マスフラグメントグラフィーによる血漿中 α -Tocopherol および α -Tocopheryl Acetate の同時定量

中西正詞, 土屋和子, 坂口健哉, 藤田 孟
エーザイ株式会社研開本部生物薬剤研究室¹⁾

Simultaneous Determination of α -Tocopherol and α -Tocopheryl Acetate in Plasma by Mass Fragmentography

MASASHI NAKANISHI, KAZUKO TSUCHIYA, KENYA SAKAGUCHI and TAKESHI FUJITA

Section of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Division of
Research and Development, Eisai Co., Ltd.¹⁾

(Received March 12, 1979)

A method for simultaneous analysis of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate in plasma was investigated using massfragmentography for the purpose of biopharmaceutical studies of α -tocopheryl acetate administered parenterally to animals.

α -Tocopherol and α -tocopheryl acetate in plasma were extracted with *n*-hexane, derivatized by silylation, and determined simultaneously by monitoring at *m/e* 502 for silylated α -tocopherol and at *m/e* 430 for α -tocopheryl acetate.

This method was rapid and specific, and was satisfactorily employed in the biopharmaceutical studies of α -tocopheryl acetate.

Keywords— α -tocopherol; α -tocopheryl acetate; gaschromatography; massfragmentography; plasma

α -Tocopheryl acetate (Toc-Ac) は、経口投与された場合、消化管でそのほとんどが加水分解を受けて遊離の α -tocopherol (Toc) として吸収される^{2,3)} のに対し、非経口投与においては主として未変化の Toc-Ac として血中に移行し、体内で Toc に変換することが知られている。^{4,5)} 今回、非経口投与時の Toc-Ac の体内動態に対する製剤的要因の把握のために、血漿中 Toc-Ac および Toc の同時定量法を検討した。

Newmark ら⁵⁾ は、Toc-Ac 非経口投与後の血漿中 Toc および Toc-Ac 濃度の経時的推移を求めるために Quaife ら⁶⁾ による Emmerie-Engel 法 (E-E 法) を利用した。すなわち、Toc については血漿をエタノールにより除蛋白後キシレン抽出し、キシレン相に FeCl_3 - α, α' -dipyridyl 試薬を加えて Toc の還元性によって生成する Fe(II) 錯体の赤色を比色定量する。また、Toc-Ac についてはアルカリ加水分解を行ない、分解前後の E-E 法による Toc 量の差から間接的に求めている。この方法では、比較的多量の試料を必要とし、操作時間が長かつ操作が煩雑である。

一方、ガスクロマトグラフィー (GLC) 法では、血漿中に多量存在するコレステロールと Toc との分離がガスクロマトグラフ上で困難であり、測定試料中のコレステロールを前もって除去しておく必要がある。

そこで、著者らはマスフラグメントグラフィー (MF) 法による血漿中 Toc および Toc-Ac の定量法を検討し、簡易な操作により、少量の血漿試料中の両者を迅速にしかも同時に定量する方法を確立したので報告する。

実 験 の 部

試薬 Toc, Toc-Ac および α -tocopheryl propionate (Toc-Pr) は、エーザイ (株) 合成品の dl 体を用いた。

- 1) Location: Kawashima, Hashima, Gifu.
- 2) H.E. Gallo-Torres, O.N. Miller, *Intern. Vit. Nutri. Res.*, **41**, 339 (1971).
- 3) R. Blomstrand, L. Forgren, *Intern. Z. Vitaminforsch.*, **38**, 328 (1968).
- 4) H.E. Gallo-Torres, O. N. Miller, J.G. Hamilton, C. Tratnyek, *Lipids*, **6**, 318 (1971).
- 5) H.L. Newmark, W. Pool, J.C. Bauernfeind, E. De Ritter, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 655 (1975).
- 6) M.L. Quaife, N.S. Scrimshaw, O.H. Lowry, *J. Biol. Chem.*, **180**, 1229 (1949).

エタノールおよび *n*-ヘキサンは[関東化学製試薬特級品を、また N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) は Pierce 製ガスクロ分析用の試薬をそれぞれ用いた。充填剤 3% Silicone OV-17 (Gaschrom Q, 80—100 mesh) は、日本クロマト社製のものをを用いた。

GC-MS 装置 多重イオン検出器を装備した島津製作所製 LKB-9000 (電子衝撃イオン化方式) を用い、カラムとしては 3% Silicone OV-17 を充填した 0.5 m×3 mm (i.d.) のガラスカラムを用いた。

温度は、カラム 285°, 注入口およびセパレーター 350°, イオン源 330° とした。キャリアガス He の流量は 30 ml/min とし、またイオン化エネルギーは 25 eV とした。内部標準物質 (IS) として Toc-Pr を用いた。

血漿中 Toc および Toc-Ac の抽出および定量法 阿部および勝井⁷⁾ がケイ光法による血清中 Toc の定量法に用いている抽出法に準じて行なった。すなわち、ウサギ血漿 100 μ l に蒸留水 0.9 ml を加え、IS (Toc-Pr 2 μ g 含有エタノール溶液 0.2 ml) を添加し、よく混和した後エタノール 1 ml を加えて除蛋白する。5 ml の *n*-ヘキサンで 2 回抽出し、得られた *n*-ヘキサン相をチッ素ガス気流下 45° で濃縮乾固した後、その残渣を 150 μ l のアセトンに溶解する。これに 50 μ l の BSTFA を加えて trimethylsilyl (TMS) 化し、その 1 μ l を GC-MS に注入した。

動物への投与実験 健康な雄性ウサギ (日本白色種、体重 2.5—2.8 kg) 6 羽の大腿筋に Toc-Ac 注射液⁸⁾ を Toc-Ac として 5 mg/kg 筋肉内投与した。投与前と投与後 2, 4, 6, 8, 12, 24, 32, 72 および 96 時間における血液を耳静脈より採取した。血液は 3000 rpm で 15 分間遠沈し、得られた血漿を測定まで凍結保存した。なお、投与前 1 週間および実験期間中の給餌は、日本クレア社製 CR-1 100 g/日とし、摂水は自由とした。また、ウサギ血漿中における Toc-Ac の安定性を調べるために、Toc-Ac 7 mg/kg を同様に筋肉内投与し、投与 17 時間後の血液を 37° で 0, 1, 3 および 6 時間温置し、その血漿について Toc および Toc-Ac を測定した。

結 果

MF 条件

前記の GC-MS 条件において、トータルイオンモニターによるガスクロマトグラム上で、Toc は保持時間 (t_R) 2.6 分にピークを示し、 t_R 2.7 分にピークを示す Toc-Ac と分離能 (R_s) 0.5 でほぼ完全に重なった。しかし、BSTFA により TMS 化した Toc (Toc-TMS) は t_R 2.1 分に単一ピークを示し、Toc-Ac のピークと R_s 1.63 で完全に分離した。なお、Toc-Ac は BSTFA の添加によっても TMS 化されない。一方、IS として用いた Toc-Pr は t_R 3.2 分にピークを示し、Toc-Ac のピークと R_s 1.17 でほぼ満足すべき分離を示した。

Fig. 1 (a)—(c) に Toc-TMS, Toc-Ac および Toc-Pr の各ガスクロマトグラム上のピークから得られたマスペクトルを示す。

Fig. 1 の (a)—(c) に示すマスペクトルにおいて、主要なフラグメントイオンの解析は Waller⁹⁾ に準じて帰属された。Toc-TMS は分子イオンである m/e 502 を、Toc-Ac および Toc-Pr は共に基準ピークを示す m/e 430 のフラグメントイオンをそれぞれ用いて MF 測定を行なった。Fig. 2 にそのマスフラグメントグラムを示す。

MF 法による検量線は、IS とのピーク高さ比法により、注入量として Toc 0.5—25.0 ng および Toc-Ac 0.5—50 ng の範囲でそれぞれ直線性を示した。

血漿中 Toc および Toc-Ac の測定

IS 2 μ g を添加したウサギ血漿 100 μ l および Toc 1 μ g, Toc-Ac 2.5 μ g, IS 2 μ g を添加した血漿 100 μ l のそれぞれの抽出物について測定したマスフラグメントグラムを Fig. 3 に示す。

Fig. 3 (a) から明らかなように、 t_R 2.1 分に内在性 Toc に由来するピークが認められた以外は生体成分による妨害はないものと考えられる。

Fig. 4 は、正常ウサギの血漿 100 μ l に Toc 0.05—2.50 μ g および Toc-Ac 0.05—5.00 μ g を添加し、ピーク高さ比法によって得た回収検量線である。なお、Toc 値は各測定値から Toc 添加前の内在性 Toc 値を差引いて求めた。

Fig. 4 から明らかなように、Toc 0.5—25.0 μ g/ml 血漿および Toc-Ac 0.5—50.0 μ g/ml 血漿の濃度範囲において、検量線は相関係数 0.9997 および 0.9998 でそれぞれ直線性を示した。また、同濃度範囲における各測定値の変動係数は 3% 以内であった。

7) 阿部皓一, 勝井五一郎, 栄養と食糧, **28**, 277 (1975)。

8) Toc-Ac を 2 倍量の HCO-60 により可溶化した。濃度は Toc-Ac 50 mg/ml である。

9) G.R. Waller (ed.), "Biochemical Applications of Mass Spectrometry," John Wiley and Sons, Inc., 1972, p. 512。

Fig. 1. Mass Spectra of Trimethylsilylated dl - α -Tocopherol (a), dl - α -Tocopheryl Acetate (b) and dl - α -Tocopheryl Propionate as the Internal Standard (c)

Fig. 2. Typical Mass Fragmentogram of Trimethylsilylated dl - α -Tocopherol and dl - α -Tocopheryl Acetate

Fig. 3. Mass Fragmentograms of α -Tocopherol and α -Tocopheryl Acetate Extracted from Rabbit Plasma

Fig. 4. Calibration Curves for α -Tocopherol (—○—) and α -Tocopheryl Acetate (—●—) in Plasma

Fig. 5. α -Tocopherol (---○---) and α -Tocopheryl Acetate (—●—) Level in Plasma after Intramuscular Administration of α -Tocopheryl Acetate (5 mg/kg) in Rabbits

TABLE I. *In Vitro* Hydrolysis Test of α -Tocopheryl Acetate in Rabbit Blood ($n=3$)

Incubation time (hr)	Toc ($\mu\text{g/ml}$)	Toc-Ac ($\mu\text{g/ml}$)
0	8.47 ± 0.20	40.94 ± 0.12
1	8.83 ± 0.08	40.21 ± 0.11
3	8.87 ± 0.07	39.31 ± 0.55
6	9.38 ± 0.16	40.23 ± 0.52

Toc-Ac 筋注時におけるウサギ血漿中 Toc および Toc-Ac 濃度の経時的推移

正常なウサギ 6 羽に Toc-Ac 5 mg/kg を筋肉内投与し、血漿中 Toc および Toc-Ac 濃度を測定した。Fig. 5 にそれぞれの平均血漿中濃度の経時的推移を示した。なお、Toc については各ウサギについて投与後各時間の測定値から投与前の内在性 Toc 値を差引いて求めた。この投与前の内在性 Toc 血漿濃度値は 6 例平均で 3.22 ± 1.24 (S.D.) $\mu\text{g/ml}$ を示した。

Fig. 5 から明らかなように、Toc-Ac は投与 12 時間後に 6 例平均値として $26.55 \mu\text{g/ml}$ のピークに達して以後消失するのに対し、Toc は投与後 32 時間に $3.43 \mu\text{g/ml}$ の最高値に達し、その後の消失も緩やかであった。

また、Toc-Ac 7 mg/kg を筋肉内投与したウサギの投与 17 時間後における血液を 37° で加温し、その血漿中 Toc および Toc-Ac 濃度を測定した。

Table I から明らかなように、Toc および Toc-Ac 濃度は 37° , 16 時間の加温によっても変化せず、Toc-Ac は血漿中においてほとんど加水分解を受けないことが示唆された。

考 察

MF 法による血漿中 Toc および Toc-Ac の同時定量法においては、従来 Toc の GLC 分析上妨害物質として指摘されていたコレステロール¹⁰⁾ およびその他の生体成分の影響が全く認められず、連続操作により迅速に測定できた。なお、Fig. 2 および 3 に示すマスフラグメントグラムにおいて Toc-Ac と Toc-Pr のピークの谷の重なりが若干見られた。この分離状態はカラムの長さおよびカラム温度の検討によりさらに改良できるものと考えられるが、本実験条件において実際上のピーク高さ比法による定量性には問題はなかった。

本定量法により Toc-Ac 5 mg/kg 筋注投与後のウサギ血漿中 Toc および Toc-Ac 濃度の経時的推移を十分に

10) 阿部皓一, 湧口泰昌, 勝井五一郎, 栄養と食糧, 27, 329 (1974).

把握できた。また、ウサギにおける Toc-Ac 筋注後の Toc-Ac から Toc への転換は、Rindi および Perri¹¹⁾ によるヒトあるいは Newmark ら⁴⁾ によるイヌにおける研究と同様に極めて遅いことが明らかとなった。

以上述べたように、今回著者らが検討した MF 法による血漿中 Toc および Toc-Ac の同時定量法は、Toc-Ac の体内動態の解析あるいは製剤の生物学的利用性の評価に充分応用し得るものであると考える。

11) G. Rindi, V. Perri, *Intern. Z. Vitaminforsch.*, **28**, 274 (1958).

〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
99 (10) 1041-1043 (1979)

UDC 547.91.02 : 581.192

ナズナ (薺) の精油成分¹⁾

宮沢三雄, 上竹晶哉, 亀岡 弘
近畿大学理工学部応用化学教室²⁾

The Constituents of the Essential Oils from *Capsella bursa-pastoris* MEDIK.¹⁾

MITSUO MIYAZAWA, AKIYA UETAKE and HIROMU KAMEOKA

Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Engineering,
Kinki University²⁾

(Received April 2, 1979)

The essential oil of *Capsella bursa-pastoris* MEDIK. collected in Higashiosaka-shi was examined. The oil yield of the aerial part was about 0.02%, and that of the root was 0.03%. The essential oils were separated into individual components by the combination of a chemical method and preparative gas or elution chromatography. Seventy-four compounds in the oils were characterized. The characteristic major component was camphor.

Keywords—*Capsella bursa-pastoris*; Cruciferae; essential oil; terpenoids; camphor phenols; fatty acid; alkanes

ナズナ *Capsella bursa-pastoris* MEDIK. (アブラナ科) は薬用として全草を利尿, 解熱, 止血の目的で用い, また西洋民間では, 胆汁および血液の排除の目的で内用し, 鼻血, 月経障害に使用している.^{3,4)}

本植物の化学成分については炭水化物,⁵⁾ 脂肪酸,⁶⁾ フラボノイド,⁷⁾ アミノ酸⁸⁾ の報告がみられるが, 薬効の本体や精油成分に関する報告は見られない. そこで著者らは薬用植物の成分研究⁹⁾ の一環として, ナズナの精油の構成成分を明らかにし, 薬効との関係について考察したので報告する.

実 験 の 部

試料ナズナの精油 1978年4—6月, 東大阪市小若江の空地に群生するものを採集し, 地上部 32.2 kg, 地下部 1.5 kg に分け, ただちに水蒸気蒸留し, 留出液をエーテル抽出して, 地上部から精油 6.4 g (収油率 0.02

1) 本研究の一部は日本化学会第38秋季年会で発表, 名古屋, 1978年10月.

2) Location: Kowakae, Higashi-Ōsaka, 577, Japan.

3) 赤松金芳, “和漢薬,” 医歯薬出版, 東京, 1974, p. 399.

4) 伊藤道人, “週刊朝日百科世界の植物,” 朝日新聞社, 東京, 1978, 62号, p. 1445; 刈末達夫, 木村康一, “薬用植物大事典,” 広川書店, 東京, 1973, p. 254.

5) U. Kaminska, R.S. Lukwiczak, *Roczniki Chem.* **38**, 29 (1964).

6) K.L. Mikolajczek, *J. Am. Oil Chemists Soc.*, **38**, 678 (1961).

7) W.O. Stepien, *Dissertationes Pharm.*, **17**, 389 (1965).

8) 赤松金芳, “和漢薬,” 医歯薬出版, 東京, 1974, p. 400.

9) 宮沢三雄, 亀岡 弘, 薬誌, **97**, 120 (1977); 宮沢三雄, 亀岡 弘, 薬誌, **96**, 1076 (1976).