放射性同位元素による医薬品の分析 (第5報¹⁾) 家兎肝による
Ephedrine 代謝産物の分析²⁾

馬場茂雄, 松田暁忠, 長瀬雄三
東京薬科大学³⁾

Studies on the Analysis of Drugs by Use of Radioisotopes. V.¹⁾
Identification of Metabolites of Ephedrine
in the Rabbit Liver²⁾

SHIGEO BABA, AKITADA MATSUDA, and YUZO NAGASE
Tokyo College of Pharmacy³⁾

(Received November 11, 1968)

L-Ephedrine (α -¹⁴C, ca. 1×10^6 dpm/mg) was incubated with rabbit liver preparation (supernatant fraction of 15000 g, 20 min centrifugation and NADPH₂ regenerating system) for 2 hours. The metabolites were separated by paper partition and thin-layer chromatography and were determined by the reverse isotope dilution analysis. Nor-ephedrine (33.4%), 1-phenyl-1,2-propanediol (11.4%), 1-hydroxy-1-phenyl-2-pentanone (4.2%), and benzoic acid (39.3%) were identified as the metabolites together with unchanged ephedrine (6.2%).

propanone

著者等はラットに *L*-ephedrine (α -¹⁴C) (I) を投与し, 尿中に排泄された代謝産物を逆希釈分析法によって検索し, 未代謝の I, norephedrine (II), *p*-hydroxyephedrine (III), 馬尿酸 (IV), 安息香酸 (V) などを同定し, さらにかなりの量の中性物質が I の代謝産物として存在することを報告¹⁾ した. 一方 Axelrod⁴⁾ は犬, モルモット, ラット, 兎などに無標識 ephedrine を投与し, 尿中に排泄された代謝産物を, メチルオレンジとの呈色反応を指標にして検索し, I の代謝産物として II, III および未代謝の I を同定し, さらに尿中に現われた I, II, III の割合は試験動物の種類によって著しく異なることを明らかにした. しかしこの方法ではメチルオレンジに呈色するものだけしか検索できないという問題点がある. 実際, 兎では, 速やかに脱窒素反応が起るために, 投与した I のわずか 3.8% が代謝産物または I として説明されているにすぎない. 著者等は, 無標識 ephedrine を用いる従来の方法では確認できなかった I の脱窒素以後の代謝産物に興味をもち, 家兎の *in vivo* 実験の第1段階として, 家兎肝臓の *in vitro* における I の代謝反応を標識 ephedrine を用いて行なった.

比放射能 1×10^6 dpm/mg の *L*-ephedrine (α -¹⁴C) 0.5 mg を実験の部に詳記した liver preparation と 37° でインキュベイトした. インキュベーション開始後 60 分までは 15 分ごとに, 以後 180 分までは 30 分ごとにインキュベーション混液の一部をとり, Whatman No. 2 の濾紙にスポットし, iso-BuOH-HCOOH-H₂O (100:12:10, 展開溶媒 1) で展開したのち, ペーパークロマトスキャンナー (PPC スキャンナー) で測定した. 測定結果は Fig. 1 に示したが, インキュベーション 15 分後には基質 (および少量の II) に相当する放射能ピーク (ピーク 1) のほかに, *R_f* 0.8 付近に新しい放射能ピーク (ピーク 2) が現われはじめ, 両者の比はインキュベーション 120 分以後にはほぼ一定になることを認めた.

つぎに Chart 1 にしたがって代謝産物の分離同定を試みた. 体重約 3 kg の雄家兎 3 羽から摘出した肝臓の 25% homogenate を 15000g, 20 分間遠心分離して得た上清を用い, 経時変化の実験と同じようにインキュベイトした. なおインキュベーションの時間は 2 時間と決めた. インキュベーション混液を沸騰水浴中で加熱し反応

1) 第4報: 長瀬雄三, 馬場茂雄, 松田暁忠, 薬誌, 87, 123 (1967).

2) 日本薬学会第87年会, 京都, 1967年4月; 第88年会, 東京, 1968年4月に一部発表.

3) Location: Kashiwagi 4-600, Shinjuku-ku, Tokyo.

4) J. Axelrod, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 109, 62 (1953).

Fig. 1. Paper Chromatograms of *l*-Ephedrine (α - ^{14}C) Metabolites at Various Incubation Time

developing system: iso-BuOH-HCOOH-H₂O (100:12:10)

を停止させ、もはや放射能が抽出されなくなるまでエタノールで抽出した。投与した全放射能の 90% 以上がこの操作で回収された。エタノール抽出液を濃縮後、展開溶媒 1 で展開し、ピーク 1 および 2 に相当する部分を切りとり、エタノールで溶出した。ピーク 2 の溶出液を BuOH-sat. conc. NH₄OH (展開溶媒 2) で再展開すると *Rf* 0.4 (ピーク 2') および 0.8 (ピーク 2'') に 2 つの放射能ピークが認められた。前と同様に各ピークに相当する部分をエタノールで溶出した。

代謝産物のうち、ピーク 1 は I および II、ピーク 2' は V、ピーク 2'' は *erythro*-1-phenyl-1,2-propanediol (VII) および 1-hydroxy-1-phenyl-2-pentanone (VIII) であると考えられた。そこで各ピークの溶出液から 1×10^4 — 4×10^4 dpm に相当する量を取り、それぞれに対応した非放射性物質約 100 mg (a) を正確に加えて

Chart 1. Experimental Procedure

回収し、比放射能が統計誤差範囲内で一定 (S) になるまで (普通 3—4 回) 再結晶をくり返し、代謝産物の量 (x) を (1) 式から求めた。なお I と II は物理化学的性質が似ているので再結晶法では、相互の contamination を除くことはむずかしいと考えられた。しかし実際には P-1 の一部に I, II を別々に加え再結晶による精製を繰返したところ、Fig. 2 に示すようにいずれも 3 回の再結晶で比放射能が一定になり、しかも P-1 の全放射能のほぼ 100% が (I)+(II) で説明できることがわかった。また VIII は、常温では液体のため、再結晶による精製はできないのでピーク 2'' の溶出液の一部に 1.5—3 mg の VIII を加え、thiosemicarbazone (無色の誘導体) に誘導し、薄層クロマトグラフ法 (TLC) で VII から分離精製した。この比放射能は、TLC で分離精製したスポットの抽出液の 275 m μ の吸光度と放射能の強さから求めた。Table I にはそれぞれの家兎肝臓につき 3 回ずつ実験して得られた実験結果の平均値を示した。

$$xS_0 \doteq aS$$

ただし $a \gg x$

Fig. 2. Purification of Recovered Ephedrine (●—●) and Norephedrine (○—○) by Means of Recrystallization

(1)

TABLE I. Reverse Dilution and Isotope Derivative Analysis of Incubation Mixture

Peak	Substrate and metabolites	Rabbit 1 ^{a)} (%)	Rabbit 2 ^{a)} (%)	Rabbit 3 ^{a)} (%)	Mean (%)
1	ephedrine	7.2	5.1	6.4	6.2
	norephedrine	47.3	30.9	21.9	33.4
2''	1-phenyl-1,2-propanediol	6.8	13.5	13.8	11.4
	1-hydroxy-1-phenyl-2-pentanone	2.2	6.3	4.0	4.2
2'	benzoic acid	31.8	40.7	45.3	39.3
	total	95.3	96.5	91.4	94.5

a) Numbers indicate the mean values of three runs.

L-Ephedrine (α - ^{14}C) を用い、 ^{14}C activity を指標にして代謝産物を検索することにより、従来は見のがされていた VII および VIII を、また代謝産物として予想はされていたが確認に至らなかった V を確認することができた。顕著な量ではないが、中性物質 VII および VIII が同定されたことは特に興味深い。なお投与した ^{14}C 総放射能の約 94% が代謝産物 II, V, VII, VIII または未代謝の I として説明されているので、この条件下ではパラ位に水酸化された代謝産物やその他の代謝産物は無視できる。

実験の部

装置および放射能の測定 液体シンチレーション計数装置 (液シン) による測定 試料を疎水性シンチレータ (PPO 4.0 g/liter, dimethyl POPOP 0.4 g/liter の割合で toluene に溶解) 10 ml に溶解し、日本無線医理学研究所製 LSC-501 型液シンで統計誤差が 1% 以下になるように測定した。なお計数効率は外部線源法で補正した。

4 π -ペーパークロマトスキャナー (PPC スキャナー) による放射能の測定 ペーパークロマトグラム (幅広くスポットした場合には両端と中央部から幅 2.5 cm に切りとる) を日本無線医理学研究所製の PPC スキャナー TRM 1 を用いて測定した。なお放射性物質のスポット量は、スリット幅 3 mm, full scale 1000 または 3000 で適当な測定結果が得られる量にした。

紫外吸収スペクトル (UV) の測定 日立自記分光光度計 ESP-3 型で測定した。

核磁気共鳴スペクトル (NMR) の測定 日本電子株式会社製 JNM-4H 100 を用いて測定した。

実験動物 成熟雄家兎 (体重約 3 kg) 3 羽を定温室であらかじめ 1 週間飼育したものを使用した。

逆希釈および誘導体逆希釈分析に使用した非放射性物質の合成 dl-Norephedrine (II) は W.H. Hurtung 等

の方法,⁵⁾ 1-hydroxy-1-phenyl-2-~~propanone~~^{propanone} (VIII) は島津の方法⁶⁾ にしたがって合成した。erythro-1-Phenyl-1,2-propanediol は Th. Zincke 等の方法⁷⁾ にしたがって合成し, NMR で erythro 体であることを確認した。

代謝産物の経時変化の検討 比放射能約 1×10^6 dpm/mg の l-ephedrine (α - 14 C) 1 mg を雄家兎の肝臓の 25% ホモジネート (1.15% KCl in 0.1 M Tris b. pH 7.4) の 15,000g 20 min 遠心上清の 6 ml, 0.1 mmole/ml の nicotinamide 0.8 ml, 0.1 mmole/ml の G-6-P (glucose-6-phosphate) 0.8 ml, 4.83 unit/ml の G-6-PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 0.5 ml, 1.221 μ mole/ml の NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 0.5 ml, 0.1 mmole/ml の Mg(OAc) 0.4 ml のインキュベーション混液中で 37° でインキュベイトした。インキュベーション開始後 60 min までは 15 min ごとにそれ以後は 30 min ごとにインキュベーション混液から 1 ml をとり, ただちに沸騰水浴中で反応を停止させた。反応を停止させたインキュベーション混液を EtOH でもはや放射能が抽出されなくなるまで抽出し, 抽出液を N₂ をふきつけて濃縮後 Whatman No. 2 のろ紙にスポットして iso-BuOH-HCOOH-H₂O (100:12:10) で展開後, PPC スキャンナーで放射能を測定した (Fig. 1 参照)。

代謝産物の同定 1) インキュベーション——比放射能約 1×10^6 dpm/mg の l-ephedrine (α - 14 C) 0.5 mg を, 雄家兎肝臓ホモジネートの 15,000g 上清と NADPH₂ 再生系および NADP とともに 37° で 2 hr インキュベイトし, 沸騰水浴中で 30 min 加熱し反応を停止させた後, 遠心分離し, 上清を目盛り付き試験管にとり, 沈殿物は EtOH 2 ml で 4 回抽出し上清に合わせた。抽出液の全容積を 10 ml とし, その抽出液の中から 0.1 ml をバイアルにとり, 無水 EtOH 0.5 ml を加え, 疎水性シンチレータ 10 ml を加えて, 液シンで放射能の強さを測定した。放射能の回収率は約 90% であった。

2) Ephedrine (I), Norephedrine (II), Benzoic Acid (V) および erythro-1-Phenyl-1,2-propanediol (VII) の逆希釈分析法による同定—— 1×10^4 — 4×10^4 dpm に相当するピーク 1, 2' および 2'' のエタノール溶出液を, 予想される化合物約 100 mg をひょう取した遠沈管に移し, 完全に溶解したのちその溶液から 0.1 ml をバイアルに取り標準とした。それぞれの遠沈管内容物を濃縮乾固し, 残留物の比放射能が一定になるまで (普通 3—4 回) 再結晶した。ピーク 1 では I (再結晶溶媒 無水 EtOH) および II (再結晶溶媒 無水 EtOH), ピーク 2' では V (再結晶溶媒 H₂O) またピーク 2'' では VII (再結晶溶媒 ether+benzine) を用いて逆希釈分析を行ない, (1) 式から I, II, V および VII の量を算出した (Table II 参照)。

3) 1-Hydroxy-1-phenyl-2-~~propanone~~^{propanone} (VIII) の誘導体希釈分析による同定——ピーク 2'' の EtOH 溶出液 (約 10^4 dpm) に VIII 1.5—3 mg を加え, EtOH を N₂ をふきつけて濃縮後, 常法により thiosemicarbazone (IX) を合成した。これをケイ光剤入りキーゼルゲル薄層にスポットし, hexane-AcOEt (1:1) で VII (R_f 0.7) と分離精製した。IX に相当する部分 (R_f 0.4—0.5) をけずりとり, IX を EtOH で抽出した。この抽出液の 275 m μ の吸光度から IX の物質量を求め, また同じ液の一部を液シンで放射能を測定し, VIII の比放射能を算出した。

謝辞 酵母をいただいたエビオス薬品工業株式会社, 助言をいただいた本学 須賀哲弥講師, 実験に助力された黒木三千丈君に深謝します。

5) W.H. Hurtung, J.C. Munch, *J. Am. Chem. Soc.*, **51**, 2262 (1929).

6) 島津嘉男, 日化, **71**, 503 (1950).

7) Th. Zincke, K. Zahn, *Chem. Ber.*, **43**, 849 (1910).