

細胞培養液中の微量アスコルビン酸の HPLC による測定

◎前河 裕一¹⁾、米田 操¹⁾、棚橋 伸行¹⁾、森下 芳孝¹⁾
鈴鹿医療科学大学¹⁾

【はじめに】

ヒト前骨髄性白血病細胞株である HL-60 に誘導剤である活性化ビタミン D3 と TGF- β (transforming growth factor- β) を作用させる際に、アスコルビン酸 (AA) を添加すると細胞内に吸収され、CD14 の発現が促進される。CD14 発現によって細胞系統や分化・成熟段階を推測する場合には培養液中の AA 濃度を明解にすることが重要となる。しかし、現在 HPLC による培養液中の AA 測定は報告がない。本研究では細胞培養液中の微量 AA を高感度に測定できるか検討した。

【方法と対象】

前研究では基線が不安定であったため移動相について検討した。移動相である 10%テトラブチルアンモニウム溶液を関東化学株式会社製 (粉末 HPLC 用) に変更した。リン酸二水素カリウム 1.4g(10mM)は前回と同様に作製し、クロマトグラムを比較した。電気化学検出の測定条件は、カラムは Acclaim TM120、C18、5 μ m(4.6 \times 250mm) [Thermo Fisher Scientific] を前実験と同様に使用した。カラム温度は 30°C を 40°C に変更し、流速は 0.8mL/min、注入量：10 μ L 検出電圧は -200mV~850mV とした。

標準 AA の検量線作成には関東化学株式会社製を移動相として使用した。標準液 AA を 0.1~0.001 μ g/mL まで希釈し、前研究の溶出時間とピーク面積値を比較した。ピーク面積値の精密性はピーク面積値の平均値、標準偏差および変動係数を求め、ばらつきの程度を分析した。また回収率は細胞培養液中に標準液 AA 濃度 0.1~0.001 μ g/mL を添加し、その回収率について検討した。

【結果】

本研究結果は前研究の標準液 AA 濃度 0.1~0.01 μ g/mL 濃度範囲内のピーク時間は一致し、安定した基線上に各ピークが認められた。また測定感度を上げるため、移動相の作製方法を変え、オープン温度を前回の 30°C から 40°C に変更した。AA 濃度 0.1~0.001 μ g/mL のピーク面積値、標準偏差および変動係数を比較した結果、各濃度でピーク面積値は上昇したが、標準偏差は 0.001 μ g/mL 濃度でばらつきが大きかった。変動係数を比較すると 0.001 μ g/mL は 4.9%、0.01 μ g/mL は 1.4%、0.1 μ g/mL は 2.2%であった。変動係数は各濃度とも 5.0%以下で有意性が認められた。

【考察】

テトラブチルアンモニウム溶液の作製方法およびオープン温度の変更によって、基線の安定と標準液中 AA 濃度 0.001 μ g/mL が明確なピークとして認められ測定感度が向上した。細胞培養液中の AA 濃度 0.1~0.001 μ g/mL の回収率は、92~73%と低く、さらに回収率を上げるために移動相など測定条件を再検討する必要がある。

【結語】

本研究では、HPLC 用テトラブチルアンモニウム溶液の作製方法の変更とオープン温度を 40°C に変更したことにより、標準液中の AA 濃度は 0.001 μ g/mL まで測定可能となった。しかし、同濃度の培養液中の AA 量の回収率が低く、さらに移動相などの測定条件の検討が必要と考える。

連絡先：〒510-0293 三重県鈴鹿市岸岡町 1001-1 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部臨床検査学科
電話番号：059-383-8991 (代表)