

ピラチンアミドに関する研究 (I)

ピラチンアミド経口投与後の血中濃度定量法

丸 山 素 弘

三共高峰研究所

(昭和 31 年 6 月 14 日受付)

緒 言

ALLEN 等¹⁾はピラチンアミド ($PzNH_2$) を経口投与すると血中に $PzNH_2$ と共にその加水分解物ピラチン酸 ($PzOH$) が出現する事を認め、之を分離定量するために血液の除蛋白遠沈上清を弱塩基性イオン交換樹脂 De-Acidite anion exchange resine の column を通じて $PzOH$ のみを吸脱着し、硫酸第一鉄アンモン (MOHR's salt) で顕色後比色定量した。一方、 $PzNH_2$ は加水分解後同様に操作し $PzOH$ として定量した。その後、 $PzNH_2$ の顕色剤として $CoCl_2^{2)}$ 、 Na -nitroprusside³⁾、 Na -pentacyanoamineferoate³⁾、dimethylaminobenzaldehyde³⁾ 等が報告されているが、之等を用いて血中の $PzNH_2$ 或は $PzOH$ を定量した報告はまだない。

ALLEN 等の用いた De-Acidite resine は本邦で市販されておらず入手しがたいので、入手容易な樹脂の検討を行ない、Amberleit 1 R 4 B (AG) を用い条件の若干を変更すれば ALLEN の方法に勝る結果が得られる事を見出した。又同樹脂を使用する事によつて顕色剤に MOHR's salt のみでなく Na -nitroprusside も用いる事が可能で ALLEN 法以上の微量濃度が定量出来る事を認めた。ALLEN 法の定量条件には厳密を欠く点も認められたので、それ等の検討も加えて得られた結果を報告する。

試 薬

(I) 血液処理試薬。1) 10% タングステン酸ソーダ 2) 10% 硫酸 3) 20% 塩化バリウム 4) 50% 苛性カリ

(II) 脱着液 0.5 N HCl

(III) 顕色試薬

MOHR's salt 顕色試薬。1) pH 4.8 塩酸-枸橼酸ソーダ緩衝液 2) 5% 硫酸第一鉄アンモン緩衝液(用時調整)

Na -nitroprusside 顕色試薬。1) 0.2% Na -nitroprusside 2) 10% 炭酸ソーダ

(IV) 樹脂その他。1) Amberleit 1 R 4 B (AG) 2) パームチット法 B_1 定量用置換筒(夏目製作所製) 3) Beckmann spectrophotometer 或は日立製 EPV spectrophotometer

定 量 法

1° 血液処理方法。内容 15 ml 程度の共栓付遠沈管 2 本に脱繊維した血液各 1 ml を採り、夫々に水 3 ml、タングステン酸ソーダ液 1 ml、硫酸 2 ml を順次添加してその都度よく混和する。遠沈して上清を分ち更に 3 ml の水で 2 回洗滌遠沈を繰返し前の上清に合せる。塩化バリウム水溶液 2.5 ml を添加遠沈して硫酸根を完全に除きその上清の pH を 7~8 に併せる。併行実験中の 1 本は直ちに下記操作を行ない、 $PzOH$ (I) を、他の 1 本は KOH 溶液 1 滴を添加、100°C の oven 上に 1 時間加熱して $PzNH_2$ を完全に $PzOH$ に水解してから pH を整え同様に操作して $PzOH$ と $PzNH_2$ の総量 (II) を定量する。(II) (I) の差から $PzNH_2$ の濃度を算出する。

2° $PzOH$ の分離及び比色定量

Amberleit 1 R 4 B (AG) を乳鉢中で磨砕し 50~100 mesh のものを篩別し、之を内径約 0.9 cm の置換筒に約 8 cm 充填する。 $N/2$ HCl でよく洗滌後蒸留水で洗い Cl 型の樹脂として、pH 7~8 に調整した検液を通過せしめついで 15 ml の水で 3 回洗滌を行なう。此の操作によつてその後の発色操作に影響する血液成分及び $PzNH_2$ は除去され、 $PzOH$ のみが樹脂層に残る。更に $N/2$ HCl 30 ml を通過すると $PzOH$ は完全に脱着される。脱着液を内容 50 ml の三角コルベンに取り、 N -NaOH で pH 6~10 に調整した後 oven 上で蒸発乾涸する。尚流速は総て 5 ml/cm²/min.程度とし各段階は連続的に行ない樹脂層に空気が混入しない様に注意する必要がある。蒸発残渣を pH 4.8 の枸橼酸緩衝液 4.5 ml に溶かした後 MOHR's salt 0.5 ml を添加して顕色せしめ λ 480 m μ の吸光度を水を対照として測定する。或は蒸発残渣を水 5 ml に溶かし Na -nitroprusside、 Na_2CO_3 水溶液各 1 ml を添加して 40°C の恒温槽に 5 分間保ち暗所に 15 分間放置して顕色せしめた後 λ 475 m μ の吸光度を盲検を対照として測定する。予め既知量の $PzOH$ を添加した血液について同様に処理し検量曲線を求め之に内挿或は外挿して $PzOH$ の濃度を求める。

定量条件の検討

1° 血液処理液中に硫酸根が残っていると $PzOH$ の樹脂への吸着を阻害する。従つて $BaCl_2$ は少々過剰に添加する必要があり ALLEN の条件¹⁾では不十分である。

Table 1 脱着剤の検討

脱着剤	流速 流下液/分 脱着剤濃度	1.25 ml/ cm ² /min.				2.5 ml/ cm ² /min.				5.0 ml/ cm ² /min.				10.0 ml/ cm ² /min.			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
HCl	0.1N	0	81	18	1	2	80	17	1	21	69	26	4				
	0.2N	74	24	2	0	55	41	4	0	32	63	5	0				
	0.5N	89	11	0	0	89	11	0	0	90	10	0	0	70	23	7	0
	1.0N	95	5	0	0	95	5	0	0	89	10	1	0	83	14	3	0
	2.0N	96	4	0	0	95	5	0	0	91	7	1	0	87	13	0	0
NaOH	1.0N	55	42	3	0	53	48	4	0	46	44	6	4				
	2.0N	63	34	3	0	57	38	5	0	52	38	10	0				
	3.0N	93	6	1	0	95	21	7	0	72	21	7	0				
NaCl	1.0N	7	53	21	2	9	39	21	8	9	24	16	8				
	2.0N	23	54	15	0	23	60	10	0	25	50	16	4				
	3.0N	50	40	10	0	44	49	6	0	48	40	12	0				

500 mcg の PzOH を吸着せしめた後、各種脱着剤で処理。

流下液 10ml 毎に脱着された PzOH を定量し、吸着量に対する % で示した。

又検液通過後樹脂層の水洗を充分に行なわないと脱着液に Ba⁺⁺ が混入し顕色の際 BaSO₄ の白濁を生じ定量の妨害となる。

2° Amberleit 1 R 4 B (AG) の市販品は稍粗大に過ぎるので前述の様に調整する。HCl, 水, NaHO, 水で順次洗滌して樹脂中の夾雑物による発泡が完全になくなる迄繰返す。

3° PzOH の吸着はかなり容易に行なわれ 10 ml/cm²/min. でも完全に行なわれる。脱着条件を検討するために pH 7~8 に調整した既知量の PzOH 水溶液を樹脂層に通過して吸着させ、水洗後各種流速の下に各種濃度の NaCl, NaOH, HCl 水溶液で脱着を行ない脱着液 10 ml 毎に含まれる PzOH を定量し、その結果を Table 1 に示した。NaCl は最も劣り実用上採用出来ない。NaOH は NaCl, HCl の中間の効果を示した。又 NaOH を使用すると樹脂が OH 型となり吸着を行なうためには之を再び Cl 型に再生しなければならないので不都合である。HCl は最も勝れ N/10 でも目的を達する事が可能であるが安全のために N/2, 30 ml 流速略 5 ml/cm²/min. を脱着条件とした。此の条件下では PzOH の吸着量を 5,000 mcg としても完全に脱着が行なわれる。

4° 脱着液は pH 6~10 に調整後蒸発乾涸する。pH 6 以下になると恐らく昇華分解等起因すると考えられる分析値の低下が認められ、誤差の重大な原因となる。此の意味で ALLEN 等が指定している“pH 4~7 として蒸発乾涸する”条件は不適当である。水溶液中で MOHR's salt 顕色を行なうと液の pH がアルカリに傾くに伴い Fe(OH)₂ の沈澱が生じ定量の障害となる。之を避けるために ALLEN 等は上記条件を採つたものと思

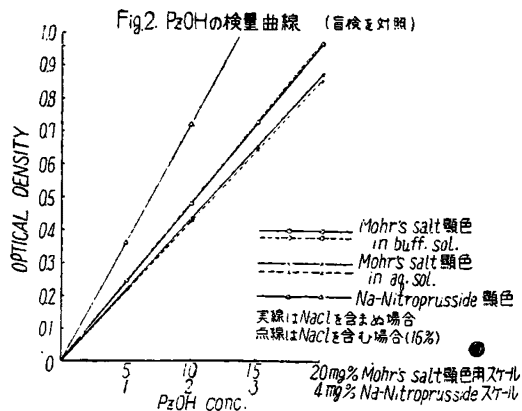
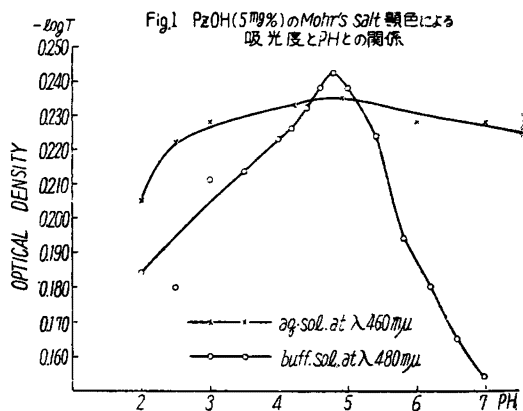
われる。私は此の点を解決するために SÖRENSEN の枸橼酸緩衝液中で顕色を行なう方法を採用した。此の条件の変更により他にも 2, 3 の利点が見られるが此の点については後述する。

5° 顕色条件の検討

1) MOHR's salt 顕色法

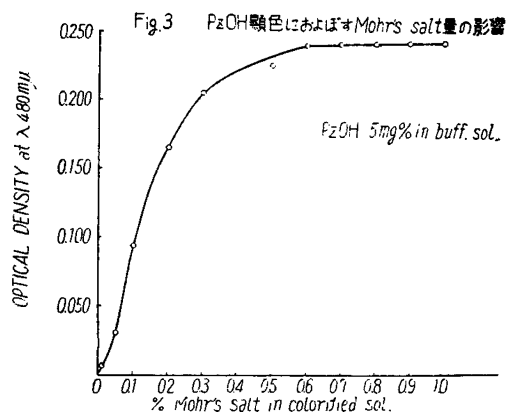
a) 溶出液に水、緩衝液の何れを用いても pH 4.8 附近に E_{max} があり此の点を離れるに従い吸光度を減ずる (Fig. 1 参照)。此の傾向は緩衝液中に於て殊に顕著である。又両者共 pH の増加に伴い E_{max} は長波長側に移動する。HCl 脱着液は pH 6~10 として蒸発乾涸す

るので溶出に水を用いるとその pH が 8 以上となり MOHR's salt 添加によつて Fe(OH)₂ の沈澱を生じ易い。pH を 6~7 に保つて蒸発乾涸すれば解決不可能ではないが処理検体数が多い時にはかなり面倒である。水



溶液の $\lambda_{\max}$ は $460\text{ m}\mu$ にあるが緩衝液では $\lambda 480\text{ m}\mu$ 附近に移動しその吸光度は約 10% 増加する。両者共 BEER の法則によく適合し盲検値も略等しい (Fig. 2 参照)。緩衝液使用上の欠点は吸光度が pH の変化に比較的鋭敏に感ずる点である。實際上 pH 4.6~5.0 に於ける吸光度は略一定とみなし得るが緩衝液の調整には pH meter を用い充分注意せねばならない。

b) PzOH の吸光度は顕色液中の MOHR's salt の濃度が 0.5% に達する迄は濃度の増加に伴つて増加するが以後は略一定となる (Fig. 3 参照)。ALLEN 等は結晶 2~3 個を加える様に指示しているが此の表現は曖昧であり不適当である。



c) 脱着液を NaOH で中和する結果溶出液には NaCl が約 16% 含まれる。発色を水溶液中で行なうと NaCl の存在によつて盲検値は NaCl を含まない盲検値よりやや増加し、 PzOH による吸光度はやや減少する。緩衝溶液の場合は之と全く逆の関係になる (Fig. 2 参照)。

d) 安定性 緩衝液中の色調は 6 時間以上安全で殊に NaCl が含まれると 10 時間以上変化しない。 $\lambda 480\text{ m}\mu$ に於ける盲検値の変化もその間事実上無視出来る。水溶液を用いると PzOH の顕色は略 2 時間安定に保た

れるが盲検値はその間次第に増加する。緩衝液中で顕色せしめた場合、約 50 cm の距離から 100 W 電燈光を照射したが色調に影響は認められなかった。

2) Na-nitroprusside 顕色法

本顕色法については掛見等の報告³⁾があるので詳細は省略し血中濃度定量に関する部分についてのみ記す。同顕色による $\lambda_{\max}$ は $\lambda 475\text{ m}\mu$ にあり盲検値は MOHR's salt 顕色の略 5 倍であり経時的变化も著しい。従つて定量に当つては盲検を対照として吸光度を測定する事が望ましい。又若干吸光度は減ずるが $\lambda 495\text{ m}\mu$ 附近の波長を用いて測定すると色調の不安定に基づく誤差を相当減少せしめる事が出来る。併し此の附近では波長の変化に伴い吸光度も著しく変化するから厳密に常に一定波長を用いる必要がある。Na-nitroprusside は血液中の種々の成分によつて顕色し、且つ PzNH_2 , INAH によつても顕色する。併し前記の如く Amberleit 処理を行なう事によつて之等定量妨害物の影響を除き得るので MOHR's salt 同様に血中 PzOH , PzNH_2 定量に利用出来る。本法による PzOH の顕色は MOHR's salt による場合の約 8 倍 (Fig. 2 参照) の吸光度を示すから、安定性に注意すれば血中濃度定量の如き微量定量には MOHR's salt 顕色より遙かに勝れた結果が得られるが、特に高濃度に含まれている事が明らかな場合には安定性の点からみて MOHR's salt 顕色の方が勝れている。定量限界濃度は MOHR's salt 顕色法で略 10 mcg/ml, Na-nitroprusside 顕色法で 2.5 mcg/ml 程度である。勿論 1 回の分析に用いる血液量を増せば更に微量検出が可能である。

文 献

- 1) ALLEN, W. S., et al.: Anal. Chem. 25 895 (1953)
- 2) 青木, 他 薬学研究 27 773 (1955)
- 3) 掛見, 他: 薬誌 76 273 (1956)