向精神薬に関する研究 (第 2 報¹⁾) 生体試料中 Carpipramine の化学定量法

中西美智夫, 加藤安之, 安田 寛

吉富製薬株式会社研究所²⁾

Studies on Psychotropic Drugs. II.¹⁾ Chemical Methods for Determination of Carpipramine in Biological Materials

MICHIO NAKANISHI, YASUYUKI KATO and HIROSHI YASUDA

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.²⁾

(Received September 17, 1969)

The spectrometric and fluorometric methods for quantitative determination of carpipramine in biological materials were investigated. Carpipramine in the urine, bile, and gastrointestinal tract of rats was measured from the absorbance at 250 m μ , where the absorption peak of carpipramine is present. The intensity of its fluorescence (excitation, 280 m μ ; fluorescence, 400 m μ) depends on the pH of its solution, and intensity increased as its solution became more alkaline. Therefore, carpipramine in various tissues was measured from the fluorescence at 400 m μ in alkaline conditions. From these results, carpipramine can be determined with good recovery and reproducibility by the present method with the exception of adipose tissue.

Iminodibenzyl 誘導体の向精神薬, carpipramine (以下 CPP と略) の薬理学的性質¹⁾ および臨床成績³⁾ については, すでに報告されているが, 本化合物の生体内運命に関する検討は現在までになされていない。

本化合物の生体内運命を追求する目的で, 生体試料中 CPP の紫外吸収およびけい光法による定量法を検討した。

実験の部

装置 紫外吸収スペクトル (以下 UV スペクトルと略); 島津マルチバーパス自記分光光度計 MPS-50L 型, 吸光度測定; 日立パーキンエルマー 139 型分光光度計, けい光測定; 日立 MPF-2 型分光けい光光度計をそれぞれ使用した。

被検液および試薬の調製 CPP の UV およびけい光スペクトルの測定は, CPP の最終濃度が 10 μ g/ml または 40 μ g/ml になるように, 精製水, 0.1N HCl または 0.1N NaOH で溶解した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

検量線の作成 UV 法—CPP の 0.1N HCl 溶液 (100 μ g/ml) を 0.1N HCl で希釈して作成した標準濃度溶液について, 0.1N HCl をブランクとし 250 m μ における吸光度を測定して作成した。

けい光法—UV 法と同様に作成した CPP の標準濃度溶液 2.5 ml に 3N NaOH 0.25 ml を加えて攪拌し, ただちに 400 m μ におけるけい光強度 (励起波長, 280 m μ) を測定した。検量線は 10 μ g/ml のけい光強度を 100 とした相対強度で示した。

生体試料の調製 体重約 200 g の雌性 Wistar ラットを用い, 1 夜絶食後エーテル麻酔により殺し臓器を摘出した。尿はラットを採尿ケージ中で固型飼料と水を自由に摂取させて飼育し, 24 hr 尿を採取した。胆汁はラットをウレタン (1.2 g/kg, s.c.) 麻酔下に開腹し, ポリエチレン・カニューレ (外径 1 mm) を総胆管に挿入して約 6 hr 連続採取した。

生体試料中 CPP の回収実験 生体試料中 CPP の抽出法は Salzman ら⁴⁾ のクロールプロマジンについて

1) 第 1 報: M. Nakanishi, T. Okada, T. Tsumagari, *Arzneimittel-Forsch.*, **18**, 1435 (1968).

2) Location: 955, Koivai, Yoshitomi-cho, Chikugo-gun, Fukuoka.

3) 藤田貞雄, 由良了三, 西願寺弘通, 後藤基裕, 出口武夫, *精神医学*, **7**, 821 (1965).

4) N.P. Salzman, B.B. Brodie, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **118**, 46 (1956).

記載した方法に準じた。ラットの各臓器に4倍量の精製水を加えて作成したホモジネート(血清は後大静脈より採血後遠心分離して得た)1mlを試料とした。試料を内容50mlの共栓遠沈管に入れ、10% NaOH 1ml およびヘプタン(1.5% イソアミルアルコール含有)20mlを加え30min振盪抽出後遠心し、上清15mlを別の共栓遠沈管に移す。これに0.1N HCl 5mlを加え15min振盪抽出後遠心する。水層2.5mlを取り3N NaOH 0.25mlを加え、400m μ におけるけい光強度を測定した。尿、胆汁の場合には1mlを用い組織ホモジネートの場合と同様の操作で抽出して得られた水層の250m μ における吸光度から薬物濃度を求めた。消化管の場合には、0.1N HCl 50mlでホモジナイズし、ホモジネート1mlを用い尿の場合と同様に測定した。

代謝産物の影響 ラットにCPP 160 mg/kg 経口投与1hr後に殺し各臓器を摘出、前項と同様にホモジナイズ後抽出した。抽出液は約50°の水浴中で減圧濃縮後薄層クロマトグラフィー(以下TLCと略)に付した。TLCの条件は、シリカゲルプレート(Wakogel B-5, 和光純薬, 厚さ0.25mm, 105°, 30min活性化)を用い、ベンゼン-ジオキサン-10% NH₄OH (10:15:1, v/v)の溶媒系で展開した。スポットはDragendorff試薬の噴霧により検出し、無投与ラットを用いた対照実験でも認められたスポットは除外した。

結果と考察

CPPのUVおよびけい光スペクトル

CPPのUVスペクトルはFig. 1に示したように250m μ 付近に極大吸収を有し、その分子吸光係数はおよそ 8×10^3 であった。本化合物のUVスペクトルは溶液のpHによりほとんど影響を受けなかった。したがって比較的高濃度の場合、抽出操作により妨害物質の除去が可能であれば250m μ における吸光度から定量可能と考えられる。CPPのけい光スペクトルを種々の条件で検討した結果、Fig. 2に示したように、励起波長280m μ の場合に約400m μ に強いけい光が認められた。けい光強度は溶液のpHに依存し、アルカリ性、水溶液(pH約5)、酸性の順にけい光強度は減少した。けい光強度の比率はおよそ100:55:20であった。以上の結果からCPPのけい光法による測定は、Dingellら⁵⁾がイミプラミンに

Fig. 1. UV-spectrum of CPP (40 μ g/ml, 0.1N HCl Soln.)

Fig. 3. Calibration Curve of CPP by UV-method

Each point represents the mean of 3 determinations.

Fig. 2. Fluorescence-spectra of CPP (10 μ g/ml)

—: 0.1N NaOH - - - : H₂O
- · - : 0.1N HCl

Fig. 4. Calibration Curve of CPP by Fluorometric-method

Each point represents the mean of 5 determinations.

5) J.V. Dingell, F. Sulser, J.R. Gillette, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **143**, 14 (1964).

TABLE I. Percent Recovery of CPP in the Urine, Bile and Gastrointestinal Tract of Rats (UV-method)

Sample Added	Urine	Bile	G.I. ^{a)}
3.13 μ g		106	
6.25	105	100	
12.5	101	101	
25.0	95	101	
50.0	99	100	
100.0	96	99	
2.5mg			90
5.0			104
20.0			93

Each value represents the mean of 3 determinations.
^{a)} the gastrointestinal tract and its content

TABLE II. Percent Recovery of CPP in Various Tissues of Rats (Fluorometric-Method)

Tissue Added	Liver	Lung	Kidney	Heart	Spleen	Fat	Brain	Serum
1.25 μ g								106
3.12							101	108
6.25	105		107	106	85	109	102	108
12.5	102	96	102	110	106	86	107	
25.0	99	106	108	102	98	80		
50.0	104	96	106	102	99	84		

Each value represents the mean of 3 determinations.

ついて報告しているように検液をアルカリ性として測定すべきである。

検量線と安定性

UV法による検量線は5—100 μ g/ml の濃度範囲で直線となり再現性は良好であった(Fig. 3). しかし 2.5 μ g/ml での吸光度は約 0.03 で、この濃度以下の生体試料中 CPP の定量は困難であると考えられる。けい光法では Fig. 4 に示したように 0.1—10 μ g/ml の範囲ではほぼ直線となり、0.1 μ g/ml での相対けい光強度は 2 であった。したがってけい光法による定量感度は UV 法の 10 倍以上であり、低濃度まで定量することができる。

CPP の 0.1N HCl 溶液はかなり安定で、0.1—10 μ g/ml の濃度では 1 週間以上、100 μ g/ml では 6 カ月以上(冷蔵庫中保存)安定であった。またアルカリ性溶液に 280 m μ の紫外線を照射した場合 10 min 以内であれば、けい光強度にまったく変化は認められなかった。

Fig. 5. Thin-layer Chromatogram of Heptane-extract from Rat Tissues treated with CPP (160 mg/kg, *p.o.*, at 1 hr)

developing solvent: benzene-dioxane-10% NH_4OH (10:15:1, v/v)

detection: Dragendorff's reagent

^{a)} gastrointestinal tract and its content

^{b)} authentic sample

生体試料中 CPP の回収実験

ラット尿および胆汁中に一定量の CPP を添加し UV 法で回収実験を行なった。Table I に示したように回収率は尿 95—105%, 胆汁 99—106% および消化管 (内容物を含む) 100—104% といずれも満足すべき結果が得られた。また 3 回のくり返し実験においても再現性は良好であった。

ラット組織中 CPP のけい光法による回収率は Table II に示した。脂肪組織以外の各組織でほぼ満足すべき回収率と再現性が得られた。脂肪組織からの回収率がやや低い原因の一つとして脂肪組織のホモジナイズ操作が不完全なことが考えられる。

本法の特異性について

本定量法に対する CPP の代謝産物の影響を検討する目的で CPP 投与ラットの各組織ホモジネートについて抽出操作を行ない、ヘプタン層中に移行した物質を TLC で分析した。得られたクロマトグラムは Fig. 5 に示した通り、いずれの組織を用いても対照の CPP と R_f 値の等しい単一スポットが検出され、本抽出操作で CPP の代謝産物はヘプタン層に移行しないものと推定される。以上の結果から本定量法で、代謝産物の妨害を受けることなく生体試料中 CPP を定量できると考えられる。