慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	薄層クロマトグラフィと直接ケイ光定量法による微量分析：アデニンのDNS-Clとポリアミド薄層を用いた定量
Sub Title	Microanalysis by thin-layer chromatography and direct scanning fluorometry : determination of adenine using DNS-Cl and polyamide thin-layer
Author	村上, 文子(Murakami, Ayako) 生駒, 千春(Ikoma, Chiharu) 斎藤, 恵子(Saito, Keiko) 西澤, 秀幸(Nishizawa, Hideyuki) 石原, 政雄(Ishihara, Masao)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1981
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.26 (1981.) ,p.37- 45
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000026-0037

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

共立薬科大学
Annu. Rep. Kyoritsu
Coll. Pharm.

薄層クロマトグラフィと直接ケイ光定量法による微量分析
——アデニンのDNS-Clとポリアミド薄層を用いた定量

村上　文子，生駒　千春，斎藤　恵子，西澤　秀幸，石原　政雄

Microanalysis by thin-layer chromatography and direct scanning fluorometry——Determination of adenine using DNS-Cl and polyamide thin-layer

Ayako MURAKAMI, Chiharu IKOMA, Keiko SAITOH,
Hideyuki NISHIZAWA, Masao ISHIHARA

(Received October 1, 1981)

One of the methods for fluorometric determination of adenine is described. Adenine was dansylated at pH 8.3, 40°C for 60 min and di-DNS-adenine was extracted with benzene and chromatographed on polyamide thin-layer. The chromatogram was measured by scanning fluorometer. $5\times10^{-9}-1\times10^{-6}$ Mole of adenine was quantitatively reacted with 1 mg of DNS-Cl. The lowest limit of detection was 5×10^{-11} mole of di-DNS-adenine. The reproducibility of measurement was ± 3.5% at 2×10^{-10} mole on the same thin-layer.

1. 緒　言

試料をケイ光性誘導体としたのち薄層クロマトグラフィで分離し，これを直接測定して定量する方法は既に多くの報告がみられ，諸物質の微量定量法として有用であることが知られている。筆者らはこれを各種の生体内成分や医薬品等の分析に応用する試みを続けているが，今回その一環として核酸塩基のDNS法による微量定量を検討することとし，まず最初にアデニンをとりあげてみた。

DNS法は，ケイ光化試薬の代表的なものの1つであるダンシルクロライド（1-ジメチルアミノナフタレン-5-スルフォニルクロライド）が第一・第二アミン，フェノール性水酸基等と反応してケイ光誘導体を生成することを利用した方法である。DNS誘導体は一般に，シリカゲル薄層上と比べてポリアミド薄層上でより安定であり，またそのケイ光強度も数倍大きくなるので，ポリアミド薄層を使用した。アデニンは理論的には図1のI, II, IIIの3種類の誘導体を生成するが，ここではIIIのdi-DNS-アデニンのみを定量的に得，かつ測定するための各条件を検討した。

2. 実　験

2-1 試薬・器具

アデニン水溶液：アデニン（$C_5H_5N_5$，Mw=135.13，和光純薬）の10 mM水溶液を作り，用時適宜希釈した。

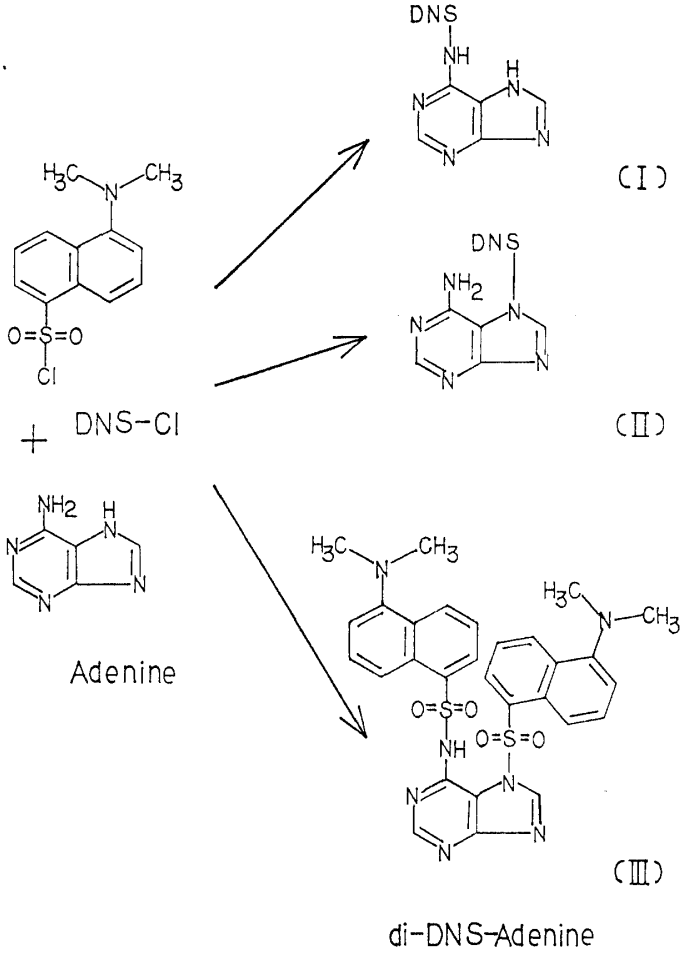


Fig. 1. Dansylation of adenine

0.1 M 炭酸緩衝溶液：炭酸ナトリウム（Na_2CO_3, Mw=105.99, 国産化学特級）と炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$, Mw=84.01, 国産化学特級）の 0.1 M 水溶液をそれぞれつくり，これらを適当に混合して必要な pH の緩衝液を得た。

DNS-Cl 溶液：ダンシルクロライド（$C_{12}H_{12}ClNO_2S$, Mw=269.75, 東京化成）100 mg をアセトン（国産化学特級）100 ml に溶かした。

DNS 誘導体の抽出溶媒：ベンゼン（国産化学特級）

水：イオン交換水。

ポリアミド薄層：6-ナイロンをプロピレングリコール（キシダ化学特級）中で溶解したものをガラス板上に塗布して作製した。[1)]

薄層へのスポット：薄層スポッター（ニシザワ・ラボラトリ）とマイクロキャップ（5 μl, ドラムント）を使用した。

ケイ光測定：スキャニングケイ光光度計（ヤマト科学, SFR-21）を用いた。

2-2 操 作

アデニン水溶液 0.1 ml（アデニン 5×10^{-9}～1×10^{-6} モル）を共栓試験管にとり，0.1 M 炭酸

緩衝液（pH 8.3）0.9 ml を加えたのち DNS-Cl 溶液 1 ml（DNS-Cl 1 mg＝3.7×10^{-6} モル）を入れて振りまぜ，40℃ の水浴中で 1 時間反応させる。その後ロータリーエバポレータを用いてアセトン・水共に減圧留去し，残渣に水約 1 ml を加えて溶かしてからベンゼンを加えて充分に振とうし，DNS 誘導体をベンゼン層に移行させる。このベンゼン層を DNS-アデニン抽出液とよぶことにする。そのうちの 5 μl をポリアミド薄層上にスポットし，水：n-プロパノール：酢酸（20：5：1）で約1時間，約 10 cm 展開後，120℃ の乾燥器内で 30 分間加熱してケイ光を安定化し，冷後ケイ光強度を測定する。記録紙上に描かれる積分図形の 1 往復を 20 として数えた値に記録計のレンジ（単位：V）を乗じたものをケイ光強度の読み（I_F）とする。

3. 結果および考察

3-1 薄層クロマトグラムと di-DNS-アデニンの同定

DNS-アデニン抽出液中には目的物の di-DNS-アデニンのみでなく，DNS-Cl の分解物や反応条件によっては 2 種類の mono-DNS-アデニン等の副生成物が混在しているため，展開後現われた数種のスポットのどれが目的物であるか見きわめる必要があるが，シリカゲル薄層上で酢酸エチル展開した時 *Rf* 値 0.31 を示すスポットが di-DNS-アデニンであることが知られている[2]ので，その部分のシリカゲルをかきとり後溶出したものを di-DNS-アデニン溶液として使用し，ポリアミド薄層上で DNS-アデニン抽出液，DNS-アミド（主たる反応副生物）および DNS 酸（DNS-Cl の加水分解物）と共に展開したのが図 2 である。di-DNS-アデニンのポリアミド薄層上での *Rf* 値は 0.34～0.42，そのケイ光は最初黄色であるが，次項の安定化のため充分加熱乾燥したあとでは青色に変化する。なお，DNS-アデニン抽出液を展開した時に DNS 酸のすぐ上に現われる淡黄色ケイ光物質の構造は不明である（図 2 の B）。

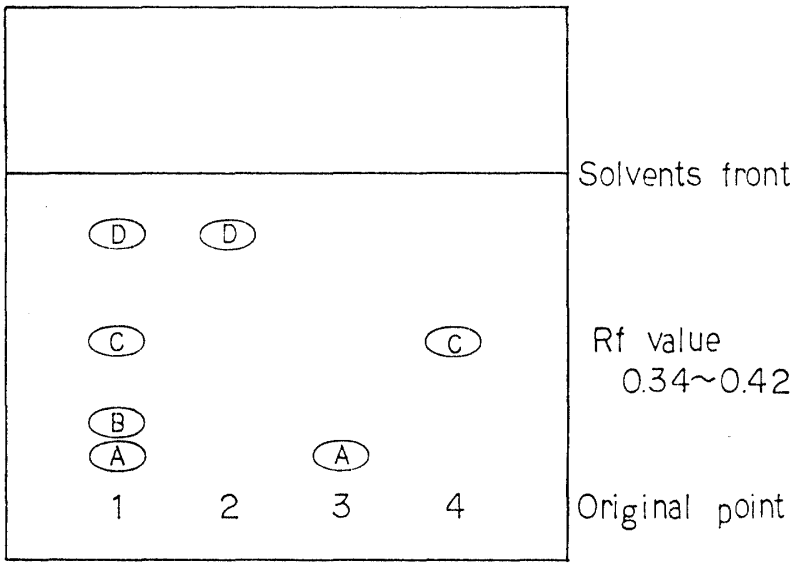


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of DNS-derivatives
1: DNS-adenine extraction, 2: DNS-NH_2, 3: DNS-OH, 4: di-DNS-adenine;
A: DNS-OH, B: unknown, C: di-DNS-adenine, D: DNS-NH_2;
developer: water-n-propyl alcohol-acetic acid (20: 5: 1)

3-2　ケイ光の安定化および薄層上での定量範囲と測定誤差

展開後ケイ光強度が時間経過につれてどのように変化するかを調べ，その変化を小さくするためにはどのような処理が有効であるかを検討した。まず最初に，室内で薄層に 30 分間扇風機の風をあてて溶媒を溶かした後，ケイ光強度を経時的に測定したが，はじめ急激に，のち徐々に増え続けることがわかった（図 3-A)。このケイ光強度の増加は，ケイ光光度計の受光器特性によるものでケイ光色の黄色から青色への変化に対応しているので，常温で少なくとも 28 時間程度かかるこの変化を加熱により早めることを目的として 80℃ の乾燥器中に 30 分間入れてみたところ，まだ緩やかなケイ光強度の増加がみられた（図 3-B)。そこでさらに乾燥器の温度を 120℃ にあげて 30 分間加熱すると，加熱終了直後からほぼ一定のケイ光強度が得られるようになった（図 3-C)。この変色が何に基因するか調べるために薄層板上に DNS-アデニン抽出液をスポットした後直ちに 120℃ 30 分間加熱し，その後展開したところ，di-DNS-アデニンのケイ光は消失し，DNS 酸のケイ光強度が増加すると同時に原点に緑色ケイ光が新たに生じていた。このことから黄色ケイ光をもつ di-DNS-アデニンは不安定で常温では一昼夜，120℃ では 30 分以内に DNS 酸と mono-DNS-アデニン（図 1 の I）とに分解するためにケイ光色が青色に変わることがわかった。

薄層上で di-DNS-アデニン量とケイ光強度が比例する範囲を求めるために，高濃度の DNS-アデニン抽出液をつくり，ベンゼンで順次希釈して 10 種類の濃度の溶液とし，一枚の薄層板上にそれぞれ 5 μl ずつスポットした。各濃度溶液のスポット順を不同にして薄層板を 9 枚つくり，一斉に展開・測定した結果を示したのが図 4 である。横軸に反応率を 100% と仮定した 1 スポット（5 μl）あたりの di-DNS-アデニン量（モル），タテ軸にケイ光強度（どちらも対数目盛）

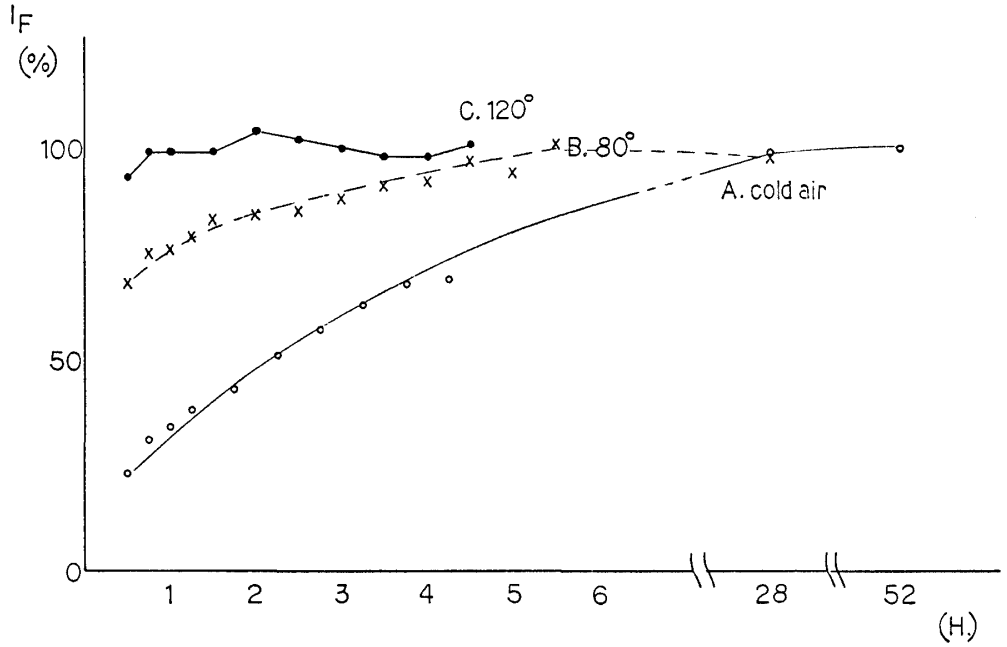


Fig. 3. Stability of di-DNS-adenine on a polyamide thin-layer after treatments listed downward
A: cold air for 30 min., B: 80°C for 30 min., C: 120°C for 30 min.

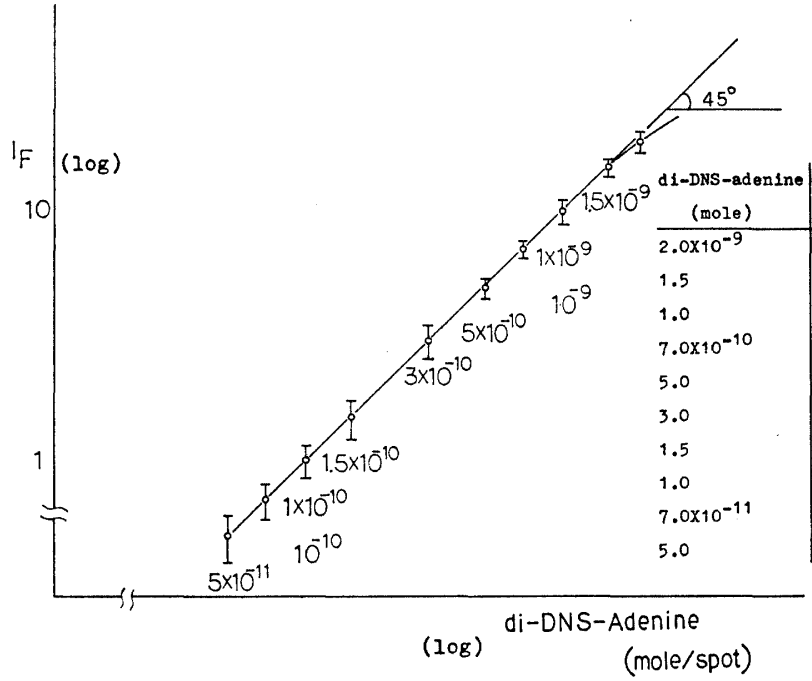
をとると，5×10^{-11}～1.5×10^{-9} モルの間で傾き 45° の直線となった。2×10^{-9} モルの時ケイ光強度が直線の下側にずれているのは濃度消光によるものと思われる。

図 4 の付表からどの di-DNS-アデニン量においてもケイ光強度の変動率がかなり大きいことがわかるが，これはそれぞれの濃度の溶液を 9 枚の薄層板上に 1 点ずつスポットしての測定であるためで，主に薄層の違いの影響によるものと思われる。ここで念のため一枚の薄層板上に 2×10^{-10} モルの di-DNS-アデニンを 10 点スポットしてケイ光強度の変動率を調べたところ 3.5% という値が得られた（表 1）ので，薄層の違いが変動率を大きくしていることは確かであるが，これが薄層の厚みの違いによるものかあるいは薄層の質の違いによるものかは定かではない。従って，以下の実験では比較するものを必ず同一の薄層板上で測定するよう配慮した。

3-3 DNS 化反応の定量性

一般にアミンと DNS-Cl との反応率は溶液の pH，温度および DNS-Cl 濃度に影響されるが，DNS-Cl 量は 1 mg (3.71×10^{-6} モル)，温度はポリアミン類の DNS 化[1] に準じて 40℃ と定め，この条件下でできるだけ短時間かつ高収率で di-DNS-アデニンを生成させる pH について検討した。

アデニンは 1×10^{-7} モルを使用し，0.1 *M* 炭酸緩衝液の pH を 7.95～9.32 に調整して以下操作法に従って各 pH での収率を比較した（図 5）。7.95～8.32 の pH でほぼ同じ値を示し，8.5 より大きい pH では極端に小さな値になることがわかったので，緩衝液は pH 8.3 の 0.1 *M* 炭酸水素ナトリウム溶液を採用し，次に加温時間についても調べてみた。DNS 化は室温でも徐々に進むので，厳密には反応混合液を作った瞬間から減圧濃縮が終るまでが反応時間であるが，ここでは混合液を作ると同時に 40℃ の恒温槽に入れとり出した後直ちに溶媒を留去する（30℃ の水浴上で約 15 分間で完了）こととし，加温時間を 30～120 分間の間で変えてみた。アデニンは同じく 1×10^{-7} モルを用いた。図 6 がその結果であるが，30 分間では過剰の DNS-Cl が残存し



di-DNS-adenine (mole)	X̄	S.D.	S.D./X̄ (%)
2.0×10^{-9}	19.1	1.84	9.6
1.5	15.0	1.31	8.7
1.0	9.97	1.11	11
7.0×10^{-10}	7.06	0.587	8.4
5.0	4.95	0.429	8.7
3.0	3.02	0.468	16
1.5	1.48	0.255	17
1.0	1.00	0.152	15
7.0×10^{-11}	0.695	0.112	16
5.0	0.499	0.106	21

Fig. 4. Calibration curve of di-DNS-adenine

Table 1. Reproducibility of measurement on the same plate (2×10^{-10} mole/each spot)

Spot number	I_F
1	1.86
2	1.93
3	1.94
4	1.97
5	1.97
6	2.00
7	2.03
8	2.05
9	2.05
10	2.12
$\bar{X}$	1.99
S.D.	0.070
S.D./ $\bar{X}$	3.5 %

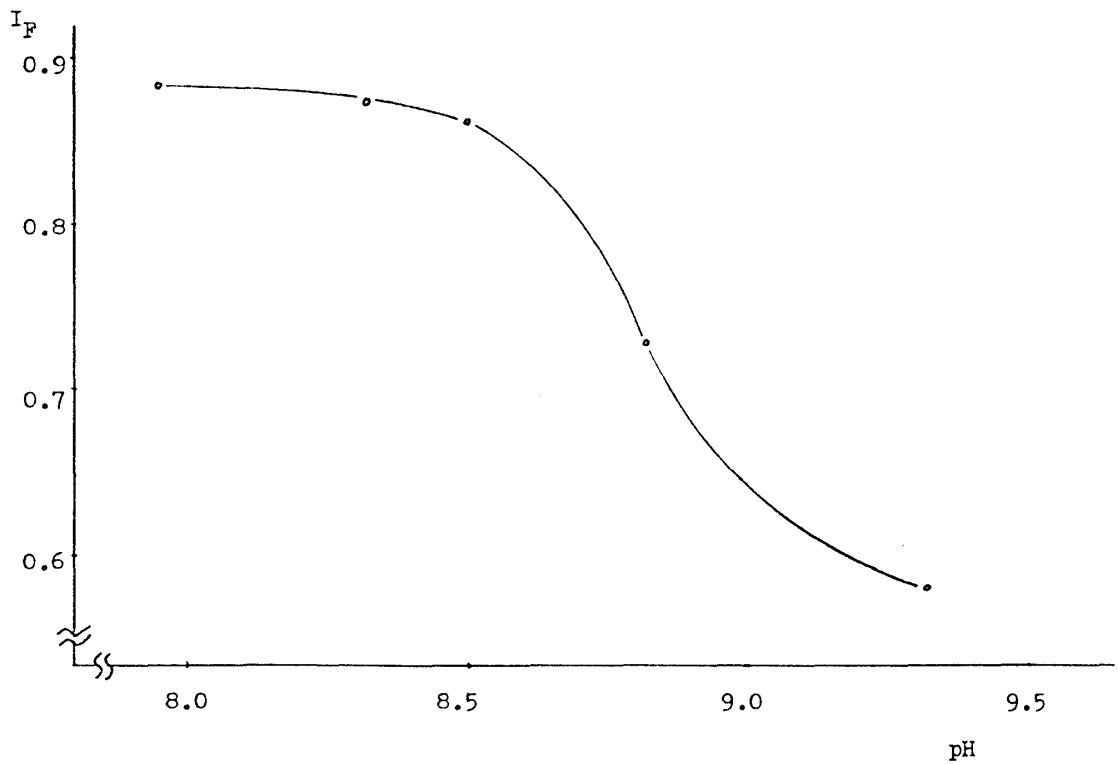


Fig. 5. Effect of pH of buffer solution for dansylation (adenine 1×10^{-7} mole, DNS-Cl 1 mg, 40°C for 60 min., 100 pmole/spot)

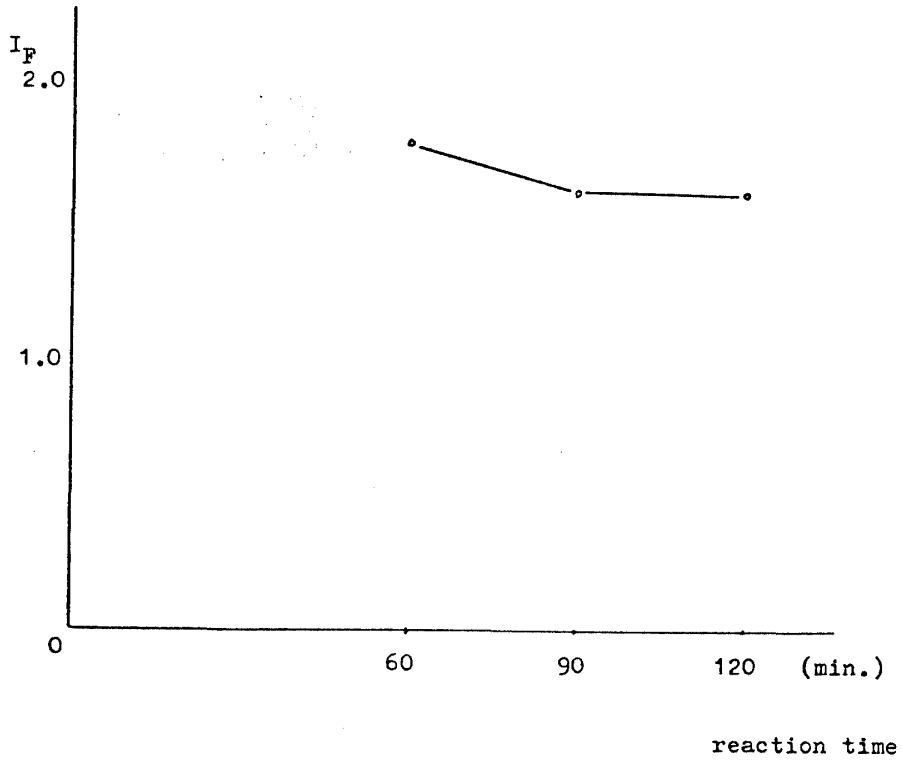


Fig. 6. Effect of reaction time for dansylation (adenine 1×10^{-7} mole, DNS-Cl 1 mg. 40°C, pH 8.3, 200 pmole/spot)

展開後の薄層に著しいケイ光テーリングを生じるため di-DNS-アデニンの測定が妨害される結果となった。また 90 分以上加温するとケイ光強度がわずかながら減少するので 60 分間加温が最適であった。

以上，DNS 化条件が定まったので，同量のアデニンを 8 本同時に反応させ反応の再現性を調べたところ，8 本のケイ光強度の変動率は 5.8% (表 2) と良好な結果が得られた。

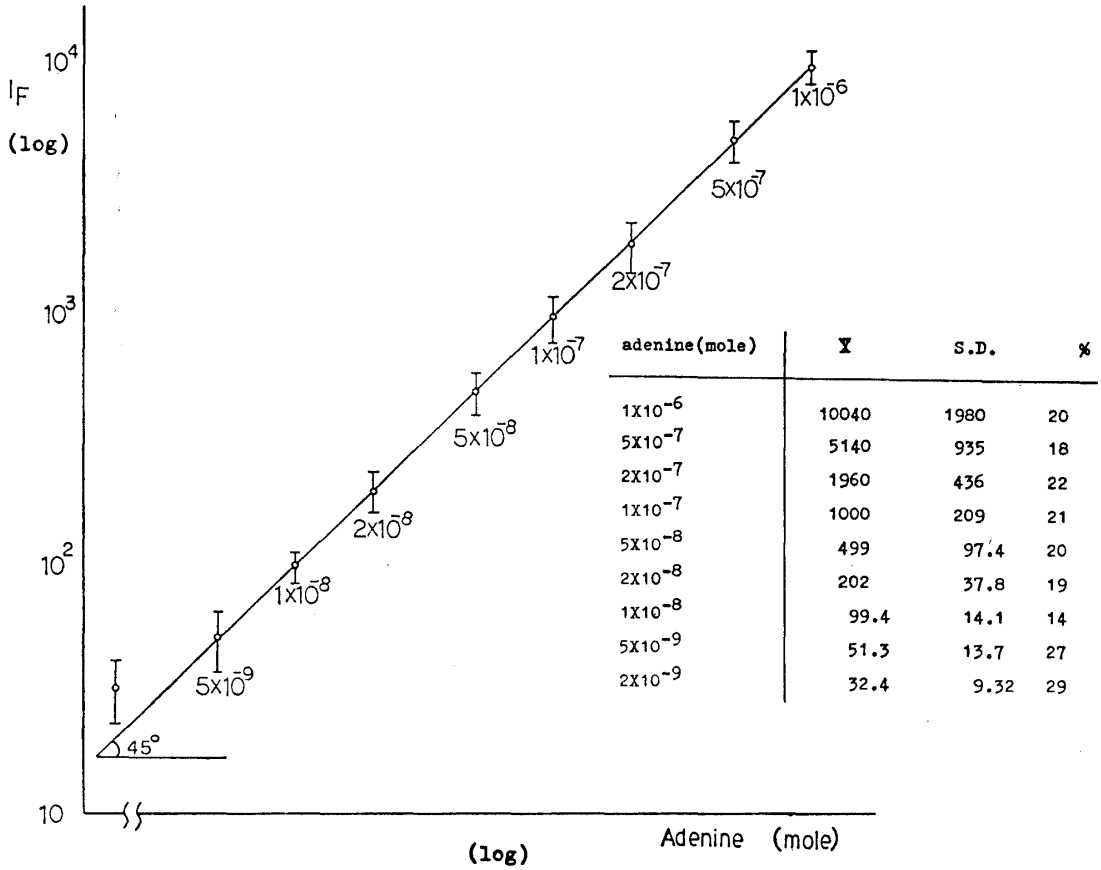
この方法を未知試料の分析に応用するため上の条件で定量可能なアデニン量について検討した。1×10^{-6} モル以下の量のアデニンをそれぞれ 1 mg の DNS-Cl (3.71×10^{-6} モル，アデニンとの当量比 1.85 以上) と反応させて，結果を両対数グラフ用紙にプロットしてみた (図 7)。ただし，測定時に誤差が生じないよう，図 4 の di-DNS-アデニンの薄層上での定量範囲に応じて抽出に用いるベンゼンの量をアデニン量 1×10^{-6}～1×10^{-7} モルの時は 5 ml，5×10^{-8} モル以下では 0.5 ml と変えて抽出した。また横軸には全アデニン量 (モル) を，タテ軸には〔ケイ光測定値×ベンゼン量 (μl)÷5 μl〕をとってある。5×10^{-9}～1×10^{-6} モルの間が傾き 45° の直線上に乗った。各アデニン量のケイ光強度の変動率が大きくなっているが，これは各量 7 本ずつ反応させ一枚の薄層板上には全て量の異なるものをスポットした，すなわち 7 枚の薄層を使用したための薄層差によるものである。

4. 結 語

以上に述べてきたように，DNS-Cl とポリアミド薄層，およびスキャニングケイ光光度計を用いて 5×10^{-9}～1×10^{-6} モルのアデニンを定量する条件が得られた。3-3 ではアデニン量に応じ

Table 2. Reproducibility of dansylation (adenine 1×10^{-6} mole, DNS-Cl 1 mg, 40°C for 60 min., pH 8.3, 500 pmole/spot)

Sample number	$\bar{X}$ of I_F (3 spots)
1	5.26
2	4.58
3	4.91
4	5.01
5	4.85
6	5.39
7	4.94
8	4.48
$\bar{X}$	4.93
S.D.	0.287
S.D./ $\bar{X}$	5.8 %



adenine(mole)	$\bar{X}$	S.D.	%
1×10^{-6}	10040	1980	20
5×10^{-7}	5140	935	18
2×10^{-7}	1960	436	22
1×10^{-7}	1000	209	21
5×10^{-8}	499	97.4	20
2×10^{-8}	202	37.8	19
1×10^{-8}	99.4	14.1	14
5×10^{-9}	51.3	13.7	27
2×10^{-9}	32.4	9.32	29

Fig. 7. Calibration curve of adenine

て抽出時のベンゼン量を変えたが，未知試料の場合には一定量のベンゼンで抽出し，スポット量を変えてみるとよいであろう。さらに，薄層によって同じもののケイ光強度が異なることを考慮して，一枚の薄層板上に試料と同時に di-DNS-アデニン 5×10^{-11} モルと 1×10^{-9} モルをスポットし，薄層板ごとに簡単な検量線を描くことも必要である。

今回はアデニンのみの定量であったが，他の核酸塩基（グアニン，シトシン，チミンおよびウラシル）との分離・同時定量を目標にして実験を進めていく予定である。

参 考 文 献

1) 村上他，薄層クロマトグラフィと直接ケイ光定量法による微量分析　その1，ポリアミン類の DNS-Cl とポリアミド薄層を用いた定量，分化，投稿中。
2) N. Seiler and M. Wiechmann, in A. Niederwieser and G. Pataki (Editors), Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods, Vol. I, Ann Arbor-Humphrey Science Publishers, Ann Arbor, 1970, p. 94.