薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
106 (11) 1028-1033 (1986)

Iodoplatinate によるポストカラム配位子交換反応を用いる 有機硫黄化合物の高速液体クロマトグラフィー. アンギオテンシン変換酵素阻害剤 (2*R*,4*R*)-2-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(3-mercaptopropionyl)-4-thiazolidinecarboxylic Acid (SA446) とその尿中代謝物の同時定量への応用

参天製薬株式会社研究部

堀内正人,* 高階秀男, 藤村健一, 磯 正

High-Performance Liquid Chromatography of Organosulfur Compounds Using Postcolumn Ligand Exchange Reaction with Iodoplatinate. Application to the Simultaneous Determination of (2*R*,4*R*)-2-(*o*-Hydroxyphenyl)-3-(3-mercaptopropionyl)-4-thiazolidinecarboxylic Acid (SA446), an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor and Its Urinary Metabolites

MASATO HORIUCHI,* HIDEO TAKASHINA, KEN-ICHI FUJIMURA
and TADASHI ISO

Research Laboratory, Santen Pharmaceutical Co., Ltd., 3-9-19
Shimoshinjo, Higashiyodogawa-ku, Osaka, 533, Japan

(Received November 18, 1985)

The reactivity of iodoplatinate with 36 compounds was surveyed. Most of organosulfur compounds such as thiols, disulfides, thioethers, thioketones and compounds having thiazolidine ring reacted with colored iodoplatinate to result in decoloration. However, compounds which contain organosulfur in the molecule as sulfoxide or sulfone group gave weak or no decoloration. Iodoplatinate also reacted with such reductants as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, nicotinamide adenine dinucleotide and L-ascorbic acid. For the simultaneous determination of (2*R*,4*R*)-2-(*o*-hydroxyphenyl)-3-(3-mercaptopropionyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid (SA446), a thiol group containing angiotensin converting enzyme inhibitor, and its urinary metabolites, the reaction was applied to the postcolumn detection after high performance liquid chromatography (HPLC). Iodoplatinate may be expected as a useful reagent for the postcolumn reaction in HPLC determination of organosulfur compounds and some reductants in biological samples.

Keywords—HPLC; organosulfur compound; reactivity; SA446; (2*R*,4*R*)-2-(*o*-hydroxyphenyl)-3-(3-mercaptopropionyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid

緒 言

薬物の中には thiouracil, tiopronin, captopril, D-ペニシラミンなどにみられるように, 分子内にイオウを持つものが少なくない. 生体成分としてもグルタチオン, リポ酸, coenzyme A などイオウを持つものが多い. このイオウに着目した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による有機硫黄化合物の検出方法については, 多くの方法が報告されている.¹⁻¹²⁾ 例えば, チオール化合物については各種チオール基反応性試薬⁸⁻¹¹⁾を用いることにより, また, ジスルフィド化合物では還元してチオール化合物としたのち, チオール基反応性試薬を用いることにより定量されている.^{1,2,10,12)} しかし, 分子中にチオール基やジスルフィド基を欠く有機硫黄化合物に対しては報告例⁹⁾もあるがその数は極めて少ない.

Iodoplatinate は古くからアルカロイドの検出薬として用いられる一方, メチオニンやシステインなどの含硫アミノ酸と反応して退色することが知られている.^{8,13,14)} 後者の反応は既にペーパークロマトグラフィーによるメチオニン, シスチンやシステインの検出,^{14,15)} イオン交換クロマトグラフィーによる D-ペニシラミン, メチオニン, システインやシスチンの定量に応用されている.¹⁶⁾

Fig. 1. Chemical Structures of SA446 and Its Related Compounds

しかし、本反応の特異性については十分に知られておらず、また水溶性含硫アミノ酸以外の有機硫黄化合物への応用例はほとんど見当らない。本研究では有機硫黄化合物を含む 36 種の化合物について *iodoplatinate* との反応性を検討するとともに、本反応を逆相高速液体クロマトグラフィー (RP HPLC) の検出方法に応用して、アンギオテンシン変換酵素阻害剤 (2*R*,4*R*)-2-(*o*-hydroxyphenyl)-3-(3-mercaptopropionyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid (SA446 Fig. 1 a)¹⁷⁾ 及びその尿中代謝物の同時分離定量法を検討した。その結果、*iodoplatinate* は有機硫黄化合物の RP HPLC において有用なポストカラム検出法であることを認めたので報告する。

実験の部

使用化合物 SA446 並びに Fig. 1 に示す (2*R*,2'*R*,4*R*,4'*R*)-3,3'-(3,3'-dithiodipropionyl)bis[2-(*o*-hydroxyphenyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid] (SA687, b), (2*R*,4*R*)-2-(*o*-hydroxyphenyl)-3-[3-(methylthio)propionyl]-4-thiazolidinecarboxylic acid (SA738, c), (2*R*,4*R*)-2-(*o*-hydroxyphenyl)-3-[3-(methyl sulfinyl)propionyl]-4-thiazolidinecarboxylic acid (SA850, d), (2*R*,4*R*)-3-[3-[(2*R*)-2-amino-2-carboxyethylthio]propionyl]-2-(*o*-hydroxyphenyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid (SA1214, e), (2*R*,4*R*)-3-[3-[(2*R*)-2-[(4*S*)-4-amino-4-carboxybutyramido]-2-(carboxymethylcarbonyl)ethylthio]propionyl]-2-(*o*-hydroxyphenyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid (SA1215, f), (2*R*,4*R*)-3-acryloyl-2-(*o*-hydroxyphenyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid (SA849, g) 及び 3-acetyl-4-thiazolidinecarboxylic acid (h) は参天製薬(株)合成品を使用した。その他の化合物は、すべて市販の試薬特級品を使用した。なお、本実験で用いた水は日本ミリポア・リミテッド製ミリポア Q システムで純化して使用した。

Iodoplatinate 試薬の調製 酢酸 300 ml, 水 400 ml, 1 M ヨウ化カリウム水溶液 4 ml 及び 1% ヘキサクロロ白金 (IV) 酸 ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 和光純薬工業) 水溶液 2.4 ml の混液を一夜放置後、アスピレーターで 20 分間脱気することにより調製した。

Iodoplatinate 試薬の反応性 被験化合物の 20 mM 水溶液又はメチルアルコール溶液 0.1 ml に *iodoplatinate* 試薬 0.9 ml を加え、10 秒後、波長 500 nm の吸光度を測定することによった。¹⁸⁾ 反応性の程度は、化合物の有無による吸光度差を吸光度の減少率に換算して求めた。

逆相高速液体クロマトグラフィー 高速液体クロマトグラフは島津製作所製 LC-3A を用いた。カラムには Nucleosil 7C₈ (Macherey-Nagel 社) をステンレス製クロマト管 (15 cm×4 mm i.d.) に充填したものを使用した。被験化合物間の相互分離が不十分な場合は、このカラムに更に Nucleosil 7C₁₈ (Macherey-Nagel 社) を充填したステンレス製クロマト管 (10 cm×4 mm i.d.) を接続した。溶離液には pH 3.0 に調整した 10 mM リン酸二水素カリウム-メチルアルコール (72:28) とメチルアルコールを用い、メチルアルコールを添加する直線勾配溶離法 (流速 1 ml/min, 島津製作所製 LC-3A 用グラジエント装置) を用いた。グラジエントのプログラムは、はじめの

16 分間でメチルアルコール濃度を 28% から 34% に, 続く 10 分間で 34% から 55% に上げるものである. 検出は, カラムからの流出液を別の送液用ポンプ (Minimicro Pump KHD-16, 協和精密社製) から LC-3A 用高感度ダンパー (島津製作所製) を経て送った iodoplatinate 試薬 (流速 0.6 ml/min) と反応 (反応コイル 3 m×0.3 mm i.d.) させたのち, 波長 500 nm (島津製作所製紫外・可視分光光度計検出器 SPD-1) でモニター (感度 0.01 AUFS) することによった. 記録計は島津製作所製クロマトパック C-R2A を用いた. カラム及び反応コイルは 40°C の恒温槽中に設置した. 定量は, カラム注入量を 20 μ l として, ピークの高さに基づいて行った. 標準溶液は, 各標準化合物をメチルアルコールもしくは酢酸に溶解したのち, 希釈用溶液 (0.5 M 酢酸-2% 塩化ナトリウム-メチルアルコール, 1:1:1) で希釈して調製した.

尿試料の調製 Wistar 系雄性ラット (9-10 週齢) に SA466 を経口投与 (30 mg/kg) したのち, あらかじめ 0.5-1 ml の 5 M 酢酸を入れたガラス容器に尿を採取し, ファインフィルター F (10 μ m, 石川製作所) でろ過した. フィルターを更に 2% 塩化ナトリウム水溶液, メチルアルコールで洗い, ろ過尿と合せたものを尿試料とした.

尿試料の Dithioerythritol (DTE) 処理 既報の方法¹⁰⁾によった. すなわち, 尿試料 150 μ l に 1-15 mg/ml の DTE を含有する 1 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH 9.0) 25 μ l を加え, 30 分間放置後, 100 μ l の 1 M HCl を加えて還元反応を停止して DTE 処理尿試料とした.

結 果

各種有機化合物と Iodoplatinate との反応性

Iodoplatinate と種々の有機化合物との反応性を調べた結果を Table I に示す. チオール化合物 (No. 1-6,

TABLE I. Reactivities of Various Compounds with Iodoplatinate Reagent

No.	Compound	Reactivity	No.	Compound	Reactivity
Thiol			Thiazolidine + disulfide		
1.	L-Cysteine	99	19.	SA1214	83
2.	D,L-Homocysteine	99	20.	SA1215	85
3.	Glutathione (red.)	100	21.	SA687	92
4.	Tiopronin	99	Thiazolidine + thioether		
5.	Coenzyme A	99	22.	SA738	93
6.	2-Thiouracil	95	Thiazolidine + sulfoxide		
Disulfide			23.	SA850	83
7.	L-Cystine	56	Other sulfur compound		
8.	Glutathione (ox.)	99	24.	S-Carbamyl-L-cysteine	52
9.	D,L-Lipoic acid	88	25.	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)	0
Thioether			Reductant		
10.	L-Methionine	96	26.	NADPH	81
11.	S-Methyl-L-cysteine	100	27.	NADH	82
12.	D,L-Ethionine	95	28.	L-Ascorbic acid	99
Thioketone			29.	D-Glucose	0
13.	2-Thiobarbituric acid	99	Phenol		
Sulfoxide			30.	Dopamine	0
14.	Dimethylsulfoxide	11	31.	L-Epinephrine	0
Sulfone			32.	p-Nitrophenol	0
15.	D,L-Methionine sulfone	0	33.	Hydroquinone	0
Thiazolidine			Others		
16.	3-Acetyl-4-thiazolidine-carboxylic acid	57	34.	NADP	6
17.	SA849	86	35.	NAD	10
Thiazolidine + thiol			36.	tert-Butylhydroperoxide	3
18.	SA446	100			

Test compound was mixed with the iodoplatinate reagent at a final concentration of 2 mM, and absorbance at 500 nm was determined within 10 s. Reactivity was expressed as decreased percent of the extinction.

18), チオエーテル化合物 (No. 10—12, 22), ジスルフィド化合物 (No. 7—9, 19—21), チオケトン化合物 (No. 13) は, iodoplatinate と反応することにより退色して吸光度の低下を生じた. しかし, スルホキンド化合物 (No. 14) は反応性に乏しく, また, スルホン化合物 (No. 15) 及びスルホン酸化合物 (No. 25) は, 反応しなかった. また, No. 16, 17 にみられるようにチアゾリジン環を有する化合物も反応することが認められた. このため, No. 18—23 で認められた退色反応は, このチアゾリジン環の関与による反応ともみられる. 還元性化合物のうちでは, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (No. 26), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (No. 27) や L-アスコルビン酸 (No. 28) が iodoplatinate と反応したが, グルコース (No. 29), 各種フェノール性化合物 (No. 30—No. 33) や過酸化化合物 (No. 36) とは反応しなかった.

RP HPLC の検出系への応用 Fig. 2 (A) に, iodoplatinate を RP HPLC による有機硫黄化合物の検出に応用した例を示す. 対象化合物は SA446 (No. 18) 並びにその関連化合物 (No. 19—23) で, いずれも分子内にチアゾリジン環とアシル基部分にイオウ原子を有する化合物を用いた. Fig. 2 (A) に示すように, 実験の部に記載した HPLC 条件下でこれらすべての化合物の分離と検出が可能であった. なお, 本実験では Nucleosil 7 C₈ 充填カラム一本では No. 19 と No. 23 の分離が不充分であったため, 更にこのカラムに Nucleosil 7 C₁₈ 充填カラムを接続したところ両化合物の分離が可能となった. また, 再現性のあるクロマトグラムを得るにはカラム及び検出系を 40°C の恒温に保持する必要がある.

Fig. 2 (B), (C), (D) の各 RP HPLC クロマトグラムは, SA446 の尿中代謝物の分析に応用した例を示す.

Fig. 2 (B) にみられるように, SA446 を投与しないラットの尿では, ほとんどピークが見られなかった. Fig. 2 (C), (D) は, それぞれ 30 mg/kg の SA446 を経口投与後, 6 時間までに採取したラット尿, 及び DTE 処理尿の場合を示す. DTE 処理前では約 6 種のピークが認められ, このうちピーク 21 は, Fig. 1 (D) にみられるように DTE 処理で消失したことから, ジスルフィド体であると推定された. また, 検出方法として iodoplatinate のかわりに 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を用いる¹⁰⁾と, ピーク 18' のみが出現したことから, ピーク 18' はチ

Fig. 2. High Performance Liquid Chromatograms of SA446 and Its Related Compounds Detected by Iodoplatinate Reagent

Peak 19: SA1214, peak 23: SA850, peak 20: SA1215, peak 18: SA446, peak 22: SA738, peak 21: SA687, peak a, b: unknown metabolites.

(A), Standard mixture; (B), urine of control rat; (C), (D), urine of rat administered SA446 without (C) or with (D) the DTE treatment.

TABLE II. Recoveries of SA446 and Its Related Compound Added to Rat Urine

Compound	Retention time (min)	Added amount ($\mu\text{g/ml}$)	Found amount ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)
SA1214	7.6	24.4	24.8 $\pm$ 0.9	102
SA 850	8.2	25.0	25.4 $\pm$ 1.2	102
SA1215	9.5	26.2	27.1 $\pm$ 1.4	104
SA 446	16.5	26.5	27.4 $\pm$ 0.4	104
SA 738	20.6	25.7	26.1 $\pm$ 1.2	102
SA 687	28.9	25.6	25.1 $\pm$ 1.2	97.8

SA446 and its related compounds were added to 2 ml of rat urine which gave no interfering peak. The urine was diluted 3 times with 50% methanol solution containing 1% NaCl. Each compound in the diluted urine was determined by HPLC as described in Experimental. Recovery amount was mean $\pm$ S.D. from 5 experiments.

オール基含有化合物であることが確認された。さらに、標品との保持時間の比較からピーク 23', 18', 22', 21' (保持時間 8.2, 16.5, 20.6, 28.9 min) は、それぞれ SA850 (No. 23), SA446 (No. 18), SA738 (No. 22) 及び SA687 (No. 21) によるものと推察された。未同定ピーク a 及び b (保持時間それぞれ 8.6, 10.7 min) は、少なくとも分子内にチオール基やジスルフィド結合を持たない化合物と推定される。

Table II は、SA446 及びその関連化合物をラット尿に添加して回収率を求めた結果を示す。いずれの化合物もほぼ定量的に回収され、また、この時の変動係数 (C.V.) は各化合物で 1—5% (測定回数 5 回) であったことから分析精度も良好であった。更に、検量線について検討したところ、6 種の化合物のすべてにおいて、5—100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で添加量に比例したピーク高さが得られることを確認した。

考 察

有機硫黄化合物による iodoplatinate の脱色反応は、白金原子に配位したヨウ素イオンに有機硫黄化合物が置きかわり配位子交換反応が起こるためと推察されている。¹⁵⁾ この反応はアセトンやエチルアルコールなどの有機溶媒共存下では妨害を受けることもあり主に水溶性の含硫アミノ酸類の検出に応用されたにすぎない。¹⁵⁾ 今回、含硫アミノ酸以外の有機硫黄化合物として SA446 とこの関連化合物を用い、これらの尿中定量法への応用を検討した結果、メチルアルコールを移動相とする RP HPLC においても、iodoplatinate が有用なポストカラム検出法であることを認めた。

本法の定量限界は SA446 関連化合物の場合、20 μl の HPLC 注入量で注入濃度として約 1 $\mu\text{g/ml}$ であり、他のチオール基反応性試薬を用いた高感度定量法^{9,11,12)} と比べると、感度も低く、またスルホキシド化合物やスルホン化合物とは反応性に乏しい欠点がある。しかし、チオール化合物、チオエーテル化合物、ジスルフィド化合物、チアゾリジン環含有化合物などの有機硫黄化合物に対して比較的特異性が高く、回収率や精度も良好であったことから、SA446 のみならず他の含硫薬物の尿中代謝物の検索及び定量などへの応用も可能と考えられる。この場合、iodoplatinate は有機硫黄化合物だけでなく NADPH, NADH や L-アスコルビン酸のような還元性物質とも反応して退色することに留意する必要がある。逆にこの反応を利用して、これらの還元性化合物をクロマトグラフィーにより同時定量することも可能と考えられる。

引 用 文 献

- 1) H. Takahashi, Y. Nara, T. Yoshida, K. Tuzimura, H. Meguro, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 79 (1981).
- 2) J. Reeve, J. Kuhlenskamp, *J. Chromatogr.*, **194**, 424 (1980).
- 3) H. Takahashi, Y. Nara, H. Meguro, K. Tuzimura, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1439 (1979).
- 4) B. Kagedal, M. Kallberg, *J. Chromatogr.*, **229**, 409 (1982).
- 5) K. Hiramatsu, *Biochim. Biophys. Acta*, **490**, 209 (1977).
- 6) O. W. Griffith, *Anal. Biochem.*, **106**, 207 (1980).
- 7) O. C. Ingebretsen, M. Farstad, *J. Chromatogr.*, **210**, 522 (1981).
- 8) C. E. Werkhoven-Goewie, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, **203**,

- 165 (1981).
- 9) K. Shimada, M. Tanaka, T. Nambara, Y. Imai, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 119 (1984).
 - 10) 高階秀男, 堀内正人, 宮城章吾, 植村 功, 磯 正, 薬誌, **105**, 671 (1985).
 - 11) H. Nakamura, Z. Tamura, *Anal. Chem.*, **53**, 2190 (1981).
 - 12) H. Nakamura, Z. Tamura, *Anal. Chem.*, **54**, 1951 (1982).
 - 13) H. M. Winegard, G. Toennies, *Science*, **18**, 506 (1948).
 - 14) J. Fondarai, C. Richert, *J. Chromatogr.*, **9**, 262 (1962).
 - 15) H. K. Awward, S. J. Adelstein, *Anal. Biochem.*, **16**, 433 (1966).
 - 16) B. Fowler, A. J. Robins, *J. Chromatogr.*, **72**, 105 (1972).
 - 17) 堀内正人, 寺嶋達雄, 藤村健一, 下川恵子, 磯 正, 薬誌, **104**, 1257 (1984).