

## 赤血球中のヘモグロビンヘムの 酸化開裂物質ヘマチン酸の定量

廣田 和 弘<sup>1)</sup> 佐々木 健 二<sup>2)</sup> 廣田 喬<sup>2)</sup>

### Determination of Hematinic Acid Produced by Oxidative Cleavage of Hemoglobin Heme in Red Blood Cells

Kazuhiro HIROTA<sup>1)</sup>, Kenji SASAKI<sup>2)</sup> and Takashi HIROTA<sup>2)</sup>

Our previous studies on the mechanism of phenylhydrazine-induced hemolytic anemia have shown that hematinic acid, one of oxidative cleavage products of heme, is formed by the reaction of hemoglobin with phenylhydrazine. Development of the determination of hematinic acid formed by this reaction in red blood cells (RBC) was required to study the mechanism of the hemolysis. Hemolysates prepared by lysis of fresh human RBC with water was mixed with standard hematinic acid. A solution consisting of hydrochloric acid, methanol, and acetone was added, and most of hemoglobin precipitated was removed by centrifugation. Hematinic acid was derived to the methyl ester by incubation with methanol containing sulfuric acid. The ester was passed to two type of silica gel column to remove interferences, and was analysed on a reversed-phase high-performance liquid chromatographic column. Hematinic acid could be determined in the range 1.0-20.0  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  RBC. Recovery from hemolysate was 65.0%  $\pm$  3.5%.

Standard compounds of hematinic acid and its methyl ester were prepared by the oxidation of hemin with hydrogen peroxide, and were confirmed by elemental analyses and mass spectra.

**Key Words :** hematinic acid, high-performance liquid chromatography, red blood cells, heme

#### 緒 言

ヘマチン酸 (HA, 2,5-dihydro-4-methyl-2,5-dioxo-1H-pyrrole-3-propanoic acid) は, つぎに示すようにマレイミドのカルボン酸誘導体であり, ビリルビン<sup>1)</sup>やウロクローム<sup>2)</sup>の酸化生成物の1つであることから, 新生児黄疸の光治療や尿色素の研究において取り上げられてきた化合物である。

本著者らは, 溶血毒であるフェニルヒドラジンの溶血機構を研究する途上, フェニルヒドラジンがヘモグロビン (Hb) のヘムを酸化開裂して HA を生成することを見出した<sup>3)-5)</sup>。この毒物による

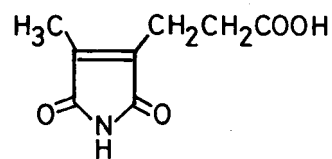


図1 ヘマチン酸(HA)

溶血性と赤血球中における HA の生成との関係を研究するため, HA の定量法を検討したので報告する。人の溶血液に HA 標品を添加し, Hb や膜成分などの分析妨害成分を除去した後, HA を硫酸-メタノール溶液でメチルエステルに誘導し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

<sup>1)</sup> 岡山大学医療技術短期大学部

<sup>2)</sup> 岡山大学薬学部

## 試薬と機器

試薬は1級品を用い、溶液の%表示は、硫酸はw/vで、その他はv/vを示す。

HAメチルの合成のための分取カラムクロマトグラフィーは、高速液体クロマトグラフ(LC-5A, 島津製作所)のポンプと紫外吸収検出器(大岳製作所)を連結し、280nmで検出して行った。この際用いるカラムは、中圧ガラスカラム(47×1.4cm, 桐山製作所)に16gシリカゲル(Kieselgel 60, 230-400mesh, Merck)を乾式で真空で吸引しながら詰めて製作したものであった。溶離液はn-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール(1/1/0.013)溶液であった。

薄層クロマトグラフィー(TLC)は、pre-coated plate(シリカゲル60, F<sub>254</sub>, 厚さ0.25mm, Merck)を用いた。展開溶媒は、HAに対してクロロホルム/アセトン/酢酸(5/1/0.1)溶液およびHAメチルに対して四塩化炭素/シクロヘキサン/酢酸エチル(5/1/3)溶液であった。展開後のスポットの検出は紫外線ランプ(254nm)で行った。

HAの定量に用いる順相シリカゲルカラムは、和光ゲルC-200(2.3g)をガラス管(0.8×10cm)に詰めたもので、酢酸エチル(10ml)を通し洗浄した後、30%酢酸エチル-n-ヘキサン溶液で平衡化したものであった。また同じ目的で使用した逆相シリカゲルミニカラム(SEP-PAK, C-18, Waters Associates, Inc.)は、あらかじめメタノールで洗浄した後10%メタノール-水溶液で平衡化したものであった。

HAの定量に用いたHPLCは、紫外吸収検出器(SPD-2A)付きHPLC(LC-3A, 島津製作所)を使用し、280nmで検出して行った。分析カラムとして逆相シリカゲル(ODS)カラム(15×0.46cm, ガスクロ工業)を、またプレカラム(1.0×0.65cm)として、Deverosil(野村化学)を詰めたものを用いた。これらのカラムは46℃に加温し、溶離液は35%メタノール-水、検出は280nm、そして流速は0.7ml/minで分析した。

EI質量分析は、島津-LKB9000を用いて行った。

## 方 法

標準HAとそのメチルエステルの合成

### 1. HA

Schaeferら<sup>6)</sup>のヘミンの酸化分解の方法を改良して行った。ヘミン(1.0g)を濃アンモニア水(1.0ml)に溶かし、水(100ml)を加え希釈した。60℃に加温しながら、過酸化水素水(35%, 25ml)、水(25ml)および濃アンモニア水(1.5ml)からなる溶液を10分間で加え、その後1時間加温を続けた。2N塩酸(7ml)を加え酸性にし沈殿する茶褐色物質を濾過し除いた。褐色濾液を酢酸エチルで抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮乾固した。褐色残渣をアセトンに溶解し分取TLCを行った。Rf値0.35のバンドをかき取り、酢酸エチルで抽出し、濃縮乾固した。淡褐色残渣を酢酸エチル/n-ペンタン(1/3)溶液から3回再結晶し白色結晶(10mg)を得た。融点115-116℃(文献値114.4-115.℃<sup>7)</sup>。元素分析、C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>(MW:183)計算値:C, 52.46; H, 4.92; N, 7.65。実測値:C, 52.37; H, 4.90; N, 7.60。EI質量分析m/z(相対強度):165(69%, M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 137(100%, M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-CO), 119(17%, M<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O-CO), 109(29%, M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-CO-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), 94(23%, M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-CONHCO)。

### 2. HAメチル

上のHAの分取TLC前の褐色残渣に2%硫酸-メタノール溶液(50ml)を加え、60℃、1時間加温した。冷後濃アンモニアを加え中和し、エステルを酢酸エチル(10ml)で4回抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮乾固した。残渣を酢酸エチル(3ml)に溶かし、分取カラムクロマトグラフィーを行った。1フラクションあたり12ml集め、各フラクションについてTLCを行い、Rf値0.58を与える2番から5番のフラクションを集め濃縮乾固した。残渣をアセトンに溶解し分取TLCを行った。上記Rf値のバンドをかき取り、酢酸エチルで抽出し、濃縮乾固した。再結晶を試みたが結晶化しなかった。TLCおよびHPLCで純度を調べた結果、他の成分は認められなかった。EI質量分析m/z(相対強度):197

(4%, M<sup>+</sup>), 165 (100%, M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>OH), 137 (85%, M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>OH-CO).

## RBC 中の HA の定量

### 1. 採血と RBC の分離

人静脈からヘパリン入り採血管で採血し、7本の試験管の各々に血液 (3.5ml) を入れた。遠心分離機にかけ (3,000rpm, 5分), 上層の血漿を除去し, RBC を生理食塩水で3回洗浄し, 水 (2ml) を加え溶血させた。検量線作製のため, 標準 HA 0, 4, 8, 12, 16, 20 $\mu$ g を含む水溶液 (0.1ml) を加えた。

### 2. HA の抽出

上記の標準 HA を含む水溶液に, 6 N 塩酸 (1ml), メタノール (2ml) およびアセトン (5ml) を順次に加えその都度攪拌した。遠心分離 (3,000rpm, 5分) し沈殿の Hb タンパクなどを除いた。沈殿に残存する HA を抽出するため, アセトン (2ml) を加え攪拌し, 同じように遠心分離し上清を分離した。ここで得た上清を前の上清と合わせ, 突沸防止のためベンゼン (3ml) を加え, 40 $^{\circ}$ C で減圧下濃縮して褐色残渣を得た。

### 3. HA のエステル化

残渣に2%硫酸-メタノール溶液 (10ml) を加え60 $^{\circ}$ C, 1時間加温しエステル化した。冷却後濃アンモニア水で中和し濃縮乾固し, 褐色残渣を得た。

### 4. 順相シリカゲルカラム処理

残渣に酢酸エチル (3ml) を加え溶解し, n-ヘキサン (3ml) を加え生成する沈殿を遠心分離機にかけ (3,000rpm, 5分) 除去した。上清を順相シリカゲルカラムに注入し30%酢酸エチル-n-ヘキサン溶液 (16ml) を通し, 溶出液を濃縮乾固し残渣を得た。

### 5. 逆相シリカゲルカラム処理

残渣に10%メタノール-水溶液 (4ml) を加え溶解し, この溶液を逆相シリカゲルカラムに通し HA を吸着させた。さらに10%メタノール-水溶液 (5ml) を通し夾雑物を洗い流した後, 35%メタノール-水溶液 (4ml) を通し HA メチルを溶出した。

## 6. HA メチルの HPLC 分析

溶出液 (0.1ml) について HPLC 分析を行った。15分の保持時間で出るピークの高さを測定し検量線を作製した (図5参照)。

## 結果と考察

ここで合成した HA とそのメチルエステルについて, 融点測定, 元素分析, 質量分析, TLC および HPLC を行い, 同定と純度を確認した。

### 1. 溶血液から HA の抽出

溶血液に添加した HA は, 塩酸酸性にして初めてその溶液に溶出することがわかった。従って, 溶血液を塩酸酸性にした後, 除タンパク剤としてメタノールとアセトンの混合溶液を加え, 膜の脂質やタンパク, Hb, Hb の酸分解で生じたヘミンなどの夾雑物をまず沈殿として除去した。この沈殿物にまだ吸着し残存している HA があり, アセトンと攪拌しこれを溶出した。ここで除タンパク剤として繁用されているアセトニトリルを上混合溶液の代わりに用いると, 生成する沈殿はペースト状となり, この沈殿に吸着している HA のアセトンによる溶出が困難であった。このようにして得られた溶出液は, ヘミンなどの褐色成分をはじめ多種の夾雑物を多く含んでいた。

HPLC 分析までには以下の順相と逆相の二つの型のシリカゲルカラム処理が必要であり, この方法の検討に多くの時間を費やした。

### 2. エステル化

硫酸-メタノール溶液による HA のエステル化は, 上の条件で完結することが, 反応後の TLC および HPLC 分析で確認できた。この場合, 反応液の水分含量が, 7%以上であるところの反応は完結しなかった (詳細なデータ省略)。このため試料は, 水をできるだけ含まないように乾固しておく必要があった。

### 3. 順相シリカゲルカラム

ここで用いたシリカゲルには, HPLC で HA メチルと同じ保持時間に溶出する不純物を含んでいたため, 酢酸エチルを通して前もって洗浄除去する必要があった。その最小容量は10mlであった。

HA のエステル化後の褐色夾雑物を含む残渣を

n-ヘキサンを溶媒にしてこのカラムに通すと、この褐色成分はカラム先端に強く吸着されるが、同時に HA メチルも同様に吸着され溶出されない。反対に極性溶媒の酢酸エチルに代えると両方とも全く吸着されずに溶出される。褐色成分が吸着され HA メチルが溶出される n-ヘキサンに対する酢酸エチルの濃度を検討した。褐色成分に HA メチル標品を添加してクロマトグラフィーを行った結果、図 2 に示すように、酢酸エチルの濃度を 30% に上げると初めて HA メチルの全部が溶出し、褐色成分もほとんどカラム先端に吸着し除去された。しかし、この溶出液にはまだ淡黄色の夾雑物が含まれていた。

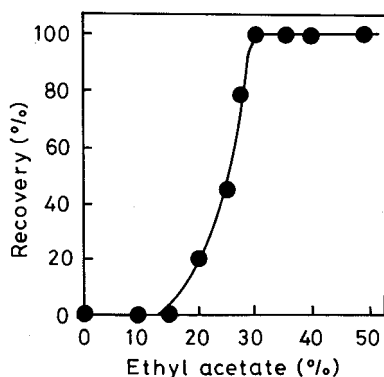


図 2 順相カラムによる HA メチルの溶出に及ぼす酢酸エチル濃度の影響  
方法の項に示すように HA のエステル化後の残渣を、溶離液として異なる濃度をもつ酢酸エチル (n-ヘキサンに対して) を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出液について HA を定量し、その回収率を求めた。詳細は方法の項参照。

#### 4. 逆相シリカゲルカラム

上の黄色成分を含む溶出液を水に溶解してこのカラムに通すと、HA メチルも黄色成分も完全に吸着するが、溶離液にメタノールを含ませると黄色成分が吸着して HA メチルが溶出されてくる濃度が存在していた。メタノール濃度を変化し、溶出試験をした結果、図 3 に示すようにそのメタノール濃度は 35% であった。このことは、黄色成分は HA メチルより疎水性が強く、逆相シリカゲルにより強く吸着する性質を持っていることがわ

かる。使用後のカラムは、メタノール (4 ml) を通すと黄色成分は完全に溶出されるので再使用が可能であった。

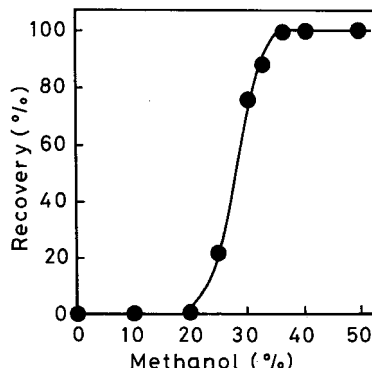


図 3 逆相カラムによる HA メチルの溶出に及ぼすメタノール濃度の影響

順相カラムの溶出液から得た残渣を方法の項に示すように逆相カラムにかけた。溶離液として異なる濃度をもつメタノール (水に対して) を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出液について HA を定量し、その回収率を求めた。詳細は方法の項参照。

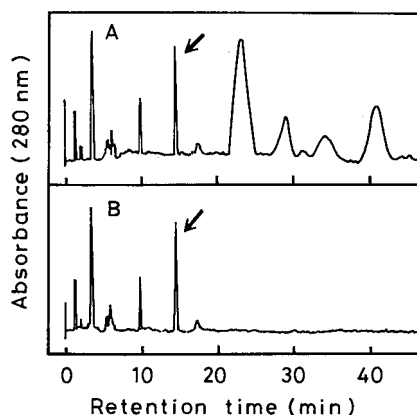


図 4 HA メチルの高速液体クロマトグラム  
A : 順相カラムからの溶出液について分析したもの。  
B : 順相カラムからの溶出液を逆相カラムに通し、得られた溶出液について分析したもの。図中の矢印は HA メチルのピークを示す。分析の条件などは試薬と機器および方法の項参照。

このカラムを通させない試料を HPLC 分析すると、図 4 A に示すように、HA メチルの溶出のあと40分まで種々の夾雑物が溶出した。一方、カラムを通した場合、図 4 B に示すように、HA の溶出後に出るほとんどの夾雑物が除去されていることがわかる。このカラム処理は、HA メチルの分析が終わると、つぎの試料注入が可能となり、分析の迅速化に寄与した。

#### 5. HPLC 分析

HA のピーク高から検量線を作ったところ、図 5 に示されるように、1.0–20.0  $\mu\text{mol/ml}$  RBC の範囲で直線性が認められた (HA メチルの HPLC については図 4 B 参照)。

RBC の容量は、採血後のヘマトクリット値を測定し、この値から求めた。HA の無添加の赤血球からは HA メチルに相当するピークが認められなかった (クロマトグラムは省略)。

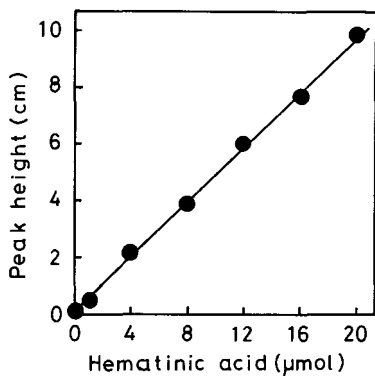


図 5 HA の検量曲線

HA 添加赤血球を抽出、エステル化、カラムの各操作を行い、HA メチルを HPLC 分析した。HA メチルのピーク高から検量線を作製した。詳細は方法の項参照。

#### 6. 回収率

赤血球に添加した HA が一連の定量操作中に回収される量について検討した。添加した同じ量の HA を硫酸–メタノール溶液で直接エステル化し、得られた HPLC のピーク高と比較した結果、HA の各添加量について平均したところ 65 ±

3.5% の回収率が得られた。2 種のカラム処理ではほとんど定量的に回収されているので、溶血液から HA の抽出のところの問題があるものと思われる。

#### 7. 終わりに

本定量法によって、目的である赤血球中で溶血毒フェニルヒドラジンと Hb の反応で生じる HA を定量できるようになった。赤血球試料だけでなく、この方法で得られた夾雑物の除去法を工夫して、他の生体試料中の HA も定量できるものと思われる。この際、HPLC の溶離液のメタノール濃度を減少すると HA メチルの保持時間が大きくなり、他の夾雑物との分離が可能となるものと思われる。

### 文 献

- 1) Lightner, D. A. and Quistad, G. B. : Hematinic acid and propentidyopents from bilirubin photo-oxidation in vitro. FEBS letters., 25 : 94-96, 1972
- 2) Stoll, M. S. : Formation, metabolism, and properties of pyrrolic compounds appearing in the gut; in Bilirubin Vol. 2. Metabolism, Heirwegh, K. P. M. and Brown, S. B. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp103-131, 1982
- 3) 広田和弘, 佐々木健二 : ヘモグロビンのヘム酸化が契機となる血液毒の溶血機構. 第29回日本薬学会中四国支部大会講演要旨集. 36頁, 1990
- 4) Hirota, K., Hatanaka, T. and Hirota, T. : Isolation of N-phenylprotoporphyrin IX from the red cells and spleen of the phenylhydrazine-treated rat. Arch. Biochem. Biophys., 255 : 42-47, 1987
- 5) Hirota, K., Yamamoto, S. and Itano, H. A. : Urinary excretion of isomers of biliverdin after destruction in vivo of haemoproteins and heamin. Biochem. J., 229 : 477-483, 1985
- 6) Schaefer, W. H., Harris, T. M. and Guengerich, F. P. : Characterization of the enzymatic and nonenzymatic peroxidative degradation of iron porphyrins and cytochrome p-450 heme. Biochemistry., 24 : 3254-3263, 1985
- 7) Wittenberg, J. and Shemin, D. J. : The location in protoporphyrin of the carbon atoms derived from the  $\alpha$ -carbon atom of glycine. J. Biol. Chem., 185 : 103-116, 1950

## 要 約

フェニルヒドラジン惹起性溶血貧血機構の著者らの研究において、ヘモグロビンとフェニルヒドラジンとの反応でヘムの酸化開裂物質の1つであるヘマチン酸が生成することが示された。この反応によって赤血球 (RBC) 中で生じたヘマチン酸を定量する方法の確立が、溶血機構研究のため必要となった。人のRBCを水で溶血し、ヘマチン酸の標品を加えた。塩酸、メタノール、アセトンの溶液を加え、ほとんどのヘモグロビンを沈殿除去した。メタノール-硫酸溶液で加温し、ヘマチン酸をメチルエステルに誘導した。夾雑物を2種のシリカゲルカラムを通すことによって除去し、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析した。ヘマチン酸は、1.0-20.0 $\mu$ mol/ml RBCの範囲で定量でき、回収率は65.0 $\pm$ 3.5%であった。

ヘマチン酸とこのメチルエステルの標品は、ヘミンを過酸化水素酸化することによって合成し、元素分析と質量分析によって確認した。

(1990年11月1日受理)