

Application Report

プラズマ中の¹⁵N及び¹³C濃縮度分析

序 言

プラズマ（代謝生成物）サンプル中の窒素、炭素同位体の濃縮度の測定にはANCA（全自動窒素炭素同位体質量分析計）が最適である。また、HPLCを使用することによりANCA用に多種類の代謝生成物を単離し、その単離物質中の同位体比分析が可能となる。ANCAは、運転条件をキーボードから簡単な操作で、多くの違った分析手順による¹³Cおよび¹⁵Nトレーサ自動分析を行なう事ができる。HPLCの後でANCAを使えば、GC-IRMS（ガスクロマトグラフィー同位体比質量分光分析計）よりもはるかに多種の代謝生成物の分析を行う事が出来る。

GC-IRMSはラベルされた代謝生成物をオンラインで精製することが出来るが、この方法は揮発性のものか、分析以前に誘導体に変えられた物に限られる。代謝精製物の調整にオフラインのHPLCを使えば、前もって誘導体に変えることなしに、あらゆるクラスの生物学的化合物を分析することが出来る。この様にして、単離された代謝生成物は¹⁵Nおよび¹³Cの分析、全炭素および全窒素に関する分析をする事が出来る。（現在のところ、GC-IRMSは¹³Cについてのみ有効）

用 途

- ・アミノ酸異化作用
- ・蛋白質の代謝回転
- ・炭水化物の代謝
- ・遊離脂肪酸の酸化
- ・臓器の障害

実 験・目 的

蛋白質の合成とアミノ酸のアミノ基転移は、安定同位元素でラベルしたアミノ酸をトレーサとして使用し研究することが出来る。この方法として、プラズマ中のアミノ酸とこれらアミノ酸の酸化生成物（例えば α -Ketoiso-caproate）中の安定同位体の濃縮度が分析される。一例として、プラズマ中のグリシンの [¹⁵N] 濃縮度を測定した。

患者の遊離脂肪酸酸化の進行状況は、¹³Cでラベルした脂肪酸を点滴投与して代謝産物を測定することにより把握出来る。一例として [1-¹³C] パルチミン酸塩の点滴投与による、プラズマ中への代謝産物としての [1-¹³C] パルチミン酸塩の濃縮度の分析について述べる。

第1表 ANCAとGC-IRMSの比較

	ANCA	GC-IRMS
初期プラズマ精製	血液細胞の除去と代謝生成物混合物の抽出	
代謝生成物の精製	off-line HPLC	on-line capillary GC
安定同位体	¹⁵ Nおよび ¹³ C	¹³ C
全窒素および全炭素	Yes	No
代謝生成物を誘導体に変える必要性	No	Yes
自動分析	標準装備	オプション
システム的设计	机上型 (130Kg)	床置型 (850Kg)
精度	≤0.0002APE	≤0.0002APE
サンプル量	μgN,C	ngC

プラズマ中グリシンの単離

プラズマ中グリシンの単離にはPreston 他(1)の方法を使った。

簡単に言えば、メタノールで血液プラズマを脱蛋白化し、エーテル抽出で脂肪を除いた。中性のアミノ酸は、陽イオン交換HPLCで分離した。その時の条件は：カラムの温度、50℃、0.2M, pH3.1, piridine formateの流速は0.45cm³/minであった。グリシンの保持時間である20秒の分画を採取した。(あらかじめUV/ninhydrin検知にて決定) 各分画は冷却した燃焼用容器の中にピペットで移し、移動相を除くため凍結乾燥した。

平均サンプルサイズ	0.13 μmol N
平均同位体比	0.3660 atom% ¹⁵ N
CV (n=10)	0.22%

プラズマ中のパルミチン酸塩の単離

Preston とMcMilan(1)の方法により、標準的なHPLC法を使って血漿から純粋なパルミチン酸塩を単離した。クロロホルムとメタノールの混合物(2:1)を使って、遊離脂肪酸をプラズマから抽出した。このサンプルは、化学結合型カラムを使って更に精製した。精製された溶液を乾燥し(45:20:35, アセトニトリル：テトラヒドロフラン：0.1% H₃PO₄)移動相の中に溶解させた。HPLCを室温でC-18のカラムに対して行い、その場合の流速は0.75cm³/minであり、UVで検知した。各分画を清潔なアルミ製燃焼容器にピペットで入れ、凍結乾燥した。

第3表 ANCAによる

プラズマパルミチン酸塩の¹³C同位体比の精度

a) 1- ¹³ Cパルミチン酸を投与後のプラズマパルミチン酸塩の ¹³ C同位体比分析の精度	
平均サンプルサイズ	0.26 μmol パルミチン酸塩
平均同位体比	1.6766 atom% ¹³ C
CV (n=6)	0.33%
b) 1:9に希釈した後の99%atom%	
1- ¹³ Cパルミチン酸塩の ¹³ C同位体比分析の精度	
平均サンプルサイズ	0.10 μmol パルミチン酸塩
平均同位体比	0.604 atom% ¹³ C 過剰
CV (n=6)	0.8%
原料中の1- ¹³ Cの計算濃縮度	97.8±0.8atom% ¹³ C

ANCA

安定同位元素の濃縮度分析のため、上記の燃焼カプセルをROBOPREP(オンラインでIRMSに接続している。)のオートサンプラーに入れた。この際、適当な標準物質を選定した。¹⁵Nまたは¹³Cの分析をキーボードにより、運転条件を簡易な操作で済ませる事が出来た。移動相のブランクは凍結乾燥して燃焼カプセルに入れ、同じバッチの分析に入れた。第2表と第3表に、上記サンプル分析の精度を示す。分析を1サイクル行う時間は [¹⁵N] グリシンの場合の4.5分から [¹³C] パルミチン酸塩の5.8分迄変動した。

トレーサ、例えば [¹³C] パルミチン酸塩を使用した場合は、炭素原子の数(即ち16)で測定した¹³Cの濃縮度を補正する必要がある。(炭素の数の分だけANCAの燃焼段階で濃縮度が希釈されるため。)

Europa Scientific社のTRACERMASS はANCA用に特に設計された安定同位体質量分析計である。

謝辞

このレポートにデータを提供して頂いたSURRC,UKのDr.J.Prestonに感謝致します。

参考文献

(1)T.Preston and DC Mcmilan, Biomed, Environ., Mass Spectrom., 16, 229-235(1988)