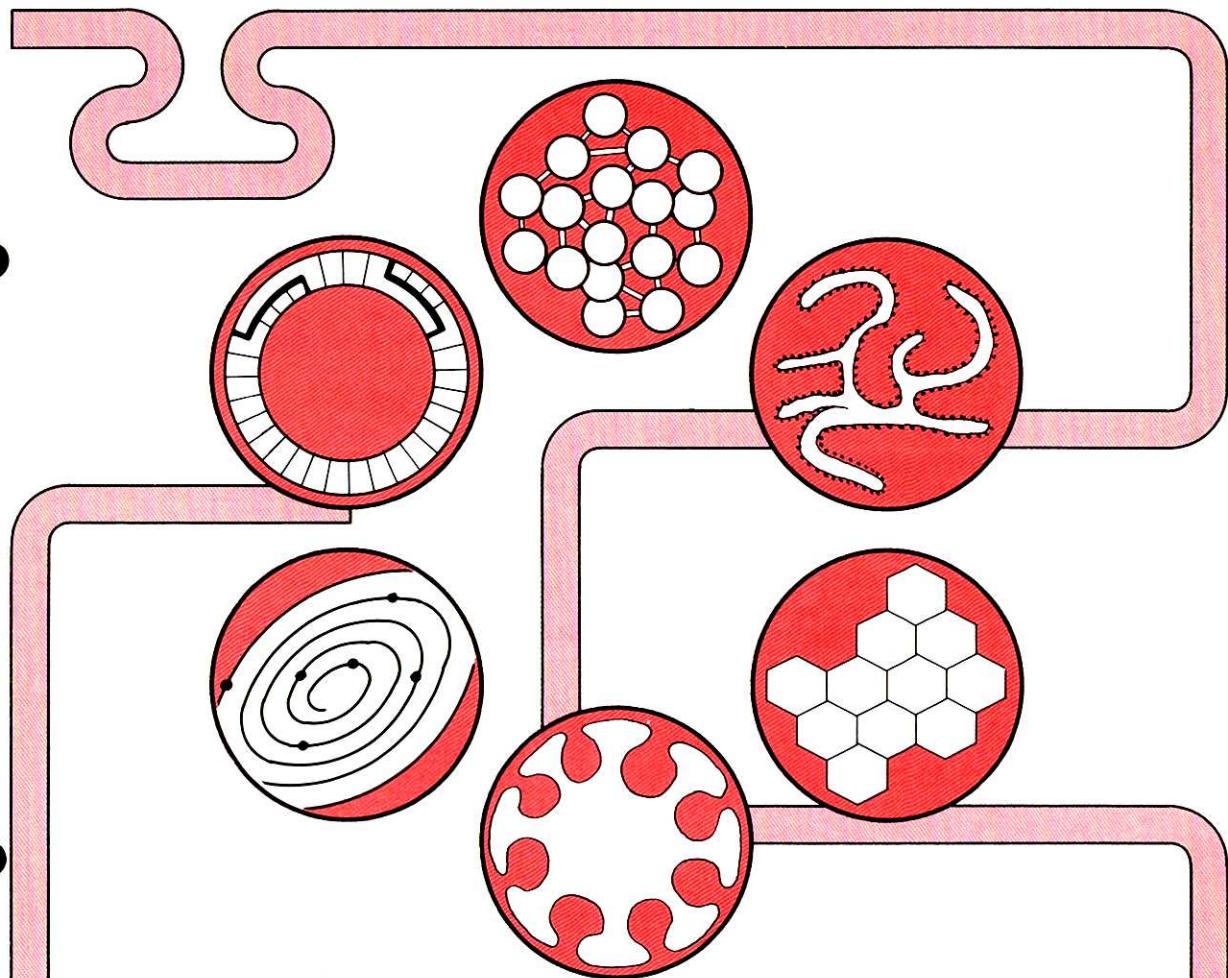


# THE CHEMICAL TIMES

ISSN 0285-2446  
KANTO CHEMICAL CO., INC.  
1982年 No.3 (通巻105号)



## 目 次

高速液体クロマトグラフィーによる薬物血中濃度測定法(Ⅰ) .....	久保 博昭…1882
ポリアミンの生化学(Ⅱ) .....	山川 敏郎…1885
実験室における空気中で不安定な化合物の取扱い法 その1 .....	小宮 三四郎…1888
液-液抽出用 エキストレシート <sup>®</sup> カラム .....	E. メルク社 J. ブライター…1892
E. メルク社 KONTAKTE 1981年 No. 2 より収載	
薬学ゆかりの外国人(7) .....	根本 曾代子…1898
ヘボン Jawes Curtis Hepburn	
ニュースコラム・編集後記 .....	1900

# 高速液体クロマトグラフィーによる薬物血中濃度測定法

北里大学薬学部 助教授 薬学博士 久保博昭

## はじめに

かつて、「医者の匙加減」といわれる経験的な方法によって行なわれてきていた薬物療法は、薬物の著しい薬理効果による副作用の発現とともに跡を断ち、今日、各薬物の安全かつ効果的な治療薬物投与計画が客観性のある科学的な手段によって行なわれつつある。また、薬物は、すべての患者に画一的に医学成書や薬物の効能書に従って投与しても期待される効果が得られなかったり、逆に効果以上の結果を得たり、患者によって様々な反応を呈する。これは、患者の病態および年齢、性、体重、生活環境によって薬物の体内動態（吸収、分布、代謝、排泄）が変動するためである。それゆえ、個々の患者の薬物の体内動態を知ることは、患者にとって適切な薬物療法が受けられると言っても過言ではない。この薬物の体内動態を知る手段としては、薬物の血中濃度を経時的に測定することが上げられる。そして、この薬物の血中濃度測定の臨床的有用性が明らかになるとともに、医療の場に治療薬物濃度モニタリング（Therapeutic Drug Monitoring、以下TDMと略）という新しい分野ができるつつある。そして、今日、病院の臨床検査部または薬剤部で盛んに薬物血中濃度測定が行なわれるようになってきている。この新しいTDMという分野は、薬物代謝、薬物速度論、薬力学、病態生理学、薬品分析、臨床化学などの学問が協力して成立っており、特に血液中の薬物を分析する技術が基礎となる。

表1 TDMの対象となる薬物

抗てんかん剤
Phenytoin, Phenobarbital, Primidone,
Carbamazepine, Ethosuximide, Valproic acid,
循環器用剤
Digoxin, Digitoxin, Disopyramide, Lidocaine,
Procainamide, Propranolol, Quinidine,
抗喘息薬
Theophylline
アミノ配糖体系抗生物質
Amikacin, Gentamicin, Tobramycin,
向精神剤
Lithium, Amitriptyline, Desipramine,
Imipramine, Nortriptyline, Protriptyline,

TDMを行なう必要性のある薬物としては、治療至適濃度域が狭く、副作用発現濃度域が治療至適濃度域に接近している薬物や副作用の徵候が潜在的で臨牀上、把握しにくい薬物などであり、また患者が投薬指示どおり薬物を服用しているか否かのチェックのためにもTDMが行なわれる。現在、TDMの対象となる薬物は、抗てんかん剤、循環器用剤、抗喘息薬、アミノ配糖体系抗生物質、向精神剤などで表1に示すものがある。

ここでは筆者が経験した薬物血中濃度測定法について実例をまじえながら述べてみたい。

## 1. 薬物血中濃度測定法

薬物の血中濃度を測定する方法には大別して表2に示す生物学的測定法、物理化学的測定法、免疫学的測定法の三種類がある。このうち日常的に血中濃度測定に用いられる方法として物理化学的測定法のうちの分離分析法である高速液体クロマトグラフィーと免疫学的測定法であるエンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイそ

表2 薬物血中濃度測定法の種類

1. 生物学的測定法
• 微生物学的測定法
• 酵素的測定法
2. 物理化学的測定法
• 紫外光度法
• 吸光光度法
紫外可視部吸光光度法
原子吸光分析法
• 蛍光光度法
• 分離分析法
薄層クロマトグラフィー
ガスクロマトグラフィー
高速液体クロマトグラフィー
3. 免疫学的測定法
• ラジオイムノアッセイ
• エンザイムイムノアッセイ
• 蛍光イムノアッセイ
• 競合的ネフェロメトリックイムノアッセイ
• ラジオレセプターアッセイ

して競合的ネフェロメトリックイムノアッセイがある。ここでは特に高速液体クロマトグラフィーがどのように薬物血中濃度測定に用いられているかを述べる。

#### 1-1. 高速液体クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフィー-High-Performance Liquid Chromatography(以下HPLCと略)はHigh Speed Liquid ChromatographyまたはHigh Pressure Liquid Chromatographyとも呼ばれており、従来の液体クロマトグラフィーよりも分離能が良く、分離分析時間が速く、高い圧力が生じる方法である。

HPLCは従来の液体クロマトグラフィーと原理は同じで装置的に異なる分離分析手段である。主な相異点は、分離を行なう場であるカラムに固定相として粒子径(5~35μm)の揃った微粒子充填剤をクロマト管に詰めたものを用いることと、カラムに一定速度で移動相としての溶媒を流すとき微粒子充填剤のため高圧になるので高圧(50~500kg/cm<sup>2</sup>)に耐えるクロマト管および定流量ポンプが必要なことである。

また、HPLCが薬物の血中濃度測定に盛んに用いられるようになった理由として、薬物の多くが紫外外部に吸収をもつので、感度の良い紫外外部吸収検出器で検出できること、HPLCの心臓部分であるカラムの充填剤の種類が豊富にあること、10~30cmの長さで理論段数5000段という分離能の良いカラムが容易に入手できること、水溶性有機溶媒と緩衝液の比率を変えるだけで、目的の薬物を分離することができる逆相分配クロマトグラフィーが使用できることなどが上げられる。

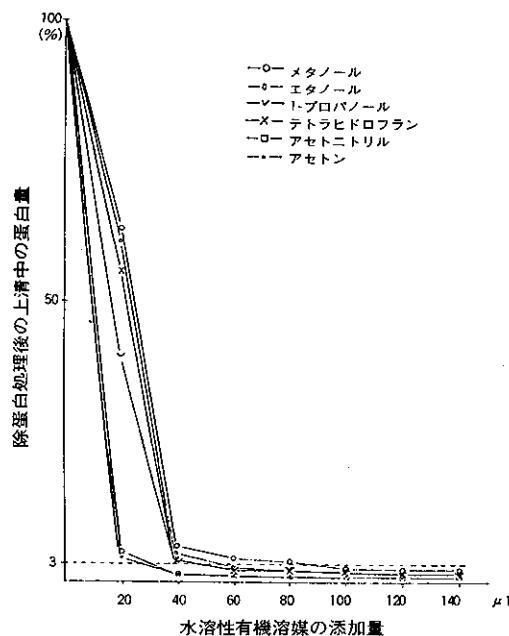
表3 前処理法

1. 除蛋白法	
・水溶性有機溶媒による方法	メタノール、エタノール、アセトニトリル、その他
・酸による方法	過塩素酸、トリクロロ酢酸、その他
・塩による方法	硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、その他

2. 抽出法	
・有機溶媒による方法	クロロホルム、塩化メチレン、エーテル、その他
・吸着剤による方法	XAD-2, アルミナ、Sep-Pak, Extrelut, その他
・イオン対抽出	カウンターイオンを加え有機溶媒で抽出

図1 水溶性有機溶媒による除蛋白効果



#### 1-1-1. 試料の前処理

血液中の薬物を測定する場合、まず血液を遠心分離して血球と血漿または血清に分離してから、血漿または血清中の薬物を測定することになる。

血漿または血清中には、高分子の蛋白質と低分子の糖、脂肪、尿素などの有機化合物からナトリウム、カリウム、クロールなどの無機イオンにいたるまでいろいろな夾雑物を含んでいる。これら夾雑物のうちで特に問題になるのは蛋白質(血漿または血清中約7g/dlを含む)である。蛋白質はHPLCでカラムの固定相に沈着して、目詰まりを起こし分離分析の再現性を失わせる。

血漿または血清から蛋白質を除去しながら薬物を濃縮または抽出する前処理法として大きく分けて表3に示す除蛋白法と抽出法がある。これら前処理法を薬物血中濃度測定法に応用する場合、薬物の物理化学的性質および薬物の血中濃度量によって適した方法を考えなければならない。

ここでは前処理法として筆者が検討した水溶性有機溶媒を用いた除蛋白法について述べる。

血漿または血清に水溶性有機溶媒を加え、vortex-mixerで攪拌し、析出した蛋白質を遠心分離して、その上清の割量を試験管に取り、窒素気流で乾固後Lowry法で各々の蛋白質量を測定する。水溶性有機溶媒としてメタノール、エタノール、1-プロパノール、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリルを用い、血漿または血清20μlに対して図1に示す割合で加えると水溶性有機溶媒により1~数倍量で90%以上の蛋白質が上清から除去されることがわかる。また水溶性有機溶媒の種類により析

出する蛋白質の形状が異なり、通常の血漿または血清分離に使用する遠心器(3000rpm)を用いた遠心では蛋白質の沈殿は完全ではない。10000rpmで約7800gを出す卓上小型遠心器(エッペンドルフ社、国産遠心器社、久保田商事)を用いて1~2分間遠心すると析出した蛋白質が完全に沈殿することがわかった。血漿または血清と水溶性有機溶媒を入れる容器は卓上小型遠心器専用の栓付プラスチック尖底管で、上記の条件で蛋白質は尖底管の底に硬くへばり着き上清を採取するのに便利である。

なお、薬物は血漿または血清中でアルブミンなどの蛋白質と物理的親和力(電気的結合、水素結合、ファンデルワールス力など)で結合していることもある。しかし、この結合力は一般に弱く、多くの薬物は水溶性有機溶媒除蛋白により蛋白質から遊離してくる。また、フィブリシンには薬物がほとんど結合しないので、フィブリノーゲンをフィブリシンにして血液凝固物を除いた血清と、フィブリノーゲンを含む血漿での薬物濃度値は通常では同じである。

#### 1-1-2. 分離分析用カラムの選択

薬物の血中濃度測定に用いるカラムとして、一般に分配クロマトグラフィー用のカラムが使用できる。現在、分配クロマトグラフィー用のカラムとして、支持担体に固定相を化学的に結合させた充填剤を詰めたものが使用されている。固定相が移動相よりも極性が高いものを順相と呼び、順相とは逆に、固定相が移動相よりも極性が低いものは逆相と呼ばれている。多くの薬物は逆相分配クロマトグラフィーによって分離分析される。その理由として、薬物は一般に比較的親油性なので逆相用カラムに親和性があり保持され、血漿または血清中の内因性極性物質は保持されず、移動相をカラムに流すことによつ

て分離が行なわれる。逆相用結合型固定相として図2に示すものがあるが、一般にオクタデシルシリラン(ODS、 $C_{18}H_{37}-Si-$ )基が微粒子のシリカゲル(5μmまたは10μm)の表面に結合したものが使用されている。炭素が18個連なっているので、 $C_{18}$ カラムまたはODSカラムとも呼ばれている。

#### 1-1-3. 移動相の選択

逆相分配クロマトグラフィーを行なうときの移動相としては水溶性有機溶媒とリン酸緩衝液または酢酸緩衝液の混合溶媒が用いられる。pH3~8程度の緩衝液がよく使用され、このpH範囲外では、支持担体のシリカゲルが劣化分解してしまう恐れがある。水溶性有機溶媒として紫外外部吸収の低い高速液体クロマトグラフ用のメタノール、アセトニトリルがよく使用される。さらに、これら混合溶媒にカウンターイオンという物質を加えて酸性または塩基性のイオン物質とイオン対を形成させ、これらイオン物質を逆相分配用カラムで分離させることもできる。カウンターイオンとして酸性物質に対しては、テトラブチルアンモニウムイオン( $(C_4H_9)_4N^+$ )の陽イオンが、塩基性物質に対しては、アルキルスルfonyl酸イオン( $RSO_3^-$ 、例として、オクタンスルfonyl酸イオン、 $C_8H_{17}SO_3^-$ )の陰イオンが用いられている。

薬物のカラムからの溶出時間は、移動相の流速、移動相の混合溶媒の混合比(有機溶媒の割合を多くすると溶出は早まる)やpHを変えたり、前述のカウンターイオンを添加することによって変化する。

移動相の混合溶媒は使用前に必ず脱氣する。脱気しないと泡が発生して分析の再現性を失わせることがある。脱気法には超音波処理やアスピレーター減圧などがあるが、超音波処理の方が溶媒組成を変化させない。

#### 1-1-4. 検出方法

カラムから溶出した液をフローセルで連続的に検出する検出器として広く用いられている固定波長紫外線吸収検出器、紫外可視分光光度計検出器そしてフィルター式蛍光光度計検出器がある。

固定波長紫外線吸収検出器は紫外部に吸収のある薬物の検出に用いられ、光源として特定の輝線スペクトル(254nm、313nm、334nm、365nm)を出す低圧水銀ランプが使用されている。光強度が一番大きい254nmを検出波長として用いた検出器が広く出来ていている。

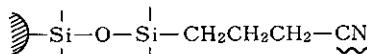
紫外可視分光光度計検出器は紫外部または可視部に吸収のある薬物の検出に用いられ、光源として連続スペクトル(190~650nm)を出す重水素ランプが使用されている。この検出器は目的薬物の最大吸収極大波長に合わせて検出波長を変化させることができる。

フィルター式蛍光光度計検出器は紫外線を照射して、可視部の蛍光を発する薬物の検出に用いられ、紫外線の光源としては、低圧水銀ランプの254nmの紫外線、または、254nmの紫外線で300~400nmの連続スペクトルを出す蛍光体をランプに塗布した光源が用いられている。紫外部の散乱光を除き可視部の蛍光を通過させるためカットオフフィルターが使用される。

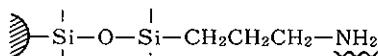
(以下次号)

図2 逆相用結合型固定相

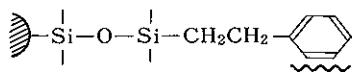
- ニトリル型



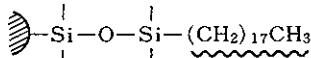
- アミノ型



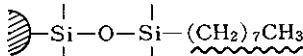
- フェニール型



- オクタデシル型



- オクチル型



## ポリアミンの生化学(Ⅱ)

東京薬科大学 助教授 農学博士 山川敏郎

### 4. 酵素活性の調節

ポリアミンは、強塩基性であるが故に核酸に対して強い親和性を有し特定構造の保持に介入したり、酵素タンパクにも結合してその酵素活性を変動させることが知られている。これらのうちポリアミンにより活性化する酵素についてみると<sup>11)</sup>、ポリアミン特有の活性化および単なるカチオンとしての作用で活性化する場合があり、それらの詳細なメカニズムについては判明していない。しかし、1価のカチオンによって活性化される酵素を、 $K^+ - NH_4^+$ により活性化する型、 $Na^+ - Li^+$ により活性化する型および非特異型に分類するとき、非特異型に属する酵素のみがポリアミンによって活性化を受ける傾向がある。

酵素の活性化カチオンとして代表的な $Mg^{2+}$ との関係では、 $Mg^{2+}$ 要求性酵素に対してポリアミンが完全に $Mg^{2+}$ と置換できる場合と、反応に対する $Mg^{2+}$ 要求性に影響しな

いが $Mg^{2+}$ に対する $K_a$ 値を低下する様に作用する場合がある。

### 5. ポリアミンの生理的役割

ポリアミンの細胞レベルでの生理作用としては、微生物、植物組織および動物組織由来培養細胞における増殖因子としての位置付けがなされている<sup>12)</sup>。それ故にある種の組織培養液にはブトレッキンが添加されている(Hamの培地)。また、培養乳腺細胞培養におけるミルクタンパク合成系で、添加ホルモン3種中コチゾールはスペルミジンで完全代用でき、このことはホルモンの作用がポリアミンを介して発現されることを示唆している<sup>13)</sup>。

ポリアミンの生理作用とメカニズムの解析がcell-free系でいくつかなされている(表-4)<sup>12)</sup>。

表-4 cell-free系でのポリアミン

細胞内顆粒に対する作用
核の安定化、核小体の形態変化、クロマチンの機能変化、リボソームとの結合、ミトコンドリアの安定化、(血小核凝集阻止)
核酸に対する作用
DNAの安定化、RNAの安定化、RNA合成促進、rRNAとの結合、安定化、tRNAとの結合、tRNAのメチル化促進、DNAの複製促進
タンパク合成に対する促進作用
促進作用: アミノ酸の活性化、initiation complexの形成と機能維持、タンパク合成、インターフェロン、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、RNAポリメラーゼ、グロビンの合成
酵素に対する作用
〈活性促進〉テトラヒドロ葉酸、ジヒドロ葉酸還元酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、RNase(基質特異性の変化)、DNase、ポリヌクレオチドキナーゼ、tRNAスクレオチジルトランスフェラーゼ、cAMP非依存タンパクリン酸化酵素、 $\alpha$ -グリセロリン酸脱水素酵素、tRNAリガーゼ、非ヒストンクロマチンタンパクリン酸化反応、リバーゼ、膜結合アセチルコリンエステラーゼ、tRNAメチルトランスフェラーゼ、ポリヌクレオチドフォスフォリラー
〈活性抑制〉ポリ(A)ポリメラーゼ、cAMP依存タンパクリン酸化酵素

この様に多様な作用を示すのは、ポリアミンが前述の核酸の特定構造保持による機能発現やカチオンとして、とくに $Mg^{2+}$ 要求反応系など、酵素タンパク活性の増減に関与するなどによるものと考えられる。

種々の生理的条件下でポリアミンが増加し、その結果種々の生理作用が誘導されるわけであるが、ポリアミン合成の律速段階は動物の場合オルニチン脱炭酸酵素(ODCase)であり、この酵素が速い代謝回転性をもつ特性

のことについては前述した(表-1)。このODCaseの活性増加に関与する因子を各種臓器についてみると(表-5)<sup>12)</sup>、各種因子が各々の臓器の機能と代謝に影響を与えており、とくに核酸とタンパク合成促進をふまえての系では確實に本酵素の活性増加が認められる。

次に種々の生理的条件下での挙動について述べてみる。

表-5 動物組織・器官のオルニチン脱炭酸酵素活性増加因子

組織	因子
肝	部分切除、チオアセトアミド、成長ホルモン、グルココルチコイド、インシュリン、グルカゴン、チロキシン、cAMP 関連物質、上皮成長因子、食餌(高タンパク食)、ビタミン B <sub>6</sub> 欠乏食、プロラクチン、発ガン剤、P-450誘導剤、ウシ胎児血清因子、腫瘍由来タンパク、ピューロマイシン
腎	成長ホルモン、グルココルチコイド、ACTH, PTH, カルシトニン、プロラクチン、トリヨードサイロニン、セロトニン、ベンタガストリン、葉酸、片側腎摘出、サイクロヘキシミド
脳	成長ホルモン、nerve growth factor
甲状腺	TSH, 抗甲状腺剤、チロキシン
副腎	プロラクチン、cAMP 関連物質、成長ホルモン
心	動脈狭窄、運動
脾	食餌、プロラクチン、腫瘍由来タンパク
腸	インシュリン、食餌、cAMP 関連物質、発ガン剤
皮膚	フォルボールエステル、エチルフェニールプロピオレート、抜毛、創瘻
男性生殖器	アンドロゲン、テストステロン、ゴナドトロピン、上皮成長因子
女性生殖器	エストロゲン、黄体ホルモン、抗エストロゲン剤、ゴナドトロピン、妊娠
培養細胞	血清、インシュリン、グルタミン、低張培地、ヒト血清因子、ウイルス感染、グルココルチコイド、抗 Ig 抗体(B細胞)、cAMP 関連物質、新鮮培地、レクチン(リンパ細胞)、インシュリン+プロラクチン(乳腺細胞)、フォルボールエステル(上皮細胞)、conditioned medium

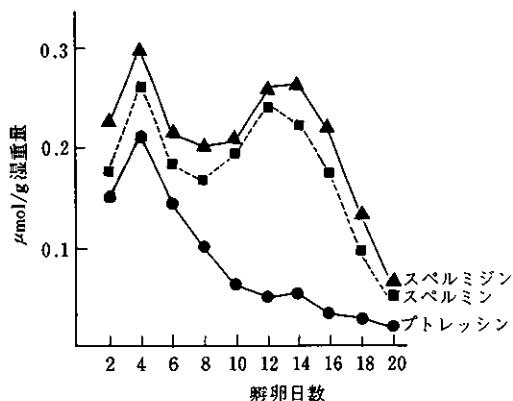
図-9 発生過程におけるポリアミン量の変動  
(ニワトリ胚)

図-10 枯草菌の胞子形成系におけるポリアミン、とくにスペルミジンの二相性増加。

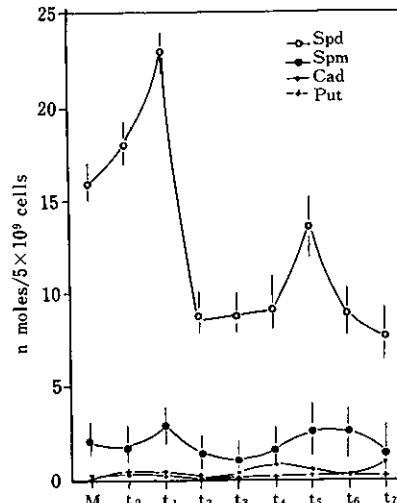


表-6 ポリアミンおよび RNA 量の変動(ラット胚)

発育日数	ポリアミン量(nmol/mg蛋白)			RNA量(μg/mg蛋白)
	ブトレッシン	スペルミジン	スペルミン	
10日	1.50	2.10	3.00	16.2
13日	3.45	3.90	3.35	16.6
14日	2.20	3.15	2.55	20.3
15日	1.30	3.20	2.50	23.8
16日	0.87	3.05	2.40	25.6
19日	0.54	3.40	1.80	19.9

表-7 健康人、血液がんおよび固形がん患者の尿中ポリアミン

ポリアミン検体	Pu	Sd	Sm	Puおよび(または) Sd
健康人(n=103)	1.58±0.55 <sup>a</sup>	1.29±0.43	0.21±0.29	
血液がん(n=29)	6.72±5.33 (83%)	4.29±3.71 (59%)	0.77±1.51 (31%)	→※
固形がん(n=73)	7.54±15.29 (73%)	4.81±6.10 (59%)	1.18±2.08 (36%)	(83%) (75%)

ポリアミン濃度( $\mu\text{g}/\text{mg}$  クレアチニン)<sup>6,5)</sup><sup>a</sup>平均±SD※ $p < 0.001$ 。( )内は、正常範囲上限(健康人平均+2SD)をこえる頻度。

## (1) 発生・分化・再生

これらは細胞増殖が前提となっている生理的現象でありポリアミンの增量がみられる。

発生の場合、受精卵(ニワトリ)の発育過程で、ポリアミンが核酸とタンパクの合成速度を調節していることが示唆されている(図-9)<sup>14)</sup>。代謝回転の指標としてのRNA量と対比してみると(ラット胚、表-6)<sup>15)</sup> RNA量の増加に先行してポリアミン量の増加が認められる。また、図-9と表-6の比較で、分化の点で2日目のニワトリの胚に10日目のラット胚が対応することから、胚の発育に共通した現象と考えられる。

図-9におけるスペルミジンとスペルミンの二相性増加の観察は、著者らが行っている細胞胞子形成系でも観察されている(図-10)<sup>16)</sup>。この場合スペルミジンが主成分であり、培養系の $t_2$ で細胞分裂が終了したことから、二相性増加の各々は異なる生理的条件下での挙動である。この二相性増加に伴って、オルニチン脱炭酸酵素系が二相性に活性増加を示すことをみいだしている<sup>17)</sup>。

再生の場合、実験にはラットやマウスが用いられ通常肝の $\frac{1}{2}$ を切除するが、肝を部分切除する場合顕著なオルニチン脱炭酸酵素活性の上昇、ポリアミン(プロレッシンさらにはスペルミジン)の增量がみられ、これはRNA合成開始に先行する<sup>2)</sup>。

## (2) 疾病とくにがん

がん(悪性腫瘍)が正常細胞からの異常増殖であることを考えると、ポリアミンの增量との関係が理解し易い。しかし、悪性腫瘍の種類によってポリアミン量の変動が異なり、またポリアミンの総量で把えるべきか、個々のポリアミンについての変動をパラメーターにすべきか、さらにはそれらの組合せにすべきか、指標の設定が確立していない。例えば、表-7<sup>18)</sup>に表示されている様にポリアミンの増加が認められている。

ポリアミン定量をどの素材に求めるか、即ち、組織、体液(血清、血漿、赤血球、骨髄穿刺液など)、尿のどれを用いるかが問題となる。尿中へは大部分抱合型として排泄される。

ポリアミンが生体内で遊離型か抱合型(アシル化体を含めて)かで存在するかを生理的状態(とくに疾病との関係で)と関連して解析することも今後の問題であろう。

がんとの関係では、ポリアミンの増加が殆んどの場合かなり進行したものであり、早期がんでは正常値の範囲内であることが多いので、早期がんの診断には限界がある。しかし、疾患の進行度および化学療法や放射線療法を適用したときの有効度の判定や治療の完了を知る上で有意義と考えられる。これらの治療で効を奏した場合には、初期にポリアミンの増加に引き続いて正常域に落ちつくことが観察されている<sup>19)</sup>。さらに、治療完了の判定ができれば、再発を恐れるが故に過剰治療の弊害が回避され、治癒率が上がると期待される。

## 文 献

- 11) 吉野昌孝、村上恵子：生化学、51(12)、1328-1334(1979)
- 12) 井上秀夫、竹田義文：生化学、49(6)、411-428(1977)
- 13) 岡孝己：蛋白質・核酸・酵素、20、101-115(1975)
- 14) S. H. Snyder, D. S. Kreuz & V. J. Medina : Ann. N. Y. Acad. Sci., 171, 749(1970)
- 15) D. H. Russell & T. A. McVicker : Biochim. Biophys. Acta, 259, 247(1972)
- 16) 山川敏郎、金子一郎：第5回微生物をめぐる分子生物学とその薬学領域における応用面シンポジウム講演要旨、69-71(1980)
- 17) T. Yamakawa, H. Taira & I. Kaneko : Agric. Biol. Chem., 44(9), 2235-2237(1980)
- 18) R. Teradaira, K. Fuzita, T. Nagatsu, K. Shinpo, K. Murata & M. Nakamura : J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Abstracts of Joint Congress of the Scandinavian and German Societies of Clinical Chemistry, 18, 698(1980)
- 19) 遠藤康夫：日本臨床、38(12)、4641-4646(1980)

# 実験室における空気中で不安定な化合物の取り扱い法

## その1

東京工業大学 資源化学研究所 工学博士 小宮三四郎

### 1. はじめに

近年有機金属化学の急速な進歩に伴ない、数多くの有機金属試薬や触媒が合成化学において用いられるようになってきた。有機金属化合物は一般に空気や水に対して不安定なものが多く、その取り扱い方はいわゆる有機実験を行なってきた研究者には“いやなもの”である。しかしながら現在では有機金属試薬は、その反応の特異性や高い触媒能などから有機合成化学において必要欠くべからざるものとなってきている。とくに金属を用いた高い位置または立体選択的反応が数多く知られるようになっており、それらの天然物合成への応用も開発されるようになってきた。<sup>1)</sup>筆者等は10数年来空気中で不安定な有機金属化合物を取り扱ってきており、その経験をもとに本稿では実験室的にいかにこのような化合物を取り扱うかを詳細に述べさせていただきたい。これらの技術は私の師である東京工業大学教授山本明夫先生がドイツのマックスプランク石炭研究所に留学中学んできた技術を基本としており、それにわれわれ独自の技術を加えたものであり、読者にとって何らかの役に立てば幸いである。なおこののような技術についてはいくつかの成書もあるので参考されたい。<sup>2)</sup>

### (1) 基本的実験装置

空気中で不安定な物質を取り扱うには次のようにいくつかの装置を組み立てておくと便利である。それは真空排気装置(vacuum line)と不活性ガス導入ライン(窒素ラインと呼ぶ)である。図1と図2にそれらの概略図を示す。高真空を必要とする場合( $10^{-3}$ mmHg以下)はさらに拡散ポンプを使用するが、いわゆる有機金属化合物を取り扱う場合にはほとんど必要でない。また必要に応じて水銀マノメーターやガスだめを付属品としてつけておくと気体を取り扱う時に非常に便利である。不活性ガス導入ラインは図2に示してあるように途中に水銀バブラーをつけておくと使いやすい。これにより大気圧よりやや高い内圧の不活性ガスを常に得ることができ、後に述べるブリッジフィルターによる口過法に役に立つ。ガスの出口を開じると内圧が徐々に上昇するが、一定圧以上になると余分な不活性ガスは系外へ放出される仕組みになっているので安全である。また使用するガスは一般に

図1 真空ライン

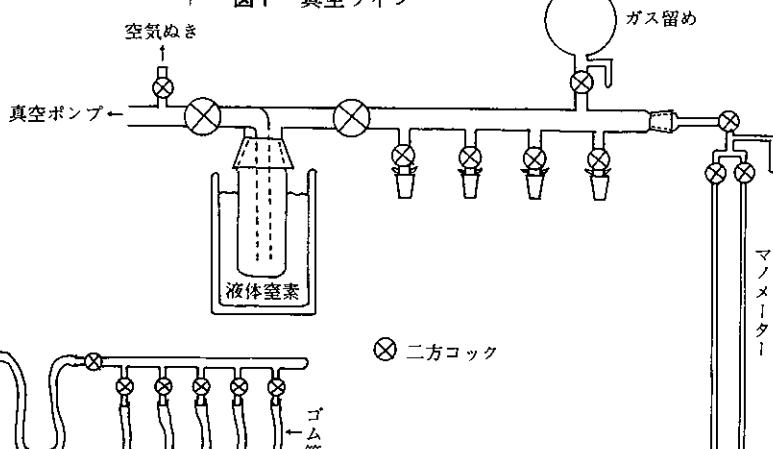
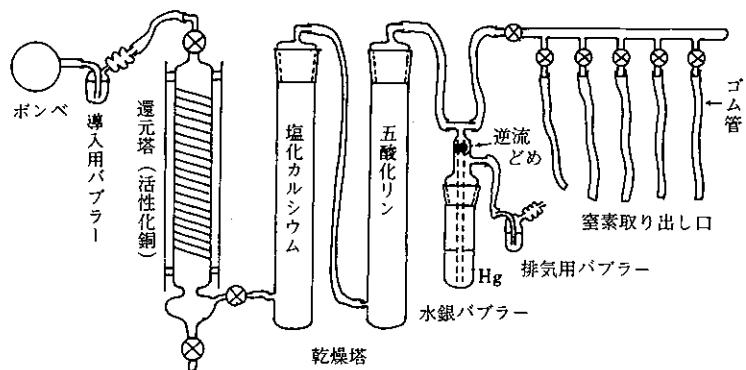


図2 窒素ライン

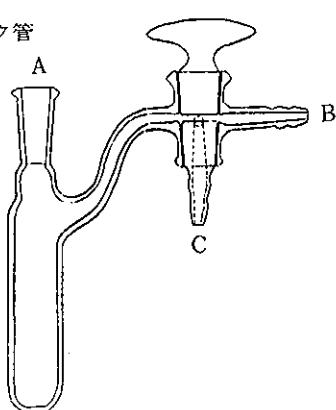


ケイソウ土に吸着させた活性化銅で脱酸素した後、塩化カルシウム、五酸化リンを通すことにより脱水して用いる。(しかしわれわれの経験からは最近の市販の高純度窒素ガスやアルゴンガスは純度が良くそのまま使用しても問題がない場合が多い)さらにごく微量の水や酸素の混入を問題とする場合は液体窒素のトラップを通す(アルゴンは不可)ことなどによりほぼ完全にそれらを除くことができる。このような2つのラインを実験台に設置しておくと非常に便利である。なお研究室によっては真空ラインと窒素ラインを一体化して用いる場合もある。

#### (2) シュレンク型反応管

不活性ガス下で“もの”を取り扱うには通常の有機実験で用いるフラスコの代わりにシュレンク管と呼ばれるガラス製の三方コック付反応管を使用すると便利である。これは単にスリ付フラスコに三方コックを取りつけただけの簡単なもの(図3)であるが、これを用いることにより空気や水に不安定なほとんどの化合物を容易に取り扱うことが可能となる。以下に基本的な使用法を示す。

図3 シュレンク管



まずシュレンク管を窒素下にする(窒素置換)には小型ポンプ等によりB(またはC)より減圧にし、その後精製した窒素をBより導入する。この操作を3回以上繰り返すことにより系内をほぼ完全に窒素下にすることができる。次にシュレンク内の物質の移しかえであるが、固体の場合にはスパチュラを用いたり(図4)、両オズミのジョイントを用いることによりできる(図5)。前者の場合ズボンと呼ばれるガラス器具を併用するとかなり空気に不安定なものでも取り扱える。あらかじめ窒素下に保存された溶媒等の液体は注射器によりとれるが、この際、使用直前に注射器や注射針を窒素置換する必要がある。即ち、シュレンク管に流れている窒素ガスのみを注射器でゆっくりとり、系外にすてる操作をやはり3回以上繰り返してから使用する。この際シュレンク管へ流入している窒素ガスの速度より速く窒素ガスを吸い上げてはならないことを付記したい。このようにすれば液体および固体をシュレンク管中窒素下で混合することができ、反応を行なうことができる。しかしながら多くの反

図4 ズボンを用いた移し替え

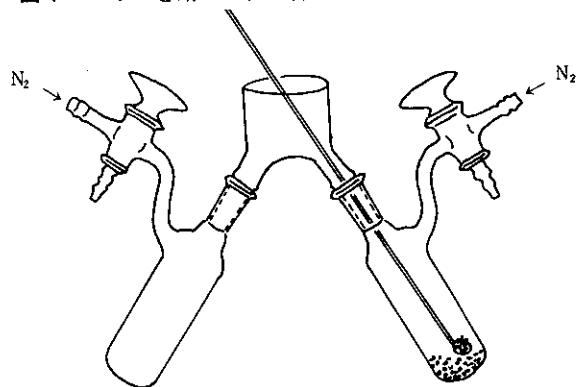


図5 ジョイントによる移し替え

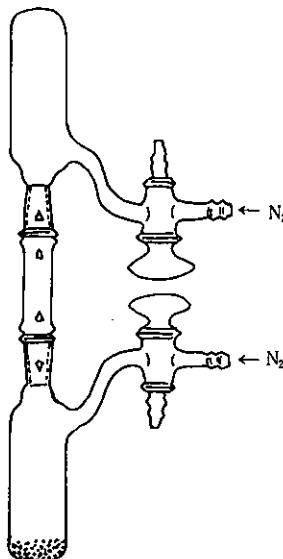
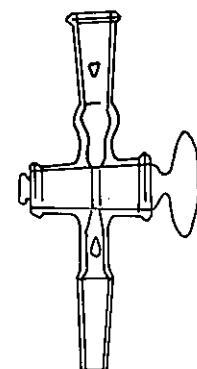


図6 真空コック



応は気体の発生を伴なうことが多い、その場合には真空コック(図6)をシュレンク管上部につけて真空下にして反応をさせる。必要な反応試薬や溶媒は真空蒸留により導入することができる(trap to trap distillation)。完全に真空下にするには系を液体窒素で固化し真空ラインで脱気する操作を3回以上繰り返す必要がある。真空蒸留できない反応試薬の場合には二又のシュレンク管(分解用シュレンク管、図7)を用い、系を脱気した後側管をかたむけることにより混合することができる。なおこのような反応の後の生成気体の定量同定法は後述する(テプラーポンプ)。

#### (3) 口過

空気中で不安定な物質を口別するにはふつうのロートを用いることはできないが、次のようにすればよい。まずひだ折り口紙等をあらかじめ入れておいた口過管(図8)をシュレンク管の上に接続した後、系全体を窒素置

図7 分解用シュレンク

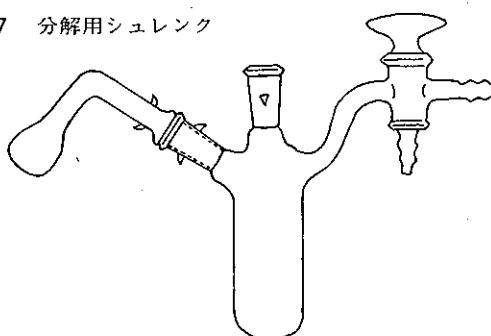


図8 口過管

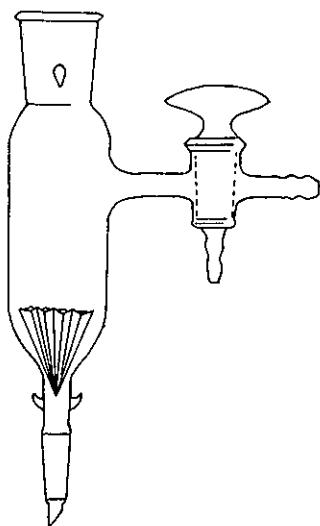


図9 ブリッジフィルターによる口過

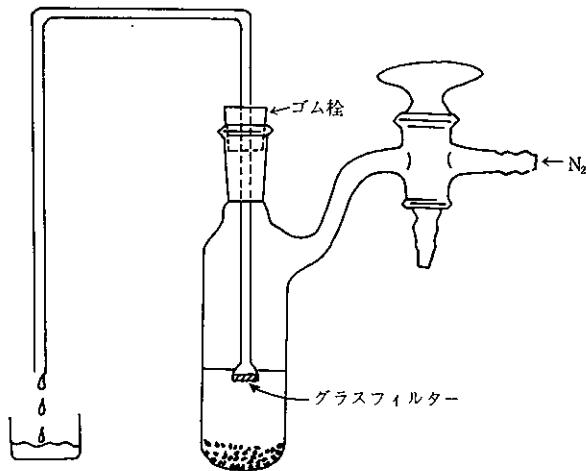
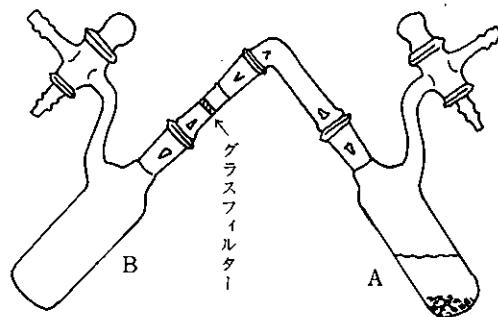


図10 ヤジロベー抽出器



換し、不均一の溶液を注射器を用いて口紙の上に移し口過する方法である。この場合窒素ガスは口過管のコックを通して溶媒の蒸発を防ぐことができる。また口紙の代わりにグラスフィルター付の管を通して良いが、ものによっては完全に口過できない場合もある。前者の場合固体の回収は難しいが、後者の場合はグラスフィルター上のものをかき集めることも可能である。さらに化合物が熱的に不安定な場合には口過管のまわりに外套をつけ、ドライアイス/メタノール等で冷却すれば分解を防ぐことができる。また不均一溶液の溶液部および沈澱部の両方を窒素下で欲しい場合はブリッジフィルターを用いると便利である。図9に示したようなグラスフィルター付のガラス管に穴あきのゴム栓をとりつける。先に述べたように窒素ラインからは大気圧より少し高い圧の窒素ガスが得られるので、フィルターが液面につくと液体のみが押し出されて分離することができる。受け器もシュレンク管にすれば液体も空気に全くふれずに口過できるし、残った固体も窒素下で保存された溶媒で洗浄口過後回収することも容易である。もう一つ真空系のまま口過洗浄（または抽出）を繰り返しできるおもしろ

い方法がある。図10のように2つのシュレンク管をグラスフィルター付ジョイントで連結して用いるもので、その型と動作から“ヤジロベー”と呼んでいる。まず不均一液（たとえば固体と洗浄用溶媒等）を液体窒素により固化し系中の窒素ガスを真空ポンプで排気しておく。適当な温度でよく攪拌した後全体をかたむけると液部のみがグラスフィルターを通りBへ口過される。口過後Aの方を液体窒素で冷却すると今用いた溶媒が真空蒸留されてもどってくる。この溶媒で洗浄（または抽出）を繰り返すことができる。空気中で不安定な化合物を少量の溶媒（もちろん真空蒸留しやすいヘキサン、アセトン、エーテル等の溶媒に限られるが）で行なうことができ、時には便利である。

#### (4) その他シュレンク管と併用すると便利なガラス器具

図11～15に示すようないくつかのガラス器具を用意しておくと便利である。たとえば窒素下で還留するときシュレンクの三方コックから窒素ガスを流していくては用いた溶媒が系外にすぐに出でてしまうが、T字型の三方コックをジムロートの上につけ、そこに窒素ガスを通せば溶媒の蒸発を防ぐことができる。その他紙面の都合で

いろいろの詳細な方法が書けなく残念だが、これらの基本的方法を各自応用して工夫していただきたい。

次稿では反応系中のガス定量法(テプラーポンプ)、NMR、IR等サンプル作成法、その他簡単な窒素下での実験法について述べたい。

## 文 献

- 1) 例えは、B. M. Trost and C. R. Hutchinson, "Organic Synthesis Today and Tomorrow", Pergamon, 1981; E. Negishi, "Organometallics in Organic Synthesis Vol 1, 2", John Wiley & Sons, 1980; 野崎一、向山光昭、野依良治共編、「化学増刊91 高選択的の反応」化学同人, 1981
- 2) D. F. Shriver, "The manipulation of Air-Sensitive Compounds", McGraw-Hill(1969); 日本化学会編、「新実験化学講座12、有機金属化学」、丸善(1976); 山本隆一、山本明夫、触媒, 19, No.5 372 (1977)  
; 山本明夫、「有機金属化学—基礎と応用—」、笠原房(1982).

図12 溶媒ピン

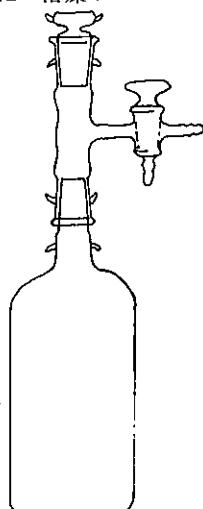


図13 トの字管

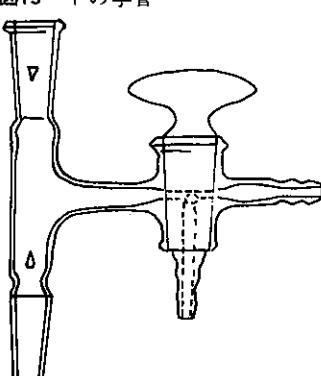
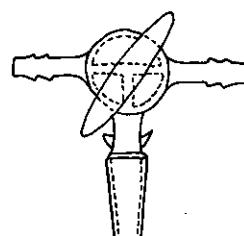


図11 T字コック



シュバンツハン

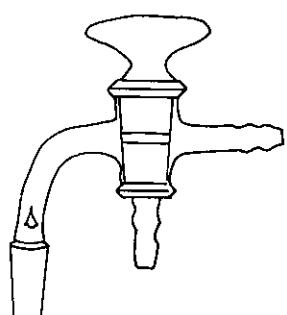


図14 ガス吹込み管

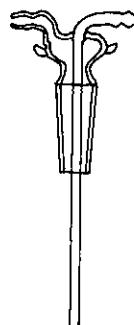
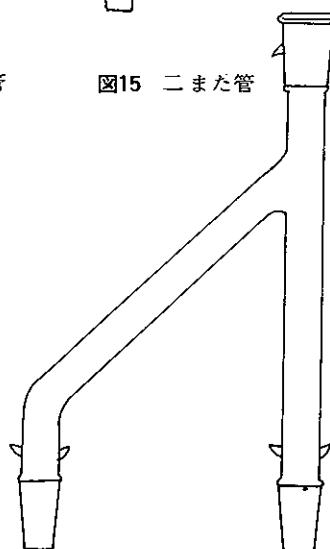


図15 二また管



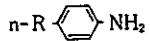
## KANTO Fine Chemicals

Cica印試薬の技術が生きる関東化学のファインケミカル製品

n-アルキルベンゼン



p-n-アルキルアニリン



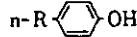
p-n-アルキル安息香酸



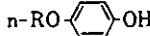
p-n-アルコキシ安息香酸



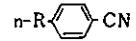
p-n-アルキルフェノール



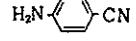
p-n-アルコキシフェノール



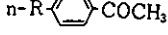
p-n アルキルベンゾニトリル



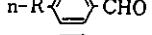
p-n アミノベンゾニトリル



p-n アルキルアセトフェノン



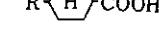
p-n アルキルベンズアルデヒド



p-n アルキルオキシベンズアルデヒド



トランス-4-n-アルキルシクロヘキサンカルボン酸



$\text{R} = \text{C}_2 \sim \text{C}_8$



関東化学 株式会社 化成品事業部 電話 (03)279-1755代表

# 液-液抽出用エキストレルート<sup>®</sup>カラム

E. メルク社 KONTAKTE誌1981年No.2より収載

E. メルク社 生化学研究所 J. ブライター

## 1. 序論

体液や生物学的組織、食料、生薬等に含まれる親油性化合物の分析には、それらを抽出、精製、濃縮することが必要である。1976年、J. Breiter ら<sup>(1)</sup>はカラムを用いた液-液抽出について最初に発表した。メルク社はエキストレルート<sup>®</sup>カラムと詰め替え用パック(20mlサンプル用)を発売した。エキストレルート<sup>®</sup>カラム法を用いるとエマルジョン形成、相分離、溶媒の大量消費というような従来の液-液抽出で生ずる幾つかの困難を克服できる。ここでは毒物学・薬理学・臨床化学・食品分析化学・製剤品質管理などの分野で応用する上でのヒントを紹介する。

## 1.1 原理と機構

エキストレルート<sup>®</sup>は、液-液抽出の原理に基づいた抽出用カラムである。<sup>(1,2)</sup> カラムには大きな細孔直径を持つ顆粒状のキーゼルグールを充填してある。水溶液試料をチャージすると、多孔性表面上に保持されて新しい固定相を形成する。次に、水と混合しない有機溶媒をカラムに注ぎ親油性成分を抽出、溶出させてから、そのままあるいは濃縮後分析する。

## 1.2 カラム抽出の利点

エキストレルート<sup>®</sup>カラムによる抽出の利点は、(a) エマルジョンを形成しない、(b) 簡単でしかも高い回収率

と精度、(c) 従来の液-液抽出に比べ、より高純度の抽出物が得られる。(e) 時間の短縮、溶媒量も節約できることである。

## 1.3 カルボン酸の溶出による抽出カラムの評価

エキストレルートに残存する極く僅かな活性一特に水溶液によって湿らされていない部分で一により親油性溶媒での溶離に際して、かなり極性の強い化合物の保持が起こることもある(規定のサンプルチャージ量ではカラム底部の充填剤約10%はぬれないためである)。充填剤の表面を弱アルカリ性に調整することにより、pK-値4.5以下の酸性化合物はカラム下部に残存する担体の未吸湿部分で再吸着される。

フェノールやバルビツール酸(pK 7~8)のような弱酸性化合物をもっと強酸性の化合物ー主としてカルボン酸ーから分離する場合、この効果が大である。例えば、弱酸性溶液中ではバルビツール酸は、血清や血中から定量的に溶出されるが、サリチル酸(pK 2.97)やアスピリン(pK 3.5)は保持される。逆に、もっと酸性の強い化合物の抽出は困難である。酸性にした尿(pH 1.5~2)からのサリチル酸のカラム抽出では、エーテルによる回収率は80~100%であった。バニリンマンデル酸(VMA)、ホモバニリンマンデル酸(HVA)、ヒドロキシンドール酢酸(HIAA)の溶離は、標準水溶液からよりも、尿からの方が回収の再現性が良かった。食物や飲料(100~1,000μg/ml

表1.a

Acid	Citric acid 0.5 mol/l				HCl 0.2 mol/l	$H_3PO_4$ 0.5 mol/l
	0.5 ml	0.7 ml	1.0 ml	0.25ml		
Serum	0.5 ml	0.7 ml	—	0.25ml	0.5 ml	1.0 ml
Recovery (%)	95.1 (N=3)	96.4 (N=3)	93.2 (N=5)	0.2 (N=3)	41.6 (N=3)	77.2 (N=6)
VK(1SD)	1.4	0	4.2	17.0	28.6	15.6

表1.b

Acid	Cirric acid 0.1 mol/l		HCl 0.1 mol/l	
	0.5 ml	0.7 ml	0.5 ml	0.7 ml
Serum	0.5 ml	0.7 ml	0.5 ml	0.7 ml
Recovery (%)	86 (N=14)	86 (N=3)	57 (N=5)	69 (N=2)
VK(1SD)	7.4	8.4	18	0

表1 エキストレルート<sup>®</sup>-1カラムで酸性化合物(インドメタシンまたはサリチル酸)を抽出した時の回収率(最大試料チャージ量1.4ml、抽出は7mlジクロロメタン)

1 a. サリチル酸(40μg/ml溶液) pK 2.97

1 b. インドメタシン(20μg/ml溶液) pK 4.5

の高濃度のもの)からのソルビン酸、サリチル酸、安息香酸のカラム抽出では、より極性の強い大量の溶媒を使用し、ほぼ回収率は100%であった(硫酸による酸性化)。一方、血清中のサリチル酸やインドメタシンは塩酸で酸性にしても、少量しか回収できず、再現性が悪い。尿中の芳香族カルボン酸が高い回収率を示すことから、極性のカルボン酸と他の化合物は、尿から共抽出され、吸着剤から溶離液中へと比較的極性の弱いものと置換していると結論できる。この効果は水溶液中や血清中で、抽出され方の弱い、極性のカルボン酸(例えば、クエン酸)を添加して模擬実験できる。エキストレルートをバッファー溶液で完全に湿らすことによって、さらに不可逆的吸着を減らすことができる。表1は酸性化に使用した酸の種類や量と、サリチル酸やインドメタシンの実際の回収率の相関関係を示している。塩酸は不適である。0.2~0.5 mol/l の濃度のクエン酸を使って、希釈した血清を完全にカラムにチャージすると最良の結果が得られる。カラムの半分までしかチャージしないと、どんな酸でもほとんど全吸着される。化合物はそれぞれUV測定法により測定した。血清は40~80 μg/ml を使用した。“治療”濃度がこの範囲内に含まれるので、サリチル酸の結果は重要である。インドメタシンは、1つのモデル実験として参考になる。

#### 1.4 カラム構造とサイズ

生体液中の代謝物や薬物の分析では、サンプル量が、0.1~5ml の範囲、特に0.2~1ml である。そのため、新しく小さいカラムが開発された。エキストレルート<sup>®</sup>-1と-3は1ml および3ml の水溶液用で、最大チャージ量は、それぞれ1.3ml と3.9ml である。1ml のカラムは、ごく少量のサンプルでも希釈せずに取り扱える。先に発売した20ml用は、今後エキストレルート<sup>®</sup>-20と呼ばれる。

担体は上下2つのフィルター間に充填されている。上部空間(6または15ml)に溶出用溶媒をチャージする。流速はカラム出口のカニューレにより調節する。

サンプルは適当なバッファーで希釈し、カラムにチャージする。5~10分放置して、水(溶液)相が担体に吸着

されてから、各々6ml か15ml の溶媒で溶出する。溶出速度は溶離液がカラムからゆっくりと滴下する位がよい。

#### 1.5 溶出特性

薬剤のモニタリングとして重要な化合物を用いて、血漿から完全に溶出するのに必要な溶媒量を調べた。キニジン、パパベリン、フェノバルビタールは、UV光度法により測定した。ディスオピラミド、スバルテイン、マプロチリン、ノルチブリン、フェノバルビタール、フェニトイント、エトサクシミド、カルバマゼピン、5-メチルフェニル-5-フェニルヒダントイン(MPPH)は、HPTLC分析によって判定した。エキストレルート-3では、エーテルまたはクロロホルム15~16ml、エキストレルート-1では6mlで回収率は95%であった(エーテルはスバルテインやディスオピラミドには不適である)。

エキストレルート-1で、水溶液のチャージ量の違いを調べた(表2)。弱酸、中性および塩基性化合物の溶離には希釈したサンプル250~500μl で十分である。

#### 1.6 カラムの洗浄

抽出カラム自体から溶出される汚染物が、GLCやHPLCによる薬物等の非特異的検出を妨害することがある。試料が高濃度の場合、あるいは特殊検出器、たとえばGCのP-N検出器が使えるような場合は、不純物の妨害は問題にならない。エキストレルート<sup>®</sup>-20カラムは品質を厳選したポリエチレンを使用しているが、エーテルに長時間浸すと何んらかの物質が溶出されてくる。GLC/質量分析法によりエキストレルート<sup>®</sup>を通した溶離液中に脂肪酸、アミド、フタル酸、高級アルコールや樹脂酸が同定された。<sup>(3)</sup>

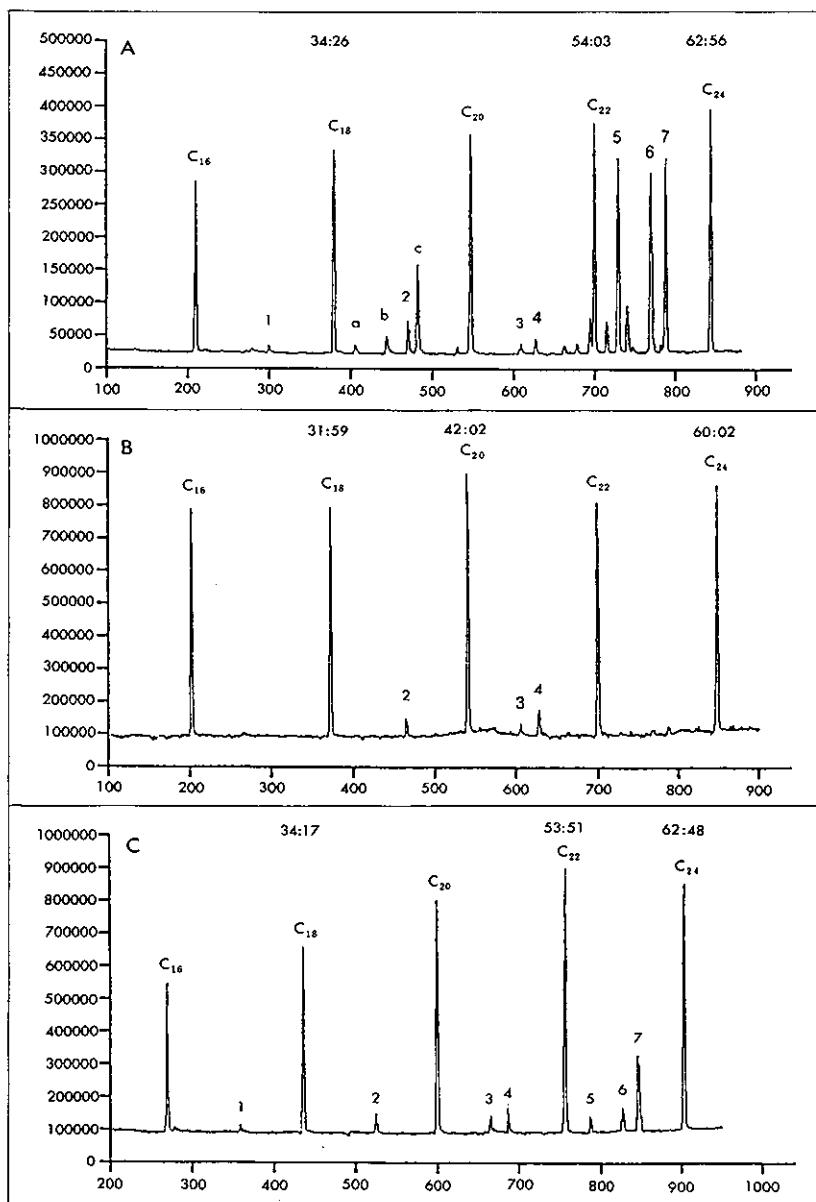
プラスチックフィルムでラミネートした詰め替えパック中の担体では、発売当初、製造時の補助剤が吸着されて分析の妨害となった。その後、包装材料の変更により改善された。図1は、新旧の詰め替え用パックからの担体を空溶出した溶離液のガスクロマトグラムである。新しいものでは、ほとんど妨害物質は検出されないが、保存期間内にフィルムを通して若干の樹脂酸が担体に吸着

表2 エキストレルート<sup>®</sup>-1 (1mlサンプル用、担体3.5ml充填) による抽出:

希釈した血清を異なる量でカラムにチャージした時の回収率

\* 希釈した血清 1 + 0.5mol/l クエン酸 1

Compound	Column loaded with sample of				Eluted with solvent
	1400μl	1000μl	500μl	250μl	
phenobarbital	not tested	101%	100%	100%	6 ml chloroform
salicylic acid*	96.4%	95.1%	35%	—	6 ml dichloromethane
indomethacin*	92%	92%	—	—	6 ml dichloromethane
quinidine	95% 98%	90% 93%	89% 89%	92% 88%	6 ml chloroform 6 ml ether

図1 エキストレルート<sup>®</sup>つめ替えバックの担体を充填したカラムからの空溶液のGLC分離

A) 古いバックの中のエキストレルート<sup>®</sup> 担体  
B) 新しいバック中のエキストレルート<sup>®</sup> 担体 (約6~8週間貯蔵)

ガラス容器に入っていたエキストレルート<sup>®</sup> 担体  
エキストレルートを通していない空溶離液

C) 新しいバック中に数ヶ月入っていたエキストレルート<sup>®</sup> 担体

条件 20mℓの水を添加

文献69を参照にしてpH 2~3に調節、酢酸エチル50mℓでエキストレルート<sup>®</sup>-20カラム上で溶出する。

溶離液の  $\frac{1}{2}$  をジアゾメタンでメチル化し、ガラスキャビラリー-GLCで分離する。

クロマトグラム バイロト大学有機化学研究室

ピークの同定 (1~7:酢酸メチル)

1. ミリスチン酸	5. ピマリシン酸
2. パルミチン酸	6. インビマリシン酸
3. オイレン酸	7. ジヒドロアピエチン酸
4. ステアリン酸	a, b, c フタレート
C <sub>16</sub> ~C <sub>18</sub>	炭化水素

図2 空溶離液カラムのGLC (pH 6にしてジクロロメタンで溶離)

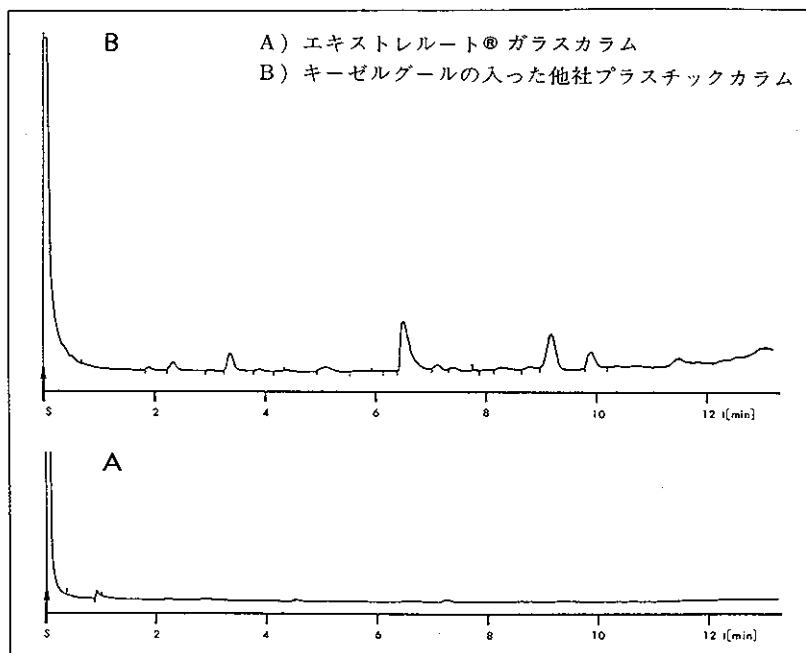
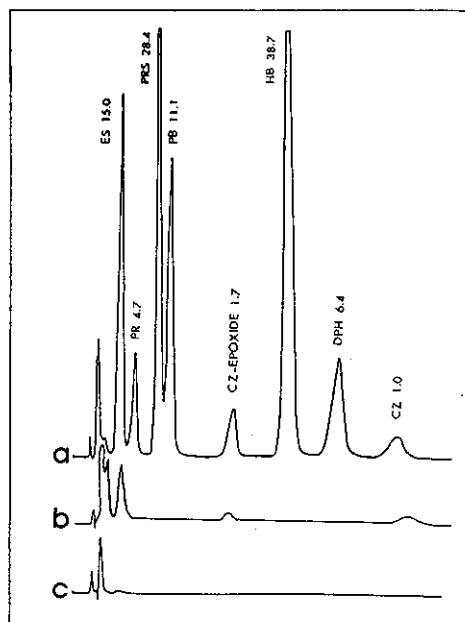


図3 抗けいれん薬とその代謝物のHPLC分離



(クロマトグラフ条件はM. Riedmannによる)

エキストレルート 1 に 0.5mℓ 血清(水) + リン酸バッファー-pH6 をチャージしてクロロホルムで抽出

- a) 低濃度薬物を添加したヒト保存血清のカラム溶離液  
b) ヒト保存血清のカラム溶離液  
c) カラムブランク溶離液

ピークの同定:  
ES=エトサクシミド、PP=ブリミトン、PRS=プロピルサクシミド、PB=フェノバルビタール  
CZ-EPO×IDE=カルバマゼピンエポキシド、HB=ヘキソバルビタール、DPH=フェニトイント  
CZ=カルバマゼピン

番号(例えばCZ 1.0)は血清中の化合物  $\mu\text{g}$  を意味する

HPLC条件:ハイパー ブレパックカラム RT125-4  
LiChrosorb RP-8 (5  $\mu\text{m}$ )  
溶媒: a) 0.01mol / ℓ リン酸バッファー-pH5.3/83.6%  
b) アセトニトリル16.4%  
温度: 72°C 流速1.28mℓ/min 検出: 204nm  
クロマトグラム:E. Merck. Darmstadt.

されている。不純物を含まない担体の調製には、担体を酢酸エチルやジクロロメタン、アセトンなどによりソックスレー装置で済過する。最良の方法は、ガラスカラム中で担体をその10倍量のメタノールで溶出、洗浄し、湿った担体を真空加熱器で50~60°Cで乾燥すると不純物を含まない担体が得られる<sup>1)</sup>。新しいエキストレルート®-1と-3は純粹な担体をガラスカラムに充填した。図2と3に溶出してくる不純物のクロマトグラムを示した。

## 2. エキストレルートの応用

### 2.1 薬学、毒物学

エキストレルート®は胃液や尿中の酸性、中性および塩基性の薬物を効率良く抽出し、他の分析法で同定、定量するための新しい前処理法として開発された。

バルビツール酸中毒の迅速スクリーニングテストは、エキストレルートによる水銀-バルビツール錯体の抽出とジチゾン反応の組み合わせにより、簡単で確実になる。溶離液調製用の水中に含まれる水銀による誤った判定(陽性)を防止できる。

血中のバルビツール酸のUV測定では、サリチル酸が妨害となるので、2度目の抽出段階でサリチル酸を含まない溶出液を得る必要がある<sup>4,5)</sup>。尿中のバルビツール酸をpH6で、カラム抽出するとGLC法の妨害となる内因性のカルボン酸がカラム内に保持されることが報告されている<sup>6)</sup>。全血中のベンゾジアゼピンや、その分解物であるベンゾフェノンなどがHPLCで分離されている<sup>7)</sup>。全血5~10mlあるいは加水分解した尿20ml中からのニトラゼパム、オキサゼパム、クロルジアゼポキシドの回収率が79~86%である。競争馬のドーピングテストでは、馬の血中の興奮剤19種のうち、17種について回収率が90~100%である<sup>8)</sup>。これは、従来の抽出法やXAD-吸着法よりずっと良い。

表3 エキストレルート®-1を用いた血清から抜けいれん薬のカラム抽出の回収率

溶媒: 6mLクロロホルム 分析:HPLC

方法: a. 0.5mL血清と0.5mLバッファーをカラムへ連続して順番にチャージ

b. 0.5mL血清と0.5mLバッファーの混合物をチャージ

Drug	Concentration [μg/ml]	Method a(N=3/conc.)			$\Sigma$ a	Method b(N=3/conc.)			$\Sigma$ b
		20	15	5		20	15	5	
Phenytoin	Concentration [μg/ml]	20	15	5	N=9	20	15	5	N=9
	Recovery[%]	96.5	96.2	97.3	96.7	97.3	96.5	92.7	95.5
	Var. coeff.[%]	3.9	2.5	4.3	3.2	6.0	1.7	6.6	5.0
Phenobarbital	Concentration [μg/ml]	40	30	10		40	30	10	
	Recovery[%]	100.4	94.6	103.0	99.3	99.0	96.8	97.7	97.8
	Var. coeff.[%]	1.5	2.6	1.0	4.0	5.6	4.3	6.0	4.8
Primidone	Concentration [μg/ml]	15	12	5		15	12	5	
	Recovery[%]	98.0	91.9	110.7	100.2	102.7	97.2	121.3	107.1
	Var. coeff.[%]	3.1	2.1	1.0	8.5	5.6	2.6	5.3	11.0
Carbamazepine	Concentration [μg/ml]	7.5	6	2.5		7.5	6	2.5	
	Recovery[%]	95.1	96.1	98.7	96.6	96.0	96.7	94.7	95.8
	Var. coeff.[%]	3.5	2.7	2.3	3.0	7.0	1.7	6.5	4.9

頻繁に用いられる抗てんかん薬およびその代謝物のHPLC分析には、サンプル前処理として、希釈とpH調整をエキストレルートカラム上で直接行なえる。これは、血清とpH6.0の0.15Mリン酸を連続的にチャージして行った。比較サンプルとして、前もって血清0.5mLとバッファー0.5mLを混合したものをカラムにチャージして、溶出した(図3)。

エトサクシミド、プリミドン、フェノバルビタール、フェニトイント、カルバマゼピンなどを異った濃度で含む3つの血清(大量および少量を添加したプール血清、平均濃度を示すコントロール血清はメルコテスト-EMIT/448、310を用いたもの)を両方法で希釈して溶出した。各濃度について3回分析した結果、総ての物質がほぼ定量的に回収された(95~100%、表3)。前処理していない血清の方が高い精度を示すので有利である。

エトサクシミドは濃縮する際揮発しやすいので、内部標準(プロピルサクシミド)を使う必要があり、溶離液は40°C以下で濃縮する。血清からの親油性の弱い化合物がクロマトグラムの開始直後に検出され、エトサクシミドや、低濃度のプリミドンを妨害することがある。

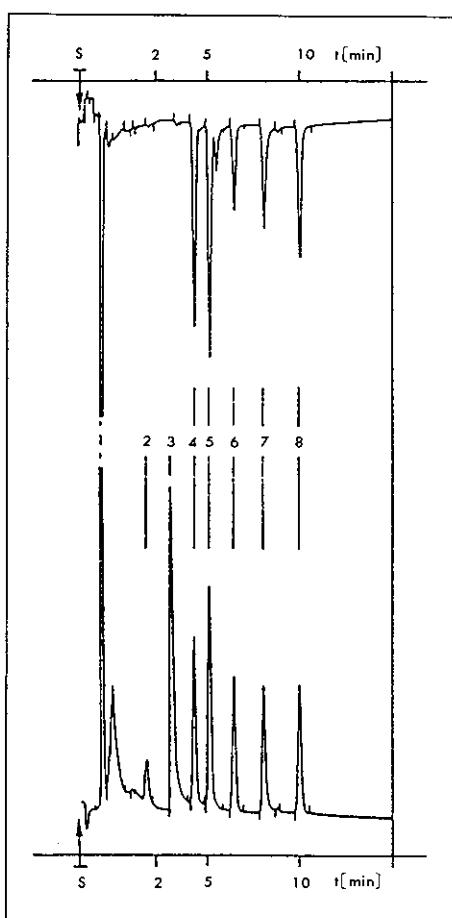
### 2.2 エキストレルート®-3を用いたGLC用サンプルの調整

種々の化合物を添加した血液を用いて、血液からの抽出法についての検査室間調査を行なった。

血清1mLに、0.12mol/lのアンモニア水2mLを添加してpH9.4に調整し、エキストレルート®-3カラムにチャージ後、酢酸エチルかジクロロメタン20mLで溶出した。溶離液は濃縮し、残渣は内部標準としてオルフェナドリン40μgを含むメタノール100μLで希釈した。3μLを注入した(図4)。ジクロロメタンでの回収率は、酢酸エチルの場合より悪く、アプロバルビタールとパラセタモール

(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )は抽出されなかった。酢酸エチルを用いると両者およびデシプラミンが定量的に溶出され、ニコチン(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )は80%、プロピフェナゾン(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、メサドン(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )とコデイン(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )の総回収率は54~68%であった。プロピフェナゾン、コデインとメサドンは連続限外沪過を行なってから沪液をカラム抽出すると良い回収率が得られたが、アプロバルビタールとデシプラミンは大部分失われる。エキストレルート法ではすべての化合物が良好に回収される。

図4 エキストレルート® - 3 上での尿血液中の薬物のカラム抽出、N-FID付きGLCを使つ分離



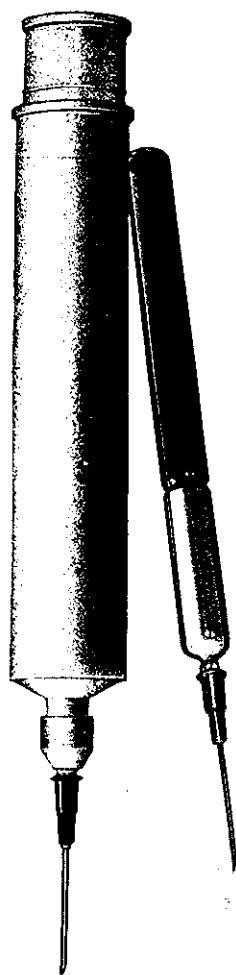
上のクロマトグラム：ジクロロメタンで溶出  
下の “” 酢酸エチルで “”

クロマトグラム：

1. ニコチン
2. アプロバルビタール
3. パラセタモール
4. オルフェナドリン
5. プロピルフェナゾン
6. メサドン
7. デシプラミド
8. コデイン

文 献

- 1) BREITER, J., HELGER, R., LANG, H.: *Forensic Sci.* 7, 131~140 (1976)
- 2) Information brochure: "Extrelut®: New method for the extraction of lipophilic substances", E. Merck, Darmstadt
- 3) ENDE, M., PFEIFER, P., SPITELLER, G.: *J. Chromatogr.* 183, 1~7 (1980)
- 4) BREITER, J.: *Arzneim. Forsch.* 28 (II), 1941~1944 (1978)
- 5) BREITER, J.: unpublished paper
- 6) HOELTZENBEIN, P., BOHN, G., RÜKKER, G.: *Z. Anal. Chem.* 292, 216~218 (1978)
- 7) HARZER, K., BARCHET, R.: *J. Chromatogr.* 132, 83~90 (1977)
- 8) DELBEKE, F. T., DEBACKERE, M.: *J. Chromatogr.* 161, 360~365 (1978)



エキストレルート® カラム



## 薬学ゆかりの外国人(7)

ヘボン James Curtis Hepburn

薬学博士 根本曾代子

### 初期医薬文化の貢献者

米人宣教師で医師のヘボン博士が来日したのは、今から123年前になる。幕末から明治にかけて滞日33年、日本がまだ発展途上国で、衛生状態や生活水準が低かった頃、施療院を設けて病気治療に貢献した。

また、独自のヘボン式ローマ字を発明し、最初の和英・英和辞典の著者としても知られる。ヘボン塾からは明治の英才が育成された。

因みに、ヘボンの本名はその綴りから言えば、ヘップバーンであるが、その頃は不慣れな発音から日本流に、「ヘボンさん」と親しまれた。辞典には著者名を漢字で「平文」と記名してある。

### 来日するまでの略歴

ヘップバーン家の祖先はスコットランド人で、1784年に2代目すなわち祖父の代に、建国7年目のアメリカに渡り、ペンシルヴァニア州のミルトンという小都市に定住していたから、イギリス系のアメリカ人ということになる。

1815年3月13日に生れたヘボンの父は弁護士で、母は牧師の娘であった。彼の終生変わらぬ社会福祉活動は、信仰厚き母の教育の感化があざかって力があった。父はヘボンを跡継ぎの法律家にするため、プリンストン大学へ入れた。しかし科学志望の彼は父の期待にそむいて1年で退学し、ペンシルヴァニア大学医学部に転学してしまった。

21歳で卒業して、医学博士の学位を受領すると、フィラデルフィアの北にあたるノリストウエンという町で開業医となる。25歳の時に教育者で母のように敬虔な信仰深い三歳年下のクララと結婚した。

在学中から宣教医として、外国伝道の夢を描いていたので、理想的な妻の共鳴をえて、結婚1年後の1841年(天保12)3月、医院を廃業し、夫人同伴で東洋伝道の旅に出発した。4カ月の長い船旅を終えて、英領シンガポールに着き、キリスト教の伝道と施療に打ち込んだ。

折しも清国は英國と阿片戦争の真っ最中であったが、翌年清国が敗れて、南京条約が締結された。その結果、広東、アモイ、上海等が開港されたため、ヘボン夫妻はアモイに移り、施療病院の共同経営に当った。ところが夫妻や同僚がマラリアに冒され、ついに子供まで失う悲運に見舞われた。夫妻は病氣回復後アモイを引揚げて、

5年ぶりに母国アメリカの土を踏んだ。

ニューヨークで開業して治療に努めたので評判が高く、13年経つうちに資産も豊かになり、ヘボン家は幸運の絶頂にあった時に、図らずも運命の転機が訪れた。

### 日本渡航の決行

時あたかも1858年(安政5)6月、日米修好通商条約の調印によって、貿易の自由化が認められたので、日本への渡航の禁が解かれた。これを機として、米国伝道教会は有能な宣教師を日本に派遣する計画を立てて、候補者を物色した。これにまつ先に応募したのは、余人ならぬヘボン夫妻であった。

しかし、すでに夫妻は40歳を過ぎており、冒険に挑戦するのは、誰の目にも危ぶまれた。しかも当時の日本は、外国人を目の敵にする過激な攘夷浪人が横行するという風評が伝わっていた。年老いた父や知友は、みすみす死地におもむくような危険な異國への旅を思いとどまるよう、極力翻意をうながしたが、決意は固く、出国計画の準備を進めた。

病院、別荘などを処分して資金をつくり、老父と一緒にサムエルをあとに残して、1859年(安政6)4月末、夫妻は勇躍、ニューヨーク港から遙かなる未知の日本への壮途に上了った。

帆船で大西洋を迂回する航路は175日もかかり、アメリカ領事館が駐在する神奈川に上陸したのは10月18日であった。

### 日本の第一印象

領事館の斡旋で、成仏寺の本堂を借りて暮らすことになったが、日本語は全く分からず、生活様式もすべて異なるので、途方に暮れるばかりであった。2週間後にアメリカから到着した宣教師のブラウン夫妻と生活をともにすることになり、百万の味方をえたように意気投合して、生涯の友となった。

ヘボンの目に映った日本の第一印象は、周辺の神奈川在の漁民の実情について、こう述べている。「日本には病院がないので、忌まわしい悪疾が公然と路傍にさらされている。天然痘が流行して、3人に1人は痘痕を持っており、盲人やできものだらけの頭を至る所で見た。肺病が蔓延している有様を見るに忍びず」として、寺を解放して施療を始めた。

キリスト教は禁制だったので、名主の石井源右衛門はご法度のキリシタンではないかと、ひそかにヘボンの行動を監視していた。万延元年（1860）源右衛門が神奈川奉行に差し出した「異人聞書」には、次のように報告されていた。

「漁師仁介眼病を患い、洲千弁天に願をかけ、お百度を踏み候ところ、ヘボンに出会い、手真似にて眼病治してやるとて、僅かに1滴の薬水にてたちまち痛み止まり、仁介泣いて恩を謝し、漁師共の間に評判一方ならず、あるいはキリシタンの一派かとも疑い候へ共、更にその動静もみえず、実に珍しき異人に候……」。

キリスト教は天文18年（1549）ザビエルがカトリック教を伝來したのが始まりで、キリシタンはポルトガル語のキリスト教を意味し、布教の便法に用いる理化学技法から、魔法の別称にも通用されていた。

#### 和英辞典出版の挿話

幕府は安政5年の条約で、翌年5月末、欧米5カ国に対し、神奈川、長崎、箱館（のち函館）の開港を許可した。ところが6月2日に神奈川湾は水深が浅く港には不適であり、かつ神奈川は東海道の宿駅で攘夷派浪人の取締が困難なことなどを理由に、横浜開港に緊急変更を宣言した。すでに神奈川に駐留した各國領事館は抗議したが、結局強行された。

こうして100戸足らずの農漁村に過ぎなかった横浜村は、一転して国際貿易港に飛躍するための建設計画に、幕府は9万6千両もの巨額を投じたといわれる。

中心部の運上所（明治7年横浜税関と改称、現在神奈川県庁の位置）の東側を外人居留地、西側を日本人町に指定したので、各地から一旗揚げる人々が移住して、異国情緒みなぎる国際開港場に発展して行った。

開港翌年の万延元年（1860）になると、外人居留地の海岸通りは英米一流の商館が先を争って、英1番館、米2番館が進出したのに続いて、洋館がずらりと建ち並んだ。

ヘボン夫妻が神奈川成仏寺の仮住居から、横浜山手の居留地に新築した39番館の住宅に移ったのは、文久2年（1862）も押し詰った12月29日であった。文久3年が明けて、診療を開始すると、待ち構えた病人が引きも切らぬ有様で、難病や手術など様々な患者の適切な処置に忙殺された。しかし、従前通り無償で、施療の方針を変えようとなかった。

ヘボン博士と岸田吟香の深い信頼関係が結ばれたきっかけは、眼病に悩んでいた吟香が人づてに聞き、元治元年（1864）4月、江戸から横浜へ来て、ヘボン先生の治療を受けたのが始まりである。7日ばかりで全治したので、効験いちじるしい医術に改めて敬服する感謝の念に加えて、高邁な人格に打たれた。しばしば訪れて懇談するうち、お互いに気脈が以心伝心で通い合った。

ヘボンは来日当初、言葉の不通で苦労した経験から、考案したローマ字式による最初の和英辞典の編纂に着手

していた。2～3人の日本人が手伝っていたが、吟香の和漢蘭に通じる学才を見込まれ、編纂助手として全力を傾注した。

和英・英和対訳の実用語2万語を収集して、ヘボン式綴りで発音を表現し、漢字と仮名字を付けた画期的な辞典の原稿が出来上った。しかし、日本にはまだ辞典を出版する設備がなく、ヘボンは吟香を同伴して、慶応2年（1866）9月上海に渡り、美華書院に出版を託した。

翌慶応3年5月、最初の和英・英和辞典として、吟香が命名した、平文先生著「和英語林集成」が出版され、その後7版を重ねた。

辞典刊行に協力した謝礼として、吟香はヘボン先生の眼薬の処方をえて、「点眼水・精錠水」の製造販売に乗り出ことになった。硫酸亜鉛液を主剤にした点眼式の眼薬の形態は、日本では初めての薬剤の型で、治療効果は立証済みであった。吟香は東京銀座に精錠水本舗・樂善堂を創業し、販路を中国まで拡張して一代で産を成した。

精錠水の名の由来は、オランダ語で亜鉛zinkをシンキと発音し、精錠の字を当てた。つまり精錠水は亜鉛水の意で命名したと思われる。

#### 滞日33年の業績を残して

ヘボン博士の名声が一段と華やかに広まったのは、慶応3年（1867）江戸の名女形として人気の高かった沢村田之助が、致命的な脱疽に冒された時、ヘボン博士の執刀で右足を切断し、危うく一命を取り止めたからであった。翌年、博士が治療する図が錦絵に描かれて売り出された。

評判を一段と盛り上げたのは、この年5月、田之助が博士へのお札興行を横浜北仲通の下田座で催した。田之助は博士がアメリカから取り寄せた義足をつけて演じるという、前代未聞の舞台見物で大入満員であったという。

これより先、39番館に移ってから、ヘボンは詠われるままに、診療の傍ら、西洋医学の指導に当っていた。鎖国時代はオランダ流が西洋医学の主流を占めていたが、開国後は視野が開けて、世界の趨勢は英米が強大で、新しい知識を吸収しようと、ヘボンの門をたたいたのは、将軍侍医・伊東玄朴、佐倉藩医・佐藤泰然（順天堂の創始者）、村田藏六（のちの大村益次郎兵部大輔）らであった。村田藏六は当時幕府の洋書調所（東京大学の前身）教授を務めていた。

ヘボン塾の年少者の英語教育は、もっぱらクララ夫人の担当であった。高橋是清（後の太政大臣）は文久3年（1863）11歳で入門している。佐藤泰然の末子董（後の林董外務大臣）、三宅秀（後の東京帝大医科大学長）、早矢仕有的（丸善の創始者）など大成した人材が巣立っている。

ヘボン塾が母体となり、芝白金の明治学院（現在の明治学院大学）に発展し、ヘボン博士が初代学院総理となる。

明治6年(1873)キリスト教禁制の高札撤去を機に、初志の伝道と聖書の翻訳に主力をそそぐことになり、来日以来10数年間私財を投じて継続した施療を打ち切る。

宣教師としての多彩な業績は多数文献にゆづる。明治23年(1890)10月27日、ヘボン博士夫妻は山手245番地の自宅で、一人息子サムエル夫妻と金婚の賀を祝った。博士は75歳、夫人72歳。2年後の明治25年10月22日、77歳の博士は半生の33年を過ごした想い出深い日本に別れ

を告げて、夫人とともに横浜港から故国へと旅立った。

ニュージャージー州のイースト・オレンジで余生を送った。1905年(明治38)日本政府から90歳のヘボン博士に勲三等旭日章が贈られた。同年、プリンストン大学より法学博士号が贈呈された。翌1906年3月4日、よき協力者であった夫人が不帰の人となった。5年後の1911年9月21日、社会福祉に献身した博士は96歳の偉大な生涯を閉じた。

Coca

## 北陸営業所開設

このたび北陸営業所を下記に開設致しましたので、ご案内申し上げます。本年5月末から業務を開始致しております。

お得意様各位のご要望にお応え申し上げますよう心掛けておりますので、よろしくお引立、ご指導の程お願い申し上げます。

## 「Chemical Times」へのアンケート 集計結果のご報告とお礼

昨年、第3号(7月発行、通巻101号)、第4号(10月発行、通巻102号)についてそれぞれダイレクトメール、配布による読者アンケート調査をお願い致しましたが、貴重なご回答を沢山戴きました。その一部をご紹介致しますと、興味をもって読まれる分野ではダイレクトメール、配布を通じて生化学がトップで約57%、次いで有機化学約48%、分析化学46%、薬学的なものに約44%の方が興味を示されておられました。その他勿論医学、農芸化学、無機化学にもご興味の方は多くおられました。

利用などについては、他分野の知識を広めることができます約70%、参考文献として約43%、資料収集としての方が約32%おられました。本誌に対する要望としては掲載領域では現在のままが約51%で大勢を占めており、内容については現在のままというご意見が約74%と圧倒的に多い結果がありました。

ほかにも、多くの方々から貴重なご意見やご指摘、また、力強い激励のお言葉もいただきました。

この他にご回答戴いたデータも一諸に参考にさせて戴いてご愛読者の皆様のご要望に少しでもお応えできますよう心掛けて編集に携わりたいと存じております。

お手数ながらお寄せ下さいますようお願い申し上げます。以上甚だ簡単ですがご報告旁々お礼申し上げます。

まぎら  
住所：〒921 石川県金沢市間明町1丁目65-2

名称：関東化学株式会社 北陸営業所

☎ 0762-91-0121

## 〈編集後記〉

本誌1982年第3号をおとどけ致します。今年も5、6月の新緑の候はいつの間にか過ぎて、湿っぽい梅雨もそろそろ終りも近く、太陽の夏も間近い今日この頃です。

ご愛読の皆様にはますます健勝でご活躍のことと拝察申し上げます。本号には前号に引き続き山川先生の「ポリアミンの生化学」久保先生の「HPLCによる薬物血中濃度測定」小宮先生の「不安定物質取扱い」など極めて興味深い話題を収載させて戴きました。また毎号おなじみの根本先生の「薬学ゆかりの外国人(7)」はローマ字で名高いヘボン先生で、これまた面白く読ませて戴けます。ご執筆の諸先生方のご好意に厚くお礼申し上げます。

次にお知らせと致しまして、従来本誌を担当致しておりました当学術部が他業務を併合して業務部という名称になりました。本ケミカルタイムスの担当は従前と変りなく山田、大橋が致します故、従来通りのご指導、ご鞭撻を賜りたく存じております。

これからよいよ盛夏になりますので皆様には十分ご健康にご留意下さいますよう併せてお願ひ申し上げます。

〈山田記〉



関東化学株式会社

〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目7番地  
電話 (03) 279-1767

編集責任者 山田 博 昭和57年7月1日 発行