**Bromazepam の代謝に関する研究 (第 5 報¹⁾) 尿中未知代謝産物の同定と
各種動物における代謝産物の尿中排泄について²⁾**

沢田英夫, 原 明

徳島文理大学薬学部³⁾

**Studies on Metabolism of Bromazepam. V.¹⁾ Identification of New
Urinary Metabolites and Their Excretion Pattern
in Various Animal Species²⁾**

HIDEO SAWADA and AKIRA HARA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University of Arts & Science³⁾

(Received September 24, 1974)

Five metabolites appearing in the urine of the rabbit fed bromazepam were isolated; these are 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine (ABBP), 2-(2-amino-5-bromo-3-hydroxybenzoyl)pyridine (3-OH ABBP), 3-hydroxybromazepam, and two new metabolites, 9-hydroxybromazepam and 5'-hydroxybromazepam. The new metabolites were characterized by thin-layer chromatography (TLC); elemental analysis, and infrared, nuclear magnetic resonance, and mass spectrometries. Metabolites, which were excreted mainly as conjugates of glucuronic acid and/or sulfuric acid, were measured by preparative TLC and characteristic colorimetric method after enzymic hydrolysis of the conjugates.

Urinary excretion of bromazepam and its metabolites have been studied in dogs, rabbits, mice, rats and guinea pigs after massive doses of bromazepam. The conjugated 3-OH ABBP was the major metabolite in rabbits (17.1% of the dose) and dogs (6.2% of the dose) during 24 hr. The major metabolites found in rats, however, were the conjugated form of 3-OH ABBP (5.3% of the dose), 5'-hydroxybromazepam (4.2% of the dose), and ABBP (3.8% of the dose), and 9-hydroxybromazepam was not excreted. In mice the major metabolite was the unconjugated form of 3-hydroxybromazepam (7.5% of the dose). In guinea pigs, two unknown metabolites, besides the above five metabolites, were excreted, and it was confirmed that one of them was benzhydrol analog of ABBP.

When intraperitoneal injection was compared with oral administration of the same dose in the rabbit, the urinary excretion of the ring-cleaved metabolites, ABBP and 3-OH ABBP, decreased, but that of the others, 3-hydroxybromazepam and 5'-hydroxybromazepam, increased.

On the basis of these data, pathways of bromazepam were postulated (Chart 1). Quantitative differences in the urinary metabolites of bromazepam in each species was clearly observed during the first 24-hr period.

著者らはこれまでに bromazepam (BZ) の尿中代謝産物 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine (ABBP), 2-(2-amino-5-bromo-3-hydroxybenzoyl)pyridine (3-OH ABBP)^{4,5)} および 7-bromo-1, 3-dihydro-3-hydroxy-5-(2-pyridyl)-2H-1,4-benzodiazepine-2-one (3-OH BZ)⁶⁾ を単離同定し, ヒト⁷⁾ およびウサギ⁶⁾ では 3-OH ABBP が主代謝産物でグルクロン酸抱合体として尿中に排泄され, さらにその生成機序について明らかにした.¹⁾ 最近,

1) 第 4 報: 沢田英夫, 原 明, 木戸 啓, 福元 守, 薬誌, 94, 991 (1974).

2) 日本薬学第 94 年会で発表, 仙台, 1974 年 4 月.

3) Location: Yamashiro-cho, Tokushima.

4) H. Sawada, *Experimentia*, 28, 393 (1972).

5) 沢田英夫, 矢野博子, 木戸 啓, 薬誌, 92, 1237 (1972).

6) 沢田英夫, 原 明, 矢野博子, 木戸 啓, 岐阜医紀, 21, 237 (1973).

7) 沢田英夫, 原 明, 矢野博子, 木戸 啓, 岐阜医紀, 21, 248 (1973).

Schwartz ら⁸⁾ は ^{14}C -BZ を投与したヒト、イヌ、ラットおよびマウスにおける尿中代謝産物の排泄について観察し、ヒトでは抱合型 3-OH BZ および 3-OH ABBP が、イヌでは抱合型 3-OH BZ、マウスでは非抱合型 3-OH BZ が主代謝産物であるが、ラットでは上記の既知代謝産物としての排泄量は少なく、未知代謝産物が大部分をしめ、BZ の代謝に種差があることを明らかにしている。特に未知代謝産物はヒト、イヌ、マウスでは ^{14}C 全排泄量の約 40—50%、またラットでは約 80% をしめているが、その性状については明らかにされていない。著者らは、BZ 投与動物尿中におけるこれら未知代謝産物の性状を明らかにする目的で、BZ 投与ウサギ尿中の未知代謝産物を検索し、2 つの新代謝産物を単離同定した。また各種動物におけるこれら代謝産物を含む既知代謝産物の尿中排泄について観察し、種属による代謝経路の差異について実験を行ったので報告する。

実 験 の 部

実験材料 試薬——BZ, 3-OH BZ, ABBP, 3-OH ABBP は Hoffmann-La Roche から提供をうけた合成標品を用いた。β-glucuronidase/arylsulphatase (GRD/ARS) は Boehringer Mannheim の製品、β-glucuronidase 活性 5.2 U/ml および arylsulphatase 活性 2.6 U/ml を用いた。溶媒は再蒸留により精製して用いた。

実験方法 動物と BZ の投与——体重 8.0—8.5 kg のビーグル犬(雄)、体重 2.5—3.5 kg のウサギ(雄)、体重 480—540 g の Hartley 系モルモット(雄)、体重 230—260 g の Wistar 系ラット(雄)および体重 30—35 g の ddY 系マウス(雄)を用い、各動物は BZ 投与前一晩絶食し、投与後水と餌を自由に与え代謝ケージ内に飼育した。

マウス、ラット、ウサギ、モルモットには BZ (25 mg/kg または 50 mg/kg) を 5% アラビアゴムに懸濁して stomach tube またはゾンデを用いて経口投与した。イヌには BZ (50 mg/kg) のカプセルを、ヒト (年令 25 と 26 才の男子 2 名) には 5 mg の BZ の錠剤をそれぞれ 1 回投与した。なお、腹腔内投与の場合には BZ (1 g) を 5 滴の Tween 80 と混和後、0.4% CMC 水溶液 (100 ml) を加え懸濁液とし投与した。

代謝産物の抽出——各種動物の BZ 投与後 24 時間尿を集め、20% 炭酸ナトリウムで pH 8.0 とし、1.5 倍量の酢酸エチルで 2 回抽出した。その水層を希酢酸で pH 5.0 に調整後、GRD/ARS (10 μl/ml) を加えて 37° で 12 時間 incubate 後、抱合型代謝産物のアグリコンを同様酢酸エチルで抽出した。各抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、蒸発乾固し、その残渣を薄層クロマトグラフィーに供した。

薄層クロマトグラフィー (TLC)——TLC 薄層は吸着剤としてシリカゲル G および H (Merck) を用いて作製し、110° で 60 分間活性化した。展開溶媒として次のものを用いた。(A) クロロホルム：メタノール：28% アンモニア水 (60:10:1)、(B) 酢酸メチル：iso-プロパノール：28% アンモニア水 (9:7:4)、(C) ベンゼン：メタノール：28% アンモニア水 (90:25:1)、(D) クロロホルム：アセトン (1:1)、(E) クロロホルム：アセトン：エタノール (2:1:1)。

展開後、UV ランプ下での観察のほか検出試薬として、(I) Ehrlich,⁹⁾ (II) Bratton-Marshall¹⁰⁾、(III) Fluorescein-hydrogen peroxide,⁹⁾ (IV) Folin-Ciocalteu,⁹⁾ (V) 2,6-dichloroquinonechloroimide,¹¹⁾ (0.2% 2,6-dichloroquinonechloroimide のエタノール溶液を噴霧後、1M borate buffer, pH 9.0 を噴霧。)、(VI) 2,5-dimethoxytetrahydrofuran¹²⁾ (0.1% 2,5-dimethoxytetrahydrofuran の酢酸溶液を噴霧後 100° で 5—10 分間加熱し、冷後 2% p-dimethylaminobenzaldehyde の酢酸：塩酸 (85:15) 溶液を噴霧。)、(VII) Ferrous sulfate (FeSO₄ を 0.2% の割合に pH 5.0 acetate buffer に溶解。) の各試薬を用いた。

代謝産物の定量——BZ を投与した各動物から採取した尿を 3000 rpm, 5 分間遠心分離し、マウス、モルモット、ラットは尿 5 ml を、ウサギ、イヌでは尿 10 ml を用い、pH 8.0 に調整し、非抱合型分画は酢酸エチル 15 ml, 10 ml で 2 回 30 分間機械振盪抽出後、遠沈して分取した酢酸エチル抽出液を合わせ、その 20 ml を分取し蒸発乾固した。一方、抱合型分画は水層を pH 5.0 に調整し、GRD/ARS (50 μl/ml) を加え 37° で 16—18 時間 incubate 後、上記と同様、酢酸エチル抽出し、その 15 ml を分取蒸発乾固した。各分画の残渣を 0.3 ml の Naphthyl Red 200 μg/ml のメタノール溶液に溶解し、この一部 (約 0.2 ml) を薄層板 (kieselgel H) に直線状に塗布した。展開溶媒 (A) で展開後同じ薄層板の一端で展開した標品を試薬 (VII) を用いて検出し、UV ランプ下で各標品に相当する R_f 値の螢光バンドを薄層板の未処理の部分からかき取った。BZ (R_f 0.60) はメタノール 5 ml を加え、30 分間機械振盪してシリカゲルから溶出し、遠沈後その上清 4 ml を分取、蒸発乾固後、前報¹³⁾ の方法に従って Bratton-Marshall 反応により定量した。3-OH ABBP と 3-OH BZ の黄色バンド (R_f 0.45) および M-I と M-II のバンド (R_f 0.20) はそれぞれメタノール 10 ml で同様に溶出遠沈後、その上清を

8) M.A. Schwartz, E. Postma, S.J. Kolis, A.S. Leon, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1776 (1973).

9) E. Stahl, "Thin-Layer Chromatography," 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 1969, p. 856.

10) H.D. Bachstead, S.J. Smith, *Arzneimittel-Forsch.*, **18**, 529 (1968).

11) H.D. Gibbs, *J. Biol. Chem.*, **72**, 649 (1927).

12) P.J. Haefelfinger, *J. Chromatog.*, **48**, 184 (1970).

13) 沢田英夫, 矢野博子, 原 明, 木戸 啓, 福元 守, 岐阜医紀, **20**, 608 (1972).

4 ml ずつに 2 分し蒸発乾固した。3-OH ABBP は 0.01N NaOH 2 ml に溶解後、前報¹⁾の方法で定量した。M-I は 0.01N NaOH 2 ml に溶解後、1M borate buffer (pH 9.2) 1 ml と 2,6-dichloroquinonechloroimide 溶液 0.5 ml を加え、25° で 90 分間放置後 700 mμ の吸光度で測定した。3-OH BZ と M-II は BZ と同様に 15% HCl で加水分解後 Bratton-Marshall 法で定量した。

一方、Naphthyl Red の橙色バンド (R_f 0.70) をメタノール 5 ml で溶出後、遠沈した上清 2 ml に 0.2N HCl 2 ml を加え直ちに 535 mμ の吸光度を測定し、この Naphthyl Red の量より薄層板へのサンプルの塗布量を算出し、尿中の各代謝産物の濃度はそれぞれ検量線から求めた。

正常ウサギ尿に次の括弧内に示す濃度の各化合物を添加した際の回収率は BZ (5—22 μg/ml) 94%, 3-OH ABBP (6—32 μg/ml) 91%, 3-OH BZ (5—30 μg/ml) 98%, M-I (7—35 μg/ml) 98%, M-II (2—10 μg/ml) 99% であった。なお ABBP は別に前報¹³⁾の方法で定量した。

BZ と肝細胞画分の Incubation 実験——ラットとウサギの肝を 4 倍量の 0.25M sucrose でホモジナイズし、前報¹⁾の方法に従って 4 画分 (核, ミトコンドリア, ミクロゾーム, 可溶性画分) に分画した。反応系には 1 mmole の Tris-HCl buffer (pH 7.4), NADPH generating system (2 μmoles の NADP, 125 μmoles の glucose-6-phosphate, 約 2 units の glucose-6-phosphate dehydrogenase), 25 μmoles の Mg Cl₂, 2 μmoles の BZ および 2 ml の細胞画分を加えて全量 10 ml とした。37° で 1 時間 incubate 後、酢酸エチル 15 ml で 2 度抽出し、抽出液を濃縮後 TLC の試料とした。

各種スペクトル——紫外線吸収 (UV) スペクトルは 25% エタノール溶液中で日立 124 型ダブルビーム分光光度計で、赤外線吸収スペクトル (IR) は KBr ペレットとして日本分光 IRG スペクトロメーターで、核磁気鳴スペクトル (NMR) は DMSO-*d*₆ 中で日立 R-22 型高分解能 NMR 装置、質量スペクトルは日立 RMU-7L 型質量分析計でそれぞれ測定した。

結 果

未知代謝産物 (M-I, M-II) の単離と同定

BZ を経口投与したウサギの尿を GRD/ARS 作用後、酢酸エチルに抽出される代謝産物を TLC で検索した結果、ABBP, 3-OH ABBP のほか試薬 (VII) で紫色に呈色する 3-OH BZ および未知代謝産物 (M-I, M-II) を認めたので、これらの代謝産物を次に述べる方法で単離した。BZ (100 mg/kg) を 4 日間隔で計 3 回経口投与したウサギ 5 匹より 0—48 時間尿 (10 liter) を採取し、酢酸で pH 7.0 とし Darco G-60 (300 g) を加え、4° で 30 分間攪拌後 Darco G-60 を吸引濾取し 80% アセトン 2.5 liter を加え 10 分間攪拌し抱合体を溶出し、さらに 1.3 liter と 1.2 liter の 80% アセトンで同様 2 回溶出した。溶出液を低温で蒸発乾固し、水 100 ml に溶解後 Sephadex G-10 のカラム (4×50 cm) でゲル濾過を行った。溶出は水で行い、ABBP と 3-OH ABBP の各抱合体よりも先に溶出する 3-OH BZ, M-I, M-II の抱合体画分を分取し、これをさらに Amberlite XAD-2 カラム (3.5×20 cm) に通し、水 (1 liter) で洗滌後、50% エタノール (500 ml) で溶出した。この溶出液を減圧蒸発乾固し、残渣を 0.05M acetate buffer (pH 5.0) 50 ml に溶解、GRD/ARS (50 μl/ml) を加え 37° で 18 時間 incubate した。反応液を pH 8.0 に調整し、1.5 倍量の酢酸エチルで 2 回抽出、抽出液を濃縮し、まず展開溶媒 (E) を用い分取 TLC を行った。

展開後の薄層板の一端に試薬 (VII) を噴霧し、紫色に呈色する 3-OH BZ と M-I のバンド (R_f 0.4—0.5) と R_f 0.30 以下に tailing している M-II のバンドをかき取り、それぞれシリカゲルからエタノールで溶出した。前者はさらに展開溶媒 (A) を用いた再クロマトにより 3-OH BZ (R_f 0.50) と M-I (R_f 0.25) に分離し、各バンドを同様かきとり溶出後、アセトンから再結晶した。一方、M-II の溶出液は濃縮後さらに展開溶媒 (A) および (B) を用いた再クロマトにより精製し、エタノール：水 (1:10) より再結晶した。その結果 3-OH BZ 150 mg, M-I 35 mg, M-II 7.5 mg をえた。なお Sephadex G-10 のゲル濾過でえられた ABBP と 3-OH ABBP の抱合体画分を pH 4.5 とし 4 時間 37° で放置後、遊離した ABBP を酢酸エチルで抽出した。一方その水層に GRD/ARS を加え 37° で 16 時間 incubate し、3-OH ABBP をエーテルで抽出した。各抽出液から前報⁵⁾の方法にしたがって ABBP 55 mg と 3-OH ABBP 350 mg を単離した。

単離した未知代謝産物 (M-I, M-II) と既知合成標品の TLC の R_f 値および呈色反応の成績を Table I に総括して示した。

また M-I, M-II および 3-OH BZ の融点、元素分析値、UV, IR, mass および NMR スペクトルの成績は Table II, Fig. 1 に示すとおりであった。

TABLE I. *R_f* Value and Color Reaction of Bromazepam and Its Metabolites in Thin-Layer Chromatography

Compound	Solvent system			Color reaction						
	A	B	C	I	II	III	IV	V	VI	VII
BZ	0.52	0.79	0.29	—	purple	pink	—	—	purple	violet
ABBP	0.70	0.84	0.65	orange	purple	pink	—	—	—	—
3-OH ABBP	0.42	0.56	0.30	orange	black	pink	blue	blue	—	—
3-OH BZ	0.40	0.62	0.13	—	purple	pink	—	—	—	purple
M-I	0.12	0.45	0.10	—	—	pink	blue	green	purple	violet
M-II	0.11	0.28	0.07	—	purple	pink	gray	—	purple	purple

adsorbent: Silicagel G (Merck), solvent system: A: chloroform/methanol/conc. ammonia (60:10:1); B: methyl acetate/iso-propanol/conc. ammonia (9:7:4); C: benzene/methanol/conc. ammonia (90:25:1) Spray reagent: I. Ehrlich reagent; II. spray with the Bratton-Marshall reagent after hydrolysis by 2N H₂SO₄; III. Fluorescein-hydrogen peroxide reagent; IV. Folin-Ciocalteu reagent; V. 2,6-dichloroquinonechloroimide reagent, VI. 2,5-dimethoxytetrahydrofuran reagent; VII. ferrous sulfate reagent

TABLE II. Physical Properties of Bromazepam and Its Metabolites

Com- pound	Formula	mp(°C)	Analysis (%)			UV $\lambda_{\text{max}}^{25\% \text{ EtOH}}$ nm	IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	Mass Spectrum m/e
			Found					
			C	H	N			
BZ	C ₁₄ H ₁₀ ⁻ ON ₃ Br	246—248				233, 320	1685	315(M ⁺), 286, 259, 236
3-OH BZ	C ₁₄ H ₁₀ ⁻ O ₂ N ₃ Br ^(a)	191—193	50.35	2.82	12.45	235(4.46), 320 (3.22)	1685, 1152	331(M ⁺), 313, 302, 274, 259, 234
M-I	C ₁₄ H ₁₀ ⁻ O ₂ N ₃ Br ^(a)	267—269	50.75	2.82	13.13	223(4.36), 240 (4.36), 330(3.42)	3350, 1685	331(M ⁺), 302, 275, 252
M-II	C ₁₄ H ₁₀ ⁻ O ₂ N ₃ Br ^(a)	290 (decomp.)	51.11	3.13	12.40	232(4.48), 292 (4.00), 260, 330	1672	331(M ⁺), 302, 275, 252
shoulder								

shoulder

a) elemental analysis: Calcd. for C₁₄H₁₀O₂N₃Br: C, 50.62; H, 3.03; N, 12.56

Fig. 1. NMR Spectra of 3-OH BZ, M-I and M-II

M-I は定性反応の結果から, Br, 活性メチレンおよびパラ位に置換基のないフェノール性的水酸基の存在が示唆され, 鉄キレート試薬 (VII) 陽性で BZ と同様 pyridyl benzodiazepine-2-ones の鉄 complex¹⁴⁾ を生成した. 本物質 (500 μ g) の 15% 塩酸溶液を沸騰水浴上で 2 時間加水分解後, 中和して酢酸エチルで抽出した加水分解生成物は *R_f* 値および UV スペクトルの結果から 3-OH ABBP と確認した. 元素分析値および mass スペクトルは BZ に酸素原子 1 個の増加を示し, また NMR スペクトルでは δ 4.17 (2H, singlet) のシグナルは C-3 位に酸素原子がないことを示し, aromatic region で 2Hz のメタカップリングした AB 型のシグナル (δ 6.85 と δ 7.17) がえられたが, ピリジン環のプロトンのシグナルは 3-OH BZ と比べ全く変化が認められなかった. したがって, 本物質は BZ の 9-hydroxy 誘導体 (9-OH BZ) と同定した.

14) J.D. Sabatino, O.W. Weber, G.R. Padmanahan, B.Z. Senkowski, *Anal. Chem.*, **41**, 905 (1969).

M-II の定性反応の結果は試薬 (V) による反応を除いて全く M-I と同様であったが、本物質の 15% 塩酸による加水分解生成物は ABBP または 3-OH ABBP とは異なるフェノール性水酸基を有する物質であった。元素分析値, mass スペクトルはほとんど M-I と一致した結果をえたが, NMR スペクトルではベンゼン環のプロトンのシグナルは 3-OH BZ と比べて変化なく, ピリジン環のプロトンは δ 7.30 (1H, doublet of doublet, $J_{4',3'}=8$ Hz, $J_{4',6'}=2$ Hz, $C_{4'}-H$), δ 7.95 (1H, doublet, $J_{3',4'}=8$ Hz, $C_{3'}-H$), δ 8.09 (1H, doublet, $J_{6',4'}=2$ Hz, $C_{6'}-H$) となり, また δ 4.14 に CH_2 , δ 10.37 と δ 10.50 に NH または OH のシグナルが観察された。これらの成績から M-II は BZ のピリジン環の C-5' 位が水酸化された BZ の 5'-hydroxy 誘導体 (5-OH BZ) と同定した。

In Vitro での BZ の代謝

BZ とラットおよびウサギの肝の各細胞画分を酵素源として incubate し, その酢酸エチル抽出物を展開溶媒 (A および B) を用いて TLC を行った。その結果マイクロゾーム画分と incubate した際に 3-OH BZ の生成を認めたが, 少量の ABBP はどの細胞画分を酵素源として incubate した際にも観察され, しかも熱処理 (100° で 5 分間) した各細胞画分を酵素源とした場合にも検出された。したがって, incubation の間に少量の BZ は nonenzymatic に加水分解されて ABBP に変化すると考える。なお, 9-OH BZ と 5'-OH BZ はラット, ウサギいずれの各細胞画分と BZ の反応生成物中にも全く検出されなかった。

各種動物における BZ およびその代謝産物の尿中排泄

ヒトのほか 5 種の動物の尿中代謝産物を定性的に TLC で比較検討した結果, Table III に示すように, 各種動物で 3-OH ABBP, ABBP, 3-OH BZ および 5'-OH BZ の排泄が認められたが, 9-OH BZ はラットでは検出出来なかった。これら代謝産物のほかにラット, ウマスでは試薬 (I), (II), (III), (IV) および (VII) で陽性の未知代謝産物 (R_f 0.10) を認めたが, 微量のため精査出来なかった。またモルモットでは Bratton-Marshall 試薬で陽性の二つの未知代謝産物を認め, このうちより多く排泄される R_f 0.63 の代謝産物の精製を行うため, BZ (100 mg/kg) を投与した尿 (2 liter) を GRD/ARS 作用後酢酸エチルで抽出し, 抽出液を蒸発乾固後残渣を 0.1N 塩酸に溶解し Amberlite XAD-2 のカラム (3.5×15 cm) に吸着させ, 0.1N 塩酸を含む 50% メタノールで溶出し, これを濃縮して展開溶媒 (C) を用い分取 TLC で精製し, さらにエタノール: 水 (2: 8) から再結晶して針状晶 (mp 99—101°) 18 mg を単離した。本物質は, ABBP⁵⁾ と比べ, IR スペクトルでは aromatic $>C=O$ の吸収が消失し, 1034 cm^{-1} に $-CH$ の吸収が認められ, NMR スペクトルでは aromatic region では変化ないが, δ 5.84 (1H, singlet) に OH のシグナルが認められた。また元素分析の結果, *Anal.* Calcd. $C_{12}H_{11}ON_2Br$: C, 51.82; H, 3.99; N, 10.07. Found: C, 51.74; H, 4.03; N, 10.08. したがって, ABBP のカルボニル基が還元された 2-amino-5-bromo-2'-azabenzhydrol と推定された。

マウス, ラット, ウサギ, イヌの各動物に BZ (50 mg/kg) を経口投与後 24 時間尿中の各代謝産物について, 抱合型と非抱合型に分けて定量した結果は, Fig. 2 に示すとおりであった。また, 24 時間尿中の各動物の代謝産物の総量 (平均 $\pm$ S.D.) はそれぞれ投与量の 19.0 $\pm$ 0.9% (マウス), 16.2 $\pm$ 1.1% (ラット), 30.8 $\pm$ 5.4% (ウサギ), 12.1% (イヌ) であった。

TABLE III. Detection of Urinary Metabolites of Bromazepam by Thin-Layer Chromatography

Species	Metabolite					Unidentified ^{a)} metabolite
	ABBP	3-OH ABBP	3-OH BZ	9-OH BZ	5'-OH BZ	
Mouse	+	+	+	+	+	R_f 0.10
Rat	+	+	+	—	+	R_f 0.10
Guinea pig	+	+	+	+	+	R_f 0.63, 0.40
Rabbit	+	+	+	+	+	
Dog	+	+	+	+	+	
Human ^{b)}	+	+	+	—	—	

Each animal was administered with 50 mg/kg of bromazepam orally.

a) Unidentified metabolites were represented by R_f value in solvent system A.

b) Human subjects received 5 mg of bromazepam single oral doses.

Fig. 2. Urinary Excretion of Bromazepam and Its Metabolites in 24 hr Urine

▨: unconjugate; □: conjugate. A: BZ, B: ABBP, C: 3-OH ABBP, D: 3-OH BZ, E: 9-OH BZ, F: 5'-OH BZ. ordinate: amounts of bromazepam metabolites are expressed as percentage of dose. the number of sample is 2 groups of 10 male mice, 6 male rats, 4 male rabbits and 2 male dogs.

しかし、モルモットでは前記の二つの未知代謝産物が排泄されるため、ABBP, BZ および 3-OH BZ の定量は出来なかったが、他の代謝産物の排泄量を投与量に対する % で示すと 3-OH ABBP ($11.7 \pm 0.9\%$), 9-OH BZ ($0.9 \pm 0.3\%$), 5'-OH BZ ($0.5 \pm 0.3\%$) であり、主として抱合体の形で排泄された。

BZ および各代謝産物の尿中排泄を 3 日間測定した結果、Table IV に示すように、ラット、ウサギとも未変化した BZ および ABBP は 24 時間以内に、3-OH ABBP および 3-OH BZ は抱合体として 3 日間連続して排泄されることを認めたが、各代謝産物の大部分が 24 時間以内に排泄されることを明らかにした。

また、ウサギにおける腹腔内投与と経口投与後の各代謝産物の尿中排泄は Table V に示すように、腹腔内投

TABLE IV. Urinary Excretion of Bromazepam and Its Metabolites by Rat and Rabbit

Species	Day	BZ un- conj.	ABBP		3-OH ABBP		3-OH BZ		9-OH BZ conj.	5'-OH BZ		Total
			un- conj.	conj.	un- conj.	conj.	un- conj.	conj.		un- conj.	conj.	
Rat	1st	0.2	0.3	3.8	0.4	6.0	0.8	0.3	—	0.1	3.4	15.3
	2nd	—	0.1	—	1.7	1.3	0.2	0.2	—	—	0.2	3.7
	3rd	—	—	—	0.4	0.4	—	0.1	—	—	0.1	1.0
	total	0.2	4.2	—	10.2	—	1.6	—	—	3.8	—	20.0
Rabbit	1st	0.1	0.1	5.8	0.8	17.3	0.2	3.8	1.5	—	0.8	30.4
	2nd	—	—	0.1	—	10.6	—	0.2	0.3	—	—	11.2
	3rd	—	—	—	—	2.3	—	0.1	—	—	—	2.4
	total	0.1	6.0	—	31.0	—	4.3	—	1.8	0.8	—	44.0

Each animal was administered with 50 mg/kg of bromazepam orally. The value represents as percent of the dose. unconj: compound extractable at pH 8 conj.: compound extractable at pH 8 after GRD/ARS treatment

TABLE V. Urinary Excretion of Bromazepam and Its Metabolites in Rabbits following the Administration of a Single Oral or Intraperitoneal Dose of 25 mg/kg of Bromazepam

	Compound	BZ	ABBP	3-OH ABBP	3-OH BZ	9-OH BZ	5'-OH BZ	Total
<i>p.o.</i> administration	unconjugate	0.1	0.0	0.2	0.6	0.0	0.0	0.9
	conjugate	0.0	3.8	36.1	6.4	4.9	1.1	52.3
	total	0.1	3.8	36.3	7.0	4.9	1.1	53.2
<i>i.p.</i> administration	unconjugate	0.5	0.1	0.4	2.6	0.0	0.0	3.6
	conjugate	0.0	2.6	17.2	15.5	4.3	3.7	43.3
	total	0.5	2.7	17.6	18.1	4.3	3.7	46.9

The value represents as the mean of two experiments. The excretion rates of bromazepam and its metabolites in the urine during 48 hr following the administration were indicated in percent of dose.

与は経口投与と比較して代謝産物の総排泄量には差を認めなかったが, diazepine 環開裂体 ABBP および 3-OH ABBP の排泄が減少し, 逆に diazepine 環の開裂しない代謝産物 3-OH BZ および 5'-OH BZ の排泄の増加が観察された。

考 察

著者ら⁴⁻⁶⁾ はさきに BZ 投与ヒトおよびウサギの尿中代謝産物として ABBP, 3-OH ABBP および 3-OH BZ を単離同定し, その代謝経路を明らかにした。最近, Schwartz ら⁸⁾ は ¹⁴C-BZ 投与イヌ尿中にこれら代謝産物のほか BZ の N-oxide 体が排泄されることを認め, またヒトおよび動物尿中の既知代謝産物の定量を行い, 未知代謝産物の排泄量が既知代謝産物と総量ではほぼ同量であることを報告している。著者らは BZ 投与動物尿中の未知代謝産物を明らかにする目的で, まず BZ 投与ウサギ尿中の未知代謝産物の検索を行い, 2 種の新代謝産物を単離し, 元素分析および各種スペクトル分析の結果から 9-OH BZ および 5'-OH BZ を同定した。

Chart 1. Postulated Pathways of Bromazepam Metabolism in Man and Animals

BZ 投与動物における *in vivo* および *in vitro* の実験から代謝経路は、Chart 1 に示すように、diazepine 環の水酸化と開裂、芳香環の水酸化および抱合の各反応からなり、未変化体の BZ の排泄は極めて微量で非抱合型であるが、3-OH BZ (ラットおよびマウスにおける) を除く他の代謝産物の大部分は抱合型として排泄されることを認めた。このうち ABBP の抱合体は、Sephadex G-10 によるゲル濾過で部分精製後、pH 4.5 で酵素を加えないで 37° に放置する処置により ABBP が遊離することから、多分弱酸溶液中で分解する N-glucuronide の型として存在すると考えられる。なお、他の水酸化体 3-OH ABBP, 9-OH BZ, 5'-OH BZ はウサギの例では、Chang ら¹⁵⁾ により単離された oxazepam O-glucuronide のように、O-glucuronide または sulphate と推定されるが、先の報告⁶⁾ で明らかにしたように主抱合体は glucuronide と考える。

単離した代謝産物のうち、ABBP, 3-OH BZ, 9-OH BZ, 5'-OH BZ は BZ の 1 次代謝産物と考えられるが、3-OH ABBP は *in vivo*⁵⁾ および *in vitro*¹⁾ の ABBP の代謝に関する研究からも明かなように ABBP の 2 次代謝産物と考える。*In vivo* における diazepine 環開裂体である 3-hydroxybenzophenone 誘導体の生成は medazepam,¹⁶⁾ nitrazepam,¹⁷⁾ oxazolam¹⁸⁾ および cloxazolam¹⁹⁾ でも同様報告されている。また、ウサギにおいては ABBP は BZ を経口投与後 1 時間の胃内容物にすでに認められ、⁶⁾ さらに腹腔内投与後の ABBP や 3-OH ABBP の排泄量は経口投与の場合に比較して約 1/2 に減少した。したがって、経口投与された BZ のかなりの量が胃内で nonenzymatic に ABBP に加水分解されるものと考えられる。

5 種の動物における BZ の代謝産物の尿中排泄の種差について観察した結果、ウサギ、イヌともに主代謝産物は抱合型 3-OH ABBP で、その主代謝経路は diazepine 環の開裂さらに開裂体 ABBP の水酸化であり、他の水酸化は minor な経路と考えられる。ラットでは主代謝産物は 3-OH ABBP, 5'-OH BZ および ABBP の各抱合体であり、9-OH BZ は排泄されなかった。マウスでは 3-OH BZ が主代謝産物で、しかもラットと同様その大部分が非抱合型として排泄され、ウサギ、イヌと比較して明らかな種差が認められた。特にラットでは環の開裂のほかピリジン環の水酸化の代謝経路が重要であり、この事実はラットにおける diazepam²⁰⁾ および chlor-diazepoxide²¹⁾ の代謝において 5'-phenyl 環のパラ位の水酸化が主代謝経路であるという報告と類似した結果をえた。しかしながら、ラットの *in vitro*¹⁾ および *in vivo* での ABBP の代謝において主代謝様式は 5'-OH BZ の加水分解産物である 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)-5-hydroxypyridine へのパラ位の水酸化でなく、3-OH ABBP へのオルト位の水酸化であることを認めた。したがって、ラットではパラ位の水酸化は 5-pyridyl- または 5-phenyl-1,4-benzodiazepine-2-one の構造においてのみ促進され、他の水酸化が抑制されることが考えられる。一方、マウスでは環の開裂は比較的弱く、C-3 位の水酸化が主代謝経路であった。またモルモットではこれらの代謝経路のほか ABBP が benzhydrol 型代謝産物に変化する経路も考えられる。

1,4-Benzodiazepine 誘導体では diazepine 環の C-3 位の水酸化は *in vivo*²²⁾ および *in vitro*²³⁾ で一般的な代謝経路であり、BZ も 3-OH BZ に代謝されるが、芳香環の水酸化は *in vivo* ではイヌにおける demoxepam²⁴⁾ の代謝にみられるように C-9 位 (9-OH BZ) およびピリジン環の 5' 位 (5'-OH BZ) に起こり、ラット以外の動物においてはいずれも minor な代謝経路であった。しかしながら、*in vitro* ではラットおよびウサギにおいても芳香環の水酸化体は全く認められなかった。Diazepam²⁵⁾ の代謝においても同様に *in vivo* で生成される芳香環

15) T.T.L. Chang, Ch. F. Kuhlman, R.T. Schillings, S.F. Sisenwine, C.O. Tio, H.W. Ruelius, *Experientia*, **29**, 653 (1973).

16) M.A. Schwartz, J.J. Carbone, *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 343 (1970).

17) J. Reider, G. Wendt, "The Benzodiazepines," ed. by S. Garattini, E. Mussini, L.O. Randall, Raven Press, New York, 1973, p. 99.

18) A. Yasumura, H. Murata, K. Hattori, K. Matsuda, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **19**, 1929 (1971).

19) H. Murata, K. Kuogo, A. Yasumura, E. Nakajima, H. Sindo, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **21**, 404 (1973).

20) M.A. Schwartz, P. Bommer, F.M. Vane, *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 508 (1967).

21) M.A. Schwartz, F.M. Vane, E. Postma, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 965 (1968).

22) H.W. Ruelius, J.M. Lee, H.E. Alburn, *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 376 (1965).

23) W. Sadée, W. Garland, N. Jr. Castagnali, *J. Med. Chem.*, **14**, 643 (1971).

24) M.A. Schwartz, E. Postma, S.J. Kolis, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 438 (1971).

25) M.A. Schwartz, E. Postma, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 2443 (1968).

の水酸化体は *in vitro* では生成されないことが観察されている。Viau ら²⁶⁾ が考察しているように、*in vitro* では肝ミクロゾームの芳香環水酸化活性が benzodiazepine 核によって阻害されるために、このような *in vitro* と *in vivo* の代謝の差異が生じるのかもしれない。

マウス、ラット、イヌにけおる 9-OH BZ および 5'-OH BZ を除く BZ の代謝産物の尿中排泄は ¹⁴C-BZ を薬用量投与した場合の尿中排泄率⁹⁾ と本質的には類似した結果がえられたが、BZ 大量投与時には BZ の diazepine 環の開裂の代謝様式が促進される結果、ABBP と 3-OH ABBP が多量に排泄されることが考えられる。

結 語

1. BZ (100 mg/kg) を経口投与したウサギ尿から ABBP, 3-OH ABBP, 3-OH BZ および BZ の酸化成績体である新代謝産物 9-OH BZ および 5'-OH BZ を単離同定し、各種動物における新代謝経路であることを明らかにした。
2. BZ および 5 種の代謝産物を GRD/ARS 作用前後で酢酸エチル抽出後、非抱合型と抱合型に分離し、preparative TLC で分離溶出しそれぞれ比色定量した。
3. マウス、ラット、ウサギ、イヌおよびモルモットの各動物における BZ とその代謝産物の尿中排泄を観察した結果、主代謝産物はイヌ、ウサギでは抱合型 3-OH ABBP、ラットでは 3-OH ABBP, 5'-OH BZ の各抱合型であり、マウスでは 3-OH BZ の遊離型であった。しかし、モルモットでは ABBP のさらに代謝された benzhydryl 型の代謝産物を認め、各動物により BZ の代謝経路に明らかな種差が認められた。

謝辞 本研究にあたり標品をご恵与頂いた日本ロシュ株式会社 福元 守博士に厚く感謝する。

26) J.-P. Viau, J.E. Epps, F.J. DiCarlo, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 641 (1973).