

HPLC を用いた柑橘類果汁中に含有されるフラノクマリン誘導体の一斉分析

植 沢 芳 広,* 毛 利 公 則

Comprehensive Determination of Furanocoumarin Derivatives in Citrus Juice by High Performance Liquid Chromatography

Yoshihiro UESAWA* and Kiminori MOHRI

Clinical Pharmaceutics Laboratory, Department of Pharmaceutics, Meiji Pharmaceutical University,
2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

(Received June 14, 2005; Accepted August 1, 2005; Published online August 3, 2005)

We studied a reverse phase HPLC method employing a simple acetonitrile: 0.1% phosphoric acid aqueous solution gradient as the mobile phase for the determination of furanocoumarin (FC) derivatives, such as bergamottin (BG) and 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB), using UV detection. Anthracene was added to samples as an internal standard. A Capcell Pak SG-Phenyl column (4.6 mm [inner diameter] × 25 cm; particle size 5 mm; Shiseido) was used, and the flow rate was set at a constant 1 ml/min. A photodiode array detector was used because it reveals the characteristic UV-absorption spectrum of FCs, commonly with 311 nm as the maximum wavelength. Furanocoumarin derivatives in pomelo juice (PJ) were detected by the method and compared with those in grapefruit juice (GJ) and orange juice (OJ). GJ contained 3 kinds of FCs, BG, DHB and bergaptol (BT). OJ had no FCs. On the other hand, PJ contained 8 kinds of FCs including BT, BG and DHB. This FC detection system may be effective for identifying foods and beverages that interact adversely with drugs.

Key words—HPLC; furanocoumarin; grapefruit juice; drug interaction; pomelo juice

緒 言

ベルガモチン (BG), 6',7'-ジヒドロキシベルガモチン (DHB) 等のフラノクマリン (FC) 誘導体はグレープフルーツジュース (GJ) と薬物の相互作用における原因物質として注目されている。^{1,2)} GJ に含有されるこれらの FCs は、小腸粘膜上皮細胞に発現する主要薬物代謝酵素である CYP3A4 に結合することによりその活性を長期間消失させる。^{3,4)} その結果、消化管 CYP3A4 の基質であり吸収率の低い一群の薬物の生物学的利用率を数日間に渡って上昇させる。例えばジヒドロピリジン系抗高血圧薬等は GJ の摂取による血中濃度の上昇により副作用の誘発を招く危険性が高い。⁵⁾ これは現在临床上で広く認識されている問題であり、服薬指導時に薬物治療中の患者が GJ の飲用を禁止される例も

多い。

一方、GJ 以外の飲食物にも FCs の含有が認められている。⁶⁾ しかし、その医薬品相互作用に関する情報は極めて少ない。よって、GJ を始めとする飲食物中に含有される FCs を網羅的に検出する方法の開発は、薬物治療中の患者における相互作用の予測及び回避の観点から重要な知見となる可能性が考えられる。

今回の報告では、UV 吸光スペクトルパターンを指標にした FCs の網羅的検出法を、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を接続した HPLC を用いて検討した。さらにポメロ果汁 (PJ) における FCs を測定し、GJ 及びオレンジジュース (OJ) と比較した。

方 法

1. 試薬・試料 アントラセン (内部標準物質) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より、BT はフナ

コシ株式会社（東京）より、BG 及び DHB は第一化学薬品株式会社（東京）より購入した。アセトニトリル及びリン酸は HPLC 用試薬を用いた（和光純薬工業株式会社）。他の試薬はすべて特級品を用いた（和光純薬工業株式会社）。GJ 及び OJ は市販品を、PJ は市販のポメロの果肉を圧搾して得た果汁を使用した。

2. FCs の測定 柑橘類果汁中の FCs を、次に示す HPLC 条件下で測定した。検出器は MD-910 多波長 UV/VIS 検出器（JASCO）を用いた。データ解析には JASCO-Borwin computer program（JASCO）を用いた。固定相には、ガードカラムとして Capcell Pak SG-ODS (4.6 mm [inside diameter] × 1 cm; particle size 5 mm; 資生堂) を接続した逆相 Capcell Pak SG-Phenyl カラム (4.6 mm [inside diameter] × 25 cm; particle size 5 mm; 資生堂) を使用した。移動相として、アセトニトリル：0.1%リン酸水溶液（4：6）を 5 分間流し、その後 30 分間でアセトニトリル 100% までのグラジエントを用いることにより FCs を溶出した。流速は毎分 1 ml とした。検量線には標準 FCs として BG 及び DHB を使用し、各々 2.96—148 μM 及び 2.69—134 μM の範囲で作成した。

3. HPLC 用試料の調製 100 μl の GJ, OJ 又は PJ に 400 μl のアントラセン（内部標準物質）アセトニトリル溶液（10 μg/ml）を加え、攪拌後 16000 g で 10 分間の遠心分離を行い、上清 50 μl を上記 HPLC 分析系に供した。

結 果

1. FCs の HPLC 測定条件 BG 及び DHB は、医薬品の体内動態に影響を与える GJ 中の主要 FCs と考えられている。^{1,2)} 上記逆相 HPLC 測定条件を用いて DHB, BG 及び IS を測定したところ、各々 7.4 分、22.7 分及び 20.2 分の保持時間で溶出した。両 FCs の極大波長はともに 311 nm を示した。この波長において、IS に対する FCs のピーク面積比対各 FC 濃度 (μM) の検量線を作成したところ、BG 及び DBH は相関係数 0.999 ($y=0.0575x-0.190$) 及び 1.000 ($y=0.0544x-0.073$) の良好な相関を与えた。

2. GJ に含有される FCs の検出 GJ に含有される FCs を、上記 HPLC 条件において 311 nm の極大波長を指標に探索した。GJ のアセトニトリル抽出液を測定に供したところ、BG (18.6 μM) 及び DHB (9.2 μM) が検出された。さらに、311 nm に極大吸収を有する第 3 のピークが 5.2 分の保持時間に観察された。標準試薬との比較によりこのピークがベルガプツール (BT) に由来することを確認した (47.4 μM) (Figs. 1, 2)。同様に、総計 7 種類の国産 GJ に含有される FCs を測定した結果、いずれのブランドにおいても主要 FCs として BG, DHB, 及び BT を認めた (平均値 ± S.D. として各々 18.2 ± 6.1 μM, 17.9 ± 10.0 μM, 及び 29.1 ± 14.7 μM)。

3. OJ に含有される FCs の検出 OJ に含有

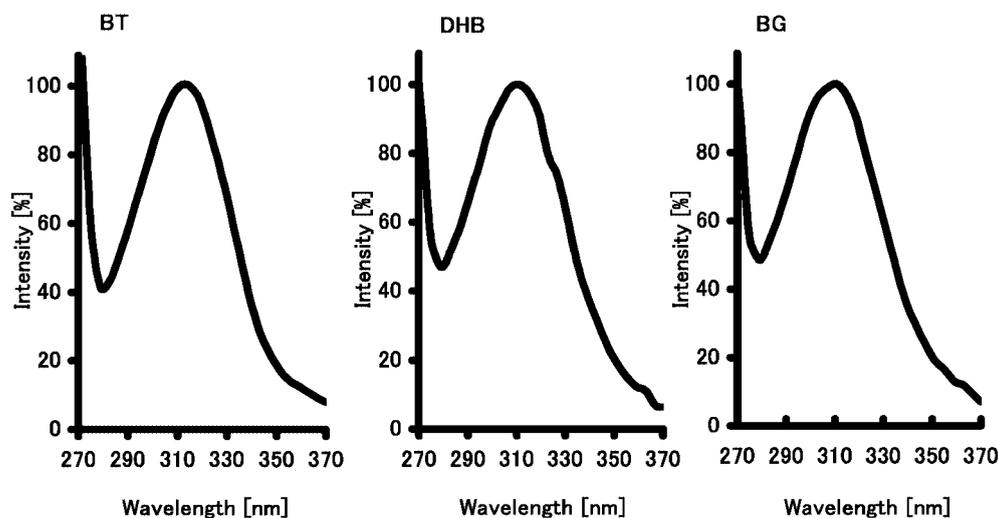


Fig. 1. UV Spectra of the Furanocoumarin Derivatives in GJ

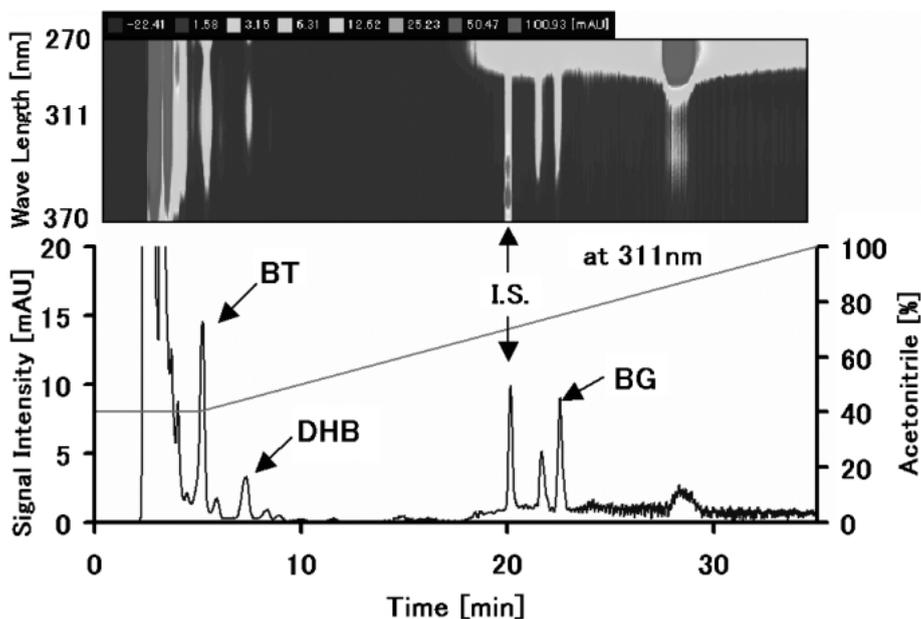


Fig. 2. HPLC Chromatogram of the GJ Extract

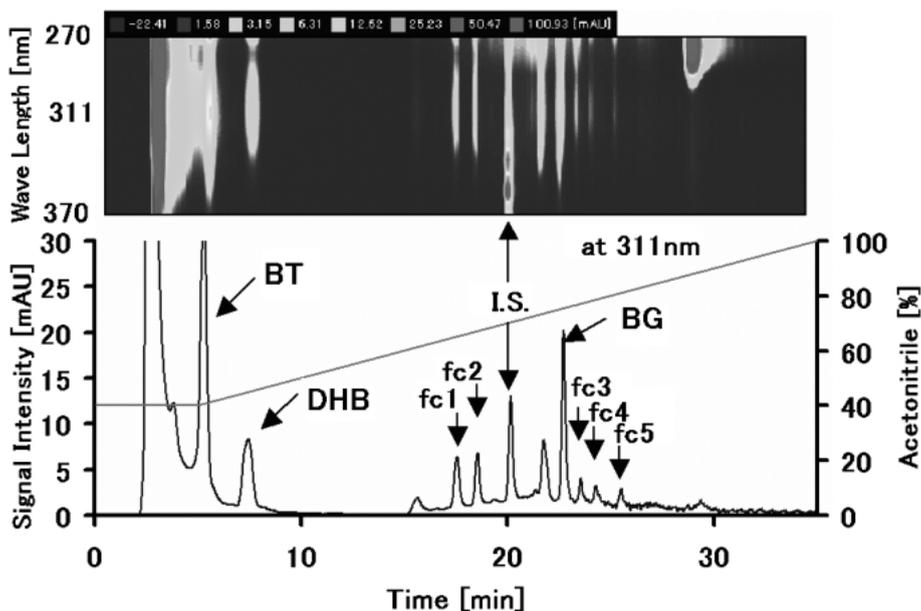


Fig. 3. HPLC Chromatogram of the PJ Extract

される FCs を、GJ と同様に上記 HPLC 条件において 311 nm の極大波長を指標に探索した。その結果、HPLC クロマトグラム上に該当するピークは検出されなかった。

4. PJ に含有される FCs の検出 PJ に含有される FCs を、GJ 及び OJ と同様に上記 HPLC 条件において 311 nm の極大波長を指標に探索した。その結果、PJ には GJ と同様に BG、DHB、及び BT が認められた (各々 31.9、29.5 及び 147.4 μM)。さ

らに、保持時間 17.6、18.6、23.6、24.3 及び 25.5 分に 311 nm の極大吸収を有する 5 種類の未同定ピーク (各々 fc1、fc2、fc3、fc4 及び fc5) を検出した (Fig. 3)。BG を用いて作成した検量線に基づき各未同定 FCs が BG と同等のモル吸光係数を有するものと仮定したときの濃度を推算したところ、fc1、fc2、fc3、fc4 及び fc5 濃度は各々 15.7、13.0、7.4、7.1 及び 6.2 μM に相当した。

考 察

BG, DHB 等の FCs は GJ が誘発する薬物相互作用の原因物質であると考えられている。^{1,2)} *In vivo* 評価系による種々の検討がなされてきたが、相互作用に寄与する主要 FC を、BG であるとする報告^{1,7,8)}がある一方、DHB により強い相互作用活性を見出したとする結果も複数報告されている。^{2,9)} また、*in vitro* 評価系において最も強い P450 3A4 阻害活性を示すとされる FC 2 量体¹⁰⁾の薬物相互作用に関する動態試験は行われていない。すなわち、FCs の薬物相互作用への寄与に対する重要性は認知されているものの、その詳細に関する十分な統一的理解は得られていないのが現状である。他の柑橘類果汁等に含有される他種の FCs が薬物相互作用の原因となる危険性を有する可能性も推察される。したがって、FCs に対する網羅的検出法の開発は薬物間相互作用を惹起し得る飲食物の発見に重要な貢献を与えるものと考えられる。

薬物との相互作用に重要な役割を果たしていることが認知されて以来、GJ 中の FCs は HPLC-UV 法、¹¹⁻¹³⁾ LC-tandem MS 法¹²⁾等によって測定されてきた。これらの測定法は特定の FCs を検出・定量するために有効である一方、未同定の FCs を網羅的に探索するための分析手段としては不十分である。今回の HPLC-PDA 法を用いた検討では、GJ 中に含有される 3 種類の FCs である BG, DHB, BT が共に 311 nm を極大吸収波長とする共通した UV 吸収スペクトルを示すことを見出した (Fig. 1)。今回とは異なる測定条件において、BG 等が類似した波長を示す知見も報告されている。¹³⁾ 3 種類の FCs に共通の構造から、この特徴的なスペクトルは 5 位に酸素原子を有する FC 骨格に由来するものと考え、この構造を有する成分の探索に 311 nm の極大吸収を特定できる多波長検出は有効であると推察した。そこで、HPLC-PDA 法を用いて、市販 GJ 及び GJ 以外の柑橘類果汁に含有される可能性のある FCs の網羅的な検出を試みた。

7 種類の国産 GJ を用いた検討の結果、いずれのブランドにおいても含有される主要 FCs として BG, DHB, 及び BT が観察された。一方、OJ を用いた検討において、311 nm を最大吸収波長とするピークは全く検出されなかった。すなわち、OJ は

FCs を含有しないことが示された。この観察は、GJ が有するジヒドロピリジン系高圧薬等に対する血中濃度上昇作用を OJ は全く示さないという多くの知見と一致する。^{5,8,14,15)}

最近、PJ が GJ と同様にヒト肝ミクロソームの P450 3A4 によるテストステロンの 6 β 水酸化活性を阻害することが報告された。¹⁶⁾ これは、PJ が GJ 様の薬物相互作用を惹起する可能性を示す知見である。実際、腎移植患者においてタクロリムスの血中濃度がポメロの摂取によって上昇したとする報告もある。¹⁷⁾ そこで、PJ に関する FCs の網羅的探索を GJ 及び OJ と同様に試みた。その結果、PJ 中には 311 nm を最大吸収波長とする BG, DHB, BT を含む 8 種類のピークを確認した (Fig. 3)。これらの FCs は BG 及び DHB とともに PJ の薬物相互作用に寄与している可能性が推察される。

本研究において開発された FCs の網羅的な検出法は、種々の飲食物中に含有される FCs の一斉分析を可能にした。この方法は、薬物治療中の患者における薬物-食物相互作用の予測及び回避に有用なツールになるものと考えられる。

REFERENCES

- 1) Goosen T. C., Cillie D., Bailey D. G., Yu C., He K., Hollenberg P. F., Woster P. M., Cohen L., Williams J. A., Rheeders M., Dijkstra H. P., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **76**, 607-617 (2004).
- 2) Kakar S. M., Paine M. F., Stewart P. W., Watkins P. B., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**, 569-579 (2004).
- 3) He K., Iyer K. R., Hayes R. N., Sinz M. W., Woolf T. F., Hollenberg P. F., *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 252-259 (1998).
- 4) Schmiedlin-Ren P., Edwards D. J., Fitzsimmons M. E., He K., Lown K. S., Woster P. M., Rahman A., Thummel K. E., Fisher J. M., Hollenberg P. F., Watkins P. B., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 1228-1233 (1997).
- 5) Bailey D. G., Spence J. D., Munoz C., Arnold J. M., *Lancet*, **337**, 268-269 (1991).
- 6) Beier R. C., *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **113**, 47-137 (1990).
- 7) Malhotra S., Bailey D. G., Paine M. F., Watkins P. B., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**, 14-23

- (2001).
- 8) Mohri K., Uesawa Y., *Pharm. Res.*, **18**, 177–182 (2001).
 - 9) Paine M. F., Criss A. B., Watkins P. B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 1151–1160 (2005).
 - 10) Guo L. Q., Taniguchi M., Xiao Y. Q., Baba K., Ohta T., Yamazoe Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 122–129 (2000).
 - 11) Edwards D. J., Bellevue 3rd. F. H., Woster P. M., *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 1287–1290 (1996).
 - 12) He K., Iyer K. R., Hayes R. N., Sinz M. W., Woolf T. F., Hollenberg P. F., *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 252–259 (1998).
 - 13) Fukuda K., Ohta T., Oshima Y., Ohashi N., Yoshikawa M., Yamazoe Y., *Pharmacogenetics*, **7**, 391–396 (1997).
 - 14) Grundy J. S., Eliot L. A., Kulmatycki K. M., Foster R. T., *Biopharm. Drug Dispos.*, **19**, 175–183 (1998).
 - 15) Yee G. C., Stanley D. L., Pessa L.J., Dalla Costa T., Beltz S. E., Ruiz J., Lowenthal D. T., *Lancet*, **345**, 955–956 (1995).
 - 16) Egashira K., Ohtani H., Itoh S., Koyabu N., Tsujimoto M., Murakami H., Sawada Y., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 828–833 (2004).
 - 17) Egashira K., Fukuda E., Onga T., Yogi Y., Matsuya F., Koyabu N., Ohtani H., Sawada Y., *Transplantation*, **75**, 1057 (2003).