〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
37 (6) 461-466 (1991)

高速液体クロマトグラフィーによるアントラニル酸系解熱鎮痛消炎剤 の微量分析とその裁判化学的応用

篠塚達雄, 武井節子, 黒田直人, 栗原克由, 柳田純一
慶應義塾大学医学部法医学教室

Micro-Determination of Anthranilic Acid Derivatives of Anti-Inflammatory Drugs by High Performance Liquid Chromatography and Its Application to Forensic Chemistry

TATSUO SHINOZUKA, SETSUKO TAKEI, NAOHITO KURODA,
KATSUYOSHI KURIHARA and JUNICHI YANAGIDA

*Department of Legal Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi,
Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan*

(Received May 9, 1991)

A sensitive method for the determination of four anthranilic acid derivatives (diclofenac sodium, aluminium flufenamate, mefenamic acid and tolfenamic acid) of analgesic and anti-inflammatory drugs was developed by using high performance liquid chromatography (HPLC).

It was found that the four drugs were converted into methylphthalimide (MPI) derivatives in a constant yield by reaction with *N*-chloromethylphthalimide at 60°C for 30 min. The productions of the MPI derivatives were confirmed by mass spectrometry. The MPI derivatives of the four drugs tested showed satisfactory results of separation and sensitivity by HPLC using C₁₈ bonded phase with acetonitrile: H₂O (80:20, v/v) as mobile phase at 282 nm. The calibration curves of the MPI derivatives of the four drugs were linear from 1.0 to 5.0 µg/ml. The detection limits of the four drugs were 0.5–5 ng.

The extraction procedure of the four anthranilic acid derivatives added in the plasma and urine was performed by using Extrelut[®] 1 column. Yields of column extraction of 100 µl of plasma and urine samples (containing 0.5 µg of anthranilic acid derivatives) with 6 ml of ethyl acetate were 84–106%.

The present procedure may be an easier and more convenient method for the analysis of anthranilic acid derivatives of analgesic and anti-inflammatory drugs and could be applicable for the determinations of these drugs in forensic samples.

Keywords — anti-inflammatory drugs; anthranilic acid derivatives; *N*-chloromethylphthalimide; HPLC; Extrelut[®] column

緒 言

アントラニル酸系薬物は、非ステロイド系解熱鎮痛消炎剤として臨床的に幅広く用いられている薬剤であるが、時として本薬剤による中毒例も見られ、¹⁾ 法医裁判化学的にも重要な薬物となっている。また、アントラニル酸系解熱鎮痛消炎剤の一つであるメフェナム酸を服用後、骨髄障害から無顆粒球症となり、これに続発した敗血症で死亡したと思われる一

例についても報告がなされている。²⁾ これらの事例では、生体試料中の微量な薬剤の検出が要求されるが、アントラニル酸系薬物は尿中に排泄される未変化体の量が微量であることが知られている。^{3,4)} したがって、生体試料中の微量なアントラニル酸系薬物を検出するには、迅速・簡便で、しかも従来より高感度な分析法が必要となる。

アントラニル酸系薬物の分析法としては、これまでにガスクロマトグラフィー、^{4,5)} ガスクロマトグラ

フィー・マススペクトロメトリー (GC-MS)⁶⁾ 及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁷⁾ などの報告がなされている。しかし、数種類のアントラニル酸系薬物の同時分析法は、これまでのところ報告例が見当たらない。

一般に HPLC 分析では、薬毒物の検出器に対する感度上昇を得るために、紫外吸収の強い感能基を導入する方法、蛍光試薬による誘導体化法などが知られている。⁸⁾ 今回検討した4種のアントラニル酸系薬物は、いずれも分子中にカルボキシル基を有するため、*N*-クロロメチルフタルイミド試薬⁹⁾を用いた誘導体化が、UV 検出器に対する検出感度を上昇させるものと期待される。そこで著者らは、*N*-クロロメチルフタルイミド試薬を用いた誘導体化の条件、並びに HPLC による誘導体の分析条件を検討し、血漿と尿からの薬物回収条件についても検討を行い、裁判化学分野において有用なアントラニル酸系薬物の高感度微量分析法を確立したので報告する。

実 験

1. 試料及び試薬 ジクロフェナクナトリウム (sodium 2-(2,6-dichloroanilino)-phenylacetate, ボルタレン) とメフェナム酸 (*N*-(2,3-xylyl) anthranilic acid, ポンタール) は、それぞれ日本チバガイギーと三共から供与された原末を使用した。フルフェナム酸アルミニウム (aluminium *N*-(3-trifluoromethyl-phenyl) anthranilate) は、オパイリン錠 (大正製薬社) からクロロホルムで抽出し精製

したものを使用した。トルフェナム酸 (*N*-(3-chloro-2-methylphenyl) anthranilic acid) は、クロタム (大鵬薬品工業社) から酢酸エチルで抽出し精製したものをを使用した (Table I), *N*-クロロメチルフタルイミドは東京化成工業の製品を使用した。アセトニトリルと蒸留水は、HPLC 分析用 (関東化学社) を、その他の試薬類は特級品を使用した。

2. 電子衝撃-質量 (EI-MS) 分析 アントラニル酸系薬物のメチルフタルイミド (MPI) 誘導体は、下記 3. に示す HPLC 分析の条件下で分離することにより精製した。得られた MPI-誘導体の質量分析は、日本電子 JMX-AX 505 H 型質量分析計を用いて直接導入法で測定した。イオン電流は 300 μ A で、イオン化電圧は 70 eV で測定した。

3. HPLC 分析 HPLC 分析は以下の条件下で行った。機器；日立液体クロマトグラフィー (L-6200 形), 検出器 (L-4200 形 UV-VIS), D-2000 形クロマトデータ処理装置。カラム；LiChrospher RP-18(e), 内径 4 mm, 長さ 250 mm. 移動相；アセトニトリル-蒸留水 (80:20, v/v). 流量；0.8 ml/分. 測定波長；282 nm.

4. 誘導体の調製 アセトニトリルに溶解したアントラニル酸系薬物の試料溶液 50 μ l を 5 ml 容のネジ蓋付試験管に取り、ついで 50 mm *N*-クロロメチルフタルイミドアセトニトリル溶液と 50 mm トリエチルアミンアセトニトリル溶液をそれぞれ 50 μ l 加え密栓した後、水浴中で 60°C, 30 分間反応させて調製した。

TABLE I. Anthranilic Acid Derivatives of Anti-inflammatory Drugs

Sample	General name	Chemical structure	Commercial name
1	Diclofenac sodium		Voltaren
2	Aluminium flufenamate		Opyrin
3	Mefenamic acid		Pontal
4	Tolfenamic acid		Clotam

5. 検量線の作成 4種のアントラニル酸系薬物は、それぞれ1.0 mg/ml濃度のアセトニトリル溶液を調製して標準溶液とした。各標準液から1, 2, 3, 4及び5 µg/mlの溶液を作成し、それぞれの0.1 mlを減圧乾固した後、内部標準物質として50 µg/ml濃度の*n*-ウンデカン酸を含むアセトニトリル溶液100 µlに再溶解した。その溶液の50 µlを試料として前記4.の操作により誘導体を調製後、4 µlをHPLCに注入して内部標準法により検量線を作成した。

6. 血漿及び尿からの薬物抽出 血漿及び尿100 µl(薬物各0.5 µgを添加)を試料とし、それに0.05 N塩酸0.05 mlと蒸留水0.65 mlを加えExtrelut® 1カラム(メルク社)に注入した。室温で10分間放置した後、酢酸エチル6 mlで溶出した。溶出液は減圧乾固後、前記5.と同様に操作して、検量線より各薬物の回収率を求めた。

結果及び考察

1. メチルフタルイミド誘導体のEI-MSによる同定

メチルフタルイミド(MPI)誘導体はHPLCによって分取した後、EI-MSによって同定した。MPI-ジクロフェナメート(Fig. 1-1), MPI-フルフェナメート(Fig. 1-2), MPI-メフェナメート(Fig. 1-3)及びMPI-トルフェナメート(Fig. 1-4)のEI-MSスペクトルには、*N*-メチレンフタルイミドに由来すると考えられるフラグメントイオン m/z 160(基準ピーク)と、 m/z 454 [M^+], m/z 440 [M^+], m/z 400 [M^+] 及び m/z 420 [M^+] にそれぞれの分子イオンピークが認められた。特にMPI-ジクロフェナメートのスペクトルには、塩素の同位体存在比($Cl_{35}:Cl_{37}=3:1$)の違いにより m/z 454, 456, 458の分子ピークがほぼ理論値通り9:6:1のピーク比で出現した。したがってEI-MSによる同定は、4種薬物のメチルフタルイミド誘導体の生成を示した。

2. MPI誘導体生成反応における*N*-クロロメチルフタルイミドの最適量の検討

MPI誘導体生成反応における*N*-クロロメチルフタルイミド試薬の最適量を検討した。各標準液から調製した試料50 µl(各薬物をそれぞれ5 nmol含む)に、*N*-クロロメチルフタルイミドを0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 5.0 µmol含むアセトニトリル溶液50 µlを添加し、さらに対応する量のトリエチルアミンを含むアセトニトリル溶液50 µlを加え、60°C, 30分間反応した時の各誘導体の生成率を比較した(Table

Fig. 1. The EI Mass Spectra of MPI Derivatives of Anti-inflammatory Drugs

1: MPI-diclofenamate, 2: MPI-flufenamate,
3: MPI-mefenamate, 4: MPI-tolfenamate.

II).

5 nmol量のアントラニル酸系薬物に対して、*N*-クロロメチルフタルイミド誘導化試薬を2.5 µmol以上添加した時、MPI誘導体はいずれも100%近い生成率を示した。この実験成績から、誘導化反応の試薬添加量は2.5 µmolとした。そこでMPI誘導体の調製には、50 mM濃度の*N*-クロロメチルフタルイミドアセトニトリル溶液50 µlと同濃度のトリエチルアミンアセトニトリル溶液50 µlとを使用することとした。

3. MPI誘導体生成反応における温度と時間の検討

標準溶液から調製した濃度10 µg/mlの試料溶液

TABLE II. Effect of *N*-Chloromethylphthalimide (*N*-CMPI) Amounts on the Formation of Methylphthalimide (MPI) Derivatives of Anti-inflammatory Drugs

<i>N</i> -CMPI (μ mol)	Triethylamine (μ mol)	Formation(%) of MPI derivatives of anti-inflammatory drugs			
		Diclofenac sodium	Aluminium flufenamate	Mefenamic acid	Tolfenamic acid
0.05	0.05	17.9	5.3	10.4	15.3
0.25	0.25	69.8	21.4	54.7	31.2
0.5	0.5	102.4	42.0	84.0	73.0
2.5	2.5	100.0	100.0	100.0	100.0
5.0	5.0	104.1	107.4	100.5	129.1

Anti-inflammatory drugs, 5nmol; Reaction temperature, 60°C; Reaction time, 30min.

50 μ l に, 50 mM *N*-クロロメチルフタルイミドアセトニトリル溶液と 50 mM トリエチルアミンアセトニトリル溶液を, それぞれ 50 μ l 加えた後, 誘導化の条件を検討した. 40°C, 60°C, 80°C の水浴中で各々 15 分, 30 分, 45 分, 60 分間反応させた後に, 反応液 4 μ l を HPLC に注入し得られたクロマトグラム上のピーク面積から MPI 誘導体の生成率を測定した (Fig. 2). 40°C の加熱における MPI 誘導体の生成は, いずれも 60 分までは不十分であった. 60°C と 80°C では, 30 分から 60 分まで誘導体の安定した生成がみられた.

以上の結果より, *N*-クロロメチルフタルイミド試薬による 4 種のアントラニル酸系薬物の誘導化条件は, 60°C, 30 分間加熱とした.

4. HPLC による MPI 誘導体の分析

4 種のアントラニル酸系薬物の MPI 誘導体は, クロマトグラム上でいずれもシャープなピークを示した (Fig. 3). Dusci と Hackett は,⁷⁾ HPLC を用いてメフェナム酸とトルフェナム酸の分析を行っているが, クロマトグラム上での両薬物の相互分離はなされていない. 本法によれば MPI-ジクロフェナメート, MPI-フルフェナメート, MPI-メフェナメート, MPI-トルフェナメートの順に検出され, 各誘導体間の相互分離も充分であった.

5. 検量線の作成

4 種類のアントラニル酸系薬物の検量線は, Fig. 4 に示すように, 1.0–5.0 μ g/ml の濃度で原点を通る直線性が得られ, 充分高感度分析が可能であることが考えられた.

6. MPI 誘導体の検出感度

UV 検出器 (測定波長: 282 nm) における 4 種のアントラニル酸系薬物とそれらを MPI 誘導体とした時の検出感度を, HPLC に注入したアントラニル酸系薬物 ng 当りのピーク面積比として比較した

(Table III). 4 種薬物を MPI 誘導体とすることにより, 誘導化前と比較してそれぞれ 10–30 倍の感度上昇がみられた. MPI 誘導体とした時の絶対検出限界は, ジクロフェナクナトリウム (0.5 ng), フルフェナム酸アルミニウム (1.0 ng), メフェナム酸 (1.0 ng), トルフェナム酸 (5.0 ng) と高感度の値が得られ, 充分微量分析ができることが確認された.

Dasci と Hackett は, メフェナム酸とトルフェナム酸を HPLC で分析し検出限界が 20–200 ng であること,⁷⁾ 血清中のメフェナム酸を GC で分析し検出限界が 50 ng であること⁸⁾などを報告している. また, Hieda らは⁹⁾ GC-MS を用いてメフェナム酸を分析し, 血中での検出限界が 0.6–20 μ g/ml であり, 尿中でのそれが 0.05–20 μ g/ml であることを報告している. したがって, 本法によるアントラニル酸系薬物の検出限界は GC-MS 法にほぼ匹敵し, 十分に高感度なものと見える. さらに, 本法は GC-MS 法と比較して, アントラニル酸系薬物の検索が迅速・簡便に行える点で有力であり, 裁判化学分野における分析法として有用なものと考えられる.

7. Extrelut[®] 1 カラムによる血漿及び尿からの薬物の回収

裁判化学の分野における薬物分析は, 検査に必要な試料量が充分に得られるとは限らず, 微量な生体試料からの分析が予想される. そこで微量な生体試料からの薬物分析に, 本定量法の応用を試みた. 血漿及び尿 100 μ l に 4 種薬物の標準品をそれぞれ 0.5 μ g ずつ添加したものを試料として, Extrelut[®] 1 カラムによる薬物の回収を検討した. 4 種類のアントラニル酸系薬物は, 塩酸酸性 (pH 2.0) 条件下, 6 ml の酢酸エチルでいずれも効率よくカラムから回収され, それらの回収率はいずれも 80%以上を示した (Table IV). また, 血漿及び尿からの抽出物では, クロマトグラム上で定量値に影響するような夾

Fig. 2. Effect of Reaction Temperature and Time on the Formation of MPI Derivatives of Anti-inflammatory

—○—: diclofenac sodium, —●—: aluminium flufenamate,
—□—: mefenamic acid, —■—: tolfenamic acid.

Fig. 3. Chromatogram of the MPI Derivatives of Four Anti-inflammatory Drugs by HPLC

1: MPI-diclofenamate, 2: MPI-flufenamate,
3: MPI-mefenamate, 4: MPI-tolfenamate,
5: MPI-derivative of *n*-undecanoic acid (Internal standard).

雑ピークは認められなかった。

結 論

4種のアントラニル酸系解熱鎮痛消炎剤（ジクロフェナクナトリウム、フルフェナム酸アルミニウム、メフェナム酸、トルフェナム酸）のHPLCによる微量分析法を検討した。4種の薬物は *N*-クロロメチルフタルイミド試薬と 60°C, 30 分間反応させることにより、それぞれ効率良く誘導体化された。生成し

Fig. 4. Calibration Curves of Anti-inflammatory Drugs

—○—: MPI-diclofenamate, —●—: MPI-flufenamate,
—□—: MPI-mefenamate, —■—: MPI-tolfenamate.

たメチルフタルイミド誘導体はクロマトグラム上での相互分離もよく、しかも UV 検出器に対する分析感度が 10—30 倍上昇した。各薬物の検出限界は 0.5—5 ng であった。血漿及び尿からの薬物回収も Extrelut[®] 1 カラムを使用することにより迅速・簡便に行うことが出来た。

以上のことから、本定量法はアントラニル酸系解熱鎮痛消炎剤の高感度微量分析に応用でき、裁判化学上においても有用なものと認められた。

TABLE III. Relative Sensitivities between Anti-inflammatory Drugs and Their MPI Derivatives

Compounds	Sensitivity ^{a)}
Diclofenac sodium	0.37 (1.0)
MPI-diclofenamate	2.70 (7.3)
Aluminium flufenamate	0.05 (1.0)
MPI-flufenamate	1.68 (33.6)
Mefenamic acid	0.11 (1.0)
MPI-mefenamate	1.93 (17.5)
Tolfenamic acid	0.02 (1.0)
MPI-tolfenamate	0.50 (25.0)

a) Peak area per 1 ng of anti-inflammatory drugs at wavelength of 282nm.

TABLE IV. Recoveries of Anti-inflammatory Drugs from Plasma and Urine Samples by Using Extrelut[®] 1 Column

Drugs	Recovery (%)	
	Plasma	Urine
Diclofenac sodium	95.9 ± 4.2	95.7 ± 1.1
Aluminium flufenamate	106.0 ± 8.9	84.6 ± 7.3
Mefenamic acid	99.6 ± 11.3	95.6 ± 4.4
Tolfenamic acid	96.8 ± 5.4	84.3 ± 7.6

Data present means ± S.D. for five determinations.

謝辞 本研究を行うに当り貴重な薬品を供与された各社に深謝いたします。本研究に対し、財団法人 金原一郎記念医学医療振興財団より助成金が交付されています。

引用文献

- 1) A.H. Stead, A.C. Moffat, *Human Toxicol.*, **3**, 437 (1983); M. Balali-Mood, M. Critchley, A.T. Proudfoot, L.F. Prescott, *Lancet*, **1**, 1354 (1981).
- 2) 重田聡男, 高津光洋, 国吉 昇, 阿部光伸, 法医学の実際と研究, **33**, 241 (1990).
- 3) 加藤隆一, 野口英世, 土屋為弘, 寺川雅人, 臨床薬理, **5**, 393 (1974); 砂川慶介, 加藤達夫, 佐藤吉江, 竹内弘剛, 加藤 誠, 市橋保雄, 薬理, **10**, 653 (1978); 田村豊幸, 藤田一郎, 山口博司, 吉井義寿, 基礎と臨床, **9**, 1241 (1975).
- 4) 国仲晃行, 菅井憲一, 斎藤俊雄, 森 登, 木村良平, 村田敏郎, 薬学雑誌, **101**, 232 (1981).
- 5) L.J. Dusci, L.P. Hackett, *J. Chromatogr.*, **161**, 340 (1978); H. Roseboom, A. Hulshoff, *ibid.*, **173**, 65 (1979).
- 6) Y. Hieda, M. Kageura, T. Tsuji, *Bull. of TIAFT*, **19**, 46 (1987).
- 7) L.J. Dusci, L.P. Hackett, *J. Chromatogr.*, **172**, 516 (1979).
- 8) 本間春雄 (編集), “液体クロマトグラフィーハンドブック,” 日本分析化学会関東支部編, 丸善, 東京, 1985, pp.264—272.
- 9) W. Lindner, W. Santi, *J. Chromatogr.*, **176**, 55 (1979).