

# 新規プレラベル蛍光誘導体化法による医薬品及び ビスフェノール類の分析

藤野 博之

財団法人 西日本産業衛生会 北九州健診診療所PET画像診断部,  
803-0812 福岡県北九州市小倉北区室町3-1-2

## Analysis of drugs and bisphenols with new prelabeling fluorescence derivatization methods

Hiroyuki Fujino

PET Diagnostic Imaging Center, Kitakyushu Medical Checkup Clinic,  
3-1-2 Muromachi, Kokura-Kita, Kitakyusyu 803-0812, Japan.

### Abstract

Simple and sensitive prelabeling fluorescence derivatization methods were developed for theoretical drug monitoring of amantadine and acetaminophen and for monitoring of bisphenols. First, amantadine was converted to the corresponding fluorescent derivative by reaction with DMEQ-COCl as fluorescence derivatization reagent. Furthermore, this method was successfully applied to the determination of amantadine in serum of healthy volunteers and hospitalised patients. Secondary, a new fluorescence derivatization reagent, DTBBIT, was synthesized and proved to react readily with acetaminophen. Utilizing this reagent, saliva acetaminophen level was measured without any sample purification. Finally, a new derivatization reagent, DTBIT, was synthesized for argon laser-induced fluorescence detection and found to be useful for the detection of bisphenols. These methods permit the highly sensitive and simple determination of amantadine, acetaminophen and bisphenols.

**Key Words** : prelabeling fluorescence derivatization method, amantadine, acetaminophen, bisphenol.

## 緒言

蛍光ラベル化試薬を用いる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -蛍光検出法は、生体試料のような複雑な試料中に極く微量にしか存在しない生理活性物質や薬物などを選択的に高感度で分析できることから様々な分野で汎用されている。しかし、臨床における治療薬物モニタリング (TDM) への蛍光ラベル化法の導入に関しては、迅速な分析が可能な誘導体化試薬の利用が望ましく、生体試料の前処理の簡便化なども含め、未だに検討の余地が多く残されている。

また、生殖・発生の異常を引き起こす可能性がある外因性内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) であるビスフェノール類の環境中濃度や環境動態を明らかにしていくためには高感度な測定法の開発が必要であるが、この分野における蛍光ラベル化試薬の普及はあまり実現されていない。

そこで、医薬品アマンタジン及びアセトアミノフェンのTDM、更に環境ホルモンであるビスフェノール類の分析に応用できるプレラベル蛍光誘導体化法の開発を目的に本研究を行った。

### 1) 抗パーキンソン病薬アマンタジンの分析法の開発<sup>1,2)</sup>

アマンタジンは、ドーパミン遊離作用<sup>3)</sup>及びその脳内取り込み阻害作用<sup>4)</sup>を有することからパーキンソン症候群治療薬<sup>5)</sup>として、また脳機能障害患者の脳代謝改善薬として幅広く臨床の場で用いられている。しかし、血中濃度が1.5µg/mL以上になると重篤な神経毒性 (幻覚・錯乱など) を引き起こす<sup>6)</sup>。従って、本剤を有効かつ安全に用いるためには患者ごとのTDMが必要である。そこで、蛍光ラベル化試薬を用いる血清中アマンタジンの簡便で高感度なHPLC-蛍光検出法を構築した。本法の原理は蛍光ラベル化試薬 6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxoquinoline-2-carbonyl chloride (DMEQ-COCl)<sup>7)</sup> がトリエチルアミン存在下、アマンタジンの第一アミノ基と反応し、高蛍光性DMEQアミドを生成することに基づいている (Fig. 1)。DMEQ-COClによるアマンタジンの蛍光誘導体化及びHPLC条件について検討し、Chart 1 に示す高感度HPLC-蛍光検出法を確立した。検出限界 (S/N = 3) は 54 pg/mL血清 (注入量当り 18 fmol) で、従来の蛍光ラベル化試薬 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl chloride を用いるHPLC-蛍光検出法<sup>8)</sup> よりも約 50 倍高感度であった。

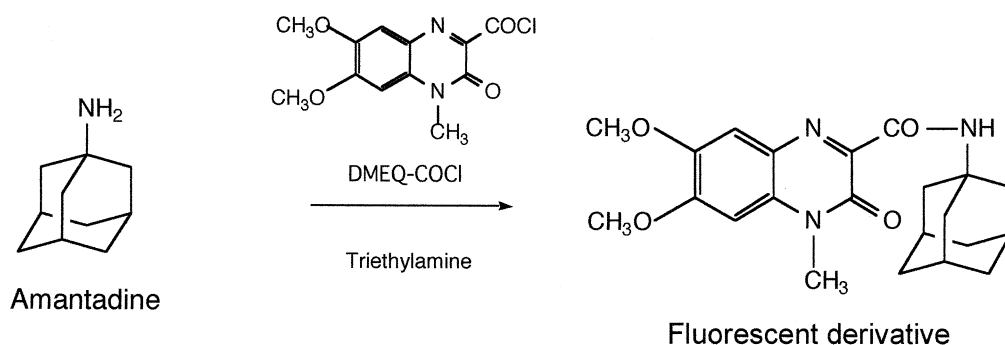
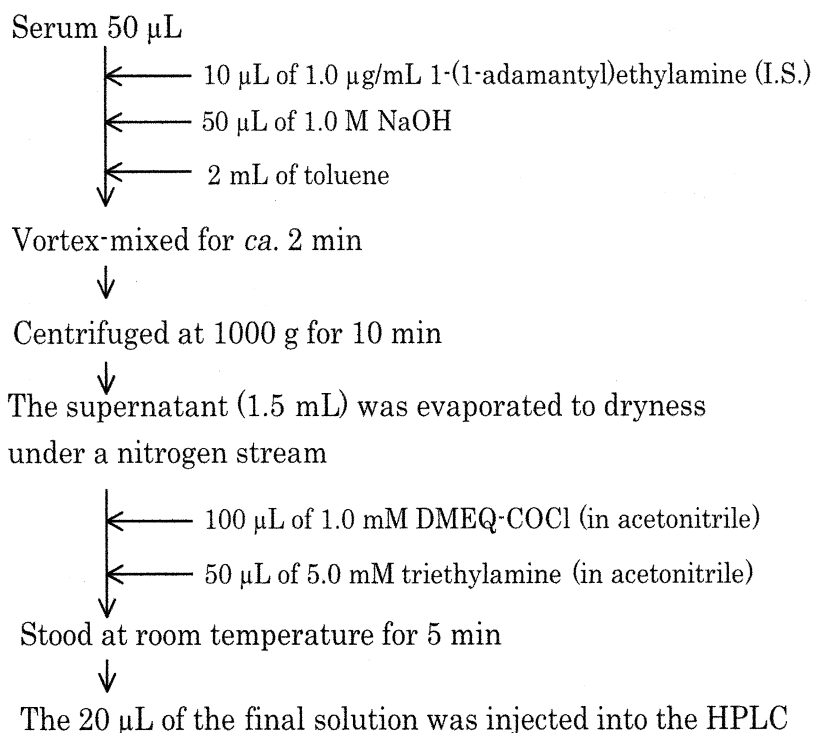


Fig. 1 Fluorescence derivatization of amantadine with DMEQ-COCl

Chart 1 Procedure for the fluorescence derivatization of amantadine in serum with DMEQ-COCl



アマンタジンを単回投与した健常者及び常用している入院患者のTDMを実施し、体内動態解析を行った。Fig. 2にアマンタジンを単回投与した健常者の

血清から得られたクロマトグラムを示す。その結果，入院患者では個々の患者間で大きな変動が認められた。

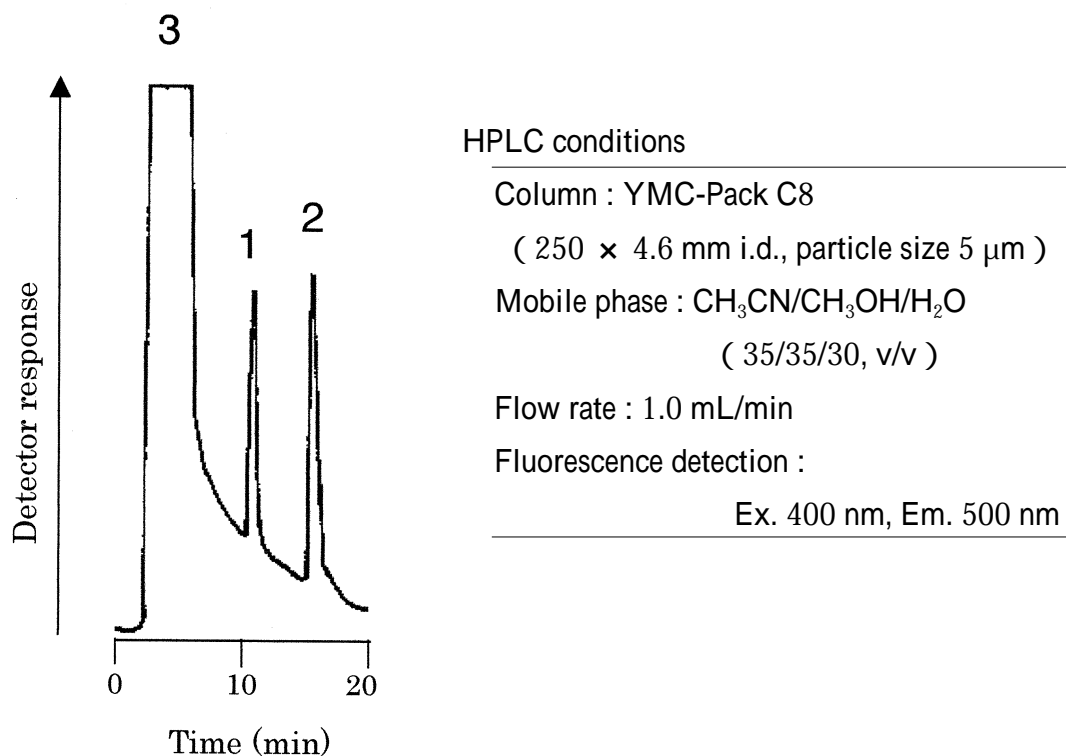


Fig. 2 Chromatogram of a healthy human serum after single 50 mg oral dose of amantadine hydrochloride.

Peaks and concentrations( ng/mL serum ): 1, amantadine hydrochloride( 39 ); 2, I.S. ( 200 ); 3, reagent blank component

更に，治療中患者の血中濃度の長期的な変動を確認するため，脳梗塞後遺症で塩酸アマンタジン 50 mgを1日2回あるいは3回服用中の入院患者7名の血中濃度を月に1回ずつ採血して6ヶ月間追跡した ( Fig. 3 )。その結果，全ての患者の血中濃度は月別での変動はあったが，1.5 μg/mL以上の中毒域まで上昇することはなく，治療中の投与量及び投与方法に問題のないことが確認された。

以上，アマンタジンのプレラベル蛍光誘導体化法を開発し，その有用性を確認した。

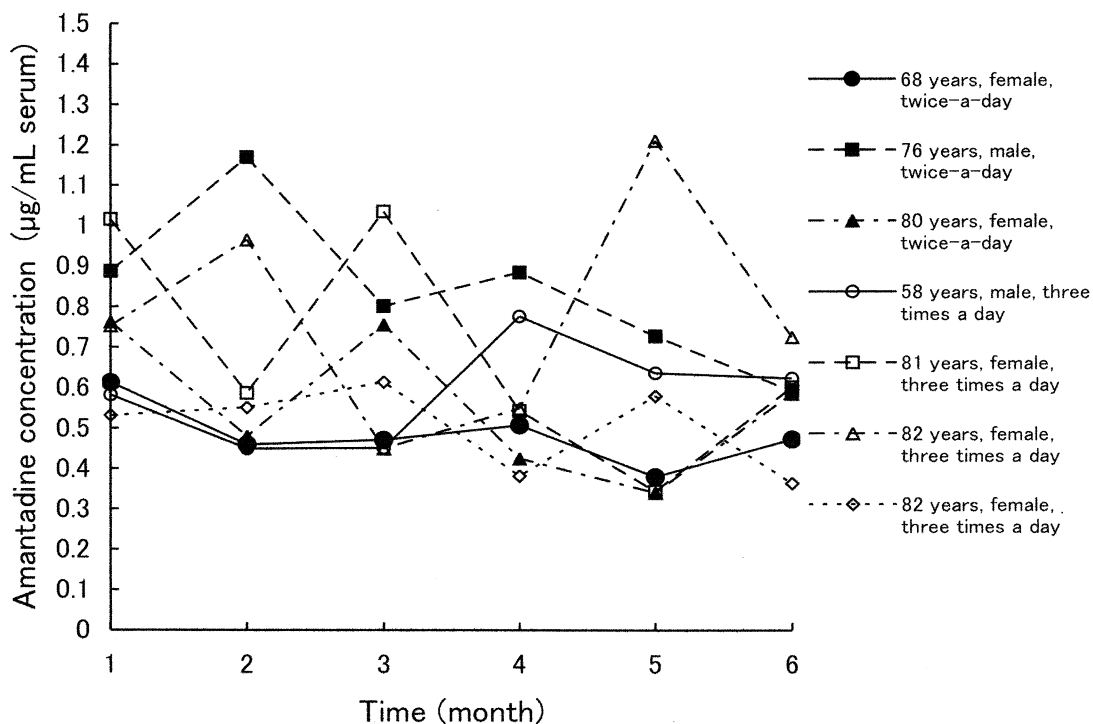


Fig. 3 Serum concentrations of amantadine in early morning of seven hospitalised patients with cerebral infarction at once-a-month for six months. Symbol: closed, administrated 50 mg of amantadine hydrochloride twice-a-day; open, administrated 50 mg of amantadine hydrochloride three times a day.

## 2) 解熱鎮痛薬アセトアミノフェンの分析法の開発<sup>9)</sup>

アセトアミノフェン (APAP) は, 中枢性に作用する解熱鎮痛薬として幅広く臨床で使用されている<sup>10)</sup>。本剤は, 投与した5 - 10%がシトクロムP-450酵素系により, 肝毒性を示すN-アセチルパラベンゾキノンイミン (NAPQI) に代謝される<sup>11)</sup>。治療量ではこのNAPQIは肝臓でグルタチオン抱合を受け無毒化されるが, 大量のAPAPを摂取するとNAPQIが蓄積され重篤な肝細胞壊死を起こすことが知られており<sup>12)</sup>, 解毒薬N-アセチルシステインの補充治療や肝毒性の予後を判断するためにもAPAPのTDMが必要である。

既に, J.P.Glynnらにより, APAPを投与されたヒト血漿中濃度が唾液中濃度に相関することが報告されていた<sup>13)</sup>ため, 生体試料として非侵襲的に採取で

きるヒト唾液を用いる APAP の HPLC-蛍光検出法を検討した。本法の原理は新規に合成した蛍光ラベル化試薬 12-(3,5-dichloro-2,4,6-triazinyl)benzo[d]benzo-[1'2'-6,5]isoindolo[1,2-b][1,3]thiazolidine (DTBBIT) が水酸化ナトリウム存在下 APAP のフェノール性水酸基と反応し、高蛍光性エーテル誘導体を生成することに基づいている (Fig. 4)。

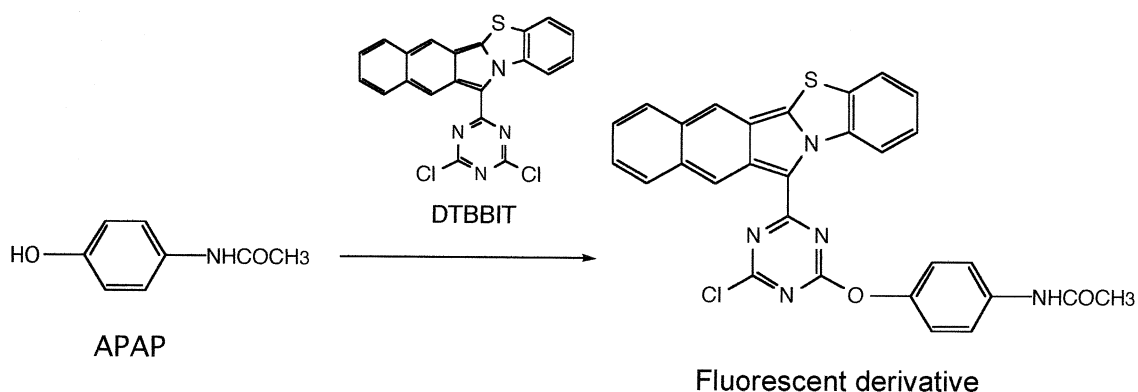
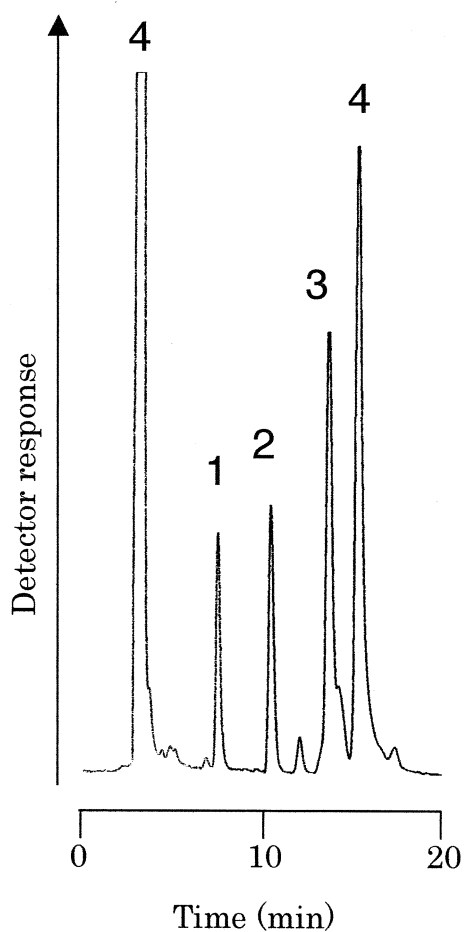
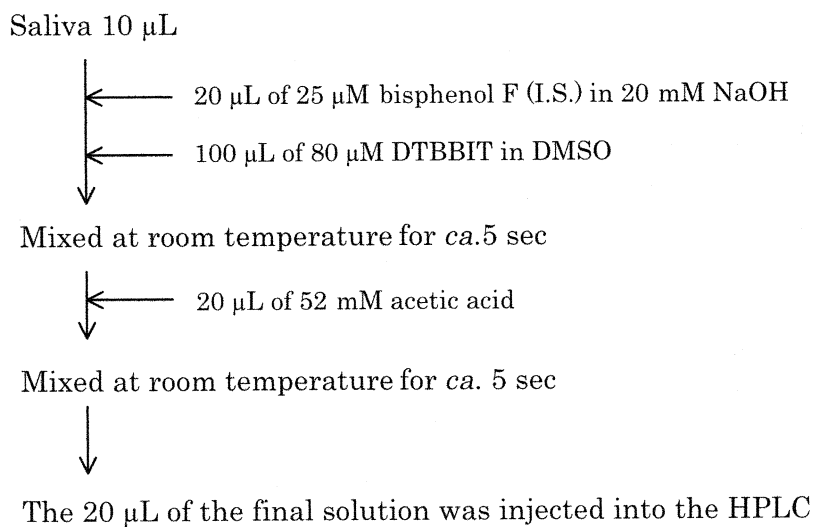


Fig. 4 Fluorescence derivatization of APAP with DTBBIT.

DTBBITは、テトラヒドロフラン中、2,3-naphthalenedialdehyde, *o*-aminothiophenol 及び cyanuric chloride を室温で反応後、カラム精製して合成した。メタノール中のDTBBITの蛍光波長は、励起極大波長 540 nm、蛍光極大波長 560 nmであった。DTBBITによるAPAPの蛍光誘導体化及びHPLC条件について検討し、Chart 2 に示す高感度HPLC-蛍光検出法を確立した。本法により得られたクロマトグラムをFig. 6に示す。検出限界 (S/N = 3) は 0.1  $\mu\text{g/mL}$  唾液 (注入量当り 800 fmol) で従来のHPLC-UV法<sup>12)</sup>よりも約5倍高感度であった。実際にAPAP投与後のヒト唾液中APAP濃度推移を測定した結果、Fig. 7に示すように、APAP濃度は投与50分後に最高値を示し、以後減衰した。この結果は、既報<sup>13)</sup>とよく一致していた。

以上、APAPの簡便なプレラベル蛍光誘導体化法を開発し、その有用性を確認した。

Chart 2 Procedure for the fluorescence derivatization of acetaminophen in saliva with DTBBIT



HPLC conditions

---

Column; TSKgel ODS-80TM  
 ( 250  $\times$  4.6 mm I.D., particle size 5  $\mu$ m )

Guard column; TSKgel ODS-80TM  
 ( 15  $\times$  3.2 mm I.D., particle size 5  $\mu$ m )

Mobile phase; CH<sub>3</sub>OH

Flow rate; 1.0 mL/min

Fluorescence detection;  
 Ex. 540 nm, Em. 560 nm

---

Fig. 6 Chromatogram obtained with saliva spiked with APAP and I.S..  
 Peaks and concentrations(  $\mu$ g/mL saliva ):  
 1, APAP( 10 ); 2, I.S.( 10 ); 3, DTBBIT; 4,  
 reagent blank components.

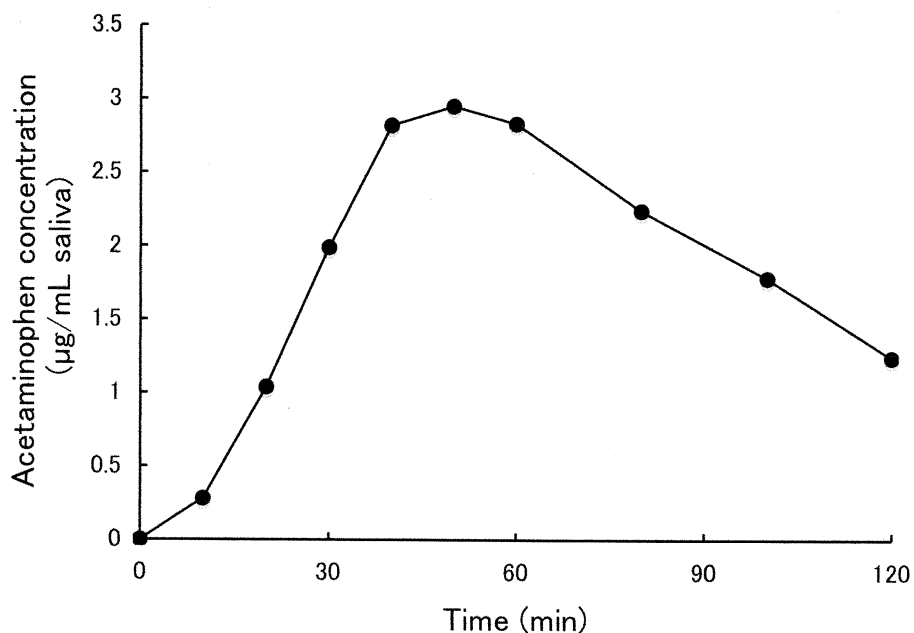


Fig. 7 Saliva concentration of APAP after the oral administration of APAP( single dose, 200 mg ) to a healthy person( male, 48 years old, 60 kg ).

### 3) 環境ホルモンビスフェノール類の分析法の開発<sup>14)</sup>

ビスフェノール類は正常なホルモン機能のバランスを攪乱し、野生生物や人において、生殖・発生の異常を引き起こす可能性がある内分泌攪乱化学物質、すなわち環境ホルモンである<sup>15-18)</sup>。その分析には様々な分析法が報告されているが、いずれも多量な試料を濃縮して用いなければならず、改善の余地が残されている。そこで超高感度分析のために励起光源としてレーザーの使用が可能な蛍光誘導体化試薬を検討する中、新規に合成した3-(dichloro-1,3,5-triazinyl)-benz[*f*]isoindolo[1,2-*b*][1,3]thiazolidine (DTBIT) は、励起極大波長を 490 nm に、蛍光極大波長を 536 nm に有していた。この励起波長はアルゴンイオンレーザーの発振波長 488 nm に近似しており、より高感度検出が期待されるレーザー励起蛍光検出への応用が期待された。そこで本試薬とビスフェノール類との反応性について検討を行った。本法は、新規に合成した蛍光ラベル化試薬 DTBIT が水酸化ナトリウム及び相間移動触媒 tetra-*n*-pentylammonium bromide (TPABr) 存在下ビスフェノール類のフェノール性水酸基と反応し、高蛍光性



エーテル誘導体を生成することに基づいている。Fig. 8 に、ビスフェノール類と DTBIT の蛍光反応を示す。

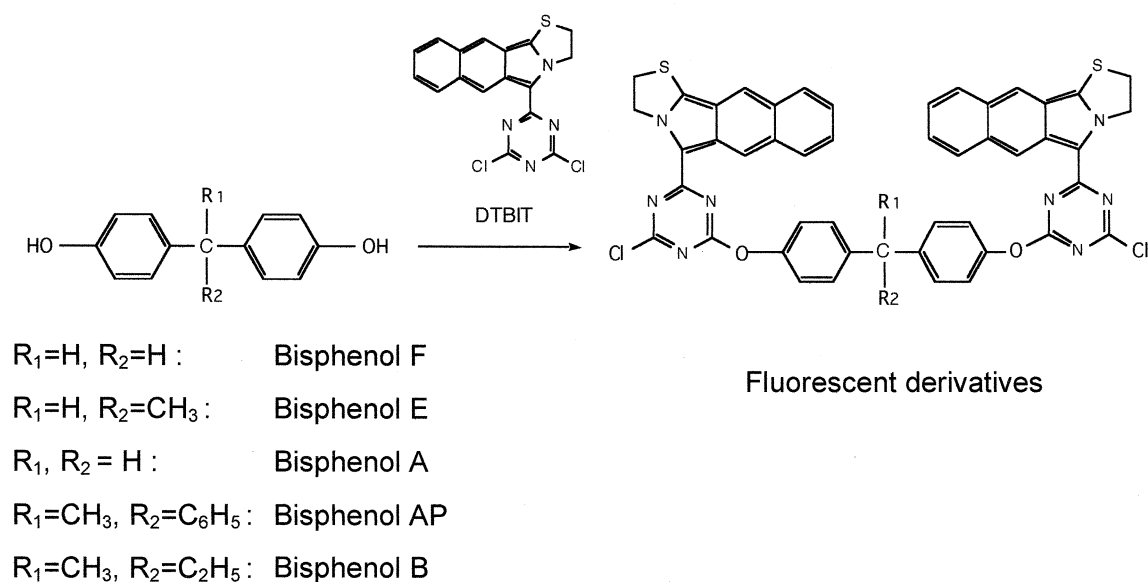


Fig. 8 Fluorescence derivatization of bisphenols with DTBIT.

DTBITは、テトラヒドロフラン中、2,3-naphthalenedialdehyde, 2-aminoethanethiol 及び cyanuric chloride を室温で反応後、カラム精製して合成した。まず、DTBIT とビスフェノールA (BPA) の反応性を水酸化ナトリウム存在下、アセトニトリル水溶液及びアセトン水溶液中で検討した。しかし、対応する誘導体のピークはクロマトグラム上に出現しなかった。そこで、K.H.DeSilva ら<sup>19)</sup> が水溶液中のエストロゲン類を蛍光誘導体化する際に使用している相間移動触媒を用いて二層間での誘導体化反応について検討を行った。その結果、相間移動触媒 TPABr 及び水酸化ナトリウム存在下、室温で反応させたときクロマトグラム上に対応する誘導体のピークを生じた。そこで、DTBIT による BPA の蛍光誘導体化及び HPLC 条件について検討し、Chart 3 に示す高感度 HPLC 蛍光検出法を確立した。5 種類のビスフェノールの標準混合液を用いて得られたクロマトグラムを Fig. 9 に示す。検出限界 (S/N = 3) は注入量当たり 10 fmol と従来の蛍光検出法<sup>20-23)</sup> よりも約 8 倍高感度であった。DTBIT と BPA の反応生成物の構造は、LC-MS 分析の結果から BPA に 2 つの DTBIT が結合していることを確認した。

### Chart 3 Procedure for the fluorescence derivatization of bisphenols with DTBIT

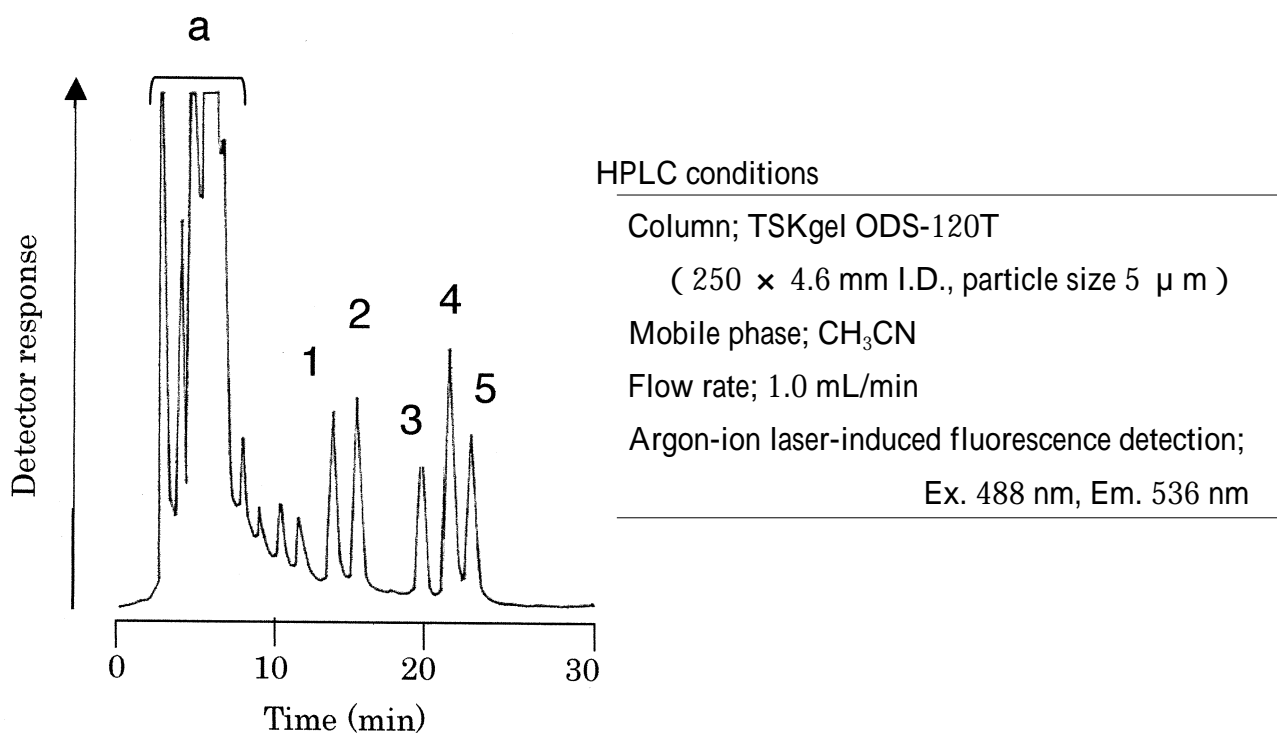
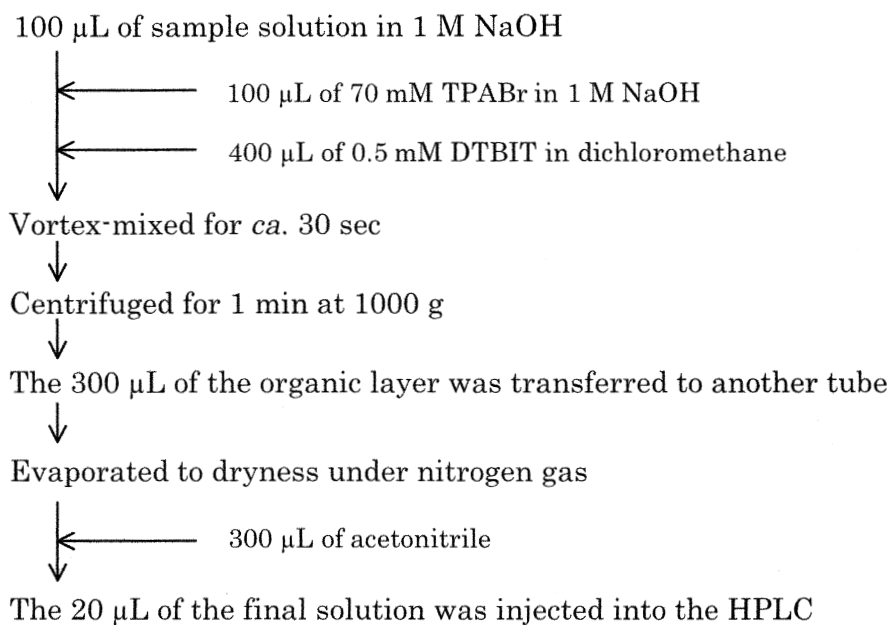


Fig. 9 Chromatogram obtained with a standard solution of bisphenols( each 10 pmol/injection volume ).

Peaks: 1, Bisphenol F; 2, Bisphenol E; 3, Bisphenol A; 4, Bisphenol AP; 5, Bisphenol B; a, reagent blank components.

## 結論

新規プレラベル蛍光誘導体化法による抗パーキンソン病薬アマンタジンの分析法を開発した。本法の実試料分析に対する有用性を示すため、健常者及び入院患者の血清中アマンタジン濃度の定量を行った。本法は血清中アマンタジンをトルエンで抽出後、蛍光ラベル化試薬 DMEQ-COCl で室温 5 分間で標識でき、しかも高感度で再現性良く定量できることからその有用性が示唆された。

続いて、解熱鎮痛薬アセトアミノフェン (APAP) 分析のために新規に DTBBIT を合成し、これを用いる唾液中 APAP の HPLC-蛍光分析法を開発した。本法は、唾液の前処理を必要とせず、水酸化ナトリウム存在下 5 秒間で APAP を標識でき、HPLC に直接唾液試料を注入できるため迅速な定量が可能であった。しかも既存の HPLC-UV 法よりも高感度で再現性良く定量できることから、DTBBIT は有用なプレカラム蛍光誘導体化試薬であることが示された。

最後に、ビスフェノール類を分析するために新規に DTBIT を合成し、これを用いるビスフェノール類の HPLC-アルゴンレーザー励起蛍光分析法を開発した。本法は、水溶液中ビスフェノール類を相間移動触媒 TPABr 存在下ジクロロメタン層に移送後、室温 30 秒間で標識でき、既存の HPLC-蛍光法よりも高感度であることからその有用性が示唆された。

## 謝辞

本研究は、福岡大学薬学部薬品分析学教室 山口政俊 教授 の終始変わらざる暖かい御指導と御鞭撻の下に行われました。謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤な御指導と激励を賜りました同教室 能田均 教授、石田淳一 助教授、吉田秀幸 助手 並びに 轟木堅一郎 助手に謹んで感謝いたします。

## 参考文献

- 1) T.Iwata, H.Fujino, J.Sonoda, M.Yamaguchi, *Anal.Sci.*, **13**( 1997 )467 ( Supplement ).
- 2) H.Fujino, T.Iwata, M.Mishima, O.Tsuzuki, H.Yoshida, M.Yamaguchi, *Anal.Pharmac.*, **4**( 2003 )56.

- 3 ) P.F.Von Voigtlander, K.E.Moore, *Science*, **174**( 1971 )408.
- 4 ) F.F.Brown, P.H.Redfern, *Br.J.Pharmacol.*, **58**( 1976 )561.
- 5 ) R.S.Schwab, A.C.England, D.C.Poskanzer, *J.Am.Med.Assoc.*, **208**( 1969 )  
1168.
- 6 ) T.S.Ing, J.T.Daugirdas, L.S.Soung, *Can.Med.Assoc.J.*, **120**( 1979 )695.
- 7 ) T.Iwata, M.Yamaguchi, S.Hara, M.Nakamura, *J.Chromatogr.*, **362**,  
( 1986 )209.
- 8 ) R.F.Suckow, M.F.Zhang, E.D.Collins, M.W.Fischman, T.B.Cooper,  
*J.Chromatogr.B*, **729**( 1999 )217.
- 9 ) H.Fujino, H.Yoshida, H.Nohta, M.Yamaguchi, *Anal.Sci.*, **21**( 2005 )1121.
- 10 ) J.Snooner, J.Harvev, *J.Int.Med.Res.*, **4**( 1976 )1.
- 11 ) 福本真理子 , *月刊薬事* , **44**( 2002 )97.
- 12 ) T.D.Boyer, S.L.Rouff, *J.Am.Med.Assoc.*, **218**( 1971 )440.
- 13 ) J.P.Glynn, W.Bastain, *J.Pharm.Pharmacol.*, **25**( 1973 )420.
- 14 ) H.Fujino, H.Yoshida, H.Nohta, M.Yamaguchi, *Anal.Sci.*, **16**( 2000 )975.
- 15 ) S.C.Nagel, F.S.vom Saal, K.A.Thayer, M.G.Dhar, M.Boechler,  
W.V.Welshons, *Environ.Health.Perspect.* **105**( 1997 )70.
- 16 ) F.S.vom Saal,P.S.Cooke, D.L.Buchanan, P.Palanza, K.A.Thayer, S.C.  
Nagel, S.Parmigiani, W.V.Welshons, *Toxicol.Ind.Health.*, **14**( 1998 )  
239.
- 17 ) K.L.Howdeshell, A.K.Hotchikiss, K.A.Thayer, J.G.Vandenbergh,  
F.S.vom Saal, *Nature*, **401**( 1999 )763.
- 18 ) A.V.Krishnan, P.Stathis, S.F.Permuth, L.Tokes, D.Feldman,  
*Endocrinology*, **132**( 1993 )2279.
- 19 ) K.H.DeSilva, F.B.Vest, H.T.Karnes, *Biomed.Chromatogr.*, **10**( 1996 )  
318.
- 20 ) Y.Sen, M.Wada, N.Kuroda, K.Hirayama, H.Nakazawa, *Anal.Sci.*, **17**  
( 2001 )697.
- 21 ) Y.Hayashi, R.Matsuda, Y.Haishima,T.Yagami, A.Nakamura,  
*J.Pharm.Biomed.Anal.*, **28**( 2002 )421.
- 22 ) M.Naassnera, M.Mergler, *J.Chromatogr.A*, **945**( 2002 )133.
- 23 ) C.Nerín, M.R.Philo, J.Salafranca, L.Castle, *J.Chromatogr.A*, **963**  
( 2002 )375.