

# 三次元HPLCを用いるシトルリンおよびオルニチンのキラル識別生体内含量解析

## Three-dimensional HPLC analysis of citrulline and ornithine enantiomers in mouse tissues and body fluids

○守田 衣織<sup>1</sup>、古賀 鈴依子<sup>1</sup>、石井 千晴<sup>2</sup>、三田 真史<sup>3</sup>、吉田 秀幸<sup>1</sup>、能田 均<sup>1</sup>、浜瀬 健司<sup>2</sup>

○Iori Morita<sup>1</sup>, Reiko Koga<sup>1</sup>, Chiharu Ishii<sup>2</sup>, Masashi Mita<sup>3</sup>, Hideyuki Yoshida<sup>1</sup>, Hitoshi Nohta<sup>1</sup>, Kenji Hamase<sup>2</sup>

1. 福岡大薬、2. 九大院薬、3. KAGAMI

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

【目的】尿素回路中の非タンパク質構成アミノ酸であるシトルリン (Cit) およびオルニチン (Orn) は、食品添加物やサプリメントとして利用される身近な機能性アミノ酸であり、アミノ酸代謝異常症をはじめとする様々な疾患との関連が報告されている。アミノ酸のエナンチオ選択的な生理機能や体内分布、代謝解析についての関心が高まる一方で、CitおよびOrnの鏡像異性体を区別した生体内含量の詳細な検討は未だほとんど進んでいない。そこで本研究では、生体内に極めて微量にしか存在しないこれらアミノ酸の高選択的キラル識別分析を可能とする三次元HPLC分析法を用いて、コントロールマウスおよびD-アミノ酸酸化酵素 (DAO) 欠損マウスの生体試料を分析し、CitおよびOrn鏡像異性体の生体内分布およびDAO欠損に伴う含量変化の解析を試みた。

【実験】試料溶液に、ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) および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、血漿および組織試料はメタノールを用いて除タンパクし減圧乾固した上清を水で再溶解したものを、誘導体化に使用した。反応後、0.2%トリフルオロ酢酸を含む40%アセトニトリル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】本研究に用いた三次元HPLC分析法は、一次元目の逆相分配にSingularity RP18カラム (1.0 mm i.d. ×250 mm) を使用し、分析対象アミノ酸であるCitおよびOrnのNBD誘導体をD体とL体の混合物として他の生体成分から分離する。二次元目の陰イオン交換分離にはSingularity AXカラム (1.5 mm i.d. ×250 mm) を用い、一次元目で分取した各アミノ酸を生体成分から更に分離する。三次元目の光学分割にはSingularity CSP-001Sカラム (1.5 mm i.d. ×250 mm) を使用し、二次元目で分取し得られた各アミノ酸の光学分割および検出を行う。本分析法をマウスの尿および血漿試料に適用した結果、夾雑成分の影響をほとんど受けることなく高選択的な分析が可能であり、尿中におけるD-Cit (2.1 μM)、L-Cit (29.4 μM)、D-Orn (21.3 μM) およびL-Orn (43.0 μM)、血漿中におけるL-Cit (79.4 μM)、D-Orn (0.2 μM) およびL-Orn (74.3 μM) の存在が示された。また、DAO欠損に伴う%D値の変化について解析した結果、コントロールマウスおよびDAO欠損マウス尿中のCitについてはそれぞれ7.5%、55.0%、尿中Ornは31.9%、83.3%、血漿中Ornは0.3%、1.6%であった。DAO欠損に伴い尿中および血漿中の%D値が有意 (p<0.001) に増加することが明らかになり、CitおよびOrnは生体内においてDAOによる含量制御を受けていることが示唆された。現在、様々な生体試料を用いてこれらのアミノ酸鏡像異性体の分布と含量変化について更なる検討を進めている。

# Three-dimensional HPLC analysis of citrulline and ornithine enantiomers in mouse tissues and body fluids

Olori Morita<sup>1</sup>, Reiko Koga<sup>1</sup>, Chiharu Ishii<sup>2</sup>, Masashi Mita<sup>3</sup>, Hideyuki Yoshida<sup>1</sup>, Hitoshi Nohta<sup>1</sup>, Kenji Hamase<sup>2</sup>

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

【目的】尿素回路中の非タンパク質構成アミノ酸であるシトルリン (Cit) およびオルニチン (Orn) は、食品添加物やサプリメントとして利用される身近な機能性アミノ酸であり、アミノ酸代謝異常症をはじめとする様々な疾患との関連が報告されている。アミノ酸のエナンチオ選択的な生理機能や体内分布、代謝解析についての関心が高まる一方で、CitおよびOrnの鏡像異性体を区別した生体内含量の詳細な検討は未だほとんど進んでいない。そこで本研究では、生体内に極めて微量にしか存在しないこれらアミノ酸の高選択的キラル識別分析を可能とする三次元HPLC分析法を用いて、コントロールマウスおよびD-アミノ酸酸化酵素 (DAO) 欠損マウスの生体試料を分析し、CitおよびOrn鏡像異性体の生体内分布およびDAO欠損に伴う含量変化の解析を試みた。

【実験】試料溶液に、ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) および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、血漿および組織試料はメタノールを用いて除タンパクし減圧乾固した上清を水で再溶解したものを、誘導体化に使用した。反応後、0.2%トリフルオロ酢酸を含む40%アセトニトリル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】本研究に用いた三次元HPLC分析法は、一次元目の逆相分配にSingularity RP18カラム (1.0 mm i.d. ×250 mm) を使用し、分析対象アミノ酸であるCitおよびOrnのNBD誘導体をD体とL体の混合物として他の生体成分から分離する。二次元目の陰イオン交換分離にはSingularity AXカラム (1.5 mm i.d. ×250 mm) を用い、一次元目で分取した各アミノ酸を生体成分から更に分離する。三次元目の光学分割にはSingularity CSP-001Sカラム (1.5 mm i.d. ×250 mm) を使用し、二次元目で分取し得られた各アミノ酸の光学分割および検出を行う。本分析法をマウスの尿および血漿試料に適用した結果、夾雑成分の影響をほとんど受けることなく高選択的な分析が可能であり、尿中におけるD-Cit (2.1 μM)、L-Cit (29.4 μM)、D-Orn (21.3 μM) およびL-Orn (43.0 μM)、血漿中におけるL-Cit (79.4 μM)、D-Orn (0.2 μM) およびL-Orn (74.3 μM) の存在が示された。また、DAO欠損に伴う%D値の変化について解析した結果、コントロールマウスおよびDAO欠損マウス尿中のCitについてはそれぞれ7.5%、55.0%、尿中Ornは31.9%、83.3%、血漿中Ornは0.3%、1.6%であった。DAO欠損に伴い尿中および血漿中の%D値が有意 (p<0.001) に増加することが明らかになり、CitおよびOrnは生体内においてDAOによる含量制御を受けていることが示唆された。現在、様々な生体試料を用いてこれらのアミノ酸鏡像異性体の分布と含量変化について更なる検討を進めている。