

氏名(本籍)	宮下正弘 (東京都)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	乙第74号
学位授与年月日	平成7年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者
学位論文の題名	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
論文審査員	主査 教授 故山下三郎 主査 学長 粕谷豊 副査 教授 河内佐十 副査 教授 入江昌親

論文内容の要旨

ヨウ素の研究を進めるうえで、ヨウ素イオン (I^-) とヨウ素化アミノ酸のすぐれた分析法を確立することは重要な課題である。吸光検出法による逆相高速液体クロマトグラフィー (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 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た。

第1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った。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 μ gの範囲で定量できることを確認した。この検出感度は電気化学検出法の感度に匹敵する高感度なものであった。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。また、CEを添加した場合の Γ の保持の増加の割合は、CEの濃度や移動相の有機修飾溶媒の種類と濃度によって影響を受けることを示した。この方法によって、CEと錯体を形成しない化合物 (iodouracil) と Γ 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試薬とする移動相にCDを添加したところ、 Γ 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 Γ 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。また、CDを添加した場合の Γ の保持の減少の割合は、CDの種類やCDの濃度によって影響を受けることを示した。さらに、CEやCDを添加した移動相を使用しても Γ は問題なく定量できることを確認した。

第2章では、実試料を分析する場合に重要な Γ の固相抽出法による前処理について検討した。 Γ の固相抽出法については、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)) を使用する方法がすでに報告されていたが、その抽出操作には疑問があった。そこで、BE-NH₂による固相抽出の基本的な操作を、標準試料を用いて再検討した。その結果、固相に Γ を保持させる最初の操作では、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。次に固相から Γ 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 Γ 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標準の Γ を処理したところ、良好な回収率と再現性で Γ を定量できることを確認した。この固相抽出法は、ヨウ素含有試料のヨウ素を高感度で定量するために応用した。すなわち、日本薬局方に制定されている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 Γ として吸収液に捕捉させたあと、この Γ を固相抽出法で濃縮してから逆相HPLCで定量することによって、試料中の微量ヨウ素を定量した。固相濃縮法では、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) を使用した。基本的な操作はBE-NH₂の場合と同じであったが、吸収液中の Γ を固相に保持させるには、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。これは吸収液中の大量の陽イオンによって Γ 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。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、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、微量ヨウ素の定量に対する本法の実用性を示した。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。

第3章では、ヨウ素化アミノ酸の分析を研究する場合に必要となる、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 (monoiodohistidine (MIH) およびdiiiodohistidine (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、最初に、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、I₂-EtOH溶液を使用してヨウ素化した場合、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。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diiiodocarnosine (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、I₂-EtOH溶液を使用してヨウ素化した場合、CarとI₂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。

第4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、225 nmまたは254 nmの波長で検出した。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、イミダゾール基の解離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つた。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つた。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、 Γ も保持されることから、 Γ 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つた。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。

本研究は、吸光検出法を使用した逆相HPLCによる Γ 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立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期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は逆相高速液体クロマトグラフィー (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研究を行ったもので、次のような結論を得ている。

1. I⁻は、イオンペア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HPLCで 1ngから 2 μ g の範囲で高感度な定量ができることを明らかにした。

2. I⁻の逆相HPLCによる新規な分離の調節法として、クラウンエーテルやシクロデキストリンを移動相の添加剤として利用する方法を開発した。

3. I⁻の陰イオン交換カラムによる固相抽出法について検討し、最適な抽出条件を確立した。

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た吸収液中のI⁻を、陰イオン交換カラムで固相濃縮してからHPLCで分析する方法を検討し、試料中のヨウ素含有量を高感度で定量する方法を確立した。

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、ヒスチジンのヨウ素化反応液中の生成物をHPLCで分析して、反応条件を検討した。また、最適な反応条件で合成したMIHは、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. 逆相HPLCによるヨードヒスチジンの分離特性を調べた。ヨードヒスチジンの良好な分離を得るためには、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ことを明らかにした。

7. ヨードカルノシンを合成するために、カルノシン (β -alanylhistidine) のヨウ素化学反応液中の生成物を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、分取HPLC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。

以上の内容は、ヨウ素の研究を行う上で重要な化合物であるI⁻とヨウ素化アミノ酸の分析技術を確立した点で意義がある。また、化学形を異にする各種ヨウ素化合物の生理機能の解明あるいは新しいヨウ素化合物の生理活性について研究を進める上で応用性の高い内容が多く含まれており、博士の学位論文に充分値すると判定した。