

高速液体クロマトグラフィーによる血しょう及び尿中の オキザラート (トランス-*l*-1,2-ジアミノシクロヘキサン) プラチニウム (II) の定量

木津良一[Ⓐ], 東 信一, 早川和一, 宮崎元一*

(1985年9月30日受理)

血しょう及び尿中の制がん性白金錯体オキザラート(トランス-*l*-1,2-ジアミノシクロヘキサン)プラチニウム(II) (*l*-OHP) の分析法を研究した。種々検討した結果, 分析条件は以下のように定めた。前処理; Dowex 1-X8, Dowex 50 W-X4 及び Sep-Pak C₁₈ カートリッジを一連のカラムとして構成する。この前処理カラムに血しょう及び尿の 1 ml と引き続き水を流す。前処理カラム溶出液の最初の 6 ml 部分は捨て, 次の 10 ml 部分を分取し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の試料とした。HPLC 条件; カラム: Finepak SIL C₁₈ (4.6 mm i.d. × 25 cm), カラム温度: 50°C, 溶離液: 水-メタノール (95:5), 流速: 1 ml/min, 検出波長: 210nm, 試料注入量: 100 μl。ピーク高さによる検量線は, 原点を通る良い直線性を示した。定量下限は, 血しょう及び尿中 *l*-OHP 濃度 0.5 μM, 再現性は R.S.D. 3% 程度であった。血しょう及び尿中の *l*-OHP を高感度で精度良く定量することができた。

1 緒 言

近年, がんの化学療法における白金錯体の有効性が注目されており, シスプラチン {シス-ジクロロジアンミンプラチニウム(II)} は広く臨床使用されている。しかし, シスプラチンは腎毒性を始めとする副作用も強いいため, より制がん性が高く副作用の低い制がん性白金錯体の開発研究が盛んに行われている^{1)~3)}。

喜谷らにより合成されたオキザラート(トランス-*l*-1,2-ジアミノシクロヘキサン)プラチニウム(II) (*l*-OHP, NSC-266046)⁴⁾⁵⁾ は, 制がん性白金錯体の一つで, 種々のがんに対し優れた制がん活性をもち, 腎毒性をほとんど示さず, 又, シスプラチン耐性 L1210 細胞に交差耐性を示さないことなどが見いだされている⁶⁾。このように, *l*-OHP は多くの特徴を有し, シスプラチンに続く有望な白金錯体として注目されている。*l*-OHP の構造式を Fig. 1 に示した。

今後, *l*-OHP を医薬品として開発し, 又より良い投与計画を確立するうえで, *l*-OHP の体内挙動についての詳細な解明が必要となるが, この目的には総白金についてばかりでなく, 未変化の *l*-OHP の体内挙動をも明らかにすることが不可欠である。そのためには, *l*-OHP

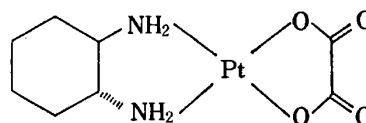


Fig. 1 Structure of (*trans-l*-1,2-diaminocyclohexane) oxalatoplatinum(II) (*l*-OHP)

の体内挙動研究に広く活用しうる分析法の確立が必要であり, この分野での研究の活発な展開が期待されている。しかし, 現在まで生体試料中の *l*-OHP の分析法についての研究は報告されていない。

一方, 生体試料中の制がん性白金錯体の分析法に関する知見としては, シスプラチンについて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による4種の方法が報告されている^{7)~10)}。これらの方法のうち, 3種の方法^{7)~9)}では, 白金元素に着目した検出法を採っているが, 操作や HPLC 装置が複雑であるなど, はん用性に欠けるものであった。これに対して著者らは, 一般的な HPLC 装置を用いて血しょう及び尿中のシスプラチンを, シスプラチン自身の紫外吸収で直接検出し定量する方法を確立し, 既に報告した¹⁰⁾。

そこで本研究では, 今後の展開が予想される *l*-OHP の代謝研究に資する目的で, 紫外吸収検出 HPLC による血しょう及び尿中の *l*-OHP の分析法について検討し, *l*-OHP を含まない血しょう及び尿については, *l*-

* 金沢大学薬学部衛生化学教室: 920 石川県金沢市宝町 13-1

OHP の保持時間に妨害性ピークの見られないクロマトグラムを得ることができ, その結果 *l*-OHP を添加した血しょう及び尿については高感度で精度よく *l*-OHP を分析できたので報告する.

2 実 験

2.1 装 置

HPLC 装置は, 送液ポンプ (島津 LC-5A), 試料注入器 (レオダイン 7125), 分離カラム, 波長可変紫外吸収検出器 (島津 SPD-2A) 及び記録計 (ユニコーダー U-228) で構成した. なお, 分離カラムは大洋サーモユニット C-600 を装着した水浴中で恒温とした.

2.2 試薬類

l-OHP は, 名古屋市立大学薬学部薬品分析化学教室から提供された. Dowex 1-X8 (Bio-Rad., Cl 型, 200~400 メッシュ) 及び Dowex 50 W-X4 (Bio-Rad., Na 型, 200~400 メッシュ) は 2 M 水酸化ナトリウム, 2 M 塩酸, 2 M 塩化ナトリウム及び水で十分に洗浄し, Sep-Pak C₁₈ カートリッジ (Waters) はメタノール 10 ml 及び水 10 ml を通して使用した. 水は水道水を蒸留後, イオン交換樹脂を通したものを, その他の試薬は, 市販特級品を使用した. 溶離液は, 0.4 µm のメンブランフィルター (富士フィルム, FR-40) で濾過した. 分離カラムには, Zipax SAX (Du Pont), 日立ゲル #3013-N 及び #3010 (日立化成), MCI Gel CPK08 (三菱化成) をそれぞれステンレス製クロマト管 (4.6 mm i.d. × 15 cm) にスラリー法で充てんしたもの及び Finapak SIL C₁₈ (4.6 mm i.d. × 25 cm) について検討した.

2.3 操作及び HPLC 条件

血しょう及び尿の前処理カラムとして, Dowex 1-X8, Dowex 50 W-X4 及び Sep-Pak C₁₈ カートリッジを 3.3, Fig. 4 に示したように, 一連のカラムとして構成する.

血液は 1000 g で 3 分間遠心し, 血しょうを分取する. 採取した血しょう又は尿の 1 ml を直ちに先の前処理カラムに流し, 引き続き水を流す. 前処理カラムからの溶出液の最初の 6 ml 部分は捨て, 次の 10 ml 部分を分取し, このうちの 100 µl を HPLC に注入した. 以上の操作は 5 ± 2°C で行った. HPLC 条件は以下のとおりである. カラム: Finapak SIL C₁₈ (4.6 mm i.d. × 25 cm); カラム温度: 50°C; 溶離液: 水-メタノール (95:5); 流速: 1 ml/min; 検出波長: 210 nm.

3 結果及び考察

3.1 *l*-OHP の紫外吸収スペクトル

l-OHP の紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示した.

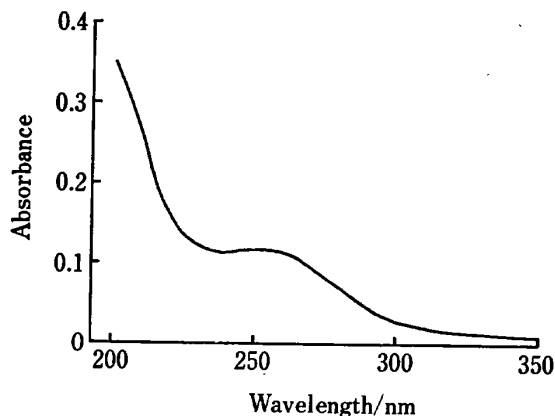


Fig. 2 UV spectrum of *l*-OHP

Sample: 50 µM *l*-OHP in H₂O; Reference: H₂O

l-OHP は 250 nm 以下の波長で 2500 以上の分子吸光係数を持つことが分かった.

3.2 *l*-OHP の HPLC

l-OHP の分離カラムとして, 5 種類のカラムについて検討した. 溶離液に水を用いた場合の容量比を Table 1 に示した. シスプラチンを強く保持した日立ゲル #3013-N カラムでの *l*-OHP の容量比は 1 と保持は弱く, Zipax SAX, MCI Gel CPK08, 日立ゲル #3010 の各カラムでは溶媒先端から *l*-OHP を分離することはできなかった. これらの 4 種のカラムでは, 種類の溶離液を用いても *l*-OHP の容量比はほとんど変化しなかった. 検討したカラムの中で最も強い保持を示したのは, Finapak SIL C₁₈ カラムであった. *l*-OHP の Finapak SIL C₁₈ カラムでの溶出挙動を検討したところ, 溶離液のメタノール濃度を増すに従い *l*-OHP の容量比は小さくなり, *l*-OHP は逆相分配モードにより保持, 溶出されていると考えられた. 更に, *l*-OHP 濃度とピーク高さの間には原点を通る良い直線性が見られ, ピーク高さから *l*-OHP を定量できることが分かった. 以上

Table 1 Capacity factors of *l*-OHP on various columns

Column	Capacity factor	Mode
Hitachi Gel #3013-N	1	anion exchange
Zipax SAX	0~0.1	anion exchange
MCI Gel CPK08	0~0.1	cation exchange
Hitachi Gel #3010	0~0.1	adsorption
Finapak SIL C ₁₈	13	reversed phase partition

Eluent: H₂O; Other conditions are the same as described in 2.3.

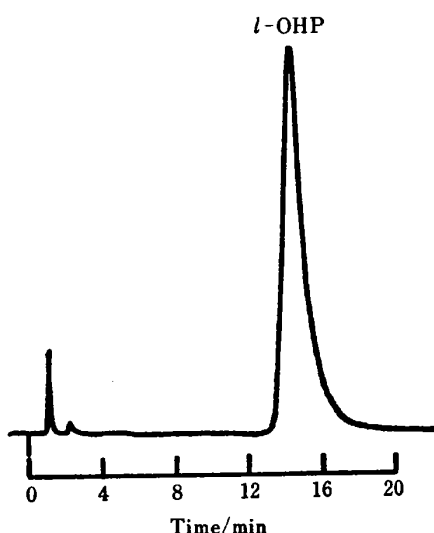


Fig. 3 A chromatogram of *l*-OHP
The conditions are described in 2.3.

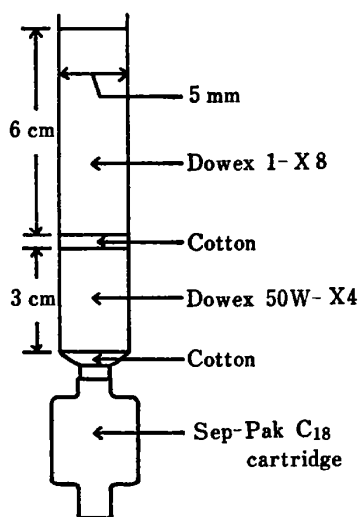


Fig. 4 Pretreatment column for plasma and urine

の結果から以下の検討は Finepak SIL C₁₈ カラムを用いて行うことにした。Fig. 3 に *l*-OHP 溶液についてのクロマトグラムの一例を示した。

3.3 血しょう及び尿の前処理

血しょうの除タンパク液及び尿を直接 HPLC に適用したところ、HPLC 条件を種々変化させても *l*-OHP の保持時間に生体成分による妨害ピークが見られ、*l*-OHP を分離検出することはできなかった。そこで、この妨害性成分を除去するために Sep-Pak C₁₈ カートリッジ、陰イオン交換樹脂の Dowex 1-X8 及び陽イオン交換樹脂の Dowex 50W-X4 を用いて血しょう及び尿の前処理法を検討した。なお、Dowex 1-X8 及び Dowex 50

W-X4 は内径 5 mm のガラスカラムに充てんして使用し、試料は主に健常人の血しょう及び尿を用いた。

Sep-Pak C₁₈ カートリッジ、Dowex 1-X8 カラム及び Dowex 50W-X4 カラムを個々に用いた場合には、ほとんど前処理効果が見られなかった。そこでこれらを種々に組み合わせて血しょう及び尿を前処理したところ、Fig. 4 に示したような Dowex 1-X8、Dowex 50W-X4 及び Sep-Pak C₁₈ カートリッジから構成されたカラムを用いた場合に最も良好なクロマトグラムが得られた。

本前処理カラムからの *l*-OHP の溶出、回収曲線の一例を Fig. 5 に示した。*l*-OHP の溶出位置を数例検討したところ、*l*-OHP は主として前処理カラム溶出液の 6 ml から 16 ml にかけて溶出されたので、前処理カラム流出液の最初の 6 ml 部分は捨て、次の 10 ml 部分を分取し、HPLC の試料とした。又、本前処理条件における *l*-OHP の回収率を標準 *l*-OHP 溶液を用いて検討したところ、*l*-OHP 濃度が 0.1 M から 1 mM の範囲で、92±3% と良好な回収率が得られ、本前処理法は十分実用しうるものと考えられた。

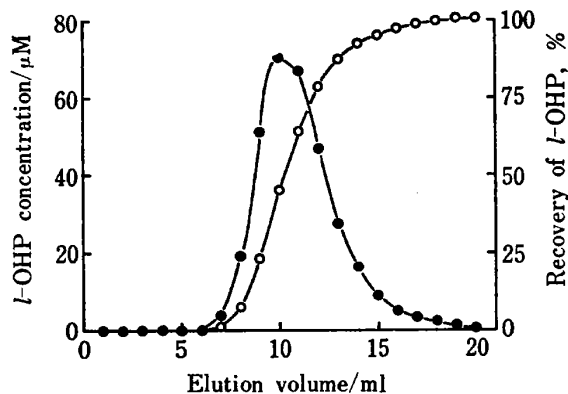


Fig. 5 Elution and recovery profiles of *l*-OHP in pretreatment

● : Elution of *l*-OHP, ○ : Recovery of *l*-OHP;
Sample : 400 μM *l*-OHP

3.4 HPLC 条件

3.3 の前処理を施した血しょう及び尿を用いて最適 HPLC 条件を検討した。

3.4.1 検出波長 血しょう及び尿について、種々の検出波長で得られるクロマトグラムを比較検討した。血しょう及び尿ともに検出波長が 205~250 nm の範囲で、*l*-OHP の保持時間に妨害性ピークは見られなかった。3.1 の紫外吸収スペクトルから分かるように、*l*-OHP の分子吸光係数は低波長側で大きいのでベースラインのノイズ幅を考慮して検出波長は 210 nm と定めた。Fig. 6

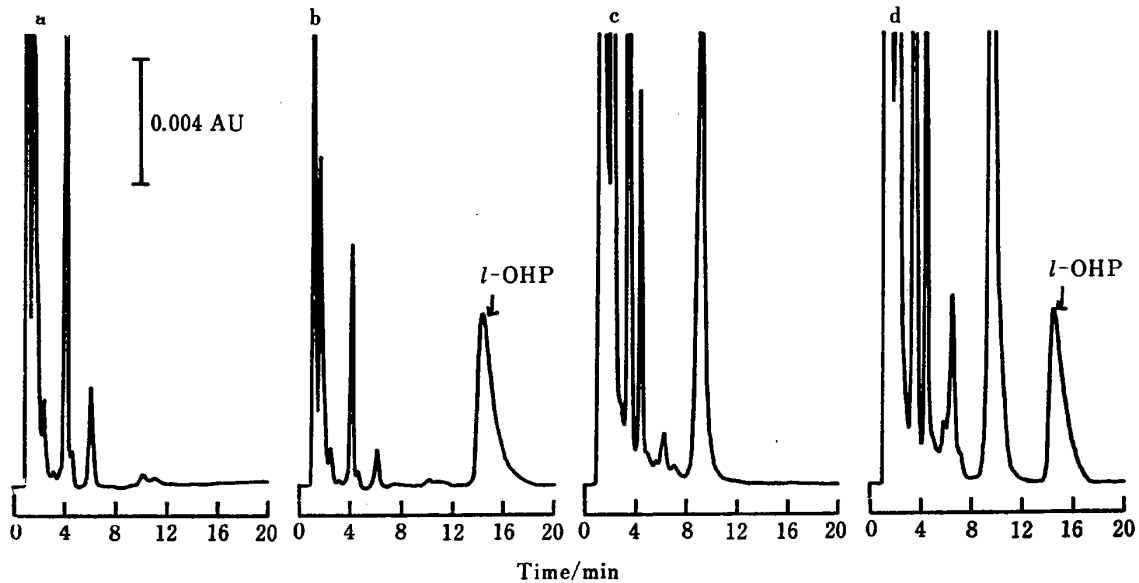


Fig. 6 Chromatograms of plasma and urine obtained by detection at 210 nm

a: Blank plasma, b: Plasma freshly spiked with *l*-OHP at 50 μ M, c: Blank urine, d: Urine freshly spiked with *l*-OHP at 50 μ M. Other conditions are the same as described in 2·3.

に血しょう及び尿についてのクロマトグラムの一例を示した。

3·4·2 溶離液 血しょう及び尿について, 種々のメタノール濃度の溶離液を用いてクロマトグラフィーを行った。Fig. 7 に尿について得られたクロマトグラムの一例を示した。血しょう及び尿ともにメタノール濃度が10%以上で, 血しょう及び尿の成分によるピークと *l*-

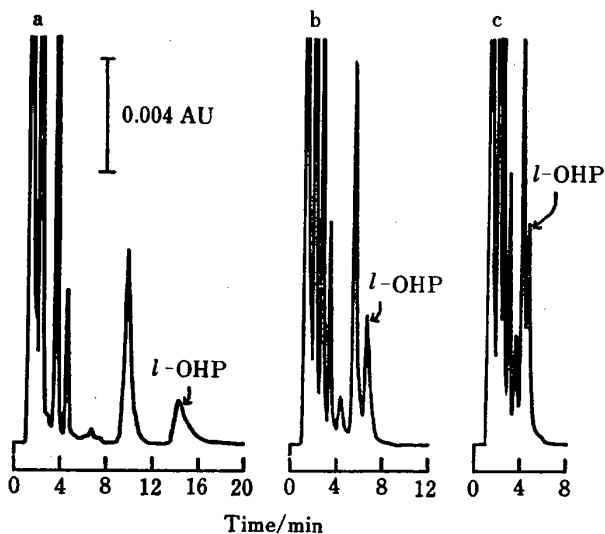


Fig. 7 Effect of methanol in eluent on chromatogram of urine

a: H₂O-MeOH (95:5), b: H₂O-MeOH (90:10), c: H₂O-MeOH (85:15); Sample: Urine freshly spiked with *l*-OHP at 10 μ M.

OHP の分離が不十分となった。そこで, 高感度化と迅速性を考慮して, 溶離液は血しょう及び尿ともに水-メタノール (95:5) と定めた。

3·5 検量線及び回収率

血しょう及び尿に *l*-OHP を添加し, ピーク高さを用いた検量線を作成した。Fig. 8 に示したように, 血しょう及び尿ともに, 検討した 1 mM 以下の濃度で検量線は原点を通る良い直線性を示し, 定量下限は血しょう及び尿で 0.5 μ M であった。又このとき, 本前処理にお

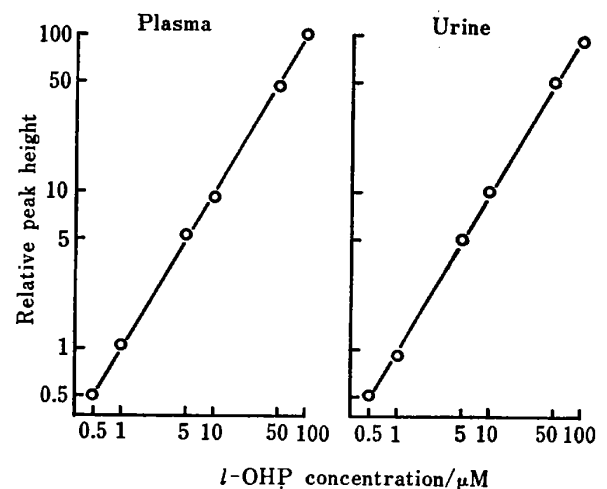


Fig. 8 Calibration curves for *l*-OHP in plasma and urine

ける血しょう及び尿中の *l*-OHP の回収率は、血しょう 86±3%、尿 83±2% と良好であり、又再現性も優れていた。

3.6 患者血しょう及び尿のクロマトグラム

現時点では、*l*-OHP の臨床試験は開始されていないので、将来 *l*-OHP による治療の対象の一つとなることが予想される、卵巣がんの患者の血しょう及び尿を用いてブランクのクロマトグラムを検討した。得られたクロマトグラムを Fig. 9 に示した。血しょう及び尿ともに *l*-OHP の保持時間には妨害性ピークは見られず、本法は患者の血しょう及び尿にも適用が可能であると考えられた。

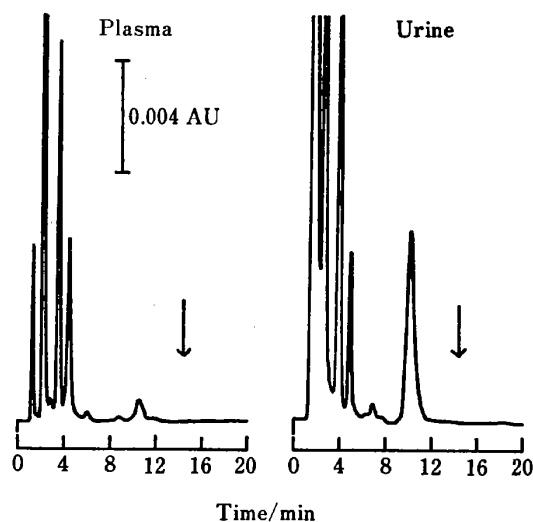


Fig. 9 Chromatograms of blank plasma and urine obtained from a patient with ovarian carcinoma

↓: Supposed retention time of *l*-OHP.
Conditions are described in 2.3.

3.7 *l*-OHP の安定性

本法を用いて、水、血しょう及び尿中での *l*-OHP の安定性を検討した。*l*-OHP は水中では室温暗所で少なくとも2週間は安定であった。又、血しょう及び尿中では *l*-OHP の分解が見られた。今回の検討に用いた血しょう及び尿中における *l*-OHP の半減期は、37°C ではそれぞれ約1時間及び約20分と不安定であったが、溶液を約0°C とすることにより、半減期はそれぞれ約15時間及び6時間とかなり安定化することができた。又、本分析法の前処理を施した溶液中の *l*-OHP は0°C では少なくとも10時間は安定であった。従って、血しょう及び尿中の *l*-OHP を分析する場合は、2.3 で述べた

ように試料の取り扱いをできるだけ低温で迅速に行うことが必要である。

終わりに、制がん性白金錯体の *l*-OHP を御供与いただいた名古屋市立大学薬学部喜谷喜徳教授に深謝致します。又、卵巣がん患者の血しょう及び尿試料をいただいた藤間病院清水謙博士に深謝致します。

文 献

- 1) A. W. Prestayko, S. T. Crooke, S. K. Carter, Ed.: "Cisplatin; Current Status and New Development", (1980), (Academic Press, London).
- 2) M. P. Hacker, E. B. Douple, I. H. Krakoff, Ed.: "Platinum Coordination Complex in Cancer Chemotherapy", (1983), (Martius Nijhoff Pub., Boston).
- 3) 喜谷喜徳: 癌と化学療法, **10**, 2442 (1983).
- 4) Y. Kidani, K. Inagaki, R. Saito, S. Tsukagoshi: *J. Clin. Haematol. Oncol.*, **7**, 197 (1977).
- 5) Y. Kidani, K. Inagaki, S. Tsukagoshi: *Gann*, **67**, 921 (1976).
- 6) Y. Kidani, M. Noji, K. Inagaki, T. Tashiro, M. Miyazaki: "Platinum Coordination Complex in Cancer Chemotherapy", Edited by M. P. Hacker, E. B. Douple, I. H. Krakoff, p. 261 (1983), (Martius Nijhoff Pub., Boston).
- 7) Y. Chan, L. A. Sternson, A. J. Repta: *Anal. Lett.*, **B11**, 449 (1978); A. J. Repta, D. F. Long: "Cisplatin; Current Status and New Development", Edited by A. W. Prestayko, S. T. Crooke, S. K. Carter, p. 287 (1980), (Academic Press, New York).
- 8) I. S. Krull, X-D. Ding, S. Braverman, C. Selavka, F. Hochberg, L. A. Sternson: *J. Chromatogr. Sci.*, **21**, 166 (1983).
- 9) K. C. Marsh, L. A. Sternson, A. J. Repta: *Anal. Chem.*, **56**, 491 (1984).
- 10) R. Kizu, S. Higashi, M. Miyazaki: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4614 (1985).

☆

Determination of (*trans*-*l*-1,2-diaminocyclohexane) oxalatoplatinum (II) in plasma and urine by high performance liquid chromatography.
Ryoichi KIZU, Shin-ichi HIGASHI, Kazuichi HAYAKAWA and Motoichi MIYAZAKI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920)

A method for determination of (*trans*-*l*-1,2-diaminocyclohexane) oxalatoplatinum (II) (*l*-OHP), introduced by Kidani *et al.* as one of the promising antineoplastic platinum complexes, in plasma and urine by high performance liquid chromatography (HPLC) was investigated in order to contribute for metabolic study of *l*-OHP. The recommended pretreatment procedures and HPLC conditions are as follows. Pretreatment of plasma and urine; pretreatment column is composed of Dowex 1-X8 (5 mm i.d. × 6 cm), Dowex 50 W-X4 (5 mm i.d. × 3 cm) and Sep-Pak C₁₈ cartridge. Blood samples are centrifuged at 1000 g for 3 min to obtain plasma. One ml of plasma or urine is immediately

placed on the pretreatment column and is eluted with water at the flow rate of 1.2 ml/min. The initial 6 ml portion of effluent is discarded and subsequent 10 ml portion is collected. An aliquot (100 μ l) of the effluent collected is subjected to HPLC. All of these pretreatment procedures are carried out at $5 \pm 2^\circ\text{C}$. HPLC conditions; column: Finepak SIL C₁₈ (4.6 mm i.d. \times 25 cm), eluent: H₂O-MeOH (95 : 5), column temperature: 40°C, flow rate: 1 ml/min, detection wavelength: 210 nm, injection volume: 100 μ l. Under the conditions described above, a linear relationship was obtained between peak height and *l*-OHP concentration in plasma and urine. Determination limit was 0.5 μM *l*-OHP in sample solutions. Recovery of

l-OHP in pretreatment was $86 \pm 3\%$ in plasma and $83 \pm 2\%$ in urine. A sensitive and precise determination of *l*-OHP in plasma and urine will be possible by this method.

(Received September 30, 1985)

Keyword phrases

(*trans-l*-1,2-diaminocyclohexane) oxalatoplatinum (II); antineoplastic platinum complex; high performance liquid chromatographic determination; plasma and urine.