

| | |
|------------------|---|
| Title | 薬物の吸収ならびに排泄に関する研究(第16報) : ラット尿中のスルピリンならびにその代謝物の定量法 |
| Sub Title | Studies on absorption and excretion of drugs. (XVI). : determination of sulpyrin and its metabolites in the rat urine |
| Author | 野上, 寿(Nogami, Hisashi) 花野, 学(Hanano, Manabu) 粟津, 荘司(Awazu, Shoji) 今岡, キク子(Imaoka, Kikuko) |
| Publisher | 共立薬科大学 |
| Publication year | 1970 |
| Jtitle | 共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.15 (1970.) ,p.79- 86 |
| JaLC DOI | |
| Abstract | |
| Notes | 抄録 |
| Genre | Technical Report |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000015-0079 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

薬物の吸収ならびに排泄に関する研究 (第16報¹⁾)
 ラット尿中のスルピリンならびにその代謝物の定量法*

野上 寿, 花野 学, 粟津荘司, 今岡キク子

Studies on Absorption and Excretion of Drugs. XVI¹⁾.
 Determination of Sulpirin and Its Metabolites in the Rat Urine

Hisashi NOGAMI, Manabu HANANO, Shoji AWAZU
 and Kikuko IMAOKA

スルピリンの化学構造, 代謝物, 薬効などに類似性をもつアミノピリンについて, Brodie²⁾ がこれを人間に投与し, 尿中に排泄された非代謝アミノピリンならびに代謝物である 4-aminoantipyrine (AA), 4-acetylaminoantipyrine (AcAA) を有機溶剤でおのおの抽出したのちに比色定量し, 4-hydroxyantipyrine (HO-A), 4-hydroxyantipyrine-conjugate (RO-A) は紫外外部吸光度を用いる方法³⁾ によって測定している. 他方, スルピリンの加水分解については Wagner⁴⁾ が 4-monomethylaminoantipyrine (MAA), bis (4-methylaminoantipyrinyl) methane (Bis 体), AA, AcAA などの分解物を報告しているが, 分離定量法は完成されていない. われわれはスルピリンの代謝物について検討するため, スルピリンをラットに投与し, 非代謝スルピリン (S) ならびに代謝物 MAA, AcAA, HO-A, RO-A を尿中から検出した. しかし有機溶剤による分離定量法は尿中の各種代謝物の分離が悪く, S が水溶液の状態において変化しやすいため適用できなかつた. そこで本研究においてはラット尿中の各種排泄物を沱紙クロマトグラフィーにより分離したのち, おのおのについて比色定量することを試み, S, MAA, AA, AcAA を十分な精度で分離定量することに成功したので報告する.

沱紙クロマトグラフィーは丹羽ら⁵⁾ ならびに Pechtold⁶⁾ の方法を参考にした. S の定量法は種種知られているが, 本実験試料の濃度が低いため (10-100 μ g/ml), この濃度に適合している守田⁷⁾ のリンモリブデン酸による方法を用いた. MAA もこの方法によって行なつた. AA ならびに AcAA は Brodie ら²⁾ の α -ナフトールによる比色法を用いた. HO-A ならびに RO-A は Brodie ら³⁾ の紫外外部吸光度を用いる方法のとおりに行なつた.

沱紙クロマトグラフィー

S, MAA, AA, AcAA の各種標準物質を pH 7.0 リン酸緩衝液に溶かした混合液 (各 150 μ g/0.1 ml) を調製し, その 0.1 ml を原報の実験の部で述べた方法により沱紙クロマトグラフィーを行なつた. 沱紙クロマトグラムを Fig. 1 に示す. 分離が明確に行なわれ, 各定量値は良好な回収率および再現性を示し, その結果を Table I に示す. また Bis 体の標準液は MAA と同一の Rf 値を示したので, 最終濃度が 20 μ g/ml になる標準液をスポットし, 展開操作後の沱紙を EtOH で抽出し, UV 吸収スペクトルを測定した結果, 沱紙クロマトグラフィー中に Bis 体は MAA に変化することを確認した. この沱紙クロマトグラフィー後の Bis 体および直接測定した MAA, Bis 体の各 EtOH 溶液 (20 μ g/ml) の UV 吸収スペクトルを Fig. 2 に示す.

尿が分離に影響するか否かを検討するため, ブランク尿で各標準物質を溶かした混合液 (各 150

1) 本報告は薬誌, 90, 378 (1970) に発表.

$\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$) をつくり、前述同様に操作したところ、 R_f 値の変化がなく、よく分離し、よい定量値が得られた (Table I), つぎに各標準物質の $100\mu\text{g}$ ずつをブランク尿 0.1 ml で溶かし、反覆測定を行ない、定量誤差を求めた。それらの結果を Table II に示す。

S の検量線

S の吸収スペクトルは Fig. 3 の (a) に示すとおりであり、S の定量操作において使用する抽出上澄液は $1/2$ 量であるため、検量線作成時には濃度をあらかじめ 2 倍とし、S $40\text{--}200\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ の pH 7.0 リン酸緩衝液による標準液 0.1 ml を前述同様に操作して求める。その検量線を Fig. 4 に示す。

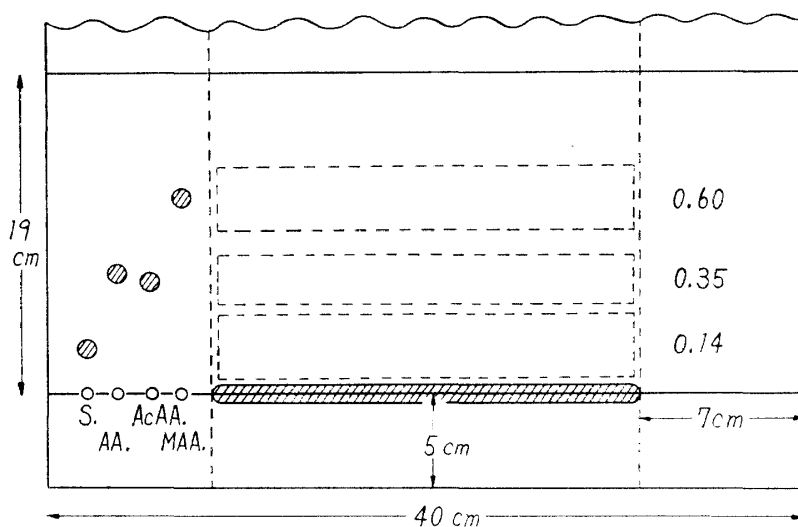


Fig. 1 Paper Chromatography on the Urinary Excretion of Sulpyrin

- 0.60 : 4-Monomethylaminoantipyrine (MAA) R_f Value
- 0.35 : 4-Aminoantipyrine (AA) and 4-Acetylaminoantipyrine (AcAA) have the Same R_f Value
- 0.14 : Sulpyrin (S) R_f Value

Table I Recovery Rate from the Mixture of Sulpyrin, 4-Monomethylaminoantipyrine, 4-Aminoantipyrine and 4-Acetylaminoantipyrine ($150\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ Each) with the Paper Chromatography

| Substance | Recovery Rate from the Buffer Soln. (%) | Recovery Rate from the Rat Urine (%) |
|-----------------------------|---|--------------------------------------|
| Sulpyrin | 90 | 91 |
| 4-Monomethylaminoantipyrine | 96 | 94 |
| 4-Aminoantipyrine | 97 | 96 |
| 4-Acetylaminoantipyrine | 105 | 102 |

Standards were taken before paper chromatographic treatment.

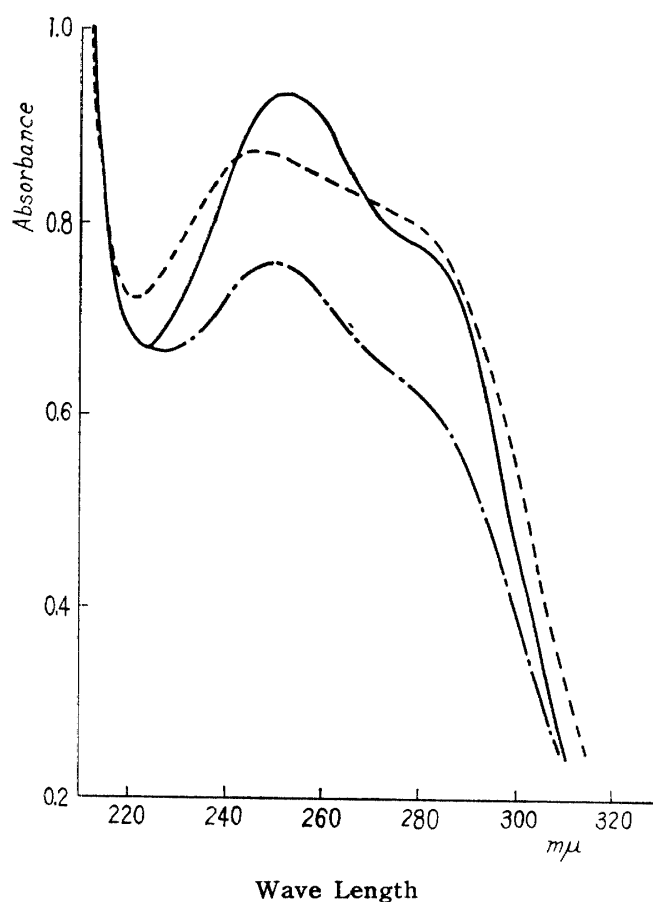


Fig. 2 Ultraviolet Absorption Spectra of 4-Monomethylaminoantipyrine (—), Bis-(4-methylaminoantipyrinyl) methane (---), and Bis-(4-methylaminoantipyrinyl) methane Extracted with Ethanol after Separated by Paper Chromatography (-·-·-). Each Substance was dissolved in Ethanol, and a Final Concentration was $20\mu\text{g/ml}$

Table II Recovery Test of Sulpyrin and Metabolites from the Rat Urine

| Substance | Recovery (%) | | | n* | Standard Deviation (%) |
|-----------------------------|--------------|-------|------|----|------------------------|
| | Mean | Max. | Min. | | |
| Sulpyrin | 98.8 | 100.2 | 95.0 | 6 | 1.76 |
| 4-Monomethylaminoantipyrine | 100.4 | 103.2 | 98.4 | 5 | 2.04 |
| 4-Aminoantipyrine | 100.8 | 102.5 | 99.7 | 5 | 1.19 |
| 4-Acetylaminoantipyrine | 100.5 | 103.6 | 97.5 | 5 | 2.47 |

* number of determinations.

また S 標準液は調製後ただちに炉紙へスポットして急速に冷風乾燥するため、S の安定性が著しく増大し、Table III に示すような良い結果が得られた。

MAA の検量線

MAA の定量法は S と同様であるから、検量線作成時にもやはり 2 倍濃度の MAA 40—200 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ の pH 0.7 リン酸緩衝液による標準液 0.1 ml を前述同様に操作して求める。その検量線を Fig. 5 に示す。なお Bis 体の標準物質は定量操作中に MAA に変化することから、

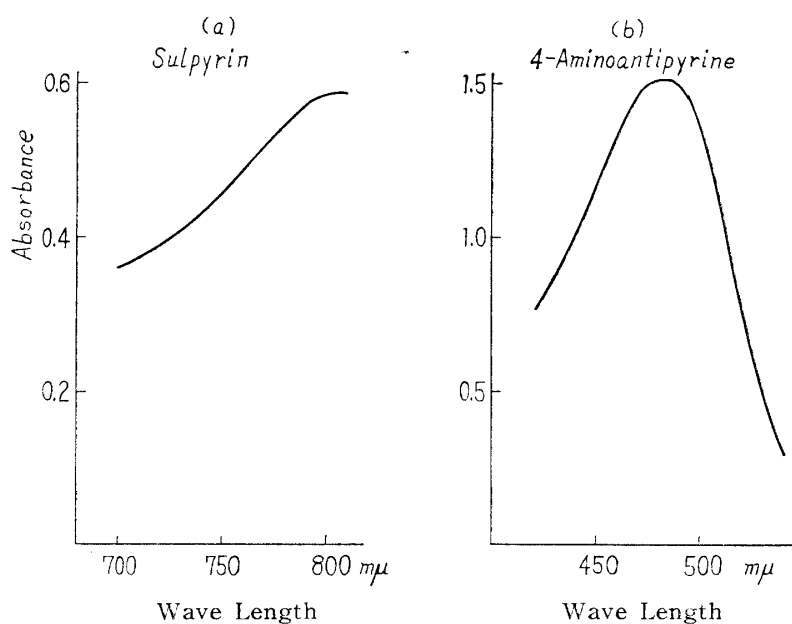


Fig. 3 Absorption Spectra of the Coloured Solutions on the Determinations of Sulpyrin with the Phosphomolybdic Acid Method and 4-Aminoantipyrine with the α -Naphthol Method

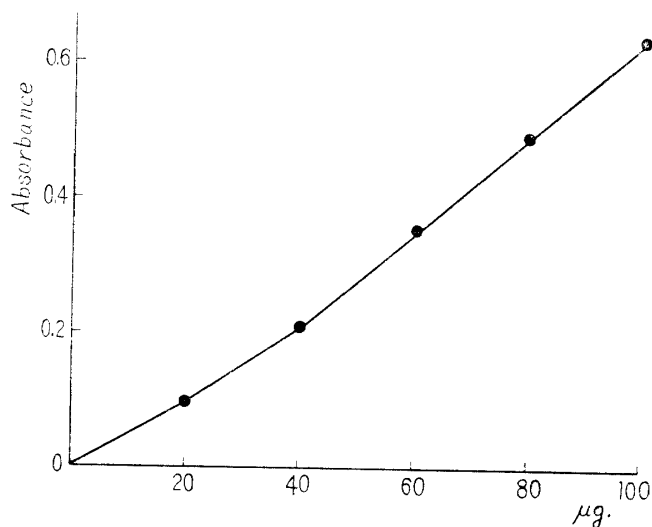


Fig. 4 Working Curve of Sulpyrin by Paper Chromatography

この定量法においては尿中の Bis 体, MAA の区別がつかず, いずれも MAA として定量される。

AA の検量線

AA の吸収スペクトルは Fig. 3 の (b) に示すとおりであり, AA の定量操作において使用する抽出上澄液は $\frac{1}{4}$ 量であるため, 検量線作成時にはあらかじめ 4 倍濃度とし, AA 80—400 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ の pH 7.0 リン酸緩衝液による標準液 0.1 ml を前述同様に操作して求める。その検量線を Fig. 6 に示す。

AcAA の検量線

AcAA の定量操作においても使用する抽出上澄液は $\frac{1}{4}$ 量であるため, 検量線作成時にはあらかじめ 4 倍濃度とし, AcAA 80—400 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ の pH 7.0 リン酸緩衝液による標準液 0.1 ml を前述同様に操作して求める。その検量線を Fig. 7 に示す。

Table III Recovery Rate from the Paper Chromatography (PPC)

| Sulpyrin ($\mu\text{g.}$) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Direct-determined Absorbance | 0.098 | 0.235 | 0.402 | 0.568 | 0.735 |
| Absorbance after PPC | 0.095 | 0.208 | 0.350 | 0.494 | 0.638 |
| Recovery Rate (%) | 96 | 90 | 89.5 | 89 | 88.5 |

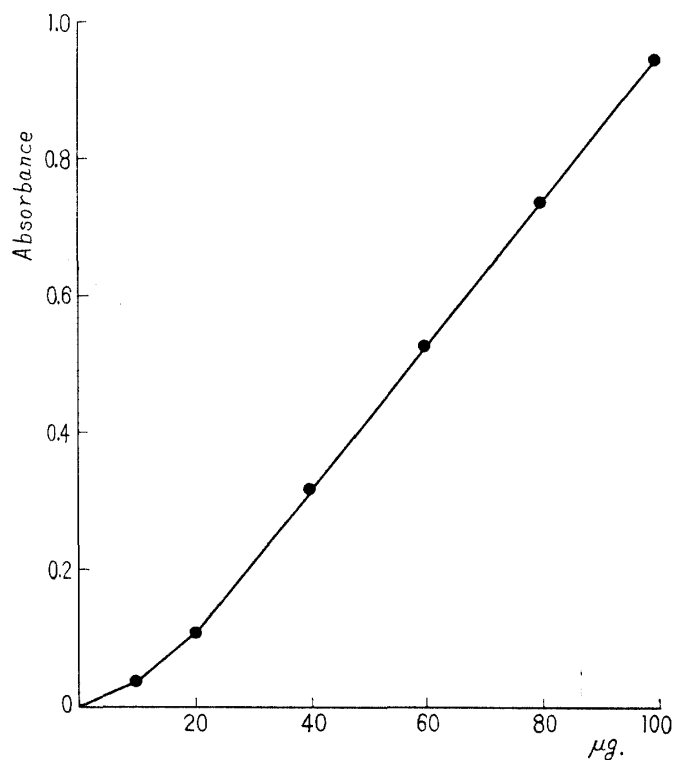


Fig. 5 Working Curve of 4-Monomethylaminoantipyrine by Paper Chromatography

尿ブランク値

薬物投与前のブランク尿 0.5 ml を炉紙にスポットし、展開後、各物質の Rf 値に相当する部分を切りわけ、おのおのの定量法で測定した値を各物質の尿ブランク値とし、一定時間ごとの採尿量に対する全尿ブランク値はつぎの式によりそのつど算出する。

$$\text{全尿ブランク値} (\mu\text{g}) = \frac{C}{B} \times E$$

B : ブランク尿のスポット量 (0.5 ml)

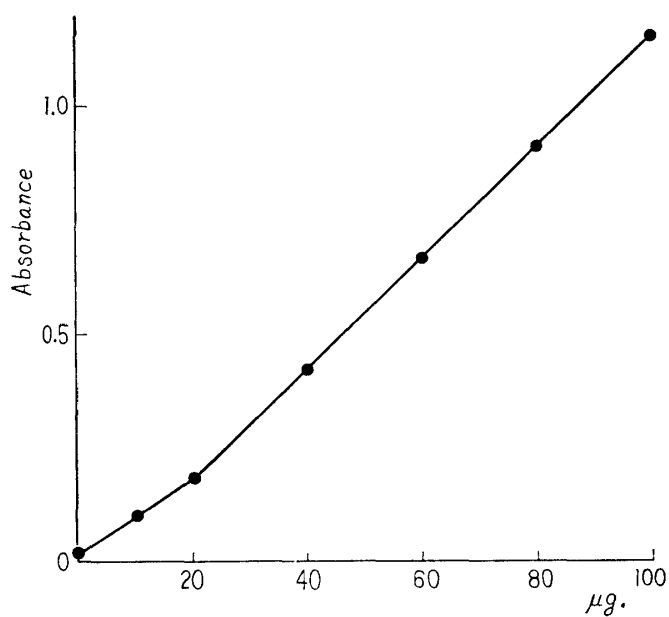


Fig. 6 Working Curve of 4-Aminoantipyrene by Paper Chromatography

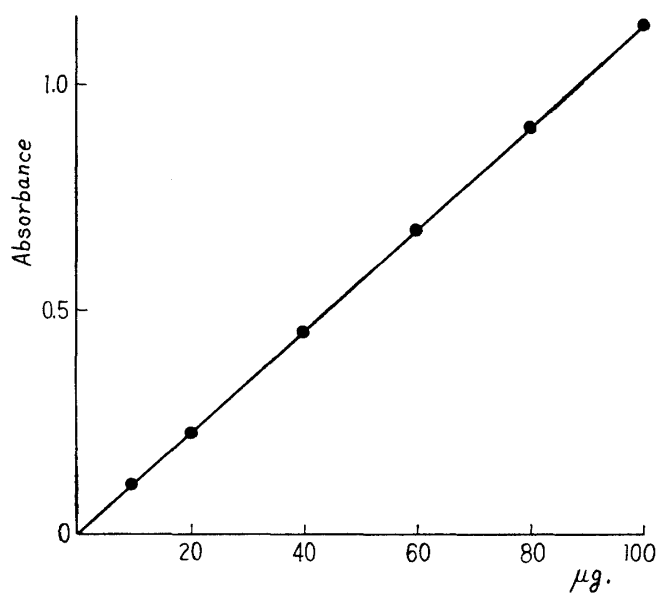


Fig. 7 Working Curve of 4-Acetylaminoantipyrene by Paper Chromatography

C : ブランク尿 0.5 ml の測定値 (μg)

E : 一定時間ごとの各採尿量 (ml)

試料尿中の定量

一定時間ごとに採取した試料尿中の各薬物の定量値は次式に示すようにして求めた測定値から、そのものの全尿ブランク値を減じたものである。

$$\text{試料尿中の測定値 } (\mu\text{g}) = \frac{D}{T} \times E$$

T : 試料尿のスポット量 (0.5 ml)

D : 試料尿 0.5 ml の測定値 (μg)

E : 前述の E と同一のもの

また尿ブランク値はラットの個体差によって相異があり、それらの値を Table IV に示す。

以上のような結果が得られたので、S 14.04 mg を筋肉注射により投与したラット (Donryu 種, 300 g 位の成育雄) の尿を一定時間ごとに採取し、その 0.5 ml を用いて前述同様に操作し、経時的に測定した。それらの定量結果を Table V に示す。

水溶液中で不安定なスルピリンが本法の実験条件ではほとんど分解せず、分離、抽出時の損失を含めても約 90% が回収された (Table III)。

Table IV Individual Deviations of the Urinary Blank on the Paper Chromatography

| Substance | n* | Mean ($\mu\text{g/ml}$)** | Max. ($\mu\text{g/ml}$)** | Min. ($\mu\text{g/ml}$)** | Standard Deviation ($\mu\text{g/ml}$)** |
|-----------------------------|----|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| Sulpyrin | 10 | 75 | 102 | 51 | 17.9 |
| 4-Monomethylaminoantipyrine | 10 | 0 | 4 | 0 | 1.2 |
| 4-Aminoantipyrine | 10 | 14 | 20 | 3 | 5.0 |
| 4-Acetylaminoantipyrine | 10 | 1 | 5 | 0 | 1.5 |

* number of rats.

** These values are calculated from the absorbance as described in text.

本研究の方法によって、スルピリンを投与したラット尿中に排泄された非代謝 Sulpyrin ならびに代謝物 4-Monomethylaminoantipyrine, 4-Aminoantipyrine, 4-Acetylaminoantipyrine をおのおの十分な精度で分離することができ、ラット尿中の微量試料においても良好な定量結果を得られた。

しかし、Wagner⁴⁾によるスルピリンの加水分解の報告から、ラット尿中においてもその代謝物として Bis 体が存在するものと考えられるが、本定量法においては、Bis 体は炉紙クロマトグラフィー中に MAA に変化してしまうため、Bis 体を MAA と区別することができない。したがってラット尿中から MAA として得られた定量値は MAA および Bis 体の合計値と考えらるべきであろうと思われる。また鮫島ら⁸⁾によるスルピリンの加水分解の考察から、ラット尿中より定量された MAA がスルピリンの分解によって生じた真の代謝物であるか、あるいは定量操作中に生じたものであるかの疑問が残っている。この点についてはさらに研究する必要があると思われる。

Table V The Amounts of Sulpyrin and Metabolites Excreted in the Rat Urine (Dose=14.04 mg)

| Time hr. | Sulpyrin | | 4-Monomethylamino- antipyrine | | 4-Aminoantipyrine | | 4-Acetylamino- antipyrine | |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Excreted Amounts ($\mu\text{g.}$) | Cumulative Amounts ($\mu\text{g.}$) | Excreted Amounts ($\mu\text{g.}$) | Cumulative Amounts ($\mu\text{g.}$) | Excreted Amounts ($\mu\text{g.}$) | Cumulative Amounts ($\mu\text{g.}$) | Excreted Amounts ($\mu\text{g.}$) | Cumulative Amounts ($\mu\text{g.}$) |
| 0.25 | 2,441 | 2,441 | 186 | 186 | 2 | 2 | 10 | 10 |
| 0.5 | 2,349 | 4,790 | 222 | 408 | 10 | 12 | 17 | 27 |
| 0.75 | 771 | 5,561 | 84 | 492 | 30 | 42 | 26 | 53 |
| 1. | 446 | 6,007 | 74 | 566 | 19 | 61 | 56 | 109 |
| 1.25 | 196 | 6,203 | 31 | 597 | 24 | 85 | 62 | 171 |
| 1.5 | 162 | 6,365 | 8 | 605 | 22 | 107 | 88 | 259 |
| 2. | 262 | 6,627 | 44 | 649 | 54 | 161 | 293 | 552 |
| 2.5 | 187 | 6,814 | 11 | 660 | 119 | 280 | 266 | 818 |
| 3. | 81 | 6,895 | 0 | | 71 | 351 | 312 | 1,130 |
| 3.5 | | | | | 16 | 367 | 215 | 1,345 |
| 4. | | | | | 13 | 380 | 222 | 1,567 |
| 5. | | | | | 32 | 412 | 441 | 2,008 |
| 6. | | | | | 32 | 444 | 363 | 2,371 |
| 7. | | | | | 14 | 458 | 199 | 2,570 |
| 8. | | | | | 4 | 462 | 59 | 2,629 |

文 献

- * 本報告は、野上 寿，花野 学，栗津荘司，今岡キク子，薬誌，**90**, 378 (1970). に発表.
- 1) 第15報：H.Nogami, M.Hanano, S.Awazu, T.Iga, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **18**, 228 (1970).
 - 2) B.B.Brodie and J.Axelrod, *J.Pharmacol. Expl. Therap.*, **99**, 171 (1950).
 - 3) B.B.Brodie and J.Axelrod, *J.Pharmacol. Expl. Therap.*, **98**, 97 (1950).
 - 4) G.Wagner, *Archiv der Pharmazie*, **61**, 121 (1956).
 - 5) 丹羽弘司，橋本充子，東北薬科大学紀要，**7**, 81 (1960).
 - 6) F.Pechtold, *Arzneimittel-Forsch.*, **14**, 1056 (1964).
 - 7) 守田 実，衛生試験所報告，**77**, 113 (1959).
 - 8) 鮫島政義，杉本 功，内海 勇，薬剤学，**26**, 23 (1966).