

# 全血及び組織ホモジネート試料の直接注入 による薬物の HPLC 分析法

玉井 元, 今井日出夫

(生物薬学科, 薬品分析化学教室)

## High Performance Liquid Chromatographic Determination of Drugs by Direct Injection of Whole Blood and Tissue Homogenate Samples

Gen TAMAI, Hideo IMAI

### [初めに]

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は, その分離の高効率性ととも、分析目的物質が移動相にさえ溶解すれば分析対象となること、即ちガスクロマトグラフィーでは扱いにくい蛋白質、塩類等の物質も直接分析対象となるという特徴を持っている。従来の HPLC による生体試料中の薬物、あるいは生体成分の分析には、カラム性能の劣化を防ぐため、又妨害成分を除去するため、1) 溶媒抽出、2) 吸着剤を使う濃縮捕集、3) 変性沈澱剤による除蛋白等の前処理が行われてきた。これらの操作はもっぱら用手法により行われるため、繁雑である上に分析データの再現性及び目的成分の回収率が変動しがちである。

血しょう (血清) 試料のカラムへの直接注入は、血しょう蛋白質のカラム充填剤への非可逆的吸着、更に変性沈澱によるカラム内での目詰まりによりカラム性能を劣化させると考えられていた。それにもかかわらず1980年頃、前処理カラムへの血しょう試料の直接注入による薬物の HPLC 分析が報告された<sup>1,2</sup>。最近では、血しょう試料を直接プレカラムに導入し共存する蛋白質の影響を巧みに避けて除蛋白する方法が発展している。これには、

- 1) ゲルろ過用樹脂による単純な分子ふるい効果を利用する方法<sup>3</sup>,
- 2) 蛋白質と相互作用をする樹脂による方法<sup>4,5</sup>,
- 3) 蛋白質コート ODS カラム<sup>6-9</sup>, ピンカートンのカラム<sup>10,11</sup>, 等多孔性の逆相系充填剤を用いる分子ふるい効果を利用する方法等がカラム充填剤の特性の違いにより区分される。更に、これらの方法は蛋白質除去のためのプレカラム及び分析目的物質分離用の分析カラムを用いてカラムスイッチングと溶媒切替え操作を自動化するに至っている<sup>12-14</sup>。労力が軽減さ

れるという事のみでなく前処理条件が一定となるため再現性及び回収率が安定する。又、前処理カラムにおける高い抽出段数により試料中分析対象の合計総量（遊離型+蛋白質結合同型）が100%回収率で測定されるという特徴を持っている。

筆者らは1986年福山大学薬学部年報で血しょう、血清試料中の薬物分析法について解説した<sup>15</sup>。以後、その方法は血球等有形成分を含む試料の直接注入法へと発展し、全血、組織ホモジネート試料をそのままHPLC分析できるに至っている。本総説では有形成分を含む試料を分析するための前処理カラムの作成とその利用法、及びいくつかの薬物分析への応用例を解説する。

## 1. 全血試料の分析

全血中で薬物は、血しょう中の遊離型、血しょう蛋白質との結合同型、そして血球膜を含めて血球中へ取込まれた成分と大きく3つの分画に存在し、夫々の分画間で平衡を保っている。一般的に血しょう中の遊離型のみが全血中から組織に移行して作用部位に到達するが、その平衡の移動によって遊離型は血しょう蛋白質との結合同型から、あるいは血球中から補給されるため、全血中の存在量を測定する事の薬物動態上の意義は大きい。

HPLCを用いる全血試料の分析は一般に溶血後、除蛋白、溶媒抽出などの前処理を必要とする。溶血により生成する血球膜破砕片に吸着した薬物の回収は困難であり、通常のHPLCカラムへ直接注入すると即座にカラムフィルターが目詰まりするため薬物の分析は不可能となる。そこで筆者らは全血試料の前処理カラムへの直接注入と分析カラムへのカラムスイッチングを自動化した薬物分析法の開発を試みた。

### 1-1 全血試料の直接注入に用いられる前処理カラム

全血中薬物の試料直接注入HPLC分析において、

- 1) 有形成分（赤血球、白血球は共に10~20 $\mu$ m、血小板は2~4 $\mu$ m）によるカラムの目詰まり（通常のカラムフィルターの孔径は2 $\mu$ mである。）、
- 2) 溶血の方法、
- 3) ヘモグロビンのカラム充填剤への吸着、等の対策を考えなければならない。

図1に前処理カラム（5 cm×4 mm I.D.）の概念図と血液成分の挙動について示した。脂溶性薬物捕捉用前処理カラムに孔径40 $\mu$ mのエンドフィルターを、又それ以上の粒径を持つ逆相系充填剤（Fuji Davison ODS、粒径30~50 $\mu$ m、孔径7 nm）を用いて血しょう蛋白

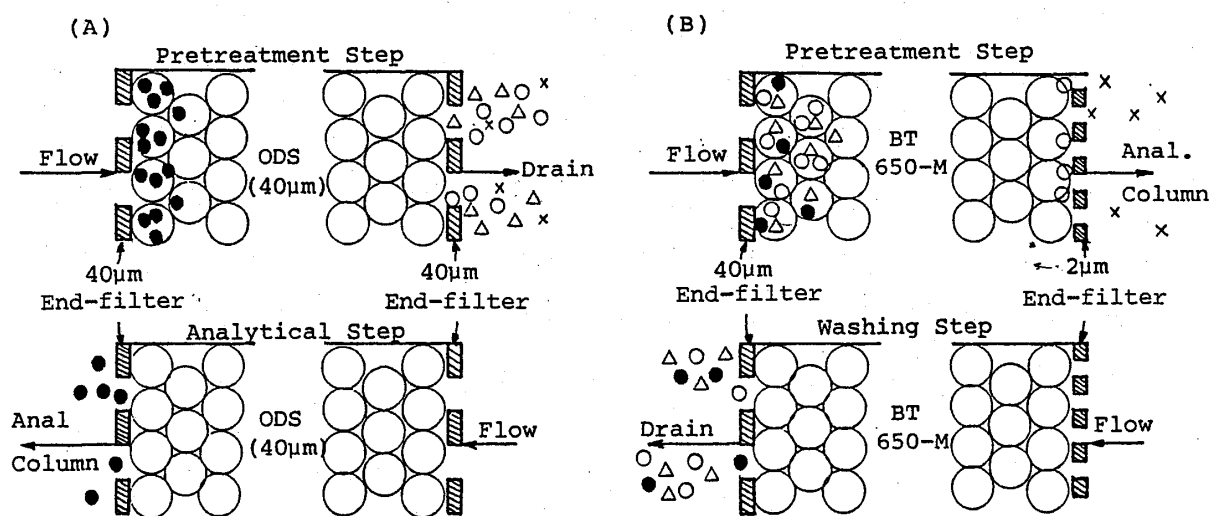


Fig.1 Schematic representation of precolumns for the determination of hydrophobic compounds (A) and hydrophilic compounds (B) in whole blood. Symbols : (●) Hydrophobic compounds ; (△) blood proteins ; (×) hydrophilic compounds ; (○) cytomembranes.

質でゲル外部表面を被覆後(蛋白質コートODS, P-ODS), 前処理条件を検討した。結果として, 蒸留水で前処理カラムを平衡化後全血試料を注入し5~10%アセトニトリルを含む0.1Mりん酸塩水溶液(pH 3.0)でカラムを洗浄する。カラムスイッチングを行い分析対象を前処理カラムから分析カラムへ導入し, 分析カラムで目的成分の分離を行う。前処理カラムは0.5% SDSでバックフラッシュ洗浄, その後メタノールでSDSを洗い流し次の分析に備える。尚, SDSが前処理カラムに残っていると固定化されたイオン対試薬として働くため1分析ごとにメタノールで洗浄する(図1-A)<sup>16</sup>。0.5% SDSは血球膜を瞬時に可溶化する。

蛋白質コートODSカラムは水溶性の高い物質には前処理カラムとして使用出来ない。その理由は水溶性の高い対象物質は蛋白質及び血球膜破砕片等と共に前処理カラムを通過してドレインに破棄されるためである。蛋白質と疎水性相互作用を示す樹脂TSKブチルトヨパール(BT)650-Mに蛋白質を吸着させるのに5~50%飽和硫酸アンモニウムが一般に用いられるが, 筆者らは同じ目的にトリクロロ酢酸(0.05~0.75%), 過塩素酸(PCA, 0.025~0.5%), その他トリフルオロ酢酸, タングステン酸, モリブデン酸等が効果的であることを見出し<sup>17</sup>, これを用いる血清中の水溶性薬物<sup>5</sup>, さらにいくつかの脂溶性薬物<sup>18,19</sup>の自動前処理HPLC分析法を報告した。ここでは, 0.4% PCAを移動相とし入口側に孔径40µmのエ

ソドフィルターを用いて、前処理カラム(充填剤, BT 650-M)に蛋白質を捕捉する。血球破砕膜が分析カラムに入るのを防ぐため前処理カラムの出口側には2  $\mu\text{m}$ のエンドフィルターを用いて、水溶性の高い物質のみを分析カラムに導入するシステムをデザインした(図1-B)<sup>20</sup>。0.4% PCAで平衡化した前処理カラム(BT 650-M, 5 cm $\times$ 4 mm I.D., 0.63 ml wet gel)のウサギ全血試料に対する保持容量は約40  $\mu\text{l}$ であった。この前処理カラムの再生には、水2分間、0.5% SDSを含む0.1 M水酸化ナトリウム水溶液を5分間、そしてメタノールを5分間順番に流して前処理カラムの再生を行った。

### 1-2 全血中薬物のHPLC分析<sup>16,20,21)</sup>

用いた薬物は水溶性の高いリドカイン(LD, 抗不整脈薬), プロカインアミド(PA, 抗不整脈薬)とその活性代謝物であるN-アセチルプロカインアミド(NAPA), 脂溶性の高いカルバマゼピン(CBZ, 抗てんかん薬)及び極めて脂溶性の高いクロルプロマジン(CPZ, 抗精神病薬)である。表1にそれら薬物の特性値を示した<sup>22,23</sup>。

表1. 用いた薬物の特性値

薬物	pKa	治療濃度( $\mu\text{M}$ )	蛋白質結合率(%)	半減期
PA	9.2	17~43	15	2.5~5.0(hr)*
LD	7.9	7.3~30	60~65	13分(静注), 90分(筋注)
CBZ	—	21~42	70~80	24~48(hr)
CPZ	9.3	0.09~1.10	95~98	16~30(hr)

\* rapid acetylatorでは約2.5時間, slow acetylatorでは4.5時間

PA, NAPA, 及びLDはその高い水溶性のため逆相系充填剤(OVS)への濃縮吸着はイオン対試薬を用いない限り出来ないが, 0.4% PCAを移動相に用いる時, スルホン酸型陽イオン交換樹脂に吸着する。図2にPA及びNAPAの全自動分析のためのカラムスイッチングを示した。0.4% PCAで前処理カラム(BT 650-M)とミニカラム(充填剤:ヌクレオシル5 SA, シリカ系陽イオン交換樹脂)を平衡化した後, 血液試料を注入する。蛋白質, 血球膜片, 及び内因性の脂溶性成分を前処理カラムに, PA等の水溶性陽イオン性物質をミニカラムに捕捉し5分後にそれぞれのカラムを切離す。ミニカラムを分析カラム(充填剤:ヌクレオシル5 SA)と逆流モードで接続し分離分析を行う。その間, 前処理カラムは0.5% SDSを含む0.1 M水酸化ナトリウム水溶液, ついでメタノールで洗浄する。この方法は前

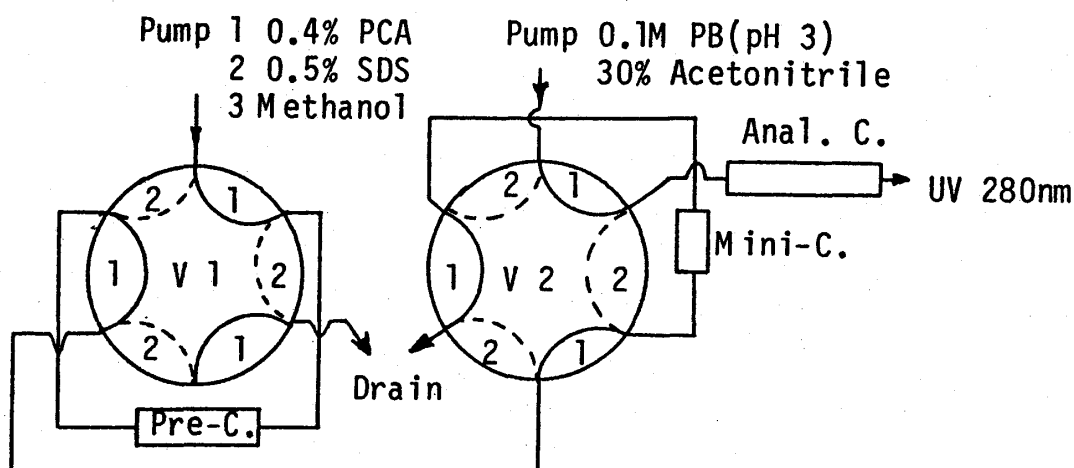


Fig.2 Column switching system for the determination of PA and NAPA in whole blood.

処理溶媒として0.4% PCA (pH 1.6) を使用するのでシリカ系充填剤を用いるとき、その寿命は減少する。しかし、親水性陽イオンを捕集するためのミニカラムを用いるため分析カラムの劣化を避けると共に、ミニカラムからは逆流モードで溶出するので連続使用によるピークの広がりも最小限に止まり、再現性、耐久性ともに優れていた。

CBZの場合、前処理カラム (P-ODS) を蒸留水で平衡後、全血試料50 $\mu$ lをそのまま注入し流路内で溶血させる。3分間、蛋白質、膜破砕片、及び内因性的水溶液成分を溶出破棄した後、10%アセトニトリルを含む0.1Mりん酸塩水溶液で5分間洗浄する。分析カラム (ODS) と前処理カラムを逆流モードで接続し、3分間溶離液を流してCBZを分析カラムに導入する。分析カラム内で分離分析を行っている間、前処理カラムは0.5% SDS、そしてメタノールで洗浄する。

脂溶性の高いCPZの場合、前処理カラムに TSK Gel HW 65-F (粒径30~60 $\mu$ m) を用いる時、好結果が得られた。ポリビニル系樹脂である TSK Gel HW 65-F は樹脂表面に水酸基を持つゲルろ過用の充填剤として用いられるものである。蒸留水で平衡化した前処理カラムに全血試料を注入し溶血させる。3分後、10%アセトニトリルを含む0.1Mりん酸塩緩衝液 (pH 7.0) で残存する内因性妨害成分を5分間で溶出する。次に前処理カラムと分析カラムを逆流モードで接続し吸着しているCPZを溶離液を用いて導入する。3分間接続後、2本のカラムを切離す。分析カラムで分離分析を行っている間、前処理カラムは0.5% SDS、そしてメタノールで洗浄、再生を行う。

表2. カラムスイッチングHPLC分析法

薬物	PA	LD	CBZ	CPZ
前処理カラム いずれも (5cm×4mm I.D.)	BT 650-M	BT 650-M	P-ODS	TSK HW-65 F
前処理移動相	0.4% PCA	0.4% PCA	Water → 0.1M PB(pH3)+10%MeCN	Water → 0.1M PB(pH3)+MeCN
ミニカラム いずれも (1cm×4mm I.D.)	Nucleosil 5SA	Nucleosil 5SA	なし	なし
分析カラム	Nucleosil 5SA (粒径 5 μm) (5cm×4mm I.D.)	Nucleosil 5SA (粒径 5 μm) (5cm×4mm I.D.)	TSK Gel ODS 120T (粒径 5 μm) (8cm×4mm I.D.)	TSK Gel ODS 120T (粒径 5 μm) (5cm×4mm I.D.)
分析カラム温度	37℃	40℃	45℃	45℃
溶離液	0.1M PB*(pH 3) +30% MeCN	0.1M PB(pH 3) +15% MeCN	0.1M PB*(pH 3) +25% MeCN	0.2M CB*(pH 4) +28% MeCN
検出	UV 280nm	UV 220nm	UV 285nm	UV 254nm
試料注入量 (μl)	10	10	50	200

\* PB=りん酸塩水溶液, CB=くえん酸塩緩衝液

表3. 添加試料からの薬物回収率と日内変動係数

	薬物	回収率(%)	日内変動係数(CV)%
血しょう	PA	101.1	1.1 (n=10)
	NAPA	100.1	1.9 (n=10)
	LD	98.2	2.6 (n=8)
	CBZ	104.9	1.0 (n=10)
	CPZ	101.1	3.4 (n=10)
全血	PA	102.7	2.7 (n=20)
	NAPA	102.6	3.8 (n=20)
	LD	103.7	1.5 (n=11)
	CBZ	100.3	1.9 (n=10)
	CPZ	103.3	3.4 (n=10)

分析法を表2に、得られたクロマトグラムを図3に、その分析結果を表3に纏めて示した。  
前処理カラムに大孔径のエンドフィルターを用いることにより100回程度、全血試料の分析

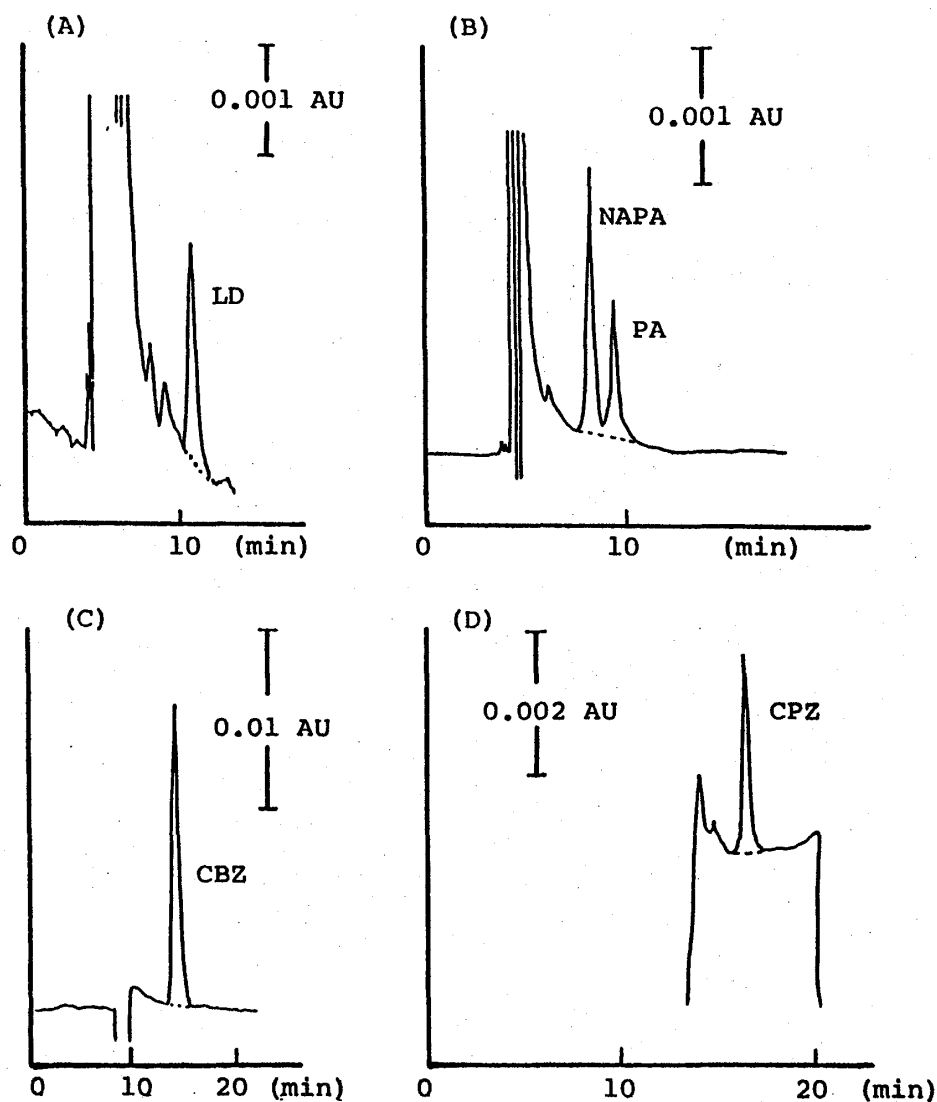


Fig.3 Chromatograms obtained by the present method.

- (A) Rabbit whole blood spiked with 10  $\mu$ M LD, 10  $\mu$ l injection.
- (B) Rabbit whole blood spiked with 10  $\mu$ M PA and NAPA, 10  $\mu$ l injection.
- (C) Rabbit whole blood spiked with 30  $\mu$ M CBZ, 20  $\mu$ l injection.
- (D) Rabbit whole blood spiked with 0.5  $\mu$ M CPZ, 200  $\mu$ l injection.

を可能としたが、連続分析による前処理カラムの圧力上昇は避けられなかった。この時、前処理カラムの入口側のエンドフィルターを取外し、0.5% SDSを含む0.1M水酸化ナトリウム水溶液中で超音波洗浄することにより元の状態に戻った。本法の特徴はいわゆる固相抽出による前処理法であり、原則として試料中の総量を定量する。CPZのように高い蛋白結合率を示す薬物も前処理カラム内での平衡移動によりすべて遊離型への移行を示し全血中の総量定量が可能であることがわかった。又、全血中での検量線は治療濃度範囲内ですべての場合も原点を通る直線を示し、CPZの場合では少なくとも500  $\mu$ lまでは注入量とピーク高さに比

例関係があった。

### 1-3 全血中の薬物分布測定への応用<sup>24</sup>

薬物を全血に添加すると全血各フラクションへの分布がおこる。インキュベートした後の血しょう濃度を測定したところ、いずれの薬物も約10分程度ではほぼ一定の血しょう濃度が得られていた。PAの場合、赤血球内酵素N-アセチルトランスフェラーゼの作用によりNAPAを生成する<sup>25</sup>。この代謝反応は1時間以上のインキュベーションで顕著に現われ、24時間後には10 $\mu$ Mに添加したPAの約40%が代謝された。PA, NAPA, LD, CBZ, CPZをウサギ全血に添加し10分間インキュベート後、以下の方法で、それらの分布状態を検討した。

血しょう中の遊離型を簡単に測定するのに加圧型限外ろ過器があるが、この方法では初流は限外ろ過膜への薬物吸着があり、又ろ過の進行とともに残液中の蛋白質濃度が増加するため得られる値の信頼性は低いと思われる。一般に用いられる平衡透析法では透析膜、透析セル等への薬物の吸着があるためコントロールにより補正を行うが、透析液を用いることによる蛋白質結合型と遊離型との“平衡のずれ”を考慮に入れなければならない。図4にLDをモデルに血しょうと生理食塩水の容量比に対する、透析物濃度の関係を示した<sup>26</sup>。この図に

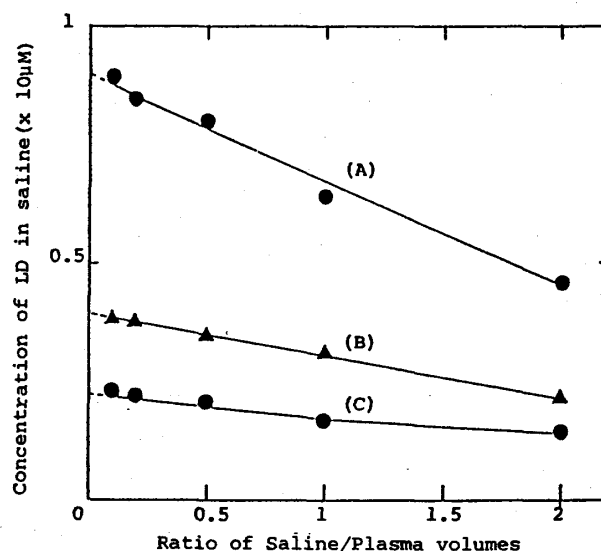


Fig.4 Estimate of free concentration in plasma sample.

Equilibrium dialysis; 5ml capacity dialysis cell was used at 25 $^{\circ}$ C with a cellulose membrane (cut-off M.W. 8000~12000). Plasma samples of 2ml were dialyzed with 4ml, 2ml, 1ml, 0.4ml, 0.2ml saline for 5 hr.

(A) plasma samples spiked with 20 $\mu$ M LD.

(B) plasma samples spiked with 10 $\mu$ M LD.

(C) plasma samples spiked with 5 $\mu$ M LD.



において、実際の遊離型濃度は生理食塩水の容量が0の時、即ちその容量比を0に外挿した値であると考えられる。一方、薬物の血球膜への吸着型は血液細胞をホモジナイザーにより粉碎し [マイクロホモジナイザー (容量, 約0.5ml) により30分間ホモジナイズする。], 10000×gで30分間遠心分離した上清を分析することにより求めた (血球膜破碎片の容量は10v/v%であった。尚, ウサギ全血のヘマトクリット値は34%であった。

$$\text{血しょう内 (\%)} = (\text{血しょう濃度} \times 0.66 / \text{全血濃度}) \times 100$$

$$\text{血球内 (\%)} = 100 - \text{血しょう内 (\%)}$$

$$\text{遊離型 (\%)} = (\text{遊離型濃度} / \text{血しょう濃度}) \times 100$$

$$\text{蛋白結合型 (\%)} = \text{血しょう (\%)} - \text{遊離型 (\%)}$$

$$\text{血球膜吸着型 (\%)} = [(\text{全血濃度} - \text{全血ホモジナイズ上清} \times 0.9) / \text{全血濃度}] \times 100$$

$$\text{血球内移行型 (\%)} = \text{血球内 (\%)} - \text{血球膜吸着型 (\%)}$$

Chart 1. 薬物の全血内分布計算法

ウサギに塩酸PA (10mg/kg, 静脈注射), 塩酸LD (20mg/kg, 静脈注射), CBZ (12mg/kg, 経口投与), CPZ (12mg/kg, 静脈注射) を投与し, それらの治療濃度範囲内での分布測定を試みた (投与実験)。纏めた結果を表4に示す。LD, NAPA, CBZ及びCPZについては添加実験と投与実験ではほぼ同様の結果が得られているが, PAにおける分布状態

表4. ウサギ全血中での薬物分布測定

薬物		遊離型 (%)	蛋白結合型 (%)	血球内移行型 (%)	血球膜吸着型 (%)
LD	添加実験	33	34	33	0
	投与実験	27	40	33	0
PA	添加実験	53	7	40	0
	投与実験	86	7	7	0
NAPA	添加実験	42	14	44	0
	投与実験	40	10	50	0
CBZ	添加実験	19	43	30	8
	投与実験	19	43	30	8
CPZ	添加実験	2	34	25	39
	投与実験*	65		35	

いずれのデータもそれぞれの薬物の治療濃度内でのものである。用いたウサギ血液ヘマトクリット値は34%である。

\* CPZの投与実験では平衡透析, ホモジネーションも行わなかったため血しょう内%と血球内%のみのデータである。

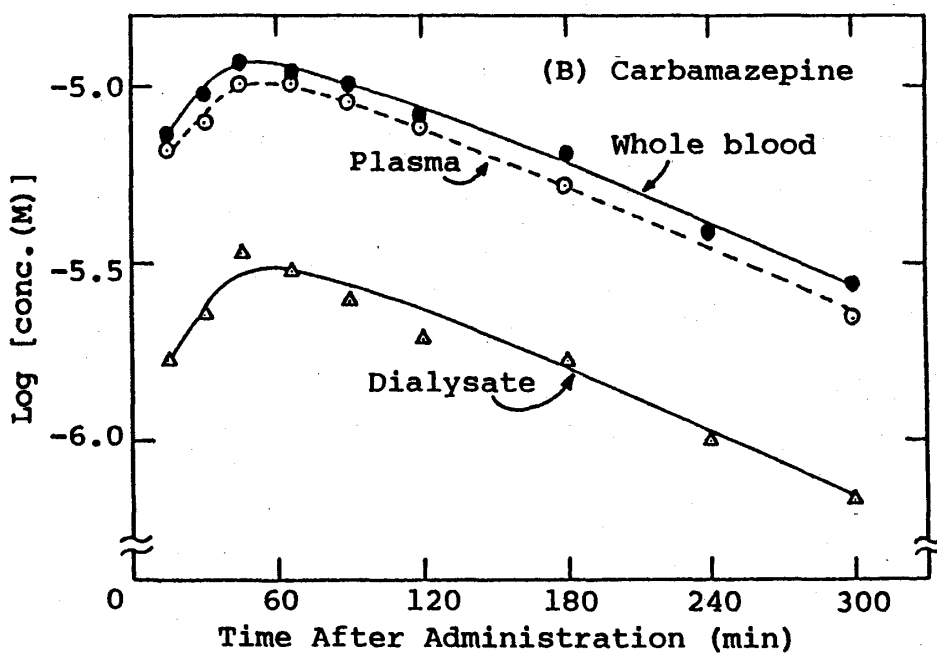
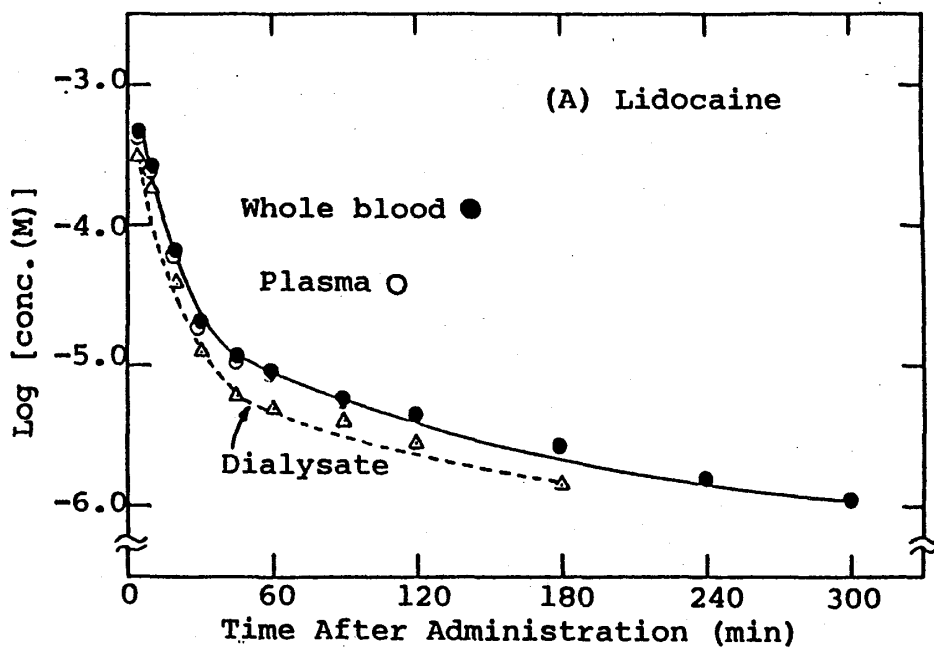


Fig.5 Drug concentrations in rabbit blood fractions (A) after intravenous administration of LD (20mg/kg) and (B) after oral administration of CBZ (12mg/kg).

の大きな違いは血球内酵素N-アセチルトランスフェラーゼ活性の差によるものと考えられた。

図5に薬物投与後の経時変化に対するLDとCBZの全血中、血しょう中、及び血しょう中の遊離型濃度の関係を示した<sup>27</sup>。薬物はそれぞれの試料中ではほぼ同様の挙動を示している。市販の透析ブロック（容量1ml）に透析膜（蛋白質の分画分子量は8千から1万2千）を介して、一方に薬物を添加した全血試料、もう一方には生理食塩水を流速10ml/分で常時流し、振とうしながらフロースルー透析を行った。いずれの薬物も時間の経過とともに透析され、24時間後には殆ど全て全血試料から透析され消失していた。薬物は血しょう中の遊離型、血しょう蛋白質との結合型、血球内への取込まれ型と分布しているが、全ての薬物が遊離型を経由して透析された。このことは、全血各フラクションに分布している薬物の平衡はすみやかに移動できることを示しており、一般に薬物の有効血中濃度は血しょう中の遊離型濃度であると考えられているが、実際に利用できる薬物量は血中の総量であることを示すものである。

## 2. 組織ホモジネート試料の分析<sup>28</sup>

生体内に入った薬物は血液を通じて全身に分布する。その薬効は、一般に血しょう濃度、又は遊離型濃度を測定して評価されているが直接的には組織中濃度が問題である。近年研究の進んでいる“ドラッグデリバリーシステム”による薬物投与方法では薬物はターゲット組織に特異的に輸送されるので、直接組織濃度を測定する必要がある。

以下の内容は組織のホモジネート試料を前処理カラムに直接注入し分析カラムへスイッチして組織各部位に分布した様々な状態にある薬物のHPLC分析を試みたものである。

### 2-1 前処理カラムによる組織ホモジネートの処理法

一般に固体試料である組織をHPLC分析するには、ホモジネートの後、目的成分の有機溶媒抽出又は変性沈澱剤による除蛋白などの用手法による前処理が必要となるが、抽出効率が100%に達しないことや、蛋白質との共沈によって蛋白質、その他の内因性成分と結合した薬物を完全に回収することは困難な場合が多い。表5に蛋白質変性沈澱後の上清の分析から求めた薬物の共沈率を示す。変性沈澱剤によっては薬物の共同沈澱が起こり薬物の定量的な回収は望めないことがわかる。

表5. 組織ホモジネート試料中の蛋白質変性沈澱に伴う薬物の共沈率

試料	0.4M PCA	5% TCA	60% アセトニトリル
肝中のPA	2.4	1.0	4.3
肝中のNAPA	5.2	13.9	7.8
腎中のPL	14.5	53.7	0

そこで前章の全血の場合と同様に前処理カラムによる固相抽出法の検討を行った。肝、及び腎組織試料はマウスより採取し、常法により100mg組織/ml生食をポッター型ホモジナイザーで氷冷下ホモジネートした。前処理カラム（5 cm×4 mm I.D.）に孔径40~70 $\mu$ mのエンドフィルターを用いてその組織ホモジネート試料を注入したところ、数回の試料注入（100 $\mu$ l）でカラム圧は50kg/cm<sup>2</sup>以上となった。そこで粗大粒子を除くため次のような試みを行った。試料注入器の後にラインフィルターを置き、HPLC内で組織ホモジネート試料中の粗大粒子をろ過した。ラインフィルターには通常のろ紙を装填し、圧力が上昇するようになると取替える必要がある。この時、ポンプの作動を妨害しないためバイパス流路が設けられている。この方法では粗大粒子に含まれる薬物の回収が問題になると考えられたが、薬物はフィルター上で移動相流液によって連続的に抽出され、脂溶性の高い薬物も短時間内に定量的に回収されて前処理カラムに送りこまれていることがわかった。前処理カラムの入口のエンドフィルターは、組織細片や細胞膜の破砕片が流入できるよう孔径40~70 $\mu$ mのものを用いた。水溶性の高い薬物を分析対象とするとき、前処理カラムの充填剤には蛋白質と疎水性相互作用を示すBT 650-Mを用い、膜破砕片が次の分析カラムに入らぬよう孔径2 $\mu$ mの出口フィルターを用いた。この前処理カラムの肝ホモジネートに対する保持容量は、約70 $\mu$ l（0.63 ml wet gel）であった。

一方、脂溶性の高い薬物を分析対象とするとき、薬物は蛋白質コートODSシリカ充填剤へ吸着されるが、蛋白質、細胞細片をそのまま流出棄却するため入口、出口ともに孔径40~70 $\mu$ mの出口エンドフィルターを用いた。前処理カラムの洗浄は毎回操作後に必要でBT 650-Mには、初めに0.5% SDSを含む0.1 M水酸化ナトリウムを、次いでメタノールを洗浄液として用いた。蛋白質コートODSシリカの洗浄には初めに0.5% SDSを、次に水とメタノールを用いた。

## 2-2 組織ホモジネート試料中薬物のHPLC分析

分析対象とした薬物は、水溶性の高い5-フルオロウラシル (5-FU, 抗ガン剤), PAとその活性代謝物であるNAPA, 比較的脂溶性の高いメソトレキセート (MTX, 抗ガン剤), 及びプロプラノロール (PL, 抗不整脈薬) である。それら薬物の特性値を表6に示す。

前述の前処理カラムを用いるカラムスイッチング法による組織ホモジネート中の薬物分析法を表7に纏めた。

肝ホモジネート試料中の5-FUを分析する場合, まず前処理カラム, ミニカラム及び分析カラムを直列に接続し0.4% PCAで平衡化する。肝ホモジネート試料を注入して3分後, 5-FUは前処理カラム, ミニカラムを通過して完全に分析カラムに導入される。次に, 前処理カラムとミニカラムを外し, 分析カラムのみに溶離液を導入する。分析カラム内で5-FUの分離分析を行っている間, 前処理カラムとミニカラムは逆流モードで0.5% SDSを含む0.1

表6. 用いた各薬物の特性

薬物	5-FU	MTX	PL
pKa	8.0、13.0	3.8、4.8、5.6	9.5
蛋白結合率(%)	—	65-94	90-96
分布	腎、肝	胸くう、腹くう	全組織
治療濃度(μM)	380*	0.11**	0.19~0.39
半減期	10~20分	—	2.3hr

\* 15mg/kgを投与した時の最高血中濃度

\*\* 投与後72時間後の危険状態の濃度

表7. 組織ホモジネート試料のカラムスイッチング分析法

薬物	5-FU	MTX	PL
前処理カラム	BT 650-M	P-ODS*	BT 650-M
前処理移動相	0.4% PCA	いずれも(5cm×4mm I.D.) 0.1M PB(pH 3)	0.1M NaOH→ 0.1M PB(pH 7)+5%MeCN
分析カラム	TSK SCX(5μm)** (20cm×4mm I.D.)	TSK ODS 120T(5μm) (5cm×4mm I.D.)	TSK ODS 120T(5μm) (5cm×4mm I.D.)
分析カラム温度	室温	30℃	35℃
溶離液	0.4% PCA	0.1M PB(pH 7)+6% MeCN	0.1M CB(pH 4)+25% MeCN
検出	UV 265nm	UV 305nm	自己ケイ光 λ ex297nm、λ em347nm
試料注入量 (μl)	10	50	50

\* 前処理カラムの前にHW 65Fを充填したガードカラム(1cm×4mm I.D.)を接続して用いた。

\*\* 分析カラムの前に同じ充填剤TSK SCXのガードカラム(1cm×4mm I.D.)を接続して用いた。

M水酸化ナトリウムを5分間、メタノールを5分間流し洗浄、再生する。分析カラムの前にそれと同じポーラスポリマー系の陽イオン交換樹脂を充填したガードカラムを用いると分析カラムを保護することが出来る。

組織ホモジネート中のMTXを分析する場合、まずミニカラムと前処理カラムを接続し0.1 M PB (pH 3.0) で平衡化する。MTXはミニカラムを素通りし、次の前処理カラムに捕捉される。試料を注入して3分後、前処理カラムを分析カラムと接続し逆流モードで溶離液を導入する。分離分析を行っている間、妨害性の内因性成分を吸着したミニカラムは0.5% SDSを5分間、水を3分間、そしてメタノールを5分間流し洗浄、再生する。

組織ホモジネート中のPL (pKa 9.5) を分析する場合、0.1M水酸化ナトリウムを前処理溶媒に用いる時、PLは前処理カラムに吸着される。組織ホモジネート試料中の殆どの有形成分はアルカリにより溶解され蛋白質、水溶性成分等は溶出破棄される。3分後、用いたアルカリを分析カラムに入れなため、5%アセトニトリルを含む0.1M PB (pH 7.0) で5分間前処理カラムを洗浄する。次に前処理カラムと分析カラムを逆流モードで接続し、溶離液を導入して分離分析を行う。分析を行っている間、前処理カラムは上述と同様の方法で、洗浄再生する。

以上のカラムスイッチング法により得られたクロマトグラムを図6に、そしてその分析結

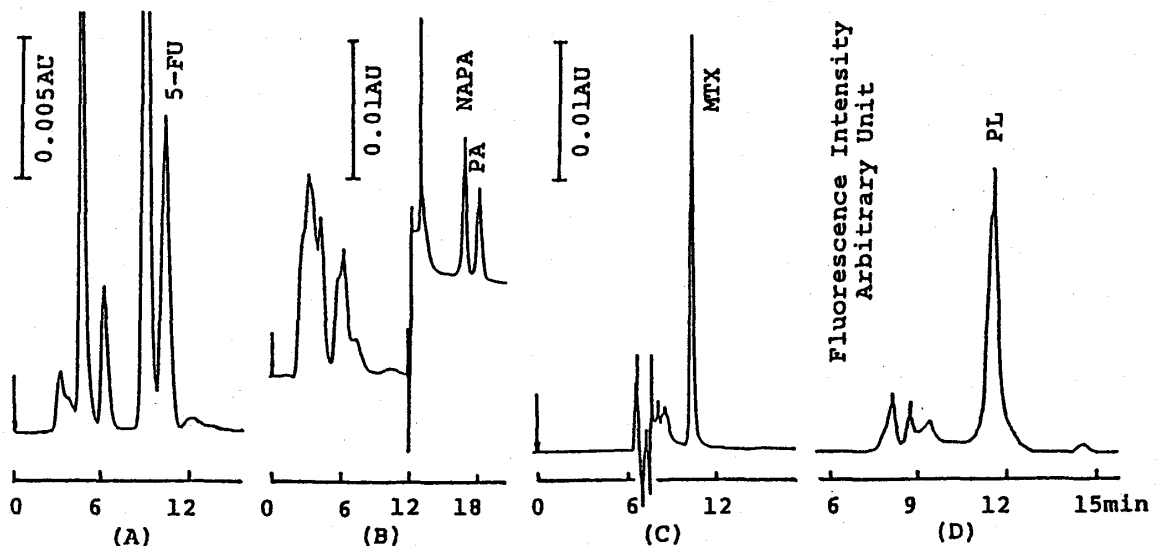


Fig.6 Elution profiles of tissue homogenate samples.

- (A) mouse liver homgenate spiked with 100 $\mu$ M 5-FU, 10 $\mu$ l injection.
- (B) mouse liver homgenate spiked with 20 $\mu$ M PA and NAPA, 20 $\mu$ l injection.
- (C) mouse liver homgenate spiked with 10 $\mu$ M MTX, 50 $\mu$ l injection.
- (D) mouse liver homgenate spiked with 0.2 $\mu$ M PL, 50 $\mu$ l injection.

果を表8に示した。5-FUでは内因性成分の妨害があり肝試料ではその影響は小さく無視できるものであったが、腎試料では検出波長を変えてもその影響は避けられなかった。

生体組織ホモジネートをそのまま前処理カラムに注入し、分析カラムにスイッチすることにより組織ホモジネート中の薬物分析が可能であることがわかった。又、結果は良好でいずれの薬物も再現性よく、かつ目的成分を全血同様に100%の回収率で定量できた。

表8. 組織ホモジネート中の薬物の分析結果

試料	回収率(%)	日内変動係数(CV)%
5-FU/肝	101	2.1(n=10)
/腎	内因性成分に大きく妨害される	
PA/肝、腎	100.6	1.4(n= 5)
NAPA/肝、腎	101.6	1.0(n= 5)
MTX /肝、腎	99.1	2.6(n=10)
PL/肝、腎	102.4	2.4(n=10)

それぞれのデータは血中治療濃度内においてマウス組織ホモジネートに添加したものである。

### 2-3 組織ホモジネート遠心画分中の薬物定量への応用

薬物がどの生体組織にどのようにどのような形態で分布しているかを知ることは医学的にも又薬理学的にも重要であると考えられる。この組織ホモジネート試料の直接注入分析法の応用例として、組織ホモジネート遠心画分中の薬物分布測定を試みた。

DDY系マウスにPL (2  $\mu\text{g/g}$  wt マウス) を経口投与し、一定時間後に脱血し、肝、腎組織を採取した。得られた肝及び腎試料100mg 当り 1 ml の0.25M しょ糖溶液を加えてホモジナイズし、それを遠心分離した。細胞核画分は1000 $\times$ g 10分で、ミトコンドリア画分は10000 $\times$ g 30分、ミクロソーム画分は100000 $\times$ g 約60分内に沈降平衡にする。得られた結果を表9に示す。

この方法では(未遠心分-1000 $\times$ g)の値が細胞核画分に、(1000 $\times$ g-10000 $\times$ g)の値がミトコンドリア画分に、(10000 $\times$ g-100000 $\times$ g)の値がミクロソーム画分に帰せられると考えられる。

### [終りに]

近年、血しょう又は血清試料の直接注入分析法に関しては多くの報告がなされているが、

表9. 組織ホモジネート遠心画分中PLの分布

投与後の時間 (hr)	ホモジネート	濃度(nM)		
		( $10^3 \times g$ , 10分)	( $10^4 \times g$ , 30分)	( $10^5 \times g$ , 60分)
肝臓				
0.5	610	390	130	89
1.5	440	300	130	100
3.0	71	44	18	11
腎臓				
0.5	170	93	44	31
1.5	51	24	13	9
3.0	40	22	13	11

経口投与 ( $2 \mu g$  PL/g wt DDY マウス)

データは  $n = 2$  の平均値

細胞も含めた全血試料及び組織ホモジネート試料の直接注入に関しては未だ例を見ず、筆者らの報告が最初である。有形細胞を含んだ生体試料を前処理なくそのまま分析でき、しかも分析対象物質の総量を定量できることは薬物動態、バイオアベイラビリテイの研究、又薬理学的研究の上で重要であると考えられる。

#### [参考文献]

- (1) C.E.Werkhoven-Goeure, U. A. Th. Brinkman and R. W. Frei, *Anal. Chem.*, **53**, 2072 (1981).
- (2) W. Roth, K. Beschke, R. Jauch, A. Zimmer and F. W. Koss, *J. Chromatogr.*, **222**, 13 (1981).
- (3) H. Takahagi, K. Inoue and M. Horiguchi, *J. Chromatogr.*, **352**, 369 (1986).
- (4) H. Murakami, M. Hayashi, H. Mikami and Y. Ishida, *Bunseki Kagaku*, **35**, 236 (1986).
- (5) G. Tamai, H. Yoshida and H. Imai, *Chromatographia*, **21**, 519 (1986).
- (6) H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2287 (1982).
- (7) H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3287 (1982).
- (8) H. Yoshida, I. Morita, G. Tamai, T. Masujima, T. Tsuru, N. Takai and H.



- Imai, *Chromatographia*, **19**, 466 (1984).
- (9) G. Tamai, I. Morita, T. Masujima, H. Yoshida and H. Imai, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1825 (1984).
- (10) I. H. Hagestam and T. C. Pinkerton, *Anal. Chem.*, **57**, 1757 (1985).
- (11) T. Nakagawa, A. Shibukawa, N. Shimono, T. Kawashima, H. Tanaka and J. Haginaka, *J. Chromatogr.*, **420**, 297 (1987).
- (12) R. A. Hux, H. Y. Mohammed and F. F. Catwell, *Anal. Chem.*, **54**, 113 (1982).
- (13) A. Nazareth, L. Jaramillo, B. L. Karger, R. W. Giese and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **309**, 357 (1984).
- (14) D. Dadger and A. Power, *J. Chromatogr.*, **416**, 99 (1987).
- (15) 今井日出夫, 桜幸子, 玉井元, “臨床薬物モニタリング(TDM)”, 福山大学薬学部研究年報, 第4号, p1~17. (1986).
- (16) G. Tamai, H. Yoshida and H. Imai, *J. Chromatogr.*, **423**, 147 (1987).
- (17) H. Imai, G. Tamai and S. Sakura, *J. Chromatogr.*, **371**, 29 (1986).
- (18) 玉井元, 吉田久信, 今井日出夫, *分析化学*, **35**, 335 (1986).
- (19) G. Tamai, H. Yoshida and H. Imai, *Anal. Sci.*, **2**, 481 (1986).
- (20) G. Tamai, H. Yoshida and H. Imai, *J. Chromatogr.*, **423**, 155 (1987).
- (21) G. Tamai, H. Yoshida and H. Imai, *J. Chromatogr.*, **423**, 163 (1987).
- (22) W. Sadee and G. C. M. Beelen, “Drug Level Monitoring”, A Wiley-Intersci. Publ., New York, (1980).
- 斎藤正行, 田村善蔵監訳 “ドラッグレベルモニタリング”, 広川書店 (1982), 東京, pp. 357.
- (23) 神代昭, 西岡幹夫編 “臨床薬物ハンドブック”, 医歯薬出版株式会社 (1986), 東京, pp 612.
- (24) a) 玉井元, 今井日出夫, 第8回生体成分の分析化学シンポジウム (63年9月, 東京), 講演要旨集 p 129~132 (1988).
- b) G. Tamai and H. Imai, *J. Pharm-bio. Dyn.*, **12**, S-18 (1989).
- (25) J. Dreyfuss, J. T. Bigger, Jr., A. I. Cohen and E. C. Schreiber, *Clin Pharmacol. Ther.*, **13**, 366 (1972).
- (26) 今井日出夫, 玉井元, 吉田稔, 未発表データ.

- (27) 今井日出夫, 玉井元, 吉田稔, 米田幸憲, 投稿準備中.
- (28) a) 今井日出夫, 玉井元, 第8回生体成分の分析化学シンポジウム (63年9月, 東京), 講演  
要旨集 p 133~136 (1988).
- b) H. Imai and G. Tamai, *J. Pharm-bio. Dyn.*, **12**, S-19 (1989).
- c) H. Imai and G. Tamai, *Biomedical Chromatography*, in press (1989).