

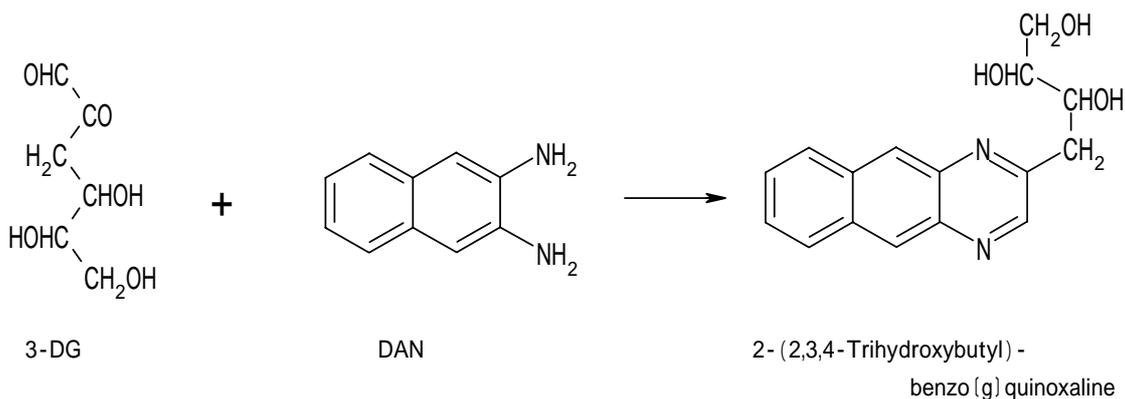
TSK-GEL テクニカルインフォメーション

プレカラム蛍光ラベル化法による 3-Deoxyglucosone の分析

タンパク糖化反応の生成物である AGE (Advanced Glycation End Products) は、糖尿病合併症を引き起こす要因の一つとして考えられています。グルコース由来のジカルボニル化合物である 3-Deoxyglucosone (3-DG) は、ピラリソ、ヘントジソ等の AGE の生成過程における前駆体として知られており、その存在と糖尿病合併症、白内障等の病気との関係が注目されている物質です。

3-DG の分析方法として、一般に、蛍光ラベル化による HPLC 法と MS による分析法が使用されています。今回は、操作が容易である、2,3-ジアミノナフレン (DAN) を用いた蛍光ラベル化法による、血漿中の 3-DG の測定例を紹介します。

下記の反応により、DAN は、3-DG のカルボニル基と反応して、安定性の高いキノキサリン化合物を生成します。この生成物は、最大吸収波長 268nm を示し、また、励起波長 271nm、蛍光波長 503nm の蛍光性も有します。蛍光検出器による測定により、高感度かつ高選択性の測定が可能になります。



血漿試料蛍光ラベル化条件

血漿に、6% 過塩素酸を加え(血漿:過塩素酸=1:0.6)、遠心分離、除タンパクを行う。

上清を取り、飽和炭酸ナトリウム溶液を添加して、中和する。

中和後の溶液 1mL に、0.1% 2,3-DAN(メタノール溶液) 100 μL を加える。

遮光し、4℃で、一晚静置して反応させる。

酢酸エチル 4ml を加えて混合し、溶媒抽出を行う。

酢酸エチル相を、蒸発乾固後、メタノール 200 μL に再溶解させ、測定試料とした。

HPLC 分析条件

Column	: TSKgel ODS-80Ts (4.6mmI.D. x 25cm)
Eluent	: A ; CH ₃ CN / CH ₃ OH / 5mmol/L H ₃ PO ₄ = 15/15/70 B ; CH ₃ CN / CH ₃ OH / 5mmol/L H ₃ PO ₄ = 40/40/20
Gradient	: Linear Gradient 0min (B ; 0%) 30min(B ; 0%) 35min(B ; 100%)
Flow rate	: 1.0mL/min
Column temp.	: 40
Detector	: Fluorescence (Ex ; 271nm, Em ; 503nm)
Injecion volume	: 10 μL

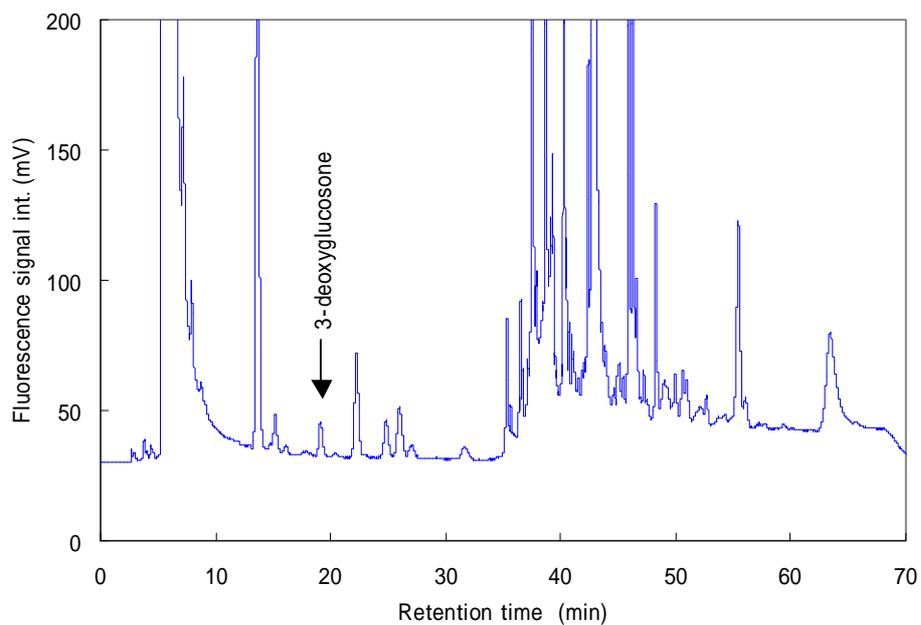


図 1 ヒト血漿のクロマトグラム

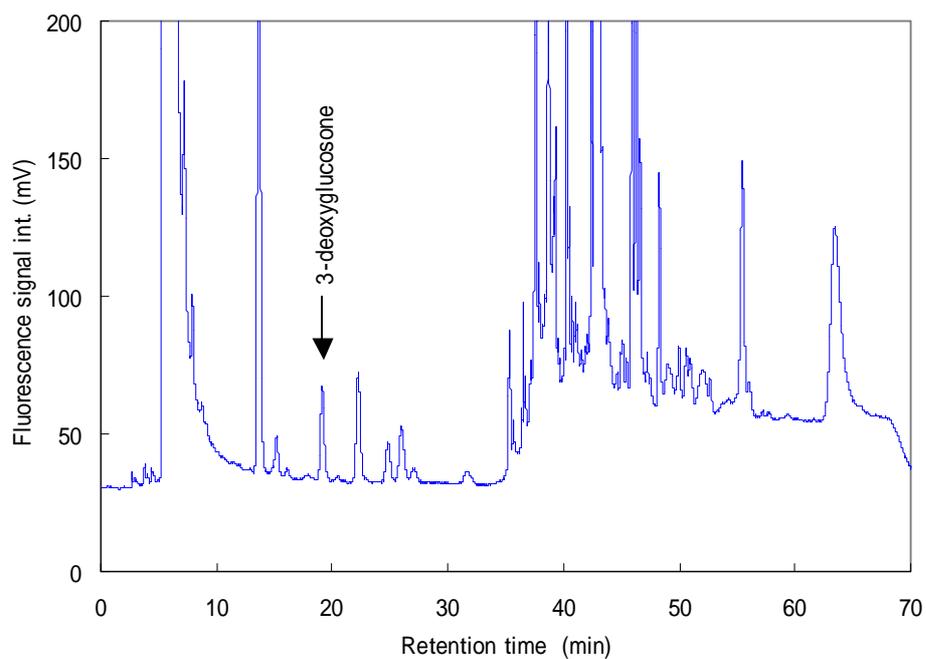


図 2 ヒト血漿(3-DG 8ng/ml 添加)のクロマトグラム

参考文献 : H. Yamada et al, J. Biol. Chem. 269 (1994) 20275-20280