

[Jan. J. Hosp. Pharm.]
 一般論文
 16(3) 162-167 (1990)

グルタチオンの安定性に及ぼす微量元素の影響と安定化†¹

加藤裕久*, 三田敏之, 古橋裕子, 高地新八郎, 横山朋正
 国立病院医療センター薬剤部†²

Effects of Trace Element on the Stability and Stabilization of Glutathione†¹

YASUHISA KATO*, TOSHIYUKI MITA, YUKO FURUHASHI,
 SHINHACHIRO KOHCHI, and TOMOMASA YOKOYAMA
 Department of Pharmacy, National Medical Center Hospital†²

(Received December 20, 1989)

Glutathione (GSH) was combined with trace elements in infusion solution for total parenteral nutrition. The effects of the trace elements (copper, zinc and selenium) on the stability of GSH, and the stabilization of GSH by protamine sulfate (PT) and ascorbic acid (AC) were studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography using 4-(amino-sulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-F). The contents of GSH decreased in the presence of zinc, copper, and selenium, in that order. In particular, 14% of GSH remained after 10 minutes at 25°C in the presence of 5μM of selenium. The contents of GSH decreased with an increase in the concentration of selenium. GSH was stabilized by PT or AC in the presence of trace element. When 5μM of cupric sulfate was added to the GSH solution after 20 minutes, 39.5% of GSH remained. On the other hand, 70.6% of GSH remained under the same conditions in the presence of 10mg of AC per ml.

Keywords—glutathione; trace element; high-performance liquid chromatography; protamine; ascorbic acid; stability; ABD-F

緒言

グルタチオン (GSH) は生体内に広く存在し、細胞内の主要な有機イオウ化合物の位置を占めている¹⁾。また、肝疾患やアレルギー疾患そして薬物及び重金属中毒などの治療に繁用されている^{2~4)}。しかし、GSH は水溶液中でそのチオール基が容易に酸化されジスルフィドを形成し、薬効を減少

させることも知られている。

一方、短腸症候群などによる高カロリー輸液療法の長期施行患者において、微量元素の欠乏症の出現が明らかにされつつある⁵⁾。このような患者では、同一輸液中で GSH と微量元素が血管確保の困難さなどの理由により、しばしば配合されている。しかし、輸液中での微量元素の配合性については、“重金属との配合性”などのように論じられ、個々の微量元素との配合性についての報文は少ない。

そして、GSH の安定化には硫酸プロタミン (PT) の添加がすでに知られているが、銅との配

†¹ 本研究の一部は、日本病院薬剤師会関東ブロック第19回学術大会 (山梨, 1989年) で発表。

†² 新宿区戸山1丁目21-1; 21-1, Toyama 1-chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 162 Japan

合時のみの検討で、他の微量元素では報告されていない⁶⁾。更に、抗ヘパリン作用を有する PT の添加は、臨床適用上問題が残る。そこで、GSH の安定性に及ぼす微量元素の影響とアスコルビン酸 (AC) による安定化について、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による蛍光ラベル化剤 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole (ABD-F)⁷⁾ を用いて GSH を定量し検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

Table 1 に硫酸亜鉛、硫酸銅そして亜セレン酸ナトリウム注射薬の製剤処方を示す。各微量元素は、0.1, 1, 5 μ M となるように調製した。GSH は注射用蒸留水で 200 μ M に、PT は 10, 25, 50 mg/ml となるように調製した。AC は 0.1~20 mg/ml となるように注射用蒸留水で調製した。

2. 試薬

ABD-F は同仁化学研究所製、硫酸亜鉛、硫酸銅、GSH、PT、フタル酸カリウム、液クロ用アセトニトリル、ホウ酸そして AC は和光純薬工業製、亜セレン酸ナトリウムはメルク社製を用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

3. 装置及び器具

蛍光波長可変モニター付島津高速液体クロマトグラフ LC-6A, 東興化学研究所 pH メーター

TP100, 大洋化学工業ウォーターバスシェーカー パーソナル-10 を使用した。

4. HPLC 法による GSH の定量

200 μ M GSH と 0.1~5 μ M 硫酸銅、硫酸亜鉛そして亜セレン酸ナトリウムを室温下反応させ、残存 GSH 量を Toyo'oka ら⁷⁾ の開発した蛍光ラベル化剤 ABD-F を用いた HPLC 法により測定した。更に、PT と AC を配合し、残存 GSH 量も同様に測定した。

分離カラムは、ODS (6mm \times 15cm, Zorbax), 移動相はアセトニトリル/0.05M フタル酸水素カリウム (pH 4.0)=8/92 (v/v), カラム温度は室温、蛍光波長は 510nm, 励起波長は 380nm で測定した。流速は 1.5ml/min とした。

前処理方法は Chart 1 に示すように、反応試料溶液 0.6ml に 1mM ABD-F 1ml と 0.2M ホウ酸 (pH 0.8) 0.5ml を加え、30 秒間攪拌後、50 $^{\circ}$ C, 1 時間インキュベーションし、5 分氷冷後、0.1N 塩酸 0.5ml を加え、その 20 μ l を HPLC に注入した。なお、微量元素がこの定量法を妨害しないことを確認するために、GSH と微量元素を混和、静置し、5 分後の残存 GSH 量を ABD-F との反応時間 (5, 10, 30, 60, 120 及び 180 分間) を変えて測定した。

5. 検量線の作成

GSH 標準溶液として 10, 50, 100, 200 及び 400 μ M の各濃度を用い、前述の前処理方法に従っ

Table 1. Formulae of Trace Element Preparations

| <u>Zinc sulfate injection</u> ^a | | <u>Copper sulfate injection</u> ^b | |
|---|--------|--|--------|
| Zinc sulfate | 2.875g | Copper sulfate | 0.624g |
| (ZnSO ₄ ·7H ₂ O) | | (CuSO ₄ ·5H ₂ O) | |
| Water for injections to | 500 ml | Sodium lactate (50%) | 62.5g |
| | | Water for injections to | 500 ml |
| <u>Selenium injection</u> ^c | | | |
| Natrium selenite | 0.083g | | |
| (Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O) | | | |
| Water for injections to | 500 ml | | |

^a Zn 20 μ mol (1.3mg)/ml, ^b Cu 5 μ mol (0.3mg)/ml, ^c Se 0.63 μ mol (50 μ g)/ml

sample 0.6ml
 —1mM ABD-F 1.0ml
 —0.2M Borate (pH 0.8, Na⁺) 0.5ml
 vortex 30 sec
 incubation 1hr (50°C)
 cooling on ice water (5min)
 —0.1N HCl 0.5ml
 20μl injection to HPLC

HPLC condition

Column, Zorbax-ODS, 15cm×4.6mm i.d.;
 mobile phase, CH₃CN/0.05M potassium biphthalate (pH 4.0)=8/92; flow rate, 1.5ml/min; Em 510nm, Ex 380nm

Chart 1. Analytical Procedure for GSH

て処理した。ピーク面積を用いた絶対検量線法により検量を作成した。

結果及び考察

1. 定量法に及ぼす反応時間の影響

Fig. 1 に示すように、亜セレン酸ナトリウムと GSH との配合を除いて、残存 GSH 量の安定した定量には、かなりの反応時間を要することが確認された。したがって、残存 GSH 量と ABD-F との反応は、50°C、1 時間と設定した。

2. 残存 GSH 量の定量

Fig. 2-A に示すように、GSH のピークは良好に検出され、妨害ピークも認められず、保持時間は 4 分と短かった。また、GSH の検量線を定量条件下で作成した結果、Fig. 2-B に示すように 5 から 400 μM の範囲で、ほぼ原点を通る良好な回帰直線が得られた ($y=1002x+20070$, $r=0.998$)。

3. GSH と微量元素との配合性

GSH は水溶液中で Fig. 3 に示すように、60 分まではほぼ 100% の含量を有していたが、微量元素を等モル配合することによって、経時的に GSH の残存率は、硫酸亜鉛>硫酸銅>亜セレン酸ナトリウムとの配合順で減少した。GSH と各微量元

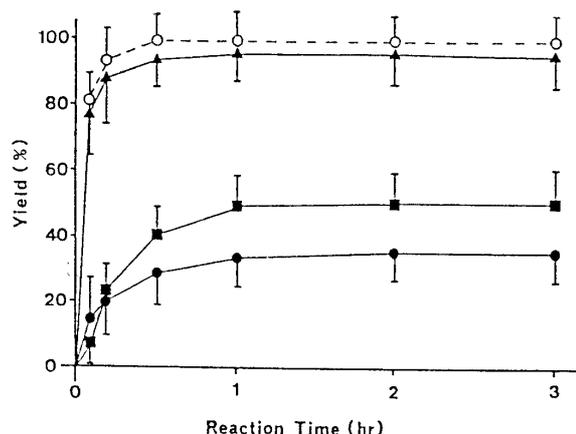


Fig. 1. Time Courses of Reaction Yield Obtained from Glutathione (GSH) with ABD-F and Presence of Metal Ion (5 μM).

The yields were calculated based on the fluorescence intensities (Ex 380 nm, Em 510nm) of authentic ABD-GSH

○ : GSH, ▲ : GSH + SeO₃²⁻,
 ■ : GSH + Zn²⁺, ● : GSH + Cu²⁺

素は選択的に反応し、微量元素との配合10分後の GSH の残存率は、それぞれ 78.4, 48.4 そして 16.3%を示した。さらに Fig. 4 に示すように、亜セレン酸ナトリウムとの反応においては用量依存性を示し、亜セレン酸ナトリウムの添加量が多いほど GSH 量は減少した。

セレンは、近年特に注目される微量元素の一つで、その薬理作用と共に、膀胱癌等に効果を発揮するシスプラチンの毒性を緩解する目的にも用いられている⁸⁾。現在 3 種類のセレン製剤が知られているが、最も繁用され、良く研究されている亜セレン酸ナトリウムは化学的に不安定で、セレン酸ナトリウムと L-セレノメチオニン⁹⁾は化学的には安定とされている。また、その薬理効果はそれぞれ異なり、投与時には注意を要する⁹⁾。そして、セレンはチオール類と非常に選択的に反応し、セレノトリスルフィドを生成することが知られており、同様の機序で GSH を酸化していると考えられる。銅イオンは GSH のスルフヒドリルと結合し、亜鉛イオンは GSH のカルボキシル基よりもスルフヒドリルと結合すると考えられる。更に、微量元素による GSH の酸化はその微量元素自身

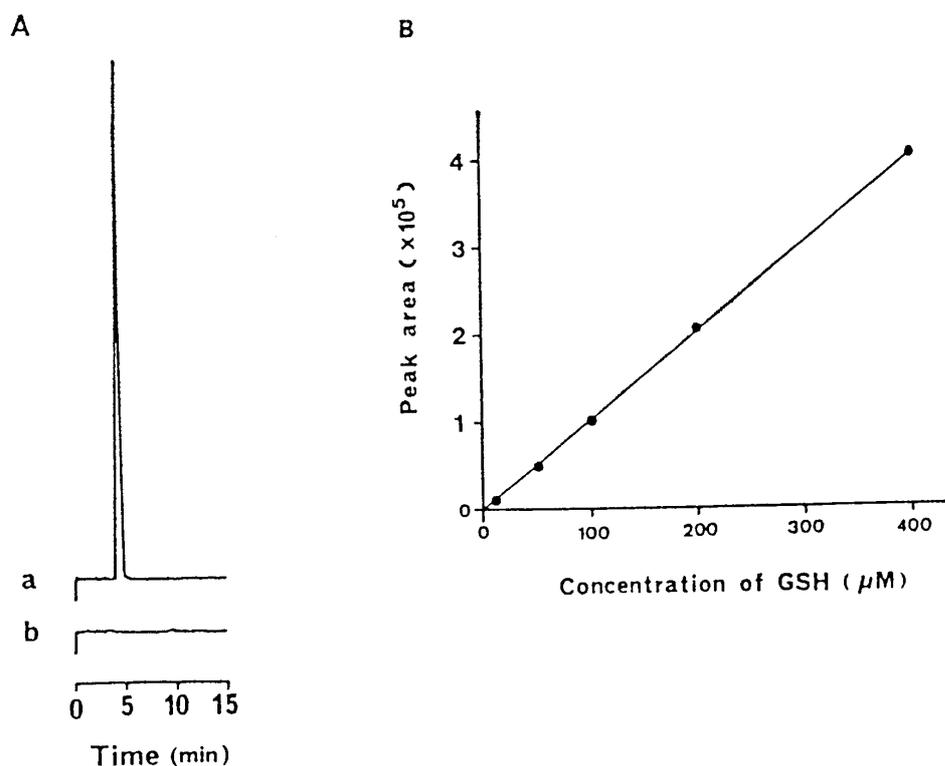


Fig. 2. Assay of GSH Remained

(A) Chromatogram of Glutathione (GSH) with ABD-F (a) and a Blank (b)
 (B) Calibration curve for the determination for glutathione (GSH) with ABD-F

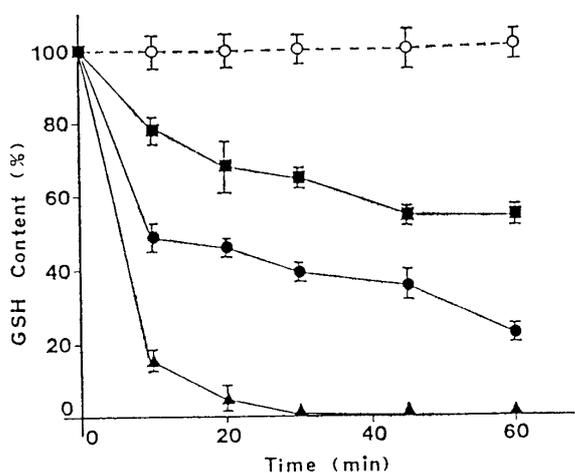


Fig. 3. Stability of Glutathione (GSH) in the Absence (---) and Presence (—) of Metal Ion (5μM) (mean ± S.D., n = 5)
 ○ : GSH, ■ : GSH + Zn²⁺,
 ● : GSH + Cu²⁺, ▲ : GSH + SeO₃²⁻

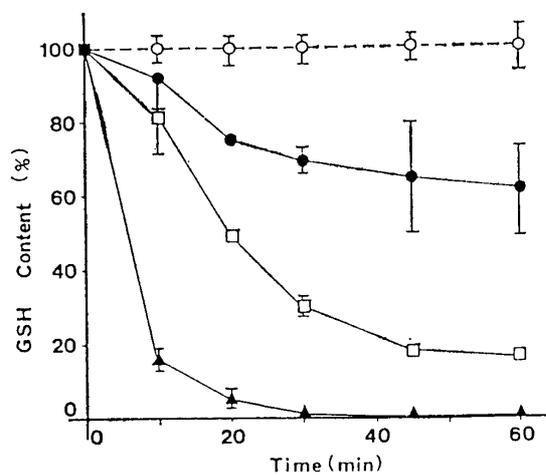


Fig. 4. Effect of Amount of Selenium on the Stability of Glutathione (GSH) (mean ± S.D., n=5)
 ○ : GSH, ● : GSH + SeO₃²⁻ (0.1μM),
 □ : GSH + SeO₃²⁻ (1μM),
 ▲ : GSH + SeO₃²⁻ (5μM)

の還元を伴うため、細胞成分との反応性が変化することが知られている。例えば銅イオンは GSH を酸化すると同時に GSH 還元酵素活性をも阻害

し、GSH 濃度を減少させて酸素ラジカルを増加させる結果、細胞機能を障害する¹⁰⁾。

Table 2. Effect of Protamine (10mg/ml) and Ascorbic Acid (10mg/ml) on the Stability of Glutathione (GSH) in the Presence of Metal Ion (5 μ M) after 20 Minutes

| Metal(5 μ mol/l) | GSH Content (%) | | |
|----------------------|-----------------|--------------------|------------------------|
| | Absence | Protamine(10mg/ml) | Ascorbic acid(10mg/ml) |
| Zn | 68.8 \pm 7.5 | 96.6 \pm 7.3 | 84.4 \pm 1.4 |
| Cu | 39.5 \pm 1.2 | 45.6 \pm 5.6 | 70.6 \pm 4.9 |
| Se | 5.2 \pm 1.0 | 5.3 \pm 6.7 | 19.4 \pm 2.8 |

Each datum represents the mean \pm S.D.(n=5)

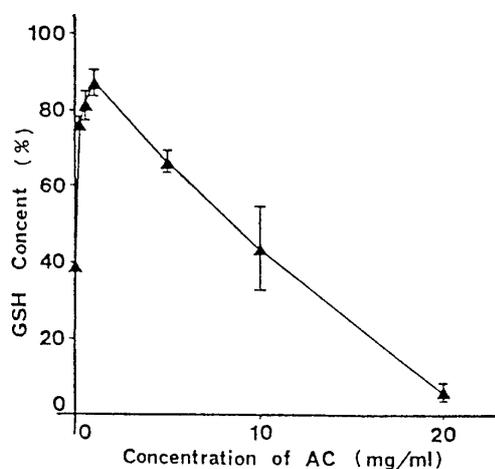


Fig. 5. Effect of Ascorbic Acid (AC) on the Stabilization of Glutathione (GSH) in the Presence of Copper Ion (5 μ M) Standing 20 Minutes at 20 $^{\circ}$ C (mean \pm S.D., n=5)

4. ACによるGSHの安定化

GSHと微量元素との配合において、残存GSH量の低下が認められたが、Table 2に示すように、PTの添加によってGSHの残存率は増加傾向を示し、硫酸亜鉛との配合時、GSHの残存率は1.4倍増加した。しかし、硫酸銅との配合においては、増加傾向はみられたものの有意差は認められなかった。亜セレン酸ナトリウムとの配合では、安定化されなかった。PTによるGSHの安定化は、GSHのチオール基がPT分子上のグアニジル基と結合し、GSH分子が互いに引き離されてS-S結合しにくくなるためと考えられている⁶⁾。抗ヘパリン作用を有するPTを補液中に添加することは、臨床上問題が残る。

そこで、PT以外の安定化剤について検討したところ、ACの添加によって、硫酸亜鉛を除いてPTによる効果を上回ってGSHは安定化された。ACによるGSHの安定化において、Fig. 5に示すように、安定化の極大量がACでは見られた。今後は、各微量元素とAC自身の安定性について、更に体内での安定性、代謝及び臨床効果等についても検討する必要がある。

結 論

GSHと特定の微量元素との配合によって、GSHの活性は低下し、その酸化反応には選択性と用量依存性が認められた。安定化には、PTあるいはACの添加が有効であり、特にACの配合によって、亜セレン酸ナトリウムによるGSHの含量低下を約20%まで抑制することができた。

引用文献

- 1) N.S.Kosower, and E.M.Kosower, *Int. Rev. Cytol.*, **54**, 109-160 (1978).
- 2) K.Nakao, O.Wada, and Y.Yano, *Clin. Chim. Acta*, **19**, 319-325 (1968).
- 3) L.F.Prescott, and J.A.Critchley, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 87-101 (1983).
- 4) H.L.Gurtoo, J.H.Hipkens, and S.D.Sharma, *Cancer Res.*, **41**, 3584-3591 (1981).
- 5) 平岡栄一, “薬学領域の高カロリー輸液”, 医薬ジャーナル社, 東京, 1986, pp.53-65.
- 6) 中村徳子, 村山和代, 飯沼文夫, 木下俊夫, 松下泰雄, 森口郁生, *薬剤学*, **48**(1), 54-57 (1988).
- 7) T.Toyo'oka, and K.Imai, *Anal. Chem.*, **56**, 2461-2464 (1984).

-
- 8) 永沼 章, 佐藤雅彦, 井村伸正, 横山正夫, 日本薬学会第103年会要旨集, 354 (1983).
- 9) O. A. Levander, and R. F. Burk, *JPEN*, 10 (6), 545-549 (1986).
- 10) 平山紀美子, 安武 章, 井上正康, 蛋白質・核酸・酵素, 33(9), 1487-1494 (1988).
- 11) M. E. Shils, and O. A. Levander, *Am. J. Clin. Nutr.*, 35, 829 (1982).