

29amL-007

高速向流クロマトグラフィーによるチオール化合物のカラム内蛍光標識・分離法の検討

山中 彩音¹, 柳田 彰郎¹, ○渋谷 庸一¹(¹東京薬大薬)

【目的】高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) は、互いに混じり合わない二相溶媒系の一方の相を固定相、他の相を移動相とする液-液分配クロマトグラフィーである。チオール化合物を固定相内で蛍光標識し、反応生成物を移動相に分配させて分離、高感度定量するシステムの構築を試みた。

【実験】二相溶媒系: t-butylmethylether/CH₃CN/aqueous buffer 系の混合体積比や pH を変えて使用した。HSCCC 分析システム: 多層 PTFE コイル(0.86 mm I. D. x 20 m, 13 mL を装着した J 型遠心装置 (1000 rpm)、送液ポンプ、ダイオードアレイ検出器、蛍光検出器から構成した。二相系の上層を固定相、下層を移動相とする逆相分配モードの HSCCC で、蛍光標識試薬 (N-(9-acridinyl) maleimide : NAM) を注入し固定相に保持させた後、各種チオール化合物を注入し、カラム内で蛍光標識された反応生成物を溶出(0.5 mL/min)した。

【結果】二相溶媒系の上層を固定相とし、下層を移動相としてカラム内で平衡化した後、500 ppm の NAM を 200 μ L インジェクトし、固定相に保持させた。次に、250 ppb Glutathione, 50 ppb L-Cysteine, 500 ppb Captopril の混合溶液 100 μ L をインジェクトし、溶出液を蛍光検出 (Ex 365 nm, Em 435 nm) した。カラムから NAM 標識 Glutathione, NAM 標識 L-Cysteine, NAM 標識 Captopril の順に溶出し、相互分離できた。次に、血中のチオール化合物 (薬物) が同様に検出・定量できるかを検討した。5 ppm の Captopril を添加した血清を 10 μ L とり、二相溶媒系の上層、下層各 50 μ L 加え、全量 100 μ L (Captopril 500 ppb) をスピンフィルターで前処理しカラム内蛍光標識 HSCCC の試料とした。その結果、Blank 血清には認められない、NAM 標識 Captopril のピークが保持時間 27 分に確認できた。