

オンカラム電気化学的酸化還元化学種変換液体クロマトグラフィーシステムの開発

- アドレナリン代謝物の電気化学的挙動と保持挙動 -

日大生産工(院) ○小田 幹 日大生産工 齊藤 和憲, 中釜 達朗
ユタ大 Marc D. Porter 埼玉大院理工 渋川 雅美

【緒言】

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、研究や産業などの幅広い分野で利用されている分離分析法である。近年、分析対象化合物は増加の一途をたどっており、また、多成分混合物中の極微量成分の分離が要求されていることから、それらに対応した高分離選択性を有するシステムの開発が望まれている。分離選択性を向上させる方法として、特異的な化学反応を利用する方法がある。そのうち、化学反応を二次的平衡(SCE)として利用する方法は、その化学平衡に関与する物質の保持を反応試薬の濃度で制御できるため、高い分離選択性を実現できる。最近、本研究室では、Porterらの開発した電気化学クロマトグラフィー(EMLC)を用い¹⁾、カラムへの印加電位を制御することにより、分析対象化合物の酸化還元反応を SCE として制御可能であることを明らかにした。

一方、アドレナリン代謝物には、カテコールアミンと呼ばれるカテコールとアミンを有する構造の物質が数多く存在する。カテコールアミンの酸化によって生成されるアミノクロムはパーキンソン病や動脈硬化の原因となっており、カテコールアミンおよびアミノクロムを分離・定量する手法が求められている³⁾。

本研究はオンカラム酸化還元化学種変換液体クロマトグラフィーシステムの開発を目的とし、L-アドレナリン、およびアミノクロムであるアドレノクロムの電気化学的挙動および保持挙動の検討した結果について報告する。

【実験操作】

サイクリックボルタンメトリー(CV)測定

試料溶液としては、L-アドレナリンおよびアドレノクロムを0.1M リン酸緩衝溶液(pH=3.5)で溶解したものをを用いた。参照電極はAg/AgCl(1M NaCl)電極を用いた。電位走査速度は100 mV s⁻¹とした窒素雰囲気下で行った。

EMLC カラムの作製

Fig.1 に EMLC カラムの概略図を示す。EMLC カラムは、多孔質ステンレス管に管状のナフィオン陽イオン交換膜を挿入し、BTRcarbon(3.5 μm)を充填して作製した。参照電極はAg/AgCl電極(飽和NaCl)を用い、多孔質ステンレス管を浸漬した電解質溶液内に設置した。

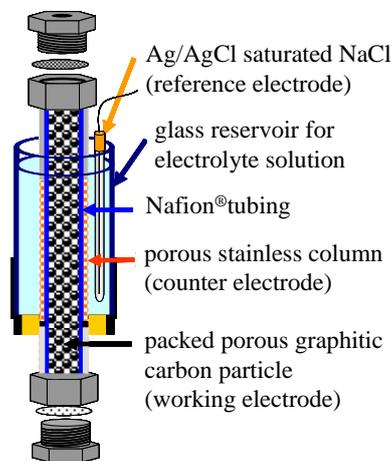


Fig.1 Schematic diagram of EMLC column.

HPLC 測定

Fig.2 に本研究で使用した HPLC システムの概略図を示す。溶離液は pH 3.5 に調整した 0.1 M リ

Development of On-Column Electrochemical Redox Derivatization Liquid Chromatography System
-Electrochemical Behavior and Retention Behavior of Adrenaline Metabolite-

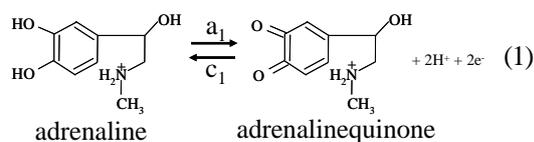
Takashi ODA, Kazunori SAITOH, Marc D. PORTER, Masami SHIBUKAWA and Tatsuro NAKAGAMA

ン酸緩衝溶液に 50%(v/v)アセトニトリルを添加したものを用いた。流量は 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ に設定し、試料注入体積は 5 μl とした。電解セルは esa 社製 Guard cell 5020 (GC) および Analytical cell 5010 (AC) を使用し、印加電位はポテンショスタット(esa 社製)により制御した。この電解セルは酸化還元反応による誘導體化を行うためのものである。検出はフォトダイオードアレイ検出器を用い、200~500 nm の波長で測定した。EMLC カラムへの印加電位はポテンショスタット(北斗電工製)を用いて制御した。アドレノクロムおよび L-アドレナリンのストック溶液は、0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 3.5)で溶かして調製した。HPLC システムに注入する試料溶液は、溶離液でストック溶液を希釈し、0.1 mM に調製したものを用いた。

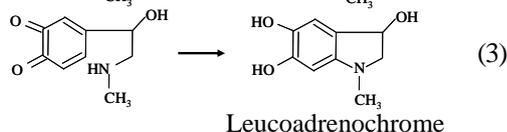
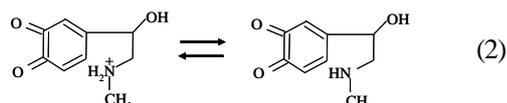
【結果および考察】

アドレノクロムおよび L-アドレナリンの CV 測定

Fig.3b は、L-アドレナリンのボルタンモグラムを示したものである。3つの酸化ピーク ($a_1 \sim a_3$) および 3つの還元ピーク ($c_1 \sim c_3$) が見られる。Wang らは、アドレナリンの電気化学的酸化還元挙動について調査し、その代謝過程を提案している⁴⁾。そこで、Wang らの過程に基づき、次のように L-アドレナリンの反応機構を解析した。L-アドレナリンは a_1 で酸化してアドレナリンキノンに変換する((1)式)。



アドレナリンキノン、環化反応を示してロイコアドレノクロムへと変換する((2)および(3)式)。



ロイコアドレノクロムは酸化すると、酸化体であるアドレノクロムを生成する((4)式)。

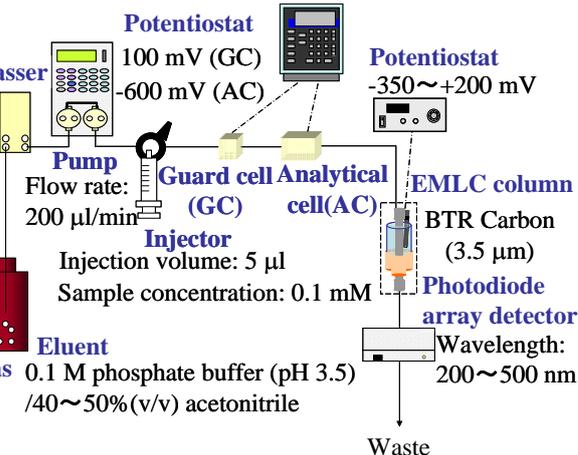


Fig.2 Schematic diagram of on column electrochemical redox derivatization liquid chromatography system.

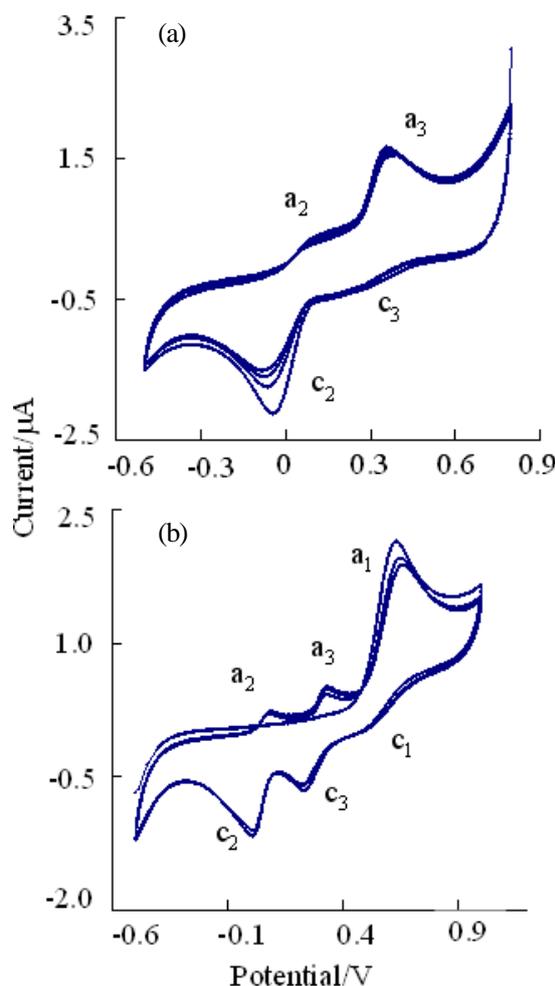
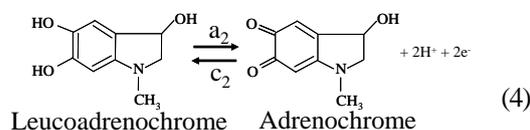
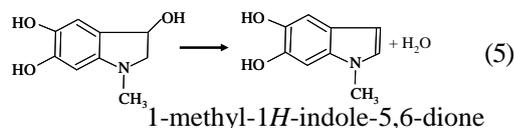


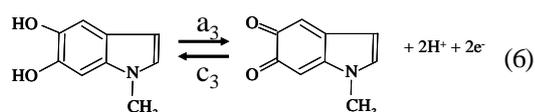
Fig.3 Cyclic voltammograms of adrenaline and adrenochrome. Sample: 0.5 mM adrenochrome (a) and adrenaline (b) in 0.1 M phosphate buffer (pH 3.5) Scan rate: 100 mV/s



一方、ロイコアドレノクロムは、低いpH条件化では脱水反応を生じ、1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールに変換する((5)式)。



さらに、1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールは a_3 で酸化し、得られた酸化体は c_3 で還元する((6)式)。



このようにアドレナリンは電極反応によって種々の代謝物質に変換することが可能であり、EMLCカラム内での化学種変換が可能であると考えられる。特に、アドレナリン、アドレノクロムおよび1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールが、酸化または還元反応によって還元体または酸化体に変換できることから、EMLCカラムにおける保持挙動を検討することとした。一方、L-アドレナリンを酸化することによって生じるアドレノクロムを用いてCV測定を行った。Fig.3aはそのボルタンモグラムである。観察されたピークは、L-アドレナリンのボルタンモグラム(Fig.3b)で観察されたピーク a_3 および c_2 と同様の電位で観察された。しかし、 a_2 および c_3 については、明瞭なピークが見られなかった。この原因についてはまだ明らかになっていない。

フロー電解セルを用いた1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールへの化学種変換条件の検討

EMLCカラムにおける1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールの保持挙動については、EMLCカラムの前段にフロー電解セルを設置し、セル内でL-アドレナリンまたはアドレノクロムを1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールに変換することとした。そこで、フロー電解セルによる化学種変換の条件について検討した。本検討に用いるシステムは、電解セルの後段に分離カラムを設置したものを用いた。分離カラムには、逆相クロマトグラフィー用のオクタデシルシリカ(ODS)カラムを用いた。Fig.4aは、本システムにアドレノクロムを注入し

た際のクロマトグラムである。印加電位を-600 mVとした。ピークが2つ検出され、ピークのスペクトルから8分付近のピークが1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールであることが明らかになった。また、6分付近のテーリングしたピークは、アドレノクロム試薬中の不純物と考えられる。次に、L-アドレナリンの変換について検討した。先に述べたとおり、L-アドレナリンから1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールへの変換は、アドレナリンキノンへの酸化変換と、1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールへの還元変換を行う必要がある。そこで、ODSカラムの前段に2つの電解セルを設置し、前段のセルに+100 mV、後段のセルに-600 mVを印加したシステムを用いて、化学種変換を試みた。Fig.4bはそのクロマトグラムを示したものである。3つのピークが観察され、ピークの吸収スペクトルを確認したところ、L-アドレナリン、アドレノクロム、1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールの順に溶出していることが明らかになった。これより、L-アドレナリンから1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールへの変換は完全に達成されていないことが明らかになった。前段の電解セル内では(1)および(2)式より、L-アドレナリンが還元してアドレナリンキノンが生成し、これがロイコアドレノクロムに変換するが、(7)式に示す

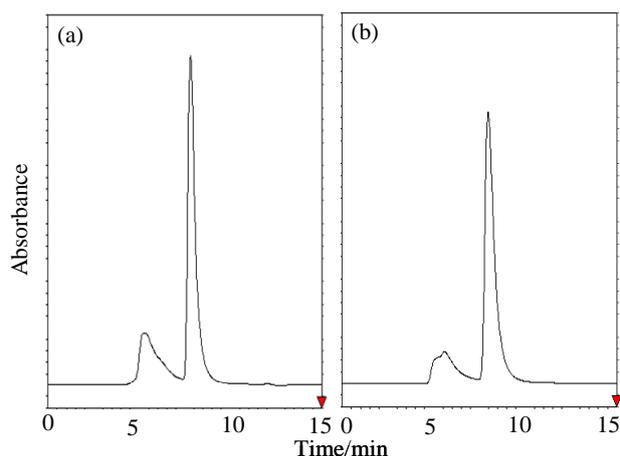
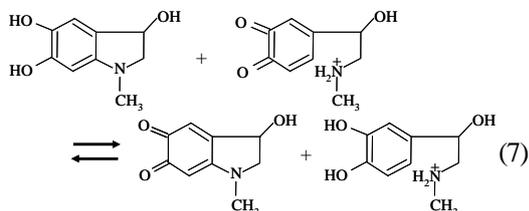


Fig. 4 Schematic chromatograms of generated 1-methyl-1*H*-indole-5,6-diol using electrolytic cell.
Sample: (a) adrenochrome, (b) L-adrenaline
Applied potential: (a) -600 mV (AC), (b) +100 (GC), -600 mV (AC)
Column: ODS column (XBridge™, 5 μm 4.6 × 100 mm)

ように、一部のアドレナリンキノンがロイコアドレノクロムと反応して再度アドレナリンが生成することが考えられる。このため、完全に1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールに変換しなかったものと推測される。



印加電位に対するアドレノクロム、L-アドレナリンおよび1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールの保持時間の依存性

Fig. 5は、印加電位に対するアドレノクロムとL-アドレナリンおよび1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールの保持時間の依存性を示したものである。アドレノクロムおよびL-アドレナリンはEMLCカラムのみを使用した。1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールについては、L-アドレナリンを試料として用い、EMLCカラムの前段に2つの電解セルを設置したシステムを用いて行った。アドレノクロムの保持時間は、印加電位+100~+200 mVの範囲内で一定だが、-50 mV以下の電位を印加すると増加した。ピークのスペクトルを調べたところ印加電位+100~+200 mVではアドレノクロムとして溶出した。-50 mV以下では、アドレノクロムの還元により生成した1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールが溶出した。一方、L-アドレナリンの保持時間は、全ての印加電位範囲において変化が見られず、また、ピークの吸収スペクトルからL-アドレナリンとして溶出していることを確認した。

1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールは印加電位-200~0 mVにおいて、アドレノクロムと同様の保持時間であったが、印加電位+100~+200 mVにおいてはその保持が著しく増加した。得られた吸収スペクトルから、印加電位-200~0 mVでは1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールとして溶出していることが明らかになった。一方、1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールが酸化した1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオンは、1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールと反応して二量化することが報告されている⁵⁾。このことから、100 mV以上の電位を印加すると、1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールは、酸化して得られた1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオンと二量化したため保持が増加したと考えられる。

以上の結果から、L-アドレナリン、アドレノクロムおよび1-メチル-1*H*-インドール-5,6-ジオールは、EMLCカラムの印加電位を変化させることによって化学種変換することができ、容易に保持時間を変えることが可能であることが示唆された。

【参考文献】

- 1) J. A. Harnisch, M. D. Potter, *Analyst*, 126, 2001, 1841.
- 2) K. Saitoh, K. Koichi, F. Yabiku, Y. Noda, M. D. Potter, M. Shibukawa, *J. Chromatogr. A*, 1180, 2008, 66.
- 3) S. D. Ochs, T. C. Westfall, H. Macarthur, *J. Neurosci Methods*, 142, 2005, 201.
- 4) H.-S. Wang, D.-Q. Huang, R.-M. Liu, *J. Electroanal. Chem.*, 570, 2004, 83.
- 5) M. Grazia, A. Napolitano, G. Prota, *Tetrahedron*, 42, 1986, 2083.

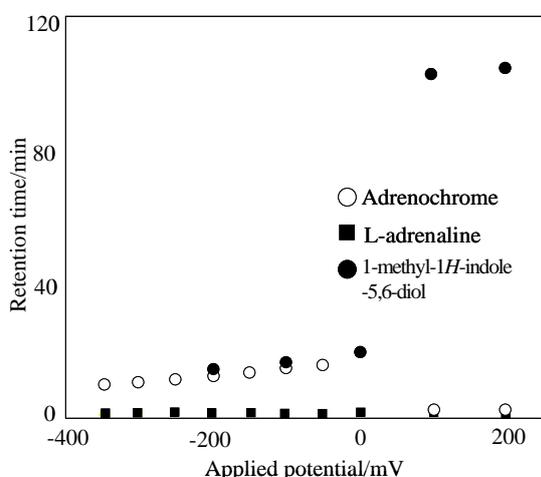


Fig. 5 Dependence of retention time of adrenochrome, L-adrenaline and generated 1-methyl-1*H*-indole-5,6-diol on applied potential.