高速液体クロマトグラフィーによる生体中の *N*-Acetyl- L-cysteine の微量けい光測定法

安斎則夫,^{*,a} 木村哲夫,^a 千田 敏,^a 田中照夫,^a 高橋裕明,^b 目黒 熙^b
東亜栄養化学工業株式会社研究所,^a 東北大学農学部食糧化学科食品分析学教室^b

A Sensitive Fluorometric Determination of *N*-Acetyl-L-cysteine in Biological Fluids by High Performance Liquid Chromatography

NORIŌ ANZAI,^{*,a} TETSUO KIMURA,^a SATOSHI CHIDA,^a TERUO TANAKA,^a
HIROAKI TAKAHASHI,^b and HIROSHI MEGURO^b

*Research Laboratory, Toa Eiyo Kagaku Kogyo Co., Ltd., Yuno, Iizaka-machi,
Fukushima, 960-02, Japan^a and Laboratory of Analytical Chemistry,
Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku
University, Tsutsumidori-amamiyamachi, Sendai, 980, Japan^b*

(Received April 27, 1981)

A new sensitive fluorometric HPLC method for the determination of a mucolytic agent *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) and its metabolite L-cysteine (CySH) in biological fluids was developed. By the addition of a fluorescent agent, *N*-(9-acridinyl)maleimide (NAM), to NAC and CySH, stable fluorescence of NAM derivatives were developed at room temperature in a buffer solution, and the derivatives were separated and determined by HPLC. To standard or test solutions containing NAC and CySH were added 0.5 M Na₂CO₃-H₃BO₃-KCl buffer solution (pH 8.8), 5 N NaOH and acetone solution of NAM (0.5—2 × 10⁻⁶ mol/ml), and the mixture was allowed to stand for 2 h at room temperature. An aliquot of this solution (5—20 μl) was injected into the HPLC equipped with fluorometric detector. The separation of the derivatives were carried out on an aminoalkyl chemically bonded silica by using acetonitrile/0.05 M CH₃COONa as mobile phase system for the analysis of NAC and on an octadecyl chemically bonded silica by using acetonitrile/0.05 M CH₃COONH₄ for the analysis of CySH. The fluorescence intensities of the derivatives were determined at 360 nm (excitation) and 435 nm (emission). This method is simple, specific and sensitive compared with the gas chromatographic procedure for the determination of NAC and CySH in the plasma and tissues of rats after single oral administration of NAC.

Keywords—high performance liquid chromatography; fluorometry; *N*-acetyl-L-cysteine; mucolytic agent; L-cysteine; *N*-(9-acridinyl)maleimide; distribution

N-Acetyl-L-cysteine (NAC) は従来から気道内へ直接吸入する去痰剤として臨床的に広く用いられてきた。近年経口投与によっても薬効が期待できることが報告され、¹⁾ ヒトまたは動物に経口投与したときの生体内動態に関する知見がいくつか得られている。²⁾ それらの報告によると NAC の ³⁵S 標識化合物を経口投与した場合、ほぼ完全に吸収され体内で代謝を受けて L-cysteine (CySH) や L-cystine になったり、組織または血中のたん白質とジスルフィド結合することが報告されている。

生体内の NAC を機器分析によって定量した報告例としては、Hannestad ら³⁾ がヒト尿中に排泄された NAC をベンジルエステルとしガスクロマトグラフ (GC) により定量したものがあるが、生体成分中の微量の NAC の分析法としては検出感度が低く、また試料の濃縮を行っているために操作が非常に繁雑であった。そこで今回著者らは、Takahashi ら⁴⁾ が報告した高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いるプレカラム法によるチオール化合物の微量けい光定量法が、水溶液のままで試料溶液の調製ができ p mol レベルの SH 基の定量が可能であることに注目し、これを改良して NAC 経口投与後の生体内動態の解析に用いることを検討した。その結果血漿および組織ホモジネート中の NAC および CySH を、SH 基に特異的かつ定量的に結合するけい光試薬 *N*-(9-acridinyl)maleimide (NAM)⁵⁾ でラベルした後に HPLC で分離定量することにより、これらの SH 化合物を高感度か

つ簡便に定量することができた. なお高橋らが報告したポストカラム法によるチオール化合物の定量法は,⁶⁾ 本法に比べて定量感度が悪く, 生体中の NAC の定量にはプレカラム法が適していることがわかった.

実験の部

1. **試薬** NAM は Nara ら⁷⁾ の方法に従って当研究室で合成したものを用いた. NAM は SH 化合物の濃度に応じて $0.5\text{--}2 \times 10^{-6}$ mol/ml のアセトン溶液として使用した. なおアセトンは試薬特級品を酸およびアルカリで処理した後, 塩化カルシウムで 3 回乾燥し蒸留したもの⁸⁾ を用いた. NAC は Zambon Chimica S.p.A. のものを, diacetylcystine は Greenstein⁹⁾ の方法に従って当研究室で合成したものを, その他の試薬は試薬特級品 (和光純薬) を用いた.

2. **装置** HPLC は日本分光 TRI ROTAR を, 検出器は容量 11 μ l の角型マイクロフローセルを装着した日立 204 型けい光分光光度計 (励起波長: 360 nm, けい光波長: 435 nm) を用いた.

3. **HPLC の分離条件** NAC を定量するための分離条件 (I) として固定相に日本分光 SN-01 (アミノアルキル基化学結合型シリカ) を, 移動相にアセトニトリル-0.05 M 酢酸ナトリウム (55:45) を用いた. 一方 CySH を定量するための分離条件 (II) として固定相に日本分光 SC-02 (オクタデシル基化学結合型シリカ) を, 移動相にアセトニトリル-0.05 M 酢酸アンモニウム (18:82) を用いた. 流速はいずれも 1.5–2.0 ml/min とし, カラムは直径 $4.6 \times$ 長さ 250 mm のステンレス製のものを用いた.

4. **電気還元法** NAM は遊離の SH 基にのみ特異的に結合する⁵⁾ ので, ジスルフィド結合型の NAC および CySH を SH 型にするために電気還元を行った. すなわち Saetre ら¹⁰⁾ の報告に従って水銀プール電極を作成し, これに以下の方法で調製した試料溶液 0.3 ml を取り, 0.4N 塩酸 0.3 ml を加えて窒素ガスを通しつつ 7 mA の直流を 10 min 通電した. この条件下でジスルフィド結合はほぼ定量的に遊離 SH 基に還元された.

Fig. 1. Experimental Methods on Determination of *N*-Acetyl-L-cysteine and Its Metabolites in Plasma and Tissues

F-NAC: non protein free NAC, NP-NAC: non protein total NAC, T-NAC: total NAC, oxd-NAC: non protein oxidized form NAC which can be calculated by subtracting F-NAC from NP-NAC, P-NAC: protein disulfide bound NAC which can be calculated by subtracting NP-NAC from T-NAC. F-CySH, NP-CySH, T-CySH, oxd-CySH and P-CySH can be determined same as NAC.

5. 試料溶液の調製法 5.1 血漿——ラットに NAC を経口投与し、一定時間後にエーテル麻酔下に開腹して腹部大動脈からヘパリン処理した注射筒を用いて 3—5 ml の血液を採取した。その後 Fig. 1 に示した方法に従って試料溶液を調製した。すなわち採取直後の血液の一定量を遠沈管に取り、その 9 分の 1 量 (v/v) の 0.2 M エチレンジアミン四酢酸・二ナトリウム (Na_2EDTA) を含む 0.9% 塩化ナトリウム溶液を加えて軽くかき混ぜた後、4°C, 3000 rpm で 5 min 遠心分離して血漿を得た。また残った血液の一部でヘマトクリット値を測定した。血漿を除たん白するために、血漿 1 ml に 15% トリクロル酢酸 (TCA) 0.5 ml を加え、よくかき混ぜて 4°C に 30 min 以上放置した後に 4°C, 3000 rpm で 5 min 遠心分離し、この上清 0.1 ml を取って非たん白質性 SH 型 NAC (F-NAC) 濃度を測定するための試料溶液とした。また TCA で除たん白処理した上清から電気還元を妨害する TCA を除去するために、上清 0.6 ml にエーテル 1.2 ml を加えて抽出操作を繰り返し 3 回行った。この TCA を除去した残液 0.3 ml について電気還元を行い、その反応液 0.1 ml を取って非たん白質性総 NAC (NP-NAC) 濃度を測定するための試料溶液とした。この NP-NAC 濃度から F-NAC 濃度を差し引いた値を非たん白質性ジスルフィド結合型 NAC (oxd-NAC)¹¹⁾ 濃度とした。また別に血漿 0.3 ml を取って電気還元を行い、この反応液 0.3 ml に 15% TCA 0.15 ml を加えて除たん白操作を行った。この遠心分離した上清 0.1 ml を取って総 NAC (T-NAC) 濃度を測定するための試料溶液とした。この T-NAC 濃度から NP-NAC 濃度を差し引いた値をたん白質性ジスルフィド結合型 NAC (P-NAC) 濃度とした。

このようにして得た測定値のいずれについても Na_2EDTA 溶液を添加した分を補正するために、測定値に $1 + 100 / \{9 \times (100 - \text{Ht})\}$ (Ht: ヘマトクリット値) を乗じた値を真の血漿中の値とした。

また調製した試料溶液を用いて NAC と同様に非たん白質性 SH 型 CySH (F-CySH)、非たん白質性総 CySH (NP-CySH) および総 CySH (T-CySH) 濃度を測定し、それらの測定値から非たん白質性ジスルフィド結合型 CySH (oxd-CySH) およびたん白質性ジスルフィド結合型 CySH (P-CySH) 濃度を計算した。

5.2 臓器——NAC を経口投与したラットから一定時間後に各種臓器を摘出し、それぞれの湿重量を測った後、氷冷した 0.02 M Na_2EDTA を含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.4) を 10 倍量 (w/v) 加えてポリトロン® (スイス、キマネチカ社製) によってホモジナイズし、それを 4°C, 3000 rpm で 5 min 遠心分離して上清を得た。それを Fig. 1 に示した方法に従って非たん白質性 SH 型成分、非たん白質性ジスルフィド結合型成分およびたん白質性ジスルフィド結合型成分に分別し、それぞれの NAC および CySH 濃度を測定した。

6. HPLC による定量法 0.02 M Na_2EDTA を含む 5% TCA 溶液に溶解した NAC および CySH の標準溶液または試料溶液 0.1 ml に 0.5 M 炭酸ナトリウム-ホウ酸-塩化カリウム緩衝液 (pH 8.8) 0.295 ml, 5 N 水酸化ナトリウム 0.005 ml および NAM のアセトン溶液 0.1 ml を順次加え、暗所に 2 h 以上放置した後その 5—20 μl を正確に取り、HPLC に注入して絶対検量線法によって試料溶液中の NAC および CySH 濃度を測定した。

実 験 結 果

1. NAC 溶液の安定性の検討

SH 化合物は容易に酸化されてジスルフィド化合物になることが知られている。¹²⁾ そこで標準溶液および試料溶液の安定な条件を見出すために、NAC を終濃度 1×10^{-5} g/ml になるように蒸留水、0.02 M Na_2EDTA および 5% TCA に溶解し、それぞれを 4°C と室温に保存して F-NAC の残存率を本法を用いて経時的に測定した。その結果 Na_2EDTA または TCA 溶液に溶解し、4°C に保存した場合に安定性が高いことが明らかとなった (Fig. 2)。

一方、ラット血漿、0.2 M Na_2EDTA を 10 分の 1 量 (v/v) 添加した血漿、0.4 N 塩酸を同量添加した血漿、および 15% TCA を血漿に 2 分の 1 量 (v/v) 添加して除たん白した後の上清のそれぞれに終濃度 1×10^{-5} g/ml になるように NAC を溶解したものについて 4°C と室温に保存し、同様の実験を行った。その結果 NAC は血漿中では極めて不安定であったが、 Na_2EDTA または塩酸を添加した血漿では安定性が増し、TCA で除たん白した上清中では 4°C で 10 日間は安定であることが認められた (Fig. 3)。

2. HPLC による分離条件の検討

NAC, CySH および glutathione の標品を用い、それらと NAM との反応生成物の HPLC による分離条件を検討したところ、Fig. 4 に示したように条件 (I) では NAC-NAM を良く分離できたものの、CySH-NAM は固定相にほとんど保持されず、再現性が劣っていた。一方、条件 (II) では逆の現象が認められた。このように NAC と CySH を同時にかつ短時間に定量することは困難であり、それぞれを (I) と (II) の条件で測定することにし

Fig. 2. Time Course for the Stability of 1×10^{-5} g/ml NAC in Various Solutions and Temperatures

- , distilled water stored at room temperature,
- △—, 0.02 M Na_2EDTA stored at room temperature,
- ▲—, 0.02 M Na_2EDTA stored at 4°C,
- , 5% TCA stored at room temperature,
- , 5% TCA stored at 4°C.

Fig. 3. Time course for the Stability of 1×10^{-5} g/ml NAC in Rat Plasma before and after Addition of Na_2EDTA , HCl and TCA

- , plasma before addition,
- △—, plasma containing 0.02 M Na_2EDTA ,
- , plasma added with equal volume of 0.4 N HCl,
- , supernatant after addition of 5% TCA to plasma stored at room temperature,
- , supernatant after addition of 5% TCA to plasma stored at 4°C.

Fig. 4. Separation of Fluorescent Derivatives of *N*-Acetyl-L-cysteine, L-Cysteine and Glutathione

Peaks: 1=L-cysteine, 2=*N*-acetyl-L-cysteine, 3=glutathione. Condition: (I) column; JASCO SN-01, Mobile phase; acetonitrile-0.05 M CH_3COONa (55:45), Flow rate; 2.0 ml/min, Chart speed; 5 mm/min. (II) column; JASCO SC-02, Mobile phase; acetonitrile-0.05 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (18:82), Flow rate; 2.0 ml/min, Chart speed; 5 mm/min.

Fig. 5. Typical Chromatograms of Plasma Samples

(a) reference sample of 5 ng of NAC, (b) blank rat plasma, (c) 5 ng of NAC spiked to rat plasma, (d) reference sample of 5 ng of CySH, (e) 10 ng of CySH spiked to rat plasma. Peaks: N=*N*-acetyl-L-cysteine, C=L-cysteine. Conditions are the same as described in Fig. 4.

た。また肺臓および肝臓に多量に含まれていて測定妨害となる glutathione-NAM の目的ピークからの分離も条件 (I) と (II) において良好であった。

これらの条件によって血漿、肺臓、肝臓および腎臓中の NAC および CySH を選択性良く分離することができた (Fig. 5, 6)。

3. NAC および CySH と NAM の反応

NAC および CySH と NAM を反応させたときのけい光強度の経時変化を、HPLC で測定したときのピーク高を指標として測定したところ、CySH-NAM は単一のピークとして検出されたが、NAC-NAM は反応直後から 2 つのピークが検出され、保持時間の短いピーク (1) が徐々に小さくなるとともに保持時間の長いピーク (2) が大きくなる現象が認められた (Fig. 7)。これを Takahashi ら⁴⁾ が提唱した反応機構に当てはめてみると (Chart

Fig. 6. Typical Chromatograms of Liver and Kidney Samples after Single Oral Administration of NAC (100 mg/kg) in Rats

(a) F-NAC in lung (sensitivity of spectrofluorometer; $\times 90$), (b) F-CySH in lung (sens.; $\times 80$), (c) F-CySH in liver (sens.; $\times 80$), (d) F-CySH in kidney (sens.; $\times 30$)
Peaks: N = N-acetyl-L-cysteine, C = L-cysteine.
Conditions are the same as described in Fig. 4.

Fig. 7. Time Course for the Fluorescence Development to the Reaction Mixture of NAC and CySH with *N*-(9-Acridinyl)maleimide (NAM)

Fluorescence intensity at 3 h reaction is taken as 100 %.

NAC-NAM (1) represents the shorter retention time peak. NAC-NAM (2) represents the longer retention time peak.

...○... NAC-NAM (1), —○— NAC-NAM (2), —●— CySH-NAM.

1), NAC-NAM のピーク (1) はおそらく反応生成物 (I) に相当し、それが時間とともに加水分解されて反応生成物 (II) となり、それに伴ってピークが (2) に移ると推測される。この succinimide 基の開環は、Machida ら¹³⁾ が報告しているように時間とともに極大けい光波長が長波長側へわずかに移動することからも裏付けられた。一方、CySH-NAM のけい光スペクトルは、Nara ら⁷⁾ の報告している閉環反応物のものと一致することから、反応は (I) で止まり、したがってピークが 1 本しか現われないと考えられる。NAC-NAM のピーク (2) と CySH-NAM のピーク高は、反応後 2—24 h の間は室温ではほぼ一定であったことから、HPLC による測定はこの時間内に行うことにした。

4. 添加回収試験

ラットに NAC を経口投与 (100 mg/kg) し、投与後 1 h に採取した血液および主な臓器を用いて添加回収試験を行った。全血またはホモジナイズ直前の臓器浮遊液に NAC, CySH, diacetylcystine または cystine の一定量を添加した後、直ちに実験の部に述べた操作法に従って F-NAC, F-CySH, oxd-NAC または oxd-CySH 濃度をそれぞれ測定した。これらから無添加の場合の測定値を差し引いた値を添加量で除することによって回収率を計算した (Table I)。

なお P-NAC の回収率を測定することは技術的に困難であったので、P-NAC 濃度は T-NAC 濃度の測定値から回収率で補正した F-NAC および oxd-NAC 濃度を差し引くことによって求めた。P-CySH 濃度も同様に求めた。

Chart 1. Reaction Mechanism of Thiol with *N*-(9-Acridinyl) maleimide (NAM)

TABLE I. Recovery Studies of NAC, CySH, Diacetylcystine and Cystine added to Plasma, and Homogenates of Lung, Liver and Kidney of Rats at 1 h after Oral Administration of NAC (100 mg/kg)

Sample	n	Initial	Addition	Found after addition	Recovery (%)
Plasma:					
F-NAC	6	10.3±0.5	10.0	18.8±0.5	84.9±0.9
F-CySH	6	13.4±0.9	10.0	20.6±1.0	72.6±3.4
oxd-NAC	6	3.94±0.17	10.0	13.8±0.6	98.4±1.8
oxd-CySH	6	12.2±0.9	10.0	21.9±0.8	97.4±1.1
Lung:					
F-NAC	5	6.26±0.61	10.0	14.3±0.8	80.6±1.5
F-CySH	5	48.7±1.9	20.0	64.6±2.2	79.3±3.5
oxd-NAC	5	2.40±0.21	10.0	11.7±0.4	92.9±3.5
oxd-CySH	5	32.3±1.8	20.0	50.1±1.6	88.8±3.6
Liver:					
F-NAC	6	ND	10.0	ND	0
F-CySH	6	40.1±1.7	20.0	56.2±2.1	80.6±5.1
oxd-NAC	6	ND	10.0	1.34±0.35	13.4±3.5
oxd-CySH	6	29.0±2.2	20.0	46.8±2.0	89.6±4.2
Kidney:					
F-NAC	6	ND	10.0	0.84±0.44	3.4±1.3
F-CySH	6	421±22	100	504±21	82.9±3.6
oxd-NAC	6	ND	10.0	3.32±0.56	33.2±5.6
oxd-CySH	6	35.9±3.4	20.0	54.6±3.4	93.5±1.5

Added NAC, CySH, diacetylcystine and cystine were recovered as F-NAC, F-CySH, oxd-NAC and oxd-CySH respectively. Each value is the mean ± S.E. (μg/ml or μg/g). ND means "no detectable."

TABLE II. Concentrations of NAC and Its Metabolites in Plasma, Lung, Liver and Kidney at 30 min after Single Oral Administration of NAC (100mg/kg)

Tissue	Sample No.	Tissue concentration (μg/ml or g)							
		T-NAC	F-NAC	oxd-NAC	P-NAC	T-CySH	F-CySH	oxd-CySH	P-CySH
Plasma	1	36.4	16.4	3.33	16.7	80.9	25.0	19.3	36.6
	2	28.8	13.8	2.63	12.4	37.3	13.0	10.8	13.5
	3	36.6	15.5	9.53	11.5	53.9	21.4	20.4	12.1
Lung	1	12.1	8.57	2.52	1.04	122	39.9	14.5	67.8
	2	17.1	9.24	2.96	4.88	117	43.4	32.6	40.7
	3	14.6	7.31	3.41	3.83	116	45.8	11.9	58.3
Liver	1	ND	ND	ND	ND	123	68.8	36.4	17.6
	2	ND	ND	ND	ND	114	42.9	29.8	41.1
	3	ND	ND	ND	ND	116	53.4	22.4	39.8
Kidney	1	ND	ND	ND	ND	614	467	48.2	99.5
	2	ND	ND	ND	ND	567	470	60.1	36.9
	3	ND	ND	ND	ND	568	464	43.6	59.8

ND means "no detectable."

5. 検量線および再現法

実験の部に述べた方法に従い、0.16—15 ng の NAC および 0.08—7.5 ng の CySH の標準溶液について HPLC によりそのピーク高を求めたところ、原点を通る直線が得られた。また 1.25 ng の NAC の標準溶液について HPLC により繰り返しそのピーク高を求めたところ、それぞれ 10.05, 10.30, 10.00, 10.15, 10.20 および 10.50 cm となり、標準偏差 0.182, 変動係数 1.78% であった。同様に 0.63 ng の CySH の標準溶液について測定した

ピーク高はそれぞれ 11.20, 11.35, 11.20, 10.85, 11.40 および 11.25 cm となり, 標準偏差 0.193, 変動係数 1.73 % であった. このように再現性は非常に良好であり, ピーク高を指標とする絶対検量線法によって試料中の NAC および CySH 濃度を精度良く定量できると考えられた.

6. 生体中の NAC および CySH 濃度の定量

3 匹のラットに 100 mg/kg の NAC を経口投与し, 投与後 0.5 h に採取した血漿, 肺臓, 肝臓および腎臓中の NAC およびその代謝物濃度を測定し, 回収率で補正した値を Table II に示した.

考 察

Lorber ら^{2b)}によると血漿へ添加した NAC は非常に不安定で, 急速に酸化を受けて非たん白質性およびたん白質性ジスルフィド結合型化合物になると述べている. しかし血漿に Na_2EDTA を添加して SH 基の酸化を触媒するわずかの金属とキレートを形成させたり, TCA を加えて除たん白したり, また低温に保存することによって SH 基の酸化をある程度抑制できることが明らかになった (Fig. 3). これらの結果から, 血液および臓器試料は採取後直ちに冷却するとともに Na_2EDTA を添加し, 次いで TCA を加えて除たん白するまで速やかに処理することにした.

これらを配慮して添加回収試験を行った結果, 血漿と肺臓ではいずれの化合物も高い回収率が得られたが, 肝臓と腎臓では NAC や diacetylcystine の回収率は非常に低かった (Table I). このような現象は, Sheffner ら^{2a)}が肝臓ホモジネートと NAC および CySH をインキュベートした試験においても認めており, CySH の代謝速度に比べて NAC の脱アセチル化反応速度は非常に大きいと述べている. それゆえ本実験において NAC 経口投与後に肝臓や腎臓で NAC や diacetylcystine が検出されなかったのは, これらの臓器では脱アセチル化活性が高いためと思われる. したがって肝臓や腎臓にこれらの化合物が存在していたとしても本定量法では検出が困難であったと考えられ, この点については今後さらに検討が必要と思われる.

ここで述べた HPLC を用いたけい光測定法は, 除たん白した試料溶液に緩衝液と NAM を添加するだけで反応が進行し, 操作が簡便な上に HPLC も短時間で終了するために多数の検体を処理するには適当な方法である. NAM は SH 基と定量的に結合して強いけい光を発するがそれ自身にはほとんどけい光がない.⁵⁾ したがって HPLC で分析する場合, チャート上に未反応の試薬による盲けい光ピークはほとんど認められず, また血漿と腎臓には CySH 以外にほとんど他のピークが検出されない. 一方, 肺臓と肝臓に認められる CySH 以外のいくつかのピークは, 目的成分のピークから選択的に分離できるために精度の高い定量を行うことが可能である.

本法による検出限界は, 絶対量で NAC が約 200 pg, CySH が約 100 pg であり, これを血漿中濃度の検出限界に直すと NAC が約 50 ng/ml, CySH が約 25 ng/ml である. これは Hannestad ら³⁾の報告した GC 法に比べて感度が高く, この方法を NAC 経口投与後の生体内動態の検討に利用できることがわかった.

結 語

生体中の NAC およびその代謝物の HPLC による微量けい光測定法について検討した. NAC および CySH と NAM を反応させてけい光ラベルした後, アミノアルキル基またはオクタデシル基化学結合型シリカを固定相とし, アセトニトリル-酢酸ナトリウムまたはアセトニトリル-酢酸アンモニウムを移動相として NAC または CySH の分離定量を行うことができた. この方法は再現性および特異性が高く, ばらつきも小さいため血漿および臓器ホモジネートへの添加回収試験では肝臓および腎臓を除き満足すべき回収率を得ることができた. NAC を経口投与したラットの血漿および臓器中の NAC およびその代謝物濃度を測定したところ, 検出限界に比べて十分高い測定値が得られたことから, 本法は NAC の生体内動態を検討する手段として利用できることが明らかになった.

謝辞 本実験に当たり電気還元法について御教示をいただきました福島医科大学公害医学研究所, 長井 靖教授に感謝します.

引用文献および注

- 1) a) A. Porsio, M. Borgia, *Clinica Terapeutica*, **64**, 341 (1973); b) H. Burgi, *Chemotherapy*, **21**, 167

- (1975); c) M. Aylward, J. Maddock, P. Dewland, *Eur. J. Respiratory Diseases*, **111**, 81 (1980); d) Multicenter Study Group, *ibid.*, **111**, 93 (1980).
- 2) a) A.L. Sheffner, E.M. Medler, K.R. Bailey, D.G. Gallo, A.J. Mueller, H.P. Sarett, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 1523 (1966); b) A. Lorber, C.C. Chang, D. Masuoka, I. Meacham, *ibid.*, **19**, 1551 (1970); c) D. Rodenstein, A. De Coster, A. Gazzaniga, *Clinical Pharmacokinetics*, **3**, 247 (1978).
- 3) U. Hannestad, B. Sörbo, *Clinica Chimica Acta*, **95**, 189 (1979).
- 4) H. Takahashi, Y. Nara, H. Meguro, K. Tuzimura, *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **43**, 1439 (1979).
- 5) H. Takahashi, Y. Nara, K. Tuzimura, *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **42**, 769 (1978).
- 6) 高橋裕明, 吉田隆典, 目黒 熙, 分析化学, **30**, 339 (1981).
- 7) Y. Nara, K. Tuzimura, *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **42**, 793 (1978).
- 8) 吉田政幸, 大貫 隆, “新実験化学講座 1 巻, 基本操作 (1),” 日本化学会編, 丸善, 東京, 1975, pp. 453—454.
- 9) J.P. Greenstein, M. Winitz, “Chemistry of the Amino Acids,” Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, pp. 1917—1918.
- 10) R. Saetre, D.L. Robenstein, *Anal. Chem.*, **50**, 276 (1978).
- 11) この画分には diacetylcystine の他に, NAC と CySH, または NAC と glutathione との mixed disulfide も含まれると推測される。
- 12) P.C. Jocelyn, “Biochemistry of the SH Group,” Academic Press, New York, N.Y., 1972, pp. 94—110.
- 13) M. Machida, T. Takahashi, K. Itoh, T. Sekine, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 596 (1978).