総 説

薬物の体液中濃度測定法

宮入伸一・後藤順一

東北大学薬学部 (〒980 仙台市青葉区荒巻字青葉)

Modern Methods for Drug Level Monitoring

Shinichi MIYAIRI and Junichi GOTO

Pharmaceutical Institute, Tohoku University

(Aobayama, Sendai-shi, 〒980)

Drugs are metabolized in liver and/or target organs mainly. However the metabolizing enzyme activity is variable in individuals because of genetical deviations, aging, environmental factors and so on. Monitoring of drug levels in biological fluids is, therefore, needed to avoid side effects and hyper responses. Recently, elegant methods, immunoassay based upon the antigen-antibody reaction and high-performance liquid chromatography (HPLC), have been introduced into the clinical field. In this review we describe the basics and applications for drug level monitoring of these methods. Gas chromatography is also discussed briefly.

1 はじめに

昔から「匙加減」という言葉で表されるように、投与された薬物の吸収、体内分布、その薬理活性の発揮、そして代謝、排泄という一連の過程は、年齢、性、生活環境、遺伝特性等の因子によって変動する。そればかりか、病態や併用薬物によっても大きく影響を受ける。それゆえ個々の患者について薬物の体内動態を的確に知ることが適正な薬物療法を行うための前提となる。

臨床における薬物の治療効果は、血中濃度によりよく相関することが明らかにされており、薬物の動態解析には、信頼度の高い血中濃度の測定がその基礎となることは言うまでもない。生体試料は、採取量に制約があるうえ、薬物は体液という複雑なマトリックスの中に通常は微量にしか存在しないため、正確かつ迅速な測定は一般に困難とされる。しかし、最近における分析技術の目覚ましい進歩が、これらの問題解決に大きく寄与している。

薬物血中濃度の測定には、光学分析、バイオアッセイ、酵素法、イムノアッセイ、クロマトグラフィーなどが用いられるが、本稿では、このうち主として用いられる後二者を取り上げて述べてみたい。

2 イムノアッセイ

2・1 ハプテン調製の

薬物のイムノアッセイは、1967年のButlerらによるジゴキシンのラジオイムノアッセイ(RIA)に始まり、以来数多くの薬物の微量分析に利用されてきている¹⁾。本法は、感度、特異性、簡便性に優れ、薬物投与時における薬理活性本体、あるいは特定の代謝物のみを測定対象とする場合に有利な手法である。アッセイ系の特異性は用いる抗体の性質に強く依存する。一般に薬物などの低分子化合物は、そのままでは免疫原とならず抗体が産生されないため、いったんハプテン化した後ウシ血清アルブミン(BSA)、カサガイヘモシアニン(KLH)等の高分子タンパクと共有結合させ、異種タンパクの部分構造として免疫原性を獲得させることが必要となる。

ハプテン化とは、低分子化合物(薬物)中にタンパク質との結合のための橋かけ構造(ブリッジ)を新たに構築することであり、多くの場合分子中のヒドロキシル基、アミノ基、カルボニル基あるいはメルカプト基等がその足掛りとして利用される。しかし、これら官能基は分子自身の持つ構造上の特徴でもあり、修飾を施して官能基の化学的性質を変性させることは、特異性に優れる抗体

図-1 グリコウルソデオキシコル酸のハプテン化

を調製する上で好ましいこととは言えない。そればかりか、一般に産生される抗体は、ハプテンのブリッジ近傍に対する認識があいまいであるため、ブリッジの導入位置は、その化合物固有の特徴であり抗体に強く認識させたい官能基、原子団から離れた部位であることが望ましい。したがってハプテンの調製に際しては、薬物の代謝様式も充分考慮に入れてデザインすることが重要である。南原らは抗体産生に用いるハプテンの調製にこれを巧みに利用し、非麻薬性鎮痛剤ペンタゾシン光学異性体の一方のみを特異的に認識する抗体の調製に成功している²⁾。

一般に、ブリッジとして無水コハク酸またはカルボキシメトキシアミンをそれぞれヒドロキシル基、カルボニル基に導入する手法が広く利用される。薬物自身が分子中にカルボキシル基を有する場合でも、有機化学的手法を駆使することによりこのブリッジ部分のカルボキシル基のみをキャリアタンパクと縮合させることも可能である。例えば、図-1に示すグリコウルソデオキシコル酸は24位にカルボキシル基を持っているが、これを利用して高分子タンパク質と結合させると、産生する抗体は生体内に共存するタウリン抱合体を識別できない。そこでこのカルボキシル基をいったん還元的に除去できる2,2,2-トリクロロエチルエステルとして保護したのち、胆汁酸に共通する3位ヒドロキシル基をヘミスクシネートに導いた。ついで、新たに導入したカルボキシル基を活性エステルであるN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルに誘導し、グリシン側のカルボキシル基の保護基を除去しハプテンを調製した³⁾。これをBSAと結合させ家と(兎)に投与して得た抗体は、期待した通り24位アミノ酸抱合の違いを明確に認識した⁴⁾。近年、単クローン性抗体作製の技術が確立されてきてはいるが、特異性の高い抗体を効率よく得る上でこうした適切なハプテンのデザインが重要であることには変わりはない。

抗血清を試薬として用いるイムノアッセイは、抗原-抗体反応をその原理としており、両者間の親和性が高いため(解離定数 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ M)必ずしも目的成分の分

離・濃縮等の前処理を必要としない。さらに操作も簡便であるため、多数の検体を測定するのに適しており、このことが後述するクロマトグラフィーと比較した時の大きな特長といえる。

2・2 ラジオイムノアッセイ

ラジオイムノアッセイ(RIA)では放射性同位元素で標識した抗原の特性がアッセイ系の感度や特異性に影響を与える。用いられる標識抗原の比放射活性が高いほど高感度な系が得られるが、標識体の安定性、抗体との親和性及び放射性同位元素の半減期等についても考慮しなければならない。トリチウム標識体は、比放射活性の高いものが比較的容易に得られ、また非標識抗原との間の構造上の差異が小さく抗体に対する親和性にも大きな違いがないため、今日標識抗原として広く用いられている。また、トリチウムは後述する放射性ヨウ素に比し半減期が長く、高感度なアッセイ系を組み立てるのに有利である。例えば、比放射活性40 Ci/mmolの標識抗原を用いるステロイドホルモンのRIAでは、通常定量限界が10 pg程度の感度が得られる。更に高い感度を必要とするときは、より比放射活性の高いものを用いることで達成も可能となる。

同様に放射性ヨウ素(^{125}I , ^{131}I)標識体も用いられる。本標識体の調製には、抗体産生に用いたハプテンが利用されることが多い。すなわちハプテンのカルボキシル基を介してチロシンメチルエステルあるいはチラミンを共有結合させ、それらのフェノール性ヒドロキシル基のオルト位にヨウ素を標識する⁵⁾。ハプテン自身がアミノ基を有する場合にはBolton-Hunter試薬, N-succinimidyl 3-(4-hydroxy-5-[^{125}I]iodophenyl) propionateを用いて同様に放射性ヨウ素を導入する標識法が工夫されている⁶⁾。抗ハプテン抗体は、一般にブリッジ部分の構造をもその親和性の一部として認識しており、免疫の際と同じハプテンを標識に利用した場合、抗体の標識抗原に対する親和性が著しく高くなり、非標識抗原(薬物)による競合が困難となるため充分な感度の得られないことがある。こうした現象があることは放射性ヨウ素を用いるRIAのみならず、後述するエンザイムイムノアッセイ(EIA)等においても考慮に入れておく必要がある。

イムノアッセイにおいて非標識抗原の量を知るには、後述するホモジニアス系の場合を除き、あらかじめ抗体結合型抗原(B)と遊離型抗原(F)を物理的に分離し、どちらか一方の画分に含まれる標識抗原量を求める必要がある。RIAにおいて、B/F分離には塩化アンモニウムによる塩析法、デキストラン-炭末を用いる吸着法、抗体を前もって固定化しておく固相法、第二抗体法、ポリエチレングリコールを用いる沈殿法が利用されるが、それぞれ一長一短があり、アッセイ系を組み立てるにあ

たっては、それらを比較検討することも必要となろう。

2・3 非放射性イムノアッセイ

RIA は、簡便で感度、特異性に優れた測定法であるが、放射性物質を用いるため、特殊な施設、設備、装置、機器を必要とし、また廃棄物の処理という問題も生じる。そこで、放射性同位元素を用いない非放射性イムノアッセイが工夫、開発された。本法は抗原（または抗体）に標識となる化合物を導入し、それを測定する方法と、抗原と抗体が反応した結果生じる物理的変化を直接定量する方法とに大別することができる。前者は、ハプテンを標識抗原に利用する RIA と原理的に同じであり、標識体にはその量を感度よく測定する酵素や蛍光あるいは発光物質、さらには金属やバクテリオファージ等も用いられる。

2・3・1 エンザイムイムノアッセイ

EIA は、酵素を標識体に用いる方法で、標識用酵素には、基質のターンオーバー数が大きく、純度、比活性が高く安定であり、安価で容易に入手できるものが望ましい。そのうえ測定対象が生体試料ということを考え合わせ、生体内には高濃度に存在せず、かつ生体内きょう雑物による阻害等を受けないことも重要な条件となる。

本法は、抗原抗体反応の結果 B あるいは F のいずれかの標識酵素にのみ活性が認められる現象を利用したホモジニアス EIA と、RIA と同様に酵素活性測定の前処理として B/F 分離を必要とするヘテロジニアス EIA の二つに分けられる。

1) ホモジニアス EIA

Ullman らにより開発された EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) は代表的なホモジニアス EIA として知られ、既にキット化されている⁷⁾。標識酵素としてグルコース-6-リン酸脱水素酵素を用いたものは、抗体が標識抗原と結合することによって酵素の活性中心への基質の進入が妨げられ、見掛け上の酵素活性が低下する現象を利用している。一方、リンゴ酸脱水素酵素を標識酵素とした場合は、抗体と結合した時にのみ酵素活性がみられ、その検量線は前者と逆相関の関係になる。これらのアッセイ系はフェニトイン等の抗てんかん薬、強心配糖体、抗生物質の測定に適用されている。

7-(β -ガラクトシル) ウンベリフェロン誘導体を標識抗原として用いる SLFIA (substrate-labeled fluorescent immunoassay) も開発、キット化されている⁸⁾。これは標識抗原のハプテン部分に抗体が結合すると、ガラクトシターゼによる標識抗原の加水分解反応が阻害され、発光性物質を生成しないことを利用したものである。さらに、抗酵素抗体結合によるハプテン化酵素の活性阻害が抗ハプテン抗体の結合により抑制されることを原理とした Emmia、抗体の標識に用いた酵素

の生成物を基質とする第二の酵素を抗原と隣接させて固定化すると、標識抗体が固定化抗原に結合することによってこれら酵素による二段階反応の効率が著しく高まることを原理とする enzyme channeling 法等も開発されている。

2) ヘテロジニアス EIA

EIA では標識した酵素の活性を指標として薬物の量を測定するため、結合型及び遊離型抗原いずれもが酵素活性を有する場合、前処理としてこれらを分画することが必要となる。このような場合をヘテロジニアス EIA と称し、B/F 分離には、第二抗体法、固定化抗体法、及びこれら二者を組み合わせた固定化第二抗体法等が用いられる。

EIA における特異性は、RIA の場合と同様主として抗体の特性に依存する。これに対し感度は、標識抗原と抗体との組み合わせに大きく影響されるため、酵素標識体の調製法が重要となる。酵素標識抗原の抗体に対する親和性が非標識抗原（薬物）のそれと同程度である両者の組み合わせが望ましいことは言うまでもない。したがって免疫用と標識抗原用に同一のハプテンを用いると抗体が標識抗原に対して高い親和性を示すことがあり、その結果競合に高濃度の非標識抗原を必要とするため感度が低下する。ハプテン分子上の同位置に結合様式または長さの異なるブリッジを導入した化合物を免疫用と標識抗原用に使い分ける（ブリッジヘテロロジー）とこうした問題を解決できることがある。前者はエステル結合、チオエーテル結合等異なった化学種を組み合わせる場合であり⁹⁾、後者ではより短いブリッジを有するハプテンを標識抗原用とすると感度の向上の認められることが報告されている¹⁰⁾。これに対しブリッジの導入位置等ハプテンの構造を大きく変える位置ヘテロロジーも試みられているが、抗体への親和性が減少するため特異性の低下することもあり注意が必要である⁹⁾。

EIA では調製した標識酵素のハプテンと酵素タンパクとの結合モル比もアッセイ系の感度を左右する重要な因子の一つであり、充分な抗原性が得られしかも結合数が最低のとき、感度は最大となる¹¹⁾。

今日、橋かけ剤として種々の化合物が市販に供されているが、self-coupling（酵素あるいはハプテン同士の間での結合）を起こさず酵素タンパクと薬物を緩和な条件下縮合し得るものが望ましい。N-(3-Maleimidobenzoyloxy) succinimide (MBS) は現在最も広く使われている橋かけ剤のひとつで、二つの官能基に対する反応活性基を併せ持っており、チオール基を有する酵素とアミノ基を有する薬物とを縮合させるのに有用である¹²⁾。また、同種の橋かけ剤 N-(maleimidoalkyl-carboxy) succinimide と組み合わせることにより、ブリッジヘテロロジーによるアッセイ系を容易に組み立て

ることが可能となり、感度の向上が期待できる¹³⁾。この手法は、ペニシリン、ゲンタマイシン、バイオマイシン、セファロsporin等の抗生物質に対するEIAに応用されている。

西洋ワサビペルオキシダーゼが糖タンパクであることを利用して、酵素の遊離アミノ基を保護した後、糖部分を過ヨウ素酸で酸化し、生成したジアルデヒド体と抗原のアミノ基との間にイミン(シッフ塩基)を形成させ、ついで水素化ホウ素ナトリウムにより還元して安定な付加体とするNakaneの方法はネオカルチノスタチンのEIAに応用されている¹⁴⁾。このほか、カルボキシル基を持つハプテンを*in situ*で活性化しついでアミノ基と反応させる混合酸無水物法やカルボジイミド法、またこれをいったん*N*-ヒドロキシスクシンイミドとのエステルとする活性エステル法も酵素標識体の調製法として用いられている。なかでも活性エステル法は中間体を容易に単離・精製することができ、酵素とハプテンの結合モル比を制御することにより感度に優れるアッセイ系を再現性よく組み立てることができる点で有利である¹⁵⁾。

2・3・2 蛍光イムノアッセイ

蛍光イムノアッセイは酵素タンパクの代わりに発蛍光性物質を抗原に標識するものであり、その感度はEIA同様抗体との親和性と共に標識に用いた化合物の蛍光強度にも依存する。本法もB/F分離を必要とするヘテロジニアス系と必要としないホモジニアス系に大別される。前者には、希土類元素Eu(III)のキレート化合物を標識に用いる方法(時間分解蛍光法で測定)が¹⁶⁾、また後者には前述の蛍光基質イムノアッセイ(SLFIA)や蛍光偏光イムノアッセイ(fluorescence polarization immunoassay)¹⁷⁾があり、それぞれ対応するEIAと比べ感度的にも遜色がないとされる。

蛍光偏光イムノアッセイは、TDX[®]という商品名でキット化されゲンタマイシン、フェニトイン等の血中濃度測定に応用されている。本法は蛍光偏光消滅現象をその基本原理としている。発蛍光性物質で標識した抗原を直線偏光で励起するときのそれと平行の蛍光強度を I_x とし、垂直の強度を I_y とすると、偏光度は $P = (I_x - I_y) / (I_x + I_y)$ で表される。この時 P 値は0~1の範囲にあり、蛍光標識抗原のブラウン運動により定まる値である。蛍光分子の運動の盛んな遊離型では I_x と I_y は近似し(P 値は小さい)、ハプテン部分に抗体が結合して標識抗原分子の運動が抑制されている結合型では I_x に比べ I_y が小さくなる(P 値は大きい)。従って試料中の抗原となる薬物分子と蛍光標識抗原との間の抗体に対する競合的結合反応の結果、変動する P 値から薬物の量を求めることができる。

2・3・3 Competitive Nephelometric Immunoassay¹⁸⁾

本法も前述の蛍光偏光イムノアッセイ同様抗原抗体反応による物理的変化を直接測定に利用している。すなわち、高分子タンパクやラテックス等にハプテンを複数個結合させ調製した多価抗原が抗体と結合するとき分子の大きい不溶性沈降物を生じるため光散乱することを原理としている。レーザーネフェロメーターにより測定した光散乱の強度より沈殿物の量を求め、競合した薬物等の低分子抗原を定量する方法である。本法は、B/F分離を必要としないため簡便かつ短時間で結果が得られ、感度に若干難があるものの血中濃度の比較的高いテオフィリン、フェノバルビタール、フェニトイン等のモニタリングに威力を発揮すると考えられる。

3 クロマトグラフ法

3・1 高速液体クロマトグラフィー

クロマトグラフ法は、抗けいれん(痙攣)薬のように多剤併用が行われるときや活性代謝産物を含め多成分の同時測定が求められる場合などにその特徴が発揮される。なかでも高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、広範囲に及ぶ薬物を温和な条件で測定できるうえ、取り扱いも容易であるなど数々の利点を備え、現在体液中薬物濃度の測定に広く利用されている。

生体内薬物の測定では、試料中に多量のきょう雑物が含まれ、しかも日常分析法として繁用されることが多いため、固定相には単位体積当たりの吸着量が大きく、透過性に優れ、しかも粒子が均一で径のなるべく小さい充填剤が適している。通常、ODS等の化学結合型シリカが用いられる。薬物は内因性物質に比し脂溶性の高いものが多いためこの種充填剤を用いた逆相分配クロマトグラフィーでは測定を妨害するきょう雑物が先に溶出され、薬物の連続的な分析が容易となる。

3・1・1 検出法

体液中薬物濃度の測定では、検出系がきわめて重要となる。検出器は測定対象に対して鋭敏に応答し、直線性を示す範囲が広く、しかも勾配溶出などの溶離条件に影響されず、かつ操作が簡便であることなどが望まれる。薬物にはそれ自身紫外吸収を示すものが多い。このためUV検出器は最も広く利用され、薬物によっては数ngレベルを検出できるが、紫外吸収をもつきょう雑物のため、しばしばクロマトグラムが妨害される。蛍光検出法は、感度に優れ、pgレベルの薬物が検出可能であり、選択性、特異性の点でも有利である。励起波長は多くの場合300~400nmが用いられ、レーザー光源で照射する方法や化学的に励起発光させる化学発光も工夫されている¹⁹⁾。電気化学検出器(ECD)は、電気化学的に活性な原子団を有する化合物に対して高感度、高選択的に応答し、アポモルフィン、トコフェロール、ユビキノンの検出に利用される。

3.1.2 誘導体化法

薬物それ自身が検出器に対して十分な応答を示さないか、あるいは体液中レベルが検出感度に及ばない薬物については誘導体化が種々工夫される。HPLCにおける誘導体化は、薬物を誘導体化反応に付した後、分離、検出するプレカラム法と薬物を直接カラムで分離した後、その溶出液に試薬を送液して反応させ検出するポストカラム法の二者に大別される。いずれも高感度化を主な目的とするが、共存物質による妨害の除去にも役立ち、選択性向上の利点をも備えている。現在カルボキシル、アミノ、カルボニル、メルカプトならびにヒドロキシル基などを対象としたUV、蛍光、電気化学検出器用誘導体化剤が種々開発されている。詳しくは総説を参照されたい^{20), 21)}。

3.1.3 光学異性薬物の測定

薬物には分子内に不斉中心を持ち、しかもその光学対掌体の一方が他方に比して強い薬理活性を示すにもかかわらず、光学分割が生産規模では困難なことからラセミ体として臨床に提供されているものが少なくない。しかし、光学異性体の吸収、代謝、排泄など体内動態は相互に異なることが指摘されている。例えば合成ステロイド剤の norgestrel は、(+)体と(-)体とで異なる代謝を受け、またグルクロン酸抱合にも差異のあることが知られており、非ステロイド性抗炎症薬である α -アリルプロピオン酸では、生体内で一方の光学異性体が他の対掌体に一方的に異性化することも明らかにされている。このため光学異性薬物の有効性と安全性を確保するうえに、これらの信頼度の高い測定法の確立がত্যよくもとめられている。

HPLC による光学異性体の分離は、原理的に二者に大別される。その一つは光学活性な固定相あるいは移動相を用い、相システムにキラルな環境を導入して直接分離する方法である。固定相としては、光学活性化化合物を化学結合させたシリカなどが利用される。一方、移動相に光学活性アミン、アミノ酸類と金属イオンを添加して用いる試みもある。他の一つは、薬物を光学活性誘導体化剤と反応させジアステレオマーに導いた後、通常のカラムで分離する方法であり、検出の高感度化をも図り得る点の特徴とされる^{22), 23)}。一般に体液中における光学異性薬物は微量であり、しかも内因性きょう雑物による妨害を受けやすいため、その測定にはジアステレオマー法が用いられることが多い。これに用いる誘導体化剤は、キラリティー、反応活性基及び検出器に対し高感度に応答するシグナル・グループを併せ備えることが不可欠である。

図-2 に代表的なアミノ基用光学活性誘導体化剤をあげた。1~4 はカルボキシル基及びその誘導体を反応活性基として有しており、アミノ基と縮合してアミドを生

図-2 アミノ基用光学活性誘導体化剤

図-3 カルボキシル基用光学活性誘導体化剤

成する。一方、5~8 は光学活性なイソシアナート及びイソチオシアナート類であり、それぞれアミノ化合物と反応して 250 nm 付近に強い UV 吸収を持つ尿素及びチオ尿素誘導体を生成する。

カルボキシル化合物をジアステレオマーに誘導する場合、結合様式としてはエステル及びアミドが考えられる。しかし、試薬調製の容易さ、生成物の安定性、さらには光学異性体の相互分離という点から後者の方がよく利用される。図-3 にカルボキシル基用光学活性誘導体化剤の代表例を示した。9~11 はいずれも α -アリルエチルアミン構造を有し、蛍光検出器に対して高感度に応答する。一方、12, 13 は易酸化性で可逆性に優れるフェロセンを electrophore とする光学活性誘導体化剤で、ECD に高感度に応答するジアステレオマーを与える。

アルコール性ヒドロキシル基は、通常アシルクロリドあるいはイソシアナートを用いてそれぞれエステル、ウ

図-4 ヒドロキシル基用光学活性誘導体化剤

レタンに誘導される。しかし、前者は試薬自身の安定性に欠け、一方、後者は反応性に難がある。アシルクロリドのプロイドハロゲン体であるカルボニル・ニトリルは、安定性に優れ、しかもアルコール性ヒドロキシル基に対する反応性もアシルクロリドとほぼ同程度である。このような反応活性基を備えた光学活性誘導体化剤 14 (図-4) は、 β -遮断薬やヒドロキシ酸光学異性体の分離に利用される。このものは在来の誘導体化剤が Mosher 型試薬と呼ばれる中心性不斉化合物であるのに対し、軸性不斉という特異な構造を備えている。

3.2 ガスクロマトグラフィー

ガスクロマトグラフィー (GC) は、卓越した分離能を有し、多成分を同時に分離、定量し得るという大きな特徴を備えている。しかし、難揮発性物質を揮発性に変え、熱安定性を増して熱分解を防止することが GC 分析の前提条件となる。そのうえ生体試料の入念なクリーン・アップが不可欠なことから、臨床の間では不利とされてきた。近年、さらに感度、特異性に優れる検出器、分離能のきわめて高いキャピラリーカラムが開発され、試料処理の自動化とも相まって、再びその有用性が注目されるにいたっている。

現在、最も広く用いられる水素炎イオン化検出器 (FID) のフレームにアルカリ金属塩を挿入した熱イオン化検出器 (FTD) は N-P (あるいは N) 検出器とも呼ばれ FID に比し窒素で 50~100 倍、リンで 500~1 000 倍高感度であり、安定性、再現性にも優れることから窒素を含むものが多い薬物の測定にきわめて有用である。

キャピラリーカラムは、分離能に優れ、S/N の向上に伴って検出感度もよくなる。近年、丈夫な溶融シリカ (fused silica) に固定液相を化学結合させた安定で取り扱いやすい高性能キャピラリーカラムも開発されており、体液中薬物の測定に威力を発揮しよう。

GC/マスマスペクトロメトリー (MS) は、分離、感度、特異性に優れ、今日生体微量成分の測定に欠くことのできない手段となっている。比較的安価で、簡便な装置も市販に供されるようになり、薬物モニタリングへの応用も今後ますます増大していくものと思われる。

3.3 前処理法

体液中にはタンパクをはじめとする内因性物質が高濃度に含まれ、これらが目的成分の測定上大きな障害とな

る。とりわけクロマトグラフ法では、精度、正確度の向上のみならず分離カラムの劣化を防ぎ、再現性ある結果を得るうえに適切な前処理法が重要となる。最も簡便な試料前処理法としては、メタノール、エタノール、トリクロロ酢酸、過塩素酸を用いる除タンパク操作があげられる。しかし、このような除タンパク操作のみでは通常十分な効果が得られず、有機溶媒で目的成分を直接抽出分離する方法が広く行われる。この時、けいそう土を充填したカートリッジを利用すると簡便、かつ高い再現性で、しかも効率よく薬物を回収、濃縮することができる。一方、極性の高い薬物及び代謝産物の抽出には Amberlite XAD 樹脂や化学結合型シリカ充填のカートリッジを用いる固相抽出法が有効である³⁷⁾。

近年、プレカラムを利用してカラムスイッチングにより試料を直接高速液体クロマトグラフに注入し、薬物を測定する方式が種々工夫されている。プレカラムには、主に化学結合型シリカやこれに変性タンパクをコートした担体を利用する手法も考案されている。

〔平成元年 (1989) 7 月 17 日受理〕

文 献

- 1) V.P. Butler Jr., J.P. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **57**, 71 (1967)
- 2) T. Nambara, T. Tanaka, M. Numazawa, *J. Pharm. Dyn.*, **2**, 151 (1979)
- 3) S. Miyairi, H. Shioya, M. Ebihara, H. Hosoda, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1891 (1984)
- 4) S. Miyairi, H. Shioya, H. Hosoda, T. Nambara, *Jap. J. Clin. Chem.*, **15**, 110 (1986)
- 5) J.I. Thorell, S.M. Larson, "Radioimmunoassay and Related Techniques—Methodology and Clinical Applications", The C.V. Mosby Company, St Louis (1978), p.32
- 6) J.I. Langone "Methods in Enzymology", Vol. 70, Academic Press, New York (1980), p.221
- 7) E. Engvall "Methods in Enzymology", Vol.70, Academic Press, New York (1980), p.419
- 8) J.F. Burd, "Methods in Enzymology", Vol.74, Academic Press, New York (1981), p.79
- 9) H. Hosoda, H. Yoshida, Y. Sakai, S. Miyairi, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3035 (1980)
- 10) H. Hosoda, N. Kawamura, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1969 (1981)
- 11) H. Hosoda, Y. Sakai, H. Yoshida, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2147 (1979)
- 12) T. Kitagawa, T. Aikawa, *J. Biochem.*, **79**, 233 (1976)
- 13) K. Fujiwara, M. Yasuno, T. Kitagawa, *Cancer Res.*, **41**, 4121 (1981)
- 14) K. Matsuoka, M. Maeda, A. Tsuji, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1864 (1980)
- 15) H. Hosoda, Y. Sakai, H. Yoshida, S. Miyairi,

- K. Ishii, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 742 (1979)
- 16) 前田昌子, 辻 章夫, *ぶんせき*, **1989**, 436
- 17) R.A.A. Watson, J. Landon, E.J. Shaw, D.S. Smith, *Clin. Chim. Acta*, **73**, 51 (1976)
- 18) T. Nishikawa, H. Kubo, M. Saito, *Clin. Chim. Acta*, **91**, 59 (1979)
- 19) 今井一洋, 沢田嗣郎, 渡辺訓行, 渡辺秀夫編, “超高感度高速液体クロマトグラフィー” 学会出版センター (1980), p.1
- 20) 中村 洋, *ぶんせき*, **1980**, 561
- 21) 後藤順一, 南原利夫, *ぶんせき*, **1984**, 60
- 22) S. Hara, J. Cazes, *J. Liq. Chromatogr.*, **2** (8), (1979)
- 23) S. Hara, J. Cazes, *J. Liq. Chromatogr.*, **9** (2 and 3), (1986)
- 24) C. Baufeld, M. Rowland, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 921 (1983)
- 25) G. Helmchen, W. Strubert, *Chromatographia*, **7**, 713 (1974)
- 26) K.J. Miller, J. Gal, M.M. Ames, *J. Chromatogr.*, **307**, 335 (1984)
- 27) J. Goto, M. Hasegawa, S. Nakamura, K. Shimada, T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **152**, 413 (1978)
- 28) J. Goto, N. Goto, A. Hikichi, T. Nambara, *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 1179 (1979)
- 29) A. Darmon, J.P. Thenot, *J. Chromatogr.*, **374**, 321 (1986)
- 30) T. Nambara, S. Ikegawa, M. Hasegawa, J. Goto, *Anal. Chim. Acta*, **101**, 111 (1978)
- 31) J. Gal, A.J. Sedman, *J. Chromatogr.*, **314**, 275 (1984)
- 32) J. Goto, N. Goto, A. Hikichi, T. Nishimaki, T. Nambara, *Anal. Chim. Acta*, **120**, 187 (1980)
- 33) J. Goto, N. Goto, T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **239**, 559 (1982)
- 34) J. Goto, M. Ito, S. Katsuki, N. Saito, T. Nambara, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 683 (1986)
- 35) K. Shimada, E. Haniuda, T. Oe, T. Nambara, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 3161 (1987)
- 36) J. Goto, N. Goto, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4597 (1982)
- 37) 後藤順一, 南原利夫, “最新高速液体クロマトグラフィー, 応用編Ⅱ”, 廣川書店 (1983), p.405

国際油脂情報

(Cocomunity 15 Sept. 1989, 吉富和彦)

★インドのココナッツ・クリームプロジェクト

インドの Trivandrum にある地域研究所は, ココナッツ・クリームの製造技術を完成した。本研究所において開発された生産技術は, 他の国の技術とはやや異なっている。品質的には他国で生産, 市販されているものよりも良いと評価されている。デモンストレーションを兼ねたパイロットプラントが, 1990年2月に生産に入れるように, Ernakulam のココナッツ開発部によって建設されている。

★フィリピンのココナッツ油, 燃料油とのバーター委員会

フィリピンの国会議員は, ココナッツ油貿易協定を石油輸出国やココナッツ油及び他のココナッツ製品に対する需要量の多い国との間に締結しようとする, 議会の決議案を採択した。本指令を有効に実施するために, 議会はまたフィリピンココナッツ会議 (PCA), 下院及び上院, エネルギー局及び貿易工業省の代表をバーター委員会に含めることを提案した。

★インドのココナッツ油の需要, 増加

最近のインドにおけるココナッツ油需要は, 同国の植物油需要量の6~7% になっているもようである。やし油の生産量約22万tに対し, 需要量はほぼ35万tとなっている。現在の生産状況でも, ココナッツ油はひまわり, あまに, ごまなどの同国で生産される油並みの価格になっている。ココナッツ油の消費割合は, 供給量の保証と通常の価格動向とによって増加しているもようである。

★アメリカのココナッツ油, 輸入増加

アメリカ農務省が7月に出した報告によれば, アメリカの1989/90年(10月~9月)のココナッツ油輸入量は, 昨年の低輸入量から10万t増えて47万5,000tになるものと見込まれる。アメリカの国内消費量は, 同年度で42万5,000tと前年比4%の増加が見込まれる。EECと日本を含む他の諸国もココナッツ油輸入量の増加が見込まれる。アメリカ農務省は世界のコプラ生産量を470万tと見込んでいる。オイルワールド誌は初期に490万tと予測している。

★“世界のココナッツ”

これはAPCC (アジア太平洋ココナッツ連合) の創立20周年記念を祝って出版された本の題名である。過去20年間におけるココナッツ産業の発展を生産, 処理, 研究開発及び国内・輸出等を含めて報告した小冊子で, 24カラーページから成っている。