チオペンタール- ^{35}S : 合成, 同位体希釈分析およびラットにおける代謝¹⁾

功刀 彰, 長瀬雄三, 馬場茂雄, 相沢義雄

東京薬科大学²⁾Thiopental- ^{35}S : Synthesis, Isotope Dilution Analysis and Metabolism in Rat¹⁾

AKIRA KUNUGI, YUZO NAGASE, SHIGEO BABA and YOSHIO AIZAWA

Tokyo College of Pharmacy²⁾

(Received September 12, 1968).

Thiopental- ^{35}S having a specific radioactivity of 13.2 mCi/mmole was synthesized from $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ as the starting material through H_2^{35}S and thiourea- ^{35}S . Radiochemical and chemical yields from $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ were 80.3 and 85.7%, respectively. The isotope dilution analysis for the determination of commercial thiopental sodium preparations was investigated with the ^{35}S -labeled thiopental, and it gave the mean recovery of $99.60 \pm 0.68\%$. This method was advantageous over other known official methods such as ultraviolet absorptiometry and gravimetric analysis in the precision and selectivity of the method.

As the metabolites of thiopental in the liver of male rats, methionine, thiourea, inorganic sulfate, and several unidentified ^{35}S -containing compounds were recognized by radio-paperscannography or reverse isotope dilution method. Metabolic rates of thiopental- ^{35}S in rat liver were 0, 49.7, 59.2, and 60.2% at 15, 30, 90, and 120 minutes after its intraperitoneal injection, respectively.

It was proved that a considerable amount of radioactivities arising from the injected ^{35}S -labeled thiopental was distributed in rat brain within 15 minutes after its intraperitoneal administration, and that the rapid reduction in radioactivities was found to three-fifths of the original during the following 15 minutes.

チオペンタール (5-ethyl-5-(1-methylbutyl)-2-thiobarbituric acid) は超短時間作用の全身麻酔剤として現在広く用いられている。チオペンタールの定量法には比色法,³⁾ 紫外吸光度法,⁴⁾ 電量分析法,⁵⁾ 重量法,⁶⁾ 非水滴定法,⁷⁾ ペーパークロマトグラフ法,⁸⁾ ガスクロマトグラフ法⁹⁾ などが従来報告されている。これらの定量法は組織中の微量チオペンタールの定量には適していない。そこで著者等は, ^{35}S 標識チオペンタールを合成し, これを用いて同位体希釈法によるチオペンタールの定量法を検討し, あわせて他の定量法と比較した。その結果, チオペンタール- ^{35}S を用いる同位体希釈法が生体組織中のチオペンタールの定量に適していることが明らかになったので ^{35}S を指標として, その体内分布および肝における代謝について検討した。

実 験 の 部

装置および試薬 液体シンチレーション計数装置: Packard TRI-CARB 314 型, ガスフロー計数装置: 神

- 1) 日本薬学会第 83 年年会で発表, 徳島, 1965 年 10 月。
- 2) Location: Kashiwagi, Shinjuku-ku, Tokyo.
- 3) J. Raventós, *Brit. J. Pharmacol.*, **1**, 210 (1946); V.I. Lobanov, *Med. Prom. SSSR*, **19**, 43 (1965).
- 4) "U.S.P. XVII", 1965, p. 654. B.B. Brodie, L.C. Mark, E.M. Papper, P.A. Lief, E. Bernstein, E.A. Rovenstein, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **98**, 85 (1950); L.R. Goldbaum, *Anal. Chem.*, **24**, 1604 (1952); L.A. Williams, A.T. Hardy, J.S. Cohen, B. Zak, *J. Med. Pharm. Chem.*, **11**, 609 (1960).
- 5) 日本原子力研究所製; 化学的性状, $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{HCl}$ 溶液; 放射能濃度, 41 mCi/ml; 比放射能, Carrier Free.
- 6) K. Kalinowski, A. Piotrowska, *Acta Polon. Pharm.*, **16**, 107 (1959).
- 7) "J.P. VII", 1961, p. 411.
- 8) J. Vacek, J. T. Walker, *Českosl. Farm.*, **5**, 80 (1956).
- 9) E. J. Algeri, J. T. Walker, *Am. J. Clin. Path.*, **22**, 37 (1952); **23**, 654 (1953); J. Raventós, *J. Pharm. and Pharmacol.*, **6**, 217 (1954); A. O. Cortes, *Anales Fac. Quím. Farm., Univ. Chile*, **16**, 170 (1964).
- 10) K. D. Parker, C. R. Fontan, P. L. Kirk, *Anal. Chem.*, **35**, 418 (1963); E. S. Furano, N. M. Greene, *Anesthesiology*, **24**, 796 (1963); L. I. Braddock, N. Marec, *J. Gas Chromatog.*, **3**, 274 (1965).

戸工業製 SA-1000 型, ラジオペーパークロマトスキャンナー: 日本無線医理学研究所製 PCS-4 型, 積分計: 島津製作所製 “複式プランニメーター,” 分光光度計: 島津製作所製 QV-50 型, シンチレーター: PPO 4 g, ジメチル POPOP 100 mg をトルエン 1 liter に溶かして調製。

分析用試料 市販の注射用チオペンタールナトリウム (粉末) を硫酸デシケーター中で室温減圧下 48 hr 乾燥して用いた。

チオペンタール-³⁵S の合成 Chart 1 に示した方法により $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ 15 mCi に 0.1N H_2SO_4 1 ml を加え, BaCl_2 により $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ を沈殿せしめ, 十分に乾燥後, 白金のつぼ中に移し, 炭末 40 mg, Na_2CO_3 20 mg, K_2CO_3 20 mg を加えて 800°, 30 min 加熱還元して Ba^{35}S を得た, これを単離することなく多岐管を用いて減圧下に 10N H_3PO_4 を滴下し分解して H_2^{35}S を発生させ, 反応フラスコ中のシアナミド (30 mg/ml) 溶液 1 ml に 40°, 24 hr 吸収させ チオ尿素-³⁵S とする。これをナトリウムエチレート (Na 34 mg/ml EtOH) 5 ml, diethylethyl-(1-methylbutyl)malonate 500 mg と浴油中 100°, 10 hr 還流して縮合させチオペンタール-³⁵S を得た。溶媒留去後, 水に溶かし, 希 HCl を加えてチオペンタールを遊離させ, 遠心分離して沈殿をとる。さらに希 NaOH 溶液に溶かし, 希 HCl を加えて CHCl_3 でチオペンタール-³⁵S を抽出し, シリカゲルカラムに吸着させ CHCl_3 で溶離し, 放射化学的不純物や分解産物を除去して精製した。比放射能 13.22 mCi/mmmole。 $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ からの放射化学的収率 80.3%, 化学的収率 85.7%。

Chart 1. Synthetic Route of Thiopental-³⁵S

チオペンタールの定量 1) 同位体希釈法——チオペンタール約 100 mg に対応する試料を精秤し, 水に溶かし, 10^5 cpm レベルのチオペンタール-³⁵S 2 mg を精秤して加え, 希 HCl 10 ml を加えて CHCl_3 25 ml ずつで 6 回抽出する。抽出物をエタノールから 3 回再結晶して精製し, その放射能を液体シンチレーション計数装置で統計誤差が 1% 以下になるように計数し次式により算出した。

$$x = a (S_0/S - 1)$$

x : 試料中のチオペンタールの量, a : 試料に加えたチオペンタール-³⁵S の量, S_0 : チオペンタール-³⁵S の比放射能 (cpm/mg), 抽出操作後に精製して得たチオペンタール-³⁵S の比放射能 (cpm/mg)。

2) 紫外外部吸光度法——U.S.P. XVII. の定量法に準じて, チオペンタール約 100 mg に対応する試料を精秤し, 0.1 N NaOH 溶液を加えて 200 ml とする。その溶液をさらに 0.1 N NaOH 溶液を用いて 100 倍に希釈し, 304 mμ で吸光度を測定し, 次式より定量した。

$$x = 20 c (1.091 A_u/A_s)$$

x : 試料中のチオペンタールナトリウムの mg, c : 標準チオペンタール溶液の濃度 (5 mcg/ml), 1.091: チオペンタールナトリウムとチオペンタールの分子量の比, A_u : 試料溶液の吸光度, A_s : 標準チオペンタール溶液の吸光度。

3) 重量法——J.P. VII の定量法に準じて, チオペンタール約 500 mg に対応する試料を精秤し, 水 15 ml に溶かし, 希 HCl 10 ml を加えて CHCl_3 25 ml ずつ 6 回抽出し, CHCl_3 を留去後 80°, 2 hr 乾燥してその重量をはかりチオペンタールの量を算出した。

重量法における溶媒抽出回数の検討 J.P. VII の定量法に準じて, チオペンタール約 500 mg に対応する試料を精秤し, 水 15 ml に溶かし, 希 HCl 10 ml を加えて CHCl_3 25 ml ずつで 7 回抽出した。第 1 回目の抽出液には 10^5 cpm レベルのチオペンタール-³⁵S 約 5 mg を, 第 2 回目以降の抽出液には 10^3 cpm レベルのチオペンタール-³⁵S 約 50 mg を精秤して加え, エタノールから再結晶して精製後, それぞれの比放射能を液体シンチレーション計数装置で計数し, 同位体希釈分析法により各抽出液中のチオペンタールを定量した。

体内分布の検討 平均体重 100 g の雄ラットを 1 群 6 匹とし, チオペンタール-³⁵S 3.5 mCi/70 mg/kg を腹腔内注射し, 15, 30, 90, 120 分後に断頭して肝臓, 腎臓, 脳, 血清をとり, 各臓器のホモジェネートおよび体液中の ³⁵S 含有チオペンタール関連化合物を 70% エタノールで抽出し, それぞれの放射能を 2π ガスフロー計数装置で統計誤差が 1% 以下になるように測定した。

代謝産物の分離・同定 平均体重 100 g の雄ラットを 1 群 6 匹とし, チオペンタール-³⁵S 3.5 mCi/70 mg/kg を腹腔内投与後, 15, 30, 90, 120 分に断頭して肝臓を摘出し, Chart 2 に示した方法により直ちにホモゲナイズして 70% エタノールで抽出し, エタノール留去後, 脂質を除くために 70% エタノール-ヘキサン (2:1) で再抽出し, 70% エタノール層を濃縮し, ブタノール-アセトン-アンモニア (5:1:4) の溶媒系によるペーパーク

ロマトグラフィーで分離した。ラジオペーパークロマトスキャンナーを用いてスキャノグラムをとり、そのピークの R_f 値と cold authentic sample の R_f 値が一致すること、さらに放射性スポット部分を濾紙から溶離し、それに cold 体を加えて再結晶を4回繰返したとき、2回目以降ではその比放射能が低下しないことにより代謝産物を同定した。またスキャノグラムの ^{35}S 放射能ピークの面積を複式プランニメーターにより測定し、未変化チオペンタールと各代謝産物の相対存在比を全放射能ピークの面積を100として算出した。

Chart 2. Extraction Method of Thiopental- ^{35}S and Its Metabolites in Rat Liver

結果および考察

チオペンタール ^{35}S の合成

チオペンタール- ^{35}S の合成法としては、 Ba^{35}S , H_2^{35}S を出発原料とする方法¹⁰⁾ と isotope exchange 法¹¹⁾ が知られている。 $\text{H}_2^{35}\text{S} \cdot \text{Ba}^{35}\text{S}$ はいずれも $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ に比べて著しく高価であり、また isotope exchange 法では ^{35}S 単体を原料とするが目的物の収率はきわめて低い。そこで安価な $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ を出発原料とし、 Ba^{35}S を単離することなく Chart 1 に示した方法により簡単に高収率でチオペンタールを ^{35}S 合成した。その $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ からの放射化学的収率は約 80% であった。

チオペンタール- ^{35}S の化学的純度は、併行して合成した非放射性チオペンタールの mp (158—159°), IR, 数種の溶媒系を用いたペーパークロマトグラフィーから確かめた。放射化学的純度は3種類の溶媒系(ブタノール-アセトン-アンモニア (5:1:4); 5N アンモニア飽和ブタノール-ブタノール-イソアミルアルコール-アンモニア (2:3:3))を用いたペーパークロマトグラフィーにより、1個の放射性スポットのみを示すことから確かめた。得られた ^{35}S 標識体の比放射能は 50 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (13.2 mCi/mmole) であり、70 mg/kg をラットに投与した場合に、その体内分布や代謝産物を十分有意に測定するに足りる。 $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ を出発原料とする上記の合成法は操作・装置が簡単であり、チオ尿素- ^{35}S までの合成は中間生成物を単離することなく、多岐管を用いて同一装置内で減圧下に行ないうるので放射能汚染の危険性がなく、そのうえ放射化学的収率が高いなどの利点をもっている。なおチオペンタール- ^{35}S は保存中 β 線による自己分解を起こすが、この分解による副生物はシリカゲルカラムを用いクロロホルムで溶離することにより容易に除去できる。

定量法の検討 従来の定量法は定量感度が不十分である。また組織中の微量チオペンタールを定量する際には、チオペンタールと同一の malonyl urea 核を有する代謝産物も共存し、それが類似の発色または吸収曲線を示すために特異性に欠ける。チオペンタールの定量法としてもっとも簡便と考えられ、U.S.P. XVII 初め広く用いられている紫外吸光度法はバラツキは少ないが、定量限界が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度である。また生体試料を用いる場合には、生体中には数多くの測定妨害となる紫外線を吸収する物質が存在し、それらを除去する操作が繁雑であり、操作中の損失が大きく回収率にバラツキを生ずるなどの問題を含む。これに対して放射性同位元素による標識体を用いて希釈分析をすれば、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の低濃度においても定量可能になる。チオペンタール- ^{35}S を用いる同位体希釈分析法、U.S.P. XVII による紫外吸光度法、J.P. VII による溶媒抽出重量法の3種の分析法を比較検討し、その結果を Table I に示した。同位体希釈分析法は他の方法に比べて分離過程での回収率に関係なく、純粋に単離されれば定量できる利点があるうえ、バラツキも少なく正確である。

11) D.L. Tabern, J.D. Tayler, G.I. Gleason, *Nucleonics*, **7**, 40 (1950); **8**, 60 (1951).

12) G.A., Anorova, *Metody Polucheniya i Izmeren. Radioaktivn. Preparatov, sb. Statei*, 1960, 177.

TABLE I. Analytical Results of Commercial Thiopental Preparation^{a)}

Method	Sample taken (mg) ^{b)}	Found (mg)	Content (%)	Mean value $\pm$ SD
Isotope dilution analysis	100.400	100.509	100.11	99.60 $\pm$ 0.68
	101.672	100.839	99.38	
	100.842	99.248	98.42	
	101.812	102.303	100.49	
	100.848	100.460	99.61	
UV absorptiometric analysis (U.S.P. XVII)	94.875	95.353	100.49	98.91 $\pm$ 1.40
	100.621	98.720	98.12	
	97.518	98.134	100.64	
	101.569	99.588	98.05	
	101.178	98.375	97.23	
Gravimetric analysis (J.P. VII)	508.430	509.466	100.20	100.25 $\pm$ 2.16
	510.300	530.394	103.90	
	506.798	507.206	100.08	
	501.677	487.459	97.12	
	517.072	516.769	99.94	

a) commercial thiopental sodium for injection (J.P. VII)

b) Calculated on the amount of thiopental present.

また J.P.VII による溶媒抽出重量法において、クロロホルム抽出の必要回数が明記されていないので、チオペンタール-³⁵S を用いる同位体希釈分析法により抽出の必要回数を検討した。その結果 Table II に示すように 6 回抽出すれば必要かつ十分であることがわかった。Table I の重量法によるチオペンタールの定量成績は、上記の結果に基づきクロロホルム 25 ml ずつ 6 回抽出して得たものである。

TABLE II. Extraction of Thiopental from Standard Preparation with Chloroform

Extraction	Extracted thiopental (mg)	Recovery (%)
1st	487.12	92.47
2nd	16.89	3.21
3rd	9.07	1.72
4th	7.48	1.42
5th	5.09	0.97
6th	0.31	0.06
Total	525.96	99.84

体内分布および生体内代謝 チオペンタールの体内分布と代謝に関してはいくつかの報告¹³⁾ がある。しかしいずれもウサギやラットを用いたチオペンタール投与後の経過時間に伴う尿中への排泄率や最終代謝産物の数の検討のみであり、代謝産物の定量はほとんど行なわれていない。そこで著者等は、まずチオペンタール-³⁵S をラット腹腔内に投与し、その体内分布を ³⁵S を指標として検討し、その結果を Table III に示した。

つぎにラット肝における *in vivo* でのチオペンタールの時間の経過に伴う代謝について検討し、その結果を Fig. 1 および Table IV に示した。

以上の実験結果から、投与直後すでにチオペンタール-³⁵S は肝臓、腎臓および脳に多く分布し、時間の経過に伴い脳、血中濃度は著明に減少するが肝臓、腎臓における減少はわずかであることがわかる。このように、非常

- 13) J.D. Tayler, R.K. Richards, D.L. Tabern, *Current Researches in Anesthesia and Analgesia*, **29**, 101 (1950); W. Block, I. Ebigt, *Arzneimittel-Forsch*, **7**, 572 (1957); **10**, 709, 852, 949 (1960); **11**, 59 (1961); L. C. Mark, L. Brand, S. Komvyssi, R. C. Britton, J. M. Perel, M. A. Landrau, P. G. Dayton, *Nature*, **106**, 117 (1965).

TABLE III. Distribution of 70% Ethanol Extractable ^{35}S -Radioactive Substances arised from Thiopental- ^{35}S in Male Rat

Tissue	cpm/g tissue (wet weight) ^{a)}			
	Time (min) after administration ^{b)}			
	15	30	90	120
Liver	30097.7 $\pm$ 187.2	25174.2 $\pm$ 130.6	21555.8 $\pm$ 130.4	18024.0 $\pm$ 122.8
Kidney	25270.1 $\pm$ 120.3	24166.7 $\pm$ 113.7	21486.7 $\pm$ 161.9	19449.5 $\pm$ 104.1
Brain	13463.3 $\pm$ 130.6	7926.0 $\pm$ 96.6	5312.5 $\pm$ 136.9	4995.9 $\pm$ 136.3
Serum	4425.3 $\pm$ 116.6	3822.8 $\pm$ 117.2	3093.3 $\pm$ 109.1	3014.0 $\pm$ 130.3

a) average of six animals

b) does: 3.5 mCi/70 mg/kg *i.p.*

に迅速に脳へも分布していることから、チオペンタールは脳血液関門を容易に通過できることが Table III の結果とも併せて理解できる。また Fig. 1 に示すように、肝臓においては投与後 15 分ではチオペンタールは分解されないが、30 分後には *Rf* 値 0.84 の未変化チオペンタールのほかに 4 個の ^{35}S 含有代謝産物がみられ、時間の経過に伴いさらに多数の代謝産物に分解される。肝臓ホモジネート抽出物中の未変化チオペンタールとその代謝産物の合計を 100% とすると、チオペンタール投与後 15, 30, 90, 120 分ではそれぞれ 0.0, 49.8, 59.2, 60.6% のチオペンタールが *in vivo* で代謝される。それゆえチオペンタールの体内分布を調べたり、組織中の定量を行なう場合には投与後の時間経過による補正が必要である。同定された代謝産物および予想される代謝産物としては無機硫酸塩、チオシアン酸塩、メチオニン、チオ尿素、thiopental carboxylic acid (5-ethyl-5-(1-methyl-3-carboxypropyl)-2-thiobarbituric acid), pentobarbital (5-ethyl-5-(1-methylbutyl)barbituric acid) などがある。

また代謝産物の 1 つであるチオ尿素がさらに *in vivo* で代謝されるか否かを調べるために、チオ尿素- ^{35}S をラットに投与し、その肝臓における代謝を検討した。その結果チオ尿素は体内においてそれ

Fig. 1. Radiopaperscannograms of Rat Liver Extracts injected with Thiopental- ^{35}S solvent system; butanol-acetone-ammonia=5:1:4
time after intraperitoneal injection

A: 15 min, B: 30 min, C: 90 min, D: 120 min

TABLE IV. Ratio of Thiopental- ^{35}S and its Metabolites in Male Rat Liver (*in vivo*)

Peak No.	<i>Rf</i> value ^{a)}	Compound (metabolite)	Relative percentage of radioactivity of each spot ^{b)}			
			Time (min) after administration ^{c)}			
			15	30	90	120
1	0.02	SO_4^{2-}	0.0	7.04 $\pm$ 0.01	12.51 $\pm$ 0.33	20.81 $\pm$ 0.20
2	0.13	unknown	0.0	23.10 $\pm$ 0.18	15.73 $\pm$ 0.30	10.50 $\pm$ 0.30
3	0.34	unknown	0.0	7.57 $\pm$ 0.06	6.87 $\pm$ 0.14	9.15 $\pm$ 0.16
4	0.57	thiourea	0.0	0.0	7.86 $\pm$ 0.43	5.66 $\pm$ 0.10
5	0.69	methionine	0.0	12.00 $\pm$ 0.22	16.25 $\pm$ 0.16	14.74 $\pm$ 0.37
6	0.84	thiopental	100.0 $\pm$ 0.0	50.28 $\pm$ 0.10	40.76 $\pm$ 0.16	39.15 $\pm$ 0.21

a) PPC solvent system: butanol-acetone-ammonia=5:1:4

b) Percentage to total ^{35}S radioactivities extracted taken as 100%, average of six animals.c) does: 3.5 mCi/70 mg/kg *i.p.*

以上分解されない最終代謝産物であることがわかった。以上のことよりチオペンタールの代謝経路には malonyl urea 環の解裂によりチオ尿素が生成される経路と、脱硫化が起こり、その結果生じた ^{35}S が生体内の S プールに入り硫酸塩、メチオニンなどの含硫無機・有機化合物になる経路とが考えられる。

謝辞 終わりに、液体シンチレーション計数装置の使用に御便宜をいただいた国立衛生試験所に深謝いたします。