

高選択的三次元キラルHPLCを用いるアミノ酪酸構造異性体の生体内含量解析

Enantioselective analysis of structural isomers of aminobutyric acid in biological samples using highly selective three-dimensional chiral HPLC system

○川添 奈倫¹、古賀 鈴依子¹、石井 千晴²、三田 真史³、井手 友美⁴、吉田 秀幸¹、能田 均¹、浜瀬 健司²

○Namichi Kawazoe¹, Reiko Koga¹, Chiharu Ishii², Masashi Mita³, Tomomi Ide⁴, Hideyuki Yoshida¹, Hitoshi Nohta¹, Kenji Hamase²

1. 福岡大薬、2. 九大院薬、3. KAGAMI、4. 九大院医

1. Fac. Pharm. Sci., Fukuoka Univ., 2. Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyushu Univ., 3. KAGAMI, Inc., 4. Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ.

【目的】近年、ヒト体内に様々なD-アミノ酸が存在することが明らかとなり、体内分布や生理機能に加え、様々な疾患による含量変化について研究が進められている。本研究の分析対象であるアミノ酪酸には、アミノ基の位置が異なる3種の構造異性体、 α -アミノ酪酸（AABA）、 β -アミノ酪酸（BABA）および γ -アミノ酪酸（GABA）が存在し、これらのうちAABAおよびBABAは光学中心を有している。いずれも神経変性疾患をはじめとする様々な疾患との関連が報告されているが、これまでにD体とL体を区別した詳細な生体内含量解析はほとんど行われていない。生体内のアミノ酪酸含量は極めて低いため、多種多様な内在性化合物による妨害を受けやすく、精確な生体内含量解析には高い選択性を有する分析法が必須である。そこで本研究では、蛍光誘導体化と三次元キラルHPLCを組み合わせ高感度かつ高選択的な分析法を構築し、ヒト尿中および血漿中の含量解析を行った。

【実験】試料溶液にホウ酸塩緩衝液（pH 8.0）および蛍光誘導体化試薬である4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole（NBD-F）のアセトニトリル溶液を加えて60℃で2分間加熱し、蛍光誘導体化を行った。尿試料は水で希釈したものを、血漿試料はメタノールにより除タンパクして得た上清を減圧乾固して水で再溶解したものを誘導体化に用いた。加熱後、希トリフルオロ酢酸水溶液を加えて反応を停止させ、反応液の一部を分析に用いた。NBD誘導体化アミノ酸の検出は、励起波長470 nmにおける530 nmの蛍光発光により行った。

【結果】本分析法では一次元目の逆相分配にSingularity RP18カラム（1.0 mm i.d.×250 mm）を用い、各アミノ酪酸構造異性体のNBD誘導体を他の生体成分より分離する。分取したアミノ酸画分をそれぞれ二次元目のSingularity AXカラム（1.5 mm i.d.×250 mm）へ導入し、陰イオン交換分離により対象アミノ酸を再び夾雑成分から分離・分取し、三次元目へと導入する。三次元目の光学分割にSingularity CSP-013Sカラム（1.5 mm i.d.×250 mm）を選択した結果、AABAおよびBABA鏡像異性体についてそれぞれベースライン分離が得られ、分離度は3.84、2.33であった。構築した分析法をヒト血漿および尿試料分析へと適用した結果、夾雑成分の影響を受けることなく良好な検出が可能であった。健康人の早朝第一尿においては、D/L-AABA、D/L-BABA、GABAの存在が示され、AABAおよびBABAの%D値はそれぞれ5.3%、77%であった。血漿においても同様に、対象とした全てのアミノ酪酸構造異性体が存在し、AABAおよびBABAの%D値はそれぞれ0.016%、51%であった。また、食事による尿中%D値の変化について検討した結果、BABAが1日を通じてほとんど変化しなかったのに対し、AABAについては食事に伴い徐々に増加する傾向が認められた。本分析法を用いることで生体試料に含まれるアミノ酪酸構造異性体の高選択的なキラル分析が可能であり、今後、疾患に伴う含量変化や生理的意義の解明への貢献が期待される。

Enantioselective analysis of structural isomers of aminobutyric acid in biological samples using highly selective three-dimensional chiral HPLC system

○Namichi Kawazoe¹, Reiko Koga¹, Chiharu Ishii², Masashi Mita³, Tomomi Ide⁴, Hideyuki Yoshida¹, Hitoshi Nohta¹, Kenji Hamase²

1. Fac. Pharm. Sci., Fukuoka Univ., 2. Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyushu Univ., 3. KAGAMI, Inc., 4. Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ.

【目的】近年、ヒト体内に様々なD-アミノ酸が存在することが明らかとなり、体内分布や生理機能に加え、様々な疾患による含量変化について研究が進められている。本研究の分析対象であるアミノ酪酸には、アミノ基の位置が異なる3種の構造異性体、 α -アミノ酪酸（AABA）、 β -アミノ酪酸（BABA）および γ -アミノ酪酸（GABA）が存在し、これらのうちAABAおよびBABAは光学中心を有している。いずれも神経変性疾患をはじめとする様々な疾患との関連が報告されているが、これまでにD体とL体を区別した詳細な生体内含量解析はほとんど行われていない。生体内のアミノ酪酸含量は極めて低いため、多種多様な内在性化合物による妨害を受けやすく、精確な生体内含量解析には高い選択性を有する分析法が必須である。そこで本研究では、蛍光誘導体化と三次元キラルHPLCを組み合わせ高感度かつ高選択的な分析法を構築し、ヒト尿中および血漿中の含量解析を行った。

【実験】試料溶液にホウ酸塩緩衝液（pH 8.0）および蛍光誘導体化試薬である4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole（NBD-F）のアセトニトリル溶液を加えて60°Cで2分間加熱し、蛍光誘導体化を行った。尿試料は水で希釈したものを、血漿試料はメタノールにより除タンパクして得た上清を減圧乾固して水で再溶解したものを誘導体化に用いた。加熱後、希トリフルオロ酢酸水溶液を加えて反応を停止させ、反応液の一部を分析に用いた。NBD誘導体化アミノ酸の検出は、励起波長470 nmにおける530 nmの蛍光発光により行った。

【結果】本分析法では一次元目の逆相分配にSingularity RP18カラム（1.0 mm i.d.×250 mm）を用い、各アミノ酪酸構造異性体のNBD誘導体を他の生体成分より分離する。分取したアミノ酸画分をそれぞれ二次元目のSingularity AXカラム（1.5 mm i.d.×250 mm）へ導入し、陰イオン交換分離により対象アミノ酸を再び夾雑成分から分離・分取し、三次元目へと導入する。三次元目の光学分割にSingularity CSP-013Sカラム（1.5 mm i.d.×250 mm）を選択した結果、AABAおよびBABA鏡像異性体についてそれぞれベースライン分離が得られ、分離度は3.84、2.33であった。構築した分析法をヒト血漿および尿試料分析へと適用した結果、夾雑成分の影響を受けることなく良好な検出が可能であった。健常人の早朝第一尿においては、D/L-AABA、D/L-BABA、GABAの存在が示され、AABAおよびBABAの%D値はそれぞれ5.3%、77%であった。血漿においても同様に、対象とした全てのアミノ酪酸構造異性体が存在し、AABAおよびBABAの%D値はそれぞれ0.016%、51%であった。また、食事による尿中%D値の変化について検討した結果、BABAが1日を通じてほとんど変化しなかったのに対し、AABAについては食事に伴い徐々に増加する傾向が認められた。本分析法を用いることで生体試料に含まれるアミノ酪酸構造異性体の高選択的なキラル分析が可能であり、今後、疾患に伴う含量変化や生理的意義の解明への貢献が期待される。