U.D.C. 615.779.931-034:541.183.5

47. 坂口武一, 花木 昭: テトラサイクリン誘導体の金属キレート化合物 (第 4 報)

陽イオン交換樹脂並びに硼酸錯塩法による尿中のクロルテトラサイクリンの定量

Takeichi Sakaguchi and Akira Hanaki: Metal Chelate Compounds of Tetracycline Derivatives. IV. Colorimetric Determination of Aureomycin in Urine by Borate Complex Procedure using Cation Exchange Resin.

(Pharmaceutical Faculty, University of Chiba*)

A possible use of ion exchange resins for isolation of Aureomycin in urine was investigated. It was found that Aureomycin and components of urine were retained on strong cation exchangers, Amberlite IR-112, but it seemed possible to remove urine materials by the following procedures. Aureomycin can be eluted with 1N HCl-EtOH solution (8%) while the use of 1.5N AcOH-EtOH or 0.2N HCl-EtOH eluates the components of urine alone, not Aureomycin. A colorimetric determination of Aureomycin present in the eluate involves reaction of this antibiotic with boric and sulfuric acid mixtures, as previously described.

(Received October 20, 1955)

クロルテトラサイクリンの血液及び尿中の分離定量には、合成 zeolite (decalso) を使用して螢光分析する方法が提出せられているが¹⁾、著者等はイオン交換樹脂を用いて前報²⁾の硼酸錯塩法によつて比色定量する法を企て所期の結果を得た。

本法はクロルテトラサイクリンの dimethylamino 基が塩基性を呈することよりこの基によつてクロルテトラサイクリンを強酸性陽イオン交換樹脂に捕捉して尿成分と分離することに基づく。この目的に適する樹脂として Amberlite IR-112 はを使用した。

1. クロルテトラサイクリン塩酸塩水溶液の Amberlite IR-112 に対する吸着溶離特性 実験の部のごとく精製した樹脂柱 (約 7 cc) に 807 γ /cc のクロルテトラサイクリン塩酸塩水溶液 2 cc を加え、更に蒸留水を加えて希釈しながら 1~2 cc/min[†] の速度で洗滌し、吸着を完成せしめる。次に 1.5N 酢酸-エタノールで樹脂柱を洗滌し、最後に N 塩酸-80% エタノールを用いて 1~2 cc/min の速度で溶離せしめる。この場合使用する溶離液は反応を促進させるため予め 40~50° に加温しておく。

実験結果は Fig. 1 のごとくである。Fig. 1 は 10 cc づつのフラクションを順次とり、水溶上で乾固し実験の

Fig. 1.

Elution Curve of Chlorotetracycline (CT)*: 1516 γ (807 γ /cc. solution 2 cc.)
Resin: Amberlite IR-112 H-type
Flow Rate: 1 cc./min.
* Chlorotetracycline concn.

* Inohana-cho, Chiba.

1) Saltzman: J. Lab. Clin. Med. **35**, 123 (1950).2) T. Sakaguchi: Pharm. Bull. (Japan) **3**, 170 (1955).

† 単位断面積につき。

Table I. Elution of Chlorotetracycline (%)

Volume of effluent	50 cc.	100cc.	150 cc.
Concn. of HCl (N)	(%)	(%)	(%)
1.0	80.6	97.4	—
0.5	51.6	89.9	97.8
0.3	12.8	59.0	86.0
0.25	4.7	37.9	71.5
0.2	0	17.6	50.4

部の硼酸錯塩の呈色反応を行い, 濃硫酸で全量を 10 cc とし 530 m μ で吸光度を測定した時のクロルテトラサイクリン水溶液の溶離曲線である. Fig. 1 によれば 1.5 N 酢酸-エタノールで多少の吸光度が認められるがこれは不純物によるもので N 塩酸-エタノールによつて樹脂に吸着されたクロルテトラサイクリンの溶離が完了する.

2. クロルテトラサイクリンの分別溶離曲線 上記のごとく洗滌した樹脂柱 8 cc に 608 γ /cc クロルテトラサイクリン塩酸塩水溶液 2 cc を吸着させ, 50 cc の蒸留水及び 1.5 N 酢酸-エタノールで洗滌する. 次に 1.0 N, 0.5 N, 0.3 N, 0.25 N, 0.2 N の各塩酸-エタノールで溶離させる. 溶離液は予め 40~50° に加温し 1 cc/min の速度で加える. 流出液を 10 cc づつ分取し水浴上で蒸発し硼酸錯塩法によつて 530 m μ で吸光度を測定する. この場合の分別溶離曲線は Fig. 2 のごとくである. またその溶離率を Table I に示す. なおこの際流出したクロルテトラサイクリンの純度を検定するために 510, 530, 550 m μ の 3 点で吸光度を測定し吸光度比を算出した (Table II).

Fig. 2. Integral Elution Curves at Varying Elutriants
(CT) = 608 γ . Resin : Amberlite IR-112 H-type 8 cc. Flow Rate : 1 cc./min.
Elutriants A : 1.0 N HCl-EtOH B : 0.5 N HCl-EtOH C : 0.3 N HCl-EtOH
D : 0.25 N HCl-EtOH E : 0.2 N HCl-EtOH

Table II. Absorbance Ratio*

Concn. of HCl (N)	530/530		510/550	
	max. (%)	min. (%)	max. (%)	min. (%)
1.0	1.11	1.07	1.02	0.979
0.5	"	"	"	0.981
0.3	"	1.08	0.25	"
0.25	"	"	1.01	0.983
0.2	"	"	"	0.980

* Value obtained from each fraction of 100 cc. effluent.

これ等の実験からクロルテトラサイクリンを吸着分離するために最も適当な溶離液は N 塩酸-エタノールである. すなわち N 塩酸-エタノールで溶離した場合には流出液 100 cc を捕取すれば殆んど完全に溶離が行われている (Fig. 2). 従つて尿中に存在するクロルテトラサイクリンを分離し更に再取するためには N 塩酸-エタノールで樹脂柱を洗滌すれば良い. 溶離されたクロルテトラサイクリンは吸光度比から推して純粋であることが考察せられる.

一方 0.25 N 塩酸-エタノールを使用した場合には流出液 40 cc より, 0.2 N 塩酸-エタノールを使用した場合には 70 cc よりクロルテトラサイクリンが流出しはじめる. 従つて樹脂柱に吸着された尿色素を選択的に除去し

ようにするためには 0.25 *N* 塩酸-エタノールでは 30 cc, 0.2 *N* 塩酸-エタノールでは 60 cc 以内を溶離液として使用すれば安全である。

3. 尿の Amberlite IR-112 による吸着溶離特性 上記のごとく処理した H 型 Amberlite IR-112 約 6 cc(樹脂柱)に尿 100 cc を加えて吸着させ、加温蒸留水で洗滌後、0.5 *N* 塩酸で吸着無機陽イオンを溶離させ再び蒸留水で洗滌する。然る後 1.5 *N* 酢酸-エタノール, 0.2 *N* 塩酸-エタノール, 及び *N* 塩酸-エタノールで 1.5~2 cc/min の速度で溶離し、各フラクション 10 cc を取り、硼酸錯塩法で前法のごとく吸光度を測定し Fig. 3 の溶離曲線を作成した。Fig. 3 より 0.2 *N* 塩酸-エタノール 30 cc によつて尿中の色素成分が充分溶離されることが知れる。

Fig. 3. Stepwise Elution Curve of Urinary Solution
Sample: Urinary solution 100 cc.
Resin: Amberlite IR-112 H-type 6 cc.
Flow Rate: 1.5~2.0 cc./min.

4. 尿中のクロルテトラサイクリンの定量 尿中のクロルテトラサイクリンは H 型 Amberlite IR-112 で定量的に捕捉することができる。この際尿色素成分が吸着を阻害することがあるが、流出速度を遅くすれば無視し得る。なお吸着性の異なる尿色素成分が存在するから溶離は分別的に行うことが必要である。実験は次のごとく行う。

一定量のクロルテトラサイクリン標準液に尿を加えて全量を 50 cc とする。全量が 50 cc に達しない場合には蒸留水を加えて 50 cc にする。この場合の尿の量は 25 cc 以上がなくてはならない。

断面積 1 cm² のガラス柱に充した約 10 cc の Amberlite IR-112** に 1 cc/min の速度でクロルテトラサイクリン含有尿を加える。次に 40° に加温した蒸留水 100 cc, 0.3 *N* 塩酸 30 cc 及び更に蒸留水 30 cc で樹脂柱を洗滌する。更に 1.5 *N* 酢酸-エタノール 30 cc 及び 0.2 *N* 塩酸-エタノール 20 cc で順次樹脂に吸着された尿色素成分を可及的に除去する。最後に *N* 塩酸-エタノールで 1 cc/min の速度でクロルテトラサイクリンを溶離する。流出液 100 cc をメスフラスコに捕集しその 10 cc を水浴上で蒸発し硼酸錯塩法によつて比色定量する (Table III)。各実験値の吸光度比は何れも純粋なものと殆んど差がなかったことより分離は殆んど完全に行われていることが考察される。

Table III.

Chlorotetracycline (γ)	Volume of urinary solution (cc.)	Volume of distilled water (cc.)	Absorbance	Recovery (%)
2430	50	0	0.499	88.5
"	"	0	0.494	87.6
992	40	10	0.230	99.9
1980	30	20	0.443	96.5

1980 γ クロルテトラサイクリン塩酸塩を 30 cc の尿に添加した検液に就いてのクロルテトラサイクリンの溶離曲線は Fig. 4 のごとくになる。

5. 実験結果の考察 クロルテトラサイクリンと尿との分離に最も影響を及ぼすものは尿の樹脂に対する相対量である。殊に尿色素成分が樹脂に強く吸着されて吸収帯を形成する場合には重要である。この吸収帯は尿のみによつて展開されるもので液の pH によつて著しく変化する。一般に樹脂量は尿量の 1/5 程度が良好である (Table IV)。樹脂柱を洗滌する蒸留水の量が多い場合には吸着されたクロルテトラサイクリンが流出する危険がある。このために洗滌水は 100 cc を超えてはならない。これはクロルテトラサイクリンと樹脂との結合が比較的弱いことを示している。

** 粉碎して細末とする。

Fig. 4. Stepwise Elution Curve of Chlorotetracycline-Urinary solution (CT) : 1980 γ (in 30 cc. urinary solution)
Resin : Amberlite IR-112 H-type 7 cc.
Flow Rate : 1.0~1.2 cc./min.
Recovery : 96.5%

Table IV. Relation between Volumes of Urinary Solution and Resin

Chlorotetracycline (γ)	Volume of urinary solution (cc.)	Volume of resin (cc.)	Absorbance	Recovery (%)
2430	50	6	0.410	72.9
"	"	7	0.445	78.9
"	"	10	0.505	89.6
"	"	13	0.441	78.2

本研究に当り御鞭撻を賜わった東大薬学科石館守三教授に深謝する。

実 験 の 部

1. 測定器具 日立分光光電光度計 EPB-V 型, 1 cm セル使用.
2. クロルテトラサイクリン塩酸塩, 市販品結晶を充分乾燥したものを使用.
3. Amberlite IR-112 の洗滌 Amberlite IR-112 は使用に先立ち細末となし, アルカリ性のものと 10~15% 過酸化水素水で処理して精製. 水洗後水中に沈降した樹脂約 7~10 cc を断面積 1 cm² のガラス柱に気泡の生じないように注入. 次に 5 N 塩酸 (10 倍量) で再生し蒸留水で流出液がメチルオレンジ中性になるまで洗滌.
4. 硼酸錯塩法による流出フラクション中のクロルテトラサイクリンの定量 流出フラクション各 10 cc をとり, エタノールを加えて水浴上で殆んど蒸発乾固, これに蒸留水 0.4 cc, 硼酸-濃硫酸試薬 (10%) 2 cc, 及び濃硫酸 5 cc を順次加えてよく混和, 10 cc 目盛の試験管に移し, 前のビーカーを濃硫酸で洗滌, 洗液を加えて試験管の標線まで充たす. 2 時間後 530 m μ で吸光度を測定する.

千葉大学薬学部