

# Development of analytical methods for antimalarial drugs in biological samples using on-line photoreactor with peroxyoxalate chemiluminescence detection

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻

氏名 Abena Amponsaa-Karikari

【目的】化学発光反応を利用する分析法は、優れた感度と広い定量範囲を有することから微量生体成分や医薬品の分析に有用な方法となっている。化学発光分析法の中でも、過シュウ酸エステル化学発光 (peroxyoxalate chemiluminescence, PO-CL) は高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC) との組み合わせが容易であることから、その化学発光検出手段として最も広く用いられている。PO-CL ではシュウ酸エステルと過酸化水素との反応により活性中間体が生じ、これが共存する蛍光物質を励起することにより発光が生じる。従って、PO-CL は過酸化水素や蛍光物質の分析に広く用いられているが、それ以外の化合物を PO-CL により定量することは困難であり、その応用範囲には限界がある。この問題の解決のために、測定対象に紫外線を照射することで、これを過酸化水素へと変換後に PO-CL 検出するという方法が申請者の所属する研究室において開発されている。すなわち、有機過酸化物に紫外線照射を行うことで過酸化水素へと変換させ、これを PO-CL により検出する原理に基づく有機過酸化物の HPLC-PO-CL 定量法を開発している。さらに最近、芳香族化合物の水溶液に紫外線を照射することで、芳香族化合物量に応じた過酸化水素が発生することを見出し、これを PO-CL により検出する芳香族化合物の HPLC 定量法を開発した。この方法においては、特に phenanthrene 等の多環芳香族炭化水素でより強い発光が得られることを確認している。

本研究ではこれらの紫外線照射 PO-CL 定量法の医薬品分析への応用として、抗マラリア薬 artemisinin 及び halofantrine のオンライン紫外線照射 HPLC-PO-CL 定量法を開発を行った。Artemisinin 及び halofantrine (Fig. 1) はそれぞれ構造中に分子内 endoperoxide 及び phenanthrene 骨格を有していることから、紫外線照射により効率的に過酸化水素が発生し、PO-CL により高感度に検出可能であると考えられた。

マラリアは世界で最も頻発している疾患のひとつであり、広い地域で感染が認められ多くの人命が危機にさらされている。Artemisinin や halofantrine をはじめとするいくつかの抗マラリア薬がこの治療あるいは予防のために開発され、用いられている。しかし、い

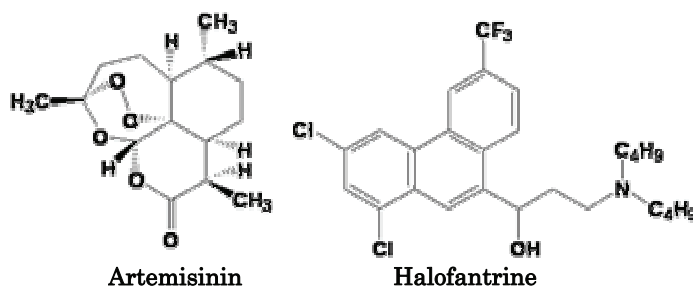


Fig. 1. Structures of artemisinin and halofantrine.

くつかの国で流通している抗マラリア薬のおよそ3分の1が偽造薬あるいは規格外薬であると見積もられており、大きな問題となってきた。このような不正医薬品の世界的急増に対処するためにも、選択的で信頼性の高い分析法の開発が必要である。また、高感度な分析法は臨床現場において抗マラリア薬の有効性を調査するためにも有用であると考えられる。

【実験方法】抗マラリア薬の定量に用いた HPLC システムの模式図を Fig. 2 に示す。HPLC システムは2台の送液ポンプ、インジェクター、分離カラム、紫外線ランプ、化学発光検出器及び記録計により構成されている。抗マラリア薬は acetonitrile と imidazole 緩衝液の混液を移動相として ODS カラムにより分離された後、紫外線ランプに巻き付けたテフロンチューブに導入することによりオンラインで紫外線照射が行われる。紫外線照射後の試料はシュウ酸エステルと蛍光物質から成る化学発光試薬と混合され、そのとき生じる発光を化学発光検出器により検出する。

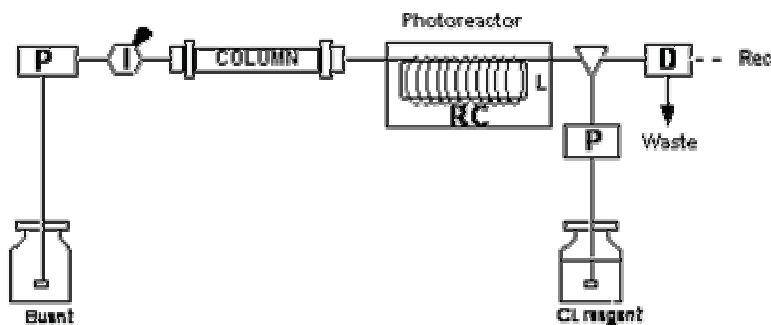


Fig. 2. HPLC-PO-CL system for the determination of antimalarial drugs. P, pump; I, injector; L, low-pressure mercury lamp; RC, reaction coil; D, CL detector; Rec, recording device.

### 【結果及び考察】

#### 1. ヒト血清中 artemisinin の定量法の開発 [1]

Artemisinin は中国産の薬用植物である青嵩 (*Artemisia annua* L.) から抽出された効果的なマラリア治療薬である。Artemisinin はその構造中に紫外・可視部に強い吸収を持たず、また誘導体化試薬による標識が可能な官能基を有していないことから、高感度定量が困難とされている化合物である。

Artemisinin 定量のための HPLC-PO-CL システムの各条件の最適化を行った結果、移動相として 70% の acetonitrile を含む 20 mM imidazole-HNO<sub>3</sub> 緩衝液 (pH 8.5)、化学発光試薬としては 0.5 mM bis(2,4-dinitrophenyl)oxalate (DNPO) と 1.5 μM 2, 4, 6, 8-tetrathiomorphorinopyrimido[5,4-*d*]pyrimidine (TMP) の混液を用いたときに最も良好な結果が得られた。

Artemisinin 標準品を添加したヒト血清を用いて、本法のヒト血清試料への応用性を評価した。ヒト血清からの artemisinin の抽出法には *n*-hexane による液-液抽出を用いることで、94%の良好な回収率が得られた。Fig. 3 には artemisinin 標準品を添加したヒト血清及び未添加の血清試料のクロマトグラムを示している。ヒト血清に由来する妨害成分の影響を受けることなく選択的に artemisinin を検出可能であった。本法によるヒト血清中の artemisinin の検出下限 (S/N=3) は 17.5 ng/ml であった。

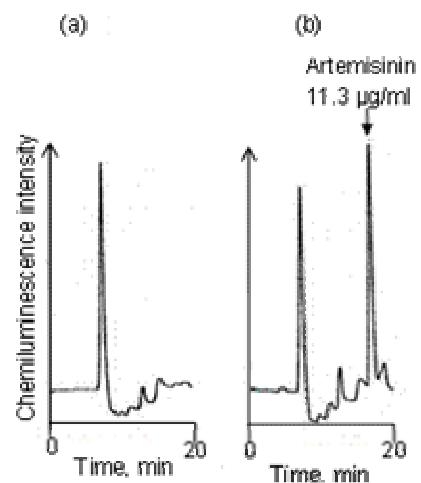


Fig. 3 Chromatograms of (a) human serum and (b) human serum spiked with artemisinin.

## 2. ラット血漿中 halofantrine 及び代謝物の同時定量法の開発 [2]

Halofantrine は薬剤耐性マラリアの治療のために開発された抗マラリア薬であり、世界中で広く用いられている。Halofantrine は脂肪食摂取によりその血中濃度が変動すること及びその代謝物である *N*-desbutylhalofantrine も薬理作用を有することが報告されており、これらの血中濃度モニタリングは重要であると考えられる。

Halofantrine 及び *N*-desbutylhalofantrine の同時定量のための HPLC-PO-CL システムの条件の最適化を行った結果、移動相として 73% の acetonitrile を含む 30 mM imidazole-HClO<sub>4</sub> 緩衝液 (pH 9.1)、化学発光試薬として 0.5 mM bis[(2-(3,6-dioxaoctyloxycarbonyl)-4-nitrophenyl)oxalate (DOPO) と 1.5 μM TMP の混液を用いたときに最も良好な結果が得られた。

ラット血漿に内標準物質 (internal standard, I.S.) として 9,10-diphenylanthracence を添加後、acetonitrile による除タンパクとそれに続く *n*-hexane を用いる液-液抽出により、ラット血漿から halofantrine 及び *N*-desbutylhalofantrine を抽出した。ラット血漿中 halofantrine 及び *N*-desbutylhalofantrine の検量線を作成した結果、0.01-0.8 μg/mL の濃度範囲でピーク高さ比と濃度との間に良好な直線関係 ( $r=0.997$ ) が得られ、halofantrine 及び *N*-desbutylhalofantrine の検出下限 (S/N=3) はそれぞれ 1.5 及び 1.4 ng/ml であった。本法は血漿内在成分の妨害を受けることなく halofantrine 及び *N*-desbutylhalofantrine を良好に定量可能であった (Fig. 4)。

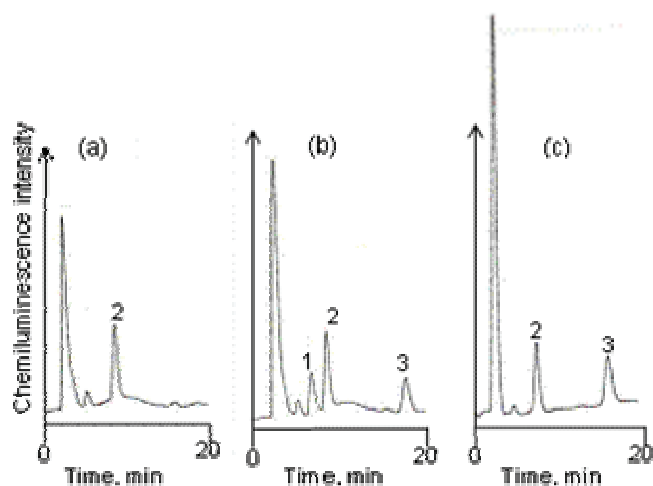


Fig. 4. Chromatograms of (a) rat plasma spiked with I.S., (b) rat plasma spiked with halofantrine, *N*-desbutylhalofantrine and I.S., (c) rat plasma obtained 10 h after an oral dose of halofantrine to rat. Peaks: 1=*N*-desbutylhalofantrine, 2=I.S., 3=halofantrine.

【結論】 オンライン紫外線照射装置を組み込んだ HPLC-PO-CL システムにより、分子内 endoperoxide や芳香環を構造中に有する抗マラリア薬を高感度かつ選択的に定量する方法を開発した。本研究で開発した方法は、血液中の抗マラリア薬を簡単な前処理操作のみで他の生体成分の影響を受けることなく定量することが可能であり、これらの医薬品の定性、定量はもとよりとして血中濃度モニタリング法としても有用であると考えている。

### 【基礎となった学術論文】

1. Amponsaa-Karikari, A., Kishikawa, N., Ohba, Y., Nakashima, K., Kuroda, N., *Biomed. Chromatogr.* **20**, 1157-1162 (2006)
2. Amponsaa-Karikari, A., Kishikawa, N., Ohyama, K., Nakashima, K., Kuroda, N., *Biomed. Chromatogr.* in press