薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
89 (1) 29-33 (1969)

UDC 615.233.015.4 : 543.422.5.062 : 547.922.3

1-Methyl-3-[di(2-thienyl)methylene]piperidine Citrate¹⁾ の代謝に関する研究

(第1報) 1-Methyl-3-[di(2-thienyl)methylene]piperidine

およびその N-脱メチル体の分離定量法

渡辺 章, 佐々木靖彦, 杉原重孝, 鶴岡正夫

田辺製薬株式会社生物研究所²⁾

Studies on the Metabolism of 1-Methyl-3-[di(2-thienyl)methylene]piperidine

Citrate.¹⁾ I. Fractional Determination of 1-Methyl-3-[di(2-thienyl)-methylene]piperidine and Its N-Demethylated Derivative

AKIRA WATANABE, YASUHIKO SASAKI, ZYUKO SUGIHARA,
and MASAO TSURUOKA

Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.²⁾

(Received May 29, 1968)

A method is described for the fractional determination of 1-methyl-3-[di(2-thienyl)methylene]piperidine (I) and its N-demethylated derivative (II). The fractional determination was made possible by coloration of II only with a Ninhydrin-acetic acid reagent and by coloration of both I and II with a Ninhydrin-sulfuric acid reagent after the method of Kase, *et al.* with minor modifications. By this method one can determine as little as 5 μ g of I and 2.5 μ g of II per ml of benzene extracts from biological materials.

The color reaction with the Ninhydrin-acetic acid reagent may be used also for the determination of several kinds of N-unsubstituted piperidine, morpholine, and pyrrolidine derivatives.

1-Methyl-3-[di(2-thienyl)methylene]piperidine (I) はその有機酸塩の形で、鎮咳作用のほか祛痰作用を兼ね備えた新しい型の中枢性非麻薬鎮咳薬として知られており,³⁾ そのほか類似構造をもった dithienyl butene 系化合物で医薬品として用いられているものも多く,⁴⁾ その生体内における代謝の研究は意義あるものと考えられる。

しかしながら、その代謝についてはほとんど研究されておらず、六藤等⁵⁾ が ³⁵S ラベル I を用いて主要臓器内の放射エネルギーの測定をおこなっているにすぎない。

著者等は、研究の初期段階において I が家兎およびラットの肝酵素によって N-脱メチル反応をうけることを見だし、この N-脱メチル体 (II) もまた I とほぼ同様の鎮咳作用をもつことをみとめた。したがって、これら I および II の生体内分布および消長はその生理作用の研究上からも重要であろうと考え、まずその分離定量法の検討をおこなった。

ペペリジン核をもつ化合物の N-メチル体およびその N-脱メチル体の分離定量法としては、Burns 等⁶⁾ は meperidine およびその N-脱メチル体を溶媒によって別々に分離抽出したのちメチルオレンジと複合体を形成させて比色定量する方法を報告しているが、この方法はまず溶媒によってそれぞれを分離抽出することが前提とな

1) この化合物はすでに 3-(1-methyl)-piperidene-di-(2'-thienyl)methane citrate として発表されている。

2) Location: Kawagishi, Toda-shi, Saitama.

3) Y. Kase, T. Yuizono, T. Yamasaki, T. Yamada, S. Ito, M. Tomiya, I. Kondo, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **7**, 372 (1959); Y. Kase, T. Yuizono, *ibid.*, **7**, 378 (1959); 加瀬佳年, 薬局, **13**, 65 (1961).

4) D.W. Adamson, *J. Chem. Soc.*, **1949**, 144; *ibid.*, **1950**, 885; *ibid.*, **1950**, 1039.

5) M. Muto, K. Watanabe, M. Maruo, T. Uchida, I. Sugioka, Y. Kase, *Kumamoto Pharmaceutical Bulletin*, **1965**, 428.

6) J. J. Burns, E. L. Berger, P. A. Lief, A. Wollack, E. M. Papper, B. B. Brodie, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **114**, 289 (1955).

るため、I および II の分離定量には応用できなかった。

また、I あるいはチオフェン核をもった一連の類似化合物の定量については、さきに由井蘭等⁷⁾はチオフェン核のニンヒドリン硫酸試薬による呈色反応によって比色定量をおこなっている。

著者等はベンゼン溶液中のチオフェン関連化合物を直接に比色定量に用いるように由井蘭等の方法を一部改変するとともに、生体試料中の I およびその代謝物のうち、I および II をベンゼン中に抽出し、ベンゼン溶液中に共存している I および II の定量をおこなった。

また、ニンヒドリン硫酸試薬のかわりにニンヒドリン酢酸試薬⁸⁾を用いると II が特異的な呈色反応を示すことをみとめたので、これを用いて II を分離定量し、さきの方法で求めた I および II の値との差から I 量を算出することによってベンゼン溶液中の I および II を分離定量することができた。

なお、ここに用いたニンヒドリン酢酸試薬による呈色反応は、医薬品の代謝物としてしばしば見いだされ、かつ、従来適当な定性、定量法が知られていないピペリジン、モルフォリンおよびピロリジン核をもった数種の化合物のノル体の定性、定量法としても有用であることを見いだした。

実験の部

試薬 1) I のクエン酸塩 (mp 138—142°), および II の塩酸塩 (mp 209—211°) は当社有機化学研究所で合成されたものを用いた。

2) ニンヒドリン酢酸試薬：使用のたびごとに 100 mg のニンヒドリンを新たに蒸留した 100 ml の氷酢酸に溶解して使用する。氷酢酸の純度は重要であり、不純なものは呈色反応を阻害する。

3) ニンヒドリン硫酸試薬：使用のたびごとに 10 mg のニンヒドリンを濃硫酸に溶解して使用する。

4) ベンゼン：ベンゼンは濃硫酸とともに反覆振とうして洗浄、水洗ののち、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥し、蒸留して精製したものを用いる。

5) I および II の基準ベンゼン溶液：I のクエン酸塩 33.8 mg を 10 ml の水に溶解し 1N NaOH を加えて pH 10 に調整したのち、50 ml ずつのベンゼンを加えて 3 回抽出を行なう。ベンゼン抽出液を合わせて乾燥剤紙によってろ過し、ろ液をベンゼンで 200 ml として I の基準ベンゼン溶液を調製する。この溶液 1 ml は I の 100 μ g に対応する。また、II の塩酸塩 22.2 mg を約 10 ml の水に溶解し、I の基準溶液調整法に準じて 200 ml のベンゼン溶液として II の基準ベンゼン溶液を調製する。この溶液 1 ml は II の 100 μ g に対応する。

定量法 1) ニンヒドリン硫酸法による I および II の定量——1.5×15 cm の共せん試験管に 5—10 μ g の I または II を含むベンゼン溶液 1 ml をとり、これにニンヒドリン硫酸試薬 10 ml を加えて密せんし、振とう機によって室温で 20 min 間振りまぜる (振幅 7 cm, 速度 170 spm)。これを室温で 90 min 間放置したのち 2 hr 以内に 490 m μ で吸光度を測定する。本呈色反応における I および II の呈色液の吸収曲線は Fig. 1 に示したようにともに $\lambda_{\max}$ 490 m μ である。本方法における I および II の検量曲線を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

Fig. 1. Absorption Spectra of the Coloured Solutions on the Determination of I and II with the Ninhydrin-Sulfuric Acid Method

— I: 60 μ g --- II: 30 μ g

Fig. 2. Working Curve of I for the Ninhydrin-Sulfuric Acid Method

7) T. Yuizono, Y. Kase, A. Kawano, H. Okubo, M. Kataoka, *J. Pharm. Pharmac.*, **18**, 112 (1966).

8) W. Grassmann, K.V. Arnim, *Ann.*, **509**, 288 (1934).

Fig. 3. Working Curves of II for the Ninhydrin-Sulfuric Acid and the Ninhydrin-Acetic Acid Methods

—●— ninhydrin-sulfuric acid method
—▲— ninhydrin-acetic acid method

Fig. 4. Absorption Spectrum of the Coloured Solution on the Determination of I (60 μ g) with the Ninhydrin-Acetic Acid Method

2) ニンヒドリン酢酸法による II の定量—— 1.5×15 cm の共せん試験管に 2.5—100 μ g の II を含むベンゼン溶液 1 ml をとりこれにニンヒドリン酢酸試薬 10 ml を加え、ゆるくせんを付して沸騰水浴中で 10 min 間加熱したのち、ただちに流水中で冷却し、500 m μ における吸光度を測定する (Fig. 4). 呈色は室温においては呈色ののち 5 hr は安定である. 検量曲線を Fig. 3 に示した. なお、同様の反応条件においては I は全く呈色を示さなかった.

3) I および II の分離定量——I および II の混合ベンゼン溶液中における II は前述のニンヒドリン酢酸法によって定量する. この II の量に対応するニンヒドリン硫酸法における 490 m μ の吸光度を、ニンヒドリン硫酸法の検量曲線 Fig. 3 を用いて求める. 他方、別の同一試料ベンゼン溶液についてニンヒドリン硫酸法を行なう. この 490 m μ の吸光度とさきに求めた II による 490 m μ における吸光度との差から試料中の I のみに基づくニンヒドリン硫酸法における 490 m μ の吸光度を求め、Fig. 2 の検量曲線によって I の量を知ることができる.

I および II の混合ベンゼン溶液について回収実験を行なった結果、それぞれ、I : 99% II : 100% の平均回収率が得られた (Table I).

TABLE I. Recovery of I and II in Benzene

Added I+II (μ g)	Found I		Found II	
	(μ g)	(%)	(μ g)	(%)
20.0+ 5.0	19.8	99	5.0	100
10.0+10.0	9.8	98	10.0	100
5.0+20.0	5.0	100	20.0	100

4) 動物組織からの I および II の抽出——動物組織中の I および II の定量を行なうには、組織 2—10 g を 2 倍容の 4.5 N HCl とともにテフロン製 Potter 型ホモジナイザーで 5 min 間磨砕する. 磨砕物は組織量と同容の 3 N HCl によって 2×20 cm 試験管に洗いこみ、ガラス球で管口を覆って沸騰水浴中で 3 hr 加熱する. 冷却したのち少量の 0.1 N HCl とともに分液漏斗中に洗いこみ濃 NaOH 溶液によって pH 10 に調整したのち、2 倍容ずつのベンゼンによって 3 回抽出を行なう. ベンゼン抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウムを加えて一夜放置したのち、滲液および洗液を合わせて約 50 ml まで減圧濃縮する. このベンゼン溶液を定量的に分液漏斗に移して同容の 0.1 N HCl で 2 回抽出する. 塩酸層を合わせて分液漏斗に移し 1 N NaOH によって pH 10 に調整したのち 2 倍容のベンゼンで 3 回抽出を繰返す. ベンゼン抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウムを加えて一夜放置のち滲過し、滲液および洗液を合わせて減圧下にはほとんど乾涸するまで濃縮したのちこれをベンゼンで全容 10 ml として定量に用いる.

正常なラットの肝ホモジネートに I のクエン酸塩および II の塩酸塩の水溶液を添加したのち前記の抽出操作

を行ない、そのベンゼン抽出液について I および II の分離定量を行なった結果を Table II に示した。I および II を添加しない正常なラットの肝そのほかの組織には本定量値の補正を必要とするような呈色性物質は含まれていなかった。

TABLE II. Recovery of I and II added to Rat Liver Homogenates

Sample	I Found		Sample	II Found	
	(μg)	(%)		(μg)	(%)
1	183	91.5	1	180	90.0
2	178	89.0	2	185	92.5
3	182	91.0	3	182	91.0
4	179	89.5	4	185	92.5
5	178	89.0	5	188	94.0
	180 ± 2^a	90 ± 1^a		184 ± 4^a	92 ± 2^a

^a) standard deviation

200 μg of I (I-citrate 340 μg) and 200 μg of II (II-HCl 211 μg) were added to a homogenate of 5 g rat liver. The benzene extract was made by the method described in the text and 1 ml out of 10 ml of the concentrated benzene extract was used for the determination of I and II.

定量法の特異性 I のクエン酸塩を投与したラットの組織および尿にはアルカリ性でベンゼン抽出を行なうと、I および II のほかに、薄層クロマトグラム上でニンヒドリン硫酸試薬によって呈色する 1 代謝物が検出された。しかし、この代謝物は I と II の前記定量法においてはアルカリ性の水溶液からベンゼンで抽出されるが、このベンゼン溶液から 0.1 N HCl によって逆抽出され得ないので前記抽出操作によって完全に除去される。また、試料をアルカリ性で塩化メチレン抽出を行なうと、薄層クロマトグラム上でニンヒドリン硫酸試薬による呈色性から I の代謝物と推定される 3 種のスポットが新たに検出された。しかし、これら 3 種の物質はいずれもどのような液性においてもベンゼンによって抽出されないので前記の抽出操作をあらかじめ行なう I および II の分離定量には影響をあたえない。

TABLE III. The Specificity of The Colour Reaction of Ninhydrin-Acetic Acid Reagent

	Compd. ^{a)}	Colourization	λ_{max} (m μ)	Molar absorptivity ϵ
(1)		+	554	2.06×10^6
(2)		+	560	4.31×10^6
(3)		—	—	—
(4)		+	560	0.090×10^6
(5)		—	—	—
(6)		+	560	
(7)		+	570	0.492×10^6

(8)		+	app. 510	
(9)		—	—	—
(10)		+	545	0.261×10^6
(11)		+	560	0.065×10^6
(12)		—	—	—
(13)		+	515	0.566×10^6
(14)		—	—	—
(15)		+	520	1.33×10^6
(16)		+	540	0.047×10^6

a) (1), (6), (7), (9), (10), (13), (14), (15), (16) were obtained from commercial sources.

(2), (3), (4), (5), (11), (12) were synthesized in Organic Chemistry Research Laboratory of Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

(8) was prepared by enzymatic demethylation of (9) with rabbit liver homogenate.

ニンヒドリン酢酸試薬による呈色反応の特異性 ニンヒドリン酢酸試薬による呈色反応は II のほかに, Table III で示したようにピペリジン, モルフォリンおよびピロリジン核をもった数種の化合物についてもそのノル体にもみ特異的に呈色をあたえた. したがってこれらの N 置換された骨格をもつ薬物が生体内において代謝され, そのノル体を生成するときにはその定量に应用することが可能であろう.

謝辞 本研究にあたり終始御指導いただいた当研究所長阿部久二博士に深謝致します.