薬物の吸収ならびに排泄に関する研究 (第 16 報¹⁾) ラット尿中のスルピリン
ならびにその代謝物の定量法

野上 壽, 花野 学, 栗津莊司,^{2a)} 今岡キク子^{2b)}

東京大学薬学部,^{2a)} 共立薬科大学^{2b)}

Studies on Absorption and Excretion of Drugs. XVI.¹⁾ Determination
of Sulpyrin and Its Metabolites in the Rat Urine

HISASHI NOGAMI, MANABU HANANO, SHOJI AWAZU^{2a)} and KIKUKO IMAOKA^{2b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo^{2a)} and
Kyoritsu College of Pharmacy^{2b)}

(Received November 4, 1969)

When sulpyrins is administered to the rat, unchanged sulpyrin, and 4-monomethylaminoantipyrine (MAA), 4-aminoantipyrine (AA), and 4-acetylaminoantipyrine (AcAA), which are the metabolites, are detected in the urine. This study was undertaken to determine these excretions by colorimetric method, after being separated by paper chromatography. The determinations of sulpyrin, MAA, AA, and AcAA by colorimetric method are as follows. Sulpyrin and MAA are extracted from the paper with pH 5.9 buffer solution, colored by phosphomolybdic acid, and their absorbances are measured at 810 m μ . AA and AcAA are extracted with 0.5N HCl, colored by α -naphthol, and their absorbances are measured at 490 m μ . It was found that each of the substances in the standard mixed solution containing sulpyrin, MAA, AA, and AcAA (150 μ g/0.1 ml each) showed a high recovery rate and reproducibility. Especially, the stability of sulpyrin increased markedly, and its value was indicated correctly. These excretions in the rat urine after administration of sulpyrin were separated clearly by the present method. Effective results were obtained even in a small amount of substances in the rat urine.

スルピリンの化学構造, 代謝物, 薬効などに類似性をもつアミノピリンについて, Brodie³⁾ らがこれを人間に投与し, 尿中に排泄された非代謝アミノピリンならびに代謝物である 4-aminoantipyrine (AA), 4-acetylaminoantipyrine (AcAA) を有機溶剤でおのおの抽出したのちに比色定量し, 4-hydroxyantipyrine (HO-A), 4-Hydroxyantipyrine-conjugate (RO-A) は紫外外部吸光度を用いる方法⁴⁾ によって測定している。他方, スルピリンの加水分解については Wagner⁵⁾ が 4-monomethylaminoantipyrine (MAA), bis(4-methylaminoantipyrinyl) methane (Bis 体), AA, AcAA などの分解物を報告しているが, 分離定量法は完成されていない。われわれはスルピリンの代謝物について検討するため, スルピリンをラットに投与し, 非代謝スルピリン (S) ならびに代謝物 MAA, AA, AcAA, HO-A, RO-A を尿中から検出した。しかし有機溶剤による分離定量法は尿中の各種代謝物の分離が悪く, S が水溶液の状態において変化しやすいため適用できなかった。そこで本研究においてはラット尿中の各種排泄物を濾紙クロマトグラフィーにより分離したのち, おのおのについて比色定量することを試み, S, MAA, AA, AcAA を十分な精度で分離定量することに成功したので報告する。

濾紙クロマトグラフィーは丹羽⁶⁾ ならびに Pechtold⁷⁾ の方法を参考にした。S の定量法は種種知られているが, 本実験試料の濃度が低い (10—100 μ g/ml), この濃度に適合している守田⁸⁾ のリンモリブデン酸による方

1) 第15報: H. Nogami, M. Hanano, S. Awazu, T. Iga, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **18**, 228 (1970).

2) Location: a) Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo; b) Shibakoen, Minato-ku, Tokyo.

3) B.B. Brodie, J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **99**, 171 (1950).

4) B.B. Brodie, J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **98**, 97 (1950).

5) G. Wagner, *Archiv der Pharmazie*, **61**, 121 (1956).

6) 丹羽弘司, 橋本充子, 東北薬科大学紀要, **7**, 81 (1960).

7) F. Pechtold, *Arzneimittel-Forsch.*, **14**, 1056 (1964).

8) 守田 実, 衛生試験所報告, **77**, 113 (1959).

法を用いた。MAA もこの方法によって行なった。AA ならびに AcAA は Brodie ら⁹⁾ の α -ナフトールによる比色法を用いた。HO-A ならびに RO-A は Brodie ら⁴⁾ の紫外外部吸光度を用いる方法のとおりに行なった。

実 験 の 部

試料ならびに試液 S は日局品を用い、AA (mp 109° の微黄色針状結晶) および AcAA (mp 202° の淡黄色微細結晶) はグレラン製薬 KK から賜わり、HO-A (mp 188° の無色針状結晶) は東北薬科大学の丹羽教授から賜わり、Bis 体 (mp 175° の白色微細粒状晶, *Anal.* Calcd. $C_{25}H_{30}O_2N_6$: C, 67.24; H, 6.77; N, 18.82. Found: C, 67.40; H, 6.84; N, 18.80. UV 吸収スペクトル: Fig. 2) は守田⁹⁾ の方法により、MAA (mp 60° の黄色結晶, *Anal.* Calcd. $C_{12}H_{15}ON_3$: C, 66.36; H, 7.01; N, 19.40. Found: C, 66.53; H, 7.00; N, 19.59. 紫外線 (UV) 吸収スペクトル: Fig. 2) は小野¹⁰⁾ の方法により合成した。汙紙クロマトグラフィーの展開液: 石油エーテル- C_6H_6 -MeOH (5:4:2). 東洋汙紙の No. 51. pH 7.0 リン酸緩衝液. pH 5.9 リン酸緩衝液. 0.8% リンモリブデン酸液. 10N H_2SO_4 . 0.2% $NaNO_2$ 液. 1% スルファミン酸アンモン液. 5% α -ナフトール液. 4N NaOH. 0.5N HCl. $1/15$ M Na_2HPO_4 液. 0.1N NaOH.

装置 吸収スペクトルは日立 124 型ダブルビーム分光光度計を用いて測定し、汙紙上の各試料の位置はスーパーライト UV-LS, D1 型紫外線検出器により探知した。遠心分離は久保田 KR-6P 型冷却遠心分離機を用いた。

尿中の S ならびにその代謝物の汙紙クロマトグラフィー 試料尿 0.5 ml を汙紙の中央部 (約 25 cm) ヘスポットし、汙紙の余白部へ各標準物質液 (各 10% EtOH 液) を点滴スポットし、冷風乾燥したのち、展開液で約 2 時間の展開を行ない、ただちに冷風乾燥したのち、紫外線照射 (波長: 2537 Å) により目じるしをつけ、各物質の R_f 値を求める。この各 R_f 値の部分を作りわけておのおのを以下に述べる方法で測定した。

S の定量法 S は汙紙の R_f 値 0.14 の部分にあり、ここを切りとり、細かく切って遠心沈殿管にいれ、pH 5.9 のリン酸緩衝液 20 ml を加えて 15 分間振とうし、汙紙を除去したのち 5 分間遠心分離し、その上澄液 10 ml を共栓試験管にいれ、0.8% リンモリブデン酸液 2 ml および 10N H_2SO_4 1 ml を加えてよくふりまぜ、正確に 15 分間沸騰水浴中で加熱したのち、ただちに冷水で冷却し、20—60 分の間に 810 m μ で吸光度を測定する。対照液には同緩衝液 10 ml を同様に操作したものを用いた。

MAA の定量法 MAA は汙紙の R_f 値 0.60 の部分にあり、ここを切りとり、細かく切って遠心沈殿管にいれ、pH 5.9 のリン酸緩衝液 20 ml を加え、そののちは S の場合と同様に操作して行なう。対照液も同様である。

AA の定量法 AA は汙紙の R_f 値 0.35 の部分にあり、ここを切りとり、細かく切って遠心沈殿管にいれ、0.5N HCl 20 ml を加えて 15 分間振とうし、汙紙を除去したのち、5 分間遠心分離し、その上澄液 5 ml を共栓試験管にいれ、0.2% $NaNO_2$ 液 0.5 ml を加えて 10 分間冷室にいれ、そののち 1% スルファミン酸アンモン液 0.5 ml を加えて 3 分間放置後、5% α -ナフトール液 0.1 ml および 4N NaOH 1 ml を加え、10 分間放置し、490 m μ で比色定量する。対照液は 0.5N HCl 5 ml を同様に操作して用いる。

AcAA の定量法 AcAA は汙紙の R_f 値 0.35 の部分にあり、AA と同じ位置に混在している。そこで前述の AA 測定時の 0.5N HCl 20 ml による抽出液の上澄液のうちから 5 ml をとり、共栓試験管にいれて蓋をしたまま沸騰水浴中で 30 分間加熱したのち冷却し、この脱アセチル化されて AA となったものを AA のときと同様に操作して求めるが、この測定値は AA および AcAA の総計値であり、これから AA の値を減じて得た測定値を用いて AcAA の定量値を求める。対照液は AA の場合と同様である。

結 果

汙紙クロマトグラフィー

S, MAA, AA, AcAA の各種標準物質を pH 7.0 リン酸緩衝液に溶かした混合液 (各 150 μ g/0.1 ml) を調製し、その 0.1 ml を実験の部で述べた方法により汙紙クロマトグラフィーを行なった。汙紙クロマトグラムを Fig. 1 に示す。分離が明確に行なわれ、各定量値は良好な回収率および再現性を示し、その結果を Table I に示す。また Bis 体の標準液は MAA と同一の R_f 値を示したので、最終濃度が 20 μ g/ml になる標準液をスポットし、展開操作後の汙紙を EtOH で抽出し、UV 吸収スペクトルを測定した結果、汙紙クロマトグラフィー中に Bis 体は MAA に変化することを確認した。この汙紙クロマトグラフィー後の Bis 体および直接測定した MAA, Bis 体の各 EtOH 溶液 (20 μ g/ml) の UV 吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。

尿が分離に影響するか否かを検討するため、ブランク尿で各標準物質を溶かした混合液 (各 150 μ g/0.1 ml) をつくり、前述同様に操作したところ、 R_f 値の変化がなく、よく分離し、よい定量値が得られた (Table I)。つぎに各標準物質の 100 μ g ずつをブランク尿 0.1 ml で溶かし、反覆測定を行ない、定量誤差を求めた。それらの結

9) 守田 実, 薬誌, 82, 50 (1962).

10) 小野真一, 尾西良一, 川村邦夫, 薬誌, 86, 11 (1966).

TABLE I. Recovery Rate from the Mixture of Sulpyrin, 4-Monomethylaminoantipyrine, 4-Aminoantipyrine and 4-Acetylaminoantipyrine (150 μ g/0.1 ml Each) with the Paper Chromatography

Substance	Recovery rate from the buffer soln. (%)	Recovery rate from the rat urine (%)
Sulpyrin	90	91
4-Monomethylaminoantipyrine	96	94
4-Aminoantipyrine	97	96
4-Acetylaminoantipyrine	105	102

Standards were taken before paper chromatographic treatment.

Fig. 1. Paper Chromatography on the Urinary Excretion of Sulpyrin

0.60: 4-monomethylaminoantipyrine (MAA) R_f value
0.35: 4-aminoantipyrine (AA) and 4-acetylaminoantipyrine (AcAA) have the same R_f value
0.14: sulpyrin (S) R_f value

Fig. 3. Absorption Spectra of the Coloured Solutions on the Determinations of Sulpyrin with the Phosphomolybdic Acid Method and 4-Aminoantipyrine with the α -Naphthol Method

液 0.1 ml を前述同様に操作して求める。その検量線を Fig. 4 に示す。

また S 標準液は調製後ただちに濾紙へスポットして急速に冷風乾燥するため、S の安定性が著しく増大し、

Fig. 2. Ultraviolet Absorption Spectra of 4-Monomethylaminoantipyrine(—), Bis(4-methylaminoantipyrinyl) methane(—), and Bis(4-methylaminoantipyrinyl) Methane extracted with Ethanol after Separated by Paper Chromatography(---)

Each substance was dissolved in ethanol, and a final concentration was 20 μ g/ml.

果を Table II に示す。

S の検量線

S の吸収スペクトルは Fig. 3 の (a) に示すとおりであり、S の定量操作において使用する抽出上澄液は 1/2 量であるため、検量線作成時には濃度をあらかじめ 2 倍とし、S 40—200 μ g/0.1 ml の pH 7.0 リン酸緩衝液による標準

TABLE II. Recovery Test of Sulpyrin and Metabolites from the Rat Urine

Substance	Recovery (%)			n^a	Standard deviation (%)
	Mean	Max.	Min.		
Sulpyrin	98.8	100.2	95.0	6	1.76
4-Monomethylaminoantipyrine	100.4	103.2	98.4	5	2.04
4-Aminoantipyrine	100.8	102.5	99.7	5	1.19
4-Acetylaminoantipyrine	100.5	103.6	97.5	5	2.47

^a) number of determinations

TABLE III. Recovery Rate from the Paper Chromatography (PPC)

Sulpyrin (μg)	20	40	60	80	100
Direct-determined absorbance	0.098	0.235	0.402	0.568	0.735
Absorbance after PPC	0.095	0.208	0.350	0.494	0.638
Recovery rate (%)	96	90	89.5	89	88.5

Fig. 4. Working Curve of Sulpyrin by Paper Chromatography

Table III に示すような良い結果が得られた。

MAA の検量線

MAA の定量法は S と同様であるから、検量線作成時にもやはり 2 倍濃度の MAA 40—200 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ の pH 7.0 リン酸緩衝液による標準液 0.1 ml を前述同様に操作して求める。その検量線を Fig. 5 に示す。なお Bis 体の標準物質は定量操作中に MAA に変化することから、この定量法においては尿中の Bis 体、MAA の区別がつかず、いずれも MAA として定量される。

AA の検量線

AA の吸収スペクトルは Fig. 3 の (b) に示すとおりであり、AA の定量操作において使用する抽出上澄液は 1/4 量であるため、検量線作成時にはあらかじめ 4 倍濃度とし、AA 80—400 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ の pH 7.0 リン酸緩衝液による標準液 0.1 ml を前述同様に操作して求める。その検量線を Fig. 6 に示す。

AcAA の検量線

AcAA の定量操作においても使用する抽出上澄液は 1/4 量であるため、検量線作成時にはあらかじめ 4 倍濃度とし、AcAA 80—400 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ の pH 7.0 リン酸緩衝液による標準液 0.1 ml を前述同様に操作して求める、その検量線を Fig. 7 に示す。

尿ブランク値

薬物投与前のブランク尿 0.5 ml を濾紙にスポットし、展開後、各物質の R_f 値に相当する部分を切りわけ、お

Fig. 5. Working Curve of 4-Monomethylaminoantipyrine by Paper Chromatography

Fig. 6. Working Curve of 4-Aminoantipyrine by Paper Chromatography

Fig. 7. Working Curve of 4-Acetylaminoantipyrine by Paper Chromatography

TABLE IV. Individual Deviations of the Urinary Blank on the Paper Chromatography

Substance	<i>n</i> ^{a)}	Mean (µg/ml) ^{b)}	Max. (µg/ml) ^{b)}	Min. (µg/ml) ^{b)}	Standard deviation (µg/ml) ^{b)}
Sulpyrin	10	75	102	51	17.9
4-Monomethylaminoantipyrine	10	0	4	0	1.2
4-Aminoantipyrine	10	14	20	3	5.0
4-Acetylaminoantipyrine	10	1	5	0	1.5

a) number of rats

b) These values are calculated from the absorbance as described in text.

TABLE V. The Amounts of Sulpyrin and Metabolites Excreted in the Rat Urine (Dose=14.04 mg)

Time (hr)	Sulpyrin		4-Monomethylaminoantipyrine		4-Aminoantipyrine		4-Acetylaminoantipyrine	
	Excreted amounts (µg)	Cumulative amounts (µg)	Excreted amounts (µg)	Cumulative amounts (µg)	Excreted amounts (µg)	Cumulative amounts (µg)	Excreted amounts (µg)	Cumulative amounts (µg)
0.25	2441	2441	186	186	2	2	10	10
0.5	2349	4790	222	408	10	12	17	27
0.75	771	5561	84	492	30	42	26	53
1.	446	6007	74	566	19	61	56	109
1.25	196	6203	31	597	24	85	62	171
1.5	162	6365	8	605	22	107	88	259
2.	262	6627	44	649	54	161	293	552
2.5	187	6814	11	660	119	280	266	818
3.	81	6895	0		71	351	312	1130
3.5					16	367	215	1345
4.					13	380	222	1567
5.					32	412	441	2008
6.					32	444	363	2371
7.					14	458	199	2570
8.					4	462	59	2629

のこの定量法で測定した値を各物質の尿ブランク値とし、一定時間ごとの採尿量に対する全尿ブランク値はつぎの式によりそのつどに算出する。

$$\text{全尿ブランク値 } (\mu\text{g}) = \frac{C}{B} \times E$$

B: ブランク尿のスポット量 (0.5 ml)

C: ブランク尿 0.5 ml の測定値 (μg)

E: 一定時間ごとの各採尿量 (ml)

試料尿中の定量

一定時間ごとに採取した試料尿中の各薬物の定量値は次式に示すようにして求めた測定値から、そのものの全尿ブランク値を減じたものである。

$$\text{試料尿中の測定値 } (\mu\text{g}) = \frac{D}{T} \times E$$

T: 試料尿のスポット量 (0.5 ml)

D: 試料尿 0.5 ml の測定値 (μg)

E: 前述の E と同一のもの

また尿ブランク値はラットの個体差によって相異があり、それらの値を Table IV に示す。

以上のような結果が得られたので、S 14.04 mg を筋肉注射により投与したラット (Donryu 種, 300 g 位の成育雄) の尿を一定時間ごとに採取し、その 0.5 ml を用いて前述同様に操作し、経時的に測定した。それらの定量結果を Table V に示す。

考 察

水溶液中で不安定なスルピリンが本法の実験条件ではほとんど分解せず、分離、抽出時の損失を含めても約 90% が回収された (Table III)。

本研究の方法によって、スルピリンを投与したラット尿中に排泄された非代謝 Sulpyrin ならびに代謝物 4-Monomethylaminoantipyrine, 4-Aminoantipyrine, 4-Acetylaminoantipyrine をおのおの十分な精度で分離することができ、ラット尿中の微量試料においても良好な定量結果を得られた。

しかし Wagner⁵⁾ によるスルピリンの加水分解の報告から、ラット尿中においてもその代謝物として Bis 体が存在するものと考えられるが、本定量法においては、Bis 体は薄紙クロマトグラフィー中に MAA に変化してしまうため、Bis 体を MAA と区別することができない。したがってラット尿中から MAA として得られた定量値は MAA および Bis 体の合計値と考えるべきであろうと思われる。また鮫島¹¹⁾ によるスルピリンの加水分解の考察から、ラット尿中より定量された MAA がスルピリンの分解によって生じた真の代謝物であるか、あるいは定量操作中に生じたものであるかの疑問が残っている。この点についてはさらに研究する必要があると思われる。

謝辞 終わりに臨み、丁重な御指導を賜った田村善蔵 東大教授に厚く御礼を申し上げます。また貴重な試料を賜った丹羽弘司 東北薬科大学教授ならびにグレラン製薬株式会社に深謝いたします。終始実験に協力していただいた共立薬科大学の金子明子、近藤敏子、林 光子の諸嬢に深謝いたします。

11) 鮫島政義, 杉本 功, 内海 勇, 薬剤学, 26, 23 (1966).