薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (6) 394-399 (1990)

アスポキシシリン分解物の研究 (第1報¹⁾) アスポキシシリンの加水分解系分解物

柳田 正,^{*,a} 小島幸雄,^a 山崎一矢,^a 大良 勇,^a

石川 勉,^a 絹巻明生,^b 我妻光吉^b

田辺製薬株式会社分析化学研究所,^a 有機化学研究所^b

Studies on Structures of Degradation Products of Aspoxicillin. I. Hydrolysis Products of Aspoxicillin in Aqueous Solution

Tadasu YANAGIDA,^{*,a} Yukio KOJIMA,^a Kazuya YAMASAKI,^a

Isamu DAIRA,^a Tsutomu ISHIKAWA,^a Akio KINUMAKI,^b

and Mitsuyoshi WAGATSUMA^b

Analytical Chemistry Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,^a

16-89, Kashima 3-Chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan and

Organic Chemistry Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co.,

Ltd.,^b 2-2-50, Kawagishi, Toda, Saitama 335, Japan

(Received December 16, 1989)

Concerning the decomposition of a novel semisynthetic penicillin, aspoxicillin (ASPC) in aqueous solution, several labile products were isolated and their structures elucidated. The stepwise rearrangements of the penam ring were recognized and they were similar to the known decomposition system about the practical penicillins, in spite of the unique 6-acyl side chain of ASPC.

Keywords—semisynthetic penicillin; aspoxicillin; hydrolysis; epimerization; decarboxylation; structure elucidation

Aspoxicillin (ASPC) は田辺製薬より開発された溶菌的な殺菌作用を示すアミノ酸型ペニシリン (Chart 1) で、その抗菌力は *in vitro* より *in vivo* で強く、ヒトにおいて血中濃度半減期が長い等の特徴を有している。^{2,3)}

今回著者らは、ASPC の各種 pH 水溶液中における分解物を分取して構造解析を行い、これらの構造を明らかにしたので報告する。

1. 各種 pH 水溶液中における ASPC の分解パターン

ASPC の各種 pH 水溶液中における分解物の検索のために、pH 10, 5, 3 及び 2.1 の 0.1% ASPC 水溶液を 25°C に放置し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により検討した (Fig. 1)。

pH 10 では初めに分解物 A₃ が生成し、時間の経過と共に A₂ の生成が認められた。また、pH 3 では、24 h 後に ASPC の前後に主なピークが 6 種 (A₁—A₆) 認められたが、初めに A₁—A₄ が生成し、時間の経過に従い、A₅, A₆ のピークが出現した。また、pH 2.1 で、2 h 放置したところでは A₁ の生成が優先し、5 h では A₂—A₄ への分解も起こり、A₅, A₆ の生成もわずかに認められた。8 h では A₁ が更に増加し、A₂—A₆ も増加した。なお、これら分解物のピーク以外にも微小ピークが数種認められた。pH 5 では ASPC は安定で、48 h 後においても分解物の生成は 10% 以下であった。

2. 分解物の構造

2.1 A₂ 及び A₃ の構造 一般に、ペニシリンはアルカリ又はペニシリナーゼにより加水分解を受け、β-ラクタム環が開環して penicilloic acid を生成することが知られている。⁴⁻⁶⁾ ASPC においてもアルカリ性水溶液中で生成する A₃ は、HPLC の結果から、ASPC にペニシリナーゼを作用させるとき生成する化合物と同じであることが判明した。すなわち、ASPC にペニシリナーゼを作用させ、反応生成物をポラスポリマーゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分取し、凍結乾燥により、白色粉末 A₃ を得た。

このものの赤外吸収 (IR) スペクトル (KBr 法) では β-ラクタム環に基づく 1770 cm⁻¹ 付近の吸収が消失し、

質量 (MS) スペクトルにおいて $(M+1)^+$ のピークが m/z 512 に認められた. 更に核磁気共鳴 (^1H -NMR) スペクトルにおいても ASPC penicilloic acid であることが支持された.

A_3 水溶液を 55°C で 2.5 h 加温し, 生成した A_2 を DEAE-cellulose イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離した後, CM-Sephadex カラムにより脱塩を行い, 凍結乾燥により, 白色粉末 A_2 を得た. A_2 の IR スペクトルは A_3 に類似し, MS スペクトルでも $(M+1)^+$ は A_3 と同様, m/z 512 にピークが認められた.

A_2 と A_3 は水溶液中で可逆的に変換されることが HPLC により認められ, A_3 を pH 7.0 リン酸塩緩衝液に溶かし, 20°C で放置し, 経時的に旋光度と A_2 及び A_3 の濃度を HPLC により測定した. これら測定の結果, A_3 に対する A_2 の比は, 0.065 から 7 h 後 0.20 に増加し, 比旋光度は $+46.2^\circ$ から $+26.5^\circ$ に変化し, 両者は diastereomer の関係にあることが判明した.^{7,8)} これらの結果から, 他のペニシリンと同様, A_2 は 5R 体である A_3 が 5S 体に異性化した ASPC (5S)-penicilloic acid と認められる. そこで A_3 と A_2 を 15% D_2O を含む d_5 -ピリジン中で ^1H -NMR を測定し, 3 位 methine プロトンシグナルを比較したところ, A_2 , A_3 のそれは各々 δ 3.10, 3.41 に認められ, McMillan らの経験則^{9,10)}から, A_2 は 5S 体に帰属され上記推定を支持した. なお, D_2O 中での ^1H -NMR スペクトルで, A_3 の 2 位の geminal CH_3 基のシグナルが δ 1.34 と δ 1.45 であるのに対し, A_2 では δ 0.92 と δ 1.74 にシフトしていることから 5S 体と考えられる.

2.2 A_5 及び A_6 の構造 A_2 及び A_3 をそれぞれ酸性水溶液中で加熱するとき, 脱炭酸を起こし,^{7,8,10)} 各々から極性の低下した A_5 と A_6 がほぼ同時に生成する. A_5 と A_6 の混合物は逆相クロマトグラフィーにより分画分取し, ポーラスポリマーゲルを用いたカラムクロマトグラフィーで精製し, それぞれを凍結乾燥品として得た.

MS スペクトルで $(M+1)^+$ のピークは共に m/z 468 と等しく, ^1H -NMR (D_2O) スペクトルでは, A_5 と A_6 のペニシラン酸構造の 6 位 methine プロトンシグナルは消失し, 新たに methylene プロトンが認められた. また, A_5 の 2 位の geminal CH_3 のシグナルは δ 1.24, 1.58 であるのに対し A_6 では δ 1.06, 1.60 にみられ, 両者の chemical shift の特徴は, A_5 は A_3 に A_6 は A_2 に類似していた. そこで penicilloic acid の場合と同様, 15% D_2O を含む d_5 -ピリジン中で A_5 と A_6 の ^1H -NMR スペクトルを測定した. S 配置の 3 位 methine プロトンシグナルは, A_6 (δ 3.14) の方が A_5 (δ 3.32) より高磁場にあることから A_5 は ASPC penicilloic acid, A_6 は ASPC (5S)-penicilloic acid と決定した.^{8,9)}

Fig. 1. HPLC of the Aspoxicillin and Its Degradation Products in Aqueous Solution at 25°C

a) pH 10, 15 h; b) pH 5, 48 h; c) pH 3, 24 h; d) pH 2.1, 5 h.

HPLC condition: instrument, Hitachi HPLC model 635; detection, UV 280 nm; column, TSK gel LS-410 ODS SIL, $5\ \mu\text{m}$, 4 mm i.d. $\times$ 15 cm, column temperature, 40°C ; mobile phase, solution A, pH 3.0 phosphate buffer-methanol (93:7); solution B, methanol-water (3:2). Linear gradient of solution B added to solution A (0% $\rightarrow$ 100%; 3.33%/min). Flow rate, 1 ml/min.

Chart 1

A_2 , A_3 , A_5 及び A_6 の構造と水溶液中における分解経路を Chart 1 に示した。

2.3 A_1 及び A_4 の構造 強酸性水溶液中でのペニシリン G の分解物として、紫外吸収 (UV) スペクトルにおいて 280 nm に吸収極大を示す penamaldic acid が知られている。⁴⁾

ASPC を pH 2.1 の水溶液中に放置すると A_1 が優先的に生成する (Fig. 1)。pH を 1.5 に調整した ASPC 溶液から生成した A_1 を Amberlite CG-120 カラムを用いて分取し、更に、逆相クロマトグラフィーにより精製後、ポーラスポリマーゲルカラムにより脱塩を行い、凍結乾燥により淡黄色粉末を得た。 A_1 について UV スペクトルを測定した結果、pH 2.2 の水溶液中では 280 nm に吸収極大を、また、中性溶液中では 273 nm に吸収極大がシフトすることが認められた。これらの極大波長における分子吸光係数は ASPC に比べて増大しており、新たな不飽和結合の生成が考えられる。IR スペクトル (KBr 法) においては、 β -ラクタム環による 1770 cm^{-1} 付近の吸収は消失し、MS スペクトルで $(M+1)^+$ のピーク (m/z 512) は、ASPC より 18 マスユニット増加していることが認められた。一方、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (D_2O) において、7 位側鎖アシル基のプロトンはすべて存在するほか、新たに δ 7.28 に 1 個の olefine プロトンが認められた。また、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (D_2O) においても、不飽和炭素 2 個の新生が認められ、 A_1 の構造を支持していた。以上の結果から、 A_1 は ASPC penamaldic acid と決定した。

ペニシリンは酸性水溶液中で 320 nm に特徴的な UV 吸収を持つ penicillenic acid を生成することが報告さ

れている。¹¹⁾

ASPC の弱酸性溶液中で生成する A_4 を A_1 と同様、逆相クロマトグラフィーにより分取し、ポーラスポリマーゲルカラムにより脱塩を行い、凍結乾燥により白色粉末を得た。単離した A_4 は UV スペクトルにおいて 226 nm, 267 nm 及び 323 nm に吸収極大を有し、構造中に共役系の存在が予想された。IR スペクトル (KBr 法) では β -ラクタム環のカルボニル吸収はなく、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (D_2O) から、5 位と 6 位の methine プロトンが消失、新たに δ 7.12 に olefine プロトンが認められた。更に $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) においても、5 位と 6 位の methine 炭素がなく、代わって不飽和炭素が 2 個生成していることが明らかとなった。また、MS スペクトルで $(\text{M}+1)^+$ のピークが m/z 494 に認められた。以上の知見から A_4 の構造を、ASPC penicillenic acid と決定した。

ペニシリン G は penicillenic acid から penamaldic acid を生成することが知られており,¹⁴⁾ A₄ は pH 2.1 の水溶液中で容易に A₁ に変化することが認められた。なお、IR スペクトルにおいてラクトンと考えられる吸収が見られないこと及び ¹³C-NMR スペクトルにおいて 6 位炭素が δ 107.9 とやや特異値であることから、penicillenic acid はラクトン構造 (keto form) よりラクトール構造 (enol form) として存在していると考えられる。A₁ 及び A₄ の推定構造と生成経路を Chart 2 に示した。更に、水溶液中における A₁ と A₄ の変化を HPLC 法により調査した結果、A₁ から弱酸、弱アルカリ性で penicilloic acid (A₅) と (5*S*)-penicilloic acid (A₂) を生成することが判明し、A₄ は強酸性で A₁ の他に penilloic acid (A₆) 及び (5*S*)-penilloic acid (A₆) に変化し、中性では penicilloic acid (A₃) と (5*S*)-penicilloic acid (A₂) の生成も認められた。

実 験 の 部

紫外吸収スペクトルは島津自記分光光度計 VU-300, 赤外スペクトルは日立 260-30 型赤外分光光度計にて測定した。 ^1H (100 MHz) 及び ^{13}C (25 MHz) NMR は日本電子 JNM-FX-100S 核磁気共鳴装置にて, DSS (sodium 2,2-dimethyl 2-silapentane-5-sulfone) を内部標準として測定した。質量スペクトルは日立 M-80A 質量分析計にて, グリセロールマトリックスを使用して, 二次イオンマスマスペクトル (SIMS) を測定した。分取した ASPC 分解生成物の純度は日立 635 型液体クロマトグラフ装置を用い, ピーク面積百分率法により測定した。これら分解生成物はいずれも不安定で適当な再結晶法は見出せなかった。

ASPC Penicilloic Acid (A_3): (3*S*,5*R*,6*R*)-[(*R*)- α -[(*R*)-2-Amino-3-*N*-methylcarbamoyl propionamido]-*p*-hydroxybenzyl]penicilloic Acid—ASPC 1 g に水 10 ml を加え, 1 N NaOH で pH 7.2 に調整する。これに penicillinase (10 万 units/ml, Tokyo Kasei Co.) 2 ml を加え, 1 N NaOH で pH 7.2 に保ちながら 25°C で 40 min 攪拌する。反応物をポーラスポリマーゲルカラム (4.6 cm i.d. $\times$ 9 cm, スチレンジビニルベンゼン系ポーラスポリマー, 片山化学製) により精製する。水で溶出した A_3 の分画を凍結乾燥し白色粉末 0.4 g を得る。Purity 93.0%. MS(SIMS) m/z : 512 ($M+1$)⁺. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400 (br, OH, NH), 1650 (CONH), 1600 (COO⁻). ^1H -NMR (D_2O) δ : 1.34, 1.45 (6H, each s, $2 \times \text{CH}_3$), 2.90 (3H, s, NCH_3), 3.04 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 3.40 (1H, s, H-3), 4.22 (1H, d, $J=6$ Hz, H-5), 4.22 (1H, m, $>\text{CHNH}_2$), 5.26 (1H, d, $J=6$ Hz, H-6), 5.64 (1H, s, $\text{PhCH}-$), 7.08, 7.52 (4H, each d, $J=8$ Hz, aromatic H).

ASPC-(5*S*)-penicilloic Acid (A_2): (3*S*, 5*S*, 6*R*)-[(*R*)- α -[(*R*)-2-Amino-3-*N*-methylcarbamoyl propionamido]-*p*-hydroxybenzyl]penicilloic Acid A_3 の 3.6% 水溶液 30 ml を 55°C で 2.5 h 加温する。この溶液を DEAE-cellulose カラム (DE-32 Cl⁻ form, 5.8 cm i.d. $\times$ 20 cm, pH 4.5 NaOAc-HCl buffer) により分取し, 溶出液を 1 N NaOH で pH 7.2 とする。この溶出液を減圧濃縮後, CM-Sephadex カラム (H⁺ form) で脱塩し, A_2 溶液を凍結乾燥し白色粉末 0.34 g を得る。Purity 85.8% (A_3 10.2% を含む)。MS(SIMS) m/z : 512 ($M+1$)⁺. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3200—3400 (br, OH, NH), 1650 (br, CONH). ^1H -NMR (D_2O) δ : 0.92, 1.74 (6H, each s, $2 \times \text{CH}_3$), 2.96 (3H, s, NCH_3), 3.06 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 3.56 (1H, s, H-3), 4.40 (1H, m, $>\text{CHNH}_2$), 4.80 (1H, d, $J=4$ Hz, H-5), 5.26 (1H, d, $J=4$ Hz, H-6), 5.78 (1H, s, $\text{PhCH}-$), 7.12, 7.60 (4H, each d, $J=8$ Hz, aromatic H).

ASPC Penilloic Acid (A_5): (3*S*, 5*R*)-[(*R*)- α -[(*R*)-2-Amino-3-*N*-methylcarbamoyl propionamido]-*p*-hydroxybenzyl]penilloic Acid, ASPC-(5*S*)-penilloic Acid (A_6): (3*S*, 5*S*)-[(*R*)- α -[(*R*)-2-Amino-3-*N*-methylcarbamoyl propionamido]-*p*-hydroxybenzyl]penilloic Acid A_2 3.0 g を水 20 ml に溶かし, conc. HCl で pH 2.0 に調整し, 80°C で 10 min 加温する。冷後, Na_2CO_3 で pH 7.4 とし, Diaion HP-20 カラムで分取する。水で脱塩後, 10% MeOH で溶出し, A_5 と A_6 を含む分画を凍結乾燥する。白色粉末 (A_5 及び A_6 の約 1:1 の混合物) 660 mg を得る。ここで得た A_5 と A_6 の混合物 90 mg を水 0.5 ml に溶かし, 分取用 HPLC (Column: LiChrosorb RP-18, 10 mm i.d. $\times$ 30 cm, room temp.; mobile phase: 25% MeOH in 0.05 M phosphate buffer (pH 3.0); flow rate: 2 ml/min; detection: UV 280 nm; sample: 0.1 ml) により A_5 と A_6 を分離する。 A_5 と A_6 の分画をそれぞれ冷却した 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 5 ml に捕集する。 A_5 と A_6 を含む溶液をそれぞれポーラスポリマーゲルカラム (1.4 cm i.d. $\times$ 5 cm) で脱塩後, 20% MeOH で溶出し, 凍結乾燥を行い白色粉末を得る。 A_5 5.4 mg (purity 97.0%, A_6 2.6% を含む), A_6 11 mg (purity 91.3%, A_5 6.8% を含む)。 ^1H -NMR (D_2O) δ , A_5 : 1.24, 1.58 (6H, each s, $2 \times \text{CH}_3$), 2.64 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 2.76 (3H, s, NCH_3), 3.27 (1H, dd, $J=14$, 8 Hz, H-6), 3.51 (1H, dd, $J=14$, 6 Hz, H-6), 3.84 (1H, m, $>\text{CHNH}_2$), 4.80 (1H, dd, $J=8$, 6 Hz, H-5), 5.32 (1H, s, $\text{PhCH}-$), 6.96, 7.32 (4H, each d, $J=8$ Hz, aromatic H). A_6 : 1.06, 1.60 (6H, each s, $2 \times \text{CH}_3$), 2.70 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 2.76 (3H, s, NCH_3), 3.40 (1H, s, H-3), 3.51 (1H, dd, $J=14$, 5 Hz, H-6), 3.78 (1H, dd, $J=14$, 5 Hz, H-6), 3.92 (1H, m, $>\text{CHNH}_2$), 4.68 (1H, t, $J=5$ Hz, H-5), 5.36 (1H, s, $\text{PhCH}-$), 6.92, 7.36 (4H, each d, $J=8$ Hz, aromatic H).

ASPC Penamaldic Acid (A_1): (3*S*)-[(*R*)- α -[(*R*)-2-Amino-3-*N*-methylcarbamoyl propionamido]-*p*-hydroxybenzyl]penamaldic Acid ASPC 4 g に 0.05 M citrate buffer (pH 1.5) 50 ml を加えて溶かし, 6 N HCl で pH 1.5 に調整する。Amberlite CG-120 カラム (K⁺ form, 4.3 cm i.d. $\times$ 15 cm) に全量を注入する。0.05 M citrate buffer (pH 6.0) で溶出する。 A_1 を含む分画を濃縮し, 分取用 HPLC (Column: TSK-gel LS-410 ODS SIL, 21.5 mm i.d. $\times$ 30 cm, room temp.; mobile phase: 15% MeOH in 0.05 M phosphate buffer (pH 2.5); flow rate: 3 ml/min; detection: UV 280 nm; sample: 0.7 ml) により分取する。19 回行った分取液を合わせて, 1 N HCl で pH 2.5 とし減圧濃縮後, ポーラスポリマーゲルカラム (31.5 mm i.d. $\times$ 26 cm) に注入し, 水及び 5% MeOH で洗浄する。次いで 10% MeOH で A_1 を溶出し, 凍結乾燥を行って淡黄色の粉末 130 mg を得る。Purity 97.4%.

MS(SIMS) m/z : 512 ($M+1$)⁺. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2920—3430 (OH, NH), 1635 (CONH), 1515, 1375, 1270 (CONH). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 1.34, 1.58 (6H, each s, $2\times\text{CH}_3$), 2.68 (3H, s, NCH_3), 2.70 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 3.75 (1H, s, H-3), 3.99 (1H, t, $J=7$ Hz, $>\text{CHNH}_2$), 5.45 (1H, s, $\text{PhCH}-$), 6.90 (2H, d, $J=8$ Hz, aromatic H), 7.28 (1H, s, H-5), 7.36 (2H, d, $J=8$ Hz, aromatic H). $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) δ : 50.7 (s, C-2), 64.6 (d, C-3), 130.6, 132.2 (C-5, C-6).

ASPC Penicillenic Acid (A_4): (3*S*)-[(*R*)-2-[(*R*)-2-Amino-3-*N*-methylcarbamoyl propionamido]-*p*-hydroxybenzyl]penicillenic Acid ASPC 200 mg に水 10 ml を加えて溶解し, 40°C で 45 h 放置する. この溶液を減圧下約 1 ml まで濃縮する. 生成した A_4 を分取用 HPLC (Column: TSK-gel LS-410 ODS SIL, 21.5 mm i.d. $\times$ 30 cm, room temp.; mobile phase: 15% MeOH in 0.05 M phosphate buffer (pH 3.0); flow rate: 4.1 ml/min; detection: UV 280 nm; sample: 0.75 ml) により分取する. 繰り返し行い得られた A_4 を含む分画を合わせ, 1 N KOH により pH 6 に調整し, 減圧下 70 ml まで濃縮する. 濃縮液をポーラスポリマーゲルカラム (31.5 mm i.d. $\times$ 10 cm) に注入し, 水洗後, 20% MeOH で A_4 を溶出する. 溶出液を凍結乾燥し, 白色粉末 12 mg を得る. Purity 99.1%. MS (SIMS) m/z : 494 ($M+1$)⁺. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ nm: 226, 267, 323. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2920—3400 (OH, NH), 1640 (CONH), 1515, 1375, 1270 (CONH), $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 1.51 (6H, s, $2\times\text{CH}_3$), 2.65 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 2.69 (3H, s, NCH_3), 3.91 (1H, t, $J=7$ Hz, $>\text{CHNH}_2$), 4.14 (1H, s, H-3), 5.82 (1H, s, $\text{PhCH}-$), 6.90 (2H, d, $J=8$ Hz, aromatic H), 7.12 (1H, s, H-5), 7.32 (2H, d, $J=8$ Hz, aromatic H).

引用文献及び注

- 1) この報告の概要は日本薬学会第 107 年会 (京都, 1987 年 4 月) で発表した.
- 2) M. Wagatsuma, M. Seto, T. Miyagishima, M. Kawazu, T. Yamaguchi, S. Ohshima, *J. Antibiot.*, **36**, 147 (1983).
- 3) 松本慶蔵, *Jpn. J. Antibiot.*, **40**, 122 (1987).
- 4) M. A. Schwartz, F. H. Buckwalter, *J. Pharm. Sci.*, **51**, 1119 (1962).
- 5) J. P. Hou, J. W. Poole, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 503 (1971).
- 6) R. L. Peck, K. Folkers, "The Chemistry of Penicillin," Princeton University Press, Princeton, N. J., 1949, p. 144.
- 7) 高野俊太郎, 吉田長作, 酒井広志, 山本芳子, 田井 賢, 保田 隆, 才川 勇, 薬誌, **97**, 1064 (1977).
- 8) 戸引久雄, 半間範隆, 丹野紀彦, 梅田 勲, 薬誌, **100**, 206 (1980).
- 9) I. McMillan, R. J. Stoodley, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1968**, 11.
- 10) M. A. Schwartz, *J. Pharm. Sci.*, **54**, 472 (1965).
- 11) J. M. Blaha, A. M. Knevel, D. P. Kessler, J. W. Mincy, S. L. Hem, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1165 (1976).