202. 増田 亨, 澤 陽一, 浅井満子, 桑田 智: クロマトグラフィーの応用 (第26報)

FAD 水溶液の安定度

Toru Masuda, Yoichi Sawa, Mitsuko Asai, and Satoru Kuwada: Application of Chromatography. XXVI*. Stability of Aqueous Solution of FAD.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

周知のようにリボフラビン (B_2) の水溶液は光線に対して不安定, ことに温度が高いほど不安定性を増し, またアルカリに弱いといわれている. FAD も B_2 の誘導体であるから同じようなことが考えられる. 従つて本品が液性を異にする時どの程度の加熱にたえ, 光線の影響を受けるかをしらべておくことは有意義なことである.

著者らは pH 3.0, 7.0, 9.0 をもつ Theorell 緩衝液 1 cc に FAD 約 6 mg を含む溶液をつくり, 無色のアンプルに封入後 100° の水浴中に 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 時間加熱した. 室温で冷却後アンプルの内容 0.025 cc を 5×40 cm の沓紙片の原線上に塗布し, 暗室中ブタノール・ピリジン・水 (4:3:7) で展開し, 暗所で乾かしたクロマトグラムを紫外線下で観察した. この試験で FAD の分解は pH 7.0 の場合最も少く, 5 時間加熱後もそのクロマトグラムには FAD のほかに FMN の黄色蛍光像が極めてかすかに認められたに過ぎない. pH 3.0 のときは加熱の時間が短かければ FAD, FMN, 5 時間の長きに及ぶときはその他に AMP の光線吸収像が現われる. pH 9.0 の場合には加熱 3 時間で FAD, FMN, AMP の分別帯が認められ, 5 時間では AMP の像がよいよ著明となり分解の進行したことがよくうかがわれる.

著者らは残存 FAD を定量するためあらかじめ上記の分解物を除去する目的で, 紫外線下で観察した FAD の部分をクロマトグラムから切り取り, エーテルで洗つた後試験管に入れ, pH 7.0 のリン酸緩衝液 5 cc とともに時々ふりまぜながら室温で約 30 分間抽出し, 抽出液を Beckman 光電比色計により 450 mμ における E 吸光度を測定し, これを $\varepsilon \times 10^{-3}$ の値に換算し純 FAD の $\varepsilon \times 10^{-3} = 11.3$ を用いて FAD の量を算出した. なおこの程度の試料一定量を沓紙に塗布し, 同一条件でリン酸緩衝液による抽出を行い, 沓紙のみによる盲検値を控除して FAD の回収率を求めたが, ほぼ完全に回収されることを確かめた. ただしこのような簡易定量法が実施できるのは, 試料溶液中 FAD の濃度が高いからであることはいうまでもない.

Table I は本実験の成績をまとめたもので pH と加熱時間の条件, 加熱後の溶液の E 450 mμ の値, それから計算した 1 アンプル中の FAD mg/cc を示した. 残存率としては加熱しないものの定量値を 100 とし, 各種の処理をしたものの値をこれに対する比率で表わした.

次に FAD を pH 7.0 の Theorell 緩衝液に溶かして約 7 mg/cc の溶液をつくり, 無色のアンプルに封入後 100 W の白色電球で 30 cm の距離から照射した後そのクロマトグラムをつくつたが, FAD 以外の像はほとんど

Table I

pH of the buffer solution	Hour of heating at 100°C	E 450 mμ	FAD Content in the test solution γ/cc.	FAD Content in 1 ampule, mg./cc.	Percentage of the residual FAD
3	0	0.417	29.1	5.82	100
	1	0.374	26.0	5.20	90
	2	0.362	25.2	5.04	86.5
	3	0.347	24.1	4.82	83
	4	0.342	23.7	4.74	81.5
	5	0.332	23.0	4.60	79.0
7	0	0.427	30.0	6.00	100
	1	0.409	28.6	5.72	95
	2	0.400	28.0	5.60	93
	3	0.380	26.6	5.32	88.7
	5	0.369	25.8	5.16	86.0
9	0	0.395	27.5	5.50	100
	1	0.340	23.6	4.72	85.8
	2	0.325	22.0	4.40	80.0
	3	0.277	18.6	3.72	67.5
	4	0.263	17.6	3.52	64.0
	5	0.250	16.7	3.34	60.7

認められず, これを抽出して定量したところ FAD はほぼ完全に残存していることがわかった. そこで上記のサンプルを 10 月の太陽光線にあて, 4 および 8 時間後その内容をペーパー上に展開したところ, いずれの場合にも FAD のほかに FMN, リボフラビン, AMP, ルミフラビンおよび性状不明の青色螢光像 [ブタノール・酢酸・水 (4:1:5) で展開したときの Rf 0.18] が検出された. しかし FAD の残存率は意外に高く Table II の成績を示した.

Table II

Hour of illumination	FAD Content in 1 ampule mg./cc.	Percentage of the residual FAD, %
0	7.4	100
4	6.6	89
8	6.5	88

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

To examine the stability of FAD solution, FAD was dissolved in Theorell buffer solution (pH 3.0~9.0) and heated at 100° for 1~5 hrs. in fused, colorless ampules. The solution was then developed on paper with butanol:pyridine:water (4:3:7) and the chromatogram was observed under a ultraviolet light to detect the band of FAD. The band was cut out and eluted with phosphate buffer and from the absorption value at 450 m μ of the eluate, the residual percentage of FAD was estimated. The residual percentage was 95% immediately after one hour's heating at 100° (pH 7.0). When the same solution in ampules is illuminated with 100-W. electric lamp from a distance of 30 cm. for 5 hrs., there was observed no change in the quantity of FAD. When the solution was exposed to the October sunlight for 4 or 8 hrs., paper chromatography of the solution in both cases showed the bands of FMN, riboflavin, AMP, and lumiflavin, besides that of FAD, but the residual percentage of FAD was as high as 88% even after 8-hr. exposure, contrary to expectations.

(Received April 8, 1955)