

九州大学中央分析センター



目 次

分析機器解説シリーズ(39) 1
 ポストカラム蛍光誘導体化高速液体クロマトグラフィー

トピックス 6
 導電性フタロシアニンとその解釈における重要な注意点

お知らせ 10

分析機器解説シリーズ(39)

ポストカラム蛍光誘導体化高速液体クロマトグラフィー：
カテコールアミンおよびその代謝物の一斉分析

薬学部 能 田 均

1. はじめに

『分析機器解説』とはいいいながら、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に用いられる機器は解説するまでもなく、広く一般的なものとなっている。ここでは筆者らが開発したカテコールアミンおよびその代謝物(図1)のポストカラム蛍光誘導体化HPLCを例に、ハードよりもそのソフトに焦点を当てて解説させていただきたい。

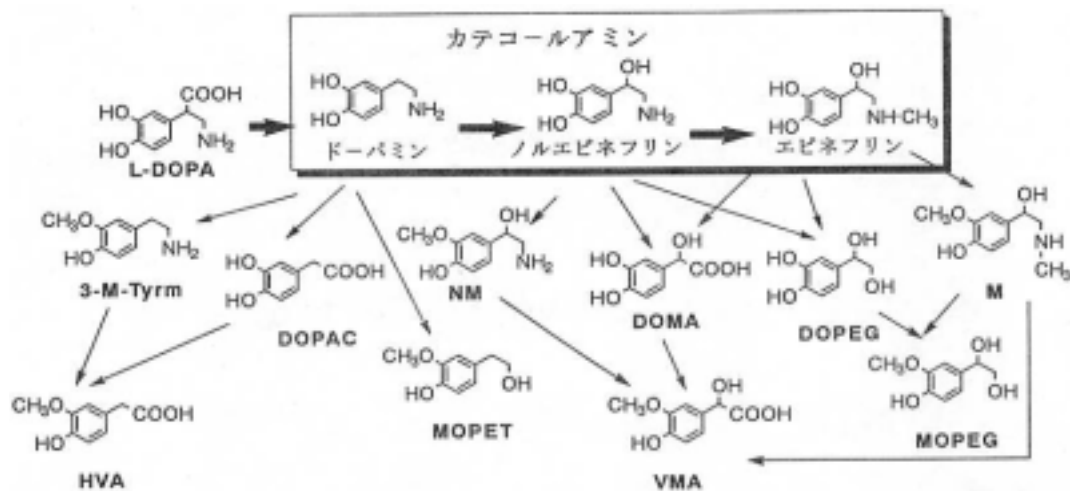


図1 カテコールアミンとその代謝物

蛍光検出は、数あるHPLCの検出法のなかでも最も高感度かつ高選択的な方法のひとつである。しかし、高選択的ということは逆に計測対象物質そのものは検出できない場合が多く、蛍光誘導体化という操作がHPLCカラムによる分離の前か後で必要になる(それぞれプレカラムおよびポストカラム蛍光誘導体化)。筆者の所属する薬品分析化学教室(大倉洋甫教授)では計測対象物質を2点で認識し、分子認識能を有する蛍光反応の開発を行っている¹⁾。その一環として、カテコールアミンの蛍光試薬として1, 2-ジフェニルエチレンジアミン(DPE、図2A)を見出し、これをプレカラム誘導体化反応に利用した。ついでこの反応を利用してカテコールアミンとその代謝物の一斉分析システムへ発展させた。

2. カテコールアミンの蛍光検出HPLC

カテコールアミン(ドーパミン、ノルエピネフリン、エピネフリン)は生体の恒常性維持に関与しており、その生体試料(血液、髄液、尿)中の濃度は各種の病態とも深く関与していると考えられる。しかし、その測定には極めて高い選択性と高感性が要求される。

3種カテコールアミンにはカテコール核の2つの水酸基とアミノ基が共通の官能基として存在するが、筆者らはカテコール核の2つの水酸基を2点で認識することが高い選択性を得ることができると考え、各種試薬を設計して反応性を検討した²⁾。その結果、DPEがヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウムの存在下、弱酸性~中性、室温で反応して蛍光誘導体を与えることがわかった(図2)。この反応はカテコール核の認識と言えるが、実際はカテコールアミンに対して特に強い蛍光を与えたので、極めて簡便な前処理でヒト血漿中カテコールアミンのプレカラム蛍光誘導体化HPLCに適用できた³⁾。またDPEはそれ自身は無蛍光性で、反応も比較的緩和な条件で進行するのでポストカラム蛍光誘導体化にも容易に適用できる。

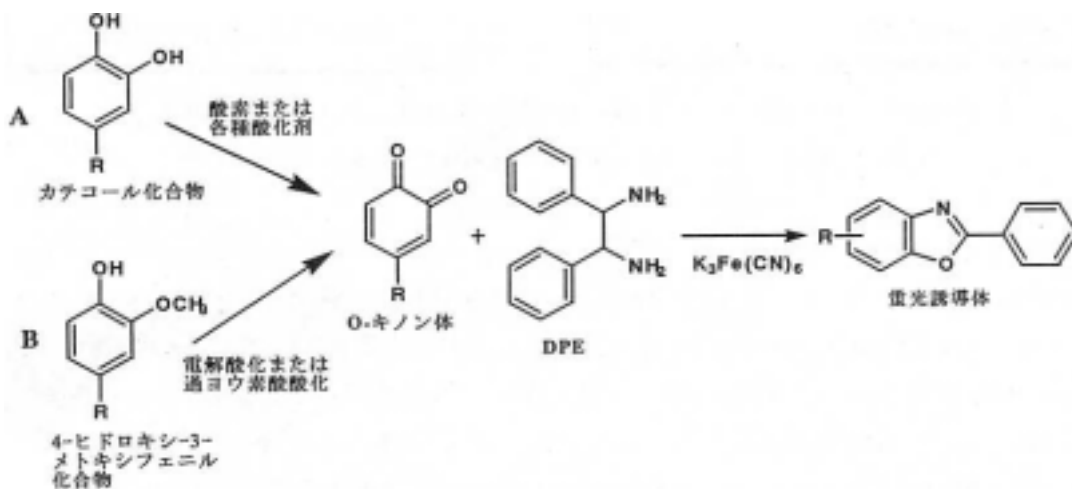


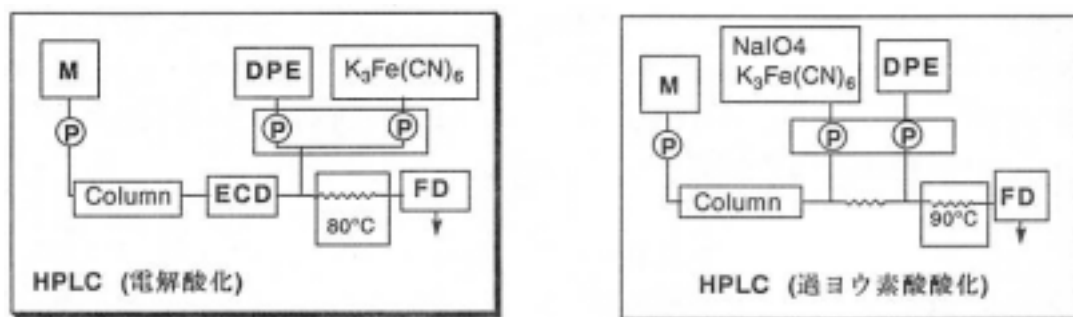
図2 カテコール及び4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル化合物の蛍光誘導体化

3. カテコールアミンおよびその代謝物の一斉分析

カテコールアミンは極めて強い生理活性を持つが故に、生体には迅速な代謝機構が備わっていて、その代謝も数多い(図1)。カテコールアミンとその代謝物と同時分析することによって飛躍的に情報量が増大することがある。これらの化合物はいずれもカテコール化合物または4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル化合物であるので(それぞれについてさらに硫酸抱合体が存在する)、その一斉分析のために両者に共通の誘導体化反応を考えた。

DPE反応では図2Aのように、カテコールアミンはまずヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウムでo-

キノン体へ酸化され、DPEと発蛍光する。ここで4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル化合物も図2Bに示すように電解酸化または過ヨウ素酸酸化でo-キノン体へ変換できることに着目した。ただし、この反応ではカテコール化合物と対応する4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル化合物は同一の蛍光誘導体を与えるためプレカラム蛍光誘導体化には適用できない。そこで酸化およびDPE反応をポストカラム蛍光誘導体化反応として組んだHPLCシステムを作成した(図3)^{4,5)}。いずれのシステムでもカテコールアミンおよびその代謝物をイオン対逆相分配モードで分離したのち、電解酸化または過ヨウ素酸酸化してo-キノンへ変換し、次いでDPEで蛍光誘導体化して蛍光検出する。



M = 移動相 ; P = ポンプ ; E C D = 電気化学検出器 ; F D = 蛍光検出器

図3 ポストカラム蛍光誘導体化HPLCシステム

電解酸化には市販のクーロメトリック方式の電気化学検出器を利用しているが、o-キノンへの変換率は90 - 100%であった。電気化学検出器からの流出液にDPEとヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸カリウムの混合液を導入し、80℃の反応コイル(内径0.5mm、20m)中を通過する間に蛍光誘導体化する。過ヨウ素酸酸化ではカラムから溶出液に過ヨウ素酸ナトリウム溶液を導入して反応コイル(内径0.5mm、1m)を通過する間にo-キノンへの変換が完了する(変換効率90 - 95%)。次いで電解酸化と同様にDPEと反応させる。過ヨウ素酸酸化 - DPE反応のような2段階の反応でもポストカラム反応としてシステムに組み込むことができる。

両システムとも尿および血漿試料に適用可能であり、その前処理も極めて簡便なものであった。尿および除タンパクした血漿を陽イオン交換カートリッジを用いて得たアミン画分(抽出)と酸・アルコール画分(素通り)をHPLC試料とした^{5,6)}。両システムを比較すると、電解酸化では硫酸抱合体も酸化されo-キノンへ変換されて蛍光ピークを与えるので、それを酸化しない過ヨウ素酸酸化の場合より複雑なクロマトグラムになった。図4に過ヨウ素酸酸化 - DPE反応を用いたシステムによる尿の分析結果を示す。

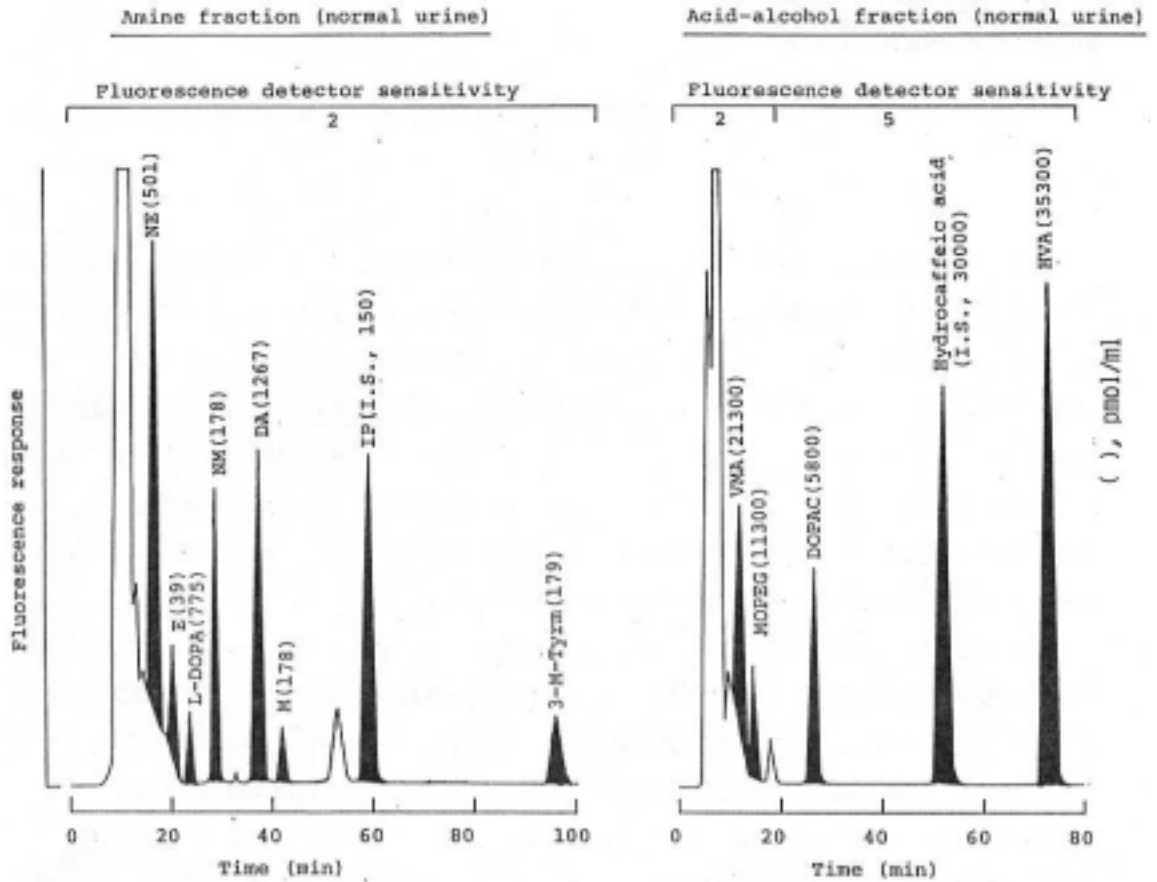


図4 ヒト尿中カテコールアミン及びその代謝物

4. おわりに

生理活性物質について、活性が共通するグループや代謝物を含めたグループの一斉分析を計画する場合、クロマトグラフィーは必須方法論となる。生体試料のように極めて複雑なマトリックスから目的グループのみを検出するためには様々な工夫が必要となる。グループに共通の蛍光反応があれば、ポストカラム蛍光誘導体化HPLCは有用と考えられる。

文 載

1. Y. Ohkura, *Ana1. Sci.*, 5, 371 (1989)
2. 能田 均, *ぶんせき*, 307 (1992)
3. A. Mjtsuj, H. Nohta and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, 344, 61 (1985)
4. H. Nohta, E. Yamaguchi, Y. Ohkura and H. Watanabe, *J. Chromatogr.*, 493, 15 (1989)
5. H. K. Jeon, H. Nohta and Y. Ohkura, *Anal. Biochem.*, 200, 332 (1992)
6. H. Nohta, E. Yamaguchi, Y. Ohkura and H. Watanabe, *J. Chromatogr.*, 493, 15 (1989)

トピックス

導電性フタロシアニンとその解釈における重要な注意点

工学部 石川 雄一

金属様の導電特性を持つフタロシアニンは、米国ノースウェスタン大学のマークスやホフマングループによって70年代の後半に開発され現在も興味深い研究が続けて行われてます¹⁾。「積層構造にあるフタロシアニン環の電子雲の重なり」と「中心金属の連結鎖」のイメージがもたらす研究衝動だけでなく、これら機能性化合物の持つ合成の容易さと優れた単結晶性も多くの世界的な研究をモチベートしているのも事実でしょう。多くの物性データ、特に電気伝導性が理論的観点から活発に議論されてます。そのような中で、最近、私の協同研究先であるホフマングループは、先の特性故に研究者が見落としていた致命的な過ちを明らかにしました²⁾。極端な表現をしますと、従来の詳細な研究は何を議論しているのか判らないといえます。ここでは、この事についてフタロシアニンの伝導特性の簡単な説明を踏まえて触れてみたいと思います。ここで述べる仕事の大半は、「(株)日本触媒筑波研究所」の村田和彦博士とJ. A. Thompson 博士らがホフマングループでなされたものでJ. Am. Chem. Soc. に掲載予定です²⁾。

ヨウ素によって部分酸化されたフタロシアニン(p c)の単結晶は、金属様の導電性を示します。図1(a)にこのpc - ヨウ素錯体の結晶構造(断面図)を示してあります。ヨウ素酸化体は互いのベンゼン環の接触を避けるように平行に積み重なり、その次元カラム間に還元されたヨウ素が I_3^- として充填されてます。 I_3^- 一分子と三つのp c環が対応しているのが特徴です。即ち、 I_3^- 一分子は三つのp c環(HOMOの $2 \times 3 = 6$ 電子から)から一電子を受取り一つの正孔をp c側に作り出します。これが次元鎖バンド構造内の伝導キャリアーとして作用することにより金属的な特性をもたらすと説明されてます(図1(b))。

図2は、p c ヨウ素錯体単結晶の規格化された伝導特性に与える調製方法の影響を現してあります。具体的なpc自身の調製方法には触れませんが、いくつかの方法があります。四つの試料で伝導特性が大きく異なり、AからDの順番で伝導特性が低下します。もちろんこれらの試料は、何れも化学的な分析を十分に満足しているものです。異なるのは、「ppm」レベルのラジカル濃度です。図2(b)は、有機ラジカル領域に表れたESRシグナルで、試料Dのシグナル強度はAの47倍の強度を与えます。ラジカル性不純物の伝導度に対する影響が明瞭です。同様な効果は、有機ラジカルだけでなく銅や鉄を初めとした常磁性金属イオンからも認められます。特に使用している伝導鎖が配位性化合物なので強く影響します。伝導のキャリアーが、局所的な非常に微量な常磁性モーメントにより摂動を受け、巨視的な電気特性に反映する(「Kondo」)効果として定量的に説明がなされてます²⁾。注意が必要なのは、このような常磁性不純物は、加熱などの物理的要因のみに基づ

(a)

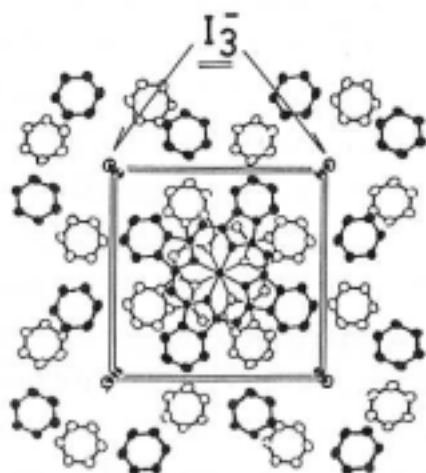


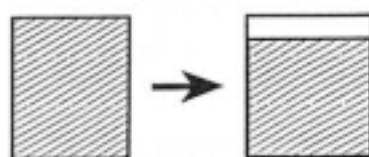
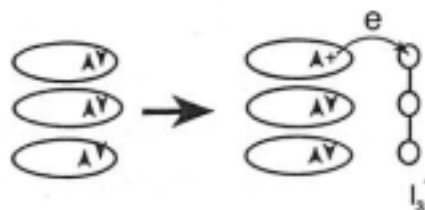
図 1.

(a) ニッケルフタロシアニンヨウ素酸化体の構造。水素原子は表示していない。単位セルのC軸からの投影図。

(b) ヨウ素による酸化前後の電子状態。酸化前は、三つのHOMOに二電子、計、六電子が基本単位中に含まれる。酸化後は5/6個の電子と一つの正孔がそのユニット構造に表れる。

(b)

Partial Charge Transfer



Ni(pc)

Ni(pc)I

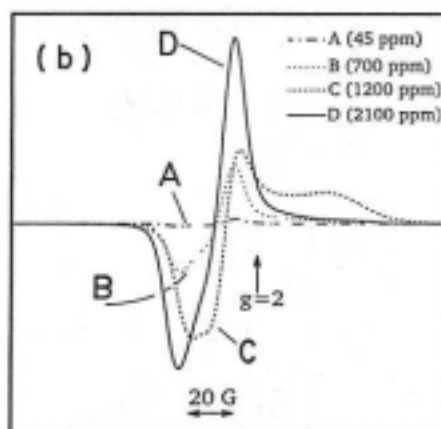
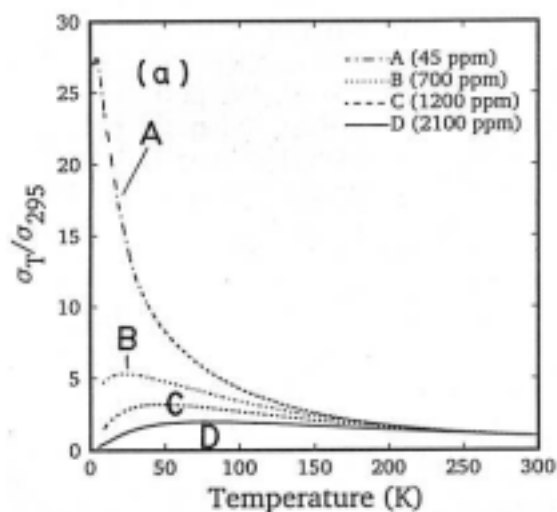
 $[\text{Ni}(\text{pc})]^{0.33} [\text{I}_3]_{0.33}$ 

図 2. フタロシアニンヨウ素酸化体の電気伝導特性に与えるラジカル性不純物の効果。

σ_T : 温度T(K)における伝導度、 σ_{295} : 室温における伝導度

(a) 規格化伝導度/温度曲線

(b) 用いた試料のESRシグナル。Xバンド、室温。

くのでなく、合成過程でのパイレックス製ガラス容器などからも混入してくることで、従って、

理論的精度が必要な議論には純度の高い石英製容器等での合成、調製が不可欠になります。

注意して伝導特性の温度依存性をみますと一つの矛盾に気がきます。純粋に金属的なものでしたら伝導度は温度の低下とともに増加し絶対零度で発散するはずですがそうなりません。図3ではそれが明かで極低温で温度の低下とともに増加していた伝導度が減少してます。即ち、伝導度が極大値を持ってます。このことを説明するために少し回り道ですが物理的なことに触れなければなりません。「パイエルス転移」です。一般に、TTF - TCNQなどの一次元性伝導物質は、その一次元性故に低温で結晶格子が歪み、バンド構造が変化し(切断され)て金属状態を取れなくなってしまうパイエルス(金属 半導体)転移を引き起こします³⁾。この転移に伴い温度の減少とともに増加していた伝導度はその転移点以降、急激に減少するようになります。即ち、伝導度の最大値を示す様になるわけです。詳細な説明は文献¹⁾に譲りますが、先のヨウ素によるpc部分酸化錯体は強い一次元性にもかかわらずそのような電子格子転移を起こしません。にもかかわらず、その伝導度は低温で最大値を示します。従って、pcヨウ素錯体の伝導度/温度曲線で認められる最大値の存在は、通常の一次元体に特徴的なパイエルス転移ではありません。

図3は、非常に注意深く調製された、ニッケル(Ni(pc)I)およびフリーベース型(H₂(pc)I)の伝導特性に与える両者の混合効果を示してます。図中の数字は、H₂(pc)ヨウ素錯体の含有率です。

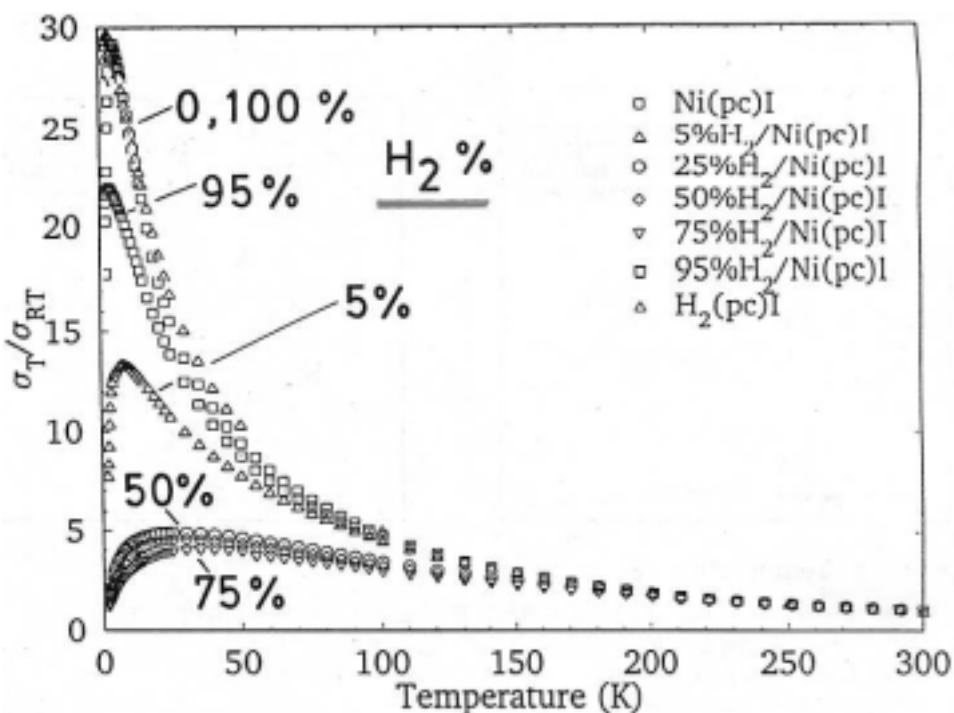


図3. 極めて純粋なニッケルおよびフリーベースのヨウ素酸化フタロシアニンの伝導特性に与える混合効果。図中の数字は、ニッケル体に対するフリーベース体のモル%を示す。

ニッケルとフリーベースのヨウ素錯体は同様に高い伝導特性を示す曲線を与えるにもかかわらず、それら混合体のヨウ素酸化体の伝導特性は低下し、当量混合体でその低下がほぼ飽和しています。両試料は、共に反磁性化合物なので、前述した「Kondo 効果」もこの特性低下の原因ではありません。この低下は結晶格子欠陥（有機性の反磁性不純物に基づく）伝導キャリアーの局在化（「Anderson 局在」）として定量的な解釈が可能です。ここで強調したいのは、ニッケルとそのフリーベースといった酷似した異種化合物の混入の場合であってさえもその電気伝導特性は大きく低下する事です。従って、例えば中心金属の錯化が不十分な試料では錯体本来の伝導特性を評価できない事になります。もちろん、図2は「Kondo」効果で説明可能です。

ヨウ素錯体を初めとした種々のpc酸化体の単結晶は、どなたにでも比較的容易に作成できますし、その元素分析や線解析も良い結果を与えます。従って、研究者は自分の作成試料に対して満足感を抱き、その物性測定結果が真実の姿を反映しているものとして議論を闘わせることとなります。その結果、種々の收拾の付かない局面へ展開して行きます。ここで述べたいのは、化学的な分析手法では検知できない不純物の影響です。特に電気、磁気的な物性測定に対しその効果は、正にも負にも作用します。このような系で重要なことは、先に述べたことを意識して実験を組立て、結果を解釈するか否かでしょう。

文 献

- 1) (a) B. M. Hoffman, J. A. Ibers, *Acc. Chem. Res.*, 1983, 16, 15.
(b) 最近では B. M. Hoffman ら, *Inorg. Chem.*, 1992, 31, 352.
- 2) B. M. Hoffman, K. Murata, J. A. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 掲載予定。
- 3) D. O. Cowan, F. M. Wlygul, *Chem. Eng. News*, 1986, July 21, 28.

お 知 ら せ

1. センターニュースバックナンバーについて

本センターニュースは 1983 年の創刊以来、多くの方の御協力を頂き現在に至っています。
バックナンバーが残っていますので、御希望の号がございましたら下記に御記入の上、工学分室
事務室（箱崎地区内線 5973）までお送りください。

センターニュースバックナンバー申込用紙

・御希望の号数 _____

・御送付先 氏名 _____

所属 _____

センターニュースバックナンバー一覧

号数	年号	Vol	No.	種 類	題 名	所 属	氏 名
1	1983	1	1	分析機器	エスカスキャンニングオージェ表面分析装置	中央分析センター	道城 正徳
2	1983	1	2	分析機器	核磁気共鳴吸収装置と多核種用 FT 型 NMR	生産科学研究所	森 章
3	1983	1	3	分析機器	エネルギー分散型蛍光 線分析装置	理学部	岡崎 篤
3	1983	1	3	トピックス	超音速ジェットと多光子イオン化分析法	工学部	今坂 藤太郎
4	1984	1	4	分析機器	フーリエ変換赤外分光光度計	工学部	松田 義尚
4	1984	1	4	トピックス	光ファイバーを利用した生体分析用センサー	工学部	川畑 祐司
5	1984	2	1	分析機器	エネルギー分散型 線分析装置	理学部	岡崎 篤
6	1984	2	2	分析機器	メスパウアー分光法 - その化学への応用 -	総合理工学研究科	森永 健次
7	1984	2	3	分析機器	フーリエ変換赤外分光光度計 (FT - IR3) の特長	工学部	松田 勲
7	1984	2	3	トピックス	核酸プローブ法による遺伝子の分析	工学部	片山 佳樹、大木 章
8	1985	2	4	分析機器	角度分散型 線分析装置	理学部	岡崎 篤
8	1985	2	4	トピックス	イオンマイクロアナライザーによる深さ方向分析	工学部	大城 桂作
9	1985	3	1	分析機器	発光分析法による微量重窒素の定量	農学部	福德 康雄、吉田 瑞樹
10	1985	3	2	分析機器	高周波スパッタ装置	理学部	青峰 隆文
11	1985	3	3	分析機器	FT / MS (フーリエ変換質量分析計)	工学部	高木 誠、松田 勲
11	1985	3	3	トピックス	半導体レーザーを光源とする近赤外スペクトロメトリー	工学部	川畑 祐司
12	1986	3	4	分析機器	金属中水素分析装置	工学部	林 安徳
12	1986	3	4	トピックス	官能的評価と機器分析データ	工学部	諸岡 成治
13	1986	4	1	分析機器	高性能熱分析装置の応用	農学部	箴島 豊
14	1986	4	2	分析機器	誘導結合プラズマ (ICP) 分析装置	総合理工学研究科	森永 健次
15	1986	4	3	分析機器	固定化酵素を用いる多成分同時定量用フローインジェクション分析	工学部	川畑 祐司
15	1986	4	3	トピックス	光ファイバーを応用した流動層内の濃度と流れの測定	農学部	松本 清
16	1987	4	4	分析機器	電子スピン共鳴	工学部	松田 義尚
16	1987	4	4	トピックス	Falling Jet を利用するレーザー励起高感度検出法	教養部	山田 淳
17	1987	5	1	分析機器	走査型トンネル電子顕微鏡	中央分析センター	坂下 寛文
18	1987	5	2	分析機器	光電子分光法 - X P S , U P S について -	中央分析センター	西山 宣昭
19	1987	5	3	分析機器	走査型電子顕微鏡	工学部	片田江由紀子
19	1987	5	3	トピックス	流れ系を利用した迅速低分析法	工学部	今任 稔彦
20	1988	5	4	分析機器	超伝導 NMR	工学部	中村 博

号数	年号	Vol	No.	種 類	題 名	所 属	氏 名
20	1988	5	4	トピックス	吸着クロマトグラフィーによる細胞分離	工学部	前田 瑞夫
21	1988	6	1	分析機器	希ガス放電アフターグロー装置	機能物質科学研究所	西村 幸雄
22	1988	6	2	分析機器	生体NMR測定	薬学部	金沢 洋子
23	1988	6	3	分析機器	分析化学におけるレーザーの利用	工学部	今坂藤太郎
23	1988	6	3	トピックス	水面単分子膜の分光学的研究	工学部	君塚 信夫
24	1989	6	4	分析機器	高速液体クロマトグラフィー・GPC	工学部	松下 琢、菊池 裕嗣
24	1989	6	4	トピックス	化学変換によるNMRスペクトルの線形変化とそのシミュレーション分析	工学部	斉藤 英
25	1989	7	1	分析機器	超音速ジェット分析法による同位体分析	機能物質科学研究所	関谷 博
26	1989	7	2	分析機器	超高压物性測定装置	総合理工学研究科	桑原 範之
27	1990	7	3	分析機器	時間分解ESR	工学部	臼井 聡、松田 義尚
27	1990	7	3	トピックス	低真空観察SEM	中央分析センター	渡辺美豊里
28	1990	7	4	分析機器	質量分析	農学部	下田 満哉
28	1990	7	4	トピックス	福岡市の酸性雨	特殊廃液処理施設	宮地 治、磯村 計明
29	1990	8	1	分析機器	細胞生物学における顕微蛍光分析の利用	中央分析センター	西山 宣昭
30	1990	8	2	分析機器	磁気旋光現象に基づく汎用フロー検出器の開発	総合理工学研究科	河済 博文
31	1990	8	3	分析機器	円偏光二色計	工学部	有村 隆志、新海 征治
31	1990	8	3	トピックス	磁性体を利用した生体試料からのDNAの迅速分離	工学部	竹中 繁織
32	1991	8	4	退官記念	分析化学の発展・分析化学と教育についての雑感	工学部	石橋 信彦、松田 勲
32	1991	8	4	トピックス	プロフィールフィッティングによるX線粉末回折法の見直し	理学部	中卒田義博、青木 義和
33	1991	9	1	分析機器	リアクトド・イオン測光システムを用いた光学的物性計測	工学部	原 一広、金谷 晴一
34	1991	9	2	分析機器	レーザー蒸発法と多光子イオン化法の組み合わせによる生体試料の質量分析	機能物質科学研究所	関谷 博
35	1992	9	3	分析機器	誘導結合プラズマ質量分析装置の試料導入系	中央分析センター	渡辺美豊里
35	1992	9	3	トピックス	固体高分解能NMRを用いたゼオライトのキャラクタリゼーション	工学部	長田 秀夫
36	1992	9	4	分析機器	イメージングプレート	工学部	高原 淳
36	1992	9	4	トピックス	合成二分子膜に固定したタンパク質の配向評価	工学部	濱地 格
37	1992	10	1	分析機器	還元反応に及ばず超音波効果	中央分析センター	都築 広久
38	1992	10	2	分析機器	動的な光散乱	理学部	町田 光男
39	1992	10	3	分析機器	原子間力顕微鏡	工学部	大石 祐司
39	1992	10	3	トピックス	トリチウムガス(水素ガス状トリチウム)の環境中での挙動	理学部	百島 則幸