ノ ー ト

ルテニウム錯体電解化学発光検出/高速液体クロマトグラフィー による血清中ヒドロキシプロリンとプロリンの分析

内倉 和雄*, 桜田 郁雄**, 手塚 高**, 小池 勝也®*

Determination of free hydroxyproline and proline in serum by HPLC with
electrogenerated chemiluminescence detection using
tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II)

Kazuo UCHIKURA*, Kunio SAKURADA, Kou TEZUKA** and Katsuya KOIKE*

* College of Pharmacy, Nihon University, 7-7-1, Narashinodai, Funabashi-shi, Chiba 274-8555

** Comet Co., 1087-131 Kamiaso, Aso-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 215-0021

(Received 24 April 2002, Accepted 5 July 2002)

A simple method for the determination of free hydroxyproline (Hyp) and proline (Pro) in serum by HPLC with electrogenerated chemiluminescence detection using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) was developed. A serum sample was applied to a centrifugal filter (Microcon, YM-10, Millipore Co., Bedford, MA, U.S.A.) and was centrifuged (14000 rpm, 60 min, 15°C). The filtrate was injected to HPLC. The HPLC conditions were as follows: separation-eluent, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.6), 1 mM Cu^{2+} , 10 mM 1-octanesulfonate-acetonitrile (99 : 1, v/v); flow rate, 0.5 ml/min; column, Capcell Pak C18 (4.6 × 150 mm, Shiseido Co., Ltd); detection-reagent solution, 0.3 mM tris(2,2'-bipyridine)ruthenium chloride, 10 mM sulfuric acid, flow rate: 0.3 ml/min, electrogenerated chemiluminescence detector, ECR-2000 (Comet Co., Ltd); controlled current oxidation as 80 μA . Calibration curves plotted the peak area versus Hyp and Pro concentrations. The assay was linear in the concentration range of 0.3~10000 and 0.6~5000 nmol/ml serum for Hyp and Pro, respectively. The recovery was 101% (10 nmol/ml) for Hyp and 103% (50 nmol/ml) for Pro. The inter-assay coefficient of variation was less than 5% for both Hyp and Pro in the linear concentration range. The method was successfully applied to the determination of aged human serum without prior derivatization.

Keywords : hydroxyproline; proline; ruthenium complex; chemiluminescence; HPLC.

1 緒 言

イミノ酸代謝異常症である高ヒドロキシプロリン (Hyp) 血症, 高プロリン (Pro) 血症等の診断は, 血中の Hyp, Pro を測定することによって確認されている¹⁾. Hyp はコラーゲン中のプロリン残基がプロリン-4-モノオキシゲナーゼによりヒドロキシル化され, トランス異性体として生成することが知られていることから, 血中の Hyp はコラー

ゲンの分解・生成の情報を得る手段として用いられており, 各種疾患との関係が議論されマーカーとしての有用性が報告されている^{2)~4)}.

生体試料 (血清, 尿, コラーゲン) 中の Pro 及び Hyp の分析には, フローインジェクション分析法 (FIA)⁵⁾⁶⁾, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{7)~9)}, ガスクロマトグラフィー (GC¹⁰⁾, GC/MS¹¹⁾) やキャピラリー電気泳動 (CE)¹²⁾¹³⁾ 等が利用されている. GC 法においては, 分離に先立って2段階の誘導体化反応や, 過剰の試薬の除去など煩雑な操作が要求される. また, HPLC, CE においても, 検出感度の向上や選択性の改善を目的に, プレカラ

* 日本大学薬学部: 274-8555 千葉県船橋市習志野台 7-7-1

** コメント: 215-0021 神奈川県川崎市麻生区上麻生 1087-131

ム誘導体化が利用されている。いずれの方法においても、Hyp 及び Pro は適当な誘導体に変換する操作が要求される。一方、ポストカラム誘導体化反応を利用したもの¹⁴⁾もあるが、分析に長時間を要するなど十分満足できるものが少ない。

著者らは、ルテニウム錯体 {トリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II), $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ } を発光試薬とした電解化学発光 (ECL) 法について種々検討している。その中で、安定で長時間連続運転可能なポストカラム反応検出システムを開発した¹⁵⁾¹⁶⁾。Ru(bpy)₃²⁺ ECL 検出法ではアミンの高感度検出が可能であり、検出感度は第三アミン>第二アミン>第一アミンの順と言われている¹⁷⁾。適用例には第三アミン関連化合物のものが多く見られる^{18)~20)}。一方、第二アミンである Hyp, Pro の分析に応用した例も幾つかある^{21)~23)}。しかし、日常分析に適用されたものはない。著者らは先に、高齢者血清試料中の Hyp, Pro の濃度分布について考察した結果を報告した²⁴⁾。今回、Ru(bpy)₃²⁺ ECL 検出法を用いた Hyp, Pro の分析法について検討した結果を報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

L-プロリン (Pro), トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン (Hyp), シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン (*cis*-4-Hyp) 及びトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウムクロライド [$\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$] はシグマ製を用いた。トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリン (*trans*-3-Hyp) はフルカ製を用いた。オクタンスルホン酸ナトリウム, アセトニトリル, その他の試薬は和光純薬製特級をそのまま用いた。水はスチールエース SA-2000E (東京理化) で精製して用いた。

2.2 装 置

送液用ポンプは Intelligent Pump301 (フロム製) を用いた。移動相及び試薬溶液の脱気には流路に Gastorr (フロム製) を挿入して用いた。サンプルインジェクターは Rheodine9125 (Cotaci 製) に 20 μl のサンプルループを装着して用いた。カラムは Capcell Pak C-18 (4.6 $\times$ 150 mm, 資生堂製) を室温で用いた。検出器は電解化学発光検出器 Comet-2000 (コメット製) を用いた。クロマトグラムの記録は Chromatopac CR-5A (島津製作所製) を用いた。

2.3 測定条件及び試料調製

移動相には 1 mM 硫酸銅, 10 mM オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.6) とアセトニトリル 99 : 1 の混液を用い、毎分 0.5 ml の流量で送液した。試薬溶液は 0.3 mM Ru(bpy)₃²⁺ を含む 10 mM 硫酸

で、毎分 0.3 ml で送液し、電解反応器において 80 μA で定電流電解酸化した。

Hyp, *cis*-4-Hyp, *trans*-3-Hyp 及び Pro の標準溶液は、それぞれを 50 mM 塩酸に溶解して 10 mM としたもので、用時水で希釈して用いた。

試料調製は、使用目的を十分に説明し、同意を得た健康で高齢なボランティアから採血したヒト血清 300 μl を限外濾過フィルター (Microcon, YM-10, Millipore 製) に採り、15°C において 14000 rpm で 60 分間遠心し、除タンパク血清を調整した。得られた除タンパク血清を水で 5 倍に希釈したものを HPLC に 20 μl を注入した。

3 結果と考察

3.1 分離の最適化

血清試料中の Hyp, Pro の分析には、きょう雑物からの完全分離が要求される。そのため分離調節因子が比較的多い銅錯体生成反応を利用した、イオン対逆相分配 HPLC を用いた²⁵⁾。この系においては、銅イオン、イオン対試薬、有機溶媒の濃度や pH を調節することで分離の最適化が可能である。更に銅イオン、イオン対試薬などは Ru(bpy)₃²⁺-ECL 検出系を妨害しない¹⁵⁾ことから、有効な分離系と思われる。

移動相条件について、Hyp, *cis*-4-Hyp 及び Pro の相互分離を目安として、最適化を検討した結果を Fig. 1 に示す。イオン対試薬としてオクタンスルホン酸ナトリウムを用い、2.5~15 mM の範囲で変化させたところ、試薬濃度の増加に伴って *k* (保持係数) は増大したが、 α (*k* の比) はほぼ一定であった。Cu²⁺ については 0.5~2.0 mM の範囲において濃度の上昇に伴って *k* は増大し、 α も増大した。いずれの濃度においても相互分離は可能であった。

次にアセトニトリルの添加について検討した。1 から 10% と濃度の増加に従って *k* は減少し、早く溶出した。 α も減少し 6% 以上では十分な分離が得られなかった。最後に pH について調べた。pH 4.5 から 5.8 と上昇させると *k* は増大した。特に Pro については大きく増大した。いずれの pH においても分離は可能であるが、短時間での分離が可能な低い pH 域が有効と思われる。

分離カラムの種類について保持挙動及び Hyp と Pro の相互分離を目安として検討した。はじめに硬質ポリマーを基体として、鎖長の異なるアルキル基を化学結合したポリマー系充填剤 (P-C18, P-C8, P-C4) について調べた。P-C4 から、P-C8, P-C18 カラムへと鎖長の長いものにすると *k* は増大し、強く保持された。P-C4 カラムでは相互分離できないが、P-C8 及び P-C18 カラムでは十分な分離が得られた。次に、P-C18 カラムとシリカ系 C18 (S-C18) カラムとを比較したところ、S-C18 カラムでは *k* が若干大きくなったが、相互分離についてはほぼ同一であった。更

Fig. 1 Dependence of the retention factor on the concentration of octanesulfonate (A), Cu^{2+} (B), CH_3CN (C) and the pH of eluent (D)

Curves: ● Hyp, ▲ *cis*-4-Hyp, ■ Pro; HPLC conditions: column, Capcell Pak C18 (4.6×150 mm); eluent, 20 mM acetate buffer (pH 4.6) containing 1 mM Cu^{2+} and 5 mM octanesulfonate- CH_3CN (99 : 1, v/v); flow rate, 0.5 ml/min; reagent solution, 10 mM H_2SO_4 containing 0.3 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$; flow rate, 0.3 ml/min; controlled current oxidation, 80 μA

に, P-C18, S-C18に加え, シリカをポリマーコーティング処理したものにアルキル基を付けたカラム (S-P-C18) について血清試料を用いて比較した. P-C18 及び S-C18 カラムでは Hyp のピークにきょう雑物によるピークが重なり Hyp の測定が困難であったが, Pro のピークには妨害ピークは認められなかった. 一方, S-P-C18 カラムにおいては Hyp 及び Pro の両ピーク共にきょう雑物によるピークの重なりはなく, 良好に分離された. 採用した分離条件では Hyp, *cis*-4-Hyp, Pro の順に溶出し, 相互の完全分離が可能であった [Fig. 3(A)]. また, *trans*-3-Hyp は *cis*-4-Hyp のピークと重なって溶出した.

3.2 検出条件の最適化

本検出系におけるアミンの発光強度は, 反応時の pH に影響され, 多くの場合酸性から中性域になるに従って発光強度が増大することが言われている²⁶⁾²⁷⁾. そこで, pH の影響について調べた. 反応時の pH すなわち, フローセル内のそれは検出器からの流出液の pH を測定して得た値を用いた. pH の変換はカラムと検出器の間に流路を設け, pH 調整用の溶液をカラム流出液に合流, 混合させて行った. 検討した結果を Fig. 2 に示す. pH の上昇に伴って Hyp, *cis*-4-Hyp 及び Pro の発光強度は増大した. 一方, ベースラインノイズも増加した. 至適 pH は S/N を考慮

Fig. 2 Effect of pH on the ECL intensity and baseline noise

Curves: ● Hyp, ▲ *cis*-4-Hyp, ■ Pro; HPLC conditions are the same as in Fig. 1.

して4.3とした。至適 pHを保つためには、pH調整用の溶液を加えることなく移動相の pHを4.6にすることによって可能であった。

次に試薬溶液の流量を0.4 ml/minに一定にして移動相流量の発光強度に及ぼす影響について検討した。0.5から1.0 ml/minの範囲ではHyp, *cis*-4-Hyp及びPro共に発光強度はほぼ一定であった。

3.3 検量線及び検出下限

Hyp, Proについて調べた。Hypは100 nmolまでは原点を通る直線関係が認められ、検出下限は2.7 pmol ($S/N=4$)であった。Proは59 nmolまでは注入量とピーク高さは原点を通る直線関係を示し、検出下限は12 pmol ($S/N=4$)であった。これらの値はヒト血清試料の分析に適用するには十分満足するものであった。

3.4 実試料への応用

操作の簡便性を考慮して限外濾過による除タンパク法を採用した。血清試料を分析したクロマトグラムをFig. 3 (B)に示す。Hyp及びProピーク共にきょう雑物からの分離は良好であった。また、*cis*-4-Hypの溶出位置にピークは検出されなかった。両ピークの同定、純度の確認を目的にECLの電解電流値を変化させた。電流値0のとき両ピークは消失した。また、電流値を変化(50~100 μ A)させ、両ピークの形状及び強度の変化を調べたところ、標準のものと類似した挙動を示した。

Fig. 3 Chromatograms obtained from (A) a standard solution and (B) the deproteinized human serum

Peaks: (A) ● 250 pmol of Hyp, ▲ 250 pmol of *cis*-4-Hyp, ■ 100 pmol of Pro; (B) Hyp (12.3 nmol/m), Pro (110.5 nmol/m); HPLC conditions are the same as in Fig. 1.

Table 1 Recoveries of Hyp and Pro added to serum

Serum	Added/ nmol ml ⁻¹	Found/nmol ml ⁻¹ a)		Recovery, %
		Non-addition	Addition	
1	Hyp(10)	7.0 ± 0.3	17.3 ± 0.8	103
	Pro(50)	120 ± 2	171 ± 3	102
2	Hyp(10)	7.4 ± 0.2	17.9 ± 0.3	105
	Pro(50)	110 ± 3	160 ± 3	100
3	Hyp(10)	4.7 ± 0.2	14.6 ± 0.4	99
	Pro(50)	96 ± 3	150 ± 2	108
4	Hyp(10)	14.4 ± 0.3	24.0 ± 0.3	96
	Pro(50)	131 ± 2	182 ± 3	102

a) Mean ± SD ($n=4$)

血清試料への添加回収試験の結果をTable 1に示す。Hypは103%, Proは101%の回収率であった。再現性についてはHyp, Pro共に相対標準偏差は5%以下と良好であった。

高齢者の血清について、本法によって定量した結果をTable 2に示す。これらの値は若年者の結果²⁸⁾と比較するとHyp, Pro共に低い値を示している。Hyp含量については加齢とともに減少すると報告されている²⁹⁾ことから、今回の測定結果は高齢者のものであり、年齢を反映しているものと考えられる。今後更に若年者の結果と比較することによってより有意な知見が得られると考えられる。

Table 2 Concentration of free Hyp and Pro in serum

Serum	Sex*	Age(yr)	Concentration/nmol ml ⁻¹	
			Hyp	Pro
1	F	87	7.0	120
2	F	81	7.4	110
3	F	84	5.7	97
4	F	80	6.7	26
5	F	80	6.3	122
6	F	85	3.5	91
7	M	83	3.3	82
8	M	81	7.6	117
9	M	91	4.7	96
10	F	81	8.8	39
11	F	88	6.7	78
Mean			6.2	89

* M = male, F = female

本法では煩雑な誘導体化の必要がなく, 簡便な限外戸過法による除タンパク操作のみの前処理操作で血清試料に適用できる. また, 1 試料 15 分の分析時間で連続測定が可能であった. 感度, 再現性などにおいても血清試料の実用的な分析法として満足できるものと考えられ, 広く利用できるものと期待される.

文 献

- 1) 松本 勇, 坂元正一: “臨床化学診断学”, p. 243 (1995), (ソフトサイエンス社).
- 2) R. Smith: *Clin. Sci.*, **59**, 215 (1980).
- 3) P. C. Kelleher, C. J. P. Smith: *Clin. Lab. Med.*, **2**, 519 (1982).
- 4) K. F. Faull, G. M. Schier, P. Schlesinger, B. Halpern: *Clin. Chim. Acta*, **70**, 313 (1976).
- 5) Y. Uji, A. Karmen, H. Okabe, K. Hata, M. Miura, K. Ozaki, M. Minamizaki, T. Shibata, S. Inayama: *J. Clin. Lab. Anal.*, **8**, 267 (1994).
- 6) K. Uchida, T. Shibata, M. Tomoda, S. Saito, S. Inayama: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2649 (1986).
- 7) H. Inoue, H. Iguchi, A. Kono, Y. Tsuruta: *J. Chromatogr. B*, **724**, 221 (1999).
- 8) M. Lever, P. C. B. Sizeland, L. M. Bason, C. M. Hayman, S. T. Chambers: *Biochim. Biophys. Acta*, **1200**, 259 (1994).
- 9) H. Inoue, Y. Date, K. Kohashi, H. Yoshitomi, Y. Tsuruta: *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 163 (1996).
- 10) H. Kataoka, K. Nagao, M. Makita: *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 296 (1993).
- 11) E. E. Tredget, N. Falk, P. G. Scott, A. M. Hogg, J. F. Burke: *Anal. Biochem.*, **190**, 259 (1990).
- 12) Q. Chu, T. E. Bradford, G. Z. Michael: *J. Chromatogr. B*, **692**, 293 (1997).
- 13) K. C. Chan, G. M. Janin, G. M. Muschik, H. J. Issaq: *J. Chromatogr.*, **622**, 269 (1993).
- 14) J. L. Boucher, C. Charret, C. C. J. Giboudeau, L. Cynober: *Clin. Chem.*, **43**, 1421 (1997).
- 15) K. Uchikura, M. Kirisawa: *Anal. Sci.*, **7**, 971 (1991).
- 16) R. Chiba, M. Fukushi, A. Tanaka: *Anal. Sci.*, **14**, 979 (1998).
- 17) J. B. Noffsinger, N. D. Danielson: *Anal. Chem.*, **59**, 865 (1987).
- 18) G. M. Greenway, S. J. L. Dolman: *Analyst* (Cambridge), **124**, 759 (1999).
- 19) H. Monji, M. Yamaguchi, I. Aoki, H. Ueno: *J. Chromatogr. B*, **690**, 305 (1997).
- 20) J. A. Holeman, N. D. Danielson: *J. Chromatogr. Sci.*, **33**, 297 (1995).
- 21) L. L. Shultz, J. S. Stoyanoff, T. A. Nieman: *Anal. Chem.*, **68**, 349 (1996).
- 22) L. He, K. A. Cox, N. D. Danielson: *Anal. Lett.*, **23**, 195 (1990).
- 23) 江頭直義, 朴 錦順, 一二三恵美, 宇田泰三: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 1029 (2000).
- 24) K. Koike, Y. Li, M. Seo, I. Sakurada, K. Tezuka, K. Uchikura: *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 101 (2000).
- 25) S. Levin, E. Grushka: *Anal. Chem.*, **57**, 1830 (1985).
- 26) S. N. Brune, D. R. Bobbitt: *Talanta*, **38**, 419 (1991).
- 27) Q. Song, G. M. Greenway, T. McCredy: *Analyst* (Cambridge), **126**, 37 (2001).
- 28) H. Inoue, K. Moritani, Y. Date, K. Kohashi, Y. Tsuruta: *Analyst* (London), **120**, 1141 (1995).
- 29) K. Koyama, T. Sato, N. Omichi, T. Miyamoto, K. Mimura, K. Maeda: *Ann. Physiol. Anthropol.*, **12** (4), 243 (1993).