

ノート

カルボン酸のけい光分析

片 岡 憲 治 , 川 端 省 三*

Fluorometric Analysis of Carboxylic Acid

Kenji KATAOKA and Shozo KAWABATA

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531, Iwase, Matsudo-shi Chiba-ken, 271 JAPAN

N-(4-Aminobutyl)-N-ethylisoluminol (ABEI) was used as the fluorometric labeling reagent in order to detect benzoic acid in local anaesthetic such as cocaine.

The reaction mixture of benzoic acid and acetic acid with ABEI was separated by the HPLC system equipped with a UV detector or a fluorescence detector. A good separation was achieved using ZORBAX ODS column with mobile phase of acetonitrile-water (85 : 15).

The detection limit was about 1×10^{-9} g/injection for benzoic acid.

- Received April 28, 1989 -

1 緒 言

局所麻酔剤であるコカインはコカ葉の主なアルカリドで、エクゴニンのエステルであり、また安息香酸のエステルでもある。その微量検出の方法として、エステルの加水分解によって生ずる安息香酸をけい光ラベル化して検出することが考えられる。

我々は先に、ダンシルクロリドを用いたけい光ラベル化による覚せい剤の微量検出法について報告した¹⁾。カルボン酸は、ダンシルクロリドとの反応性がないので、これをラベル化剤として用いることはできない。

脂肪族カルボン酸類の高感度ラベル化剤として、N-(4-Aminobutyl)-N-ethylisoluminol (ABEI) を用いた検出法が Kawasaki らにより報告されている²⁾。また、柄谷らは ABEI の類似物である N-(4-Aminobutyl)-N-methylisoluminol (ABMI) を用

いたラベル化法を報告している³⁾。ABEI 及び ABMI はいずれもイソルミノール系の誘導体であり、検出系として化学発光法が応用でき高感度検出に適したラベル化剤といえる。

今回我々は、局所麻酔剤等の微量検出の一助となることを期待して ABEI をけい光ラベル化剤とした安息香酸の微量検出法について検討したので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

ABEI: アルドリッヂ社

2-chloro-1-methylpyridinium iodide (CMPI)
: 東京化成工業

3,4-dihydoro-2H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-2-one (DPP) : 東京化成工業

* 大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬531

安息香酸：純正化学

2.2 装置

高速液体クロマトグラフィー：LC - 3A (島津)

UV 検出器：SPD - 2A (島津)

蛍光検出器：分光蛍光 HPLC モニタ RF535 (島津)

カラム：ZORBAX ODS 4.6mm × 25cm

2.3 ラベル化条件

ABEI によるラベル化反応は, Kawasaki らの報告²⁾を参考にして行った。

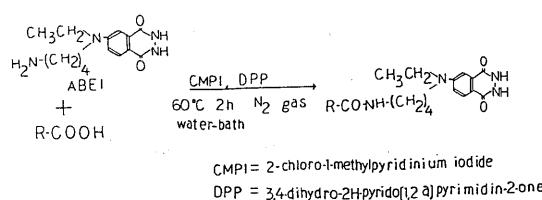


Fig. 1 Fluorometric labeling reaction scheme

Fig. 1 にラベル化反応式を示す。Kawasaki らは、このラベル化反応をミニバイアルびん（スクリュウキャップ付, 2ml 容）を用い, N₂ 気流下, 60 °C, 2 時間で行っているので、我々はその反応容器の代用として、たんぱく分解管 (Fig. 2) を使用することとした。

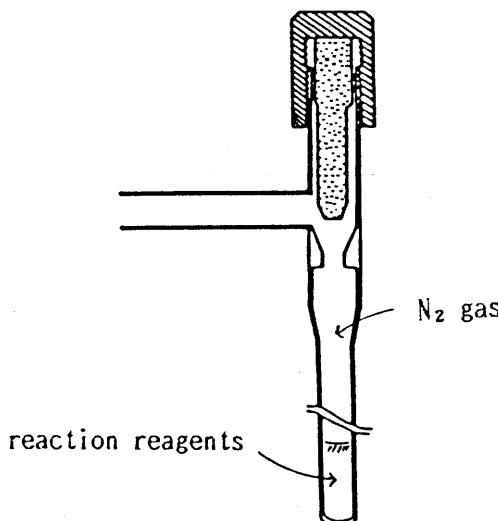


Fig. 2 Reaction tube

反応試薬の混合割合は、Kawasaki らとほぼ同じ割合とした。その混合割合（モル比）及び実際の試薬調製、反応使用量を Table. 1 に示す。カルボン酸と ABEI はメタノール溶液 (0.3ml), CMPI と DPP はアセトニトリル溶液 (2.0ml) で、それぞれを反応容器 (Fig. 2) に注入後、上部を N₂ ガスで置換した後密栓して 60 °C の水浴中に 2 時間以上放置した。この反応混合物を直接（希釈後）HPLC に注入した。

Table 1 Mixing ratio of reagents

reagent	molar ratio	solvent
carboxylic acid	(less than) 1	CH ₃ OH (0.3ml)
ABEI	1	
CMPI	2	
DPP	4	CH ₃ CN (2.0ml)

(For example)

reagent	concentration	used volume
Benzoic acid	10mg/100ml	0.2ml
ABEI	6 mg / 5 ml	0.1ml
CMPI	10mg/50ml	1.0ml
DPP	12mg/50ml	1.0ml

3 結果及び考察

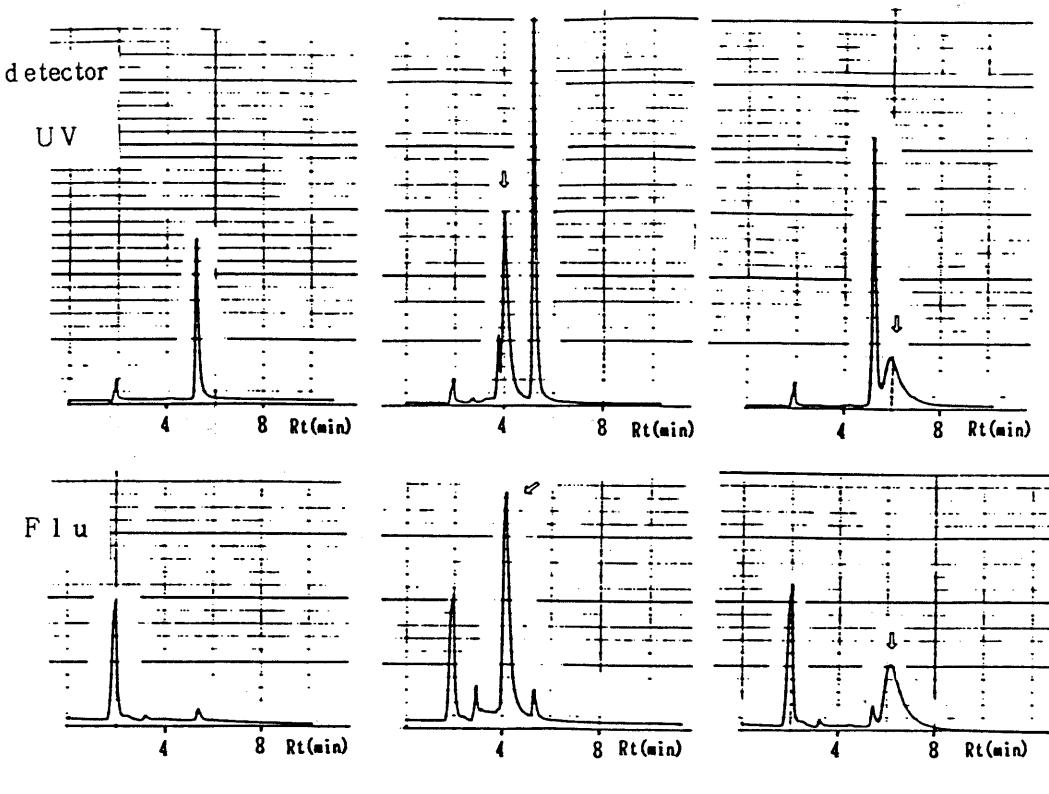
3.1 ABEI ラベル化物の液体クロマトグラフィーによる分離

空試験として安息香酸を入れなかったもの及び反応の確認として既にラベル化反応が確認されている酢酸²⁾をそれぞれ対象として、同時に実験を行った。

2.3 のラベル化反応混合物を、文献^{2), 3)}を参考に、逆相系のカラムを用い分離した。移動相は、アセトニトリル - 水系及びメタノール - 水系で試みた結果、アセトニトリル - 水系では 85 : 15, メタノール - 水系では 90 : 10 が適当であった。各移動相とも水の割合が少なくなると目的ピークが遅くなり、ブロードとなつた。

移動相にアセトニトリル : 水 (85 : 15) を用い、検出器として UV 検出器及び蛍光検出器を用いたクロマトグラムを Fig. 3 に示す。安息香酸及び酢酸の ABEI

ノート カルボン酸のけい光分析



R-COOH = Blank Benzoic acid Acetic acid
Fig. 3 Chromatograms of Labeling reaction mixtures

column ; ZORBAX ODS 4.6mm × 25cm

mobile phase ; CH₃CN : H₂O = 85 : 15

flow rate ; 1.0ml/min

detector ; UV 300nm/fluorescence EX 300nm, EM 420nm

ラベル化物のピークは、それぞれ矢印のピークと認められた。蛍光検出器を用いた方が、UV 検出に比べて副ピークが少なく良好であった。

なお、検出器の波長は、種々変化させて測定した結果、良好なピークが得られた波長で測定したものである。

3.2 検出限界について

安息香酸のラベル化物の検出限界の目安を求めた。

Fig. 4 は注入絶対量として、約 4×10^{-8} g 及び約 1×10^{-9} g (100%のラベル化反応として) のクロマトグラムである。検出限界として、 10^{-9} g オーダは十分可能と考えられる。

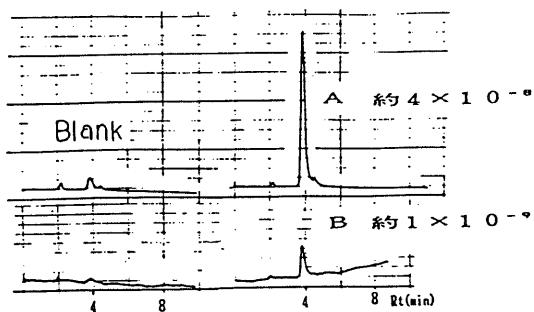


Fig. 4 HPLC of ABEI-benzoic acid
(about 4×10^{-8} g, about 1×10^{-9} g/injection)

column ; ZORBAX ODS 4.6mm × 25cm

mobile phase ; CH₃CN : H₂O = 90 : 10

flow rate ; 1.0ml/min

detector ; UV 300nm/fluorescence EX 320nm,

EM 430nm

3.3 薄層クロマトグラフィー(TLC)による分離
2.3のラベル化反応化合物を TLC による分離を試みた。UV254nm で観察したクロマトグラムを Fig. 5 に示す。

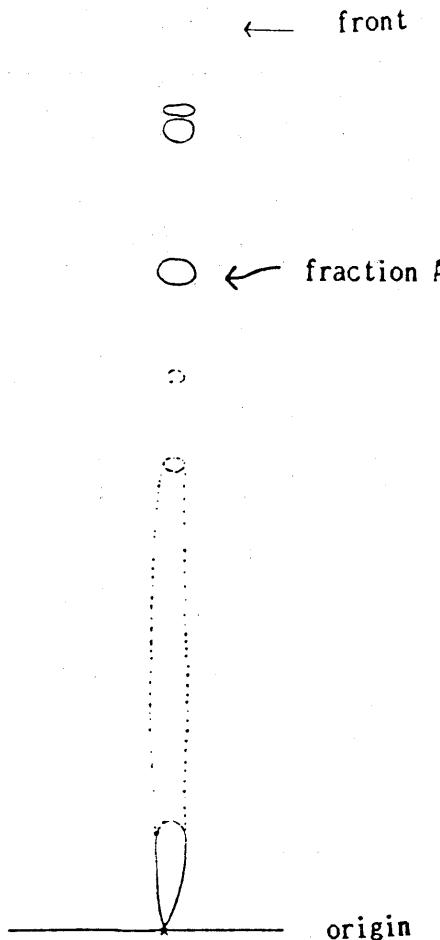


Fig. 5 Thin-layer Chromatogram of reaction mixtures
solvent system ; CH₃CN : H₂O = 85 : 15
detector ; UV 254nm

画分 A は黄色の蛍光、原点付近からの帯状に展開しているスポットは青紫色の蛍光 (DPP は青紫系の蛍光を発する) であった。画分 A (アセトニトリル - 水で抽出) を HPLC に注入したところ、3.1 でみられた副ピークは消失しており、TLC においても良好に目的物を分離できることがわかった (Fig. 6)。

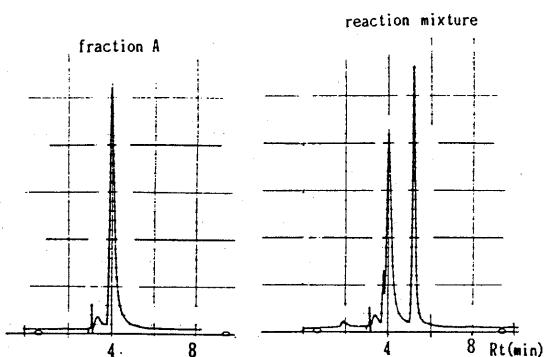


Fig. 6 HPLC of fraction A fractionated by TLC
column ; ZORBAX ODS 4.6mm x 25cm
mobile phase ; CH₃CN : H₂O = 85 : 15
flow rate ; 1.0ml/min
detector ; UV 300nm

4 要 約

安息香酸のラベル化剤として, N-(4-Aminobutyl)-N-ethylisoluminol (ABEI) を用いた。反応混合物を直接 HPLC に注入し、UV 検出及び蛍光検出により、安息香酸のラベル化物を分離検出した。検出限界は、注入絶対量として、約 1×10^{-9} g (100% のラベル化反応として) であった。

この手法は、安息香酸エステル類 (例えば、コカイン等の局所麻酔剤) の微量検出法に応用可能と考えられる。

文 献

- 1) 片岡憲治 , 出来三男 : 本誌 , 28 , 111 (1988)
- 2) T. K. Kawasaki , M. Maeda , A. Tsuji : J. Chromatogr. , 328 , 121 (1985)
- 3) 柄谷肇 , 高野純志 , 森下伸吾 , 吉田益子 , 佐藤昌憲 : 分析化学 , 38 , 59 (1989)