

# HPLC 法を用いた葉酸化合物の迅速分離・分別定量法の開発 (予報)

岩 井 和 夫

谷 昌 子

(京都大学農学部栄養化学)  
研究室

葉酸は、アミノ酸・タンパク質・核酸などの生合成および代謝における  $C_1$  単位のキャリアーとしての機能を営む重要なビタミンであり、その欠乏や代謝異常は、生体に重大な障害を引き起こすことが知られている。その遺伝的な代謝障害としては、現在までに、先天性葉酸吸収障害、リンパ球・骨髄球における葉酸取り込み障害、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損症、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ欠損症、5-メチルテトラヒドロ葉酸メチルトランスフェラーゼ欠損症、ホルムイミノトランスフェラーゼ欠損症、サルコシンデヒドロゲナーゼ欠損症、グリシン分解系欠損症などが報告されている。このように多様な遺伝的疾患に対する臨床的研究においても、また、生体内におけるそれらの代謝変換系に関する基礎的研究においても、葉酸化合物の微量迅速分離・分別定量法の開発が強く要望されて来た。しかしながら、葉酸化合物はその種類が多く、また、それらの化合物の不安定性の故に、まだ実用に供し得る良い方法が確立されるには至らず大きな問題点として残されたままであった。そこで、本研究においては、近年進歩のめざましい高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を用いた葉酸化合物の迅速分離・分別定量法の開発を目的として検討を行った。

種々検討した結果、分離カラムとしては、Cosmosil 5-Ph (3.6×150 mm) の分離能が最も優れていた。このカラムの特長は、従来  $10\ \mu\text{m}$  であった充てん剤の粒子径を  $5\ \mu\text{m}$  とし分離能を著しく高めた点にあり、比較的スモールサイズのカラムで高性能の分離が可能であった。移動層として、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、1% Methanol を用いた場合、分離時間約 22分で、5-メチルテトラヒドロ葉酸をはじめとする生理的に重要なほとんど全ての遊離型葉酸化合物およびその代謝産物 (合計12種類以上) が、効率よく1本のカラムで分離されることが見い出された。その際、検出器として UV 検出器 (280 nm) を用いた場合の定量限界は、プテロイルグルタミン酸として 1 pmol、5-メチルテトラヒドロ葉酸として 2 pmol であり、マイクロバイオアッセイ法 (0.2~0.5 pmol/tube) にほぼ匹敵し、既報の HPLC 法に比べて、10~30倍以上の高感度で測定することが可能であった。

以上の結果より、本分離・分別定量法は、「分離能」「迅速性」などにおいて、現在までに報告された方法のなかで、最も優れた方法であることが明らかとなった。生体サンプルへの応用

については、現在研究中であり、さらに検討を必要とするが、特に、血漿・尿・胆汁など、遊離型葉酸化合物が主体のサンプルへの応用は、大いに期待できるものと考えられる。



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



葉酸は、アミノ酸・タンパク質・核酸などの生合成および代謝におけるC1単位のキャリアーとしての機能を営む重要なビタミンであり、その欠乏や代謝異常は、生体に重大な障害を引き起こすことが知られている。その遺伝的な代謝障害としては、現在までに、先天性葉酸吸収障害、リンパ球骨髄球における葉酸取り込み障害、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損症、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ欠損症、5-メチルテトラヒドロ葉酸メチルトランスフェラーゼ欠損症、ホルムイミノトランスフェラーゼ欠損症、サルコシンデヒドロゲナーゼ欠損症、グリシン分解系欠損症などが報告されている。このように多様な遺伝的疾患に対する臨床的研究においても、また、生体内におけるそれらの代謝変換系に関する基礎的研究においても、葉酸化合物の微量迅速分離・分別定量法の開発が強く要望されて来た。しかしながら、葉酸化合物はその種類が多く、また、それらの化合物の不安定性の故に、まだ実用に供し得る良い方法が確立されるには至らず大きな問題点として残されたままであった。そこで、本研究においては、近年進歩のめざましい高速液体クロマトグラフ(HPLC)法を用いた葉酸化合物の迅速分離・分別定量法の開発を目的として検討を行った。