UDC 615.779.931-07

掛見喜一郎, 有田隆一, 大橋 貞: 抗菌性物質の化学的定量法 (第8報*)

バイオマイシンの比色定量法

Kiichiro Kakemi, Takaichi Arita, and Sada Ohashi: Chemical Methods for the Determination of Antibiotics. VIII. Colorimetric Determination of Viomycin.

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

Potency determination of Viomycin had heretofore been chiefly made by biological method and in order to establish a colorimetric method of determining Viomycin, which would be comparatively simple, following procedure was attempted. In a test tube, 4 cc. of an aqueous solution of Viomycin sulfate is cooled to 0° to 5°, 1 cc. of 20% potassium hydroxide solution and 0.3 cc. of 0.1% oxine solution are added, shaken thoroughly, and 0.5 cc. of sodium hypobromite solution is added to effect coloration. This mixture is shaken for 1 minute and 2 cc. of pyridine is added to stabilize the color. This solution has an absorption maximum at 507 mμ and its absorbancy is proportional to potency. Determination of potency with a sample treated by this method and allowed to stand for a definite length of time gave values agreeing well with the potency determined by the biological assay.

(Received September 15, 1958)

バイオマイシンは $C_{18}H_{31-33}O_8N_9$ なる分子式を有する物質であるが化学構造は未知で、その力価の測定は主にカップ法、比濁法等の生物学的方法によつて行われている。化学的定量法としてはバイオマイシンを加熱分解して生ずる尿素を比色する方法¹⁾が報告されているのみで他に見るべきものはない。また紫外部吸収スペクトルにより測定する時は、調製時には力価に比例して定量し得るが放置分解したものについては生物学の定量法と一致しない。このため著者等は比較的簡便なバイオマイシンの比色定量法を得る目的で本研究を行つた。硫酸バイオマイシン水溶液を苛性アルカリで強アルカリ性とし、オキシン溶液および次亜ブロム酸ナトリウム液を加えると液は赤色を呈する。この呈色はかなり不安定でそのままでは測定が困難であるが呈色後ピリジンを添加することによりこれを安定化することが出来た。このものの吸収曲線は Fig. 1 に示す如く 507 mμ に吸収極大を有しその濃度と吸光度の関係は一定濃度範囲で直線的に比例するのでこの反応を用いて比色定量を行つた。なお一定期間放置した試料について本法により測定した値と生物学の定量法による値とを比較した結果、かなりよく一致することを認めた。したがつて硫酸バイオマイシンの放置分解した試料についても本法により測定することが出来る。

Fig. 1.
Absorption Curve of Viomycin
Solution colored by Reagents
(concn. 100 γ/cc.)

本研究に際し御指導を頂いた京都大学宇野豊三教授に深謝する。

* 第7報: 本誌 79, 29(1959).

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

1) Albert W. Jackson: Antibiotics & Chemotherapy 4, 1210(1954).

実 験 の 部

I) 試 薬 i) 20% KOH 液, ii) 0.1% オキシシン溶液: オキシシン 20 mg を 95% EtOH 20 cc に溶解, iii) NaOBr 液: 50% NaOH 液 50 cc に Br_2 0.7 cc を滴加して製し更にこの液を 10 倍に希釈 (用時調製), iv) ビリジン (精製).

II) 定量法 検液 (50~200 γ /cc) 4 cc を試験管にとり 0~5° に冷却しながら 20% KOH 液 1 cc および 0.1% オキシシン溶液 0.3 cc を加え, 1 分間よく振りまぜ NaOBr 液 0.5 cc を加える. 更に 1 分間よく振りまぜた後直ちにビリジン 2 cc を加える. 同時に蒸留水 4 cc を用いて同様の操作を行い, これを対照としてベックマンスペクトロフォトメーターで波長 507 m μ において吸光度を測定する. 予じめ力価既知の常用標準バイオマイシンを用いて作成した検量曲線に前記の測定値を照合して検液の力価を求める. 検量曲線を Fig. 2 に示す.

Fig. 2. Calibration Curve

III) 定量法の検討 i) 反応温度: 反応温度を 0, 5, 10, 15, 30° と変え他は定量法と同様に操作しその吸光度を比較した結果, 温度が低い程呈色が鮮明でかつ吸光度は大であり, また 0~5° では同値を示したので反応は 0~5° の氷水中で冷却しながら行つた.

Table I. Effect of Reaction Temperature

Temperature (°C)	0	5	10	15	30
Absorbancy	0.310	0.312	0.305	0.300	0.276

ii) 試薬量 a) KOH 液の濃度: KOH 液の濃度を 5, 10, 15, 20, 30% に変え他は定量法と同様に操作しその吸光度を比較した結果, 20~30% の KOH 液を使用する時が最高の吸光度を示した. したがって KOH 液は 20% 1 cc とした.

Table II. Effect of Concentration of Potassium Hydroxide

KOH-soln. Concentration (%)	5	10	15	20	30
Absorbancy	0.270	0.285	0.290	0.305	0.302

b) オキシシン溶液の濃度: オキシシン溶液の濃度を变え他は定量法と同様に操作しその吸光度を比較した結果, 0.1% 以上では濃度が増すにつれて吸光度も大となるが対照もまた著しく着色するので本法においては 0.1% とした.

Table III. Effect of Concentration of Oxine

Oxine-soln. Concentration (%)	0.05	0.1	0.2	0.3
Absorbancy	0.190	0.317	0.435	混濁
Blank	0.008	0.010	0.186	—

c) NaOBr 液の量: 呈色液の安定度は NaOBr 液の量に可成り影響を受ける. すなわち NaOBr 液の量が多い程吸光度は大となるが褪色が早くまたこの液の量を少くすれば呈色は遅く吸光度も小である. 従つて適当な NaOBr 液の量を求めるために 0.2% NaOBr 液を用い添加量を 0.3 cc から 1 cc に変え吸光度を比較した結果, 0.5 cc を使用した場合バイオマイシンの力価と吸光度が最もよく直線的に比例したので本法では 0.2% 0.5 cc を用いることとした.

d) ビリジンの添加量: NaOBr 液の適量を用いた呈色でもそのままではなお不安定で時間の経過と共に褪色する. この呈色を安定化するためにビリジンの添加を行つた. すなわち呈色せしめて 1 分後にビリジン 2 cc を添加する時はその呈色は安定となり 30 分後においてもその吸光度は約 3% の変化を認めるに過ぎなかつた.

e) NaOBr 液を加えてからビリジン添加迄の時間: この時間を 30 秒, 1, 3, 5, 10 分と変え他は定量法と同

様に操作しバイオマイシンの各力価の溶液についてその吸光度の検討を行つた結果, 30 秒より 3 分の間では添加迄の時間に関係なくバイオマイシンの同一濃度の溶液では常に同一の吸光度を示した力価と吸光度の関係はよくベールの法則に従う. 故に本法では呈色後ピリジン添加迄の時間を 1 分間とした. ピリジン添加迄の時間が呈色後 3 分以上になると NaOBr 液による褪色が著しく力価と吸光度の関係は直線的に比例しなくなる.

Table IV. Effect of Time between Addition of Pyridine and Addition of Sodium Hypobromite

	Mins.	0.5	1	3	5	10
Absorbancy	50 γ /cc.	0.143	0.145	0.140	0.135	0.130
	100 γ /cc.	0.292	0.295	0.300	0.305	0.300
	150 γ /cc.	0.448	0.452	0.450	0.450	0.460

IV) 本法と生物学的方法との比較 硫酸バイオマイシン水溶液を長時間放置したものおよび市販品の有効期限を過ぎたものについて本法を用いて定量しその値を抗生物質製剤基準記載のカップ法によつて定量した値と比較した結果, 次表に示す如く両者の値はよく一致することを認めた. 故に本法は硫酸バイオマイシン水溶液を放置し分解物の混在した試料についても測定に用いることが出来る.

Table V. Comparison of Potencies by this Chemical Method and by Biological Method for Test Solution

Sample	Potency, prepared	Condition, allowed to stand	This method		Biological method	
1	400 γ /cc.	in 37° incubator 20 days	320 γ /cc.	80.0 (%)	325 γ /cc.	81.3 (%)
2	400	in 37° incubator 30 days	270	67.5	250	62.8
3	800	in 37° incubator 70 days	346	43.3	330	41.4
4	800	in 37° incubator 140 days	175	21.6	230	28.9
5	800	in refrigerator 30 days	700	87.5	720	90.2
6	the sample, elapsed for 10 months after expiration date (concn. 400 γ /cc., prepared as labeled potency)		375	94.0	380	96.2

京都大学医学部薬学科