薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (10) 617-620 (1991)

ガスクロマトグラフ質量分析計によるラット血清中の Gomisin A (TJN-101) 及び代謝物の定量

松崎 豊,* 石橋恵美子, 小口幸子, 和久井容子, 竹田秀一,
油田正樹, 尾山 力
株式会社ツムラ 薬理研究所

Determination of Gomisin A (TJN-101) and Its Metabolite in Rat Serum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Yutaka MATSUZAKI,* Emiko ISHIBASHI, Sachiko KOGUCHI, Yoko WAKUI,
Shuichi TAKEDA, Masaki ABURADA and Tsutomu OYAMA

Research Institute for Pharmacology, Tsumura & Co.,
3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashiki-gun,
Ibaraki, 300-11 Japan

(Received June 7, 1991)

Gomisin A (TJN-101) is one of the lignan components isolated from Schisandra Fruits. A high sensitive and precise method for the determination of TJN-101 and its major metabolite (Met. B) in the rat serum was developed by selected ion monitoring (SIM) with gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) using a fused silica capillary column (SPB™-1, Supelco). A 100 μ l serum sample was used for the solid phase extraction.

The calibration curves of TJN-101 and Met. B both showed a good linearity between 2.0 and 2000.0 ng/ml. The analytical precision (intra-assay, C.V. < 4.7%), recoveries ($98.4 \pm 10.1\%$), and detection limit (2 ng/ml) of TJN-101 indicated that this system was suited for the determination of TJN-101 in biological fluid. In case of Met. B, the same results as TJN-101, were obtained.

After oral administration of TJN-101 at a dose of 10 mg/kg to male rats, the average values of the maximal serum concentration of TJN-101 and Met. B were 1446.1 ± 131.8 and 317.4 ± 18.5 ng/ml, respectively. The serum concentrations of these substances could be monitored sufficiently for 8 h after dosing.

Keywords—gomisin A (TJN-101); lignan component; Schisandra Fruits; metabolite; Met. B; GC/MS; SIM; serum concentration; rat

緒 言

Gomisin A (TJN-101; (+)-(6S,7S,R-biar)-5,6,7,8-tetrahydro-1,2,3,12-tetramethoxy-6,7-dimethyl-10,11-methylenedioxy-6-dibenzo[a,c]cyclooctenol) はマツブサ科のチョウセンゴミシ (*Schisandra chinensis* BAILL) より単離されたジベンゾシクロオクタジエン型リグナンであり,¹⁾ 各種実験的肝障害に有効な作用を有することが報告されている。²⁾ また、本化合物には数種の酸化型代謝物がラットにおいて確認・同定され、Ikeya らにより既に報告されている。³⁾ 我々は本薬物の体内動態研究を実施するにあたり、高感度及び高精度な分析方法として、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いた selected ion monitoring (SIM) によるラット血清中の未変化体並びに主代謝物 (Met. B)³⁾ の定量法を開発したので報告する。

実 験 の 部

1. 試薬 TJN-101 は当社、技術部より供与を受けた純度 99% 以上のものを使用した。主代謝物である Met. B 及び内標準物質として使用した deoxyschizandrin (DS), gomisin H (GH) はいずれもゴミシより単離,^{4,5)} あるいは合成⁶⁾されたものであり、当社、生物・化学研究所から入手した。これらの構造式を Fig. 1 に示

Fig. 1. Chemical Structures of Gomisin A and Related Substances

Fig. 2. Mass Spectra of Gomisin A and Related Substances

した。Met. B 及び GH のトリメチルシリル (TMS) 誘導体の調製にはガスクロ工業 (株) の bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) を使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

2. 動物 7 週齢 (体重; 210—240 g) の Sparague-Dawley 系雄性ラット (日本チャールスリバー) を約 1 週間の予備飼育の後、一夜絶食した後に使用した。

3. GC/MS 装置及び分析条件 本体は 5890 型ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard) を装備した AX-505 型二重収束 GC/MS (日本電子) を使用し、データ処理用として DA-5000 コンピューター (日本電子) を接続した。カラムは溶融シリカキャピラリーカラム (SPBTM-1, 15 m×0.32 mm, $df=0.25\ \mu\text{m}$, Supelco) を使用した。カラムオーブンは 195°C にて 2.5 分保持後、285°C まで毎分 16°C で昇温した。注入口 (スプリットレス) は 310°C, GC-MS 接続部は 275°C, イオン源は 280°C とした。試料のイオン化は電子衝撃イオン化法 (EI, 70 eV, 300 μA) を使用した。SIM 法における測定イオンは, TJN-101 及び DS はその分子イオンピーク (M^+) である $m/z=416$ を, Met. B 及び GH はそれぞれ TMS 誘導体の M^+ である $m/z=548$ 及び $m/z=490$ とした。それらのマススペクトルを Fig. 2 に示す。

4. 検量線の作製 TJN-101 あるいは Met. B のアセトン溶液 (1 mg/ml) を蒸留水, 更に非投与ラットから得たブランク血清で順次希釈し, それぞれ 2.0, 20.0, 200.0, 2000.0 ng/ml の添加血清を作製した。それぞれ 100 μl の TJN-101 添加血清と 100 ng/ml の DS を含む水溶液を固相抽出用カートリッジカラムである Bond Elut[®] C18 (充てん量 100 mg, Analytichem International) のカラムに添加することにより両者を混合し, 更にカラムを 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH=5.0) で満たした後, 減圧吸着させた。1 ml の蒸留水でカラムを洗浄した後, 1 ml の酢酸エチル-アセトン混液 (1:4) で TJN-101 及び DS 分画を溶出させた。溶媒を留去した後, 100 μl のアセトンに再び溶解し, その 2 μl を GC/MS に注入した。Met. B の場合は GH (200 ng/ml) を内標準物質として同様に固相抽出した。溶媒を留去した後, それぞれ 200 μl のアセトン, BSTFA を加えて溶解し, アルミブロック恒温槽中 60°C で 1 時間加熱し TMS 化を行った。溶媒を窒素気流下にて留去し, 100 μl のアセトンに再び溶解した後, その 2 μl を GC/MS に注入した。TJN-101 及び Met. B とともに各濃度につき 5 例ずつ調製し, 内標準物質とのピーク面積比法にて検量線を作製した。TJN-101 及び Met. B の代表的な SIM クロマトグラムを Fig. 3 及び 4 に示す。

5. 日間変動 検量線サンプル調製後, 約 0.6 ml ずつ -20°C にて凍結保存した前記添加血清を各濃度につき 1 日 1 例ずつ, 計 5 日間にわたり上記同様に固相抽出しサンプルを調製した。SIM 法にて測定後, 上記にて作製した検量線から血清中濃度を定量し, 定量値の日間変動及び添加量に対する回収率を算出した。

6. 血清中濃度推移 TJN-101 を 0.5% カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し, 10 mg/kg の割合でラットに経口投与した。ラットを所定時間にエーテル麻酔し開腹後, 腹部下行大静脈から血液を採取した。常法により血清を分離し, 使用時まで -20°C にて凍結保存した。融解した血清は TJN-101, Met. B とともに前記検

Fig. 3. Typical Chromatogram of Gomisins A and B in Rat Serum by Selected Ion Monitoring Method
(a) deoxyschizandrin, (b) gomisins A.

Fig. 4. Typical Chromatogram of Metabolites in Rat Serum by Selected Ion Monitoring Method
(a) gomisins H monoTMS, (b) Met. B bisTMS.

量線の作製の項と同様に処理した後、血清中濃度をそれぞれ定量した。採血時間は、投与後 5, 15, 30, 45 分, 1, 2, 4, 6, 8 時間とし、1 群 5 匹のラットを用いた。

結果及び考察

本測定法により得られた検量線は TJN-101 ($r=0.9997$, $p<0.001$), Met. B ($r=0.9995$, $p<0.001$) とともに良好な直線性を示した。2.0, 20.0, 200.0, 2000.0 ng/ml の各濃度 5 例におけるピーク面積比の日内変動は、TJN-101 の場合で変動係数 (C.V.) が 1.4—4.7%, Met. B の場合 4.3—9.3% であり満足のものであった (Table I)。この検量線を用い 5 日間にわたり添加血清中の TJN-101 及び Met. B を測定した結果、その定量値の添加量に対する回収率は TJN-101 の場合、平均 $98.4 \pm 10.1\%$ であり、Met. B の場合は $97.0 \pm 5.6\%$ であった。また、5 日間にわたる定量操作に伴う定量値の C.V. は TJN-101 の場合、3.5—13.6% であり、Met. B の場合 1.7—7.8% となり、回収率と共に十分な精度が得られた (Table II)。また、保持時間の変動は認められなかった。

TJN-101 10 mg/kg をラットに経口投与すると、その吸収は速やかで、投与後 30 分で最大血清中濃度 ($C_{\max}$) 1446.1 ± 131.8 ng/ml を示し、以降徐々に減少し 8 時間では 18.8 ± 7.9 ng/ml となった。Met. B も同様に 30 分で $C_{\max}$ 317.4 ± 18.5 ng/ml を示し、8 時間で 16.0 ± 2.3 ng/ml に減少した (Fig. 5)。このように本定量法により、10 mg/kg の TJN-101 を経口投与した後 8 時間までの血清中 TJN-101 及び Met. B のモニタリングが十分可能であった。本定量法の定量下限を検量線の下限值 (2.0 ng/ml) と規定すると、TJN-101 の場合 $C_{\max}$ 値の 1/700, Met. B の場合 $C_{\max}$ 値の 1/150 の濃度まで定量が可能となり、薬物動態研究に応用するに十分な感度であると考えられる。

TABLE I. Intra-Assay Precision of Gomisins A and Met. B by Selected Ion Monitoring Method

Amount added (ng/ml)	n	Precision ^{a)}	
		Gomisins A	Met. B
2.0	5	4.7	4.3
20.0	5	2.5	5.4
200.0	5	1.4	9.3
2000.0	5	1.6	5.1

a) Coefficients of variation (%).

Fig. 5. Serum Concentration of TJN-101 and Met. B after Oral Administration of TJN-101 at a Dose of 10 mg/kg to Rats

●, TJN-101; ○, Met. B.
Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5 rats.

TABLE II. Inter-Assay Precision and Recovery of Gomisins A and Met. B by Selected Ion Monitoring Method

Amount added (ng/ml)	n	Gomisin A		Met. B	
		Precision ^{a)}	Recovery ^{b)}	Precision	Recovery
2.0	5	13.6	104.9±14.3	7.8	94.9±7.4
20.0	5	9.5	91.6±8.7	6.9	99.2±6.9
200.0	5	3.5	94.1±3.3	5.1	98.3±5.0
2000.0	5	5.4	102.9±5.6	1.7	95.7±1.6
Mean	20	—	98.4±10.1	—	97.0±5.6

a) Coefficients of variation (%), b) mean±S.D.

結 語

今回著者らが検討した TJN-101 及び Met. B の定量法は、抽出法も含め非常に簡便、かつ再現性の良い方法である。GC/MS における 1 検体当たりの分析時間も 10 分以内と短いものであるが、その分離能は十分なものであった。

したがって本法は薬物動態研究における他の生体試料中での定量にも十分応用できるものと考えられる。

引 用 文 献

- 1) Y. Ikeya, H. Taguchi, I. Yoshioka, H. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1383 (1979).
- 2) 竹田茂文, 前村俊一, 須藤和彦, 加瀬義夫, 新井一郎, 大倉靖史, 布野秀二, 藤井祐一, 油田正樹, 細谷英吉, *日薬理誌*, **87**, 169 (1986); 竹田茂文, 加瀬義夫, 新井一郎, 長谷川雅之, 関口裕子, 布野秀二, 油田正樹, 細谷英吉, 溝口靖紘, 森沢成司, *ibid.*, **88**, 321 (1986); 竹田茂文, 加瀬義夫, 新井一郎, 大倉靖史, 長谷川雅之, 関口裕子, 立木朱美, 油田正樹, 細谷英吉, *ibid.*, **90**, 51 (1987); Y. Ohkura, Y. Mizoguchi, Y. Sakagami, Y. Kobayashi, S. Yamamoto, S. Morisawa, S. Takeda, M. Aburada, *Jpn. J. Pharmacol.*, **44**, 179 (1987).
- 3) Y. Ikeya, H. Taguchi, H. Mitsuhashi, H. Sasaki, T. Matsuzaki, M. Aburada, E. Hosoya, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2061 (1988); Y. Ikeya, H. Mitsuhashi, H. Sasaki, Y. Matsuzaki, T. Matsuzaki, E. Hosoya, *ibid.*, **38**, 136 (1990).
- 4) Y. Ikeya, H. Taguchi, I. Yoshioka, H. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2695 (1979).
- 5) Y. Ikeya, H. Taguchi, I. Yoshioka, H. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1576 (1979).
- 6) Y. Ikeya, H. Taguchi, I. Yoshioka, H. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2893 (1981).