N-ヘテロ芳香族の電子的性状 (第17報¹⁾) リボフラビンとスルファニルアミド,
p-アミノ安息香酸および関連化合物との電荷移動型相互作用

岡野定輔,^{2a)} 辻 和之^{2b)}

東北大学医学部薬学科,^{2a)} 東亜栄養化学工業株式会社^{2b)}

Electronic Properties of N-Heteroaromatics. XVII.¹⁾ Charge-Transfer
Interactions of Riboflavin with Sulfanilamide, p-Aminobenzoic
Acid, and Their Related Compounds

TEISUKE OKANO^{2a)} and KAZUYUKI TSUJI^{2b)}

Pharmaceutical Institute, Tohoku University School of Medicine,^{2a)}

Research Laboratory, Toa-Eiyo Chemical Industries Co., Ltd.^{2b)}

(Received July 31, 1967)

Reddish coloration took place upon mixing riboflavin and sulfanilamide in high concentrations, and the nature of interactions between riboflavin and compounds related to sulfanilamide including p-aminobenzoic acid was investigated. New absorption bands were observed in the vicinity of 370 and 500 m μ in the difference spectra of mixed systems of riboflavin and sulfanilamide related compounds. Analysis of the data of these two difference bands through [the Benesi-Hildebrand equation revealed that 1:1 complexes were formed. Furthermore, it was also revealed from the values of K, ΔH , and ΔS , as well as solvent effects that sulfanilamide and p-aminobenzoic acid behave quite similarly in interacting with riboflavin. A reciprocally correspondent relationship was found to exist between the two difference bands; whereas the band at about 500 m μ was more distinct in aqueous medium, the one at about 370 m μ was more distinct in non-aqueous media. It was presumed that charge-transfer interaction which is dominant in non-aqueous media (occurrence of the band around 370 m μ) proceeds to the extent of formation of riboflavin semiquinone (occurrence of the band around 500 m μ). It was found from the effects of pH on absorbances at the longer wavelength maxima that undissociated species of both riboflavin and sulfanilamide compounds are more favorable for the complex formation reactions. These results for complex formation in aqueous medium has been confirmed also through the examination of changes in solubility of riboflavin which took place in the presence of sulfanilamides compounds. Possible correlations of sulfanilamides-riboflavin complexing to the metabolic disturbance of vitamin B₂ which is incidental to administration of sulfonamide drugs have also been referred to.

著者等は前報³⁾においてリボフラビン (RF) とアスコルビン酸との相互作用について述べたが、本報では前者とスルホンアミド剤を中心とする一連の化合物との相互作用について報告する。抗生物質投与によるビタミン B₂ 欠乏症状の発現がビタミン B₂ 代謝障害によるものであることは数多くの研究によって明らかにされているが、一方腸内細菌叢の菌交代を起こすスルホンアミド剤についても、佐久間⁴⁾ はシロネズミにスルファニルアミド (SA) を負荷するとき腎・肝臓中のビタミン B₂ 量が低下することを、また中村⁵⁾ は D-アミノ酸酸化酵素系において SA が補酵素 FAD および基質 D-アラニンに対してそれぞれ競争的阻害をすることを報告している。これらの現象の機転としては RF とスルホンアミド剤分子との間の相互作用が考えられるのであるが、今日まで十分な説明はなされていない。著者等は RF と SA との比較的濃厚な混合水溶液がやや赤味を呈することを見出したので、この事実にもとづいて RF とスルホンアミド剤分子との相互作用について検討することとした。著者等は

1) 第16報: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 7(1968).

2) Location: a) Kita-4-bancho, Sendai; b) Iizaka, Fukushima.

3) 岡野定輔, 辻和之, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 7(1968).

4) 佐久間礼三郎, *ビタミン*, **21**, 287(1960).

5) T. Nakamura, *J. Vitaminol.*, **5**, 277(1959).

SA を中心として、その特異的拮抗体である *p*-アミノ安息香酸 (PABA) および SA のアミノ基あるいはスルホン酸アミド基が種々置換された化合物について、まず分光光度法の見地から検討を行ない、これらの化合物がいずれも溶液中フラビン誘導体と成分モル比 1:1 の錯体を形成することを確認することができた。さらに錯体の分子吸光係数、溶媒効果などの測定結果からは、SA と PABA とは RF との相互作用においてもきわめて類似した挙動を示すという興味ある事実が明らかとなった。これらの結果は RF と SA または PABA との相互作用による前者の溶解度変化の検討結果からも確認した。

結 果 と 考 察

I. 吸収スペクトルの変化

水溶液 SA ($4.8 \times 10^{-2} \text{M}$) と RF ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) との混合水溶液 (pH 6.5) について RF を対照として差スペクトルを測定したところ、Fig. 1A に示したように、495 m μ 付近の明瞭な吸収帯と 390 m μ 付近の微弱な吸収帯が認められた。これらの吸収帯は著者等が RF とアスコルビン酸との混合水溶液において観察したそれぞれ 493 および 380 m μ 付近の吸収帯³⁾ に対応するもので、したがって長波長側の吸収帯は RF のセミキノンに起因するものであることが予想される。RF-PABA 系 (NaOH により pH 6.5 に調整した水溶液) についても、SA の場合と全く同様の結果が得られた (Fig. 1B)。RF と PABA の相互作用に起因する 500 m μ 付近の吸収帯の出現についてはす

Fig. 1. Difference Spectra of Mixed Systems of RF-SA and RF-PABA

Above: RF ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) + SA vs. RF
Below: RF ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) + PABA vs. RF
Concn. of SA or PABA: curve 1, 0.048 M; 2, 0.036 M;
3, 0.024 M; 4, 0.012 M

TABLE I. Solvent Effect on the Difference Spectra of RTB ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) plus SA (0.1 M) vs. RTB, and of RTB ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) plus PABA (0.1 M) vs. RTB

Effector	Solvent	λ_{max} m μ (Δ absorbance ^{a)})		Z
SA	H ₂ O ^{b)}	495 (0.045)	395 (0.005)	94.6
	MeOH	493 (0.023)	378 (0.029)	83.6
	HCONH ₂	496 (0.010)	388 (0.012)	83.3
	AcOH	488 (0.034)	381 (0.051)	79.2
	MeCN	489 (0.017)	373 (0.034)	71.3
	DMSO	486 (0.007)	367 (0.018)	71.1
	DMF	490 (0.010)	370 (0.012)	68.5
	acetone	487 (0.017)	368 (0.034)	65.7
PABA	pyridine	493 (0.014)	369 (0.027)	64.0
	H ₂ O ^{b)}	498 (0.048)	395 (0.015)	94.6
	MeOH	494 (0.021)	379 (0.027)	83.6
	HCONH ₂	497 (0.022)	390 (0.019)	83.3
	AcOH	493 (0.020)	382 (0.028)	79.2
	MeCN	498 (0.033)	374 (0.073)	71.3
	DMF	487 (0.008)	382 (0.020)	68.5
	acetone	495 (0.024)	369 (0.048)	65.7

a) Calculated from difference transmissions

b) RF ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) was used in place of RTB and concentration of SA was 0.048 M.

で知られているが,⁶⁾ 390 m μ 付近の吸収帯についてはこれまで報告されていない。

溶媒効果

上記 RF と SA および関連化合物との相互作用により出現する2個の吸収帯の $\lambda_{\max}$ の位置に対

Fig. 2. Relationships between Z-value of Solvents and Transition Energy of Complexes

A: RTB-SA complex
B: RTB-PABA complex
Solvents: 1, H₂O; 2, MeOH; 3, HCONH₂;
4, AcOH; 5, MeCN; 6, DMSO; 7, DMF;
8, acetone; 9, pyridine

Fig. 3. Benesi-Hildebrand Plots for the Mixed Systems RF-SA and RF-PABA at pH 6.5

する溶媒効果を検討したところ、長波長側の吸収帯についてはほとんど影響がなかった。一方、短波長側の吸収帯は水溶液中では微弱であったものが、非水溶液中では明瞭な極大を示し、溶媒の極性を示す Z 値⁷⁾ の増大とともに深色移動した (Table I)。この顕著な溶媒依存性は、Kosower⁸⁾ が挙げている電荷移動型錯体に起因する吸収帯の特徴の1つであり、380 m μ 付近の吸収帯は電荷移動性のものであることが示唆される。さらに短波長側の吸収帯について $\lambda_{\max}$ 値から算定した遷移エネルギー (E_T) の値を Z 値に対してプロットすると Fig. 2 に示したように勾配正の直線関係が得られ、したがってこの吸収帯は $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移に帰属される。これらの実験では、溶解度の関係から RF の代わりに主として riboflavin tetrabutrylate (RTB) を用いたが、RTB が各種溶媒中でスペクトル的に RF とほぼひとしい挙動を示すことはすでに著者等⁹⁾ が報告したところである。SA の代わりに PABA を用いても、SA の場合と同様の結果が得られた (Fig. 1, Table I)。

錯体の組成, K および ϵ

RF-SA 系および RF-PABA 系の差スペクトルの性質が明らかとなったので、相互作用の性質を検討する目的で、pH 6.5 における 10、25 および 35° の各温度で水溶液の差スペクトルの $\lambda_{\max}$ (SA 系では 495 m μ , PABA 系では 498 m μ) についての数値を Benesi-Hildebrand 式¹⁰⁾ に適用してプロットを作成した。その結果は Fig. 3 に示したように各温度で勾配一定の直線関係が得られ、RF は SA および PABA とそれぞれ成分モル比 1:1 の錯体を形成することが示された。Fig. 3 の直線の切片と勾配から錯体の生成定数 K および分子吸光係数 ϵ を求め、さらに K 値より結合エネルギー ΔH およびエントロピー変化 ΔS を算定した (Table II)。一方、log K と絶対温度の逆数 $1/T$ との間には Fig. 4 に示したように勾配正の直線関係が得られるので、錯体生成は発熱反応であることが指示される。Table II に示されているように、RF-SA 系と RF-PABA 系で近似の諸数値が得られたことは、SA および PABA 分子の電子状態

6) S. Ueda, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **14**, 22(1966).

7) E. M. Kosower, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3253(1958).

8) BBA Library, "Flavins and Flavoproteins", Vol. 8, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, (1966).

9) 岡野定輔, 辻和之, 薬誌, **87**, 473(1967).

10) H. A. Benesi, J.H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703(1949).

TABLE II. Thermodynamic Data for the Interactions between RF and SA, and between RF and PABA

Systems	Temp. (°C)	ϵ^a	K	$-\Delta H$ (cal/mole)	$-\Delta S$ (cal/mole deg.)
RF-SA	10	800	18.8	3250	5.66
	25	813	13.8		5.69
	35	833	11.7		5.64
RF-PABA	10	883	17.3	3010	4.99
	25	900	13.6		4.91
	35	883	11.3		4.95

a) Analytical wavelengths: RF-SA system, 495 m μ ; RF-PABA system, 498 m μ

Fig. 4. Relationships between Logarithms of Formation Constants and Inverse Absolute Temperatures

A: by spectral method

B: by solubility method

の近似性を示唆するものであり、抗菌作用における両者の拮抗性の問題と関連して興味がある。なお RF-PABA 系の熱力学的定数は上田⁹⁾によっても求められているが、SA との比較を目的として行なった著者等の場合とは実験条件がやや異なり、数値にも幾分相違が認められる。

pH の影響 錯体生成の pH 依存性を検討するために、差スペクトルの $\lambda_{\max}$ における吸光度を pH 1—11 の各 pH において測定したところ、Fig. 5A に示したように RF-SA 系では pH 2—10 の範囲でほとんど変化がなく、pH 2 以下の酸性あるいは pH 10 以上のアルカリ性領域で吸光度が下降する傾向が認められた。RF-PABA 系では pH 4 付近にピークを示し、pH 3 以下および pH 5 以上では吸光度は低下し、pH 9 付近からさらに下降することが認められた。以上の事実から SA 系および PABA 系とも RF との間の錯体形成には各物質の解離状態 (pK_a : RF, 1.7, 9.8; PABA, 2.8, 4.8; SA, 10.2) が関係していることが考えられる。この事実をさらに確かめるために、PABA の pK_a (=4.8) に近い値を有する N^1 -acetylsulfanilamide ($pK_a=5.4$) について同様の検討を行なったところ、PABA の場合と同じように pH 4 付近にピークをもつ曲線が得られた (Fig. 5)。これらの関係を総合すると、錯体形成にはいずれの場合も RF および相手の化合物ともに非解離型の方が有利であるといえる。

相互作用の様式について 上記において、著者等はフラビン誘導体と SA または PABA との混合系の差スペクトルの 500m μ 付近および 370m μ 付近に出現する 2 個の吸収帯について検討したが、これらの吸収帯に対する溶媒効果は、水溶液中では前者の吸収帯が非水溶液の場合よりも明瞭になるのに対し、後者の吸収帯は水溶液におけるよりも非水溶液の場合が明瞭である。このことは両吸収帯間における何らかの相関性の存在を予想させるが、この関係は吸収帯の位置および性質の対応性からいって著者等³⁾が RF-アスコルビン酸系において 490 およ

Fig. 5. Effect of pH on the Interactions between RF and SA Related Compounds

A. Changes in absorbance of the difference spectra

Curves: a, RF (1×10^{-4} M) + SA (0.048 M) vs. RF (at 495 mμ); b, RF (1×10^{-4} M) + PABA (0.048 M) vs. RF (at 498 mμ); c, RF (1×10^{-4} M) + N¹-acetylsulfanilamide (0.048 M) vs. RF (at 495 mμ)

B. Solubilization of RF

Curves: a, in the presence of SA (0.048 M); b, in the presence of PABA (0.048 M); c, in the presence of N¹-acetylsulfanilamide (0.048 M)

および 380 mμ 付近に認められた 2 個の吸収帯の関係と同様のものと考えられる。すなわち、RF-SA 系および RF-PABA 系においても、RF-アスコルビン酸系の場合と同様に短波長側の吸収帯はいわゆる電荷移動性のものであり、長波長側のそれはセミキノン性のもので、非水溶液中での電荷移動 (370 mμ 付近の吸収帯の出現) が水溶液中ではセミキノン型 (500 mμ 付近の吸収帯の出現) にまで進行するものと解釈することができるであろう。Pullman 等¹¹⁾ の分子軌道エネルギーの計算によれば、RF は比較的良好な電子受容体 ($\lambda_{h.o.} = -0.344$ ¹²⁾) であり、一方 PABA は中程度の電子供与体 ($\lambda_{h.o.} = 0.566$ ¹³⁾) である。

500 mμ 付近の吸収帯の吸光度は、非水溶媒中では水溶液の場合より低下するが、これは著者等³⁾ が RF-アスコルビン酸系において観察したと類似の現象で、RF と SA または PABA との混合系においても水溶液中では水分子を含む ternary complex¹³⁾ が形成されるものと推測される。

置換基の影響 a. アミノ基の変換 SA と RF との相互作用におよぼす置換基の影響を検討するために、まず SA のアミノ基を離脱したベンゼンスルホンアミドおよびアミノ基を等配的に変換¹⁴⁾ した同族体とフラビンとの相互作用について検討を加えた。これらの同族体は水に対する溶解性が低いので、溶媒としてアセトニトリルを、フラビンとしてはこの溶媒に可溶な RTB を用いて差スペクトルの変化を観察した。いずれの置換体についても 490 および 375 mμ 付近に λ_{max} を有する 2 個の吸収帯が観察され、置換基の種類によって λ_{max} の位置はほとんど影響を受けなかった (データ省略)。両吸収帯の λ_{max} における数値につき Benesi-Hildebrand 式にしたがってプロットを作成したところ、いずれの場合にも直線関係が得られ (図省略)、成分モル比 1:1 の錯体形成が指示された。これら直線の切片と勾配から算定した K 値は Table III に示したように、波長 375 mμ について求めた値の方が 490 mμ について求めたものより大であるが、両種の K 値とも置換基の影響を受け、 K 値と Wilms¹⁵⁾ が提唱した基電気陰性度 (group electronegativity) との間には並行性が認められた。このことはフラビンとの相互作用においてこの位置の電気陰性度が何らかの形で直接的な役割を演ずることを示すものと考えられる。OH 置換体の K 値は比較的大となっているが、OH 置換体すなわち *p*-hydroxybenzenesulfonamide の抗菌作用が PABA でほとんど拮抗されない事実¹³⁾ を考え合わせると、SA の特異的抗菌性とリボフラビンとの錯体形成との間に直接的な関係があるとは考え難い。ちなみに、フェノール系化合物とフラビンとの相互作用については Tollin

11) $\lambda_{l.o.}$ は最低空軌道エネルギー、 $\lambda_{h.o.}$ は最高被占軌道エネルギーを示す (ともに β 単位)。

12) B. Pullman, A. Pullman, "Quantum Biochemistry"; John Wiley & Sons Inc., New York, 1963, p. 747, 802.

13) BBA Library, "Flavins and Flavoproteins", Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Vol. 8, 1966, p. 15.

14) 石館守三, 岡野定輔, 薬誌, **69**, 513(1949).

15) J. K. Wilms, *J. Chem. Phys.*, **27**, 1129(1957).

16) 石館守三, 岡野定輔, 薬誌, **69**, 525(1949).

TABLE III. Effect of Substituents on the Complex Formation between RTB and Benzenesulfonamide Derivatives in MeCN

R in <chem>R-c1ccc(cc1)S(=O)(=O)N</chem>	$K^a)$		Group-electronegativity ^{b)}
	(1)	(2)	
H	0.67	0.30	2.17
CH ₃	0.70	0.32	2.63
Cl	0.78	0.37	3.00
NH ₂	0.89	0.59	3.40
OH	1.33	0.49	3.89

a) Calculated from Benesi-Hildebrand plots.

Analytical wavelengths: column (1), 375 mμ; column (2) 490 mμ.

b) See reference 15).

等¹⁷⁾ および八木等¹⁸⁾ の報告がある。

b. スルホン酸アミド基の変換 SA 分子のスルホン酸アミド基の方を置換した数種の化合物について RF (溶媒, 水) および RTB (溶媒, アセトニトリル) との相互作用を差スペクトルにより観察したが, いずれの場合も成分モル比 1:1 の錯体形成が認められ, K 値は SA に関して最大であった (Table IV). 表には参考までにこれまで知られている抗菌性を併記した。

TABLE IV. Formation Constants of the Complexes between Flavin Derivatives and Aniline Derivatives

R in <chem>Nc1ccc(cc1)R</chem>	$K^a)$		Bacteriostatic activity ^{b)}
	(1)	(2)	
H	—	0.28	—
AsO ₃ H ₂	5.4	—	+
NO ₂	—	0.58	+
COOH	14.5	—	+
SO ₂ NH ₂	16.1	0.74	+

a) Calculated from Benesi-Hildebrand plots. Column (1): RF-aniline derivatives in H₂O (pH 6.5).

Column (2): RTB-aniline derivatives in MeCN.

b) See reference 16), 19).

II. 溶解度の変化 分光法による結果をさらに確かめるために, 溶解度法による検討を行なった. Fig. 6 に示したように, 添加した SA の濃度と RF の溶解度との間には 12, 25 および 35° の各測定温度において一定の勾配を有する直線関係が得られた. この図の両軸の関係は Higuchi らの式²⁰⁾のプロットに対応するもので, したがって Fig. 6 の直線関係は両成分間における成分モル比 1:1 の錯体形成を指示するものであり, 前記分光法による Benesi-Hildebrand 式からの結果を支持する. Fig. 6 の直線の切片と勾配から各温

Fig. 6. Solubilization of RF in the Presence of SA and PABA

- 17) D. E. Fleischman, G. Tollin, *Biochim. et Biophys. Acta*, **94**, 248(1965); A. Ray, A.V. Guzzo, G. Tollin, *Ibid.*, **94**, 258(1965); D.E. Fleischman, G. Tollin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **53**, 38(1965).
 18) K. Yagi, Y. Matsuoka, *Biochim. Z.*, **328**, 138(1956).
 19) 石館守三, 岡野定輔: 薬誌, **70**, 435(1950).
 20) T. Higuchi, D. A. Zuck, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **41**, 10(1952).

TABLE V. Formation Constants of RF-SA and RF-PABA Complexes Estimated from Solubility Data

Temp. (°C)	K	
	RF-SA	RF-PABA
12	16.1	15.9
25	14.3	10.1
35	11.1	7.2

度における K 値を求め Table V に示したが、分光法の数値 (Table II) と溶解度法からの数値とはきわめて近似しており、 $\log K$ と $1/T$ との関係も両法でほとんど差が認められない (Fig. 4A). PABA による RF の可溶化についてはすでに報告²¹⁾されているが、著者等はこれを上記 SA の場合と比較する目的で SA の場合と同じ条件で検討した (Fig. 6B). K 値は Table V に示したが、分光法による K 値との間の差違は温度の上昇とともにやや大きくなる傾向が見られる (Fig. 4B). しかし、さきに著者等が観察した RF-アスコル

ビン酸系¹⁾ の場合よりはるかに近似しており、したがって相互作用の様式も両分子 (RF および SA または PABA) の電子状態の変化が主役を演ずる比較的単純なものと推測される。

pH の影響 SA 共存下の RF の溶解度におよぼす pH の影響を検討したところ、Fig. 5B に示したように pH 2—9 の範囲でとくに変化は認められず、分光法の結果ときわめて近似した関係曲線が得られた。SA の代わりに PABA または N^1 -acetylsulfanilamide を用いた場合も結果は分光法の場合と近似しており、RF との錯体形成には、両成分とも非解離状態の方が有利であるという分光法の結果をさらに確認することができた。

結語 以上 RF と SA または PABA との相互作用について分光法および溶解度法によって検討した結果、SA と PABA が RF に対してきわめて近似した挙動 (錯体の成分モル比, K , ΔH および ΔS 値の近似性) を示すことを明らかにすることができた。両分子の性質のこのような近似性は明らかに両者の電子密度 π 分布^{11,19)} の近似性に由来するものと考えられ、一面からすれば著者等の結果はむしろこれら分子軌道計算結果に実験的根拠を与えたものといえようが、いずれにしても SA と PABA との性質の近似性がこのようなかたちで実証されたことは両者間の代謝拮抗の機転と関連して興味あることと考えられる。ただし置換基の項でも述べたように、SA と RF との錯体形成が、前者の特異的抗菌作用において直接的な役割を演じているとは考え難く、その意味では本研究はあくまで SA と PABA との物理化学的性質の近似性を実証したに止まる。しかし、SA と RF との錯体形成はスルホンアミド剤によるビタミン B₂ 代謝異常の問題とは何らかの相関関係をもつことが推測される。

実 験 の 部

試料 RF は第 7 改正日本薬局方適合品、RTB (東京田辺製薬 KK 製) は EtOH-H₂O 混液より数回再結晶。mp: RTB, 146°; sulfanilamide, 163.5°; N^1 -acetylsulfanilamide, 178.5°; benzenesulfonamide, 153°; *p*-hydroxybenzenesulfonamide, 176—177°; *p*-methylbenzenesulfonamide, 137.5°; *p*-chlorobenzenesulfonamide, 144°; *p*-aminobenzoic acid, 184°; *p*-nitroaniline, 147°; arsanilic acid, ca. 300° (decomp.). aniline, bp 184—186°.

溶媒 全溶媒は常法にしたがって十分に精製、脱水して使用。

吸収スペクトルの測定 全波長の測定には日立 EPS-3T 型自記分光光度計を、定量の目的には日立 139 型分光光度計を用いた。セルの長さ、10mm. 溶液は定温に 4hr 静置したのち測定した。

SA, PABA および N^1 -acetylsulfanilamide 共存下の RF の定量 濃度 $5 \times 10^{-4}M$ の SA, PABA または N^1 -acetylsulfanilamide の共存下、RF 濃度 $0.5-4.0 \times 10^{-5}M$ の範囲で検量線は直線を示した (RF の λ_{max} (447 m μ) で測定). 放置 8hr 後まで検量線には変化がなかった。定量は共存物質の濃度が $5 \times 10^{-4}M$ 以下となるように希釈して行なった。

RF の溶解度 内径 2cm, 長さ 16cm の平底共栓試験管に RF 約 10mg を容れ、SA, PABA または N^1 -acetylsulfanilamide 溶液 10ml を加えて 4hr 恒温槽 (温度 12, 25 および $35 \pm 1^\circ$) 中で機械的にふりまぜ、過剰の RF は遠沈して除去、RF 濃度が約 $2 \times 10^{-5}M$ となるように希釈して吸光度を測定した。

pH の影響 pH 3.5—5.0, pH 5.5—8.0 および pH 8.5—11.0 の検液を調製するためには、それぞれ最終濃度 0.02 M の AcOH-AcONa, NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ および NaHCO₃-Na₂CO₃ 緩衝液を使用、SA, PABA または N^1 -acetylsulfanilamide を添加した場合は 2N NaOH を適当量加えて pH を再調整したのち、水を加えて RF および添加物質の最終濃度を所定のものとした。なお pH 3.5 以下の場合には N HCl を適当量加えて pH を調整した。pH の測定には東亜電波 HM-5A 型 pH メーターを用いた (精度 $\pm 0.03pH$)。

謝辞 終わりに、研究上の便宜を与えられた東亜栄養化学工業株式会社 瀬口義章社長ならびに宮崎米雄研究部長に深謝する。

21) cK. Sakai, *Nagoya J. Med. Sci.*, **18**, 237(1955); S. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **14**, 29(1966).

22) E. C. Foernzler, A.N. Martin, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 608(1967).