

氏 名	堀 正 剛 ほり まさ たけ
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	論 理 博 第 278 号
学位授与の日付	昭 和 44 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Automatic Liquid Chromatography of Steroids and Flavonoids (ステロイドおよびフラボノイドの自動液体クロマトグラフィーに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 波多野博行 教 授 後 藤 良 造 教 授 香 月 裕 彦

論 文 内 容 の 要 旨

昆虫変態ホルモンは、蚕の蛹から単離され、またその同族体はある種の植物体にも分布していることが知られている一種のステロイドである。これら同族体の構造にはフェノール基などのイオン交換性の基が含まれていないので、従来のイオン交換法で分離することはできない。

主論文第一部においては、スチレン・ジビニルベンゼンの共重合体である多孔性樹脂をカラム固定相に用い、水・エタノール系溶媒の濃度比を徐々にかえる勾配溶出法で溶出させる吸着型自動液体クロマトグラフィーを考案し、この方法を用いてこれらのステロイドをその生物活性を失うことなく定量的に分離分析を行なっている。この方法では紫外外部吸収法で検出するので数百 μg の昆虫変態ホルモンを誤差 $\pm$ 約2%以下の精度で分離定量することができ、生物活性による検出法を併用して数 μg の量をも追跡することに成功している。また、口径の大きいカラムを用いて数百 mg 以上の物質を単離し、核磁気共鳴、赤外部吸収、マススペクトル、紫外外部吸収、融点、元素分析などの基本的データを測定している。

このクロマトグラフィーでは固定相が非極性で移動相溶媒のほうが高い極性をもっているので、シリカゲルやアルミナなどを固定相に用いた場合とは逆に、極性の大きい物質ほど早く溶出され、従来の方法よりも鋭い分離を与える特徴がある。また、分離状態を230, 250, および330 $\text{m}\mu$ の三波長で測定して記録するので、昆虫変態ホルモンの活性のある物質の吸光度比は $E_{230\text{m}\mu}/E_{250\text{m}\mu} \approx 0.58 \sim 0.76$, $E_{300\text{m}\mu}/E_{250\text{m}\mu} < 0.01$ となり、この特性は本物質群の活性に関係ある特異構造、6-on-7-ene に由来するもので、天然物の抽出エキスなどから新しい同族体を探索する際にきわめて有用な指標となるものであり、ステロイドの系統的な分離分析が可能となった。

主論文第二部においては、第一部で用いた吸着型自動液体クロマトグラフィーを応用してアグリコンからグリコシド、糖酸エステルに至る56種のフラボノイドについて分離分析を行なっている。

フラボノイドは母核のフラボンあるいはフラバノンの3, 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5', 6' の位置の水酸基、糖類、糖酸エステルの数、位置、種類によって極めて多くの同族体が存在し、いずれも互いに極めて類似

した性質をもっており、しかも植物体にはその含量がきわめて少ないものもある。この自動液体クロマトグラフィーによって、これらの糖酸エステル、グリコシド、アグリコンなどが同時に能率よく分離することができている。この場合も極性の大きい物質ほど先に溶出され、糖酸エステルに属するもの、グリコシドに属するもの、およびアグリコンに属するものの順に分離溶出され、それぞれの化合物群の内では水酸基、糖、糖酸の数が多い化合物ほど早く溶出された。分離された物質は元素分析および一般の物理化学的測定によって同定され、薄層クロマトグラフィー、マススペクトルなどの有効な同定手段も用いられている。フラボノイドは母核についている水酸基や糖の数と位置とによって紫外外部吸収スペクトルの形が著しく異なっているから、 $E_{270m\mu}$ 、 $E_{300m\mu}$ および $E_{330m\mu}$ の吸収度比が構造を推定するための一つの指標として用いられ、フラボノイドの系統的分離分析法が確立された。

参考論文その一およびその二はイオン交換クロマトグラフィーを用いてサイアミンポリリン酸類の分離定量を行なったものである。

その二は新しい自動液体クロマトグラフを考案して核酸および関連化合物の分析法を確立したものである。

その三およびその四はビタミンB₂生合成機構の研究においてイオン交換クロマトグラフィーを用いてアミノ酸の分析を行なったものである。

その五は主論文第一部で確立した吸着型の自動液体クロマトグラフィーを応用してイヌマキに含まれる昆虫変態ホルモンの中で新物質であるマキシテロンAが発見され、その化学構造が明らかにされたものである。

その六は抗血液凝固作用をもつ脂質ペプチド “Surfactin” のペプチド部分のアミノ酸配列を決定したものである。

その七はイオン交換クロマトグラフとオートアナライザーを用いて糖酸類の自動化分析を行なったものである。

その八～十一はいずれも液体クロマトグラフィーを用いて合成高分子物質の分子量分布や組成を決定したものである。

その十二はアミノ酸自動分析計の精度について検討したもの、その十三は植物生長調整剤の定量法に関するもの、

その十四は安定なアスコルビン酸誘導体を電気泳動法で分離定量したものである。

その十五は殺虫剤の定量にアミノ酸自動分析計を応用したものである。

その十六およびその十七は非水溶性ビタミンB₁誘導体の定量法を確立したものである。

その十八およびその十九はアドメトリーを用いてアミノ酸を定量する場合の条件の検討を行なったものの、

その二十はサイアミン二リン酸のポーラログラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーに関するものである。

論文審査の結果の要旨

液体クロマトグラフィーは古くから天然物有機化学あるいは生物化学の分野で極めて効率のよい分離法として用いられてきたもので、最近では自動的な分離分析機器としての液体クロマトグラフが著しく進歩し、ガスクロマトグラフと並んで化学に関連ある分野で広く用いられるようになったものである。

このクロマトグラフの最もすぐれた固定相はイオン交換樹脂であって、従来の吸着剤は再現性に乏しく自動機器に用いるには種々の難点があった。しかしながら、吸着クロマトグラフィーはイオン交換性を持たない物質をも含めて極めて広い範囲の物質の分離に基だ有効であるので吸着剤を用いる自動液体クロマトグラフィーを確立することは化学および関連ある広い分野においてきわめて重要な問題であり、その基礎的な研究が強く要望されている。

申請者は主論文第一部において従来の吸着剤とは全く異なるスチレン・ジビニルベンゼン系多孔性樹脂を固定相に用いる自動液体クロマトグラフィーを考案し、ポリオキシステロイド構造をもつ昆虫変態ホルモンの化合物の分離分析を行なっている。ステロイド類の分離分析には従来ガスクロマトグラフィーが多く用いられてきたが、昆虫変態ホルモンの一連の化合物のように五個以上もの水酸基をもつ化合物は蒸気圧が極めて低いため、これを用いることができなかったのであるが、この方法によれば天然有機物から抽出した生物活性物質で少量の未知成分を含むきわめて複雑な組成をもつ混合物でも、生物活性を失うことなく定量的に分離することができる。本論文において対象としている昆虫変態ホルモンはすでに1954年 Butenandtらによって蚕の蛹から単離されたものであるが、最近ではある種の植物体にもその同族体が分布していることが知られている一種のステロイドである。申請者が用いた固定相は吸着剤として有効でありかつ均一性のある多孔性樹脂 (Amberlite XAD-2) であり、溶媒は水・エタノール系溶媒の濃度比を徐々に変える勾配溶出法であるため極めて再現性のよい分離を示す吸着型自動液体クロマトグラフィーが確立されたといえる。さらにこのクロマトグラフの検出部には紫外外部吸収法が用いられているので数百マイクログラムの物質を誤差±約2%以下のきわめてよい精度で分離定量することができ、また、生物活性による検出法では数マイクログラムの量をも追跡することができた。また、一方、この方法はそのまま口径の大きいカラムにも応用することができ、直径3 cm程度のカラムでも一回に約500mgの単離物質を得ることができる。

主論文第二部においては、第一部でえられた方法や結果をさらに広範囲に応用してアグリコンからグリコシド、糖酸エステルに至る56種のフラボノイドについて分離分析を行ない、その有用性を明らかにしている。一般に植物の一個体内に含有されているフラボノイドの種類は限られたものであるが、本法における分離法を用いれば、多くの場合、一度の分析で相互に分離の目的を達することができる。

参考論文はいずれもイオン交換法、吸着法などをはじめ、いろいろな原理に基づく液体クロマトグラフィーによるビタミンやホルモンなど広範囲の生物活性物質の分離に関する基礎的研究であって、特にその二に報告された方法は現在、この分野における権威ある核酸分析法を提供したものであり、また、その五は主論文において用いられた方法によりイヌマキ抽出エキスから数多くの新しい昆虫変態ホルモンが発見され、その分離精製が行なわれたものである。

要するに、申請者堀正剛は構造の複雑なしかも分析の困難なステロイドおよびフラボノイドの分析に成功し、特にそれらの生物活性の基礎研究までも行ない、数々の興味ある貴重な知見をこの分野に加え、こ

の研究領域の発展に寄与するところが少なくない。また、主論文、参考論文を通じて申請者が天然物有機化学および生物化学に豊富な知識と優れた研究能力とをを持っていることを認めることができる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。