

逆相高速液体クロマトグラフィーによる
ヨウ素イオンとヨウ素化アミノ酸の分析に
関する基礎研究

星薬科大学
図書館



0000060074

宮 下 正 弘

目次

序論	1
第1章 逆相高速液体クロマトグラフィーによるヨウ素イオンの分析	3
1・1 イオンペアークロマトグラフィーによるヨウ素イオンの分析	4
1・2 クラウンエーテル添加移動相を用いるヨウ素イオンの分析	8
1・3 シクロデキストリン添加移動相を用いるヨウ素イオンの分析	13
第2章 固相抽出法によるヨウ素イオンの前処理法	18
2・1 陰イオン交換カラムを用いる固相抽出法	19
2・2 固相濃縮法を利用した微量ヨウ素の定量	23
第3章 ヨウ素化合物の合成	33
3・1 ヨードヒスチジンの合成	34
3・2 ヨードカルノシンの合成	42
第4章 逆相HPLCによるヨードヒスチジンの分析	47
総括	58
謝辞	60
掲載雑誌目録	61
引用文献	62

序論

ヨウ素は自然界に広く分布している元素で、生体にとっては甲状腺ホルモンを構成する成分として必須の微量元素である。^{1, 2)} この元素は海水に多く存在するため、海草などの海産の食物はヨウ素含量が他の食物にくらべてはるかに高く、生体の重要なヨウ素供給源となっている。食物中のヨウ素はほとんど無機化合物の形態で存在するが、胃腸管より血中に取り込まれたヨウ素は甲状腺で濃縮され、さらに有機化されて甲状腺ホルモン活性を示すthyroxine (T_4) やtriiodo-thyronine (T_3) を生成する。これらのホルモンは、新陳代謝や基礎代謝の上昇、成長や成熟の促進など種々の生理作用を示す。生体に対するヨウ素の欠乏は甲状腺腫など重大な疾患の原因となるが、逆にヨウ素の過剰摂取によってもいろいろな障害が起きることが指摘されている。

医薬品としてもヨウ素は重要である。³⁾ たとえば、ヨウ化カリウムやヨウ素レシチンは慢性気管支炎、喘息、甲状腺腫、網膜疾患の治療薬として、ヨウ素やポビドンヨードは殺菌消毒薬として使用されている。また、ヨードミドのような有機ヨウ素化合物はX線造影剤として、さらに、 ^{131}I で標識したヨウ化ナトリウムや人血清アルブミンは臓器の診断やがんの治療に使用されている。

生化学の領域では、酵素などの蛋白質のチロシン残基の化学修飾にヨウ素が使用されている。^{4, 5)} また、種々の化合物の放射化標識に ^{125}I や ^{131}I のような放射性のヨウ素が使用されている。^{6, 7)}

このように、ヨウ素は生体にとって重要な元素であり、化学的にも利用価値の高い元素であるので、医学や薬学の広範囲な分野で様々なヨウ素化合物が研究されている。そのヨウ素化合物の中で、ヨウ素イオン (I^-) とヨウ素化アミノ酸は、ヨウ素のあらゆる研究に係わることから、とりわけ強い関心もたれ、数多く研究されている。そして、これらの化合物の研究を進めるために、すぐれた分析法の開発が要求されている。

近年、多くの化合物に対する高感度で迅速な分析手段として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が傑出した役割を担うようになってきた。HPLCでは、分離モード (吸着、分配、イオン交換およびサイズ排除モード) と検出法 (吸光、蛍光、電気化学、電気電導度および屈折率検出法) の組み合わせによっていろいろなシステムが構成されているが、現在最も広く使用されているのは、逆相分配による分離モードと吸光検出法を組み合わせたシステムである。逆相モードの分

離が汎用されるのは、使いやすい、効率が良い、カラムの安定性が高い、そして多くの化合物を同時に分析できるなどの理由による。また、吸光検出法が汎用されるのは、感度が良い、使用範囲が広い、温度や流速の影響を受けにくいなどの理由による。このような分析システムの普及度と利点から、I⁻とヨウ素化アミノ酸の分析に吸光検出法による逆相HPLCを適用することは極めて意義があるものと考えられる。一方、このHPLCのシステムを使用したI⁻とヨウ素化アミノ酸の分析は、いくつか報告されているが、分析の基礎は十分確立していないのが現状である。

そこで本研究では、吸光検出法を使用した逆相HPLCによるI⁻とヨウ素化アミノ酸の分析法を確立することを目的として、分離、前処理および標品の合成法など分析に係わる基礎的な問題を検討した。

第1章 逆相高速液体クロマトグラフィーによるヨウ素イオンの分析

〔要旨〕 本章では、I⁻のイオンペアークロマトグラフィー（IPC）による分析法について、分離を中心に検討した。I⁻は、疎水性を持たないため、通常逆相の固定相に保持させて分離することはできなかつた。しかし、イオンペアー試薬としてアルキルアミンを添加した移動相を使用することによって、固定相に保持させて分析できることを明らかにした。また、I⁻の検出波長を225 nmに設定することにより、1 ngから2 μgの範囲でI⁻を定量できることを確認した。この分析法は、有機ヨウ素化合物に不純物として含まれているI⁻を定量するために応用した。さらに、IPCによるI⁻の逆相HPLC分析について、新規な分離の調節法を開発するために、クラウンエーテル（CE）やシクロデキストリン（CD）のホスト・ゲスト相互作用を利用することを試みた。そして、1級のアルキルアミンをイオンペアー試薬とする移動相にCEを添加したところ、I⁻の保持が増加することを見出した。これはアルキルアンモニウムイオンとCEが錯体を形成し、この錯体がイオンペアー試薬として作用するからである。この方法によって、CEと錯体を形成しない化合物（iodouracil）とI⁻の選択的な分離が可能になることを示した。一方、一級のアルキルアミンから成る移動相にCDを添加したところ、I⁻の保持は減少することを見出した。この保持機構として、CDとアルキルアンモニウムイオンおよびCDとI⁻との包接複合体の形成による効果、あるいは、CDの固定相への吸着による効果を考察した。さらに、CEやCDを添加した移動相を使用しても、I⁻は問題なく定量できることを確認した。

I⁻の分析は、従来滴定や比色などの方法で行われてきたが、近年では、イオンクロマトグラフィー（IC）、ガスクロマトグラフィー、イオン選択性電極法、フローインジェクション法などの機器分析が多数使用されるようになってきた。とりわけ、ICによるI⁻の分析法は、高感度、多成分分析、そして迅速性などの特徴から、すぐれた方法であると考えられる。1975年にSmallら⁸⁾によって発表された最初のICでは、低交換容量のイオン交換カラムと電気伝導度検出器が使用され、また、移動相のイオンのバックグラウンドを除くために除去カラム（サプレッサーカラム）が設けられていた。そのため、初期のICは、このような特殊な装置を用いて行う無機イオンの分析を意味し、有機化合物の分析を目的とした既存のHPLCとは全く別の分析法である考えられていた。しかしながら、ICの研究が進むにつれて、一般のHPLCで使われていた装置や技術が無機イオンの分析にも多数利用されるようになってきた。^{9, 10)}そのため、現在では、ICとHPLCの明確な区別は無くなりつつある。

本章では、紫外吸光 (UV) 検出法を使用した逆相HPLCによるI⁻の分析法を確立することを目的として、主にI⁻のイオンペアークロマトグラフィー (IPC) による分離について検討した結果について述べる。

1・1 イオンペアークロマトグラフィーによるヨウ素イオンの分析

ICでは、無機イオンに対する万能な検出器として電気伝導度検出器が一般に選択されるが、I⁻を含め一部の無機イオンは紫外部に吸収を持つことから、UV検出器を使用することも可能であった。一方、無機イオンの分離に関しては、イオン交換法以外は困難とされていたが、有機のイオン性物質に対して確立したIPCの技術が導入されるようになって、逆相HPLCでの無機イオンの分析も可能になった。IPCは、移動相に溶質イオンと反対の電荷を持ったイオン性物質 (イオンペアー試薬) を添加することによって、溶質イオンを固定相に保持させて分離する手法である。逆相のIPCで無機イオンを分析する研究は、1979年にReeveら¹¹⁾によって最初に報告された。その分析では、陰イオンに対するイオンペアー試薬としてcetrimide (cetyl trimethyl ammonium bromide) が使用された。また、1982年には、Skellyら¹²⁾によってoctylamineをイオンペアー試薬として使用する陰イオンの分析が報告された。

このような無機イオンのIPCの研究にならない、本節では、dibutylamineをイオンペアー試薬として使用するI⁻の逆相HPLCについて検討することにした。

1・1・1 実験の部

試薬、標準液および試料溶液 1)試薬 —— ヨウ化カリウム (KI) は岩井化学製のものを使用した。1.0 M dibutylamine phosphate (DBAP) 溶液 (Reagent D-4TM) はウォーターズから入手した。monoiodocaranosine (MIC) は合成品 (第3章参照) を、monoiodotyrosine (MIT) はシグマ製のものを使用した。HPLCの移動相は蒸留水と液体クロマトグラフ用のメタノール (MeOH) を使用して調製した。その他の試薬は市販の特級規格のものを使用した。

2)ヨウ素標準液 —— KIを水に溶解して10 mMの標準液を調製し、これを水で所定の濃度まで順次希釈して調製した。

3)試料溶液 —— MICを水に溶解して1.0 mg/mlの溶液を、また、MITを0.005 N HClに溶解して0.5 mg/mlの溶液を調製し、HPLCの分析の試料溶液とした。

移動相 1.0 M DBAP溶液10 ml (1バイアルのReagent D-4) を1 lのH₂O-MeOH (80:20, v/v) に溶解して調製した。移動相の最終的なDBAPの濃度は0.01 M, また, pHは3.0であった。

装置 高速液体クロマトグラフは, 6000A型ポンプ (ウォーターズ), NS-310A型波長可変紫外分光検出器 (日本精密科学), U6K型ユニバーサルインジェクター (ウォーターズ) およびVP-6511W ペンレコーダー (松下通信工業) より構成した。分離カラムはLiChrosorb RP-18 (7 μm, 3.9 mm i. d. × 30 cm) (メルク) を使用した。UVスペクトルは200型レコーダーを接続した100-50型ダブルビーム分光光度計 (日立) を使用して測定した。

分析法 HPLCによるI⁻の分析は, 移動相の流速を1.0 ml/minに, また検出波長を225 nmに設定し, 室温下で行った。I⁻の検量線は, 0.001, 0.01, 0.1または1 mM ヨウ素標準液の2.5 μlから20 μlをHPLCに注入して作成した。

1・1・2 結果および考察

逆相IPCによるI⁻の分離 HPLCの分析は溶質を固定相に保持させて分離することを基本とする。逆相HPLCでは, 溶質は固定相との疎水性相互作用によって保持されるが, 無機イオンのような極性の高い化合物は疎水性相互作用が得られないので, 分析は困難であった。

DBAPを成分とするReagent D-4は, 塩基性の有機化合物をHPLCで分析するとき, 分離を改善する目的で移動相に添加される試薬である。^{13, 14)} ところが, この試薬を添加した移動相を使用した場合, I⁻を逆相の固定相に保持できることが明らかになった。これは, 移動相中のdibutylamine (dibutylammonium ion) が, I⁻に対してイオンペア試薬として作用するIPCの保持機構が働くからである。IPCの保持機構に対しては, いろいろ議論されているが,¹⁵⁾ 3つの代表的なモデルが考えられている。イオン対形成モデルでは, 移動相中で溶質イオンと有機サイトを持ったイオンペア試薬がイオン対を形成し, この電氣的に結びついた複合体が全体として非極性溶質としてふるまい, 逆相カラムに保持されると考える。動的イオン交換モデルでは, 有機サイトを持ったイオンペア試薬が固定相に吸着することによって固定相表面がイオンで覆われ, この表面イオンが動的なイオン交換体として作用して溶質イオンが保持されると考える。また, イオン相互作用では, 有機サイトをもったイオンペア試薬が固定相に吸着することによって固定相表面に電氣的二重層が形成され, この表面からの静電的な効果により溶

質イオンが保持されると考える。しかし、IPCの正確な保持機構はいまだに確立されていない。

検出波長の検討 I⁻は、紫外光の吸収を示すことから、UV検出器で直接検出することが可能である。Reeve¹¹⁾は215 nmで、Skellyら¹²⁾は205 nmで、そしてVespalecら¹⁶⁾は210 nmの波長でI⁻の検出を行ったことを報告している。これらの研究で使用された検出波長は、他の無機イオンも同時に分析するために設定されたものであって、I⁻を高感度で検出するのに適した波長であるかどうかは不明であった。一方、Hurstら¹⁷⁾は、I⁻を単独で分析する実験で、226 nmに検出波長を設定した。このように、I⁻の検出波長は文献によって相違があるので、本法の最適な検出波長を定めるために、DBAPを含有した溶液中でのI⁻のUVスペクトルを調べることにした。

I⁻のUVスペクトルは、水中では226 nmの波長で吸収極大 (ϵ , 13400) を示したが、DBAPの溶液中では225 nmで吸収極大 (ϵ , 12800) を示すことが明らかになった。また、DBAPの溶液にMeOHを添加すると、I⁻の吸収極大波長はわずかではあるが短波長側にシフトすることも明らかになった。本法では、移動相に20%のMeOHを添加したが、この添加量では、I⁻の吸収極大波長はほとんどシフトしなかったため、225 nmの検出波長を使用することにした。一方、アセトニトリルを添加したDBAPの溶液中では、I⁻の吸収極大波長は長波長側にシフトすることが明らかになった。そのため、アセトニトリルを添加した移動相を使用する場合には、検出波長を修正する必要がある。

I⁻の定量性 実験の部に記した方法に従って作成したピーク高さによるI⁻の検量線は、5 pmol (0.64 ng) から15 nmol (1.9 μ g) の範囲で良好な直線性 ($r = 0.999$) を示すことを確認し、本法では、およそ1 ngから2 μ gの範囲でI⁻を定量できることを明らかにした。また、本法のI⁻の検出限界は500 pg (S/N = 3, 0.005 AUFS) であった。本分析法の感度は電気化学検出器を使用した分析法¹⁸⁾に匹敵する高感度なものであった。

実試料への応用 本研究で検討したI⁻の分析法は、有機ヨウ素化合物の標品に不純物として含まれるI⁻を定量するために応用した (Fig. 1)。

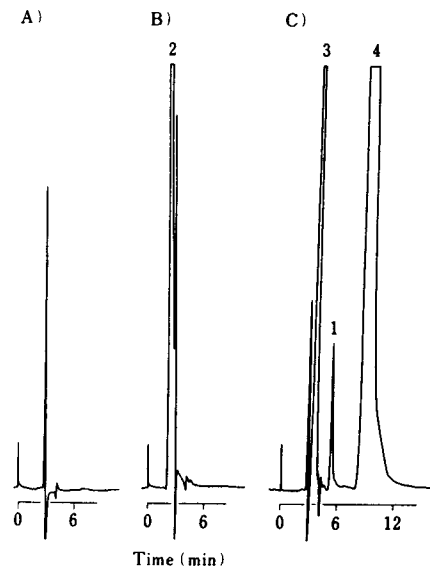


Fig. 1. HPLC Chromatograms of I^- Contained in Organic Iodine Compounds

Sample, injection volume and sensitivity: A, H_2O (blank), 5 μl , 0.005 AUFS; B, MIC, 5 μl , 0.005 AUFS; C, MIT, 10 μl , 0.01 AUFS. Peak identity: 1, I^- ; 2, MIC; 3, tyrosine; 4, MIT. For other conditions, see Experimental.

その結果、合成したMICには I^- が含まれていないことを確認した。しかし、市販のMIT 5 μg 中には11.7 ng (0.23%) の I^- が含まれていることが判明した。このMIT 5 μg に12.7 ngの割合で I^- を添加して行った添加回収実験は、 $96.4 \pm 3.44\%$ ($n = 5$) の良好な回収率が得られ、本法の信頼性が確かめられた。

逆相HPLCによる I^- 分析の展開 本研究を発表した(1984年)頃、UV検出法を使用したIPCによる I^- の分析法がいくつか同時に発表された。Hurst¹⁷⁾は、hexadecyltrimethylammonium chlorideをイオンペア試薬に使用して、粉乳等の乳製品中のヨウ素を定量した(1983年)。長島ら¹⁹⁾は、tetrabutylammonium hydroxideをイオンペア試薬に使用して、有機ヨウ素化合物のヨウ素の元素分析を行った(1985年)。その後、安部ら²⁰⁾は、tetrabutylammonium hydroxideをイオンペア試薬に使用して、生体成分中のヨウ素の定量を行った(1988年)。このように、UV検出法を使用したIPCによる I^- の分析は、 I^- の高感度で簡便な分析法として実用化されるようになった。

1・2 クラウンエーテル添加移動相を用いるヨウ素イオンの分析

前述のように、イオンペア試薬としてアルキルアミン（アルキルアンモニウム塩）を移動相に添加することによって、非極性の固定相にI⁻を保持させることが可能になったが、I⁻の保持の大きさは移動相の種々のパラメーター、例えばpH、イオン強度、イオンペア試薬の種類と濃度、有機修飾溶媒の種類と濃度などによって影響を受け、また調節することができる。^{12, 16, 19)} 一方、近年になって、分子認識の観点から注目されているホスト・ゲスト相互作用をHPLCの新しい分離の調節因子として用いることが試みられるようになった。^{21, 22)} これは、ホストとなる化合物、例えばクラウンエーテル（CE）やシクロデキストリン（CD）を、HPLCの固定相として使用したり、移動相に添加したりすることによって、多くのゲスト化合物を選択的に分離しようとするものである。このようなホスト・ゲスト相互作用は、逆相HPLCにおけるI⁻の分離に対しても保持の調節因子として利用することができるものと考えられる。そこで、最初にCEを添加した移動相を用いてI⁻を分析することを試みた。

1・2・1 実験の部

試薬および標準液 1)試薬 —— hexylamineと18-crown-6 (18-C-6) は半井化学製のものを、ヨウ化カリウム (KI) , butylamineおよびoctylamineは和光純薬製のものを使用した。その他の試薬は市販の特級規格のものを使用した。HPLCの移動相は蒸留水と液体クロマトグラフ用のメタノール (MeOH) , アセトニトリル (MeCN) およびテトラヒドロフラン (THF) を使用して調製した。

2)ヨウ素標準液 —— 本章1・1・1に記載した方法で調製した。

移動相 アルキルアミンとリン酸を水に溶解してアルキルアミンのリン酸塩溶液 (pHはリン酸で調整) を調製したのち、この溶液に18-C-6を加えて溶解し、さらに有機溶媒を加えて移動相とした。

装置 高速液体クロマトグラフは本章1・1・1に記載した装置で構成した。分離カラムはNova-Pak C₁₈ Radial-Pak cartridge (4 μm, 8 mm i. d. × 100 mm) (ウォーターズ) を使用した。

分析法 HPLCによるI⁻の分析は、移動相の流速を2.5 ml/minに、また検出波長を225 nmに設定し、室温下で行った。I⁻の保持比 (k') は $k' = (V_1 - V_0)/V_0$ (V₁はI⁻の保持容量、V₀はカラムのホールドアップ容積) の式より計算した。V₀は、60% MeCNを移動相として、210 nmの検出波長で測定した硝酸イオンの

溶出容積より求めた。また、 I^- の検量線は0.01, 0.1または1 mM ヨウ素標準液の2.5 μ lから25 μ lをHPLCに注入して作成した。

1・2・2 結果および考察

I^- の保持機構 一級アミンのリン酸塩から成る移動相に18-C-6を添加することによって、 I^- の保持は増加した。これは、大環状のポリエーテルであるCEが、その環の空孔内にサイズのあった陽イオン（金属イオンや一級のアシルアンモニウムイオン）を取り込み安定な錯体を形成する特性を持つからである。^{23, 24)} すなわち、移動相中でCEがイオンペアー試薬のアシルアンモニウムイオンと錯体を形成し、この錯体が、より疎水性の大きなイオンペアー試薬として働くために、 I^- の保持が増加したと考える。一方、CEと錯体を形成する特性を持たない2級、3級または4級アンモニウム塩から成る移動相に18-C-6を添加しても、 I^- の保持は変化しなかった。

移動相のpHの影響 pH 3.0から7.0のbutylamine, hexylamineまたはoctylamineから成る移動相を用いて、 I^- の保持に対する移動相のpHの影響を調べた (Fig. 2)。

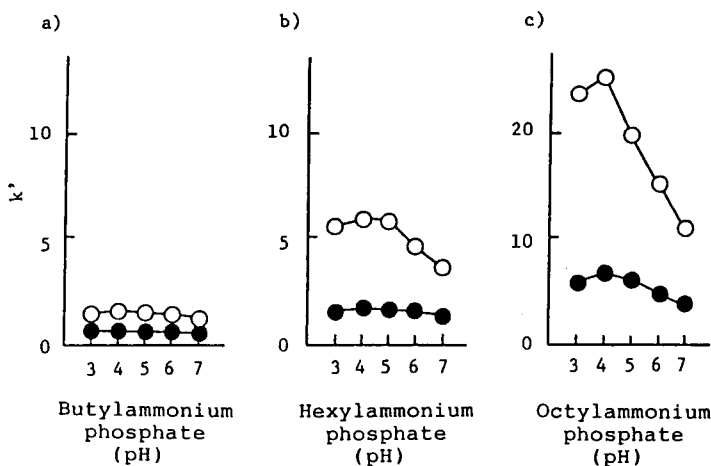


Fig. 2. Effect of Mobile Phase pH on the Capacity Factor of I^-

Mobile phase: ●, 15% MeCN in 5 mM alkylammonium phosphate; ○, 15% MeCN in 5 mM alkylammonium phosphate containing 5 mM 18-C-6.

CEを添加していない移動相では、pH4.0でI⁻の保持が最大になった。また、CEを添加した移動相でも、pH 4.0で保持が最大になった。そのため、CEはI⁻の保持の大きさには影響するが、pHに対する保持挙動のプロフィールには影響しないことが明らかになった。

移動相のCEの濃度の影響 hexylamineから成る移動相に、種々の濃度の18-C-6を添加して、I⁻の保持に対するCEの濃度の影響を調べた (Fig. 3)。

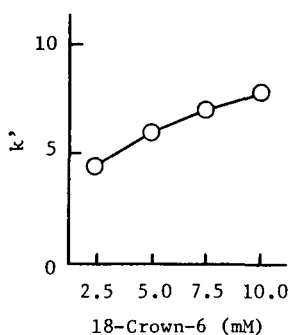


Fig. 3. Effect of CE Concentration on the Capacity Factor of I⁻
Mobile phase: 15% MeCN in 5 mM hexylammonium phosphate (pH 4.0)
containing 18-C-6.

I⁻の保持はCEの濃度が増加するに従って増加した。これは、CEの濃度が増加することによってアルキルアンモニウムとCEの平衡が錯体形成の方向に傾き、錯体の濃度が増加するからであると考えられる。

移動相の有機修飾溶媒の影響 hexylamineから成る移動相を用いて、 I^- の保持に対する移動相の有機修飾溶媒の種類と濃度の影響を調べた (Fig. 4) .

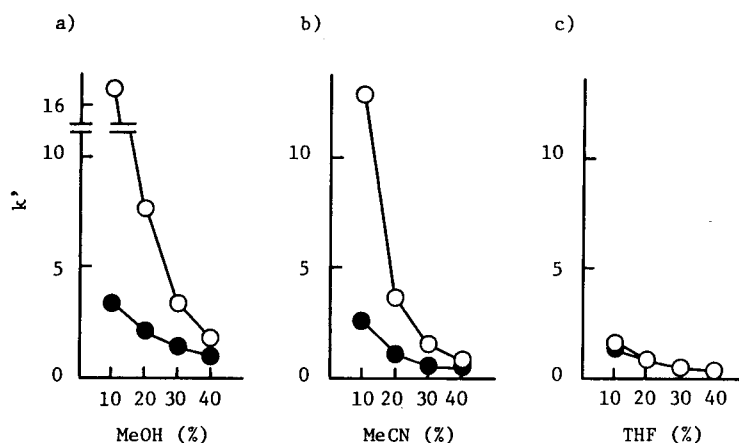


Fig. 4. Effect of Organic Modifier on the Capacity Factor of I^-

Mobile phase: ●, MeOH (MeCN or THF) in 5 mM hexylammonium phosphate (pH 4.0);
○, MeOH (MeCN or THF) in 5 mM hexylammonium phosphate (pH 4.0) containing 5 mM 18-C-6.

I^- の保持は、MeOHやMeCNを使用した移動相では、CEを添加することによって増加したが、THFを使用した移動相では、ほとんど増加しなかった。これは、エーテル構造を持つTHFが陽イオンと特異な親和性を示す²³⁾ためである。すなわち、THFがアルキルアンモニウムに強く配位するため、アルキルアンモニウムとCEとの錯体形成が妨害され、 I^- の保持が変化しなかったと考える。

また、有機溶媒の濃度に関しては、どの場合も濃度が増加するに従って I^- の保持は減少した。

I^- の定量性 CEを添加した移動相 (15% MeCN in 5 mM hexylamine phosphate (pH4.0) containing 18-C-6) を使用して I^- の定量性を検討した。 I^- の検出波長は、この移動相溶媒中で吸収極大を示す225 nmの波長に設定した。実験の部に記した方法に従って作成したピーク高さによる I^- の検量線は、25 pmol (3.2 ng) から25 nmol (3.2 μg) の範囲で良好な直線性 ($r = 0.999$) を示すことを確認した。また、本法の I^- の検出限界は1 pmol (127 pg) ($S/N = 3, 0.005$ AUFS) であった。

分離への応用 I^- とiodouracilの分離にCEを応用した (Fig. 5) .

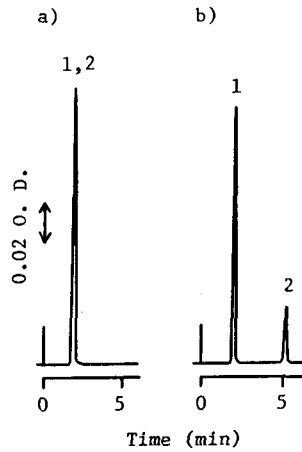


Fig. 5. HPLC Chromatograms of I^- and Iodouracil

Mobile phase: (a) 15% MeCN in 5 mM hexylammonium phosphate (pH 4.0);
(b) 15% MeCN in 5 mM hexylammonium phosphate (pH 4.0) containing 5 mM
18-C-6. Sample: iodouracil (1.25 μ g) + KI (0.25 μ g). Peak identity: 1, iodouracil;
2, I^- . For other conditions, see Experimental.

CEを添加していない移動相では両方のピークを分離することはできなかったが、CEを添加した移動相では、CEはiodouracilには作用しないので、 I^- の保持だけを選択的に増加させて完全に分離することができた。

1・3 シクロデキストリン添加移動相を用いるヨウ素イオンの分析

シクロデキストリン (CD) は、グルコースが α -1,4位で結合した多糖類で、円環体 (torus) 状の形態をしている。そして、その空洞内に種々のゲスト分子を取り込み、包接複合体を形成する特性を持つ。²⁴⁾ HPLCでは、芳香族化合物の位置異性体を分離²⁵⁾したり、ラセミ混合物をエナンチオマーに分割²⁶⁾するのに、CDを添加した移動相が使用されている。

本節では、逆相HPLCによるI⁻の分離に対する、移動相の添加剤としてのCDの利用を検討することにした。この研究の目的は、CDの包接作用に基づく新規なI⁻の保持の調節法を確立することである。

1・3・1 実験の部

試薬および標準液 1) 試薬 —— ヨウ化カリウム (KI) は和光純薬製のもの、CDは半井化学製のものを使用した。HPLCの移動相は蒸留水を使用して調製した。その他の試薬は市販の特級規格のものを使用した。

2) ヨウ素標準液 —— 本章1・1・1に記載した方法で調製した。

移動相 アルキルアミンとリン酸を水に溶解してアルキルアミンのリン酸塩溶液 (pHはリン酸で調整) を調製したのち、CDを溶解して移動相とした。

装置 高速液体クロマトグラフは本章1・1・1に記載した装置で構成した。分離カラムはNova-Pak C₁₈ Radial-Pak cartridge (4 μ m, 5 mm i. d. \times 100 mm) (ウォーターズ) を使用した。

分析法 HPLCによるI⁻の分析は、移動相の流速を1.0 ml/minに、また検出波長を226 nmに設定し、室温下で行った。I⁻の保持比 (k') は $k' = (V_1 - V_0) / V_0$ (V_1 はI⁻の保持容量、 V_0 はカラムのホールドアップ容積) の式より計算した。 V_0 は、60% MeCNを移動相として、210 nmの検出波長で測定した硝酸イオンの溶出容積より求めた。また、I⁻の検量線は、種々の濃度のヨウ素標準液10 μ lをHPLCに注入して作成した。

1・3・2 結論と考察

CD添加の影響 hexylamine, heptylamineまたはoctylamineのリン酸塩から成る移動相に、 α -CD, β -CD, γ -CDまたは2,6-di-O-methyl- β -CD (DM- β -CD) を添加した場合のI⁻の保持を調べた (Table I)。また、クロマトグラムの一例を示した (Fig. 6)。

Table I. Effect of CD in the Mobile Phase^{a)} on the Capacity Factor of I⁻

Ion-pairing reagent ^{b)}	CD				
	None	α -CD	β -CD	γ -CD	DM- β -CD
Hexylammonium	5.10	3.33	3.33	3.90	0.96
Heptylammonium	12.18	6.68	7.82	7.94	2.05
Octylammonium	26.68	14.63	16.15	20.79	5.10

a) 2 mM alkylammonium phosphate (pH 4.0) containing 2 mM CD.

b) Added as phosphate salts.

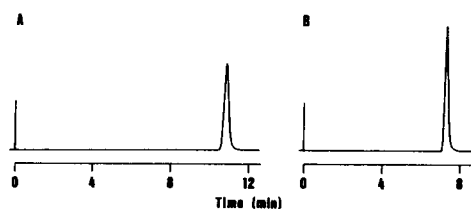


Fig. 6. HPLC Chromatograms of I⁻

Mobile phase: (A) 2 mM heptylammonium phosphate (pH 4.0); (B) 2 mM heptylammonium phosphate (pH 4.0) containing 2 mM β -CD. For other conditions, see Experimental.

I⁻の保持は、移動相にCDを添加することによって減少したが、減少の割合はCDの種類によって異なった。すなわち、グルコースの重合度が小さいCDを、またメチル化したCDを使用したときに保持は大きく減少した。

I⁻の保持のメカニズム CDを添加した移動相を用いた場合のI⁻の保持のメカニズムを、動的イオン交換モデルで考察することにした。このモデルでは、CDを添加していない移動相でのI⁻の保持は、次のような二つの重要な平衡によって支配されていると考える。(1) 非極性固定相表面へのイオンペアー試薬と対イオンの吸着、(2) 対イオンとI⁻のイオン交換。

そして、移動相にCDを添加すると、CDとイオンペアー試薬、CDとI⁻、あるいはCDと固定相との相互作用が新たな平衡過程として保持機構に組み込まれて、I⁻の保持に影響を及ぼすと考えられる。

CDとイオンペアー試薬が包接複合体を形成することはMiyajimaら²⁷⁾の研究から示唆される。彼らは、 α -CDと β -CDが、hexylammonium, heptylammoniumあるいはoctylammonium塩と水中で1:1の複合体を形成することを報告した。CDがアルキルアンモニウム (AA) 塩と複合体を形成するなら、AA-CDの複合体がイオンペアー試薬として機能することになるが、このイオンペアー試薬の疎水性はもとのAAよりも小さくなると考えられる。それは、AAがCDの空洞内にvan der Waals力や疎水的な相互作用によって包接されるが、CD分子の外側は親水性であるからである。その結果、固定相表面に吸着するイオンペアー試薬の量が減少し、I⁻の保持は減少すると考えられる。CDの分子種に対するI⁻の保持の減少の違いは、形成される複合体の安定性と疎水性の違いによる。しかしながら、 γ -CDを添加したときI⁻の保持が減少することは、イオンペアー試薬の疎水性の減少からは説明することができなかった。それは、 γ -CDが、hexylammonium, heptylammoniumあるいはoctylammonium塩とは包接複合体を形成しないからである。

一方、 α -CD、 β -CDおよび γ -CDは、水溶液中でI⁻と包接複合体を形成することも知られている。²⁸⁾ これらのCDがI⁻と複合体を形成するなら、I⁻-CD複合体が溶質イオンとして働くことになるが、この溶質のイオンの特性はI⁻と異なると考えられる。それは、I⁻の電荷が複合体形成によって遮蔽されるからである。その結果、溶質イオンとイオンペアー試薬とのイオンの相互作用が弱まり、I⁻の保持が減少すると考えられる。CDの分子種に対するI⁻の保持の減少の違いは、形成される複合体の安定性とイオンの特性の違いによる。

DM- β -CDがAA塩やI⁻と包接化合物を形成するかどうかは報告されていないが、このCDを使用したときに、I⁻の保持が著しく低下することは、上述の説明とは別の保持機構を考える必要がある。CDのメチル化は、CDの化学的あるいは物理的性質に大きな変化をもたらす。通常、CDは逆相の固定相に保持されないが、メチル化したCDでは疎水性が増加するために、固定相への吸着が無視できなくなる。²⁹⁾ そして、DM- β -CDが非極性な固定相に吸着して表面を覆うと、固定相の極性は元の極性よりも大きくなると想像される。その結果、固定相表面上のイオンペアー試薬の疎水的な吸着が弱まり、I⁻の保持が減少すると考えられる。

このように、CDとイオンペアー試薬、CDとI⁻そしてCDと固定相との相互作用の可能性が示されたが、実際にはこれらの相互作用が複合的に働いてI⁻の保持が減少すると考えられる。

移動相のpHの影響 pH 3.0から7.0のheptylamineから成る移動相を用いて、 I^- の保持に対する移動相のpHの影響を調べた (Fig. 7) .

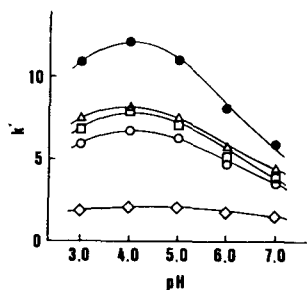


Fig. 7. Effect of Mobile Phase pH on the Capacity Factor of I^-

Mobile phase: 2 mM heptylammonium phosphate containing 2 mM (○) α -CD, (□) β -CD, (△) γ -CD, (◇) DM- β -CD or (●) no CDs.

CDを添加していない移動相では、pH 4.0で I^- の保持が最大になった。また、CDを添加した移動相でも同じ結果が得られた。そのため、CDは I^- の保持の大きさには影響するが、pHに対する保持挙動のプロフィールには影響しないことが明らかになった。

CDの濃度の影響 heptylamineから成る移動相に、種々の濃度のCDを添加して、 I^- の保持に対するCDの濃度の影響を調べた (Fig. 8) .

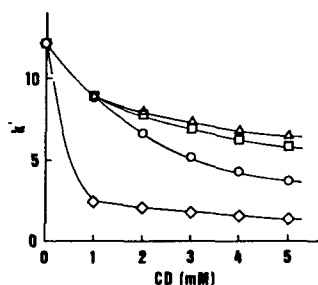


Fig. 8. Effect of CD Concentration on the Capacity Factor of I^-

Mobile phase: 2 mM heptylammonium phosphate (pH 4.0) containing (○) α -CD, (□) β -CD, (△) γ -CD or (◇) DM- β -CD.

この実験条件では、heptylammoniumとCDのモル比は1：0.5から1：2.5の割合で変化する。I⁻の保持はCDの濃度が増加するに従って減少した。これは、CDの濃度が増加することによって、CDとheptylammoniumあるいはCDとI⁻との複合体の形成が増加し、またDM-β-CDの固定相への吸着が増加するからであると考えられる。これらのCDは、CD1分子とheptylammonium1分子、あるいはCD1分子とI⁻1分子からなる1：1複合体を形成すると推測されるが、他の比率の複合体を形成することも否定はできなかった。

I⁻の定量性 CDを添加した移動相（2 mM heptylammonium phosphate (pH 4.0) containing 2 mM β-CD）を使用してI⁻の定量性を検討した。CDを添加した溶液中でもI⁻の吸収極大の波長はほとんど変化しなかったため、検出波長は226 nmに設定した。

実験の部に記した方法で作成したピーク高さ法による検量線は、25 pmol (3.2 ng) から12.5 nmol (1.6 μg) の範囲で良好な直線性を示すことを確認した。検出限界は0.5 pmol (63.5 pg) (S/N = 3, 0.005 AUFS) であった。

第2章 固相抽出法によるヨウ素イオンの前処理法

【要旨】 本章では、実試料を分析する場合に重要な I^- の固相抽出法による前処理について検討した。最初に、アミノプロピルシリカを充填した陰イオン交換カラム（Bond Elut NH₂ (BE-NH₂)) による固相抽出の基本的な操作を、標準試料を用いて検討した。その結果、固相に I^- を保持させる操作では、試料の液性を酸性に調整する必要があることを明らかにした。また、固相から I^- を遊離させて回収する操作では、高濃度のアンモニアを溶離液として溶出するのが最も効果的であることを明らかにした。さらに、回収した I^- をHPLCで定量する場合、溶離液に由来するアンモニウムイオンが定量を妨害することを指摘し、この妨害を避けるために、陽イオン交換カラム（AG-50）で脱アンモニウム処理する方法を考案した。そして、最適化した固相抽出の操作で、良好な回収率と再現性で I^- を処理して定量できることを示した。

一方、この固相抽出法に基づいて、エチレンジアミン・N-プロピルシリカを充填した陰イオン交換カラム（Bond Elut PSA）を使用する I^- の固相濃縮法を検討し、ヨウ素含有試料中のヨウ素を高感度で定量するために応用した。すなわち、酸素フラスコ燃焼法で試料を分解し、種々の化学形態で存在しているヨウ素を I^- として吸収液に捕捉させたあと、この I^- を固相濃縮してから逆相HPLCで定量することによって、試料中の微量ヨウ素を定量を可能にした。固相濃縮の操作は、基本的にはBE-NH₂による固相抽出法と同じであったが、吸収液中の I^- を固相に保持させるには、吸収液の液性を酸性に調整しただけでは、十分な保持が得られなかった。これは吸収液中の大量の陽イオンによって I^- の保持が妨害されるからである。そこで、吸収液を陽イオン交換カラム（AG-50）を通し、陽イオンを除去してから固相処理する方法を考案した。そして、標準の2-iodobenzoic acid (IBA) を使用して、酸素フラスコ燃焼法と固相濃縮法によるヨウ素の定量性を評価した。その結果、微量のIBAからでも、良好な回収率と再現性でヨウ素を定量できることを確認し、微量ヨウ素の定量に対する本法の有用性を示した。この分析法は、ヨウ素化蛋白質（thyroglobulin）とヨード強化卵のヨウ素を定量するために応用した。どちらの試料も、燃焼分解により得られた I^- を約8倍から20倍濃縮することによって、良好な定量結果が得られることを確認した。

HPLCによる I^- の分析は、臨床化学や食品化学など幅広い分野での利用が期待できるが、実試料に適用する場合、試料の夾雑物の除去や濃縮など、前処理の操作が不可欠である。近年、分析試料の前処理操作を簡便・迅速化するために、小型の充填済みカラムを用いる固相抽出法が採用されるようになってきた。この前処理法は、すぐれた回収率や再現性が得られるため、急速に普及してきた。

I^- の分析に対しても、固相抽出法は高い実用性を有していると考えられる。そこで本章では、 I^- の固相抽出法について検討することにした。

2・1 陰イオン交換カラムを用いる固相抽出法

固相抽出法は、試料溶液を固相抽出カラムに流し込むことによって分析目的物質を固相に保持させ、次に、同時に保持された試料マトリックス中の不要成分を適当な洗浄液で固相から洗い流し、最後に、分析目的物質を適当な溶離液で固相から溶出させて選択的な抽出や濃縮を行う方法である。³⁰⁾ 固相への分析目的物質の保持には、非極性相互作用、極性相互作用、そしてイオン交換相互作用の三種類の方法が利用されているが、I⁻を処理する場合、イオン交換相互作用の適用が最適であると考えられる。そこで、アミノプロピルシリカを充填した陰イオン交換カラム (Bond Elut NH₂ (BE-NH₂)) を使用する固相抽出法について検討することにした。

Hurst³¹⁾は、血清中のI⁻を定量するためにBE-NH₂を使用した。その実験では、血清を水で希釈したのち、アセトニトリルを加えて除蛋白した試料をBE-NH₂に流し込み、I⁻を固相に保持させた。そして、0.2 N KH₂PO₄を流して固相からI⁻を遊離させて回収し、これをHPLCで分析した。その結果、良好な回収率 (93%) でI⁻を定量することができたと報告している。しかしながら、著者らの実験では、Hurstの方法に従って試料を処理しても、I⁻をこのように高い回収率で定量することはできなかった。そして、この操作方法には多くの疑問があることが明らかになった。そこで、BE-NH₂を使用したI⁻の固相抽出法を標準試料で再検討し、最適化することを試みた。

2・1・1 実験の部

試薬および標準液 1) 試薬 —— ヨウ化カリウム (KI), 水酸化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム溶液 (0.5 M, 液体クロマトグラフ用) は和光純薬製のものを使用した。その他の試薬は市販の精密分析用あるいは特級規格のものを使用した。HPLCの移動相は蒸留水と液体クロマトグラフ用のアセトニトリル (MeCN) を使用して調製した。

2) ヨウ素標準液 —— KIを水に溶解して10 mMの標準液を調製し、これを水で所定の濃度まで順次希釈した。

装置および器材 高速液体クロマトグラフは、6000A型ポンプ (ウォーターズ), NS-310A型波長可変紫外分光検出器 (日本精密科学), U6K型ユニバーサルインジェクター (ウォーターズ) およびVP-6511Wペンレコーダー (松下情報工業) より構成した。分離カラムはNova-Pak C₁₈ Radial-Pak cartridge (4 μm,

5 mm i. d. × 100 mm) (ウォーターズ) を使用した。固相抽出用のカラムであるBE-NH2 (500 mg充填) はアナリティケムインターナショナルから、陽イオン交換樹脂AG50W-X8 (200-400 メッシュ) はバイオラッドから入手した。

固相のコンディショニング BE-NH2は、メタノール5 ml、水5 mlおよび試料の希釈溶媒5 mlを順次流し、コンディショニングした。陽イオン交換カラム (AG-50) は、あらかじめスルホン酸基をH型に変換した陽イオン交換樹脂AG50W-X8 1 mlを充填して作製してから、水5 mlを流してコンディショニングした。

HPLCによるI⁻の分析 移動相 (MeCN-5 mM tetrabutylammonium phosphate (pH 4.0) (25:75, v/v)) の流速は1.0 ml/minに、また検出波長は225 nmに設定し、試料およびヨウ素標準液5 μlを注入して分析した。定量はピーク高さによる絶対検量線法で行った。

2・1・2 結果および考察

固相へのI⁻の保持 最初に、I⁻をBE-NH2に保持させる方法について検討した。通常、試料は適当な溶媒で希釈してから固相に流し込むが、I⁻の固相への保持は、希釈溶媒によって影響を受ける。イオン交換相互作用を使用する場合、希釈溶媒による試料のpHの調整が特に重要になる。そこで、ヨウ素標準液を種々のpHの溶媒で希釈してからBE-NH2に流し込み、固相へのI⁻の保持を比較した。この実験では、1 mM ヨウ素標準液0.5 mlを、水または10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液4.0 mlで希釈してからBE-NH2に流し込んでろ液を集め、このろ液中のI⁻をHPLCで定量してBE-NH2へのI⁻の保持率を求めた (Table II)。

Table II. Retention of I⁻ on Bond Elut NH2

Dilution Solvent	Retention (%) ^{a)}
H ₂ O	29.5
Acetate buffer (pH 6.7)	68.8
Acetate buffer (pH 6.0)	76.1
Acetate buffer (pH 5.0)	100.0
Acetate buffer (pH 4.0)	100.0

a) Mean (n = 5).

I⁻を水やpH 6以上の酢酸緩衝液で希釈した場合には、固相に十分保持させることができなかつた。一方、pH 5以下の酢酸緩衝液で希釈した場合には、固相に完全に保持させることができた。この結果から、I⁻をBE-NH₂に保持させるためには、試料の液性を酸性に調整する必要があることが明らかになった。

固相からのI⁻の回収 次に、BE-NH₂に保持させたI⁻を回収する方法について検討した。この実験では、まず、1 mM ヨウ素標準液0.5 mlを10 mM 酢酸4.0 mlで希釈した試料をBE-NH₂に流しこみ、I⁻を固相に保持させた。次に、このBE-NH₂に、種々の濃度のアンモニウム塩溶液から成る溶離液を1 mlずつ2回流し、溶出液を集めた。この溶出液は、AG-50を通し（この操作の理由は後で述べる）てから、水を加えて5 mlとしたのち、遊離してきたI⁻をHPLCで定量してBE-NH₂からのI⁻の回収率を求めた（Table III）。

Table III. Recovery of I⁻ from Bond Elut NH₂

Salt in eluent	Recovery (%) ^{a)}		
	Concentration of salt		
	0.05 M	0.10 M	0.50 M
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.0	69.0	74.8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	75.4	83.7	89.7
(NH ₄) ₃ PO ₄	80.4	89.8	94.1
NH ₄ OH	0.0	0.0	92.5

a) Mean (n = 5).

溶離液には0.05 M、0.10 Mまたは0.50 MのNH₄H₂PO₄、(NH₄)₂HPO₄、(NH₄)₃PO₄またはNH₄OHを使用した。固相からのI⁻の回収率は、pHの高い、高濃度の溶離液を使うほど高くなった。90%以上の回収率を得るためには、0.5 M (NH₄)₃PO₄または0.5 M NH₄OHを使用する必要があるがった。

共存イオンの影響 固相から回収したI⁻の溶出液には、溶離液に使用した塩（または塩基）が含まれている。これらの塩がI⁻の定量に及ぼす影響を調べるために、1 mMヨウ素標準液0.5 mlに0.1 Mあるいは0.5 Mの塩の溶液2 mlを添加し、さらに水を加えて5 mlとした試料をHPLCで分析した。そして、得られたI⁻のピーク高さを、塩を添加していない試料のI⁻のピーク高さと比較して、相対値（回収率）で示した（Table IV）。

Table IV. Effects of Foreign Salts
on the Determination of I⁻

Salt	I ⁻ found (%) ^{a)}	
	Concentration of salt	
	0.1 M	0.5 M
NH ₄ H ₂ PO ₄	99.7	82.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	78.2	5.6
(NH ₄) ₃ PO ₄	38.1	3.6
NH ₄ OH	82.4	4.8
CH ₃ COOH	100.1	100.3
H ₃ PO ₄	98.9	97.7

a) Mean (n = 5).

I⁻のピーク高さは、リン酸アンモニウムやアンモニアを添加することによって減少した。この減少の割合は、pHの高い、高濃度の塩を添加したとき大きくなった。一方、比較のために、酸（酢酸またはリン酸）を添加した試料も分析したが、I⁻のピーク高さはほとんど変化しなかった。よって、HPLCによるI⁻の分析は、試料中にアンモニウムイオン（NH₄⁺）が共存すると、妨害を受けることが明らかになった。そのため、BE-NH₂からアンモニウム塩の溶離液で溶出したI⁻は、HPLCに直接注入しても、正確に分析できないという重要な問題が指摘された。

そこで、NH₄⁺の妨害を避ける方法を検討したところ、BE-NH₂からの溶出液を陽イオン交換カラムのAG-50を通してNH₄⁺を除く方法が有効であった。たとえば、1 mM ヨウ素標準液0.5 mlに0.5 M NH₄OH 2.0 mlを添加した試料を、AG-50を通してから分析したところ、97%の回収率でI⁻を分析することが可能になった。

固相抽出の標準操作法 このような実験結果から、I⁻をBE-NH₂で固相抽出処理するための最適化した操作法として次のような方法を確立した。1) 試料は10 mM酢酸で希釈して液性を酸性に調整してからBE-NH₂に流し込み、I⁻を固相に保持させる。2) 保持させたI⁻は、固相に1 M NH₄OH 1 mlを2回流して回収する。3) 回収した溶出液は、陽イオン交換カラムAG-50を通してNH₄⁺を除去してから、HPLCでI⁻を分析する。この方法で標準のI⁻を固相抽出したところ、98.0 ± 1.7% (n = 5) の良好な回収率と再現性でI⁻を処理して定量できることが明らかになった。

2・2 固相濃縮法を利用した微量ヨウ素の定量

ヨウ素含有試料中のヨウ素を定量するには、試料を何らかの方法で分解して、種々の化学形態で存在するヨウ素を単一の定量可能な形態に変換する必要がある。日本薬局方に制定されている酸素フラスコ燃焼法³²⁾は、簡単な装置を使って試料を迅速に分解できる利点を持ち、すべてのヨウ素化合物はI⁻として吸収液に捕捉される。長島ら¹⁹⁾は数mgほどの有機ヨウ素化合物を酸素フラスコ燃焼法で分解した後、捕捉されたI⁻をUV検出法による逆相HPLCで直接定量することにより、高感度で精度の高いヨウ素の分析が可能になることを示した。

本研究は、長島らの方法を発展させたものであるが、より微量のヨウ素の分析に対処するために、酸素フラスコ燃焼法により得られたI⁻を陰イオン交換カラムによる固相濃縮法で予備濃縮してからHPLCで分析する方法を検討した。この分析法はthyroglobulin (TG) とヨード強化卵 (I卵) のヨウ素の定量に応用した。

2・2・1 実験の部

試薬、吸収液および標準液 1)試薬 —— ヨウ化カリウム (KI) , 抱水ヒドラジン (特級) および水酸化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム溶液 (0.5 M, 液体クロマトグラフ用) は和光純薬製のものを、2-iodobenzoic acid (IBA) (元素分析用) はメルク製のものを使用した。その他の試薬は市販の精密分析用あるいは特級規格のものを使用した。HPLCの移動相は蒸留水と液体クロマトグラフ用のアセトニトリル (MeCN) を使用して調製した。

2)酸素フラスコ燃焼法の吸収液 —— 1 Mヒドラジン水溶液を調製し、これを5 mM水酸化ナトリウム溶液で希釈して20 mMヒドラジン溶液として調製した。

3)ヨウ素標準液 —— 本章2・1・1に記載した方法で調製した。

4)IBA標準液 —— IBAをエタノールに溶解して10 mMの標準液を調製し、これをエタノールで所定の濃度まで順次希釈して調製した。

試料 TG (porcine由来) はシグマ製のものを使用した。I卵 (日本農産工業) と普通卵は1990年2月に市場にて販売されたものを使用した。

装置および器材 化学天秤は分析用上皿電子天秤AE163 (メトラー) を、燃焼フラスコは500 mlの容量のパイレックス製のものを、ホモジナイザーはポリトロン超高速ホモジナイザーCPU-2 (キネマチカ) を使用した。高速液体クロマトグラフは、レコーダーにsicクロマトコーダー12 (システムインスツルメンツ) を使用したほかは、本章2・1・1に記載した装置で構成した。分離用のカラム

はNova-Pak C₁₈ Radial-Pak cartridge (4 μm, 5 mm i. d. × 100 mm) (ウォーターズ) を使用した。固相抽出用のカラムであるBond Elut PSA (BE-PSA) (100 mg 充填) は アナリテイケムインターナショナルから、陽イオン交換樹脂AG50W-X8 (200-400メッシュ) はバイオラッドから入手した。

分析法 1)TGの燃焼分解 —— 日本薬局方記載の方法³²⁾に準じて行った。まず、TG約2 mgを所定のろ紙(東洋ろ紙No. 6)上に精密に量りとり、包み込んでから共栓先端の白金かごに入れた。フラスコには吸収液20 mlを入れ酸素を充填した。次に、ろ紙に点火してフラスコ内で試料の分解を行った。分解後、吸収液をビーカーに移し、さらにフラスコの内壁や共栓を少量の水で洗い、洗液も吸収液に合わせて検液とした。

2)I 卵の燃焼分解 —— I 卵の殻を除き、卵黄と卵白を分けて重量を量り、それぞれを等量のエタノールでホモジナイズしてから、ホモジネートを燃焼用の試料とした。酸素フラスコの共栓の白金網に約10 mgの脱脂綿を詰め、共栓の取っ手の部分を下にして白金網を上に向けて天秤の秤量皿に立て、その風袋をゼロに設定した。100から150 mg位の燃焼試料をすばやく脱脂綿に吸収させ、その重量を精密に量った。フラスコには吸収液20 mlを入れ、酸素を充填した。縦50 mm、横3 mmほどのろ紙片を点火部として白金網と脱脂綿の間にはさみ込み、ろ紙に点火してフラスコ内で試料の分解を行なった。分解後、吸収液をビーカーに移し、さらにフラスコの内壁や共栓を少量の水で洗い、洗液も吸収液に合わせて検液とした。

3)固相抽出法によるI⁻の濃縮 —— あらかじめスルホン酸基をH型に変換したAG50W-X8 1 mlを充填したカラム (AG-50) を作製し、水を流してコンディショニングした。またBE-PSAは、メタノール1 mlと0.01 M酢酸1 mlを順次流してコンディショニングした。これらのカラムはアダプターを使用して連結し、上部にはリザーバーをとりつけた (Fig. 9)。

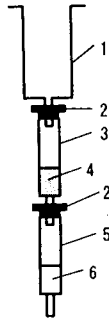


Fig. 9. Connection of Columns for Solid-Phase Preconcentration

1, reservoir; 2, adapter; 3, AG-50; 4, packing (AG 50 W-X 8); 5, BE-PSA;
6, packing (Bondesil PSA).

燃焼により得られた検液は、1M 酢酸0.5 mlを添加してからリザーバーへ流し込み、吸引ろ過法でカラムを順次通過させ、BE-PSAの固相上にI⁻を保持させた。次にBE-PSAをはずし、これに1 Mアンモニア水0.5 mlを2回流して、I⁻を遊離させて回収した。この回収液は、I⁻の定量を妨害するNH₄⁺除くために別のAG-50を通してからメスフラスコに集め、TGの分析では5 mlに、I 卵の分析では2 mlに水を加えてメスアップし、HPLC用の試料とした。

4)HPLCによるI⁻の定量 —— I⁻の分析は、Fig. 10またはFig. 11に記した条件で、濃縮処理した試料10 μlまたはヨウ素標準液10 μlを注入して行った。定量はピーク面積による絶対検量線法で行った。どちらの分析条件でも0.64 ngから1.27 μgまでのI⁻の定量性を確認した。検出限界は約0.2 ng (S/N = 5)であった。

2・2・2 結果および考察

固相抽出法によるI⁻の濃縮 本実験では、試料の燃焼分解に20 mlの吸収液を使用したが、これは分解後にフラスコの洗液と合わせて回収するため、最終的な検液の液量は40 ml近くに増量する。そこで、吸収液20 mlに水20 mlと1 mM ヨウ素標準液50 μ lを加えて人工の標準検液を調製し、これを用いてI⁻の濃縮を検討することにした。

固相抽出カラムは陰イオン交換体のエチレンジアミン-N-プロピルシリカを充填したBE-PSA³⁰⁾を使用した。固相濃縮の基本的な操作は、本章2・1・2に記載したBE-NH₂の場合と同じであったが、吸収液中のI⁻を固相に保持させるとき、単に吸収液の液性を酸性に調整しただけでは、十分な保持が得られなかった。これは、検液中に大量に存在するNa⁺やヒドラジンの陽イオンがI⁻とイオン対を形成し、I⁻と陰イオン交換体とのイオン交換反応を妨害するからである。そこで、これらの陽イオンを除去するために、Fig. 9のように検液をあらかじめ陽イオン交換カラム (AG-50) を通してからBE-PSAに流し込む方法を考案した。なお、アルカリ性の検液は少量の酢酸を添加しておけばAG-50を通したときに酸性に変化するので、本法では検液のpH調整は行わなかった。そして、実験の部に記載したような濃縮方法を定め (メスアップの容量は5 ml)、標準検液を処理したところ、94.7 \pm 1.5% (n = 5) の良好な回収率と精度でI⁻を濃縮できることが示された。この場合、約40 mlの標準検液は最終的には5 mlまで濃縮されたので、約8倍の濃縮効果を得ることができた。

標準試料のヨウ素の定量 前述の濃縮法を適用して標準試料のヨウ素の定量を試みた。標準試料は、長島らによって定量の行われたIBAを使用した¹⁹⁾が、濃縮による定量性を評価するため、試料量を既報¹⁹⁾の10分の1から1000分の1程度に減らして分析を行った。この場合、試料を天秤で量り取ることは困難であったので、0.1, 1および10 mMのIBA標準液をそれぞれ50 μ lずつろ紙にしみこませて、1.24, 12.4および124 μ gのIBAを量り取った後、実験の部に記載の方法 (メスアップの液量は5 ml) に従って分析を行った (Table V)。

Table V. Determination of Binding Iodine in IBA^{a)}

IBA taken (μg)	Found (%)	Recovery (%)
1.24	46.6 \pm 1.4 ^{b)}	91.0 \pm 2.7 ^{b)}
12.4	47.8 \pm 1.2	93.4 \pm 2.3
124	48.9 \pm 0.7	95.5 \pm 1.4

a) Iodine content in IBA is 51.2%.

b) Mean \pm S. D. (n = 5).

ヨウ素の測定値は、IBAの量が少なくなるほど理論値（51.2%）よりも小さくなる傾向がみられた。しかしながら、90%以上の回収率が得られていること、また、繰り返し測定における再現性も良好であることから、本法は、微量の試料に対する高感度なヨウ素の分析法として十分実用性があると結論した。一方、I⁻のHPLCの定量下限（0.64 ng）から考えると、IBA 1.24 μg がほぼ本分析法の試料の下限量となる。この試料量では、I⁻を濃縮しないで分析することは不可能であった。また、濃縮率をもっと上げることによって、1.24 μg よりも少ないIBAからヨウ素を定量することは可能になると考えられる。

TG中のヨウ素の定量 TGは甲状腺に存在するヨウ素化蛋白質の一つであるが、ヨウ素含量は1%程度²⁾とIBAよりも低いために、数mgほどの試料量ではHPLCによる高感度な分析手段を用いても定量下限に近い領域でI⁻を分析しなければならない問題点が指摘された。一方、試料量を増やすことによって十分定量可能な範囲でI⁻を分析することはできるが、TGのような貴重な生物試料を、破壊分析のために多量消費することは望ましいことではない。そこで、TGの試料量を少量化して分析を行うために固相濃縮法を適用することにした。本実験では、通常天秤で量り取ることのできる最少量（2 mg程度）のTGを用いて分析を行った。

実験の部に記載した方法に従ってTGのヨウ素の定量を行った。ここでも約8倍の濃縮効果を得ることができた。Fig. 10はTGを分解して濃縮処理した試料をHPLCで分析したクロマトグラムを示す。

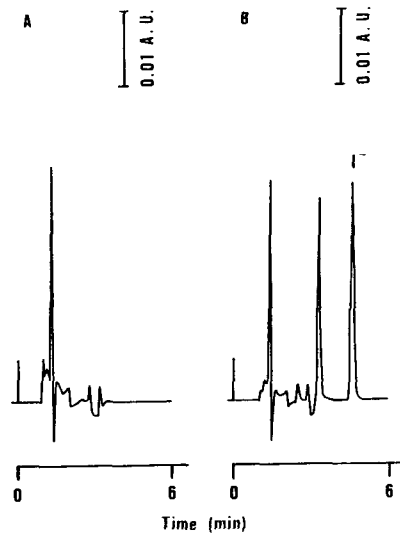


Fig. 10. HPLC Chromatograms of TG after Oxygen Flask Combustion and Solid-Phase Preconcentration

Analytical conditions: column, Nova-Pak C₁₈ (5 mm i. d. × 100 mm); mobile phase, MeCN-5 mM tetrabutylammonium phosphate (pH 4.0) (25:75, v/v); flow rate, 1.0 ml/min; detection, UV at 225 nm. Sample: A, blank (filter-paper); B, oxygen flask combusted sample of TG (2.23 mg).

ブランクはろ紙だけを燃焼して濃縮処理した試料を注入したが、I⁻の溶出する位置に定量の妨害となるピークは存在しなかった。TGの分解試料ではI⁻を十分な感度で検出することができた。そして、TG中のヨウ素の含量として0.89 ± 0.01% (n = 5) の測定値を得た。この値は表示値 (約1%) ならびに既存の報告値²⁾ とほぼ一致し、妥当なものと考えられる。さらに、TGを秤量後、ろ紙に10 mMのIBA標準液20 μlをしみ込ませてIBA 49.6 μg (ヨウ素量として25.4 μg) を添加して結合ヨウ素の添加回収実験を行ったところ、94.6 ± 1.1% (n = 5) の良好な回収率が得られ、本法の信頼性が確かめられた。

I 卵中のヨウ素の定量 近年、健康食品として市販されているI卵は、海草粉末などを添加することによって飼料中に強化したヨウ素分を鶏体を介して移行させた鶏卵で、普通卵に比べ約20倍のヨウ素を含有し、抗アレルギー作用や抗高脂血症作用を示すことが報告されている。³³⁾ I卵のヨウ素量を求める簡単な分析法を確立することは、ヨウ素の過剰摂取に対する安全性の評価や生産業者の品質管理などの面から必要である。そこで、酸素フラスコ燃焼法とHPLCによるI卵のヨウ素の定量法を検討することにした。

I 卵の分解を実施する場合、分解により得られるI⁻の量を考えると、燃焼可能な範囲で出来るだけ多くの試料を分解する必要があった。本法では500 mlの酸素フラスコを使用した。この容器で分解できる試料の量は100 mg位までである。^{34, 35)} しかしながら、I 卵は水分を多く含むために数十mg以下の試料でも直接燃焼分解することは困難であった。そこで、I 卵の燃焼分解を容易にするために、燃焼補助剤としてエタノールを使用することにした。この方法では、I 卵の卵黄や卵白に等量のエタノールを加えてホモジネートを調製し、これを燃焼試料として分解した。その結果、150 mg位までのホモジネート（すなわち75 mg位までの卵黄や卵白）を完全燃焼させることが可能となった。しかしながら、150 mgの燃焼の限界に近い試料を分解しても、吸収液に捕捉されるI⁻の量は定量に十分ではなかった。さらに吸収液のI⁻を予備濃縮することによって、I⁻の定量を高感度化することを試みた。

実験の部に記載した方法に従ってI 卵のヨウ素の定量を行った。この方法では、約40 mlの検液を最終的には2 mlにメスアップしたので、約20倍の濃縮効果を得ることができた。Fig. 11はI 卵と普通卵の燃焼試料の分析例を示した。

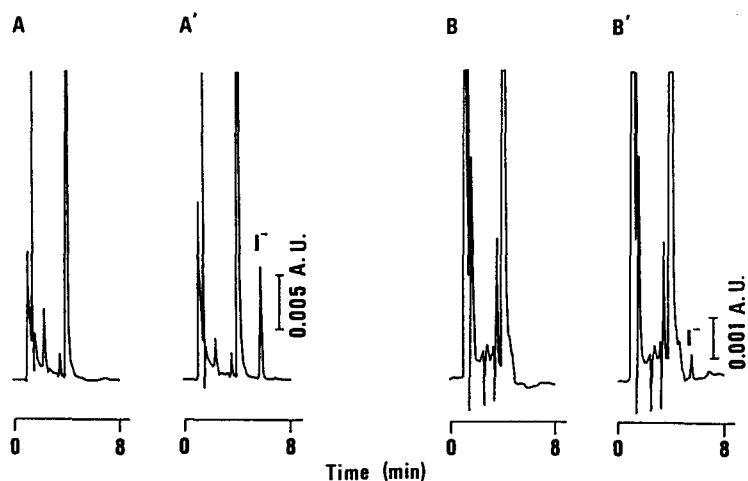


Fig. 11. HPLC Chromatograms of Iodine-Enriched Egg (IE) and Ordinary Egg (OE) after Oxygen Flask Combustion

Analytical conditions: column, Nova-Pak C₁₈ (5 mm i. d. × 100 mm); mobile phase, MeCN-5 mM tetrabutylammonium phosphate (pH 4.0) (20:80, v/v); flow rate, 1.0 ml/min; detection, UV at 225 nm. Sample: A, egg yolk (OE); A', egg yolk (IE); B, egg white (OE); B', egg white (IE). Iodine found: A', 18.0 ng; B', 1.2 ng.

普通卵の卵黄と卵白のクロマトグラムにはI⁻のピークは認められなかったが、I 卵の卵黄と卵白のクロマトグラムでは他のピークに妨害されることなくI⁻のピークを検出することができた。

Table VI. Determination of Iodine in Iodine-Enriched Egg

Sample	Run	Homogenate taken (mg)	Content ($\mu\text{g/g}$ of sample)		
			Found	Mean (C. V., ^{a)} %)	
Egg yolk	1	95	76.2	76.2	(2.5)
	2	114	79.5		
	3	103	75.1		
	4	89	75.6		
	5	134	74.6		
Egg white	1	123	3.8	3.9	(5.1)
	2	140	4.0		
	3	108	4.2		
	4	111	3.7		
	5	112	3.9		

a) Coefficient of variation.

I 卵のヨウ素の定量結果をTable VIに示した。この実験では、同一の卵黄と卵白に含まれるヨウ素をそれぞれ5回づつ繰り返して分析した。その結果、このI 卵の卵黄と卵白1 g当りには、それぞれ76.2 μg と3.9 μg のヨウ素が含まれていることが明らかになった。また、繰り返し分析による変動係数は卵黄で2.5%、卵白で5.1%であり、再現性は十分であった。本法のヨウ素の検出限界は、燃焼試料の採取量を100 mgとした場合、卵黄または卵白1 g当り1 μg であった。

Table VII. Recovery of Iodine^{a)} Added to Iodine-Enriched Egg

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Found ^{b)} ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	(C. V., ^{c)} %)
Egg yolk	0	43.9	-	
	5.1	48.5	90.2	(1.3)
	20.3	62.4	91.1	(2.3)
	101.6	137.0	91.6	(1.9)
Egg white	0	1.6	-	
	5.1	6.1	88.2	(3.2)
	20.3	19.8	89.7	(2.3)
	101.6	94.4	91.3	(1.5)

a) Added as 2-iodobenzoic acid (IBA). b) Mean (n = 4).

c) Coefficient of variation.

I 卵の卵黄と卵白の各1 g当りに、5 μg から102 μg に相当するヨウ素を含有するIBAの標準品を添加して、回収試験を行った (Table VII)。

どちらも良好な回収率が得られ、また回収率の再現性も良好であった。

このような検討から、I 卵のヨウ素の定量に対して、本法は十分実用性があると結論した。本研究で開発した定量法を用いて市販のI 卵のヨウ素量を調査した結果をTable VIIIに記した。

Table VIII. Determination of Iodine in Iodine-Enriched Eggs^{a)}

Egg yolk				Egg white				Whole egg
Sample No.	Wet weight (g)	Iodine		Sample No.	Wet weight (g)	Iodine		Iodine Total (mg)
		Found (µg/g)	Total (mg)			Found (µg/g)	Total (mg)	
Y- 1	16.2	58.9	0.954	W- 1	31.5	2.6	0.082	1.036
Y- 2	17.3	69.7	1.206	W- 2	37.0	2.9	0.107	1.313
Y- 3	17.1	40.0	0.684	W- 3	34.9	2.2	0.077	0.761
Y- 4	18.2	77.6	1.412	W- 4	34.4	3.9	0.134	1.546
Y- 5	14.9	84.0	1.252	W- 5	37.9	2.3	0.087	1.339
Y- 6	17.9	67.0	1.199	W- 6	36.4	3.2	0.116	1.315
Y- 7	14.6	56.2	0.821	W- 7	39.3	3.7	0.145	0.966
Y- 8	13.7	61.4	0.841	W- 8	36.5	1.5	0.055	0.896
Y- 9	13.2	55.0	0.726	W- 9	39.7	2.5	0.099	0.825
Y-10	14.9	59.4	0.885	W-10	38.2	2.8	0.107	0.992
Y-11	16.1	56.5	0.910	W-11	39.5	2.1	0.083	0.993
Y-12	15.5	58.8	0.911	W-12	37.9	1.6	0.061	0.972
Mean		62.0	0.983			2.6	0.096	1.080
S. D.		11.4	0.229			0.7	0.027	0.241

a) Detection limit: 1 µg/g.

第3章 ヨウ素化合物の合成

【要旨】 本章では、ヨウ素化アミノ酸の分析を研究する場合に必要な、ヨードヒスチジンの標品の合成法について検討した。ヨードヒスチジン (monoiodo-histidine (MIH) および diiodohistidine (DIH)) の合成法はすでに報告されていたが、MIHの合成法には純度や収率に難点があり実用的でなかった。そこでMIHの合成法を改良するために、ヒスチジン (His) のヨウ素化の反応条件を検討した。この実験では、反応液中のMIHとDIHをUV検出法による逆相HPLCで分析することによって、反応条件を詳細に検討することを可能にした。そして、Hisを0.2 N NaOH中で、 I_2 -EtOH溶液を使用してヨウ素化した場合、Hisと I_2 を1:1のモル比で反応させたときMIHが、また、1:2のモル比で反応させたときDIHが、それぞれ最高の収率で生成することを明らかにした。さらに、反応液からMIHを回収するために、カラムクロマトグラフィーによる分離・精製法を検討した。そして、陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーで順次処理することによって、反応液からMIHを効果的に分離・精製できることを示した。本合成法によって得られたMIHの純度は高く、収率も良好であった。一方、ヨードヒスチジンの合成条件を検討するために使用したHPLCの手法は、ペプチドのヨウ素化合物の合成にも一般的に適用できると考え、ヨードカルノシン (monoiodocarnosine (MIC) および diiodocarnosine (DIC)) の合成に応用した。そして、カルノシン (Car) を0.5 N NaOH中で、 I_2 -EtOH溶液を使用してヨウ素化した場合、Carと I_2 と1:1のモル比で反応させたときMICが、また、1:2のモル比で反応させたときDICが、それぞれ最高の収率で生成することを明らかにした。また、最適な反応条件で合成したヨードカルノシンを反応液から回収するために、逆相の分取HPLCによる分離・精製法を検討し、純度の高いMICとDICを高収率で合成できることを示した。

甲状腺ホルモンの研究やペプチドのヨウ素化の研究を進める上で、ヨウ素化アミノ酸の分析は重要である。これらの研究で扱われるヨウ素化アミノ酸は、チロシン (Tyr) やサイロニン (T_0) から誘導されるヨウ素化合物である。ヨードチロシンには、monoiodotyrosine (MIT) と diiodotyrosine (DIT) の二つの化合物が存在する。これらの化合物は、甲状腺ホルモンの前駆体として存在し、また、ペプチドをヨウ素化したとき、ヨウ素がTyr残基と反応して生成することから数多く研究されている。また、ヨードサイロニンには、triiodothyronine (T_3) や thyroxine (T_4) などヨウ素の数と位置の異なる多数の化合物が存在する。これらの化合物は甲状腺ホルモン作用を示す物質として重要であることから数多く研究されている。

一方、ヒスチジン (His) から誘導されるヨウ素化アミノ酸 (monoiodo-

histidine (MIH) と diiodohistidine (DIH)) も甲状腺のヨウ素化蛋白質中に存在することが知られている。³⁶⁾ そのため、ヨードヒスチジンの生理活性や生物化学的な特性を調べることは重要である。また、ペプチドをヨウ素化したとき、ヨウ素はHis残基と反応してヨードヒスチジンを生成する⁴⁾ことから、化学修飾等の副生物を確認することも大切なことである。

これらのことを基礎として、ヨードヒスチジンの研究を進めるために、ヨードヒスチジンのHPLCによる分析法を確立しようと考えた。そのために、ヨードヒスチジンの標品を入手する必要があるが、ヨードチロシンやヨードサイロニンは市販の標品を入手することができるのに対し、ヨードヒスチジンは市販品として供給されているものではなく、実験室で合成しなければならなかった。ヨードヒスチジンの合成法は、1947年にBrunings³⁷⁾によって発表された。この方法は、今日まで多数の研究者によって使用されてきた重要な方法である。しかし、この方法は、DIHは比較的容易に合成することができるが、MIHは収率や純度の面で問題が多く、満足すべき標品を得ることができないという問題点を有していた。

そこで本章では、ヨードヒスチジンのHPLC分析に必要な純度の高いMIHの標品を得るために、その合成法について再検討することにした。さらに、ヨードヒスチジンの合成を検討するために使用したHPLCの手法を応用して、ペプチド(カルノシン)のヨウ素化合物を合成することを試みた。

3・1 ヨードヒスチジンの合成

Bruningsは、Hisを0.2 N NaOH溶液中で0.1 N I₂-hexane溶液 (HisとI₂のモル比はおおよそ1:1) を用いてヨウ素化し、32%の収率でMIHの結晶を、また0.5 N NaOH中で0.1 N I₂-hexane溶液 (HisとI₂のモル比はおおよそ1:2) を用いてヨウ素化し、94%の収率でDIHの結晶を得たことを報告している。この方法では、MIHの収率があまり良くなかったが、その原因としてヨウ素化条件が適切でなかったことが考えられる。しかし反応液からのMIHの分離・精製の効率(回収率)が不明であったので、ヨウ素化条件の適否をこの収率から単純に判断することはできなかった。そこで本研究では、Hisを種々の条件でヨウ素化して得られた反応液中のヨードヒスチジンをHPLCで直接分析して、ヨウ素化の条件を調べることにした。また、最適条件で合成したMIHを反応液から効果的に分離・精製するために、カラムクロマトグラフィーを使用した。

3・1・1 実験

試薬および器材 L-His・HCl・H₂O, I₂およびIClは和光純薬製のものを使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。HPLCの移動相は蒸留水と液体クロマトグラフ用のメタノール (MeOH) を使用して調製した。陽イオン交換樹脂Dowex 50W-X4 (200-400 メッシュ) はダウケミカルから、ゲルろ過樹脂Sephadex G-10はファルマシアから、固相抽出用カラムSEP-PAK C₁₈はウォーターズから入手した。薄層クロマトグラフィー (TLC) のプレートはメルク製のDC-Fertigplatten Cellulose (厚さ, 0.1 mm) を使用した。

装置 高速液体クロマトグラフは, 6000A型ポンプ (ウォーターズ), 440型紫外分光検出器 (ウォーターズ), U6K型ユニバーサルインジェクター (ウォーターズ) およびVP-6511W ペンレコーダー (松下通信工業) より構成した。分離カラムはμBondapak C₁₈ (10 μm, 3.9 mm i. d. × 30 cm) (ウォーターズ) を使用した。融点はMP-1型融点測定器 (ヤマト) で測定した。核磁気共鳴 (¹H-NMR) スペクトルは, tetramethylsilane (TMS) を外部標準として, JEOL LNM-FX-100を使用して測定した。

MIHおよびDIH標品の合成 反応条件を検討する際に使用したMIH (塩酸塩) の標品は, 今井³⁸⁾の方法で合成したものを, Dowex 50, AvicelおよびSephadex G-10によるカラムクロマトグラフィーで精製したのち, EtOH-HClより再結晶して得た。DIH (塩酸塩) の標品は, Bruningsの方法で合成したものを, 活性炭で脱色処理したのち, 水から再結晶して得た。mp 198-200°C (dec.)。¹H-NMR (D₂O) δ: 3.24 (2H, d), 4.06 (1H, t)。Anal. Calcd C₆H₈ClI₂N₃O₂: C, 16.48; H, 1.88; N, 9.49. Found: C, 16.25; H, 1.82; N, 9.47。

HPLCによるヨードヒスチジンの分析 His・HCl・H₂O, 250 mg (1.2 mmol) を0.2 N NaOH 75 mlに溶解した。この溶液に氷冷したI₂ (またはICl) 0.6 mmolを攪拌しながら10分間で加え, さらに5分間攪拌してヨウ素化を行った。同様にI₂を5回段階的に添加し, 最終的には3.6 mmol (Hisの3倍量) のI₂を加えた。I₂を添加する度に, 反応液250 μlを取り出し, これに0.2 N HCl 250 μlと水 2 mlを加えてHPLCの試料とした。HPLCによる反応物の分析は, 0.005 M NaH₂PO₄・MeOH (80:20, v/v) を移動相に使用して, 流速1.8 ml/min, 検出波長254 nmで, 試料10 μlを注入して行った。標準試料は, MIH・HCl (0.25 mg/ml H₂O) またはDIH・HCl (0.2 mg/ml H₂O) 10 μlを注入した。

カラムクロマトグラフィー Dowex 50は2,6-lutidineで飽和してからMIHの分離に使用した。SEP-PAK C₁₈はMeOHと水を流してコンディショニングしてから使用した。カラムから溶出したアミノ酸は、各フラクション10 μ lをニンヒドリン反応で発色して検出した。溶出したアミノ酸の確認は、*n*-BuOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 1) を展開溶媒とするTLCで行った。ハロゲンおよびナトリウムイオンは、AgNO₃溶液およびピロアンチモン酸カリウム溶液を使用して検出した。

3・1・2 結果および考察

Hisのヨウ素化条件の検討 Wolffら³⁹⁾は、Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) 中でK¹³¹Iを使用してHisのヨウ素化を行い、MIHとDIHの収率がHisとヨウ素のモル比に依存することを示した。この報告は、ヨードヒスチジンの合成条件を最適化するうえで、重要な指針となる。そこで本研究では、0.2 N NaOH中でHisに種々のヨウ素化試薬を段階的に添加してヨウ素化を行い、各段階で生成したヨードヒスチジンをHPLCで分析して、ヨウ素化試薬の量とMIHおよびDIHの収率の関係を明らかにすることにした。

HPLCによる反応物の分析は254 nmの検出波長で行った。Hisは254 nmの紫外光に対して吸収を示さないが、ヨードヒスチジンは吸収を示すことから、このHPLC分析では生成物だけを検出することができた。

Hisのヨウ素化反応物を、HPLCで分析したクロマトグラムをFig. 12に示した。また、種々のヨウ素化試薬を用いて調べたMIHとDIHの収率をFig. 13に示した。

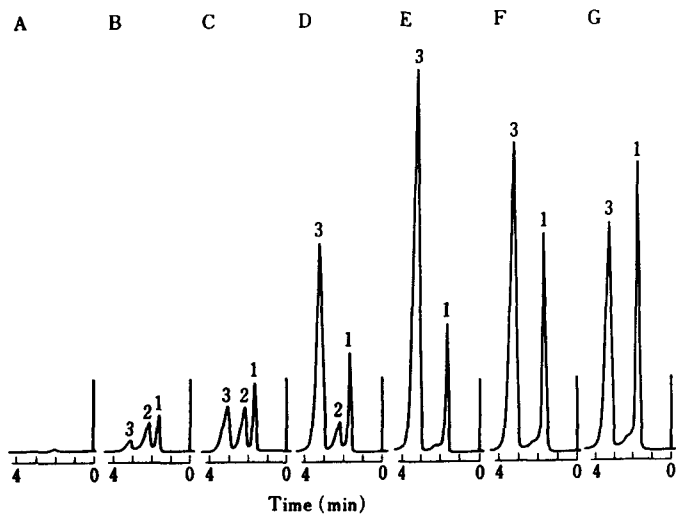


Fig. 12. Effect of the Molar Ratio of Iodine to His on the Formation of MIH and DIH
 Sample: reaction mixture (His iodinated with 0.1 M I_2 -EtOH in 0.2 N NaOH).
 His/ I_2 (molar): A, 1/0; B, 1/0.5; C, 1/1.0; D, 1/1.5; E, 1/2.0; F, 1/2.5; G, 1/3.0.
 Peak identity: 1, I^- ; 2, MIH; 3, DIH.

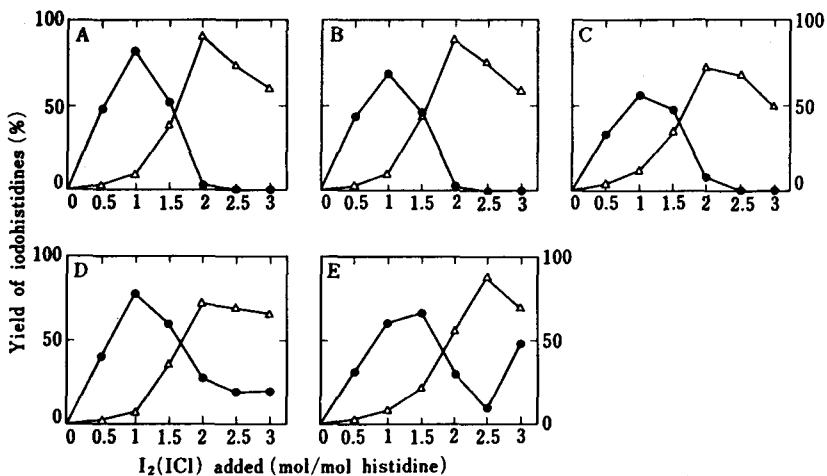


Fig. 13. Profile of Yields of MIH (●) and DIH (Δ) under Various Reaction Conditions
 Iodinating reagents: A, 0.1 M I_2 -EtOH; B, 0.025 M I_2 -hexane; C, 0.05 M I_2 -KI;
 D, 0.1 M ICl-EtOH; E, 0.1 M ICl-hexane.

0.1 M ICl-hexaneを使用した場合を除いて、MIHはHisと I_2 (ICI) を1:1のモル比で反応させたとき、また、DIHは1:2のモル比で反応させたとき、それぞれ

最高の収率で生成した。このことから、Hisは、最初に、イミダゾール環の4位にヨウ素が反応（ヨウ素が導入される位置は、Hisとヨードヒスチジンの¹H-NMR (D₂O) スペクトルを比較することによって、すなわち、Hisのイミダゾール環の4位のシグナル (δ, 7.39) がMIHでは消失することから確認) してMIHを形成し、次に、イミダゾール環の2位にヨウ素が反応（Hisのイミダゾール環の2位のシグナル (δ, 8.66) が消失することから確認) してDIHを形成する反応機構が明らかになった。そのため、反応が定量的に進行するならば、1 molのHisは1 molのI₂と反応して1 molのMIHを形成したのち、さらに、もう1 molのI₂と反応して1 molのDIHを形成する。0.2 N NaOH溶液中で行った本研究のヨウ素化は、ほぼ定量的に反応が進行したと考えられる。一方、WolffらがpH 8.5のTris-HCl緩衝液中で行ったヨウ素化は、His 1 molに対しI₂ 2 molを使用しないとMIHの最大の収率が得られなかった。このことから、Hisのヨウ素化は強アルカリの溶媒中で効率的に進行することが明らかになった。また、His 1 molに対し、I₂を2 mol以上使用したときにはDIHの収率が低下したが、これは過剰のI₂によってDIHが酸化分解するためであると考えた。

ヨウ素化試薬によるヨウ素化の違いは、試薬の濃度が異なるため単純には比較できないが、I₂がIClよりも、また、試薬の溶媒としてはEtOHがhexaneよりも効率が良いように思われる。0.1 M ICl-hexaneは最も効率の悪い試薬であった。

このように、反応液の生成物をHPLCで分析する手法は、ヨウ素化の反応条件を正確に把握するのに役立つことが示された。そして、BruningsのMIH合成の反応条件を、この手法で調べてみたところ、反応液中のMIHの収率は78%であったので、反応条件はほぼ適切であると評価した。

カラムクロマトグラフィーによるMIHの分離・精製 1)イオン交換クロマトグラフィーによるMIHの分離・精製 Bruningsは、反応液からのMIHの分離・精製を抽出、活性炭処理、再結晶の方法で行ったが、この方法では純度の高いMIHを得ることができなかった。また、複雑な操作がMIHの収率を低下させる原因になったと考えられる。そこで、カラムクロマトグラフィーを使用してMIHを効率良く処理する方法について検討することにした。

最初に、イオン交換クロマトグラフィーで、反応混合物中のHis、MIHおよびDIHを分離する方法について検討した。その結果、MIHは、陽イオン交換樹脂Dowex 50から成るカラムと0.05 M 2,6-lutidineから成る溶離液を使用したとき、他の成分から最も良く分離することが明らかになった。Hisのヨウ素化反応物を、

Dowex 50カラムで分離したクロマトグラムをFig. 14に示した。

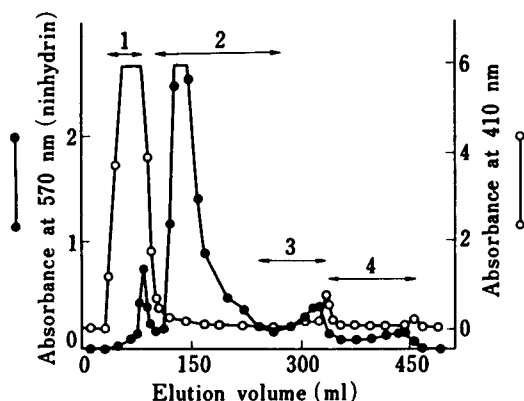


Fig. 14. Ion-exchange Chromatogram of the Reaction Mixture

Column: Dowex 50 W X4 (200-400 mesh) (2.5 × 25 cm). Detection: Ninhydrin reaction. Sample: His · HCl · H₂O (1.5 g) iodinated with 0.025 M I₂-hexane in 0.2 N NaOH. Peak identity: 1, I⁻ and Cl⁻; 2, MIH; 3, DIH; 4, His. Eluent: 0.05 M 2,6-lutidine, pH 9.56.

このクロマトグラフィーで、MIHとDIHのピークはわずかに重なったが、未反応のHisは完全に分離することができた。また、I⁻やCl⁻はMIHの前に溶出し、Na⁺もMIHと分離していたので、脱塩処理を行うこともできた。さらに着色物質(410 nmの吸光度で検出)も、MIHの前に大部分溶出させて除くことができた。

2) SEP-PAK C₁₈カートリッジを使用する脱色 Dowex 50カラムによって分離して集めたMIHのフラクションには若干着色物質が含まれていた。そこで、この着色物質を除くためにMIHのフラクションを逆相のSEP-PAK C₁₈カラムで処理した。その結果、大部分の着色物質をSEP-PAK C₁₈に吸着させて除くことができた。しかしながら、MIHのフラクションに含まれている微量のDIHは、この操作で分離することはできなかった。

3) ゲルろ過によるMIHの分離・精製 最終的に、MIHからDIHを除くためにSephadex G-10によるゲルろ過を行った。Sephadex G-10によるヨードヒスチジンの分離は、分子排除効果ではなく、ゲルろ過樹脂へのイミダゾール基の吸着効果によるものである。⁴⁰⁾ 本法では0.1 N 酢酸を溶離液に使用して、MIHの精製を行った (Fig. 15)。

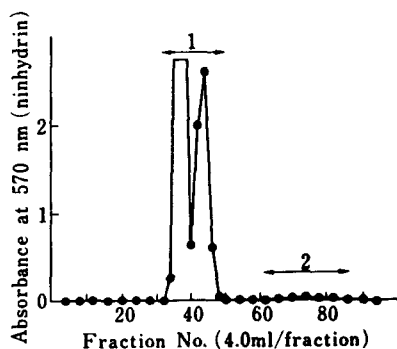


Fig. 15. Purification of MIH on Sephadex G-10

Column: Sephadex G-10 (2.5 × 45 cm). Detection: ninhydrin reaction. Sample: MIH fraction after treatment with Dowex 50 and Sep-Pak C₁₈. Peak identity: 1, MIH; 2, DIH. Eluent: 0.1 M AcOH, pH 2.90.

MIHとDIHのピークは良好に分離し、純粋なMIHを得ることができた。MIHのピークが二つに分裂したが、これは試料を大量に負荷したためで、精製には問題はなかった。

MIHの合成法 本研究により確立したMIH（塩酸塩）の合成法を記す。L-His · HCl · H₂O 1.5 gを0.2 N NaOH 250mlに溶解し、氷冷下で、I₂-EtOH溶液（I₂ 2 g + EtOH 100 ml）を攪拌しながら2時間で添加し、さらに30分間攪拌してヨウ素化を行った。反応後、反応液に濃塩酸を滴加してpHを5に調整してから、減圧下で約20mlまで濃縮した。濃縮した反応液をDowex 50W X4（2.5 × 25 cm）カラムにアプライしたのち、0.05 M 2,6-lutidineで溶出し、5 mlずつフラクションを集めた。各フラクションの組成をTLCで調べ、MIHを含むフラクション（フラクションNo. 23-50）を合わせ、これを減圧下で濃縮した。得られた残渣は、少量の水を加えて溶解してから、SEP-PAK C₁₈を通し、ろ液を集めた。SEP-PAK C₁₈は、水10 mlを2回流して洗い、洗液もろ液に合わせてから、これを減圧下で10 mlまで濃縮した。この濃縮液をSephadex G-10カラム（2.5 × 40 cm）にアプライしたのち、0.1 N 酢酸で溶出し、4 mlずつフラクションを集めた。MIHを含むフラクション（フラクションNo. 34-48）を合わせ、これを減圧

下で濃縮した。そして残渣に濃塩酸1 mlとEtOH 100 mlを加え、その溶液をアニリンで中和し、 -5°C で一昼夜放置してMIHの結晶を得た。遠心分離（3000rpm, 10分間）で集めた結晶は、少量のEtOHで洗ったのち、減圧下で乾燥した（収量1.2 g）。母液からは、さらに0.1 gのMIHを回収した。総収量は1.3 g（収率57%）であった。Mp $178-180^{\circ}\text{C}$ (dec.)。 $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 3.22 (2H, d), 3.97 (1H, t), 8.35 (1H, s)。Anal. Calcd $\text{C}_6\text{H}_9\text{ClIN}_3\text{O}_2$: C, 22.70; H, 2.86; N, 13.23. Found: C, 22.68; H, 2.95; N, 13.32.

3・2 ヨードカルノシンの合成

HPLCでヨウ素化反応物を分析してヨウ素化の反応条件を調べる手法は、ペプチドのヨウ素化にも広く適用できると考えられる。そこで、カルノシン (Car) (β -alanyl-L-histidine) のヨウ素化合物を合成することを試みた。Carをヨウ素化したとき、ヨウ素はHis残基に導入され、monoiodocarnosine (MIC) と diiodocaranosine (DIC) の二つの化合物を生成する。本研究では、前報と同様に、Carのヨウ素化反応物をHPLCで分析して、MICとDICのヨウ素化条件を調べた。また、最適条件で合成したヨードカルノシンを、反応液から効果的に分離・精製するために、逆相の分取HPLCを使用した。

3・2・1 実験

試薬および器材 L-Carはペプチド研究所製のものを使用した。その他の試薬および器材は本章3・1・1に記載したものを使用した。

装置 高速液体クロマトグラフは本章3・1・1に記載した装置で構成した。分離カラムは μ Bondapak C₁₈ (10 μ m, 3.9 mm i. d. \times 30 cm) (ウォーターズ) を、また、分取カラムは μ Bondapak C₁₈ (10 μ m, 7.8 mm i. d. \times 30 cm) を使用した。融点および¹H-NMRスペクトルは本章3・1・1に記載した装置で測定した。

HPLCによるヨードカルノシンの分析 Car 27 mg (0.12 mmol) を0.5 N NaOH 7.5 mlに溶解した。この溶液に0.1 M I₂-EtOH溶液 0.6 ml (0.06 mmol) を、氷冷下で、攪拌しながら10分間で加え、さらに5分間攪拌してヨウ素化を行った。同様に0.1 M I₂-EtOH溶液をさらに5回添加し、最終的には0.36 mmol (Carの3倍量) のI₂を加えた。

I₂を添加する度に、反応液50 μ lを取りだし、これに0.5 N HCl 50 μ lと水 0.4 mlを加えてHPLC用の試料とした。HPLCによる反応物の分析は、0.005 M NaH₂PO₄-MeOH (80:20, v/v) を移動相に使用して、流速1.8 ml/min, 検出波長254 nmで、試料10 μ lを注入して行った。

本分析で示されたMICとDICのピーク高さは、それぞれの相対的な収率を表わす。MICおよびDICの収率は、ヨウ素とカルノシンを、それぞれ、1:1または1:2のモル比で反応させたときに最大になった。この結果はHisのヨウ素化の場合と同じであった。

分取HPLCによるヨードカルノシンの分離 反応液からのヨードカルノシンの分離するために、抽出と再結晶によるBruningsの方法を適用しても純粋なヨードカルノシンを高収率で得ることは困難であった。そこで、逆相の分取HPLCによるヨードカルノシンの分離・精製法を検討した。

分取HPLCは μ Bondapak C₁₈ (7.8 mm i. d. × 30 cm) カラムとH₂O-MeOH (90:10, v/v) から成る移動相を使用して行った。移動相の流速は5.0 ml/minに、検出波長は254 nmに、また検出感度は2.0 AUFSに設定した。Carを最適条件でヨウ素化して調製したMICの反応液(後述)を分取HPLCで処理したクロマトグラムをFig. 18に示した。

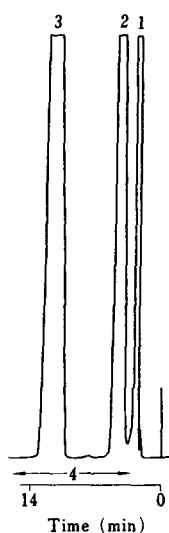


Fig. 18. Preparative HPLC of MIC

Peak identity; 1, I⁻; 2, MIC; 3, DIC; 4, Car (detected by ninhydrin reaction).

For other conditions, see Result and Discussion.

MICはI⁻やDICから良く分離することができた。反応液中のNa⁺やCl⁻は、I⁻と一緒に溶出するため、MICのフラクションには含まれていなかった。一方、未反応のCarは254 nmでは検出できないので分離を確認できなかった。そこで、標準

のCarをHPLCに注入して、溶出液をニンヒドリン反応で調べたところ、Carの溶出位置はMICやDICと重なり、分離が不十分であることが明らかになった。そのため、MICのフラクションからCarを分離する操作が必用であった。

MICからCarを分離するために、MICのフラクションを濃縮した。この操作によって、MICは水性の濃縮液から容易に結晶化するので、水溶性のCarを簡単に分離することができた。

同じ分取HPLCの条件を使用して、DICの反応液（後述）も処理することができた。集めたDICのフラクションは、DICが水から結晶化しにくいので、濃縮液にEtOHを添加して結晶化した。この方法では、Carは除くことができないが、DICを最適条件で合成した反応液中には未反応のCarは含まれていないので、DICの純品を得ることができた。

MICの合成法 本研究により確立したMICの合成法を記す。L-Carnosine 271 mgを0.5 N NaOH 75 mlに溶解し、氷冷下で、0.1 M I_2 -EtOH 12 mlを攪拌しながら1時間で添加し、さらに30分間攪拌してヨウ素化を行った。反応後、反応液に濃塩酸を滴加してpHを約6.5に調整してから、これを減圧下で約15 mlまで濃縮した。濃縮液は、あらかじめMeOHと水で処理したSEP-PAK C_{18} を通し、ろ液を集めた。SEP-PAK C_{18} は5 mlの水で4回すすぎ、洗液も溶出液に合わせた。SEP-PAK処理した溶液は減圧下で9 mlまで濃縮して、0.45 μ mのフィルターを通した。このようにして調製した試料は1.8 mlずつ5回HPLCに注入してMICを分離した。分離したMICの分画は減圧下で4 mlまで濃縮して低温で一昼夜放置し、白色の結晶を得た。この結晶はろ過して少量の水で洗った。収量は247mgであった。ろ液からはさらに55 mgの結晶を回収した。総収量は302 mg（収率72%）であった。mp 216-218 $^{\circ}$ C (dec.) . *Anal.* Calcd $C_9H_{13}IN_4O_3$: C, 30.70 ; H, 3.72 ; N, 15.91. Found : C, 30.57 ; H, 3.70 ; N, 15.86.

DICの合成法 ヨウ素化試薬をMICの2倍量（24 ml）使用したほかは、MICの場合と同じ方法で反応を行い、また分取HPLCも同じ条件で行った。分離したDICのフラクションは減圧下で濃縮したあと、EtOHを加えて結晶化した。収率86%。mp 187-189 $^{\circ}$ C (dec.) . *Anal.* Calcd $C_9H_{12}I_2N_4O_3$: C, 22.61 ; H, 2.53 ; N, 11.72. Found : C, 22.27 ; H, 2.59 ; N, 11.57.

第4章 逆相HPLCによるヨードヒスチジンの分析

〔要旨〕 本章では、今まで研究されていなかったヨードヒスチジンの逆相HPLCによる分析法について、その分離の特性をヨードチロシンの分離と比較して明らかにした。分離には3種類のODSカラム (Nova-Pak C₁₈, μ Bondapak C₁₈, Radial-Pak C₁₈) を使用した。逆相HPLCでヨードチロシンを分離する場合、一般的には酸性の移動相を使用するが、ヨードヒスチジンを分離する場合には、イミダゾール基のイオン化を抑制して固定相への保持を得るために、中性付近のpHの移動相を使用して分離するのが有利であると考えた。しかし、リン酸緩衝液を移動相とするシステムでは、pHを調節しても十分な保持を得ることができなかった。また、移動相の有機溶媒の含量を調節しても十分な保持を得ることができなかった。これはヨードヒスチジンのイミダゾール基の疎水性が小さいためであると考察した。また、中性付近のpHの移動相で分離を行った場合、固定相の影響が顕著に現われることが示された。ヨードヒスチジンの良好な分離を得るために、疎水性のイオンペアー試薬を使用する分離を検討した。その結果、アルキルスルホン酸塩を添加した酸性の移動相を使用した場合、どのカラムでも、ヨードヒスチジンを固定相に保持させて良好に分離することができた。一方、水酸化テトラブチルアンモニウムを添加した中性の移動相を使用した場合、Nova-Pak C₁₈カラムでは、ヨードヒスチジンを固定相に保持させて良好に分離することができた。また、この移動相システムでは、I⁻も保持されることから、I⁻とヨウ素化アミノ酸の同時分析が可能になることが示唆された。しかし、他のカラムでは、ピークの形状が悪く、良好な分離を得ることができなかった。さらに、酢酸を移動相とする分離を検討したところ、ヨードチロシンとDIHでは逆相モードの分離が得られるのに対し、MIHとHisでは順相モードの分離が得られることが明らかになった。また、この移動相システムでは、分離に固定相の影響が顕著に現われることが示された。これらの検討から、逆相HPLCでヨードヒスチジンを分離するためには、十分なイオン強度を持った酸性の溶液にアルキルスルホン酸塩をイオンペアー試薬として添加した移動相を用いる必要があると結論した。

ヨウ素化アミノ酸の分析法として、吸光検出法を使用した逆相HPLCは極めて実用性の高い分析手段である。そのため、多数の分析例が報告されているが、これらの報告は、いずれも、ヨードチロシンやヨードサイロニンの分析について述べられたものである。一方、ヨードヒスチジンの分析に関しては、TLC⁴¹⁾やオーブンカラムクロマトグラフィー^{36, 42)}を用いた方法は報告されていたが、HPLCによる分析法は全く報告されていなかった。

そこで本章では、逆相HPLCによるヨードヒスチジンの分析法を確立するために、その分離特性をヨードチロシンの分離特性と比較して明らかにすることにした。

4・1 実験の部

試薬および標準液 1)試薬 —— MIH (塩酸塩), DIH (塩酸塩) は合成品 (第3章参照) を使用した. MIT, DITはシグマ製のものを, His (一塩酸塩, 一水和物), ヨウ化カリウム (KI) および水酸化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (TBAOH) 溶液 (0.5 M, 液体クロマトグラフ用) は和光純薬製のものを, Tyr および1-heptanesulfonic acid (HSA) (Na塩) は半井化学製のものを使用した. HPLCの移動相は蒸留水と液体クロマトグラフ用のメタノール (MeOH) またはアセトニトリル (MeCN) を使用して調製した. その他の試薬は市販の特級規格のものを使用した.

2)標準液 —— His, MIHおよびDIHを水に溶解して0.5 mg/mlの溶液を, Tyr, MITおよびDITを5 mM HClに溶解して0.5 mg/mlの溶液を, また, KIを水に溶解して0.1 mg/mlの溶液を調製し, 標準液とした.

装置 高速液体クロマトグラフは, 6000A型ポンプ (ウォーターズ), NS-310A型波長可変紫外分光検出器 (日本精密科学), U6K型ユニバーサルインジェクター (ウォーターズ) およびVP-6511Wペンレコーダー (松下情報工業) より構成した. 分離カラムはウォーターズのNova-Pak C₁₈ Radial-Pak cartridge (NC₁₈) (8 mm i. d. × 100 mm), μBondapak C₁₈ Radial-Pak cartridge (MC₁₈) (8 mm i. d. × 100 mm) およびRadial-Pak C₁₈ cartridge (RC₁₈) (8 mm i. d. × 100 mm) を使用した.

移動相 50 mM NH₄H₂PO₄, 50 mM (NH₄)₂HPO₄または50 mM H₃PO₄を, pHメーターでpHを確認しながら混合して50 mMリン酸アンモニウム緩衝液を調製したのち, この緩衝液にMeOHまたはMeCNを添加し, 必要ならばさらにHSAまたはTBAOHを添加して移動相とした.

分析方法 HPLCの測定は室温下 (約20℃) で行った. 移動相の流速は, NC₁₈を用いた場合は2.5 ml/minに, また, MC₁₈とRC₁₈を用いた場合は3.0 ml/minに設定した. 溶質の検出は通常225 nmで行ったが, 酢酸溶液を移動相に用いた場合は, Hisの検出は235 nmで, その他の化合物の検出は254 nmの波長で行った. 各溶質の保持は, 標準液5 μlをHPLCに注入して測定した. 溶質の保持比 (k') は $k' = (V_1 - V_0) / V_0$ (V_1 は溶質の保持容量, V_0 はカラムのホールドアップ容積) の式より計算した. V_0 は, 60% MeCNを移動相として, 210 nmの検出波長で測定した硝酸イオンの溶出容積より求めた.

4・2 結果および考察

移動相pHの影響 逆相HPLCによるヨードチロシンやヨードサイロニンの分析では、MeOH（またはMeCN）と酸性のリン酸溶液（またはリン酸緩衝液）から成る移動相が一般に使用されている。^{43, 44)}そして、この移動相システムで、ヨウ素化アミノ酸の疎水性と保持の関係、⁴⁵⁾あるいはヨウ素化アミノ酸の保持に対する移動相のpHや有機修飾溶媒の濃度の影響^{46, 47)}が検討された。そこで、最初に、MeOH-50 mM リン酸緩衝液から成る移動相を用いて、ヨードヒスチジンの保持に対する移動相のpHの影響を、三種類のODSカラムで調べることにした (Fig. 20)。

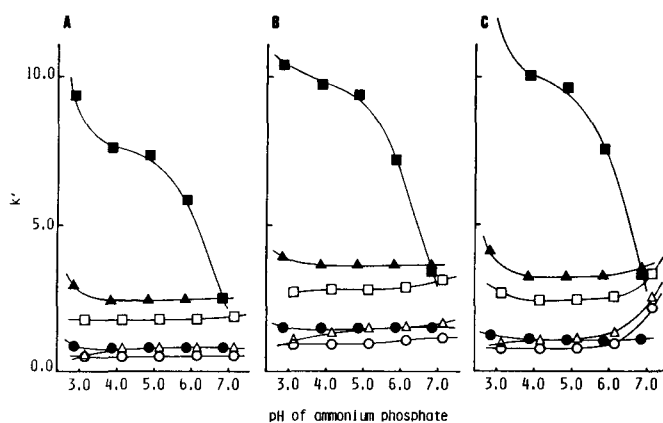


Fig. 20. Effect of Mobile Phase pH on the Capacity Factor of Iodoamino Acids

Column: (A) NC₁₈; (B) MC₁₈; (C) RC₁₈. Mobile phase: 25% MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 3.0-7.0). Compounds: O, His; Δ, MIH; □, DIH; ●, Tyr; ▲, MIT; ■, DIT.

この移動相のシステムで、ヨードヒスチジンの溶出順序は、Hisに結合するヨウ素の数が増えるにしたがって遅くなった。これは、Tyrと同じように、Hisも疎水性がヨウ素化によって増大するからである。また、同じ数のヨウ素を持つヨードヒスチジンとヨードチロシンの保持をそれぞれ比較した場合、ヨードヒスチジンの保持は対応するヨードチロシンよりも弱かった。これは、His（特にイミダゾール基）の疎水性がTyr（特にヒドロキシフェニル基）の疎水性よりも小さいからである。

移動相のpHは3から7の間で変化させたが、イオン性の溶質の保持は、溶質のイオン化状態によって変化するので、pH 3から7におけるヨードヒスチジンのイオン化状態を考察することにした。イオン性物質のイオン化状態は、イオン性官能基の酸解離定数 (pKa) から推測することができる。ヨードヒスチジンには三つのイオン性官能基が存在し、そのpKa値はBruningsによって報告されている (Table IX)。³⁷⁾

Table IX. pKa Values of Iodoamino Acids

Compound	pKa ^{37, 48, 49)}			
	Imidazolyl	Hydroxyphenyl	-COOH	-NH ₃ ⁺
His	6.00		1.82	9.17
MIH	4.18		1.72	8.62
DIH	2.72		- ^{a)}	8.18
Tyr		10.13	2.20	9.11
MIT		8.20	- ^{a)}	- ^{a)}
DIT		6.48	2.12	7.82

a) Not in literature.

Hisおよびヨードヒスチジンのカルボキシル基は、そのpKa値が2より小さいことから、pH 3から7ではほぼ完全に解離してイオン化状態にあると考えられる。同様に、Hisおよびヨードヒスチジンのアミノ基は、そのpKa値が8より大きいことから、pH 3から7ではほぼ完全にプロトン付加してイオン化状態にあると考えられる。したがって、Hisとヨードヒスチジンのカルボキシル基とアミノ基は、pH 3から7の範囲では一定の状態 (すなわちイオン化した状態) を保つことから、移動相のpHが変化しても、溶質の保持には影響を与えないと予測される。

一方、HisおよびMIHのイミダゾール基は、そのpKa値から、pH 3から7の間でイオン化状態が大きく変化すると考えられる。すなわち、pH 3ではHisとMIHのイミダゾール基はプロトン付加してイオン化しているが、pHが上昇するにつれてプロトン付加が抑制され、pH 7ではどちらも非イオン化状態になっていると考えられる。そのため、HisとMIHについては、移動相のpHの変化によって、保持が変化することが予測された。一方、DIHのイミダゾール基は、ヨウ素化によっ

てpKa値が著しく小さくなるため、pH 3から7の範囲ではほとんど非イオン化状態を保つと考えられ、移動相のpHが変化しても保持は変化しないと予測された。

このような予測に対し、ヨードヒスチジンの実際の保持挙動は、NC₁₈とMC₁₈のカラムで、MIHがpH3から5にかけてわずかな保持の増加を示しただけで、全体としては大きな保持の変化は観察されなかった。これは、ヨードチロシンのDITが、pH 4から7にかけてヒドロキシフェニル基（フェノール性水酸基）のイオン化状態が変化するのに伴って、保持が大きく変化することと対照的であった。DIHが保持の変化を示さなかったのは予測どおりであるが、HisとMIHが保持の変化をあまり示さなかったのは、イミダゾール基の疎水性が、非イオン化状態でもかなり小さいために、イオン化状態の違いが保持の大きさにそれほど反映されないからであると考えられる。このことは、中性付近のpHの移動相を用いてイミダゾール基を非イオン化の状態に導びいても、HisとMIHは分離に十分な保持が得られないことを意味する。一方、中性付近のpHの移動相を使用した場合には、次に述べるように、固定相の影響が強く現われた。また、RC₁₈カラムを使用した場合、pH7で溶質のイオン化状態からは説明できない保持の増加が観察された。

固定相の影響 ヨードヒスチジンは、ヨードチロシンと同じように、pHの低い移動相を使用したときには、どのカラムでも同じような分離が得られた。しかし、移動相のpHが上昇するにつれて、カラムによる分離の違いが示された。この違いは、主にピークの形状に示された。NC₁₈カラムでは、pH7の移動相を使用しても、ヨードヒスチジンとヨードチロシンは比較的良好な形のピークが得られたが、MC₁₈とRC₁₈カラムでは、pHの上昇に伴って著しいブロードやテーリングが生じた。また、RC₁₈カラムでは、移動相のpHの上昇に伴って、ヨードヒスチジンの保持が特異的に増加した。

このようなカラムによるヨウ素化アミノ酸の分離の違いを考察するためには、固定相の特性を知る必要がある。使用したカラムの充填剤の特性は、十分明らかにされているとは言えないが、粒子径（NC₁₈：4 μm, MC₁₈：10 μm, RC₁₈：10 μm）、粒状（NC₁₈：球型, MC₁₈：破碎型, RC₁₈：球型）、残存シラノール基の処理（エンドキャップ）の有無（NC₁₈：有, MC₁₈：有, RC₁₈：無）、ポアサイズ（NC₁₈：60 Å, MC₁₈：125 Å, RC₁₈：90 Å）、および炭素含量（NC₁₈：7%, MC₁₈：10%, RC₁₈：12%）についてのデータを得ることができた。¹³⁾

NC₁₈カラムで、pH7の移動相を使用しても比較的良好なピークの形状が得られ

たのは、明確ではないが、固定相の炭素含量が少ないからではないかと考えた。また、 RC_{18} カラムでpH 7の移動相を使用したときにヨードヒスチジンの保持が増加するのは、固定相のシラノール基とのイオニックな相互作用によるものであると思われる。この作用は、酸性下ではシラノール基の解離が抑制されるので弱いが、pHの上昇によりシラノール基の解離が促進されるためにpH 7で強く現われたと考えた。

移動相の有機修飾溶媒の影響 NC_{18} カラムとMeOH-リン酸緩衝液 (pH 3.0 または pH 7.0) から成る移動相を用いて、ヨードヒスチジンの保持に対する移動相の有機修飾溶媒 (organic modifier) の濃度の影響を調べた (Fig. 21)。

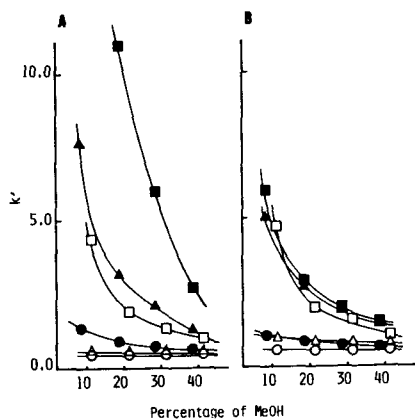


Fig. 21. Effect of the Ratio of MeOH on the Capacity Factor of Iodoamino Acids

Mobile phase: (A) MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 3.0); (B) MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 7.0). Column: NC_{18} . Compounds: as in Fig. 20.

どちらのpHでも、DIHは、ヨードチロシンと同じように、有機修飾溶媒の比率が増加するに従って保持が減少した。また、図には示していないが、有機修飾溶媒の比率が同じ移動相では、MeOHよりもMeCNを用いたほうが保持が小さくなった。一方、HisとMIHは有機修飾溶媒の変化に対して、保持はほとんど変化しなかった。このことは、有機修飾溶媒の比率の低い移動相を用いても、HisとMIHは分離に十分な保持が得られないことを意味する。

疎水性のイオンペア試薬の添加の影響 移動相にリン酸溶液を用いるシステムでは、リン酸イオンが親水性 (hydrophilic) のイオンペア試薬として作用し、溶質の保持を減少させることが知られている。⁴³⁾ このような作用は、逆相の固定相への保持が弱いヨードヒスチジンの分離に対しては不利である。そこで保持を増加させるために、疎水性 (hydrophobic) のイオンペア試薬を添加した移動相を用いて分離を行うことを試みた。このイオンペア試薬には、HSAとTBAOHを用いたが、添加濃度や移動相のpHは、一般的に選択される条件を使用した (Table X)。

Table X. Effect of Addition of Hydrophobic Ion-pairing Reagents

Compound	k'			
	A	A'	B	B'
I ⁻	0.55	0.34	0.59	3.30
His	0.49	1.54	0.54	0.74
MIH	0.59	1.99	0.80	1.24
DIH	1.74	4.09	1.84	3.09
Tyr	0.83	1.76	0.80	1.07
MIT	2.91	8.22	2.42	3.47
DIT	9.39	28.01	2.41	4.64

Mobile phase: A, 25% MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 3.0); A', 25% MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 3.0) containing 5 mM HSA; B, 25% MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 7.0); B', 25% MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 7.0) containing 5 mM TBAOH.

NC₁₈カラムでHSAを添加した移動相を用いたところ、ヨードヒスチジンの保持が増加した。その結果、I⁻、His、MIHおよびDIHの良好な分離を得ることができた。このような分離は、他のカラムでも得ることができた (Fig. 22)。

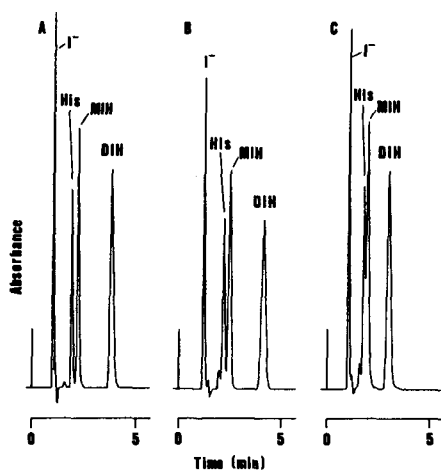


Fig. 22. HPLC Separation of Iodo-histidines on Different Columns

Column: (A) NC_{18} ; (B) MC_{18} ; (C) RC_{18} . Mobile phase: 25% MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 3.0) containing 5 mM HSA. Flow-rates: (A) 2.5; (B) 3.0; (C) 3.0 ml/min. Detector: wavelength, 225 nm; sensitivity, 0.1 AUFS. Amounts injected: His, 1; MIH, 1; DIH, 1; I^- , 0.2 μ g.

同様に、 NC_{18} カラムで、TBAOHを添加した移動相を用いたところ、ヨードヒスチジンの保持は増加し、適当な分離を得ることができた。さらに、この移動相による分離では、ヨードヒスチジンと同時に無機の I^- も保持が増加した。そのため、この移動相では、 I^- とヨードヒスチジンの同時分析が可能になる。しかし、TBAOHを用いた分離では、固定相の影響が顕著であった (Fig. 23)。

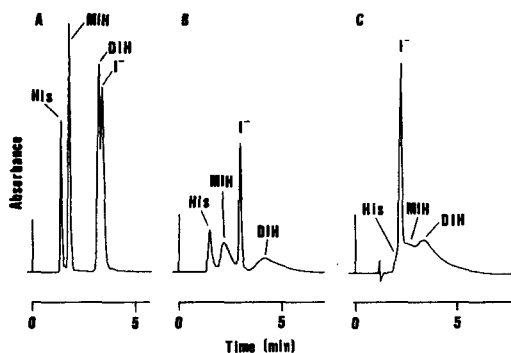


Fig. 23. HPLC Separation of Iodo-histidines on Different Columns

Mobile phase: 25% MeOH in 50 mM ammonium phosphate (pH 7.0) containing 5 mM TBAOH. Other conditions as in Fig. 22.

すなわち、NC₁₈カラムでは、良好な形状のピークが得られたが、ほかのカラムでは、著しいブロードとテーリングを生じ、分離が困難であった。しかし、酸性の移動相にTBAOHを添加した場合、ピークの形状はどのカラムでも良好であった。したがって、固定相の影響はTBAOHを添加したことに起因するのではなく、移動相のpHによるものであることが明らかになった。

酢酸を含む移動相を用いた分離 ヨードチロシンやヨードサイロニンの分離では、リン酸溶液以外に酢酸溶液が移動相に用いられる。⁵⁰⁾ 一般に、酢酸イオンは、アルキルスルホン酸と同じように、疎水性のイオンペア試薬として働く。そのため、酢酸をヨードヒスチジンの分離に適用した場合、保持の増加が期待された。そこで、MeOH (またはMeCN) -50 mM 酢酸 (pH 3.0) から成る移動相を用いて、NC₁₈カラムで、ヨードヒスチジンの保持を調べた (Fig. 24)。

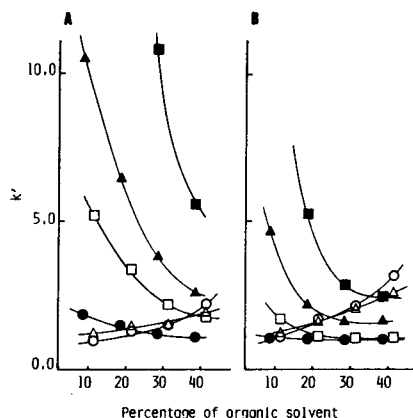


Fig. 24. Effect of the Ratio of Organic Modifier on the Capacity Factor of Iodoamino Acids
 Mobile phase: (A) MeOH in 50 mM acetic acid; (B) MeCN in 50 mM acetic acid.
 Column: NC₁₈. Compounds as in Fig. 20.

この移動相で、DIHとヨードチロシンの保持は、対応するMeOH (あるいはMeCN) -50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0) を移動相に使用した場合よりも大きくなった。また、有機修飾溶媒が増加すると、一般の逆相の分離で観察されるように、保持が減少した。これに対し、HisとMIHは、リン酸緩衝液を移動相に使用した場合とは、全く違う保持挙動を示した。すなわち、これらの化合物は、有機修飾溶媒が増加すると保持が増加し、またMeOHよりもMeCNを用いたほうが大きな保持が得られた。そのため、MeOHを40%またはMeCNを20%以上含む移動

相では、ヨードヒスチジンは、DIH, MIH, Hisと逆の順序で溶出した。HisとMIHのこのような保持挙動は、逆相の溶出モードで予想される挙動とは全く反対であり、順相の溶出モードによる挙動であると考えられる。このような、順相モードによる保持挙動はヨードチロシンやヨードサイロニンについても高濃度の有機修飾溶媒を含む移動相で観察されることが報告されている。⁴⁷⁾

HisやMIHの順相モードによる保持挙動は、ほかの移動相、たとえば酪酸を添加した移動相や、酸や塩の成分を含まないMeOH（あるいはMeCN）-水だけから成る移動相を使用した場合にも観察された。しかしながら、酸解離定数が酢酸や酪酸よりも大きなトリフルオロ酢酸を含む移動相や、酢酸にNaClのような無機塩を添加した移動相を使用した場合には、正常な逆相モードによる保持挙動が観察された。このようなことから、順相モードによる保持挙動は、イオン強度の低い移動相を使用した場合に現れることが明らかになった。

さらに、酢酸溶液を移動相に用いた場合のヨードヒスチジンの保持は、カラムによって大きな違いが見られた。ここでは、30% MeCN-50 mM酢酸 (pH 3.0) を移動相に用いたときのヨードヒスチジンの分離を、三種類のカラムで比較した (Fig. 25)。

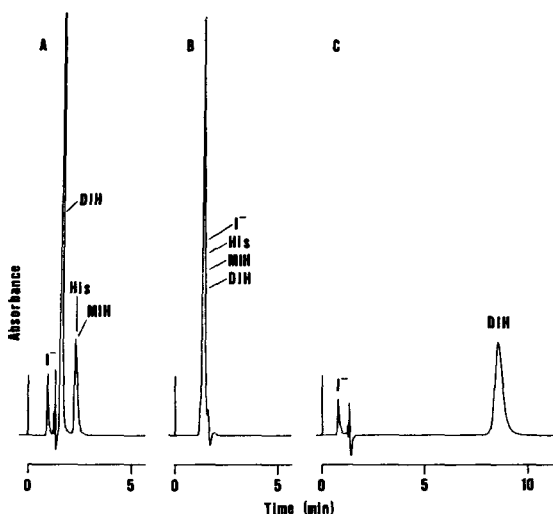


Fig. 25. HPLC Separation of Iodohistidines on Different Columns

Mobile phase: 30% MeCN in 50 mM acetic acid. Detector: wavelength, 254 nm; sensitivity, 0.02 AUFS. The elution of His was confirmed by separate injection and detection at 235 nm. Other conditions as in Fig. 22. His and MIH were not eluted within 10 min on the RC₁₈ column.

MC₁₈カラムでは、ヨードヒスチジンの保持はNC₁₈カラムよりも小さくなった。しかし、RC₁₈カラムでは、保持はNC₁₈カラムよりも大きくなった。特にHisとMIHの保持は強く、溶出に10分以上の時間を要した。このように酢酸を移動相に用いた場合、カラムの種類によって分離が大きく変化することは、リン酸緩衝液（pH 3.0）を用いた場合に、どのカラムでも同じような分離が得られることと対照的であった。

このようなことから、イオン強度の低い移動相では、低いpHでも、固定相の性質が分離に重要な影響を与えることが明らかになった。特にRC₁₈におけるヨードヒスチジンの極端な保持の増加は、固定相のシラノール基とのイオニックな相互作用による結果であると考えられる。しかしながら、順相モードやシラノール基との相互作用によるヨードヒスチジンの保持の増加は、ピークのブロードやテーリングを伴うために、分離にはほとんど利用できない。

このような保持挙動の検討から、逆相HPLCにおけるヨードヒスチジンの分離は、一般的には、十分なイオン強度を持った酸性の溶液にアルキルスルホン酸塩を添加した移動相を用いた場合に最適化するという結論を得た。

総括

吸光検出法による逆相HPLCは、高感度で使いやすいなどの長所を持つことから、現在さまざまな分野で使用されている重要な分析法である。本研究は、このHPLCによるヨウ素イオン (I^-) とヨウ素化アミノ酸の分析法を確立することを目的として、分析に係わる基礎的な問題を検討し、次のような結果および結論を得た。

1. I^- は、イオンペアー試薬としてアルキルアミンを添加した移動相を使用することによって、逆相の固定相に保持させて分析できることを明らかにした。また、 I^- の検出波長を225 nmに設定することにより、1 ngから2 μ gの範囲で高感度な定量ができることを確認した。この分析法は、有機ヨウ素化合物に不純物として含まれている I^- を定量するために応用し、良好な定量結果を得た。

2. I^- の逆相HPLCの新規な分離の調節法を開発するために、クラウンエーテル (CE) やシクロデキストリン (CD) のホスト・ゲスト相互作用を利用した。1級のアルキルアミンをイオンペアー試薬とする移動相にCEを添加したところ、 I^- の保持が増加することを見出した。この方法によって、CEと錯体を形成しない化合物 (iodouracil) と I^- の選択的な分離が可能になることを示した。一方、1級のアルキルアミンをイオンペアー試薬とする移動相にCDを添加したところ、 I^- の保持が減少することを見出した。さらに、CEやCDを添加した移動相を使用しても I^- は問題なく定量できることを確認した。

3. I^- をアミノプロピルシリカを充填した陰イオン交換カラム (Bond-Elut NH₂ (BE-NH₂)) で固相抽出する基本的な操作を、標準試料を用いて検討した。その結果、 I^- を固相に保持させるには、試料の液性を酸性に調整する必要があることを明らかにした。また、固相から I^- を遊離させて回収するには、高濃度のアンモニアを溶離液として溶出するのが最も効果的であることを明らかにした。さらに、回収した I^- をHPLCで定量する場合、溶離液に由来するアンモニウムイオンが定量を妨害することを指摘し、この妨害を避けるために、陽イオン交換カラム (AG-50) で脱アンモニウム処理する方法を考案した。

4. ヨウ素含有試料を酸素フラスコ燃焼法で分解して得られる吸収液中の I^- を、エチレンジアミン-N-プロピルシリカを充填した陰イオン交換カラム (Bond Elut PSA) で固相濃縮することにより、微量ヨウ素を高感度で定量する方法を検討し

た。そして、吸収液中のI⁻を固相に保持させるために、陽イオン交換カラムを通して陽イオンを除去してから固相濃縮する方法を考案した。さらに、標準の2-iodobenzoic acid (IBA) を使用して本法の定量性を評価した。その結果、I⁻を濃縮しない場合には定量が困難である微量のIBAからでも、良好な回収率と再現性でヨウ素を定量できることを確認した。この分析法は、thyroglobulinおよびヨード強化卵のヨウ素の定量に応用し、良好な定量結果を得た。

5. ヨウ素化アミノ酸の標品となるmonoiodohistidine (MIH) を合成するために、ヒスチジン (His) のヨウ素化反応液の生成物 (MIHとdiiodohistidine (DIH)) をUV検出法による逆相HPLCで分析して、反応条件を検討した。その結果、HisとI₂を1 : 1のモル比で反応させたときMIHが、また、1 : 2のモル比で反応させたときDIHが、それぞれ最高の収率で生成することを明らかにした。一方、最適な反応条件で合成したMIHは、Dowex 50, SEP-PAK C₁₈およびSephadex G-10によるカラムクロマトグラフィーで処理することによって、反応液から効率的に分離・精製できることを示した。

6. ヨードカルノシン (monoiodocarnosine (MIC) およびdiiodocarnosine (DIC)) を合成するために、カルノシンのヨウ素化反応液の生成物をHPLCで分析して、反応条件を明らかにした。また、最適な反応条件で合成したヨードカルノシンは、逆相の分取HPLCを用いて反応液から効率的に分離・精製できることを示した。

7. ヨードヒスチジンの逆相HPLCの分離の特性をヨードチロシンと比較して明らかにした。リン酸緩衝液を移動相とするシステムでは、ヨードヒスチジンの十分な保持を得ることができず、良好に分離することが困難であった。一方、酢酸を移動相とするシステムでは、ヨードチロシンとDIHは逆相モードの分離が得られるのに対し、HisとMIHは順相モードの分離が得られることが明らかになった。これらの検討から、ヨードヒスチジンの良好な分離を得るためには、十分なイオン強度を持った酸性の溶液にアルキルスルホン酸塩をイオンペア試薬として添加した移動相を用いる必要があると結論した。

本研究は、吸光検出法を使用した逆相HPLCによるI⁻とヨウ素化アミノ酸の分析について、分離、前処理および標品の合成法などの基礎的な技術を確認した点で意義がある。本研究で得た知見は、ヨウ素の研究を進めるうえで広く役立つものと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり，御指導，御鞭撻を賜った星薬科大学臨床化学教室・山下三郎教授に厚く御礼申し上げます。

また，本研究の一部は大谷研究助成金の援助を受けた事を付記して，星薬科大学・大谷孝吉理事長に深謝致します。

掲載雑誌目録

本研究の内容は次の雑誌に掲載されたものである。

第1章

1・1 *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2430 (1984)

1・2 *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 2143 (1986)

1・3 *J. Chromatogr.*, **498**, 137 (1989)

第2章

2・2 薬誌, **114**, 597 (1994)

2・2 衛生化学, **40**, 472 (1994)

第3章

3・1 *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 386 (1983)

3・2 *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3302 (1983)

第4章

J. Chromatogr., **475**, 135 (1989)

引用文献

- 1) B. S. Hetzel, G. F. Maberly, "Trace Elements in Human and Animal Nutrition," 5th ed., Vol. 2, ed. by W. Mertz, Academic Press, Inc., London, 1986, Chapter 2.
- 2) J. Robbins, J. E. Rall, "Hormones in Blood," 3rd ed., Vol. 1, ed. by C. H. Gray and V. H. T. James, Academic Press, Inc., London, 1979, Chapter XII.
- 3) 日本公定書協会監修, "第十二改正日本薬局方解説書," 廣川書店, 東京, 1991, C.
- 4) O. A. Roholt, D. Pressman, "Methods in Enzymology: Enzyme Structure, Part B," Vol. 25, ed. by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, New York, 1972, pp. 438-449.
- 5) 大野素徳, 金岡祐一, 崎山文夫, 前田浩, "生物化学実験法12, 蛋白質の化学修飾<上>," 瓜谷郁三, 志村憲助, 中村道徳, 船津勝編, 学会出版センター, 東京, 1981, pp. 194-206.
- 6) P. J. McConahey, F. J. Dixon, M. Morrison, J. J. Langone, S. L. Commerford, S. I. Schlager, "Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques, Part A," Vol. 70, ed. by H. V. Vunakis and J. J. Langone, Academic Press, New York, 1980, Section II-A.
- 7) 山田武, 大山ハルミ, "実験生物学講座 3, アイソトープ実験法," 江上信雄, 吉田精一編, 丸善, 東京, 1982, pp. 191-195.
- 8) H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman, *Anal. Chem.*, **47**, 1801 (1975).
- 9) P. K. Dasgupta, "Chromatographic Science Series; Vol. 37: Ion Chromatography," ed. by J. G. Tarter, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, Chapter 6.
- 10) 武藤義一, 及川紀久雄編, "イオンクロマトグラフィー," 講談社サイエンティフィック, 東京, 1983.
- 11) R. N. Reeve, *J. Chromatogr.*, **177**, 393 (1979).
- 12) N. E. Skelly, *Anal. Chem.*, **54**, 712 (1982).
- 13) "Waters Sourcebook for Chromatography Columns and Supplies," Waters, Milford, MA, 1986.
- 14) 久保博昭, 小林良江, 木下俊夫, 分化, **35**, 256 (1986).

- 15) W. R. Melander, C. Horvath, "Chromatographic Science Series; Vol. 31: Ion-Pair Chromatography," ed. by M. T. W. Hearn, Marcel Dekker, Inc., New York 1985, Chapter 2.
- 16) R. Vespalec, J. Neca, M. Vrchlabsky, *J. Chromatogr.*, **286**, 171 (1984).
- 17) W. J. Hurst, K. P. Snyder, R. A. Martin, Jr., *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 2067 (1983).
- 18) R. D. Rocklin, E. L. Johnson, *Anal. Chem.*, **55**, 4 (1983).
- 19) H. Nagashima, K. Nakamura, *J. Chromatogr.*, **324**, 498 (1985).
- 20) 安部晴康, 小島順司, 鈴木準之助, 薬誌, **108**, 1104 (1988).
- 21) 田伏岩夫, 新海英孝, ふんせき, **3**, 162 (1985).
- 22) 澁川明正, 中川照眞, ふんせき, **12**, 849 (1986).
- 23) 平岡道夫, "クラウン化合物," 講談社, 東京, 1978.
- 24) 平岡道夫, 柳田博明, 小原正明, 古賀憲司, "ホスト・ゲストケミストリー," 講談社サイエンティフィク, 東京, 1984.
- 25) D. Sybilska, J. Devowski, J. Jurczak, J. Zukowski, *J. Chromatogr.*, **286**, 163 (1984).
- 26) J. Debowski, D. Sybilska, J. Jurczak, *J. Chromatogr.*, **237**, 303 (1982).
- 27) K. Miyajima, M. Ikuto, M. Nakagaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 389 (1987).
- 28) J. P. Diard, E. Saint-Aman, D. Serve, *J. Electroanal. Chem.*, **189**, 113 (1985).
- 29) M. Tanaka, T. Miki, T. Shono, *J. Chromatogr.*, **330**, 253 (1985).
- 30) D. D. Blevins, M. F. Burke, T. J. Good, P. A. Harris, K. C. Van Horne, L. S. Yago, "Sorbent Extraction Technology," ed. by K. C. Van Horne, Analytichem International, Inc., USA, 1985.
- 31) W. J. Hurst, *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 2021 (1984).
- 32) 日本公定書協会監修, "第十二改正日本薬局方解説書," 廣川書店, 東京, 1991, B-160.
- 33) 日本農産工業編, "〈ヨード卵・光〉ならびに〈ヨード〉に関する学術研究集," 1986.
- 34) 上野景平, 化学の領域, **12**, 942 (1958).
- 35) E. C. Dunlop, "Treatise on Analytical Chemistry: Part I Theory and Practice," Vol. 2, ed. by I. M. Kolthoff and P. J. Elving, Interscience Publishers, Inc., New York, 1961, pp. 1062-1063.

- 36) J. C. Savoie, P. Thomopoulos, F. Savoie, *J. Clin. Invest.*, **52**, 106 (1973).
- 37) K. J. Brunings, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 205 (1947).
- 38) 今井恵子, 北関東医学, **29**, 303 (1979).
- 39) J. Wolff and I. Covelli, *Eur. J. Biochem.*, **9**, 371 (1969).
- 40) 志村憲助, 江尻慎一郎, 吉田充輝, 石原弘章, “生物化学実験法11, ゲル濾過法,” 瓜谷郁三, 志村憲助, 中村道徳, 船津勝編, 学会出版センター, 東京, 1978, pp. 147-152.
- 41) W. M. Goldberg, *J. Chromatogr.*, **134**, 246 (1977).
- 42) P. Thomopoulos, *Anal. Biochem.*, **65**, 600 (1975).
- 43) M. T. W. Hearn, W. S. Hancock, C. A. Bishop, *J. Chromatogr.*, **157**, 337 (1978).
- 44) M. T. W. Hearn, W. S. Hancock, *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 217 (1979).
- 45) M. T. W. Hearn, W. S. Hancock, *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 288 (1980).
- 46) S. J. Su, B. Grego, M. T. W. Hearn, *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 1709 (1981).
- 47) M. T. W. Hearn, B. Grego, *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 1709, (1984).
- 48) H. Edelhoch, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2778 (1962).
- 49) E. D. Mooz, “Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,” 3rd ed., Vol. 1, ed. by G. D. Fasman, CRC Press, Ohio, 1976, p. 109.
- 50) N. M. Alexander, M. Nishimoto, *Clin. Chem.*, **25**, 1757 (1979).

論文正誤表

誤	正
(35ページ 下から11行目) δ : 3.24 (2H, d) , 4.06 (1H, t)	δ : 3.24 (2H, d, J = 7.1 Hz) , 4.06 (1H, t, J = 7.1 Hz)
(35ページ 下から8行目) 氷冷した I_2	氷冷下で I_2
(41ページ 上から2行目) MIHの結晶を	MIH (塩酸塩) の結晶を
(41ページ 上から4行目) MIHを回収	MIH (塩酸塩) を回収
(41ページ 上から6行目) 3.22 (2H, d) , 3.97 (1H, t)	3.22 (2H, d, J = 7.1 Hz) , 3.97 (1H, t, J = 7.1 Hz)
(46ページ Fig. 19) H_2O	DHO

学位（課程外博士）申請中の論文（論文題目：逆相高速液体クロマトグラフィーによるヨウ素イオンとヨウ素化アミノ酸の分析に関する基礎研究，学位申請者：宮下正弘）について別紙のとおり訂正をお願い致します。