終わりに、御指導、御鞭撻を賜った京都大学 宇野豊三教授ならびに当研究所長 武田健一博士に厚く御礼申し上げます。また IR, NMR スペクトルの測定ならびに元素分析を担当された当研究所の諸氏に感謝します。

塩野義製薬株式会社研究所

〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
85 (12) 1049 ~ 1057 (1965)

UDC 543.426.062 : 547.574.03

155. 天野為之：多価アルデヒド類による定量法の研究(第5報^{*1}) 2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン類のケイ光とその分析化学的应用

Tameyuki Amano: Studies on the Determination Methods with Polyaldehydes. V. Fluorescence of 2-Phenyl-5,6-methylenedioxyphthalimidines and Its Analytical Application.

(Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.^{*2})

2-Phenyl-5,6-methylenedioxyphthalimidines were prepared from 4,5-methylenedioxyphthalaldehyde and ring-substituted anilines. These phthalimidines showed fluorescence and the effect of solvents, substituents, and steric state on their fluorescence was the same as those on 2-phenylphthalimidines reported earlier, and their fluorescence intensity was stronger than that of the corresponding 2-phenylphthalimidines.

Based on these facts, fluorometric determination of sulfanilamides with 4,5-methylenedioxyphthalaldehyde was established. This method is more sensitive than the one using phthalaldehyde as the reagent and is hardly affected by the presence of aliphatic amines, aromatic secondary and tertiary amines, or *ortho*-substituted aromatic primary amines.

(Received March 6, 1965)

著者等は、第4報^{*1}で2-フェニルフタルイミジン類の構造とケイ光能の関係について考察し、さきに報告したフタルアルデヒドによるスルファミン類のケイ光定量法¹⁾に対して基本的な解釈を試みた。今回は、4,5-メチレンジオキシフタルアルデヒドと、核置換アニリン類から Chart 1 に示す 2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン類を合成し、そのケイ光に対する溶媒効果、ならびに構造との関係を明らかにするとともに、その生成反応を利用することによって、4,5-メチレンジオキシフタルアルデヒドによるスルファミン類のケイ光定量法を確立した。

Chart 1.

I : R = <i>o</i> -OH	VI : R = H	XI : R = <i>m</i> -CO ₂ H	XVI : R = 2',3'-benz.
II : R = <i>m</i> -OH	VII : R = <i>o</i> -Cl	XII : R = <i>p</i> -CO ₂ H	XVII : R = 3',4'-benz.
III : R = <i>p</i> -OH	VIII : R = <i>m</i> -Cl	XIII : R = <i>p</i> -SO ₂ NH ₂	
IV : R = <i>m</i> -OCH ₃	IX : R = <i>p</i> -Cl	XIV : R = <i>m</i> -NO ₂	
V : R = <i>p</i> -OCH ₃	X : R = <i>o</i> -CO ₂ H	XV : R = <i>p</i> -NO ₂	

2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン(VI)のケイ光に対する溶媒効果は、Table I に示すように、溶媒の誘電率および粘度の増大とともに、相対ケイ光強度が増大する。とくに粘度による影響が著しく、メタ

*1 第4報：本誌，85，1042(1965)。

*2 Sagisu, Fukushima-ku, Osaka.

1) 天野，水上：本誌，85，1035(1965)。

ノールの場合を 100.0 とするときの相対ケイ光強度 (RFI) と、誘電率 (ϵ), 粘度 (η) に関する回帰曲面*³ を (1) 式に近似.

$$\text{RFI} = -27.95 + 4.03\epsilon + 57.25\eta - 0.07\epsilon^2 - 9.72\eta^2 + 1.49\epsilon \cdot \eta \quad (1)$$

ただし, $s=21.41$, C. V. = 22.22%.

またケイ光極大波長は, 誘電率の増大によって red shift する傾向を示し, 粘度による影響は小であった. ケイ光極大波長 (Em._{max}) と ϵ , η に関する回帰曲面*³ を (2) 式に近似.

$$\text{Em.}_{\text{max}} (\text{m}\mu) = 414.28 + 0.61\epsilon + 5.87\eta - 0.25\eta^2 - 0.17\epsilon \cdot \eta \quad (2)$$

ただし, $s=5.02$, C. V. = 1.17%.

TABLE I. Solvent Effects in the Fluorescence of 2-Phenyl-5,6-methylenedioxyphthalimidine

Solvent	Dielectric const. ϵ ²⁾	Viscosity η ²⁾	Ex. max ^{a)} $\text{m}\mu$	Em. max ^{b)} $\text{m}\mu$	RFI ^{c)}
Formamide	109.5	3.302	316	440	178.1
Methanol	32.6	0.545	312	434	100.0
Ethanol	24.3	1.078	315	430	138.0
Acetone	20.7	0.337	330	425	4.7
Propanol	20.1	2.004	315	430	161.4
Butanol	17.1	3.379	315	435	170.5
Isoamylalcohol	14.7	4.81	315	430	179.8
Pyridine	12.3	0.945	317	430	86.2
Acetic acid	6.2	1.314	315	435	62.7
Benzene	2.27	0.603	315	420	35.6
Dioxane	2.21	1.493	315	420	36.6
Heptane	1.92	0.437	315	410	2.8

a) Fluorescence excitation maximum, uncorrected instrumental readings

b) Fluorescence emission maximum

c) Relative fluorescence intensities; concentration: 5×10^{-3} mole/ml., wave length width of excitation light: 20 $\text{m}\mu$, slit width: 1.50 mm., sensitivity: 7

2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン類の, メタノールおよび 0.1N 硫酸-メタノール溶媒中におけるケイ光能は Table II に示すとおりであった (置換基効果).

TABLE II. Fluorescence Properties of 2-Phenyl-5,6-methylenedioxyphthalimidines

R	Hammett's σ ³⁾	MeOH			MeOH + Acid ^{d)}		
		Ex. max ^{a)} $\text{m}\mu$	Em. max ^{b)} $\text{m}\mu$	RFI ^{c)}	Ex. max ^{a)} $\text{m}\mu$	Em. max ^{b)} $\text{m}\mu$	RFI ^{c)}
<i>p</i> -OH	-0.357	315	470	2.8	310	470	2.1
<i>p</i> -OCH ₃	-0.268	314	460	8.1	310	480	5.4
<i>m</i> -OH	-0.002	310	450	19.2	310	455	8.1
None	0.000	310	440	26.1	310	440	17.4
<i>m</i> -OCH ₃	0.115	312	440	42.4	313	446	27.9

*³ 計算は, 森口繁一編: “日科技連数値表 B,” 第14版 20 (1964) 日本科学技術連盟の平方根法によった.

2) A. Weissberger, *et al.*: “Organic Solvents,” 2nd. Ed., Interscience Publ., New York (1955).

3) H.H. Jaffe: Chem. Rev., 53, 191 (1953).

<i>p</i> -Cl	0.227	313	435	48.3	310	433	34.3
<i>m</i> -CO ₂ H	0.355	310	440	31.5	310	420	26.6
<i>m</i> -Cl	0.373	310	415	45.0	312	418	40.0
<i>p</i> -SO ₂ NH ₂	0.621	318	392	116.3 ^{c)}	318	400	103.7 ^{c)}
<i>m</i> -NO ₂	0.710	—	none	—	—	none	—
<i>p</i> -CO ₂ H	0.728	318	400	120.8 ^{c)}	320	400	103.5 ^{c)}
<i>p</i> -NO ₂	0.778	—	none	—	—	none	—
<i>o</i> -OH	—	325	390	1.2	325	405	1.0
<i>o</i> -Cl	—	305	450	4.9	295	440	3.7
<i>o</i> -CO ₂ H	—	300	430	9.9	310	420	5.0
2',3'-benz.	—	310	450	4.9	306	450	4.0
3',4'-benz.	—	321	445	112.6 ^{c)}	322	450	65.8 ^{c)}

a) Fluorescence excitation maximum, uncorrected instrumental readings

b) Fluorescence emission maximum

c) Relative fluorescence intensities; concentration: 1×10^{-8} mole/ml., wave length width of excitation light: 20 m μ , slit width: 1.75 mm., sensitivity: 7 c') slit width: 1.25 mm.

d) 0.1N H₂SO₄-MeOH.

2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン類はケイ光能を示し、さらに2-フェニルフタルイミジン類について得られた結論^{*1}と同様の結果を得た。

すなわち、*m*-, *p*-置換体のケイ光極大波長は、置換基の電子供与性の増大により red shift し、電子受容性の増大によって blue shift した。ケイ光極大波長と、ハメットの置換基定数 σ について相関分析を行なった結果、Fig. 1 に示すように、メタノール溶媒中においては、相関係数 $r = -0.9616^{**}$ (**は高度に有意)、回帰式の標準偏差の推定値 $s = 7.27$, 0.1N 硫酸-メタノール溶媒中においては、 $r = -0.9739^{**}$, $s = 6.60$ を示し、負の相関関係が成立することを認めた。

m-, *p*-置換体の相対ケイ光強度は、置換基の電子供与性の増大により減少し、電子受容性の増大によって増大した。相対ケイ光強度と、ハメットの置換基定数 σ について相関分析を行なった結果、Fig. 2 に示すように、メタノール溶媒中においては、相関係数 $r = 0.9053^{**}$, $s = 18.51$, 0.1N 硫酸-メタノール溶媒中においては、 $r = 0.9003^{**}$, $s = 17.21$ を示し、正の相関関係が成立することを認めた。ニトロ基の導入、あるいは *o*-置換体のような立体障害のある場合は、著しくケイ光能を減少または消失し、共役系の拡張はケイ光強度を増大せしめた。2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン類のケイ光極大波長は、2-フェニルフタルイミジン類^{*1}よりも短波長にあり、ケイ光強度は大きい。基本型である2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン (VI) と、2-フェニルフタルイミジンの各 1×10^{-8} mole/ml. メタノール溶液を、同時に、同感度 (7), 同スリット幅 (1.70 mm.) で、それぞれの励起極大波長の励起光で励起したときの、それぞれのケイ光極大波長におけるケイ光強度を、励起光の相対分光エネルギー^{*1}によって補正して求めた結果、VI は2-フェニルフタルイミジンに対し、8.8 倍の相対ケイ光強度を示した。

Fig. 1. Correlation Analysis of Fluorescence Emission Maxima to Hammett's Substituent Constants σ

(A): Medium: MeOH, $r = -0.9616^{**}$, Em. max (m μ) = $446.4 - 68.00\sigma$, $s = 7.27$, $n = 10$,

(B): Medium: MeOH+acid, $r = -0.9739^{**}$, Em. max (m μ) = $449.7 - 75.48\sigma$, $s = 6.60$, $n = 10$.

r : correlation coefficient. ** : highly significant.

Fig. 2. Correlation Analysis of Relative Fluorescence Intensities to Hammett's Substituent Constants σ

(A): Medium; MeOH, $r=0.9053^{**}$, $\text{RFI}=27.2+105.23\sigma$, $s=18.51$, $n=10$.

(B): Medium; MeOH+acid, $r=0.9003^{**}$, $\text{RFI}=19.9+95.01\sigma$, $s=17.21$, $n=10$.

2-(*p*-sulfamoylphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (XIII) のケイ光に対する溶媒効果は Table III に示すとおりである。Table III における相対ケイ光強度は未補正，メタノール溶媒中における値を基準として，同感度 (7)，同スリット幅 (1.25 mm.) で測定した。

TABLE III. Fluorescence Characteristics of 2-(*p*-Sulfamoylphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine

Medium	Absorption peak $m\mu$		Ex. max ^{a)} $m\mu$	Em. max ^{b)} $m\mu$	RFI ^{c)}
0.02 <i>N</i> KOH-MeOH	293,	314	318	392	36.7
MeOH	292,	314	318	392	89.0
0.01 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292,	314	318	392	91.9
0.02 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292,	314	318	392	90.5
0.05 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292,	314	318	395	84.2
0.1 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292,	314	318	400	79.3
0.2 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292,	314	318	407	76.0
0.8 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292,	314	319	417	67.0
2.7 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292,	314	319	426	66.8
3.6 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292,	314	319	429	66.3
7.2 <i>N</i> H ₂ SO ₄ -MeOH	292.5,	315	320	430	85.3

a) Fluorescence excitation maximum, uncorrected instrumental readings

b) Fluorescence emission maximum

c) Relative fluorescence intensities, uncorrected: microammeter readings at same sensitivity (7) setting, wave length width of excitation light (20 $m\mu$), slit width (1.25 mm.), and concentration, 1×10^{-5} mole/ml.

すなわち，硫酸濃度の増大とともに，ケイ光極大波長は red shift，ケイ光強度は硫酸濃度 0.01~0.02*N* に極大値を示した。

一方，4,5-メチレンジオキシフタルアルデヒドとスルファニルアミドとの，アルカリ性溶媒中における反応液はケイ光を示さず，メタノール中ではケイ光の発現に長時間を要するが，酸性溶媒中における反応液は容易にケイ光を発し，ケイ光強度の極大値が硫酸のやや高濃度側 0.05~0.1*N* にずれることを除くと，すべて XIII による Table III に一致するケイ光能を示した。

また，4,5-メチレンジオキシフタルアルデヒドと，*m*-, *p*-クロルアニリン，*m*-, *p*-アミノ安息香酸， β -ナフチルアミンとの酸性溶媒中における各反応液は，それぞれ対応する 2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン類 (VIII, K, XI, XII, XVII) の吸収，励起，ケイ光スペクトルと一致した。

これらの事実は、酸性溶媒中において 2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン類が、容易に生成することを示すものと思われる。

したがって、2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジン類の生成反応を利用する芳香族一級アミン類のケイ光定量が可能であり、種々検討の結果、4,5-メチレンジオキシフタルアルデヒドによる、スルファミン類のケイ光定量法を定めた。本定量法は、フタルアルデヒド法¹⁾よりもさらに高感度である。脂肪族アミン、芳香族二、三級アミンは発ケイ光反応陰性であり、かつその共存は本定量法に影響を与えない。また、*o*-ブロムアニリンのように、立体障害の大きい置換基をオルト位に有する *o*-置換芳香族一級アミンは、発ケイ光反応陰性であり、かつその共存は本定量法に影響を与えることが少ない。

実験の部

装置および測定 日立製分光光度計 EPU-2A 型、EPS-2U 型と、分光ケイ光付属装置 G-2 型および付属ケイ光装置 L-3 型を使用、励起光源は日立クセノンランプ XD-500 および東芝製高圧水銀灯 SHL-100 UV-2 を使用した。

ケイ光スペクトルは色温度 3200°K の白熱電球により機器の感度特性を補正⁴⁾した。励起スペクトルは未補正である。

相対ケイ光強度は、各 Table 内、各 Fig. 内における相対的なケイ光強度を示すものである。Table I および Table II における相対ケイ光強度は、2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジンの MeOH 溶液を基準として測定した。すなわち、各測定ごとに、同モル濃度の 2-フェニル-5,6-メチレンジオキシフタルイミジンの MeOH 溶液を標準として、同時に、同感度、同スリット幅における、それぞれの励起極大波長の励起光で励起したときの、それぞれのケイ光極大波長におけるケイ光強度を、機器の感度特性、励起光の相対分光エネルギー^{*1}によって補正して求めた。その他の相対ケイ光強度は未補正の値である。

定量操作における励起光は、クセノンランプにより励起極大波長を選択して使用する場合よりも、高圧水銀灯による輝度の強い 365 mμ の輝線を使用する場合のほうが、定量の感度をあげる目的に対しては若干有利であった。

4,5-Methylenedioxyphthalaldehyde³⁾ (4,5-M) Dallacker 等³⁾の方法にしたがい、piperonyl alcohol から 1,2-bis(chloromethyl)-4,5-methylenedioxybenzene, 1,2-bis(acetoxymethyl)-4,5-methylenedioxybenzene, 4,5-methylenedioxyphthalalcohol およびその selenite を経て合成。THF から再結晶。m.p. 148~149°, 分析値, UV, IR で確認のうえ使用した。本品は、MeOH, 0.1N H₂SO₄-MeOH, 0.02N KOH-MeOH 各溶媒中において Ex_{max} 289 mμ, Em_{max} 328 mμ^{*4} のケイ光を示した(濃度: 8×10⁻⁸ mole/ml. で測定)。

2-(*o*-Hydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (I) 4,5-M 96 mg. と *o*-aminophenol 59 mg. を dioxane 3 ml. に溶かし、室温に 12 日間反応。溶媒を除き、エーテル溶液とし Al₂O₃ (Merck neutral 15 g.) でクロマトグラフィーを行なう。エーテル 320 ml. で展開後、dioxane 100 ml. で流出する粉末を benzene から再結晶, m.p. 259~261°, 粉末状晶 7 mg. を得。C₁₅H₁₁O₄N Anal. Calcd.: C, 66.91; H, 4.12; O, 23.77. Found: C, 67.08; H, 4.12; O, 24.01. TLC^{*5} (純品であることを確認するために行なったものであるが、参考のために Rf 値を示す。以下すべて同じ): Rf 0.70. UV λ_{max}^{MeOH} mμ (log ε): 304 (4.31). IR ν_{max}^{Nujol} cm⁻¹: ν_{C=O} 1653.

2-(*m*-Hydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (II) 4,5-M 95 mg. と *m*-aminophenol 58 mg. を dioxane 3 ml. に溶かし、室温に 20 hr. 反応。析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 287~288°, 粉末状晶 25 mg. を得。C₁₅H₁₁O₄N Anal. Calcd.: C, 66.91; H, 4.12; O, 23.77; N, 5.20. Found: C, 67.15; H, 4.33; O, 23.66; N, 5.30. TLC: Rf 0.52. UV λ_{max}^{MeOH} mμ (log ε): 311 (4.28). IR ν_{max}^{Nujol} cm⁻¹: ν_{C=O} 1654.

2-(*p*-Hydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (III) 4,5-M 92 mg. と *p*-aminophenol 55 mg. を dioxane 3 ml. に溶かし、室温に 1.5 hr. 反応。析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 283~285°, 粒状晶 60 mg. を得。C₁₅H₁₁O₄N Anal. Calcd.: C, 66.91; H, 4.12; O, 23.77; N, 5.20. Found: C, 66.63; H, 4.19; O, 23.62; N, 5.41. TLC: Rf 0.42. UV λ_{max}^{MeOH} mμ (log ε): 308 (4.23). IR ν_{max}^{Nujol} cm⁻¹: ν_{C=O} 1660.

2-(*m*-Methoxyphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (IV) 4,5-M 127 mg. と *m*-anisidine 88 mg. を dioxane 3 ml. に溶かし、室温に 3 日間反応。析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 210°, 針状晶 51 mg. を得。C₁₆H₁₃O₄N Anal. Calcd.: C, 67.84; H, 4.63; O, 22.59; N, 4.94. Found: C, 67.78; H, 4.77; O, 22.09; N, 4.92. TLC: Rf 0.77. UV λ_{max}^{MeOH} mμ (log ε): 310 (4.25). IR ν_{max}^{Nujol} cm⁻¹: ν_{C=O} 1679.

2-(*p*-Methoxyphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (V) 4,5-M 185 mg. と *p*-anisidine 128 mg. を

*4 未補正。

*5 Al₂O₃ (Merck Aluminum oxid G)-dioxane, 253.7 mμ の紫外線下および I₂ で検出。以下 TLC はすべてこの方法による。

4) 佐藤: The Hitachi Scientific Instrument News, 2, No. 3, 1 (1959)。

5) F. Dallacker, et al.: Ann., 643, 67 (1961)。

dioxane 5 ml. に溶かし, 室温に 20 hr. 反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 225°, 針状晶 94 mg. を得. $C_{16}H_{13}O_4N$ Anal. Calcd.: C, 67.84; H, 4.63; O, 22.59; N, 4.94. Found: C, 67.59; H, 4.60; O, 22.27; N, 4.95. TLC: Rf 0.86. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 310 (4.23). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1678.

2-Phenyl-5,6-methylenedioxyphthalimidine (VI) 4,5-M 190 mg. と aniline 99 mg. を dioxane 5 ml. に溶かし, 室温に 4 日間反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 236~237°, 針状晶 106 mg. を得. $C_{15}H_{11}O_3N$ Anal. Calcd.: C, 71.14; H, 4.38; O, 18.95; N, 5.53; mol. wt., 253.261. Found: C, 71.03; H, 4.42; O, 18.80; N, 5.63; mol. wt. (VPO 法*) 273. TLC: Rf 0.84. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 309 (4.24). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1679.

2-(o-Chlorophenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (VII) 4,5-M 93 mg. と o-chloroaniline 66 mg. を dioxane 2 ml. に溶かし, 室温に 16 日間反応. 溶媒を除き, エーテル溶液とし Al_2O_3 (Merck neutral 2 g.) でクロマトグラフィーを行なう. エーテル 80 ml. で流出する結晶をエーテルから再結晶, m.p. 154°, 針状晶 40 mg. を得. $C_{15}H_9O_3NCl$ Anal. Calcd.: C, 62.62; H, 3.50; O, 16.68; N, 4.87; Cl, 12.32; mol. wt., 287.710. Found: C, 62.72; H, 3.33; O, 16.68; N, 5.14; Cl, 12.15; mol. wt. (VPO 法*) 294. TLC: Rf 0.75. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 303 (4.01). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1693.

2-(m-Chlorophenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (VIII) 4,5-M 78 mg. と m-chloroaniline 56 mg. を dioxane 2 ml. に溶かし, 室温に 3 日間反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 238°, 針状晶 27 mg. を得. $C_{15}H_9O_3NCl$ Anal. Calcd.: C, 62.62; H, 3.50; O, 16.68; N, 4.87; Cl, 12.32. Found: C, 62.89; H, 3.53; O, 16.87; N, 4.97; Cl, 12.62. TLC: Rf 0.82. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 310 (4.30). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1679.

2-(p-Chlorophenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (IX) 4,5-M 97 mg. と p-chloroaniline 70 mg. を dioxane 2.5 ml. に溶かし, 室温に 3 日間反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 282°, 針状晶 61 mg. を得. $C_{15}H_9O_3NCl$ Anal. Calcd.: C, 62.62; H, 3.50; O, 16.68; N, 4.87; Cl, 12.32; mol. wt., 287.710. Found: C, 62.77; H, 3.58; O, 16.78; N, 4.82; Cl, 12.68; mol. wt. (VPO 法*) 299. TLC: Rf 0.83. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 312 (4.33). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1679.

2-(o-Carboxyphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (X) 4,5-M 102 mg. と anthranilic acid 80 mg. を dioxane 3 ml. に溶かし, 室温に 16 日間反応. 溶媒を除き, エーテル 20 ml. を加えて 2 日間放置. 沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 231~233°, 針状晶 141 mg. を得. $C_{16}H_{11}O_5N$ Anal. Calcd.: C, 64.65; H, 3.73; O, 26.91; N, 4.71; mol. wt., 297.272. Found: C, 64.46; H, 3.89; O, 26.89; N, 4.85; mol. wt. (VPO 法*) 286. TLC: Rf 0.00. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 304 (4.11). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1712, 1645.

2-(m-Carboxyphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (XI) 4,5-M 94 mg. と m-aminobenzoic acid 73 mg. を dioxane 10 ml. に溶かし, 室温に 18 hr. 反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 300°, 粉末状晶 115 mg. を得. $C_{16}H_{11}O_5N$ Anal. Calcd.: C, 64.65; H, 3.73; O, 26.91; N, 4.71. Found: C, 64.26; H, 3.83; O, 26.65; N, 4.92. TLC: Rf 0.00. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 309 (4.28). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1694, 1670.

2-(p-Carboxyphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (XII) 4,5-M 85 mg. と p-aminobenzoic acid 64 mg. を dioxane 3 ml. に溶かし, 室温に 21 hr. 反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. >300°, 粉末状晶 117 mg. を得. $C_{16}H_{11}O_5N$ Anal. Calcd.: C, 64.65; H, 3.73; O, 26.91; N, 4.71. Found: C, 64.42; H, 4.06; O, 26.84; N, 4.95. TLC: Rf 0.00. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 315 (4.45). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1693, 1666.

2-(p-Sulfamoylphenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (XIII) 4,5-M 233 mg. と sulfanilamide 215 mg. を dioxane 8 ml. に溶かし, 室温に 3 日間反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. >300°, 針状晶 164 mg. を得. $C_{15}H_{12}O_5N_2S$ Anal. Calcd.: C, 54.21; H, 3.64; O, 24.07; N, 8.43; S, 9.65. Found: C, 54.12; H, 3.88; O, 24.00; N, 8.27; S, 9.46. TLC: Rf 0.60. IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1690.

2-(m-Nitrophenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (XIV) 4,5-M 83 mg. と m-nitroaniline 65 mg. を dioxane 2 ml. に溶かし, 室温に 3 日間反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 270~271°, 針状晶 73 mg. を得. $C_{15}H_9O_5N_2$ Anal. Calcd.: C, 60.41; H, 3.38; O, 26.82; N, 9.39; mol. wt., 298.261. Found: C, 60.42; H, 3.55; O, 26.79; N, 9.38; mol. wt. (VPO 法*) 285. TLC: Rf 0.78. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 311 (4.26). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1681.

2-(p-Nitrophenyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (XV) 4,5-M 99 mg. と p-nitroaniline 83 mg. を dioxane 3 ml. に溶かし, 室温に 3 日間反応. 析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 290~291°, 黄色針状晶 100 mg. を得. $C_{15}H_9O_5N_2$ Anal. Calcd.: C, 60.41; H, 3.38; O, 26.82; N, 9.39. Found: C, 59.96; H, 3.41; O, 26.62; N, 9.61. TLC: Rf 0.80. UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ m μ (log ϵ): 339 (4.44). IR $\nu_{\max}^{Nujol}$ cm^{-1} : $\nu_{C=O}$ 1697.

2-(1-Naphthyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (XVI) 4,5-M 98 mg. と α -naphthylamine 79 mg. を

*6 Mechrolab 社製 Model 301A-VPO を用い 37°, アセトン溶媒で測定.

*7 dioxane 溶媒中で測定.

dioxane 3 ml. に溶かし、室温に 11 日間反応後 Al_2O_3 (Merck neutral 6g, 5g.) で 2 回クロマトグラフィーを行なう。エーテルで流出する結晶をエーテルから再結晶, m.p. 148~149°, 針状晶 22 mg. を得。 $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}$ Anal. Calcd.: C, 75.24; H, 4.32; O, 15.82; N, 4.62; mol. wt., 303.321. Found: C, 75.49; H, 4.53; O, 16.07; N, 4.59; mol. wt. (VPO 法⁷⁾) 316. TLC: Rf 0.82. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ m μ (log ϵ): 302 (4.21). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: $\nu_{\text{C=O}}$ 1679.

2-(2-Naphthyl)-5,6-methylenedioxyphthalimidine (XVII) 4,5-M 100 mg. と β -naphthylamine 80 mg. を dioxane 3 ml. に溶かし、室温に 3 日間反応。析出する沈殿を dioxane から再結晶, m.p. 248°, 針状晶 129 mg. を得。 $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}$ Anal. Calcd.: C, 75.24; H, 4.32; O, 15.82; N, 4.62; mol. wt., 303.321. Found: C, 74.92; H, 4.46; O, 15.64; N, 4.70; mol. wt. (VPO 法⁹⁾) 319. TLC: Rf 0.78. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ m μ (log ϵ): 315 (4.36). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: $\nu_{\text{C=O}}$ 1680.

4,5-Methylenedioxyphthalaldehyde による sulfanilamides の定量法 試液: 4,5-M 45 mg. を MeOH に溶かして 250 ml. とする。

操作法: 10 ml. のメスフラスコに検体の MeOH 溶液 2 ml., Table IV に示すような一定濃度の H_2SO_4 1 ml., 試液 2 ml. をとり混和。60 $\pm$ 1° の恒温槽中に、一定時間反応後水冷して室温にもどし、MeOH を加えて全容を 10 ml. とする。希釈後 1 hr. 以内に、365 m μ の Hg 輝線あるいは励起極大波長 (Xe) を励起光として、ケイ光極大波長におけるケイ光強度を測定する。ブランク値を差し引き、同時に同条件で求めた標準品による検量線から定量値を算出する。各種スルファミンの定量条件を Table IV に示す。

TABLE IV. The Conditions for the Assay of Sulfanilamides

Sulfanilamides	Concn. of H_2SO_4 (N)	Reaction time (min.)	Ex. max m μ	Em. max m μ	Concn. suitable for fluorometry (mole/ml.)
Sulfanilamide	1	60	320	400	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$
Sulfisoxazole	1	60	325	375	$2 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-8}$
Sulfisomesol	18	60	327	425	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$
Sulfadimethoxine	1	60	327	380	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$
Sulfidiazole	20	30	327	425	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$

Fig. 3. Fluorescence Excitation and Emission Spectra of Sulfanilamides reacted with Reagent

	Sensitivity	Slit width (mm.)	Light source
1: [Sulfanilamide]: 2.6×10^{-8} mole/ml.	7	1.25	xenon lamp
2: [Sulfisoxazole]: 2.3×10^{-8} mole/ml.	7	2.00	"
3: [Sulfisomesol]: 2.1×10^{-8} mole/ml.	7	0.80	"

Fig. 4. Relationship between Concentration of Reagent and Fluorescence Intensity

	Sensitivity	Slit width (mm.)	Light source
1: [Sulfanilamide]: 5.0×10^{-9} mole/ml.	7	0.30	mercury lamp
2: [Sulfisoxazole]: 5.4×10^{-9} mole/ml.	7	0.40	"
3: [Sulfisomesol]: 4.3×10^{-9} mole/ml.	7	0.20	"
4: [Sulfadimethoxine]: 5.1×10^{-9} mole/ml.	7	0.25	"
5: [Sulfidiazole]: 5.6×10^{-9} mole/ml.	7	0.20	"

Fig. 5. Relationship between Concentration of Sulfuric acid and Fluorescence Intensity

	Sensitivity	Slit width (mm.)	Light source
1: [Sulfanilamide]: 2.6×10 ⁻⁸ mole/ml.	7	1.25	xenon lamp
2: [Sulfisoxazole]: 2.3×10 ⁻⁸ mole/ml.	7	2.00	"
3: [Sulfisomesol]: 2.1×10 ⁻⁸ mole/ml.	7	0.80	"
4: [Sulfadimethoxine]: 2.8×10 ⁻⁸ mole/ml.	7	1.00	"
5: [Sulfadiazole]: 2.2×10 ⁻⁸ mole/ml.	7	0.70	"

Reaction temp.: 60±1°
[4,5-Methylenedioxyphthalaldehyde]:
1×10⁻⁶ mole/ml.

Fig. 6. Relationship between Reaction Time and Fluorescence Intensity

	Concn. of added H ₂ SO ₄ (N)	Sensitivity	Slit width (mm.)	Light source
1: [Sulfanilamide]: 2.5×10 ⁻⁸ mole/ml.	1	7	1.25	xenon lamp
2: [Sulfisoxazole]: 2.3×10 ⁻⁸ mole/ml.	1	7	2.00	"
3: [Sulfisomesol]: 2.1×10 ⁻⁸ mole/ml.	18	7	0.60	"
4: [Sulfadimethoxine]: 2.8×10 ⁻⁸ mole/ml.	1	7	0.96	"
5: [Sulfadiazole]: 2.2×10 ⁻⁸ mole/ml.	20	7	0.60	"

定量条件の検討 i) ケイ光スペクトル: それぞれの定量条件における 2, 3 のスルファミン類のケイ光スペクトルは Fig. 3 に示すとおりである。いずれも medium の酸濃度の増大とともに、ケイ光極大は red shift するが、ケイ光強度が極大値を示す酸濃度における波長を選んだ

Fig. 7. Calibration Curves of Sulfanilamides

	C. V. (%)	Sensitivity	Slit width (mm.)	Light source
1: Sulfanilamide $y = 0.909x + 1.5$	2.4	7	0.27	mercury lamp
2: Sulfisoxazole $y = 0.199x - 0.8$	4.5	7	0.28	"
3: Sulfisomesol $y = 0.776x + 0.4$	4.2	7	0.15	"
4: Sulfadimethoxine $y = 0.819x + 0.8$	1.8	7	0.22	"
5: Sulfadiazole $y = 0.958x + 1.0$	1.8	7	0.18	"

ii) 試薬の濃度: sulfanilamides の濃度を一定として、それぞれの定量条件における試薬 (4,5-M) の濃度とケイ光強度の関係を求めた結果、Fig. 4 に示すように、いずれの場合も約 100 mole 比倍以上の 4,5-M を使用するとき、一定のケイ光強度を示した。

iii) H₂SO₄ の濃度: 各定量条件における、硫酸濃度とケイ光強度の関係を Fig. 5 に示す。酸濃度の増大は反応速度を促進し、かつケイ光強度を増大するが、一定濃度をこえると逆に著しくケイ光強度を減少する場合も認められる。

iv) 反応条件: 各定量条件 (反応温度はいずれも 60±1°) における、反応時間とケイ光強度の関係は Fig. 6 に示すとおりである。30~60 min. 以上で一定のケイ光強度を示した。

v) 安定度: 測定液のケイ光強度は室温、室内光中で少なくとも 1 hr. は安定であった。

vi) 検量線: 各定量条件において、Table IV に示した濃度範囲で各スルファミンの濃度とケイ光強度の間に直線関係が成立した。Fig. 7 に高圧水銀灯の 365 mμ の輝線を励起光として使用したときの検量線を示す。回帰式の傾斜および変動係数は、高圧水銀灯による 365 mμ の輝線を励起光として使用する时候のほう、キセノンランプ

による各励起極大波長の励起光を使用するときよりも大であった。スリット幅, 波長の純度, 光源の輝度の差, 受光部の感度の差などのために, 回帰式の日間あるいは機器間における差は有意であり, したがって定量の都度検量線を作成する必要がある。

vii) 共存物質の影響: BuNH₂, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline, *o*-anisidine, *o*-toluidine, *o*-bromoaniline, は定量条件においてケイ光を示さず, BuNH₂, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline は 500 mole 比倍以内, *o*-bromoaniline は 3 mole 比倍以内の存在で影響を与えない。N⁴-acetylsulfisomesol は sulfisomesol の定量条件において, 定量的に脱アセチルして sulfisomesol とまったく同様の挙動を示し, N⁴-actylsulfisoxazole および N¹,N⁴-diacetylsulfisoxazole は sulfisoxazole の定量条件において一部脱アセチルして障害した。

回帰分析 sulfisomesol に BuNH₂, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline, *o*-bromoaniline を添加した合成試料について回帰分析を行なった結果, 本定量法は sulfisomesol に対して誤差 2% 以内で正しい定量値を与え得ることを認めた。

終わりに, 御指導, 御鞭撻を賜った京都大学 宇野豊三教授ならびに当研究所 武田健一所長, 水上聡博士に厚く御礼申し上げます。また元素分析を担当された当研究所の諸氏, 実験に協力された坂野俊行氏に感謝します。

塩野義製薬株式会社研究所

薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
85 (12) 1057 ~ 1061 (1965)

UDC 615.778.25-011

156. 山名月中, 水上勇三: 薬剤の安定性に関する研究 (第14報^{*1}) ベンゾサイア
ダイアジン系化合物の安定性 その 6^{*2} ハイドロクロロサイアザイド
のアルカリ性溶液中における分解について

Tsukinaka Yamana and Yüzō Mizukami: Studies on the Stability of
Drugs. XIV. Stability of Benzothiadiazine. (6). On the
Decomposition of Hydrochlorothiazide in Alkaline Solution.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University^{*2})

Hydrolysis of hydrochlorothiazide (I) in alkaline solution was examined. Hydrochlorothiazide was hydrolyzed to 4-amino-6-chloro-*m*-benzenedisulfonamide (II) and formaldehyde which was converted to methanol and formic acid. These reactions are represented as the reversible consecutive reaction.

The rate for all reactions was determined and the rate constants checked with analog and digital computers.

(Received March 8, 1965)

Rehm 等¹⁾ はハイドロクロロサイアザイド (I) の定量法について研究しているが, その中で I はアンモニアまたは水酸化ナトリウムアルカリ性水溶液中では分解して 4-amino-6-chloro-*m*-benzenedisulfonamide (II) とホルムアルデヒドとを生じるけれども, I とこれらの分解物との間には平衡関係が成り立つことを報告している。

われわれは I をアンモニアおよび水酸化ナトリウムアルカリ性水溶液で分解したところ, アンモニアアルカリ性では Rehm 等が報告しているとおりの平衡が成り立つが, 水酸化ナトリウムアルカリ性では徐々に完全分解に近づくことを観察した。

ホルムアルデヒドとアンモニアとが反応してヘキサミンを生じることはよく知られているが, 最近小方等²⁾ はこれらの間には複雑な平衡関係があることを示している。

^{*1} 第13報. その 5: 本誌, 85, 654 (1965).

^{*2} Takara-machi, Kanazawa.

1) C. R. Rehm, J. B. Smith: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. ed., 49, 386 (1960).

2) Y. Ogata, A. Kawasaki: Bull. Chem. Soc. Japan, 37, 514 (1964).