

微分パルスポーラログラフ法による血漿中の Metronidazole の直接定量

窪田種一*, 宮崎 寛**

(岐阜薬科大学薬品分析化学教室*, 塩野義製薬株式会社研究所**)

Direct Determination of Metronidazole in Plasma by the Method
of Differential Pulse Polarography

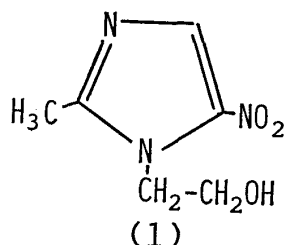
TANEKAZU KUBOTA*, HIROSHI MIYAZAKI**

Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Gifu College
of Pharmacy*, and Shionogi Research Laboratories, Shionogi and
Co. LTD.**

(Received February 27, 1982)

Direct analysis of metronidazole in rat plasma was studied by applying the differential pulse polarographic method. The effects of pH and ionic strength of buffer solutions, maximum wave suppresser (gelatin), main proteins in plasma, and instrumental conditions on a linear peak current (i_p) vs. concentration (C) plot and sensitivity were examined in detail for setting the assay method. As a result the ten-fold diluted solution of the test plasma with pH=7.3 phosphate buffer ($\mu=0.52$) was the most suitable for the present analysis, the i_p vs. C plot showed a good linear relation. Under these conditions the standard addition method was adopted as the actual procedure to eliminate the concomitant error brought about by the direct use of plasma as a test solution. The detectable limit concentration of the sample was 10^{-7} M. Finally, the sampled DC and the usual DC polarographic methods were also examined to compare those with the DPP technique, the latter being the most excellent as reported by other workers.

Metronidazole (MNZ) (1- β -hydroxyethyl-2-methyl-5-nitroimidazole) は〔I〕の構造式をもち、効力の強いトリコモナス症治療剤として広く使用されている。MNZ は分子中にイミダゾール核に結合した NO_2 基をもつため



ポーラログラフ的に顕著な還元波を示す。水溶液中、その還元波は $\text{R-NO}_2 + 4\text{e} + 4\text{H}^+ \rightarrow \text{RNHOH} + \text{H}_2\text{O}$ の機構によると考えられており、ニトロベンゼンのそれに類似している。したがって MNZ の定量にポーラログラフ法を応用することは効果的である。Kane,¹⁾ 及び Brooks²⁾ 等は尿、血漿、血清中の MNZ の定量にポーラログラフ法を応用した。血漿あるいは血清を取り扱うときは塩酸で除タンパクし遠心分離後上澄液を NaOH で中和、酢酸エチルエステルで抽出、蒸発後測定試料溶液を

調製している。しかしこのような測定のための前処理は比較的面倒である上に処理誤差も伴うので、もし血漿そのままを測定試料溶液として使用することができれば非常に便利である。また測定法として微分パルスポーラログラフ(DPP)法を応用すれば通常の方法に比べて感度が向上すると共にピーク電流値を決定し易いので非常に有力である。

* 岐阜市三田洞東5-6-1, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502, Japan.

** 大阪市福島区鷺洲5-12-4, 5-12-4, Sagisu, Fukushima-bu, Osaka 553, Japan.

ここでは血漿中の MNZ の直接定量に DPP 法を適用した結果、良好な結果が得られたのでその詳細を報告する。

実験の部

分析装置および測定条件 微分パルスポーラログラフおよびサンプリング直流ポーラログラフ (SDCP) の測定は PAR-Model 174A Polarographic Analyzer を用いた。比較のために用いた通常の直流ポーラログラフ (DCP) 測定装置は柳本製 P-8 型である。作用電極に強制滴水銀電極、参照電極に飽和甘汞電極 (SCE)、対極に水銀と連結した白金線を用いる三電極方式で行なった。滴水銀電極の特性は蒸留水中開回路で $h=35\text{cm}$, $m=1.54\text{mg/sec}$ で測定は総て $h=35\text{cm}$ で行なった。測定溶液中の溶存酸素の除去はアルゴンガスを約15分間通気して行った。血漿溶液の測定時は電解基礎液として用いる緩衝溶液をあらかじめアルゴンガスあるいは窒素ガスで充分除酸素しておき、H型測定セル中での通気は7~8分間に短縮した³⁾。測定は総て $25\pm 0.1^\circ\text{C}$ の恒温槽中で行った。使用した緩衝液は pH=1~11の間で Walpole, Clark-Lubs, 及び Sørensen の緩衝液である⁴⁾。また中性 (pH=7.3) 附近では $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ 系のリン酸塩緩衝液も使用した。これら緩衝液は NaCl を加えることにより、あるいは適当に稀釈することにより種々のイオン強度 μ に調整した。測定に用いた MNZ は塩野義製薬の製品 (Flagyl) で融点 $163\sim 4^\circ\text{C}$ で元素分析値は理論値と完全に一致した。

実験材料 使用した血漿は7~9週令の雄ラットより頸動脈切断或は麻酔下開腹手術で注射器により採取したものである。特に前者のときはできるだけ溶血を避けるように注意した。これらの血液は凝固を防ぐため Heparin (局方品) 添加の遠心管にとり約3000rpm で10~15分間遠心分離した。得られた血漿はアンプルに封入し -20°C の冷凍庫に保存した⁵⁾。以後の DPP による実験では採血方法の違いによる差はあまり認められなかった。血漿中の主要タンパクとしてのアルブミン、 β -及び γ -グロブリン、フィブリノーゲン等は牛から採取された市販試薬 (-20°C で保存) を用い上述の血漿と比較検討した。

結果と考察

緩衝溶液中での挙動 まず MNZ の水溶液中での DPP による定量条件を検討した。これをもとにして血漿タンパクの影響、血漿中での挙動を調べて定量分析の条件を設定した。MNZ を pH=7.15, $\mu=0.45$ のもとで測定した DPP は図1の Curve 1 のようになり大きな極大波を示す。今この溶液のイオン強度を減少してゆくと図1に見られるように還元波の極大現象はなくなってゆくが、ピーク電位 E_p は2個に分裂して負電位側に移動する。そしてより負電位側の波高が他方に比べて大きくなるが、波高自体は $\mu=0.45$ のときに比べて減少する。このことは、ここでの定量条件として μ 値を下げてゆくことは不適當であることを示す。それゆえ図1の Curve 1 の極大現象を消すために常法に従って極大抑制剤としてのゼラチンの添加効果をゼラチン濃度 0.001~0.15% の範囲で検討した。結果を図2に示す。ゼラチン濃度の増大とともに波高は急激に減少し約0.02%位で一定値におちつく。これはわずかのゼラチンにより電極水銀表面への MNZ の吸着等々にもとづく極大波が急速になくなり通常の拡散電流になることを示している。分析条件としては、図2を参照して、感度の点ではゼラチン濃度が少ない方が良いが反面ピーク電流値が不安定になるので、種々検討の結果、最終的にはゼラチン量 0.005% が最適であった。この時の図1に対応する結果を図3に示す。吸着現象による極大波はなくなり正常な DPP を示す。しかし緩衝液のイオン強度 μ の減少により図1と類似の挙動を示すとともにピーク電流値は減少する。 μ 値としては緩衝液として通常よく用いられる 0.5~0.45の値を採用した。最適の装置定数としては $\mu=0.5$, ゼラチン 0.005%, pH=7.1, 試料濃度 $\sim 4\times 10^{-4}\text{M}$ のもとで検討した。パルス電圧 ($4E$) は平均的な値として 25mV にセットした。水銀陰極の強制滴水時間 t とピーク電流値の関係調べた結果、 $t=2$ 秒の場合に最も高い電流値を示した。通常滴水銀電極の表面積は $t^{2/3}$ に比例するから、ピーク電流値は $t^{2/3}$ に対して直線関係が期待される。ここでの実験系ではそのような直線関係は得られなかつ

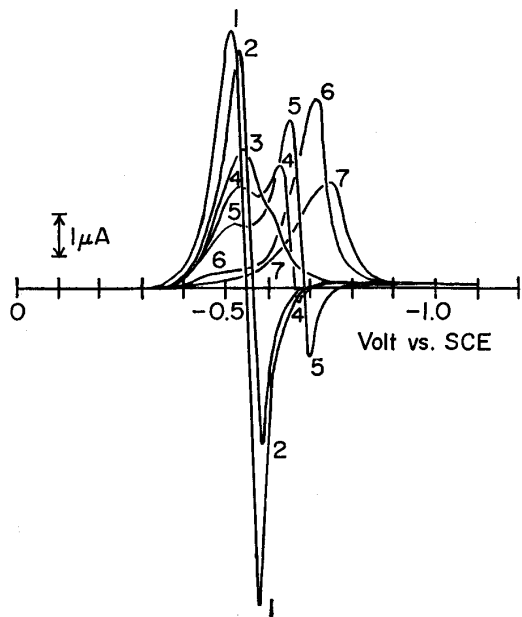


図1: MNZ の DPP に及ぼすイオン強度 μ の影響. Curve 1~7はそれぞれ $\mu=0.45, 0.2, 0.1, 0.075, 0.05, 0.01, 0.0025$ に対応する. PH=7.1~7.5. 4.50×10^{-4} M の MNZ 溶液. $\Delta E=25$ mV.

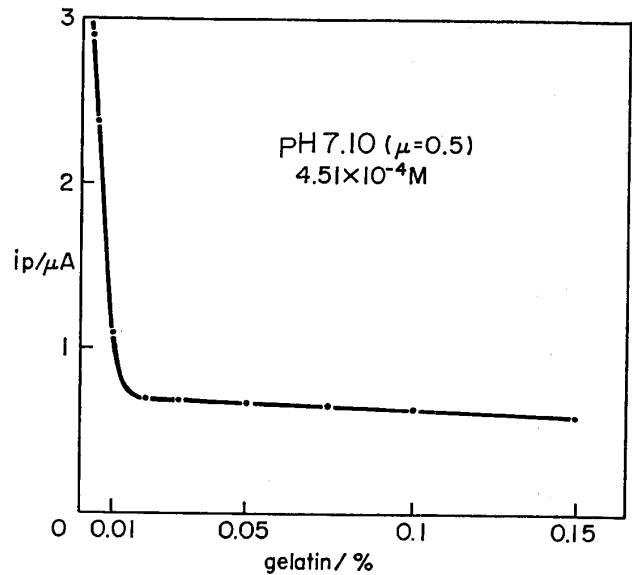


図2: ピーク電流波高 (i_p) に及ぼすゼラチン濃度の影響.

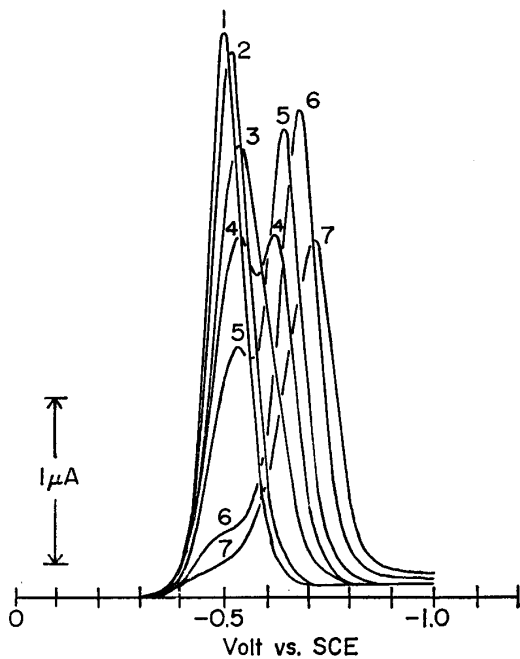


図3: PH=7.1~7.5. 4.40×10^{-4} M. ゼラチン0.005%. Curve 1~7は図1の Curve の μ 値にそれぞれ対応する.

たから、ここで測定しているピーク電流の性格は少し複雑な要素を含むようである。このような理由によってピーク電流値は電位の掃引速度によっても少し変わる傾向があった。一番実験しやすい点を考え 2 mV/sec にセットした。このような実験条件のもとで濃度変化とピーク電流値の関係を調べた。 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ M の範囲で検量線の作成を行った結果、誤差範囲で原点を切る非常に良い直線関係が得られ定量分析に利用し得ることがわかった。1例として低濃度側の検量線を図4に示す。⁶⁾

血漿中の主なタンパク質の DPP 及びそれ等の MNZ の DPP への影響: 血漿中での MNZ の DPP を解析するために、まず血漿中の主なタンパク質であるアルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン、および血液凝固防止剤として少量添加されるヘパリン Na 塩の DPP を検討した。測定液は pH=7.3, $\mu=0.52$ のリン酸緩衝液中で前章記述の測定条件で行った。測定濃度は実際の分析操作で期待されるよりも相当濃い条件下で測定した。得られた結果を図5に示す。アルブミン(濃度は約0.8%)は -0.6 V 付近にピーク電位を示す。血漿中の MNZ のそれと似た電位である。 β -グロブリンおよび γ -グロブリン(約0.37%)は互いにいず

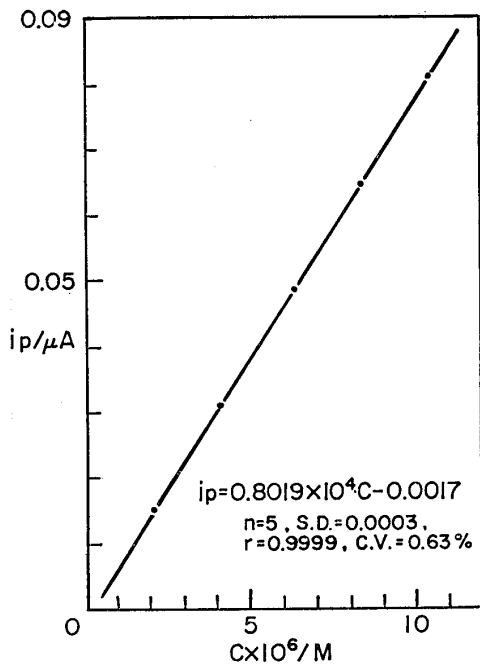


図4: MNZ の濃度と i_p の関係. $\text{PH}=7.10$, $\mu=0.5$, セラチン0.005%, $\Delta E=25\text{mV}$, $D. T.=2\text{sec}$.

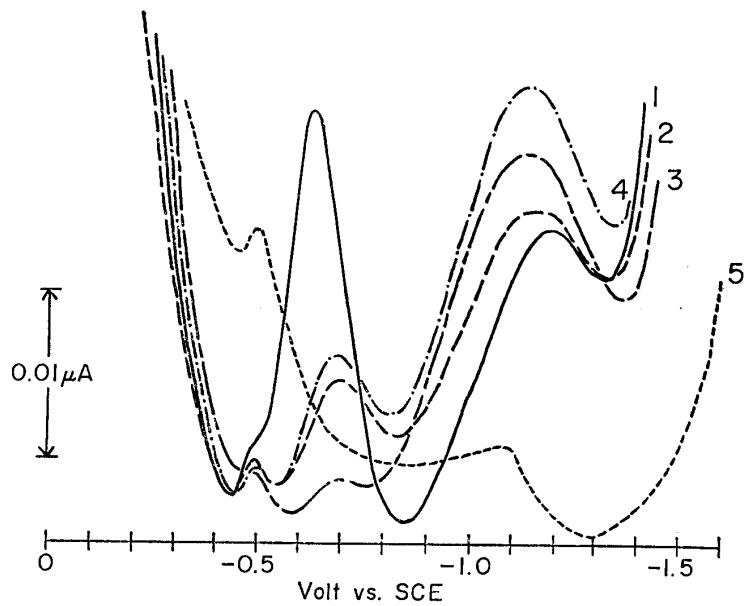


図5: 血漿中の主なタンパク質の DPP. 1: アルブミン (0.75%), 2: γ -グロブリン (0.37%), 3: フィブリノーゲン (0.37%), 4: β -グロブリン (0.38%). なお5はヘパリン Na 塩 (100u/20ml) の DPP を示す. $\text{PH}=7.3$, $\mu=0.52$.

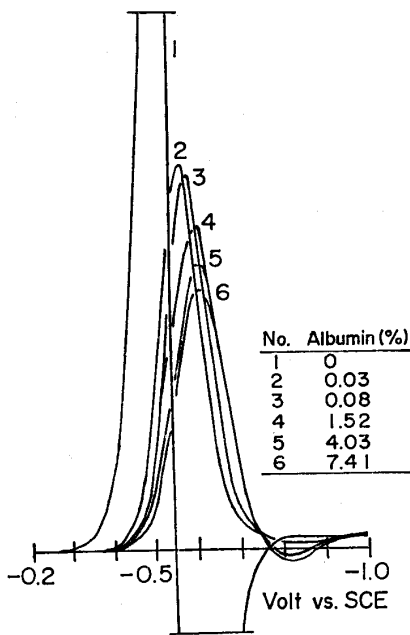


図6: $\text{PH}=7.3\sim 7.1$, $\mu=0.52$, $\text{MNZ}: 4.01 \times 10^{-4}\text{M}$ MNZ の DPP に対するアルブミン添加の影響.

れも似た DPP を示す。-0.6V 付近は谷となるのでアルブミンよりは MNZ の DPP に対する影響は少ない。フィブリノーゲンの DPP も図5に見られるように MNZ の DPP への影響は少ないと思われる。血液凝固防止剤として用いるヘパリン Na は血液 20~30ml に対して 100unit (約 0.74 mg) 程添加する⁷⁾。このヘパリン Na の DPP も図5に見られるように -0.5V 付近にピーク電位を示すので MNZ の DPP に多少影響すると考えられる。以上のような結果より血漿中の MNZ を直接定量する場合バックグラウンドを補正しなければならないこと、またバックグラウンドの DPP を許される範囲内で小さくすることが望まれる。アルブミンは血漿中に最も多く(血漿タンパクの約60%)存在するタンパクであるので MNZ の DPP に及ぼすアルブミンの影響を検討した。アルブミン量を 0~7.41% (血漿中の全タンパク量に近い) に変化させたとき MNZ の DPP はアルブミン量の増大とともにピーク電位は負に移動しピーク電流値は減少する⁸⁾。この現象は SDCP あるいは通常の DCP においても見られた。結果を図6に示す。この図に見られる MNZ の挙動は、わずかのアルブミンの添加により、図3に見られるように、吸着現象等にもとづく極大波は見られず素直な DPP を示す。

アルブミンは高分子タンパクであるので丁度ゼラチン添加による極大波抑制効果と同様の作用をすることがわかる。血漿中の MNZ を定量する場合には従って極大波抑制剤として特にゼラチンを添加する必要はない。いま1例としてアルブミン 0.75%を含む pH=7.3 ($\mu=0.52$) のリン酸塩緩衝溶液を基礎液として MNZ の濃度変化の実験を行った場合、バックグラウンドとしての基礎溶液の DPP 値を補正すると低濃度側まで非常に良い直線関係（検量線）が得られた。この場合 SDCP あるいは普通の DCP では基礎液にもとづく還元波が不明瞭であるためバックグラウンドの補正のしかたに任意性がいくぶん入り検量線の精度が悪くなる。

ラット血漿中の MNZ の DPP と定量：まず 1ml のラット血漿を 10ml の pH=7.3 ($\mu=0.52$) のリン酸塩緩衝液でうすめた場合の DPP を図7に示す。血漿中の各成分は採血条件（採血方法，部位）によって少し変動するといわれているが，DPP 上では実験の部で記した採血条件の違いで殆んど変化は見られなかった。 -20°C で凍結保存したプラズマを解凍した場合フィブリンにもとづくと思われる白い膜状のものが少し析出する。しかしこの場合も MNZ の分析に関係のある電位附近での DPP には殆んど変化はなく，0.1V 附近のフィブリノーゲンに基づくと思われる還元波が消失するだけである。また図7で MNZ の DPP が現われる -0.6V 附近は丁度血漿の DPP カーブの谷と

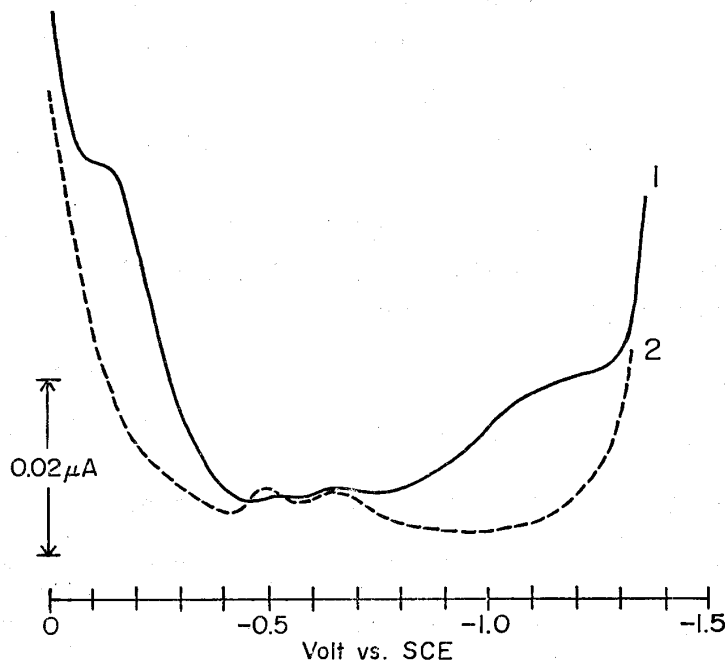


図7： ラット血漿の DPP. 1：採血後すぐに測定。
 2：1を3日間室温放置した場合の DPP. $4E=25\text{mV}$, $D. T.=2\text{sec}$. 測定条件は本文参照。

なり MNZ 定量に好都合である。この谷の附近の DPP は先にも述べたように血漿中のタンパク（主にアルブミン）に基づくものであるからバックグラウンドの補正として，この分を MNZ の測定値から引いてやらなければならない。このようにして base current の補正をしてやると，血漿中での濃度変化の実験結果は非常に良好な直線関係を示した。パルス電圧 $4E=25\text{mV}$ のもとで MNZ の検出限界は $\sim 10^{-7}\text{M}$ であった。これらの結果の一例を図8に示す。図8の結果より血漿中の MNZ を DPP で直接定量することが可能である。血漿中のタンパク質等の各成分量は動物種や飼育条件，週令等により変動することが考えられる。従って分析の場合は標準品を内部標準として添

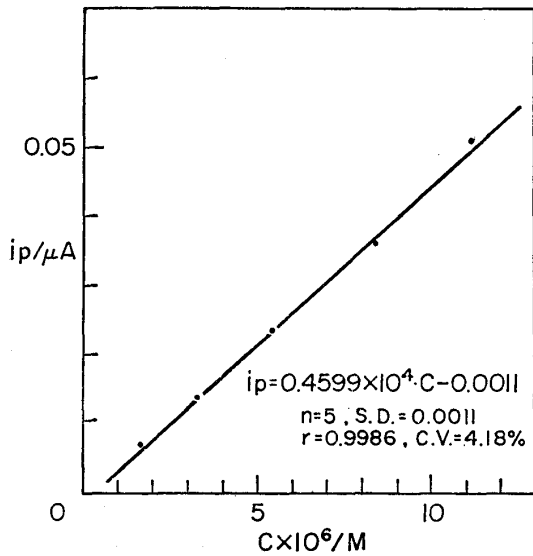


図8: ラット血漿10%(v/v)を含む溶液中で測定した MNZ の DPP-ピーク電流値と濃度との関係。PH = 7.3 のリン酸緩衝液。μ=0.52。

加して行なうことがより有効である。標準品としては MNZ の純品を用いた。この方法で一定量の MNZ を添加した試料について実際に分析を行い回収率を求めて定量分析精度を検討した。最終的な DPP の測定条件はパルス電圧 25mV, 滴下水銀電極の強制滴下時間 2sec, 電位掃引速度 2mV/sec である。血漿は pH=7.3 のリン酸塩緩衝液 (μ=0.52) で10倍に稀釈した (10v%の血漿を含む) 溶液を測定基礎液とした。この基礎液だけの base current に基づく DPP 値を差し引いて補正した。試料は標準品の入っているものと入っていないものについて2回測定する。何回か行なった結果の一例を表1に示す。比較のために SDCP で行なった結果も一所に示した。また表2には血漿の存在しない緩衝液だけで同様の実験を行なった結果を示す。ここで回収率の計算は式1及び式2によった。

$$\text{回収率 (M)} = \frac{(i_{p,1} - i_{p,2})}{i_{p,1}} \times M \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{回収率 (M)}}{M} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

$i_{p,1}$: base current を差し引いた試料のピーク電流値

$i_{p,2}$: 標準品 M mol を加えた試料の base current を差し引いたピーク電流値

表1: Standard Addition Method による血漿中の MNZ の DPP 及び SDCP による直接定量結果, 標準品添加濃度 $M = 5.07 \times 10^{-6} M$, 試料調製濃度 $= 5.07 \times 10^{-6} M$, 記号については本文 (1), (2) 式参照。

| No. | D. P. P. | | | | | | S. D. C. P. | | | | |
|--------------------|-----------|----------|-----------|-----------|------------------------|---------|-------------|--------------|-----------------------|--------|---------|
| | $E_{p/v}$ | a) i_p | $i_{p,1}$ | $i_{p,2}$ | 回収率(M) | 回収率 (%) | $E_{1/2/v}$ | b) $i_{1,1}$ | b) $i_{1,2}$ | 回収率(M) | 回収率 (%) |
| A | 1 | -0.614 | 0.0253 | 0.0238 | 4.83×10^{-6} | 95.3 | -0.580 | 0.0770 | 6.67 $\times 10^{-6}$ | 132 | |
| | 2 | -0.614 | 0.0503 | 0.0488 | | | -0.584 | 0.1355 | | | |
| B | 1 | -0.610 | 0.0259 | 0.0244 | 4.97×10^{-6} | 98.0 | -0.580 | 0.0750 | 6.23 $\times 10^{-6}$ | 123 | |
| | 2 | -0.614 | 0.0508 | 0.0493 | | | -0.586 | 0.136 | | | |
| C | 1 | -0.614 | 0.0264 | 0.0249 | 5.195×10^{-6} | 103 | -0.592 | 0.0870 | 8.65 $\times 10^{-6}$ | 171 | |
| | 2 | -0.610 | 0.0507 | 0.0492 | | | -0.582 | 0.138 | | | |
| D | 1 | -0.616 | 0.0260 | 0.0245 | 5.03×10^{-6} | 99.2 | -0.586 | 0.0780 | 6.82 $\times 10^{-6}$ | 135 | |
| | 2 | -0.616 | 0.0507 | 0.0492 | | | -0.584 | 0.136 | | | |
| Base ^{c)} | | -0.614 | 0.0015 | | | | | | | | |
| E | 1 | -0.616 | 0.0248 | 0.0238 | 4.71×10^{-6} | 92.9 | -0.582 | 0.0715 | 5.75 $\times 10^{-6}$ | 113 | |
| | 2 | -0.616 | 0.0504 | 0.0494 | | | -0.584 | 0.1345 | | | |
| F | 1 | -0.614 | 0.0261 | 0.0251 | 5.32×10^{-6} | 105 | -0.578 | 0.0775 | 6.83 $\times 10^{-6}$ | 135 | |
| | 2 | -0.614 | 0.0500 | 0.0490 | | | -0.586 | 0.1350 | | | |
| G | 1 | -0.616 | 0.0259 | 0.0249 | 5.35×10^{-6} | 106 | -0.588 | 0.0755 | 6.54 $\times 10^{-6}$ | 129 | |
| | 2 | -0.608 | 0.0495 | 0.0485 | | | -0.582 | 0.1340 | | | |
| H | 1 | -0.616 | 0.0258 | 0.0248 | 5.11×10^{-6} | 101 | -0.586 | 0.0770 | 6.91 $\times 10^{-6}$ | 136 | |
| | 2 | -0.616 | 0.0504 | 0.0494 | | | -0.586 | 0.1335 | | | |
| Base ^{c)} | | -0.615 | 0.0010 | | | | | | | | |

回収率(%)で平均=100%, S.D.=4.60%, C.V.=4.60%, n=8

回収率(%)で平均=134%, S.D.=16.8%, C.V.=12.5%, n=8

- a) Base current 込みのピーク電流値 (μA). b) Base current にもとづく分は作図上で引算されている。
c) 基礎溶液の DPP この場合は限界電流 i_1 として測定されるから, 本文(1), (2) 式で計算する場合(1), (2)式の $i_{p.1}$, $i_{p.2}$ を $i_{1.1}$, $i_{1.2}$ として計算する.

表 2: Standard Addition Method による緩衝溶液中 (PH=7.3, $\mu=0.52$) の MNZ の DPP による定量結果, 標準品添加濃度 $M=5.04 \times 10^{-6} \text{M}$, 試料調製濃度 $=5.04 \times 10^{-6} \text{M}$. 記号については本文(1), (2)式参照

| No. | E_p/D | a) i_p | $i_{p.1}$ | $i_{p.2}$ | 回収率(M) | 回収率(%) |
|---|---------|-------------|-----------|-----------|-----------------------|--------|
| A | 1 | -0.488 | 0.0413 | 0.0385 | 5.15×10^{-6} | 102 |
| | 2 | -0.488 | 0.0790 | | | |
| B | 1 | -0.488 | 0.0416 | 0.0388 | 5.27×10^{-6} | 105 |
| | 2 | -0.488 | 0.0787 | | | |
| C | 1 | -0.490 | 0.0407 | 0.0379 | 5.11×10^{-6} | 101 |
| | 2 | -0.488 | 0.0781 | | | |
| D | 1 | -0.488 | 0.0413 | 0.0385 | 5.23×10^{-6} | 104 |
| | 2 | -0.486 | 0.0784 | | | |
| Base ^{b)} | | -0.494 | 0.0028 | | | |
| E | 1 | -0.488 | 0.0419 | 0.0387 | 5.17×10^{-6} | 103 |
| | 2 | -0.486 | 0.0796 | | | |
| F | 1 | -0.488 | 0.0413 | 0.0381 | 4.99×10^{-6} | 99.0 |
| | 2 | -0.486 | 0.0798 | | | |
| G | 1 | -0.488 | 0.0420 | 0.0388 | 5.21×10^{-6} | 103 |
| | 2 | -0.488 | 0.0795 | | | |
| H | 1 | -0.488 | 0.0414 | 0.0382 | 5.20×10^{-6} | 103 |
| | 2 | -0.486 | 0.0784 | | | |
| Base ^{b)} | | -0.494 | 0.0032 | | | |
| 回収率(%)で平均=103%, S. D.=1.93%, C. V.=1.87%, n=8 | | | | | | |

a) Base current 込みのピーク電流値 (μA). b) 基礎溶液の DPP

添加する標準試料濃度 (M) としては ($i_{p.2} - i_{p.1}$) と $i_{p.1}$ の間で有効数字の桁数に差がないようにすることがデータ解析上望ましい。表 1 の試料回収率, 標準偏差, 変動倍数の値は血漿そのままを取り扱うことを考えればまず満足なものと思われる。しかし当然のことながら緩衝液だけの場合に比して精度は落ちるようである。なお SDCP の場合は DPP に比して精度は相当落ちる。主な原因は base current を含めて還元波の波高の取り方からくる誤差が大きいためと思われる。以上記述の実験結果より DPP 法を用いて血漿中の MNZ を直接定量することが可能である。操作も簡単で分析時間も短いのが利点である。我々は Brooks 等が報告している方法, すなわち血漿を除タンパク後 MNZ を酢酸エチルエステルで抽出分離した後アルカリ性溶液でポーラログラフを測定する方法を $10^{-5} \sim 10^{-7} \text{M}$ の各種の濃度について追試したが, 試料回収率 52.3 ± 5.56 (S. D.) % と悪く操作も直接定量に比べて面倒であった。問題点としては血漿中でタンパクと結合した状態にある MNZ と非結合状態にあるものとの 2 種類が考えられ, そのそれぞれが DPP の上で異なる挙動を示した場合定量精度が落ちるのではないかということが考えられる。しかし, ここで行った実験条件の範囲内では DPP で, また検量線作成の上で, 上述の現象によると思われる差は電位, 電流値とも認められず正常な一段の還元波として観測された。

文献並びに脚注

- 1) P. O. Kane, *J. Polarographic Society* 8/3 58 (1961).
- 2) M. A. Brooks, L. D'arconte, and J. A. F. de Silva *J. Pharm. Sci.*, 65 112 (1976). また下記文献も参照
Y W. Chien and S. S. Mizuba, *J. Mea. Chem.*, 21 374 (1978).
- 3) 血漿中には種々の高分子タンパクを含むので通気の際発泡現象を示す。これをできるだけ少なくするためこのように処理した。
- 4) 榎本克彦, 緩衝液, 化学実験学第2部, 第12巻, 微生物及び酵素実験法, p. 119, 河出書房(1944)
- 5) 一度使用したものの残りを保存して再使用することはしなかった。
- 6) この場合の検出限界は $4E=100\text{mV}$ のもとで $\sim 5 \times 10^{-7}\text{M}$ であった。
- 7) 実際は注射液となっており保存剤として benzylalcohol を0.9%程度含まれている。
- 8) これは図2に示したゼラチン濃度を変えた時の挙動に似ており, 主に溶液の粘度の増大(拡散定数の減少), タンパク質等高分子物質との相互作用ならびに電極界面の問題に起因する。
- 9) ポーラログラフならびに電気分析化学討論会(Oct. 1980, 九州大学)で発表した。