医薬品の生体内変化に関する研究 (第 85 報¹⁾) 1-*p*-Chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylaminobutan-2-ol Hydrochloride の代謝に関する研究

辰巳 淳,²⁾ 中野正行,^{2a)} 北村繁幸, 吉村英敏²⁾

九州大学薬学部²⁾

The Metabolism of Drugs. LXXXV.¹⁾ The Metabolism of 1-*p*-Chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylaminobutan-2-ol Hydrochloride

KIYOSHI TATSUMI,²⁾ MASAYUKI NAKANO,^{2a)} SHIGEYUKI KITAMURA

and HIDETOSHI YOSHIMURA²⁾

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University²⁾

(Received October 18, 1974)

The metabolic fate of 1-*p*-chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylaminobutan-2-ol hydrochloride (CDDA·HCl) in rabbits, rats, and human was studied.

1) In rabbits and rats receiving ³H-CDDA·HCl orally, the radioactivity was mainly recovered in 24 hr urine. The summation of radioactivity excreted in urine and feces during 96 hr was about 89% and 80% in rabbits and rats, respectively.

2) In rabbits, the urinary metabolites detected were 1-*p*-chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-monomethylaminobutan-2-ol (CDMA), 1-*p*-chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-aminobutan-2-ol (CDA), *p*-chlorobenzoic acid, benzoic acid, and hippuric acid.

3) In rats, similar result was obtained, except the excretion of *p*-chlorobenzoic acid found in rabbits. In humans orally receiving non-radioactive CDDA·HCl, the urinary excretion of CDMA and CDA was also suggested.

1-*p*-Chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylaminobutan-2-ol hydrochloride (以下 CDDA·HCl と略記, Fig. 1 参照) はコデインあるいはコデイン類縁化合物でみられる副作用を示さない新鎮咳剤を開発する目的で Berg によって合成された化合物である。またその薬理作用は Engelhorn³⁾ によって詳細に研究され、鎮咳効果および作用持続時間はコデインと同等であるが、CDDA·HCl には鎮痛作用、気管支拡張作用、抗ヒスタミン作用はなく自律神経系の機能に影響がないことから、その作用部位は中枢神経系であろうと考えられている。

Fig. 1. 1-*p*-Chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylaminobutan-2-ol hydrochloride (CDDA·HCl)

従来、アンフェタミンやエピネフリンなどフェネチルアミン誘導体の代謝に関しては多数報告されているが、当薬物を始めとしてアリルブチルアミンなど側鎖の長い化合物の代謝に関する報告は数少ない。したがって、今回は当薬物の薬効・毒性とも関連するその代謝様式を解明する目的で本研究に着手した。

実験の部

実験材料 CDDA·HCl, 1-*p*-chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-monomethylaminobutan-2-ol·HCl (以下 CDMA·HCl と略記), 1-*p*-chlorophenyl-2,3-dimethyl-4-aminobutan-2-ol·HCl (以下 CDA·HCl と略記) は森下製薬株式会社より提供された。β-Glucuronidase は牛の肝臓から調製したもの (Fishman unit, 3000 units/ml) を使用した。

1) 第 84 報: 飯田成字, 小栗一太, 吉村英敏, 薬誌, 95, 570 (1975).

2) Location: Maidashi, Fukuoka; a) Present address: Research Laboratory, Shionogi Pharmaceutical Co., Ltd., Sagisukami, Fukushima-ku, Osaka.

3) R. Engelhorn, *Arzneim. Forsch.*, 10, 785 (1960).

^3H -CDDA·HCl の精製 Wilzbach 法によって得られた粗製 ^3H -CDDA·HCl を製造的薄層クロマトグラフィー (20×20 cm シリカゲルプレート使用) の手法により, 溶媒系 CHCl_3 -MeOH (1:1), ついで 1.5N NH_4OH 飽和 BuOH を用いて精製, CDDA 該当部分 (上記溶媒系による R_f 値はそれぞれ 0.45 および 0.83) を MeOH にて薄層プレートより抽出し, これに少量の 0.1N NaOH 溶液を加えてエチルエーテルにて抽出. ついで遊離型 CDDA を含むこの抽出物を iso-PrOH-HCl に溶解し, 溶媒を留去すると ^3H -CDDA·HCl の白色結晶が得られる. この結晶を前記 2 溶媒系および CHCl_3 -MeOH-AcOH (2:1:1) (CDDA の R_f 値は 0.35) による薄層クロマトグラフィー (TLC) において, ドラージェンドルフ試薬による呈色, 放射能測定 of いずれによっても単一スポットおよび単一ピークを示し, R_f 値も標品 CDDA のそれによく一致するところから, 放射化学的に純粋な ^3H -CDDA·HCl であることが確認できた.

TLC シリカゲルプレート (厚さ 0.25 mm, Kieselgel G, Merck) を 105°, 60 分間活性化して用いた. 展開溶媒としては (1) CHCl_3 -MeOH (1:1), (2) 1.5N NH_4OH 飽和 BuOH, (3) CHCl_3 -MeOH-AcOH (2:1:1), (4) MeOH 飽和 hexane-AcOEt (50:1), (5) benzene-acetone-MeOH (7:1:2), (6) CHCl_3 -MeOH-conc. NH_4OH (24:4:1), (7) CHCl_3 -MeOH-conc. NH_4OH (50:6:1) を用いた. 呈色試薬としては塩基性代謝物にはドラージェンドルフ試薬を, 酸性代謝物にはブロムチモルブルー (BTB) 試薬を使用した. また, 薄層ラジオクロマトグラムは日本無線医理学研究所製の薄層クロマトスキャンナー JTC-201 型を用いて測定した.

放射能測定 試料をジオキサン系シンチレーター (PPO 4 g, POPOP 0.2 g, ナフタリン 60 g をメタノール-エチレングリコール-ジオキサン (5:1:44) の混液 1 liter に溶解して調製したもの) またはトルエン系シンチレーター (PPO 4 g, POPOP 0.1 g をトルエン 1 liter に溶解して調製したもの) に溶解して, Aloka 502 型液体シンチレーション計数装置を用いて測定した. なお, 糞中の放射能測定の場合には糞をハイアミンヒドロキサイドで溶解した後, トルエン系シンチレーターを加えて測定した.

ガスクロマトグラフィー (GLC) 水素炎イオン化検出器を付した島津 GC-1C 型ガスクロマトグラフを使用. カラムは 1.5% OV-1 または 1.5% OV-17 をコーティングした Shimalite W を充填したガラスカラム 4 mm×2.625 m を使用. 酸性代謝物は常法により, ビリジン中へキサメチルジシラザンおよびトリメチルクロロシランを用いて沸とう水浴上 5 分間加熱してトリメチルシリル化後ガスクロマトグラフに注入した.

実験動物および薬物投与 実験には薬物投与前 24 時間絶食させた雄のウサギ (平均体重 3.2 g) および雄のドンリュウ系ラット (体重 100 g) を使用した. また, いずれの場合にも ^3H -CDDA·HCl は水溶液として投与した.

シリカゲルカラムクロマトグラフィー マリンクロット Silic ARCC-7, 100—200 メッシュを使用.

ラット総胆管のカニュレーション Abou-El-Makarem⁴⁾ の方法に準じて行なった.

結 果

尿, 糞中排泄率

^3H -CDDA·HCl をウサギには 10 mg/kg (比放射能 0.52 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) あるいは 50 mg/kg (比放射能 0.06 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) を, またラットには 50 mg/kg (比放射能 16 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) をそれぞれ経口投与し, 放射能の尿および糞中への排泄を 4 日間にわたって測定した. その結果を Table I に示す.

TABLE I. Excretion of Radioactivity in Urine and Feces, after a Single Oral Administration of ^3H -CDDA·HCl to the Rabbit and the Rat

Time (hr)	Rabbit				Rat	
	10 mg/kg ^{a)}		50 mg/kg ^{b)}		50 mg/kg ^{c)}	
	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces
	(% of dose)					
0—24	83.8	1.9	57.5	0.2	37.1	11.8
24—48	1.9	0.2	3.5	9.0	6.5	10.7
48—72	0.7	trace	1.4	11.9	4.0	5.0
72—96	trace	trace	1.6	3.6	2.7	2.2
Total	86.4	2.1	64.0	24.7	50.3	29.7

a) Values in Table represent the mean values of four rabbits.

b) Values in Table represent the mean values of two rabbits.

c) Values in Table represent the mean values of two rats.

4) M.M. Abou-El-Makarem, P. Millburn, R.L. Smith, R.T. Williams, *Biochem. J.*, **105**, 1269 (1967).

ウサギに ^3H -CDDA·HCl を 10 mg/kg および 50 mg/kg 投与した場合の排泄率は後者では前者に比較して 96 時間尿中への排泄率は小さい値を示すのに対し、96 時間糞中への排泄率は大きい値を示す。以上の事実から、 ^3H -CDDA·HCl は投与量の増加に伴って消化管からの吸収率が若干低下するものと推定される。また、ラットに ^3H -CDDA·HCl を 50 mg/kg 投与した場合の 96 時間尿および糞中への排泄率はウサギに同用量を投与した場合と大差はなかった。さらに、ラット糞中の放射能が未吸収の ^3H -CDDA·HCl によるのか、あるいはいったん吸収されて胆汁中に排泄された放射能に由来するものかを明らかにするため、つぎのごとき検討を行なった。すなわち、総胆管にカニューレを挿入したラットに前記同様 ^3H -CDDA·HCl を経口投与し、48 時間までの放射能の胆汁中排泄を測定した結果、24 時間で投与量の 8.9%、24—48 時間で 1.1% の値が得られ、前記糞中放射能の少なくとも 1/3 近くは胆汁中に排泄された放射能からなることが明らかになった。

ウサギおよびラットにおける尿中代謝物の検索

1) 経口投与時の代謝 i) 尿中代謝物の抽出——ウサギ 2 羽に ^3H -CDDA·HCl を 50 mg/kg それぞれ経口投与し 24 時間尿を採取した。これらを 4% NaOH 溶液にて pH 10 に調整後、AcOEt にて 20 時間連続抽出して得られた抽出物を塩基性分画とした。つぎに水層を 7% HCl 溶液で pH 2 に調整後、AcOEt にて同様に抽出して得られた抽出物を酸性分画とし、残りの水層を極性分画とした。かくして得られた各分画の放射能を実験の部記載の方法に従って測定し、各分画中の放射能の相対的割合を算出した。一方、ラット 2 匹にも ^3H -CDDA·HCl を 50 mg/kg それぞれ経口投与し、24 時間尿を採取した。これらの 20 ml を前記同様に pH 10 ついで pH 2 に調整し、いずれの場合にも同量の AcOEt で 15 分間 3 回振盪抽出した後、各分画中の放射能分布を測定した。

TABLE II. Distribution of Radioactivity among Basic, Acidic and Polar Fractions of Urine following a Single Oral Administration of ^3H -CDDA HCl (50 mg/kg) to the Rabbit and the Rat

	Rabbit (%)	Rat (%)
Basic fraction	16.2	40.0
Acidic fraction	50.8	6.4
Polar fraction	33.0	53.6

Values in Table represent the mean values of two animals.

Table II より明らかなように、ウサギの場合には酸性分画中に最高の放射能がみられるのに対し、ラットの場合には当分画中への分布は小さく、塩基性および極性分画に高い放射能がみられた。以上の事実から、 ^3H -CDDA·HCl の尿中代謝物として、ウサギでは酸性代謝物が、またラットでは塩基性および極性代謝物が多く生成していることが示唆される。

ii) 塩基性代謝物の TLC——前記ウサギおよびラット尿の塩基性分画につき、展開溶媒 6 を用いて TLC を行なった。

Fig. 2. Radioactivity Scans of Thin-Layer Chromatograms of the Basic Fractions from the Rabbit and the Rat Urine after a Single Oral Administration ^3H -CDDA·HCl of (50 mg/kg)

solvent system: CHCl_3 -MeOH-conc. NH_4OH (24: 4: 1)

●: Dragendorff reagent-positive spot

その結果 Fig. 2 に示すごとく、ウサギの塩基性分画の場合には、ドラージェンドルフ試薬で発色させると、 R_f 値が 0.35 (M-2), 0.45 (M-3) および 0.85 (M-5) の部分に 3 種のスポットが現われ、標品 CDA, CDMA および CDDA の R_f 値にそれぞれ一致した。また、薄層板上の放射能を測定したところ上記 M-2, M-3 および M-5 該当部分のほか R_f 0.05 (M-1) および 0.70 (M-4) の部分にも放射能ピークが認められた。

つぎに、ラットの塩基性分画の場合には、ドラージェンドルフ試薬で発色させると、 R_f 値が 0.05 (M-1), 0.35 (M-2), 0.45 (M-3), 0.70 (M-4) および 0.85 (M-5) の部分に 5 種のスポットが現われ、このうち M-2, M-3 および M-5 のスポットはウサギの場合同様に標品 CDA, CDMA および CDDA の R_f 値にそれぞれ一致した。また、薄層板上の放射能を測定したところ、上記 5 種のスポットに相当する部分に放射能ピークが認められた。

iii) 塩基性代謝物の同定——ウサギ 6 羽に ^3H -CDDA·HCl (比放射能 1.65 m μ Ci/mg) を 50 mg/kg/day の用量で 6 日間連続投与し (全量 5.4 g), 投与直後より最終投与の 24 時間後まで合計 7 日間の尿を集めた。これを前記 i) の家兎尿の抽出法に従って抽出し、塩基性分画を得た。さらに、この分画をエチルエーテル可溶分と不溶分とに分離し、それぞれについてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行なった。

まず、エチルエーテル不溶分 2.2 g の CHCl_3 溶液をシリカゲル 72 g に通し、溶出液としては CHCl_3 620 ml, CHCl_3 -MeOH (9:1) 340 ml, CHCl_3 -MeOH (17:3) 80 ml, CHCl_3 -MeOH (4:1) 160 ml および CHCl_3 -MeOH (1:1) 140 ml を順次用い (各フラクション, 20 ml), TLC (展開溶媒 6) により溶出状態を検討した。その結果, CHCl_3 -MeOH (9:1) で溶出するフラクション No. 34—40 には R_f 0.80 および 0.35 の部分に標品 CDDA および CDA にそれぞれ一致するスポットが認められた。さらに、これらの R_f 値部分をかきとり, EtOH で抽出し GLC [カラム 1.5% OV-1, カラム温度 160°, 検出器温度 230°, 試料室温度 210°, キャリアガス (N_2 ガス) 流速 40 ml/min (2.5 kg/cm 2)] を行なったところ, R_f 0.80 部分の抽出物は保持時間 5.6 分を示して標品 CDDA に一致し, また R_f 0.35 部分の抽出物は保持時間 6.2 分を示して標品 CDA に一致し, これらの化合物は CDDA および CDA であることを確認した。

つぎに、エチルエーテル可溶分 0.85 g の benzene 溶液をシリカゲル 43 g を充填したカラムに通し、溶出液としては benzene 960 ml, benzene- CHCl_3 (9:1) 60 ml, benzene- CHCl_3 (1:1) 260 ml, CHCl_3 100 ml, CHCl_3 -AcOEt (1:1) 340 ml, AcOEt 80 ml および MeOH 40 ml を順次用い (各フラクション, 20 ml), 前記同様に TLC により溶出状態を検討した。その結果, MeOH で溶出するフラクション No. 91—92 には R_f 0.45 の部分に CDMA に一致するスポットが認められた。したがって, R_f 0.45 部分を製造的 TLC にて精製した後, さらに, この粗精製物につき GLC (熱伝導度型検出器を使用。その他の条件は前記 CDDA および CDA の場合と同じ) を行なって, CDMA に相当する保持時間 7.1 分の部分を分取した。この分取したものにつき, 赤外吸収スペクトル (IR), 紫外吸収スペクトル (UV) および Mass スペクトルを測定するとともに, GLC および TLC で検討したところ, これらはいずれも標品 CDMA (IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm $^{-1}$: 3300 (NH), 3100 (OH). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ m μ : 222. Mass Spectrum m/e : 241 (M^+)) に全く一致し, ここに代謝物 CDMA を同定することができた。

iv) 酸性代謝物の同定——前記 iii) で用いたウサギ尿を前記 i) の方法で抽出して酸性分画を得た。この抽出物 3.6 g の benzene 溶液をシリカゲル 100 g のカラムに通し、溶出液としては benzene 2620 ml, benzene- CHCl_3 (99:1) 400 ml, benzene- CHCl_3 (98:2) 400 ml, benzene- CHCl_3 (9:1) 400 ml, benzene- CHCl_3 (8:2) 220 ml, benzene- CHCl_3 (1:1) 420 ml, CHCl_3 200 ml, CHCl_3 -AcOEt (99:1) 180 ml, CHCl_3 -AcOEt (9:1) 300 ml, CHCl_3 -AcOEt (1:1) 140 ml および MeOH 80 ml を順次用い, 各フラクション (20 ml) の放射能を測定することにより溶出状態を検討した。その結果, benzene で溶出するフラクション No. 26—131 および CHCl_3 -AcOEt (1:1) で溶出するフラクション No. 258—288 に高い放射能が認められた。そこでフラクション No. 258—288 を合し, その一部を常法に従ってヘキサメチルジシランおよびトリメチルクロロシランでトリメチルシリル化した後, GLC [カラム 1.5% OV-1, カラム温度 180°, 検出器温度 150°, 試料室温度 170°, キャリアガス (N_2 ガス) 流速 30 ml/min (2 kg/cm 2)] を行なうと保持時間 4.25 分に単一ピークがみられ, 標品馬尿酸のそれに一致した。また, このフラクションの一部につき, 展開溶媒 4 および 5 を用いて TLC を行ない, 薄層板上の放射能分布を測定した結果, 展開溶媒 4 の場合には原点に, また展開溶媒 5 の場合には R_f 値 0.58 の部分に単一ピークがみられ, いずれの場合にも標品馬尿酸の R_f 値に一致した。ここに, CDDA の酸性代謝物として馬尿酸を確認することができた。

つぎに、フラクション No. 26—131 からは結晶性物質が得られ、 H_2O から再結晶すると mp 122° の白色針状晶となった。この結晶の IR および UV は標品安息香酸のそれらに完全に一致し、標品との混融試験の結果、融点降下もみられないことから、この化合物は安息香酸であることが明らかになった。このものにつき、 H_2O から再結晶を繰返しなが放射能を測定した結果、この結晶は一定の比放射能を示した。また、この結晶の純度を調べるため、その一部を馬尿酸同様にトリメチルシリル化した後、GLC [カラム 1.5% OV-1, カラム温度 130°, 検出器温度 150°, 試料室温度 200°, キャリアガス (N_2 ガス) 流速 30 ml/min (1.6 kg/cm²)] を行なった結果、保持時間 2.7 分に安息香酸の単一ピークがみられるのみで不純物の混在は認められなかった。さらに、この結晶の一部につき、展開溶媒 5 および 4 を順次用いて二次元 TLC を行ない、BTB 試薬で発色させた後、薄層板上の放射能を測定した結果、安息香酸に相当する部分にのみ放射能が認められた。

以上の結果から、CDDA の一部は脱塩素化されて安息香酸に代謝されることが明らかになった。

さらに、CDDA の酸性代謝物として *p*-クロル安息香酸の生成が予想されたので、つぎのような検討を行なった。すなわち、 3H -CDDA·HCl 10 mg/kg を経口投与したウサギの 24 時間尿 20 ml に、標品 *p*-クロル安息香酸約 100 mg を加え、conc. NH_4OH で pH 10 に調整し AcOEt で振盪抽出後、残りの水層を conc. HCl で pH 2 に調整し、さらに AcOEt で同様振盪抽出することによって酸性 AcOEt 抽出液を得た。この AcOEt 抽出液を減圧濃縮後、残留物に $CHCl_3$ を加えて $CHCl_3$ 可溶成分を除去し、あとに残った結晶性物質を H_2O から再結晶することにより mp 217° の無色針状晶が得られた。この結晶は混融試験および IR によって *p*-クロル安息香酸であることも確認した。つぎに、このものにつき H_2O からの再結晶を繰返しなが放射能を測定した結果、一定の比放射能を示し、CDDA の尿中代謝物として *p*-クロル安息香酸が排泄されていることが示唆された。

一方、 3H -CDDA·HCl 50 mg/kg を経口投与したラットの 24 時間尿の酸性分画につき、展開溶媒 4 を用いて TLC を行なった。その結果、BTB で発色させると原点および *R_f* 0.25 の部分に 2 種のスポットが現われ、標品馬尿酸および安息香酸の *R_f* 値にそれぞれ一致した。また薄層板上の放射能を測定した結果、やはり原点および *R_f* 0.25 の部分に 2 本のピークが認められ、このことからラットの場合にもウサギ同様に CDDA の酸性代謝物として馬尿酸および安息香酸が尿中に排泄されていることが明らかになった。

v) 極性代謝物についての検討—— 3H -CDDA·HCl 50 mg/kg を投与したウサギおよびラットの 24 時間尿の極性分画 [1] を参照] を β -glucuronidase で加水分解し、グルクロン酸抱合体について検討した。上記ウサギ尿の極性分画 50 ml を 4% NaOH 溶液で pH 5 に調整し、 β -glucuronidase (3000 units/ml) 20 ml を加えて 37° で 8 時間インキュベートした。反応液は 0.2% NaOH 溶液で pH 10 に調整、AcOEt 70 ml ずつで 3 回振盪抽出し、この AcOEt 抽出液を塩基性分画とした。水層はさらに conc. HCl で pH 2 に調整し同様に AcOEt で振盪抽出し、この AcOEt 抽出液を酸性分画とし、残りの水層を極性分画とした。

つぎに、ラット尿の極性分画についても前記同様に β -glucuronidase で加水分解した後、AcOEt 抽出によって、塩基性、酸性、極性分画を得た。

なお、前記酵素源の代りに加熱により不活性化した β -glucuronidase を用いてインキュベートした反応液を対照とした。Table III にはウサギおよびラット各分画における放射能分布を示す。

この結果、ラットの場合にはウサギに比較して放射能の上記 AcOEt 抽出物 (塩基性および酸性分画) 中への移行率が高いことから、グルクロン酸抱合体の生成量の多いことが示唆された。また、ウサギおよびラットい

TABLE III. Distribution of Radioactivity among Basic, Acidic and Polar Fractions from the β -Glucuronidase-treated Polar Fractions of the Rabbit and the Rat Urine after a Single Oral Administration of 3H -CDDA·HCl (50 mg/kg)

	Rabbit (%)	Rat (%)
Basic fraction	16.2	72.6
Acidic fraction	3.5	trace
Polar fraction	80.3	27.4

Values in Table represent a typical result obtained by one rabbit or rat.

Fig. 3. Radioactivity Scans of Thin-Layer Chromatograms of the Basic Fractions from the β -Glucuronidase-treated Polar Fractions of the Rabbit and the Rat Urine after a Single Oral Administration of ^3H -CDDA·HCl (50 mg/kg)

solvent system: CHCl_3 -MeOH-conc. NH_4OH (24: 4: 1)

れの場合にも、酸性分画に比較して塩基性分画中への放射能の移行率が高く、主として塩基性代謝物のグルクロン酸抱合体が生成されているものと推定された。

つぎに、ウサギおよびラットの上記塩基性分画につき展開溶媒 6 を用いて TLC を行ない薄層板上の放射能を測定した。

その結果、Fig. 3 に示すように、両者ともにほぼ同様なパターンを示し、 R_f 0.70 の顕著なピークは前記 ii) で述べた構造未知の代謝物 (M-4) の R_f 値に完全に一致しており、この代謝物のグルクロン酸抱合体の存在が示唆された。また、 R_f 0.05, 0.35, 0.45 および 0.85 にも 4 つのピークがみられ、構造未知の代謝物 (M-1), CDA (M-2), CDMA (M-3) および CDDA (M-5) のグルクロン酸抱合体の存在が推定された。

vi) 未変化物の定量——ウサギおよびラットの尿中に排泄される未変化物 CDDA の定量は、いずれの場合にも逆希釈分析法によって行なった。

^3H -CDDA·HCl 10 mg/kg および 50 mg/kg をそれぞれウサギおよびラットに経口投与して得られた 24 時間尿のうち、約 20 ml に標品 CDDA·HCl 200 mg を加え、20% NaOH 溶液で pH 10 に調整しエチルエーテル 5 ml ずつで 3 回振盪抽出した。つぎに、エチルエーテル抽出物を iso-PrOH-HCl 5 ml に溶解し、溶媒を除去すると白色針状結晶が得られた。これを AcOEt-MeOH から比放射能が一定になるまで再結晶を繰り返した後、その比放射能から未変化物の排泄率を求めた。

その結果、尿中に排泄される未変化物の投与量に対する割合は、ウサギでは 2.7%、ラットでは 4.1% となり、このことは CDDA が動物体内で容易に代謝を受けることを示唆している。

2) 静脈注射時の代謝 これまではウサギおよびラットにおける CDDA の経口投与時の代謝について述べてきた。これによって明らかにされた安息香酸や馬尿酸など脱クロル代謝物が非経口投与時においても生成されるか否かを調べるため、CDDA をウサギに静脈注射した場合の代謝について検討した。

ウサギに ^3H -CDDA·HCl 10 mg/kg (比放射能 15.9 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) を静脈内投与した後、前記 1) i) の方法に従って、その 24 時間尿を AcOEt で連続抽出することにより酸性分画を得た。この分画より得られた抽出物 3.3 g の benzene 溶液をシリカゲル 150 g に通し、溶出液としては benzene 3250 ml, benzene- CHCl_3 (99: 1) 500 ml, benzene- CHCl_3 (95: 5) 500 ml, benzene- CHCl_3 (1: 1) 500 ml, CHCl_3 250 ml, AcOEt 550 ml および MeOH 250 ml を順次用い (各フラクション、20 ml)、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果、AcOEt 溶出フラクション No. 101—111 より mp 187—189° の針状結晶が得られ、その IR は 3390, 3130 および 1755 cm^{-1} などに強い吸収を示し馬尿酸であることが判明した。この結晶を AcOEt から再結晶を繰返すと比放射能が一定となり、経口投与の場合同様、馬尿酸が CDDA の代謝物であることが明らかになった。つぎに、AcOEt 抽出前の尿試料 (pH 10) に安息香酸の標品約 60 mg を加えて振盪溶解させ、これを同量の AcOEt にて 3 回抽出した後、水層を塩酸にて pH 2.0 とし、同様に AcOEt にて 3 回抽出した。この抽出液を減圧濃縮すると安息香酸の結晶が得られ、これを H_2O より再結晶を繰返すと比放射能が一定となった。このことから静脈注射の場合も CDDA の一部が安息香酸に変化することが明らかになった。全く同様にして尿試料に p -クロ

Fig. 4. Thin-Layer Chromatogram of the Basic Fraction from the Human Urine after Oral Administration of CDDA·HCl

solvent system: CHCl_3 -MeOH-conc. NH_4OH (50:6:1)

T: test basic fraction, C: control basic fraction

して調製した抽出物を対照として用いた。また、上記抽出物中の代謝物含量は少なく、これらを確実に検出するために試料溶液はバンド状にスポットして展開した。その結果を Fig. 4 に示す。

Fig. 4 にみられるように、薬物投与のヒト尿抽出物の場合には、 R_f 0.90, 0.40 および 0.27 にドラージェンドルフ試薬で呈色するスポットが認められ、これらはいずれも標品 CDDA, CDMA および CDA の R_f 値にそれぞれ一致した。また、試験尿抽出物では R_f 0.8 付近にかなり大きなスポット 2 箇所も検出されたが、これらは対照尿抽出物にも認められ常尿成分と考えられる。

以上の結果から、ヒトにおいてもウサギおよびラットの場合同様に、CDDA の尿中代謝物として未変化物とともに CDMA および CDA が排泄されているものと推定される。

2) 未変化物の定量 前述のように CDDA 投与のヒト尿中には未変化物の排泄が確認されたので、定性に用いた 24 時間尿の抽出物の一定量をピリジンに溶解し、GLC [カラム 1.5% OV-17, カラム温度 165° , 検出器温度 220° , キャリアガス (N_2 ガス) 流速 40 ml/min (2.6 kg/cm^2), CDDA の保持時間 7.2 分] による定量を行った。なお、定量には標品 CDDA を用いて別途作成した検量線を使用した。

その結果、未変化物の 24 時間尿中への排泄量は No. 1 では 1.85 mg, No. 2 では 0.34 mg で、投与量に対する割合は No. 1 では 0.77%, No. 2 では 0.14% であった。

考 察

^3H -CDDA·HCl をウサギに 10 mg/kg 経口投与した場合には、0—24 時間尿中に投与された放射能の大部分が排泄され、糞中には低い放射能しか認められなかった。一方、この放射性化合物をラットに 50 mg/kg 経口投与した場合にも、96 時間尿中に投与した放射能の約 50% が排泄され、糞中には約 30% が排泄された。さらに、ラット糞中に排泄された放射能の約 1/3 は胆汁中に排泄された放射能から成ることも明らかにされた。以上の事実は CDDA·HCl がウサギおよびラットの消化管からよく吸収されることを示している。当薬物のヒトにおける消化管からの吸収率を今回の実験から直接求めることは困難である。しかし、上記の動物実験の結果ならびにヒトでの薬用量が上記投与量に比して少なく約 2 mg/kg であることから、当薬物が臨床的に使用される時にはその消化管からの吸収は速かであると考えられる。

^3H -CDDA·HCl を投与して得られたウサギ尿およびラット尿をそれぞれ塩基性、酸性および極性分画に分け、

ル安息香酸の標品約 100 mg を加え、pH 2 で AcOEt 抽出によって得られた *p*-クロル安息香酸を H_2O より再結晶を繰返すと比放射能が一定となった。このことから *p*-クロル安息香酸も静脈注射時の代謝物として尿中に排泄されることが確かめられた。

ヒトにおける尿中代謝物の検索

1) 塩基性代謝物について 毎回 80 mg の CDDA·HCl を 1 日 3 回毎食後服用した健康な成年男子 (No. 1 および 2) の初回投与より 24 時間の尿を採取し、その中の塩基性代謝物について検討した。まず、前記 2 名から採取したそれぞれの尿試料を、ウサギの場合同様に 4% NaOH 溶液で pH 10 に調整し、吸引濾過後、濾液を AcOEt で 20 時間連続抽出した。この抽出液は無水芒硝で脱水し減圧濃縮する。得られた残留物を再び少量の AcOEt に溶解し、1N HCl で 3 回振盪抽出した。つぎに、この塩酸抽出液を 10% Na_2CO_3 溶液で pH 10 に調整し、さらに AcOEt で 3 回振盪抽出した後、AcOEt 抽出液を無水芒硝で脱水し減圧濃縮した。このようにして得られた塩基性代謝物の粗抽出物を少量の AcOEt に溶解した後、展開溶媒を用いて TLC を行ない、ドラージェンドルフ試薬で発色させた。なお、薬物投与前の正常な 24 時間尿から前記同様に

それらの分画間における放射能の分布状態を調べた。その結果から、CDDA の尿中代謝物としてウサギでは酸性代謝物が、またラットでは塩基性および極性代謝物が多く生成されていることが示唆された。これまでに、イソプロフェナミン (1-*o*-chlorophenyl-2-isopropylaminoethanol) の尿中代謝物についてなされた検討によれば、ウサギではイソプロフェナミンの酸性代謝物が多く排泄されるのに対し、マウスでは塩基性代謝物の方が多いと報告されている。⁵⁾ したがって、これらの事実を考え合わせると、CDDA やイソプロフェナミンのごとき N-アルキル-フェニルアルキルアミン誘導体のウサギとラットあるいはマウスでみられるような代謝様式の相違は、おもにこれらの動物の N-脱アルキル化活性、脱アミノ活性や水酸化活性の差に起因するものと考えられている。

ウサギおよびラットにおける CDDA の酸性代謝物として安息香酸およびその抱合体である馬尿酸が生成されることを明らかにした。これらの代謝物の生成過程には還元的脱ハロゲン化反応が関与していると考えられ、その点これらの酸性代謝物の生成は興味深い。しかし、哺乳動物ではこの反応は DDT,⁶⁾ 2-bromoacylurea 化合物⁷⁾ などのアルキル基に結合したハロゲン化合物について若干報告されているほか、Bray⁸⁾ によって報告されたごとく、芳香核に直接結合したハロゲンがチオール基の存在下で還元的に脱ハロゲン化されるといった例などできわめて少なく、またその機構もほとんど解明されていない。本研究では前述のごとく、CDDA をウサギに静

Fig. 5. The Postulated Metabolic Pathways of CDDA

脈注射した場合にも安息香酸および馬尿酸の生成をみたが、このような還元的脱ハロゲン化体の生成が腸内微生物に起因するか否かについては結論を得るにいたらなかった。また、慎重を期すため、CDDA·HCl をラネーニッケルあるいは Pd-C で接触還元して得られた CDDA·HCl の脱ハロゲン化体 1-phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylaminobutan-2-ol hydrochloride を標品として、本実験で使用した ³H-CDDA·HCl 中にその脱ハロゲン化体が混在しているか否かについても GLC で検討を行なったが、脱ハロゲン化体の存在は認められなかった。本研究の結果にもとづいて、CDDA の代謝経路を予想すると Fig. 5 のごとくである。

ヒトの場合にも、ウサギおよびラット同様に塩基性の尿中代謝物として CDMA および CDA が生成されているものと推定される。また、ヒトでも前記動物同様に酸性代謝物として安息香酸および馬尿酸が生成されている可能性がある。しかし、これらの化合物はヒトにおいても常尿成分として認められており、CDDA に由来する安息香酸および馬尿酸の確認は標識化合物の服用以外は困難と考えられ、これらについての検討は行なわなかった。

謝辞 本研究に際し実験に協力された吉弘栄子嬢に謝意を表します。

- 5) K. Tatsumi, N. Arima, C. Yamato, Y. Yoshimura, H. Tsukamoto, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **18**, 1254 (1970).
- 6) P.S. Barker, F.O. Marrison, R.S. Whitaker, *Nature*, **205**, 621 (1965); C.H. Walker, *Life Sciences*, **8**, 1111 (1969).
- 7) 檜府直大, 薬誌, **87**, 726 (1967); *idem, ibid.*, **89**, 430, 796 (1969); T.C. Butler, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **143**, 23 (1964).
- 8) H.G. Bray, W.V. Thorpe, D.K. Vallance, *Biochem. J.*, **51**, 193 (1952).