薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (6) 620-623 (1984)

高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中のアドリアマイシン
とその代謝物の定量 (第2報¹⁾) 抽出法による組織の分析

増池健年,* 大嶽純一, 小波蔵政弘, 野田忠晴, 武本宜教
協和醸酵工業株式会社医薬研究所

Determination of Adriamycin and Its Metabolites in Biological Samples
Using High Performance Liquid Chromatography. II.²⁾
Analysis of Tissues by Extraction Method

TAKETOSHI MASUIKE,* JUNICHI ODAKE, MASAHIRO KOHAGURA,
TADAHARU NODA, and YOSHINORI TAKEMOTO
Pharmaceuticals Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.,
1188, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka, 411, Japan

(Received October 20, 1983)

We developed a favourable method for the determination of adriamycin (ADR) and its metabolites in tissues by use of high performance liquid chromatography with fluorescence detector. Tissue was homogenized and extracted with a mixture of butanol and toluene. The extract was evaporated *in vacuo*, and the residue was dissolved with a mixture of phosphate buffer and methanol. An aliquot of this solution was injected onto reversed-phase ODS column, and eluted by a mixture of 1 N formic acid and methanol. The fluorescence signal was monitored at Ex 470 nm and Em 585 nm. Six kinds of tissues from ADR-administered rabbits were analysed by the present method and the total fluorescence method. ADR, adriamycinol and two unidentified metabolites, were detected on chromatograms. Compared with the total fluorescence method, this method is possible to determine each concentration of ADR and its metabolites in tissues. Metabolites are better separated on chromatograms by use of this reversedphase column than normal phase columns previously described.

Keywords—adriamycin; metabolite; tissue; analysis; HPLC; fluorescence detector

緒 言

組織中のアドリアマイシン (ADR) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析には、順相カラムの利用が報告されている。²⁾ しかし、これらの方法では代謝物の分離が十分でない。この分離を改善するために、逆相系 ODS カラムの利用を検討し、組織内の ADR や代謝物の分離定量法を確立した。また、ADR を投与したウサギの各種組織を本方法と総蛍光法で分析し比較した。

実 験 の 部

試薬・装置 前報¹⁾に述べたものと同じものを使用した。

試料 体重約 3 kg のウサギの各種組織を摘出して、コントロール組織とし、回収実験等の試料に用いた。また、体重約 3 kg のウサギに ADR 5 mg/kg を静注し、60 分後に各種組織を摘出し、分析に用いた。

HPLC カラムの調製 ステンレス製カラム (4×60 mm) に TSK gel ODS-120A (10 μm, 東洋曹達 KK) をスラリー法で充填し使用した。

HPLC 法による定量 コントロール組織 0.1 g に ADR 0.5 μg を添加し、ホモジナイズして回収実験の試料とした。ADR を効率よく回収するため、抽出条件を検討し、Fig. 1 の前処理条件を採用した。前処理で得た試料液 100 μl を HPLC に注入し分析した。移動相には 1 N ギ酸-メタノール混液を用いた。検出器は励起波長 470 nm, 蛍光波長 585 nm に設定した。確立した条件で自動 HPLC を用い、ウサギの組織を分析した。

総蛍光法による定量 試料 0.5 g に水 1.5 ml を加えてホモジナイズした。得られたホモジネイト上清 0.5 ml

Fig. 1. Procedure of Extraction for HPLC Method

PB=0.1 M KH_2PO_4 -1 M H_3PO_4 (pH 3.0).

は、前報¹⁾と同様な処理、蛍光強度の測定、計算法により、ADR と代謝物の合計濃度を ADR 換算で算出した。なお、各種のコントロール組織に添加した ADR (10 $\mu\text{g/g}$) の回収率は 65—85% であった。コントロール組織のブランク値は、ADR に換算し、0.3—7.8 $\mu\text{g/g}$ であった。

結果および考察

1. HPLC 定量法

前処理における回収率 Fig. 1 の抽出操作による各種組織からの ADR, アドリアマイシノール (NOL) およびアドリアマイシノン (NONE) (5 $\mu\text{g/g}$) の回収率は Table I のように脾臓以外は比較的良好であった。また、Fig. 1 の操作による血清と尿からの ADR (0.2 $\mu\text{g/ml}$) の回収率も Table I に示す。このときのクロマトグラムは、前報のブタノール抽出液の ODS カラム-HPLC 法¹⁾とほぼ同様であった。

試料溶液中の ADR の安定性 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.0)-メタノール混液 (1 : 1) に溶解することによって、約 18 時間室温で放置しても ADR の濃度低下はなく、昼夜連続自動分析が可能であった。

移動相 1 N ギ酸-メタノール混液 (55 : 45) を用いると、Fig. 2 のように試料に由来する妨害ピークはなく、ADR, NOL および NONE の分離性が良く、100 検体以上分析してもカラムの分離はほとんど変化しなかった。したがって、Fig. 2 に示す条

TABLE I. Recovery of Adriamycin, Adriamycinol and Adriamycinone by the Procedure of Extraction Shown in Fig. 1 for High Performance Liquid Chromatography Method

Biological sample	Mean recovery $\pm$ SD ^{a)} (%)		
	ADR	NOL ^{b)}	NONE ^{b)}
Liver ^{c)}	68.3 $\pm$ 6.3 (n=6)	65.0	77.0
Kidney ^{c)}	76.6 $\pm$ 2.9 (n=5)	76.3	84.7
Lung ^{c)}	76.3 $\pm$ 2.6 (n=4)	82.7	99.7
Spleen ^{c)}	54.8 $\pm$ 7.7 (n=4)	N.D. ^{f)}	N.D.
Heart ^{c)}	81.8 $\pm$ 8.7 (n=5)	97.3	81.7
Muscle ^{c)}	96.0 $\pm$ 5.1 (n=4)	96.3	103.7
Serum ^{d)}	91.3 $\pm$ 1.3 (n=5)	N.D.	N.D.
Urine ^{e)}	101.3 $\pm$ 2.4 (n=5)	N.D.	N.D.

a) Standard deviation.

b) n=3.

c) Control tissue obtained from rabbit.

d) Pooled human serum.

e) Obtained from healthy man.

f) Not determined.

Fig. 2. Typical Chromatograms on Analysis of Rabbit Tissues

a) a mixture of authentic samples, b) control liver, c) liver obtained at 60 min after injection, d) heart obtained at 60 min after injection.

Peak: 1=NOL, 2=ADR, 3=NONE, 4=UK₁, 5=UK₂.

Condition: Column; TSK gel ODS-120A, 10 μ m, 4 $\times$ 60 mm, mobile phase; 1N HCO₂H-MeOH (55:45), flow rate; 1 ml/min, detection; Ex470 nm, Em585 nm, injection volume; 100 μ l.

Fig. 3. Calibration Curve for ADR

$r=0.999$.

TABLE II. Concentration of Adriamycin and Its Metabolites in Tissues

Tissue	No. of rabbit	Concn. of ADR and metabolites (μ g/g as ADR)					Total fluorescence method Total ADR eq.
		NOL	ADR	UK ₁	UK ₂	Total	
Liver	1	2.15	10.2	28.4	trace	40.8	42.3
	2	7.35	22.2	44.1	3.25	76.9	73.3
	3	2.52	14.3	45.3	trace	62.1	63.1
Kidney	1	3.58	34.8	104.0	0.88	143.3	106.5
	2	5.25	52.6	113.9	2.77	174.5	154.5
	3	5.54	70.8	42.9	3.42	122.7	120.3
Lung	1	0.72	34.0	21.2	0.35	56.3	63.4
	2	0.63	30.9	8.86	trace	40.4	49.0
	3	0.84	44.4	36.2	1.28	82.7	83.1
Spleen	1	1.15	68.9	2.69	trace	72.7	62.3
	2	1.09	50.4	1.57	trace	53.1	40.7
	3	1.40	52.9	4.35	trace	58.7	25.5
Heart	1	0.17	12.7	24.4	0.86	38.1	20.8
	2	0.28	16.3	23.6	0.63	40.9	23.1
	3	0.62	24.1	18.2	2.38	45.3	33.6
Muscle	1	trace	3.15	0.72	U.D. ^{b)}	3.87	5.20
	2	trace	2.43	trace	U.D.	2.43	3.04
	3	trace	1.99	0.69	U.D.	2.68	2.44

a) Each concentration was calculated from the calibration curve of ADR.

b) Undetected.

件を定量法の条件に採用した。

検量線 Fig. 2 の HPLC 条件を用いて作成した ADR の検量線は、0.1—1.0 $\mu\text{g/ml}$ において直線性が良好であった (Fig. 3)。

ADR の定量限界および精度 定量限界は組織によって異なり、約 0.3—0.4 $\mu\text{g/g}$ ($S/N \approx 3$) であった。また、ADR 10 $\mu\text{g/g}$ 添加の各種組織の分析における変動係数は約 4.0—9.5% であった。

2. HPLC 法と総蛍光法の分析結果の比較

2つの分析法によるウサギの各種組織の分析結果を Table II に、そのときのクロマトグラムの例を Fig. 3 に示す。

HPLC 法では ADR と代謝物 NOL および未確認代謝物 UK_1 , UK_2 が認められ、NONE はいずれの試料にも検出されなかった。HPLC で測定された ADR, NOL, UK_1 および UK_2 を合わせた総濃度と総蛍光法の値が比較的一致したのは約 1/3 の試料においてであり、脾臓・心臓・筋肉では一致しなかった。大きな差の原因として、組織の部位による濃度差が考えられるが、明らかではない。HPLC 法によると UK_1 などの代謝物が相当量生成しているのが認められたが、総蛍光法ではこれらすべてを含めて測定しているため、ADR の濃度とは大幅にかけはなれた値が得られた。

結 び

本 HPLC 法は組織内の ADR や代謝物を分離し、各々の濃度を測定できる点で総蛍光法より優れた分析法である。また、順相カラムを用いる既知の分析法²⁾と比較し、本方法は代謝物相互の分離が良好である。試料溶液中の ADR は室温で 18 時間程度安定であり、昼夜連続自動分析が可能である。本方法は前報¹⁾の血清・血漿の分析法と共に、今後臨床サンプルの分析や動物実験による ADR の投与法の研究などへの利用が期待できる。

引用文献および注

- 1) 第1報: 増池健年, 大嶽純一, 武本宜教, 薬誌, **104**, 614 (1984).
- 2) a) S. Shinozawa, Y. Mimaki, Y. Araki, T. Oda, *J. Chromatogr.*, **196**, 463 (1980); b) J. H. Peters, G. R. Gordon, D. Kashiwase, E. M. Acton, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **7**, 65 (1981).