

高速液体クロマトグラフィーによる尿中ピペミド酸の 定量およびその薬動力学*1

古田知由, 西川三喜男, 鈴木吉成, 山田喜広, 鈴木時紀,
伊藤 譲, 二橋純一, 川影逸郎, 藤井喜一郎
浜松医科大学医学部附属病院薬剤部*2

Determination of Pipemidic Acid in Urine by High Performance Liquid Chromatography and Its Pharmacokinetics*1

TOMOYOSHI FURUTA, MIKIO NISHIKAWA, YOSHINARI SUZUKI,
YOSHIHIRO YAMADA, TOKINORI SUZUKI, YUZURU ITO,
JUNICHI NIHASHI, ITSURO KAWAKAGE, and KIICHIRO FUJII
Hospital Pharmacy, Hamamatsu University School of Medicine*2

(Received January 28, 1985)

A high performance liquid chromatography (HPLC) was used for the determination of urinary pipemidic acid (PPA). PPA was chromatographed as ion pairs with ethanesulphonic acid by use of Finepack SIL C₁₈-10 reverse phase column. The amount of PPA was determined by the peak height ratio. The coefficients of variation at within-run were 1.77% (50 µg/ml) and 2.83% (1200 µg/ml), and at between-run were 8.77% (50 µg/ml) and 3.34% (1200 µg/ml).

The urinary levels of PPA after oral administration of 500 mg to healthy male subjects were measured and pharmacokinetics of PPA were studied. The mean elimination rate constant (k_e) was $0.27 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, biological half-life ($t_{1/2}$) was $2.6 \pm 0.16 \text{ h}$, and the maximal time of the elimination rate (T_{\max}) was $2.5 \pm 1 \text{ h}$. It was confirmed that the urinary levels of PPA determined by this method agree well with those by bioassay.

Keywords—Pipemidic acid; HPLC; Bioassay; Urinary level; pharmacokinetics

緒 言

ピペミド酸(PPA)の体液中濃度は、一般に bioassay により測定されているが、迅速性、精度の点において必ずしも十分とはいえず、特にピペミド酸についてはそのことが指摘されている。¹⁾ そこで、HPLC によるピペミド酸の分析の報告はなされていないが、操作の簡便さ、精度の点から HPLC を選択し、ピペミド酸の尿中濃度定量法を検討、確立し、さらに投与後の体内動態について解析したので報告する。

実 験 の 部

1. 試料および試薬

ピペミド酸三水合物は大日本製薬株式会社より提供を受けた。ピペミド酸製剤はドルコール® 250 mg 錠を用いた。エタンスルホン酸は Aldrich 製特級試薬、その他はすべて試薬特級を用いた。

2. HPLC 法

試料の前処理法および HPLC の分析条件は Fig. 1 に示すように、尿 1 ml に 1% 酢酸溶液 1 ml を加えて攪拌し、内部標準として 300 µg/ml のパラヒドロキシ安息香酸メチル 2 ml を加えた。30 秒攪拌後、3000 rpm で 5 分間遠沈し、上清をろ過して 10 µl を HPLC に注入した。

*1 日本薬学会第 104 年会(仙台, 1984年)病院薬学部会で発表。

*2 浜松市半田町 3600 ; 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, 431-31 Japan

3. 対象および実験方法

被験者はすべて健康成人男子である。被験者は実験前に朝食を絶食し、水 200 ml とともにピペミド酸 250 mg

Urine 1 ml
 ← 1% acetic acid 1 ml
 mix. 5 sec
 ← methyl p-hydroxybenzoate/CH₃CN
 2 ml (I.S.)
 mix. 30 sec
 c.f.g. 3,000 rpm, 5 min
 filt. 0.45 μm membrane filter

HPLC

Column : Finepack SIL C₁₈-10, 46φ×250 mm
 Instrument : Nihonbunko TRI ROTAR III pump
 UVIDEC-100-III detector (274 nm)
 Mobile phase : 15 mM C₂H₅SO₃H in 1% CH₃COOH/
 THF (95/5)
 Flow rate : 2.5 ml/min
 Injd. volume : 10 μl

Fig. 1. Assay Procedure for Urine Samples by HPLC

を含む試料錠剤 2 個、計 500 mg を服用し、服用後 4 時間は飲食物を摂取しなかった。服用直前、服用後 1, 3, 5, 7, 9, 12 時間までの尿を採取し、測定まで -20°C で凍結保存した (Table 2)。

結果および考察

1. 前処理の検討

試料は、水溶性有機溶媒を加えて精製した。すなわち、尿に対して 2 倍量のアセトニトリルを加えて遠沈し、その上清を試料とする簡単、迅速な方法で十分であった。

2. HPLC 条件の検討

ピペミド酸は、カルボキシル基に pK_a 5.57, ピペラジル基に pK_a 8.71 の解離定数を持つ両性化合物であるので、イオン対による逆相分配クロマトグラフィーを検討した。イオン対形成試薬として 15 mM エタンサルホン酸の 1% 酢酸溶液、カラムは Finepack SIL C₁₈-10 を用いた。移動相の有機溶媒はメタノール、アセトニトリルよりもテトラヒドロフランを用いた場合の方がピペミド酸のピークはシャープであった。したがって、テト

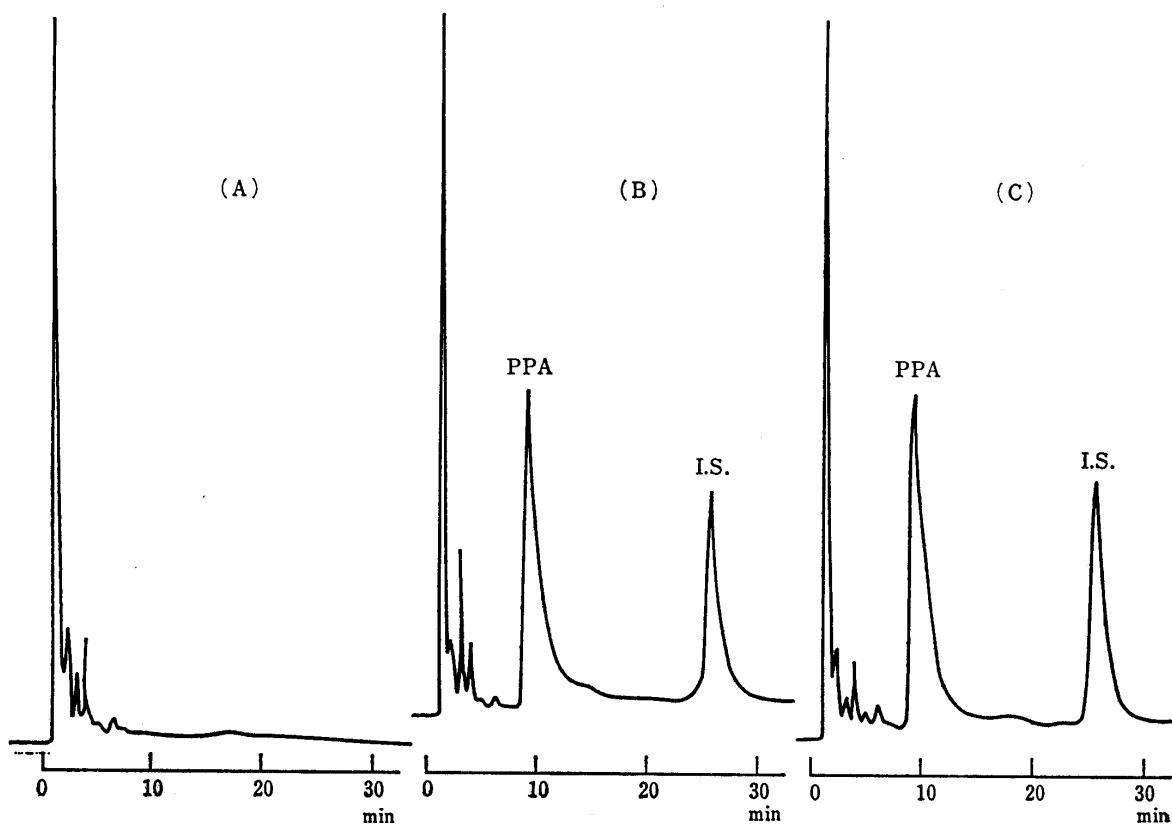


Fig. 2. Chromatogram of PPA

(A) blank urine, (B) urine containing 100 μg/ml of PPA and 150 μg/ml of methyl p-hydroxybenzoate (I.S.), and (C) urine after oral administration of 500 mg of PPA

ラヒドロフランと 15 mM エタンスルホン酸の 1% 酢酸溶液の混合比率を変えてピペミド酸、内部標準およびブランクのピークの分離能を調べた結果、テトラヒドロフランの比率が 5% のとき最もよいクロマトグラムが得られた。なお検出波長は 274 nm を用いた。

尿ブランク、ピペミド酸添加尿、ピペミド酸投与後の尿を本法で分析したときのクロマトグラムの例を Fig. 2 に示す。

3. 検量線

ヒトの尿 1 ml にピペミド酸の 50, 100, 200, 400, 800, 1200 $\mu\text{g/ml}$ の標準溶液をそれぞれ 1 ml 添加し、実験の部で述べた方法で HPLC 分析を行った結果、少なくとも実験の濃度範囲内では、濃度(x)とピーク高さ比(y)の間に良好な直線関係が得られた (Fig. 3)。

測定精度の検討は、尿 1 ml にピペミド酸の 50, 1200 $\mu\text{g/ml}$ の標準溶液をそれぞれ 1 ml 添加した試料を繰り返し分析して行った (n=5)。いずれの場合も変動係数は小さく測定精度は良好であった (Table 1)。

4. 試料の分析

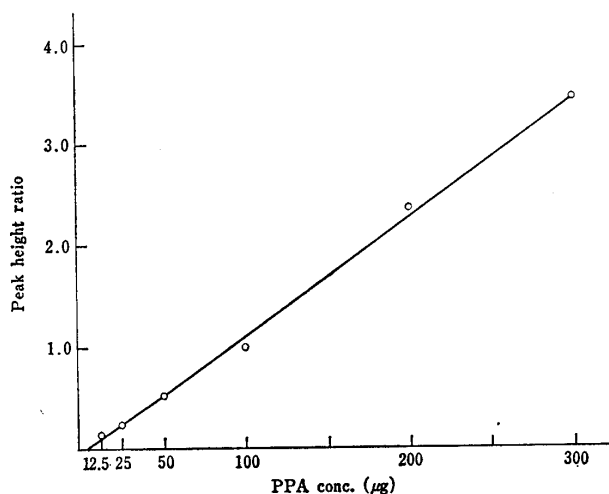


Fig. 3. Standard Curve of PPA

$$y=0.0119x-0.0902, r=0.999$$

健常な成人男子 4 名の被験者にピペミド酸 500 mg を服用させ、服用直前、服用後 1, 3, 5, 7, 9, 12 時間までの尿中濃度を HPLC 法と bioassay 法で測定した。Bioassay 法は、大日本製薬株式会社に依頼し、*Escherichia coli* Kp を指示菌とする薄層カップ法で行った。

ピペミド酸はほとんど未変化体で尿中に排泄されることから、¹⁾ 未変化体量を測定した。その結果、服用後 12 時間までの累積排泄量は、HPLC 法では 322 mg, bioassay 法では 312 mg であり、累積排泄率は 64% および 63% であった。この時、両定量法間における測定値のバラツキは非常に小さく、良好な一致性が認められた (Fig. 4, 5)。

また、ピペミド酸の尿中排泄速度—時間曲線を Fig. 6

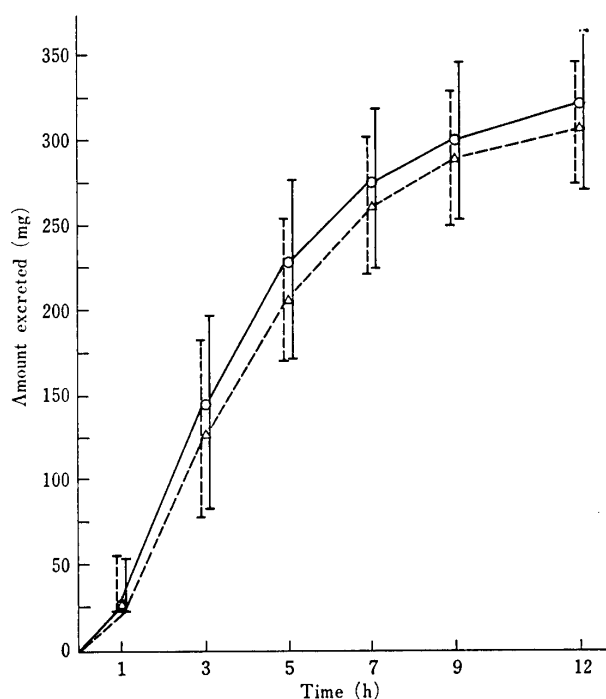


Fig. 4. Cumulative Urinary Excretion of PPA

○—○ : HPLC, △……△ : Bioassay, mean \pm S.D. n=4

Table 1. Precision of Assays for PPA in Urine

Added (μg)	Within-run (n=5)		Between-run (n=5)	
	Found (μg)	C.V. ^{a)} (%)	Found (μg)	C.V. ^{a)} (%)
50	62.3	1.77	59.3	8.77
1200	1170	2.68	1190	3.43

a) Coefficient of variation

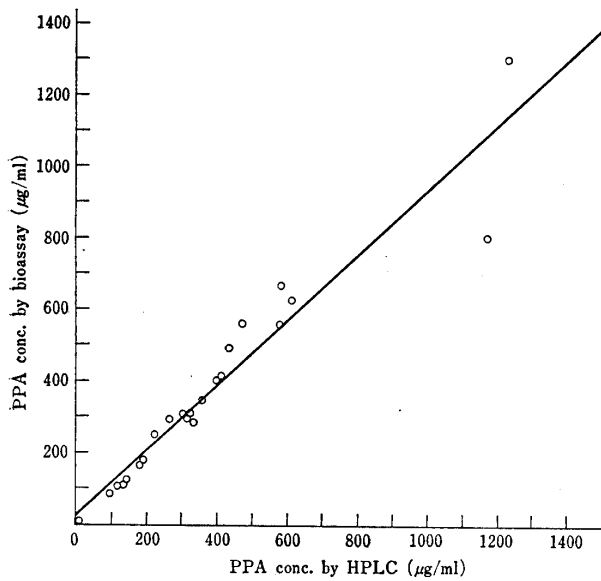


Fig. 5. Correlation between PPA Concentrations Determined by HPLC and Bioassay
 $y=0.912x+28.5$, $r=0.959$, $n=24$
 $(p < 0.01)$

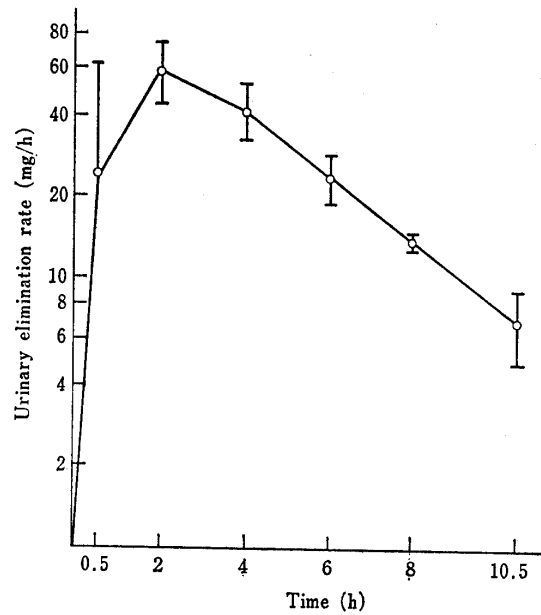


Fig. 6. Urinary Elimination Rate of PPA
 mean \pm S.D. $n=4$

Table 2. Pharmacokinetic Parameters of PPA

Volunteer	Age (years)	Sex	Weight (kg)	Urinary elimination rate (mg/h)						Ke (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	T _{max} (h)
				Time (h)								
				0.5	2	4	6	8	10.5			
1	29	M	52	55	76	46	22	13	7.3	0.27	2.6	2
2	24	M	48	0	54	46	26	15	6.7	0.29	2.4	2
3	35	M	54	40	65	28	19	14	4.7	0.27	2.6	2
4	30	M	54	0	41	48	30	15	10	0.25	2.8	4
Mean				24	59	42	24	14	7.2	0.27	2.6	2.5
\pm S.D.				28	15	9.4	4.8	0.96	2.2	0.02	0.16	1

に示したが、その消失過程からピペミド酸の体内動態を one compartment open model を用いて解析した。³⁾

消失速度定数 k_e 、生物学的半減期 $t_{1/2}$ 、最高排泄速度を示す時間 T_{max} は、Table 2 に示したように各種パラメーターの個体差によるバラツキは非常に小さくなった。同様な服用計画で血中濃度を測定した文献^{1,2)}より測定値を解析すると、 k_e は $0.15-0.30h^{-1}$ 、 $t_{1/2}$ は $2.3-4.7h$ となり、尿中濃度からの解析値との関連性が認められた。

結 論

HPLC 法によるピペミド酸の尿中濃度定量法を検討

し、尿中濃度測定を行い、one compartment open model で薬動学的パラメーターを解析した。

簡単な前処理方法でピペミド酸を分離でき、再現性、迅速性ともにもすぐれた測定条件を見出すことができた。また本法と bioassay 法との相関性はきわめて良好であった。さらに、本法により得られた尿中濃度測定値より薬動学的パラメーターを算出することができた。

なお、追加実験により、本法で使用した内部標準をアミノ安息香酸エチルにすることにより、測定時間を短縮できることが判明した。

謝辞 本研究でピペミド酸三水和物の提供、ならびに bioassay 法による試料の測定に協力していただいた大

日本製薬株式会社に感謝します。

引用文献

- 1) 清水喜八郎ほか: Chemotherapy, 23, 2707 (1975).
- 2) 上田 泰ほか: Chemotherapy, 23, 2798 (1975);
- 3) 中川圭一ほか: Chemotherapy, 23, 2820 (1975);
石川俊次ほか: Chemotherapy, 23, 2906 (1975);
金尾昌明ほか: Chemotherapy, 23, 2935 (1975);
鈴木恵三ほか: Chemotherapy, 23, 3025 (1975).
後藤 茂: “臨床薬物速度論序説,” 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1979.

劇 胆汁分泌促進剤

スルファレム錠

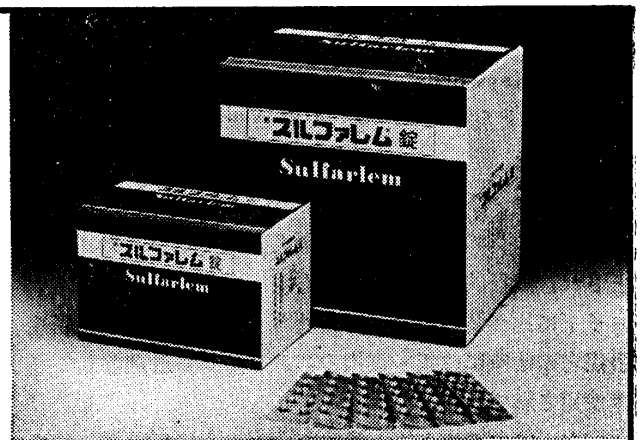
アネトールトリチオン 12.5mg/錠 含有

〔適応症〕 下記疾患における利胆
胆道（胆管・胆のう）系疾患及び胆汁うっ滞を伴う肝疾患

〔用法用量〕 アネトールトリチオンとして通常成人1回25mgを1日3回経口投与
年齢・症状により適宜増減

〔薬理作用〕 (1) 催胆作用
(2) 肝機能賦活作用（血中GSH値上昇/色素排泄能促進/尿素合成能促進/肝コレステロール量調整）

薬理作用の詳細及び使用上の注意については製品添付文書をご参照下さい。



〔包装〕 1,200錠 6,000錠
(PTP) 10錠×120 10錠×600

◇同一成分製剤にスルファレム丸(12.5mg/丸)があります。

規制区分：劇薬

薬価基準収載品

製造 東菱薬品工業株式会社
東京都千代田区有楽町1-10-1

提携 ラテマ社(フランス)

販売元



扶桑薬品工業株式会社
大阪市東区道修町2丁目50番地