

培養肝細胞抽出液における 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate と UDP-Glucuronic Acid の HPLC による定量分析

今村雅弘、熊谷岳文、杉原成美、古野浩二

Journal of Health Science, 49 (5) 395-400 (2003)

High-Performance Liquid Chromatographic Assay of 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate(PAPS) and UDP-Glucuronic Acid(UDPGA) in Cultured Hepatic Cell Extracts

Masahiro Imamura, Takefumi Kumagai, Narumi Sugihara, and Koji Furuno

ABSTRACT : 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) and uridine 5'-diphosphate glucuronic acid (UDPGA) in cultured rat hepatocytes were directly assayed by isocratic reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). The sample preparation involves the extraction of nucleotide cofactors with cold alkaline solvent and clearing treatment by ultra-filtration.

Nucleotides were separated on HPLC equipped with a RPAQUEOUS C-30 column adjusted to 20°C using 100 mM sodium potassium buffer (pH 5.5) as elution solvent and detected by UV absorption at 260 nm. Linear calibration curves were obtained over the ranges from 0.1 to 1.0 μ M for PAPS and 1.0 to 10 μ M for UDPGA in both distilled water and hepatic cell extracts. Peaks in the cell extracts were identified as PAPS and UDPGA by comparison of the retention times and co-elution with each of their corresponding authentic standards. Assignment of peak identity was additionally supported by the preferential decrease in PAPS and UDPGA in cultured hepatocytes which were incubated with quercetin or D-galactosamine. This HPLC method was found to be sensitive enough to accurately quantify the cellular contents of PAPS and UDPGA far below that normally found in cultured rat hepatocytes.

抄録 培養ラット肝細胞における 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) と UDP-glucuronic acid (UDPGA) を、バイオアッセイによる間接的定量ではなく、逆相 HPLC により直接分析した。サンプルの調整において、ヌクレオチドコファクターは、冷アルカリ溶媒により抽出され、限外濾過法により精製された。ヌクレオチドは、溶離液として 100mM ナトリウム・カリウム緩衝液(pH5.5)を用いた、20°C に設定した PRAQUEOUS C-30 カラムを装備する HPLC により分離され、260nm の UV 吸収にて検出された。蒸留水と肝細胞抽出液の両方において、PAPS は 0.1 から 1.0 μ M、UDPGA は 1.0 から 10 μ M の濃度範

囲で検量直線が得られた。細胞抽出液におけるピークは、保持時間や共通溶出体をそれぞれの純粋な標準品と比較することにより PAPS と UDPGA であると同定された。これらのピークが PAPS と UDPGA であることは、ケルセチンおよび D-ガラクトサミンで処理された培養肝細胞におけるこれらピークを選択的な減少からも確認された。この HPLC 分析法は、培養肝細胞に通常含まれる PAPS と UDPGA 量よりはるかに低い細胞内濃度においても正確に測定できる感度であることが示された。