

金属イオンと薬物間の錯体形成を検出するための
ハイスループットスクリーニング法の開発

2019 年度 博士学位論文

守岩 友紀子

The Study on High-throughput Screening Method for Detection of Complexation Interactions between Metal Ions and Medicinal Drugs

Thesis for the Degree of Doctor of Pharmaceutical Science,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences
2019

Yukiko Moriiwa

金属イオンと薬物間の錯体形成を検出するための
ハイスループットスクリーニング法の開発

研究分野	臨床分析化学
指導教授	柳田 顕郎
学位申請者	守岩 友紀子

日本薬局方医薬品の中には、金属イオンに親和性の高い多座配位子構造を有するものが多数ある。また、金属イオンとの錯体形成反応に伴い、薬物の吸収挙動や薬効の変化や、予期せぬ副作用や配合変化が生じた事例などの報告もある。しかしながら、金属イオンと薬物の膨大な組合せに対して、両者間の金属錯体形成の有無を網羅的に検出できる分析法はいまだに確立されていない。また、薬物の金属錯体形成は生理的 pH やイオン強度条件下での観測が望ましいが、既存の分光機器分析手法は測定条件の制約が大きく、生理的条件下での相互作用の報告事例は非常に少ない。

以上の背景から、本研究では、金属イオンと薬物間の錯体形成を網羅的かつ迅速に検出するためのハイスループットスクリーニング法の構築を検討した。具体的にはまず、二相溶媒系中での金属錯体形成に伴う薬物の分配挙動の変化を、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) で検出するシステムを検討した。次に、任意の金属イオンをキレートさせた固相抽出 (SPE) 媒体に生理的 pH 条件下で薬物を通液し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で検出するシステムを検討した。さらに、銅イオンと薬物の錯体形成を、イオン選択性電極 (ISE) で選択的に検出できるシステムを検討した。

第一章 金属イオン含有二相溶媒系を用いる高速向流クロマトグラフィーによる薬物の金属錯体形成検出法の検討

HSCCC は二相溶媒系を用いる液-液分配クロマトグラフィーであり、金属イオンによる固定相の劣化を心配する必要がない。ベンゾジアゼピン系抗不安薬のブロマゼパム (BMP) に対して、*t*-butylmethylether-CH₃CN-H₂O (2:2:3, v/v/v) の二相溶媒系の上相 (UP) を固定相とする逆相分配モードでの HSCCC を行った (Fig. 1-A)。その結果、疎水的な BMP は移動相が下相 (LP) では溶出しなかった (1-B (a))。一方、二相溶媒系にあらかじめ任意の金属イオンを添加して HSCCC を行ったところ、Fe²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺の各イオン添加時に親水的な BMP-金属錯イオンが移動相中で形成されて素早く溶出した (1-B (d~g))。すなわち、BMP はこれらの金属イオンと選択的に錯体形成すると判定できた。同様な手法で、BMP 以外の 4 種類の薬物と 7 種類の金属イオン間の錯体形成のスクリーニングを実施し、これまで報告例のない金属錯体の事例を複数見出した。さらに、Cu²⁺含有二相溶媒系を用いる HSCCC により (Cu²⁺との選択的な錯形成に基づく) 血中 BMP 濃度の迅速定量法も開発した。

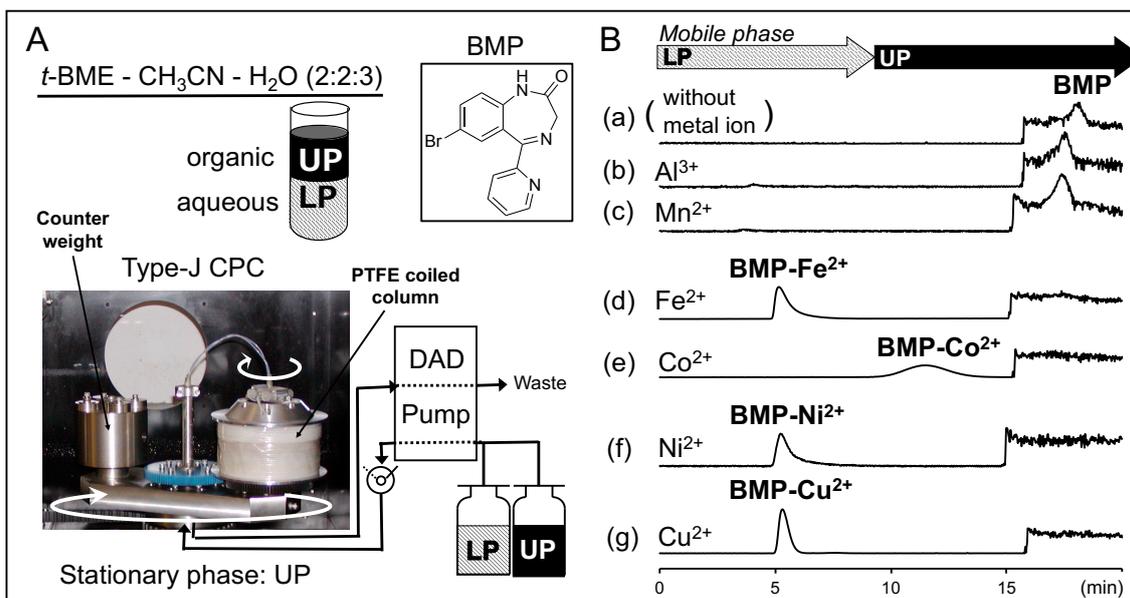


Fig. 1 **A:** The HSCCC apparatus and the two-phase solvent system of the present method. **B:** HSCCC chromatograms of bromazepam (BMP) in reverse-phase partition mode (stationary phase solvent: UP, mobile phase solvent: LP→UP) using the two-solvent system in the absence of a metal ion (a) and that containing Al^{3+} (b), Mn^{2+} (c), Fe^{2+} (d), Co^{2+} (e), Ni^{2+} (f), or Cu^{2+} (g).

第二章 固相抽出媒体を用いる薬物もしくは関連化合物の金属錯体形成検出のためのハイスルーブットスクリーニング法の検討

第一章の手法よりもスクリーニングの効率を飛躍的に向上させる目的で、SPE 媒体と HPLC 分析を組合せた手法を新たに検討した。任意の金属イオンをキレート保持させる SPE 媒体（遠心用スピナーカートリッジ）として、イミノ二酢酸基が修飾された MonoSpin ME とニトリロ三酢酸基が修飾された MonoSpin NTA を使用した。両カートリッジの金属キレート特性を把握した後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いた擬似生理的条件下での金属イオンと薬物間の錯体形成検出手順を最適化した。具体的には、NTA カートリッジに任意の金属イオンをキレートさせた後、 CH_3CN 含有 PBS 溶液（pH 7.4）で希釈した被験薬物溶液を通液した（Fig. 2-A）。次に、通液前後の溶液中薬物含量を HPLC 定量し（Fig. 2-B, 通液前: (a), 通液後: (b)~(m)）、各金属（キレート NTA カートリッジ）への吸着率（%）を算出した（Fig. 2-C）。同図に示したように、BMP を被験薬物としてスクリーニングした結果、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} に対する選択的な錯体形成が検出できた。続けて、BMP 以外の 54 種類の薬物と 11 種類の金属イオン間の錯体形成の網羅的なスクリーニングを実施した。また、ME カートリッジを用いる生理的 pH 条件下（1 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4）での実験系を構築し、生体アミノ酸（20 種類）及びペプチド（5 種類）と 12 種類の金属イオン間のスクリーニングを行った。さらに、ME カートリッジでの 24 種類のポリフェノール化合物と 12 種類の金属イオン間のスクリーニングも試みた。各手法の SPE 条件と結果の一部を Fig. 3 に示した。

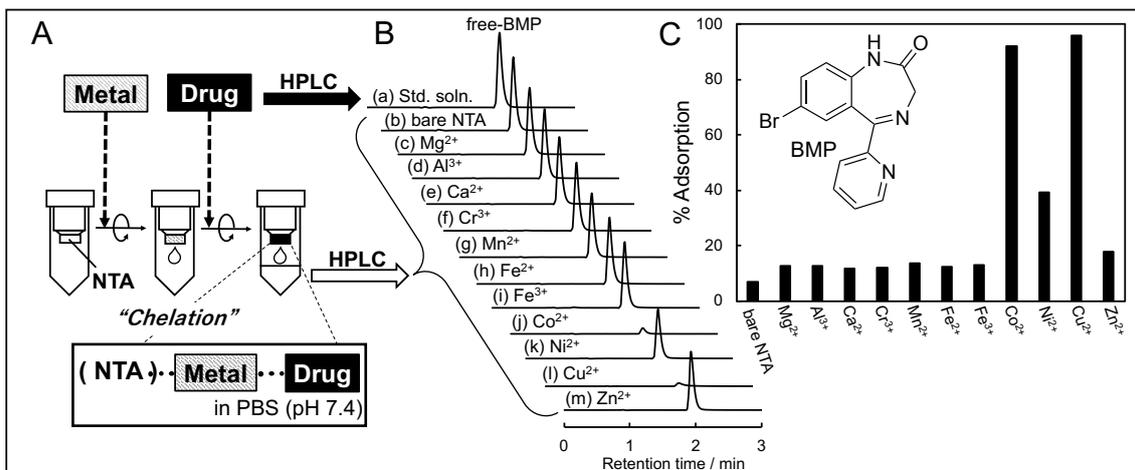


Fig. 2 A: Schematic showing a screening method for complex formation with a metal ion on a MonoSpin NTA cartridge. B: HPLC stacked chromatograms of BMP in eluates after passing a BMP test solution through a metal ion chelated NTA cartridge. C: Comparison of the adsorption capacity (%) of BMP to each of eleven different metal ions chelated onto the NTA cartridge.

SPE condition		Compound		Adsorption capacity (%)												
Cartridge	Solution*	Category	Name	no metal	Mg ²⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Cr ³⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mo ⁵⁺
NTA	PBS (pH 7.4)	Drugs	BMP	7	13	13	12	12	14	12	13	92	39	96	18	
			LVX	13	12	18	11	15	11	36	50	42	94	90	38	
			LTG	13	20	20	20	42	20	21	21	35	22	32	21	
			⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
ME	1 mM HEPES (pH 7.4)	Amino acids & peptides	Trp	17	15	30	18	23	22	23	66	39	40	67	31	81
			Cys	16	12	14	17	11	7	23	32	12	10	64	12	9
			Tyr	8	7	7	6	7	7	11	19	9	13	37	12	28
			Tyr-Tyr-Tyr	5	21	73	23	23	59	69	99	95	98	93	89	98
			⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
ME	H ₂ O	Polyphenols	Catechin	6	0	1	4	3	1	7	70	2	1	4	4	0
			Quercetin	8	13	20	16	16	17	54	94	15	12	30	20	26
			Caffeic acid	3	11	30	15	29	20	53	83	17	18	33	26	24
			⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

*Each solution contains CH₃CN in arbitrary proportion.

Fig. 3 Comparison of the adsorption capacity (%) of various kinds of compounds to each of twelve different metal ions chelated onto a MonoSpin NTA or ME cartridge.

第三章 銅イオン選択性電極を用いる簡便迅速な銅-薬物錯体形成検出法の検討

第二章のスクリーニングの結果，Cu²⁺と錯体形成する薬物が多数見出された．そこでさらに，Cu²⁺との錯体形成のみを選択的かつ迅速に検出する新規なスクリーニング法について検討した．具体的には，生理的 pH 条件下（10 mM HEPES 緩衝液，pH 7.4）における（固定化されていない）遊離状態の Cu²⁺と薬物間の錯体形成の有無について，銅イオン選択性電極を用いて（錯体形成に伴う遊離 Cu²⁺減少に基づく）電位変化量（電位減少率）を計測した．計測に際しては，市販の銅イオン選択性電極を活用して少量の試料液（500 μl）の電位計測が可能な装置を自作し（Fig. 4），測定条件を最適化した．本装置により，44 種類の薬物に対する銅イオンとの錯体形成の有無のスクリーニングを実施した結果，19 種類において顕著な電位の減少（減少率 50%以上）を確認できた（Fig.

5) . 本法は極めて迅速かつ簡便な手法であり，薬物以外の生体成分にも適用できる．また，電極の種類を変更することで，他の金属イオン (Ca^{2+} や Cd^{2+} など) との選択的な錯体形成の検出も可能と考えられる．

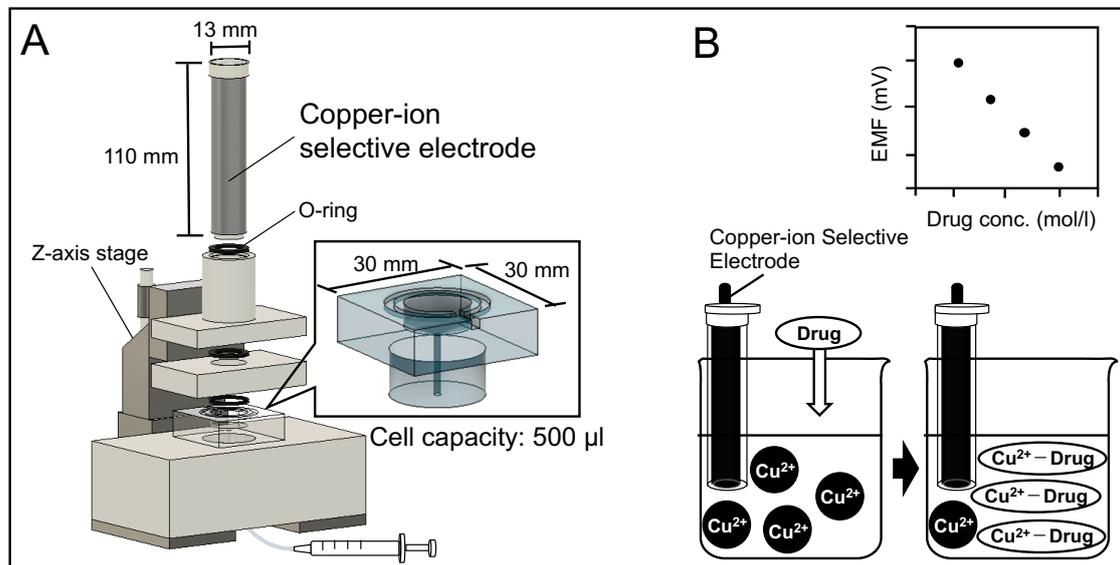


Fig.4 A: The ISE apparatus using a copper-ion selective electrode of the present method. B: Schematic showing a basic concept of the present method for selective detection of the complexation formation between Cu^{2+} and a test drug.

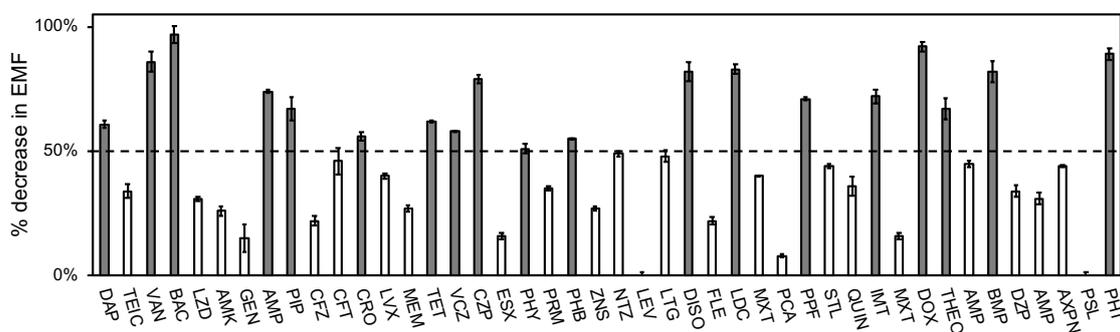


Fig. 5 Comparison of % decrease in EMF of 44 different drugs under the present ISE method.

総括

金属イオンと薬物間の錯体形成の有無を迅速に検出するためのスクリーニング法について，複数の新規手法を開発した．さらに，これらの手法を用いて，擬似生理的 pH 条件下における金属イオンと薬物（または生体成分）間の錯体形成に関する網羅的なスクリーニングを実施し，これまでに未報告の様々な錯体形成の組合せを発見した．構築した手法は金属錯体のさらなる研究促進ツールとして有用であり，発見した錯体形成の組合せは創薬・薬理・臨床薬学等の分野での有益な情報として価値が高い．

【研究成果の掲載誌】

Y. Moriiwa, *et al.*, *Anal. Sci.*, Accepted.

略号表

本論文では以下の略号を使用する.

〈クロマトグラフィー関連用語〉

HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HSCCC	高速液体クロマトグラフィー
PTFE	ポリテトラフルオロエチレン
K	平衡定数
k	保持係数
K_{RP}	逆相 HSCCC における物質の分配係数
UP	上相
LP	下相
t_R	保持時間
t_0	カラムを素通りする物質の保持時間

〈測定関連機器および装置〉

UV-Vis	紫外可視吸光光度法
FL	蛍光分光光度法
MS	質量分析
XRD	X線解析
ISE	イオン選択電極
IMAC	固定化金属イオンクロマトグラフィー
SPE	固相抽出
NTA	ニトリロ三酢酸
IDA	イミノ二酢酸

〈有機溶媒および水溶液〉

t -BME	t -ブチルメチルエーテル
BtOH	ブタノール
CH ₃ CN	アセトニトリル
PBS	リン酸緩衝生理食塩水

ISA イオン強度調整剤
PDMS ポリジメチルシロキサン

〈薬物, アミノ酸, 誘導体化試薬および植物由来化合物〉

BMP ブロマゼパム (Bromazepam)
ABX アンブロキシロール (Ambroxol)
TZD チザニジン (Tizanidine)
PTM フェントラミン (Phentolamine)
VRCZ ボリコナゾール (Voriconazole)
VCM バンコマイシン (Vancomycin)
IMT イマチニブ (Imatinib)
Gly グリシン (Glycine)
Ala アラニン (Alanine)
Val バリン (Valine)
Leu ロイシン (Leucine)
Ile イソロイシン (Isoleucine)
Phe フェニルアラニン (Phenylalanine)
Tyr チロシン (Tyrosine)
Trp トリプトファン (Tryptophan)
Cys システイン (Cysteine)
Met メチオニン (Methionine)
Pro プロリン (Proline)
Ser セリン (Serine)
Thr トレオニン (Threonine)
Asn アスパラギン (Asparagine)
Gln グルタミン (Glutamine)
Asp アスパラギン酸 (Aspartic acid)
Glu グルタミン酸 (Glutamic acid)
His ヒスチジン (Histidine)
Lys リシン (Lysine)
Arg アルギニン (Arginine)
OPA オルトフタルアルデヒド (*o*-phthalaldehyde)
FMOC クロロギ酸 9-フルオレニルメチル (Chloroformic acid 9-fluorenylmethyl ester)
ACT プロアントシアニジン混合物 (Apple condensed tannins)
C カテキン (catechin)

EC	エピカテキン (epicatechin)
PB1	プロシアニジン B1 (procyanidin B1)
PB2	プロシアニジン B2 (procyanidin B2)
PC1	プロシアニジン C1 (procyanidin C1)
PT	プロシアニジンテトラマー (procyanidin tetramer)

〈数式関連用語〉

$P_{A_{STD}}$	標準溶液中の化合物のピーク面積
P_{A_E}	MonoSpin 溶出液中の化合物のピーク面積
$P_{A_{MBE}}$	金属イオンをキレートしていない MonoSpin 溶出液中の化合物のピーク面積
Q	MonoSpin カートリッジへの吸着率
EMF	起電力 (膜電位)
E	電極に発生する電位
E_0	比較電極の電位
R	気体定数
T	温度 (K)
a	遊離銅イオンの活量
y	活量係数
C_f	遊離銅イオン濃度

目次

序論.....	1
第一章 金属イオン含有二相溶媒系を用いる高速向流クロマトグラフィーによる薬物の金属錯体形成検出法の検討.....	4
1-1 緒言.....	4
1-2 実験方法.....	6
1-3 結果と考察.....	6
1-4 第一章のまとめ.....	6
第二章 固相抽出媒体を用いる薬物もしくは関連化合物の金属錯体形成検出のためのハイスループットスクリーニング法の検討.....	7
2-1 緒言.....	7
2-2 実験方法.....	8
2-2-1 被験化合物.....	8
2-2-2 試薬と溶媒.....	8
2-2-3 試料溶液調製.....	9
2-2-4 HPLC 分析装置と分析条件.....	9
2-2-5 固相抽出媒体.....	10
2-2-6 MonoSpin カートリッジへの通液遠心条件.....	11
2-2-7 MonoSpin カートリッジの前処理条件.....	11
2-2-8 MonoSpin カートリッジへの金属イオン吸着量の測定.....	11
2-2-9 MonoSpin カートリッジからの金属イオン脱離の有無の確認.....	11
2-2-10 金属イオンキレート MonoSpin カートリッジへの被験薬物 (BMP) の吸着率の算出.....	11
2-2-11 UV 吸収スペクトルの測定.....	12
2-3 結果と考察.....	13
2-3-1 MonoSpin カートリッジの特性把握.....	13
2-3-1-a MonoSpin カートリッジへの金属イオン吸着量の確認.....	13
2-3-1-b MonoSpin カートリッジに吸着した金属イオンの脱離の有無の確認...14	
2-3-2 擬似生理的条件下での金属イオンと薬物間の錯体形成スクリーニング15	
2-3-2-a 被験薬物の HPLC 分析条件の最適化.....	15

2-3-2-b	MonoSpin NTA 使用時の SPE 分析条件および薬物溶液組成の最適化	17
2-3-2-c	BMP と錯形成する金属イオン種のスクリーニング実施	19
2-3-2-d	多品目の薬物の金属錯体形成のスクリーニング実施	21
2-3-3	生理的 pH 条件下での金属イオンとアミノ酸やペプチド間の錯体形成スクリーニング	24
2-3-3-a	被験アミノ酸の HPLC 分析条件の最適化	24
2-3-3-b	MonoSpin ME ならびに NTA 使用時の SPE 条件の最適化	26
2-3-3-c	多品目のアミノ酸やペプチドの金属錯体形成のスクリーニング実施	27
2-3-4	水条件下での金属イオンとポリフェノール化合物間の錯体形成スクリーニング	29
2-3-4-a	被験ポリフェノール化合物の HPLC 分析条件の最適化	30
2-3-4-b	多品目のポリフェノール化合物の金属錯体形成のスクリーニング実施	31
2-4	第二章のまとめ	33
第三章	銅イオン選択性電極を用いる簡便迅速な銅-薬物錯体形成検出法の検討	35
3-1	緒言	35
3-2	銅イオン選択性電極を用いた銅-薬物錯体形成検出の理論	35
3-3	実験方法	35
3-4	結果と考察	36
3-5	第三章のまとめ	36
総括		37
謝辞		39
引用文献		40
主論文目録		48

序論

近年の医薬品市場では、金属イオンを含有する（金属イオン錯体）医薬品が多く開発されている。特に、がん化学療法において金属錯体は欠かせない存在である [1-3]。シスプラチンは白金 (Pt) との錯体構造を有する白金制がん剤であり、非常に広い範囲のがんに適応を持つ。シスプラチンの白金 (Pt) が、がん細胞の DNA に結合することにより、DNA 鎖内に架橋が形成され、DNA の複製が阻害される結果、がん細胞の分裂・増殖が抑制される [4, 5]。シスプラチンは、幅広いがん腫瘍縮小効果を有するものの、激しい副作用を示すという特徴も有している。深刻な副作用として、強い腎毒性による腎不全などの腎臓機能の障害が挙げられ、投与上の大きな問題となる。また、多くの患者に見られる悪心・嘔吐や食欲不振などの消化器症状も強く発現することが知られている [4]。シスプラチンの抗腫瘍活性を弱めることなく、腎毒性および嘔気・嘔吐などの副作用を軽減することを目的にカルボプラチンやオキサリプラチンなどの白金制がん剤が開発された [5]。しかしながら、副作用の軽減はいまだ克服すべき重要な課題である。また、シスプラチン耐性がんでは既存の白金制がん剤が互いに交叉耐性を示すことがわかっているため、交叉耐性を示さない亜鉛 (Zn)、金 (Au)、銅 (Cu) などの他の金属イオン錯体を用いた新規抗がん剤の開発は大きな関心を集めている [1, 2]。制がん剤の他にも、医薬品として用いられる金属イオンは多く存在する。例えば、マグネシウム (Mg) は酸化マグネシウムなどの形で胃酸の中和剤や安全性の高い下剤として用いられる [6]。鉄 (Fe) は貧血治療として Fe を補給するための製剤がある [7]。カルシウム (Ca) も鉄 (Fe) と同様にカルシウム (Ca) 自体が骨の成分として重要であり、細胞間シグナル伝達にも欠かせない役割を持つため、Ca を補給するための製剤が数多く販売されている [8, 9]。また、薬物の水溶性を上げるためにカルシウム塩として製剤化されている医薬品も多く、高脂血症治療薬であるアトルバスタチンはカルシウム塩である [10]。亜鉛 (Zn) 錯体であるポラプレジンクは胃粘膜の損傷部を修復作用があり [11]、ウィルソン病治療薬（銅吸収阻害剤）であるノベルジンは酢酸亜鉛水和物である [12]。また、酸化亜鉛をベースとした亜鉛軟膏は古くから皮膚疾患に用いられている [13]。抗潰瘍剤として有名なスクラルファートはアルミニウム (Al) を含有しており、胃粘膜保護作用、抗ペプシン作用、制酸作用があり、防御因子を増強し攻撃因子を抑えるという 2 つの機能を持つ [14]。上記のように、金属含有医薬品は数多く存在し、その薬効は幅広い。

金属含有医薬品と他の薬物との複合処方によく見受けられるが、薬物が金属含有医薬品中の金属イオンと相互作用を引き起こすことが知られている。ニューキノロン系抗菌薬は金属イオンとのキレート能を有するため、金属含有医薬品と同時服用により、不溶性の金属イオン錯体を形成し吸収が阻害されることは有名である [15-17]。一方で、抗菌薬や抗ウイルス薬と金属イオンとの錯体は、薬物と標的微生物 DNA との結合が金属イオンにより安定化されるため、強い活性を示すことが報告されている [18-24]。さらに、薬物は金属イオンとの錯体形成により、血清中タンパク結合率が大幅に変化することも明らかになった [25-27]。このように、金属イオンは薬物に配位結合することで、薬物の吸収・分布・活性に大きな影

響を与える。近年の創薬研究では、コンピューターによる解析とシミュレーションから分子レベルで構造の設計がされるが、設計された薬物候補化合物の中で、臨床応用まで成功するものはごく一部である。薬物候補化合物の多くは、臨床試験の段階でバイオアベイラビリティ、有効性、副作用などに関して問題が生じる。このような問題を解決するアプローチとして、薬物候補化合物と金属イオンとの錯体形成は薬物候補化合物の薬物動態学的特性と薬力学的特性の両方を改善する効果的な手段となりうるため、幅広い問題を克服する汎用性のある足場である可能性を秘めている [28, 29]。

鉄 (Fe) やカルシウム (Ca) のように、金属イオン自体が生体に欠かせない役割を持つ。生体に必須な金属イオンは存在量に応じて、多量元素と微量元素に分けられており、これらの金属イオンは食物や大気から生体内に取り込まれ、アミノ酸、有機酸、タンパク質などと錯体を形成した状態で血流と共に移動し、様々な臓器に到達した後に化学変化を受けながら、一部は貯蔵（あるいは蓄積）され、残りは排泄される。この吸収から始まる一連のプロセスでは、非常に複雑精緻なフィードバック機能が成り立ち、金属イオンの欠乏症や過剰症が生じないよう厳密に制御されている [30-35]。金属イオンの過剰症や生体にとって有毒なカドミウム (Cd)、水銀 (Hg) やヒ素 (As) などの金属イオンが摂取された場合は、生体内で誘導・合成される高システイン含有金属結合性タンパク質であるメタロチオネインによりキレートされ解毒されることが知られている [36-39]。古くより、金属イオンの多くは生体にとって有害あるいは毒性があるとして、毒性学、環境科学を中心に研究が盛んであった。しかしながら、金属イオンが生体内で生命活動に必要な不可欠な多くの役割を担っている有用な生体成分であることが 1990 年代から明らかになり、現在では生体を構成する元素の中でも特に微量金属元素の機能と役割を解明するメタロミクスの研究が活発を呈している [40-42]。生体内での金属イオンの主な働きとして、タンパク質の高次構造の安定化や酵素の活性中心としての働きが挙げられる。例えば、生体内微量金属である鉄 (Fe) イオンは血液中の酸素を運搬するヘモグロビン中に含まれ、Fe が酸素と直接結合し錯体状態となり酸素の運搬を行う [43]。亜鉛 (Zn) イオンはスーパーオキシドジスムターゼやアルカリホスファターゼ、RNA ポリメラーゼといった酵素の中心金属として働き、ジンクフィンガーとしてタンパク質の三次構造の安定化にも寄与する [35]。鉄 (Fe) や亜鉛 (Zn) の他にも銅 (Cu) やニッケル (Ni) といった金属種が生体内微量金属イオンとして、タンパク質の折りたたみ構造の安定化 [44-47] や様々な触媒作用 [35, 47-49] に寄与している。

上記のような薬物の金属イオンの配位に伴う薬物特性の変動や生体中の金属含有酵素の解明や金属イオンの体内動態を明らかにするために、金属イオンとの錯体形成を検出することは非常に重要であるが、その膨大な組合せに対して、両者間の金属錯体形成の有無を網羅的に検出できる分析法はいまだに確立されていない。加えて、錯体形成反応は溶液中の pH やイオン強度によって影響を受けるため、薬物や生体成分と金属イオンとの錯体形成を評価する際は、生理学的 pH (pH 7.4) およびイオン強度条件下での評価が望ましいが、既存の分光機器分析手法は測定条件の制約が大きく、生理的条件下での相互作用の報告事例は非常に少ない。既存の検出法として、質量分析法 (Mass Spectrometry: MS) [50-52]、X 線解析法 (X-

Ray Diffraction: XRD) [21, 53-55] , 蛍光光度法 (Fluorescence Spectrometry: FL) [24, 25] や紫外可視吸光度法 (UltraViolet- Visible Spectrometry: UV-Vis) [21-25, 50, 52, 55, 56] が挙げられる. MS 法では, リン酸緩衝塩が測定の夾雑成分となるため, リン酸緩衝液を必要とする生理的条件下での測定は困難である. XRD 法では, 測定試料の結晶化など煩雑な測定手順が必要である. FL 法については, 錯体形成による蛍光・発光から錯体形成を評価できるが, 蛍光・発光が確認される組み合わせは極めて稀である. 一般的に使用されている UV-Vis 法は, 金属イオンとの錯体形成に伴う光 UV 吸収スペクトルの変化から錯体形成を検出するが, 錯体形成に伴う光 UV 吸収スペクトルの変化を生じない場合も存在する. また, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は金属錯体の迅速な分析に適しているが [57-61] , 遊離金属イオンは分離カラム内へ蓄積し, 分離カラムを徐々に劣化させる [62, 63] .

このような背景のもと, 金属イオンと薬物間の錯体形成を検出するためのハイスループットスクリーニング法の開発を企図した. スクリーニング法として, 幅広い金属イオンと薬物を対象とできること, 膨大な組合せを迅速に評価できるハイスループットな分析であること, また, 測定手順が煩雑ではなく簡便であることが望まれる. そこで本研究では, 高速向流クロマトグラフィー (High-speed countercurrent chromatography; HSCCC) , 固相抽出媒体 (Solid-phase extraction; SPE) , イオン選択性電極 (Ion-selective electrode; ISE) を用いる新規な手法開発を試みた.

第一章では, 互いに混ざり合わない二相溶媒系を移動相と固定相として用いる液-液分配モードの HSCCC [63, 64] を用いた錯体検出法の開発を検討した. さらに, 薬物と金属イオンとの錯体形成を利用した, 血清中の薬物の迅速な定量を行った. 第二章では, 金属イオンキレート官能基が修飾されたシリカモノリスディスクを内蔵した遠心用スピナーカートリッジを用いた SPE 法と HPLC 分析を組合せた, 擬似生理的条件下 (生理的 pH, イオン強度) での金属錯体形成の迅速かつ簡便な検出が可能なスクリーニング法の開発を検討した. 第三章では, 生理的 pH 条件下 (pH 7.4) で共に遊離状態である薬物と Cu^{2+} 間の錯体形成を検出することを目的として, 銅イオン選択性電極を用いたスクリーニング法の開発を検討した.

第一章 金属イオン含有二相溶媒系を用いる高速向流クロマトグラフィーによる薬物の金属錯体形成検出法の検討

1-1 緒言

薬物と金属イオンの錯体の分離・検出法として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は原理的には有用な手法であると考えられる [57-61]。しかしながら現実的には、通常の HPLC 分離カラム内の充填剤表面への遊離金属イオンの非可逆的な吸着・蓄積による分離カラムの劣化を招き、溶出成分のピーク形状の悪化や定性・定量の不良が生じる [62, 63] ため、金属錯体の分離や検出の用途として積極的に活用される手法には成り得ていない。そこで、本章では、お互いに混ざり合わない二相溶媒系の上下相の片方を固定相、もう片方を移動相とする液-液分配クロマトグラフィーである高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) [64, 65] を利用した薬物の金属錯体形成の検出法について検討することとした。HSCCC においては、液体の固定相を遠心力によって物理的に保持させるための独自の遠心カラムホルダーが用いられるが、Fig. 1. 1 に最も汎用されている Type-J coil-planet centrifuge (J-CPC) の模式図を示した。J-CPC では、円筒状のアルミ製のカラムホルダーにテフロン製 (polytetrafluoroethylene: PTFE) チューブを多相コイル状に巻きつけたものをカラムとして使用する。カラムホルダーは公転軸に取り付けられた固定ギア (stationary gear) からプラネタリーギア (planetary gear) を介して公転軌道上に配置されている。公転軸を回転させると、カラムホルダーが回転しながら同時に自転する。また、遠心時のバランス維持のために、公転軸に対してカラムの対角にカウンターウェイトが取り付けられている。この自公転するコイル状カラム内で生じる遠心力とアルキメデスのスクリュウ効果により、二相溶媒系の片方を固定した状態でもう片方を送液することができる。カラム内の二相溶媒は、動的な強い攪拌と二相分離を繰り返すことにより、二相溶媒系への溶質の分配係数の差から溶質の分離が可能になる。HSCCC は移動相・固定相ともに液体であるため、固定相への試料の不可逆的吸着による損出がない。また、溶質成分の溶出挙動は二相溶媒系の上下相に対する分配係数 (K) にのみ依存するため、天然由来成分のような複雑な化合物に対して収率の非常に高い分離精製法となる [66, 67]。また、金属イオンの吸着による固定相の劣化も回避できるため、金属イオンを分析対象とした無機分析に応用されており、固定相にキレート抽出試薬を添加した HSCCC 分析による金属イオンの分離・検出例が数多く報告されている [68-75]。この HSCCC カラム内では、キレート抽出試薬を含有する固定相がサンプル溶液中の微量な重金属の連続的な抽出・濃縮を行うことができる [73-75]。このように、HSCCC は固定相および移動相として使用される二相溶媒系を分離の目的に応じて調製することができるため、幅広い分離・分析を実現できる。

最近の研究では、金属イオン含有二相溶媒系を用いた HSCCC 分離を行うことで、混合物や鏡像異性体の分離効率が向上したという報告がされている [76-79]。この分離効率の向上

は、二相溶媒系中に添加した金属イオンに対する化合物ごとに異なった錯形成能に基づいている。つまり、HSCCC カラム内で二相溶媒系中の金属イオンと錯体形成する化合物としない化合物を選択的分離することができる。

本章では、金属イオンとの錯体形成に伴う薬物の親疎水性変化に注目し、金属イオンを含有する二相溶媒系を用いた HSCCC 分析を行い、薬物の金属錯体形成の有無の検出に応用するための検討を行った。具体的には、これまでに金属イオンとの錯体形成が報告されているベンゾジアゼピン系抗不安薬であるブロマゼパム (BMP) を被検薬物として、HSCCC 分析条件を最適化し、BMP と錯体形成する金属イオン種のスクリーニングを行った。さらに、BMP 以外の薬物についても同様な検討を行った。

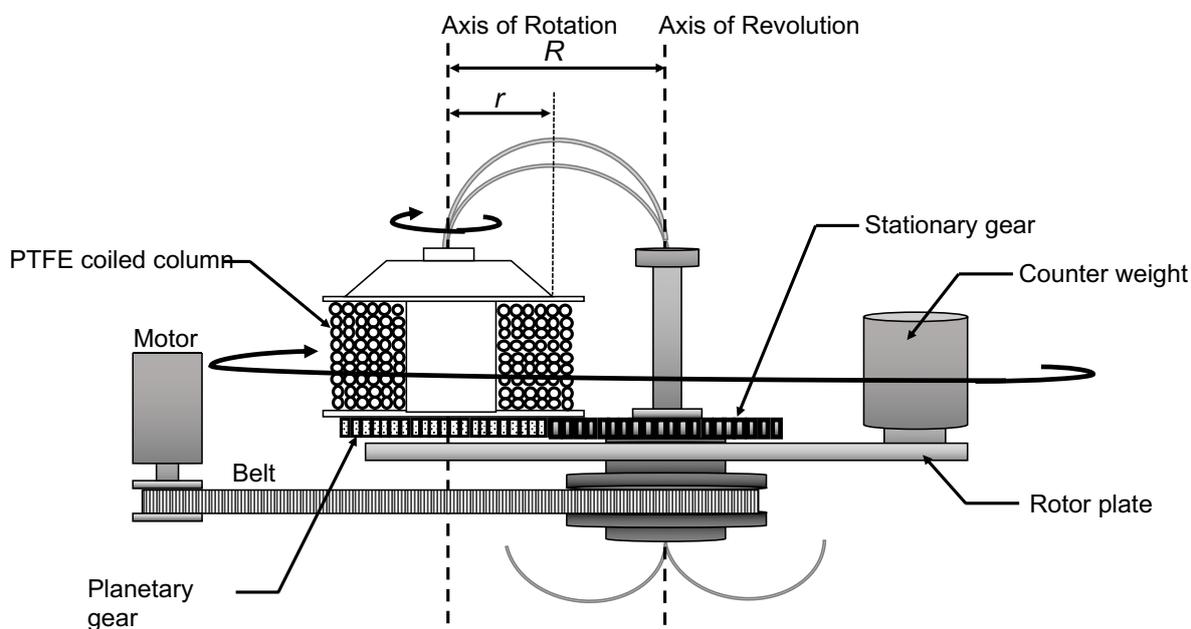


Figure 1.1 Schematic drawing of J-CPC.

1-2 実験方法

学術論文に投稿予定のため省略させていただきます。

1-3 結果と考察

学術論文に投稿予定のため省略させていただきます。

1-4 第一章のまとめ

学術論文に投稿予定のため省略させていただきます。

第二章 固相抽出媒体を用いる薬物もしくは関連化合物の金属錯体形成検出のためのハイスループットスクリーニング法の検討

2-1 緒言

生理的 pH (pH 7.4) 条件や生理的イオン強度条件下での金属イオンとの錯形成能を有する化合物を検出することは非常に重要であるが、生理的 pH (pH 7.4) およびイオン強度条件下での多種類の金属イオンとの錯体形成を網羅的に評価する手法は確立されていない。

錯体形成の検出法として、質量分析法 (Mass Spectrometry: MS) [50-52], X 線解析法 (X-Ray Diffraction: XRD) [21, 52-55], 蛍光光度法 (Fluorescence Spectrometry: FL) [24, 25] や紫外可視吸光光度法 (UltraViolet- Visible Spectrometry: UV-Vis) [21-25, 50, 52, 55, 56] が挙げられるが、簡便性、迅速性、測定条件に関して制限がある。MS 法では、リン酸緩衝塩が測定の夾雑成分となるため、リン酸緩衝液を必要とする生理的条件下での測定は困難である。XRD 法では、測定試料の結晶化など煩雑な測定手順が必要となり、FL 法については、錯体形成に伴う蛍光・発光が確認される組み合わせは極めて稀である。一般的に使用されている UV-Vis 法は、金属イオンとの錯体形成に伴う UV 吸収スペクトルの変化が生じず、錯体形成を判断できない場合も存在する。また、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は金属錯体のハイスループット分析に適しているが [57-61], 遊離金属イオンは分離カラム内へ蓄積し、分離カラムを徐々に劣化させる [62, 63]。第一章では、二相溶媒系を用いる液-液分配クロマトグラフィーである高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) 分析により、二相溶媒系中に添加した金属イオンと薬物の錯体形成時に生じる極性の変化から薬物と錯体形成する金属イオン種のスクリーニングを行った。しかしながら、二相溶媒系の調製や HSCCC 分析には時間を要し、薬物に応じて二相溶媒系を選択しなければならない。加えて、生理的条件下での測定に難がある。

一方で、このようなスクリーニングの観点とは別に、遺伝子組み換えタンパク質の精製法として固定化金属イオンクロマトグラフィー (Immobilized metal ion adsorption chromatography; IMAC) が知られている [89-91]。IMAC は、金属イオンを固定化したカラムに対する化合物の親和性を利用した分離技術で、ヒスチジン、システイン、トリプトファンといった金属イオンと配位結合するアミノ酸を標識化したタンパク質の精製に利用される [92]。また近年では、IMAC の類似の観点から、微量の金属イオンをキレート捕集するための簡易型の固相抽出カートリッジも多種類が市販されている。これらのカートリッジは大半が「使い捨て」であり、多検体処理を前提として開発されたものである。

このような背景の下、本章では金属イオンキレート官能基が修飾されたシリカモノリスディスクを内蔵した遠心用スピナーカートリッジである固相抽出 (SPE) 媒体と HPLC 分析を組合せた、擬似生理的条件下 (生理的 pH, イオン強度) での金属錯体形成の迅速かつ簡便な検

出が可能なスクリーニング法の着想を得て、その開発を検討した。また本章ではさらに、薬物以外に生体成分（アミノ酸、ペプチド）や植物由来成分（ポリフェノール関連化合物）を対象として、金属イオンとの錯体形成挙動の包括的な分析についてもあわせて検討したので報告する。

2-2 実験方法

2-2-1 被験化合物

本研究では、薬物、アミノ酸、ポリフェノール化合物を被験化合物として選択した。55種類の医薬品（Table 2.3 (p.32~33) を参照）のうち、No.1, 7, 8, 11-13, 16-19, 24, 27, 28, 30, 33, 34, 39, 41, 48, 49, 51, 53, 55 の薬物は東京化成工業から、No. 2, 10, 15, 25, 26, 29, 31, 38, 43, 52 および 54 は、シグマ・アルドリッチジャパン、3, 5, 6, 9, 14, 21-23, 32, 35-37, 42, 44-47 および 50 は、富士フィルム和光純薬から、No.4, 20, 40 はフナコシから購入した。

続いて、被験アミノ酸として使用した20種類のL-アミノ酸（Table 2.4 (p.41) 参照）は、全て富士フィルム和光純薬から、L-Tyrosine のトリペプチド（No.21: Tyr-Tyr-Try）はシグマ・アルドリッチジャパンより購入した。 γ -glutamic acid (γ -Glu) を含有するペプチド（No.22-25）は味の素株式会社 イノベーション研究所より提供された。

24種類のポリフェノール化合物（Table 2.5 (p.46) を参照）のうち、No.1-6, 8, 10-13, 16 は富士フィルム和光純薬から、7, 9, 15, 17-20 はシグマ・アルドリッチジャパンより、14 は関東化学より購入した。また、21-24 に示した Epicatechin (EC) オリゴマー（2~4 量体）は後述で単離精製したものをを使用した。EC オリゴマーの単離精製の出発化合物はプロアントシアニジン混合物（Apple condensed tannins, 以下 ACT と略す）の粉末はアサヒビール未来技術研究所より提供された。

2-2-2 試薬と溶媒

被験金属イオンとして使用した12種類の金属イオン塩化物（ $MgCl_2$, $AlCl_3$, $CaCl_2$, $CrCl_3$, $MnCl_2$, $FeCl_2$, $FeCl_3$, $CoCl_2$, $NiCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $MoCl_5$ ）は富士フィルム和光純薬から購入した。

実験用の水は、Milli-Q Reference-A+（Millipore SAS）にて製造したものを使用し、上記被験化合物の希釈・抽出液や後述の HPLC 移動相溶液の調製用、固相抽出媒体処理用として、アセトニトリル（高速液体クロマトグラフ（HPLC）用、以下 CH_3CN と略す）、酢酸エチル、硝酸、酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、塩化ナトリウム（ $NaCl$ ）、塩化カリウム（ KCl ）、リン酸二水素カリウム（ KH_2PO_4 ）およびリン酸水素二ナトリウム（ Na_2HPO_4 ）（以上、関東化学）、HEPES は同仁化学研究所より購入した。上記の無機塩（ $NaCl$: 0.8 g, KCl : 0.02 g, KH_2PO_4 :

0.024 g, Na₂HPO₄: 0.144 g) を 100 ml の水に溶解し, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) を調製した.

2-2-3 試料溶液調製

薬物試料は以下に示す手順で調製した. Table 2.3 に示す 52 種類の薬物 (No. 40, 52, 55 を除く) のストック溶液 (1000 µg/ml) は, 各薬物 1 mg を CH₃CN 水溶液 (CH₃CN:H₂O=5:5, v/v) 1 ml に溶解して調製した. Dasatinib (No. 40), Folic acid (52), Metoclopramide (55) のストック溶液 (1000 µg/ml) は, 1 mg の各薬物を CH₃CN/1 M 塩酸 (CH₃CN:HCl=5:5, v/v) 1 ml に溶解して調製した. さらに, 各薬物ストック溶液を PBS と CH₃CN の混合液で希釈することにより, 各薬物の標準溶液 (20 µg/ml) を調製した. 各薬物の標準溶液の CH₃CN 含有率 (%) は, Table 2.3 に示す各 HPLC 移動相と同じ含有率 (%) とした.

Table 2.4 に示す 17 種類のアミノ酸 (No. 4, 5, 7 を除く) と γ-Glu 含有ペプチド (No. 22~25) のストック溶液 (1000 µg/ml) は, 各アミノ酸 1 mg を水 1 ml に溶解して調製した. L-Leucine (Leu, No. 4), L-Isoleucine (Ile, 5), L-Tyrosine (Tyr, 7) と L-Tyrosine のトリペプチド (Tyr-Tyr-Tyr, 21) のストック溶液 (1000 µg/ml) は, 1 mg の各アミノ酸またはペプチドを 1 M 塩酸 1 ml に溶解して調製した. 各ストック溶液を CH₃CN と 1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) の混合溶液 (CH₃CN:HEPES=1:9, v/v) で希釈することにより, 各アミノ酸・ペプチドの標準溶液 (0.1 mM) を調製した.

Table 2.5 に示す 24 種類のポリフェノール化合物のストック溶液 (1000 µg/ml) は, 各化合物 1 mg を CH₃CN 水溶液 (CH₃CN:H₂O=5:5, v/v) 1 ml に溶解して調製した. 各ポリフェノールのストック溶液を CH₃CN 水溶液で希釈することにより, 各ポリフェノールの標準溶液 (20 µg/ml) を調製した. ポリフェノールの標準溶液 (No. 17-24 を除く) の CH₃CN 含有率 (%) は, Table 2.5 に示す各 HPLC 移動相と同じ含有率 (%) とした. カテキン類 (17-20) とカテキンオリゴマー類 (21-24) の標準液 (20 µg/ml) は CH₃CN 水溶液 (CH₃CN:H₂O=4.5:5.5, v/v) で希釈することにより調製した.

金属イオン溶液 (500, 1000 µg/ml) は, 1 mg の各金属塩化物を 1 ml または 2 ml の水に溶解することによって調製した.

2-2-4 HPLC 分析装置と分析条件

HPLC 分析装置は, 日立 HPLC システム (構成装置: L-7100 ポンプ, L-2200 オートサンプラー, L-7455 ダイオードアレイ検出器) を使用した. クロマトグラムは, D-7000 型 HPLC マネージャー (日立製ソフトウェア) を内蔵する PC 上で記録した. 分離カラムは, Merck 製のモノリスカラムである Chromolith Performance Si (100×4.6mm I.D., Merck) 又は Chromolith HighResolution RP-18 (100×4.6 mm I. D.) に同 guard column (5×4.6 mm I. D.) を接続して, 測定対象化合物に応じて使い分けた.

HPLC 分析の際には, 移動相溶媒 A (CH₃CN) と B (10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0), 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), 10 mM 酢酸, 0.1%ギ酸) の 2 種類の溶液を送液ポンプ内で任意の

割合で混合し、2.0 ml/min の流速でイソクラティック送液した。A 液と B 液の混合比率は、溶質が素通りせずかつ 3 分以内に溶出するように、被験化合物ごとに検討・最適化した。被験化合物として芳香族環を有しないアミノ酸を測定する際には、プレカラム誘導体化処理を行った。1 級アミンは *o*-Phthalaldehyde (OPA) 誘導体化、2 級アミンは 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) 誘導体化処理を行い、測定試料とした。試料溶液はスナップバイアル (0.3 ml 容、ジーエルサイエンス製) に入れて、オートサンプラーにて 20 μ l の一定量を HPLC 装置に注入した。試料注入・分離後の溶出液の吸光度を 200~400 nm の範囲でモニタリングし、被験化合物ごとに設定した至適波長での吸光度値に基づいて、溶出ピーク面積の算出を行った。また、最適条件下での HPLC クロマトグラムより、各被験化合物の保持係数 (質量分布比: k) を次式より算出した。

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad (2.1)$$

ここで、 t_R は被験化合物の保持時間 (min) であり、 t_0 は素通り時間 (min) とした。

2-2-5 固相抽出媒体

本研究に使用する固相抽出 (SPE) 媒体として、モノリスシリカディスク内蔵遠心スピナーカートリッジである「MonoSpin (ジーエルサイエンス製)」を選択し、微量金属イオンの吸着捕集用途で主に用いられる MonoSpin ME と MonoSpin NTA の 2 種類のカートリッジを使用した。MonoSpin M と MonoSpin NTA のシリカディスク表面は、それぞれイミノ二酢酸 (IDA) とニトリロ三酢酸 (NTA) 基によって修飾されたものである (Fig. 2.1)。

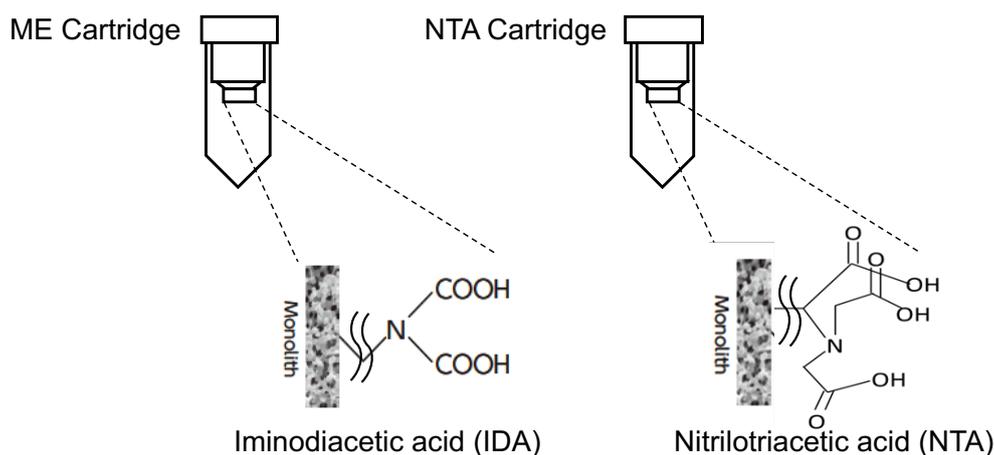


Figure 2.1 Chemical structures of functional groups on a MonoSpin ME cartridge and a MonoSpin NTA cartridge.

2-2-6 MonoSpin カートリッジへの通液遠心条件

MonoSpin カートリッジへの溶液の通液は、卓上遠心機 (Centrifuge 5415R, Eppendorf) を使用して、5,000 rpm (2,300×g) で1分間の遠心分離により行なった。

2-2-7 MonoSpin カートリッジの前処理条件

MonoSpin カートリッジへの試料溶液通液前にコンディショニングとして、200 µl の 1 M 硝酸と 200 µl の 100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) を順次通液し、カートリッジの IDA または NTA 官能基の活性化を行った。

2-2-8 MonoSpin カートリッジへの金属イオン吸着量の測定

金属イオン溶液中の金属量と、MonoSpin カートリッジ通液後の金属イオン溶液中の金属量を、グラファイト炉原子吸光分析装置 (Z-2000, HITACHI) を用いて測定した。測定の前に、2800°C で 6 秒間の加熱を繰り返し、安定したベースラインが得られるまでグラファイトの測定チューブ内をクリーニングした。金属イオン溶液中の金属量の測定は、MonoSpin カートリッジ通液前後の金属イオン溶液 (500 µl) を 10 ng/ml 以下になるよう水で希釈した溶液 (10 µl) をグラファイトチューブ内に直接注入し、吸光度を測定した。各金属を測定するための吸収波長およびその他の測定条件 (乾燥時間、洗浄時間・温度、キャリア Ar ガスの流量) は、推奨される条件に従い設定した。溶液中の金属濃度は、予め各金属標準溶液を用いて測定した検量線から算出した。MonoSpin カートリッジへの金属イオンの吸着量は、MonoSpin カートリッジを通液後の金属イオン溶液中の金属量の減少量から計算した。

2-2-9 MonoSpin カートリッジからの金属イオン脱離の有無の確認

MonoSpin ME, NTA 両カートリッジからの Cu^{2+} と Fe^{2+} の脱離を確認した。MonoSpin ME, NTA 両カートリッジに Cu^{2+} を過飽和量キレートさせた後、200 µl の水または PBS 溶液をそれぞれ Cu^{2+} キレート MonoSpin ME または NTA カートリッジに通液した。次に、通過液中の Cu^{2+} 濃度を原子吸光分光計 (Z-2000, 日立) を用いて測定した。

MonoSpin ME, NTA 両カートリッジに Fe^{2+} を過飽和量キレートさせた後、200 µl の水、10 mM NaCl, 1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) または PBS 溶液をそれぞれ Fe^{2+} キレート MonoSpin ME または NTA カートリッジに通液した。通過液中の脱離した Fe^{2+} を 1,10-フェナントロリンとの呈色反応によって確認した。まず、各通過液に 100 µl の 1, 10-フェナントロリン溶液 (1 mg/ml) および 100 µl の酢酸アンモニウム緩衝液 (100 mM, pH 5.5) を添加し、混合溶液中の赤褐色複合体 (1, 10-フェナントロリン- Fe^{2+}) の有無について呈色により確認した。

2-2-10 金属イオンキレート MonoSpin カートリッジへの被験薬物 (BMP) の吸着率の算出

今回、被験化合物として薬物 (55 種類)、生体アミノ酸 (20 種類) とペプチド (5 種類)、ポリフェノール化合物 (24 種類) を選択した。被験化合物の種類に応じて MonoSpin ME・

NTA カートリッジを使い分けた。薬物と塩基性アミノ酸 (L-Histidine: His, L-Lysine: Lys, L-Arginine: Arg) を対象とする場合は NTA カートリッジ, 塩基性アミノ酸以外のアミノ酸 (17種類) とペプチド, ポリフェノール化合物を対象とする場合は ME カートリッジを使用した。まず, コンディショニング済みの MonoSpin カートリッジに 500 μ l の金属イオン溶液 (NTA: 500 μ g/ml, ME: 1000 μ g/ml) を通液させ, 続いて 500 μ l の水を通液し, 洗浄した。最後に, 200 μ l の各種類の被験化合物の標準溶液 (20 μ g/ml) を通液し, 先述した HPLC 分析により溶出液中の被験化合物量 (クロマトグラム上のピーク面積 (PA)) を測定するため溶出液を回収した。

金属イオンとの錯体形成は金属イオンキレート MonoSpin カートリッジへの被験化合物の吸着を算出することで評価した。HPLC 分析により得られた MonoSpin カートリッジからの溶出液中の被験化合物量 (PA_E) および標準溶液中の被験化合物量 (PA_{STD}) より金属イオンキレート MonoSpin カートリッジへの被験化合物の吸着率を, 式 2.2 を使用して算出した。

$$Q = (1 - PA_E/PA_{STD}) \times 100 \quad (2.2)$$

上記の測定とは別に, 被験化合物の標準溶液を金属イオンをキレートさせていない (bare cartridge) MonoSpin カートリッジに通液し, その溶出液 (Metal ion Blank Eluate : MBE) 中の被験化合物量 (PA_{MBE}) を測定し, 金属イオンをキレートしていない MonoSpin カートリッジへの被験化合物の吸着率を算出した。

2-2-11 UV 吸収スペクトルの測定

BMP と Trp について, UV 吸収スペクトル測定に基づく実験を行なった。BMP 原液として, BMP を CH_3CN 水溶液 ($CH_3CN:H_2O=1:1$, v/v) で溶解し, 1000 μ g/ml に調製した。各金属イオン原液 (Mg^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{5+}) は各金属塩化物を水で溶解し, 1000 μ g/ml に調製した。BMP 原液を CH_3CN 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) ($CH_3CN:PBS=3:7$, v/v) で 6.0×10^{-5} mM になるよう希釈したものを BMP 試料とした。BMP-金属イオン試料は, BMP と金属イオンの終濃度がそれぞれ, 6.0×10^{-5} M, 3.0×10^{-4} M になるよう CH_3CN 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) ($CH_3CN:PBS=3:7$, v/v) を用いて調製した。

また, Trp 原液として, Trp を水で溶解し, 1000 μ g/ml に調製した。各金属イオン原液 (Mg^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{5+}) は各金属塩化物を水で溶解し, 1000 μ g/ml に調製した。Trp 原液を CH_3CN 含有 1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) ($CH_3CN:HEPES=1:9$, v/v) で 0.1 mM になるよう希釈したものを Trp 試料とした。Trp-金属イオン試料は, Trp と金属イオンの終濃度がそれぞれ, 0.1 mM, 0.5 mM になるよう CH_3CN 含有 1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) ($CH_3CN:PBS=1:9$, v/v) を用いて調製した。

UV 吸収スペクトルは, 吸光光度計 (UV-1800, 島津) を用いて 200~500 nm の波長範囲で測定した。ベースラインは BMP の場合, CH_3CN 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) ($CH_3CN:PBS=3:7$,

v/v)を用いて補正し, Trp の場合は, CH₃CN 含有 1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) (CH₃CN:PBS=1:9, v/v) を用いて補正した.

2-3 結果と考察

2-3-1 MonoSpin カートリッジの特性把握

2-3-1-a MonoSpin カートリッジへの金属イオン吸着量の確認

本研究では, SPE 媒体として, IDA 基が修飾された ME カートリッジと NTA 基が修飾された NTA カートリッジを使用した. 塩化銅溶液をカートリッジに通液し, 両カートリッジの銅イオン (Cu²⁺) 最大キレート量を調べた結果を Fig. 2.2 に示した.

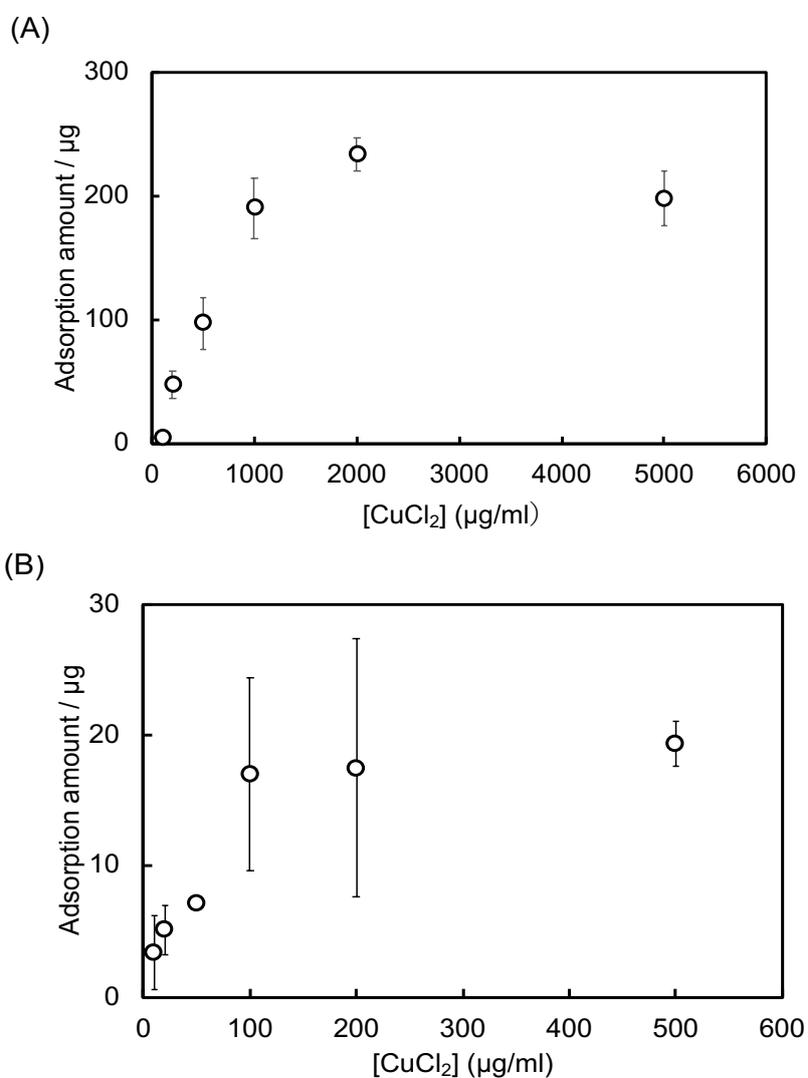


Figure 2.2 The adsorption amount of Cu²⁺ on a ME cartridge (A) and a NTA cartridge (B). Averages of three measurements were plotted. Error bars indicate means ± standard deviations (n = 3).

ME カートリッジの場合, 2000 $\mu\text{g/ml}$ 以上の CuCl_2 溶液を 500 μl 通液するとカートリッジ 1 個あたり約 200 μg の Cu^{2+} がキレートされることが確認できた (Fig. 2. 2-A) . 一方 NTA カートリッジの場合, 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の CuCl_2 溶液を 500 μl 通液するとカートリッジ 1 個あたり約 20 μg の Cu^{2+} がキレートされることが確認できた (Fig. 2. 2-B) . ME, NTA カートリッジの Cu^{2+} の最大吸着量の差はカートリッジ上に修飾されたそれぞれの官能基の修飾量の差が比例している可能性がある. 次に, 選択した 11 種類の金属イオンが, それぞれ NTA カートリッジ上にキレートされる最大量を調べた. 500 μl の各金属イオン溶液 (500 $\mu\text{g/ml}$, 金属量 : 250 μg) を NTA カートリッジに通液し, 通液前後の金属の減少量から求めた各金属イオンの最大キレート量を Table 2. 1 に示した. Al^{3+} の 1.94 μg から Zn^{2+} の 31.77 μg の範囲に渡り金属イオンごとにキレート量は異なるものの, 各金属イオン溶液の通過後に過剰の金属イオン (250 μg) によってカートリッジの NTA 官能基はほぼ完全に金属イオンで飽和・キレート化されていると見積もられた. 金属イオン種によって吸着量の再現性が悪いものがあるが, その理由のひとつとして, カートリッジ表面の NTA 官能基の密度の誤差が大きいという可能性が挙げられる. IDA と比べて NTA はかさ高い官能基であるため, IDA ほど高密度に化学修飾できず結合量の制御が困難である. NTA の修飾量の誤差が金属イオンの吸着量の再現性に影響を及ぼしている可能性が考えられる.

Table 2. 1 Maximum amount of metal ion adsorbed on the NTA surface of a MonoSpin cartridge.

Metal ion ^{a)}	Maximum adsorption amount (per cartridge) / μg	SD (n=3)
Mg^{2+}	8.60	1.35
Al^{3+}	1.94	0.67
Ca^{2+}	13.46	3.44
Cr^{3+}	3.50	2.19
Mn^{2+}	3.13	0.94
Fe^{2+}	4.24	0.60
Fe^{3+}	8.71	0.42
Ni^{2+}	5.00	3.30
Cu^{2+}	19.30	1.74
Zn^{2+}	31.77	12.22

a) The loaded amount of each metal chloride was 250 μg (per cartridge).

2-3-1-b MonoSpin カートリッジに吸着した金属イオンの脱離の有無の確認

金属イオンキレートカートリッジにイオン強度の高い溶液を通液した場合, MonoSpin カートリッジ上のキレート官能基と金属イオンの配位結合が弱まり, キレートさせた金属イオンが脱離する可能性が考えられる. ME, NTA 両カートリッジからの Cu^{2+} と Fe^{2+} の脱離の有無について, それぞれ原子吸光分光計 (Cu^{2+} 用) と, フェナントロリンによる呈色反応 (Fe^{2+} 用) によって確認した (Table 2.2) . NTA カートリッジの場合, どの溶液を通液させても通過液

中に Cu^{2+} や Fe^{2+} は確認されなかった。一方で、 Cu^{2+} キレート ME カートリッジに PBS 溶液を通液させたところ、通過液中に $19.5 \mu\text{g/ml}$ の Cu^{2+} が検出された。また、 Fe^{2+} キレート ME カートリッジに 10 mM NaCl 溶液や PBS 溶液など電解質を含有する溶液を通液させると、通過液中に Fe^{2+} が脱離するため、フェナントロリン- Fe^{2+} 呈色反応が確認された。イオン強度の高い溶液は、ME カートリッジ上の IDA 基と金属イオンの配位結合を弱め、キレートさせた金属イオンを脱離させることがわかった。一方 NTA カートリッジでは、キレートさせた Fe^{2+} と Cu^{2+} の両金属の脱離は確認されなかった。NTA カートリッジに修飾されている NTA 基は IDA 基と比較し、金属イオンへの配位数が多く、より安定で強固なキレートを形成することが確認できた。上記の結果に基づいて、本研究においては、例えば PBS 溶液 (pH 7.4) のようなイオン強度の高い溶液中での相互作用を評価する必要がある場合は NTA カートリッジを使用することとした。一方、(イオン強度の低い) 1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) や水中での測定においては ME カートリッジを積極的に活用した。

Table 2. 2 Comparison of the adsorption-desorption characteristics of Cu^{2+} or Fe^{2+} chelated with ME or NTA cartridge.

Cartridge	[Cu^{2+}] in eluate ^{*1} / $\mu\text{g/ml}$		Color reaction of Fe^{2+} in eluate ^{*2}			
	Water	PBS	Water	10 mM NaCl	1 mM HEPES ^{*3}	PBS
ME	N. D. ^{*4}	19.5	Neg. ^{*5}	Reddish brown	Neg.	Reddish brown
NTA	N. D.	N. D.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

*1) A portion of $200 \mu\text{l}$ of water or PBS solution was passed through the Cu^{2+} chelated ME or NTA cartridge, respectively. Then the Cu^{2+} concentration in the eluate was measured by an atomic absorption spectrometer (Z-2000, Hitachi, Tokyo, Japan).

*2) A portion of $200 \mu\text{l}$ of water or PBS solution was passed through the Fe^{2+} chelated ME or NTA cartridge, respectively. Then the presence of desorbed Fe^{2+} ion in the eluate was confirmed by a color reaction with 1, 10-phenanthroline. The procedure was as follows: each eluate was mixed with $100 \mu\text{l}$ of 1, 10-phenanthroline solution (1 mg/ml) and $100 \mu\text{l}$ of ammonium acetate buffer (100 mM , pH 5.5). Then the presence (or absence) of reddish brown complex (1, 10-phenanthroline- Fe^{2+}) in the mixture solution was visually confirmed.

*3) 1 mM HEPES buffer (pH 7.4).

*4) N. D.: Not detected.

*5) Neg.: Negative.

2-3-2 擬似生理的条件下での金属イオンと薬物間の錯体形成スクリーニング

2-3-2-a 被験薬物の HPLC 分析条件の最適化

今回の実験における被験薬物の HPLC 分析に際して、UV 検出波長は各被験薬物に応じて最適化した。分離カラムは、一般的な微粒子充填カラムよりも低背圧で、気泡や汚れ詰まり

が抜けやすく、ガードカラムの交換が容易な一体形成型のシリカモノリス RP-C18 カラムを採用した。移動相溶媒は、移動相溶媒 A (CH₃CN) と B (10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) , 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) , 10 mM 酢酸, 0.1%ギ酸) の 2 種類を送液ポンプ内で任意の割合で混合し、2.0 ml/min の流速でイソクラティック送液した。A 液と B 液の混合比率は、被験薬物が素通りせずかつ 3 分以内に溶出するように、被験化合物ごとに検討・最適化した。

上述の通り構築した HPLC システムにおいて、薬物ごとに最適化した分析条件 (移動相中の CH₃CN 比率, UV 検出波長) と保持挙動 (保持時間, *k*) の一覧表を Table 2. 3 に示した。

薬物 55 品目において、本 HPLC システムによる基本的な分析条件が構築できた。表から明らかなように、各被験薬物の新疎水性の差異に応じて移動相条件が異なるが、全ての被験薬物に対して 3 分以内に保持・溶出できる条件をそれぞれ決定することができた。

Table 2. 3 Optimized HPLC conditions for rapid analyses of 55 different medical drugs.

Medicinal drug ^{a)}		Optimized HPLC condition				
No.	Name	Mobile phase composition		UV wavelength / nm	RT ^{c)} / min	<i>k</i>
		CH ₃ CN %	aq. soln. ^{b)}			
1	daptomycin	35	Type I	220	1.76	1.20
2	teicoplanin	25	Type II	230	2.38	1.98
3	vancomycin	10	Type II	210	2.53	2.16
4	linezolid	25	Type II	250	1.49	0.86
5	bacitracin	30	Type II	210	2.59	2.24
6	ampicillin	10	Type I	210	1.41	0.76
7	piperacillin	25	Type I	210	1.23	0.54
8	cefazolin	10	Type I	270	2.75	2.44
9	cefotaxime	15	Type I	240	1.20	0.50
10	ceftriaxone	5	Type I	240	1.36	0.70
11	meropenem	5	Type I	300	2.64	2.30
12	levofloxacin	15	Type I	290	1.79	1.24
13	clindamycin	30	Type I	210	1.39	0.74
14	tetracycline	15	Type III	270	2.00	1.50
15	chloramphenicol	30	Type I	210	1.60	1.00
16	voriconazole	40	Type I	260	1.79	1.24
17	carbamazepine	40	Type I	280	1.39	0.74
18	ethosuximide	10	Type I	210	2.80	2.50
19	lamotrigine	25	Type I	220	1.47	0.84
20	levetiracetam	10	Type I	210	1.41	0.76
21	phenobarbital	25	Type I	220	2.19	1.74
22	phenytoin	40	Type I	220	1.41	0.76
23	primidone	25	Type I	220	1.23	0.54
24	zonisamide	25	Type I	240	1.68	1.10
25	disopyramide	25	Type I	210	1.44	0.80
26	flecainide	40	Type I	220	1.39	0.74
27	lidocaine	25	Type I	220	1.41	0.76
28	mexiletine	25	Type I	220	1.52	0.90

Table 2.3 Continue.

Medicinal drug ^{a)}		Optimized HPLC condition				
No.	Name	Mobile phase composition		UV wavelength / nm	RT ^{c)} / min	<i>k</i>
		CH ₃ CN %	aq. soln. ^{b)}			
29	procainamide	10	Type I	280	1.17	0.46
30	propafenone	40	Type I	220	1.60	1.00
31	quinidine	30	Type I	240	1.23	0.54
32	sotalol	10	Type I	220	1.97	1.46
33	phentolamine	30	Type I	210	1.41	0.76
34	hydrochlorothiazide	15	Type I	220	1.63	1.04
35	clonidine	10	Type I	210	1.97	1.46
36	losartan	30	Type I	220	1.92	1.40
37	nifedipine	50	Type I	230	1.55	0.94
38	propranolol	30	Type I	220	1.76	1.20
39	valsartan	30	Type I	210	1.73	1.16
40	dasatinib	30	Type I	320	1.97	1.46
41	imatinib	30	Type I	260	1.55	0.94
42	methotrexate	10	Type I	300	1.68	1.10
43	pazopanib	25	Type IV	270	1.79	1.24
44	mycophenolic acid	40	Type I	220	1.52	0.90
45	salicylic acid	10	Type I	220	1.63	1.04
46	bromazepam	30	Type I	240	1.89	1.36
47	diazepam	40	Type I	240	1.76	1.20
48	aminophylline	10	Type I	280	1.39	0.74
49	theophylline	10	Type I	280	1.41	0.76
50	ambroxol	30	Type I	210	1.36	0.70
51	dipyridamole	40	Type I	290	1.76	1.20
52	folic acid	5	Type I	280	2.32	1.90
53	diclofenac	40	Type I	220	2.11	1.64
54	prednisolone	30	Type I	250	1.60	1.00
55	metoclopramide	20	Type I	270	1.55	0.94

a) Antibacterial agent: No. 1~15; triazole antifungal agent: No. 16; antiepileptic drug: No. 17~24; antiarrhythmic drug: No. 25~32; antihypertensive drug: No. 33~39; anticancer drug: No. 40~43; immune-suppressive agent: No. 44; salicylic acid series: No. 45; psychoneurotic agent: No. 46&47; theophylline formulation: No. 48&49; expectorant drug: No. 50; anti-ischemic drug: No. 51; vitamin: No. 52; anti-inflammatory drug: No. 53; steroid: No. 54; antiemetic agent: No. 55; digestive tract function-improving agent.

b) Type I: 10 mM acetate buffer (pH 5); Type II: 10 mM phosphate buffer (pH 7); Type III: 10 mM acetic acid; Type IV: 0.1 % formic acid.

c) RT: Retention time.

2-3-2-b MonoSpin NTA 使用時の SPE 分析条件および薬物溶液組成の最適化

PBS 溶液を用いて擬似生理的条件下での金属イオンと薬物間の錯体形成スクリーニングを行うため、MonoSpin カートリッジは NTA カートリッジを使用した。MonoSpin NTA カートリッジを用いた金属イオンと被験薬物の相互作用スクリーニング手順を Fig. 2.3 に示した。まず、金属イオン溶液の通液により、カートリッジ上の NTA 基に金属イオンをキレート化した後、金属イオンをキレートしたカートリッジを水で洗浄した。最後に、被験薬物標準溶液

(PBS 溶液と CH₃CN を含む) をカートリッジに通液し、溶出液中の被験薬物量を HPLC により定量した。溶出液中の被験薬物量は、Fig. 2.3 に示すように、HPLC クロマトグラムのピーク面積(PA_E)として示される。カートリッジに通液していない標準溶液の被験薬物量(PA_{STD})も同様に測定し、PA_E および PA_{STD} を用いて金属イオン (カートリッジにキレートされている) への吸着率 (%) を式 2.2 を用いて算出した。

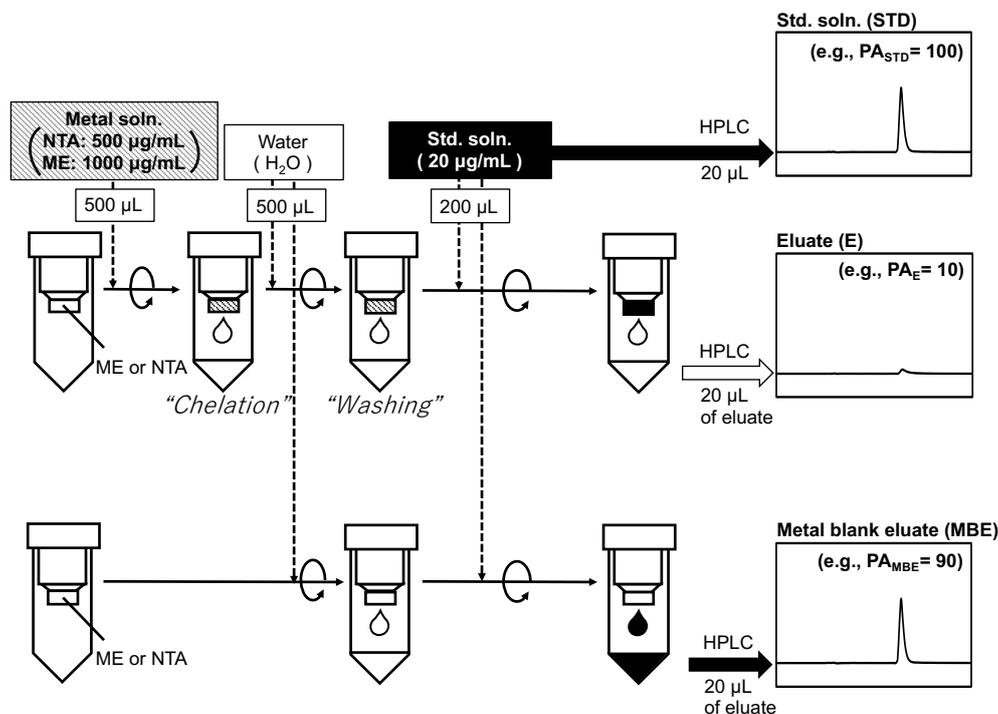


Figure 2.3 Schematic showing the screening method for complex formation between a metal ion and a compound on a MonoSpin cartridge.

Fig. 2.3 を例とすると、PA_E と PA_{STD} がそれぞれ 10 と 100 の場合、吸着率 (Q, %) は $(1-10/100) \times 100 = 90\%$ と計算される。

上記の金属イオンへの吸着率 (%) の算出前に、金属キレートしていないカートリッジに通液した際に、被験薬物がカートリッジ上の官能基に吸着しないことを、金属キレートしていないカートリッジからの溶出液中の被験化合物量 (PA_{MBE}) を測定し、確認した。この研究では、被験薬物がカートリッジ上の官能基に吸着しない (PA_{MBE} ≒ PA_{STD}) ことが望ましい (金属イオンをキレートしていないカートリッジへの Q 値 : 20%未満)。一方で、この値は、被験薬物標準溶液の溶媒の CH₃CN 含有率の影響を受ける可能性がある。そこで、金属イオンをキレートしていない NTA カートリッジとベンゾジアゼピン系抗不安薬であるブロマゼパム (BMP) を使用して、BMP 標準溶液中の CH₃CN 含有量 (%) の最適化を試みた。金属イオンをキレートしていない NTA カートリッジへの BMP (No.46 in Table 2.3) の吸着率 (Q, %) と BMP 標準溶液中の CH₃CN 濃度 (%) との関係を図 2.4 に示した。CH₃CN 濃度が 0% の場合、Q 値は比較的高値 (約 50%) であったが、CH₃CN 濃度が増加すると Q 値は大幅に減

少しした。この結果は、金属イオンをキレートしていない NTA 基への BMP の非特異的吸着は主に疎水性相互作用に起因することを示している。実際に、30 %以上の CH₃CN を含む BMP 標準溶液を通液させた場合、BMP の Q 値は 20 %未満に低下した (BMP の HPLC 移動相の CH₃CN 濃度 (%) : 30%)。BMP の金属イオンをキレートしていない NTA カートリッジへの吸着率 (Q, %) を測定した結果に基づき、55 種類の薬物の標準溶液中の CH₃CN 濃度 (%) は Table 2.3 に示す各 HPLC 移動相の CH₃CN 濃度 (%) と同じ値とした。

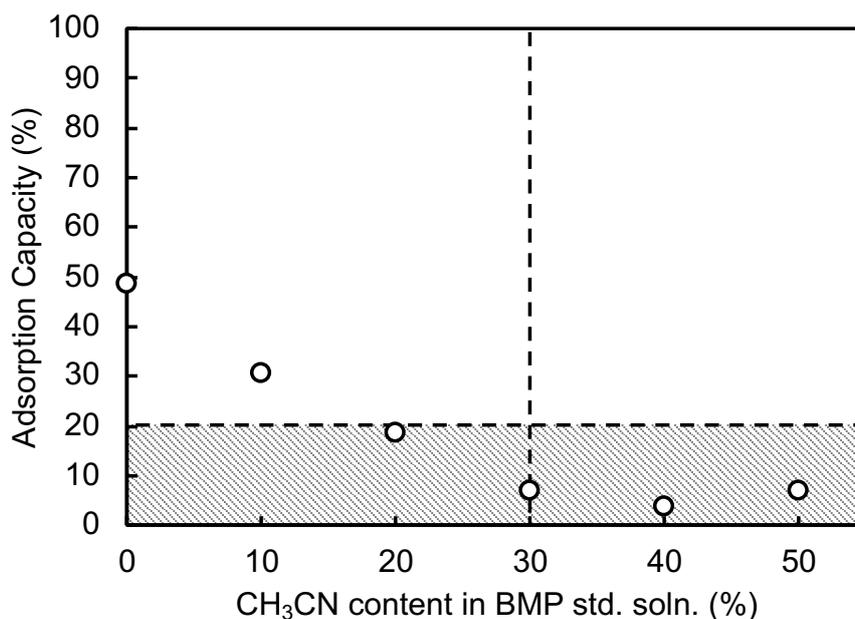


Figure 2.4 Relationship between the adsorption capacity (%) of BMP to a bare NTA cartridge and the CH₃CN concentration (%) in the BMP test solution.

2-3-2-c BMP と錯形成する金属イオン種のスクリーニング実施

BMP はベンゾジアゼピン系抗不安薬であり、Mn²⁺、Cr³⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺と金属錯体を形成することが知られている [80-86]。金属イオンとの BMP 錯体の特性と挙動は、UV-Vis 分光分析、結晶学的分析、電気化学的分析、熱分析など様々な手法で行われているが、生理学的 pH およびイオン強度条件下では行われていない。したがって、PBS を用いた擬似生理的条件下で本スクリーニング法を使用して、11 種類の金属イオンと BMP との錯体形成の有無を調べた。BMP の標準溶液 (PBS:CH₃CN=7:3, v/v) を NTA カートリッジに通液後の、溶出液中の BMP の HPLC クロマトグラムを Fig. 2.5-A に示した。クロマトグラム (a) は NTA カートリッジに通液前の標準溶液中の BMP を示し、(b) は金属イオンをキレートしていない NTA カートリッジに通液後の溶出液中の BMP を示し、クロマトグラム (c) ~ (m) は各金属キレート NTA カートリッジに通液後の溶出液中の BMP を示している。BMP 量 (ピーク面積) に基づいて、11 の金属イオン (各 NTA カートリッジにキレートされた) のそれぞれに対する BMP の吸着容量 (%) を式 2.2 を用いてそれぞれ計算した (Fig. 2.5-B)。

Figure 2. 5-B より, BMP は Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} に対する吸着率は高いが, Mg^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} に対しては非常に低いことが明らかになった (金属イオンをキレートしていない NTA カートリッジへの吸着率と同程度). これらは, BMP が擬似生理学的 PBS 条件下で Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} と選択的に錯体を形成し, 残りの 8 つの金属イオンでは錯体を形成しないことを示している.

これまでの報告では, BMP は水溶液中において, Mn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} と錯体を形成することが明らかにされている [80-86]. さらに, 第一章の HSCCC を用いた手法では, Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} との錯形成を確認している. PBS 溶液などのイオン強度が高い条件下では, イオン結合と配位結合を弱めることが知られており, PBS 溶液の調製に使用したリン酸塩は金属イオンの配位子として作用し, 薬物-金属錯体形成の妨害となる. また, 本法はカートリッジ上の NTA 基と金属イオン, 薬物の三元錯体形成を評価しているため, 金属イオンの配位部位の一部が NTA 基と配位結合をしている. そのため, 二元錯体と比較し, 錯形成を生じにくい可能性がある. そこで, CH_3CN 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{PBS}=3:7$, v/v) 溶液中での金属イオンとの錯体形成による BMP の UV 吸収スペクトルの変化を確認し (Fig. 2. 6), Fig. 2. 5 の結果と比較した. その結果, Fig. 2. 6 の実験では Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} 存在下で BMP の吸収スペクトルの変化が確認できた. よって, 過去の水溶液中での実験 [83-88] で確認されていた Mn^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} との相互作用は, 今回の実験では BMP 標準溶液中の PBS によって打ち消されたと思われる. また, Fe^{2+} , Fe^{3+} とは溶液中で二元錯体は形成するが, 三元錯体は形成しにくいということがわかった.

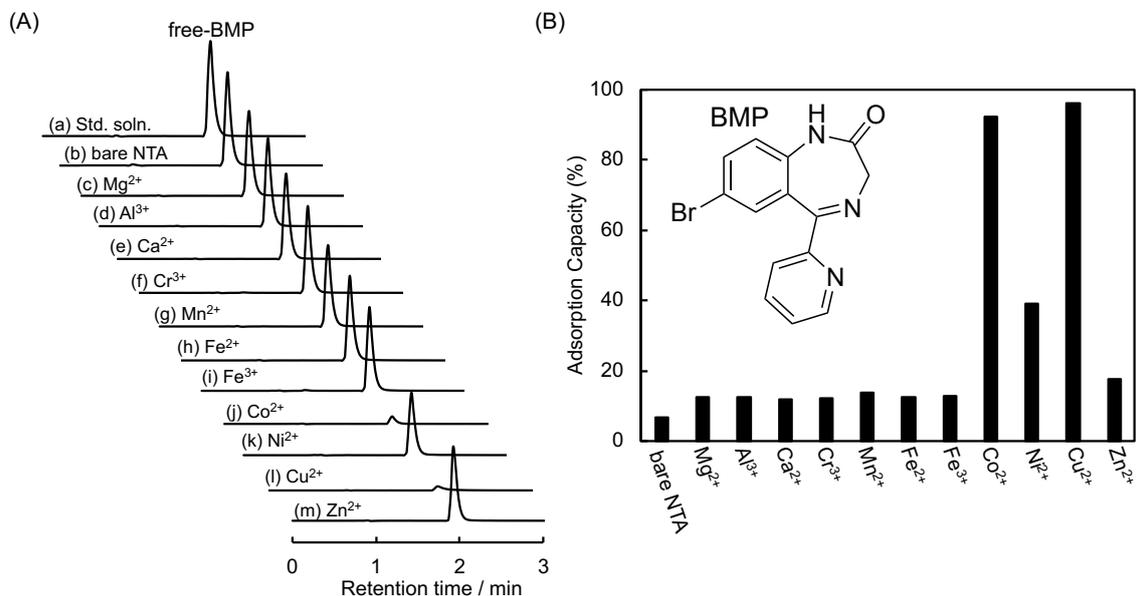


Figure 2. 5 (A) HPLC stacked chromatograms of BMP in the eluates after passing the BMP test solution through the MonoSpin NTA cartridge. a) Chromatogram of BMP in the test solution before passing through the NTA cartridge; b) after passing through the bare NTA cartridge; c) ~ m) after passing through each of eleven different metal-chelated NTA cartridges: c) Mg^{2+} , d) Al^{3+} , e) Ca^{2+} , f) Cr^{3+} , g) Mn^{2+} , h) Fe^{2+} , i) Fe^{3+} , j) Co^{2+} , k) Ni^{2+} , l) Cu^{2+} , m) Zn^{2+} . (B) Comparison of the adsorption capacity (%) of BMP to each of eleven different metal ions chelated onto the NTA cartridge.

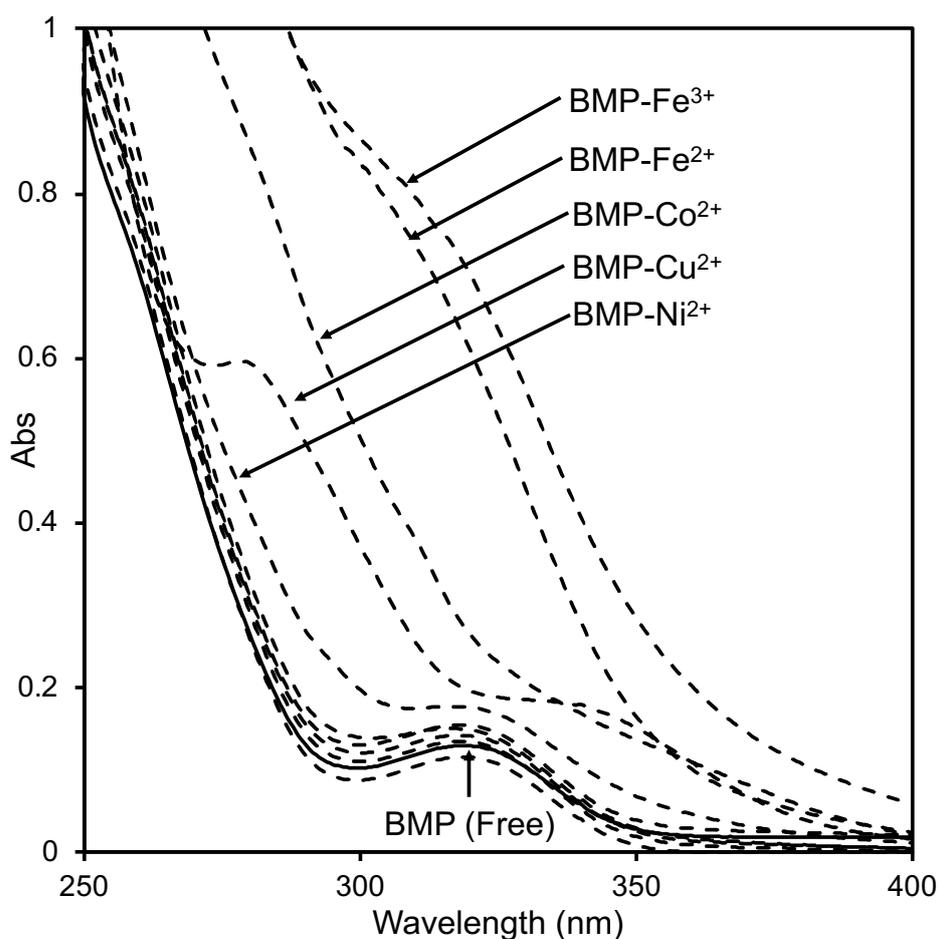


Figure 2. 6 The UV spectra of BMP with metal ions in a mixture solution of PBS (pH 7.4) and CH₃CN (7:3, v/v). The concentration of BMP was 6.0×10^{-5} M, and a molar ratio between BMP and each metal ion in each mixture solution was 1:5 (i.e., the concentration of each metal ion was 3.0×10^{-4} M). The UV absorption spectra were recorded on a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) in the range 250 nm to 400 nm.

2-3-2-d 多品目の薬物の金属錯体形成のスクリーニング実施

2-3-2-c で構築したハイスループットスクリーニング法を用いて、擬似生理学的 PBS 条件下で 11 種類の金属イオンと上記の BMP 以外の 54 種類の薬物間の錯体形成の網羅的検出を行った。Fig. 2.7 にすべての金属と薬物の組合せの結果を示し、吸着率に応じて色分けしたヒートマップを示した。BMP を含めた 55 種類の薬物のうち、クロニジン (No. 35) は金属イオンをキレートしていない NTA カートリッジへの非特異的吸着のため、測定不可であった (bare NTA : 47%)。残りの薬物のうち、41 種類は非常に弱い錯体を形成し、12 種類 (No. 2, 3, 5, 10~12, 14, 33, 41, 46, 48, 49) は Cu²⁺ と強く錯体形成した (吸着率 40% 以上)。具体的には、バシトラシン (5) およびテトラサイクリン (14) は Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ と、レボフロキサシン (12) は Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ と、セフトリアキソン (10) は Ni²⁺ および Cu²⁺ と、BMP (46) は Co²⁺ および Cu²⁺ と錯体を形成した。テイコプラニン (2), バンコマ

イシン (3) , メロペネム (11) , フェントラミン (33) , イマチニブ (41) , アミノフィリン (48) , テオフィリン (49) は, Cu^{2+} とのみ錯体を選択的に形成した. さらに, ラモトリギン (19) のみが Cr^{3+} と錯体を形成した. 上記に示した結果は, 擬似生理的 PBS 条件下での薬物と金属イオン錯体形成が初めて確認された組合せである.

テトラサイクリン (14) が重金属イオン (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) および軽金属イオン (Mg^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+}) と錯体を形成したという報告があるが [93, 94] , 本法ではテトラサイクリンはこれらの軽金属イオンと錯体を形成した薬物は確認されなかった. 本法は, MonoSpin カートリッジ上の NTA 基と金属イオン, 薬物間の三元錯体形成を評価しているが, 一般的に薬物-軽金属イオン間の相互作用は薬物-重金属イオン間の相互作用よりも弱いため, 特に擬似生理的 PBS 条件下では上述の錯体形成の検出が困難であった可能性が考えられる.

	No.	Drug	Ratio of adsorption capacity (%)											
			bare NTA	Mg ²⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Cr ³⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
antimicrobial	1	Daptomycin	6	5	5	7	6	7	5	7	6	6	9	8
	2	Teicoplanin	11	10	11	11	10	9	11	11	12	11	60	12
	3	Vancomycin	12	16	15	15	16	14	28	30	15	17	61	16
	4	Linezolid	8	12	8	10	10	8	10	9	9	9	10	8
	5	Basitracin	9	2	2	0	5	2	12	6	50	98	85	43
	6	Ampicilline	15	2	2	2	2	2	2	3	3	4	26	3
	7	Piperacilline	14	15	18	8	19	13	12	12	12	13	21	17
	8	Cefazolin	9	9	9	18	8	8	9	9	10	9	10	8
	9	Cefotaxime	6	8	8	9	7	4	6	6	8	0	7	6
	10	Ceftriaxone	10	10	9	10	10	9	12	11	20	41	54	21
	11	Meropenem	6	8	11	10	9	9	9	8	9	27	57	9
	12	Levofloxacin	13	12	18	11	15	11	36	50	42	94	90	38
	13	Clindamycin	0	0	0	0	0	0	4	0	0	19	18	5
	14	Tetracycline	9	10	12	10	10	23	32	32	90	79	100	49
	15	Chloramphenicol	12	8	13	10	8	10	10	9	9	10	12	9
	16	Voriconazole	9	12	11	11	13	12	11	10	11	13	17	12
antiepileptic	17	Carbamazepine	17	16	16	14	14	15	16	15	15	15	12	
	18	Ethosuximide	5	5	13	8	13	9	6	9	11	5	12	9
	19	Lamotrigine	13	20	20	20	42	20	21	21	35	22	32	21
	20	Levetiracetam	11	10	9	18	3	10	11	12	7	10	6	9
	21	Phenobarbital	4	11	9	9	11	10	12	9	10	12	20	11
	22	Phenytoin	18	13	11	12	13	15	14	11	13	15	25	14
	23	Primidone	12	10	13	12	12	10	11	12	11	11	8	12
	24	Zonisamide	10	10	12	10	12	11	10	12	11	11	13	11
	antiarrhythmic	25	Disopyramide	13	17	9	12	15	15	13	15	14	14	23
26		Flecainide	11	11	14	13	11	9	10	11	14	10	11	11
27		Lidcain	16	14	14	16	13	14	15	13	15	13	20	13
28		Mexiletine	14	18	17	17	16	15	17	15	16	15	30	15
29		Procainamide	18	21	23	21	20	21	20	22	19	15	21	19
30		Propafenone	9	10	10	11	10	10	11	11	10	8	11	11
31		Quinidine	18	0	0	0	22	23	0	1	23	22	22	22
32		Sotalol	15	11	15	11	15	11	14	12	8	8	15	11
antihypertensive		33	Phentlamine	16	17	16	18	17	16	17	18	17	16	64
	34	Hydrochilrothiazide	16	17	17	17	17	17	20	17	18	16	24	17
	35	Clonidine	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	Losartan	8	10	9	9	9	10	9	9	10	10	29	10
	37	Nifedipine	8	12	11	14	17	12	12	12	11	12	11	11
	38	Propranolol	18	17	17	17	17	18	17	19	18	14	17	16
	39	Valsartan	17	16	12	15	13	8	14	10	13	11	24	10
anticancer	40	Dasatinib	8	9	9	10	9	8	9	8	9	9	12	9
	41	Imatinib	21	20	20	22	20	21	19	18	27	27	92	25
	42	Methotrexate	12	12	12	11	11	12	12	12	10	11	15	12
others	43	Pazopanib	15	12	14	12	12	15	12	11	12	13	17	11
	44	Mycophenoic acid	12	13	7	7	8	7	8	11	8	7	9	12
	45	Salicylic acid	9	11	11	10	10	10	18	26	10	9	22	8
	46	Bromazepam	7	13	13	12	12	14	12	13	92	39	96	18
	47	Diazepam	7	8	9	10	8	7	9	9	10	9	9	9
	48	Aminophylline	11	15	14	13	14	14	15	14	14	16	52	16
	49	Theophylline	16	12	12	14	12	12	12	12	13	13	58	13
	50	Ambroxol	16	18	17	20	20	18	18	17	18	18	20	18
	51	Dipyridamole	5	6	5	7	5	7	5	4	19	5	6	5
	52	Folic acid	17	13	13	13	13	13	13	13	14	13	26	14
	53	Diclofenac	7	8	8	8	8	9	8	8	8	9	10	9
	54	Prednisolone	10	12	10	11	11	12	10	12	12	11	12	12
	55	Metoclopramide	6	2	6	3	3	5	4	5	4	4	5	3

Figure 2. 7 Comparison of the adsorption capacity (%) of 55 drugs to each of eleven different metal ions chelated onto a NTA cartridge.

2-3-3 生理的 pH 条件下での金属イオンとアミノ酸やペプチド間の錯体形成スクリーニング

前項の薬物スクリーニングに引き続き、薬物以外の生体成分や生理活性成分と金属イオンとの錯体形成スクリーニング実験系について検討した。そのための第一ステップとして、本項では生体成分かつ食品成分であるアミノ酸やペプチド類を被験化合物として選択した。

2-3-3-a 被験アミノ酸の HPLC 分析条件の最適化

実験に際してまず、アミノ酸やペプチドごとに HPLC 分析条件を最適化した (Table 2. 4)。UV 検出波長は、芳香族環を有するアミノ酸とペプチドは短波長で直接 UV 検出し、その他のアミノ酸についてはプレカラム誘導体化処理を行い、誘導体化後の化合物の UV スペクトルの極大吸収波長で検出した。アミノ酸のプレカラム誘導体化反応を Fig. 2. 8 に示した。

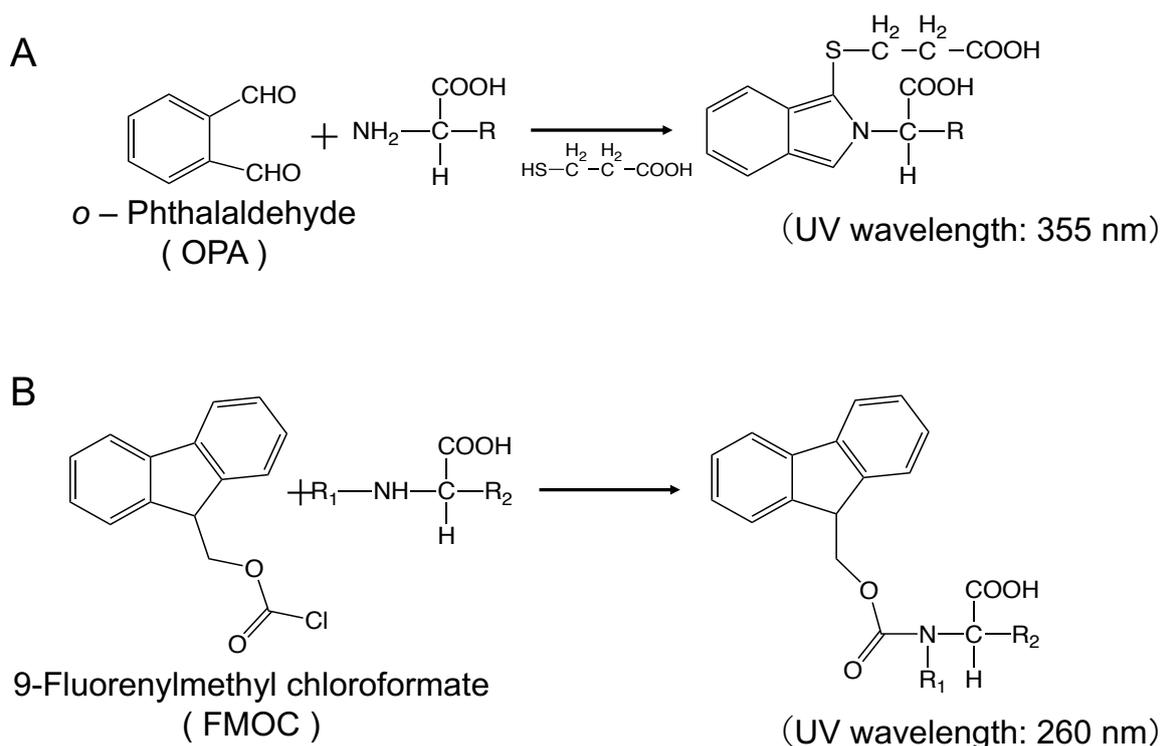


Figure 2. 8 Scheme of precolumn derivatization for an amino acid. A: Derivatization of *o*-phthalaldehyde for a primary amine. B: Derivatization of 9-fluorenylmethyl chloroformate for a secondary amine.

L-Histidine (His) 分析の際は、シリカモノリス Si カラムを使用し、その他の化合物の分析にはシリカモノリス RP-C18 カラムを用いた。移動相溶媒は、移動相溶媒 A (CH₃CN) と B (10

mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) , 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) , 0.1%ギ酸) の 2 種類を任意の割合で組合せ, 2.0 ml/min の流速でイソクラティック送液した. 全ての被験アミノ酸とペプチドに対して 3 分以内に検出できる被験アミノ酸とペプチド最適化した分析条件 (移動相中の CH₃CN 比率, UV 検出波長) と保持挙動 (保持時間, *k*) とプレカラム誘導体化の有無の一覧表を Table 2. 4 に示した.

Table 2. 4 Optimized HPLC conditions for rapid analyses of 20 different amino acids and 5 different peptides.

Amino acid		Optimized HPLC condition					
No.	Name	Mobile phase composition		UV wavelength /nm	RT ^{b)} /min	<i>k</i>	Precolumn derivatization ^{c)}
		CH ₃ CN %	aq. soln. ^{a)}				
1	Gly	20	Type I	335	1.55	0.94	OPA
2	Ala	20	Type I	335	2.16	1.70	OPA
3	Val	25	Type I	335	2.80	2.50	OPA
4	Leu	30	Type I	335	2.43	2.04	OPA
5	Ile	30	Type I	335	2.19	1.74	OPA
6	Phe	5	Type III	210	1.57	0.96	—
7	Tyr	2	Type III	210	1.39	0.74	—
8	Trp	10	Type III	210	1.65	1.06	—
9	Cys	25	Type II	335	1.84	1.30	OPA
10	Met	20	Type I	335	2.67	2.34	OPA
11	Pro	35	Type II	260	1.17	0.46	—
12	Ser	15	Type I	335	1.89	1.36	OPA
13	Thr	20	Type I	335	1.49	0.86	OPA
14	Asn	15	Type I	335	1.63	1.04	OPA
15	Gln	15	Type I	335	2.05	1.56	OPA
16	Asp	8	Type I	335	1.68	1.10	OPA
17	Glu	10	Type II	335	2.13	1.66	OPA
18	His	70	Type II	220	1.92	1.40	—
19	Lys	35	Type I	335	2.4	2.50	OPA
20	Arg	20	Type II	335	1.65	1.06	FMOC
21	Tyr-Tyr-Tyr	10	Type I	210	1.89	1.36	—
22	γGlu-Gly	20	Type III	210	1.84	2.50	—
23	γGlu-Val	5	Type III	210	1.52	0.90	—
24	γGlu-Val-Gly	5	Type III	210	1.75	1.12	—
25	γGlu-Cys-Gly	5	Type III	210	1.28	0.60	—

a) Type I: 10 mM acetate buffer (pH 5); Type II: 10 mM phosphate buffer (pH 7); Type III: 0.1 % formic acid.

b) RT: Retention time.

c) OPA: *o*-Phthalaldehyde ; FMOC: 9-Fluorenylmethyl chloroformate.

2-3-3-b MonoSpin ME ならびに NTA 使用時の SPE 条件の最適化

NTA カートリッジに修飾されている NTA 基は金属イオンを強固にキレートすることができるが、金属イオンの配位部位を NTA 基が覆っている状態であるため、目的化合物と金属イオンの弱い錯体形成を阻害してしまっている可能性がある。そこで、NTA 基と比較し金属イオンへの配位数の少ない IDA 基が修飾された ME カートリッジを用いて、2-3-1-b で ME カートリッジからの金属イオンの脱離が確認されなかった 1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を使用し、生理的 pH 条件下での 20 種の生体アミノ酸やペプチドと金属イオンとの弱い錯体形成の評価を行うこととした。スクリーニングを行う前に、被験アミノ酸やペプチドがカートリッジ上の官能基に吸着しない(金属イオンをキレートしていないカートリッジへの Q 値:20%未満)、被験アミノ酸標準溶液の溶媒の CH₃CN 含有率 (%) の検討を行った。その結果、17 種類のアミノ酸 (His, Lys, Arg を除く) と 5 種類のペプチド (No.21-25) は、10%CH₃CN を含む標準溶液を通液させた場合、Q 値は 20%未満に低下したため、17 種類のアミノ酸と 5 種類のペプチドの標準溶液中の CH₃CN 濃度 (%) は全て 10%とした。

3 種類の塩基性アミノ酸 (His, Lys, Arg) は ME カートリッジ上の IDA 基とイオン性相互作用し吸着したため、NTA カートリッジに変更した。Fig. 2.9 に His, Lys, Arg の標準溶液の組成と金属イオンをキレートしていない ME, NTA カートリッジへの吸着率を示した。ME カートリッジへはイオン結合により 3 種類全て 100%吸着した。カートリッジを NTA に変更したところ、3 種類の塩基性アミノ酸の吸着率は 20%程度まで減少した。この吸着率の減少は、NTA カートリッジ上に修飾されている NTA 基は、ME カートリッジ上に修飾されている IDA 基よりも修飾量が少ないためと考えられる。3 種類全ての塩基性アミノ酸の金属イオンをキレートしていない NTA カートリッジへの吸着率を 20%以下にするため、標準溶液の溶媒には 20 mM NaCl 含有 1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を用いてスクリーニングを行うこととした。

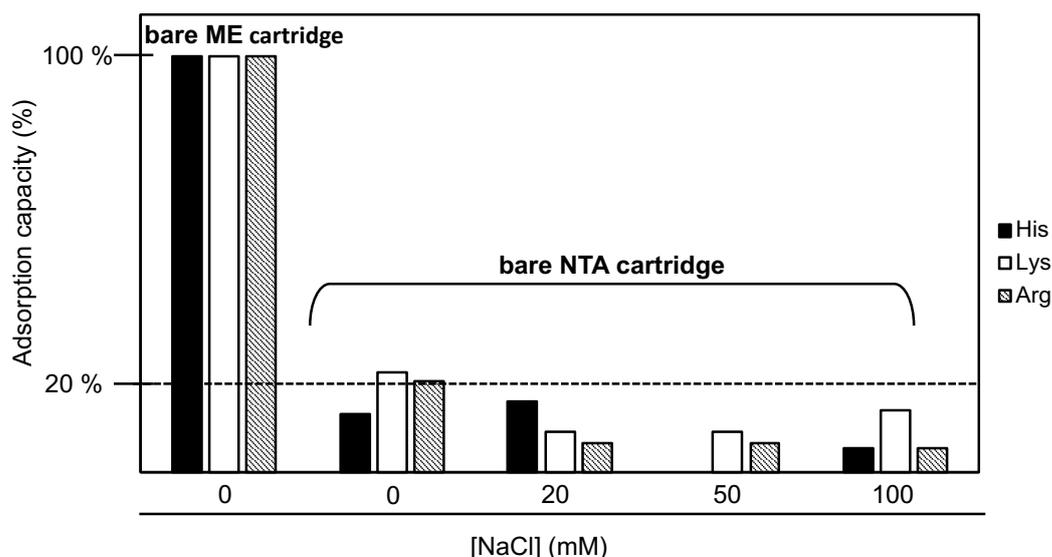


Figure 2.9 Relationship between the adsorption capacity (%) of 3 basic amino acids to a bare ME or NTA cartridge and the NaCl concentration in the amino acids test solution.

2-3-3-c 多品目のアミノ酸やペプチドの金属錯体形成のスクリーニング実施

生体内において、金属イオンはペプチドやタンパク質と錯体を形成している。生理機能ペプチドである C-ペプチドやオキシトシンの構造安定化に金属イオンが関与することも報告されている [95,96]。また、金属イオン代謝の異常からアルツハイマー病などの神経性疾患の原因の一つとなる [97]。ペプチドやタンパク質の構成成分であるアミノ酸はアミノ酸側鎖構造ごとに異なる金属イオン配位能を有している [98,99]。金属イオンと錯形成するアミノ酸として、塩基性アミノ酸である His は、タンパク質精製の His タグとして利用されるなど広く知られているが [92]，20 種の生体アミノ酸に対して様々な種類の金属イオンとの錯体形成の有無を生理的 pH 条件下で比較した報告例は全くない。

Figure 2. 10 にスクリーニングの結果を示した。ME カートリッジを用いたスクリーニングは、17 種類（3 種類の塩基性アミノ酸を除く）の生体アミノ酸に適用でき、このうち 12 種類のアミノ酸が Cu^{2+} ， Mo^{5+} の両方もしくはいずれかと強く錯形成（吸着率 40 %以上）することが確認できた (Fig. 2. 10-A)。特に Trp は、 Cu^{2+} や Mo^{5+} のみならず、 Fe^{3+} との錯形成が確認された唯一のアミノ酸であった。

3 種類の塩基性アミノ酸 (His, Lys, Arg) へは、NTA カートリッジを用いたスクリーニングが適用でき、その結果、3 種類とも全て Cu^{2+} と錯体形成し、特に His は Fe^{3+} ， Ni^{2+} ， Zn^{2+} と錯体を形成した (Fig. 2. 10-B)。

5 種類のペプチドに対して ME カートリッジを用いたスクリーニングを実施したところ、Tyr は単量体 (7) は特に目立った錯体形成は確認されなかったが、トリペプチド (21, Tyr-Tyr-Tyr) は全ての金属イオンに対しての吸着率が格段に増加した (Fig. 2. 10-C)。また、味の素株式会社 イノベーション研究所より提供された、L-Glutamic acid の側鎖側のカルボキシ基との間にアミド結合を有する γGlu 含有ペプチド (22-25) をスクリーニングした結果、 Fe^{3+} キレート ME カートリッジへのとの錯体形成による吸着率が増加した。 $\gamma\text{Glu-Cys-Gly}$ (Glutathione: GSH) は、フリーラジカルや過酸化物質といった活性酸素種から細胞を保護する補助的役割を有する抗酸化物質である [100]。 $\gamma\text{Glu-Cys-Gly}$ は Cu^{2+} と特に強い錯体を形成し、他の全ての金属イオンに対しても弱い錯体形成が見られた (Fig. 2. 10-C)。

NTA カートリッジは軽金属イオン (Ca^{2+} ， Mg^{2+}) や Fe^{2+} ， Fe^{3+} との錯形成検出に難がある一方で、ME カートリッジを使用した生理的 pH 条件下 (1 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) でのスクリーニングでは、Tyr-Tyr-Tyr の結果より、軽金属や Fe^{2+} ， Fe^{3+} を含めた選択した全ての金属イオンとの錯体形成の検出が可能であると考えられる。

(A)

	No.	Amino acid	Adsorption capacity (%)												
			bare ME	Mg ²⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Cr ³⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mo ⁵⁺
Hydrophobic amino acid	1	Gly	5	6	3	6	12	11	15	12	9	12	16	15	48
	2	Ala	13	18	16	17	20	20	24	20	18	22	41	25	51
	3	Val	9	11	12	12	12	11	13	17	13	13	35	13	39
	4	Leu	2	11	6	8	12	13	12	21	11	12	34	13	47
	5	Ile	12	16	14	16	19	18	17	29	17	17	39	19	45
	6	Phe	11	11	16	16	14	14	16	23	19	20	47	17	35
	7	Tyr	8	7	7	6	7	7	11	19	9	13	37	12	28
	8	Trp	17	15	30	18	23	22	23	66	39	40	67	31	81
	9	Cys	16	12	14	17	11	7	23	32	12	10	64	12	9
	10	Met	9	12	11	14	13	12	15	20	14	13	56	15	51
	11	Pro	9	8	9	9	10	8	9	12	10	9	21	8	15
Hydrophilic amino acid	12	Ser	14	19	15	17	20	13	18	23	19	18	43	21	26
	13	Thr	4	8	6	9	9	16	10	12	11	11	44	12	17
	14	Asn	1	3	8	0	3	11	2	9	0	4	56	3	72
	15	Gln	8	9	9	8	12	10	12	14	9	9	37	9	79
	16	Asp	4	8	5	5	7	8	5	10	7	4	11	11	20
	17	Glu	5	12	12	11	17	9	8	16	14	8	12	10	25
	18	His	100												
	19	Lys	100												
	20	Arg	100												

(B)

No.	Amino acid	Adsorption capacity (%)											
		bare NTA	Mg ²⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Cr ³⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
18	His	17	13	16	8	17	14	2	31	33	69	91	31
19	Lys	10	12	8	8	12	14	17	10	11	15	50	19
20	Arg	7	9	4	9	10	9	14	7	8	16	36	11

(C)

No.	Amino acid & Peptide	Adsorption capacity (%)												
		bare ME	Mg ²⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Cr ³⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mo ⁵⁺
7	Tyr	8	7	7	6	7	7	11	19	9	13	37	12	28
21	Tyr-Tyr-Tyr	5	21	73	23	31	59	69	99	95	98	93	89	98
22	γGlu-Gly	11	9	8	10	5	6	14	60	3	7	12	5	21
23	γGlu-Val	3	6	3	5	3	5	4	40	4	3	16	5	16
24	γGlu-Val-Gly	0	14	13	20	16	20	19	41	19	19	28	22	24
25	γGlu-Cys-Gly	6	25	29	27	26	27	31	34	29	28	92	30	33

Figure 2. 10 Comparison of the adsorption capacity (%) of 20 amino acids to each of twelve different metal ions chelated onto a ME cartridge (A), that of 3 basic amino acids to each of eleven different metal ions chelated onto a NTA cartridge (B), that of 5 peptides to each of twelve different metal ions chelated onto a ME cartridge (C).

さらに、Trp について金属錯体形成に伴う UV 吸収スペクトル変化の挙動を精査した結果を Fig. 2. 11 に示した。Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Mo⁵⁺それぞれとの混合液の場合、これらの金属イオンとの錯形成に伴う Trp の UV 吸収スペクトルの変化が確認された。Trp (金属イオンなし) と Trp と各金属イオン混合液の 280 nm の波長における吸光度を比較した結果、Trp は Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Mo⁵⁺との錯形成に伴い 280 nm における吸光度が増大していることが確認できた。この吸光度増加が確認された金属イオン種と ME カートリッジを用いたスクリーニング法より得られた、Trp の吸着率が高値の金属イオン種は非常に良く一致した。よって、本法は 1 つの被験化合物に対して 10 種以上の金属イオンとの相互作用を迅速に測定できる有用な手法であることが確認できた。

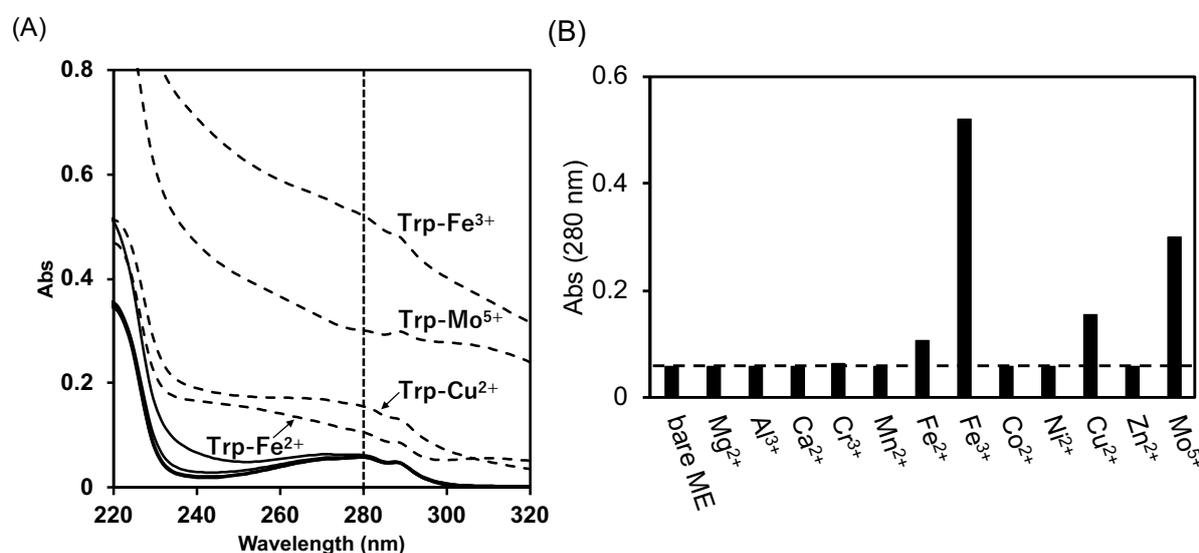


Figure 2. 11 (A) The UV spectra of Trp with metal ions in a mixture solution of 1mM HEPES buffer (pH 7.4) and CH₃CN (9:1, v/v). The concentration of Trp was 0.1 mM, and a molar ratio between Trp and each metal ion in each mixture solution was 1:5 (i.e., the concentration of each metal ion was 0.5 mM). The UV absorption spectra were recorded on a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) in the range 220 nm to 320 nm. (B) Absorbance of Trp and the complexation between Trp and a metal ion (wavelength : 280 nm).

2-3-4 水条件下での金属イオンとポリフェノール化合物間の錯体形成スクリーニング

第二ステップとして、植物由来の生理活性物質として著名なポリフェノール化合物についてスクリーニングを試みた。なお、ポリフェノール化合物は中性以上の pH では酸化変性しやすいため、(生理的 pH 条件下ではなく) 緩衝液や塩類を含まない「水」条件下での検討を行なった。

2-3-4-a 被験ポリフェノール化合物の HPLC 分析条件の最適化

2-3-2-a に示した HPLC システムを用いて、ポリフェノール化合物ごとに HPLC 条件を最適化した。UV 検出波長は各被験ポリフェノール化合物に応じて最適化した。分離カラムは、シリカモノリス RP-C18 カラムを使用した。移動相溶媒は、移動相溶媒 A (CH₃CN) と B (10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)) の 2 種類を送液ポンプ内で任意の割合で混合し、2.0 ml/min の流速でイソクラティック送液し、全ての被験ポリフェノール化合物に対して 3 分以内に保持・溶出できる条件をそれぞれ決定した。被験ポリフェノール化合物ごとに最適化した分析条件 (移動相中の CH₃CN 比率, UV 検出波長) と保持挙動 (保持時間, *k*) の一覧表を Table 2. 5 に示した。

Table 2. 5 Optimized HPLC conditions for rapid analyses of 24 different polyphenol compounds.

Polyphenol compound ^{a)}		Optimized HPLC condition				
No.	Name	Mobile phase composition		UV wavelength/ nm	RT ^{c)/} min	<i>k</i>
		CH ₃ CN %	aq. soln. ^{b)}			
1	salicylic acid	25	Type I	230	1.76	1.20
2	4-hydroxybenzoic acid	25	Type I	230	1.89	1.36
3	protocatechuic acid	10	Type I	260	1.71	1.14
4	gentisic acid	5	Type I	230	1.73	1.16
5	gallic acid	30	Type I	260	2.56	2.20
6	4-coumaric acid	20	Type I	280	1.63	1.04
7	caffeic acid	5	Type I	230	1.82	1.28
8	chlorogenic acid	10	Type I	260	1.76	1.20
9	naringenin	40	Type I	290	1.55	0.94
10	apigenin	40	Type I	260	1.48	0.85
11	luteolin	30	Type I	250	1.62	1.03
12	kaempferol	40	Type I	260	1.55	0.94
13	quercetin	30	Type I	250	1.84	1.30
14	morin	25	Type I	230	1.54	0.93
15	myricetin	30	Type I	260	1.60	1.00
16	rutin	20	Type I	270	1.36	0.70
17	catechin	15	Type I	220	1.46	0.83
18	epicatechin	15	Type I	230	1.57	2.50
19	epigallocatechin	10	Type I	220	1.83	1.29
20	epigallocatechin gallate	15	Type I	220	1.71	1.14
21	procyanidine B1	15	Type I	220	2.02	1.53
22	procyanidine B2	15	Type I	220	1.61	1.01
23	procyanidine C1	20	Type I	220	1.74	1.18
24	procyanidine tetramer	20	Type I	220	1.06	1.58

a) Phenolcarboxylic acid: No. 1~8; flavonoid: No. 9~16; catechin: No. 17~20; catechin oligomer: No. 21~24.

b) Type I: 10 mM acetate buffer (pH 5.0).

c) RT: Retention time.

2-3-4-b 多品目のポリフェノール化合物の金属錯体形成のスクリーニング実施

ポリフェノール化合物の中でも、フラボノイド類は植物細胞の液胞中に含まれる代表的な成分であり [101,102]，金属イオンとのキレート形成によりラジカル補足や抗酸化作用が増加されるという報告がある [103-107]．また、カテキン重合体が重合に伴い形成する独特な高次構造は 3 量体以上でカテキン分子本来の物性に劇的な変化を起し、単量体よりも強力な抗酸化作用を持つことが知られている [108]．しかし、カテキン単量体ならびにカテキン重合体について金属イオンとの錯体形成に関する詳細なデータは報告されていない．そこで、ME カートリッジを用いて、2-3-1-b で ME カートリッジからの金属イオンの脱離が確認されなかった水条件下での 24 種類のポリフェノール化合物 (No. 1~8: フェノールカルボン酸類, 9~16: フラボノイド類, 17~20: カテキン類, 21~24: カテキン重合体) と金属イオンの錯体形成のスクリーニングを行なった．カテキン重合体は一般に市販されていないため、2 量体から 4 量体のエピカテキン (EC) 重合体の単離精製を行った．食品添加物製剤として市販されているリンゴ由来カテキン重合体混合物 (ACT) を出発原料として、2 量体から 4 量体の EC 重合体の精製を Yanagida *et al.* が報告した順相・逆相 HPLC を用いて行った [109]．精製したカテキン重合体の構造式を Fig. 2. 12 に示した．

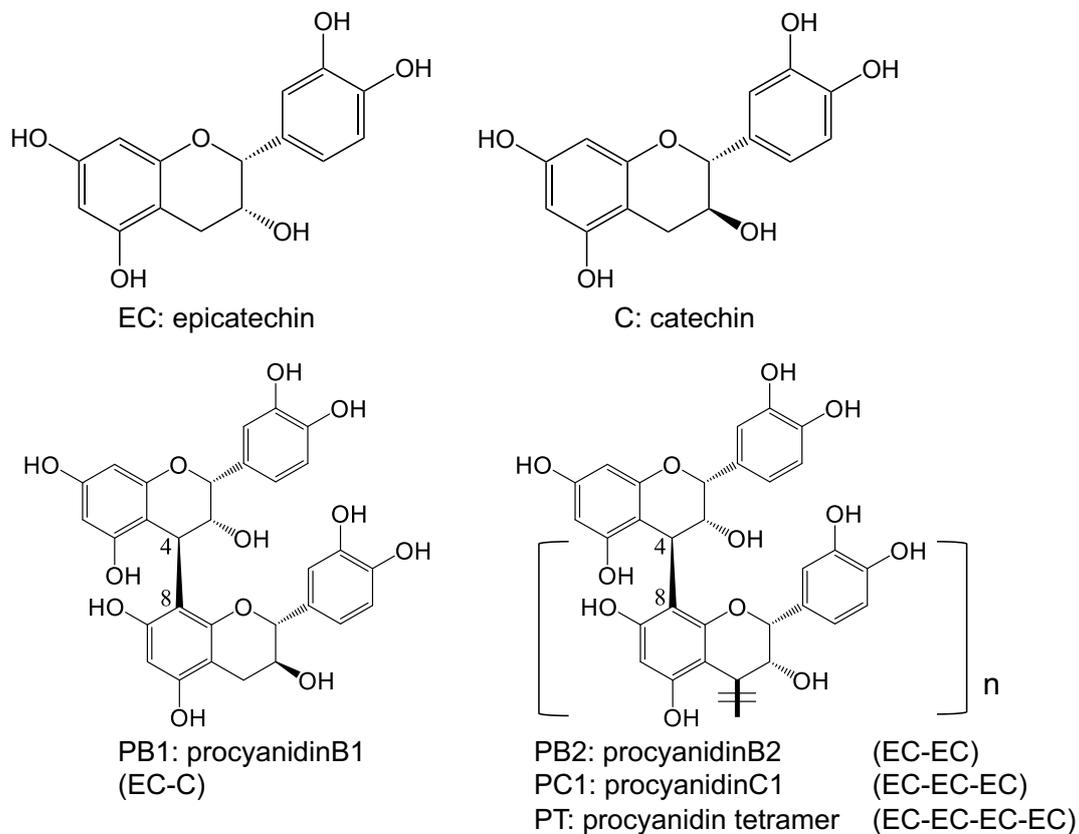


Figure 2. 12 Chemical structures of catechin standards.

スクリーニングを行う前に、ポリフェノール化合物が ME カートリッジ上の IDA 基に吸着しない（金属イオンをキレートしていないカートリッジへの Q 値：20%未満），被験ポリフェノール化合物の標準溶液の溶媒の CH₃CN 含有率（%）の検討を行った。その結果，ポリフェノールの標準溶液（No. 17-24 を除く）の CH₃CN 含有率（%）は，Table 2. 5 に示す各 HPLC 移動相と同じ含有率（%）において Q 値が 20%未満となり，カテキン類（17-20）とカテキンオリゴマー類（21-24）の標準液は 45% CH₃CN 含有水溶液で調製することにより 20%未満となった。

上記で最適化した SPE 条件での 24 種類のポリフェノール化合物のスクリーニング結果を Fig. 2. 13 に示す。フェノール性水酸基を持つポリフェノール化合物の代表的な相互作用として，Fe³⁺との錯体形成はほぼ全ての被検化合物において確認できた。カフェイン酸，モリン，ミリセチンは Fe³⁺以外に Fe²⁺とも錯形成し，ケルセチンは Fe²⁺，Fe³⁺，Cu²⁺と錯体形成することが確認できた。没食子酸エピガロカテキンは，Fe³⁺以外に Mo⁵⁺とも錯体形成することが確認できた。EC 重合体の物性は 3 量体以上で劇的に変化すると知られているが，重合に伴い Fe³⁺との結合強度が高まる傾向がみられた一方で，相互作用する金属イオン種に変化は無く Fe³⁺に選択的であった。

	No.	Polyphenol compound	Adsorption capacity (%)												
			bare ME	Mg ²⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Cr ³⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mo ⁵⁺
phenolcarboxylic acid	1	Salicylic acid	6	4	10	5	5	5	6	78	5	6	7	7	5
	2	4-hydroxybenzoic acid	6	6	12	8	9	8	13	53	8	9	11	12	26
	3	protocatechuic acid	5	8	24	13	17	14	27	72	19	17	19	18	17
	4	gentisic acid	8	6	17	6	9	11	12	39	8	9	14	8	11
	5	gallic acid	0	8	11	8	9	10	28	83	9	11	15	14	15
	6	4-coumaric acid	3	8	19	13	17	15	18	91	17	18	19	18	20
	7	caffeic acid	3	11	30	15	29	20	53	83	17	18	33	26	24
	8	chlorogenic acid	5	7	17	12	16	13	15	52	15	14	17	16	15
flavonoid	9	naringenin	5	7	6	7	8	9	7	13	7	8	12	8	7
	10	apigenin	9	6	10	12	7	8	10	46	8	6	10	7	0
	11	luteolin	7	13	12	13	14	13	32	81	14	13	27	5	20
	12	kaempferol	6	14	8	18	15	14	31	75	16	13	34	12	1
	13	quercetin	8	13	20	16	16	17	54	94	15	12	30	20	26
	14	morin	4	4	20	8	6	8	50	92	17	12	60	39	21
	15	myricetin	11	13	19	15	16	12	57	97	11	11	18	22	27
	16	rutin	0	13	15	24	19	3	35	86	24	3	19	5	7
catechin	17	catechin	6	0	1	4	3	1	7	70	2	1	4	4	0
	18	epicatechin	4	13	6	6	11	14	9	49	12	8	11	6	0
	19	epigallocatechin	10	14	0	14	12	3	4	85	12	0	15	0	0
	20	epigallocatechin gallate	10	10	12	26	26	9	34	91	13	18	32	11	54
catechin oligomer	21	procyanidine B1	2	3	4	5	6	3	5	81	2	2	10	3	0
	22	procyanidine B2	10	7	9	12	9	6	9	78	10	6	11	6	6
	23	procyanidine C1	1	7	9	9	6	4	5	81	10	0	8	2	3
	24	procyanidine tetramer	7	14	8	6	13	14	17	86	14	11	14	13	10

Figure 2. 13 Comparison of the adsorption capacity (%) of 24 polyphenol compounds to each of twelve different metal ions chelated onto a ME cartridge.

2-4 第二章のまとめ

本章では、SPE 媒体を用いた生理的条件下での金属イオンとの錯体形成の迅速・簡便な検出法の構築を検討した。金属キレート官能基が修飾されたカートリッジに、金属イオンをキレートさせた後、金属イオンキレートカートリッジに薬物溶液を通液させた。金属イオンキレートカートリッジに通液前後の溶液中の薬物を HPLC で定量することにより各金属（キレートカートリッジ）への吸着率（%）から錯体形成の有無を検出した。金属キレート官能基が修飾されたカートリッジは、ジーエルサイエンス性の MonoSpin ME と MonoSpin NTA の 2 種類のカートリッジを使用した。MonoSpin ME の表面はイミノ二酢酸 (IDA) が、MonoSpin NTA の表面はニトリロ三酢酸 (NTA) が修飾されている。ME カートリッジは NTA カートリッジと比較し、シリカモノリスディスク上の官能基の修飾密度が高いため、金属イオンを多くキレートすることができるが、キレート強度が弱いため、イオン強度のある溶液を通液するとキレートさせた金属イオンが脱離する。一方で、NTA カートリッジは金属イオンをキレート後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を通液しても金属イオンが脱離しないことがわかった。ME、NTA カートリッジの金属キレート特性を確認後、SPE 条件を最適化し、錯体形成条件に応じてカートリッジを使い分けた。まず、PBS を用いた、生理的 pH、イオン強度条件下での 55 種類の薬物と 11 種類の金属イオンとの錯体形成検出のスクリーニングを NTA カートリッジを用いて行なった。生理的 pH、イオン強度条件下での多種類の薬物と金属イオンの錯体形成を確認した例はなく、スクリーニング結果より、生理的条件下において Cu^{2+} と錯体を形成する多くの薬物を新たに発見することができた。しかしながら、NTA カートリッジを用いたスクリーニングでは軽金属や Fe^{2+} 、 Fe^{3+} との錯体形成がどの薬物においても確認されなかった。この理由の一つとして、NTA カートリッジ上の NTA 基が強固に金属イオンをキレートしているため、軽金属や Fe^{2+} 、 Fe^{3+} と薬物がカートリッジ上で三元錯体の形成が困難な状態になっている可能性がある。そこで、ME カートリッジを用いて、1 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を用いた生理的 pH 条件下での 20 種類の生体アミノ酸に対して 12 種類の金属イオンとの錯体形成検出のスクリーニングを行った。その結果、 Cu^{2+} 、 Mo^{5+} の両方もしくはいずれかと強く錯体形成するアミノ酸を多数確認できた。特に L-Tryptophan (Trp) は Cu^{2+} や Mo^{5+} の他に唯一 Fe^{3+} との錯形成が確認でき、L-Tyrosine (Tyr) のトリペプチド (Tyr-Tyr-Tyr) が対象とした全ての金属イオンキレート ME カートリッジへ吸着したため、ME カートリッジでは軽金属や Fe^{2+} 、 Fe^{3+} との錯体形成を検出可能であることがわかった。さらに、ME カートリッジを用いたポリフェノール化合物のスクリーニングでは、 Fe^{3+} との錯体形成がほぼ全てのポリフェノール化合物において確認でき、ポリフェノール化合物が植物体内のみならず、地上の生態系内の物質循環において、水溶性 Fe^{3+} の選択的なキャリア物質として機能している可能性を示唆することができた。本法は、遠心分離操作により一度に 10 種類以上の金属イオンキレートカートリッジを処理でき、引き続きカートリッジからの溶出液中の化合物濃度をオートサンプラーを兼ね備えた HPLC により迅速な定量を行うことができる、ハイスループットなスクリーニ

ング法である。ME カートリッジを用いれば軽金属や重金属など幅広い金属イオンとの錯体形成を検出できると述べたが、金属イオンをカートリッジ上へ固定化することで、金属イオンの配位部位の一部は覆われた状態となり、遊離金属イオンとの二元錯体形成ではなく、キレート官能基と結合状態の金属イオンとの三元錯体形成の有無を評価していることに変わりはないため、二元錯体のみを形成するような弱い錯体形成を見落としてしまう可能性がある。次章では溶液中での遊離金属イオンと薬物の二元錯体形成の検出を目的とした、簡便かつ迅速なスクリーニング法を検討した。

第三章 銅イオン選択性電極を用いる簡便迅速な銅-薬物錯体形成検出法の検討

3-1 緒言

第二章において、任意の金属イオンをキレートさせた固相抽出 (SPE) 媒体に試料溶液を通液し、素通り液中の試料濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析することにより、1 種類の被験化合物に対して 10 種類以上の金属イオンとの錯体形成の有無を一斉評価可能な迅速スクリーニング法を構築した。構築した手法を用いて、擬似生理的 pH 条件下での 55 種類の薬物に対して 11 種類の金属イオンとの錯体形成の有無を網羅的に解析した結果、特に銅イオン (Cu^{2+}) と錯体形成する薬物が多数存在することを見出した。しかしながら、同法では金属イオンをカートリッジ上へ固定化することで、金属イオンの配位部位の一部は覆われた状態となっている。つまり、遊離金属イオンとのフリーな状態での錯体形成ではなく、キレート官能基と結合した状態の金属イオンとの三元錯体形成の有無を評価している。したがって第二章のスクリーニングでは見落とされてしまう錯体形成の事例が存在した可能性がある。

一方で、上記のような薬物と金属イオンの錯体検出とは別に、特定のイオンに選択的に感応する電極をイオン選択電極 (ISE) といい、電極を測定対象イオンを含む溶液に浸漬すると、ISE と参照電極の両電極間のイオン活量に応じた起電力 (Electromotive force: EMF) を生じ、対象イオン濃度を測定することができる [110, 111]。ISE の測定対象イオンには様々な種類 (F^- , Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+}) があり、河川中の重金属を測定するなど水質汚染の計測に広く利用されている [112-115]。また、ISE は遊離状態のイオンにのみ反応するため、キレート滴定の原理を利用したキレート剤の定量に応用されている [116-119]。

第二章の SPE 媒体を用いた PBS 条件下での 55 種類の薬物に対する金属イオンとの錯体形成の有無を網羅的に解析した結果、特に銅イオン (Cu^{2+}) と錯体を形成する薬物が多数存在することを見出した。そこでさらに、 Cu^{2+} との錯体形成のみを選択的かつ迅速に検出する新規なスクリーニング法として、銅イオン選択性電極を用いる手法について検討し、薬物の遊離 Cu^{2+} との錯体形成スクリーニングを行なった。

3-2 銅イオン選択性電極を用いた銅-薬物錯体形成検出の理論

学術論文に投稿予定のため省略させていただきます。

3-3 実験方法

学術論文に投稿予定のため省略させていただきます。

3-4 結果と考察

学術論文に投稿予定のため省略させていただきます。

3-5 第三章のまとめ

学術論文に投稿予定のため省略させていただきます。

総括

金属イオンとの錯体形成を検出する方法としてこれまでに様々な機器分析法が適用されているが、簡便性、迅速性、測定条件に関して制限があるため、網羅的なスクリーニングが行われたことはこれまで全くなかった。そこで本研究では、幅広い金属イオンと薬物との錯体形成を評価するハイスループットスクリーニング法の開発を目的として、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) や固相抽出 (SPE) 媒体、イオン選択性電極 (ISE) を用いた新たな測定法について検討した。

まず、第一章では、HSCCC による薬物の金属錯体形成検出法を検討した。この手法では、二相溶媒系に添加した共に遊離状態の金属イオンと薬物の錯体形成の検出が可能であり、薬物の金属イオンとの錯体形成に伴う親疎水性変化を二相溶媒系への分配挙動の変化に変えて錯体形成を判定することができた。しかしながら、薬物に応じた二相溶媒系の最適化や HSCCC の測定に時間を要する。また、二相溶媒系を HSCCC に保持できないため、生理的条件下 (pH 7.4, イオン強度) での測定は困難である。

第一章の課題を改善した手法として、第二章では金属イオンをキレート捕集するための SPE 媒体と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を組合せた金属錯体形成検出法を検討した。本章では、55 種類の薬物、20 種類の生体アミノ酸や 5 種類のペプチド、24 種類のポリフェノール化合物という幅広い化合物を対象に 10 種類以上の金属イオンとの錯体形成の有無を評価可能な、ハイスループット性に非常に優れたスクリーニング法を構築することができた。MonoSpin ME カートリッジでは、1 mM HEPES 緩衝液を用いて生理的 pH 条件下での錯体形成を評価でき、MonoSpin NTA カートリッジでは、生理緩衝食塩水 (PBS, pH 7.4) を用いて生理的 (pH 7.4, イオン強度) 条件下での錯体形成を検出することができる。しかしながら、この SPE 媒体を用いた手法では、原理的に金属イオンをカートリッジ上へ固定化するため、金属イオンの配位部位の一部は覆われた状態となるため、遊離状態同士の薬物と金属イオンの二元錯体のみを形成するような弱い錯体を見落としてしまう可能性がある。特に NTA カートリッジでは、カートリッジのシリカモノリスディスク上の NTA (ニトリロ三酢酸) 官能基が金属イオンと強固にキレート形成するため、軽金属や Fe^{2+} , Fe^{3+} と被験化合物の錯体形成の検出が難しい状態である。

そこで第三章では、遊離状態同士の薬物と金属イオンの二元錯体を簡便に検出可能な、イオン選択電極 (ISE) を用いた手法を検討した。ISE には第二章で薬物との錯体形成が多く確認された銅イオン (Cu^{2+}) 選択性電極を用いた。まず、市販の銅イオン選択性電極を組み込んだ電極装置と測定セルを自作し、溶液の電位の測定、溶液の入れ替えや電極の洗浄を簡便に行えることを確認した。さらに、多種類の薬物と Cu^{2+} の錯体形成の有無を確認することができた。この手法は溶液中の共に遊離状態での薬物と Cu^{2+} の錯体形成を検出でき、さらに 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を用いて生理的 pH 条件下での Cu^{2+} と薬物の錯体形成を検出することが可能である。本法は、 Cu^{2+} と薬物の混合溶液の電位の測定のみで錯体形成の有無を確認

できるため、極めて簡便な手法であり、測定対象とする薬物に制限がない（光吸収を持たない薬物も測定可能）。対象金属イオン種は電極の扱いにより制限はあるが、電極の種類を変えれば銅イオンだけでなく他の金属イオン（ Ca^{2+} や Cd^{2+} など）と薬物との錯体形成検出に応用が可能である。

上記の通り三種類の手法を構築できたが、第一章と第三章の内容に関して現在、さらに検討を開始している。第一章での HSCCC の測定に時間を要する、生理的条件下（pH 7.4, イオン強度）での測定が困難であるという点を解消する目的で、（HSCCC を使用しない）シンプルな分配係数測定による金属錯体形成検出法を検討している。具体的には、（HSCCC の遠心装置では固定相が保持できない）生理的 pH 条件で調製した二相溶媒系の下相に被験薬物を溶解してから、さらに上相を加えて（手動で）攪拌・二相分配させた後、下相を再度分取し、分配前と分配後の各下相中の薬物濃度をオートサンプラー付きのフローインジェクション装置で UV 検出・自動定量し、分配係数の変化の有無から錯体形成の有無を判定する、新たなシステムを開発中であることを付記する。この手法は、薬物と金属イオン濃度を自由に設定できるため、錯生成定数 (K_f) の算出も可能であり、薬物の金属錯体形成後の親疎水性の物性値も同時に評価できる手法である。また、第三章の手法は銅イオン選択性電極だけでなくカルシウムイオン選択性電極においても適用が可能であることを確認している。

本研究では、幅広い化合物を対象とした金属イオンとの錯形成の迅速・簡便な検出のためのハイスループットスクリーニング法の開発を目的として、HSCCC や SPE 媒体、ISE を用いた手法を構築し、薬物だけでなく生体アミノ酸、ポリフェノール化合物などの生理活性物質を対象に金属イオンとの錯体形成スクリーニングを行った。その結果、これまでに報告例のない金属錯体の事例を複数発見することができた。既存の錯体検出法と比較し、構築した手法はどれも迅速性があり、SPE 媒体と ISE 用いた方法では擬似生理的条件下での錯体形成を評価することができた。これらのハイスループットなスクリーニング法は、金属錯体のさらなる研究促進ツールとして有用であり、発見した錯体形成の組合せは創薬・薬理・臨床薬学等の分野での有益な情報として価値が高い。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり多くのご支援とご指導を賜りました，指導教官である 東京薬科大学生体分析化学教室教授 柳田 顕郎 博士に心より感謝申し上げます。

また，東京薬科大学公衆衛生学教室教授 藤原 泰之 博士ならびに東京薬科大学情報教育研究センター教授 土橋 朗 博士には，副査として有益なご指摘と励ましをいただきました。厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，研究全般にわたるご指導を賜りました，東京薬科大学生体分析化学教室准教授 東海林 敦 博士ならびに東京薬科大学生体分析化学教室助教 森岡 和大 博士に感謝申し上げます。

大学院入学前から丁寧で温かいご指導を賜りました，東京薬科大学名誉教授 渋澤 庸一 博士に感謝申し上げます。

本研究の第二章 MonoSpin ME および NTA カートリッジを使用した固相抽出処理に関する適切な御指導，ご助言と原子吸光高度計での測定にご協力頂きました ジーエルサイエンス株式会社 太田 茂徳 様に深く感謝申し上げます。

第二章の研究で使用した，被験試料であるペプチドのご提供や実験に対するご指導，ご助言を頂きました 味の素株式会社 イノベーション研究所 中山 聡 博士ならびに 岩畑 大悟 博士に心より感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたり，実験に協力して頂いた 中井 彩香 氏，鈴木 菜穂子 氏，藤本 和史 氏，木村 ももこ 氏に深く感謝いたします。

最後に本研究を進めるにあたり，ご協力と激励を賜りました 東京薬科大学生体分析化学教室の皆様にご丁寧に御礼申し上げるとともに，私をサポートしてくれた家族にも感謝いたします。

引用文献

1. U. Ndagi, N. Mhlongo, M. E. Soliman. Metal complexes in cancer therapy-an update from drug design perspective. *Drug Des. Dev. Ther.*, **11**, 599-616 (2017).
2. M. Ajmal. Review: electrochemical studies on some metal complexes having anti-cancer activities. *J. Coord. Chem.*, **70**, 2551-2588 (2017).
3. S. Ahmad, A. A. Isab, S. Ali, A. R. Al-Arfaj. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. *Polyhedron*, **25**, 1633-1645 (2006).
4. R. Oun, Y. E. Moussa, N. J. Wheate. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: areview for chemists. *Dalton Trans.*, **47**, 6645-6653 (2018).
5. X. Han, J. Sum, Y. Wang, Z. He. Recent advances in platinum (IV) complex-based delivery systems to improve platinum (II) anticancer therapy. *Med. Res. Rev.*, **35**, 1268-1299 (2015).
6. M. Yamasaki, S. Funakoshi, S. Matsuda, T. Imazu, Y. Takeda, T. Murakami, Y. Maeda. Interaction of magnesium oxide with gastric acid secretion inhibitors in clinical pharmacotherapy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **70**, 921-924 (2014).
7. G. Weiss, L. T. Goodnough. Anemia of chronic disease. *N. Eng. J. Med.*, **352**, 1011-1023 (2005).
8. M. P. Ginabra, T. Traykova, J. A. Planell. Calcium phosphate cements as bone drug delivery system: A review. *J. Control. Release*, **113**, 102-110 (2006).
9. M. Peacock. Calcium metabolism in health and disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **5**, 23-30 (2010).
10. N. Kumar, S. Chaurasia, R. R. Patel, G. Khan, V. Kumar, B. Mishra. Atorvastatin calcium encapsulated eudragit nanoparticles with enhanced oral bioavailability, safety and efficacy profile. *Pharm. Dev. Technol.*, **22**, 156-167 (2017).
11. S. Furuta, S. Toyama, M. Miwa, T. Itabashi, H. Sano, T. Yoneta. Residence time of polaprezinc (Zinc L-carnosine complex) in the rat stomach and adhesiveness to ulcerous sites. *Jpn. J. Pharmacol.*, **67**, 271-278 (1995).
12. D. Sato, T. Gohda, M. Kihara, Y. Kanaguchi, T. Kobayashi, S. Mano, Y. Sasaki, N. Nohara, M. Murakoshi, J. Nakata, H. Suzuki, S. Ueda, S. Horikoshi, Y. Suzuki. Effect of zinc acetate dihydrate (Nobelzin) treatment on anemia and taste disorders in patients with chronic kidney disease with hypozincemia. *Acta. Med. Okayama*, **72**, 535-538 (2018).
13. H. Akiyama, O. Yamasaki, H. Kanzaki, J. Tada, J. Arata. Effects of zinc oxide on the attachment of Staphylococcus aureus strains. *J. Dermatol. Sci.*, **17**, 67-74 (1998).
14. W. D. W. Rees. Mechanisms of gastroduodenal protection by sucralfate. *Am. J. Med.*, **91**, 58-61 (1991).
15. P. Lehto, K. T. Kivisto, P. J. Neuvonen. The effect of ferrous sulphate on the absorption of norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **37**, 82-85 (1994).
16. M. W. Pletz, P. Petzold, A. Allen, O. Burkhardt, H. Lode. Effect of calcium carbonate on bioavailability of orally administered gemifloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 2158-2160

- (2003).
17. N. Sultana, E. Humza, M. S. Arayne, U. Haroon. Effect of metal ions on the *in vitro* availability of enoxacin, its *in vivo* implications, kinetic and antibacterial studies. *Quim. Nova.*, **34**, 186-189 (2011).
 18. I. Turel. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coord. Chem. Rev.*, **232**, 27-47 (2002).
 19. Z. Muhi-Eldeen, K. Al-Obaidi, M. Nadir, V. F. Roche. Synthesis and antimicrobial activity of Ni(II), Co(II), Zn(II), and Cd(II) complexes of 4-substituted-3-mercapto-5-phenyl-4H-1,2,4-triazoles. *Eur. J. Med. Chem.*, **27**, 101-106 (1992).
 20. N. Shahabadi, F. Shiri, S. Hadidi. Studies on the interaction of antibiotic drug rifampin with DNA and influence of bivalent metal ions on binding affinity. *Spectrochim. Acta A*, **219**, 195-201 (2019).
 21. P. Fernandes, I. Sousa, L. Cunha-Silva, M. Ferreira, B. Castro, E. F. Pereira, M. J. Feio, P. Gameiro. Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper (II) lomefloxacin ternary complex. *J. Inorg. Biochem.*, **131**, 21-29 (2014).
 22. J. Nagaj, R. Starosta, M. Jezowska-Bojczuk. Acid-base characterization, coordination properties towards copper (II) ions and DNA interaction studies of ribavirin, an antiviral drug. *J. Inorg. Biochem.*, **142**, 68-74 (2015).
 23. N. Shahabadi, F. Shiri, S. Hadidi. Studies on the interaction of antibiotic drug rifampin with DNA and influence of bivalent metal of bivalent metal on binding affinity. *Spectrochim. Acta A*, **219**, 195-201 (2019).
 24. X. Yuan, J. Qin, L. Lu. Influence of metal ions on the interaction between gatifloxacin and calf thymus DNA. *Spectrochim. Acta A*, **75**, 520-524 (2010).
 25. M. Tian, X. Zhang, L. Xie, J. Xiang, Y. Tang, C. Zhao. The effect of Cu²⁺ on the interaction between an antitumor drug-mitoxantrone and human serum albumin. *J. Mol. Struct.*, **892**, 20-24 (2008).
 26. R. S. P. Singh, J. K. Mukker, A. N. Deitchman, S. K. Drescher, H. Derendorf. Role of divalent metal ions in atypical nonlinear plasma protein binding behavior of tigecycline. *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3409-3414 (2016).
 27. Y. Zhang, S. Shi, Y. Liu, X. Chen, M. Peng. Differential effects of Cu(II) and Fe(III) on the binding of omeprazole and pantoprazole to bovine serum albumin: Toxic effect of metal ions on drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56**, 1064-1068 (2011).
 28. K. Sarkar, K. Sen. Some Drugs in Action: Metal ions do influence the activity!. *Int. J. Pharm. Sci. Pes.*, **6**, 1-13 (2015).
 29. A. K. Renfrew. Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics*, **6**, 1324-1335 (2014).
 30. Y. Mawani, C. Orvig. Essential metal related metabolic disorders. *Biorg. Med. Chem.*, 307-350 (2011).
 31. C. Nouet, P. Motte, M. Hanikenne. Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci.*, **16**, 395-404 (2011).

32. M. A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi. The essential metals for humans: a brief overview. *J. Inorg. Biochem.*, **195**, 120-129 (2019).
33. G. Crisponi, V. M. Nurchi, D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, G. Faa. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coord. Chem. Rev.*, **254**, 876-889 (2010).
34. G. Berthon. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coord. Chem. Rev.*, **228**, 319-341 (2002).
35. W. Maret. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv. Nutr.*, **4**, 82-91 (2013).
36. K. S. Egorova, V. P. Ananikov. Toxicity of metal compounds: knowledge and myths. *Organometallics*, **36**, 4071-4090 (2017).
37. A. Sofyan, J. R. Shaw, W. J. Birge. Metal trophic transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**, 1034-1041 (2006).
38. A. T. Jan, M. Azam, K. Siddiqui, A. Ali, I. Choi, Q. M. R. Haq. Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 29592-29630 (2015).
39. A. J. Bird. Cellular sensing and transport of metal ions: implications in micronutrient homeostasis. *J. Nutr. Biochem.*, **26**, 1103-1115 (2015).
40. J. Szpunar. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*, **130**, 442-465 (2005).
41. H. Haraguchi. Metallomics as integrated biometal science. *J. Anal. Spectrom.*, **19**, 5-14 (2004).
42. S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski. Metallomics: the concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1119-1138 (2009).
43. M. U. Muckenthaler, S. Rivella, M. W. Hentze, B. Galy. A red carpet for iron metabolism. *Cell*, **168**, 344-361 (2017).
44. R. Jernigan, G. Raghunathan, I. Bahar. Characterization of interactions and metal ion binding sites in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 256-263 (1994).
45. A. J. Doerr, G. L. Mclendon. Design, folding, and activities of metal-assembled coiled proteins. *Inorg. Chem.*, **43**, 7916-7925 (2004).
46. T. R. Sosnick, B. A. Krantz, R. S. Dothager, M. Baxa. Characterizing the protein folding transition state using ψ analysis. *Chem. Rev.*, **106**, 1862-1876 (2006).
47. C. Zhang, F. Zhang, P. Zhou, C. Zhang. Functional role of metalloproteins in genome stability. *Front. Biol.*, **11**, 119-131 (2016).
48. U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud, R. K. Thauer. Active sites of transition-metal enzymes with a focus in nickel. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 749-758 (1998).
49. G. Palermo, A. Cavalli, M. L. Klein, M. Alfonso-Prieto, M. D. Peraro, M. D. Vivo. Catalytic metal ions and enzymatic processing of DNA and RNA. *Acc. Chem. Res.*, **48**, 220-228 (2015).

50. L. Szyrwił, J. S. Pap, W. Malinka, Z. Szewczuk, A. Kotyna, J. Brasun. Interactions of anti-Parkinson drug benserazide with Zn(II), Cu(II), Fe(II) ions. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **76**, 36-43 (2013).
51. C. F. Harrington, A. Taylor. Analytical approaches to investigating metal-containing drugs. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **106**, 210-217 (2015).
52. A. Kadej, M. Kuczer, E. Czarniewska, A. Urbanski, G. Rosinski, T. Kowalik-Jankowska. High stability and biological activity of the copper(II) complexes of alloferon 1 analogues containing tryptophan. *J. Inorg. Biochem.*, **163**, 147-161 (2016).
53. I. Nicolis, E. Curis, P. Deschamps, S. Benazeth. X-ray absorption spectroscopy of low-molar-mass metallic complexes in pharmacy. *J. Synchrotron. Rad.*, **10**, 96-102 (2003).
54. B. Tita, C. Morgovan, D. Tita, T. A. Neag. Anti-inflammatory drugs interacting with Zn(II) metal ion synthesis, characterization and thermal behavior of the complex with ketoprofen. *Rev. Chim.*, **67**, 38-41 (2016).
55. O. P. Chouham, G. Jacob. FTIR, UV-Vis, magnetic, mass spectral and XRD studies of Ni(II) complex with pioglitazone: an oral antidiabetic drug. *Orient. J. Chem.*, **30**, 1501-1506 (2014).
56. N. Sridevi, K. K. M. Yusuff. Rapid in vitro screening of drug-metal ion interactions. *Toxicol. Mech. Method.*, **17**, 559-565 (2007).
57. L. Wuping, L. Qiping. Study on the retention behavior of platinum metal complexes in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350**, 671-673 (1994).
58. R. Giovannetti, V. Bartocci. High-performance liquid chromatographic determination of Mn(II), Co(II), Zn(II), Ni(II), Cu(II) as coproporphyrin-I complexes. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **21**, 2607-2617 (1998).
59. N. Sultana, M. S. Arayne, M. Nawaz, Z. U. Rehman. Liquid chromatographic analysis of halofantrine from dosage form and its metal interaction studies. *Med. Chem. Res.*, **20**, 531-534 (2011).
60. P. Wang, H. K. Lee. Recent applications of high-performance liquid chromatography to the analysis of metal complexes. *J. Chromatogra. A*, **789**, 437-451 (1997).
61. S. Najma, M. S. Arayne, K. M. Mehboob, N. Muhammd. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of leflunomide: application to *in vitro* drug metal interactions. *Chin. J. Chem.*, **29**, 1933-1938 (2011).
62. T. Cecchi, F. Pucciarelli, P. Passamonti, S. Ferraro. Influence of metal impurities sorption onto a silica based C₁₈ stationary phase on the HPLC of metal chelating analytes. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, **22**, 429-440 (1999).
63. H. Engelhardt, T. Lobert. Chromatographic determination of metallic impurities in reversed-phase HPLC columns. *Anal. Chem.*, **71**, 1885-1892 (1999).
64. A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shpigun, I. A. Suutherland. Countercurrent chromatography in analytical chemistry. *Pure. Appl. Chem.*, **81**, 355-387 (2009).

65. Y. Ito. Golden rules and pitfalls in optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1065**, 145-168 (2005).
66. J. B. Friesen, J. B. Mcalpine, S. Chen, G. F. Pauli. Countercurrent separation of natural products: an update. *J. Nat. Prod.*, **78**, 1765-1796 (2015).
67. A. Yanagida, A. Shoji, Y. Shibusawa, H. shindo, M. Tagashira, M. Ikeda, Y. Ito. Analytical separation of tea catechins and food-related polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1112**, 195-201 (2006).
68. E. Kitazume, T. Higasiyama, N. Sato. On-line microextraction of metal traces for subsequent determination by plasma atomic emission spectrometry using pH peak focusing countercurrent chromatography. *Anal. Chem.*, **71**, 5515-5521 (1999).
69. E. Kitazume, M. Bhatnagar, Y. Ito. Separation of rare earth elements by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.*, **538**, 133-140 (1991).
70. E. Kitazume, Y. Saito, Y. Ito. Separation of heavy metals by high-speed countercurrent chromatography. *Anal. Chem.*, **65**, 2225-2228 (1993).
71. S. Nakamura, H. Hashimoto, K. Akiba, Y. Saito. Mutual separation of heavy lanthanoid elements and yttrium by high-speed countercurrent chromatography. *Anal. Sci.*, **13**, 525-529 (1997).
72. E. Kitazume, N. Sato, Y. Ito. Concentration of heavy metals by high-speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **21**, 251-261 (1998).
73. E. Kitazume, T. Takatsuka, N. Sato, Y. Ito. Mutual metal separation system with enrichment using pH-peak focusing countercurrent chromatography. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **27**, 437-449 (2004).
74. A. Hosoda, A. Tsuyoshi, K. Akiba. Enrichment and determination of zinc by high-speed countercurrent chromatography. *Anal. Sci.*, **18**, 897-901 (2002).
75. K. Shimizu, H. Kuribayashi, H. Watanabe, T. Shimasaki, K. Azuma, Y. Horie, K. Saitoh, S. Saito, M. Shibukawa. Multistep pH-peak-focusing countercurrent chromatography with a polyethylene glycol-Na₂SO₄ aqueous two phase system for separation and enrichment of rare earth elements. *Anal. Chem.*, **85**, 978-984 (2013).
76. Y. Wen, J. Wang, X. Chen, Z. Le, Y. Chen, W. Zheng. Application of silver ion in the separation of macrolide antibiotic components by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 4668-4672 (2009).
77. Q. Liu, S. Shi, L. Liu, H. Yang, W. Su, X. Chen. Separation and purification of bovine serum albumin binders from *Fructus polygoni orientails* using off-line two-dimensional complexation high-speed counter-current chromatography target-guided by ligand fishing. *J. Chromatogr. A*, **1304**, 183-193 (2013).
78. W. Liu, J. Luo, L. Kong. Application of complexation high-speed counter -current chromatography in the separation of 5-hydroxyisoflavone isomers from *Belamcanda chinensis* (L.) DC. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 1842-1848 (2011).

79. C. Han, W. Wang, G. Xue, D. Xu, T. Zhu, S. Wang, P. Cai, J. Luo, L. kong. Metal ion-improved complexation countercurrent chromatography for enantioseparation of dihydroflavone enantiomers. *J. Chromatogr. A*, **1532**, 1-9 (2018).
80. M. M. C. D. Santos, V. Famila, ML. S. Goncalves. A voltammetric study of copper by the psychoactive compounds 1, 4-benzodiazepines. *Electroanal.*, **12**, 216-222 (2000).
81. J. Hernandez-Mendez, C. Gonzalez-Perez, M. I. Gonzalez-Martin. Metal complexes of 1, 4-benzodiazepines. *Microchem. J.*, **31**, 94-101 (1985).
82. J. D. Sabatino, O. W. Weber, G. R. Padmanabhan, B. Z. Senkowski. Spectrophotometric studies of iron (II) complexes of pyridyl benzodiazepin-2-ones. *Anal. Chem.*, **41**, 905-909 (1969).
83. J. A. Real, M. C. Munoz, J. Borrás. Study of the thermal decomposition of bromazepam-thiocyanate complexes of Fe(II), Co(II), Ni(II) and Cu(II). *Thermochimica. Acta*, **101**, 83-87 (1986).
84. J. A. Real, J. Borrás. Synthesis and characterization of Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with bromazepam, an anxiolytic drug. part I. chloro-complexes. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, **14**, 843-855 (1984).
85. J. A. Real, J. Borrás. Synthesis and characterization of Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with bromazepam, an anxiolytic drug. part II. perchlorate and sulphate complexes. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, **14**, 857-868 (1984).
86. A. M. Mansour, O. R. Shehab. Structural studies and quantum chemical calculations of Cr(III), Fe(III) and Ru(III) bromazepam complexes. *Appl. Organometal. Chem.*, **31**, 3635-3641 (2017).
87. Q. Li, T. Wu, J. Lai, Z. Fan, W. Zhang, G. Zhang, D. Cui, Z. Gao. Diversity of coordination modes, structures, and properties of chiral metal-organic coordination complexes of the drug voriconazole. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **31**, 5281-5290 (2015).
88. Y. Zhao, G. Tang, Y. Wang, Y. Cui, S. W. Ng. Copper-based metal coordination complexes with voriconazole ligand: syntheses, structures and antimicrobial properties. *J. Solid State Chem.*, **259**, 19-27 (2018).
89. R. C. F. Cheung, J. H. Wong, T. B. Ng. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **96**, 1411-1420 (2012).
90. G. S. Chaga. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **49**, 313-334 (2001).
91. L. Ortiz-Martin, F. Benavante, S. Medina-Casanellas, E. Gimenez, V. Sanz-Nebot. Study of immobilized metal affinity chromatography sorbents for the analysis of peptides by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **36**, 962-970 (2015).
92. W. K. Kuo, H. A. Chase. Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnol. Lett.*, **33**, 1075-1084 (2011).
93. L. Lambs, M. Venturini, B. D. Reverend, H. Kozłowski, G. Berthon. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 8. potentiometric and spectroscopic studies on the formation of Ca(II) and Mg(II) complexes with 4-dedimethylamino-tetracycline and 6-desoxy-6-demethyl-

- tetracycline. *J. Inorg. Biochem.*, **33**, 193-210 (1988).
94. B. Carlotti, A. Cesaretti, F. Elisei. Complexes of tetracyclines with divalent metal cations investigated by stationary and femtosecond-pulsed techniques. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 823-834 (2012).
 95. Z. Keltner, J. A. Meyer, E. M. Johnson, A M. Palumbo, D. M. Spence, G. E. Reid. Mass spectrometric characterization and activity of zinc-activated proinsulin C-peptide and C-peptide mutants. *Analyst*, **135**, 278-288 (2010).
 96. C. Avanti, N. A. Oktaviani, W. L. J. Hinrichs, H. W. Frijlink, F. A.A. Mulder. Aspartate buffer and divalent metal ions affect oxytocin in aqueous solution and protect it from degradation. *Int. J. Pharm.*, **444**, 139-145 (2013).
 97. X. Kong, Z. Zhao, X. Lei, B. Zhang, D. Dai, L. Jiang. Interaction of metal ions with the His13-His14 sequence relevant to alzheimer's disease. *J. Phys. Chem. A*, **119**, 3528-3534 (2015).
 98. O. Yamauchi, A. Odani, M. Takani. Metal-amino acid chemistry. weak interactions and related functions of side chain groups. *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.*, **18**, 3411-3421 (2002).
 99. Y. Shimazaki, M. Takani, O. Yamauchi. Metal complexes of amino acids and amino acid side chain groups. Structures and properties. *Dalton Trans.*, **38**, 7854-7869 (2009).
 100. L. E. Hernandez, J. Sobrino-Plata, M. B. Montero-Palmero, S. Carrasco-Gil, M. L. Flores-Caceres, C. Ortega-Villasante, C. Escobar. Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress. *J. Exp. Bot.*, **66**, 2901-2911 (2015).
 101. J. L. Gardea-Torresdey, C. M. Rico, I. C. White. Tropic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 2526-2540 (2014).
 102. T. Suzuki, N. Yamazaki, Y. Sada, I. Oguni, Y. Moriyasu. Tissue distribution and intracellular localization of catechins in tea leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2683-2686 (2003).
 103. M. Grazul, E. Budzisz. Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones. *Coord. Chem. Rev.*, **253**, 2588-2598 (2009).
 104. M. M. Kasprzak, A. Erxleben, J. Ochocki. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Adv.*, **5**, 45853-45877 (2015).
 105. D. A. Porfirio, R. D. Q. Ferreira, A. R. Malagutti, E. M. A. Valle. Electrochemical study of the increased antioxidant capacity of flavonoids through complexation with iron(II) ions. *Electrochem. Acta*, **141**, 33-38 (2014).
 106. A. Torreggiani, Z. Jurasekova, S. Sanchez-Cortes, M. Tamba. Spectroscopic and pulse radiolysis studies of the antioxidant properties of (+)catechin: metal chelation and oxidizing radical scavenging. *J. Raman Spectrosc.*, **39**, 265-275 (2008).
 107. M. Elhabiri, C. Carrer, F. MarMe, H. Traboulsi. Complexation of iron(III) by catecholate-type polyphenols. *Inorganica Chim. Acta*, **360**, 353-359 (2007).
 108. C. Li, B. Xie. Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin

- oxypolymers. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6362-6366 (2000).
109. A. Yanagida, H. Murao, M. Ohnishi-Kameyama, Y. Yamakawa, A. Shoji, M. Tagashira, T. Kanda, H. Shindo, Y. Shibusawa. Retention behavior of oligomeric proanthocyanins in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1143**, 153-161 (2007).
110. R. L. Solsky. Ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, **60**, 106-113 (1988).
111. Y. G. Vlasov. New solid-state ion-selective electrodes – sensors for chemical analysis of solutions. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **335**, 92-99 (1989).
112. M. Li, D. Li, Y. Long. A hybrid method combining an electrochemical technique and fluorescence measurement for the highly selective and sensitive detection of Cd²⁺. *Anal. Methods*, **7**, 472-477 (2015).
113. X. Ma, S. M. Armas, M. Soliman, D. A. Lytle, K. Chumbimuni-Torres, L. Tetard, W. H. Lee. *In situ* monitoring Pb²⁺ leaching from the galvanic joint surface in a prepared chlorinated drinking water. *Environ. Sci. Technol.*, **52**, 2126-2133 (2018).
114. G. A. Crespo. Recent advances in ion-selective membrane electrodes for in situ environmental water analysis. *Electrochim. Acta*, **245**, 1023-1034 (2017).
115. C. Wardak, M. Grabarczyk. Analytical application of solid contact ion-selective electrodes for determination of copper and nitrate in various food products and drinking water. *J. Environ. Sci. Health*, **51**, 519-524 (2016).
116. J. M. Garcia-Mina. Stability, solubility and maximum metal binding capacity in metal-humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost. *Org. Geochem.*, **37**, 1960-1972 (2006).
117. H. R. Schulten, P. Leinweber. New insights into organic-mineral particles: composition, properties and models of molecular structure. *Biol. Fertil. Soils*, **30**, 399-432 (2000).
118. S. Ito, M. Morita. Quantitative determination of NTA and other chelation agents in detergents by potentiometric titration with copper ion selective electrode. *Anal. Sci.*, **32**, 1257-1261 (2016).
119. W. Liu, J. Huang, Y. Zhu, H. Zhang, N. Ning, C. Song. Potentiometric characterization of telomerase activity using a copper(ii)-pyrophosphate complex with a copper ion-selective electrode. *Anal. Lett.*, **52**, 353-362 (2019).

主論文目録

本論文に関連して下記の発表を行った.

1. Yukiko MORIWA, Naoko SUZUKI, Atsushi SHOJI, and Akio YANAGIDA; Analysis of complexation interactions between metal ions and drugs under pseudo-physiological pH condition by a high-throughput screening method using a solid-phase extraction cartridge. Anal. Sci., Accepted.