過ヨード酸-チオバルビツール酸法によるストレプトマイシンの比色定量¹⁾

福元久子
九州大学医学部²⁾

Colorimetric Determination of Streptomycin by Periodate-Thiobarbituric Acid Method¹⁾

HISAKO FUKUMOTO
*Department of Legal Medicine, Faculty of
Medicine, Kyushu University²⁾*

(Received August 23, 1976)

For the purpose of establishing a sensitive method for the determination of streptomycin in organic materials, the colorimetric method reported by Duda was investigated and the two main procedures in the original method were modified. With this modified method, 2.5—60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of streptomycin in water was successfully determined and sensitivity of the method was twice that of the original method.

The effect of protein coexisting with streptomycin on the colorimetry was examined. In lower concentration, protein suppressed the color development, and the absorbance in 1.5 mg/ml of albumin solution decreased the most and was as low as 80 % of the control. On the contrary, in higher concentration of more than 6 mg/ml, protein promoted the reaction and the absorbance in 16 mg/ml of albumin solution was as high as 136 % of the control.

Thorough elimination of protein from the sample is therefore necessary to obtain an accurate streptomycin value in organic materials, but the technique is not yet established.

緒 言

ストレプトマイシンの比色定量法としては、坂口反応ほか数種の方法が知られており、製剤中、発酵液中あるいは尿中の定量法としての応用が成書³⁾にも記載されている。しかし、ショック死々体など法医学の分野で対象となる生体試料中の微量のストレプトマイシンの検出および定量の目的にかなった方法はみあたらない。

著者は、Duda⁴⁾の報告したストレプトマイシンの新比色定量法を追試検討し、二、三の改良すべき点を明らかにするとともに、坂口反応の約10倍の感度をもつことを認め、さらに共存する蛋白質が本法の定量値におよぼす影響を検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 試料、試薬および装置 ストレプトマイシン溶

液——硫酸ストレプトマイシン結晶（明治製菓社）を純水に溶解し、濃度は塩基の量で表わした。牛血しょう：食肉市場でのしゃ血々液をヘパリン Na を添加した広口ビンに採取し、その上清を用いた。牛血清アルブミン：bovine albumin fraction V (Sigma 社)を用いた。発色用試薬：Duda の原法にしたがって調製した。装置：島津 UV 200 型分光光度計。

2. 原法の追試 ストレプトマイシン 40—200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液について、Fig. 1 の原法通り操作したところ、Duda の約半分の吸光度しか得られなかった。原著には反応条件について検討した記載がみられず、与えられた条件が至適のものか疑問を感じたので各操作ごとに検討することにした。

3. 反応条件の検討 1) 試料溶液の量——試料

- 1) 第25回日本法医学会九州地方会で発表、大分、1975年10月。
- 2) Location: 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka (福岡市東区馬出 3-1-1)。
- 3) 坂口武一, “医薬品定量分析,” 第1版, 南江堂, 東京, 1959, pp. 138—151。
- 4) E. Duda, *Anal. Chem.*, **51**, 651 (1973)。

original method by Duda→ partial modification by the author
 sample 1.5 ml→ 2.0 ml
 |—0.05 ml of 0.1 M-KIO₄→ 0.1 ml of 0.05 M-KIO₄
 incubate at 37° for 15 min→ 45° for 25 min
 |—0.5 ml of 2% NaAsO₂
 after the disappearance of the brownish color
 |—1 ml of 0.3% thiobarbituric acid
 heat in boiling water for 10 min→ 5 min
 absorbance at 415 mμ→ 412 mμ

Fig. 1. Colorimetric Determination of Streptomycin
by Periodate-Thiobarbituric Acid Method

1.5 ml を用いた場合、最終発色液は 3.05 ml となり、測定セル内の液量が不足するので、試料は 2.0 ml 用いることにした。

2) KIO₄ の量——吸光度が低かった原因として KIO₄ の不足を疑った。ストレプトマイシン 200 μg/ml 溶液に原法の10倍量 (0.1 M KIO₄, 0.5 ml) を加えたところ、次の 2% NaAsO₂ を加えた段階で反応液は濃橙色を呈し、後には黒色沈澱を生じ吸光度の測定を妨害した。この量では試薬ブランクも黒色沈澱を生じた。原法の2倍量 (0.1 ml) では、発色液が白濁し、吸光度に大きなばらつきをもたらした。原法通り 0.05 ml を加えたものでは濁りを生じなかった。以上により、KIO₄ の量は原法通りとする必要を認めた。著者はビペットの都合で、0.05 M-KIO₄ を 0.1 ml 加えることにした。

3) KIO₄ 酸化の温度と時間——ストレプトマイシン 200 μg/ml 溶液を用い、原法 (37°) より低温 (20° 室温) および高温 (50° 水浴中) の条件で 15 分間反応させた。20° では吸光度 0.388, 50° ではオーバースケール、4 倍希釈後 0.897 の高い値となり、原法より高温が必要ながことが認められた。つぎに、ストレプトマイシン 40 μg/ml 溶液を用い、50°, 45° および 40° の各温度における加温時間と吸光度の関係をしらべた。Fig. 2 参照。50° 15 分後が最高の吸光度を示したが、50° 加温の場合には加温時間のずれが吸光度に影響しやすいと考えられる。定量法の条件としてはばらつきが生じにくい 45° 25 分間加温の方が適当と考える。

4) NaAsO₂ の量——KIO₄ の量をかえなかったため、NaAsO₂ の量は原法通りとし、特に検討を加えなかった。

5) チオバルビツール酸との加熱時間——ストレプトマイシン 40 μg/ml 溶液を用い、加熱時間と吸光度の関係を検討した。余熱による誤差を小さくするため、沸とう水浴から取り出した試験管を氷水につけて直ちに冷却

Fig. 2. Relationship between Absorbance and Incubating Time with Potassium Periodate

—●—: at 50° —×—: at 45° —○—: at 40°

した。5 分間ごとに 25 分後まで検討したが、Fig. 3 に示すように、加熱時間は 5 分で十分であり、それ以上加熱すると極小部の吸光度が高くなり、極大部の吸光度はむしろ低下する傾向が認められた。

6) 発色液の安定性——ストレプトマイシン 50 μg/ml 溶液の発色後の試験管を室温 (25°) および冷蔵庫内 (5°) に保存し、発色液の安定性を検討した。その結果、Table I に示すように、室温の場合 2.5 時間後に約 2%, 19 時間後に約 5% の吸光度低下が認められ、冷蔵庫内に保存した場合には 19 時間後 0.4% の低下にすぎず、低温ではかなり安定なことが認められた。

4. 改良法 3. で得られた知見にもとづき、原法の一部を Fig. 1 の右側のように改良した。再現性をよくするには、加温操作時の温度、時間を正確にすること、室温の変化による影響および多数の試験管を同時に操作する際の時間のずれによる影響を小さくするため、加温および加熱終了後の冷却および試薬添加の操作などは、試験管を氷水中で冷却しながら行うことにした。なお、著者の実験では発色液の吸収極大は 412 mμ に認め

TABLE I. Stability of the Reaction Product

Temperature	Time after the Reaction (hr)	Absorbance at 412 m μ (Mean Value $\pm 2\sigma$)	Stability (%)
20°	0	0.750 $\pm$ 0.016	100
	2.5	0.736 $\pm$ 0.014	98.1
	19	0.713 $\pm$ 0.017	95.1
5°	0	0.751 $\pm$ 0.009	100
	19	0.748 $\pm$ 0.009	99.6

Fig. 3. Variations in the Absorption Spectrum of Product by Heating Periodate Reaction Mixtures with Thiobarbituric Acid

heating time
 ———: 5 min - - - - : 15 min ·····: 25 min

られた。

ストレプトマイシン 2.5—60 $\mu\text{g/ml}$ 溶液を用い、本改良法にしたがって 412 m μ の吸光度をもとめ、Fig. 4 に示す検量線が得られた。

5. 蛋白質の影響——ストレプトマイシンならびにその塩は、水に易溶でアルコール、クロロホルムおよびエーテルには、ほとんど不溶³⁾であるため、生体試料中の水溶性の蛋白成分からの分離が困難な薬物である。本法の定量値におよぼす蛋白質の影響について検討した。

1) 牛血しょう混入実験——血しょう成分が 1/10 程度の濃度で存在する場合の影響を検討した。すなわち、ストレプトマイシンを 100—400 $\mu\text{g/ml}$ に混入した牛血しょうを水で 10 倍希釈したものを試料として本法を行った。得られた吸光度は同時に操作したストレプトマイシン水溶液 (control) の吸光度にくらべて異常に高い値で

Fig. 4. Calibration Curve of Streptomycin plotted with Mean Value $\pm 2\sigma$, $n=9$

あった (Fig. 5 参照)。

牛血しょうが、このように測定値に予想以上の影響をおよぼすことが認められたことから、この影響が血しょう中の蛋白質によるものであることを確かめるとともに、保存および濃度の設定などの点で、生の血しょうより便利であることから、つぎに精製された市販の牛血清アルブミンを用いて混入実験を行うことにした。

2) 牛血清アルブミン混入実験——アルブミン 0—16 mg/ml 水溶液 (blank test) およびこれにストレプトマイシンを 40 $\mu\text{g/ml}$ 濃度に添加したものの発色液の吸光度を Fig. 6 に示した。Blank test では、6 mg/ml まではアルブミン濃度の増加とともに吸光度も高くなるが、それ以上の濃度では吸光度はもはや増加せず一定値を示している。アルブミン混入ストレプトマイシン溶液についてみると、アルブミン濃度が比較的低いところでは、control より低い吸光度を示し、アルブミン濃度が 2 mg/ml 以上になると吸光度が増加していく現象が認められる。

つぎにアルブミン濃度の低い部分について、ややこまかく検討してみると、Fig. 7 に示すように、アルブミン 1.5 mg/ml 付近で吸光度がもっとも低くなることが認められた。

アルブミン 1 mg/ml 溶液にストレプトマイシンを添

Fig. 5. Influence of Plasma on the Calibration Curve

Fig. 6. Effect of Albumin on the Absorbance

—●—: 40 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin in albumin sol.
—○—: albumin sol. (blank test)

加した場合, Fig. 8 に示すように, control より低い吸光度を示し, 牛血しょう混入の場合 (Fig. 5) と逆の関係になった。

総 括

Duda の原法を一部改良し, 水溶液中のストレプトマイシンは 2.5—60 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で精度よく定量しうることを認めた. 感度は Duda の原法の約 2 倍に高めることができた. 金沢⁵⁾ は, 坂口反応によるストレプトマイシンの測定は, 50—600 $\mu\text{g/ml}$ の範囲が好ましいと報告しており, これにくらべると本法は約 10 倍の感度をもつといえる。

Fig. 7. Effect of Albumin on the Absorbance

—●—: 40 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin in albumin sol.
—○—: albumin sol. (blank test)

Fig. 8. Influence of Albumin on the Calibration Curve

—●—: streptomycin in albumin sol.
—○—: streptomycin in water

本法を蛋白成分が混在する試料に応用する場合について検討した結果, 蛋白質に発色の阻害および増強という相反した作用のあること, 低濃度では阻害作用が, 高濃度では増強作用が強くあらわれることが認められた. アルブミン濃度 1.5 mg/ml 付近で吸光度の低下が著しく, 対照の 80% にまで低下した. 6 mg/ml で対照とほぼ同じ吸光度になり, それ以上の濃度では対照より高い吸光度を示すようになり, 16 mg/ml では対照の 136% にも達した。

本法を法医学の実際例に応用する際には, 蛋白成分の除去が不十分な試料にはこのような誤差の生ずることを

5) Y. Kanazawa, *J. Antibiotics* (Tokyo), 4, 552 (1951).

考慮し、成績の判定には慎重でなければならない。

蛋白質の分離、除去法については現在検討を行っているが、まだ微量定量の目的にかなった方法を確立するに

至っていない。

謝辞 本研究にあたり、御指導、御校閲を賜った
牧角三郎教授に感謝いたします。