

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (8) 597-601 (1994)

ヨウ素化合物の研究 (第7報¹⁾) 酸素フラスコ燃焼法及び固相濃縮法を
利用した高速液体クロマトグラフィーによる
Thyroglobulin 中の結合ヨウ素の定量

宮下正弘,* 山下三郎
星薬科大学

Studies on Iodinated Compounds. VII.¹⁾ High-Performance Liquid
Chromatographic Determination of Binding Iodine in
Thyroglobulin after Oxygen Flask Combustion
and Solid-Phase Preconcentration

Masahiro MIYASHITA* and Saburo YAMASHITA

Department of Clinical Chemistry, Hoshi College of Pharmacy,
2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

(Received February 18, 1994)

A sensitive method was investigated for the determination of binding iodine in thyroglobulin (TG). The method was based on the solid-phase preconcentration of iodide (I^-) in the absorbing solution prepared by the oxygen flask combustion of TG. The optimum procedures were discussed for the preconcentration. The absorbing solution was passed through a cation-exchange column (AG-50), followed by an anion-exchange column (Bond Elut PSA). Iodide concentrated on the Bond Elut PSA was eluted with ammonia water and treated with the AG-50. An aliquot of the concentrated sample was subjected to reversed-phase HPLC with a UV detector for the determination of I^- . The method was applied successfully to the determination of binding iodine in trace amounts of TG.

Keywords—iodine; solid-phase preconcentration; oxygen flask combustion; iodide; HPLC

有機ヨウ素化合物中の結合ヨウ素の定量において、試料の分解法として酸素フラスコ燃焼法が使用されている。²⁾ この分解法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、結合ヨウ素はヨウ素イオン (I^-) として吸収液に捕捉される。長島らは数 mg の試料を酸素フラスコ燃焼法で分解後、捕捉された I^- を UV 検出法による逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で直接定量することにより、高感度で精度の高い結合ヨウ素の分析が可能になることを示した。³⁾

著者らは、甲状腺に存在するヨウ素化蛋白質の1つである thyroglobulin (TG) の結合ヨウ素の定量に長島らの分析法を適用しようと考えた。しかしながら、TG のヨウ素含量は1% 程度⁴⁾ にすぎず、数 mg 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。

本研究では、微量の TG を用いて高感度に結合ヨウ素を定量する方法を確立するために、酸素フラスコ燃焼法により得られた I^- を予備濃縮してから HPLC で分析する方法を検討した。 I^- の予備濃縮に関しては、すでにエバポレーターによる蒸発法⁵⁾や有機溶媒での抽出法⁶⁾が使用されているが、ここでは、陰イオン交換カラムを用いる固相濃縮法を検討し、TG の結合ヨウ素の定量に適用した。

実 験 の 部

1. 試薬、吸収液及び標準液 1) 試薬——TG (porcine 由来, シグマ社製), 2-iodobenzoic acid (IBA) (元素分析用, メルク社製), 抱水ヒドラジン (特級, 和光純薬社製) 並びに水酸化テトラ-*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, 和光純薬社製) 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を使用して調製した。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。

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た。

3) ヨウ素標準液——ヨウ化カリウムを水に溶解して 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。

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た。

2. 装置及び器材 燃焼フラスコ (パイレックス製) は 500 ml の容量のものを使用した。高速液体クロマトグラフはポンプ: 6000A 型ポンプ (ウォーターズ社製), 検出器: NS-310A 型波長可変紫外分光検出器 (日本精密科学社製), インジェクター: U6K 型ユニバーサルインジェクター (ウォーターズ社製), インテグレーター: sic クロマトコーダー 12 (システムインスツルメンツ社製), 分離カラム: Nova-Pak C₁₈ Radial-Pak Cartridge (4 μ m, 5 mm \times 100 mm) (ウォーターズ社製) より構成した。固相抽出用のカラムは Bond Elut PSA (BE-PSA) (100 mg 充填, アナリティケムインターナショナル社製) を、陽イオン交換樹脂は AG50W-X8 (200—400 メッシュ, バイオラッド社製) を使用した。HPLC の試料はカラムガード LCR (0.45 μ m) (ミリポア社製) を使用してろ過した。

3. 分析法 1) 酸素フラスコ燃焼法——日本薬局方記載の方法²⁾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、その洗液も吸収液に合わせて検液とした。

2) 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、水洗した。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、洗浄した。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. 1)。

燃焼により得られた検液は、1 M 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^- を吸着させた。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^- の定量を妨害するアンモニウムイオン除くために別の AG-50 を通してからメスフラスコに集め、水を加えて 5 ml にメスアップして HPLC 用の試料とした。

3) HPLC による I^- の定量—— I^- の分析は既報^{3,7)}に準じ、UV 検出法 (検出波長, 225 nm) による逆相 HPLC により、濃縮処理した試料 10 μ l 又はヨウ素標準液 10 μ l を注入して行った (HPLC 条件, Fig. 2). 定量はピーク面積による絶対検量線法で行った. 本 HPLC では 0.64 ng から 1.27 μ g 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.

結 果 と 考 察

1. 固相抽出法による I^- の濃縮

本実験では、燃焼分解に 20 ml の吸収液を使用した。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 近くに増量した。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 (Bondesil PSA[®]) を充填した BE-PSA[®] を使用した。検液中に大量に存在する Na^+ やヒドラジンの陽イオンは 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。そのため陰イオン交換体への I^- の捕集率が低下する。そこで、これらの陽イオンを除去するために、Fig. 1 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 に流し込んだ。なお、 I^- を陰イオン交換体の固相に吸着させるためには試料の液性を酸性に調整する必要があったが、⁹⁾ 本法ではアルカリ性の検液に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検液の pH 調整は必要としなかった。そして、実験の部に記載したような濃縮方法を定め、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。また、リザーバーに検液を流し込んでから HPLC 用の試料を調製するまでの濃縮操作は 15 分以内で行うことができた。

2. 標準試料の結合ヨウ素の定量

前述の濃縮法を適用して標準試料の結合ヨウ素の定量を試みた。標準試料は、すでに定量の行われた IBA を使用したが、濃縮による定量性を評価するため、試料量を既報³⁾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 並びに 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 並びに 124 μ g の IBA を量り取り、実験の部に記載の方法に従って分析を行った (Table I).

結合ヨウ素の測定値は、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結合ヨウ素の分析法として十分実用性があると考えた。一方、 I^- の HPLC の定量下限 (0.64 ng) から考えると、IBA 1.24 μ g がほぼ本分析法の試料の下限量となるが、濃縮率を上げることによってこの下限量を

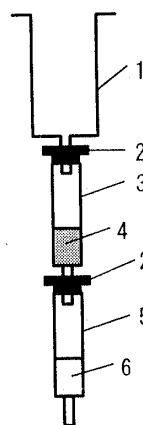


Fig. 1. Connection of Columns for Solid-Phase Preconcentration

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

TABLE I. 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 ± 1.2	93.4 ± 2.3
124	48.9 ± 0.7	95.5 ± 1.4

a) Iodine content in IBA is 51.2%. b) Mean \pm S.D. ($n=5$).

下げることは可能であると思われる。

3. TG 中の結合ヨウ素の定量

本法を TG の結合ヨウ素の定量に適用した。TG はヨウ素含量が IBA の 50 分の 1 程度しかないため mg レベルの試料量でも予備濃縮が必要であった。本実験では、分析に供する TG の試料量を少量化するため、通常天秤で量り取ることでできる最少量 (2 mg 程度) の TG を用いて分析を行った。

Fig. 2 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。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 中の結合ヨウ素の含量として $0.89 \pm 0.01\%$ ($n=5$) の測定値を得た。この値は表示値 (約 1%) 並びに既存の報告値⁴⁾ 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 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、 $94.6 \pm 1.1\%$ ($n=5$) の良好な回収率が得られ、本法の信頼性が確かめられた。

本法は酸素フラスコ燃焼法と HPLC による結合ヨウ素の定量に試料の予備濃縮を導入することによって、高感度な結合ヨウ素の定量を可能にしたものである。本法の開発により、ヨウ素含量の低い試料でも、少量の試料量で容易に結合ヨウ素を定量することが可能になった。

引用文献及び注

- 1) 第 6 報: M. Miyashita, S. Yamashita, *J. Chromatogr.*, **475**, 135 (1989).
- 2) 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.
- 3) H. Nagashima, K. Nakamura, *J. Chromatogr.*, **324**, 498 (1985).
- 4) 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.
- 5) W. J. Hurst, K. P. Snyder, R. A. Martin, Jr., *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 2067 (1983).

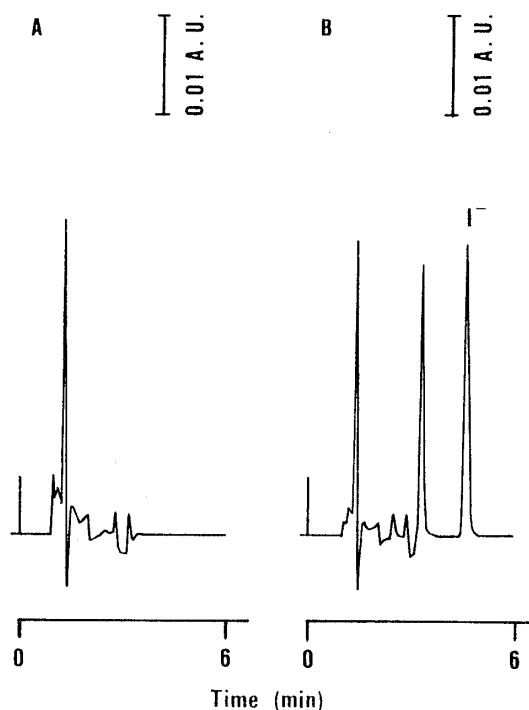


Fig. 2. HPLC Chromatograms of TG after Oxygen Flask Combustion and Solid-Phase Preconcentration

Analytical conditions: column, Nova-Pak C_{18} (5 mm i.d. \times 100 mm); mobile phase, acetonitrile–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).

-
- 6) 安部晴康, 小島順司, 鈴木準之助, 薬誌, **108**, 1104 (1988).
 - 7) M. Miyashita, K. Kaji, S. Seyama, S. Yamashita, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2430 (1984).
 - 8) 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., U.S.A., 1985, p. 95.
 - 9) 宮下正弘, 山下三郎, 日本分析化学会第 36 年会講演要旨集, 熊本, 1987 年 10 月, p. 565.