

[J. Chromatogr., 210, 342 (1981)]

Gas chromatographic enzymic determination of amygdalin

SATOSHI KAWAI, KEIKO KOBAYASHI, YUZI TAKAYAMA*

酵素反応を利用したアミグダリンのガスクロマトグラフィー

河合 聡, 小林恵子, 高山雄二*

D-Amygdalin は制ガン因子として注目されており, 生体挙動を知る必要性も生じている。水溶性カルボニル化合物の優れた GC 用試薬として pentafluorobenzoyloxylamine hydrochloride (PFBOA) を用いた研究を進めてきたが, 本報では amygdalin の β -glucosidase による酵素的な加水分解から遊離した benzaldehyde の GC に応用し, amygdalin の微量分析法の確立を検討した。

Amygdalin を含む pH4.8 の酢酸緩衝液 200 μ l に β -glucosidase 50 μ l を加えて 30°C, 1 時間振とうする。その後 PFBOA 水溶液 50 μ l を加えて室温で 30 分間放置し, 食塩飽和・硫酸酸性条件下, 内標準物質として α , α -dichlorodiphenylmethane を含む酢酸エチル 0.5ml または 2.0ml で抽出し, その一定量を GC に注入する。GC の分離条件は 3% XE-60, 2.0m ガラスカラム, カラム温度 160°C, 検出器は FID と ECD である。

Amygdalin の酵素的な加水分解は Stobaugh らの報告を参考に行った。FID-GC を用いたとき 0.5~2 μ g, ECD-GC では 100~500ng の amygdalin の GC 分析が可能である。0.1~2 μ g の amygdalin の濃度範囲で ECD を用いたときの検量線は, CV=5.03%(n=6), 相関係数 0.9989 を示した。PFBOA 誘導体は ECD に高感度で benzaldehyde として 10pg の注入量で測定が可能であるため血清量も少なくすむ。また β -glucosidase, PFBOA ともに弱酸性で反応が進行する。

* 豊橋技術科学大学

[J. Chromatogr., 226, 461 (1981)]

Assay of catechol O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection

SEISHU KOH, MAYUMI ARAI, SATOSHI KAWAI, MITSUYOSHI OKAMOTO*

電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによるカテコール

-O-メチルトランスフェラーゼ活性の測定

洪 性修, 荒井まゆみ, 河合 聡, 岡本光美*

〔装置〕 協和精密ミニポンプ KSU, 協和精密ダンパー KD-300, 柳本製ボルタンメトリー VMD 101 を接続して用いた。〔分離条件〕 カラム: 4mm \times 15cm, ステンレス製, LiChrosorb 5 Rp-18; 溶離液: メタノール, 50mM リン酸緩衝液 (3:7, v/v), pH7.2; 流速: 0.3ml/min; 溶離温度: 40°C; 電極電位: +0.9V。〔測定法〕 酵素反応溶液の組成は, 50mM リン酸緩衝液, pH7.5, 0.5mM ノルエピネフリン (基質), 1mM S-アデノシル-L-メチオニン硫酸塩, 5mM MgCl₂, 2mg のカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT, ラット肝より調製, たん白量として) を含む。37°C, 1 時間インキュベートする。生成した O-メチル体を過ヨウ素酸酸化してワニリンおよびイソワニリンに変え, 酢酸エチルで抽出し高速液体クロマトグラフィーで測定する。内部標準物質は p-ヒドロキシアセトアニリドである。〔考察〕 重要なカテコールアミンの一つであるノルエピネフリンを基質にえらび, 酵素反応によって生成したノルメタネフリンとノルパラネフリンをワニリンとイソワニリンに変え, m-, p-メチル体を同時測定するところに本法の特色がある。酵素活性と m/p 生成比に及ぼす pH の影響が検討され, pH 7.5 から 8.2 への変化で m/p 比は 50% に低下した。

* 岐阜県衛生研究所