

# Studies on Development of Analysis of Conjugated 25-Hydroxyvitamin D

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/30581">http://hdl.handle.net/2297/30581</a>

# 抱合型25-ヒドロキシビタミンD分析法の開発研究

三田村 邦 子

1997年5月

博士論文

抱合型25-ヒドロキシビタミンD分析法の開発研究

Studies on Development of Analysis of Conjugated 25-Hydroxyvitamin D

金沢大学大学院自然科学研究科

三田村 邦子

## 目次

緒論	1
第1章 血漿中25-ヒドロキシビタミンD <sub>3</sub> 及びその3-サルフェートの分析	7
第1節 序	7
第2節 25-ヒドロキシビタミンD <sub>3</sub> 定量法の開発	9
第3節 25-ヒドロキシビタミンD <sub>3</sub> 3-サルフェートの同定	15
第4節 25-ヒドロキシビタミンD <sub>3</sub> 3-サルフェート定量法の開発	22
第5節 ヒト血漿中25-ヒドロキシビタミンD <sub>3</sub> とその3-サルフェートの相関	28
第6節 考察	30
第2章 25-ヒドロキシビタミンDモノグルクロニドの合成と生体成分分析 への応用	31
第1節 序	31
第2節 25-ヒドロキシビタミンDモノグルクロニドの合成	32
第3節 ラット胆汁中25-ヒドロキシビタミンDモノグルクロニドの同定	38
第4節 考察	48
結語	49
謝辞	50
実験の部	51
第1章付属実験	51
第2章付属実験	58
引用文献	75

本学位論文は、次の原著論文を基礎としたものである。

1. Separation and characterization of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 3-sulfate in human plasma by high-performance liquid chromatography  
Shimada K., Mitamura K., Mukouyama M., Okumura T., Sugaya K.  
*J. Chromatogr. Sci.*, **33** (2), 82-85 (1995).
2. Quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 3-sulphate in human plasma using high performance liquid chromatography  
Shimada K., Mitamura K., Kitama N.  
*Biomed. Chromatogr.*, **9** (5), 229-232 (1995).
3. Syntheses and enzymatic hydrolysis of 25-hydroxyvitamin D monoglucuronides  
Shimada K., Sugaya K., Kaji H., Nakatani I., Mitamura K., Tsutsumi N.  
*Chem. Pharm. Bull.*, **43** (8), 1379-1384 (1995).
4. Separation and characterization of monoglucuronides of vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rat bile by high-performance liquid chromatography  
Shimada K., Nakatani I., Saito K., Mitamura K.  
*Biol. Pharm. Bull.*, **19** (4), 491-494 (1996).
5. Determination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection  
Shimada K., Mitamura K., Kitama N., Kawasaki M.  
*J. Chromatogr. B*, **689** (2), 409-414 (1997).
6. Characterization of monoglucuronides of vitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> in rat bile using high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry  
Shimada K., Mitamura K., Nakatani I.  
*J. Chromatogr. B*, **690** (1-2), 348-354 (1997).

## 緒論

ビタミンDは抗くる病因子として発見された脂溶性ビタミンであり、9,10-セコステロイド骨格を基本構造としている。ビタミンDには、その17位側鎖構造の異なるD<sub>2</sub>-D<sub>7</sub>が知られているが、強い生理活性を有し、かつ自然界でもその分布が多いビタミンD<sub>3</sub> (cholecalciferol, D<sub>3</sub>) とビタミンD<sub>2</sub> (ergocalciferol, D<sub>2</sub>) (以下Dと総称する) の2種類のみが実用的なものとして評価されている。

D<sub>3</sub>は動物性食品からも摂取されるが、主として皮膚においてプロビタミンD<sub>3</sub> (7-dehydrocholesterol, 7DHC) からUV照射によって産生される内因性の化合物である。一方、D<sub>2</sub>は主に植物においてそのプロ体であるergosterol (Erg) より生合成され、ヒトでは総合ビタミン剤や強化食品中より経口的に体内に取り込まれる外因性のものである。D<sub>3</sub>とD<sub>2</sub>はヒト体内において、同様に第I相反応により代謝活性化され、ほぼ同等の生理作用を発現する。すなわち、皮膚で生成されたD<sub>3</sub>及び食餌として摂取されたDはまず肝臓に運ばれ、25位に水酸化を受けて25-ヒドロキシビタミンD [25(OH)D] に代謝される。これはD結合タンパク (DBP) と結合して体内を循環し、血中カルシウム濃度が正常値 (9-10 mg/dl) 以下になると、副甲状腺ホルモン (PTH) の働きを介して腎臓でその1 $\alpha$ 位に水酸化を受け、いわゆる活性型ビタミンDである1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミンD [1,25(OH)<sub>2</sub>D] に変換される。一方、血中カルシウム濃度が正常に回復すると、1 $\alpha$ 位への水酸化は抑制され、25(OH)Dは、24R位を始め23S位、26位など側鎖部分に水酸化を受けた代謝物に変換される。これらはさらに酸化され、結果として数多くの代謝物が血中に共存することになる。以上説明したD<sub>3</sub>の生合成及び第I相反応による代謝経路をFig. 1に示した。<sup>1,2)</sup>

これら第I相反応によるD代謝物はそれぞれ重要な生物学的意義を有している。例えば1,25(OH)<sub>2</sub>Dは最も生理活性が強く、生体内カルシウムの恒常性、骨代謝平衡の

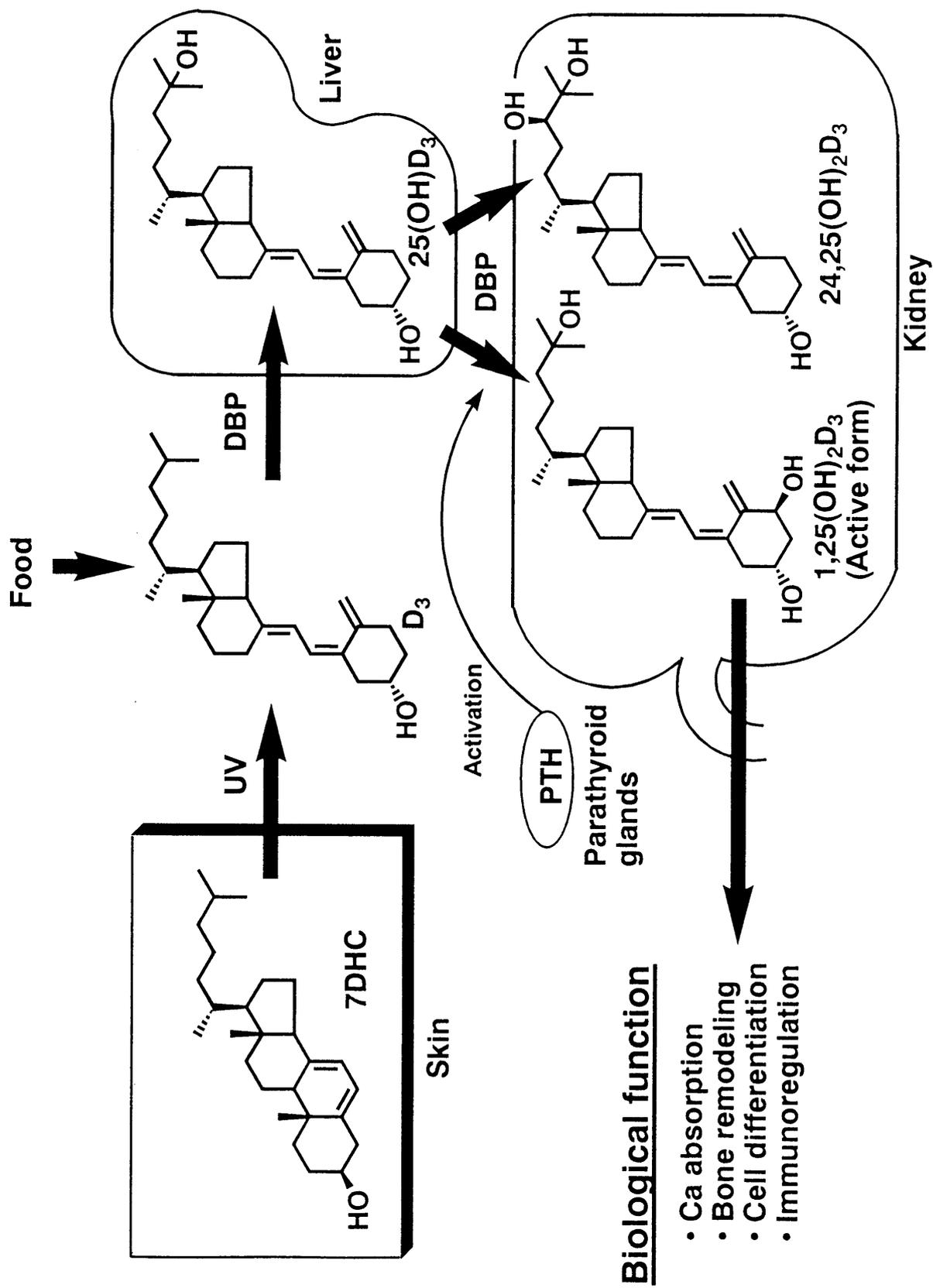


Fig. 1. Metabolic Activation of D<sub>3</sub>

維持<sup>3,4)</sup>に重要な役割を果たしているステロイドホルモンの1種である。さらに近年、カルシウム代謝調節のみならず細胞の分化誘導・増殖抑制、免疫調節など、さまざまな生体反応に関与することが明らかとなり、<sup>5,7)</sup>ポテンシャルの高い医薬品として多大な注目を集めている。また、腎機能の低下している患者では低値を示すなど、その血中濃度と種々の病態とは密接な関係を有している。一方25(OH)Dは、D代謝物のうちヒト体内における主要な循環物質であり、その血中濃度はDの供給状態を示す指標となるうえ、D代謝異常に起因する各種疾患の病因鑑別にも有用な指針を与えられている。したがって、これらD代謝物の体液中レベルを的確に把握することは、臨床・栄養診断、生理作用の解明、あるいは新薬の開発上極めて重要である。現在、第I相反応によるD代謝物の測定は各種結合タンパクやHPLCに代表される各種クロマトグラフィーを駆使して行われているが、D代謝物の存在量が極微量であるうえ、その構造が相互に酷似していること、さらに血中に大量に含まれる脂質との分離が困難で、化学的にも不安定であることから、いずれも満足し得るものではなく、現在も積極的な開発が進められている。Table 1に主な第I相反応生成物の血中レベルとその測定法を示した。<sup>8-10)</sup>なお、各代謝物の大部分は皮膚で生成されたD<sub>3</sub>に由来し、D<sub>2</sub>系が占める割合は約1割とされている。

一方、Dの第II相反応生成物に関する研究は十分になされていない。第II相反応は内因性あるいは外因性物質の主な代謝経路の1つであり、サルフェートやグルクロニドなどの抱合体へ導くことで水溶性を増し、排泄されやすい代謝物に変換する反応ととらえることができる。<sup>11)</sup>抱合体は多くの場合生理活性が低いため、従来から単なる排泄型に過ぎないとされてきた。しかし、ある種のステロイドにおいては抱合体がその生合成、輸送などに積極的に関与していることや、<sup>12)</sup>抱合体の体液中レベルが病態と密接に関連していることが明らかとされ、<sup>13)</sup>抱合体の体内動態が重要視されるに至った。

Table 1. Human Plasma Level of D and Its Metabolites<sup>8-10)</sup>

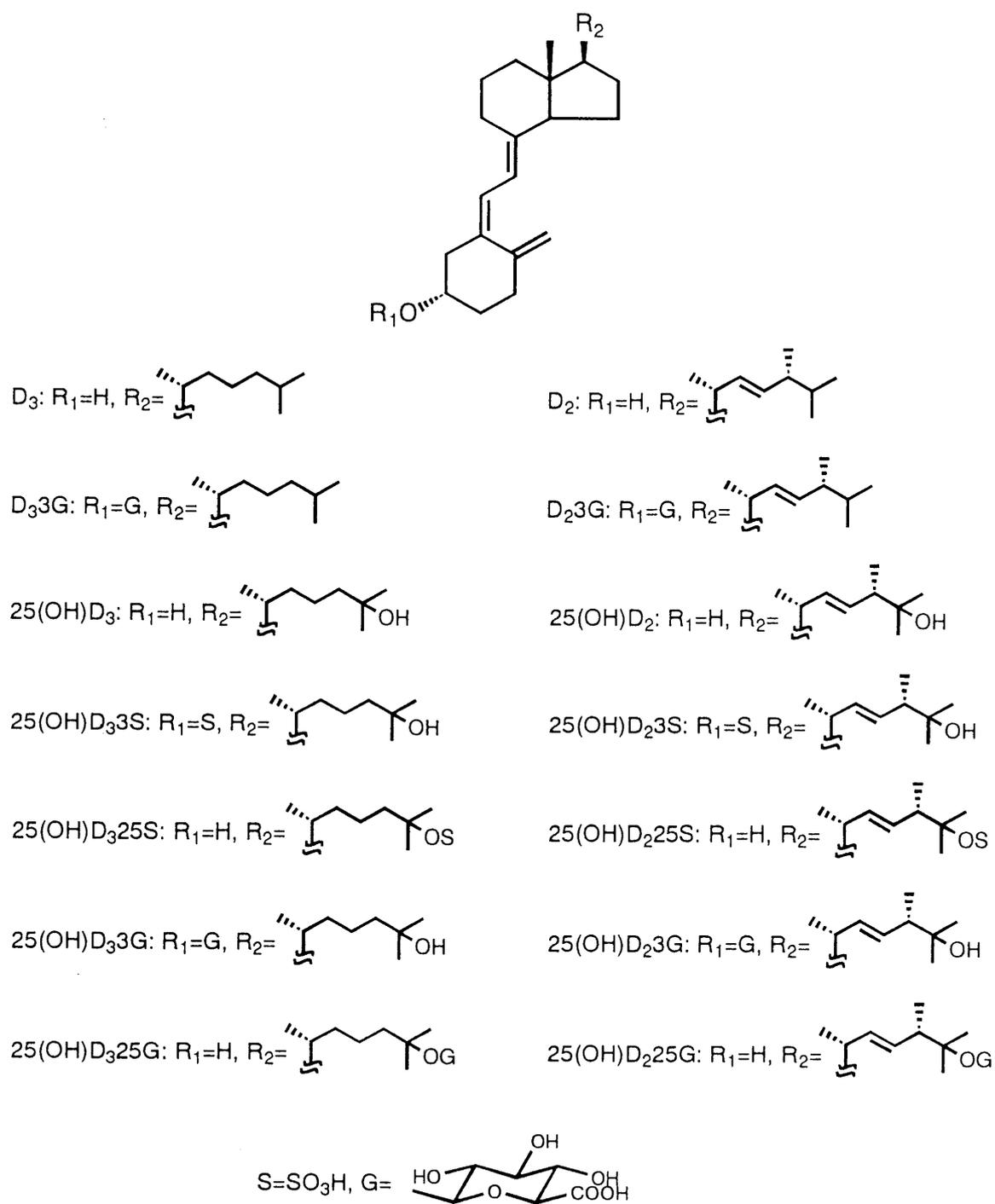
	D	25(OH)D	1,25(OH) <sub>2</sub> D	24,25(OH) <sub>2</sub> D
Normal level	1-5 ng/ml	10-40 ng/ml	36-65 pg/ml	1-4 ng/ml
Half-life	1 d	12-20 d	a few h	14-21 d
Assay method	HPLC	CPBA, HPLC	RRA, RIA	CPBA, HPLC

CPBA: competitive protein binding assay

RRA: radioreceptor assay

体液中Dの第Ⅱ相反応生成物に関しては、ヒト乳汁中における硫酸抱合体の存在が示唆されていたが、<sup>14, 15)</sup> Axelsonはヒト血中に25(OH)D<sub>3</sub> 3-サルフェート [25(OH)D<sub>3</sub>3S] が25(OH)D<sub>3</sub>とほぼ等しい濃度 (10-30 ng/ml) で存在すると報告し、多大な注目を集めた。<sup>16-18)</sup> しかしこれらの報告は、いずれも脱抱合に基づく間接的証明によるものであることから少なからず疑問な点が残されており、その存在を否定する報告もなされている。<sup>19-21)</sup> 一方の重要な第Ⅱ相反応生成物であるグルクロン酸抱合体については、実験動物を用いた研究においてその存在も示唆されているが、十分なものではない。例えばヒヨコにおいて、D<sub>2</sub>投与後の胆汁中に25(OH)D<sub>2</sub> 25-グルクロニド [25(OH)D<sub>2</sub>25G] の排泄が報告されたが、<sup>22)</sup> 標品が得られないため間接的な方法による構造証明であり、抱合位置などに疑問が残されている。同様のことは近年活発に進められているDアナログの代謝物の同定でもみられる。<sup>23-27)</sup> また、ヒト体液中におけるDグルクロニドに関する研究には見るべきものがない。以上のように、体液中の各種Dの第Ⅱ相反応生成物はその存否すら明らかではなく、生理作用及び臨床診断上の測定意義など解明されるべき多くの問題点を有している。

以上の知見を踏まえ著者は、D代謝物、特に第Ⅱ相反応生成物の分析法を開発し、臨床診断に寄与することを究極の目的として以下の研究を行った。第1章ではまず、ヒト血中におけるDの主代謝物である25(OH)D<sub>3</sub>の、より簡便なUV検出HPLCによる定量法を確立した。次いで、ヒト血中における25(OH)D<sub>3</sub>3Sの存在を標品を指標とする各種検出HPLCにより明らかとし、引き続きUV検出HPLCによる定量法を開発した。さらに、開発した方法を駆使してヒト血中における両代謝物の相関について検討した。第2章においては、体液中グルクロン酸抱合型D代謝物の研究に標品として必要不可欠な25(OH)D-3G, -25Gを合成し、これらを指標として25(OH)D投与胆管ろうラット胆汁中の25(OH)DモノグルクロニドをHPLC又はLC/MSにより同定した。なお、本論文の主な化合物の構造式をFig. 2にまとめて示した。



**Fig. 2. Structures of D, 25(OH)D and Their Conjugates**

## 第1章 血漿中25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>及びその3-サルフェートの分析

### 第1節 序

緒論で述べたように体内に取り込まれたD<sub>3</sub>は肝臓で速やかに25(OH)D<sub>3</sub>に代謝され、血漿中のDBPと結合して体内を循環している。25(OH)D<sub>3</sub>はD関連化合物の中では最も高い血中濃度(10-40 ng/ml)を示し、体内での半減期も12-20 dと長く、代謝調節を受けてその濃度に変動をきたすことも少ない。したがって、血漿中25(OH)D<sub>3</sub>はD<sub>3</sub>の摂取量や日光照射により生成する量を正確に反映しており、D<sub>3</sub>の供給状態を示す指標として、従来より種々の方法による定量が試みられている。これら定量法はcompetitive protein binding assay (CPBA), RIAなどの結合タンパクを用いる方法<sup>28, 29)</sup>とGC/MS, HPLCなどの各種クロマトグラフィー<sup>16, 30, 31)</sup>とに大別される。しかしいずれの方法でも、結合タンパクを必要とすることや、内標準物質 (IS) を含め放射性同位体を使うなど簡便性の点で難がある。最近、Shimizuらは非放射性ISを用いるUV検出HPLC法を報告したが、<sup>32)</sup> 本法は順相系HPLCを使用しており、ルーチン分析には必ずしも汎用的ではない。すなわち、生体マトリックスの極性が高いこと、廃液の問題などを考慮すると生体成分の分析には逆相系HPLCが有利である。

一方、その第II相反応生成物である25(OH)D<sub>3</sub>3Sについての検討は十分になされていない。緒論で述べたように、Axelsonはヒト血中における25(OH)D<sub>3</sub>3Sの存在を示唆している。<sup>16)</sup> しかし、その研究はソルボリシス後に遊離する25(OH)D<sub>3</sub>をGC/MSやHPLCで同定した間接的手法によるものであり、このため脱抱合率の問題に加え抱合部位や形式に疑問が残されている。例えば、最近Coldwellらは血漿抽出物のUVスペクトルのデータを基に、本代謝物の存在を疑問視する報告をしている。<sup>19)</sup> このように血中25(OH)D<sub>3</sub>3Sについては存否すら明らかではない。また、Axelson, Christensenによる本代謝物の定量はISとして放射性同位体を用いているうえに、ソルボリシス後

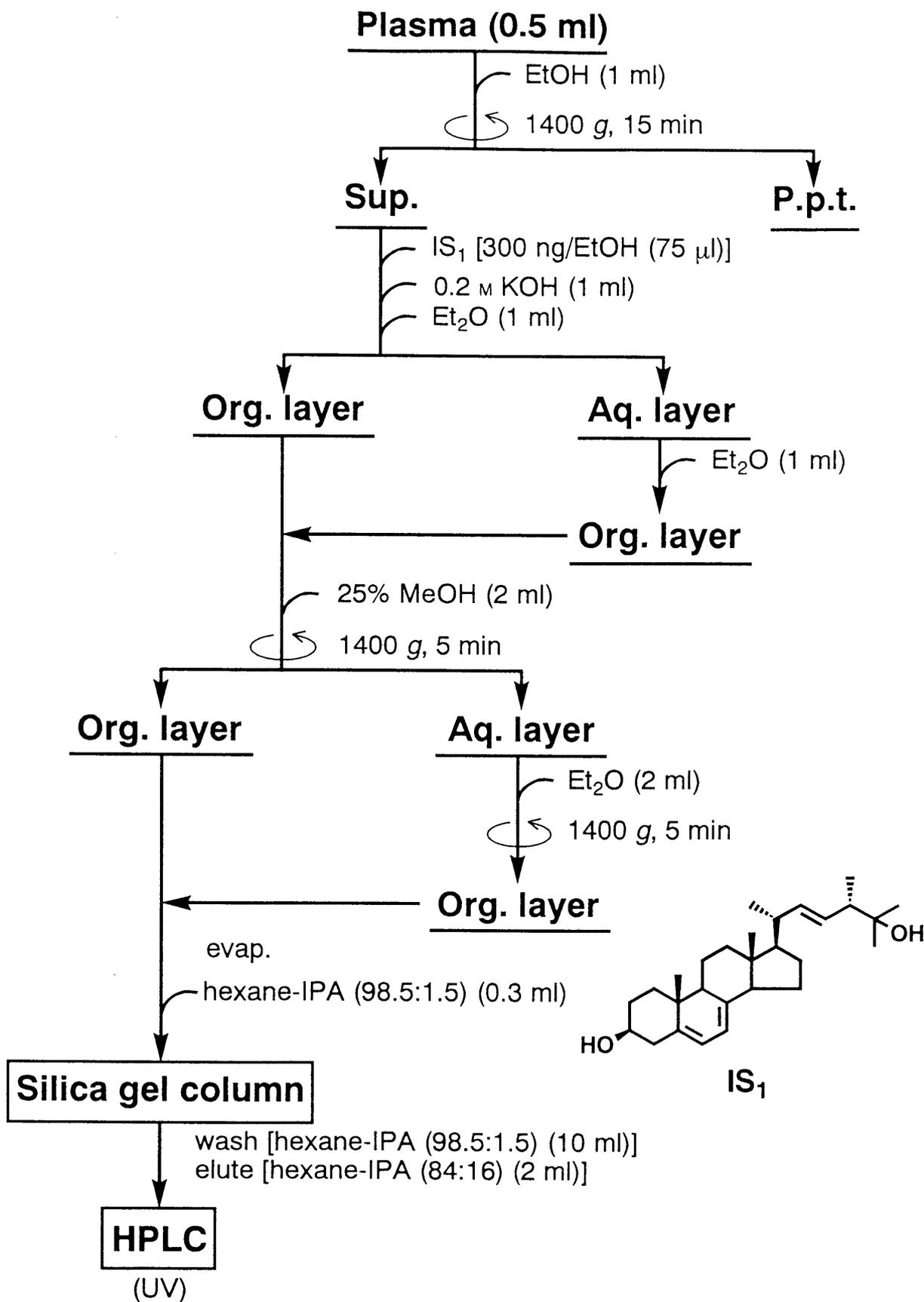
の25(OH)D<sub>3</sub>を測定する間接的方法であり,<sup>17)</sup> 簡便性の点で難がある。さらに、遊離型代謝物である25(OH)D<sub>3</sub>との相関についての検討は十分になされていない。これは生合成的な見地からばかりでなく、D<sub>3</sub>代謝異常に起因する各種疾患との関連など解明されるべき多くの問題を有している。

そこで著者は、まず非放射性ISとして25-hydroxyergosterol [25(OH)Erg, IS<sub>1</sub>] を用い、逆相系HPLCによるヒト血漿中25(OH)D<sub>3</sub>定量法の開発を企てた。次いで、先に当研究室で合成した標品 [25(OH)D<sub>3</sub>-3S, -25S及び25(OH)D<sub>2</sub>3S] を指標として、各種HPLCによりヒト血漿中25(OH)D<sub>3</sub>3Sを同定し、引き続きUV検出HPLCでその定量法を開発した。さらに開発した定量法を駆使して、健常人及び慢性腎不全患者血漿中における両代謝物の相関に検討を加えた。

## 第2節 25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>定量法の開発

血漿中25(OH)D<sub>3</sub>定量の前処理には、既報に準じ、<sup>32)</sup>有機溶媒抽出、アルカリ性溶液洗浄による脂肪酸の除去、シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる目的代謝物の分離精製を順次用いることとした。抽出溶媒にはメタノール-ジクロロメタン(2:1)が汎用されているが、<sup>30)</sup>抽出層が下層になるため多数検体処理に際しての簡便性に欠ける。一方、エーテルや酢酸エチルなどの単一溶媒では抽出効率が低いとの報告もあるが、<sup>31)</sup>これは除タンパク操作を省略しているため、25(OH)D<sub>3</sub>とDBPとの結合の影響が強く現れたものと考えられる。そこで種々検討の結果、Chart 1に示す定量法を確立した。すなわち、血漿(0.5 ml)をエタノールで除タンパクし得られた上清にIS<sub>1</sub>を添加した。0.2 M 水酸化カリウム液を加え攪拌後、エーテルにより目的物を抽出した。有機層を25%メタノールで洗浄、乾燥後シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-2-プロパノール(IPA)(98.5:1.5)で洗浄後、ヘキサン-IPA(84:16)で目的物を溶出した。溶媒を留去後メタノールに再溶解し、カラムにJ'sphere ODS-H80、移動相にアセトニトリル-水(7:3)を用いるUV検出逆相系HPLCに付した。Fig. 3には本操作により得られたクロマトグラムを示したが、25(OH)D<sub>3</sub>とIS<sub>1</sub>のピークは良好に分離しており、またIS<sub>1</sub>の保持時間( $t_R$ )付近は血漿の内因性物質による影響を受けていなかった。なお、ピークの純度は以下の方法により確認した。すなわち、25(OH)D<sub>3</sub>に対応するピークを分取し、再びIS<sub>1</sub>を添加後、順相系を含む他の条件のHPLCに付したところ、検討したすべての条件において25(OH)D<sub>3</sub>とIS<sub>1</sub>のピーク面積比に有意差はみられなかった。

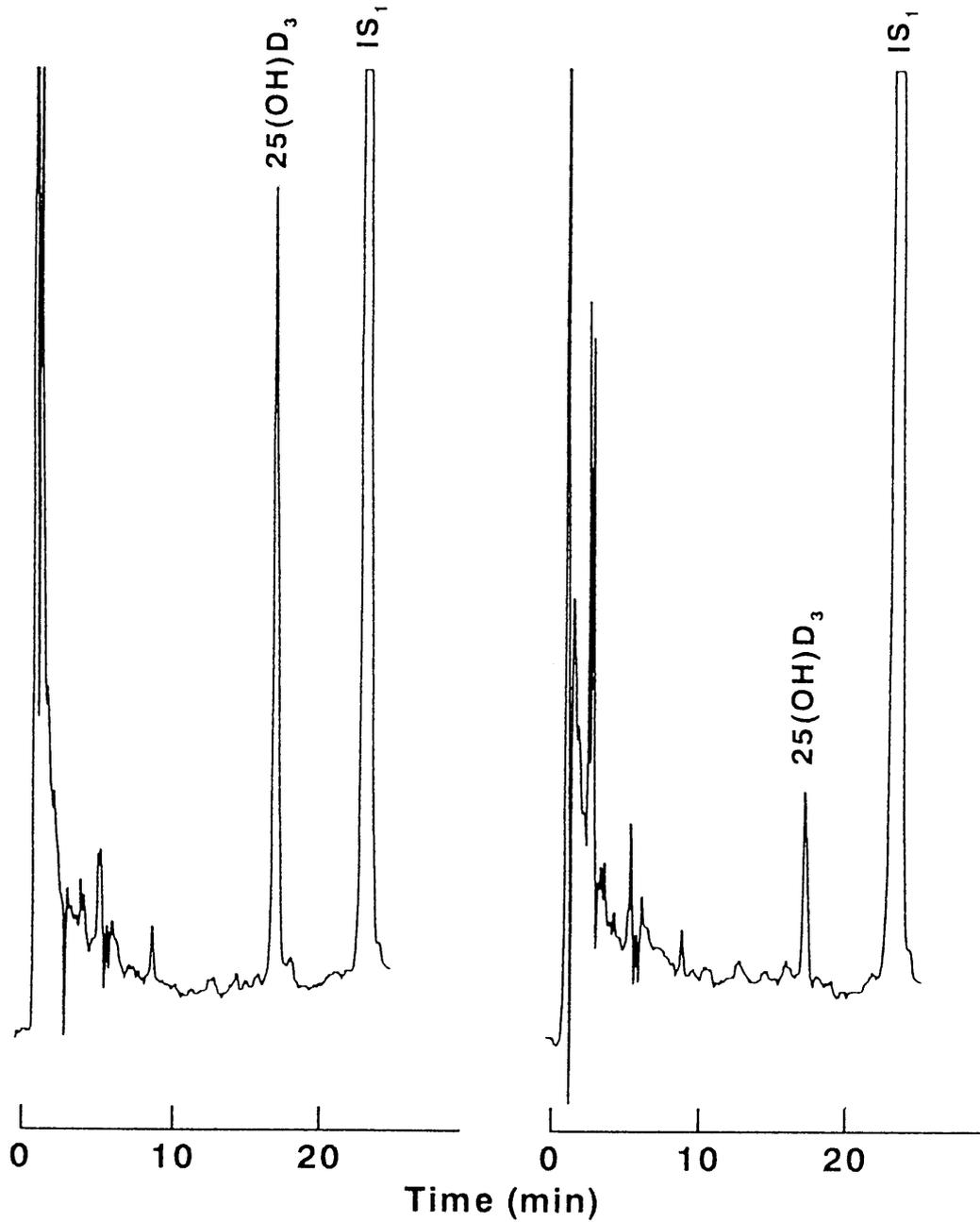
ところで、25(OH)D<sub>3</sub>を含まないブランク血漿の調製は必ずしも容易ではない。本代謝物はDBPとの結合力が強いため、常法の活性炭処理では十分に吸着除去されない。また、熱処理による本代謝物の分解はタンパクの変性を伴うため不適である。



**Chart 1. Procedure for Determination of 25(OH)D<sub>3</sub> in Human Plasma**

a) Authentic samples

b) From human plasma



**Fig. 3. Chromatograms of 25(OH)D<sub>3</sub>**

Column : J'sphere ODS-H80

Mobile phase : MeCN-H<sub>2</sub>O (7:3)

Flow rate : 1 ml/min

Temperature: 40°C

Detection : UV 265 nm

そこでヒト血漿中と同程度のタンパクを含む7%牛血清アルブミン/リン酸カリウム緩衝液 [0.4 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.5)] (7% BSA/buffer) をブランク血漿の代替として使用し、回収率を求めた。その結果、本法による25(OH) $\text{D}_3$ とIS $_1$ の回収率はいずれも52.5%以上、相対標準偏差 (R.S.D.)は7.1%以下であり、4段階にわたる前処理操作を考慮するとほぼ満足し得るものであった (Table 2)。

また、標準添加法 (5-40 ng/ml plasma) により得られた回帰直線 (ピーク高さ比法) は良好な直線性 ( $r>0.995$ ) を示し、その傾きの再現性 (R.S.D.=7.5%) も良好であった。そこでプール血漿を用いて作成した直線を検量線として用いることとした。なお、本法における検出限界及び定量限界は各々2 ng/ml及び5 ng/mlであった。

次いで、添加回収試験により精度、正確度について検討を加えた。異なる4種の血漿に標品 (0, 10, 20 ng/ml plasma) を添加し、回収率を求めたところ90.5-106.5%、R.S.D.はアッセイ内変動9.0%以下、アッセイ間変動8.2%以下と満足のいくものであった (Table 3)。

Table 2. Recovery of 25(OH)D<sub>3</sub> and IS<sub>1</sub>

	Added <sup>a</sup> (ng)	Recovery <sup>b</sup> (%)
25(OH)D <sub>3</sub>	5	52.5 ± 0.3 (0.6)
	20	59.3 ± 4.2 (7.1)
IS <sub>1</sub>	300	55.2 ± 3.3 (6.0)

<sup>a</sup> To 7% BSA/buffer (0.5 ml).

<sup>b</sup> Mean ± S.D. [R.S.D. (%)], n≥3.

Table 3. Accuracy and Precision of Determination of 25(OH)D<sub>3</sub>

Sample	Concentration (ng/ml)		Recovery <sup>b</sup> (%)	Intra-assay		Inter-assay <sup>c</sup>	
	Added	Observed <sup>a</sup>		R.S.D. (%)	R.S.D. (%)	R.S.D. (%)	R.S.D. (%)
1	0	16.8 ± 0.6		3.4			
2	0	18.7 ± 1.0		5.5			
3	0	18.8 ± 0.8		4.4			
4	0	15.5 ± 0.4		2.7			
1	10	27.4 ± 0.7	106.5 ± 7.2	6.8			
2	10	27.7 ± 0.7	90.5 ± 7.2	8.0			
3	10	28.3 ± 0.6	94.8 ± 5.9	6.2			
4	10	26.1 ± 0.5	106.4 ± 4.7	4.4			8.2
1	20	37.1 ± 0.9	101.7 ± 4.9	4.5			
2	20	37.9 ± 1.5	96.0 ± 7.8	8.1			
3	20	37.6 ± 1.7	93.6 ± 8.4	9.0			
4	20	36.6 ± 1.0	105.5 ± 4.8	4.5			5.4

<sup>a</sup> Mean ± S.D., n=5.

<sup>b</sup> Recovery (%) =  $(F - F_0) / A \times 100$ .

A = added 25(OH)D<sub>3</sub>.

F = 25(OH)D<sub>3</sub> in supplemented plasma.

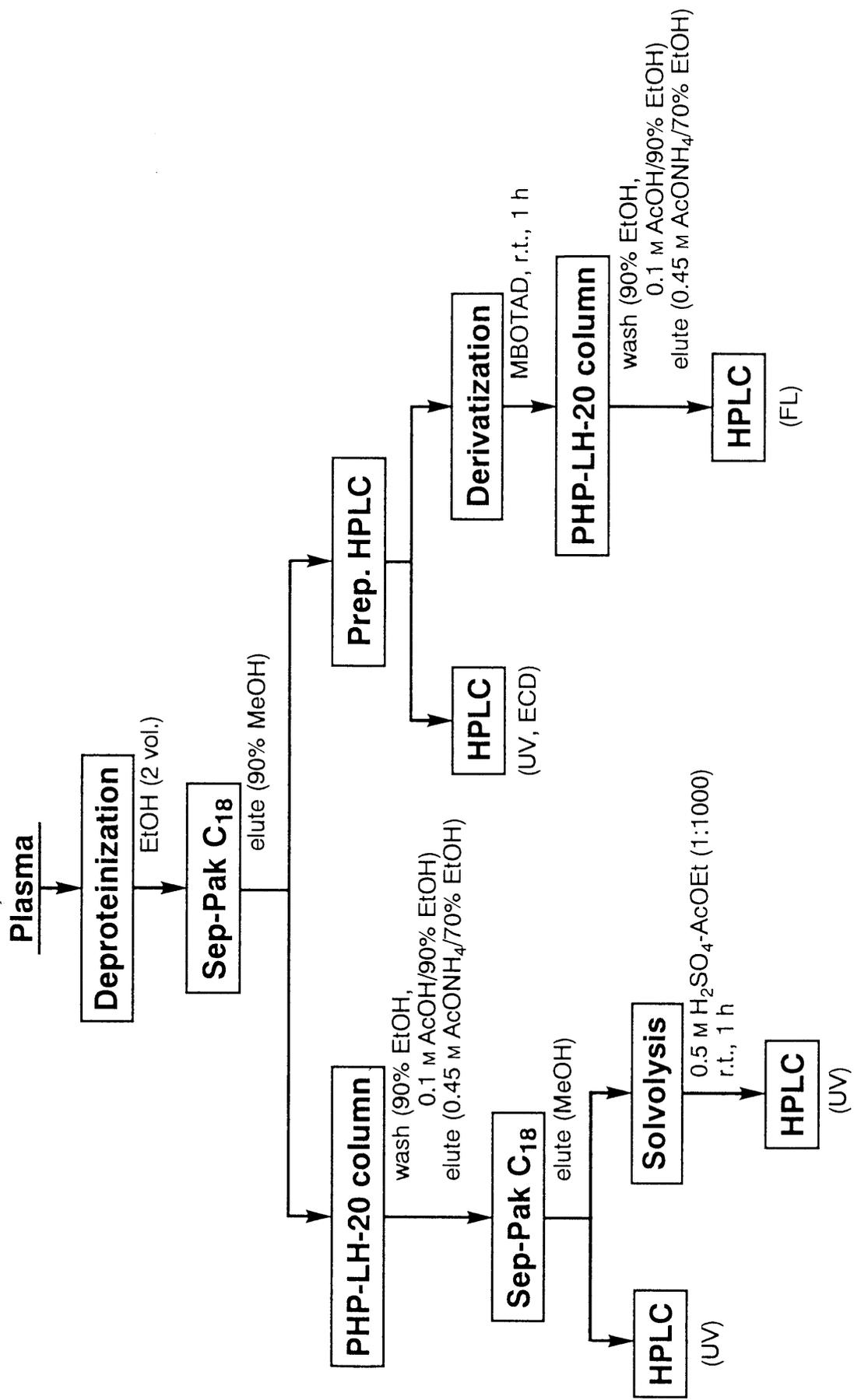
F<sub>0</sub> = 25(OH)D<sub>3</sub> in unsupplemented plasma.

<sup>c</sup> R.S.D. of recovery rates of sample 1-4.

### 第3節 25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 3-サルフェートの同定

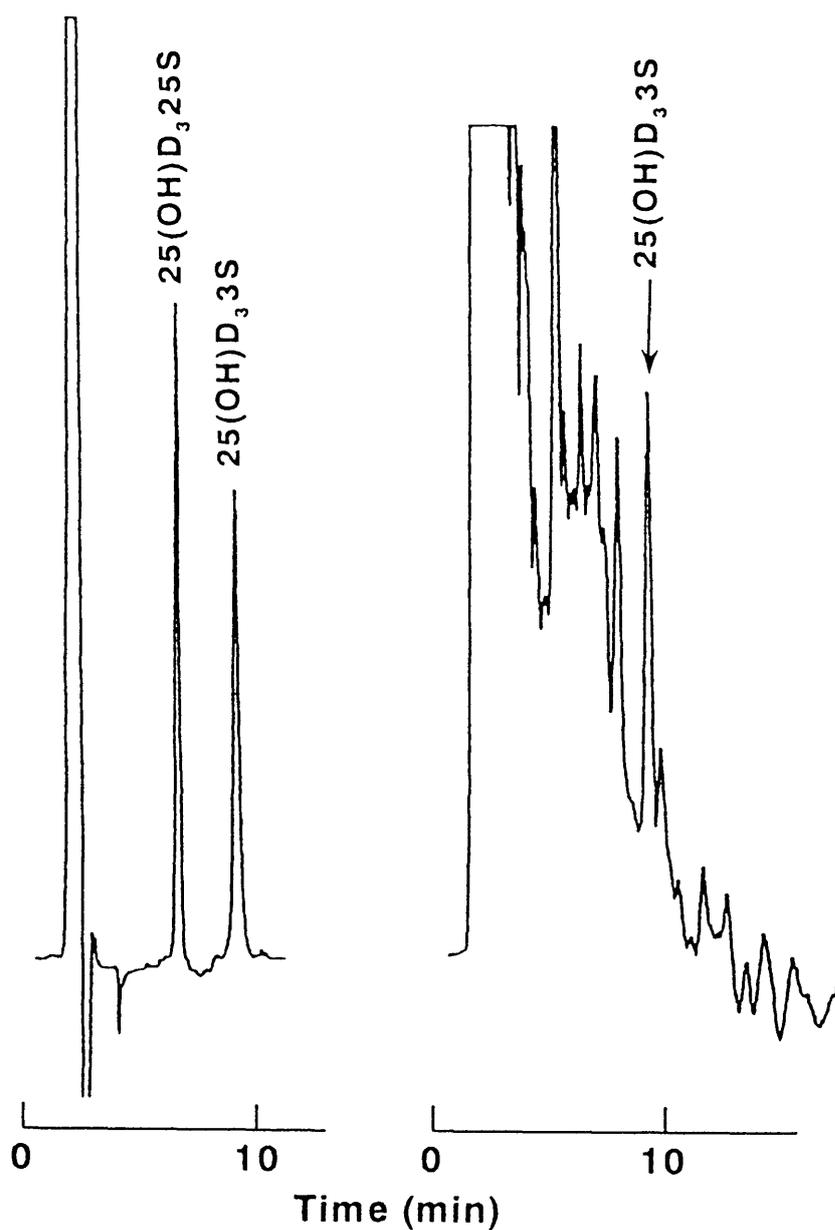
Dの第Ⅱ相反応生成物は比較的極性が高くかつ不安定であり、ヒト血中における存否を明らかとするにはその前処理法が重要である。先にNiwaらは、<sup>33)</sup> ヒト体液中胆汁酸及びその抱合体 (グリシン, タウリン, グルクロン酸, 硫酸) の分離精製に, Sep-Pak C<sub>18</sub>などのODS結合シリカゲルによる固相抽出と疎水性陰イオン交換ゲル [piperidinohydroxypropyl Sephadex LH-20 (PHP-LH-20)]<sup>34)</sup>を用い, 良好な結果を得ている。特に, PHP-LH-20カラムはステロイドを各種抱合体別に分画する手段として極めて有用である。そこで, 血漿中25(OH)D<sub>3</sub>3Sの分離及び同定に本法を適用した (Chart 2)。

すなわち, 健常人血漿 (1 ml) をエタノールにより除タンパク後, ステロイドをSep-Pak C<sub>18</sub>により抽出し, PHP-LH-20カラムに通導した。90% エタノール, 0.1 M 酢酸 / 90% エタノールにより遊離型代謝物などを洗浄除去後, サルフェートを0.45 M 酢酸アンモニウム / 70% エタノールにより溶出した。脱塩後 (Sep-Pak C<sub>18</sub>), 得られた画分の一部をUV検出HPLCにより分析した結果, 25(OH)D<sub>3</sub>3Sに対応するピークが得られ, 同条件下で位置異性体である25(OH)D<sub>3</sub>25Sのピークとは明らかに分離することも確認した (Fig. 4)。さらに, ゲニン部の構造を確認するため, 得られたサルフェート画分を0.5 M 硫酸 - 酢酸エチル (1:1000) によるソルボリシスに付した。後処理後, 逆相系及び順相系HPLCにより, 25(OH)D<sub>3</sub>に対応するピークが本反応後に新たに出現したことを確認した (Fig. 5)。なお, 25(OH)D<sub>3</sub>は25(OH)D<sub>2</sub>といずれの系においても十分な分離を示しており, 実試料のクロマトグラムでは前者のみが検出された。また, 同定をより確実なものとするため, 血漿 (1 ml) を固相抽出後, HPLCにより25(OH)D<sub>3</sub>3Sを分取, 濃縮後, HPLCに付した (Chart 2)。2種の移動相によるUV検出HPLCのほか, これらとは異なる逆相系カラムを用い, 電気化学検出 (ECD) HPLCに



**Chart 2. Procedure for Separation and Characterization of 25(OH)D<sub>3</sub>S in Human Plasma**

a) Authentic samples    b) From human plasma



**Fig. 4. Chromatograms of 25(OH)D<sub>3</sub>S**

Column : TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>

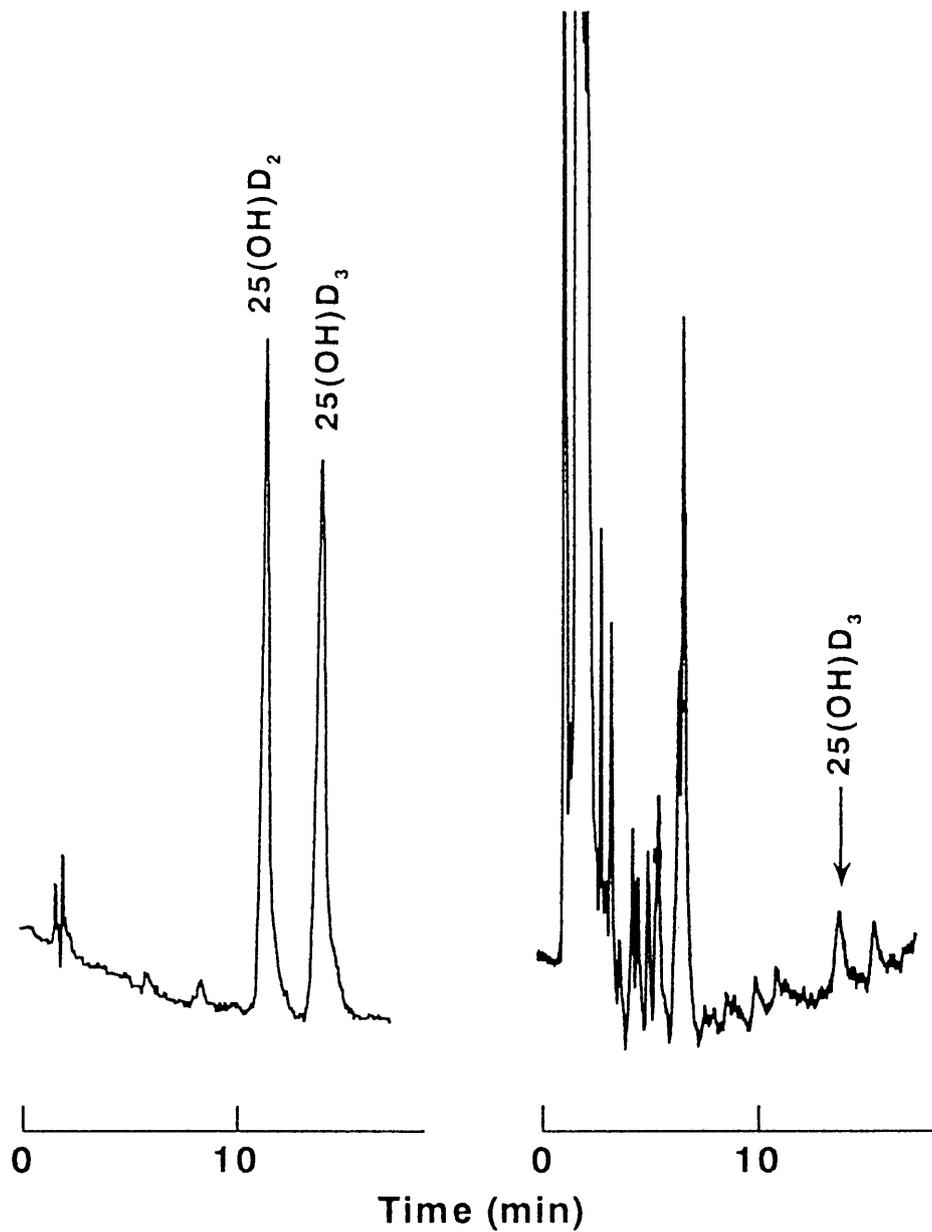
Mobile phase : MeCN-0.5% AcONH<sub>4</sub> (1:1)

Flow rate : 1 ml/min

Detection : UV 265 nm

a) Authentic samples

b) From human plasma



**Fig. 5. Chromatograms of 25(OH)D**

Column : Develosil 60-5

Mobile phase : Hexane-IPA (97:3)

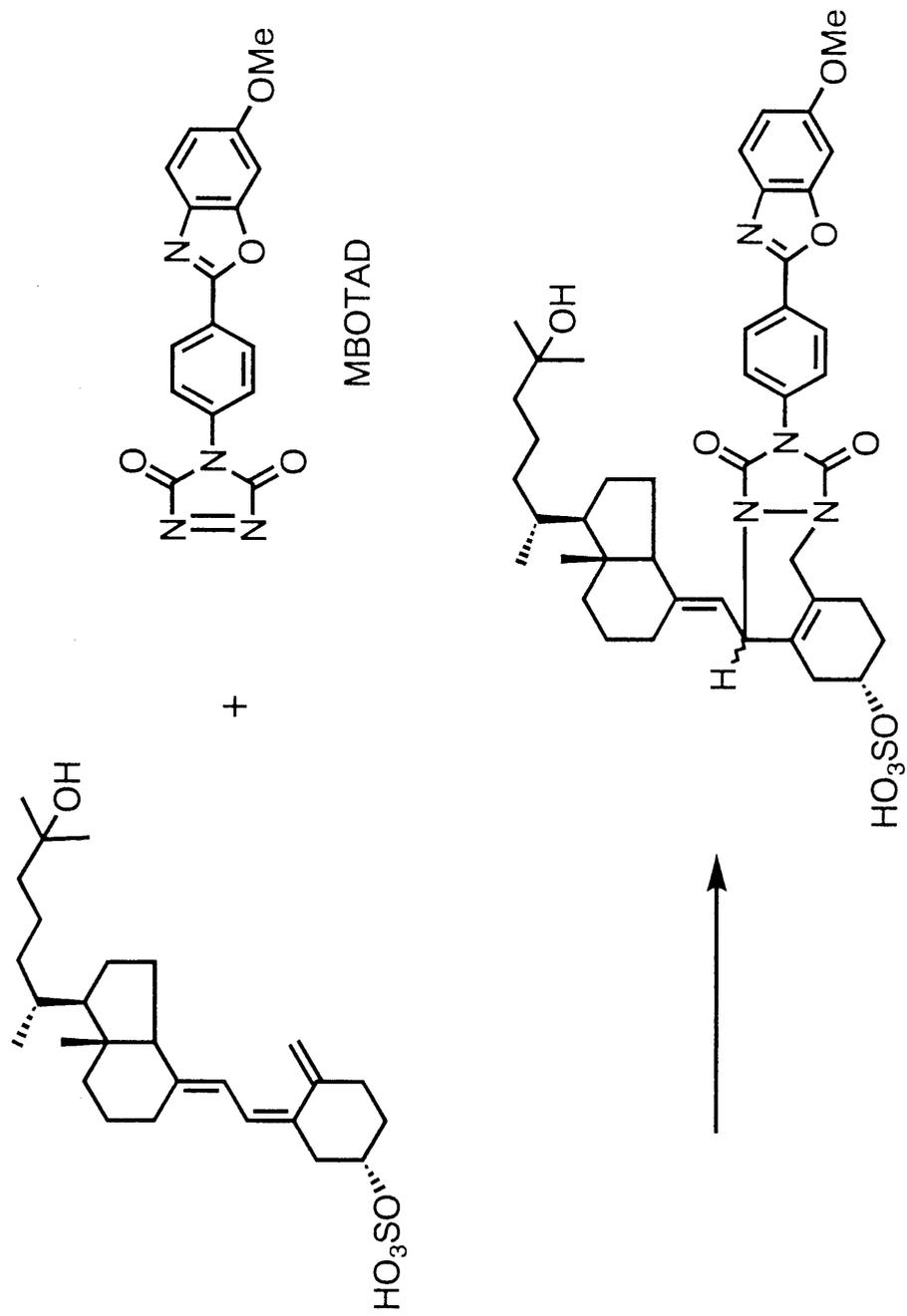
Flow rate : 2 ml/min

Detection : UV 265 nm

よっても検討したが、いずれにおいても25(OH)D<sub>3</sub>3Sに対応するピークが確認された。

先に当研究室ではDの*s*-シス-ジエンと選択的に反応するCookson型試薬の一つとして4-[4-(6-methoxy-2-benzoxazolyl)phenyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione (MBOTAD) を開発した (Chart 3).<sup>35)</sup> これは蛍光 (FL) 検出HPLC用プレラベル化試薬であり、その高感度、高選択性はD代謝物分析用試薬として注目されている。そこで、HPLCの分取画分について本試薬を適用した (Chart 2)。誘導体化後、PHP-LH-20カラムにより過剰な試薬などを除去し、サルフェート画分をFL検出HPLCに付したところ25(OH)D<sub>3</sub>3S-MBOTAD付加体のピークが確認された。なお、本試薬はDのα面からの付加体とβ面からの付加体の2種のエピマーを与えることが知られており、後者が主生成物となる。<sup>36, 37)</sup> これらはクロマトグラフィー条件により1本あるいは2本のピークを与えるが、<sup>38)</sup> 本条件では25(OH)D<sub>3</sub>-3S-MBOTAD付加体、-25S-MBOTAD付加体が各々1本及び2本のピークとして現れている (Fig. 6)。

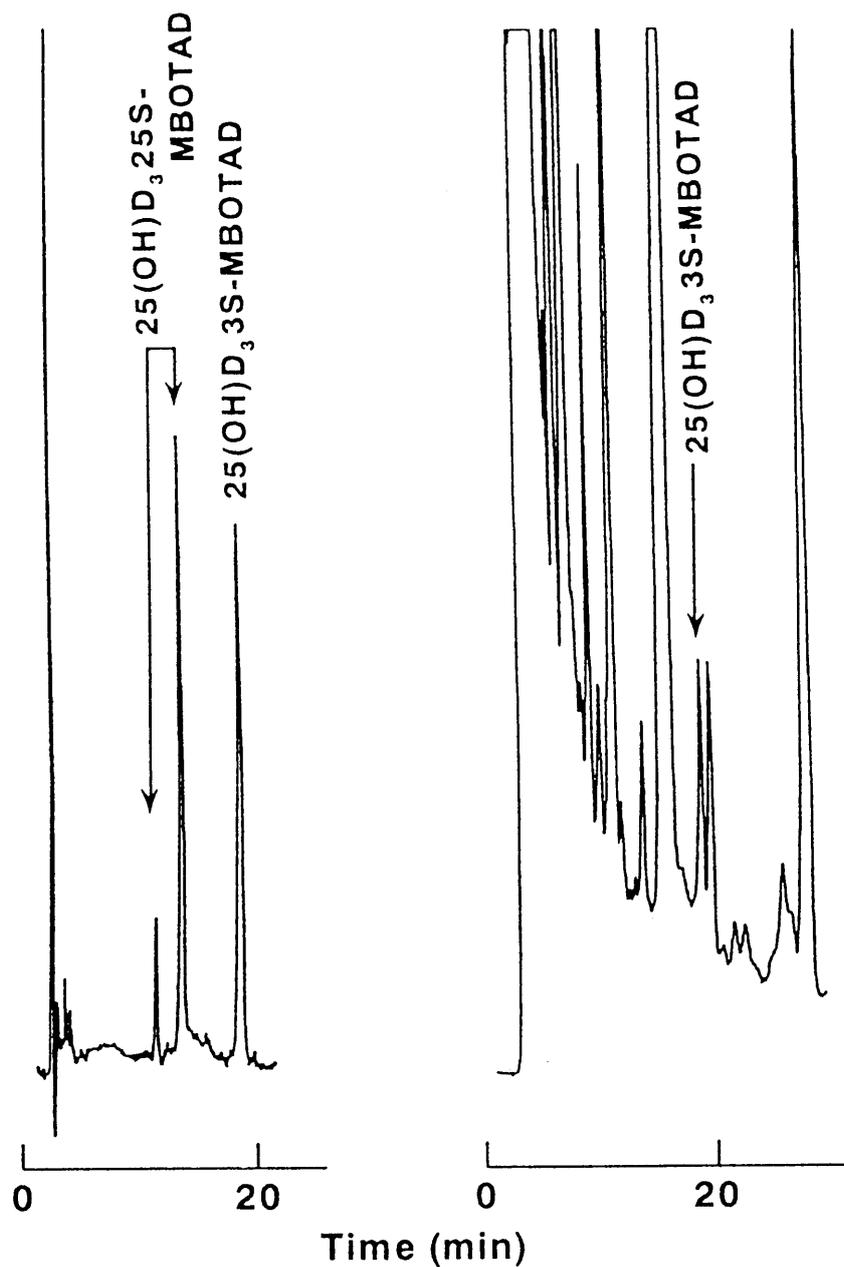
以上の研究は、健常人3名の血漿について行い、いずれも標品とのco-chromatography及び血漿に標品を添加後同様に操作した試料との比較により確認したものである。なお、25(OH)D<sub>3</sub>25S、25(OH)D<sub>2</sub>3Sについても検索したがその存在を明らかとするには至らなかった。また、25(OH)D<sub>2</sub>25Sは標品の合成を試みたものの、濃縮などの一般的な化学操作によってさえ容易に遊離型に変換し混合物としてしか得られなかった。このため、生体内における本代謝物の検索は行わなかった。



**Chart 3. Derivatization Reaction of 25(OH)D<sub>3</sub>S with MBOTAD**

a) Authentic samples

b) From human plasma



**Fig. 6. Chromatograms of 25(OH)D<sub>3</sub>S-MBOTAD Adducts**

Column : YMC-Pack ODS-AM

Mobile phase : MeCN-0.5% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (5:6)

Flow rate : 1 ml/min

Detection : FL (  $\lambda$  ex. 320 nm,  $\lambda$  em. 380 nm)

#### 第4節 25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 3-サルフェート定量法の開発

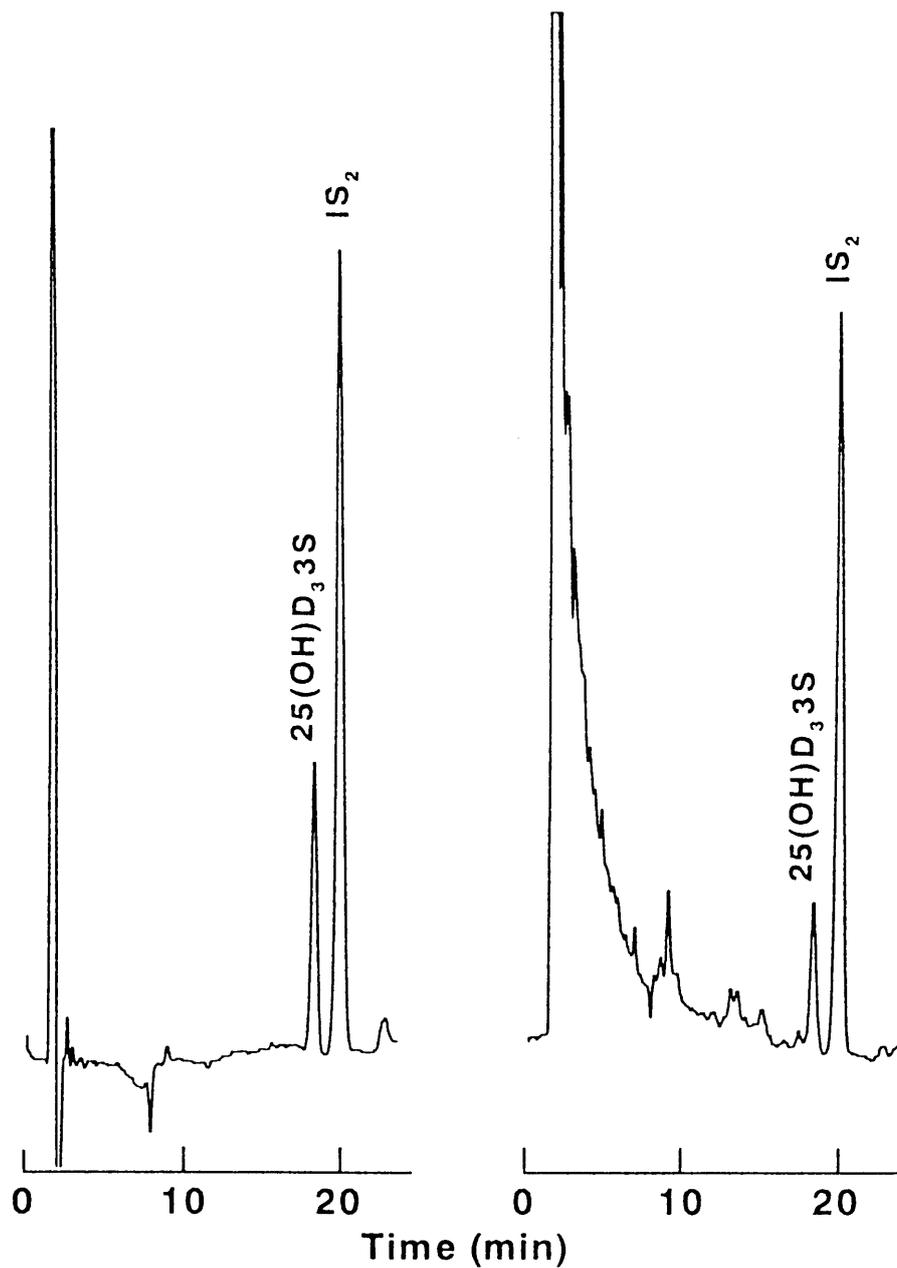
ヒト血漿中25(OH)D<sub>3</sub>3Sの定量を第3節において用いた前処理法を基に種々検討した。当初、固相抽出用カートリッジにBond Elut C18、検量線は7% BSA/bufferに標品を添加して得られたものを用いたが、<sup>39)</sup>コスト面、より信頼性の高い方法を目指して吟味を加え、以下のように確立した (Chart 4)。血漿 (0.5 ml) にISとして25-hydroxy-7-dehydrocholesterol 3-sulfate [25(OH)7DHC3S] のMBOTAD付加体 (IS<sub>2</sub>) を添加、エタノールにより除タンパクし得られた上清をリン酸カリウム緩衝液で希釈後、固相抽出用カートリッジであるISOLUTE C18 (EC) (ISOLUTE C18) に吸着させた。水、50% メタノールで洗浄後メタノールでステロイドを溶出し、溶出液に水を加え約90% メタノール溶液としたのちPHP-LH-20カラムに通導した。90% メタノール、0.1 M 酢酸/90% メタノールで洗浄後、サルフェートを0.7 M 酢酸-0.5 M 酢酸アンモニウム/90% メタノールで溶出し、ISOLUTE C18により脱塩後、UV検出HPLCに付した。カラムにYMC-Pack ODS-AM、移動相にアセトニトリル-2% 過塩素酸ナトリウム (pH 3.0) (5:6) を用いたところ、25(OH)D<sub>3</sub>3SとIS<sub>2</sub>は良好に分離しており、血漿中内因性物質の影響も受けていなかった (Fig. 7)。なお、25(OH)D<sub>3</sub>3Sのピーク純度は対応するピークを分取後、条件の異なるHPLCに付したところ単一ピークを示したことから、活性炭処理したブランク血漿に25(OH)D<sub>3</sub>3Sに対応するピークが検出されなかったことより確認した。ブランク血漿の代替として7% BSA/bufferを用いて求めた本操作における標品及びIS<sub>2</sub>の回収率はいずれも73.1%以上、R.S.D.は6.6%以下と、ほぼ満足し得るものであった (Table 4)。

プール血漿を用いる標準添加法 (5-40 ng/ml plasma) により得られた回帰直線 (ピーク高さ比法) は良好な直線性 ( $r > 0.991$ ) を示し、その傾きの再現性 (R.S.D.=6.3%) も良好であった。そこで本直線を検量線として用い、精度、正確度について検討した。



a) Authentic samples

b) From human plasma



**Fig. 7. Chromatograms of 25(OH)D<sub>3</sub>3S**

Column : YMC-Pack ODS-AM

Mobile phase : MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (5:6)

Flow rate : 1 ml/min

Temperature: 40°C

Detection : UV 265 nm

Table 4. Recovery of 25(OH)D<sub>3</sub>3S and IS<sub>2</sub>

	Added <sup>a</sup> (ng)	Recovery <sup>b</sup> (%)
25(OH)D <sub>3</sub> 3S	5	73.1 ± 4.8 (6.6)
	16	81.9 ± 1.6 (2.0)
IS <sub>2</sub>	200	85.7 ± 3.3 (3.8)

<sup>a</sup> To 7% BSA/buffer (0.5 ml).

<sup>b</sup> Mean ± S.D. [R.S.D. (%)], n≥4.

その結果、異なる 4 種の血漿に 25(OH)D<sub>3</sub>S (0, 10, 20 ng/ml plasma) を添加し得られた回収率は 91.2-102.9%、R.S.D. はアッセイ内変動 14.2% 以下、アッセイ間変動 6.0% 以下といずれも満足のいくものであった (Table 5)。なお、本法における検出限界及び定量限界は各々 2 ng/ml 及び 5 ng/ml であった。

Table 5. Accuracy and Precision of Determination of 25(OH)D<sub>3</sub>S

Sample	Concentration (ng/ml)		Recovery <sup>b</sup> (%)	Intra-assay		Inter-assay <sup>c</sup>	
	Added	Observed <sup>a</sup>		R.S.D. (%)	R.S.D. (%)	R.S.D. (%)	R.S.D. (%)
1	0	23.3 ± 0.5			2.1		
2	0	23.0 ± 1.1			4.9		
3	0	17.6 ± 1.5			8.6		
4	0	12.9 ± 1.0			8.1		
1	10	32.4 ± 0.8	91.4 ± 9.0	9.8			
2	10	32.2 ± 1.1	92.4 ± 11.2	12.1			
3	10	27.9 ± 1.5	102.9 ± 14.6	14.2			
4	10	22.0 ± 0.5	91.2 ± 5.3	5.9		6.0	
1	20	42.3 ± 1.0	95.2 ± 5.2	5.5			
2	20	41.7 ± 1.0	93.7 ± 4.9	5.2			
3	20	37.7 ± 1.7	100.2 ± 8.4	8.3			
4	20	32.4 ± 0.9	97.7 ± 4.3	4.4		2.9	

<sup>a</sup> Mean ± S.D., n=7.

<sup>b</sup> Recovery (%) =  $(F - F_0) / A \times 100$ .

A = added 25(OH)D<sub>3</sub>S.

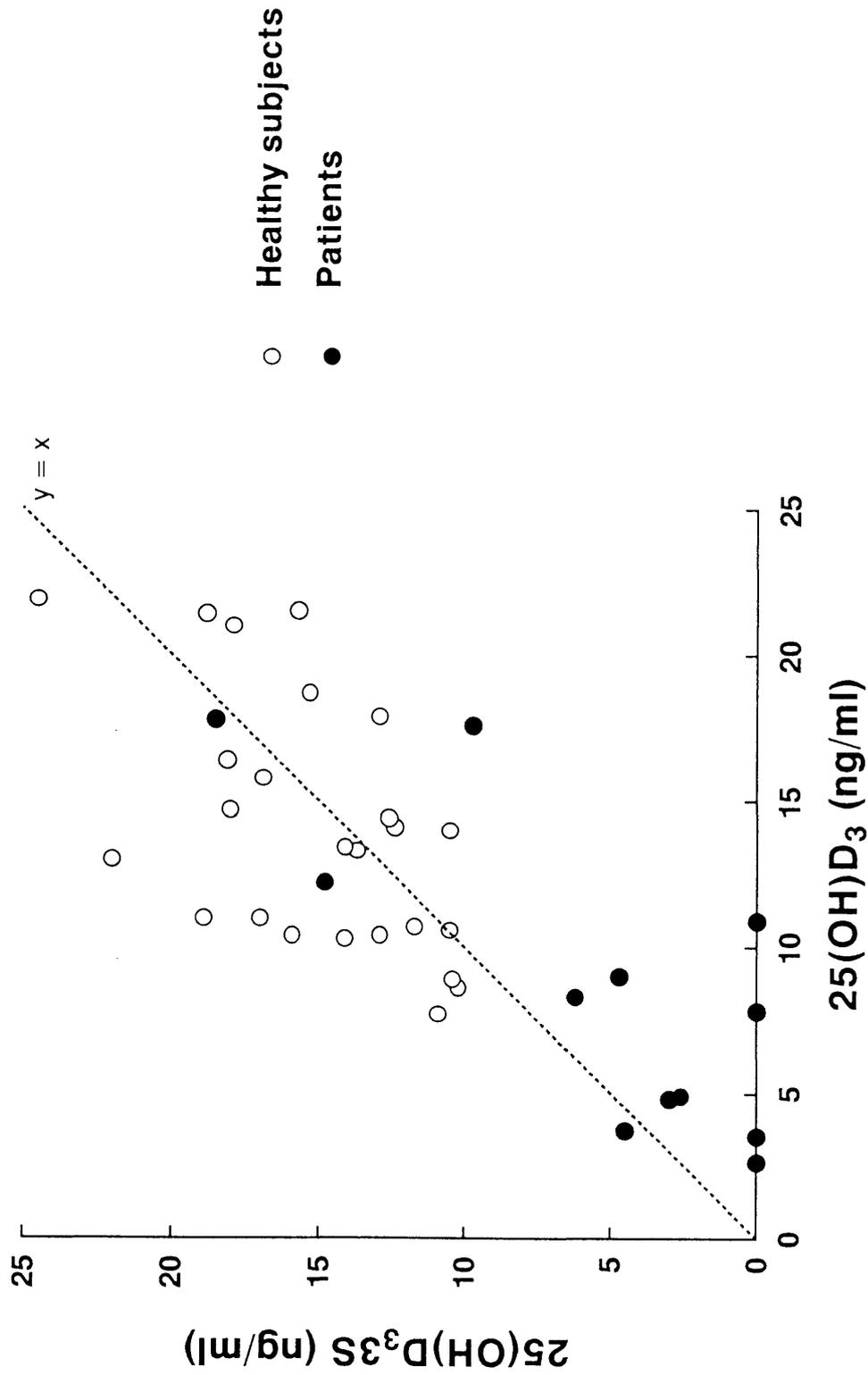
F = 25(OH)D<sub>3</sub>S in supplemented plasma.

F<sub>0</sub> = 25(OH)D<sub>3</sub>S in unsupplemented plasma.

<sup>c</sup> R.S.D. of recovery rates of sample 1-4.

## 第5節 ヒト血漿中25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>とその3-サルフェートの相関

第2節及び第4節で開発した25(OH)D<sub>3</sub>及び25(OH)D<sub>3</sub>3S定量法を駆使し、健常人血漿25例及び慢性腎不全患者血漿12例における両代謝物の相関について検討した (Fig. 8). その結果、健常人では25(OH)D<sub>3</sub>3Sは25(OH)D<sub>3</sub>とほぼ同レベル [25(OH)D<sub>3</sub>3S: 15.0 ± 3.8 ng/ml, 25(OH)D<sub>3</sub>: 14.0 ± 4.3 ng/ml, mean ± S.D.] を示したが、前者が後者の約2倍存在する2例もみられた。一方、患者血漿では、サルフェートの方が遊離型よりも低値を示すものが多く、検出されない例が1/3にも及んだ。



**Fig. 8. Correlation between Concentration of 25(OH)D<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub>S in Plasma from Healthy Subjects and from Patients with Chronic Renal Failure**

## 第6節 考察

非放射性ISとUV検出逆相系HPLCによるヒト血漿中25(OH) $D_3$ 定量法を確立した。HPLCによる本代謝物の分析法は種々報告されているものの、放射性同位体を用いるものや順相系HPLCによるものであり、ルーチン分析には必ずしも適していなかった。今回、著者が開発した定量法は、精度、正確度に優れるうえに、これらの問題点を克服した汎用性に富むものである。

次いで、これまで疑問視する考えもあったヒト血漿中25(OH) $D_3$ 3Sの存在に検討を加えた。すなわち、血漿を固相抽出、陰イオン交換ゲルに付しサルフェートを分画後、UV検出HPLCにより25(OH) $D_3$ 3Sを検出した。これはHPLCによる分取後、UV、ECD及び誘導体化後のFL検出HPLCの挙動からも確認された。さらにUV検出HPLCによる本代謝物の定量法を確立した。本法は非放射性ISを使用し、またサルフェートをソルボリシスすることなく直接定量するものであり、簡便性に優れるうえに抱合部位に関する情報を保持しているなど従来法に比し信頼性が高い。

開発した以上の定量法を駆使し、ヒト血漿中における両代謝物の相関について検討した。健常人血漿では両者はほぼ同レベルで存在しており、これは先のAxelsonの報告と符合する結果であった。<sup>16)</sup> 一方、慢性腎不全患者血漿では遊離型代謝物が優位に存在していた。生理活性の低いサルフェートは活性な $D_3$ 代謝物の貯蔵型であることを示唆する報告もあるが、<sup>17, 18)</sup> 25(OH) $D_3$ 3Sの生理的意義はいまだ不明である。本代謝物に関してこのような病態との関連が示された報告例は今回が初めてであり、今後の展開が期待される。なお、25(OH) $D_3$ 25S、25(OH) $D_2$ 3Sについてはその存在を確認するには至らなかった。後者については、ヒト体液中では $D_2$ 系は $D_3$ 系の1/10程度しか存在しないとされており、納得し得る知見であった。

## 第2章 25-ヒドロキシビタミンDモノグルクロニドの合成と生体成分分析への応用

### 第1節 序

緒論で述べたように、近年グルクロン酸抱合型D代謝物の存在が示唆されるに至った。しかしこれらの報告の多くは、標品が得られていないことなどから抱合体を加水分解後の間接的証明に基づくものであり、これに起因する問題は先のサルフェートと同様の経緯で説明し得る。例えば、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>投与ラット胆汁中にグルクロニドが存在すると報告されたが、<sup>24)</sup>抱合部位に関する検討はなされていない。また、D<sub>2</sub>投与後のヒヨコ胆汁中における25(OH)D<sub>2</sub>25Gの存在が報告され、<sup>22)</sup>立体障害の大きい3級水酸基(25位)への抱合を示唆するものとして注目されたが、構造に疑問が残る。ステロイドの3級水酸基へのグルクロニド化は数多くみられるものではなく、WilliamsとGoldzieherがエチニルエストラジオールの3級水酸基である17β位へのそれを報告している程度である。<sup>40)</sup>しかしこの例はエチニル基により活性化された部位であることを考慮すると、この種の水酸基への抱合が、Dの代謝上普遍的に起こるか否か興味を持たれる。

そこで著者は、まず、体液中これらの分析に標品として不可欠な25(OH)Dのグルクロン酸抱合体 [25(OH)D<sub>3</sub>-3G, -25G; 25(OH)D<sub>2</sub>-3G, -25G] 計4種を合成した。次いで、25(OH)D投与胆管ろうラット胆汁中25(OH)Dモノグルクロニドの検索を標品を指標とするHPLC又はLC/MSにより行った。

## 第2節 25-ヒドロキシビタミンDモノグルクロニドの合成

ステロイド配糖体 (グルクロニド, グルコシドなど) の合成は古くから Koenigs-Knorr 反応により行われており,<sup>41)</sup> D 関連物質のそれも本法によっている. 例えば最近, Fürstらは25(OH)Dのグルコシデーションによって3-グルコシドのみならず25-グルコシドも得られることを報告している.<sup>42)</sup> このことは立体障害の大きい25位の3級水酸基にも Koenigs-Knorr 反応が進行すること及び熱, 光, 酸に対して不安定とされているD骨格が, 本反応条件下では安定であることを示している. そこで目的とする25(OH)D<sub>3</sub>Gの合成には25(OH)D<sub>3</sub>を基質として本反応に付すルートが考えられた. しかし, 25(OH)D<sub>3</sub>の大量入手あるいは合成が容易でないことから以下のルートを選択した (Chart 5). すなわち, プロ体である25(OH)7DHC (**2a**) を本反応に付し, 得られたモノグルクロニドアセテートメチルエステル (G') をD骨格へ変換する方法である. まず, 3β-hydroxychol-5-en-24-oic acid (**1**) から Baggioliniらの方法<sup>43)</sup> に準じて合成した25(OH)7DHC (**2a**) を基質とし, 炭酸銀を触媒に, methyl (2,3,4-tri-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl)uronate bromide (Br-sugar)<sup>41)</sup> を用いる Koenigs-Knorr 反応を行った. フラッシュクロマトグラフィーにより精製したところ, 対応する3-あるいは25-G'体 (**3**, **4a**) 及びジグルクロニドアセテートメチルエステル (diG') (**5**) が各々51.5%, 12.9%及び1.7%の収率で得られた.

これらの化合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルには, いずれも4.7 ppm付近にアノメリックプロトンに基づくシグナルが $J=7.9$  Hzのdoubletとして観察され, 糖がβ結合していることを示していた. なお, **3**及び**4a**のG'基の位置は以下のようにして決定した. すなわち, 26, 27位のメチル基に基づくシグナルが前者は基質 (**2a**) と同様に1.22 ppmに6H分のsingletとしてみられるのに対し, 後者は1.18, 1.22 ppmに各々3H分のsingletとして観察され25位の構造変化を示していた. さらに後者はピリジン-無水酢酸によ

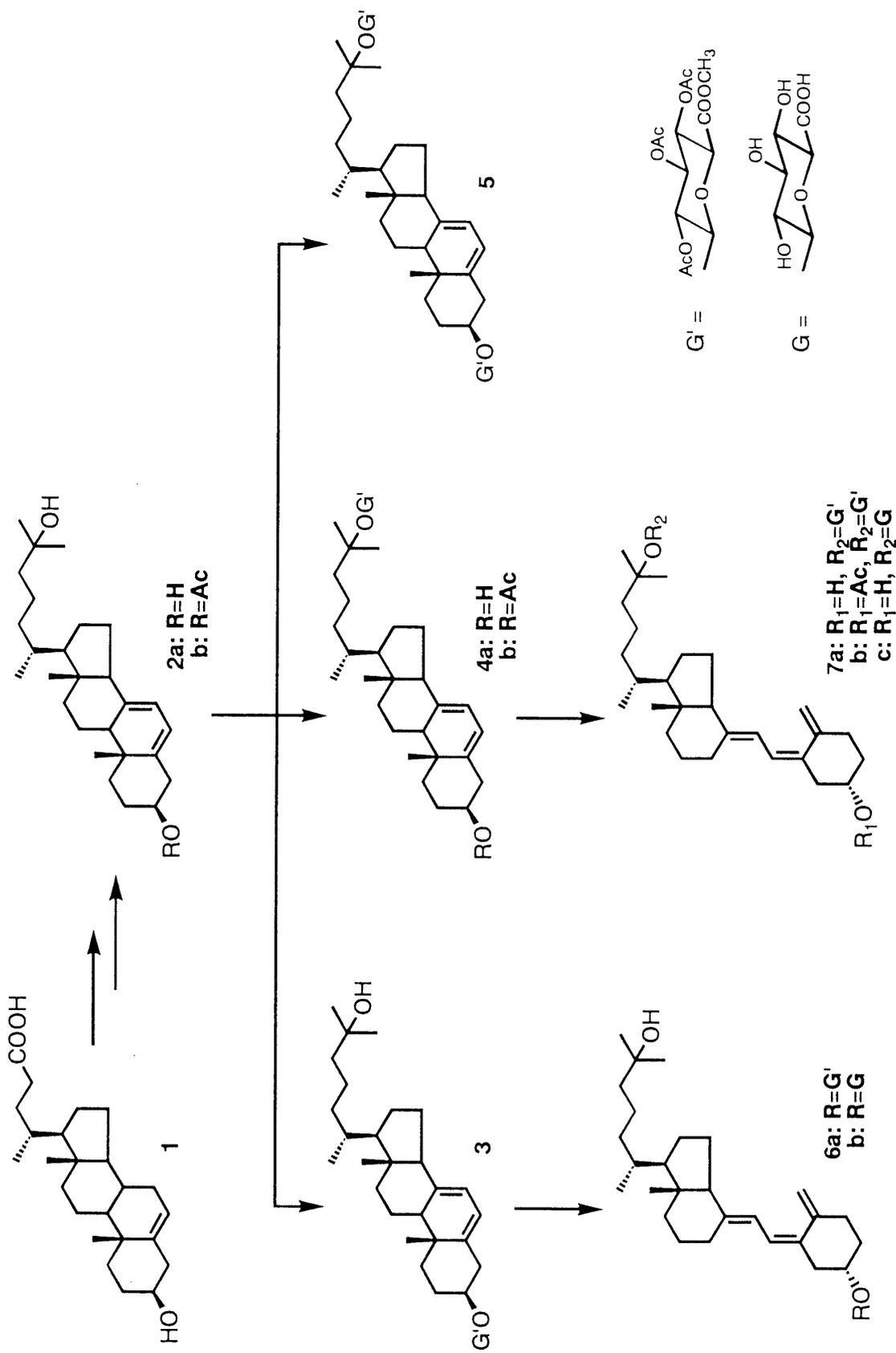


Chart 5

り容易に対応するアセテート (**4b**) を与えた。以上のデータより**3**, **4a**を各々25(OH)7DHC-3G', -25G'と確認した。一方, **5**については, FAB-MSにおいて擬分子イオンピーク ([M-H]) が  $m/z$ : 1031に明瞭に観察され, また<sup>1</sup>H-NMRスペクトルにおいても, ピラノース由来のカルボキシメチル基に基づくシグナルが2本のsinglet (各々3H) としてみられ, 2分子の糖の結合を示唆していた。以上のように本化合物は25(OH)7DHC3,25diG'であることを確認したが, 少量しか得られなかったため, これ以上の検討は行わなかった。このようにFürstらの報告と同様に**2a**を直接Koenigs-Knorr反応に付すことにより3位のほか, 25位の3級水酸基へもグルクロニデーションの進行することが明らかとなった。

次いで, **3**及び**4a**を各々光開裂反応, 引き続き熱異性化反応後, 分取TLC (prep. TLC) により精製し, 対応する25(OH)D<sub>3</sub>G' [**6a** (20.8%), **7a** (9.6%)] を得た。これらの<sup>1</sup>H-NMRスペクトル [19-CH<sub>2</sub>: *ca.* 4.8, 5.0 ppm, broad singlet; H-7, 6: *ca.* 6.0, 6.2 ppm, AB quartet] 及びUVスペクトル [ $\lambda_{\max}$  nm: 264,  $\lambda_{\min}$  nm: 227] ではD骨格への変換が証明され, 電子衝撃(EI)-MS ( $m/z$ : 716 [M<sup>+</sup>]) もその構造を支持していた。次いで, **6a**をアルカリ加水分解反応後prep. TLCにより精製し, 目的とする25(OH)D<sub>3</sub>G (**6b**) (84.6%) を得た。**6b**は無色無晶形物質として単離され, <sup>1</sup>H-NMR, UV及びFAB-MSにより構造を確認した。

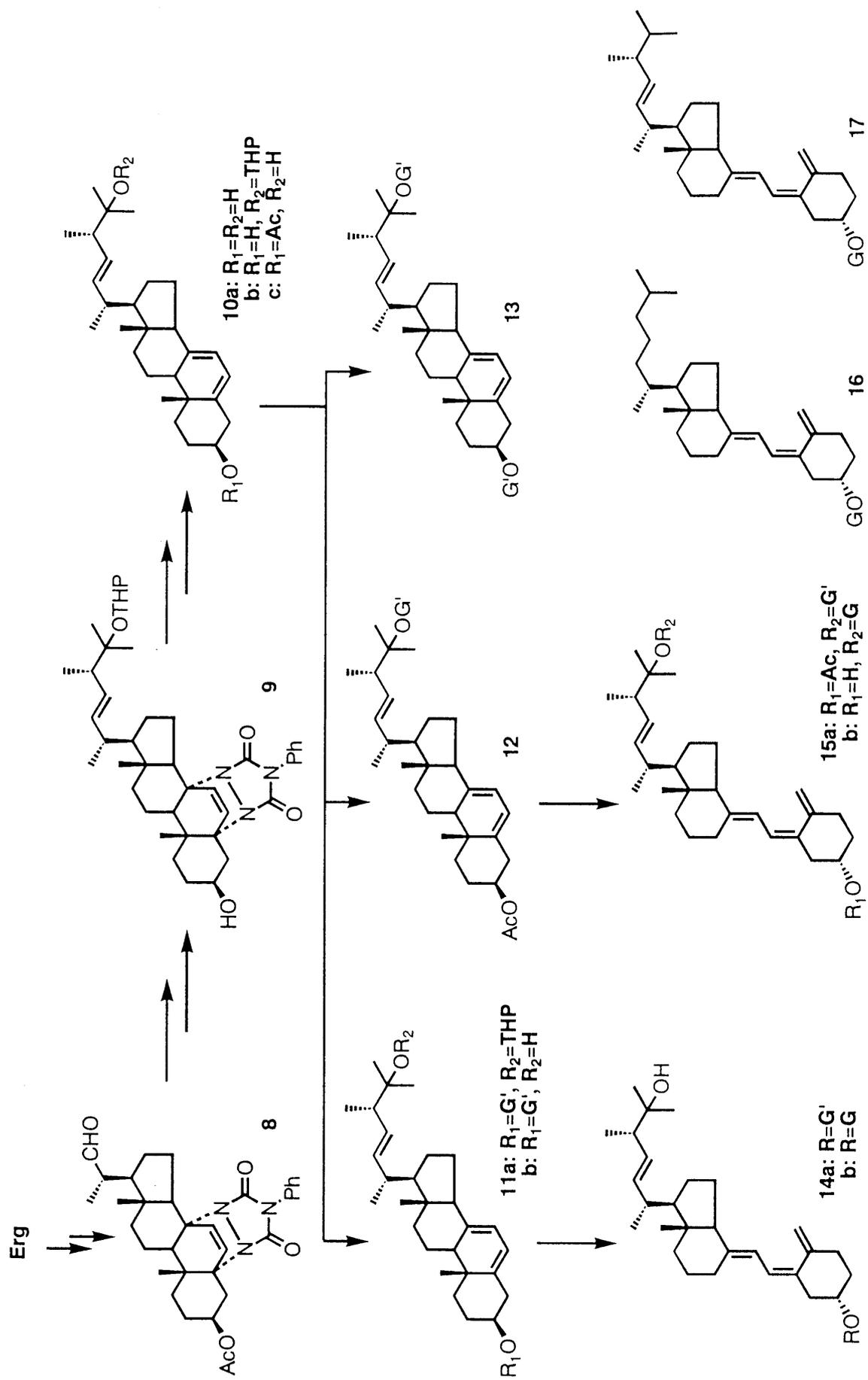
一方, **7a**は十分な量が得られないうえに, 一般的な化学操作に対して必ずしも安定ではなかった。そこで, 基質である**2a**の3位水酸基をあらかじめアセチル基で保護することにより, 25位へのより効率的なG'の導入を試みた。すなわち, **2a**の合成中間体である3-アセテート (**2b**) をKoenigs-Knorr反応に付し, 25G'体 (**4b**) を62.9%の収率で得た。本化合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは, 先に合成した25(OH)7DHC3Ac25G'のそれと一致していた。次いで, **4b**を常法通り光開裂, 熱異性化反応によりD骨格へ変換し25(OH)D<sub>3</sub>Ac25G' (**7b**) (18.1%) を得, アルカリ加水分解反応後prep. TLCにより精

製し、目的とする25(OH) $D_3$ 25G (**7c**) (68.7%) を無色油状物として得た。本化合物のUVスペクトル及びFAB-MSは構造を支持するものであったが、 $^1\text{H-NMR}$ の測定にクロロホルム- $d_1$ -メタノール- $d_4$  (1:1) を用いたところ分解物が生じた。これはクロロホルム- $d_1$ 中の微量の酸に基づくものと推定されたが、適当な溶媒が得られないため、これ以上の検討を行わなかった。

続いて25(OH) $D_2$ Gの合成を試みたが、25(OH) $D_3$ Gと同様にプロ体をG'体としたのち、D骨格へ変換する方法を選択した (Chart 6)。まず、ErgよりBartonら<sup>44)</sup>及びTsujiら<sup>45)</sup>の方法に従い合成した25(OH)Erg (**10a**) を基質としてKoenigs-Knorr反応に付したところ、25(OH)Erg3G' (**11b**) 及び25(OH)Erg3,25diG' (**13**) が各々29.4%、25.2%の収率で得られたものの、25(OH)Erg25G'の生成は認められなかった。そこで25-テトラヒドロピラニルエーテル (THP) (**10b**) 及び3-アセテート (**10c**) を、各々3G'体及び25G'体の合成基質として用いた。すなわち、**10b**をグルクロニデーションして**11a**としたのち *p*-トルエンスルホン酸ピリジニウム (PPTS) により25位を脱保護し3G'体 (**11b**) (47.2%) を得た。なお、本化合物は $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及び順相、逆相系HPLCにより、前ルートで得られた25(OH)Erg3G'と同一であることを確認した。一方、**10c**のグルクロニデーションにおいても25G'体 (**12**) が31.8%の収率で得られた。次いで、**11b**及び**12**を各々光開裂、熱異性化反応後、アルカリ加水分解反応に付し、目的とする25(OH) $D_2$ -3G, -25G [**14b** (10.6%), **15b** (10.5%)] を得た。これらの各種機器データはいずれも構造を支持するものであった。ただし、**15b**は25(OH) $D_3$ 25G (**7c**) と同様にクロロホルム- $d_1$ -メタノール- $d_4$ を用いる $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定条件で容易に分解したため、UVスペクトル及びFAB-MSにより構造を確認した。

なお、 $D_3$ 及び $D_2$ の3G体 (**16**, **17**) も文献記載の方法に従って合成し、<sup>26)</sup> 構造を確認した。

以上のようにして得られたモノグルクロニド (**6b**, **7c**, **14b**, **15b**, **16**及び**17**) の



**Chart 6**

構造をさらに明らかとするため各々を $\beta$ -グルクロニダーゼによる酵素水解反応に付したところ、HPLC上対応する25(OH)D<sub>3</sub>の生成が認められ、糖の結合配置、ゲニン部の構造が改めて確認された。

また、得られたモノグルクロニドはいずれもHPLC上単一ピークを示し、標品としての使用に十分な純度を有していた。

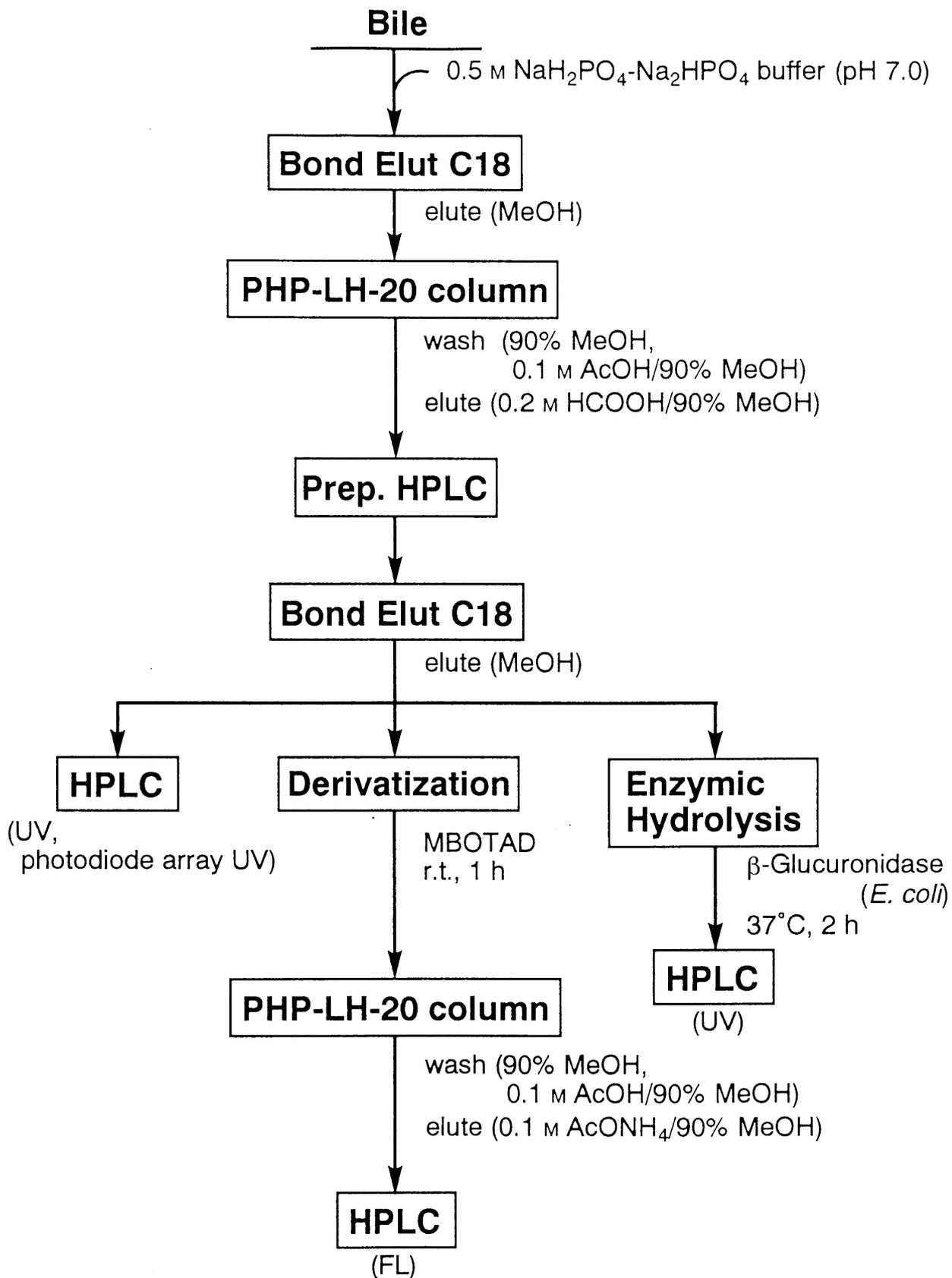
### 第3節 ラット胆汁中25-ヒドロキシビタミンDモノグルクロニドの同定

胆汁中Dモノグルクロニド同定の前処理には、第1章第3節を参考に、固相抽出、PHP-LH-20, prep. HPLCを順次用いることとした (Chart 7).

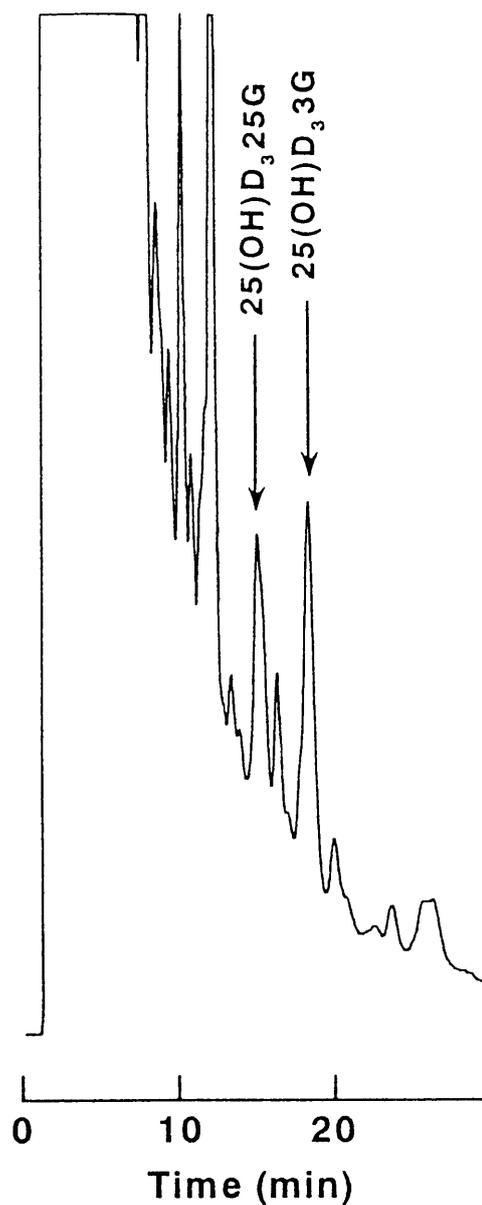
まず、25(OH)D<sub>3</sub> (1 mg) を経口投与したWistar系雄性ラット (2匹) に胆管カニューレーションを施し、胆汁を24 hにわたって捕集した。得られた胆汁を0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で希釈後、Bond Elut C18カートリッジにより目的物を抽出、次いでPHP-LH-20カラムに通導し、90% メタノール、0.1 M 酢酸/90% メタノールで未変化体などを洗浄除去後、グルクロニドを0.2 M ギ酸/90% メタノールで溶出した。この溶出画分をUV検出HPLCに付したところ、25(OH)D<sub>3</sub>-3G及び-25Gに対応するピークが検出された (Fig. 9)。対応するピークを各々分取精製、脱塩後、先とは異なるHPLCに付した結果、25(OH)D<sub>3</sub>-3G又は-25Gに対応する単一ピークが認められた。なお、標品との比較により両代謝物は各々約140 ng/ml, 50 ng/ml (mean, n=2) 存在するものと思われた。

次いで、各々の画分のUVスペクトルをフォトダイオードアレイUV検出HPLCで観察したところ、Dのトリエン構造に基づく特徴的なスペクトルがみられ、これらがD骨格を有することが明らかとなった (Fig. 10)。また、得られた画分をD骨格に特異的な蛍光誘導体化試薬であるMBOTADで誘導体化後、HPLCで検索したところ対応するMBOTAD付加体のピークが観察された。さらに分取画分をβ-グルクロニダーゼによる酵素水解反応に付し、ゲニンの生成をHPLCにより認めたが、これにより糖の結合配置がβであること及び各々のゲニン部の構造が確認された。なお、D<sub>3</sub> (1 mg) についても同様の実験を行いD<sub>3</sub>3G [ca. 120 ng/ml (mean, n=3)] を確認した。

続いて25(OH)D<sub>2</sub> (0.5 mg) 投与胆管ろうラットより得られた胆汁を同様に処理し、25(OH)D<sub>2</sub>-3G及び-25Gに対応するHPLCの分取画分を得た (Chart 8)。なお、両代謝物



**Chart 7. Procedure for Separation and Characterization of 25(OH)D<sub>3</sub>G in Rat Bile**



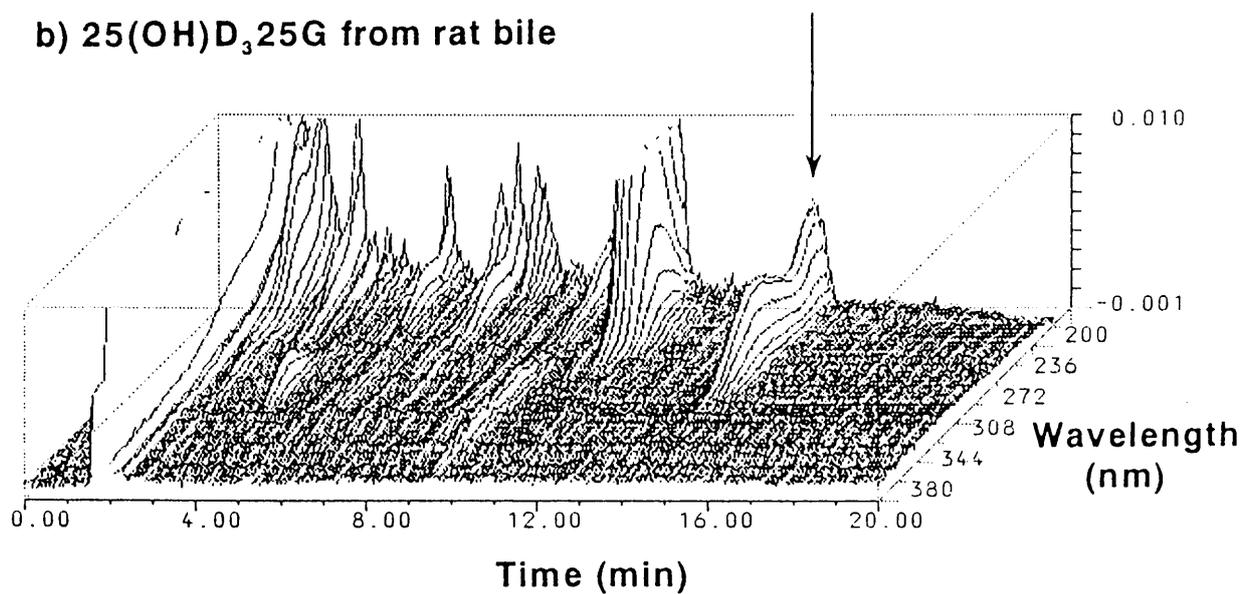
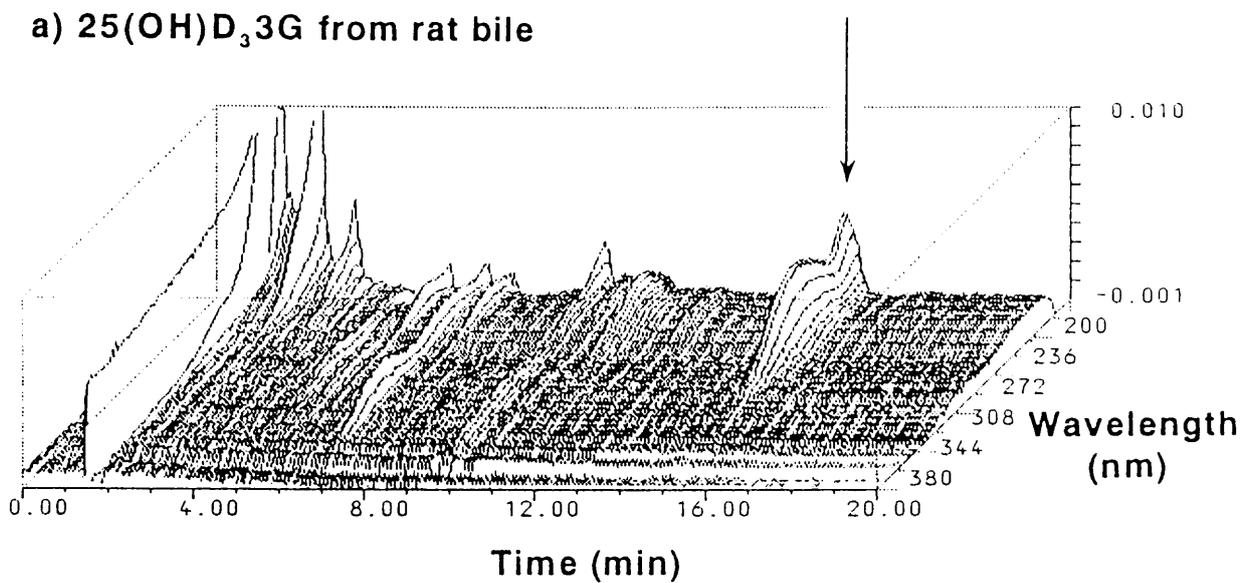
**Fig. 9. Chromatogram of 25(OH)D<sub>3</sub>G from Rat Bile**

Column : TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>

Mobile phase : MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (1:1)

Flow rate : 1 ml/min

Detection : UV 265 nm



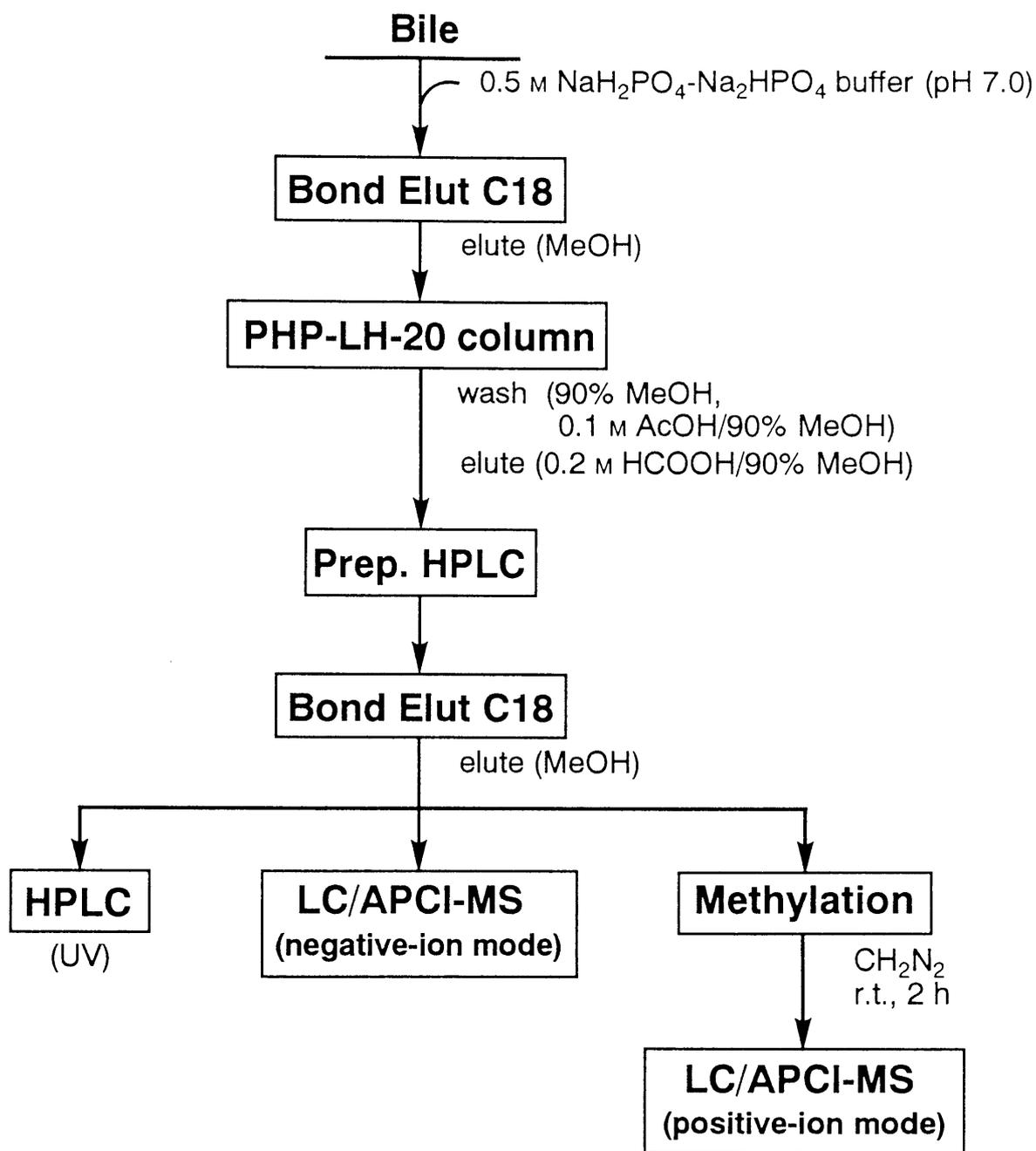
**Fig. 10. Chromatograms of 25(OH)D<sub>3</sub>G from Rat Bile**

Column : J'sphere ODS-M80

Mobile phase : MeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (4:1)

Flow rate : 1 ml/min

Detection : Photodiode array UV (200-380 nm)



**Chart 8. Procedure for Separation and Characterization of 25(OH)D<sub>2</sub>G in Rat Bile**

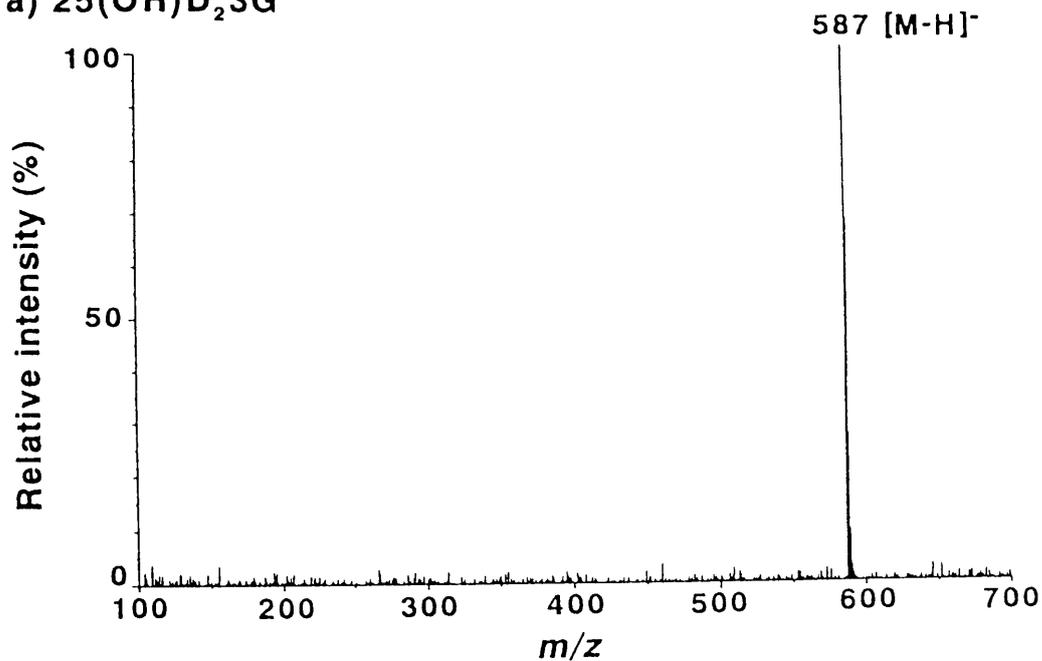
は各々約160 ng/ml, 140 ng/ml (mean, n=2) 存在していた.

ところでLC/MSは、近年各種インターフェースの実用化に伴い著しい発展を遂げた. 特に大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI), エレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) に代表される大気圧イオン化法の導入は、その操作性、適用範囲の広さと検出感度の向上から注目されている.<sup>46)</sup> しかしDの第Ⅱ相反応生成物分析に適用された例はない. 本化合物は熱に不安定なうえ高極性を有することからHPLCによる分析が主流を占めているものの、その感度、情報量には限りがあるため、代謝物の同定には先に示したような複数の条件による確認を要する. したがってLC/MSの有用性が明らかとなれば、ビタミンD研究の新しい分析手段と成り得るものと期待される. そこでD<sub>2</sub>系モノグルクロニドの同定に本法の適用を試みた.

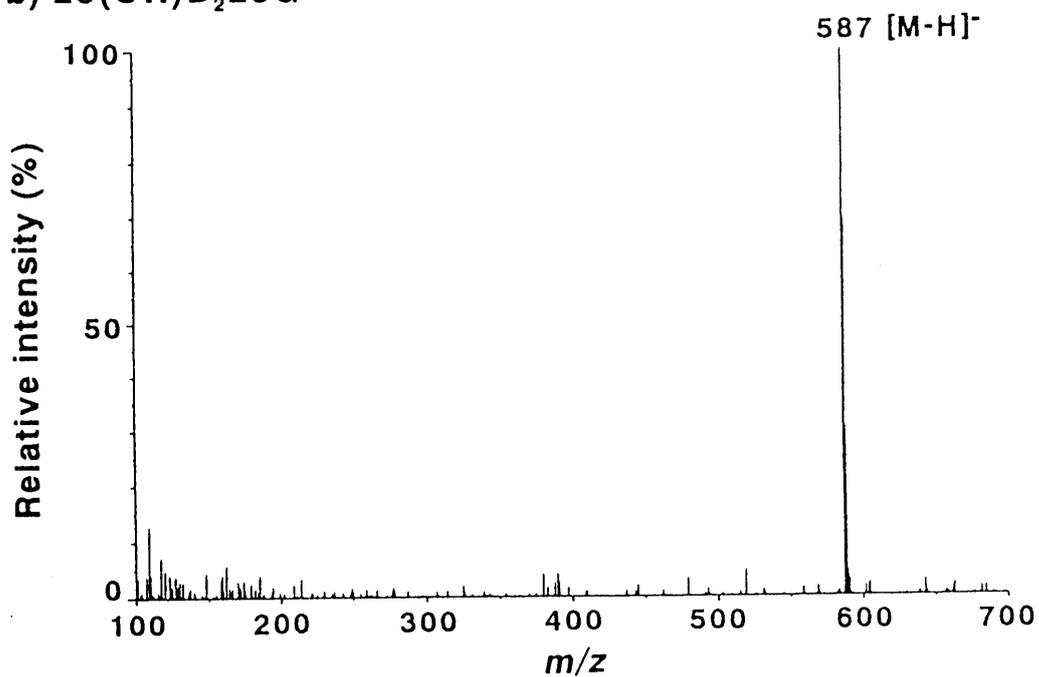
まず、標品及び酢酸アンモニウム含有メタノール-又はアセトニトリル-水系の移動相を用い、フローインジェクション分析により検出条件を検討した. その結果、ESIでは十分なイオンの生成は認められなかったが、APCIの負イオン検出モード(ドリフト電圧, -80 V)において、各々の擬分子イオン  $[M-H]^-$  が  $m/z$ : 587に明瞭に観察された (Fig. 11). そこで先のグルクロニド画分を本イオンを用いる選択イオン検出 (SIM) に付したところ、対応するピークが検出された (Fig. 12). また全イオン検出により得られたマススペクトル ( $m/z$ : 100-700) は標品のそれと一致していた. 一方、正イオン検出では擬分子イオンなどの特徴的なイオンは観察されなかった.

そこで、同定をより確実にするため誘導体化を試みた. まず標品グルクロニドをジアゾメタンにより対応するメチルエステルに誘導後、フローインジェクション分析により検出条件を検討した. その結果、正イオン検出モード(ドリフト電圧, 15 V)において相対強度の強いクラスターイオン ( $[M+NH_4]^+$ ,  $m/z$ : 620) が擬分子イオン ( $[M+H]^+$ ) 又は脱水イオン ( $[M+H-H_2O]^+$ ) とともに観察された (Fig. 13). 次いで先のグ

a) 25(OH)D<sub>2</sub>3G



b) 25(OH)D<sub>2</sub>25G



**Fig. 11. Mass Spectra of 25(OH)D<sub>2</sub>G**

Flow injection analysis

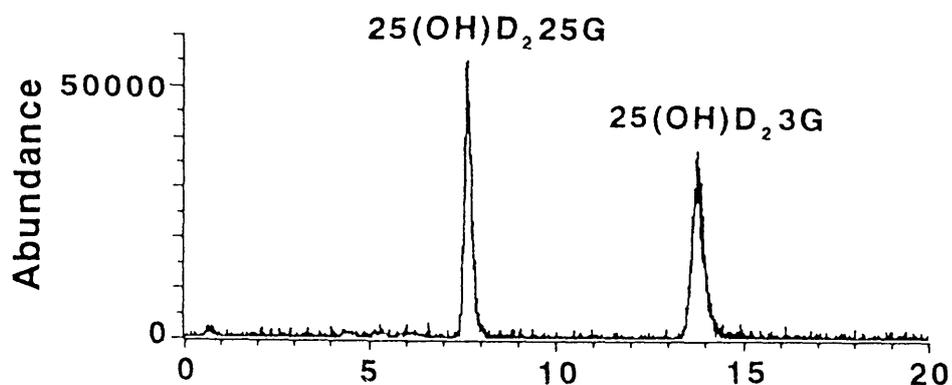
Mobile phase: MeCN-H<sub>2</sub>O (2:3) containing AcONH<sub>4</sub> (65 mM)

Flow rate: 1 ml/min

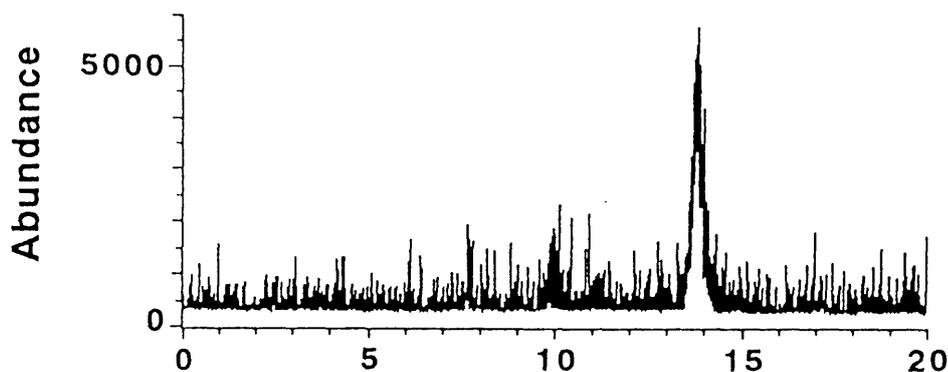
Vaporizer temp.: 210°C

Drift volt.: -80 V

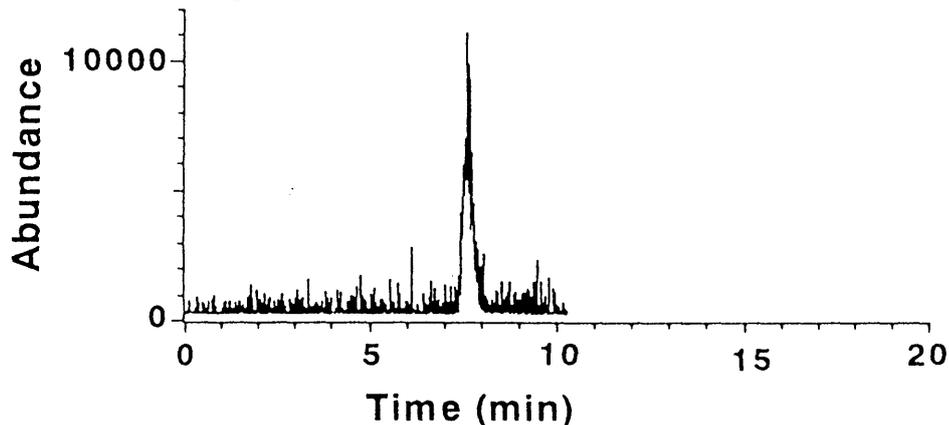
a) Authentic samples



b)  $25(\text{OH})\text{D}_2\ 3\text{G}$  from rat bile



c)  $25(\text{OH})\text{D}_2\ 25\text{G}$  from rat bile



**Fig. 12. Selected Ion Recordings of  $25(\text{OH})\text{D}_2\ \text{G}$**

Column : J'sphere ODS-H80

Mobile phase : MeCN- $\text{H}_2\text{O}$  (2:3) containing AcONH<sub>4</sub> (65 mM)

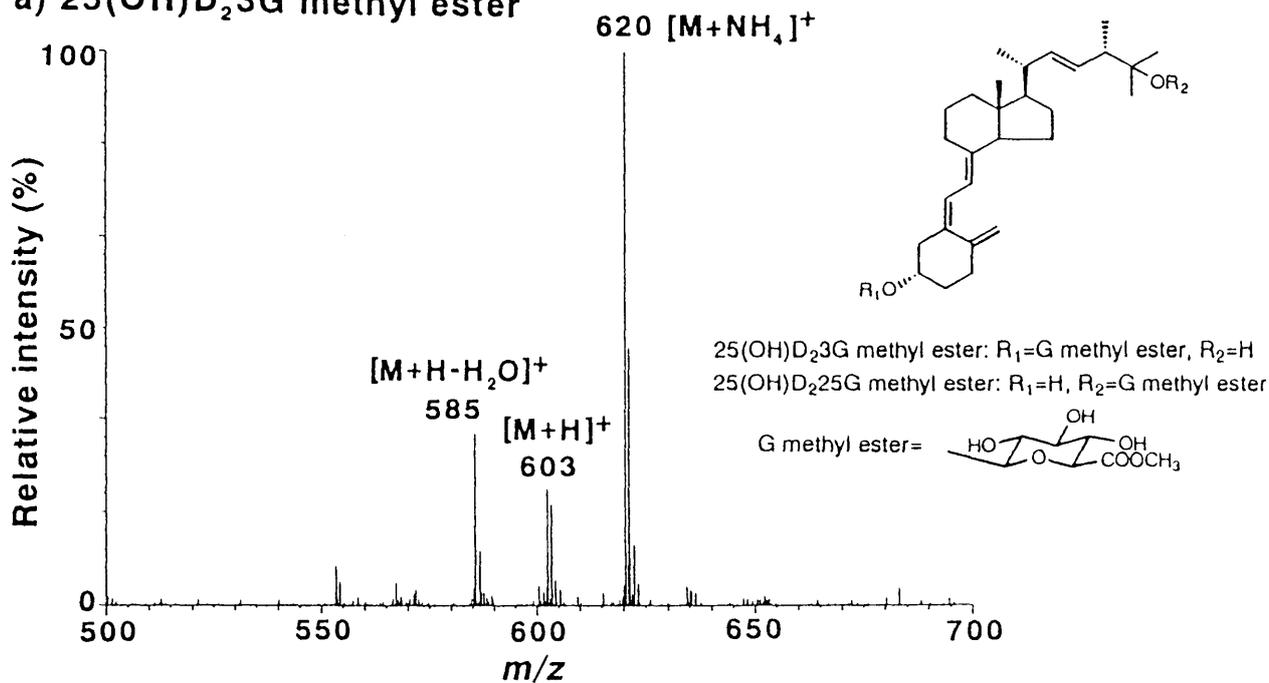
Flow rate : 1 ml/min

Vaporizer temp.: 210°C

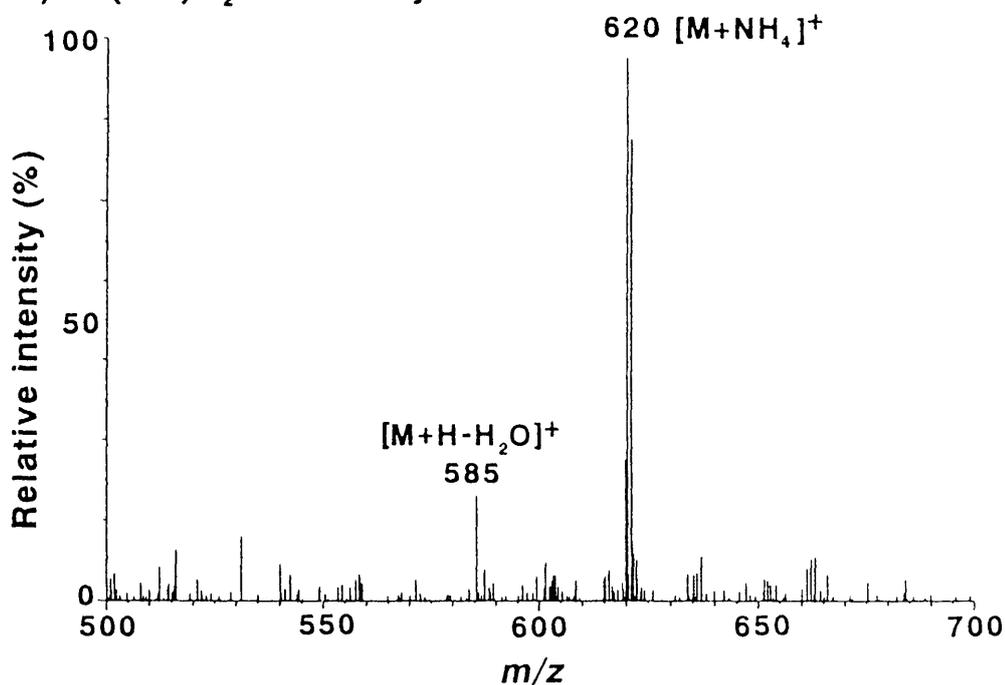
Drift volt.: -80 V

Detection : SIM ( $m/z$ : 587 [M-H]<sup>-</sup>)

a) 25(OH)D<sub>2</sub>3G methyl ester



b) 25(OH)D<sub>2</sub>25G methyl ester



**Fig. 13. Mass Spectra of 25(OH)D<sub>2</sub>G Methyl Esters**

Flow injection analysis

Mobile phase: MeOH-H<sub>2</sub>O (17:3) containing AcONH<sub>4</sub> (65 mM)

Flow rate: 1 ml/min

Vaporizer temp.: 180°C

Drift volt.: 15 V

ルクロニド画分をメチルエステルに誘導後、クラスターイオンを用いるSIM分析に付したところ、各々目的物のピークが検出され、改めて同定された。なお、D<sub>2</sub> (1 mg) についても同様の実験を行いD<sub>2</sub>3G [ca. 70 ng/ml (mean, n=2)] を確認した。

以上のように胆汁中25(OH)D-3G, -25G及びD3Gの存在をD<sub>3</sub>系は各種検出法を駆使したHPLCで、一方D<sub>2</sub>系はより簡便なLC/MSにより確認した。

#### 第4節 考察

生体中におけるDグルクロニドの存否を明らかとし、次いで分析法を確立するうえで重要な指標となる25(OH)D-3G, -25Gの合成を行った。当初、25-ヒドロキシプロビタミンDを直接Br-sugar, 炭酸銀を用いるKoenigs-Knorr反応に付すことで一挙に各位置異性体を合成し、分離精製することが可能か否か検討したが十分でなく、25位あるいは3位を保護したプロ体を基質とするルートに変更した。すなわち、基質を各々Koenigs-Knorr反応に付して対応するG'体を得、次いで光開裂、熱異性化、加水分解反応により目的物へ変換した。Koenigs-Knorr反応は、3位のみならず25位の3級水酸基にもほぼ満足し得る収率で進行した。合成した標品及び中間体の構造は各種機器データ、あるいは酵素水解反応の知見より確認した。

次いで、標品を指標として、各種検出法を駆使したHPLC又はLC/MSにより、25(OH)D投与胆管ろうラット胆汁中グルクロン酸抱合型D代謝物の同定を行った。その結果、25(OH)D<sub>3</sub>Gのみならず3級水酸基への抱合体である25GがD<sub>3</sub>系で約5:2、D<sub>2</sub>系で約1:1の割合で存在しており、立体障害の大きい3級水酸基へのグルクロニド化が生体内で普遍的に起こることを示唆するものとして興味を持たれる。このことは先に報告されたヒヨコ胆汁中における例とも比較し得る。ちなみに25(OH)proD<sub>3</sub>に対するKoenigs-Knorr反応での3G'と25G'の生成比は約4:1であった。なお、Dを投与したラット胆汁にD<sub>3</sub>Gが生成することも同様にして確認した。

一方、LC/MSにおいてDグルクロニドが擬分子イオンピークを、対応するメチルエステルがクラスターイオンを生成した。このことは今後、いまだ明らかとされていないヒト体液中におけるこの種化合物の同定及び定量法開発上有用な指針を与えるものと期待される。

## 結語

Dの第Ⅰ相反応生成物の体液中レベルを的確に把握することは、栄養・臨床診断上重要であるが、現在汎用されている定量法はいずれも満足し得るものではない。一方、第Ⅱ相反応生成物に関しては、その存否すら明らかにされていない。そこで著者はこれら、特に第Ⅱ相反応生成物のより簡便で信頼性の高い分析法を開発し、臨床診断に寄与することを究極の目的として研究し、以下の成果を得た。

第1章においてはまず、D<sub>3</sub>の主代謝物である25(OH)D<sub>3</sub>のUV検出HPLCによる定量法を確立した。本法はISとして非放射性物質を、HPLCとして汎用性に富む逆相系を用いるもので、従来法に比しはるかに優れるものである。次いで標品を指標とし、各種検出HPLCにより、ヒト血漿中25(OH)D<sub>3</sub>3Sの存在を明らかとし、さらにUV検出HPLCによる定量法を開発した。本法はソルボリシス操作を伴わずサルフェートを直接定量するものであるうえに、非放射性ISを使用しており、信頼性、簡便性に優れるものである。以上の開発した定量法を駆使して、健常人と慢性腎不全患者血漿中における両代謝物の相関を求めたところ、病態との関連を示唆する興味ある知見が得られた。

第2章ではまず、体液中Dモノグルクロニドの分析法の確立に必要な不可欠な標品である25(OH)D-3G、-25G計4種を合成した。次いでこれらを指標として25(OH)-D<sub>3</sub>、-D<sub>2</sub>投与胆管ろうラット胆汁中に各々のモノグルクロニドが存在することを、各種検出HPLC又はLC/MSにより明らかとした。生体内で立体障害の大きい25位の3級水酸基への抱合がみられたことは、合成化学における反応性との関連からも興味深いものであった。またこの際、LC/MSがDの第Ⅱ相反応生成物分析上有用であることを明らかとしたが、本分析法によりヒト体液中のグルクロニドを始め、未知とされている各種第Ⅱ相反応生成物が解明されることを期待したい。

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました金沢大学薬学部教授 島田和武先生に謹んで感謝いたします。実験に際し、御協力下さいました鍛冶秀文修士、菅谷克子修士、中谷糸修士を始め、金沢大学薬学部薬品分析学研究室の諸氏に厚く御礼申し上げます。LC/MSの使用を御許可下さいました金沢大学工学部教授 林良茂先生、LC/MSについて御教授下さいました東北大学薬学部教授 後藤順一先生、日本化薬株式会社 山下幸和博士に深謝いたします。25(OH)D<sub>3</sub>などを御恵与下さいました帝国臓器製薬株式会社、慢性腎不全患者血液試料を御恵与下さいました金沢大学医学部附属病院第一内科血液浄化療法部に御礼申し上げます。

## 実験の部

### 第1章付属実験

#### 装置及び試薬

HPLCは島津LC-6AクロマトグラフにUV検出器として島津SPD-10A又はSPD-6AV (検出波長 265 nm), FL検出器として日立F-1050 ( $\lambda_{ex}$ . 320 nm,  $\lambda_{em}$ . 380 nm) 又はECD (クーロメトリック型) としてESA 5100 (Environmental Sciences) [ガードセル, 5020 (+1.0 V); 分析セル, 5011 (第1セル, +0.5 V; 第2セル, +1.0 V); 検出, 第2セル] を接続して用いた. カラムには逆相系のJ'sphere ODS-H80 (4  $\mu$ m), YMC-Pack ODS-AM (5  $\mu$ m) (いずれも 15 x 0.46 cm i.d.; YMC), TSKgel ODS-80TM (5  $\mu$ m, 15 x 0.46 cm i.d.; TOSOH)又は順相系のDevelosil 60-5 (5  $\mu$ m, 25 x 0.4 cm i.d.; 野村化学) を特記しない限り室温で使用. 流速は逆相系は1 ml/min, 順相系は2 ml/minに設定. 移動相に用いた水はイオン交換水を蒸留したものを, 有機溶媒は蒸留後, それぞれメンブランフィルター (ポアサイズ: 水用 0.45  $\mu$ m, 有機溶媒用 0.5  $\mu$ m) でろ過し, 混和後, 超音波により脱気して使用. なお, 移動相のpHの調整に, AcONH<sub>4</sub>系にはAcOH, NaClO<sub>4</sub>系にはHClO<sub>4</sub>を用いた.

25(OH)Erg (IS<sub>1</sub>), 25(OH)D<sub>2</sub>,<sup>45)</sup> 25(OH)D<sub>3</sub>-3S, -25S, 25(OH)D<sub>2</sub>3S,<sup>47)</sup> 25(OH)7DHC3S-MBOTAD付加体 (IS<sub>2</sub>), 25(OH)7DHC-MBOTAD付加体 (IS<sub>3</sub>) 及び蛍光誘導体化試薬であるMBOTADは当研究室で合成. 25(OH)D<sub>3</sub>及びestrone (IS<sub>4</sub>)は帝国臓器製薬より恵与されたものを使用. 他の試薬, 溶媒はいずれも市販特級品を用いた. 前処理用器材であるSep-Pak C<sub>18</sub>カラム (2 x 0.6 cm i.d.; Waters, 充てん剤のみ使用)及びISOLUTE C18カートリッジ (500 mg; International Sorbent Technology) はあらかじめhexane, CHCl<sub>3</sub>で洗浄後MeOH, H<sub>2</sub>Oでコンディショニングして使用. PHP-LH-20カラム (2 x 0.6 cm i.d.) の充てん剤<sup>34)</sup>は当研究室で合成. シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーに

はSilica gel 60 (70-230 mesh; E. Merck)をあらかじめhexane-IPA (84:16, 98.5:1.5) で洗浄後使用.

## 血漿試料

健常人より血液 (10 ml) を採取 (1995. 11) し, ヘパリンナトリウム注射液 (0.2 ml) を添加後, 遠心分離 (1400 g, 15 min, 4°C) して調製. 慢性腎不全患者血漿は金沢大学医学部附属病院第1内科血液浄化療法部より恵与 (1995. 4) されたものを使用. プール血漿は日赤新鮮凍結血漿を使用.

## 第2節付属実験

### ヒト血漿中25(OH)D<sub>3</sub>の定量法

血漿 (0.5 ml) にEtOH (1 ml) を加えvortex-mix (1 min) 後, 遠心分離 (1400 g, 15 min) により除タンパク. 得られた上清にIS<sub>1</sub> [300 ng/EtOH (75 µl)] を添加, 0.2 M KOH (1 ml) を加えvortex-mix (10 s) 後, Et<sub>2</sub>O (1 ml) で2回抽出. 有機層に25% MeOH (2 ml) を加えvortex-mix, 遠心分離 (1400 g, 5 min) し有機層を採取. 水層にEt<sub>2</sub>O (2 ml) を加えvortex-mix, 遠心分離 (1400 g, 5 min) し得られた有機層を先のそれに合し溶媒を減圧下留去. 残渣をhexane-IPA (98.5:1.5, 0.3 ml) に溶解し, シリカゲルミニカラム (0.3 g, 2 x 0.6 cm i.d.) に吸着. Hexane-IPA (98.5:1.5, 10 ml) で洗浄後, hexane-IPA (84:16, 2 ml) で目的物を溶出. 溶媒を留去後, MeOHに溶解し, UV/HPLC {conditions A: J'sphere ODS-H80; MeCN-H<sub>2</sub>O (7:3); カラム温度, 40°C; t<sub>r</sub> 17.3 min [25(OH)D<sub>3</sub>], 23.5 min (IS<sub>1</sub>)} に付した.

### ピーク純度の検定

上述の処理により得られた25(OH)D<sub>3</sub>に対応するピーク( $t_R$  16.8-18.3 min)を分取, IS<sub>1</sub>を添加後溶媒を留去. 残渣を再びUV/逆相系HPLC {conditions A及びB: YMC-Pack ODS-AM; MeOH-H<sub>2</sub>O (6:1); カラム温度, 40°C;  $t_R$  9.4 min [25(OH)D<sub>3</sub>], 11.2 min (IS<sub>1</sub>)} 及びUV/順相系HPLC {conditions C: hexane-IPA (197:3);  $t_R$  10.6 min [25(OH)D<sub>3</sub>], 9.3 min (IS<sub>1</sub>)} に付し, 25(OH)D<sub>3</sub>とIS<sub>1</sub>とのピーク面積比を求めた (conditions A, 0.53; B, 0.52; C, 0.54).

### 回収率

25(OH)D<sub>3</sub> [5又は20 ng/EtOH (20 µl)], IS<sub>1</sub> [300 ng/EtOH (75 µl)] を7% BSA/buffer (0.5 ml) に添加後, 上述の前処理操作を施した. 得られた試料にIS<sub>3</sub> [50 ng/EtOH (20 µl)] を添加し, HPLC [conditions A,  $t_R$  10.1 min (IS<sub>3</sub>)] に付した. 25(OH)D<sub>3</sub>又はIS<sub>1</sub>とIS<sub>3</sub>のピーク高さ比より回収率を算出.

### 検量線

25(OH)D<sub>3</sub> [0, 2.5, 5, 10, 15又は20 ng/EtOH (20 µl)] をプール血漿 (0.5 ml) に添加, 30 min 放置後, 上述の前処理を施し, HPLC (conditions A) に付した. 添加した25(OH)D<sub>3</sub> 濃度に対する25(OH)D<sub>3</sub>とIS<sub>1</sub>のピーク高さ比を用いて回帰直線を作成し, 本直線を検量線として用いた. なお, 同一血漿及び異なる血漿 (n=4) を用いて本検量線を計8回作成したところ, 傾きは $1.13 \times 10^{-2} \pm 8.48 \times 10^{-4}$  (mean  $\pm$  S.D.), R.S.D.は7.51%であった.

### 添加回収試験

25(OH)D<sub>3</sub> [0, 5又は10 ng/EtOH (20 µl)] を異なる4種の血漿 (0.5 ml) に添加, 30 min

放置後、上述の前処理を施し、HPLC (conditions A) により定量。

### 第3節 付属実験

#### ヒト血漿中25(OH)D<sub>3</sub>Sの同定

1. 血漿 (1 ml) にEtOH (2 ml) を加え、vortex-mix (1 min) 後10 min放置し、再び vortex-mix (1 min)。次いで遠心分離 (1400 g, 15 min) し得られた上清を減圧下濃縮、0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.5, 2 ml) で希釈後、Sep-Pak C<sub>18</sub>カラムに吸着。H<sub>2</sub>O (5 ml), 50% MeOH (2 ml) で洗浄後、90% MeOH (10 ml) でステロイドを溶出。溶媒を減圧下留去後、90% EtOH (1 ml) に溶解し、PHP-LH-20カラムに通導。90% EtOH (10 ml), 0.1 M AcOH/90% EtOH (10 ml) で洗浄後、サルフェートを0.45 M AcONH<sub>4</sub>/70% EtOH (5 ml) で溶出。EtOHを留去後、H<sub>2</sub>O (2 ml) を加えSep-Pak C<sub>18</sub>カラムに吸着。H<sub>2</sub>O (5 ml) でAcONH<sub>4</sub>を洗浄除去後、MeOH (5 ml) で目的物を溶出。溶媒を減圧下留去後、残渣をMeOHに再溶解しUV/HPLC {TSKgel ODS-80TM; MeCN-0.5% AcONH<sub>4</sub> (1:1); t<sub>R</sub> 9.2 min [25(OH)D<sub>3</sub>S], 6.5 min [25(OH)D<sub>3</sub>25S]} に付した。

さらに先の残渣に0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-AcOEt (1:1000) (1 ml) を加え攪拌後1 h放置。水洗後、AcOEt層をN<sub>2</sub>気流下留去、残渣をMeOH又はhexaneに溶解し、各々UV/逆相系HPLC {TSKgel ODS-80TM; MeCN-H<sub>2</sub>O (3:1); t<sub>R</sub> 16.6 min [25(OH)D<sub>3</sub>], 19.9 min [25(OH)D<sub>2</sub>]} 又はUV/順相系HPLC {hexane-IPA (97:3); t<sub>R</sub> 13.7 min [25(OH)D<sub>3</sub>], 11.1 min [25(OH)D<sub>2</sub>]} に付した。

2. 血漿 (1 ml) を前述の固相抽出後、UV/HPLC [TSKgel ODS-80TM; MeOH-0.25% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7:2)] に付し、25(OH)D<sub>3</sub>Sに対応する画分(t<sub>R</sub> 9.5-11.5 min) を分取。減圧下溶媒留去後MeOHに再溶解しUV/HPLC {TSKgel ODS-80TM; MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (7:8); t<sub>R</sub> 14.1 min [25(OH)D<sub>3</sub>S] 又は MeCN-0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8:9); t<sub>R</sub> 11.3 min

[25(OH)D<sub>3</sub>3S]} 又はECD/HPLC {YMC-Pack ODS-AM; MeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (5:1); t<sub>R</sub> 8.7 min [25(OH)D<sub>3</sub>3S]} に付した.

さらに得られた画分にMBOTAD [ca. 0.5 µg/AcOEt (50 µl)] を加え, 室温で1 h放置. 反応液の溶媒を留去し90% EtOHに溶解して過剰の試薬を分解. 先に述べたPHP-LH-20カラムによって精製し, FL/HPLC {YMC-Pack ODS-AM; MeCN-0.5% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (5:6); t<sub>R</sub> 18.6 min [25(OH)D<sub>3</sub>3S-MBOTAD], 11.9 min, 13.6 min (main) [25(OH)D<sub>3</sub>25S-MBOTAD]} に付した.

また, 25(OH)D<sub>3</sub>3S (30 ng/ml plasma) を添加した血漿についても同様の操作を施し, 目的物のピークを確認. なお, いずれもピークの同定は標品とのco-chromatographyによった.

#### 第4節 付属実験

##### ヒト血漿中25(OH)D<sub>3</sub>3Sの定量法

血漿 (0.5 ml) にIS<sub>2</sub> [200 ng/EtOH (40 µl)], EtOH (1 ml) を加えvortex-mix (1 min) 後, 遠心分離 (1400 g, 15 min) により除タンパク. 得られた上清を0.4 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.5, 2 ml) で希釈後, ISOLUTE C18に吸着. H<sub>2</sub>O (5 ml), 50% MeOH (2ml) で洗浄後, MeOH (2 ml) で溶出. 溶出液にH<sub>2</sub>O (0.2 ml) を加えたのちPHP-LH-20カラムに通導, 90% MeOH (4 ml), 0.1 M AcOH/90% MeOH (4 ml) で洗浄後, 0.7 M AcOH-0.5 M AcONH<sub>4</sub>/90% MeOH (4 ml) でサルフェートを溶出. 溶出液をH<sub>2</sub>O (5 ml) で希釈後再びISOLUTE C18に通導, H<sub>2</sub>O (5 ml) で洗浄後MeOH (2 ml) で目的物を溶出. 溶媒を留去後, MeOHに再溶解し, UV/HPLC {conditions D: YMC-Pack ODS-AM; MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (5:6); カラム温度, 40°C; t<sub>R</sub> 18.2 min [25(OH)D<sub>3</sub>3S], 19.8 min (IS<sub>2</sub>), 23.5 min [25(OH)D<sub>2</sub>3S]} に付した.

## ピークの純度検定

上述の処理により得られた25(OH)D<sub>3</sub>3Sに対応するピーク( $t_R$  17.0-19.2 min)を分取、脱塩後、溶媒を留去。残渣をUV/HPLC {conditions D及びE: J'sphere ODS-H80; MeCN-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (4:5); カラム温度, 40°C;  $t_R$  18.0 min [25(OH)D<sub>3</sub>3S]} に付し、単一ピークであることを確認。

また、活性炭処理血漿 (0.5 ml) に上述の前処理を施し、UV/HPLC (conditions D) において25(OH)D<sub>3</sub>3Sに対応するピークが検出されないことを確認。

## 回収率

25(OH)D<sub>3</sub>3S [5又は16 ng/EtOH (20 µl)], IS<sub>2</sub> [200 ng/EtOH (40 µl)] を7% BSA/buffer (0.5 ml) に添加後、上述の前処理操作を施した。得られた試料にIS<sub>4</sub> [50 ng/EtOH (20 µl)] を添加、HPLC [conditions D,  $t_R$  8.3 min (IS<sub>4</sub>)] に付した。25(OH)D<sub>3</sub>3S又はIS<sub>2</sub>とIS<sub>4</sub>のピーク高さ比より回収率を算出。

## 検量線

25(OH)D<sub>3</sub>3S [0, 2.5, 5, 10又は20 ng/EtOH (20 µl)] をプール血漿 (0.5 ml) に添加、30 min 放置後、上述の前処理を施し、HPLC (conditions D) に付した。添加した25(OH)D<sub>3</sub>3S濃度に対する25(OH)D<sub>3</sub>3SとIS<sub>2</sub>のピーク高さ比を用いて回帰直線を作成し、本直線を検量線として用いた。なお、同一血漿及び異なる血漿 (n=6) を用いて本検量線を計14回作成したところ、傾きは $3.67 \times 10^2 \pm 0.23 \times 10^2$  (mean  $\pm$  S.D.), R.S.D.は6.29%であった。

## 添加回収試験

25(OH)D<sub>3</sub>3S [0, 5又は10 ng/EtOH (20 µl)] を異なる4種の血漿 (0.5 ml) に添加、30

min 放置後, 上述の前処理を施し, HPLC (conditions D) により定量.

## 第 5 節 付 属 実 験

健常人血漿 (25 例) 及び慢性腎不全患者血漿 (12 例) について第 2 節及び第 4 節の定量法を用いて各々 25(OH)D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>S 濃度を定量し相関を求めた.

## 第2章 付属実験

### 装置及び試薬

融点は柳本微量融点測定装置を用い、未補正。旋光度は日本分光DIP-181デジタル旋光計を、UVスペクトルはEtOHを溶媒として日立U-2000ダブルビーム分光光度計を用いて測定。EI-MSは日立M-80又は日本分光AutoSpec EQ, FAB-MSは日本電子JMS-DX 303又は日本分光AutoSpec EQを用いて測定。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルはtetramethylsilaneを内部基準物質として日本電子JNM-EX 270核磁気共鳴装置(観測周波数 270.05 MHz)を用いて測定。また略号としてs=singlet, d=doublet, dd=doublet of doublets, q=quartet, m=multiplet, br=broadを用いた。

HPLCのフォトダイオードアレイUV検出器には島津SPD-6MAを、カラムには逆相系のJ'sphere ODS-M80 (4 μm), YMC-GEL C<sub>8</sub> (5 μm) (いずれも15 x 0.46 cm i.d.; YMC), Develosil ODS-5 (5 μm, 15 x 0.46 cm i.d.; 野村化学)を使用。第2節でのprep. HPLCには、カラムにDevelosil ODS-5 (5 μm, 15 x 1.0 cm i.d.; 野村化学)を流速4.7 ml/minで使用。他の機器及びHPLC条件などは第1章と同様。LC/MSには日立M-1000H APIMSを日立L-6200クロマトグラフに接続して使用。デソルベーター温度及びマルチプライヤー電圧は各々399℃及び2.5 kVに設定。フォーカス電圧は110 V (正イオン検出)あるいは-110 V (負イオン検出)とした。

D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>及びErgは東京化成工業の製品を、3β-hydroxychol-5-en-24-oic acidは帝国臓器製薬より恵与されたものを使用。β-Glucuronidase [Type B-1 (from bovine liver), Type IX-A (form *E. coli*)]はシグマ製を使用。前処理用器材であるBond Elut C18カートリッジ (500 mg; Varian) はあらかじめhexane, CHCl<sub>3</sub>で洗浄後MeOH, H<sub>2</sub>Oでコンディショニングして使用。カラムクロマトグラフィー, フラッシュクロマトグラフィーにはそれぞれSilica gel 60 (70-230 mesh; E. Merck), Wakogel FC-40 (20-40 mesh; 和光純薬工

業) を, TLC (層厚0.25 mm) 及びprep. TLC (20 x 20 cm, 層厚 0.5 mm) にはいずれも precoated TLCプレート (Silica gel 60 F<sub>254</sub>; E. Merck) を使用. 他の試薬, 溶媒, 前処理用 器材などは第 1 章と同様.

## 実験動物など

Wistar系雄性ラット (体重約200 g, 7-8 週令; 日本SLC) は使用前日から絶食して用いた. 胆管カニュレーションに用いたポリエチレンチューブ (SP31) は夏目製作所製を使用.

## 第 2 節 付属実験

**Methyl (25-Hydroxycholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -yl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate (3), Methyl (3 $\beta$ -Hydroxycholesta-5,7-dien-25-yl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate (4a)及びCholesta-5,7-diene-3 $\beta$ ,25-diy l Di(methyl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosiduronate) (5)**

**2a**<sup>43)</sup> (235 mg, 0.59 mmol) の無水CHCl<sub>3</sub> (23 ml) 溶液に, 新たに調製したAg<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (660 mg, 2.39 mmol) 及びBr-sugar<sup>41)</sup> (350 mg, 0.88 mmol) を加え遮光して室温にて攪拌. 1 h 後さらにAg<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (290 mg, 1.05 mmol) を加え1 d 攪拌. 反応液をろ過後, ろ液を減圧下留去し, 得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (35 x 1.0 cm i.d.) により精製. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt (40:1) 溶出画分より**3** [TLC: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt (6:1), *R<sub>f</sub>* 0.54; 217 mg, 51.5%] を無色針状晶 (Et<sub>2</sub>Oより再結晶) として得. mp 159-162°C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>17</sup> -40.5° (c=0.10, CHCl<sub>3</sub>). *Anal.* Calcd C<sub>40</sub>H<sub>60</sub>O<sub>11</sub>: C, 67.01; H, 8.44. Found: C, 66.72; H, 8.38. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.61 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d, *J*=6.6 Hz, H-21), 1.22 (6H, s, H-26, 27), 2.02 (6H, s, 2 x OAc), 2.05 (3H, s, OAc), 3.63 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 3.75 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>),

4.03 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, H-5'), 4.67 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-1'), 4.95-5.02, 5.16-5.30 (total 3H, m, 3 x  $\underline{\text{CHOAc}}$ ), 5.38, 5.57 (1H each, m, H-7, 6). EI-MS  $m/z$ : 716  $[\text{M}]^+$ , 382  $[\text{M}-\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_{10}]^+$ , 317  $[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_9]^+$ .

同画分より **4a** [TLC:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt (6:1),  $R_f$  0.42; 54.2 mg, 12.9%] を無色無晶形物質 (MeOHより再結晶) として得. mp 174-176°C.  $[\alpha]_D^{19}$  -74.6° ( $c=0.10$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Anal. Calcd  $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_{11} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ : C, 66.18; H, 8.47. Found: C, 65.97; H, 8.58.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.61 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J=6.3$  Hz, H-21), 1.18, 1.21 (3H each, s, H-26, 27), 2.01 (6H, s, 2 x OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 3.65 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 3.74 (3H, s,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.00 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, H-5'), 4.70 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-1'), 4.93-5.01, 5.17-5.30 (total 3H, m, 3 x  $\underline{\text{CHOAc}}$ ), 5.39, 5.58 (1H each, m, H-7, 6). EI-MS  $m/z$ : 716  $[\text{M}]^+$ , 382  $[\text{M}-\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_{10}]^+$ , 317  $[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_9]^+$ .

同画分より **5** [TLC:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt (6:1),  $R_f$  0.63; 10.1 mg, 1.66%] を無色無晶形物質 ( $\text{Et}_2\text{O}$ より再結晶) として得. mp 142-145°C.  $[\alpha]_D^{19}$  -68.3° ( $c=0.10$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.61 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d,  $J=6.3$  Hz, H-21), 1.18, 1.21 (3H each, s, H-26, 27), 2.02 (12H, s, 4 x OAc), 2.05 (6H, s, 2 x OAc), 3.65 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 3.74, 3.75 (3H each, s, 2 x  $\text{COOCH}_3$ ), 4.00, 4.02 (1H each, d,  $J=9.6$  Hz, 2 x H-5'), 4.67, 4.70 (1H each, d,  $J=7.6$  Hz, 2 x H-1'), 4.93-5.01, 5.17-5.29 (total 6H, m, 6 x  $\underline{\text{CHOAc}}$ ), 5.38, 5.57 (1H each, m, H-7, 6). FAB-MS  $m/z$ : 1031  $[\text{M-H}]^-$ .

**Methyl (3 $\beta$ -Acetoxycholesta-5,7-dien-25-yl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate (4b)**

**4a** (5.2 mg) を pyridine-Ac<sub>2</sub>O (2:1, 0.8 ml) に溶解し, 室温にて 2 h 攪拌. 反応液に少量の  $\text{H}_2\text{O}$  を加えたのち AcOEt で抽出. 有機層を  $\text{H}_2\text{O}$ , 5% HCl, 5%  $\text{NaHCO}_3$ , 飽和食塩水で順次洗浄後溶媒を留去し, 得られた残渣を prep. TLC [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt (50:1)] にて精製.

*R<sub>f</sub>*が約0.4の画分を回収し、AcOEtで溶出。溶媒を留去し、**4b** (5.1 mg, 92.6%) を無色セミソリッドとして得。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.61 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, *J*=6.6 Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-19), 1.18, 1.21 (3H each, s, H-26, 27), 2.01 (6H, s, 2 x OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 2.04 (3H, s, OAc), 3.74 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 4.00 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-5'), 4.70 (1H, m, H-3α), 4.70 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1'), 4.94-5.00, 5.16-5.30 (total 3H, m, 3 x CHOAc), 5.38, 5.56 (1H each, m, H-7, 6). EI-MS *m/z*: 758 [M]<sup>+</sup>, 424 [M-C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>]<sup>+</sup>, 317 [C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>]<sup>+</sup>.

**Methyl [(5*Z*,7*E*)-(3*S*)-25-Hydroxy-9,10-secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-yl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid]uronate (**6a**)**

**3** (75 mg) のEt<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400:1, 400 ml) 溶液に0°C, Ar通導下, 400 W高圧水銀灯及びVycorフィルターを用いて10 s, 5 s, 5 s, 3 sの計4回光照射。反応の進行状況はUV/HPLC [Develosil ODS-5; MeOH-H<sub>2</sub>O (7:1)] で追跡。溶媒留去後, 残渣をhexane-tetrahydrofuran (THF) (4:1, 25 ml) に溶解, Ar雰囲気下室温, 暗所に7 d放置。溶媒留去後, 残渣をprep. TLC [hexane-AcOEt (8:5)] にて精製。<sup>2</sup>*R<sub>f</sub>*が約0.5の画分を回収し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (5:1) で溶出。溶媒を留去し, **6a** (15.6 mg, 20.8%) を無色無晶形物質 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexaneより再結晶) として得。mp 126-128°C. [α]<sub>D</sub><sup>19</sup> +2.3° (c=0.10, CHCl<sub>3</sub>). UV λ<sub>max</sub> nm: 264, λ<sub>min</sub> nm: 227. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.54 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, d, *J*=5.9 Hz, H-21), 1.22 (6H, s, H-26, 27), 1.96, 2.01, 2.02 (3H each, s, 3 x OAc), 3.75 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.96 (1H, m, H-3α), 4.03 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-5'), 4.68 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1'), 4.80, 5.03 (1H each, br s, H-19), 4.95-5.01, 5.17-5.31 (total 3H, m, 3 x CHOAc), 6.00, 6.18 (total 2H, ABq, *J*=11.2 Hz, H-7, 6). EI-MS *m/z*: 716 [M]<sup>+</sup>, 382 [M-C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>]<sup>+</sup>, 317 [C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>]<sup>+</sup>.

**(5Z,7E)-(3S)-25-Hydroxy-9,10-secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-yl  $\beta$ -D-Glucopyranosiduronic Acid (6b)**

**6a** (17 mg) の MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1, 2.5 ml) 溶液に 0.1 M NaOH/MeOH (1.5 ml) を加え室温にて 17 h 攪拌。氷冷下反応液に H<sub>2</sub>O, 5% HCl を加え中和。NaCl を飽和量加えたのち THF で抽出。有機層の溶媒を留去し、得られた残渣を prep. TLC [CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:4)] にて精製。R<sub>f</sub> が約 0.3 の画分を回収し、CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:4) で溶出。溶媒を留去し、**6b** (11.5 mg, 84.6%) を無色無晶形物質 (MeOH より再結晶) として得。mp 165-170°C (dec.). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>19</sup> +6.0° [c=0.10, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:4)]. UV  $\lambda_{\max}$  nm: 264,  $\lambda_{\min}$  nm: 227. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 0.54 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, d, *J*=5.6 Hz, H-21), 4.82, 5.05 (1H each, br s, H-19), 6.02, 6.24 (total 2H, ABq, *J*=11.2 Hz, H-7, 6). FAB-MS *m/z*: 575 [M-H]. 本化合物の純度は UV/HPLC [J'sphere ODS-M80; MeCN-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (2:3); *t<sub>r</sub>* 10.4 min] にて確認。

**Methyl [(5Z,7E)-(3S)-3-Hydroxy-9,10-secocholesta-5,7,10(19)-trien-25-yl 2',3',4'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid]uronate (7a)**

**4a** (26 mg) の Et<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400:1, 400 ml) 溶液を **3** の光開裂反応に準じて処理 [照射時間: 6 s 及び 4s, UV/HPLC: Develosil ODS-5; MeCN-H<sub>2</sub>O (3:1)]. 溶媒留去後、残渣を hexane-THF (4:1, 25 ml) に溶解, Ar 雰囲気下室温, 暗所に 3 d 放置。溶媒留去後、残渣を prep. TLC [hexane-AcOEt (5:3)] にて精製。<sup>2</sup>R<sub>f</sub> が約 0.3 の画分を回収し、CHCl<sub>3</sub>-MeOH (5:1) で溶出。溶媒を留去し、**7a** (2.5 mg, 9.6%) を無色油状物質として得。UV  $\lambda_{\max}$  nm: 264,  $\lambda_{\min}$  nm: 227. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.54 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, *J*=5.9 Hz, H-21), 1.17, 1.20 (3H each, s, H-26, 27), 2.01 (6H, s, 2 x OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 3.74 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.97 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 4.00 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-5'), 4.70 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1'), 4.82, 5.02 (1H each, br s, H-19), 4.94-4.97, 5.16-5.30 (total 3H, m, 3 x CHOAc), 6.03,

6.24 (total 2H, ABq,  $J=11.2$  Hz, H-7, 6). EI-MS  $m/z$ : 716  $[M]^+$ , 382  $[M-C_{13}H_{18}O_{10}]^+$ , 317  $[C_{13}H_{17}O_9]^+$ .

**Methyl (3 $\beta$ -Acetoxycholesta-5,7-dien-25-yl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate (4b)**

**2b**<sup>43)</sup> (129.7 mg, 293.4  $\mu$ mol) の無水CHCl<sub>3</sub> (10 ml) 溶液に, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (369.6 mg, 1.34 mmol) 及びBr-sugar (468.0 mg, 1.18 mmol) を加えAr雰囲気下遮光して室温にて攪拌. 7 h後反応液をろ過. ろ液を濃縮し, 得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (13 x 3.0 cm i.d.) に付した. Hexane-AcOEt (2:1) 溶出画分より**4b** (139.8 mg, 62.9%) を無色無晶形物質 (Et<sub>2</sub>Oより再結晶) として得. なお構造は<sup>1</sup>H-NMRにより前ルートで得られた25(OH)7DHC3Ac25G'と同一であることを確認. mp 167-169°C.  $[\alpha]_D^{19}$  -54.9° ( $c = 0.10$ , CHCl<sub>3</sub>). *Anal.* Calcd C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>12</sub>: C, 66.47 ; H, 8.23. Found: C, 66.49 ; H, 8.20.

**Methyl [(5Z,7E)-(3S)-3-Acetoxy-9,10-secocholesta-5,7,10(19)-trien-25-yl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid]uronate (7b)**

**4b** (50.3 mg) のEt<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400:1, 400 ml) 溶液を**3**の光開裂反応に準じて処理 [照射時間: 5 s, 3 s, 2 s及び2 s, UV/HPLC: Develosil ODS-5; MeOH-H<sub>2</sub>O (12:1)]. 溶媒留去後, 得られた残渣をEtOH (30 ml) に溶解し, Ar雰囲気下室温, 暗所にて7 d放置. さらに3.5 h加温 (60°C) し, 3 d室温放置. 溶媒留去後, 得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (14.5 x 1.0 cm) に付した. Hexane-AcOEt (3:1) 溶出画分を引続きprep. UV/HPLC [MeOH-H<sub>2</sub>O (15:1)] に付し, 目的画分 ( $t_R$  6.6-7.8 min) を分取, **7b** (9.1 mg, 18.1%) を無色油状物として得. UV  $\lambda_{max}$  nm: 265,  $\lambda_{min}$  nm: 227. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.53 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d,  $J=5.9$  Hz, H-21), 1.17, 1.21 (3H each, s, H-26, 27), 2.01 (6H, s, 2 x OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 2.04 (3H, s, OAc), 3.74 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 4.00 (1H,

d,  $J=9.2$  Hz, H-5'), 4.70 (1H, d,  $J=7.6$  Hz, H-1'), 4.84 (1H, br s, H-19), 4.95 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 4.94-4.97, 5.16-5.30 (total 3H, m, 3 x  $\text{CHOAc}$ ), 5.06 (1H, br s, H-19), 6.03, 6.21 (total 2H, ABq,  $J=11.9$  Hz, H-7, 6). UV/HPLC: Develosil ODS-5; MeOH-H<sub>2</sub>O (12:1);  $t_R$  8.6 min.

**(5Z,7E)-(3S)-3-Hydroxy-9,10-secocholesta-5,7,10(19)-trien-25-yl  $\beta$ -D-Glucopyranosiduronic Acid (7c)**

**7b** (9.2 mg) の MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1, 1.3 ml) 溶液に, 0.1 M KOH/MeOH (0.8 ml) を加え遮光下室温にて14 h 攪拌. 氷冷下さらに0.1 M KOH/MeOH (0.3 ml) を加え19.5 h 攪拌. 反応液を**6a**の加水分解反応の際と同様に後処理. 得られた残渣を prep. TLC [CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:4)] にて精製.  $R_f$  値が約0.3の画分を回収し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:4) で溶出. 溶媒留去後, **7c** (4.8 mg, 68.7%) を無色固形状物質として得. UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm: 263,  $\lambda_{\text{min}}$  nm: 227. FAB-MS  $m/z$ : 575 [M-H]. UV/HPLC: Develosil ODS-5; MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (3:2);  $t_R$  5.6 min; MeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (5:1),  $t_R$  9.4 min.

**Methyl [(22E)-25-Hydroxyergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -yl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid]uronate (11b) 及び (22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ ,25-diyl Di(methyl 2',3',4'-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosiduronate) (13)**

**10a**<sup>44)</sup> (49.6 mg, 0.12 mmol) の無水CHCl<sub>3</sub> (7.0 ml) 溶液に, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (167.8 mg, 0.61 mmol), 次いでBr-sugar (96.7 mg, 0.24 mmol) を加え室温にて攪拌. Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (86.0 mg, 0.31 mmol), Br-sugar (56.0 mg, 0.14 mmol) を各々3, 17 h 後に加えた. さらに, 25 h 後 Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (88.5 mg, 0.32 mmol) と Br-sugar (95.5 mg, 0.24 mmol) を加え, 47.5 h 後反応液をろ過. ろ液を濃縮し, 得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (32 x 1.0 cm i.d.) に付した. Hexane-AcOEt (2:1) 溶出画分より, **11b** [TLC: hexane-AcOEt (3:2),  $R_f$  0.45; 25.8 mg, 29.4%] を無色無晶形物質 (Et<sub>2</sub>O-hexaneより再結晶) として得. mp 134-

135°C.  $[\alpha]_D^{18}$  -33.8° ( $c=0.26$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). *Anal.* Calcd  $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_{11} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ : C, 66.73; H, 8.33. Found: C, 66.54; H, 8.42.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.63 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, d,  $J=6.9$  Hz, H-24<sup>1</sup>), 1.06 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-21), 1.13, 1.17 (3H each, s, H-26, 27), 2.02 (6H, s, 2 x OAc), 2.05 (3H, s, OAc), 3.62 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 3.75 (3H, s,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.03 (1H, d,  $J=9.2$  Hz, H-5'), 4.67 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-1'), 4.95-5.02 (1H, m,  $\underline{\text{CHOAc}}$ ), 5.21-5.36 (5H, m, H-7, 22, 23, 2 x  $\underline{\text{CHOAc}}$ ), 5.56 (1H, m, H-6). FAB-MS  $m/z$ : 751  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 729  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Hexane-AcOEt (1:1) 溶出画分より, **13** [TLC: hexane-AcOEt (3:2),  $R_f$  0.27; 31.7 mg, 25.2%] を無色無晶形物質 (acetone-hexaneより再結晶) として得. mp 158-160°C.  $[\alpha]_D^{18}$  -33.3° ( $c=0.29$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). *Anal.* Calcd  $\text{C}_{54}\text{H}_{76}\text{O}_{20} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ : C, 61.52; H, 7.36. Found: C, 61.46; H, 7.50.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.61 (3H, s, H-18), 0.91 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J=9.2$  Hz, H-24<sup>1</sup>), 1.02 (3H, d,  $J=5.9$  Hz, H-21), 1.07, 1.19 (3H each, s, H-26, 27), 2.01 (12H, s, 4 x OAc), 2.05 (6H, s, 2 x OAc), 3.62 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 3.75 (6H, s, 2 x  $\text{COOCH}_3$ ), 4.00, 4.02 (1H each, d,  $J=9.6$  Hz, 2 x H-5'), 4.67, 4.72 (1H each, d,  $J=7.9$  Hz, 2 x H-1'), 4.95-5.03 (2H, m, 2 x  $\underline{\text{CHOAc}}$ ), 5.16-5.30 (6H, m, H-22, 23, 4 x  $\underline{\text{CHOAc}}$ ), 5.37, 5.55 (1H each, m, H-7, 6). FAB-MS  $m/z$ : 1067  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1045  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1043  $[\text{M}-\text{H}]$ .

**(22E)-3 $\beta$ -Hydroxy-25-tetrahydropyranloxy-4'-phenyl-3',5'-dihydro-5,8-[1,2]-epi[1,2,4]triazolo-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergosta-6,22-diene-3',5'-dione (9)**

**8**<sup>44)</sup> (768.2 mg) より Tsuji ら<sup>45)</sup> の方法に準じて 2 段階の反応により **9** (556.2 mg, 58.8%) を無色セミソリッドとして得.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.46 (1H, m, THPH-6), 3.95 (1H, m, THPH-6), 4.45 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 4.77 (1H, m, THPH-2), 5.16-5.39 (2H, m, H-22, 23), 6.24, 6.40 (total 2H, ABq,  $J=8.3$  Hz, H-7, 6), 7.26-7.43 (5H, m, ArH).

**(22E)-25-Tetrahydropyranyloxyergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol (10b)**

**9** (56.6 mg) を1,1,3,3-tetramethylguanidine (1.5 ml) に溶解し, N<sub>2</sub>気流下1.5 h還流. 反応液をAcOEtで抽出, 有機層を飽和食塩水で洗浄. 溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (8.5 x 1.3 cm i.d.) により精製. Hexane-AcOEt (4:1) 溶出画分より**10b** (28.4 mg, 67.9%) を無色固形物質として得. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.63 (3H, s, H-18), 0.95 (3H, s, H-19), 3.45 (1H, m, THPH-6), 3.64 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 3.96 (1H, m, THPH-6), 4.78 (1H, m, THPH-2), 5.35 (3H, m, H-7, 22, 23), 5.57 (1H, m, H-6).

**Methyl [(22E)-25-Tetrahydropyranyloxyergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -yl 2',3',4'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid]uronate (11a)**

**10b** (157.3 mg, 0.32 mmol) の無水CHCl<sub>3</sub> (15 ml) 溶液に, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (264.3 mg, 0.96 mmol), 次いでBr-sugar (187.7 mg, 0.47 mmol) を加え室温にて攪拌. さらに, 9 h後Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (93.6 mg, 0.34 mmol), Br-sugar (130.1 mg, 0.33 mmol) を加えて攪拌. 17 h後反応液をろ過し, ろ液を濃縮. 得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (38 x 1.0 cm i.d.) に付した. Hexane-AcOEt (3:1) 溶出画分より**11a** (165.0 mg, 64.1%) を白色固形物質として得. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.63 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 2.02 (6H, s, 2 x OAc), 2.05 (3H, s, OAc), 3.45 (1H, m, THPH-6), 3.63 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 3.75 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.96 (1H, m, THPH-6), 4.03 (1H, d,  $J=9.2$  Hz, H-5'), 4.68 (1H, d,  $J=7.6$  Hz, H-1'), 4.78 (1H, br s, THPH-2), 4.99 (1H, m, CHOAc), 5.18-5.39 (5H, m, H-7, 22, 23, 2 x CHOAc), 5.56 (1H, m, H-6).

**Methyl [(22E)-25-Hydroxyergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -yl 2',3',4'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid]uronate (11b)**

**11a** (165.1 mg, 0.20 mmol) の95% EtOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3:1, 2.1 ml) 溶液にPPTS (2.6 mg,

10.4  $\mu\text{mol}$ ) を加え54-65°Cで5.5 h攪拌. 反応液をAcOEtで抽出, 有機層を飽和食塩水で洗浄後, 溶媒を留去. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (8.5 x 2.0 cm i.d.) に付した. Hexane-AcOEt (2:1) 溶出画分より **11b** (109.1 mg, 73.7%) を無色無晶形物質として得. なお構造は<sup>1</sup>H-NMRにより確認. さらに, UV/順相系HPLC [hexane-IPA (95:5),  $t_R$  8.3 min] 及びUV/逆相系HPLC [Develosil ODS-5; MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1),  $t_R$  6.0 min] におけるco-chromatographyにより前ルートで得られた25(OH)Erg3G' と同一であることを確認.

**Methyl [(5Z,7E,22E)-(3S)-25-Hydroxy-9,10-secoergosta-5,7,10(19),22-tetraen-3-yl 2',3',4'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid]uronate (14a)**

**11b** (84.3 mg) のEt<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub> (400:1, 400 ml) 溶液を3の光開裂反応に準じて処理 [照射時間: 20 s及び8 s, UV/HPLC: Develosil ODS-5; MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1)]. 溶媒留去後, 得られた残渣をhexane-THF (4:1; 25 ml) に溶解し, Ar雰囲気下室温, 暗所に6 d放置. 溶媒留去後, 得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (36 x 1.0 cm i.d.) に付した. Hexane-AcOEt (2:1) 溶出画分を引き続きprep. UV/HPLC [MeOH-H<sub>2</sub>O (7:1)] に付し, 目的画分 ( $t_R$  8.3-9.4 min) を分取し**14a** (11.4 mg, 13.5%) を無色セミソリッドとして得. UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm: 265,  $\lambda_{\text{min}}$  nm: 229. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.55 (3H, s, H-18), 0.99 (3H, d,  $J=6.9$  Hz, H-24<sup>1</sup>), 1.03 (3H, d,  $J=6.3$  Hz, H-21), 1.13, 1.17 (3H each, s, H-26, 27), 1.95, 2.01, 2.02 (3H each, s, 3 x OAc), 3.75 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.96 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 4.03 (1H, d,  $J=9.2$  Hz, H-5'), 4.68 (1H, d,  $J=7.6$  Hz, H-1'), 4.79 (1H, d,  $J=2.6$  Hz, H-19), 4.94-5.02 (2H, m, H-19, CHOAc), 5.17-5.42 (4H, m, H-22, 23, 2 x CHOAc), 6.00, 6.17 (total 2H, ABq,  $J=11.2$  Hz, H-7, 6). EI-MS  $m/z$ : 728 [M]<sup>+</sup>, 668 [M-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 394 [M-C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>]<sup>+</sup>, 317 [C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>]<sup>+</sup>.

**(5Z,7E,22E)-(3S)-25-Hydroxy-9,10-secoergosta-5,7,10(19),22-tetraen-3-yl  
β-D-Glucopyranosiduronic Acid (14b)**

**14a** (7.4 mg) の MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10:3, 1.3 ml) 溶液に, 0.1 M NaOH/MeOH (0.5 ml) を加え遮光下室温にて17 h 攪拌. 反応液を**6a**の加水分解反応の際と同様に後処理. 得られた残渣をprep. TLC [CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:4)] にて精製. *R*<sub>f</sub>値が約 0.4の画分を回収し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:4) で溶出. 溶媒留去後, **14b** (4.7 mg, 78.6%) を無色セミソリッドとして得. UV λ<sub>max</sub> nm: 264, λ<sub>min</sub> nm: 228. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) δ: 0.56 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, d, *J*=6.9 Hz, H-24<sup>1</sup>), 1.04 (3H, d, *J*=6.6 Hz, H-21), 1.12, 1.15 (3H each, s, H-26, 27), 3.99 (1H, m, H-3α), 4.23 (1H, dd, *J*=1.8, 5.8 Hz, H-5'), 4.44 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1'), 4.79, 5.03 (1H each, br s, H-19), 5.27-5.34 (2H, m, H-22, 23), 6.02, 6.24 (total 2H, ABq, *J*=10.7 Hz, H-7, 6). FAB-MS *m/z*: 633 [M+2Na-H]<sup>+</sup>, 611 [M+Na]<sup>+</sup>, 587 [M-H]<sup>-</sup>. UV/HPLC: Develosil ODS-5; MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (3:2), *t*<sub>R</sub> 8.1 min又は MeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (4:1), *t*<sub>R</sub> 13.2 min.

**(22E)-25-Hydroxyergosta-5,7,22-trien-3β-yl Acetate (10c)**

**10a** (338.4 mg) を pyridine-Ac<sub>2</sub>O (2:1; 9.0 ml) に溶解し室温で11.5 h 攪拌. 反応液に少量のH<sub>2</sub>Oを加えて攪拌し, AcOEtで抽出. 有機層を5% HCl, 5% NaHCO<sub>3</sub>, 飽和食塩水で順次洗浄後, 溶媒を留去. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (13.5 x 3.5 cm i.d.) に付した. CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (100:1) 溶出画分より**10c** (233.4 mg, 62.6%) を白色葉状晶 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>より再結晶) として得. mp 175-176°C. [α]<sub>D</sub><sup>17</sup> -94.4° (*c*=0.25, CHCl<sub>3</sub>). *Anal.* Calcd C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>: C, 79.24; H, 10.20. Found: C, 78.76; H, 10.14. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.63 (3H, s, H-18), 0.95 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, d, *J*=6.9 Hz, H-24<sup>1</sup>), 1.06 (3H, d, *J*=6.6 Hz, H-21), 1.13, 1.16 (3H each, s, H-26, 27), 4.70 (1H, m, H-3α), 5.34 (3H, m, H-7, 22, 23), 5.56 (1H, m, H-6). EI-MS *m/z*: 436 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 394 [M-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 376 [M-

$C_2H_6O_3]^+$ .

**Methyl [(22E)-3 $\beta$ -Acetoxyergosta-5,7,22-trien-25-yl 2',3',4'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid]uronate (12)**

**10c** (51.8 mg, 0.114 mmol) の無水 $CHCl_3$  (2.0 ml) 溶液に,  $Ag_2CO_3$  (95.4 mg, 0.35 mmol), 次いでBr-sugar (182.1 mg, 0.46 mmol) を加え室温にて攪拌, 11 h後反応液をろ過. ろ液を濃縮し, 得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (34 x 1.0 cm i.d.) に付した. Hexane-AcOEt (3:1) 溶出画分より**12** (27.9 mg, 31.8%) を白色羽毛状晶 ( $Et_2O$  より再結晶) として得. mp 200-201°C.  $[\alpha]_D^{20}$  -58.0° ( $c=0.26$ ,  $CHCl_3$ ). *Anal.* Calcd  $C_{43}H_{62}O_{12}$ : C, 66.99; H, 8.11. Found: C, 66.81; H, 8.08.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.62 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, d,  $J=5.9$  Hz, H-24<sup>1</sup>), 0.95 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, d,  $J=6.9$  Hz, H-21), 1.08, 1.20 (3H each, s, H-26, 27), 2.02-2.04 (12H, m, 4 x OAc), 3.75 (3H, s,  $COOCH_3$ ), 4.00 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, H-5'), 4.70 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 4.72 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-1'), 5.00 (1H, m,  $\underline{CHOAc}$ ), 5.21-5.30 (4H, m, H-22, 23, 2 x  $\underline{CHOAc}$ ), 5.39, 5.56 (1H each, m, H-7, 6). FAB-MS  $m/z$ : 793  $[M+Na]^+$ .

**Methyl [(5Z,7E,22E)-(3S)-3-Acetoxy-9,10-secoergosta-5,7,10(19),22-tetraen-25-yl 2',3',4'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid]uronate (15a)**

**12** (41.1 mg) の $Et_2O-CHCl_3$  (400:1, 400 ml) 溶液を3の光開裂反応に準じて処理 [照射時間: 6 s, 2 s, 2 s及び2 s, UV/HPLC: Develosil ODS-5; MeOH- $H_2O$  (97:3)]. 溶媒留去後, 得られた残渣を $EtOH$  (20 ml) に溶解し,  $Ar$ 雰囲気下室温, 暗所に5 d放置. さらに, 2.5 h加温 (48-55°C). 溶媒留去後, 得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (24.5 x 1.0 cm i.d.) に付した.  $CHCl_3-AcOEt$  (50:1) 溶出画分を引き続きprep. UV/HPLC [ $MeOH-H_2O$  (93:7)] に付し, 目的画分 ( $t_R$  8.0-8.7 min) を分取し**15a** (5.6 mg, 13.6%) を

無色セミソリッドとして得. UV  $\lambda_{\max}$  nm: 264,  $\lambda_{\min}$  nm: 227.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.54 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, d,  $J=6.9$  Hz, H-24<sup>1</sup>), 1.00 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-21), 1.07, 1.19 (3H each, s, H-26, 27), 2.01-2.05 (12H, m, 4 x OAc), 3.75 (3H, s,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.00 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, H-5'), 4.72 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-1'), 4.83 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-19), 4.94-5.00 (3H, m, H-3, 19,  $\text{CHOAc}$ ), 5.17-5.30 (4H, m, H-22, 23, 2 x  $\text{CHOAc}$ ), 6.02, 6.21 (total 2H, ABq,  $J=11.4$  Hz, H-7, 6). EI-MS  $m/z$ : 770  $[\text{M}]^+$ , 710  $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$ , 650  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4]^+$ , 436  $[\text{M}-\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_{10}]^+$ , 317  $[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_9]^+$ .

**(5Z,7E,22E)-(3S)-3-Hydroxy-9,10-secoergosta-5,7,10(19),22-tetraen-25-yl  $\beta$ -D-Glucopyranosiduronic Acid (15b)**

**15a** (4.9 mg) の  $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7:2, 0.9 ml) 溶液に, 0.1 M  $\text{KOH}/\text{MeOH}$  (0.4 ml) を加え遮光下室温にて14 h 攪拌. 反応液を**6a**の加水分解反応の際と同様に後処理. 得られた残渣を prep. TLC [ $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$  (70:30:4)] にて精製.  $R_f$ 値が約 0.3の画分を回収し,  $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$  (70:30:4) で溶出. 溶媒留去後, **15b** (2.9 mg, 77.5%) を無色セミソリッドとして得. UV  $\lambda_{\max}$  nm: 264,  $\lambda_{\min}$  nm: 228. FAB-MS  $m/z$ : 633  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ , 611  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 589  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . UV/HPLC: Develosil ODS-5;  $\text{MeCN}-2\%$   $\text{NaClO}_4$  (pH 3.0) (3:2),  $t_R$  6.6 min 又は  $\text{MeOH}-2\%$   $\text{NaClO}_4$  (pH 3.0) (5:1),  $t_R$  8.8 min.

**(5Z,7E)-(3S)-9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-yl  $\beta$ -D-Glucopyranosiduronic Acid (16) 及び (5Z,7E,22E)-(3S)-9,10-Secoergosta-5,7,10(19),22-tetraen-3-yl  $\beta$ -D-Glucopyranosiduronic Acid (17)**

$\text{D}_3$  及び  $\text{D}_2$  より Bell, Kodicek ら<sup>26)</sup> の方法に準じて各々**16** 及び **17** を無色無晶形物質として得. **16**: mp 200-205°C (dec.) [ $\text{D}_33\text{G}$  Na塩: Lit. mp 152-153°C (dec.)<sup>26)</sup>].  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.55 (3H, s, H-18), 0.86, 0.89 (3H each, d,  $J=6.6$  Hz, H-26, 27), 0.93

(3H, d,  $J=5.9$  Hz, H-21), 4.80, 5.04 (1H each, br s, H-19), 6.02, 6.24 (total 2H, ABq,  $J=11.2$  Hz, H-7, 6). FAB-MS  $m/z$ : 559 [M-H]. **17**: mp 200-205°C (dec.).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.56 (3H, s, H-18), 0.83, 0.85 (3H each, d,  $J=6.9$  Hz, H-26, 27), 0.92 (3H, d,  $J=6.9$  Hz, H-24<sup>1</sup>), 1.02 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-21), 4.81, 5.04 (1H each, br s, H-19), 5.19-5.22 (2H, m, H-22, 23), 6.02, 6.24 (total 2H, ABq,  $J=11.2$  Hz, H-7, 6). FAB-MS  $m/z$ : 571 [M-H].

### 酵素水解反応による構造確認

**6b**, **7c**, **14b**, **15b**, **16** 又は **17** [各々 0.25 nmol/EtOH (20  $\mu\text{l}$ )] を acetate buffer [0.1 M AcONa-AcOH (pH 5.0)] (0.2 ml) で希釈し,  $\beta$ -glucuronidase [酵素原, bovine liver (**6b**, **7c**, **14b**, **15b**) 又は *E. coli* (**16**, **17**); いずれも 500 Fishman units]<sup>47)</sup> の acetate buffer (0.8 ml) 溶液を加え, 37°C, 2 h incubation 後, 氷冷下 AcOEt (1 ml) を加えて反応を停止. 反応液を AcOEt で抽出, 溶媒を留去後, 残渣を MeOH に溶解し, UV/HPLC {25(OH) $\text{D}_3$  [J'sphere ODS-H80; MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (21:4),  $t_{\text{R}}$  19.9 min], 25(OH) $\text{D}_2$  [J'sphere ODS-H80; MeCN- $\text{H}_2\text{O}$  (7:3),  $t_{\text{R}}$  22.4 min],  $\text{D}_3$  [J'sphere ODS-M80; MeCN- $\text{H}_2\text{O}$  (29:1),  $t_{\text{R}}$  20.6 min],  $\text{D}_2$  [J'sphere ODS-H80; MeOH-2%  $\text{NaClO}_4$  (pH 3.0) (19:1),  $t_{\text{R}}$  21.0 min]} によりゲニンの生成を確認.

## 第3節 付属実験

### ラット胆汁の採取

25(OH) $\text{D}_3$  (1 mg), 25(OH) $\text{D}_2$  (0.5 mg),  $\text{D}_3$  (1 mg) 又は  $\text{D}_2$  (1 mg) を dimethylsulfoxide (0.1 ml) に溶解, 生理食塩水 (0.7 ml) と Tween 80 (0.2 ml) で懸濁後, ラットに経口投与. エーテル麻酔下, ラット腹部を切開, 胆管にポリエチレンチューブを挿入, 投与後 24 h 胆汁を採取.

## ラット胆汁中25(OH)D<sub>3</sub>G及びD<sub>3</sub>3Gの検索

25(OH)D<sub>3</sub>又はD<sub>3</sub>投与ラットより得た胆汁試料 (各12 ml) を0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0, 480 ml) で希釈後, Bond Elut C18カートリッジに吸着. H<sub>2</sub>O (10 ml) で洗浄後, ステロイドをMeOH (5 ml) で溶出. 溶出液にH<sub>2</sub>O (0.56 ml) を加え, 90% MeOH 溶液としたものをPHP-LH-20カラムに通導. 90% MeOH (5 ml), 0.1 M AcOH/ 90% MeOH (5 ml) で順次洗浄後, 0.2 M HCOOH/90% MeOH (10 ml) でグルクロニド画分を溶出, 溶媒留去. 残渣をprep. UV/HPLC {TSKgel ODS-80TM; MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (1:1); *t<sub>R</sub>* 17-19 min [25(OH)D<sub>3</sub>3G], 14-16 min [25(OH)D<sub>3</sub>25G] 又はMeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (12:1); *t<sub>R</sub>* 10.5-11.5 min (D<sub>3</sub>3G)} に付した. 各画分を5% NaHCO<sub>3</sub>で中和しH<sub>2</sub>Oで希釈後, Bond Elut C18カートリッジにより脱塩. MeOH溶出液を減圧下留去後, MeOHに再溶解し, HPLC {J'sphere ODS-M80; MeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (4:1), *t<sub>R</sub>* 15.6 min [25(OH)D<sub>3</sub>3G], 14.7 min [25(OH)D<sub>3</sub>25G], MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (1:1), *t<sub>R</sub>* 14.2 min [25(OH)D<sub>3</sub>3G], MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (9:10), *t<sub>R</sub>* 16.4 min [25(OH)D<sub>3</sub>25G] 又はMeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (14:1); *t<sub>R</sub>* 8.9 min (D<sub>3</sub>3G); 検出, UV及びフォトダイオードアレイUV} に付した.

得られたグルクロニド画分 [25(OH)D<sub>3</sub>3G, *ca.* 31 ng; 25(OH)D<sub>2</sub>25G, *ca.* 27 ng; D<sub>2</sub>3G, *ca.* 15 ng] にMBOTAD [*ca.* 60 µg/AcOEt (100 µl)] を加え, 室温で1 h放置. MeOH (3 drops) を加えて過剰の試薬を分解, 溶媒留去. 90% MeOH (1 ml) に溶解し, PHP-LH-20カラムに通導. 先と同様に洗浄後, 0.1 M AcONH<sub>4</sub>/90% MeOH (4 ml) でグルクロニドを溶出. 得られた画分をFL/HPLC {YMC-GEL C<sub>8</sub>; MeOH-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (3:1), *t<sub>R</sub>* 12.7, 14.5 (main) min [25(OH)D<sub>3</sub>3G-MBOTAD], 10.0, 12.6 (main) min [25(OH)D<sub>3</sub>25G-MBOTAD], MeCN-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (7:10), *t<sub>R</sub>* 17.6 min [25(OH)D<sub>3</sub>3G-MBOTAD], MeCN-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (7:11), *t<sub>R</sub>* 15.4, 18.6 (main) min [25(OH)D<sub>3</sub>25G-MBOTAD], MeOH-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (5:1), *t<sub>R</sub>* 11.4, 13.5 (main) min

(D<sub>3</sub>3G-MBOTAD), MeCN-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (8:5), *t<sub>R</sub>* 9.6 min (D<sub>3</sub>3G-MBOTAD)} に付した.

得られた25(OH)D<sub>3</sub>G及びD<sub>3</sub>3G画分 [ca. 0.25 nmol/EtOH (20 µl)] をacetate buffer (0.2 ml) で希釈. β-Glucuronidase (*E. coli*, 500 Fishman units) のacetate buffer (0.8 ml) 溶液と混合し37°C, 2 h incubation後, 氷冷下AcOEt (1 ml) を加えて反応を停止. 反応液をAcOEtで抽出, 溶媒を留去後, 残渣をMeOHに溶解し, UV/HPLC {J'sphere ODS-M80; MeOH-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (5:1); *t<sub>R</sub>* 7.3 min [25(OH)D<sub>3</sub>3G], 6.5 min [25(OH)D<sub>3</sub>25G], 20.8 min [25(OH)D<sub>3</sub>], MeCN-H<sub>2</sub>O (8:3), *t<sub>R</sub>* 17.0 min [25(OH)D<sub>3</sub>], MeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (14:1), *t<sub>R</sub>* 10.2 min (D<sub>3</sub>3G), 20.6 min (D<sub>3</sub>), MeCN-H<sub>2</sub>O (29:1), *t<sub>R</sub>* 20.6 min (D<sub>3</sub>)} によりゲニンの生成を確認. なお, ピークの同定はいずれも標品とのco-chromatographyによった.

#### ラット胆汁中25(OH)D<sub>2</sub>G及びD<sub>2</sub>3Gの検索

25(OH)D<sub>2</sub>又はD<sub>2</sub>投与ラットより得た胆汁試料 (各12 ml) をD<sub>3</sub>系と同様の固相抽出, PHP-LH-20カラムに付し, 得られたグルクロニド画分をprep. UV/HPLC {TSKgel ODS-80TM; MeCN-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (10:9); *t<sub>R</sub>* 15.5-16.5 min [25(OH)D<sub>2</sub>3G], 12.5-14.0 min [25(OH)D<sub>2</sub>25G] 又はMeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (12:1); *t<sub>R</sub>* 10.5-11.5 min (D<sub>2</sub>3G)} により精製. 各画分を先と同様に脱塩後UV/HPLC {J'sphere ODS-M80; MeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (4:1), *t<sub>R</sub>* 18.9 min [25(OH)D<sub>2</sub>3G], 17.2 min [25(OH)D<sub>2</sub>25G], MeCN-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (2:3), *t<sub>R</sub>* 14.9 min [25(OH)D<sub>2</sub>3G], 9.7 min [25(OH)D<sub>2</sub>25G], MeOH-2% NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) (12:1); *t<sub>R</sub>* 11.5 min (D<sub>2</sub>3G)又はMeOH-0.5% AcONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (12:1), *t<sub>R</sub>* 8.5 min (D<sub>2</sub>3G)} に付した. なお, ピークの同定は標品とのco-chromatographyによった.

得られたグルクロニド画分 [25(OH)D<sub>2</sub>3G, ca. 140 ng; 25(OH)D<sub>2</sub>25G, ca. 200 ng; D<sub>2</sub>3G, ca. 160 ng/MeOH (20 µl)] をLC/APCI-MS (J'sphere ODS-H80; AcONH<sub>4</sub> (65 mM) 含有

MeCN-H<sub>2</sub>O (2:3),  $t_R$  13.8 min [25(OH)D<sub>2</sub>3G], 7.7 min [25(OH)D<sub>2</sub>25G], AcONH<sub>4</sub> (65 mM) 含有MeOH-H<sub>2</sub>O (19:1),  $t_R$  4.9 min (D<sub>2</sub>3G); ドリフト電圧, -80 V; ベーパライザー温度, 210 °C [25(OH)D<sub>2</sub>G], 170 °C (D<sub>2</sub>3G); 検出, SIM {25(OH)D<sub>2</sub>G  $m/z$ : 587 [M-H], D<sub>2</sub>3G  $m/z$ : 571 [M-H]}又は全イオン検出 ( $m/z$ : 100-700) に付した.

さらに得られたグルクロニド画分 [25(OH)D<sub>2</sub>3G, *ca.* 1700 ng; 25(OH)D<sub>2</sub>25G, *ca.* 800 ng; D<sub>2</sub>3G, *ca.* 500 ng/MeOH (20  $\mu$ l)] をCH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>のEt<sub>2</sub>O溶液 (適当量) と混和, 室温で1 h放置. 溶媒を留去後MeOHに再溶解し, LC/APCI-MS (J'sphere ODS-H80; AcONH<sub>4</sub> (65 mM) 含有MeOH-H<sub>2</sub>O (17:3),  $t_R$  6.6 min [25(OH)D<sub>2</sub>3G methyl ester], 6.4 min [25(OH)D<sub>2</sub>25G methyl ester], AcONH<sub>4</sub> (65 mM) 含有MeOH-H<sub>2</sub>O (97:3),  $t_R$  6.3 min (D<sub>2</sub>3G methyl ester); ドリフト電圧, 15 V; ベーパライザー温度, 180 °C; 検出, SIM {25(OH)D<sub>2</sub>G methyl ester,  $m/z$ : 620 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, D<sub>2</sub>3G methyl ester,  $m/z$ : 604 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>} に付した.

## 引用文献

- 1) 尾形悦郎, 須田立雄, 小椋陽介編, “ビタミンDのすべて,” 講談社, 東京, 1993.
- 2) 小林 正, “ビタミンハンドブック①脂溶性ビタミン,” 日本ビタミン学会編, 化学同人, 京都, 1989, pp. 31-48.
- 3) 小林 正, ビタミン, **64**, 509-516 (1990).
- 4) 岡崎 亮, 松本俊夫, 尾形悦郎, 日本臨牀, **48**, 2785-2790 (1990).
- 5) 阿部悦子, ビタミン, **58**, 487-499 (1984).
- 6) 岡野登志夫, ビタミン, **68**, 671-678 (1994).
- 7) Iqbal S.J., *Ann. Clin. Biochem.*, **31**, 109-124 (1994).
- 8) 小林 正, 増田園子, “ビタミンハンドブック③ビタミン分析法,” 日本ビタミン学会編, 化学同人, 京都, 1989, pp. 15-26.
- 9) 小林 正, “ビタミン学実験法I. 脂溶性ビタミン,” 日本ビタミン学会編, 東京化学同人, 東京, 1983, pp. 82-120.
- 10) Makin H.L.J., Jones G., Calverley M.J., “Steroid Analysis,” ed. by Makin H.L.J., Gower D.B., Kirk D.N., Blackie Academic and Professional, London, 1995, pp. 562-620.
- 11) 小林靖奈, 山元俊憲, 黒岩幸雄, ぶんせき, **1995**, 830-842.
- 12) Anderson N.G., Lieberman S., *Endocrinology*, **106**, 13-21 (1980).
- 13) 本庄英雄, 日本内分泌, **68**, 1158-1166 (1992).
- 14) Le Boulch N., Cancela L., Miravet L., *Steroids*, **39**, 391-398 (1982).
- 15) Sahashi Y., Suzuki T., Higaki M., Asano T., *J. Vitaminol.*, **13**, 33-36 (1967).
- 16) Axelson M., *FEBS Lett.*, **191**, 171-175 (1985).
- 17) Axelson M., Christensen N.J., *J. Steroid Biochem.*, **31**, 35-39 (1988).

- 18) Axelson M., *J. Steroid Biochem.*, **26**, 369-373 (1987).
- 19) Coldwell R.D., Trafford D.J.H., Makin H.L.J., "Vitamin D. Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology," ed. by Norman A.W., Schaefer K., Grigoleit H.-G., Herrath D.v., Walter de Gruyter, Berlin, 1988, pp. 132-134.
- 20) Okano T., Kuroda E., Nakao H., Kodama S., Matsuo T., Nakamichi Y., Nakajima K., Hirao N., Kobayashi T., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 449-462 (1986).
- 21) Hollis B.W., Roos B.A., Draper H.H., Lambert P.W., *J. Nutr.*, **111**, 384-390 (1981).
- 22) LeVan L.W., Schnoes H.K., DeLuca H.F., *Biochemistry*, **20**, 222-226 (1981).
- 23) 山田幸子, ビタミン, **70**, 43-55 (1996).
- 24) Litwiller R.D., Mattox V.R., Jardine I., Kumar R., *J. Biol. Chem.*, **257**, 7491-7494 (1982).
- 25) Kumar R., Nagubandi S., Mattox V.R., Londowski J.M., *J. Clin. Invest.*, **65**, 277-284 (1980).
- 26) Bell P.A., Kodicek E., *Biochem. J.*, **115**, 663-669 (1969).
- 27) Kumar R., Nagubandi S., Londowski J.M., *J. Lab. Clin. Med.*, **96**, 278-284 (1980).
- 28) Prószyńska K., Lukaszkiwicz J., Jarocewicz N., Lorenc R.S., *Clin. Chim. Acta*, **153**, 85-92 (1985).
- 29) Kobayashi N., Ueda K., Kitahori J., Shimada K., *Steroids*, **57**, 488-493 (1992).
- 30) Seamark D.A., Trafford D.J.H., Makin H.L.J., *Clin. Chim. Acta*, **106**, 51-62 (1980).
- 31) Shepard R.M., Horst R.L., Hamstra A.J., DeLuca H.F., *Biochem. J.*, **182**, 55-69 (1979).
- 32) Shimizu M., Iwasaki Y., Ishida H., Yamada S., *J. Chromatogr. B*, **672**, 63-71 (1995).
- 33) Niwa T., Fujita K., Goto J., Nambara T., *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 2531-2544 (1993).
- 34) Goto J., Hasegawa M., Kato H., Nambara T., *Clin. Chim. Acta*, **87**, 141-147 (1978).

- 35) Shimada K., Mizuguchi T., *J. Chromatogr.*, **606**, 133-135 (1992).
- 36) Shimizu M., Yamazaki T., Yamada S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 1809-1814 (1993).
- 37) Shimada K., Mitamura K., Miura M., Miyamoto A., *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 2885-2893 (1995).
- 38) Shimada K., Mitamura K., Kaji H., Morita M., *J. Chromatogr. Sci.*, **32**, 107-111 (1994).
- 39) Shimada K., Mitamura K., Kitama N., *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 229-232 (1995).
- 40) Williams M.C., Goldzieher J.W., *Steroids*, **36**, 255-282 (1980).
- 41) Becker J.F., *Biochim. Biophys. Acta*, **100**, 574-581 (1965).
- 42) Fürst A., Labler L., Meier W., *Helv. Chim. Acta*, **66**, 2093-2102 (1983).
- 43) Baggiolini E.G., Iacobelli J.A., Hennessy B.M., Uskokovic M.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2945-2948 (1982).
- 44) Barton D.H.R., Shioiri T., Widdowson D.A., *J. Chem. Soc. (C)*, **1971**, 1968-1974.
- 45) Tsuji M., Yokoyama S., Tachibana Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 3132-3137 (1989).
- 46) 坂入 実, "LC/MSの実際 天然物の分離と構造決定," 原田健一, 岡 尚男編, 講談社, 東京, 1996, pp. 57-86.
- 47) Shimada K., Mitamura K., Saito K., Ohtake Y., Nakatani I., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, in press.

