薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
98 (2) 236-241 (1978)

UDC 615.254.1.011.4.033:547.962.3.04.09

水溶液中における利尿薬の安定性ならびに血清アルブミンとの結合¹⁾

後藤 茂, 小田原よき子,^{2a)} 中野 節, 荒木泰典,^{2b)}

岡山大学薬学部,^{2a)} 岡山大学附属病院薬剤部^{2b)}

Stability and Serum Albumin Binding of Diuretics in Aqueous Solution¹⁾

SHIGERU GOTO, YOKIKO ODAWARA,^{2a)} MISAO NAKANO, and YASUNORI ARAKI^{2b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University^{2a)} and
Hospital Pharmacy, Okayama University Hospital^{2b)}

(Received July 25, 1977)

Stability of seven diuretics in aqueous solution was examined under the condition of equilibrium dialysis study. It was found that furosemide, ethacrynic acid, and bumetanide were not decomposed and that benzothiadiazine derivatives except hydrochlorothiazide were slightly decomposed in pH 7.4 buffer solution within 120 hr at 5° or 6 hr at 30° or 37°. The hydrolysis of hydrochlorothiazide could not be disregarded. The binding of these diuretics by bovine serum albumin (BSA) was investigated using equilibrium dialysis technique at pH 7.4 and 30°. The mathematical analysis of binding data described by Scatchard was applied, and the binding data of hydrochlorothiazide were corrected using its hydrolysis rate. All the compounds were found to interact with BSA, but a large difference in BSA binding was recognized among them. Physicochemical properties such as ionic form ratio and hydrophilicity of benzothiadiazine derivatives were found to be related to their BSA binding ability.

Keywords—diuretics; equilibrium dialysis; stability; pK_a value; partition coefficient; serum albumin binding; benzothiadiazine derivatives; hydrochlorothiazide; Scatchard's plot

前報³⁾においてすでに述べたように難溶性薬物の体内分布にさいし、血液中の蛋白成分と薬物との結合がきわめて重要な意味をもつことがわかっている。また、どの蛋白分画に結合するかは薬物の種類により異なるが、量的にもつとも多量存在するアルブミン分画が通常考えられている。今回、利尿薬をとりあげた理由は、(1) 利尿薬の作用機序に関連する生理的機構 (Na^+ の尿細管再吸収阻止など) を対象とした研究は多いが、生体内薬物濃度に直接関与する血清あるいは組織蛋白との結合の検討はきわめて少ない (2) 個々の利尿薬についての蛋白結合の検討は断片的に実施されているが、多数の利尿薬をまったく同一の実験条件下で比較検討した報告はない (3) 降圧利尿薬は他の薬物と併用投与されることが多く、薬物相互作用を生じる可能性が大きい、すなわち、蛋白結合部位をめぐる併用薬物による置換、追出し現象が生起する可能性がある (4) 患者の血中蛋白組成や量は正常人と比較すれば変動しており、利尿薬の結合性に変化がみられると予想できる、などが主なものである。本実験では、利尿薬 7 種を選択し、牛血清アルブミンとの結合実験を行ったが、これに先立ち、実験条件下、溶液中での利尿薬の安定性を検討する必要性があると考えられた。この報告では主に上述の検討結果について述べる。

実 験 の 部

試料 実験に供した利尿薬は、Chart 1 にまとめて示した。試薬類はすべて試薬特級 (和光純薬ならびに半井化学) を使用した。また、血清アルブミンとして、今回は牛血清アルブミン (BSA) を用いた。これは、Armour 社製の fraction V で、分子量は 69000 として計算を行った。

pK_a の測定 分光光度法⁴⁾ によった。実験に供した利尿薬はいずれも二段階またはそれ以上の解離を示した

- 1) a) 本報を「医薬品と血液成分との相互作用 (第 3 報)」とする; b) Part II: S. Goto, H. Yoshitomi, M. Nakase, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 26, 472 (1978).
- 2) Location: a) Tsushima naka 1-1-1, Okayama, 700, Japan; b) Shikata-cho, 2-5-1, Okayama, 700, Japan.
- 3) 後藤 茂, 吉富博則, 岸 征恵, 薬誌, 97, 1219 (1977).
- 4) A. Albert, E. P. Serjeant, "Ionization Constant of Acids and Bases," Methuen and Co., London, 1967, pp. 69—91.

Chart 1. Compounds Used in This Study

が、一般に二段階の酸塩基平衡は式 (1) (2) で表わすことができる。

したがって、酸解離定数 K_{a1} , K_{a2} は、式 (3) (4) で定義される。

$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+][\text{AH}^-]}{[\text{AH}_2]} = [\text{H}^+] \left(\frac{d_{\text{AH}_2} - d}{d - d_{\text{AH}^-}} \right) \quad (3)$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{AH}^-]} = [\text{H}^+] \left(\frac{d' - d_{\text{AH}^-}}{d_{\text{A}^-} - d'} \right) \quad (4)$$

すなわち、 $\text{p}K_{a1}$, $\text{p}K_{a2}$ はつぎのようになる。

$$\text{p}K_{a1} = \text{pH} + \log \left(\frac{d - d_{\text{AH}^-}}{d_{\text{AH}_2} - d} \right) \quad (5)$$

$$\text{p}K_{a2} = \text{pH} + \log \left(\frac{d_{\text{A}^-} - d'}{d' - d_{\text{AH}^-}} \right) \quad (6)$$

ここで、 d_{AH_2} : AH_2 の吸光度、 d, d' : 非解離、解離型が混在する領域内のある pH における吸光度

d_{AH^-} : AH^- の吸光度、 d_{A^-} : A^- の吸光度。

しかしながら d_{AH_2} , d_{A^-} は容易に測定できても、 d_{AH^-} の値を求めることは容易でない。

式 (3) を変形すれば式 (7) が得られる。

$$d = \frac{[\text{H}^+]}{K_{a1}} (d_{\text{AH}_2} - d) + d_{\text{AH}^-} \quad (7)$$

すなわち、Fig. 1-(A) で示すように、 $[\text{H}^+] (d_{\text{AH}_2} - d)$ vs. d の作図を行い、 d 軸との交点から d_{AH^-} を求めた。なお、濃度は $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\mu = 0.2$ になるように調製して実施した。その代表例として hydroflumethiazide の場合を Fig. 1-(B) に示した。

みかけの分配率の測定 50 ml の共栓遠沈管にエーテル 10 ml と利尿薬の溶液 ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 溶解にさいしては 1/15M のリン酸緩衝液を使用) 10 ml を入れ、室温にて 30 分間振盪機 (Iwaki KM-shaker V-S type) を用いて振盪後、3000 rpm で 10 分遠心、水層中の濃度を測定、さらに 30 分間振盪を行ってから再び同様の手段により濃度を測定した。両測定値が一致した場合、式 (8) より、pH 7.4 におけるみかけの分配率を算出した。

$$P_{\text{app}} = \frac{A_0 - A}{A} \quad (8)$$

ここで P_{app} はみかけの分配率、 A_0 , A は水層中の利尿薬の初濃度ならびに分配平衡成立後の濃度である。

平衡透析法 前報^{1b, 3)} とまったく同様な方法で実施した。ただし、BSA の濃度は $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ と一定に保ち、利尿薬の濃度は $1-100 \times 10^{-5} \text{ M}$ の範囲で実施した。また pH は 7.4 に保持し温度は 30° において行った。

Fig. 1. Absorption Spectra of Hydroflumethiazide ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) in Various Buffer Solution and Example of Determination of d_{AH^-} Value by Graph Method

For analytical wavelength, 275 nm was selected.

ける試料溶液の吸光度, $[\text{HCT}]$, $[\text{TCT}]$, $[\text{IV}]$ は, hydrochlorothiazide, trichlormethiazide, および分解産物のモル濃度, E_{λ} , E'_{λ} , E''_{λ} は hydrochlorothiazide, trichlormethiazide および分解産物の測定条件下での分子吸光係数で, 値は以下のとおりであった. $E_{273}=11020$, $E_{261}=4700$, $E'_{271}=11240$, $E'_{261}=9000$, $E'_{273}=7400$, $E'_{271}=6040$, $E'_{261}=1640$. なお, hydrochlorothiazide, と trichlormethiazide の加水分解により生成する分解産物は同一 (4-amino-6-chloro-*m*-benzenedisulfonamide (IV)) である.

4-Amino-6-chloro-*m*-benzenedisulfonamide (IV) の生成 山名らの報告⁵⁾に従い, hydrochlorothiazide (V) または chlorothiazide (I) 何れかを用い, これら薬物 1 g を 0.2 N HCl 300 ml 中に加熱溶解し, 沸騰水浴上で 7 hr 加温, 冷却後析出した結晶を 40% EtOH から再結した. mp 253—257° (253°).⁵⁾ Trichlormethiazide を同様に加水分解して得られた分解産物も上記とまったく同一の融点を示した.

結果ならびに考察

平衡透析実験条件における Benzothiadiazine 系利尿薬の加水分解

Benzothiadiazine 系利尿薬の加水分解反応が中性領域でかなり顕著に進行するという山名らの報告⁶⁻⁸⁾があるので, まず平衡透析の実験条件下での分解について検討を実施した. 山名らの報告⁶⁻⁸⁾によれば Chart 2 に示す経路で chlorothiazide (I), hydrochlorothiazide (II) は分解し, いずれも最終的に 4-amino-6-chloro-*m*-benzenedisulfonamide (IV) を生成する. さらに I は中性, アルカリ性領域では $\text{I} \rightleftharpoons \text{II} \rightarrow \text{IV}$ の過程を経て分解して行くことも明らかにされている. そこで, 報告⁶⁾中の pH 7.62 (リン酸緩衝液を使用, 温度は 80°, 85° および 90° で実施) のデータを用い, Arrhenius plots を行って温度 5°, 30°, 37° における一次反応速度定数, k_1 , k_2 および k_3 を推定した. 得られた値は Fig. 2 の脚註に記したが, これらを用いて各時間における I および

利尿薬の定量 みかけの分配率, あるいは平衡透析における試料溶液の定量にさいしては, その一部を正確に採取, 0.6 N NaOH を用いて液性をアルカリとなした後, UV 法による定量を実施した. 実験に供した利尿薬の測定波長はつぎのとおりである. Chlorothiazide (292 nm), hydrochlorothiazide (273 nm), hydroflumethiazide (274 nm), trichlormethiazide (271 nm), furosemide (271 nm), ethacrynic acid (277 nm), bumethanide (319 nm).

Benzothiadiazine 系利尿薬の溶液中における分解 pH 7.4, 1/15M のリン酸緩衝液 (NaCl を添加し, イオン強度 (μ) を 0.2 にととのえた) 500 ml に benzothiadiazine 系利尿薬を $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ の濃度になるように溶解, 恒温槽中におき, 各時間ごとに試料を採取した. また, 平衡透析と同一条件下で一定時間振盪を行ったものを試料とした. 測定にさいしては, benzothiadiazine 系利尿薬ならびに分解産物の分子吸光係数を正確に求め, 式 (9)—(12) からそれぞれの濃度を算出した. すなわち, hydrochlorothiazide の場合,

$$A_{273} = E_{273}[\text{HCT}] + E'_{273}[\text{IV}] \quad (9)$$

$$A_{261} = E_{261}[\text{HCT}] + E'_{261}[\text{IV}] \quad (10)$$

trichlormethiazide の場合,

$$A_{271} = E'_{271}[\text{TCT}] + E'_{271}[\text{IV}] \quad (11)$$

$$A_{261} = E'_{261}[\text{TCT}] + E'_{261}[\text{IV}] \quad (12)$$

ただし, A_{λ} は, 測定波長 λ (単位, nm) にお

5) 山名月中, 古池 宏, 田村裕喜男, 薬誌, 81, 1528 (1961).

6) 山名月中, 水上勇三, 辻 彰, 薬誌, 87, 1447 (1967).

7) 山名月中, 水上勇三, 薬誌, 85, 1057 (1965).

8) 山名月中, 水上勇三, 辻 彰, 薬誌, 89, 740 (1969).

II の量的な変動を追跡してみると Fig. 2 のごとく顕著な分解は平衡透析の実験条件下では認められない。このさい $A \rightleftharpoons B \rightarrow C$ 型の速度式として、式 (13), (14) を用いた。⁹⁾

$$\frac{[I]}{[I]_0} = \frac{k_2}{k_1 + k_2} e^{-\frac{k_1 k_3}{k_1 + k_2} t} + \frac{k_1}{k_1 + k_2} e^{-(k_1 + k_2)t} \quad (13)$$

$$\frac{[II]}{[I]_0} = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \left[e^{-\frac{k_1 k_3}{k_1 + k_2} t} - e^{-(k_1 + k_2)t} \right] \quad (14)$$

ここで $[I]_0$, $[I]$ は, Chart 2 中で, I の初ならびに t 時間における濃度, $[II]$ は, II の t 時間における濃度。つぎに, hydrochlorothiazide にかんして, 同様に山名^{7,8)}による詳細な分解の報告がある。分解過程はすでに Chart 2 に示したところであるが, 強アルカリ性領域を除けば, 反応は最初の段階でとどまる。その適用にさいし, 実験 pH が異なる点が気になりであるが, 山名が与えている活性化エネルギー値, 27.7 kcal/mol ($V \rightarrow IV + HCHO$), 17.4 kcal/mol ($IV + HCHO \rightarrow V$) ならびにもう一つの報告⁸⁾で 90°, pH 7.0 での速度定数, $k_4: 3.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $k_5: 70 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ を用いて 5°, 30°, 37° での速度定数を推定した。1 次と 2 次の複合反応の場合, 式 (15) が成立する。¹⁰⁾

$$\ln \frac{[V]_0 - [V]_e [V]}{([V] - [V]_e)[V]_0} = k_4 \left(\frac{[V]_0 + [V]_e}{[V]_0 - [V]_e} \right) t \quad (15)$$

さらに平衡定数, K は式 (16) により求めることができる。¹⁰⁾

Fig. 2. Time Plots^{a)} for the Disappearance of Chlorothiazide (I) and the Appearance of N-(2-Amino-4-chloro-5-sulfamoylphenyl-sulfonyl)formamide (II)

a) Rate constants determined by Arrhenius plots are follows;

Temp. (°C)	k_1	k_2	k_3 (min ⁻¹)
5	1.8×10^{-6}	2.8×10^{-6}	1.6×10^{-7}
30	3.9×10^{-6}	3.6×10^{-5}	1.9×10^{-6}
37	8.5×10^{-6}	7.4×10^{-5}	3.7×10^{-6}

Chart 2. Degradation of Chlorothiazide (I) and Hydrochlorothiazide (V) in Aqueous Solution

9) 大岩正芳, “反応速度計算法,” 朝倉書店, 東京, 1962, p. 137.

10) A.A. Frost and R.G. Pearson, “Kinetic and Mechanism, second edition,” John Wiley and Sons, New York, 1962.

$$K = \frac{[V]_e}{([V]_0 - [V]_e)^2} = \frac{k_5}{k_4} \quad (16)$$

ここで, $[V]_0$ は V の初濃度, $[V]_e$ は平衡成立後の V の濃度, $[V]$ は時間 t における V の濃度.

式 (16) に推定した速度定数を代入して, $[V]_e$ の値を各温度について求め, つぎに式 (15) を利用して, 任意の時間 t における $[V]$ の値を算出した. この結果, かなり長時間にわたり V は安定なことがわかった. 例えば, 5° で 120 時間後において 99.8%, 30° , 6 時間後では 99.4%, さらに 37° , 6 時間後 99.8% であった.

一方, 分子吸光係数を正確に求めた後に実施した分解 % の実測の結果は, chlorothiazide で前述の計算値とまったく一致した値が得られたのに対し, hydrochlorothiazide では Table I に示すように 5% 程度の分解が観察できた. 表には掲げていないが trichlormethiazide については 2% 程度で, hydrochlorothiazide にくらべて低い. さらに, hydroflumethiazide の分解を試みたが分解産物を得ることができず, 前述のごとき分解 % の算出ができなかった. しかし, 分解はより低く抑えられるものと考えられる.

結論的に benzothiadiazine 系利尿薬のなかでも 3,4-dihydro 体については分解を考慮にいれて BSA 結合データをながめる必要がある. とくに hydrochlorothiazide は, 計算による推測と実験値の間に食い違いがみられたが, 分解が 5% 程度進行しているものと考えて, BSA 結合データを補正することを試みた.

なお, furosemide, ethacrynic acid, bumethanide についても実験を試みたが, 分解はまったく認められず,

TABLE I. Hydrolysis of Hydrochlorothiazide

Temp. ($^\circ\text{C}$)	Estimated rate constant ^{a)}		Residual percentage	
	k_4 (min^{-1})	k_5 ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Calculation ^{a)} (from rate constant)	Spectrophotometry ^{d)}
5	2.5×10^{-7}	4.4×10^{-2}	98.8 ^{b)}	95.5 ^{b)}
30	1.5×10^{-5}	5.9×10^{-1}	99.0 ^{c)}	95.0 ^{c)}
37	4.4×10^{-5}	1.1	97.5 ^{c)}	94.8 ^{c)}

a) pH 7.0, 0.05 M phosphate buffer. b) After 120 hours. c) After 6 hours. d) See text.

TABLE II. pK_a Values and Partition Coefficients of Diuretics

Diuretics	pK_{a1}	pK_{a2}	Ionic form % (at pH 7.4)	P.C. ether/water (phosphate buffer pH 7.4)
Chlorothiazide	6.7	9.5	83.4	0.04
Hydrochlorothiazide	7.9	9.2	24.0	0.31
Hydroflumethiazide	8.9	10.7	3.1	1.83
Trichlormethiazide	6.8	10.3	79.9	1.67
Furosemide	3.8	7.5	99.9	0.05
Ethacrynic acid	3.5	10.5	99.9	0.07
Bumetanide	5.2	10.0	99.4	0.14

きわめて安定であった。

BSA 結合と利尿薬の物性値との関係

今回検討を行ったすべての利尿薬について pK_{a1} および pK_{a2} の算出を行い、また、ether/H₂O 分配率の測定も併せ実施した。これらの結果は Table II にまとめて示した。

つぎに、実験の部において述べた平衡透析法による BSA 結合データの整理は、しばしば使用される Scatchard's plots¹¹⁾ によった。これは Fig. 3 として示した。Hydrochlorothiazide について、分解産物 (IV) は BSA と殆んど結合しないことが、平衡透析法の結果より確認できたので、予想される分解濃度を初濃度より差引いて補正を行い、結果は点線で示した。

上記の BSA 結合性の結果と物性値との関係とを対比させると、benzothiadiazine 系化合物 4 種のなかで、イオン形存在 % が大きく、分配率が小さな (水溶性大) chlorothiazide の BSA 結合性は見かけ上もっとも大であり、逆にイオン形存在 % が小さく、分配率が大い (脂溶性大) hydrochlorothiazide の BSA 結合性は見かけ上もっとも小さいという結果を得た。この事実から、検討を行った利尿薬について BSA 結合におけるイオン結合性の優位性を強調できるものではないが、furosemide, ethacrynic acid, bumethanide はいずれも pH 7.4 でほとんどイオン形として存在し、BSA 結合性が比較的大きなことも考えあわせると、きわめて興味深く今後検討の対象とすべき点であると考ええる。Hydrochlorothiazide と chlorothiazide の二者は前述したごとく構造式の上からは 3,4 位の飽和、不飽和の相違であるが、それらの物性値とならんで BSA 結合性にも大きな差異がみられたことは興味深い点である。

BSA をはじめ血清アルブミンとの結合については続報において詳しく述べるが、Fig. 3 の実験データを基に最小二乗法の原理により得た K_1 , K_2 , n_1 , n_2 の最確値¹²⁾ を Table III に掲げた。

TABLE III. Summary of Binding Constants and Maximum Number for Diuretics at 30° and pH 7.4

Diuretics	K_1 $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$	K_2 $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$	n_1	n_2
Chlorothiazide	29.4	6.81	0.88	2.12
Hydrochlorothiazide	—	0.25	—	7.78
Hydroflumethiazide	19.8	0.42	0.20	1.57
Trichlormethiazide	25.7	3.40	0.62	2.77
Furosemide	375	4.16	0.65	4.85
Ethacrynic acid	5.34	2.14	4.76	10.6
Bumethanide	46.2	0.91	0.77	8.37

謝辞 本実験において使用した利尿薬を提供いただいた、三共(株)、塩野義(株)、万有(株)、ヘキストジャパン(株)の各製薬会社にお礼申し上げます。

11) G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660 (1949).

12) 後藤 茂, 大木俊光, 吉柳節夫, 井口定男, *薬剤学*, **31**, 247 (1971).

Fig. 3. Scatchard Plots for Binding of Various Diuretics to Bovine Serum Albumin ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) at 30° and pH 7.4

Key: A; ethacrynic acid, B; furosemide, C; chlorothiazide, D; bumethanide, E; trichlormethiazide, F; hydroflumethiazide G; hydrochlorothiazide (-----; correction line, see text)

All points are experimental while the solid lines are computed from the binding parameter.