尿中デヒドロエピアンドロステロン-サルフェートのイオン対抽出けい光定量

前田昌子, 辻 章夫

昭和大学薬学部¹⁾

Fluorophotometric Determination of Dehydroepiandrosterone Sulfate in Urine by Ion-Pair Extraction

MASAKO MAEDA and AKIO TSUJI

School of Pharmaceutical Sciences, Showa University

(Received May 27, 1978)

Fluorophotometric method for the determination of dehydroepiandrosterone sulfate in urine has been established. The method involves the formation of an ion-pair complex between the sulfate and acridine orange, and extraction of the complex into 1,2-dichloroethane, followed by the measurement of the fluorescence intensity at λ_{ex} 495 nm and λ_{em} 520 nm.

The limit of detection was about 80 ng/ml of dehydroepiandrosterone sulfate and the recovery from urine was between 92.3 and 103.3%. The present method has been applied to the determination of dehydroepiandrosterone sulfate present in normal human urine.

Keywords—dehydroepiandrosterone sulfate; fluorophotometry; ion-pair extraction; dye; acridine orange

製剤や生体試料中の塩基性医薬品の比色定量にフタレイン系酸性色素を用いるイオン対抽出比色法が種々報告されている。²⁻¹⁰⁾

また、逆に塩基性色素を用いる水中の陰イオン性界面活性剤の比色定量法が公定法として規定され、種々の検討がなされている。¹¹⁻¹⁴⁾

一方、デヒドロエピアンドロステロン-サルフェート (以下 DHEA-S と略記) は尿中に含まれる硫酸結合型ステロイドの大部分を占め、尿中の本品の排泄量の測定は胎児の生長の度合いを知る手がかりとして、また、最近ではその量と各種の癌性疾患との関連についても議論されている。即ち癌患者の尿中の DHEA-S 量は正常人に比べて極端に低く、回復に伴って増加するので診断の目やすになることが報告されている。¹⁵⁾

そこで従来の方法より簡便で感度のよい方法を確立することは、より低いレベルの DHEA-S 量を知ることが可能となるので有意義であると考えられる。

従来、尿中の DHEA-S の定量法としては、Zimmermann 反応、¹⁶⁾ ラジオイムノアッセイ法、¹⁷⁾ ガスクロマ

1) Location: 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142, Japan.

2) J. Axelrod, "The Estimation of Basic Drugs by Dye Method," 1st Ed., Academic Press, New York, 1961.

3) 坪内正弘, 分析化学, **20**, 83 (1971).

4) 坪内正弘, 分析化学, **20**, 314 (1971).

5) 坪内正弘, 分析化学, **20**, 1040 (1971).

6) M. Tsubouchi, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 943 (1971).

7) 緒方惟治, 坂口武一, 分析化学, **24**, 279 (1975).

8) 星野正徳, 辻 章夫, 分析化学, **21**, 1523 (1972).

9) 星野正徳, 辻 章夫, 分析化学, **22**, 163 (1973).

10) 前田昌子, 松岡 薫, 辻 章夫, 分析化学, **24**, 681 (1975).

11) S. Longwell, W.D. Maniece, *Analyst*, **80**, 167 (1955).

12) O.C. Abott, *Analyst*, **87**, 286 (1962).

13) 田中 孝, 日色和夫, 川原昭宣, 千田政希, 分析化学, **23**, 289 (1974).

14) 横山 剛, 得津勝治, 衛生化学, **20**, 81 (1974).

15) 小川誠一, 鎌田昌平, 雨森良彦, 日本内分泌学会講演要旨集, p. 19, (1976 年 10 月).

16) W. Zimmermann, *Z. Physiol. Chem.*, **233**, 259 (1935).

17) H. Sekihara, N. Ohsawa, H. Ibayashi, *Steroids*, **20**, 813 (1972).

トグラフ法,¹⁸⁾ メチレンブルーを用いた抽出比色法,¹⁹⁾ が知られており, DHEA-S を含む製剤の定量法として, メチルグリーンを用いた抽出比色法が報告されている.²⁰⁾ しかし, 前 3 者は操作が繁雑であり, 後 2 者は感度がやや劣る.

本法では, 発けい光性塩基性色素としてアクリジンオレンジを選び, 従来の比色法より感度の高いけい光定量法を確立した.

実験の部

1. 試薬および装置 1.1. 試薬・試液——DHEA-S: DHEA (東京化成 K K) をスルファミン酸を用いて Joseph らの方法²¹⁾ に従って硫酸エステルとした.

Anal. Calcd.: $C_{19}H_{27}KO_5S \cdot 1/2 H_2O$, C, 53.57; H, 6.99. Found: C, 53.07; H, 6.88.

DHEA-S 標準溶液: DHEA-S 一定量を取り, エタノールに溶かし, 100 $\mu\text{g/ml}$ として貯蔵溶液とする. 用時この 1 ml をとり, N_2 ガスで乾固後, 再蒸留水で正確に 100 ml とする (1 $\mu\text{g/ml}$).

アクリジンオレンジ溶液 (0.025 mg/ml): アクリジンオレンジ 2.5 mg (東京化成 K K) を希硫酸 1 ml に溶解した後, 50 mg/ml 硫酸ナトリウム溶液で 100 ml とした.

1,2-ジクロロエタン, クロロホルム, その他の試薬は市販特級品を用いた.

1.2. 装置——けい光々度計: 日立 MPF-2A 型分光けい光々度計 (光源: キセノンランプ). 島津 RF-500 型分光けい光々度計 (光源: キセノンランプ), サーモミキサー: 大洋物産 TB II 型を使用した.

2. 定量操作法 2.1. 検量線——DHEA-S 標準溶液 (0.08—1.0 $\mu\text{g/ml}$ DHEA-S 含有) 1 ml をガラス試験管にとり, 再蒸留水 2 ml, アクリジンオレンジ溶液 (0.025 mg/ml) 0.5 ml および 1,2-ジクロロエタン 5 ml を加え, サーモミキサーで激しく攪拌混和 (約 1 分間) 後, 放置する. 二層を分離した後, 水層を除去し, 有機層のけい光強度—励起波長 495 nm, けい光波長 520 nm) を測定する. 標準溶液の代わりに再蒸留水を用いて同様の操作を行い, 空試験のけい光強度とする.

2.2. 尿中 DHEA-S の定量法——尿 0.5 ml をとり, 再蒸留水でうすめて 50 ml とする. この液 5 ml に 1,2-ジクロロエタン 5 ml を加えて振盪し, 遊離のステロイドを有機層に抽出する. 抱合体を含む水層 3 ml をとり, アクリジンオレンジ溶液 0.5 ml および 1,2-ジクロロエタン 5 ml で抽出し, 有機層を 2.5 w/v% 硫酸ナトリウムを含む 1% 硫酸溶液 5 ml, および再蒸留水 5 ml で洗浄し, グルクロナイドその他を除いた後, 1,2-ジクロロエタン層のけい光強度を測定する.

尚, 空試験のけい光強度を, 各測定値から差引いて補正する.

実験結果および考察

1. 励起およびけい光スペクトル

DHEA-S 標準溶液について, 前述の定量操作法に従って得た液の励起極大波長は, 495 nm, けい光極大波長は 520 nm である (Fig. 1).

2. アクリジンオレンジの濃度の影響

DHEA-S 0.5 $\mu\text{g/ml}$ および 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 溶液についてアクリジンオレンジ溶液の濃度を 5×10^{-3} — 5×10^{-2} mg/ml の間で種々に変化させ, 前述の定量法に従って, けい光強度を測定したところ, 1.5×10^{-2} mg/ml 以上で一定のけい光強度を与えることから 0.025 mg/ml とした. 尚, 塩析効果のために加える硫酸ナトリウムは 1—10 w/v% の間で検討したが, けい光強度への影響はなかった.

3. 抽出溶媒と抽出率

前述の定量操作法において, 抽出溶媒を Table I のように変化させ, けい光強度を測定したところ, ヘキサンや四塩化炭素, 酢酸エチルにはほとんど抽出されないか, または抽出されても非常にけい光強度は低いが, 1,2-ジクロロエタンに最もよく抽出された.

また, 抽出はサーモミキサーにより約 10 秒間の攪拌を 1 回行えば十分であり, その後直ちに分離する.

4. けい光の安定性

けい光強度は, 抽出後 60 分までは安定であるが, その後は徐々にけい光強度が減少し, 90 分後には約 20 %

18) J.T. France, R. Rivera, N. McNiven, I. Dorfman, *Steroids*, **5**, 687 (1967).

19) G.R. Coertz, O.C. Crepy, O.E. Judas, J.E. Longchmpt, M.F. Jayle, *Clin. Chem. Acta*, **51**, 277 (1974).

20) 杉本 功, 沢瀬洋子, 前田四郎, 中川 寛, 石原俊博, 薬剤学, **37**, 94 (1977).

21) J.P. Joseph, J.D. Dusga, S. Bernstein, *Steroids*, **6**, 577 (1976).

Fig. 1. Excitation and Emission Spectra of the Extract from Standard Solution

(a); λ_{ex} 495 nm, (b); λ_{em} 520 nm.

Fig. 2. Working Curve of Dehydroepiandrosterone Sulfate

TABLE I. Effect of the Extracting Solvent on the Fluorescence Intensity

Solvent	Relative fluorescence intensity
Chloroform	40.0
1,2-Dichloroethane	53.0
Dichloromethane	12.4
Carbontetrachloride	0
Benzene	14.0
Ethyl acetate	7.0
<i>n</i> -Hexane	0
<i>n</i> -Heptane	0

TABLE II. Effect of Co-existing Substances on the Recovery of DHEA-S

Co-existing substances	Recovery (%)	Co-existing substances	Recovery (%)
Alanine	100.8	Proline	95.6
Aspartic acid	103.0	Serine	101.4
Arginine	100.2	Threonine	102.6
γ -Aminobutylic acid	101.0	Tryptophan	101.2
Cysteine	99.7	Tyrosine	103.1
Citrulline	96.4	Glucose	101.8
Histidine HCl	118.8	Chondroitin sulfate	100.8
ϵ -Aminocaproic acid	101.7	BSA (30 times)	102.1
Glycine HCl	125.2	Gelatin	100.3
Glutamic acid	99.7	Urea	93.2
Isoleucine	100.8	Uric acid	97.2
Lysine HCl	115.1	Taurine	100.8
Methionine	107.4	Creatin	100.2
Ornithine HCl	118.5	Creatinine	105.4
Phenylalanine	101.9		

減少する。したがって抽出後 60 分以内に測定することが望ましい。

5. 検量線

以上の結果を基にして前述の定量操作法を定めた。至適条件下での DHEA-S の検量線は Fig. 2 に示したように 80 ng/ml—1 μ g/ml の間で原点を通る直線性を示した。

TABLE III. Effect of Co-existing Substances on the Recovery of DHEA-S

Co-existing substances	Recovery (%)	Co-existing substances	Recovery (%)
NaCl	150.4	Fe ₂ (SO ₄) ₃	96.9
NH ₄ Cl	122.4	MgSO ₄	101.8
KCl	128.9	MnSO ₄	96.8
CaCl ₂	123.6	ZnSO ₄	91.1
ZnCl ₂	124.1	CuSO ₄	94.9
KNO ₃	253.4	Na ₂ SO ₃	105.4
NaNO ₃	260.9	KH ₂ PO ₄	100.0
Al(NO ₃) ₃	265.5	Ammonium acetate	100.3
Pb(NO ₃) ₂	245.2	Ammonium sulfate	104.5
NaNO ₂	107.0	Citric acid	106.8
KCNS	283.7	Sodium citrate	105.1
KI	286.9	Sodium acetate	103.2
KBr	198.1	Sulfamic acid	111.2
Al(CH ₃ COO) ₃	106.4	Sulfanylic acid	109.4
Hg(CH ₃ COO) ₂	101.7	<i>p</i> -Toluenesulfonic acid	252.7
		ABS-Na	298.8

TABLE IV. Determination of DHEA-S in Human Urine

Sample	A	B	C	D	E
Found (μg/ml)	0.282	0.260	0.316	0.308	0.238
DHEA-S (μg/ml) ^{a)}	9.42	8.67	10.5	10.27	7.93
<i>n</i>	6	5	5	6	6
c.v (%)	3.49	6.81	2.07	6.49	3.86

Recovery of DHEA-S from Human Urine

Sample	A	B	C	D	E
Found (μg/ml)	0.566	0.567	0.613	0.585	0.548
<i>n</i>	5	5	5	5	6
c.v. (%)	2.90	2.31	1.74	1.50	2.07
Recovery (%)	94.6	102.9	98.9	92.3	103.3

$$a) \text{ DHEA-S } (\mu\text{g/ml}) = \text{found } (\mu\text{g/ml}) \times \frac{1}{0.5 \times 5/50 \times 3/5}$$

また、精度は 0.5 μg/ml で c.v 1.05% (*n*=10), 1 μg/ml で c.v 1.51% (*n*=10) で満足できるものであった。

6. 共存物質の影響

生体試料の定量時に共存する物質について DHEA-S 1 μg に対し、各化合物を 1000 倍共存させた時の DHEA-S の回収率を求めた。Table II からわかるように、遊離のアミノ酸類では影響なく、塩酸塩ではプラスの影響を与える。これは Table III に示したように塩素イオンの影響によると思われる。

グルコースやコンドロイチン硫酸、BSA (30 倍共存)、クレアチン、尿素などには影響されない。

Table III は各種イオンについての影響を示したもので、塩化ナトリウムをはじめ塩素イオン、硝酸イオン、チオンアン酸イオン、ハロゲンイオンは何れも影響する。亜硝酸イオン、硫酸および亜硫酸イオン、リン酸、酢酸イオンは影響しない。また、トルエンスルホン酸やアルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムは構造の類似性から、当然強い影響を与える。

7. 尿中 DHEA-S の定量および添加回収実験

Table IV に本法での 5 人の正常人の尿について分析した結果および、これらの尿への添加回収実験の結果を示した。

尿 1 ml 中の DHEA-S の値は 7.93—10.27 $\mu\text{g/ml}$ で、正常値として報告されている値²²⁾ とよく一致する。

また、これらの尿に DHEA-S, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ を添加した時の回収率は 92.3—103.3% で c.v は 1.5—2.9% とよい再現性を示し、尿中排泄量の測定に十分適用できる。尚、正常尿について、色素溶液を加えずに同様操作した有機層のけい光は認められなかった。

22) 北村元仕編, “実践臨床化学”, 医歯薬出版, 東京, 1973, pp. 507—508.

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
98 (11) 1560—1565 (1978)

UDC 547.574.3.04.09 : 615.277.3.011.5.015.11

環状ヒドラジド構造を含む複素環化合物の合成とその抗腫瘍性について

林 英作, 東野武郎, 大石悦男, 飯島千穂子, 山岸政昭, 太田千栄子, 三輪良雄,
中島厚子, 岩田茂子,^{1a)} 大峰美保子, 津田季子, 大平ヤス子,
星 昭夫, 樽谷和男^{1b)}

静岡薬科大学,^{1a)} 国立がんセンター研究所^{1b)}

Syntheses and Anti-tumor Activity of *N*-Heterocyclic Compounds Having the Cyclic Hydrazide Structure

EISAKU HAYASHI, TAKEO HIGASHINO, ETSUO ÔISHI, CHIHOKO IJIMA, MASAOKI
YAMAGISHI, CHIEKO ÔTA, YOSHIO MIWA, ATSUKO NAKAJIMA, SHIGEKO
IWATA^{1a)} MIHOKO OHMINE, SUEKO TSUDA, YASUKO OHHIRA,
AKIO HOSHI, and KAZUO KURETANI^{1b)}

Shizuoka College of Pharmacy^{1a)} and National Cancer Center Research Institute^{1b)}

(Received June 8, 1978)

Compounds possessing a cyclic hydrazide structure in their molecule, 2-amino-3-phenyl-1(2*H*)-isoquinolinone (*I*₁), 3-amino-2-(4-methoxyphenyl)-4(3*H*)-quinazolinone (*II*₁), 5-amino-1,5-dihydro-1-phenyl-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one (*III*₁), 5-amino-1,5-dihydro-1-(2-pyridyl)-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one (*IV*₁), and 30 kinds of their derivatives were synthesized for antitumor screening. It was found that 5-(benzoylamino)-1,5-dihydro-1-phenyl-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one (*III*₅) possessed an anti-tumor activity against Sarcoma-180A.

Keywords—cyclic hydrazide; 2-amino-1(2*H*)-isoquinolinone derivatives; 3-amino-4(3*H*)-quinazolinone derivatives; 1-substituted 5-amino-1,5-dihydro-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one derivatives; syntheses; Sarcoma-180 A; anti-tumor activity

環状ヒドラジド構造 (A) を分子内に含む 2-amino-1(2*H*)-isoquinolinone (*I*), 3-amino-4(3*H*)-quinazolinone (*II*), 1-置換-5-amino-1,5-dihydro-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one (*III*) を母核とする 30 種類の誘導体を合成し, Sarcoma-180 A を用いて抗腫瘍性のスクリーニング試験を行った。

I の系列の化合物としては 2-amino-3-phenyl-1(2*H*)-isoquinolinone (*I*₁) とその誘導体で, *I*₁ は H. Wölbling の方法²⁾ により deoxybenzoin-2-carboxylic acid (*I*_a) をヒドラジンによって閉環して合成し, その誘導体の合成法は既に報告した。³⁾ *II* の系列の化合物としては 3-amino-2-(4-methoxyphenyl)-4(3*H*)-quinazolinone (*II*₁) と

1) Location: a) 2-2-1, Oshika, Shizuoka-shi, 422, Japan; b) 5-1-1, Tsukiji, Chuô-ku, Tokyo 104, Japan.

2) H. Wölbling, *Ber.*, 38, 3845 (1905).

3) 林 英作, 山岸政昭, 薬誌, 94, 1322 (1974).