

高速液体クロマトグラフィーを用いたアセトアミノフェン *O*-硫酸体とチロシン *O*-硫酸体の UV 検出による測定法

森田千紘¹・元山優作²・谷口玲央真²・上田裕人³・木下英樹^{1,2}
小野政輝^{1,2}・黒木勝久⁴・榊原陽一⁴・水光正仁⁵・安田伸^{1,2}

Determination of Acetaminophen *O*-sulfate and Tyrosine *O*-sulfate by High-performance Liquid Chromatography with UV Detection

Chihiro MORITA, Yusaku MOTOYAMA, Reoma TANIGUCHI, Yuto UEDA, Hideki KINOSHITA,
Masateru ONO, Katsuhisa KUROGI, Yoichi SAKAKIBARA, Masahito SUIKO and Shin YASUDA

(Received 30 November 2022 ; accepted 28 December 2022)

Abstract

We have recently established a method for chemical synthesis of acetaminophen *O*-sulfate (APAPS) , which was a modified procedure based on that used for the tyrosine *O*-sulfate (TyrS) synthesis. Current study was designed to set up a simple method to quantitatively determine APAPS and TyrS using high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. In addition to being the target compounds for the chemical synthesis, these two sulfated chemicals were selected as the metabolites capable of generating from their parent molecules upon Phase-II sulfate conjugation in the body. Under an isocratic separation with a mobile phase (methanol : water, 40 : 60 (v/v)) and ODS column, APAPS and TyrS were detectable at 241 nm with their retention time of 1.70 min and 1.65 min, respectively. Calibration curves using the data from peak area and height demonstrated that the detection and quantification limits after a 20- μ L injection for APAPS were 2.29-3.55 nM and 6.93-10.8 nM, respectively, while those for TyrS were 0.199-0.659 μ M and 0.602-2.00 μ M, respectively. Intra- and inter-day assay precision confirmed that the variances defined as the relative standard deviation in their peak area and height for APAPS were 0.89-4.53%, while those for TyrS were 0.77-7.15%. Collectively, this analytical setting will be a useful tool for estimating the yields of APAPS and TyrS produced during their chemical synthesis, and possibly for further sulfated metabolite research as well.

緒 言

硫酸化は、細胞質に存在する可溶性の硫酸転移酵素により触媒され、生体内ではステロイドホルモンや神経伝達物質であるカテコールアミン類の恒常性維持だけでなく、生体外異物や薬物の不活性化ならびに排泄を担う主要な薬物代謝反応経路の1つとして知られる(1-4)。しかしながら、化合物の硫酸化される位置によっては弱いながらも活性が維持される場合(5-7)や、ヒドロキシ

アリルアミンなどのある種の化合物の硫酸化が、結果的に発ガン性物質を生じる代謝活性化を引き起こす事例もある(8)。そのため、硫酸化を経て各々の化合物がどの程度不活性化されるのかを精査する代謝物の生理機能に関する研究は不明な部分も多く残っている。

アセトアミノフェン(*N*-acetyl-*p*-aminophenol; APAP)は世界で広く用いられる解熱鎮痛薬の1つであり(9, 10)、主に肝臓でグルクロン酸体や硫酸体に代謝され、尿中へと排出される。近年の研究では、吸収された

¹ 東海大学大学院農学研究科

² 東海大学農学部バイオサイエンス学科(現食生命科学科)

³ 尚絅大学生活科学部

⁴ 宮崎大学農学部応用生物科学科

⁵ 宮崎大学キャリアマネジメント機構

連絡先：安田伸 e-mail : shin.yasuda@agri.u-tokai.ac.jp

APAP の20-46% が APAP *O*- 硫酸体 (APAPS) になることが報告されている (10).

チロシン (Tyr) は、必須アミノ酸の一種フェニルアラニンが肝臓でヒドロキシ化されて生じた後、 L -Dopa や dopamine などの神経伝達物質に変換されるほか (11)、タンパク質を構成する主要なアミノ酸としても知られている。タンパク質結合型の Tyr が翻訳後修飾の過程で硫酸化される一方で、遊離体の Tyr もまた L -Dopa や dopamine と同じく硫酸転移酵素 SULT1A3 の基質となって硫酸化され、チロシン *O*- 硫酸 (TyrS) に代謝変換されることが報告されている (12-14)。

現状では安価で十分量の硫酸化代謝物の入手と続く生物活性などの機能性研究が容易ではない場合も多く、硫酸化代謝物の潜在的な機能性については不明な部分もある (15)。我々はこれまでに既存の TyrS 合成法 (16) を参考に APAPS の有機合成法を確立し (17)、そこで得られた APAPS とその類似化合物を用いて抗酸化活性の差異について検証を行ってきた (18)。しかしながら、APAPS 合成時に薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography ; TLC) により合成物の有無を確認しているものの (17)、定量性には優れておらず、さらに安定して高収量の APAPS を得るには未だ課題が残っている。そのため、合成の早い段階で各工程における合成物の生成量を少量のサンプルによりモニタリングすることができれば、収量および収率向上のための合成条件の改良が容易となる。

そこで本研究では、高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography ; HPLC) を用いた APAPS と TyrS の UV 検出による測定を定量的に行うため、汎用的な ODS カラムと水-メタノールを移動相とするアイソクラティック溶離法に基づくシンプルな手法の設計を目的とした。これら2つの化学物質は、体内で第 II 相薬物代謝における硫酸抱合時に親分子から生じる硫酸化代謝物であり、これまでも有機合成を行っていることから選択した。

材料および方法

試薬類

TyrS の 標 品 (H-Tyr (SO_3H) -OH, sodium salt · 0.1 H_2O ($\geq 98\%$), K00228) を渡辺化学工業株式会社 (広島) より購入した。APAPS の標品 (APAPS potassium salt, 純度: $97.0 \pm 1.6\%$) は、TyrS 合成法 (16) に基づいて我々が以前に確立した方法で APAP と硫酸を用いて有機合成したものを使用した (17)。HPLC グレードの

メタノールは富士フィルム和光純薬 (大阪) より入手した。TLC 用の silica gel 60 F₂₅₄ (1.05554.0001) プレートおよび silica gel 60 (1.05748.0001) プレートは Merck 社より購入した。*n*-ブチルアルコール、イソプロパノール、ギ酸、ニンヒドリン、アセトンはナカライテスク (京都) より購入した。本研究では、MilliQ グレードの水を使用した。

装置と HPLC の測定条件

HPLC による APAPS と TyrS の分離検出条件の設定は、移動相に溶解し調製した試料溶液を用いて、既報 (17, 19) を一部改良して行った。HPLC システムには、日本分光製の UV 検出器 (UV-2075 Plus) とフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 (MD-4010) を備えた LC-2000 PLUS シリーズとクロマトグラフィーシステム (ChromNAV Ver.2) を使用した。即ち、YMC 社製 ODS カラム、(YMC-Pack ODS-A, 内径 4.6 mm x 150 mm, 粒子径 3 μm , 細孔径 12 nm) を用いた逆相クロマトグラフィーによるアイソクラティック溶離法により、移動相 (メタノール: 水, 40 : 60 (v/v)) とともに、温度 30°C, 試料注入量 20 μL , 流速 0.7 mL/min, 検出波長 241 nm (APAPS), 272 nm (TyrS) における UV 検出を行った。化合物の真正性を確認する際には、PDA 検出器により得られる UV 吸収スペクトルを参照した。

検量線の作成

APAPS を移動相に溶解し、1 mM のストック溶液を調製した。その後、最大濃度 100 μM を等倍ずつ希釈することにより、異なる濃度 (0.0244, 0.0489, 0.0977, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM) の APAPS 標準溶液を調製した。これらを HPLC に供し、ピーク面積、ピーク高、溶出時間を測定した。これを 3 回繰り返した。ピーク面積およびピーク高より $y = ax + b$ の直線式を求め、直線性を決定係数 (r^2) で表した。

TyrS を移動相に溶解し、1 mM のストック溶液を調製した。その後、最大濃度 1,000 μM を等倍ずつ希釈することにより、異なる濃度 (1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μM) の TyrS 標準溶液を調製した。上述の APAPS と同様に 3 回繰り返して測定を行った。

検出限界 (DL ; detection limit) 値と定量限界 (QL ; quantitation limit) 値は、次の等式 ($\text{DL} = 3.3 \sigma / \text{slope}$, $\text{QL} = 10 \sigma / \text{slope}$) により算出した。なお、 σ は標準物質を含まないブランク試料の測定値の標準偏差、slope は検出限界付近の 4 測定点における検量線の傾きを表す。

日内変動および日間変動率の測定

APAPS (0.195 μM と 50 μM) と TyrS (7.81 μM と 500 μM) の標準溶液をそれぞれ 2 つの異なる濃度で調製した。日内変動率の算出のために、これらを同日中に 10 回繰り返し測定した。日間変動率の算出のために、3 別日にそれぞれ 10 回、3 回、3 回の繰り返し測定を行い、各測定日におけるデータの平均値を使用した。

硫酸化代謝物の合成と HPLC による測定

既報 (17) に従い、APAP (1 g) を予め 20 分間かけて少量ずつ濃硫酸 (10 mL) と混合し、さらに所定の時間反応後に 2 mL ずつ回収した。次に、回収液を碎氷とともに水酸化バリウムと炭酸ガス処理により中和した反応液約 20 mL を得た。これより 100 μL を回収し、遠心濃縮および乾固後に等量の移動相に再溶解し、次に 1/1,000 となるように希釈後、HPLC に供することで、APAPS 生成物の定量を行った。この実験を 2 回繰り返しした。

統計解析

実験結果は、一部を除き、3 または 10 回測定時の異なるデータより得た平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。変動率として表す際には、標準偏差を百分率で表した相対標準偏差 (%RSD; % of relative standard deviation) 値を使用した。

結果および考察

近年我々は、Jevons による既存の TyrS 合成法 (16) をもとに APAPS の有機合成法を確立した (17)。しかしながら、TLC による簡易的な APAPS の検出では定量性に課題があり (17)、収量と収率の向上を図る条件検討を行うためには、少量のサンプルで定量性に優れた HPLC を導入する必要がある。そこで本研究では、HPLC を用いた APAPS と TyrS の UV 検出による測定法の確立を行うため、検量線の作成、検出限界および定量限界値の決定、日内および日間変動率の確認を行うこととした。

分析法の確立

HPLC-UV 検出により 0.781 μM の APAPS と 62.5 μM の TyrS の標品を個々に 20 μL ずつ注入してクロマトグラムを得た結果、それぞれ 1.70 min (Fig. 1 A) および 1.65 min (Fig. 1 B) の溶出時間とともにシングルピークが確認できた。同時に、PDA 検出器により得られた UV 吸収スペクトルを図内に示した。APAPS では 241 nm 付近

に極大吸収波長が認められた。TyrS では 263 nm 付近に極大吸収波長を認めたものの、本研究では既報に従って 272 nm で測定した (20, 21)。ピークの溶出時間から化合物がカラムに保持されにくく溶出時間が短い可能性が考えられるものの、本条件における APAP の溶出時間は約 3.34 min であるため (17)、少なくとも APAPS と APAP は異なる溶出時間にピークとして分離することが可能である。同様に、本条件では TyrS と Tyr についても異なる溶出時間に別のピークとして分離できることを確認している (data not shown)。本 HPLC 法による APAPS と TyrS の検出は、UV 吸収のある混合物が存在しない場合には有効である。しかしながら、目的化合物や試料によってはピークが他の成分と重なる可能性もあるため、その際には移動相の組成など分離溶出条件のさらなる検討を必要とする。

検量線の作成

異なる濃度の APAPS 標準溶液 (0.0244-100 μM) を 3 回繰り返し測定し、得られたピーク面積 (Fig. 2 A) およびピーク高 (Fig. 2 B) の平均値より検量線を作成した。その結果、検量線の r^2 にはピーク面積を用いた際の 0.9998 とピーク高を用いた際の 0.9906 の両方で高い直線性が得られた (Table 1)。この時 APAPS の検出限界付近の低濃度 4 点 (0.0244-0.195 μM) における検量線においては、 r^2 がピーク面積およびピーク高でそれぞれ 0.9994 および 0.9997 と、低濃度領域でも高い直線性を認めた。

次に、異なる濃度の TyrS 標準溶液 (1.95-1,000 μM) を 3 回繰り返し測定し、得られたピーク面積 (Fig. 2 C) およびピーク高 (Fig. 2 D) の平均値より検量線を作成した。その結果、検量線の r^2 にはピーク面積を用いた際の 0.9996 とピーク高を用いた際の 0.9929 が得られ、両方で高い直線性が認められた。TyrS の低濃度 4 点 (1.95-15.6 μM) においては、 r^2 がピーク面積およびピーク高でそれぞれ 0.9948 および 0.9993 と、ここでも高い直線性を認めた。

次に、ブランク試料の測定値と Table 1 に示す検出限界付近の 4 測定点における検量線の情報をもとに、検出限界と定量限界値を算出した。その結果、APAPS の DL と QL はピーク面積でそれぞれ 2.29 nM および 6.93 nM、ピーク高ではそれぞれ 3.55 nM および 10.8 nM であり、これ以上の濃度で検出または定量可能であった (Table 2)。一方、TyrS の DL と QL はピーク面積でそれぞれ 0.659 μM および 2.00 μM 、ピーク高ではそれぞれ 0.199 μM および 0.602 μM であった。我々は、これまで硫酸体の有機合成時に、合成物の有無を TLC 後の UV 検出

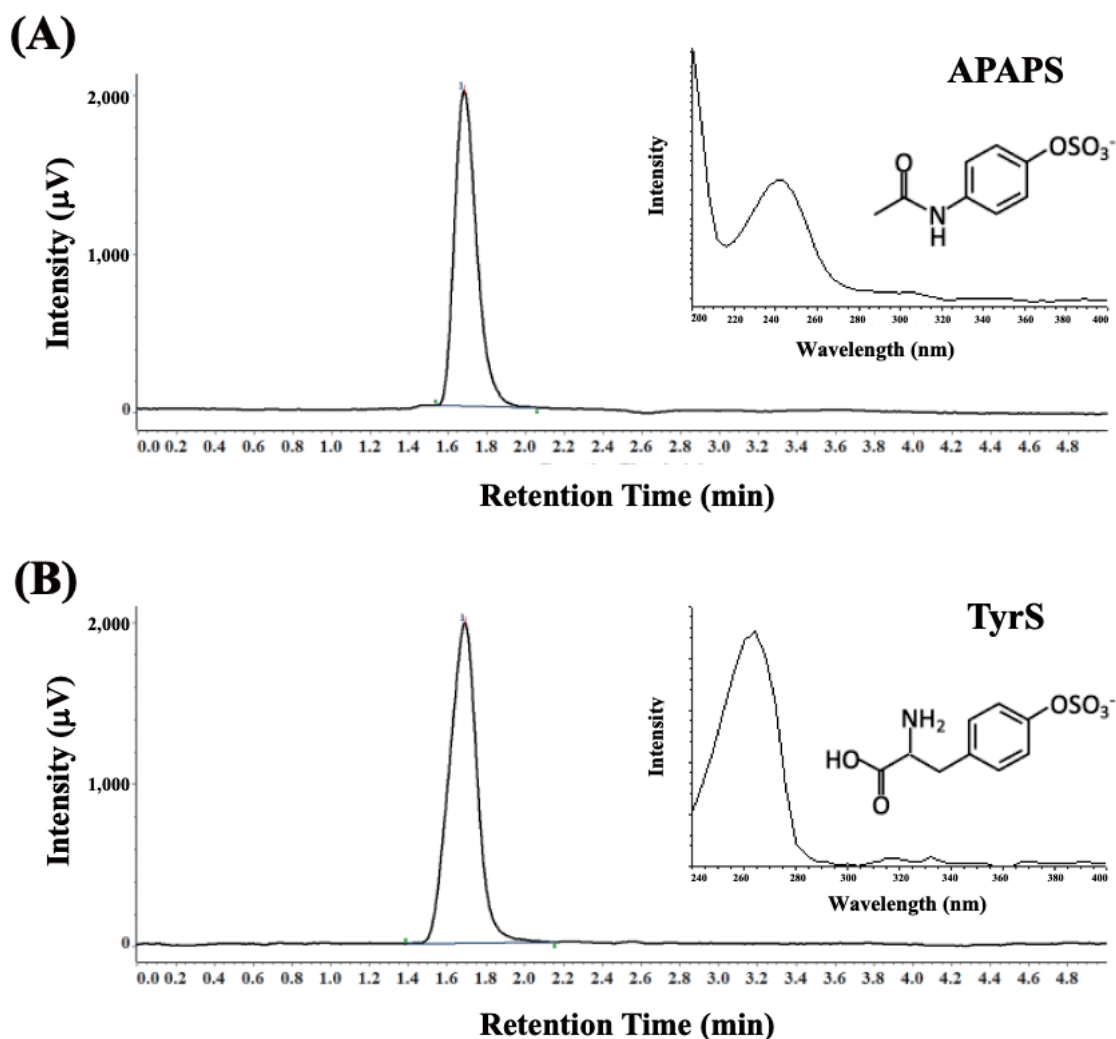


Fig. 1. HPLC Chromatograms of standards of APAPS (A) and TyrS (B). A twenty-microliter aliquot of 0.781 μM (4.20 ng injection) APAPS or 62.5 μM TyrS (356 ng injection) was applied to HPLC. Detection was performed for APAPS at 241 nm and for TyrS at 272 nm. The retention times for APAPS and TyrS were 1.70 min and 1.65 min, respectively.

Table 1. Calibration curves of APAPS and TyrS in HPLC analysis.

	Range (μM)	Raw Data	Equation	r^2
APAPS	0.0244-100	Peak Area	$y = 21,571x - 3,737$	0.9998
		Peak Height	$y = 1,760x + 2,992$	0.9906
TyrS	1.95-1,000	Peak Area	$y = 331.5x + 300.0$	0.9996
		Peak Height	$y = 20.07x + 538$	0.9929
Calibration curves with 4 points closer to their detection limit				
APAPS	0.0244-0.195	Peak Area	$y = 19,509x + 88$	0.9994
		Peak Height	$y = 2,460x + 6$	0.9997
TyrS	1.95-15.6	Peak Area	$y = 294.4x + 697.1$	0.9948
		Peak Height	$y = 34.59x + 29.65$	0.9993

x , conc. (μM); y , peak area or height; r^2 , determination coefficient.

またはニンヒドリン呈色により簡便に確認してきた (17). TLC 上のスポットやバンドの濃さを数値化することが可能な ImageJ 画像処理ソフトウェア ver 1.53t (NIH) を用いることにより, 一定量以上で化合物の検量線を半定量的に作成することが可能である. そこで, 異なる量の APAPS と TyrS を TLC 上にスポットし, 半定量的に検出可能な限界値を先行的に調べた結果, いずれも $1\text{ }\mu\text{L}$ スポット時に約 $70\text{--}80\text{ ng}$ 以上の量が必要であった (data not shown). 本研究における HPLC-UV 検出条

件の APAPS と TyrS の定量限界は $0.04\text{--}0.06\text{ ng}$ および $3\text{--}11\text{ ng}$ であったため, TLC よりも検出感度と定量性の面から優れていることが確認できた. これまでに, HPLC-UV 検出における APAPS の DL と QL にはそれぞれ $10\text{ }\mu\text{L}$ 測定時に 51 ng/mL (0.51 ng) と 103 ng/mL (1.03 ng) (22) や, $20\text{ }\mu\text{L}$ 測定時にそれぞれ $0.2\text{ }\mu\text{M}$ (1.08 ng) と $6.4\text{ }\mu\text{M}$ (34.4 ng) (23) が報告されている. 生体試料中に APAPS をスパイクした際と, 移動相中に調製し外挿法を基本とした際の検量線における APAPS の DL や

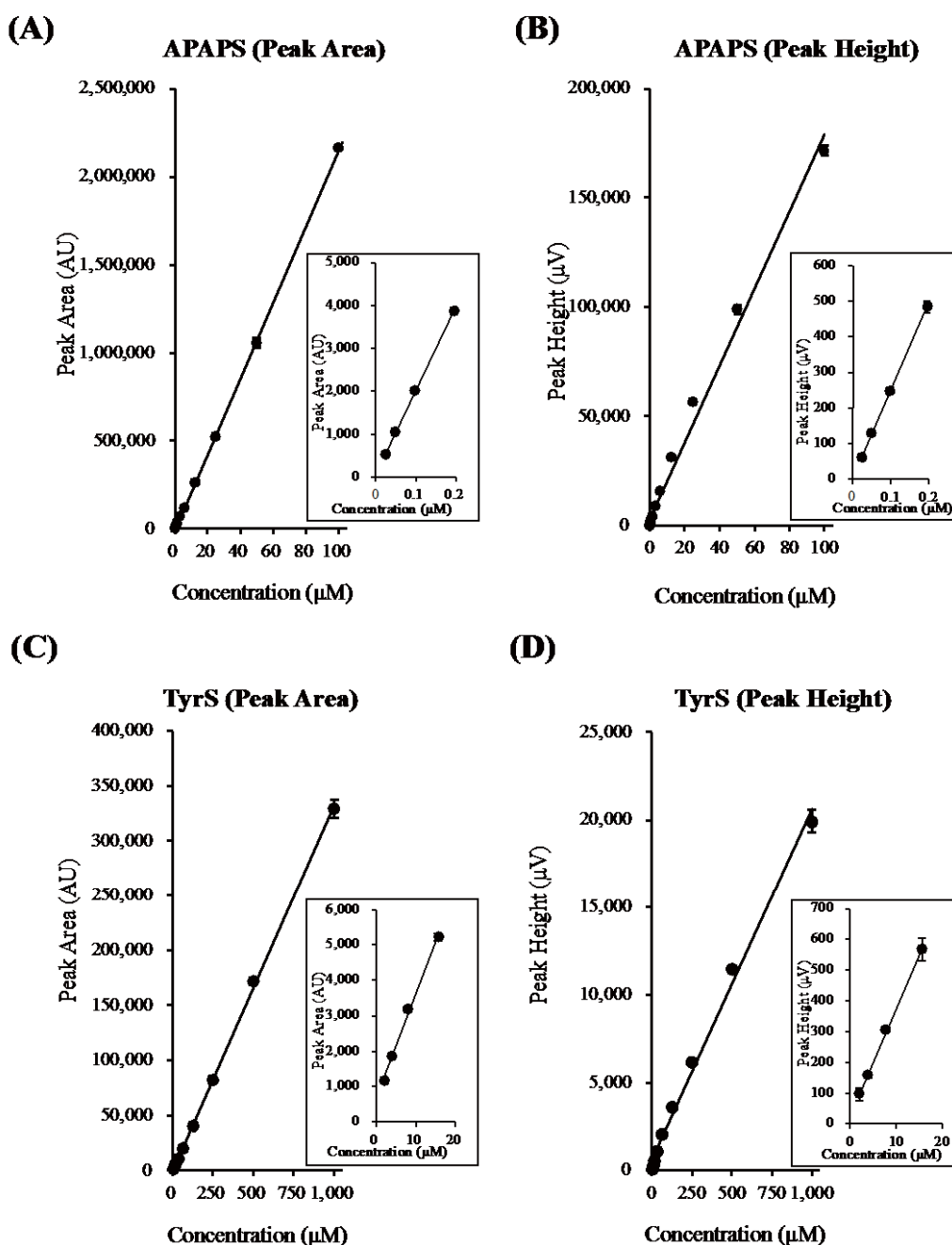


Fig. 2. Calibration curves for APAPS (A, B) and TyrS (C, D). Calibration curves were drawn by plotting the data from peak area (A, C) or peak height (B, D), respectively. Detection was performed for APAPS at 241 nm and for TyrS at 272 nm . The range of concentration injected for APAPS was $0.0244\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$, while that for TyrS was $1.95\text{--}1,000\text{ }\mu\text{M}$.

QL を単純に比較することはできないものの、本 HPLC-UV 検出では十分な感度で定量が可能であることが認められた。TyrS においては、イオンペア逆相 HPLC と蛍光発色の組み合わせによる検出において、0.13-19 $\mu\text{g/mL}$ (0.46-66.7 μM) (20) または 20 $\mu\text{g/mL}$ (70.2 μM) までの濃度範囲で良好な直線性ととも、ピコモルオーダーの検出感度が報告されている (21)。本研究における HPLC-UV 法は蛍光法ほどの感度ではないものの、UV 吸収のある混合物が存在しない場合には、APAPS と TyrS の測定に十分に適用可能であると考えられる。

日内変動と日間変動率

APAPS と TyrS の測定精度を調べるために、異なる 2 つの濃度において繰り返し測定を行い、得られた値の変動率と相対標準偏差値 (%RSD) で表した。その結果、本実験条件における 2 化合物の溶出時間は、10 回繰り返し測定時の日内変動率として 0.22-0.54%，3 別日にそれぞれ 10 回、3 回、3 回の繰り返し測定時の日間変動率として 0.57-4.25% が示された (Table 3)。APAPS のピーク面積とピーク高の日内変動率は、低濃度 0.195 μM で 2.10-2.18%，高濃度 50 μM で 0.89-2.09% であり、日間変

動率はそれぞれの濃度で 4.12-4.53% と 2.28-4.31% であった。同様に、TyrS の日内変動率は、低濃度 7.81 μM で 2.72-3.24%，高濃度 500 μM で 0.96-1.06% であり、日間変動率はそれぞれの濃度で 4.84-7.15% と 0.77-3.21% であった (Table 3)。これらの結果は、ピーク面積およびピーク高のいずれの測定データにおいても良好な精度と再現性を示すものであった。

APAPS の合成と HPLC による測定

これまでに我々が行ってきた APAPS と硫酸との反応条件では (17)，APAPS 合成時に安定して高収量を得るには未だ課題が残っている。そのため、先行して APAP 1 g と 10 mL の硫酸との反応溶液より経時的にサンプリングを行い、本 HPLC 手技を用いて中和後の試液中の APAPS 生成量についての情報を得ることとした。本条件では、原料の APAP と生成物である APAPS は異なる溶出時間にピークとして分離できている (17)。その結果、20 分反応よりもむしろ 30-60 分反応後に APAPS 生成量が高い傾向にあった。さらに、APAP 1 g 当たりの APAPS 生成量を推定値として算出した結果、最大 100 mg 付近まで合成できていることを確認できた (Fig. 3)。

Table 2. Detection and quantitation limits for APAPS and TyrS determined in HPLC analysis.

	Peak Area		Peak Height	
	DL (μM)	QL (μM)	DL (μM)	QL (μM)
APAPS	0.00229 (0.0123 ng)	0.00693 (0.0373 ng)	0.00355 (0.0193 ng)	0.0108 (0.0582 ng)
TyrS	0.659 (3.76 ng)	2.00 (11.4 ng)	0.199 (1.13 ng)	0.602 (3.43 ng)

Data shown in the parentheses indicate the calculated amount of test chemicals within a 20- μL injection to HPLC. DL; detection limit, QL; quantitation limit.

Table 3. Intra- and inter-day assay precision for APAPS and TyrS determined in HPLC analysis.

	Conc. (μM)	Intra-day (n=10)			Inter-day (n=3)		
		Retention Time (min)	Peak Area (AU)	Peak Height (μV)	Retention Time (min)	Peak Area (AU)	Peak Height (μV)
APAPS	0.195	1.66 (0.54)	4,244 (2.10)	519 (2.18)	1.71 (4.25)	4,175 (4.12)	495 (4.53)
	50	1.76 (0.32)	1,094,462 (0.89)	101,827 (2.09)	1.78 (1.01)	1,100,968 (4.31)	101,460 (2.28)
TyrS	7.81	1.63 (0.38)	3,329 (2.72)	288 (3.24)	1.63 (0.613)	3,290 (4.84)	287 (7.15)
	500	1.93 (0.22)	169,822 (0.96)	10,960 (1.06)	1.93 (0.57)	171,270 (0.77)	11,275 (3.21)

Variation (%RSD, as shown in the parentheses) in the intra-day data is shown from the mean of 10 replicated injections. Variation in the inter-day data is shown from the mean of 3 separated days with 10 or 3 replicated injections. AU; arbitrary unit, %RSD; % of relative standard deviation.

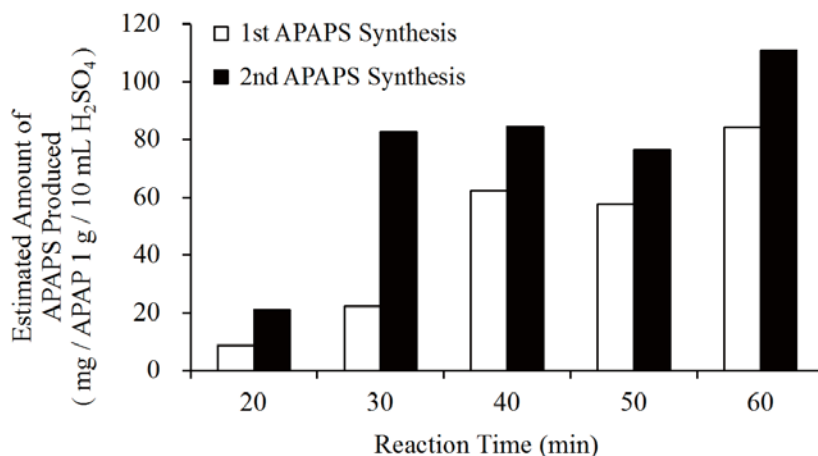


Fig. 3. Effect of reaction time on the production of APAPS. APAP (1 g) was reacted with 10 mL sulfuric acid for indicated periods including a 20-min premixture. Data shown represent estimated amounts of APAPS produced in two independent experiments.

これらの値は、同条件のもと我々が以前報告した際の、APAP 1 g と硫酸10 mL とを40分間反応後に分離精製し、最終的に得られた APAPS 91.1 mg (17) に匹敵するものであった。現状では、APAP が硫酸に完全には溶解にくく、飽和に近い状態で反応を行っていると考えられる。今後はより低濃度の APAP を用いて同様の実験を行い、APAPS の生成量に加えて APAP の検出量とともに反応の効率性や進行状況を検証していくこともまた重要である。

生体内における硫酸化は、これまで異物代謝と不活性化ならびに排泄の面より注目されてきた。しかしながら、個々のフェノール性化合物の生理活性の増減に硫酸化がどの程度貢献しているのかを定量的に調べることができれば、将来的には硫酸化代謝後の化合物の効能を予測できる可能性がある。我々はこれまでに、ナフトール異性体とそれらの硫酸化代謝物を用いて抗酸化活性試験を行うことにより、薬物代謝の過程で硫酸化代謝されても、必ずしも常に活性が低下する訳ではないこと、硫酸化される位置に依存して活性が保持されることを明らかにした (24)。また、硫酸化代謝物のインドキシル硫酸が、マクロファージの細胞内酸化レベルを亢進し、さらには貪食能を低下させることを報告してきた (25, 26)。硫酸化代謝の生理的意義を明らかにするためにも、硫酸化により化合物がどの程度の活性を保持しうるのかを個別に調査することは (15)、薬物代謝後の化合物の生理活性を予測する上でも重要である (27)。従って、APAPS や TyrS のみならず様々な硫酸化代謝物の生理機能や有効性について明らかにしていくためにも、収量・収率の面で効率の良い硫酸体合成法の設計と導入、続く代謝物レベルでの機能性研究を力強く推進していくことが重要である。

まとめ

以上より、HPLC-UV 検出による本手技が、APAPS と TyrS のクロマトグラムにおける検出ピークの面積と高さの両方において、定量性、検出感度、実験精度と再現性の面より、少量サンプルの測定に有用であることを明らかにした。従って、本手技が化学合成時に生じる APAPS や TyrS の収率の推定や、さらなる硫酸化代謝物の研究においても有益なツールとなることが期待される。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会 JSPS の科研費基盤研究 (C) (JP20K05881) および先進生命科学研究所のプロジェクト研究の助成を受けて実施されたものです。

要 約

我々は最近、既存のチロシン *O*-硫酸体 (TyrS) 合成法を基本としたアセトアミノフェン *O*-硫酸体 (APAPS) の有機合成法を確立してきた。本研究では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた APAPS と TyrS の UV 検出による測定を定量的に行うためのシンプルな手法の設計を目的とした。これら2つの化学物質は、体内で第 II 相薬物代謝における硫酸抱合時に親分子から生じる硫酸化代謝物であり、これまでも有機合成を行っていることから選択した。移動相 (メタノール: 水, 40: 60 (v/v)) と ODS カラムを使用したアイソクラティック溶離では、APAPS が λ_{241} nm, TyrS が λ_{272} nm で検出可能であり、保持時間はそれぞれ 1.70 分と 1.65 分であっ

た。ピーク面積とピーク高のデータを使用した検量線より、それぞれ20 μ L 注入後の APAPS の検出限界と定量限界はそれぞれ 2.29-3.55 nM と 6.93-10.8 nM, TyrS の検出限界と定量限界はそれぞれ 0.199-0.659 μ M と 0.602-2.00 μ M であった。日内および日間変動率の分析により、ピーク面積とピーク高における APAPS の相対標準偏差が 0.89-4.53% で、TyrS が 0.77-7.15% であることが確認できた。以上より、本手技が化学合成時に生じる APAPS や TyrS の収率の推定や、さらなる硫酸化代謝物の研究においても有益なツールとなることが期待される。

引用文献

- 1) Mulder, G.J. and Jakoby, W.B., 1990, Sulfation. in Conjugation Reactions in Drug Metabolism (Mulder, G.J. ed.), Taylor and Francis, London, pp.107-161.
- 2) Falany, C.N. and Roth, J.A., 1993, Properties of human cytosolic sulfotransferases involved in drug metabolism. in Human Drug Metabolism: From Molecular Biology to Man (Jeffery, E.H. ed.), CRC Press, Boca Raton, pp.101-115.
- 3) Weinshilboum, R. and Otterness, D., 1994, Sulfotransferase enzymes. in Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity (Kaufmann, F.C. ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.45-78.
- 4) Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Sakakibara, Y. and Liu, M.-C., 2017, Biosci. Biotechnol. Biochem. **81**, 63-72.
- 5) Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., Gonzalez-Paramas, A.M. and Santos-Buelga, C., 2011, Eur. Food Res. Technol. **232**, 103-111.
- 6) Valentová, K., Káňová, K., Di Meo, F., Pelantová, H., Chambers, C.S., Rydlová, L., Petrásková, L., Křenková, A., Cvačka, J., Trouillas, P. and Křen, V., 2017, Int. J. Mol. Sci. **18**, 2231. doi: 10.3390/ijms18112231.
- 7) Kanova, K., Petraskova, L., Pelantova, H., Rybkova, Z., Malachova, K., Cvačka, J., Kren, V. and Valentova, K., 2020, J. Agric. Food Chem. **68**, 11197-11206.
- 8) DeBaun, J.R., Smith, J.Y.R., Miller, E.C. and Miller, J.A., 1970, Science **167**, 184-186.
- 9) Jozwiak-Bebenista, M. and Nowak, J.Z., 2014, Acta Pol. Pharm. **71**, 11-23.
- 10) Ohashi, N. and Kohno, T., 2020, Front. Pharmacol. **11**, 580289. doi.org/10.3389/fphar.2020.580289
- 11) Fernstrom, J.D. and Fernstrom, M.H., 2007, J. Nutr. **137**, 1539S-1547S.
- 12) Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C., 1994, Eur. J. Biochem. **226**, 293-301.
- 13) Suiko, M., Sakakibara, Y., Nakajima, H., Sakaida, H. and Liu, M.-C., 1996, Biochem. J. **314**, 151-158.
- 14) Yasuda, S., Idell, S. and Liu, M.-C., 2007, Biochem. J. **401**, 497-503.
- 15) Yi, L., Dratter, J., Wang, C., Tunge, J.A. and Desaire, H., 2006, Anal. Bioanal. Chem. **386**, 666-674.
- 16) Jevons, F.R., 1963, Biochem. J. **89**, 621-624.
- 17) 森田千紘, 谷口玲央真, 吉田実央, 徳永祐希, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸., 2022, 東海大学紀要農学部 **41**, 39-46.
- 18) Morita, C., Tokunaga, Y., Ueda, Y., Ono, M., Kinoshita, H., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2022, J. Toxicol. Sci. **47**, 421-428.
- 19) Weber, C.C., Kulkarni, S.A., Kunov-Kruse, A.J., Rogers, R.D. and Myerson, A.S., 2015, Cryst. Growth Des. **15**, 4946-4951.
- 20) Suiko, M., Fernando, P.H., Arino, Y., Terada, M., Nakatsu, S. and Liu, M.-C., 1990, Clin. Chim. Acta **193**, 193-198.
- 21) Suiko, M., Fernando, P.H., Nakamura, T., Ohshima, T., Liu, M.-C. and Nakatsu, S., 1992, Bull. Fac. Agric. Miyazaki Univ. **39**, 141-146.
- 22) QI, J.F., Honda, Y. and Mineshita, S., 2002, Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther. **33**, 263-275.
- 23) Jensen, L.S., Valentine, J., Milne, R.W. and Evans, A.M., 2004, J. Pharm. Biomed. Anal. **34**, 585-593.
- 24) Sugahara, S., Fukuhara, K., Tokunaga, Y., Tsutsumi, S., Ueda, Y., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2018, J. Toxicol. Sci. **43**, 213-221.
- 25) Tsutsumi, S., Tokunaga, Y., Shimizu, S., Kinoshita, H., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2020, Biosci. Biotechnol. Biochem. **84**, 1023-1029.
- 26) Tsutsumi, S., Tokunaga, Y., Shimizu, S., Kinoshita, H., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2020, J. Toxicol. Sci. **45**, 569-579.
- 27) Beekmann, K., Actis-Goretta, L., van Bladeren, P.J., Dionisi, F., Destailats, F. and Rietjens, I.M.C.M., 2012, Food Funct. **3**, 1008-1018.