

25P-am01S

HPLC 蛍光分析における NANA とその酸化体 ADOA の誘導体化条件の検討 (第 6 報)

○川崎 茜¹, 高坂 乃々佳¹, 並木 みなみ¹, 飯島 亮介¹, 油井 聡¹, 佐藤 元信¹, 安田 誠¹, 福内 友子¹, 山岡 法子¹, 馬渡 健一¹, 金子 希代子¹, 中込 和哉¹ (¹帝京大薬)

【目的・背景】 *N*-acetylneuraminic acid (NANA) は糖鎖の末端にあるが、遊離された NANA の生理機能はほとんど明らかにされていない。 *In vitro* において NANA は過酸化水素と反応し、4-(acetylamino)-2,4-dideoxy-D-glycero-D-galacto- octonic acid (ADOA) を生成することが報告されている。生体内での ADOA の生成を確認するため、蛍光誘導体化試薬 DBD-ED、縮合試薬 DMT-MM による NANA 及び ADOA の HPLC-蛍光検出法を開発した。しかしこの分析法において、NANA, ADOA 由来の副反応物との分離は達成できたが、保持時間 100 分前後に副反応物ピークが出現し、さらに NANA 由来のピークが複数になり感度に影響を及ぼしたため、誘導体化反応を再検討した。

【方法】 蛍光誘導体化は NANA 又は ADOA 50 μ L に DMT-MM 溶液 25 μ L、DBD-PZ 溶液 50 μ L をそれぞれ加え、遮光して 65°C で 60 分反応させ、CH₃CN/HCOOH=100/1 を 25 μ L 加えて反応を停止した。HPLC 条件は流速 1.5 mL/min、移動相 H₂O/CH₃CN/HCOOH=7/93/0.35、カラム COSMOSIL HILIC (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μ m, Nacalai tesque) を用いて励起波長 450 nm、蛍光波長 560 nm で検出した。

【結果及び考察】 蛍光誘導体化試薬を DBD-PZ に変えた結果、NANA-DBD-PZ 及び ADOA-DBD-PZ のピークと副反応物のピークは分離した。保持時間の長い副反応物は生成せず、測定時間が短縮された。NANA 由来のピークが複数になることは防げなかったが、感度は NANA, ADOA とともに DBD-ED を用いた分析法より 5 倍高く、NANA 濃度 0.5~100 μ M、ADOA 濃度 0.05~100 μ M の範囲で良好な検量線が得られた。

本方法を用いて唾液試料及び血清試料を測定した結果を報告する。