

新規蛍光誘導体化試薬 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
スルホニルクロライドを用いる尿中N-末端
プロリルジペプチド、プロリン及び
ヒドロキシプロリンの高感度HPLC分析

井上裕文、井口東朗*、河野 彬*、鶴田泰人

J. Chromatogr. B, **724**(2), 221-230(1999)

Highly sensitive determination of *N*-terminal prolyl dipeptides, proline and hydroxyproline in urine by high-performance liquid chromatography using a new fluorescent labelling reagent, 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride

Hirofumi Inoue, Haruo Iguchi*, Akira Kono*
and Yasuto Tsuruta

ABSTRACT A highly sensitive pre-column HPLC method for simultaneous determination of prolyl dipeptides, Pro and Hyp in urine was developed. The analytes were labelled with 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride at 70 °C for 20 min. The derivatives separated on tandem reversed phase columns by a gradient elution and were monitored with fluorescence detection at 318 nm (excitation) and 392 nm (emission). The detection limits for prolyl dipeptides, Pro and Hyp were 1 - 5 fmol/injection (S/N = 3). Urine samples were treated with *o*-phthalaldehyde, followed by purification on a Bond Elut C18 column before conducting the labelling reaction. Pro-Hyp, Pro-Gly and Pro-Pro were identified as prolyl dipeptides in urine. The within-day and between-day relative standard deviations were 1.45 - 4.79 and 1.66 - 5.80%, respectively. The concentrations of Pro-Hyp, Pro-Gly, Pro-Pro, Pro and Hyp in normal human urine were 97.6 ± 28.2 , 2.74 ± 1.48 , 2.08 ± 1.13 , 6.71 ± 3.34 and 2.30 ± 1.59 nmol/mg creatinine, respectively.

抄録 尿プロリルジペプチド、Pro及びHypの高感度プレラベルHPLC分析法を開発した。プロリルジペプチド、Pro及びHyp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ライドにより70℃、20分で誘導体化された。誘導体は逆相系カラムを用いた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392 nmにおける蛍光で検出された。検出限界は1-5 fmol/injection (S/N = 3)であった。尿試料は誘導体化反応の前に*o*-フタルアルデヒドで処理され、Bond Elut C18カラムで精製された。尿中のプロリルジペプチドとしてPro-Hyp、Pro-Gly及びPro-Proが同定された。日内及び日差変動はそれぞれ1.45-4.79及び1.66-5.80%であった。健常人尿中のPro-Hyp、Pro-Gly、Pro-Pro、Pro及びHypの濃度はそれぞれ97.6 ± 28.2、2.74 ± 1.48、2.08 ± 1.13、6.71 ± 3.34及び2.30 ± 1.59 nmol/mg creatinineであった。

* National Kyushu Cancer Center Research Institute
国立九州がんセンター