

蛍光誘導体化試薬 4-(5, 6-ジメトキシ-2-フタルイミジニル)-2-メトキシフェニルスルホニルクロリドを用いる尿中カルニシンの高速液体クロマトグラフ法による高感度定量

鶴田泰人、丸山 潔、井上裕文、古謝景子、伊達有子、
岡村信幸、江藤精二、小嶋英二郎

Journal of Chromatography B, **878**(3-4), 327-332 (2009)

Sensitive determination of carnosine in urine by high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent

Yasuto Tsuruta, Kiyoshi Maruyama, Hirofumi Inoue, Keiko Kosha, Yuuko Date,
Nobuyuki Okamura, Seiji Eto, Eijiro Kojima

ABSTRACT: A simple and highly sensitive high-performance liquid chromatography procedure was developed for the determination of carnosine in urine. Carnosine was derivatized with 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride at 70°C for 15 min in borate buffer (0.1 mol l⁻¹, pH 9.0) to produce fluorescent sulfonamides. After hydrolysis of the reaction mixture with formic acid at 100°C for 15 min, the fluorescent derivative of carnosine was separated on a reversed-phase column with a linear gradient elution using solvents of (A) acetate buffer (0.1 mol l⁻¹, pH 7.0) and (B) acetonitrile at a flow-rate of 1.0 ml/min and was detected at excitation and emission wavelengths of 318 and 400 nm, respectively. The detection limit of carnosine was 4 fmol at a signal-to-noise ratio of 3. The within-day and day-to-day relative standard deviations were 2.7-4.6% and 0.4-5.2%, respectively. The concentration of carnosine in normal human urine was found to be 4.6-125 nmol (mg creatinine)⁻¹ (mean±SD: 21.6±26.6 nmol (mg creatinine)⁻¹, n=20).

抄録 尿中カルノシンの定量のための簡便で高感度なHPLC分析法を開発した。カルノシンは4-(5,6-ジメトキシ-2-フタルイミジニル)-2-メトキシフェニルスルホニルクロリドによりホウ酸塩緩衝液 (0.1 mol l⁻¹, pH 9.0) の存在下、70°C、15分間で誘導体化され、発蛍光性のスルホンアミドを生成した。ギ酸により反応液を100°C、15分間で加水分解したのち、蛍光誘導体は逆相系カラム(55°C)を用いた酢酸塩緩衝液 (0.1 mol l⁻¹, pH 7.0) -アセトニトリルのグラジエント溶出法により分離され、励起波長318 nm、蛍光波長400 nmにおける蛍光で検出された。検出限界は注入量あたり4 fmol (S/N = 3)であった。繰り返し精度は、日内変動で2.7-4.6%、日差変動で0.4-5.2%あった。健常人の尿中カルノシンの濃度は4.6-125 nmol (mg creatinine)⁻¹ (mean±SD: 21.6±26.6 nmol (mg creatinine)⁻¹, n=20)であった。