技術論文

p-カルボキシフェニルフルオロン及びチタン(IV)を用いる
塩酸ミノサイクリンの吸光光度定量

星野 満*, 森 逸男*, 本松 未帆*, 中谷 健三*,
山口 敬子*, 藤田 芳一®*

Spectrophotometric determination of minocycline hydrochloride
with *p*-carboxyphenylfluorone and titanium(IV)

Mitsuru HOSHINO, Itsuo MORI, Miho MOTOMATSU, Kenzou NAKATANI,
Takako YAMAGUCHI and Yoshikazu FUJITA*

*Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki-shi, Osaka 569-1094

(Received May 7, 2001, Accepted 2 June 2001)

A spectrophotometric method for the determination of minocycline hydrochloride (MC) was established with *p*-carboxyphenylfluorone (PCPF) and titanium(IV). Beer's law was obeyed in a concentration range 5~25 µg of MC in 10 ml of final solution. The apparent molar absorptivity of the proposed method, which does not require an extraction procedure, is $1.2 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 580 nm. The relative standard deviation for five replicate determinations for 12.3 µg of MC was 2.1%. The proposed method was then applied to the assays of MC in pharmaceutical preparation (tablet), and the results were satisfactory.

Keywords : minocycline hydrochloride; *p*-carboxyphenylfluorone; titanium(IV); spectrophotometry; in pharmaceutical preparation.

1 緒 言

ミノサイクリン (MC) 等のテトラサイクリン系抗生物質 (TC) は, 特異な抗菌スペクトルを有し¹⁾, 臨床的には異型肺炎などの呼吸器系疾患をはじめ, 種々の感染症に広く用いられる一群の薬物である. この TC は, Fig. 1 で示すように, その構造中にフェノール性 1,3-ジケトンを含んでいるので, 種々の金属イオンとキレートを生ずることが知られており, これら金属イオンを用いた二元錯体生成反応利用法も従来より報告されている²⁾. 一方, 薬物定量法において, 単に金属イオンのみ, あるいは色素のみとの二元錯体反応を用いる方法に比べ, 混合配位子錯体生成系などの混合錯体反応を利用する方法が, 感度, 選択性, 簡便性など種々の点で優れていることが認められており^{3)~6)}, 著者らも既に *o*-ヒドロキシヒドロキノフタレイン (QP)-

ジルコニウム(IV)-フッ化物イオン (QP-Zr-F⁻) 錯体法⁷⁾による, MC の吸光光度定量法を報告している. 今回は, QP-Zr-F⁻ 法に優る高感度定量法の確立を目的として, 新しい混合錯体生成反応系を利用する MC の吸光光度定量法の開発を目的として検討した. その結果, 色素として QP 構造異性体の *p*-カルボキシフェニルフルオロン (PCPF), 金属イオンにジルコニウム(IV) と同族のチタン(IV) を用いたとき, 定量感度の面で十分満足な結果を得ることができたので報告する.

Fig. 1 Structure of minocycline hydrochloride

* 大阪薬科大学: 569-1094 大阪府高槻市奈佐原 4-20-1

2 実 験

2.1 装 置

吸光度及び吸収スペクトルの測定: 島津製作所製 UV-2400PC 型分光光度計を用い, セルは光路長 10 mm の石英製セルを使用した。

pH の測定: 堀場製 F-22 複合電極 pH メーターを用いた。

2.2 試 薬

MC 溶液: 和光純薬製塩酸 MC を水に溶解して 1.0×10^{-3} M とし, 冷暗所に保存した。使用に際しては, 本液を適宜水で希釈して用いた。その他の TC (塩酸テトラサイクリン, 塩酸オキシテトラサイクリン) は, ナカライテスク製のものを MC 溶液と同様に調製し用いた。

PCPF 溶液: 文献記載の方法⁸⁾で合成した PCPF を, 少量の塩酸を含むメタノールに溶解し, 1.0×10^{-3} M 溶液として調製し, 褐色瓶に保存して用いた。その他のキサントン系色素も PCPF と同様に合成⁸⁾⁹⁾し, 1.0×10^{-3} M 溶液として用いた。

チタン(IV) 溶液: 和光純薬製原子吸光分析用チタン標準液を適宜 0.1 M HCl 溶液で希釈し, 5.0×10^{-4} M 溶液とした。

臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 溶液: 東京化成製の CTAB $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}]$ を水に溶解し, 1.0×10^{-2} M 溶液とした。

緩衝液: 0.2 M 塩酸溶液及び 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液を pH メーターで測定しながら適宜混合し, pH 4.6 の緩衝液として用いた。

その他の試薬は市販特級品を精製せずそのまま用いた。また, 本実験ではイオン交換水を用いた。

2.3 標準定量操作

10 ml のメスフラスコに 5~25 μg の MC を含む試料溶液を加え, 次いで 1.0×10^{-2} M CTAB 溶液 1.5 ml, 5.0×10^{-4} M チタン(IV) 溶液 0.4 ml, 0.2 M 塩酸-0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) 3.0 ml, 1.0×10^{-3} M PCPF 溶液 0.4 ml 及び水を加え全量 10 ml とする。別に MC のみ除いて同様に処理して得た試薬空試験液とともに 60℃ で 35 分加温, 5 分水冷した後の吸光度を試薬空試験液を対照に 580 nm で測定し, あらかじめ作成した検量線より MC 量を求める。

3 実験結果

3.1 色素及び金属イオンの選定

まず, 使用する色素及び金属イオンの組み合わせの予備的検討を行った。色素としては Fig. 2 に示すようなキサ

Fig. 2 Structures of dyes used

Dye	R ₁	R ₂	R ₃
PCPF	H	H	COOH
QP	COOH	H	H
PFPF	H	H	F
PF	H	H	H
SPF	SO ₃ H	H	H
VF	H	OCH ₃	OH

ンテン系色素の PCPF, QP, *p*-フルオロフェニルフルオロン (PFPF), フェニルフルオロン (PF), *o*-スルホフェニルフルオロン (SPF), バニリルフルオロン (VF) を, 金属としてチタン(IV), 鉄(III), コバルト(II), 銅(II), ハフニウム(IV), ジルコニウム(IV) を用いて, 色素, 金属イオンの組み合わせを検討した。その結果, PCPF とチタン(IV) を併用したとき, MC との発色反応が最も優れていることを認めた。なお, この際フッ化物イオン共存効果は認められなかった。したがって, 以下 MC の定量に際し PCPF-チタン(IV) 錯体を用いることにした。

3.2 液性の影響

本発色体生成時における液性の影響を検討した。0.2 M 塩酸-0.2 M 酢酸ナトリウム溶液, 0.2 M リン酸二水素カリウム-0.1 M 水酸化ナトリウム溶液, 0.2 M 酒石酸-0.1 M 水酸化ナトリウム溶液, 0.2 M クエン酸-0.1 M 水酸化ナトリウム溶液等の緩衝液のうち, 0.2 M 塩酸-0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液を, 全量 10 ml に対し 3.0 ml 加えて, 最終液性を pH 4.4~4.8 に調整するとき, 最大ではほぼ一定の吸光度を示した。

3.3 界面活性剤の影響

チタン(IV)-PCPF 溶液及び MC-チタン(IV)-PCPF 溶液は, 界面活性剤非共存下では徐々に沈殿するので, その分散剤を種々検討した。陽イオン性 [CTAB, 臭化セチルピリジニウム (CPB), 塩化セチルトリメチルアンモニウム, 塩化セチルピリジニウム], 陰イオン性 [硫酸ドデシルアンモニウム], 両性 [SWANOL AM-101], 非イオン性 [ポリビニルアルコール, ポリビニルピロリドン, Brij 35, Triton X-100] 界面活性剤の併用を検討したところ,

Fig. 3 Absorption spectra

MC: 12.3 μg ; Ti(IV): 4.0×10^{-5} M; PCPF: 4.0×10^{-5} M; CTAB: 1.5×10^{-5} M; pH: 4.4; Curve A: MC-Ti(IV)-PCPF-CTAB solution; Curve B: Ti(IV)-PCPF-CTAB solution; Curve C: curve A minus curve B; Reference: water

1.0×10^{-2} M CTAB 溶液を全量 10 ml に対し 1.0~1.5 ml 加えるとき, 吸光度は最大値を示した. なお, CPB は感度の面で CTAB より優れていたが, 水への溶解性の面で難点を有していたので, 本操作法においては CTAB を用いることとした.

3.4 チタン(IV) 及び PCPF 量の影響

2.5×10^{-6} M MC に対し, 用いるチタン(IV) 量及び PCPF 量の影響を検討したところ, PCPF: チタン(IV) を 1:2 のモル比に設定し, 最終 10 ml に対し 5.0×10^{-4} M PCPF 溶液 0.4 ml, 1.0×10^{-3} M チタン(IV) 溶液 0.4 ml としたとき, 吸光度は最大値を示した.

3.5 発色体の安定性

本発色反応は室温下 (15~30℃) では 120 分以上の静置が必要であったので, 加温温度 (50℃, 60℃, 70℃) と加温時間 (10~60 分) を種々検討した. その結果, 60℃ で 30 分以上加温後室温に放置したとき最大の吸光度値を示し, 以後室温では 120 分間以上一定の吸光度を示した. したがって, 定量操作としては 60℃ で 35 分加温反応後, 5 分間水冷することにした. また, 試薬の添加順序を検討したところ, MC → CTAB → チタン(IV) → 緩衝液 → PCPF の順に添加するとき, 最も高い吸光度が得られた.

3.6 吸収スペクトル

設定した基礎的定量条件に従って, MC-チタン(IV)-PCPF-CTAB 溶液, 及びチタン(IV)-PCPF-CTAB 溶液の

Table 1 Molar absorptivity and reproducibility

Drug	$\epsilon \times 10^{-5} / \text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	RSD, %
MC	1.2	2.1
Tetracycline	1.1	3.1
Oxytetracycline	1.0	2.6

ϵ : molar absorptivity ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$); RSD: relative standard deviation ($n = 5$)

Table 2 Effect of substances

Substance	Molar ratio (MC/substance)	Absorbance at 560 nm	Recovery, %
None	—	0.392	100.0
Cu(II)	1.0	0.455	116.1
Zn(II)	1.0	0.325	82.9
Fe(III)	1.0	0.325	83.0
NaCl	100	0.392	100.0
KNO ₃	100	0.392	100.0
NH ₄ Cl	100	0.392	100.0
NaF	0.5	0.327	83.4
K ₂ SO ₄	20	0.392	100.0
Ascorbic acid	1.0	0.340	86.7
Citric acid	1.0	0.651	166.1
Thiamine	2.0	0.340	86.7
Pyridoxine	1.0	0.425	108.4
Diphenhydramine	1.0	0.317	80.9
Caffeine	10	0.392	100.0
Creatinine	50	0.336	85.7
Streptomycin	2.0	0.417	106.4
Ampicillin	2.0	0.392	100.0
EDTA	100	0.392	100.0
Glucose	100	0.392	100.0
Lactose	100	0.392	100.0
Glycine	100	0.392	100.0
Histidine	100	0.392	100.0
Urea	100	0.392	100.0

MC: 12.3 μg ; Ti(IV): 2.0×10^{-5} M; PCPF: 4.0×10^{-5} M; CTAB: 1.5×10^{-3} M; pH: 4.6; Reference: PCPF-titanium (IV) solution

吸収スペクトルを測定した. Fig. 3 に見られるように, 両溶液の吸光度差は 580 nm 付近で最大で, MC 濃度に比例することを認めた.

3.7 検量線の作成

2.3 の標準定量操作に従って MC の検量線を作成したところ, 5~25 μg の濃度範囲で原点を通る良好な直線を得ることができた. Table 1 に MC 及びその他の TC (テトラサイクリン, オキシテトラサイクリン) の見掛けのモル吸光係数 (ϵ , $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) 並びに相対標準偏差 (RSD) を示す. MC の ϵ は $1.2 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ で, 既報の QP-Zr-F⁻ 法⁷⁾ の 2 倍以上の ϵ を示し, 安定性にも優れていることを認めた. また, MC 12.3 μg における RSD は 2.1% ($n = 5$) と再現性にも優れていた.

Fig. 4 Composition of the complex obtained by the continuous variation method

Fig. 5 Composition of the complex obtained by the mole-ratio method

Table 3 Application for tablets

Sample	Amount/mg ^{a)}			Recovery ^{c)d)} (S.D) ^{f)} , %
	Nominal ^{b)}	Found ^{c)}		
		this method (S.D) ^{f)}	other method ^{e)} (S.D) ^{f)}	
A	100	97.7 (0.057)	102.7 (0.099)	105.3 (0.117)
B	50	50.7 (0.034)	44.6 (0.144)	104.2 (0.082)

a) mg per 1 tablet. b) sample A 95 ~ 105 mg, sample B 47.5 ~ 52.5 mg. c) the average of 5 determinations. d) MC taken, 24.7 µg. e) QP-Zr-F⁻ method, ref.7), f) standard deviation

3.8 共存物質の影響

本法における共存物質の影響を MC (12.3 µg) を用いて検討した。銅 (II) あるいは亜鉛 (II)、鉄 (III) イオンはそれぞれ正及び負の妨害を与えるが、これら金属イオンは EDTA でその影響を除去することができた。アスコルビン酸は負の誤差を、クエン酸は正の誤差をそれぞれ与え、チアミン、ピリドキシン等のビタミン類もそれぞれ正及び負の誤差を与えたが、医薬品製剤の添加剤として用いられるグルコース、ラクトース等の糖類、グリシン、ヒスチジン等のアミノ酸類、塩化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン等の陰イオン並びにカフェイン、尿素等は多量に共存しても影響を与えなかった。

3.9 発色体の組成比

本法における発色体の組成を連続変化法及びモル比法を用いて検討した。その結果、本反応で生成した発色体は MC : チタン (IV) : PCPF : CTAB が 1 : 1 : 2 : 1、すなわち {Ti^{IV}(MC)(PCPF)₂}CTAB の四元錯体であることが推定されたが、更に詳細に検討する必要がある。チタン (IV) : PCPF 及びチタン (IV) : MC の組成比の検討結果をそれぞれ Figs. 4, 5 に示す。

3.10 医薬品製剤への応用

本法を錠剤中の MC 定量に応用した。まず、錠剤の質量を正確に測り、乳鉢を用いて粉碎、その一定量を精製し脱イオン水を用いて溶解させ一定容量とした後、汙過した汙液の一定量の試料溶液について、標準定量操作に従って MC 含量を求めた。その結果、分析値は表示値によく一致し、QP-Zr-F⁻ 法⁷⁾よりも実試料への適用においても優れていることを認めた。また、添加回収率 (MC 24.7 µg) も 104 ~ 105% を示し、本法は実試料中の MC 定量に十分適用できることを認めた。

陽イオン界面活性剤共存下、金属イオンとしてチタン (IV)、色素として PCPF を用いる MC の簡便、高感度な吸光光度定量法を開発した。本法の評価を製剤中の MC 定量で検討したところ、その分析値、添加回収率とも良好な値を示し、本 MC 定量法が実用分析法として十分利用できることを認めた。また、本反応で生成する発色錯体は MC : Ti : PCPF : CTAB が 1 : 1 : 2 : 1 の四元錯体と推定される結果が得られた。今後も金属イオン及び色素を併用する、混合錯体生成反応系利用の簡便で高感度な種々の生体機能分子の新規定量法の開発が期待される。

本研究にあたり, 医薬品製剤をご提供いただきました日本ワイ
スレダリー株式会社に深く感謝いたします。

(2000 年 10 月, 第 50 回日本薬学
会近畿支部大会において一部発表)

文 献

- 1) オーストラリア治療ガイドライン協会原著, 医薬品
治療研究会: “抗生物質治療ガイドライン”, p. 36
(1999), (医療ビジネスセンタープリメイド社).
- 2) 坂口武一編: “薬品分析学”, (1978), (南江堂).

- 3) I. Mori, Y. Fujita, H. Kawabe, K. Fujita, T. Tanaka, A.
Kishimoto: *Analyst* (London), **111**, 1409 (1986).
- 4) Y. Fujita, I. Mori, K. Fujita, T. Tanaka: *Chem. Pharm.
Bull.*, **35**, 865 (1987).
- 5) Y. Fujita, I. Mori, K. Fujita, Y. Nakahashi, T. Tanaka:
Chem. Pharm. Bull., **35**, 5004 (1987).
- 6) 藤田芳一, 森 逸男, 豊田美奈子, 田口一彦: 分
析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, T1 (1993).
- 7) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**,
4016 (1983).
- 8) H. Sano: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **31**, 974 (1958).
- 9) C. Lievermann: *Chem. Ber.*, **34**, 2299 (1901).

要 旨

陽イオン界面活性剤の臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 共存下, *p*-カルボキシフェニルフル
オロン (PCPF) 及びチタン(IV) を用いる塩酸ミノサイクリン (MC) の簡便で高感度な吸光光度定量法を
開発した. 本操作法における見掛けのモル吸光係数 (ϵ) は, $1.2 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 相対標準偏差は 2.1%
($n=5$, $12.3 \mu\text{g MC}$) であり, 著者らが既に報告している, α -ヒドロキシヒドロキノンフタレイン-ジルコ
ニウム(IV)-フッ化物イオン錯体法における ϵ (5.5×10^4) の 2 倍以上を示した. 本法を製剤中の MC の定
量に応用したところ, その分析値, 添加回収率とも良好な値を示し, 本塩酸ミノサイクリン定量法が実用分
析法として十分利用できることを認めた. 更に本発色体の組成を検討した結果, MC : Ti : PCPF : CTAB が
1 : 1 : 2 : 1 の四元錯体の生成が示唆された.