生体試料中の 4-Nitroquinoline 1-Oxide およびその代謝産物の定量法
(第 2 報) 4-Aminoquinoline の蛍光定量法

山根靖弘, 坂井和男, 吹野秀亀, 大多和昌克, 飯郷正明, 森田育男
千葉大学薬学部衛生化学教室¹⁾

Determination of 4-Nitroquinoline 1-Oxide, and Its Metabolites in
Biological Materials. II. The Fluorimetric De-
termination of 4-Aminoquinoline

YASUHIRO YAMANE, KAZUO SAKAI, HIDEKI FUKINO, MASAKATSU OHTAWA,
MASAAKI IIGO, and IKUO MORITA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University¹⁾

(Received May 18, 1974)

Following the previous report on the determination of 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), which is a chemical carcinogen, and its metabolites, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO), 4-aminoquinoline 1-oxide (4-AQO), and 4-hydroxyquinoline 1-oxide (4-(OH)QO) in biological materials, fluorimetric determination of 4-aminoquinoline (4-AQ), which is the last reduced metabolite of 4-NQO, was established. After the development on a silica gel thin-layer chromatography, a single band of R_f 0.15, corresponding to 4-AQ, was extracted with HCl-MeOH (R_f s of 4-HAQO 0.60, 4-AQO and 4-(OH)QO 0.45) and the fluorescence intensity was measured with excitation at 300 nm and emission at 355 nm. In addition a further modification of the determination of 4-NQO and its metabolites was attempted and a more rapid and more reliable determination was established.

化学発がん物質である 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO と略す) とその代謝産物である 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO と略す), 4-aminoquinoline 1-oxide (4-AQO と略す) および 4-hydroxyquinoline 1-oxide [4-(OH)QO と略す] について, 生体試料中における分離定量法をさきに報告した.²⁾ しかしながら, 4NQO の代謝の研究を進める上において, それらの最終還元代謝産物である 4-aminoquinoline (4-AQ と略す) の定量法の確立がさらに必要とされるので, 上記代謝産物に加えて 4-AQ の微量定量法の開発に関する研究を行った.

4-AQ の定量法については, 現在までその報告はほとんどない. そこで著者らは種々の検討を加えた結果, 4-AQ が発蛍光性を有することに着目し, その蛍光定量を試みたところ, 高感度の分析法が得られた. また, 4-NQO とその代謝産物の分離定量にもさらに検討を加え, 十分利用性のある定量法を確立したので報告する.

定 量 法

1. 試薬

薄層クロマト用シリカゲル Kieselgel-G [5% CaSO₄ 含有] (Merck 社 No. 60) を厚さ 0.5 mm として用い, 120°, 90 分間活性化する.

展開溶媒 *sec*-ブタノール:酢酸エチル:水 (2:1:1) を混合し, 24 時間以上放置したのち, 上層を用いる.

4-AQ 抽出用塩酸メタノール 0.1N HCl 10 ml にメタノールを加え, 250 ml とする.

4-NQO, 4-HAQO, 4-AQO および 4-(OH)QO 前報²⁾ と同様のものを使用.

4-AQ Howitz³⁾ および落合⁴⁾ の方法で合成, 精製したものを使用.

1) Location: 1-33, Yayoi-cho, Chiba.

2) 山根靖弘, 大多和昌克, 飯郷正明, 薬誌, 92, 631 (1972).

3) C. Howitz, *J. pr.*, [2] 56, 182 (1943).

4) E. Ochiai (ed.), "Aromatic Amine Oxide," Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1967, p. 362.

● **その他の試薬** すべて試薬特級を使用。

2. 装置

日立自記分光光度計 EPS-3T 型, 島津ボシュロム Spectronic 20 回析格子型光電比色計, 日立分光蛍光光度計 MPF-2A 型, ターナー蛍光光度計 Model 110.

ホモジナイザーはガラスホモジナイザー 10 ml 用を使用。

3. 定量分析操作

本操作は 4-NQO およびその代謝産物 [4-HAQO, 4-AQO, 4-(OH)QO および 4-AQ] の分離定量法を示す。

4-NQO およびその代謝産物を含む組織のホモジネート溶液 2 ml にベンゼン 5 ml を加え, 3 分間振とうし, 4-NQO を抽出し, このベンゼン層を 392 nm にて吸光度を測定し, 4-NQO の量を求める。

一方, 分離された水層に 2N HCl 0.1 ml を加え (pH を約 1 とする), すばやく振り混ぜたのち, クロロホルム 4 ml で 1 回洗浄する。遠心分離してこの有機層を十分に分離したのち, その水層の一定量を薄層板上にスポットし, 展開溶媒を用いて展開する。

この薄層板を紫外線照射し, 蛍光スポットを観察すると, R_f 0.60 に 4-HAQO の緑色蛍光, R_f 0.45 に 4-AQO および 4-(OH)QO の青色蛍光, R_f 0.15 に 4-AQ の紫色蛍光が現われる。

4-HAQO, 4-AQO および 4-(OH)QO の定量を行なうには, シリカゲル薄層板からそれぞれ相当する部分をすみやかにかきとり, 前報²⁾に従って蛍光定量を行う。

4-AQ の定量には, R_f 0.15 の 4-AQ に相当する部分をかき取ったのち, 4-AQ 抽出用塩酸メタノール 5 ml を加え, 15 分間振とうした後, 20 分間, 3000 rpm で遠心分離する。この上清液を励起波長 300 nm, 蛍光波長 355 nm で蛍光強度を測定し, 4-AQ 量を求める。

実験と考察

4-AQ の発蛍光性と蛍光定量

4-AQ は塩酸-メタノール中で発蛍光性を示し, 励起極大波長は 330 nm, 蛍光極大波長は 355 nm に存在する (Fig. 1)。

4-AQ を蛍光定量する場合に, 上記励起波長に設定して行なうと, 透過光の影響を受けて定量が妨害されるので, 本定量を行なう場合には励起波長 300 nm, 蛍光波長 355 nm で行なうことにした。参考のため検量線を Fig. 2 に示した。原点を通り, 4-AQ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ まで直線性を示した。

Fig. 1. Fluorescent Spectrum of 4-AQ in HCl-MeOH

Fig. 2. Calibration Curve of 4-AQ

4-NQO の代謝産物である 4-HAQO, 4-AQO および 4-(OH)QO はすべて蛍光定量できるので, 4-AQ も蛍光定量ができるということは, これらが同種の方法で定量が行なえるという利点があるとともに, 感度の点でも高感度でしかもその定量濃度範囲がほぼ等しいことも, 代謝の研究に大きな一助となると考えられる。

4-AQ の薄層クロマトグラフィーによる分離

4-AQ を定量する場合, 4-NQO の他の代謝産物と分離する必要があるので, 薄層クロマトグラフィーによる分離を試みた。

展開溶媒としては, 前報²⁾と同様の *sec*-ブタノール:酢酸エチル:水 (2:1:1) の混合溶媒を用いて, シリカゲル上で展開させたところ, R_f 0.60 に 4-HAQO, R_f 0.45 に 4-AQO および 4-(OH)QO が展開されたが, 4-AQ は R_f 0.15 に紫色蛍光として観察された。この分離の状態を Fig. 3 に示したが, 4-AQ は本展開溶媒で非常に良く分離されていることがわかる。

なお、4-AQ の確認は、薄層部分を塩酸メタノールで抽出し、紫外外部吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルにより同定した。

薄層からの 4-AQ の抽出

薄層クロマトグラフィーにて分離された 4-AQ を抽出して蛍光定量する場合の抽出溶媒について検討した。ヘキサン、ベンゼン、*sec*-ブタノール、*n*-ブタノールおよび *iso*-アミルアルコールなどは抽出不可能であったが、メタノールでは 1 回の抽出で 100% 近く抽出できることが認められた。また、4-AQ は酸性溶液中で安定であるので、蛍光定量操作時における安定性を考慮して、塩酸メタノールを抽出溶媒として用いることとした。

生体試料からの 4-AQ などの代謝産物の分離定量と回収率

生体組織のホモジネートにベンゼンを加え、4-NQO を抽出した残りの水層に、アスコルビン酸と塩酸エタノールを加えて、室温で減圧濃縮してから、薄層クロマトグラフィーで分離する方法を前報²⁾で報告した。しかし、この減圧濃縮の過程において、時間がかかり過ぎる点などもあって、各代謝産物は分解し、回収率の悪くなることを認めたので、濃縮操作を行なわないで、短時間にしかも簡易に行なう方法を考慮した。そこで、これらの代謝産物はいずれも約 pH 1 の酸性で安定性のあることを確認したので (Table I 参照)、単に塩酸酸性 (約 pH 1) にするのみで分析を行なったところ、回収率に大きな上昇がみられた。本法で行なった場合の回収率を Table II に示した。

A: *R_f* 0.60 4-HAQO
B: *R_f* 0.45 4-AQO and 4-(OH)QO
C: *R_f* 0.15 4-AQ

Fig. 3. Separation of 4-NQO Metabolites by Thin-Layer Chromatography

TABLE I. Effect of pH on the Decomposition of 4-NQO Metabolites

	Recovery (%)			
	pH 1	pH 4	pH 7	pH 9
4-HAQO	96	69	69	28
4-AQO	98	93	94	94
4-(OH)QO	100	100	100	100
4-AQ	94	90	82	67

The amounts used are as follows: 4-HAQO: 20 μ g; 4-AQO: 4.9 μ g; 4-(OH)QO: 19.6 μ g; 4-AQ: 11.5 μ g.

TABLE II. Recovery of 4-NQO, 4-HAQO, 4-AQO, 4-(OH)QO and 4-AQ from Tissue

	Taken (μ g)	Found (μ g)	Recovery (%)
4-NQO	12.0	12.0	100.0
	12.0	11.8	98.3
	12.0	11.5	95.8
	19.0	18.4	96.8
	19.0	18.9	99.5
		av.	98.1
4-HAQO	20.0	19.5	97.5
	20.0	19.5	97.5
	40.0	39.7	99.3
	40.0	39.4	98.5
		av.	98.2
4-AQO	4.9	4.7	95.9
	4.9	4.9	100.0
	9.8	8.5	86.8
	9.8	8.7	88.8
		av.	92.9

4-(OH)QO	19.6	18.4	93.9
	35.2	31.4	89.2
	35.2	34.2	97.2
	35.2	35.2	100.0
			av. 95.1
4-AQ	11.5	10.5	91.3
	11.5	10.3	89.6
	23.5	20.8	88.5
	23.5	21.0	89.4
			av. 89.7

すなわち、4-HAQO は前法では回収率が 69.0% であったのが、本法では 98.2% に、また 4-AQO は 67.2% が 92.9%、4-(OH)QO は 50.3% が 95.1% にそれぞれ上昇し、いずれも 90% 以上の高回収率を得た。なお、4-AQ も 89.7% の回収率を示した。

結 論

4-NQO の最終還元代謝産物である 4-AQ は Kawazoe⁵⁾ らのラジオアイソトープを用いた間接的分析によれば、肝臓中においては投与後 30 分で 4-HAQO の 25 倍、4-AQO の 5 倍存在することが報告されている。このことから生体中の 4-AQ が直接にしかも簡易に定量できるようになったことは、生体中における 4-NQO の代謝過程を追及するうえで大きな役割を果たすと考えられる。

また前報では、4-NQO の代謝産物を減圧濃縮する場合に多くの時間を要し、その間に分解を起こし、回収率が 70% に満たないことが多かったが、本法では操作を簡易化し、短時間で分析を行なうことにより、上記のような分解を防ぎ、90% 以上の高回収率を得られるようになった。

以上のように、前法に改良を加えた結果、代謝産物としての 4-AQ の定量が可能になり、また他の代謝産物も高回収率が得られ、直接定量に一段と精度を加えて、代謝の研究に有用性を深めたものと考えられる。

謝辞 最後に本研究にあたり試料を提供していただいた国立がんセンターの川添 豊博士、4-NQO などの合成にご援助をいただいた本学薬品製造化学教室の池田仁三郎教授ならびに石井 永助教授に深甚の謝意を表するとともに、本研究にご協力していただいた武立啓子、芦野けい子の諸氏に感謝の意を表する次第である。

5) Y. Kawazoe, N. Uehara, M. Araki, *Gann*, **60**, 617 (1969).