UDC 547.478.6 : 543.422.5.062

105. 宇野豊三, 安田博幸, 近藤尚志: サイクロセリンの比色定量法^{*1}

Toyozo Uno, Hiroyuki Yasuda, and Takashi Kondo: Colorimetric

Determination of Cycloserine.

(Faculty of Pharmacy, Kyoto University^{*2})

Colorimetric determination of cycloserine is made by addition of phosphotungstic-phosphomolybdic acid reagent (the so-called Folin-Ciocalteu's reagent) to the aqueous solution of cycloserine, basification of this solution with sodium carbonate, and measurement of the optical density of the resultant blue solution at 770 m μ . The concentration of cycloserine is calculated from the regression equation. The value obtained by this method was found to agree well with those obtained by biological assay and by ultraviolet absorption method.

(Received July 21, 1960)

サイクロセリンの化学的定量法としては、ニトロプルシッドナトリウムによる比色法¹⁾、紫外部 (UV) 吸収法²⁾、キレート化合物の生成を利用した滴定法³⁾ および比色法³⁾ 等が報告されている。

著者等は、サイクロセリン水溶液に燐タングステン酸燐モリブデン酸試薬 (Folin-Ciocalteu's reagent)⁴⁾ を加えた後、炭酸ナトリウムでアルカリ性とし、45° で 5 分間加温する時は青色を呈し、このものは Fig. 1 に示すように 770 m μ に吸収極大を有することを見出したので、この呈色を利用して 3~60 γ /cc の濃度の検液の定量を試みた。

Fig. 1.
Absorption Spectrum of Cycloserine
colored by Folin-Ciocalteu's
Reagent
(Concn. of test soln. 60 γ /cc.)

本法を生物学的定量法および UV 吸収法と比較した結果、これら三つの方法は、ほぼ一致した値を示した。

実 験 の 部

試 薬 i) 燐タングステン酸燐モリブデン酸試薬 (Folin & Ciocalteu's reagent): $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (特級試薬) 5 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (特級試薬) 1.25 g, 蒸留水 35 cc, 85% H_3PO_4 (特級試薬) 2.5 cc, HCl (特級試薬) 5 cc を混じ、浴温 190~210° で 10 hr 加熱還流させ、つぎに $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (一級試薬) 7.5 g と Br_2 1~2 滴、蒸留水 3.5 cc を加え、還流冷却器を除いて 15 min 加熱して過剰の Br_2 を揮散させた後、冷却し、蒸留水で 50 cc としてから過し、褐色ビンに保存する。

ii) 2N Na_2CO_3 溶液

定量法 検液 (3~60 γ /cc) 1.0 cc を共栓試験管に正確にとり、燐タングステン酸燐モリブデン酸試薬 1.0 cc を加え、つぎに 2N Na_2CO_3 4.0 cc を加えてよく振とう後、直ちに 45° の水浴中で 5 min 加温する。反応後流水で冷却し、5 min 後、Beckmann DU 型分光光度計で波長 770 m μ で吸光度を測定する。なお同時に、蒸留水 1.0 cc に燐タングステン酸燐モリブデン酸試薬 1.0 cc, 2N Na_2CO_3 4.0 cc を加えて同様の操作を行なつたも

^{*1} 第 80 回日本薬学会年会で発表 (1960).

^{*2} Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) L. R. Jones: Anal. Chem. **28**, 39(1956).

2) J. M. Woodside, J. Piper, J. B. Leary: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. **46**, 729(1957).

3) J. B. Nieland: Arch. Biochem. Biophys. **62**, 151(1956).

4) O. Folin, V. Ciocalteu: J. Biol. Chem. **73**, 627(1927).

を用いて対照とする。

検量線の作製 100 γ /cc の原液を適宜希釈して各種濃度の検液を作製し、定量法の操作にしたがつて呈色させその吸光度を測定した。結果を Table I に示す。その数値より回帰方程式を求めて (1) 式を得た。検量線を Fig. 2 に図示する。

$$A_{770} = 0.0069 C_w + 0.0066 \dots \dots \dots (1)$$

A_{770} : 770 m μ における吸光度

C_w : サイクロセリンの濃度, γ /cc

0.0066 はサイクロセリンの濃度が 0 のときの吸光度

Table I. Absorbancy of Various Cycloserine Solution. Colored by this Method
Concn. (γ /cc.)

Sample No.	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
1	0.0482	0.0887	0.1316	0.1730	0.2156	0.2587	0.2966	0.3404	0.3780	0.4185
2	0.0473	0.0885	0.1303	0.1737	0.2144	0.2543	0.2980	0.3435	0.3815	0.4199
3	0.0486	0.0883	0.1326	0.1697	0.2154	0.2546	0.2973	0.3382	0.3785	0.4185
4	0.0486	0.0884	0.1299	0.1728	0.2144	0.2545	0.2975	0.3418	0.3788	0.4180
5	0.0498	0.0887	0.1322	0.1725	0.2152	0.2556	0.2983	0.3380	0.3818	0.4208
6	0.0472	0.0888	0.1316	0.1740	0.2141	0.2554	0.2971	0.3422	0.3783	0.4182
7	0.0474	0.0877	0.1288	0.1695	0.2154	0.2586	0.2998	0.3398	0.3811	0.4173
8	0.0484	0.0871	0.1275	0.1732	0.2144	0.2547	0.2984	0.3363	0.3810	0.4223
9	0.0484	0.0891	0.1299	0.1697	0.2144	0.2587	0.2962	0.3411	0.3788	0.4188
10	0.0489	0.0889	0.1307	0.1692	0.2150	0.2559	0.2938	0.3380	0.3780	0.4187
11	0.0474	0.0881	0.1321	0.1698	0.2154	0.2549	0.2941	0.3386	0.3782	0.4199
12	0.0474	0.0891	0.1288	0.1698	0.2154	0.2559	0.2970	0.3373	0.3813	0.4187

Fig. 2.
Calibration Curve for Cycloserine

定量条件の検討 i) 反応温度および反応時間 : Na_2CO_3 アルカリ性における本試薬による呈色反応は室温でも徐々に進行し、20~25 min で吸光度は一定となるが、加温することにより著しく促進される。40° に加温した場合、吸光度は 15 min で一定となり、45° では 5 min で一定となる。しかし 50° に加温するときには沈殿を生成して測定は不可能になった。以上のことから定量法には 45°, 5 min の加温を採用した。

ii) 呈色試薬量について : 燐タングステン酸燐モリブデン酸試薬の量を 0.6, 0.8, および 1.0 cc と変え、他は定量法と同じ条件で操作した場合、6~40 γ /cc の濃度の検液においては、試薬量による吸光度の差異は見られないが、50~60 γ /cc の濃度の検液においては、1.0 cc のものが最も良好な吸光度を示した。また 1.5 cc にすると沈殿が析出して測定ができなくなるので、呈色試薬量は 1.0 cc とした。

iii) 2N Na_2CO_3 の量について : 2N Na_2CO_3 の量が呈色試薬量の 2.5 倍以下では、呈色試薬そのもののものもつ黄色の退色が不完全であるが、3~5 倍では退色が完全なうえ、吸光度も最も良好であつた。また、6 倍以上では 45°, 5 min の加温によって沈殿を生成するので、定量法としては、呈色試薬量を 1.0 cc とする場合の 2N Na_2CO_3 の量を 4.0 cc と選んだ。

iv) 燐タングステン酸燐モリブデン酸試薬の調製条件 : 燐タングステン酸燐モリブデン酸試薬を調製する際の加熱温度および加熱時間をそれぞれ、120~130°, 140~160°, 190~210°, および 8, 10, 12 hr と変えたところ、190~210° の浴温で 10~12 hr 加熱した場合が安定した値を示したので 190~210° で 10 hr の加熱を採用した。なお、本試薬は調製時の条件における多少の差、および調製後の保存日数によつて、鋭敏度に若干変動を生じるので、定量時にはかならず、サイクロセリンの標準品を用いて、感度の補正を行なわなければならない。

本法と生物学的定量法および紫外部吸収法との比較 i) 調製後 5 日以内のサイクロセリン被検水溶液について

て, 本法と生物学的定量法⁵⁾による測定値を比較した結果, Table II に示すように, 両者はいずれも 3%以内の誤差で理論的力価 (potency) とよく一致した。

Table II. Determination of Cycloserine in Aqueous Solution

Sample No.	pH of soln.	Potency (prepared) (γ /cc.)	Author's method (γ /cc.)	Biological method (γ /cc.)
1	5.6	100	100.4	100
2	5.6	100	100.3	102
3	5.6	100	101.9	99
4	5.4	96.8	95.7	96

ii) 0.001N NaOH に溶解した調製後 3 日以内の試料液について, 本法と生物学的定量法および UV 吸収法の 3 法を比較した。UV 吸収法については Woodside 等によつて, 生物学的定量法の結果とよく一致すると報告²⁾されている。その結果は Table III に示すように, 原液が 50 γ /cc 以上の高濃度のものでは 3 法の結果は理論的力価に一致するが, 20 γ /cc のような低濃度のものでは, 化学的 2 法の結果は理論的力価と一致するのに生物学的定量法では誤差が大きかった。

Table III. Comparison of Potencies by this Chemical Method, U. V. Spectrophotometric Method, and Biological Method for Various Test Solutions

Sample No.	pH of soln.	Potency (prepared) (γ /cc.)	Author's method (γ /cc.)	U. V. spectro-photometric method (γ /cc.)	Biological method (γ /cc.)
1	6.4~6.8	198.6	195.0	197.1	199
2	7.0	198.6	195.0	197.1	197
3	6.6~6.8	99.3	99.6	101.3	98
4	7.2	99.3	99.6	101.3	98
5	7.0	49.7	53.1	51.0	50
6	8.0	49.7	53.1	51.0	48
7	8.2	19.9	20.2	19.5	28
8	8.0	19.9	20.2	19.5	32

iii) 平均気温 10° の冬期室温中に放置した試料液について本法と UV 吸収法を比較したところ, Table IV に示すように両法の測定値はよく一致した。またそれらの結果から, 冬期のサイクロセリン水溶液には経時の変化はほとんどないことがわかる。

Table IV. Comparison of Potencies by this Method and U. V. Spectrophotometric Method for Test Solution allowed to stand for a Long Period in Winter (av. room temperature: 10°)

Sample No.	Period of standing (day)	pH	Potency (prepared) (γ /cc.)	Author's method (γ /cc.)	U. V. spectro-photometric method (γ /cc.)
1	55	5.6	100	104.5	103.4
2	44	5.6	100	95.9	95.4
3	44	5.6	100	105.0	106.0
4	30	5.6	100	92.4	88.8
5	20	12.4	100	98.4	98.9
6	14	5.6	100	99.9	96.2
7	14	5.6	100	96.4	96.6
8	9	11.2	100	98.4	98.7
9	6	12.4	100	92.9	95.3

iv) 平均気温 23~25° の夏期室温中に長期間放置した試料液について, 本法と UV 吸収法を比較したところ, Table V に示すように, 両法の値はほぼ一致した。またそれらの結果から, 夏期のサイクロセリン水溶液には, 経時の変化がかなりあることがわかる。

Table V. Comparison of Potencies by this Method and U. V. Spectrophotometric Method for Test Solutions allowed to stand for a Long Period in Summer (av. room temperature: 23~25°)

Sample No.	Period of standing (day)	pH	Potency (prepared) (γ/cc.)	Author's method (γ/cc.)	U. V. spectrophotometric method (γ/cc.)
1	167	5.6	100	44.41	42.47
2	131	5.6	100	50.27	53.96
3	123	5.6	100	49.52	49.30
4	79	5.6	300	204.06	210.29
5	72	5.6	300	226.96	221.31
6	8	5.4	96.8	95.66	96.47

本研究にあたり試料を提供していただいた塩野義製薬株式会社, ならびに生物学的定量法を実施して下さった
同社研究所 西村治雄博士および細菌研究室の各位に感謝致します。

京都大学薬学部

UDC 547.54 : 546.171.5

106. 久保田晴寿, 秋田 正: 有機化合物とヒドラジンの反応 (第4報^{*1})

ベンゼンスルフォニルクロライドとヒドラジンの反応

Seiju Kubota and Tadashi Akita: Reaction of Organic Compounds with Hydrazine. IV. Reaction of Benzenesulfonyl Chloride with Hydrazine.

(Faculty of Pharmacy, University of Tokushima^{*2})

Heating of benzenesulfonyl chloride (I) and hydrazine hydrate in ethanol results in the formation of benzenesulfinic acid (IV), while the use of diethylene glycol as a solvent and heating at 180~200° gave diphenyl disulfide (VI) in a good yield, accompanied with a small amount of thiophenol (VII). Various reaction conditions were examined for this reaction and the reaction was assumed to proceed by the route shown in Chart 1. The low yield of (VII) is probably due to the formation of (VI) from (VII) by autoxidation by the alkalinity of hydrazine. The reaction of hydrazine with diphenyl sulfone, diphenyl disulfone, benzenesulfonic acid, and benzenesulfonamide resulted in the reduction of diphenyl disulfone alone to (VI) and others were not reduced. (VI) was also obtained when (I) was reacted with methylhydrazine and phenylhydrazine instead of hydrazine hydrate.

(Received July 22, 1960)

著者等はさきに芳香族ニトロ化合物¹⁾, 4-nitropyridine 1-oxide, 4-nitropicoline 1-oxide²⁾ および芳香族アゾ化合物^{*1} のヒドラジンヒドラートによる還元について報告したが, 今回は benzenesulfonyl chloride (I) とヒドラジンヒドラートの反応について種々検討を加えた結果, 反応成績体が温度により異なること, ジスルフィド体の新合成法として有意義であると考えられたこと等, 二, 三の興味ある知見を得たので, その反応機構を解明するために還元成績体の検索を行なった。

Curtius³⁾ は冷時 (I) にヒドラジンヒドラートを反応させて benzenesulfonylhydrazine (II) および 1,2-bis-

^{*1} 第3報: 本誌 78, 1194(1958).

^{*2} Sho-machi, Tokushima.

1) 久保田, 奈良, 大西: 本誌 76, 801(1956). 2) 久保田, 秋田: 本誌 78, 248(1958).

3) Th. Curtius, F. Lorenzen: J. prakt. Chem.[2]58, 160(1898).