

原 著

ラットにおける Doxapram hydrochloride の
代謝物に関する研究

武 田 隆 幸

信州大学医学部薬理学教室

STUDIES ON METABOLISM OF DOXAPRAM HYDROCHLORIDE
IN RATS

Takayuki TAKEDA

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Shinshu University

Key words: ドキサプラムハイドロクロライド (Doxapram hydrochloride), 1-エチル-4-(2-モルフォリノエチル)-3, 3-ジフェニル-2-ピロリディノンハイドロクロライド [1-ethyl-4-(2-morpholinoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone hydrochloride], 呼吸興奮剤 (Respiratory stimulant), 1-エチル-4-(2-N, N-ジヒドロオキシエチルアミノエチル)-3, 3-ジフェニル-2-ピロリディノン [1-ethyl-4-(2-N, N-dihydroxyethylaminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone], 1-エチル-4-(2-ヒドロオキシエチルアミノエチル)-3, 3-ジフェニル-2-ピロリディノン [1-ethyl-4-(2-hydroxyethylaminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone], 1-エチル-4-(2-アミノエチル)-3, 3-ジフェニル-2-ピロリディノン [1-ethyl-4-(2-aminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone].

緒 言

さきに著者はラットにおける 3-¹⁴C-Doxapram hydrochloride, 1-ethyl-4-(2-morpholinoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone hydrochloride (以下 Dop. HCl) の消化管吸収, 生体内分布, 尿, 糞中および胆汁中排泄について報告した¹⁾。しかしそれらはいずれも ¹⁴C の吸収, 分布, 排泄であって Dop. HCl の代謝物についての研究はなされていない。

そこで今回, Bruce ら²⁾, Pitts ら³⁾によってその化学構造が推定あるいは確認されている尿中, 胆汁中の Dop. HCl 代謝物およびこのほか 1 種の推定代謝物の 3 種類を合成し, ラット尿中, 胆汁中代謝物について同位体希釈法をもちい, その存在比と同定をおこなった。また同様の方法をもちいて血中および肝臓中の放射性物質のうち Dop. HCl の存在比を決定した。さらにこれら推定代謝物の数が少ないことを補うため, Dop. HCl 投与後の胆汁, 尿を各種条件下でベンゼン

分画をおこない, 血中肝臓中のベンゼン抽出物について Thin Layer Chromatography (以下 TLC) で分離し, 放射能の分布を検討した。さらに薬物の投与経路を変えたさいの尿中排泄率と尿中代謝物についての TLC 分離をあわせて検討した。

実験方法

1. 尿中, 胆汁中代謝物の採取

Wistar 系雄ラット (体重 200~300g) 5 匹に 3-¹⁴C-Dop. HCl (8.3 μ Ci/10mg) を 10mg/kg, 静脈内に投与し, 代謝ケージをもちいて尿, 糞を別々に採取した。採取は投薬後 24hrs までおこない, さらに 24hrs 後の採取と同時に Dop. HCl を同量投与し, ひきつづき 24hrs の尿を採取, この操作を 4 回 4 日間続け, 必要量の放射性尿中代謝物をえた。

2. 尿中, 胆汁中代謝物のベンゼン分画

上述の方法で採取した尿, 胆汁のそれぞれ 0.2ml を 3 本づつのバイアルにとり, Cellosolve scintillator 15

mlをくわえ、1N HCl 2滴をくわえて Packard Liquid Scintillation Counter (以下 LSC) にて放射能を測定した。尿、胆汁試料はそれぞれ6本づつの共栓付30mlの円筒フラスコに2mlづつとり、アルカリ加水分解群については図1に示すごとく、酸加水分解群については図2に示すごとく、ベンゼン分画をおこなった(図1, 図2)。抽出率は尿、胆汁2ml中の全放射

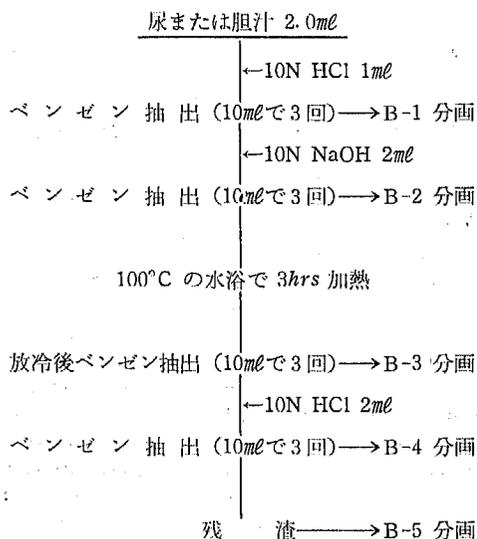


Fig. 1. Method of benzene partition with basic hydrolytic fractionation.

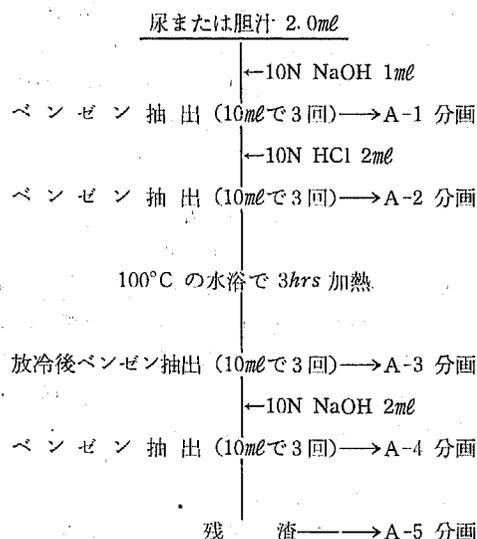


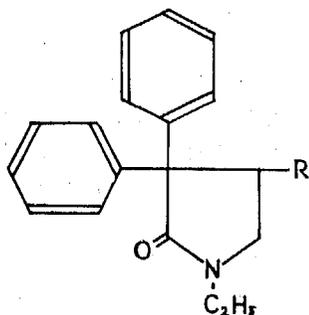
Fig. 2. Method of benzene partition with acidic hydrolytic fractionation.

能に対するベンゼン抽出された放射能の百分率でもとめた。各分画は Rotary vacuum evaporator をもちい、40°C で減圧濃縮して溶媒を除いたのち、最少量のベンゼンに溶かして、TLC プレートに全量をスポットし、99% エタノール (1-step), 酢酸エチル:アンモニア水=100:1 (2-step) で15~17cm展開した。溶媒を乾燥させたのち、原点より1cmづつかきとってバイアルに入れ、ベンゼン0.5mlをくわえて湿らせたのち、Cellosolve scintillator 15ml をくわえて放射能を測定し、原点から上端までの全放射能に対するそれぞれの位置の放射能分布を百分率で表わした。

3. 同位体希釈分析による Dop. HCl の尿、

胆汁中代謝物の分離、同定

実験法2. と同様の方法で採取した尿、胆汁について、尿は図1の B-2 分画まで抽出操作をおこない、胆汁は図1の B-2 分画まで抽出操作をおこなったのち図2の A-3, A-4 分画の抽出操作をおこなった。尿、胆汁中代謝物のそれぞれの分画は尿、胆汁ごとにまとめて40°C で減圧濃縮をおこなった。これらの抽出物は尿、胆汁ごとに4分し、それぞれに Dop. HCl, 代謝物-1 (以下 M-1), 代謝物-2 (以下 M-2), 代謝物-3 (以下 M-3), (図3) を20μgくわえ、クロロホルム-メタノール混液 (2:1) で総量10mlとし、そのうち0.1mlをバイアルにとり、Cellosolve Scintillator をくわえて LSC で測定した。別に0.1mlをとり Bruce ら²⁾の方法で酸化定量をおこない Benzophenone の249nmにおける吸光度に対する放射能を比放射能とした。つぎにさきに述べた Dop. HCl およびその代謝物を含むクロロホルム-メタノール混液 (2:1) を室温で減圧濃縮して乾固させ、最少量のクロロホルム-メタノール混液 (2:1) にとかし、Merck Silica gel H 0.5mm プレートに線状にスポットし、メタノール:アンモニア水=100:2 で分離し、それぞれ Dop. HCl, M-1, M-2, M-3 に相当する部分をかきとってクロロホルム-メタノール混液 (2:1) 20mlで抽出し、3000 rpm 5 min 遠心後上清0.1mlづつについて同様に放射能測定と化学定量をおこなった。以上の展開、抽出、測定の操作を Dop. HCl, M-1 を添加した試料については、展開溶媒を、(1) 酢酸エチル:アンモニア水=100:1, (2) エタノール, (3) エタノールと酢酸エチル:アンモニア水=100:1, (4) エタノールと酢酸エチル:氷酢酸=100:2の順に分離操作をおこなった。TLC 分離前に測定した比放射能に対するそれぞれの展開溶媒による分離後の比放射能の比は、



- (1) $R-CH_2-CH_2-N$ (morpholine ring)
- (2) $R-CH_2-CH_2-N \begin{cases} CH_2-CH_2-OH \\ CH_2-CH_2-OH \end{cases}$
- (3) $R-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-OH$
- (4) $R-CH_2-CH_2-NH_2$

- (1) Dop. HCl : 1-ethyl-4-(2-morpholinoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone
 (2) M-1 : 1-ethyl-4-(2-N, N-dihydroxyethylaminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone
 (3) M-2 : 1-ethyl-4-(2-hydroxyethylaminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone
 (4) M-3 : 1-ethyl-4-(2-aminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone

Fig. 3. Chemical structures of Dop. HCl and its metabolites.

次の計算式に示すごとく非放射性物質の添加が十分大きいさいに、総放射能中のそれぞれの物質に相当する放射性物質の存在比を表わしている。

$$\text{総放射能量 (dpm)} = T$$

T の a % が添加した目的物 B と同一物質放射性代謝物中 B と同一のもの m

m 以外の放射性物質 n

T に B を添加した後の比放射能 S_0

精製後の比放射能 S_1

とすると

$$S_0 = \frac{T}{B + m + n}$$

$$S_1 = T \times \frac{a}{100} \times \frac{1}{B + m}$$

$$\frac{S_1}{S_0} = \frac{a}{100} \left(\frac{B + m + n}{B + m} \right) = \frac{a}{100} \left(1 + \frac{n}{B + m} \right) = \frac{a}{100}$$

となり、添加量が 100 倍程度大きいさいは、1% のマイナス誤差で目的物の存在比が算出できる。

4. 肝および血中代謝物

Wistar 系雄ラットに $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl ($8.3\mu\text{Ci}/10\text{mg}$) を $10\text{mg}/\text{kg}$ 静脈内投与し、投与後 5min , 10min , 30min , 60min に腹部大動脈より採血し、同時に肝を採取した。肝は門脈より氷冷した生理食塩水で灌流してできる限り血液を除いた。血液 5ml に生理食塩水 10ml を加え、 $10\text{N HCl } 1\text{ml}$ を加えてベンゼン 15ml で 3 回抽出し、これを酸抽出分画とし、さらに水層に $10\text{N NaOH } 2\text{ml}$ を加えて同様に抽出しこれをアルカリ性抽出分画とした。また肝 5g に生理食塩水 5ml を加えて氷冷下にホモジナイズし、ホモジネート 2ml に $10\text{N HCl } 0.5\text{ml}$ を加え、ベンゼン 25ml で 3 回抽出し

これを肝の酸性抽出分画とした。さらに残りの水層に $10\text{N NaOH } 1\text{ml}$ を加え同様に抽出してこれを肝のアルカリ性抽出分画とした。それぞれの分画は 37°C で減圧濃縮乾固し、最少量のベンゼンにとかして Merck silica gel H 0.5mm プレートにスポットし、エタノールと酢酸エチル：アンモニア水 = $100:1$ で two step 展開をおこなった。展開溶媒を自然乾燥で除いたのち、原点より 1cm づつかきとり、バイアルに入れてエチルエーテル 1ml を加えて湿らせ、Cellosolve scintillator 15ml を加えて LSC で測定した。分布は、原点より上端までの総放射能に対する各 Rf 値部分の放射能の百分率で示した。

5. 血液中、肝臓中の Dop. HCl 未変化体の

同位体希釈法による分析

Wistar 系雄ラット (300g 前後) に $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl ($8.3\mu\text{Ci}/10\text{mg}$) を $20\text{mg}/\text{kg}$ 静脈内投与し、 5min , 30min , 60min , 240min 後に腹部大動脈より採血し、同時に肝を摘出した。肝は門脈より氷冷生理食塩水で灌流したのち摘出した。血液 5ml を 100ml の分液ロートにとり、蒸留水 5ml を加えて溶血させ、 10N NaOH を 2.5ml 、Dop. HCl 水溶液 ($20\text{mg}/\text{ml}$) を 1ml 加えてよく混合しベンゼン 20ml で 3 回抽出した。また肝 5g に生理食塩水 5ml を加え、Dop. HCl の水溶液 ($30\text{mg}/\text{ml}$) を 1ml 加えてホモジナイズし、これを 100ml の分液ロートに移して $10\text{N NaOH } 2.5\text{ml}$ を加えベンゼン 20ml で 3 回抽出した。それぞれの抽出液 0.1ml をバイアルにとり Cellosolve scintillator 15ml を加えて放射能を LSC で測定した。また別の 0.1ml については、Bruce ら²⁾の酸化法で定量し比放射能をもとめ

た。比放射能の測定にもちいた残りのベンゼン抽出液は 37°C で減圧乾固し、最少量のベンゼンに溶かして Merck silica gel H 0.5mm プレートにスポットし、(1) 酢酸エチル：アンモニア水=100：1、(2) 酢酸エチル：氷酢酸=100：1 とエタノールの two step 展開、(3) メタノール：アンモニア水=100：2、(4) エタノールと酢酸エチル：アンモニア水=100：1 の two step 展開の順にそれぞれ順次展開溶媒を変えて分離をおこない、そのつど Dop. HCl に相当する部分をかきとって 30ml の円筒フラスコに入れ、クロロホルム-メタノール混液 (2：1) 10ml で 3 回抽出し、その 0.1ml づつを放射能と Bruce ら²⁾の酸化法の定量に供して比放射能をもとめ展開前の比放射能に対する比を求めた。この展開、抽出、比放射能の測定は比放射能がほぼ一定になるまで展開溶媒を変えてくり返されるが今回の実験においては (1)~(4) で一定となった。Dop. HCl 未変化体の存在百分率は尿、胆汁中の代謝物と同様の計算方法で算出された。

6. 投与方法による尿中代謝物の相違

Wistar 系雄ラット (体重 300g 前後) に 3-¹⁴C-Dop. HCl (8.3μCi/10mg) を 100mg/kg 腹腔内に、また 20mg/kg を静脈内に投与して、24hrs、48hrs 後の尿を代謝ケージをもちいて採取した。それぞれの尿は蒸留水で一定量にし、その 0.5ml をバイアルにとって Cellosolve scintillator 15ml を加え LSC で測定した。さらにこの尿を 37°C で減圧濃縮し 5ml にした。これに 10N NaOH 2.5ml を加え 20ml のベンゼンで 3 回抽出した。抽出液は 37°C で減圧乾固し、最少量のベンゼンに溶かして Merck silica gel H 0.5mm プレートにスポットし、エタノールと酢酸エチル：アンモニア水=100：2 の two step 展開をおこなった。原点より 1cm づつかきとりそれぞれにクロロホルム-メタノール混液 (2：1) を 2ml 加えて抽出し、抽出液 1.0ml をバイアルにとって室温で溶媒を乾固させたのち、Cellosolve scintillator 15ml を加えて LSC で測定した。また抽出液の残り 0.5ml は Bruce ら²⁾の方法により 5% KMnO₄ で酸化し iso-Octane 層 3ml のうち 0.5ml について放射能を測定し、iso-Octane 層の残り 2.5ml は 249nm における吸光度を測定した。

成 績

1. 尿、胆汁中代謝物のベンゼン分画

ラットに 3-¹⁴C-Dop. HCl を 10mg/kg 静脈内投与したのち、24hrs まで採取した尿および胆汁中の放射性

代謝物について酸性、およびアルカリ性で加水分解をおこない図 1、図 2 の方法でベンゼン分画をおこなったさいの尿、胆汁中総放射能に対するそれぞれの分画中の放射能百分率を表 1-a、表 1-b に示した (表 1-a、表 1-b)。尿中代謝物については、酸性抽出後アルカリ性で抽出をおこなうと、あわせて 80% 以上の放射性代謝物が抽出されるが、さきにアルカリ性で抽出したのち酸性で抽出をおこなった場合は、あわせて 60% の抽出率にすぎなかった。胆汁についても同様の傾向があったが抽出率の差は数%にすぎなかった。加水分解後の抽出は尿中代謝物については酸、アルカリ性いずれの加水分解においても抽出率は数%であったが、胆汁中代謝物については酸加水分解後アルカリ性で抽出をおこなうと 22% の代謝物が抽出された。以上の結果

Table 1. Radio activity of benzene partition of metabolites in urine and bile collected for 24hrs after intravenous administration of 10mg/kg of 3-¹⁴C-Dop. HCl in rats. (Recovery percent)

	Bile	Urine
Acidic extraction	12.87	7.36
Basic extraction	25.83	73.15
Basic hydrolysis basic extraction	0.31	4.57
Basic hydrolysis acidic extraction	1.23	0.70
Residue	37.75	14.51
Total recovery (percent)	77.99	100.29

Table 2. Radio activity of benzene partition of metabolites in urine and bile collected for 24hrs after intravenous administration of 10mg/kg of 3-¹⁴C-Dop. HCl in rats. (Recovery percent)

	Bile	Urine
Basic extraction	21.79	57.30
Acidic extraction	10.29	5.21
Acidic hydrolysis acidic extraction	1.04	0.44
Acidic hydrolysis basic extraction	21.84	2.99
Residue	20.57	13.23
Total recovery (percent)	75.53	79.17

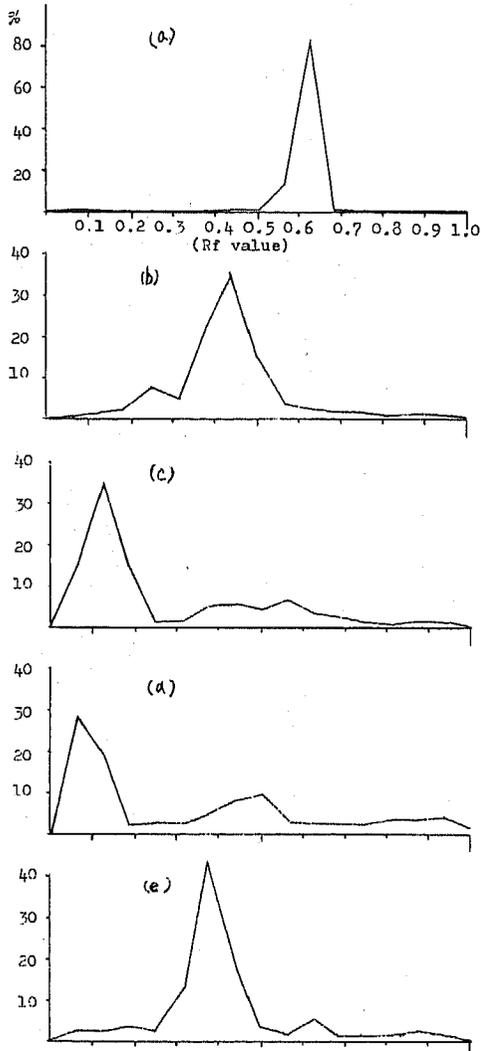


Fig. 4-a. Benzene partition with basic hydrolytic fractionation and thin layer chromatographic separation of metabolites in bile collected for 24hrs after intravenous administration of 10mg/kg of 3-¹⁴C-Dop. HCl in rats.

- (a) Standard (3-¹⁴C-Dop. HCl)
- (b) B-1 fraction (acidic extraction).
Recovery=12.87%
- (c) B-2 fraction (basic extraction).
Recovery=25.83%
- (d) B-3 fraction (basic hydrolysis and extraction).
Recovery=0.303%
- (e) B-4 fraction (basic hydrolysis and acidic extraction). Recovery=1.233%

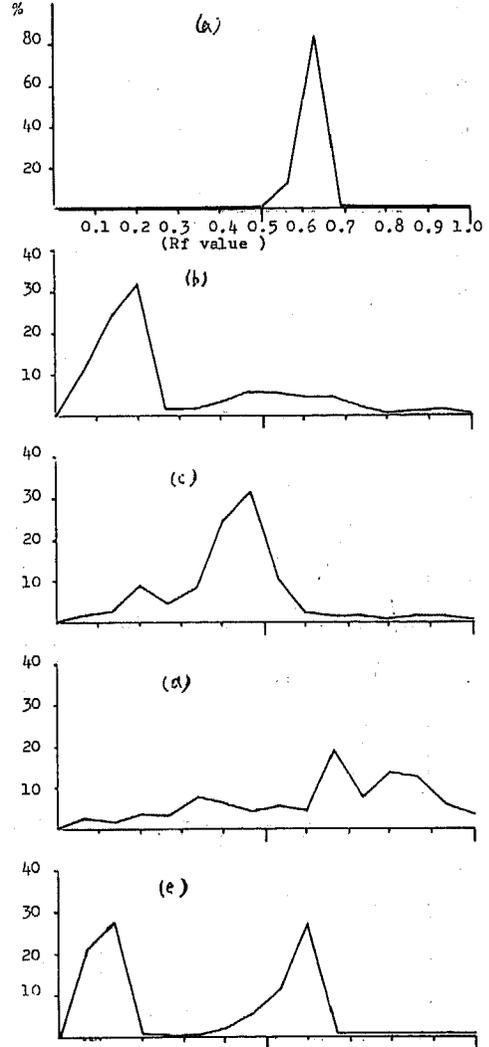


Fig. 4-b. Benzene partition with acidic hydrolytic fractionation and thin layer chromatographic separation of metabolites in bile collected for 24hrs after intravenous administration of 10mg/kg of 3-¹⁴C-Dop. HCl in rats.

- (a) Standard (3-¹⁴C-Dop. HCl)
- (b) A-1 fraction (basic extraction).
Recovery=21.79%
- (c) A-2 fraction (acidic extraction).
Recovery=10.29%
- (d) A-3 fraction (acidic hydrolysis and extraction).
Recovery=1.036%
- (e) A-4 fraction (acidic hydrolysis and basic extraction). Recovery=21.84%

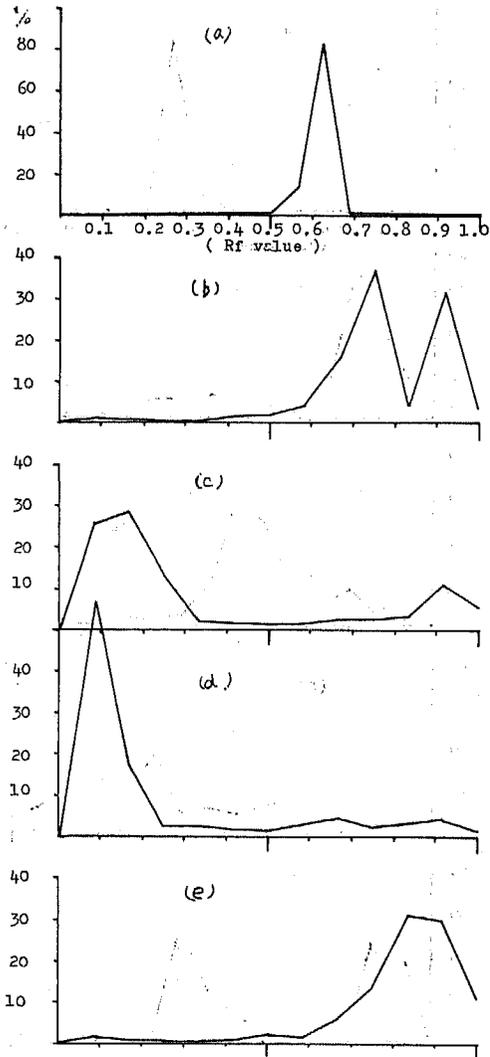


Fig. 5-a. Benzene partition with basic hydrolytic fractionation and thin layer chromatographic separation of metabolites in urine collected for 24hrs. after intravenous administration of $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl in rats.

- (a) Standard ($3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl)
- (b) B-1 fraction (acidic extraction). Recovery=7.35%
- (c) B-2 fraction (basic extraction). Recovery=73.15%
- (d) B-3 fraction (basic hydrolysis and extraction). Recovery=4.571%
- (e) B-4 fraction (basic hydrolysis and acidic extraction). Recovery=0.695%

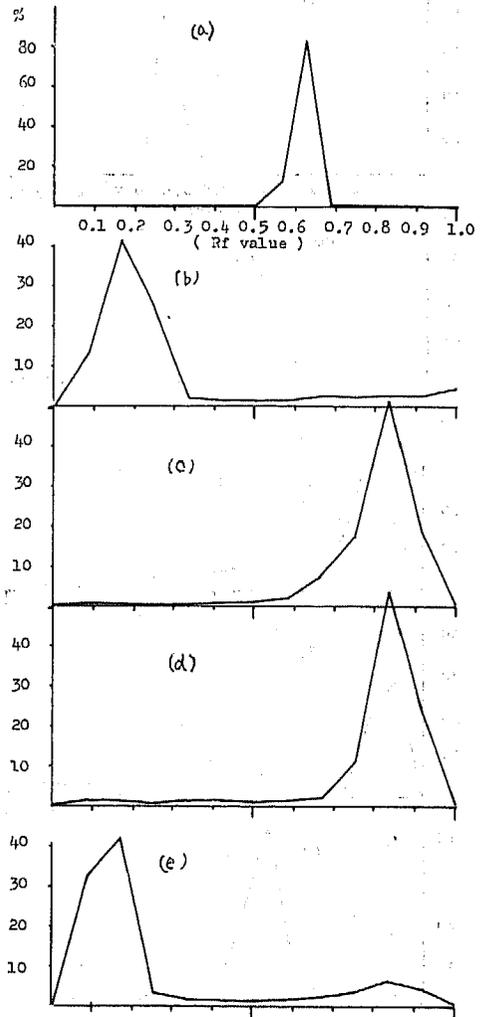


Fig. 5-b. Benzene partition with acidic hydrolytic fractionation and thin layer chromatographic separation of metabolites in urine collected for 24hrs. after intravenous administration of $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl in rats.

- (a) Standard ($3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl)
- (b) A-1 fraction (basic extraction). Recovery=57.30%
- (c) A-2 fraction (acidic extraction). Recovery=5.205%
- (d) A-3 fraction (acidic hydrolysis and extraction). Recovery=0.443%
- (e) A-4 fraction (acidic hydrolysis and basic extraction). Recovery=2.986%

により、尿中代謝物に関しては、酸性抽出後アルカリ性で抽出をおこなえば80%以上の放射性代謝物が回収され、また胆汁中代謝物に関しては酸性抽出後アルカリ性抽出をおこない、さらに酸加水分解後アルカリ性で抽出をおこなうと、あわせて60%の放射性代謝物が回収された。

2. 尿, 胆汁中代謝物の TLC 分離

Dop. HCl 投与後の尿, 胆汁中代謝物について酸, アルカリ加水分解, ベンゼン抽出をおこなったそれぞれの分画を TLC で分離し, 放射能の分布をもとめた成績を図4-a, b, 図5-a, bに示した(図4-a, b, 図5-a, b)。尿, 胆汁中のいずれの代謝物についてもアルカリ性で抽出される代謝物はM-2, M-3のRf値に相当するRf値の部分に, 酸性で抽出される代謝物はDop. HCl, M-1のRf値に相当するRf値部分の付近に分布した。Dop. HClに一致するRf値の部分への放射能の分布は, 胆汁についてのベンゼン分画のB-4分画(図2)にのみみとめられた。尿, 胆汁中代謝物を TLC で分離後放射能分布のパターンはアルカリ性抽出物ではほとんど違いがなく, 酸性抽出物については尿中代謝物の分画でDop. HClのRf値より大きいRf値の部分に放射能の分布がみとめられたのに対し, 胆汁中代謝物ではDop. HClのRf値より小さいRf値の部分に放射能の分布がみられた。同位体希釈分析法によって求めたラット尿, 胆汁中の酸性およびアルカリ性抽出物中の総放射性代謝物のうち, Dop. HCl, M-1, M-2, M-3に由来する放射能の百分率を表3に示した(表3)。尿, 胆汁中のいずれの代謝物についてもM-2が最も多く60~70%存在し, ついでM-3が多く20~30%であった。未変化のDop. HClとM-1は尿中に数%存在したが, 胆汁中にはほとんどみとめられなかった。この実験にもちいた抽出方法では尿, 胆汁中代謝物の総放射能のうち, それぞ

れ80%, 60%が抽出されているので, したがって尿中にM-2は48%, M-3は24%, 胆汁中にM-2は36%, M-3は12%存在する。

3. 血中, 肝臓中代謝物

$3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl を静脈内投与した後, 5min, 10min, 30min, 60minの血液中および肝臓中放射性代謝物について酸およびアルカリ性でベンゼン抽出をおこない, それぞれの抽出物についてのTLC分離後の放射能の分布を図6, 図7に示した(図6, 図7)。血中の放射性代謝物についての経時的研究において, アルカリ性抽出でDop. HCl投与後5min, 10min, の血液では, 90%以上の放射能が抽出され, 30min, 60minにおいては抽出率は低下したが60min後でも60%抽出できた。血中放射性物質の酸性における抽出率はDop. HCl投与後5min, 10minでは数%であったものが30min以後の血液では20%前後抽出された。以上酸, アルカリ性抽出率をあわせるとDop. HCl投与後のいずれの時間においても80~100%となった。抽出率は投与後の時間経過とともに減少した。また代謝物のTLC分離後の放射能の分布は, アルカリ性抽出ではDop. HCl投与後10minまでは代謝物に相当するRf値の部分への放射能分布はほとんどなかったが, 30minでM-2, M-3のRf値に相当する部位の放射能とDop. HClのRf値に相当する部位の放射能比はほぼ1:1となり, 以後60minでは同比は2:1となった。つまり抽出率の低下と放射性代謝物の増加は相関していた。酸性における抽出物については, Dop. HCl投与後10minまではDop. HClのRf値の部分に放射能が分布していたが30min以後はM-1とDop. HClのRf値の中間の部位に放射能が分布していた。

肝臓中代謝物に関しては抽出率は求めなかったがTLC分離ではアルカリ性抽出物についてDop. HCl投与後5minでもM-2, M-3のRf値に相当する部位に放射能の分布がみとめられ, 30min, 60min後ではDop. HClのRf値に相当する部位にほとんど放射能の分布がみとめられなかった。また酸性における抽出物についてのTLC分離でも, Dop. HCl投与後10minまではDop. HClのRf値に相当する部位にわずかに放射能の分布があるのみで, 30min以後はDop. HClよりRf値の大きい部位に大部分の放射能が分布していた。

4. 血液中, 肝臓中の未変化体の定量

Dop. HCl投与後5~240minまでの血液中および肝

Table 3. Determination of Dop. HCl and its metabolites by isotope dilution method in urine and bile collected for 24hrs after intravenous administration of 10 mg/kg of $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl in rats.

	Urine (%)	Bile (%)
Dop. HCl	7.37	1.67
M-1	6.17	1.68
M-2	66.32	58.31
M-3	31.33	19.90

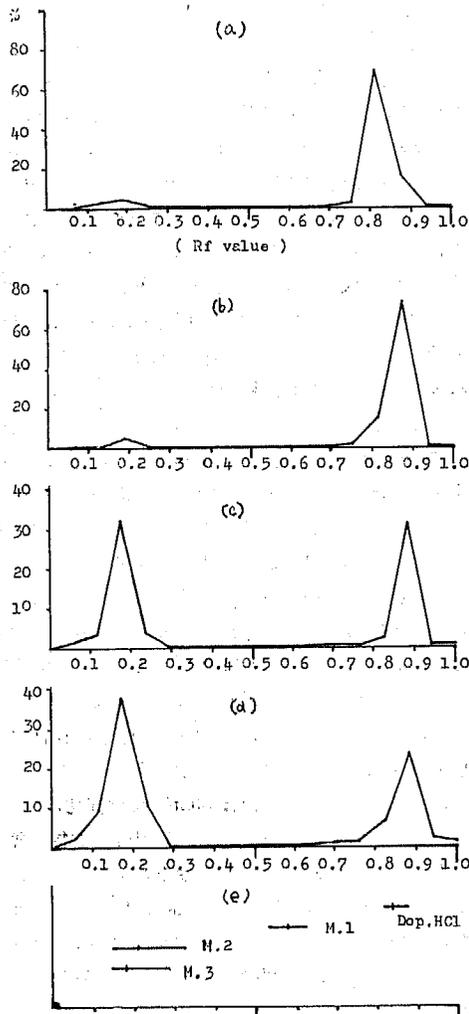


Fig. 6. Benzene extraction in basic and thin layer chromatographic separation of radio active materials in blood collected at various times after intravenous administration of 10mg/kg of 3-¹⁴C-Dop. HCl in rats.

- (a) 5min after. Recovery=95.96%
- (b) 10min after. Recovery=90.15%
- (c) 30min after. Recovery=73.36%
- (d) 60min after. Recovery=60.72%
- (e) Spots of standard substance

臓中の放射性代謝物のうち、Dop. HCl に由来するものの百分率を図8に示した(図8)。血中放射性代謝物のうち Dop. HCl 投与後 5min では95%が Dop.

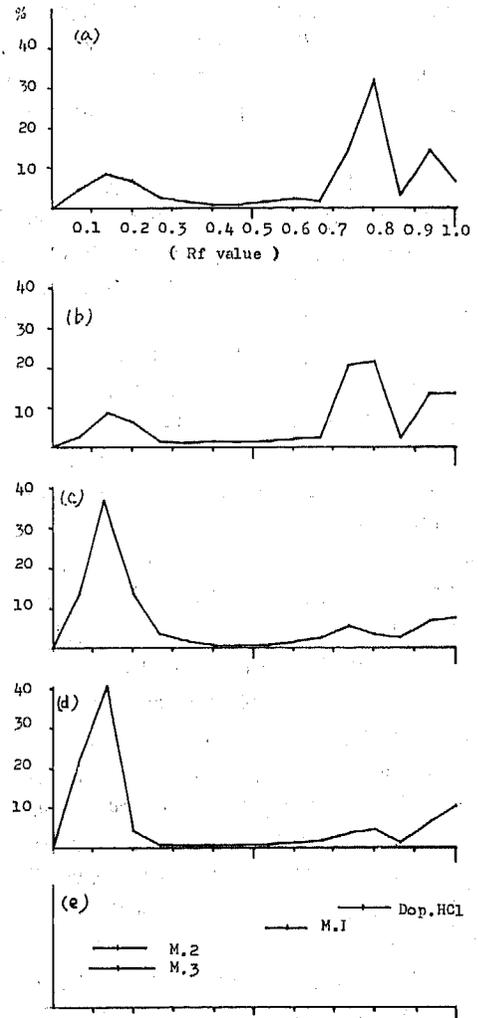


Fig. 7. Benzene extraction in basic and thin layer chromatographic separation of radio active materials in liver collected at various time after intravenous administration of 10mg/kg of 3-¹⁴C-Dop. HCl in rats.

- (a) 5min after
- (b) 10min after
- (c) 30min after
- (d) 60min after
- (e) Spots of standard substance

HCl そのものであったが 30min では40%程度となり、60min で35%、240min では10%前後となった。また肝臓中の放射性代謝物については Dop. HCl 投与後 5

min でも Dop. HCl そのものは20%しかなく、30min 以後は5%~1%となった。血液中の Dop. HCl そのものの量は呼吸興奮作用の持続とみかけ上よく一致していた。

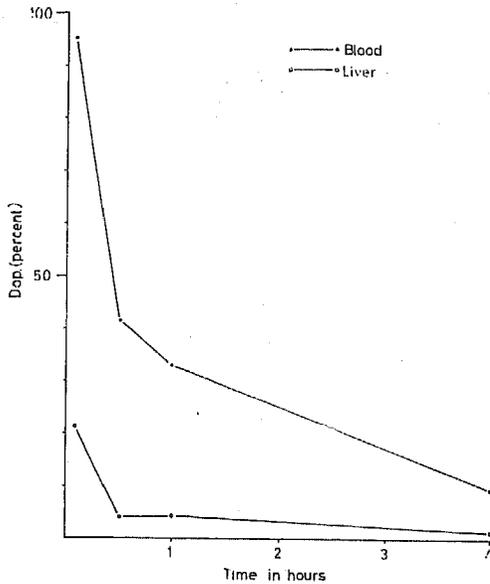


Fig. 8. Determination of Dop. HCl by radio isotope dilution method in blood and liver collected at various times after intravenous administration of 10mg/kg of $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Dop. HCl in rats.

5. 投与経路による差異

Dop. HCl を腹腔内あるいは静脈内に投与したさいの尿中代謝物について、アルカリ性でベンゼン抽出をおこなった抽出物を TLC で分離し、各 Rf 値の部位に分布する代謝物を、1. 放射能、2. Bruce ら²⁾の化学的定量法による iso-Octane 抽出層 (Dop. HCl 由来の物質は $\text{C}_6\text{H}_5\text{-}^{14}\text{CO-C}_6\text{H}_5$ となっている。)の放射能、3. 2. の Benzophenone の 249nm における吸光度を測定した (図 9)。腹腔内、静脈内いずれの投与によっても尿中代謝物は、TLC 分離後の放射能の分布について、さきの 1. 2. 3. いずれの方法で測定してもほぼ同一のパターンを示した。つまり代謝物についてアルカリ性抽出できる放射能は大部分が $\text{C}_6\text{H}_5\text{-C-C}_6\text{H}_5$ の構造を有していることが明らかとなった。ただアルカリ性抽出物質では、腹腔内投与で Rf 値 0.9 付近に放射能の分布がみとめられるのに対し、静脈内投与ではこの部分に分布がみとめられなかった。Rf

値 0.3~0.4 付近の部位の放射能分布については腹腔内、静脈内いずれの投与後の代謝物にも違いがなく、この部位に大部分の放射能が分布していた。

Dop. HCl の腹腔内、静脈内投与後 24hrs, 48hrs の尿中排泄率を表 4 に示した (表 4)。24hrs までの排泄率はいずれの投与でも 35%前後で違いはなかったが、24~48hrs までの排泄率は腹腔内投与で 6.46%に対し、静脈内投与では 1.16%であった。

Table 4. Urinary excretion of Dop. HCl for 24hrs and 48hrs after intraperitoneal and intravenous administration.

	Excretion percent		
	24hrs	48hrs	Total
I. P.	35.68	6.46	42.14
I. V.	33.95	1.16	35.11

考 察

Dop. HCl 投与後の尿中代謝物についてベンゼンによる抽出率の検討をおこなった結果、アルカリ性で抽出したのち酸性で抽出した場合 (図 2 A-1, A-2 分画) よりも酸性で抽出したのちアルカリ性で抽出した場合 (図 1 B-1, B-2 分画) の方が抽出率が良好で、20%もの差があった。このことは抱合をうけて抽出されにくくなった代謝物が、酸性で抽出中に加水分解をうけて抽出されたものと思われる。

一方、胆汁中代謝物については当然多量の抱合体の存在が予想されるが、さきの A-1, A-2 分画と B-1, B-2 分画のそれぞれの分画をあわせたものについての抽出率の差は数%であった。しかし酸加水分解後アルカリ性で抽出をおこなうとさらに抽出率が22%増加したことから、胆汁中代謝物は尿中代謝物にくらべ加水分解されにくいことが推測される。この抱合体の違いについては検討をおこなっていない。いずれにしても Dop. HCl の代謝物を化学的に定量する場合、アルカリ性抽出のみでは尿で60%、胆汁では20%しか抽出されず、加水分解などの抽出法をあわせてもちいても、尿では85%、胆汁では60%が回収されるのみであった。

図 1, 図 2 に示した胆汁の各分画についての TLC 分離の結果、A-4 分画については放射能の10%程度が Dop. HCl の Rf 値の部位に分布している [図 4-b (e)] が同位体希釈分析の結果 (表 3) では、胆汁中代謝物に Dop. HCl はほとんど存在しないことが明らか

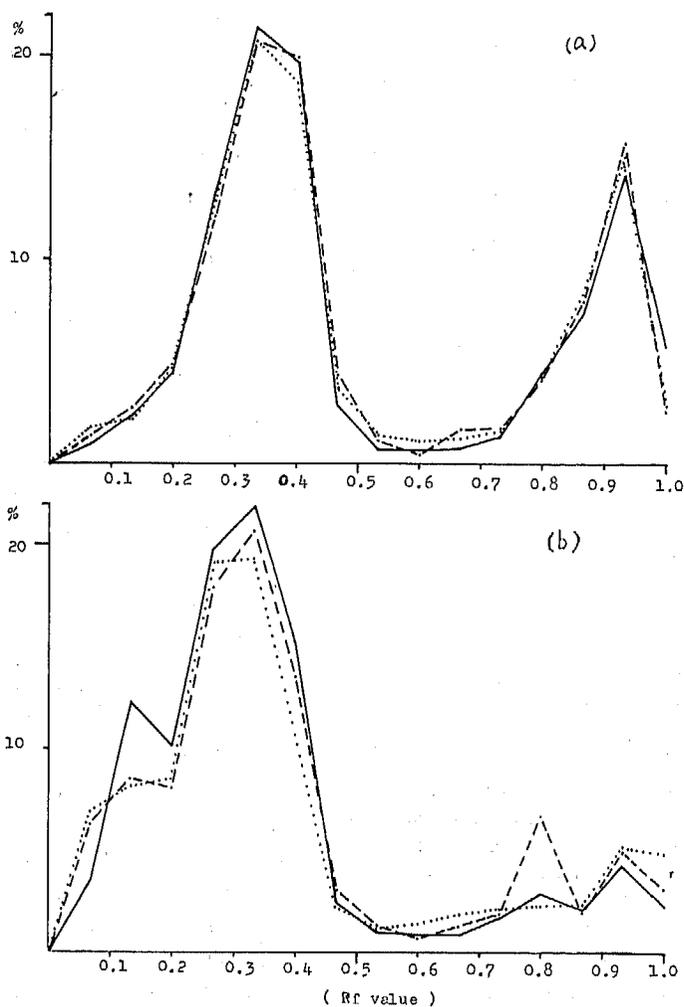


Fig. 9. Thin layer chromatographic separation of metabolites in urine collected for 24hrs after intravenous and intraperitoneal administration of 10mg/kg of 3-¹⁴C-Dop. HCl in rats.

(a) Intraperitoneal administration (100mg/kg)

(b) Intravenous administration (20mg/kg)

- Radio activity of substance extracted with benzene.
- - - Radio activity of substance extracted with iso-octane.
- Absorption at 249nm of substance extracted with iso-octane.

かとなった。したがって胆汁中代謝物には加水分解後, Dop. HCl と同一の Rf 値をもつ代謝物が含まれていることを意味するがこの Rf 値は展開溶媒にエタノールと酢酸エチル:アンモニア水=100:2 の two step 展開でえられたものであって, 同位体希釈分析にもちいた一連の展開溶媒でこの代謝物は Dop. HCl と分離できたことになる。

同位体希釈分析の結果, ラット尿中のベンゼン抽出できる代謝物 (80%) のうち Dop. HCl, M-1, M-2, M-3 に由来する放射能百分率は表 3 に示したごとくであるが, Bruce ら²⁾および Pitts ら³⁾がおこなった Dop. HCl 投与後の犬の尿中代謝物のうち, M-2 が 50%, M-3 が 30%存在するという成績に比較的近い値を示している。

胆汁中代謝物についての同位体希釈分析の結果では、尿中代謝物に比べて M-2, M-3 の全代謝物に対する存在比は低いが、M-2 : M-3 の比はほぼ同様の傾向を示している。Bruce らおよび Pitts らは犬における Dop. HCl の胆汁中代謝物についても尿とほぼ同様の結果であるとしているが詳しい実験はおこなっていないようである。さらに Pitts ら⁹⁾による高速イオン交換液体クロマトグラフィーの成績においては、Dop. HCl の犬の尿中代謝物において M-1 の存在を否定しているが、著者の成績では 6% 存在している。同位体希釈分析法の定量限界は分離の程度にあり、微量の高比放射能物質の混入は大きなプラス誤差を与える。したがってこゝに求めた推定代謝物の存在百分率の値は、さらに高度な分離法をもちいれば小さくなる可能性を含んでいる。いずれにしても TLC 分離後の放射能分布の傾向と同位体希釈分析の成績とはほぼ一致した。

Dop. HCl 投与後一定時間に血液および肝臓をとり、これらに含まれる Dop. HCl の代謝物について研究をおこなった実験では、同位体希釈分析による Dop. HCl の血中、肝臓中未変化体の全放射能に対する百分率は投与後の時間経過とともに急激に減少していた。さきに著者が報告した¹⁾ごとく Dop. HCl 10mg/kg を静脈内投与すると 15sec 後には 100 μ g/ml の濃度に相当する放射能が血中にみとめられたが、以後速やかに血中から消失し、5min 後には 20 μ g/ml となり、さらに 60min 後には 2 μ g/ml まで低下していた。これらの値はあくまでも放射能量から換算したものである。今回の実験で Dop. HCl 投与後 5min の Dop. HCl の血中濃度 20 μ g/ml は 95% が Dop. HCl そのものであるが 60min における 2 μ g/ml という濃度のうち Dop. HCl としてはその 30% にすぎないことが明らかとなった。また Dop. HCl 投与後 5~15min までは血中の放射能レベルはほぼ一定しているが Dop. HCl としては 95% から 30% に低下している。以上 Dop. HCl の血中未変化体の減少についての成績は Dop. HCl の呼吸興奮作用が一過性であるという内藤ら⁹⁾の一般薬理実験の成績にみかけ上よく一致する。このことは言いかえれば Dop. HCl の代謝物には呼吸興奮作用がほとんどないことを推測させる。肝臓中代謝物については図 8 に示したごとく、Dop. HCl の存在比は Dop. HCl 投与後 5min でも 20% と低く、30min 以後は 5% 以下となった。さきに著者が報告した成績¹⁾で、Dop. HCl の生体内分布は、Dop. HCl 投与後 15~60

min までは肝臓中の放射能レベルはほとんど低下せず、高い値を示していたが、このうち Dop. HCl としては 5% 以下で、ほとんどがその代謝物として分布していたことが明らかとなった。

Dop. HCl を腹腔内および静脈内に投与したさいの尿中排泄率と尿中代謝物について検討した成績では 24hrs までの排泄率がほぼ等しいのに 24~48hrs までの排泄率に 5 倍の差があった。もっとも 24~48hrs の排泄率は 24hrs までの排泄率に比べてわずかであった。TLC による Dop. HCl の代謝物の分離についても、腹腔内投与後の代謝物では Dop. HCl の Rf 値に相当する部位にかなりの放射能分布をもつが、静脈内投与ではこの部分に放射能分布がみられない。このように Dop. HCl を腹腔内と静脈内に投与したさい、尿中排泄率ならびに代謝物にわずかの違いがみられたが、投与量の相違もあり、その原因は明らかではない。

総 括

呼吸興奮剤 Doxapram (以下 Dop. HCl) のラットにおける代謝を検討する目的で、尿中、胆汁中、血液中、肝臓中代謝物について検討した。

1. Dop. HCl 投与後の尿中ならびに胆汁中代謝物の抽出については、著者が今回検討した抽出条件によれば、尿で 80%、胆汁で 60% の放射性代謝物が抽出された。
2. Dop. HCl 投与後の尿中、胆汁中代謝物としては、1-ethyl-4-(2-hydroxyethylaminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone が最も多く、尿中の総放射性代謝物の 48%、胆汁中の総放射性代謝物の 36% を占め、ついで 1-ethyl-4-(2-aminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone が多く、尿中に 24%、胆汁中に 12% 存在した。Dop. HCl および 1-ethyl-4-(2-N, N-dihydroxyethylaminoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone は数% 存在したのみであった。
3. Dop. HCl 投与後一定時間における血中未変化体の同位体希釈分析の成績では、Dop. HCl 投与後 5min で 95%、30min で 42%、60min で 33%、240min で 10% の未変化体が存在した。
4. Dop. HCl 投与後一定時間における肝臓中未変化体の同位体希釈分析の成績では、Dop. HCl 投与後 5min で 21%、30min で 4.3%、60min で 4.7%、240min で 1.4% の未変化体が存在した。
5. Dop. HCl の腹腔内および静脈内投与後、尿中

への排泄率は48hrsまでに腹腔内投与で42.1%, 静脈内投与で35.1%が排泄された。また尿中代謝物のTLC分離後の放射能分布ではRf値0.9付近の分布に違いがみられた。

文 献

- 1) 武田隆幸：ラットにおける $3\text{-}^{14}\text{C}$ -doxapram hydrochlorideの吸収, 分布, 排泄, 信州医誌, 21 : 227-237, 1973
- 3) Bruce, R. B., Pitts, J. E., Pinchbeck, F. and Newman, J. : Excretion, distribution and metabolism of doxapram hydrochloride, J. med. Chem. 8 : 157-164, 1965
- 3) Pitts, J. E., Bruce, R. B. and Forehand, J. B. : Identification of doxapram metabolites using high pressure ion exchange chromatography and mass spectroscopy, Xenobiotica, 3 : 73-83, 1973
- 5) 久我哲郎, 内藤 惇 : 1-Ethyl-4-(2-morpholinoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone hydrochloride (Doxapram) の薬理作用, 日薬理誌, 69:701-710, 1973
- 5) 内藤 惇, 東 洋, 佐々木忠治, 小野里正昭, 玉置博司 : Doxapramの一般薬理作用知見補遺, 日薬理誌, 69 : 789-799, 1973

(1973. 12. 10 受稿)