

Title	蛍光光度法によるクロマトグラムの直接定量(蛍光デンシドメトリー)(III)レセルピンの定量
Sub Title	
Author	西沢, 秀幸(Nishizawa, Hideyuki) 佐々木, 順子(Ishihara, Masao) 石原, 政雄
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1969
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.14 (1969.) ,p.95- 96
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学会講演要旨
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000014-0095

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Riboflavin は塩基性水溶液に光照射して Lumiflavin に分解し、氷酢酸で酸性としてクロロホルム抽出し、これを測定して定量される。そこで Riboflavin を光分解し、得られたクロロホルム抽出物を薄層板上にスポットし、クロロホルム：アセトン：氷酢酸=7:3:2 により展開したところ、得られるクロマトグラムは時により、様相を異にし、分解産物の量的な再現性の点でも問題を有している様であった。この変化を検討したところ、抽出後の溶液についても時間経過と共にスポット数が増し、全体的な蛍光量も減少する傾向にある事を見出し、この点について、検討の結果、抽出溶媒のクロロホルムを 1,2-ジクロロエタンに置き換える事により Lumiflavin の不安定問題は解決された。

溶液法による定量法を、クロマトグラム上の定量に移行するに当っては、スポットに先立ち、濃縮し、クロマト板上に定量的にスポットされなければならない。約 6 ml ある 1,2-ジクロロエタン溶液を定量的に濃縮するには、その 5 ml をピペットで正確にとり、減圧下で濃縮し、完全に乾固した後、0.1 ml 氷酢酸によって溶解する方法をとった。スポットは 5 μ l の定容量キャピラール (Drummond 製 Microcaps) により行ったが、これに際し、薄層板を傷つける事は、原点に塗布された試料が失われて、ぼらつきの原因となるので、これを防ぐ為の器具を考案し使用した。

展開後のクロマトグラムは黄緑色の Lumiflavin のスポットが Rf 値 0.4 附近にあり、他に Rf 値 0.7 附近に青色のスポットが見られるが、この Lumiflavin の蛍光は展開溶媒の揮散と共に変化し、風乾状態、約 1 時間を経て安定状態に到達するのでこれを待って測定を行う事が適当である。

検量線を描くに当り、薄層クロマトグラム上に存在する Lumiflavin 量と、そこに生ずる蛍光量との間の直線関係が保証される範囲を知る為、Riboflavin 光分解物から Lumiflavin を単離し、これを酢酸に溶かして、標準試料とし、実測したところ、1 スポット当り、Lumiflavin が約 1 μ g 以下に直線関係が得られた。

以上に基き、Riboflavin 定量法を次の様に定めた。Riboflavin の 1%酢酸溶液 1 ml に 1N 水酸化ナトリウム 2 ml を加え、1 時間光分解後、氷酢酸 0.2 ml で酸性とし、1,2-ジクロロエタン 6 ml を加えて抽出し、その 5 ml を減圧濃縮し乾固させる。これに酢酸 0.1 ml を加えて溶解させ、その 5 μ l をスポットし、展開後 1 時間風乾して蛍光測定する。この方法により標準 Riboflavin 溶液につき検量線を作成したとえろ 24~0.6 μ g/ml (検体量 1 ml) 間の検量線が得られた。又、製剤中の Riboflavin 定量に応用する事を検討した。

1) 石原, 西沢: 日本薬学会第88年会講演要旨集 p.282 (1968)

蛍光光度法によるクロマトグラムの直接定量 (蛍光デンシドメトリー)

(III) レセルピンの定量

西沢秀幸, 佐々木順子, 石原政雄

(日本分析化学会第17年会 (1968.10) にて発表)

先に試作されたスキャンニング蛍光光度計は薄層クロマト上に存在する蛍光物質の直接定量を可能とする。これによれば蛍光定量において目的物の単離手段として、クロマトグラフ法を用い

No. 14 (1969)

る場合には、その操作が短縮され、かつ盲蛍光による測定障害が減じる筈である。一般の蛍光定量法においても、これが有効手段となると思われたので、レセルピンについてこの装置を用いる蛍光定量法の開発を検討した。

レセルピンの蛍光定量法を¹⁾ Bechene は抽出されたレセルピンを 5N 酢酸溶液とし過酸化水素水との加熱で生ずる蛍光物質を蛍光定量する方法をとっている。これに従って過酸化水素水量と加温時間を再検討し、5N 酢酸溶液 10 ml に対し 3% 過酸化水素水 0.15 ml 使用し 45 分間沸騰水浴中での加温により更に強い蛍光が得られた。この方法は溶液法であるから盲蛍光物質の障害を受け易く実用的には、単離操作を経ねばならない。これに薄層クロマトグラフ法による単離操作を付加するには、溶液を濃縮し、含まれている蛍光物質の出来るだけ多量を定量的に薄層板上にスポットすることが必要であり、その濃縮法を検討した。

濃縮は減圧下で行ったが蛍光量の減少が見られ、原因と思われる残存過酸化水素水の影響を除く為、チオ硫酸ナトリウム或はシステイン添加を試みたが成功せず結局、減圧濃縮時の水浴温度を 30°C 以下に保つことで蛍光減少を見ることなく濃縮が出来た。濃縮は最終濃度を知る為乾固するまで行い、これを 0.1 ml の 5N 酢酸で溶解した液を薄層板にスポットする方法を採用した。

展開溶媒は、n-ブタノール：氷酢酸：水を 4：1：3 とした。レセルピンは Rf 値 0.55 に紫外線照射で、青色の 1 つのスポットとして検出された。

展開、風乾後の蛍光値のバラツキは時間の経過と共に減少し 4.5 時間以後は安定となったが、溶媒揮散後、直ちに 110°C で 30 分間加熱すると定常状態に達することがわかった。

薄層板上に存在する物質と蛍光量の関係は、レセルピン標準溶液の発蛍光操作した溶液を希釈し 1 スポット (5 μ l) 当り 10 μ g~0.01 μ g を塗布し、展開後測定した結果 1 μ g~0.005 μ g の間に直線関係が存在した。これより高濃度では濃度に起因する消失、又これ以下では原因不明の蛍光増大が見られ定量には不適當となることがわかった。

以上の結果に基いて、レセルピンの 5N 酢酸溶液に 3% 過酸化水素水 0.15 ml と、5N 酢酸溶液を加えて全量 10 ml とし、45 分間沸騰水浴中で加温後 30°C 以下で減圧濃縮乾固に至らせる。これを 0.1 ml の 5N 酢酸溶液で溶かして、その 5 μ l を薄層板上にスポットし前記の溶媒で 1.5 時間展開し、溶媒揮散後 110°C で 30 分間加熱し冷後測定することを定量法とした。これに従いメルク社製レセルピンを標準試料とし作製した検量線は 1 μ g~0.05 μ g 間で、直線関係を有し、定量法として利用出来ることを示した。又 0.05 μ g 以下の量と製剤中の定量については、検討中である。

1) Bechene, E.B., J. Am Pharm. Assc., Sci. Ed. **44**, 659 (1955).

蛍光光度法によるクロマトグラム上の直接定量 (蛍光デンストメトリー) (IV) 塩酸エメチンの定量

西沢秀幸, 高瀬玲子, 石原政雄

(日本分析化学会第17年会 (1968.10) にて発表)

先に試作されたスキャンニング蛍光光度計は、クロマトグラム上に存在する蛍光性物質の定量