

22R-am04

ヒト血漿及び尿中 D-アミノ酸の高選択的一斉分析を可能とするオンライン二次元キラル HPLC-MS/MS システムの開発

○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 (¹九大院薬, ²資生堂, ³九大院医)

【目的】分析技術の進歩とともにヒトを含む哺乳類体内で微量 D-アミノ酸の存在が明らかにされ、腎疾患や神経疾患において進行に伴う含量変化を示す事から、疾患の新規診断マーカーとして注目されている。しかし、生体試料中の D-アミノ酸は多種の夾雑成分により定量妨害を受ける事が多く、高い選択性と網羅性を兼備したスクリーニング法の開発が切望されていた。そこで本研究では哺乳類内在性化合物として注目される親水性及び疎水性 D-アミノ酸 10 種を対象とし、二次元 HPLC と三連四重極型質量分析器を連結したキラルアミノ酸四次元スクリーニングシステムを開発するとともに、ヒト血漿および尿における含量を解析した。

【方法】ヒト血漿はメタノール除タンパクを行って上清を得、減圧乾固後に水に溶解した。アミノ酸は 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole で誘導体化し、二次元 HPLC-MS/MS で分析した。尿は水で 5 倍希釈後、同様に誘導体化して分析した。

【結果・考察】分析対象アミノ酸を Ala、Asp、Glu、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Val の 10 種とし、オンライン二次元 HPLC-MS/MS システムを構築するため、分析条件を精査した。その結果、一次元目では微粒子充填型 ODS カラム (KSAARP, 1.0 x 500 mm) を用いてすべての対象アミノ酸を 450 分で逆相分離した。二次元目では Pirkle 型光学分割カラム (KSAACSP-001S, 1.5 x 250 mm) を用いて全対象アミノ酸が 30 分以内に完全分離された ($R_s > 1.59$)。本法を用いてヒト血漿および尿中の内在性アミノ酸を分析した結果、夾雑成分による妨害を殆ど受けずに鏡像異性体の定量が可能であり、血漿では D-Ala、Pro、Ser が認められ、尿中では D-Ala、Asp、Glu、Leu、Met、Phe、Ser が認められた。現在は本分析法を用いて様々な試料への適用を行っている。