UDC 615.778.25 : 547.919.2

316. 扇谷正三郎：スルファミン剤の N-グルクロナイドの研究 (第3報^{*1})スルファチアゾール, スルファミン, スルファジアジンの代謝産物
としての N-グルクロナイドについてShōzaburō Ōgiya : On the N-Glucuronides of Sulfonamides. III. N-Glucuronide
as a Metabolite of Sulfathiazole, Sulfanilamide, and Sulfadiazine.(Tōhoku Pharmaceutical College^{*2})

Urine of rabbits administered with sulfathiazole, sulfanilamide, and sulfadiazine was examined by the same method as that reported in the preceding paper for detection of N-glucuronide as the metabolic product of sulfapyridine in rabbit urine^{*1}. The Rf values of the N-glucuronides from rabbit urine were compared with the values of the N-glucuronides of the three kinds of sulfa drug. The rate of conjugation of N-glucuronides of these three kinds of sulfa drug was 6~20% of the drug administered, the value being lower than that of sulfapyridine. The fact that the amount of N-glucuronide does not increase in parallel with increased dosage of the sulfa drugs is different from the result obtained with sulfapyridine. The method devised by the present author for separatory determination of the free, acetylated, and N-glucuronide types of various sulfanilamides was applied to the rabbit urine after administration of sulfathiazole and sulfonamide. It was thereby assumed that the free sulfonamide is not necessarily in equivalent amount of free glucuronic acid but increases with the increasing dosage administered and that the substance which shows diazo coloration reaction only after hydrolysis with hydrochloric acid is nothing but N⁴-acetylated compound in the majority.

(Received February 22, 1960)

従来スルファチアゾールの代謝産物としてその N⁴-アセチル体と少量の酸化成績体のエーテルグルクロナイドが、またスルファミンの代謝産物として大量の N⁴-アセチル体と少量の酸化成績体のエーテルサルフェイトが、スルファジアジンの代謝産物としてその N⁴-アセチル体と極めて少量の酸化成績体が知られている¹⁾。また Scudi, Jelinek²⁾ はスルファミン剤の代謝産物を有機溶媒 (ブタノール) 可溶のグループと水溶性グループに分け、前者の中に遊離体と N⁴-アセチルモノヒドロキソ誘導体を、後者の中にモノヒドロキソ誘導体のエーテルサルフェイトとエーテルグルクロナイドをあげている。

著者は前報^{*1} においてスルファピリジンを家兎に投与して、その排出尿の中に N-グルクロナイドの存在することを buffered-filter paper chromatography (BPC) により同定すると共に、定量的にもその存在を証明することができたが、今回同じスルファミン剤であるスルファチアゾール, スルファミン, スルファジアジンについて同様の検討を加え、それらの N-グルクロナイドの存在を証明することができた。

Buffered-filter paper chromatography による家兎尿中のスルファチアゾール-N-グルクロナイド (ST-N-G-Na), スルファミン-N-グルクロナイド (S-N-G-Na), およびスルファジアジン-N-グルクロナイド (SD-N-G-Na) の同定 合成した ST-N-G-Na, S-N-G-Na, SD-N-G-Na とこれらの母体であるスルファミン剤を投与した家兎尿の凍結乾燥末, または凍結乾燥末からアセトンにより遊離体と N⁴-アセチル体を除去後水で溶出したフラクションについて 7.0, 9.0, 11.0 の各 pH における BPC を同時に実施した結果, Table I に示すように薬物を投与した尿の chromatogram の中に合成した N-グルクロナイドと一致する Rf 値を持ち, 各スルファミンならびにグルクロン酸の反応を呈するスポットを確認した。

またそのスポットはいずれも酸性溶媒によつてその構成分であるスルファミン剤とグルクロン酸に分解する。

*1 第2報：本誌 79, 953(1959).

*2 Odawara, Harano-machi, Sendai.

1) R. T. Williams : "Detoxication Mechanisums," 160(1949), John Wiley & Sons, Inc., New York.

2) J. V. Scudi, V. C. Jelinek : J. Pharmacol. Exptl. Therap. 81, 218(1943).

Table I. Identification of Sulfathiazole-N-glucuronide, Sulfanilamide-N-glucuronide, and Sulfadiazine-N-glucuronide by Buffered Filter-Paper Chromatography

N-Glucuronide pH	Rf value					
	ST-N-G-Na		S-N-G-Na		SD-N-G-Na	
	Synthetic	Metabolite	Synthetic	Metabolite	Synthetic	Metabolite
7.0	0.08	0.08 (0.075)	0.05	0.05	0.02	0.02
9.0	0.05	0.05 (0.055)	0.05	0.05	0.02	0.02
11.0	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01

Table II. Quantity of Glucuronic Acid in Various Forms and Sulfonamides in 24-hr. Urine of Rabbit given Sulfathiazole, Sulfanilamide, and Sulfadiazine (mmol.)

a) Sulfathiazole									
Dose (mmol.)	Control		0.70		1.05		1.40		
	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ	
T-G	0.575	0.087	0.696	0.054	0.584	0.080	0.630	0.132	
F-G	0.109	0.042	0.158	0.030	0.136	0.042	0.132	0.090	
Est-G	0.062	0.026	0.026	0.010	0.016	0.019	0.047	0.030	
N-G	0.093	0.021	0.232	0.050	0.215	0.060	0.218	0.055	
Et-G	0.290	0.040	0.274	0.006	0.225	0.050	0.241	0.060	
F+Ng-Sulf	0.010	0.003	0.206	0.049	0.385	0.186	0.435	0.102	
Acet-Sulf	0.000	0.001	0.340	0.077	0.408	0.175	0.511	0.134	
N-Glucuronide conjugation (%)			19.9		11.6		8.9		

b) Sulfanilamide							
Dose (mmol.)	0.70		1.40		2.10		
	mean	σ	mean	σ	mean	σ	
T-G	0.575	0.054	0.648	0.048	0.730	0.074	
F-G	0.116	0.043	0.142	0.034	0.127	0.075	
Est-G	0.066	0.036	0.028	0.022	0.048	0.035	
N-G	0.164	0.018	0.211	0.036	0.222	0.053	
Et-G	0.249	0.011	0.263	0.022	0.321	0.051	
F+Ng-Sulf	0.124	0.017	0.331	0.157	0.614	0.336	
Acet-Sulf	0.455	0.043	0.762	0.145	0.824	0.430	
N-Glucuronide conjugation (%)			10.1		8.3		6.1

c) Sulfadiazine							
Dose (mmol.)	0.70		0.96		1.16		
	mean	σ	mean	σ	mean	σ	
T-G	0.458	0.192	0.621	0.067	0.624	0.103	
F-G	0.093	0.036	0.153	0.054	0.159	0.074	
Est-G	0.007	0.010	0.005	0.001	0.032	0.042	
N-G	0.145	0.026	0.219	0.046	0.229	0.044	
Et-G	0.219	0.101	0.233	0.046	0.249	0.046	
F+Ng-Sulf	0.180	0.016	0.237	0.060	0.376	0.130 ^{a)}	
Acet-Sulf	0.449	0.064	0.769	0.106	0.856	0.135	
N-Glucuronide conjugation (%)			7.4		13.1		11.7

mean : mean value of 7 experiments, σ : standard deviation.

a) スルファミン剤の排出総量が薬物投与量を若干超過することがあるのは、スルファミン剤よりジアゾ呈色度の強い誘導体の存在によるものと考えられる。

スルファチアゾール、スルファミンおよびスルファジアジン負荷家兎尿中の各種グルクロナイドおよびスルファミン剤の定量 上記の各スルファミン剤を負荷した家兎尿中の総グルクロン酸 (T-G), 遊離型 (F-G), エステル型 (Est-G), N-グルクロナイド型 (N-G), エーテル型 (Et-G) の各種グルクロン酸を定量すると共に, ジアゾ法によつて遊離型と N-グルクロナイド型のスルファミン剤の合計量 (F+Ng-Sulf), および塩酸によつて加水分解を受けて初めてジアゾ呈色を示す N⁴-アセチル体およびその他の N⁴-誘導体の合計量 (Acet-Sulf) を定量し, Table II-a), b), c) に示す結果を得た. なお表中に N-グルクロナイド型グルクロン酸の増量の負荷量に対する mol 比を % で示したが, この値はスルファミン剤の N-グルクロナイド抱合率を表わすものと考えられる.

Table II の結果を考察すればつぎのようになる. 1) スルファチアゾール, スルファミン, スルファジアジン三者共に薬物負荷によつて家兎尿中の N-グルクロナイド型グルクロン酸の増量を示す. このことは BPC の結果と共に代謝産物としての N-グルクロナイドの排出を証明するものと考えられる. 2) 体内で N-アセチル化を受けることの大きいスルファミンは総グルクロン酸の増量が著しくないことから, 一応 N-グルクロナイドの排出がないものと推定³⁾してきたが, 薬物負荷量を適当にコントロールした (家兎一匹当たり 0.70~2.10 m.mol) 上で, N-グルクロナイド型グルクロン酸の増量を測定するとその増量が見られることが判明した. 3) スルファミン剤の負荷量が小さ過ぎる場合は N-グルクロナイド抱合が認められず, また大き過ぎる場合は機能障害が起こるためか N-グルクロナイド抱合が僅かとなる. 負荷量の或る範囲内で N-グルクロナイド抱合が明らかに見られる. 4) これらのスルファミン剤の N-グルクロナイド抱合の度合いは薬物負荷量の 6~20% でスルファピリジンの場合に比べるといずれも低い. またスルファピリジンの場合のように負荷量を増すにつれて N-グルクロナイドの増量が大になるということがなく, 負荷量が或る範囲内では N-グルクロナイド増量に余り変化がないように見える.

家兎尿中の遊離型 N⁴-アセチル型および N-グルクロナイド型^{*3} 各種スルファミン剤量の測定 著者はスルファミン剤投与家兎尿中の遊離スルファミン剤が遊離グルクロン酸といかなる量比にあるものか, また塩酸で加水分解を受けて初めてジアゾ呈色を行なう物質 (Acet-Sulf) の中 N⁴-アセチルスルファミン剤が何程の量を占めるものかを検討する目的で, 一つの遊離型 (F-Sulf), N⁴-アセチル型 (N⁴-Acet-Sulf), および N-グルクロナイド型 (Ng-Sulf) の各種のスルファミン剤量を測定する方法を考案し, かつこれらの標準品を生理尿に添加した液についてテストの結果, 一応満足すべき結果を得た (Table IV). この方法の原理はセルロースパウダーカラムに載せた家兎尿減圧乾燥末から先ずアセトンで遊離型と N⁴-アセチル型スルファミン剤を溶出し, その溶出液についてそれぞれを定量し, つぎに pH 8.0 の希アンモニア水で N-グルクロナイド型とその他の水溶性誘導体を溶出し, その溶出液についてそれぞれを定量することにある. この方法をスルファチアゾールおよびスルファミン投与家兎尿に適用した結果を, 同じ尿について前項の定量法で得られた F-G, N-G, F+Ng-Sulf, Acet-Sulf の値と共に Table III に示す.

Table III. Separatory Estimation of Sulfonamides in Various Forms in Urine of Rabbit given Sulfathiazole and Sulfanilamide

	Dose (mmol.)	F-G (mmol.)	N-G (mmol.)	F+Ng-Sulf (mmol.)	F-Sulf (mmol.)	Ng-Sulf (mmol.)	Acet-Sulf (mmol.)	N ⁴ -Acet-Sulf (mmol.)
Sulfathiazole	1.05	0.145	0.202 (0.108)	0.160	0.090	0.070	0.129	0.102
〃	1.40	0.104	0.171 (0.083)	0.612	0.525	0.086	0.200	0.133
Sulfanilamide	1.40	0.135	0.170 (0.083)	0.180	0.099	0.081	1.244	1.233
〃	2.10	0.104	0.185 (0.091)	0.483	0.366	0.093	1.250	1.151

N-G 欄 () 内の数字は N-G の増量 mol を示す.

上の表から薬物負荷家兎尿中の遊離のスルファチアゾールまたはスルファミンは必ずしも遊離グルクロン酸と当量関係になく, 投与量を増すと共に遊離スルファミン剤のみが増す傾向にあること, およびこれ迄塩酸で加水分解を受けて初めてジアゾ呈色するものを一応 Acet-Sulf として定量してきたが, このものは大部分 N⁴-アセチルスルファチアゾールまたは N⁴-アセチルスルファミンで, 少量^{*4}の水溶性 N⁴-誘導体 (スルファミン剤の体内

3) M. Ishidate, S. Ōgiya, Y. Hashimoto, S. Takitani: Pharm. Weekblad **93**, 216(1958).

*3 厳密には僅かの酸化成績体のエーテルサルフェイト, エーテルグルクロナイドが含まれる.

*4 スルファピリジン負荷家兎尿ではこの量は相当大きい.

酸化成績体の N⁴-アセチルエーテルサルフェイトまたは同 N⁴-アセチルエーテルグルクロナイド) その他を含むことが推定される。

実験の部

同定用および定量用標準品

sodium sulfathiazole-N⁴-glucosiduronate mp 197~200°(decomp), 板状晶. 本研究第1報⁴⁾の製法, 精製法による.

sodium sulfanilamide-N⁴-glucosiduronate mp 180°(decomp), 絹光沢板状晶.

sodium sulfadiazine-N⁴-glucosiduronate mp 184~188°(decomp), 無晶形.

スルファミンまたはスルファチアゾールとグルクロン酸ナトリウムをエチレングリコールとジメチルホルムアミドの混液中で縮合させて製す^{*5}.

sulfathiazole mp 203.5°, sulfanilamide mp 165°, sulfadiazine mp 253.5°.

いずれも局方品を EtOH から再結精製.

N⁴-acetylsulfanilamide mp 217°

アセトアニリドをクロルスルホン化し, NH₃ と反応させて製す. EtOH から再結精製す.

N⁴-acetylsulfathiazole mp 254°, N⁴-acetylsulfadiazine mp 252°.

スルファチアゾールまたはスルファジアジンを冷時ピリジン, Ac₂O でアセチル化して製す. EtOH から再結精製. このものはいずれも N NaOH に溶け, 冷時ジアゾ呈色を行わず加水分解して初めてジアゾ呈色を示す.

家兎に対する薬物の投与 本研究第2報^{*1}の方法に準ずる.

Buffered filter-paper chromatography 体重 2.2~2.5 kg の家兎にそれぞれスルファチアゾール 1.05, スルファミン 2.10, スルファジアジン 0.96 m・mol を投与, その 24 hr 尿の凍結乾燥末を用い 7.0, 9.0, 11.0 の各 pH において実施した. 使用した buffer の組成, 展開溶媒, 展開方法, 呈色方法等はすべて本研究第2報^{*1}の方法に準ずる.

家兎尿中各種グルクロン酸の定量 採取尿の処理は本研究第2報^{*1}の方法に準ずる. 薬物投与 24 hr 後の家兎尿の pH はいずれも pH 7.8~8.4 である. 各種グルクロン酸の分離測定は本研究第1報⁴⁾の方法に準ずる. なおスルファミン-N-グルクロナイド, スルファジアジン-N-グルクロナイド両者の標準液について第1報記載の方法で NaBH₄ による還元, 0.1N NaOH によるアルカリ分解, および NaBrO 酸化に対する態度を検討し, 還元およびアルカリ分解に抵抗することおよび NaBrO 酸化に対しては大部分酸化を受けることを確かめた.

家兎尿中 F+Ng-Sulf, Acet-Sulf 各量の定量 本研究第2報^{*1}のスルファピリジンの定量に準ずる. 但し冷時のジアゾ呈色度から求めたスルファミン剤の量を F+Ng-Sulf, HCl で加水分解後のジアゾ呈色度から求めた総スルファミン剤量から上の量を控除した量を Acet-Sulf で示した.

標準吸光度	sulfathiazol	20 γ=0.28
	sulfanilamide	20 γ=0.42
	sulfadiazine	20 γ=0.25 (filter 532 mμ, l=10 mm)

家兎尿中遊離および各種抱合型スルファミン剤量の分離測定^{*6} 薬物投与家兎尿の 25~50 倍液についてジアゾ呈色法によつて総スルファミン剤の量を求める. 原尿をスルファミン剤量 (ス剂量) が 300~500 γ/cc となるように希釈し, その 3 cc を小口径のペトリジャーレに取り一夜減圧デシケーター中で乾固する. 尿乾固物をセルロースパウダー 150 mg と混合し, Me₂CO を用いて充填した 1×5 cm のセルロースパウダーカラムに載せる. ペトリジャーレの内容をさらに 50 mg のセルロースパウダーを用いて拭いカラムに載せる.

溶出は先ず溶媒として Me₂CO を用いて行ない, 一定量の溶出液 (スルファチアゾール 100, スルファミン 50, スルファジアジン 150 cc^{*7}) を集める. その 4~8 cc を採り Me₂CO を減圧で留去してから, 溶出液中のス剂量と総ス剂量を定量, 溶出液中の総ス剂量とス剂量からつぎの各量を算出する.

$$F-Sulf = \text{ス剂量} \times \text{希釈倍率} \times \frac{\text{尿量}}{3}$$

$$N^4\text{-Acet-Sulf} = (\text{総ス剂量} - \text{ス剂量}) \times \text{希釈倍率} \times \frac{\text{尿量}}{3}$$

つぎに NH₄OH 水を用い pH 8.0 に調整した蒸留水をカラムに流し 20~25 cc の溶出液を集める. 溶出の速度はいずれも 6 sec 間に一滴とする. 溶出液 1~2 cc についてス剂量と総ス剂量を定量. 溶出液中の総ス剂量およびス剂量からつぎの各量を算出する.

$$Ng-Sulf = \text{ス剂量} \times \text{希釈倍率} \times \frac{\text{尿量}}{3}$$

4) 扇谷, 片岡: 本誌 79, 949(1959).

*5 扇谷, 橋本: 本誌投稿中.

*6 この方法はスルファピリジン投与の家兎尿にも適用できる.

*7 スルファジアジンは F-Sulf, N⁴-Acet-Sulf の溶出率が約 80%に止まる. ジメチルホルムアミドを用いると溶出率はよくなるがグルクロナイドが若干溶出される.

$$\text{その他の水溶性 } N^4\text{-誘導体量} = (\text{総ス剂量} - \text{ス剂量}) \times \text{希釈倍率} \times \frac{\text{尿量}}{3}$$

この方法を遊離型, N^4 -アセチル型, N -グルクロナイド型各種スルファミン剤の標準品を添加した生理家兔尿に適用して, F-Sulf, Ng-Sulf, N^4 -Acet-Sulf の各量を定量し, これ等の値を前項の方法で尿から直接定量した F+Ng-Sulf, Acet-Sulf の各量と照合して Table IV に示す結果を得た。

Table IV. Separative Estimation of Sulfathiazole and Sulfanilamide in Various Forms in Physiological Urine added with Standard Substances (mean value of 5 experiments)

	Sulfathiazole (γ /cc.)	Sulfanilamide (γ /cc.)		Sulfathiazole (γ /cc.)	Sulfanilamide (γ /cc.)
F+Ng-Sulf	211.4	185.7	Acet-Sulf	62.9	90.5
F-Sulf	69.7	96.9	N^4 -Acet-Sulf	61.1	86.5
Ng-Sulf	142.9	95.2			

本研究は東大薬学部 石館教授の御懇篤な御指導を頂いたものである。深甚の謝意を表します。また本研究に当たり理解ある御援助を頂いた当学 高柳理事長, 種々御助言を頂いた東大 田村助教授他薬品分析化学教室員各位, 実験の補助をされた当学学生諸君に感謝の意を表します。

東北薬科大学

UDC 547.859.3

317. 白川研蔵：ピリミジン誘導体の研究 (第9報^{*1}) Mercapto-s-triazolopyrimidine 類

Kenzo Sirakawa: Studies on Pyrimidine Derivatives. IX.
Mercapto-s-triazolopyrimidines.

(Research Laboratories, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.^{*2})

Reaction of 2-hydrazino-4-hydroxy-6-methylpyrimidine (I) and carbon disulfide afforded 3-mercapto-5-hydroxy-7-methyl-s-triazolo[4,3-*a*]pyrimidine (II) and 3-mercapto-5-methyl-7-hydroxy-s-triazolo[4,3-*a*]pyrimidine (VII). (VII) alone was obtained by pyrolysis of 1-(4-hydroxy-6-methyl-2-pyrimidinyl)-4-phenyl-3-thiosemicarbazide (XV), formed by the reaction of (I) and phenyl isothiocyanate. Heating of (II) at 250~255° effects its isomerization to (VII).

Reaction of 2-hydrazino-4,6-dimethylpyrimidine (III) and carbon disulfide afforded 3-mercapto-5,7-dimethyl-s-triazolo[4,3-*a*]pyrimidine (XXIV) but (XXIV) easily underwent isomerization to 2-mercapto-5,7-dimethyl-s-triazolo[2,3-*a*]pyrimidine (XXVI). Similar mercapto compounds were obtained from 2-hydrazinopyrimidine (XXVII) and 2-hydrazino-4-methylpyrimidine (XXII).

(Received February 24, 1960)

Bower 等¹⁾は 2-hydrazino-4-hydroxy-6-methylpyrimidine (I) に希エタノール中水酸化カリウムの存在下二硫化炭素を作用させると mp 273°(decomp) の 3-mercapto-5-hydroxy-7-methyl-s-triazolo[4,3-*a*]pyrimidine (II) が, また同様に 2-hydrazino-4,6-dimethylpyrimidine (III) から mp 241°(decomp) の 3-mercapto-5,7-dimethyl-s-triazolo[4,3-*a*]pyrimidine (IV) が得られると報告している。Bower 等とは別に著者も同様な反応によつて (II), (IV) のほか数種の 3-メルカプト化合物を合成したが²⁾, その際得られた新しい知見について述べる。

*1 第8報: 本誌 80, 956(1960).

*2 Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) J. D. Bower, F. P. Doyle: J. Chem. Soc. 1957, 727.

2) 白川: 特許公告 8072 (昭和 33 年).