thereby found that, in the amine-water-alkali hydroxide system, the mutual solubility decreases with the increase of temperature at the same composition, while the concentration of the amine in the upper layer increases with the increasing concentration of the alkali hydroxide in the lower layer, at a definite temperature. In other words, the concentration of the amine coexistent with alkali hydroxide solution increases with the increasingly high temperatures. Comparison of the dehydration effect of sodium and potassium hydroxides against the amine showed that sodium hydroxide possessed larger effect at a low temperatures while potassium hydroxide was better at higher temperatures. By the utilization of these properties, the best method for the dehydration of the amine or its isolation from an aqueous solution can easily be obtained.

(Received October 20, 1954)

51. 掛見喜一郎, 有田隆一: 抗菌性物質の化学的定量法 (第1報)

ジヒドロストレプトマイシンの比色定量法

Kiichiro Kakemi and Takaichi Arita: Chemical Methods for the Determination of Antibiotics. I. Colorimetric Determination of Dihydrostreptomycin.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto*)

ジヒドロストレプトマイシンの比色定量法としては既に多くの報告がなされている。即ちグルコサミンに対する Elson-Morgan の反応を利用した方法¹⁾, 過ヨード酸により酸化しフォルムアルデヒドを生ぜしめて定量する方法²⁾ 或いはグアニジル基の呈色を利用した方法, 即ち坂口氏反応による方法³⁾, ジアセチルを用いる方法⁴⁾, 及びニトロプルシッドナトリウムと赤血塩による方法⁵⁾ 等がある。

我々はナトリウムペンタシアノアンミンフェロアート及び赤血塩によりストレプトマイシン, ジヒドロストレプトマイシンが鋭敏に赤橙色を呈し, 且つその呈色度は濃度に比例する事を知り, この呈色を利用してジヒドロストレプトマイシンの比色定量を行つた。本定量の基準物質としては常用標準ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩 730 u/mg を用いて検量曲線を作製し, 微生物学的方法による力価と本法による力価とを比較してそのよく一致する事を知り, 更に市販のジヒドロストレプトマイシンの力価を測定した。

本試薬は一般にグアニジル基を有する化合物, 例えばスルファグアニジン, アルギニン等にも同様に鋭敏に呈色するのでこれ等の比色分析に利用する事が出来る。

本研究に際して終始御指導を戴いた京都大学薬学科宇野助教授に厚く謝意を表する。

実 験 の 部

試薬及び比色計 1) 0.05 M ナトリウムペンタシアノアンミンフェロアート溶液. 2) 0.025 M 赤血塩溶液. 3) pH 9.5 クラークラブス緩衝液. 4) 精製アセトン. 5) 比色計, AKA 光電管比色計. フィルター S 50. Cell 1 cm.

定量法 試料溶液 1 cc に pH 9.5 緩衝液 1 cc を加え, 更に 0.05 M ナトリウムペンタシアノアンミンフェロアート溶液及び 0.025 M 赤血塩溶液各 0.1 cc を加えて軽くふりまぜ直ちにアセトン 2 cc を加えて充分によ

* Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) Scudi Boxer: Science **104**, 486 (1946).

2) Aubrey Vail: Anal. Chem. **24**, 975 (1952). 3) 金沢: J. Antibiotics (Japan) **4**, 552 (1951).

4) Halliday: Nature **169**, 335 (1952). 5) Monastero: J. Am. Pharm. Assoc. **42**, 332 (1952).

くふりまぜ 7 分以内にその吸光度を測定する。一方別に試料の代りに蒸留水を用いて同様に操作してその吸光度を求め、これをブランクとして先に求めた値から差引き、その差をジヒドロストレプトマイシンによる吸光度とする。これを予め作製した検量曲線によりその対応力価を求めるか、或いはその吸光度に 67.47 を乗じてジヒドロストレプトマイシンの力価を計算する。

検量曲線の作製 検量曲線を作製するために常用標準ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩 730 u/mg を用いて 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 mg% 力価の溶液を作り上記定量法により呈色せしめてその吸光度を測定した所、吸光度は力価に比例して増大し、その吸光度と力価との関係は直線関係を示し、Beer の法則に従う事を知った。この測定値よりジヒドロストレプトマイシンの力価は吸光度 $\times 67.47$ で表わされる。

Fig. 1

Table I

mg (u) %	$-\log T$	mg (u) % / $-\log T$
15	0.223	67.26
20	0.295	67.79
25	0.373	67.38
		67.47

微生物学的方法と本法による力価との比較 微生物学的方法による力価既知のジヒドロストレプトマイシンを本法によりその力価を求め比較を行つた所 Table II に示す様にその力価はよく一致する事を知った。

市販品の力価の測定 市販ジヒドロストレプトマイシンの容器内の全量の重量を秤り、次にこの中の 50 mg を秤取し、これを蒸留水に溶解して 20 mg% の溶液を作り、定量法に従つて測定し、これより 1 mg% の力価及び全内容の力価を求めた。又直接容器内のジヒドロストレプトマイシンの総力価を求めるには、その内容を約 20 mg% 力価になるように溶解し、これを定量法に従つて測定して全内容の力価を求めた。なおこの測定に用いたものは何れも 1 g 力価表示のものである。この測定結果は Table III に示す。

Table II

Sample	Microbiological method	This chemical method
1	765 u/mg	762 u/mg
2	748	759
3	745	746
4	735	739

Table III

Sample	Weight of whole contents	$-\log T$	Potency of 1 mg (weight)	Gram units of whole contents
A	1.3667 g	0.226	762	1.038
B	1.3148	0.233	786	1.025
C	1.3174	0.214	721	0.948
D	全量を溶解し、表示力価より換算して 20 mg% 力価となし定量した結果			0.990

検 討 1) 試薬について: ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンはナトリウムペンタシアンオキシニフェロアートのみでも呈色するが余り鋭敏ではない。これに赤血塩を加えると呈色の鋭敏度は上昇するが呈色が不安定なためそのままでは比色分析に利用する事は困難である。しかしこれに液量と同量のアセトンを加えるとその安定性は高められ、又その呈色の鋭敏度もはるかに大となる。又試薬の量はジヒドロストレプトマイシンに対して過剰量が必要とされるが、大過剰は呈色を不安定ならしめるので避けねばならない。

2) 水素イオン濃度と呈色の関係: 本試薬はアルカリ性で呈色するのであるが、その呈色度は溶液の pH により異つてゐる。我々は緩衝液を用いて各 pH における呈色度を検した結果、pH が大となるに従つて呈色度は大となるが pH が 10 以上となると呈色が不安定となり測定が困難なので pH 9.5 で測定を行つた。

3) 色の安定性について: この呈色は pH 9.5 以下の場合には比較的安定である。呈色後 8 分頃よりやや褐色が認められるが、その減少度は僅かであり、10 分後においても測定誤差程度であるが出来得る限り 7 分以内に測定することが望ましい。

Summary

It has been found that streptomycin and dihydrostreptomycin form sensitive orange red color with sodium pentacyanoamminferroate and potassium ferricyanide, on the addition of acetone, and that the relationship between the optical density of this coloration and the concentration of the streptomycin followed the Beer's law. This coloration was utilized in the colorimetric determination of dihydrostreptomycin. The determination was carried out with the ordinary dihydrostreptomycin sulfate as the standard. The potency obtained by this method and that from microbiological assay were found to agree. Potency determinations were carried out on the market products of dihydrostreptomycin.

(Received October 22, 1954)

52. 掛見喜一郎, 宇野豊三, 鮫島政義: 抗菌性物質の化学的定量法 (第2報)

オキシテトラサイクリンの比色定量法

Kiichiro Kakemi, Toyozo Uno, and Masayoshi Samejima: Chemical Methods for the Determination of Antibiotics. II. Colorimetric Determination of Oxytetracycline.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

オキシテトラサイクリンの定量法としては生物学的定量法の外, 化学的定量法としては塩化鉄法¹⁾, 紫外外部吸収スペクトル法²⁾, アルカリ分解法³⁾等が報告され, 現在これ等の化学的定量法が簡易定量法として用いられているが, 塩化鉄法は余りにも選択性に乏しく, 現在では紫外外部吸収スペクトル法がより良好な方法であると考えられている. 我々はオキシテトラサイクリン溶液にモリブデン酸アンモンを加え水浴中 60°, 15 分加温するときは紅赤色を呈する反応を見出し, この反応を利用してオキシテトラサイクリンの定量を行つた.

オキシテトラサイクリンのモリブデン酸アンモンによる呈色物は Fig. 1 に示す如く 500 m μ で最大吸収を有し, その吸光度は濃度に比例し, また 630 m μ 附近から長波長側では吸収はほとんどなくなつてゐる. この呈色反応を利用してオキシテトラサイクリンの定量を行つた.

溶液中に混在するオキシテトラサイクリンの分解物の影響を調べるためにオキシテトラサイクリンのアルカリ分解物溶液を作成し, このものをモリブデン酸アンモンで呈色させた後, 酢酸エチル・エーテル混液で抽出し残液の吸収を調べた結果 500 m μ に於ける吸収と 660 m μ に於ける吸収が Fig. 1 c 線に示す如く相等しいことが明らかとなつた. また 660 m μ に於いてはオキシテトラサイクリンの吸収は殆んど 0 と考えてよいから, オキシテトラサイクリン溶液にアルカリ分解物が混在する場合にはモリブデン酸アンモンで呈色後, 酢酸エチルとエーテルの同容混液で抽出し, 残液を 500 m μ 並びに 660 m μ で吸光度を測定しその差をとればオキシテトラサイクリンのみによる吸光度が求められる. なおこの方法をオキシテトラサイクリン塩酸塩水溶液を室温に放置して一部分解させたものについて試みた結果と, 同溶液を紫外外部吸収スペクトル法で定量した結果とはよく一致し, 従つて本法はアルカリ分解物が混在する場合ばかりでなく塩酸塩溶液を自然に放置する間に生ずる分解物を混在する場合にも適用し得られることが明らかとなつた.

実 験 の 部

I) 比色定量法 検体オキシテトラサイクリン塩酸塩の 500 γ /cc の溶液を作り, その 2 cc を正確にとり, これに pH 4 の酢酸塩緩衝液 30 cc を加え, 次いで 1%モリブデン酸アンモン溶液 1 cc を加え 60° の水浴中