



COSMOSIL

COSMOSIL 2.5HILIC

LC-MS/MS によるトリアゾール型固定相を用いた光学活性アミノ酸の一斉分離定量法の開発と応用

Technical Note
23

データご提供：東邦大学薬学部 薬品分析学教室 坂本 達弥 様 / 福島 健 教授

コスモシル 2.5HILIC は、トリアゾール基を有する HILIC カラムです。今回、本カラムを用いた LC-MS/MS による光学活性アミノ酸の分析データをご提供いただきましたので紹介します。

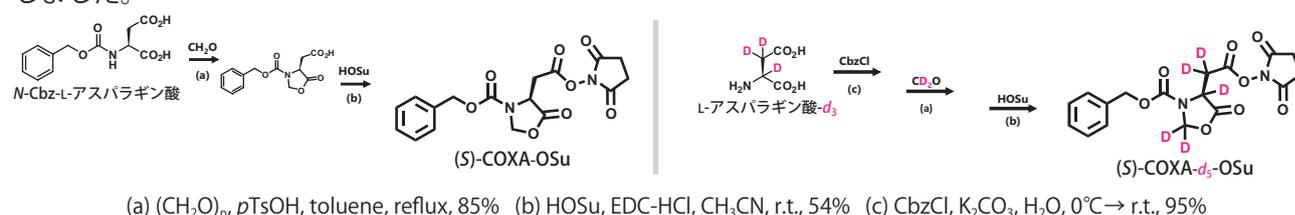
(1) 光学活性アミノ酸の誘導体化試薬の合成

ヒトを含む哺乳類体内には、L 型アミノ酸のほかに微量の D 型アミノ酸の存在が知られるようになりました。D-セリンやD-アスパラギン酸のように、既にその機能解析が盛んに進められている D 型アミノ酸もありますが、それらの詳細な機能解明には、生理活性評価とともに生体濃度変動を把握できる定量分析法が必要です。本研究では、LC-MS/MS による光学活性アミノ酸の分離定量法開発を目的として、下記の 3 条件を満たす新規のジアステレオマー誘導体化試薬 COXA-OSu の合成を行いました。

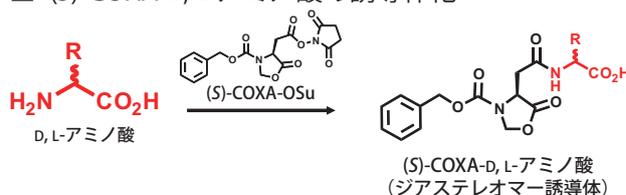
- i) 光学活性部位の識別に有利と考えられる環構造をもつ
- ii) 誘導体化試薬の安定同位体標識体の合成が容易
- iii) 光学活性原料から合成可能

■ COXA-OSu の合成

原料として、重水素標識体、非標識体とも入手性のよい光学活性化合物である Asp 誘導体を出発物質とし、下記の通り合成しました。同様に IS として用いる COXA-d₅-OSu も Asp-d₃ を原料として、同等の工程で合成しました。

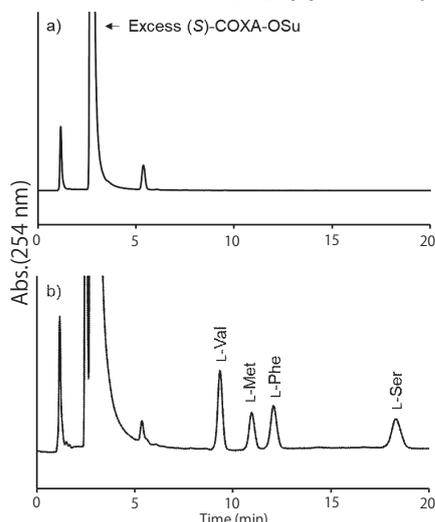


■ (S)-COXA-D, L-アミノ酸の誘導体化



D, L-アミノ酸を COXA-OSu で誘導体化すると、アミノ基が誘導体化されたジアステレオマー誘導体が得られました。また、アミノ基以外にも、メルカプト基、フェノールヒドロキシ基の誘導体化が可能でした。

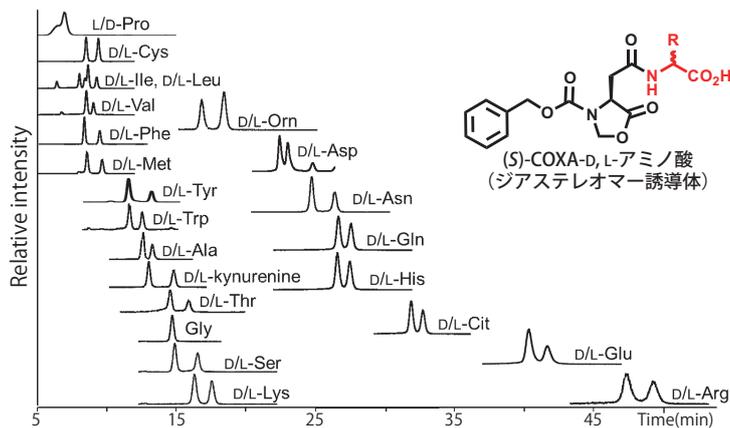
(2) COSMOSIL HILIC による (S)-COXA-D, L-アミノ酸 (ジアステレオマー誘導体) の分析



(Conditions)
 Column: COSMOSIL 2.5HILIC
 Column size: 2.0 mmI.D.-150 mm
 Mobile phase: A:10 mM HCO₂NH₄ in 5:1:95(v/v/v)H₂O / CH₃OH / CH₃CN
 B:10 mM HCO₂NH₄ and 10 mM HCO₂H in 5:1:95(v/v/v)H₂O / CH₃OH / CH₃CN
 B conc. 0%(0-15 min), 0 → 100%(15-20 min), 100%(20-53 min), 0%(53.01-60 min)
 Flow rate: 0.4 mL/min(0-20, 56-60 min), 0.6 mL/min(20-32 min), and 0.9 mL/min(32-56 min)
 Temperature: 60°C
 Detection: (This page)UV 254 nm
 (Next page)ESI-MS/MS, Negative, MRM
 Sample: (S)-COXA-D, L-Amino Acid
 Injection Vol.: 5.0 μL

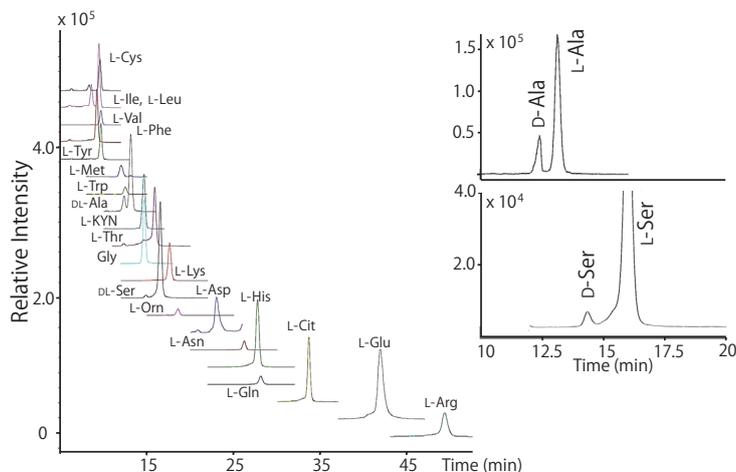
コスモシル HILIC を用いて、a) は誘導体化試薬のみを、b) は誘導体化試薬および誘導体である COXA-アミノ酸を分析した結果です。a) と b) を比較すると、過剰に加えている誘導体試薬は、保持が弱く、V₀ 付近に溶出されましたが、誘導体である COXA-アミノ酸が保持される特徴が見られました。

■ (S)-COXA-OSu を用いた D, L-アミノ酸 (標準試料) の分析



(S)-COXA-OSu を用いた D, L-アミノ酸の分離では、タンパク構成アミノ酸の DL 体 37 種 (36 種 + Gly)、その他のアミノ酸類 6 種、計 43 種の D, L-アミノ酸の一斉光学分割が達成できました。

■ ラット血漿中 D, L-アミノ酸 の分析



ラット血漿に由来するアミノ酸においても、ラット血漿に含まれる複数の L-アミノ酸や D-Ala, D-Ser を一斉に検出することができました。

(3) 考察

LC-MS/MS によるコスモシル 2.5HILIC を用いた COXA-D, L-アミノ酸の光学分割について検討した結果、本研究の対象としていた COXA-D, L-Ser の光学異性体がよく分離され、ラット血漿中 D-Ser や D-Ala の定量が可能でありました。本研究では、トリアゾールで化学修飾された固定相を用いて、N-誘導体化アミノ酸の光学分割を初めて示すことができました。現在は、本法を用いてマウス血清およびアメフラシ中枢組織への応用研究を行っています。

(4) 参考文献

Sakamoto, T.; Furukawa, S.; Nishizawa, T.; Fukuda, M.; Sasaki, M.; Onozato, M.; Uekusa, S.; Ichiba, H.; Fukushima, T. Succinimidyl (3-[(Benzyloxy)carbonyl]-5-oxo-1,3-oxazolidin-4-yl)acetate on a triazole-bonded phase for the separation of DL-amino-acid enantiomers and the mass-spectrometric determination of chiral amino acids in rat plasma. J Chromatogr A. 2019, vol. 1585, p. 131-137.

(5) COSMOSIL 2.5HILIC 分析カラム (粒子径 2.5 μm) ラインアップ 本実験で使用したカラムサイズは、★です。

サイズ内径×長さ (mm)	製品番号	価格	サイズ内径×長さ (mm)	製品番号	価格	サイズ内径×長さ (mm)	製品番号	価格
2.0 × 50	11766-21	68,000	★ 2.0 × 150	11770-51	68,000	3.0 × 100	11773-21	68,000
2.0 × 75	11768-01	68,000	3.0 × 50	11771-41	68,000	3.0 × 150	11774-11	68,000
2.0 × 100	11769-91	68,000	3.0 × 75	11772-31	68,000			

COSMOSIL コスモシル は、ナカライテスク株式会社の登録商標です。

ご注意ください 試験・研究用以外には使用しないでください。

※記載の内容は、'19年5月現在の情報に基づいております。
 ※データをご提供いただきました研究者の皆さまのご所属などの情報は、データご提供時の情報に基づいております。
 ※価格に消費税は含まれておりません。

nacalai tesque
The quality for certainty.



● Web site
<https://www.nacalai.co.jp/cosmosil/>

● 価格・納期のご照会
 営業部まで
 0120-489-552

ナカライテスク株式会社

〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町498

● 製品に関する技術的なご照会
<https://www.nacalai.co.jp/ss/Contact/>
 TEL:075-211-2703

■ 販売取扱店