

誘導体化試薬

HPLC用誘導体化試薬の特性、使用例

1) *N*-(9-Acridinyl) maleimide (NAM)

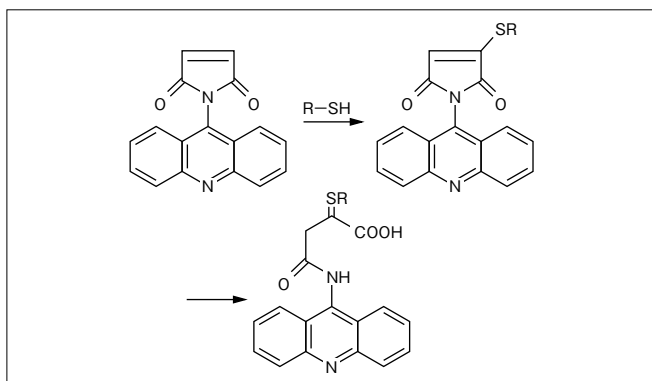
349-04764, 343-04763

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=365\text{nm}$, $\lambda_{em}=435\sim 440\text{nm}$)

プレカラム

官能基：チオール基

反応例



1mM試料水溶液を2mlとり、30%水酸化ナトリウム0.4ml、0.2Mほう酸緩衝液(pH8.8)1mlを加える。さらに10mM NAMのアセトン溶液0.5mlを加えて、振り混ぜる。室温で30分反応させ、反応液をHPLC試料とする。

性質

淡黄色結晶、m.p.240~250°C(分解)。この反応は水溶液中pH3~10の広範囲でほぼ定量的に進行し、1pmolのシステムが検出可能である。DTNB法の約100倍の高感度試薬である。

参考文献

- 1) T.Konno, T.Kamata, H.Ohrui, H.Meguro, *Anal.Sci.*, 9, 871 (1993).
- 2) T.kamata, K.Akasaka, H.Ohrui, H. Meguro, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 58, 878(1994).
- 3) S.Takeda, M.Yamaki, S.Ebina, K.Nagayama, *J. Biochem.*, 117, 267 (1995).

2) 4-Amino-3-penten-2-one

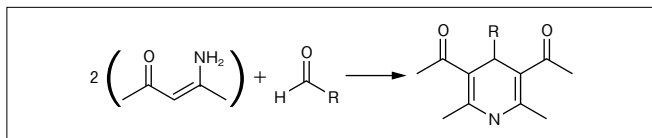
(LO8379)

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=410\text{nm}$, $\lambda_{em}=510\text{nm}$)

ポストカラム

官能基：アルデヒド

反応例



本品はpH2~2.5で種々のアルデヒドと反応して黄色を呈し、410nmでの吸光度を測定することにより定量が可能である。さらにアルデヒド類の中でホルムアルデヒドとの反応生成物のみ蛍光を持つことから、ホルムアルデヒドの高選択的、高感度定量が可能である。

本品は溶液中で安定であり、取り扱いが容易で、反応時間も短い。また他の溶媒系との混合も容易で非常に

有効な試薬である。この方法は、りん脂質・トリグリセライド類のHPLC検出に利用されている(ポストカラム法)。

性質

淡黄色結晶、m.p.42~45°C。アルデヒドの蛍光分析試薬として有用である。フローインジェクション法によりnmolレベルのホルムアルデヒドが検出されている。

参考文献

- 1) J.B.Sainani, A.C.Shah, V.P.Arya, *Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 33b, 526(1994).
- 2) T.Muiamba, R.El Bouklli-Garre, *et al.*, *Heterocycles*, 41, 29(1995).

3) *N*-(4-Anilinophenyl) maleimide (APM)

013-09991

検出：ECD(ボルタンメトリー検出器)

官能基：SH基

本品は高速液体クロマトグラフィー(ボルタンメトリー検出器)を用いてチオール類(R-SH)の高感度分析を行う際の誘導化剤である。

mp: 136°C

参考文献

- 1) 南原利夫 他：日本薬学会第102年会講演会要旨,

4) 1-Anthroyl Cyanide OH基蛍光ラベル化用

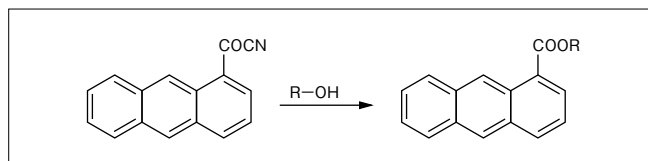
017-12101

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=370\text{nm}$, $\lambda_{em}=470\text{nm}$)

プレカラム

官能基：アルコール性水酸基

反応例



抽出したPG(プロスタグランジン)類を含む80%含水メタノール液の溶媒留去後、0.2% 1-アントロイルシアニド含有アセトニトリル溶液50 μl 、0.16%キヌクリジン含有アセトニトリル溶液50 μl を加え、60°Cで30分間反応させる。

メタノールを添加し(過剰の1-アントロイルシアニドはメチルエステルになる)、シリカゲルカラムにて過剰の試薬を除去する。残渣をメタノール400 μl に溶解し、その10 μl をHPLCで分析する。

性質

橙色結晶、m.p.163~166°C、1級アルコール性水酸基、2級アルコール性水酸基およびフェノール性水酸基に対して特異的に反応する。ただし立体障害のある2級アルコール性水酸基との反応性は、その立体障害の程度に依る。3級アルコール性水酸基とはほとんど反応しない。

水酸基をもつ各種薬物やステロイドホルモン、胆汁酸、プロスタグランジンなどの分析に有効。いくつかの反応率(エステル化率)を示す。

Cortisol (21prim) 100%, Androsterone (3 α , axial) 12%, Lithocholate (3 α , eq.) 53%, Isoandrosterone (3 β , eq.) 20%, 11 α -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (11 α , eq.) 0%, 11 β -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (11 β , eq.) 0%, 17 α -Hydroxy-5 α -androstan-3-one (17 α , quasi-ax.) 7%, Dihydrotestosterone (17 β , quasi-eq.) 7%, Estrone (3, phenolic) 72%

参考文献

- 1) J.Goto, T.Nambara, *et al.*, *Anal. Chem. Acta*, 147, 397(1983).
- 2) J.Goto, T.Nambara, *et al.*, *J. Liquid. Chromatogr.*, 6, 1977(1983).
- 3) J.Goto, T.Nambara, *et al.*, *J. Chromatogr.*, 276, 289(1983).
- 4) M.Kudo, K.Tsuji, *et al.*, *J. Chromatogr.*, 287, 337(1984).
- 5) J.Goto, T.Nambara, *et al.*, *Anal. Sci.*, 2, 175(1986).
- 6) I.Kudo, S.Komatsu, *J.Chromatogr.*, 362, 61(1986).

5) 9-Anthroylnitrile OH基蛍光ラベル化用

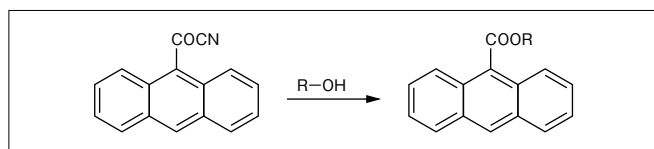
018-11771

検出：蛍光 (λ ex=360nm、 λ em=460nm)

プレカラム

官能基：アルコール性水酸基

反応例



6 α -ヒドロキシコルチゾールを内部標準として、尿中の6 β -ヒドロキシコルチゾールを抽出する。

抽出した試料に9-アントロイルシアニド100 μ gを含むアセトニトリル溶液(5%トルエチルアミン含有)10 μ lを加え、室温で1時間反応させる。液-液抽出で過剰の試薬を除去する。

残渣を酢酸エチル0.5mlに再溶解させ、その10 μ lをHPLCで分析する。

性質

赤橙色結晶、m.p.141~144 $^{\circ}$ C、1-Anthroyl Cyanideとほぼ同じ。比較のためいくつかの反応率(エステル化率)を示す。

Cortisol (21prim) 100%, Androsterone (3 α , axial) 0%, Lithocholate (3 α , eq.) 2%, Isoandrosterone (3 β , eq.) 3%, 11 α -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (11 α , eq.) 0%, 11 β -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (11 β , eq.) 0%, 17 α -Hydroxy-5 α -androstan-3-one (17 α , quasi-ax.) 0%, Dihydrotestosterone (17 β , puasi-eq.) 0%, Estrone (3, phenolic) 50%

参考文献

1-Anthroyl Cyanideに同じ

6) BCA Protein Assay Reagent

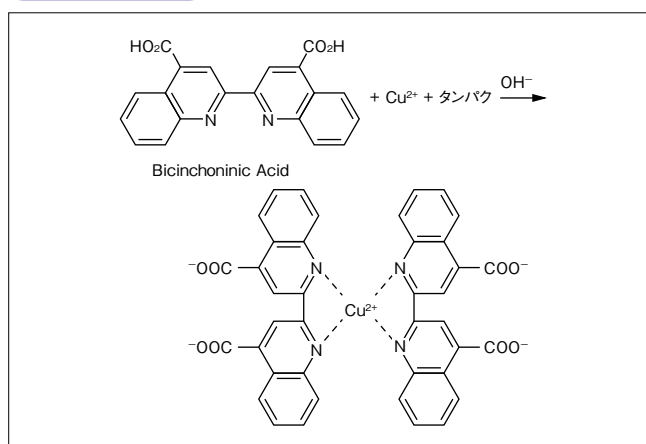
531-20721

検出：可視562nm

ポストカラム

官能基：タンパク質、ペプチド

反応例



タンパク質はアルカリ性Cu(II)と反応し、Cu(I)を生成する。BCAアッセイ試薬はCu(I)と反応し562nmに吸収を持つ強い紫色を呈する。

イオン交換、逆相クロマトグラフィーのポストカラムラベルに使用できる。イオン交換クロマトグラフィーに通常使用する、りん酸、トリス、酢酸いずれの緩衝液でも測定に影響はない。

また、逆相クロマトグラフィー時の0.1% TFA、55%までのアセトニトリルも影響はない。最高の感度を得るためには最低10メートルの反応コイルで60~90 $^{\circ}$ Cの反応が必要である。

性質

試薬A：炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、BCA検出用試薬、酒石酸ナトリウム(0.1M水酸化ナトリウム中)

試薬B：4%硫酸銅・五水塩

タンパク質を280nmで測定する通常の方法に比べて約60倍の高い感度が得られる。また、280nmで測定する方法に比べてタンパク質による吸光度のレスポンスが一定になるので、タンパク質種が変わってもより正確な測定が可能である。

参考文献

- 1) P.K.Smith, *et al.*, *Anal.Biochem.*, 150, 76(1985).

7) Bis(2,4-dinitrophenyl) Oxalate (DNPO)

028-07781

8) Bis[2-(3,6-dioxaoctyloxycarbonyl)-4-nitrophenyl]Oxalate (DOPO)

048-20101

9) Bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)-phenyl]Oxalate (TDPO)

204-09161

10) Bis(2,4,6-trichlorophenyl) Oxalate (TCPO)

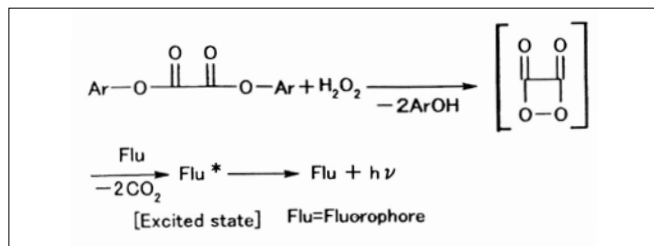
028-07421

検出：蛍光

ポストカラム

官能基：化学発光(H₂O₂を用いる)

反応例



H₂O₂と反応して、活性な中間体(1,2-dioxetandione)を生成する。その中間体は、蛍光物質を基底状態から励起状態へと励起する。生じた励起状態の蛍光物質は光の放出を伴って基底状態にもどる。

この化学発光反応を利用して、10fmolレベルのダンシルアミノ酸が分離定量され、従来の蛍光法に比べて1オーダー以上高感度化された。さらに今井らはDNPO-H₂O₂発光反応を利用したダンシルアミノ酸の定量法を開発し、フローインジェクション分析法に応用した。その時のダンシルアラニンの検出限界は5fmolである。

参考文献

- 1) S.Kobayashi, K.Imai, *Anal. Chem.*, 52, 424(1980).
- 2) K.Honda, J.Sekino, K.Imai, *Anal. Chem.*, 55, 940(1983).
- 3) S.Kobayashi, J.Sekino, K.Honda, K.Imai, *Anal. Biochem.*, 112, 99(1981).
- 4) 今井, 小林, 臨床化学, 9, 247(1980).
- 5) 今井一洋編集「生物発光と化学発光、基礎と実験」広川書店(1989).

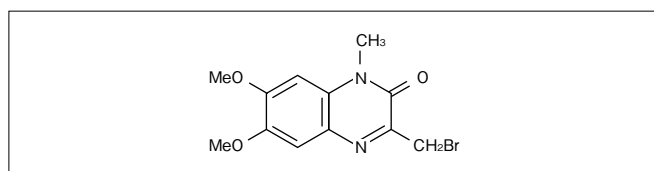
11) 3-Bromomethyl-6, 7-dimethoxy-1-methyl-1,2-dihydroquinoxaline-2-one (ⒹBr-DMEQ)

346-05511

検出：蛍光(λ_{ex}=370nm, λ_{em}=450nm)

プレカラム

官能基：カルボン酸



大倉(九大薬)、山口(福大薬)らによって合成された脂肪酸のHPLC用蛍光ラベル化剤である。

Br-DMEQは1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシベンゼン(DDB)とピルビン酸との反応で得られるキノキサリノン誘導体が強い蛍光(λ_{ex}=370nm, λ_{em}=450nm)を示すことに着目して創案された、新しいタイプの蛍光ラベル化剤である。脂肪酸などのラベル化はアセトニトリル中、18-クラウン-6と炭酸カリウムの存在下で安易に行える。

C₃~C₂₀の飽和脂肪酸をラベル化し、逆相系カラムで分離した時の検出限界は0.3~1fmol/5μlとの報告がある。

脂肪酸のラベル化剤としては極めて感度が高い。

参考文献

- 1) M.Yamaguchi, K.Fukuda, S.Hara, M.Nakamura, Y.Ohkura, *J.Chromatogr.*, 380, 257(1986).
- 2) M.Yamaguchi, M.Nakamura, N.Kuroda, Y.Ohkura, *Anal. Sci.*, 3, 75(1987).
- 3) M.Yamaguchi, O.Takehiro, S.Hara, M.Nakamura, Y.Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2263(1988).
- 4) Y.Ohkura, *Anal. Sci.*, 5, 371(1989).

- 5) K.Nakashima, M.Okamoto, K.Yoshida, N.Kuroda. *et al.*, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 584, 275(1920).
- 6) H.Kamimori, Y.Hamashima, M.Konishi, *Anal. Biochem.*, 218, 417(1994).

12) 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin (ⒹBr-Mmc)

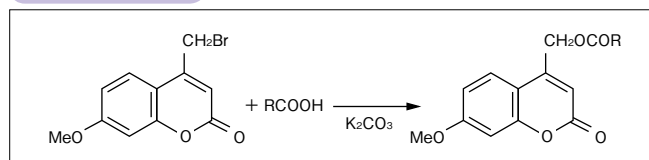
349-04021

検出：蛍光(λ_{ex}=360nm, λ_{em}=412nm)UV=332nm(ε=1.1×10⁴)

プレカラム

官能基：カルボン酸

反応例



試料3μmolを400μlのアセトンまたは酢酸エチルに溶かし、本品9μmolと炭酸カリウム粉末25mgを加える。1時間還流し反応させる。

直鎖、直鎖誘導基、側鎖、環状の飽和、不飽和脂肪酸類と反応するが、ピルビン酸、トリクロロ酢酸、フマル酸、マレイン酸、アセチレンジカルボン酸とは反応しない。

18-クラウン-6をエステル生成の触媒にすれば反応は速くなり、かつジカルボン酸もエステル化される。

性質

淡黄色結晶、m.p.206~209℃。水には溶けないが、アセトン、アルコールには溶ける。本品はK₂CO₃(縮合剤)共存下カルボキシル基を持つ有機酸と反応して青色の蛍光(λ_{ex}=360nm, λ_{em}=410nm)を発する。従って、脂肪あるいは含カルボン酸製剤中の微量カルボン酸はTLC検出、HPLC分離定量などに利用できる。

参考文献

- 1) J.C.Marr, L.M.McDowell, M.A.Quilliam, *Nat. Toxins*, 2, 302(1994).
- 2) R.Abushufa, P.Reed, C.Weinkove, *Clin.Chem.*, 40, 1707(1994).
- 3) M.Slebioda, K.Pazdro, J.Lewandowska, L.Falkowski, *Chem. Anal.*, 39, 439(1994).
- 4) T.Furuta, H.Torigai, M.Sugimoto, M.Iwamura, *J. Org. Chem.*, 60, 3953(1995).

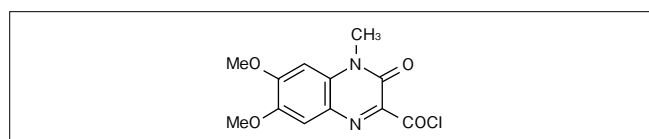
13) 3-Chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalin (ⒹDMEQ-COCl)

347-06141

検出：蛍光(λ_{ex}=400nm, λ_{em}=500nm)

プレカラム

官能基：アルコール(1級、2級)



性質

DMEQ-COClは有機溶媒(ベンゼン、アセトニトリルなど)中で1級、2級アルコールと容易に反応して高蛍光性の誘導体を生成する。蛍光波長はλ_{ex}=500nm(λ_{ex}=400nm)であり、乾燥状態、-20℃で保存すれば、かなり安定な

化合物である。Benzylalcohol, *n*-Hexanol, Cyclohexanolと反応してHPLC分析で2~3fmolまで検出している。1級、2級の水酸基を持つステロイドも蛍光誘導体を生成する。

参考文献

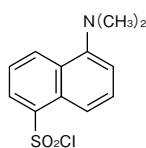
- 1) T.Iwata, M.Yamaguchi, S.Hara, M.Nakamura, *J. Chromatogr.*, 362, 209 (1986).
- 2) J.Ishida, M.Yamaguchi, M.Nakamura, *Anal. Biochem.*, 395, 168 (1991).
- 3) J.Ishida, M.Yamaguchi, M.Nakamura, *Anal. Biochem.*, 184, 86 (1990).
- 4) M.Shimizu, S.Yamada, *Bitamin*, 68, 15 (1994).

14) Dansyl Chloride

048-18251, 042-18254, 044-18253

性質

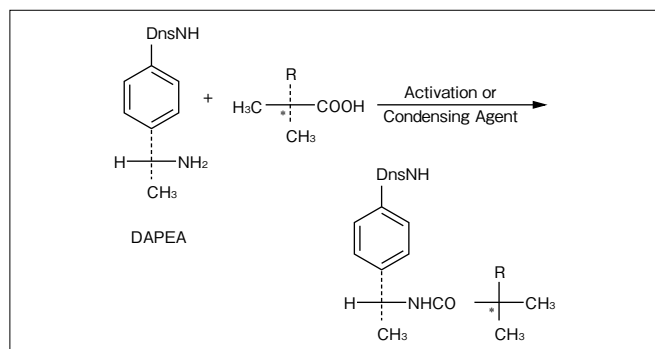
橙色の塊~結晶性粉末で、アセトンに溶けやすく、エタノールにやや溶けやすく、水にほとんど溶けない。



15) (S)-(-)-DAPEA

047-24691

本品は、蛍光団として汎用されているダンシル基を用いたカルボン酸類の光学分割試薬である。



誘導化操作法

試料(ラセミ体) アセトニトリル溶液 (0.1mg/ml) 100 μ l
 (s)-DAPEAアセトニトリル溶液 (2mM) 100 μ l
 TPPアセトニトリル溶液 (3mM) 100 μ l
 DPDSアセトニトリル溶液 (3mM) 100 μ l

室温3時間

※TPP: Triphenylphosphine, DPDS: 2,2'-Dipyridyl Disulfide

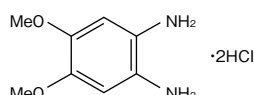
16) 1, 2-Diamino-4, 5-dimethoxybenzene, Dihydrochloride (DDB)

344-05551

検出: 蛍光 (λ ex=338nm, λ em=402nm)

プレカラム

官能基: 芳香族アルデヒド



性質

酸性条件下で芳香族アルデヒドと反応し、強い蛍光性物質を与えることから、ベンズアルデヒドなどの高感度蛍光試薬として用いられる。最近の研究によれば反応生成物は2-Aryl-5,6-dimethoxybenzimidazole構造であることも明らかにされている。DTANと同様に芳香族アルデヒドの検出試薬として広く利用できるかと期待されている。

参考文献

- 1) M.Nakamura, M.Toda, H.Saito, Y.Ohkura, *Anal. Chem. Acta.*, 134, 39 (1982).
- 2) M.Nakamura, M.Toda, N.Mihashi, M.Yamaguchi, Y.Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 2910 (1983).
- 3) S.Hara, M.Yamaguchi, Y.Takemori, M. Nakaura, *J. Chromatogr.*, 377, 111 (1986).
- 4) T.Iwata, S.Hara, M.Yamaguchi, M. Nakamura, Y. Ohkura. *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3499 (1985). (アスコルビン酸の分析)
- 5) H.Masui, A.B.P.Lever, E.S.Dodsworth, *Inorg. Chem.*, 32, 258 (1993).

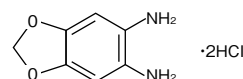
17) 1, 2-Diamino-4, 5-methylenedioxybenzene, dihydrochloride (MDB)

347-05541, 343-05543

検出: 蛍光 (λ ex=367nm, λ em=445nm)

プレカラム

官能基: α -ケト酸



性質

o-フェニレンジアミン(OPD)は α -ケト酸と反応してキノキサリノン誘導体を与え、蛍光を示す。原(福大薬)らは11種の芳香族ジアミン類についてピルビン酸との発蛍光反応を比較検討し、1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン(MDB)が反応性及び感度において優れていることを見出した。

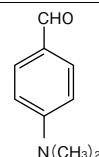
α -ケトグルタル酸、ピルビン酸、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸など10種類の α -ケト酸を良好に分離でき、そのHPLC検出限界は数fmol/10 μ lのオーダーに達している。MDBはOPDの150倍の感度を有している。

参考文献

- 1) B.K.Singh, B.Teacle, D.L.Shaner, *J. Liq. Chromatogr.*, 17, 4469 (1994).
- 2) A.P.Bishop, A.Mercedes, P.M.Gallop, M.L. Karnovsky, *Free Radical Biol. Med.*, 18, 617 (1995).

18) *p*-Dimethylaminobenzaldehyde

049-02632, 043-02635



性質

白~微黄色の結晶又は結晶性粉末で水に溶けにくく、エタノール及びジエチルエーテルにやや溶けやすい。うすい塩酸に溶ける。m.p.73~75 $^{\circ}$ C

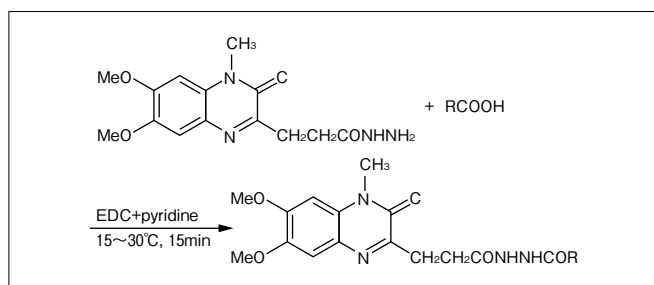
19) 6, 7-Dimethoxy-1-methyl-2 (1H) -quinoxalinone-3-propionohydrazide (DMEQ-Hydrazide)

049-23671

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=365\text{nm}$, $\lambda_{em}=447\text{nm}$)

プレカラム

官能基：カルボン酸



性 質

- 1) 含水試料中のカルボン酸のラベル化が可能
- 2) 長波長側での蛍光分析が可能
- 3) 温和な条件下、短時間でのラベル化が可能
- 4) fmolレベルで脂肪酸類を分析 (検出限界3~6fmol)

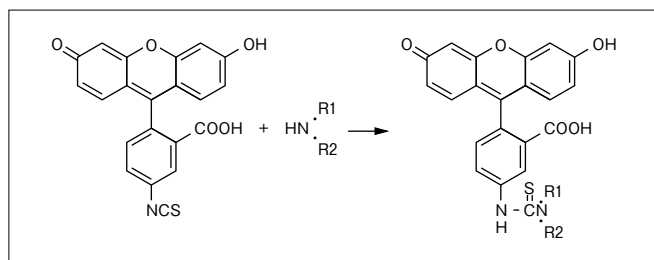
20) Fluorescein Isothiocyanate Isomer- I (FITC)

349-03661, 343-03664

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=495\text{nm}$, $\lambda_{em}=520\text{nm}$)

プレカラム

官能基：アミノ基



性 質

Fluorescein Isothiocyanate isomer- I (FITC、FTC) は、蛍光試薬Fluoresceinに親タンパク基であるNCSを結合させたもので、黄橙色結晶性粉末、水に溶けて強い黄緑色蛍光 ($\lambda_{ex}=495\text{nm}$, $\lambda_{em}=520\text{nm}$) を発する。密閉容器に遮光し湿気をささぎって冷所に保存する。

参考文献

- 1) 蛍光抗体法総説：川村明義ほか、臨床検査、17, 28(1973)。
- 2) H.Maeda, N.Ishida, H.Kawauchi, K.Tuzimura, *J. Biochem.*, 65, 777(1969)。
- 3) E.Grell, E.Lewitzki, *et al.*, *J. Fluoresc.*, 4, 251(1994)。
- 4) A.S.Abuelyaman, D.Hudig, S.L. Woodard, *et al.*, *Bioconjugate chem.*, 5, 400(1994)。

21) 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (FNBD-F)

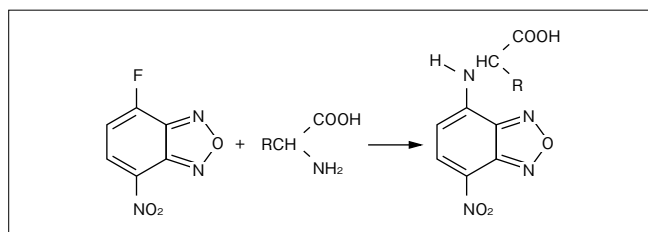
342-04751, 348-04753

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=470\text{nm}$, $\lambda_{em}=530\text{nm}$)

プレカラム

官能基：アミノ基

反応例



操作法

アミノ酸(数10pmolから数nmol)を含む試料水溶液10 μl を0.5mlのコニカルチューブに採り、これに0.1Mほう酸緩衝液(pH8.0)10 μl および80mM NBD-Fエタノール溶液20 μl を順次加え、密栓後、アルミホイルでコニカルチューブを覆って遮光し、60°Cの水浴上で一分間加熱する。直ちにコニカルチューブを氷水中に移し、これに0.005M塩酸460 μl を加える。この溶液の10 μl をHPLC用カラムに注入する。

性 質

第一、第二級アミン及びアミノ酸などと温和な条件下極めて反応性に富み(弱アルカリ性下、60°C、1分間)、発蛍光体は安定で、励起、蛍光波長が比較的長波長($\lambda_{ex}=470\text{nm}$, $\lambda_{em}=530\text{nm}$)の強い蛍光を発するが試薬自身は蛍光を持たない。HPLCにおけるアミン・アミノ酸の蛍光ラベル化剤として適している。

参考文献

- 1) H.Miyono, T.Toyooka, K.Imai, *Anal. Chem. Acta.*, 170, 81(1985)。
- 2) 鈴木博文, 藤原茂, 秋本恒一, 杉本功, 分析化学, 35, 283(1986)。
- 3) 渡辺訓行, 豊岡利正, 今井一洋, 日本分析化学会 第36年会, 1A03(1987)。
- 4) T.Toyooka, K.Imai, *J.Chromatogr.*, 420, 141(1987)。
- 5) H.Ruyters, S.van der Wal, *J. Liq. Chromatogr.*, 17, 1883(1994)。
- 6) C.G.Bradshaw, K.Ceszowski, G.Turcatti, *J. Med. Chem.*, 37, 1991(1994)。
- 7) E.Gazit, W.Lee, P.T.Brey, Y.Shai, *Biochemistry*, 33, 10681(1994)。
- 8) K.Yoshinaga, N.Kobayashi, Y.Nagatani, *et al.*, *Biomed. Chromatogr.*, 8, 297(1994)。
- 9) T.Fukushima, M.Kato, T.Santa, K.Imai, *Biomed. Chromatogr.*, 9, 10(1995)。
- 10) T.Fukushima, M.Kato, T.Santa, K.Imai, *Analyst*, 120, 381(1995)。

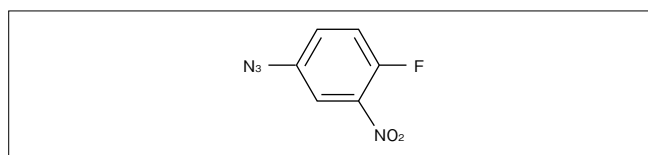
22) 4-Fluoro-3-nitrophenylazide (FNPA)

341-05321

検出：UV

プレカラム

官能基：チオール化合物



性 質

アジド基の光開裂によって生じるナイトレンを利用するフォトアフィニティーラベル化剤である。BissonらはFNPAを用いてチトクロムCオキシダーゼとの相互作用を調べている¹⁾。Starosらはアジド基がジチオスレイトールなどで容易に相当するアミンに還元されることに着目してチオール化合物をラベル化前の処理用スカベンジャーとして、非特異的ラベル化を減少させる考え方も示唆している²⁾。

参考文献

- 1) R.Bisson, A.Azzi, H.Gutweniger, R.Colonna, C. Montecucco, A.Zanotti, *J.Biol. Chem.*, 253, 1874(1978).
- 2) J.V.Staros, H.Bayley, D.N.Standring, J.R.Knowles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 568(1978).

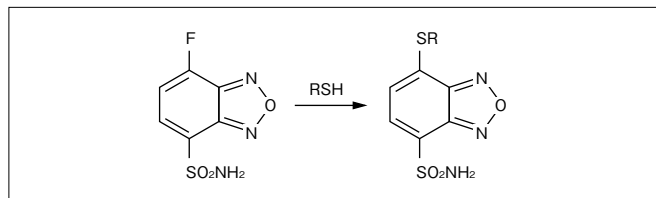
23) 4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan (ⒹABD-F)

341-05441, 347-05443

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=380\text{nm}$, $\lambda_{em}=510\text{nm}$)

プレカラム

官能基：チオール基



性質

今井(東大薬)らにより開発されたチオールの新しい蛍光ラベル化剤である。

ラベル化の速度はSBD-F (Ammonium-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate) に比べて30倍以上も速く、pH8.0で50℃にて5分以内に反応が終了する。しかし、この条件ではAlanine、Proline、Cystineとは反応しない。蛍光強度のpH依存症はpH2で最高となる。

HPLCでの分析ではプレラベル化したABD-チオール化合物は逆相にて分離、検出でき、検出限界(S/N=3)はCysteine、Glutathione、N-Acetylcysteine、Cysteamineでそれぞれ0.6、0.4、1.9、0.5pmolである。

参考文献

- 1) T.Toyooka, K.Imai, *Anal.Chem.*, 56, 2461(1984).
- 2) S.Takeda, G.Picard, M.Yamaki, K.Nagayama, *Trans.Mater. Res. Soc. Jpn.*, 15A 509(1994).
- 3) S.Takeda, M.Yamaki, S.Ebina, K.Nagayama, *J. Biochem.*, 117, 267(1995).

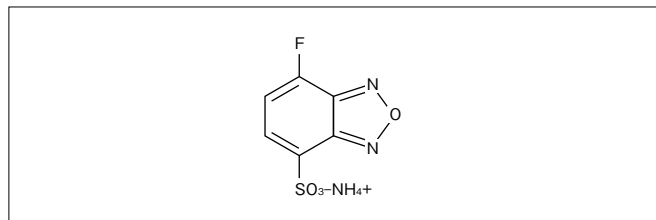
24) 4-Fluoro-7-sulfobenzofurazan, ammonium salt (ⒹSBD-F)

342-05111, 348-05113

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=385\text{nm}$, $\lambda_{em}=515\text{nm}$)

プレカラム

官能基：チオール基



性質

本品はチオール化合物と選択的に反応する水溶性の蛍光試薬で長期保存に耐え、生じた蛍光誘導体も安定であり長波長域に蛍光特性を有するなどの特長がある。

反応は0.1Mほう酸緩衝液(pH9.5)、1mM EDTA共存下にて、60℃で1時間行い、 $\lambda_{ex}=385\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=515\text{nm}$ で蛍光測定する。GSH、システム、N-アセチルシステイン、CoA、BSAなどの検出限界は100~500pmol/mlと高感度である⁵⁾。

HPLCのプレラベル化試薬として用いると血中GSH、血しょう中システインの簡易定量が可能である⁶⁾。

参考文献

- 1) K.Imai, T.Toyooka, Y.Watanabe, *Anal. Biochem.*, 128, 471(1983).
- 2) K.Imai, T.Toyooka, *J. Chromatogr.*, 282, 495(1983).
- 3) T.Toyooka, K.Imai, Y.Kawahara, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2, 473(1984).
- 4) T.Toyooka, K.Imai, *Analyst*, 109, 1003(1984).
- 5) T.Toyooka, S.Uchiyama, Y.Saito, K.Imai, *Anal. Chem. Acta.*, 205, 29(1988).
- 6) T.Toyooka, M.Ishibashi, Y.Takeda, et al., *J. Chromatogr.*, 588, 61(1991).
- 7) T.Sueyoshi, T.Miyata, S.Iwanaga, T.Toyooka, K. Imai, *J. Biochem.*, 97, 1181(1985).
- 8) P.B.Young, A.M.Molloy, J.M.Scott, D.G.Kennedy, *J. Liq. Chromatogr.*, 17, 3553(1994).

25) GITC (2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl Isothiocyanate)

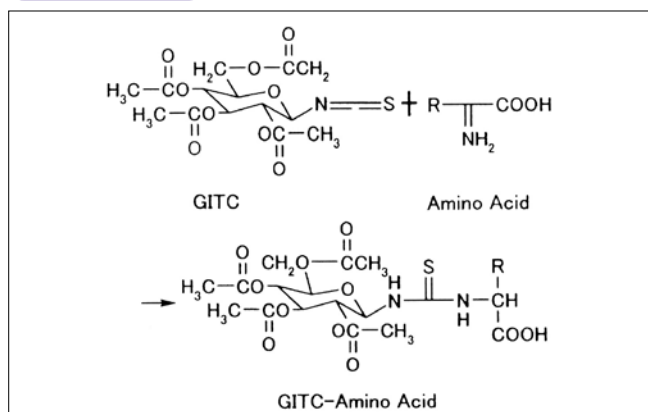
077-02751, 073-02753

検出：UV250nm

プレカラム

官能基：アミノ基

反応例



アミノ酸を、水/アセトニトリル=1/1溶媒(0.2%のトリメチルアミン含有)に0.5mg/mlの濃度で溶解し、その50μlを採る。これに0.2%GITCアセトニトリル溶液50μlを加え、室温で15分間放置後、2μlを直接HPLCに注入する。

性質

本品は白色～淡黄色の結晶性粉末で融点は113~116℃である。室温下、短時間で1級、2級アミン類と定量的に反応し、ジアステレオマーとしての尿素誘導体を生成する。この誘導体は逆相系液体クロマトグラフィーにより良く分離し、UV検出器で高感度に検出できる。アミノ酸をはじめ、カテコールアミン類、β-アミノアルコール類への応用が可能である。

参考文献

- 1) J.Gal, R.C.Murphy, *J. Liquid Chromatogr.*, 7, 2307(1984).
- 2) T.Kinoshita, Y.Kasahara, et al., *J. Chromatogr.*, 210, 77(1981).
- 3) N.Nimura, A.Toyama, et al., *J. Chromatogr.*, 316, 547(1984).
- 4) N.Nimura, H.Ogura, et al., *J. Chromatogr.*, 202, 375(1980).
- 5) N.Nimura, Y.Kasahara, et al., *J. Chromatogr.*, 213, 327(1981).
- 6) J.Gal, *J. Chromatogr.*, 307, 220(1984).
- 7) K.J.Miller, J.Gal, *J. Chromatogr.*, 307, 335(1984).
- 8) A.J.Sedman, J.Gal, *J. Chromatogr.*, 278, 199(1983).
- 9) J.Turgeon, M.Gilbert, et al., *J. Chromatogr.*, 337, 172(1985).
- 10) Y.Takahashi, Y.Imai, et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 35, 27(1989).

26) 2-(2,3-Naphthalimino) ethyl Trifluoromethanesulfonate (NE-OTf)

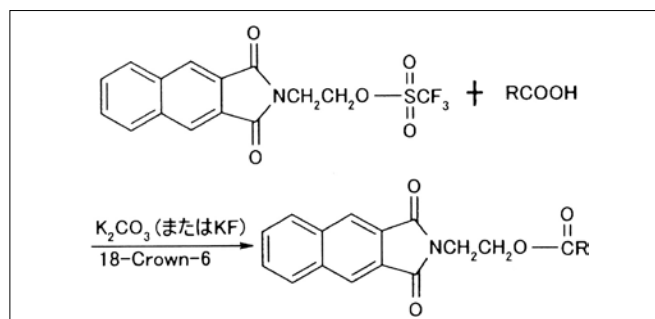
148-05911

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=259\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=394\text{nm}$)UV ($\lambda_{max}=259\text{nm}$ 、 $\epsilon \approx 6.2 \times 10^4$)

プレカラム

官能基：カルボン酸

反応例



反応容器に、アセトニトリルに溶解した脂肪酸試料 (0.5ml)、 10^{-3}M 18-Crown-6 (0.1ml)、および無水ふっ化カリウム (約5mg) を混合、攪拌の後、 10^{-3}M NE-OTf のアセトニトリル溶液 (0.1ml) を加えて室温で10分間攪拌しながら反応させる。

性質

- 1) 保存安定性：冷所で1年以上
調製後も -20°C で1週間 (アセトニトリル溶媒) 安定
- 2) 反応時間・温度：室温で10分以内
- 3) 試薬濃度反応収率：試料濃度 (10^{-5}M) の5倍以上
(NE-OTf/18-Crown-6=1/1) で100%
- 4) 検出限界
蛍光：4fmol ($\lambda_{ex}=259\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=394\text{nm}$)
UV：100fmol ($\lambda_{max}=259\text{nm}$ 、 $\epsilon \approx 6.2 \times 10^4$)

参考文献

- 1) Y.Yasaka, M.Tanaka, T.Shono, *J. Chromatogr.*, 508, 133(1990).

27) 9,10-Phenanthraquinone

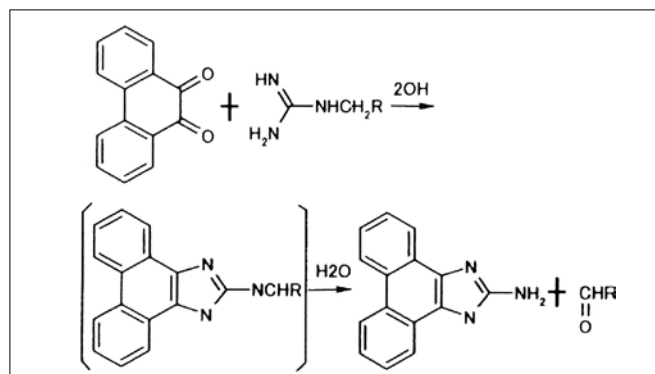
166-11301, 162-11303

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=310\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=390\text{nm}$)

プレカラム

官能基：グアニジノ化合物

反応例



操作法

試料0.5mlに0.1mM PhenanthraquinoneのDMF溶液1.5ml及び1M水酸化ナトリウム0.25mlを加え、室温で40~50分間反応させる。塩酸0.25mlと水2.5mlを加え

HPLC試料とする。

性質

橙黄色~かつ色の結晶~結晶性粉末、m.p.208~213°C

参考文献

- 1) *Anal.Chem.*, 53, 1658(1981).

28) o-Phthalaldehyde

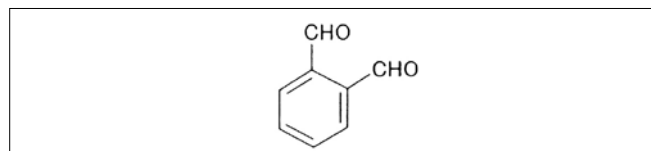
161-09261, 167-09263, 169-09262, 165-09264

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=340\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=455\text{nm}$)

ポストカラム

官能基：アミノ基

反応例



カラム溶出液に試薬 (800mg o-フタルアルデヒド、2.0ml 2-メルカプトエタノール、1.0g Brij/1.0L 0.4M) ほう酸緩衝液 (pH9.7) を加え蛍光測定する。

性質

微黄色~淡黄色の結晶性粉末。m.p.53~57°C、水、アルコール、エーテル、キシレン、ヘキサンに可溶。

参考文献

- 1) *J. Chromatogr.*, 204, 143(1981).

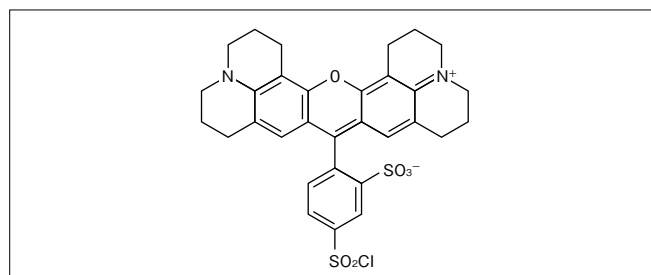
29) Sulforhodamine 101 Acid Chloride

345-05221

検出：蛍光 ($\lambda_{ex}=568\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=590\sim630\text{nm}$)

プレカラム

官能基：アミノ酸、タンパク質



性質

アミノ酸、タンパク質などの蛍光ラベル剤としては、現在FITCが最も広く用いられているが、より長波長側で蛍光のラベル化剤が必要とされる場合も少なくない。

本品は抗体、酵素などのタンパク質やアミノ酸に高収率で結合し強い赤色蛍光 ($\lambda_{ex}=568\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=590\sim630\text{nm}$) を発し、生体試料に含まれる蛍光物質の妨害を受けない。また、酵素などの活性を保持したままラベル化できるという利点を有する。

参考文献

- 1) J.A.Titus, R.Haugland, S.O.Sharrow, D.M. Segai, *J. Immunol. Method.*, 50, 193(1982).
- 2) S.Wiemann, J.Stegemann, D.Grothues, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 224, 117(1995).
- 3) H.Brismar, O.Trepte, B.Ulfhake, *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.*, 43, 699(1995).
- 4) R.J.Lowy, *J. Microsc.*, 178, 240(1995).