グラッシーカーボン電極への吸着濃縮を利用した アドリアマイシンの定量

平野伸二*, 升島 努, 吉田久信**, 今井日出夫***

(1985 年 9 月 26 日受理)

電解酸化処理したグラッシーカーボン電極の強い吸着能を利用したアドリアマイシンの電気化学的高感度分析法を検討した。吸着量の pH と浸す時間による変化、及び再還元波を分析指標とするときの、溶液の pH、電位変化速度、加電圧範囲について検討し、吸着に対してそれぞれ pH 7.4, 10 分 (1000 r. p. m.) の条件を、ボルタンメトリーに対してそれぞれ pH 2.0, 200 mV/s, 0~0.9 V の条件を選んだ。試料液 0.5 ml を用いて、日内変動誤差 2.7% で、5~50 pmol の定量が可能であった。血清中の妨害成分を除くため、初め pH 3.0 でクロロホルム抽出した後、水相を pH 8.0 にしてアドリアマイシンを 95% 回収率をもってクロロホルム抽出する方法を提案した。

1 緒 言

アドリアマイシン (Adriamycin, 別名 Doxorubicin, ADM と略記) は広い抗がんスペクトルを持ち、化学療法剤としてよく用いられている¹⁾が、一方で心毒性が強く現れるのでその適用は制限を受ける。そのため体内濃度のモニタリングが必要とされ、簡易で数 ng/ml に及ぶ高感度分析法が望まれている。

従前、ADM の高速液体クロマトグラフィー²⁾、蛍光分析³⁾、ラジオイムノアッセイ³⁾及び質量分析⁴⁾などが報告されているが、一層簡便で迅速かつ再現性のよい高感度分析法に対する要望は強い。

ADM の電気分析については、水銀電極における還元波を主体とする研究^{5)~7)}のほか、酸化波領域に広い適用性を持つカーボンペースト電極における電解⁸⁾が報告されている。ADM は炭素電極におけるサイクリックボルタンメトリー (CV) において、-0.4 V vs. 銀/塩化銀 (pH 2.0) に可逆度の高い還元波とこれに対応する酸化波を与え、これらは ADM の高い特異吸着性を示している。又 +0.6 V vs. 銀/塩化銀付近 (pH 2.0) には可逆度の高い酸化波とこれに対応する再還元波が見られる。グラッシーカーボン電極を用いるとき、これらの電極過程は再現性良く観測できるが、特に電極表面を強く

電解酸化することによって、顕著な吸着が現れ、ADM の検出感度は再現性良く ng/ml に達する⁹⁾。その後、カーボンペースト電極における吸着濃縮、電解検出について Chaney-Baldwin の報告¹⁰⁾があり、更に窪田ら¹¹⁾によって吸着過程の検討が行われた。本報では、前に報告したグラッシーカーボン (GC) 電極への吸着濃縮⁹⁾について、その諸条件を詳細に報告する。ADM は昨今種々の誘導体化による毒性の軽減が検討されつつあるが、その基本構造は変わらないので、本分析法は、それらについても適用可能と考える。

2 実 験

2.1 試 料

ADM, (8S-cis)-10-[(3-Amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxohexopuranyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione は協和醸酵工業製を用い、他の試薬はすべて試薬特級品で、入手したものをそのまま用いた。

2.2 サイクリックボルタンメトリー

CV は北斗電工 HA-104 型ポテンショスタットと扶桑 321 型波形発生器を組み合わせて用いた。対極は白金板、参照電極は銀/塩化銀 (0.1 M 塩化カリウム) 電極とし、電極は東海カーボン GC-20 を後述のように電解処理して用いた。セルは水ジャケットにより循環恒温水によって 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C に保った。

2.3 電極前処理

直径 3.15 mm, 長さ 5 mm の GC (東海カーボン

* 広島大学医学部解剖学第二教室, ** 総合薬学科: 734 広島県広島市南区霞 1-2-3

** 徳山大学薬学部: 729-02 広島県福山市東村町三蔵 985

GC-20) をテフロン管 (直径 10 mm, 長さ 20 mm) に埋め込み, テフロン管の他端はガラス管に継いだ. 電極の定速回転には, 東京理科 HI-25 型かき混ぜ機を用い, ポテンシオスタットの端子と回転する電極との接続は, GC 上に入れた約 10 mm 深さの水銀中へ直径 0.5 mm の銅線を挿入して行った.

GC はテフロンと共にエメリーペーパーで研磨し, 最終 #2000 のエメリーで入念に磨いて光沢面を得る. これを 0.1 M 硫酸ナトリウムを含むマッキルベン緩衝溶液 (pH 6.0) 中に浸し, 1.4 V *vs.* 銀/塩化銀の電圧を印加し, 25 分間通電する. その後, 0 ~ -1.2 V の間を 20 mV/s の掃引速度で 1 回掃引後, 水洗する. この操作によって, 緩衝溶液中, 20 mV/s の電位掃引速度下で観測される充電電流は元の約 2.4 倍に大きくなったが, ADM の吸着量は 6.4 倍に増大した. この電極に対する ADM の吸着は極めて強く, 水洗しても除去されない. 各種の有機溶媒を用いても完全に旧状に復することは困難であった. しかし, 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液で洗浄するとき, 電極は完全に旧状に復し, 再使用できた.

GC 電極は, 上述の電解酸化処理によって, 多少表面の粗雑度を増し, 光沢を失う¹²⁾¹³⁾. このための有効表面積の増加もあるが, 電解酸化により表面にカルボニル基を生じ, これが電極の活性化の主体であることが, -CO, -OH, -COOH などの誘導体化 (2,4-ジニトロベンゼン誘導体など) による表面グループの評価に基づいて Vasquez ら¹⁴⁾ により確かめられている.

3 結 果

3.1 ADM の CV

ADM 分子中のアントラキノン, カルボニル, フェノール性水酸基の三つの部分が電極活性を有し, このうちカルボニル基の還元はかなり負電位で生ずる. Fig. 1 は 0.1 mM の ADM を含む pH 2.0 の試料液の 0.9 ~ -0.8 V *vs.* 銀/塩化銀間の CV を示す. I_A のピークはフェノール性水酸基の酸化, I_C のピークは I_A で生じた酸化体の再還元に対応するものである. Fig. 2 に示すように, これらのピーク電位は溶液の pH に依存し, pH が高くなると I_A は 72 mV/pH, I_C は 56 mV/pH の比率で負電位にずれる. この電極反応は, ϕ をベンゼン環とすると, 模式的に

と表すことができる.

Fig. 1 の II_A , II_C はそれぞれ, キノン部分の還元と

Fig. 1 Cyclic voltammogram of 0.1 mM adriamycin in 0.1 M phosphate solution (pH 2.0)

Scan rate=20 mV/s

Fig. 2 Variation of oxidative and reductive peak potentials with pH

再酸化に対応し, その特徴ある急峻なピーク波形と, 還元, 再酸化ピーク電位の差が小さいことは, この電極過程が拡散律速 {この場合, n を出入電子数とすると, ϕ

ーク, 半ピーク電位の差は $28 \text{ mV}/n$, 還元, 再酸化ピーク電位の差は $57 \text{ mV}/n$ (25°C) となることが理論的に導かれる¹⁵⁾でなく, 吸着に強く依存する過程であることを示している¹⁶⁾.

I_C は, 溶存酸素の還元波の直後に現れるから, そのピーク波高は溶存酸素の影響を免れない. 一方 I_A , I_C には溶存酸素の影響はないので, 定量にはこれを用いることとした.

3.2 ADM の吸着過程の検討

GC 電極を, 25°C の ADM 溶液 ($\text{pH } 7.4$) 中で 1000 r.p.m. で回転するとき, 吸着量の浸す時間による変化を Fig. 3 に示す. Fig. 3 で, フェノール性水酸基の酸化, 再還元ピーク波高で示した吸着量は時間と共に増加し, 30 分を経てもなお飽和値に達していない. そのため, 操作の簡便性を考えて, 電極の吸着濃縮時間は 10.0 分で打ち切ることとした.

Fig. 3 Dependence of peak current on dipping time for adsorption

Dip solution: 1 ml of 100 nM adriamycin solution ($\text{pH } 7.4$)

次いで試料液の pH による吸着量の変化を検討した. Fig. 4 に見られるように, $\text{pH } 7.0$ 以下では, 吸着量は pH によって影響されない. しかし, pH が 8.0 以上になると吸着量は急激に減少し, $\text{pH } 13$ 以上では全く吸着されない. ADM は $\text{pH } 10.4$ において, 1 時間につきその 13% が分解する. 吸着量の $\text{pH } 8.0$ 以上での減少は, この分解によるものでなく, むしろ ADM の電離によるものと推定される. 吸着の機構が, フェノール性水酸基による表面 $-\text{CO}$ への水素結合と考えると, GC の活性化による吸着能の増大, アルカリ性溶液中での吸着量の減少, あるいは 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液による吸着 ADM の脱着などが理解できる.

Fig. 4 Dependence of peak current on pH of dip solution

Dip solution: same as in Fig. 3

ADM は, 還元を受けるとアミノ糖部分との間のエステル結合が切れ, 生じたアグリコン (Adriamycinon) は溶解度を減少する. ADM を 0.2 M 塩酸中, 90°C で 1 時間加熱加水分解し, 生じた沈殿物を水洗後メタノールに溶解し, TLC 蛍光検出でアドリアマイシノンと同定したものを用いて, GC 電極への吸着量を検討した. 結果は予想に反して, ADM と同程度の吸着量しか示さなかった. 市販 (柳本製) の GC 電極を用い, ADM の類似化合物であるダウノマイシンの吸着を見ると, -1.0 V の電圧を印加して還元しつつ吸着させるとき, 単に電極を溶液に浸して吸着させるときの数倍の吸着量が見られる. これから考えると, 電解酸化で前処理した GC 電極は, 単なる溶解度変化で影響されないような強い化学吸着力で ADM を吸着していくものと考えられ, 前述の水素結合機構の妥当性が裏書きされる.

3.3 ADM の検出条件の検討

前述のように, 溶存酸素の影響をこうむらないという理由で, フェノール性水酸基の酸化 (I_A), 再還元波高 (I_C) を ADM の定量に用いることとした. $\text{pH } 7.4$ の

ADM 溶液に 1000 r.p.m. で 10 分間浸し、引き上げて水洗した GC 電極を pH 2.0 の溶液中で 0~0.9 V *vs.* 銀/塩化銀の間を掃引して CV 図を得る。その例を Fig. 5 に示す。

Fig. 5 Cyclic voltammogram used for quantitation of adriamycin adsorbed on glassy carbon electrode

Scan rate=200 mV/s. Each peak corresponds to pH 2.0 phosphate solution containing 100, 200, 300, 400 and 500 mM adriamycin.

3.1 に述べたように、この電極過程には水素イオン濃度が関与する。ADM を吸着させた電極を、ADM を含まない基礎液の中に入れて繰り返し電位掃引を試みると、溶液の pH が高いと、しだいにピーク波高が減少していくことが観測された。これは酸化と還元とが可逆的に進行しないためと考えられる。溶液の pH を 2.0 近傍に減少すると、繰り返し掃引による波高減少は起こらない。pH が低いと、3.1 の中に示す反応式の逆方向の過程（還元）が促進されるためであろう。

この条件下で、電極反応はかなり可逆に近いものとなり、ピーク電流は迅速な電位変化速度に追従できる。可逆系の電極反応でピーク波高は掃引速度の平方根に比例し、一方充電電流は掃引速度そのものに比例するが、ピークの検出は迅速な掃引のほうが有利である。このことも考慮して、吸着 ADM の検出には、pH 2.0 の緩衝液中で、200 mV/s の掃引速度で、ADM の I_A 、 I_C の

ピークを 0~0.9 V *vs.* 銀/塩化銀 にわたって記録するのが適当である。

3.4 標準操作法と検量線

前述の結果をまとめて標準化した分析法を Fig. 6 に示す。本操作に要する時間は 12~13 分であるが、ADM 濃度が高いときは、10 分の吸着濃縮時間を数分の一に短縮できる。

Fig. 6 Standard procedure for determination of adriamycin

標準試料による検量線は、Fig. 7 に示すように低濃度領域のみを見るとほぼ直線に近いが、広い濃度範囲では、高濃度ほど勾配を減じてくる。定量限界は 10 nM、0.5 ml の試料液を用いるとき 5 pmol であり、50 pmol での相対標準偏差は 2.7% (日内誤差, $n=10$) であった。又定量性を考えないときの検出限界は S/N 比を 2 とすると 1 pmol 以下に及んだ。

3.5 溶媒抽出を併用する血しょう中の ADM の定量

ADM はエーテルにはあまり抽出されないが、クロロホルムにはよく抽出されるので、ヒトヘパリン血しょう

Fig. 7 Calibration curves for adriamycin

に ADM を添加した試料を用いて, 溶媒抽出を前処理とする定量法を検討した。

ADM のクロロホルムへの抽出率は pH によって大きく変動する。Fig. 8 に示すように, 抽出率は pH 5 以下で 4% と低く, pH 5 以上で抽出率は増大し pH 8~9 で最大値 78% となる。pH 9 以上での抽出率の減少は ADM の分解のためと考えられる。溶媒抽出される血しょう成分の本分析法に対する妨害を検討するため, 0.5 ml のヒトヘパリン血しょうに 10 ml のクロロホルムを用いて得た抽出分の乾燥残留物を溶かし, 1 μ M の ADM を含む pH 7.4 の溶液とした 0.5 ml について, 標準操作法に示す分析を試みると, ADM のシグナルは約 22% 減少した。これは, ヒト血しょうからの抽出成分に ADM の GC 電極への吸着に競合する成分があることを示したものである。同様の実験を, 塩酸を少量添加して pH 3.0 としたヒトヘパリン血しょうについて試みると, その妨害は 27% に増大した。pH 3.0 で ADM はわずかしきクロロホルムに抽出されないが, 血しょう中の妨害成分は効率よく抽出される。これから, 初め 0.5 ml の血しょう試料を塩酸により pH 3.0 とし, 10 ml のクロロホルムで溶媒抽出し, 有機相を棄却, 残る水相に 0.1 g の炭酸水素ナトリウムを加えて溶かし, pH を 8.0 に上げて再度 10 ml のクロロホルムで溶媒抽出を行い, 有機相の蒸発残留物を 0.5 ml の緩衝液 (pH 7) に溶かして, 分析を行う。これにより, ADM の回収率は 95% で, 血しょう中の妨害成分をほぼ除いて高感度分析を行うことができた。

Fig. 8 Effect of pH on recovery of adriamycin extracted with chloroform

Ten ml of chloroform was used for 0.5 ml aqueous solution containing 100 nM adriamycin.

以上, この方法は, Chaney-Baldwin によるカーボンペースト電極への吸着濃縮を用いる微分パルス法の検出限界 10^{-8} M, 相対標準偏差 10%, 尿試料にのみ適用という結果に比しても, 又蛍光法などの他の方法に比しても, 感度, 精度, 適用性とも優るとも劣らない。

文 献

- 1) H.L. Davis, T.E. Davis : *Cancer Treat. Rep.*, **63**, 809 (1979).
- 2) S. Shinozawa, T. Oda : *J. Chromatogr.*, **212**, 323 (1981).
- 3) H. van Vunakis, J. J. Langone, L. J. Riceberg, L. Levine : *Cancer Res.*, **34**, 2546 (1974).
- 4) E. Watson, K. K. Chan : *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 1611 (1976).
- 5) G. M. Rao, J. W. Lown, J. A. Plambeck : *J. Electrochem. Soc.*, **125**, 534 (1978).
- 6) C. Molinier-Jumel, B. Malfroy, J. A. Reynaud, G. Aubel-Sadron : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 441 (1978).
- 7) L. A. Sternson, G. Thomas : *Anal. Lett.*, **10**, 99 (1977).
- 8) R. P. Baldwin, D. Packett, T. M. Woodcock : *Anal. Chem.*, **53**, 540 (1981).
- 9) H. Imai, H. Yoshida, T. Masujima, S. Hirano : *Rev. Polarogr.* (Kyoto), **27**, 111 (1981).
- 10) E. N. Chaney, R. P. Baldwin : *Anal. Chem.*, **54**, 2556 (1982).
- 11) T. Konse, K. Kano, T. Kubota : *Rev. Polarogr.* (Kyoto), **29**, 71 (1983).
- 12) 今井日出夫, 吉田久信, 升島 努, 尾和 恵 : 分化, **30**, 561 (1981).
- 13) R. M. Wightman, E. C. Paik, S. Borman, M. A. Dayton : *Anal. Chem.*, **50**, 1410 (1978).
- 14) R. E. Vasquez, H. Imai : *Bioelectrochem. Bioergistics*, in press.
- 15) H. Matsuda, Y. Ayabe : *Z. Elektrochem.*, **59**, 494 (1955).
- 16) E. Laviron : *J. Electroanal. Chem.*, **52**, 355, 395 (1974), **100**, 263 (1979).

☆

Electrochemical determination of adriamycin using preconcentration by adsorption on glassy carbon electrode. Shinji HIRANO, Tsutomu MASUJIMA, Hisanobu YOSHIDA and Hideo IMAI (Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 734)

Highly sensitive determination of adriamycin (an anticancer chemotherapy agent) using preconcentration by adsorption on glassy carbon electrode was investigated by an electrochemical method. A glassy carbon electrode was pre-treated by electrolytic oxidation at 1.4 V vs. Ag/AgCl for 25 min in 0.1 M McIlvaine buffer (pH 6.0) containing 0.5 M sodium sulfate. The electrode rotating at 1000 r.p.m. was dipped in 0.5 ml adriamycin solution for 10 min. Then, the quantity of

adriamycin adsorbed was estimated by the oxidative peak current (or by the reductive peak current) recorded by scanning 0~0.9 V span at 200 mV/s in pH 2.0 solution. The determination range was 5~50 pmol with 0.5 ml sample solution, and the within-day relative standard deviation was 2.7% ($n=10$). Plasma sample was pre-treated by two-stages solvent extraction, the first at pH 3.0 to remove interfering plasma component and the second at pH 8.0 to extract

adriamycin. The recovery of adriamycin was 95%.
(Received September 26, 1985)

Keyword phrases

preconcentration of adriamycin by adsorption on glassy carbon electrode; electrochemical determination of adriamycin.