蛍光プレラベル化剤として4－(5,6－ジメトキシ－2－フタルイミジニル)フェニルスルホニルクロライドを用いた人血清中遊離型ハイドロキシプロリン及びプロリンの高速液体クロマトグラフ法による定量

井上裕文、守谷和弘、伊達有子、小橋一彌、鶴田泰人

Analyst, **120**(4), 1141－1145(1995)

Determination of Free Hydroxyproline and Proline in Human Serum by High-performance Liquid Chromatography Using 4-(5,6-Dimethoxy-2-phthalimidinyl)phenylsulfonyl Chloride as a Pre-column Fluorescent Labelling Reagent

Hirofumi Inoue, Kazuhiro Moritani, Yuuko Date, Kazuya Kohashi and Yasuto Tsuruta

Abstract A fluorescent labelling reagent, 4-(5,6-dimethoxy－2－phthalimidinyl) phenylsulfonyl chloride, was designed for the determination of amines by precolumn HPLC and was applied to the simultaneous determination of hydroxyproline and proline in serum. The reagent reacted with hydroxyproline and proline at 30℃ for 10 min to produce the fluorescent derivatives, which were separated on a reversed-phase column by gradient elution with phosphate buffer (1 mmol l^{-1}, pH 7) and acetonitrile and detected by fluorescence measurement at 315 nm (excitation) and 385 nm (emission). The detection limits (signal-to-noise ratio=3) for both hydroxyproline and proline were 10 fmol per injection. The within-day (n=10) and day-to-day (n=5) relative standard deviations using human sera were less than 2.16% and 2.75%, respectively, for hydroxyproline and less than 2.30% and 3.25%, respectively, for proline. The concentrations of free hydroxyproline and proline in normal human sera (n=13) were 5.6-18.0 and

137.6–252.6 μmol l^{-1}, respectively. The proposed method was also applied to the determination of hydroxyproline and proline in sera from patients with chronic renal failure. The mean concentrations of hydroxyproline and proline in chronic renal failure were about 2.6 and 1.6 times higher, respectively, than those in normal human sera.

アミン類の高速液体クロマトグラフ分析用蛍光誘導体化試薬として4－(5,6－ジメトキシ－2－フタルイミジニル)フェニルスルホニルクロライドを開発し、さらに、本試薬を用いて人血清中遊離型ハイドロキシプロリン及びプロリンの同時定量を確立した。本試薬はハイドロキシプロリン及びプロリンと反応(30℃、10分間)して蛍光誘導体を生じ、これらの誘導体はEx 315 nm及びEm 385 nmにおける蛍光検出でアセトニトリル／りん酸塩緩衝液(1mmol l^{-1}, pH 7)を用いたグラジエント溶出法により逆相系カラムで分離検出された。ハイドロキシプロリン及びプロリンの検出限界(S/N＝3)はいづれにおいても10 fmol/注入量(20 μl)であった。人血清を用いたときの日内(n＝10)及び日差(n＝5)の相対標準偏差はハイドロキシプロリンでそれぞれ2.16%及び2.75%以下、プロリンでそれぞれ2.30%及び3.25%以下であった。本法を用いて測定した健常人血清中遊離型ハイドロキシプロリン及びプロリン濃度(n＝13)は、それぞれ5.6～18.0及び137.6～252.6 μmol l^{-1}であった。また、慢性腎不全患者の血清を用いて測定したところ、慢性腎不全患者の血清中遊離型ハイドロキシプロリン及びプロリン濃度は健常人に比べ、平均値でそれぞれ約2.6及び1.6倍高い値を示した。