

| | |
|------------------|---|
| 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(II) : 3-O-メチルカテコールアミン(ノルメタネフリン, メタネフリン, および3-メトキシ-チラミン)のDNS-Clとポリアミド薄層を用いた微量定量法 |
| Sub Title | Microanalysis with thin-layer chromatography and direct scanning fluorometry (II) : microdetermination of 3-O-methyl-catecholamines (normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine) using dansy-chloride and polyamide thin-layer |
| Author | 村上, 文子(Murakami, Ayako) 中込, 操子(Nakagomi, Ayako) 永倉, 真理子(Nagakura, Mariko) 西沢, 秀幸(Nishizawa, Hideyuki) 石原, 政雄(Ishihara, Masao) |
| Publisher | 共立薬科大学 |
| Publication year | 1982 |
| Jtitle | 共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.27 (1982.) ,p.15- 20 |
| JaLC DOI | |
| Abstract | |
| Notes | 原報 |
| Genre | Technical Report |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000027-0015 |

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.

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 (II)

“3-O-メチルカテコールアミン (ノルメタネフリン, メタネフリン, および 3-メトキシ-チラミン) の DNS-Cl とポリアミド薄層を用いた微量定量法”

村上文子, 中込操子, 永倉真理子, 西沢秀幸, 石原政雄

Microanalysis with thin-layer chromatography and direct scanning fluorometry (II)

Microdetermination of 3-O-methyl-catecholamines (normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine) using dansyl-chloride and polyamide thin-layer

Ayako MURAKAMI, Ayako NAKAGOMI, Mariko NAGAKURA, Hideyuki NISHIZAWA, and Masao ISHIHARA

A fluorometric method for the determination of 3-O-methyl-catecholamines (normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine) using polyamide thin-layer is described. 3-O-Methyl-catecholamines were reacted with dansyl-chloride at pH 9.8 at 40°C for 1 hr and dansylated 3-O-methyl-catecholamines were extracted into toluene. An aliquot of the extract was spotted on the polyamide thin-layer plate, and developed with a solvent system of cyclohexane : dichloroethane : acetic acid (12 : 2 : 1). The spots were measured with a scanning fluorometer. The fluorescence intensity of dansylated 3-O-methyl-catecholamines was stable on the thin-layer plate at least for 24 hours. The relative standard deviation obtained from the same thin-layer plate was (1~2) % at 200 pmole/spot, and the lowest limit of determination was 20 pmole/spot with each bis-DNS-3-O-methyl-catecholamine.

1. 緒 言

著者らは、試料をケイ光性誘導体とした後薄層クロマトグラフィで分離し薄層上で直接測定して定量する方法の各種の生体内成分・医薬品等の分析への応用を検討しているが、今回はカテコールアミン類の代謝産物として重要な役割を果たしている 3-O-メチル-カテコールアミン (ノルメタネフリン, メタネフリンおよび 3-メトキシ-チラミン) を試料としてとりあげた。

3-O-メチル-カテコールアミンを蛍光化して薄層クロマトグラフィを行う方法は、すでにパラフォルムアルデヒド¹⁾, Prochazka 試薬²⁾, グリオキシル酸³⁾, フルオレサミン⁴⁾等をケイ光化剤に用いての研究があるが、これらの方法では、3-O-メチル-カテコールアミンの種類により感度が大幅に異なったり¹⁻²⁾, 3-O-メチル-カテコールアミンのうちの1~2種にしか適用できず³⁻⁴⁾,

いずれも3種を同時に定量するには不適當であった。そこで、多くのアミン類と非特異的に反応す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)と、ダンシル誘導体に対し高い分解能を有するポリアミド薄層とを用いて検討を行ったところ、3種とも完全に同一の感度が得られ、また、再現性においてもすぐれた結果が得られたので報告する。

2. 実 験

2.1 試薬および器具

3-O-メチル-カテコールアミン(3-O-MCA)混合溶液：ノルメタネフリン(NMN)、メタネフリン(MN)、3-メトキシ-チラミン(3MT)の15 mM-0.1 M 過塩素酸水溶液をそれぞれ作り、等量混合して各5 mM 混合溶液とした。

緩衝液：0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液5容と0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液2容を混合し、pHを9.8に調整した。

ダンシルクロライド(DNS-Cl)溶液：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250 mgをアセトン100 mlに溶かし、2.5 mg/ml溶液とした。

なお、水はイオン交換水、試薬は市販特級品をそのまま使用した。

ポリアミド薄層：次項(2.2)の方法に従って作成した。

機器はそれぞれ次のものを使用した。

pHメーター：HM-5A型pHメーター(東亜電波)。

反応水槽：BT-21型インキュベーター(ヤマト科学)。

薄層用乾燥機：PS-11D型パーフェクトオープン(田葉井製作所)。

ケイ光光度計：SFR-21型スキヤニングケイ光光度計(ヤマト科学、光源：低圧水銀灯)。

また、スポットは5 μ lのマイクロキャップ(Drummond)を使用して行なった。

2.2 ポリアミド薄層作成法

できるだけ細かく挽いたのち、60メッシュのふるいを通して粒径を揃えたポリアミド粉0.9gとプロピレングリコール9mlをアルミ製容器に入れ、約184°Cの電気炉上で攪拌しながら161°Cまで加熱溶解したものを、約80°Cに加熱したアプリケーション(ギャップは200 μ m)を用いて、同様に加熱したガラス板上に薄層とする。上の分量は縦・横とも200mmのガラス板1枚分に相当する。加熱溶解は約2分間で終了するのが適当で、これより長いのも短いのも望ましくない(すなわち、高温が長く続くと薄層が着色して盲ケイ光が生じ、測定時に基線が乱れて測定誤差を大きくする原因となる。また、あまり短時間で161°Cに達してしまうとポリアミドの溶解が不完全になり、残存するポリアミド粒の周囲に小孔が生じて分離が悪くなる)ため、電気炉の表面温度を常に184°C前後に保つことが重要である。また161°C以上に加熱すると薄層の緻密さが失われて分離が悪くなる。得られた薄層板は80°Cの乾燥機中で約30分間乾燥し、シリカゲルデシケーター中に保存する。

2.3 操作法

15mlの共栓付き試験管に3-O-MCA混合溶液0.1mlを入れ、緩衝液(pH9.8)0.4mlを加えた後さらにDNS-Cl溶液0.4mlを加えて混合し、40°Cの水浴中で1時間加熱する。加熱終了後ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧留去し(30°Cの水浴上で約10分間)、残滓に水滴を加えてよく溶かした後トルエンを加え、充分振盪してDNS誘導体をトルエン層に移行させ

る。このトルエン抽出液の $5 \mu\text{l}$ をポリアミド薄層上にスポットし、シクロヘキサン：ジクロロエタン：酢酸 (12:2:1) で約1時間展開後、室温で約30分間扇風機の風をあてて薄層を完全に乾かした後ケイ光強度を測定する。記録紙上にはピーク形と積分図形とが描かれるが、積分図形の方から積分値を読み取り、ケイ光強度とした。

3. 結果および考察

3.1 DNS 誘導体の薄層クロマトグラムと薄層上での安定性

DNS 誘導体の薄層クロマトグラムを Fig.1 に示す。トルエン抽出液を展開するとケイ光スポットが5つ現れるが、Rf 値の小さい順にビスダンシル-NMN (Rf=0.22), ダンシルアミド (Rf=0.28: 反応副生物), ビスダンシル-MN (Rf=0.62), ビスダンシル-3 MT (Rf=0.73), ダンシル酸 (Rf=0.96: 反応副生物) である。

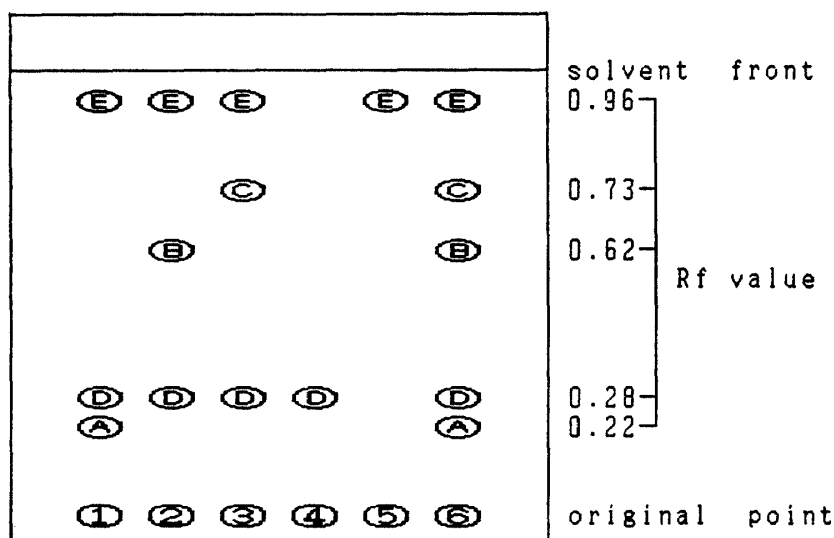


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of DNS-derivatives

1: DNS-normetanephrine extract, 2: DNS-metanephrine extract,
3: DNS-3-methoxy-tyramine extract, 4: DNS-NH₂, 5: DNS-OH,
6: DNS-3-O-methylcatecholamines extract;
A: bis-DNS-normetanephrine, B: bis-DNS-metanephrine,
C: bis-DNS-3-methoxy-tyramine, D: DNS-NH₂, E: DNS-OH;
developer: cyclohexane-dichloroethane-acetic acid (12: 2: 1)

各ビスダンシル-3-O-MCA のポリアミド薄層上での安定性を調べるために、展開後の薄層板に室温で30分間扇風機の風を当てて乾かした後、ケイ光強度を経時的に測定してみたところ、展開後24時間以内での減少は見られず、各ビスダンシル-3-O-MCA は、ポリアミド薄層上で非常に安定であることがわかった (Fig. 2)。

3.2 薄層上での定量範囲と測定の精度

薄層上でビスダンシル-3-O-MCA 量とケイ光強度が比例する濃度範囲を調べるため、高濃度のダンシル-3-O-MCA トルエン抽出液を作ってトルエンで順次希釈、それぞれの濃度の溶液を1枚の薄層上に1点 ($5 \mu\text{l}$) ずつスポットしたものを10枚展開・測定した結果、メタネフリン・ノルメタネフリン・3-メトキシチラミンの3種について、(20~200) ピコモルの間で全く同一の検量

R. F. I.

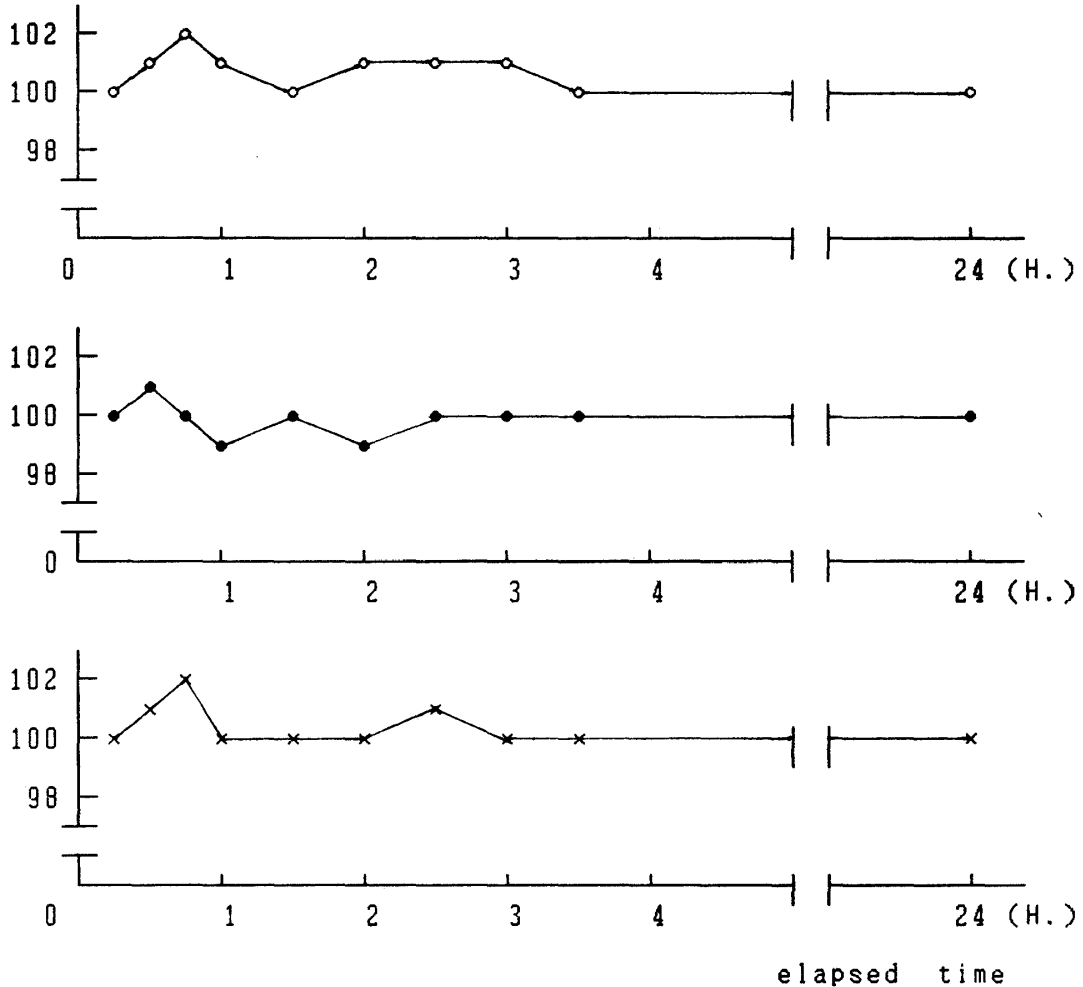


Fig. 2. Stability of bis-DNS-3-O-methylcatecholamines on polyamide thin-layer

○: bis-DNS-normetanephrine, ●: bis-DNS-metanephrine,
 ×: bis-DNS-3-methoxy-tyramine.
 (R.F.I.=relative fluorescence intensity(%))

線が描けた (Fig. 3)。緒言でも述べたように、このことは本法の大きな特徴である。高速液体クロマトグラフィによる結果⁵⁾ と比べると、定量下限はやや高いが、分析時間が比較的短くてすむので、本法は多数の試料を同時に分析するのに非常に有用であると言えよう。

また、測定の精度を調べるために、一枚の薄層板上に 100 ピコモル/スポットのトルエン抽出液を 10 点スポットして展開・測定したところ、ケイ光強度の変動係数は、ビスダンシル-NMN, ビスダンシル-MN, ビスダンシル-3MT の順に 1.5%, 1.4%, 2.2% となり、この測定法の精度は極めて高いことがわかった (Table 1)。

3.3 ダンシル化条件

3-O-MCA の全量を 1.5 マイクロモル (3 種各々 0.5 マイクロモル) として、ダンシル化に必要な DNS-Cl 量, 反応時の pH, 反応温度, および反応時間について検討した。最初に 40°C 1 時間反応で DNS-Cl 量 (1.25~3.2 mg) と緩衝液の pH (8.7~10.35) を変えてみたところ、緩衝液

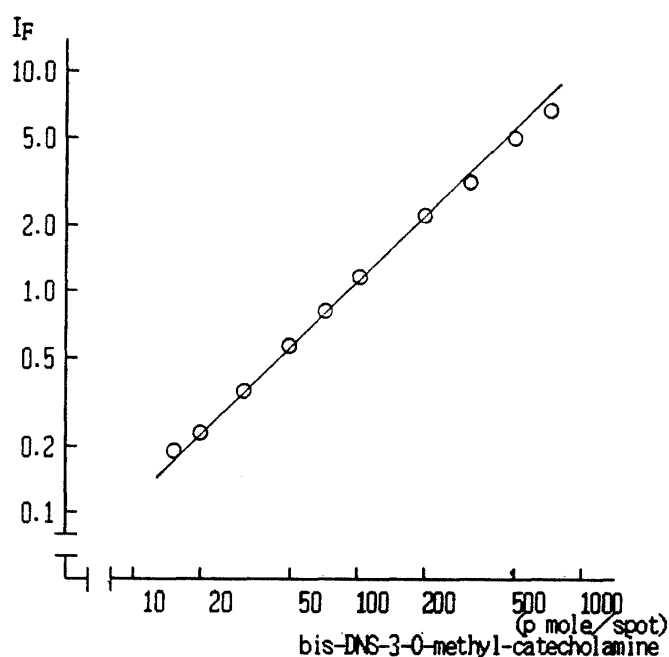


Fig. 3. Calibration curve of bis-DNS-3-O-methyl-catecholamines (IF: arbitrary units)

Table I. Reproducibility of measurement on the same thin-layer plate (100pmole/spot) (r.s.d.=relative standard deviation)

| spot number | bis-DNS-NMN | bis-DNS-MN | bis-DNS-3MT |
|-------------|-------------|------------|-------------|
| 1 | 1.13 | 1.09 | 0.98 |
| 2 | 1.13 | 1.10 | 0.99 |
| 3 | 1.14 | 1.10 | 0.99 |
| 4 | 1.15 | 1.10 | 0.99 |
| 5 | 1.15 | 1.10 | 1.00 |
| 6 | 1.15 | 1.10 | 1.00 |
| 7 | 1.16 | 1.11 | 1.01 |
| 8 | 1.17 | 1.12 | 1.04 |
| 9 | 1.18 | 1.13 | 1.04 |
| 10 | 1.18 | 1.14 | 1.04 |
| \bar{X} | 1.154 | 1.109 | 1.008 |
| s.d. | 0.017 | 0.015 | 0.022 |
| r.s.d.(%) | 1.5 | 1.4 | 2.2 |

の pH は (9.3~10.35) の間であればほぼ一定の収率が得られ、この pH 範囲では DNS-Cl 量は 1.25 mg で充分であった。次に、反応温度・時間を 30°C 1 時間、40°C 1 時間・16 時間の 3 種で比較してみたところ、40°C 1 時間・16 時間はほぼ同じ結果が得られたが 30°C 1 時間では過剰の DNS-Cl の分解が不充分であり、40°C 1 時間反応がよいことがわかった。

上の条件を用いて 3-O-MCA 標準試料溶液での反応の定量性を調べてみた。[3.2] のビスダン

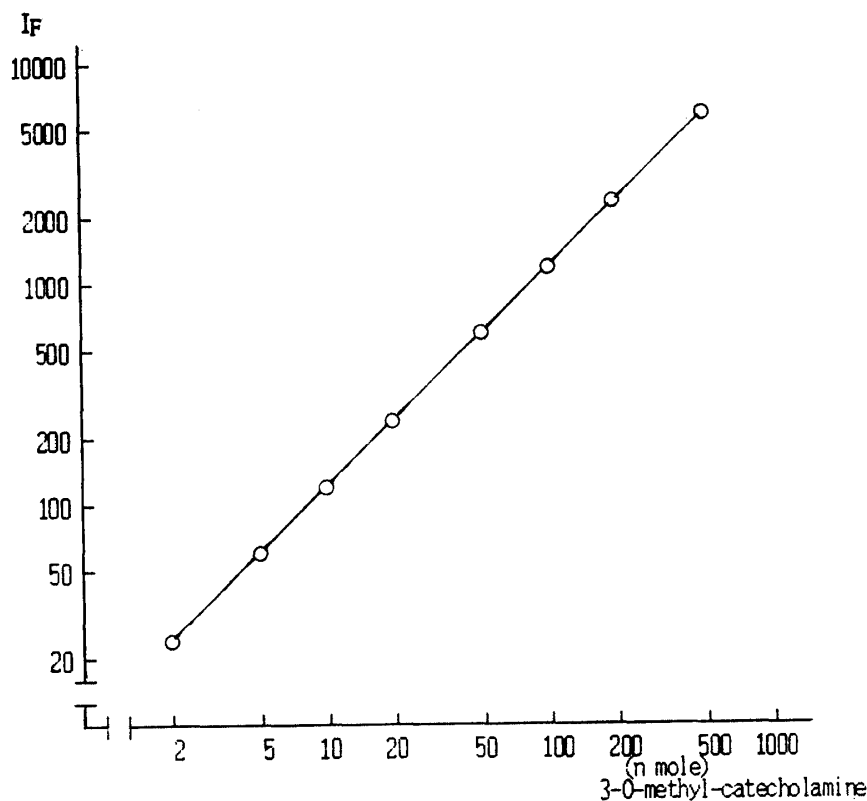


Fig. 4. Calibration curve 3-O-methyl-catecholamine
(IF: arbitrary units)

シル-3-O-MCA 量とケイ光強度とが比例する範囲を考慮して、抽出の際のトルエン量を (0.5~15)ml の間で変え、それぞれから 5 μ l をスポット・展開・測定し、横軸に 3-O-MCA 量、縦軸に (ケイ光強度 \times 抽出トルエン量 (μ l)/5) をとって両対数グラフ用紙に描いたところ、3 種とも (2~500) ナノモルの間が直線上に乗った (Fig. 4)。

4. 結 語

ノルメタネフリン、メタネフリンおよび 3-メトキシ-チラミンの混合物 (2 ナノモル~1.5 マイクロモル) が 1.25 mg の DNS-Cl と pH (9.3~10.35) の緩衝液中で定量的に反応した。ビスダンシル-ノルメタネフリン、ビスダンシル-メタネフリン、ビスダンシル-3-メトキシ-チラミンはポリアミド薄層上で互いに、また副生物と良く分離し、非常に安定であった。また、(20~200) ナノモルのビスダンシル-3-O-メチル-カテコールアミンが薄層上で直接定量でき、同一薄層上でのケイ光強度の変動係数は、100 ピコモル/スポットの時で (1.4~2.2)% という小値が得られた。

Literature

- 1) D. Aures, R. Fleming, R. Hakanson : *Journal of Chromatography*, **33**, 480 (1968).
- 2) A. Björklund, B. Falck, R. Hakanson : *Journal of Chromatography*, **47**, 530 (1970).
- 3) S. Axelsson, A. Björklund, O. Lindvall : *Journal of Chromatography*, **105**, 211 (1975).
- 4) H. Nakamura, J.J. Pisano : *Journal of Chromatography*, **154**, 51 (1978).
- 5) R.T. Borchardt, M.R. Hegazi, R.L. Schowen : *Journal of Chromatography*, **152**, 255 (1978).