

22R-am06

プロリンおよび4位水酸化体の二次元キラル HPLC-MS/MS 分析法開発

○岩崎 孔明¹, 石井 千晴¹, 秋田 健行¹, 三田 真史², 井手 友美³, 浜瀬 健司¹ (¹九大薬, ²資生堂, ³九大院医)

【目的】近年、様々な高等生物体内で D-アミノ酸の存在が報告されており、疾患との関連や生理機能が明らかにされている。プロリン (Pro) および 4-ヒドロキシプロリン (Hyp) はコラーゲン中に多く含まれ、コラーゲン代謝関連疾患のマーカーとして注目されている。しかし、これらの解析はキラル分析を行っておらず新規マーカー探索を目的として D 体を識別した含量解析が期待される。そこで本研究では Pro、Hyp 鏡像異性体の高選択的な分析を可能とする二次元 HPLC-MS/MS 法の開発を行うとともに、ヒト臨床試料を含む種々の生体試料への適用を行った。

【方法】ヒト血漿は 20 倍量のメタノールで除タンパクし、上清中のアミノ酸を 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)を用いて誘導体化した。ヒト尿は水で 10 倍希釈した後、同様に NBD 誘導体化した。反応液は二次元キラル HPLC で分析し、検出は三連四重極型質量分析器で行った。

【結果・考察】対象アミノ酸を Pro、*cis*-Hyp、*trans*-Hyp とし、二次元 HPLC の分離条件を検討した。一次元目には微粒子充填型 C18 カラム (KSAARP, 1.0 x 250 mm) を使用し、二次元目には Pirkle 型キラル固定相 (KSAACSP-001S, 1.5 x 250 mm) を使用した。移動相条件を検討した結果、一次元目では 0.05% TFA を含む 5-15% アセトニトリル水溶液により 180 分で対象アミノ酸を他のアミノ酸から分離した。二次元目では、0.1%ギ酸を含むアセトニトリルとメタノールの混液により対象アミノ酸が 30 分以内に分離度 2.8 以上で良好に光学分割された。本分析法をヒト血漿および尿に適用した結果、血漿中には L 体と比較して約 0.3%、尿中には約 0.8% の D-Pro が認められたことに加え、両試料とも *trans*-Hyp の L 体が認められた。現在、本法を用いてタンパク質・ペプチドを含む様々な試料分析を行っている。