

Benz[a] anthracene 誘導体の高速液体
クロマトグラフィー(1)

—— 紫外線検出器による分離定量の検討 ——

川崎医療短期大学 放射線技術科

紺野 勝信 西村 明久

日地 啓夫 西下 創一

(昭和57年10月30日受理)

High Speed Liquid Chromatography of

Benz [a] anthracene Derivatives. I.

—— Separation and Determination by Use of UV detector ——

Katsunobu KONNO, Akihisa NISHIMURA,

Hiroo HIJI, Soichi NISHISHITA

Department of Radiological Technology,

Kawasaki College of Allied Health Professions

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Oct. 30, 1982)

Key words : benz[a] anthracene 誘導体, 多環芳香族炭化水素, 高速液体クロマト
グラフィー

概 要

主に7と12位に置換基のある benz[a] anthracene 誘導体, 16種を試料とし, 移動相に含水メタノール, カラムにパーマフェーズ ODS (内径 2.1 mm × 1000 mm) を用いた高速液体クロマトグラフィーを行い, 分離条件と紫外線検出器による定量を検討した。

この結果, 最適分離条件はメタノール濃度 57.5%, 温度 60°C, 圧力 70 kg/cm² (流速 0.81 ml/min) であった。また, 同条件において benz[a] anthracene を内部標準に用いて検量線を作成した。15~75 ng の範囲で直線関係が成立し, 検量線の直線性における変動係数はいずれも 2% 以下で十分定量が可能であるという結果が得られた。

1 緒 言

大気や自動車の排ガス、食品など環境中に広く検出されている多環芳香族炭化水素類はその一部が癌原性を有することが知られている。その分析法には薄層クロマトグラフィー¹⁾²⁾、ガスクロマトグラフィー³⁾⁴⁾などがあるが、最近では高速液体クロマトグラフィー (HSLC)を用いて分析する報告^{5)~8)}が多くみられてきた。

Benz[a]anthracene (BA) は、癌原性多環芳香族炭化水素類の中では最も少ない4個の縮合環を有する炭化水素である。BA 自体の癌原性は弱いですが、これに置換基が導入されると癌原性に影響が顕われ、特にメソ位(7, 12位)においてその影響が強く、例えばメチル基がメソ位に置換されるとその癌原性は非常に増大することが知られている^{9)~11)}。このようにメソ位のBA類は興味ある化合物群であり、またクロマトグラフィー的に多環芳香環の特定部位の置換基効果を調べることは薄層クロマトグラフィーでの一報告²⁾を除きほとんど行われていない。

今回はBA類のクロマトグラフィー的挙動の基礎的段階として、16種の化合物、すなわち7-bromo-BA(1)、7-chloro-BA(2)、BA-7-carbonitrile(3)、7,12-diacetoxy-BA(4)、BA-7-carboxaldehyde(5)、BA-7-aldoxime(6)、7-nitro-BA(7)、7-amino-BA(8)、7-acet-amido-BA(9)、7-methyl-BA(10)、12-methyl-BA(11)、5,6-dimethyl-BA(12)、7,12-dimethyl-BA(13)、BA(14)、dibenz(a,h)anthracene(15)、7,12-diphenyl-BA(16)について、固定相にパーマフェーズ ODS、移動相に含水メタノールを用いた逆相分配系のHSLCを行い分離条件を設定するための検討をした。また、発癌物質としての観点から紫外線検出器による定量の基礎的検討を試みたので、その結果もまとめて報告する。

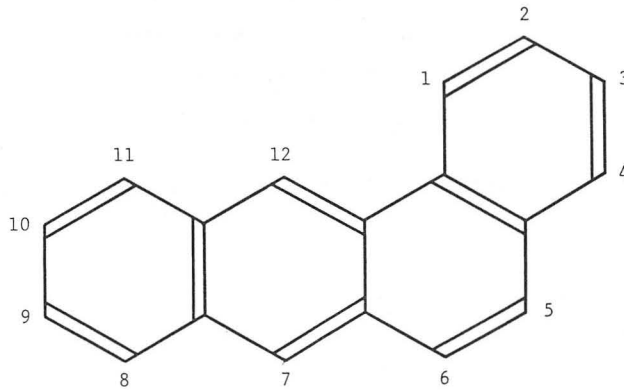


Fig. 1 Structural formula of benz(a)anthracene

2 実 験

2.1 試料、試薬

試料はジオキサンに溶かし、混合試料は各試料1 mg/ml または0.1 mg/ml 濃度の等量混合したものをを用いた。

溶剤および展開剤としてメタノール、ジオキサンは市販クロマトグラフ用をそのまま用いた。

2.2 装 置

分離装置は島津・デュボン830型高速液体クロマトグラフを使用した。なお、本器は定圧式シリンジ型のポンプであるため、実験結果における流速値はすべて数回の平均値である。検出器は830型用紫外線吸光光度計（波長254 nm）または高速液クロ用島津UV-202分光光度計を単独または直列に2台接続して測定した。

カラムとしては、パーマフェーズ ODS を充てんした内径 2.1 mm、長さ 1000 mm のものを用いた。

2.3 操 作

試料溶液の2.0～3.0 μ l をセプタムを通じ オンフロー方式で注入して各クロマトグラムを得た。

本実験で得られた試料のピークに対して、保持時間 t_R 、ピーク幅 W を測定し、固定相、移動相に対する親和性をキャパシティーファクター k' 、各条件におけるカラムの比較を分離度 R_s を次式から計算した。

キャパシティーファクター k' は、

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

で示され、ここで t_0 は固定相にまったく保持されない成分ピークの保持時間で、ここではジオキサンの保持時間を用いた。

分離度 R_s は、

$$R_s = \frac{2\Delta t_R}{W_1 + W_2}$$

で示され、ここで Δt_R は近接する2つのピークの保持時間 t_{R1} と t_{R2} の差であり、 W_1 、 W_2 はそれぞれのピーク幅である。

3 結果と考察

3.1 分離に及ぼす影響

BA 類の分離挙動について、移動相組成、カラム温度、圧力（流速）を各種変化させキャパシティーファクター、保持時間あるいは分離度に及ぼす影響から検討を行った。なお、本実験では保持時間、分離状態 (Fig. 5) から、7種類の試料を選び用いた。

3.1.1 移動相組成の影響

カラム温度、カラム圧力を一定にした条件で、移動相組成を変化させた時の各試料のキャパシティーファクター k' に及ぼす影響を検討した結果を Fig. 2 に示した。この結果は Bodén⁷⁾、白山⁸⁾ による多環芳香族化合物に対する結果と同様で、有機溶媒含有量の増加にともないキャパシティーファクターは対数的に減少することがわかった。この現象はハイドロホビック・クロ

マトグラフィー的考えによれば、有機溶媒含有量の増加にともない試料と固定相間の疎水結合が弱くなることに基づくものである。

3.1.2 カラム温度の影響

カラム圧力、移動相組成を固定して、カラム温度を20から60℃まで変化させた時のキャパシティーファクターに及ぼす影響を Fig. 3 に示した。これらの結果は白山⁸⁾と同様、キャパシティーファクターの対数値と絶対温度の逆数との間には直線関係が成立した。

3.1.3 流速の影響

移動相組成、カラム温度を一定とした条件で、圧力（流速）を変化させた時の各試料の保持

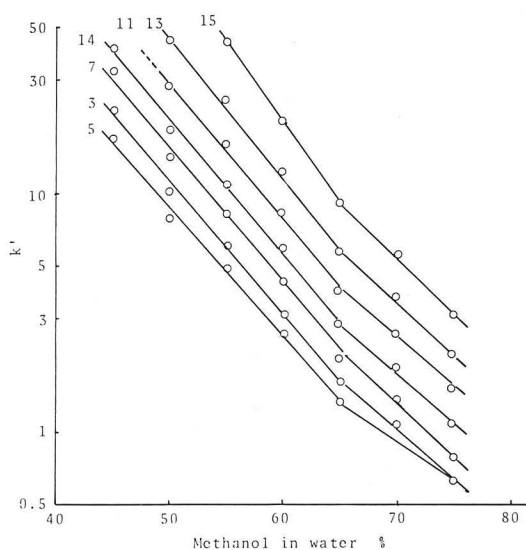


Fig. 2 Effect of methanol concentration on k'
column temperature: 50°C, pressure: 70 Kg/cm²

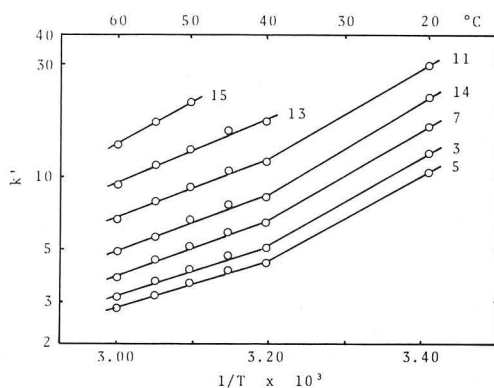


Fig. 3 Effect of column temperature on k'
Mode: 1, solvent: 60 % methanol in water,
pressure: 70 Kg/cm²

時間 t_R に及ぼす影響を Fig. 4 に示した。この結果から流速の増大にともない保持時間は対数的に減少することがわかった。

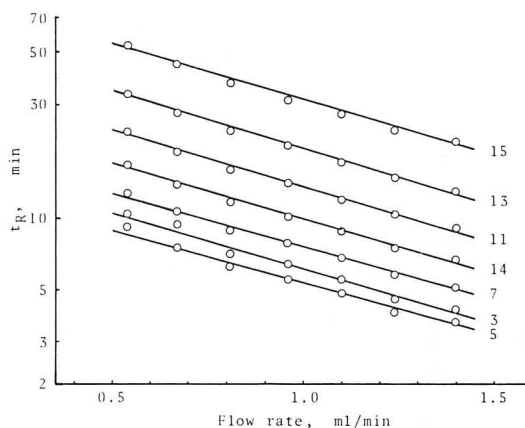


Fig. 4 Effect of flow rate on t_R
Mode: 1, solvent: 60% methanol in water,
column temperature: 50°C

3.2 最適分離条件

HSLC において実用的に試料中の各成分を能率よく分離するためには、各成分のキャパシティーファクター k' が $1 \leq k' \leq 10$ の範囲にあるのがよく、また分離度は定量的実験には 1.5 から 2.0 以上必要といわれ、定性的には 0.8 前後が必要であるということから考慮して求められる。

3.1 における分離に及ぼす影響の結果を参考として、試料に適した分離条件を求めた。その結果は Fig. 5 に示したように、移動相組成: 57.5%メタノール・水、カラム温度: 60°C, 圧力: 70Kg/cm² (流速: 0.81 ml/min) であった。各試料のキャパシティーファクターの変動係数はほとんどのものが 2~3% (n=5) 以下であり、また分離度は若干のものを除き 0.8 以上であった。

保持時間の短縮と前半に溶出されてくる試料の分離改善のため、濃度勾配溶出法について検討した。カラム温度、圧力は Fig. 5 と同条件で、移動相組成のみを時間とともに変化させることにより上記目的を達成させるものである。その結果、初期メタノール濃度を下げた 45% とし、最後に溶出してくる 7, 12 dimethyl-BA (16) の保持時間を短縮させるために最終メタノール濃度を 75% と上げ、その変化率を 1%/min とした (Fig. 6)。この条件により前半の分離も改善され、全体にまとまって溶出分離された。各試料のキャパシティーファクターの変動係数は、1~2% (n=5) 以下であった。

3.3 紫外線検出器による定量

紫外線検出器による BA 誘導体の定量検討を Fig. 5 の最適分離条件で行った。

3.3.1 紫外線吸収スペクトル

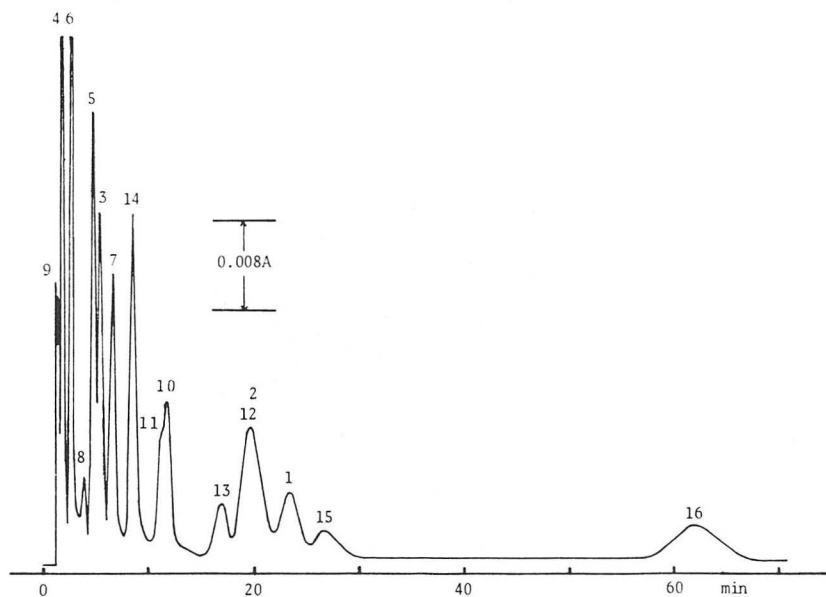


Fig. 5 Chromatogram of benz(a) anthracenes
column temperature : 60°C, solvent : 57.5 % methanol in water,
pressure : 70 Kg/cm² (flow rate : 0.81 ml/min)

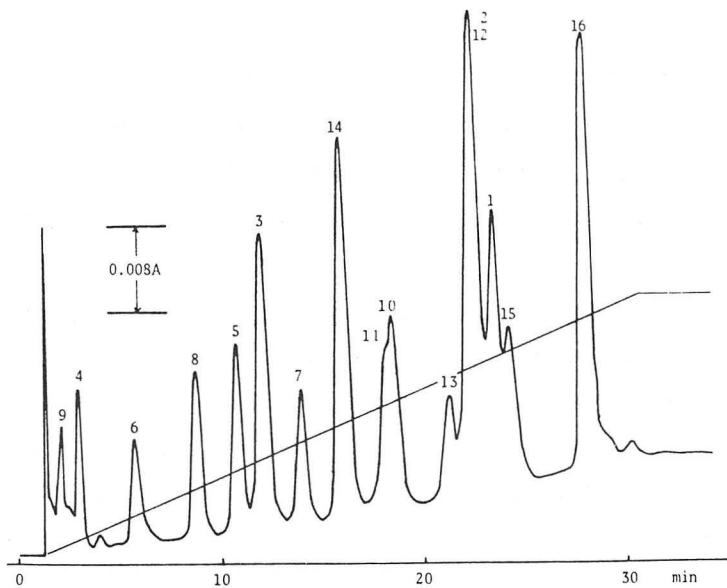


Fig. 6 Chromatogram of benz(a) anthracenes : gradient elution
column temperature : 60°C, solvent : 45-75 % methanol in
water (1 %/min), pressure : 70 Kg/cm²

各試料の 0.1 mg/ml ジオキサン溶液, 3.0 μ l をクロマトグラフに注入し, 紫外線分光光度計で測定したスペクトルを Table 1 に示した。

Table 1 UV spectral data of benz (a) anthracenes

Sample No.	λ_{\max} * (nm)
2	286, 297
3	290, 300.5
4	284, 293.5
5	298, 307.5
7	282.5, 293
9	284.5, 295
11	286, 295
12	287, 297
13	290, 301
14	282, 292
15	293, 301.5

* In 57.5 % methanol - water

3.3.2 ピーク測定法

クロマトグラムのピーク測定法について, ピーク高, ピーク面積および, BA を内部標準物質としたピーク高比, ピーク面積比の各変動係数をみることにより, それぞれの測定法の比較を行った。その結果, ピーク高: 3.0%, ピーク面積: 0.7%, ピーク高比: 0.3%, ピーク面積比: 3.0% であり (n=5), ピーク高比が最も変動係数が少なかった。以下, ピーク測定法はピーク高比を使用した。

3.3.3 注入量

ピーク測定法をピーク高比とした場合に, 注入量の影響について検討した。その結果, 2.5, 3.0, 3.5 μ l の3点とも変動係数に差がなく (n=5), 本実験で用いる注入量は一応 3.0 μ l とした。

3.3.4 検出器

検出器として紫外線吸光度計 (波長 254 nm) と分光光度計を用いた場合, 両者の感度比較を各試料について検討した結果を Table 2 に示した。分光光度計の測定波長は各試料の最大吸収波長 λ_{\max} で行った。光源の特性が異なるため, 最大吸収波長で測定しても BA-7-aldoxime (5) のように感度比が 1 のものもあるが, 7, 12-diphenyl-BA(16) などでは感度比が大きく分光光度計で測定した方が有利である。

3.3.5 検量線

以上 3.3.1 から 3.3.4 まで検討した結果から, 各種濃度の試料 3.0 μ l を液体クロマトグラフに注入し, ピーク高比を測定して検量線を作成した。その結果, Fig. 7 に示すように多くの試

Table 2 Comparison of sensitivity of UV photometer and UV-202 spectrophotometer for peak height of benz(a) anthracenes

Sample No. (ng)	Detector* (nm)	Peak height (mm)						Sensitivity ratio A/B	
		1	2	3	4	5	Average		
3 (52.5)	A	290.0	143.0	144.8	143.0	141.6	142.8	143.0	1.9
	B		74.0	75.8	76.3	74.2	76.1	75.3	
5 (52.5)	A	307.5	111.2	112.0	125.0	125.0	133.2	121.3	1.0
	B		111.8	113.5	125.0	125.0	132.7	121.6	
7 (52.5)	A	282.5	108.4	113.6	111.4	108.6	109.0	110.2	1.6
	B		67.1	68.1	69.0	69.7	66.9	68.2	
11 (105.0)	A	295.0	182.4	201.4	187.0	196.8	194.2	192.4	2.2
	B		83.4	90.3	84.6	89.0	88.0	87.1	
13 (420.0)	A	290.0	287.6	279.2	280.0	290.8	269.8	281.5	1.5
	B		185.5	185.6	181.9	188.0	190.3	186.3	
15 (420.0)	A	293.0	247.2	272.0	261.2	264.0	275.2	263.9	5.4
	B		48.0	49.3	47.9	49.1	48.5	48.6	

Chromatographic condition is same as Fig. 5

*A. UV 202 Spectrophotometer: λ_{\max} nm of each sample

B. UV Photometer: 254 nm

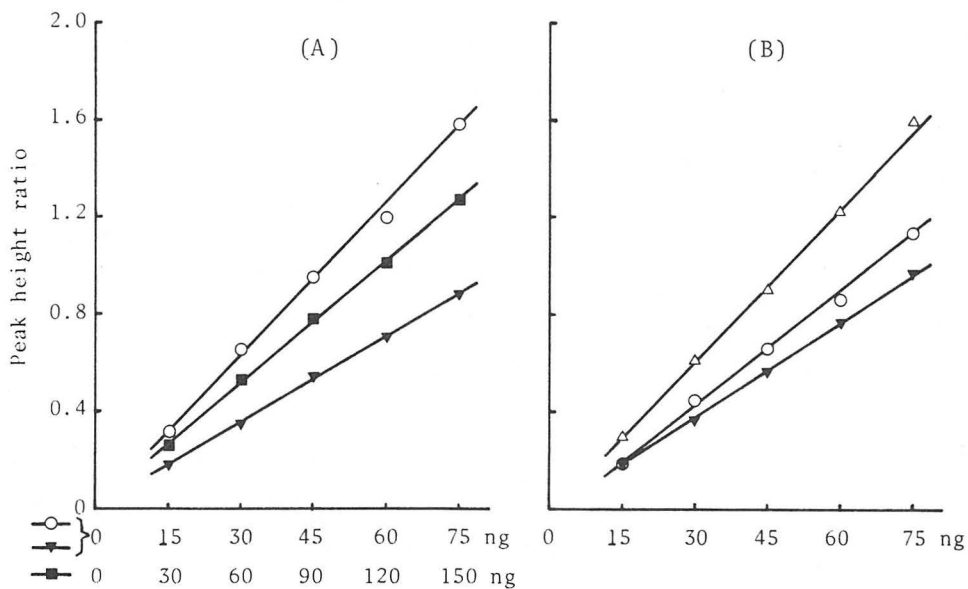


Fig. 7 Calibration curves of benz(a) anthracenes

Chromatographic condition is same as Fig. 5

sample: benz(a) anthracene-7-carboxaldehyde (\triangle), benz(a) anthracene-7-carbonitrile (\circ), 7-nitrobenz(a) anthracene (\blacktriangledown), 12-methylbenz(a) anthracene (\blacksquare).

(A) UV spectrophotometer: λ_{\max} of each sample, (B) UV photometer: 254 nm.

料は 15~75 ng の範囲で直線関係が成立した。直線性における変動係数はいずれも 1~2%(n=5) 以下であり、十分定量が可能である結果が得られた。

謝 辞

終わりに、本研究に際し御指導をいただきました東京理科大学、滝谷昭司教授、鈴木政雄講師に深く感謝致します。

文 献

- 1) L. Zoccolillo, A. Libert: J. Chromatogr., 120, 485 (1976)
- 2) 多田敬三, 滝谷玲子: 分析化学, 25, 76 (1966)
- 3) K. Bhatia: Anal. Chem., 43, 609 (1971)
- 4) T. D. Searl, F. J. Cassidy: ibid, 42, 954 (1970)
- 5) I. Y. Chunakon, S. K. Lopatenko: Chromatographia, 8, 242 (1975)
- 6) B. Cog, C. Gonnet: J. Chromatgr., 106, 249 (1975)
- 7) H. Boden: J. Chromatogr. Sci., 14, 391 (1976)
- 8) 白山 肇: 日化誌, 1, 118 (1977)
- 9) J. Pataki, C. Huggins: Cancer Res., 29, 403 (1969)
- 10) L. K. Sydor, J. W. Flesher: ibid, 29, 506 (1969)
- 11) O. G. Fahny, M. J. Fahny: ibid, 33, 2354 (1973)

