

薄層クロマトグラフィー法と表面増強ラマン散乱の活性による簡便かつ迅速な新規血中薬物濃度測定法の開発

安藤 基純、安永 峻也
(医療生命薬学研究ユニット)

【背景】

臨床ではしばしば、薬物治療の効果が優れない患者や予期せぬ副作用に見舞われる患者に遭遇する。そのような場合、治療薬の血中濃度に疑いの目が向けられるが、臨床現場では薬物血中濃度の測定に要する手間・人材・費用などの問題から、それらを測定するのが極めて困難となっている。特に、リアルタイムに、まさに point of care で薬物血中濃度を測定するのは尚更である。この問題を解決すべく、本研究では、薄層クロマトグラフィー (TLC) 法による血漿からの薬物分離と、ラマンスペクトル (または表面増強ラマン散乱 ; SERS) による分離後薬物の定性・定量を組み合わせた、新しい血中薬物濃度の測定法を開発することを目的とした。血漿からの薬物分離に TLC 法を用いるメリットとして、免疫学的手法や種々のクロマトグラフィー法よりも安価で簡便であり、また、複数の血漿から同時に薬物を分離できること (ハイスループット) が挙げられる。一方、分離薬物の同定・定量にラマンスペクトルを用いるメリットとして、比較的短時間に薬物固有のスペクトル形状を取得し、分離後薬物の定性・定量を行うことができること、また、ナノ粒子との相互作用による SERS 活性を利用した高感度な分離後薬物の定性・定量も可能であることが挙げられる。

【方法】

(1) 銀クエン酸ナノ粒子 (Ag-citrate NPs) 懸濁液の調製とその粒子径および表面電位の測定

精製水で希釈した硝酸銀溶液をホットスターラーで 150°C に加熱しながら攪拌を行い、10 mL のクエン酸水溶液 (1%; w/v) を添加したのち、灰色に変化するまで反応を継続させた。その後、さらに 90 分間、加熱と攪拌を継続し、それらを室温まで冷却したものを Ag-citrate NPs の試料とした。尚、調製条件が Ag-citrate NPs の特性に及ぼす影響を評価するため、攪拌子の回転数がそれぞれ 300 rpm、500 rpm、700 rpm の時の調製液を経時的に採取し、粒子径とゼータ電位を測定した。測定は、各 Ag-citrate NPs 懸濁液を精製水で 5 倍希釈して行った。粒子径およびゼータ電位は、それぞれ 3 回測定した値の平均値で評価した。

(2) ラマンスペクトルの取得

各物質のラマンスペクトルの測定には、758 nm を励起波長とする超小型レーザーラマン分光計 [RAMMINI/785 KFS2 ; (株) ラムダビジョン (神奈川県相模原市)] を使用した。TLC 板上における、Ag-citrate NPs による SERS 活性を期待した 5-FU のラマンスペクトルの取得においては、5-FU 溶液と Ag-citrate NPs 懸濁液の滴下エリアが一部重複するようにそれぞれの液を TLC 板上に滴下し、5-FU 溶液と Ag-citrate NPs 懸濁液が重複したエリアのラマンスペクトルから、Ag-citrate NPs 懸濁液のみのエリアのラマンスペクトルを差し引くよう

にして取得した。

【結果および考察】

(1) 対象薬物の選定

臨床的意義を加味して、メトトレキサート、クレアチニン、5-FU の粉末のラマンスペクトルを測定したところ、5-FU のスペクトル強度が最も強く、770、1230、1333、1660 cm^{-1} 付近に特徴的なシャープなピークが観察された。従って、今回の研究では、5-FU を対象物質として検討を進めることが妥当と考えられた。

(2) 5-FU の TLC 板上におけるラマンスペクトルの測定

5 mg/mL に調製した 5-FU 溶液を TLC 板に 2 μL 滴下し、乾燥後にラマンスペクトルを測定した。しかしながら、5-FU に特有のピークやスペクトル形状は見られなかった。

(3) Ag-citrate NPs を使用した 5-FU の SERS 活性の確認

TLC 板上の 5-FU 溶液 (5 mg/mL ; 2 μL) が滴下されているスポットに、一部が重複するように Ag-citrate NPs 懸濁液を滴下し、ラマンスペクトルを取得したところ、770、1230、1333、1660 cm^{-1} 付近にシャープなピークが観察され、それらは 5-FU 標準品のピークとほぼ一致した (図 1)。従って、Ag-citrate NPs 懸濁液による SERS 活性により、TLC 板上の 5-FU 溶液のラマンスペクトルの取得が可能になったと考えられた。

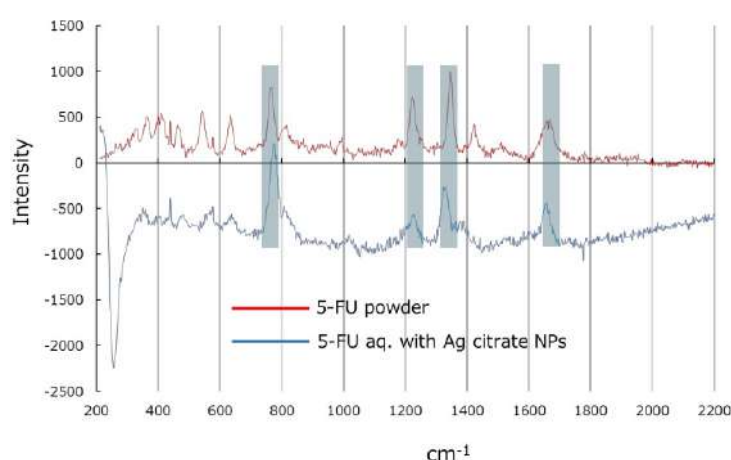


図1 5-FU粉末およびTLC板上のAg-citrate NPs滴下後の5-FUのラマンスペクトル

(4) 各種 Ag-citrate NPs の調製とそれらの SERS 活性の確認

さらに高感度な 5-FU の SERS 活性をもたらす Ag-citrate NPs を見出すため、懸濁液調製時の温度や攪拌速度を種々変更させて Ag-citrate NPs 懸濁液を調製し、それらの 5-FU に対する SERS 活性を確認した。-14.9 から -40.9 mV までのゼータ電位と 26.8 から 80.8 nm までの粒子径の範囲において、様々な特性を有する Ag-citrate NPs 懸濁液が調製された。それらを用いて、5-FU のラマンスペクトルに対する SERS 活性を確認したところ、残念ながらいずれの Ag-citrate NPs にも、5-FU のラマンスペクトルに対する SERS 活性は見られなかった。

【今後の展望】

今後は、より高性能なレーザーラマン分光分析装置を利用し、5-FU のラマンスペクトルを増強させ得るナノ粒子の特性的情報を入手する予定である。それらの情報が取得できれば、その特性を満たすようなナノ粒子の調製方法の検討が可能になると考えられる。