- 3) A. P. H. A., Standard Method for Examination of Water and Sewage (1960).
- 4) 半谷高久: "水質調査法" 271~274 (1960).
- 5) 鈴木登, 伊藤守男, 中井義夫, 永井武: 水処理技術, **6**, No. 7, 8~12 (1965).
- 6) 沢村良二: 薬局**13**, No. 6, 77 (1962).
- 7) 本田淳裕: 工業用水**3**, No. 1, 23~28 (1957).
- 8) 清水嘉夫: 金沢大学衛生学教室業報, No. 45, 25~36 (1960).

放射性同位元素による医薬品の分析 III^{*1}

混合スルファミン剤の定量分析^{*2}

長瀬雄三, 馬場茂雄, 国弘和雄 (東京薬科大学^{*3})

Studies on the Analysis of Drugs by Use of Radioactive Isotopes. III^{*1}

Quantitative Determination of Mixed Sulfamines. ^{*2}

Yuzô Nagase, Shigeo Baba and Kazuo Kunihiro

(Tokyo College of Pharmacy^{*3})

The combination of paper chromatographic method and isotope dilution method was proved to yield good results in quantitative determination of mixed sulfamines.

The isotope dilution analysis of homosulfamine was also performed by use of ³⁵S-homosulfamine.

The synthesis of ³⁵S-labeled homosulfamine, sulfamine, sulfadiazine and sulfamerazine were described.

(Received May 20, 1966)

ホモスルファミン (I) 以外の混合スルファミン剤中のスルファミン類を分離定量することは、スルファミン類の物理的および化学的性質が似ているためむずかしい問題であり、任意の混合スルファミン剤に適用できるような方法はまだ報告されていない。スルファミン類のペーパークロマトグラフ¹⁾ (以下 PPC と略記), 薄層クロマトグラフ²⁾ (以下 TLC と略記) による分離については多数報告されているが、試料を PPC または TLC に定量的にスポットしたり回収したりすることはむずかしい。またクロマトグラフによる方法は、R_f 値が接近している2つのスルファミン類に対しては適用できない。一方同位体希釈分析法では目的成分を定量的に分離しなくてもよいという利点がある。著者らは PPC と同位体希釈分析法の長所を組み合わせ、スルファダイアジン (III) とスルファメラジン (IV) の組み合わせを例にとり、任意の混合スルファミン剤に適用できるような定量分析法を検討

し、満足な結果を得た。さらに ³⁵S ホモスルファミンを合成し、これを用いて製剤中の (I) の同位体希釈分析も行なった。

1. ³⁵S スルファミン類の合成 ³⁵S スルファミン類の合成については、(I)³⁾, (III)⁴⁾, スルファミン (II)⁵⁾, スルファピリジン⁶⁾ などについてすでに報告されているが、著者らは ³⁵S で標識した (I), (II), (III), (IV) の合成を Fig. 1 の経路にしたがって行なった。この経路にしたがえば、*p*-acetoamino-sulfonyl chloride (VI) さえ合成しておけば、縮合させる塩基を変えることによって比較的容易に各種の ³⁵S スルファミン類を合成できるという利点がある。

スルファミン類の合成にクロルスルホン酸を使用すれば、一行程でスルホニルクロライドを合成することができるが、市販されている最も安価な ³⁵S の化学形は H₂³⁵SO₄ であり、H₂³⁵SO₄ からトレーサースケールで H³⁵SO₃Cl を合成することはむずかしいので、Fig. 1 の経路にしたがって ³⁵S スルホニルクロライドを合成した。また標識化合物の合成では化学的収率のほかに放射化学的収率も重要な意義をもっているので、著者らはスルホ

*1 前報, 薬誌, **81**, 619 (1961)

*2 国弘の修士論文の一部で、第 21 回日本薬学会大会 (徳島市, 1965) で発表した。

*3 東京都新宿区柏木 4-600; Kashiwagi 4-600, Shinjuku-Ku, Tokyo

Fig. 1 Synthetic Process of ^{35}S -Sulfamines

化の行程で、キャリアとして加える非放射性硫酸の量と放射化学的収率の関係を検討した。その結果アトアニリド 1 モルに対して 2.0 モルの硫酸を用いると、化学的収率は若干低下するが、放射化学的収率は最高の 45% になることを見出した。この割合でスルホン化することにより、Byrne⁴⁾ に比べて $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ の利用率を 35% 増加させることができた。スルホン化以外の行程では放射化学的収率は化学的収率に一致するものと見てよい。合成した ^{35}S スルファミン類の化学的純度は、同じ条件で合成し、精製した非放射性スルファミン類の IR, mp から確めた。またその放射化学的純度は、Rf 値の小さい展開溶媒と大きい展開溶媒の 2 つについて PPC を行ない、いずれの系でも放射性物質のスポットが 1 個になることにより確めた (TABLE I)。後述の分析操作、測定装置の計数効率などを考慮すると、同位体希釈分析に用いる ^{35}S スルファミン類の比放射能は 2×10^5 dpm/mg 以上であることが必要と考えられ、 $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ の使用量はこの前提に基づいてきめた。

TABLE I Rf Values of Synthesized ^{35}S -Sulfamines

Developing system	<i>n</i> -BuOH saturated with 3% NH_3	<i>n</i> -BuOH : AcOH : H_2O (5:4:3)	<i>n</i> -BuOH : pyridine : H_2O (4:3:7)
Sulfadiazine	0.12	0.72	
Sulfamerazine	0.18	0.79	
Sulfamine	0.52		
Homosulfamine	0.19		0.70

2. ホモスルファミンの定量 ホモスルファミンの定量法としては紫外吸収スペクトルを利用する方法⁷⁾、比色定量法⁸⁾、生物学的定量法⁹⁾ および非水滴定法¹⁰⁾ な

どが報告されているが、著者らは同位体希釈分析によるホモスルファミンの定量を試みた。試料に比放射能 S_0 の ^{35}S ホモスルファミン a mg を加え、溶解混合したのち、ホモスルファミンを単離し、その比放射能が一定になるまで再結晶を繰返したのち、比放射能 S を液体シンチレーション計数装置で測定する。試料中のホモスルファミン量を次式より算出した。

$$x = a(S_0/S - 1)$$

ホモスルファミン重曹散、ホモスルファミン錠に本法を適用した分析結果をそれぞれ TABLE II, III に一括した。なおホモスルファミン錠については、局方にしたがって重量法による定量も試みたが、重量法による分析結果はいずれも高くあらわれた。これはホモスルファミン以外の物質もひょう量しているためと考えられる。

TABLE II Analytical Results of Homosulfamine (Pulv. Homosulfam.)

Homosulfamine Taken (mg)	Sodium bicarbonate Added (mg)	Homosulfamine Found (mg)	Recovery (%)
284.5	200	283.6	99.68
292.3	"	294.5	100.75
296.4	"	296.9	100.21
300.1	"	304.2	101.03

3. 混合スルファミンの定量 (III) と (IV) の物理化学的性質はきわめて似ているために両者の分離は PPC または TLC に頼らなければならない。この 2 つの方法のうち PPC のほうが放射性物質の検索が容易であるから著者らは両者の分離に PPC を用いることにした。 ^{35}S で標識した (III) または (IV) を試料に加え、混合したの

TABLE III Analytical Results of Homosulfamine
(Tab. Homosulfam.)

Weight of pulverized tablet taken (mg)	Homosulfamine	
	Found (mg)	Weight %
501.4	407.2	81.2
504.2	405.9	80.5
497.6	409.0	82.2
501.9	407.5	81.2

The analytical results of the same tablet by use of JP VII method were 85.4, 84.9, 85.5 and 89.2%.

ろ紙上にスポットして、3%NH₃で飽和したBuOHで展開する。放射性物質の位置をPPCスキャナーで検索する。この展開溶媒での(III)、(IV)のRf値はそれぞれ0.12, 0.18で両者のスポットにはかなりの重なりが見られる。同位体希釈分析法では定量的に分離する必要はないから、重なりのないと思われる部分を切り取り一定量のメタノールで抽出する。PPCでは結晶として単離できるほどの量をスポットするのはむずかしいので、回収したスルファミン類の比放射能の測定は、メタノール抽出液の一部で280mμの吸光度を他の一部で放射能の強さを測定することによって行なった。なお280mμにおける吸光度と試料量の直線関係は(III)または(IV)の濃度が7μg/mlまで成立した。同位体希釈分析法をPPCに併用することにより、試料をろ紙に定量的にスポットしたり、ろ紙から定量的に回収したりする必要はなくなったことは本法の大きな特徴といえよう。分析結果はTABLE IVに示した。さらに生化学分析においても着色物質や定量妨害物質はPPC精製によって除去できるの

TABLE IV Analytical Results of Sulfadiazine and Sulfamerazine

1. Analytical Results of Sulfamerazine in the Presence of Sulfadiazine (25 mg)

Taken (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
24.91	25.10	100.8
"	24.95	100.2

2. Analytical Results of Sulfadiazine and Sulfamerazine

Sulfadiazine			Sulfamerazine		
Taken (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	Taken (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
24.99	25.00	100.0	24.98	25.04	100.3
"	24.68	98.8	"	25.07	100.4
"	25.01	100.0	"	25.15	100.6

で、本法は生体試料中のスルファミン類の定量にも利用できるものと思われる。

実験の部

測定機器

液体シンチレーション計数装置 パッカー社製、Model 314E

ペーパークロマトスキャナー 日本無線医理学研究所製、Aloka TRM1

光電光度計 島津製作所製、Model QV 50

放射能の測定

液体シンチレーション計数装置による測定は、試料をPPO 2 g, dimethyl POPOP 50 mg, 特級トルエン 500 mlから調製したシンチレーター 15 mlに溶かし、統計誤差が1%以下になるように測定した。スルファミン類の場合には、試料をあらかじめエタノール 1 mlに溶かしたのちシンチレーターを加えて測定した。

ペーパークロマトスキャナーによる測定は、駆動速度 12.5 または 5 mm/min, スリット幅 1.5 または 3 mmで行ない、全スケール 1000 で適当な測定結果が得られる量(約 10⁴dpmに相当する)の放射性物質をろ紙にスポットした。

分析試料

ホモスルファミンは95%エタノールから、スルファダイアジンおよびスルファメラジンは50%エタノールから、いずれも市販品を2回再結晶して用いた。

標識化合物の合成

³⁵S N-acetylsulfanilic acid (V) の合成 H₂³⁵SO₄ の希塩酸溶液を赤外線ランプで蒸発乾燥する。これに 1.5 ml の濃硫酸 (0.028 モル) を加え、氷冷しながら 4 ml の酢酸無水物を混ぜる。これに 2.0 g (0.014 モル) のアセトアニドを少量ずつ加え混ぜながら加えたのち、反応混合物を沸騰水浴中で30分間加熱する。反応混合物を氷冷し、あらかじめ冷却しておいたアセトン 10 ml を加える。生成物をろ取り、少量の冷アセトンで洗浄する。減圧デシケーター中で恒量になるまで乾燥する。

³⁵S N-acetylsulfanilyl chloride (VI) の合成 PCl₅ 5.98 g に、上記の (V) を加え、よく混和する。塩化水素ガスを発生しながら反応が進むが、最初の激しい反応が終わったら、反応混合物が均一な液状になるまで水浴上で加温する。放冷後約 10 g の水を加え、過量の PCl₅ を分解する。スルファミン (II) を合成するためには (VI) を単離する必要はないが、スルファダイアジンやスルファメラジンを合成するためには、(VI) を単離し、乾燥したほうがよい。そのためには氷で分解して得られたけんだく液をエーテルで抽出し、エーテル層を水洗後、硫酸

ナトリウムで乾燥し、エーテルを留去する。

³⁵S Sulfamine (II) の合成 (VI) の合成で過量の PCl_5 を氷水で分解して得られたけんだく液を氷冷し、10 ml の濃アンモニア水を少量ずつ加える。30分間水浴上で加温する。冷後希硫酸で pH 3 に調製する。沈殿してきた ³⁵S N-acetylsulfamine をろ取し、水洗したのち 5 ml の 10% 塩酸と 1 時間加熱する。反応液をまず 5 N NaOH で pH 5 まで中和し、ついで 10% NaHCO_3 で中性にする。氷冷したのち沈殿した (II) をろ取し、水洗する。(II) 1.15 g.

³⁵S p-cyanobenzenesulfonamide (VII) の合成 精製した (II) 1 g を 7.5 ml の 2 N HCl に溶かし、氷冷しながら 0.47 g の亜硝酸ナトリウムを 2.5 ml の水に溶かした液を徐々に加える。この反応液に 1.5 g の硫酸銅と 1.3 g のシアン化カリウムを 8 ml の水に溶かした溶液を加え、2 時間かき混ぜる。70° に 10 分間加温したのち、放冷する。析出した褐色の固体をろ取し、乾燥したのち 5% のエタノールを含むベンゼンで抽出する。溶媒を留去すれば黄色の (VII) が得られる。

³⁵S homosulfamine (I) の合成 上記の (VII) を少量の HCl を添加したエタノール溶液中で、Pd-C を触媒として接触還元することにより (I) を合成した。95% のエタノールから再結晶し、0.142 g の精製品を得た。

³⁵S sulfamerazine (III) の合成 1.05 g の 2-amino-pyrimidine を 5 ml のピリジンに溶かし、氷冷しにかき混ぜながら 2.98 g の (VI) を徐々に加える。加え終わら水浴上で 1 時間加温する。反応溶液に水を加え減圧濃縮する。ここに得られたアセチル体を 4.5 ml の 10% NaOH に溶かし、1.5 時間還流する。放冷後 20 ml の水でうすめ、ろ過し、ろ液を希塩酸で中和する。白色の沈殿をろ取し水洗する。この結晶をまず 60% の酢酸から、ついで 50% のエタノールから再結晶する。精製した (III) の収量は 0.230 g であった。

³⁵S sulfamerazine (IV) の合成 1.20 g の 2-amino-4-methylpyrimidine を取り、(III) の合成に準じて行なった。精製した (IV) の収量は 0.180 g であった。

ホモスルファミンの定量

散剤 散剤約 100 mg を精ひょうし、希釈されたものの比放射能が 10^3 cpm/mg くらいになるように 10^5 cpm/mg レベルの放射性ホモスルファミンを加える。水を加えて均一な溶液としたのち、アンモニア水を加えてホモスルファミンを遊離させる。析出した結晶をろ取し、水から 2 回再結晶する。減圧デシケーターで乾燥後、約 2 mg を精ひょうし液体シンチレーション計数装置で放射能の強さを測定する。

錠剤 ホモスルファミン錠の 10 錠を取り、乳ばちですりつぶす。これより約 500 mg を精ひょうし、80% のエタノールで抽出する。希釈されたものの比放射能が 10^3 cpm/mg くらいになるように 10^5 cpm/mg レベルの放射性ホモスルファミンを加え、エタノールを留去する。以後の操作は散剤の場合と同じである。

スルファダイアジン (III) とスルファメラジン (IV) の混合物の定量

50 mg の試料に、希釈されたものの比放射能が 10^4 cpm/mg になるように、放射性の (III) または (VI) あるいは両者を加え、メタノールを加えて均一な液とする。この濃縮液の一部をおよそ 0.1 mg/cm になるように、幅 2.5 cm の whatman No. 2 にスポットする。新しく調製した $n\text{-BuOH}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}$ (4:1:3) で展開する。風乾後 PPC スキャンナーで放射性物質の位置を測定する。他の成分が混っていないと思われる部分だけを切り取り、5 ml のメタノールに一夜浸漬しておく。抽出液の 2 ml をバイアルに取り、 N_2 を吹きつけて溶媒を除き、1 ml のエタノールを加えて残留物を溶かし、15 ml のシンチレーターを加えて放射能の強さを測定する。抽出液の他の 2 ml を取り、280 mμ の吸光度を測定し、あらかじめ作成しておいた検量線から、放射能の強さの測定に供されたスルファミン類の量を求める。

文 献

- 1) 高木誠司, 鈴木友二, 今枝一男: 薬学研究, **22**, 145 (1950); 吉田嶋介, 河野美保: 名市大薬学部紀要, **4**, 41 (1956).
- 2) T. Bican-Fister, V. Kajganovic: J. Chromatog., **11**, 492 (1963); J. Zarnack, S. Pfeifer: Pharmazie, **19**, 216 (1964).
- 3) E. G. Fingl, J. E. Christian, L. D. Edwards: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., **39**, 693 (1950).
- 4) P. J. Byrne, A. A. Alberts, J. E. Christian: *ibid.*, **42**, 77 (1953).
- 5) I. M. Klotz, J. B. Melchior: Arch. Biochem., **21**, 35 (1949).
- 6) E. G. Bray, G. E. Francis, F. C. Neale, W. V. Thorpe: Biochem. J., **46**, 267 (1950).
- 7) M. L. Heideman, R. C. Rutledge: J. Pharmacol. Exptl. Therap., **93**, 451 (1948).
- 8) 百瀬勉, 安村友宏: 薬誌, **70**, 672 (1950); 塚本赴夫, 由比頭之介: 薬誌, **79**, 1294 (1959); 掛見喜一郎, 川邑年四郎, 瀬崎雅子: 薬剂学, **21**, 16 (1961).
- 9) 山村秀夫: 日新医学, **35**, 323 (1948).
- 10) 第 7 改正日本薬局方