

28V-am10

新規蛍光誘導体化試薬 NBD-COOSu を用いる親水性アミノ酸の二次元キラル HPLC 分析法開発

○二井屋田 美樹¹, 吉田 あすみ¹, 秋田 健行¹, 三田 真史², 浜瀬 健司¹ (¹九大院薬, ²資生堂)

【目的】分析技術の進歩に伴い高等生物体内で様々な D-アミノ酸が発見され、バイオマーカー等として注目を集めている。当研究室では 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoadiazole (NBD-F)による蛍光誘導体化と二次元キラル HPLC を用いる高感度選択的分析法を開発してきた。しかし数種の NBD-アミノ酸は蛍光強度が低く、全てのアミノ酸の高感度検出を可能とする方法が切望されている。そこで本研究では、オリジナル蛍光試薬 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-[N-(4-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-7-yl)-N-methylamino]acetate (NBD-COOSu)を用いる全アミノ酸高感度分析法構築の第一段階として、親水性アミノ酸 11 種の二次元キラル HPLC 分析法を開発した。

【方法】アミノ酸水溶液はホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) 及び NBD-COOSu を加えて 60°C で 10 分間加熱した後、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液を加えて反応を停止した。得られた反応液は逆相及び光学分割カラムを装備した二次元 HPLC で分離し、検出は蛍光発光 (Ex. 470 nm, Em. 530 nm) 及び吸光度 (470 nm) で行った。

【結果・考察】一次元目にセミマイクロ逆相カラム (KSAARP, 1.5 x 500 mm) を用いて分離条件を検討した結果、CH₃CN/TFA/H₂O=10/0.05/90 を移動相として 150 分以内に対象アミノ酸全ての良好な分離が得られ、いずれも十分な蛍光強度を与えた。二次元目では Pirkle 型セミマイクロカラム (KSAACSP-001R, 1.5 x 250 mm) を使用し、ギ酸を含む CH₃CN/CH₃OH 溶液を移動相として、アミノ酸の検出及び光学分割を検討した。その結果、対象とした全アミノ酸において高感度分析が可能であり、Ala、Asn、Gln、allo-Thr では 30 分以内で分離係数 1.07 以上の光学分割が得られた。以上の結果は NBD-COOSu が親水性アミノ酸の高感度二次元 HPLC 分析に良好に適用可能であることを示しており、今後更に分析対象を拡大する予定である。