総合論文

電気化学検出 HPLC を活用する血中の薬物動態分析

小谷 明^{*1}, 楠 文代¹, 袴田 秀樹¹

血中薬物の動態分析に適用できる高感度な分離定量法として、アンペロメトリック様式を活用した電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を開発した。炭素電極を用いた電気化学検出キャピラリー液体クロマトグラフィー (CLC-ECD) により amol レベルのフラボノイド類を、ホウ素ドーブダイヤモンド (BDD) 電極を用いた CLC-ECD により fmol レベルのポリメトキシフラボン類を定量できた。酸に特異的な検出にキノンを利用してバルプロ酸及び遊離脂肪酸 (FFA) の HPLC-ECD を、また塩基に特異的な検出にトロロックスを利用してテオフィリンの HPLC-ECD をそれぞれ開発した。各 HPLC-ECD は、感度と特異性に優れる上に、微量 (10 μL 程度) の血漿試料で分析可能であった。血中薬物の動態分析へ応用し、時間-濃度プロファイルの取得や薬物動態パラメーターの算出に適用できることを示した。

1 緒言

創薬過程における薬物動態試験あるいは臨床における治療薬物モニタリングを的確に実施するには、信頼性に優れた測定データが得られる血中薬物の分析法を使用し、正確な薬物動態 (PK) パラメーターを算出できることが重要となる。さらに、分析法を臨床現場で使用することを考慮した場合、血中薬物濃度測定における前処理方法が簡易であり、汎用性に優れることも望まれる。

アンペロメトリック様式の電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) は、酸化還元能を有する物質を特異的かつ高感度に検出でき¹⁾、試料の微量化が可能、比較的簡便な前処理操作で分析可能などの、特長がある。しかし、検出の場合である作用電極表面が試料中の夾雑物により汚染を受けた場合、感度と精度が著しく低下する。一方、酸化還元能がない薬物の場合は、誘導体化試薬の利用によって、電気化学検出が可能になる。しかしながら、従前の方法では必ずしも血中薬物の動態分析の汎用的な方法になっていない。

そこで、血中薬物の動態分析における HPLC-ECD の実用性を向上するためには、次の点を留意した上で高感度かつ高精度な HPLC-ECD を開発し、適切な応用を図ることが重要と考えた。(1) 測定対象の薬物を特異的かつ比較的低電位側での酸化反応、あるいは比較的高電位側での還元反応を介して電気化学的に検出する。(2) 電解生成物や夾雑物の電極への吸着が回避でき、安定な電気二重層を維持でき

る HPLC 条件、電解条件、前処理方法を総括的に設定する。(3) 電極不活性な酸塩基物質について、誘導体化を行わずに検出する手法を開発する。特にこれは、電気化学検出で測定可能な対象の範囲を拡張でき、生体試料中の薬物の分析に有用と考えられる。

本稿では、測定対象物質の性質に応じた適切な電気化学検出法を HPLC-ECD の検出部として開発し、これを血中薬物の動態分析へ応用できた成果を紹介する。

2 直接電解酸化によるフラボノイド類の定量

2.1 フラボノイド類の酸化還元電位

HPLC-ECD の作用電極として汎用されるグラッシーカーボン電極は、樹脂を高温処理して炭状にしたもので、電気伝導性が大さい、高純度で機械的強度也大さい、電位窓が広いなどの特徴がある。カテコールアミン類、含硫アミノ酸、キノン類などの生体成分は、グラッシーカーボン電極の電位窓の範囲内で電極酸化あるいは還元することが可能であり、これらの生体成分の定量分析に HPLC-ECD が利用されてきた^{2)~4)}。

フラボノイドは、植物に含まれる天然色素化合物群であり、フェニルクロマン構造を基本骨格とする芳香族化合物である。構造中にフェノール性水酸基を有するフラボノイド類は、グラッシーカーボン電極上において電極酸化反応が進行すると予想されるので、HPLC-ECD を活用してフラボノイド類の高感度定量法を開発することとした。Table 1 では、炭素電極を用いたボルタンメトリー及びフロー型カラム電解法で求めたフラボノイド類の半ピーク電位 ($E_{p/2}$) 及び半波電位 ($E_{1/2}$) を示した⁵⁾。エピカテキンの電極酸化には、次のように 2 電子 2 プロトンが関与すると報告され

* E-mail: kotani@toyaku.ac.jp

¹ 東京薬科大学薬学部: 192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

Table 1 Electrochemical characteristics of flavonoids

Flavonoids	Substituent	$E_{p/2}^a$ (V)	$E_{1/2}^b$ (V)
Flavonols			
Myricetin	3,5,7,3',4',5'-OH	-0.025	-0.030
Quercetin	3,5,7,3',4'-OH	0.021	0.020
Fisetin	3,7,3',4'-OH	0.055	0.030
Kaempferol	3,5,7,4'-OH	0.064 ^{ir}	0.080
Morin	3,5,7,2',4'-OH	0.115 ^{ir}	0.105
Galangin	3,5,7-OH	0.188 ^{ir}	0.280
Rutin	5,7,3',4'-OH-3-rutinoside	0.187	0.180
Hyperoside	5,7,4',5'-OH-3-glucose	0.185	0.185
Flavones			
Baicalein	5,6,7-OH	-0.055	-0.060
Baicalin	5,6-OH-7-glucose	0.080	0.080
Luteolin	5,7,3',4'-OH	0.175	0.180
Wogonin	5,7-OH-8-OCH ₃	0.380 ^{ir}	0.360
Apigenin	5,7,4'-OH	0.520 ^{ir}	> 0.500 ^c
Flavanones			
Fustin	3,7,3',4'-OH	0.137	0.132
Naringenin	5,7,4'-OH	0.570 ^{ir}	0.590
Isoflavones			
Daidzein	7,4'-OH	0.411 ^{ir}	0.500
Daidzin	4'-OH-7-glucose	0.411 ^{ir}	0.538
Puerarin	7,4'-OH-8-C-glucose	0.435 ^{ir}	0.540
Flavans			
(-)-Gallocatechin	3,5,7,3',4',5'-OH	-0.042	-0.030
(-)-Epigallocatechin	3,5,7,3',4',5'-OH	-0.035	-0.035
(-)-Epigallocatechin gallate	5,7,3',4',5'-OH-3-gallate	-0.025	-0.020
(-)-Gallocatechin gallate	5,7,3',4',5'-OH-3-gallate	-0.010	-0.010
(-)-Catechin gallate	5,7,3',4'-OH-3-gallate	0.120	0.040
(-)-Epicatechin gallate	5,7,3',4'-OH-3-gallate	0.105	0.080
(+)-Epicatechin	3,5,7,3',4'-OH	0.115	0.082
(-)-Epicatechin	3,5,7,3',4'-OH	0.100	0.082
(-)-Catechin	3,5,7,3',4'-OH	0.113	0.092
(+)-Catechin	3,5,7,3',4'-OH	0.116	0.102
Flavanonol			
Silibinin		0.390 ^{ir}	0.450

a) $E_{p/2}$ values were obtained from cyclic voltammetry. WE: plastic formed carbon; RE: Ag/AgCl; CE: Pt; electrolysis solution: methanol-0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) (1 : 1, v/v). $E_{p/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$, for the reversible and quasi-reversible electrode reaction; while for irreversible electrode reaction, $E_{p/2}$ of the anodic peak was listed instead of $E_{p/2}$. b) $E_{1/2}$ values were measured using column electrolysis. WE: carbon fibers; RE: Ag/AgCl; CE: Pt; carrier solution: methanol-0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) (1 : 1, v/v). c) No obvious plateau was observed. Apigenin was oxidized at potentials higher than 0.500 V. ^{ir}) Irreversible electrode reaction. Used and reproduced with permission from ref. #5.

Scheme 1 Electrochemical oxidation reaction of (-)-epicatechin

ている (Scheme 1)⁶⁾. これらの結果より、炭素電極上での電解酸化でフラボノイド類を検出することが可能であり、フラボノイド類の高感度かつ特異的な分析法としてのHPLC-ECDの有用性を示した。

Fig. 1 にはガラングイン (GL), フィセチン (FI), ケンフェロール (KF), モリン (MR), ケルセチン (QC), ミリセチン (MC), バイカレイン (B), バイカリン (B), オウゴン (WO), ルテオリン (LO), ヒペロシド (HP), フスチン (FU), ヘスペリジン (HE), ダイゼイン, (D), ダイジン (DG) のクロマトグラムを示した⁷⁾. 各フラボノイドの疎水性と酸化電位を考慮したHPLC条件下で分離定量を行っているが、各HPLC-ECDにおける検出限界は2 fmolであり、フラボノイド類の高感度HPLC-ECDとして開発することができた。

Fig. 1 Chromatograms of flavonoids by HPLC-ECD

The following HPLC conditions used were: column, Capcell pak C18 UG120 column (150×1.0 mm i.d., 3 μm); column temperature, 40 °C; mobile phase, phosphoric acid-methanol-water (A, 0.5 : 50 : 50; B, 0.5 : 40 : 60; C, 0.5 : 30 : 70; v/v/v); flow rate, 25 μL min⁻¹; applied potential, (A) +0.8 V; (B) +0.6 V; (C) +0.8 V *vs.* Ag/AgCl. Flavonoids: B, baicalein; BG, baicalin; D, daidzein; DG, daidzin; FI, fisetin; FU, fustin; GL, galangin; HE, hesperidin; HP, hyperoside; KF, kaempferol; LO, luteolin; MC, myricetin; MR, morin; QC, quercetin; WO, wogonin. Used and reproduced with permission from ref. #7.

2.2 分析カラムのダウンサイズ化による HPLC-ECD の高感度化

HPLC の分析カラムにマイクロボアカラム及びキャピラリーカラムを使用してダウンサイズ化を行い、フラボノイド類の HPLC-ECD のさらなる高感度化を図った。

HPLC-ECD では、検出部であるフロー型電解セル内の作用電極表面で生じる酸化電流あるいは還元電流を計測する。これらの電解電流 (i) には、式(1)の関係が成り立つ⁸⁾。

$$i = 1.47 \text{ nF} U^{1/3} (DA/h)^{2/3} C \quad (1)$$

ここで、 n は酸化還元反応に関与する電子数、 F はファラデー定数、 U は流量、 D は測定対象物質の拡散定数、 A は作用電極の面積、 h はフローセル層の厚さ、 C は作用電極表面における測定対象物質の濃度である。HPLC においてサンプルインジェクターから導入された測定対象物質は、流路やカラムを通過する際に拡散した後に検出部へ到達する。内径の小さいカラムを利用したダウンサイズ化によりこの拡散が低減できれば、HPLC-ECD の場合、作用電極表面に測定対象物質の濃度を高く維持したまま到達させることができ、電解効率の増大によって高いシグナルが得られ、感度の向上を図ることができる。

エピカテキンの HPLC-ECD において、内径 4.0 mm のカ

ラムを用いた場合、その検出限界は 500 fmol であったが⁹⁾、内径 1.0 mm のカラムに替えたところ検出限界は 5.0 fmol となった¹⁰⁾。さらに、内径 0.2 mm のキャピラリーカラムを用いて構築した電気化学検出キャピラリー液体クロマトグラフィー (CLC-ECD) では、検出限界は 0.075 fmol であった¹¹⁾。カラムのダウンサイズ化は HPLC-ECD の高感度化に大きく寄与することを示した。特に、カテキン類の CLC-ECD では、amol レベルの超高感度検出を達成できた。

2.3 血中カテキン類の動態分析

フラボノイド類は、生体内において微量ながら強い生理活性を有することから、広範な研究領域においてその利用が注目されている。フラボノイド類の生理作用のメカニズムを解明するには、日常的な生活で摂取しうる微量のフラボノイド類投与下における詳細な体内動態を把握する必要がある。著者らは、HPLC-ECD を活用した結果、緑茶飲用の後のケルセチンやカテキン類^{10)~12)}、及び漢方製剤 (柴胡桂枝湯) 投与後のバイカレインとバイカリン¹³⁾ の動態分析など、微量のフラボノイド類投与後における時間-濃度プロファイルを把握することができた。

本節では特に、超高感度 CLC-ECD を活用して緑茶飲用の後の血中カテキン類の動態分析を行い、カテキン類の遊離体及び抱合体の濃度推移を詳細に把握できた結果を記す¹¹⁾。

Fig. 2 Chromatogram of catechins by CLC-ECD

A mixture of catechins was injected into the CLC-ECD in the amount of 25 fmol each. The CLC conditions used were: column, Inertsil ODS-3 Capillary EX-Nano (150×0.2 mm i.d., 3 μm); column temperature, 50 °C; mobile phase, phosphoric acid-methanol-water (0.5 : 27.5 : 72.5, v/v/v); flow rate, 4.0 μL min⁻¹; applied potential, +0.85 V *vs.* Ag/AgCl. Used and reproduced with permission from ref. #11.

2.3.1 カテキン類の超高感度 CLC-ECD

カテキン類の CLC-ECD において、分離には ODS を充填したキャピラリーカラムを用い、作用電極のグラッシーカーボン電極には +0.85 V *vs.* Ag/AgCl を印加した。ガロカテキン (GC), エピガロカテキン (EGC), カテキン (C), エピガロカテキンガレート (EGCg), エピカテキン (EC), ガロカテキンガレート (GCg), エピカテキンガレート (ECg), カテキンガレート (Cg) と内標準物質のプロピルガレートを含む標準溶液 50 nL を CLC-ECD に注入したところ、Fig. 2 のクロマトグラムが得られた。各カテキン類のピークは 10 min 以内に現れ、そのピーク高さは 0.2 ~ 500 fmol の範囲で良好な直線性 ($r > 0.999$) を示した。

2.3.2 緑茶飲用後の血中カテキン類の時間-濃度プロファイル

緑茶に多く含まれるカテキン類は、抗酸化作用や抗腫瘍作用など多彩な生理作用を有することが報告されている¹⁴⁾。カテキン類が、動脈硬化などの生活習慣病の予防やがんの抑制効果に及ぼす影響を明らかにするには、緑茶のようにヒトが日常的に摂取しうるカテキン類投与後の微少な濃度レベルの血中カテキン類を定量する必要がある。カテキン類は、経口摂取後に主として小腸で吸収され、肝でグルクロン酸抱合と硫酸抱合を受ける。そのため血中

や尿中では、グルクロン酸抱合あるいは硫酸抱合を受けた抱合体と遊離体のカテキン類が共存する¹⁴⁾¹⁵⁾。そこで、カテキン類の遊離体及び抱合体の時間-濃度プロファイルをそれぞれ得るために、酵素による脱抱合反応と酢酸エチルによる溶媒抽出を組合せた前処理方法を確立した。すなわち、血漿 10 μL に β-グルコニダーゼとスルファターゼを加え、脱抱合反応 (37 °C, 45 min) した後にカテキン類を酢酸エチルで溶媒抽出した。抽出物は移動相で溶解し、その 50 nL を CLC-ECD に注入した。この前処理方法により、緑茶飲用後のヒト血中において 5 種のカテキン類 (EGCg, EC, GCg, ECg, Cg) が定量できた。繰り返し測定及び添加回収試験を行ったところ、相対標準偏差 (RSD) ($n = 5$) は 5.0 % 以下、回収率は 87.5 ~ 94.2 % であった。また、酵素を加えずに前処理して得た検液の測定によって遊離体のカテキン類が定量できた。それらの結果から抱合体のカテキン類を個別に算出した。

茶及び茶関連食品を約 1 週間摂取していない健康人を被験者とし、市販の缶緑茶 1 本 (340 mL) を 12 時間絶食後に飲用させた。穿刺器具を用いた手指採血によって経時的に得た血漿を試料とし、緑茶飲用後 6 時間にわたって血中カテキン類の濃度変化を追跡したところ、Fig. 3 に示す抱合体及び遊離体のカテキン類の時間-濃度プロファイルが取得できた。緑茶のように日常的なカテキン摂取の場合、飲用 1 ~ 2 時間後に最大血中濃度に達し、その後減少することが分かった。カテキン類の CLC-ECD は感度に優れ、健康人が日常的に摂取しうる微量なカテキン類の血中動態分析へ適用できることを示した。

3 ホウ素ドーパダイヤモンド (BDD) 電極を利用したノビレチンの定量

3.1 ポリメトキシフラボンのボルタンメトリー

ノビレチン (3',4',5,6,7,8-Hexamethoxyflavone) はポリメトキシフラボン類 (PMFs) の 1 種で、シークワーサーやポンカン等の柑橘類の果皮に多く含まれている。ノビレチンのメトキシ基を電解酸化するには比較的高い正電位の印加が必要である。したがって、炭素電極を用いてノビレチンの脱メチル化体を電極酸化で検出した報告はあるが、分子中にフェノール性水酸基を持たないノビレチンの検出には至っていない¹⁶⁾。

ホウ素ドーパダイヤモンド (BDD) 電極は、酸素加電圧が大きいため電位窓が広い、電気二重層容量が小さいためバックグラウンド電流が少ない、物理的・化学的に安定であるため、かなり高い正電位をかけても電極表面の形状変化がないなどの特長がある¹⁷⁾。以上のことから、陽極酸化に有利な電極としてその利用が注目されている。

実際に、BDD 電極を用いてノビレチンのボルタンメトリーを行ったところ、+1.4 V と +1.5 V *vs.* Ag/AgCl に 2 段

Fig. 3 Time course of catechins concentrations of (A) conjugated form and (B) free form in plasma after the ingestion of 340 mL commercial canned green-tea

Catechins: $\square$, GCg; $\blacksquare$, EC; $\triangle$, EGCg; $\blacklozenge$, ECg; $\diamond$, Cg. Used and reproduced with permission from ref. #11.

の酸化波が観察された¹⁸⁾。いずれの酸化波の波高も、走査速度の平方根 ($v^{1/2}$, $v=10\sim200\text{ mV s}^{-1}$) と比例関係を示したことから、この酸化波の出現にかかわる電極酸化は拡散支配で進行することが示された。ジメトキシベンゼン誘導体のメトキシ基は1電子酸化を受け、アレールカチオンラジカルが生成する¹⁹⁾²⁰⁾。ノビレチンの酸化波の出現電位は、電解質溶液のpHの影響を受けなかったことを考慮すると、ノビレチンもBDD電極上で、同様の電極酸化が進行したと考えられる。また、タンゲレチン (4',5,6,7,8-Pentamethoxyflavone) のボルタンメトリーにおいても2段の酸化波が観察されたことから、ノビレチンのA環とB環のメトキシ基が一つずつ酸化されたと思われる。BDD電極の利用により、PMFsを電解酸化で検出できることを明らかにした。

一方、プラスチックフォームドカーボン (PFC) 電極を用いたボルタンメトリーでは、ノビレチンの酸化波は

+1.2 V *vs.* Ag/AgCl に観測できたが、ブランク試料の測定においてバックグラウンド電流が大きく、炭素電極表面の酸化が観察された。シグナル/バックグラウンド比 (*S/N* 比) はBDD電極の方が約5倍大きかった。したがって、BDD電極の利用は、PMFsの高感度かつ高精度分析において有用であることが分かった。

3.2 CLC-ECDによるノビレチンの定量

BDD電極を作用電極としたCLC-ECDシステムを構築し、ノビレチンの高感度定量法を開発した¹⁸⁾。ノビレチンのCLC-ECDにおいて、分離にはODSを充填したキャピラリーカラムを用い、BDD電極には+1.45 V *vs.* Ag/AgClを印加した。ノビレチンと内標準物質の4-アミノフェノールを含む標準溶液50 nLをCLC-ECDに注入し、クロマトグラムを測定したところ、各ピークは5 min以内に得られた。ノビレチンのピーク高さは $9.7\text{ ng mL}^{-1}\sim8.1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ の範囲で良好な直線性 ($r>0.999$)を示し、検出限界 (*S/N*=3) は 2.7 ng mL^{-1} であった。BDD電極を利用したCLC-ECDは、ノビレチンの液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS)²¹⁾や液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC-MS/MS)²²⁾に比べて感度に優れていた。

Fig. 4Aには、市販のシークワサージュースのクロマトグラムを示した。1.5 minにノビレチン、2.2 minにタンゲレチン、4.0 minに4-アミノフェノールのピークが得られ、内標準法により定量した結果、シークワサージュースは 0.34 mg mL^{-1} のノビレチンと 0.15 mg mL^{-1} のタンゲレチン含有することが分かった。

3.3 シークワサージュース投与後のラット血中ノビレチンの動態分析

ノビレチンは、アルツハイマー病における記憶障害改善作用や抗酸化作用などの生理作用を有することが知られているが、その詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い。これらのメカニズムの解明には、血中ノビレチンの濃度変化を経時的に追跡でき、体内動態や代謝を把握できる分析が必要である。本節では、BDD電極を用いたCLC-ECDを血中ノビレチンの高感度定量法として開発し、シークワサージュース投与後のラット血中ノビレチンの動態分析へ応用した¹⁸⁾。

本法における必要試料量は血漿30 μL 、前処理方法は酢酸エチルによる溶媒抽出であり、微少の試料かつ比較的簡単な前処理で分析可能であった。Fig. 4Bには、シークワサージュース投与1時間後のラット血漿のクロマトグラムを示した。2.1 minにピークが得られたが、血漿にタンゲレチンを添加した試料の分析によって、このピークがタンゲレチンでないことを確認した。タンゲレチンは、ノビレチンに比べてバイオアベイラビリティが低い²³⁾、今

Fig. 4 Chromatograms of (A) *Citrus depressa* juice and (B) rat plasma after ingestion of *Citrus depressa* juice obtained by CLC-ECD

The CLC conditions used were: column, Monocap Fast-flow (150×0.2 mm); mobile phase, phosphoric acid-acetonitrile-water (0.5 : 35 : 65, v/v/v); flow rate, $16 \mu\text{L min}^{-1}$; applied potential, +1.45 V vs. Ag/AgCl. (A) One hundred microliter of *Citrus depressa* juice with internal standard was diluted with 0.3-mL methanol and 9.7-mL phosphoric acid-acetonitrile-water (0.5 : 35 : 65, v/v/v) to prepare test solution for determining nobiletin in *Citrus depressa* juice. (B) Rat plasma was obtained at 1 hr after the ingestion of *Citrus depressa* juice. Forty microliters of plasma with internal standard was mixed with 0.12-mL ethyl acetate to extract nobiletin in plasma to ethyl acetate phase. Used and reproduced with permission from ref. #18.

回の投与量では血中タンゲレチン濃度が 3.0 ng mL^{-1} 以下 (本 CLC-ECD の検出限界) であったと考えた。また、ノビレチンはシトクロム P450 (CYP) によって代謝され、様々な脱メチル化体を生成する²⁴⁾。したがって、このピークはノビレチンの脱メチル化体由来のものであると考えた。血中のノビレチン定量について繰り返し測定及び添加回収試験を行ったところ、RSD ($n=5$) は 0.9 %, 回収率は 100.5 % であった。

シークワージーウス [5 mL kg^{-1} (ノビレチン量として 0.17 mg kg^{-1})] 投与 3 時間にわたって血中ノビレチンの定量を行い、得られた時間-濃度プロファイルから PK パラメーター²⁵⁾を算出した。ラットにおける PK パラメーター [平均値 $\pm$ SE ($n=3$)] は、最高血中濃度 (C_{max}) = $54.8 \pm 3.37 \text{ ng mL}^{-1}$, 最高血中濃度到達時間 (t_{max}) = $20.0 \pm 0.00 \text{ min}$, 血中濃度-時間曲線下面積 ($\text{AUC}_{0-3\text{h}}$) = $59.1 \pm 2.45 \text{ ng} \cdot \text{hr mL}^{-1}$ であった。

BDD 電極を利用したノビレチンの CLC-ECD は感度に優れた定量分析法であるため、日常生活で摂取する微量のノビレチン投与後の時間-濃度プロファイルを取得

できた。ヒトの血中動態分析へも容易に適用可能であり、シークワージーがもたらす健康効果を解明するための分析法へ展開できると考えている。

4 キノンを利用したバルプロ酸と遊離脂肪酸の定量

4.1 キノンの還元前置波に基づく酸測定

Kusu らは、グラッシーカーボンのような炭素電極を用いたボルタンメトリーにおいて、ビタミン K_3 (VK_3) の電解還元を微量の酸の存在下で行うと酸の濃度に依存的な VK_3 の還元前置波が出現することを見だし、この波高計測を酸定量法として開発した²⁶⁾。還元前置波に基づく酸定量法の概要を以下に記す。

VK_3 のようなキノン化合物 (Q) を、プロトン性溶媒 (HB) 中で電解還元すると 2 電子が関与する電極還元反応によってハイドロキノン (QH_2) が生成し、ボルタモグラム上には 1 段の還元波が観察される。

この電解還元を HB よりも強い酸 (HA) の存在下で行うと、式 (3) の電極還元反応が式 (2) に比べて正電位側で進行する。ボルタモグラム上には、キノンの還元波より正電位側に 1 段の還元前置波が観察される。

キノンの還元前置波の出現は、キノンへのプロトン供与が溶媒よりプロトン供与性の高い酸から行われ、キノンの電極還元反応が溶媒のみのときと比較してより低エネルギー側、すなわち正電位側で起こったためと考えている。

還元前置波の波高は、酸物質の濃度に比例する。また、還元前置波は強い酸ほど正電位、弱い酸ほど負電位に出現する特徴があり、 VK_3 のボルタンメトリーでは、 $\text{pK}_a < 5$ 程度の酸物質について還元前置波が観察できた。酸定量用のキノン試薬には、常温で安定性、還元前置波の出現電位、溶媒への溶解性などを考慮した結果、 VK_3 と 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone (DBBQ) を選定した。オルトキノンの DBBQ では 1 電子還元が進行するが、還元前置波は同様に出現した。

バルプロ酸の存在下で DBBQ のボルタンメトリーを行ったところ、 $-0.15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ に還元前置波を観測することができ、その波高はバルプロ酸の濃度に比例した。この結果から、キノンの還元前置波を利用してバルプロ酸の定量法が開発可能であることが示された。キノンの還元前置波による酸測定をバルプロ酸の HPLC-ECD の検出部として適用する場合、還元前置波が出現する電位を作用電極に印加してクロマトグラム測定を行い、還元電流の

Fig. 5 Block diagram of the HPLC-ECD system for determining acids or bases

MP, mobile phases; RS, quinone solution for determining acids or trolox solution for determining bases; DG, degasser; P1 and P2, pumps; S, sample injector; D, electrochemical detector, electrochemical cell and potentiostat; R, recorder; W, waste. Used and reproduced with permission from ref. #28.

計測によってバルプロ酸を定量することができる。

従来, バルプロ酸や遊離脂肪酸 (FFA) のような電極不活性な脂肪酸カルボン酸を HPLC-ECD で検出するためには, 電極活性部位を有する誘導体化試薬を用いたプレカラム誘導体化が行われてきた²⁷⁾。キノンの還元前置波の利用により誘導体化を行わずに生体試料中の酸が検出できることは, 検液調製の手順が少なくなるので前処理方法は比較的簡易になり, さらに前処理過程において試料のロス回避できるので必要試料量は微少になると考えた。

4.2 バルプロ酸と遊離脂肪酸の HPLC

キノンの還元前置波による酸測定に基づく HPLC-ECD として, Fig. 5 に示すような移動相とカラムからなる分離系にキノン試液を合流させるポストカラム方式の HPLC システムを構築した²⁸⁾。キノンとして DBBQ を使用した。VK₃ と比較して還元前置波が正電位側に現れる DBBQ を使用すれば, 酸素の還元波の影響を回避でき, バックグラウンドノイズを低減できると考えた。さらに, DBBQ は比較的水に溶けやすいので, 逆相 HPLC の移動相として多く利用される水-有機溶媒混液へ溶解を考慮した場合に有利である。VK₃ と比較した場合, DBBQ の質量あたりの価格は高いが, バルプロ酸及び FFA の HPLC ではカラムのダウンサイズ化により送液量を低減 ($1.0 \rightarrow 0.06 \text{ mL min}^{-1}$) できたため, 経済的負担も回避したと思われる²⁸⁾²⁹⁾。

バルプロ酸及び FFA の分離にはトリアコンチル基 (C30) を修飾したシリカ系カラムを用いた。フロー型電極セルの作用電極はグラッシーカーボン, 参照電極は Ag/AgCl 電極, 対極はステンレススチールを用いた。

バルプロ酸と内標準物質の *n*-ノナン酸を含む標準溶液 $5 \mu\text{L}$ を HPLC-ECD に注入し, クロマトグラムを測定したところ, 8.7 min にバルプロ酸, 11.0 min に *n*-ノナン酸の

ピークがそれぞれ得られた。バルプロ酸のピーク高さは $0.36 \sim 14.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ の範囲で良好な直線性 ($r > 0.999$) を示し, 検出限界 ($S/N=3$) は $0.11 \mu\text{g mL}^{-1}$ であった²⁹⁾。

一方, FFA と内標準物質のマルガリン酸を含む標準溶液を FFA の HPLC-ECD に注入したところ, 25 min 以内に測定対象としたアラキドン酸 (C20:4), リノール酸 (C18:2), オレイン酸 (C18:1), パルミチン酸 (C16:0), マルガリン酸 (C17:0), ステアリン酸 (C18:0) のピークがそれぞれ得られ, 各ピークは良好に分離していた。各 FFA のピーク高さは $0.75 \sim 160 \mu\text{M}$ の範囲で良好な直線性 ($r > 0.999$) を示し, 検出限界 ($S/N=3$) は $0.23 \mu\text{M}$ 以下であった²⁹⁾。以上のように, バルプロ酸及び FFA の HPLC-ECD は, 血中濃度測定を行う上で, 十分な感度, 範囲, 直線性を有することを示した。

4.3 マルトース負荷ラット及び糖尿病モデルラットにおける血中バルプロ酸と遊離脂肪酸の動態分析

16 時間絶食したラット (Wistar 系, 雄) にバルプロ酸ナトリウム (150 mg kg^{-1}) を経口投与し, 尾静脈から投与 1 時間後に採血して血液試料を得た。血漿 $10 \mu\text{L}$ へ内標準物質を含むアセトニトリルを加えて除タンパクをし, その後, 超音波処理と遠心分離を行って検液を調製した。Fig. 6A には, バルプロ酸ナトリウム投与 1 時間後のラット血漿のクロマトグラムを示した。血中のバルプロ酸定量について繰り返し測定を行ったところ, RSD ($n=5$) は 0.69% であった。また, 添加回収試験を行って求めた回収率は 90.8% であり, その RSD ($n=5$) は 1.7% であった。

血漿中の FFA の定量では, 血漿は 16 時間絶食したラット (Wistar 系, 雄) の尾静脈から採血して得た。血漿 $10 \mu\text{L}$ へ内標準物質とエーテルを加え, エーテル層に FFA を抽出した。エーテルを留去後, 残渣にアセトニトリル-エタノール混液を加えて検液を調製した。Fig. 6B には, 16 時間絶食後のラット血漿のクロマトグラムを示した。血中の各 FFA 定量について繰り返し測定を行ったところ, RSD ($n=5$) は 2.9% 以下であった。また, 添加回収試験を行って求めた回収率は $93.1 \sim 100 \%$ であり, その RSD ($n=5$) は 2.1% 以下であった。

以上のように, 微少の血漿量と比較的簡便な前処理方法を用いて, 血中バルプロ酸と FFA の定量が可能であった。

バルプロ酸は, 肝でのインスリン代謝の阻害³⁰⁾, 膵 β 細胞のインスリン分泌機能不全³¹⁾, 視床下部の機能低下³²⁾ などの内分泌障害及び代謝異常を引き起こし, 肥満になりやすい傾向になる³³⁾。バルプロ酸は炭素数 8 の分岐脂肪酸であり, FFA と同様に β 酸化によって代謝される。したがって, バルプロ酸は, 糖脂質代謝調節に直接的な影響を及ぼす可能性があるが, バルプロ酸と FFA の直接的な相互作用に関する報告はない。糖脂質代謝を考慮して適切な薬物療

Fig. 6 Chromatograms of (A) valproic acid and (B) FFA by HPLC-ECD based on DBBQ reduction

(A) The HPLC conditions for determining valproic acid used were: column, Develosil C30-UG-3 (250 mm $\times$ 1.0 mm i.d., 3 μ m); column temperature, 30 $^{\circ}$ C; mobile phase, acetonitrile-water (70 : 30, v/v); quinone solution, acetonitrile-water (70 : 30, v/v) containing 6.0 mM DBBQ and 20 mM LiClO₄; flow rate of mobile phase, 30 μ L min⁻¹; flow rate of quinone solution, 60 μ L min⁻¹; applied potential, -0.15 V vs. Ag/AgCl. Plasma sample obtained from normal rat after 16-hr fasting. Plasma sample obtained from normal rat after the oral administration of 150 mg kg⁻¹ sodium valproate under fasting. Ten microliters of plasma with internal standard was diluted with 0.1 mL-acetonitrile to prepare test solution for determining valproic acid in rat plasma. (B) The HPLC conditions for determining FFA used were: column, Develosil C30-UG-3 (250 mm $\times$ 1.0 mm i.d., 3 μ m); column temperature, 30 $^{\circ}$ C; mobile phase, acetonitrile-ethanol (90 : 10, v/v); quinone solution, acetonitrile-ethanol (90 : 10, v/v) containing 6.0 mM DBBQ and 100 mM LiClO₄; flow rate of mobile phase, 30 μ L min⁻¹; flow rate of quinone solution, 60 μ L min⁻¹; applied potential, -0.09 V vs. Ag/AgCl. Plasma sample obtained from normal rat after 16-hr fasting. Ten microliters of plasma with internal standard was mixed with 0.1-mL diethyl ether to extract FFAs in plasma to ether phase. Used and reproduced with permission from ref. #29.

法を行うための知見を得るには、糖脂質代謝調節の指標となる FFA の体内動態を血中バルプロ酸と同時かつ詳細に把握する必要がある。本節では、キノンの還元前置波に基づく酸の HPLC-ECD を血中バルプロ酸と FFA の動態分析へ応用し、高血糖状態がバルプロ酸と FFA の体内動態に及ぼす影響を明らかにした²⁹⁾。

健常ラット、マルトースを 1 時間ごとに経口投与した健常ラット (マルトース負荷ラット) 及びアロキサンを腹空

内投与した 1 型糖尿病モデルラット (糖尿病ラット) にバルプロ酸ナトリウム (150 mg kg⁻¹) を経口投与し、尾静脈より経時的に採血した。採血して得た約 50 μ L の血液のうち約 5 μ L を用いて、血糖自己測定 (SMBG) 用の血糖測定器で血糖値 (BG) も測定した。残りの血液よりバルプロ酸と FFA 測定用の血漿を調製し、上述の前処理を行って得た検液をそれぞれの HPLC-ECD に注入して血中バルプロ酸と FFA を定量した。その結果、Fig. 7 に示したバルプロ酸ナトリウム投与後のバルプロ酸、FFA、BG の時間-濃度プロファイルが得られ、Fig. 7A、Fig. 7D、Fig. 7G の結果からバルプロ酸の PK パラメーター [平均値 $\pm$ SE ($n=5$)] を算出した。本法は、同一個体におけるバルプロ酸と FFA の血中動態を同時に追跡できることから、正確な PK パラメーターの算出において有利であり、バルプロ酸と FFA が糖脂質代謝調節に及ぼす影響を *in vivo* でモニタリングする手法として有用であることを示した。

さらに、食餌あるいは糖尿病等に起因する高血糖状態がバルプロ酸の体内動態に影響を及ぼす機序を明らかにする目的のために、健常ラット、マルトース負荷ラット及び糖尿病ラットにおけるバルプロ酸の PK パラメーターの多群間比較を Scheffe 法に基づいて行った (Fig. 8)。健常ラットに比べてマルトース負荷ラットでは、AUC_{0-5hr} は有意に低下した (186.1 $\pm$ 4.1 vs. 90.3 $\pm$ 28.6 mg $\cdot$ hr mL⁻¹)。また、健常ラットに比べて糖尿病ラットでは、AUC_{0-5hr} は有意に低下 (186.1 $\pm$ 4.1 vs. 80.9 $\pm$ 10.4 mg $\cdot$ hr mL⁻¹)、分布容積 (*Vd*) は有意に増加 (259.1 $\pm$ 45.8 vs. 1229 $\pm$ 219 mL)、半減期 (*t*_{1/2}) は有意に増加した (0.91 $\pm$ 0.2 vs. 1.72 $\pm$ 0.1 hr⁻¹)。これらの PK パラメーターの変化は、ラットでは BG の上昇に伴ってバルプロ酸の代謝と排泄が促進されることを捉えられた結果であり、糖尿病時においてバルプロ酸のタンパク結合率が低下する報告³⁴⁾³⁵⁾を支持するものであった。本研究で実践したバルプロ酸の PK パラメーター解析は、今後、食餌の内容、病態、併用薬等が及ぼす影響を解明する手段として展開可能である。バルプロ酸の HPLC-ECD は、患者個々に適したバルプロ酸の投与計画を立案する上で有益な分析法になると考えられる。

5 トロロックスを利用したテオフィリンの定量

5.1 トロロックスの酸化前置波に基づく塩基測定

塩基の電気化学検出では、クロマノール骨格の 6 位にヒドロキシ基をもつ α -トコフェロール (α -TOH) やトロロックスの電極酸化反応に着目した。 α -TOH やトロロックスのヒドロキシ基からのプロトン供与が溶媒よりプロトン受容性の高い塩基へ行われ、 α -TOH あるいはトロロックスの電極酸化反応が溶媒のみのときと比較してより低エネルギー側、すなわち負電位側で起こり、これが酸化前置波として観測できれば、塩基検出へ展開可能と考えた。

Fig. 7 Time-concentration profiles of mean ($\pm$ SE) (A, D, G) valproic acid (VPA), (B, E, H) FFA, and (C, F, I) blood glucose level (BG), in (A–C) normal rats ($n=5$ each), (D–F) 1.8 g kg^{-1} maltose ingested normal rats ($n=5$, each), and (G–I) diabetic rats ($n=5$ each) after the oral administration of 150 mg kg^{-1} of sodium valproate under fasting

FFAs: ■, C20 : 4; ◇, C18 : 2; ◆, C18 : 1; □, C16 : 0; △, C18 : 0. Maltose (1.8 g kg^{-1}) was orally ingested by a normal rat every 1 hr after 16 hr of fasting. Used and reproduced with permission from ref. #29.

α -TOH の電解酸化をリドカイン, N,N -ジメチルアニリン, アニリンのような塩基物質の存在下でそれぞれ行ったところ, 各塩基物質に由来する酸化前置波が, α -TOH の酸化波より負電位側に観測できた. 酸化前置波の波高は塩基物質の濃度に比例したことから, 塩基物質の定量法として開発可能であった. また, 酸化前置波は強い塩基ほど負電位, 弱い塩基ほど正電位に出現する特徴があり, α -TOH のボルタンメトリーでは, $4 < \text{p}K_b < 10$ 程度の弱塩基物質について酸化前置波が観測できた³⁶⁾. テオフィリンは $\text{p}K_b = 11.5$ (実験値) であり³⁷⁾, α -TOH のボルタンメトリーでは

酸化前置波は出現しなかった. そこで, α -TOH 同様, クロマノール骨格を有し, カルボキシ基の影響で α -TOH より酸化されにくいと予想されるトロロックスの利用を図った.

α -TOH 同様, トロロックスも 1 電子 2 プロトンが関与する電極酸化反応が進行し, カルボカチオンが生成する (Scheme 2)³⁸⁾.

アセトニトリル中でトロロックスのボルタンメトリーを行ったところ, 酸化波は $+0.9 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ に現れ, この出現電位は α -TOH の場合に比べ $0.15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ほど

Fig. 8 Effect of hyperglycemia on (A) AUC, (B) $t_{1/2}$, and (C) V_d ($\pm$ SE) of valproic acid in (N) normal, (M) maltose ingested normal, and (D) diabetic rats, respectively ($n=5$, each)

Significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) were determined by using a one-way analysis of the variance (ANOVA), followed by Scheffe's method.

Scheme 2 Electrochemical oxidation reaction of trolox

正電位であった。テオフィリン存在下でトロロックスのボルタンメトリーを行ったところ、 $+0.75$ V *vs.* Ag/AgCl に酸化前置波を観測することができ、その波高はテオフィリンの濃度に比例した³⁹⁾。トロロックスの酸化前置波による塩基測定をテオフィリンの HPLC-ECD の検出部として適用する場合、酸化前置波が出現する電位を作用電極に印加してクロマトグラム測定を行い、酸化電流の計測によってテオフィリンを定量することができる。

一方、テオフィリンは、1 電子 1 プロトンが関与して電極酸化することが知られており⁴⁰⁾、炭素電極及び BDD 電極を用いて電気化学的に検出が可能である⁴¹⁾⁴²⁾。しかし、テオフィリンを直接電解酸化で検出するには、作用電極の電位窓の範囲で比較的高い電位を印加する必要がある。したがって、反応の場である作用電極表面の劣化や、テオフィリン以外のキサンチン誘導体及びほかの生体成分の検出も危惧される。トロロックスの酸化前置波の利用によって、比較的低い正電位での電解でテオフィリンを検出することは、妨害物質由来のピークを減らすことができ、特異性を向上することにおいて有利であった。

5・2 テオフィリンの HPLC-ECD

トロロックスの酸化前置波に基づくテオフィリンの HPLC-ECD として、Fig. 5 に示すような移動相とカラムか

らなる分離系にトロロックス試液を合流させるポストカラム方式の HPLC システムを構築した³⁹⁾。テオフィリンの分離にはシリカゲルカラムを用い、印加電位は $+1.1$ V *vs.* Ag/AgCl に設定した。テオフィリンの標準溶液 5 μ L を HPLC に注入し、クロマトグラムを測定したところ 6.7 min にテオフィリンのピークが得られ (Fig. 9A)、そのピーク高さは $2.0 \sim 100$ μ M の範囲で良好な直線性を示した ($r=0.999$)。検出限界は、 0.55 μ M であった。

つぎに、テオフィリンの HPLC-ECD の特異性について評価するために、テオフィリンの代謝物及び類縁物質がトロロックスの酸化前置波により塩基として検出されるか確認した。 0.1 mM のカフェイン、テオブロミン、尿酸、3-メチルキサンチンの標準溶液を HPLC-ECD に注入したところ、これらの化合物に由来するピークは、クロマトグラム上に出現しなかった。コンピュータソフト [Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14] を用いた pK_b のシミュレーションでは、テオフィリンは $pK_b=12.3$ 、カフェイン、テオブロミン、尿酸、3-メチルキサンチンはいずれも $pK_b > 13$ であった。これらのテオフィリン代謝物及び類縁物質は塩基性が非常に弱く、トロロックスの酸化前置波が出現しないため検出不能であったと考えた。そのほかのテオフィリン代謝物として 1-メチルキサンチン、1-メチル尿酸、3-メチル尿酸、1,3-ジメチル尿酸などがあるが、これらも $pK_b > 13$ であり、検出は困難と考えられる。このようにテオフィリンの HPLC-ECD は、カフェイン等のテオフィリンの代謝物及び類縁物質の妨害を受けず、特異性に優れることを示した。

5・3 血中テオフィリンの定量と PK パラメーター算出

テオフィリンは、気管支喘息や慢性気管支炎などの呼吸

Fig. 9 Chromatograms of (A) a 20 μM theophylline standard solution and (B) rat plasma 2 hr after the oral administration of 10 mg kg^{-1} of theophylline obtained by HPLC-ECD based on trolox oxidation

The HPLC conditions used were: column, Inertsil SIL 100A (100 mm $\times$ 1.0 mm i.d., 3 μm); column temperature, 20 $^{\circ}\text{C}$; mobile phase, acetonitrile; trolox solution, acetonitrile containing 1.5 mM trolox and 20 mM LiClO_4 ; flow rate of mobile phase, 50 $\mu\text{L min}^{-1}$; flow rate of trolox solution, 90 $\mu\text{L min}^{-1}$; applied potential, +1.1 V vs. Ag/AgCl. The arrows indicate the peak of theophylline. Ten microliters of plasma was mixed with 0.2-mL chloroform-isopropanol (50:50) and from the collected chloroform phase theophylline in plasma was extracted. Used and reproduced with permission from ref. #39.

器系疾患の治療に利用される。テオフィリンの代謝速度は患者個人ごとで異なるため、治療薬物モニタリングの対象薬物であり、血中テオフィリン濃度の測定結果をもとに患者個々に適した投与量が設定される。テオフィリンの分析の対象が、新生児や乳幼児、あるいは高齢者の場合、採血量が少なくなるため、微量の血漿量で分析できる方法が望まれる。本節では、トロロックスの酸化前置波に基づくテオフィリンのHPLC-ECDが、微量の血漿量で血中テオフィリンを定量でき、PKパラメーターの算出に適用できることを明らかにした³⁹⁾。

テオフィリン投与前のラット血漿 10 μL にテオフィリンの標準溶液を加えて試料溶液を調製し、血漿中テオフィリンをクロロホルムとイソプロパノール混液で抽出する前処理方法について、その回収率を確認した。血漿中のテオフィリン濃度が 200, 50, 20 μM になるように調製した試料を分析した結果、回収率はそれぞれ 89.3, 87.5, 95.3 % であった。クロロホルム-イソプロパノール混液による溶媒抽出を用いた比較的簡易な前処理方法で、真度と精度に優れた血中テオフィリンの定量分析を行うことができた。

Fig. 9B には、テオフィリン投与 (10 mg kg^{-1}) 2 時間後のラット血漿のクロマトグラムを示した。テオフィリン投与 24 時間にわたって血中テオフィリンの定量を行い、得られた時間-濃度プロファイルから PK パラメーター²⁵⁾を算出した。ラットにおける PK パラメーター [平均値 $\pm$ SE ($n=5$)] は、 $C_{\text{max}}=41.9\pm2.66$ μM , $t_{\text{max}}=2.0\pm0.37$ hr, $\text{AUC}_{0-24\text{h}}=472.1\pm42.2$ $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$, 消失速度定数(k_{el})= 0.11 ± 0.01 hr^{-1} , $t_{1/2}=6.19\pm0.47$ hr, $V_d=269.21\pm8.13$ mL, クリアランス (Cl)= 30.15 ± 2.31 mL hr^{-1} であった。

トロロックスの酸化前置波に基づき、テオフィリンを塩基として検出する HPLC-ECD は、血中テオフィリン定量において感度と特異性に優れ、微量量の血漿で分析可能であった。テオフィリンの HPLC-ECD は、テオフィリンの治療薬物モニタリングや副作用の発症メカニズムを解明するための分析法として適用可能と考えられる。

6 結 言

酸化還元物質を特異的に検出できるアンペロメトリック様式の HPLC-ECD につき、測定対象の拡張及び感度と特異性の向上を目指したシステムの開発を行い、構築した HPLC-ECD システムを種々の薬物の血中動態分析へ応用した。グラッシーカーボンを用いる電極に用い、酸化還元能を有するフラボノイド類を一斉分析できる HPLC-ECD システムを構築し、分析カラムのダウンサイズ化によって amol レベルのカテキン類の定量に適用可能な超高感度 CLC-ECD を開発できた。炭素電極の電位窓の範囲内で高感度定量が困難な物質については、BDD 電極の適用を図った。PMFs が BDD 電極上で電解酸化することを明らかにし、fmol レベルのノビレチンの定量に適用可能な高感度 CLC-ECD を開発できた。さらに、酸化還元能を有さない物質であっても、酸物質であればキノンの還元前置波を、あるいは塩基物質であればトロロックスの酸化前置波を利用することで電気化学検出可能であることを示した。キノンの還元前置波を利用した HPLC-ECD によって血中バルプロ酸と FFA を、トロロックスの酸化前置波を利用した HPLC-ECD によって血中テオフィリンを高感度に定量できることを示した。このように、測定対象物質ごとに適切な電極酸化還元反応を活用することで、高感度かつ特異的な HPLC-ECD を開発できた。

本稿で紹介した薬物の HPLC-ECD は、血液由来のマトリックスが複雑であっても、感度、特異性、真度、精度に優れることから、血中薬物の動態分析において信頼できる分析結果を提供できる。また、前処理方法は比較的簡便であるため汎用性の観点で優れており、微量量の血漿試料で同一個体の動態分析が可能であるため正確な PK パラメーターを算出する上で有利であることが分かった。

HPLC-ECD は、その感度と特異性を適切に活かすこと

で、血中薬物の動態分析において有用であった。

文 献

- 1) F. Kusu, A. Kotani : "HPLC with Electrochemical Detection" in (Ed.) R. A. Shalliker, "Hyphenated and Alternative Methods of Detection in Chromatography", p. 187 (2012), (Taylor & Francis, FL).
- 2) D. M. Radzik, S. M. Lunte : *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **20**, 317 (1989).
- 3) A. M. Krstulovic : *J. Chromatogr. B*, **229**, 1 (1982).
- 4) A. K. Sakhi, K. M. Russnes, S. Smeland, R. Blomhoff, T. E. Gundersen : *J. Chromatogr. A*, **1104**, 179 (2006).
- 5) B. Yang, A. Kotani, K. Arai, F. Kusu : *Anal. Sci.*, **17**, 599 (2001).
- 6) S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M. G. Simic : *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4846 (1994).
- 7) D. Jin, H. Hakamata, K. Takahashi, A. Kotani, F. Kusu : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77**, 1147 (2004).
- 8) R. D. Rocklin, T. R. Tullsen, M. G. Marucco : *J. Chromatogr. A*, **671**, 109 (1994).
- 9) B. Yang, K. Arai, F. Kusu : *Anal. Biochem.*, **283**, 77 (2000).
- 10) A. Kotani, N. Miyashita, F. Kusu : *J. Chromatogr. B*, **788**, 269 (2003).
- 11) A. Kotani, K. Takahashi, H. Hakamata, S. Kojima, F. Kusu : *Anal. Sci.*, **23**, 157 (2007).
- 12) D. Jin, H. Hakamata, K. Takahashi, A. Kotani, F. Kusu : *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 662 (2004).
- 13) A. Kotani, S. Kojima, H. Hakamata, F. Kusu : *Anal. Biochem.*, **350**, 99 (2006).
- 14) M. N. Clifford, J. J. J. van der Hooft, A. Crozier : *Am. J. Clin. Nutr.*, **98**, 1619S (2013).
- 15) T. Miyazawa : *BioFactors*, **13**, 55 (2000).
- 16) J. Zheng, M. Song, P. Dong, P. Qiu, S. Guo, Z. Zhong, S. Li, C.-T. Ho, H. Xiao : *Mol. Nutr. Food Res.*, **57**, 1999 (2013).
- 17) 栄長泰明 : *ぶんせき (Bunseki)*, **2012**, 243.
- 18) A. Kotani, K. Nagami, C. Mino, Y. Sugawara, K. Takahashi, F. Kusu, H. Hakamata : *Electrochemistry*, **83**, 363 (2015).
- 19) T. Sumi, T. Saitoh, K. Natsui, T. Yamamoto, M. Atobe, Y. Einaga, S. Nishiyama : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 5443 (2012).
- 20) M. G. Dolson, J. S. Swenton : *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2361 (1981).
- 21) Y.-S. Lin, S. Li, C.-T. Ho, C.-Y. Lo : *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 12082 (2012).
- 22) T. Li, Z. Yan, C. Zhou, J. Sun, C. Jiang, X. Yang : *Biomed. Chromatogr.*, **27**, 1041 (2013).
- 23) J. Manthey, T. B. Cesar, E. Jackson, S. Mertens-Talcott : *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 145 (2011).
- 24) N. Koga, M. Matsuo, C. Ohta, K. Haraguchi, M. Matsuoka, Y. Kato, T. Ishii, M. Yano, H. Ohta : *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2317 (2007).
- 25) 北海道 TDM 研究会 : *TDM 実践ハンドブック*, (2007), (薬事新報社).
- 26) F. Kusu, T. Fuse, K. Takamura : *J. AOAC Int.*, **77**, 1686 (1994).
- 27) K. Shimada, T. Matsue, K. Shimada : "Reagents for Electrochemical Detection" in (Ed.), T. Toyo'oka, "Modern Derivatization Methods for Separation Sciences", p. 191 (1999), (John Wiley & Sons, NY).
- 28) A. Kotani, Y. Miyaguchi, M. Kohama, T. Ohtsuka, T. Shiratori, F. Kusu : *Anal. Sci.*, **25**, 1007 (2009).
- 29) A. Kotani, T. Kotani, N. Ishii, H. Hakamata, F. Kusu : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **97**, 47 (2014).
- 30) V. Belcastro, C. D'Egidio, P. Striano, A. Verrotti : *Epilepsy Res.*, **107**, 1 (2013).
- 31) G. Luef, M. Rauchenzauner, M. Waldmann, W. Sturm, A. Sandhofer, K. Seppi, E. Trinka, I. Unterberger, C. F. Ebenbichler, M. Joannidis, G. Walser, G. Bauer, F. Hoppichler, M. Lechleitner : *Epilepsy Res.*, **86**, 42 (2009).
- 32) L. Breum, A. Astrup, L. Gram, T. Andersen, K. H. Stokholm, N. J. Christensen, L. Werdelin, J. Madsen : *Metabolism*, **41**, 666 (1992).
- 33) A. Verrotti, A. Scardapane, E. Franzoni, R. Manco, F. Chiarelli : *Epilepsy Res.*, **78**, 171 (2008).
- 34) J. Doucet, J. Fresel, G. Hue, N. Moore : *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **45**, 577 (1993).
- 35) G. Gatti, F. Crema, G. Attardo-Parrinello, P. Fratino, F. Aguzzi, E. Perucca : *Ther. Drug. Monit.*, **9**, 389 (1987).
- 36) J. Taguchi, S. Ohtsuki, F. Kusu : *J. Electroanal. Chem.*, **557**, 91 (2003).
- 37) K. I. Evstratova, N. A. Goncharova, V. Y. Solomko : *Farmatsiya*, **17**, 33 (1968).
- 38) J. Malyszko, M. Karbarz : *J. Electroanal. Chem.*, **595**, 136 (2006).
- 39) A. Kotani, M. Hashimoto, T. Kotani, F. Kusu : *J. Electroanal. Chem.*, **656**, 85 (2011).
- 40) G. Dryhurst : "Electrochemistry of Biological Molecules", p. 156 (1977), (Academic Press, NY).
- 41) P. Augustijns, N. Verbeke : *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 1303 (1992).
- 42) N. Spataru, B. V. Sarada, D. A. Tryk, A. Fujishima : *Electroanalysis*, **14**, 721 (2002).

HPLC with Electrochemical Detection for Plasma Pharmacokinetic Studies

Akira KOTANI^{*1}, Fumiyo KUSU¹ and Hideki HAKAMATA¹^{*} E-mail : kotani@toyaku.ac.jp¹ School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0392

(Received July 1, 2015; Accepted August 18, 2015)

Liquid Chromatography with electrochemical detection (LC-ECD) systems by means of a variety of voltammetric reactions have been developed as a sensitive, selective, and accurate method for determining bioactive compounds in plasma. Capillary LC-ECD (CLC-ECD) utilizing voltammetric oxidation on a glassy carbon electrode was applicable to determine attomole levels of flavonoids that have antioxidant activities. A boron-doped diamond (BDD) electrode was used to provide sensitive CLC-ECD for determining femtomole levels of polymethoxyflavones (PMFs) that were difficult to be oxidized on a carbon electrode. Voltammetric acid sensing by the means of reducing 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone (DBBQ) was applied to determine electro-inactive acid compounds, such valproic acid and free fatty acids (FFAs), and thus enabling one to detect valproic acid and FFAs without derivatization by HPLC-ECD. Moreover, voltammetric base sensing by the means of oxidizing trolox was applied to determine theophylline in plasma. In conclusion, the present HPLC-ECD systems characterized by sensitivity and selectivity are powerful analytical methods for determining plasma bioactive compounds using a small blood sample (about 10 μ L). Additionally, the present HPLC-ECD systems are useful to examine concentration-time profiles of bioactive compounds and determine pharmacokinetic parameters in rat and/or human blood.

Keywords: HPLC; electrochemical detection; pharmacokinetic analysis; bioactive compounds; natural compound.