

ラット血液中ビタミン B₆の高速液体クロマトグラフィーによる分離定量

兼 平 和 徳・木 村 美 恵 子・糸 川 嘉 則
(京都大学医学部衛生学教室*)

Liquid-chromatographic Separation and Determination of Vitamin B₆ Derivatives in Rat Blood

Kazunori KANEHIRA, Mieko KIMURA, Yoshinori ITOKAWA
Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University

A simple and sensitive liquid-chromatographic method has been developed for the separation and determination of vitamin B₆ derivatives in rat blood. The analyses were carried out with an ODS reversed phase column and fluorescence spectrometer (ex. 298 nm, em. 392 nm) using a solution of 0.1 M sodium perchloric acid in 0.1 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 2.5) as mobile phase. A standard solution of vitamin B₆ derivatives was eluted in the following order; PMP, PM, PLP, PL, PN and 4-PA. Deproteinized blood samples were applied to the HPLC system. PLP was the predominant derivative of the vitamin in rat blood.

ビタミン B₆は、主としてアミノ酸代謝に関与する酵素群の補酵素であり、非必須アミノ酸の生合成および相互転換において中心的役割を果たしている。このビタミンの定量法として古くから微生物的、酵素的、理化学的な方法がとられてきた。これに対し高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法は、従来の方法に比べて分離が迅速であり、簡便で高感度であるという利点がある。近年、この HPLC 法を用いたビタミン B₆誘導体の定量法がいくつか紹介されているが¹⁻⁵⁾、その中には非常に複雑な装置を必要としたり^{1,3)}、複数の移動相を用いるものなどがあり^{2,3,5)}、簡便な分離定量のためには若干の問題点を残している。特に HPLC 法を生体試料中の B₆誘導体の測定に应用する場合に、サンプルの前処理法、溶出時の妨害ピークが存在、あるいは検出感度などが問題となる。本報では HPLC 法による B₆誘導体の分離定量法とラット血液試料への応用について検討した。

*所在地：京都市左京区吉田近衛町 (〒606)

実験方法

1 試薬

ピリドキシン (PN) ピリドキサル (PL) ピリドキサルリン酸 (PLP) ピリドキサミン (PM) ピリドキサミンリン酸 (PMP) 4-ピリドキシン酸 (4-PA) はナカライテスク (京都) より購入した。他の試薬はすべてナカライテスク製の特級または液クロ用をもちいた。

2 高速液体クロマトグラフィー

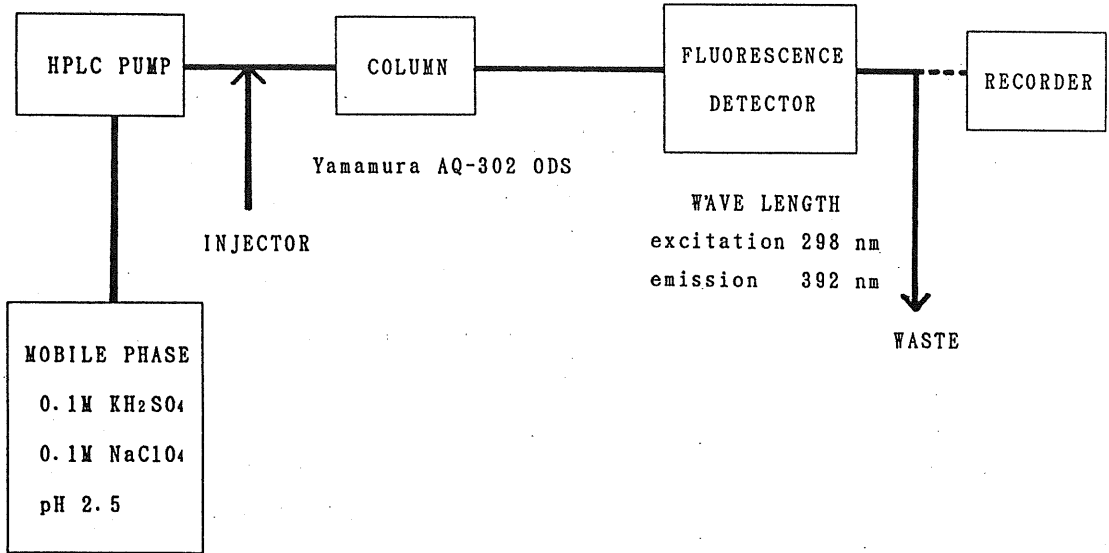


Fig. 1. Schematic diagram of the HPLC system. (—) liquid flow.

Fig. 1 は B₆誘導体を分離定量するシステムをモデル化して示したものである。本システムに用いた装置は HPLC ポンプ LC-3A, 試料導入器 SIL-1A, 蛍光分光光度計 PF-500-LCA, データ処理装置 CHROMATOPAC C-RIA (以上すべて島津製作所製), 分析カラム AQ-302 ODS (ワイエムシー製) である。

移動相として 0.1M/L の過塩素酸ナトリウムを含む 0.1M/L リン酸カリウム緩衝液 (pH2.5) を流速 1.0ml/min. で送液した。試料導入器より注入された試料はカラムで分離され, これを蛍光検出器に導入し, 励起波長 298nm 蛍光波長 392nm で測定した。なお, B₆誘導体の中には紫外線により分解されるものがあるので, そのような物質を扱う作業はすべて赤色燈下の暗室内で行い, 紫外線を避けるようにした。以上の作業は室温下で行った。

3 血液試料の前処理方法

麻酔下のウイスター系ラットの腹部大動脈よりヘパリン採血をした。全血, プラズマ及び赤血球試料へ同容量の 0.77M 過塩素酸を加えボルテックスミキサーにてよくかくはんした。除タンパク質のため 5,600×g で 10 分間遠心分離し, その上清 50 μl を試料として HPLC システムに注入した。なお, B₆誘導体混合溶液を凍結保存すると 2 日間でリン酸エステル型誘導体 (PMP PLP) がほぼ半減することが報

告されている⁶⁾。我々も血液試料を凍結保存すると PLP が減少するなどの無視しえない変化が生じることを確認したので、試料は凍結などの方法で保存しないで採血後速やかに測定した。

結果と考察

1 B₆誘導体標品の分離定量

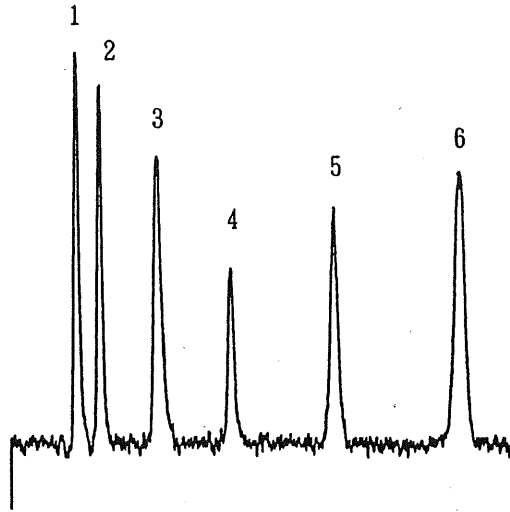


Fig. 2. HPLC chromatogram of a standard mixture containing 6.25 pmol each of pyridoxamine-phosphate(1) and pyridoxamine(2); 125 pmol of piridoxal-phosphate(3); and 12.5 pmol each of pyridoxal(4), pyridoxine(5) and 4-pyridoxic acid (6).

B₆誘導体の標準溶液をこのシステムに注入したところ Fig. 2 の様なクロマトグラムが得られた。B₆誘導体の溶出の順番は早い順に、PMP, PM, PLP, PL, PN, 4-PA となり、これらの物質は完全に分離溶出された。なお、生理活性型のひとつである PNP については、その純品が市販されておらず、また動物組織内には殆んど存在しないとの報告があるので²⁾、今回は定量の対象から除いた。

試料中の B₆誘導体の測定には、得られたクロマトグラムの高さをを用いたが、何れの物質についても、良好な直線関係が得られた (Fig. 3)。最小検出限界は、PMP, PM, では100pg, PL, PN, 4-PA では200pg, PLP では2 ng であった。

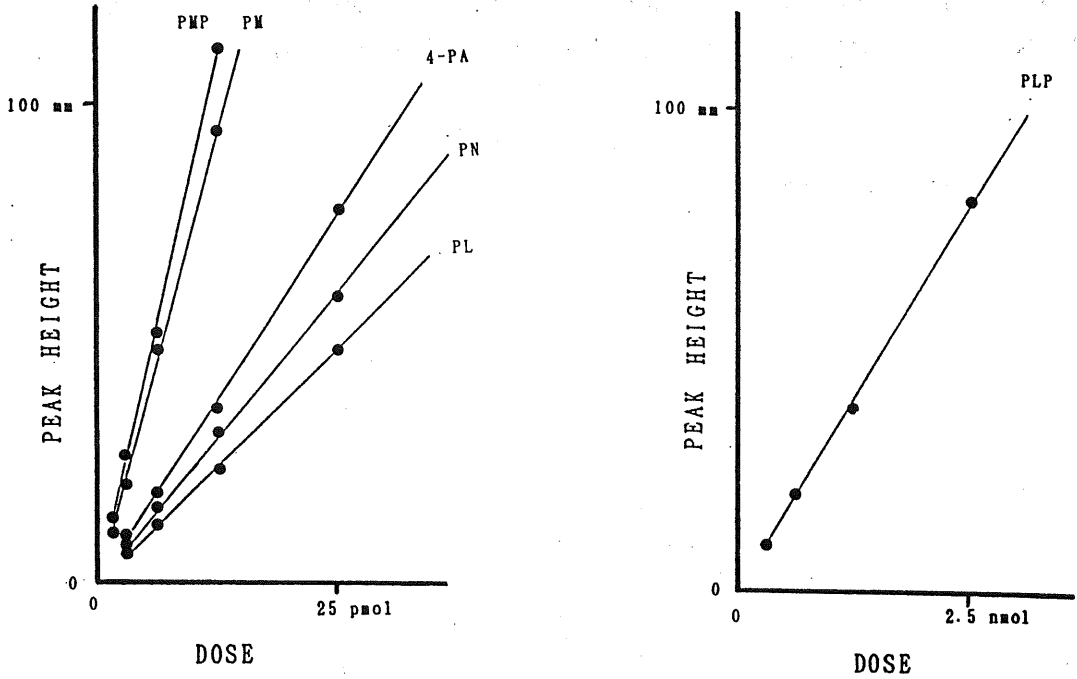


Fig. 3. Standard curves of B-6 derivatives, showing linear relationship between the peak height and the amount injected.

2 ラット血液中 B₆誘導体の分離定量

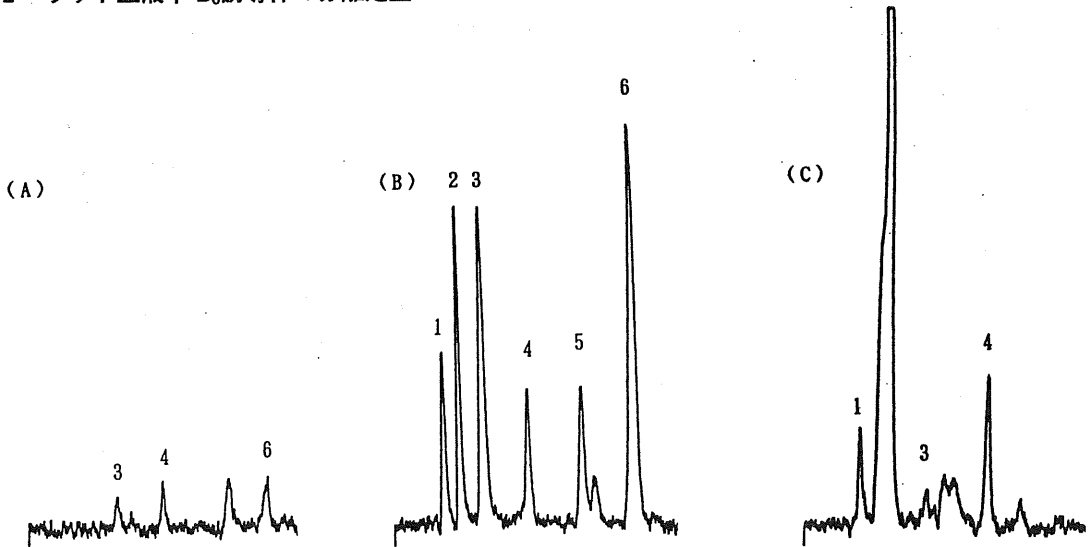


Fig. 4. Typical chromatograms of rat plasma and RBC samples. (A) Rat plasma (B) Rat plasma containing standard B-6 derivatives (C) Rat RBC sample, 1. pyridoxamine-phosphate 2. pyridoxamine 3. pyridoxal-phosphate 4. pyridoxal 5. pyridoxine 6. 4-pyridoxic acid

標準溶液について以上のような知見が得られたので、この方法を血液試料に応用した。まずプラズマ試料のクロマトグラムを Fig. 4 (A) に示す。Fig. 4 (B) は B₆ 標準物質を添加して同様に分析した場合のクロマトグラムである。この結果、プラズマ中には PLP, PL および 4-PA が認められた。Fig. 4 (C) は赤血球試料のクロマトグラムである。この場合も同様に標準添加を行ったところ、PMP, PLP, PL の存在が確認された。

Table 1. Distribution of vitamin B₆ derivatives in rat blood

	plasma	RBC	whole blood
PMP	n.d.	220 ± 22*	102 ± 16
PM	n.d.	—	—
PLP	720 ± 42	768 ± 374	846 ± 170
PL	230 ± 60	574 ± 118	420 ± 74
PN	n.d.	n.d.	n.d.
4-PA	200 ± 10	n.d.	118 ± 20

* Mean ± S.D. (n = 3, pmol/ml)

n.d. : Not detected

— : Not determined

ラット血液中 B₆ 量の測定値を Table 1 に示した。血液中に最も多くみられる B₆ 誘導体の型は補酵素としての活性を持つ PLP であり、ついで PL であった。また、PMP と尿中にみられる B₆ の主要代謝産物である 4-PA はそれぞれ赤血球とプラズマ中にみられた。

本実験結果でラット血液中の B₆ の主要な存在型は PLP であることが明らかとなり、また PLP が B₆ 酵素に対して補酵素としての活性を持つ唯一の型であることを考えると、血液以外の組織でも同様に PLP が主要型であることが予想される。従って、汎用性のある HPLC 法による生体試料中の B₆ の測定法を確立するためには PLP のより高感度な定量法の開発が必要である。その試みとして現在の所、プレカラムで PLP をより高感度な物質に誘導する方法が紹介されている^{7,8)}。われわれも亜硫酸ナトリウムを用いた PLP のより高感度な定量法について検討中である。

文 献

1. VANDERSLICE, J. T. and C. E. MAIRE (1980) J. Chromatogr. 196 : 176
2. COBURN, S. P. and J. D. MAHUREN (1983) Anal. Biochem. 129 : 310
3. GREGORY, J. F. and D. FELDSTEIN (1985) J. Agric. Food Chem. 33 : 359
4. TSUGE, H., T. ODA and H. MIYATA (1986) Agric. Biol. Chem. 50 : 195
5. HOLLINS, B. and M. HENDERSON (1986) J. Chromatogr. 380 : 67
6. SHEPHARD, G. S. and D. LABADARIOS (1986) Clinica Chimica Acta 160 : 307
7. ARGOUDELIS, C. J. (1988) J. Chromatogr. 424 : 315
8. TSUGE, H., T. TOUKAIRIN, T. SHOJI, E. SAKAMOTO, M. MORI and H. SUDA (1988) Agric. Biol. Chem. 52 : 1083