果、未変化スルファメチゾールの生物学的半減期は、Pc の連続投与により有意に延長されることが確認された (Fig. 5). 以上の結果を Table I にまとめた. この表は Pc の連続投与が N⁴-アセチルスルファニルアミドおよび N⁴-アセチルスルファジメトキシンの尿細管分泌を阻害することを示唆している.

N⁴-アセチルスルファニルアミドおよび N⁴-アセチルスルファジメトキシンの生物学的半減期と累積尿中排泄率に及ぼす Pc 連続投与の効果は、連続投与 7 日目または 14 日目までは投与日数が増すに伴って増強される傾向が認められた. また Pc を連続投与すると、連続投与 14 日目からは Pc の大部分が代謝物として尿中に排泄されることが明らかにされた.¹²⁾ これらの結果から、Pc の連続投与による尿細管分泌阻害効果は Pc の代謝物によってひきおこされることが推察される. しかし Pc の連続投与による尿細管分泌阻害効果の機序については、今後の詳細な検討が必要である.

謝辞 本研究にあたり pyridinolcarbamate の提供をはじめ多くの御協力をいただいた 萬有製薬株式会社に感謝いたします.

12) 一番ヶ瀬尚, 今村順茂, 末永綾香, 上野 笑, 薬誌, 98, 1402 (1978).

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
98 (10) 1402-1405 (1978)

UDC 547.823.04.09 : 615.225.011.5.033.074

Pyridinolcarbamate に関する生物薬剤学的研究 (第 2 報¹⁾) Pyridinolcarbamate の家兎尿中代謝産物の単離, 同定

一番ヶ瀬尚, 今村順茂, 末永綾香, 上野 笑
熊本大学薬学部²⁾

Biopharmaceutical Studies on Pyridinolcarbamate. II.¹⁾ Isolation and Identification of the Urinary Metabolites of Pyridinolcarbamate in Rabbits

HISASHI ICHIBAGASE, YORISHIGE IMAMURA, AYAKA SUENAGA,
and EMI UENO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University²⁾

(Received February 2, 1978)

Metabolism of pyridinolcarbamate (Pc) was investigated in rabbits after its oral administration. Three metabolites in the urine of rabbits were isolated by a combination of column chromatography and paper chromatography. The results of melting point, elementary analysis, and ultraviolet and infrared spectral measurements were compared with those of each authentic sample, and the metabolites were identified as unchanged, 2-(carbamoyloxymethyl)-6-pyridinemethanol methylcarbamate, and 2,6-pyridinedimethanol bis(carbamate).

Keywords—Kinin-antagonist; pyridinolcarbamate; metabolism; urine; side-chain demethylation; rabbit

Pyridinolcarbamate (以下 Pc) は島本および石川^{3,4)}により合成され、血管膜透過性亢進阻止作用を有する抗キニン剤で、冠動脈硬化症⁵⁾ 狭心症⁶⁾ や四肢血管病変⁷⁾ 等の予防および治療に用いられ、化学名は 2,6-pyri-

1) 第 1 報: 一番ヶ瀬尚, 今村順茂, 末永綾香, 川畑博文, 薬誌, 98, 1398 (1978)

2) Location: 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto, 862, Japan.

3) 島本多喜雄, 医学のあゆみ, 51, 443 (1964).

4) 島本多喜雄, 石岡忠夫, 竹内邦夫, 小田倉力, 松村釣男, 臨床血液, 6, 158 (1965).

5) 島本多喜雄, 月刊薬事, 7, 63 (1965).

6) 高橋辰広, 清水 明, 中原秀彦, 中島 孝, 小野圭吾, 小沢友紀雄, 老川豊明, 治療, 48, 157 (1966).

7) 喜多島康一, 福島泰資, 半沢敦正, 久山栄一, 高原二郎, 巻幡 正, 診断と治療, 53, 2059 (1965).

dinedimethanol bis (methylcarbamate) である。

一番ヶ瀬ら⁸⁾は家兎に Pc を経口投与 2 時間後にサリチル酸を経口投与するとサリチル酸の尿中排泄は抑制され、さらに Pc を連続経口投与した場合はその効果は増強されるが、Pc を同時投与するか、または静脈内投与したときはサリチル酸の尿中排泄はほとんど影響を受けないという結果を得ている。また著者らは Pc の連続投与によりサルファ剤の尿中排泄が著しく抑制されることを認めた。¹⁾

このような知見から、著者らはサリチル酸およびサルファ剤の尿中排泄に対する Pc の抑制作用は Pc 本体ではなく、その代謝物によることが推定されることを報告した。¹⁾ 一方、Pc の代謝に関しては、Mallein ら⁹⁾ がヒトにおいて検討を試み、尿中に 2 種の代謝物、すなわち 1 つは未変化体、もう 1 つは Pc のモノ脱メチル体を核磁気共鳴および赤外線吸収スペクトルにより類推しているが、その他には全く報告は見当たらない。そこで著者らは、さらに Pc の代謝を検討するために家兎を用いて代謝物の検索を行なった。その結果、Pc を経口投与した家兎尿中より 3 種の代謝物を単離、同定したので報告する。

実 験 の 部

実験材料 Pc (萬有製薬から提供された純末を使用。mp 136.6—137.1°), Pc のモノ脱メチル体である 2-(carbamoyloxymethyl)-6-pyridinemethanol methylcarbamate (mp 115.5—117.0°) およびジ脱メチル体である 2,6-pyridinedimethanol bis(carbamate) (mp 155.9—160.2°) は萬有製薬研究部で合成されたものを使用した。その他の試薬はすべて市販の試薬特級品を使用した。

実験動物および薬物投与方法 雄性家兎 (体重 3.0—3.4 kg) を用い、1 羽あたり Pc 500 mg を蒸留水 50 ml に懸濁し、1 日 1 回、連日 115 日間経口投与を続けた。投与後採尿ケージに入れ 24 時間尿を採集した。

クロマトグラフィー 1) カラムクロマトグラフィー——Florisil (60—80 mesh) を 6 時間加熱し活性化したものを CHCl_3 に懸濁し、カラムに充填した。溶出は (1) CHCl_3 , (2) $\text{CHCl}_3 \cdot \text{EtOH}$ (16: 1, v/v), (3) $\text{CHCl}_3 \cdot \text{EtOH}$ (12: 1, v/v), (4) EtOH の順に行なった。

2) ペーパークロマトグラフィー (PPC)——東洋汙紙 No. 50 (2×40, 40×40 cm) を用いた。展開溶媒としては (I) toluene·MeOH (2: 1, v/v), (II) toluene·MeOH (3: 1, v/v), (III) toluene·MeOH (4: 1, v/v) の 3 種を使用した。呈色試薬として 0.02% ローダミン B EtOH 溶液を噴霧後、紫外線下で観察すると Pc および代謝物ともに橙赤色の螢光を発する。

スペクトルの測定 赤外線吸収 (IR) スペクトルは日本分光 DS-701 G 型を使用し、KBr 法で測定した。紫外線吸収 (UV) スペクトルは日立自記分光光度計 EPS-3T 型を使用して測定した。

尿中代謝産物の単離 Pc 投与後の尿を 2N NaOH を用いて pH 13 に調整し、食塩を飽和後、 $\text{CHCl}_3 \cdot \text{EtOH}$ (20: 1, v/v) 混合溶媒にて 2 回抽出する。得られた抽出液は減圧乾固し、残渣を CHCl_3 で溶解し (CHCl_3 可溶分)、さらに不溶物は EtOH に溶解した (EtOH 可溶分)。 CHCl_3 可溶分は濃縮後、Florisil カラムに通し、溶出剤の違いにより 4 つに分画する。EtOH 可溶分はカラムクロマトグラフィーは行なわなかった。得られた溶出液の各分画について preparative PPC により未変化体 (M-I) と代謝物 (M-II, M-III) に分離し、それぞれを EtOH で溶出した。各 EtOH 溶出液を活性炭処理後濃縮し、得られた結晶を熱 EtOH より 3 回再結晶し、未変化体 (M-I)、代謝物 (M-II) および (M-III) を得た。

結 果 お よ び 考 察

Pc を経口投与した家兎尿を実験の部記載の方法で $\text{CHCl}_3 \cdot \text{EtOH}$ (20: 1, v/v) 混合溶媒で抽出後、得られた抽出液について PPC を行なうと紫外線下、橙赤色螢光を発する 3 つのスポットが検出され、 R_f 値の大きい方より M-I, M-II, M-III と名付けた (Table I)。さらに、Pc の連続投与と代謝物 M-I, M-II, M-III の関係を前記 PPC 法で検討した結果、Pc の連続投与日数が増大するにつれて M-I は漸次減少し、連続投与 2 週間で尿中に PPC では痕跡程度にしか検出されず 3 週間目には全く検出できなくなるのに対し、M-II および M-III は 2 週間目まで漸次増加し、3—4 週間目には M-II および M-III のみになり、8 週間以降には M-III の方が M-II より多くなる傾向がみられた (Table II)。

次にこれら代謝物の単離、同定に必要な量を確保するために、家兎に 115 日間、Pc を連続経口投与した。採集した尿を実験の部記載の方法によって処理し CHCl_3 可溶分と EtOH 可溶分を得た。PPC による検討によって CHCl_3 可溶分には、M-I, M-II および少量の M-III が含まれ、EtOH 可溶分には M-III のみが含まれる

8) 未発表。

9) R. Mallein, J. Rondelet, M. Boucherat, M.H. Avenue, *Thérapie*, 28, 115 (1973)。

ことがわかった。そこで CHCl_3 可溶分は Florisil カラムによって M-I, M-II および M-III をそれぞれ多く含有する分画に分別し、さらに preparative PPC により単離し、EtOH より再結晶した。

M-I は PPC で合成標品 2,6-pyridinedimethanol bis (methylcarbamate) の R_f 値と完全に一致した (Table I)。また本物質は UV スペクトル [$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$, 263 nm ($\epsilon=5391$)] (Fig. 1), IR スペクトル (Fig. 2A), および

TABLE I. PPC of the Metabolites in the 24 hr Urine of Rabbit following Oral Administration of Pyridinolcarbamate

Metabolite	Solvent system		
	I	II	III
M-I	0.81	0.73	0.48
M-II	0.63	0.45	0.35
M-III	0.27	0.17	0.11

Developing solvent; (I) toluene. MeOH (2:1, v/v), (II) toluene. MeOH (3: 1, v/v), (III) toluene. MeOH (4: 1, v/v) Detecting reagent; 0.02% Rhodamine B EtOH solution.

TABLE II. Transition of the Metabolites in the Urine of Rabbit following Continuous Oral Administration of Pyridinolcarbamate

Metabolite	Presence ^{a)} of metabolites in urine, day					
	1-7	8-14	15-34	35-54	55-74	75-91
M-I	++	+	±	—	—	—
M-II	+	++	+++	+++	+++	+++
M-III	+	++	++	+++	+++	+++

Rabbit received the continuous oral administration of 500 mg Pc/animal/day for 91 days. The metabolites were extracted from the 24 hr urine alkalinized with 2N NaOH with CHCl_3 . EtOH (20: 1, v/v).

a) Observed by PPC: —, absence; ±, presence questionable; +, ++, +++, degree of presence.

Fig. 1. UV Spectra of the Urinary Metabolites of Rabbit following Oral Administration of Pyridinolcarbamate

Concentration of M-I, M-II, and M-III: 38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in EtOH, —, M-I; ---, M-II; ···, M-III.

Fig. 2. IR Spectra of M-I (A), M-II(B), and M-III (C)

融点の結果はいずれも合成標品と完全に一致したことから、M-I を未変化の Pc と同定した。

M-II は元素分析値 (Table III) および検体構造式による代謝過程の類推から側鎖末端メチル基のモノ脱メチル体を推定したが、UV スペクトル [$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$, 264 nm ($\epsilon=4761$)] (Fig. 1) および IR スペクトル (Fig. 2B) の結果はいずれも合成標品 2-(carbamoyloxymethyl)-6-pyridinemethanol methylcarbamate と完全に一致した。また M-II を合成標品と混融したところ融点降下を示さなかった。以上の結果から代謝物 M-II を Pc のモノ脱メチル体である 2-(carbamoyloxymethyl)-6-pyridinemethanol methylcarbamate と同定した。この代謝物は Mallein ら⁹⁾ がヒトにおける Pc の尿中代謝物として推定したものと同一物であると考えられる。

同様に M-III は UV スペクトルは 264 nm ($\epsilon=4494$, EtOH) に極大吸収を示し、元素分析値 (Table III) から Pc の側鎖末端メチル基のジ脱メチル体を推定したが、IR スペクトル (Fig. 2C) の結果は合成標品 2,6-pyridinedimethanol bis(carbamate) と完全に一致し、また標品と混融しても融点降下を示さなかった。したがって、代謝物 M-III を Pc のジ脱メチル体である 2,6-pyridinedimethanol bis(carbamate) と同定した。また PPC における M-II および M-III の R_f 値は各合成標品と完全に一致した (Table I)。

以上のように著者らは Pc を投与した家兎尿中から未変化体およびその代謝物としてモノ脱メチル体とジ脱メチル体の 3 種を同定することができた (Fig. 3)。しかし、Pc の加水分解により生成が予想される 2,6-pyridinedimethanol は検出されなかった。このことは Mallein ら⁹⁾ がヒトにおける Pc の代謝を検討した結果、2,6-pyridinedimethanol は得られないという報告と一致する。

TABLE III. Analytical Data of the Metabolites (M-II and M-III) of Pyridinolcarbamate

Metabolite	mp (°C)	Formula	Analysis (%)		
			Calcd. (Found)		
			C	H	N
M-II	115—117	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$	50.20 (50.31)	5.44 (5.52)	17.54 (17.82)
M-III	161.5—163	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$	48.00 (48.18)	4.89 (4.75)	18.67 (18.25)

Fig. 3. Metabolism of Pyridinolcarbamate in Rabbits

現在、著者らは Pc を投与したときの尿中および血中の Pc (M-I), M-II, および M-III の量的関係ならびにその代謝反応の詳細について検討中である。

謝辞 本研究にあたり試料および貴重な標品を提供していただいた 萬有製薬株式会社研究部、松崎明紀氏に深謝致します。また、元素分析および IR スペクトルを測定していただいた本学中央機器分析室の白木邦子、木村泰代の諸氏に感謝致します。