

Title	TEMP0の電気酸化触媒能を用いるチオール類の構造化学的特性の評価およびHPLC分析法の開発
Author(s)	呉, 紅岩
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45689">https://hdl.handle.net/11094/45689</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	吳 紅 岩
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 4 2 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学系研究科分子薬科学専攻
学 位 論 文 名	TEMPO の電気酸化触媒能を用いるチオール類の構造化学的特性の評価および HPLC 分析法の開発
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 林 祐 次  (副査) 教 授 田 中 慶 一 教 授 小 林 資 正 教 授 高 木 達 也 助教授 前 田 初 男

#### 論 文 内 容 の 要 旨

グルタチオン (GSH) やホモシステイン (Hcy) 等の生体内チオールの体内濃度は様々な疾病の病因や病態と密接に関係しているため、これら化合物の生体分析は医療薬学および臨床薬学の観点から非常に重要である。チオール類の HPLC 分析法としては、UV/VIS 吸光検出法あるいは蛍光検出法が一般によく用いられている。ところがチオール化合物は容易に空気酸化を受けるため、誘導体化過程による確度の低下がしばしば問題となっている。従って、誘導体化することなく簡便で再現性の高い分析法の確立が強く望まれている。

電気化学分析法は、高感度かつ高選択的な分析手法の 1 つであり、HPLC 分析における検出法として幅広い分野で利用されている。ところが電気化学検出法は、電極により容易に酸化あるいは還元される化合物のみを測定対象とするため、分析の選択性が高い反面、測定対象化合物が限定されるという欠点を持っている。一方、電子移行触媒 (メディエーター) は電極と化合物との間の電子移行を媒介し、電極による直接酸化あるいは還元が困難な化合物の電極反応を促進する。このようなメディエーターを利用すれば、電気化学的に検出することが困難であった化合物を、誘導体化を必要とせず、簡便で再現性の高い電気化学分析法の開発を行うことができる。当研究室ではこれまでに、2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-oxyl (TEMPO) をメディエーターとした新規電気化学分析法の開発研究を行ってきた。その結果、TEMPO を用いることでアルコール類や糖類が電気化学的に検出可能となることを見出ししている。そこで今回著者はこれらの知見に基づき、TEMPO を用いたチオール類の新規電気化学分析法の開発を目指して本研究に着手した。

まず初めに、チオール化合物に対する TEMPO の電気化学的酸化触媒能を評価するため、サイクリックボルタンメトリー (CV) を用いた検討を行った。その結果、TEMPO とチオール類共存下において CV 測定を行うと、TEMPO のレドックス波よりも低い電位にプレピークが観測されることを見出した。このプレピークを測定指標とすることにより、第 1 級、第 2 級および第 3 級の何れのチオール類も電気化学的に検出可能となることが明かとなった。また、プレピーク電流値はチオール濃度依存性を示すことから、TEMPO を用いた電気化学分析法が、チオール類の定量分析法として利用できることも明かとなった。TEMPO とチオール類共存下の CV 結果を比較検討したところ、チオール化合物をシステイン (Cys) 型 CV 挙動と GSH 型 CV 挙動を示す 2 つに大別できることがわかった。TEMPO によ

るチオール類の電気化学酸化の反応メカニズムを詳細に検討したところ、Cys 型 CV 挙動を示すチオール化合物と TEMPO との反応は当量反応であるのに対し、GSH 型 CV 挙動を示すチオール化合物は TEMPO により触媒的に電解酸化されることが分かった。また、GSH 型 CV 挙動を示すチオール化合物は 3-mercaptopropionamide 構造を持つ必要があることもわかった。以上のことより、チオール化合物の構造と TEMPO をメディエーターとして用いた電気化学的触媒酸化メカニズムとの関連を明らかにすることができた。

次に、TEMPO を用いたチオール化合物の電気化学分析法を HPLC の検出法として適用することで、誘導体化を必要とせず、チオール類を直接検出できる新規電気化学検出-HPLC (HPLC/ECD) 分析法の開発を検討した。その結果、TEMPO を含む溶液をポストカラムにおいて HPLC 溶離液と混合することで、チオール類に対する新規 HPLC/ECD 分析法が開発できた。新規 HPLC/ECD 法においては、Cys、アセチルシステイン、GSH、Hcy、ペニシラミンの 5 種類のチオール化合物がベースライン分離されると共に、高感度に検出された。また、これらチオール類の検出限界濃度は  $0.1 \mu\text{M}$  程度であり、 $0.2 \sim 30 \mu\text{M}$  程度の濃度範囲で応答と濃度との間に直接関係が観察された。

低分子チオール化合物の中で血液中に最も多く存在する GSH の生体内動態や生体内分布を調査研究することは大変重要であり、その精密分析法の開発が強く望まれている。また、血液中に酸化型グルタチオン (GSSG) も存在している。近年、様々な疾病の発症に伴い、血液中の GSSG の濃度が上昇することが報告されている。従って、GSH と GSSG の分別定量法の確立も非常に重要である。そこで次に、新規 HPLC/ECD 法の生体内 GSH および GSSG 分析法としての適用を試みることにした。ところが、本分析システムでは、GSSG を直接検出することはできない。そこで、GSSG のジスルフィド結合を還元的に開裂し、生成した GSH を本分析法で検出する方法を検討した。ジスルフィド結合の還元剤としては、 $\text{NaBH}_4$  が最適であることがわかった。 $\text{NaBH}_4$  を用いた GSSG の還元反応の最適条件を確立するため、反応温度および反応時間の検討を行ったところ、 $50^\circ\text{C}$ 、15 分で反応はほぼ定量的に完了することがわかった。また GSH の回収率を同様に検討したところ、 $50^\circ\text{C}$ 、15 分では 96.5% の GSH が回収され、この反応条件下では GSH の分解反応が進行しないことがわかった。従って、 $\text{NaBH}_4$  を用いた GSSG の還元反応には、 $50^\circ\text{C}$ 、15 分が最適であると判断した。

次に、本分析システムを、血液中の GSH 分析へ応用する試みを行った。Free 及び Total GSH は共に、他の生体成分に妨害されることなく良好に検出できることがわかった。本分析結果より、Free および Total GSH の血中濃度は、 $1.194$  および  $1.261 \text{ mM}$  と算定された。また、Free 及び Total GSH の血液分析における添加回収率は 101%、95% であり、本分析法を利用することで、血中 GSH の確度の高い分析が可能となることが示された。血液中の Free および Total GSH を良好に定量できたことより、新規 HPLC/ECD 法は、血中 GSH 分析法として適用可能であることが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

申請論文の研究成果を以下に概説する。

- (1) NaOH 水溶液中 2,2,6,6-tetramethylpiperidiny1-1-oxyl (TEMPO) から電気化学的に発生する oxoammonium ion (1) に対して glutathione (GSH) および cysteine (Cys) のどちらもが求核付加するが、GSH から生成する付加体のみが後続反応を受け TEMPO を再生することが cyclic voltammetry (CV) の結果に基づき明らかにした。この GSH の挙動の起源を構造化学的に解析するため、様々な構造を有するチオール類について CV ならびに電解反応の生成物解析により評価した。その結果、GSH に特有な 1 との反応には 3-mercaptopropionamide が重要な部分構造であり、その作用は 5 員環中間体 1,2-thiazolidin-3-one の形成であると推定した。
- (2) チオール類はその構造に関係なく 1 と円滑に反応するため、TEMPO はそれ自身の酸化波より、チオール共存下において低い電位に酸化波を示すことを見い出した。この現象に基づき、チオール類の電気化学的 HPLC システムの構築を行ったところ、GSH、Cys、N-acetylcysteine ならびに homocysteine の一斉分離分析法として利用可能なシステムの開発に成功した。また、本システムを用いることにより、全血中のフリー-GSH およびトータ

ル GSH を簡便な操作により定量できることも明らかにした。

細胞内 GSH 濃度の低下に起因する様々な疾患が見い出され、それらの治療薬として GSH と同様な機能を持つ人工チオール類が注目されている。本論文における知見は、そのような人工チオール類として 3-mercaptopropionamide 構造を有するものが有望であることを示唆するものである。一方、様々な疾患の病因・病態を評価するための危険因子として、全血中の GSH に対するその酸化体 GSSG の比が近年注目されている。本論文は、感度には少し問題があるものの、全血中の GSSG/GSH 比を比較的簡便に分析できる HPLC システムを提供するものである。このような観点から、本申請論文は創薬ならびに臨床分析の観点から非常に興味深い知見を含むものであり、学位論文に値する内容であると判断した。