心脈管系薬に関する研究 (第 8 報¹⁾) 1-*tert*-Butylamino-3-[*o*-(tetrahydrofurfuryloxy)phenoxy]-2-propanol Hydrochloride (Y-6124) の代謝

中西美智夫, 加藤安之, 有馬德行

吉富製薬株式会社研究所²⁾Studies on Cardiovascular Drugs. VIII.¹⁾ Metabolism of 1-*tert*-Butylamino-3-(*o*-(tetrahydrofurfuryloxy)phenoxy)-2-propanol Hydrochloride (Y-6124)

MICHIO NAKANISHI, YASUYUKI KATO and NORIYUKI ARIMA

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.²⁾

(Received August 30, 1971)

The urinary metabolites of 1-*tert*-butylamino-3-[*o*-(tetrahydrofurfuryloxy)phenoxy]-2-propanol hydrochloride (Y-6124) in rats were investigated by a radiochemical method, thin-layer chromatography (TLC), mass spectrometry, and column chromatography using Amberlite XAD-2 resin. When ³H-labeled Y-6124 was orally administered, 84% of ³H counts in the 24 hr urine was adsorbed by Amberlite XAD-2 resin, which was followed by quantitative elution with methanol. Two metabolites (I, II) were detected in the methanol eluate by TLC. These (I and II) were hydrolyzed with β -glucuronidase to the corresponding aglycones III and IV, respectively. Further, treatment of compound IV with acid afforded compound V, which was easily reverted to IV under an alkaline condition. Compound III, which was the aglycone of metabolite I, was discovered to be a monohydroxylated derivative of Y-6124 by mass spectrometry and color reactions. On the other hand, compound V, which was derived from the aglycone (IV) of metabolite II, was found to be a monohydroxylated derivative of 1-*tert*-butylamino-3-[*o*-(5-oxotetrahydrofurfuryloxy)phenoxy]-2-propanol by the above mentioned methods. Therefore, compound IV, the aglycone of metabolite II, was considered to be a monohydroxylated derivative of 3-hydroxy-4-[*o*-3(*tert*-butylamino-2-hydroxypropoxy)phenoxy]pentanoic acid.

著者ら³⁾は、すでに 1-*tert*-butylamino-3-[*o*-(tetrahydrofurfuryloxy)phenoxy]-2-propanol hydrochloride (以下 Y-6124 と略) の ³H 標識体 (以下 ³H-Y-6124 と略) を用いて、ラットにおける生体内運命を検討し、投与後 3 日以内の尿中には投与した ³H の約 40% が排泄されるが、未変化体は尿中 ³H の約 6% で、他の大部分は代謝物に由来していることを報告した。しかし適当な推定代謝物の合成標品が得られず、代謝物を同定できなかった。

最近、マススペクトロメトリーにより、尿中代謝物を比較的簡単な操作で同定する試みが報告され⁴⁾ 本法は特にラットのような小動物の尿中代謝物を同定する場合に有効な手段と考えられる。

本報では、Y-6124 のラット尿中代謝物を同定する目的で、まず ³H-Y-6124 を用いて予備的検討を行ない、さらにクロマトグラフィーとマススペクトロメトリーとを併用して尿中代謝物の構造を明らかにした。

実 験 の 部

実験材料 ³H-Y-6124——著者ら³⁾ が合成した。比放射能 5.62 μ Ci/mg.

Y-6124——Nakanishi ら⁵⁾ によって合成された純品 (mp 153.5—157°) を使用。

Amberlite XAD-2 樹脂——市販品をあらかじめ MeOH および精製水でくり返し洗滌した後、精製水にけん

1) 第 7 報: 中西美智夫, 今村 博, 中村忠男, 木村智彦, 薬誌, 投稿中。

2) Location: 955, Koiwai, Yoshitomi-cho, Chikujo-gun, Fukuoka.

3) 中西美智夫, 加藤安之, 三浦誠二, 有馬德行, 応用薬理. 投稿中。

4) N. Arnold, H.F. Grützmaier, Z. Anal. Chem., 247, 179 (1969); 立松 晃, 灘井種一, 吉住秀夫, 内藤国博, 薬誌, 90, 1428 (1970).

5) M. Nakanishi, T. Muro J. Med. Chem., 15, 45 (1972)

だくしてクロマト・カラムへ充填した。

β -Glucuronidase——市販品 (Sigma, Bacterial Type 1, 58200 u/g) を使用。

実験動物 体重約 100 g の雄 Donryu ラット (日本ラット供給) を使用。

実験方法 検体の投与—— ^3H -Y-6124 および Y-6124 はいずれも水溶液として、前者は 50 mg/kg をラット 3 匹に経口投与して 24 hr 以内の尿を採取、後者は 100 mg/kg/day をラット 9 匹に 4 日間連続経口投与して 4 日間 (第 1 回投与から最終投与後 24 hr まで) 採尿して試料とした。

尿中代謝物の分離——上記試料尿を、尿量の約 1/2 容量の Amberlite XAD-2 樹脂を充填したカラムへ通す。吸着したカラムは、樹脂量に対して約 5 倍量の精製水を用いて洗滌した後、同容量の MeOH で溶出した。MeOH 溶出液は減圧濃縮により溶媒を留去、濃縮残渣を少量の MeOH に再溶解して以下の実験に供した。

薄層クロマトグラフィー (TLC)——シリカゲルプレート (wakogel B-5, 和光純薬, 厚さ 0.25 mm, 大きさ 10×20 cm, 105°, 30 min 活性化) を用い、 $\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4:1:5, v/v) または $\text{CHCl}_3 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{AcOH}$ (15:10:0.1, v/v) の溶媒系で展開した。クロマトグラム上の放射性物質は Radiochromatogram Scanner System (Packard, Model 7201) により検出した。呈色試薬はつぎの 4 種の試薬を用いた。(1) ドラージェンドルフ試薬⁶⁾ (2,3 級アミン検出用), (2) ナフトレゾルシン試薬⁷⁾ (グルクロン酸検出用), (3) ジアゾベンゼンスルホン酸試薬⁸⁾ (フェノール性 OH 検出用), (4) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬⁹⁾ (カルボニル基検出用)。

^3H の測定——試料を Bray¹⁰⁾ のシンチレーターに溶解させ、液体シンチレーション計数装置 (Packard, Model 3380) を用いて測定。試料のクエンチングは Absolute Activity Analyzer (Packard, Model 544) により自動補正した。

質量スペクトル——質量スペクトルは、日本電子製 (JMS 01 SG 型) 質量分析計を使用し、試料直接導入装置により、つぎの条件で測定した。

イオン加速電圧: 6.0—6.5 kV, イオン化電圧: 75 eV 全放射電流: 100—200 μA イオンソース温度: 110—150° 試料加熱温度: 115—160°。

結果と考察

予備的検討

^3H -Y-6124 を投与したラットの 24 hr 尿を用い、尿中代謝物の分離条件、各種呈色試薬に対する反応などを検討した。

試料尿を Amberlite XAD-2 樹脂を充填したカラム中へ入れ、カラムを精製水で洗滌すると、尿中 ^3H の 16% は吸着されずにそのまま通過し、84% が MeOH により定量的に溶出された。通過した分画中の ^3H は、主として $^3\text{H}_2\text{O}$ と推定される揮発性 ^3H ³⁾ および未変化の ^3H -Y-6124 に由来するので、以下の実験は尿中 ^3H の 84% を含む MeOH 溶出液についてのみ実施した。

$\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4:1:5, v/v) の溶媒系を用いた TLC により、MeOH 溶出液中に 2 種類 (I, II) の代謝物が検出された (Fig. 1)。クロマトグラム上のピーク面積から、代謝物 I, II はラット尿中にほぼ同量ずつ存在すると考えられる。代謝物 I, II は、いずれもドラージェンドルフ試薬およびナフトレゾルシン試薬陽性で、これらの代謝物は glucuronides であり、側鎖の 2 級アミンは変化していないものと推定される。さらに代謝物 II は、ジアゾベンゼンスルホン酸試薬を噴霧すると赤橙色を呈し、抱合されていないフェノール性 OH の存在が示唆される。検体を投与しないラットの尿を用いて対照実験を行ない、以上の呈色反応が ^3H -Y-6124 の代謝物に基づくものであることを確認した。

つぎに代謝物 I, II に相当するクロマトグラム上のシリカゲルをかき取り、MeOH で振とう抽出、溶媒を減圧濃縮により留去して両者を分離した。濃縮残渣を少量の精製水 (pH 7) に溶解して、 β -glucuronidase で処理 (β -glucuronidase 約 3 mg を添加, 37°, 6 hr インキュベート) した後、 $\text{CHCl}_3 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{AcOH}$ (15:10:0.1, v/v) の溶媒系で展開すると、代謝物 I, II は、それぞれ化合物 III, IV に変化した (Fig. 2)。III および IV は、ドラージェンドルフ試薬、ジアゾベンゼンスルホン酸試薬陽性であるが、ナフトレゾルシン試薬陰性であり、これらが代謝物 I および II の aglycone であり、しかも共にフェノール性 OH を有することがわかる。しかし前述のように代謝物 II はそのままでもジアゾベンゼンスルホン酸試薬陽性であるのに対し、代謝物 I は β -glucuron-

6) 全田 浩, “化学の領域-増刊-64 号,” 南江堂, 1964, p. 135.

7) G. Pastuska, *Z. Anal. Chem.* **179**, 427 (1961).

8) 百瀬 勉, “有機定性分析,” 広川書店, 1965, p. 122.

9) 百瀬 勉, “有機定性分析,” 広川書店, 1965, p. 188,

10) G.A. Bray, *Anal. Biochem.*, **1**, 279 (1960).

Fig. 1. Radioactive Scan of Thin-Layer Chromatogram of MeOH-eluate (Amberlite XAD-2) obtained from Rat Urine during 24 hours after Oral Administration of ^3H -Y-6124 (50 mg/kg)

developing solvent:
BuOH·AcOH·H₂O (4:1:5, v/v)

Fig. 3. Radioactive Scan on Thin-Layer Chromatograms of Compound IV (derived from Metabolite II) treated with Hydrochloric Acid

developing solvent:
CHCl₃·EtOH·AcOH (15:10:0.1, v/v)
---: before the treatment with 1N HCl
—: after the treatment with 1N HCl

Fig. 2. Radioactive Scan of Thin-Layer Chromatograms of the Urinary Metabolites (I, II) treated with β -Glucuronidase

developing solvent:
CHCl₃·EtOH·AcOH (15:10:0.1, v/v)
---: before the treatment with β -glucuronidase
—: after the treatment with β -glucuronidase

idase 処理によって III に変化してはじめて陽性となることから、代謝物 I ではフェノール性 OH が、また代謝物 II ではそれ以外の位置が glucuronic acid によって抱合されているものと推定される。

代謝物 II の aglycone である化合物 IV は、HCl 処理 (1N HCl に溶解し、沸とう水浴中 1 hr 加熱) により、さらに化合物 V に変化する (Fig. 3)。V は各種呈色試薬に対し化合物 IV と同様の反応を示すほか、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬により橙赤色を呈する。また化合物 V を 1N NaOH に溶解し、室温で 1—2 hr 放置すると簡単に IV に

もどる。すなわち化合物 IV と V は液性の違いにより可逆的变化をする。これらの結果から化合物 V はアルカリ性で不安定なカルボニル基を有するものと考えられる。

III, V の質量スペクトル

上記の ^3H -Y-6124 を用いた予備的検討により、Y-6124 のラット尿中主要代謝産物として 2 種類の glucuronides (I, II) の存在が確認された。非標識 Y-6124 を投与したラット尿中代謝物を同様の方法で分離、精製した結果、予備的検討で得られた成績と完全に一致したので、以下の実験はすべて非標識 Y-6124 を用いて行なった。尿中代謝物の分離、精製の各段階ごとに、MeOH 抽出液の濃縮残渣を試料として質量スペクトルの測定を試み

Fig. 4. Mass Spectra of Y-6124 (A), Compound III (B) and V (C)

たが、代謝物 I, II および化合物 IV では、尿常成分由来のピークが出現すること、目的物由来のピークがきわめて小さいかまたはまったく検出されないことなどの理由で測定困難であった。したがって質量スペクトルが測定可能な、化合物 III および V について得られたスペクトルと前述の各種呈色試薬に対する反応性などから、代謝物 I, II の構造を推定することにした。

Fig. 4 に Y-6124 の合成標品 (A), およびラット尿中代謝物 I, II から誘導された化合物 III (B) および V (C) の質量スペクトルを示す。

Y-6124 の分子イオンピーク (M⁺) は m/e 323 に弱いピークとして現われ、M-15 (m/e 308) に脱メチル体に由来する強いピークが現われるのが、本化合物の特徴である。その他の主なピークは m/e 279, 194, 110, 86, 71 などである。Y-6124 のフラグメンテーションについては工藤ら¹¹⁾によって詳細に検討されているが、その大要は Chart 1 のように考えられている。

尿中代謝物 I から誘導された化合物 III (B) でも、分子イオンピーク (m/e 339) は弱く、M-15 (m/e 324) に強いピークが現われ、本化合物が Y-6124 と類似のフラグメンテーションを行なうことがわかるが、いずれも質量単位が 16 大きい位置ヘシフトしている。さらに Y-6124 のフラグメントイオン, m/e 279, 194, 110 に対応する比較的強いピークが、いずれも質量単位が 16 大きい位置 (m/e 295, 210, 126) ヘシフトしている。一方、Y-6124 の *tert*-butylamino 基を含む側鎖部分のフラグメントイオンと考えられる m/e 86, 71 のピークは変化していない。これらの質量スペクトルの知見は、すべて化合物 III の構造が、Y-6124 のフェニル基へ OH の導入されたものであることを示しており、前述の予備的検討の結果とも完全に一致した。すなわち化合物 III は Y-6124 の

Chart 1

11) 工藤 章, 杉本のり子, 室 富雄, 基礎と臨床, 5, 1573 (1971).

水酸化体であり、さらに化合物 III の由来から、尿中代謝物 I は導入された OH が glucuronic acid 抱合を受けたものであることが確認された。しかし本実験から OH のフェニル基への導入位置は確認できなかった。

化合物 III は、著者ら⁹⁾が ³H-Y-6124 のラット尿中代謝物の 1 つとしてすでに報告した水酸化体と、すべての TLC 的性質が一致するので、一部は抱合されずに化合物 III の形で尿中へ排泄されられると考えられるが、量的には少ない。

化合物 V は、予備的検討によりフェノール性 OH およびカルボニル基を有すると推定された。Fig. 4 (C) に示した質量スペクトルの分子イオンピーク (m/e 353), M-15 (m/e 338), フラグメントイオンピーク (m/e 224) は、いずれも対応する Y-6124 のピークより質量単位が 30 大きく、tetrahydrofurfuryl 基を含む側鎖の離脱によって生成したフラグメントイオンピーク (m/e 255, 126) では 16 大きい位置にシフトしている。一方, *tert*-butyl-amino 基を含む側鎖のフラグメントイオンピーク (m/e 86, 71) は変化しない。これらの知見はすべて予備的検討により推定された化合物 V の構造を支持し、呈色反応およびフラグメンテーションの様式から、フェノール性 OH はフェニル基、カルボニル基は tetrahydrofurfuryl 基を含む側鎖中に存在することが明らかである。また m/e 309 のピークも Y-6124 のフラグメントイオンピーク (m/e 279) より質量単位が 30 大きい位置にシフトしているが、側鎖中にカルボニル基を有する化合物 V から、Y-6124 の m/e 279 に対応するフラグメントイオンが生成することは考え難い。むしろ化合物 V が、Y-6124 の tetrahydrofurfuryl 基の 5 位が代謝されて、カルボニル基に変化したものであり、隣接する酸素原子とともに脱炭酸¹²⁾されて生じた、M-44 に相当するピークと考えるのが妥当である。

尿中代謝物 II の aglycone である化合物 IV の質量スペクトルを直接測定することはできなかったが、上述のように IV の HCl 処理によって生成する化合物 V の、側鎖 tetrahydrofurfuryl 基の 5 位が酸化され lactone 環を形成していること、および化合物 V のアルカリ分解により容易に化合物 IV を生ずることなどから、化合物 IV の構造は、V の側鎖 lactone 環の開裂した、3-hydroxy-4-[*o*-(3-*tert*-butylamino-2-hydroxypropoxy)phenoxy]-pentanoic acid の水酸化体と推定される。Suzuoki ら¹³⁾は, thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide の代謝物である *r*-hydroxy- δ -methylsulfonyl valeric acid が、本実験とはほぼ同様な条件で、容易に δ -methylsulfonyl-*r*-valerolactone を生成することを報告しており、化合物 IV の性質とも一致する。したがって尿中代謝物 II は、化合物 IV のカルボキシル基 (またはアルコール性 OH) が glucuronic acid により抱合され

Fig. 5. Postulated Metabolic Pathways of Y-6124 in Rats

12) L. Friedman, F.R. Long, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2832 (1953).

13) Z. Suzuoki, K. Murakami, S. Kikuchi, K. Nishikawa, M. Numata, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **158**, 353 (1967).

たものと推定される。

以上の結果から、Y-6124 のラットにおける代謝経路は Fig. 5 のように推定される。

ただし化合物 V は、生理的 pH で室温に放置するだけでも徐々に分解して化合物 IV を生成するので、V から IV への反応は非酵素的に進行する可能性もある。

謝辞 質量スペクトルの解析に際し、有益な御助言を賜った当研究所 室 富雄所長 補佐，工藤 章主任 研究員に感謝致します。