

## 酵素反応を利用した電気化学検出高速液体クロマト グラフィーによる胃液中のレシチンの測定

山崎一矢<sup>®</sup>, 菊岡正之, 佐伯孝文, 国仙谷良男, 松尾賢明\*

(1992 年 1 月 16 日受理)

酵素反応と HPLC-電気化学検出法とを組み合わせる胃液中のレシチン (ホスファチジルコリン) を高感度に測定する方法を開発した。レシチンは胃液からクロロホルム・メタノール混液 (1:1) により抽出し、ホスホリパーゼ D で処理してコリンを生成させ、逆相カラムで分離した後、コリンオキシダーゼ固定化酵素カラムにより過酸化水素を生成させ、電気化学検出器による測定を行った。コリンを生成させる条件としては、胃液抽出レシチンに 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 0.8 ml, 10 mM 塩化カルシウム 0.8 ml, ホスホリパーゼ D (5 unit/ml) 0.4 ml 及びエーテル 1 ml を加え、室温で 30 分間反応させた。本法の再現性 (RSD%) 及び添加回収率はそれぞれ 1.88% ( $n=6$ ), 97% ( $n=3$ ) と良好で、実際にヒト及びラット胃液中のレシチンの測定に応用したところ、2~22 nmol/ml (ジラウロイルホスファチジルコリンに換算すると 1~14  $\mu\text{g/ml}$ ) の値を得た。

### 1 緒 言

胃粘膜保護作用の主要因子として、従来より高分子糖タンパク質が知られており、抗かいよう剤の治療効果の一つの指標として、その最小構成成分であるヘキソサミンの測定が行われている<sup>1)</sup>。一方、リン脂質は、近年、胃液、胃粘膜表層被覆粘液層及び被蓋上皮細胞上層部における存在が確認され、胃内くう面に疎水性の防壁を形成することや  $\text{H}^+$  逆拡散遅延作用及び粘性の増強作用を有することなどから胃粘膜の防御因子として注目されてきた<sup>2)</sup>。従って、胃液中のリン脂質、特にその成分の約 50% を占めるレシチンを測定することも、抗かいよう剤の治療効果の指標の一つになり得ると考えられる。

レシチンの測定法としては、UV 検出<sup>3)</sup>、蛍光検出<sup>4)</sup>、あるいは水素フレイムイオン化検出<sup>5)</sup>などによる HPLC 法が報告されており、酵素反応を利用して、レシチンから過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を生成させ、これを比色法により定量する方法<sup>6)</sup>も報告されている。まず、最初にこれらの方法により胃液中のレシチンの測定を試みたところ、分離条件及び感度が不十分であることが判明した。そこで著者らは、酵素反応により生成する  $\text{H}_2\text{O}_2$  が電気化学的活性種であることに着目し、この  $\text{H}_2\text{O}_2$  を極めて高感度に検出できる電気化学検出器 (ECD)

により測定する手法の検討を行った。すなわち、レシチンをホスホリパーゼ D で処理してコリンとし、HPLC でマトリックス由来の混在物と分離後、コリンオキシダーゼ固定化酵素カラムにより  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成させ、これを ECD で測定する方法である。本法におけるレシチンからコリンを生成させる最適条件を求め、ヒト及びラット胃液中のレシチン量の測定に応用した。

### 2 実 験

#### 2・1 試 薬

レシチンは日本油脂製 COATSOME MC-2020 (L- $\alpha$ -ジラウロイルホスファチジルコリン、純度: 99.7%, 平均分子量: 623) を標準品として使用した。ホスホリパーゼ D はシグマ製タイプ I (起源: キャベツ) を、その他の試薬は市販特級品を使用した。

#### 2・2 HPLC 装置及び分析条件

HPLC は、インジェクター 7125 型 (レオダイン製)、ポンプ LC-9A 型、恒温槽 CTO-6A 型及びインテグレータークロマトパック C-R5A 型 (島津製作所製) を使用した。ECD は AMPEROMETER  $\Sigma$  875 型 (医理化機器製) を用い、電極は白金電極、設定電位は +0.45 V vs. Ag/AgCl とした。分離カラムは Asahipak ODP-50 (6 mm $\times$ 15 cm, 旭化成) 酵素カラムは IRICA Ach-EC (4 mm $\times$ 5 mm, 医理化) を用い、37°C で使用

\* 田辺製薬(株)分析化学研究所: 532 大阪府大阪市淀川区加島 3-16-89

した。移動相はリン酸水素二ナトリウム十二水和物 30 g, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 0.37 g 及びオクタンスルホン酸ナトリウム 1 g を蒸留水 1000 ml に溶かし, リン酸で pH 8.3 に調製し, 孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターで濾過後使用した。流量は 0.6 ml/min で, 試料注入量は 20  $\mu\text{l}$  とした。

### 2.3 HPLC 分析用試料の調製

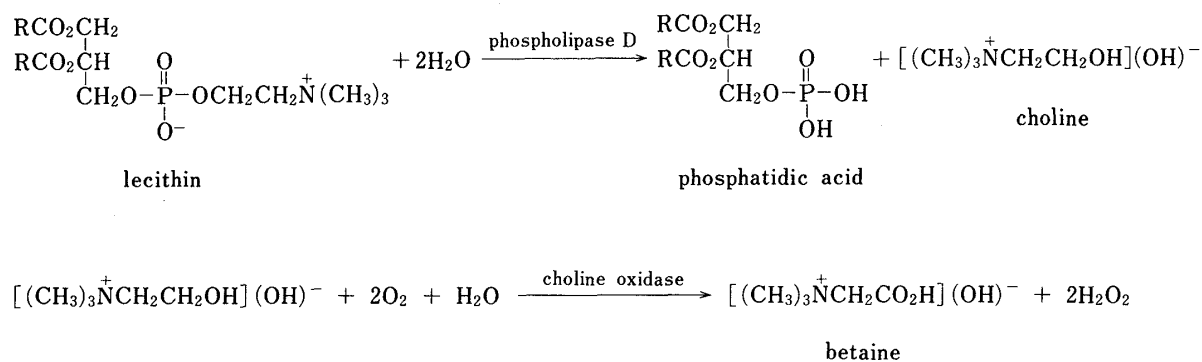
レシチン含有試料にホスホリパーゼ D (5 unit/ml) 0.4 ml, 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 0.8 ml, 10 mM 塩化カルシウム 0.8 ml 及びエーテル 1 ml を加え, 室温 (20~25°C) で, 振り混ぜ機を用いて 30 分間激しく振り混ぜる。この反応液を遠心分離し (4000 rpm, 5 分間), 水層 1 ml を蒸発乾固した後, 水 0.5 ml で溶かして HPLC 分析用試料とした。

### 2.4 胃液の前処理法

胃液 0.5 ml にクロロホルム・メタノール混液 (1:1) 4.5 ml を加え, 10 分間激しく振り混ぜ, 遠心分離 (4000 rpm, 5 分間) し, 上澄み液をとり除き, クロロホルム・メタノール混液 (1:1) を加えて 10 ml とした。次にこの液 2 ml を減圧乾固し, 再度クロロホルム 1 ml に溶かし, 水 2 ml で 3 回洗浄して胃液由来のコリンを除去した。最後にクロロホルム層にメタノール 0.5 ml を加えて減圧乾固したものを試料とした。

## 3 結 果

レシチンはホスホリパーゼ D で処理することにより加水分解されコリンを生成する。又, コリンはコリンオキシダーゼにより酸化され, ベタインと  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成する。これらの反応式を Scheme 1 に示す。



Scheme 1 Schematic enzyme reaction for lecithin

### 3.1 コリン生成条件の検討

Yang ら<sup>7)</sup>は, レシチンをホスホリパーゼ D を用いて塩化カルシウムを含む酢酸緩衝液 (pH 5.6) 中で, エチルエーテルを加え, 室温で 10~30 分反応させて, コリンに変換している。この条件に従ってコリン生成の最適条件の検討を行った。

#### a) 酵素濃度について

各濃度の酵素水溶液を用いて最適濃度の検討を行った。結果を Fig. 1 に示す。ピーク面積は 4 unit/ml 以上で一定となったため, 酵素濃度を 5 unit/ml に設定した。なお, 1 unit とは pH 5.6, 30°において, 1 時間に L- $\alpha$ -ホスファチジルコリン (起源: 卵黄) から 1.0  $\mu\text{mol}$  のコリンを生成する酵素量を示す。

#### b) 緩衝溶液の pH 及び濃度について

各 pH の 0.2 M 酢酸緩衝液を用いて最適 pH の検討を行った。結果を Fig. 2 に示す。ピーク面積は pH

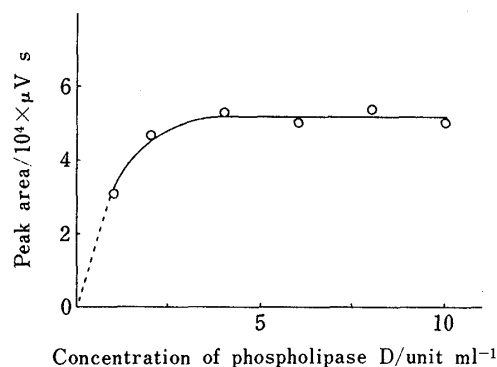


Fig. 1 Effect of phospholipase D concentration on enzyme reaction

Lecithin (1.25  $\mu\text{g}$ ), phospholipase D (0.4 ml), acetate buffer (pH 5.6, 100 mM, 0.8 ml),  $\text{CaCl}_2$  solution (50 mM, 0.8 ml), ether (1 ml), shaking time (30 min)

5.6~6.0 で最大となったため, キャベツ由来のホスホリパーゼ D の至適 pH である pH 5.6 で検討を行うこととした。なお, 塩濃度については, 10 mM 以上でピーク面積は一定となったため, 25 mM と設定した。

c) 活性化剤について

ホスホリパーゼ D の活性化剤である塩化カルシウムの濃度及びエチルエーテルの添加量について検討を行った。結果を Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。塩化カルシウム濃度は 5 mM 以上で, エーテルの添加量は 0.5 ml 以上でピーク面積が一定となったため, それぞれ 10 mM 及び 1 ml とすることとした。

d) 反応時間について

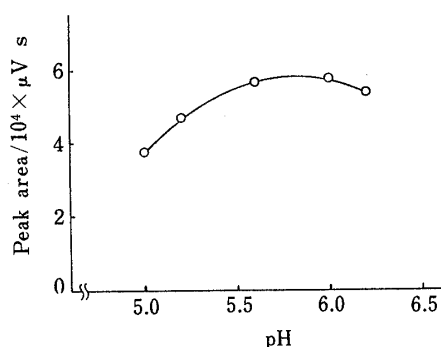
振り混ぜ機を用い, 室温で反応時間 (振り混ぜ時間)

の検討を行った。結果を Fig. 5 に示す。20 分以上でピーク面積は一定の値を示したため, 反応時間は 30 分とした。

以上よりコリンの生成条件を実験の項に述べたように設定した。

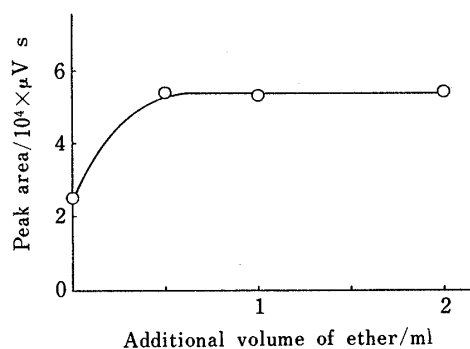
### 3・2 検量線及び再現性

設定条件下でのレシチン濃度とピーク面積との関係を Fig. 6 に示す。0.1~1.5  $\mu\text{g/ml}$  (0.16~2.4 nmol/ml) の濃度範囲内で良好な直線性を与えた。又, レシチン 0.75  $\mu\text{g}$  (1.2 nmol) を用いて 6 回の繰り返し測定を行ったところ, 相対標準偏差は 1.88% と良好な再現性が得られた。



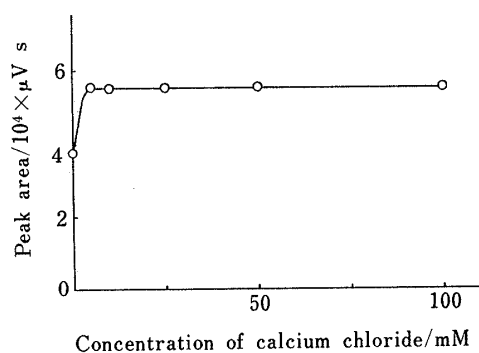
**Fig. 2** Effect of pH of acetate buffer on enzyme reaction

Lecithin (1.25  $\mu\text{g}$ ), phospholipase D (5 unit/ml, 0.4 ml), acetate buffer (100 mM, 0.8 ml),  $\text{CaCl}_2$  solution (50 mM, 0.8 ml), ether (1 ml), shaking time (30 min)



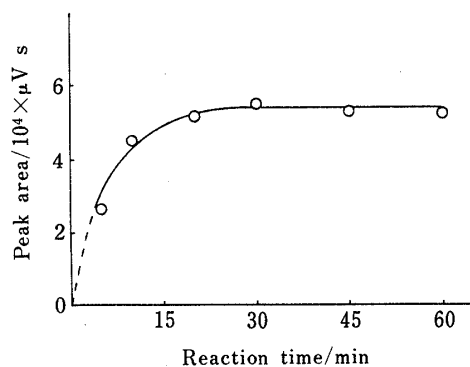
**Fig. 4** Effect of activator(ether) on enzyme reaction

Lecithin (1.25  $\mu\text{g}$ ), phospholipase D (5 unit/ml, 0.4 ml), acetate buffer (pH 5.6, 25 mM, 0.8 ml),  $\text{CaCl}_2$  solution (10 mM, 0.8 ml), shaking time (30 min)



**Fig. 3** Effect of activator (calcium chloride) on enzyme reaction

Lecithin (1.25  $\mu\text{g}$ ), phospholipase D (5 unit/ml, 0.4 ml), acetate buffer (pH 5.6, 25 mM, 0.8 ml),  $\text{CaCl}_2$  solution (0.8 ml), ether (1 ml), shaking time (30 min)



**Fig. 5** Effect of reaction time (shaking time) on enzyme reaction

Lecithin (1.25  $\mu\text{g}$ ), phospholipase D (5 unit/ml, 0.4 ml), acetate buffer (pH 5.6, 25 mM, 0.8 ml),  $\text{CaCl}_2$  solution (10 mM, 0.8 ml), ether (1 ml)

### 3・3 胃液からレシチンの添加回収率

ヒト胃液 0.5 ml にレシチン 3.75  $\mu\text{g}$  を添加し、胃液の前処理法に従って試料とした後、設定したコリンの生成条件で操作して HPLC 分析を行い、添加回収率を求めた。3 回の平均添加回収率は 97.0% となり、満足できる値が得られた。

### 3・4 ヒト及びラット胃液中のレシチンの測定

本法により、各々 5 検体のヒト及びラット胃液中のレシチンの測定を行った。結果を Table 1 に示す。胃液中にはコリン含有リン脂質として、レシチン、リゾレシチン、スフィンゴミエリンが存在する<sup>8)</sup>が、本法で使したキャベツ由来のホスホリパーゼ D はスフィンゴミエリンには作用しないことが知られている<sup>9)</sup>。よって本法では、胃液中のレシチンとリゾレシチンの双方を測定していることになる。測定時の代表的なクロマトグラ

ムを Fig. 7 に示す。約 8 分にコリン由来の  $\text{H}_2\text{O}_2$  によるピークが見られ、反応液のマトリックス由来のピークが溶媒ピークの直後に現れるものの、その影響を受けることなくノイズレベルの低いきれいなクロマトグラムが得られた。

以上レシチンの測定法として、酵素反応を利用した HPLC-電気化学測定法の検討を行い、良好な直線性、再現性を示す方法を開発した。この測定法によりヒト及びラット胃液中のレシチンを測定したところ、それぞれ 4.3~22.2 nmol/ml, 2.2~18.5 nmol/ml の値を得た。本法では、ホスホリパーゼ D による反応後、HPLC による分離分析を行うため、胃液のような夾雑物の多い試料においても nmol/ml レベルのレシチンの測定が可能であった。又、クロマトグラムで良好なベースラインが得られていることや、前処理過程での濃縮操作について検討することによって pmol/ml レベルの低濃度のレシチンの測定が可能であると考えられる。なお、本法は、試料に適した前処理を導入することにより、胃液以外においても食品などに含まれるレシチンの測定に適用可能であり、はん用性の高い有用な手法と言える。

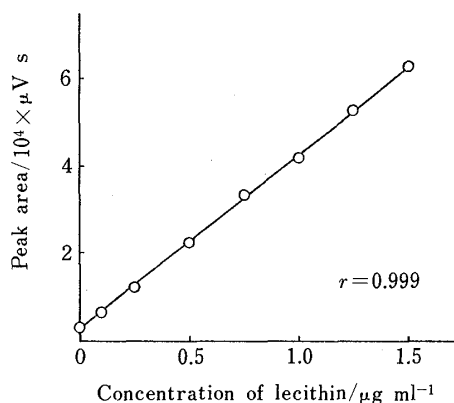


Fig. 6 Calibration curve of lecithin

Table 1 Assay results of lecithin in gastric juice of human and rat (nmol ml<sup>-1</sup>)

|       | 1    | 2    | 3    | 4    | 5   | Average |
|-------|------|------|------|------|-----|---------|
| Human | 10.1 | 22.2 | 4.3  | 4.3  | 4.5 | 9.1     |
| Rat   | 2.2  | 10.4 | 10.1 | 18.5 | 4.5 | 9.1     |

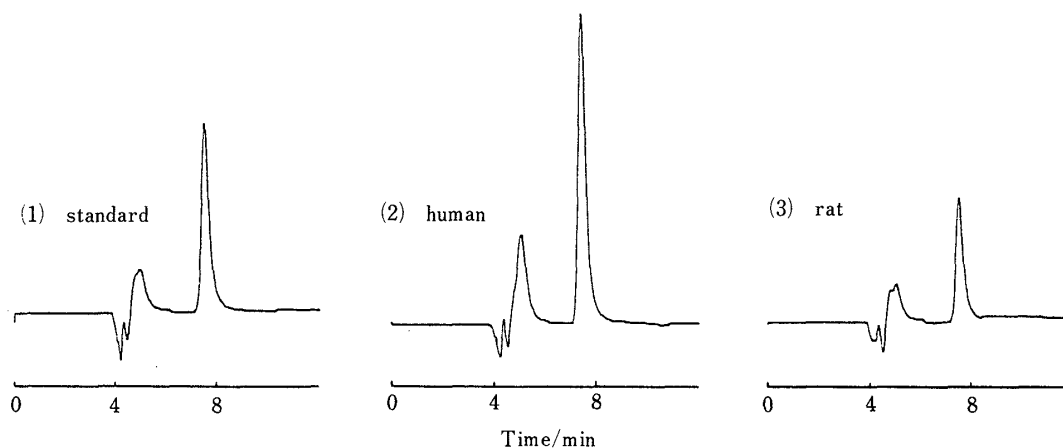


Fig. 7 Typical chromatograms for gastric juice of human and rat

本研究の機会を与えていただくと共に御指導を賜った田辺製薬分析化学研究所所長柿本年雄博士並びに副所長佐藤忠司博士に深く感謝いたします。

(1991 年 11 月, 日本分析化学会)  
(第 40 年会において一部発表)

### 文 献

- 1) 木村 健, 吉田行雄, 市田文弘, 原田 尚, 関口利和, 福富久之, 古田精市, 西川貴之: 診断と治療, **76**, 3015 (1988).
- 2) 広原淳子, 備仲健之, 西村俊夫, 立岩二郎, 平松新, 水野孝子, 鮫島美子: *Prog. Med.*, **9**, 2379

- (1989).
- 3) 山中樹好, 藤田 直: 油化学, **39**, 393 (1990).
- 4) A. Poste: *J. Chromatogr.*, **415**, 241 (1987).
- 5) H. A. Norman, J. B. John: *J. Lipid Res.*, **27**, 1104 (1986).
- 6) M. Takayama, S. Itoh, T. Nagasaki, I. Tanimizu: *Clin. Chim. Acta*, **79**, 93 (1977).
- 7) S. F. Yang, S. Freer, A. A. Benson: *J. Biol. Chem.*, **242**, 477 (1967).
- 8) M. G. J. Schmitz, W. Renooij: *Gastroenterology*, **99**, 1292 (1990).
- 9) 馬場茂明, 和田 博, 北村元仕, 奥田 潤編: “臨床酵素ハンドブック”, 第 2 版, p. 607 (1982).



**Determination of lecithin in gastric juice by HPLC with electrochemical detection using enzyme reaction.** Kazuya YAMASAKI, Masayuki KIKUOKA, Takafumi SAEKI, Yoshio KOKUSENYA and Masaaki MATSUO (Analytical Chemistry Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd, 3-16-89, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka 532)

HPLC with electrochemical detection using enzyme reaction was developed for determination of lecithin in gastric juice. In this method, lecithin extracted from gastric juice was hydrolyzed by phospholipase D. The liberated choline was injected to HPLC and separated by reverse phase column and converted to betaine and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) by column packed with immobilized choline oxidase.  $H_2O_2$  was detected by electrochemical detector. The detection limit for lecithin was 2 ng/injection. The peak area of HPLC was proportional to the concentration of lecithin from 0.1 to 1.5  $\mu\text{g/ml}$ . The relative standard deviation was 1.88% ( $n=6$ ). The coefficient of lecithin recovery from human gastric juice was 97.0% ( $n=3$ ).

(Received January 16, 1992)

### Keyword phrases

lecithin; gastric juice; HPLC with electrochemical detection; phospholipase D; choline oxidase.