〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
100 (4) 407-414 (1980)

新鎮痛剤 1,4-Dimethyl-10-hydroxy-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine Hydrobromide (ST-2121) の生体内運命 (第 2 報¹⁾)
光学異性体間におけるラット尿中代謝物の比較

野上祐喜, 宮村靖子, 黒部 明, 小川貫山, 宮本重夫,^{2a)} 小泉 保^{2b)}
日本医薬品工業株式会社総合研究所,^{2a)} 富山医科薬科大学薬学部^{2b)}

Metabolic Fate of a New Analgesics 1,4-Dimethyl-10-hydroxy-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine Hydrobromide (ST-2121). II.
Comparative Metabolism of the Optical Isomers in Rat Urine

YUKI NOGAMI, YASUKO MIYAMURA, AKIRA KUROBE, MICHITAKA OGAWA,
SHIGEO MIYAMOTO,^{2a)} and TAMOTSU KOIZUMI^{2b)}

Research Laboratory of Nihon Iyakuin Kogyo Co., Ltd.,^{2a)} and Toyama Medical
and Pharmaceutical University, Faculty of Pharmaceutical Sciences^{2b)}

(Received September 28, 1979)

The metabolism of ST-2121 was investigated in rat urine after subcutaneous administration of ¹⁴C-labeled and non-labeled compounds. The metabolites were characterized by radio-thin-layer chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.

ST-2121 (M-I), 9,10-dihydroxy-1,4-dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine (M-II), 9-hydroxy-10-methoxy(or 9-methoxy-10-hydroxy)-1,4-dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine (M-III), 10-hydroxy-1-methyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine (M-IV) and their glucuronides were identified.

d-, *l*- or *dl*-ST-2121 was administered to rats and M-I, M-II, M-III and M-IV excreted in the urine were determined by mass fragmentography.

Remarkable differences were observed between *d*- and *l*-isomers with respect to the excretion rate of M-I, M-II and M-III, however, the excretion rate of M-IV was the same among the optical isomers.

Keywords—1,4-dimethyl-10-hydroxy-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine hydrobromide(ST-2121); analgesics; metabolism; rat urine; hydroxylation; monomethoxylation; N-demethylation; conjugation; optical isomers; GC-MS-MF

塩谷ら³⁾によって新規に合成された 1,4-dimethyl-10-hydroxy-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine hydrobromide (以下 ST-2121 と略す) は、強い鎮痛作用を有する薬物であり、その光学異性体間における薬理作用の相違については、野沢ら⁴⁾ 塩谷ら⁵⁾ によって報告されている。また我々⁶⁾ は ¹⁴C ラベル化合物を合成しそれらの吸収・分布・代謝・排泄等の生体内挙動について検索し、特に *d* 体の尿中代謝物中に親水性未知物質が多量に含まれていることを報告した。

今回は、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS) を用い、ラット皮下投与における尿中代謝物を検索し、未変化の ST-2121 以外に芳香環が水酸化された 9,10-dihydroxy 体 (M-II), さらに一方の水

1) 第 1 報: 野上祐喜, 二日市修, 小川貫山, 小泉 保, 薬誌, **99**, 757 (1979).

2) Location: a) 350-1 Hariwaranakamachi, Toyama; b) 2630 Sugitani, Toyama.

3) S. Shiotani, K. Mitsuhashi, T. Kometani, T. Nozawa, A. Kurobe, O. Futsukaichi, *J. Med. Chem.*, **19**, 803 (1976).

4) 野沢 勉, 水橋徹男, 池田政男, 五味保男, 塩谷俊作, 日本薬学会第 97 年会, 東京, 1977 年 4 月.

5) S. Shiotani, T. Kometani, T. Nozawa, A. Kurobe, O. Futsukaichi, *J. Med. Chem.*, **22**, 1558 (1979).

6) 小川貫山, 黒部 明, 亀田繁雄, 小林宗雄, 野上祐喜, 小泉 保, 日本薬学会第 97 年会, 東京, 1977 年 4 月.

酸基が methoxy 化された 9-hydroxy-10-methoxy (または 9-methoxy-10-hydroxy) 体 (M-III) および Nor 体 (M-IV) を同定し, これらの代謝物につきマスフラグメントグラフィー (MF) で定量することにより, 光学異性体間での排泄パターンが顕著に異なることを確認したので報告する。

実 験 の 部

標識化合物 ST-2121 の ^{14}C ラベル化合物を前報¹⁾に報告した方法で合成した。標識位置を Fig. 1 に示す。このものの比放射能は $20\ \mu\text{Ci}/\text{mg}$ であった。

代謝物標品 予想される代謝物として次の物質を当研究所で合成し,⁷⁾ 同定に用いた。9,10-Dihydroxy-1,4-dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine hydrobromide (II), 10,11-dihydroxy-1,4-dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine hydrobromide (V), 9-hydroxy-10-methoxy-1,4-dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine hydrobromide (III), 10-methoxy-11-hydroxy-1,4-dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine hydrobromide (VI), および 10-hydroxy-1-methyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1,6-methano-1H-4-benzazonine hydrobromide (IV)。

Fig. 1. ^{14}C -ST-2121

使用動物および投与方法 体重 200—300 g の SD 系雌性ラットを使用し, *d, l* およびラセミ体の ^{14}C ラベル化合物および非標識化合物をそれぞれ 10 mg/ml (遊離塩基として) となるように生理食塩水に溶解し, 皮下投与 (10 mg/kg) した。投与後ラットを代謝ケージに入れ, 24 時間まで尿を採集した。尿採集用受器にはあらかじめ 0.1 N AcOH 10 ml を入れておいた。

放射能の測定 各分画液層の一部を取り, トルエン系シンチレーター (PPO 6 g, POPOP 75 mg, トリトン X-100 500 ml, トルエン 1000 ml) を加えて調製し, 液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-653) により測定した。試料のクエンチングは内部標準法で補正した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merk) を使用し, 展開溶媒には (A) $\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH} \cdot \text{conc. NH}_4\text{OH}$ (8:2:0.05), (B) methyl ethyl ketone (MEK) $\cdot$ AcOH $\cdot$ H_2O (3:1:1) を用いた。スポットの検出には TLC-ラジオクロマトスキャナー (Aloka GTL-223) および波長 254 nm の紫外線検査灯を用い, 発色検出にはナフトレゾルシン試薬およびヨウ素を適宜使用した。

カラムクロマトグラフィー Amberlite XAD-2 (Rohm and Haus) および Silicagel C-100 (和光純薬) を用いた。Amberlite XAD-2 を水に浸漬したのちカラムに充てんし, 等量のメタノールおよびアセトン, ついで 3 倍量の水で洗浄後使用した。Silicagel C-100 を $\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH}$ (9:1) 混液に懸濁してカラムに充てんし, CHCl_3 に対する MeOH の割合を順次大きくすることによって溶出した。

GLC, GC-MS 装置: 日本電子製 JGC-20 K/JMS D-100/MS-PD-01 型多重イオン検出器を使用。GLC 測定条件: (A) 3% OV-17 Gas Chrom Q (80—100 mesh), ガラスカラム 2 mm $\times$ 1 m, カラム温度 200—250°, キャリヤガス He (0.8 kg/cm²), (B) 3% OV-1 Gas Chrom Q (80—100 mesh), ガラスカラム 2 mm $\times$ 0.5 m, カラム温度 280°, キャリヤガス He (0.8 kg/cm²), MS: イオン化電圧 25 eV, 加速電圧 3 kV, イオン化電流 300 μA , MF。

Chart 1. Procedure Used for Fraction and Isolation of Metabolites in Rats Urine

7) 二日市修, 林 市裕, 宮村佳男, 黒部 明, 野沢 勉, 宮本重夫, 薬誌, 掲載予定。

Chart 2. Extraction and Isolation Procedures of M-I, M-III, M-IV, and Their Glucuronides

internal standard; ^3H -ST-2121 (for M-I)
Pentazocine (for M-III and M-IV).

Chart 3. Extraction and Isolation Procedures of M-II and M-II Glucuronide

internal standard; authentic ^3H -II.

β -Glucuronidase 処理および酸分解 尿を 0.1 M リン酸緩衝液で pH 6.0 に調整し β -glucuronidase (bacterial type I 63250 units/g Sigma) 10 mg を加え, 37° で 24 時間インキュベートした. また尿 2 ml に対し, 濃塩酸 1 ml の割合で加え窒素置換し, 沸湯水浴中で約 1 時間加熱し酸分解を行なった.

代謝物の分離 採集した尿を Chart 1 に示した方法で分画した. まず尿を conc. NH_4OH で pH 8.0 に調整し, Amberlite XAD-2 カラムに通し,⁸⁾ 2 倍量の水で洗浄した (F-I) のち, 等量の isopropyl ether により酸性物質および中性物質の一部を溶出した (F-II). ついで等量の $\text{CHCl}_3 \cdot \text{isopropanol}$ (3:1) 混液により塩基性物質および中性物質の一部を溶出した (F-III). さらに等量の $\text{MeOH} \cdot \text{conc. NH}_4\text{OH}$ (99:1) 混液により強極性物質を溶出した (F-IV). F-III はさらにシリカゲルカラムにより分離精製した. また F-IV を分取用薄層板で分離し, そのシリカゲルをかきとり $\text{MeOH} \cdot \text{AcOH}$ (95:5) 混液で抽出し溶媒を留去したのち, 氷冷下減圧乾燥し結晶を得た.

尿中代謝物の抽出および定量 尿を 0.1 N AcOH で一定量に希釈し, その一定量を用いて Chart 2 (ST-2121, M-III, M-IV) および Chart 3 (M-II) の方法で抽出し, TMS 化後 GLC の測定条件 (A) で MF を行なった. 内部標準には ST-2121 および M-II にはそれらの N-メチル重水素体を用い, M-III および M-IV には pentazocine を用いた. 後者は, 3 ペンを用いた多重イオン検出器により M-III と M-IV を同時定量するのに適していた. なお, 使用したイオンは, pentazocine は $\text{M}^+ - 68$ (m/z 289) で, 他はそれぞれの分子イオンである.

結 果

尿中代謝物の同定

尿中代謝物を検索するにあたって, 親水性未知物質の多いことがわかっている⁶⁾ ^{14}C -d-ST-2121 をラットに皮下投与した. 投与後 24 時間まで採集した尿には投与量の約 80% の放射活性が認められた.

この尿を Chart 1 の方法で分画した結果, F-I には 0.1%, F-II には 0.5%, F-III には 20%, F-IV には 77% の放射活性の移行が認められ, F-I および F-II では微量のため検索は行なえなかった. F-III の溶出物を溶媒系 (A) を用いて TLC を行なうと Fig. 2 の a に示すラジオクロマトグラムが得られた. また, N, O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide で TMS 化および trifluoroacetic anhydride で trifluoroacetyl (TFA) 化し, 測定条件 (A) で GLC を行なうと Fig. 3 および Fig. 4 が得られた. TLC 上のスポットをかき取り, TMS 化および TFA 化して GLC を行なうと $R_f=0.24$ のスポットは Fig. 3, 4 の M-II のピークと一致し, $R_f=0.54$ のスポットは M-I のピークと, また $R_f=0.56$ のスポットは M-III のピークと一致した. またこれらのマススペクトル (MS) を Fig. 5, 6 に示した.

M-I は TLC の R_f 値, GLC 保持時間, および MS において分子イオン m/z 303 (TMS 化体), m/z 327

8) M.L. Bastos, D. Jukofsky, S.J. Mulé, *J. Chromatogr.*, **81**, 93 (1973).

Fig. 2. Radiochromatogram Profile of Amberlite XAD-2 Column Eluate Fraction

a; CHCl_3 : isopropanol eluate,
solvent; (A) CHCl_3 : MeOH: conc. NH_4OH (8: 2: 0.05).
b; MeOH: conc. NH_4OH eluate,
solvent; (B) MEK: AcOH: H_2O (3: 1: 1).

Fig. 3. Gas Chromatogram of CHCl_3 : Isopropanol Eluate (TMS)

—: after subcutaneous administration of ST-2121,
---: control.

Fig. 4. Gas Chromatogram of CHCl_3 : Isopropanol Eluate (TFA)

—: after subcutaneous administration of ST-2121,
---: control.

(TFA 化体) を示したことなどから、未変化の ST-2121 (遊離塩基) と同定した。M-II と M-III は互いによく似た MS を示し、ST-2121 の TMS 化体よりそれぞれ 88 m. u., 30 m. u., TFA 化体より 112 m. u., 30 m. u. ずつ high mass 側にシフトしている。また TFA 化後の GLC で M-II は未変化体や M-III に比べて保持時間が短くなっている。これらのことから M-II は 2 ケ所に TMS 化および TFA 化される活性基を有していることがわかる。またアルカリ性水溶液で不安定なことから、M-II はカテコール型に水酸化されたものと推定され、予想される 2 種類の dihydroxy 体の合成標品 II および V の TMS 化体、TFA 化体の GLC 保持時間、MS を比較した結果 V とは明らかに異なり、II とよく一致した。したがって M-II は 9 位が水酸化された 9, 10-dihydroxy 体と同定した。

一方, M-III は TMS 化も TFA 化も ST-2121 に比べ 30 m. u. だけ high mass にシフトするだけであったことから, M-II の一方の水酸基が methoxy 化されたものと推定され, TLC の *R_f* 値, GLC 保持時間, MS において合成標品 III とよく一致した。

Fig. 5. Mass Spectrum of Metabolites and Authentic Compounds (TMS)

Fig. 6. Mass Spectrum of Metabolites and Authentic Compounds (TFA)

Fig. 7. Gas Chromatogram of MeOH: conc. NH_4OH Eluate (TMS)

—: after subcutaneous administration of ST-2121,
 ----: control.

M-IV は GLC において M-II と同様に 2 ケ所に活性基が認められ、かつ、TLC-ラジオクロマトグラムには相当するピークがないことから、N-脱メチル体が示唆され、合成標品と比較した結果 Nor 体と同定した。

F-IV を溶媒系 (B) を用いて TLC を行なうと Fig. 2 の b に示すラジオクロマトグラムが得られ、ナフトレゾルシン試薬で陽性であった。また、F-IV を β -glucuronidase 処理または酸分解処理し再度 Amberlite XAD-2 カラムで分離すると、放射活性はすべて F-III に移行し TLC-クロマトグラムも一致した。これらのことより F-IV には先に同定した未変化体および代謝物の glucuronide が推定された。F-IV を Chart 1 の方法で精製した結晶を BSA · N-trimethylsilylimidazole · trimethylchlorosilane (3:2:2) で TMS 化し、測定条件 (B) で GLC を行なったところ Fig. 7 が得られた。この MS から $R_f=0.18$ は ST-2121 の glucuronide (G-I), $R_f=0.23$ は M-II の monoglucuronide (G-II) であった。また M-III の glucuronide と考えられる分子イオンも確認できた (G-III)。Nor 体の glucuronide も存在すると思えられるが確認できなかった。

尿中代謝物の定量

非標識の *l, d* およびラセミ体をラットに皮下投与 (10 mg/kg

Fig. 8. Mass Spectrum of Conjugate (TMS)

遊離塩基として) し, 投与後 24 時間までの尿について, 同定された代謝物を Chart 2, 3 の方法で抽出し, MF 法で定量した結果を Table I に示した. なお M-III の回収率は $95.4 \pm 3.2\%$ ($n=5$) で検出限界は GLC への注入量で 10 pg, M-IV の回収率は $93.7 \pm 4.5\%$ ($n=5$) で, 検出限界は 100 pg であった.

l 体ではほとんど未変化体およびその抱合体で, わずかに M-II が認められた. *d* 体では M-II および M-III が *l* 体比べて極めて多かった. ラセミ体ではそれらの代謝物は *l* 体と *d* 体の中間の生成であった. M-IV は *l, d* およびラセミ体ともに約 1% の生成であった.

考 察

^{14}C -*d*-ST-2121 および非標識体をラットに皮下投与し, その尿中代謝物について GC-MS を用いて検索同定した. また *l, d* およびラセミ体を投与し, 光学異性体間におけるそれらの代謝物の尿中排泄率の相違について検討した.

ラットにおける ST-2121 の尿中代謝物として, 芳香環が水酸化されたカテコール型の代謝物 9,10-dihydroxy 体 (M-II), 9-hydroxy-10-methoxy (または 10-hydroxy-9-methoxy) 体 (M-III), および N-脱メチル化された Nor 体 (M-IV) が同定された. M-III は M-II のどちらか一方の水酸基が methoxy 化されたものと考えられる

Chart 4. Possible Metabolic Pathway of ST-2121 in Rat

⇒: Big arrow represents more active transformation.

TABLE I. Urinary Excretion of the Metabolites after s.c. Administration of *d,l* and *dl*-ST-2121 in Rat (Dose; 10 mg/kg as Free Base)

Enantiomer	Metabolites	% of dose (0—24 hr)		
		Nonconjugated	Conjugated	Total
<i>l</i> -ST-2121	M-I	23.17±1.99	58.10±0.80	81.28±1.79
	M-II	0.04±0.00	3.37±0.48	3.41±0.48
	M-III	N.D.	N.D.	N.D.
	M-IV	0.11±0.03	1.00±0.14	1.10±0.16
	Total	23.32±2.01	62.47±1.17	85.79±1.79
<i>dl</i> -ST-2121	M-I	17.81±1.60	39.33±1.27	57.14±0.44
	M-II	0.86±0.22	16.57±1.48	17.40±1.30
	M-III	0.08±0.00	5.25±0.62	5.32±0.61
	M-IV	0.12±0.01	1.89±0.79	2.01±0.78
	Total	18.86±1.55	63.04±1.33	81.87±1.45
<i>d</i> -ST-2121	M-I	19.29±5.31	30.49±4.48	49.78±2.37
	M-II	2.66±0.51	19.98±1.94	22.64±1.84
	M-III	0.51±0.23	15.24±3.18	15.75±3.21
	M-IV	0.14±0.05	0.79±0.04	0.93±0.08
	Total	22.60±6.05	66.50±6.18	89.10±2.88

Each value is expressed as mean±S.E. of 6 rats.

が、容易に合成できた 9-hydroxy-10-methoxy 体と比較すると *R_f* 値, GLC 保持時間, MS でよく一致したので, M-III は 10 位が methoxy である可能性が高い。そして未変化体を含めこれらのほとんどは主として glucuronide として尿中に排泄されることが明らかとなった。また以前の報告⁹⁾において *d* 体に多く存在した親水性未知物質はほとんどが 9,10-dihydroxy 体であることが明らかとなった。

M-II はカテコール型のため pH 9 以上のアルカリ性溶液中では不安定であったので, 定量の内部標準物質としてその N-メチル重水素体を最初に添加し抽出処理による誤差をなくし, また Chart 3 に示す方法により抽出効率をよくし再現性よく定量することができた。

定量の結果, ラットにおける ST-2121 の代謝は光学異性体間で顕著に異なることが明らかとなった。すなわち, *l* 体では未変化体の glucuronic acid 抱合が主要な代謝であるのに対して, *d* 体では芳香環の水酸化およびそれに続いて一方の水酸基の methoxy 化が活発に行なわれ, それらは最終的に glucuronic acid 抱合を受けて尿中に排泄される。N-脱メチル化はラットでは主要代謝経路ではなく, また光学異性体間での相違もみられない。これらのことからラットでは芳香環の水酸化およびそれに続く水酸基の methoxy 化において光学異性体の選択性があるものと考えられる。

以上のことから, ラットにおける ST-2121 の推定代謝経路は Chart 4 に示すようになると考えられる。これはペンタゾシン,^{9,10)} モルヒナン¹¹⁾ などと類似した代謝経路である。

薬物の代謝において光学異性体の選択性はその薬理効果, 毒性などに何らかの関与があるものと考えられ, 光学異性体の生体内挙動を詳細に追求することは重要なことと考えられる。

謝辞 本研究にあたり, 終始助言をいただいた日本医薬品工業株式会社総合研究所所長 池田政男博士に深く感謝します。

9) K.A. Pittman, D. Rosi, R. Cherniak, A.J. Morola, W.D. Conway, *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1673 (1969).

10) K. Fukawa, O. Irino, K. Maruyama, Y. Ohsawa, K. Saitoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 578 (1979).

11) F.M. Vane, D.H. Ellis, J. Rao, M. Petrim, J.F. Blount, E. Mohacsi, A. Szuma, J.J. Kamm, *Biomedical Mass Spectrometry*, **5**, 498 (1978).