

Nitrazepam およびその代謝産物の蛍光定量について

沢田英夫, 原 明, 中山俊裕, 林原正和*, 佐伯孝雄*

(岐阜薬科大学生化学教室) (*島根医科大学付属病院薬剤部)

A Fluorometric Method for the Quantitative Determination of Nitrazepam and its Metabolites

HIDEO SAWADA, AKIRA HARA, TOSHIHIRO NAKAYAMA

MASAKAZU HAYASHIBARA* and TAKAO SAEKI*

Department of Biochemistry, Gifu College of Pharmacy

**Department of Pharmacy, Shimane Medical University Hospital*

A fluorometric method for the quantitative determination of nitrazepam, which was previously described by Rieder, was applied to measure its metabolites having the benzodiazepine rings.

After treatment with single oral dose of 5mg, 10mg and 15mg of nitrazepam, the plasma concentrations of nitrazepam and its major metabolites (7-amino and 7-acetamido derivatives) were investigated in 13 subjects using his fluorometric method. In most subjects, peak plasma levels of the unchanged drug occurred within 2 hr after oral administration of each dose, and the doses of 5mg, 10mg and 15mg of nitrazepam produced maximum levels of the plasma concentrations at 29 to 46, 77 to 136, and 95 to 172 ng/ml, respectively. A marked individual difference was observed in their plasma level fall-off curves, such that the maximum concentration values of the metabolites ranged from 6 to 23 ng/ml.

緒 言

Nitrazepam (NZ) は、ニトロ基を有する 1,4-benzodiazepine 化合物であり、抗けいれん薬および睡眠誘導剤として臨床各分野で繁用されている。本薬物の生体内変化はヒトおよび各種動物で研究され、ニトロ基の還元により^{1,2)} 7-aminonitrazepam (7-amino NZ) およびそのアセチル体^{1,3)} 7-acetamidonitrazepam (7-acetamido NZ) にいたる経路と NZ の diazepine 環の開裂により^{4,5)} 2-amino-5-nitrobenzophenone (ANB) および⁶⁾ 2-amino-3-hydroxy-5-nitrobenzophenone (3-OHANB) にいたる経路が主経路であることが明らかにされている。体液中の NZ およびその代謝産物の定量は、高濃度に存在する場合は比色法および赤外分光法で行われている。また GLC による⁷⁾ 定量法では薬用量投与での血中濃度が測定できる程の感度が得られず、また分析前に NZ を酸加水分解し、その生成物 ANB を GLC により測定することで感度が増大するが、代謝産物も同時に測定され特異性が低下するという⁷⁾ 欠点が見出されている。Rieder⁸⁾ は体液中の NZ と 7-amino NZ および 7-acetamido NZ を分別抽出し、これらを蛍光物質に変化させ測定する簡便な方法を報告し、本法により薬用量投与の NZ の血中濃度測定が可能であることを認めているが、著者らは本蛍光定量法の特異性について検討し、本法が NZ と 7-amino NZ および 7-acetamido NZ に非常に高い特異性を示す定量法であることを認め、本法をもちいてヒトにおける NZ の投与量の変化にともなう NZ およびその代謝産物の血漿中濃度推移について観察したので報告する。

実験材料および実験方法

1. 試 薬

亜鉛末 (Art. 8756) は Merck 社より購入した。

抽出溶媒は酢酸エチル：ジクロロメタン＝1：2の混合溶媒19に対し *n*-アミルアルコール1の割合で混和したものをを用いた。これら有機溶媒はすべて市販のものを蒸留して用いた。

0.05% *o*-フタルアルデヒド溶液は *o*-フタルアルデヒド (半井化学) 10mg を 20ml のメタノールに溶解し、 -20°C で保存した。

NZ 標準保存液——NZ は日本ロシュ株式会社から供与された標品を用いた。200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の50%エタノール溶液を調製し密栓して -20°C で保存した。

7-Amino NZ 標準保存液——7-Amino NZ は、NZ 0.5g を MgO 1g で pH 10にした50%エタノール30ml に溶解し、Na₂S₂O₄ 2g を加え 50°C の水浴中で1時間加熱し、冷後エタノールを減圧蒸発し、酢酸エチル：ジクロロメタン (1：2) で抽出し、エタノールより再結晶して得た。200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の50%エタノール溶液を調製し、密栓して -20°C で保存した。

2. 薬物の投与および採血方法

NZ はベンザリン 5mg 錠 (塩野義製薬) として1～3錠を6時間前より食餌をとっていない成人男子に夕方4～5時に1回経口投与した。

採血は投与後、0, 30, 60, 90, 120, 240分後に行ない、抗凝血処理し遠心分離により血漿を分離した。得られた血漿は測定に供するまで凍結保存した。

3. 血漿中の nitrazepam およびその代謝産物の抽出および定量

3-1. 血漿中の代謝産物の抽出

凍結保存した血漿を 37°C 、15分間インキュベートし融解させ、その2.0ml を 25ml 共栓付遠沈管に取り、0.2% 酢酸 3.0ml を加え混和後、沸騰水浴中で3分間加熱した。流水中で室温にまで冷却し、MgO 30mg を加えよく混和した後、抽出溶媒 10.0ml を加え、10分間機械振盪した。3000rpm、10分間遠心分離後、有機溶媒層 8.0ml を 15-20ml 共栓付遠沈管に分取し、0.15N塩酸 2.0ml を加え、10分間機械振盪後、3000rpm 10分間遠心分離した。この0.15N 塩酸層1.0ml を 10ml 共栓付試験管に取り、代謝産物を下記の定量法により定量した。

3-2. Nitrazepam の抽出

0.15N塩酸抽出後の有機溶媒層7.0ml を 15-20ml 共栓付遠沈管に分取し、3 N塩酸 2.0ml を加え、10分間機械振盪後、3000rpm 10分遠心分離した。3 N塩酸層 1.0ml を 10ml 共栓付試験管に分取した。

3-3. Nitrazepam の定量法

NZ の3 N塩酸抽出液に氷冷下9 N塩酸 1.0ml を加え混和後室温にまで放冷した。さらに亜鉛末 150mg を加え軽く栓をして泡が出なくなるまで放置後、0.05% *o*-フタルアルデヒド-メタノール溶液 0.2ml を加え、 60°C で60分間反応させた。さらに6 N塩酸 1.0ml を加え、室温まで冷却し10-60分以内に励起波長 355nm、蛍光波長 475 nm で測定した。また、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の NZ メタノール溶液 0.10ml に6 N塩酸 1.9ml を加え、後同様に操作し、外部標準とした。盲検は6 N塩酸 2.0ml について同様に操作したものをを用いた。

3-4. 代謝産物の定量法

3-1で得られた代謝産物の0.15N塩酸抽出液 1.0ml に12N塩酸 1.0ml を加え、混和放冷後0.05% *o*-フタルアルデヒド-メタノール溶液 0.2ml を加え、 60°C で60分間反応させた。さらに6 N塩酸 1.0ml を加え、室温まで冷却

後10—60分以内に励起波長 340nm 蛍光波長 470nm で測定した。2.0 μ g/ml の 7-amino NZ—メタノール溶液0.1 ml に 6 N塩酸 1.9ml を加え同様に操作したものを外部標準とした。また、盲検は 6 N塩酸 2.0ml について同様に操作したものをを用いた。

4. 装置

蛍光測定には島津 RF 501型分光蛍光光度計および日立 Perkin-Elmer 204A型蛍光光度計を用いた。

実験結果と考察

1. 定量法の検討

(1) 回収率

正常ヒト血漿に 0.01—0.20 μ g/ml となるように NZ および 7-amino NZを添加し、Rieder の方法⁸⁾を一部改良し実験方法に述べたように抽出後定量した結果、回収率は Table I に示すように NZ では74.9 \pm 4.7%—75.1 \pm 3.0%、7-amino NZ では 91.0 \pm 4.3%—93.2 \pm 2.9%と良好で一定した回収率を示し、Rieder の報告⁹⁾に一致した値が得られた。また、両化合物の検量線は 0.01 μ g/ml から 2.0 μ g/ml まで直線性を示し、本蛍光定量法が薬用量投与程度の低い血漿中濃度まで十分に定量できる感度を有することを確認した。

Table I Recovery of Nitrazepam and 7-Aminonitrazepam by the Fluorometric Method

Concentration in plasma (μ g/ml)	Recovery (%)	
	nitrazepam mean \pm SE	7-aminonitrazepam mean \pm SE
0.2	75.0 \pm 5.1	92.4 \pm 4.1
0.4	74.9 \pm 4.7	91.0 \pm 4.3
0.8	75.1 \pm 3.0	93.0 \pm 4.1
1.2	74.9 \pm 2.5	92.9 \pm 2.2
1.6	74.8 \pm 2.7	92.9 \pm 3.3
2.0	75.0 \pm 1.9	93.2 \pm 2.9

Values represent means \pm S.E. of 3 experiments.

(2) 定量法の特異性

Rieder⁸⁾は、NZ ではニトロ基の還元後、代謝産物の 7-amino NZ および 7-acetamido NZ は直接塩酸酸性下¹⁻³⁾ *o*-フタルアルデヒドと反応し、蛍光物質を生じることを認めているが、ヒトおよび動物ではその他に数種の代謝産物が知られているので、NZ およびその代謝産物を亜鉛還元前後で *o*-フタルアルデヒドと反応させ、蛍光物質の生成について検討した。Table II に示すように 7-amino NZ、7-acetamido NZ および 3-hydroxynitrazepam (3-OH-NZ) は、NZ とほぼ同一蛍光波長の蛍光を示した。しかし、diazepine 環が開裂した代謝産物の ANB、2,5-diaminobenzophenone (DAB)、3-OH-ANB、2-(hydroxyacetoamido)-5-nitrobenzophenone (N-(hydroxyacetyl) ANB) および 2-(N-formylamino)-5-nitrobenzophenone (N-formyl ANB) では、本定量法における測定波長ではまったく蛍光が認められなかった。芳香族第1級アミン類は酸性条件下で *o*-フタルアルデヒドとの反応により、460nm 付近に極大を示す蛍光物質を生ずることが知られているが、NZ の芳香族第1級アミンに属する代謝産物 ANB、3-OH-ANB、DAB、N-(hydroxyacetyl) ANB および N-formyl ANB はいずれもまったく蛍光物質を生じなかった。また、ヒトでは 3-OH-NZ は尿中においてさえほとんど検出されない minor の代謝産物である²⁾

ので，ニトロ基還元による本定量法は NZ のみを特異的に定量できることが確認され，また代謝産物として測定される量は 7-amino NZ と 7-acetamido NZ およびヒトではかなり尿中に排泄される 7-amino-3-hydroxynitrazepam¹⁾ (3-OH-7-amino NZ) も含まれると考えられた。本実験では，これら代謝産物は 7-amino NZ の値として示した。

Table II Specificity in this Fluorometric Method

Nitrazepam and its Metabolites	Fluorescence Intensity
Nitrazepam (NZ)	123.1
3-OH-NZ	76.4
7-amino NZ	83.5
7-acetamido NZ	62.0
3-OH-7-amino NZ	6.1
ANB	0
3-OH-ANB	0
DAB	0
N-hydroxyacetyl ANB	0
N-formyl ANB	0

2. 成人男子における nitrazepam およびその代謝産物の血漿中濃度推移

(1) Nitrazepam の血漿中濃度推移

成人男子に NZ 5, 10 および 15mg を投与し，4 時間後までの未変化の NZ の血漿中濃度推移を Table III に示した。5 mg 投与例では血漿中最高濃度は 29-46ng/ml であり，1 例をのぞき最高濃度を示す時間は投与後 30~120 分であった。10mg 投与例では投与後 60~240 分までに 77-136ng/ml の最高濃度を示し，投与量の増加にともない血漿中濃度の増加および最高濃度に至る時間も遅くなり，以後高濃度を維持し 2 例 (No 6, 10) では 240 分後まで NZ 濃度は増加傾向を示した。さらに 15mg 投与例では，1 例 (No 11) は 240 分後まで増加傾向を示し，2 例が投与後

Table III Plasma Levels of Unchanged Nitrazepam after a Single Oral Dose

Subjects Number	Name	Dose (mg)	Concentration of Nitrazepam in Plasma after Dose (ng/ml)				
			30 min	60 min	90 min	120 min	240 min
1	U. E.	5	37	40	35	27	0
2	K. U.	5	2	9	40	41	36
3	Y. A.	5	4	12	44	46	38
4	M. I.	5	1	6	1	5	29
5	I. W.	5	29	25	29	17	15
6	Y. A.	10	2	28	50	70	77
7	A. H.	10	35	126	103	59	102
8	U. E.	10	25	66	81	84	76
9	N. A.	10	88	136	120	115	104
10	Y. O.	10	20	82	87	85	94
11	S. A.	15	4	27	110	115	134
12	Y. N.	15	95	81	68	18	0
13	Y. M.	15	172	139	117	130	116

30分に最高濃度に達した。No.11 と No.13 では高い血漿中濃度を長時間維持しており、投与量と血漿中濃度の相関が認められた。しかし、いずれの投与量においても著しい個人差が認められた。Table III で同一個人において投与量と血漿中濃度推移との関係を U.E. (No. 1 と No. 8) および Y.A. (No. 3 と No. 6) の例で比較してみると、U.E. では投与量増加にともない最高血漿中濃度到達時間が投与後60分から120分へと遅れ、またその濃度も 40ng/ml から 84ng/ml と約 2 倍の値を示した。また、Y.A. でも最高血漿中濃度到達時間は 120 分後から240分後へと投与量の増加にともなって遅れ、その濃度も約 2 倍と、2 例とも同様の推移を示した。この結果から、薬用量では NZ 投与量の増加にともなって、最高血漿中濃度も比例的に増加し、その到達時間も約 1 時間遅れることが明らかとなった。また、投与量の増加にともない、4 時間まで高濃度を維持することから、長時間薬効が続くことが推察された。

(2) 代謝産物の血漿中濃度推移

NZ 5 mg あるいは 10mg 投与例での代謝産物の血漿中濃度推移を Table IV に示した。10mg 投与例では最高血漿中濃度到達時間が投与後 90~240 分であり、また 5 mg 投与例では30分、60分、120分後という値を示し代謝産物についても未変化の NZ の濃度推移と同様に投与量を増すと最高血漿中濃度に到達する時間は遅くなるという結果が得られた。また、Table III の各例と比較して、代謝産物の最高濃度到達時間が未変化の NZ のそれに比べ明らかに30分あるいはそれ以上遅くなっており、特にNo. 8 と No. 9 では典型的な薬物代謝様相を示した。しかし、その濃度は 10mg 投与例で 6-23ng/ml と著しい個人差が認められた。また、代謝産物の血漿中濃度は NZ の血漿中濃度の10分の1程度であることから、NZ はそのほとんどが血漿中に未変化のまま存在することが明らかとなった。Rieder¹⁾ は ¹⁴C-NZ を用いて健康な成人での代謝様相を検討し、投与量の85%程度の NZ が血漿中に未変化のまま存在していることを報告しているが、蛍光法を用いた著者らの実験でも同様の結果が得られた。しかし、尿中には未変化の NZ はほとんど排泄されず、7-amino NZ および 7-acetamido NZ が主代謝産物であることが知られている¹⁻³⁾ので、これらの代謝産物のすみやかな排泄が示唆され、一方未変化の薬物の排泄は遅く、その大部分は代謝されて体外に排泄されるものと考えられる。

Table IV Plasma Levels of Metabolites after a Single Oral Dose of Nitrazepam

Subjects Number	Name	Dose (mg)	Concentration of Metabolite in Plasma after Dose (ng/ml)				
			30 min	60 min	90 min	120 min	240 min
1	U. E.	5	0	0	0	9	0
2	K. U.	5	12	9	3	10	9
3	Y. A.	5	0	15	8	15	10
6	Y. A.	10	6	4	5	7	4
8	U. E.	10	0	2	4	13	17
9	N. A.	10	2	15	23	20	6
10	Y. O.	10	1	12	18	14	22

結 論

- 1) NZ のニトロ基還元後、*o*-フタルアルデヒドと縮合させ NZ を測定する蛍光定量法は、7-amino NZ, 7-acetamido NZ, 3-OH-NZ, 3-OH-7-amino NZ などの代謝産物の測定にも応用できた。しかし、他の benzodiazepine 環開裂型の代謝産物はまったく蛍光物質を生成せず、本法は diazepam 環を有する代謝産物に高い特異性を示した。

- 2) NZ 10mg を経口投与したヒト血漿中濃度を本法で測定した結果，未変化の薬物は投与後 1～2 時間で最高濃度を示し，その濃度は 77-136ng/ml と個人差が認められた。代謝産物の濃度推移では，最高濃度に到達する時間は一般に NZ の最高濃度到達時間よりも遅いが，さらに大きな個人差が認められ，その濃度も 6～23ng/ml であった。
- 3) 同一個人で投与量（2 倍）の増加にともない，最高血漿中濃度は明らかに約 2 倍に増加し，最高血漿中濃度到達時間は 1－2 時間延長した。

文 献

- 1) J. Rieder, G. Wendt, : Pharmacokinetics and metabolism of hypnotic nitrazepam. In "The Benzodiazepines." ed by S. Garattini, E. Mussini, L. O. Randall. New York, Raven Press, 1973, 99-127.
- 2) J. Rieder : *Arzneim-Forsch.*, 23 : 212-218, 1973.
- 3) H. Sawada, K. Shinohara : *Arch. Toxikol.*, 27 : 71-78, 1970.
- 4) 沢田英夫，篠原和子：衛生化学，16 : 318-321, 1970.
- 5) H. Sawada, K. Shinohara : *Arch. Toxikol.* 28 : 214-221, 1971.
- 6) S. L. Tompsett : *J. Clin. Pathol.* 21 : 366-371, 1968.
- 7) G. P. Beharrell, D. M. Hailey, M. K. MacLaurin : *J. Chromatog.* 70 : 45-52, 1972.
- 8) J. Rieder : *Arzneim-Forsch.*, 23 : 207-212, 1973.
- 9) 天野為之，水上 聡：薬学雑誌，85 : 1035-1041, 1965.