

生体試料中抗アレルギー剤の分析法の開発

在間一将（日本大学薬学部 薬品分析学研究室）

【背景および目的】

抗アレルギー剤の中でも、抗ヒスタミン薬のエピナスチン (EPN) は花粉症やアレルギー性鼻炎等の治療に用いられ、鎮静作用が少なく、OTC 医薬品としても販売されている。しかし、EPN は授乳婦への投与を避け、やむを得ず投与する場合には授乳を中止することが添付文書に記載されており、動物実験で乳汁中に移行することが報告されているものの、ヒトでの乳汁移行率については明らかではない。EPN の体内動態を解析するためには、血液や乳汁などの生体試料における定量法が重要であるが、生体試料中における EPN などの塩基性薬物の前処理法として汎用されるジクロロメタン抽出は、回収率が 50% 程度で低いため、高精度で高感度の定量分析を行う上で回収率の向上を図る必要がある。また、EPN は構造中に不斉炭素をもち、医薬品にはラセミ体を用いられている。EPN のエナンチオマーに薬効の有意差はないとされているが、それぞれの生体への移行率については明らかではないため、生体試料中の EPN のエナンチオマーを定量するための高感度分析法が必要である。

そこで、本研究では、乳汁などの生体試料中の EPN を簡便かつ効率的に抽出できる方法を開発するとともに、蛍光ラベル化および LC/MS による高感度定量分析法の開発と EPN のキラル分離について検討した。

【方法】

前処理法：モデル試料として市販の牛乳 100 μ L に、100 μ g/mL EPN 水溶液 100 μ L および内標準物質の 400 μ g/mL ジフェニドール (DPN) 80 μ L を添加し、メタノールと *n*-ヘキサンを加えて液-液抽出を行った。さらに、メタノールを 0.1% 酢酸メタノール溶液、0.1% ギ酸メタノール溶液、0.1% TFA メタノール溶液に変更して、それぞれ *n*-ヘキサンとともに液-液抽出を行った。その後、遠心分離 (1000 g \times 10 min) し、メタノール画分を分取し濃縮乾固した。濃縮物に精製水を 1 mL 添加し、その 20 μ L を HPLC 装置に注入し、得られたクロマトグラムから面積百分率を求め回収率を算出した。

蛍光ラベル化¹⁾：EPN およびキヌクリジンをそれぞれ 10 μ g/mL および 5.5 mg/mL とするようベンゼンに溶解した。このベンゼン溶液 10 μ L に、8.3 mg/mL 4-(*N*, *N*-

dimethylaminosulfonyl)-7-(*N*-chloroformylmethyl-*N*-methylamino)benzofrazan (DBD-COCl) ベンゼン溶液 10 μL を加え、60 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間加温した。その後、アセトニトリル (ACN)/1% 酢酸 (1 : 1) 溶液 980 μL を加えて反応を停止し、その 20 μL を HPLC で分析した。

DBD-CO-EPN の分析は、カラム:kinetex 5 μ C18 100A (4.6 \times 250 mm, 5 μm , Phenomenex), 流速 : 1.0 mL/min, カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$, 移動相 : 1% TFA 溶液 (pH 4.5)/ACN (65 : 35), 注入量 : 20 μL , 蛍光検出 : 励起波長 443 nm, 蛍光波長 553 nm で行った。

LC/MS : EPN 濃度が 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/mL となるように母乳に添加し試料溶液とした。各試料溶液 500 μL に 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPN 水溶液 20 μL を添加し混和した。さらに、*n*-ヘキサンと 0.1% 酢酸メタノール溶液を 2 mL ずつ加え 1 分間攪拌し、遠心分離 (3000 rpm \times 10 min) した。その後、分取した下層を濃縮乾固し、メタノール 200 μL で再溶解した溶液の 3 μL を LC/MS で測定した。

母乳中 EPN の測定は、カラム : AQUITY UPLC[®] BEH C18 (2.1 \times 150 mm, 1.7 μm , Waters), 流速 : 0.25 mL/min, カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$, 移動相 A : 0.1% ギ酸水溶液, 移動相 B : 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件 : A/B 95/5 (initial)–95/5 (2 min)–0/100 (10min)–0/100 (5 min hold), イオン化法 : ESI positive モード, キャピラリー電圧 : 3.0 kV, 測定質量電荷比 : m/z 250.134 (EPN), 310.217 (DPN) で行った。

キラル分離²⁾ : EPN 濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調製した母乳を 0.1% 酢酸メタノール溶液と *n*-ヘキサンにより液-液抽出した後、メタノール/イソプロパノール (1 : 1) 200 μL で再溶解し、その 20 μL を HPLC で分析した。HPLC 分析は、カラム : CHIRALCEL OD-H (4.6 \times 250 mm, 5 μm , DAICEL), 流速 : 1 mL/min, 移動相 : *n*-hexane/isopropanol (IPA)/diethylamine/trifluoroacetic acid (90 : 10 : 0.1: 0.1, v/v), 検出 : 215 nm で行った。

【結果および考察】

前処理法 : 添加回収率を向上させることを目的として、市販の牛乳に EPN および内標準物質の DPN を添加し、各種溶媒で液-液抽出を行った。その結果、クロロホルムを用いた抽出³⁾では、EPN と DPN の回収率がそれぞれ 51.7% と 47.4% であるのに対し、メタノールと *n*-ヘキサンによる液-液抽出では、これらの回収率はそれぞれ 80.6% と

55.4% に改善された。さらに、メタノールに酸を添加することで EPN と DPN をイオン形とし、抽出効率が改善するかを確認した結果、いずれの回収率も 80% 程度まで改善された。なかでも、0.1% 酢酸メタノール溶液を用いた抽出ではバラツキが少なかつたため、本研究では前処理法に 0.1% 酢酸メタノール溶液と *n*-ヘキサンによる液-液抽出を用いることとした (Table 1)。

Table 1 各抽出法による EPN および DPN の回収率

	recovery (%)				
	IPA/chloroform	<i>n</i> -hexane/MeOH	<i>n</i> -hexane/ 0.1% AcOH in MeOH	<i>n</i> -hexane/ 0.1% formic acid in MeOH	<i>n</i> -hexane/ 0.1% TFA in MeOH
EPN	51.7 ± 4.5	80.6 ± 0.8	81.7 ± 1.9	81.6 ± 5.9	89.6 ± 5.2
DPN	47.4 ± 3.3	55.4 ± 1.2	79.1 ± 2.1	82.5 ± 4.5	78.5 ± 4.3

Each value was expressed by mean ± S.D. (n = 4)

蛍光ラベル化：高感度化を目的として、EPN を蛍光ラベル化するために、その構造に含まれる第 1 級アミンに着目し、4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) やフルオレスカミン (FLA) 等によるラベル化を検討したが、反応は進行せず発蛍光されなかった。これは EPN の第 1 級アミンがグアニジノ基の一部であり、芳香環と共鳴しているためと考えられた。そこで、芳香族アミンの蛍光試薬である DBD-COCl によるラベル化を検討した。その結果、DBD-CO-EPN の蛍光ピークを測定することができた (Fig. 1)。しかし、DBD-COCl では、現在 1000 ng/mL までの検出感度しか得られていないため、今後、反応条件等を検討することで一層の検出感度の向上を図る予定である。

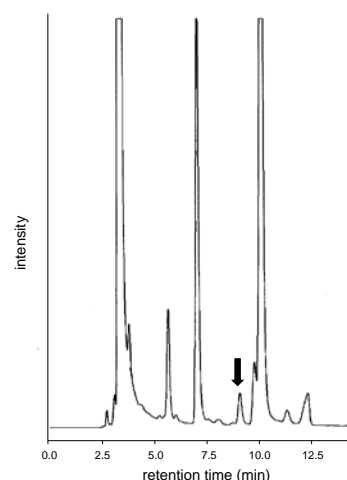


Fig. 1 蛍光誘導化 EPN のクロマトグラム
蛍光検出： $\lambda_{ex} = 443 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 553 \text{ nm}$

LC/MS：EPN の高感度定量法を開発するために、LC/MS による分析法を検討した。EPN を 0.1 ~ 25 ng/mL になるように母乳に添加した標準品について、確立した液-液抽出により得られたメタノール画分を濃縮した後、メタノールで再溶解し検量線を作成した。その結果、0.1 ~ 25 ng/mL の濃度範囲において良好な直線性を示した (Fig.

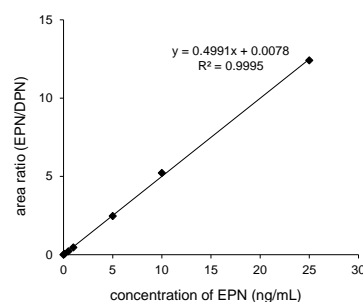


Fig. 2 EPN の検量線

2). 従来法³⁾の HPLC-UV を用いた血漿における定量下限は 10 ng/mL であったのに対し, LC/MS を用いた本法での定量下限は 0.1 ng/mL であり, 約 100 倍高感度となった.

キラル分離: EPN の標準品を用いてキラルカラムによるエナンチオマーの分離を検討した. その結果, 保持時間 15 分と 26 分に各エナンチオマーのピークが確認できた. また, EPN を添加した母乳について分配抽出し分析した結果, 生体試料中の EPN についてもキラル分離できることがわかった.

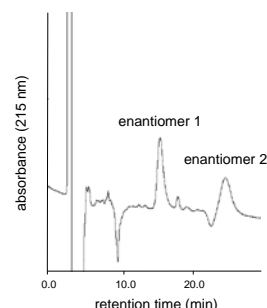


Fig. 3 キラル分離した母乳中 EPN のクロマトグラム

今後, DBD-COCl による蛍光ラベル化の反応条件の最適化を行い, 高感度化を目指すとともに, キラル分離による EPN の各異性体の体内動態についても検討していく予定である.

【謝辞】

本研究の一部は, 平成 28 年度日本大学薬学部萌芽探索型研究助成金により行われた. 関係各位に謝意を表する.

また, 本研究は, 日本大学薬学部 (15-007), 千葉県済生会習志野病院において倫理委員会の承認を得て行われた.

なお, 本研究の成果の一部は, 下記の学会等で発表された.

1. 岩佐千尋, 在間一将, 小瀬英司, 張替直輝, 四宮一総, 田中嘉一, 濱田潤, 林宏行: 母乳中エピナスチン測定のための HPLC 分析法の検討. 日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 27 日・横浜)
2. 岩佐千尋, 在間一将, 目鳥幸一, 鈴木貴詞, 小瀬英司, 張替直輝, 四宮一総, 田中嘉一, 濱田潤, 林宏行: ヒト母乳中への抗アレルギー薬の移行に関する研究—エピナスチンの母乳中濃度—. 日本薬学会第 137 年会 (2017 年 3 月 25 日・仙台)
3. 在間一将: 生体試料中医薬品の分析法の開発. 学部連携ポスターセッション (2017 年 7 月 22 日・東京)

【参考文献】

1. Imai K., Fukushima T., Yokosu H. *Biomed. Chromatogr.* **8**, 107-113 (1994).
2. Saleh O. A., El-Azzouny A. A., Badawy A. M., Aboul-Enein H. Y. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **33**, 413-422 (2010).
3. Ohtani H., Kotaki H., Sawada Y., Iga T. *J. Chromatogr. B* **683**, 281-284 (1996).