シアノコバラミン製剤の原子吸光分析法による定量条件の検討*

喜谷 喜徳**, 竹田 勝彦***, 小池 久**

(1972 年 11 月 7 日受理)

原子吸光分析法による微量医薬品の迅速定量法の開発を試みた。シアノコバラミン (CyCo) はコバルトを含有する金属キレート化合物である。したがって B_{12} の定量は原子吸光分析法により、コバルト量を測定すると定量できる。本実験には日立 207 型原子吸光分光光度計を用い、予混合式バーナー、空気-アセチレン燃料、中空陰極ランプを用いて測定を行なった。本報告では測定条件の検討を行なった。比較のため α -グリシンコバルト錯体、酢酸コバルトを同時に測定し、CyCo 製剤の測定条件を検討した。

水溶液の測定条件は、波長 2407 Å, ランプ電流値 10 mA, スリット幅 0.18 mm, 流量は空気 13.0 l/min, アセチレンは 3.0 l/min である。水溶液の測定では、回収率は低いが、0.1N 塩酸性溶液で行なうと、100% 近い回収率を与えた。CyCo および錠剤、注射薬は 0.1N 塩酸溶液で測定するときわめてよい結果を与える。20% エタノール溶液ではヒドロキシコバラミンは期待どおりの結果を与えるが、CyCo は低い回収率を与える。100% エタノール溶液および 0.1N 塩酸エタノール溶液では、いずれもよい結果を与えた。錠剤における乳糖などの賦形薬、注射薬における生理的食塩水の影響はない。したがって CyCo 製剤は水に可溶であっても 0.1N 塩酸性溶液で測定する必要がある。CyCo はかなり安定な化合物であるが、コバルトイオン共存の場合には、吸光光度法の併用が望ましい。著者らはこの分離定量法を検討中である。

1 緒 論

cyanocobalamin (以下 CyCo と略記) の定量法には微生物を用いる 定量法¹⁾²⁾, 原虫を用いる 生物学的定量法³⁾⁴⁾ などあり、またジシアニド法^{5)~7)} などの化学的定量法がある。CyCo はコバルトを含む暗赤色の水溶性金属錯体であり、吸光光度法もきわめて有効な方法である。したがって USP 法⁸⁾, Heinrich 法⁹⁾, 日本薬局方などにおいても 361 nm における吸光光度法を採用している。しかし錠剤など共存物質の影響をうけるとときには、吸光光度法は適当でない場合がある。

CyCo はコバルトを配位した金属錯体であるから、金属を定量すればただちに医薬品の定量が可能である。CyCo の原子吸光分析法による定量について二、三の報告^{10)~12)} はあるが、製剤中の CyCo の定量条件の検討がじゅうぶんでないと思われる。濃硫酸による酸分解¹⁰⁾ののち、コバルト錯体として溶媒抽出し、原子吸

光分析法により全コバルト量を測定することができる。著者らは微量の CyCo をより簡単、迅速に定量するために直接定量を試み、まず水溶液の定量を行なったところ、回収率は約 60% であった。Diaz も CyCo 水溶液の直接定量法を行ない、吸光光度法と比較してきわめてよい一致を得たと報告¹²⁾しており、回収率についての記載がない。そこで著者らは測定条件の検討を行なう必要を認め、測定の結果 pH 3.0 以下の酸性溶液で行なう必要のあることがわかった。

著者らは錯体化学的な観点から、微量の医薬品を原子吸光分析法により簡単な操作により、迅速に、精度よく短時間で定量する方法の開発を試み、まず医薬品それ自身が金属錯体である代表例として CyCo の定量を試み、その測定条件の検討を行なった。

2 装置および試薬

2.1 装 置

日立 207 型原子吸光分光光度計を用い、光源には日立製コバルト中空陰極ランプを、バーナーは水冷予混合式を用い、空気-アセチレンフレームにより吸光度の測定を行なった。

2.2 試 薬

* 原子吸光分析法による微量医薬品の定量 (第 1 報)

** 名古屋市立大学薬学部: 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

*** 日本メルク万有(株)試験研究所: 愛知県岡崎市上六名町大道東 15

CyCo および hydroxocobalamin (以下 HyCo と略記) はメルク社製。CyCo 注射液 (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、"レヂソール注射液" および CyCo 錠剤 (250 $\mu\text{g}/\text{tablet}$)、"レヂソール錠" は日本メルク万有(株)社製。 α -グリシンコバルト (以下 CoGly と略記) は $\text{Gly}_3\text{Co}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, calcd.: C 22.51, H 5.03, N 13.13. found: C 22.53, H 4.70, N 13.45. 酢酸コバルト (以下 CoAc と略記) は和光純薬製試薬特級。

コバルト標準溶液はコバルトスポンジ (99.99%, 片山化学製) を 6*N* 塩酸に溶解し、コバルト 1 mg/ml の溶液を調製して、使用時適当に希釈した。また同時に和光純薬製原子吸光測定用標準液を用いた。塩酸は和光純薬精密分析用を使用した。精製水はイオン交換樹脂により脱イオン化ののち、硬質ガラス容器で蒸留し、コバルト不含を原子吸光光度計で確認した。

3 実験および結果

3.1 水溶液における測定条件の検討

測定波長は 2407 Å, スリット幅 0.18 mm として、コバルト標準液 2.00 ppm を使用し、中空陰極ランプ作動電流値、空気-アセチレン流量 およびバーナー位置など吸光度との関係を調べ測定最適条件を検討した。

3.1.1 ランプ電流 空気 13.0 l/min, アセチレン 3.0 l/min およびバーナー位置を 1 に選定し、ランプ電流値を 2~20 mA の範囲で変化させ、電流値と吸光度の関係を調べた。その結果を Fig. 1 に示す。電流値が小さくなると吸光度は大きく不安定となる。安定性や吸光度などを考えあわせて、電流値 10 mA として測定することにした。

Fig. 1 Relationship between lamp current and absorption of cobalt

Sample: Co 2.00 ppm; Air flow rate: 13.0 l/min; Acetylene flow rate: 3.0 l/min; Position of burner: 1* {1* indicates the lowest position of burner of this instrument (2.7 cm from the burner top to the center of the beam)}

3.1.2 空気-アセチレン流量およびバーナー位置

空気流量を 13.0 l/min とし、アセチレン流量を 2.0~3.5 l/min の範囲で 0.25 l/min 単位で変化させ、それぞれについて可動バーナーの支持台の高さを変え、吸光度との関係を調べた。その結果を Fig. 2 に示す。アセチレン流量 3.0 l/min 以上では吸光度は大きくなるが、フレイムが不安定となり、3.0 l/min 以下では吸光度は徐々に小さくなる。また吸光度はバーナー位置 2 および 3 に比べ 1 がいずれも大きかった。したがって空気流量 13.0 l/min, アセチレン流量 3.0 l/min, バーナー位置 1 とし、波長は 2407 Å, スリット幅 0.18 mm, ランプ電流値 10 mA で測定することとした。本機器のバーナー位置 1 は、炎の先端より光束中心が 2.7 cm の距離である。

Fig. 2 Effect of acetylene flow rate on the absorption of cobalt

Sample: Co 2.00 ppm; Air flow rate: 13.0 l/min; Current: 10 mA; Position of burner: 1

3.2 溶液条件の検討

試料としては水溶性の CoGly, CoAc および CyCo を用いた。

3.2.1 水溶液 まず試料の適当な濃度の水溶液を調製し、そのまま測定液として用いたところ、CoAc は 85%, CoGly, CyCo は 50~65% 程度の回収率しか得られなかった。それらの結果は Table I, III に示す。

そこで、次に測定液を塩酸酸性とした。すなわち試料の一定量を取り、これを精製水に溶かす。この水溶液の

Table I Measurement of cobalt complexes in H_2O

Samples in H_2O	Calcd. (ppm)	Found (ppm)	Recovery (%)
CoGly	0.743	0.485	65.3
CyCo	0.681	0.407	59.8

Table II Measurements of cobaltous acetate and cyanocobalamin in solutions of various pH

Samples	pH	CoAc			CyCo		
		Calcd. (ppm)	Found (ppm)	Recovery (%)	Calcd (ppm)	Found (ppm)	Recovery (%)
No. 1 H ₂ O solution	5.13	0.914	0.463	50.7	0.681	0.407	59.8
No. 2 0.1N HCl solution	1.35	"	0.913	99.9	"	0.695	102.1
No. 3 0.1N HCl 7 ml→100 ml H ₂ O soln.†	2.30	"	0.920	100.7	"	0.700	102.8
No. 4 0.1N HCl 0.8 ml→	2.85	"	0.928	101.5	"	0.685	100.6
No. 5 0.1N HCl 0.15 ml→	3.00	"	0.888	97.2	"	0.700	102.8
No. 6 0.1N HCl 1 μl→	5.02	"	0.733	80.2	"	0.606	89.0

† The respective 0.1N HCl solutions were made to 100 ml exactly with metal free distilled water.

一定量をさらに適当な濃度の塩酸でうすめた溶液の pH を求めておき, これを測定液とした. 各種の pH における回収率を Table II に示す.

なお, CoAc については同様の pH 変化による影響を調べなかったが, 0.1N 塩酸溶液を用いた場合の回収率は 100.5% となった.

以上の結果より, 水溶性錯体は pH 3.0 以下あるいは 0.1N 塩酸酸性で行なうと好結果を与えることがわかった.

3.2.2 エタノール溶液 CoAc および CyCo について 20% エタノールを溶媒として用い測定した. なお, 装置の測定条件はアセチレン流量を 2.75 l/min とした以外, 水溶液の場合と同じである. その結果, 回収率は 100.1% となったが, CyCo では 62.5% となり, 水溶液の場合に比べて多少高くなったが, 0.1N 塩酸溶液を用いる必要のあることがわかった. いずれの場合も試料溶液中のコバルトの最終濃度は 0.7~0.8 ppm となるように調製した.

次に試料として CyCo および HyCo を用いエタノールを溶媒とした場合について検討した. 装置の測定条件はアセチレン流量のみ 2.5 l/min としたほかは水溶液の場合と同じである. 試料のエタノール溶液はコバルトの濃度が 0.7~0.8 ppm となるように調製した. その結果回収率は CyCo が 102.1%, HyCo が 100.6% となり, この両試料については 0.1N 塩酸とともにエタノールも溶媒として使用しうることがわかった. またエタノール-0.1N 塩酸 (2:8 容量比) を溶媒とした場合についても検討したが, 両試料とも約 98% の回収率となり, ほぼ満足すべき結果が得られた. 以上の結果を Table III に示す.

3.3 製剤中の CyCo の定量

製剤の試料としては注射液と錠剤を用い, 吸光光度法による結果と比較した. まず注射液の場合には CyCo 注射液 200 μl ずつを正確に採取し, 精製水および 0.1

Table III Measurements of cobaltous acetate, cyanocobalamin and hydroxocobalamin in various solutions

Samples	Calcd. (ppm)	Found (ppm)	Recovery (%)
CoAc, in H ₂ O	0.816	0.583	71.5
CoAc, in 0.1N HCl	0.826	0.830	100.5
CoAc, in 20% C ₂ H ₅ OH	0.816	0.817	100.1
CyCo, in H ₂ O	0.720	0.415	57.2
CyCo, in 0.1N HCl	0.720	0.710	98.6
CyCo, in 20% C ₂ H ₅ OH	0.675	0.422	62.5
CyCo, in C ₂ H ₅ OH	0.810	0.827	102.1
CyCo, in 0.1N HCl 20% C ₂ H ₅ OH†	0.810	0.791	97.7
HyCo, in C ₂ H ₅ OH	0.772	0.777	100.6
HyCo, in 0.1N HCl 20% C ₂ H ₅ OH†	0.772	0.761	98.5

† C₂H₅OH+0.1N HCl (20:80 v/v)

N 塩酸でそれぞれ全量を 10 ml としたものを測定液とする. 注射液の場合には水, 0.1N 塩酸溶液のいずれも好結果を与えた. したがって単に希釈するだけでじゅうぶんよい値を与え, きわめて簡単に定量が可能であることがわかる.

Table IV Measurements of cyanocobalamin injections

Samples	Calcd.† (ppm)	Found†† (ppm)	Recovery (%)
CyCo, in H ₂ O	0.918	0.950	103.5
CyCo, in 0.1N HCl	"	0.940	102.9

† Spectrophotometric method; †† Atomic absorption spectroscopy

次に錠剤の場合は, CyCo 錠剤 10 錠を精製水に溶解し, 全量を 100 ml としたのについて測定した. その結果を Table V に示す. 吸光光度法より若干低い値が得られ, 特に水溶液は不適当である.

注射液は生理的食塩水の影響をみるため塩化ナトリウムの共存による回収率を測定した. また錠剤は賦形剤の

Table V Measurements of cyanocobalamin tablets

Samples	Calcd.† (ppm)	Found†† (ppm)	Recovery††† (%)
CyCo, in H ₂ O	0.422	0.387	91.8
CyCo, in 0.1N HCl	"	0.425	100.7

† Measured at 361 nm, according to the spectrophotometric method; †† Measured by atomic absorption spectroscopy; ††† Found/Calcd.

影響として乳糖の共存による回収率を測定し、それらの結果を Table VI に示した。塩化ナトリウムは大過剰となるとプラスの効果を示し、乳糖はマイナスの効果を示すが、本製剤においては回収率の増減には影響がない。

Table VI Effect of NaCl and milk sugar upon recovery of cobalt (0.4 ppm), in 0.1N HCl solution

NaCl (g/100 ml)	Recovery (%)	Milk sugar (g/100 ml)	Recovery (%)
0.45	100.0	2.1686	100.0
0.9†	100.0	4.3372††	97.9
1.35	102.3	6.5058	97.7
1.8	105.4	8.6744	97.7
2.7	107.0	13.0116	90.7

† According to the VIII Japanese Pharmacopoeia, NaCl content in physiological saline water is 0.85–0.95%. In order to examine the effect of NaCl upon CyCo injections, recovery of cobalt was measured; †† As to CyCo tablets, effect of additives was examined. The amount of additives nearly corresponds to one tablet.

4 考 察

原子吸光分光光度法による微量医薬品の迅速定量法として金属を含有する医薬品の代表例として CyCo について実験を行なった。測定条件の選定のため、CoGly, CoAc を用いて比較検討した。

水溶液中¹²⁾ではいずれも期待どおりの回収率を与えないが、pH 3.0 以下では回収率もほぼ 100% を与え、CyCo および CyCo 製剤、注射液、錠剤なども好結果を与える。エタノール溶液では、CyCo の場合 20% エタノール溶液では好結果を与えず、100% エタノールでは回収率は 100% を与え、HyCo も同様であった。エタノール 0.1N 塩酸 (2:8, 容量比) ではいずれも好結果を得た。したがって CyCo のように金属錯体中の金属の定量には錯体が水溶性であっても、0.1N 塩酸酸性で行なうのが望ましい。CyCo 製剤の場合、注射液などはそのまま希釈するだけでじゅうぶんよい結果を与え、製剤でも水、エタノールに易溶であるのできわめて

簡単、迅速に測定できる利点を有しており、利用価値がきわめて高いと考える。混酸による分解法によっても、また直接定量法によっても、原子吸光分析法は全コバルト量の測定であるため、非結合コバルト量を区別して測定することは困難であるが、吸光光度法の併用が効果的であることは Diaz も指摘しているとおりである。著者らはこの面の検討を続けているが、CyCo は光線、湿気などを避けて保存すればかなり安定な物質であり、したがってじゅうぶん実用価値のある方法と考え、特に製薬工業における品質管理など純度の検定にはきわめて有効な方法であると考えらる。

本法により生体成分中の微量医薬品の定量を開発してゆく予定である。

(1971 年 4 月, 日本薬学会第 91 年会において一部発表)

文 献

- 1) R. D. Green, A. J. Brrok, R. B. McCormack: *J. Biol. Chem.*, **178**, 999 (1949).
- 2) U. S. P. XVIII, p. 887 (1970).
- 3) H. R. Skeggs, J. W. Hoff, L. D. Wright, D. K. Bosshardt: *J. Biol. Chem.*, **176**, 1459 (1948).
- 4) H. R. Skeggs, H. M. Nepple, J. W. Hoff, L. D. Wright: *ibid.*, **184**, 211 (1950).
- 5) G. O. Rudkin, Jr., R. J. Taylor: *Anal. Chem.*, **24**, 1155 (1952).
- 6) G. E. Boxer, J. C. Richards: *Arch. Biochem.*, **29**, 75 (1950).
- 7) G. E. Boxer, J. C. Richards: *ibid.*, **30**, 372 (1951).
- 8) U. S. P. XVIII, p. 153 (1970).
- 9) H. C. Heinrich: *Z. anal. Chem.*, **135**, 251 (1952).
- 10) 佐藤 彰: 医薬品研究, **1**, 19 (1970).
- 11) D. G. Berge, R. T. Pflaum, D. A. Lehman, C. W. Frank: *Anal. Lett.*, **1**, 613 (1968).
- 12) F. J. Diaz: *Anal. Chim. Acta*, **58**, 455 (1972).

☆

Examination of the measurement conditions in the quantitative determination of cyanocobalamin preparations by atomic absorption spectroscopy. Yoshinori KIDANI*, Katsuhiko TAKEDA** and Hisashi KOIKE* (*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1, Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi; **Nippon Merck Banyu Co., Ltd., 15, Daido-higashi, Kamimutsuna-cho, Okazaki-shi, Aichi)

An attempt was made to develop a rapid quantitative determination method of a micro amount of medicinal drugs by atomic absorption spectroscopy. According to the metal complex formation of medicinal drugs, they may be classified into several groups, and cyanocobalamin, vitamin B₁₂, belongs to the group which contains cobalt, i.e., a drug itself is a metal chelate compound. Therefore, it is very natural to consider that the determination of vitamin B₁₂ can be

achieved by measuring cobalt contents by atomic absorption spectroscopy. A Hitachi Model 207 atomic absorption spectrophotometer, equipped with a premix type burner, using air and acetylene fuels and a hollow-cathode lamp was used throughout the measurements.

In this paper, determination conditions were mainly investigated. For a comparison, α -cobaltic glycinate, synthesized in our laboratory, as well as cobaltous acetate purchased were employed. Both compounds are water soluble and acetate is also alcohol soluble, while cobaltic glycinate being insoluble in alcohol. It is very convenient to measure known compounds simultaneously, for the establishment of the measuring conditions of cyanocobalamin. The operating conditions are as follows: wavelength, 2407 Å; lamp current, 10 mA; slit width, 0.18 mm; burner position, the lowest position; and flow rate of air, 13.0 l/min and of acetylene, 3.0 l/min.

The results show that the recovery of cobaltous acetate and cobaltic glycinate obtained in water solution was unexpectedly low, however, when measurements were made in 0.1 N HCl solution, it gave nearly 100% recovery. Then cyanocobalamin, as well as its preparations, such as injections and tablets, are measured in 0.1 N HCl solution. In alcoholic solution, fuel conditions should be readjusted, depending on the

mixing ratio of the solvents. In 20% C_2H_5OH solution, cyanocobalamin gave low values, while in 100% C_2H_5OH , cyanocobalamin and hydroxocobalamin gave an expected value. In 0.1 N HCl C_2H_5OH solution, it gave also better values.

In conclusion, determination of cyanocobalamin preparations are recommended to be carried out in 0.1 N HCl solution, even when they are water soluble. Alcohol solution is also available for this measurement.

As injections and even tablets are easily soluble in both water and alcohol, they are measured with great ease and therefore, this method is recommended to be employed as a rapid quantitative determination method pharmaceutical industries.

There are many types of structures in medicinal drugs, when classified according to the metal complex formation, and determination of drugs by atomic absorption spectroscopy will be capable of measuring even a micro amount of metals in drugs, when they would form metal complexes.

The authors are attempting to develop this method to the determination of medicinal drugs in biological materials.

(Received Nov. 7, 1972)

臭化セチルピリジニウム共存におけるピロカテコール バイオレットによるニオブの吸光光度定量

中島 良三, 佐々木 昭三, 柴田 正三*

(1972 年 11 月 14 日受理)

ニオブは pH 0.8~1.6 において臭化セチルピリジニウム (CPB) $6.0 \times 10^{-4}M$, ピロカテコールバイオレット (PV) $1.92 \times 10^{-4}M$ において紫色の錯体を生成する。連続変化法で求めた結合比はニオブ:PV=1:4 で, CPB の共存しない場合も同じ値を示した。また, 最大吸収波長は CPB の共存しない場合の値, 575 nm に対してほとんど変化を示さず, 565 nm であって, 見かけのモル吸光係数のみ 5.3×10^4 とほぼ 2 倍に増加する。検量線は 0.2~2.0 $\mu g/ml$ の間で直線性を示し, 呈色は少なくとも 19 時間は安定である。塩化カリウム, 硝酸カリウム, 硫酸ナトリウムなどの共存塩の影響は一律ではなく, それぞれのイオン種により異なる。共存金属イオンの影響についても検討した。

1 緒 言

キシレノールオレンジ, ブロムピロガロールレッドなどトリフェニルメタン系金属指示薬のあるものは, ニオ

ブと強く結合し, EDTA などの補助キレート剤と併用することにより, 妨害金属の少ない吸光光度定量法として有用となり, モル吸光係数も大きい¹⁾²⁾。ピロカテコールバイオレットも主として Babko ら³⁾によりニオブの吸光光度法に利用され, Maltsev らにより, 特殊鋼中のニオブの分析法に 응용されている⁴⁾。またブロムピロ

* 名古屋工業技術試験所: 愛知県名古屋市中区平手町 1