

ポストラベル蛍光検出 HPLC によるグルタチオンの高感度定量分析

福永健治・鈴木鐵也・高間浩蔵
(北海道大学水産学部水産食品学科)

A High Sensitive Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide by HPLC with Post-Label Fluorometric Detection.

Kenji Fukunaga, Tetsuya Suzuki and Kozo Takama.

Department of Food Science and Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041 Japan.

A high sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of μmol levels glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) in biological samples is described. GSH and GSSG were separated isocratically on a reversed-phase column (ODS column). The mobile phase consisted of 50mM sodium phosphate buffer (pH 3.0). After chromatographic separation, GSH and GSSG were converted to fluorescent derivatives by post-label reaction with α -phthalaldehyde under the alkaline condition. A 0.5 μmol quantity of GSH and GSSG can be determined and the analytical recoveries were found to be almost 100%. The procedure is rapid, completed within 15 min, and it has been successfully applied to various biological samples.

グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドSH化合物で、動物、植物、かびおよび細菌などに広く分布し、異物代謝、アミノ酸輸送、酸化障害からの防御あるいは補酵素として多彩な生理作用を有し、生体内において非常に重要な役割を果たしている^{1,2)}これらグルタチオンの生理機能を研究するにあたり、高感度で特異的かつ迅速に定量分析を行うことは不可欠である。従来、定量には、化学的方法³⁾あるいは酵素的方法⁴⁾が用いられ、また、化学修飾したグルタチオンをHPLCで分離定量した例^{5,6)}もあるが特異性、検出感度、再現性、操作の煩雑さなど未だ改良されるべき種々の問題があると思われる。また、最近では電気化学検出HPLCによる高感度定量法⁷⁾が報告されているが、検出器の電極の劣化による感度低下、再現性不良などの問題もあり、必ずしも満足のいく方法ではない。

そこで筆者らは、オルトフタルアルデヒド (OPA) による蛍光定量法⁸⁾とHPLCを組み合わせたポス

トラベル蛍光検出 HPLC によるグルタチオンの特異的かつ高感度定量分析法を開発したので報告する。

実験方法

市販飼料で飼育した Wistar 系雄ラット (12週齢, 体重180-220g) から, エーテル麻醉下, 心臓より採血し, 常法により赤血球および血漿を得た。採血後直ちに肝臓を摘出, 灌流し10%ホモジネートとした。肝臓ホモジネートおよび赤血球, 血漿のそれぞれに対し, 終濃度6%となるように過塩素酸を加え, 遠心分離により除タンパクを行なった。得られた上清を中和操作を行わず, そのまま希釈して0.45 μ m フィルターで濾過し測定試料とした。

ポンプは移動相用に日立 L-6200, 誘導体化反応液用に日立 L-6000 を, 蛍光検出器および紫外外部検出器は, それぞれ日立 F-1050, L-4200 を, インテグレータは日立 D-2500 を用いた。分析カラムは GL Sciences ODS 80A (5 μ m, 150 \times 4.6mm/I. D.) を用いた。

分離条件の最適化を図るため, 移動相に0.1%トリフルオロ酢酸, 過塩素酸緩衝液およびリン酸緩衝液を用い, 紫外部 (UV210nm) で検出し, 比較検討した。

ポストラベル誘導体化条件を検討するため, 種々の濃度, pH の OPA 溶液を調製し, 反応温度を変化させた。誘導体化反応は, カラムからの溶離液と OPA 溶液を T 字型コネクターを用い混和し, 1.0m \times 0.5mm/I. D のテフロン製チューブを用いて行なった。誘導体化反応液の流量は, 溶離液の HPLC 分離後の拡散を防ぐため0.2ml/min とした。検出は Ex. 340nm, Em. 420nm で行なった。定量は, グルタチオン (GSH), 酸化型グルタチオン (GSSG), いずれもナカライテスク製を0.1%過塩素酸に溶解し, 外部標準法により行なった。

また, 従来からよく用いられている GR-DTNB 法⁴⁾との比較も行なった。

結果および考察

はじめに, 移動相による分離最適条件を検討した。ペプチド, アミノ酸の分析に常用される0.1%トリフルオロ酢酸溶液は, GSH, GSSG とともにテーリングがはげしく, 他ピークとの分離も良くなかった。そこで, 種々の濃度, pH の過塩素酸緩衝液およびリン酸緩衝液を調製し, 検討したところ, 50mM リン酸緩衝液, pH3.0で最も良い分離を得た。

ポストラベル誘導体化条件を検討するため, 種々の濃度, pH の OPA 溶液を調製し, 反応温度を変化させた。その結果, OPA の濃度が10mM のとき蛍光強度は最大となり, それより濃度を上げてても下げても蛍光強度は減少した。OPA は, アルカリ性条件下で GSH, GSSG と反応し蛍光物質を作ることから, pH を9.0から1.0ずつ上げて検討したところ, pH9.0では GSSG は GSH の10分の1程度の蛍光強度しか得られなかったが, pH 13.0のとき GSH, GSSG とともに, ほぼ同程度の, 最大の蛍光強度が得られた。反応温度は, 50 $^{\circ}$ C で最大の蛍光強度を示し, これ以上温度を上げてても蛍光強度の増加はみられなかった。以上の検討から得られた至適分析条件を Table 1. に示す。至適条件で分析した標品およびラット肝臓のクロマトグラムを Fig.1 に示す。本法によると, 蛍光検出法では, 紫外部 (UV210nm) 検出法の200倍以上の高感度で検出可能であり, 非常にシャープで, テーリングのない安定したクロマトグラムが得ら

れた (Fig.1a)。また、紫外部検出法では、ラット肝臓を試料とした場合、感度が低く、検出が困難であった。そこで、クロマトグラムをスケールアップしたところ、GSHのピークは確認できるが、夾雑物質によるピークも多くみられ、定量性に問題が残った。一方、蛍光検出法では、OPAのGSH、GSSGに対する高い特異性から夾雑ピークは少なく、GSSGも同時に定量可能であった (Fig.1b)。

ラット肝臓、赤血球および血漿を試料とし、本法とGR-DTNB法⁴⁾で測定し、比較した結果をTable 2に示す。その結果、本法、GR-DTNB法ともほぼ同じ結果が得られたが、GR-DTNB法では、試料調製および測定時に起因すると思われる分析値のばらつき、GSSGの過剰検出がみられた。本法では、試料調製は、過塩素酸による抽出後、そのまま希釈して測定試料としたので、中和操作途中で起こるGSHの酸化によるGSSG生成、測定誤差がなく、GSSG含量の少ない試料でも、正確に測定可能であった。

本法の検出限界は0.05 μ molであり、非常に高感度で、GSSGも分析前の還元操作なしで分析でき、肝臓、赤血球はもとより血漿や臓器灌流液などGSH、GSSG含量の少ない試料の分析も可能であった。

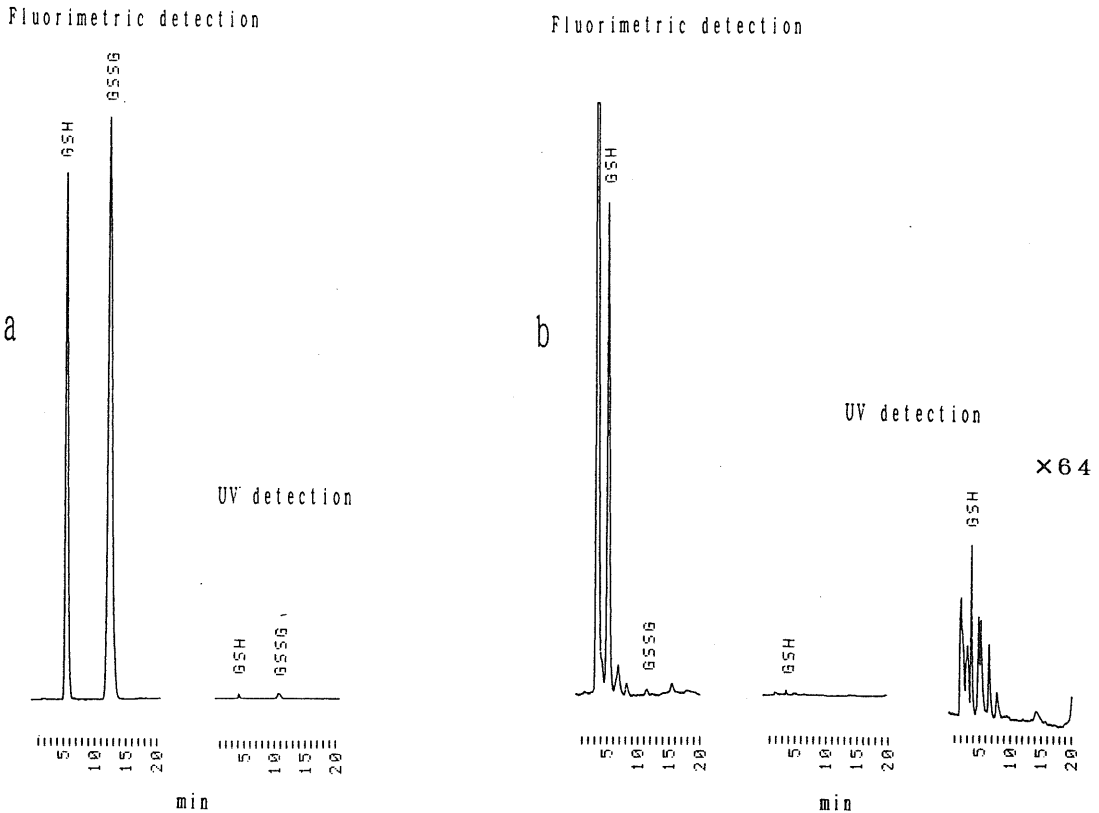


Fig. 1. Typical chromatograms of standards (a) and rat liver sample (b).

a : GSH and GSSG standards, Sample size is 75 μ mol per 10 μ l.

b : Deproteinized supernatant from rat liver was further diluted 1 : 100 with 0.1M perchloric acid prior to injection (10 μ l).

Table 1. Optimum analytical condition of HPLC

Analytical column	: GL Sciences ODS 80A 5 μ m, 150 \times 4.6mm I. D.
Mobile phase	: 50mM Sodium phosphate buffer
Flow rate	: 0.8ml/min
Column temperature	: Ambient
Derivatizing reagent	: 10mM <i>o</i> -phtalaldehyde with 20mM 2-mercaptoethanol in 400mM boric acid, adjusted to pH 13.0 with NaOH
Flow rate	: 0.2ml/min
Reaction coil	: 1.0m \times 0.5mm I. D. Teflon tube
Reaction temperature	: 50 $^{\circ}$ C
Detection	: Fluorescence Ex : 340nm, Em : 420nm.

Table 2. Comparison of GSH and GSSG levels determined by the HPLC and GR-DTNB method.

Sample	HPLC		GR-DTNB method	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG
Liver (nmol/g)	5988 \pm 231	56 \pm 2.9	5783 \pm 413	95 \pm 8.3
RBC (nmol/ml)	1843 \pm 98	5.7 \pm 0.6	2109 \pm 224	16.3 \pm 1.4
Plasma (nmol/ml)	14.7 \pm 0.3	1.8 \pm 0.1	13.5 \pm 2.4	3.7 \pm 0.9

Mean \pm S. D. (n=8)

文 献

- 1) 坂本幸哉, 木下祝郎 (1985) グルタチオン, 講談社サイエンティフィック, 東京: pp.5.
- 2) 坂本幸哉 (1988) 蛋白質 核酸 酵素 33 臨時増刊, グルタチオン研究のエポック, 1429.
- 3) Boyne, A. F and G. L. Ellman, (1972) Anal. Biochem. 46 : 639.
- 4) Owens, C. W. I and R. V. Belcher, (1965) Biochem. J. 94 : 705.
- 5) Newton, G. L., R Dorian, and R. C. Fahey, (1981) Anal. Biochem. 114 : 383.
- 6) Reed, D. J., J. R. Babson, P. W. Beatty, A. E. Brodie, W. W. Ellis, and D. W. Potter, (1980) Anal. Biochem. 106 : 55.
- 7) 芝田英生, 古谷榮助, 田川郁夫 (1980) 蛋白質 核酸 酵素 33 臨時増刊, グルタチオン研究のエポック, 1392.
- 8) Cohn, V. H and J. Lyle, (1966) Anal. Biochem. 14 : 434.