164. 掛見喜一郎, 有田隆一, 瀬崎 仁, 灘井種一: 医薬品の吸収と排泄に関する
研究 (第18報^{*1}) テトラサイクリンの吸収について^{*2}

Kiichiro Kakemi, Takaichi Arita, Hitoshi Sezaki, and Tanekazu Nadai :

The Absorption and Excretion of Drugs. XVIII.

On the Absorption of Tetracycline.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University^{*3})

A quantitative examination was made on tetracycline (I) epimerization in the digestive tract and its influence on absorption. I undergoes a reversible epimerization at 4-carbon to form 4-*epi*-tetracycline (II). The epimerization occurs in the pH range of ca. 3~6 and its rate is increased by the presence of certain anions, such as a citrate, phosphate, or acetate. Other adjuvants usually incorporated in preparations of I, such as glucosamine hydrochloride, have very little effect on the epimerization rate whereas calcium ion markedly decreases it. Oral administration of I with or without citric acid or of II indicated that no detectable amount of II is excreted in the urine from a rat or humans although the intestinal content from the rat clearly demonstrated the presence of II. Absorption experiments from the rat stomach and small intestine were carried out using pre-equilibrated solutions of pH 4, 5, and 6. The result indicates that little absorption of I and II occurs from the stomach and that I is more rapidly absorbed than II from the small intestine. For example, the degrees of 90-minute absorption of I and II at pH 5 are 13% and 0.2%, respectively. Considering all the evidences presented here, it is concluded that epimerization in the digestive tract is one of the reasons to be accounted for the relatively low recovery of I in the urine.

(Received April 1, 1963)

テトラサイクリンを人に経口投与した場合その尿中排泄量は比較的少なく、投与後 24 時間に約 40~50% が排泄されるに過ぎない。また一方テトラサイクリンはある条件では速やかに異性化し、抗菌力を有しない 4-*epi*-tetracycline となること¹⁾、いったん吸収された後はほとんど体内変化を受けないこと²⁾ などが知られている。したがって尿中排泄量が比較的少ない理由としてその化学構造に由来する本質的な吸収速度の問題、吸収後の再分泌、特定の臓器、骨などへの固定³⁾ のほかに、吸収の前段階、すなわち消化管内で起こり得る分解反応をも無視し得ないものと考えられる。著者等はこの点について種々検討を行ない、テトラサイクリンが消化管内で種々の経路にしたがって分解し、とくに腸管の pH 領域では異性化を受け、これがある種の陰イオンによって促進されること、およびここに生じた異性体、4-*epi*-tetracycline がテトラサイクリンに比して吸収され難く、テトラサイクリンの吸収が比較的低い理由の一つとなっていることを明らかにした。

テトラサイクリンの分解 著者等は、Kaplan 等⁴⁾ によるクロマトグラフ法に、先に報告した比色定量法⁵⁾ を組み合わせ、テトラサイクリンおよびその分解物を含む水溶液中のテトラサイクリンのみを分離定量することができたので、これを用いてテトラサイクリンの分解を検討することとし、まず 37°, pH 1~8 の水溶液中における安定性を 24 時間にわたって追跡した。Fig. 1 はその結果を示すもので、pH 1, 2 においては anhydro 化により液は橙黄色、pH 7, 8 においては isotetracycline 等の生成により液は赤紫色を呈し、かなりの分解が認

*1 第17報: 本誌, 83, 264 (1963).

*2 本論文の要旨は第14回日本薬学会大会 (1961), 第12回日本薬学会近畿支部総会で発表 (1962).

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

1) J.R.D. McCormick, *et al.*: J. Am. Chem. Soc., **79**, 2849 (1957).

2) R.G. Kelly, *et al.*: J. Pharmacol. Exptl. Therap., **130**, 144 (1960).

3) D.A. Buyske, *et al.*: *Ibid.*, **130**, 150 (1960).

4) M.A. Kaplan, *et al.*: Antibiotics & Chemotherapy, **7**, 569 (1957).

5) 掛見, 有田, 瀬崎, 灘井: 本誌, **82**, 297 (1962).

Fig. 1. Percentage Degradation of Tetracycline Hydrochloride against pH at 37°

Fig. 2. Effect of Anions on the Degradation of Tetracycline Hydrochloride at 37°

められたが、その中間、すなわち pH 3~6 においては外観上いちじるしい変化もなく、24 時間の分解率もまた 10% 程度に留まることを知った。

先に McCormick 等¹⁾は、テトラサイクリン類の可逆的異性化反応について定性的検討を行ない、この反応が主として弱酸性水溶液中で進行し、ある種の陰イオンによっていちじるしく促進されることを認めている。したがって著者等はさらに、消化管内に存在する可能性のある塩類、ならびにテトラサイクリン製剤に用いられている薬物の存在下における異性化を 37°, pH 3~6 の水溶液中で観察した。

用いた塩類は酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、D-グルコサミン塩酸塩、EDTA-2Na 塩、および塩化カルシウムで、前3者の場合は Fig. 2 に示すごとく、いずれも対照に比して異性化を促進する傾向にあり、特にクエン酸塩の場合その影響はいちじるしく、塩酸テトラサイクリン初濃度 1000 mcg./ml., クエン酸塩濃度を 0.1M とするとき 24 時間以内に平衡に達することを認めた。37°, pH 4 において、少なくとも 24 時間以内では異性化のみが主反応であり、テトラサイクリンおよび 4-*epi*-tetracycline が擬一次反応にしたがって可逆的に異性化するものと仮定して速度論的処理を行なえば Fig. 3 に示すごとく、テトラサイクリン残存率が 68% のところで

Fig. 3. Reversible Epimerization of Tetracycline in Citrate Buffer Solution (0.1M, pH 4) at 37°

平衡に達することがわかる。またこの値から求めた 0.1M クエン酸塩溶液中におけるテトラサイクリンの異性化の速度恒数は 0.085 hr^{-1} となり、仮にクエン酸を含むテトラサイクリン製剤を経口投与した後、消化管内で pH

Fig. 4. Effect of Adjuvants on the Degradation of Tetracycline Hydrochloride at 37°

消化管内における分解とくにその異性化の吸収におよぼす影響を検討するため、まずシロネズミに塩酸テトラサイクリンを単独投与した場合、およびこれにクエン酸を併用投与した場合についてそれぞれ24時間の尿および糞をあつめ、濾紙クロマトによる検索を試みた。その結果糞中および解剖後摘出した腸管内容物中にはテトラサイクリンおよび4-*epi*-tetracyclineを検出したが、尿中には後者を認めることができなかった。また健康成人男子に、塩酸テトラサイクリン；塩酸テトラサイクリンにクエン酸を加え、pH 3, 37°であらかじめ異性化させ、平衡に達せしめた4-*epi*-tetracycline含有液体試料；およびKaplan等⁴⁾の方法により製した4-*epi*-tetracycline試料(テトラサイクリン19%を含む)を経口投与した場合の尿について、4-*epi*-tetracyclineの検索を試みたが、いずれもこれを認めることはできなかった。また第3の試料については、24時間にわたって尿中排泄量をもとめたが、テトラサイクリン単独投与時のわずかに1/5に過ぎなかった。

消化管内で分解して生じた4-*epi*-tetracyclineが吸収され、体内でテトラサイクリンに変化して排泄される可能性はKaplan等⁴⁾の報告からみてもほとんど考えられず、投与した試料中の4-*epi*-tetracyclineはほとんど吸収されなかったものと思われる。そこで著者等は、この点をさらに確かめるため、シロネズミの胃および小腸を用いて吸収実験を行なった。すなわちFig. 5は胃からの吸収をテトラサイクリンと4-*epi*-tetracyclineの和としてあらわしたものであるがその吸収にはほとんど見るべきものがない。

Fig. 5 Absorption of Tetracycline from the Rat Stomach

Fig. 6. Absorption of Tetracycline and 4-*epi*-Tetracycline from the Rat Small Intestine

— tetracycline
----- 4-*epi*-tetracycline

これに対し、Fig. 6に示すごとく小腸からの吸収実験の場合pH 4ではテトラサイクリン、4-*epi*-tetracycline共わずかの吸収が認められ、小腸のpHである5, 6ではテトラサイクリンが9~12%も吸収されるのに対し、4-*epi*-tetracyclineはほとんど吸収されないことが明らかであり、先の*in vivo*の実験結果をよく裏書きしている。

実 験 の 部

テトラサイクリンの分解率の測定 消化管の pH 領域におけるテトラサイクリンの分解率の測定は、37° で塩酸テトラサイクリンを初濃度が 1000 mcg./ml. となるように蒸留水に溶かし、HCl または NaOH 液を加えて所定の pH に調整したものについて行ない、調製後 6 および 24 hr. 目のテトラサイクリン量を測定した。また各種添加剤、塩類共存下におけるテトラサイクリンの異性化率の測定は 37° で行ない、各種添加剤、塩類の 0.1M 水溶液を調製し (CaCl₂ の場合のみ 0.01M とする)、これに塩酸テトラサイクリンを溶かして 1000 mcg./ml. とし、HCl または NaOH 液を加えて所定の pH としたものについて行ない、調製後 6 および 24 hr. 目のテトラサイクリン量を測定した。なおクエン酸塩の場合は調製後 1, 3, 4, 6, 7, 8, 21, 24 hr. 目に試料を採取し分解率を求めた。

また試験した pH 範囲 (pH 3~6) でのテトラサイクリンの分解は、少なくとも 24 hr. 以内では異性化反応が支配的で、クロマトグラフ法などによる検索^{1,4,9)}の結果も、テトラサイクリンより出発した場合は 4-*epi*-tetracycline, また後者より出発した場合は前者以外の生成物を認めることは出来なかった。したがってこのようにして得られたテトラサイクリン量をその初濃度からさしひき、4-*epi*-tetracycline の量とした。

テトラサイクリンの定量法 i) 試液, 展開溶媒, 濾紙 呈色には *p*-nitrobenzediazonium chloride 試液,⁹⁾ 一次元下降法濾紙クロマトには東洋濾紙 No. 51 (幅 5 cm., 長さ 40 cm.) およびニトロメタン-ベンゼン-ピリジン (20:10:3) の混合溶媒を用いた。

ii) 定量法 検液 0.1 ml. を濾紙上の原線にスポットし、風乾後これに pH 3.5 の McIlvaine 緩衝液を噴霧し、直ちに一次元下降法により展開する。展開後濾紙を風乾し、短時間 NH₃ 蒸気にさらし、紫外線下にテトラサイクリンのスポットを検出し、この部分の濾紙を細切し共栓試験管に移す。蒸留水 8 ml. を加えて 5 min. はげしくふりまぜ、テトラサイクリンを抽出した後、先端に小濾紙 (東洋濾紙 No. 135) をかぶせたピペットを用いて抽出液を吸い上げる。この抽出液 5 ml. に *p*-nitrobenzediazonium chloride 試液 1 ml. を加えてよくふりまぜ、65° で 45 min. 加温した後 435 mμ における吸光度を測定する。別に同時に常用標準塩酸テトラサイクリンの 500, 750, 1000 mcg./ml. 溶液について同様に操作して検量曲線を作製し、先に求めた値から検液中のテトラサイクリンの濃度を計算する。なお対照としては、テトラサイクリンをスポットしない濾紙について同様に操作して得た値を用いる。

iii) 定量法に関する考察 検液をスポットし展開を始めるまでに要する時間はできるだけ短いことが望ましい。緩衝液を噴霧する際多量を用いると展開に著しく時間を要し、展開中に試料が分解を起こす場合がある。なお展開中は遮光することが望ましい。

テトラサイクリンおよび 4-*epi*-tetracycline の吸収 i) 内服実験 体重 200 g. の雄のシロネズミに塩酸テトラサイクリン 40 mg. を水に溶かした液を経口投与した後、24 hr. の尿および糞について、定量法に記載した濾紙クロマト法によるテトラサイクリンおよび 4-*epi*-tetracycline の検索を行なった。また塩酸テトラサイクリン水溶液 (2000 mcg./ml.) にクエン酸を加え、37°, pH 3 で一夜放置して異性化し、平衡に達せしめた試料溶液にシロ糖を加えたもの 125 ml., および Kaplan 等⁴⁾の方法に準じて調製した 4-*epi*-tetracycline 試料 (テトラサイクリン 19% を含む) 250 mg. を含む水溶液を、それぞれ健康成人男子に経口投与したとき排泄される尿について同様の検索を行なった。第3の場合は、内服後 1, 3, 6, 10, 15, 24 hr. 目の尿中に排泄されるテトラサイクリン量をも測定した。

ii) シロネズミの胃および小腸からの吸収 吸収実験法は胃および小腸の場合共、さきに報告した著者等の方法⁷⁾に準じて行ない、胃の場合は 60 min. 後のテトラサイクリンおよび 4-*epi*-tetracycline の吸収率を総テトラサイクリンとして、また小腸の場合は 90 min. 還流後のテトラサイクリンおよび 4-*epi*-tetracycline それぞれの吸収率を測定した。試料液には塩酸テトラサイクリンを pH 4, 5, 6 の等張リン酸塩・クエン酸塩緩衝液に溶かし 1000 mcg./ml. とし、38° で一夜放置して完全に平衡に達せしめ、使用前濾過したものを用いた。なお総テトラサイクリンの定量には試料液の 50 倍希釈液 5 ml. を用いて Chiccarelli 等のアンヒドロ法⁸⁾を、テトラサイクリンの定量には同じく 50 倍希釈液 1 ml. を用いて Kohn による螢光法⁹⁾を行ない、両者による測定値の差を 4-*epi*-tetracycline の量とした。

終りに本実験の一部を担当された横田幹子学士および森田敏子学士に感謝します。

京都大学薬学部

7) 掛見, 有田, 大橋: 本誌, 82, 348 (1962).

8) F. S. Chiccarelli, et al.: J. Am. Pharm. Assoc., 48, 263 (1959).

9) K. W. Kohn: Anal. Chem., 33, 826 (1961).