ピリドキサルおよびピリドキサル-5-リン酸のけい光定量*

宇野 豊三**, 中野 三郎, 谷口 寛一***

(1971 年 2 月 2 日受理)

ピリドキサルおよびピリドキサル-5-リン酸はイソ酪酸ヒドラジドと反応してヒドラゾンを生成し、炭酸ナトリウムアルカリ性で緑色の強いけい光(励起極大波長 380 mμ, けい光極大波長 490 mμ)を示すので、その強度を測定することによってピリドキサルおよびピリドキサル-5-リン酸のけい光定量法を確立した。ピリドキサルとピリドキサル-5-リン酸は同一条件で定量が可能であり、またピリドキサル-5-リン酸が酸ホスファターゼによって加水分解して生じたピリドキサルを同様の方法で定量できた。そのため酸ホスファターゼを用いる方法を組み合わせると、ピリドキサルおよびピリドキサル-5-リン酸の分離定量が可能となった。ピリドキサルは塩酸塩として 0.01~1.0 μg/ml, ピリドキサル-5-リン酸は 0.1~1.0 μg/ml の間で濃度とけい光強度の間に直線関係が成立した。

1 緒 言

ピリドキサル (PAL) のけい光定量法にはアンモニア性硝酸銀で酸化する方法¹⁾およびシアン化カリウムを作用させてラクトンにする方法^{2)~4)}などがある。ピリドキサル-5-リン酸 (PALP) のけい光定量法には酸ホスファターゼの加水分解によって生ずる PAL をシアン化カリウムを用いて定量する方法^{3)~5)}がある。著者らは PAL [本研究ではピリドキサル塩酸塩 (PAL·HCl)] を用いた} および PALP に Table I に示した酸ヒドラジドを反応させてけい光性ヒドラゾンの生成によるけい光定量法を検討した。

PAL および PALP は酢酸酸性で酸ヒドラジドを反応させてから、炭酸ナトリウムアルカリ性になると、イソ酪酸ヒドラジド (IBH) から誘導したヒドラゾンが最も強い緑色のけい光を示したので、IBH によるけい光定量法を検討した。また酸ホスファターゼで PALP を加水分解してから IBH を反応させると、PALP のけい光強度は約 2.7 倍増大した。酸ホスファターゼの種類によってもけい光強度に差異が認められたが、入手の容易な酸ホスファターゼを用いて PAL および PALP の分離定量法を確立した。そのほかピリドキシン (PXN) およびピリドキサミン (PMN) の PAL および PALP の測

定に及ぼす影響についても検討した。

2 試薬および装置

2.1 試 薬

標準 PAL 溶液: Sigma 製 PAL·HCl を蒸留水に溶かし、0.01~1.0 μg/ml 溶液にする。

標準 PALP 溶液: Sigma 製 PALP を蒸留水に溶かし、0.1~1.0 μg/ml 溶液にする。

酢酸塩緩衝液: 1M 酢酸溶液と 1M 酢酸ナトリウム溶液から pH メーターを用いて pH 4.8 に調製する。

DMF: 特級ジメチルホルムアミドを蒸留する。

炭酸ナトリウム溶液: 特級炭酸ナトリウム 5g を蒸留水に溶かし、100 ml にする。

酸ホスファターゼ溶液: Calbio Chem 製酸ホスファターゼ (Lot. 71750, 2.0 Eu/mg, protein) を水に溶かして、0.04 mg/ml の溶液にする。

IBH 溶液: 4:1 で合成した IBH 1g を蒸留水に溶かし、100 ml にする。

ウラニン溶液: 特級ウラニンを水に溶かした。

安息香酸ヒドラジド, イソニコチン酸ヒドラジドおよびピコリン酸ヒドラジドは特級試薬, そのほかのカルボニル試薬は 4:1 で合成したものをを用いた。

2.2 装 置

けい光分光光度計: MPF-2A 形日立分光けい光光度計。

けい光光度計: FPL 2 形日立けい光光度計。

pH メーター: 東亜電波工業 HM5A 型 pH メーター。

恒温そう: 37±1.5°C に調節できるものをを用いた。

* けい光分析におけるヒドラゾン誘導体について (第 1 報)

** 京都大学薬学部: 京都市左京区吉田下阿達町

*** 明治薬科大学: 東京都世田谷区野沢 1 丁目

3 定量操作法

3.1 操作法 I (PAL および PALP の測定)

試料溶液 5 ml, 酢酸塩緩衝液 1 ml, DMF 3 ml および IBH 溶液 4 ml を混ぜ、50 分間室温に放置後、炭酸ナトリウム溶液 4 ml を加え、蒸留水で全量 20 ml にしてそのけい光強度を測定する。から試験は試料の代わりに蒸留水を用いて操作する。別に標準 PAL および標準 PALP 溶液を試料の場合に準じて測定し、検量線を作成して濃度の算定を行なうか、または 3.3 の計算式に従って濃度を求める。

機器の感度設定は PAL および PALP の濃度が 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の間では 0.5 mg% ウラニン 溶液, PAL 0.01 ~ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の間では 0.05 mg% ウラニン 溶液を用いて調節する。けい光光度計の 1 次フィルターには #365, 二次フィルターには #47 を用いる。

3.2 操作法 II (PAL および PALP の混合試料または PALP の測定)

試料溶液 5 ml, 酢酸塩緩衝液 1 ml および酸ホスファターゼ溶液 0.5 ml を混ぜ、37°C, 30 分間放置後、DMF 3 ml および IBH 溶液 4 ml を混ぜ、50 分間室温に放置し、炭酸ナトリウム溶液 5 ml および蒸留水を加えて全量 20 ml にしてそのけい光強度を測定する。から試験は蒸留水を用いて操作する。濃度の算出は 3.3 の計算式により求める。機器の感度設定は 0.5 mg% ウラニン 溶液を用いて調節する。けい光光度計のフィルターは操作法 I の場合と同じである。

3.3 濃度の計算

$$\text{PAL} \cdot \text{HCl の濃度 } (\mu\text{g/ml}) = \frac{F_B}{F_A}$$

$$\text{PALP の濃度 } (\mu\text{g/ml}) = \frac{F_{B'}}{F_{A'}}$$

F_A = 標準 PAL 溶液 (1 $\mu\text{g/ml}$) のけい光強度, F_B = 試料 PAL 溶液のけい光強度, $F_{A'}$ = 標準 PALP 溶液 (1 $\mu\text{g/ml}$) のけい光強度, $F_{B'}$ = 試料 PALP 溶液のけい光強度。けい光強度はすべてから試験値を引いた値である。

分離定量の場合: 4.3.8 の実験の結果, 酸ホスファターゼは PAL に無影響である。すなわち操作法 I および II によって測定した PAL の同濃度のものは同一けい光強度を示す。したがって次に示す計算式がなりたつ。

$$C_{\text{PALP}} = \frac{M_2 - M_1}{A_2 - A_1}, C_{\text{PAL}} = (M_2 - A_2 \times C_{\text{PALP}}) \times \frac{1}{F_A}$$

C_{PALP} = 混合試料中の PALP の量 ($\mu\text{g/ml}$), C_{PAL} = 混合試料中の PAL の量 ($\mu\text{g/ml}$), M_1 = 操作法 I に従って測定した混合試料のけい光強度, M_2 = 操作法 II に従って測定した混合試料のけい光強度, A_1 = 操作法 I に従って測定した標準 PALP 溶液 (1 $\mu\text{g/ml}$) のけい光強度, A_2 = 操作法 II に従って測定した標準 PALP 溶液 (1 $\mu\text{g/ml}$) のけい光強度。

けい光強度はすべてから試験値を引いた値である。

4 実験

4.1 試薬の合成

酸ヒドラジドは文献に従って以下のように合成した。

4.1.1 酢酸ヒドラジド⁶⁾ 酢酸エチルとヒドラジンヒドラートを還流, 析出する結晶を無水エタノールから再結晶。mp 62°C。

4.1.2 プロピオン酸ヒドラジド⁷⁾ プロピオン酸エチルとヒドラジンヒドラートを還流後, 減圧で分留し, 無水クロロホルムと無水エーテルから再結晶。mp 40°C。

4.1.3 酪酸ヒドラジド⁸⁾ 酪酸エチルとヒドラジンヒドラートを還流後, 減圧で分留し, 無水エーテルから再結晶。mp 44°C。

4.1.4 IBH⁹⁾ イソ酪酸エチルとヒドラジンヒドラートを還流, 析出する結晶をエタノールから再結晶。mp 104°C。

4.1.5 PAL のイソ酪酸ヒドラゾン塩酸塩 PAL · HCl 1 g と IBH 0.5 g をエタノール 5 ml に溶かし, 水浴上でエタノールが留去するまで加熱し, 残留物をベンゼン-エタノールから再結晶。白色針状結晶 mp 205 ~ 206°C, 収量 42.5%, 元素分析値: 計算値 ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$) C 50.09%, H 6.31%, N 14.60%; 実測値 C 49.92%, H 6.15%, N 14.76%。

4.2 けい光試薬の選択

Table I に示したカルボニル試薬のなかから有用なものを選択する目的で, PAL および PALP との発けい光反応を調べた。反応は各 0.1M 溶液にしたカルボニル試薬をつくり, 3.1 の定量操作法に従って PAL および PALP のけい光強度を測定した。けい光光度計の各種フィルターを組み合わせ測定したなかで, 測定値の大きいものだけを Table I に示した。

カルボニル試薬のなかで IBH が最も強いけい光を示した。

4.3 定量条件の検討

4.3.1 pH の影響 緩衝液の pH だけを変化させ

Table I Reaction of PAL and PALP with carbonyl reagents

Reagents	R.F.I.†			
	PAL·HCl		PALP	
	365††/47†††	365/53	365/47	365/53
Benzoic acid hydrazide	1.2	1.0	2.0	1.7
Picolinic acid hydrazide	1.0	0.5	0.5	0
Isonicotinic acid hydrazide	1.0	1.5	9.6	0.2
Acetic acid hydrazide	56.0	21.0	29.5	8.7
Propionic acid hydrazide	44.0	17.0	27.5	7.9
Butyric acid hydrazide	82.0	29.0	26.8	7.6
Isobutyric acid hydrazide	97.0	32.0	30.9	8.7

PAL·HCl: 1.0 $\mu\text{g/ml}$; PALP: 1.0 $\mu\text{g/ml}$; † Relative fluorescence intensities; †† Primary filter; ††† Secondary filter

て, ほかは 3.1 の操作法 I に従って PAL と PALP の測定を, 3.2 の操作法 II に従って PALP の測定を行った. それらの結果を Fig. 1 に示す.

Fig. 1 Effect of pH on fluorescence intensity

(1) PAL·HCl: 1.0 $\mu\text{g/ml}$; (2) PALP: 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (acid phosphatase added); (3) PALP: 1.0 $\mu\text{g/ml}$

3.1 の方法では PAL は pH 4.6~5.0, PALP は pH 4.4~5.0 の緩衝液を用いると一定のけい光強度を得る. 3.2 の方法では PALP のけい光強度は pH 4.6~5.4 の緩衝液を用いると一定になる. 3.1 および 3.2 の方法によって得た測定値をそのまま PAL および PALP の分離定量に利用するためには, 同一緩衝液を用いて操作するのが望ましいと考えたので, 操作法 I および II に共通の pH 4.8 の緩衝液を採用した.

4.3.2 溶媒の影響 溶媒の影響を検討する目的で, 操作法 I においては PAL と PALP を, 操作法 II においては PALP の測定を DMF 以外の溶媒を使用したときの測定も行なった. その結果を Table II に示す.

Table II Effect of solvents on fluorescence intensities

Solvent	R.F.I.†		
	PAL·HCl††	PALP††	PALP†††
DMF	98.0	31.0	78.0
Ethanol	95.0	27.0	75.6
Methanol	82.5	24.5	65.5
Acetone	1.5	0.5	1.0
Water	69.8	19.8	54.8

PAL·HCl: 1.0 $\mu\text{g/ml}$; PALP: 1.0 $\mu\text{g/ml}$; † Relative fluorescence intensities; †† Measurement by procedure I; ††† Measurement by procedure II (acid phosphatase added)

操作法 I および II において DMF を溶媒として用いると強いけい光を示した.

4.3.3 DMF の量 DMF の量だけを変化させ操作法 I においては PAL と PALP を, 操作法 II においては PALP を測定した. その結果を Fig. 2 に示す.

Fig. 2 Effect of volume of DMF

(1) PAL·HCl: 1.0 $\mu\text{g/ml}$; (2) PALP: 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (acid phosphatase added); (3) PALP: 1.0 $\mu\text{g/ml}$

DMF の量は 3.1 および 3.2 の操作法で測定すると 2~6 ml の間でけい光強度が一定したので, 定量操作法では 3 ml を採用した.

4.3.4 IBH の量 IBH 溶液の量だけを変化させて、操作法 I においては PAL と PALP を、操作法 II においては PALP の測定をしてけい光強度の変化を調べた。その結果を Fig. 3 に示す。

Fig. 3 Effect of IBH concentration

(1) PAL·HCl : 1.0 $\mu\text{g/ml}$; (2) PALP : 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (acid phosphatase added); (3) PALP : 1.0 $\mu\text{g/ml}$

操作法 I において、PAL の場合は 3~7 ml, PALP の場合は 1~7 ml の IBH 溶液を、操作法 II において PALP は 1~7 ml の IBH 溶液を用いるとけい光強度は一定になった。したがって操作法 I および II に共通の 4 ml を使用した。

4.3.5 反応時間 3.1 および 3.2 の操作法において PAL または PALP が IBH と反応する時間を種々変化したときのけい光強度の関係を調べた。その結果を Fig. 4 に示す。

けい光強度は 40 分以後ではほぼ一定となるが、安全性を考慮して、操作法 I および II において反応時間を 50 分間とした。

4.3.6 炭酸ナトリウムの量 炭酸ナトリウム溶液の量だけを変化させ、操作法 I においては PAL と PALP を、操作法 II においては PALP を測定した。その結果を Fig. 5 に示す。

炭酸ナトリウム溶液 3 ml 以上で一定のけい光強度に達する。操作法 I および II では 4 ml の炭酸ナトリウ

Fig. 4 Effect of reaction time of IBH on fluorescence intensity

(1) PAL·HCl : 1.0 $\mu\text{g/ml}$; (2) PALP : 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (acid phosphatase added); (3) PALP : 1.0 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 5 Effect of sodium carbonate concentration

(1) PAL : 1.0 $\mu\text{g/ml}$; (2) PALP : 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (acid phosphatase added); (3) PALP : 1.0 $\mu\text{g/ml}$

ム溶液を使用した。

4.3.7 酸ホスファターゼの量 酸ホスファターゼ溶液の量だけを変化させて、ほかは操作法 II に従って PALP のけい光強度を測定した。その結果を Fig. 6 に示す。

Fig. 6 Effect of amount of acid phosphatase (2.0 Eu/mg, protein)

PALP: 1.0 $\mu\text{g/ml}$

酸ホスファターゼ溶液は 0.3~0.8 ml で一定のけい光強度を示した。したがって本操作法では便宜上 0.5 ml を採用した。

4.3.8 酸ホスファターゼの反応温度 操作法 II で酸ホスファターゼの加水分解作用の温度変化による PALP のけい光強度を測定した。また操作法 I および II によって PAL を測定した。これは PAL が操作法 I による場合と、操作法 II による場合で測定値に影響があるかどうかを調べるためである。その結果を Fig. 7 に示す。

Fig. 7 Effect of reaction temperature of acid phosphatase

(1) PALP (acid phosphatase added); (2) ---●--- PAL-HCl (acid phosphatase added), ---△--- PAL-HCl

25~40°C の反応温度で酸ホスファターゼを反応させると PALP は一定のけい光強度を示す。また PAL は酸ホスファターゼの影響をほとんど受けない。

4.3.9 酸ホスファターゼの反応時間 操作法 II で酸ホスファターゼの作用する時間と PALP のけい光強

Fig. 8 Effect of reaction time of acid phosphatase on fluorescence intensity

PALP: 1.0 $\mu\text{g/ml}$

度の関係を調べた。その結果を Fig. 8 に示す。

けい光強度は反応時間が 20 分間以上で一定となった。操作法 II では 30 分間とした。

4.3.10 けい光の安定性 操作法 I および II に従って測定した PAL および PALP のけい光は、操作後室温で 3 時間経過してもけい光強度は一定であった。

4.4 検量線

操作法 I に従って PAL-HCl および PALP の検量線を求めたところ、PAL-HCl は 0.01~1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、PALP は 0.1~1.0 $\mu\text{g/ml}$ の間で濃度とけい光強度の間に直線関係が成立した。PAL-HCl の 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、および PALP の 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溶液をそれぞれ 5 回測定した結果、測定値の標準偏差は 0.67%、0.90% および 0.40% であった。操作法 II に従って PALP の検量線を求めたところ、0.1~1.0 $\mu\text{g/ml}$ の間で濃度とけい光強度の間に直線関係が成立した。また PALP の 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溶液を 5 回測定した結果、測定値の標準偏差は 0.59% であった。

4.5 励起およびけい光スペクトル

操作法 I に従った PAL および PALP の測定液、操作法 II に従った PALP の測定液、4.1.5 で合成したヒドラゾン (PAL-IBH) を操作法 I における測定液と同じような溶液にしてそれぞれの励起およびけい光スペクトルを測定した。その結果を Fig. 9 に示す。

PAL および PALP の定量法に従った測定液の励起およびけい光スペクトルは PAL のイソ酪酸ヒドラゾンのそれと一致した。これは PAL および PALP がヒドラ

Fig. 9 Excitation and emission spectra

A: Excitation; B: Emission; (1) PAL-IBH; (2) PALP-IBH (acid phosphatase added); (3) Iso-butyril hydrazone of PAL; (4) PALP-IBH; Spectra are uncorrected.

ゾンを形成してけい光を発したものと考えられる。

4.6 PAL および PALP の分離定量

PAL·HCl および PALP の混合試料をつくり測定した結果を Table III に示す。

Table III Recovery of PAL and PALP in mixed sample

No.	Mixed sample	Amount taken (μg/ml)	Found (μg/ml)	Recovery (%)
1	PAL·HCl	0.100	0.100	100.0
	PALP	0.900	0.918	102.0
2	PAL·HCl	0.200	0.200	100.0
	PALP	0.800	0.804	100.5
3	PAL·HCl	0.300	0.298	99.3
	PALP	0.700	0.701	100.1
4	PAL·HCl	0.400	0.400	100.0
	PALP	0.600	0.597	99.5
5	PAL·HCl	0.500	0.487	97.4
	PALP	0.500	0.510	102.0
6	PAL·HCl	0.600	0.595	99.2
	PALP	0.400	0.402	100.5
7	PAL·HCl	0.700	0.685	97.9
	PALP	0.300	0.298	99.3
8	PAL·HCl	0.800	0.786	98.3
	PALP	0.200	0.195	97.5
9	PAL·HCl	0.900	0.890	98.9
	PALP	0.100	0.103	103.0

平均回収率 99.66%, 回収率の標準偏差は 1.17% が得られた。

4.7 共存物質の影響

PXN および PMN の共存する PAL および PALP を操作法 I に従って測定した結果を Table IV に示す。

PXN 塩酸塩の 10 倍量および PMN 塩酸塩の等量は PAL·HCl および PALP の測定値に影響がなかった。

5 結語と考察

PAL および PALP が IBH と反応してヒドラゾンを

Table IV Influence of coexistent substances

No.	Amount taken (μg/ml)	Coexistent substances (μg/ml)	Found (%)
1	PAL·HCl 0.5	PXN·HCl 0.5	100.0
2	" "	" 5.0	100.0
3	" "	PMN·2HCl 0.5	100.0
4	" "	" 5.0	105.0
5	PALP 0.5	PXN·HCl 0.5	100.0
6	" "	" 5.0	100.0
7	" "	PMN·2HCl 0.5	100.0
8	" "	" 5.0	113.3

形成する反応をけい光定量に応用できた。また PALP を酸ホスファターゼで加水分解してから IBH を反応させると、けい光は強くなる。したがって酸ホスファターゼ反応前と反応後のけい光強度の差を利用することにより、PAL と PALP の分離定量が可能となった。

PAL·HCl と同モルの PALP を 3.1 の操作法 I で測定するとそのけい光強度比は 100 : 38.4 であるが、3.2 の操作法 II を適用すると 100 : 96.7 となったので、PALP はかなりの程度加水分解してからけい光反応をしたものと考えられる。

また酸ホスファターゼの種類によって PALP の加水分解率が異なった。たとえば Sigma 製酸ホスファターゼ (0.7 unit, 基質: *p*-nitrophenyl phosphate, pH 4.8, 37°C) の最適濃度と定量条件を種々検討したところ、酸ホスファターゼの 0.5 mg/ml 溶液を用いて、操作法 II と同一に操作すれば PALP の 0.1~1.0 μg/ml の定量が可能となり、また分離定量法にも応用できたが、この酸ホスファターゼを用いた測定では、同モルの PAL·HCl と PALP のけい光強度比は 100 : 80 となった。したがって酸ホスファターゼは種類によって PALP のけい光強度に差異が生ずるので、酵素の種類によって至適条件を求めることが望ましい。

終わりに、元素分析を担当された明治薬科大学氏家妙美氏に感謝します。

(1968 年 4 月, 日本薬学会第 88 年会において一部講演)

文 献

- 1) 藤田大祐: ビタミン, **7**, 502 (1954).
- 2) V. Bonavita: *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 366 (1960); *Chem. Abstr.*, **54**, 19273 (1960).
- 3) M. Yamada, A. Saito, Z. Tamura: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **14**, 482 (1966).
- 4) S. Takanashi, I. Matsunaga, Z. Tamura: *J. Vitaminol.*, **16**, 129 (1970).
- 5) S. Takanashi, Z. Tamura: *ibid.*, **16**, 132 (1970).
- 6) G. Schöfer, N. Schwan: *J. Prakt. Chem.*, **51**, 185 (1908).

- 7) T. Curtius, H. Hille: *ibid.*, **64**, 404 (1908).
- 8) R. Stolle: *ibid.*, **69**, 486 (1913).
- 9) R. Stolle, L. Gutmann: *ibid.*, **69**, 497 (1913).

☆

Fluorometric determination of pyridoxal and pyridoxal-5-phosphate. (Studies on hydrazone derivatives in fluorometric analysis. I.) Toyozo UNO*, Saburo NAKANO and Hirokazu TANIGUCHI** (*Faculty Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto-shi; ** Meiji College of Pharmacy, Setagaya-ku, Tokyo)

Fluorescence reaction of pyridoxal(PAL) and pyridoxal-5-phosphate(PALP) with hydrazides (Table

I) was examined. PAL and PALP reacted with isobutyric acid hydrazide(IBH) to form hydrazones in an acetate buffer solution which gave green fluorescence in an alkaline medium. IBH was suitably used for the determination of PAL and PALP. By the proposed method, 0.01~1.0 μg per ml of PAL hydrochloride and 0.1~1.0 μg per ml of PALP could be determined. Ten fold amount of pyridoxine hydrochloride and equal amount of pyridoxamine hydrochloride did not interfere.

Separatory determination of PAL and PALP has been done by the combination of the proposed method with an enzymatic method using acid phosphatase.

(Received Feb. 2, 1971)

アルミニウムのけい光定量*

宇野 豊三**, 谷口 寛一***

(1971 年 3 月 1 日受理)

酢酸, フェニル酢酸, 安息香酸およびイソニコチン酸のヒドラジドと 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドからヒドラゾンを合成し, スポットテストにより金属イオンとの反応を行なったところ, これらのヒドラゾンは酢酸酸性でアルミニウムと反応して強いけい光を示した. そのなかで安息香酸ヒドラゾンとアルミニウムからは励起極大波長 395 $\text{m}\mu$, けい光極大波長 475 $\text{m}\mu$ のけい光性錯体を形成した. またこのヒドラゾン-アルミニウム錯体のけい光はほかのアルミニウム錯体のけい光よりも強いので, 安息香酸ヒドラゾンをを用いてアルミニウムのけい光定量法を確立した.

試薬(安息香酸ヒドラゾン)とアルミニウムを pH 4.6 の酢酸塩緩衝液中で 40~42°C, 30 分間加温して得られるけい光を測定する. この方法によるとアルミニウムの 0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間で濃度とけい光強度の間に直線関係が成立した.

1 緒 言

ヒドラゾン誘導体に関するけい光分析の研究のなかには, サリチル酸ヒドラジドを用いたアルデヒドの分析的研究¹⁾, サリチルアルデヒド酢酸ヒドラゾンによるアルミニウムの定量²⁾, サリチルアルデヒド酢酸ヒドラゾンによるスカンジウムおよびガリウムの定量³⁾, レゾルシンアルデヒド酢酸ヒドラゾンによるスカンジウムの定量⁴⁾, スカンジウム, ガリウムおよびジルコニウムのベ

ーバークロマトグラフ⁵⁾などがある. 著者らは¹⁾すでにヒドラゾン誘導体のけい光分析的研究を行ってきた⁶⁾⁷⁾が, これらのうちイソニコチン酸ヒドラジドの定量法の研究は⁸⁾, イソニコチン酸ヒドラジドが 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドと反応してヒドラゾンになり, 酢酸酸性でこのヒドラゾンがさらにアルミニウムと錯体を形成し, この錯体の示す強いけい光を測定することによった. したがって 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドから誘導されるヒドラゾンが金属の分析試薬として期待された. そこで本報では酢酸, フェニル酢酸, 安息香酸およびイソニコチン酸のヒドラジドと 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドからヒドラゾンを合成し検討を試みた. これらヒドラゾンはアルミニウムと反応してけい光を発するようになり, そのなかでも安息香酸ヒドラゾン

* けい光分析におけるヒドラゾン誘導体について (第 2 報). 前報は宇野豊三, 中野三郎, 谷口寛一: 本誌, **20**, 1117 (1971)

** 京都大学薬学部: 京都市左京区吉田下阿達町

*** 明治薬科大学: 東京都世田谷区野沢 1 丁目