

## Thiamphenicol の体液中濃度測定法

有田隆一・堀 了平・上杉 孝・片山幸一

北海道大学薬学部

(昭和 44 年 5 月 1 日受付)

## I. 緒 言

Thiamphenicol は 1952 年 CUTLER 等<sup>1)</sup>により合成された Chloramphenicol の Methylsulfonyl 同族体である。

近年、このものの体内変化、排泄などの体内動態の研究が行なわれて来ているが、適当な化学的定量法および体内変化物との分離定量法についての報告がなく未だ充分な検討が行なわれていない現状にある。

Thiamphenicol (TP) の化学的定量法としては MCCHESNEY 等<sup>2)</sup>の方法があるが精度も充分でなく操作も煩雑である。

今回、著者らはすでに報告した水溶液中の測定法<sup>3)</sup>を体液中濃度測定に応用し簡便でかつ精度の高い測定法を確立したので報告する。

## II. 実 験 法

## (1) 測定法の原理

Thiamphenicol は Chloramphenicol と同様に、 $\text{NaIO}_4$  で酸化をうけ *p*-Methylsulfonyl benzaldehyde を生ずる。この反応はきわめて速く、かつ時間と共にさらに酸化が進み、このため測定に誤差を生じやすいことから、酸化と同時に、生成する Aldehyde を有機層へ転溶する。

次いで有機層中でカルボニル試薬と反応させ比色定量を行なう。

カルボニル試薬としては、Azobenzene phenylhydrazine sulfonic acid (APHS) に着目し、このものが不溶性でかつ不安定であることから、新たに APHS の Diethanolamine 塩を合成し、発色試薬に用いた。

生ずるヒドラゾン は  $415 \mu\text{m}$  に最大吸収を有する安定な黄色々素である。

なお同様の構造を有する Chloramphenicol も同一操作で測定できる。この場合、加水分解は  $\text{N}/2 \text{ NaOH}$  1 ml を用い、 $438 \mu\text{m}$  の吸収を測定する。

## (2) 操 作 法

## i) 試薬および機器

$\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$  (試薬特級) 規定液

1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5)

0.5%  $\text{NaIO}_4$  (試薬特級, 褐色瓶保存)

12% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -MeOH 溶液: 氷冷下 MeOH 50 ml

に  $\text{H}_2\text{SO}_4$  12 ml を徐々に加え MeOH で全量を 100 ml とする。

0.02% APHS 試薬: 下記の方法で調製した APHS-Diethanolamine 100 mg を MeOH に溶解, 全量 500 ml とする。褐色瓶中冷所保存により少くとも 1 週間は使用できる。

APHS-Diethanolamine の合成: 市販もしくは TRÖGER 等<sup>4)</sup>の方法により新たに調製した APHS 2g を EtOH 10 ml に懸濁させ, Diethanolamine 3g, 水 1 ml を加え, 沸騰水浴中すばやく加熱溶解し, 黄色溶液を濾過後, 室温に放置する。析出する結晶を濾取し, 少量の EtOH で洗浄後,  $\text{Et}_2\text{O}$  で 2~3 度洗浄する。MeOH から 1 度再結晶。融点:  $151^\circ$   $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$  Anal. Calcd.: C 48.00; H 5.83; N 17.62; Found: C 48.35; H 5.75; N 17.44

Ethylene Dichloride (EDC), Ethyl Acetate (EtOAc), MeOH: 試薬特級

測定機器: Hitachi Model EPU-2 A spectrophotometer

## ii) 尿中分離定量操作法

総 TP 測定法

サンプル 1 ml,  $\text{N-NaOH}$  2 ml を 25 ml の共栓試験管に取り, 沸騰水浴中 10 分間加熱, 冷却後  $\text{N-HCl}$  3 ml を加え酸性とし EtOAc 5 ml と共に 10 分間振とうする。静置して 2 層に分離後, 有機層約 4 ml を除き, 次いで EDC 5 ml を加え再び 5 分間振とうする。遠心分離 (2,000 rpm, 5 分間) 後水層 5 ml を 25 ml の共栓試験管に移し, リン酸緩衝液 3 ml, EDC 5 ml を加えさらに 0.5%  $\text{NaIO}_4$  3 ml をすばやく加え 10 分間振とう, 酸化, 抽出を同時に行なう。遠心分離 (2,000 rpm, 5 分間) 後, EDC 層 4 ml を 10 ml のメスフラスコに移し, 0.02% APHS 試薬 3 ml, 12%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -MeOH 溶液 1 ml を各々加え良く混和し, 容器にゆるやかに栓をし恒温水浴中  $70 \pm 1^\circ\text{C}$  で 45 分間発色させる。室温にもどした後, MeOH 0.5 ml を加え, 次いで EDC で全量 10 ml とし, その 5 ml を 25 ml の共栓試験管にとり, 4 N  $\text{HCl}$  4 ml と共に 10 分間振とうを行ない過剰の試薬を除く。遠心分離 (2,000 rpm, 5 分間) 後, EDC 層の  $415 \mu\text{m}$  の吸光度を測定する。

別に投与前の尿サンプルを同様に処理したものを対照液とする。

#### TP-deacyl 体の測定法

サンプル 1 ml に N/10 HCl 5 ml を加え EtOAc 5 ml, EDC 5 ml による洗浄を行ない、総 TP 測定法に準じて操作する。

#### 未変化 TP の測定法

サンプル 1 ml を 50 ml の共栓遠沈管にとり、EtOAc 20 ml と N/5 NaOH 2 ml を加え 10 分間振とうし抽出を行なう。遠心分離(2,000 rpm, 5 分間)後、有機層 18 ml を別の共栓遠沈管に移し N-HCl 3 ml を加え再び 5 分間振とうし、混入する TP-Deacyl 体を除く。遠心分離(2,000 rpm, 5 分間)し、有機層 15 ml を 30 ml の

フラスコに移し約 50° で減圧留去する。残渣を N/2 NaOH 5 ml に溶解し、沸騰水浴中 10 分間加熱する。冷後、3 N-HCl 1 ml で酸性とし以下総 TP 測定法と同様に EtOAc, EDC 洗浄, 以下の操作を行なう。

#### iii) 血液中濃度測定法

##### 全血中総 TP の測定法

血液 1 ml に 0.2% サポニン 4 ml を加え溶血させる。次いで 10% ZnSO<sub>4</sub> 1 ml, N/2 NaOH 1 ml の順に加え良く混和し遠心分離 (3,500 rpm, 20 分間) する。上澄液 5 ml を共栓試験管にとり 2 N-NaOH 0.5 ml を加え沸騰水浴中 10 分間加熱し、冷後 3 N-HCl 0.5 ml で酸性とし、以下尿中総 TP 測定法と同様に操作する。

##### 全血中未変化 TP の測定法

Fig.1. Calibration curve of total TP and deacyl-TP (TP equiv.) in urine and bile

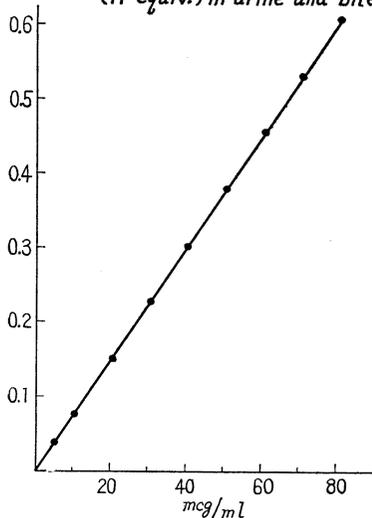


Fig.2. Calibration curve of free TP in urine and bile

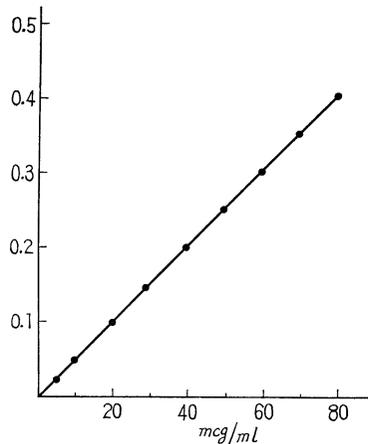


Fig.3. Calibration curve of total TP in blood

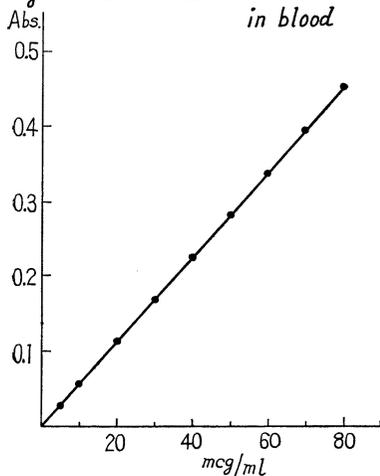


Fig.4. Calibration curve of free TP in blood and plasma

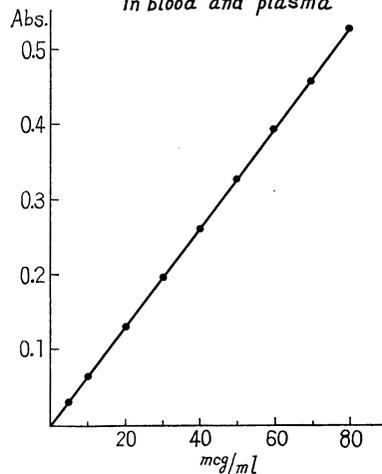


Table 1. Recovery test

Sample (mcg/ml)	% of recovered							
	urine			bile		blood		plasma
	total	free	deacyl	total	free	total	free	free
10	99.8	100.0	103.9	100.0	102.8	98.4	99.5	94.5
20	101.0	94.1	101.0	96.0	—	107.3	102.6	99.8
30	99.5	102.0	99.7	99.6	104.9	101.0	100.5	108.2
40	100.0	101.0	99.6	100.0	—	98.2	100.9	99.1
50	100.5	98.4	101.3	99.3	97.7	101.0	98.6	100.9
80	100.0	99.3	99.5	—	—	99.8	102.4	99.7
Mean	100.1	99.1	100.7	99.0	101.8	101.0	100.8	100.4

Table 2 Urinary excretion of thiophenicol in man

Dose (g)	% of dose excreted in urine in 24 hrs		
	total TP	free TP	deacyl-TP
0.5	57.7 (43.4~72.6)	55.1 (41.1~70.2)	2.08 (1.70~2.31)
1.0	75.5 (68.9~78.9)	68.4 (61.0~72.0)	2.50 (2.40~2.50)

- a) Oral administration  
b) Average values for four men, with the ranges in parentheses

血液 1 ml を 50 ml の共栓遠沈管に取り、0.5% サロニン 1 ml で溶血させる。これに EtOAc 20 ml と N/5 NaOH 1 ml を加え 10 分間振とうし抽出を行なう。遠心分離 (2,000 rpm, 5 分間) 後、有機層 18 ml を取り減圧留去し、以下残渣を尿中未変化 TP の測定法と同様に、加水分解、洗浄、NaIO<sub>4</sub> 酸化、発色などの操作を行なう。

プラズマ中未変化 TP の測定法

プラズマ 1 ml に N/10 NaOH 2 ml を加え EtOAc 20 ml で 10 分間抽出し、以下、前記の全血中未変化 TP の測定操作と同様に行なう。

iv) 胆汁中濃度測定

胆汁中の総 TP と未変化 TP はそれぞれ尿中測定法

に準じて行なう。また TP-Deacyl 体は、すでに報告した<sup>9)</sup>ように、家兎、ラットおよびモルモットの胆汁中にもわずかながら排泄されるが胆汁成分の影響が大きいため、現在のところ測定していない。

検量曲線の作成

総 TP 測定法と未変化 TP の測定法の場合は TP 0.5 ~ 80 mcg 含有の水溶液を調製し使用する。TP-deacyl 体の測定法は TP 100 mg を 2 N-NaOH 5 ml と共に沸騰水浴中 30 分間加熱し、塩酸で中和し水を加えて全量 100 ml としたものを標準溶液として使用し、各々の測定法に従がつて操作し、標準曲線を作成した。Fig. 1~4 に各々の標準曲線を示す。

### III. 定量法の検討

以上の各体液中濃度測定法を確立するに先立ち、加水分解、酸化、発色、抽出等の諸条件および色素の安定性などについての種々の検討を加えずに報告してある<sup>9)</sup>。ここでは上記の方法を用い各々の検体からの回収実験を行なつた (Table 1)。

Table 1 において、ヒトの尿、家兎の血液、プラズマおよび胆汁をそれぞれ検体として用いた。

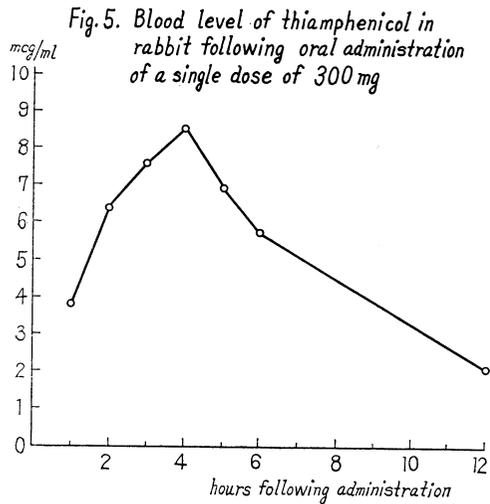
各々の結果からも充分使用し得る測定法であることが明らかである。

### IV. 体液中濃度測定実験

各々の測定法を用い、種々動物における TP 投与時の

Table 3 Biliary excretion of thiamphenicol in various species

Species	No. of animals	Dose (mg/kg)	Route of administration	Time of collection of bile(hr)	% of dose in bile	
					free TP	conj. TP
Rat	(3)	12.5	i. v.	7.0	1.7	21.3
	(2)	100.0	p. o.	24.0	1.5	26.4
Guinea pig	(3)	12.5	i. v.	7.0	0.5	64.4
	(2)	100.0	i. v.	7.0	1.4	50.9
Rabbit	(2)	12.5	i. v.	7.0	0.7	0.1



尿中、胆汁中排泄および血中濃度変化を測定した。

尿排泄は TP 0.5, 1.0 g をヒトに経口投与した場合について示した。胆汁排泄はラット、モルモット、家兎の3種の動物を用い、TPの種々の投与量を経口あるいは静注により投与し未変化 TP および体内変化物の排泄率を測定した。血中濃度変化は家兎について行ない、TPの経口投与時の濃度変化を測定した。なおこの場合、24時間絶食家兎を用いた。

尿排泄の結果は Table 2、胆汁排泄の結果は Table 3、血中濃度変化は Fig. 5 にそれぞれ示した。

ヒトにおける TP の尿中排泄は、すでに 2, 3 の報告から予想されたように、総 TP 量と未変化 TP 量との差がきわめて小さく、わずかながら TP-Deacyl 体の排泄を除いては体内変化物はほとんど排泄されないことがわかった。

胆汁への排泄は、使用した総ての動物において、未変化 TP 量がきわめて少く、特に多量の排泄が見られるラット、モルモットにおいては、その大部分が体内変化物

である。この体内変化物は、先の報告<sup>6)</sup>で、グルクロン酸抱合体であることを胆汁中から単離し構造決定を行ない明らかにした。

家兎血中濃度は、全血中未変化 TP を測定した結果である。

#### 総 括

Thiamphenicol を精度良く、対応するアルデヒドとし、これに APhS-Diethanolamine 塩を反応させる時、安定な黄色々素を生ずる。このことを利用して、簡便にして精度の高い体液中測定法を確立した。なお体液中の定量妨害物質の除去、および体内変化物の分離については溶媒抽出および直接過ヨード酸々化を行なうなどにより精度良く分離測定することができた。

さらに同様の方法を用い体液中の Chloramphenicol も測定することができる。

#### 引 用 文 献

- 1) CUTLER, R. S., STENGER, R. J. & SULTER, C. M.: New antibacterial agents. 2-Acylamino-1-(4-hydrocarbonyl-sulfonylphenyl)-1,3-propanediols and related compounds. J. Am. Chem. Soc. 7: 5475, 1952
- 2) MCCHESENEY, E. W., SHEKOSKY, J. M., ECKERT, H. W. & KOSS, R. F.: Colorimetric determination of dextrosulphenidol and racephenidol. J. Amer. Pharm. Ass. 49: 28, 1960
- 3) 有田隆一, 堀 了平, 上杉 孝, 片山幸一: チオフェニコールの化学的定量法。第15回日本化学療法学会総会 (1967)
- 4) TRÖGER, J. & FRANKE, M.: Archiv. der Pharmac. 244: 302, 1906
- 5) 出内秀人, 真下啓明, 上杉 孝, 堀 了平, 有田隆一: チオフェニコールの体内変化とその胆汁排泄。第16回日本化学療法学会総会 (1968)
- 6) 上杉 孝, 堀 了平, 有田隆一: 医薬品の体内変化と排泄の動態 (第6報)。Chloramphenicol, Thiamphenicol の種々動物における胆汁中体内変化と胆汁排泄の動態。第39回日本薬学会北海道支部2月例会 (1969)

---

COLORIMETRIC DETERMINATION OF THIAMPHENICOL  
IN BIOLOGICAL FLUID

TAKAICHI ARITA, RYOHEI HORI, TAKASHI UESUGI  
and KOICHI KATAYAMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hekaido University

A new colorimetric assay method is described for the determination of thiamphenicol and its metabolites in biological fluid. This method is based upon separation of these substances utilizing the extraction procedure, followed by oxidation of deacylated thiamphenicol and coloration with diethanolamine azobenzenephenylhydrazine sulfonate.

Using this method, the urinary and biliary excretion, and the blood level following administration of thiamphenicol were measured in rats, rabbits, guinea pigs and men.