

蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる血清中 *N*-ソ ラネシル-*N,N'*-ビス(3,4-ジメトキシベンジル)エタンジア ミンの定量

平井利生[®], 梅澤聖美, 北村正孝, 井上義敬*

(1990 年 11 月 20 日受理)

種々の抗がん剤に対する抗がん作用増強剤として新規に開発された *N*-ソラネシル-*N,N'*-ビス(3,4-ジメトキシベンジル)エタンジアミン (SDB) の血清中定量法を確立した。ヒト血清を中性条件下エタノールで除タンパクした後, SDB をジエチルエーテルで抽出・濃縮し, プレカラム蛍光誘導体化試薬サクシニミド-2-フルオレニルカルバメートのアセトニトリル溶液を加えて室温下 5 分間反応させた。反応液の一部を直接蛍光検出逆相 HPLC で分析したところ, SDB の定量を妨害するピークは認められず, ヒト血清を用いた低濃度領域 (1~40 ng/ml) での直線性もほぼ原点を通る良好な結果が得られた。本法の定量限界は 1 ng/ml (0.5 ml の血清を使用) であり, SDB を 40 及び 500 ng/ml 含むヒト血清を分析して得られた回収率と同時再現性 ($n=5$) はそれぞれ 102.0%, RSD (%) = 1.4 及び 100.9%, RSD (%) = 1.8 であった。本法の応用例として, イヌに 0.5 mg/kg の SDB を単回静脈内投与した際の血清中 SDB 濃度を測定したところ, 血清からの消失相半減期は約 7.3 時間であった。

1 緒 言

SDB {日清製粉・開発番号: N-1379: *N*-ソラネシル-*N,N'*-ビス(3,4-ジメトキシベンジル)エタンジアミン} は, 日清製粉において合成された分子内に二級アミンを有するイソプレノイド誘導体であり, アドリアマイシン, マイトマイシン C, 5-フルオロウラシル, プレオマイシン, ペプレオマイシンなど広範囲な抗がん剤に対して *in vitro*¹⁾²⁾ 及び *in vivo*³⁾⁴⁾ で強い抗がん作用増強効果が確認されている。

SDB は, 分子吸光係数が小さく ($\lambda_{\max}$ 280 nm: $E_{1\%}^{1\text{cm}}=53$ (エタノール)), 又それ自身の有する蛍光強度も弱いことから, 既報において著者らは, SDB に適した蛍光プレ誘導体化試薬として活性カルバメート型のサクシニミド-2-フルオレニルカルバメート (SFC) を開発し, HPLC による高感度検出を可能にした⁵⁾。

本報では更に, HPLC による SFC を用いた血清中 SDB の高感度定量法を確立すると共に, その応用例としてイヌに SDB を静脈内投与した際の血清中 SDB の濃度推移について検討を行った。

2 実 験

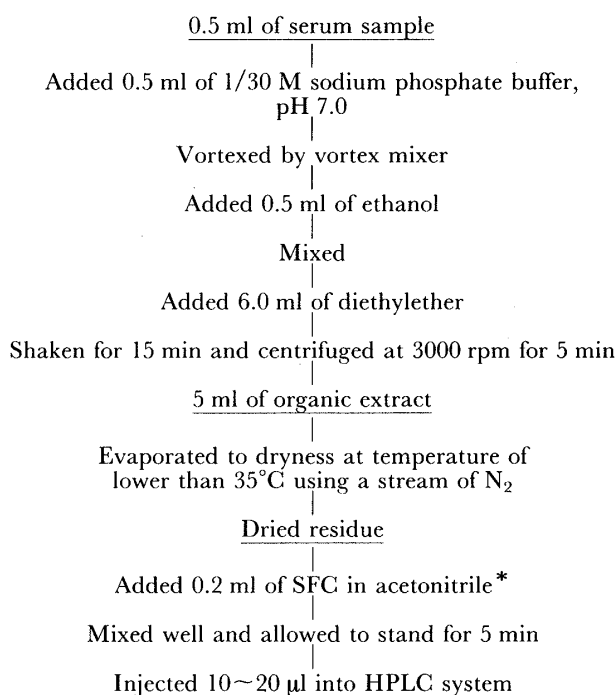
2.1 試 薬

SDB は日清製粉で合成されたものを使用した。ヒト血清は市販の精度管理用プール血清コンセーラ[®] (日水製薬) を用いた。蛍光プレ誘導体化試薬の合成に使用した 2-アミノフルオレンは Aldrich Chem. より, 又炭酸 *N,N'*-ジサクシニミルは東京化成工業よりそれぞれ入手し, 既報⁵⁾ に従って SFC を合成した。その他の試薬はすべて和光純薬工業の試薬特級を用いた。

2.2 機器及び分析条件

島津製作所製 HPLC 用ポンプ LC-6A に逆相 ODS カラム TSK Gel ODS-80TM 4.6×250 mm (東ソー) を接続し, サンプル注入はレオダインループインジェクター 7125 (Berkeley, CA, USA) を使用した。HPLC 用溶離液は 0.2% の酢酸アンモニウムを含むエタノール: メタノール: 酢酸 (650: 347.5: 2.5 v/v%) を用い, 流量は 1.0 ml/min で行った。検出器として日本分光工業の蛍光検出器 820-FP を用い, 励起及び蛍光波長をそれぞれ 286 及び 343 nm に設定した。インテグレーターとしてはクロマトパック C-R3A (島津製作所) を接続した。

* 日本レダリー (株) 製薬製剤研究所: 353 埼玉県志木市柏町 1-6-34



* SFC : succinimido-2-fluorenylcarbamate (50 µg/ml)

Fig. 1 Sample preparation

2・3 試料の前処理操作

血清試料からの SDB の抽出及び蛍光誘導体化操作について Fig. 1 に示した。すなわち、血清 0.5 ml に等容量の 1/30 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 を加えてかき混ぜた後エタノールで除タンパクを行い、更にジエチルエーテルを加えて SDB の抽出を行った。抽出溶媒を 35°C 以下で窒素気流下濃縮乾固した。残留物に SFC のアセトニトリル溶液を加えて溶かし、5 分間室温に放置した後、反応液の一部を直接 HPLC 装置に注入した。

2・4 動物試験

8 月齢の雌性ビーグル犬 2 頭を使用し、0.5 mg/kg の SDB を前肢のとう側静脈より 15 分かけて持続静脈内投与した。投与開始より 5, 10, 15 (投与終了時), 20, 30, 45 分後、更に 1, 2, 4, 8, 24 及び 48 時間後に前肢静脈より血液を採取し、30 分間室温に放置した後血清分離を行った。得られた血清は薬物濃度測定まで -20°C で凍結保存した。

3 結果及び考察

3・1 抽出条件

あらかじめ SDB の 2 µg/100 µl エタノール溶液を 10

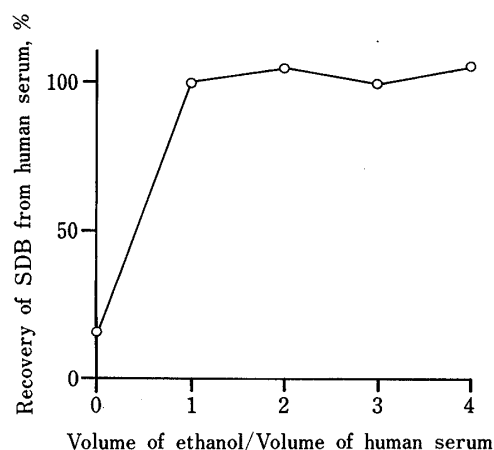


Fig. 2 Effect of ethanol to liquid-liquid partition efficiency for extraction of SDB in serum using diethylether as extract solvent

ml の遠沈管に分取し、40°C 以下で窒素吹き付けにより溶媒を乾固した後ヒト血清 (コンセーラ®) を 0.5 ml 加えてよくかき混ぜ 30 分以上室温放置して血清試料とした。この血清試料から除タンパクなしに直接ジエチルエーテルで SDB を抽出した場合、SDB の回収率は 16% であった。しかし、除タンパクと液-液分配効率の向上を目的にエタノールを加えたところ、有機相への SDB の回収率は急激に高まり、血清と等容量以上のエタノールを加えて除タンパクを行うことによりほとんど 100% の回収率を達成することができた (Fig. 2)。更に回収率の再現性を向上させる目的で血清の液性 (酸性、中性、アルカリ性) について検討を行った結果、エタノール添加の前に 1/30 M リン酸塩緩衝液 pH 7.0 を血清と等容量加えることにより良好な結果が得られた。

3・2 HPLC 条件

SDB は水に極めて溶けにくいメタノール、エタノール及びアセトニトリルには溶けやすいことから、これらの溶媒をベースとして ODS 系カラム TSK Gel ODS-80TM 4.6×250 mm を用いた逆相クロマトグラフィーについて検討した。

その結果、アセトニトリルを含む系では SDB のピークにテILING が観察されたことから、溶離液としてはエタノール:メタノール系が適しており、最終的に 0.2% の酢酸アンモニウムを含むエタノール:メタノール:酢酸 (650:347.5:2.5 v/v%) の系を確立した。本法を用いて SDB 及び SDB と SFC を室温下アセトニトリル中で反応させて得られた SDB-FC を分析したとこ

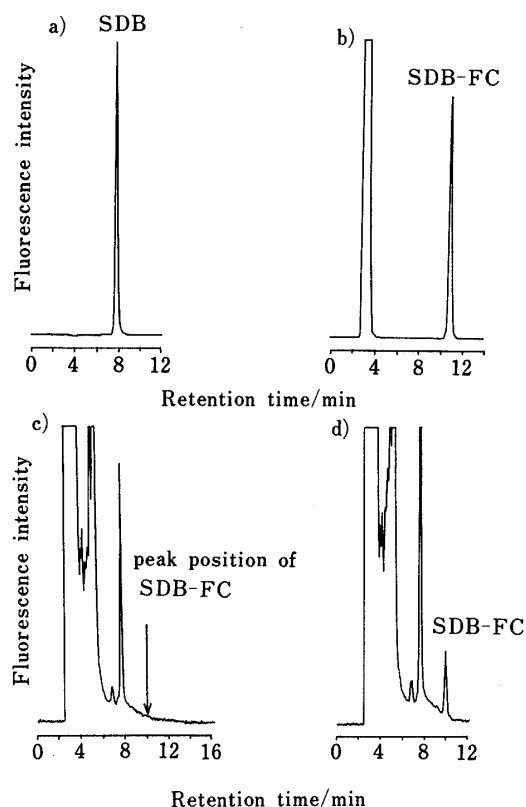


Fig. 3 Chromatograms obtained in the analysis of a) SDB, b) reaction mixture of SFC (100 µg) with SDB (10 µg) in 2 ml of acetonitrile, c) SFC with human serum (Consera®) extract containing no SDB and d) containing 20 ng of SDB per ml of serum

Chromatography was carried out on a reversed-phase TSK Gel ODS-80 TM 4.6×250 mm column using ethanol: methanol: acetic acid=650:347.5:2.5 v/v% containing 0.2% of ammonium acetate as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min. Eluate from the column was monitored at 286 nm for excitation and 343 nm for emission wavelengths except when 280 nm for excitation and 313 nm for emission wavelengths were used in the analysis of non-derived SDB.

ろ, 共に良好なクロマトグラムが得られた. 更に, ヒト血清 (コンセーラ®) に SDB を添加した試料と添加しなかった試料 (ブランク) を用意して Fig. 1 の操作に従って分析したところ, クロマトグラム上 SDB-FC を妨害するピークは観察されず, 本法の条件下で SDB-FC と血清成分及び SFC 由来ピークとの間に十分な分離を果たすことができた (Fig. 3).

3.3 SDB に対する SFC の反応性

SDB と SFC が反応して SDB-FC に至る反応式を Fig. 4 に示した. SDB の二級アミン構造は強い求核性を有しており, 室温下アセトニトリル中で容易に SFC のカルボニル基を攻撃して 5 分以内に対応する尿素誘導体がほぼ 100% の収率で生成されることを前報で報告した⁵⁾.

本研究では, 薬物添加のないヒト血清 (コンセーラ®) から Fig. 1 の操作に従ってジエチルエーテルで抽出して得られた抽出残留物に SDB の既知量と SFC のアセトニトリル溶液を加えて室温放置し, 既報⁵⁾に従って反応性を測定した. その結果, ヒト血清からの抽出物は, SDB と SFC の反応速度及び SDB の収率にほとんど影響しないことが確認された.

3.4 低濃度領域での直線性

薬物添加のないヒト血清 (コンセーラ®) 1 ml 当たり SDB を 0.5~40 ng の範囲で添加した血清試料各 0.5 ml について, 本法の操作に従って分析を行い検量線を作成した. 0.5 ng/ml について若干低い値が得られたが, 1~40 ng/ml の範囲ではほぼ原点を通る良好な直線性が得られ, 0.5 ng/ml の値を含めて計算した相関係数は 0.9998 であった.

3.5 回収率と同時再現性

薬物添加のないヒト血清 (コンセーラ®) に SDB を

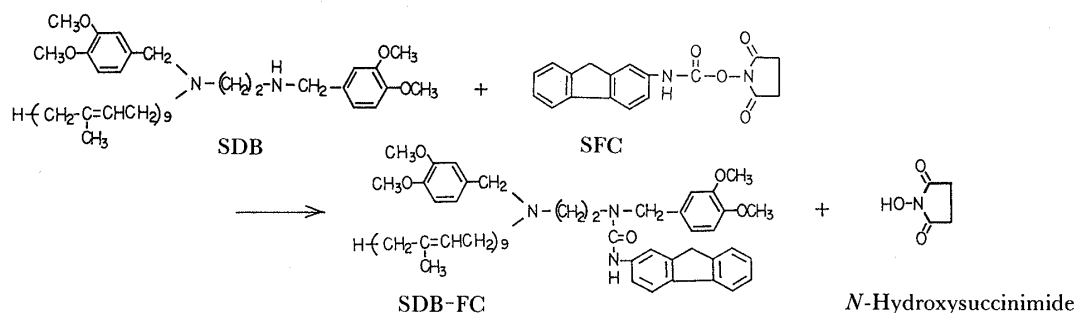


Fig. 4 Reaction scheme for the formation of urea derivative SDB-FC from SFC with SDB

Table 1 Recovery and reproducibility of SDB from serum

Added serum/ ng ml ⁻¹	Mean recovery, %	<i>n</i>	RSD, %
40	102.0	5	1.4
500	100.9	5	1.8

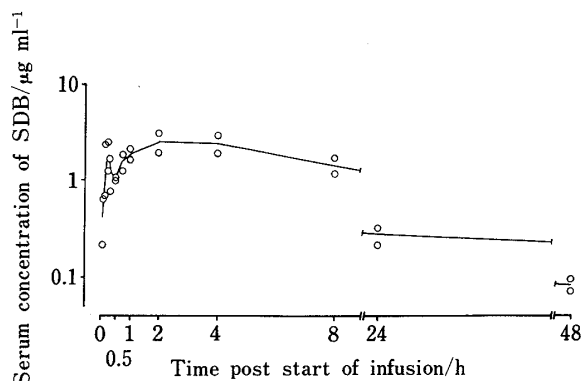


Fig. 5 Change in serum concentration of SDB following single continual intravenous infusion (15 min) of SDB (0.5 mg/kg) to female dogs

○: individual data, —: mean value

添加して終濃度として 40 及び 500 ng/ml に調製した試料各 5 検体ずつについて、本法の操作に従って分析を行ったところ、回収率及び同時再現性共に良好な結果が得られた (Table 1).

3・6 応用例: イヌ血清中 SDB 濃度

SDB 0.5 mg/kg をイヌに 15 分間持続静脈内投与した際、血清中 SDB 濃度は投与後いったん低下し再び緩やかに上昇するパターンを示し、血清中最高濃度 (C_{max}) は投与開始 2 時間後に得られた。SDB はその後緩やかに減少し、血清からの消失相半減期 ($T_{1/2 \text{ term}}$) は約 7.3 時間であった⁶⁾ (Fig. 5).

SDB を投与したイヌ血清を本法で分析して得られたクロマトグラムは、SDB 添加ヒト血清から得られたそれと極めて類似したパターンを示した (Fig. 6)。又本法の条件下では SDB-FC の後に溶出するようなピークは観察されなかったことから、1 検体 15 分以内での分

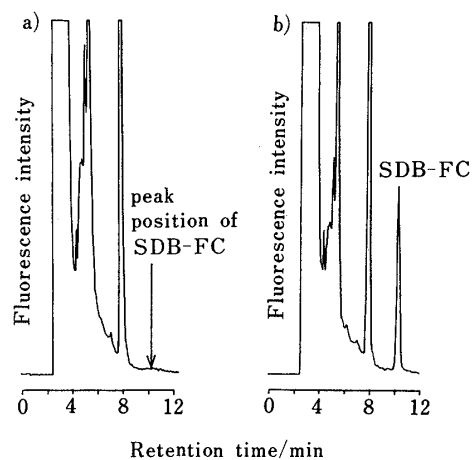


Fig. 6 Chromatograms obtained in the analysis of dog serum a) pretreatment and b) at 24 h after single continual intravenous infusion (15 min) of SDB (0.5 mg/kg) to a female dog

Chromatographic conditions are the same as in Fig. 3.

析が可能であった。

本法は感度、特異性及び再現性に優れており、簡便な操作と 1 検体を 15 分以内に分析できる HPLC 条件を備えていることから、血清中 SDB の日常分析法として有用であると考えられる。

終わりに、本研究に際しイヌの薬物投与及び採血を行って下さいました成毛 驥室長はじめ日本レダリー生物研究所薬物動態研究室の諸研究員に深謝致します。

文 献

- 1) S. Akiyama, M. Kuwano, T. Yamaguchi, M. Nakagawa, T. Yoshida, N. Shiraishi, T. Kiyosue, M. Arita: *J. N. C. I.*, **76**, 947 (1986).
- 2) H. Suzuki, A. Tomida, T. Nishimura: *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 298 (1990).
- 3) 田中基裕, 佐々木琢磨, 遠藤良夫: 第 49 回日本癌学会総会講演要旨集, p. 419 (1990).
- 4) 藤田昌秀, 藤田史子, 田口鉄男: 第 49 回日本癌学会総会講演要旨集, p. 422 (1990).
- 5) 平井利生, 北村正孝, 井上義敬: 分析化学, **40**, 233 (1991).
- 6) 山岡 清: “マイコンによる薬物体内動態解析法”, p. 79 (1987), (南江堂).

☆

Determination of *N*-solanesyl-*N,N'*-bis(3,4-dimethoxybenzyl)ethanediamine in serum by HPLC using new fluorescence labeling reagent succinimido-2-fluorenylcarbamate. Toshio HIRAI, Kiyomi UMEZAWA, Masataka KITAMURA and Yoshi-

norio INOUE {Chemical and Formulation Laboratories, Lederle (Japan), Ltd., 1-6-34, Kashiwa-cho, Shiki-shi, Saitama 353}

A novel isoprenoid derivative *N*-solanesyl-*N,N'*-bis(3,4-dimethoxybenzyl)ethanediamine (SDB) is an anti-tumor activity potentiating agent for a variety of anti-tumor agents, *e.g.*, adriamycin, 5-fluorouracil and mitomycin C. A simple and sensitive method for the determination of SDB in serum has been developed by HPLC using precolumn fluorescence labeling reagent succinimido-2-fluorenylcarbamate (SFC). After deproteinization with ethanol, SDB in human serum was extracted with diethylether. Extracted SDB was converted into its fluorenylcarbamyl derivative SDB-FC using SFC in acetonitrile. Reaction was completed within 5 min at room temperature. A part of the reaction mixture was injected directly into a HPLC system. HPLC was performed on a reversed-phase TSK Gel ODS-80TM 4.6×250 mm column using ethanol: methanol: acetic acid=650:347.5:2.5 v/v containing 0.2% of ammonium acetate as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min. Eluate from the column was monitored fluorometrically at 343 nm while excited at 286 nm. Under these conditions, SDB-FC could be separated completely from the other components in the samples including excess SFC. The detection limit of the assay was 1 ng/ml: the good linear relationships between peak area and the concentration of SDB were found in even low ranges, 1 to 40 ng/ml of human serum. Mean recovery and reproducibility ($n=5$) of the method were 102.0% and RSD (%)=1.4 for 40 ng/ml, and 100.9% and RSD (%)=1.8 for 500 ng/ml of human serum, respectively. Present method was successfully applied to the analysis of serum after a single intravenous administration of 0.5 mg/kg of SDB to female dogs. Terminal half lives of SDB in dog serum was *ca.* 7.3 h.

(Received November 20, 1990)

Keyword phrases

determination of *N*-solanesyl-*N,N'*-bis(3,4-dimethoxybenzyl)ethanediamine in serum by HPLC; precolumn fluorescence labeling reagent succinimido-2-fluorenylcarbamate; human serum; analysis of serum in dog given *N*-solanesyl-*N,N'*-bis(3,4-dimethoxybenzyl)ethanediamine.