薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
98 (9) 1258—1266 (1978)

UDC 615.217.24.033.076.9:547.582.4.09

アドレナリン β -遮断薬 *o*-[3-(*tert*-Butylamino)-2-hydroxypropoxy]benzonitrile
(Bunitrolol) の代謝に及ぼす投与経路の影響

力久忠昭, 富山信次, 森 睦博, 鈴木徳治
千葉大学薬学部¹⁾

Influence of the Route of Administration on the Metabolism of a β -Adrenergic
Blocker, *o*-[3-(*tert*-Butylamino)-2-hydroxypropoxy]-
benzonitrile (Bunitrolol)

TADAAKI RIKIHISA, SHINJI TOYAMA, MUTSUHIRO MORI and TOKUJI SUZUKI
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Chiba¹⁾

(Received February 13, 1978)

The metabolic fate of *o*-[3-(*tert*-butylamino)-2-hydroxypropoxy]benzonitrile (Bunitrolol) in the rat was studied by using the drug labeled with ¹⁴C in the nitrile group.

Urine samples collected for 24 hr after oral or intravenous administration contained about 60% of the dosed ¹⁴C. The amount of unchanged Bunitrolol in urine was small after both routes of administration. The major metabolite was conjugated 4-hydroxybunitrolol, which constituted about 90% of the urinary ¹⁴C after oral administration and about 70% after intravenous administration. The amount of free 4-hydroxybunitrolol was relatively small. The sum of the recovery of 4-hydroxybunitrolol and conjugated 4-hydroxybunitrolol was almost equal after both routes of administration. Two minor metabolites were detected. One of them was conjugated 2-hydroxybenzonitrile and the other was probably 3-(2-cyanophenoxy)-2-hydroxypropionic acid. Most of the metabolites in bile was conjugated 4-hydroxybunitrolol.

Blood concentration of free 4-hydroxybunitrolol in the postdistributive phase was about 25—33% of the corresponding values of the parent drug after oral administration and about 5—9% after intravenous administration. These findings were different from the fact that 4-hydroxypropranolol was detected in the systemic circulation after oral administration of propranolol but not after intravenous administration. This difference would be explained by the predominant biotransformation of bunitrolol to 4-hydroxybunitrolol.

Keywords— β -adrenergic blocker; bunitrolol; drug metabolism in rats; influence of administration route; drug disposition

アドレナリン性 β -受容体遮断薬の中には代謝物も薬理作用を持つものがあり、投与経路の違いによって代謝物の生成率が変化するため薬効の発現過程に相違を生じる場合がある。²⁾ 例えば, propranolol を経口投与した場合、代謝物の 4-hydroxypropranolol が血液中に未変化体とほぼ同じ濃度で検出されるが、静脈内投与では検出されない。^{3,4)} 経口投与における薬理効果は、同一の血中 propranolol 濃度と比較すると、静脈内投与の場合の 2—5 倍強いといわれ、propranolol と同様に β -受容体遮断作用を持つ 4-hydroxypropranolol の存在のためとされている。^{2a)} しかし、propranolol の代謝経路は複雑である⁵⁾ うえ、4-hydroxypropranolol は化学的に不安定である⁶⁾ ため、代謝過程の定量的な全貌は明らかにされていない。また、propranolol の投与経路が異なるだけで、何

1) Location: 1-33 Yayoi-cho, Chiba.

2) a) C.T. Dollery, D.S. Davies, M.E. Conolly, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **179**, 108 (1971); b) B. Åblad, K.O. Borg, G. Johnsson, C-G. Regårdh, L. Solvell, *Life Sci.*, **14** 693 (1974); 本間誠次郎, 神戸川明, 薬誌, **95**, 680 (1975).

3) J.W. Paterson, M.E. Conolly, C.T. Dollery, A. Hayes, R. G. Cooper, *Pharmacol. Clin.*, **2**, 127 (1970).

4) A. Hayes, R.G. Cooper, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **176**, 302 (1971).

5) T. Walle, T.E. Gaffney, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **182**, 83 (1972).

6) T. Walle, J. Morrison, K. Walle, E. Conradi, *J. Chromatogr.*, **114**, 351 (1975).

故このような代謝経路の顕著な差が見られるのかについても検討されていない。o-[3-(*tert*-Butylamino)-2-hydroxypropoxy]benzonitrile (bunitrolol と略) は β -受容体遮断薬として開発された薬物である。われわれはラットにおける bunitrolol の生物学的半減期が propranolol と同程度であり、著しい肝臓における first-pass effect を蒙り、経口投与後の bioavailability は投与量に依存するなど、その生体内動態は propranolol に類似した点が多いことを既に報告した。⁷⁾ また、主代謝物である 1-(2-cyano-4-hydroxyphenoxy)-3-*tert*-butylamino-2-propanol(4-hydroxybunitrolol と略) は 4-hydroxypropranolol に比べ化学的に安定である。そこで、propranolol の生体内動態を解明する手掛かりをつかむために bunitrolol の代謝過程を詳細に検討し、propranolol と比較することを試みた。

実験の部

実験材料 Bunitrolol は HCl 塩 (mp 162—163°) を、標識化合物は前報⁷⁾ の nitrile 基を標識した ¹⁴C-bunitrolol HCl 塩 (59.5 μ Ci/mg, シリカゲル薄層クロマトグラフィー⁸⁾ による放射化学的純度は 98% 以上) を使用した。Bunitrolol, ¹⁴C-bunitrolol および推定代謝物の合成標品, 4-hydroxybunitrolol hydrochloride, 2-hydroxybenzonitrile (cyanophenol と略), 2-hydroxy-3-(2-cyanophenoxy)propionic acid (acid 体と略), 1-amino-3-(2-cyano-phenoxy)-2-propanol hydrochloride (amino 体と略), 3-(2-cyanophenoxy)-1,2-propanediol (glycol 体と略) は C.H. Boehringer Sohn より提供を受けた。 β -Glucuronidase はソルビトール含有の凍結乾燥粉末 (Miles-Seravac) を水に溶解 (12500 Fishman units/ml) して用いた。その他の試薬は市販特級品を使用した。

実験動物 体重 200—260 g の Wistar 系雄性ラットを薬物投与前約 16 hr 絶食し、その間水は自由に摂取させた。

薬物投与および試料採取方法 ¹⁴C-Bunitrolol は非放射性 bunitrolol で適宜希釈して生理食塩水に溶解し、この溶液 0.5 ml を、静脈内投与では大腿静脈に 30 sec で、経口投与では経口ゾンデを用いて胃内に投与した。血液はラットを固定台 (夏目製作所, 小山式) に固定したまま大腿動脈に挿入したカニューレから採取した。採血ごとに他のラットの新鮮な血液をカニューレを通して大腿静脈内に注入し、採血によって失われた血液を補充した。尿は尿道を結紮後、軽い ether 麻酔下で開腹し膀胱にポリエチレン管を挿入したラットをボールマンケージに固定して、糞と完全に分離した状態で採取した。胆汁は軽い ether 麻酔下で開腹し、総胆管にポリエチレン管を挿入して採取した。

放射能の測定 放射能の測定には液体シンチレーションカウンター (Beckman, LS100C) を使用した。シンチレータは dioxane 系シンチレータ (naphthalene 100 g, DPO 5 g, dimethyl POPOP 0.3 g, toluene 135 ml, MeOH 35 ml, dioxane 730 ml) あるいは toluene 系シンチレータ (DPO 10 g, POPOP 0.5 g, toluene 1000 ml) を使用した。クエンチングの補正はそれぞれのシンチレータにつき外部標準法により補正曲線を作製して行った。

尿中代謝物の検討 試料——4匹のラットに 10 mg/kg (35.1 μ mol/kg, 6.1 μ Ci/head) の ¹⁴C-bunitrolol を静脈内投与し、2 hr までの尿を合わせて試料とした。 β -Glucuronidase による加水分解は、尿試料 1 ml につき 1.5 M acetate buffer (pH 5.0) 0.4 ml を加えて pH 5.0 とし、 β -glucuronidase 溶液 0.2 ml を添加後 37° の恒温槽に 40 hr 静置して行った。

薄層クロマトグラフィー (TLC)——シリカゲル薄層板 (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄, 厚さ 0.25 mm, precoated) を用い、展開溶媒として (I) CHCl₃-PrOH-30% NH₄OH (12:7:1, v/v), (II) CHCl₃-MeOH (5:1, v/v), (III) benzene-EtOH-AcOH-H₂O (30:10:20:1, v/v) を用いた。クロマトグラム上の放射性物質は薄層クロマトグラム・スキャナー (Aloka, TRM-1) で検出し、ラジオクロマトグラムの面積比から放射性物質の割合を求めた。必要に応じて対応部位のシリカゲルを削り取り、MeOH で抽出した。なお、同時に展開した非放射性の合成標品は紫外線照射下に検出した。呈色試薬には、1 級アミンに対してニンヒドリン試薬、2,3 級アミンに対して Dragendorff 試薬、フェノール性 OH に対して diazobenzenesulfonic acid 試薬、グルクロン酸抱合体に対して naphthoresorcinol 試薬をそれぞれ使用した。

スペクトル——質量スペクトルは日立 RMU-6E 型、赤外吸収スペクトルは日立 215 型、蛍光スペクトルは日立 204 型の各測定機器により測定した。

代謝物の分画—— β -Glucuronidase で処理を行った尿 1 ml を 1 N NaOH と 0.2 M carbonate buffer (pH 9.0) を用いて pH 9.0 に調節し、AcOEt 10 ml を加え、ミキサー (大洋, S-F₅) で 30 sec 攪拌、遠沈 (3000 rpm, 5 min) 後 AcOEt 層を分取した。さらに 5 ml ずつの AcOEt で 2 度抽出をくり返し、塩基性分画を得た。なお、抽出操作中に水層の pH が低下した場合は buffer を加えて pH を調節した。ついで 1 N HCl で残りの水層を pH 1.0 とし、ether 10 ml, さらに 5 ml ずつの ether で 2 度抽出をくり返し、ether 層を合わせて無水 Na₂SO₄

7) 力久忠昭, 富山信次, 大塚峯三, 磯崎貞夫, 斎藤侑也, 中川富士雄, 応用薬理, 15, 283 (1978).

8) プレート; Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄, precoated, 展開溶媒; CHCl₃-PrOH-30% NH₄OH (12:7:1, v/v), benzene-dioxane-EtOH-30% NH₄OH (5:4:1:1, v/v).

で乾燥後、室温で乾固して酸性分画を得た。なお、胆汁中の代謝物についても尿の場合と同様の方法で検討した。

放射性 4-Hydroxybunitrolol の単離 ^{14}C -Bunitrolol をラットの門脈内に Suzuki らの方法⁹⁾ で注入し、30 min 後に肝臓を摘出、そのホモジネートを β -glucuronidase で処理し、pH 9.0 で AcOEt による抽出をくり返した。AcOEt 層を乾固して 0.1 N HCl に溶解し、ether で洗浄後、再び水層を pH 9.0 とし AcOEt で抽出した。抽出物は分取用薄層板 (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 × 20 cm, 厚さ 2 mm, precoated) にスポットし、展開溶媒 I による分離精製をくり返して、標品の R_f 値に対応し、かつラジオクロマトグラム上で単一ピークを与える部分を MeOH に溶出、MeOH 性 HCl を加えて放射性 4-hydroxybunitrolol (^{14}C -4-hydroxybunitrolol と略) の HCl 塩の MeOH 溶液を得た。非放射性 bunitrolol を用い同様の操作による MeOH 溶液を乾固して白色粉末を得、質量スペクトルおよび赤外吸収スペクトルを比較して 4-hydroxybunitrolol であることを確認した。また、得られた ^{14}C -4-hydroxybunitrolol は TLC による回収率の算出に用いた。

Bunitrolol 投与後の血中濃度 ^{14}C -Bunitrolol を各群 3 匹のラットに経口あるいは静脈内投与した後、経時的に 0.25—0.40 ml の血液を採取した。血液中の総放射能は、採取血の一部をオキシダイザー用コンバストコーン (Packard) 中のセルローズ粉末 (東洋汙紙) 約 100 mg に吸着させ、自動燃焼装置 (Aloka, ASC-112) を用いて燃焼、生じた $^{14}\text{CO}_2$ を monoethanolamine-methanol (1:1, v/v) 混液、ついで toluene 系シンチレーター-methanol (7:5, v/v) 混液に吸収、溶解して、その放射能を測定した。セルローズ粉末に既知量 (約 10000 dpm) の ^{14}C -bunitrolol を添加し燃焼させて得た回収率は 98.6% であり、測定値の補正に用いた。血液中の ^{14}C -bunitrolol と ^{14}C -4-hydroxybunitrolol の分離定量は TLC により行った。キャリアーとして非放射性の bunitrolol および 4-hydroxybunitrolol を各 5 μg 含む水溶液 1 ml に血液試料 0.2—0.3 ml を加えて溶血し、0.5 M carbonate buffer (pH 9.0) 1 ml と AcOEt 12 ml を加え、ミキサーで 30 sec 攪拌、遠沈 (3000 rpm, 5 min) 後に AcOEt 層 10 ml を分取し室温で乾固した。乾固物を MeOH 0.5 ml に溶解し、その 0.4 ml を展開溶媒 I を用いる TLC により分離した。Bunitrolol および 4-hydroxybunitrolol の各対応部のシリカゲルを削り取り、MeOH 1 ml を加えて 1 夜放置後、dioxane 系シンチレータ 15 ml を加え、それぞれの放射能を測定した。Blank の血液を用い、キャリアーの水溶液に既知量 (8000—20000 dpm) の ^{14}C -bunitrolol と ^{14}C -4-Hydroxybunitrolol を同時に添加して得た回収率は ^{14}C -bunitrolol で 91.6%, ^{14}C -4-hydroxybunitrolol で 82.0% であり、それぞれの測定値の補正に用いた。なお、 ^{14}C -bunitrolol を投与して 15 min と 8 hr 後の血液試料は溶血させ、一部は尿中代謝物の検討と同様に β -glucuronidase で処理をして前記の分離操作を行った。 ^{14}C -4-Hydroxybunitrolol の抱合体濃度は β -glucuronidase で処理を行った場合と無処理の場合の ^{14}C -4-hydroxybunitrolol の濃度差として求めた。その他の代謝物の総濃度は β -glucuronidase 処理を行って得た ^{14}C -bunitrolol 濃度と ^{14}C -4-hydroxybunitrolol 濃度を総放射能から差し引いて求めた。

4-Hydroxybunitrolol 投与後の血中濃度 5 mg/kg (16.6 $\mu\text{mol/kg}$) の非放射性の 4-hydroxybunitrolol を 3 匹のラットの静脈内に投与し、経時的に 0.1—0.2 ml の血液を採取した。血液試料を H₂O 1 ml に加えて溶血させ、0.5 M carbonate buffer (pH 9.0) 1 ml と新たに蒸留した AcOEt 12 ml を加え、振盪、遠沈 (3000 rpm, 5 min) 後、AcOEt 層 10 ml を分取し、室温で乾固した。乾固物を MeOH 1 ml に溶解し、その蛍光強度 (励起波長 325 nm, 測定波長 365 nm) を測定して 4-hydroxybunitrolol を定量した。

尿、胆汁および糞中排泄率の測定 尿および胆汁中の総放射能は試料を水で希釈定容し、その一部を dioxane 系シンチレータに溶解して測定した。また一部の尿試料は β -glucuronidase で処理して血液試料と同様の操作で TLC により ^{14}C -bunitrolol と ^{14}C -4-hydroxybunitrolol を定量した。Blank の尿に既知量 (約 10000 dpm) の ^{14}C -bunitrolol と ^{14}C -4-hydroxybunitrolol を添加して得た回収率は、 ^{14}C -bunitrolol で 90.0%, ^{14}C -4-hydroxybunitrolol は 72.0% であり、それぞれの測定値の補正に用いた。糞中の総放射能は糞を乾燥させ、乳鉢で均質化し約 100 mg を精秤して血液と同様の燃焼法により測定した。Blank の糞約 100 mg に既知量 (約 10000 dpm) の ^{14}C -bunitrolol を添加し燃焼させて得た回収率は 91.0% であり、測定値の補正に用いた。また、試料中の bunitrolol のみを定量する場合は、既に報告した方法⁷⁾ に従って、強アルカリ下で 1.5% iso-amyl-alcohol 含有 heptane に、続いて 0.1 N HCl に抽出し、HCl 層の放射能または蛍光強度 (励起波長 295 nm, 測定波長 330 nm) を測定した。

実 験 結 果

尿中代謝物の同定

10 mg/kg の ^{14}C -bunitrolol をラットの静脈内に投与し、2 hr までの尿を集めて TLC による代謝物の分離、同定を行った。この試料の総放射能は投与量の 9.4% に相当していた。尿試料を直接、薄層板にスポット (30 μl) して展開溶媒 I で分離すると、Fig. 1a に破線で示すクロマトグラムが得られ、放射性物質 A, B, C が認められた。つぎにこの尿を β -glucuronidase で処理し、そのまま展開溶媒 I で分離すると、Fig. 1a に実線で示すクロマトグラムが得られ、放射性物質 A, B の他に D, E が認められた。

9) T. Suzuki, Y. Saitoh, S. Isozaki, R. Isida, *J. Pharm. Sci.*, 62 345 (1973).

Fig. 1. Thin-Layer Radiochromatograms of 2 hr Urine after Intravenous Administration of ^{14}C -Bunitrolol to Rats

A pooled urine sample of 4 animals dosed at 10 mg/kg (6.1 $\mu\text{Ci}/\text{head}$) was used.

....., before the treatment with β -glucuronidase.

—, after the treatment with β -glucuronidase.

Silica gel plate: Kieselgel 60 F₂₅₄, thickness 0.25 mm, pre-coated. Authentic compounds: 1, bunitrolol; 2, 4-hydroxybunitrolol; 3, cyanophenol; 4, 2-hydroxy-3-(2-cyanophenoxy)-propionic acid.

[a] solvent I; CHCl_3 : PrOH : 30% NH_4OH : 12: 7: 1 (v/v), [b] solvent II; CHCl_3 : MeOH = 5: 1 (v/v), [c] solvent III; benzene: EtOH : AcOH : H_2O = 3: 1: 2: 0.1 (v/v).

TABLE I. Thin-Layer Chromatographic Analysis of the ^{14}C -Radioactivity of the Fractions obtained from 2 hr Urine after Intravenous Administration of ^{14}C -Bunitrolol to Rats

	% of urinary radioactivity				Total
	A	B	D	E	
Basic fraction	43.6	36.1	7.2	1.2	88.1
Acidic fraction	0.0	0.2	0.2	2.4	2.8

A pooled urine sample of 4 animals dosed at 10 mg/kg (6.1 $\mu\text{Ci}/\text{head}$) was treated with β -glucuronidase.

β -Glucuronidase で処理をした尿を pH 9.0 に調節し AcOEt で抽出を行うと、88.1% の放射能が塩基性分画として得られた。残りの水層を pH 1.0 に調節し ether で抽出を行うと、2.8% の放射能が酸性分画として得られ、水層には 8.5% の放射能が残った。塩基性分画と酸性分画をそれぞれ TLC によって分離し、ラジオクロマトグラムの面積比から放射性物質の割合を求め Table I に示した。これらの結果から、A および B は主として塩基性物質、E は酸性物質、D は E よりも弱い酸性の物質であると推定された。呈色反応は、A、B および C は Dragendorff 試薬に、C は naphthoresorcinol 試薬にそれぞれ陽性であった。 β -Glucuronidase で処理をした尿に非放射性標品を加えて同時に展開すると、A、B、D、E のピークはそれぞれ標品の bunitrolol、4-hydroxybunitrolol、cyanophenol、acid 体の位置と一致した。さらに、A は 0.1N HCl で溶出しその蛍光スペクトルを標品と比較して bunitrolol であることを確認した。尿を β -glucuronidase で処理すると、C は 4-hydroxybunitrolol と cyanophenol および acid 体に分れることから、C は 4-hydroxybunitrolol と cyanophenol のそれぞれの抱合体と acid 体の混合物であると推定できた。なお、 β -glucuronidase で処理をする条件では bunitrolol、4-hydroxybunitrolol および acid 体は安定であり、これらの化合物から cyanophenol が生成することは認められなかった。また、採取した尿 (pH 7.0–7.5) をそのまま室温 (23°) で 4 日間放置しても代謝物の割合には変化を認めず、採尿中の代謝物の分解は無視できた。なお、尿を 1.5M acetate buffer で pH 5.0 とし、 β -glucuronidase を加えずに 45 hr、37° の恒温槽に静置すると、4-hydroxybunitrolol は増量し cyanophenol が検出され、これらの抱合体が β -glucuronidase を添加せずとも一部分解し、おのおののアグリコンを遊離することが示され

Fig. 2. Semilogarithmic Plots of Mean Blood Concentrations of Total ^{14}C -Radioactivity calculated as Bunitrolol, Unchanged Bunitrolol and 4-Hydroxybunitrolol in Rats after Oral (50 mg/kg) and Intravenous (5.6 mg/kg) Administration of ^{14}C -Bunitrolol

Each animal was dosed with ^{14}C -bunitrolol at 21.2 μCi orally and at 22.6 μCi intravenously. Vertical bars represent standard errors of the estimation from three animals.

—x—: total ^{14}C -radioactivity, —○—: bunitrolol, —●—: 4-hydroxybunitrolol.

Fig. 3. Semilogarithmic Plot of Mean Blood Concentrations of 4-Hydroxybunitrolol after Intravenous Administration of 5 mg/kg 4-Hydroxybunitrolol to Rats

Vertical bars represent standard errors of the estimation from three animals.

た.¹⁰⁾ しかし、 β -glucuronidase の阻害剤である D-glucaro-(1 $\rightarrow$ 4)-lactone を添加した場合はこの現象は起こらず、尿中の β -glucuronidase¹¹⁾ によるものと推定されたが、これ以上の検討は行わなかった。

尿試料を展開溶媒 II および III で分離した場合のクロマトグラムをそれぞれ Fig. 1b および Fig. 1c に示した。展開溶媒 II は cyanophenol の分離に適しており、その検出に利用した。また、展開溶媒 III を用いると β -glucuronidase で処理した尿では原点付近のピークが消失し、本条件によって抱合体がほぼ完全に加水分解されることが示された。なお、 β -glucuronidase で処理をした尿を pH 5.0 で ether 抽出し、抽出物を展開溶媒 I, ついで III を用いて 2 次展開を行うと、オートラジオグラフィ¹²⁾ 上で glycol 体の R_f 値に対応し、試料中放射能の 1% 以下と推定されるきわめて小さなスポットが検出されたが、glycol 体であるとの確認はできなかった。¹³⁾ また、N-dealkylation を受けた amino 体は検出されなかった。

Bunitrolol 投与後の血中濃度

^{14}C -Bunitrolol を静脈内あるいは経口投与した各群 3 匹のラットの総放射能、bunitrolol および 4-hydroxybunitrolol の平均血中濃度の経時変化を Fig. 2 に示した。

5.6 mg/kg (19.7 $\mu\text{mol/kg}$, 22.6 $\mu\text{Ci/head}$) の ^{14}C -bunitrolol を静脈内投与して 15 min では、血中総放射能のうち平均 60% が bunitrolol, 3% が 4-hydroxybunitrolol, 37% が 4-hydroxybunitrolol の抱合体であり、それ以外の代謝物は 1% に満たなかった。血中総放射能は投与後 2 hr で投与直後の約 12% に減少したが、8 hr 後においても投与直後の約 8% の放射能が血中に認められた。Bunitrolol は速やかに減少し、投与後 1 hr 以降より求めた半減期は平均 48 min であったが、前報⁷⁾ で得られた 38 min の半減期と比べ有意な差は認められなかった。4-Hydroxybunitrolol の濃度は bunitrolol 投与後 1 min で最大値に達し、その消失は bunitrolol よりもやや遅く半減期は平均 73 min であった。4-Hydroxybunitrolol 濃度の bunitrolol 濃度に対する割合は、投与後 15 min—2 hr の間では約 5—9% とほぼ一定であった。

10) TLC を用いて、同一条件下に β -glucuronidase で処理した尿と比較すると、上記の水溶液中では 4-hydroxybunitrolol の抱合体は約 45%, cyanophenol の抱合体は約 60% 分解していた。

11) D. Coonrod, P.Y. Paterson, *J. Lab. Clin. Med.*, 73, 6 (1969).

12) サクラ N type X 線フィルム (工業用) を使用し、露出は 2 あるいは 3 週間行った。

13) Glycol 体の R_f 値は展開溶媒 I で 0.56, 展開溶媒 III で 0.69 であり、未同定物質の R_f 値はそれぞれ 0.52, 0.67 であった。

50 mg/kg (176 μ mol/kg, 21.2 μ Ci/head) の経口投与では、投与後 15—30 min で血中総放射能, bunitrolol, 4-hydroxybunitrolol はいずれも最高濃度に達した。投与後 15 min における血中総放射能のうち平均 43% が bunitrolol, 10% が 4-hydroxybunitrolol, 47% が 4-hydroxybunitrolol の抱合体であり、血中の総代謝物濃度 (血中総放射能と bunitrolol 濃度の差) に対する 4-hydroxybunitrolol 濃度の割合は約 18% であった。以後、血中総放射能はゆるやかに減少し、投与後 8 hr では最高値の 9% に減少した。Bunitrolol の半減期は平均 43 min, 4-hydroxybunitrolol の半減期は平均 69 min であった。4-Hydroxybunitrolol 濃度の bunitrolol 濃度に対する割合は、投与後 15 min—2 hr の間では約 25—33% とほぼ一定であった。

いずれの投与方法においても、投与後 8 hr の血中には bunitrolol および 4-hydroxybunitrolol は検出されず、血中総放射能のほとんどが 4-hydroxybunitrolol の抱合体によるものであった。

4-Hydroxybunitrolol 投与後の血中濃度

5 mg/kg の非放射性 4-hydroxybunitrolol を静脈内に投与した 3 匹のラットの 4-hydroxybunitrolol の平均血中濃度の経時変化を Fig. 3 に示した。投与後 1 hr 以降から求めた半減期は平均 60 min であった。

尿中および糞中排泄率

尿試料と糞試料を完全に分けるため膀胱にカニューレを挿入したラットを使用した。Table II に示すように、 14 C-bunitrolol を経口投与した場合と静脈内投与した場合の総放射能の排泄率には有意な差は認められなかった。投与した放射能の約 60—70% が投与後 72 hr までに尿中へ、約 20—30% が糞中へ排泄されたが、放射能の大部分はいずれも 24 hr 以内に排泄されていた。なお、尿および糞中への総放射能の排泄率は代謝ケージを用いた場合⁷⁾ とくらべ大きな差異は認められなかった。

非放射性の bunitrolol を投与して 2, 6, 24 hr までに尿中へ排泄された未変化 bunitrolol の平均累積値を蛍光分析法により求めると、5 mg/kg の静脈内投与 ($n=4$) ではそれぞれ投与量の 3.55, 3.88, 3.89% であり、10 mg/kg の静脈内投与 ($n=5$) では 4.31, 4.57, 4.57% であったが、いずれの時間においても投与量による差は認められず、その排泄は 2 hr でほぼ終わっていた。50 mg/kg の経口投与 ($n=3$) では 2, 6, 24 hr までに尿中へ排泄された未変化 bunitrolol の平均累積値は投与量の 0.13, 0.28, 0.31% であり、静脈内投与にくらべその排泄はさらに少なかった。なお、いずれの投与方法でも 24 hr 以降の尿には bunitrolol は全く検出されなかった。

50 mg/kg の 14 C-bunitrolol を経口投与した 3 匹のラットの尿を β -glucuronidase で処理し、TLC で分離して 4-hydroxybunitrolol の抱合体の経時的な尿中排泄率を測定した。Fig. 4 に 4-hydroxybunitrolol の抱合体の総排泄量と各時間までの排泄量との差の片対数プロット (Sigma-minus plot¹⁴⁾) を示した。投与後 8 hr 以降の直線部分から求めた半減期は平均 290 min であった。

Table III に 14 C-bunitrolol を投与した各群 3 匹のラットの 24 hr までの尿を集めて TLC で分離し、そのラジオクロマトグラムの面積比から求めた尿中代謝物の割合を示した。5 mg/kg 静脈内投与の bunitrolol の排泄

TABLE II. Cumulative Urinary and Fecal Excretion of Total 14 C-Radioactivity after Oral and Intravenous Administration of 14 C-Bunitrolol to Rats

Time (hr)	Excreted radioactivity (% of dose)					
	50 mg/kg, <i>p.o.</i> ($n=6$) ^{a)}		5 mg/kg, <i>p.o.</i> ($n=3$) ^{b)}		5 mg/kg, <i>i.v.</i> ($n=6$) ^{c)}	
	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces
0—8	21.0 $\pm$ 3.3	—	55.0 $\pm$ 1.9	—	37.4 $\pm$ 7.0	—
0—24	53.6 $\pm$ 3.2	22.2 $\pm$ 4.4	71.8 $\pm$ 3.5	15.7 $\pm$ 0.8	60.3 $\pm$ 2.7	17.8 $\pm$ 6.5
0—48	60.2 $\pm$ 1.7	29.2 $\pm$ 2.4	72.0 $\pm$ 3.5	16.3 $\pm$ 1.0	63.4 $\pm$ 3.0	24.5 $\pm$ 2.3
0—72	60.2 $\pm$ 1.7	29.7 $\pm$ 2.4	72.0 $\pm$ 3.5	16.3 $\pm$ 1.0	63.6 $\pm$ 3.0	24.8 $\pm$ 3.9

The data represent the mean $\pm$ S.E.

a) 1.9 μ Ci/head ($n=3$), 3.5 μ Ci/head ($n=3$).

b) 4.6 μ Ci/head ($n=3$).

c) 1.8 μ Ci/head ($n=3$), 15.4 μ Ci/head ($n=3$).

14) M. Gibaldi, D. Perrier, "Pharmacokinetics," Marcel Dekker, Inc., New York, 1975, pp. 281—292.

TABLE III. Urinary Excretion of Bunitrolol and Its Metabolites during 24 Hours in Rats

Excreted compounds	% of dose (% of urinary radioactivity) ^{a)}		
	Oral		Intravenous
	50 mg/kg (3.5 μ Ci/head)	5 mg/kg (4.6 μ Ci/head)	5 mg/kg (15.4 μ Ci/head)
Bunitrolol	— (—) ^{b)}	— (—) ^{b)}	2.1 (3.5)
4-Hydroxybunitrolol	3.3 (6.2)	0.9 (1.3)	11.0 (18.3)
Conjugated 4-hydroxybunitrolol	46.3 (86.4)	64.9 (90.4)	44.3 (73.4)
Conjugated cyanophenol	1.2 (2.2)	2.3 (3.2)	1.7 (2.8)
2-Hydroxy-3-(2-cyanophenoxy)-propionic acid	2.8 (5.2)	3.7 (5.1)	1.2 (2.0)

a) Pooled urine sample of 3 animals was used in each experiment and the values were calculated from the area under peak on thin-layer radiochromatograms by use of solvent I (CHCl_3 : PrOH : 30% NH_4OH =12: 7: 1) and solvent II (CHCl_3 : MeOH =5: 1).

b) The solvent extraction method indicated that bunitrolol constituted about 0.25% of the urinary radioactivity after a dose of 50 mg/kg and 0.05% after a dose of 5 mg/kg.

Fig. 4. Semilogarithmic Plot of the Amounts of Conjugated 4-Hydroxybunitrolol to be excreted in Urine after Intravenous Administration of 50 mg/kg ^{14}C -Bunitrolol to Rats

Each animal was dosed at 1.9 μ Ci of ^{14}C -bunitrolol. Vertical bars represent standard errors of the estimation from three animals.

分画に 0.5%, 残りの水層に 10.7% の放射能が認められた。TLC による分析の結果, 塩基性分画中の放射性物質はすべてが 4-hydroxybunitrolol であった。前報⁷⁾で ^{14}C -bunitrolol を投与すると放射性物質が腸肝循環を行うことを報告したが, 今回の結果から胆汁中の放射性物質のほとんどは 4-hydroxybunitrolol の抱合体であることが示された。

考 察

ラットにおける bunitrolol の代謝は著しく, 未変化の bunitrolol のままで排泄される量はきわめて少ない。Bunitrolol の主な代謝物は芳香環が水酸化を受けて生成した 4-hydroxybunitrolol の抱合体であり, 尿中代謝物の 70—90% を占め, また胆汁中では代謝物のほぼ全量を占めた。一方, 遊離型の 4-hydroxybunitrolol の排泄は比較的少なく, 経口投与では尿中代謝物の数 %, 静脈内投与でも 20% 弱であった。その他の代謝物としてわずかに cyanophenol の抱合体と acid 体が認められた。N-dealkylation を受けて生成する amino 体は検出されなかった。これらの結果からラットにおける bunitrolol の代謝経路を推定すると Chart 1 のようになり, こ

率が非放射性 bunitrolol を用いた場合よりもわずかに低いが, 定量値が小さいことと個体差が重なったためと考えられる。TLC では経口投与後の尿中の bunitrolol は検出できなかったが, 同一の試料から抽出を行うと 5 mg/kg では尿中総放射能の 0.05%, 50 mg/kg では 0.25% が bunitrolol によるものであった。また, 5 mg/kg を静脈内投与したラットの 24 hr までの糞中には抽出しても bunitrolol は全く検出されなかった。

胆汁中への排泄率

5 mg/kg (17.6 μ mol/kg, 1.63 μ Ci/head) の ^{14}C -bunitrolol を静脈内に投与した 3 匹のラットの胆汁中に 24 hr で投与量の平均約 57% の総放射能が排泄された。投与後 24 hr までに採取した胆汁について, 尿と同様に TLC 用をいて代謝物の割合を検討すると, 胆汁中には bunitrolol は全く検出されず, わずかに 0—5% (平均 2.7%) の 4-hydroxybunitrolol の他はすべて原点付近に留まる C (Fig. 1a, 1b) の部分だけであった。胆汁を β -glucuronidase で処理し, 尿の場合と同様に抽出を行うと, 塩基性分画に 88.0%, 酸性

Chart 1. Probable Metabolic Pathway of Bunitrolol in Rats

これはマウスにおける代謝経路とほぼ同様である。¹⁵⁾ なお、代謝物のうち 4-hydroxybunitrolol は未変化体の 1/2—1/4 の β -受容体遮断作用を示すといわれている。¹⁶⁾

ラットにおける bunitrolol の代謝は, propranolol の場合¹⁷⁾ にくらべ acid 体が少なく, amino 体も検出されないの側鎖は代謝を受け難いと考えられる。一般に側鎖の N-dealkylation は N-demethylation よりも N-deisopropylation の方が困難であり,¹⁸⁾ N-*tert*-butyl 基の dealkylation はさらに困難とされている。¹⁹⁾ 側鎖に *tert*-butyl 基を有するいくつかの β -受容体遮断薬^{19b,20)} は、いずれも側鎖の代謝を受け難く、側鎖に isopropyl 基を有する propranolol や alprenolol²¹⁾ などの β -受容体遮断薬と異なる点と考えられる。

経口、静脈内いずれの投与方法でも、¹⁴C-bunitrolol を投与した後の血中の総放射能は bunitrolol の消失速度に比べきわめて緩慢に減少した。同様のことは propranolol でも観察されている。^{3,4)} Bunitrolol の場合は、投与後の初期を除けば血中総放射能の大部分は 4-hydroxybunitrolol の抱合体であるので、4-hydroxybunitrolol の抱合体の体外への排泄が遅いと考えられる。このことは、4-hydroxybunitrolol の抱合体の尿中排泄の半減期が血中の bunitrolol の半減期の約 6—7 倍であることから明らかである (Fig. 4)。胆汁中に排泄された 4-hydroxybunitrolol の抱合体が、そのまま吸収されて、あるいは加水分解された後吸収され再び抱合化を受けて、血中に現われることも抱合体の体外への排泄を遅らせる要因の 1 つと考えられる。また、¹⁴C-bunitrolol を静脈内に投与した後の血中 4-hydroxybunitrolol の半減期は 73 min で、bunitrolol の半減期の 48 min よりもやや遅いことから、4-hydroxybunitrolol の抱合化反応は bunitrolol の消失、即ち 4-hydroxybunitrolol の生成反応よりもわずかに遅いと考えられる。このことは、4-hydroxybunitrolol を静脈内に投与して得られる半減期が約 60 min であることによっても支持される。

以上のことより bunitrolol の水酸化反応と 4-hydroxybunitrolol の抱合化反応を比べると、水酸化反応の方がわずかに速い程度でほぼ同等の速さであるが、抱合体の排泄速度は水酸化反応や抱合化反応に比べ著しく遅いと結論できる。

Paterson ら³⁾ は、propranolol をヒトに経口投与すると、血中の propranolol と 4-hydroxypropranolol は

15) 鈴木徳治, 力久忠昭, 大塚峯三, 内藤一秋, 応用薬理, **15**, 1057 (1978).

16) W. Traunecker (C.H. Boehringer Sohn), 私信.

17) P.A. Bond, *Nature* (London), **213**, 721 (1967).

18) S.E. Mayer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **135**, 204 (1962); P.A. Bond, R. Howe, *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 1261 (1971).

19) a) J.J. Kamm, A. Szuna, R. Kuntzman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **182**, 507 (1972); b) S. Honma, A. Kambekawa, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **23**, 1045 (1975).

20) 中西美智夫, 加藤安之, 有馬徳行, 薬誌, **92**, 299 (1972); R. Hayashi, M. Okuda, T. Nakazawa, Y. Tanaka, Y. Shimoji, Y. Sato, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **23**, 1173 (1975).

21) N-C. Bodin, *Life Sci.*, **14**, 685 (1974).

いずれも投与後約 75 min で最高値に達し、その時の血中濃度はほぼ等しかったが、静脈内投与をした場合には血中に 4-hydroxypropranolol が全く検出されなかったと報告している。イヌ、サルにおいても経口あるいは門脈内投与の場合にのみ propranolol 濃度の 1/2—1/10 の 4-hydroxypropranolol が血中に検出されている。⁴⁾ この理由を Hayes ら⁴⁾ は、propranolol を経口あるいは門脈内に投与した場合は静脈内投与に比べ短時間内に多量の薬物が肝内に流入するため、主代謝経路が飽和して他の代謝経路である水酸化反応が顕著に認められるようになるか、あるいは 4-hydroxypropranolol の生成量が多いためにその消失過程、特に抱合化反応が飽和し、その結果 4-hydroxypropranolol が血中に検出されるようになったと推定している。

5.6 mg/kg の bunitrolol をラットの静脈に投与すると、血中に 4-hydroxybunitrolol が検出され、その濃度は投与後 15 min—2 hr の間では bunitrolol の約 5—9% であった (Fig. 2b)。

一方、50 mg/kg の bunitrolol を経口投与した場合、血中の 4-hydroxybunitrolol 濃度は投与後 15 min—2 hr で bunitrolol の約 25—33% であり (Fig. 2a)、投与経路の相違に基づく差は propranolol ほど顕著ではなかったが、経口投与の方が 4-hydroxybunitrolol の割合が多い結果を示した。しかし、Table III で示されるように、bunitrolol では 4-hydroxybunitrolol とその抱合体の尿中排泄率の和は投与量が異なるにもかかわらず静脈内投与と経口投与でほぼ同等の値を示した。また、他の代謝物の投与量に対する割合にも際立った変化は見られなかった。つまり、bunitrolol の経口投与においては 4-hydroxybunitrolol への代謝が静脈内投与に比べ目立って増加することは認めなかった。

Propranolol を経口投与した後 4-hydroxypropranolol の血中濃度が最高値を示す時点において、血中総代謝物濃度に対する 4-hydroxypropranolol 濃度の割合を文献値から計算すると、ヒトで約 2%,³⁾ イヌで約 4%,⁴⁾ サル⁴⁾ では約 0.1% となる。しかし、bunitrolol では経口投与後 15 min において血中総代謝物濃度に対する 4-hydroxybunitrolol 濃度の割合は約 18% であり、propranolol に比べかなり大きな値を示した。これは propranolol では投与量の 20—40% が acid 体に相当する代謝物である^{3,4,17)} ので 4-hydroxypropranolol は多くても 50% 位と推定されるのに対して、bunitrolol では、いずれの投与経路においても投与量の 90% 以上が 4-hydroxybunitrolol に代謝されるためと考えられる。また、同じ理由から bunitrolol を静脈内に投与した場合にも 4-hydroxybunitrolol が血中から検出され、投与経路による代謝物の相違が propranolol よりも目立たなくなったと推定できる。