



Title	医薬品分析における高速液体クロマトグラフィー—電気化学検出法の応用に関する研究
Author(s)	上野, 恭嗣
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37868
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	上野 恭嗣
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 10070 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	医薬品分析における高速液体クロマトグラフィー—電気化学検出法の応用に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 富田 研一 (副査) 教授 今西 武 教授 岩田 宙造 教授 北川 勲

論文内容の要旨

1969年、Kirkland のペリキュラー型（表面多孔性ガラス微粒子）高性能充填剤の開発に始まった高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、現在、分離分析法の中核をなしていると言える。そして、HPLC により分離された各成分を検出するために、種々の検出器が分析対象、目的に応じて用いられている。これらの検出器の中で電気化学検出器（ECD）は、1973年、Kissinger らが、カテコールアミンの高感度分析に成功して以来、広く用いられるようになっている。

電気化学検出法（EC）は、電気化学的に活性な物質が電極表面上で酸化あるいは還元され、その際に電極間に流れる電流を測定するものである。HPLC の検出法としては紫外検出法（UV）が汎用されているが、ほとんどの有機化合物が紫外吸収を示すため、選択性に乏しいという欠点がある。EC はその検出原理に基づき、固有の酸化還元電位をもつ電気化学的活性物質のみに応答するので、はるかに高い選択性を示す。また、その検出感度も、例えばカテコールアミン類では UV に比較して、100—1000倍程度高い感度を示す。そして、現在では EC による分析対象もカテコールアミン類をはじめとした電気化学的活性物質にとどまらず、本来、電気化学的に酸化あるいは還元されないものも誘導化試薬の開発により検出可能になるなど、その応用範囲は増加している。

一方、医薬品の開発は、日々展開の見られる生命現象の解明とともにその速度を上げている。それに伴い、医薬品の有効性と安全性評価を的確かつ確実に行うことが、ますます重要となっている。これらの評価を行う上で、医薬品及びその代謝物に対する分析法は、より微量な分野へ対応させるべく、高感度、高選択性を有するものが要求されるようになっている。EC はその高感度性、高選択性により、これらの要求を満たす有用な分析手段の一つであると考えられる。

そこで、その EC の適用範囲拡大、生体試料中の生体関連物質や医薬品及び代謝物に対する高感度定量法への適用などを指向した応用研究を行うことは、医薬品の開発に対してだけではなく、それを通じて薬学、医学などの生命科学の発展に貢献し得ると考えられ、その意義は大きいであろう。以上のような観点から HPLC-EC (LCEC) の高感度性、高選択性の特性を生かした医薬品ならびに代謝物の微量分析法の確立を指向した応用研究を行った。

一般の医薬品においては、電気化学的に不活性な場合も多い。そのような医薬品や代謝物の分析に、感度及び選択性にすぐれた LCEC を適用するためには、その誘導化が必要とされる。この観点から、まず初めに、近年その重要性が高まっているステロイド系化合物の一部や、プロスタグランジン系化合物の大部分に含まれ、かつ本来電気化学的に不活性なカルボニル化合物について LCEC に適した誘導化試薬の開発を計画した。これまでにカルボニル化合物の LCEC 誘導化試薬としては 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン及び 4-ニトロフェニルヒドラジンが報告されているが、さらに有用な誘導化試薬の探索を目的として 11 種のヒドラジン誘導体について種々検討を行った。その結果、2,5-ジヒドロキシベンゾヒドラジド (2,5-DHBH) が従来の試薬に比べて、非常に低い電位で検出できることより、感度及び選択性に優れた有用な試薬であることを見出した。

次に、2,5-DHBH の生体試料分析における応用性について、構造中にカルボニル基を有し、かつ薬理学的にも注目すべき抗アンドロゲン作用、抗腫瘍作用をもつアントラステロイド誘導体 S-605 [3a β , 6-dimethyl-2, 3, 3a, 4, 5, 8, 9, 10, 10a β , 11, 11a β , 11b α -dodecahydro-1 H-cyclopenta [a] anthracene-3,8-dione] 及び 436 (S-605 の 3 β -hydroxy- 体) を対象に選び検討を行った。その結果、S-605 及び 436 について 2,5-DHBH を用いたプレカラム誘導化-カラムスイッチング LCEC によるヒト血中濃度高感度同時定量法を確立した (定量範囲: 2 - 200 ng/ml, 検出限界: S-605, 0.5 ng/ml ; 436, 1 ng/ml)。

次に、LCEC の応用研究として、医薬品分析における直接定量法の有用性の検討及び応用性の拡張も重要であると考えた。そこで、電気化学的に活性な官能基を有する化合物の中で、薬理学的に重要なカルシウム遮断作用を示し、かつその基礎的な薬動学的研究を行うにあたり高感度定量法の設定が必要不可欠な 2 種の新規双環系ジヒドロピリジン誘導体を対象として選び、LCEC 直接定量法による生体試料分析法の開発を検討した。

まず、新規ピラゾール縮環ジヒドロピリジン誘導体, 8363-S [Methyl 3-cyclopentyl-4,7-dihydro-1,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl) pyrazolo-[3,4-b] pyridine-5-carboxylate] のヒト血中濃度高感度定量法として、カラムスイッチング LCEC による方法を確立した (定量範囲: 0.5-20 ng/ml, 検出限界: 0.3 ng/ml)。

さらに、新規チオフェン縮環ジヒドロピリジン誘導体, S-312 [Methyl 4,7-Dihydro-3-isobutyl-6-methyl-4-(3-nitrophenyl) thieno [2,3-b]-pyridine-5-carboxylate] 及びそのピリジン型酸化代謝物である Dehydro-S-312 のイヌ血中濃度高感度同時定量法として、カラムスイッチング LCEC-UV による方法を確立した (定量範囲: S-312, 0.2-200 ng/ml ; Dehydro-S-312, 2 - 200 ng/ml, 定量下限: S-312, 0.2 ng/ml ; Dehydro-S-312, 2 ng/ml)。

以上の結果は、生体試料中の電気化学的に活性な医薬品及びその代謝物についても、それぞれ工夫することにより、高感度、高選択的な LCEC 定量法が開発できる可能性を示すものである。

また、S-312 の LCEC 検出時に起こる電気化学的酸化反応機構の解明は、分析化学的興味だけでなく、生体内酸化反応に対する重要な情報を与えてくれる可能性からも興味を持たれた。特にこれまでまったくわかっていないチオフェン縮環ジヒドロピリジン誘導体である S-312 及びその関連化合物の酸化反応機構を明らかにする目的で、サイクリックボルタンメトリー、定電位電解、電解-ESR などの電気化学的手法により検討を加え、1 電子酸化から始まる一連の反応機構を推定した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、高速液体クロマトグラフィーの検出法として電気化学検出法を用い、物質のもつ固有の酸化・還元電位を利用することによって、種々の医薬品の血中濃度をより高感度、高選択的に定量する方法を確立した。

以上の結果は、博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認める。