

2種類の蛍光誘導体化試薬を用いた
血清及び尿中ヒドロキシプロリン及びプロリンの
液体クロマトグラフィーによる同時定量

井上裕文、小橋一彌、鶴田泰人

Anal. Chim. Acta, **365** (1-3), 219-226 (1998)

**Simultaneous determination of serum and urinary
hydroxyproline and proline by liquid chromatography
using two fluorescent labeling reagents**

Hirofumi Inoue, Kazuya Kohashi, Yasuto Tsuruta

ABSTRACT A method for the simultaneous determination of free serum and total urinary hydroxyproline (Hyp) and proline (Pro) concentrations by liquid chromatography (LC) using two fluorescent labeling reagents was developed. Serum Hyp and Pro, after treatment with *o*-phthalaldehyde, were derivatized with 4-(2-phthalimidinyl)phenylsulfonyl chloride (Phisyl-Cl). Imino acids in hydrolysed urine were derivatized with 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)phenylsulfonyl chloride (DPS-Cl) after treatment with *o*-phthalaldehyde and cleanup on a Bond Elut C18 Column. The two reaction mixtures were combined and mixed with dichloromethane to extract the excess of the reagents, and then the aqueous layer (10 μ l) was subjected to LC. The Phisyl and DPS derivatives of imino acids were separated on a reversed-phase column by a gradient elution with phosphate buffer (5 mM, pH 2.5) and acetonitrile at 35°C and detected by fluorescence measurement at 300 nm (excitation) and 400 nm (emission). The detection limits for Hyp and Pro were 30 and 40 fmol/injection, respectively, for Phisyl derivatives and 5 fmol/injection for both DPS derivatives. The within-day and day-to-day relative standard deviations for Hyp and Pro in serum and urine were less than 2.77%. The recoveries of Hyp and Pro added to serum and urine were in the region of 97.6~103.6%. The method is sensitive, gives reproducible results, and is useful for

simultaneous determination of serum and urinary Hyp and Pro concentrations.

抄録 2種の蛍光誘導体化試薬を用いた液体クロマトグラフィー (LC) による血清中 Free 及び尿中 Total のヒドロキシプロリン (Hyp) 及びプロリン (Pro) の同時定量法を開発した。血清中の Hyp 及び Pro は *o*-フタルアルデヒドによる処理後に 4-(2-フタルイミジニル)フェニルスルホニルクロライド (Phisyl-Cl) で蛍光誘導体に導いた。加水分解尿中のイミノ酸は *o*-フタルアルデヒド及び Bond Elut C18 カラムによる処理後に 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 (DPS-Cl) で蛍光誘導体に導いた。この二つの反応液を混合し、過剰の試薬を除去するためにジクロロメタン抽出を行い、得られる水層 (10 μ l) を LC に注入した。イミノ酸の Phisyl 及び DPS 誘導体はいずれも Ex 300 nm 及び Em 400 nm における蛍光検出でアセトニトリル/リン酸塩緩衝液 (5 mM, pH 2.5) 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。Hyp 及び Pro の検出限界 (S/N=3) は注入量あたり Phisyl 誘導体でそれぞれ 30 及び 40 fmol、DPS 誘導体ではいずれも 5 fmol であった。日内及び日差の精度 (R.S.D.) は血清及び尿中 Hyp 及び Pro のいずれにおいても 2.77% 以下であった。血清及び尿に添加した Hyp 及び Pro の回収率は 97.6~103.6% であった。本法は高感度で精度が高いことから、血清及び尿中 Hyp 及び Pro の同時定量に有用である。