

財団法人日中医学協会

2008 年度共同研究等助成金一調査・共同研究一報告書

平成 21 年 3 月 10 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団の助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：水上 元



所属機関名：名古屋市立大学

所 属 部 署：大学院薬学研究科 職名：教 授

〒467-8603

所 在 地：名古屋市瑞穂区田辺通 3 - 1

電話：052-836-3415 (ダイアルイン)

1. 助 成 金 額：1,000,000 円

2. 研 究 テ ー マ

夏天無アルカロイドの品質規格と薬理作用に関する研究

3. 成 果 の 概 要

虚血性脳疾患による各種症状の治療薬として用いられている夏天無について、その超臨界流体 CO<sub>2</sub> キスの品質のコントロールのためのアルカロイド分析法を確立するとともに、経口投与時のアルカロイドの血中移行について解析した。

※発 表 論 文 等

該当なし

4. 研 究 組 織

日本側研究代表者氏名：水上 元 職名：教 授

所属機関：名古屋市立大学 部署：大学院薬学研究科

中国側代表研究者氏名：楊 義芳 職名：副主任研究員

所属機関：上海医薬工業研究院 部署：中薬研究室

-日中医学協会助成事業-

## 夏天無アルカロイドの品質規格と薬理作用に関する研究

研究者氏名 水上 元

所属機関 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中国側共同研究者 楊 義芳

所属機関 上海医薬工業研究院

### 要旨

中国ではその総アルカロイド画分が、虚血性脳疾患による各種症状の治療薬として用いられている夏天無について、その超臨界流体  $\text{CO}_2$  エキスの品質のコントロールのためのアルカロイド分析法を確立するとともに、それをラットに経口投与したときの含有 4 アルカロイドの血中濃度推移を測定することを目的として、分析方法のバリデーションと実際にラットに投与したときの体内動態を検討した。血清を酢酸酸性下アセトニトリルで処理することにより除タンパクし、パパベリンを内部標準とした LC/MS/MS ESI(+) 分析を行うことにより、含有 4 化合物において  $0.1\text{--}3.0 \mu\text{g/mL}$  の濃度範囲で回収率、再現性、直線性いずれも良好な検量線を描くことが出来た。夏天無エキス  $53.2 \text{ mg/kg}$  (ヒト常用量の 20 倍量) をラットに経口投与した後の含有 4 化合物の血中濃度推移を元に薬物動態学的パラメーターを算出し、protopine、egeline、tetrahydropalmatine、bicuculline の最高血中濃度  $C_{\max}$  は、それぞれ  $49.9$ 、 $44.4$ 、 $127$ 、 $31.6 (\text{ng/mL})$  であった。

**Key Words** 夏天無、イソキノリンアルカロイド、薬物動態、LC/MS/MS

### 緒言:

夏天無は *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. (ケシ科) の根茎を基原とする生薬であり、中医学における薬能は、祛風除湿、舒筋活血、通絡止痛である。中国では夏天無に含まれるアルカロイドの注射液が開発され、ラット脳虚血再灌流障害モデルに対する有用性が報告されている<sup>1)</sup>。しかし、生薬エキスの注射液は、中国国外では医薬品としての使用するための認可を得ることは困難であるため、経口投与による製剤開発が求められる。夏天無に含まれているアルカロイドには、protopine (1)、egeline (2)、tetrahydropalmatine (3)、bicuculline (4)、palmatine (5)、kikemanine (6)、coptisine (7) 等 (構造式を図 1 に示す) が報告されている。本研究では、夏天無の超臨界流体  $\text{CO}_2$  エキスをラットに経口投与したときの化合物 1~4 の血中濃度推移を測定し、消化管吸収と体内分布を調査することを目的とする検討を行った。

### 方 法:

**材 料:** 夏天無の超臨界流体  $\text{CO}_2$  エキス、化合物 1~4 の標準品は、共同研究者の楊義芳先生から供与されたものを使用した。夏天無超臨界流体  $\text{CO}_2$  エキスのヒト常用量は  $130 \text{ mg/day}$  であることから、体重換算で  $2.6 \text{ mg/kg/day}$  をヒト常用量として投与量を計算した。

**実験動物:** Wistar ST ラット (9 週齢、オス) を日本 SLC より購入して使用した。

**アルカロイド分析方法:** 適宜前処理したサンプルを、LC/MS/MS により分析した。システムは Quattro Premier XE (Waters、Milford、MS) の ESI (+)-MRM モードで行い、カラムは Inertosil ODS-3、 $2.1 \text{ mm i.d.} \times 50 \text{ mm}$ 、 $4 \mu\text{m}$ 、移動層、 $10 \text{ mM AcONH}_4$  緩衝液、pH 3.0 : MeCN (80/20)、 $0.2 \text{ mL/min}$  を使用した。検出に用いた条件

は以下の通りである：化合物 1、353.89→188.5、cone voltage 14 V、collision energy 29 eV (tR 4.3 min)；化合物 2、369.9→189.9、cone voltage 13 V、collision energy 13 eV (tR 2.5 min)；化合物 3、355.9→191.9、cone voltage 41 V、collision energy 29 eV (tR 4.9 min) 化合物 4、367.9→307.0、cone voltage 29 V、collision energy 25 eV (tR 2.9 min)；papaverine、339.9→201.9、cone voltage 37 V、collision energy 29 eV (tR 3.7 min)。

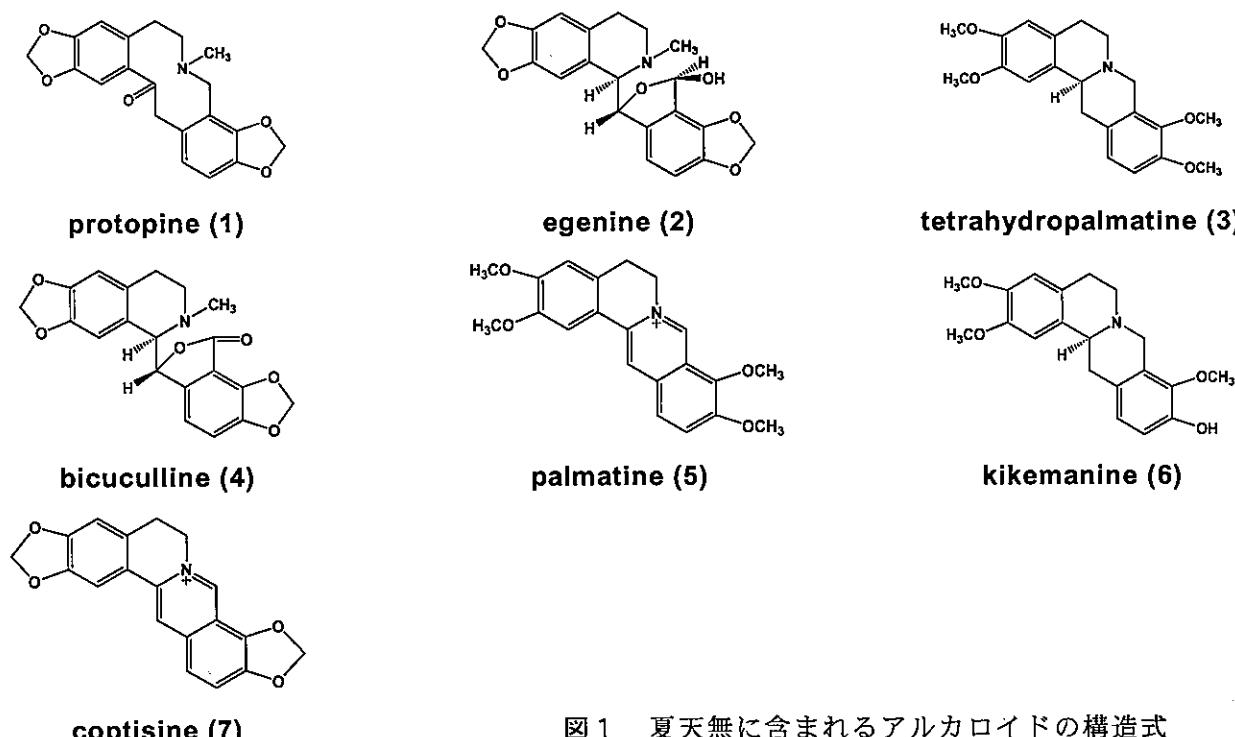


図1 夏天無に含まれるアルカロイドの構造式

### 結果：

まずははじめに、移動層で適宜希釈した化合物 1~4 溶液 180 μL に、内部標準として papaverine (97 ng/mL) 溶液 20 μL 加えることで調製した標準溶液を、LC/MS/MS で分析し、検量線を描いた。その結果、化合物とも 14~450 ng/mL の濃度範囲で、 $r^2$  値 0.998 以上の良好な検量線が描けた。これをもとに夏天無の超臨界流体 CO<sub>2</sub>エキス中の各化合物含量を求め、化合物 1~4 で 20.4、20.1、10.8、2.4 (w/w)% の値を得た。

次に、各化合物を血清に溶解させたときの分析方法について検討した。各種、除タンパク前処理方法を検討した結果、血清 75 μL に、papaverine (24 ng/mL) in MeCN : AcOH (98/2) 溶液 75 μL を加え、激しく攪拌後、-20°C で 30 分静置し、12,000 g、7 min 遠心し、その上清 10 μL を LC/MS/MS にインジェクトする、という方法で、表1に示す分析条件が得られた。

表1 分析条件のバリデーション

	protopine (1)	egenine (2)	tetrahydropalmatine (3)	bicuculline (4)
500 ng/mL での回収率 (%)	108	100	115	100
100 ng/mL での回収率 (%)	109	101	119	106
30 ng/mL での回収率 (%)	137	131	144	140
日内変動係数 (%)	3.5	2.8	1.8	3.8
日間変動係数 (%)	6.0	4.5	5.0	5.2
3 回凍結融解変動係数 (%)	5.0	4.1	3.7	5.0

検量線は、4~500 ng/mL の濃度範囲内で  $r^2$  値がそれぞれ 0.990 以上の良好な検量線が描けたものの、30 ng/mL 以上の濃度において、回収率の低下が認められたことから、この濃度においては血清由来成分によるマトリクス効果を排除できないことが推測され、若干の誤差を生じる可能性が示唆された。

頸静脈にカニューレーション手術を施して、覚醒時でも容易に採血を可能にしたラットに対して、夏天無の超臨界流体 CO<sub>2</sub>エキスを 1%カルボキシメチルセルロースに 5.32 mg/mL の濃度で懸濁させたものを、10 mL/kg の容量で経口投与（53.2 mg/kg、ヒト常用量の 20 倍量に相当する）し、経時的に採血して化合物 1~4 の血中濃度推移を測定した。その結果を図 2 に示す。

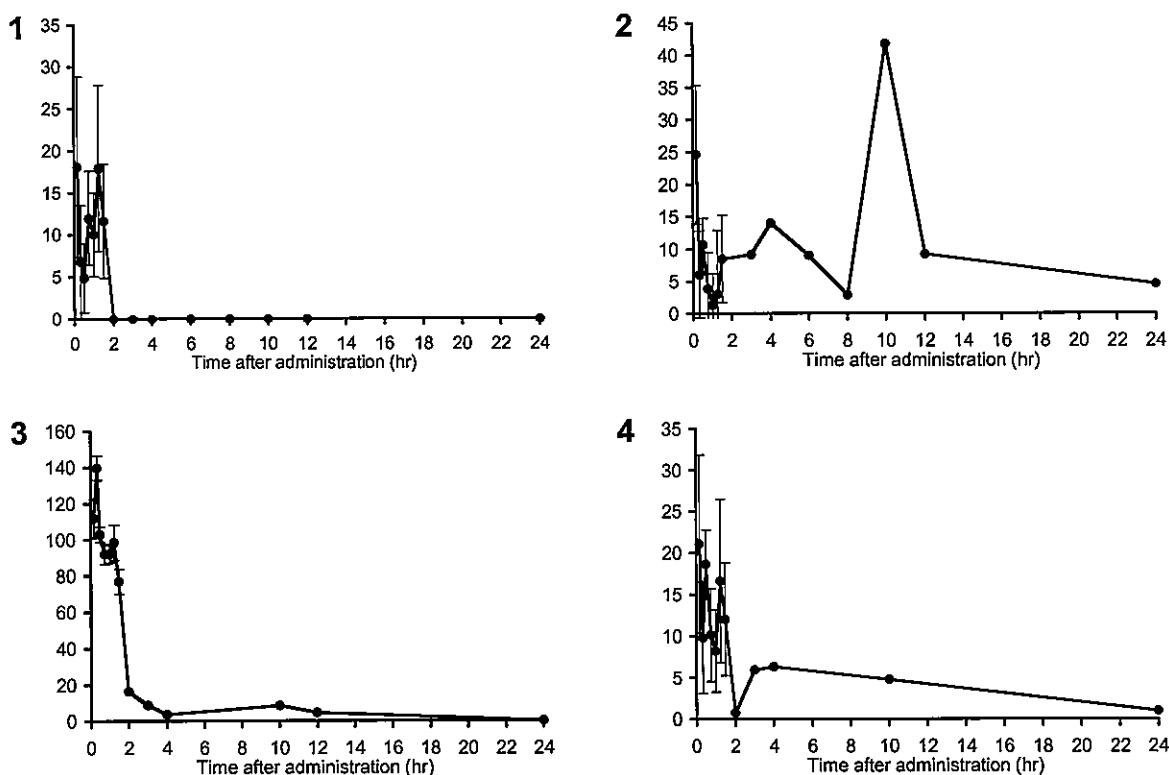


図 2 夏天無エキスをラットに経口投与した後の化合物 1~4 の血中濃度推移

表 2 薬物動態学的パラメータ

	protopine (1)	egeline (2)	tetrahydropalmatine (3)	bicuculline (4)
投与量 (mg/kg)	10.8	10.7	5.75	1.28
AUC (ng/mL·h)	19.5	249.3	259.7	105.0
C <sub>max</sub> (ng/mL)	49.9	44.4	127	31.6

夏天無エキスに含まれているアルカロイドの含量から算出した、個々の化合物における投与量と、ラットにおける血中の濃度推移から算出した薬物動態学的パラメータを、表 2 に示す。4つのアルカロイドのうち、最も血中濃度が高かったのは tetrahydropalmatine (3) で、経口投与後速やかに吸収され、4 時間後には血液中からはほぼ消失していた。また、エキス中の含量が最も多い protopine (1) は、最も低い血中濃度推移曲線下面積 (AUC) を示した。

## 考 察 :

夏天無に含まれているアルカロイドの LC/MS/MS における定量を試み、化合物を移動層である 20% MeCN に溶解した場合には、2 ng 程度までの高感度で良好に分析できることが明らかになった。しかし、それらを血清に溶解した場合には、有機溶媒を用いた除タンパク法では 30 ng/mL の濃度では 100%を大幅に超える回収率が得られた。有機溶媒により血清を処理すると、タンパク質は沈殿により除去することが可能であるが、脂質は上清中に残ってしまうため、残存脂質が MS での分析に影響するマトリクス効果と呼ばれる現象が起こることが知られている。従って、各化合物 30 ng/mL 以下の濃度では、そのマトリクス効果による影響が無視できないものとなり、定量の正確性が低下してくる可能性が推定された。

本研究において、ラットに投与した夏天無エキスは、ヒト常用量の 20 倍の投与量である。このときに調製した夏天無エキス (5.32 mg/mL) 1%カルボキシメチルセルロース懸濁液は、エキスの粘性が著しく、容器や注射器に吸着したまま離れないなど、正確な投与量を均一な懸濁液として投与が出来ていない状態であった。夏天無エキスに含まれるアルカロイドの水溶性は低く、本研究では生葉からの抽出効率を高めるために超臨界流体 CO<sub>2</sub>を用いた抽出方法を採用しているが、実際に経口投与製剤を調製する際にはそれらの難水溶性という性質が問題となることが明らかとなった。界面活性剤では懸濁化が困難であったため、シクロデキストリンを用いた包接化合物化など、水への分散性を改善する必要性がある。

また、夏天無エキスをヒト常用量の 20 倍量ラットに投与したが、化合物 1~4 の最高血中濃度は 30~120 ng/mL と、マトリクス効果の影響が無視できる濃度ではないものであった。一方、予備実験で夏天無エキスをヒト常用量の 100 倍量でラットに経口投与したときには、ラットは投与直後に強直性痙攣を起こして死亡したことから、投与量をヒト常用量の 20 倍量に增量することは困難で、血中濃度をこれ以上の高値を想定することは出来ない。従って、マトリクス効果の影響を考慮して、標準溶液を調製するための正常ラット血清を実験に使用するラットと同一ロットで調製する必要があると考えられた。

本研究で測定対象とした化合物のうちでは、夏天無エキスには protopine (1) が最も多く含まれているが、本化合物の消化管吸収は極めて低く、ほぼ同量含まれている eginine (2) の約 20 分の 1 の AUC しか示さなかった。一方、bicuculline (4) は夏天無エキス中には eginine (2) の約 8 分の 1 しか含まれていないが、eginine (2) の約 3 分の 2 の C<sub>max</sub> と、約 2 分の 1 程度の AUC と、含量の割には高い値を示した。Eginine (2) と bicuculline (4) は、分子構造内では水酸基とケトン基の違いであることから、pH 分配仮説に従い、脂溶性の高いケトン基を持つ bicuculline (4) の方が消化管吸収が高いことが説明される。一方、protopine (1) の脂溶性は、eginine (2) や bicuculline (4) よりも高いことから、細胞膜の透過性はそれよりも高いことが推測されるが、実際の血中濃度は極めて低いものとなった。これは、その脂溶性の高さから、経口投与に用いた懸濁液中の分散性が低くなり、不溶物のまま消化管内に滞在してしまい、吸収されなかつたものと考えられた。また、tetrahydropalmatine (3) は、エキス中の含量は eginine (2) の約 2 分の 1 であるが、約 3 倍の C<sub>max</sub> とほぼ同程度の AUC の値を示した。Tetrahydropalmatine (3) については、分子構造を特異的に認識して能動的に消化管内から血液中へ輸送される何らかのトランスポーターの基質になっている可能性が示唆された。

夏天無アルカロイドを経口投与製剤として開発するための課題としては、化合物の水への分散性を高める必要性がまず第一にあげられる。しかし、本化合物の毒性は低くではなく、本実験で使用した投与量の 5 倍量でラットが死亡するほどであることから、化合物の水への分散性を高めて血中濃度が上昇すること自体は決して歓迎されることではない。本化合物を安全に有効に医薬品として開発するためには、徐放性製剤など剤型の工夫が必要と考えられる。

(2001 年 3 月 7 日作成)