させた液の 530 m μ における吸収は極めて僅少で 10 γ /cc の濃度で 0.005 以下の吸光度を示すに過ぎず、440 m μ における吸光度に比するとき殆んど無視して差支えない。テトラサイクリンを種々の濃度に含有する混合試料についてさきに記載した方法により分離定量を行なった結果を Table III に記載する。

放置検体に対する本法ならびに生物学的定量法の比較 塩酸オキシテトラサイクリン水溶液を Table IV に示すように異なった温度の下に長時間放置したものについて本法および生物学的の方法による測定値を比較した結果、分解の程度の甚しいもの以外はかなりよく一致した値を得ることが出来た。

Table IV. Comparison of Potencies by this Method and by Biological Method for Test Solutions allowed to stand for a Long Period

Sample	Temp. of standing (°C)	Period of standing (days)	Concn. of test solns. at prepn. (γ /cc.)	Biological method		This method	
				(γ /cc.)	% (remained)	(γ /cc.)	% (remained)
A	2~5	3	446	400	89.5	426	95.5
B	20	3	446	400	89.5	394	88.4
C	30	3	446	258	57.8	261	58.5
D	2~5	6	446	416	93.3	417	93.5
E	20	6	446	394	88.5	336	75.4
F	30	6	446	160	35.8	219	49.1
G	2~5	14	446	408	91.5	405	90.8
H	20	14	446	225	50.5	244	54.6
I	30	14	446	46	10.3	91	20.4
J	2~5	36	446	392	87.9	366	82.0
K	2~5	36	446	406	91.0	362	81.1

本研究に際し終始御指導を戴いた京都大学薬学科宇野教授、有田助教授に深く感謝し、生物学的定量法を御担当下さった台糖ファイザー株式会社に厚く感謝する。

京都大学医学部薬学科

UDC 615.779.931-07 : 543.432.06:

37. 掛見喜一郎, 横田矩子, 灘井種一: オキシテトラサイクリンの比色定量法 (II)

アスコルビン酸含有製剤中のオキシテトラサイクリンの分離定量法
(抗菌性物質の化学的定量法 第 10 報^{*1})

Kiichiro Kakemi, Tsuneko Yokota, and Tanekazu Nadai: Chemical Methods for the Determination of Antibiotics. X. Colorimetric Determination of Oxytetracycline. (II). Determination of Oxytetracycline in Preparations with Ascorbic Acid.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto^{*2})

Separatory determination of oxytetracycline from oxytetracycline preparation containing ascorbic acid was carried out by the use of a Permutit column. A solution (5 cc.) of oxytetracycline preparation containing ascorbic acid (10~200 γ /cc.) was passed through a column of acid-treated Permutit to effect adsorption of oxytetracycline on Permutit, the column was washed with five 10-cc. portions of distilled water to remove ascorbic acid from the column completely, and the column was eluted with 20 cc. of 0.2N sodium hydroxide solution to desorb oxytetracycline. The effluent was received in a vessel containing 4 cc. each of N hydrochloric acid and N acetic acid, and the total volume was brought to 50 cc. To 5 cc. of this solution, 1 cc. of p-nitrobenzenediazonium chloride reagent is added and the mixture is warmed at 70° for 25 minutes. This is cooled in running water and the optical density of this solution is measured at 440 m μ to obtained the potency of oxytetracycline. The

*1 第 9 報: 本誌 80, 176(1960).

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

values obtained by this method with oxytetracycline preparation containing ascorbic acid, the sample solution of which had been allowed to stand for a long time, were compared with that obtained by biological method and a fairly well agreeing result was obtained. In this case, aqueous solution containing oxytetracycline alone was allowed to stand under the same conditions and it was found that the rate of decomposition was somewhat higher in the sample containing ascorbic acid.

(Received June 27, 1959)

前報で著者等は *p*-nitrobenzenediazonium chloride を用いる オキシテトラサイクリンの比色定量法を報告したが、本報においてはこの方法をさらにアスコルビン酸含有製剤中のオキシテトラサイクリンの定量に利用するためバームチットを用いて分離定量を行ない、好結果を得たので報告する。すなわちオキシテトラサイクリンの静注用製剤には多量のアスコルビン酸を含み、この存在は前報の定量法に障害を与えるので、あらかじめこれを除去する必要がある。Salzman¹⁾等は尿中および血中のクロルテトラサイクリンの定量にバームチットカラムを利用しているが、著者等はこれをアスコルビン酸含有製剤に用いてオキシテトラサイクリンの分離定量を行なった。すなわち試料溶液を塩酸性でバームチットカラムに通すとオキシテトラサイクリンはバームチットに吸着されてカラム内に止まり、一方アスコルビン酸はそのまま流去する。またカラム内に止まったオキシテトラサイクリンは水酸化ナトリウム液で容易に溶離することが出来る。したがって溶出液中のオキシテトラサイクリンを著者等の行なった定量法で定量することにより、アスコルビン酸混在中のオキシテトラサイクリンの分離定量を行なうことが出来た。

なお長時間放置したアスコルビン酸含有試料溶液について本法を用いて測定した値と生物学的方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。

実 験 の 部

試 薬 1) 呈色試薬: *p*-nitroaniline 200 mg を AcOH 5 cc および conc HCl 3 cc に溶解した後、氷冷し振盪しながら 15% NaNO₂ 水溶液 1 cc および AcOH 20 cc を加え、ついで再び 15% NaNO₂ 水溶液 1 cc および AcOH を加えて全量を 50 cc とする。試薬は用時調製し、使用中は 20° 以下に保存する。

2) 0.1N HCl 3) 0.2N NaOH 4) N HCl, N AcOH

5) バームチット (50~100 メッシュに粒度を揃え蒸留水に浸し、液が微酸性を呈する迄 HCl を加えよく攪拌し、充分水洗した後乾燥したもの)。

定量法 バームチット約 2 cc を 0.1N HCl とともに先端に活栓を有する内径約 8 mm のガラス管に注意してそそぎ、バームチット層の上下にはゆるく綿をつめる。ついで検液 (オキシテトラサイクリン 10~200 γ /cc, アスコルビン酸 50~1000 γ /cc) 5 cc をバームチットカラムに通し、ついで蒸留水約 10 cc ずつで 5 回カラムを洗浄しアスコルビン酸を完全に流去させる。つぎに 0.2N NaOH 20 cc をカラムに通しオキシテトラサイクリンを溶離し、あらかじめ N HCl 4 cc および N AcOH 4 cc を入れた受器にこの溶出液を受け蒸留水を加えて全

Fig. 1.

Calibration Curve of Oxytetracycline Hydrochloride

1) A. Salzman: J. Lab. Clin. Med. 35, 123(1950).

量を 50 cc とし、この中 5 cc を採り試薬 1 cc を加え 70° で 25 min 加温した後、流水で冷却し 440 m μ における吸光度を測定する。この値をあらかじめ力価既知の常用標準塩酸オキシテトラサイクリンを用いて作成した検量曲線に照合してオキシテトラサイクリンの力価を求める。Fig. 1 に検量曲線を示す。

検 討 a) オキシテトラサイクリンのパームチットに対する吸着条件 i) パームチットの処理：市販のパームチットを処理せずにそのまま使用するときにはオキシテトラサイクリンの吸着が不充分で定量値に誤差を来たすので、さきに試薬の項で記載したようにあらかじめ酸処理を行なう必要がある。

ii) パームチットカラムの洗浄：アスコルビン酸はオキシテトラサイクリンと同様に本試薬により黄色を呈するので、カラムに検液を通した後充分に洗浄しアスコルビン酸を完全に流去する必要がある。このため、検体と同濃度のアスコルビン酸溶液を試料としてカラムに通し、蒸留水 10 cc ずつでカラムを洗浄し、各々の洗浄液の一部をとり本試薬を用いて呈色させ吸光度を測定した結果、30 cc までは洗浄液が本試薬により呈色を示すが、それ以後は全く呈色しない。したがって蒸留水 50 cc で洗浄すれば完全にアスコルビン酸の影響を除去することが出来る。またこの操作はオキシテトラサイクリンの定量値に何等影響を与えないことを認めた。

b) オキシテトラサイクリンの溶離条件 i) 溶離曲線：パームチットに吸着されたオキシテトラサイクリンは 0.2N NaOH で容易に溶離される。この際 0.2N NaOH 2 cc ずつで溶離した液について定量法にしたがつて呈色させ、その吸光度を測定し溶離状態を検討した結果、Fig. 2 の溶離曲線に示す如く、パームチットカラムに吸着されているオキシテトラサイクリンは 0.2N NaOH 12 cc で大部分が溶離され、以後微量のオキシテトラサイクリンが溶離されるが、0.2N NaOH 16 cc で殆んど完全に溶離される。したがって溶離液としては 0.2N NaOH 20 cc を用いれば、定量値に殆んど誤差なく測定出来ることを認めた。

Fig. 2.

Elution Curve of Oxytetracycline

ii) N HCl および N AcOH の量：オキシテトラサイクリンは NaOH 液中に長時間放置するときには不安定で、また本呈色反応は NaOH の影響を受け易いので溶出液の受器にあらかじめ酸を加えておく必要がある。これに用いる酸について検討した結果、N HCl および N AcOH それぞれ 4 cc ずつ用いた場合、酸の量に僅かの増減があつても吸光度に変化なく一定の値を示し、かつ測定値は再現性のあることを認めたので、N HCl および N AcOH 4 cc をあらかじめ受器に加えておくこととした。

放置検体に対する本法ならびに生物学的定量法の比較 塩酸オキシテトラサイクリンとこれに約 5 倍量のアスコルビン酸を加えた水溶液を Table I に示すような各種の条件で長時間放置したものについて、本法および生物学的的方法による測定値を比較した結果、かなりよく一致した値を得た。またこの際、オキシテトラサイクリンのみの水溶液に比して同じ条件で放置したアスコルビン酸を含有する試料溶液の方がやや分解率の高いことを認めた。

Table I. Comparison of Potencies by this Method and by Biological Method for Test Solutions allowed to stand for a Long Period

Sample	Temp. of standing (°C)	Period of standing (day)	Concn. of test solns. at prepn.	Oxytetracycline with Ascorbic acid (2500 γ /cc.)				Oxytetracycline alone			
				Biological method		This method		Biological method		This method	
				γ /cc.	% (remained)	γ /cc.	% (remained)	γ /cc.	% (remained)	γ /cc.	% (remained)
A	2~5	14	423	293	69	272	64	414	98	412	97
B	2~5	7	423	333	79	360	85	424	100	424	100
C	2~5	3	423	372	88	399	94	400	95	421	100
D	room temp.	14	423	264	62	295	70	372	88	359	85
E	"	7	423	284	67	298	70	400	95	369	87

F	room temp.	3	423	308	73	287	68	368	91	376	89
G	30	1	423	336	79	367	87	374	88	398	94
H	30	3	423	227	54	271	64	244	58	246	58
I	30	7	423	129	30	129	30	101	24	107	25
J	70	30 min.	423	218	52	294	70	225	53	328	78
K	70	60 min.	423	200	47	278	66	182	43	216	51

本研究に際し終始御指導を戴いた京都大学薬学科 宇野教授, 有田助教授に深く感謝し, また生物学的定量法を御担当下さった台糖ファイザー株式会社に厚く感謝する。

京都大学医学部薬学科

UDC 615.779.931-07 : 543.432.062

38. 掛見喜一郎, 大橋 貞: フラジオマイシンの比色定量法 (抗菌性物質の化学的定量法 第 11 報^{*1})

Kiichiro Kakemi and Sada Ohashi: Chemical Method for the Determination of Antibiotics. XI. Colorimetric Determination of Fradiomycin.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto^{*2})

The potency determination of Fradiomycin had relied on biological method and the present studies were carried out in order to find a simple colorimetric method for its determination. To 5 cc. of a sample solution placed in a glass-stoppered test tube, 5 cc. of 2% isoamyl alcohol solution of lauric acid and 0.5 cc. of 5% sodium carbonate solution were added, the mixture was shaken vigorously, and centrifuged. Four cc. of the isoamyl alcohol in the upper layer was transferred to a new glass-stoppered test tube, 5 cc. of distilled water and 0.2 cc. of 50% acetic acid solution were added, and the mixture was shaken for 5 minutes. Four cc. of the lower aqueous layer was transferred to a new test tube, 1 cc. of 20% sodium carbonate solution was added, and shaken thoroughly. The mixture was cooled in ice water, 0.5 cc. of 1% sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate solution was added, and allowed to stand in ice water of 0° to 2° for 20 minutes. To this mixture, 2 cc. of an equi-volume mixture of acetone and ethanol was added, followed by 0.5 cc. of 50% acetic acid solution. At the same time, blank test was carried out with distilled water in place of the sample solution and treated in the same way with the same reagents. Using this as the control, absorbancy was measured at 460 mμ and the potency of the sample solution was calculated from the calibration curve of Fradiomycin.

Determinations were carried out by this method on the samples sterilized by boiling and treated with acid and alkali, and a sample solution allowed to stand for a long period. The values so obtained were compared with the values obtained by the cup method, given in the standard for antibiotic preparations and the two values showed good agreement.

(Received June 27, 1959)

フラジオマイシンはネオマイシン近縁の抗菌性物質であるが, その化学的構造は未だ確定されず, 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なわれている。化学的定量法としては, フラジオマイシンを硫酸と共に加熱して生ずるフルフラールの吸光度を測定する方法¹⁾が報告されているにすぎない。

著者等はフラジオマイシンの簡便な比色定量法を得る目的で本研究を行なつた。すなわちフラジオマイシン水溶液をアルカリ性とし, 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウム液を加えて反応させた後, アセトン・エタノール混液を加え, ついで酸性にすると液は鋭敏な橙赤色を呈する。しかるにこの反応はフラジオマイシンに混在

^{*1} 第 10 報: 本誌 80, 180(1960).

^{*2} Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) J. D. Dutcher: Antibiotics & Chemotherapy 3, 534(1953).