

生体成分の高感度蛍光プレラベル HPLC 分析に関する研究

井上 裕文

Development of Highly Sensitive Determination of Biogenic Compounds by High-performance Liquid Chromatography with Pre-column Fluorescence Derivatization

Hirofumi INOUE

Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Ichibancho Sanzo, Gakuencho, Fukuyama City 729-0292, Japan

(Received February 17, 2006)

A sensitive fluorescent labeling reagent, 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride (DMS-Cl), for the determination of amino compounds in HPLC was developed. DMS-Cl reacted with amino compounds in the basic medium to produce the corresponding fluorescent sulfonamides (excitation 318 nm, emission 406 nm in aqueous acetonitrile). When amino acids were analyzed using reverse-phase HPLC, the detection limits (signal-to-noise ratio = 3) of almost all amino acids labeled with DMS-Cl were less than 5 fmol/injection. DMS-Cl was utilized for highly sensitive determination of amino compounds in biological samples and HPLC methods for determination of prolyl dipeptides, Pro and Hyp, in serum and urine, pipercolic acid in serum, taurine in plasma, and free and *N*-acetylated polyamine in urine were established. As these proposed methods are highly sensitive and reproducible and require only a small amount of biological sample, they may be useful for clinical and biochemical research.

Key words—fluorescence derivatization; HPLC; amino compounds; biological sample

1. はじめに

HPLC 法は多成分を同時かつ高感度に測定することができる有用な分離分析法の 1 つであり、様々な分野で広く利用されている。特に、試料中に極微量しか存在していない分析対象物を選択的かつ高感度に測定するための手段として、HPLC-蛍光検出法は有効である。HPLC-蛍光検出法を利用するとき、分析対象物が強い蛍光を発する場合には、それ自身の蛍光を利用してそのまま分析が可能であるが、分析対象物がそれ自身蛍光を発しないか蛍光を発しても弱い場合には分析対象物を蛍光誘導体に導くことにより微量の分析が可能となる。蛍光誘導体に導く場合、分析対象物が有する種々の官能基に対する特異的な反応を利用した蛍光誘導体化法が一般に用いられており、これまでに種々の官能基に対する蛍光誘導体化試薬が開発されている。¹⁾

そこで、2-フェニルフルタルイミジン類を発蛍光団

とし、これに各種官能基に対する反応基を導入することにより種々の蛍光誘導体化試薬を開発してきた。²⁻¹⁶⁾ その中で、2-フェニルフルタルイミジンに増感基としてメトキシ基を導入したものを発蛍光団とし、これにアミノ基に対する反応基としてスルホンクロライド基を導入した蛍光誘導体化試薬 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride (DMS-Cl) が安定で非常に強い蛍光を発する誘導体を与えることから、生体成分の高感度分析に有用であることを見出してきた。さらに、この DMS-Cl を用いる誘導体化法と比較的簡単な前処理操作を組合せることにより、生体試料中のアミノ基を有する成分を高感度に精度よく分析する蛍光プレラベル HPLC 分析法の開発を行ってきた。本稿では、それらについて記述する。

2. 蛍光誘導体化試薬の開発⁸⁾

アミノ基と反応する蛍光誘導体化試薬として DMS-Cl を開発し、その有用性について検討した。

DMS-Cl は、塩基性下アミノ酸類と反応し、安定な発蛍光性のスルホンアミド誘導体を与えた (Fig. 1)。合成単離したヒドロキシプロリン (Hyp) の

福山大学薬学部 (〒729-0292 福山市学園町一番地三蔵)
e-mail: inoue@fupharm.fukuyama-u.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

DMS 誘導体は含水溶媒中で強い蛍光を発し、アセトニトリル-水系溶媒中での蛍光極大波長は、Ex: 318 nm, Em: 406 nm であった。また、Hyp の DMS 誘導体の蛍光強度は pH 2.5—3 で強く、中性領域に比べて約 1.3 倍強い強度を示し、蛍光極大波長は pH 2.5—3.5 において短波長側にシフト (392 nm) した。

DMS-Cl の反応性についてモデル化合物として Hyp 及びアラニン (Ala) を用いて検討したところ、誘導体化反応は、Hyp では室温、5 分で完了 (誘導体化率: 約 100%) し、Ala では 70°C, 15 分で完了した。検出限界は、ほとんどのアミノ酸で 5 fmol/injection (S/N=3) 以下であり、DMS-Cl の感度は、一般に利用されているアミノ酸の蛍光分析試薬 (Dansyl-Cl 及び NBD-F) に比べ数十倍—数百倍高感度であった。

以上のことから、DMS-Cl はアミノ酸類の高感度な逆相系 HPLC 分析用蛍光誘導体化試薬であり、生体試料中に極微量しか存在していないアミノ基を有する成分の分析に応用できることが分かった。

3. プロリルジペプチド類、プロリン及びヒドロキシプロリンの高感度蛍光プレラベル HPLC 分析^{9,12)}

コラーゲン中に特異的に含まれ、骨転移癌などのコラーゲン代謝異常を伴う骨疾患において、血清及び尿中の濃度が変動し、これらの疾病の診断や治療経過をみる上での指標とされるプロリルジペプチド類、プロリン (Pro) 及び Hyp の高感度な分析法を確立すべく検討を行った。

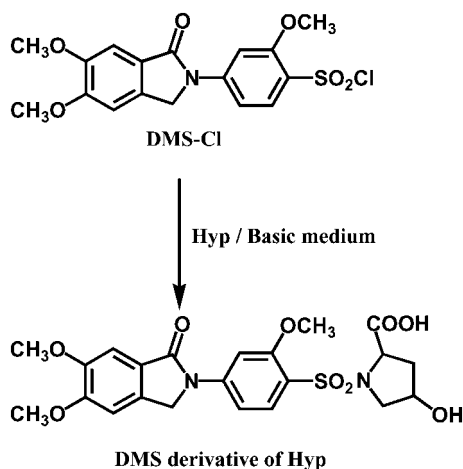


Fig. 1. Labeling Reaction of Hyp with DMS-Cl

DMS-Cl によるプロリルジペプチド類、Pro、Hyp 及び 3,4-デヒドロ-DL-プロリン (内標準物質, IS) の誘導体化反応は、塩基性下、70°C, 20 分間で完了した。標準プロリルジペプチド類 (12 種類)、Pro、Hyp 及び IS の DMS 誘導体は、酢酸 (10 mM) -アセトニトリル系のグラジエント溶出法を用いた逆相系 HPLC で分離され、それぞれ単一のピークとして溶出した (Fig. 2)。検出限界は 1—5 fmol/injection (S/N=3) であり、プロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp は高感度に検出された。

3-1. 尿分析⁹⁾ 尿 (25 μ l) に IS を加え、*o*-フタルアルデヒド (OPA) で処理したのち、Bond Elut C18 カラムを用いた固相抽出により処理し、プロリルジペプチド類、Pro、Hyp 及び IS を DMS-Cl で誘導体化し、HPLC で分離分析した。

尿試料を分析したときのクロマトグラムを Fig. 3 に示す。尿中プロリルジペプチド類として Pro-Hyp、Pro-Gly 及び Pro-Pro が同定された。尿中には数多くの一級アミノ基を有する化合物が含まれており、これらはプロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp の分析を妨害することが予想される。しかしながら、OPA 処理により一級アミノ基を有する化合物をマスキングしたのち、二級アミノ基を有する

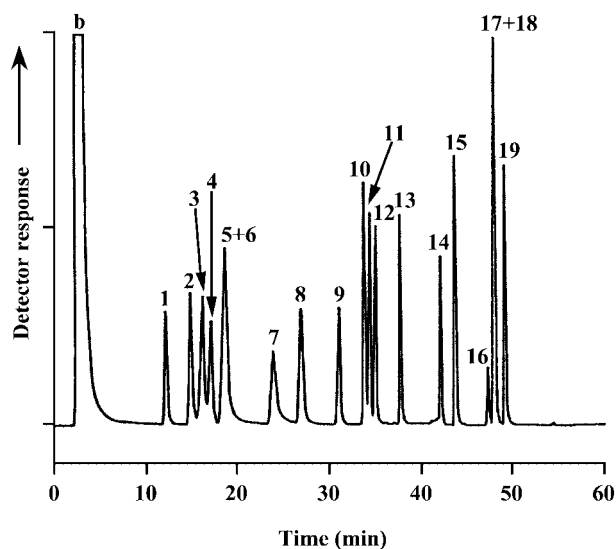


Fig. 2. Chromatogram Obtained from a Standard Solution of Prolyl Dipeptides, Pro, Hyp and IS (10 μ M, each) Labeled with DMS-Cl

Peaks, 1: Hyp, 2: Pro-Asn, 3: Pro-Gln, 4: Pro-Hyp, 5: Pro-Asp, 6: Pro-Ser, 7: Pro-Glu, 8: Pro-Gly, 9: IS, 10: Pro-Ala, 11: Pro, 12: Pro-Pro, 13: Pro-Tyr, 14: Pro-Met, 15: Pro-Val, 16: Pro-Trp, 17: Pro-Ile, 18: Pro-Leu, 19: Pro-Phe, b: Reagent blank.

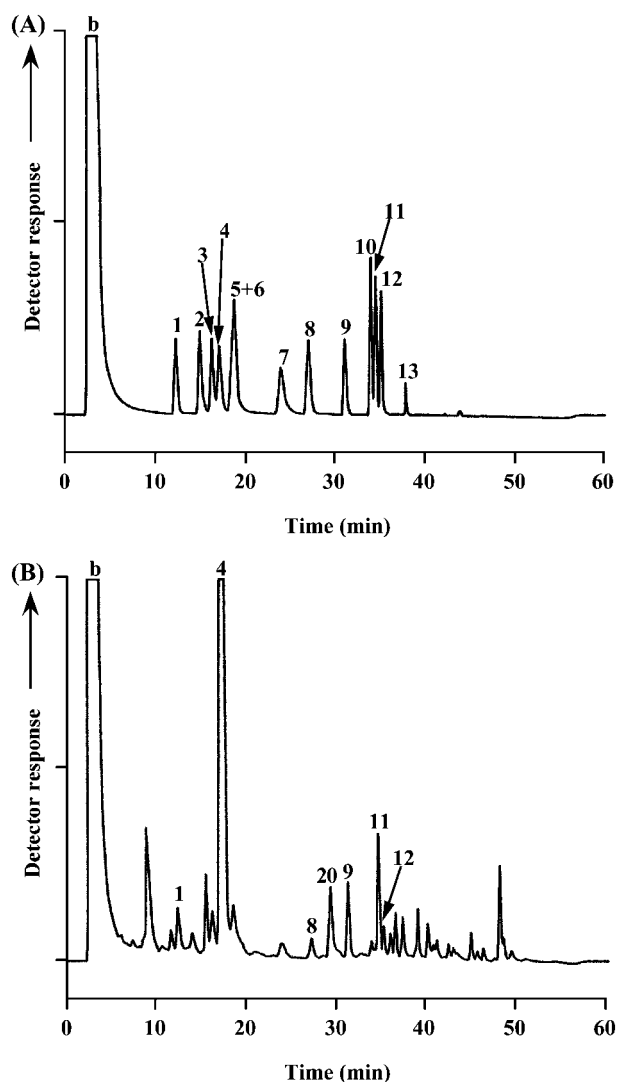


Fig. 3. Chromatograms Obtained from (A) a Standard Solution of Prolyl Dipeptide, Pro, Hyp and IS ($10 \mu\text{M}$, each) and (B) a Human Urine according to the Solid-phase Extraction Method

Legend numbers except 20 (sarcosine) are as in Fig. 2.

プロリルジペプチド類, Pro 及び Hyp を選択的に DMS-Cl で誘導体化することにより, 選択的な分析が可能となった. 尿試料を OPA 処理すると液が著しく呈色したため, この呈色物質を除去するための前処理操作として固相抽出法及び溶媒抽出法を用いて検討した. 一部のプロリルジペプチド類は Bond Elut C18 カラムから完全に回収されなかったが, 尿中に同定された Pro-Hyp, Pro-Gly 及び Pro-Pro の分析には固相抽出法が適していることが分かった. Pro-Hyp, Pro-Gly, Pro-Pro, Pro 及び Hyp の添加回収率は Pro-Gly (86.6%) 以外はほぼ 100% であり, 日内変動及び日差変動における繰り返し精度

(RSD) は, それぞれ 1.5—4.8 及び 1.7—5.8% であった. 本法により尿中プロリルジペプチド類及び遊離型 Pro 及び Hyp が高感度に精度よく選択的に分析された.

3-2. 血清分析¹²⁾ 血清 ($200 \mu\text{l}$) に IS を加え, メタノールで除タンパクし, OPA で処理したのち, DMS-Cl で誘導体化反応を行い, HPLC で分離分析した.

血清試料を分析したときのクロマトグラムを Fig. 4 に示す. 血清中プロリルジペプチド類として Pro-Hyp, Pro-Gly 及び Pro-Pro が同定された. Pro-Hyp, Pro-Gly 及び Pro-Pro, Pro 及び Hyp の添加回収率は 90.8—97.3% であり, 日内変動及び日差変動における繰り返し精度 (RSD) は, それぞれ 1.5—7.9 及び 2.4—10.8% であった. 本法により, 健康人の血清中に極微量しか存在していない Pro-Hyp ($0.64 \pm 0.35 \mu\text{M}$), Pro-Gly ($0.078 \pm 0.047 \mu\text{M}$) 及び Pro-Pro ($0.022 \pm 0.016 \mu\text{M}$) が始めて測定された. また, 骨転移の認められる前立腺癌患者の血清について分析したところ, 健康人に比べて Pro-Hyp は数倍, Pro-Pro では数十倍高い値を示した. 本法により血清中プロリルジペプチド類及び遊離型 Pro 及び Hyp が高感度に精度よく選択的に分析された.

4. 血清中ピペコリン酸の高感度蛍光プレラベル HPLC 分析¹⁴⁾

ピペコリン酸は, 二級アミノ基を有するアミノ酸であり, 脳においてリジンの代謝により生成され, 神経伝達物質として作用していると考えられている. 血清中ピペコリン酸の濃度は, 精神発達遅滞を伴う遺伝的疾患である高ピペコリン酸血症, Zellweger 症候群, 乳児の Refsum 病などにおいて上昇すると言われている. そこで, 血清中ピペコリン酸の高感度な分析法を確立すべく検討を行った.

血清 ($20 \mu\text{l}$) にニペコチン酸 (IS) を加え, メタノールを加えて除タンパクし, OPA で一級アミノ基を有する化合物をマスクしたのち, 二級アミノ基を有するピペコリン酸及び IS を選択的に DMS-Cl で誘導体化 (70°C , 15 分間) し, 酢酸 (10mM)-アセトニトリル-メタノールの混液を用いた逆相系 HPLC (ステップワイズ溶出法) で分離分析した.

ピペコリン酸及び IS の DMS 誘導体は, 逆相系

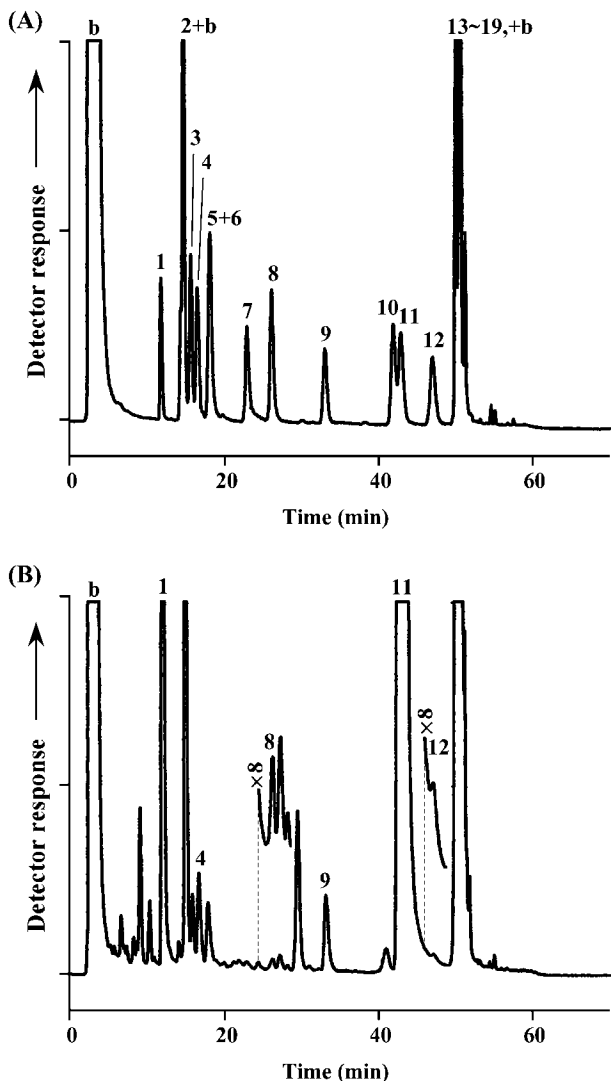


Fig. 4. Chromatograms Obtained from (A) a Standard Solution of Prolyl Dipeptide, Pro, Hyp and IS ($10 \mu\text{M}$, each) and (B) a Normal Human Serum
Legend numbers are as in Fig. 2.

HPLC で分離するとき、試薬ブランク及び他の生体成分と分離し、単一のピークとして溶出した (Fig. 5)。ピペコリン酸の誘導体化率はほぼ 100% であり、検出限界は 4 fmol/injection ($S/N=3$) であった。添加回収率は 104.3% であり、日内変動及び日差変動における繰り返し精度 (RSD) は、それぞれ 3.3–8.1 及び 1.4–6.4% であった。健康人の血清についてピペコリン酸を測定したところ、その濃度は $1.09 \pm 3.5 \mu\text{M}$ であった。本法により血清中ピペコリン酸が高感度に精度よく選択的に分析された。

5. 血漿中タウリンの高感度蛍光プレラベル HPLC 分析¹⁵⁾

タウリンは、含硫黄の β -アミノ酸であり、その生理作用としては、神経伝達物質、抗酸化作用などが知られており、その血漿中の濃度は精神疾患 (抑うつ及びてんかんなど) や網膜症において変動し、心筋梗塞においては血中の濃度が上昇すると言われている。そこで、血漿中タウリンの高感度な分析法を確立すべく検討を行った。

10 倍希釈した血漿試料 ($20 \mu\text{l}$) に *N*-メチルタウリン (IS) 及びホウ酸塩緩衝液 (pH 7.5) を加え、DMS-Cl で誘導体化反応 (70°C , 10 分) を行い、リン酸塩緩衝液 (酸性)-アセトニトリルの混液を用いた逆相系 HPLC (ステップワイズ溶出法) で分離分析した。

タウリン及び IS の DMS-誘導体は、逆相系 HPLC で分離するとき、試薬ブランク及び他の生体成分と分離し、単一のピークとして溶出した (Fig. 6)。検出限界は 3 fmol/injection ($S/N=3$) であった。添加回収率は 100.5% であり、日内変動及び日差変動における繰り返し精度 (RSD) は、それぞれ 3.0–4.8 及び 2.5–4.7% であった。健康人の血漿についてタウリンを測定したところ、その濃度は $48.9 \pm 7.5 \mu\text{M}$ であった。本法は、簡易な操作により、血漿中のタウリンを高感度で精度よく測定できる高感度蛍光プレラベル HPLC 分析法である。

6. 尿中ポリアミン及び *N*-アセチルポリアミンの高感度蛍光プレラベル HPLC 分析¹⁶⁾

細胞の分化や成長に関与し、がん患者においては尿中の濃度が上昇し、さらに、がん患者の治療経過をみる上で有用であると言われているポリアミン及びその代謝物である *N*-アセチルポリアミンの高感度な分析法を確立すべく検討を行った。

尿 ($100 \mu\text{l}$) を水で希釈し、陰イオン交換樹脂 (Dawex 1-X8) を加えて放置したのち、上清の一部にホウ酸塩緩衝液 (pH 9.0) 及び DMS-Cl を加えて誘導体化反応 (50°C , 15 分) を行い、アセトニトリル-メタノール-水系のグラジエント溶出法による逆相系セミマイクロ HPLC で分離分析した。

ポリアミン及び *N*-アセチルポリアミンの DMS-誘導体は、逆相系 HPLC で分離するとき、試薬ブランク及び他の生体成分と分離し、単一のピークと

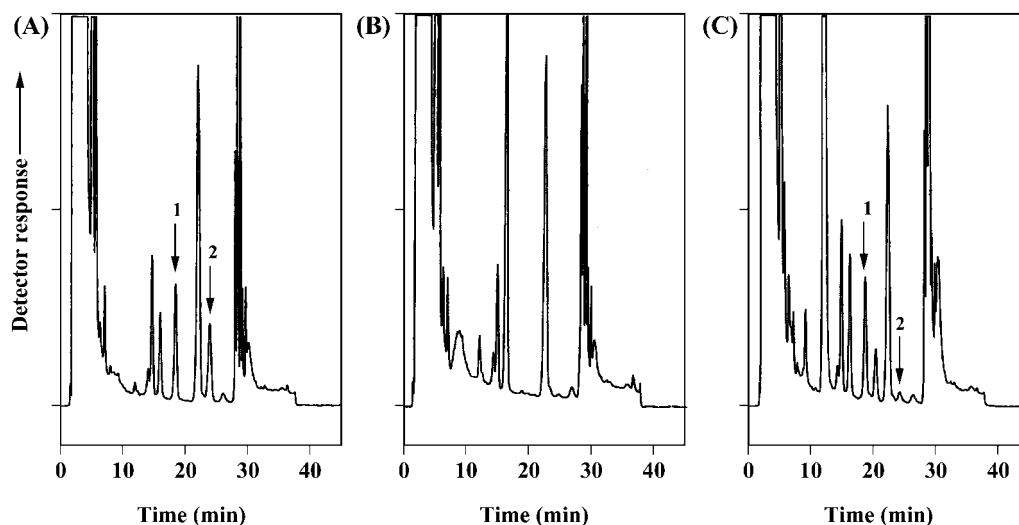


Fig. 5. Chromatograms Obtained from (A) a Standard Solution of Pipecolic Acid ($5 \mu\text{M}$), (B) a Reagent Blank and (C) a Serum Peaks, 1: IS, 2: pipecolic acid.

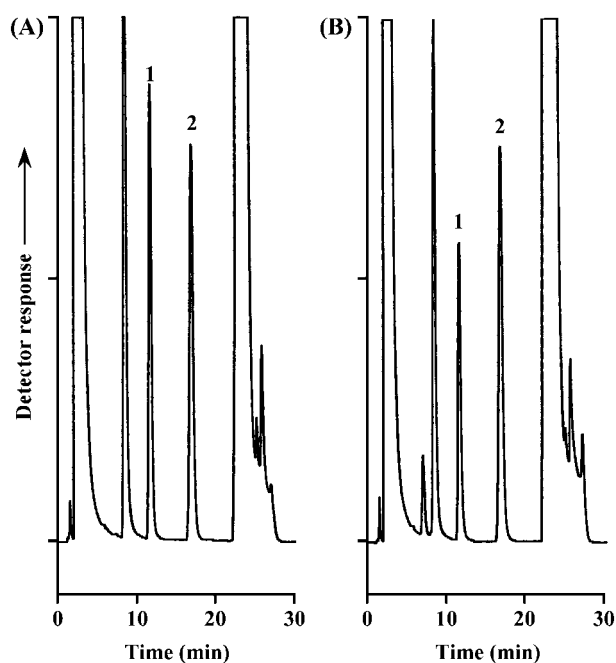


Fig. 6. Chromatograms Obtained from (A) a Standard Solution of Taurine ($5 \mu\text{M}$) and (B) a Plasma Sample Peaks, 1: taurine, 2: IS.

して溶出した (Fig. 7). 検出限界は $0.7\text{--}4.5 \text{ fmol/injection}$ ($S/N=3$) であった. 尿試料を陰イオン交換樹脂の添加なしで分析した場合, ポリアミン及び *N*-アセチルポリアミンの添加回収率は $90\text{--}128\%$ であったが, 陰イオン交換樹脂を添加することにより, 尿中に共存するアミノ酸やペプチドなどによる影響が除去され, 添加回収率はいずれにおいてもほ

ぼ 100% となった. 日内変動及び日差変動における繰り返し精度 (RSD) は, それぞれ $3.2\text{--}7.9$ 及び $3.0\text{--}7.7\%$ であった. 本法により, 健常人の尿中濃度が $0.1 \mu\text{M}$ 程度であるプトレスシンやスペルミンも高感度に分析された. 本法は, 尿中ポリアミン及び *N*-アセチルポリアミンの簡便で精度のよい高感度蛍光プレラベル HPLC 分析法である.

7. おわりに

本研究において, アミノ基と反応する高感度な蛍光誘導体化試薬 DMS-Cl を開発し, さらに, この DMS-Cl を利用して生体試料中に極微量で存在するアミノ酸やペプチド及びアミン類の高感度蛍光プレラベル HPLC 分析法を確立した. 今回確立した分析法は, 比較的簡便な操作により, 分析対象物を高感度に精度よく分析できることから, 生化学的研究や臨床化学分野において有用な分析法となるものと考えられる.

謝辞 本研究に際し, 終始御懇篤な御指導, 御鞭撻を賜りました福山大学薬学部臨床分析化学研究室鶴田泰人教授に心より深く感謝申し上げます.

また, 本研究の推進中, 御指導と御助言を賜りました福山大学薬学部薬品分析化学研究室小橋一彌教授, 御協力と御支援を頂きました福山大学薬学部臨床分析化学研究室助手北田久子さん, 川島ゆかさん, 峠佳江さん, 福永佳子さん, 宗村小夜香さん, 並びに福山大学薬学部臨床分析化学研究室大学

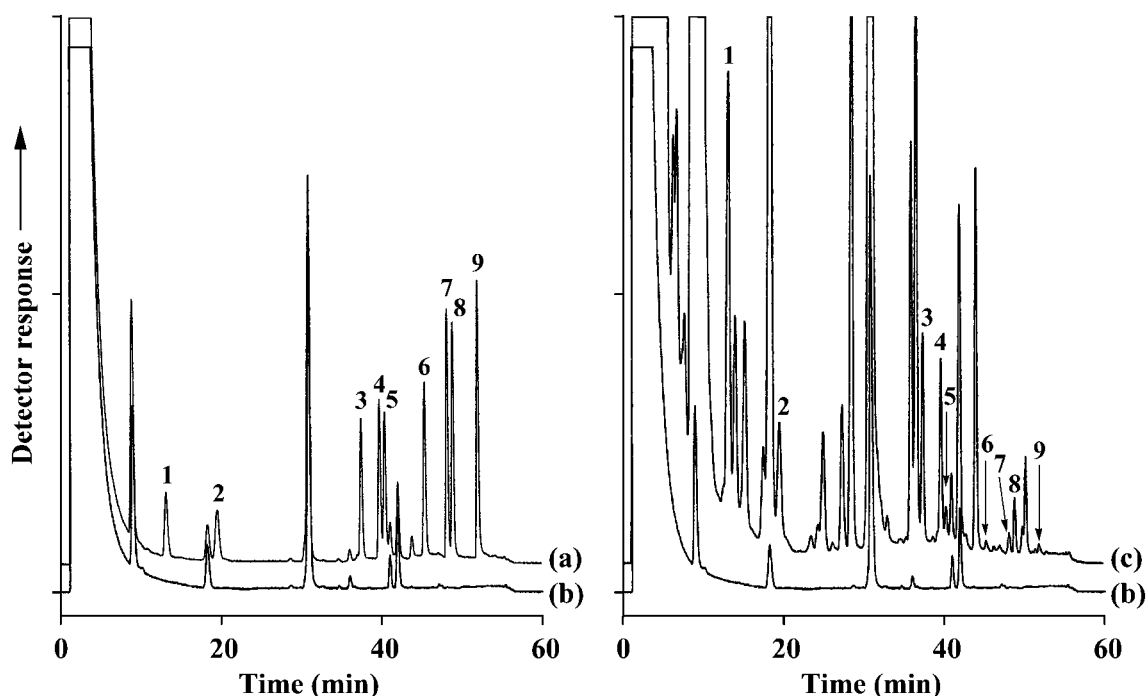


Fig. 7. Chromatograms Obtained from (a) a Standard Solution of Polyamines and *N*-acetylated Polyamines ($5 \mu\text{M}$ each), (b) a Reagent Blank and (c) a Normal Human Urine

Peaks, 1: *N*-acetylputrescine, 2: *N*-acetylcadaverine, 3: *N*⁸-acetylspermidine, 4: *N*¹-acetylspermidine, 5: putrescine, 6: cadaverine, 7: *N*-acetylspermine, 8: spermidine, 9: spermine.

院修了生池野昌樹君, 渡辺祥児君, 北井真吾君, 寺戸 功君, 松原大祐君, 尾崎実左さん, 阪田安彦君, 松本真弥さんをはじめとする学生諸氏に心より御礼申し上げます。

さらに, がん患者の血清及び尿サンプルを提供してくださいました独立行政法人国立病院機構四国がんセンター臨床研究部長井口東郎博士, 元独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究部河野彬博士に心より感謝いたします。

REFERENCES

- Ohkura Y., Kai M., Nohta H., *J. Chromatogr. B*, **659**, 85–107 (1994).
- Inoue H., Moritani K., Date Y., Kohashi K., Tsuruta Y., *Analyst*, **120**, 1141–1145 (1995).
- Inoue H., Date Y., Kohashi K., Yoshitomi H., Tsuruta Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 163–166 (1996).
- Inoue H., Watanabe S., Tsuruta Y., *Anal. Biochem.*, **243**, 86–91 (1998).
- Inoue H., Yamazaki J., Sugino E., Fujioka H., Kohashi K., Date Y., Ishii Y., Tsuruta Y., *Anal. Sci.*, **13**, 669–671 (1997).
- Inoue H., Kohashi K., Tsuruta Y., *Anal. Chim. Acta*, **365**, 219–226 (1998).
- Inoue H., Ikeno M., Ishii Y., Tsuruta Y., *J. Chromatogr. A*, **816**, 137–143 (1998).
- Tsuruta Y., Inoue H., *Anal. Biochem.*, **265**, 15–21 (1998).
- Inoue H., Iguchi H., Kono A., Tsuruta Y., *J. Chromatogr. B*, **724**, 221–230 (1999).
- Tsuruta Y., Kitai S., Watanabe S., Inoue H., *Anal. Biochem.*, **280**, 36–41 (2000).
- Terado I., Inoue H., Tao Y., Tsuruta Y., *Anal. Sci.*, **16**, 881–883 (2000).
- Inoue H., Iguchi H., Kono A., Tsuruta Y., *J. Chromatogr. B*, **757**, 369–373 (2001).
- Tsuruta Y., Terado I., Inoue H., *J. Chromatogr. B*, **788**, 401–405 (2003).
- Inoue H., Sakata Y., Fukunaga K., Nishio H., Tsuruta Y., *Anal. Chim. Acta*, **511**, 138–142 (2004).
- Inoue H., Fukunaga K., Tsuruta Y., *Anal. Biochem.*, **319**, 138–142 (2003).
- Inoue H., Fukunaga K., Munemura S., Tsuruta Y., *Anal. Biochem.*, **339**, 191–197 (2005).