

アミノ酸類のHPLC分析用蛍光誘導体化試薬
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及び
尿中遊離型ヒドロキシプロリンの定量への応用

鶴田泰人、井上裕文

Anal. Biochem., 265 (1), 15-21 (1998)

4-(5,6-Dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl
Chloride as a Fluorescent Labeling Reagent for Determination of
Amino acids in High-Performance Liquid Chromatography and its
Application for Determination of Urinary Free Hydroxyproline

Yasuto Tsuruta and Hirofumi Inoue

ABSTRACT A highly sensitive fluorescent labeling reagent, 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride (DMS-Cl), for determination of amino acids by HPLC has been developed. DMS-Cl reacted with amino acids in the basic medium to produce the corresponding fluorescent sulfonamides (excitation and emission wavelength: 318 and 406 nm in aqueous acetonitrile, respectively). When the reactivity of DMS-Cl was investigated by means of reversed phase HPLC using hydroxyproline (Hyp) and alanine (Ala) as model compounds, the reaction of Hyp was completed within 5 min at 25°C and that of Ala was within 15 min at 70°C. The efficiency of conversion of Hyp into the fluorescent derivative was about 100%. The detection limits (signal-to-noise ratio = 3) of almost all amino acids were less than 5 fmol/injection. When the concentration of urinary free Hyp was measured with HPLC using DMS-Cl, the concentration (mean±SD, n=10) was $3.8 \pm 2.76 \mu\text{M}$ ($2.7 \pm 1.71 \text{ nmol/mg creatinine}$).

抄録 アミノ酸類の定量のための高感度なHPLC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)-2-メトキシフェニルスルホニルクロリド

(DMS-Cl)を開発した。DMS-Clは、塩基性下、アミノ酸類と反応して発蛍光性のスルホンアミド誘導体 (Ex 318 nm, Em 406 nm; アセトニトリル-水混液中) を生成した。モデル化合物としてヒドロキシプロリン (Hyp) 及びアラニン (Ala) を用いて DMS-Cl による誘導体化反応条件について検討した。誘導体化反応は、Hyp では室温、5分で完了し、Ala では 70℃、15分で完了した。Hyp の誘導体化率は約 100 % であった。ほとんどすべてのアミノ酸の検出限界 (S/N=3) は 5 fmol/注入量以下であった。DMS-Cl を用いて尿中遊離型ヒドロキシプロリンの濃度を HPLC により測定したところ、その濃度 (mean±SD, n=10) は $3.8\pm 2.76\ \mu\text{M}$ ($2.7\pm 1.71\text{nmol/mg creatinine}$) であった。