小沢 光, 清本昭夫: イソニコチン酸ヒドラチッドの新比色定量法

Hikaru Ozawa and Akio Kiyomoto: A New Colorimetric Determination of Isonicotinic Acid Hydrazide.

(Tokyo Research Laboratory, Gohei Tanabe & Co., Ltd.,*)

イソニコチン酸ヒドラチッド (I. N. A. H. と略記す) の比色定量法として現在使用されている方法には, dimethylaminobenzaldehyde (Ehrlich 試薬) を用いる方法¹⁾, cyanogen bromide^{2,3)} を用いる方法, 及び sodium nitropurusside と potassium ferricyanide⁴⁾ を用いる方法等が報告されているが, 何れも試薬調製及び保存に難があり, 又過程が煩雑で操作に長時間を要し, ひいては誤差の多くなる場合もある様である. 著者等は上記方法を検討したが, 更に簡便な方法の必要を痛感して本実験を行った. 先ず I. N. A. H. の還元性に着目して, 之を比色定量に利用せんとし, 種々試薬を検索した結果, 燐モリブデン酸の還元によるモリブデン青の呈色が, 比較的安定で, 且つ相当の鋭敏度を有する点にかんがみ, 更にその呈色条件を吟味し, スペクトロフォトメーターによりその呈色が Lambert-Beer の法則に適合する事実を見出した. 本法の利点としては, 1. 試薬の種類が少く, 而も何れも比較的安定で或る程度の保存が可能である. 2. 操作が簡便であり, その為生ずる誤差が少い. 3. 呈色が青色で, 肉眼的に比色し易く, 肉眼的比色 (コンパラトール法, Duboscq 比色法等) にも便利である等が考えられる. 著者等は, 本法を応用して, キルヒナー培地中, 血液 (漿, 清) 中, 及び製剤中の I. N. A. H. の定量法を現在追求中である.

実 験 の 部

試薬 (1) 1 N NaOH 溶液.

(2) 10% 燐モリブデン酸溶液. 燐モリブデン酸 (Merck 製) 10 g を蒸留水 90 g に溶かし, 不溶物を遠心沈澱し, 上澄の黄色液を用う.

(3) 標準 I. N. A. H. 溶液. 10 mg の I. N. A. H. を 100 cc の蒸留水に溶かし, その 10 cc をとつて蒸留水で 100 cc とし, 10 γ /cc の標準液を作る. 更に之を稀釈して, 階段的に 1~9 γ /cc を作る.

操作 検体 (1 cc 中約 1~10 γ 含む) 2 cc に 10% 燐モリブデン酸溶液 0.2 cc を加え, 更に 1 N NaOH 0.2 cc を加う. 呈色は漸次緑から青となり, 試薬添加後約 15~20 分で呈色が安定し, 少くとも 2 時間は安定で測定に不便を来さない. 但し液の pH は 6.5~7 位である事が必要で, 酸性が強いと呈色せず. 又アルカリ性になると退色が速かで測定出来ない. 故に上記の試薬添加は検体の液性に依じて, 適宜 pH がこの範囲内であるように変更する必要がある. かくて生じた青色を肉眼的にはコンパラトール, 或は Duboscq 比色計を用いて標準液

Fig. 1. Absorption Curve of Molybden-blue by Reduction of INAH

Fig. 2. Relationship between Molybden-blue and Optical density. (Standard Line).

* 1-Chome-daita, Setagaya-ku, Tokyo.

1) J. M. Kelly, R. B. Poet: American Review of Tuberculosis 65, 484 (1952).

2) Mueller, A. & Foo, S. H.: J. Am. Pharm. Ass. (Sci. Ed.) 40, 513 (1951).

3) Hoffman La Roche: Rimifon 文献.

4) Chas. Pfizer & Co.: I. N. A. H. 試験規格.

と比較することが出来、(確認限度 $1 \gamma/\text{cc}$, 限界濃度 $1 \gamma/\text{cc}$) 厳密には光电比色計 (フィルター使用) や、スペクトロフォトメーターを用いて測定する。

標準曲線 著者等は、先ずスペクトロフォトメーターを用いて、I. N. A. H. $10 \gamma/\text{cc}$ 溶液の吸収スペクトルを取り、(Fig. 1) その最大吸収が $7200 \text{ \AA}$ なることを確認し、又実際の定量に先立つて標準液につき、Lambert-Beer の法則への適合性をしらべたが、最大吸収 $7200 \text{ \AA}$ では $1 \sim 10 \gamma$ の間で極めてよくこの法則に適合し、濃度と吸光度が直線関係を示した。(Fig. 2)

障害物質 本法において次の物質の存在は比色定量を障害するので適當の前処置を必要とする。

1. Ascorbic acid (Vitamin C) 殆んど同程度の呈色をする。酸性でも発色する点異なる。
2. 尿酸 約 $1/30$ 程度の色調を呈する。
3. Vitamin B_1 約 $1/10$ 程度の色調を呈する。
4. ナオ硫酸ソーダ 約 $1/50$ 程度の色調を呈する。
5. 亜硝酸塩 試薬を加えて直ちに若干青色を帯びるが、徐々に退色し5分間後には無色となるので一定時間後に測定すれば障害とならない。

尚、糖類 (葡萄糖、乳糖等) は還元性物質で本試薬には感じない。

分離法 血清中の I. N. A. H. を定量する場合には上記障害物質が混入する恐れがあり、その除去法としては従来の比色定量法 (1) に用いられた方法を改良して苛性ソーダアルカリ性で $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を用い除蛋白し、イソアミルアルコールとエーテルの混合溶媒で抽出し、之を HCl 酸性の水に転溶せしめて後、前記の操作を用いて定量して所期の目的を達した。但しこの方法によると操作が煩雑化する事になるので、簡便な方法を研究中である。

考 察 (1) 吸収スペクトルによれば、吸収曲線の山は比較的なだらかであるので、フィルターによる光电比色によつても正確な測定が可能である。

(2) 試薬の濃度は種々検討の結果 $1 \sim 10 \gamma/\text{cc}$ 程度の呈色を行う場合には 10% 磷モリブデン酸を検液の $1/10$ 容用うると最も呈色状態がよい様である。

(3) 使用する蒸留水中には完全に酸化性物質不含である事が重要で、古い蒸留水を用いた場合には呈色が弱くなる。

(4) 比色は検液調製後 20~45 分の間に行つたが、その前後に於て同一検体の吸光度 E に $0.001 \sim 0.005$ 程度の差が認められた。

終りに本研究に当り吸光度測定に御助力を賜つた国立東京第一病院鳴谷亮一博士、東京大学薬学科奥井誠一助教授に謝意を表す。

Summary

It was found that, as a colorimetric determination of isonicotinic acid hydrazide, the colorimetry of Molybdane Blue formed by the addition of phosphomolybdic acid, utilizing the reducibility of the hydrazide, gave the simplified and fairly accurate mode of determination, and that this method could be used for the determination of the hydrazide content in blood and in preparations. However, the colorimetry is interfered by the presence of reducing substances such as vitamin C and urea which must be eliminated by preliminary treatment.

(Received July 12, 1952)