

高速液体クロマトグラフィーによるウマ血しょう及び尿中フェニルブタゾンとその代謝物の定量

篠原達美[®]，石高 治，田中恒夫，百瀬 篤*

(1985年10月11日受理)

ウマ血しょう及び尿中のフェニルブタゾン及び代謝物のオキシフェンブタゾン， γ -ヒドロキシフェニルブタゾンの高速液体クロマトグラフィーによる定量法を検討した。抽出溶媒はジクロルメタン又はベンゼンを使用した。カラムは Cosmosil 5C₁₈ を用い，移動相は血しょうの場合，アセトニトリル-水-酢酸 (55:42:3, v/v)，尿では (49:48:3, v/v) を使用し，流速 1.0 ml/min，検出は 254 nm で行った。内標準物質はメテノロンを使用した。この移動相中では γ -ヒドロキシフェニルブタゾンからカプロラクトン体への異性化が起こるが，これは試料を少量のトリエチルアミンを含む溶液に溶解することにより防止できた。検量線は3者とも血しょうで 40 μ g/ml，又尿では 160 μ g/ml まで直線性を示した。日内及び日差変動は血しょう，尿とも各々 2% 程度と良好であった。この方法をフェニルブタゾン投与ウマ血しょう及び尿中の各代謝物の濃度測定に応用した。

1 緒 言

フェニルブタゾン (4-ブチル-1,2-ジフェニル-3,5-ジオキソピラゾリジン) (以下 PBZ と略記) は Stenzl¹⁾ により合成された非ステロイド性抗炎症・解熱鎮痛薬であり，ヒトはもとより広く獣医領域でも繁用されており，競走馬ではてい葉炎，関節炎あるいは各種せん痛の治療に用いられている。

ウマにおける PBZ の代謝はヒト²⁾ とほぼ同じであり，フェニル基又は側鎖ブチル基が水酸化を受けたオキシフェンブタゾン (以下 OPBZ と略記) 及び γ -ヒドロキシフェニルブタゾン (以下 HPBZ と略記) の2種の生理活性代謝物 (Fig. 1) が知られている³⁾。今回，著者らは PBZ のウマにおける体内動態を調べる目的で，ウマ血しょう及び尿中の PBZ，OPBZ 及び HPBZ の同時定量法について検討した。

体液中の PBZ 及び代謝物の定量法としては紫外分光法^{4)~6)}，質量分析法⁷⁾，ガスクロマトグラフィー^{8)~11)}及び高速液体クロマトグラフィー^{12)~16)} (以下 HPLC と略記) が報告されている。これらのうち，紫外分光法は特異性に欠け，又質量分析法及びガスクロマトグラフィーは煩雑な前処理及び誘導體化が必要である。一方，HPLC は試料調製が簡易であり，又代謝物を含めた分

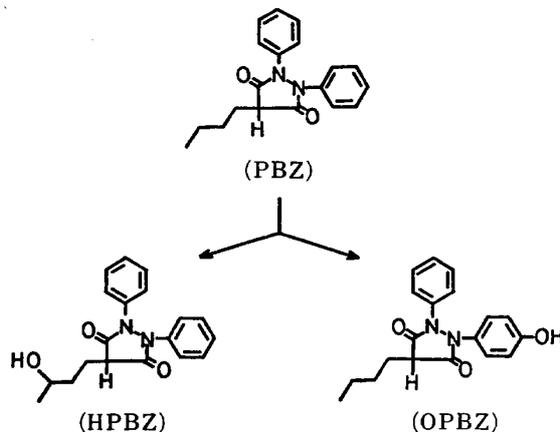


Fig. 1 Major matabolic pathway of phenylbutazone

離定量ができることから，既に幾つかの方法が報告されている。そこで HPLC について検討したところ，代謝物の HPBZ は使用した酸性の移動相に溶かすと，一部 δ -カプロラクトン- α -カルボニックアシド-*N*, *N'*-ジフェニルヒドラジド¹⁷⁾ (以下カプロラクトンと略記) に異性化し，両者の平衡混合物となり，クロマトグラム上2本の分裂ピークとなるため，定量分析を行ううえで問題があることが分かった。しかし，この異性化は試料を少量のトリエチルアミンを含む溶液に溶かすことで防止できることが分かり，迅速，簡易，再現性の良い定量法を確立した。

* (財)競走馬理化学研究所：158 東京都世田谷区上用賀 4-37-6

2 実 験

2.1 試薬及び溶媒

PBZ 及び OPBZ は藤沢薬品工業製のブタゾリジン及びタンデリール錠より抽出し, それぞれメタノール及びエーテル-石油エーテル混液から再結晶したものを使用した. HPBZ の合成原料であるケトフェニルブタゾン は協和醸酵工業製のケタゾン錠より抽出し, ベンゼン-ヘキサン混液から再結晶したものを使用した. 内標準物質のメテノロンは日本シェーリング製のプリモボラン錠より抽出し, 酢酸エチルから再結晶したものを使用した. エーテル, テトラヒドロフラン, メタノール, ジクロロメタン, ベンゼン及びアセトニトリルは和光純薬工業製あるいは半井化学薬品製の残留農薬試験用又は HPLC 用を使用した. その他の試薬及び溶媒は市販の試薬特級品をそのまま使用した.

2.2 装置及び分析条件

高速液体クロマトグラフは, 日立 635 型定流量ポンプに島津 UVD-1 型検出器を接続して使用した. 又データ処理には島津クロマトパック C-R1A 型を用いた. カラムは半井化学薬品製の Cosmosil 10C₁₈ ガードカラム (5cm×4.6mm i.d.) に同じく Cosmosil 5C₁₈ (15cm×4.6mm i.d.) を接続して使用し, カラム温度 40°C, 測定波長 254 nm で行った. 移動相は血しょうの場合, アセトニトリル-水-酢酸 (55:42:3, v/v), 尿では (49:48:3, v/v) を使用し, 流速 1.0 ml/min で行った.

2.3 HPBZ の合成

無水エーテル 100 ml に無水塩化亜鉛 4.1 g を加えてかき混ぜ, これにテトラヒドロホウ酸ナトリウム 2.3 g を少量ずつ加えた後, 室温で 2 時間かき混ぜる. 別に, ケトフェニルブタゾン 10 g を無水テトラヒドロフラン 150 ml に溶解した後, 更に無水エーテル 200 ml を加えて希釈する. この溶液にかき混ぜながら先に調製したテトラヒドロホウ酸亜鉛のエーテル溶液を加え, その後室温で 2 時間かき混ぜる. 反応終了後, 反応混合物に蒸留水 200 ml を少量ずつ加え, 過剰の試薬を分解する. 水相を分取し, これを 5% 塩酸で酸性とした後, エーテル抽出, 水洗, 硫酸ナトリウム乾燥後, 減圧下溶媒留去, 無色針状の粗結晶 (本品は IR スペクトルより HPBZ と推定された) を得る. これを酢酸エチルから再結晶し, 融点 183~185°C (文献値 181~184°C¹¹⁾) の無色針状結晶 8.23 g (収率 79.6%) を得た. これは IR スペクトルから HPBZ の異性体であるカプロラクトン体¹⁷⁾ と同定した. なお, このカプロラクトン体は薄層クロマトグラフィーにおいて二つのスポット (R_f 値: 0.59, 0.13, 展開溶媒: クロロホルム-メタノール, 95:

5, v/v) を与え, 又, CDCl₃ 中で HPBZ との平衡混合物として存在することが NMR スペクトルより確認された. Mass m/z : 324 (M⁺), 184 (base peak), 93, 77. IR (nujol) cm⁻¹: 3270 (-NH-), 1720(-COO-), 1685 (-CON=). NMR (CDCl₃) ppm: 1.20 (d, $J=7$ Hz, HPBZ-CH₃), 1.40 (d, $J=7$ Hz, カプロラクトン-CH₃), 3.49 (s, HPBZ-OH, D₂O で消失), 5.32 (s, カプロラクトン-NH).

2.4 標準溶液の調製

PBZ, OPBZ 及びカプロラクトン (HPBZ 等価物) を各 1 mg/ml の濃度で含有するメタノール溶液を同溶媒で段階希釈し, それぞれ 400, 200, 100, 50, 30, 10, 5 及び 2.5 µg/ml の溶液を調製し, 使用時まで冷暗所に保存した. 又, 内標準物質の標準溶液はメテノロンを 60 µg/ml の濃度で含有するメタノール溶液を調製し, 同じく使用時まで冷暗所に保存した.

2.5 定量法

あらかじめ内標準物質の標準溶液 100 µl を加え, 窒素気流下蒸発乾固した共栓付き試験管にウマ血しょう 0.5 ml 及び 2 M 酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) 0.5 ml を加えた後, フラッシュミキサーで混和する. これにジクロロメタン 7 ml を加え 15 分間振り混ぜて抽出した後, 5°C, 3000 r. p. m. (1600 g) で 10 分間遠心分離する. 水相を吸引除去後, 有機溶媒相をスピッツ管に移し, 窒素気流下 40°C で蒸発乾固する. 残留物にアセトニトリル-水-トリエチルアミン (55:42:0.5, v/v) の混液 200 µl を加えた後, 超音波処理及びフラッシュミキサーで混和する. 不溶性残留物を除去するため, 再度 5°C, 3500 r. p. m. (2200 g) で 10 分間遠心分離した後, 上澄みをマイクロ試験管に移し, その 20 µl を HPLC の試料とした. 一方, 尿試料ではウマ尿 0.25 ml を用い, 抽出溶媒はベンゼンを使用し, 血しょうと同様の操作を行い, その 20 µl を HPLC の試料とした. なお, 尿では不溶性残留物がないため, 2 回目の遠心分離操作を省略した.

PBZ, OPBZ 及び HPBZ の血しょう及び尿中濃度は, 得られたクロマトグラムの内標準物質のピーク面積に対する各ピーク面積の比を求め, あらかじめ作成した回帰直線式を用いて算出した. 又, 検量線の作成及び回収率の測定も同様の方法で行った.

3 結果及び考察

3.1 HPLC の分離条件の検討

PBZ, OPBZ 及び HPBZ の HPLC による分離は,

酸性の移動相を用い、順相¹²⁾¹³⁾及び逆相^{14)~16)}のカラムによる報告がある。そこで著者らは逆相カラムとして Cosmosil 5C₁₈ を用い、移動相について種々検討したところ、血しょうではアセトニトリル-水-酢酸 (55:42:3, v/v), 又尿では未知代謝物との相互分離を考慮し、移動相の組成を若干変えた (49:48:3, v/v) が満足する結果を与えた。しかし代謝物の HPBZ には次のような問題があることが分かった。すなわち、HPBZ は前に述べたように再結晶, あるいは室温で放置¹¹⁾することによって、安定なカプロラクトン体に異性化する。

一方、このカプロラクトン体はクロロホルム, あるいは今回用いた HPLC の移動相中で HPBZ との平衡混合物となり、Fig. 2 の右に示したクロマトグラムのように 2 本の分裂ピークとして検出され、しかもその強度比は時間の経過とともに変化した。又カプロラクトン体の保持時間は今回の HPLC の条件で OPBZ のそれとほぼ一致していた。

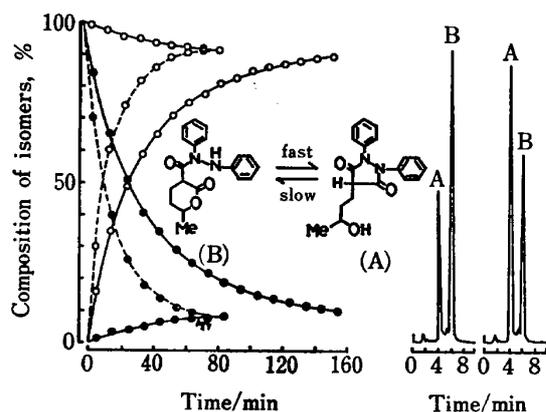


Fig. 2 Time courses of equilibrium state between γ -hydroxyphenylbutazone (A) and δ -caprolactone- α -carbonic acid- N,N' -diphenylhydrazide (B) in acetonitrile-water-acetic acid (55:42:3) used as a mobile phase at 25°C and 40°C

○: A, ●: B; Temperature: — 25°C, -- 40°C

Fig. 2 の左図はカプロラクトン体を HPLC の移動相の一つであるアセトニトリル-水-酢酸 (55:42:3, v/v) に溶解したときの、時間の経過に伴う両異性体の濃度比の変化を HPLC により求めたものである。温度が 25°C の場合、カプロラクトン体(B)は時間の経過とともに減少し、それに伴い HPBZ (A)が増加し、2.5 時間で A と B の比が約 9:1 の平衡混合物となった。又、温度を 40°C にした場合でも平衡速度が速くなるのみで、HPBZ へ 100% は変換しなかった。一

方、カプロラクトン体はアルカリ水溶液中で速やかに HPBZ に異性化 (加水分解)¹¹⁾するため、加水分解により得た HPBZ を移動相に溶解し、カプロラクトンへの異性化を同様に検討したが、先と同じく A と B の比が 9:1 の平衡混合物を与えたが、その異性化速度はかなり遅いことが判明した。そこでカプロラクトン体を完全に加水分解した状態で HPLC に注入することにし、HPLC の移動相の組成を一部変えた溶液, すなわちアセトニトリル-水-トリエチルアミン (55:42:0.5, v/v) に溶解した後、これを HPLC に注入したところ予期したとおり、HPBZ の単一ピークとして検出することができた。これは HPLC への注入後 HPBZ の一部がカプロラクトンに異性化するものと考えられるが、Fig. 2 から分かるように HPBZ の溶出時間が 4 分程度と速く、又前述のように HPBZ からカプロラクトンへの異性化速度が遅いため、見掛け上 HPBZ の単一ピークとして検出できたものと思われる。なお、HPBZ に対するこのような問題点は HPLC による定量法のいずれの文献においても指摘されていない。

3.2 抽出法の検討

ウマ血しょう及び尿からの PBZ 及び代謝物の抽出法として、抽出溶媒及び pH の影響などを検討した。抽出溶媒は血しょうの場合ジクロロメタン, 又尿ではベンゼンが好結果を与えた。pH は 2~6 まで段階的に変えて検討したが、pH 5~6 が最も良く、pH の低下に伴い血しょう及び尿成分が多く抽出された。

Fig. 3 にウマ血しょう及び尿抽出物のクロマトグラムを示した。いずれも I はブランク, II は PBZ 投与により得られた試料のクロマトグラムである。血しょう及び尿共 PBZ, OPBZ, HPBZ 及び内標準物質の相互分離はもとより、それらの出現位置には体液成分に由来する妨害ピークは出現していない。なお、PBZ 投与尿抽出物のクロマトグラムでは PBZ, OPBZ, HPBZ 以外に代謝物と思われる 2 本のピーク (4, 5) が検出された。

3.3 検量線の作成, 回収率及び再現性の検討

ブランク血しょう 0.5 ml に PBZ, OPBZ 及び HPBZ の 3 者とも各々 0.5, 1, 2, 6, 10, 20 及び 40 μ g/ml の濃度となるように添加し、定量法に従って操作し検量線を作成した。得られたクロマトグラムの内標準物質に対する PBZ, OPBZ 及び HPBZ のピーク面積比 (X) と添加量 (Y) との間には原点を通る良好な直線関係が得られた。又、最小二乗法により求めた回帰式は、PBZ: $Y=16.75X+0.09$, OPBZ: $Y=13.43X+$

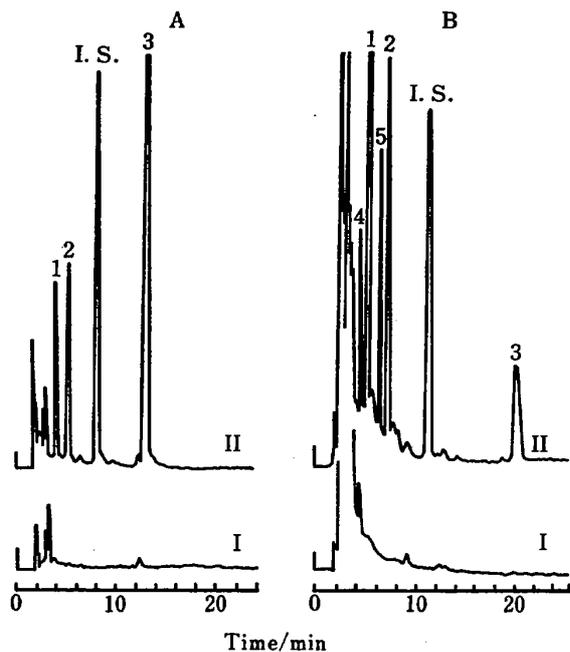


Fig. 3 Typical chromatograms of the extracts from horse plasma and urine

Chromatogram: A plasma extracts, B urine extracts, I blank, II administered. Peak: 1 HPBZ, 2 OPBZ, 3 PBZ, I.S. methenolone, 4 and 5 unknown metabolites. Mobile phase used were acetonitrile-water-acetic acid (55:42:3) for plasma sample and (49:48:3) for urine sample. Flow rate was 1.0 ml/min.

0.23 及び HPBZ: $Y=17.61X+0.04$ であり, いずれも相関係数 (r) は 0.999 であった. 又, $6\mu\text{g/ml}$ の添加における PBZ, OPBZ 及び HPBZ の日内変動 (各々 $n=5$) はそれぞれ 1.4, 1.2, 1.5% であり, 日差変動 (各々 $n=5$) も 2.3, 1.8, 2.0% と良好であった. 定量限界は 3 者とも $0.25\mu\text{g/ml}$ であった.

一方, ブランク尿 0.25ml に PBZ, OPBZ 及び HPBZ を各々 1, 2, 4, 12, 20, 40, 80 及び $160\mu\text{g/ml}$ の濃度となるように添加し, 同様に検量線を作成したところ 3 者とも原点を通る良好な直線関係が得られた. 又そのときの回帰式は PBZ: $Y=31.15X+0.87$, OPBZ: $Y=29.48X+0.61$ 及び HPBZ: $Y=39.84X+0.74$ であり, いずれも $r=0.999$ であった. 又, $12\mu\text{g/ml}$ の添加における PBZ, OPBZ 及び HPBZ の日内変動 (各々 $n=5$) はそれぞれ 2.0, 1.2, 1.7% であり, 日差変動 (各々 $n=5$) も 2.1, 1.8, 2.3% と良好であった. 定量限界は 3 者とも $0.5\mu\text{g/ml}$ であった.

PBZ, OPBZ 及び HPBZ の血しょう及び尿からの回収率は, 血しょうの場合 $1\sim 40\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲において PBZ が 83% と若干劣るものの, 他はいずれ

も 95% 以上の高い値を示した. 又尿では 3 者とも $2\sim 80\mu\text{g/ml}$ の範囲で平均 82% 前後と血しょうに比べ幾分劣っていたが, これは抽出溶媒であるベンゼンに対する溶解度が低いためと考えられる.

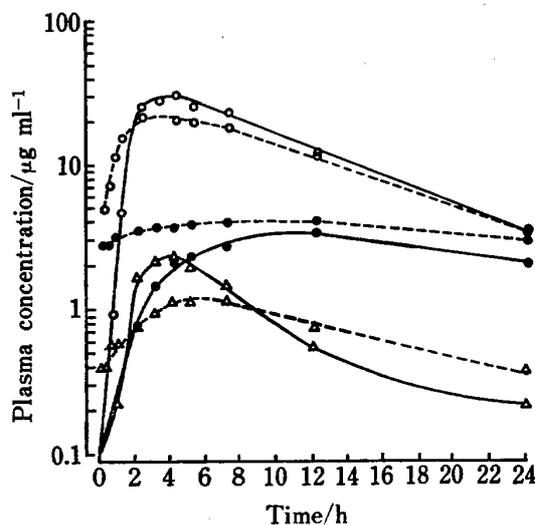


Fig. 4 Plasma concentrations of phenylbutazone and its metabolites in horses after single and consecutive oral administration of phenylbutazone

○: PBZ, ●: OPBZ, △: HPBZ; —: single administration (3 g/head), ---: consecutive administration (2 g/head, once a day for 4 days). Plasma samples on the consecutive administration of phenylbutazone were collected after the last administration.

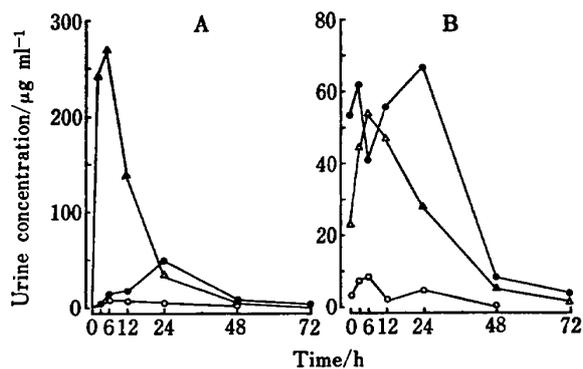


Fig. 5 Urine concentrations of phenylbutazone and its metabolites in horses after single and consecutive oral administration of phenylbutazone

○: PBZ, ●: OPBZ, △: HPBZ; A: single administration (3 g/head), B: consecutive administration (2 g/head, once a day for 4 days). Urine samples on the consecutive administration of phenylbutazone were collected after the last administration.

3・4 実際試料の分析

体重 450~550 kg の雌軽種馬 4 頭に PBZ を経口で単回投与 (3 g/頭) 及び 24 時間間隔で反復投与 (2 g/頭×4 回, 最終投与後, 試料採取) し, 血しょう及び尿中の PBZ とその代謝物の濃度を測定した例を, Fig. 4 及び Fig. 5 に示した. 血しょう中では PBZ が大部分を占め, 単回及び反復投与とも 2~4 時間で最高血しょう中濃度 (単回投与 30.2 µg/ml, 反復投与 21.5 µg/ml) に達した後, 順次減少した. PBZ の半減期は単回 (7.2 h) 及び反復投与 (7.7 h) に大きな差は認められず, Maylin¹⁸⁾ が報告している反復投与による半減期の延長は認められなかった.

一方, 尿中では HPBZ と OPBZ が主代謝物であり, 未変化の PBZ は微量であった. 又, 反復投与では単回投与に比べ OPBZ が著しく増加した.

本研究は日本中央競馬会の委託研究により行なわれたものであり, ここに深謝する. 又本研究に際し, 薬物投与実験に御協力いただいた日本中央競馬会馬事公苑診療所長盛 茂男氏をはじめ, 当研究所美馬恭佑調査役及び運動薬理課の諸氏に感謝する.

文 献

- 1) H. Stenzl : *Helv. Chim. Acta*, **33**, 1183 (1950).
- 2) J. J. Burns, R. K. Rose, S. Goodwin, J. Reichenthal, E. C. Horning, B. B. Brodie : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **113**, 481 (1955).
- 3) E. J. Finocchio, F. J. Ozog, F. W. Oehme, J. H. Johnson, G. W. Osbaldiston : *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **156**, 454 (1970).
- 4) H. D. Beckstead, K. K. Kaistha, S. T. Smith : *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1952 (1968).
- 5) G. Lucas, C. B. Borman, S. B. Zak : *J. Pharm. Sci.*, **65**, 86 (1976).
- 6) J. E. Wallace : *J. Pharm. Sci.*, **64**, 284 (1975).
- 7) R. J. Weinkam, M. Rowland, P. J. Meffin : *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 42 (1977).
- 8) J. A. Bogan : *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 125 (1977).
- 9) R. B. Bruce, W. R. Maynard, L. K. Dunning : *J. Pharm. Sci.*, **63**, 446 (1974).
- 10) R. Perego, E. Martinelli, P. C. Vanoni : *J. Chromatogr.*, **54**, 280 (1971).
- 11) Y. Tanimura, Y. Saitoh, F. Nakagawa, T. Suzuki : *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 651 (1975).
- 12) N. J. Pound, R. W. Sears : *J. Pharm. Sci.*, **64**, 284 (1975).
- 13) J. B. Taylor, P. Lees, E. L. Gerring : *Equine Vet. J.*, **13**, 201 (1981).
- 14) L. Aarons, C. Higham : *Clin. Chim. Acta*, **105**, 377 (1980).
- 15) T. Marunaka, T. Shibata, Y. Minami, Y. Umeno : *J. Chromatogr.*, **183**, 331 (1980).

- 16) A. Shoufi, D. Colussi, P. Mangoni : *J. Chromatogr.*, **275**, 201 (1983).
- 17) R. Denss, F. Hafiger, S. Goodwin : *Helv. Chim. Acta*, **40**, 402 (1975).
- 18) G. A. Maylin : Proceedings of 20th Annual Meeting Am. Assoc. Equine Practitioners, p.243 (1974).

☆

Determination of phenylbutazone and its metabolites in horse plasma and urine by high performance liquid chromatography. Tatsumi SHINOHARA, Osamu ISHIDAKA, Tsuneo TANAKA and Atsushi MOMOSE (Laboratory of Racing Chemistry, 4-37-6, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158)

A simple and reproducible method for the determination of phenylbutazone (PBZ) and its metabolites, oxyphenbutazone (OPBZ) and γ -hydroxyphenylbutazone (HPBZ), in horse plasma and urine by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. Plasma (0.5 ml) was diluted with 0.5 ml of 2 M acetate buffer (pH 5.0) and extracted with 7 ml of dichloromethane. After centrifugation at 3000 r.p.m. (1600 g) for 10 min, the organic phase was evaporated to dryness under nitrogen stream at 40°C. The residue was dissolved in 200 µl of acetonitrile-water-triethylamine (55 : 42 : 0.5) with sonication and flash mixing. After re-centrifugation at 3500 r.p.m. (2200 g) for 10 min, supernatant was transferred to a micro test-tube and 20 µl portion of the solution was applied to HPLC (column: Cosmosil 5C₁₈, 15 cm×4.6 mm i.d.; column temperature: 40°C; mobile phase: acetonitrile-water-acetic acid, 55 : 42 : 3; flow rate: 1.0 ml/min; detector: UV at 254 nm). It was undesirable for the quantitative analysis that HPBZ was split into two peaks on a chromatogram, because of equilibration of HPBZ with δ -caprolactone- α -carbonic acid-*N,N'*-diphenylhydrazide in the mobile phase. However, this isomerization could be prevented by dissolving the sample in a solution containing trace amount of triethylamine. The retention times of HPBZ, OPBZ, methenolone (internal standard) and PBZ were 4.1, 5.3, 8.1 and 12.8 min, respectively. Urine (0.25 ml) was treated by the same procedure, except that extraction with 7 ml of benzene and mobile phase, acetonitrile-water-acetic acid (49 : 48 : 3), were used. The detection limits of each metabolite from plasma and urine were 0.25 µg/ml and 0.5 µg/ml, respectively. The proposed method is reproducible for the assay of PBZ and its metabolites in plasma and urine, and applicable to the pharmacokinetic studies of the drug in horses.

(Received October 11, 1985)

Keyword phrases

determination of phenylbutazone and its metabolites; horse plasma and urine; reversed phase high performance liquid chromatography; UV detector.