Analytical Studies on Antileprosy Drugs
VI. On the Analysis of Sulfone Drugs and their Metabolites
by Thin-layer Chromatography

SADAE TSUTSUMI, YOSHIKI SAKAMOTO
and KAZUNARI NAKAMURA
(*National Institute for Leprosy Research*)

To find out a favorable method for the analysis of various sulfone drugs and their metabolites, the separation of 55 compounds relating to the present drugs was studied by thin-layer chromatography (TLC).

The separation of DDS, DDSO, 4, 4'-Diaminodiphenyl sulfide (DDSD) and their mono-N-acetylates could easily be achieved on a thin-layer plate. When benzene/ethylacetate (2/3) was used as a developing system, the order of their R_f values was $S > SO_2 > SO$ and $NH_2 > NHCOCH_3$. Also, the order was found to be $R, R' : NO_2 > H > OCH_2CH_2OC_2H_5 > NH_2NH > OH, NH_2 > NHCOCH_3, NHCH_2CH_2OH > COOH, NHCH_2COOH$ in the case of 4-R-C₆H₄SO₂C₆H₄-R'-4'. When the same solvent system was used, no clear difference was found between the R_f value of a diphenyl sulfone compound (DS) and that of the corresponding diphenyl sulfonamide (DSA) or the diphenyl ethyl sulfonamide (DESA), though the R_f value of the former was somewhat higher than that of the latter two.

Applying this method, a sample of human urine was examined after the oral intake of DDSO. The metabolites identified were DDSD, the mono-N-acetylate (MAcDDSD) and DDS (all of them faintly detected), and MAcDDS, unchanged DDSO, and MAcDDSO (all of them markedly detected).

It was also coincident with the result of the experiment, that the MAcDDSO was more labile under auto-oxidation than DDSO when they were allowed to stand in ethylacetate. Therefore, it can be said that this experiment suggests the reason why a considerable portion of DDSO is found to be existent as MAcDDS in the urine sample, even though this oxidation is presumed to be accelerated by TPN-linked liver microsomal function. However, in the urine sample of a rabbit, DDS, MAcDDS, MAcDDSO, and unchanged DDSO could merely be detected.

Several authors had already reported the reduction of some dialkyl sulfoxides to the corresponding sulfides by an enterobacteria^{5a,b)} or their oxidation by liver microsomes^{5c)}. However, no report hitherto mentioned the reduction of diaryl sulfoxides *in vivo*.

In the second step, the separation of some water-soluble labile derivatives or conjugates of DDS was carried out to certify the main metabolites of Promin by TLC. A compound named Promin A (PrA) was prepared for this purpose, together with ¹⁴C-PrA, and intravenously injected into several rabbits, which were synthesized by sodium glucuronate (GNa), glucuronic amide (GNH₂) or GK-6-¹⁴C respectively, instead of glucose in the case

of Promin. All of them were more labile than Promin in aqueous solution.

As the result, it was found that the main metabolites in the rabbit urine were DDS and mono-N-glucosiduronate (DDSG). This result suggested that a main metabolite of Promin might be DDS mono-N-glucoside, especially if the R_f values of DDS mono- and di-N-glucoside were compared with those of the corresponding mono- and di-N-glucosiduronate on a TLC plate, even though DDS N-glucosides were more labile than the N-glucosiduronates, and also the mono-N-glucoside as a standard material could not be isolated yet.

In spite of the report by Dr. Sweet^{6a)} and Dr. Bushby^{6b)} who had respectively presumed and maintained the existence of DDS mono-N-glucose sulfonite (mono-Promin) as a main metabolite of Promin, this predominant desulfinitation was again certified in the case of PrA.

In addition, because the measured radioactivity in the rabbit urine and the plasma was calculated to be too low to explain the total activity in ¹⁴C-PrA injected into the rabbit, the GK-6-¹⁴C freed from ¹⁴C-PrA was supposed to be separately catabolized *in vivo*, though the relation between the xylulose cycle could not be explained. This result was also observed when DDSG-6-¹⁴C was injected similarly into a rabbit.

治らい剤の分析学的研究

第6報 薄層クロマトグラフィーによるスルホン剤 ならびにその代謝物の分析について

堤 貞 衛 坂 本 芳 幹 中 村 和 明
(国立多摩研究所)

(受付 1969年12月15日)

薄層クロマトグラフィーが種々の天然物、医薬品分析に活用されて既に久しいことは衆知の事実である。一例として Rifamycin,^(a) Neomycin,^(b) などの混合物分離は薄層クロマトグラフィー(TLC)独特の成果である。著者らの1人は、先に濾紙クロマトグラフィー(PPC)によるスルホン剤ならびにその代謝分析について報じたが^{2a, b)}、本報では主として TLC による再検討結果につき述べる。

実験方法

1. **TLC**: Kieselgel G (Merck) を層厚 250 μ に塗布, 110°C, 1.5時間乾燥賦活化したガラス展開板の原点に試料0.5 μ g 程度を点滴, 東洋濾紙 TLC 装置で上昇, 展開後乾燥せる展開板に津田, Bratton-Marshall, Ehrlich 各試液を適時選択粉霧。

2. 標品: 先報^{2a, b), 3a-d)}物質のほか次の合成をおこなった。

Tetrasodium DDS N, N'-diglucosiduronate C₁, C_{1'}-disulfonate (PrA): 本物質はプロミンのグルコース(Gs)をグルクロン酸ナトリウム(GNa)に置換したDDS誘導体で純物質単離は不可能である。GNaの2.0g(計算量2.16g), 重亜硫酸ナトリウム1.0gを15mlの蒸留水に溶解, DDS 1.25gを30mlの熱エタノールに溶解した溶液と混和, 1時間緩やかに還流, アセトンを加え析出沈澱を傾斜して溶媒と分離, 沈澱を少量の冷蒸留水に再溶解しアセトンとエーテルの混液で沈澱させ反覆精製, 最後に脱水アセトン中で低温保存固化せしむ。DDS含量24.7~22.3%(計算量の83.7%~79.8%)。1%濃度では, 5~20%にGNaを添加した蒸留水中で37°C, 12時間以後DDSが分解析出するので冷アセトン中保存, 用事溶解使用。iso-PrOH: BuOH: universal buffer (3:2:3)^{2b)}によるPPCでRf: 0.83

(DDS), 0.56(DDS mono-N-glucosiduronate (DDSG))のほかに, 0.27, 原点に各津田, 2-アミノデフェニール試液(OAD)^{2a)}の双方で発色するスポットを認めた。Sørensen (pH 7.4)による電気泳動でも向陰極(DDS), 向陽極(DDSG)のほかに, より早く陽極へ移動する2発色体(津田, OAD 陽性)を認めた。

なおGNaの代りにグルクロン酸アמיד(GNH₂)を用いた結果もほぼ同様であった。

3. **¹⁴C 標識 DDS 標識誘導体の合成**: グルクロン酸(GA)を0.1M K₂CO₃で中和, 凍結乾燥し, その2.0gで0.1mCi/25mg (0.93mCi/mM, Radiochemical Center, Amersham)のグルクロン酸カリウム(GK)-6-¹⁴Cを同位体稀釈, 再凍結乾燥す。

PrA-¹⁴C: 0.8gのGK-6-¹⁴CからPrAに準じて合成, 7130 $\pm$ 82cpm/mg(Aloka FC-1), DDS結合率計算値の64.7%。

DDSG-¹⁴C: 1.0gのGK-6-¹⁴Cから先報^{2a)}に準じて合成, 10700 $\pm$ 110cpm/mg(同)1.35gを得た。ラヂオPPC走査(Aloka PCS-4)の結果も標品に一致。

4. **代謝物分析**: 家兔尿ならびに人尿につき分析した。

家兔: 体重3.2kg 前後の雄家兔右耳静脈に薬物静注, 左耳静脈から経時採血。採尿は一定量を凍結乾燥, 場合により乾燥残渣をメタノールで抽出。ただし安定な代謝物は尿を3%塩酸で37°C, 30分間処理後塩基性とし, 食塩塩析下反覆酢酸エチルで抽出。

人尿: 4,4'-Diaminodiphenylsulfoxide (DDSO)服用12時間の集尿を安定な代謝物分析に準じ分析。

実験結果

1. 置換基とRf値との関係について

(i) DDSのSO₂基, 4,4'位のNH₂基のそれぞれ

Table I. Thin-layer Chromatography of Some DS-compounds
 4-R₁-C₆H₄-SO₂-C₆H₄-R₂-4'

No	R ₁	R ₂	m.p. (°C)	R _f	R _f *1	Colour
13	NH ₂ NH	NH ₂ NH	(Fujisawa Pharm. Co.)	0.45~0.55	—	R V
14 ^{3b)}	NH ₂	"	157~159 (decomp.)	0.42~0.48	—	"
15 ^{3b)}	AcNH	"	208~209	0.15~0.25	—	V
16	NH ₂	NHCH ₂ CH ₂ OH	(Yoshitomi)	0.11~0.16	0.83	R
17 ^{3c)}	"	OH	176~177	0.39~0.43	—	V
18 ^{3b)}	NO ₂	"	172~173	0.63~0.71	—	faint
19*2	NH ₂	OCH ₂ CH ₂ OC ₂ H ₅	137~140	0.56~0.59	—	R V
20 ^{3b)}	"	NHCH ₂ COOH	191~193	0.01~0.03	0.21~0.37*3	V
21 ^{3b)}	"	COOH	263~265	0.03~0.12	0.42~0.57*3	R V
33*2	"	(C ₂ H ₅) ₂ NCH ₂ CONH	131~132	0.02~0.05	0.22~0.34*3	V
23*2	"	O $\overline{\text{H}}$ NCH ₂ CONH	216~217	0.03~0.13	0.70	R V

*1 Shown in Fig. 1., *2 Unpublished, *3 Tailing
 Spraying reagent: Tsuda's reagent

Fig. 1 Separation of Some Diphenyl Sulfones (DS), Diphenyl Sulfoxides (DSO) and Diphenyl Sulfide (DSD) by Thin layer Chromatography
 Adsorbent: Kieselgel G (Merck) Thickness: 250 μ Solvent Syntem: Benzene: EtOAc(2:3)
 RV: reddish violet, BR: bluish red etc. (Tsuda's reagent)
 Parentheses: Bratton Marshall's reagent

NH ₂ -C ₆ H ₄ -R ₁ -C ₆ H ₄ -R ₂ -4'					
No.	R ₁	R ₂	m.p. (°C)	R _f	R _f *1
1	SO ₂	NH ₂	(Yoshitomi Pharm. Co.)	0.33~0.40	0.88
2 ^{a)}	S O	"	175~176 (decomp.)	0.07~0.10	0.76
3 ^{a)}	S	"	107~108	0.58~0.60	
4 ^{d)}	SO ₂	AcNH	238~237	0.13~0.18	0.94
5 ^{d)}	S O	"	206~207	0.03~0.05	0.81
6 ^{3b)}	S	"	119~121	0.27~0.31	
7 ^{d)}	SO ₂	<i>iso</i> -C ₄ H ₉ CONH	175~176	0.52~0.54	
8 ^{d)}	SO ₂	NO ₂	169~177	0.62~0.70	
9 ^{3b)}	S O	"	131~133 (decomp.)	0.38~0.43	
10 ^{3d)}	S	"	147~148	0.75~0.80	
11 ^{3b)}	SO ₂	H	173~175	0.64~0.64*2	
12 ^{3b)}	S	"	92~94	0.79~0.80*3	

*1 EtOAc: *iso*-PrOH: H₂O(13:7:7), *2 V, *3 BV

Table II. (a) Rf Value of a DS-compound in Comparison with That of the Corresponding Diphenyl Sulfonamide (DSA), or the Ethylsulfonamide (DESA)

R=C₆H₄-R' DS-compounds^{3b)}4-NH₂-C₆H₄-SO₂RR=NHC₆H₄-R'-4 DSA-compounds^{3c)}....(')R=CH₂CH₂NHC₆H₄-R'-4 DESA-compounds^{3c)}....('')

No	R'	m.p. (°C)	Rf	Rf*2	Rf*1	Colour
12	H	173~175	0.64~0.64	0.50		V
12'	"	197~198	0.63~0.64	0.48		RV
12''	"	167~169	0.58~0.60	0.40		"
24*3		150~151	0.65~0.66	0.50		BR
25	CH ₃	180~181	0.61~0.63	0.52		RV
25'	"	184~187	0.62~0.64	0.56		"
25''	"	131~132	0.55~0.57	0.42		"
26	Cl	185~187	0.66~0.67	0.57		BR
26'	"	195~197	0.64~0.66	0.46		RV
26''	"	157~158	0.56~0.57	0.38		"
27	OC ₄ H _{9-n}	178~179	0.66~0.07	0.56		BR
27'	"	161~162	0.70~0.71	0.53		RV
27''	"	97~99	0.69~0.61	0.40		"
28'	OC ₂ H ₅	197~198	0.62~0.65	0.45		V
1	NH ₂	(Yoshitomi)	0.33~0.40		0.88	"
1'	"	140~142	0.24~0.32			"

(b) Rf Value of the several Compounds relating to (a)

No	R'	m.p. (°C)	Rf	Rf*2	Rf*1	Colour
29'	NH ₂	(Tokyo Chem.)	0.31~0.41		0.90	RV
29''	CH ₂ CH ₂ NH ₂	234~237	0.00~0.04		0.68	"
30	CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	102~104	0.00~0.04		0.15~0.30**4	"
31	Sulfathiazole	(Yoshitomi)	0.09~0.09		0.88	"
32	Promizole	(")	0.20~0.20		0.93	"
33'	NHC ₁₀ H ₇	209~211	0.65~0.70			V
33''	(CH ₂) ₂ NHC ₁₀ H ₇	184~186	0.61~0.65			RV
34	C ₄ H _{9-n}	109~110	0.61~0.64			"
35	(CH ₂) ₂ COOH (HCl salt)	232~236 (decomp.)	0.04~0.08			"
36	(CH ₂) ₂ N O	141~144	0.06~0.08		0.64	"
37	(CH ₂) ₂ N	126~129	0.04~0.10		0.26~0.66**4	"
38	(CH ₂) ₂ NH	152~156	0.00~0.06		0.09~0.37**4	"

*1 Shown in Fig. 1., *2 Benzene: EtOAc (3: 2), *3 4-NH₂-C₆H₄-SO₂CH₂CH₂-C₆H₄^{3c)}

**4 Tailing, **4 Sereous tailing

を種々誘導した化合物のベンゼン: 酢酸エチル (2: 3) による展開結果をそれぞれ像 1, 表 1 に示した。

像 1 から DDS の NH₂ 基 1 箇をアセチル化した場合

(MAcDDS) は Rf 値の減少を, 逆にイソ吉草酸化 (*iso*-C₄H₉CONH-DS) のように炭素鎖の長い脂肪酸でアシル化すると Rf 値が逆に増大することを認めた。また 4' 位

がHの場合と較べると、4'位に NO_2 基を導入すると R_f 値は幾分増大するが、 NH_2 基、 AcNH 基では特に後者の導入で著しい R_f 値減少を認めた。一方これら4'位導入基のいずれの場合でも R_f 値は $\text{S} > \text{SO}_2 > \text{SO}$ であることを認めた。これら R_f 値は総べて2～5回展開した結果を示す。表1はDS化合物に限定して、4, 4'位の置換でどのように R_f 値が変化するかにつき、調べた結果を示す。 NH_2NH 基置換はわずかながら増大を示し、薄層板上では好便に津田試薬で発色した。像1と総括すると、ベンゼン：酢酸エチル(2：3)による展開後の R_f 値は、DS化合物の4位置換基と照合する時に、 $\text{NO}_2 > \text{H} > \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_5 > \text{NH}_2\text{NH} > \text{OH} \approx \text{NH}_2 > \text{AcNH} \approx \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH} > \text{NHCH}_2\text{COOH}$, COOH , 3級アミノアチルの順序であることが認められた。またこの展開系は特に R_f 値の小さい3, 5, 20～23などの化合物の場合を除いて、特にS, SO , SO_2 の分別に適していることが認められた。

(ii) 表II(a)は、DS化合物と、その SO_2 基を $\text{SO}_2\text{-NH}$ 基に置換した化合物(DSA)、 SO_2 基を $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{NH}$ 基に置換した化合物(DESA)との R_f 値を比較した結果である。これらの結果から、DESA化合物はベンゼン：酢酸エチル(2：3)、(3：2)両展開系に関して、ほかの2系列化合物よりも幾分 R_f 値が小さいが大差は無く、分離が明瞭であったのは $\text{R}'=\text{Cl}$ をベンゼン：酢酸エチル(3：2)で展開した場合と、 $\text{R}'=\text{NH}_2$ を同(2：3)で展開した場合のみであった。なお、 $\text{R}'=\text{NH}_2$ のDESA化合物は純品合成に成功していない。

表II(b)には、DS化合物以外で、 $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ 基を含む化合物(ESA)を主とした一連の関連化合物の R_f 値を示した。 $\text{R}=\text{NH}_2$ (29', 29'')で較べるとスルホンアミドに較べてESA誘導体がより R_f 値が減少し、またPromizoleとSulfathiazoleとを較べると SO_2 が SO_2NH に置換されると R_f 値が幾分か減少することが考えられる。表II(a)全般を通じて、明瞭ではないがこの傾向があることも認められる。またRに第3級アミンやカルボキシル基が導入されると、 R_f 値の著明な減少を生じるのが29', 30, 34～38で認められる。

2. 代謝物の分析結果について

(i) DDSO 服用人排尿中の代謝物分析：本実験は、重点を SO 基の酸化還元代謝に置いたので、4, 4'位の

NH_2 基に関する検討を安定抱合体のみに留めた。像1の1～6を標準とし、ベンゼン：酢酸エチル(2：3)で展開すると像2のように明瞭に分離する。一方DDSOおよびそのmono-N-acetylate(MAcDDSO)を酢酸エチルに溶解し、1週間室温で放置後同様展開すると、各2', 5'のように、MAcDDSO(5)の放置後展開結果からは顕著なMAcDDS(5)のスポットを検出するが、DDSO(4)のそれからはDDS(1)の痕跡しか検出しえなかった。これは、 SO 基が放置により自然酸化される度合が1箇の NH_2 基を酢化した後の方が強まることを示している。次にDDSO服用人排尿を塩酸処理を経て常法により酢酸エチルで抽出、同様展開したところ、像2のように濃淡6箇のスポットを検出した。その中で SO_2 へ酸化されたDDS(1)、MAcDDS(4)のほかにSに還元されたDDSD(3)、MAcDDSD(6)が検出された。またDDSに較べてMAcDDSが顕著に検出されたことは、放置中の自然酸化と考えられる結果とも符合する。

(ii) プロミン、PrA 静注家兔排尿中の代謝物の分析：像3(a)～(c)はそれぞれ像3附文(a)～(c)展開系でDDSの不安定な水溶性誘導体を展開した結果である。これから次のことが認められた。DDSO potassium mono-N-sulfamate(DDSOs)は、DDSSと異り純物質の合成が不可能であったが^{2a)}、TLCによる展開ではそれぞれDDSのmono-, di-N-sulfamateよりも少し R_f 値の小さい2スポットを認めた(像3, 39)。またTLC展開では不安定な誘導体が分解しつつ上昇し再吸着されると考えられるスポット(像3斜線)を検出した。たとえばDDSG(44)を(a)で展開後Bratton-Marshall試液を粉霧した例のようにわずかに混在するDDS、そのdi-N-glucosiduronateのほかに、DDSGよりやや速く上昇した説明しがたい小スポットの分離を認めた。一方PrA(43)は(a)～(c)で上昇するとこれらN-glucuronidesのほかに、より R_f 値の小さいスポットを生じ、これが亜硫酸結合体であることは推定しうるが、この場合も(a)での上昇時に、PrAから解離、または既に混在していたと考えられる、不明の小スポットを、DDSGの上に認めた。次に精製したDDS di-N-glucoside^{2b)}を上昇したところ、像3(43)(a～c)のように速く上昇する薄色のスポットと、かなり遅れて上昇する濃色スポットを検出した。この両スポットはプロミン(像3(41)(a, b)上昇時の2スポットと符合し、脱亜硫酸したN-glucoside分画と考えられる。ただしプロミンは、この条件で上昇すると、PPCの場合よりもtailingが甚だしいような印

Fig. 2 Metabolites of DDSO Detected in a Urine Sample of Human after the Oral Intake of DDSO

Metabolites: 500mg of DDSO was dosed orally to a human. A portion (100ml) of the total urine collected for 12 hrs. was acidified with HCl and allowed to stand for 30 mins. at 37°C. After extracting the urine sample with warmed EtOAc, it was evaporated *in vacuo*, and the residue was developed by thin-layer technique as shown in Fig. 1.

1-6: Standard materials

2', 5': Each substance was separately dissolved into EtOAc and allowed to stand for 1 week at room temperature.

象を受けた。DDS の N-glucoside はその N-glucuronide よりも不安定であり、特に DDS mono-N-glucoside は未だ単離されていない。しかるにそれらを重亜硫酸ナトリウムと反応させると、プロミンは PrA よりむしろ安定になる。

これらの結果から考えて、TLC は脱亜硫酸した分画の同定には適していたが、あまりに Rf 差が明確な結果、同一条件で一斉に展開した場合には、PrA の亜硫酸結合分画の分離に特色が無く、プロミンでは同分画がしばしば tailing する欠陥を認めたので、次のように家兎分析をおこなった。

1050mg の PrA, ¹⁴C-PrA をそれぞれ 5% GNa 水溶液 3.5ml に溶解、家兎 1 匹ずつに静注、12 時間の集尿を凍結乾燥し、メタノールで乾燥残渣を抽出、低温でメタノールを減圧乾涸、2ml のメタノールで再抽出

Fig. 3 Thin-layer Chromatography of Some Water-soluble Derivatives of DDS

— Bratton-Marshall ···· Ehrlich

●: unknown spots x: corresponding to a main metabolite of Promin

a: Benzene: EtOAc(2:3) b: *n*-PrOH: *n*-BuOH: 0.2N NH₄OH(2:2:3)^{2b)} c: EtOAc: *iso*-PrOH(1:1)

39: a product by dropping ClSO₃H into the pyridine solution of DDSO under refrigeration^{2a)}

40: potassium DDS mono-N-sulfamate (DDSS)^{2a)}

41: Promin, a, b····commercial Promin; c····synthesized Promin

42: DDS di-N-glucoside

43: Tetrasodium DDS di-N-glucosiduronate C₁, C_{1'}, -disulfonate (PrA)

44: sodium DDS mono-N-glucosiduronate(DDSG)

し、その 0.03~0.01 ml を東洋濾紙 No. 50 を用いてイソプロパノール: *n*-ブタノール: ユニバーサル緩衝液^{2a)} pH 7.4 (3:2:3) で展開したところ、像 4 (a) のように OAD 試液で陽性すなわち GA を含み、津田試液にも陽性な発色帯 2 本と津田試液のみに陽性な発色帯 1 本 (DDS) を検出した。その中で最も Rf 値の小さい 1 本は OAD 試液には強陽性であったが、津田試液には弱陽性かつ著しい tailing を示した。さらに、メタノール抽出液の 0.01ml を東洋濾紙 No. 51 を用いて Sørensen 緩衝液、pH 7.4 で 1 mA/cm, 4 時間冷却下泳

動したところ、像 4 (a₂) のように、PrA あるいはその GNH₂ 置換体は速く陽極に移動する 2 本、わずかに向陽極する 1 本および向陰極する 1 本計 4 本の津田試液発色帯を認め、この中で向陽極する 3 本はすべて OAD 試液に陽性を示した。それらを像 4 (a₂) の対照 DDSG と比較すれば、陰極側から DDS, DDSG, di-N-glucuronide ~ 亜硫酸結合分画と考えられる。一方家兎尿試料 (RU) では、DDS ならびに DDSG に該当する津田試液発色帯を認めたが、その他としては OAD 試液のみに強陽性な発色帯を陽極側に認めたに過ぎなかった。また ¹⁴C-PrA 家兎尿を同様 PPC または泳動にかけたところ、OAD 試液陽性発色帯部位に弱いながら放射能を認めた (像 4 (b₂))。なお像 4 (b₁) のように、酢酸エチル:ピリジン:0.1N NH₄OH (8:2:1) で PPC すると、DDSG は序々に分解し、GA は原点に留り、DDS のみ tailing しつつ上昇することを見出したので、家兎尿試料の 0.03 ml を展開したところ、この度は原点に鋭い放射能ピークを認めた。これらから、PrA の主代謝物は DDS および DDSG であり、ほとんど亜硫酸ナトリウムは脱離して代謝されることが明らかである。また定量的には何とも言えないが、¹⁴C-PrA 家兎尿中の ¹⁴C-糖酸による放射能が予定よりはるかに弱かったことは、¹⁴C-PrA がプロミン以上に不安定なので、DDS を多量に遊離し、同時に ¹⁴C-GA も遊離した結果、DDS は家兎体内既存の GA で再抱合されて DDSG を生じて DDSG-¹⁴C を同位体希釈し、¹⁴C-GA はそのものの自体の代謝へ繰込まれていったと考えられる。

またプロミン静注家兎尿については先報^{2b)}と重複するので多くを記さないが、3.0ml の 30% W/V プロミンを静注した家兎尿を像 3 (a~c) 展開系による TLC または先報^{2b)}のように *n*-プロパノール:*n*-ブタノール:ユニバーサル緩衝液, pH 7.4 (3:2:2) により PPC を行ったところ、先報同様 PPC では DDS, Rf 0.6 前後の主代謝物を認めたが、DDSG, MAcDDS は明瞭には検出されず、TLC では像 3 (a~c) の × 該当スポットと DDS が先報^{2b)}のとおり主代謝物として検出された。

総 括

TLC はスルホン剤の分離検出に有力な手段であることが認められた。特に従来困難であった DDS, DDSO, DDSO およびそれらの mono-N-acetylate が容易に分離検出されることが解った。また多数のスルホンアミド化合物を TLC にかけた結果、置換基の Rf 値にお

Fig. 4 Metabolites of PrA Detected in the Urine of Rabbit after the Intravenous Injection

PrA: Synthesized from DDS, NaHSO₃, and sodium glucuronate (GNa) ¹⁴C-PrA: Instead of GNa, GK-6-¹⁴C was used. sp. act. 7130±82cpm/mg. (Aloka FC-5 2π gas-flow counter)

A Portion (30ml) of the urine (45ml) collected for 12 hrs. from a rabbit (male, 3.2kg) was lyophilized with MeOH, and it was evaporated *in vacuo*. The residue was re-extracted with 2 ml of MeOH and 0.01 ml (a₁, a₂ b₂) or 0.03ml (b₁) was spotted.

Dose: a₁, a₂; 1050mg of PrA/3.5 ml of 5% GNa
b₁, b₂; 1050mg of ¹⁴C-PrA/3.5 ml of 5% GNa

a₁, b₁: Ascending PPC, filter paper; Toyo Roshi No. 50, 2×40cm

a₂, b₂: Paper electrophoresis, Sørensen's phosphate, pH 7.4, 1 mA/cm, for 4 hrs. under cooling, filter paper; Toyo Roshi No. 51, 2×24cm

43: PrA, 44: potassium DDS mono-N-glucosiduronate (DDSG) or DDSG-¹⁴C

45: A compound synthesized by glucuronic amide (GNH₂) instead of GNa in the case of PrA RU: Urine sample of a rabbit

(): Detected by 2-aminodiphenyl reagent, the others by Tsuda's reagent

よばず影響を概括しうる結果を得た。これらの分析方法により、SO 基を有する DDSO の生体内変化を、主として SO 基の異化に関して調べたところ、人排尿中では

SO は SO_2 へ酸化されているのみか S へも微量還元されていることが認められ、またその酸化は DDSO が一旦人体内でアセチル化されて MAcDDSO になってからの方が進行しやすいような結果を得た。従来の濾紙泳動法では、DDS と DDSO の分離は可能であったが^{3a)}、それらの MAc 体の相互分離は未成功であった。それゆえ先報^{3a)}の結果は MAcDDSO の部分にそれと分離しない MAcDDS が含まれていたと考えられ、また他方微量生成した DDS, DDSD(-S-), MAcDDSD は濾紙上の検出感度では検出できなかったものと考えられる。古くからジメチルスルフォキシドなどのジアルキル型 SO は腸内細菌などにより-S-へ還元されることが知られているが^{3a, b)}、ジアリル型 SO については確報を見出さない。一方酸化については TPN と link した肝マイクロゾーム系による加速が考えられるが^{3c)}、DDSO の場合自然放置でも酸化され、特に MAcDDSO のそれが著るしかったことは注目すべきかと考える。また附言することとして、DDSO を経口投与した家兎排尿中には、未変化 DDSO, MAcDDSO, DDS, MAcDDS しか検出できなかった。この結果、直ちに人と家兎の差異に言及することは避けたいが、人排尿中に TLC 検出感度限界量以上の還元体(-S-)が検出され、家兎排尿では検出できなかった点は興味深い。

DDS の不安定水溶性誘導体、同抱合体についても、TLC は優れた分離能を示したが、プロミンやそのグルクロン酸置換化合物である PrA の亜硫酸結合分画を、その含有するほかの分画と分離する場合には、PPC に較べて特に優れている点は無かった。しかし今回 PrA を用いた結果、その家兎尿中主代謝物が DDSG であり、プロミン同様脱亜硫酸していたことや、プロミンの家兎、人排尿^{2c)}中の主代謝物を DDS mono, di-N-glucosiduronate と TLC の Rf 値で比較する時に、仮に DDS mono-N-glucoside 標品が合成不可能な現状ではあっても、プロミン主代謝物が何かということに一示唆を与えたのではないかと考えられる。この結果が得られた理由は、PrA を構成する DDS N-glucuronides が、不安定ながらもまだその N-glucosides よりも安定で標品が合成可能だからである。これらから考えて、プロミン主代謝物は Sweet ら^{6a)}が推定し、Bushby^{6b)}が主張する DDS mono-N-glucose sulfonite ($4\text{-NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NHCH(OSO}_2\text{Na)(CHOH)}_4\text{CH}_2\text{OH-4'}$) ではなく

てその N-glucoside であるのみか、mono-N-glucoside である可能性が濃厚である。しかしその同定は、先報^{2b)}のとおり、N-glucosides $\rightleftharpoons$ Schiff base と思われる互変異性のためか、最終的に DDS: グルコースの定量比に依存せねばならず極めて難しい。なお ^{14}C -PrA 静注家兎排尿中の ^{14}C -糖酸による放謝能が予想よりはるかに低かったので、DDSG- ^{14}C の 1080mg , $1.2 \times 10^7 (1 \pm 0.0098)\text{cpm}$ を 9ml の生塩水に溶解し家兎右耳静脈に静注、12時間排尿 (60ml) および溶媒抽出法による 8 時間の血漿中放謝能を 2 π -ガスフロー計数器 (Aloka FC-1) で測定したところ、それぞれ $2.5 \times 10^5 (1 \pm 0.0057)\text{cmp}$ (投与量の 2.2%) および $866 (1 \pm 0.0163)\text{cmp/ml}$ に過ぎなかった。これは ^{14}C -PrA から家兎体内で生じる DDSG- ^{14}C と同様に、DDSG- ^{14}C が容易に DDS と ^{14}C -GA に解離し、後者が代謝減衰されるという一証拠事実ではあるまいか。ただし、 ^{14}C -GA の標識位置が C_1 ではなくて C_6 なので直ちに xylulose cycle 中へ繰込まれたとは断定できない。

本報の TLC 実験では、試液粉霧で発色しない di-N-acetate 類の検出は検討されていない。また自記走査濃度計による定量的実験については言及しなかったが、これらについては統報する。

本報要旨は第35回日本薬学会総会(昭和37年4月)および第41回日本薬学会総会(昭和43年4月)で報告した。

参考文献

- 1) Nicolaus, B., *et al.*: Experimentia, **17**, 473 (1961), J. Chromatog., **5**, 519(1961)^{a)}; Brodsky, T. F.: Anal. Chem., **35**, 343(1963)^{b)}.
- 2) Tsutsumi, S.: Chem. & Pharm. Bulletin, **9**, 432(1961)^{a)}; *Idem*: Ibid., **9**, 437(1961)^{b)}; *Idem*: レプラ, **30**, 149(1961)^{c)}.
- 3) 堤貞衛: レプラ, **28**, 268 (1959)^{a)}; *Idem*: Ibid., **29**, 75(1960)^{b)}; *Idem*: Ibid., **29**, 80 (1960)^{c)}; *Idem*: Ibid., **29**, 88(1960)^{d)}.
- 4) 為政脩ら: レプラ, **28**, 276(1959)
- 5) Ando, H., *et al.*: Jap. J. Microboil., **1**, 335(1957)^{a)}; Williams, J. H., *et al.*: Archiv. Biochem. Biophys., **113**, 251(1966)^{b)}; 藤田剛ら: 生化学, **41**, 296(1969)^{c)}.
- 6) Sweet, L. A., *et al.*, Intern. J. Leprosy, **18**, 254(1950)^{a)}; Bushby, S. R. M.: Pharmacol. Rev., **10**, 1(1958)^{b)}.