

報 文

o-ヒドロキシヒドロキノンフタレインとウラン(VI) を用いるチアミンの吸光光度定量*

森 逸男[®], 藤田 芳一, 坂口 紀美子^{**}

(1980 年 8 月 14 日受理)

メチルセルロース (MC) を分散剤とし pH 5.4 付近 としたときの o-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン (Qn. Ph.), ウラン(VI), チアミンの間に得られる 2:1:2 会合錯体の溶液 (A液), 並びに Qn. Ph. とウラン(VI) の間の 2:1 錯体の溶液 (B液) を用いるチアミン定量法を検討した. すなわち, A液とB液との 550nm における吸光度の差を測定して 0~32.0 µg/10 ml チアミンを簡便, 迅速に定量した. なお, 吸光度 0.001 を示す Sandell 表示の感度は 0.0054 µg/cm² チアミンである.

1 緒 言

総合ビタミン剤あるいは各種配合製剤に用いられているチアミンの定量法として, 従来チオクロム法¹⁾²⁾, ジアゾ法³⁾, ホルマリンアゾ法⁴⁾, あるいはこれら改良法が利用されているが, いずれも分析操作がやや複雑で再現性に難点を有する. 著者らは塩化セチルピリジニウム (CPC) のような陽イオン性界面活性剤併用下に Qn. Ph. を用いる金属イオン定量法が Qn. Ph. のみを用いる場合よりも定量感度の上昇, 呈色の安定性の増進することを認めた^{5)~7)}. 又, Qn. Ph. とウラン(VI) の呈色反応に塩酸パバベリンのような有機塩基の併用は陽イオン性界面活性剤と同じ作用を示して Qn. Ph. とウラン(VI) 及び塩酸パバベリンの間に会合錯体を生成するので, この呈色を塩酸パバベリンの定量に利用した⁸⁾. 今回塩酸パバベリンの代わりにチアミンを用いてもウラン(VI) と Qn. Ph. の間に同じような呈色反応を示すので, 新たに Qn. Ph. とウラン(VI) を用いるチアミンの簡便な吸光光度定量法について検討した.

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

Qn. Ph. 溶液: 既報^{5)~7)}に従って 1.0×10^{-3} M Qn.

* キサンテン系誘導体の分析化学への利用(第16報). 前報は森 逸男, 藤田芳一, 坂口紀美子, 辻 弘子, 榎 健寿: 分化, **29**, 723 (1980)

** 大阪薬科大学: 大阪府松原市河合 2-10-65

Ph. メタノール溶液を調製して用いた.

ウラン(VI) 溶液: 1.0×10^{-3} M 硝酸ウラニル水溶液を調製して用いた.

メチルセルロース (MC) 溶液: 0.5 % MC 水溶液を調製して用いた.

チアミン溶液: 硝酸チアミン, 塩酸チアミンの各 5.0×10^{-4} M 水溶液を調製して用いた.

なお, 試薬はすべて試薬特級, あるいは1級品を精製して用いた.

2.2 装 置

吸収スペクトル及び吸光度の測定に島津 UV-200 型, QV-50 型分光光度計でセル長 10 mm の石英製セルを用いた. 又, pH の測定に日立堀場 M5 型ガラス電極 pH メーターを用いた.

3 定量操作

32.0 µg 以下のチアミンを含む溶液に 0.5 % MC 液 1.0 ml, 1.0×10^{-3} M ウラン(VI) 液 0.75 ml, 酢酸塩緩衝液 (pH 5.4) 2.0 ml 及び 1.0×10^{-3} M Qn. Ph. 液 1.5 ml を加え, 次いで水を加えて全量 10.0 ml の溶液 (A液) とする. 別にチアミンのみ除いて同じように処理して得た Qn. Ph. とウラン(VI) の溶液 (B液) とともに (20~25) °C で 20 分間静置する. 次いで 550 nm における A 液, B 液の吸光度の差を測定し, あらかじめ作成して得たチアミン検量線よりチアミン濃度を求める.

4 実験結果

4.1 吸収スペクトル

pH 5.4 付近において MC を分散剤とした Qn. Ph.-ウラン(VI)-チアミンの溶液 (A 液) と Qn. Ph.-ウラン(VI) の溶液 (B 液) の間には, Fig. 1 に示すように著しい呈色の差があり, 特に波長 550 nm における吸光度の差が顕著である. なお, 550 nm 付近の吸光度はチアミン濃度に比例して変化するので, 以下定量操作の検討に A 液, B 液の 550 nm における吸光度の差を求めることとした.

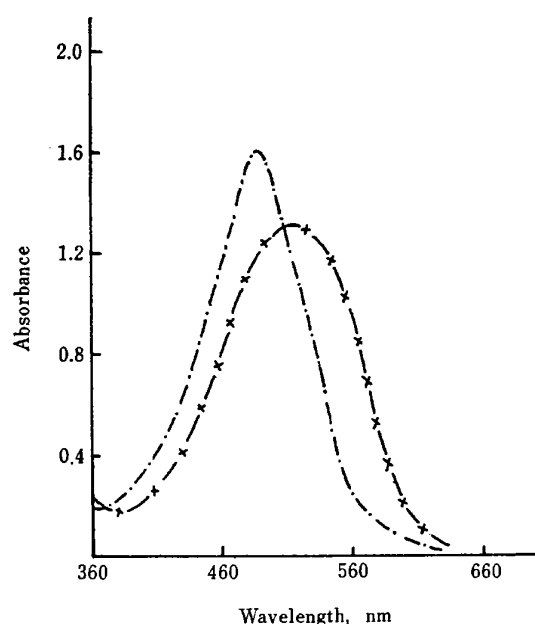


Fig. 1 Absorption spectra of Qn. Ph.-U(VI) and Qn. Ph.-U(VI)-thiamine solution at pH 5.4.

Thiamine : 1.0×10^{-4} M; Qn. Ph. : 5.0×10^{-5} M;
U(VI) : 5.0×10^{-5} M; MC : 1.0 ml of 0.5 % MC
solution; Reference : Water; --- Qn. Ph.-U(VI)
solution; -×- Qn. Ph.-U(VI)-thiamine solution

4.2 pH の影響

Walpole の酢酸緩衝液を全量 10 ml に対し 1.5 ml 以上加えて pH 5.1~5.7 に調整するとき, A 液と B 液との 550 nm における吸光度の差は一定値を示す. 従って以下の検討に pH 5.4 の緩衝液 2.0 ml を全量 10 ml に対し用いることとした.

4.3 MC の影響

Qn. Ph.-ウラン(VI)-チアミン会合錯体の溶液 (A 液) の分散剤として非イオン性界面活性剤のカルボキシメチルセルロース (CMC), ポリビニルアルコール

(PVA), ポリビニルピロリドン (PVP), セラチン, ラビアゴム, トラガント, MC, Tween 20 など, 並びに陰イオン性界面活性剤のラウリル硫酸ナトリウム (SLS), アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムについて検討した. その結果 Table 1 及び Fig. 3 に示すように, 非イオン性界面活性剤の 0.5 % MC 液を全量 10 ml に対し 0.75 ml 以上を添加するとき, 一定で安定な A 液を得るので, 以下分散剤に 0.5 % MC 液 1.0 ml を用いた.

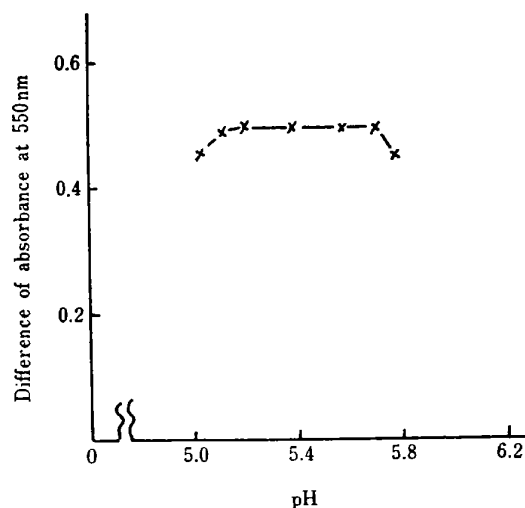


Fig. 2 Effect of pH on absorbance of Qn. Ph.-U(VI)-thiamine solution

Thiamine : 1.0×10^{-5} M; U(VI) : 7.5×10^{-5} M; Qn. Ph. : 1.5×10^{-4} M; MC : 1.0 ml of 0.5 % MC solution; Reference : Water

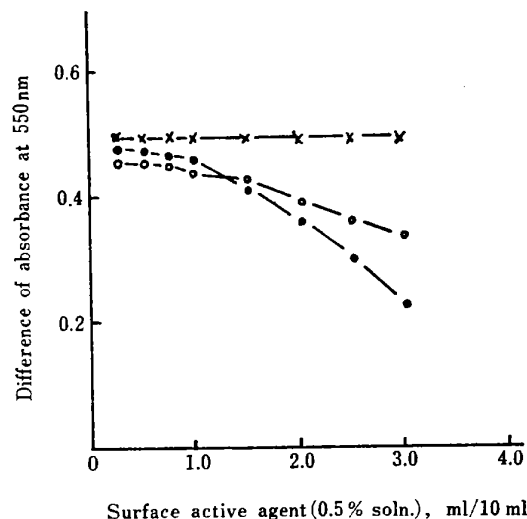


Fig. 3 Effect of concentration of surfactants solution on absorbance of Qn. Ph.-U(VI)-thiamine solution

Thiamine : 1.0×10^{-5} M; U(VI) : 7.5×10^{-5} M; Qn. Ph. : 1.5×10^{-4} M; -×- MC; -○- Acacia; -●- ABS; Reference : Water

Table 1 Effect of surface active agents

Surfactants	Difference of absorbance at 550 nm
Methylcellulose (MC)	0.490
Carboxymethylcellulose (CMC)	0.423
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	0.027
Polyvinylalcohol (PVA)	0.020
Gelatin	0.010
Tolagant	0.437
Acacia	0.442
Tween 20	0.035
Sodium laurylsulfonate (SLS)	0.412
Sodium alkylbenzenesulfonate (ABS)	0.453

Thiamine·HCl : 33.7 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$; U(VI) : $7.5 \times 10^{-5}\text{ M}$; Qn. Ph. : $1.5 \times 10^{-4}\text{ M}$; Surfactants : 1.0 ml of 0.5 % surfactants solution; pH : 5.4; Reference : Water; Difference of absorbance : A solution-B solution

4.4 Qn. Ph. とウラン(VI) 量の影響

$1.0 \times 10^{-5}\text{ M}$ チアミンの定量に対し, ウラン(VI) : Qn. Ph. = 1 : 2 の $7.5 \times 10^{-5}\text{ M}$ ウラン(VI) と $1.5 \times 10^{-4}\text{ M}$ Qn. Ph. を用いるとき, A液とB液との吸光度は一定で最大の差を示した. 従って以下, 全量 10 ml に対し $1.0 \times 10^{-5}\text{ M}$ ウラン(VI) 液 0.75 ml, $1.0 \times 10^{-5}\text{ M}$ Qn. Ph. 液 1.5 ml を用いることとした.

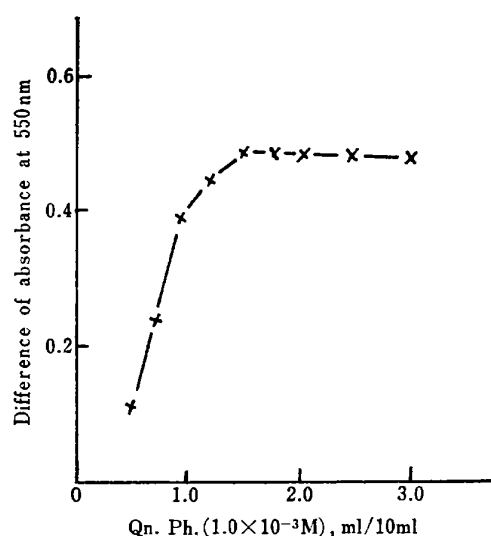


Fig. 4 Effect of concentration of Qn. Ph. solution on absorbance of Qn. Ph.-U(VI)-thiamine solution

Thiamine : $1.0 \times 10^{-5}\text{ M}$; U(VI) : $7.5 \times 10^{-5}\text{ M}$; MC : 1.0 ml of 0.5 % MC solution; pH : 5.4; Reference : Water

4.5 呈色の安定性

MC 共存下の A 液及び B 液の呈色は (20~25)°C の室温で 15 分間以上静置するとき, それぞれ一定の吸光度に達し, 550 nm における A 液と B 液との吸光度の差は 120 分以内安定で一定値を示す.

4.6 検量線の作成

3 の定量操作に従って検量線を作成するとき, 0~32.0 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ チアミン濃度範囲において原点を通る良好な直線性を示した. なお, 吸光度 0.001 を示す Sandell 表示の感度は $0.0054\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ チアミンである.

4.7 共有物質の影響

本定量法における鉄(III), 銅(II), 鉛(II) などの金属イオンの妨害は, あらかじめ 10^{-3} M EDTA を添加することによりマスキング除去できるが, クエン酸, シュウ酸イオンなどの陰イオンの共存は, それぞれ負の誤差, 正の誤差を与える. 又, チアミンに配合されるビタミン類の影響を検討したところ, Table 2 に示すようにシアノコバラミン, ピリドキシン, パントテン酸は妨害するが, その他ビタミン類の共存はほとんど妨害しない. なお, チアミンの 2 倍モル量以内のピリドキシン, パントテン酸の共存は影響を与えない.

Table 2 Effect of foreign substances

Foreign substances	Added as	Added ($\mu\text{g}/10\text{ ml}$)	Difference of absorbance at 550 nm	
			Method A	Method B
—	—	—	0.490	0.326
Fe(III)	sulfate	1.4	0.543	0.330
Cu(II)	nitrate	6.4	0.580	0.326
Pb(II)	chloride	10.6	0.571	0.326
Al(III)	chloride	1.4	0.623	0.326
$\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	acid	9.0	0.533	
$\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COO}^-)_3$	acid	19.2	0.401	
F^-	sodium salt	19.0	0.401	
Pyridoxine	hydrochloride	82.2	0.560	
Riboflavin	—	376.4	0.498	
Folic acid	—	441.4	0.485	
Biotin	—	244.3	0.490	
Nicotinamide	—	122.1	0.483	
Ascorbic acid	—	176.1	0.490	
Cyanocobalamin	—	135.5	0.575	
Pantotenate	calcium salt	190.6	0.533	

Thiamine·HCl taken : 33.7 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$; U(VI) : $7.5 \times 10^{-5}\text{ M}$; Qn. Ph. : $1.5 \times 10^{-4}\text{ M}$; MC : 1.0 ml of 0.5 % MC solution; pH : 5.4; Reference : Water; Method A : EDTA not added; Method B : 1.0 ml of $1.0 \times 10^{-3}\text{ M}$ EDTA solution/10 ml

4.8 錯体の組成

MC 共存下に pH 5.4 付近で得られる Qn. Ph. とウラン(VI) とチアミンの間に得られる 会合錯体の組成比をモル比法により求めた. その結果, Fig. 5 に示すように Qn. Ph. : ウラン(VI) : チアミン = 2 : 1 : 2 の組成比を得た.

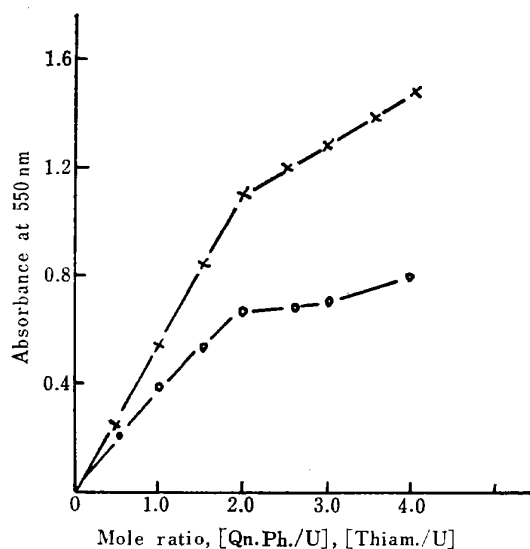


Fig. 5 Composition of the complex as obtained by the molar ratio method

—x— [Qn. Ph.]/[U(VI)], U(VI) : 4.0×10^{-5} M, Qn. Ph. : 5.0×10^{-4} M $\times$ ml/10 ml, pH : 5.4, MC : 1.0 ml of 1.0 % MC solution, reference : water; —o— [Thiamine]/[U(VI)], U(VI) : 4.0×10^{-5} M, Qn. Ph. : 8.0×10^{-5} M, thiamine : 5.0×10^{-4} M $\times$ ml/10 ml, pH : 5.4, MC : 1.0 ml of 1.0 % MC solution, reference : water, difference of absorbance at 550 nm

4.9 応用例

チアミン製剤中のチアミンの定量に本法を応用したところ, Table 3 に示すように従来のチオクロム法⁹⁾に類似した定量結果を得た。

Table 3 Analytical results of thiamine in thiamine pharmaceuticals

Sample	Thiamine		Recovery of proposed method† (%)
	Calcd. (%)	Found (%)	
Thiamine-HCl injection	1.0	1.01	98.0~103.5
Thiamine-HNO ₃ powder	10.0	10.82	99.7~105.2

† Thiamine taken : (8.4~16.8) μ g/10 ml

5 結果及び考察

MC を分散剤に pH 5.4 付近でウラン(VI) : Qn. Ph. : チアミン = 1 : 2 : 2 の会合錯体を用いるチアミンの本吸光度定量法は Sandell 表示の感度 $0.0054 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で, $0 \sim 32.0 \mu\text{g}/10 \text{ ml}$ 濃度範囲のチアミンの定量に用いる。なお本法の定量感度は従来のチオクロム法⁹⁾¹⁰⁾の約 5 倍, ジアゾ法の約 2 倍, ホルマリン法の約 20 倍で, 550 nm における会合錯体の Qn. Ph.-ウラン(VI) 液との吸光度の差より求めた見掛けのモル吸光係数は $4.9 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。又, 本法の繰り返し変動係数は 1.44 % で再現性に優れ, 定量操作も簡便でチアミン製剤, 総合ビタミン製剤などのチアミン定

量法として利用可能である。

文 献

- 1) B. C. Jansen : *Rec. trav. Chim.*, **55**, 1046 (1936).
- 2) 藤田秋治 : “ビタミン定量法”, p. 215 (1955), (南江堂).
- 3) H. J. Prebluda, E. V. McCollum : *J. Biol. Chem.*, **127**, 495 (1939).
- 4) H. W. Kirneersly, R. A. Petes : *Biochem. J.*, **28**, 667 (1934).
- 5) 森 逸男, 藤田芳一, 榎 健寿 : 薬誌, **98**, 1145 (1978).
- 6) 森 逸男, 藤田芳一, 榎 健寿 : 分化, **28**, 685 (1980).
- 7) 森 逸男, 藤田芳一, 榎 健寿 : 分化, **28**, 707 (1980).
- 8) 森 逸男, 藤田芳一, 榎 健寿 : 日本薬学会第 98 年会講演要旨集, p. 526 (1978).
- 9) 日本公定書協会 : “第 9 改正日本薬局方解説”, C-1045 (広川書店).
- 10) 日本薬学会編 : “衛生試験法注解”, 209 (1980), (金原出版).

☆

Spectrophotometric determination of thiamine with *o*-hydroxyhydroquinonephthalein and uranium(VI). Itsuo MORI, Yoshikazu FUJITA and Kimiko SAKAGUCHI (Osaka College of Pharmacy, 2-10-65, Kawai, Matsubara-shi, Osaka)

A new rapid and simple spectrophotometric method for the determination of thiamine with *o*-hydroxyhydroquinonephthalein (Qn.Ph.) and uranium(VI) in the presence of nonionic surface active agent (methylcellulose, MC) was established. This method based on the coloration of uranium(VI)-Qn.Ph.-thiamine, can be applied in the concentration range of $0 \sim 32 \mu\text{g}/10 \text{ ml}$ of thiamine. The sensitivity is estimated to be $0.0054 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for thiamine at an absorbance of 0.001 at wavelength of 550 nm against the Qn.Ph.-uranium(VI) solution and the apparent molar absorptivity is 4.9×10^4 . The recommended analytical procedure is as follows: Thiamine less than $32.0 \mu\text{g}$ was placed on a 10.0 ml measuring flask, and 1.0 ml of 0.5 % MC solution, 0.75 ml of 1.0×10^{-3} M Qn.Ph. solution were added. The pH of the solution was adjusted to 5.4 by the addition of 2.0 ml of 0.2 M sodium acetate-acetic acid buffer solution. Then the solution was diluted to 10.0 ml with water, kept at $(20 \sim 25)^\circ\text{C}$ for 20 min. And the difference of absorbance of the Qn.Ph.-uranium(VI)-thiamine solution and the Qn.Ph.-uranium(VI) solution was measured at 550 nm against water. The molar ratio of uranium(VI), Qn.Ph. and thiamine in the associated complex was estimated to be 1 : 2 : 2 by the continuous variation method and molar ratio method. The effect of interfering substances was described. (Received Aug. 14, 1980)

Keyword phrases

determination of thiamine; spectrophotometry; with *o*-hydroxyhydroquinonephthalein-uranium(VI) complex; associated complex.