イミダゾリジノン系化合物の薬剤学的研究 (第 5 報¹⁾) 1,2-Dimethyl-3-phenyl-4-imidazolidinone および 3-Phenyl-4-imidazolidinone の血中における安定性

桂 義和, 安藤富仁, 高田千代子

日本新薬株式会社総合研究所²⁾

Pharmaceutical Studies of Imidazolidinone Derivatives. V.¹⁾ Stability of 1,2-Dimethyl-3-phenyl-4-imidazolidinone and 3-Phenyl-4-imidazolidinone in Blood

YOSHIKAZU KATSURA, TOMINI ANDO and CHIYOKO TAKADA

Research Laboratories, Nippon Shinyaku, Co., Ltd.²⁾

(Received May 18, 1970)

The stability of 1,2-dimethyl-3-phenyl-4-imidazolidinone (IMO-1) with a fast decomposition rate and 3-phenyl-4-imidazolidinone (IMO-4) with a low rate in rat blood was investigated. Both α -methylaninoacetanilide (IMO-D) and glycyaniline, which are decomposition products of IMO-1 and IMO-4, respectively, were metabolized to aniline in blood. It was found that the decomposition rate of glycyaniline was much larger than that of IMO-D. On the other hand, acetaldehyde produced from IMO-1 disappeared rapidly from blood by the attack of enzymes and protein binding. This result strongly suggested that IMO-1 was scarcely affected by the contribution of a reversible reaction, and appeared to be rapidly broken down by the first-order reaction in blood. These facts reveal that IMO-1 easily produced aniline, in contrast to IMO-4 which was quite stable and does not form aniline in blood.

第 1 報—第 4 報³⁾において, イミダゾリジノン系化合物の水溶液中での安定性について報告した. この中で最も安定であり, すぐれた薬効を有する 3-phenyl-4-imidazolidinone (以下 IMO-4 と略す) の生体内での挙動を検索する目的で, その分解物質の一種である glycyaniline (以下 GA と略す) を rat に *i.v.* 投与した結果, 血中に大量の aniline が生成していることを認めた. ここにみられた aniline は肝臓その他の代謝臓器に存在する酵素系により生成されたものも含まれるが, 古くから血中に存在することが知られているペプチド分解酵素⁴⁾の作用により aniline が生成することも考えられる. いずれであっても, 体内に生成した aniline は主として肝臓により代謝され, aniline 中毒の一種であるメトヘモグロビン形成の主因となるフェニルヒドロキシルアミン⁵⁾を生成することが知られている. 著者らは緩衝液中での検討結果より pH 7—8 で分解速度の速い 1,2-dimethyl-3-phenyl-4-imidazolidinone (以下 IMO-1 と略す) と安定な IMO-4 の 2 種の化合物を選び, rat の血中における安定性を検討して興味ある結果を得たので報告する.

実 験 の 部

実験動物および採血 Wister King 系雄性ラットより断首採血した血液 14 ml に対して, 10% のクエン酸ナトリウム水溶液を 1 ml 添加して凝固を阻止した.

- 1) 日本薬学会第 90 年年会で発表, 札幌, 1970 年 7 月; 第 4 報: 桂 義和, 杉山 信, 小野泰道, 薬誌, 91, 33 (1971).
- 2) Location: Nishiōji-Dori, Hachijyo-Sagaru, Minamiku, Kyoto.
- 3) 第 1 報: 桂 義和, 杉山 信, 薬誌, 91, 12 (1971); a) 第 2 報: 桂 義和, 杉山 信, 薬誌, 91, 19 (1971); b) 第 3 報: 桂 義和, 薬誌, 91, 26 (1971).
- 4) E. Adams, M. McFadden and E.L. Smith, *J. Biol. Chem.*, 198, 663 (1952).
- 5) M. Kiese, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 235, 354 (1959); M. Kiese, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 236, 19 (1959).

反応条件 試料溶液はすべて $3.23 \times 10^{-4} \text{M}$ の初濃度になるように生理食塩液または 0.115M の等張磷酸塩緩衝液 (pH 7.7) を用いて調製した。反応はすべて 37° のインキュベーター中で行ない、ゆるやかな攪拌を行なった (振幅 2 cm, 150 回/min)。

平衡透析法⁶⁾ CH_3CHO を溶解した磷酸塩緩衝液 4 ml を試験管にとり、同一緩衝液または血液 2 ml を入れた Cellulose Tubing (Visking Co. 8/32#) を浸して経時的に外液中の CH_3CHO を Albrecht の方法⁷⁾ で定量した。

IMO-1 の定量法 試料溶液 (血液) 2 ml に CHCl_3 20 ml および pH 6 の磷酸塩緩衝液 16 ml を加えて 3 分間振盪する。 CHCl_3 層 10 ml をとり pH 6 の磷酸塩緩衝液を 10 ml 加え 3 分間振盪し、さらに CHCl_3 層 9 ml をとり pH 6 の磷酸塩緩衝液 10 ml で 3 分間振盪することにより、混在する分解生成物、 α -methylamino-acetanilide (以下 IMO-D と略す) を完全に除去する。 CHCl_3 層 8 ml をとり CHCl_3 を留去したのち、 1N NaOH 5 ml を加えて 70° , 45 分間加熱して IMO-1 を加水分解し、生成した aniline を CHCl_3 5 ml で抽出して第 3 報に報告した操作にしたがって aniline を定量する。

IMO-4 の定量法⁸⁾ 試料溶液 (血液) 1 ml に CHCl_3 10 ml および pH 6 の磷酸塩緩衝液 8 ml を加えて 5 分間振盪する。 CHCl_3 層を 2 ml とり、エタノール 2 ml, 氷酢酸 8 ml を加えて、あらかじめ調製した 0.06% の dimethylamino cinnamaldehyde のエタノール溶液 2 ml を加え、遮光して 40 分間放置後 $502 \text{ m}\mu$ で吸光度を測定し、別に作成した検量線を用いて IMO-4 の濃度を求める。

CH_3CHO の定量法 i) 緩衝液中の CH_3CHO は第 1 報で報告した Albrecht の方法⁷⁾ にしたがった。

ii) 血中の CH_3CHO の定量は Burbridge の方法⁹⁾ にしたがった。すなわち Conway cell の内室に 0.067M のセミカルバジッド塩酸塩溶液 (pH 7) 3 ml を入れ、定量直前に外室に $2/3 \text{N H}_2\text{SO}_4$ 2 ml と 10% のタングステン酸ナトリウム水溶液 2 ml を入れる。試料溶液 (血液) 2 ml を外室に入れ直ちに密閉し、 28° — 30° で 90 分間放置する。内室液 2 ml を蒸留水で 10 ml として $224 \text{ m}\mu$ の吸光度を測定し、別に求めた検量線により CH_3CHO の濃度を求める。

GA の定量法 試料溶液 (血液) 1 ml に CHCl_3 10 ml および pH 6 の磷酸塩緩衝液 8 ml を加えて 5 分間振盪し、水層 8 ml をとり CHCl_3 10 ml と共に 5 分間振盪する。さらにこの水層 7 ml をとり CHCl_3 10 ml と共に 5 分間振盪したのち、水層 6 ml に 0.2N NaOH 4 ml および CHCl_3 3 ml を加え 5 分間振盪後 CHCl_3 層 1 ml をとり、氷酢酸 1 ml を混合し、 3% の *p*-dimethylamino benzaldehyde のエタノール溶液 8 ml を加え、遮光して 40 分間放置後 $410 \text{ m}\mu$ の吸光度を測定し、別に求めた検量線により GA の濃度を算出する。

IMO-D の定量法 試料溶液 (血液) 1 ml に CHCl_3 10 ml および pH 5 の酢酸塩緩衝液 8 ml を加えて振盪し、水層 7 ml をとり CHCl_3 10 ml と共に 5 分間振盪後、水層 6 ml に 0.2N NaOH 4 ml および CHCl_3 10 ml を加え 5 分間振盪したのち CHCl_3 層 6 ml を減圧留去し、 1N NaOH 5 ml を加え 70° , 45 分間加熱水分解して生成した aniline を第 3 報の操作により定量し、別に求めた検量線により濃度を算出する。

なお IMO-1 および IMO-4 の定量法によれば混在する aniline が同時に定量されるので、最初に振盪後の CHCl_3 層を用いて aniline を定量して差引いた。

結 果 と 考 察

GA と IMO-D の血中における分解

IMO-1 と IMO-4 の分解生成物である GA と IMO-D を 37° に保ち、ゆるやかな攪拌を加えながら血中で反応させると、Fig. 1 に示すごとく GA は急速に、IMO-D はゆるやかにいずれも見掛け上一次反応にしたがって分解することが認められた。

それぞれの分解速度定数は、

$$k_{\text{GA}} = 2.13 \text{ hr}^{-1}$$

$$k_{\text{IMO-D}} = 1.65 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1} \text{ となる。}$$

Fig. 2 は血中において生成された aniline を定量して、残存する GA および IMO-D とを対比したものであり、両化合物とも主として Chart 1 に示した反応により aniline を生成するものと考えられる。同一 pH における磷酸塩緩衝液中では GA および IMO-D の分解は全くみられないことより、血中の酵素作用によるものと考えられる。血液を 100° で 10 分間熱処理したのち、同様の実験を試みたところ、GA, IMO-D とともに全く aniline の生成がみられず酵素による反応であることを示唆している。

6) 掛見喜一郎, 有田隆一, 端 幹子, 住井聖子, 薬誌, **86**, 739 (1966).

7) A.M. Albrecht, W.I. Scher, H.J. Vogel, *Anal. Chem.*, **34**, 398 (1962).

8) 世一義隆, 佐野 彰, 荻野昭男, 分析化学, **19**, 1603 (1971).

9) T.N. Burbridge, C.H. Hine, A.F. Schick, *J. Lab. Clin. Med.*, **35**, 983 (1950).

Fig. 1. Decomposition of IMO-D and Glycydaniline at 37° in Blood (Initial Conc. of IMO-D and Glycydaniline: $3.23 \times 10^{-4}M$)

●—●: IMO-D
○—○: glycydaniline

Fig. 2. Decomposition of IMO-D and Glycydaniline, and Aniline Formation from These Compounds at 37° in Blood (Initial Conc. of IMO-D and Glycydaniline: $3.23 \times 10^{-4}M$)

●—●: IMO-D
○—○: glycydaniline
⊙—⊙: aniline from IMO-D
×—×: aniline from glycydaniline

Chart 1. Decomposition of Glycydaniline and IMO-D in Blood

一般に体内におけるアミド分解反応^{10,11)}はエステル分解反応に比し活性が低いことが知られているが, pyrazinamide の分解¹²⁾はかなり著明であることも報告されている. 一方血中でのペプチダーゼの存在は古くから知られ, しかも基質特異性のあることも報告されている. またアニリド結合は一般に血漿中では加水分解されがたく, リドカインの例¹³⁾では 2, 6 位のメチル基の存在はアミド結合の加水分解をさらに困難にするともいわれている. これらを考えあわせるとき, GA および IMO-D の分解がいかなる酵素によるものかは不明であるが, 類似化合物間に著しい反応速度の差異を生じることは興味深い.

血中での aniline 生成速度の速い GA を用いて, 基質濃度の増加に伴う aniline 生成速度をプロットすると, Fig. 3 のごとく酵素反応に特有な関係が得られた.

Fig. 4 は whole blood 中における GA および IMO-D からの aniline 生成量を血漿中および溶血液中对比したものである. この結果より, 溶血液は 6 倍に希釈されているにもかかわらず GA においては whole blood とほぼ同量の aniline の生成がみられ, IMO-D においても約半量生成している. また血漿中との比較において

10) L.C. Mark, H.J. Kayden, J.M. Steele, J.R. Cooper, I. Berlin, E.A. Rovenstine, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **102**, 5 (1951).

11) H.G. Mandel, V.W. Rodwell, P.K. Smith, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **106**, 433 (1952).

12) 掛見喜一郎, 宇野豊三, 瀬崎 仁, 薬誌, **76**, 906 (1956).

13) G. Hollunger, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **17**, 356 (1960).

Fig. 3. Influence of Concentration on the Decomposition Rate of Glycyaniline at 37° in Blood

Fig. 4. Aniline Formation from Glycyaniline, IMO-D at 37° in Blood (Initial Concn.: $3.23 \times 10^{-4} \text{M}$)

●—●: whole blood
○—○: hemolyzed blood by 1/200M phosphate soln.
⊙—⊙: plasma

も whole blood が明らかに多量の aniline を生成していることより、これらの化合物の加水分解反応に関与する酵素は血球に多く存在するものと考えられる。

IMO-1 および IMO-4 の血中での分解

IMO-1 および IMO-4 を血中で反応させると、Fig. 5, Fig. 6 に示すごとく IMO-4 はほとんど分解がなく aniline の生成もみられないが、IMO-1 は見掛け上一次反応にしたがって分解が進行し、これに伴って aniline の生成がみられた。第 1 報³⁾ に報告したごとく、IMO-1 は水溶液中ですみやかに分解して IMO-D と CH_3CHO を生成するが、中性ないしアルカリ性領域では逆反応が顕著になりこれらの三種の化合物の間に平衡関係が成立し分解が進行しなくなることが知られている。

Fig. 5. Decomposition of IMO-4 at 37° in Blood (Initial Concn. of IMO-4: $3.23 \times 10^{-4} \text{M}$)

Fig. 6. Decomposition of IMO-1 at 37° in Isotonic Phosphate Buffer Soln. (pH 7.7) and Blood (Initial Concn. of IMO-1: $3.23 \times 10^{-4} \text{M}$)

●—●: in buffer soln.
○—○: in blood

Fig. 6 に示した曲線は 37° において血液と同一 pH を有する等張リン酸塩緩衝液中での平衡反応を示している。可逆反応速度式¹⁴⁾ を用いてこの曲線上の実測値から IMO-1 の分解速度定数 k_1 を求めると、

$$k_1 = 1.17 \text{ hr}^{-1} \quad \text{なる値を得た。}$$

一方、Fig. 6 の直線の勾配より求めた血中における IMO-1 の分解速度定数 k_2 は、

$$k_2 = 1.17 \text{ hr}^{-1} \quad \text{となった。}$$

14) Frost and Pearson, "Kinetics and Mechanism," 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, 1962, p. 186.

血中で IMO-1 が一次反応に従って分解することおよび k_1 , k_2 の値が等しくなったことより、血中においては逆反応に参与する IMO-1 の分解物質が反応系外に消失したことが考えられる。しかし Fig. 1 に示したごとく、IMO-D の血中における分解速度は小さく、かつ bovine serum albumin による蛋白結合が全くみられないことより、他方の分解生成物である CH_3CHO が急速に消失するものと考えられた。

CH_3CHO の血中における挙動

Duritz ら¹⁵⁾ は血中における CH_3CHO の消失を酵素反応であると想定し、Mohammad ら¹⁶⁾ は蛋白と CH_3CHO の結合を不可逆反応であると想定している。しかし血中にはこれらの高分子成分の他に低分子の種々の成分が存在しており、低分子成分の作用により CH_3CHO が分解することも考えられる。血中における CH_3CHO の消失速度の検討とあわせてこの点についても検討を加えるため以下の実験を行なった。

まず低分子成分が容易に通過し得る cellulose tubing による透析法を応用して、内液に血液を用い、外液中に溶解した CH_3CHO の消失を検討した。実験の部に述べた反応条件において CH_3CHO の約 5% が透析膜に吸着される現象がみられたので対照実験によりこれを補正¹⁷⁾ した。

Fig. 7. Outer Concentration of CH_3CHO in Equilibrium Dialysis at 37°

●—●: pH 7.7 buffer soln. in inner side
○—○: blood in inner side
x: calcd. value

Fig. 8. Disappearance of CH_3CHO at 37° in Blood (Initial Conc. of CH_3CHO : $3.23 \times 10^{-4}\text{M}$)

Fig. 7 にその結果を示したごとく、内外液共に pH 7.7 の等張磷酸塩緩衝液を用いたときは、約 30 分で平衡に到達し CH_3CHO の外液濃度は初濃度の $2/3$ となる。この曲線から CH_3CHO の移行速度定数を求める¹⁴⁾ と、

$$k_3 = 2.04 \text{ hr}^{-1} \text{ (外液} \rightarrow \text{内液)}$$

$$k_4 = 4.08 \text{ hr}^{-1} \text{ (内液} \rightarrow \text{外液) となる。}$$

また内液に血液を用いた場合は、外液濃度と時間との関係は初期の短時間のみ曲線となり、以後直線的に急速に減少することが観察された。

一方、血中に溶解した CH_3CHO の消失をセミカルバゾン生成法で直接定量することにより Fig. 8 を得た。図のごとく一次反応に従ってすみやかに消失することが認められ、この直線の勾配より求めた血中における CH_3CHO の消失速度定数 k_5 は、

$$k_5 = 2.38 \text{ hr}^{-1} \text{ となる。}$$

これらの速度定数 k_3 , k_4 , k_5 を用いて次式に示すモデルを設定した。すなわち外液中の CH_3CHO が透析膜を隔てて内液中に可逆的に移行し、内液中に存在する血中の高分子成分により k_5 で消失することを仮定したモデルである。

A = 外液中の CH_3CHO の濃度

15) G. Duritz, E.B. Truitt, *Quarterly J. of Studies on Alcohol*, **25**, 498 (1964).

16) A. Mohammad, H. S. Olcott, H.F. Conrat, *Arch. Biochem.*, **24**, 270 (1949).

17) I.M. Klotz, F.M. Walker, R.B. Pivan, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1486 (1946).

B = 内液中の CH_3CHO の濃度

C = CH_3CHO の変化物の濃度

$$A = -\frac{\gamma_2 + k_1}{2\sqrt{\alpha^2 - \beta}} e^{\gamma_1 t} + \frac{\gamma_1 + k_1}{2\sqrt{\alpha^2 - \beta}} e^{\gamma_2 t} \quad \text{Eq. 1)}$$

ただし $\alpha = (k_3 + k_4 + k_5)/2$

$$\beta = k_3 \cdot k_5$$

$$\gamma_1 = -\alpha + \sqrt{\alpha^2 - \beta}$$

$$\gamma_2 = -\alpha - \sqrt{\alpha^2 - \beta}$$

t = 時間

A の濃度変化を Eq. 1 により計算¹⁸⁾ して Fig. 7 の × 印で示す値を得た。計算値と実測値がよく一致したことより、 CH_3CHO は透析膜を通過しない血球、酵素、蛋白などの作用によりすみやかに消失することが明らかになった。

IMO-1 からの Aniline の生成

これまでの検討結果から、IMO-1 は血中において Chart 2 に示す分解を起すものと考えられる。

Chart 2. Decomposition of IMO-1 in Blood

() 内は CH_3CHO がすみやかに消失するため、逆反応がきわめて小さくなり、事実上無視し得る値になることを意味している。

k_1 , k_6 の値を用いて逐次反応により生成する aniline 量を計算¹⁹⁾ すると Fig. 9 の × 印で示す値を得た。血中に IMO-1 を溶解して、生成する aniline 量を実測して得た値とよく一致することが認められた。なお、 k_6 は Fig. 2 に示した曲線から求めた IMO-D からの aniline 生成速度定数である。 $k_6 = 1.47 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ 。

総括

IMO-1 および IMO-4 とこれらの分解生成物質の血中における挙動を検討して、緩衝液中での安定性が大きく変化することを認めた。イミダゾリジノン系化合物は概して消化管吸収²⁰⁾ は良好である。したがって経口投与においてもすみやかに血中へ移行するものと考えられる。医薬品が体内に入り、まず遭遇する血液の中で、純化学系から予知し難い変化が起り、薬効に及ぼす影響はもとよりひいては副作用につながる物質の生起することもあり得ることが明らかになった。

前報までに報告した水溶液中での安定性^{1,3)} と本報での血中における安定性の検討結果を総括して IMO-4 が最も優れた製剤適性を有する化合物であることが明らかになった。

謝辞 本研究にあたり、終始御指導を賜った京都大学薬学部 掛見喜一郎教授ならびに瀬崎仁助教授に深謝致します。

18) 大岩正芳, “反応速度計算法,” 朝倉書店, 東京, 1964, p. 137.

19) 大岩正芳, “反応速度計算法,” 朝倉書店, 東京, 1964, p. 36.

20) 日本薬学会第 89 年会で発表, 名古屋, 1969 年 4 月.

Fig. 9. Aniline Formation from IMO-1 at 37° in Blood (Initial Concn. of IMO-1: $3.23 \times 10^{-4} \text{ M}$)

●—●: experimental value
×—×: calculated value