慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	螢光光度法によるクロマトグラム上の直接定量(螢光デンシトメトリー)(V)Estriolの定量
Sub Title	
Author	西沢, 秀幸(Nishizawa, Hideyuki) 丸島, 功子(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.97- 98
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=AN00062898-00000014-0097

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.

を目的とするものであるが，これを用いて螢光分析の操作を簡易化することを目的として塩酸エメチンの定量を検討した．

塩酸エメチンはヨウ素4モルを消費して黄色の強い螢光を生ずることが知られ，これを利用する螢光定量法が報告されている[1]が，試料中に螢光性の物質が共存する場合の分離手段として薄層クロマトグラフ法を用い，更に直接定量する操作法については未検討である．

エメチンにヨウ素を作用させて得た螢光性溶液をクロマトプレートにイソブタノール，酢酸，水（4：2：3）の溶媒を用いて展開すると黄色のスポットと他の3ツの青色のスポットに分れるが，黄色の螢光が最も強いのでこれを測定対象とした．このスポットの現われ方は反応に使用するヨウ素の量によって変化し，ヨウ素量を増すことによって青色の螢光が減少し黄色の螢光が強まるが，ヨウ素量を著しく増した場合には黄色の螢光も減じる．しかし塩酸エメチン 0.8μg/ml エタノール溶液 10 ml に対し 0.6% ヨウ素エタノール溶液を 0.01～1.0 ml の範囲で使用し 30～60 分沸騰水浴中で還流した場合には黄色螢光の量はほぼ同一で，煮沸時間がこの範囲以上，以下では螢光が減じることが知られた．この溶液は極めて安定で一週間室温で放置してもその螢光強度は変化しなかった．薄層板にこれをスポットするには濃縮が必要とされるので，この液を減圧下に 35～40° の水浴中で乾固させ，これを 0.1 ml のメチルエチルケトンで溶解して，その 5μl を薄層板上に直径約 5 mm のスポットとし，前記溶媒により展開を行った．展開後クロマトグラム上の螢光は溶媒の揮散直後は著しいバラツキを示すが，一般的には経時的に増加し安定化に約3時間を要する．しかし展開後のプレートを 110° の恒温槽中で加温したところ，加温時間と共に螢光強度が増大し，約 15 分で安定状態に至り以後 60 分まで変化しないこと，また加温終了後約 10 分で安定化し以後3日間変化しないことが知られた．

以上の結果に従って定量条件を下記の如く定めた．塩酸エメチンのエタノール溶液 10 ml に 0.6% ヨウ素エタノール液 0.2 ml を加え，1時間煮沸後 35～40° で減圧下に乾固させ，0.1 ml のメチルエチルケトンを加えて溶解し，その 5μl を薄層板上にスポットして前記溶媒で展開後 110° の恒温槽中で 20 分加温し冷後螢光強度を測定する．

この場合，塩酸エメチン 0.02～2μg/ml の濃度間で直線的な検量線を得た．又，製剤である酸塩エメチン注射液について標準添加法で定量したところ満足し得る結果をみた．

また薄層板上にスポットとして存在する螢光量と測られた螢光量の関係については，塩酸エメチンの濃い溶液について螢光性化処理を行い，その希釈液をスポットして上記処理をして測定したところ，スポットあたり 1μg より少い範囲で直線関係が得られたが，1μg 以上を含むスポットは直線関係から外れ，濃度による消光が起きたことを示している．

1）市村陽二：分析化学，**10**，623（1961）．

螢光光度法によるクロマトグラム上の直接定量（螢光デンシトメトリー）（V）Estriol の定量

西沢秀幸，丸島功子，石原政雄

（日本分析学会第17年会（1968.10）にて発表）

Estriol の定量法として，螢光光度法や，ガスクロマトグラフ法によるもの等が知られている

が，これらは，盲螢光物質の分離の為の操作が繁雑であったり，あるいは，機器のこなせる数が制約される等の問題があり，日常分析として，これを行うにあたっては，更に迅速，且つ，簡便な方法が望まれる．そこで，産婦人科系における，臨床化学的応用を目的として，妊婦尿中の estriol の定量を，薄層クロマトグラフィーにより単離を行ったのち，螢光発色し，scanning fluorometer を用いて，直接定量する方法を試みた．

①薄層クロマトグラフィーによる，尿中 estriol の単離：試料としては，常法に従って尿 1ml に，10 倍量の N-塩酸を加え，1 時間還流して，加水分解したものを，冷後 16 ml のエーテルで抽出し，エーテル層を，1 %-$NaHCO_3$ 及び，精製水で洗浄後，減圧下に濃縮，乾固し，エタノール 0.1 ml で溶解したものを使用した．試料は，その 5μl を薄層に spot し，展開させる．

抽出溶媒については，酢酸エチルエステル，クロロホルムも試みたが，共に 10% 以下の抽出率であり，エーテルでは，約 70% の抽出率であったので，結局，エーテルを使用した．

展開溶媒は，アセトン：ジクロルエタン＝3：2 の混合溶液を用いた．この溶媒は，共存螢光性物質を溶媒先端付近まで移動させ，estriol の spot は，ほぼ完全に，単離される．

②発色法の検討：クロマトグラム上の estriol を定量的に螢光性にするにあたって，液体試薬をスプレーする方法は，試薬の散布量が不均一になり易く，発色条件の再現性に問題を生じ易いので，これを避け，蒸気による方法を検討した．estriol を螢光性にする試薬として，硫酸，リン酸等が用いられるが，蒸気状態で作用させる目的で，発煙硫酸，塩化ホスホリル，クロルスルホン酸等を試みた．薄層板を試薬に曝すには，15×25×30 cm の密閉できるガラス製容器中に，小容器に入れた試薬と共に，薄層板を置く方法によった．次いで，薄層板を取出し，空気循環式恒温槽中で加熱したところ，クロルスルホン酸が，最も良い結果を示した．結局，展開後の薄層板を 110°C，30 分乾燥後，同時に処理する薄層板の数に応じて，クロルスルホン酸蒸気に 5～10 分曝し，次いで，140°C で 30～40 分加熱する事により，螢光強度が最大となったが，この螢光は，経時的に退色し，不安定なので，いろいろ試みたところ，更に，アミンに曝す事によって，経時的変化が少なく，且つ一段と螢光強度が増大する事を知り，アンモニア，ジエチルアミン，n-ブチルアミンについて検討した結果，ジエチルアミン蒸気に約 30 分曝すこととした．

上記の方法を，estriol NaOH 溶液を試料として，クロマトグラムに展開したものについて試みた結果，1-spot あたり，0.125～5μg の範囲で検量線に直線関係がみられた．また，正常尿 1ml を加水分解後，estriol を添加したものについて抽出定量した場合には，添加量 2.5～100μg の範囲で直線的な検量線が得られた．これは，妊婦尿中の estriol 濃度に対比される量であって，目的を達したものといえる．

螢光光度法によるクロマトグラム上の直接定量
(VI) ベルベリンの定量

西沢秀雄，佐藤与司子，奥津陽子，今井和子，石原政雄

（日本薬学会第89年会（1969．4）にて発表）

〔目　的〕　螢光々度法による定量に際して最も繁雑な操作を要する盲螢光物質の除去に薄層クロマトグラフ法を利用し，単離した目的物をクロマトグラム上で直接螢光測定する方法の開発