UDC 547.94 : 543.426

84. 山崎友久：アルカロイドのケイ光分析研究 (第1報) アトロピンの
ケイ光による新定量法^{*1}

Tomohisa Yamazaki: Fluorescence Analysis of Alkaloids. I.
A New Fluorometry of Atropine.

(Pharmaceutical Affairs Division, Health Bureau, Tokyo Metropolitan Government^{*2})

A new quantitative method of atropine by fluorophotometric determination has been devised. A sample which contains 1~100 μg . of atropine is evaporated to dryness, and to this 0.5 cc. of nitric acid is added. It is also evaporated to dryness on a water-bath, similarly to the treatment in the Vitali reaction. The residue is dissolved in 1 cc. of water, basified by 10% sodium hydroxide, and it is reduced by zinc-grains. After the reduction for half an hour, the reduced product is diluted to the definite volume with a ethanol-water mixture (1:1) and the intensity of the fluorescence is measured. Simultaneously the standard and blank are treated similarly followed by the calculation of atropine contents in the sample. As to the filters for the measurement, Matsuda UV-D₂ is used for the excited light source, AKA-FL-B₁, for the selection of fluorescence and AKA-UV-O₁, for shattering the excited fluorescence. The light source for the excitation is the Toshiba super high-voltage mercury lamp. In this measurement, the fluorescence of atropine is stable, and the intensity shows the linearity in 1~100 μg . The presumable standard error for the recurrent line is considered to be $\hat{\sigma}=0.1048$ (=0.3 μg . Atropine).

(Received November 28, 1962)

著者の薬用植物に対する放射線の影響についての研究^{*3} に関して、ダツラ中アトロピンの定量をわずかの試料で数多く行なう必要を生じたので、アトロピンの微量定量法を研究しケイ光による新定量法を考案した。

これまでアトロピンについてのケイ光分析例は少なく、最近の報告¹⁾ も若干の定性的な微量検出を行なっているのみで、これらを追試したが定量としては不十分な結果であった。

アトロピンの定性反応である Vitali 反応はその比色定量に応用され^{2,3)} また Nir-Grosfeld 等⁴⁾ はアトロピンを Vitali 反応と同様に発煙硝酸でニトロ化し、これを酸性で還元したのちジアゾ化してナフチルアミン類とカップリングさせアゾ化合物として比色定量を行なっている。著者は同様にアトロピンのニトロ化を行なったが、さらにこれを水酸化ナトリウムアルカリ性で亜鉛により還元し Fig. 1 のケイ光スペクトルを持つケイ光性物質に導くことができた。この操作を定量的に行ない、定量条件を検討したところアトロピンの新ケイ光定量法として満足すべき結果を得た。またこの方法にしたがってダツラ中アトロピンの定量を試みたので報告する。

実 験 の 部

装 置 ケイ光光度計：コタキ製作所製八木式微量ケイ光光度計 UM 型。日立製作所製分光光電光度計 EPU-2A 型および付属ケイ光測定装置 L-3 型。励起光源はともに東芝製超高压水銀燈 SHL-100 UV-2 を使用した。

標準液 I (アトロピン 1 mg./cc.): 硫酸アトロピン 1.2006 g. を水にとり 1 L. とする。II: I の 5 cc. を正確にとり、これを NH₄OH でアルカリ性としたのち合計約 40 cc. の CHCl₃ でアトロピンを完全に抽出、Na₂SO₄ で脱水後 CHCl₃ で正確に 50 cc. とする。この II を試料のアトロピン含量にしたがって CHCl₃ で希釈して用いる。これら標準液は無ケイ光でなければならない。

試 薬 1) NH₄OH (25% 試薬特級). 2) CHCl₃ (試薬特級). 3) HNO₃ (60~65% 試薬特級). 4) 10% NaOH

*1 第81回日本薬学会大会で講演 (1961).

*2 Marunouchi, Chiyoda-ku, Tokyo.

*3 一部は昭和35年日本生薬学会で講演。

1) 最所：医学研究, 19, 410 (1949).

2) R.R. Alami, B.V. Christensen, J.L. Beal: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 44, 710 (1955).

3) F.M. Freeman: Analyst, 80, 520 (1955).

4) I. Nir-Grosfeld, E. Weissenberg: Drug Standards, 25, 180 (1957) (C.A., 52, 8455 (1958)).

溶液 (NaOH は試薬特級). 5) EtOH-水 (1:1) (EtOH は試薬特級品を無ケイ光であることを確かめて使用する かまたは後述の精製を行なう). 6) Zn 粒 (試薬特級無砒素). 水はイオン交換樹脂による精製水を用い, EtOH は AgNO_3 と KOH を加えてよく煮沸後蒸留し, CHCl_3 は K_2CO_3 による脱水と蒸留をくり返して行ない, すべて不純物によるケイ光を完全に除いたものを使用する.

Fig. 1. Fluorescence Spectra of Sample Solution

ケイ光定量分析 1) **ケイ光スペクトルの測定** 後述の定量法にしたがって操作して得た液について分光光度計およびケイ光付属装置により 430~600 mμ の各波長におけるケイ光エネルギー分布を測定し, 得た数値をマツダリボンタングステン電球により機器の感度特性を補正した数値を用いて補正し Fig. 1 に示すようなケイ光スペクトルを得た.

2) **定量法** アトロピン 1~100 μg. 含有の試料溶液および標準溶液をそれぞれ小ビーカーにとり, 水浴上蒸発乾固する. おののの残留物に HNO_3 0.5 cc. を加えてふたたび水浴上で蒸発乾固する. つぎにこれらの残留物を水 1 cc. ずつで溶かし, さらに 10% NaOH 2 cc. を用いて内容物を小三角フラスコ中に洗い入れる. これに Zn 粒約 0.2 g. を投じ冷却器をつけて水浴上で加温すると Zn 粒からは水素の気泡が生じて還元が行なわれる. 30 min. 後反応液をそれぞれ 10 cc. メスフラスコに入れ, EtOH-水で容器, Zn 粒などを洗い, 洗液はさきのメスフラスコ中に合し EtOH-水で

正確に 10 cc. としたのちこの溶液をケイ光度計用キューベットに入れる. 励起光源用フィルターをマツダ UV-D₂, ケイ光選択フィルターを AKA-FL-B₁, 励起光カットフィルターを AKA-UV-O₁ とし, 処理した標準溶液を用いて感度を調整した上で試料あるいはブランクのキューベットを装置しそれぞれケイ光度計のメーターを読む. ただしブランクは HNO_3 のみを蒸発乾固したのち試料と同様に操作したものを用いる. 試料中のアトロピン含量 A は次式によって算出する.

$$A (\mu\text{g.}) = \frac{f_x - f_0}{f_s - f_0} \times (\text{標準液中のアトロピン量 } \mu\text{g.})$$

ただし f_x, f_s, f_0 はそれぞれ試料, 標準, ブランクにおける螢光光度計のメーターの読み.

3) **定量法の検討** 1) **フィルターの選択** アトロピン 200 μg. 含有のものについて定量法にしたがって操作し, フィルターの組合わせを Table I のように変化させてメーターの指示を読んだ. この結果から励起光源用, ケイ光選択および励起光カットの三種のフィルターの組合わせはマツダ UV-D₂, AKA-FL-B₁, AKA-UV-O₁ が良いとされた.

Table I. Combination of Filters and Fluorescence Intensity

Combination No.	1	2	3	4	5	6
Excitation filter	D ₁	D ₁	D ₂	D ₂	V ₁	V ₂
Selection filter	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂	B ₂	B ₂
Cutting filter	O ₁	O ₂	O ₁	O ₂	O ₂	O ₂
Fluorescence intensity	12.8	4.9	24.8	9.0	9.7	2.1
Ratio	51.7	19.8	100.0	36.4	39.1	8.5

Note. D₁, D₂, V₁, V₂: MAZDA-UV-D₁, D₂, V₁, V₂.

B₁, B₂: AKA-FL-B₁, B₂. O₁, O₂: AKA-UV-O₁, O₂.

2) **硝酸量** ニトロ化の HNO_3 量のみを変え, ほかは定量法にしたがって操作し, その螢光発生状況をみると Fig. 2 のようであって, これにより HNO_3 を 0.5 cc. 加えることとした.

Fig. 2. Relation between Volume of Nitric Acid and Fluorescence Intensity (Atropine 50 μg.)

Fig. 3. Relation between Concentration of Sodium Hydroxide and Fluorescence Intensity (Atropine 25 μg.)

3) 水酸化ナトリウム濃度 NaOH の濃度のみを変え、ほかは定量法にしたがって操作したときの螢光発生状況は Fig. 3 のようであって、このことから NaOH 濃度を 10% と定めた。

4) 還元時間 アルカリ性で Zn 粒により還元するときの還元時間のみを変えて螢光の発生状況をみると Fig. 4 のようであって、還元時間は 30 min. で充分であると考えられる。

5) エタノール濃度 還元が終わったのちの溶液を希釈するとき用いる EtOH の濃度を変えてケイ光の強さを比較したところ Fig. 5 のようであって、EtOH 濃度が増すにしたがってケイ光が強くなる傾向を示したが EtOH が 60% 以上になるとやや濁ってくるために、これを 1:1 の EtOH-水とした。

Fig. 4. Relation between Reduction Period and Fluorescence Intensity (Atropine 100 µg.)

Fig. 5. Relation between Concentration of Ethanol and Fluorescence Intensity x become turbid (Atropine 100 µg.)

6) ケイ光の安定性 定量法にしたがって操作し、ケイ光を生じた試料の溶液を室内に放置したときのケイ光強度の変化をみると Table II のようで、2 hr. 後でもほとんど減弱せず安定であることがわかった。

Table II. Stability of Fluorescence Intensity

Period after development (min.)		0	60	120
Atropine (µg.)	10	3.5	3.3	3.5
	20	6.0	5.9	5.5
	30	9.0	8.8	8.5

7) 定量性の検討 ブランク値を差引いたケイ光強度が濃度に比例するとして立てた上記の算出法が正しいかどうかを検討するために、1~100 µg. のアトロピンについて定量操作を行ないケイ光強度を測定し上記の範囲で濃度に比例することを確かめた。10~60 µg. における結果を Table III に示す。

Table III. Relationship between Fluorescence Intensity and Containing of Atropine, and Result of Regression Analysis

Exptl. No.	Atropine (µg.)	Fluorescence intensity	
1	10.0	2.2	regression coefficient : $b=0.215$
2	10.0	2.4	
3	20.0	4.1	intercept : $a=0.04$
4	20.0	4.3	regression line : $y=0.215x+0.04$
5	20.0	4.4	mean square : $V_{yx}=0.011$
6	30.0	6.4	root mean square : $\hat{\sigma}=0.1048$
7	30.0	6.5	(=0.5 µg. Atropine)
8	50.0	10.6	Null hypothesis : $H_0 : a_0=a=0$
9	50.0	10.8	root mean square of Intercept :
10	50.0	11.0	$\sqrt{V_a}=0.067$
11	60.0	13.0	$t\text{-Test} : t_0 =0.595^{**} < t(9, 0.01)$

4) ダツラ中アトロピンの定量 ダツラについてこの定量法を行なった結果を Table IV に示す。このときは抽出したアルカロイド溶液を一たんペーパークロマトグラフィにかけてアトロピンを分離し、これを再溶出して試料溶液とした。標準液もペーパークロマトグラフィにかけたものを用いた。展開溶媒は BuOH-AcOH-H₂O (5:1:4) でアトロピンの R_f は 0.65 (上昇法) である。スポットの位置は同時に上昇させた別の標準をドラージェンドルフ試薬により発色させ、その都度確認した。

Table IV. Assay of Atropine in Datura

Sample No.	Author's method (%)	J. P. VII (%)	Deviation
1	0.48	0.46	+0.02
2	0.64	0.63	+0.01
3	0.45	0.44	+0.01
4	0.45	0.45	0.00
5	0.59	0.60	-0.01

本研究にあたり終始御指導を賜った国立衛生試験所々長 刈米達夫先生に謹んで感謝致します。また螢光分析に関して国立衛生試験所技官 太幡利一博士より懇切な御教示をいただきました。なお実験は東京都技師 坪川忠君の協力によるものであります。併せて謝意を表します。

東京都衛生局薬務部