臭素・ピリジン水溶液によるチアミンの比色定量

柴崎利雄, 山本美代子,^{1a)} 佐々木武祥^{1b)}国立衛生試験所,^{1a)} エスエス製薬株式会社^{1b)}Absorptiometric Determination of Thiamine with
Bromine and Pyridine in WaterTOSHIO SHIBAZAKI, MIYOKO YAMAMOTO^{1a)} and TAKEYOSHI SASAKI^{1b)}National Institute of Hygienic Sciences,^{1a)} and Esuesu Seiyaku Co., Ltd.^{1b)}

(Received May 28, 1969)

A new colorimetric determination of thiamine was proposed. The optimum conditions for this determination were examined by a Technicon Autoanalyzer. The procedure is as follows: A sample solution of 9.0 ml of containing 100—500 μg of thiamine is transferred to a 50 ml volumetric flask and the solution is cooled in ice water. To this solution, 20 ml of an aqueous solution containing 0.25% bromine and 6.5% pyridine, 4 ml of 0.5N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, and 15 ml of 1N NaOH are added with shaking, and the mixture is diluted to 50 ml with water. The absorbance of the developed color is measured at 445 $\text{m}\mu$ against the reagent blank. The present method can be applied to the determination of thiamine in mixed preparations.

チアミンの比色定量法にはチオクローム法,²⁾ ホルムアルデヒド・アゾ法,³⁾ パラアミノアセトフェノン法^{4,5)} などがあり, 利用されている. 混合物中のチアミンの測定には, チオクローム法は測定波長が 368 $\text{m}\mu$ であるため共存物の影響を受けやすく, ホルムアルデヒド・アゾ法およびパラアミノアセトフェノン法は測定波長が長波長であるが, 前者は感度, 後者は精度が劣る.

著者等は臭素・ピリジンの水溶液によりチアミンが選択的に反応して黄色 (λ_{max} 445 $\text{m}\mu$) となる新呈色反応を見いだしたので, この反応を利用してチアミンの定量を行なった. 条件はオートアナライザーにより定め, これを手動法に転用した.

実験の部

装置 Technicon Instruments 社製オートアナライザー (比色計付属型).

フィルター: λ_{max} 440 $\text{m}\mu$, 半値幅 $\pm 18 \text{ m}\mu$, 440 $\text{m}\mu$ における透過率 28%.

スタンダードフローセル: 層長 6 mm.

分光光度計: 日立自記分光光度計 EPS-3T 型, 島津分光光度計 QV-50 型.

試薬および試液 臭素・ピリジン混合水溶液: 13% (v/v) ピリジン (特級品) 水溶液と 0.5% (w/v) 臭素水溶液の等容量を用時混和して製する.

0.5N チオ硫酸ナトリウム液, 1N 水酸化ナトリウム液: 日本薬局方の方法に準じて製する.

塩酸チアミン標準溶液: 国立衛生試験所標準品を 105° で 2 hr 乾燥し, その約 100 mg を精密にはかり, 水および希塩酸 0.1 ml を加えて溶かし正確に 100 ml とする. この液 5 ml を正確にはかり, 水を加えて正確に 100 ml とし標準溶液とする (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

試料溶液の調製: 混合試料⁶⁾ 中の塩酸チアミン約 25 mg に対応する量を精密にはかり, 水 50 ml および 0.1N 塩酸を加えてよく振り混ぜて溶かし pH 2.5—4.0 とし, 水を加えて正確に 100 ml とする (必要あればろ過する). この液 10 ml を正確にはかり, 水を加えて正確に 50 ml とする (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

1) Location: a) Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo; b) 6-2 Nihonbashihakigara-cho, Chuo-ku, Tokyo.

2) 河内敬朝, 笠原 閑, ビタミン, 7, 514, 518 (1954).

3) H.W. Kinnnersley, R.F. Peters, Biochem. J., 28, 667 (1934).

4) H.J. Prebulda, E.V. Macollum, J. Biol. Chem., 127, 495 (1939).

5) 櫻井芳人, 稲垣長典, 大森 静, 農化, 16, 331 (1941).

6) 試料が錠剤, 顆粒剤, 散剤, カプセル剤などの場合は均一な微粉末とし用いる.

I. オートアナライザーによる定量法の検討

1) 定量用回路および操作 定量用回路は Fig. 1 による. サンプラーの作動回数は 1 hr に 30 とした.

Fig. 1. Autoanalyzer Flow Diagram for Thiamine Determination

S: sampler
M₂: mixing coil (80 mm)
R: recorder
M₁, M₃: mixing coil (160 mm)
C: colorimeter
—: acid flex tube —: clear standard tube

リジン水溶液中の臭素の濃度 0.05—0.8% について検討したところ, Fig. 2 に示すように臭素の濃度は 0.2—0.4% が適当であった.

ピリジン: 0.5% 臭素水溶液と等容量の各種濃度のピリジン水溶液の混液について検討した. Fig. 3 からピリジンの濃度は 5—12% が適当であった. これらの混液を常温で 24 hr 放置後使用したところ, 約 2 倍のブランク値を示した. 冷蔵庫に 24 hr 保存したものはわずかにブランク値の増加を認めた. したがって, これらの液は用時混和して製するか, 冷蔵庫に保存し 8 hr 以内に使用する.

チオ硫酸ナトリウム液: 0.01—2N チオ硫酸ナトリウム液を用いて検討したところ, 0.4—2N の液で同一の吸光度を示したので 0.5N チオ硫酸ナトリウム液を使用することとした.

水酸化ナトリウム液: 0.1—5N 水酸化ナトリウム液を用いて検討したところ, 吸光度は 0.1N: 0.102, 0.25N:

Fig. 2. Effect of Concentration of Bromine in 5% (v/v) Pyridine Solution

A: thiamine HCl solution, 50 μg/ml
B: thiamine HCl solution, 0 μg/ml (reference)

Fig. 4. Effect of pH of Thiamine Solution
thiamine HCl solution 50 μg/ml

2) 計算式 塩酸チアミンの量 (mg) = 塩酸チアミン標準品の量 (mg) × $\frac{E_T}{E_S} \times \frac{1}{4}$

ただし, E_S = 標準溶液から得た吸光度

E_T = 試料溶液から得た吸光度

3) 定量条件の検討 定量用回路 (Fig. 1) にしたがって, つぎの諸条件について検討した (塩酸チアミン標準溶液 50 μg/ml).

i) 試薬の濃度——臭素: 臭素水溶液とピリジン水溶液を各別のチューブを用いて混合したのち発色操作を行なったところ, 1.5—2.0% の臭素が必要であり, なおブランク値が大となり, かつ回路中に沈殿を生じたので, 臭素水溶液とピリジン水溶液の混液を使用することを試みた. 5% ピ

Fig. 3. Effect of Concentration of Pyridine in 0.25% (w/v) Bromine Solution

—x—: thiamine HCl solution, 50 μg/ml, reagent was prepared before use.
---x---: thiamine HCl solution, 0 μg/ml, reagent was prepared before use.
—●—: thiamine HCl solution, 50 μg/ml, reagent was used after 24 hr.
---●---: thiamine HCl solution, 0 μg/ml, reagent was used after 24 hr.

Fig. 5. Flow Diagram to Examine Oxidation Time of Thiamine HCl by Bromine-pyridine Solution

Denotements are same with Fig. 1.

0.192, 0.5N: 0.210, 1N: 0.227, 2N, 3N, 5N: 0.240 であった。2N 以上の高濃度では吸光度は一定であった。しかし、ブランク値が著しく増大したので、やや一定した 1N 水酸化ナトリウム液を使用することとした。

ii) 試料溶液の pH——pH 1—13 までの試料溶液を塩酸または水酸化ナトリウム液を用いて操作直前に調製して試料溶液の pH による影響を検討したところ、Fig. 4 に示すように pH 2.0—6.5 まで測定波長 440 mμ における吸光度に変化を認めないが、pH 2.5 以下および 6.0 以上では 430 mμ より短波長側の吸光度が増大した。試料溶液の pH は 3.0—5.0 が適当である。pH 12 以上ではチアミンは呈色しなかった。

iii) チアミンと臭素・ピリジン混合水溶液との反応の時間と温度の影響および呈色液の安定性——つぎの回路 (Fig. 5) によって、チアミン標準溶液 80 ml と臭素・ピリジン混合水溶液 170 ml を混和してから過量の臭素をチオ硫酸ナトリウム液で分解するまでの時間および温度の吸光度に及ぼす影響を検討した。Fig. 6-a に示すように、チアミンと臭素・ピリジン混合水溶液は速やかに反応し、25° で約 9 min, 0—5° では 20 min 経過しても呈色液の吸光度に変化を認めなかった。

Fig. 6a. Effect of Oxidation Time and Temperature

Fig. 6b. Effect of Standing Time on Absorbance

—: 0° - - - - : 25°
thiamine HCl solution, 50 μg/ml

thiamine HCl solution, 50 μg/ml
temp., 25°

なお、回路のポンプを停止して、スタンダードフローセル内の呈色液の経過時間による吸光度の変化を調べた。呈色液は Fig. 6-b に示すように 25° で約 12 min 吸光度に変化を認めなかった。

II. 比色定量法 (手動法) 試薬の濃度および反応条件はオートアナライザーによる方法を準用した。

定量操作 標準溶液 (S), 試料溶液 (T) および水 (B) のそれぞれ 5 ml を正確にはかり、各別の 50 ml のかっ色メスフラスコに入れ、これらに水 4 ml ずつ加え、氷水中で冷却し、同様に冷却した臭素・ピリジンの混合水溶液 20 ml を加えて混和し、冷却を続ける。2 min 後、標準溶液 (S) の反応液に 0.5 N チオ硫酸ナトリウム液 4 ml, 1 N 水酸化ナトリウム液 15 ml を順次振り混ぜながら加え、水を加えて 50 ml とし、水を対照とし、ただちに層長 10 mm で波長 445 mμ における吸光度 E_S を測定する。つぎに試料溶液 (T) および水 (B) の入った液についても順次同様に操作して吸光度 E_T および E_B を測定する。

$$\text{塩酸チアミンの量 (mg)} = \text{塩酸チアミン標準品の量 (mg)} \times \frac{E_T - E_B}{E_S - E_B} \times \frac{1}{4}$$

吸収スペクトルおよび検量線の作成 手動法 (manual method) によって得た呈色液の吸収スペクトルの極大波長は 445 mμ である (Fig. 7)。

手動法による定量法では測定時の塩酸チアミンの濃度 1—10 μg/ml につき検量線を作成した。その間良好な直線性を示した (Fig. 8)。なお、オートアナライザー法では塩酸チアミン標準溶液の濃度 20—150 μg/ml の範囲で直線性を示した。

チアミンの安定性と呈色 0.1 N 塩酸または 0.1 N 水酸化ナトリウム液を用いて pH 1—12.2 のチアミン水溶液を調製し、25° で 6 日間保存し、測定時 0.1 N 水酸化ナトリウム液または 0.1 N 塩酸で pH 約 3.5 にし、倍容量に希釈 (塩酸チアミンとして 50 μg/ml) し、Fig. 1 にしたがって操作した。pH 1—5: 0.220, pH 7: 0.211, pH 10: 0.125, pH 12.2: 0.008 であった。この結果はチオクロームけい光定量法^{7,8)} による結果と同様な傾向を示した。臭素とピリジンによる反応はアルカリによるチアミン分解物とは呈色しないものと解せられる。

共存物質の影響 チアミンは保健薬または解熱鎮痛剤などに配合されているので、これらの製剤に含有される成分の影響を検討した (オートアナライザー使用, 塩酸チアミン標準溶液 50 μg/ml)。

Table I に示すように、テオフィリン、テオブロミンは同様に呈色したが、カフェインは 3 倍量まで影響を与えない。バルビツール酸系催眠剤、尿素系催眠剤も影響しなかった。通常の配合量で影響を与えたものはスルピ

7) M. Fujiwara, K. Matsui, *Anal. Chem.*, **25**, 810 (1953) にはチオクローム反応によるチアミンの定量において試料溶液の pH は 1—7 がよいとある。

8) D.J. Hennesy, L.R. Cerecedo, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 179 (1939).

Fig. 7. Absorption Spectra of Colored Solution obtained by Manual Method

A: thiamine HCl 250 $\mu\text{g}/50\text{ ml}$
reference...solution of curve B
B: blank test solution (in the absence of thiamine HCl)
reference...water

Fig. 8. Calibration Curve of Thiamine at 445 $\text{m}\mu$ by Manual Method

TABLE I. Effect of Various Ingredients on Determination (by Autoanalyser)

No.	Compounds	Coexisting ratio	Found (%)	No.	Compounds	Coexisting ratio	Found (%)
1	Riboflavine	1 : 1	135	23	Salicylamide	1 : 40	350
2	Pyridoxine HCl	1 : 1	105	24	Ethoxybenzamide	1 : 40	150
3	L-Ascorbic acid	1 : 40	100	25	Acetylsalicylic acid	1 : 40	240
4	Orotic acid	1 : 40	102	26	Antipyrine	1 : 40	260
5	Nicotinamide	1 : 40	102	27	Aminopyrine	1 : 40	159
6	B.T.D.S.	1 : 1	105	28	Sulpyrine	1 : 40	273
7	T.D.S.	1 : 1	114	29	N-Acetyl- <i>p</i> -aminophenol	1 : 40	195
8	Inosite	1 : 40	100	30	Barbital	1 : 40	100
9	Dehydrocholic acid	1 : 40	102	31	Allobarbitol	1 : 40	100
10	Choline tart.	1 : 40	100	32	Amobarbital	1 : 40	100
11	DL-Methionine	1 : 40	100	33	α -Bromovalerylurea	1 : 40	100
12	Sodium L-glutamate	1 : 40	100	34	Procaine HCl	1 : 40	152
13	Aminoethansulfonic acid	1 : 40	100	35	Noscapine HCl	1 : 40	130
14	L-Lysine	1 : 40	100	36	Diphenhydramine HCl	1 : 40	100
15	Calcium pantothenate	1 : 40	100	37	DL-Methylephedrine HCl	1 : 40	100
16	Glycyrrhizin	1 : 40	100	38	Chlorpheniramine maleate	1 : 40	100
17	DL- α -Tocopherylacetate	1 : 40	100	39	Codeine H_3PO_4	1 : 40	145
18	Creatine	1 : 40	100	40	Hydrocodeine H_3PO_4	1 : 40	110
19	Theobromine	1 : 1	135	41	Lactose	1 : 40	100
20	Theophylline	1 : 1	118	42	Glucose	1 : 40	100
21	Caffeine	1 : 10	105	43	Starch	1 : 40	100
22	Salicylic acid	1 : 40	250	44	Talc	1 : 40	100

thiamine HCl solution, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

リン, アミノピリン, アセトアミノフェン, サリチルアミド, アセチルサリチル酸, リボフラビン, 塩酸ピロカルピン, 塩酸ピリドキシンなどのフェノール類およびアミン類であった。リボフラビンは呈色反応に関与しないので, ブランクとして差し引けば妨害とならなかった。

リボフラビンが配合された場合の定量法 Fig. 4 のように、チアミンは試料溶液の pH 12 以上では呈色しなかった。リボフラビンは pH 3—13 で、その吸収極大 450 mμ における吸光度が変化しなかったので、試料溶液の pH を 12—13 とし、同様に操作すれば、リボフラビンのみの吸光度を知ることができる。したがって、定量操作にしたがい吸光度 E_s , E_T , E_B を測定し、別に試料溶液 5 ml をとり、水 4 ml と 1.2 N 水酸化ナトリウム液 1 ml を加え、以下同様に操作すれば、リボフラビンのみの吸光度 (E_T') が得られる。同時に試料溶液の代りに水 9 ml をとり、1.2 N 水酸化ナトリウム液 1 ml を加え、以下同様に操作して空試験値 (E_B') を得る。

$$\text{塩酸チアミンの量 (mg)} = \text{塩酸チアミン標準品の量 (mg)} \times \frac{(E_T - E_B) - (E_T' - E_B')}{E_s - E_B} \times \frac{1}{4}$$

Table II に示したように、処方 2 例を調製し、おのおのにつき手動法およびオートアナライザー法により繰返し定量を行なったところ満足な結果が得られた。

TABLE II. Recovery of Thiamine HCl in Synthetic Preparation by Automatic and Manual Methods

Composition I	(mg)	Composition II	(mg)
Thiamine HCl	10	thiamine HCl	10
Orotic acid	75	glycyrrhizin	10
Riboflavine	2	L-ascorbic acid	20
L-Ascorbic acid	20	dehydrocholic acid	5
Cyanocobalamine	0.001	aminoethanesulfonic acid	10
Inosite	5	calcium pantotheate	15
Choline tart.	5	L-lysine HCl	10
Dehydrocholic acid	25	nicotinamide	10
DL-Methionine	25		
Aminoethanesulfonic acid	25		
Siassmen (enzyme)	30		
Recovery of thiamine HCl			
Average	100.1% (100.3%) ^{a)}	100.2% (100.5%) ^{a)}	
Standard deviation	0.75 (0.62)	0.72 (0.70)	
Frequency	10 (10)	10 (10)	

a) manual method

結 語

この臭素・ピリジン混合水溶液によるチアミンの定量法にはつぎの特長があり、十分実用性のあるものと思われる。i) 操作が簡易である。ii) 精度がよい。iii) 高感度である (測定時のチアミン濃度 2 μg/ml で吸光度約 0.12)。iv) アルカリによって分解されたチアミンの分解物は呈色しない。

なお、多種混合製剤への応用および呈色機構について検討中である。

謝辞 終わりに臨み本研究に際し、終始御懇篤なる御指導を賜りました京都大学 宇野豊三教授に感謝致します。また多大の御便宜と御助言をいただきました所長 石館守三博士、薬品部長 井上哲男博士、前医薬品部長 山本展由博士に感謝致します。