

## Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride の基礎的検討 第5報

## Thiamphenicol glycinate hydrochloride の代謝産物

堤 淳三・藤田 孟・河部 靖・金沢 保・山本伸郎

エーザイ株式会社研究本部薬理研究所

金 政 泰 弘

岡山大学医学部微生物学教室

(昭和 44 年 4 月 17 日受付)

Chloramphenicol (CP) の吸収, 排泄, 代謝産物については広範囲に研究<sup>1-4)</sup>されており, 特に代謝産物は動物の種差によつて左右されることがわかっている。すなわち, ヒトの場合ではほとんどが不活性の glucuronide として尿中に排泄されることが確認されている。

Thiamphenicol (TP) の吸収, 排泄, 代謝については MC CHESNEY ら<sup>5)</sup>, LAPLASSOTTE ら<sup>6)</sup>により精査され, 代謝産物は CP の場合と異なりヒト, イヌでは尿中に投与量の 50~80% が未変化の TP の型で排泄され, その他は glucuronide, および TP から脱アシル化した amine の型に変化していることが知られている。

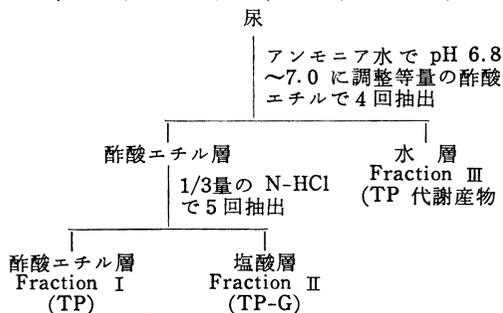
Thiamphenicol glycinate hydrochloride (TP-G) は体内エステラーゼによつて加水分解をうけ TP に解離すること<sup>7,8)</sup>は明らかであり, 従つて TP-G を非経口的に投与した場合も TP 投与時の代謝産物<sup>14)</sup>と変りないことは推定できる。また, このことは TP-G をヒトに筋注射した場合の尿中排泄量を著者ら<sup>8)</sup>が検討した際, その 67.6% が TP の型として排泄されることによつても確認している。

本報ではさらにヒト以外の動物に投与したときの尿中代謝物につき検討を加えた。

## I. 実験方法

体重  $2.8 \pm 0.2$  kg のウサギ (♂) 20 羽に TP-G 100

表 1 TP-G 投与時の尿中代謝物の分離法  
(ウサギ, 100 mg/kg (TP eq.) i. v. 投与)



mg/kg (TP としての換算値) を耳静脈に投与し, 48 時間目までの尿を集め全尿量として 4,840 ml を得た。この尿から表 1 に示す方法に従つて尿中の TP, 未変化の TP-G および TP 代謝物の分離確認を試みた。

## 1. Fraction I の検討

表 1 に示した酢酸エチル層 (Fraction I) を減圧下, 60 °C で溶媒を留去すると褐色の固形物が残留した。このものの一部をとり少量の水に溶かし Kieselgel G を吸着剤とし展開剤には酢酸:n-ブタノール水 (1:4:5) を用いて薄層クロマトグラフィー (TLC) を行なつた。

ところが main spot が確認試験で TP のそれと一致したため, 前記固形物を 5 回酢酸エチルから再結晶した結果, 白色針状結晶を得た。

## 2. Fraction II の検討

TP-G は LANZA<sup>9)</sup>, CONCILIO ら<sup>7)</sup>をはじめ著者ら<sup>10)</sup>も報告したように溶液の状態では不安定で容易に加水分解をうけて TP となることが確認されているため, Fraction II はできるだけ緩和な条件を保つため凍結乾燥を行なつた。このものを Kieselgel G を吸着剤とし, 展開溶媒には酢酸:n-ブタノール:水 (1:4:5) を用いて Preparative TLC を行ない, UV ランプで薄層板上の各 band を確認して切りとりベンゼン:メタノール:水 (5:5:2) 混液で溶出し, TP の化学的定量法<sup>11)</sup>を応用して発色した band を濃縮し Fraction II に含有していると推定できる TP-G の同定を試みた。

## 3. Fraction III の検討

Fraction III の水層をアンモニア水で pH 7.0 に調整, 吸着剤として Dowex 1-X 2 を使用, クロマトグラフィーを行なう。次いで洗液が無色になるまで水洗してから N-HCl を流して吸着物質を充分溶出させ, この酸性溶出液を再びアンモニア水で pH 7.0 に調整, Amberlite IRA-411 を吸着剤としてクロマトグラフィーにかける。水, N-HCl で洗浄してから N-HCl:メタノール (44:500) で溶出させた。

この酸性液をアンモニア水で pH 7.0 に調整後濃縮

し, Kieselgel H を吸着剤とし水飽和ブタノール:酢酸 (15:1) を展開剤として Preparative TLC を実施した。

UV ランプで確認した原点に近い Band 1 および Band 2 の部分をかきとりメタノールで溶出し, 減圧下 37°C でメタノールを留去, 0.075 M phosphate buffer (pH 6.8) 5 ml に溶解し, 水 1 ml を添加, 37°C に 2~3 分保ち,  $\beta$ -glucuronidase 溶液 (Sigma 製,  $\beta$ -glucuronidase 11.0 mg を水 1 ml に溶解したもの) 1 ml を加え, 同温度に 4 時間加温した。その後沸とう水中に 2~3 分浸して反応を終了させる。冷後, 酢酸エチルで抽出, 溶媒層ならびに水層をそれぞれ TLC にかけて溶質の確認を行なった。スポットの確認は酢酸エチル層では UV ランプと 0.5% カメレオン液, 水層は Naphthoresorcinol 反応試薬によつた。すなわち, 溶媒層, 水層ともに Kieselgel H を吸着剤, 水飽和 *n*-ブタノール:酢酸 (15:1) を展開剤とした場合と, Kieselgel G を吸着剤, 酢酸:*n*-ブタノール:水 (1:4:5) を展開剤とした場合の 2 条件につき検討を加えた。

## II. 実験結果と考察

まず全尿中に含有されている total-TP, free-TP, および TP-G を定量<sup>11,12,15</sup>したところ, 表 2 に示すような値が得られた。

表 2 の結果から, 本実験では投与量の約 63% が尿中に排泄され, その中の 88% が free-TP であることがわかつた。

表 2 全尿中の TP 各区分の定量値

投与 TP-G 量*		5.60 (g)	投与に対する回収率 (%)	total-TP に対する比率 (%)
尿中排泄量	total-TP	3.14	62.8	87.9
	free-TP	2.76	49.3	
	TP-G	0.12	2.7	3.8
	TP 代謝産物	0.26		8.3

\* TP 換算値

表 3 Fraction I から単離した結晶の性質

試験項目	測定値
融点	164~166°C (TP の文献値, 164~166°C <sup>13</sup> )
元素分析値	TP: C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> NSCl <sub>2</sub> として 実測値 (%): C 40.20, H 4.27, N 4.16 計算値 (%): C 40.16, H 4.24, N 3.93
TLC	吸着剤 Kieselgel G, 発色剤 50% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 展開溶媒 { ①クロロホルム:メタノール(9:1) ②酢酸: <i>n</i> -ブタノール:水(1:4:5) 実測値 R <sub>f</sub> : ①0.49, ②0.78 TP標品 R <sub>f</sub> : ①0.45, ②0.78

図 1 Fraction I から得た結晶の紫外線吸収スペクトル

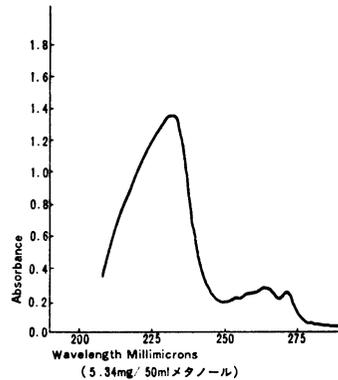
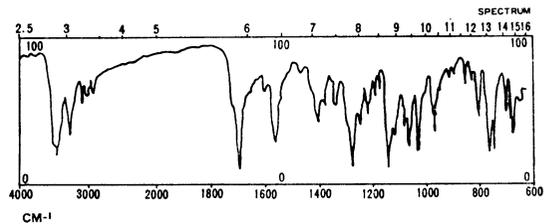


図 2 Fraction I から得た結晶の赤外線吸収スペクトル (KBr disc)



### 1. Fraction I の検討

Fraction I から単離, 精製した白色針状結晶の諸性質を検討した結果は, 表 3 および図 1, 図 2 に一括して示した。

これらの結果から明らかなように, Fraction I から単離した結晶は TP そのものであることが確認された。

### 2. Fraction II の検討

Fraction II は定量結果では約 4% の TP-G を含有していることになっているが, Preparative TLC を行ない各 band を溶出, TP 定量のときの発色試薬で呈色した band を濃縮後 TLC にかけたところ TP と全く同一部分に R<sub>f</sub> 値を認めた。すなわち, TP-G は含量も少なく, かつ操作中に加水分解をうける可能性もあり TP-G の型で単離確認することは困難と考える。

### 3. Fraction III の検討

表 2 から, Fraction III には約 8% の TP 代謝産物が含有されているものと推定される。

$\beta$ -Glucuronidase と加温して酢酸エチルで抽出した層と水層とを TLC にかけた結果,

#### A. 酢酸エチル層の TLC

Kieselgel H を吸着剤, 水飽和 *n*-ブタノール:酢酸 (15:1) を展開剤としたとき R<sub>f</sub> 値 0.80, Kieselgel G を吸着剤, 酢酸:*n*-ブタノール:水 (1:4:5) を展開剤

としたとき  $R_f$  値 0.89, いずれも明瞭に標品 TP と全く同一のスポットが認められた。

#### B. 水層の TLC

Kieselgel H を吸着剤, 水飽和 *n*-ブタノール: 酢酸 (15:1) を展開剤としたとき原点に近い  $R_f$  値 0.07 に, Kieselgel G を吸着剤, 酢酸:*n*-ブタノール:水(1:4:5) を展開剤としたとき  $R_f$  値 0.50 に, いずれも明らかに標品グルクロン酸と全く同一のスポットが認められた。

$\beta$ -Glucuronidase で加水分解前の水層は大部分が原点附近を中心としてテーリングした不明瞭な像を示したのに対し, 酵素分解後は酢酸エチル層には TP, 水層にはグルクロン酸と明確に標品と一致するスポットが見られたことから Fraction III には TP-glucuronide が存在するものと認められる。

### III. 結 語

著者ら<sup>9)</sup>は TP-G をヒトに筋注した場合, 尿中には投与量の 67.6% が TP となつて排泄されることを報告した。今回はさらに尿中代謝産物を精査する目的をもつて TP-G をウサギに 100 mg/kg 静注 (TP としての換算値) し, 48 時間目までの尿を集めてこの中より TP, TP-G, ならびに TP-代謝産物の分離同定を試みた。すなわち, 3 者の溶媒に対する移行性の差を利用して 3 fraction に分けた結果, Fraction I からは TP を純結晶として取出し, 融点, 元素分析値, 紫外部および赤外部吸収スペクトル, TLC の  $R_f$  値, いずれも標品のそれと一致することを認めた。Fraction II には定量時 TP-G が少量認められるが不安定なため TP-G として単離は困難であつた。Fraction III は TP の代謝産物が存在するものとして  $\beta$ -glucuronidase を作用させたのち TLC にかけると TP とグルクロン酸の各スポットが明瞭に認められたことから Fraction III には TP-glucuronide が存在することが確認された。

終りに, 本研究に終始御鞭撻を賜つたエーザイ株式会社研究本部長 田辺普博士, 薬理研究所長 宮尾興平博士に厚く御礼申し上げる。

### 文 献

- 1) GLAZKO, A. J., DILL, W. A. & REBSTOCK, M. C.: Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin). III. Isolation and identification of metabolic products in urine. *J. Biol. Chem.* 183: 679, 1950
- 2) GLAZKO, A. J., WOLF, L. M., DILL, W. A. & BRATTON, A. C.: Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin). II. Tissue dis-

tribution and excretion studies. *J. Pharm. Exp. Therap.* 96: 445, 1952

- 3) DILL, W. A., THOMPSON, E. M., FISKEU, R. A. & GLAZKO, A. J.: A new metabolite of chloramphenicol. *Nature* 185: 535, 1960
- 4) GLAZKO, A. J.: Identification of chloramphenicol metabolites and some factors affecting metabolic disposition. *Antimicrob. Agents & Chemoth.*: 655, 1966
- 5) MCCHESNEY, E. W., KOSS, R. F., SHEKOSKY, J. M. & DEITZ, W. H.: Metabolism of dextrosulphenidol in several animal species. *J. Am. Pharm. Assoc.* 49: 762, 1960
- 6) LAPLASSOTTE, J. & BRUNAUD, M.: Recherches expérimentales sur la thiophénicol: activité antibactérienne, concentrations humorales, élimination. Comparaison avec le chloramphénicol. *Thérapie* 16: 101, 1961
- 7) CONCILIO, C., LANZA, P. & PRETI, M.: Ricerche chimiche e biologiche sul glicinato di tiofenicolo. *Farmaco (Ed. Prat.)* 16: 371, 1961
- 8) 片山幸一, 藤田 孟, 金沢 保, 河部 靖, 佐藤 勝, 山本伸郎, 金政泰弘: Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride の基礎的検討, 第 4 報。Thiamphenicol glycinate hydrochloride の生体内動態。 *Chemotherapy* 18: 45, 1970
- 9) LANZA, P.: L'idrolisi alcalina di esteri basici del tiofenicolo. *Farmaco (Ed. Prat.)* 16: 196, 1961
- 10) 金沢 保, 河部 靖, 佐藤 勝, 藤田 孟, 山本伸郎, 金政泰弘: Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride の基礎的検討, 第 2 報。Thiamphenicol glycinate hydrochloride から Thiamphenicol への解離。 *Chemotherapy* 18: 937, 1970
- 11) 有田隆一, 堀 了平, 上杉 孝, 片山幸一: 医薬品の相互作用に関する研究(第 4 報), チオフェニコールの尿中定量法。第 24 回日本薬学会総会, 1967
- 12) 金沢 保, 片山幸一, 河部 靖, 藤田 孟, 山本伸郎: Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride の基礎的検討, 第 3 報。Thiamphenicol および Thiamphenicol glycinate hydrochloride の定量法。 *Chemotherapy* 18: 941, 1970
- 13) CULTER, R. A., STRENGER, R. J. & SUTER, C. M.: New antibacterial agents. 2-Acylamino-1-(4-hydrocarbonylsulfonylphenyl)-1,3-propanediols and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 5475, 1952
- 14) 出内秀人, 真下啓明, 上杉 孝, 堀 了平, 有田隆一: チオフェニコールの体内変化とその胆汁排泄。第 16 回日本化学療法学会総会, 1968
- 15) 有田隆一, 堀 了平, 上杉 孝, 片山幸一: Thiamphenicol の体液中濃度測定法。 *Chemotherapy*: 投稿中

BASIC STUDIES ON THIAMPHENICOL GLYCINATE  
HYDROCHLORIDE (V)

Metabolites of Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride

JUNZO TSUTSUMI, TAKESHI FUJITA, KIYOSHI KAWABE,

TAMOTSU KANAZAWA and SHINRO YAMAMOTO

Department of Pharmacology, Eisai Research Laboratories

YASUHIRO KANEMASA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

After the intravenous injection of thiamphenicol glycinate hydrochloride (TP-G) to rabbits, observations were made on the metabolites in urine.

As a result, it has been elucidated that about 90% of the substances excreted in the urine proves to be free-thiamphenicol (TP) by the chemical assay. Moreover such an excreted substance was isolated and purified in the crystalline form, and the element analysis, ultraviolet and infrared spectrum of this purified substance confirmed that it is identical with TP.