

カラメル輸液の高速液体クロマトグラフィー による薬物動態の研究

王 亜軍*・松田達彦*・大石秀夫**
清水祥夫*・井上和幸*・田村俊二*

(受理: 1984年11月30日)

Studies on Pharmacokinetics by High Performance Liquid Chromatography of Caramel Transfusion

Yajun WANG*, Tatsuhiko MATSUDA*, Hideo OHISHI**, Yoshio SHIMIZU*
Kazuyuki INOUE* and Shunji TAMURA

摘 要

栄養輸液剤であるグルコース由来のカラメル単剤 (DA-10) を家兎・犬・牛・馬に投与した場合の薬物動態について、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を主な手段として検討したところ、いくつかの知見を得ることが出来た。結果は次の通りである。

1. カラメル液の糖分析用逆相カラム (LS-450 NH₂SIL) を使用する HPLC パターンは 11 ピークを認める特徴あるものであった。

2. カラメル液中にグルコース、フラクトース、マルトースの存在が確認された外、その他のオリゴ糖類、フルフラール、ヘキシトールの存在が推測された。

3. カラメル液を動物の静脈内へ投与すると直後から尿中にカラメルの特徴パターンを示す物質が確認され、カラメルそのものが排泄されている事が判明した。カラメル投与後の尿 1 容にアセトニトリル 2 容を混合し、25,000 g 5 分間遠心分離すると比重差からカラメル特有色の着色層が認められ、HPLC 分析によりカラメルであることが確認された。

4. カラメルの尿中への排泄量に比例して尿量は増大した。カラメルの尿中への排泄は投与約 1 時間後にピークを示し、漸減しながら約 6 時間後まで認められた。

5. 動物にカラメルを投与した後、尿中カラメルの経時的 HPLC 分析によれば、尿量のピーク時に一致して溶媒部位にヘキソースの分解産物と思われる成分が増大した。グルコース、フラクトース、マルトースの分画はやや減少するか、あまり変らなかった。

* 帯広畜産大学獣医学科家畜薬理学教室

Department of Veterinary Pharmacology; School of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan.

** 日高地区農業共済組合

Hidaka Agricultural Aid Association, Mitsuishi, Hokkaido, Japan.

緒 言

カラメルは原料や製法の相違によって大きく4種類に分類されているが⁷⁾、いずれも単一の物質ではなく未反応の単糖類あるいは二糖類の縮・重合物、糖脱水物など多数の物質を含む混合物であり、その化学的本態に関する研究は少ない^{5), 6)}。

また、カラメルの栄養輸液としての治療的应用面における研究も乏しく、大村(1951)⁹⁾の報告例があるのみである。

獣医領域ではカラメルに安息香酸ナトリウムカフェインをビタミン B₁ 塩酸塩など添加した合剤“ラーメル”(タケダ薬品工業)が強心ならびに栄養輸液として広く応用されている¹¹⁾。

そこで本研究ではグルコース由来のカラメル単剤を動物の静脈内へ投与した場合の薬物動態について、高速液体クロマトグラフィーを主な手段として検討を加えたところ、いくつかの知見を得ることが出来たので報告する。

方法および材料

1. 試験方法

カラメル単剤を動物に静脈注射し、投薬前後の変化を血清、尿を材料として高速液体クロマトグラフィー(以下 HPLC と略記)によって分析した。

対照の薬剤として高張の20%グルコース液および20%マンニトール液を使用した。

2. HPLC

1) 装 置

東洋曹達 HL-803 D 型, カラム; 糖分析用逆相カラム LS-450 NH₂SIL, サイズ 4 mm, ID×300 mm

2) 溶出条件

75/25 アセトニトリル緩衝液, 流速 0.7 ml/min, 20°C, サンプル注入量 20 μl

3) 検 出 器

東洋曹達 RI-8 型屈折式 Detector を用い各分画の濃度比はデジタイザ MYPAD-A₃, Logitec K-510 分解能 0.1 mm, で測定した。

3. 供試動物

Table 1 に示す通り。

4. 供試薬剤

カラメル液; 大五栄養化学株式会社製, 動物用30%カラメル注射液 (DA-10), 500 ml 点滴ビン入り, 製造番号 N001 DB。

マンニトール液; (株)大塚製薬工場製, 20 w/v%, 日本薬局方 D-マンニトール注射液 500 ml 点滴ビン入り, 製造番号 2 A 87。

グルコース液; 共成製薬株式会社製, 20 w/v%, 日本薬局方ブドウ糖注射液 500 ml 点滴ビン入り, 製造

Table 1. Animals used and experimental conditions of caramel treatment.

Animal	Prot. No.	Injected medicine	Injection volume (ml)	Injection time (min)
Rabbit	R-1, 2	30% Caramel	30	30
	R-3, 4	30% Caramel	40	40
	R-5~10	30% Caramel	10	10
	R-11	20% Mannitol	20	20
	R-12	20% Glucose	10	10
Dog	D-1, 2	30% Caramel	30	30
	D-3	20% Glucose	30	30
Cattle	C-1, 2, 4	30% Caramel	1000	30
	C-3	20% Glucose	1000	30
Horse	H-1, 2	30% Caramel	1000	40
	H-3, 4	30% Caramel	500	30
	H-5	20% Mannitol	500	30
	H-6	30% Caramel	4000	90

番号 4803。

リンゲル液；山口製薬株式会社製，日本薬局方リンゲル液 500 ml 点滴ビン入り，製造番号 5029。

標準糖試薬；D-リボース（和光 Lot No. WKP 4584），D-キシロース（和光 Lot No. LTE 1274），L-アラビノース（和光 Lot No. LTE 8702），フラクトース（和光 Lot No. TSQ 3635），D マンノース（MERCK 1185399），グルコース（前出），ガラクトース（和光 Lot No. DPK 4255），サッカロース（和光 Lot No. WKJ 7160），マルトース（和光 Lot No. PK 16975），ラフィノース（和光 Lot No. TSH 7330）。

その他；5-ヒドロキシメチルフルフラール（5-HMF；和光）。

5. 投与および材料採取

1) 家兎および犬

家兎はウレタン麻酔（1 g/kg B. W.）後，犬はペントバルビタールナトリウム麻酔（25 mg/kg B. W.）後，仰臥保定し，尿管に導尿カテーテル（ヒビキポリエチレン細管 Fr. No. 5）を挿入留置した。

試験はまず，家兎は耳静脈，犬はサフェナ静脈よりリンゲル液を 1 ml/min の割合で注入し，尿量が安定した後，リンゲル液に替えて供試薬剤を 1 ml/min の割合で注入した。その後，再びリンゲル液に切り替えて同じ割合で注入を続け，尿量が元に戻った時，試験を終えた。

2) 牛および馬

牛，馬ともに棗場内に保定し，バルーンカテーテルを膀胱内に留置した。

供試液注入前30分に1回目の採血および採尿を行った。供試薬剤の注入量および所要時間は Table 1 に示すとおりである。以後30分毎または一部の実験例では1時間毎に実施し，供試薬剤注入終了後5時間または10時

間で採材を終えた。

6. 血液および尿の処理

牛ならびに馬において，血液は頸静脈より採血後，約2時間室温に放置した後，3,000 r. p. m.，20分間遠心分離を行い，その血清を測定に供した。

また，尿は 3,000 r. p. m.，5分間遠心分離し，その上清を測定に供した。いずれも測定時まで -20 °C で冷凍保存した。

結 果

1. HPLC 分析

1) カラメル液

Fig. 1 に示すとおり，I~XI の11ピークが認め

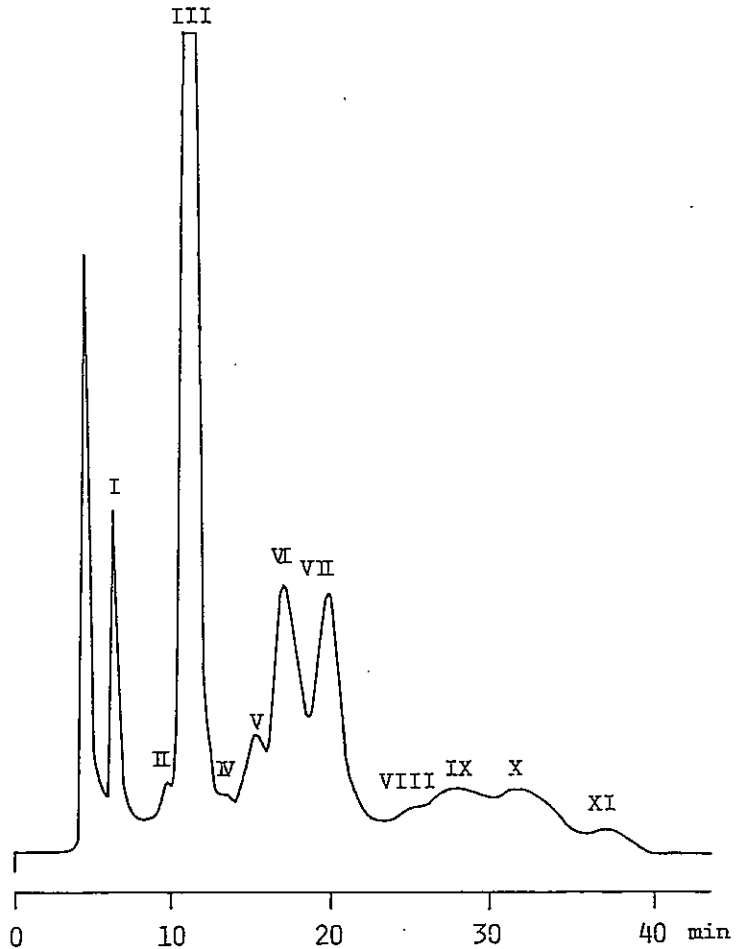


Fig. 1 Elution profile of caramel solution by HPLC. II; Fructose III; Glucose VII; Maltose

- 1 ; D-Ribose
- 2 ; D(+)-Xylose
- 3 ; L-Arabinose
- 4 ; Fructose
- 5 ; D-Mannose
- 6 ; Glucose
- 7 ; Galactose
- 8 ; Sucrose
- 9 ; Maltose
- 10 ; Raffinose

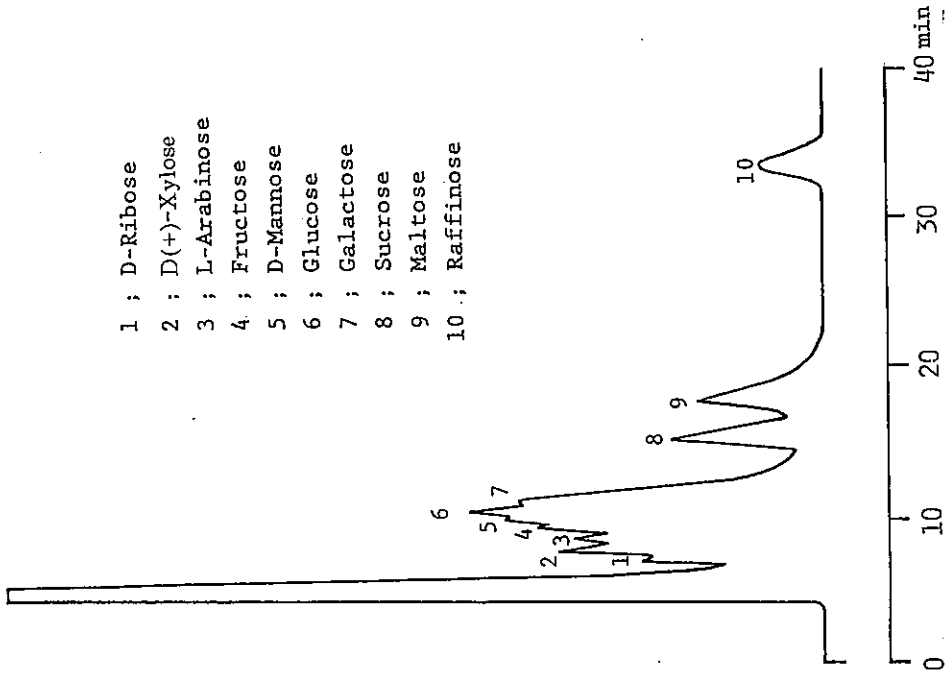


Fig. 2 Elution profile of 10 authentic sugars by HPLC.

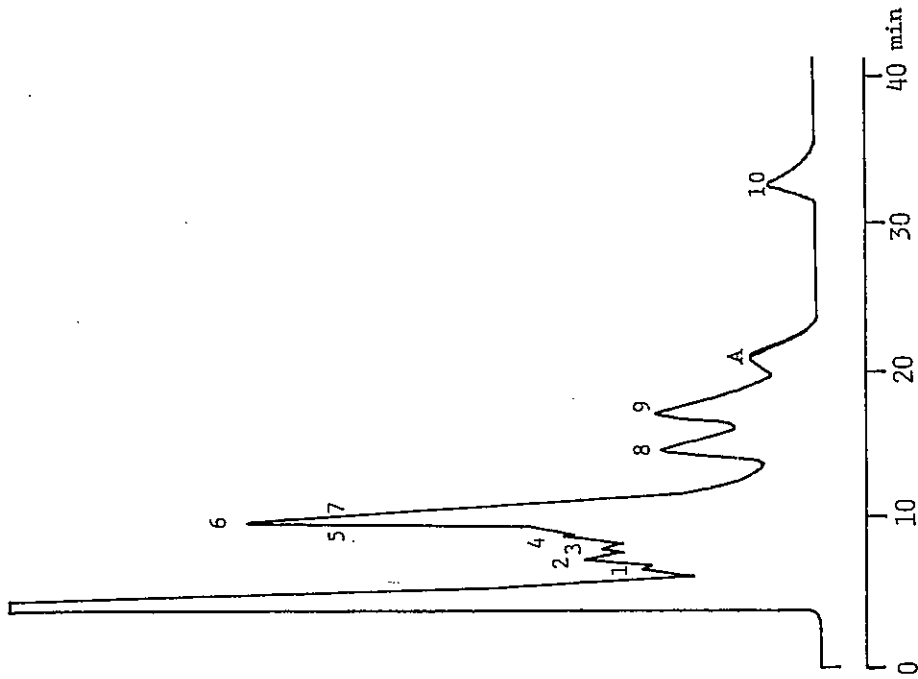


Fig. 3 Elution profile of the mixture of 10 authentic sugars and 30% caramel (5 : 1, v/v) by HPLC.

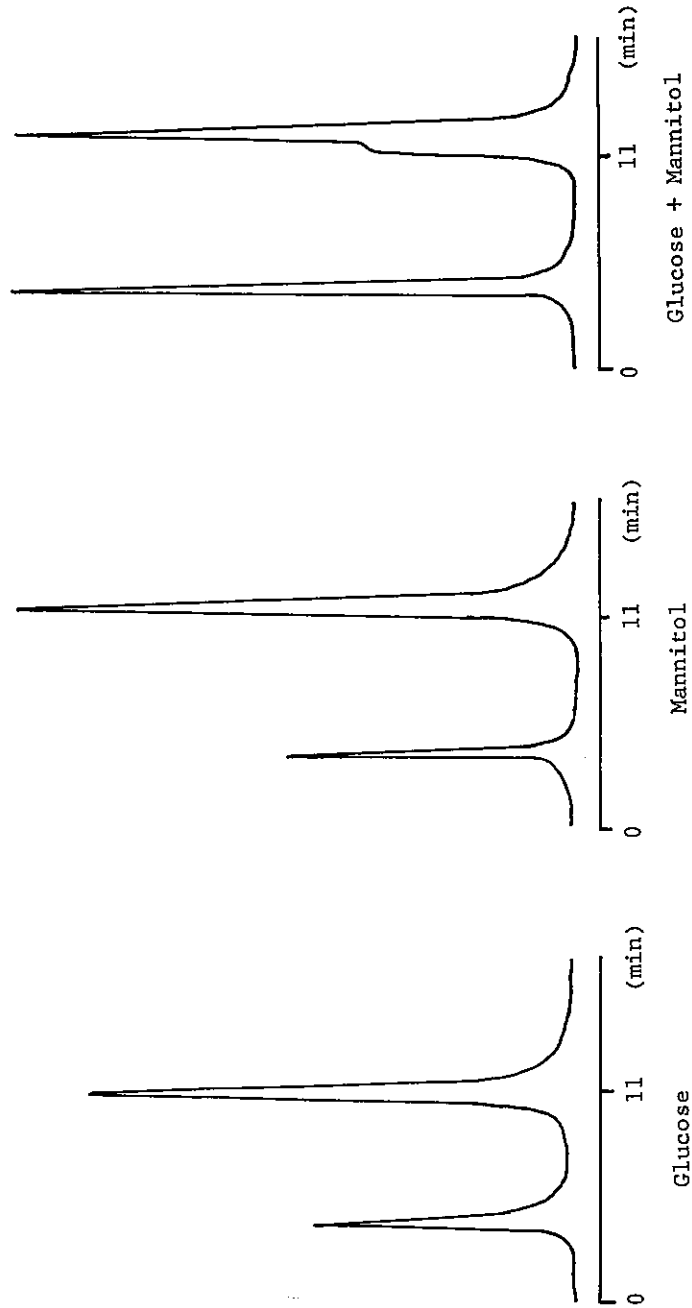


Fig. 4 Elution profile of glucose and mannitol by HPLC.

られた。流速 0.7 ml/min, 試料注入後 4 分で緩衝液のピーク 0 が現れ, 引き続き 8 分で先鋭のピーク I (10.04%) が現れる。9 分で小さなピーク II (1.96%), 引き続き 10 分~13 分に最も大きなピーク III (34.10%) が出現し, 13 分から 14 分にかけて小さなピーク IV (1.21%) を認めることが出来る。14 分~16 分にピーク V (14.77%), 19 分~23 分にピーク VII (14.74%), 23 分~26 分にピーク VIII (2.68%), 26 分~30 分にピーク IX (6.28%), 30 分~36 分にピーク X (7.29%), 36 分~40 分にピーク XI (1.84%) が認められた。

2) 標準糖液

10 種類の標準糖 (5%) をカラメル液と同条件で 1 種ずつピークの現れる位置を確認した。各種糖のピークの頂点の出現時間は, リボース (7 分 30 秒), キシロース (8 分), アラビノース (8 分 30 秒), フラクトース (9 分), マンノース (10 分 30 秒), グルコース (11 分), ガラクトース (12 分), サッカロース (16 分 30 秒), マルトース (19 分 30 秒), ラフィノース (37 分) の結果が得られた。さらに, 10 種類の標準糖を等量ずつ混合して得た液の HPLC パターンを Fig. 2 に示した。

3) 標準糖液とカラメル液

標準糖ピークとカラメル液ピークの位置的關係を知る目的で 10 種類の標準糖 5 容にカラメル液 1 容の割合で混合し, 同一条件で試験に供した。その HPLC パターンを Fig. 3 に示した。すなわち, 5・6・7 位のマンノース, グルコース, ガラクトース部分が著しく増大し, 3 つのピークは大きな 1 つのピークに変化した。また, 9 位のマルトースのピークも著しく増大した。また, マルトースの後方に標準糖では認められないピーク (A) が出現していた。

4) マンニトールおよび 5-HMF

マンニトール単独 HPLC は, 9 分~13 分のピークで頂点は 11 分 30 秒に位置していた。この位置はグルコースにきわめて近似で, また, ガラクトースとも重なる位置である。グルコースと比較するため, Fig. 4 にグルコース単独, マンニトール単独それに両者等量混合のパターンを示した。

5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-HMF) は緩衝液と共に (わずかに後位) 極めて早期に溶出していた。

5) 尿中カラメル

牛あるいは馬の尿 1 容に対し, 95 w/v% アセトニトリル 2 容を混合し, 25,000 g, 5 分間遠沈し, 上清を取って 20 分間室温に静置すると上層は透明, 下層は褐色の二層に分れた (Fig. 5a)。その褐色物質を含む部分を前記のカラメル液及び標準糖液と全く同一条件で HPLC 分析に供した。

Fig. 5b に示すように尿中の褐色液層の HPLC

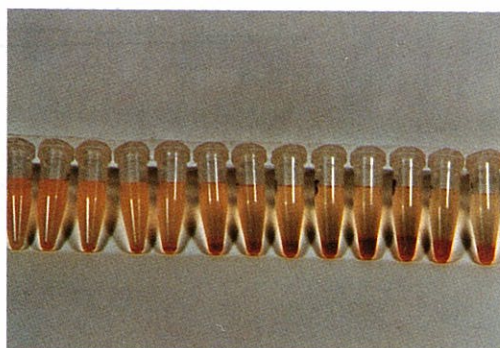


Fig. 5a Caramel-like phase collected from urine by centrifugation at 25,000 g for 5 min.

Table 2. Time course changes of percentage in its components analyzed HPLC after intravenous injection of 1 L of 30% caramel solution into cattle (Prot. No. C-1).

hr	Peaks	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
0		7.24	3.34	44.97	1.80	4.74	9.88	12.48	3.64	5.12	5.37	1.41
1.0		7.17	3.61	43.48	2.29	4.16	10.29	14.14	2.30	4.98	5.94	1.64
2.0		7.85	4.71	42.52	2.98	5.03	9.47	13.81	2.99	5.01	4.19	1.43
3.0		8.74	5.33	45.83	3.30	4.00	7.57	11.50	2.51	4.28	5.32	1.62
4.0		11.35	6.54	50.52	4.77	3.11	6.16	9.22	1.84	2.91	2.48	1.12
4.5		12.41	5.76	57.96	2.09	2.22	3.19	5.10	6.90	0.54	2.08	1.75

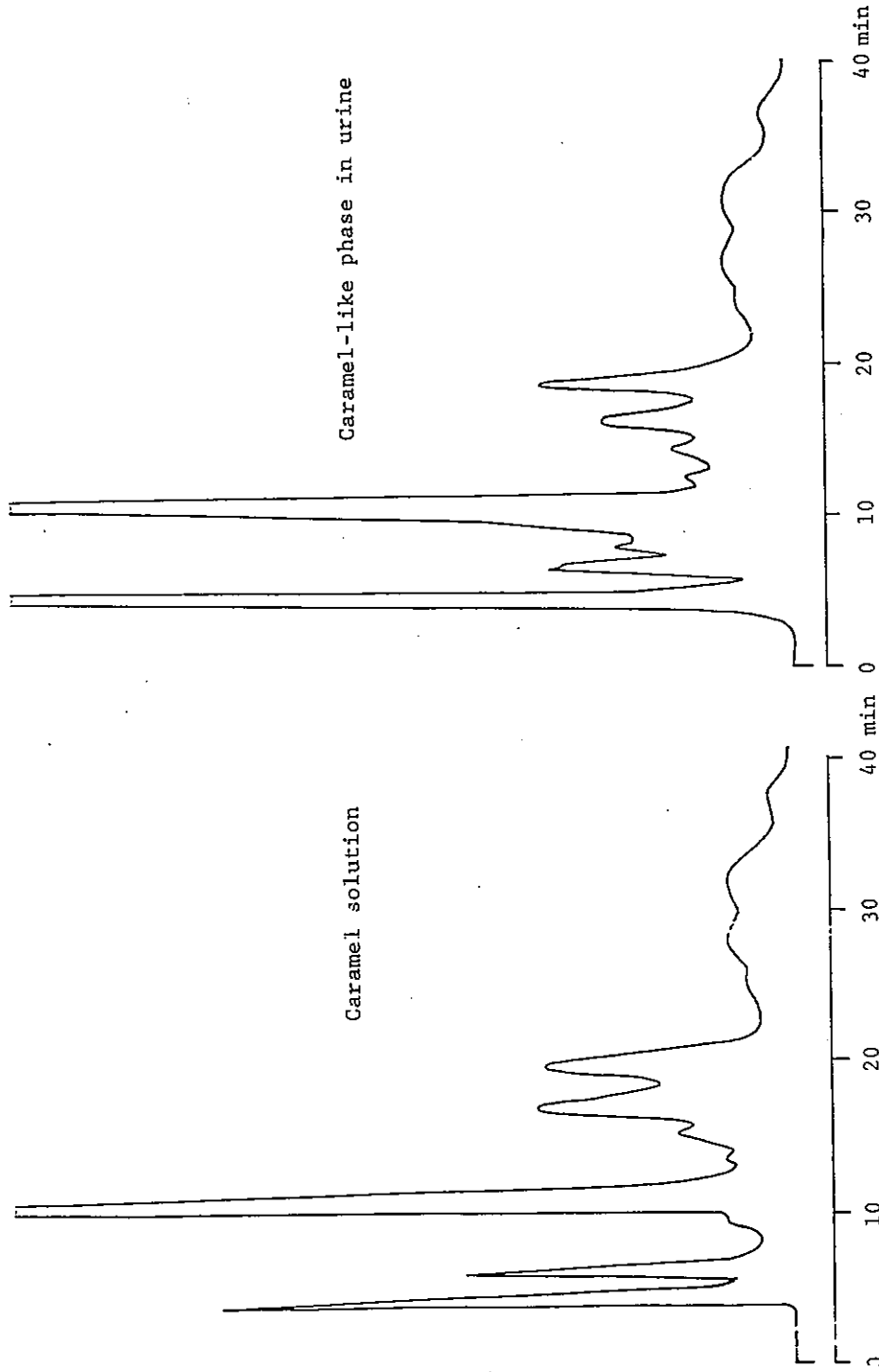


Fig. 5b Elution profile of caramel solution and caramel-like phase in urine supernatant collected by centrifugation at 25,000 g for 1 hr after caramel injection by HPLC.

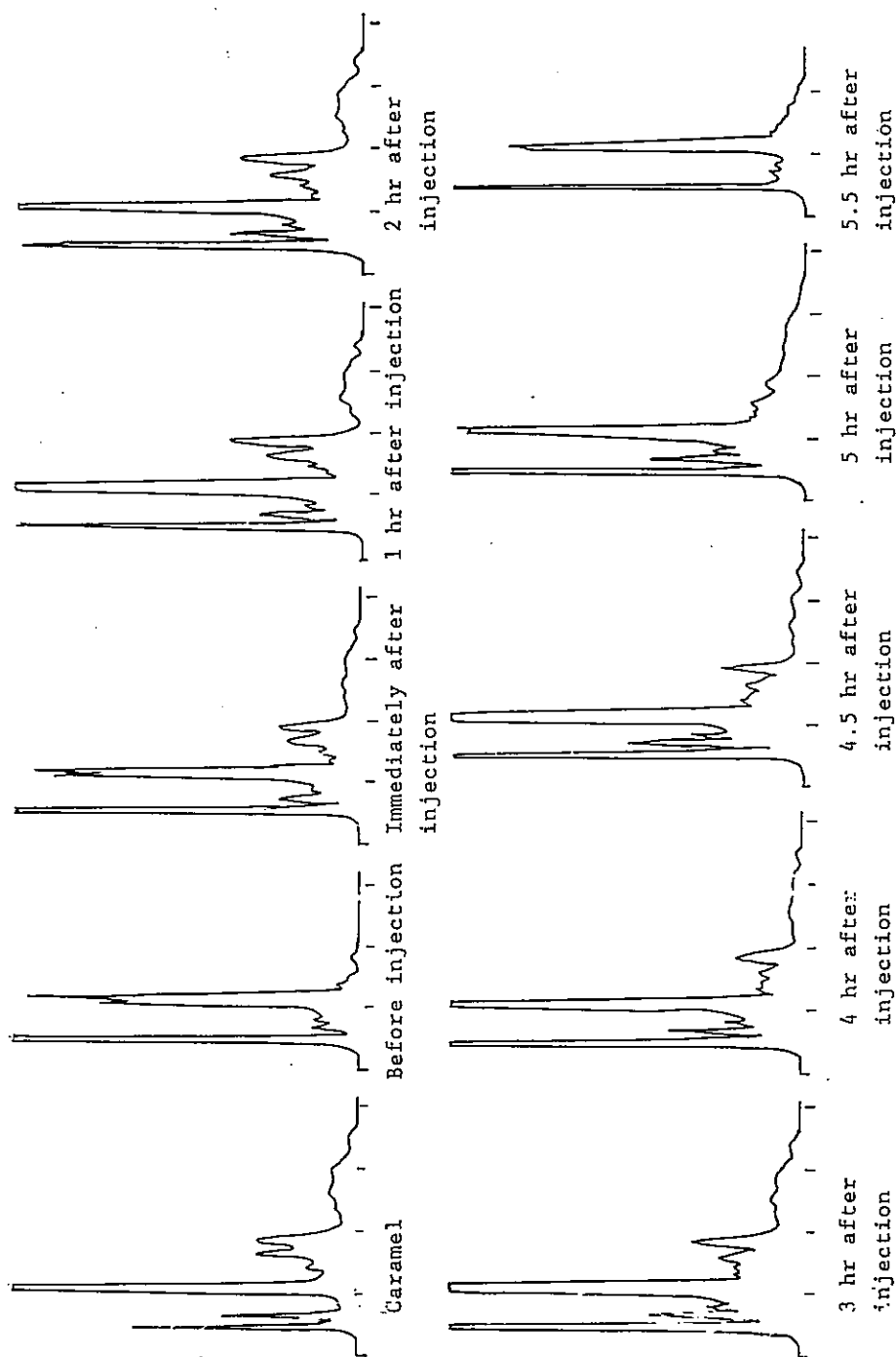


Fig. 6 Time course changes of chromatograph in urine colored layer after intravenous injection of 30% caramel into cattle (Prot. No. C-1).

パターンはカラメル液のそれとわめて近似のパターンを示しており、カラメルそのものが排泄されていることが判明した。

この尿の経時的な HPLC パターンの変化は Table 2 および Fig. 6 に示した。

6) 20%ブドウ糖投与例の尿 HPLC

Fig. 7 に示すように30分～1時間で急速にグル

コースピークは増大を示し、そして3～4時間で急速に減少した。

7) 血清の HPLC

血液中に投与された薬剤の絶対量の不足のためか、或いは、除蛋白操作と一緒に除去されるためかグルコースを除いて HPLC 分析による検出は不能であった。

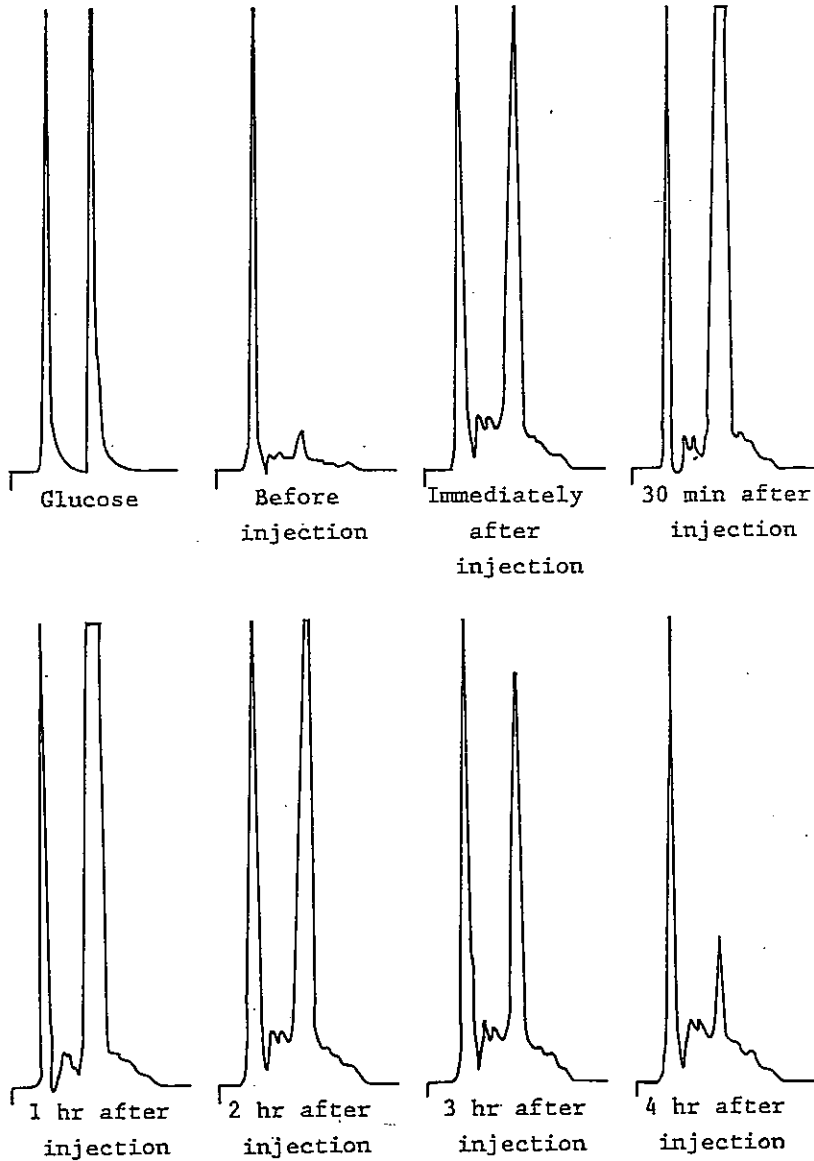


Fig. 7 Time course changes in glucose in the urine after intravenous injection of 1 L of 20% glucose into cattle (Prot. No. C-3).

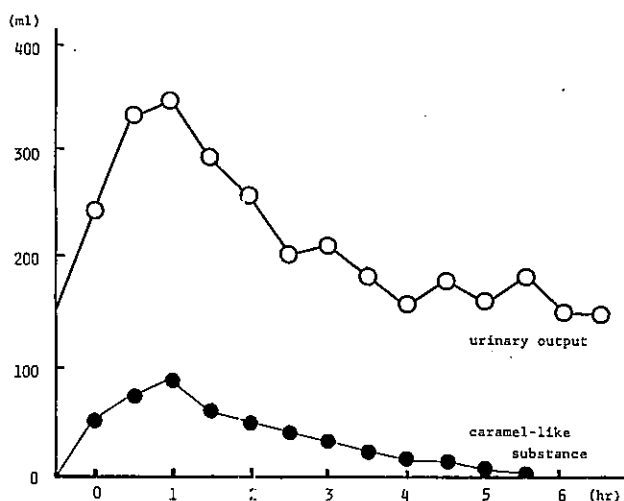


Fig. 8 Time course relationship between the amounts of urine and caramel into urine after intravenous injection of 30% caramel into a horse (Prot. No. H-4).

2. 尿量とカラメル様物質排泄量の関係

Fig. 8 に馬における尿量の経時的変化とそれに伴うカラメルの排泄量を示した。

統計学的な処理によれば相関係数 0.9708 標準誤差 1.21 で、きわめて強い相関関係にあることが示された。

3. その他の検査結果

尿量、血糖量、尿および血清の浸透圧・Na量・K量の経時的変化について測定した成績は、松田¹²⁾が詳細に報告している。

また、牛および馬の投与例における臨床的な所見は体温・脈搏・呼吸並びに末梢血液像などに、とくに異常な変化は認められなかった。

考 察

今回供試したカラメル液 (DA-10) は、グルコースを触媒なしで約 190°C で焙焼して得られたものである³⁾。

河本 (1983)⁷⁾によればカラメルの製法は原料となる糖の種類や処理方法によって大きく 4 種に分類されるが、いずれのカラメルにおいても、その化学的構成成分などは単一の物質ではなく、未反応の糖や重縮合した糖や副産物など多数の混合物であり、不明の点が多いとしている⁴⁾。

今回供試した DA-10 も例外ではなく、構成成分は従来まで不明であったが、今回糖分析用の HPLC に

よって分析を試みたところ、このカラメル液は 11 のピークで溶出され、逆相クロマトグラフィーはすぐれた分解能を有することが判明した。各ピークの成分を知る目的で 10 種の標準糖を使用してその位置を確認し、カラメルのそれと比較した。

10 種の糖は逆相カラムを使用しているので、リボース、キシロース、アラビノース、フラクトース、マンノース、グルコース、ガラクトースの順に単糖類が溶出し、次いでサッカロース、マルトースの二糖類が、遅れてラフィノースの三糖類が溶出し、分子量の小さい順に溶出する傾向を示していた (Fig. 2)。

これらの 10 種の糖のピークとカラメルのピークの関係を知る目的で、10 種の糖の混合液に供試カラメルを加えて HPLC を試みたところ Fig. 3 に示したように標準糖のピークに明らかに上乘せする形でピークの増大が認められたのはグルコース (カラメルピーク III に一致)、マルトース (カラメルピーク VII に一致) が著明であった。他にフラクトース (カラメルピーク II に一致) のピークもわずかながら増量が認められた。

また、カラメルピーク III はマンノース、グルコース、ガラクトースのピークが 1 つとなって構成されていた。

次に、6 種の糖アルコール、ヘキシトール的一种であるマンニトールはカラメルピーク III の後位に重なることが判明した (Fig. 4)。

同じヘキシトールの D-ソルビトールはマンニトールと分子量も同じ立体異性体で D-グルコースから作られるので、D-グルコース由来カラメルのピーク III の構成成分として重要な役割を占めていることが推察される。

また、カラメルの存在の 1 つの指標とされる 5-HMF¹⁾ はきわめて早期に緩衝液の後位に溶出されていることが確認された。

したがってヘキソースの分解産物としてのヒドロキシメチルフルフラール、レブリン酸、ギ酸なども同一部位に出現するものと思われる。

SUGISAWA と EDO (1964)¹³⁾ は触媒なしにグルコースを 150°C に加熱することによって得たカラメル中のオリゴ糖類分類の分離と同定について述べており kojibiose, sophorose, nigerose, laminaribiose, maltose, cellobiose, isomaltose, gentiobiose, 1,6-anhydroglucose が分離され glucose の pyrolysate から結晶性 β アセテートとして同定した。さらに、ペーパークロマトグラフィーと濾紙イオン泳動法によって trehalose, isomaltotriose などをおよそ同定したとしている。

PICTET ら (1920)¹⁰⁾ は α -D-グルコースは 150°C で急速に 1 モルの水を消失し、 α -グルコサン (1, 2-アンヒドログルコース) が出来ると報告し、CRAMER と COX (1922)²⁾ はこの物質が α -1, 2-アンヒドログルコースの構造である証拠を示した。

O'COLLA (1962)⁸⁾ は nigerose, laminaribiose, cellobiose, isomaltose, gentiobiose, 1,5-結合した二糖類が 130°C で樹脂触媒を用いた glucose の加熱で得た重合体から分離したと報告している。

今回の供試した DA-10 の構成成分は、10 種の標準糖の位置からしてピーク I ~ III は単糖類、V ~ VII は二糖類、IX ~ XI は三糖類かないしは近縁の物質 (オリゴ糖類) と推定され、いずれにしる文献からも様々な異性体や糖アルコール、それに褐色色素も加わって複雑な物質の構成になっていると思われる。

つぎに、動物に DA-10 が静脈注射された場合、すみやかに尿中へ排泄され、アセトニトリルとの比重差に対する親和性の差によると思われる褐色層の分離が可能であった。

また、この HPLC パターンにおいて、ほぼ DA-10 原液のパターンを呈しており、あまり生体内で変化を受けないまま排泄されていることが判明した。

尿中カラメルの各ピークの経時的な変化を見ると (Table 2), ピーク III は標準糖のマンノース, グルコース, ガラクトースに当る部分であるが、カラメル内の構成成分の量的変化は 5 ~ 6 時間経過しても起きていない。

ということは、このピーク III はグルコースなどとは異って体内変化を受けにくい物質、たとえばソルビトールかそれに近い物質と見るのが妥当かと思う。対照薬剤 20% グルコース液を投与した場合の尿中 HPLC パターンの経時的変化を見ると (Fig. 7), 体内利用されるためか、HPLC のグルコースピークは急速に減少している。また、尿中カラメルのピーク III が 2 峰性を示すパターンとして確認されており (Fig. 6), DA-10 投与前尿でも見られた尿中物質にソルビトールのようなヘキシトールが重なった像ではないかと類推されるのである。また、カラメルの排泄量に比例して尿量が著しく増加する事実について (Fig. 8), 松田 (1983)¹²⁾ が一連の実験で、尿量, 浸透圧, Na 量, K 量を浸透圧利尿剤として代表的なマンニトール液・高張ブドウ糖液と対比しながら詳細に検討を加えた結果、DA-10 も近位尿細管における難吸収性物質であり、典型的な浸透圧利尿を惹起すると述べている。

また、尿中カラメル HPLC の経時変化 (Fig. 6) は、尿量のピーク時に一致してピーク III の後位にヘキシトールと一致するピークが増大しており、グルコース (ピーク III の前位), フラクトース (ピーク II), マルトース (ピーク VI) は減少するか、あまり変化は見られない。

以上のような DA-10 点滴注射で血中及び尿中のカラメルの動態を高速液体クロマトグラフィーで追跡したところ、尿中のそれは主体のカラメル (ピーク III) がそのままの形で持続して排泄されることが明らかになった。

謝 辞

本研究に当り有益な御助言を賜った帯広畜産大学畜内科学教室 一条茂教授、実験に当り牛の提供を頂いた新得畜産試験場衛生科の工藤卓二科長ならびに北海道農業開発公社の山科秀也獣医師の各位に対し深謝致します。

参 考 文 献

- 1) ALFONSO, F. C., G. E. MARTIN and R. H. DYER.(1980): High Pressure Liquid Chromatographic Determination of 5-(Hydroxymethyl)-2-Furaldehyde in Caramel Solution., J. Assoc. OFF. ANAL. CHEM., 63: 1310-1313.
- 2) CRAMER, M. and E. H. COX. (1922): Sur la constitution de la glucosane, Helv. Chem. Acta., 5: 884.
- 3) 林 俊克 (1980): DA-10の製法について, 武田薬品研究所.
- 4) KITAOKA S. and K. SUZUKI (1967): Caramels and Caramelization. Part I. The Nature of Caramelan., Agr. Biol. Chem., 31: 753-755.
- 5) KŌMOTO M. (1973): A Colorimetric Method for the Determination of Imidazoles Contained in Caramel and Cola-Drink., Proc. Res. Soc. Japan Sugar Refinerries' Technologists, 24: 50-57.
- 6) KŌMOTO M., S. FUJII and M. OZASA (1974): A Densitometric Method for the Determination of Imidazoles Contained in Caramel Colors and Cola-Driks, Part 2., Seito Gijutsu Kaishi, 25: 25-31.
- 7) 河本正彦 (1983): カラメルの種類について, 神戸大学農学部.
- 8) O'COLLA, P. S., E. E. LEE and D. McGRALH (1962): The Action of Cationexchange Resins on D-glucose., J. Chem. Soc. 2730.
- 9) 大村泰男 (1951): カラメル輸液の研究 (1) および (2), 日本医事新報, 第1426号: 9-15および第1427号: 17-20.
- 10) PICTET, A. and P. CASTAN (1920): Sur la glucosane., Helv. Chem. Acta., 645.
- 11) 松下維浄 (1981): 動物用医薬品要覧, 日本動物薬事協会, 東京, 117.
- 12) 松田達彦 (1983): カラメル輸液の浸透圧利尿について, 帯広畜産大学修士論文.
- 13) SUGISAWA, H. and EDO, H. (1966): The Thermal Degradation of Sugars. I. Thermal Polymerization of Glucose., J. Food sci., 31: 561.

Summary

Caramel solution derived from glucose (a nutrient drug for transfusion, DA-10; Daigoeiyo Chem. Co. Ltd.) was injected to rabbits, dogs, cattle and horses to elucidate its pharmacokinetics by high performance liquid chromatography. The results are as follows.

1) Caramel solution itself was separated into 11 fractions on the column for sugar analysis.

2) Caramel solution was analyzed to consist of glucose, fructose and maltose. Oligosaccharides, furfural and hexitol were also assumed to be in it.

3) The characteristic pattern of caramel solution was observed in urine immediately after its intravenous injection to animals, suggesting that caramel solution itself was excreted into urine. This was supported again by the colored compound obtained from the mixture of urine and acetonitrile solution (2:1, v/v) by centrifugation at 25,000 g for 5 min.

4) The urinary output increased in exact proportion to the amount of caramel excreted into urine.

5) The time course analysis of sugar in urine revealed that a certain hexitol content attained to maximum in accordance with the peak of urine output, while glucose, fructose and maltose levels decreased to lesser extent or were almost constant.