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).

する不純物についても同様に呈色するので、本呈色反応を行なう前にあらかじめ不純物を除去しておく必要がある、したがって著者等はつぎの如き方法によつてその分離を行なつた。すなわちフラジオマイシン水溶液について 2% ラウリン酸イソアミルアルコール溶液で有効物質を抽出した後、再びそのイソアミルアルコール層から水層に移行させ、前述の試薬により呈色反応を行なつた。呈色したものの吸収曲線は Fig. 1 に示す如く 460 m μ に吸収極大を有する。また本呈色反応により呈色させたフラジオマイシン水溶液の吸光度は濃度に比例し、よく Beer の法則にしたがう直線関係を示したので、これを用いて比色定量を行なつた。

Fig. 1.

Absorption Spectrum of Fradiomycin
Solution Colored by Reagents
(concn. of test soln. 200 γ /cc.)

つぎに試料を Table V に示すような種々の方法で処理した試料について、本法により測定した値と抗生物質製剤基準記載の生物学的方法による値を比較した結果、両者はよく一致することを認めた。したがってフラジオマイシンの分解した試料についても本法により測定することが可能である。

実 験 の 部

I. 試 薬 1) 2% ラウリン酸 iso-AmOH 溶液. 2) 1% 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウム液 (用時調製). 3) 5 および 20% Na_2CO_3 液. 4) 50% AcOH. 5) $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtOH}$ (1:1) 混液.

II. 定量法 試料溶液 5 cc を共栓試験管にとり、2% ラウリン酸 iso-AmOH 溶液 5 cc および 5% Na_2CO_3 液 0.5 cc を加え、5 min はげしく振りまぜた後遠心分離し、上層の iso-AmOH 層 4 cc を新たな共栓試験管にとり、蒸留水 5 cc および 50% AcOH 0.2 cc を加え、5 min 振りまぜる。後下層の水層 4 cc を別の試験管にとり、20% Na_2CO_3 液 1 cc を加えよく振りまぜた後、氷水中で冷却しながら 1% 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウム液 0.5 cc を加え、0~2° の氷水中で遮光して 20 min 反応させる。このものに $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtOH}$ (1:1) 混液 2 cc を加え、2 min よく振りまぜ直ちに 50% AcOH 0.5 cc を加える。同時に検液の代わりに蒸留水を用いて同様の操作を行ない、これを対照として 460 m μ において吸光度を測定し、あらかじめ力価既知のフラジオマイシンを用いて作成した検量曲線に照合して検液の力価を求める。

III. 検量曲線 フラジオマイシンの 50, 100, 200, 300 および 400 γ /cc (力価) の水溶液を用いて定量法にしたがって操作し、検量曲線を作成した。検量曲線を Fig. 2 に示す。

Fig. 2.

Calibration Curve of Fradiomycin

IV. 定量法の検討 定量法の条件の検討^{*3}には 100 および 400 γ /cc の各濃度の試料溶液を用いて行なつた。1) ラウリン酸の濃度：フラジオマイシンはラウリン酸 iso-AmOH 溶液により抽出されるので、この抽出に必要なラウリン酸の濃度の検討を行なつた。すなわちその濃度を 1, 2, 4% となるように変え、その吸光度を比較した結果、いずれも 2% 以上ではほぼ同値を示したので、ラウリン酸の濃度を 2% とした。

^{*3} 条件は一つの条件のみを変え、他は前記定量法と同様に操作した。

2) 第1抽出時の Na_2CO_3 液量および抽出に要する時間: 先に述べた各試料溶液からフラジオマイシンをラウリン酸 iso-AmOH 溶液で抽出する際に加える 5% Na_2CO_3 液の量を 0.4, 0.5, 0.7, 1.0 cc と変え, その吸光度を比較した結果, いずれの場合も 0.4~0.5 cc を加える時はその吸光度は一定で 0.5 cc を越えると吸光度は低下する. したがってその量を 0.5 cc とした. また抽出に要する時間については, この時間を 2, 5, 7, 10 min と変えてその吸光度を比較した結果, 5 min 以上では吸光度は同値を示したので, この際の抽出時間を 5 min とした.

Table I. Effect of 5% Sodium Carbonate Soln.

Vol. of 5% Na_2CO_3 (cc.)		0.4	0.5	0.7	1.0
Absorbancy	Test soln. 400 γ /cc.	0.820	0.820	0.580	0.190
	Test soln. 100 γ /cc.	0.210	0.210	0.180	0.080
	Blank	0.110	0.110	0.110	0.110

3) 第2抽出時の AcOH 量および抽出に要する時間: フラジオマイシンを iso-AmOH 層から水層へ移行させる際に加える 50% AcOH の量を 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 cc と変えその吸光度を比較した結果, 0.3 cc を越えると対照の吸光度が著しく増大するが 0.3 cc 迄は対照の値も低く, かつ検液の吸光度も同値を示すことを認めたので, その量を 0.2 cc とした. また抽出に要する時間は先と同様に検討した結果, いずれも 5 min で充分であった.

Table II. Effect of 50% Acetic Acid

Vol. of 50% AcOH (cc.)		0.1	0.2	0.3	0.4
Absorbancy	Test soln. 400 γ /cc.	0.820	0.820	0.830	0.700
	Test soln. 100 γ /cc.	0.200	0.205	0.205	0.150
	Blank	0.110	0.110	0.110	0.300

4) 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウム液: 1% 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウム液の量を 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 cc と変え, その吸光度を比較した結果いずれの場合も試薬の量が多くなると検液の吸光度は徐々に大となるが, 同時に対照の吸光度もそれにつれて増加するので, 試薬の量は検液の吸光度が大で対照の吸光度が比較的少なく, かつ試薬に少量の変化があつても呈色液の吸光度に大差のない 0.5 cc とした.

Table III. Effect of 1% Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate Soln.

Vol. of 1% sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate soln. (cc.)		0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Absorbancy	Test soln. 400 γ /cc.	0.660	0.805	0.820	0.830	0.845
	Test soln. 100 γ /cc.	0.160	0.190	0.210	0.213	0.225
	Blank	0.080	0.095	0.105	0.105	0.115

5) Na_2CO_3 液: Na_2CO_3 液は 20% 溶液を用い, その量を 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 cc と変え, その吸光度を比較した結果, 0.5 cc では対照が大であり 1.0~1.5 cc ではほぼ同値を示したので, その量を 1.0 cc とした.

Table IV. Effect of 20% Sodium Carbonate Soln.

Vol. of 20% Na_2CO_3 (cc.)		0.5	1.0	1.5	2.0
Absorbancy	Test soln. 400 γ /cc.	0.790	0.830	0.825	0.795
	Test soln. 100 γ /cc.	0.175	0.210	0.205	0.190
	Blank	0.320	0.110	0.105	0.105

6) 反応温度: 反応温度を氷水中, 常温, 30°, 60° と変えてその吸光度を比較した結果, 温度が高い程呈色が強いが, 対照もまた著しく大となるので, 反応は 0~2° の氷水中で行なうこととした.

7) 反応時間: 反応時間を 15, 20, 25, 30 min と変え, その吸光度を比較した結果, 長時間にわたる程吸光度は大となるが, 30 min 以上では検量曲線が直線関係を示さなくなる. 故に反応時間は 20 min が最も適当と認められた. なお 20 min 前後の反応時間では反応時間 1 min の増減につき約 1% の割合で検液の吸光度が変化するに過ぎない.

8) $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtOH}$ (1:1) 混液: $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtOH}$ (1:1) 混液の量は試料を用いないで行なつた対照について反応後の呈色液を脱色させるに要する量とした. この量は 2 cc で充分であつた.

9) $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtOH}$ 混液添加後の振とう時間: $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtOH}$ 混液を加えてから, 50% AcOH を加える迄の時間についても同様に検討したが 2 min 以上ではほぼ同値を示した.

10) AcOH: $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtOH}$ 混液添加後に加える 50% AcOH の量については, これを 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 cc と変え, その吸光度を比較した結果いずれもほぼ同値を示したので, その量を 0.5 cc とした.

11) 呈色後の安定度: 呈色させた検液の呈色後の安定度を検討した結果, 少なくとも 30 min 迄はいずれも

吸光度の低下を認めなかつた。故にこの呈色は安定で比色定量に充分利用し得るものと思われる。

V. 本法と生物学的方法との比較 フラジオマイシン水溶液および点眼液を Table V に示す各条件、すなわち煮沸、滅菌、酸処理およびアルカリ処理を行なつた試料、ならびに長期間放置した試料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、両者はよく一致することを認めた。故に本法はフラジオマイシン水溶液および点眼液の分解物を混在する場合にも定量に用いることが可能である。

なお、酸処理アルカリ処理とはフラジオマイシンを 0.1N HCl あるいは 0.1N NaOH にとかして 1 hr 煮沸したもので、また点眼液は硫酸デキストロマイシン 100 mg (力価) に硼砂 45 mg, NaCl 160 mg を添加し滅菌蒸留水 20 cc に溶解したものである。

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

	Condition	Potency (prepared) γ/cc.	This chemical method		Biological method	
			γ/cc.	% (remained)	γ/cc.	% (remained)
Aqueous soln.	heated 100°, 2 hrs.	200	165	82.5	161	80.5
	heated 100°, 5 hrs.	200	160	80	158	79
	sterilized 15 lb., 20 min.	200	192	96	190	95
	sterilized 70°/hr., 3 times	200	187	93.5	190	95
	heated with 0.1N HCl	100	64	64	61	61
	heated with 0.1N NaOH	100	70	70	75	75
	stored 5 months	100	57	57	74	74
	stored 12 months	50	35	70	30	60
Ophthal- mic soln.		(prepared as labeled potency)				
	freshly prepared	200	210	100	211	100
	heated 100°, 2 hrs.	"	191	91	187	89
	heated 100°, 5 hrs.	"	170	81	169	80.5
	sterilized 15 lb., 20 min.	"	212	100	209	99.5
	sterilized 70°/hr., 3 times	"	195	93	198	94.5

本研究に際し終始御指導を戴いた京都大学薬学科宇野豊三教授ならびに有田隆一助教授に深く感謝し、また試料を提供戴き生物学的方法を御担当下さつた武田薬工研究所に深謝する。

京都大学医学部薬学科