

ケミルミネッセンスによる血漿リン脂質過酸化物(PCOOH)の測定

June, 2014

ヒト血中の過酸化脂質は体内の酸化ストレスの指標となる。特に生体膜を構成するリン脂質ヒドロペルオキシドの定量は、膜に対する酸素障害の指標として有効である。ケミルミネッセンス(CL) – 高速液体クロマトグラフ法 (CL-HPLC 法) は、まず初めに HPLC により脂質クラスまたは分子種を分離し、次にポストカラム検出部でケミルミネッセンス(化学発光)反応を用いてヒドロペルオキシド (-OOH) 基を持つ過酸化脂質を特異的に検出する高感度定量法である。ここでは血漿中のリン脂質過酸化物 (PCOOH:phosphatidylcholine hydroperoxide) の高感度検出を行った。

Methods

過酸化物 (R-OOH) はヘム鉄 (Cytochrome c) で分解され、活性酸素を生じる。その活性酸素がルミノールを酸化し発光する。その発光量を測定することで高感度微量分析が可能となる (図 1)。CL-HPLC システムを図 2 に示した。分析条件は以下である。

HPLC column: SIL-NH2 Mobile phase :
2-propanol-methanol-water(135 :
45 : 20, v/v/v)

CL reagent : 1 L の 50mM のホウ酸緩衝液にチトクロム C (10mg)とルミノール(2 mg)を溶かす。

Standard : L- α -phosphatidylcholine, β -oleoyl- γ -palmitoyl(C18:1,[cis]-9/C16:0, SIGMA) の光酸化物

測定装置: CLA-2100 (現 : CLA-ID4) or CLA-FL2

Sample: 健康人の血漿サンプル 2 種類 (a、及び b) からの脂質抽出物

測定時間: 約 15 分 / 1 検体 を、連続 4 回

Result

CL-HPLC クロマトグラムの結果を図 3 示す。UV クロマトグラムのピークでは未酸化品および酸化分解物 (ROH) も含まれるが、CL クロマトグラムのピークは R-OOH のみであり、過酸化物を特異的に検出できる。

PCOOH 量は a < b であり、かつ 4 回の測定に対して再現性良く検出されることがわかった。a は数百フェモトモル、b は数ピコモルのレベルである。

Reference

- M.miyazawa, T. : Free Radical Biol. Med., 7, 209-217, 1989
- M.miyazawa, T. , Suzuki, T., Fujimoto, K. and Yasuda, K. : J. Lipid. Res., 33, 1051-1059, 1992
- M.miyazawa, T. , Fujimoto, K., Suzuki, T and Yasuda, K. : Methods Enzymol., 233, 324-332 , 1994

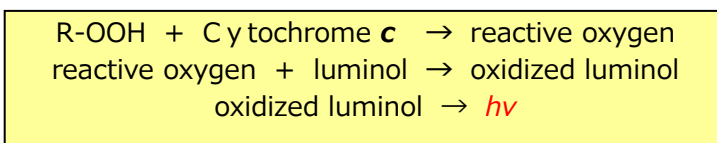


図 1 リン脂質過酸化物検出の発光メカニズム

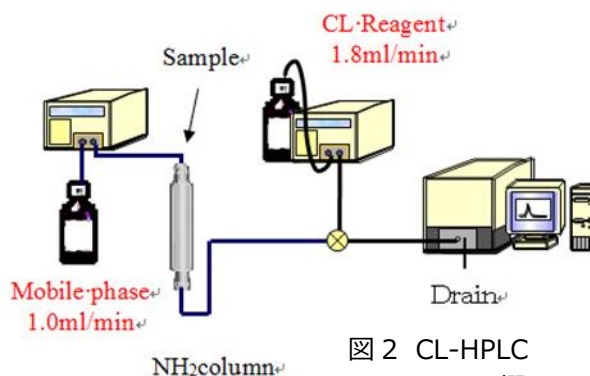


図 2 CL-HPLC システム概要

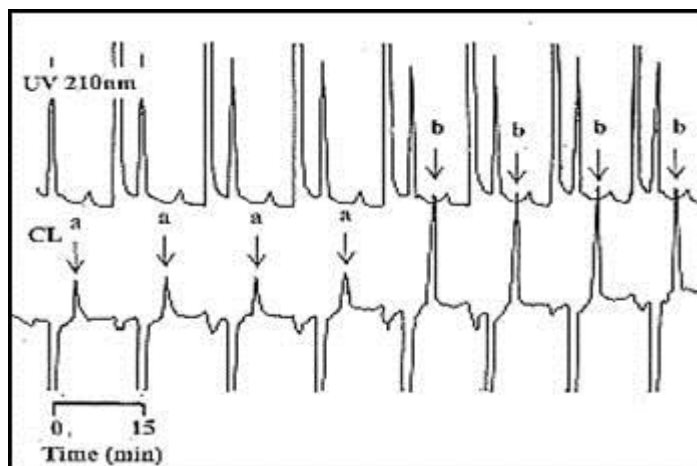


図 3 PCOOH の UV(上)および発光クロマトグラム (下)

ケミルミネッセンスアナライザーへのお問い合わせは

東京支店 : 044-411-1263

利府事業所 : 022-356-6111

京都ラボ : 東京支店へご連絡ください

TOHOKU 東北電子産業株式会社

本社 : 仙台市太白区 2-14-1 TEL022-266-1611

web <http://www.tei-c.com> mail sales@tei-c.com