1	115	1	128
2	82	2	91
3	69	3	64

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

Conditions for the formation of procaine-penicillin anhydride was clarified and revealed, from the X-ray photograph of the anhydride, that the crystals of procaine-penicillin were present as an anhydride and with one mole of the water of crystallization. Kinetic examination of thermal decomposition that occurs at the time of dehydration of procaine-penicillin indicated that the decomposition is affected by temperature and pressure.

(Received February 1, 1954)

90. 藤原 洋：抗生物質の理化学的研究（第2報*） プロカインペニシリンの
水溶液における分解の動力学 その1

Hiroshi Fujiwara: Physicochemical Studies on Antibiotics. II. Kinetics of
Decomposition of Procaine Penicillin in Aqueous Solutions. (1).

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

ペニシリンの分解生成物は構造決定の立場から種々研究され、分解機構も有機化学的に一応明らかにされている。しかし製剤上必要なその動力学的な面は分解機構の複雑さのために不明の点が多い。特に現在よく用いられているプロカインペニシリンに関しては殆んど知られていない。著者はプロカインペニシリンの水溶液における安定性を検討する目的で本研究を行つた。

プロカインペニシリンの水溶液における態度 ペニシリンのナトリウム塩の各種水溶液における態度は既に1948年 Macek¹⁾ 等によつて研究されている。氏等はペニシリンのナトリウム塩の各種水溶液における安定度を測定してペニシリンの水溶液が pH によつて分解が異り、酸性またはアルカリ性で特に不安定、中性では比較的安定であるが、分解によつて酸が生成するので pH は酸性側に移行し分解が益々大きくなることを認めた。従つて中性の緩衝液を使用すればペニシリンの分解は幾分防ぎ得るが、これだけではペニシリンを水溶液中で完全に安定に保てないことを明らかにした。

ペニシリンの水溶液に対する安定剤として Fleury²⁾ は formaldehyde を、Chain³⁾ は 2,3-dimercaptopropanol [Bal] を挙げているが、Bal は Chain⁴⁾ 等がペニシリンのアルコール分解における分解機構が重金属の接触作用であることを確かめ、重金属除去の目的に使用してペニシリンのアルコールに対する安定化を確認し、水溶液中においても同様の作用を推定して安定剤に応用した。formaldehyde にも同様のことが推定されるが、Macek 等の報告からもペニシリンの安定化は単に水溶液中の重金属除去のみでは達せられないと思われる。

さてプロカインペニシリンは水中でその一部分だけが溶解し、注射薬程度の濃度ではその大部分が固体のまま懸濁しており、しかも溶解した大部分は解離して液の pH に応じて加水分解している（この加水分解は塩が解離してイオンになり、そのイオンが酸または塩基となつて存在する場合である）。このように加水分解しているのは弱酸、弱塩基の緩非緩衝溶液にプロカインペニシリンを溶解した場合に液の pH がいづれも中性側に移行すること

* 1953 年 10 月、日本薬学会近畿支部特別例会に発表。

1) T. S. Macek: J. Am. Pharm. Soc. **37**, 322 (1948).2) P. Fleury: Ann. pharm. franç. **1**, 529 (1949). 3) E. B. Chain: Brit. Pat. 638,535 (June 7, 1950).4) E. B. Chain, F. J. Philpot: Arch. Biochem. **18**, 171 (1948).

Table I

Temp (°C)	pH	Solubility mg./cc.
0	5.42	4.02
20	6.00	5.46
30	6.45	7.26
40	5.54	8.27
50	4.68	12.22

Table II

リン酸緩衝液				酸性フタル酸カリウム-水酸化ナトリウム	
pH	Solubility mg./cc	pH	Solubility mg./cc.	pH	Solubility mg./cc.
5.42	5.84	6.92	5.38	5.6	5.82
5.67	5.78	7.25	5.25	4.72	6.12
6.07	5.64	7.33	5.57	4.67	6.17
6.55	5.52	8.31	6.04	4.33	6.83

によつて推定される。前報でプロカインペニシリン結晶の熱に対する安定性を検討し、その分解は含有水分によつて左右されず、常圧では分解点以上で殆んど分解しないことを報告した。この事からプロカインペニシリンの未溶解部分は水分と共存する状態である以上、前報以外の特異の分解は考えられない。また溶解部分についてはその大部分が解離してイオン化或いは加水分解しているとすれば、ペニシリンそのものの状態はペニシリンのナトリウム塩の水溶液と同じであると考えられる。

以上の事からプロカインペニシリンの水溶液における態度はその溶液における溶解度と溶解部分の分解反応とによつて決定される。

プロカインペニシリンの水に対する溶解度 プロカインペニシリンの水に対する溶解度は未だ明らかにされていないので、まず温度による溶解度の変化を検討するために恒温槽中でプロカインペニシリンの溶解度を測定した。同時に Beckman pH meter で液の pH も測定した (Table I)。同一の資料を用いても温度および溶解度によつて pH が違うので、これから温度に対する溶解度の法則性を求めることはできないが、実際にはこの表から温度による溶解度の変化を充分知ることができる。つぎに、液の pH による溶解度の変化を検討するために Clark の 0.05 mol のリン酸緩衝液の各種 pH の 20° における溶解度を測定した (Table II)。

緩衝液を用いたのは非緩衝溶液中では溶解によつて pH が変化するためである。この程度の緩衝液の濃度で充分溶解時の pH の変化を防ぐことが出来、無機塩による塩析作用も認められない。pH が中性附近で溶解度が最小になるのはプロカインペニシリンの溶解と液中の解離とが平衡状態にあり、中性では加水分解が少く単にプロカインペニシリンの解離のみが行われるためと考えられるが、それは H⁺ または OH⁻ の増加によつて解離度および加水分解度が大になり、ために溶解度が増加するからである。

プロカインペニシリンの水溶液中における分解の動力学 プロカインペニシリンの水溶液における態度を決定する今一つの要素である分解反応を検討するために各種条件で水溶液の分解速度を測定した。分解速度を比較するのはその分解の反応次数を決定し、これから速度恒数を求めてこれを比較すればよい。ペニシリンの分解速度恒数を測定するには分解によつて酸が生成して液の pH が変化するので、これを緩衝するために濃い緩衝液を用いなければならない。また重金属による副反応を考えて使用するペニシリンおよび緩衝液からは重金属を除去しなければならない。速度恒数測定のために各 pH の 1 mol リン酸緩衝液にプロカインペニシリンを溶解し、この液について一定温度における時間によるペニシリンの濃度変化を測定した。プロカインペニシリンの濃度測定にはヨウ素法を用いたが、本法はペニシリンの定量法として比較的簡単であり、アルカリと反応してヨウ素と作用する物質の混在しない限り正確に定量し得るからである。測定結果を次の下式にあてはめ、まず反応次数の決定を試みた。

$$k = \frac{2.303}{t} \log \frac{x}{a-x} \quad \dots\dots\dots (i)$$

t : 反応時間, a : 初濃度, x : t 時間に分解した濃度

反応温度 70°, 60°, 50°, 40° の間で緩衝液の pH 4~8 の範囲ではいずれも (i) 式を満足し、この条件の分解反

応は一次反応であることが確認された。測定温度を 40° 以上で行ったのはそれ以下の温度では正確な恒温が容易に得られず、また反応が遅く測定に時間がかかるからである。各条件における分解速度恒数は Table III のようになる。

Table III

Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	pH	k (u/cc·h)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	pH	k (u/cc·h)
70	4.35	0.835	60	6.71	0.287
"	5.50	0.784	"	7.41	0.650
"	6.36	0.749	"	8.19	0.725
"	7.00	1.150	50	5.05	0.242
"	7.50	1.678	"	6.25	0.119
60	3.81	1.405	"	6.75	0.177
"	5.08	0.385	"	7.45	0.507
"	5.50	0.335	40	5.05	0.0958
"	6.25	0.225	"	6.25	0.0819
"	6.45	0.261	"	7.45	0.176

プロカインペニシリンの水溶液における分解機構 前項でプロカインペニシリンの緩衝液中の分解は pH 4~8 の間では一次反応であり、その速度恒数は pH によつて違い pH 6.0 を境として高いほどまた低いほどであることを明らかにした。Macek 等はペニシリンの無機塩について実験し、その分解機構として penicilloic acid または penicillenic acid への分解を第一段階とする多角的な分解を推定しているが、一般にペニシリンは酸性では penillic acid に、アルカリ性では penicilloic acid に分解するのは周知の事実なので、測定範囲 pH 4.8~8.0 の間で同一の分解をしているとは考えられない。ペニシリンの既知分解生成物のうち一次反応による分解として一応次のように考えられる。

ペニシリンは紫外部に特有の吸収を持たないが、上記分解物はそれぞれ特有の吸収を持つ。Trenner⁵⁾等の研究によれば penillic acid はその構造に有する imidazole 核によつて $235\text{ m}\mu$ に強い吸収を示し、penicilloic acid は $265\text{ m}\mu$ に小さい吸収を示す。また penicillenic acid はその oxazolone 核によつて $320\text{ m}\mu$ に吸収を示すことも知られている。

著者はプロカインペニシリンの各 pH の緩衝液中の分解を明らかにするためにその分解経過を紫外部の吸収スペクトルで追跡した。すなわち速度恒数測定と同様にプロカインペニシリンを種々の pH の 1 mol の緩衝液に溶解し、これを 60° で分解し、その分解途中の紫外部吸収曲線を Beckman DU spectrophotometer で逐次測定した。しかしこの場合プロカインそのものが紫外部に大きな吸収を示し、分解によつて生成する紫外部の吸収

5) N. R. Trenner: "The Chemistry of Penicillin" 442.

Fig. 1-a

Fig. 1-b

と重つてこの曲線から分解経過を推定し得なかつたので、ペニシリンおよびその分解物を酸性でエーテルに抽出し、これを pH 7.0 の緩衝液に転溶してプロカインを除いた後、その吸収スペクトルを測定する方式を採つた (Fig. 1 a, b).

プロカインペニシリンの分解経過の吸収スペクトルの変化はその溶液の pH によつて違い、pH 6.0~7.35 では 265 mμ に顕著な変化があり、penicilloic acid の生成が推定される。またそれより酸性側では何等特異な吸収変化を示さず、酸性側の分解を推定することはできなかつた。

プロカインペニシリンの水溶液中における分解速度恒数と水溶液の pH および反応温度との関係 プロカインペニシリンが水溶液中で分解されて penicilloic acid を生成する反応において pH および反応温度と速度恒数との関係を図示すれば Fig. 2 のようになる。即ち同一温度で pH と $\log k$ (速度恒数の対数) とは直線関係にあり、各温度における pH に対する $\log k$ の勾配は一定である。この関係は (ii) 式を満足し、式中温度によつて b は変化なく、 a のみが変化する。

$$\log k = a + b \cdot \text{pH} \quad \dots\dots\dots (ii)$$

(iii) 式は (ii) 式から誘導し得るからプロカインペニシリンの penicilloic acid への分解速度恒数は水素イオン濃度と直線関係にあることが分る。

$$\log k = a - b \cdot \log [\text{H}^+] \quad \dots\dots\dots (iii)$$

Fig. 2

(iii) 式および Fig. 2 から各温度における速度恒数と pH との関係式を求めると (v)~(viii) 式のようになる。

70°C	$\log k = 0.291 \cdot \text{pH} - 1.977$	 (iv)
60°C	$\log k = 0.291 \cdot \text{pH} - 2.458$	 (v)
50°C	$\log k = 0.291 \cdot \text{pH} - 2.746$	 (vi)
40°C	$\log k = 0.291 \cdot \text{pH} - 2.906$	 (vii)

温度と速度恒数との関係は Arrhenius 式 (viii) で表わされ、この場合 (ii)~(vii) 式から $\log k$ と a が直線関係になるから、 a と $\frac{1}{T}$ が直線関係になれば (viii) 式の関係にあることが証明される。

$$\log k = \log C - \frac{A}{4.574 T} \quad \text{..... (viii)}$$

T : 絶対温度, A : 賦活エネルギー, C : 積分恒数

故に a と $\frac{1}{T}$ との関係を図示すれば Fig. 3 のようになり、温度と速度恒数の関係は (viii) 式であることが判る。

以上の結果からプロカインペニシリンの pH 6.0 以上の 1 mol のリン酸緩衝液中の分解速度恒数を任意の温度、任意の pH において求めることができる。

なお pH 6.0 以上においてプロカインペニシリンの penicilloic acid への分解がいずれも単分子反応であり、その速度恒数は水素イオン濃度と直線関係にあるという著者の実験結果はその機構に関する Johnson および Woodward⁶⁾ の推論、すなわち異つた構造の変化を通じて生ずるのでなく、単純な lactam の加水分解であるとの見解とよく一致する。

総 論 従つてプロカインペニシリンの水溶液における態度は溶解度と溶液の分解反応によつて決定され、その分解反応は pH 4~8 で、いずれも一次反応であり、また pH 6.0 以上では分解によつて penicilloic acid を生成するが、その反応で pH と速度恒数の対数は直線関係にあり、温度と速度恒数との関係は Arrhenius の式を満足すると結論し得る。

終りに本研究に終始御鞭撻を賜つた所長桑田 智博士に謹謝し、資料を供与下さつた日下綱治博士およびボーログラフの測定に協力下さつた朝日 豊氏に深謝する。

Fig. 3

実 験 の 部

プロカインペニシリンの水溶液に対する溶解度の測定 測定に使用したプロカインペニシリンは武田工場製のもを 80%アセトンで3回再結晶して乾燥したベンチルペニシリンのプロカイン塩でmp 127~129° の結晶である。測定には資料 50~100 mg をコルベンに秤取し、恒温槽中でかきまぜながら予じめ恒温にした液 10 cc を加え、2 時間かきまぜる。その一部を取つて Beckman pH meter で溶液の pH を測定し、他は恒温中で濾過し、濾液をヨウ素法で定量し、その定量値からプロカインペニシリンの溶解度を算出。

プロカインペニシリンの水溶液中における分解速度恒数の測定 プロカインペニシリンは前項のものを使用し、緩衝剤として用いる第一リン酸カリウム、第二リン酸ナトリウムは水から再結晶し、その 1 mol 溶液についてポーログラフで重金属を定量、その総量が 10^{-6} mol/L 以下のものを使用した。分解速度恒数の測定には 1 mol のリン酸緩衝液にプロカインペニシリンを溶解し、この溶液を 5 cc のアンプルに分注、これを封入し恒温槽で加温、単位時間ごとにアンプルを取り出しプロカインペニシリンの残存量をヨウ素法で定量し、この値と (i) 式から速度恒数を算出。Table IV に示すように各時間の速度恒数は誤差範囲内でよく一致。

加温に用いた恒温槽は 70° の場合は水、メタノールを 60° の場合にはアセトン、水を 50° にはアセトン、エーテルを各々その温度で沸騰するように混和して使用し、40° の場合には電気恒温槽を使用。

プロカインペニシリンの水溶液中における分解経過の吸収スペクトルの測定 前項と同様の方法でプロカインペニシリンを各条件の緩衝液に溶解して加温分解し、1 時間ごとに取出した液からその 1 cc を分液ロートに取り、エーテル 10 cc と 10%リン酸 1 cc を加え、2 分間ふりまぜて下層を流去し、これに pH 2.0 の緩衝液 5 cc を加えて洗滌、ついで pH 7.0 の 0.3 mol リン酸緩衝液 10 cc を加えて 2 分間振盪、水層をとり常温減圧下にエーテルを除き、この液の紫外部の吸収スペクトルを Beckman DU spectrophotometer で測定。

Table IV

70°C		時 間(時)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
pH 4.35	{	u/cc*	858	564	370	243	159	105	69
		残存率(%)		65.8	43.2	28.3	18.5	12.3	8
		k		0.833	0.839	0.839	0.843	0.835	0.758
pH 5.50	{	u/cc	568	383	259	175	118	80	
		残存率(%)		67.5	45.6	30.9	20.8	14.1	
		k		0.786	0.784	0.783	0.783	0.788	
pH 6.36	{	u/cc	574	394	271	186	128	88	
		残存率(%)		68.7	47.3	32.7	22.3	15.3	
		k		0.750	0.748	0.751	0.750	0.748	
pH 7.00	{	u/cc	700	396	225	119	72.6	39.6	
		残存率(%)		56.6	31.1	17	10.4	5.66	
		k		1.135	1.130	1.178	1.130	1.145	
pH 7.50	{	u/cc	647	277	119	53.8			
		残存率(%)		42.8	18.4	8.3			
		k		1.695	1.690	1.655			
60°C		時 間(時)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
pH 3.81	{	u/cc	1585	787	390	192	93	46	20
		残存率(%)		49.7	24.6	12.2	5.9	2.9	1.3
		k		1.395	1.395	1.405	1.415	1.410	1.450
pH 5.08	{	u/cc	925	760	627	516	423	350	290
		残存率(%)		82.2	67.8	55.8	45.8	37.9	31.5
		k		0.391	0.389	0.387	0.390	0.389	0.385
pH 5.50	{	u/cc	1570	1320	1110		787		588
		残存率(%)		84.1	70.7		50.1		37.4
		k		0.359	0.326		0.344		0.327

pH 6.25	u/cc	1570	1542	1482	1429	1383	1357	1317
	残存率(%)		89.2	79.2	70.6	63	58.8	52.2
	k		0.225	0.230	0.231	0.231	0.213	0.217
pH 6.45	u/cc	608	502	469	411	359	318	278
	残存率(%)		87.4	77.1	67.6	59	52.3	45.7
	k		0.267	0.261	0.261	0.263	0.259	0.259
pH 6.71	u/cc	694	548	476	409	357	315	264
	残存率(%)		86.3	75.1	64.6	56.3	49.8	41.7
	k		0.289	0.286	0.291	0.286	0.279	0.292
pH 7.41	u/cc	1380	999	720	522	376	271	198
	残存率(%)		72.3	52.2	37.8	27.3	19.7	14.3
	k		0.647	0.650	0.647	0.649	0.660	0.646
pH 8.19	時 間(時)	0	0.25	0.5	1	1.5		
	u/cc	1070	886	741	515	357		
	残存率(%)		82.8	69.2	48.2	33.4		
	k		0.736	0.718	0.721	0.725		

* u/cc はプロカインペニシリンの濃度を国際単位で表した。ペニシリンナトリウム塩 1 mg の国際単位は 1667 単位である。

50°C

	時 間(時)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
pH 5.05	u/cc	740	645	581	515	463	409	363
	残存率(%)		88.4	78.5	69.6	62.7	55.2	47.7
	k		0.244	0.242	0.242	0.233	0.238	0.246
pH 6.25	u/cc	1370	1289	1215	1150	1083	1024	965
	残存率(%)		94.1	88.7	84.7	79.1	74.8	70.4
	k		0.1245	0.1195	0.1165	0.1198	0.1160	0.1165
pH 6.25	u/cc	555	522	488	462	436	409	383
	残存率(%)		94.2	87.9	83.3	78.6	73.8	69.0
	k		0.1195	0.1265	0.1211	0.1195	0.1205	0.1232
pH 6.75	u/cc	799	735	668	608	555	503	456
	残存率(%)		92	83.6	76.2	69.4	63	57.1
	k		0.152	0.179	0.181	0.181	0.183	0.185
pH 7.45	u/cc	383	297	231	178	139		
	残存率(%)		77.5	60.3	46.4	36.3		
	k		0.507	0.506	0.507	0.506		

40°C

	時 間(時)	0	0.5	1	2	3
pH 5.05	u/cc	1382	1315	1255	1142	1044
	残存率(%)		95.2	90.8	82.7	75.5
	k		0.0967	0.0967	0.0958	0.0942
	時 間(時)	0	1	2	3	
pH 6.25	u/cc	853	820	754	694	
	残存率(%)		96.1	88.3	81.3	
	k		0.0805	0.0829	0.0824	
	時 間(時)	0	0.5	1	2	3
pH 7.45	u/cc	753	687	634	535	449
	残存率(%)		91.2	84.2	71	59.8
	k		0.184	0.177	0.172	0.172

Summary

Decomposition velocity of procaine penicillin in aqueous solution was measured at various temperatures and pH. All showed primary reaction and the velocity was found to be the smallest at around pH 6.0. Absorption spectra during the decomposition were measured and it was assumed that procaine penicillin underwent decomposition to penicilloic acid above pH 6.0.

(Received February 1, 1954)

91. 伊藤四十二, 鶴藤 丞, 久保田幸穂: 唾液腺ホルモンの研究 (第 25 報*)
放射性磷 (P^{32}) の生体内分布に及ぼすパロチンの影響**

Yosoji Ito, Susumu Tsurufuji, and Yukio Kubota: Studies on the Salivary Gland Hormones. XXV. Effect of Parotin on the Distribution of Radioactive P^{32} *in vivo*.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo***)

いわゆる唾液腺ホルモン学説に従つて牛耳下腺から抽出されたパロチンの生理作用は最近に到つて次第に解明されつつある¹⁾。著者等はパロチンが硬組織の形成、無機質の代謝に及ぼす効果の本態を追究するために人工放射性磷 (P^{32}) を使用してその生体内分布を検討した。

実験方法

体重 80 g 前後の雄ラットを用い、パロチン投与群にはパロチンの硫酸 15% 分画結晶を 0.9% 食塩水溶液として注射し、対照群の動物にはパロチンの代りに 0.9% 食塩水を注射し、一方一定量の P^{32} (約 10 μ c) を含む標識化 Na_2HPO_4 の 0.9% 食塩水溶液を全動物に注射した。皮下又は腹腔内に注射された可溶性磷酸塩は極めて速やかに血中へ移行する²⁾ から多量の可溶性磷酸塩を注射すると一時的に生体の磷代謝を攪乱するおそれがあるが逆にあまり低濃度では界面吸着などの現象のために溶液の均質性が失われる³⁾。著者等は Na_2HPO_4 の注射量を 10^{-4} ~ 10^{-5} mol, 溶液 0.5 ml としたので溶液の均質性をそとわず、又磷の総注射量は 1.5 γ 以下であるからこれは血清約 0.05 cc 中に含まれる無機磷量に相当し、磷代謝を乱すおそれもないと考えられる。注射してから一定時間経過後上部頸髄を破壊して殺し、血液、肝臓、副腎、大腿骨、下顎切歯を取り出し、血液は 20 mm³, 肝臓は約 20 mg をアルミニウム箔上にはぼ一定面積、一様の厚さに展開し、副腎は片側ずつ全体を濾紙上に展開してから何れも空气中で乾燥した後 G-M カウンターで放射能を測定した。大腿骨、下顎切歯は電気炉内で 650 ~ 750° で灰化し、塩酸に溶解した後その全部又は一部を採り蒸発乾固し G-M カウンターで測定した。

実験結果

実験 I パロチン投与量はラット体重 100 g 当り 2 mg, 背部皮下に注射し、同時に放射性磷を背部皮下に注射, 3 時間後殺し血液、肝臓、大腿骨、下顎切歯につき検討した。結果は Table I に示す通りパロチン投与群は対照群に比べ放射性磷量が血液ではやや少なく、下顎切歯では明らかに多い。

Table I. Effect of Parotin on the Distribution of P^{32} (Dose: 2 mg./100 g. rat body weight)

Blood	Liver	Femur	Lower Incisor
c.p.m./20 mm ³	c.p.m./20 mg.	c.p.m./femur/5	c.p.m./whole incisor

* 第 24 報: 本誌 74, 142 (1954).

** 日本薬学会年会で講演 (1953).

*** Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) 文部省科学研究費第七部総合研究班報告, 昭和 26 年度 193 頁, 昭和 27 年度 101 頁.

2) Hevesy: Kgl. Danske Videnskab. Selskab. Biol. Medd. 15, 5 (1940); Kjerulf-Jensen: Acta Physiol. Scand. 3, 1 (1941).

3) Voigt: "Biophysical Research Methods" Interscience Publishers inc. p 631 (1950).