

人血清及び尿中総ヒドロキシプロリン及び プロリンのHPLC・蛍光検出による定量

井上裕文、伊達有子、小橋一彌、吉富博則、鶴田泰人

Biological & Pharmaceutical Bulletin,
19 (2), 163-166 (1996)

Determination of Total Hydroxyproline and Proline in Human Serum and Urine by HPLC with Fluorescence Detection

Hirofumi Inoue, Yuuko Date, Kazuya Kohashi,
Hironori Yoshitomi and Yasuto Tsuruta

ABSTRACT A method to measure total hydroxyproline (Hyp) and proline (Pro) in human serum and urine by HPLC was developed. Hyp and Pro in acid hydrolysates of serum and urine were derivatized with 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidyl)phenylsulfonyl chloride after treatment with *o*-phthalaldehyde and cleanup on Bond Elut C₁₈ column. The derivatives of imino acids were separated on a reversed phase column by gradient elution with acetonitrile and phosphate buffer (1 mmol/l, pH 7) and detected by fluorescence measurement at 315 nm (excitation) and 385 nm (emission). Detection limits for both Hyp and Pro were 10 fmol per injection. The within-day and day-to-day relative standard deviations for Hyp and Pro in serum and urine were less than 3.19%. The recoveries of Hyp and Pro added to serum and urine were about 100%. The present method was applied to determine total Hyp and Pro in serum and urine from normal subjects and patients with chronic renal failure.

抄録 人血清及び尿中の総ヒドロキシプロリン (Hyp) 及びプロリン (Pro) のHPLCによる定量法を開発した。血清及び尿を酸加水分解し、*o*-フタルアルデヒド処理及びボンドエルトC₁₈カラムによる前処理を行ったのち、Hyp及びProは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で誘導

体化された。イミノ酸類の誘導体は逆相系カラムでアセトニトリル-リン酸塩緩衝液系のグラジエント溶出法により分離され、励起波長 315 nm, 蛍光波長 385 nm における蛍光で検出された。Hyp 及び Pro の検出限界 (S/N=3) は、いずれも 10 fmol/inj. であった。日内及び日差変動は 3.19% 以下であった。Hyp 及び Pro を血清及び尿に添加したときの添加回収率はほぼ 100% であった。本法を用いて、健常人及び腎不全患者の血清及び尿中の総 Hyp 及び Pro の測定した。