医薬品の生体内変化に関する研究 (第58報¹⁾) 4-ブチルアミノ
アンチピリンの生体内変化について

吉村英敏, 占野廣司, 塚元久雄

九州大学薬学部²⁾

Metabolism of Drugs. LVIII.¹⁾ Metabolism of Butylaminoantipyrine

HIDETOSHI YOSHIMURA, HIROSHI SHIMENO, and HISAO TSUKAMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University²⁾

(Received August 9, 1967)

In the metabolic study of butyl aryl ethers *in vivo*, it has been shown in this laboratory that dealkylation is only minor and penultimate hydroxylation is the major one. In connection with this study, metabolism of 4-butylaminoantipyrine was investigated to learn whether it also undergoes the penultimate hydroxylation rather than the dealkylation of butyl chain. Contrary to this expectation, the major pathway of this drug was found to be dealkylation in all of the animals tested (rabbits, guinea pigs, mice, and rats), excreting 4-aminoantipyrine and its acetylated metabolite, 4-acetamidoantipyrine, as the main metabolites.

However, it has also been recognized that there is a small amount of other urinary metabolite. The structure of this minor metabolite has been identified as 4-(2-butenyl-amino)antipyrine by the comparison with the authentic sample chemically synthesized.

Since it seems very likely that this metabolite may be formed from the penultimate hydroxylated metabolite by dehydration, the presnet study would support the hypothesis that, as in C- and O-alkyl compounds, the penultimate hydroxylation takes place also in N-alkyl compounds if they have a considerably long alkyl chain such as butyl group.

一般にアルキルアミン系の薬物は、生体内で窒素原子に直結する α -炭素原子において水酸化を受け、一旦不安定なアルカノールアミンとなり、これは直ちに分解して対応するアミンとアルデヒドを生成すると考えられている。³⁾

一方、芳香族アルキルエーテル類の生体内脱アルキル化反応も同様機構で進行するといわれるが、最近当教室における研究から、このアルキル鎖がブチルやイソアミルなどの比較的長い炭素鎖からなる場合には、従来知られていた上記酸化的脱アルキル化 (いわゆる α -酸化) による代謝より、むしろ主として末端メチルの隣のメチレンの酸化、すなわち (ω -1)-酸化によって代謝されることが明らかにされた。^{4,6)} 先に Brodie 等は、⁶⁾ 4-アルキルアミノアンチピリンの同族体の *in vitro* 実験において、アルキル鎖の炭素数が増大するにつれ、その脱アルキル化率が低下することを報告しているが、当教室における上記芳香族アルキルエーテルの代謝とあわせて考えると、これらアルキルアミン類においても、脱アルキル化率の低下と共に (ω -1)-酸化が生起することが推察される。事実、Beckmann は、⁷⁾ 最近抗糖尿病薬の 1-ブチルビグアナイド塩酸塩が、ラット、マウス、モルモットおよび家兎で (ω -1)-水酸化を受け、薬効のない 3-ヒドロキシブチルビグアナイドに代謝されることを見出した。

1) 第57報: *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 1953(1967).

2) Location: *Katakasu, Fukuoka.*

3) R.T. Williams, "Detoxication Mechanism" 2nd. Ed., Chapman & Hall Ltd., London. 148(1959).

4) H. Tsukamoto, H. Yoshimura, H. Tsuji, T. Watabe, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **12**, 987(1964).

5) H. Yoshimura, H. Tsuji, H. Tsukamoto, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **14**, 939(1966).

6) B. LaDu, L. Gaudette, N. Trousof, B.B. Brodie, *J. Biol. Chem.*, **214**, 741(1955).

7) R. Beckmann, *Arch intern. Pharmacodyn.*, **160**, 161(1966).

さらに Mohler 等も、ラットおよびヒトで 1-ヘキシル-3,7-ジメチルキサンチンのヘキシル基が (ω -1)-水酸化を受けることを明らかにしている。⁸⁾

著者等は、今回 4-ブチルアミノアンチピリンを合成し、家兎、モルモット、マウスおよびラットを用いてこの点に関する検討を行なったので報告する。該薬物を投与したこれらの動物の 48 時間尿を、薄層クロマトグラフィーおよびカラムクロマトグラフィーを用いて検索した結果、いずれの動物においても N-脱アルキル体に加え、少量ではあるが 4-(2-ブテニルアミノ)-アンチピリンの生成が確認された、本代謝物は (ω -1)-水酸化体の脱水により二次的に生成したものと推定することができ、このことからアルキル側鎖における (ω -1)-水酸化体の生成が示唆された。

実 験 の 部

実験材料

4-アミノアンチピリンの合成 Knorr の方法^{9,10)} にて合成、アンチピリンを亜硝酸でニトロソ化し、これを亜鉛と AcOH で還元後、HCl 塩に導き MeOH から再結晶、淡黄色結晶、mp 158-160° *Anal.* Calcd. $C_{11}H_{14}ON_3$ Cl: C, 55.12; H, 5.88; N, 17.20. Found: C, 55.14; H, 5.90; N, 17.27. UV λ_{max}^{EtOH} 254m μ .

4-ブチルアミノアンチピリンの合成 Skita 等の 4-アルキルアミノアンチピリン合成法¹¹⁾ に準じて合成した。すなわち、4-アミノアンチピリン 10g をエーテル 60ml に溶解し、氷水で冷却下、新たに蒸留した *n*-ブチルアルデヒド 5.4g をエーテル 60ml に溶かして滴下し、2hr 後溶媒を減圧留去、残留物を MeOH 36ml に溶解し、十分冷却しつつ水素化ホウ素ナトリウム 3g の MeOH 溶液 (36 ml) を徐々に滴下する。滴下終了後、さらに 50° に加温して 3hr 攪拌を続ける、MeOH を減圧留去し、水を加えて暫時放置後、分離する油状物を $CHCl_3$ にて抽出、抽出液を Na_2SO_4 で脱水後、 $CHCl_3$ を減圧留去して得られる黄色油状物を少量の MeOH に溶解し、ほぼ当量のピクリン酸を添加してピクレートとする。MeOH から再結晶し、黄色針状結晶 15g を得、mp 176-178° (decomp.). UV λ_{max}^{EtOH} m μ : 242, 360. *Anal.* Calcd. $C_{21}H_{24}O_6N_6$: C, 51.63; H, 4.95; N, 17.21. Found.: C, 51.64; H, 4.95; N, 17.33.

本ピクレートを 15% HCl 中室温にて攪拌し、生じるピクリン酸結晶を濾去、濾液を 10% KOH にて強アルカリ性とし $CHCl_3$ にて抽出、 Na_2SO_4 で脱水後溶媒留去し、微黄色油状物の遊離 4-ブチルアミノアンチピリンを得、NMR¹²⁾ (CCl_4) ppm: 0.95 (3H, triplet, $-CH_2-CH_3$), 1.48 (4H, multiplet, $-CH_2-CH_2-$), 2.18 (3H, singlet, $=C-CH_3$), 2.84 (3H, singlet, $N-CH_3$), 7.24-7.70 (フェニル基の 5H).

酒石酸塩の合成: 4-ブチルアミノアンチピリンを少量の iso-PrOH に溶解し、これに酒石酸の iso-PrOH 溶液を添加、少時水浴上加温後、減圧にて濃縮、析出せる結晶を iso-PrOH から再結晶、無色板状結晶。mp 126-127°. *Anal.* Calcd. $C_{21}H_{28}O_8N_6$: C, 55.74; H, 6.70; N, 10.26. Found: C, 55.55; H, 6.56; N, 10.24.

4-アセチルアミノアンチピリンの合成 Knorr の方法⁹⁾ にしたがひ、4-アミノアンチピリンを氷酢酸と還流することにより合成、 $CHCl_3$ -リグロインから再結晶、無色結晶、mp 197-199° UV λ_{max}^{EtOH} m μ : 245, 275.

4-(2-ブテニルアミノ)-アンチピリンの合成 4-アミノアンチピリン 2.5g の MeOH (50 ml) 溶液に氷冷下、新たに蒸留して得たクロトンアルデヒド 1.1g の MeOH (45ml) 溶液を徐々に滴下、攪拌しつつ 4hr 反応させる。溶媒を減圧留去後、残留物を MeOH 6ml に溶かし、水素化ホウ素ナトリウム 1.0g の MeOH (12ml) の溶液を氷冷下徐々に滴下後、50° にて 5hr 攪拌を続ける、MeOH を減圧留去し、残渣をアルミナカラムクロマトにより精製。溶出液には石油ベンジン、ベンゼンおよび $CHCl_3$ を用い、順次展開しベンゼン : $CHCl_3$ (4:1) およびその前後の溶液より得られる黄色油状の 4-(2-ブテニルアミノ)-アンチピリンを常法によりピクレートとし、MeOH から再結晶、黄色針状結晶、mp 177-180° (decomp.). *Anal.* Calcd. $C_{21}H_{22}O_8N_6$: C, 51.85; H, 4.56; N, 17.28. Found: C, 51.95; H, 4.51; N, 17.03.

4-ブチルアミノアンチピリンピクレートの場合と同様に処理し、遊離の 4-(2-ブテニルアミノ)-アンチピリンを得 (微黄色油状)。NMR (CCl_4) ppm: 1.70 (3H, doublet, $=CH-CH_3$), 2.16 (3H, singlet, $=C-CH_3$), 2.83 (3H, singlet, $N-CH_3$), 5.70 (2H, multiplet, $-CH=CH-$), 7.05-7.50 (フェニル基の 5H).

実験動物 尿中代謝物の検索用には、家兎 (体重 2.3kg 1羽)、モルモット (平均体重、380g 4匹)、ラット (Wister-King 均一系、平均体重 209g 4匹)、マウス (ddN 系、平均体重 27g 20匹) の各々雄を使用、代謝物単離には、家兎 (平均体重 3.2kg 3羽)、ラット (Wister-King 均一系、平均体重 177g 6匹) のいずれも雄を使用。

β -グルクロニダーゼ 家兎肝臓を用い、Fishmann 等の方法にしたがいステップ 2 まで精製した酵素液を使

8) W. Mohler, I. Bletz, M. Reisser, *Arch. der Pharmazie*, **299**, 448(1966).

9) L. Knorr, F. Stolz, *Ann.*, **293**, 58(1896).

10) L. Knorr, *Ann.*, **238**, 212(1887).

11) A. Skita, F. Keil, W. Stuhmer, *Ber.*, **75**, 1696(1942).

12) NMR は、すべて日本電子 3H 60 型 Spectrometer を使用。

用.¹³⁾

実験方法

薬物の投与および尿中代謝物の抽出 尿中代謝物の検索：4-ブチルアミノアンチピリン酒石酸塩を精製水に溶解し、ブチルアミノアンチピリン 100mg/ml となるように調製した。家兎、モルモットには 100mg/kg, ラットおよびマウスには 150mg/kg ずつをそれぞれ皮下注射により投与、その 48 時間尿を採取し、AcOH にて pH 4.65 に調整し 0.5M-アセテート緩衝液 (pH 4.65) を尿量の 1/5 容加える。ついで β -グルクロニダーゼを添加後、37—38° で 20hr インキュベートする。インキュベーション終了後、10% NaOH 液にて pH 7-7.5 に調整し CHCl_3 で 10hr 連続抽出。抽出物を TLC 試料として使用。

薬物投与前に採取した尿を同様処理して対照とした。

尿中代謝物の単離：家兎 3 羽に 4-ブチルアミノアンチピリン塩酸塩を 1 日 1 回 500mg/body ずつカテーテルにて 3 日間経口投与、48hr 尿を採取し、pH 7.5 に調整し、 CHCl_3 にて 6hr 連続抽出したものを試料とした。またラット 6 匹に 4-ブチルアミノアンチピリン酒石酸塩を 1 日 1 回 150mg/kg ずつ 7 日間連続投与 (皮下注射)。尿中代謝物検索時と同様に β -グルクロニダーゼ処理をした後、pH 7-7.5 で CHCl_3 にて 10hr 連続抽出をし、抽出物を試料とした。

薄層クロマトグラフィー シリカゲルプレート (厚さ 0.25mm, 5×20cm ガラスプレートに対し 1.5g Kieselgel G (メルク) を使用、105°, 30分活性化) を用いた。展開溶媒として (1) : CHCl_3 : Acetone : EtOH (148.5:50:1.5), (2) : CHCl_3 : EtOH (9:1) を適宜使用、また検出試薬として下記 2 種の試薬を用いたが、これらの試薬による呈色は (イ) で橙色、(ロ) で紫-赤紫色または茶色 (4-アセチルアミノアンチピリン) のスポットを与える。

(イ); ドラージェンドルフ試薬：次硝酸ビスマス 2g を少量の塩酸に溶解。アンモニア水を加えて生じる沈殿を汙別し水洗後、少量の塩酸に溶かし、用時ヨウ化カリウム 2g 含有 60% AcOH を加えて全量 50ml とする。

(ロ); 塩化第二鉄試薬：2% 塩化第二鉄水溶液。

実験結果

尿中代謝物の TLC による検索 4-ブチルアミノアンチピリン投与動物尿の CHCl_3 抽出物の薄層クロマトグラフィーにより、いずれの動物においても 4 種の代謝物の存在が確認された。すなわち、脱ブチル体である 4-アミノアンチピリン (M. 3) の生成がきわめて多く、ラットにおいてはさらにその大部分がアセチル化を受けて、4-アセチルアミノアンチピリン (M. 4) として尿中に排泄されていることが判明した。

またモルモットでは、アミノアンチピリンの約半分がアセチル化を受けているが、家兎およびマウスではアセチル化体は少なく、むしろそのまま 4-アミノアンチピリンとして排泄されている。

未変化物 (M. 1) も、すべての動物尿中に排泄されているが、特にモルモットではその量が多い、さらに M. 1 のすぐ下にごくわずかであるが未知スポットがあり、代謝物の存在が推測された (M. 2)。そのスポットの大きさからみて、本代謝物の尿中排泄はきわめて僅かであることが推察される (Fig. 1)。

尿中代謝物の単離

家兎尿抽出物よりの M. 1 および 3 の単離 薬物投与動物尿のクロロホルム抽出物を、十分減圧乾燥後 (1.84 g), これに可及的少量のベンゼンを加え、少量のシリカゲルと混合して吸着させた後、シリカゲル (関東化学、60—80メッシュ) 110g を充填した内径 4.1 cm のカラム上部に注ぐ、溶出溶媒として順次ベンゼン (900 ml), エーテル：ベンゼン (1:3, 2liter), エーテル：ベンゼン (1:1, 600 ml), エーテル (200 ml), エーテル：クロロホルム (1:1, 600 ml), エーテル：クロロホルム (1:2, 400 ml), クロロホルム (300 ml) および 3-5% メタノール含有クロロホルム (1.5 liter) を用い、流出せる溶媒を 50-200 ml ずつ分取し、各フラクションについて TLC (溶媒 B) にて、代謝物の溶出状態を検討した。

Fig. 1. Thin-layer Chromatogram of the Urine Extracts of Animals dosing 4-Butylaminoantipyrine

- No. 1: Extract of rabbit urine
 2: Extract of guinea pig urine
 3: Extract of mouse urine
 4: Extract of rat urine
 S. 1: 4-Butylaminoantipyrine
 2: 4-(2-Butenylamino)antipyrine
 3: 4-Aminoantipyrine
 4: 4-Acetylaminoantipyrine

Solvent system : CHCl_3 -acetone-EtOH (148.5:50:1.5)

13) W.H. Fishmann, P. Bernfeld, *Methods in Enzymology*, 1, 262(1955).

エーテル：ベンゼン (1:3) 溶出液より，TLC の R_f 値が 4-ブチルアミノアンチピリンと一致する黄色油状物を得，これをさらに薄層クロマトグラフィーを用いて精製し，得られた油状物を常法によりピクラートとなし，メタノールから再結晶して mp 174—176° (decomp.) の黄色針状結晶 160mg を得た．このものの mp, UV, IR スペクトルは合成標品 4-ブチルアミノアンチピリンピクリン酸塩と完全な一致をみた．

次に，3-5% メタノール含有クロロホルム溶出液から得た橙黄色の油状物は，その TLC の R_f 値から 4-アミノアンチピリンであることが推定された．これに希塩酸を加え，減圧濃縮すると橙黄色結晶が析出，メタノールから再結晶して，mp 158—160° の淡黄色結晶 502mg を得た．本代謝物の mp, IR および UV 吸収スペクトルは，合成標品 4-アミノアンチピリン塩酸塩と完全に一致した．

ラット尿よりの M. 2 および M. 4 の単離 シリカゲル (関東化学，100-200 メッシュ) 37g をカラムに充填し (内径 3cm)，クロロホルム抽出物 900mg を前項同様に吸着せしめ，カラムクロマトグラフィーにより代謝物の単離をおこなった．すなわち，溶出溶媒として順次ベンゼン (600 ml)，クロロホルム：ベンゼン (1:4, 300 ml)，クロロホルム：ベンゼン (1:1, 1.8 liter)，クロロホルム (1 liter) およびメタノール：クロロホルム (順次，1, 2, 5, 10% メタノール含有クロロホルム使用，全量 1.6 liter) を流し，50-100 ml ずつ分取し，各フракションについて代謝物の溶出状態を TLC にて検討した．クロロホルム溶出液より M. 2 の R_f 値を示す黄色油状物を得，これをピクラートに導きメタノールから再結晶し，mp 177—179° の黄色針状結晶 27mg を得た．このものの IR のスペクトルは，4-ブチルアミノアンチピリンピクリン酸塩のそれに類似はしているが，僅かに差が認められ，かつ TLC の R_f 値にも幾分の相異がある所から，(ω -1)-水酸化体ではないかと考えられた．しかし NMR スペクトルを測定した結果，4-ブチルアミノアンチピリンでみられた末端メチル (0.95 ppm) および 1.48 ppm のメチレンジグナルは，本化合物で消失し，代りに 1.70 ppm に $=CH-CH_3$ に相当するメチレンジグナル (doublet) および 5.70 ppm にビニールプロトン 2 個に相当する multiplet がそれぞれ新たに出現し，4-(2-ブテニルアミノ)-アンチピリンと推定され，別途これを合成した所，本代謝物の NMR スペクトルと一致をみた．さらに本合成標品ピクラートと M. 2 ピクラートは，mp, UV および IR も完全に一致した．

ついで，3-5% メタノール含有クロロホルムにて溶出せるフラクションより結晶性粉末を得，クロロホルム：リグロインから再結晶して，mp 197—199° の無色結晶を得た．本物質の TLC の R_f 値，mp, UV および IR 吸収スペクトルは全て合成品 4-アセチルアミノアンチピリンと一致した．

考察 以上の実験結果から明らかなように，4-ブチルアミノアンチピリンを各動物に投与した場合，脱アルキル化体，すなわち 4-アミノアンチピリンおよびそのアセチル化体である 4-アセチルアミノアンチピリンが主として尿中に排泄されており，動物間で若干の種差はあるがこの経路が本化合物の主要代謝経路であると考えられる．

また 4-(2-ブテニルアミノ)-アンチピリンが得られたが，本代謝物はブチル側鎖の (ω -1)-位に一旦水酸化を受けまた 4-(3-ヒドロキシブチルアミノ)-アンチピリンが，二次的に脱水を受けて生じたものと推察される．薬物投与動物尿を β -グルクロニダーゼ処理するとブテニルアミノ体の TLC による検出が，幾分容易になる傾向が観察されたが，このことは本代謝物の前駆体と考えられる水酸化体の少なくとも一部がグルクロナイドとして排

Fig. 2. Metabolic Pathways of 4-Butylaminoantipyrine

泄され、これが β -グルクロニダーゼ処理により遊離水酸化体となり、さらに脱水反応を起すものとも考えられる (Fig. 2).

このように、中間に水酸化体を生じ、ついで脱水がおこると考えられている例としては、3,3-ジエチル-5-メチルピペリジン-2,4-dione (メチプリロン¹⁴⁾) および α -フェニル- α -エチルグルタールイミド (グルテチミド¹⁵⁾) などが知られている。

以上の結果ならびに Beckmann⁷⁾ あるいは Mohler⁸⁾ 等の報告を考えあわせると、適当な炭素数のアルキル鎖を有するアルキルアミン類は、C-アルキルや O-アルキルの場合と同様に、生体内で (ω -1)-酸化を受けるのではないかと考えられる。

謝辞 終わりに NMR スペクトルを測定された竹尾聰修士ならびに松尾哲也学士に深謝します。なお本研究費の一部は文部省科学研究費によったことを併記し謝意を表します。

14) K. Bernhard, M. Just, A.H. Lutz, J.P. Vuilleumier, *Helv. Chim. Acta*, **40**, 436(1957),

15) H. Keberle, W. Reiss, K. Hoffmann, *Arch. intern. Pharmacodyn.*, **142**, 117(1963).