

## 釣藤鈎の主要なインドールアルカロイド hirsuteine 及び hirsutine の糞及び尿中代謝物について

伴場 光一, 中澤 孝浩, 館岡 礼奈, 大澤 啓助

### Fecal and Urinary Metabolites of Hirsuteine and Hirsutine, the Major Indole Alkaloids in *Uncaria rhynchophylla*, in Rats

Koh-ichi BANBA, Takahiro NAKAZAWA, Ayana TATEOKA, and Keisuke OHSAWA

(Received November 22, 2005)

As a part of our studies on the metabolic fate of hirsuteine (HT) and hirsutine (HS), the indole alkaloids of *Uncaria rhynchophylla*, fecal and urinary metabolites of HT and HS were analyzed by a HPLC equipped with a photodiode array detector. Feces samples from rats orally administered HT was found to contain a metabolite. Similarly, feces samples from HS were a metabolite. The metabolites of HT and HS in feces were identified as 11-hydroxyhirsuteine and 11-hydroxyhirsutine by direct comparison with authentic samples on HPLC, respectively. The parent compound was detected from only feces samples from HT. Total cumulative fecal excretion during 72 h after the oral administration of HT and HS was approximately 7 % and 8 %, respectively. On the other hand, urinary excretion during 24 h after the intravenous administration of HT and HS was approximately 5 % and 12 %.

Key words — hirsuteine; hirsutine; metabolites; feces; urine; *Uncaria rhynchophylla*

## 緒 言

釣藤鈎は *Uncaria rhynchophylla*, *U. sinensis*, 及び *U. macrophylla* のとげであり, それらは漢方薬において釣藤散や抑肝散, 七物降下湯などに配合されている. 釣藤散は神経症 (精神の興奮, 不眠, 心悸亢進), 高血圧症及びそれに伴う随伴症状 (のぼせ, 肩こり, 頭重), 動脈硬化症, 小児疳症, 慢性頭痛などに処方され, 不整脈抑制や血圧低下, 血管拡張, 鎮静の目的で用いられている.<sup>1)</sup> また近年, 基礎研究において釣藤散がマウス痴呆モデルにおいて記憶学習を改善する効果が報告されている.<sup>2)</sup> 一方, 釣藤鈎の成分研究においては, インドールアルカロイドとして hirsuteine (HT), hirsutine (HS) 及び geissoschizine methyl ether, オキシインドールアルカロイドの rhynchophylline,<sup>3,4)</sup> フェニルプロパノイドとして uncarinic acid A,<sup>5)</sup> epicatechin<sup>6)</sup>

などが単離されている. また釣藤鈎の活性成分の研究においては, HT 及び HS の降圧, 抗痙攣, 抗不整脈作用,<sup>7-9)</sup> をはじめ geissoschizine methyl ether の睡眠時間延長作用,<sup>7)</sup> 5-HT<sub>1A</sub> アゴニスト活性<sup>10)</sup> など多くの研究が既に報告されている. しかしながら, それら活性成分の生体内代謝に関する研究は全く解明されていない. このような背景から我々は, 釣藤鈎の活性インドールアルカロイドである HT 及び HS をラットに経口投与後の尿及び胆汁中代謝物について研究を行った. そして尿あるいは胆汁中からそれぞれの 11-hydroxy 代謝物, それらのグルクロン酸抱合体, 及び未変化体を同定し, それらの排泄量について明らかにした.<sup>11,12)</sup> しかしながら, それらアルカロイドを経口投与後, 尿及び胆汁中から回収された代謝物及び未変化体の量は投与量の 50% 程度であった. このことからこれらアルカロイドが糞中へと排泄されている可能性

が示唆された。そこで今回, HT及びHSの生体内代謝についてさらなる知見を得るため, それらアルカロイドの経口投与による糞中代謝物及び静脈内投与後の尿中代謝物についてラットを用いて検討を行った。

## 実験方法

### 1. 装置

融点は柳本微量融点測定装置MP-J3 (未補正), 旋光度は日本分光DIP-360 (cell length: 10 mm), UVスペクトルは Beckman DU650, CDスペクトルは日本分光J-720 (cell length: 0.2 mm), IRスペクトルはPerkin Elmer FT-IR 1725X, EI-及びFAB-MSスペクトルは日本電子JMS-DX 303型を使用し, FAB-MSはマトリックスとしてトリエタノールアミン, ニトロベンジルアルコールを用いた。<sup>1</sup>H-及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは内標準物質にtetramethylsilane (TMS)を用い, 日本電子JNM-LA 400型 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz)を使用して測定した。化学シフトは $\delta$ 値 (ppm)で表し, 結合定数はHzで表した (略号: s = singlet, d = doublet, t = triplet, dd = doublet of doublets)。HPLC装置には, 東ソー製CCPM型ポンプ, CO-8020カラムオープンを用い, UV検出器には大塚電子製MCPD-3600型フォトダイオードアレイ検出器を接続して使用した。カラムは東ソー製ODS-120T (4.6 mm i.d.×250 mm, 5  $\mu$  m particle size)を使用した。分取HPLCには, 東ソー製CCPM prep. 型ポンプに東ソー製UV-8010検出器を接続して使用した。カラムは東ソー製ODS-120T (7.8 mm i.d.×300 mm, 5  $\mu$  m particle size)を使用した。カラムクロマトグラフィーには充填剤として, Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals)を用いた。その他試薬は全て市販の特級品を使用した。

### 2. 使用動物

200–250 gのSD系雄性ラット (日本 SLC, Inc.) を実験に使用するまで室温22±2℃, 湿度55±10%, 12時間照明 (9:00 AM–9:00 PM)の一定条件下で飼育し, 飼料及び飲料水は自由

に摂取させた。なお, 実験に使用する際には18時間絶食させたものを使用した。その際, 水及び砂糖は自由に摂取させた。

### 3. HT及びHSの単離

釣藤鈎5.0 kgにMeOH 20 l加え3時間加熱還流し, それを温時濾過した。この操作を3回繰り返す, 得られたMeOHエキス (530 g)を, 水6.6 lに懸濁させ, 25%アンモニア水150 mlを加えアルカリ性にし (pH 9), EtOAc 6.6 lで3回抽出した。酢酸エチル層を減圧濃縮後, 残留物をaluminaカラム (5%MeOH/EtOAc)に付し, 得られた画分をそれぞれTLC (EtOAc/MeOH 9:1)で展開させ, ドラージェンドルフ試薬により陽性を示す画分をアルカロイド含有画分とした。その画分をさらに同カラム (EtOAc→10%MeOH/EtOAc→MeOH)により3つの画分に分画した。さらにアルカロイドを含む10%MeOH/EtOAc溶出画分をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することで, HT (0.9 g), HS (1.1 g)をそれぞれ単離した。これらの構造は文献値と比較することで同定した。<sup>13)</sup>純度はHPLC分析により98%以上のものを使用した。

### 4. 11-Hydroxy代謝物の単離

標準品に使用したHT及びHSの代謝物は前報と同様にして単離, 同定したものを使用した。<sup>11, 12)</sup>すなわち, 11-Hydroxyhirsuteine-11-O- $\beta$ -glucuronide及び11-hydroxyhirsutine-11-O- $\beta$ -glucuronideは, HT及びHSを投与したラット11匹分の24時間までに排泄される尿, それぞれ約300 mlに, 同様量のMeOH加え除蛋白し, 蒸発乾固後, MeOH 50 mlで2回抽出した。この抽出物をSephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラフィー (MeOH)を繰り返すことにより, それぞれのグルクロナイドの粗画分を得た。次いで分取HPLC (35% MeOH)を用いて精製し, 11-hydroxyhirsuteine-11-O- $\beta$ -glucuronide及び11-hydroxyhirsutine-11-O- $\beta$ -glucuronideをそれぞれ10 mg得た。11-hydroxyhirsuteine及び11-hydroxyhirsutineは上記と同様にして採取した尿, 約300 mlに, 0.2 Mリン酸緩衝液 (pH 5.5)

および  $\beta$ -グルクロニダーゼを加え、37°Cで24時間インキュベーションした。その溶液をEtOAc 700 mlで3回抽出し、その有機層を40°Cで減圧濃縮した。残留物をMeOHに溶解させてSephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラフィー (MeOH) を繰り返し行うことにより11-hydroxyhirsuteine 及び11-hydroxyhirsutineの粗画分を得た。次いで、分取HPLC (60% MeOH) を用いて精製することで、11-hydroxyhirsuteine 5 mg 及び11-hydroxyhirsutine 3 mgを得た。これら化合物モニターは全てHPLCで行い、HT 及びHS同様、純度はHPLC分析により98%以上のものを使用した。

HT, HS 及びそれらの代謝物の構造をFig. 1に示した。

### 5. HPLC測定条件

分離条件はA液に10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), B液にMeOHを用いた直線グラジエント法 [A/B=90/10 (0 min)  $\rightarrow$  10/90 (50 min)] を使用し、カラム温度40°C, 流速1.0 ml/min, 検出波長200-400 nmで行った。HT, HS 及びそれらの代謝物の溶出時間はそれぞれ, HT 44 min, HS 46 min, 11-hydroxyhirsuteine 36 min, 11-hydroxyhirsutine-11-O- $\beta$ -gurcuronide 26 min,

11-hydroxyhirsutine 38 min, 及び11-hydroxyhirsutine-11-O- $\beta$ -gurcuronide 28 minである。

### 6. 薬物投与

経口投与のためのHT 及びHS (50 mg/kg) はプロピレングリコールに溶解させ、投与量が2.0 ml/kgになるように調製した。尾静脈投与は急性毒性<sup>14)</sup>を考慮してHT 10 mg/kg 及びHS 15 mg/kgとし、それぞれ20%プロピレングリコールに溶解させ、投与量が0.5 ml/kgになるように調製した。なおコントロールにはそれぞれのvehicleを同様投与した。

### 7. 糞試料

HT, HS (50 mg/kg) 及びvehicleをラットに経口投与後、メタボリックケージを用いて、投与後72時間までの糞を24時間間隔で採取した。各糞を遠沈管 (15 ml) に取り、MeOHを加え、超音波ホモジイズしその後、遠心分離 (1600g, 10 min) を行った。この抽出操作を3回行い、得られた上澄みを合わせ最終的に20 mlに調製した。その溶液を0.45  $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過したものを各定量用サンプルとし、その50  $\mu$ lをHPLCに注入した。

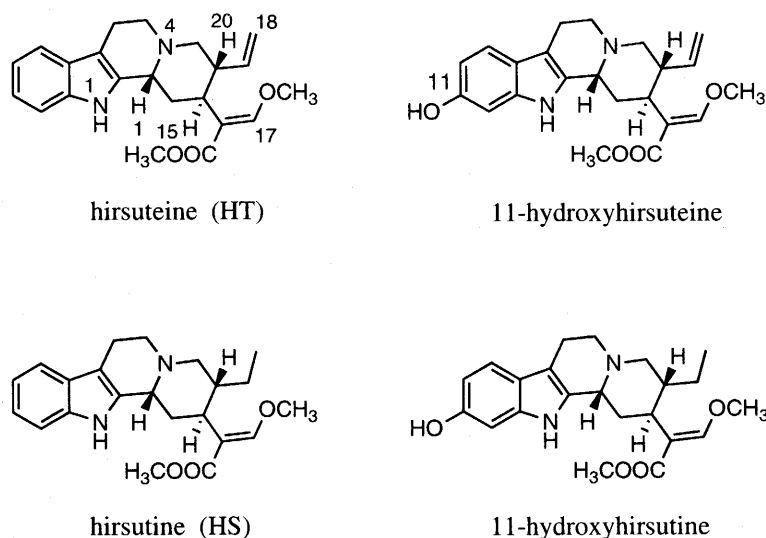


Fig. 1. Structures of HT and HS and its 11-Hydroxy Metabolites.

## 8. 尿試料

HT (10 mg/kg), HS (15 mg/kg) 及び vehicle をラットに尾静脈内投与後, メタボリックケージを用いて, 投与後24時間までに排泄される尿を採取した. 採取した尿サンプルをメンブランフィルター (0.45  $\mu$ m) でろ過し, そのろ液20  $\mu$ l を HPLC に注入した.

## 9. 検量線の作成

代謝物を含まない糞及び尿試料にそれぞれ代謝物及び未変化体を糞試料では  $6.10 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  -  $1.22 \times 10 \mu\text{g/ml}$  及び尿試料では  $12.2 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  -  $12.2 \times 10 \mu\text{g/ml}$  の濃度となるように添加し, 糞試料は50  $\mu$ l, 尿試料は20  $\mu$ l をそれぞれ HPLC に注入し, 得られたピーク面積より検量線を作成した. 各回帰直線式及び相関係数は次の通りである. 糞試料中の 11-hydroxyhirsuteine ;  $y=9.80 \times 10^{-1}x+9.10 \times 10^{-3}$  ( $r=0.999$ ), HT ;  $y=9.50 \times 10^{-1}x+9.61 \times 10^{-3}$  ( $r=0.996$ ), 11-hydroxyhirsutine ;  $y=8.90 \times 10^{-1}x-1.20 \times 10^{-3}$  ( $r=0.999$ ), 尿試料中の 11-hydroxyhirsuteine ;  $y=1.24x-9.07 \times 10^{-2}$  ( $r=1.000$ ), HT ;  $y=1.42x+9.14 \times 10^{-2}$  ( $r=1.000$ ), 11-hydroxyhirsutine ;  $y=1.71x-6.36 \times 10^{-2}$  ( $r=0.999$ ), HS ;  $y=1.20x-3.07 \times 10^{-2}$  ( $r=0.999$ ).

## 10. 添加回収実験

代謝物を含まない糞及び尿に代謝物を加え, 求めた各試料中の各化合物の添加回収率は90.1 - 109%であった.

## 結果 及 び 考 察

ラットに HT 及び HS (50 mg/kg) をそれぞれ経口投与し, その糞中成分をリン酸緩衝液 (pH 7.0) 及び MeOH を移動相溶媒に用いた3次元 HPLC により分析した. その結果 Fig. 2 に示すように, HT 投与後の糞試料から2種 (Fig. 2 (a)), HS 投与後の糞試料から1種のピーク (Fig. 2 (b)) をそれぞれ確認することができた. これらのピークは HT 及び HS (50 mg/kg) を経口投与したときに得られる尿中代謝物と HPLC での保持時間が一致し, またそれぞれの標準品を同時注入

したところ, ピークが完全に一致したことから, HT 由来ピークを 11-hydroxyhirsuteine 及び未変化体の HT, そして HS 由来のピークを 11-hydroxyhirsutine と同定した. また, HT 及び HS (50 mg/kg) をラットに経口投与後72時間, 24時間間隔でそれぞれの糞を採取し, 水酸化代謝物及び未変化体の糞中累積排泄量を定量した. その結果 Table 1 に示すように, HT 投与では 11-hydroxyhirsuteine が投与量の  $4.69 \pm 1.61\%$ , 未変化体の HT が  $2.12 \pm 1.02\%$  であり, 合計で  $6.81 \pm 2.63\%$  であることが明らかになった. 一方, HS 投与後の糞中への 11-hydroxyhirsutine の排泄量は  $8.39 \pm 2.32\%$  であることが明らかになった. このように, HT 及び HS の糞中への総排泄量についてはほとんど差がみられなかった, しかしながら, 未変化体の糞中への排泄は HT については確認されたが, HS 投与後の糞中からは確認されなかった.

著者らは経口投与された HT 及び HS はそれぞれ水酸化代謝物及びそのグルクロン酸抱合体, そして未変化体として尿中に排泄されることを報告した.<sup>11,12)</sup> また, その24時間までにおける排泄量は HT で投与量の  $8.94 \pm 1.71\%$ , 一方 HS で  $17.12 \pm 1.99\%$  であることを示した. このことから, HT 及び HS の経口での bioavailability は低いことが予想された. そこで今回, HT (10 mg/kg) 及び HS (15 mg/kg) をラットに尾静脈内投与し, その尿中代謝物についても検討を行った. その結果 Fig. 3 に示すように, HT 投与後の尿からは 11-hydroxyhirsuteine-11-O- $\beta$ -glucuronide, 11-hydroxyhirsuteine (Fig. 3 (a)), HS 投与後の尿からは 11-hydroxyhirsutine-11-O- $\beta$ -glucuronide, 11-hydroxyhirsutine (Fig. 3 (b)) をそれぞれ確認することが出来た. これらのピークの同定はそれぞれの標準品と HPLC における保持時間及び UV スペクトルが完全に一致したことにより行った. このように, HT 及び HS のラットにおける代謝反応は経口でも, 静脈内でも変化しないことが明らかになった. また HT 及び HS 静脈内投与後の代謝物及び未変化体の総排泄量は HT で  $4.95 \pm 0.87\%$ , HS で  $11.52 \pm 1.66\%$  であることが明らかになった (Table 2).

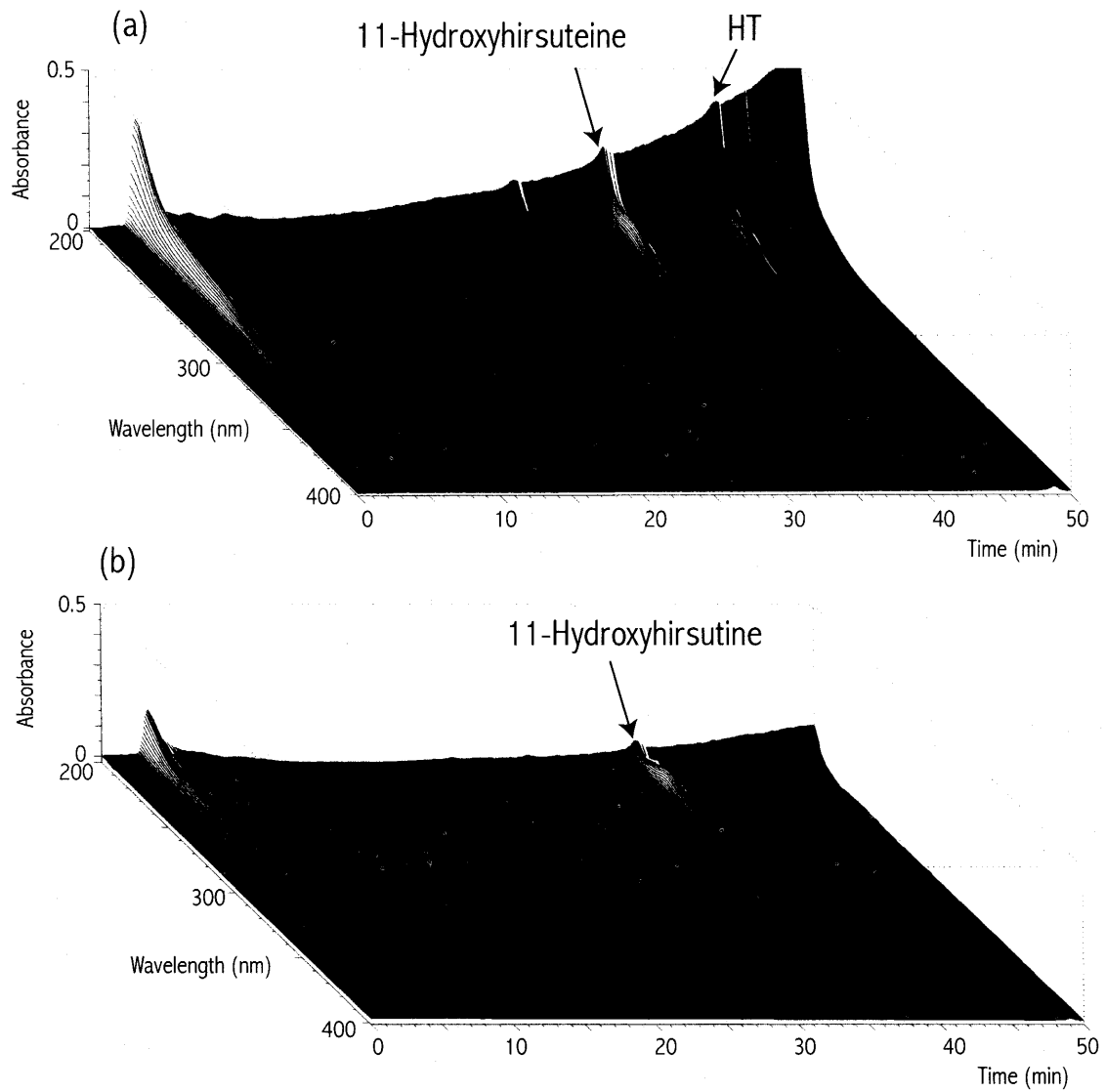


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Feces Samples Following Oral Administration of HT (a) and HS (b) (50 mg/kg) to Rats.

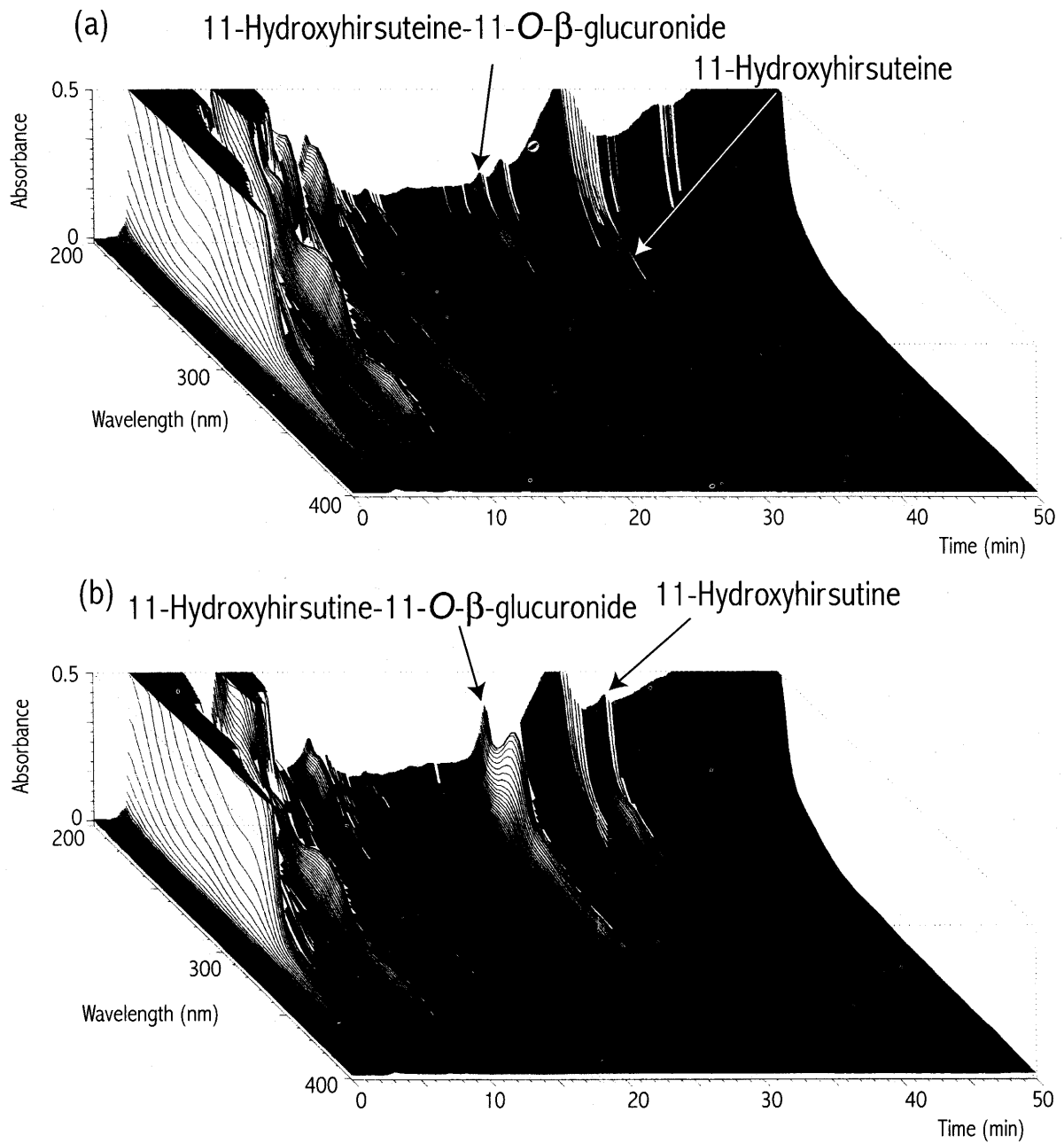


Fig. 3. HPLC Chromatograms of Urine Samples Following Intravenous Administration of HT (10 mg/kg) (a) and HS (15 mg/kg) (b) to Rats.

このようにいずれの投与ルートを用いても HS の代謝物の尿中への排泄量は HT のそれに比べおよそ 2 倍～3 倍多いことが明らかになった。

我々はこれまでに、いくつかの生薬中の成分、例えば蘇葉の主要成分 rosmarinic acid、生姜の主要成分 [6]-gingerol などは経口投与後、腸内細菌あるいは腸管粘膜によって代謝され、その後生体内に吸収されることを報告してきた。<sup>15,16)</sup> しかしながら、HT 及び HS のケースにおいては、静脈内投与においても水酸化代謝物の存在が確認できること、また、HT 及び HS と同様に、インドール骨格を有するアルカロイド yohimbine 及び rutaecarpine が肝ミクロソームによって水酸化体に代謝されることが報告されていることから、<sup>17,18)</sup> HT 及び HS の 11-水酸化にも肝ミク

ロソームが関与していると推測される。HT 及び HS の代謝運命の解明には、さらに詳細な研究が必要であると考えられ、現在進行中である。

## REFERENCES

- 1) Yano S., *The Journal of Traditional Sino-Japanese medicine*, **8**, 47–51 (1987).
- 2) Watanabe H., Zhao Q., Matsumoto K., Tohda M., Murakami Y., Zhang S. H., Kang T. H., Mahakunakorn P., Maruyama Y., Sakakibara I., Aimi N., Takayama H., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **75**, 635–643 (2003).
- 3) Haginiwa J., Sakai S., Aimi N., Yamanaka E., Shirma N., *Yakugaku Zasshi*, **93**, 448–452 (1973).

Table 1. Fecal Excretion of the Metabolites in Rats Following the Oral Administration of HT and HS (50 mg/kg).

Administrated Compounds	Metabolites	% of Dose			
		0–24 h	24–48 h	48–72 h	Total
Hirsuteine (HT)	11-Hydroxyhirsuteine	2.87 ± 1.04	1.37 ± 0.43	0.45 ± 0.14	4.69 ± 1.61
	HT	2.12 ± 1.02	—	—	2.12 ± 1.02
	Total	4.99 ± 2.06	1.37 ± 0.43	0.45 ± 0.14	6.81 ± 2.63
Hirsutine (HS)	11-Hydroxyhirsutine	3.26 ± 0.67	4.70 ± 1.38	0.43 ± 0.27	8.39 ± 2.32

Data expressed as mean ± S.E.M. (n=5)

Table 2. Urinary Excretion of the Metabolites in Rats Following the Intravenous Administration of HT (10 mg/kg) and HS (15 mg/kg).

Administrated Compounds	Metabolites	% of Dose 0–24 h
Hirsuteine (HT)	11-Hydroxyhirsuteine	
	-11-O-β-glucuronide	3.64 ± 0.53
	11-Hydroxyhirsuteine	1.31 ± 0.35
	Total	4.95 ± 0.87
Hirsutine (HT)	11-Hydroxyhirsutine	
	-11-O-β-glucuronide	8.43 ± 0.98
	11-Hydroxyhirsutine	3.09 ± 0.68
	Total	11.52 ± 1.66

Data expressed as mean ± S.E.M. (n=5)

- 4) Aimi N., Yamanaka E., Shinma N., Fujiu M., Kurita J., Sakai S., Haginiwa J., *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2067 – 2071 (1977)
- 5) Lee J. S., Yang M. Y., Yeo H., Kim J., Lee H. S., Ahn J. S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1492 – 1432 (1999).
- 6) Shimada Y., Goto H., Kogure T., Shibahara N., Sakakibara I., Sasaki H., Terasawa K., *Am. J. Chin. Med.*, **29**, 173 – 180 (2001).
- 7) Sakakibara I., Takahashi H., Yusurihara M., Katoh T., Kubo M., Hayashi K., Ishige A., Amagaya S., Okada M., Maruno M., *Natural Medicines*, **51**, 79 – 83 (1997).
- 8) Mimaki Y., Toshimizu N., Yamada K., Sashida Y., *Yakugaku Zasshi*, **117**, 1011 – 1021 (1997).
- 9) Masumiya H., Saitoh T., Tanaka Y., Horie S., Aimi N., Takayama H., Tanaka H., Shigenobu K., *Life Sci.*, **65**, 2333 – 2334 (1999).
- 10) Pengsuparp T., Indra B., Nakagawasai O., Tadano T., Mimaki Y., Sashida Y., Ohizumi Y., Kisara K., *Eur. J. Pharmacol.* **425**, 211 – 218 (2001).
- 11) The 125th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, May 2005.
- 12) Nakazawa T., Hoshikawa A., Banba K., Ohsawa K., submitted.
- 13) Sakakibara I., Terabayashi S., Kubo M., Higuchi M., Komatsu Y., Okada M., Taki K., Kamei J., *Phytomedicine*, **6**, 163 – 168 (1999).
- 14) Ozaki Y., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **94**, 17 – 26 (1989).
- 15) Nakazawa T., Ohsawa K., *J. Nat. Prod.* **61**, 993 – 996 (1998).
- 16) Nakazawa T., Ohsawa K., *Life Sci.*, **70**, 2165 – 2175 (2002).
- 17) Le Verge R., Le Corre P., Chevanne F., Doe De Maindreville M., Royer D., Levy J., *J. Chromatog.* **14**, 283 – 292 (1992).
- 18) Ueng Y. -F., Yu H. -J., Lee C. -H., Peng C., Jan W. -C., Ho L. -K., Chen C. -F., Don M. -J., *J. Chromatogr. A*, **27**, 103 – 109 (2005).