

紫外・可視微分分光法及び核磁気共鳴法による分光分析的薬学研究

北村 桂介

Derivative Spectrophotometric and NMR Spectroscopic Study in Pharmaceutical Science

Keisuke KITAMURA

Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchicho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received June 13, 2007)

This review starts with an introduction of derivative spectrophotometry followed by a description on the construction of a personal computer-assisted derivative spectrophotometric (DS) system. An acquisition system for inputting digitalized absorption spectra into personal computers and a BASIC program for calculating derivative spectra were developed. Then, applications of the system to drug analyses that are difficult with traditional absorption methods are described. Following this, studies on the interactions of drugs with biological macromolecules by the DS and NMR methods were discussed. An ^1H NMR study elucidated that the small unilamellar vesicle (SUV) has a single membrane made of a phosphatidylcholine bilayer, and that chlorpromazine interacts with both the outer and inner layers. ^{13}C NMR revealed a reduction of the dissociation constants of phenothiazine drugs due to their interaction with SUV. The partition coefficients of phenothiazine, benzodiazepine and steroid drugs in an SUV-water system and the effects of cholesterol or amino lipids content on these partition coefficients were examined by the DS method. The binding constants of phenothiazine drugs to bovine serum albumin (BSA) and the influence of Na^+ , K^+ , Cl^- , Br^- , and I^- on these binding constants were determined by DS. It was found that I^- , Br^- , Cl^- reduce the binding constants in this order, and that Na^+ and K^+ have no effect. A ^{19}F NMR study revealed that triflupromazine binds to BSA and human serum albumin in two regions including Site II with different populations, and that a nonsteroidal anti-inflammatory drug, niflumic acid, binds Sites Ia and Ib.

Key words—derivative spectrophotometry; NMR; interaction; liposome; serum albumin

1. はじめに

本総説は、筆者が京都薬科大学薬品分析学教室在職中に研究のテーマとしたものの中で、1) パソコンを利用する微分分光法の開発研究、2) 微分分光法の薬物分析への応用研究、3) 微分分光法及び核磁気共鳴 (NMR) を相補的に用いた薬物と生体マクロ分子 (リポソーム、血清アルブミン) との相互作用の解明、について記したものである。

筆者は 1975 年ごろから、NMR を用いて薬物とリン脂質リポソームとの相互作用について研究を進めていたが、その中で、リポソームの脂質二重膜に入った薬物の定量を行いたいと考えた。しかし、定量分析に一般的に用いられている吸光分析はリポ

ソームによる濁りや光散乱のため適用が困難であり思案していたところ、吸収スペクトルを波長で微分して得られる微分スペクトルでは、バックグラウンドの影響を消去できる可能性がある¹⁾ということが分かり、直ちに微分分光法の基礎研究に着手した。当時の分光光度計はアナログ式で、スペクトルの微分は微分回路を持つ電気微分計を用いる方式であり、筆者らも試作し薬物分析に用いた。一方、初期のパーソナルコンピュータがその頃に世に現れ、筆者はパソコンを利用したデジタル微分法の開発を開始した。その後、開発したデジタル微分システムの薬物分析への応用、及び、本法と NMR を相補的に用いて、薬物とリポソーム、血清アルブミンとの相互作用の解明研究を行ってきた。以下に、各テーマに沿って記述する。

2. パソコンを利用する微分分光法の開発研究

2-1. 微分分光法の概要²⁾ 紫外・可視吸光分析法は、古くから多くの領域で使用されている。し

京都薬科大学 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5)
現住所: (〒650-0004 神戸市中央区中山手通 7 丁目 13-5)

e-mail: kitamura@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、平成 18 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

かしながら、濁りのある試料や、複数成分試料でシグナルに重なりがある場合には適用が難しい。また、一般にシグナルの線幅が大きく、かつ形状はなだらかで特長が少なく、定性分析には向かない。そこで、吸光分析の利点を生かしながら、これらの弱点を改善する目的で登場したのが微分分光法である。

2-1-1. 微分スペクトルとは

2-1-1-1. 微分スペクトルの形状 吸収スペクトルを波長微分して得られる微分スペクトルは、どのような形状をしているのか、どのような性質を持つのかは、実際の吸収スペクトルの真の数学関数形を知ることは困難であるので、吸収スペクトルをガウス関数でシミュレートすることにより理論的に示すことができる。

Figure 1 (a) はシミュレーションによる吸収スペクトルで、Fig. 1 (b)–(e) はその 1 次–4 次微分スペクトルである。1, 3 次の奇数次の微分スペクトルでは元の吸収スペクトルの吸収極大波長 (λ_{\max}) で微分強度は 0 となり横軸 (波長) と交差する。したがって、 λ_{\max} やクロマトグラムのピーク位置などを

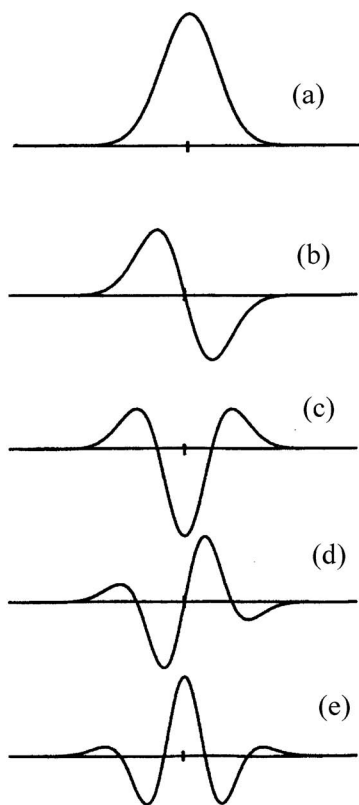


Fig. 1. Differentiation of an Analytical Band Represented by a Gaussian Curve

(a): An analytical band, (b)–(e): First to 4th derivatives of (a).

正確に求めるために、種々のソフトウェアで 1 次微分スペクトルが利用されている。偶数次の微分スペクトルでは最大微分値 (絶対値) の波長は λ_{\max} に一致するが、2 次微分スペクトルでは下に凸、4 次微分スペクトルでは上に凸となる。いずれも元の吸収スペクトルより中央の線幅が減少する。

2-1-1-2. 微分スペクトルの強度 (微分強度)

波長 λ における吸光度 $A(\lambda)$ は、モル吸光係数を $\epsilon(\lambda)$ 、 C 、 l をそれぞれ試料モル濃度 (M)、光路長 (cm) とすると、ベールの法則から、 $A(\lambda) = \epsilon(\lambda)Cl$ と表される。 $A(\lambda)$ を λ で n 回微分すると、

$$\frac{d^n A(\lambda)}{d\lambda^n} = Cl \frac{d^n \epsilon(\lambda)}{d\lambda^n}$$

が得られ、 λ における微分値、すなわち微分スペクトルの強度は微分次数 n に係わらず C と l に比例し、ベールの法則が保持されていることが分かる。したがって、吸光度と同様、微分強度を用いて定量分析が行える。

次に、微分スペクトルではどのような利点が得られるのかについて記す。

2-1-2. 微分スペクトルの利点

2-1-2-1. シグナル分離の向上 高さ及び半値幅が同じである 2 個のシグナルが強く重なり合った吸収スペクトルと、その 2 次微分スペクトルを Fig. 2 に示した。Figure 2 (a) の吸収スペクトルでは、1 個のピークにしかみえないが、Fig. 2 (b) の 2 次微分スペクトルでは 2 個のピークであることが明らか

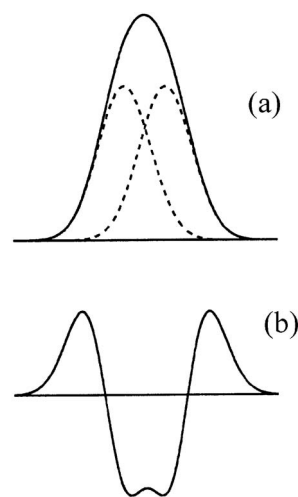


Fig. 2. Resolution Enhancement of Two Overlapping Bands by Second Order Differentiation

(a): Two overlapping bands, (b): Second derivative of (a).

になっている。4次微分スペクトルなどより高次の微分を用いればさらに接近したピークも分離される。このように微分スペクトルではシグナルの分離が改善される。

2-1-2-2. スペクトル情報の増強 ガウス関数によるシミュレーションから、 n 次微分スペクトルの最大微分強度（絶対値） D は、吸収スペクトルの半値幅 W の逆数の n 乗に比例することが示される。したがって、半値幅が W_1 と W_2 の2個の吸収スペクトルの n 次微分スペクトルにおける最大微分強度の比は、 $D_1/D_2=(W_2/W_1)^n$ となる。例えば Fig. 3の例のように、高さ比1:25、半値幅比1:5のA、B、2個のピークが存在する場合、吸収スペクトルではAのピークの存在はほとんど分からない。しかし、2次微分スペクトルでは2個のピークの最大微分強度の比は $(5/1)^2=25$ となり、Aのピークの強度はBのピークに比べて25倍増大する。Figure 3(b)のごとく、ピークAの存在が、2次微分スペクトルでは極めて明瞭に現れていることが分かる。このように微分スペクトルではスペクトルの持つ情報が選択的に強調されるため、吸収スペクトルではほとんど分からないようなシグナルの微細構造が顕著に出現してスペクトルの特徴が明確となり、化合物の同定、確認に有効に用いることができる。また、スペクトルのわずかな変化を強調して検出することができるため、種々の応用が期待される。

2-1-2-3. バックグラウンドシグナルの消去 試料溶液中の不溶成分による濁りや妨害物質による幅

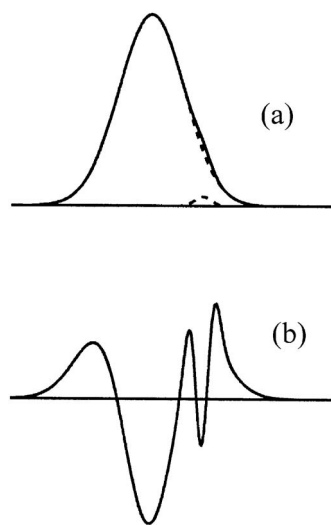


Fig. 3. Enhancement of Spectral Feature
(a): A band with a small shoulder, (b): Second derivative of (a).

広い吸収などのバックグラウンドシグナルが存在する場合において、バックグラウンドシグナルが Fig. 4(a)に示すように波長 λ に対して直線的 ($m\lambda+n$) であるとする、 λ による1回の微分では定数項 n は消去されるが、勾配の m が定数項として残るため、1次微分スペクトルは Fig. 4(b)のごとくベースラインが m だけずれた形になる。しかし、2回の微分では、 m も消去されるためバックグラウンドシグナルは完全に消去され、Fig. 4(c)に示すように成分のみの2次微分スペクトルが得られる。種々の要因によるバックグラウンドシグナルが全域を直線で近似できる訳ではないが、定量分析に必要な限られた波長領域であれば、ほとんどの場合2次微分処理により問題なくバックグラウンドシグナルは消去される。したがって、微分スペクトルを用いると濁った溶液や妨害物質による吸収が重なっている場合でも簡単に定量分析が行え、吸光分析の適用範囲が大幅に広がる事が分かる。

以上、微分分光法の概要について述べたので、次に、実際の吸収スペクトルから微分スペクトルを得る方法について筆者らの研究を中心紹介する。

2-2. 微分プログラムの作成とデジタルデータ取得装置の作製 最初に述べたように、1980年代は分光光度計に微分回路を持つ電気微分装置を接続

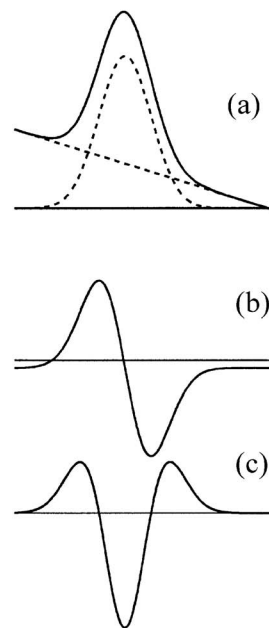


Fig. 4. Elimination of a Linear Matrix Interference
(a): A band with a linear matrix interference, (b)-(c): First and second derivatives of (a), respectively.

するアナログ微分法が広まった。⁴⁾ 筆者らも 1981 年に電気微分装置を自作し応用研究を行った。³⁾ しかし、1990 年頃には、マイクロプロセッサ内蔵の分光光度計が使用されるようになり、アナログ微分法の使用は減少した。

ところで、1980 年頃には BASIC 言語を搭載した初期のパーソナルコンピュータが現れた。現在のパソコンの性能とは比較にならないが、ある程度の数値計算や制御装置としての使用は可能である。そこで、筆者はアナログ微分法の薬物分析の研究を行うかたわら、パソコンを利用して Savitzky-Golay 法⁵⁾ に基づく数値微分（デジタル微分法）により微分スペクトルを得る方法の開発に着手した。

Savitzky-Golay 法は多項式近似法の一つで、デジタル化されたスペクトル上のある点 P における微分値を求めるには、P 点を中心に短波長側、長波長側に、それぞれ m 個ずつ（合計 $n=2m+1$ ）とり、この 1 組のデータ点を多項式（2-6 次）に近似する。すなわち、この 1 組のデータ点を最もよく通るように、その多項式の係数を最小二乗法を用いて求める。多項式の各係数が得られたら、P 点における微分値は直ちに計算できるから、順次 P 点をずらして同様の操作を行っていけば微分スペクトルが得られる。

Savitzky-Golay 法の特長は、データ点の間隔を実際の波長の値ではなく常に 1、P 点の横座標を 0 と置き換えて計算することであり、これによって微分値の計算は極めて単純化する。すなわち、近似多項

式の次数、微分次数、1 点の微分値の計算に用いるデータ点の個数 (n) によって定まる n 個の整数値列 $a_{s,i}$ を対応するデータ点の吸光度 A_i に乗じて加え合わせる（コンボリューション）ことによって微分値 D が計算される。⁵⁾

筆者はこの Savitzky-Golay 法に基づくスペクトルの波長微分プログラムを BASIC 言語で作成した。⁶⁾ また、当時の分光光度計は上述のようにアナログ装置であるから、スペクトルをデジタル化してパソコンに入力する必要がある。アナログ-デジタル変換ボードや手製の増幅器等を組み込んだデジタルスペクトルデータ取得システムも作製した。⁶⁾ 当時の BASIC 言語では 1 秒以下の制御はサポートされていないので、この部分のプログラムは機械語で組まれている。デジタルスペクトルデータ取得システムのフローチャートを Fig. 5 に示す。⁶⁾

2-2-1. 紫外・可視吸収スペクトルに対するデジタル微分条件の設定⁶⁾ 作成した微分プログラムを実際の紫外・可視吸収スペクトルに適用するには、まず、近似多項式の次数を定める必要がある。そこで、3 次式及び 5 次式を候補として検討した。Figure 6(a) は、波長校正に用いられるジジムフィルターの紫外・可視吸収スペクトルをデジタルスペクトルデータ取得システムを用いて得たものである。Figure 6(b) and (c) は、Fig. 6(a) の吸収スペクトルに対しそれぞれ 5 次式近似、3 次式近似を用いて求めた 2 次微分スペクトルである。すべてのピークについて 5 次式近似と 3 次式近似で形状に差は認めら

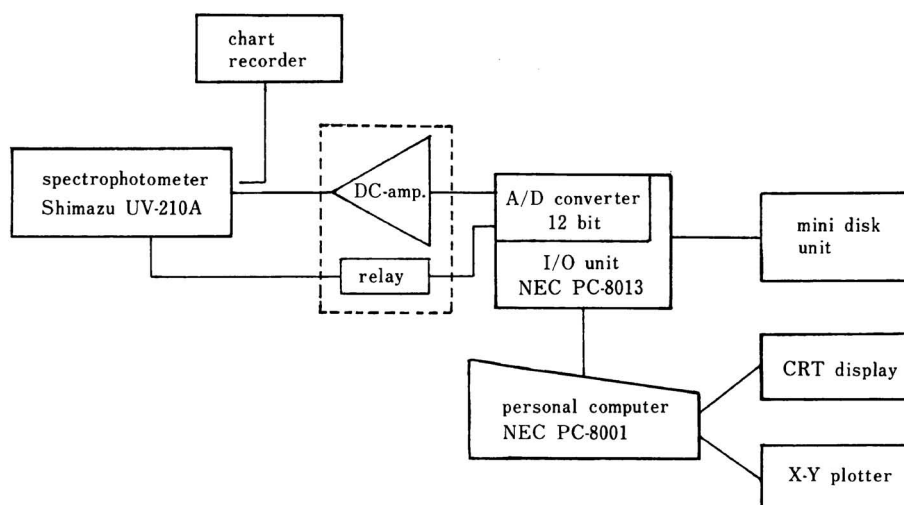


Fig. 5. The Personal Computer Based Digital Spectral Data Acquisition System

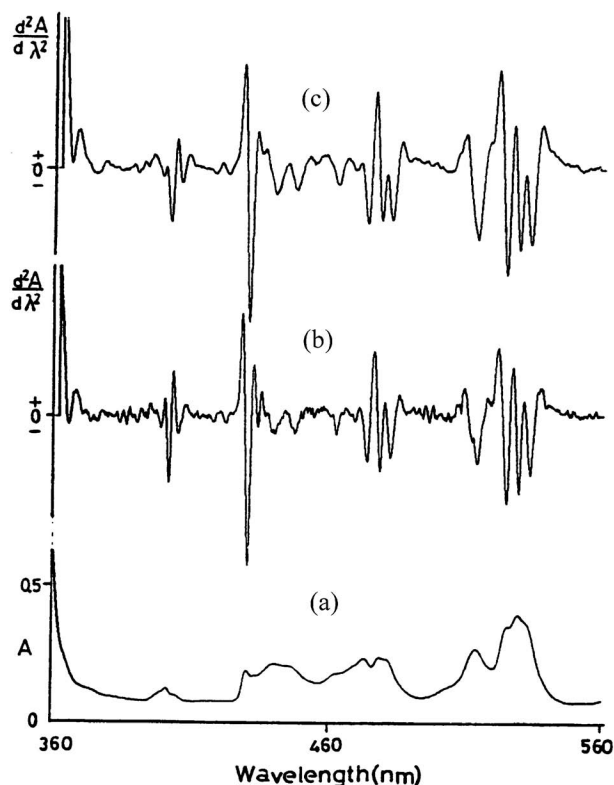


Fig. 6. Dependence of Degree of Polynomials on a Second-derivative Spectrum

(a): Absorption spectrum of a didymium filter, (b)–(c): Second-derivative spectra of (a) obtained by Savitzky-Golay method using quintic (b) and cubic (c) polynomials, respectively.

れず、5次式近似の方がノイズレベルが高くなっていることから、紫外・可視吸収スペクトルに対しては、3次式近似が適切であると判断した。⁶⁾

また、3次式近似に比して5次式近似の方がノイズレベルが高くなる理由について理論的な考察を行った。⁷⁾

次に、データ点数 n 、データ点間の間隔 $\Delta\lambda$ を定める必要があるが、1点の微分値を求めるについて $(n-1)\Delta\lambda$ の範囲のスペクトルを3次式で近似することになるから、 n と $\Delta\lambda$ を個別に検討する必要はなく、筆者は、データ点数 n を17点に固定し、 $\Delta\lambda$ を変化させて検討した。⁶⁾

Figure 7はサリチル酸エタノール溶液を試料として上述のシステムでデジタルスペクトルを取得、その2次微分スペクトルを $\Delta\lambda=0.25\text{--}2\text{ nm}$ の範囲で変化させて計算したものである。比較のため5次式近似の結果も示した。Figure 7より、3次式近似では $\Delta\lambda$ は 0.5 nm 、5次式近似では 0.75 nm が分解能、SN比の両方に優れていることが分かる。したがっ

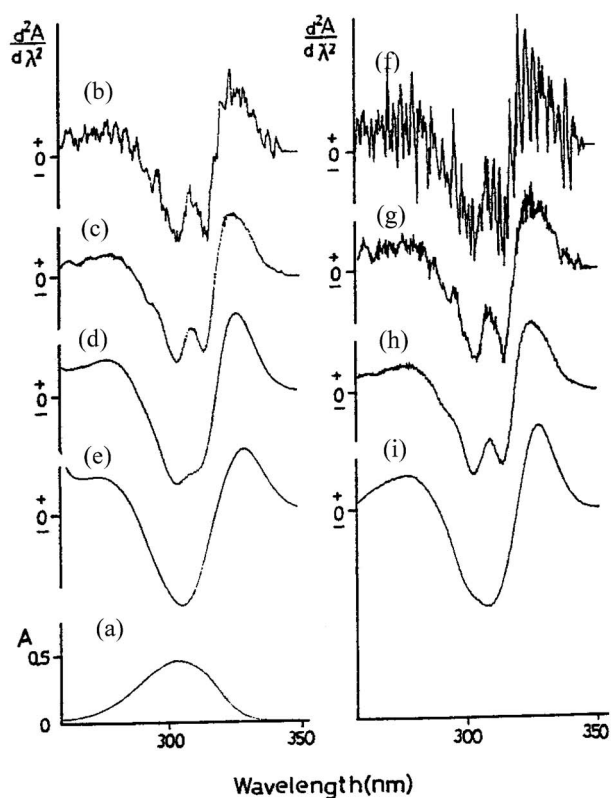


Fig. 7. Effect of $\Delta\lambda$ on the Second-derivative Spectrum of Salicylic Acid in Ethanol

(a): Absorption spectrum of salicylic acid, (b)–(e): Second-derivative spectra of (a) obtained by cubic polynomial convolutions with $\Delta\lambda$ of 2.5 (b), 5.0 (c), 1.0 (d), 2.0 (e) nm, respectively, (f)–(i): Second-derivative spectra of (a) obtained by quintic polynomial convolutions with $\Delta\lambda$ of 2.5 (f), 5.0 (g), 1.0 (h), 2.0 (i) nm, respectively.

て、紫外・可視スペクトルの微分スペクトルを求めるには、3次式近似を用いて、 $\Delta\lambda$ は 0.5 nm 、あるいは $(n-1)\Delta\lambda$ で設定するなら、 $(17-1)\times 0.5=8$ を基準に適宜増減した値を用いればよいという結論を得た。⁶⁾

2-2-2. 平滑化処理 (スムージング) 次に、微分スペクトルのノイズを軽減するために平滑化処理 (スムージング) について検討した。⁸⁾ スムージングを行うとノイズは減少するが、分解能は悪くなり、ときにはシグナルの劣化を招く危険性があり、どの程度のスムージングが適切かを把握しておく必要がある。詳細は略すが Savitzky-Golay 法では、0次微分の演算を行うことがスムージング処理に当たる。

Figure 8にサリチル酸エタノール溶液のスペクトルにスムージング処理を適用した結果を示した。Figure 8にみられるように、スムージング処理は有効に働いてノイズは減少しており、かつ線幅の増加

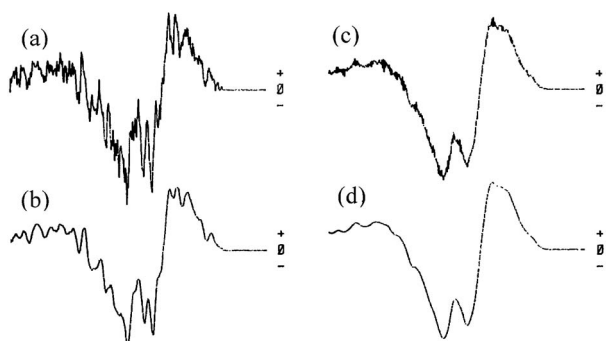


Fig. 8. Effect of Digital Smoothing on a Second-derivative Spectrum of Salicylic Acid in Ethanol

(a): Second-derivative spectrum obtained by the quintic polynomial convolution, (b): Smoothed spectrum of (a), (c): Second-derivative spectrum obtained by the cubic polynomial convolution, (d): Smoothed spectrum of (c).

やシグナル高さの減少などの劣化は生じていないので、スムージング処理が有用であることが示された。⁸⁾

上述のごとく、紫外・可視分光光度計からデジタルデータを取得するシステムを作製し、微分演算処理を行うプログラムを作成、さらに演算処理上のパラメータの適切な値を定め、パソコンを利用して紫外・可視微分スペクトルを得るトータルなシステムを構築することができた。⁶⁾ そこで、このシステムを用いて、従来の吸光分析では満足な結果が得られなかった種々の薬物分析への応用を試みた。以下にその結果を記す。ただし、一部はアナログ微分で行ったものも含まれている。

2-3. 薬物分析への応用

2-3-1. アスピリン原薬、製剤中の微量サリチル酸の定量 アスピリン中のサリチル酸はサリチル酸が粘膜障害を起こすことから、原薬については局方ではその含量が0.05%以下と定められていた。しかし、その正確な定量はHPLCを用いてもかなり困難である。なぜなら、0.05%のような微量のサリチル酸は試料溶液を作成する段階でのアスピリンの加水分解によって容易に生じ、かつ逆相クロマトグラフィーの溶離液は水を含んでいるため溶離液中での加水分解も無視できない。

筆者らは自作の電気微分装置を用いた2次微分分光法により、アスピリン共存のままで、含量0.005%のサリチル酸の定量を可能にした。³⁾ すなわち、数千倍も存在するアスピリンの吸収帯のすその部分にサリチル酸のシグナルが重なっているが、2次微

分することによりアスピリンの吸収帯のすその部分の影響は消去され、アスピリンの濃度の影響を全く受けず定量が行えた。本法は、アスピリン原薬を加水分解を抑えるためのクエン酸を含むエタノールに溶解し、微分スペクトルを測定するだけでよく、極めて簡便で短時間に行える。筆者らの報告後もHPLCによる研究報告が続いているが、⁹⁾ 20年後の2003年の報告¹⁰⁾においても、正確さ、簡便さともに、筆者らの微分分光法を上回るとは言い難い。

一方、製剤の分析は通常、製剤添加物を除くため製剤からの薬物の抽出が必要である。この抽出物について吸光分析、HPLC分析等が行われる。しかしながら、微分分光法においては濁り等によるバックグラウンド吸収の影響を受けないため、単に試料を測定溶媒に溶解するだけで測定が可能となる。したがって、操作が極めて短時間でかつ誤差を伴う抽出等の前処理が不要なため正確な定量値を得ることが容易である。筆者らはアスピリン製剤（錠剤）中のアスピリンと不純物のサリチル酸の同時定量を、錠剤を粉碎後溶媒に溶解した試料溶液の2次微分スペクトルを用いて行った。¹¹⁾ Figure 9(a)に示すように、吸収スペクトルの吸光度（図中のA）では不溶の錠剤添加物の濁りによる大きな吸収とアスピリンの吸収帯のすその部分がバックグラウンドシグナルとなってサリチル酸のピークと重なっている。しかしFig. 9(b)の2次微分スペクトルでは完全にバックグラウンドシグナルが消去されているため、図中のDからサリチル酸の正確な定量が行えた。¹¹⁾

また、座薬については、HPLC分析では大量に存在する座薬基材と薬物を分離する必要があり、時間と労力を要するほか、分離処理中のアスピリンのサリチル酸への加水分解を抑える工夫が不可欠である。しかしながら、2次微分分光法では座薬をそのまま試料溶媒に溶解し2次微分スペクトルを測定することによって、基材に基づくバックグラウンドシグナルは消去され正確な定量が可能となった。¹²⁾

以上のごとく、アスピリン製剤を例として、製剤分析において2次微分分光法は分離手段を必要とせず定量できる簡便で優れた手法であることを実証した。

2-3-2. その他の製剤分析 薄層クロマトグラフィー（TLC）は多成分系試料の分離や純度の検定に多用される簡便な分析手段であるが、定量分析

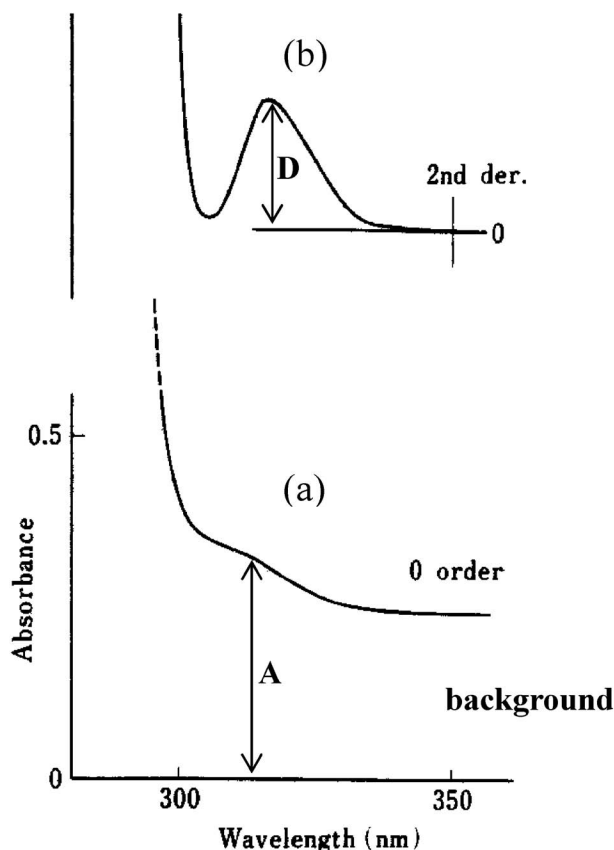
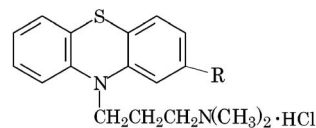


Fig. 9. Absorption (a) and Second-derivative (b) Spectra of an Ethanol Solution of Aspirin with Tablet Excipients

には、デンストメーターやスポットのスキヤニング、あるいは掻き採りスポットの溶媒抽出物の吸光分析が適用される。筆者らは掻き採りスポットを測定溶媒に溶解し、固定相粉末が浮遊したままで微分分光法を用いて錠剤中のイソニアジド定量を行い、微分分光法が TLC スポットの簡便で正確な定量法として活用できることを示した。¹³⁾

近年、筆者らは、FT-ラマンスペクトルによる製剤中の結晶多形の分析にも微分スペクトルが有効であることを示した。¹⁴⁾

2-3-3. 微分スペクトルのカーブフィッティングによる製剤中の 2 成分の同時定量¹⁵⁾ 2 成分同時定量の例として、アスピリン-カフェイン散剤について検討した。製剤添加物除去の前処理を行わず、試料を直接測定溶媒に溶解した濁りのある測定液の 2 次微分スペクトルには濁りによるバックグラウンド信号の影響は除かれている。しかし、アスピリンとカフェインのスペクトルの重なりは強く、2 次微分スペクトルにおいても分離したシグナルは得ら



R=H: PZ, R=Cl: CPZ, R=CF₃: TFZ

Fig. 10. Chemical Structures of Phenothiazine Drugs

れない。そこで、2 次微分スペクトルについてカーブフィッティングを行うことにより、両薬物の定量ができた。¹⁵⁾

このように、製剤中の 2 成分の同時定量においても、抽出操作をすることなく、2 次微分スペクトルのパソコン処理で同時定量が行えることを示した。

2-3-4. 難溶性薬物の酸解離定数 (pK_a) の測定¹⁶⁾ 微分分光法は定量分析法としてだけでなく、難溶性薬物の酸解離定数 (pK_a) の測定にも有効である。筆者らは水に難溶性の 3 種のフェノチアジン系薬物 (Fig. 10), chlorpromazine (CPZ) hydrochloride, promazine (PZ) hydrochloride, triflupromazine (TFZ) hydrochloride の pK_a を 2 次微分スペクトルを用いて測定した。

薬物には CPZ · HCl のように弱塩基の塩酸塩であるものがかなり存在するが、CPZ · HCl は水溶液中で、 $CPZ \cdot HCl \rightleftharpoons CPZH^+ + Cl^-$ で示される解離平衡にある。すなわち、CPZ では $-N(CH_3)_2$ 基がプロトン化されて $-N^+H(CH_3)_2$ となる。 $-N^+H(CH_3)_2$ はさらにその一部が加水分解されて $-N(CH_3)_2$ と H^+ に解離する。生体膜を透過できるのは $-N(CH_3)_2$ を持つ中性の分子型であるので、分子型の存在量を決定する解離定数 pK_a は薬物の重要な物性値である。

一般に pK_a の測定は水溶液中で電位差滴定により行われるが、CPZ のように分子型の溶解度が低い場合は pH が高くなると分子型が増加し不溶となって析出するため、滴定の続行が不可能になる。このためエタノール等の水溶性有機溶媒を加えた混合水溶液中で滴定が行われているが、このときの pK_a 値は加えた有機溶媒の種類や量によって水溶液中の値とは異なってしまふ。そこで筆者らは以下の理論に基づき 2 次微分分光法を適用し、簡便で正確な pK_a 測定法を開発した。¹⁶⁾

いま、CPZ の分子型の溶解度 (飽和濃度) を S_0 [M]、分子型とイオン型合計の溶解度を S [M]、解

離定数を K_a とすると、溶液中の水素イオン濃度 $[H^+]$ に対し、 $S=S_0[H^+]/K_a+S_0$ の関係がある。¹⁶⁾ したがって、種々の pH における CPZ の溶解度 S を測定すれば、上式から K_a 及び S_0 を求めることができる。しかし、 S を求めるため、ある pH の緩衝液に CPZ を過剰に加え飽和させると、不溶の CPZ は油滴となって析出するため試料溶液に濁りを生じ、Fig. 11 (a) に示すようにバックグラウンドシグナルのためベースラインが上昇する。このため、吸光度を用いて溶解している CPZ の濃度 S を求めることはできない。そこで、このスペクトルに 2 次微分処理を行うと、Fig. 11 (b) に示すようにバックグラウンドシグナルは消失してベースラインは 0 を通り、濁りによる影響が除去される。Figure 11 (b) の微分値 D は S に比例するから、上式は $D=D_0[H^+]/K_a+D_0$ と書き換えられ、 $[H^+]$ と D は直線関係を示すから、切片と勾配から D_0 と K_a が得られる。実測した $[H^+]$ と D をプロットしたところ良好な直線が得られ、極めて再現性よく K_a (pK_a) を求めることができた。

2-3-5. ゼロ点交差法による CPZ と β -cyclodextrin の包接結合定数の測定¹⁷⁾ Figure 1 に示したように微分スペクトルには横軸と交差する点 (ゼロ点) がある。この点では微分強度は 0 であるから、ある物質について濃度を変えて微分スペクトルを測定しても濃度に係らずすべてこのゼロ点を通過す

る。したがって、2 成分からなる試料溶液の微分スペクトルを測定した場合、両成分のゼロ点が一致しない限り、一方のゼロ点における微分強度は他方の成分のみの微分強度を表す。これらのゼロ点での微分強度を用いれば、2 成分の同時定量が可能となる。¹⁸⁾ このように微分スペクトルのゼロ点を利用する方法をゼロ点交差法 (zero-crossing method) という。

筆者らはゼロ点交差法を用いて chlorpromazine の β -cyclodextrin による包接の結合定数を求めた。¹⁷⁾ 本法は、chlorpromazine に限らず、cyclodextrin に包接されることにより吸収スペクトルに変化が生じる多くの薬物の結合定数の測定に簡便に適用できる方法である。

以上、筆者はパソコンを利用したデジタル微分法を開発し、その結果に基づき従来の紫外・可視吸光分析では困難であった種々の薬物分析に応用することにより、吸光分析の適用範囲を大きく拡大することができた。

3. 微分分光法及び NMR 法による薬物—リポソーム相互作用の解明研究

リン脂質、特に phosphatidylcholine (PC) は生体膜の主要構成物質であり、生体膜は PC による二重膜を基本構造としていることはよく知られている。PC を水中に分散させると同心円状の多層の二重膜からなる large multilamellar vesicles (LMV) を生じ

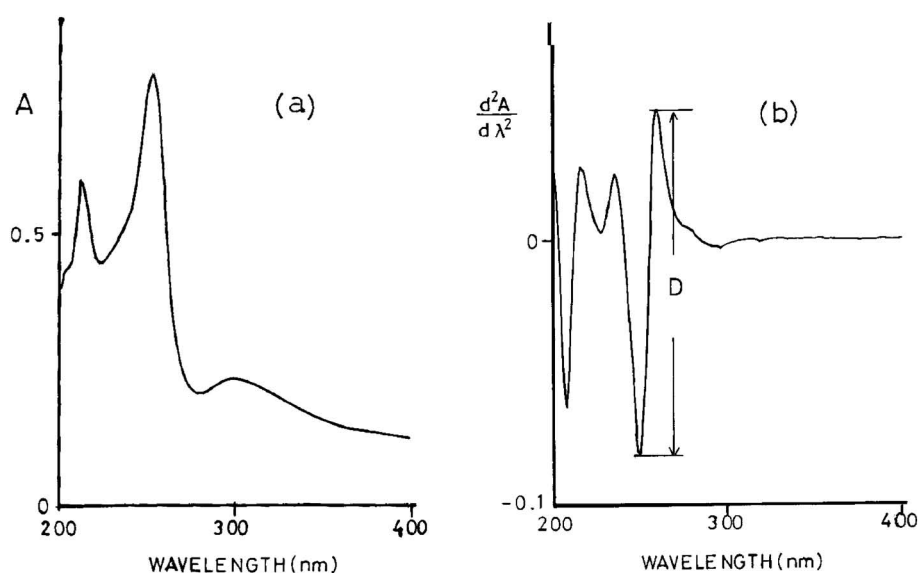


Fig. 11. Absorption (a) and Second-derivative (b) Spectra of a Turbid Sample Solution Prepared by Adding an Excess Amount of CPZ · HCl to a Buffer of pH 9.30

る。LMV 懸濁液に超音波処理を行うと、直径が約 20 nm で、生体膜と同様の一層の二重膜からなる小胞 small unilamellar vesicles (SUV) が生じる。LMV, SUV はリポソームと総称されているが、生体膜モデルとして用いられるのは SUV である。

薬物は生体に投与されると吸収、組織移行において生体膜を通過するが、多くの薬物は生体膜を受動輸送される。したがって、脂質二重膜との相互作用は薬物の生体との相互作用の基本的なものであり、強く興味を持たれるところである。

3-1. NMR による研究

3-1-1. ^1H NMR

3-1-1-1. フェノチアジン系薬物と PC リポソームの相互作用の解明 筆者は 1975 年ごろから SUV を用い、フェノチアジン系薬物をモデル薬物として、薬物と生体膜の相互作用について、NMR による研究を続けてきた。Chlorpromazine (CPZ) を代表とするフェノチアジン系薬物は向精神薬として古くから広く用いられている薬物であり、薬効とは別に生体膜への直接的な作用も知られている。

Figure 12(a) は 60 MHz の装置で測定した重水中の PC SUV の ^1H NMR スペクトルである。SUV は多数の PC 分子からなる分子量 200 万程度のマクロ分子であるが、SUV を形成している PC の脂肪酸鎖の methylene 基、末端の methyl 基、及び choline methyl 基がシグナルとして観測されている。¹⁹⁾

この試料溶液にシフト試薬である Eu^{3+} を加えると (Fig. 12(b)), PC 二重膜は Eu^{3+} を透過させないので、 Eu^{3+} は二重膜の外側の PC 層 (厳密には負電荷を帯びているリン酸残基) のみに接近し、外側の PC の choline methyl を高磁場シフトさせる。一方、内側の choline methyl 基は Eu^{3+} が近づき得ないのでシフト変化は起こらず、結果として Fig. 12(b) のごとく choline methyl は外側 (高磁場側) と内側の 2 本に分裂する。すなわち、SUV が二重膜構造であることを ^1H NMR スペクトルで証明できた。¹⁹⁾

Figure 13 は Eu^{3+} を含む Fig. 12(b) の試料溶液に CPZ を順次添加した場合の choline methyl の ^1H NMR シグナルを示している。CPZ の添加に伴い外側の choline methyl が示す高磁場側のシグナルは低磁場へ移動し、ついには元の 1 本のシグナルに戻っている。これは添加した CPZ が PC SUV 表面

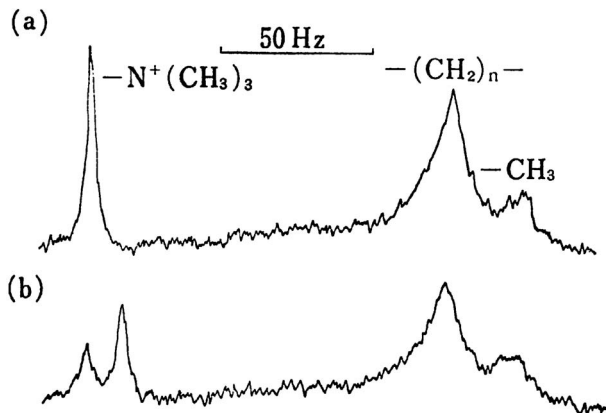


Fig. 12. ^1H NMR Spectra of PC SUV in D_2O in the Absence (a) and Presence (b) of 9.6 mM Eu^{3+}

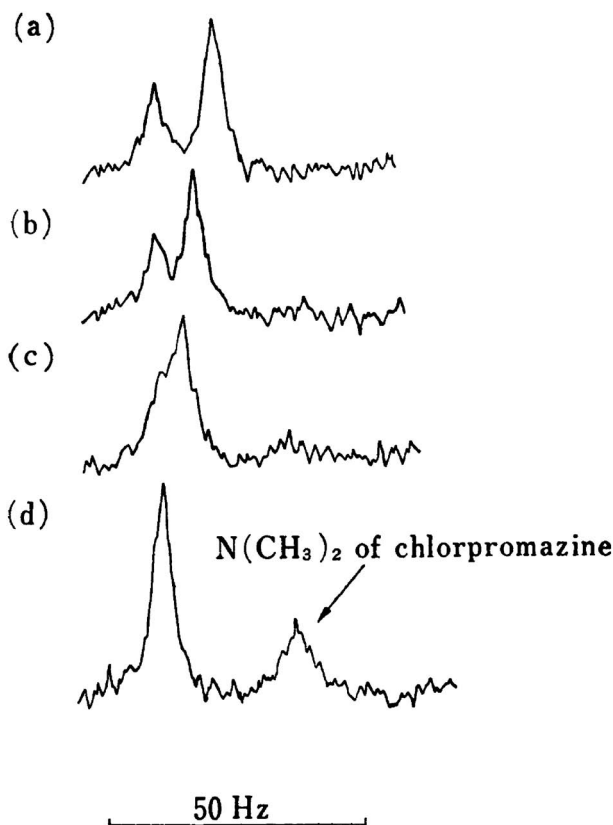


Fig. 13. Effect of CPZ on the ^1H NMR Signal Splitting of Choline Methyl of PC SUV in a D_2O Solution Containing 9.6 mM Eu^{3+}

CPZ concentrations (mM): (a) 0, (b) 4.9, (c) 11, (d) 21.

に相互作用し、SUV 表面から Eu^{3+} を排除したことを示している。このことから、CPZ が SUV 表面に直接相互作用していることが証明された。¹⁹⁾

さらに、筆者らは低磁場シフトを誘起する Pr^{3+} を内液に含有し、高磁場シフトを誘起する Eu^{3+} を

外液に含む PC SUV 試料を作製した. この試料溶液に順次 CPZ を添加して ^1H NMR (100 MHz) を測定すると, 低磁場シフトした内側の choline methyl と高磁場シフトした外側の choline methyl の両シグナルは CPZ 濃度依存的に元の位置に移動することを見出した. このことによって, CPZ は二重膜を透過して内側の PC 相とも相互作用することを明らかにした.²⁰⁾

その後, 超伝導磁石 NMR の登場によりリポソームのより高分解能な NMR スペクトルが得られるようになり, また種々の多重共鳴手段が紹介された. 筆者らは CPZ と PC SUV の相互作用に関して, ^1H - ^1H NOE (Nuclear Over Hauser Effect) を 200 MHz の装置で測定し, CPZ のフェノチアジン環は二重膜構成 PC 分子のカルボニル基に隣接する α -methylene にまで及んでいること, また $-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$ 基は PC SUV のリン酸エステル基と相互作用していることを明らかにした.²¹⁾

3-1-1-2. アルミニウムと PC 二重膜との相互作用 アルミニウムはアルツハイマー病の原因の 1 つであるとする説があり, それに関連して, 生体内において脂質の過酸化を促進するという報告もある.²²⁾ しかし, Al^{3+} が生体膜と直接相互作用をすかどうかについては不明であった. 筆者は上述と同様にシフト試薬 Eu^{3+} により内側と外側の 2 本に分裂した PC リポソームの choline methyl シグナルが, 種々の金属イオンを添加した場合に外側の choline methyl シグナルが元の位置へ戻る度合でもって各金属イオンの PC 二重膜との相互作用の大きさを比較した. その結果, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} はほとんどシグナルに変化を生じなかったもので, これらの金属イオンは PC 二重膜と直接には相互作用しないことが確認されたが, Al^{3+} は濃度依存的に外側の choline methyl の高磁場シフトを減少させたため, Al^{3+} が PC 膜と直接相互作用することが実証された.²³⁾

3-1-2. ^{13}C NMR ^{13}C NMR は ^1H NMR よりもシグナルの分離がはるかによいので, 詳細な知見が得られる. Figure 14 に PC SUV の ^{13}C NMR (20 MHz) スペクトルを示したが, ^1H NMR に比べて高分解能スペクトルであることが分かる. 特に ^1H NMR では得られない PC 分子の脂肪酸鎖のカルボニル炭素が観測されている. 筆者らは

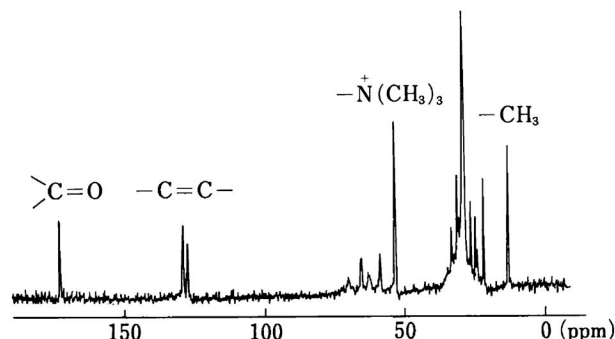


Fig. 14. ^{13}C NMR Spectrum of PC SUV in D_2O

^1H NMR と同様にシフト試薬を使用して, CPZ との相互作用がリポソーム二重膜を構成している PC 分子のカルボニル基に及んでいることを確認した.²⁴⁾

3-1-2-1. PC 二重膜と相互作用しているフェノチアジン系薬物の pK_a の測定 前述の 2 次微分スペクトル法により, フェノチアジン系薬物の pK_a が 9.4 近辺であることを明らかにしたが,¹⁶⁾ この値から計算すると, 生理的 pH である pH 7.4 の溶液中のフェノチアジン系薬物は 99% 近くがイオン型 (カチオン) である. しかし, PC 二重膜を通過できるのは電荷を持たない中性の分子であるとされているにも関わらず, 前述の NMR の結果では, CPZ は PC 二重膜を容易に通過して内側 PC 層とも相互作用している.²⁰⁾

一方, 同じ NMR の結果¹⁹⁻²¹⁾ から PC リポソームと相互作用しているフェノチアジン系薬物の $-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$ 基は膜表面近傍に存在することが分かっている. したがって, $-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$ 基の存在する環境はバルクの水相とは異なっており, このような状況のフェノチアジン系薬物の pK_a は水中における値と異なるのではないかと考えられる. そこで PC リポソームと相互作用しているフェノチアジン系薬物の pK_a を測定することを考えた.

通常, pK_a は電位差滴定で測定されるが, PC リポソームと相互作用している薬物を電位差滴定することは困難である. そこで, $-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$ 基の ^1H あるいは ^{13}C NMR の化学シフトが $-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$ の解離状態によって異なることを利用して, 試料溶液 (緩衝液) の pH とその化学シフトの関係から pK_a 値を求めることを企図した.^{25,26)} ここでは, ^{13}C NMR の場合について述べる.

まず、薬物に比して多量に存在する PC リポソームのシグナルの中から薬物のシグナルを観測するために、 $-N(CH_3)_2$ 基の 1 個の CH_3 基を ^{13}C でラベルした 3 種のフェノチアジン系薬物、 ^{13}C -CPZ, ^{13}C -triflupromazine (TFZ), ^{13}C -promazine (PZ) を合成した。²⁷⁾ また、重水を混合した水溶液中の pH 値は通常の水溶液中での値と若干のずれがあるため²⁵⁾、外部ロックを用いて、重水を全く含まない完全な水溶液 (緩衝液) を用いて ^{13}C NMR を測定した。

Figure 15 に PC リポソーム緩衝液 (pH 7.4) 中の ^{13}C -PZ (200 μM) の ^{13}C NMR (75 MHz) スペクトルを示した。内部基準には、試料溶液の pH の影響を受けないことと、基準物質添加による試料溶液への影響を避けるため、リポソームを構成している PC 分子の脂肪酸鎖の末端 CH_3 -基のシグナルを用いた。Figure 15 において、30 ppm 近傍のシグナルが ^{13}C -PZ の *N*-dimethyl 基である。また、40 ppm 近傍の強いシグナルは PC の choline methyl 基によるものである。²⁶⁾

PC 二重膜と相互作用している ^{13}C -フェノチアジン系薬物の *N*-dimethyl 基の化学シフトについて、試料溶液の pH を低くしてすべてがプロトン化されたときの化学シフトを S_c 、pH を高くしてすべてが非プロトン化されたときの化学シフトを S_n とすると、ある pH における *N*-dimethyl 基の化学シフト

S_o は、プロトン化と非プロトン化の間のプロトン交換速度が ^{13}C NMR (75 MHz) において十分早い場合、 $S_o = P_c \cdot S_c + P_n \cdot S_n$ と表される。ここで、 P_c 、 P_n はそれぞれ相互作用している ^{13}C -フェノチアジン系薬物のプロトン化、非プロトン化している分子数の割合 (分率) である。次に、 pK_m を PC 二重膜と相互作用している ^{13}C -フェノチアジン系薬物の解離定数とすると、 S_o は次のように表すことができる。²⁶⁾

$$S_o = (10^{-pH} \cdot S_c + 10^{-pK_m} \cdot S_n) / (10^{-pH} + 10^{-pK_m})$$

上式に非線形最小二乗法を適用した BASIC 言語によるプログラムを作成し、試料溶液の pH 値と S_o の実測値を用いて pK_m の値を求めた。Figure 16 は試料溶液の pH 値と S_o の実測値をプロットしたものであり、実線は得られた pK_m を上式に代入して描いた理論曲線である。各実測値は理論曲線上に乗っており、得られた pK_m 値が妥当なものであることを示している。

3 種のフェノチアジン系薬物について得られた pK_m 値は、いずれも水溶液中の pK_a 値よりも約 1 低下することが明らかとなった。²⁶⁾ すなわち、pH 7.4 においては PC 二重膜に侵入したフェノチアジン系薬物の中性分子型は、水溶液中の pK_a 値から

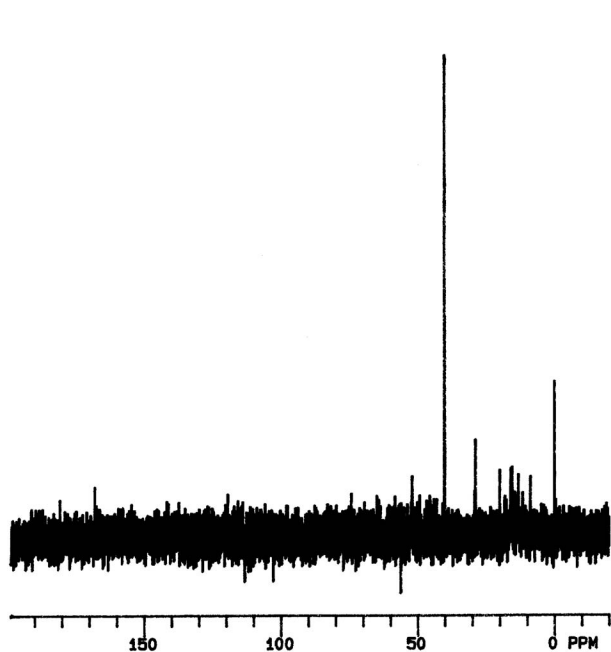


Fig. 15. ^{13}C NMR (75 MHz) Spectrum of 200 μM ^{13}C -PZ in Phosphate Buffer (pH 7.4) containing 27 mM PC SUV at 21 $^{\circ}C$

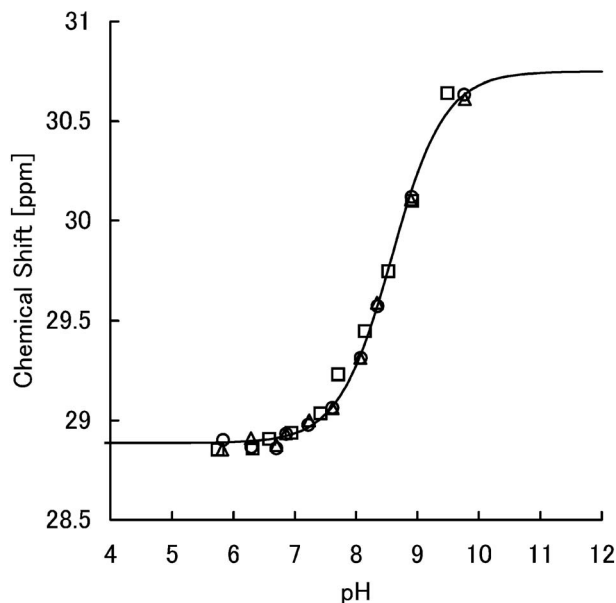


Fig. 16. ^{13}C NMR Titration Curve of ^{13}C -PZ

The solid line shows the theoretical curve calculate from the equation in the text using the obtained pK_m , S_c and S_n values. The symbols indicate the experimental values obtained with ^{13}C -PZ concentrations of 200 μM (O), 400 μM (□), 600 μM (Δ).

予測されるよりも約 10 倍多いことになる。このことは、フェノチアジン系薬物が容易に PC 二重膜を透過できることを説明している。

このように、リポソームと相互作用している各フェノチアジン系薬物の pK_a 値が約 1 低下したことは、*N*-dimethyl 基が存在する PC 二重膜表面近傍の誘電率が水相よりも低いことに起因すると考えられた。^{28,29)}

一方、コレステロールを 30% 含む PC リポソームを用いて同様の実験を行ったが、 pK_m 値は PC のみの場合とそれほど変化しない結果が得られた。²⁶⁾ このことは、PC 二重膜の表面近傍の誘電率はコレステロールが含まれていても変わらないことを示している。

NMR を用いた研究からフェノチアジン系薬物と PC 二重膜の相互作用についてこれまでに述べたような詳細な知見が得られたが、試料溶液中に加えたフェノチアジン系薬物のどれくらいの割合が二重膜と相互作用しているのか、すなわち PC 二重膜中に存在する CPZ の量については情報が得られていない。そこで、前述した 2 次微分分光法による α -シクロデキストリンとの結合定数の測定手法をリポソームに拡張することを考えた。

3-2. 微分分光法による研究

3-2-1. 2 次微分分光法による薬物のリポソーム-水系分配係数の測定法の開発 薬物と生体膜との親和性を評価する指標に *n*-octanol/水系における分配係数から得られる $\log P$ 値が広く用いられている。 $\log P$ 値は電荷を持たない中性の薬物に対してはよい指標であるが、 pH 7.4 付近でイオン化しているような薬物に対しては、生体膜と同じ基本構造を持つ PC リポソームに対する薬物の分配係数の方が相関性が高いと考えられている。^{30,31)} また、リポソームを生体膜モデルとしてではなく、DDS 担体として用いる場合にも、リポソームに対する薬物の分配係数は脂質層にどれ位の薬物が含有されるかを示す重要な値である。

リポソームに対する薬物の分配係数の測定には、バルク水相中若しくはリポソーム二重膜中のいずれかの薬物濃度を測定する必要がある。このため一般に超遠心分離や平衡透析などの分離手段が取られている。しかしながら、前者は水相に脂質成分が残ることや、操作中に平衡が保たれているかどうか疑

念が残る場合もあり、また後者は長時間を要し、かつ分離膜への薬物の吸着が問題となることがある。

これに対し、薬物の吸収スペクトルに水相と油相（リポソーム二重膜中）とで差がある場合（メタクロマジー現象）、リポソーム量とそれに依存したスペクトルの変化量（ある波長における吸光度）の関係から分配係数を求めることができる。³²⁾ この場合、吸光度の測定波長において、リポソームによる光吸収や光散乱の影響が完全に除去されていることが前提である。しかしながらリポソームによる光散乱は極めて大きく、対照溶液による光散乱の完全な相殺は困難な場合が多い。

Figure 17(a)は CPZ の緩衝液にリポソーム (PC SUV) を順次添加したときの紫外吸収スペクトルである。³³⁾ 試料溶液、対照溶液両方に同量の PC SUV を添加したにも係わらず、上述のようにリポソームの強い光散乱のため完全な相殺が達成されておらず、ベースラインが若干上下しており、したがって等吸収点も観測されない。これに対し、Fig. 17(b)に示した 2 次微分スペクトルでは、明確な等微分強度点 (derivative isosbestic point) が 3 個観測され、ベースラインの影響が完全に除去されていることを示している。³³⁾

なお、1990 年にパソコンの通信プロトコルである RS-232C を用いてデジタルスペクトルデータをパソコンに転送するシステムを構築したので、以後は吸収スペクトルデータのパソコンへの取得はこのシステムを用いて行った。³³⁾

以上から、2 次微分スペクトルを用いればリポソームに起因するバックグラウンドシグナルの影響を完全に除去でき、薬物のリポソーム/水系での分配係数を求めることは可能になると考え、以下の理論を展開した。

分配係数は次式で定義されるモル分配係数 (K_p) を用いた。^{32,33)}

$$K_p = \frac{([P_m]/[P_i])/[L]}{([P_w]/[P_i])/[W]}$$

ここで、 $[P_m]$ と $[P_w]$ はそれぞれ脂質相及び水相中に存在する薬物のモル濃度であり、 $[P_i]$ は全薬物濃度、 $[L]$ と $[W]$ はそれぞれ脂質と水 (37°C で 55.3 M) のモル濃度である。

ある波長における薬物のリポソーム添加前の微分値と添加後の微分値の差を ΔD とし、 E_m 及び E_w

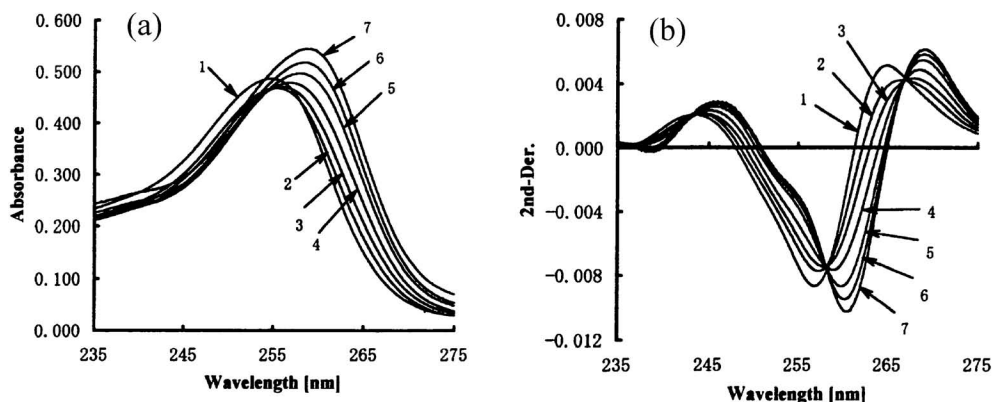


Fig. 17. Absorption (a) and Second-derivative (b) Spectra of 15 μM Chlorpromazine in a HEPES Buffer Solution Containing Several Amounts of PC SUV
PC concentration: 1-7; 0-1.43 mM.

を脂質相及び水相中の薬物のモル微分強度，さらにその差を $E = E_m - E_w$ とすると， ΔD は $\Delta D = E [P_m]$ と表わされる。³³⁾ すなわち， ΔD 値はリポソーム中の薬物の濃度に比例することを示している。これらの式から， ΔD は K_p を用いて次のように表すことができる。³³⁾

$$\Delta D = \frac{K_p \Delta D_{\max} [L]}{[W] + K_p [L]}$$

ここで， ΔD_{\max} は溶液中の薬物分子のすべてがリポソームに分配されたとした場合の ΔD 値である。したがって，種々の $[L]$ に対する ΔD 値を測定すれば，上式から ΔD_{\max} 及び K_p を求めることができる。 K_p 値は，上式に非線形最小二乗法を適用した BASIC 言語（のちに Visual BASIC へ改作）によるプログラムを作成して計算した。³³⁾

以上のようにして，リポソーム (PC SUV)-水系の CPZ, PZ のモル分配係数を相対標準偏差 10% 以下 ($n=6$) の精度で求めることができた。³³⁾

3-2-2. リポソームの粒子径と分配係数の関連³⁴⁾

上述のように，2次微分分光法を用いてリポソーム (PC SUV) に対するフェノチアジン系薬物の分配係数を測定したが，リポソームは粒子径が 20-500 nm 以上まで各種の大きさのものが調製可能であり，目的により使い分けられることができる。その中で，超音波処理によって作製される SUV は粒子径が約 20 nm と小さいため，内側と外側の PC 分子数が約 2 : 1 と異なり，また，パッキング状態は内側の方が密であることが知られている。一方，粒子径が大きい場合は内側と外側の PC 分子数にほとんど差はなく，パッキング状態も同じである。以上か

ら，リポソームの粒子径により分配係数が異なる可能性があるが，検証されてはいなかった。そこで，20-600 nm の各種の大きさのリポソームを調製し，2次微分分光法を用いて CPZ 及び TFZ のそれぞれの大きさのリポソームに対する分配係数を測定し，比較検討した。³⁴⁾

リポソームによる光散乱は粒子径の増加に伴って強くなる。Figure 18 (a) は粒子径が 400 nm のリポソームの実験例であるが，バックグランドシグナルの相殺が取れておらず，ベースラインが大きくずれていることが明らかで，等吸収点も当然ながら全くみられない。これに対し，Fig. 18 (b) に示した 2次微分スペクトルでは 3 個の等微分強度点が観測され，このように吸収スペクトルにバックグランドの影響が強く残っている場合でも，2次微分することにより完全にその影響が除去されることが分かる。

そこで，20-600 nm の各種の大きさのリポソームに対する CPZ, TFZ の分配係数を 2次微分スペクトルを用いて求めたところ，いずれの薬物についても分配係数はリポソーム粒子径による差を示さず，フェノチアジン系薬物とリポソーム PC 二重膜との相互作用はリポソームの大きさに係わらず，分配で扱えることが証明された。³⁴⁾ 同様に，粒子径の大きい赤血球ゴースト膜にも 2次微分分光法は応用できた。³⁵⁾

3-2-3. 熱力学的検討 次に，CPZ, PZ, TFZ に加えて側鎖に piperazine 核を有する trifluoperazine (TFPZ) の 4 種のフェノチアジン系薬物を用いて，フェノチアジン系薬物とリポソームの PC 二重膜との相互作用について熱力学的検討を行った。

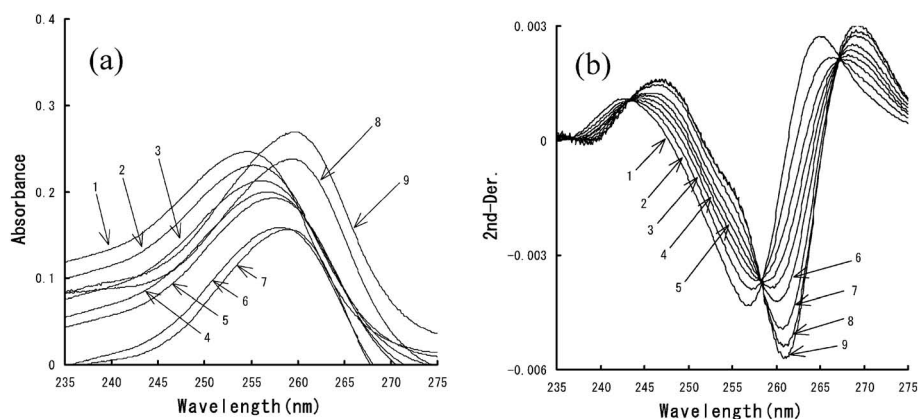


Fig. 18. Absorption (a) and Second-derivative (b) Spectra of CPZ in the Presence of Several Amounts of PC LUV of 400 nm Diameter

PC concentrations (mM): 1-9; 0-1.16.

すなわち、2次微分分光法を用いて10-40°Cの4つの温度で、これらの薬物のPCリポソームに対する分配係数を測定し、Van't Hoff plotからそれぞれの熱力学的パラメーターを求めた。³⁶⁾

得られた熱力学的パラメーターからフェノチアジン系薬物のPC二重膜への分配機構に関する有用な情報が得られた。すなわち、各薬物の $\Delta H_{w \rightarrow i}$ はいずれも負の値を示し、フェノチアジン系薬物のPCリポソームへの分配は静電的相互作用も寄与していること、また、 $\Delta H_{w \rightarrow i}$ の大きさ(絶対値)の順位から、静電的相互作用の寄与の大きさはPZ>CPZ>TFZ>TFPZであることが分かった。一方、 $\Delta S_{w \rightarrow i}$ 値が正であることから、薬物がPC二重膜に分配した結果、フェノチアジン環の侵入がPC二重膜のアシル鎖領域の運動を乱していることが示唆される。すなわち、 $\Delta S_{w \rightarrow i}$ 値の序列TFPZ ≥ TFZ>CPZ>>PZはフェノチアジン環のC-2位の置換基の大きさ(CF₃>Cl>H)、つまり、環全体の大きさに依存していることが示された。³⁶⁾

3-2-4. フェノチアジン系薬物の活性代謝物の分配係数 CPZの主要活性代謝物であるN-monodemethylated chlorpromazine (Nor1-CPZ)の血漿中での濃度は元のCPZの約17%程度であるが、³⁷⁾他の代謝物よりも脳内に高濃度に蓄積されることが知られている。³⁸⁾しかし、有機溶媒/水系で測定された分配係数はCPZに比べて極めて小さく、生体膜への親和性が低いことになり、脳内蓄積性が説明できない。そこで、(Nor1-CPZ, Nor1-PZ, Nor1-TFZ)を合成し、²⁷⁾そのPCリポソームへの

分配係数を2次微分分光法を用いて測定した。その結果、PCリポソームに対して測定された値はいずれも、元のフェノチアジン系薬物とほぼ同等で、脳への移行が可能であることが支持され、リポソーム/水系の分配係数が薬物の生体膜への親和性の指標として従来の有機溶媒/水系の分配係数よりも適切であることが実証された。³⁹⁾

3-2-5. ベンゾチアゼピン系薬物の分配係数次に、微分分光法がリポソーム/水における薬物分配係数の測定に広く適用可能であることを検証するため、ベンゾチアゼピン系薬物への適用を行った。

Figure 19(a)はdiazepamのバッファー溶液にPC SUVを順次添加したときの吸収スペクトルであるが、PC SUVに起因するバックグラウンドシグナルの相殺は不十分で等吸収点はみられず、さらに、PC SUV添加によるスペクトルの変化も小さく、吸収スペクトルから分配係数を計算するデータは得られない。しかし、Fig. 19(b)に示した2次微分スペクトルでは3個の等微分強度点が現れ、また、スペクトル変化が増幅されており、正確に ΔD 値を読み取ることが可能となっている。以上から、2次微分分光法によりdiazepam, flurazepamのPCリポソームへの分配係数を相対標準偏差10%以内($n=5$)と精度よく決定できた。⁴⁰⁾

3-2-6. ステロイド系薬物の分配係数⁴¹⁾ステロイド系薬物のPCリポソーム/水系の分配係数も2次微分分光法を適用することによって測定することが可能となった。Figure 20(a)はdexamethasoneの例であるが、リポソームによるバックグラウンドシ

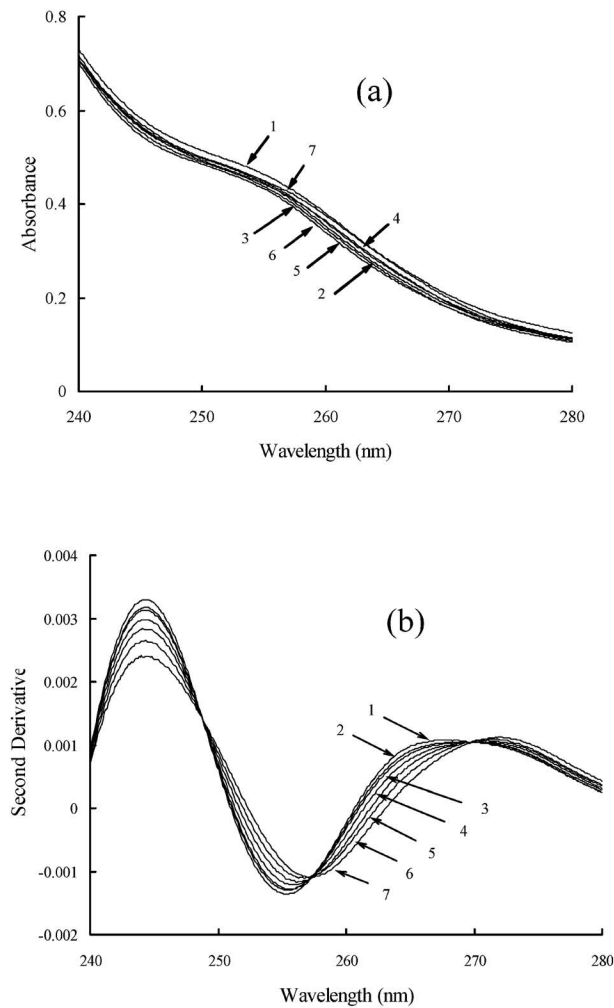


Fig. 19. Absorption (a) and Second-Derivative (b) Spectra of $30 \mu\text{M}$ Diazepam in a HEPES Buffer Solution Containing Several Amounts of PC SUV
PC concentrations: 1-7; 0-1.42 mM.

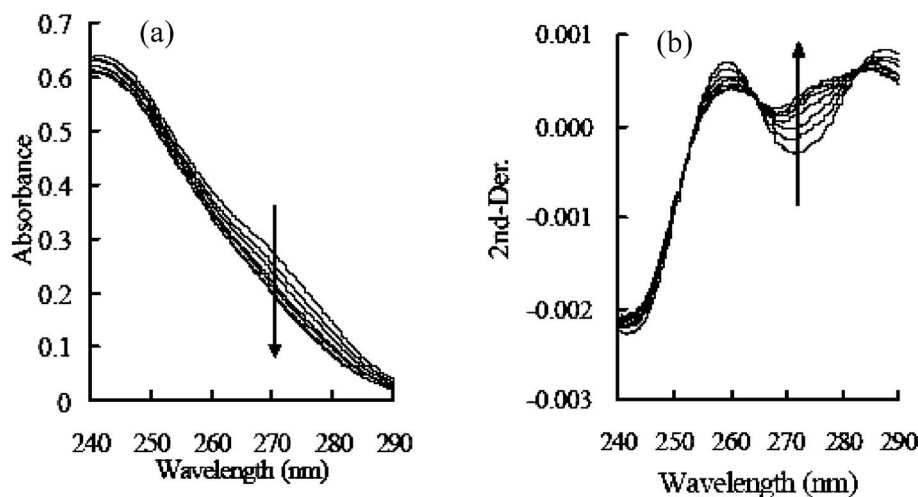


Fig. 20. Absorption (a) and Second-derivative (b) Spectra of $40 \mu\text{M}$ Dexamethasone in HEPES Buffer (pH 7.4, 37°C) Varying Concentration of PC SUV
PC concentrations: 0.0-2.4 mM (in the direction of the arrow).

グナルの影響により等吸収点がみられず、また PC リポソーム添加によるスペクトル変化も小さい。これに対し、Fig. 20 (b)に示す 2 次微分スペクトルでは、ベースラインが補正されて 3 個の等微分強度点が見られ、さらに、スペクトル変化が増幅されて変化量を精度よく読み取ることが可能であり、これより分配係数を相対標準偏差 10% 以内と精度よく求めることができた。⁴¹⁾

同様に、6 種類のステロイド系薬物について PC リポソームに対する分配係数を求めることができたので、分配係数とステロイド系薬物の化学構造の関連を検証した。また、オクタノール/水系の分配係数⁴²⁾の大きさと臨床的薬効の序列とは一致しなかったが、得られたリポソーム/水系での分配係数は臨床的薬効の序列と一致し、リポソーム/水系での分配係数が薬物の lipophilicity の指標として適切であることを示すことができた。⁴¹⁾

3-2-7. リポソーム脂質組成の薬物分配係数に及ぼす影響の検討 実際の生体膜は PC 以外に phosphatidylserine (PS) や phosphatidylethanolamine (PE) 等のリン脂質及び cholesterol を含んでいる。したがって、生体膜の脂質組成の違いによる薬物への親和性の差が生じることが考えられ、そのことが薬物の生体内分布の要因の 1 つであると考えられる。

そこで、まず cholesterol 含量がフェノチアジン系薬物の分配係数に及ぼす影響を検討した。すなわ

ち cholesterol を 0-30% 含む PC SUV を作製し、それらに対する CPZ, TFZ の分配係数を 2 次微分分光法によって求めた。その結果, cholesterol の含量依存的に分配係数は減少し, 30% cholesterol では CPZ, TFZ とともに PC のみの場合の約 50% となることが示された。³⁴⁾

次に, PS 又は PE を含んだ PC SUV を作製し, それらに対するフェノチアジン系薬物 (CPZ, TFZ) の分配係数を 2 次微分分光法を用いて測定した。⁴³⁾ Figure 21 はその結果である。すなわち, PS あるいは PE を含む PC リポソームに対する CPZ 及び TFZ の分配係数を, PC のみの場合の分配係数に対する相対値で表し, PS あるいは PE の含量についてプロットした。PE を添加しても CPZ, TFZ 両薬物とも分配係数はほとんど変化しないが, PS の場合は PS 含量に依存して両薬物とも分配係数が増加し, PS 含量が 30% においては PC のみのリポソームに比して 2-3 倍も大きくなっている。このことは, pH 7.4 において中性である PE はフェノチアジン系薬物に対する親和性は PC と変わらないが, 酸性リン脂質として荷電している PS は PC に較べて親和性はるかに大きいことによると考えられる。⁴³⁾ この結果は, 前述の熱力学的検討において得られた, フェノチアジン系薬物の PC 二重膜への分配には, 静電的相互作用の寄与も含まれているという結果³⁶⁾ とよく符合している。

同様にして, ベンゾジアゼピン系薬物, diazepam, flurazepam の分配係数に対する PS の影響を調べたところ, 30% の PS を含む PC リポソームでは,

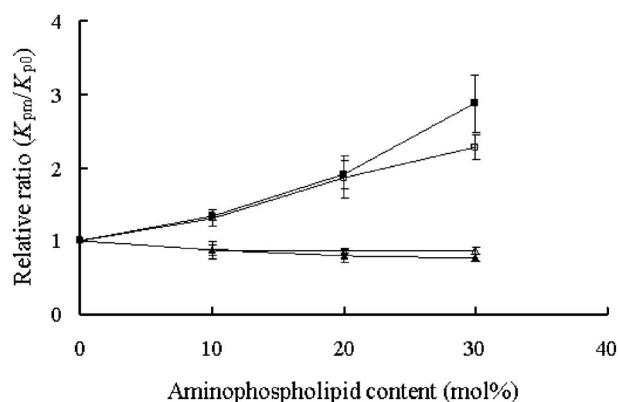


Fig. 21. Relative Partition Coefficients of TFZ (closed) and CPZ (open) at Several PS (square) and PE (triangle) Contents

PC のみの場合に較べて, diazepam で約 1.4 倍, flurazepam では約 4.8 倍を示した。flurazepam の pK_a は 8.1 であるので, pH 7.4 の試料溶液では 80% 以上がカチオン型であり, フェノチアジン系薬物の場合と同様, PS によりリポソーム表面が負電荷を有するため親和性が高くなったと考えられる。⁴⁴⁾

以上の結果は, PS が多く含まれている神経細胞や脳にフェノチアジン系薬物やベンゾジアゼピン系薬物等の向精神薬が分布することの要因と考えられ, 生体膜の脂質組成が薬物の生体内分布に大きく寄与していることを示唆している。

4. 微分分光法及び NMR 法による薬物-血清アルブミンの相互作用の解明研究

薬物のリポソームすなわちリン脂質二重膜に対する分配係数は薬物の吸収や組織への移行, 分布に関連する定量的指標であるが, 一方, 生体内の薬物の輸送や有効血中濃度に大きく関与するのは血清アルブミンへの結合である。

血清アルブミンは血中に約 0.6 mM と最も多く存在し, 血漿タンパク質の約 60% を占めている。血清アルブミンは血液の膠質浸透圧維持のほか, 脂肪酸, ビリルビン, 種々のイオンなどの内因性物質に加えて, 薬物に代表される種々の外因性物質も可逆的に結合し, 血中でこれらの物質を運搬する。⁴⁵⁾

血中において結合型薬物は血管壁を通過できず, 非結合型薬物だけが血中から組織に移行して作用部位に到達すると考えられており, 薬物の血清アルブミンへの結合は薬理効果や副作用の発現, 体内動態に大きな影響を及ぼす。

4-1. 微分分光法による研究 薬物-血清アルブミン結合定数の測定は, 一般に, 限外ろ過あるいは平衡透析等の分離手段を用いて得た水相中の非結合薬物濃度を測定し求められている。前者はろ過膜への吸着や平衡状態を乱す懸念があり, 後者は同じく透析膜への吸着と測定に長時間を要するといった欠点がある。これに対し, アルブミンに結合することによって薬物の吸収スペクトルに変化が生じる場合 (メタクロマジー) には, アルブミン自体による光吸収を対照溶液により相殺できれば, 吸光度の変化から結合定数を求めることができる。しかし, アルブミンによるバックグランドシグナルは強く, その影響を完全に相殺することは困難である。

そこで, 筆者はリポソームの場合と同様に 2 次微

分光法を適用して、アルブミンのバックグラウンドシグナルの影響によるベースラインの不一致を除去し、分離手段を用いることなく平衡を保ったままの状態に薬物-アルブミン結合定数を求める手法を開発した。

4-1-1. 2次微分分光法によるウシ血清アルブミン (BSA) と CPZ 及び TFZ との結合定数の測定⁴⁶⁾

Figure 22 (a) に種々の濃度の BSA を含む緩衝溶液中の TFZ の紫外吸収スペクトルを示したが、対照溶液は試料溶液と同濃度の BSA を含んでいるのに係わらず、BSA によるバックグラウンドシグナルが極めて強いと完全に相殺されず、平衡系に現れるべき等吸収点がみられない。これに対し 2 次微分処理を行った Fig. 22 (b) では、2 個の等微分強度点が観測され、バックグラウンドシグナルの影響が完全に消去されていることが分かる。そこで、薬物とアルブミンの結合について、以下の理論の展開を行った。

薬物とアルブミンを含む試料溶液のある波長における微分値 D と薬物のみの微分値の差を ΔD とすると、 ΔD は結合型薬物濃度、 C_b に比例し、 $\Delta D = E[C_b]$ と表すことができる。ここで $E = E_b - E_u$ で、 E_b 、 E_u はそれぞれ結合型、非結合型の薬物のモル微分強度を示す。試料溶液中に存在する全薬物分子 (濃度を C_t とする) がアルブミンに結合したときの ΔD 値を ΔD_{\max} とすると、 $\Delta D_{\max} = E[C_t]$ と表せ、薬物のアルブミンに対する結合割合 α は $\alpha = \Delta D / \Delta D_{\max}$ で与えられる。⁴⁶⁾ ΔD_{\max} 値は、 ΔD と全アルブミン濃度 $[P]$ との両逆数プロットを行い、全アルブミン濃度を無限大に外挿することにより求めることができるから、 ΔD 値から α が得られる。

以上から、結合型、非結合型薬物濃度 $\alpha[C_t]$ 、 $(1 - \alpha)[C_t]$ 、及びアルブミン 1 分子当たり結合している薬物の分子数 $r = \alpha[C_t] / [P]$ を用いて、Scatchard plot による解析を行うことができる。

上述の理論に従って、CPZ、TFZ のいくつかの濃度について Scatchard plot を行い、Fig. 23 を得た。各プロットは横軸に対して平行な直線を示しており、CPZ、TFZ と BSA の相互作用は分配型の非特異的結合モデルを適用できることが分かった。⁴⁶⁾

薬物とアルブミンの相互作用が非特異的結合モデルにより説明される場合、結合定数 $K (M^{-1})$ は次式で表すことができる。

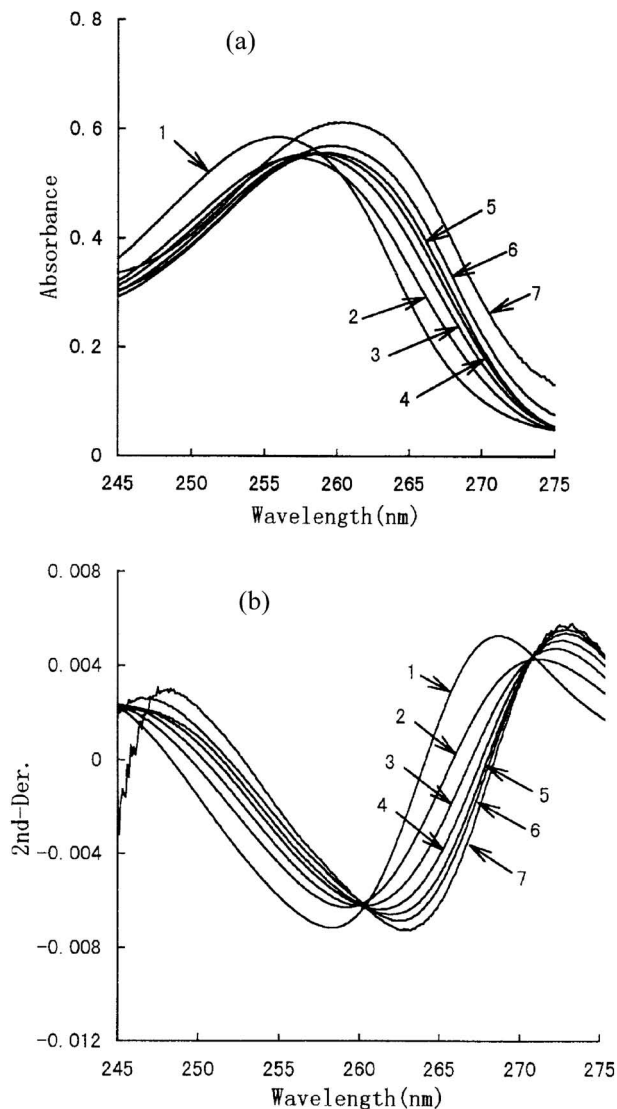


Fig. 22. Absorption (a) and Second Derivative (b) Spectra of 20 μM TFZ in a Phosphate Buffer Solution (pH 7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$) Containing Various Amounts of BSA. BSA concentration (μM): (1)-(7); 0.0-70.0.

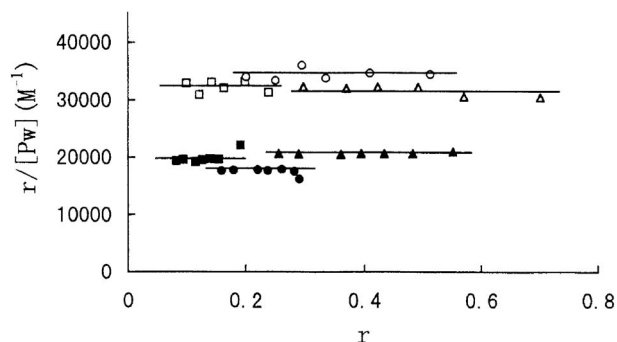


Fig. 23. Scatchard Plot for the Interaction of CPZ and TFZ with BSA, Respectively. CPZ concentration (μM): 10 (■), 20 (●), 30 (▲), TFZ concentration (μM): 10 (□), 20 (○), 30 (△).

$$\frac{r}{[C_u]} = \frac{[C_b]}{[P][C_u]} = K$$

上式を ΔD , ΔD_{\max} を用いて表し, ΔD について整理すると, 次式が得られる.

$$\Delta D = \frac{K[P]\Delta D_{\max}}{(1+K[P])}$$

上式に Taylor 展開併用最小二乗法を適用した Visual Basic によるプログラムを作製し, 最適な K 及び ΔD_{\max} を算出した.

10–30 μM の種々の濃度の CPZ, TFZ について測定実験を行い, 相対標準偏差 10% 以内で精度よく結合定数を求めることができた. また, 得られた各 K 値は薬物濃度に依存せずそれぞれ一定の値を示し, BSA に対する CPZ, TFZ の結合が分配型の非特異的結合モデルで扱えることが確認された.⁴⁶⁾

4-1-2. BSA と CPZ 及び TFZ との結合に対する無機イオンの影響の解明 血中には種々の無機イオンが存在し, その中でも Na^+ , Cl^- は, それぞれ約 0.15 M, 0.1 M と高濃度で存在しているが, それらが薬物-アルブミン結合に及ぼす影響についての定量的な知見はない. そこで, 筆者は各種の無機塩を種々の濃度で含む場合の CPZ, TFZ の BSA への結合定数 (K) を 2 次微分分光法を用いて測定し, Na^+ , K^+ , Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{2-} の影響を検討した. Figure 24(a), (b) はこれらの無機塩が存在しないときの K 値に対する無機塩存在時の K 値の比を, 無機塩濃度についてプロットしたものである.⁴⁷⁾

まず, Na_2SO_4 が CPZ, TFZ の結合定数になんら影響を及ぼしていないことから, Na^+ 及び SO_4^{2-} はフェノチアジン系薬物の BSA 結合に影響しないことが明白である. また, Na 塩 (Fig. 24(a)) と K 塩 (Fig. 24(b)) ですべての塩について差が認められないことから K^+ もフェノチアジン系薬物の結合に影響しないことが分かる. 一方, Cl^- , Br^- , I^- についてはいずれも濃度依存的に結合定数を低下させ, その度合は $\text{I}^- \gg \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ の順であることが明らかとなった. また, Cl^- はその生理的濃度である 0.1 M 近傍で影響が一定に近づくことは興味深い.

フェノチアジン系薬物は pH 7.4 ではほとんどがプロトン化された陽イオンであり, これらの陰イオンによって BSA との結合が阻害されることは, フェノチアジン系薬物と BSA の相互作用に対して静

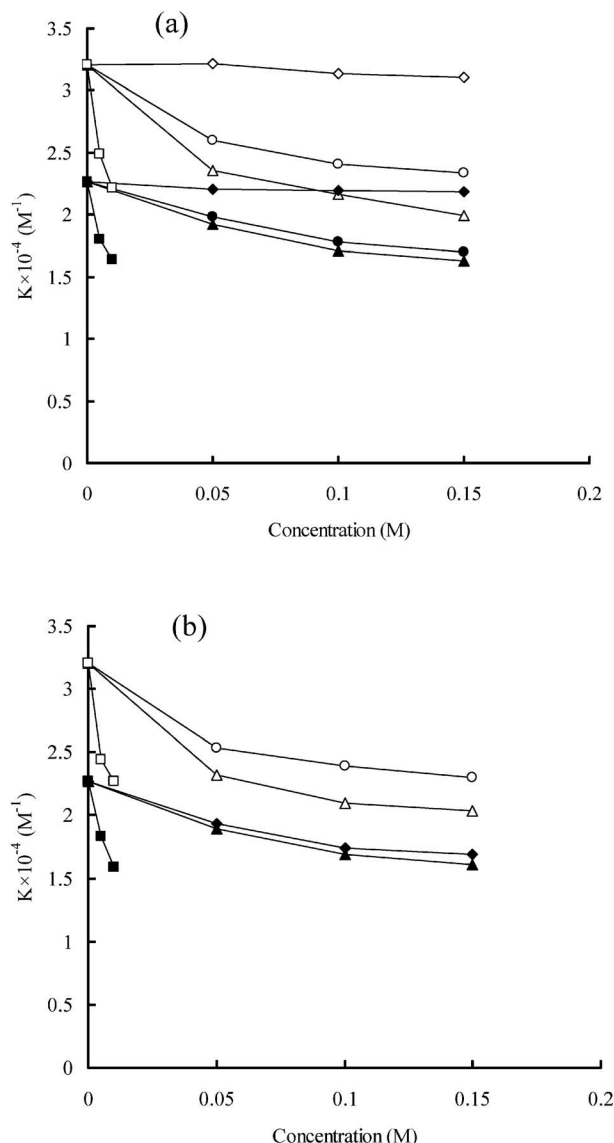


Fig. 24. Effect of Sodium (a) and Potassium (b) Salts on the Binding Constants of TFZ (Open Symbols) and CPZ (Closed Symbols) to BSA at 37°C and pH 7.4
(a): The sodium salts added, (\diamond): Na_2SO_4 , (\circ): NaCl , (Δ): NaBr , (\square): NaI , (b): The potassium salts added, (\circ): KCl , (Δ): KBr , (\square): KI .

電的な寄与は小さいと考えられた.

一方, これらの陰イオンによる結合阻害の序列がこれらの陰イオンのイオン半径の序列と同一であることから, これらの陰イオンが BSA に結合することにより, フェノチアジン系薬物に対する BSA の結合部位が影響を受けると考えられた.⁴⁷⁾

上記の結果より, 薬物のアルブミンへの結合を考察する際には, 血中に 0.1 M 存在する Cl^- の影響を考慮に入れることが重要であることが示された.

4-2. ^{19}F NMR による研究 薬物-アルブミン

結合の結合定数は有効血中薬物濃度すなわち血中の非結合薬物濃度を見積もるために必要不可欠な数値である。しかし、薬物-アルブミン結合は上述の無機イオンのみならず、その他の様々な内因性物質によって影響を受ける可能性がある。また、他の薬物を同時投与した場合に置換現象により予測しない高い血中薬物濃度を生じる可能性もある。したがって、内因性、外因性物質による結合の競合や結合部位に関するより詳細な説明が必要である。

ヒト血清アルブミン (HSA) の結晶状態における 3 次元構造は 1992 年⁴⁸⁾に He と Carter によって X 線構造解析により明らかにされた。彼らはまた薬物が結合した HSA についても結晶構造を解析し、薬物結合サイトがサブドメイン II A と III A であることを示した。これらはそれぞれ従来の Sudrow の薬物結合サイトの Site I, Site II に対応し、それぞれに分類されていた薬物と矛盾していない。⁴⁸⁾

一方、溶液中での構造化学的研究は NMR が最適と考えられるが、アルブミンの分子量は 65K と大きく、測定試料として薬物とアルブミンのモル比を 1:1, あるいはそれ以下に設定すると、薬物の ¹H NMR シグナルの強度はアルブミン由来のシグナルの方が圧倒的に大きく、さらに結合によるブロードニングのため観測は困難である。¹³C NMR においても、たとえ ¹³C 標識した薬物を用いたとしてもアルブミン由来のシグナルとの重なり、及びブロードニング等で困難は変わらない。

そこで筆者は TFZ がフッ素原子を有していることから ¹⁹F NMR に着目した。生体物質中にはフッ素を含むものは見当たらないから、どのような生体物質が共存しようとも薬物由来のシグナル以外に現れるものはない。さらに、¹⁹F 核は磁気モーメントの大きさが ¹H 核とほぼ同等の大きさを持ち、天然存在比は 100% であるため相対的感度は ¹H 核に近い高感度核種である。したがって、生体物質が共存する系において、 μM オーダーの薬物濃度でも信号を得ることが可能である。また、¹⁹F NMR の化学シフトは 250 ppm と極めて広く、わずかな環境変化による化学シフトの変化を検出し易い。以上のごとく ¹⁹F NMR は含フッ素薬物-生体マクロ分子の相互作用の解明に多くの利点を有していると考えられる。フッ素を含む薬物は、向精神薬、ニューキノ

ロン抗菌剤、ステロイド薬等に多くの種類があり、かつ重要なものが多く、¹⁹F NMR は生体物質との相互作用の解明に広範囲の薬物に適用可能であると考えられる。

4-2-1. TFZ と BSA, 及びヒト血清アルブミン (HSA) の相互作用の解明⁴⁹⁾ Figure 25 は 1.0 mM TFZ の buffer 溶液 (a) に 1.0 mM の BSA (b) 及び 1.0 mM の HSA (c) を加えたときの ¹⁹F NMR スペクトルである。(a) の buffer のみでは TFZ の CF₃ は 1 本の鋭いシグナルを示すが、BSA (b) あるいは HSA (c) が存在すると、元の位置から 0.2 ppm 低磁場側と 0.7 ppm 高磁場側へシフトしたブロードな 2 本のシグナルに分裂して現れている。すなわち、TFZ は BSA, HSA のいずれに対しても、少なくとも 2 ヶ所のサイトで結合していることが示された。また、高磁場側と低磁場側のシグナルの強度比は BSA と HSA では逆転しており、TFZ の各サイトへの分布が BSA と HSA で異なることが明らかである。⁴⁹⁾

次に、結合サイト既知のリガンドを用いて競合実験を行い、サイトの同定を試み、測定結果をまとめて Fig. 26 に示した。

Site I リガンドである warfarin を加えた場合、BSA (Fig. 26A (b)), HSA (Fig. 26B (b)) のいずれについても添加前 (Fig. 26A (a), B (a)) とスペクトルに変化はみられず、TFZ は Site I には結合していないことが明らかである。

続いて、Site II リガンドである L-tryptophan を添加した結果が Fig. 26A (c), B (c) で、BSA, HSA の

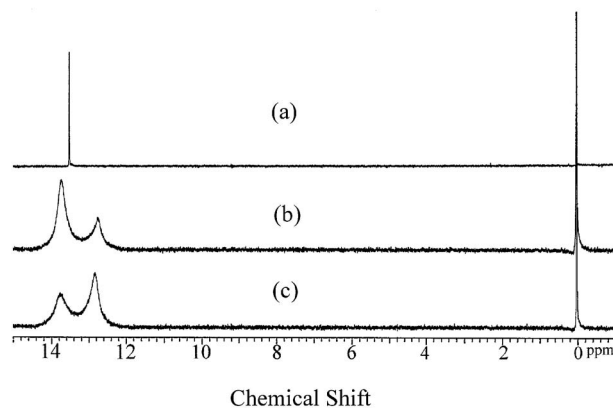


Fig. 25. ¹⁹F NMR Spectra of 1.0 mM TFZ in Buffer (a) without Serum Albumin, (b) with 1.0 mM BSA, (c) with 1.0 mM HSA

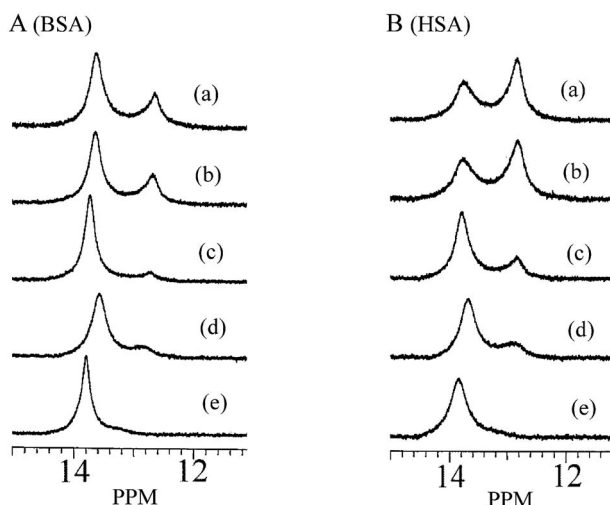


Fig. 26. ^{19}F NMR Spectra of 1.0 mM TFZ with 1.0 mM BSA (A) and 1.0 mM HSA (B), in the Presence of Several Competitive Ligands

Competitive ligands: (a) none, (b) 1.0 mM warfarin, (c) 1.0 mM L-tryptophan, (d) 0.15 M NaCl, (e) 6.0 mM oleic acid.

いずれについても高磁場側のシグナルが大幅に減少しており、高磁場側のシグナルは BSA, HSA の Site II に結合した TFZ のものであることが判明した。両スペクトルとも新たなシグナルは現れておらず、低磁場側のシグナル強度が増加していることから、Site II から離脱した TFZ は低磁場側シグナルが示す Site へ移行したと考えられる。

Figure 26A (d), B (d) は 0.15 M の NaCl を加えた結果である。L-tryptophan を添加した場合と同様に Site II 由来のシグナルが大幅に減少し低磁場側のシグナルが増大している。また、低磁場側のシグナルが若干高磁場シフトしていることから、Site II から離脱した TFZ は低磁場側シグナルの Site へ移行するが、非結合の TFZ も増加していることが分かった。この結果は、2 次微分分光法で示された NaCl 存在下では BSA に対するフェノチアジン系薬物の結合定数が約 30% 程度低下する⁴⁷⁾ ことの原因をよく説明している。また、NaCl 未添加では BSA と HSA では TFZ の結合の Site に対する分布が異なっているが、生理的条件である NaCl 存在下ではほぼ同じ分布を示し、BSA と HSA で TFZ 結合に対して差がなくなっていることが示され、興味深い。

ついで、Fig. 26A (e), B (e) は長鎖脂肪酸の一種である oleic acid をアルブミン 1 分子当たり 6 個結合した HSA, BSA を用いた結果である。アルブミ

ンは 1 分子当たり最大 6-7 分子の長鎖脂肪酸を結合する^{50,51)} と言われており、長鎖脂肪酸結合サイトが埋まった状態での TFZ 結合の様子を知る目的で行った。Figure 26Ae, Be から分かるように Site II に結合した TFZ のシグナルは消失し、oleic acid により TFZ はほぼ完全に Site II から追い出されていることが分かる。しかしながら、非結合型のシグナルは生じておらず、低磁場側のシグナルに線幅に若干の減少がみられることから、結合量の減少があるものの、oleic acid が 6 分子結合した HSA, BSA においても、TFZ のアルブミンへの結合は維持されていることが分かる。⁴⁹⁾

4-2-2. 非ステロイド系抗炎症剤 Niflumic Acid の HSA 結合の解明⁵²⁾

続いて、含フッ素薬物で非ステロイド系抗炎症剤である niflumic acid の HSA 結合について ^{19}F NMR を用いて種々の検討を行った。HSA については近年 Site I は 3 個の領域 (Site Ia, Ib, Ic)⁵³⁾ を有することが提唱されているが、今回筆者らは niflumic acid は Site Ia と Site Ib に約 1 : 3 の比率で結合すること、また競合リガンドにより Site Ia から Site Ib へ、あるいはその逆の移動が起きることを明らかにした。また、本研究において、niflumic acid が Site Ia, Ib 結合薬物であることが明らかとなったので、フッ素を含まない薬物についても niflumic acid をプローブとして利用することにより ^{19}F NMR を用いて極めて簡単に結合サイトを調べることができ示した。⁵²⁾

話が前後するが、 ^{19}F NMR は薬物のリポソーム/水系の分配係数測定へも応用が可能である。ベンゾジアゼピン系薬物である flunitrazepam, flurazepam, フェノチアジン系の trifluoperazine はいずれもフッ素原子を有しており、その ^{19}F NMR シグナルは水相から PC 二重膜へ移行することによって化学シフトが変化するため、それを利用して分配係数を算出した。得られた分配係数は 2 次微分分光法によって求めた値とよく一致した。⁵⁴⁾

また、PC 二重膜へ移行しても化学シフト変化を起こさない TFZ については、水相中と PC 二重膜中とで縦緩和時間 T_1 が異なることを利用して分配係数を測定した。⁵⁵⁾

本法は含フッ素薬物に限られるが、脂質相と水相で吸収スペクトルに差がない場合の分配係数測定に

用いることができる方法であり， ^{19}F NMR 法の新たな利用法を開いたといえる。

5. おわりに

以上、筆者らは、パソコンを利用した微分分光法を開発し、薬物分析において従来の吸光分析では困難であった課題を解決して吸光分析の応用範囲を拡大した。また、薬物と生体マクロ分子との相互作用について、2次微分分光法を適用することにより定量的な知見を得、また、NMR法を活用することによって、詳細な構造化学的知見を得、相補的な解析を行った。

謝辞 京都薬科大学薬品分析学教室で筆者とともに研究を推進したスタッフ、大学院生、特別実習生、留学生の皆さんに深謝する。

REFERENCES

- 1) Talsky G., Mayring L., Kreuzer H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **17**, 785–799 (1978).
- 2) Kitamura K., *Bunseki*, **1994**, 991–998 (1994).
- 3) Kitamura K., Majima R., *Anal. Chem.*, **55**, 54–56 (1983).
- 4) Rojas F. S., Ojeda C. B., Pavon J. M. C., *Talanta*, **35**, 753–761 (1988).
- 5) Savitzky A., Golay M. J. E., *Anal. Chem.*, **36**, 1627–1639 (1964).
- 6) Kitamura K., Morita E., Hozumi K., *Yakugaku Zasshi*, **105**, 161–165 (1985).
- 7) Kitamura K., Hozumi K., *Anal. Chim. Acta*, **172**, 111–118 (1985).
- 8) Kitamura K., Hozumi K., *Anal. Chim. Acta*, **201**, 301–304 (1987).
- 9) Glombitza B. W., Schmidt P. C., *J. Pharm. Sci.*, **83**, 751–757 (1994).
- 10) Sawyer M., Kumar V., *J. Chromatogr. Sci.*, **41**, 393–397 (2003).
- 11) Kitamura K., Takagi M., Hozumi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1484–1490 (1984).
- 12) Kitamura K., Mabuchi M., Fukui T., Hozumi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3914–3917 (1987).
- 13) Kitamura K., Hatta M., Fukuyama S., Hozumi K., *Anal. Chim. Acta*, **201**, 357–361 (1987).
- 14) Ueno T., Urakami K., Azuma A., Umemoto K., Kanbe M., Kitamura K., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 807–814 (2005).
- 15) Kitamura K., Kitade T., Mabuchi M., Mizuochi M., Goto K., *Bunseki Kagaku*, **42**, 581–585 (1993).
- 16) Kitamura K., Takenaka M., Yoshida S., Ito M., Nakamura Y., Hozumi K., *Anal. Chim. Acta*, **242**, 131–135 (1991).
- 17) Kitamura K., Imayoshi N., *Anal. Sci.*, **8**, 497–501 (1992).
- 18) Morelli B., *Anal. Lett.*, **21**, 759–776 (1988).
- 19) Kitamura K., Takahashi T., Hozumi K., Sato T., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 256–259 (1978).
- 20) Kitamura K., Kano H., Yoneyama K., Hozumi K., *Mol. Pharmacol.*, **20**, 124–127 (1981).
- 21) Kuroda Y., Kitamura K., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1–6 (1984).
- 22) Ohyashiki T., Karino T., Matsui K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1170**, 182–188 (1993).
- 23) Kitamura K., Yamamoto M., Murakami J., Kobayashi T., Kitade T., *J. Colloid Interface Sci.*, **200**, 250–252 (1998).
- 24) Kitamura K., Kishino T., Hozumi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1264–1267 (1979).
- 25) Kitamura K., Noguchi M., Nishiyama C., Kobayakawa K., Fukui T., Kuwahara Y., Hozumi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1147–1150 (1989).
- 26) Kitamura K., Takegami S., Kobayashi T., Makihara K., Kotani C., Kitade T., Moriguchi M., Inoue Y., Hashimoto T., Takeuchi M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1661**, 61–67 (2004).
- 27) Kitamura K., Fujitani K., Takahashi K., Tanaka Y., Hirako S., Kotani C., Hashimoto T., Takegami S., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **43**, 865–872 (2000).
- 28) de-Paula E., Schreier S., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **29**, 877–894 (1996).
- 29) Garcia D. A., Perillo M. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1324**, 76–84 (1997).
- 30) Roger J. A., Choi Y. W., *Pharm. Res.*, **10**, 913–917 (1993).
- 31) Avdeef A., Box K. J., Comer J. E. A., Hibbert C., Tam K. Y., *Pharm. Res.*, **15**, 209–215 (1998).
- 32) Welti R., Mullikin L. J., Yoshimura T., Helmkamp Jr. G. M., *Biochemistry*, **23**, 6086–6091 (1984).
- 33) Kitamura K., Imayoshi N., Goto T., Shiro H., Mano T., Nakai Y., *Anal. Chim. Acta*, **304**,

- 101–106 (1995).
- 34) Takegami S., Kitamura K., Kitade T., Hasegawa K., Nishihira A., *J. Colloid Interface Sci.*, **220**, 81–87 (1999).
- 35) Kitamura K., Goto T., Kitade T., *Talanta*, **46**, 1433–1438 (1998).
- 36) Takegami S., Kitamura K., Kitade T., Kitagawa A., Kawamura K., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 1056–1059 (2003).
- 37) Wode-Helgodt B., Alfredsson G., *Psychopharmacology* (Berlin), **73**, 55–62 (1981).
- 38) Kohl H. H., Brune G. G., Himwich H. E., *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 539–541 (1964).
- 39) Takegami S., Kitamura K., Takahashi K., Kitade T., *J. Pharm. Sci.*, **91**, 1568–1572 (2002).
- 40) Omran A. A., Kitamura K., Takegami S., El-Sayed A.-A. Y., Abdel-Mottaleb M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**, 319–324 (2001).
- 41) Funakoshi T., Takegami S., Kitade T., Kitamura K., Abstracts of papers, the 123th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Nagasaki, March 2003.
- 42) Hansch C., Leo A., Hoekman D., “Exploring QSAR,” American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- 43) Takegami S., Kitamura K., Kitade T., Takashima M., Ito M., Nakagawa E., Sone M., Sumitani R., Yasuda Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 147–150 (2005).
- 44) Omran A. A., Kitamura K., Takegami S., Kitade T., El-Sayed A.-A. Y., Mohamed M. H., Abdel-Mottaleb M., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 312–315 (2002).
- 45) Peters Jr. T., “All about albumin,” Academic Press, New York, 1996.
- 46) Kitamura K., Mano H., Shimamoto Y., Tado-koro Y., Tsuruta K., Kitagawa S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **358**, 509–513 (1997).
- 47) Kitamura K., Omran A.A., Nagata C., Kamijima Y., Tanaka R., Takegami S., Kitade T., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 972–976 (2006).
- 48) He X. M., Carter D. C., *Nature*, **358**, 209–215 (1992).
- 49) Kitamura K., Kume M., Yamamoto M., Takegami S., Kitade T., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **36**, 411–414 (2004).
- 50) Richieri G. V., Anel A., Kleinfeld A. M., *Biochemistry*, **32**, 7574–7580 (1993).
- 51) Bhattacharya A. A., Grune T., Curry S., *J. Mol. Biol.*, **303**, 721–732 (2000).
- 52) Kitamura K., Omran A.A., Takegami S., Tanaka R., Kitade T., *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 2843–2848 (2007).
- 53) Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1295**, 147–157 (1996).
- 54) Omran A. A., Kitamura K., Takegami S., Kume M., Yoshida M., El-Sayed A.-A. Y., Mohamed M. H., Abdel-Mottaleb M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1087–1092 (2002).
- 55) Kitamura K., Yamamoto M., Takegami S., Sugiura M., *Talanta*, **49**, 261–265 (1999).