薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (4) 343-346 (1982)

ガスクロマトグラフィーによる血漿中クロフェキサミド およびその代謝産物の微量分析

気賀沢和雄,* 田中 洵, 清水弘明, 斎藤守弘

グレラン製薬株式会社研究所

Determination of Clofexamide and Its Metabolites in Plasma by Gas Chromatography

KAZUO KIGASAWA,* MAKOTO TANAKA, HIROAKI SHIMIZU and MORIHIRO SAITO

Research Laboratories, Grelan Pharmaceutical Co., Ltd., Sakurashinmachi, Setagaya-ku, Tokyo

(Received September 28, 1981)

A specific and sensitive gas chromatographic method was developed for the simultaneous determination of clofexamide, (2-(*p*-chlorophenoxy)-*N*-(2-diethylaminoethyl)-acetamide), and its two *N*-dealkylated metabolites in the plasma. The method involves a solvent extraction, trifluoroacetylation and analysis by gas chromatography on a 5% OV-17 column with flame thermionic detection. The *N*-(2-methylaminopropyl) analogue of clofexamide was used as an internal standard. The plasma concentration of each substance can be measured at the levels down to 4 ng/ml.

The method was applied to determine the plasma levels of intact clofexamide and the metabolites after intravenous and oral administration to rabbits.

Keywords—clofexamide; *N*-dealkylated metabolites; gas chromatography; flame thermionic detector; trifluoroacetyl derivative; plasma concentration

Clofexamide, (2-(*p*-chlorophenoxy)-*N*-(2-diethylaminoethyl)acetamide, 以下 CX) は Thuillier ら¹⁾ によって合成され, 局所麻酔, 抗炎症および鎮痛作用などの効果²⁾ が明らかにされた薬物である. 近年 CX は phenylbutazone との結合体である clofezone³⁾ として副作用を軽減した消炎, 鎮痛薬に汎用されている.

CX およびその生体内代謝産物の定量分析法としては比色法の報告⁴⁾ があるにすぎない. この比色定量法は CX の代謝産物である塩基性物質の分離定量が不可能であり, しかも検出感度が低く精度も良くない. したがって, 生体試料に含まれる微量の CX および代謝産物の挙動を明らかにするためには, 高感度で精度の良い分離定量法の確立が望まれていた.

著者らは, CX の bioavailability 研究の一環として, 生体試料に含まれる微量の CX ならびに 2 種の主代謝産物⁴⁾ である 2-(*p*-chlorophenoxy)-*N*-(2-ethylaminoethyl)acetamide (以下 M-1) および 2-(*p*-chlorophenoxy)-*N*-(2-aminoethyl)acetamide (以下 M-2) の定量を目的として, 有機窒素化合物の特異的検出器であるアルカリ熱イオン化検出器 (以下 FTD) 付ガスクロマトグラフィー (以下 GC) を用いて, その操作条件を検索し, 血漿中の CX およびその代謝産物の定量法を検討した.

実 験 の 部

試薬 CX, M-1 および M-2 は Thuillier^{3a)} および Irino ら⁴⁾ の方法に準じて合成し, いずれも赤外線吸収 (IR) スペクトル, 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル, 元素分析値が文献値と一致したものを使用した. ピリジンは常法により蒸留後, KOH で乾燥したものを用いた. 有機溶媒はいずれも市販特級品を蒸留後使用した. 無水トリフルロ酢酸および他の試薬類は, いずれも和光純薬特級品を用いた.

装置および測定条件 FTD はアルカリソースに rubidium bromide を用い, これを水素炎イオン化検出器 (FID) のノズルの先端部に熔着した形式のものを使用した. ガスクロマトグラフは島津 4BM 型を用いた. 充填剤の液相は, silicone OV-17, SE-30, KOH+Thermon 1000 を検討した. 定量には, dimethyldichlorosilane (DMCS) 処理した chrolite W (80—100 mesh) に 5% silicone OV-17 をコートし, 2 m×3 mm i.d. のガラスカ

ラムに充填した分離管を使用した。測定条件として、カラム温度は 240°C, 試料導入口および検出器はともに 270°C に設定した。またベースラインが安定し、最高感度が得られる最適なガス流量条件として、N₂ 流量 50 ml/min, H₂ 流量 22 ml/min, air 流量 400 ml/min とした。一方、測定前にあらかじめ 5% dipalmitoyl phosphatidylcholine⁵⁾ (Sigma 製) のメタノール溶液 3—5 μ l をカラムに注入し、ベースラインが安定した 30 分後に試料の測定を開始した。

内部標準物質 (I.S.) 2-(*p*-Chlorophenoxy)-*N*-(2-methylaminopropyl)acetamide^{3a)} を I.S. とし、酢酸エチルに溶解して用いた。

誘導体化の方法 試料に酢酸エチル 0.5 ml, 無水トリフルロ酢酸 0.1 ml およびピリジン 2 滴を加え、室温で 15 分間反応させて trifluoroacetylation (TFA 化) を行った。

血漿中の CX および代謝産物の抽出 10 ml の共栓遠沈管に血漿 1 ml を取り、0.5 N NaOH 0.5 ml, CHCl₃ 6 ml を加え、振盪機を用いて 20 分間抽出後、遠心分離 (3000 rpm, 3 min) を行った。CHCl₃ 6 ml で再度抽出したのち、CHCl₃ 層を合せて新たな遠沈管に移し、減圧下、室温で溶媒を留去した。残留物に 1 N H₂SO₄ 2 ml および cyclohexane 1 ml を加え、10 分間振盪後、遠心分離した。有機層を十分に除いたのち、H₂SO₄ 層に氷冷下で 8 N NaOH 0.5 ml および CHCl₃ 6 ml を加えて 20 分間振盪後、遠心分離した。CHCl₃ 層をできるだけ完全に取り出して新たな遠沈管に移し、減圧下で CHCl₃ を留去後に I.S. (250 ng) を加え、前述した方法に従って TFA 化の反応を行った。反応後、過剰の試薬を減圧下で留去し、残留物に CHCl₃ および pH 7.5 1/15 M phosphate buffer を 2 ml ずつ加え、3 分間振盪後、遠心分離した。水層を除去後、CHCl₃ を新たな遠沈管に移したのち溶媒を留去した。残留物を酢酸エチル 60 μ l に溶解し、その 1—3 μ l を GC に付した。

検量線の作成 CX, M-1 および M-2 を 50—400 ng の範囲で酢酸エチルに溶かし、I.S. (250 ng) を加えたのち、TFA 化して GC 装置に注入した。このとき CX, M-1 および M-2 と I.S. との重量比とピーク面積比はつぎのごとくであった。

Ratio of CX, M-1 and M-2 to I.S. (250 ng)

CX	Weight	1.53	1.08	0.77	0.43	0.22
	Peak area	2.49	1.79	1.30	0.71	0.33
M-1	Weight	1.64	1.17	0.82	0.58	0.23
	Peak area	2.13	1.54	1.05	0.78	0.28
M-2	Weight	1.47	1.10	0.74	0.55	0.22
	Peak area	1.41	1.07	0.67	0.48	0.19

血漿中薬物の回収試験 50, 100, 200, 400 ng の CX, M-1 および M-2 をそれぞれ家兎の血漿 1 ml に添加、前述のごとく抽出、TFA 化の操作を行ったのち、GC に付しあらかじめ作成した検量線から回収率を求めた。

結 果 と 考 察

GC 分離条件および I.S.

M-1, M-2 および I.S. は、いずれも一級または二級アミンであることから、遊離のまま GC 分析を行うことは困難であり、誘導体化の方法として TFA 化を行った。

分離条件については、液相に 5% SE-30 を用いると保持時間が長くテーリングが大であり、また 3% KOH+5% Thermon 1000 を用いると測定物質の間で十分な分離が得られなかった。一方、本実験に使用した 5% OV-17 は良好な分離を示したが、M-1 と I.S. のピークにわずかなテーリングが認められた。そこで 5% OV-17 を用いて、前述した dipalmitoyl phosphatidylcholine を試料の測定前に注入した結果、これらのテーリングが防止され、対称的なピークが得られた。このテーリング防止剤については、Rutherford⁶⁾ の報告と同様に各試料の測定精度への影響は無く有効なものであった。

Fig. 1 に、CX, M-1, M-2 および I.S. の標品を添加した血漿と、対照とした血漿とについて、それぞれ抽出および誘導体化の操作を行ったのちに得られたクロマトグラムを示した。三級アミンである CX は TFA 化されず、遊離体として 4.8 min にピークが認められ、以下 M-2, M-1 および I.S. はいずれも TFA 誘導体として、それぞれ 5.7, 6.5 および 9.2 min に流出した。いずれの試料も分離は良好で対称的なピークが得られた。

Fig. 1. Chromatogram of CX, Metabolites, and I.S. extracted from Rabbit Plasma

(a) control plasma,
(b) plasma sample to which CX, M-1, M-2
and I.S. (250 ng/ml) were added.

Fig. 2. Chromatogram obtained from Rabbit Plasma extracted at 3 h after Oral Administration of Clofexamide

FTD は有機窒素化合物に対して特異的に感応し、分子内の窒素原子数に比例した応答を示す⁷⁾ことが知られている。そこで測定物質と化学構造が類似した 2-(*p*-chlorophenoxy)-*N*-(2-methylaminopropyl)acetamide を I.S. に選択した。

定量性の検討

CX, M-1 および M-2 の検量線は、測定した範囲内 (50—400 ng) でいずれも良好な直線性を示した。また、これらの物質の血漿への添加濃度を減少し、測定感度をあげて分析を行った結果、いずれも血漿中 4 ng/ml までの微量定量が可能であることがわかった。さらに、15 ng の注入量で検出器間の感度の比較を行ったところ、FTD は FID に比して約 70 倍の高感度を示したことから、FTD は生体試料中に微量に含まれる CX およびその代謝産物の分析に適した検出器であることが明らかになった。

次に、血漿に一定量の CX, M-1 および M-2 を添加し、前述した方法で回収試験を行い、その結果を Table I に示した。CX, M-1 および M-2 の各濃度における回収率は精度が良く、それぞれの平均回収率は $94.5 \pm 2.0\%$ (S.D.), $94.0 \pm 2.6\%$ (S.D.) および $92.3 \pm 3.0\%$ (S.D.) と満足すべき結果であった。また血漿からの各試料の抽出溶媒について検討した結果、 CHCl_3 が最も良い回収率を示した。

血漿試料の分析

本法を用いて、薬剤投与後の家兎血漿中の CX とその代謝産物の分析を試みた。Fig. 2 に、CX を経口投与後

TABLE I. Recovery of CX, M-1 and M-2 added to Rabbit Plasma

Added (ng/ml)	<i>n</i>	CX Recovery (Mean $\pm$ S.D.) (%)	M-1 Recovery (Mean $\pm$ S.D.) (%)	M-2 Recovery (Mean $\pm$ S.D.) (%)
50	4	91.9 ± 3.1	90.5 ± 4.2	88.5 ± 4.5
100	4	93.8 ± 3.7	95.8 ± 2.4	90.8 ± 4.0
200	4	95.4 ± 2.8	92.9 ± 3.9	95.3 ± 3.2
400	4	96.9 ± 2.7	96.7 ± 2.5	94.7 ± 4.1

Fig. 3. Plasma Levels of CX and Metabolites after Intravenous Administration of CX·HCl

Dose; 5.3 mg/kg as free base.
Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 3 rabbits.
—x—: CX, —○—: M-1, —●—: M-2.

3 hにおける血漿から得られたクロマトグラムを示した。血漿中の常在成分による妨害ピークは認められず、それぞれのピークはいずれも標品の保持時間と良く一致した。

CX を静脈内投与および経口投与したのち、CX とその代謝産物の血漿中濃度推移を測定し、その結果を Fig. 3, 4 に示した。CX を経口投与すると、CX 未変化体は投与後 30 min で血漿中濃度のピークに達し、以後は次第に減少することが明らかとなった。また M-1 および M-2 は、それぞれ 2, 4 h にピークが認められた。CX を静脈内投与した場合、M-1 および M-2 は血漿中に低濃度であるがその存在が確認された。これらのことから、投与後の CX は *N*-脱エチル反応による代謝を受けることが認められた。

以上のように本法によれば、血漿中に微量に存在する CX とその代謝産物を高感度、特異的にかつ精度よく定量することができ、今後、本法は CX の生体内挙動を追究するうえに役立つものと期待される。

引用文献および注

- 1) G. Thuillier, P. Rumpf, *Bull. Soc. Chim. France.*, **1960**, 1786.
- 2) a) G. Thuillier, *Chim. Therap.*, **1966**, 82; b) G. Par, G. Thuillier, *Arzneimittel-Forsch.*, (Drug Res.), **14**, 556 (1964).
- 3) J. Thuillier, P. Bessin, F. Geffroy, J. Godfroid, *Chim. Ther.*, **3**, 53 (1968).
- 4) O. Irino, M. Tateishi, K. Fukawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 47 (1972).
- 5) W.E. Leitch, L.P. Stuart, E. Forchielli, *Anal. Biochem.*, **56**, 580 (1974).
- 6) D.M. Rutherford, *J. Chromatog.*, **137**, 439 (1977).
- 7) "Nitrogen Detector Operating Note, 15161—90001," Hewlett-Packard, Avondale, Pa., U.S.A. 1970.

Fig. 4. Plasma Levels of CX and Metabolites after Oral Administration of CX·HCl in Capsule Form

Dose; 25 mg/kg as free base.
Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 3 rabbits.
—x—: CX, —○—: M-1, —●—: M-2.