テクニカルレター

ヨウ素化アミノ酸の逆相高速液体クロマトグラフィーのための 固相抽出法*

宮下 正弘^{®1}, 瀬山 義幸¹

Solid-phase extraction for the reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of iodoamino acids

Masahiro MIYASHITA¹ and Yoshiyuki SEYAMA¹

¹ Department of Clinical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 10 March 2004, Accepted 25 May 2004)

We studied solid-phase extraction (SPE) procedures using three SPE columns (OASIS HLB, MCX and MAX[®]) for the determination of iodoamino acids (iodohistidines, iodotyrosines and iodothyronines) by high-performance liquid chromatography (HPLC). Iodoamino acids could be retained on the SPE columns by hydrophobic, cation-exchange and/or anion-exchange interactions. Firstly, the effect of the sample pH on the retention was investigated. Secondly, the elution of iodoamino acids retained on each SPE column was investigated. The recoveries of iodoamino acids were evaluated using different compositions of the eluent. Good recovery (>90%) could be obtained under the optimum SPE conditions.

Keywords : iodohistidines; iodotyrosines; iodothyronines; solid-phase extraction; high-performance liquid chromatography.

1 緒 言

生体内のヨウ素化アミノ酸は甲状腺ホルモンの成分として生命の維持に重要な役割を担う¹⁾²⁾。甲状腺ホルモンの作用を示すのはチロキシン {thyroxine(3,3',5,5'-tetraiodothyronine), T₄} やトリヨードチロニン (3,3',5-triiodothyronine, T₃) などのヨウ素化チロニン (iodothyronines) であるが、その前駆体としてヨウ素化チロシン (iodotyrosines) が甲状腺に存在する。また、別の形態の化合物として、ヨウ素化ヒスチジン (iodohistidines) が存在することも確認されている³⁾⁴⁾。そのため、甲状腺の機能や疾患、あるいは、生体内でのヨウ素の代謝について論じるには、これらのヨウ素化アミノ酸の分析が必要になる。T₃ と T₄ については、ラジオイムノアッセイ法⁵⁾及び酵素免

疫法⁶⁾による分析法が実用化されているが、これらとともに他のヨウ素化アミノ酸にも簡単に適用し得る分析法としては、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{7)~10)} が最も適切な方法であると考ええる。

機器分析で実試料を扱う場合、試料中の^{きょう}夾雑物の除去や目的成分の濃縮など試料の前処理を施す必要があるが、その手法の良否は分析の結果に重大な影響を及ぼすため、適切な処理方法を確認することが重要な課題になる。近年、この前処理法として固相抽出法が注目され¹¹⁾¹²⁾、様々な抽出器材が開発されるとともに、多数の応用例が報告されている。ヨウ素化アミノ酸の HPLC 分析に対しても、固相抽出法による試料の前処理は有用性が高いと考える。一方、試料の実態に即した適切な固相抽出法を構築するためには、抽出条件や操作手順をあらかじめ標準試料で検討し、理解しておくことが必要である。そこで、本研究では、分離モードの異なる 3 種類の固相を用いるヨウ素化アミノ酸の固相抽出法について、抽出条件を標準試料で調べ、その結果を基礎データとして提示した。

* ヨウ素化合物の研究 (第 11 報)。前報は宮下正弘ほか、薬学雑誌, 119, 381 (1999)

¹ 星薬科大学臨床化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Table 1 Analysis of iodoamino acids

Iodoamino acid	Column ^{a)}	Mobile phase ^{b)}	Flow-rate/ ml min ⁻¹	Retention time/ min	Detection limit ^{c)} / pmol
His	HC18 (250 mm × 3.0 mm i.d.)	50 mM AP (pH 7.0)- CH ₃ CN (100 : 0, v/v)	0.4	4.00	2
MIH	HC18 (150 mm × 4.6 mm i.d.)	50 mM AP (pH 7.0)- CH ₃ CN (98 : 2, v/v)	1.0	3.95	1
DIH	HC18 (150 mm × 4.6 mm i.d.)	50 mM AP (pH 3.0)- CH ₃ CN (92 : 8, v/v)	1.0	3.98	0.5
Tyr	HC18 (150 mm × 4.6 mm i.d.)	50 mM AP (pH 3.0)- CH ₃ CN (97 : 3, v/v)	1.0	4.42	1
MIT	NC18 (150 mm × 3.9 mm i.d.)	50 mM AP (pH 3.0)- CH ₃ CN (92 : 8, v/v)	1.0	3.62	0.5
DIT	NC18 (150 mm × 3.9 mm i.d.)	50 mM AP (pH 3.0)- CH ₃ CN (87 : 13, v/v)	1.0	4.19	0.25
T ₀	NC18 (150 mm × 3.9 mm i.d.)	50 mM AP (pH 3.0)- CH ₃ CN (85 : 15, v/v)	1.0	3.80	0.5
T ₃	NC18 (150 mm × 3.9 mm i.d.)	50 mM AP (pH 3.0)- CH ₃ CN (68 : 32, v/v)	1.0	3.70	0.25
rT ₃	NC18 (150 mm × 3.9 mm i.d.)	50 mM AP (pH 3.0)- CH ₃ CN (67 : 33, v/v)	1.0	3.68	0.25
T ₄	NC18 (150 mm × 3.9 mm i.d.)	50 mM AP (pH 3.0)- CH ₃ CN (65 : 35, v/v)	1.0	4.06	0.25

a) HC18: Hydrosphere C18, NC18: Nova-Pak C18; b) AP: ammonium phosphate buffer; c) S/N = 3 or 4

2 実 験

2・1 試薬及び標準液

ヒスチジン (histidine, His) 及びチロシン (tyrosine, Tyr) は和光純薬製, モノヨードチロシン (3-iodotyrosine, MIT), ジヨードチロシン (3,5-diiodotyrosine, DIT) 及び T₄ は Sigma 製, チロニン (thyronine, T₀) 及び T₃ はナカライテスク製, リバーストリヨードチロニン (3,3',5'-tri-iodothyronine, rT₃) は Calbiochem 製を用いた. また, モノヨードヒスチジン (2-iodohistidine, MIH) 及びジヨードヒスチジン (2,4-diiodohistidine, DIH) は合成品¹³⁾を使用した. 液体クロマトグラフ用のアセトニトリルは関東化学製, その他の試薬は市販の精密分析用あるいは特級規格の製品を使用した.

固相抽出に使用するヨウ素化アミノ酸の標準液は, His, MIH 及び DIH の場合, 各標品を水に溶解して 1×10^{-3} M の標準原液を調製した後, これを水で所定の濃度まで希釈して調製した. また, Tyr, MIT, DIT 及び T₀ の場合, 各標品を 0.005 M NaOH に溶解して 1×10^{-3} M の標準原液を調製した後, これを水で所定の濃度まで希釈して調製した. 更に, rT₃, T₃ 及び T₄ の場合, 各標品を 0.01 M NaOH に溶解して 1×10^{-3} M の標準原液を調製した後, これを水で所定の濃度まで希釈して調製したが, 希釈に当たり NaOH の濃度が 0.001 M 以下になるときは, 試料が析出することがあったので, 適宜 NaOH を加えた.

HPLC の分析に使用するヨウ素化アミノ酸の標準液は,

上記の各ヨウ素化アミノ酸の標準原液を HPLC の移動相で所定の濃度まで希釈して調製した.

2・2 装置及び器材

高速液体クロマトグラフは 600E マルチソルベント送液システム (Waters 製), 484 チューナブル UV/VIS 検出器 (Waters 製), sic オートサンプラー 23 (システムインスツルメンツ製) 及び sic クロマトコーダー 12 (システムインスツルメンツ製) より構成した. 分離カラムは Hydro-sphere C18 (150 mm × 4.6 mm I.D. 及び 250 mm × 4.6 mm I.D.) (ワイエムシイ製) 及び Nova-Pak C18 (150 mm × 3.9 mm I.D.) (Waters 製) を使用した. 遠心機は小型多本架低速遠心機 90-22 型 (佐久間製作所製) を使用した. 固相抽出用のカートリッジは OASIS HLB (以下 HLB), OASIS MCX (以下 MCX) 及び OASIS MAX (以下 MAX) (充填量各 30 mg, Waters 製) を使用した.

2・3 HPLC によるヨウ素化アミノ酸の分析

各化合物の分析条件等は Table 1 に示した. 分離は室温下で行い, 検出波長は 225 nm に, 試料の注入量は 10 µl に設定した. 定量はピーク面積による絶対検量線法で行った.

2・4 固相抽出の操作法

固相抽出には, (1) 目的成分を固相に保持させた状態で妨害成分を溶出除去し, その後目的成分を溶出させて回収

する方法, (2)妨害成分を固相に保持させた状態で目的成分のみを通過させて回収する方法がある¹¹⁾が, 本研究では(1)について検討した. どの OASIS も, カートリッジを試験管に懸垂状に装着(カートリッジのフランジを試験管の開口部に掛けて載せる)した後, メタノール 1 ml, 水 1 ml を自然落下法で順次流し, 固相をコンディショニングした. 次に, ヨウ素化アミノ酸の試料溶液を自然落下法で流した後, カートリッジを試験管ごと遠心機に乗せ, 2000 rpm (448 g) で 5 分間遠心し, 固相の間隙に残存している溶液をきった. このような方法で試料をアプライしたカートリッジは, 新しい試験管に装着し直した後, 溶離液 0.5 ml を加え, 400 rpm (18 g) で 2 分間, 800 rpm (72 g) で 2 分間, 更に 2000 rpm (448 g) で 2 分間と段階的に回転数を上げて遠心し, 固相からの溶出液を集めた. なお, 遠心の初めの回転数を低く設定したのは, 固相からの溶出は遅い流速で行うことが推奨されている¹¹⁾からである. このようにして集めた溶出液は, 2 ml のメスフラスコに移した後, 各ヨウ素化アミノ酸の分析に使用する HPLC の移動相を加えて定容した. そして, その溶液 0.2 ml に更に移動相 0.6 ml を加えて 4 倍希釈したものを分析用の試料とした. また, 別法としては, 得られた溶出液を減圧下で乾固した後, 残査に HPLC の移動相を加えて再溶解し, 2 ml に定容したものを分析用の試料とした.

3 結果及び考察

3.1 逆相 HPLC によるヨウ素化アミノ酸の分析

His, MIH, DIH 及び Tyr の分析では, 化合物の保持が弱いため, 有機溶媒の少ない移動相を使用する必要があった. そのため, 分離カラムは水 100% の移動相でも使用可能な Hydrosphere C18 を使用した. 特に, His は保持が弱く, 感度も低かったので, 長さ 250 mm, 内径 3 mm の Hydrosphere C18 を使用した.

His は 5~100 pmol, Tyr 及び MIH は 2.5~100 pmol, その他のヨウ素化アミノ酸は 1~100 pmol の範囲で検量線を作成したところ, 試料量とピーク面積の間には良好な直線関係(相関係数 $r=0.999$ 以上)が認められた.

固相抽出で調製した試料には, 固相からヨウ素化アミノ酸を溶出する際に使用した溶離液が必然的に混在した. そのため, 溶離液の成分がヨウ素化アミノ酸の HPLC 分析に与える影響を調べることは重要であった. そこで, 溶離液の成分が混在したモデル試料として, 1×10^{-4} M の各ヨウ素化アミノ酸の標準液 50 μ l に 1% トリフルオロ酢酸(TFA) 150 μ l, 0.5 M NH_4OH 150 μ l, 又はアセトニトリル(CH_3CN) 150 μ l を個別に加えた試料を調製し, これを HPLC の移動相 300 μ l で希釈した後, 分析することを試みた. その結果, TFA を添加した試料は, クロマトグラム上に TFA の大きなピークが現れたが, それはどのヨ

ウ素化アミノ酸のピークとも重ならず, 定量にも全く影響しないことが分かった. 一方, NH_4OH あるいは CH_3CN を添加した試料は, 分離の上で問題となる共存物のピークは現れなかったが, 各ヨウ素化アミノ酸のピークが著しい変形(ブロード化あるいは分裂)を起こすため, 定量は不可能であることが分かった. このようなことから, ヨウ素化アミノ酸の固相抽出に使用する塩基及び有機溶媒は, ヨウ素化アミノ酸の分析に対する重大な干渉成分であるという結論を得た.

本研究では, 溶離液の分析への影響を避けるため, 固相抽出で得られた溶出液を HPLC の移動相で 2 ml に定容した後, 更に移動相で 4 倍希釈するか, あるいは, 溶出液を減圧下で乾固して干渉成分を除いた後, 移動相に再溶解して分析用の試料を調製することにした.

3.2 ヨウ素化ヒスチジンの固相抽出

3.2.1 ヨウ素化ヒスチジンの固相への保持 HLB には水潤性の多孔質ポリマーが固相として使用されている¹⁴⁾. また, MCX にはスルホン酸基(H 型)を導入した多孔質ポリマー(イオン交換容量: 1 meq/g)が, MAX には 4 級アンモニウム基(Cl 型)を導入した多孔質ポリマー(イオン交換容量: 0.3 meq/g)が固相として使用されている. そのため, HLB では疎水性相互作用による保持が, MCX では疎水性相互作用及び陽イオン交換作用による複合的な保持が, また, MAX では疎水性相互作用及び陰イオン交換作用による複合的な保持が得られる.

ヨウ素化ヒスチジンは他のヨウ素化アミノ酸に比べると疎水性が小さい. また, イミダゾール基を有するため, 基本的には塩基としての特性を示す. His, MIH 及び DIH について比較すると, ヨウ素の数が増えるに従って化合物の疎水性は増加するが, イミダゾール基の塩基性は弱まる. なお, DIH のイミダゾール基は塩基ではなく, 酸としての特性を示す.

固相抽出の第一段階として, ヨウ素化ヒスチジンを固相に保持させる条件について検討した. この保持の強さは試料の液性によって変化する. そこで, 1×10^{-4} M のヨウ素化ヒスチジンの標準液 200 μ l に種々の希釈液 1 ml を加えて液性を調整した後, これを各固相にアプライする実験を試みた. この実験では, 固相から流れ出てきた溶出液を回収し, 移動相で希釈した後, これを HPLC で分析し, 固相に保持されなかったヨウ素化ヒスチジンの量を求めた. そして, その定量値からヨウ素化ヒスチジンの固相への保持率を算出した. なお, MCX に塩基性の希釈液(0.01 M NH_4OH 又は 0.01 M NaOH)で調製した試料をアプライすると, 試料中の陽イオン(Na^+ 又は NH_4^+)が固相のスルホン酸基に結合して対イオンの H^+ と置き換わるため, 試料の液性は弱酸性に変化した. そこで, この条件

Table 2 Retention of iodohistidines on OASIS HLB, MCX and MAX

Dilution solvent ^{a)}	Retention ^{b)} , %								
	OASIS HLB			OASIS MCX			OASIS MAX		
	His	MIH	DIH	His	MIH	DIH	His	MIH	DIH
0.1% CF ₃ COOH ^{c)}	17.1	16.7	100.0	100.0	100.0	100.0	9.5	5.5	29.1
0.01 M CH ₃ COOH ^{d)}	8.0	7.3	95.4	100.0	100.0	100.0	11.5	4.6	53.2
H ₂ O	16.9	20.5	98.2	100.0	100.0	100.0	2.7	30.8	100.0
0.01 M NH ₄ OH ^{e)}	14.4	34.6	61.0	6.0	8.3	11.9	100.0	100.0	100.0
0.01 M NaOH ^{f)}	14.0	26.8	21.9	9.4	8.6	6.8	100.0	100.0	100.0

a) 1 ml of dilution solvent was added to 200 μ l of each 1×10^{-4} M iodohistidine. b) Average of two experiments; c) pH = 2.0; d) pH = 3.4; e) pH = 10.6; f) pH = 12.0

Table 3 Recovery of iodohistidines from OASIS MCX

Eluent	Recovery ^{a)} , % (RSD, %)		
	His	MIH	DIH
0.1 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	21.3	0.0	5.3
0.5 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (75 : 25, v/v)	54.0	64.8	72.8
0.5 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	88.5	78.3	74.1
0.5 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	94.3	80.1	70.4
25% NH ₄ OH-CH ₃ OH ^{b)} (5 : 95, v/v)	92.1 (1.9)	95.0 (1.3)	81.7 (0.8)

a) Average of two experiments; The recovery shown with relative standard deviation (RSD) was the average of four experiments. b) 25% NH₄OH is equivalent to 14 M NH₄OH.

では、液性の変化を避けるため、固相を通常の方法でコンディショニングした後、0.5 M NaOH（又は 0.5 M NH₄OH）1 ml、水 1 ml を続けて流し、固相のスルホン酸基を Na 型（又は NH₄ 型）に変換してから試料をアプライすることにした。実験の結果を Table 2 に示した。

HLB では、強酸性下で DIH を保持させる場合を除くと、どの条件下でもヨウ素化ヒスチジンを完全に保持させることはできなかった。DIH は、イミダゾール基のイオン化が抑制される酸性下で、疎水性相互作用による保持が増加したが、His 及び MIH は、イオン化が抑制される塩基性下でも、保持は増加しなかった。His 及び MIH が、どの条件下でも十分な保持を示さなかったのは、その疎水性が本質的に小さいからであると考えた。

MCX では、中性及び酸性下でどのヨウ素化ヒスチジンも完全に保持させることができた。この保持は固相（スルホン酸基）とヨウ素化ヒスチジン（アミノ基及び塩基性のイミダゾール基）の陽イオン交換作用によるものと考えた。

MAX では、塩基性下でどのヨウ素化ヒスチジンも固相に完全に保持させることができた。この保持は固相（4 級アンモニウム基）とヨウ素化ヒスチジン（カルボキシル基及び酸性のイミダゾール基）の陰イオン交換作用によるものと考えた。

以上のことから、疎水性が小さいヨウ素化ヒスチジンの

固相抽出には、イオン交換型の固相（MCX 及び MAX）を適用する必要があるという結論を得た。

3・2・2 ヨウ素化ヒスチジンの固相からの溶出 固相抽出の第二段階として、固相に保持させたヨウ素化ヒスチジンを溶出させる条件について検討した。この実験では、 1×10^{-4} M のヨウ素化ヒスチジンの標準液 200 μ l に 0.01 M 酢酸 1 ml を加えた試料を MCX に、また、0.01 M NH₄OH 1 ml を加えた試料を MAX にアプライした後、これらの固相に種々の溶離液を流してヨウ素化ヒスチジンを溶出させ、これを HPLC で分析し、回収率を求めた。

MCX からのヨウ素化ヒスチジンの回収率を Table 3 に示した。溶離液には、(1) 0.1 M 又は 0.5 M NH₄OH と CH₃CN の混合溶媒（以下 NH₄OH-CH₃CN）、(2) 5% の濃アンモニア水（25% NH₄OH）を含有したメタノール（CH₃OH）¹⁴⁾（以下 NH₄OH-CH₃OH）を使用した。NH₄OH-CH₃CN を使う溶出では、0.5 M NH₄OH 及び 50% 以上の CH₃CN から成る溶離液を使用した場合、約 70~95% の回収率が得られた。また、NH₄OH-CH₃OH を使う溶出では、約 80~95% の回収率が得られた。

MAX からのヨウ素化ヒスチジンの回収率を Table 4 に示した。溶離液には、(1) 0.1% 又は 1% TFA 溶液と CH₃CN の混合溶媒（以下 TFA-CH₃CN）、(2) 2% のギ酸（98% HCOOH）を含有した CH₃OH¹⁴⁾（以下 HCOOH-CH₃OH）を使用した。TFA-CH₃OH を使う溶出では、

Table 4 Recovery of iodohistidines from OASIS MAX

Eluent	Recovery ^{a)} , % (RSD, %)		
	His	MIH	DIH
0.1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN ^{b)} (50 : 50, v/v)	38.0	25.3	36.5
1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN ^{c)} (75 : 25, v/v)	66.2	67.8	63.9
1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	75.2	75.7	70.7
1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	72.3	74.2	81.3
98% HCOOH-CH ₃ CN ^{d)} (2 : 98, v/v)	65.7 (2.5)	76.8 (1.6)	79.1 (1.7)

a) Average of two experiments; The recovery shown with relative standard deviation (RSD) was the average of four experiments. b) 0.1% CF₃COOH is equivalent to 0.013 M CF₃COOH. c) 1% CF₃COOH is equivalent to 0.13 M CF₃COOH. d) 98% HCOOH is equivalent to 26 M HCOOH.

Table 5 Retention of iodotyrosines on OASIS HLB, MCX and MAX

Dilution solvent ^{a)}	Retention ^{b)} , %								
	OASIS HLB			OASIS MCX			OASIS MAX		
	Tyr	MIT	DIT	Tyr	MIT	DIT	Tyr	MIT	DIT
0.1% CF ₃ COOH ^{c)}	27.1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	10.9	94.1	100.0
0.01 M CH ₃ COOH ^{d)}	23.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	15.3	90.3	100.0
H ₂ O	22.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	22.8	100.0	100.0
0.01 M NH ₄ OH ^{e)}	15.0	19.9	14.5	6.9	18.5	9.4	100.0	100.0	100.0
0.01 M NaOH ^{f)}	13.2	16.7	19.7	8.1	10.7	11.6	100.0	100.0	100.0

a) 1 ml of dilution solvent was added to 200 µl of each 1×10^{-4} M iodotyrosine. b) Average of two experiments; c) pH = 2.0; d) pH = 3.4; e) pH = 10.6; f) pH = 12.0

1% TFA 及び 75% の CH₃CN から成る溶離液を使用した場合, 約 70~80% の回収率が得られた。また, HCOOH-CH₃OH を使う溶出では, 約 65~80% の回収率が得られた。

3.3 ヨウ素化チロシンの固相抽出

3.3.1 ヨウ素化チロシンの固相への保持 ヨウ素化チロシンは, ヨウ素化ヒスチジンよりも疎水性が大きい。また, フェノール性水酸基を持つため, 酸としての特性を示す。Tyr, MIT 及び DIT について比較すると, ヨウ素の数が增えるに従って, 化合物の疎水性は増加し, 酸性は強まる⁹⁾。なお, ヨウ素化チロシンのフェノール性水酸基が解離すると, 化合物の疎水性は著しく減少する。

3.2.1 と同じ方法でヨウ素化チロシンを固相に保持させる条件について検討し, その結果を Table 5 に示した。

HLB では, 酸性及び中性下で MIT 及び DIT を完全に保持させることができた。この保持は固相とヨウ素化チロシンとの疎水性相互作用によるものと考えた。そのため, フェノール性水酸基が解離する塩基性下では保持させることはできなかったと考えた。また, Tyr は疎水性が本質的に小さいため, どの条件下でも保持させることはできなかったと考えた。

MCX では, 酸性及び中性下でどのヨウ素化チロシンも完全に保持させることができた。この保持は固相 (スルホ

ン酸基) とヨウ素化チロシン (アミノ基) の陽イオン交換作用及び疎水性相互作用によるものと考えた。

MAX では, 塩基性下でどのヨウ素化チロシンも完全に保持させることができた。この保持は, 固相 (4 級アンモニウム基) とヨウ素化チロシン (カルボキシル基及びフェノール性水酸基) の陰イオン交換作用によるものと考えた。なお, DIT は, 疎水性相互作用により, 酸性下でも保持させることができると考えた。

3.3.2 ヨウ素化チロシンの固相からの溶出 3.2.1 と同じ方法 (HLB に保持させる試料には 0.01 M CH₃COOH を加えた) で, 固相に保持させたヨウ素化チロシンを溶出させる条件について検討した。

HLB からのヨウ素化チロシンの回収率を Table 6 に示した。溶離液には (1) 0.1% TFA と CH₃CN の混合溶媒 (以下 0.1% TFA-CH₃CN), (2) 0.1 M NH₄OH と CH₃CN の混合溶媒 (以下 0.1 M NH₄OH-CH₃CN) を使用した。酸性の 0.1% TFA-CH₃CN を使う溶出では, MIT は, 25% 以上の CH₃CN を含む溶離液を使用すれば, 95% 以上の回収率が得られた。しかし, DIT は, 50% 以上の CH₃CN 含む溶離液を使用しないと, 95% 以上の回収率は得られなかった。一方, 塩基性の 0.1 M NH₄OH-CH₃CN を使う溶出では, フェノール性水酸基が解離して疎水性が減少するため, 25% 以上の CH₃CN を含む溶離液を使用すれば, DIT も MIT と同じように 90% 以上の回収率が得

Table 6 Recovery of iodotyrosines from OASIS HLB

Eluent	Recovery ^{a)} , % (RSD, %)	
	MIT	DIT
0.1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN ^{b)} (75 : 25, v/v)	98.9	69.8
0.1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	98.2	96.7
0.1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	96.3 (2.4)	94.7 (1.5)
0.1 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (75 : 25, v/v)	96.2 (2.4)	91.1 (2.8)
0.1 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	99.0	99.3
0.1 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	98.7	97.0

a) Average of two experiments; The recovery shown with relative standard deviation (RSD) was the average of four experiments. b) 0.1% CF₃COOH is equivalent to 0.013 M CF₃COOH.

Table 7 Recovery of iodotyrosines from OASIS MCX

Eluent	Recovery ^{a)} , % (RSD, %)		
	Tyr	MIT	DIT
0.1 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	0.0	7.0	0.0
0.5 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (75 : 25, v/v)	83.0	76.3	72.3
0.5 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	92.9	90.9	90.4
0.5 M NH ₄ OH-CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	93.0	92.5	91.2
25% NH ₄ OH-CH ₃ OH ^{b)} (5 : 95, v/v)	97.4 (0.6)	96.1 (0.5)	96.5 (2.5)

a) Average of two experiments; The recovery shown with relative standard deviation (RSD) was the average of four experiments. b) 25% NH₄OH is equivalent to 14 M NH₄OH.

Table 8 Recovery of iodotyrosines from OASIS MAX

Eluent	Recovery ^{a)} , % (RSD, %)		
	Tyr	MIT	DIT
0.1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN ^{b)} (50 : 50, v/v)	27.5	58.3	35.8
1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN ^{c)} (75 : 25, v/v)	68.6	63.0	26.0
1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	74.3	71.3	52.4
1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	81.2	79.0	89.7
98% HCOOH-CH ₃ OH ^{d)} (98 : 2, v/v)	87.3 (0.7)	86.7 (1.3)	91.1 (1.2)

a) Average of two experiments; The recovery shown with relative standard deviation (RSD) was the average of four experiments. b) 0.1% CF₃COOH is equivalent to 0.013 M CF₃COOH. c) 1% CF₃COOH is equivalent to 0.13 M CF₃COOH. d) 98% HCOOH is equivalent to 26 M HCOOH.

られた。

MCX からのヨウ素化チロシンの回収率を Table 7 に示した。NH₄OH-CH₃CN を使う溶出では、0.5 M NH₄OH 及び 50% 以上の CH₃CN から成る溶離液を使用した場合、90% 以上の回収率が得られた。また、NH₄OH-CH₃OH を使う溶出では、95% 以上の回収率が得られた。

MAX からのヨウ素化チロシンの回収率を Table 8 に示した。TFA-CH₃OH を使う溶出では、1% TFA 及び 75% の CH₃CN から成る溶離液を使用した場合、約 80~90% の回収率が得られた。また、HCOOH-CH₃OH を使う溶出では、約 85~90% の回収率が得られた。

3・4 ヨウ素化チロシンの固相抽出

3・4・1 ヨウ素化チロシンの固相への保持 チロシンは、チロシンのヒドロキシフェニル基（フェノール）にフェノールがもう 1 個縮合した構造を持ち、その二つのベンゼン環 {inner-ring (α 環) 及び outer-ring (β 環)} にヨウ素は様々な形態で結合する。そのため、ヨウ素化チロニンには多種のヨウ素化合物が存在するが、本研究では生物学的に重要な四つの化合物 (T₀, T₃, rT₃ 及び T₄) について固相抽出法を検討した。

ヨウ素化チロニンは、ヨウ素化チロシンよりも疎水性が大きく、水に難溶性である¹⁵⁾。また、ヨウ素化チロシンと同じようにフェノール性水酸基を持つため、酸としての特

Table 9 Retention of iodothyronines on OASIS HLB, MCX and MAX

Dilution solvent ^{a)}	Retention ^{b)} , %											
	OASIS HLB				OASIS MCX				OASIS MAX			
	T ₀	T ₃	rT ₃	T ₄	T ₀	T ₃	rT ₃	T ₄	T ₀	T ₃	rT ₃	T ₄
0.1% CF ₃ COOH ^{c)}	100.0	—	—	—	100.0	—	—	—	100.0	—	—	—
0.1% CF ₃ COOH-CH ₃ CN (80 : 20, v/v)	—	100.0	100.0	100.0	—	100.0	100.0	100.0	—	100.0	100.0	100.0
0.01 M CH ₃ COOH ^{d)}	100.0	—	—	—	100.0	—	—	—	100.0	—	—	—
0.01 M CH ₃ COOH-CH ₃ CN (80 : 20, v/v)	—	100.0	100.0	100.0	—	100.0	100.0	100.0	—	100.0	100.0	100.0
H ₂ O	100.0	—	—	—	100.0	—	—	—	100.0	—	—	—
H ₂ O-CH ₃ CN (80 : 20, v/v)	—	92.2	86.3	99.1	—	100.0	100.0	100.0	—	100.0	100.0	100.0
0.01 M NH ₄ OH ^{e)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	89.2	100.0	100.0	100.0	100.0
0.01 M NaOH ^{f)}	100.0	100.0	100.0	100.0	19.9	44.5	33.5	42.4	100.0	100.0	100.0	100.0

a) 1 ml of dilution solvent was added to 200 μ l of each 1×10^{-4} M iodothyronine. b) Average of two experiments; c) pH = 2.0; d) pH = 3.4; e) pH = 10.6; f) pH = 12.0

性を示す。T₀, T₃, rT₃ 及び T₄ を比較すると, ヨウ素の数が增えるに従って化合物の疎水性は増加する。なお, 化合物の酸性は, フェノール性水酸基を有するベンゼン環 (β 環) のヨウ素の数が增えるに従って強まる。

ヨウ素化ヒスチジン及びヨウ素化チロシンの固相抽出では, 様々な液性の希釈液を加えて固相にアプライする試料の pH を調整した。この操作を実施する場合, 扱うヨウ素化アミノ酸は希釈液に完全に溶解するという前提条件が必要であった。しかし, この操作をヨウ素化チロニンに適用した場合, 塩基性の希釈液では問題は起こらなかったが, 水及び酸性の希釈液を加えると, 試料は溶解性を維持できなくなり, 沈殿が析出することが分かった。この問題は, ヨウ素化チロニンの疎水性が極めて大きいために起こった。そこで, 本実験では, 1×10^{-4} M のヨウ素化チロニンの標準液 200 μ l に水あるいは酸 1 ml を加えるとき, 溶解補助剤として CH₃CN 300 μ l (容積比で 20%) も同時に加えることにした。なお, T₀ は, どの希釈液を加えても沈殿は析出しなかったため, CH₃CN は加えなかった。

固相にアプライする試料の調製法を一部変更したほかは, 3・2・1 と同じ方法でヨウ素化チロニンを固相に保持させる条件について検討し, その結果を Table 9 に示した。

HLB では, 酸性下でどのヨウ素化チロニンも完全に保持させることができた。この保持は固相とヨウ素化チロニンとの疎水性相互作用によるものと考えた。また, ヨウ素化チロニンは, ヨウ素化チロシンと異なり, 塩基性下でも完全に保持させることができた。これは, ヨウ素化チロニンの疎水性が本質的に大きく, フェノール性水酸基が解離した塩基性下でも, 保持に必要な疎水性を十分維持するからであると考えた。

MCX では, 酸性及び中性下でどのヨウ素化チロニンも完全に保持させることができた。この保持は, 固相 (スルホン酸基) とヨウ素化チロニン (アミノ基) の陽イオン交

換作用及び疎水性相互作用によるものと考えた。

MAX では, すべての液性下でどのヨウ素化チロニンも完全に保持させることができた。この保持は, 酸性下では固相とヨウ素化チロニンの疎水性相互作用によるものと, 塩基性下では固相 (4 級アンモニウム基) とヨウ素化チロニン (カルボキシル基及びフェノール性水酸基) の陰イオン交換作用及び疎水性相互作用によるものと考えた。

3・4・2 ヨウ素化チロニンの固相からの溶出 3・2・2 と同じ方法 (0.01 M CH₃COOH で調製する試料には CH₃CN も加えた) で, 固相に保持させたヨウ素化チロニンを溶出させる条件について検討した。

HLB からのヨウ素化チロニンの回収率を Table 10 に示した。酸性の 0.1% TFA-CH₃CN を使う溶出では, 75% 以上の CH₃CN を含む溶離液を使用しないと, 90% 以上の回収率は得られなかった。一方, 塩基性の 0.1 M NH₄OH-CH₃CN を使う溶出では, フェノール性水酸基が解離して疎水性が減少するため, 50% 以上の CH₃CN を含む溶離液を使用すれば, 90% 以上の回収率が得られた。

MCX からのヨウ素化チロニンの回収率を Table 11 に示した。NH₄OH-CH₃CN を使う溶出では, 0.5 M NH₄OH 及び 50% 以上の CH₃CN から成る溶離液を使用した場合, 約 85~95% の回収率が得られた。また, NH₄OH-CH₃OH を使う溶出では, 約 95% の回収率が得られた。

MAX からのヨウ素化チロニンの回収率を Table 12 に示した。TFA-CH₃OH を使う溶出では, 1% TFA 及び 75% の CH₃CN から成る溶離液を使用した場合, 約 85% の回収率が得られた。また, HCOOH-CH₃OH を使う溶出では, 85% 以上の回収率が得られた。

4 結 語

本研究では, 3 種類の固相に対するヨウ素化アミノ酸の固相抽出条件を標準試料で検討した。この固相抽出では,

Table 10 Recovery of iodothyronines from OASIS HLB

Eluent	Recovery ^{a)} , % (RSD, %)			
	T ₀	T ₃	rT ₃	T ₄
0.1% CF ₃ COOH - CH ₃ CN ^{b)} (75 : 25, v/v)	75.0	0.0	0.0	0.0
0.1% CF ₃ COOH - CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	95.4	72.8	67.6	28.8
0.1% CF ₃ COOH - CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	99.1 (2.5)	99.0 (1.1)	97.9 (1.5)	92.8 (2.6)
0.1 M NH ₄ OH - CH ₃ CN (75 : 25, v/v)	71.4 (14.6)	88.5 (2.7)	96.3 (1.9)	92.5 (1.8)
0.1 M NH ₄ OH - CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	94.5 (1.9)	93.5	98.3	92.9
0.1 M NH ₄ OH - CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	99.8	93.5	97.2	94.8

a) Average of two experiments; The recovery shown with relative standard deviation (RSD) was the average of four experiments. b) 0.1% CF₃COOH is equivalent to 0.013 M CF₃COOH.

Table 11 Recovery of iodothyronines from OASIS MCX

Eluent	Recovery ^{a)} , % (RSD, %)			
	T ₀	T ₃	rT ₃	T ₄
0.1 M NH ₄ OH - CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5 M NH ₄ OH - CH ₃ CN (75 : 25, v/v)	79.9	79.8	68.1	56.8
0.5 M NH ₄ OH - CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	85.9	91.5	88.4	90.7
0.5 M NH ₄ OH - CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	88.4	93.4	92.9	97.1
25% NH ₄ OH - CH ₃ CN ^{b)} (5 : 95, v/v)	97.1 (3.2)	96.2 (0.3)	95.5 (2.8)	93.4 (3.9)

a) Average of two experiments; The recovery shown with relative standard deviation (RSD) was the average of four experiments. b) 25% NH₄OH is equivalent to 14 M NH₄OH.

Table 12 Recovery of iodothyronines from OASIS MAX

Eluent	Recovery ^{a)} , % (RSD, %)			
	T ₀	T ₃	rT ₃	T ₄
0.1% CF ₃ COOH - CH ₃ CN ^{b)} (50 : 50, v/v)	45.0	65.8	32.4	23.9
1% CF ₃ COOH - CH ₃ CN ^{c)} (75 : 25, v/v)	51.6	0.0	0.0	0.0
1% CF ₃ COOH - CH ₃ CN (50 : 50, v/v)	71.7	81.1	75.0	78.1
1% CF ₃ COOH - CH ₃ CN (25 : 75, v/v)	85.4	84.8	86.4	86.9
98% HCOOH - CH ₃ CN ^{d)} (2 : 98, v/v)	92.8 (3.6)	91.8 (2.6)	93.4 (1.2)	86.5 (2.8)

a) Average of two experiments; The recovery shown with relative standard deviation (RSD) was the average of four experiments. b) 0.1% CF₃COOH is equivalent to 0.013 M CF₃COOH. c) 1% CF₃COOH is equivalent to 0.13 M CF₃COOH. d) 98% HCOOH is equivalent to 26 M HCOOH.

疎水性相互作用, 陽イオン交換作用及び陰イオン交換作用による分離モードが利用できた。実試料の分析では, ヨウ素化アミノ酸の種類及び試料の状態に応じて, 抽出条件を適切に使い分ける必要がある。本研究のデータは, 実試料への応用を構築するとき, 重要な参考資料となる。

文 献

- 1) E. C. Jorgensen: "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 6, Edited by C. H. Li, p. 57 (1978), (Academic Press, New York).
- 2) J. Robbins, J. E. Rall: "Hormones in Blood", Vol. 1, Edited by C. H. Gray, V. H. T. James, p. 575 (1979), (Academic Press, London).
- 3) J. C. Savoie, P. Thomopoulos, F. Savoie: *J. Clin. Invest.*, **52**, 106 (1973).
- 4) J. C. Savoie, J. P. Massin, F. Savoie: *J. Clin. Invest.*, **52**, 116 (1973).
- 5) I. J. Chopra: "Handbook of Radioimmunoassay", Edited by G. E. Abraham, p. 679 (1977), (Marcell Dekker, New York).
- 6) 遠藤雄一, 畑 直成, 伊藤正雄, 宮井 潔: "酵素免疫測定法", 第3版, 石川榮治, 河合 忠, 宮井 潔編, p. 255 (1987), (医学書院).
- 7) N. M. Alexander, M. Nishimoto: *Clin. Chem.*, **25**, 1757 (1979).
- 8) M. T. W. Hearn, W. S. Hancock: *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 217 (1979).
- 9) M. Miyashita, S. Yamashita: *J. Chromatogr.*, **475**, 135 (1989).

- 10) A. de la Vieja, M. Calero, P. Santisteban, L. Lamas : *J. Chromatogr.*, **688**, 143 (1997).
- 11) K. C. Van Horne (Ed.): “*Handbook of Sorbent Extraction Technology*”, (1985), (Analytichem International, Habor City).
- 12) R. D. McDowall: *J. Chromatogr.*, **492**, 3 (1989).
- 13) M. Miyashita, Y. Seyama, K. Kaji, S. Yamashita : *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 386 (1983).
- 14) 日本ウォーターズ : “*Chromatography Columns and Supplies Catalog*”, (2003-2004).
- 15) H. E. Evert: *J. Phys. Chem.*, **64**, 478 (1960).