実 験 の 部**

Methyl 1-ethoxycarbonyl-2-methoxycarbonyl-4-(1-methyl-2-hydroxyethyl)-3-pyrrolidineacetate

(VI) Ba(OH)₂·8H₂O 33 g を蒸留水 660 cc に加えて沸騰させ、これに (I)⁹⁾ 17 g を加えて 2.5 時間還流。冷後 H₂SO₄ で Ba イオンを除き PtO₂ 0.5 g を触媒として還元し (6 時間に H₂ 約 780 cc 吸収) Amberlite IR-4B (OH 型) で鉍酸を除き減圧で蒸発乾固後 Me₂CO と EtOH で精製し (III) 5.5 g を得た。本品の水溶液を封管中で 180~190° に 8 時間加熱後反応母液を蒸発乾固して粗製の (IV) 3.5 g を得、つぎに上柳らの方法⁹⁾ により (IV) 3.5 g を 48% HBr と処理して (V) の粗製品 2.6 g を得、これを MeOH 中 HCl ガスでエステル化し続いて ethyl chloroformate と Na₂CO₃ を作用させて bp_{0.4} 187~200° の粗製の (VI) 1.2 g を得、再留して bp_{0.07} 185~187° の (VI) 0.7 g を得。C₁₅H₂₅O₇N 計算値 C 54.37, H 7.61, N 4.23, 実験値 C 54.13, H 7.48, N 4.07. I.R. λ_{max} 2.90 (OH), 5.76 (ester CO), 5.90 (NCOOC₂H₅-CO), 12.98 μ (N-COOC₂H₅)¹²⁾

Methyl 1-ethoxycarbonyl-2-methoxycarbonyl-4-isopropenyl-3-pyrrolidineacetate (VIII) (VI) 7.3 g を上柳らの方法⁹⁾ により PBr₃ と処理して臭化物 (VII) に導きこれをビリジンと加熱蒸留して bp_{0.3} 158~170° の留分 3.5 g を得、再留して bp_{0.07} 151~153° の (VIII) 1.6 g を得。C₁₅H₂₃O₆N 計算値 C 57.49, H 7.40, N 4.47. 実験値 C 57.12, H 7.48, N 4.25.

DL-α-Allokainic acid (IX) (VIII) 1.4 g を Ba(OH)₂ 5 g の 15% 水溶液と 10 時間還流したのち BaCO₃ を汙別し、母液に小過剰の H₂SO₄ を加えて Ba イオンを除き、Amberlite IR-4B (OH 型) で H₂SO₄ を除き減圧濃縮し Cu(OAc)₂ 溶液を加え析出する Cu 塩を汉取、H₂S で脱 Cu 後蒸発乾固、粗結晶 350 mg を得、水から再結晶 mp 233~235°(decomp) の板状晶 280 mg を得。C₁₀H₁₅O₄N 計算値 C 56.32, H 7.09, N 6.57, 実験値 C 56.18, H 7.11, N 6.42. 本品は DL-α-alkokainic acid^{10,11)} と I.R. スペクトルで同定。

L-α-Allokainic acid l-ephedrine salt (X) (IX) 250 mg と l-ephedrine 210 mg を MeOH 10 cc に加温溶解後減圧で蒸発乾固、得た粉末を EtOH から再結晶、mp 214~216°(decomp) の (X) 110 mg を得。本品は真正の L-α-alkokainic acid l-ephedrine salt と I.R. スペクトルで同定。

L-α-Allokainic acid (XI) (X) 100 mg の濃厚水溶液を Cu(OAc)₂ 濃厚水溶液に加え同時に沈殿する Cu 塩を汉取、H₂S で脱 Cu 後減圧で蒸発乾固し水から再結晶、mp 237°(decomp) の長板状晶 40 mg を得。[α]_D¹⁷: +8°(c=1.0, H₂O).

武田薬品工業株式会社研究所

** 本研究における沸点および融点はすべて未補正である。

12) 神尾：未発表

UDC 615.782-07

274. 清水正夫, 市村彰三*, 森 元** : メプロバメートの定性並びに定量に関する研究 (第 3 報)
メプロバメートの尿中排泄量の定量

Masao Shimizu, Shōzō Ichimura, and Hajime Mori: Detection and Determination of Meprobamate. III. Determination of Excreted Meprobamate in Urine.

(Research Laboratory* and Yanagishima Work,** Daiichi Seiyaku Co. Ltd.)

Method for determining unchanged Meprobamate in the urine was effected by the combination of paper partition chromatography, using the Ehrlich reagent, and colorimetry. By the use of this method, amount of unchanged Meprobamate excreted in the urine during 72 hours following oral administration of 1.6 g. of Meprobamate in the male was determined. Results are indicated in Table IV and Fig. 1.

(Received May 10, 1958)

第 1 報¹⁾で著者等は噴霧試薬として Ehrlich 試薬を使用する場合に、ペーパークロマトグラフィー (PPC) に依りメプロバメートを簡単に分離確認し得る事を報告し、更に第 2 報²⁾で同一試薬に依つて比色定量し得る事

*,** Hirakawabashi, Sumida-ku, Tokyo.

1) 本誌: 78, 1183(1958).

2) 本誌: 78, 1185(1958).

を報告した。

メプロバメートは精神神経安定剤として広く使用されているにもかかわらず, その血中濃度, 尿中排泄あるいは代謝産物等についての報告は極めて少い。著者等がこれ迄に知り得た処では 1954 年 Berger³⁾ が尿中よりエーテル抽出に依り, またエーテル抽出物を濃硫酸と加熱して生ずる 450 m μ に於ける吸収極大を利用した 1957 年 Agranoff⁴⁾ の比色定量法に依る研究があるのみである。

著者等は試みに Agranoff の方法を純メプロバメートについて追試して見たが, 濃硫酸と加熱後水で希釈する際の発熱の差に依つて吸収強度に相当のパラッキが生じ定量操作として一定の条件を守り難い事を知つた。そこで著者等が先に報告した Ehrlich 試薬に依る呈色反応を利用して, PPC に依る分離と比色定量法を組合せメプロバメート経口投与時に於ける尿中排泄量の測定法を検討し, これに依つて未変化メプロバメートの排泄量累積曲線を得, Agranoff 等の成績と比較した。

実験材料及び実験方法

実験材料 成年男子 (体重 48 kg) にメプロバメート 1.6 g を一回量として経口投与する (33 mg/kg) 同一人に就いて約 2 ヶ月を隔てて 2 回実験を行つた。(Ex. I. Ex. II) 尿量及び尿採取時間は Table I の如くである。尿にはトルエンを添加する。

Table I. Collected Urine (cc)

		1st Day	2nd Day	3rd Day
Ex. I		920 (A)	660 (B)	960 (C)
Ex. II	0~4 hrs.	4~8 hrs.	8~24 hrs.	
	610 (D)	225 (E)	560 (F)	
		1395	883 (G)	718 (H)

抽出方法 採取尿は 1N NaOH で pH 8 とし一度沝過し, 同容量の Et₂O で一回, 約半容量の Et₂O で 4 回抽出し水洗後 Na₂SO₄ で一夜乾燥後 Et₂O を留去, 残留物は MeOH に溶解し, 不溶の油状物は MeOH で洗浄後洗液を合併し正確に 25 cc の MeOH 溶液とする。Ex. I 検液 (A)~(C), Ex. II 検液 (E)~(G) は各々 80 cc, (H) は 120 cc を取り同容量の Et₂O で 3 回抽出する。

PPC 1) メプロバメートの検出 一次元上昇法, 東洋沝紙 No. 50, 検液 (A)~(C) を使用。噴霧試薬は第 1 報記載の Ehrlich 試薬 (2% *p*-dimethylaminobenzaldehyde の conc HCl 溶液) メプロバメート, 尿素の他に不明の物質 (substance M) を検出。(Table II). 2) メプロバメート定量のための分離 定量のための分離には尿

Table II. Rf Values of Meprobamate, Urea and Substance M

Solvent	Rf			Hours for Development
	Meprobamate	Urea	Substance M	
I	0.85	0.43	0.68	16
II	0.47	0.02	0.07	3
III	0.50	0.07	0.03	3
Solvent I	BuOH·AcOH·H ₂ O (4:1:5)			
II	toluene·BuOH·formamide (3:1:saturated)			
III	cyclohexane·AcOH·CHCl ₃ ·H ₂ O (10:3:4:0.1)			

Table III Recovery of Meprobamate from Urine

	I	II	III
Spotted methanol solution for PPC (cc)	1	1	1
E 416 m μ	0.1140	0.1170	0.1180
Blank	P. B.	U. B.	U. B.
γ /cc	300	305	308
Recovered Meprobamate (mg.)	187.5	190.6	192.5
Recovery (%)	93.7	95.3	96.2
Average (%)		95	

中より Et₂O に移行する着色物質は溶媒先端に行き, 又メプロバメートの附近に他のスポットが認められぬため, Table II 中 solvent III が好適である。東洋沝紙 No. 50 40×40 cm 沝紙下端より 7 cm の原線に両端 3 cm をあけて巾 2 mm の線状に注射針で風乾しつつ検液を塗布する。検液 (A) は 1 cc (B) (C) は 2 cc を正確にと

3) F. M. Berger: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 112, 413(1954).

4) B. W. Agranoff, R. Bradley, J. Axelrod: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96, 261(1957).

Table IV Results of Determination of Unchanged Meprobamate in Urine

	Ex. I			Ex. II												
	1st Day (A)	2nd Day (B)	3rd Day (C)	(D)	1st Day (E)	(F)	2nd Day (G)	3rd Day (H)								
Spotted methanol solution for PPC (cc)	1	2	4	2												
E 416 m μ	0.1310	0.1370	0.0860	0.1238	0.042	0.1370	0.1322	0.3390	0.3280	0.2171	0.2220	0.0735	0.0760	0.0270	0.0332	
γ /cc	340	355	224	210	327	150	360	348	905	875	575	588	192	200	65	82
Excreted Meprobamate (mg)	212.5	221.9	70	65.6	51.1	46.9	68.6	66.3	63.6	61.5	100.6	102.9	53.0	55.2	9.7	12.2
Average (mg.)	217.2	67.8	49		67.5	62.6					101.8	54.1		11		
Total excreted Meprobamate (mg.)		334				297										
Excreted/administered %		20.9				18.6										

つて塗布する。上昇法で展開後 Rf 0.3~0.65 の範囲を切り取り Soxhlet 抽出器で連続 7 時間 MeOH 100 cc で抽出後、MeOH を約 5 cc に濃縮し次の比色操作に附する。Ex. II では EtOH 抽出液より Et₂O を留去 MeOH に溶解し全量を塗布する。

比色定量 上の濃縮 MeOH 溶液約 5 cc を内容 25 cc のメスフラスコに移し、氷水で冷却しつつ Ehrlich 試薬 (conc HCl 中 3% 溶液) 10 cc を加え、次に MeOH で正確に 25 cc とする。一度濾過し日立 DU 型スペクトロフォトメーターに依り波長 416 m μ に於ける吸光度を測定。盲験に就いては後述、第 2 報記載の検量線より算出する。

実験法の検討

1) PPC 及び比色定量法の精度 比色定量法の検討は第 2 報記載の如くであるが、本実験では PPC に依り分離した後に再抽出し比色定量を行うので、両者を併用した場合の精度を検討した。即ちメプロバメート 200 mg を 25 cc のメタノール溶液とし、その 0.5 cc 及び 1 cc を濾紙に塗布し前記の如く PPC を行い再抽出して比色定量した場合（この際の盲験は濾紙にメタノールのみを塗布し他は同様に操作する）誤差は約 $\pm 5\%$ である。

2) 比色定量の場合の盲験 平常尿を前記の如くエーテル抽出、PPC、再抽出して Ehrlich 試薬を加えたもの (U.B.) 及び濾紙にメタノールのみを塗布し以後同様に処理したもの (P.B.) を盲験に使用した場合両者の間に殆んど吸光度に差異が認められぬ故、盲験としては常に簡単のため P.B. を使用した。但し更に簡易化して第 2 報の如くにメタノールに単に Ehrlich 試薬を加えたものを盲験に使用すると検体の吸光度はかなり増加し、濾紙より抽出される物質の影響を無視する事が出来なかつた。

3) 抽出法の検討 平常尿 740 cc にメプロバメート 200 mg を溶解し、規定の如くエーテル抽出、PPC、再抽出、比色定量を行つた場合 Table III の如く平均回収率 95% であつた。

実験結果

前記実験方法に従い Table I の Ex. I 被検尿 (A)~(C) Ex. II (D)~(H) について尿中メプロバメートの排泄量を定量した。Table IV Ex. I に於いては検液 (A)~(C) につき各 2 回 PPC、比色定量を行つてその平均値を求め、Ex. II に於いては被検尿 (D)~(H) より各々 80 cc を取り、抽出 PPC 比色定量を 2 回行つてその平均値を求めた。

考察及び結論

今回の実験は同一人につき約 2 ケ月を隔てて 2 回行つたものである。メプロバメート経口投与量 1.6 g は常用量 0.4 g に比して、いささか過量のきらいがあるが、Agronoff の実験成績と比較するために敢えてこれと同一量で行つた。尿よりの抽出方法についても更に吟味を要するが、これも文献の方法に準じて行つた。

Agronoff 等の方法は尿よりエーテル抽出を行い、そのエキスを濃硫酸を加え加熱した後、水で希釈して比色定量して居るので、特にメプロバメートの分離操作を施していない。従つて尿中のエーテル可溶性物質の影響が当然起る筈であるが、これに対して彼等は 450 m μ と 500 m μ に於ける optical density の差を採用して居る。これに反して著者等の方法ではまず平常尿よりメプロバメートの回収試験を行い抽出効果を吟

味した上で, PPC に依りメプロバメートを分離した後, 比色定量した結果であるから, 未変化の排泄量をより正確に表わすものと言いうる.

二回の実験の結果は Table IV に示す如くほぼ一致して居る. 即ち内服量 1.6 g で 72 時間に於ける排泄量及び排泄率は Ex. I 334 mg, 20.9% Ex. II 297 mg, 18.6% で, 排泄速度を総排泄量に対する % で表わすと, 第 1 日 Ex. I 65% Ex. II 78.1%, 第 2 日 Ex. I 20.3% Ex. II 18.2%, 第 3 日 Ex. I 14.7% Ex. II 3.7% の結果である. Berger は種々の量をラット及び人間に投与し, 尿をエーテル抽出した場合未変化のメプロバメートの排泄量は 24 時間で約 10% と記載して居るが, 詳しい実験データを示していない. 著者等の場合 24 時間の排泄量は内服量の 13.5% (Ex. I)~14.5% (Ex. II) であつた. Agranoff 等は 4 人について実験を行い, 48 時間中の排泄量及び排泄率は 191~330 mg 11.9~20.6% であると報告して居る. 著者等の Ex. II の成績と Agranoff の実験中 20.6% 排泄の場合を比較して排泄量の累積曲線を描くと Fig. 1 の如くほぼ相一致する結果となつた.

前述の如く Agranoff 等の成績は未変化メプロバメートの量のみを表わすとの直接の証明はないが, 著者等の成績と比較すると, かなり正確にメプロバメートの排泄量を表わして居るものと言える. これ等の方法は簡易な方法であるが, 著者等の経験では定量操作を一定条件で行い難い欠点がある. 著者等の方法は更に簡易化を図る余地があるが, 未変化メプロバメートの量のみを正確に測定しうる利点がある. Berger 及び Agranoff 等は間接的にグルクロナイドの生成を推定しているが, それ以外に未だメプロバメート内服時の尿中の代謝産物, 抱合体を確実に分離確認している研究は存在しない. 著者等の今回の実験は尿中未変化のメプロバメートの排泄量を可及的正確に測定する事に主眼を置いたため, 代謝産物については更に後日の研究にまたなければならないが, 今回の実験で得た経験から推察される事は, エーテル移行性物質で Ehrlich 試薬に依つて同様に呈色する物質 (Table III 中 substance M) が PPC で認められるが, Ehrlich 試薬で呈色する事からカルバモイル基を有する事が判りメプロバメートの体内代謝産物の一つではないかと考えられる.

終りに臨み本研究の発表を許可され終始御鞭撻賜わつた第一製薬株式会社社長篠田淳三博士, 研究所長橋本 昶氏に謹んで謝意を表する次第である.

Fig. 1.

Cumulative Urinary Excretion of Meprobamate following Oral Administration of 1600 mg.