医薬品分析における反応機構 (第2報¹⁾) セコバルビタールの定量法

気賀沢和雄, 清水弘明, 岩田武彦, 田中尚純, 中黒秀長

グレラン製薬株式会社研究部²⁾Reaction Mechanism in Drug Analysis. II.¹⁾ Determination of SecobarbitalKAZUO KIGASAWA, HIROAKI SHIMIZU, TAKEHIKO IWATA, HISAYOSHI TANAKA
and HIDEHISA NAKAGUROResearch Laboratories, Grelan Pharmaceutical Co., Ltd.²⁾

(Received June 23, 1969)

Colorimetric determination of barbituric acid derivatives is made by hydrolysis with sodium hydroxide to cleave the ring and coloration with a mixed solution of dimethylglyoxime and thiosemicarbazide in hydrochloric acidity. Barbituric acid derivatives like secobarbital having a methyl group in the α -position of the side chain are hardly hydrolyzed by this method and cannot be determined. Improvement of hydrolytic condition for secobarbital was examined and it was found that pretreatment with hydrochloric acid and hydrogen peroxide markedly accelerated hydrolysis rate with alkali. This method was used to examine the method of determination. Secobarbital was heated in hydrochloric acid-hydrogen peroxide mixture for 10 minutes in a boiling water bath, hydrolyzed with alkali for 10 minutes, and then colored with dimethylglyoxime-thiosemicarbazide mixture. Measurement of absorbance of this solution at 530 m μ gave a straight line in the range of 50–250 μ g/ml of secobarbital. This method was applied to commercial tablets of secobarbital and a good result was obtained.

環状ウレイド類を水酸化ナトリウムアルカリ性で加水分解して尿素誘導体とし,³⁻⁵⁾これを塩酸酸性でジメチルグリオキシム-チオセミカルバジド混液(以下 DT 混液と略記)と熱時反応させると紅色を呈する。⁶⁾この呈色を利用して、バルビツール酸誘導体の比色定量法が確立されている。^{7,8)}この場合、水酸化ナトリウムアルカリ性での加水分解時間は各バルビツール酸によって異なり、10分から1時間にわたっている。⁷⁾セコバルビタールすなわち 5-allyl-5-(1-methylbutyl)barbituric acid (I), 5-ethyl-5-(1-methylpropyl)barbituric acid (II) および 5-ethyl-5-(1-methylbutyl)barbituric acid (III) のような 5 位の側鎖の α 位にメチル基を有するバルビツール酸は、発色がきわめて弱く、3 時間以上の加水分解を行なっても定量できなかった。このうち、セコバルビタール (I) について加水分解条件の改良を検討し、塩酸および過酸化水素で前処理することによって定量が可能となったので報告する。

各バルビツール酸の発色度を比較するため、アルカリ加水分解時間を 1 時間としたときの DT 混液による発色度を求め、Table I に示した。得られた吸光度を各バルビツール酸 1 モル当りの値に換算し、見かけのモル吸光係数 A で表わした。

- 1) 日本薬学会第 89 年会で発表, 名古屋, 1969 年 4 月。気賀沢和雄, 清水弘明, 渡 貞子, 五十里紀子, 三久保 博, 薬誌, 84, 638 (1964)。“スルピリンのヨウ素滴定法における反応機構の検討”を本研究の第 1 報とする。
- 2) Location: Sakurashinmachi, Setagayaku, Tokyo.
- 3) W.J. Husa, J. Am. Pharm. Assoc., 33, 217 (1944).
- 4) F. Rotondaro, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 38, 809 (1955).
- 5) A.J. Kapadia, J.E. Goyan, J. Am. Pharm. Assoc., 48, 407 (1959).
- 6) 大熊誠一, 城戸靖雅, 薬誌, 76, 894 (1956).
- 7) 厚生省, “解熱鎮痛剤試験法,” 日本公定書協会, 1967, p. 37, 39.
- 8) 立沢政義, 橋場茂子, 鈴木隆男, 分析化学, 17, 430 (1968).

TABLE I. Extinction of Colored Solution produced from Barbiturates after Hydrolysis^{a)}

$$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix} \times \begin{matrix} \text{CO-NH} \\ \text{CO-NH} \end{matrix} \text{CO}$$

	R ₁	R ₂	A ^{b)}
Barbital	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	8.0 × 10 ³
Phenobarbital	C ₂ H ₅	C ₆ H ₅	7.2
Amobarbital	C ₂ H ₅	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂	11.3
Allobarbital	CH ₂ =CHCH ₂	CH ₂ =CHCH ₂	13.1
Secobarbital (I)	CH ₂ =CHCH ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH CH ₃	0.18
5-Ethyl-5-(1-methylpropyl) barbituric acid (II)	C ₂ H ₅	CH ₃ CH ₂ CH CH ₃	0.19
5-Ethyl-5-(1-methylbutyl) barbituric acid (III)	C ₂ H ₅	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH CH ₃	0.17

a) The sample solution in 1N NaOH was heated in boiling water for 60 min.

b) apparent molar extinction coefficient

I の発色がきわめて弱い原因として、加水分解をうけにくいこと、あるいは生じた尿素誘導体が発色しがたいことなどが考えられる。これらの原因を確認するため、まず加水分解速度の測定を行なった。バルビツール酸はアルカリ性で紫外部に極大吸収を有し、分解とともにそれが減少する事実⁹⁾を利用して各加水分解時間におけるバルビツール酸骨格の残存率を求め、これにより加水分解速度を比較した。¹⁰⁻¹²⁾ pH 12.0 のリン酸塩緩衝液に溶かし水浴中で加熱したのち、 $\lambda_{\max}$ 240 m μ にて測定した結果、I は他のバルビツール酸と比較して加水分解速度が遙かに遅いことがわかった (Fig. 1)。一方また、Kapadia ら¹³⁾の法にしたがって I を 0.2N 水酸化ナトリウムに溶かし (6% w/v), 80° で 4 日間加水分解して、尿素誘導体すなわち (2-allyl-3-methylhexanoyl)urea (IV)

を取得し、これを DT 混液で発色させたとく強く発色した。これらの結果から、I の発色がきわめて弱い原因は、加水分解をうけにくいことにあることが判明した。

また、加水分解速度が遅くても、時間の延長によって尿素誘導体 (IV) または尿素の生成量が増大すれば DT 混液による発色度は高まるはずであるが、I を長時間加水分解しても発色度を高めるに至らなかった。この原因は IV の加水分解速度を検討することによって明らかになった。すなわち、IV を 1N 水酸化ナトリウムに溶かして加熱したのち DT 混液で発色させ、各時間におけるその吸光度を測定して残存率を求めた。また、バルビツールより得た尿素誘導体 (2-ethylbutyryl)urea (V) および尿素 (VI) についても同様に行ない、その結果を Fig. 2 に示した。また、I を 1N 水酸化ナトリウムで加水分解し、さきの場合と同様に UV 吸収の減少度から求めた残存率をも同時に示した。これにより、IV は V および VI とまったく同一の分解速度を示し、かつ I の加水分解速度とほぼ同程度となることが明らかになった。したがって I では、

Fig. 1. Remaining Rate of Barbiturates in Hydrolysis with Buffer Solution (pH 12.0)

—○—: I —△—: allylisobutylbarbituric acid
—×—: amobarbital —●—: barbital
—○—: allobarbital

- 9) C. Stainier, J. Bosly, Fr. Dutrieux, R. Stainier, *Pharm. Acta Helv.*, **38**, 587 (1963).
- 10) J.E. Goyan, Z.I. Shaikh, J. Autian, *J. Pharm. Sci.*, **49**, 627 (1960).
- 11) F. Tishler, J.E. Sinsheimer, J.E. Goyan, *J. Pharm. Sci.*, **51**, 214 (1962).
- 12) J. Hasegawa, K. Ikeda, T. Matsuzawa, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **6**, 36 (1958).
- 13) A.J. Kapadia, J. Autian, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **49**, 380 (1960).

Fig. 2. Remaining Rate of (2-Allyl-3-methylhexanoyl)urea (IV), (2-Ethylbutyryl)urea (V), Urea (VI) and I in Hydrolysis with 1N NaOH

—×—: IV, —△—: V, —●—: VI, —○—: I

Fig. 3. Remaining Rate of Barbiturates in Hydrolysis after Treatment with HCl-H₂O₂

—○—: I without H₂O₂ —○—: I
—●—: barbital —△—: allylisobutylbarbituric acid
—×—: allobarbital

いったん生じた尿素誘導体がさらに加水分解を受け、長時間の水酸化ナトリウム処理も発色度を高めるのには無意味であることが判明した。

したがって、DT 混液による I の定量には、その加水分解の促進が必要となる。そこで、カフェインもまた DT 混液による比色定量法が確立されており、^{7,14)} この場合、塩酸および過酸化水素で加熱分解して尿素誘導体に導いていることから、I についてこの塩酸-過酸化水素による処理を適用したのちアルカリ加水分解を行なったところ、短時間で DT 混液により強く発色することを見出した。さらに I を塩酸-過酸化水素で加熱処理したものに付き UV 吸収を測定したところ、1 時間の加熱でもバルビツール酸骨格の極大吸収は変化しなかった。したがって、この処理が骨格を開裂して尿素誘導体に導くのではなく、環状ウレイド側鎖に反応して変化をもたらし、アルカリ加水分解を促進するものと考えられる。そこで塩酸-過酸化水素で 10 分間前処理したのち、水酸化ナトリウムで加水分解したときの残存率を求めて前処理の効果を比較したところ、I の加水分解は著しく促進されることが明らかになった (Fig. 3)。

つぎに、各種バルビツール酸について、その加水分解における過酸化水素の効果を検討した。塩酸-過酸化水素

TABLE II. Effect of H₂O₂ on Hydrolysis of Barbiturates

$$\begin{array}{c} \text{R}_1 \times \text{CO-NH} \\ \text{R}_2 \times \text{CO-NH} \end{array} > \text{CO}$$

	R ₁	R ₂	Aa ^{a)}	Ab ^{a)}	Ab/Aa
I	CH ₂ =CHCH ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH(CH ₃)	14.3 × 10 ³	79.5 × 10 ³	5.58
II	C ₂ H ₅	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)	15.2	14.5	0.95
III	C ₂ H ₅	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH(CH ₃)	13.5	19.3	1.43
	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	102.0	96.8	0.95
	CH ₂ =CHCH ₂	CH ₂ =CHCH ₂	134.5	134.0	0.99
	C ₂ H ₅	C ₆ H ₅	157.0	166.0	1.06
	C ₂ H ₅	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂	98.8	99.8	1.01
	C ₂ H ₅		119.5	115.8	0.97
	CH ₂ =CHCH ₂	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	63.5	96.3	1.52
	C ₂ H ₅ (N-CH ₃)	C ₆ H ₅	193.0	211.8	1.10

a) Apparent molar extinction coefficient obtained by pretreatment with HCl (a) or HCl-H₂O₂ (b).

14) 立沢政義, 衛生試報, 83, 5 (1965).

で15分間前処理し、アルカリ加水分解を10分間行なったのちDT混液で発色させ、得られたその吸光度をさきの場合と同様にモル当りの値 Ab で表わし、同時に対照試験として、塩酸酸性のみで以下同様に操作した場合の値を Aa で示し、 Ab/Aa すなわち過酸化水素の効果比を求めた (Table II).

これにより、I は過酸化水素前処理の効果の大きいことを示したが、他のバルビツール酸類ではその値がほぼ1となって過酸化水素の効果はみられなかった。したがって塩酸-過酸化水素での前処理はIの側鎖に対してのみ特異的に作用し、加水分解を促進することが明らかになった。

つぎにIの定量法についての検討を行なった。まず、塩酸-過酸化水素による前処理時間を検討した。すなわち、1N水酸化ナトリウムに溶かした試料溶液2ml (I 200 μ g 含有) を量り、水酸化ナトリウムによる加水分解時間を沸騰水浴中10分とし、前処理時間を変化させて発色させたところ、7分から40分まで一定吸光度を示した (Fig. 4a). したがって、前処理時間を10分と決定した。

Fig. 4. Effects of Heating Time with HCl-H₂O₂ and of Alkaline Hydrolysis Time on Absorbance

a) with HCl-H₂O₂
b) alkaline hydrolysis

Fig. 5. Calibration Curve of I

ついで、アルカリ加水分解時間について検討した。試料溶液2mlを量り、塩酸-過酸化水素による前処理時間を10分とし、水酸化ナトリウムによる加水分解時間を沸騰水浴中5分から20分まで変化させて発色させ、吸光度を測定したところ7.5分から20分まで一定となった (Fig. 4b). したがって、アルカリ加水分解時間を10分と決定した。

つぎに、以上の加水分解条件を用いてDT混液で発色させたときの検量線を求めた。Iの50-250 μ g/ml溶液について測定したところ、いずれも原点を通る直線が得られたが勾配は再現性がなかった (Fig. 5). これは試薬、加熱時間あるいは温度などを各回同一条件に保つことが困難なためと考えられるが、実際には標準品の同時操作により定量可能である。

以上の結果に基づいて、この方法の市販製剤への適用を検討した。合成試料および市販錠剤について定量を行

TABLE III. Recovery of Secobarbital (I)

In synthetic samples ^{a)}			In commercial samples (tablets) ^{a)}		
Taken (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	Taken (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
50.34	50.69	100.7	50.18	49.68	99.0
49.84	49.97	100.2	49.46	50.30	101.7
50.16	49.66	99.0	50.36	50.21	99.7
49.60	50.59	102.2			
	$\bar{X}$	100.5		$\bar{X}$	100.1
	σ	1.33			

a) secopyrabitral 35 mg (secobarbital 11.9 mg), buccetin 100 mg, caffeine 25 mg, dibenzoylthiamine 5 mg, chlorpheniramine maleate 1 mg, diluent (microcrystalline cellulose and Corn starch) 199 mg

なった結果、Table III に示したとおりいずれの場合も良好な回収率を示した。

このように、I は通常の方法では DT 混液により定量できないが、塩酸-過酸化水素での前処理によって定量が可能となることがわかった。

実 験 の 部

試薬および試液 (1) ジメチルグリオキシム-チオセミカルバジド混液 (DT 混液) : [A 液] ジメチルグリオキシム 0.5 g に HCl を加えて溶かし、100 ml とする。[B 液] チオセミカルバジド 0.1 g に水 50 ml を加えて溶かし (必要ならば加温する)、これにうすめた HCl (1→2) を加えて 100 ml とする。調製後ただちに A 液および B 液の各 10 ml ずつを混ぜ合わせ、うすめた HCl (1→2) を加えて 100 ml とし、30 分間放置後 24 時間以内に使用する (しゃ光して保存する)。(2) 1N NaOH。(3) H_2O_2 試液 (3%)。(4) NaOH 溶液 (1→2)。(5) pH 12.0 緩衝液 : 0.1N NaOH 500 ml および 0.1M Na_2HPO_4 溶液 432 ml を混ぜ合わせ、水を加えて 1000 ml とし、pH 12.0 に調整する。(6) エーテル (特級)。(7) 1N HCl。

測定機器 島津自記光電分光光度計 SV-50 A. 型、日立分光光度計 124 型。

定量法 I 50 mg を精密に量り、1N NaOH に溶かして正確に 100 ml とする。その 10 ml を正確に量り、1N NaOH を加えて正確に 50 ml とし、試料溶液とする。

別に、試料溶液と同様にして標準液を調製する。

試料溶液、標準液および 1N NaOH の各 2 ml ずつをかつ色の共せん試験管にとり、HCl 1 ml および H_2O_2 試液 1 ml を加えて沸騰水浴中で 10 min 加熱し、急冷後、NaOH 溶液 (1→2) 2 ml を加えて沸騰水浴中 10 min 加熱する。急冷後、DT 混液 5 ml を加え、90° で 30 min 加熱する。急冷後、水を加えて正確に 25 ml とし空試験液を対照として層長 10mm で波長 530 $\text{m}\mu$ における吸光度を測定する。

各種バルビツール酸の加水分解における残存率の測定 I 100 mg を量り、pH 12.0 緩衝液に溶かして 200 ml とする。その 5 ml をアンプルに封入して沸騰水浴中で加熱する。冷却後、その 2 ml を正確に量り、pH 12.0 緩衝液で正確に 50 ml とし、波長 240 $\text{m}\mu$ における吸光度を測定する。加熱しない場合と比較して各加熱時間における残存率を求める。

尿素誘導体および尿素的加水分解における残存率の測定 IV, V および VI の各 40 mg ずつを量り、1 N NaOH 100 ml に溶かす。その 2 ml を正確に量り、沸騰水浴中で加熱する。冷却後、DT 混液 5 ml を加えて発色させ、530 $\text{m}\mu$ にて吸光度を測定する。加熱しない場合と比較して各加熱時間における残存率を求める。

製剤中の I の定量 カフェインが妨害するため、つぎのような操作でそれを除去し、試料溶液を調製した。I 50 mg 対応量を精密に量り、エーテル 50 ml を加えてふり混ぜ、ろ過する。ろ液を分液ロートに入れ、1N HCl 30 ml ずつで 3 回ふり混ぜ、エーテル層を分取して留去する。残留物に 1N NaOH 100 ml を加えて溶かし、ろ過したのち、ろ液を試料溶液とし、以下定量法にしたがった。