

蛍光ラベル化剤

Fluorescence Labeling Reagents

NBD- and DBD- Series

微量成分を検出，定量する手段として，高い感度と選択性を有する蛍光検出-HPLCが多用されています。そして，より高い感度と選択性を得るため分析対象物質を蛍光標識することが行われており，多くの蛍光ラベル化剤が報告されています。その中でもNBD-とDBD-誘導体は，ベンゾオキサジアゾール骨格に起因する長波長の強い蛍光を有しているため，優れた蛍光ラベル化剤として注目されています。

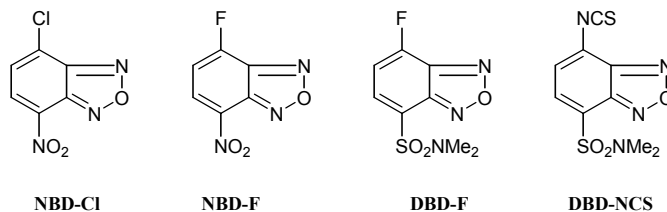
近年，今井，豊岡らは数種のNBD-とDBD-誘導体を開発し，それぞれアミノ基，メルカプト基，カルボニル基，カルボキシル基，水酸基の標識に応用し，良好な結果を報告しています。以下，分析対象物質の官能基別に利用されるNBD-, DBD-誘導体を紹介いたします。

アミノ基:

NBD-Clは，最も早くHPLCに応用された蛍光ラベル化剤で，プロリンなど二級アミンに対しての有用性が報告されています。今井らは，NBD-Clの4-(7-)位のClをFに代えたNBD-F¹⁻³⁾をアミノ基の蛍光ラベル化剤としてHPLC分析に応用，良好な結果を報告しています。それによれば，NBD-FはNBD-Clより高い反応性を持っており，一級アミンに対しても十分満足できる検出限界を有しています。

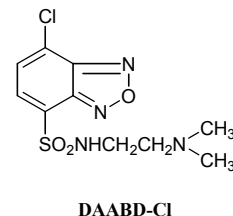
また，今井らはベンゾオキサジアゾール骨格にジメチルスルファモイル基を導入したDBD-F⁴⁻⁶⁾を開発，逆相HPLCにてアミノ酸の分離定量を行っています。DBD-Fはそれ自身が無蛍光であるため，高い感度でアミノ酸を検出，定量することができ，その検出限界はサブピコモルと報告されています。

DBD骨格の4-(7-)位にイソチオシアト基を導入したDBD-NCS⁷⁻⁹⁾はペプチド，蛋白質の末端アミノ基と結合後，酸処理することによりエドマン分解に利用可能です。



メルカプト基:

DBD-Fは，チオール類とも定量的に反応，強い蛍光を有する反応生成物を与えます。この反応生成物は，HPLCで分離，高感度で蛍光検出されます。例えば，システイン，グルタチオンの検出限界は，それぞれ0.92, 0.16ピコモルと報告されています。また，近年，今井らはDAABD-Clを用いた蛋白質の有用な分離，同定法を報告しています。それによると，まず，蛋白質のS-S結合を還元してメルカプト基にした後，DAABD-Clで蛍光標識します。次いで目的とする蛋白質を蛍光HPLCにて分離，分取し，さらにプロテアーゼにより，ペプチドに分解します。そして得られたペプチド混合物をHPLC/MS/MSにて測定し，得られたマススペクトルデータをMASCOTデータベースシステムで解析することにより，元の蛋白質を特定しています。本法はプロテオームの新規解析法として期待されています。¹⁰⁾



Keywords : fluorescence labeling reagents, NBD derivatives, DBD derivatives

2007. May, A-1079

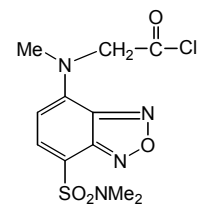
掲載されている内容は予告なく変更される場合があります。あらかじめご了承ください。



水酸基:

上述のように DBD-F は、アミン、チオール類の優れた蛍光ラベル化剤ですが、アルコール、フェノール類には使用することができません。今井らは水酸基とも反応し、安定な蛍光生成物を与える DBD-COCl^(11,12)を開発しました。DBD-COCl は、DBD-骨格の 4-(7-) 位に *N*-クロロホルミルメチル-*N*-メチルアミノ基を有しており、水酸基、アミノ基、メルカプト基と脱酸剤の存在下、反応し、安定な反応生成物を与えます。反応生成物は逆相 HPLC で分離、蛍光検出することができます。アンドロステロン、エストロン、マンデル酸の検出限界は、それぞれ 38,40,125 フェムトモルと報告されています。

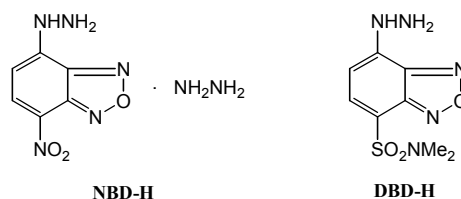
DBD-COCl は従来から知られている求電子的蛍光ラベル化剤と比較し、幅広い求核性官能基を標識できることから、さまざまな分野での応用が期待されます。



DBD-COCl

カルボニル基:

今井らは、NBD-, DBD-骨格の 4-(7-) 位にヒドラジノ基を導入した NBD-H, DBD-H⁽¹³⁾を開発し、アルデヒド、ケトン類の蛍光検出に应用しています。NBD-H, DBD-H はいずれも無蛍光ですが、アルデヒド、ケトン類との反応生成物は強い蛍光を有します。標識反応はアセトニトリル中、トリフルオロ酢酸の存在下、室温で進行します。反応生成物は逆相 HPLC で分離、蛍光検出することができます。DBD-H によるプロピオン



NBD-H

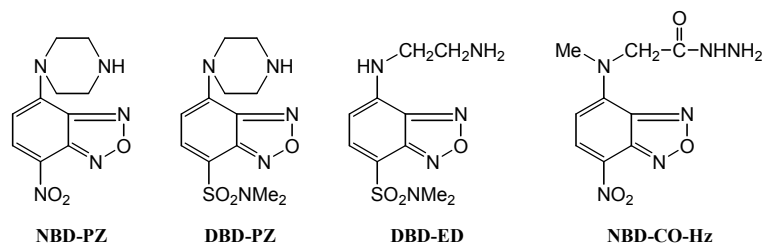
DBD-H

アルデヒドの検出限界は、120 フェムトモルと報告されています。NBD-H は、アルデヒド類に、そしてより反応性の高い DBD-H は、ケトン類の検出定量向きとされており、ケトステロイド、糖類などの検出、定量への応用が期待されます。

カルボキシル基:

NBD-, DBD-骨格の 4-(7-) 位にピペラジンを導入した NBD-, DBD-PZ⁽¹⁴⁾ や 2-アミノエチルアミノ基を導入した DBD-ED^(15,16) は、カルボン酸類の蛍光検出に利用されています。NBD-, DBD-PZ, DBD-ED はアセトニトリルあるいはジメチルホルムアミド中、縮合剤の存在下、室温でカルボン酸と反応し、安定なアミド化合物を生成します。このアミド化合物は逆相 HPLC で分離、蛍光検出することができます。DBD-PZ による飽和脂肪酸の検出限界は 3.2~4.7 フェムトモルと報告されています。プロスタグランジン、胆汁酸などの検出、定量への応用が期待されます。

NBD-骨格の 4-(7-) 位に *N*-ヒドラジノカルボニルメチル-*N*-メチルアミノ基を有する NBD-CO-Hz⁽¹⁷⁾ もカルボン酸類の蛍光検出に用いられています。



NBD-PZ

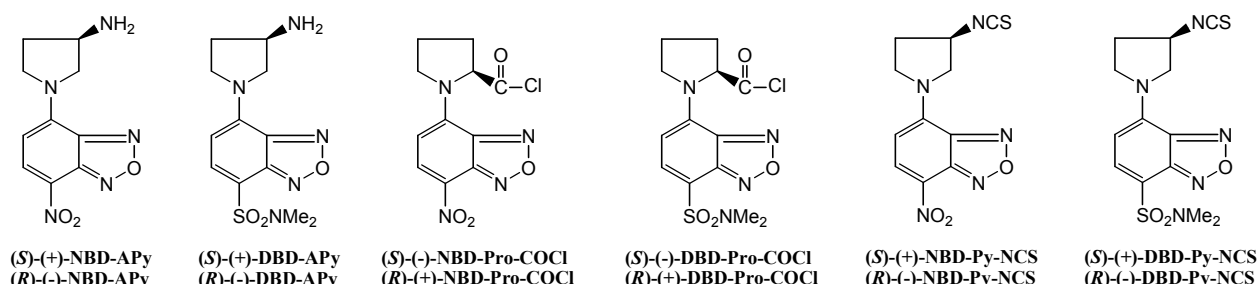
DBD-PZ

DBD-ED

NBD-CO-Hz

光学純度の測定:

NBD-, DBD-APy^(18,19), NBD-, DBD-Pro-COCl^(20,21), NBD-, DBD-Py-NCS⁽²²⁻²⁵⁾ は、それぞれ NBD-, DBD-骨格の 4-(7-) 位に光学活性な 3-アミノピロリジン、2-クロロホルミルピロリジン、3-イソチオシアナトピロリジンを導入した化合物です。NBD-, DBD-APy はカルボン酸類と、NBD-, DBD-Pro-COCl はアルコール、アミン類と、NBD-Py-NCS はアミン類と、DBD-Py-NCS はチオール、アミン類と反応し、HPLC 上で非常に良く分離するジアステレオマーを生成します。また、NBD-, DBD-Py-NCS はエドマン分解への応用も報告されています。



高感度化:

分析対象物質を DBD-, NBD- 誘導体で標識した反応生成物は、強い蛍光を有しており、高感度で検出できる。しかも、長波長に蛍光を有しているため、夾雑物の影響を受け難いという特徴を有しています。さらに高い感度で検出するため、化学発光^{26,27)}、レーザー蛍光検出の応用が期待されます。また、DAABD- 誘導体は正イオンモード MS 分析において高い感度を示します。

製品

A5592	NBD-Cl	5g	1g	A5562	(S)-(+)-NBD-APy	100mg
A5593	NBD-F		100mg	A5563	(R)-(-)-NBD-APy	100mg
A5595	DBD-F		100mg	A5560	(S)-(+)-DBD-APy	100mg
A5575	DBD-NCS		100mg	A5561	(R)-(-)-DBD-APy	100mg
A5557	NBD-H		100mg	A5567	(S)-(-)-NBD-Pro-COCl	100mg
A5556	DBD-H		100mg	A5566	(R)-(+)-NBD-Pro-COCl	100mg
A5554	NBD-PZ		100mg	A5564	(S)-(-)-DBD-Pro-COCl	100mg
A5555	DBD-PZ		100mg	A5565	(R)-(+)-DBD-Pro-COCl	100mg
A5572	NBD-COCl		100mg	A5578	(S)-(+)-NBD-Py-NCS	100mg
A5558	DBD-COCl		100mg	A5577	(R)-(-)-NBD-Py-NCS	100mg
A5573	NBD-CO-Hz		100mg	A5569	(S)-(+)-DBD-Py-NCS	100mg
A5571	DBD-CO-Hz		100mg	A5568	(R)-(-)-DBD-Py-NCS	100mg
A5574	DBD-ED		100mg	A5596	DAABD-Cl	100mg

文献

- 1) K. Imai, Y. Watanabe, *Anal. Chim. Acta*, **1981**, 130, 377.
- 2) Y. Watanabe, K. Imai, *J. Chromatogr.*, **1982**, 239, 723.
- 3) Y. Watanabe, K. Imai, *J. Chromatogr.*, **1984**, 309, 279.
- 4) T. Toyooka, T. Suzuki, Y. Saito, S. Uzu, K. Imai, *Analyst*, **1989**, 114, 413.
- 5) T. Toyooka, T. Suzuki, Y. Saito, S. Uzu, K. Imai, *Analyst*, **1989**, 114, 1233.
- 6) K. Imai, S. Uzu, T. Toyooka, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1989**, 7, 1395.
- 7) Y. Huang, H. Matsunaga, A. Toriba, T. Santa, T. Fukushima, K. Imai, *Anal. Biochem.*, **1999**, 270, 257.
- 8) H. Matsunaga, T. Santa, K. Hagiwara, H. Homma, K. Imai, S. Uzu, K. Nakashima, S. Akiyama, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 4276.
- 9) K. Imai, S. Uzu, K. Nakashima, S. Akiyama, *Biomed. Chromatogr.*, **1993**, 7, 56.
- 10) M. Masuda, C. Toriumi, T. Santa, K. Imai, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 728; M. Masuda, H. Saimaru, N. Takamura, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, **2005**, 19, 556.
- 11) K. Imai, T. Fukushima, H. Yokosu, *Biomed. Chromatogr.*, **1994**, 8, 107.
- 12) 東京化成工業 (株), 特開平 07-238075.
- 13) S. Uzu, S. Kanda, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama, *Analyst*, **1990**, 115, 1477.
- 14) T. Toyooka, M. Ishibashi, Y. Takeda, K. Nakashima, S. Akiyama, S. Uzu, K. Imai, *J. Chromatogr.*, **1991**, 588, 61.
- 15) 東京化成工業 (株), 特開平 10-218871.
- 16) 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.
- 17) T. Santa, A. Takeda, S. Uchiyama, T. Fukushima, H. Homma, S. Suzuki, H. Yokosu, C. K. Lim, K. Imai, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, 17, 1065.
- 18) T. Toyooka, M. Ishibashi, T. Terao, *Analyst*, **1992**, 117, 727.
- 19) T. Toyooka, M. Ishibashi, T. Terao, *J. Chromatogr.*, **1992**, 625, 357.
- 20) 東京化成工業 (株), 特開平 06-184141.
- 21) 東京化成工業 (株), 特開平 07-188224.
- 22) T. Toyooka, Y-M. Liu, *Analyst*, **1995**, 120, 385.
- 23) T. Toyooka, Y-M. Liu, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 689, 23.
- 24) T. Toyooka, Y-M. Liu, *Chromatographia*, **1995**, 40, 645.
- 25) Y-M. Liu, J-R. Miao, T. Toyooka, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 314, 169.
- 26) S. Uzu, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama, *Biomed. Chromatogr.*, **1991**, 5, 184.
- 27) S. Uzu, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama, *Analyst*, **1991**, 116, 1353.