

22R-am03

二次元液体クロマトグラフィーを用いた尿素回路アミノ酸分析法の開発

○住田 有子¹, 浜瀬 健司², 船津 高志¹, 角田 誠¹ (¹東大院薬, ²九大院薬)

【目的】がんなどの疾患において、尿素回路の酵素発現に変化が生じることが報告されている。疾患における尿素回路の役割解明には、尿素回路アミノ酸（アルギニン・オルニチン・シトルリン・アルギニノコハク酸）の定量が必須である。そこで我々は、生体試料中の尿素回路アミノ酸の定量を目指し分析法の開発を行った。多くの親水性物質が含まれる生体試料中で精度の良い定量をするため、分離分析法には選択性の高い二次元液体クロマトグラフィーを採用した。

【実験】アミノ酸は 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて蛍光誘導体化した。NBD-アミノ酸は、励起波長 470 nm、蛍光波長 530 nm で蛍光検出した。

【結果・考察】二次元液体クロマトグラフィーとして、一次元目に ODS カラム、二次元目に ODS カラムとは分離機構の異なるアミノカラムを採用した。一次元目より分取したフラクションを二次元目に十分量導入できるよう、二次元目の流速とカラム内径が一次元目より大きくなるように設定し、条件検討を行った。一次元目の移動相に水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸を用いた時に、NBD-尿素回路アミノ酸と NBD-蛋白質構成アミノ酸との分離が達成できた。二次元目は、移動相にメタノール/アセトニトリル/ギ酸を用いて、NBD-尿素回路アミノ酸が 10 分前後で溶出する条件を見出した。溶出ピークが、目的とするアミノ酸の NBD 誘導体であることを、質量分析計を用いて確認した。生体試料を用いてさらに分析条件の最適化を進めており、併せて報告する予定である。