

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5424505号
(P5424505)

(45) 発行日 平成26年2月26日(2014.2.26)

(24) 登録日 平成25年12月6日(2013.12.6)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 30/88	E
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 30/02	(2006.01)	GO 1 N 30/02	B
GO 1 N 30/06	(2006.01)	GO 1 N 30/06	Z
GO 1 N 30/26	(2006.01)	GO 1 N 30/88	2 O 1 X

請求項の数 11 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-13211 (P2012-13211)
 (22) 出願日 平成24年1月25日(2012.1.25)
 (65) 公開番号 特開2012-194177 (P2012-194177A)
 (43) 公開日 平成24年10月11日(2012.10.11)
 審査請求日 平成24年10月3日(2012.10.3)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-42812 (P2011-42812)
 (32) 優先日 平成23年2月28日(2011.2.28)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000133179
 株式会社タニタ
 東京都板橋区前野町1丁目14番2号
 (73) 特許権者 301021533
 独立行政法人産業技術総合研究所
 東京都千代田区霞が関1-3-1
 (74) 代理人 100110928
 弁理士 速水 進治
 (72) 発明者 小出 哲
 東京都板橋区前野町1丁目14番2号 株
 式会社タニタ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 8-イソプラスタンを精製する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第四級アンモニウム塩が固定化されたイオン交換担体に、8-イソプラスタンを含む液体試料を接触させて、前記液体試料中の8-イソプラスタンを前記イオン交換担体に保持させるステップと、

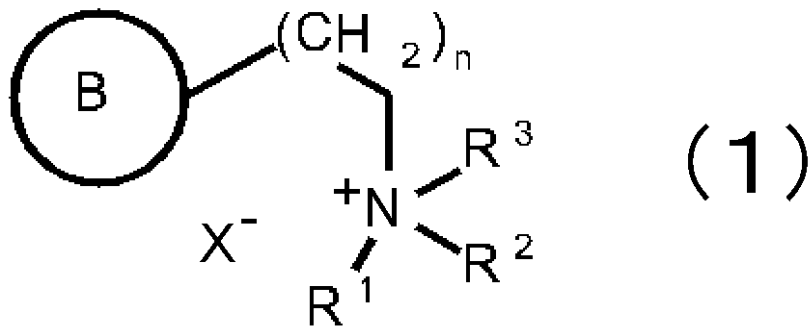
水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第一溶出液を用いて、8-イソプラスタンを前記イオン交換担体から溶離するステップと、
 を含む、8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項2】

前記イオン交換担体下記一般式(1)で表されるテトラアルキルアンモニウム塩が固定化されたものである、請求項1に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

10

【化1】



〔式(1)中、 R^1 、 R^2 、 R^3 が炭素数1～6のアルキル基であり、 n が1～5であり、 B が樹脂基材又はシリカゲルであり、 X^- が塩化物イオンである。〕

【請求項3】

8-イソプラスタンを含む生体試料と逆相担体とを接触させて、前記逆相担体に8-イソプラスタンを保持させるステップと、

8-イソプラスタンを前記逆相担体に保持させた状態で、前記逆相担体を洗浄するステップと、

水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第二溶出液を用いて、8-イソプラスタンを前記逆相担体から溶離させて、前記液体試料を得るステップと、

をさらに含み、

前記逆相担体が、官能基として炭素数1～30の直鎖の炭化水素基を有し、担体表面の炭素含有量が元素比で18%以下である材料により構成されている、請求項1又は2に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項4】

前記逆相担体が、フロー式粒子像分析装置で測定される円相当径0.5～10 μm の粒子を粒子数として1～20累積%含む、請求項3に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項5】

前記逆相担体が、さらに、フロー式粒子像分析装置で測定される円相当径20～100 μm の粒子を粒子数として65～99累積%含む、請求項4に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項6】

前記逆相担体の材料が、オクタデシルシリル基を有するシリカゲルである、請求項3乃至5いずれか1項に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項7】

前記逆相担体が、沈降法で測定される粒径35～60 μm の粒子と、コールター法で測定される粒径10～30 μm の粒子とを含み、粒径35～60 μm の前記粒子と、粒径10～30 μm の前記粒子との重量比が、80：20～95：5の範囲である、請求項3乃至6いずれか1項に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項8】

前記生体試料が尿、唾液又は血液である、請求項3乃至7いずれか1項に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項9】

前記水溶性有機溶媒がエタノールである、請求項1乃至8いずれか1項に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項10】

前記第一溶出液のpHが6.5～7.5である、請求項1乃至9いずれか1項に記載の8-イソプラスタンを精製する方法。

【請求項11】

前記第一溶出液がリン酸緩衝液を含む、請求項10に記載の8-イソプラスタンを精製

10

20

30

40

50

する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、8 - イソプラスタンを精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

8 - イソプラスタンは、細胞膜やリポ蛋白に含まれるリン脂質がフリーラジカルで酸化されることによって生じるプロスタグランジン様の化合物である。尿や血清などの生体試料中に含まれる8 - イソプラスタンを測定することにより、生体内における酸化ストレスを非侵襲的に評価することができ、免疫測定により8 - イソプラスタンを測定するためのキットも市販されている。

10

【0003】

生体試料中に含まれる8 - イソプラスタンの分析では、分析精度を向上させるため、前処理により、蛋白質などの夾雑物を除去することが知られている。

【0004】

例えば、特許文献1では、体液中に含まれる8 - イソプラスタンの濃度を免疫測定により測定するため、除タンパク及び脱脂した検体をn - ヘキサンと2 - プロパノールと酢酸とを特定の比率で配合した緩衝液に溶解してNH₂ カラムにかけ、洗浄及び溶出を行って前処理する技術が記載されている。

20

【0005】

また、特許文献2には、固相容量の異なる固相抽出担体を用いた2ステップ固相抽出により、夾雑物質を除去すると共にF₂ - イソプラスタン化合物を抽出する技術が記載されている。特許文献2において、かかる技術は、LC - MS / MS分析のための溶媒交換、分析感度を高めるための濃縮ならびに試料の精製という3つのことを同時に短い時間で行うことを可能にするものとされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2004 - 157119号公報

30

【特許文献2】国際公開第2008 / 065895号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、上記文献記載の技術は、ヘキサン等の非極性溶媒を用いるため、毒性、環境への影響などを含めた安全性の点で問題がある。また、ディスポーザブルのプラスチック製の器具は、ヘキサンに耐性がないため、こうした手軽かつ清潔な器具を使用できないなど、作業の簡便性にも改善の余地があった。

【0008】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、安全でかつ簡便に8 - イソプラスタンを精製できる技術を提供するものである。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明によれば、

第四級アンモニウム塩が固定化されたイオン交換担体に、8 - イソプラスタンを含む液体試料を接触させて、前記液体試料中の8 - イソプラスタンを前記イオン交換担体に保持させるステップと、

水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第一溶出液を用いて、8 - イソプラスタンを前記イオン交換担体から溶離するステップと、

を含む、8 - イソプラスタンを精製する方法が提供される。

50

【 0 0 1 0 】

また、本発明によれば、

上記の 8 - イソプラスタンを精製する方法により精製された 8 - イソプラスタンをを用いて 8 - イソプラスタンを分析する方法が提供される。

【 0 0 1 1 】

また、本発明によれば、

上記の 8 - イソプラスタンを精製する方法に用いられる、8 - イソプラスタンを精製するためのキットが提供される。

【 0 0 1 2 】

さらに、本発明によれば、

上記の 8 - イソプラスタンを分析する方法に用いられる、8 - イソプラスタンを分析するためのキットが提供される。

【 0 0 1 3 】

この発明によれば、第四級アンモニウム塩が固定化されたイオン交換担体を用いることにより、8 - イソプラスタンを第四級アンモニウムに保持されるため、液体試料中に含まれるカチオン性物質や非イオン性物質と 8 - イソプラスタンを分離することができる。また、8 - イソプラスタンは、毒性や環境への影響が少ない水溶性有機溶媒と水とを主成分とする溶出液により、該イオン交換担体から容易に溶離できるため、第四級アンモニウム塩に強固に吸着するアニオン性物質と 8 - イソプラスタンを簡便に分離することができる。したがって、安全でかつ簡便に 8 - イソプラスタンを精製することができる。

【発明の効果】

【 0 0 1 4 】

本発明によれば、安全でかつ簡便に 8 - イソプラスタンを精製することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図 1】実施の形態に係る 8 - イソプラスタンを精製する方法を説明するフローチャートである。

【図 2】実施の形態に係る 8 - イソプラスタンを精製する方法を説明するフローチャートである。

【図 3】実施例を示す図である。

【図 4】実施例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

以下、本発明の実施の形態について、図面を用いて説明する。尚、すべての図面において、同様な構成要素には同様の符号を付し、適宜説明を省略する。

【 0 0 1 7 】

図 1 は、本実施の形態の 8 - イソプラスタンの (8 - I P) の精製方法を説明するフローチャートである。本実施の形態は、図 1 で示すように、8 - イソプラスタンを含む液体試料を用意するステップ (S 1 0 1) と、第四級アンモニウム塩が固定化されたイオン交換担体に、8 - イソプラスタンを含む液体試料を接触させて、液体試料中の 8 - イソプラスタンをイオン交換担体に保持させるステップ (S 1 0 2) と、水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第一溶出液を用いて、8 - イソプラスタンをイオン交換担体から溶離するステップ (S 1 0 3) と、を含む。

【 0 0 1 8 】

S 1 0 1 において、8 - イソプラスタンを含む液体試料は、8 - イソプラスタンをイオン交換担体に保持できる組成であれば限定されないが、水溶性有機溶媒と水とを主成分とする液体に 8 - イソプラスタンを溶解したものが好ましい。本明細書において、「水溶性有機溶媒と水とを主成分とする」という場合、液体中、水溶性有機溶媒の含有量と水の含有量との合計が、50 体積%以上であることが好ましく、80 体積%以上であることがより好ましく、90 体積%以上であることがさらに好ましい。

【 0 0 1 9 】

本実施の形態において、水溶性有機溶媒としては、メタノール、エタノール、プロパノール及びアセトニトリルからなる群から選択される一種又は二種以上の水溶性有機溶媒を用いることができるが、安全性の観点からエタノールがより好ましい。液体試料中のエタノールの含有量は、8 - イソプラスタンが溶解し、かつ、イオン交換担体に8 - イソプラスタンを保持させることができればよいが、例えば、10 ~ 50 体積%とすることができる。

【 0 0 2 0 】

また、8 - イソプラスタンを含む液体試料は、緩衝液を含むことが好ましい。緩衝液として、たとえばpH 5.5 ~ 8.5、好ましくは6.0 ~ 8.0、より好ましくは6.5 ~ 7.5に調節された緩衝液が挙げられる。本明細書において、緩衝液は、所定の酸を水に溶解したものであり、その種類は、pHによって適宜選択することができる。例えば、pH 5.5 ~ 5.6の範囲では酢酸緩衝液、pH 5.5 ~ 6.2の範囲ではクエン酸緩衝液、pH 5.5 ~ 7.0の範囲では、クエン酸 - リン酸緩衝液、pH 5.5 ~ 8.5の範囲では、リン酸緩衝液、pH 7.2 ~ 8.5の範囲では、トリスリン酸緩衝液を用いることができる。

【 0 0 2 1 】

液体試料としては、中でも、エタノールとリン酸緩衝液との混合液に8 - イソプラスタンを溶解させたものが好ましい。本明細書において、「リン酸緩衝液」とは、所定のpHを有する水とリン酸及び/又はリン酸塩との混合液であり、リン酸緩衝液のpHは、5.5 ~ 8.5であることが好ましく、6.0 ~ 8.0であることがより好ましく、6.5 ~ 7.5がさらに好ましい。「リン酸緩衝液」中に含まれるリン酸塩は、リン酸のナトリウム塩、カリウム塩又はアンモニウム塩の一種又はこれらの組み合わせとすることができる。特に、エタノールとリン酸緩衝液(pH 7)との混合液に8 - イソプラスタンを溶解させるとより好ましい。なお、本明細書において、pHは、25 で測定したものをいう。

【 0 0 2 2 】

8 - イソプラスタンを含む液体試料は、生体試料を前処理して用意することもできる。図2は、生体試料の前処理方法を説明するフローチャートである。この前処理方法は、8 - イソプラスタン(8 - IP)を含む生体試料を用意するステップ(S201)と、8 - イソプラスタンを含む生体試料と逆相担体とを接触させて、逆相担体に8 - イソプラスタンを保持させるステップ(S202)と、8 - イソプラスタンを保持させた状態で、逆相担体を洗浄するステップ(S203)と、水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第二溶出液を用いて、8 - イソプラスタンを逆相担体から溶離させて、液体試料を得るステップ(S204)とを含む。

【 0 0 2 3 】

S201において用意される生体試料としては、尿、血液、唾液等の体液が挙げられるが、以下、試料が尿である場合を例に説明する。採取する尿の量は、測定をより確実に行う観点から、たとえば0.5 ~ 50 mL、好適には1.0 ~ 10 mL、より好適には1.5 ~ 5.0 mLとする。採取された原尿そのものを使うことが可能である。また、尿を所定の緩衝液又は水で希釈して用いてもよいし、キレート剤等の添加剤を加えても良い。尿は採取後直ちに処理されることが好ましいが、数時間から数日後であってもよい。

【 0 0 2 4 】

S202において用いる逆相担体は、官能基として炭素数1 ~ 30の直鎖の炭化水素基をもつ材料により構成されていること好ましく、生体試料中の8 - イソプラスタンをより効率的に処理する観点から、炭素数が8 ~ 22の直鎖の炭化水素基がより好ましく、炭素数が10 ~ 20の直鎖の炭化水素基が特に好ましい。逆相担体の量は、尿量に対して0.1 ~ 10 倍量とすることができる。

【 0 0 2 5 】

逆相担体の材料として、さらに具体的には、オクタデシルシリル(ODS)基を化学結合させたシリカゲルが挙げられる。このとき、オクタデシルシリル(ODS)基を化学結

10

20

30

40

50

合させたシリカゲルにおけるシリル化剤の結合様式は、シリル化剤がシリカゲル中のシラノール基と1対1で結合している様式、つまりモノメリックな結合様式とするとよい。これにより、逆相系充填剤が過度に疎水性とならないようにすることができる。また、逆相担体は、さらに好適な疎水性を有するという観点から、担体表面の炭素(C)の含有量が、元素比で18%以下が好ましく、15%以下とするとより好ましい。

【0026】

また、逆相担体は、フロー式粒子像分析装置で測定される円相当径0.5~10 μ mの粒子を粒子数として1~20累積%含むことがより好ましい。また、さらに上記装置で測定される円相当径20~100 μ mの粒子を粒子数として65~99累積%含んでいてもよく、より好ましくは、78~99累積%含んでいてもよい。こうすることで、分子量や性質等の性状が8-イソプラスタンとわずかに異なる夾雑物が含まれている場合にも、これらを簡便で確実に分離することができる。この理由としては、粒子径が異なる粒子を特定の比率で配合することにより、大きな粒子の間に小さな粒子が入り込み、単位体積あたりの担体の表面積が最大となり、8-イソプラスタンの保持力が向上することが考えられる。

10

【0027】

さらに、8-イソプラスタンの分離を効率よく行う観点から、フロー式粒子像分析装置で測定される円相当径0.5~10 μ mの粒子を粒子数として含む割合は、好ましくは4~19累積%、さらに好ましくは4~13累積%、特に好ましくは6~13累積%である。また、上記装置で測定される円相当径20~100 μ mの粒子を粒子数として含む割合は、好ましくは68~95累積%、さらに好ましくは78~93累積%、特に好ましくは85~91累積%である。

20

【0028】

なお、フロー式粒子像分析装置は、測定対象の粒子を含む試料が流れるフローセルにストロボ光等の光を照射して、通過中の粒子の画像を取得し、画像解析により円相当径等の粒子形状を示すパラメータを算出する装置である。実際には隋円形などに崩れた粒子が存在するため、円相当径とは、実際に測定した粒子の粒子投影面積と同じ投影面積を持つ球を想定し、その球の直径と定義している。フロー式粒子像分析装置の具体例としては、シスメックス社製FPIA-3000が挙げられる。

【0029】

また、逆相担体は、沈降法で測定される粒径35~60 μ mの粒子と、コールター法で測定される粒径10~30 μ mの粒子とを含むことができ、粒径35~60 μ mの粒子と、粒径10~30 μ mの粒子との重量比を、80:20~95:5の範囲にすることができる。このようにすれば、8-イソプラスタンの回収率をさらに向上させることができる。粒径35~60 μ mの粒子と、粒径10~30 μ mの粒子との重量比は、8-イソプラスタンの回収率と分離時間とのバランスを向上させる観点から、好ましくは90:10とする。

30

【0030】

生体試料は、予め水及びアルコールで十分にコンディショニングされた逆相担体と接触させることが好ましく、エタノールと純水(さらには緩衝液)でコンディショニングされているとより好ましい。生体試料と逆相担体との接触方法は特に限られず、バッチ法でもカラム法でもよいが、効率よく8-イソプラスタンを濃縮できるという観点から、カラム法が好適である。ステップS202では、逆相担体と移動相との組み合わせとして、例えばオクタデシル(ODS)基を化学結合させたシリカゲルとリン酸緩衝液-エタノールの混合液との組み合わせが用いられる。

40

【0031】

その後、所定の緩衝液等を洗浄液として逆相担体に流し、逆相担体に捕捉されない物質を洗い流す(S203)。S203における洗浄液は、例えば、pHが5.5~8.5、好ましくは6.0~8.0、より好ましくは6.5~7.5に調節された緩衝液を含むことが好ましく、中でもエタノールとリン酸緩衝液との混合液が好ましく、洗浄液中、0~

50

70体積%、好ましくは0~50体積%、より好ましくは0~30体積%のエタノールを含有することがより好ましい。洗浄液の量は、1~100mL、好ましくは1~50mL、より好ましくは1~20mLとすることができる。また、エタノールの含量を徐々に増加させるとより好ましく、0~20体積%含有エタノール/リン酸緩衝液で洗浄した後、20~40体積%含有エタノール/リン酸緩衝液で洗浄し、さらに、40~60体積%含有エタノール/リン酸緩衝液で洗浄するとより好ましい。

【0032】

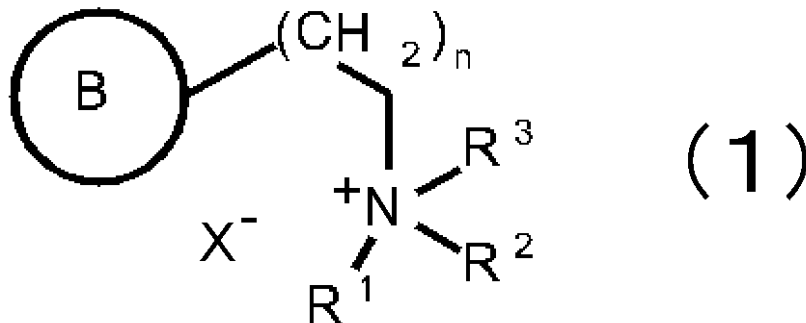
洗浄後、水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第二溶出液を用いて、逆相担体に保持した8-イソプラスタンを逆相担体から溶離する(S204)。第二溶出液は、エタノール、アセトニトリル、メタノール等の水溶性有機溶媒を含有することができ、その濃度は、第二溶出液中、10~100体積%、好ましくは、30~100体積%とすることができる。第二溶出液は、緩衝液とすることが好ましく、第二溶出液のpHは、例えば、5.5~8.5、好ましくは6~8、より好ましくは6.5~7.5とする。また第二溶出液は、エタノールとリン酸緩衝液との混合液がより好ましく、第二溶出液中、10~100体積%、好ましくは30~100体積%、より好ましくは50~100体積%のエタノールを含有することがより好ましい。第二溶出液は、0.5~10mLを通液させ、0.7~1.7mLにかけて溶出する約1mLを回収する。なお、溶出液量及び回収液量は使用する逆相担体の大きさ、サンプル量等に応じて、増減可能である。このようにして、8-イソプラスタンを含む液体試料を用意することもできる(S101)。

【0033】

ステップS102では、用意した8-イソプラスタンを含む液体試料を第四級アンモニウム塩が固定化されたイオン交換担体に導入する。第四級アンモニウム塩としては、式(1)で表されるテトラアルキルアンモニウム塩が好ましい。

【0034】

【化1】



【0035】

〔式(1)中、R¹、R²、R³が炭素数1~6のアルキル基であり、nが1~5であり、Bが樹脂基材又はシリカゲルであり、X⁻が塩化物イオンである。〕

【0036】

式(1)で表されるイオン交換担体としては、中でもR¹、R²、R³がメチル基であり、nが3のトリメチルアンモニウムプロピル基が固定化されたものが好ましい。また、式(1)中、Bは、スチレンとジビニルベンゼンの共重合体等からなる樹脂基材又はシリカゲルであるが、シリカゲルがより好ましい。使用するイオン交換担体の量は、第四級アンモニウム塩の含量(eq)が、液体試料中に含まれる8-イソプラスタンの物質質量に対して、1~100000倍にすることが好ましいが、例えば、尿中の8-イソプラスタンを精製する場合、1mLの尿に対して、0.01~1eqとなる量にすることができる。

【0037】

液体試料とイオン交換担体との接触方法は特に限られず、バッチ法でもカラム法でもよいが、生体試料中の8-イソプラスタンを精製する場合は、カラム法が好適である。イオン交換担体は、第四級アンモニウム塩の対イオンを塩化物イオンにしておくことが好ましい。塩酸や食塩水等をイオン交換担体に接触させることで、第四級アンモニウム塩の対イ

オンを塩化物イオンにすることができる。その後、十分な水及びアルコール、所定の緩衝液で平衡化しておく。緩衝液として、たとえばpH 5.5～8.5、好ましくは6.0～8.0、より好ましくは6.5～7.5に調節されたリン酸緩衝液が挙げられる。また、この緩衝液は、0～100体積%、好ましくは10～80体積%の水溶性有機溶媒（特に、エタノール）を含有することが好ましい。

【0038】

カラム法の場合、コンディショニングされたイオン交換担体に液体試料を流し、8-イソプラスタンをイオン交換担体に保持させた後、水溶性有機溶媒と水とを主成分とする洗浄液によって、イオン交換担体に捕捉されていないカチオン物質や非イオン物質を洗い流す。洗浄液として、たとえば液体試料の調製に用いられた溶液（第二溶出液を含む）と同じもの、または略同一のものを用いることができる。具体的には、S102における洗浄液は、エタノール、アセトニトリル、メタノール等の水溶性有機溶媒を含有することができる、その濃度は、洗浄液中、10～100体積%、好ましくは、30～100体積%とすることができる。S102における洗浄液もまた、緩衝液を含むことが好ましく、pHが、例えば、5.5～8.5、好ましくは6～8、より好ましくは6.5～7.5の緩衝液を用いることができる。また、エタノールとリン酸緩衝液との混合液がより好ましく、洗浄液中、0～100体積%、好ましくは30～100体積%、より好ましくは50～100体積%のエタノールを含有させることができる。洗浄液の量は、0.1～100mL、好ましくは0.1～50mL、より好ましくは0.1～20mLとすることができる。

【0039】

洗浄後、水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第一溶出液を用いて、イオン交換担体に保持した8-イソプラスタンをイオン交換担体から溶離する（S103）。第一溶出液は、エタノール、アセトニトリル、メタノール等の水溶性有機溶媒を含有ことができ、その濃度は、第一溶出液中、10～100体積%、好ましくは、30～100体積%とすることができる。第一溶出液は、緩衝液を含むことが好ましく、例えば、pH 5.5～8.5、好ましくは6.0～8.0、より好ましくは6.5～7.5の緩衝液を含んでもよい。また、エタノールとリン酸緩衝液との混合液がより好ましく、第一溶出液中、0～100体積%、好ましくは30～100体積%より好ましくは50～100体積%のエタノールを含有することがより好ましい。第一溶出液は、0.1～10mLを通液させ、1.5～2.5mLにかけて溶出する約1mLを回収する。なお、溶出液量及び回収液量は、使用する担体の大きさ、サンプル量等に応じて、増減可能である。このようにして、8-イソプラスタンの精製をすることができる。

【0040】

回収された液体中には、8-イソプラスタスが濃縮されており、8-イソプラスタスの測定に供することができる。なお、8-イソプラスタスの分析前に回収液中の溶媒を、適宜除去してもよい。

【0041】

8-イソプラスタスの測定方法としては、免疫測定法、ガスクロマトグラフィー/質量分析（GC/MS）、液体クロマトグラフィー/質量分析（LC/MS）等が挙げられる。また、8-イソプラスタスを蛍光標識し、液体クロマトグラフィーにより分析する方法を用いてもよい。蛍光標識には、カルボン酸の蛍光標識化剤を用いることができ、例えば、4-アシルアミノ-7-メルカプト-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール（特開2001-81082号公報）、ベンゾトリアゾール誘導体（特開平1-308268号公報）、キノキサリン誘導体（特開平3-291272号公報）等を用いることができるが、中でも、温和に標識できるという観点から、2,3,4-テトラヒドロ-6,7-ジメトキシ-1-メチル-2(1H)-オキソキノキサリン-3-プロピオン酸ヒドラジド（DMEQ-H）が好ましい。

【0042】

上記本実施の形態に係る8-イソプラスタスを精製する方法に用いられる、8-イソプラスタスを精製するためのキットは、第四級アンモニウム塩が固定化されたイオン交換担

10

20

30

40

50

体と、水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第一溶出液とを含むものであればよいが、トリメチルアンモニウムプロピル基がシリカゲルに固定化されたイオン交換担体と、エタノールとリン酸緩衝液とを含むpH 6.5～7.5の第一溶出液とを備えたものが好ましい。第一溶出液は、エタノールとリン酸緩衝液とを別々に包装し、ユーザにおいて調製する形態であってもよい。なお、こうしたキットには、本実施の形態に係る8-イソプラスタンを精製する方法が記載された使用説明書が添付されている。さらに、8-イソプラスタンを精製するための当該キットは、8-イソプラスタンを分析するためのキットとしてもよい。

【0043】

また、生体試料中に含まれる8-イソプラスタンを分析するためのキットとしては、上記の8-イソプラスタンを精製するためのキットに加え、官能基として炭素数1～30の直鎖の炭化水素基を有し、担体表面の炭素含有量が元素比で18%以下である材料により構成されている上記の逆相担体と、水溶性有機溶媒と水とを主成分とする第二溶出液とをさらに備えるものとすることができる。第二溶出液は、エタノールとリン酸緩衝液とを含むpH 6.5～7.5のものが好ましい。第二溶出液もまた、第一溶出液と同様に、エタノールとリン酸緩衝液とを別々に包装し、ユーザにおいて調製する形態であってもよい。こうしたキットには、前述した生体試料中の8-イソプラスタンを精製する方法、及び、この方法により精製された8-イソプラスタンを分析する方法が記載された使用説明書が添付されている。

【0044】

以上、図面を参照して本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。

例えば、実施の形態では、尿中の8-イソプラスタンを精製する場合を例に説明したが、血清中の8-イソプラスタンを精製する場合は、8-イソプラスタンの正常値が尿中の100分の1程度であるため、定量前に、濃縮操作を行ってもよい。たとえば、血清サンプルを50のヒートブロックにセットし、窒素気流下で溶媒を除去するなど、100倍の濃縮操作を追加する。こうすることで、例えば、8-イソプラスタンを蛍光標識によりHPLC分析するとき、血清中の8-イソプラスタンのピークを明瞭に観察することができる。

【実施例】

【0045】

実施例1

逆相担体として、YMC社製ODS-AQの粒径50 μ m及び20 μ mを、50 μ m：20 μ m＝90：10の重量比で、均質になるように混合して、逆相カラム充填材を調製した。粒径50 μ mは沈降法、粒径20 μ mはコールター法により測定した。調製した逆相カラム充填材は、フロー式粒子像分析装置（シスメックス社製FPIA-3000）で測定される円相当径0.5～10 μ mの粒子径を粒子数として10累積%含み、上記装置で測定される円相当径20～100 μ mの粒子を粒子数として90累積%含んでいた。この充填材を500mg充填した逆相カラムを準備し、エタノール、水の順で通液し、コンディショニングを行った。

この逆相カラムに、1.4mLの尿（産業技術総合研究所ボランティア（ヒト）、産業技術総合研究所倫理審査委員会承認番号15000-A-20081215-001）と、0.6mLの80mMリン酸緩衝液（pH 7.0、4mM EDTA（エチレンジアミン四酢酸）含有）とを混ぜ合わせた合計2mLのサンプルを導入した。そして、洗浄液として、下記（i）、（ii）、（iii）を用い、順に洗浄した。

（i）2%（v/v）エタノール含有10mMリン酸緩衝液（pH 7.0）：6.0mL

（ii）30%（v/v）エタノール含有10mMリン酸緩衝液（pH 7.0）：4.0mL

（iii）50%（v/v）エタノール含有10mMリン酸緩衝液（pH 7.0）：0.8mL

10

20

30

40

50

その後、50% (v/v) エタノール含有10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.7 mLを通液して得られるフラクションを8-イソプラスタンを含有するフラクションとして回収した。

ついで、イオン交換担体として、Varian製のSAX (イオン交換容量: 0.8 meq/g、充てん剤量0.5 g、カラムサイズ3 mL、カラム形状注射筒型、ポリプロピレン)を準備し、逆相担体から回収した8-イソプラスタンを含有するフラクションをコンディショニングしたSAXに導入した。SAXのコンディショニングは、エタノール及び純水を順に通液して行った。8-イソプラスタンを導入されたSAXは、0.4 mLの50% (v/v) エタノール含有10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した後、50% (v/v) エタノール含有10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.8 mLを通液して得られるフラクションを8-イソプラスタンを含有するフラクションとして回収した。

10

【0046】

比較例1

逆相担体から溶出した8-イソプラスタンを含有するフラクションをSAXに通さなかった以外は、実施例1と同様にした。

【0047】

実施例2

実施例1において、異なる検体から得られた尿サンプルを用いた以外は、同様にして行った。

【0048】

20

比較例2

逆相担体から溶出した8-イソプラスタンを含有するフラクションをSAXに通さなかった以外は、実施例2と同様にした。

【0049】

[評価]

実施例1、2、比較例1、2の各フラクションを150 µLとり、75 µLの試薬Iと、60 µLの試薬IIと、15 µLの試薬IIIとに混合し、70 で20分間反応させた。その後、10分間流水で冷却した。Varian製のSCX (イオン交換容量: 0.8 meq/g、充てん剤量0.25 g、カラムサイズ3 mL、カラム形状注射筒型、ポリプロピレン)をエタノール及び純水の順でコンディショニングして準備し、冷却した反応液を導入した。8% (v/v) エタノール含有10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mLで洗浄した後、8% (v/v) エタノール含有10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mLを通液して得られるフラクションを8-イソプラスタンの分析サンプルとして回収した。回収した分析サンプルは、そのままHPLCに注入した。

30

<試薬>

・試薬I: 10 mM 1, 2, 3, 4 テトラヒドロ 6, 7 ジメトキシ 1 メチル 2 (1H) オキソキノキサリン 3 プロピオン酸ヒドラジド (DMEQ-H) / ジメチルホルムアミド

・試薬II: 10% (v/v) ピリジン / 20 mM塩酸含有エタノール

・試薬III: 0.5 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジミド

40

塩酸塩 / 精製水

<HPLC条件>

流速 1.2 mL / 分

カラムオープン 50

分析カラム D i v e l o s i l O D S M G 5 (2 5 0 m m 、 4 . 6 m m)

注入量 10 µL

蛍光検出器 E x : 3 6 7 n m 、 E m : 4 4 5 n m

移動相 メタノール : 2 5 m M 酢酸 / 酢酸ナトリウム (p H 4 . 5) = 5 5 : 4 5 (アイソクラティック)

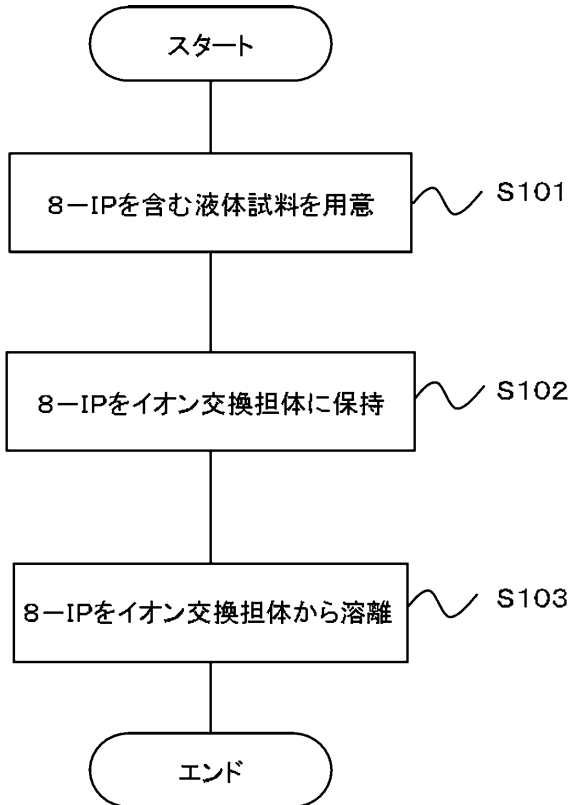
【0050】

50

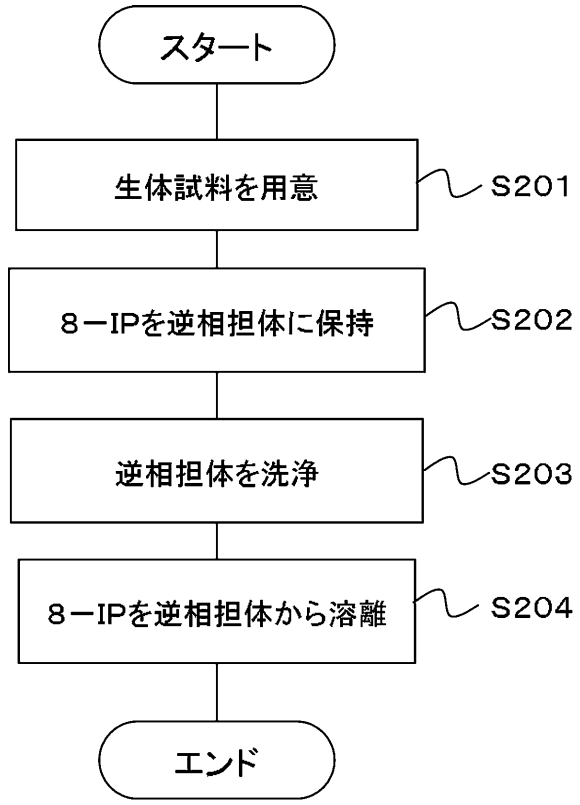
HPLCチャートを図3、4に示す。図3中、Aが実施例1、Bが比較例1である。図4中、Aが実施例2、Bが比較例2である。実施例1、2は2回行い、図3(a)のAは、1回目に行った実施例1のチャート図を示し、図3(b)のAは、2回目に行った実施例1のチャート図を示した。また、図4(a)のAは、1回目に行った実施例2のチャート図を示し、図4(b)のAは、2回目に行った実施例2のチャート図を示した。図3、4中、Cは、8-イソプラスタンの標準品(Cayman社製)2ngを8%(v/v)エタノール含有10mMリン酸緩衝液(pH7.0)0.2mLに溶解して、各実施例及び比較例と同様に評価したものである。また、図3、4中、Dは、Aの実施例1で用いた検体中に8-イソプラスタンの標準品溶液(10ng/mL)を始めに混合し、カラム処理を実施したものである。図3(a)のDが1回目に行った実施例1の検体と上記8-イソプラスタンの標準品溶液を混合したものであり、図3(b)のDが2回目に行った実施例1の検体と上記8-イソプラスタンの標準品溶液を混合したものである。図4(a)のDが1回目に行った実施例2の検体と上記8-イソプラスタンの標準品溶液を混合したものであり、図4(b)のDが2回目に行った実施例2の検体と上記8-イソプラスタンの標準品溶液を混合したものである。図3中、Cのチャートが示すように、8-イソプラスタンの保持時間は、約19分である。比較例は、8-イソプラスタンのピークが夾雑物のピークに隠れてしまうが、実施例では、8-イソプラスタンのピークを確認することができる。

10

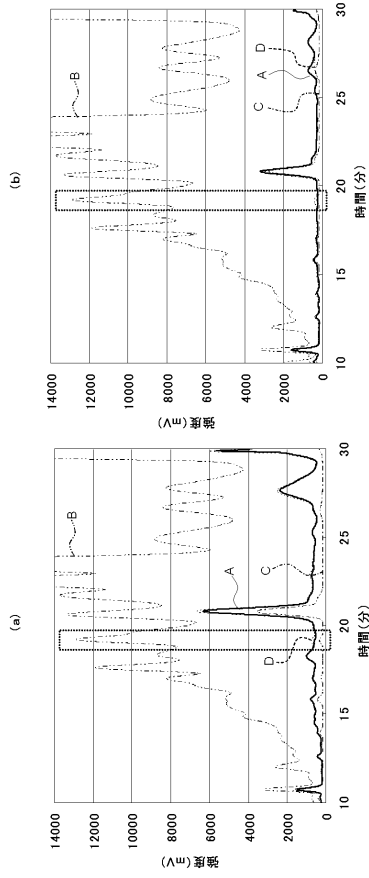
【図1】



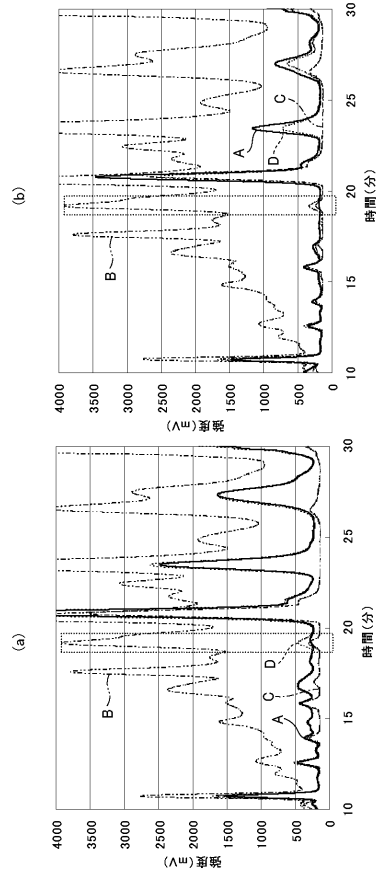
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
G 0 1 N 30/74 (2006.01)		G 0 1 N 30/26 A
G 0 1 N 1/10 (2006.01)		G 0 1 N 30/88 1 0 1 L
		G 0 1 N 30/88 2 0 1 G
		G 0 1 N 30/74 F
		G 0 1 N 1/10 C
		G 0 1 N 1/10 V

(72)発明者 横山 憲二
 東京都八王子市片倉町1404-1 東京工科大学片柳研究所棟7階 独立行政法人産業技術総合
 研究所バイオ技術産業化センター内

(72)発明者 鈴木 祥夫
 東京都八王子市片倉町1404-1 東京工科大学片柳研究所棟7階 独立行政法人産業技術総合
 研究所バイオ技術産業化センター内

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0134332(US,A1)
 特開2004-157119(JP,A)
 特開2009-222707(JP,A)
 特開2012-194178(JP,A)
 国際公開第03/076925(WO,A1)
 国際公開第2008/065895(WO,A1)
 米国特許第02597494(US,A)
 J.Nourooz-Zadeh, N.K.Gopaul, S.Barrow, A.I.Mallet, and E.E.Anggard, Analysis of F2-iso
 prostanes as indicators of non-enzymatic lipid peroxidation in vivo by gas chromat, Jo
 urnal of Chromatography B., 1995年 5月19日, Vol.667, No.2, P.199-208
 Magdalena Korecka et al., Simultaneous HPLC-MS-MS quantification of 8-iso-PGF2 and 8
 ,12-iso-iPF2 in CSF and brain tissue samples with on-line cleanup, Journal of Chroma
 tography B, 2010年, Vol.878, p.2209-2216

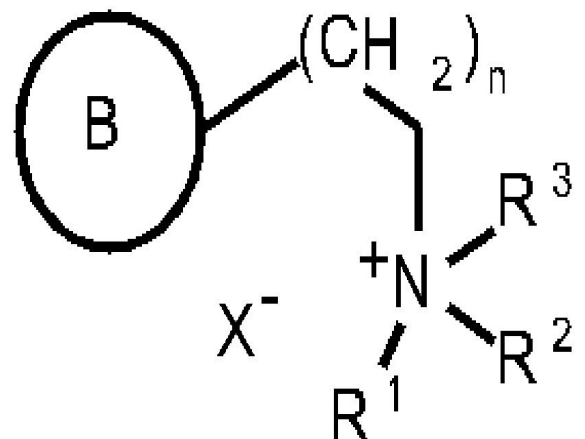
(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 0 / 0 0 - 3 0 / 9 6
 G 0 1 N 1 / 0 0 - 1 / 3 4
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	纯化8-异前列烷的方法		
公开(公告)号	JP5424505B2	公开(公告)日	2014-02-26
申请号	JP2012013211	申请日	2012-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社百利达		
申请(专利权)人(译)	百利达有限公司 先进工业科学和技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	百利达有限公司 先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	小出哲 横山憲二 鈴木祥夫		
发明人	小出 哲 横山 憲二 鈴木 祥夫		
IPC分类号	G01N30/88 G01N33/53 G01N30/02 G01N30/06 G01N30/26 G01N30/74 G01N1/10		
CPC分类号	B01D15/363 B01D15/325 G01N30/14 G01N33/493 G01N2030/009		
FI分类号	G01N30/88.E G01N33/53.S G01N30/02.B G01N30/06.Z G01N30/88.201.X G01N30/26.A G01N30/88.101.L G01N30/88.201.G G01N30/74.F G01N1/10.C G01N1/10.V B01J20/281.G B01J20/281.X B01J20/286		
F-TERM分类号	2G052/AA29 2G052/AA30 2G052/AA32 2G052/AB16 2G052/AD06 2G052/AD26 2G052/AD46 2G052/ED07 2G052/ED11 2G052/GA27 2G052/GA30		
代理人(译)	速水SusumuOsamu		
审查员(译)	黒田孝一		
优先权	2011042812 2011-02-28 JP		
其他公开文献	JP2012194177A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供能够安全且简单地纯化8-异前列烷的技术。溶剂：本发明的纯化8-异前列烷的方法包括：使含有8-异前列烷的液体样品与之接触的步骤 (S102) 离子交换载体，其上固定有季铵盐，使得液体样品中的8-异前列烷保留在离子交换载体上；以及使用含有水溶性有机溶剂和水作为主要组分的第一洗脱液从离子交换载体上洗脱8-异前列烷的步骤 (S103)。



式(1)中、R¹、R²、R³が炭素数1