

Title	2次元展開高速液体クロマトグラフィー法の確立と生体試料中の酸性代謝物分析への応用
Author(s)	奥田, 照明
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42957">https://hdl.handle.net/11094/42957</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	おく だ てる あき 奥 田 照 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 14920 号
学位授与年月日	平成11年9月14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	2次元展開高速液体クロマトグラフィー法の確立と生体試料中の酸性代謝物分析への応用
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範 (副査) 教授 小林 祐次 教授 小林 資正 教授 大森 秀信

## 論文内容の要旨

安全で有効な医薬品を開発するためには、ヒトにおける薬物の体内動態を的確に把握し、薬効あるいは毒性（副作用）と体内動態との因果関係、動物種差および人種差を明確にする必要がある。このため薬物動態試験は医薬品開発過程における必須項目となっている。薬物は投与された後、酸化あるいは還元過程において官能基による修飾を受け、直接あるいは更に抱合反応を経て、親水性（極性）の酸化代謝物として尿中あるいは胆汁中に排泄される。ヒトにおける薬物動態プロファイルを明確にするためには、これら親水性の酸性代謝物を測定することが重要となるが、近年、微量でも薬理活性を示す薬物の増加から、これらの ng レベルでの高感度分析が必要となっている。一方、生体試料中には親水性の有機酸が多量に存在すること、これら生体試料中の極性酸性化合物を選択的に抽出、精製するには複雑な方法が必要であることから、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法による極性酸性代謝物の ng レベルでの定量は困難な領域の1つであった。同様の理由から前臨床試験における極性の酸性代謝物の同定も難しく、構造決定されないまま臨床試験に移行する薬物もある。従って、効率的に臨床試験を行うためには、酸性代謝物の構造決定後、迅速にその定量法を設定する必要がある。著者は、極性酸性代謝物を生体試料中の夾雑成分と分離し ng レベルで定量するための簡便な分析方法を効率よく設定することを目的に、カラムスイッチング・ハートカット法を利用した2次元展開 HPLC 法を確立し、生体試料中の目的化合物の微量測定に応用したので報告する。

ハートカット法は分離モードが異なる複数（通常2本）のカラムをスイッチングバルブを介して連結することにより、分析対象の化合物に対する選択性を高める方法である。従来のハートカット法では、第1カラム内で生じたピークの拡散を抑制するために第2カラムでの溶出を第1カラムより速くすることでピークの圧縮を行っている。このため、第2カラムの分離能を完全には利用できない。従って、生体試料中の極性の酸性代謝物のように内因性の夾雑物が多量に存在し、これらが溶質とともに第2カラムに導入されるような場合、溶質と妨害成分との分離が不能となる。第2カラムに対して最適な溶出条件を設定しその分離能を十分に利用できる方法を確立すれば、極性酸性代謝物の選択的な定量が可能と考えられる。著者は、テトラブチルアンモニウムイオンが ODS カラムに強く吸着する特性を利用して、第1カラムに逆相モード、第2カラムにテトラブチルアンモニウムイオンを用いたイオンペアモードを採用す

ることにより、第2カラム上端に酸性化合物を選択的に濃縮する方法を開発し、実用化した。これにより、酸性化合物に対する選択性が向上するとともに、第1カラムの分析条件に制約されることなく第2カラムの分析条件を任意に設定可能となったことから、その分離能を十分に利用できるようになった。また、濃縮層で第1カラムのピークの拡散を抑制したことにより、ピーク形状が改善されS/N比が向上し、検出感度を高めることができた。この結果、生体試料中の極性の酸性化合物を簡便な前処理操作のみで効率よく高感度に分析することが可能となった。

上記の2次元展開 HPLC 法を生体試料中の微量アミノ酸である  $\alpha$ -アミノイソ酪酸 (AIB) の分析に適用して、その高分離能、高選択性を検証した。HPLC によるアミノ酸分析ではアミノ基に発色団を導入する手法が利用されているが、アミノ酸は分子サイズが小さいため、生成した誘導体は元の構造を反映せず相互の分離が困難となっている。AIB を *o*-フタルアルデヒドを用いて蛍光誘導体化すると共に、酸性のイソインドール誘導体に変換することにより、2次元展開 HPLC 法を適用して AIB の微量定量法を設定した。本法では、ng レベルの AIB を  $\mu$ g レベルで存在する内因性の他のアミノ酸やアミンと分離することが可能である。本法の応用によりヒトには存在しないと云われていた AIB がヒトにも ng レベルで存在することを明らかにした。

より簡便な分析法を追求した結果、近年では血漿の HPLC への直接注入法が盛んに導入されている。この方法には主に2つの手法、直接注入用の制限進入型のカラムを用いる方法と、カラムスイッチングを利用したオンライン固相抽出法とがある。前者はカラム上での血漿蛋白の吸着、変性が無く多数検体の分析が可能であるが、分離能が低いこと、多量の試料注入ができないことから分析感度が低いことが欠点である。一方、後者は、分離能が高く多量の試料注入も可能であるが、前処理用カラムが蛋白の吸着、変性により劣化するためルーチン分析には適さない。上記の2次元展開 HPLC 法においては分析用の第2カラムの上端に濃縮層を形成するため、前処理カラムの劣化によるピーク拡散の影響を防ぎ、多数検体をオンライン固相抽出法により高感度に分析することが可能である。

生体試料中の極性酸性代謝物を簡便に分析することを目的として2次元展開 HPLC 法を確立した。本法により極性酸性化合物に対する選択性および分離能が飛躍的に向上し、ng レベルのグルクロン酸抱合体や微量アミノ酸などの化合物の簡便で堅牢な定量を可能とした。分析法の選択性を高めた結果、ヒトには存在しないと云われていた  $\alpha$ -アミノイソ酪酸がヒトにも ng レベルで存在することを明らかにした。さらに、2次元展開 HPLC 法の応用により血漿の直接注入法における問題を克服し、直接注入法による酸性化合物の高感度ルーチン分析を可能とした。以上、今回確立した2次元展開 HPLC 法では、汎用性の高い装置、カラムおよびイオンペア試薬のみを用いて、除蛋白などの簡単な前処理のみで、高極性の酸性化合物を高感度で堅牢に測定でき得ることが判明した。従って、多くの薬物動態研究に対して極めて有効な分析手法を与え得たものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

新薬開発における調査では、薬物動態の悪さから開発を断念せざるを得ないケースが高い割合を占めている。従って、薬物の体内動態を的確に把握し、薬効あるいは副作用と体内動態との因果関係、動物種差および人種差などを明確にする事は、新薬開発に欠くべからざる重要課題となっている。

さて、投与された薬物の大半は、極性の酸性代謝物として排泄される。薬物動態プロファイルを明確にするためにはこれらを ng レベルで高感度に測定することが必須である。しかし、生体試料中には極性の有機酸性物質が多量に存在し分析を妨害することから、多数のサンプルを、簡便に、前処置無しで高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法を用いて測定し、しかも極性酸性代謝物の高感度分析を行うことは著しく困難であった。

著者はこれらを可能にするため、ハートカット法を応用することにより、新たな2次元展開 HPLC 法について検討し、以下の結果を得た。

1) 第1カラムに逆相モード、第2カラムにテトラブチルアンモニウムイオンを用いたイオンペアモードを採用することにより、第2カラム上端に極性酸性化合物を選択的に濃縮する方法を開発し実用化した。

2) この濃縮層の形成により、第1カラムの分析条件に制約されることなく、第2カラムの分析条件を任意に設定出来ることから、その分離能を十分に発揮させることが可能となった。

3) 濃縮層の形成によりピーク形状が改善され、S/N比が向上した結果、検出感度を高めることが出来た。

4) 分析操作が簡便であることから、多数検体の測定に適しているうえ、使用カラムが耐久性、再現性に優れた ODS カラムであることから、本法は極性の酸性代謝物のルーチン分析に適用可能である。

5) 事実、血漿および尿中微量アミノ酸である  $\alpha$ -アミノイソ酪酸の測定に適用したところ、本法の高分離、高選択性が証明された。

6) 親水性のメトトレキセートおよび疎水性のプロセミドをモデル化合物として検討し、血漿中の酸性化合物のオンライン固相抽出によるルーチン分析を可能とした。

以上のように、本論文は今後の薬物動態研究に対して極めて有効な分析手法を提供しており、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものとする。