UDC 615.778-07

243. 瀬崎 仁：ピラジナミドの定量法（第6報*）

ピラジナミド及びイソニアジド併用時の尿中排泄体の分離定量法

Hitoshi Sezaki: Determination of Pyrazinamide. VI.

Studies on the Separatory Determination of Pyrazinamide, Isoniazid, and
Some of their Metabolites in Urine.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto**)

A separatory determination of pyrazinamide and its biological decomposition products excreted in urine, after concurrent administration of pyrazinamide and INAH, had been devised and this was utilized in comparative examination of biological changes of pyrazinamide after its single administration and in conjunction with INAH. The sample urine was treated with anion exchange resin (Amberlite IRA-400) to separate pyrazinoic acid and urine components, the effluent solution was oxidized with bromine to change INAH and its metabolites to isonicotinic acid, and pyrazinamide was determined by the cyanogen bromide and sodium nitroprusside methods. It was thereby found that biological change of pyrazinamide was almost the same whether administered singly or with INAH and pyrazinoic acid was excreted in far larger amounts than pyrazinamide.

Separatory determination of acetylated INAH and isonicotinic acid in urine was effected by the use of cyanogen bromide method, anion exchange resin, and acid-treated alumina, and excretion of these metabolites into urine after single administration of INAH and in conjunction with pyrazinamide was examined. As a result, acetylation rate of INAH was found to differ not greatly by its administration alone or with pyrazinamide, but excretion of isonicotinic acid was found to increase fairly greatly by the concurrent use of pyrazinamide.

(Received April 16, 1958)

ピラジナミドは臨床上イソニアジド（以下 INAH と略記）と併用されることが多く、単独に投与するときよりも好結果を得るといわれているが、この理由については不明の点が多い。ピラジナミドを INAH と併用投与した場合、単独投与時の生体内変化と比較して如何なる差異があるかを知ることがこの併用療法の機作を考察する上にも重要なことであるが、併用時に於けるピラジナミド及び INAH の動態を検討するための適当な体液中濃度測定法がなく、従つて INAH 併用時に於けるピラジナミドの体内変化に関してはほとんど知られていない。また一方 INAH と併用した場合、INAH の体内変化にも何等かの影響があるのではないかとも思われる。

著者は先にピラジナミドの血中及び尿中濃度測定法を報告¹⁾し、その際ピラジナミドは体内で大部分が抗結核菌作用の低いピラジン酸に分解、排泄されることを明らかにしたが、今回は陰イオン交換樹脂、酸処理アルミナを用いるクロマト法等を利用し、INAH 併用時におけるピラジナミドと体内分解物との分離定量法を考察し、更に INAH アセチル化物並びにイソニコチン酸の定量法を得る事が出来たのでピラジナミド-INAH 併用時に於けるこれ等代謝物質の尿中排泄量を測定し、併用時のピラジナミド及び INAH の動態について検討した。その結果 INAH を併用してもピラジナミドの体内変化には単独投与時とほとんど差を認めなかつた。また INAH の体内変化についてはアセチル化率にはほとんど単独投与時と差異を認めなかつたが、INAH の酸化物であるイソニコチン酸 (INA) の排泄量は単独投与時に比して著しく増加することを認めた。

本実験に際し終始御指導御鞭達を戴いた京都大学掛見教授、宇野教授並びに有田助教授に謹謝し、また実験に御協力を戴いた坂田昌三学士、日笠弥寿男学士、並びに資料を提供された三共株式会社に厚く感謝する。

* 第5報：本誌 77, 921 (1957)。

** Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) 第2報：本誌 76, 906 (1956)。

実 験 の 部

試薬 臭素試液 (日局 V), 1M NaNO_2 液, 0.2% ニトロプルシドナトリウム液, 1N NaOH 液, 10% BrCN 液 (市販 BrCN 結晶 5g を秤量し, 蒸留水 50cc を加えよくふりまぜて溶かす. 冷暗所に貯える), 20% Na_2CO_3 液, 10% NaCl 液, AcOH (日局 VI), 1% NaCl 液, 1N H_2SO_4 , 0.1N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 液.

陰イオン交換樹脂及びアルミナ 樹脂及び樹脂筒は第2報¹⁾に準じて調製. 洗浄, 溶離の際の液の滴下は毎分 3cc 以下となるように調節. アルミナ: 市販クロマトグラフ吸着用活性アルミナ (200メッシュ), 酸処理アルミナ 200g に 1N HCl 1L を加え20分間よくかきまぜた後蒸留水で洗液がほとんど酸性を呈しなくなる迄くり返し洗う. 水洗後約 180~200° に加熱乾燥し活性化する. 注意して酸を除き過熱を避ければ容易に均質のものを得る事が出来る. アルミナカラム: アルミナカラムを作成するにはアルミナ又は酸処理アルミナの一定量を水に懸濁し, 先端に活栓を有し, 下部に綿栓を施したガラス管 (内径 7~10mm. 長さ 10~15cm, 上部の内径約 20mm) に注ぎ約 7~8cm の層となし, 上部に綿栓を施した後使用.

INAH 併用時におけるピラジナミド及びピラジン酸の尿中濃度測定法

I) ピラジナミドの定量 定量法: 被検尿 10cc を別項の如く調製したイオン交換樹脂筒に通し, 更に蒸留水 15cc を通じて樹脂筒を洗う, (洗液はすてる). 洗浄後蒸留水 20cc を樹脂筒を通し, ピラジナミド, INAH, 及びその代謝物質を共栓フラスコ中に流出. フラスコ中の液に臭素試液 0.2cc を加えてよくふりまぜ, 数分間放置した後 1M NaNO_2 液 0.2cc を用いて過剰の臭素を除く. (INAH 及びその体内分解物はイソニコチン酸 (INA) に変ずる. ピラジナミドは影響を受けない). 臭素処理液 15cc を弱く吸引しながらアルミナカラム (アルミナ 1g) に通す. 流出液をよくふりまぜた後その 5cc ずつを2本の試験管にとり, 一方の試験管には 0.2% ニトロプルシドナトリウム液及び 1N NaOH 液 1cc ずつを加え, 40° で5分間加温し, 更に15分間暗所に放置した後 $E_{494\text{nm}}$ (ニトロプルシドナトリウム発色によるピラジナミド及び INA の吸収) を測定. 他の試験管には 20% Na_2CO_3 液, 10% BrCN 液各 1cc ずつを加え, 30° で10分間加温した後 $E_{425\text{nm}}$ (BrCN 発色による INA の吸収; ピラジナミドはこの呈色を妨害しない) を測定. $E_{425\text{nm}}$ の値から液中の INA の濃度を求め, これに対応する $E'_{494\text{nm}}$ (ニトロプルシドナトリウム発色による INA の吸収) を求め, これを先に得た $E_{425\text{nm}}$ の値から差引き, ピラジナミドのみによる $E_{494\text{nm}}$ を算出し, 検量曲線に照合して対応するピラジナミドの尿中濃度を求める.

検量曲線の作製: ピラジナミドの検量曲線を作製するにはピラジナミド水溶液 (濃度~50 γ /cc) 10cc をとり陰イオン交換樹脂筒に通じ, 以下定量法に準じて操作し, 別に蒸留水 10cc を同様に処理して得た液を対照として $E_{494\text{nm}}$ (層長 10mm) を測定して求める. INA の場合は, その水溶液 (濃度~6 γ /cc) 20cc を共栓フラスコにとりピラジナミドの定量法中「フラスコ中の液に臭素試液 0.2cc を加え.....」以下を行い, 別に蒸留水 20cc について同様に処理して得た液を対照として, ニトロプルシド発色の場合は $E_{494\text{nm}}$, BrCN 発色の場合は $E_{425\text{nm}}$ (何れも層長 10mm) を測定し, 常法により検量曲線を作製. (Table I)

II) ピラジン酸の定量 定量法: I) で使用した樹脂筒に蒸留水約 200cc を通じ残っているピラジナミド及び INAH 代謝物質を完全に流出した後, 10% NaCl 液 10cc を通じる (この際の流出液はすてる). ついで 10% NaCl 液 50cc を用いて樹脂に吸着されていたピラジン酸を溶離する. 溶離液に AcOH 0.5cc を加え, よくふりまぜた後, その 5cc を弱く吸引しながら酸処理アルミナカラム (酸処理アルミナ 2g) に通す. この際の流出液はすて, 更に蒸留水 10cc, ついで 1% NaCl 液 40cc を通じて洗浄し, INA を除く. 洗液はいずれもすてる. 次に 1N NaOH 液 10cc を用いて吸着されていたピラジン酸を溶離する. 溶離液 5cc に 0.2% ニトロプルシドナトリウム液 1cc を加えよくふりまぜた後, 40° で5分間加温し, 暗所に15分間放置した後 $E_{477\text{nm}}$ を測定し, 検量曲線に照合して対応するピラジン酸の尿中濃度を求める.

検量曲線の作製: ピラジン酸水溶液 (濃度~300 γ /cc) 10cc を陰イオン交換樹脂筒に通じ以下定量法に準じて操作し, 別に蒸留水 10cc を同様に処理した液を対照として $E_{477\text{nm}}$ (層長 10mm) を測定し, 常法により検量曲線を作製する (Table I).

III) 定量法の検討 (i) INAH 及びその代謝物質の分解: INAH 併用時にはピラジナミドフラクションに INAH; INAH-アセチル化物; グルコース, ケト酸との抱合体等の代謝物質の含まれる事が考えられる. これらはいずれもニトロプルシドナトリウム反応陽性であるからすべて酸化処理により INA に変じた後定量を行う. 臭素試液による INAH 代謝物質の分解が定量的に行われることはニトロプルシド法, BrCN 法, 濾紙クロマトグラフィー等を併用した INA の回収実験によつて確認した. なおピラジナミド定量的の場合, 臭素処理を行つた液について直ちにニトロプルシド発色を行うときは尿中に存在する妨害物質の影響を受ける事があるからあらかじめ臭素処理を行つた液をアルミナカラムに通ずる事により障害する発色物質を除去する必要がある.

(ii) BrCN 発色について: INA の BrCN による呈色は Na_2CO_3 アルカリ性で Fig. 1 に見る如く 425m μ に吸収の極大を有し, 30°, 10分の加温で最大となり以後比較的長時間安定である.

(iii) 10% NaCl 溶離液の pH 及び共存する INA について: ピラジン酸を含む 10% NaCl 溶離液を酸処理アルミナカラムに通ずる際, AcOH 0.5cc を加えるのはピラジン酸の溶出を防止する為で, これを添加しない場合はピラジン酸は酸処理アルミナに保持され難い. なお INA はニトロプルシド反応陽性であるが, 1% NaCl により完全に溶離されピラジン酸定量的の障害とはならない.

Table I. Relationship between Concentration and Absorbancy

	Concn. (γ /cc)	Abs.	Concn./Abs.
Pyrazinamide (in urine)	10.0	0.044	227
	20.0	0.085	235
	30.0	0.124	242
	40.0	0.168	238
			Av. 236
Isonicotinic acid (in urine) (BrCN) (sodium nitroprusside)	2.00	0.253	791
	4.00	0.486	823
	6.00	0.740	811
			Av. 808
	10.00	0.013	769
Pyrazinoic acid (in urine)	20.00	0.027	741
	30.00	0.044	682
			Av. 731
	100.00	0.277	361
	200.00	0.574	348
	300.00	0.825	364
			Av. 358

Fig. 1. Absorption Curve of INA (5 γ /cc) colored by BrCN in Na₂CO₃ Alkalinity.

INAH—アセチル化物及びイソニコチン酸 (INA) の尿中濃度測定法

I) アセチル化物の定量：定量法：被検尿 10cc を用い前記 (I) ピラジナミドの定量法に準じ操作する。但し樹脂筒からの INAH 代謝物質の流出には蒸留水 25cc を使用する。流出液に 1N H₂SO₄ 0.5cc 及び 0.1N K₂Cr₂O₇ 液 1cc を加えてよくふりまぜ、その 10cc を弱く吸引しながら酸処理アルミナカラム（酸処理アルミナ 2g）に通す（この操作でアセチル化物以外の INAH 代謝物質は INA に変じ、酸処理アルミナに吸着され、同時に CrO₇²⁻ も吸着されて液は無色となる）。流出液に臭素試液 0.2cc を加えてよくふりまぜた後 1M NaNO₂ 液 0.2cc を加えて過剰の臭素を除く。この液 5cc に 20% Na₂CO₃ 液及び 10% BrCN 液各 1cc ずつを加え、30° で10分間加温した後 E_{425mμ} を測定し、検量曲線に照合して対応する INAH-アセチル化物の尿中濃度を求める。

検量曲線の作製：INAH-アセチル化物水溶液（濃度～50 γ /cc）10cc を陰イオン交換樹脂筒に通じ以下定量法に準じて操作し、別に蒸留水 10cc を同様に処理して得た液を対照として、E_{425mμ}（層長 10mm）を測定し、常法により検量曲線を作製する。（Table II）

II) INA の定量 定量法：I) で使用した樹脂筒にピラジノ酸の定量法に記載したように蒸留水約 200cc を通じついで 10% NaCl 液 10cc を通じて洗液をすてる。更に 10% NaCl 液 50cc を用いてイソニコチン酸を溶離する。溶離液 5cc に 20% Na₂CO₃ 液、10% BrCN 液各 1cc ずつを加え、以下 I) と同様に処理して E_{425mμ} を測定し、検量曲線に照合して対応する INA の尿中濃度を求める。

検量曲線の作製：INA 水溶液（濃度～30 γ /cc）10cc を陰イオン交換樹脂筒に通じ定量法に準じて操作し、別に蒸留水 10cc を同様に処理して得た液を対照として E_{425mμ}（層長 10mm）を測定し、常法により検量曲線を作製する。（Table II）

III) 定量法の検討 (i) アセチル化物を除く INAH 代謝物質中 IRA-400 (Cl 型) に吸着されないで溶出して来る物質は酸性-K₂Cr₂O₇ 処理により定量的に INA に変じ酸処理アルミナに吸着除去される。この分

Table II. Relationship between Concentration and Absorbancy

	Concn. (γ /cc)	Abs.	Concn. γ /Abs.
Acetyl-INAH (in urine)	10.0	0.109	91.7
	30.0	0.331	90.6
	50.0	0.540	92.6
			Av. 91.6
Isonicotinic Acid (in urine)	10.0	0.261	38.3
	20.0	0.568	35.2
	30.0	0.795	37.7
			Av. 37.1

Fig. 2. 24-hr. Urinary Excretion of Pyrazinamide and Pyrazinoic Acid after Oral Administration of Pyrazinamide and INAH.

解の検討は前記ピラジナミドの定量法の検討 (i) に従って行いほとんど誤差なく測定し得る事を認めた。

(ii) 10% NaCl 溶離液中のニコチン酸について：ニコチン酸が尿中に遊離の形で存在するときは 10% NaCl 溶離液中に来る事が考えられるが、通例人尿中には遊離の INA は少なく本定量法の障害とはならない。著者は INAH 単独内服時及びピラジナミド併用時について、このフラクションを集めて処理し、濾紙クロマトグラフィーによりニコチン酸の追跡を行つたがこれを認める事は出来なかつた。又常尿及びピラジナミド単位内服尿について行つた実験でもニコチン酸のスポットは認められなかつた。(AcOH·BuOH·H₂O=1:4:5 系に於て INA, ニコチン酸の *R_f* はそれぞれ 6.5, 7.5 である)。濾紙上展開物質の検出には第 4 報²⁾の方法を用いたが、更に BrCN 法を併用した。即ち 20% Na₂CO₃ を濾紙に噴霧後直ちに BrCN 飽和筒中に懸垂すれば INA, ニコチン酸等は鮮黄色を呈し容易に確認する事が出来る。又 Na₂CO₃ を用いないで乾燥濾紙を 30~60 分間 BrCN 飽和筒中に懸垂した場合、INA は呈色しないが、これに 1% ベンチジン・エタノール (1:1) 溶液を噴霧すれば直ちに赤紫色を呈する。

(iii) ピラジナミド併用時のアセチル化物及び INA の定量法：ピラジナミド及びその代謝物質は BrCN 反応陰性であり、従つて併用時に於ても本定量法の障害とはならない。

併用時に於けるピラジナミド及びイソニアジドの動態

I) ピラジナミドの体内変化に及す INAH の影響：本定量法を用い INAH 併用時に於けるピラジナミドの動態を追跡した結果、Fig. 2 に示す如くピラジナミド及びピラジン酸の尿中排泄は単独投与時に比しほとんど変化なく、ピラジン酸は単独投与の場合と同様ピラジナミドに比して極めて多量排泄された。又、ピラジナミド-INAH 内服尿をあつめ、減圧濃縮処理し第 4 報²⁾の方法に従い濾紙クロマトグラフィーによる追跡を試みると共に、イオン交換樹脂を用いて分離したそれぞれのフラクションについても検討を行つたが、ピラジナミド及びピラジン酸以外の、ピラジナミド代謝物質を検出する事は出来なかつた。

II) INAH のアセチル化及び酸化に及すピラジナミドの影響：内服された INAH はその殆どが体内変化を受けしかも健康人に於てはその代謝物質の大部分が抗菌力の著しく低いアセチル化物であることは既に報告されている。著者の行つた実験例でもアセチル化物の排泄は Fig. 3 に示す如くかなりの量にのぼつた。ピラジナミドが INAH のアセチル化をある程度阻止するのではないかと報告³⁾もあるが、著者の実験では同一量の INAH に対しピラジナミドを変化して 0.5~2g に渉る量を併用した場合に於ても排泄されるアセチル化物の量に特に著しい変化は認められなかつた (Fig. 3)。

INA については従来適当な定量法がなかつた為 INAH 内服時の尿中排泄量を定量した報告はほとんどなく、従つてその動態については不明の点が多かつた。著者は前記の定量法を用いてその尿中排泄量を測定した結果予想と異なり、Fig. 4 に示す如く INAH 100mg 単独内服時の尿中排泄量は 24 時間平均 19mg であつたものがピラジナミド併用時には約 33mg となり、アセチル化物の場合とは異なり、10 例 5 組の各投与例共、何れも併用時には INA が 70% も多く排泄される事実を認めた。既にピラジナミド併用時には投与 INAH の 30% 以上が INA の形で排泄されている訳であり、ピラジナミドの INAH 代謝に及す影響として、又ピラジナミド分解に

Fig. 3. 24-hr. Urinary Excretion of Acetyl-INAH after Oral Administration of INAH only or INAH with Pyrazinamide.

Fig. 4. 24-hr. Urinary Excretion of Isonicotinic Acid after Oral Administration of INAH only or INAH with Pyrazinamide.

2) 第 3 報：本誌 77, 918 (1957)。

3) 五味：第 5 回日本化学療法学会総会報告 (1957 年 5 月)。

よる大量のピラジン酸の生成とも併せ考えると興味ある問題である。Zamboni 等は INAH 代謝産物の中 INAH の構造を保ち、かつヒドラジン基の抱合を受けている代謝産物例えばアセチル化物或はピルビン酸抱合体等の排泄量は個体差が大きいが、INA 等ヒドラジン基の酸化されたものは比較的個体差が少なくほぼ一定の比率で排泄される事を認めているが、著者の実験に関しても少なくとも INA の排泄量はアセチル化物のそれに比し個体差は余り認められなかつた。従つてピラジナミド併用時には遊離 INAH の排泄率、又はピルビン酸グルコース等との抱合体及び INA のグリシン抱合体等の代謝産物の減少が予想されるが、この点に関しては更に検討が必要である。

京都大学医学部薬学科

UDC 547.861.8:616-002.5-085

244. 瀬崎 仁：ピラジナミドの定量法（第7報）

ピラジナミド関連化合物の分析法並びに体内変化

Hitoshi Sezaki: Determination of Pyrazinamide. VII.

Studies on Analytical Methods and Biological Changes of
Pyrazinamide Related Compounds *in vivo*.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

Stability and rate of change of compounds related to pyrazinamide, 1-pyrazinoyl-2-isonicotinoylhydrazine (P-I) and *p*-pyrazinamidosalicylic acid (P-P), which show better growth inhibitory action against tubercle bacilli than pyrazinamide, were compared *in vitro* and *in vivo* to those of pyrazinamide. Urinary level of P-P was determined by utilization of adsorption of P-P on alumina and the use of sodium nitroprusside, and this is not interfered by other biological decomposition products. Measurement of urinary level of P-I was made after separating it from other biological decomposition products by the use of acid-treated alumina and determined as isonicotinic acid by the cyanogen bromide method. The result of these determinations indicated that P-P and P-I are both far more stable than pyrazinamide, are absorbed better, and are excreted in far larger amounts in urine. Experiments using simulated gastric juice, simulated intestinal juice, enzyme solution from intestinal mucous membrane, intestinal bacteria, and liver homogenate all indicated that they are more stable than pyrazinamide, although the compounds were found to undergo slight decomposition with liver homogenate. P-I alone is decomposed by *Escherichia coli communior* but was found to be much more stable than pyrazinamide by measuring the rate of decomposition of pyrazinamide under the same conditions.

(Received April 16, 1958)

著者は第1～6報において主としてピラジナミドの分析法並びに体内変化に関して報告し、このものが比較的容易に分解され、結核菌発育阻止力の低いピラジン酸となる事を認めた。

さきに掛見等はピラジナミドより更に有効な結核化学療法剤を得る目的でピラジン酸誘導体の合成を行い、1-pyrazinoyl-2-isonicotinoylhydrazine (P-I)、及び *p*-pyrazinamidosalicylic acid (P-P) がピラジナミドに優る結核菌発育阻止力を有することを報告している*。極めて低濃度で試験管内結核菌発育阻止力を有する化合物でも、生体内で無効な分解或いは抱合体を生成し易いものであれば化学療法剤として好ましいものではない。従つて著者はこれ等誘導体の *in vitro* 及び *in vivo* における変化をピラジナミドと比較する事により同系列薬物の体内における有効性、吸収、排泄等の問題を比較検討し、結核化学療法剤としての効果を見る目的で本実験を行った。

* 第77回日本薬学会年会報告 (1957)。