

27L-am11S

親水性相互作用液体クロマトグラフィーを用いたマウス血清中生体チオール分析法の開発

○磯川 宗生¹, 船津 高志¹, 角田 誠¹ (¹東大院薬)

【目的】 Cysteine, homocysteine, glutathione 等の生体チオールは、生体内の酸化還元反応の中核を担っている。生体チオールの血中濃度は心血管疾患等の病態との関連が示唆されており、その同時定量法が必須である。我々は既に、親水性相互作用液体クロマトグラフィー(HILIC)-蛍光検出を用いたチオール同時定量法を開発し、ヒト血漿試料への応用に成功した一方で、マウス血清試料への応用では未知チオールの共溶出により既知チオール定量が困難であった。そこで本研究では、マウス血清中チオールの HILIC-蛍光検出を用いた定量法の開発を行うとともに、未知チオールの同定を試みた。

【方法】 マウス血清試料を用いて還元反応、除蛋白質操作を行った後、ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F)による蛍光誘導体化を行った。分析カラムにはアミド修飾 HILIC カラムを、移動相にはアセトニトリル/ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.0) (75/25)を用いた。質量分析計は四重極-Orbitrap 型を使用した。

【結果・考察】 はじめに、移動相条件等を最適化した結果、マウス血清試料において SBD-既知チオール(cysteine, homocysteine, cysteinylglycine, γ -glutamylcysteine, glutathione, tiopronine (I.S.)), -未知チオールの 16 分以内の分離を達成し、既知チオールの定量に成功した (順に 7.0, 203.2, 1.3, 7.6, 43.3 μ M)。続いて、未知チオールの HILIC-質量分析を行い、SBD-チオールが共通プロダクトイオン(m/z 230.954)を持つことに基づいて、2 種未知チオールの分子量を 1184.519, 800.281 と推定した。更に、分子量からそれぞれの組成式を推定した(C48H92O4N14S8, C44H52O4N2S4)。これら未知チオールはヒトとマウスとの間の硫黄代謝等の違いを明らかにする手がかりとなり得るため、同定に向けた更なる検討が必要である。