

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(III) : チアミンのDNS-Clとポリアミド薄層を用いた微量定量
Sub Title	Microanalysis with thin-layer chromatography and direct scanning fluorometry (III) : microdetermination of thiamine using dansyl-chloride and polyamide thin-layer
Author	村上, 文子(Murakami, Ayako) 熊谷, 知世(Kumagai, Chiyo) 代田, ますみ(Shirota, Masumi) 西沢, 秀幸(Nishizawa, Hideyuki)
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.21- 26
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000027-0021

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法定量法による微量分析 (III)

チアミンの DNS-Cl とポリアミド薄層を用いた微量定量

村上文子, 熊谷知世, 代田ますみ, 西沢秀幸

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

Microdetermination of thiamine using dansyl- chloride and polyamide thin-layer

Ayako MURAKAMI, Chiyo KUMAGAI, Masumi SHIROTA
and Hideyuki NISHIZAWA

One of the methods for the determination of thiamine is described. Thiamine was dansylated in buffer solution (pH 8.0) and evaporated in vacuo to dryness. Dansylated thiamine was extracted into ethylacetate. An aliquot of the extract was spotted on polyamide thin-layer plate, which has high resoluability for dansyl-derivatives of many amines. A solvent system of water : formic acid : triethylamine (200 : 2 : 1) allowed good separation and the spots on the thin-layer plate were measured directly by scanning fluorometer. The fluorescence intensity was stable on polyamide thin-layer plate at least for 24 hours. The relative standard deviation of the fluorescence intensity obtained on the same thin-layer plate was 3.3% at 500 pmole/spot, and the lowest limit of determination was 5 pmole.

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で各種の生体内成分・医薬品等を分析しており、今回は試料としてチアミンをとりあげて、その微量定量法について検討した。

チアミンは、一般に、酸化しチオクロームとしてケイ光定量されており¹⁻³⁾、そのうちの高速度液体クロマトグラフィによるもの⁵⁾⁸⁾では1ピコモル以下の定量が可能であるが、高速度液体クロマトグラフィは1回の分析に時間がかかり、多数の試料を同時に処理するには必ずしも適当とは言えない。そこで、多試料の同時処理に適している薄層クロマトグラフィを利用する方法の開発を試み、ケイ光試薬としては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(ダンシルクロライド)を、薄層はダンシル誘導体に対して高い分解能を有するポリアミド薄層を用いて実験を行ったところ、定量下限は高速度液体クロマトグラフィによるものに比べるとまだ高めではあるが、再現性に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

チアミン溶液：チアミンを 0.2 M 炭酸・リン酸緩衝液に溶かし 1 mM 溶液とした。

0.2 M 炭酸・リン酸緩衝液：0.2 M 炭酸水素ナトリウム溶液に 0.2 M リン酸水素ナトリウム溶液を加え、pH を 8.0 に調製した。

ダンシルクロライド溶液：ダンシルクロライド 1 g を 400 ml のアセトンに溶かし、2.5 mg/ml の溶液とした。

水はイオン交換水、試薬はすべて市販特級品をそのまま用いた。

ポリアミド薄層：6-ナイロンをプロピレングリコール中で加熱して溶かし、ガラス板上に塗布して作った⁹⁾。

スポット：5 μ l のマイクロキャップ（ドラモント）を用いて行った。

機器はそれぞれ次のものを使用した。

pH 計：HM-5 A 型 pH 計（東亜電波）。

反応水浴：TMB-8 型マグスターバス（井内盛栄堂）。

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

2.2 操作法

15 ml の共栓つき試験管にチアミン溶液 0.5 ml を取り、ダンシルクロライド溶液 0.5 ml を加えて混ぜ、50°C の水浴上で 1 時間加熱したのちロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧留去する。残滓に水 1 ml と酢酸エチル 1 ml を加え、共栓をして充分振盪しチアミンのダンシル誘導体を酢酸エチル層に移行させる。酢酸エチル抽出液の 5 μ l をポリアミド薄層上にスポットし、水：蟻酸：トリエチルアミン（200：2：1）で 40～50 分間展開後、室温で 30 分間程度扇風機の風を当てて薄層を充分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ってケイ光強度の読みとした。

3. 結果および考察

3.1 ダンシルチアミンの薄層クロマトグラムとケイ光の安定性

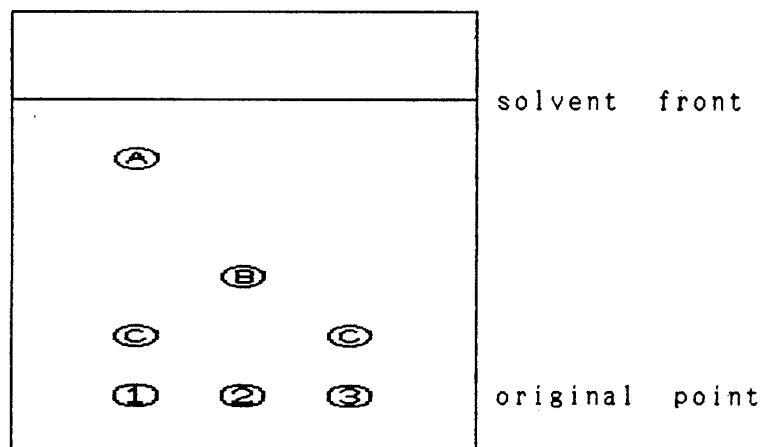


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of DNS-derivatives
1: DNS-thiamine extract, 2: DNS-OH, 3: DNS-NH₂;
A: DNS-thiamine, B: DNS-OH, C: DNS-NH₂
Developer: water-formic acid-triethylamine
(200: 2: 1).

ダンシルチアミン酢酸エチル抽出液, ダンシルアミド, およびダンシル酸の薄層クロマトグラムを Fig. 1 に示す。ダンシルチアミンの Rf 値は, 0.8 前後である。

ダンシルチアミンの薄層上での安定性を調べるために展開後の薄層に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, 24 時間はほぼ一定の値を示し (Fig. 2), ダンシルチアミン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。

3.2 薄層上での定量範囲と測定の精度

ダンシルチアミン量とケイ光強度の比例する濃度範囲を調べるために, 高濃度のダンシルチアミン抽出液を調製し, 酢酸エチルで順次希釈して標準溶液列を作った。それぞれの 5 μ l を一枚の薄層板上にスポットし, 展開・測定して両対数グラフ紙の横軸にダンシルチアミン量 (モル/スポット), 縦軸にケイ光強度をとってグラフを描いたところ, 75 ピコモル~2.5 ナノモルの間が直線上に載った (Fig. 3)。

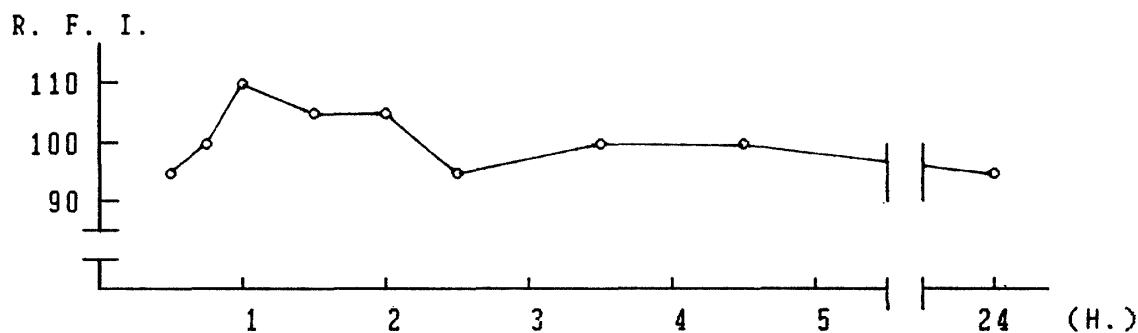


Fig. 2. Stability of DNS-thiamine on polyamide thin-layer (R.F.I.=relative fluorescence intensity (%))

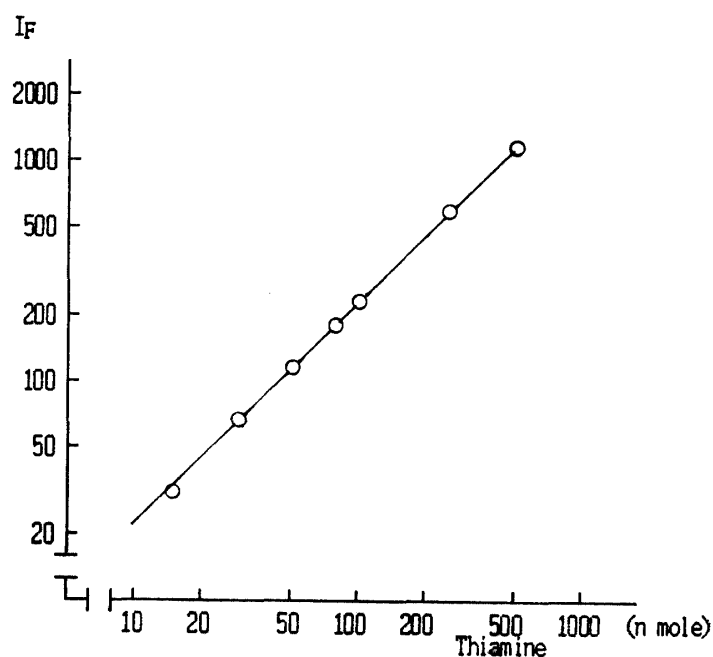


Fig. 3. Calibration curve of DNS-thiamine (IF: arbitrary units)

また、測定精度を調べるため、ダンシルチアミン抽出液 (500 ピコモル/スポット) を一枚の薄層板上に 8 点ずつ、計 5 枚にスポットして展開・測定した結果、一枚の薄層板上のケイ光強度の

Table I. Reproducibility of measurement (0.5 nmol/spot)
(r.s.d.=relative standard deviation)

plate number	1	2	3	4	5	n=40
spot number						
1	0.84	0.84	1.03	1.04	1.06	
2	0.85	0.91	1.04	1.06	1.07	
3	0.88	0.92	1.08	1.10	1.08	
4	0.91	0.92	1.10	1.11	1.14	
5	0.92	0.92	1.11	1.12	1.15	
6	0.94	0.95	1.11	1.13	1.17	
7	0.94	0.98	1.15	1.13	1.19	
8	0.99	0.98	1.18	1.16	1.19	
\bar{X}	0.91	0.93	1.10	1.11	1.13	1.035
s.d.	0.047	0.042	0.047	0.037	0.050	0.106
r.s.d.(%)	5.2	4.5	4.3	3.3	4.5	10.0

R. F. I.

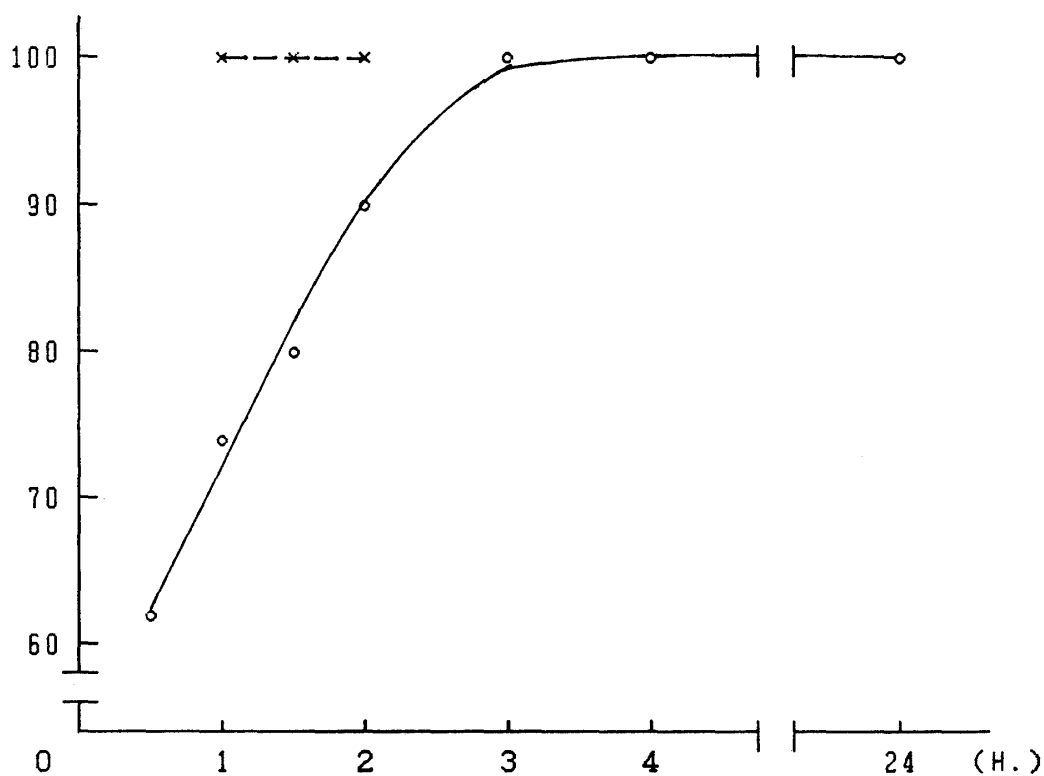


Fig. 4. Effect of temperature and time for dansylation
(R.F.I.=relative fluorescence intensity (%))

変動係数は、Table 1 に示すように (3.3~5.2)% という小さな値であった。

3.3 ダンシル化の各条件

チアミンの最多量を 500 ナノモルとして、ダンシル化に必要なダンシルクロライド量、反応時の pH、および加温温度・時間について検討した。まず加温温度・時間であるが、40°C の加温では少なくとも 3 時間以上の加温が必要であり、50°C 加温の場合には 1 時間の加温で充分であることがわかった (Fig. 4)。次にダンシルクロライド量は、2.5 mg (約 10 マイクロモル) あれば充分であり、pH は (7.75~8.35) の間が良いことがわかったので、2.5 mg のダンシルクロライドと pH 8.0 で 50°C で 1 時間加温することをダンシル化の条件と定めた。

3.4 反応の定量性

以上の条件で、どの位の量のチアミンが定量できるかを調べてみた。チアミン量は 500 ナノモル/0.5 ml のものを順次希釈してそれぞれの 0.5 ml を 2.5 mg のダンシルクロライドと反応させた。抽出時の酢酸エチル量はすべて 1 ml とし、それぞれから 5 μ l ずつをスポット・展開・測定して、両対数グラフ用紙の横軸にチアミン量 (モル)、縦軸に (ケイ光強度 \times 200) をとってグラフを描いたところ、(30~500) ナノモルの間が直線上に載った (Fig. 5)。

4. 結 語

(30~500) ナノモルの塩酸チアミンが 2.5 mg のダンシルクロライドと pH 8.0 で 50°C で 1 時間加温することにより定量的にダンシル化された。ダンシルチアミンを酢酸エチルで抽出し、ポリアミド薄層上にスポットして水 : 蟻酸 : トリエチルアミン (200 : 2 : 1) で展開したのち室温で 30 分間扇風機の風をあてて乾かしてからケイ光強度を薄層板上で直接測定した。

ダンシルチアミンはポリアミド薄層上で非常に安定であり、(75~2500) ピコモルのダンシルチ

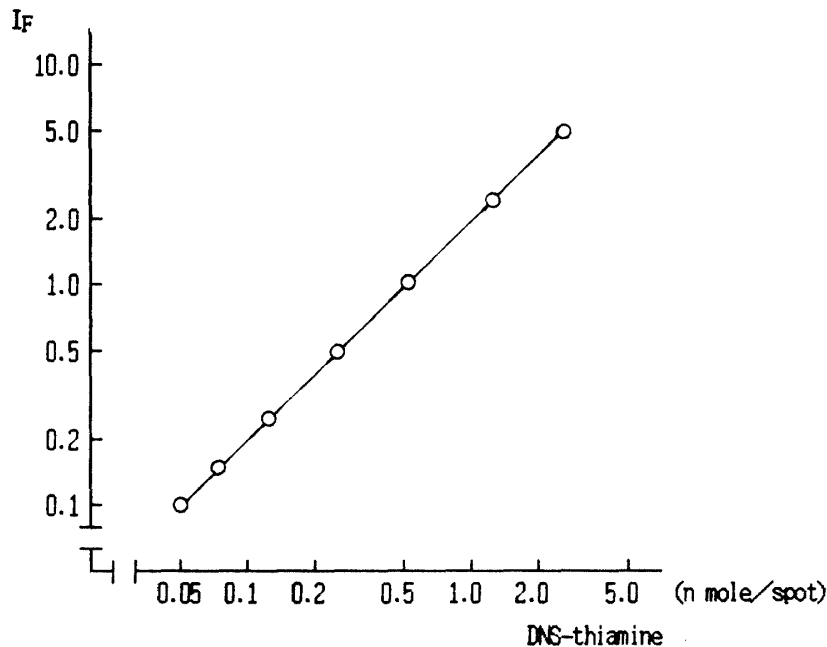


Fig. 5. Calibration curve of thiamine
(IF: arbitrary units)

アミンが薄層上で定量でき、一枚の薄層板上でのケイ光強度の変動係数は 500 ピコモル/スポットの時で (3.3~5.2)% であった。

Literature

- 1) J.K. Edijala : *Analyst*, **104**, 637 (1979).
- 2) K. Ishii, K. Sarai, H. Sanemori, T. Kawasaki : *Anal. Biochem.*, **97**, 191 (1979).
- 3) E.E. Edwin : *Methods in Enzymol.*, **62**, 51 (1979).
- 4) M.A. Pyan, J.D. Ingle : *Anal. Chem.*, **52**, 2177 (1980).
- 5) M. Kimura, T. Fujita, S. Nishida, Y. Itokawa : *J. of Chromatogr.*, **188**, 417 (1980).
- 6) S. Sato : *川崎医学会誌* Vol. 7, p. 6, (1981).
- 7) M. Kimura, T. Fujita, Y. Itokawa : *Vitamin*, **55**, 185 (1981).
- 8) M. Kimura, B. Panijpan, Y. Itokawa : *J. of Chromatogr.*, **245**, 141 (1982).
- 9) 村上文子, 中込操子, 永倉真理子, 西沢秀幸, 石原政雄 : *共立薬科大学研究年報*, Vol. 27, P.15, (1983).