にてメチル化すれば mp 78~87° のメチル化体を与え, これは 4-hydroxy-3,5-dibromobenzoic acid を同様メチル化して得られる methyl 3,5-dibromoanisate mp 92° (文献¹⁴⁾ mp 91.5~92° (corr.)) と混融するに融点降下を認めない. また母液よりの mp 175~177° の結晶はこれを MeOH, H₂SO₄ にてエステル化し, リグロインより再結, mp 95~103° のメチルエステルを得る. これを methyl 3-bromo-4-hydroxybenzoate mp 107° と混融するに融点降下を認めない.

京都大学医学部薬学科

14) Balbiano: Gazz. chim. ital. **13**, 66; Beilstein **X**, 179.

U. D. C. 545.822 : 547.473.2

270. 水上 聰, 永田耕一: γ -ブチロラクトン及びその誘導体の定量 (第1報*)

γ -ブチロラクトンの比色定量

Satoshi Mizukami and Koichi Nagata: Determination of γ -Butyrolactone and its Derivatives. I. Colorimetric Determination of γ -Butyrolactone.

(Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.**)

The formation of a red complex compound by hydroxamic acid with Fe³⁺ was utilized for the colorimetric determination of γ -butyrolactone. A comparatively stable coloration can be obtained in nitric acid solution, using iron alum as the ferric salt. In order to improve the reproducibility, detailed examination of reaction conditions was carried out, and the procedures and determination formula were established. According to this procedure, there is no interference of impurities, the determination can be carried out rapidly and in a simple manner, and its repeatability is less than $\pm 1.0\%$, reproducibility $\pm 1.3\%$. The optical density of the colored solution is affected by the active concentration and pH of hydroxylamine, pH of the colored solution, and concentration of the ferric salt, while the stability of the colored solution differs according to the pH of the colored solution and the temperature of the solution while it is allowed to stand. From these results, an aqueous solution of γ -butyrolactone and 1 N hydroxylamine were reacted in pH 11.0~12.0 at 40° for 20 minutes to form oxamic acid, cooled in ice, iron alum reagent acidified with nitric acid added to bring its concentration to 48% at pH 0.8, and the optical density of the colored solution was measured 10 minutes later with the Beckman Model B spectrophotometer, at 505 m μ .

(Received June 28, 1956)

一般にエステル, 酸無水物はヒドロキシルアミンとヒドロオキサム酸を生じ, 酸性溶液中で Fe⁺⁺⁺ と赤色の錯化合物を作るので, この反応を比色定量に利用出来ることは衆知の如くである¹⁻³⁾. この方法はその他酸アミド⁴⁾, ペーシリン^{5,6)}にも応用されているが, ラクトンについてはエステルと殆んど同様な反応をすることが指摘されている⁷⁾にとどまり, 実際の物質についての定量法は報告されていないようである. さて上記の報告によればいずれの場合も呈色液は不安定で, その定量誤差は一般に大きく, またいずれもその都度標準品を対照としていたので, 試薬濃度及び温度などの影響を含む再現性についての検討がなされておらず, その他の反応条件についての記載も少ない. そのため容易に標準品がえられず, 予じめ定量式を作成しておく必要がある場合には, 上

* 第 76 回日本薬学会年会で発表 (1956).

** Imafuku, Amagasaki, Hyogo-ken.

1) U. T. Hill: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. **18**, 317 (1946).

2) U. T. Hill: Anal. Chem. **19**, 932 (1947).

3) R. F. Goddu, et al.: Ibid. **27**, 1251 (1955).

4) F. Bergmann: Ibid. **24**, 1367 (1952).

5) J. H. Ford: Ibid. **19**, 1004 (1947).

6) G. E. Doxer, P. M. Everett: Ibid. **21**, 670 (1949).

7) R. T. Hall, W. E. Shaefer, "Determination of Esters", in J. Mitchell, I. M. Kolthoff, E. M. Proskauer, A. Weissberger, Editors, "Organic Analysis", Interscience, Publ., Inc., New York, **II**, 62, 1954.

記の報告をそのまま利用出来ない。

著者等は先にホルムアミドの比色定量について、硝酸酸性溶液中で鉄塩として鉄明ばんを用いると、比較的安定な呈色液がえられることを見出した⁹⁾。この方法に基づいて、今回 γ -ブチロラク톤の定量法を検討し、特に再現性について考慮をほらい、試薬の濃度、反応条件、操作等を定めた。その結果、異った日にその度に製した試薬を用い予め定めた定量式によつて計算しても、定量誤差は $\pm 1.3\%$ にとどまり、且つ不純物に影響されず迅速簡便に定量することが出来た。本定量法に利用する反応は下記の如くである。

試 薬 1) 3.5 N HNO₃ : 特級 HNO₃ 135 cc を蒸留水で希釈して 500 cc とし、標準試薬を用いて標定、出来るだけファクター 1.00 に近づける。 2) 3.0 N NaOH : 特級 NaOH 65 g を蒸留水に溶解して 500 cc とし、3.5 N HNO₃ を用いて標定、ファクター 1.00 に近づける。 3) 3.0 N NH₂OH·HCl : 特級品 60 g を蒸留水に溶解して 250 cc とし、3.0 N NaOH で標定、ファクター 1.00 に近づける。 4) 鉄明ばん試薬 : 特級結晶 25 g を上皿天秤にて正確に秤取し、3.5 N HNO₃ 125 cc (ビュレットで秤取) に溶解したのち、蒸留水で希釈し 250 cc とする。 5) フェノールフタレン・チモールフタレン混合指示薬 : フェノールフタレン及びチモールフタレンの結晶 100 mg 宛をそれぞれ 95%エタノールに溶解して 100 cc とした溶液の等容量混液。 6) NH₂OH·HCl-NaOH 混液 : 3.0 N NH₂OH·HCl 25 cc に上記混合指示薬 2 滴を加え、紫色を呈するまで注意して 3.0 N NaOH を加えたのち、更にその余剰 10~20 滴を加える (NH₂OH·HCl を更に多量に用いた場合は、指示薬及び余剰の NaOH の添加量を上記の割合で増加する)。用時調製。

操 作 検体 370~480 mg を蒸留水に溶かして 250 cc とし、その 10 cc を再び蒸留水に希釈して 100 cc とする。この検液 5 cc を 25 cc のメスフラスコにとり、これに NH₂OH·HCl-NaOH 混液 10 cc を加え、40° の水浴中に 20 分間加温したのち氷水中に数分間冷却する。鉄明ばん試液 10 cc を加えよく振りまぜ、鉄明ばん試液を加え始めてから 10 分後に於ける吸光度をベックマン分光光度計 B 型で測定する。波長 505 m μ 。ブランク液は同様に NH₂OH·HCl-NaOH 混液 10 cc 及び鉄明ばん試液 10 cc を秤取し、標線まで蒸留水を加えよく振りまぜたものを用いる。検体の純度は次式より求められる。

$$\text{純 度 (重量\%)} = (110930 A + 77.5) / W$$

但し W は検体秤取量の mg 数、A は吸光度の測定値である。

実 験 の 部

標準 γ -ブチロラク톤 市販品を 3 回減圧蒸留したのち精密蒸留を行つた。Kp₁₀ 81°。d₄²⁵ 1.1257。元素分析値は理論値に一致。鹼化法による定量値は 99.46 $\pm$ 0.28%。不純物としての遊離の酸は存在せず、カールフィッシャー法により水分測定を行つたが検出せず。本品を褐色アンプルに充填して使用する。

吸収曲線及び呈色液の安定度 ブランク液を標準とした呈色液及び蒸留水を標準としたブランク液の吸収曲線を Fig. 1 に示す。呈色液の吸収の極大は 505 m μ である。この呈色液は後述の如くその pH の大なる程褪色し易いが、それ以上に放置温度による影響が大きい。pH 0.8 の呈色液について温度と安定度の関係を示すと Fig. 2 の如くであり、20° では殆んど安定であるが温度の高くなる程褪色し易い。故に 20° 以下で比色するのがよいが、実際には室温がこれより高い場合には比色セルが曇り測定が困難となるので、検液を一旦氷冷後直ちに呈色試薬を加え、10 分後に比色することとした。この際は毎分 0.17% 褪色するので (Fig. 2 点線) 測定時間は正確に守る必要がある。このような褪色の原因として過剰の NH₂OH が、Fe⁺⁺⁺ を還元するため錯化合物生成の平衡が崩れることが考えられるが、また別に合成した γ -オキシブチロヒドロオキザム酸 (橙色粘稠液) に単に鉄明ばんだけを加えて得られる呈色液も、ほぼ同様の褪色を示すので錯化合物そのものが不安定なものと考えられる。

オキザム酸の生成条件及びその安定度 i) γ -ブチロラク톤と NH₂OH の反応速度は pH により異なる。例えば 40° において pH 12.0 では約 5 分間、pH 9.4 で 1.5 時間、pH 8.0 で 3.5 時間で平衡に達するが、単に NH₂OH·HCl を作用させただけでは反応せず、少量のビリジンを添加すると緩慢に進行するがオキザム酸の生成量は少ない。 ii) オキザム酸の生成量は NH₂OH の作用濃度によつて異なり、作用濃度が大となるにつれ生

成量も多くなる (Fig. 3). 然しその濃度が大きくなると, 鉄明ばんを加えた時気泡が発生し易くなるので作用濃度は $1N$ となるように定めた. またこの場合は反応速度も促進されるので pH 8.0 以上では 40° に5分間で平衡に達するが, 然しこの際のおキザム酸の生成量は pH により若干の差がある (Fig. 4). すなわち他の条件は全く一定として比色した場合の吸光度は pH 9.0 の NH_2OH 溶液を用いた場合に極大を示し, pH 10.5~12.0 で一定となる. 然し $NH_2OH \cdot HCl$ を $NaOH$ で中和する際には pH 8.0~11.5 に著しい pH 飛躍があり, pH 9.0 に調製することが困難なため, (試薬) の項に定めた如く調製した pH 11.0~12.0 の溶液を用いた. この範囲では試薬の過不足による pH 変化が緩慢で, 混合指示薬の変色を目標とするだけで充分目的を達することが出来る.

iii) γ -ブチロラクトンと NH_2OH の反応は, NH_2OH の作用濃度の低い場合は一般的にいつて温度の高い程反応速度が増すが, オキザム酸の生成量は温度が低く反応時間の長い程大となる. これは副反応である γ -ブチロラクトンの加水分解が起ることによると考えられる. 然し NH_2OH の作用濃度が $1N$ の場合には, 反応温度 $30 \sim 50^\circ$, 時間 10~30 分間では全く同一の吸光度を示した. 故に (操作) の項に定めた反応温度及び時間はそれ程厳密でなくてもよい. なお一旦生成したオキザム酸は氷水中に放置する時は, 少なくとも3時間安定である.

Fig. 1. Absorption Curve
— : Colored solution
--- : Blank solution

Fig. 2. Stability of Colored Solution at Various Temperature

Fig. 3. Effect of Concentration of NH_2OH in Reaction Solution

Fig. 4. Effect of pH of NH_2OH Solution

呈色液の pH の影響 HNO_3 の添加量を変えて pH の異なつた呈色液を作ると, その吸光度に差を生じる (Fig. 5). すなわち pH にほぼ比例して吸光度は増大し, pH 1.5~1.6 で極大となる. pH 1.5 における吸光度を 100% とすれば, pH 1.0 で 93%, pH 0.5 で 82% である. ブランク液は鉄明ばん試薬を加えた直後は pH 2.0 以上では濃橙色, それ以下では橙色~黄色であり若干の吸収を示すが, 徐々に褪色して 40 分間後にはいずれも吸光度は 0 となる. pH が大きくなるにつれ気泡の発生が大となり, 特に pH 1.4 以上では比色が困難となる. また呈色液は pH の大なる程褪色し易くなるが pH 1.3~0.7 で最も安定となる. 以上の結果から呈色液の pH が 0.8 になるように操作を定めた.

Fig. 5. Effect of pH of Colored Solution on Absorbancy and Stability

Fig. 6. Effect of Concentration of Ferric Ammonium Sulfate

鉄塩の濃度の影響 呈色液の吸光度は呈色液中の鉄明ばんの濃度が増すにつれて大きくなるが、3.2 g %以上では殆ど一定となる (Fig. 6)。鉄明ばんの量が変わっても、呈色液の pH 及びブランク液の吸光度は全く影響をうけないので、鉄明ばんの量は主として錯化合物生成の平衡に関係するものと思われる。然しその濃度があまり大きくなると気泡が発生し易くなるので、4 g %になるように定めた。なお HNO_3 を加えて後、鉄明ばんを加えるよりも同時に加えた方が、比色時の気泡の発生が少なくて好適である。

試薬濃度の変動による影響 各試薬の濃度をそれぞれ $\pm 10\%$ の範囲で変えて、これらを単独に、あるいは互に組合わせてその他の条件を全く同一として比色し、その結果を分散分析した。その結果 NaOH , $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 鉄明ばん等は何等の影響も与えないが、 HNO_3 の濃度が $\pm 10\%$ 変ると呈色液の pH に ± 0.14 の差を与えてその結果吸光度に $\pm 3.4\%$ の変動を与える。すなわち、本定量法の再現性を向上するためには、 HNO_3 の濃度を最も厳密に規定する必要があるので、 HNO_3 だけは標準試薬を用いて標定することとした。

不純物の影響 γ -ブチロラクトンは通常レップ反応で合成され不純物として、 γ -オキシ酪酸、ブタノール、1,4-ブタンジオールが考えられる。この中 γ -オキシ酪酸は純品がえられず直ちに閉環して γ -ブチロラクトンとなるので実験出来なかつた。他の二つのものを実際に混合した合成検体について実験を行つたが、何等の影響もみとめなかつた。その他一般にカルボン酸によつては障害されないが、エステル、酸アミドは当然障害する。

定量式の作成及び定量誤差 濃度の異なつた γ -ブチロラクトン溶液 10 検体を用い比色した。異なつた日にすべての試薬をあらたに調製し同様の実験を更に 2 回繰返した。かくして得た 30 点から回帰直線を求め (Fig. 7)、この回帰式を換算し定量式を定めた。この回帰直線からの標準偏差の変動係数は $\pm 1.3\%$ で、これが本定量法の再現精度を示すと考える。なお同じ日に同じ試薬を用い同じ検体を繰返し測定した結果は Table I の如く $\pm 1\%$ 以下である。

Fig. 7. Calibration Curve

Table I. Repeatability

0.416	0.788
0.420	0.785
0.417	0.794
0.419	0.787
"	0.783
0.421	"
0.422	"
0.428	0.789
0.421	0.790
0.423	0.778
0.414	0.781
0.427	0.784
$\bar{x} = 0.421$	$\bar{x} = 0.785$
$\sigma = \pm 0.0042$	$\sigma = \pm 0.0044$
$\frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 = \pm 1.0\%$	$\frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 = \pm 0.6\%$

γ -ブチロラクトン水溶液は 30° に放置すると 4 日までは殆んど変化はないが 7 日後に 96%, 1 箇月後に 91% となる。

α -アセト- γ -ブチロラクトンについて γ -ブチロラクトンと全く同様の比色操作を α -アセト- γ -ブチロラクトンについて試みたが、この場合は呈色液が不安定で、その色調も青褐色に変化する。この原因は α 位のアセチル基のカルボニルがオキシムを作り、これが Fe^{+++} と橙色を示すこと、及び α 位の水素がエノール化し易く、エノール体が青色を示すことによると考えられる。

塩野義製薬株式会社研究所

U. D. C. 547.792.9'794.3.07

271. 金岡又雄：チオセミカルバチド関連化合物の合成 (第2報*)

s-Triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazole 誘導体について

Matao Kanaoka: Synthesis of Related Compounds of Thiosemicarbazide. II.

s-Triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazole Derivatives.

(Pharmaceutical Faculty, University of Toyama**)

2-Substituted 5-phenyl-*s*-triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-triazole (I) with a new skeleton was synthesized starting with 4-amino-5-mercapto-3-phenyl-1,2,4-triazole (VI), obtained by the application of hydrazine hydrate to methyl benzoyldithiocarbazine (IV), reacting it with fatty and aromatic acid chlorides in pyridine to form 4-acylamino-5-mercapto-3-phenyl-1,2,4-triazole (VII), and dehydrative cyclization with phosphoryl chloride. Treatment of (VI) by boiling with 80% formic acid afforded 4-formlamido-5-mercapto-3-phenyl-1,2,4-triazole (VII: R=H) and extension of the heating time failed to afford the cyclized compound (I: R=H) but the dehydrative cyclization was effected with phosphoryl chloride. Reaction of acetic anhydride to (VI) directly formed the cyclized compound (I: R=CH₃). Ultraviolet absorption spectrum of the 4-acylamino compound (VII) exhibited the maximum absorption at 220 and 260 m μ , and that of the cyclized product (I) at around 275 m μ .

(Received June 2, 1956)

化学療法剤として thiosemicarbazide の誘導体が数多の研究されている。就中 thioacetazone¹⁾ 及びその類縁化合物が多く、また sulfethylthiadiazole²⁾ に於いて見られるように、thiosemicarbazide の結合をその骨格の一部として持っているものもある。著者は今回 thiocarbohydrazide の結合をその骨格に有する構造 (I) の如き、2-置換 5-phenyl-*s*-triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazole を新たに合成して、薬理、抗菌上興味ある物質を見いだそうとして本研究を行った。

(I) の合成については、i) 4-amino-5-mercapto-3-phenyl-1,2,4-triazole (VI) を acyl 化して脱水閉環する方法と、ii) 5-置換 2-hydrazino-1,3,4-thiadiazole (II) を benzoyl 化して閉環する方法とが考えられるが、今回著者は i) の方法について種々検討して好結果を得た。

先ず benzoylhydrazide (III) をエタノールに懸濁し、計算量の苛性カリの 35~40% 水溶液を加え、氷冷しながら小過剰の二硫化炭素を滴下して、benzoyldithiocarbazonic acid のカリウム塩とし、これに沃化メチルを作用して methyl benzoyldithiocarbazine³⁾ (IV) をつくり、次いで hydrazine hydrate を加え加熱還流すると、

* 第1報：本誌 75, 1149(1955).

** Okuda, Toyama.

- 1) Domagk, et al.: *Naturwissenschaften* **33**, 315(1946); Domagk: *Beitr. Klin. Tuberk.* **101**, 365(1948) (*C. A.* **44**, 4132(1950)).
- 2) Dahlbom, Ekstrand: *Sevnsk. Kem. Tid.* **55**, 122(1943) (*C. A.* **38**, 5208(1944)); Seelemann: *Deut. tierarztl. Wochschr.* **50**, 221(1942) (*C. A.* **37**, 4761(1943)).
- 3) Busch, Starke: *J. prakt. Chem.* [2] **93**, 49(1916).