

VMA スポット法の反応生成色素

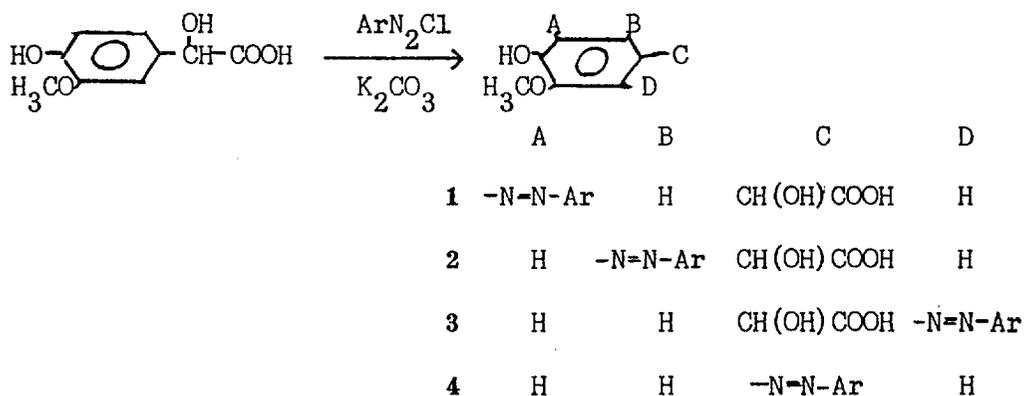
鈴木 重任, 高橋 利恵子

(東京都立衛生研究所)

はじめに

昭和58年10月より東京都においても神経芽細胞腫のマス・スクリーニングがスポット法で行われるようになった。この方法およびその変法であるDip法は1次スクリーニングの方法として多くの都道府県で行われている。しかしこれら *p*-nitrophenyldiazonium salt による方法では、疑陽性が常に2~3%出ることが問題となっている。これは、食品由来の尿中物質がジアゾカップリング反応により、4-hydroxy-3-methoxymandelic acid (VMA)と同様の紫色を呈すること、すなわちこの反応の選択性(基質特異性)が低いことが主な理由と考えられている。このため検査前にそのような食品を摂らないよう指導が行われているが、その化学的根拠は必ずしも明確でない。我々は、スポット法の食餌指導、又分析法の改良のため疑陽性物質の検索を行うにあたり、まずこの方法による反応生成物を確めることからはじめようと考えた。

この反応の原理は、VMAとジアゾ化された *p*-nitroaniline のジアゾカップリング反応と考えられているが、VMAのジアゾカップリングの起こる位置については4つの可能性が考えられる(図1)。生成物1~3は、水酸基又はメトキシル基のパラ位、又はホルト位が置換される通常の反応であるが、4は側鎖の-CH(OH)COOHが脱離し置換が起こる異常ジアゾカップリング反応である。



Ar = *p*-nitrophenyl

図1. 生成するアゾ色素の可能性

Gitlow ら (1) は、生成物 1 を考え、Vauquelin ら (2) はアルカリ性の条件で 4 が、また酸性の条件で 1 と 4 が生成することを報告しているが、その構造については $^1\text{H-NMR}$ による検討にとどまっている。我々は、通常スクリーニングに用いられているスポットテストの条件下で生じる呈色反応成績体をその条件に準じた液相中で合成し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ および高分解能質量分析 (MS) によって構造を確定した。またその可視紫外吸収について若干の検討を加えた。

実 験

1. 試薬 *dl*-4-hydroxy-3-methoxymandelic acid (VMA) 東京化成特級品、他は全て和光純薬特級品を用いた。
2. 装置 融点：矢沢 BY-1 微量融点測定器 (未補正)、可視紫外吸収スペクトル：日立 320 自記分光光度計、 $^1\text{H-NMR}$ ：270MHz、 $^{13}\text{C-NMR}$ ：67.5MHz、共に CDCl_3 中 TMS を内部標準として日本電子 FX270 で測定、MS：直接導入法により日本電子 D-300 で高分解能測定
3. スポットテスト、東洋沱紙 No 2 に VMA 2.0mg を約 1ml の 0.01N HCl 溶液に溶かし滴下。0.1% *p*-nitroaniline (2% HCl 溶液)、0.2% NaNO_2 溶液、10% K_2CO_3 溶液を約 5℃ 冷却後 1:1:2 の割合で順に混合し前述の沱紙に噴霧、紫色に発色した部分を切り取り CHCl_3 で抽出、濃縮した。
4. 液相条件における反応、VMA (1.778g) の 0.01N HCl 溶液 91.2ml と 10% K_2CO_3 溶液 2,500 ml を氷水中で混合、別に 0.1% *p*-nitroaniline (2% HCl 溶液) 1,250 ml と 0.2% NaNO_2 1,250 ml を氷水中で混合し、前述の混液に滴下混合、反応後に酢酸を加え pH7 にし CHCl_3 で抽出濃縮後 MeOH から再結晶し 4-hydroxy-3-methoxy-4'-nitroazobenzene の赤褐色針状晶、1.03g を得る (収率 41%)。m.p. 172~173.5℃ (171.5~173℃ (3), 150℃ (2), 125~135℃ (4))。薄層クロマト (TLC) による確認、ここに得た結晶とスポットテスト発色物質は、シリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck) 板上、下記の条件で同じ挙動を示し同一物質と確認した。R_F. (CHCl_3) 0.58, ($\text{EtOH-n-C}_5\text{H}_{11}\text{OH-ammonia}$ (10:10:1)) 0.57, ($\text{AcOEt-MeOH-ammonia}$ (45:10:10)) 0.47

結果および考察

スポットテストおよびそれに準じた液相中アルカリ性の条件では、紫色の同一の生成物が検出され、TLC 上に他の色素は認められなかった。この物質の MS スペクトル、 m/z 273 (M^+) (図 2、表 1) より基質の $-\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ が脱離してジアゾカップリングの結果生じた成績体 4 (図 1) が考えられ 1~3 は否定された。他のフラグメントイオンもこれを支持し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ のデータもこの構造を証明している (表 2、表 3)。融点の文献値が種々異なるのは結晶多型のためと考えられる。

反応機構としてはVauquelinらが指摘しているように電子供与性の側鎖のつけねのC₁炭素への親電子反応と考えることができるが、またラジカル反応機構の可能性もある。

単離された色素4は溶媒の種類、液性により異った色調を示す。すなわちメタノール中、酸性・中性では黄色、アルカリ性では赤紫色を示す。エタノール、アミルアルコール等のアルコールでも同様である。アセトン、ピリジンでは深色効果が認められ(表4)酸性・中性溶液中の吸収は母核のトランス-アゾベンゼン $\lambda_{\max} 320\text{nm}$ (ϵ 21500)(5)とよく対応している。pH変化に伴う変色はアゾ型とヒドラゾン型の互変異性にもとづくものと考えられる(6)。

表4. 色素の吸収スペクトル

	溶液の吸収	アルカリ添加時 [※]
メタノール	390 nm (ϵ 23300)	515 nm
アセトン	390 (ϵ 20500)	6 05
ピリジン	410 (ϵ 23400)	6 05

※ 溶液250mlに20%NaOH 6~11滴を加えた

以上のように、スポットテストでジアゾカップリング反応が起こる時、側鎖が切れて失われることが確認された。このことは、1度ジアゾカップリング反応を行ってしまえばその後いくらその色素を分析しても、VMAと側鎖が異り、しかも同じ呈色反応を起こす物質(グアヤコール核側鎖の α 炭素がアルコール又はカルボニルの物質(2, 7))を識別することができないことを意味している。スポット法の疑陽性検体について、そのような、色素を分離する試みは、尿中に共存する物質による不鮮明さを除く目的には適するが、食品由来の同じような反応を起こす物質とVMAを鑑別することはできないことがわかる。

ま と め

VMAスポットテストの生成色素を単離し、その構造を決定した。生成色素は4-hydroxy-3-methoxy-4'-nitroazobenzeneの一種のみであった。VMAの側鎖が失われる異常ジアゾカップリング反応であり、生成された色素の分析からVMAを同定することは、不可能である。

文 献

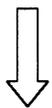
- (1) Gitlow, S.E. et al : Am. J. Med. 28, 921, (1960)
- (2) Vauquelin, G. et al : Clin. Chem. 22, 1955 (1976)
- (3) Ronaldson, J.W. : Aust. J. Chem., 34, 1935 (1981)
- (4) Beilsteins Handbuch. 4 Aufl. X V. 177. Syst. No 2126.
- (5) Rao, C.N.R., "紫外・可視スペクトル" (第2版) p. 44 (東京化学同人, 1970)

- (6) 小西謙三, 黒木宣彦 “合成染料の化学” p 143. (槇書房, 1967)
- (7) Knight, J.A. et al : Clin. Chem. 21, 130 (1975).



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



はじめに

昭和 58 年 10 月より東京都においても神経芽細胞腫のマス・スクリーニングがスポット法で行われるようになった。この方法およびその変法である Dip 法は 1 次スクリーニングの方法として多くの都道府県で行われている。しかしこれら P-nitrophenyldiazonium salt による方法では、疑陽性が常に 2~3% 出ることが問題となっている。これは、食品由来の尿中物質がジアゾカップリング反応により、4-hydroxy-3-methoxymandelic acid(VMA)と同様の紫色を呈すること、すなわちこの反応の選択性(基質特異性)が低いことが主な理由と考えられている。このため検査前にそのような食品を摂らないよう指導が行われているが、その化学的根拠は必ずしも明確でない。我々は、スポット法の食餌指導、又分析法の改良のため疑陽性物質の検索を行うにあたり、まずこの方法による反応生成物を確めることからはじめようと考えた。

この反応の原理は、VMA とジアゾ化された P-nitroaniline のジアゾカップリング反応と考えられているが、VMA のジアゾカップリングの起こる位置については 4 つの可能性が考えられる(図 1)。生成物 1~3 は、水酸基又はメトキシル基のパラ位、又はオルト位が置換される通常の反応であるが、4 は側鎖の $-\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ が脱離し置換が起こる異常ジアゾカップリング反応である。