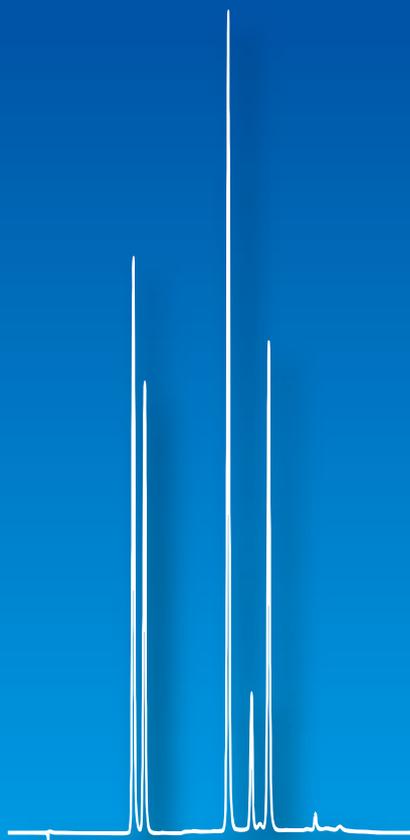


HPLC用ラベル化剤

HPLC Labeling Reagents



HPLC 用ラベル化剤

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は微量成分を検出・定量する手段として多用されています。そして、より高い感度化と選択性を得るため分析対象物質を検出方法に適したラベル化剤で標識することが行われており、多くのラベル化剤が報告されています。その中から優れたラベル化剤を厳選し、TCI-Ace シリーズといたしました。TCI-Ace シリーズの HPLC 用ラベル化剤は、いずれも高品質で、研究者の皆様に安心してご利用いただける製品です。

..... 検出法、適用官能基別 製品一覧

UV 検出

カルボキシ基用	製品コード	ページ
4-Bromophenacyl Bromide	A5501	4
9-Chloromethylanthracene	A5502	5
N-Chloromethyl-4-nitrophthalimide	A5503	6
N-Chloromethylphthalimide	A5504	7
3'-Methoxyphenacyl Bromide	A5505	8
N,N'-Diisopropyl-O-(4-nitrobenzyl)isourea	A5506	9
1-(4-Nitrobenzyl)-3-p-tolyltriazene	A5507	10
Phenacyl Bromide	A5508	11
アミノ基用		
3,5-Dinitrobenzoyl Chloride	A5511	12
2,4-Dinitrofluorobenzene	A5512	13
N ^α -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide	A5523	17
N ^α -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-D-leucinamide	A5524	17
Phenyl Isothiocyanate	A5513	14
N-Succinimidyl 4-Nitrophenylacetate	A5522	16
2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl Isothiocyanate	A5514	15
ヒドロキシ基用		
3,5-Dinitrobenzoyl Chloride	A5511	12
カルボニル基用		
2,4-Dinitrophenylhydrazine Hydrochloride	A5531	18
O-4-Nitrobenzylhydroxylamine Hydrochloride	A5532	19

蛍光検出

カルボキシ基用	製品コード	ページ
AABD-SH	A5576	42
Br-Mmc	A5551	20
4-Bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin	A5570	38
3-Bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one	A5553	22
9-Chloromethylanthracene	A5502	5
(R)-(-)-DBD-APy	A5561	29
(S)-(+)-DBD-APy	A5560	28
DBD-ED	A5574	40
DBD-PZ	A5555	24
(R)-(-)-NBD-APy	A5563	31
(S)-(+)-NBD-APy	A5562	30
NBD-CO-Hz	A5573	39
NBD-PZ	A5554	23

アミノ基用

DBD-COCl	A5558	27
DBD-F	A5595	50
DBD-NCS	A5575	41
(R)-(+)-DBD-Pro-COCl	A5565	33
(S)-(-)-DBD-Pro-COCl	A5564	32
(R)-(-)-DBD-Py-NCS	A5568	36
(S)-(+)-DBD-Py-NCS	A5569	37
4-(4,5-Diphenyl-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)benzoyl Chloride Hydrochloride	A5579	45
NBD-Cl	A5592	48
NBD-F	A5593	49
(R)-(+)-NBD-Pro-COCl	A5566	34
(S)-(-)-NBD-Pro-COCl	A5567	35
(R)-(-)-NBD-Py-NCS	A5577	43
(S)-(+)-NBD-Py-NCS	A5578	44

ヒドロキシ基用

DBD-COCl	A5558	27
(R)-(+)-DBD-Pro-COCl	A5565	33
(S)-(-)-DBD-Pro-COCl	A5564	32
4-(4,5-Diphenyl-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)benzoyl Chloride Hydrochloride	A5579	45
(R)-(+)-NBD-Pro-COCl	A5566	34
(S)-(-)-NBD-Pro-COCl	A5567	35

カルボニル基用

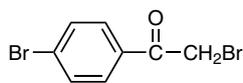
1,3-Cyclohexanedione	A5581	46
Dansyl Hydrazine	A5552	21
DBD-H	A5556	25
NBD-H	A5557	26

チオール基用

DBD-COCl	A5558	27
DBD-F	A5595	50
(R)-(-)-DBD-Py-NCS	A5568	36
(S)-(+)-DBD-Py-NCS	A5569	37
NAM	A5591	47
NBD-Cl	A5592	48
NBD-F	A5593	49
DAABD-Cl	A5596	51

4-Bromophenacyl Bromide

5g [A5501]



[A5501]

A5501はブromoアセチル基を有するHPLC用ラベル化剤で、脱酸剤の存在下、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

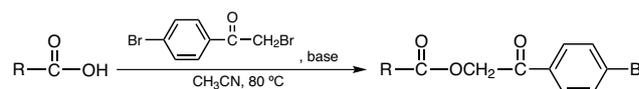
[脂肪酸] 1, 2, 8, 9)

試料をメタノールまたは水に溶解し、水酸化カリウム/クラウンエーテルのメタノール溶液中で中和する。減圧下、蒸発乾固すると、通常はほとんど白色の固体（脂肪酸カリウム塩）が残る。次に、ラベル化剤**A5501**/18-クラウン6-エーテルのアセトニトリル溶液^{*)}を加え、更にアセトニトリルを加えて全量を10 mLにする。80 °Cで15分間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。

^{*)}アセトニトリルに代えベンゼンを使用してもよい。ラベル化剤**A5501**と18-クラウン6-エーテルの混合割合（モル比）は、試料の脂肪酸濃度が0.5~20 mMの場合は20:1、0.5 mM以下では10:1に調製し、過剰に用いる。

[その他]

ジカルボン酸²⁾、合成プロスタグランジン³⁾、不飽和脂肪酸⁴⁾、メチルホスホン酸アルキル⁵⁾、 ganglioside⁶⁾、ペタイン⁷⁾

文献 1) H. D. Durst, *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1797.2) E. Grushka, *J. Chromatogr.* **1975**, 112, 673.3) F. A. Fitzpatrick, *Anal. Chem.* **1976**, 48, 499.4) 鈴木義仁, 武内次夫, 日本学術振興会炭化水素化学第116委員会業績報告 **1976**, 29, 152.5) P. C. Bossle, J. J. Martin, E. W. Sarver, H. Z. Sommer, *J. Chromatogr.* **1983**, 267, 209.6) H. Nakabayashi, M. Iwamori, Y. Nagai, *J. Biochem.* **1984**, 96, 977.7) S. Konosu, A. Shinagawa, K. Yamaguchi, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisher.* **1986**, 52, 869.8) M. Alberghina, A. Fiumara, L. Pavone, A. M. Giuffrida, *Neurochem. Res.* **1984**, 9, 1719.9) 木原和子, 六鹿宗治, 波多野博行, 分析化学 **1984**, 33, 647.

Chromatogram of fatty acids as 4-bromophenacyl esters

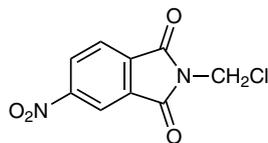


Column : Kaseisorb LC C₁-60-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 80 / 20
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Lauric Acid
 2. Myristic Acid
 3. Palmitic Acid
 4. Stearic Acid
 5. Arachidic Acid

N-Chloromethyl-4-nitrophthalimide

1g / 5g [A5503]



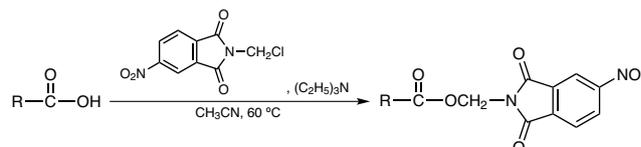
[A5503]

A5503はクロロメチル基を有するHPLC用ラベル化剤で、脱酸剤の存在下、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。UV検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

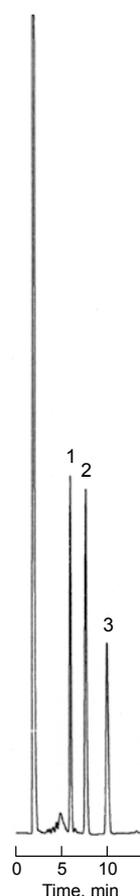
[脂肪酸]^{1,2)}

試料 3 mgをアセトニトリル 1 mLに溶解し、ラベル化剤 **A5503** (11 mg/mL)およびトリエチルアミン(5 mg/mL)のアセトニトリル溶液を各々 1 mL加える。密栓し、60 °Cで1時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。カルボン酸のアルカリ金属塩とクラウンエーテルを使用する場合は、60 °C、15分間の反応でエステル化反応が終了する。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。



- 文献 1) W. Lindner, *J. Chromatogr.* **1979**, 176, 55.
2) W. Lindner, *J. Chromatogr.* **1980**, 198, 367.

Chromatogram of fatty acids as (4-nitrophthalimido)methyl esters

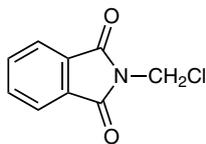


Column : Kaseisorb LC ODS-300-5
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 85 / 15
Detection : UV 230 nm
Flow Rate : 1 mL / min

1. Pentadecanoic Acid
2. Palmitic Acid
3. Margaric Acid

N-Chloromethylphthalimide

5g [A5504]



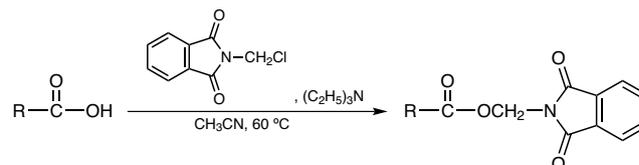
[A5504]

A5504はクロロメチル基を有するHPLC用ラベル化剤で、脱酸剤の存在下、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

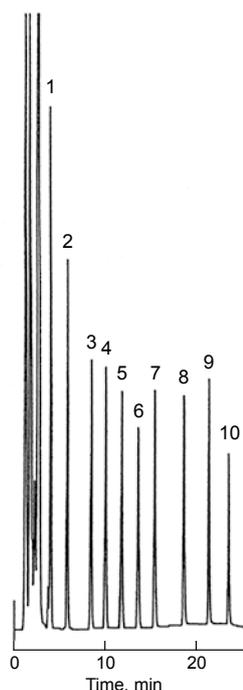
[脂肪酸]¹⁾

試料 3 mgをアセトニトリル 1 mLに溶解し、ラベル化剤 **A5504** (10 mg/mL)およびトリエチルアミン(5 mg/mL)のアセトニトリル溶液を各々 1 mL加える。密栓し、60 °Cで1時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。アルカリ金属塩とクラウンエーテルを使用する場合は、60 °C、5分間の反応でエステル化反応が終了する。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。



文献 1) W. Lindner, *J. Chromatogr.* **1979**, 176, 55.

Chromatogram of fatty acids as phthalimidomethyl esters

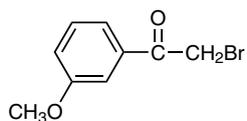


Column : Kaseisorb LC C₈-60-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 70 / 30 → 100 / 0
 20 min linear gradient
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. *n*-Caproic Acid
2. *n*-Caprylic Acid
3. *n*-Capric Acid
4. *n*-Undecanoic Acid
5. Lauric Acid
6. *n*-Tridecanoic Acid
7. Myristic Acid
8. Palmitic Acid
9. Stearic Acid
10. Arachidic Acid

3'-Methoxyphenacyl Bromide

5g [A5505]



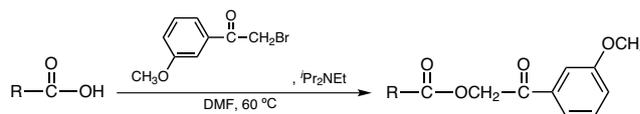
[A5505]

A5505はブロモアセチル基を有するHPLC用ラベル化剤で、脱酸剤の存在下、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

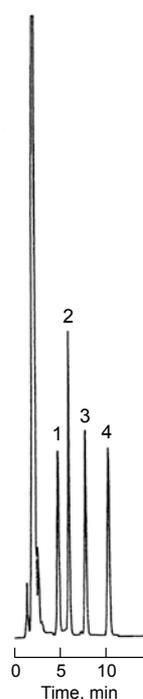
[脂肪酸]^{1~3)}

試料 4 mgをジメチルホルムアミド(DMF) 1 mLに溶解し、ラベル化剤**A5505** 10 mgを溶解したDMF 1 mLおよび*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン 10 mgを溶解したDMF 2 mLを加え密栓し、60 °Cで1時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。



- 文献 1) R. A. Miller, N. E. Bussell, C. Ricketts, *J. Liquid Chromatogr.* **1978**, *1*, 291.
 2) N. E. Bussell, R. A. Miller, *J. Liquid Chromatogr.* **1979**, *2*, 697.
 3) N. E. Bussell, A. Gross, R. A. Miller, *J. Liquid Chromatogr.* **1979**, *2*, 1337.

Chromatogram of fatty acids as 3'-methoxyphenacyl esters

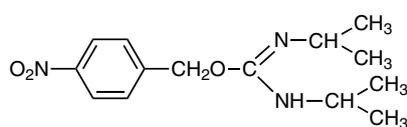


Column : Kaseisorb LC C₈-60-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 90 / 10
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Linolenic Acid
2. Linolic Acid
3. Oleic Acid
4. Stearic Acid

N,N'-Diisopropyl-O-(4-nitrobenzyl)isourea

1g [A5506]



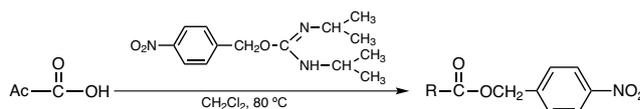
[A5506]

A5506は触媒、活性化剤などを用いることなく、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

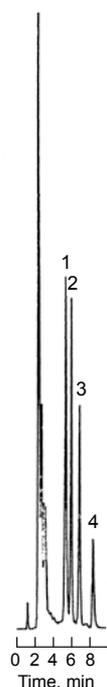
[脂肪酸]¹⁾

試料 5 mgを塩化メチレン 1 mLに溶解し、ラベル化剤 **A5506** 20 mgを溶解した塩化メチレン 2 mLを加え、密栓し、80 °Cで2時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。



- 文献 1) D. R. Knapp, S. Krueger, *Anal. Lett.* **1975**, 8, 603.
 2) B. Sbaikh, N. J. Pontzer, J. E. Molina, M. I. Kelsey, *Anal. Biochem.* **1978**, 85, 47.
 3) S. Okuyama, D. Uemura, Y. Hirata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 124.
 4) R. Badoud, G. Pratz, *J. Chromatogr.* **1986**, 360, 119.

Chromatogram of fatty acids as 4-nitrobenzyl esters

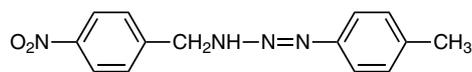


Column : Kaseisorb LC C₁-60-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 75 / 25
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Linolenic Acid
2. Linolic Acid
3. Oleic Acid
4. Stearic Acid

1-(4-Nitrobenzyl)-3-*p*-tolyltriazene

1g [A5507]



[A5507]

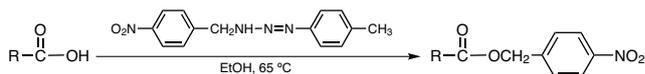
A5507は触媒、活性化剤などを用いることなく、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

[脂肪酸]¹⁾

試料 2~3 mgにエタノール 3 mL、ラベル化剤**A5507** 50 mgを加える。65 °Cで1時間反応させる(反応中に窒素ガスが発生するため、容器は完全に密栓しないで行う)。次に、密栓し室温まで冷却する。適当な溶媒で希釈し、HPLC試料とする。未反応のラベル化剤と副生成物の

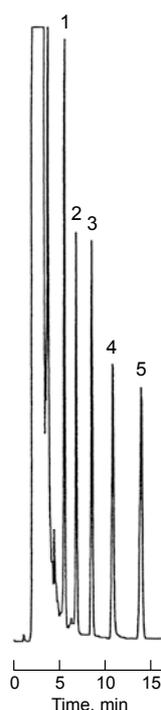
-トルイジンを除く必要がある場合には、反応後、窒素気流下低温で溶媒を留去し、残留物をエーテル 2~3 mLに溶解し、希塩酸と水で洗浄する。



[その他]

胆汁酸のHPLC^{2, 3)}文献 1) Regis. Chem. Co., *Regis Lab. Notes*, August 1974, No.16.関連文献: I. R. Politzer, *Anal. Lett.* 1973, 6, 539.; *Org. Synth.* 1968, 48, 102; *Org. Synth. Collect.* 1973, 5, 797.2) S. Okuyama, D. Uemura, Y. Hirata, *Chem. Lett.* 1976, 679.3) B. Shaikh, N. J. Ponzer, J. E. Molina, M. I. Kelsey, *Anal. Biochem.* 1978, 85, 47.

Chromatogram of fatty acids as 4-nitrobenzyl esters

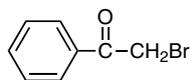


Column : Kaseisorb LC ODS-100-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 90 / 10
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. *n*-Capric Acid
2. *n*-Undecanoic Acid
3. Lauric Acid
4. *n*-Tridecanoic Acid
5. Myristic Acid

Phenacyl Bromide

5g [A5508]



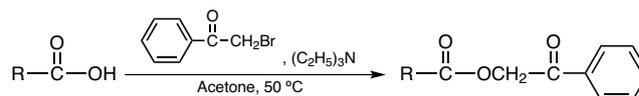
[A5508]

A5508はブromoアセチル基を有するHPLC用ラベル化剤で、脱酸剤の存在下、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

[脂肪酸]¹⁾

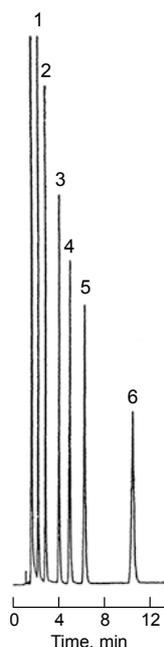
試料約100 μg、ラベル化剤**A5508**のアセトン溶液(12 mg/mL) 10 μL、トリエチルアミンのアセトン溶液(10 mg/mL) 10 μLを混合し、50 °Cで2時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。



[その他]

胆汁酸²⁾、脂肪酸³⁾、ワイン中のカルボン酸⁴⁾文献 1) R. F. Borch, *Anal. Chem.* **1975**, 47, 2437.2) F. Stellaard, *Anal. Biochem.* **1978**, 87, 359.3) 木原和子, 六鹿宗治, 波多野博行, *分析化学* **1984**, 33, 647.4) E. Mentasti, M. C. Gennaro, C. Sarzanini, C. Baiocchi, M. Savigliano, *J. Chromatogr.* **1985**, 322, 177.

Chromatogram of fatty acids as phenacyl esters

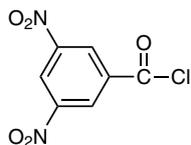


Column : Kaseisorb LC ODS-100-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 90 / 10
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Caproic Acid
2. Caprylic Acid
3. Capric Acid
4. Undecanoic Acid
5. Lauric Acid
6. Myristic Acid

3,5-Dinitrobenzoyl Chloride

5g [A5511]



[A5511]

A5511はHPLC用ラベル化剤で、水酸基やアミノ基と速やかに反応し、エステルおよびアミドを形成する。このエステルやアミドは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

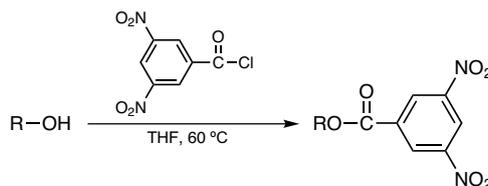
[アルコール]¹⁾

試料 1~5 mgをテトラヒドロフラン 5 mLに溶かし、ラベル化剤**A5511** 40 mg、ピリジン 2~3滴を加える。密栓し、60 °Cで1時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。

反応中に発生する塩酸を除去するためにピリジンまたはトリエチルアミンを添加した場合、カラム注入前にクリーンアップすることを勧める。一般的な方法は溶媒を留去し、エーテル抽出し、エーテル層を希塩酸と水で洗浄する。シリカゲルによるHPLCでは、溶離液は2-メチルヘプタンが良い。

[その他]

ポリエチレングリコール中のモノおよびジエチレングリコールの分析²⁾、脂肪族アルコール³⁾



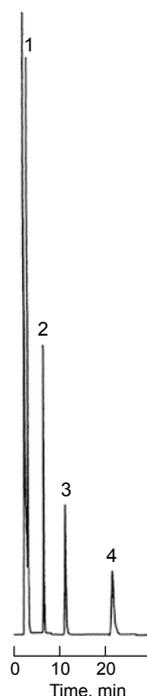
文献 1) T. H. Jupille, *Am. Lab.* **1976**, 8, 85.

2) M. A. Carey, H. E. Persinger, *J. Chromatogr. Sci.* **1972**, 10, 537.

3) 鈴木義仁, 土屋典子, *分析化学* **1981**, 30, 240.

4) L. J. Elrod, L. B. White, S. G. Spanton, D. G. Stroz, P. J. Cugier, L. A. Luka, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1786.

Chromatogram of alcohols as 3,5-dinitrobenzoic acid esters

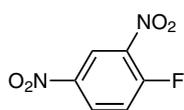


Column : Kaseisorb LC ODS-300-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 55 / 45
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Ethylene glycol
 2. Ethanol
 3. Propanol
 4. Butanol

2,4-Dinitrofluorobenzene

5g / 25g [A5512]



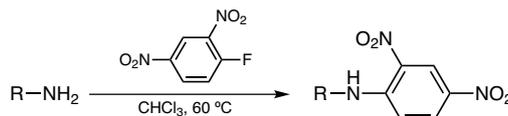
[A5512]

A5512はアミノ基と速やかに反応し、2,4-ジニトロフェニルアミンを生成する。生成物は安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

[アミン類]

試料 (遊離塩基アミン) 10 mg、クロロホルム 1 mL、ラベル化剤**A5512** (試料の10倍モル) を混合する。密栓し、60 °Cで1時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。アミノ酸の誘導体化にも用いられる^{1, 2)}。



[その他]

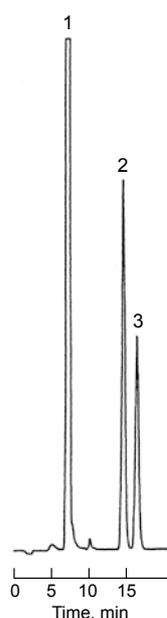
アミノグリコシド³⁾

文献 1) 鈴木義仁, 第6回液体クロマトグラフィー討論会講演要旨集 (1985年10月), p.71.

2) S. A. Cockle, H. Kaplan, M. A. Hefford, N. M. Young, 1st High-Perform. Liq. Chromatogr. Proteins Pept., Proc. Int. Symp. **1983**, 103.

3) D. M. Barends, J. S. Blauw, C. W. Mijnsbergen, C. J. L. R. Govers, A. Hulshoff, *J. Chromatogr.* **1985**, 322, 321.

Chromatogram of alkylamines as 2,4-dinitrophenyl derivatives

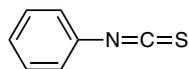


Column : Kaseisorb LC C₄-60-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 45 / 55
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Labeling Reagent
 2. Diethylamine
 3. Propylamine

Phenyl Isothiocyanate

5mL [A5513]



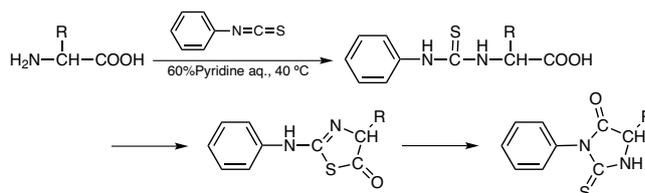
[A5513]

A5513はイソチオシアノ基を有するHPLC用ラベル化剤で、アミノ基と速やかに反応してチオ尿素を形成し、さらに酸で処理することによりフェニルチオヒダントイン(PTH)を形成する。この生成物は安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。269 nmでUV検出することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

[アミノ酸、ペプチド]

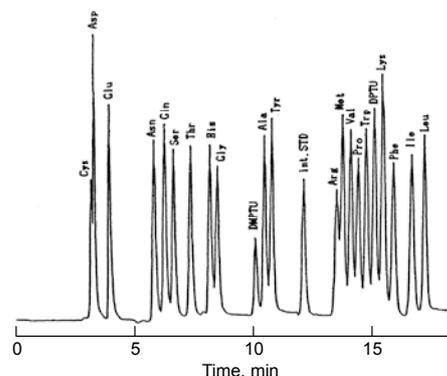
試料 1.5 μmolを、ラベル化剤 **A5513** 15 mgを含む60%ピリジン水溶液 1 mLに溶解し、40 °Cで1時間反応させる。室温に冷却後、水 1 mLで希釈し、ベンゼン(2 mL×4)で過量の試薬を抽出除去する。水層を減圧で蒸発乾固し、水酸化ナトリウムを入れたデシケーター中で乾燥する。次に、3N塩酸と60%酢酸の等量混合液 1.5 mLを加え、窒素気流下40 °Cで30分間加水分解を行う。室温に冷却後、水 2 mLで希釈し、酢酸エチル 2 mL、次にベンゼン 2 mLでPTH誘導体を抽出する。抽出液を合わせてHPLC試料とする。



文献

- 1) P. Edman, G. Begg, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *1*, 80.
- 2) V. M. Stepanov, *Anal. Biochem.* **1971**, *43*, 209.
- 3) G. Frank, W. Strubert, *Chromatographia* **1973**, *6*, 522.
- 4) A. P. Graffeo, *Anal. Lett.* **1973**, *6*, 505.
- 5) A. Hagg, K. Langern, *Chromatographia* **1974**, *7*, 659.
- 6) A. P. Graffeo, B. L. Karger, in *Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis*, ed. by R. N. Perham, Academic Press, London, New York, San Francisco, **1975**, p.111.
- 7) Z. Deyl, *J. Chromatogr.* **1976**, *127*, 91.
- 8) M. R. Downing, K. G. Mann, *Anal. Biochem.* **1976**, *74*, 298.
- 9) C. Z. Zimmerman, E. Appella, J. J. Pisano, *Anal. Biochem.* **1976**, *75*, 77.
- 10) F. Trefz, O. J. Byrd, M. E. Blaskovics, W. Kochen, P. Lutz, *Clin. Chem. Acta* **1976**, *73*, 431.
- 11) F. G. Wing-Kin, E. Grushka, *J. Chromatogr.* **1977**, *142*, 299.
- 12) E. J. Kikta, E. Grushka, *J. Chromatogr.* **1977**, *135*, 367.
- 13) C. Z. Zimmerman, E. Appella, J. J. Pisano, *Anal. Biochem.* **1977**, *77*, 569.
- 14) W. T. Butler, J. E. Finch, E. J. Miller, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 639.
- 15) M. N. Margolies, A. Brauer, *J. Chromatogr.* **1978**, *148*, 447.
- 16) M. Abrahamsson, K. Gröningsson, S. Castensson, *J. Chromatogr.* **1978**, *154*, 313.
- 17) J. Elion, M. Downing, K. Mann, *J. Chromatogr.* **1978**, *155*, 436.
- 18) A. S. Bhowan, J. E. Mole, W. L. Holloway, C. Bennett, *J. Chromatogr.* **1978**, *156*, 35.
- 19) R. L. Heinrikson, S. C. Meredith, *Anal. Biochem.* **1984**, *136*, 65.
- 20) J. J. L'Italien, S. B. H. Kent, *J. Chromatogr.* **1984**, *283*, 149.
- 21) R. R. Granberg, *LC, Liq. Chromatogr. HPLC Mag.* **1984**, *2*, 776.
- 22) B. A. Bidlingmeyer, S. A. Cohen, T. L. Tarvin, *J. Chromatogr.* **1984**, *336*, 93.
- 23) D. L. Christie, R. M. Hill, K. Isakow, P. M. Barling, *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 92.
- 24) S. A. Cohen, B. A. Bidlingmeyer, T. L. Tarvin, *Nature (London)* **1986**, *320*, 769.
- 25) L. E. Lavi, J. S. Holcenberg, D. E. Cole, J. Jolivent, *J. Chromatogr.* **1986**, *377*, 155.
- 26) D. Lanneluc-Sanson, C. T. Phan, R. L. Granger, *Anal. Biochem.* **1986**, *155*, 322.
- 27) V. Semensi, M. Sugumaran, *LC-GC* **1986**, *4*, 1108.
- 28) A. Lilova, T. Kleinschmidt, P. Nedkov, G. Braunitzer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1986**, *367*, 1055.

Chromatogram of amino acids as PTH derivatives



Column : Kaseisorb LC C₈-60-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×300 mm
 Mobile Phase : A ;CH₃CN
 : B ;40 mM CH₃COONa
 : C ;H₂O
 Temperature : 40 °C
 Detection : UV 269 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

Time(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	36	20	44
3	42	20	38
4	45	25	30
5	50	30	20
9	52	30	18
12	65	5	30
13	36	20	44

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl Isothiocyanate 100mg / 1g [A5514] (= GITC)



A5514は糖とイソチオシアノ基を有する光学純度測定用HPLC用ラベル化剤で、アミノ基と速やかに反応し、チオ尿素誘導体を形成する。この誘導体は安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。また、アミノ基を有する化合物が光学活性化合物である場合、エナンチオマーは良好な分離を示す。

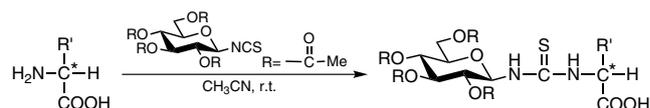
応用例

[アミノ酸]¹⁾

アミノ酸 5 mgを0.4% (W/V) トリエチルアミンを含む50% (V/V) アセトニトリル水溶液に溶解し、全量を10 mLにする。この溶液 50 μ Lに、ラベル化剤**A5514**の0.2% (W/V) アセトニトリル溶液 50 μ Lを加えて、室温で30分間反応させたものをHPLC試料とする。

[その他]

プロプラノロール²⁾、トリメトキノール³⁾

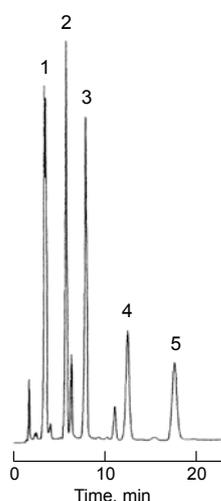


文献 1) T. Kinoshita, Y. Kasahara, N. Nimura, *J. Chromatogr.* **1981**, 210, 77.

2) A. J. Sedman, J. Gal, *J. Chromatogr.* **1983**, 278, 199.

3) H. Nishi, N. Fujimura, H. Yamaguchi, T. Fukuyama, *J. Chromatogr.* **1991**, 539, 71.

Chromatogram of thiourea derivatives formed from amino acids with GITC

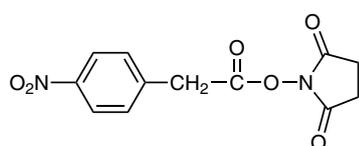


Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : 10 mM Phosphate buffer / Methanol = 45 / 55 (pH 3.0)
 Temperature : 25 °C
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Aspartic Acid
2. L-Valine
3. D-Valine
4. L-Tryptophan
5. D-Tryptophan

N-Succinimidyl 4-Nitrophenylacetate

1g [A5522]



[A5522]

A5522はスクシンイミジル基を有するHPLC用ラベル化剤で、アミノ基と速やかに反応し、アセトアミドを形成する。この生成物は安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

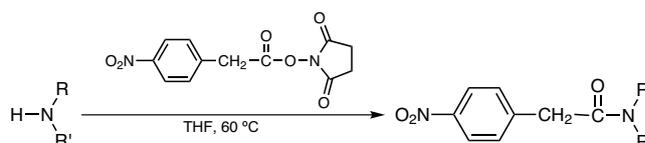
応用例

[アミン類]

試料 (遊離アミン) 1~5 mg、テトラヒドロフラン 5 mL、ラベル化剤 **A5522** 50 mg を混合する。密栓し、60 °C で1時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。反応液から未反応のラベル化剤、および副生成物のN-ヒドロキシスクシンイミドを除去する必要がある場合は、窒素気流下低温で溶媒を留去する。残留物をエーテル 2~3 mL に溶解し、希炭酸水素ナトリウム溶液、水で洗浄する。シリカゲルによるHPLCでは、溶媒にはヘプタン-クロロホルム-メタノール(85:14:1)が適している。

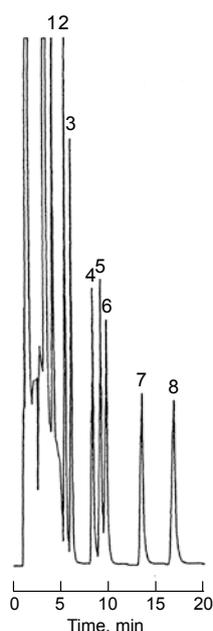
[その他]

覚せい剤 (アンフェタミン、メタンフェタミン) ¹⁾



文献 1) T. H. Jupille, *Am. Lab.* 1976, 8, 85.

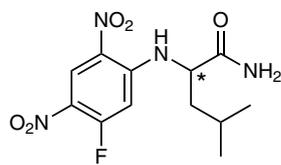
Chromatogram of alkylamines as 4-nitrophenylacetamides



Column : Kaseisorb LC ODS-100-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃OH / H₂O = 60 / 40
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Propylamine
2. Diethylamine
3. Butylamine
4. Ethylpropylamine
5. Isoamylamine
6. Amylamine
7. Dipropylamine
8. Hexylamine

N^{α} -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide (= L-FDLA) 100mg [A5523]
 N^{α} -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-D-leucinamide (= D-FDLA) 100mg / 1g [A5524]



L-form [A5523]
 D-form [A5524]

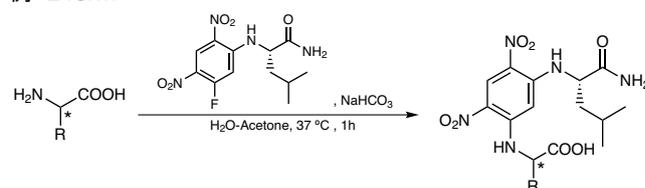
A5523および**A5524**は光学純度測定用HPLC用ラベル化剤で、アミノ基と速やかに反応する。アミノ酸のエナンチオマーを良好に分離することができ、**A5523**と**A5524**を共に用いることにより非経験的にアミノ酸の絶対配置を決定することもできる。また、LC-MSを用いることにより、容易に高感度な分析が可能となる。[検出限界 5 pmol(ESI LC-MS)]

応用例

[アミノ酸]²⁾

50 mMのアミノ酸水溶液 50 μ Lに、1 M炭酸水素ナトリウム 20 μ Lおよび**A5523**または**A5524**の1%アセトン溶液 100 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間加温放置する。反応液に1 N塩酸 20 μ Lを加え冷却し、アセトニトリルで希釈しLC-MS試料とする。

例: L-form



文献 1) K. Fujii, Y. Ikai, H. Oka, M. Suzuki, K.-I. Harada, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 5146.

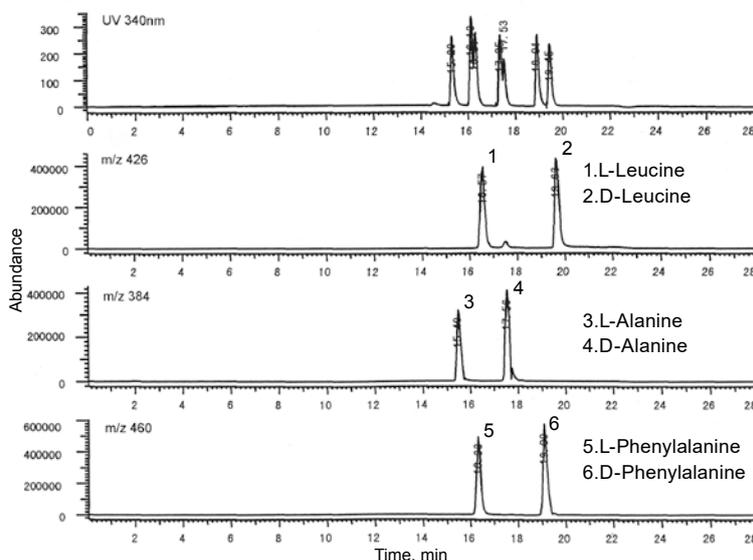
2) K. Fujii, Y. Ikai, T. Mayumi, H. Oka, M. Suzuki, K.-I. Harada, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 346.

Chromatogram of amino acids as L-FDLA derivatives

Column : Kaseisorb LC ODS 2000
 Column Size : 2.0 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : A- 20 mM Ammonium Acetate (pH 4)
 B- Methanol

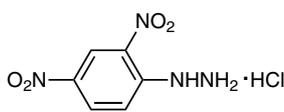
Time(min)	A(%)	B(%)
0	90	10
4	50	50
20	0	100
23	0	100

 Temperature : 40 $^{\circ}$ C
 Flow Rate : 0.2 mL / min
 Instrument : Hitachi M-8000 LC/3DQ MS
 Ionization Method : ESI-AD



2,4-Dinitrophenylhydrazine Hydrochloride

5g [A5531]



[A5531]

A5531はヒドラジノ基を有するHPLC用ラベル化剤で、カルボニル基と速やかに反応し、ヒドラゾンを形成する。このヒドラゾンは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

[アルデヒド]

試料 1 mg、ラベル化剤**A5531** 1 mg、メタノール 1 mL、1 N塩酸 0.5 mLを混合する。密栓し、40 °Cで10分間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。

[ケト酸]^{1,2)}

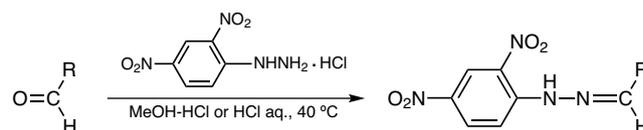
試料を2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの希塩酸溶液(500 μmol/2 N塩酸100 mL) 1 mLに溶解し、30 °Cで約30分間反応させる。(ケトモノカルボン酸は5分間、ケトジカルボン酸は約20分間で反応は終わる。)ラベル化剤は4倍モル過量になるように加えるのがよい。ヒドラゾンは酢酸エチルで抽出できる。

[尿、血漿中の17-ケトステロイド類]^{3,4)}

試料をメタノールに溶解し、濃塩酸 3~4滴で酸性にする。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンのメタノール溶液(0.2%)を過量に加え、50 °Cで5分間反応させる。

[その他]

脂肪族カルボニル化合物^{5,6)}、脂肪族アルデヒド^{7~9)}



文献 1) H. Katsuki, *Anal. Biochem.* **1968**, 24, 112.

2) N. Ariga, *Anal. Biochem.* **1972**, 49, 436.

3) F. A. Fitzpatrick, *Anal. Chem.* **1972**, 44, 2211.

4) R. A. Henry, *J. Chromatogr. Sci.* **1971**, 9, 513.

5) M. A. Carey, H. E. Persinger, *J. Chromatogr. Sci.* **1972**, 10, 537.

6) L. J. Papa, L. P. Turner, *J. Chromatogr. Sci.* **1972**, 10, 747.

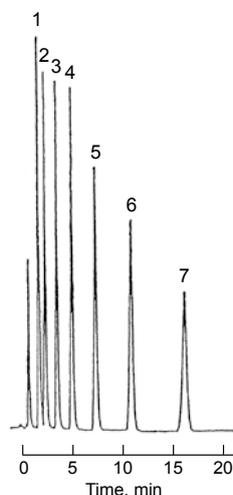
7) 鈴木義仁, 丸山昌英, *分析化学* **1979**, 28, 671.

8) 谷和江, 鈴木義仁, *分析化学* **1985**, 34, 717.

9) 上堀美智子, 桑田一弘, 山崎良明, *大阪府公害監視センター所報* **1982**, 5, 27.

Chromatogram of aldehydes as 2,4-dinitrophenylhydrazones

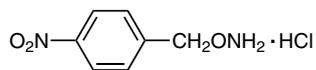
Column : Kaseisorb LC ODS-60-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 70 / 30
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min



1. Formaline
2. Acetaldehyde
3. Propionaldehyde
4. Butyraldehyde
5. Valeraldehyde
6. Capronaldehyde
7. Heptylaldehyde

O-4-Nitrobenzylhydroxylamine Hydrochloride

1g / 5g [A5532]



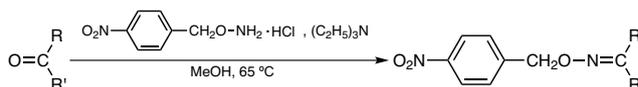
[A5532]

A5532はヒドロキシルアミンを有するHPLC用ラベル化剤で、カルボニル基と速やかに反応し、オキシムを形成する。このオキシムは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。一般的なUV検出で利用されている254 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

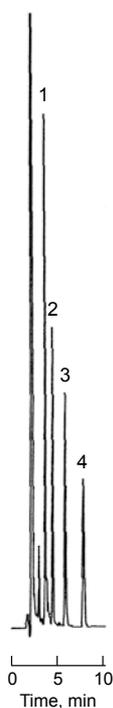
[アルデヒド]

試料 1~5 mg、メタノール 4 mL、トリエチルアミン 2滴、ラベル化剤 **A5532** 40 mg を混合する。密栓し、65 °C で1時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。カラム注入前に、未反応のラベル化剤とトリエチルアミンを除去する必要がある場合には、窒素気流下低温で溶媒を留去し、残留物をエーテル 2~3 mL に溶解し、希塩酸と水で洗浄する。



文献 1) T. H. Jupille, *Am. Lab.* **1976**, 8, 85.

Chromatogram of aldehydes as 4-nitrobenzylloximes

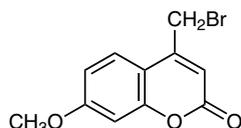


Column : Kaseisorb LC ODS-300-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 60 / 40
 Detection : UV 254 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Propionaldehyde
2. Butyraldehyde
3. Valeraldehyde
4. Capronaldehyde

Br-Mmc (= 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin)

1g / 5g [A5551]



[A5551]

A5551はブロモメチル基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、脱酸剤の存在下、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。クマリン骨格に起因する蛍光を有しており、 λ_{ex} 328 nm、 λ_{em} 380 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

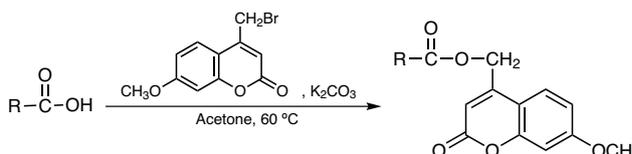
応用例

[脂肪酸]¹⁾

試料 0.01 gをアセトン 5 mLに溶解し、ラベル化剤**A5551** 0.05 gと炭酸カリウム粉末 0.5 gを加える。密栓して、60 °Cで1時間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。

[その他]

カルボン酸²⁾、脂肪酸³⁾、ジカルボン酸⁴⁾、プロスタグランジン⁵⁾、胆汁酸⁶⁾、パルピタール⁷⁾



文献 1) W. Düniges, *Anal. Chem.* **1977**, 49, 442.

2) S. Lam, E. Grushka, *J. Chromatogr.* **1978**, 158, 207.

3) S. G. Zelenski, J. W. Huber, *Chromatographia* **1978**, 11, 645.

4) E. Grushka, *Anal. Chem.* **1978**, 50, 1398.

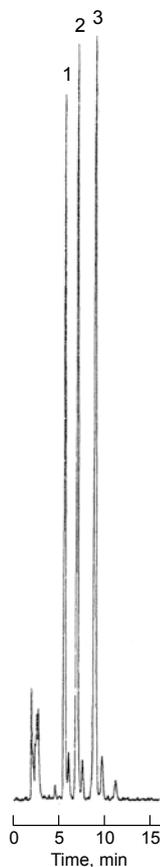
5) J. Turk, *Prostaglandins* **1978**, 16, 291.

6) S. Okuyama, *Chem. Lett.* **1979**, 461.

7) W. Düniges, N. Seiler, *J. Chromatogr.* **1978**, 145, 483.

8) M. L. Grayeski, K. D. Joseph, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1203.

Chromatogram of fatty acids as methoxycoumarinylmethyl esters

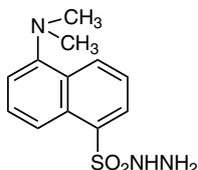


Column : Kaseisorb LC ODS-100-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 85 / 15
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 328 nm
 λ_{em} 380 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Pelargonic Acid
2. Capric Acid
3. Undecanoic Acid

Dansyl Hydrazine

1g / 5g [A5552]



[A5552]

A5552はヒドラジノ基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、カルボニル基と速やかに反応し、ヒドラゾンを形成する。このヒドラゾンは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 340 nm、 λ_{em} 525 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

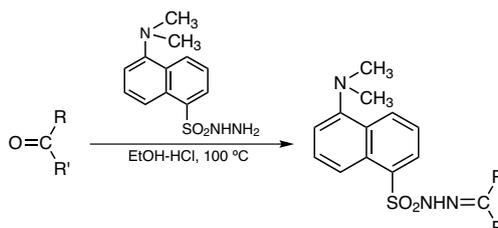
応用例

[ケトステロイド]^{1~4)}

乾燥試料、アルコール性塩酸(濃塩酸 0.65 mL/エタノール 1L) 0.2 mL、ラベル化剤**A5552**のアルコール溶液(2 mg/mL) 0.2 mLを混合し、沸とう水浴上で10分間反応させる。冷却下、ピルビン酸ナトリウムのアルコール溶液(5 mg/mL) 0.2 mLを加えて、過剰のラベル化剤を分解する。室温に15分間放置後、エーテル 6 mLと0.5 N水酸化ナトリウム 3 mLを加えて振り混ぜる。分取したエーテル溶液を蒸発乾固し、残留物にクロロホルム 0.2~0.5 mLを加えて溶解し、HPLC試料とする。

[その他]

体液中ヒドロコルチゾン^{3,4)}・還元糖・血清尿中のステロイド⁵⁾



文献 1) R. Chayen, R. Dvir, S. Gould, A. Harell, *Anal. Biochem.* **1971**, 42, 283.

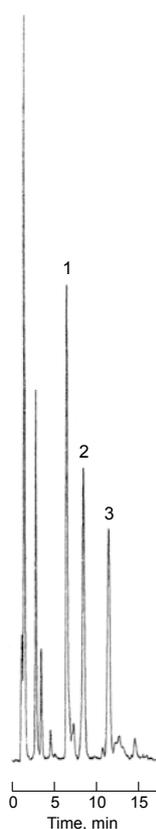
2) C. Apter, R. Chayen, S. Gould, A. Harell, *Clin. Chim. Acta* **1972**, 42, 115.

3) T. Kawasaki, M. Maeda, A. Tsuji, *J. Chromatogr.* **1979**, 163, 143.

4) T. J. Goehl, G. M. Sundaresan, V. K. Prasad, *J. Pharm. Sci.* **1979**, 68, 1374.

5) T. Kawasaki, M. Maeda, A. Tsuji, *J. Chromatogr.* **1981**, 226, 1.

Chromatogram of aldehydes as dansyl hydrazones

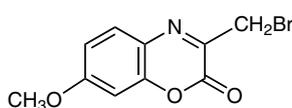


Column : Kaseisorb LC ODS-100-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 65 / 35
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 340 nm
 λ_{em} 525 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Valeraldehyde
 2. Capronaldehyde
 3. Enanthic Aldehyde

3-Bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one

100mg / 1g [A5553]



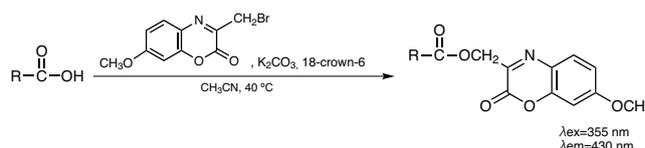
[A5553]

A5553はブロモメチル基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、脱酸剤の存在下、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 355 nm、 λ_{em} 430 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

〔脂肪酸〕¹⁾

脂肪酸 0.2~10 nmolのアセトニトリル溶液 0.5 mLに1.0 mMのラベル化剤**A5553**を含むアセトニトリル溶液 0.1 mLを加え、更に18-クラウン6-エーテルを5.7 mM含む炭酸カリウム飽和アセトニトリル溶液 0.5 mLを加え40 °Cで30分間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。



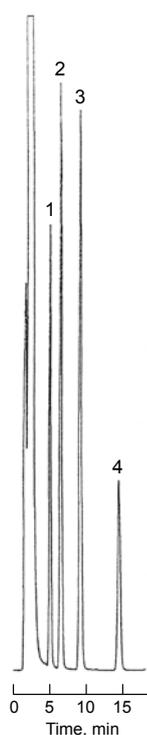
λ_{ex} =355 nm
 λ_{em} =430 nm

- 文献 1) H. Naganuma, A. Nakanishi, J. Kondo, K. Watanabe, Y. Kawahara, *Sankyo Kenkyusho Nempo* **1988**, 40, 51.
2) 中西昭雄, 長沼英夫, 近藤淳一, 渡部佳子, 川原幸則, 日本薬学会109年会講演要旨集 6TA, 2-1.
3) A. Nakanishi, H. Naganuma, J. Kondo, K. Watanabe, K. Hirano, T. Kawasaki, Y. Kawahara, *J. Chromatogr.* **1992**, 591, 159.

Chromatogram of fatty acids as 7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one-3-methyl esters

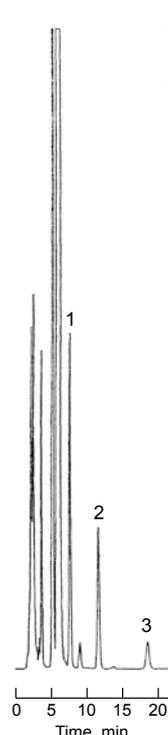
Column : Kaseisorb LC ODS-120-5
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 95 / 5
Temperature : 30 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 355 nm
 λ_{em} 430 nm
Flow Rate : 1 mL / min

1. Linolenic Acid
2. Linolic Acid
3. Oleic Acid
4. Stearic Acid



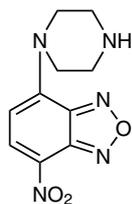
Column : Kaseisorb LC ODS-120-5
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 50 / 50
Temperature : 25 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 355 nm
 λ_{em} 430 nm
Flow Rate : 1 mL / min

1. Butyric Acid (C₄)
2. Valeric Acid (C₅)
3. Caproic Acid (C₆)



NBD-PZ (= 4-Nitro-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole)

100mg [A5554]



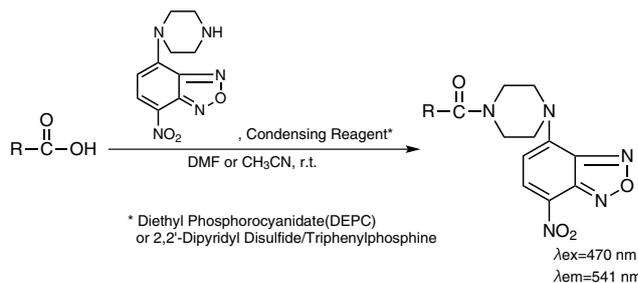
[A5554]

A5554は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とピペラジノ基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、縮合剤の存在下、カルボキシ基と室温で速やかに反応し、アミドを形成する。 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 541 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくい。また、レーザー蛍光検出により高感度分析が可能である。

応用例

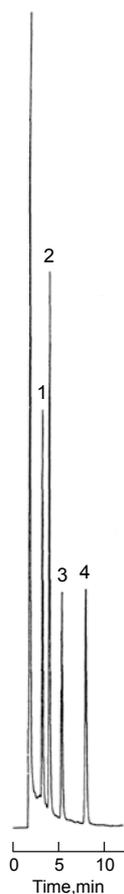
[脂肪酸]¹⁾

褐色のバイアルに10 mMのラベル化剤**A5554**／ジメチルホルムアミドまたはアセトニトリル溶液 0.2 mLを加える。さらに脂肪酸(10 μ M)を含む140 mM DEPCまたは70 mM 2,2'-ジピリジルジスルフィド／トリフェニルホスフィンジメチルホルムアミド溶液 0.2 mLを加え、室温で6時間反応させHPLC試料とする。



文献 1) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, Y. Takeda, K. Nakashima, S. Akiyama, S. Uzu, K. Imai, *J. Chromatogr.* **1991**, 588, 61.

Chromatogram of fatty acids as NBD-PZ derivatives



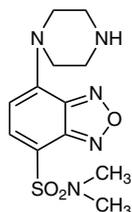
Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN
 Temperature : 25 °C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 541 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Linolenic Acid
2. Linolic Acid
3. Oleic Acid
4. Stearic Acid

DBD-PZ

100mg [A5555]

[= 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole]



[A5555]

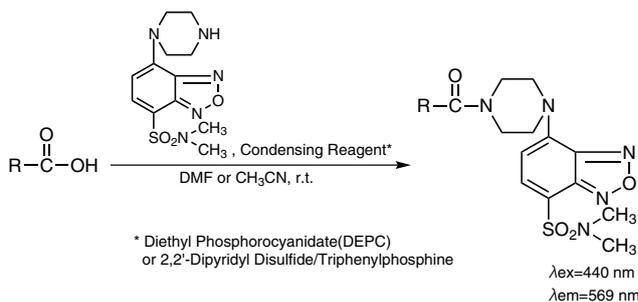
A5555は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とピペラジノ基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、縮合剤の存在下、カルボキシ基と室温で速やかに反応し、アミドを形成する。 λ_{ex} 440 nm、 λ_{em} 569 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくく、シュウ酸エステル-過酸化水素を用いた化学発光による高感度分析が可能である¹⁾。

応用例

[脂肪酸]²⁾

褐色のバイアルに10 mMのラベル化剤**A5555**/ジメチルホルムアミドまたはアセトニトリル溶液 0.2 mLを加える。さらに脂肪酸(10 μ M)を含む140 mM DEPCまたは70 mM 2,2'-ジピリジルジスルフィド/トリフェニルホスフィンのジメチルホルムアミド溶液 0.2 mLを加え、室温で6時間反応させHPLC試料とする。

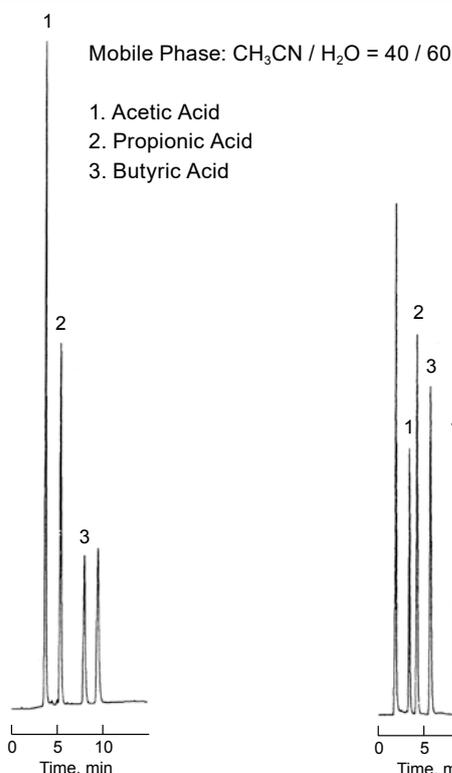
検出限界(S/N=3)は、例えば飽和脂肪酸(C₁₃~C₂₄)では3.2~4.7 fmolである。



文献 1) S. Uzu, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama, *Biomed. Chromatogr.* **1991**, 5, 184.

2) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, Y. Takeda, K. Nakashima, S. Akiyama, S. Uzu, K. Imai, *J. Chromatogr.* **1991**, 588, 61.

Chromatogram of fatty acids as DBD-PZ derivatives

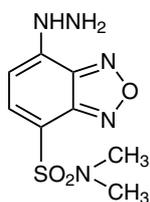


Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Temperature : 25 °C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 440 nm
 λ_{em} 569 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

DBD-H

100mg [A5556]

[= 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole]



[A5556]

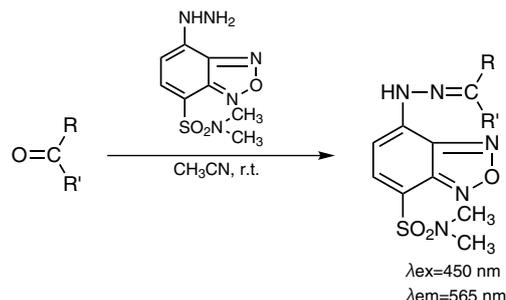
A5556は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とヒドラジノ基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、カルボニル基と室温で速やかに反応し、ヒドラゾン形成する。このヒドラゾンは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 450 nm、 λ_{em} 565 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくい。また、強い蛍光を有しており、高感度分析が可能である。

応用例

[アルデヒド-ケトン]¹⁾

250 μ Mのラベル化剤**A5556**と1.7 μ Mのプロピオンアルデヒドを0.025%TFAを含むアセトニトリルに加え、室温で30分間反応させHPLC試料とする。

検出限界は、例えばプロピオンアルデヒドでは120 fmolである。



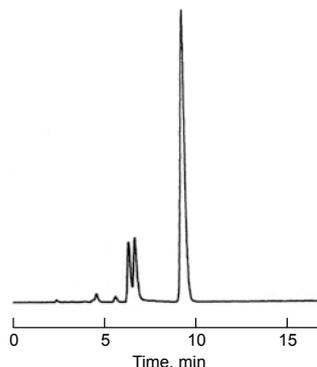
文献 1) S. Uzu, S. Kanda, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama, *Analyst* **1990**, *115*, 1477.

Chromatogram of aldehydes and ketones as DBD-H derivatives

Column : Kaseisorb LC ODS Super
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Temperature : 25 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 450 nm
 λ_{em} 565 nm
Flow Rate : 1 mL / min

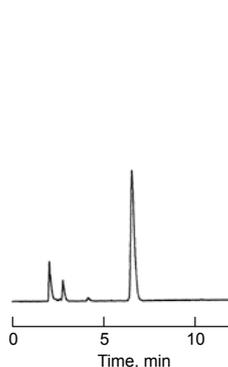
Mobile Phase
: CH₃CN / 0.05% TFA in H₂O = 45 / 55

Propionaldehyde



Mobile Phase
: CH₃CN / 0.05% TFA in H₂O = 70 / 30

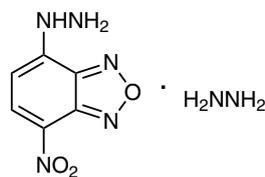
Heptan-2-one



NBD-H

100mg [A5557]

[= 4-Hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole Hydrazine]



[A5557]

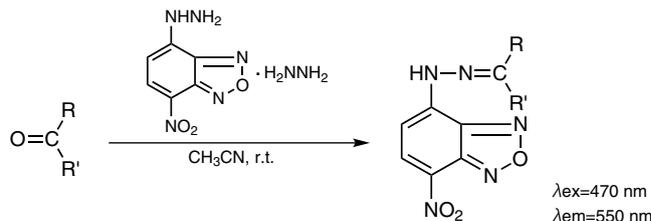
A5557は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とヒドラジノ基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、カルボニル基と室温で速やかに反応し、ヒドラゾンを形成する。このヒドラゾンは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 550 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくく、試薬自身は無蛍光である。また、反応性が高く高感度分析が可能である。

応用例

[アルデヒド-ケトン]¹⁾

250 μ Mのラベル化剤**A5557**と1.7 μ Mのプロピオンアルデヒドを0.025%TFAを含むアセトニトリルに加え、室温で1時間反応させHPLC試料とする。

検出限界は、例えばプロピオンアルデヒドで35 fmolである。

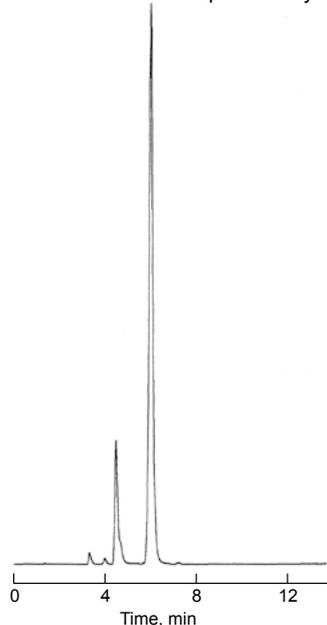


文献 1) S. Uzu, S. Kanda, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama, *Analyst* **1990**, 115, 1477.

Chromatogram of aldehydes and ketones as NBD-H derivatives

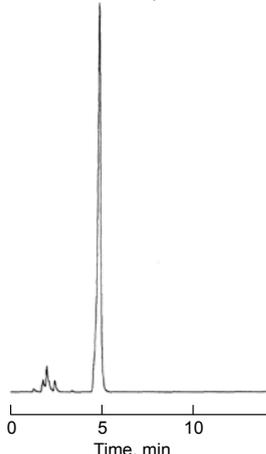
Mobile Phase
: CH₃CN / 0.05% TFA in H₂O = 50 / 50

Propionaldehyde



Mobile Phase
: CH₃CN / 0.05% TFA in H₂O = 75 / 25

Heptan-2-one



Column : Kaseisorb LC ODS Super
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Temperature : 30 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 550 nm
Flow Rate : 1 mL / min

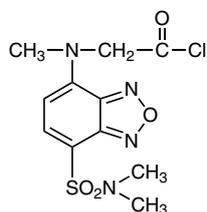
蛍光検出ラベル化剤

アルコール、アミン、チオール用

DBD-COCl

100mg [A5558]

[= 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-(*N*-chloroformylmethyl-*N*-methylamino)-2,1,3-benzoxadiazole]



[A5558]

A5558はHPLC用蛍光ラベル化剤で、多くの求核性官能基と温和な条件で反応する。以下にその代表例を示す。

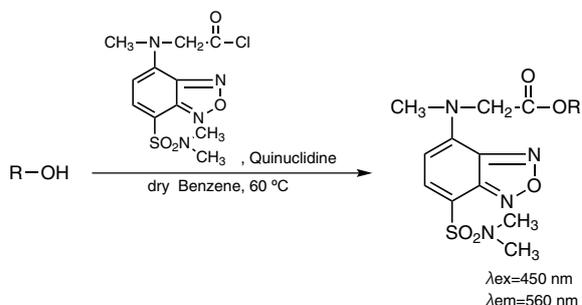
それらの生成物は安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

官能基	代表例	反応条件	波長(nm)		検出限界(fmole)
			ex	em	
アルコール	アンドロステロン	60 °C, 30 min	443	546	38
α-オキシ酸	マンデル酸	60 °C, 15 min	442	551	125
フェノール	エストロン	60 °C, 15 min	440	543	40
アミン	ベンジルアミン	室温または 60 °C, 15 min	445	555	89
芳香族アミン	フェネチジン	60 °C, 15 min	443	553	56
チオール	2-メルカプト- <i>N</i> -(2-ナフチル)-アセトアミド	室温	437	544	103

応用例

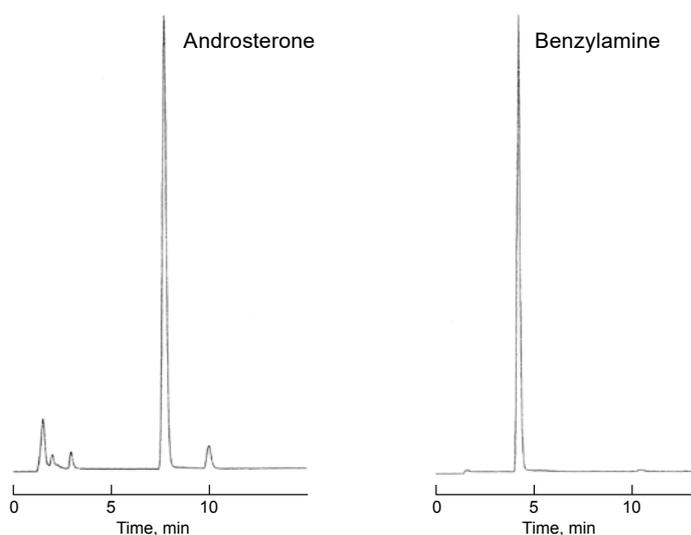
25 mMのラベル化剤**A5558**/無水ベンゼン溶液 10 μLと0.5 mMのアンドロステロン/無水ベンゼン溶液 (0.5 mMキヌクリジンを含む) 10 μLを混合する。密栓後、60 °Cで30分間反応させる。1%酢酸を含む50%アセトニトリル水溶液 980 μLで反応を停止後、HPLC試料とする。

一級アルコールの場合、キヌクリジンが不要のときもある。



- 文献 1) K. Imai, T. Fukushima, H. Yokosu, *Biomed. Chromatogr.* **1994**, 8, 107.
2) 東京化成工業株式会社, 特開平7-238075

Chromatogram of alcohol and amine as DBD-COCl derivatives

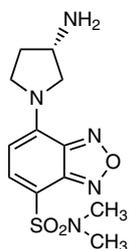


Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 50 / 50
 Temperature : 40 °C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 450 nm
 λ_{em} 560 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

(S)-(+)-DBD-APy

100mg [A5560]

[= (S)-(+)-4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-(3-aminopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]



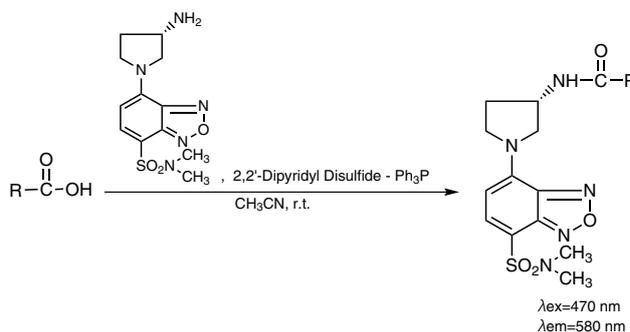
[A5560]

A5560は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とアミノ基を有する光学活性なHPLC用蛍光ラベル化剤で、カルボン酸類の光学純度測定に用いられる。光学活性カルボン酸のラベル化は向山-Corey法などの温和な方法が利用でき、ラセミ化を起こすことなくジアステレオマーを生成する。このジアステレオマーは逆相系で分離することができ、 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 580 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくい。シウ酸エステル／過酸化水素を用いた化学発光による高感度分析も可能である。

応用例

バイアルに10 mMラベル化剤**A5560**／アセトニトリル溶液 0.1 mL、2 μ Mカルボン酸／アセトニトリル溶液 0.25 mL、10 mM 2,2'-ジピリジルジスルフィドートリフェニルホスフィン／アセトニトリル溶液 0.15 mLを加え、室温で4時間反応させHPLC試料とする。

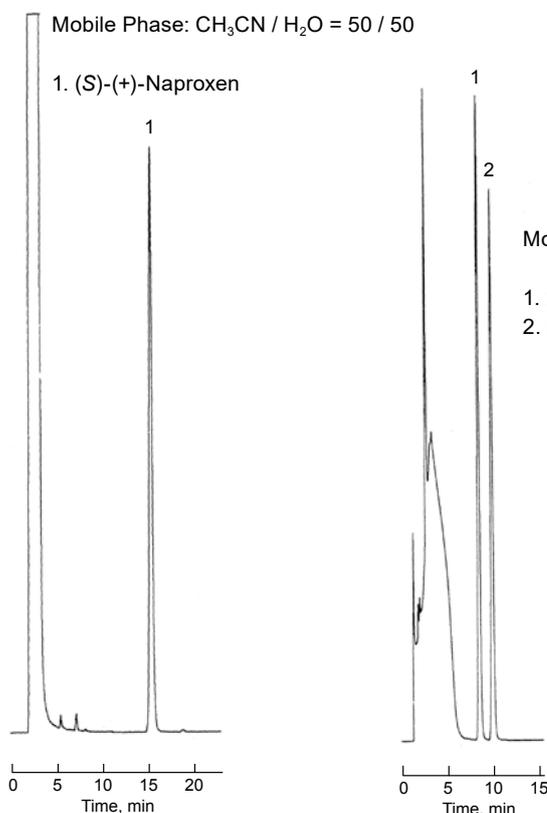
検出限界(S/N=2)は、例えばナプロキセンでは10 fmolである。



文献 1) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *Analyst* **1992**, 117, 727.

2) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *J. Chromatogr. A* **1992**, 625, 357.

Chromatogram of carboxylic acid enantiomers as (S)-(+)-DBD-APy derivatives

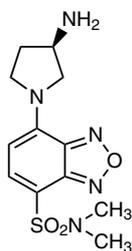


Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Temperature : 40 °C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 580 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

(R)-(-)-DBD-APy

100mg [A5561]

[= (R)-(-)-4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-(3-aminopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]



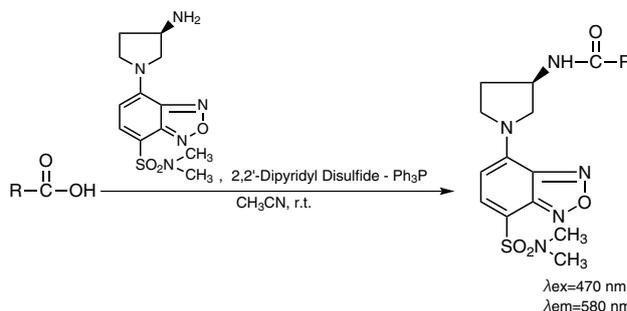
[A5561]

A5561は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とアミノ基を有する光学活性なHPLC用蛍光ラベル化剤で、カルボン酸類の光学純度測定に用いられる。光学活性カルボン酸のラベル化は向山-Corey法などの温和な方法が利用でき、ラセミ化を起こすことなくジアステレオマーを生成する。このジアステレオマーは逆相系で分離することができ、 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 580 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくい。シウ酸エステル／過酸化水素を用いた化学発光による高感度分析も可能である。

応用例

バイアルに10 mMラベル化剤**A5561**／アセトニトリル溶液 0.1 mL、2 μ Mカルボン酸／アセトニトリル溶液 0.25 mL、10 mM 2,2'-ジピリジルジスルフィドートリフェニルホスフィン／アセトニトリル溶液 0.15 mLを加え、室温で4時間反応させHPLC試料とする。

検出限界(S/N=2)は、例えばナプロキセンでは10 fmolである。



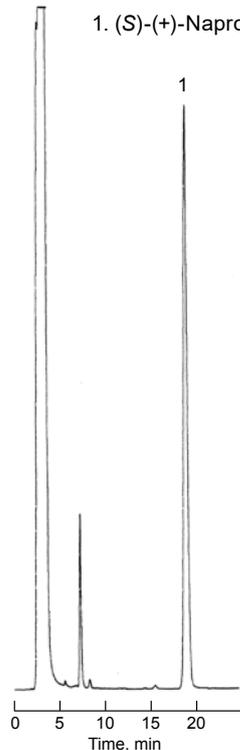
文献 1) T. Toyooka, M. Ishibashi, T. Terao, *Analyst* **1992**, 117, 727.

2) T. Toyooka, M. Ishibashi, T. Terao, *J. Chromatogr. A* **1992**, 625, 357.

Chromatogram of carboxylic acid enantiomers as (R)-(-)-DBD-APy derivatives

Mobile Phase: CH₃CN / H₂O = 50 / 50

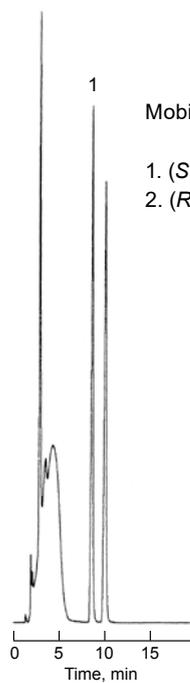
1. (S)-(+)-Naproxen



Mobile Phase: CH₃CN / H₂O = 60 / 40

1. (S)-(+)-Ibuprofen

2. (R)-(-)-Ibuprofen

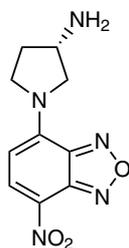


Column : Kaseisorb LC ODS Super
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Temperature : 40 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 580 nm
Flow Rate : 1 mL / min

(S)-(+)-NBD-APy

100mg [A5562]

[= (S)-(+)-4-Nitro-7-(3-aminopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]



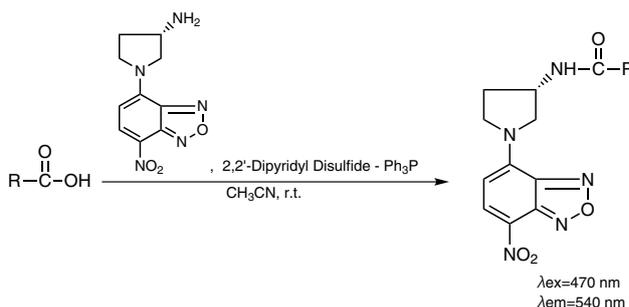
[A5562]

A5562は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とアミノ基を有する光学活性なHPLC用蛍光ラベル化剤で、カルボン酸類の光学純度測定に用いられる。光学活性カルボン酸のラベル化は向山-Corey法などの温和な方法が利用でき、ラセミ化を起こすことなくジアステレオマーを生成する。このジアステレオマーは逆相系で分離することができ、 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 540 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくい。また、レーザー蛍光検出により高感度分析が可能である¹⁾。

応用例

バイアルに10 mMラベル化剤**A5562**/アセトニトリル溶液0.1 mL、2 μ Mカルボン酸/アセトニトリル溶液0.25 mL、10 mM 2,2'-ジピリジルジスルフィド-トリフェニルホスフィン/アセトニトリル溶液0.15 mLを加え、室温で4時間反応させHPLC試料とする。

検出限界(S/N=2)は、例えばナプロキセンでは15 fmolである。

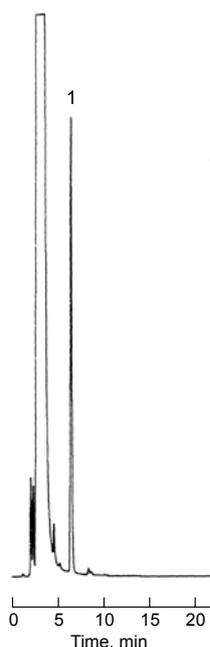


文献 1) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *Analyst* **1992**, 117, 727.

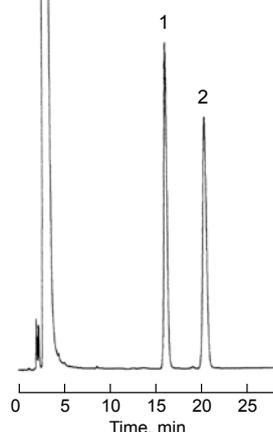
2) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *J. Chromatogr. A* **1992**, 625, 357.

Chromatogram of carboxylic acid enantiomers as (S)-(+)-NBD-APy derivatives

1. (S)-(+)-Naproxen



1. (S)-(+)-Ibuprofen
2. (R)-(-)-Ibuprofen



Column : Kaseisorb LC ODS Super
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Temperature : 40 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 540 nm
Flow Rate : 1 mL / min

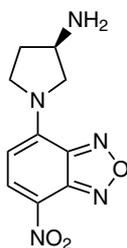
蛍光検出ラベル化剤

キラルカルボン酸用

(R)-(-)-NBD-APy

100mg [A5563]

[= (R)-(-)-4-Nitro-7-(3-aminopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]



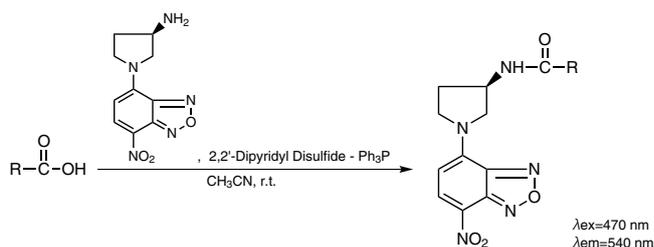
[A5563]

A5563は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とアミノ基を有する光学活性なHPLC用蛍光ラベル化剤で、カルボン酸類の光学純度測定に用いられる。光学活性カルボン酸のラベル化は向山-Corey法などの温和な方法が利用でき、ラセミ化を起こすことなくジアステレオマーを生成する。このジアステレオマーは逆相系で分離することができ、 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 540 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくい。また、レーザー蛍光検出により高感度分析が可能である¹⁾。

応用例

バイアル瓶に10 mMラベル化剤**A5563**/アセトニトリル溶液 0.1 mL、2 μ Mカルボン酸/アセトニトリル溶液 0.25 mL、10 mM 2,2'-ジピリジルジスルフィド-トリフェニルホスフィン/アセトニトリル溶液 0.15 mLを加え、室温で4時間反応させHPLC試料とする。

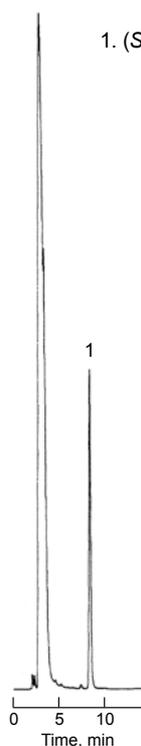
検出限界(S/N=2)は、例えばナプロキセンでは15 fmolである。



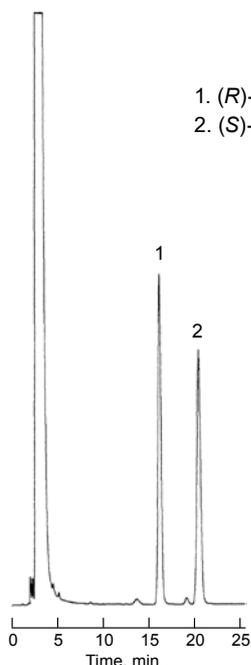
文献 1) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *Analyst* **1992**, 117, 727.

2) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *J. Chromatogr. A* **1992**, 625, 357.

Chromatogram of carboxylic acid enantiomers as (R)-(-)-NBD-APy derivatives



1. (S)-(+)-Naproxen



1. (R)-(-)-Ibuprofen
2. (S)-(+)-Ibuprofen

Column : Kaseisorb LC ODS Super
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Temperature : 40 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 540 nm
Flow Rate : 1 mL / min

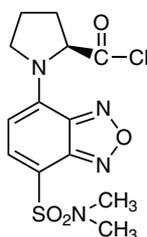
蛍光検出ラベル化剤

キラルアルコール、キラルアミン用

(S)-(-)-DBD-Pro-COCl

100mg [A5564]

[= (S)-(-)-4-(N,N-Dimethylaminosulfonyl)-7-(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]



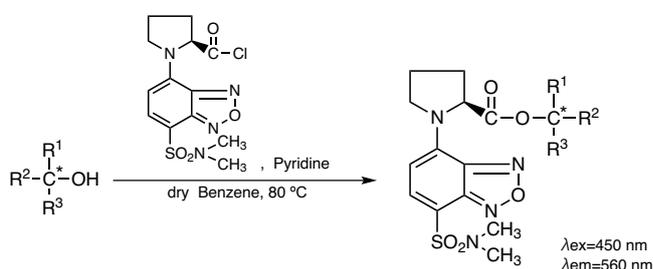
[A5564]

A5564は光学純度測定用HPLC用蛍光ラベル化剤で、光学活性なアルコールやアミンと速やかに反応し、エステルおよびアミドを形成する。このエステルやアミドは安定で、順相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 450 nm、 λ_{em} 560 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。また、ジアステレオマーの生成により光学活性なアルコール類を良好に分離できる (Hexan-2-olの分離度 $\alpha = 1.2$)。誘導体化によるラセミ化は起こらず、**A5564**のエナンチオマー[(R)-(+)-DBD-Pro-COCl]を使用することによってジアステレオマーの溶出順序を逆にすることができる。アルコールの検出限界はサブピコモルオーダーであるが、シュウ酸エステル/過酸化水素を用いた化学発光により高感度化が可能である。

応用例

[2級アルコール]¹⁾

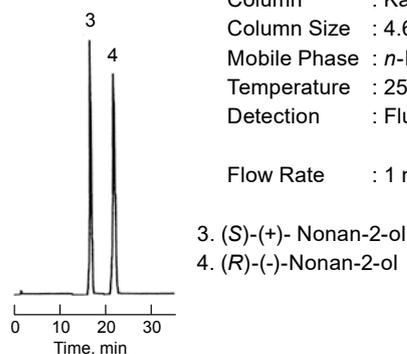
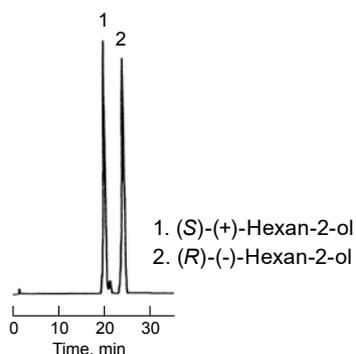
10 mMのラベル化剤**A5564**/無水ベンゼン溶液 1 mLと2 mMのアルコール/無水ベンゼン溶液 (1%ピリジンを含む) 1 mLを混合する。密栓後、80 °Cで3時間反応させ、室温にもどす。液-液抽出 (例えば、5%炭酸水素ナトリウムで洗浄) または、固相抽出により過剰の試薬を除去後、HPLC試料とする。



文献 1) T. Toyooka, M. Ishibashi, T. Terao, K. Imai, *Analyst* **1993**, *118*, 759.

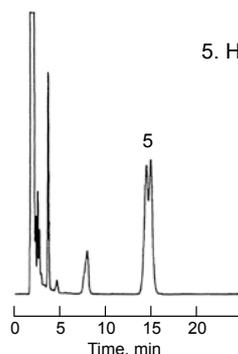
2) 東京化成工業株式会社 特開平6-184141

Chromatogram of alcohol enantiomers as (S)-(-)-DBD-Pro-COCl derivatives



Column : Kaseisorb LC 60-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : *n*-Hexane / AcOEt = 80 / 20
 Temperature : 25 °C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 450 nm
 λ_{em} 560 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

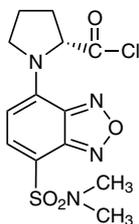
Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 60 / 40
 Temperature : 25 °C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 450 nm
 λ_{em} 560 nm
 Flow Rate : 1 mL / min



(R)-(+)-DBD-Pro-COCl

100mg [A5565]

[= (R)-(+)-4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]



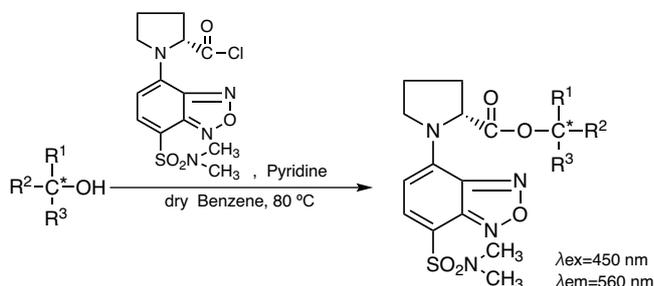
[A5565]

A5565は光学純度測定用HPLC用蛍光ラベル化剤で、光学活性なアルコールやアミンと速やかに反応し、エステルおよびアミドを形成する。このエステルやアミドは安定で、順相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 450 nm、 λ_{em} 560 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。また、ジアステレオマーの生成により光学活性なアルコール類を良好に分離できる (Hexan-2-olの分離度 $\alpha = 1.2$)。誘導体化によるラセミ化は起こらず、**A5565**のエナンチオマー[(*S*)-(-)-DBD-Pro-COCl]を使用することによってジアステレオマーの溶出順序を逆にすることができる。アルコールの検出限界はサブピコモルオーダーであるが、シュウ酸エステル/過酸化水素を用いた化学発光により高感度化が可能である。

応用例

[2級アルコール]¹⁾

10 mMのラベル化剤**A5565**/無水ベンゼン溶液 1 mLと2 mMのアルコール/無水ベンゼン溶液 (1%ピリジンを含む) 1 mLを混合する。密栓後、80 °Cで3時間反応させ、室温にもどす。液-液抽出 (例えば、5%炭酸水素ナトリウムで洗浄) または、固相抽出により過剰の試薬を除去後、HPLC試料とする。

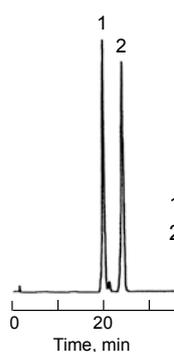


$\lambda_{ex}=450$ nm
 $\lambda_{em}=560$ nm

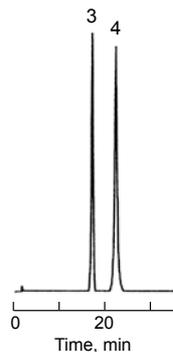
文献 1) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, K. Imai, *Analyst* **1993**, 118, 759.

2) 東京化成工業株式会社 特開平6-184141

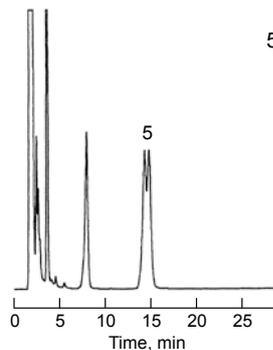
Chromatogram of alcohol enantiomers as (R)-(+)-DBD-Pro-COCl derivatives



1. (R)-(-)-Hexan-2-ol
2. (S)-(+)-Hexan-2-ol



3. (R)-(-)-Nonan-2-ol
4. (S)-(+)-Nonan-2-ol



5. Hexan-2-ol

Column : Kaseisorb LC 60-5
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Mobile Phase : *n*-Hexane / AcOEt = 80 / 20
Temperature : 25 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 450 nm
 λ_{em} 560 nm
Flow Rate : 1 mL / min

Column : Kaseisorb LC ODS Super
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 60 / 40
Temperature : 25 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 450 nm
 λ_{em} 560 nm
Flow Rate : 1 mL / min

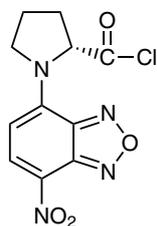
蛍光検出ラベル化剤

キラルアルコール、キラルアミン用

(R)-(+)-NBD-Pro-COCl

100mg [A5566]

[= (R)-(+)-4-Nitro-7-(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]

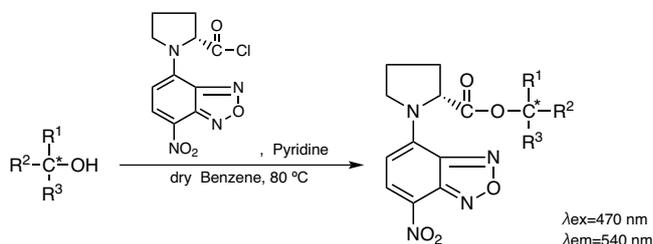


[A5566]

A5566は光学純度測定用HPLC用蛍光ラベル化剤で、光学活性なアルコールやアミンと速やかに反応し、エステルおよびアミドを形成する。このエステルやアミドは安定で、順相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 540 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。また、ジアステレオマーの生成により光学活性なアルコールおよびアミン類を良好に分離できる (Hexan-2-olおよび1-Phenylethylamineの分離係数 $\alpha = 1.2, 1.37$)。誘導体化によるラセミ化は起こらず、**A5566**のエナンチオマー[(S)-(-)-NBD-Pro-COCl]を使用することによってジアステレオマーの溶出順序を逆にすることができる。検出限界はサブピコモルオーダーであるが、レーザー蛍光検出により更に高感度化が期待できる。

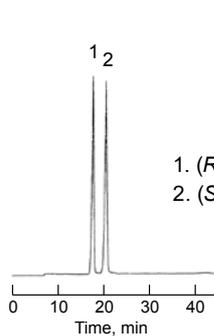
応用例

40 mMのラベル化剤**A5566**／無水ベンゼン溶液 0.5 mLと1 mMのアルコール (またはアミン) ／無水ベンゼン溶液 (2%ピリジンを含む) 0.5 mLを混合する。密栓後、80 °Cで1~2時間 (アミンの場合、50 °Cで1時間) 反応させ、室温にもどす。液-液抽出 (例えば、5%炭酸水素ナトリウムで洗浄) または、固相抽出により過剰の試薬を除去後、HPLC試料とする。

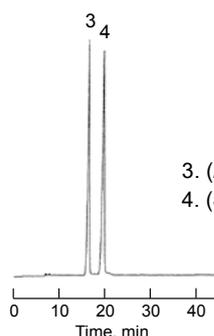


文献 1) 東京化成工業株式会社 特開平7-188224

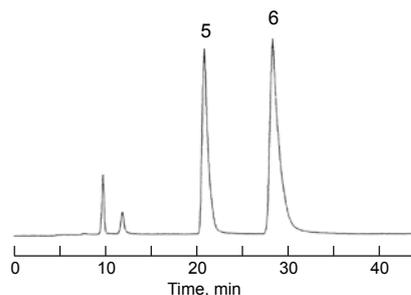
Chromatogram of alcohol and amine enantiomers as (R)-(+)-NBD-Pro-COCl derivatives



1. (R)-(-)-Hexan-2-ol
2. (S)-(+)-Hexan-2-ol



3. (R)-(-)-Heptan-2-ol
4. (S)-(+)-Heptan-2-ol



Mobile Phase : *n*-Hexane / AcOEt = 55 / 45

5. (R)-(+)-Phenylethylamine
6. (S)-(-)-Phenylethylamine

Column : Kaseisorb LC 60-5
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Mobile Phase : *n*-Hexane / AcOEt = 80 / 20
Temperature : 40 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 540 nm
Flow Rate : 1 mL / min

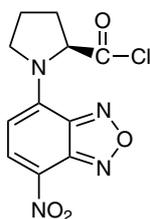
蛍光検出ラベル化剤

キラルアルコール、キラルアミン用

(S)-(-)-NBD-Pro-COCl

100mg [A5567]

[= (S)-(-)-4-Nitro-7-(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]

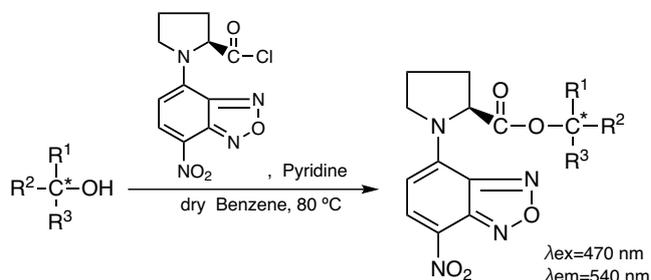


[A5567]

A5567は光学純度測定用HPLC用蛍光ラベル化剤で、光学活性なアルコールやアミンと速やかに反応し、エステルおよびアミドを形成する。このエステルやアミドは安定で、順相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 540 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。また、ジアステレオマーの生成により光学活性なアルコールおよびアミン類を良好に分離できる (Hexan-2-olおよび1-Phenylethylamineの分離係数 $\alpha = 1.2, 1.37$)。誘導体化によるラセミ化は起こらず、**A5567**のエナンチオマー[(R)-(+)-NBD-Pro-COCl]を使用することによってジアステレオマーの溶出順序を逆にすることができる。検出限界はサブピコモルオーダーであるが、レーザー蛍光検出により更に高感度化が期待できる。

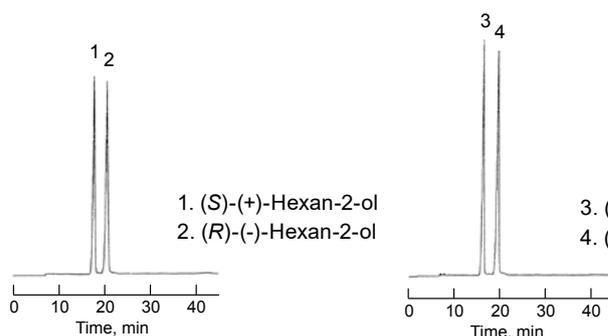
応用例

40 mMのラベル化剤**A5567**/無水ベンゼン溶液 0.5 mLと1 mMのアルコール (またはアミン) /無水ベンゼン溶液 (2%ピリジンを含む) 0.5 mLを混合する。密栓後、80 °Cで1~2時間 (アミンの場合、50 °Cで1時間) 反応させ、室温にもどす。液-液抽出 (例えば、5%炭酸水素ナトリウムで洗浄) または、固相抽出により過剰の試薬を除去後、HPLC試料とする。



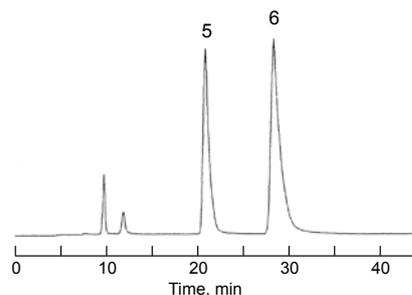
文献 1) 東京化成工業株式会社 特開平7-188224

Chromatogram of alcohol and amine enantiomers as (S)-(-)-NBD-Pro-COCl derivatives



1. (S)-(+)-Hexan-2-ol
2. (R)-(-)-Hexan-2-ol

3. (S)-(+)-Heptan-2-ol
4. (R)-(-)-Heptan-2-ol



Mobile Phase : *n*-Hexane / AcOEt = 55 / 45

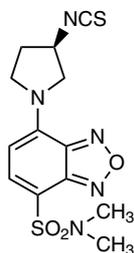
5. (S)-(-)-Phenylethylamine
6. (R)-(+)-Phenylethylamine

Column : Kaseisorb LC 60-5
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Mobile Phase : *n*-Hexane / AcOEt = 80 / 20
Temperature : 40 °C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 540 nm
Flow Rate : 1 mL / min

(R)-(-)-DBD-Py-NCS

100mg [A5568]

[= (R)-(-)-4-(N,N-Dimethylaminosulfonyl)-7-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]



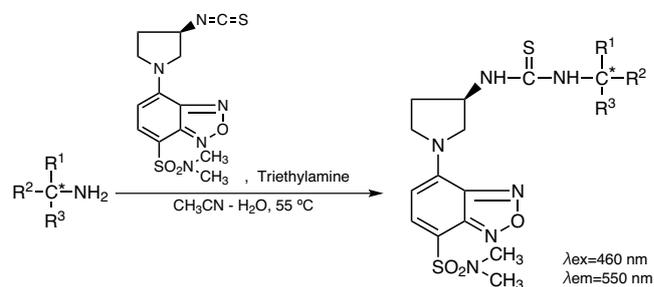
[A5568]

A5568は光学純度測定用HPLC用蛍光ラベル化剤で、不斉炭素原子に直結したアミノ基やメルカプト基と速やかに反応し、チオ尿素、ジチオカルバメートのジアステレオマーを生成する。このジアステレオマーは逆相HPLCで分離し、 λ_{ex} 460 nm、 λ_{em} 550 nmで蛍光検出測定することにより、高感度で検出することができる。[検出限界：チオプロニン= 0.5 pmol (S/N=2)]

(S)-体の**A5569**もあるためいずれかのエナンチオマーを選択することにより、生成するジアステレオマーの溶出順序を変えることができる。従って、存在量の少ないアミノ化合物のエナンチオマーを先に溶出させ、高い精度で定量することができる。エドマン分解への応用も報告されている。

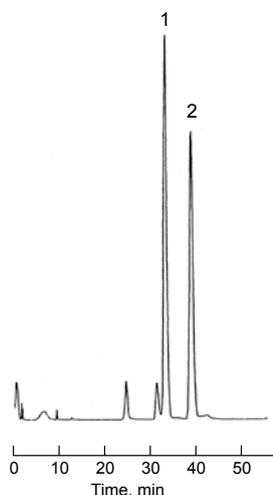
応用例

1 mMのアミン/アセトニトリル-水(1:1)溶液 (2%トリエチルアミンを含む) 10 μ L中に、5 mMのラベル化剤**A5566**/アセトニトリル溶液 10 μ Lを加え密栓し、55 $^{\circ}$ Cで10分間反応させる。これに1 Mの酢酸/アセトニトリル-水(1:1)溶液 480 μ Lを加え、この反応液をアセトニトリルで10倍希釈し、5 μ LをHPLC試料とする。



- 文献 1) T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, *Analyst* **1995**, 120, 385.
 2) T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, *J. Chromatogr. A* **1995**, 689, 23.
 3) T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, *Chromatographia* **1995**, 40, 645.
 4) Y.-M. Liu, J.-R. Miao, T. Toyo'oka, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 314, 169.
 5) D. Jin, K. Takehana, T. Toyo'oka, *Anal. Sci.* **1997**, 13, 113.

Chromatogram of amines as (R)-(-)-DBD-Py-NCS derivatives



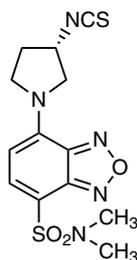
Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 40 / 60
 containing 0.05% TFA
 Temperature : Ambient
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 460 nm
 λ_{em} 550 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. (R)-1-Phenylethylamine
 2. (S)-1-Phenylethylamine

(S)-(+)-DBD-Py-NCS

100mg / 500mg [A5569]

[= (S)-(+)-4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole]



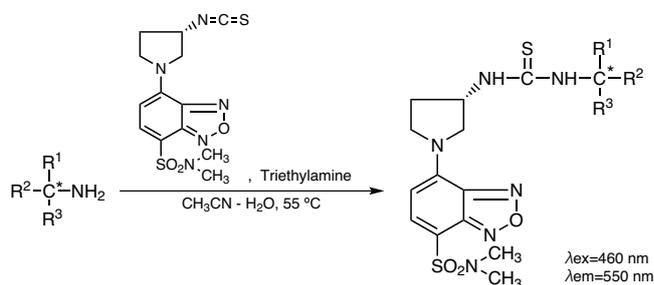
[A5569]

A5569は光学純度測定用HPLC用蛍光ラベル化剤で、不斉炭素原子に直結したアミノ基やメルカプト基と速やかに反応し、チオ尿素、ジチオカルバメートのジアステレオマーを生成する。このジアステレオマーは逆相HPLCで分離し、 λ_{ex} 460 nm、 λ_{em} 550 nmで蛍光検出測定することにより、高感度で検出することができる。[検出限界：チオプロニン= 0.5 pmol (S/N=2)]

(S)-体の**A5568**もあるためいずれかのエナンチオマーを選択することにより、生成するジアステレオマーの溶出順序を変えることができる。従って、存在量の少ないアミノ化合物のエナンチオマーを先に溶出させ、高い精度で定量することができる。エドマン分解への応用も報告されている。

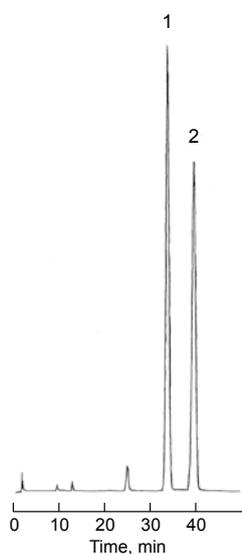
応用例

1 mMのアミン/アセトニトリル-水(1:1)溶液 (2%トリエチルアミンを含む) 10 μ L中に、5 mMのラベル化剤**A5569**/アセトニトリル溶液 10 μ Lを加え密栓し、55 $^{\circ}$ Cで10分間反応させる。これに1 Mの酢酸/アセトニトリル-水(1:1)溶液 480 μ Lを加え、この反応液をアセトニトリルで10倍希釈し、5 μ LをHPLC試料とする。



- 文献 1) T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, *Analyst* **1995**, 120, 385.
 2) T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, *J. Chromatogr. A* **1995**, 689, 23.
 3) T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, *Chromatographia* **1995**, 40, 645.
 4) Y.-M. Liu, J.-R. Miao, T. Toyo'oka, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 314, 169.
 5) D. Jin, K. Takehana, T. Toyo'oka, *Anal. Sci.* **1997**, 13, 113.

Chromatogram of amines as (S)-(+)-DBD-Py-NCS derivatives

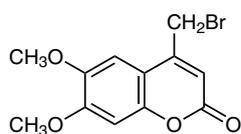


Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 40 / 60
 containing 0.05% TFA
 Temperature : Ambient
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 460 nm
 λ_{em} 550 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. (S)-1-Phenylethylamine
 2. (R)-1-Phenylethylamine

4-Bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin

100mg / 1g [A5570]



[A5570]

A5570はブロモメチル基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、脱酸剤の存在下、カルボキシ基と速やかに反応し、エステルを形成する。このエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。クマリン骨格に起因する蛍光を有しており、 λ_{ex} 340 nm、 λ_{em} 425 nmで測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

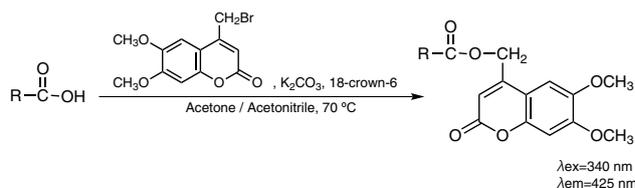
応用例

[脂肪酸]^{1a)}

遮光したフラスコを用い、試料 0.01 gをアセトン 0.1 mLに溶解し、10%水酸化カリウム/メタノールで中和した後、過剰量のラベル化剤**A5570**のアセトン溶液と18-クラウン6エーテルのアセトニトリル溶液を混合し、さらに炭酸カリウムを加え、密栓して70 °Cで30分間反応させる。室温に冷却後、反応液をHPLC試料とする。

[その他]

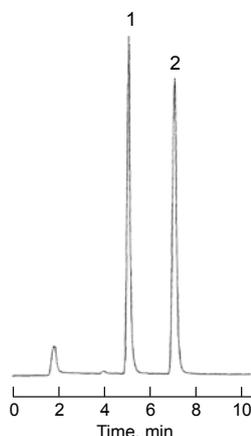
タンパク質²⁾、核酸³⁾、プロスタグランジン¹⁾、胆汁酸¹⁾



- 文献 1) a) R. Farinotti, Ph. Siard, J. Bourson, S. Kirkiacharian, B. Valeur, G. Mahuzier, *J. Chromatogr.* **1983**, 269, 81. 2) T. Hiratsuka, *J. Biochem.* **1987**, 101, 1457.
 b) H. I. Stefanova, J. M. East, M. G. Gore, A. G. Lee, *Biochemistry* **1992**, 31, 6023.
 b) Y. Amet, F. Berthou, J. F. Menez, *J. Chromatogr. B* **1996**, 681, 233. 3) a) S. Yoshida, T. Adachi, S. Hirose, *J. Chromatogr.* **1988**, 430, 156.
 c) A. J. J. M. Coenen, M. J. G. Kerkhoff, R. M. Heringa, S. van der Wal, *J. Chromatogr.* **1992**, 593, 243. b) S. Yoshida, T. Adachi, S. Hirose, *Microchem. J.* **1989**, 39, 351.

Chromatogram of fatty acids as 6,7-Dimethoxycoumarin 4-methyl esters

Column : Kaseisorb LC ODS Super
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN
 Temperature : Ambient
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 340 nm
 λ_{em} 425 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

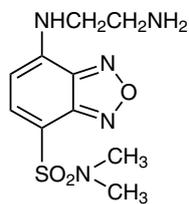


1. Linolic Acid
 2. Oleic Acid

DBD-ED

100mg [A5574]

[= 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-(2-aminoethylamino)-2,1,3-benzoxadiazole]

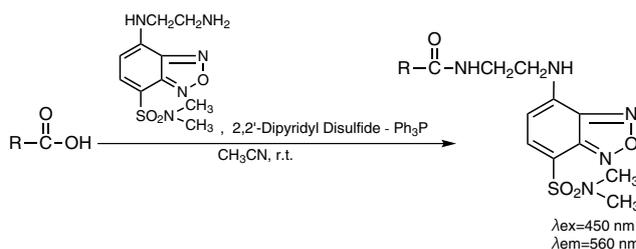


[A5574]

A5574は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とアミノ基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、縮合剤の存在下、室温でカルボキシ基と速やかに反応し、アミドを形成する。このアミドは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 450 nm、 λ_{em} 560 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域にあるため夾雑物の影響を受けにくい。また、比較的炭素数の少ない脂肪酸を再現性良く検出、定量でき、検出限界はfmolレベルである。化学発光による高感度分析も可能である。

応用例

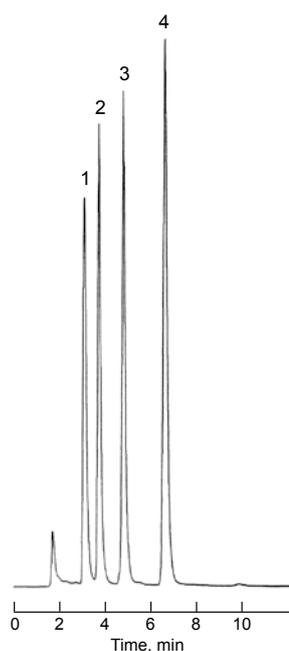
褐色のバイアルに混合脂肪酸/ジエチルエーテル溶液 50 μ L と、 5.0×10^{-3} Mラベル化剤**A5574**/アセトニトリル溶液 50 μ L、トリフェニルホスフィン/アセトニトリル溶液 50 μ L、2,2'-ジピリジルジスルフィド/アセトニトリル溶液 50 μ Lを混合し、室温暗所に放置する。この反応液をアセトニトリルで100倍希釈し、その10 μ LをHPLC試料とする。



文献 1) 東京化成工業株式会社 特開平10-218871

2) P. Prados, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma, M. Tsunoda, S. Al-Kindy, S. Mori, H. Yokosu, K. Imai, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 344, 227.

Chromatogram of fatty acids as DBD-ED derivatives



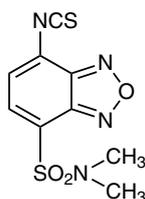
Column : Kaseisorb LC ODS 2000
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 90 / 5
 Temperature : 40 °C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 450 nm
 λ_{em} 560 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Linolenic Acid
2. Linolic Acid
3. Oleic Acid
4. Stearic Acid

DBD-NCS

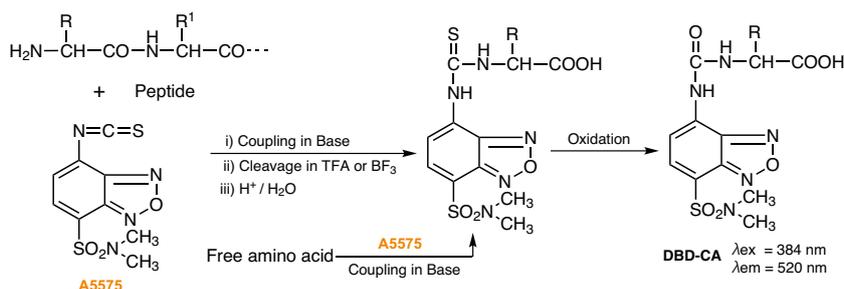
100mg [A5575]

[= 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-isothiocyanato-2,1,3-benzoxadiazole]



[A5575]

A5575は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とイソチオシアノ基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、アミノ基と速やかに反応し、チオ尿素誘導体を形成する。このチオ尿素誘導体は安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 384 nm、 λ_{em} 520 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。その検出限界(S/N=3)はサブピコモルオーダーである。**A5575**自体は無蛍光で、結晶および溶液状態での安定性に優れており、誘導体の安定性も良い。ペプチド、タンパク質のN末端アミノ酸と結合後、酸処理することによりアミノ酸配列分析(エドマン分解)に利用できる。



応用例

<手動エドマン分解による方法>

ペプチド(Insulin Chain B 500 pmol)

- ・ 50% ピリジン / 水 20 μ Lに溶解する。
- ・ 1% トリエチルアミン / アセトニトリル 5 μ Lと20 mM ラベル化剤**A5575**/ ピリジン 10 μ Lを加え、不活性ガス雰囲気下、50 $^{\circ}$ C、15分間反応させる。
- ・ 室温まで冷却後、反応液をn-ヘプタン / ジクロロメタン(6/4)で200 μ L \times 3回洗浄する。
- ・ 洗浄処理した溶液を遠心エバポレーターを使用して50 $^{\circ}$ C、15分間で乾固させる。
- ・ 1% $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ / アセトニトリル 30 μ Lを加え、50 $^{\circ}$ C、5分間反応させる。
- ・ 窒素気流により反応液を乾固させる。
- ・ 20 μ Lの水を加え、ベンゼン / 酢酸エチル(1/4) 100 μ L \times 2回抽出する。

(水層)
~ペプチド

(有機層)

- ・ 窒素気流により抽出液を乾固させる。
- ・ アセトニトリル 2 μ Lに溶解する。
- ・ 0.4 M 塩酸 8 μ Lを加え、50 $^{\circ}$ C、5分間加水分解する。
- ・ 反応液を室温下、10分間、4 M 塩酸 5 μ Lと0.5 M 亜硝酸ナトリウム 5 μ Lで処理することにより酸化する。
- ・ 1 M 炭酸水素ナトリウム 23 μ Lで中和し、0.15 M メチオニン 20 μ Lを加え、過剰の酸化剤を除去。

20 μ LをHPLC試料とする

- 文献 1) Y. Huang, H. Matsunaga, A. Toriba, T. Santa, T. Fukushima, K. Imai, *Anal. Biochem.* **1999**, 270, 257.
 2) H. Matsunaga, T. Santa, K. Hagiwara, H. Homma, K. Imai, S. Uzu, K. Nakashima, S. Akiyama, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4276.
 3) K. Imai, S. Uzu, K. Nakashima, S. Akiyama, *Biomed. Chromatogr.* **1993**, 7, 56.

AABD-SH

100mg [A5576]

[= 4-Acetamido-7-mercapto-2,1,3-benzoxadiazole]

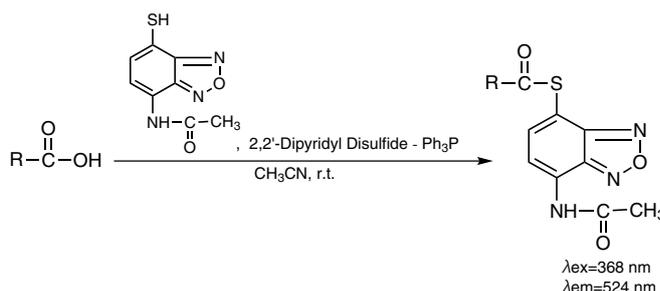


[A5576]

A5576は2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格とメルカプト基を有するHPLC用蛍光ラベル化剤で、縮合剤の存在下、室温でカルボキシ基と速やかに反応し、チオエステルを形成する。1自身の蛍光は非常に弱いですが、カルボキシ基と反応したチオエステルは強い蛍光を有する。このチオエステルは安定で、逆相HPLC条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 368 nm、 λ_{em} 524 nmで蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。その検出限界(S/N=3)は10~20 fmolである。

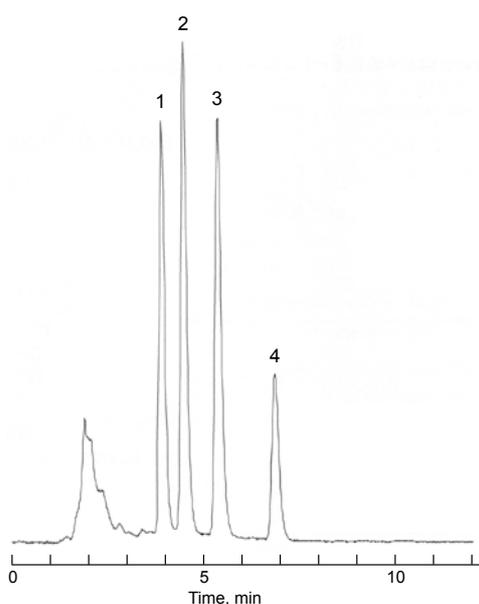
応用例

500 μ Lのバイアルに混合カルボン酸のアセトニトリル溶液 20 μ Lと、20 mM ラベル化剤**A5576**のジクロロメタン溶液 20 μ L、トリフェニルホスフィンのアセトニトリル溶液 20 μ L、2,2'-ジピリジルジスルフィドのアセトニトリル溶液 20 μ Lを混合し、室温で15分間反応させる。20 μ Lのアセトニトリルで希釈し、その1 μ LをHPLC試料とする。



文献 1) T. Santa, T. Okamoto, S. Uchiyama, K. Mitsuhashi, K. Imai, *Analyst* **1999**, 124, 1689.

Chromatogram of fatty acids as AABD-thio esters



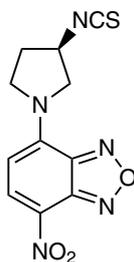
Column : Kaseisorb LC ODS 2000
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃OH
 Temperature : Ambient
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 368 nm
 λ_{em} 524 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Linolenic Acid
2. Linoleic Acid
3. Oleic Acid
4. Stearic Acid

(R)-(-)-NBD-Py-NCS

100mg [A5577]

[= (R)-(-)-4-(3-Isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole]



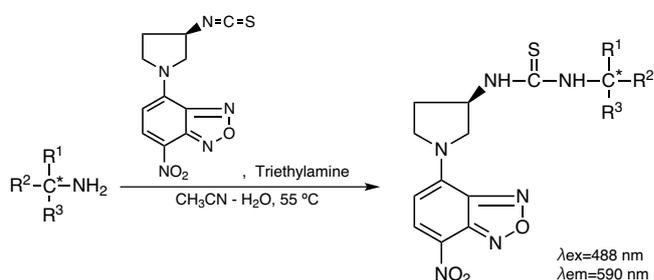
[A5577]

A5577は光学純度測定用HPLC用蛍光ラベル化剤で、不斉炭素原子に直結したアミノ基と速やかに反応し、チオ尿素のジアステレオマーを生成する。このジアステレオマーは逆相HPLCで分離し、 λ_{ex} 488 nm、 λ_{em} 590 nmで蛍光検出測定することにより、高感度で検出することができる。

(R)-体の**A5577**もあるためいずれかのエナンチオマーを選択することにより、生成するジアステレオマーの溶出順序を変えることができる。従って、存在量の少ないアミノ化合物のエナンチオマーを先に溶出させ、高い精度で定量することができる。エドマン分解への応用も報告されている。

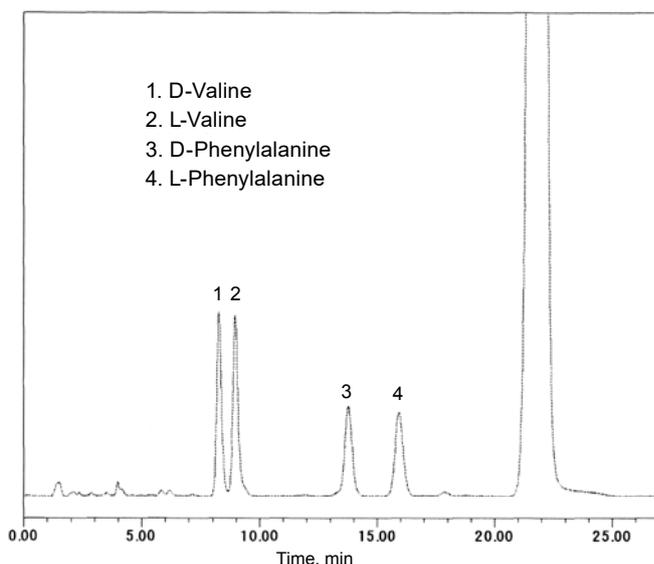
応用例

1 mMのアミノ酸／アセトニトリル-水(1:1)溶液 (2%トリエチルアミンを含む) 10 μ L中に、5 mMのラベル化剤**A5577**／アセトニトリル溶液 10 μ Lを加え密栓し、55 $^{\circ}$ Cで10分間反応させる。これに1 Mの酢酸／アセトニトリル-水(1:1)溶液 480 μ Lを加え、この反応液をアセトニトリルで10倍希釈し、5 μ LをHPLC試料とする。



- 文献 1) T. Toyooka, Y.-M. Liu, *Analyst* **1995**, 120, 385.
 2) T. Toyooka, Y.-M. Liu, *J. Chromatogr. A* **1995**, 689, 23.
 3) T. Toyooka, Y.-M. Liu, *Chromatographia* **1995**, 40, 645.
 4) Y.-M. Liu, J.-R. Miao, T. Toyooka, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 314, 169.

Chromatogram of amino acids as (R)-(-)-NBD-Py-NCS derivatives

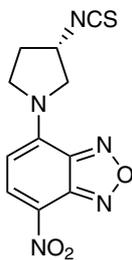


Column : Kaseisorb LC ODS 2000
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 40 / 60
 containing 0.05% TFA
 Temperature : 30 $^{\circ}$ C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 488 nm
 λ_{em} 590 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

(S)-(+)-NBD-Py-NCS

100mg [A5578]

[= (S)-(+)-4-(3-Isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole]



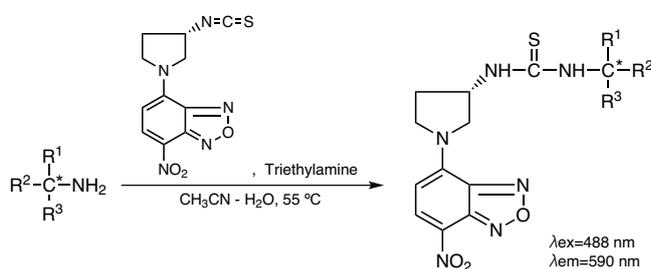
[A5578]

A5578は光学純度測定用HPLC用蛍光ラベル化剤で、不斉炭素原子に直結したアミノ基と速やかに反応し、チオ尿素のジアステレオマーを生成する。このジアステレオマーは逆相HPLCで分離し、 λ_{ex} 488 nm、 λ_{em} 590 nmで蛍光検出測定することにより、高感度で検出することができる。

(R)-体の**A5577**もあるためいずれかのエナンチオマーを選択することにより、生成するジアステレオマーの溶出順序を変えることができる。従って、存在量の少ないアミノ化合物のエナンチオマーを先に溶出させ、高い精度で定量することができる。エドマン分解への応用も報告されている。

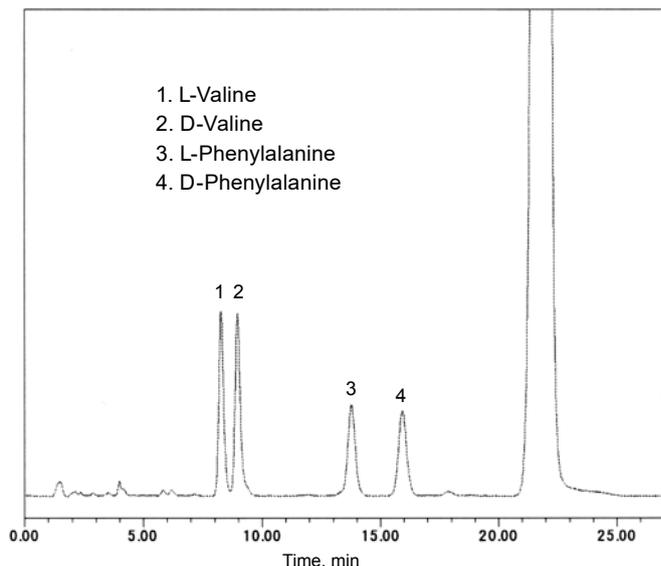
応用例

1 mMのアミノ酸／アセトニトリル-水(1:1)溶液 (2%トリエチルアミンを含む) 10 μ L中に、5 mMのラベル化剤**A5578**／アセトニトリル溶液 10 μ Lを加え密栓し、55 $^{\circ}$ Cで10分間反応させる。これに1 Mの酢酸／アセトニトリル-水(1:1)溶液 480 μ Lを加え、この反応液をアセトニトリルで10倍希釈し、5 μ LをHPLC試料とする。



- 文献 1) T. Toyooka, Y.-M. Liu, *Analyst* **1995**, 120, 385.
 2) T. Toyooka, Y.-M. Liu, *J. Chromatogr. A* **1995**, 689, 23.
 3) T. Toyooka, Y.-M. Liu, *Chromatographia* **1995**, 40, 645.
 4) Y.-M. Liu, J.-R. Miao, T. Toyooka, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 314, 169.

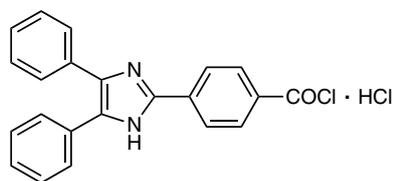
Chromatogram of amino acids as (S)-(+)-NBD-Py-NCS derivatives



Column : Kaseisorb LC ODS 2000
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 40 / 60
 containing 0.05% TFA
 Temperature : 30 $^{\circ}$ C
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 488 nm
 λ_{em} 590 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

4-(4,5-Diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl Chloride Hydrochloride

100mg [A5579]



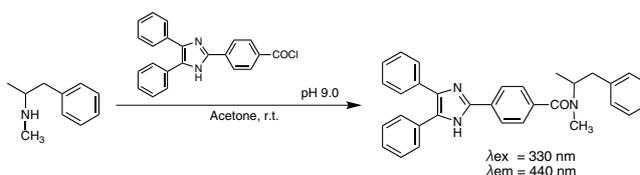
[A5579]

A5579 は HPLC 用蛍光ラベル化剤で、アミノ基や水酸基と室温下で速やかに反応し、アミドおよびエステルを形成する。この誘導体は室温で少なくとも 24 時間は安定で、逆相 HPLC 条件下で分解することなく検出器に到達する。ODS カラムによって分離でき、その検出限界 (S/N=3) は 0.6 ~ 5.2 fmol / 5 μ L injection である¹⁾。尿中のメタンフェタミンおよびその類縁体の定量^{1, 2)}のみならず、薬物を長期に蓄積することが知られている毛髪中の定量にも利用されている³⁾。

応用例

[メタンフェタミン類縁体の定量]²⁾

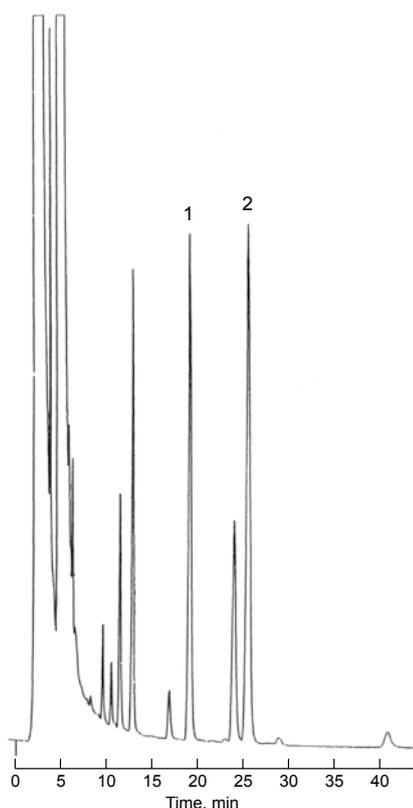
褐色のバイアルにメタンフェタミン中毒者の尿 10 μ L と酢酸 10 μ L を加え、窒素気流下、乾燥する。その残渣に炭酸緩衝液 10 μ L と 100 μ M ラベル化剤 **A5579** / アセトン溶液 190 μ L を加え、室温で 10 分間反応させる。この反応液 5 μ L を HPLC 試料とする。



- 文献 1) O. Al-Dirbashi, J. Qvarnstrom, K. Irgum, K. Nakashima, *J. Chromatogr. B* **1998**, 712, 105.
 2) O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, F. Menichini, S. Noda, M. Minemoto, K. Nakashima, *Analyst* **1998**, 123, 2333.
 3) O. Y. Al-Dirbashi, N. Kuroda, M. Wada, M. Takahashi, K. Nakashima, *Biomed. Chromatogr.* **2000**, 14, 293.

- 4) K. Nakashima, S. Kinoshita, M. Wada, N. Kuroda, W. R. G. Baeyens, *Analyst* **1998**, 123, 2281.
 5) M. Wada, S. Kinoshita, Y. Itayama, N. Kuroda, K. Nakashima, *J. Chromatogr. B* **1999**, 721, 179.

Chromatogram of amines as 4-(4,5-Diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl compounds

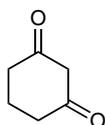


Column : Daisopak SP-120-5-ODS-BP
 Column Size : 4.6 mm I.D.×250 mm
 Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 65 / 35
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 325 nm
 λ_{em} 430 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Phentermine
 2. Fenfluramine

1,3-Cyclohexanedione

5g [A5581]



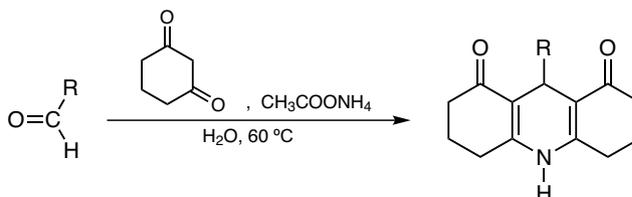
A5581 は HPLC 用蛍光ラベル化剤で、カルボニル基と速やかに反応し、デカヒドロアクリジン-1,8-ジオン (DHA) 誘導体を形成する。この誘導体は安定で、逆相 HPLC 条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 366 nm、 λ_{em} 440 nm で蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

[A5581]

応用例

[脂肪族アルデヒド]^{1, 2)}

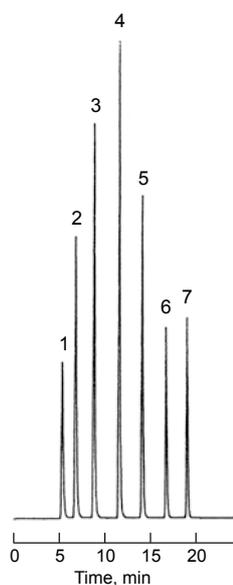
酢酸 5 mL と酢酸アンモニウム 10 g を蒸留水 50 mL に溶解し、ラベル化剤 **A5581** 0.25 g を加え、混合、溶解させる。脂肪族アルデヒド 10 ~ 30 ng を含む水溶液 (長鎖アルデヒドではエタノール溶液) 1 mL に、ラベル化剤溶液 2 mL を加える。60 °C で 30 分間反応させ、その 1 μ L を採取し HPLC 試料とする。



文献 1) W. L. Stahovec, K. Mopper, *J. Chromatogr.* **1984**, 298, 399.

2) 鈴木義仁, *分析化学* **1985**, 34, 314.

Chromatogram of aldehydes as DHA derivatives

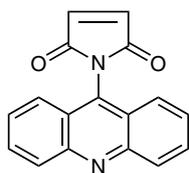


Column : Kaseisorb LC ODS-100-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : CH₃OH / H₂O = 40 / 60 → 90 / 10
 20 min. linear gradient
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 366 nm
 λ_{em} 440 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

1. Formaldehyde
2. Acetaldehyde
3. Propionaldehyde
4. Butyraldehyde
5. Valeraldehyde
6. Hexylaldehyde
7. Heptylaldehyde

NAM [= N-(9-Acridinyl)maleimide]

50mg / 100mg [A5591]



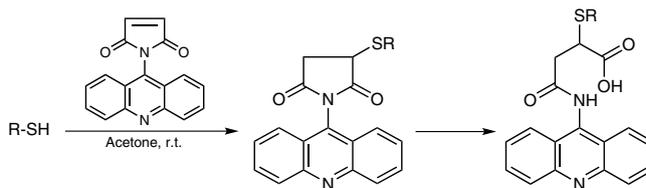
[A5591]

A5591 は HPLC 用蛍光ラベル化剤で、メルカプト基と室温で速やかに反応する。生成物は安定で、逆相 HPLC 条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 355 nm、 λ_{em} 465 nm で蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

[チオール化合物]^{1~5)}

1 mM 試料水溶液を 2 mL とり、30% 水酸化ナトリウム 0.4 mL、0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.8) 1 mL を加える。さらに 10 mM ラベル化剤 **A5591** アセトン溶液 0.5 mL を加えて、振り混ぜる。室温で 30 分間反応させ、反応液を HPLC 試料とする。



文献 1) 奈良安規, 辻村克良, 分析化学 **1973**, 22, 451.

2) Y. Nara, K. Tujimura, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 793.

3) H. Takahashi, Y. Nara, K. Tujimura, *Agric. Biol. Chem.* **1979**, 43, 1439.

4) H. Takahashi, Y. Nara, K. Tujimura, *Agric. Biol. Chem.* **1976**, 40, 2493.

5) 高橋裕明, 吉田隆典, 目黒照, 分析化学 **1981**, 30, 339.

Chromatogram of thiols as NAM derivatives



Column : Kaseisorb LC ODS-300-5
 Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
 Mobile Phase : 0.05 M Na₂HPO₄ / CH₃CN = 89 / 11 (pH 7.5)
 Detection : Fluorescence λ_{ex} 355 nm
 λ_{em} 465 nm
 Flow Rate : 1 mL / min

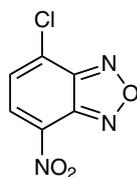
1. N-Acetyl-L-cysteine
 2. 2-Mercaptoethanol

蛍光検出ラベル化剤

アミン、チオール用

NBD-Cl [= 4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole]

1g / 5g **[A5592]**



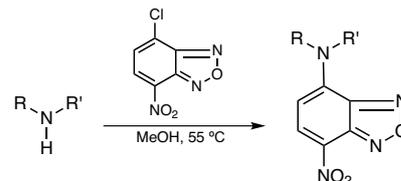
[A5592]

A5592 は 2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格を有する HPLC 用蛍光ラベル化剤で、2 級アミンやチオールと速やかに反応する。また、水酸基とも徐々に反応する。生成物は安定で、逆相 HPLC 条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 460 nm、 λ_{em} 535 nm で蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

[アルキルアミン]¹⁾

アミン 1 ~ 20 μ g を含むメタノール溶液 25 ~ 500 μ L を小試験管にとり、4 ~ 8 倍モル過剰のラベル化剤 **A5592** のメタノール溶液 (0.05%) を加える。0.1 M 炭酸水素ナトリウム 50 ~ 100 μ L を加えて振り混ぜた後、55 $^{\circ}$ C で 1 ~ 5 時間反応させる。室温に冷却後、反応液を HPLC 試料とする。



[その他]

農薬 (*N*-メチルカルバメート、*N,N*-ジメチルカルバメート) の TLC と HPLC^{2,3)}。カルバメートを加水分解し、生成したアミンをラベル化する。

[その他]

尿中のアンフェタミンの TLC^{4,5)}、プロリンの HPLC (プレカラム法)⁶⁾

文献 1) H.-J. Klimisch, L. Stadler, *J. Chromatogr.* **1974**, 90, 141.

2) J. F. Lawrence, R. W. Frei, *Anal. Chem.* **1972**, 44, 2046.

3) R. W. Frei, J. F. Lawrence, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1972**, 55, 1259.

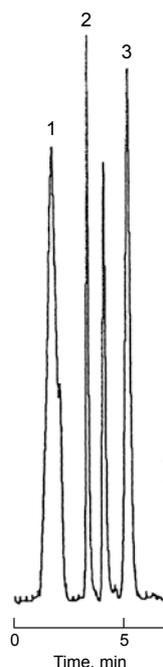
4) J. Monforte, R. J. Bath, I. Sunshine, *Clin. Chem.* **1972**, 18, 1329.

5) F. van Hoof, A. Heyndrickx, *Anal. Chem.* **1974**, 46, 286.

6) J. H. Wolfram, *J. Chromatogr.* **1977**, 132, 37.

7) Y. Nishikawa, K. Kuwata, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1864.

Chromatogram of alkylamines as NBD derivatives



Column : Kaseisorb LC ODS-300-5
Column Size : 4.6 mm I.D.×150 mm
Mobile Phase : CH₃CN / H₂O = 45 / 55
Detection : Fluorescence λ_{ex} 460 nm
 λ_{em} 535 nm
Flow Rate : 1 mL / min

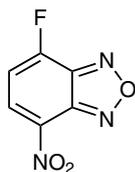
1. Propylamine
2. Butylamine
3. Amylamine

蛍光検出ラベル化剤

アミン、チオール用

NBD-F [= 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole]

100mg **[A5593]**



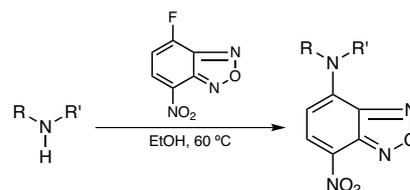
[A5593]

A5593 は 2,1,3-ベンゾオキサジアゾール骨格を有する HPLC 用蛍光ラベル化剤で、アミノ基やメルカプト基と速やかに反応し、誘導体化される。試薬自身は無蛍光であり、そのエタノール溶液は冷蔵保存すれば 1 週間は安定である。誘導体は逆相 HPLC 条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 470 nm、 λ_{em} 530 nm で蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。励起および蛍光波長が長波長領域のため夾雑物の影響を受けにくく、レーザー蛍光検出により、更に高感度な分析が可能である。試薬の加水分解物 (NBD-OH) は、酸性下で消光できるので、ポストカラム反応試薬としても使用できる^{5, 7)}。

応用例

[アミノ酸]^{2, 3)}

50 μ M のアミノ酸標準液 10 μ L に、0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 10 μ L および 50 mM ラベル化剤 **A5593** エタノール溶液 20 μ L を加える。遮光し、60 $^{\circ}$ C で 1 分間加熱する。直ちに氷冷し、反応液に 5 mM 塩酸 460 μ L を加え、その 10 μ L を HPLC 試料とする。



文献 1) K. Imai, Y. Watanabe, *Anal. Chim. Acta* **1981**, 130, 377.

2) Y. Watanabe, K. Imai, *Anal. Biochem.* **1981**, 116, 471.

3) Y. Watanabe, K. Imai, *J. Chromatogr.* **1982**, 239, 723.

4) T. Toyo'oka, Y. Watanabe, K. Imai, *Anal. Chim. Acta* **1983**, 149, 305.

5) Y. Watanabe, K. Imai, *Anal. Chem.* **1983**, 55, 1786.

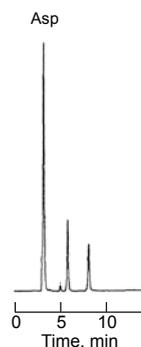
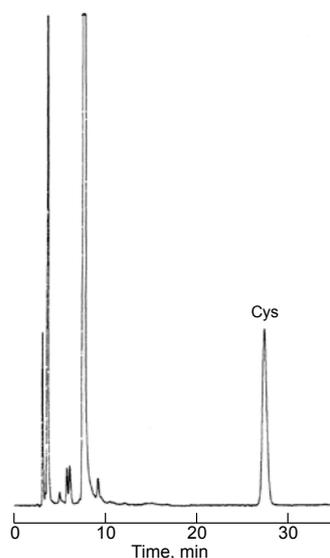
6) Y. Watanabe, K. Imai, *J. Chromatogr.* **1984**, 309, 279.

7) H. Miyano, T. Toyo'oka, K. Imai, *Anal. Chim. Acta* **1985**, 170, 81.

8) H. Kotaniguchi, M. Kawakatsu, T. Toyo'oka, K. Imai, *J. Chromatogr.* **1987**, 420, 141.

Chromatogram of amino acids as NBD derivatives

Mobile Phase:
CH₃OH / THF / 0.1 M Phosphate buffer (pH 6.0)
= 20 / 20 / 60



Column : Kaseisorb LC ODS Super
Column Size : 4.6 mm I.D.×250 mm
Mobile Phase : CH₃OH / THF / 0.1 M
Phosphate buffer (pH 6.0) = 10 / 10 / 80
Temperature : 40 $^{\circ}$ C
Detection : Fluorescence λ_{ex} 470 nm
 λ_{em} 530 nm
Flow Rate : 1 mL / min

Mobile Phase:
CH₃OH / THF / 0.1 M Phosphate buffer (pH 6.0)
= 10 / 10 / 80

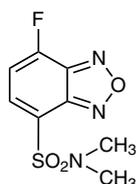
蛍光検出ラベル化剤

アミン、チオール用

DBD-F

100mg [A5595]

[= 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole]



[A5595]

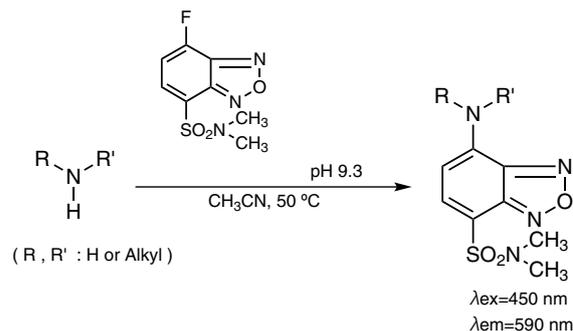
A5595 は 2,1,3- ベンゾオキサジアゾール骨格を有する HPLC 用蛍光ラベル化剤で、アミノ基やメルカプト基と速やかに反応し、誘導体化される。誘導体は安定で、逆相 HPLC 条件下で分解することなく検出器に到達する。 λ_{ex} 450 nm、 λ_{em} 590 nm で蛍光検出測定することにより、良好なクロマトグラムが得られる。

応用例

[アミノ酸]

褐色のバイアルに 20 mM のラベル化剤 **A5595** / アセトニトリル溶液 0.5 mL を加える。さらに、アミノ酸 (数 nmol) を含む 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.3; 1 mM EDTANa₂ 含む) 0.5 mL を加え、50 °C で 30 分間反応させる。氷水で冷却後、そのまま HPLC 試料とする。

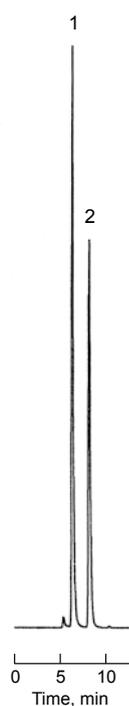
検出限界 (S/N=3) は、例えばプロリンでは 0.11 pmol である。



- 文献 1) T. Toyo'oka, T. Suzuki, Y. Saito, S. Uzu, K. Imai, *Analyst* **1989**, 114, 413.
2) T. Toyo'oka, T. Suzuki, Y. Saito, S. Uzu, K. Imai, *Analyst* **1989**, 114, 1233.
3) K. Imai, S. Uzu, T. Toyo'oka, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1989**, 7, 1395.

- 4) S. Uzu, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama, *Analyst* **1991**, 116, 1353.
5) S. Uzu, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama, *Biomed. Chromatogr.* **1991**, 5, 184.

Chromatogram of amino acids as DBD-amino acids



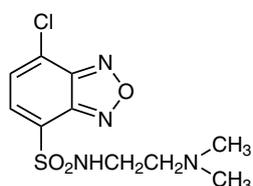
Column : Kaseisorb LC ODS-120-5
Column Size : 4.6 mm I.D.×250 mm
Mobile Phase : CH₃CN / H₂O / CH₃COOH = 50 / 50 / 1
Detection : Fluorescence λ_{ex} 450 nm
 λ_{em} 590 nm
Flow Rate : 1 mL / min

1. Valine
2. Leucine

DAABD-Cl

100mg [A5596]

[= 4-[2-(Dimethylamino)ethylaminosulfonyl]-7-chloro-2,1,3-benzoxadiazole]

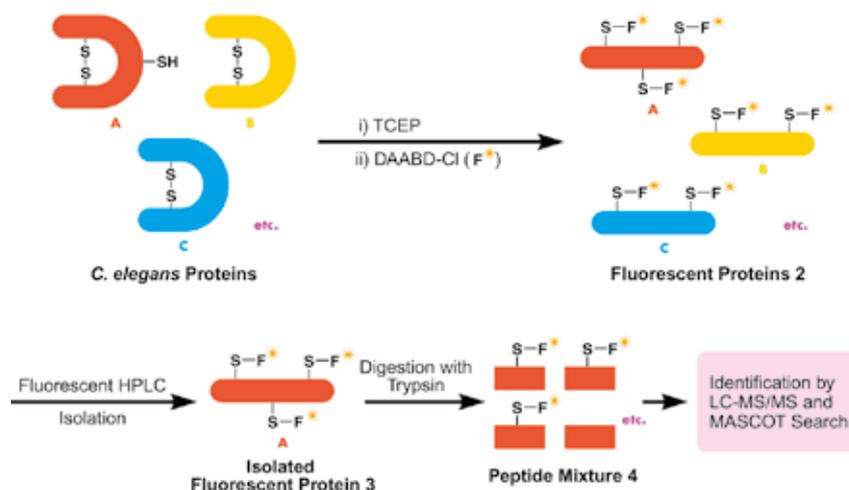


[A5596]

2003年ヒトゲノム計画の達成が宣言され、遺伝子と疾病の関係の解明が進んでいる。これら疾病の直接的な原因はゲノムから作り出されるタンパク質で、このタンパク質の解析は遺伝子と疾病の関係を明らかにするためにも重要で、プロテオミクスと呼ばれている。ゲノム計画の達成後の重要な研究テーマとして活発な研究が行われている。

タンパク質分析は、2次元ゲル電気泳動にて目的のタンパク質を単離し、次いでプロテアーゼで分解、ペプチドとし、これをMS/MSで解析して単離したタンパク質を同定する手法が広く用いられている。しかしながら、2次元ゲル電気泳動は、極端な酸性や塩基性のタンパク質、あるいは疎水性のタンパク質などの分離が十分でないことや再現性のあるデータを得るためには2次元ゲル電気泳動の操作に熟練した技術者が行う必要があるなどの問題点を有しており、種々の改良法や新たな手法が開発されている。

今井らが開発した DAABD-Cl (A5596) を用いる手法 (FD-LC-MS/MS 法) もその一つで、精度よくタンパク質を分析することができる。今井らは細胞からタンパク質を抽出し、これらタンパク質を緩衝液中でトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィンと反応させ、S-S 結合を還元切断し、一次元構造とし、これに DAABD-Cl を反応させ、細胞質中タンパク質混合物の蛍光標識体 (Scheme 1 中 2) を得ている。これを蛍光 HPLC で分析し、多数の DAABD 標識タンパク質から成るクロマトグラムを得ている (Figure 1)。この中から任意の DAABD 標識タンパク質 (Scheme 1 中 3) を分取し、トリプシンで分解して DAABD 標識ペプチドなどから成るペプチド混合物 (Scheme 1 中 4) とし、LC-MS/MS にて質量分析を行い、その結果を MASCOT データベースシステムで解析し、元のタンパク質を同定している (Scheme 1)。



Scheme 1. Quantification and Identification of Expressed Proteins in cell with DAABD-Cl

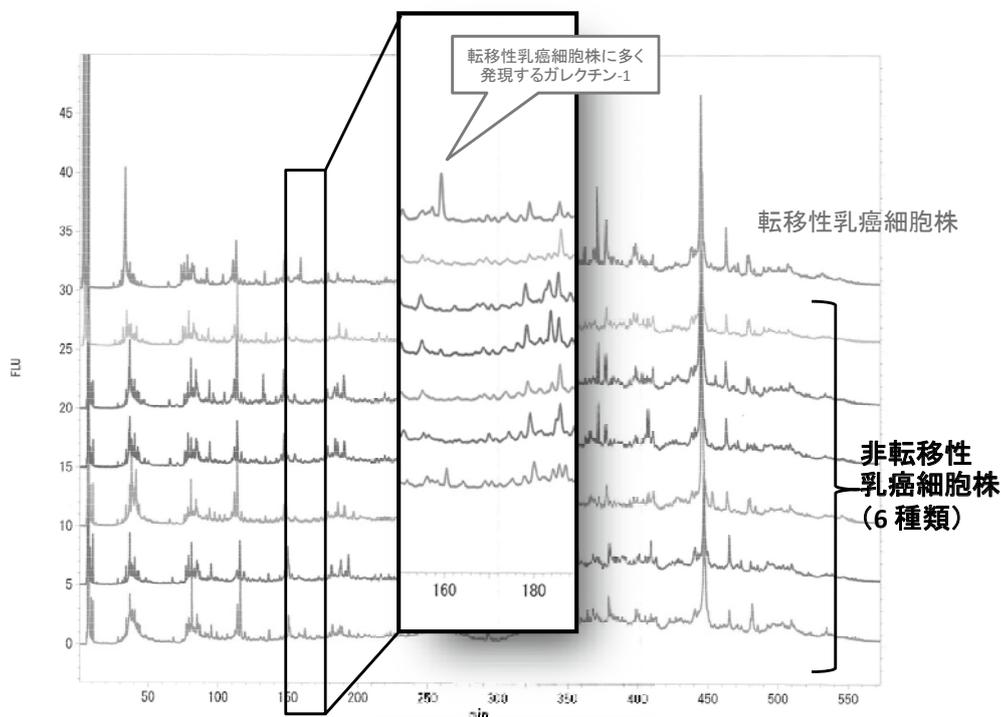


Figure 1. Chromatograms of the proteins in soluble fraction of breast cancer cells derivatized with DAABD-CI

DAABD-CI (**A5596**) の 7- 位の CI は SH 基と特異的に反応結合する。**A5596** それ自身は無蛍光であるが、SH 基と反応結合した場合はベンゾオキサジアゾール骨格に起因する強い蛍光を持つ。タンパク質中に含まれる S-S 結合、SH 基はそれほど多くなく、理想的な割合でタンパク質を蛍光標識することができる。しかもその励起波長、蛍光波長とも長波長で、高感度、高選択的なタンパク質の蛍光分析、分取が行える。また、4- 位の末端にジメチルアミノ基を有しており、エレクトロスプレーイオン化により正イオンが強い強度で得られる。そのため、極微量のペプチドをも解析することができる。

A5596 を用いる今井らの開発したタンパク質分析法 (FD-LC-MS/MS 法) は微量のタンパク質を精度よく簡便に同定することができる。存在量が僅かな異常タンパク質、病原タンパク質などの同定を始めとする多方面でのプロテオミクスへの利用が期待されている。

文献 1) M. Masuda, C. Toriumi, T. Santa, K. Imai, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 728.

2) M. Masuda, H. Saimaru, N. Takamura, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.* **2005**, 19, 556.

3) T. Ichibangase, K. Moriya, K. Koike, K. Imai, *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 2841.

4) H. Asamoto, T. Ichibangase, K. Uchikura, K. Imai, *J. Chromatogr. A* **2008**, 1208, 147.

5) T. Ichibangase, H. Saimaru, *et al.*, *Biomed. Chromatogr.* **2008**, 22, 232.

6) K. Imai, T. Ichibangase, R. Saitoh, Y. Hoshikawa, *Biomed. Chromatogr.* **2008**, 22, 1304.

7) T. Ichibangase, K. Imai, *J. Proteome Res.* **2009**, 8, 2129.

8) K. Imai, A. Koshiyama, K. Nakata, *Biomed. Chromatogr.* **2011**, 25, 59.

9) K. Nakata, R. Saitoh, J. Amano, A. Koshiyama, T. Ichibangase, *et al.*, *Cytokine* **2012**, 59, 317.

10) 今井一洋, 特許 4558297 号.

11) *Quantitative Proteome Analysis: Methods and Applications*, ed. by K. Imai, S. L. F. Yau, Pan Stanford Publishing, Singapore, **2013**.

12) K. Nakata, T. Ichibangase, R. Saitoh, M. Ishigai, K. Imai, *Analyst* **2015**, 140, 71.

製品コード番号一覧

製品コード	製品名	ページ
A5501	4-Bromophenacyl Bromide	4
A5502	9-Chloromethylantracene	5
A5503	<i>N</i> -Chloromethyl-4-nitrophthalimide	6
A5504	<i>N</i> -Chloromethylphthalimide	7
A5505	3'-Methoxyphenacyl Bromide	8
A5506	<i>N,N'</i> -Diisopropyl- <i>O</i> -(4-nitrobenzyl)isourea	9
A5507	1-(4-Nitrobenzyl)-3- <i>p</i> -tolyltriazene	10
A5508	Phenacyl Bromide	11
A5511	3,5-Dinitrobenzoyl Chloride	12
A5512	2,4-Dinitrofluorobenzene	13
A5513	Phenyl Isothiocyanate	14
A5514	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranosyl Isothiocyanate	15
A5522	<i>N</i> -Succinimidyl 4-Nitrophenylacetate	16
A5523	<i>N</i> ^o -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)- <i>L</i> -leucinamide	17
A5524	<i>N</i> ^o -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)- <i>D</i> -leucinamide	17
A5531	2,4-Dinitrophenylhydrazine Hydrochloride	18
A5532	<i>O</i> -4-Nitrobenzylhydroxylamine Hydrochloride	19
A5551	Br-Mmc	20
A5552	Dansyl Hydrazine	21
A5553	3-Bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one	22
A5554	NBD-PZ	23
A5555	DBD-PZ	24
A5556	DBD-H	25
A5557	NBD-H	26
A5558	DBD-COCl	27
A5560	(<i>S</i>)-(+)-DBD-APy	28
A5561	(<i>R</i>)-(-)-DBD-APy	29
A5562	(<i>S</i>)-(+)-NBD-APy	30
A5563	(<i>R</i>)-(-)-NBD-APy	31
A5564	(<i>S</i>)-(-)-DBD-Pro-COCl	32
A5565	(<i>R</i>)-(+)-DBD-Pro-COCl	33
A5566	(<i>R</i>)-(+)-NBD-Pro-COCl	34
A5567	(<i>S</i>)-(-)-NBD-Pro-COCl	35
A5568	(<i>R</i>)-(-)-DBD-Py-NCS	36
A5569	(<i>S</i>)-(+)-DBD-Py-NCS	37
A5570	4-Bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin	38
A5573	NBD-CO-Hz	39
A5574	DBD-ED	40
A5575	DBD-NCS	41
A5576	AABD-SH	42
A5577	(<i>R</i>)-(-)-NBD-Py-NCS	43
A5578	(<i>S</i>)-(+)-NBD-Py-NCS	44
A5579	4-(4,5-Diphenyl-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)benzoyl Chloride Hydrochloride	45
A5581	1,3-Cyclohexanedione	46
A5591	NAM	47
A5592	NBD-Cl	48
A5593	NBD-F	49
A5595	DBD-F	50
A5596	DAABD-Cl	51

東京化成工業株式会社

試薬製品について

■本社営業部 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町 16-12 T-PLUS 日本橋小伝馬町8階
Tel: 03-3668-0489 Fax: 03-3668-0520 E-mail: Sales-JP@TCIchemicals.com

■大阪営業部 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜1-1-21 第2中井ビル1階
Tel: 06-6228-1155 Fax: 06-6228-1158 E-mail: osaka-s@TCIchemicals.com

スケールアップ、受託サービス(合成・開発・製造)について

□化成品営業部 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町 16-12 T-PLUS 日本橋小伝馬町8階
Tel: 03-5651-5171 Fax: 03-5640-8021 E-mail: finechemicals@TCIchemicals.com

弊社製品取扱店

本誌掲載の化学品は試験・研究用にのみ使用するものです。化学知識のある専門家以外の方のご使用はお避けください。品目や製品情報等、掲載内容の変更を予告なく行う場合があります。内容の一部または全部の無断転載・複製はご遠慮ください。