Metabolism of 6-Dehydro-6-Chloro-17 α -Acetoxypregesterone in Rabbit

Hiroji OKADA, Yoshitaka HIGASHI, To-oru, NISHIMURA
and Michimasa AHARA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine,
Kyoto, Japan (Professor : Gen-ichi Tokuda)

In the previous experiment with 6-dehydro-retropregesterone and 6-dehydro-pregesterone, it was concluded that an introduction of 6:7 double bond to Δ^4 -3-ketosteroid resulted in the stability of Δ^4 -double bond in the course of the metabolism in vivo. In this experiment, the stability of the Δ^4 -double bond was examined with 6-halogenated Δ^4 -3-ketosteroid, 6-dehydro-6-chloro-17 α -acetoxypregesterone (Δ^6 CAP).

Cold Δ^6 CAP was labeled with tritium by Wilzbach's method. The labeled compound was chromatographed on silicagel and recrystallized 3 times from methanol. Further purification on paper in ligroin-80% methanol system was repeated two times prior the administration to rabbit. The paper chromatographic purification eliminated the contaminated radioactive material which was slightly more polar than Δ^6 CAP.

A rabbit was injected subcutaneously about 90×10^4 cpm (1.97 mg) of 3H- Δ^6 CAP and the other 200 mg of cold CAP daily for 3 days. Seven days' urine was collected, pooled and extracted as in the previous experiment. The extract was chromatographed on 1.2 g Mallinckrodt silicagel, in a 1 cm diameter column.

Radioactivities were eluted stepwise with 100 ml of hexane-chloroform (1:1), 200 ml of chloroform and 100 ml each of 2, 5 and 50% methanol in chloroform. Five to six radioactive peaks were eluted from the column and were divided into 3 fractions (A,B and C) as indicated in the Fig. 2. Each fraction was chromatographed on paper, according to the polarity, in (1) ligroin-methanol-water (100:80:20), (2) benzene-ligroin-methanol-water (70:130:160:40), (3) benzene-ligroin-methanol-water (130:70:160:40) and/or (4) benzene-methanol-water (100:50:50). This procedure separated fraction A into 4 (A1, A2, A3 & A4), fraction B into 2 (B1 & B2) and fraction C into 3 (C1, C2 & C3) radioactive compounds. Each compound was purified by rechromatography on paper and the UV absorption spectrum was determined in methanol. Of these metabolites, A1, A2, A3, A4 and B2 had an absorption maximum at 285 m μ indicating the presence of $\Delta^{4,6}$ -3-ketone structure. Other metabolites (B1 C1, C2 and C3) had an absorption maximum at 245 m μ with two shoulders as presented in Fig. 3. Such an absorption spectrum was reported by Dorfman to be characteristic for $\Delta^{4,6}$ -3-ol compound. And this was confirmed, in this experiment, by the fact that a compound obtained by the reduction of Δ^6 -CAP with NaBH₄ in dioxane had almost identical UV absorption spectrum as shown in Fig. 3. It was shown from these results that the $\Delta^{4,6}$ -double bond of Δ^6 CAP was not af-

fects during the course of the metabolism in vivo, but the reduction of C3-ketone without prior reduction of Δ^4 -double bond was demonstrated. Ringold et al reported such an abnormal reduction of C3-ketone in vitro with several Δ^4 -3-ketosteroid having an electronegative substituent at C2, C4 or C6. However, the incubation of Δ^6 CAP with rabbit liver homogenate, carried out in our laboratory, could not demonstrate the abnormal reduction of the C3-ketone.

(pp. 1103~1106)

研 究 速 報

6-Dehydro-6-Chloro-17 α -Acetoxy-progesterone のウサギにおける代謝 (第1報)

京都府立医科大学産婦人科学教室 (主任：徳田源市教授)

岡 田 弘 二, 東 義 隆
阿 原 道 正, 西 村 徹
宮 越 洋 二

(昭和43年10月1日受付)

6-Dehydro-6-Chloro-17 α -Acetoxyprogesterone をウサギに投与して尿中代謝産物を検討した。この場合も他の $\Delta^{4,6}$ -3-Ketosteroid と同様に $\Delta^{4,6}$ 二重結合は体内で変化を受けなかったが、 $\Delta^{4,6}$ -3-Ketosteroid のほかに $\Delta^{4,6}$ -3-ol 体が尿中に出現した。これは6位に存在する Cl の電気陰性度が強いためであると考えられる。

6-Dehydro-6-Chloro-17 α -Acetoxyprogesterone (Δ^6 CAP) は経口投与で有効な黄体ホルモン剤として臨床上広く利用されている。本剤は $\Delta^{4,6}$ -3-Ketone 構造をもっているが、われわれはさきにこのような構造をもつ steroid は動物に投与した場合、この構造に変化を受けにくいことを報告した¹⁾。このことは自然界に存在するいわゆる活性型 steroid が通常 Δ^4 -3-Ketone 構造をもっており、これが体内で Δ^4 2重結合の還元を受けることと比較して興味深い問題である。しかし Δ^6 CAP のように6位に塩素のような電気陰性度の強い原子が存在しても $\Delta^{4,6}$ -3-Ketone 構造が変化を受けないかどうかを知る目的でウサギに Δ^6 CAP を投与してその尿中代謝産物の構造をしらべてみた。

実 験 方 法

1) ^3H - Δ^6 CAP : Cold Δ^6 CAP を Wilzbach 法により Tritium で標識し、Silicagel Column Chromatography を行なって純化、再結晶を3回くり返し、さらに2回の Paper Chromatography を行なって純化したものを用いた。比放射能は 3.55×10^6 CPM/mg であった。

2) 投与、採尿、抽出： ^3H - Δ^6 CAP 70.0×10^6 CPM (1.97mg) を体重約 2.5kg の雌ウサギに経口投与して一週間にわたり採尿を行なった。別のウサギには Cold Δ^6 CAP を1日 200mg 3日間投与し、これらの尿を合わせて抽出した。抽出方法および放射能測定方法は既報²⁾のとおりである。

3) 代謝産物の分離：抽出物はまず Silicagel Column Chromatography を行なって分離した。すなわち直径 1cm の Column に Mallinckrodt Silicagel 1.2g を充てんし、Hexane-Chloroform (1:1) で抽出物を吸着させ、同液 100ml, Chloroform 200ml, 1% Ethanol in Chloroform 100ml, 5% Ethanol in Chloroform 100ml, 50% Ethanol in Chloroform 100ml で段階的に溶出した。各溶出物はそれぞれ Bush-type の Paper-Chromatography で分離したが、使用した System は次のようである。

(I) Ligroin-Methanol-Water (100:80:20)

(II) Benzene-Ligroin-Methanol-Water (70:130:160:40)

(III) Benzene-Ligroin-Methanol-Water (130 : 70 : 160 : 40)

(IV) Benzene-Methanol-Water (100 : 50 : 50)

実験成績ならびに考案

^3H - $\Delta^6\text{CAP}$ 投与後の尿中放射能の排泄の I 例を示すと Fig. 1 のようであり, 投与後第7日目でも第1日の約70%に及ぶ排泄を認めることがあり, いわゆるデポー剤といわれる他の Steroid 剤に似た排泄の様子を示している. さてこの尿中放射性物質の存在様式をみると Table 1 のようであり, 大部分は遊離型または glucuron 酸結合型として存在していることがわかる. そこでこの両分画を Column Chromat-

Fig. 1. Daily excretion of radioactivities after administration of ^3H -6-dehydro-6-chloro-17 α -acetoxyprogesterone

Fig. 2. Column chromatographic separation of $\Delta^6\text{-CAP}$ metabolites (free+gluc. fraction)

Table 1. Distribution of radioactivities in urine

ography で分離した成績についてみると Fig. 2 のようであり, 各溶出液によりいくつかの放射能のピークが溶出されるが, Hexane および Chloroform で溶出されたものを A 分画, 1% Ethanol in chloroform で溶出されたものを B 分画, 5% Ethanol in chloroform で溶出されたものを C 分画, として以上 3 分画をそれぞれ Paper chromatography にかけ, (I), (II), (III), (IV) の各 system で展開した. Paper は 1 cm ずつに細切して Methanol で溶出し, その一部について放射能を測定した. その結果 A 分画からは 4 個, B 分画からは 2 個, C 分画からは 3 個の放射能ピークが得られ, これらをそれぞれ $A_1 \sim A_4$, $B_1 B_2$, $C_1 \sim C_3$ と名づけた. おおのこの代謝産物は Rechromatography で純化し, Methanol 中での紫外線吸収スペクトルを測定した. その結果 Fig. 3 に見られるように 285m μ 付近に吸収のみられるものと ($A_1 \sim A_4$, B_2). 245m μ 付近に吸収のみられるもの (B_1 , $C_1 \sim C_3$) とが存在していた. 285m μ に見られる吸収のピーク

Fig. 3. UV absorption spectra of Δ^6 -CAP Metabolites Fig. 4. UV absorption spectrum of 3-keto-reduced Δ^6 -CAP Fig. 5. Metabolism of 6-dehydro-6-chloro-17 α -acetoxy-progesterone in rabbit

はそれらが $\Delta^{4,6}$ -3-Ketosteroid であることを示しており、 Δ^6 CAP のA環は変化を受けていないことが明らかである。他方 245m μ 付近に吸収のピークを示す場合のスペクトルは、そのカーブが特異的でありピークの前後 235m μ および 255m μ 付近に肩を示している。このような肩をもつ吸収スペクトルは Δ^4 -3-Ketosteroid や、それに各種 substituent の付いた steroid の示す吸収スペクトルとは明らかに異なっている。しかし Dorfman⁴⁾ は $\Delta^{4,6}$ -3-ol

steroid およびその acetate が 245m μ 付近に吸収ピークをもつと述べているので、われわれは Δ^6 CAP を既報の方法³⁾により NaBH₄ で還元して $\Delta^{4,6}$ -3-ol-steroid を作製した。還元して得たステロイドを Paper chromatography で純化しその吸収スペクトルを測定した結果は Fig. 4 のようであり、 Δ^6 CAP の代謝産物のそれとよく一致した。すなわち、 Δ^6 CAP の代謝産物のうち B₁, C₁, C₂, C₃ はいずれも $\Delta^{4,6}$ -3-ol 構造をもつたものであると考えられる。

以上のように Δ^6 CAP では 6-Dehydro-Retroprogesterone や 6-Dehydropregesterone の場合と同様に 4, 6-Diene 構造には変化を受けないが、3-Ketone の還元が起こることが明らかになった。このようなステロイドの 3-Ketone の還元はふつう A 環飽和ステロイドに起こる反応であり、 Δ^4 -3-Ketosteroid には起こ

らない。しかし Ringold⁵⁾ らは Δ^4 -3-Ketosteroid の 2, 4, 6 位にハロゲンが導入されると Δ^4 -3-ol 体に変化し得ることをラット肝ミクロゾームの incubate 実験で認めている。 Δ^6 CAP は $\Delta^4,6$ -3-Ketosteroid であるが, この場合も直接 3-Ketone の還元が起こり, $\Delta^4,6$ 二重結合は変化しないことが明らかになった (Fig. 5).

代謝産物のおおのの細部の構造については別の機会に報告する。

稿を終るに臨み, 御指導, 御校閲を賜わった恩師徳田教授に深謝する。

参 考 文 献

- 1) 岡田弘二: 産婦の世界; 19: 53, (1967)
- 2) 岡田弘二, ほか: 日内泌誌, 44, 885, (1968)
- 3) OKADA, H. et al: Acta endocrinol; 45: 1, (1964)
- 4) DORFMAN, L.: Chem. Rev.; 53: 47 (1953)
- 5) RINGOLD, H.J. et al: Biochim. Biophys. Acta.; 82, 143, (1964)