高速液体クロマトグラフ法による 4-メチルウンベリフェロン
アシルエステル類の分析¹⁾赤田良信, 山田和司, 近藤龍仁, 棚瀬弥一郎
徳島文理大学薬学部²⁾High-speed Liquid Chromatographic Analysis of Acyl Esters
of 4-Methylumbelliferone¹⁾YOSHINOBU AKADA, KAZUSHI YAMADA, TATSUHIITO KONDŌ and YAICHIRO TANASE
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University of Arts and Science²⁾

(Received December 24, 1976)

Acetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, valeryl, isovaleryl, pivaloyl, caproyl, enanthoyl, caprylyl, pelargonoyl, caprinoyl, lauroyl, myristoyl, palmitoyl, and benzoyl esters of 4-methylumbelliferone were synthesized and a method was developed for the determination of these esters by the use of a high-speed liquid chromatography. Separation can be achieved by using a 1-m column of Permaphase ODS, using gradient from H₂O to MeOH as an eluant with a Du Pont 830 liquid chromatograph. By this method, satisfactory separation was obtained for 12 normal aliphatic acyl esters of 4-methylumbelliferone. Accuracy in this method was about $\pm 2\%$.

Keywords—high-speed liquid chromatography; 4-methylumbelliferone; acyl esters of 4-methylumbelliferone; Permaphase ODS; separation analysis

4-Methylumbelliferone (7-hydroxy-4-methylcoumarin, 以下 4-Mu と略す) のアシルエステルは, カルボキシエステル類の基質としてよく用いられている.³⁾ しかし, これらは, ある特定の炭素数のアシル基をもつ 4-Mu エステルを用いて個別に酵素反応を行ない, 反応により遊離した 4-Mu を蛍光法により定量しその活性を測定するものであり, 同時に多くのエステル類の一斉分離分析を行なった報告は見当たらない.

著者等は, 種々の 4-Mu エステルの混合物について酵素反応を行なえば, 酵素活性の特異性を容易に認めることが可能であると共に, 単一の基質で行なうよりもより詳細な知見が得られるのではないかと考え, 高速液体クロマトグラフィー (以下 HLC と略す) によるこれら基質群の簡便な分離分析法の開発について検討を行なった. 4-Mu の脂肪酸エステル 15 種および芳香族エステル 1 種について, HLC による一斉分析を行なった結果, 各エステル間の分離定量が可能であることがわかったので報告する.

実 験 の 部

4-Mu エステル類の合成 4-Mu のアシル化は, 常法に従い無水ピリジン中で対応するカルボン酸の無水物または塩化物と 4-Mu を反応させ, 16 種の 4-Mu アシルエステル, acetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, valeryl, isovaleryl, pivaloyl, caproyl, enanthoyl, caprylyl, pelargonoyl, caprinoyl, lauroyl, myristoyl, palmitoyl および benzoyl 4-Mu を合成した. 得られた各エステルの融点および元素分析値は文献値と一致した.⁴⁾

1) 日本薬学会中四国支部第 46 回例会で発表, 徳島, 1976 年 7 月.

2) Location: Yamashiro-cho, Tokushima.

3) T.J. Jacks, H.W. Kircher, *Anal. Biochem.*, **21**, 279 (1967); G.G. Guibault, J.E. Hieserman, M.H. Sadar, *Anal. Lett.*, **2**, 185 (1969); H. Brockerhoff, *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 181 (1969); P. Melius, M.S. Martha, *Anal. Biochem.*, **37**, 395 (1970).

4) V.P. Dusberg, *Ber.*, **16**, 2122 (1883); G.G. Guibault, M.H. Sadar, R. Glazer, C. Skou, *Anal. Lett.*, **1**, 365 (1968); T.J. Jacks, H.W. Kircher, *Anal. Biochem.*, **21**, 279 (1967); C. Fitzmaurice, H. Cairnis, R. Hazard, J. King, *Brit. J. Appl. Biol.*, **1**, 093,637 (Cl, C 07d) Dec. 6, 1969. Appl. sept. 27 1963, and June 18, 1964, 14pp; H. Brockerhoff, *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 181 (1969); V.K. Bhagwat, R.Y. Shahane, *Rasayan*, **1**, 191 (1939).

4-Mu が 323 nm 附近に紫外吸収極大をもつのにに対し、これらのアシルエステル類は共通して 273 nm と 310 nm 附近に吸収極大をもつ。また、4-Mu が強い蛍光をもつのに反し、各エステルは蛍光をもたない。

HLC 条件 装置 Pu Pont 830 Liquid Chromatograph, カラム: Permaphase ODS 2.1 mm i.d. × 1 m, 移動相: 水に MeOH を 2%/min の割合で添加する直線型グラジエント, カラム入口圧: 500 psi, 流量: 1.4 ml/5 min, カラム温度: 室温, 検出器: UV 検出器 (254 nm). 試料は、その約 2 mg を精密に秤取し、MeOH 1 ml に溶解後、その 1 μ l から 5 μ l をセプタムを通してカラムに直接注入した。

結果および考察

HLC 測定条件の検討

試料が水にとけず、MeOH に可溶である点を考慮して、Permaphase ODS のカラムを用い、水-MeOH 逆相分配による分離を検討した。直鎖脂肪酸の 4-Mu エステル類 (炭素数 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 の 12 種) については、水-MeOH の濃度勾配を 1%/min から 10%/min まで検討したが、2%/min で試料を注入してより 1 時間以内に、炭素数 2 のアセチル 4-Mu から、炭素数 16 のパルミトイル 4-Mu までの各エ

Fig. 1. Separation of 4-Methylumbelliferone Acyl Esters by HLC on Permaphase ODS using Gradient from H₂O to MeOH at 2 %/min as Eluant

1: solvent, 2: 4-methylumbelliferone, 3: acetyl, 4: propionyl, 5: butyryl, 6: valeryl, 7: caproyl, 8: enanthoyl, 9: caprylyl, 10: pelargonoyl, 11: caprinoyl, 12: lauroyl, 13: myristoyl, 14: palmitoyl.

ステルを、炭素数の小さいものより完全に単一のピークとして溶出分離し、良好な再現性をもつクロマトグラムを得ることができた (Fig. 1). 各ピークの単一性については、分取後、その UV スペクトルおよび、薄層クロマトグラフ (plate: Wakogel B-5, solvent: CHCl₃-acetone (10: 1, v/v) および、CHCl₃-hexane (7: 3, v/v), 発色剤: 1% NaOH 水溶液, 検出: UV 照射) により調べた結果、他の成分の混在は認められなかった。なお、本研究の目的が 4-Mu アシルエステルの酵素分解に本法を応用することにあるため、水解後多量に生じる 4-Mu が得られたクロマトグラムにいかなる影響をおよぼすかが問題となる。しかし、Fig. 1 に示したごとく、4-Mu は最初に溶出され、アセチル 4-Mu エステル以下のエステルの分離パターンに影響を与え

ない。従って、本法を酵素反応に直接応用することが可能であると考えられる。

脂肪酸エステルのうち、炭素数 4 のブチリルと iso-ブチリル、炭素数 5 のバレリル、iso-バレリルおよびピバリルの各異性体については、炭素数 4 のエステルについては、ブチリル、iso-ブチリルの順に、また炭素数 5

TABLE I. Accuracy of This Method

Ester	Added (μ g)	Found (μ g)	Error (%)
Acetyl	0.76	0.77	+1.32
	1.14	1.14	± 0.00
	1.52	1.54	+1.32
propionyl	0.76	0.77	+1.32
	1.14	1.13	-0.88
	1.52	1.53	+0.66
Butyryl	1.29	1.29	± 0.00
	1.29	1.31	+1.55
	1.72	1.73	+0.58
Valeryl	1.26	1.24	-1.59
	1.26	1.28	+1.59
	1.68	1.68	± 0.00

	2.07	2.06	-0.48
Caproyl	2.07	2.09	+0.97
	2.76	2.77	+0.36
	1.08	1.08	±0.00
Enanthoyl	1.08	1.09	+0.93
	1.44	1.46	+1.39
	0.72	0.72	±0.00
Caprylyl	1.08	1.08	±0.00
	1.44	1.46	+1.39
	0.82	0.83	+1.22
Pelargonoyl	1.23	1.22	-0.81
	1.64	1.67	+1.83
	0.40	0.41	+2.50
Caprinoyl	0.80	0.81	+1.25
	1.20	1.21	+0.83
	0.74	0.74	±0.00
Lauroyl	1.11	1.11	±0.00
	1.11	1.12	+0.90
	0.76	0.78	+2.63
Myristoyl	1.14	1.14	±0.00
	1.14	1.16	+1.75
	0.72	0.76	+5.56
Palmitoyl	1.08	1.08	±0.00
	1.08	1.10	+1.85

のエステルについては、ピバリル、バレリル、iso-バレリルの順にそれぞれ溶出することがわかったが、完全に各成分を分離することはできなかった。Permaphase ODS よりも高分離能をもつと考えられる Zorbax ODS (2.1 mm i. d. × 25 cm) のカラムを用いて同様の実験を行なったが、Permaphase ODS と同様の結果を得たのみで、その分離を改善することはできなかった。次に、炭素数 7 の脂肪酸エステルであるエナントイル 4-Mu と、芳香族エステルであるベンゾイル 4-Mu について分析を行なった結果、ベンゾイル、エナントイルの順に完全に分離することがわかった。このベンゾイル 4-Mu の溶出位置は、炭素数 6 の直鎖脂肪酸エステルであるカプロイル 4-Mu のそれと完全に一致し、芳香族 4-Mu エステルの場合は、炭素数の 1 個少ない直鎖脂肪酸エステルのそれと同一の溶出挙動を示すのではなからうかと考えられる。

直鎖脂肪酸エステル類の定量精度

12 種の 4-Mu エステルは、それぞれ試料注入量とピーク高さは、良好な直線関係をもつことがわかった。最小自乗法により求めた回帰直線の方程式を用いて、12 種混合試料につきその定量精度を求めたが、Table II に示したように、ほぼ ±2% 以内の誤差で各エステルを分離定量できることがわかった。またピーク高さのかわりにピーク面積を用いても同様の結果が得られた。

結 論

以上のように、4-Mu の直鎖脂肪酸エステル 12 種は、著者等が設定した条件により、その炭素数の小さいものより順次溶出分離し、精度よく分別定量できることがわかった。従って、従来より汎用されている単一の基質を用いて酵素活性を測定する方法に加えて、本法を適用することにより多種の基質の混合物を使用して酵素反応を行ない各基質の変動を容易にクロマト分析することが可能となったため、より詳細な酵素反応の知見が得られると考えられる。また、生じる 4-Mu が強い蛍光をもつため、4-Mu ピークの検出に蛍光検出器を用いれば、その微量定量も可能となり、多方面への応用が期待できる。