16. 柴崎寿一郎, 坂本芳幹, 中村悦子: チオ尿素誘導体の代謝に関する研究 (第1報)
4,4'-Diethoxythiocarbanilide 投与家兎尿中の代謝物について その 1

Juichiro Shibasaki, Yoshiki Sakamoto, and Etsuko Nakamura: Studies on
the Metabolism of Thiourea Derivatives. I. On the Metabolites of
4,4'-Diethoxythiocarbanilide in Rabbit Urine. (1).

(Pharmaceutical Faculty, Nagasaki University*1)

Among the thiocarbanilide derivatives, being observed as an effective therapeutic agent for leprosy and tuberculosis, 4,4'-diethoxythiocarbanilide (EtO-OEt) was administered per os to male rabbits and the metabolites excreted in urine were studied. Ether soluble metabolite was separated by the thin layer chromatography (TLC) and alumina column chromatography into non-reacted EtO-OEt, 4-ethoxy-4'-hydroxythiocarbanilide (EtO-OH), 4,4'-dihydroxythiocarbanilide (HO-OH), 4,4'-diethoxycarbanilide (EtO-O-OEt), 4-ethoxy-4'-hydroxycarbanilide (EtO-O-OH) and 4,4'-dihydroxycarbanilide (HO-O-OH), produced by de-ethylation and desulfurization, as well as the decomposed phenetidine besides a few unknown substances. As to the conjugates, though they were not obtained purely, the Rf values of their crude conjugates were compared with that of synthesized compounds, and the hydrolysis of β -glucuronidase suggested that the presence of O-glucuronides with EtO-OH, EtO-O-OH and HO-OH have been identified. Smith did not observed the desulfurization product in rabbit urine metabolites by the administration of thiocarbanilide (H-H) and its some derivatives. However, the author, by tracing back the metabolism of H-H, identified the desulfurization product 4-hydroxycarbanilide (H-O-OH) by TLC.

(Received August 21, 1964)

チオ尿素誘導体の薬理作用の多様性についてはよく知られており,¹⁾ 医薬品として使用されているものも多く、生体内代謝の研究対象として意義あるものと思う。

今回は現在結核およびレプラの治療剤として注目されている thiocarbanilide 類²⁾ のうち、4,4'-diethoxythiocarbanilide 投与家兎尿中の代謝物について報告する。

なお thiocarbanilide 類の代謝については、最近 Smith 等^{3,4)} が家兎を用い thiocarbanilide はか 3,4 の誘導体について検討しているが、著者等が 4,4'-diethoxythiocarbanilide の代謝について得た知見と異なる点があったので thiocarbanilide の代謝について追試を併せ行なった。

略記号の使用について 本報における thiocarbanilide 類および carbanilide 類の置換基の位置は 4- および 4'- に限られているので、以後 thiocarbanilide 類の場合は H-H, EtO-OEt, EtO-OH のように記し、それぞれ

Chart 1. Examples of Simplified Symbols for Thiocarbanilides and Carbanilides Used in This Paper

*1 Bunkyo-cho, Nagasaki.

1) D. C. Schroeder: Chem. Revs., 55, 181 (1955).

2) “最近の新薬” 第13集 13 (1962) など。

3) R. L. Smith, R. T. Williams: J. Med. Pharm. Chem., 4, 97 (1961).

4) *Idem*: *Ibid.*, 4, 163 (1961).

thiocarbanilide, 4,4'-diethoxythiocarbanilide, 4-ethoxy-4'-hydroxythiocarbanilide を表わし, carbanilide 類の場合は $\text{H}-\text{O}-\text{H}$, $\text{EtO}-\text{O}-\text{OEt}$, $\text{EtO}-\text{O}-\text{OH}$ のように記し, それぞれ carbanilide, 4,4'-diethoxycarbanilide, 4-ethoxy-4'-hydroxycarbanilide を表わす. またグルクロナイドにおいてはそのグルクロン酸部を G, その Na 塩の場合は GNa で省略する (Chart 1).

実 験 の 部

Thiocarbanilide 類の安定性について thiocarbanilide 類は一般に熱に対して不安定で, 特に非対称型誘導体においては dismutation ($2\text{RNHCSNHR}' \rightarrow \text{RNHCSNHR} + \text{R}'\text{NHCSNHR}'$) を起こすことが知られているので,^{4,5)} 本研究における代謝物の取扱いはできるだけ室温以下の温度で行なった. また非対称型 thiocarbanilide 類の合成, 再結晶などのため加熱を要する場合はなるべく低温, 短時間で行なうように留意し, 得られた標品は TLC により単一性を確かめて使用した.

標品の合成^{*2} $\text{EtO}-\text{OEt}$ および $\text{H}-\text{H}$ の代謝物の同定のため必要と思われる thiocarbanilide 類および carbanilide 類を合成した. 以下文献未知のものについて合成法を述べる.

(1) thiocarbanilide 類: 対称型と非対称型があり, その合成法を異にする.

対称型の $\text{EtO}-\text{OEt}$, $\text{H}-\text{H}$, $\text{HO}-\text{OH}$ (以上文献既知) および $\text{NaGO}-\text{OGNa}$ はアミン類と CS_2 を反応させる常法により製した.

Thiocarbanilide-4,4'-di- β -D-glucopyranosiduronate, disodium salt ($\text{NaGO}-\text{OGNa}$) *p*-aminophenyl- β -D-glucopyranosiduronic acid^{*3,6)} (以後 PAG と略す) 300 mg. を 10% NaHCO_3 0.9 ml. に溶解, EtOH 20 ml., S 10 mg. および CS_2 0.2 ml. を加え 15 hr. 還流, 生じた析出物を濾取, dil. EtOH から再結晶して無色吸湿性の無晶形物質 200 mg. を得. m.p. ca. 235° (decomp.). 本物質を β -glucuronidase で加水分解して, $\text{HO}-\text{OH}$ とグルクロン酸を確認した (方法は後述の代謝物のグルクロナイドの場合と同様). $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_{14}\text{N}_2\text{SNa}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Anal. Calcd.: C, 44.52; H, 4.18; N, 4.15. Found: C, 44.92; H, 4.69; N, 4.09.

非対称型の $\text{EtO}-\text{OH}$,^{*4,7)} $\text{H}-\text{OH}$, $\text{HO}-\text{OG}^3)$ (以上文献既知), $\text{EtO}-\text{OCH}_2\text{COOH}$, $\text{EtO}-\text{OG}$, $\text{H}-\text{OSO}_3\text{K}$, $\text{EtO}-\text{OSO}_3\text{K}$, $\text{HO}-\text{OSO}_3\text{K}$ の合成はアミン類と phenylisothiocyanate 類の反応による.

4-Carboxymethoxy-4'-ethoxythiocarbanilide ($\text{EtO}-\text{OCH}_2\text{COOH}$) 原料 *p*-aminophenoxyacetic acid について: Bokarev など⁸⁾ の方法により合成した. 彼らは m.p. $186\sim 188^\circ$ (decomp.) の H_2SO_4 塩として捕捉しているが, 著者などは H_2SO_4 塩を H_2O から再結晶をくり返しているうちに m.p. 250° 以上の無色針状晶を得. 分析の結果 H_2SO_4 塩でなく $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 体に一致する. $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3\text{N} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ Anal. Calcd.: C, 54.54; H, 5.72; N, 7.97. Found: C, 54.45; H, 5.66; N, 8.00. $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 体を P_2O_5 上 110° , 8 hr. 減圧乾燥すると無水物が得られる. $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$ Anal. Calcd.: C, 57.48; H, 5.43; N, 8.38. Found: C, 57.57; H, 5.37; N, 8.53.

$\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3\text{N} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 400 mg. を 10% NaHCO_3 液 2.0 ml. に温時溶解, これに *p*-ethoxyphenylisothiocyanate (文献⁷⁾ に記載の isothiocyanate 類の一般製法により合成) 500 mg. のアセトン 2.0 ml. 溶液を加える. 始め 2 層になっているが水浴上でときどき振盪しながら $50\sim 60^\circ$ で加熱すると約 10 min. で均質になるとほとんど同時に沈殿が析出する. 濾取して H_2O 約 30 ml. に温時溶解, conc. HCl を加え強酸性となし析出する粘土状沈殿を取り, 水洗, EtOH より再結晶, 無色針状晶. m.p. $184\sim 185^\circ$. 収量 240 mg. $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$ Anal. Calcd.: C, 58.95; H, 5.24; N, 8.09. Found: C, 58.78; H, 5.30; N, 8.00.

4-Ethoxythiocarbanilide-4'- β -D-glucopyranosiduronic acid ($\text{EtO}-\text{OG}$) PAG 200 mg. を 10% NaHCO_3 液 0.6 ml. に溶解, これに *p*-ethoxyphenylisothiocyanate 130 mg. のアセトン 1.0 ml. 溶液を加え水浴上 $50\sim 60^\circ$ で振りまぜながら約 10 min. 加熱すると沈殿が析出する. 濾取, 一部を H_2O から再結晶すると m.p. $228\sim 229^\circ$ (decomp.) の $\text{EtO}-\text{OGNa}$ を得る. Na 塩に conc. HCl を加え強酸性にしてしばらく放置, 析出する物質を濾取, エーテル- EtOH の混液で洗浄, 粗収量 200 mg., H_2O から再結晶, 無色微細針状晶. m.p. 148° (decomp.). 本物質を β -glucuronidase で加水分解, $\text{EtO}-\text{OH}$ とグルクロン酸を確認. $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{N}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ Anal. Calcd.: C, 52.27; H, 5.43; N, 5.81. Found: C, 52.94; H, 5.81; N, 5.24.

*2 融点はすべて未補正.

*3 本物質は *p*-aminophenol 投与家兎尿から文献のごとく Pb 塩を経て単離することもできるが, 投与前にカテーテルを用い排尿し, 投与後 3.5 hr. 尿を採取, AcOH にて pH 5.5 に調整後 1 夜冷蔵庫中に放置するだけで得られる. 本法による収量は文献記載とほぼ同じである.

*4 m.p. $168\sim 169^\circ$ (EtOH から) (lit.⁷⁾ m.p. 196° , ただし Maquenne block を用いて測定). このように m.p. に差異の生ずるのは dismutation のためと考えられている.

5) H. H. Capps, W. M. Dehn: J. Am. Chem. Soc., 54, 4301 (1932).

6) R. T. Williams: Biochem. J., 37, 329 (1943).

7) Buu-Hoi, Xuong, Nam: J. Chem. Soc., 1955, 1576.

8) K. S. Bokarev, N. N. Mel'nikov: Doklady Akad. Nauk S. S. R., 97, 255 (1955) (C. A., 49, 8846^b (1955)).

4-Hydroxythiocarbanilide-4'- β -D-glucopyranosiduronic acid (HO-OG) 本物質は Smith など³⁾ が HO-OH 投与家兔尿から単離している。PAG 200 mg. と *p*-hydroxyphenylisothiocyanate⁹⁾ 110 mg. から EtO-OG の場合と同様にして粗製品 200 mg. を得。H₂O から再結晶, 無色微細針状晶。m.p. 173°(decomp.). β -glucuronidase による加水分解で HO-OH とグルクロン酸を確認。Smith などは分析の結果 1.5 H₂O 体と報告しているが, 著者などの合成品では分析値は 1 H₂O 体にあう。C₁₉H₂₀O₈N₂S·H₂O Anal. Calcd.: C, 50.22; H, 4.88; N, 6.16. Found: C, 50.37; H, 5.00; N, 5.89.

Potassium thiocarbanilide-4-sulfate (H-OSO₃K) potassium *p*-aminophenylsulfate¹⁰⁾ (以後 PAS と略す) 320 mg. を H₂O 1.5 ml. に溶解, これに phenylisothiocyanate 180 mg. のアセトン 2.0 ml. 溶液を加え, とときどき振盪しながら水浴上 50~60° で約 10 min. 加熱, 析出する結晶を濾取, エーテル-EtOH の混液で洗浄, H₂O から再結晶, 無色針状晶。m.p. ca. 255°(decomp.). 収量 220 mg. C₁₃H₁₁O₄N₂S₂K Anal. Calcd.: C, 43.08; H, 3.06; N, 7.33. Found: C, 43.51; H, 3.19; N, 7.74.

Potassium 4-ethoxythiocarbanilide-4'-sulfate (EtO-OSO₃K) PAS 300 mg. と *p*-ethoxyphenylisocyanate 180 mg. から H-OSO₃K の場合と同様にして合成。H₂O から再結晶, 無色針状晶。m.p. >260°. 収量 250 mg. C₁₅H₁₅O₅N₂S₂K Anal. Calcd.: C, 44.32; H, 3.72; N, 6.89. Found: C, 44.28; H, 3.81; N, 6.90.

Potassium 4-hydroxythiocarbanilide-4'-sulfate (HO-OSO₃K) PAS 490 mg. と *p*-hydroxyphenylisocyanate 300 mg. から同様にして合成。H₂O から再結晶, 無色微細針状晶。m.p. 246~247°(decomp.). 収量 320 mg. C₁₃H₁₁O₅N₂S₂K Anal. Calcd.: C, 41.25; H, 2.93; N, 7.40. Found: C, 41.00; H, 3.42; N, 7.55.

(2) carbanilide 類: 対称型の EtO-O-OEt, H-O-H, HO-O-OH (ともに文献既知) はアミン類と尿素の縮合¹¹⁾ により製した。非対称型の H-O-OH (文献既知), EtO-O-OH, EtO-O-OCH₂COOH, EtO-O-OG, HO-O-OG は対応する thiocarbanilide 類から Na₂O₂ による脱硫反応¹²⁾ を利用して合成した。すなわち thiocarbanilide 類 1 部を H₂O 約 40~50 部に懸濁し, 攪拌下室温で Na₂O₂ 1.5 部を粉末のまま少しずつ加えて行くとわずかに発熱して透明な溶液になる。Na₂O₂ 添加後反応液を 10% HCl で酸性にして得られる沈殿を濾取して再結晶する。粗収率 60~80%。

4-Ethoxy-4'-hydroxycarbanilide (EtO-O-OH) EtOH から再結晶, 無色針状晶。m.p. 213°. C₁₅H₁₅O₃N₂ Anal. Calcd.: C, 66.16; H, 5.92; N, 10.29. Found: C, 66.58; H, 6.01; N, 10.35.

4-Carboxymethoxy-4'-ethoxycarbanilide (EtO-O-OCH₂COOH) EtOH から再結晶, 無色針状晶。m.p. 197°. C₁₇H₁₇O₅N₂ Anal. Calcd.: C, 61.81; H, 5.49; N, 8.48. Found: C, 61.80; H, 5.70; N, 7.88.

4-Ethoxycarbanilide-4'- β -D-glucopyranosiduronic acid (EtO-O-OG) H₂O から再結晶, 無色微細針状晶, m.p. 187°(decomp.). β -glucuronidase による加水分解で EtO-O-OH とグルクロン酸を確認。C₂₁H₂₄O₉N₂·H₂O Anal. Calcd.: C, 54.07; H, 5.62; N, 6.01. Found: C, 53.86; H, 5.22; N, 6.28.

4-Hydroxycarbanilide-4'- β -D-glucopyranosiduronic acid (HO-O-OG) H₂O から再結晶, 無色微細針状晶, m.p. 170~173°(decomp.). β -glucuronidase による加水分解で HO-O-OH とグルクロン酸を確認。C₁₉H₂₀O₈N₂·2H₂O Anal. Calcd.: C, 50.00; H, 5.30; N, 6.14. Found: C, 50.18; H, 5.31; N, 6.27.

PPC の条件 濾紙: 東洋濾紙 No. 50 (2×40 cm., 検出用) および (40×40 cm., 分離抽出用). 展開溶媒: S-I) BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5), S-II) conc. NH₄OH 飽和 BuOH. 上昇法。

TLC の条件 吸着層: 和光純薬製シリカゲル B-5 を約 250 μ の厚さに塗布し 110°, 1.5 hr. 乾燥したもの。展開溶媒: S-III) benzene-AcOEt (6:4), S-IV) 同 (8:2), S-V) 同 (3:7)。

PPC および TLC における標品の検出試薬 つぎの試薬を用い標品に対する呈色を検討した。

R-I) iodine-Na azide 試薬,³⁾ R-II) 5% AgNO₃ 水溶液,³⁾ R-III) naphthoresorcinol 試薬,³⁾ R-IV) aniline hydrogenphthalate 試薬,¹³⁾ R-V) NaIO₄-KMnO₄-benzidine 試薬,¹⁴⁾ R-VI) Ehrlich 試薬。

thiocarbanilide 類および carbanilide 類の PPC および TLC における検出にはもっぱら R-I と R-II を用い非常に便利であった。これらの結果は Table I に示す。フェノール性水酸基をもつ carbanilide 類の R-I, R-II に対する呈色反応を Smith など³⁾ は見落しているが, この呈色は鋭敏で, しかも thiocarbanilide 類の呈色とも識別できるので都合である。フェノール性水酸基をもたない carbanilide 類は TLC において R-I, R-II により数日後うすく褐色を呈するが実用できる検出法ではない。ほかに UV 照射, TLC において conc. H₂SO₄ 噴霧-加熱などを試みたが十分な発色は得られず, 適当な検出法を見だし得なかった。

グルクロナイド類については Smith などが PPC において H-OG, HO-OG を R-III で検出しているので, 著者も合成グルクロナイドに対し R-III, R-IV の反応を試験したが, いずれのグルクロナイドの場合も呈色が得られなかった。ゆえに本研究においては thiocarbonyl 基 (>C=S), またはフェノール性水酸基をもつグルクロナイ

9) K. H. Slotta, H. Dresser: Ber., 63, 896 (1930).

10) G. N. Burkhardt, H. Wood: J. Chem. Soc., 1929, 143.

11) A. Sonn: Ber., 47, 2440 (1914).

12) R. T. C. Loh, W. M. Dehn: J. Am. Chem. Soc., 48, 2956 (1926).

13) S. M. Partridge: Nature, 164, 443 (1949).

14) M. L. Wolf from, J. B. Miller: Anal. Chem., 28, 1037 (1956).

TABLE I. Colour Reactions of Thiocarbanilides and Carbanilides in Paper and Thin-layer Chromatography

Spraying reagents Substances	Iodine-Na azide (R-I)		5% AgNO ₃ sol. (R-II)	
	PPC	TLC	PPC	TLC
Thiocarbanilides containing no phenolic OH	white ^{a)} →none ^{b)}	white ^{a)} →none ^{b)}	brown	brown
Thiocarbanilides containing phenolic OH	white ^{a)} →purplish brown ^{b)}	white ^{a)} →faint brown ^{b)}	brown	dark brown
Carbanilides containing no phenolic OH	none	none ^{c)}	none	none ^{c)}
Carbanilides containing phenolic OH	white ^{a)} →brown ^{b)}	faint ^{a)} →brown ^{b)}	gray ^{d)}	gray ^{d)}

a) These spots were seen in brown background by PPC and in yellow background by TLC immediately after spraying R-I.

b) These spots were seen in discoloured background some time after spraying R-I.

c) Faint brown spots were revealed after a few days, but could not be practically used as a clue to the detection.

d) These spots were visible in half a minute after spraying R-II.

ドは R-I, R-II を用い, この両者いずれをももたない EtO-O-OG は R-V を用い検出した. ただし R-V は非抱合体の thiocarbanilide 類にも反応するので, グルクロナイドに対する選択的な試薬とはいえない.

R-VI は代謝物検討の際の尿素および phenetidine の検出に用いた.

PPC および TLC における標品の Rf 値 Table II に示すとおりである. 著者などが検討した範囲では thiocarbanilide 類および carbanilide 類の非抱合体の分離には TLC が, 抱合体の分離には PPC が適しているようである.

非抱合体の TLC では展開溶媒に benzene-AcOEt を用いたが, benzene の割合を大にすると全般に Rf 値が小になり, AcOEt の割合を大にすると Rf 値が大となる. Rf 値と構造の関係ではつぎの点に気がつく. (1) フェノール性水酸基の数が増えるにしたがい Rf 値は小になる. (2) ベンゼン核の水素を ethoxy 基で置換しても Rf 値にはほとんど影響がない. (3) thiocarbanilide と対応する carbanilide (たとえば EtO-OH と EtO-O-OH) では前者の Rf 値が少し大きい (標品の TLC による分離の実例は Fig. 2, 3, 4 の S を参照).

TABLE II. Rf Values of Synthetic Thiocarbanilides and Carbanilides in Paper and Thin-layer Chromatography

Solvent systems Compounds	PPC		TLC		
	Butanol-Acetic acid-H ₂ O (4 : 1 : 5)	Butanol saturated with conc. NH ₄ OH	Benzene-Ethyl acetate (6 : 4)	Benzene-Ethyl acetate (8 : 2)	Benzene-Ethyl acetate (3 : 7)
Non-conjugated thiocarbanilides					
EtO-OEt	0.90~0.99	0.80~0.95	0.85	0.6	1.0
H-H	0.93 ^{a)}		0.85	0.6	1.0
EtO-OH	0.90~0.98	0.74~0.86	0.5	0.2	0.85
H-OH	0.92 ^{a)}		0.5	0.2	
HO-OH	0.85 ^{a)}	0.33~0.52	0.2	0.05	0.65
EtO-OCH ₂ COOH	0.78~0.97		0		
Non-conjugated carbanilides					
EtO-O-OEt			0.65		
H-O-H	0.89 ^{a)}		0.65		
EtO-O-OH	0.80~0.94		0.35		0.77
H-O-OH	0.97 ^{a)}		0.4		
HO-O-OH	0.87 ^{a)}		0.1		0.5

Conjugated thiocarbanilides

EtO-OG	0.49~0.65	0.18~0.24	0
HO-OG	0.31~0.42	0.00~0.10	0
NaGO-OGNa	0.04~0.14	0	0
EtO-OSO ₃ K	0.53~0.71	0.56~0.70	0
H-OSO ₃ K	0.56~0.70	0.41~0.64	0
HO-OSO ₃ K	0.33~0.42		0

Conjugated carbanilides

EtO-O-OG	0.56~0.65 ^{b)}
HO-O-OG	0.39~0.48

All compounds in this table except EtO-O-OG were detected R-I or R-II as shown in Table I.

a) These values were reported by Smith *et al.*³⁾

b) Detected by NaIO₄-KMnO₄-benzidine reagent.¹⁴⁾

c) Attempts to find favorable solvents for separating these conjugated compounds were unsuccessful.

薬物投与および採尿 おからで飼育した体重 2.0~3.0 kg. の雄家兎に乳鉢で微粉末とした EtO-OEt または H-H 400~500 mg./kg. を 1% CMC 液約 10 ml. に懸濁させて胃管を用い経口投与し、以後 24 hr. ごとの尿を集めた。ただし自然排泄の尿は xylene 数滴を加えた瓶にとり、これに 24 hr. ごとにカテーテルを用い導尿したものを含ませた。

実験結果および考察

4,4'-Diethoxythiocarbanilide 投与家兎尿の PPC

EtO-OEt 投与後 24 時間。尿をそのまま 0.05~0.1 ml., または凍結乾燥して得られる残渣をできるだけ少量の水に溶解、もとの尿 0.05~0.1 ml. に相当する量を濾紙につけ、溶媒 S-I, S-II を用い PPC を行ない、R-I を噴霧すると Fig. 1 に示す結果を得た。R-I に対し a, a', c, c' はフェノール性水酸基をもつ thiocarbanilide 類のような、また b, b' はフェノール性水酸基をもたない thiocarbanilide 類のような呈色を示す (Table I 参照)。48~120 時間。尿についても同じスポットが得られるが、時間の経過とともにスポットは小さく、かすかになり 144~168 時間。以後の尿にはみられなくなる。また b, b' は数回行なった実験ですべての場合にみられた明瞭なスポットであるが、a, a', c, c' は兎によっては 24 時間尿にさえみられないことがあった。つぎに S-I の各スポットについて考察する。

Fig. 1. Paper Chromatograms of 4,4'-Diethoxythiocarbanilide Urine

Solvent systems:

S-I) butanol-acetic acid-water (4:1:5)

S-II) butanol saturated with conc. NH₄OH

Spraying agent:

R-I) iodine-Na azide

a (Rf=0.85~0.99): S-II の a' に相当すると考えられる。R-I に対する呈色および Rf 値から判断して EtO-OH を含むことが推測される。このスポットは尿をエーテル抽出するとその抽出物中に移行する。尿のエーテル抽出物については後述する。

b (Rf=0.45~0.65): 主代謝物である。S-II の b' に相当することはこの部分を切り集め抽出したものを S-II で再展開して確かめた。R-I に対する呈色, Rf 値, 尿をエーテル抽出しても移行しないこと, 投与尿中のグルクロナイドの定量値が正常尿値に比し著しく増加していること*5 などから EtO-OG の存在することが推定できる。なおこのスポットは R-III, R-IV に対しては前述合成グルクロナイドと同様反応しない。本部分については後で詳述する。

c (Rf=0.26~0.34): S-II の c' に相当すると考えられる。R-I に対する呈色および Rf 値から HO-OG の存在が考えられるが、量が少ないため精査できなかった。

EtO-OSO₃H の存否について: Table II に示すように S-I では EtO-OSO₃H と EtO-OG の Rf 値はほとんど等しいため判断できないが、両者の Rf 値に差の生ずる S-II の結果からは EtO-OSO₃H の存在は認められない。

4,4'-Diethoxythiocarbanilide 投与家兎尿のエーテル抽出物の TLC

*5 尿中代謝物の分析結果については追って発表の予定。

およびアルミナカラムによる検討 EtO-OEt 投与後 24 時間、尿 10 ml. をとりエーテル 20 ml. ずつを用い 3 回分液漏斗で抽出、硫酸ナトリウムで乾燥、エーテルを減圧留去、残渣に 1~2 滴のアセトンを加え溶かし TLC により検索した結果、正常尿のエーテル抽出物のスポット以外に Fig. 2 の Et に示すスポットを得、標品との比較により EtO-OEt, EtO-OH, EtO-O-OH, HO-OH, HO-O-OH などが認められた。本法で 120~144 時間、尿までに代謝物が認められた。なお Fig. 1 の a が認められない尿の場合もスポットが得られた。

つぎにさらに精査するためエーテル抽出物についてアルミナカラムによる分離を行なった。この場合のエーテル抽出物は投与尿に濃塩酸を加え pH 4.0 に調整した後 30 時間連続抽出する方法によって得た。得られた抽出物は褐色あめ状の物質で同量の正常尿から得られる抽出物と量、外観において大差がない。この抽出物をそのまま TLC により検したところ前述の抽出法によるスポット (Fig. 2 の Et) と同じものを得たので、本抽出操作によっても代謝物が変化を受けないことを知った。つぎにこの抽出物にできるだけ少量のアセトンを加え液状とし、アルミナカラムの上に注ぎこみ、各種溶媒を用いて流出し、流出物は減圧で溶媒を留去、TLC により検索しながら代謝物の単離を試みた。実験はつぎの 3 種の投与尿について行なった。

(1) EtO-OEt 計 4.8 g. を 4 匹の家兎に 1 回に投与、72, 96, 120 時間尿計 2150 ml. のエーテル抽出物 1.7 g. をアルミナ 40 g. により分画した。流出溶媒: (i) ベンゼン, (ii) ベンゼン-酢酸エチル (9:1), (iii) 同 (8:2), (iv) 同 (6:4), (v) 酢酸エチル, (vi) メタノール。各分画を TLC により検索した結果は Fig. 2 の E₁~E₇ である。溶媒 (i) から EtO-OEt および phenetidine (E₁, E₂), (ii) から phenetidine および R-I により紫色を呈する未知のスポット U₁ (E₃), phenetidine と U₁ は S-III では R_f 値がともに 0.6 で分離できないが試料に両者が混在していないときは R-I に対する呈色が異なる (phenetidine は紫褐色) ので識別できる。混在していても (E₃ の場合) 溶媒 S-IV を用いて展開すると、phenetidine の R_f 値は 0.47, U₁ の R_f 値は 0.35 になり分離できる。phenetidine はさらに R-VI による呈色 (黄色) によって確かめた。つづいて (iii) から U₁ と EtO-OH (E₄), (iv) から EtO-OH と EtO-O-OH (E₅), (v) から R-I に対し紫色を呈する未知のスポット U₂ と HO-OH (E₆), EtO-O-OH と U₂ は S-III に対しともに R_f 値 0.35 であるが両者が別々に流出してきたので R-I による呈色の差で容易に識別できた。最後に (vi) からは展開溶媒として S-III のほかに S-V を用い検討し、U₂, HO-OH, HO-O-OH および S-V にて R_f 値 0 に近いところに R-I に対し最初黄褐色、続いて紫色に変わる未知のスポット U₃ を認めた (E₇)。

なお (iv) により流出した部分 E₅ を再結晶 (エタノール) して m.p. 213° の無色針晶 23 mg. を単離、元素分析値および標品との混融、IR の比較により EtO-O-OH であることを確認。C₁₅H₁₆O₃N₂ Anal. Calcd.: C, 66.16; H, 5.92; N, 10.29. Found: C, 65.75; H, 5.81; N, 10.45.

(2) EtO-OEt 計 7.3 g. を 5 匹の家兎に 1 回に投与、その 24 時間尿 900 ml. のエーテル抽出物 2.0 g. をアルミナ 50 g. により分画。流出溶媒: (i) ベンゼン-酢酸エチル (6:4), (ii) 酢酸エチル, (iii) エタノール。各分画を TLC により検討したが、流出の順序にしたがい、Fig. 2 の E₁~E₇ と大差ない結果を得た。

(i) で流出する最初の部分を再結晶 (エタノール) して m.p. 166~167° の無色鱗片状晶 60 mg. を得。元素分析値、標品との混融、IR の比較により EtO-OEt であることを確認。C₁₇H₂₀O₂N₂S Anal. Calcd.: C, 64.53; H, 6.37; N, 8.85. Found: C, 64.36; H, 6.26; N, 9.16.

(iii) で流出する最初の部分を再結晶 (エタノール) して m.p. 168° の無色微細針状晶 190 mg. を得た。元素分析値、標品との IR の比較により EtO-OH であることを確認。C₁₅H₁₆O₂N₂S Anal. Calcd.: C, 62.47; H, 5.59; N, 9.72. Found: C, 62.87; H, 5.74; N, 10.00.

(3) EtO-OEt 計 9.6 g. を 2 匹の家兎に 3 日間にかけて連続投与、第 1 回投与後 24, 48, 72 時間尿計 890 ml. のエーテル抽出物 0.8 g. をアルミナ 10 g. を用い、クロロホルムで流出する部分を再結晶 (エタノール) し m.p. 221~224.5° の無色針状晶 5 mg. を得。標品との混融、IR の比較により EtO-O-OEt であることを確認。

グルクロナイドの分離および β -glucuronidase 加水分解による検討 Smith等³⁾ は H-H または HO-OH 投与尿にそのまま、あるいは濃縮後濃塩酸を加えることにより、それぞれ H-OG, HO-OG を析出せしめることに成功しているが、EtO-OEt 投与尿の場合は本法ではほとんど析出物を得ないので、著者等は Fig. 1 のスポット b を直接抽出する方法によってグルクロナイドの分離を試みた。

EtO-OEt 1.1 g. を投与した 1 匹の家兎の 24 時間尿 85 ml. のうち 70 ml. を凍結乾燥、残渣 (2.5 g.) を少量

の水中に溶解, 東洋濾紙 No. 50, 40×40 cm. 32 枚にわけてつけ S-I で展開, Rf 値 0.45~0.65 (Fig. 1 の b) の部分を, Rf 値 0.25~0.34 の尿素の部分 (R-VI により黄色になる) が混じらないように注意して切り集め Soxhlet 抽出器を用いメタノールで6時間抽出, メタノールを減圧留去, 残渣に再びメタノール約 20 ml. を加え少し加温溶解後遠心分離 (3000 r.p.m., 5 min.) して不溶分を除き, 上清に多量のエーテルを加え析出するかゆ状物質を遠心分離 (同条件) して集め, デシケーター中に減圧にして放置すると褐色結晶性粉末 45 mg. を得. 本品は水に易溶, メタノールに可溶, アセトンには不溶, PPC (展開溶媒: S-I, S-II) で再展開すると単一のスポットを与え, それぞれの Rf 値は標品の EtO-OG に一致する. また TLC で S-III を用い展開すると R-I に対し Rf 値 0 のところのみスポットを生ずる. 本品の純化を試みたが成功しなかったため, つぎに述べる β -glucuronidase 加水分解を行ない本品の成分について検討を加えた.

本品約 1 mg. を pH 5.0 酢酸緩衝液 (N/15 原液から調製) 少量に溶解, β -glucuronidase 液^{*6} 1500 単位, さらに緩衝液を加えて全量 5 ml. とし, 37°, 24 時間加水分解した後, 反応液を水浴上 37° 以下で濃縮, 約 0.5 ml. とし, 酢酸エチル 5 ml. ずつで 2 回抽出, 硫酸ナトリウムで乾燥, 酢酸エチルを減圧留去, 残渣に 1~2 滴のアセトンを加え溶かし, TLC (展開溶媒: S-III) で検した結果 Fig. 3 を得た. おもなスポットとして EtO-OH と EtO-O-OH が認められたほか, かすかではあるが HO-OH と Fig. 2 の未知物質 U_1 に相当するスポットが識別された. さらに Rf 値 0.75, R-I に対し褐色地に白のスポットを与える未知物質 U_n が認められたが, これは正常尿成分グルクロナイドの aglycone と推察される.^{*7} なお酢酸エチル抽出後の水層からは PPC (展開溶媒: S-I, 検出試薬: R-III, R-IV) により Rf 値 0.12 のグルクロン酸を証明した. 以上の結果からこの粗グルクロナイドは主成分として, EtO-OG と EtO-O-OG, それに少量の HO-OG, U_1 のグルクロナイドおよび正常

Fig. 2. Thin-layer Chromatograms of Ether Soluble Metabolites of 4,4'-Diethoxythiocarbanilide Urine

Fig. 3. Thin-layer Chromatogram of Aglycones in β -Glucuronidase Hydrolysates of b Section in Fig. 1

Fig. 4. Thin-layer Chromatogram of Ether Soluble Metabolites of Thiocarbanilide Urine

Solvent systems: S-III) benzene-ethyl acetate (6:4) S-IV) benzene-ethyl acetate (8:2)
S-V) benzene-ethyl acetate (3:7)

All spots in Fig. 2, 3, 4 were detected by iodine-Na azide or 5% AgNO_3 solution.

S in Fig. 2, 3, 4: Synthetic samples, A) EtO-OEt, B) phenetidine, C) EtO-OH, D) EtO-O-OH, E) HO-OH, F) HO-O-OH, G) H-H, H) H-OH, I) H-O-OH.

Et in Fig. 2: Total ether extract of EtO-OEt urine.

E_1 ~ E_7 in Fig. 2: Eluates with the following solvents on Al_2O_3 column chromatography of Et.

E_1, E_2 : benzene, E_3 : benzene-ethyl acetate (9:1), E_4 : benzene-ethyl acetate (8:2),

E_5 : benzene-ethyl acetate (6:4), E_6 : ethyl acetate, E_7 : methanol.

U_1, U_2, U_3 in Fig. 2, 3: Unknown metabolites.

U_n in Fig. 3: An aglycone of the unknown glucuronide in normal rabbits urine.

*⁶ 東京臓器化学製バイアル入.

*⁷ 正常家兎尿を凍結乾燥後, 溶媒 S-I を用い PPC を行ない Rf 値 0.45~0.65 の部分 (R-I に反応しない) を切り集め, 投与尿の場合と同じ方法で精製, β -glucuronidase で加水分解して U_n とグルクロン酸を確認した.

尿成分グルコナイドを含むものと考えられる。EtO-OG と EtO-O-OG の Rf 値は Table II に示すようにほとんど重なっており、本抽出法では混在は当然と考えられる。

Thiocarbanilide (H-H) の代謝の追試 Smith 等³⁾ は H-H 投与家兎尿中の代謝物として、H-OH と H-OG を確認、H-OH のサルフェイトの存在を推定し、³⁸ 脱硫化合物は認め得なかったと報告している。著者等は EtO-OEt の代謝物として以上述べたように脱硫物を確認したので、H-H 投与家兎尿中の脱硫物の存否を再検討するの必要を感じ、つぎの実験を行ない脱硫物を証明することができた。

H-H 1.2 g. を家兎 1 匹に 1 回投与、24 時間尿 10 ml. を取り、EtO-OEt 投与尿の場合と同様の方法でエーテル抽出し、抽出物について TLC を行なった結果、未変化の H-H、H-OH のほかに脱硫物 H-O-OH を認めた (Fig. 4)。

結 論

EtO-OEt 投与家兎尿中の代謝物としてエーテル可溶部から TLC により、EtO-OEt, EtO-OH, HO-OH, EtO-O-OH, HO-O-OH, phenetidine のほか構造未知の物質 2, 3 が認められた。さらにアルミナカラムにより EtO-OEt, EtO-OH, EtO-O-OEt および EtO-O-OH を単離同定することができた。また抱合体は純品を単離することはできなかったが粗成品を捕捉し、標品との Rf 値の比較、および β -glucuronidase 加水分解を行ない、EtO-OG, EtO-O-OG, HO-OG の存在を確かめた。さらに HO-O-OH が認められることから推測すると対応するグルコナイド HO-O-OG の存在も予想される。総括すると EtO-OEt の代謝においては、脱エチル、脱硫およびグルクロン酸抱合の 3 反応が関与していると考えられる。Chart 2 に予想される代謝経路を示す。

Chart 2. Possible Routes of Metabolism of EtO-OEt in Rabbits

なお Smith 等は H-H はか数種の thiocarbanilide 類 (diarylthiourea 類) の家兎尿中代謝物に脱硫物を証明できなかったことを強調し、その毒性が monoarylthiourea 類に比し低いことを脱硫反応を受け難いためと推測しているが、著者等は EtO-OEt の代謝物中に脱硫物を確認したので、H-H の代謝を追試した結果、やはり脱硫物を証明することができた。したがって量的な点は未検討であるが diarylthiourea 類もその代謝過程において monoarylthiourea 類と同じく脱硫反応を受けることは確実である。

³⁸ Smith などは H-H 投与尿の PPC (溶媒: S-I) において Rf 値 0.17 のスポットを H-OH のサルフェイトと推定しているが、合成 H-OSO₃K の Rf 値は 0.56~0.70 (Table II) で、彼らの推定は間違っている。

本研究の研究費の一部は昭和 38 年度文部省科学研究費 (各個研究) によった。元素分析を施行された当薬学部馬詰久子氏および実験に協力された下田久子, 白浜欣和, 田中博輝の諸兄に感謝します。

長崎大学薬学部

〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
85 (2) 95 ~ 100 (1965)

UDC 547.875 : 615.761

17. 井上博純, 武田幹男, 檜垣 鴻, 釘田博至: Benzothiadiazine 誘導体の
合成と利尿作用 (利尿剤の研究 (第3報^{*1}))

Hirozumi Inoue, Mikio Takeda, Ko Higaki, and Hiroshi Kugita :
Synthesis and Diuretic Activity of Benzothiadiazine
Derivatives. (Diuretics. III).

(Osaka Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.^{*2})

Reactions of 5-chloro(and trifluoromethyl)-2,4-disulfamylaniline with both glyoxal and methylglyoxal gave 1,2,4-benzothiadiazine derivatives (II), while reaction of I (X=Cl) with phenylglyoxal produced ketonic dihydrobenzothiadiazine (IV). NaBH₄ reduction of II and IV afforded dihydro-1,2,4-benzothiadiazine derivatives, III and V. Reaction of I (X=Cl) with some phenylglyoxal derivatives and reduction of the products (VII) and (VII') were also investigated.

V showed high diuretic activity of about four times as much as chlorothiazide.

(Received May 22, 1964)

利尿剤として有用な 1,2,4-benzothiadiazine 系化合物の一般的な製法は aminobenzenedisulfonamide 誘導体をアルデヒド類と縮合閉環せしめることである。著者等は今回ジカルボニル化合物である glyoxal, および α -ケトアルデヒドを用いて同様反応を行ない, 強力な利尿作用を示す新しい benzothiadiazine 系化合物を得た。

4-amino-6-chloro-*m*-benzenedisulfonamide¹⁾ (I) を含水アルコール中 glyoxal および methylglyoxal と反応させると得られた化合物はいずれの場合も, IR スペクトルでカルボニルの吸収を示さず水酸基の吸収を示す。UV スペクトルは別途合成した 3-methyl-6-chloro-7-sulfamyl-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide (II') と類似の吸収を示し, 生成物が 1,2,4-benzothiadiazine 環を持つことを示す。Topliss 等²⁾ は 4,5-dichloro-*m*-benzenedisulfonamide を 95% エタノール中 30% glyoxal と反応させてその生成物に同じく 3-hydroxy-methyl-1,2,4-benzothiadiazine の構造を与えている。II を NaBH₄ で還元すると dihydro 体 (III) が得られ, その UV スペクトルは dihydrobenzothiadiazine 類の UV スペクトル³⁾ と一致する。

一方 I (X=Cl) を phenylglyoxal と同様縮合閉環せしめると, 得られる化合物は IR スペクトルでカルボニルの吸収を示し UV スペクトルは dihydrobenzothiadiazine 環と phenyl ケトンの加成された吸収を示し明らかに IV の構造である。^{*3} IV を NaBH₄ で還元すると III に対応する dihydro 体 (V) が得られる。III を酸化して IV に相当するカルボニル化合物を得る目的で酢酸中無水クロム酸による酸化を行なったところ, 得られたものは R=H, CH₃ いずれの場合も 6-chloro-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide (VI) で, これは別途合成のサンブ

*1 第2報: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 10, 1008 (1962).

*2 Kashima-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

*3 Topliss らは I と phenylglyoxal diethylacetal の反応で II 構造の化合物 (R=Ph) を得たと報告している。²⁾

1) F. C. Novello, S. C. Bell, E. L. A. Abrams, C. Ziegler, J. M. Sprague: J. Org. Chem., 25, 965 (1960).

2) J. G. Topliss, M. H. Sherlock, F. H. Clarke, M. C. Daly, B. W. Petterson, J. Lipski, N. Sperber: *Ibid.*, 26, 3842 (1961).

3) F. C. Novello, S. C. Bell, E. L. A. Abrams, C. Ziegler, J. M. Sprague: *Ibid.*, 25, 970 (1960).