356. 山岸正治, 吉田慰子, 藤原 洋: サントニンの比色定量法に関する研究 (第3報)

ナトリウムメチラート法の検討

Masaharu Yamagishi, Toshiko Yoshida, and Hiroshi Fujiwara:

Studies on Colorimetric Determination of Santonin. III.

Discussion of Sodium Methyleate Method.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.*)

前報¹⁾で我々はサントニンのナトリウムメチラートによる呈色反応を利用したサントニンの比色定量法を報告した。本法は他のサントニン定量法にくらべて特異性もあり、かつ簡便なのでその利用価値は大きい。今回我々は推計学的手法を用いて本法を検討し、本法の誤差および誤差に影響を及ぼす要因等について若干の知見を得たので報告する。

比色操作: 無水メタノール溶液としたサントニンの検液 (サントニン含量 1mg/cc 以下) 1 cc を共栓試験管にとり、約 10% のナトリウムメチラート溶液 2 cc を加え、常温に時々ふりまぜながら 20 分間放置する。ことに得た赤色の呈色液に無水メタノール 2 cc を加えてうすめ、更に 20 分間放置した後 Beckman Spectrophotometer Model B を用いて $\lambda=500\text{ m}\mu$ の単色光の吸光係数 (盲算除去値) A' を測定する。1 mg/cc の標準サントニン溶液について同時に同様に操作して得た吸光係数 A から検液中のサントニン量 $X=1000 A'/A \gamma$ を求める。但しナトリウムメチラート溶液の発色能力次第で標準溶液として 500 γ /cc のものを用い、500 γ 以下のサントニンを対照とすることができる。

本法は結局サントニン量を横軸、吸光係数を縦軸とした座標において標準サントニン溶液 1 cc 中のサントニン量に対応する吸光係数の数値を座標原点と結んで得たサントニン量—吸光係数の関係を表わす直線 (検量線と略称する) を基準として未知のサントニン量を測定することになるから、この検量線をサントニン量—吸光係数の回帰とみなし得るか、否かが根本問題であつて、我々はこの問題を中心として実験を進めた。但し現在我々が行っている比色操作は 10~500 γ のサントニンを対象とし、標準サントニン溶液は 500 γ /cc のものを用いているのでこれに合致するように実験を行つた。

実験の結果我々の検量線はサントニン量—吸光係数の回帰とみなして差支えないことが判り、また実験毎に検量線を作成することの妥当性を証明した。同一サントニン量に対する吸光係数の変動係数 (誤差) は 1% 以下、回帰からの誤差 $Sy.x/\bar{y}$ は 5% であつて、これ等の誤差に変動を与える要因としては試薬ナトリウムメチラートの不均一、空気湿度が主なものであつた。

本研究に当り終始御鞭撻を賜つた研究所長桑田 智博士に謹謝し、推計学的手法に関し種々御指示を戴いた門川清美氏に深謝する。

実 験 の 部

1) 同一サントニン量に対する吸光係数の変動ならびにその要因: 500 γ /cc のサントニン溶液 1 cc を sample とし sample 5 個ずつを 1 組とした 2 組について常法によつて製したナトリウムメチラート溶液 (汙過しない) を用いて上述の発色操作を行い、吸光係数を測定した (Table I)。この場合吸光係数の変動係数 C は約 5% であつた。

次に使用に先立ち汙過したナトリウムメチラート溶液を用いた結果を Table II に示したが、この場合 C は 0.88% で吸光係数のバラツキは僅少のものとなる。これはナトリウムメチラート溶液の不均一性が変動の主な要因であることを示し、汙過して澄明な溶液とするだけで発色操作による誤差は僅少となる。我々はこの僅少な誤差は発色操作上止むを得ぬ誤差とみなしてそれ以上の追及はしなかつた。

2) サントニン量に対する吸光係数の回帰: 10~500 γ /cc のサントニンメタノール溶液 1 cc に対して前述の変動要因に注意して発色操作を行い、サントニン吸光係数の関係を表わす回帰直線およびその信頼限界を求め

* Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) 山岸, 吉田: 本誌 73, 875 (1953).

Table I

	0.81	0.81
	0.83	0.87
	0.81	0.78
	0.81	0.74
	0.74	0.80
$\bar{x}$	0.80	0.80
$S(X-\bar{x})^2$	0.0048	0.0090
s	0.034	0.047
C	4.25%	5.97%
C 平均値	5.11%	

Table II

標本 14

	0.915	
	0.915	0.910
	0.922	0.908
	0.910	0.922
	0.918	0.891
	0.915	0.905
	0.920	0.915
		0.911
$\bar{x}$		0.9126
$S(X-\bar{x})^2$		0.00084424
s		0.00806
C		0.88%

Table III

X	Y	$\hat{Y}$	$s\hat{Y}$	$l_1 \sim l_2$
10	0.018	0.0238	0.004153	0.03438 0.01422
25	0.042	0.0499	0.003968	0.05905 0.03975
50	0.092	0.0934	0.003658	0.09555 0.09125
100	0.185	0.1804	0.003129	0.18762 0.17317
150	0.270	0.2674	0.002771	0.27148 0.263316
200	0.360	0.3544	0.002651	0.36051 0.34828
250	0.450	0.4474	0.002668	0.45355 0.44125
300	0.531	0.5284	0.003163	0.535694 0.52110
400	0.710	0.7024	0.004329	0.71238 0.692418
500	0.860	0.8724	0.005764	0.885692 0.859108
$\bar{x}=198.5$		$\hat{Y}=0.00174 X+0.0064$	$\frac{sy \cdot x}{\bar{y}} = \frac{0.00839}{0.3518} = 0.00242$	
$\bar{y}=0.3518$		$l = \hat{Y} \pm t_{0.05} s\hat{Y}$		
		$s\hat{Y} = sy \cdot x \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{Sx^2}}$	$sy \cdot x = \sqrt{\frac{Sy^2 - (Sxy)^2}{Sx^2}}$	
			$n-2$	

Table III (サントニン量, 吸光係数をそれぞれ X, Y で表わす) および Fig. 1 に示すような結果を得た。

さて回帰直線 $Y = \alpha + \beta X$ において $\alpha = 0$ の帰無仮説を検定することによつてこの回帰直線が原点を通るか、否かが検定できる。

Table III の回帰方程式 $\hat{Y} = 0.00174 X + 0.0064$ において $sy \cdot x = 0.00839$ であるから

$X = 0$ においては

$$\begin{aligned} s\hat{Y} &= 0.00839 \times \sqrt{\frac{1}{10} + \frac{(198.5)^2}{244202}} \\ &= 0.00839 \times 0.5112 \\ &= 0.004289 \end{aligned}$$

従つて

$$t = \frac{0.0064 - 0}{0.004289} = 1.49$$

$$[t_{0.05} = 2.306 (df = 8)]$$

この結果から本回帰方程式の 0.0064 と 0 とは何等有意差はなく, この回帰直線は原点を通ると見なして差支えない。即ち原点を通る我々の検量線はサントニン量—吸光係数の回帰直線と見て差支えない。

Fig. 1

3) 回帰直線の性格: ナトリウムメチラート溶液は製造後日を経るに従い効力を減ずるから経日数の異なるナトリウムメチラート溶液による回帰には有意差が当然予想される。一方用いるナトリウムメチラート溶液によつて回帰は異なつてもその分散は常に一樣であることを我々は期待する。これ等を検討するため次のような実験を行つた。

ナトリウムメチラート溶液が製造後 0, 2, 5, 6, 7, 8 日を経過した時に前と同様の操作を行つてそれぞれ

の回帰を求め, 相関分析を試みた. Table IVは各組 (組番号は前記経過日数の異なるナトリウムメチラート溶液に対する実験群を順次 1, 2, 3, ……として表わした) の回帰, Table V はその相関データである. Table V において 3, 4 組の分散が異常に大きいのは雨天の日に行つたものであつて, この結果は本定量法の誤差が空気の湿度によつて増大することを示唆する. 我々はそこで 3, 4 組を除いた他の 4 組について分散が一様であることを確かめた後, 相関分析を行つた (Table VI). 即ち各組の回帰係数は各組内からの偏差の平均値に比べて有意であり, ナトリウムメチラート溶液の変化によつて回帰係数を変化することが明らかである. 我々の定量法で定量

Table IV

1		2		3		4		5		6	
$\bar{X}$	$\bar{Y}$	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	$\bar{X}$	$\bar{Y}$
100	0.262	100	0.241	100	0.230	100	0.250	50	0.112	50	0.108
200	0.495	200	0.478	200	0.438	200	0.480	100	0.225	100	0.213
300	0.721	300	0.674	300	0.640	300	0.700	200	0.422	200	0.400
400	0.930	400	0.890	400	0.830	400	0.898	300	0.624	300	0.585
500	1.115	500	1.090	500	0.970	500	1.080	500	0.970	500	0.940

Table V

組番号	自由度	Sx^2	Sxy	Sy^2	回帰係数	推定の誤差	
						df	平方和
1	4	100000	214.10	0.4592	0.002141	3	0.0008
2	"	"	222.00	0.4943	0.00222	"	0.0015
3	"	"	152.36	0.3522	0.001524	"	0.12006
4	"	"	168.00	0.4328	0.001680	"	0.1506
5	"	128000	243.51	0.4642	0.001902	"	0.0009
6	"	"	235.62	0.4340	0.00184	"	0.0003
	24	656000	1235.59	2.6367	0.001884	18	0.27416

Table VI

変 動 因	自由度	推 定 の 誤 差	
		平方和	平均平方
組内平均 (誤差) の回帰からの偏差	15	0.0248	
個々の組ごとの回帰からの偏差	12	0.0025	0.0002
組ごとの回帰の間の差	3	0.0223	0.0074**

$$F = \frac{0.0074}{0.0002} = 37$$

$$(F_{21}^3 = 5.95)_{0.01}$$

毎に標準試料について吸光係数を求めることの妥当性がここに証明された。

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

The colorimetric determination of santonin, using sodium methoxide solution, was examined by the stochastic means. The largest factor that gives variation in error was found to be the heterogeneity of the sodium methoxide solution. It seemed that the atmospheric moisture also affects this variation that it seemed inadvisable to carry out this determination on a rainy day.

(Received August 19, 1954)