$$\theta = \left(\frac{k_1}{k_1 - u/C_p} \right) \left(e^{-\frac{u}{C_p} \cdot \frac{l}{N}} - e^{-k_1 \frac{l}{N}} \right) \frac{(-\Delta H) X_{A0}}{C_p}$$

where θ : temperature change in the catalyst bed ($^{\circ}\text{C}$), k : rate constant of pseudo-first order reaction (mol/s cm^3), u : overall heat transfer coefficient ($\text{cal/s cm}^3^{\circ}\text{C}$), C_p : specific heat of the carrier gas ($\text{cal/mol } ^{\circ}\text{C}$), l : depth of the catalyst bed (cm), N : flow rate of gas (mol/s cm^2), $(-\Delta H)$: heat of reaction (cal/mol), X_{A0} : molar ratio of the component ($-$).

The CRD is heated in a furnace of 20 mm in diameter and 330 mm in length. The volume of the catalyst bed is about 0.08 ml. A thermal conductivity detector, TCD, is simultaneously used with the CRD to detect the same sample for comparison. Reaction gases, *i.e.*, hydrogen and oxygen are generated electrolytically and mixed with the effluent gas before the CRD. When oxygen is added, the CRD selectivity responds to the components oxidizable on the catalyst used. By choosing the CRD temperature appropriately, the

selectivity of CRD can be changed. When hydrogen is added, the CRD selectively responds to the components which take part in hydrogenation reaction. The CRD is applied to the detection of unsaturated hydrocarbons. The detection limit of the CRD for pentene-1 is 2.8×10^{-6} g/ml, while that of TCD is about 1.4×10^{-6} g/ml. Peak area of the CRD signal is proportional to the amount of pentene-1. The response of the CRD is fast enough to be used in the gas chromatographic analysis.

(Received Sept. 19, 1975)

Keywords

Catalyst

Catalytic reaction detector

Gas chromatographic detector

Heat of reaction

薄層クロマトグラフィーによるベンジルヒドロクロロチアジド製剤中の 1-アミノ-5-クロロベンゼン-2,4-ジスルホンアミドの直接定量*

南川 伝憲, 松村 阜子, 橋本 敏子**

(1975 年 9 月 16 日受理)

ベンジルヒドロクロロチアジド(I) 製剤中の分解産物 1-アミノ-5-クロロベンゼン-2,4-ジスルホンアミド(II) の定量を行った. 製剤から (I) 及び (II) をアセトンで抽出した後, DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ の薄層クロマトグラフィーで分離後風乾する. 265nm の光を照射しながらその薄層をスキヤニングし, その反射率の減少により (I) 中に含まれる (II) の含有量を直接定量した. 又, (II) (0.3~0.9) μg の回収実験の相対標準偏差は (2.0~2.8)% であった.

1 緒 言

クロロチアジド系の薬物は降圧利尿剤として, 臨床に広く用いられ, 水溶液中の安定性については既に山名ら¹⁾の報告がある. しかし, 錠剤又は粉末製剤中のクロロチアジド系の安定性については報告がなく, 分解物は微量であろうと推定されるので, クロロチアジド系としてベンジルヒドロクロロチアジド(I) 中の不純物として

の 1-アミノ-5-クロロベンゼン-2,4-ジスルホンアミド(II) の定量法を設定し, 市販製剤について (I) 中の (II) の微量分析を試みた.

従来のクロロチアジド系薬物の分析は非水滴定²⁾のほか, 加水分解, ジアゾ化後比色する方法³⁾ 及び紫外部吸収法⁴⁾ がある. そのうちクロロチアジド系の分解物の分析には, 加水分解せずにそのままジアゾ化し, その吸光度より分解物の含量を求めてきた. しかし (I) に含まれる (II) の分析にこの方法を用いると, 再現性が悪く, 操作中に (I) が分解する可能性もあるので, 著者らは薄層クロマトグラフィーで (I) と (II) を分離し,

* 医薬品の品質に関する研究 (第9報). 前報は南川伝憲, 松村阜子: 薬誌, 投稿中

** 北陸製薬(株)中央研究所: 福井県勝山市猪野口

265nm の紫外線を照射しながら, 薄層をスキャンニングし, その反射率の減少より (II) の含量を直接求めたところ, ジアゾ法より高感度で微量分析が可能になったので報告する。

2 実 験

2.1 装 置

日立けい光分光光度計 MPF-2A 型, 付属装置として薄層クロマトスキャンナーを使用。一次側波長: 265 nm, 一次側スリット: 3.0 nm, 二次側波長: 約 265 nm, 二次側スリット: 原点以下の薄層の反射率が, 95% になるように設定 {通常 (2.0~5.3) nm} し, 原点より溶媒前線に向かってスキャン, 比記録 (記録計の基準電圧を光源からの光を受けたホトマルチプライヤーから電気信号を取り出すもので, 光源の明るさに多少の変動やふらつきがあっても記録計への基準信号と試料信号とは同様な割合で変わり, 明るさの変化は記録計にほとんど現れない), sample sensitivity 1, reference sensitivity 3, 薄層クロマトスキャンナースリット幅: 10 mm。

2.2 標準物質, 試薬及び試料

ベンジルヒドロクロロチアジド(I) (標準用): アセトンに (I) (GIULINI 製) を加え 還流冷却器をつけて加熱しながら溶解する。その溶液を炭末処理した後熱時ろ過する。氷水中で冷却しながら析出する結晶をろ別し, 105°C で乾燥したものにつき DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ の薄層上にスポットし, 展開溶媒としてアセトン: ベンゼン: 水 (4: 3: 1) の上層を用いて展開させ 2537 Å の紫外線 (主波長) を照射したとき 1 スポットを認めるまで上記の操作を繰り返す。定量値 (ケルダール法): 99.7% C₁₄H₁₄ClN₃O₄S₂, 元素分析値: 計算値 C 43.35%, H 3.64%, N 10.83%, 実測値 C 43.60%, H 3.82%, N 10.11% のものを使用する。

1-アミノ-5-クロロベンゼン-2,4-ジスルホンアミド (II) (標準用): エタノールに (II) (メルク製) を加え 還流冷却器をつけて加熱しながら溶解する。その溶液を炭末処理した後熱時ろ過する。氷水中で冷却しながら析出する結晶をろ別し 105°C で乾燥したものにつき (I) の場合と同様に操作する。定量値 (ケルダール法): 99.0% C₆H₈ClN₃O₄S₂, 元素分析値: 計算値 C 25.22%, H 2.82%, N 14.71%, 実測値 C 24.94%, H 2.69%, N 14.36% のものを使用する。

DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄: メルク製, 105°C で 30 分間活性化, 乾燥用シリカゲル中で保存。

その他の試薬は市販特級品及び日本薬局方適品を使用した。

試料: ベンジルヒドロクロロチアジド(I) 含有市販製剤 (錠剤及び散剤)。

2.3 定量法の検討

2.3.1 展開溶媒と発色試薬の検討 アセトン: ベンゼン: 水 (4: 3: 1) を用いて, 分離能とスポットの検出に適した吸着剤を検討したところ DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ とワコーゲル B-5F がこの目的に適していることが分かった。そこでこの吸着剤と Table 1 に示した各種溶媒を用いて (I) 及び (II) の分離, 検出法について検討した。2537 Å (主波長) を照射してスポットを検出した。その結果を Table 1 に示したが, アセトン: ベンゼン: 水 (4: 3: 1) が (I) 及び (II) をよく分離したのでこれを用いることにした。

次に検出方法を比較検討したところ, 呈色試薬を用いるよりは, 紫外線照射による反射率の減少を測定するのが高感度であったので, 反射率の一定した値が得られる DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ を用いて次の実験を行った。

Table 1 The R_f values of benzylhydrochlorothiazide (I) and 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide (II)

Developing solvent†	Substance	Wakogel B-5F	DC-Fertigplatten Kieselgel F ₂₅₄
Butyl alcohol saturated with water	(II)	0.86	0.88
	(I)	0.93	0.93
The upper layer of acetone: benzene: water (4: 3: 1)	(II)	0.72	0.72
	(I)	0.86	0.87
The upper layer of butyl alcohol: acetic acid: water (10: 1: 3)	(II)	0.92	0.89
	(I)	0.98	0.96
Cyclohexane: diethylamine (9: 1)	(II)	0.00	0.00
	(I)	0.00	0.00
The upper layer of butyl alcohol: acetic acid: water (4: 1: 2)	(II)	0.92	0.89
	(I)	0.98	0.96
Benzene: ethyl acetate: diethylamine (7: 2: 1)	(II)	0.61	0.48
	(I)	0.90	0.77
Chloroform: diethylamine (9: 1)	(II)	0.00	0.00
	(I)	0.00	0.00
Cyclohexane: chloroform: diethylamine (5: 4: 1)	(II)	0.00	0.00
	(I)	0.00	0.00
Chloroform: acetone: diethylamine (5: 4: 1)	(II)	0.18	0.12
	(I)	0.43	0.37

† v/v

2.3.2 測定機器の調整 2.4 の定量法に準じて (II) の溶液を薄層にスポットし展開、風乾後一次側分光器の波長を (250~310) nm まで、5 nm 間隔にかえ反射率の減少を測定した。なお薄層の原点以下の部分の反射率をあらかじめ各波長において二次側分光器が最高反射率を示すように二次側分光器の波長 (一次側の波長とほとんど同じ波長) を設定した後、95% の反射率を示すように二次側スリットを設定した。次にあらかじめ確認してある (I), (II) のスポットの反射率を記録した。その結果を Fig. 1 に示したが、波長 265 nm における反射率の減少が最も大きいので 265 nm を測定波長に用いることにした。又、光源のふらつきを最小にするため比記録を用い、スキャンニングスピードは low でスキャナーのスリットは 10 mm とした。

Fig. 1 Reflective absorption spectra of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide on the plate

Concentration of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide is 25 μ g per one spot; Chromatoplate; DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ (5×20 cm); Developing solvent—The upper layer of acetone : benzene : water (4 : 3 : 1)

2.4 ベンジルヒドロクロロチアジド (I) 製剤中の 1-アミノ-5-クロロベンゼン-2,4-ジスルホンアミド (II) の定量

(I) の錠剤 10 錠以上を採りその重量を精密に量り粉末とした。錠剤は粉末としたもの、散剤は均等に混和した後、(I) の表示量約 8 mg に対応する量を精密に量りアセトン 20 ml で 2 回、10 ml で 1 回抽出し全抽出液を (30~40) °C で減圧下アセトンを留去し、得られた残留物をアセトンで溶かし正確に 2.0 ml とし試料溶液とした。別に標準用 (II) 3, 6, 9, 12 及び 15 mg を精密に量りアセトンを加えて正確に 200 ml とし標準溶液とする。標準溶液及び試料溶液のそれぞれ 20 μ l を正確

に同一の薄層上にスポットし、アセトン : ベンゼン : 水 (4 : 3 : 1) の上層で約 15 cm 展開風乾後、265 nm の波長を照射しながら薄層をスキャンニングさせ、各スポットの反射率を測定した。次にプランメーターでスキャナーに接続した記録計とのピーク面積 (谷の面積) を測定し、標準溶液を用いて作成した検量線より製剤中の (II) の含量を求めた。なお各試料のピーク面積 (谷の面積) を測定する前後に検量線用の 0.6 μ g のスポットの反射率を測定し、各試料のピーク面積 (谷の面積) を補正した。

2.5 検量線

2.4 の定量法に従って (II) として 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 及び 1.5 μ g をスポットし、風乾後アセトン : ベンゼン : 水 (4 : 3 : 1) の上層で展開した。2.4 の方法で反射率を測定後、そのピーク面積 (谷の面積) より検量線を作成したところ Fig. 2 に示す検量線が得られた。なお、この検量線は反射率の減少を縦軸にとっていないので、直線とはならない。

Fig. 2 Calibration curve of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide

Chromatoplate : DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ (20×20 cm); Developing solvent—The upper layer of acetone : benzene : water (4 : 3 : 1)

2.6 ばらつき及び市販製剤についての定量例

約 3, 6 及び 9 mg の (II) を精密に量り、アセトンを加え全量 200 ml とした。この液 20 μ l を正確にスポットし、2.4 の方法に準じて展開後反射吸収を測定し、

同様に操作して得た検量線より (II) の回収率を求めた。その結果を Table 2 に示した。

次に市販製剤中の (II) の分析法を検討した。この実験に先立って Table 3 に示した調製試料から (II) の回収実験を行った。(I) に 0.62% の (II) を添加して (II) の回収実験を行ったところ、ほぼ満足すべき回収率が得られた。この結果に基づいて市販製剤の分析を行ったところ、メーカー又は剤型に関係なく (I) の製剤中に含まれている (II) の含量は 1% 以下で、製剤上ほとんど問題がないものと思われる。

Table 2 Coefficient of variation of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide (II)

(II) (μg/spot)	n	Coefficient of variation
0.3	8	±2.8
0.6	8	±2.0
0.9	8	±2.8

n: The number of runs

Table 3 Recovery of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide in synthetic preparation

Compound	
Benzylhydrochlorothiazide†	80 (mg)
Corn starch	600
Magnesium stearate	20
Cellulose crystalline	700
Lactose	600
$\bar{x}$ (%)	0.57
σ (%)	0.016
n	8

$\bar{x}$: Recovery (average) of (II) found in (I); σ : Standard deviation; n: The number of runs; † The concentration of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide (II) added in benzylhydrochlorothiazide (I) is 0.62%.

Table 4 Determination of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide in benzylhydrochlorothiazide preparations

Preparation	Lot No.	n	Found (%) 1-Amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide†
Tablet I	A	8	0.75±0.063
	B	8	0.67±0.031
Tablet II	C	8	0.58±0.035
	D	8	0.53±0.030
Powder	E	8	0.65±0.047

† Data are expressed as mean±standard deviation of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide which contained in benzylhydrochlorothiazide preparations (commercial samples). n: The number of runs

3 結 語

(I) 製剤中の (I) の分解物 (II) を製剤より抽出した

後、薄層クロマトグラフィーで分離し、スポットのない箇所と (II) のスポットの反射率の減少の差を測定して、同様に操作して得た標準 (II) の検量線を用い、(II) の含有量を求めた。又、再現性を高めるために比記録で反射率を測定し、再び当該スポットの前後の基準となるスポットの反射率を補正した。その結果、薄層クロマトグラフィーによる直線定量法の精度は前述の点に注意して実験を行ったところ、(2.0~2.8)% (標準偏差 %) であった。

著者らの方法は、紫外、可視領域に吸収を示す物質であれば、医薬品の中に含まれる不純物又は分解物、生体試料中の薬物の迅速な分析に応用できる。又、本法は高感度で試料も少量で日常の品質管理に広く利用できるものと確信する。

文 献

- 1) 山名月中, 古池 宏, 田村裕喜男: 薬誌, **81**, 1528 (1961).
山名月中, 古池 宏, 水上勇三, 本谷千枝, 院瀬見義弘: 同上, **84**, 971 (1964).
山名月中, 水上勇三, 市村藤雄, 古池 宏: 同上, **84**, 974 (1964).
山名月中, 水上勇三, 市村藤雄: 同上, **85**, 654 (1965).
山名月中, 水上勇三: 同上, **85**, 1057 (1965); **87**, 1304 (1967).
山名月中, 水上勇三, 辻 彰: 同上, **87**, 1447 (1967).
T. Yamana, Y. Mizukami, A. Tsuji: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **16**, 396 (1968).
- 2) 第8改正日本薬局方注解: P. C-1383, (1971), (広川書店).
H. C. Chiang: *J. Pharm. Sci.*, **50**, 885 (1961).
- 3) J. Mann, D. Keilin: *Nature*, **146**, 164 (1940).
J. E. Baer, H. L. L. Eidy, A. V. Brooks, K. H. Beyer: *J. Pharmacol. & Exptl. Therap.*, **125**, 295 (1959).
H. Sheppard, T. F. Mowles, A. J. Plummer: *J. Pharm. Sci.*, **49**, 722 (1960).
久保田和彦, 諸橋靖子: 新薬と臨床, **17**, 531 (1968).
- 4) F. R. Fazzari: *J. of the A.O.A.C.*, **53**, 582 (1970).
E. F. Salim, W. W. Hilty: *J. Pharm. Sci.*, **56**, 518 (1967).
W. F. Charnicki, F. A. Bacher, S. A. Freeman, D. H. Decesare: *J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed.*, **48**, 656 (1959).

☆

Determination of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide in benzylhydrochlorothiazide preparations by thin layer chromatography. (Studies on the quality of pharmaceutical preparations. IX.) Tsutanori MINAMIKAWA, Kugako MATSUMURA and Toshiko HASHIMOTO (Central Research Institute Hoku-riku Seiyaku Co., Ltd., Inokuchi, Katsuyama-shi, Fukui)

A small amount of 1-amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide(I), which is an impurity product of benzylhydrochlorothiazide (II), in preparations of (II) was separated and determined by thin layer chromatography on layers of Kieselgel F₂₅₄ with acetone-benzene-H₂O (4:3:1) as developing solvent. The recommended procedure are as follow: The sample tablets are finely powdered, and a portion of it, equivalent to *ca.* 8 mg of (II), is taken and extracted with two 20 ml. and one 10 ml portions of acetone. The acetone extract is evaporated under reduced pressure, and the resultant residue is dissolved by addition of 2.0 ml of acetone. Twenty μ l of this solution is spotted on a plate of DC-Fertigplatten-Kieselgel F₂₅₄ together with the standard solutions (15, 30, 45, 60 and 75 μ g/ml).

After drying, the spotted plate is developed with mixed solvent containing acetone-benzene-H₂O (4:3:1). After drying, the plate is scanned under irradiation of UV light (265 nm), and the reduction in the rate of reflection at each spot is measured by a scanning spectrophotometer. The standard deviation of recovery test {(0.3~0.9) μ g of (II)} was (2.0~2.8)%.

(Received Sept. 16, 1975)

Keywords

1-Amino-5-chlorobenzene-2,4-disulfonamide

Benzylhydrochlorothiazide

Thin layer chromatography

o-ヒドロキシヒドロキノンフタレインを用いるスズ(IV)の吸光及びけい光光度定量*

森 逸男, 藤田 芳一, 榎 健寿**

(1975 年 11 月 22 日受理)

ゼラチンを分散剤に pH 1.0 付近で *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン (Hy·Ph) とスズ(IV) の間に得られる 2:1 モル配位の錯体を用いて, 515nm で 0~16.0 μ g/10 ml スズ(IV) を吸光光度定量した. 又, pH 2.4 付近で 365nm を励起波長に 520nm における Hy·Ph 液 [A] とそのスズ(IV) 液 [B] のけい光強度の差を測定することにより, 0~0.55 μ g/10 ml スズ(IV) をけい光光度定量した.

1 緒 言

従来, スズ(IV) の吸光光度定量法としてジチオール¹⁾, フェニルフルオロン²⁾, ヘマトキシリン³⁾, ガレイン⁴⁾, あるいはローダミン誘導体⁵⁾などの試薬が用いられている. 又, スズ(IV) のけい光光度定量法としても 6-ニトロ-2-ナフチルアミン-8-スルホン酸⁶⁾などが用いられているが, これら定量法はいずれも比較的定量値のばらつきがあり, 定量条件を厳しく規定する必要がある.

著者らは先に *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン (Hy·Ph) を用いる鉄(III) 及びアルミニウム(III) の吸光光度定量法において, スズ(IV) と Hy·Ph は酸性域

で呈色反応を示すとともに, その際 Hy·Ph 液のけい光強度に変化を与えることを報告したが³⁾, 今回スズ(IV) の高感度, 簡便迅速な定量法の開発を目的として, Hy·Ph を用いるスズ(IV) の吸光及びけい光光度定量法について検討を加えた.

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

スズ(IV) 液: 金属スズ (99.999%) を硫酸で加熱溶解後, 水及び硫酸を用いて硫酸濃度ほぼ 1N の 5.0 $\times$ 10⁻⁴M スズ(IV) 液を調製し用いた.

Hy·Ph 液: 前報⁷⁾ までと同様に 1.0 $\times$ 10⁻³M Hy·Ph のメタノール液を調製して用いた.

ゼラチン液: 用時 0.5 及び 1.0% ゼラチン水溶液を調製して用いた.

なお, 試薬はすべて特級品以上の規格品を, 水は再蒸留水を用いた.

* キサンテン系誘導体の分析化学への利用 (第3報).
前報は森 逸男, 藤田芳一, 榎 健寿: 本誌, **25**, 239 (1976)

** 大阪薬科大学: 大阪府松原市河合 2-10-65