

ノ ー ト

制がん性白金錯体シスプラチンのイオン交換体への 保持挙動

木津 良一[®], 宮崎 元一^{*}

(1989年12月28日受理)

1 緒 言

白金錯体のシスプラチン {*cis*-ジクロロジアンミン白金(II), CDDP} は優れた制がん剤として広く臨床に用いられており¹⁾, 今後, CDDP の体内動態を詳細に検討する必要がある. なかでも制がん作用の発現に密接に関連していると考えられる未変化錯体, すなわち CDDP, の体内動態の追求が重要であり, 生体試料中 CDDP の分析法の確立にむけて HPLC による方法が種々検討されている^{2)~10)}.

CDDP は電荷を持たない無機の錯体であるが, このような錯体の HPLC 挙動はほとんど知見が得られておらず, 従来, CDDP を 2 以上の保持容量比で保持するカラムは知られていなかった. そのため血しょう及び尿中の CDDP の分析においては共存成分との分離は悪く, CDDP のできるだけ選択的な検出法の開発に主眼が置かれたが^{2)~8)}, 検出器としてオフラインでの原子吸光度計²⁾³⁾, つり下げ型水銀滴電極を備えたポーログラフ⁵⁾⁶⁾ やりん光を測定できる蛍光光度計⁹⁾ など HPLC 用検出器としては必ずしも一般的でない検出器を必要とし, CDDP の体内挙動研究に活用され得る方法にはいたらなかった. 一方, 著者らがこれまで行ってきた血しょう及び尿中 CDDP の HPLC 分析法についての研究から, CDDP が幾つかの陰イオン交換及び陽イオン交換カラムで強く保持されることを見いだすと共に, この性質を利用して血しょう及び尿中 CDDP の UV 検出 HPLC 分析法を開発した⁹⁾¹⁰⁾ これら CDDP を強く保持するイオン交換カラムにおける保持・溶出挙動の特徴を明らかにできれば, 血しょう及び尿成分と CDDP の分離を改善するうえで有用であり, 更に高感度ではん用性の高い HPLC 分析法の開発につながると

考えられた.

そこで本研究では, 今後 CDDP のより高感度ではん用性の高い分析法の開発研究に資する目的で, イオン交換カラムを用いる HPLC における CDDP の挙動を検討した結果, 興味深い知見が得られたので報告する.

2 実 験

2.1 試 薬

CDDP 及び *trans*-ジクロロジアンミン白金(II) (TDDP) は Aldrich Chemical Co. から購入した. *cis*-ジプロモジアンミン白金(II) (CBrP), *trans*-ジプロモジアンミン白金(II) (TBrP), *cis*-ジヨードジアンミン白金(II) (CIP) 及び *trans*-ジヨードジアンミン白金(II) (TIP) はそれぞれ文献記載の方法^{11)~15)} に従い合成した. CDDP 及び TDDP は 0.15 M 塩化ナトリウム溶液に, CBrP 及び TBrP は 0.10 M 臭化ナトリウム溶液に, CIP 及び TIP は 0.10 M ヨウ化ナトリウム溶液にそれぞれ 0.2 mM となるように溶解し, 溶離液にて適宜希釈して使用した.

イオン交換カラムは, 三菱化成製のイオン交換充てん剤を上昇法にてスラリー充てんして作製し, 使用した.

2.2 HPLC

HPLC 装置は, 島津 LC-5A ポンプ, レオダイン 7125 試料注入器, 島津 CTO-2A カラム恒温槽, 島津 SPD-2A 紫外吸収検出器及びバントス U-288 記録計で構成した. 流量は 1 ml/min, カラム温度は 40°C, 試料注入量は 100 µl とし, 検出波長は主として 210 nm を用いた.

3 結果及び考察

3.1 各種カラムにおける CDDP の保持容量比

各種カラムにおける CDDP の保持容量比を Table 1 に示す. CDDP はイオン交換基を持たない逆相分配

* 金沢大学薬学部: 920 石川県金沢市宝町 13-1

系のカラムには保持されなかったが、イオン交換カラムではいずれのカラムにも保持された。従来は2以上の保持容量比を与えるカラムは知られていなかったが、陰イオン交換及び陽イオン交換の各モードにおいて、イオン交換容量が大きいカラムで保持容量比もより大きく、MCI GEL CA10Sカラムでは30以上の保持容量比が得られた。

更に本研究では、イオン交換カラムを用いる HPLC における CDDP の挙動を理解するうえで有用な知見が得られることを期待して、CDDP の類似化合物の TDDP, CBrP, TBrP, CIP 及び TIP についても検討したところ、これら錯体も陰イオン及び陽イオン交換カラムに保持されるなど、CDDP と同様の挙動を示すことが明らかになった。

検討した白金錯体の保持容量比がカラムのイオン交換

容量に依存することから、これら錯体の保持にはイオン交換基が関与していると考えられた。

そこで次に、種々の溶離液を用いて保持容量比を検討した。分離カラムには、陰イオン交換の MCI GEL CDR10 カラム (4.6 mm i.d.×5 cm) 及び陽イオン交換の MCI GEL CK10S カラム (4.6 mm i.d.×25 cm) を用いた。CDDP 及び類似白金錯体の保持容量比を Table 2 に示す。又一例として、CDDP, CBrP 及び CIP について過塩素酸ナトリウム溶離液で得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

検討したいずれのカラムと溶離液の組み合わせにおいても、各錯体の保持容量比は、クロロ錯体<プロモ錯体<ヨード錯体の順で大きくなった。又異性体間の比較では、トランス体に比べシス体で大きくなった。一方、いずれの溶離液においても、溶離液濃度を変化させても各錯体の保持容量比はほとんど変化せず、更に pH にも依存しないなど極めて特異な挙動を示した。

Pt(II)X₂L₂ (X:クロロ, プロモ, ヨードなど, L:アンモニア, トリエチルホスフィンなど) 型の白金(II)錯体の双極子モーメントは、トランス異性体に比べシス異性体で大きい¹¹⁾¹²⁾が、本研究でも保持容量比はトランス異性体に比べシス異性体で大きい。又分子内のハロゲン基によっても大きく変化することから、CDDP をはじめとして本研究で用いた白金錯体のイオン交換カラムへの保持には、錯体の静電的特性が重要な役割を担っていると推定される。

3・2 保持される際のイオン交換反応

上記 3・1 の結果から、CDDP がイオン交換カラムに保持される際には、イオン性物質におけるようなイオン交換反応は起きていない可能性がある。そこで、近年発展しつつある吸光度検出イオンクロマトグラフィーの概

Table 1 Capacity factors of CDDP on various columns

| Column (chromatographic mode) | Ion exchange capacity (mequiv/ml) | Capacity factor |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| (Anion exchange) | | |
| MCI GEL SCA01 | 0.01 | 0.6 |
| MCI GEL CDR10 | 0.3 | 16.0 |
| MCI GEL CA10S | 1.2 | 31.9 |
| (Cation exchange) | | |
| MCI GEL SCK01 | 0.01 | 0.1 |
| MCI GEL CK10S | 2.0 | 1.4 |
| (Reversed-phase partition) | | |
| HITACHI GEL #3010 | — | <0.1 |
| COSMOSIL 5C18 | — | <0.1 |

Eluent: 0.1 M NaH₂PO₄; CDDP: *cis*-dichlorodiammine platinum(II)

Table 2 Capacity factors of CDDP and its five analogues with various eluents

| Column | Eluent | Capacity factor | | | | | |
|------------------------------------|---|-----------------|------|------|------|------|------|
| | | TDDP | CDDP | TBrP | CBrP | TIP | CIP |
| MCI GEL CDR10 (Anion exchange) | NaClO ₄ | 1.0 | 1.3 | 5.5 | 14.0 | 34.9 | 89.5 |
| | NaCl | 1.8 | 7.8 | 7.5 | 34.0 | 51.7 | >150 |
| | NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 1.5 | 16.0 | 9.3 | 55.0 | 79.4 | >150 |
| MCI GEL CK10S (Cation exchange) | NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 1.0 | 1.4 | 1.7 | 2.5 | 10.3 | 18.6 |
| | KH ₂ PO ₄ | 1.7 | 2.1 | 2.5 | 3.5 | 15.4 | 24.0 |

Column size: MCI GEL CDR10; 4.6 mm i.d.×5 cm; MCI GEL CK10S; 4.6 mm i.d.×25 cm. Eluent concentration: 0.1 M. TDDP: *trans*-dichlorodiammine platinum(II); CBrP: *cis*-dibromodiammine platinum(II); TBrP: *trans*-dibromodiammine platinum(II); CIP: *cis*-diiododiammine platinum(II); TIP: *trans*-diiododiammine platinum(II)

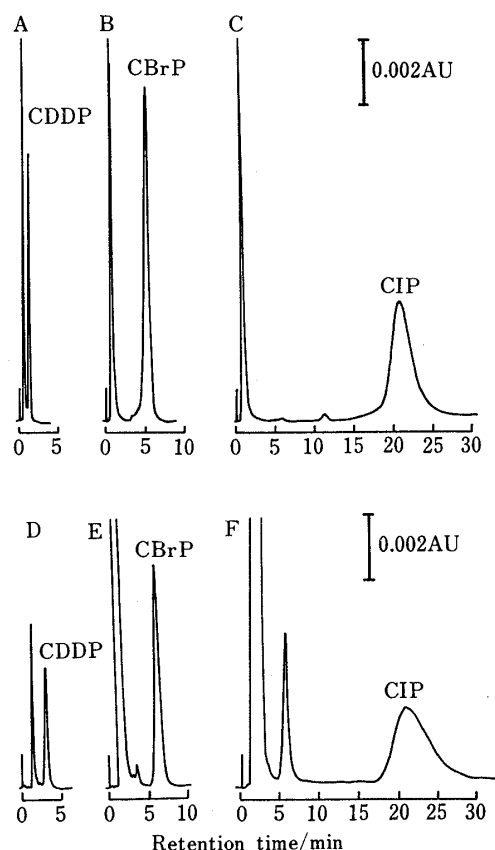


Fig. 1 Typical chromatograms of CDDP, CBrP and CIP on MCI GEL CDR 10 column and MCI GEL CK 10 S column

A, B and C: MCI GEL CDR10 column (4.6 mm i.d. \times 5 cm, anion exchange); D, E and F: MCI GEL CK10S column (4.6 mm i.d. \times 25 cm, cation exchange), Eluent: 0.1 M NaClO_4 10 μM solution of each Pt(II) complex was subjected to HPLC

念を用いてこの可能性を検討した。

吸光度検出イオンクロマトグラフィーの概念については成書¹⁶⁾に詳述されているが、イオン交換クロマトグラフィーでは、試料イオンの溶出に伴いその当量分だけ溶離液イオン濃度が減少するので、クロマトグラム上のシグナルは、試料イオンに基づく吸光度が溶離液イオン濃度の減少に伴う吸光度の減少に相殺されたものである。従って、溶離液イオンが UV 吸収を示す場合と示さない場合で、CDDP の検出波長-ピーク高さプロファイルを比較することにより、上記の可能性を検討できると考えた。

UV 吸収を示さない溶離液にはリン酸一ナトリウム、UV 吸収を示す溶離液には硝酸ナトリウム、フタル酸二ナトリウム及びイミダゾールの各溶液を用いた。220

Table 3 Relative peak heights of CDDP at various wavelengths

| Eluent | Relative peak height | | | | |
|--------|----------------------|--------|--------|--------|----------|
| | 210 nm | 220 nm | 230 nm | 250 nm | 300 nm |
| (1) | 34.8 | 15.5 | 5.7 | 0.2 | 1 |
| (2) | 29.8 | 15.0 | 5.4 | 0.2 | 1 |
| (3) | 33.4 | 15.3 | 6.4 | 0.3 | 1 |
| (4) | 31.2 | 14.8 | 5.4 | 0.2 | 1 |

(1) 50 mM sodium dihydrogen phosphate; (2) 0.2 mM sodium nitrate; (3) 0.01 mM disodium phthalate; (4) 0.1 mM imidazole. Eluents (1), (2) and (3) were used for anion exchange chromatography with a MCI GEL CDR10 column (4.6 mm i.d. \times 5 cm). Eluents (1) and (4) were used for cation exchange chromatography with a MCI GEL CK10S column (4.6 mm i.d. \times 25 cm). The pH of imidazole eluent was adjusted to 4.1 with phosphoric acid.

nm 及び 210 nm におけるモル吸光係数はそれぞれ、CDDP で 2400, 5300, リン酸一ナトリウムでは 10 以下、硝酸ナトリウムで 3200, 7700, フタル酸二ナトリウムで 9300, 18000, イミダゾールで 1700, 5600 であった。

Table 3 には、各溶離液について 300 nm でのピーク高さを 1 とした相対ピーク高さを示す。相対ピーク高さは溶離液が UV 吸収を示す場合と示さない場合で差はなく、CDDP がイオン交換カラムに保持される際にはイオン交換反応は起きていないことが明らかになった。CDDP がイオン交換カラムに保持される機構の一つとして、CDDP とイオン交換基の間の双極子-イオン相互作用が考えられた。

緒言にも述べたように、従来 CDDP について 2 以上の保持容量比を与える HPLC システムが知られておらず、血しょう及び尿成分と CDDP の分離が悪かったため、CDDP に選択的な検出法が研究されてきたが、体内挙動研究には用するには十分でなかった。もし、生体試料中の成分と CDDP の分離を良くすることができれば、UV 検出器や電気化学検出器など市販の HPLC 用検出器を用いても血しょう及び尿中の CDDP を高感度に分析できる可能性がある。この点から本研究で見いだされたイオン交換カラムを用いる HPLC における CDDP の挙動は、今後、更に高感度では用性の高い生体試料中 CDDP の HPLC 分析法を開発するうえで有用な知見となるものと考えられる。

本研究の費用の一部は、文部省科学研究費補助金による。又、本研究で MCI GEL の使用に御便宜を頂いた三

菱化成株式会社に深謝致します。

☆

文 献

- 1) A. W. Prestayko, S. T. Crooke, S. K. Carter (Eds.): "Cisplatin: Current Status and New Developments", (1980), (Academic Press, New York).
- 2) Y. Chang, L. A. Sternson, A. J. Repta: *Anal. Lett.*, **11B**, 449 (1978).
- 3) C. M. Riley, L. A. Sternson, A. J. Repta: *J. Pharm. Sci.*, **72**, 351 (1984).
- 4) C. M. Riley, L. A. Sternson, A. J. Repta: *J. Chromatogr.*, **217**, 405 (1981).
- 5) P. J. Parsons, A. F. LeRoy: *J. Chromatogr.*, **378**, 395 (1986).
- 6) S. J. Bannister, L. A. Sternson, A. J. Repta: *J. Chromatogr.*, **273**, 301 (1983).
- 7) K. C. Marsh, L. A. Sternson, A. J. Repta: *Anal. Chem.*, **56**, 491 (1984).
- 8) R. A. Baumann, C. Gooijer, N. H. Verthorst, R. W. Frei, I. Klein, W. J. F. van der Vijgh: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **5**, 165 (1987).
- 9) R. Kizu, S. Higashi, M. Miyazaki: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4614 (1985).
- 10) R. Kizu, K. Hayakawa, M. Miyazaki: *Biomed. Chromatogr.*, **3**, 14 (1989).
- 11) K. A. Jenzen: *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **225**, 97 (1935).
- 12) K. A. Jenzen: *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **229**, 225 (1936).
- 13) H. J. S. King: *J. Chem. Soc.*, **1338** (1938).
- 14) S. C. Dhara: *Indian J. Chem.*, **8**, 143 (1970).
- 15) M. J. Cleare, J. D. Hoeschele: *Bioinorg. Chem.*, **2**, 187 (1973).
- 16) 宮崎元一, 早川和一: "新しいイオンクロマトグラフィの手ほどき", (1986), (南江堂).

Retention behavior of an antitumor platinum complex Cisplatin on ion exchangers. Ryoichi KIZU and Motoichi MIYAZAKI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920)

The novel aspects of Cisplatin, a potent antitumor platinum complex, on HPLC with ion exchange columns were studied. Although Cisplatin is an inorganic nonionic complex, it was retained on both anion and cation exchange columns, but not on reversed-phase columns. The capacity factor was larger on a column with higher ion exchange capacity; a capacity factor of more than 30 was obtained in a system composed of anion exchange MCI GEL CA10S column and sodium dihydrogen phosphate eluent. However, the capacity factor measured on a column using the appropriate salt solution as the eluent was not affected by changing the concentration or pH of the eluent. The effect of UV absorptivity of an eluent on the peak height of Cisplatin was studied at various wavelengths in order to confirm the absence of an ion-exchange sorption mechanism in the eluent. No difference was observed between the relative peak height-detection wavelength profiles obtained with UV absorbing eluents and those obtained with UV-non absorbing eluents. These results indicated that Cisplatin might not be retained by ion exchange mechanism, but by other mechanisms such as ion-dipole interactions between Cisplatin and the functional groups of the stationary phases.

(Received December 28, 1989)

Keyword phrases

Cisplatin; platinum(II) complex; antitumor agent; HPLC.

.....