

ノ ー ト

3-(2-ピリジル)-5,6-ジフェニル-1,2,4-トリアジン-コバルト錯形成を利用したビタミン B₁₂ の間接吸光光度定量

酒井 忠雄[®], 大野 典子*, 佐々木英人**

(1991年1月11日受理)

1 緒 言

ビタミン B₁₂ (V.B₁₂) 化合物には, シアノコバラミン, ヒドロキソコバラミン, メコバラミンなどがあり, 悪性貧血の治療薬, 栄養補給の薬として広く使用されている. これらの化合物は吸湿性が強く, 又光により徐々に分解すること, 発酵生産のためロットごとの純度試験が必要であることなど, 品質管理のうえからも V.B₁₂ を簡便に感度よく定量することが要求されている. V.B₁₂ は主に紫外部の吸収により定量されている¹⁾が, 付近に類似の吸収をもつ化合物, 例えばビタミン A, ビタミン B₆ などが含まれている複合製剤には適用できない. V.B₁₂ はポルフィリン骨格の中心に Co を有することから, Co に着目した定量法²⁾³⁾が報告されている. いずれの方法も試料の前処理法はほぼ同じであるが, ニトロソ-R 塩による発色には 40 分を要すること, コバルト錯体のナフタレン捕集, 再溶解などの操作が煩雑であること, などの欠点がある. 又モル吸光係数は 2~4 万と小さく感度も低い.

著者らは 3-(2-ピリジル)-5,6-ジフェニル-1,2,4-トリアジン (以下 PDT と略記) が Fe, Ni などの金属イオンと安定なキレート陽イオンを生成し, テトラプロモフェノールフタレインエチルエステル (以下 TBPE と略記) と大きなモル吸光係数 (約 20 万) を有するイオン会合体を形成することを見いだした⁴⁾⁵⁾. 又, Co も PDT とキレートを生成し TBPE とイオン会合体を形成し, 大きなモル吸光係数を有することが分かった. そこで, V.B₁₂ の間接定量に応用したところ, 複合ビタミン

剤中の V.B₁₂ を高感度を選択的に定量することができたので報告する.

2 実 験

2・1 試 薬

Co(II) 標準溶液: 硝酸コバルト(II) 六水和物 (ナカライテスク製) 0.494 g を 0.1 M 塩酸に溶かして 100 ml とし, 1000 μg ml⁻¹ 溶液を調製した. EDTA による滴定法で濃度を標定した. この溶液を適宜希釈して使用した.

PDT 溶液: 3-(2-ピリジル)-5,6-ジフェニル-1,2,4-トリアジン (ドータイト製) 0.466 g をエタノールに溶かして, 200 ml とし, 7.5×10⁻³ M 溶液を調製した.

TBPE 溶液: テトラプロモフェノールフタレインエチルエステルカリウム塩 (ナカライテスク製) 0.189 g をエタノールに加温溶解し 200 ml とし, 1.35×10⁻³ M 溶液を調製した.

緩衝液: 0.05 M 四ホウ酸ナトリウムと 0.15 M リン酸二水素カリウムの混合溶液を, 6 M 又は 1 M の水酸化ナトリウム及び硫酸溶液を用いて, pH を調節した.

その他の試薬, 有機溶媒は市販の特級を使用した.

2・2 装 置

吸収スペクトル及び吸光度の測定には, 島津製 UV-365 形自記分光光度計を使用した. セルは光路長 10 mm のパイレックスセルを使用した. 東亜電波製 HM-5B 形 pH メーター, イワキ製 KM 式万能シェーカー, 日立製 05P-21 形遠心分離器を使用した.

2・3 定量操作

0.5~2.5 μg の Co を含む試料溶液をメスフラスコに採り, 10⁻⁴ M KIO₄ 1 ml, 2% タイロン 1 ml, 7.5×10⁻³

* 朝日大学教養部化学教室: 501-02 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851

** 鳥取大学工学部工業化学科: 680 鳥取県鳥取市湖山町南 4-1-1

M PDT 1 ml, pH 9 の緩衝液 10 ml, 1.35×10^{-3} M TBPE 溶液 1 ml 添加し, 水を加えて全量を 50 ml とする. よく混合し分液漏斗に移し, 1,2-ジクロロエタン 10 ml を加え 5 分間振り混ぜる. 分離後有機相を分取し, 遠心分離して水滴を取り除く. 水又は試薬から試験液を対照として, 610 nm における吸光度を測定する.

3 結果と考察

3.1 吸収スペクトル

水溶液中で Co-PDT キレートは黄色を発した. Co-PDT キレートは一一価のイオン会合性試薬 TBPE を共存させると, 1,2-ジクロロエタンに抽出される. この会合体は極大吸収波長を 610 nm にもつ青色を発した. 会合体の組成を連続変化法により検討したところ, Co: PDT: TBPE=1:3:2 の結果が得られ, 会合体は $\text{Co}(\text{PDT})_3(\text{TBPE})_2$ と推定される.

3.2 pH の影響

Co-PDT キレートの生成に及ぼす pH の影響を検討した (Fig. 1). pH 6 以上になると PDT の溶解度が下がり沈殿が生成するため, 25% アルコール-水系で検討した. pH 4~9.5 の範囲ではほぼ一定の Co-PDT キレートが生成した (曲線 1). 又 TBPE によるイオン会合体の抽出に及ぼす pH の影響を検討したところ, pH 8.1~9.7 の範囲で一定の吸光度が得られた (曲線 2). PDT がアミンであるため, TBPE と会合体を形成して抽出され, 試薬から試験液の吸光度はアルカリ性に

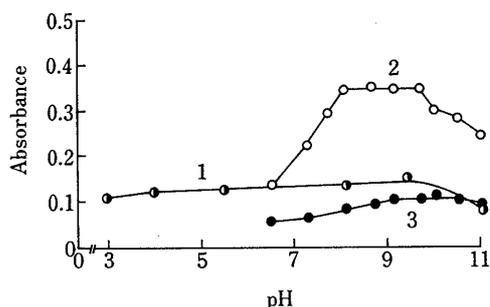


Fig. 1 Effect of pH on the formation of Co-PDT chelate in 25% aqueous ethanol solution and on the extraction of Co-PDT-TBPE associate

1: Co-PDT chelate, $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ Co, 3×10^{-4} M PDT, wavelength 510 nm, reference, water; 2: Co-PDT-TBPE associate, 30 ng ml^{-1} Co, reference, reagent blank, 3: reagent blank, reference, water, 1.5×10^{-4} M PDT, 2.7×10^{-5} M TBPE; wavelength 610 nm

なるにつれて高くなる傾向がある (曲線 3). pH 9~10.5 での試薬から試験液の吸光度は 0.10 であったが, Co の定量には影響がなかった. 本法は pH 9 で行われた.

3.3 試薬濃度及び溶媒の検討

PDT, TBPE はエタノール溶液であるので, エタノール添加量の影響を除外するため, 各種濃度の溶液を調製し, 添加量を 1 ml として会合体抽出に及ぼす試薬濃度の影響を検討した. PDT は 1.2×10^{-4} M 以上の存在で一定の吸光度を与えたので, 1.5×10^{-4} M PDT を使用した.

TBPE は 2.7×10^{-4} M 以上で一定の吸光度が得られた. しかし, TBPE 濃度の増加に伴って試薬から試験液の吸光度が増加するため, 高濃度の TBPE を使うことは不適當である. そこで, 2.7×10^{-4} M TBPE を用いた.

ニトロベンゼン, メチルイソブチルケトン, ニトロメタンなどの誘電率の高い溶媒は TBPE 自身が抽出され試薬から試験液は青色を発し, その吸光度は高くなった. 又ベンゼン, トルエン, キシレンなどの誘電率の低い溶媒は会合体の抽出が極めて悪い. そこで, 中程度の誘電率を持つ溶媒 1,2-ジクロロエタン (1,2-DCE), ジクロロメタン (DCM), *o*-ジクロロベンゼン (*o*-DCB), *m*-ジクロロベンゼン (*m*-DCB), クロロベンゼン (MCB), クロロホルム (CF) について検討を行った. *m*-DCB, MCB, CF, *o*-DCB では試薬から試験液の吸光度は 0.02~0.05 と低い値を示したが, 抽出会合体の吸光度も小さく見掛けのモル吸光係数は 5~9 万であった. DCM と 1,2-DCE では試薬から試験液は 0.10 の値を示したが, 抽出会合体の吸光度も高く抽出溶媒として適している. しかし 1,2-DCE が感度, 発色の安定性に優れていた.

3.4 検量線

$0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Co 標準溶液を 1~5 ml とり, 2.3 の定量操作に従って抽出し, 有機相の吸光度を測定して検量線を作成した. 検量線は $10 \sim 50 \text{ ng ml}^{-1}$ の範囲で原点を通る直線が得られた. 検量線の傾きより求めた見掛けのモル吸光係数は $134000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 相対標準偏差は 1.7% (30 ng ml^{-1} Co, $n=10$) であった.

3.5 共存イオンの影響

20 ng ml^{-1} Co 溶液に各種イオンを共存させ会合体の抽出に及ぼす影響を検討した. その結果を Table 1 に

Table 1 Tolerance limits^{a)} of other ions in the determination of 20 ng ml⁻¹ cobalt

Ion	Tolerance limit/ μg ml ⁻¹
Cl ⁻ , Br ⁻ , F ⁻ , CH ₃ COO ⁻ , PO ₄ ³⁻ , citrate, Ba(II)	20
Zn(II), Mg(II), Mn(II)	5
Cr(III), Ca(II), Pb(II), Al(III)	1
Cu(II) ^{b)} , Fe(II) ^{c)}	0.1
Cu(II), Fe(II), Ni(II)	0.001

a) tolerance limit was taken as the amount that caused an error of ±3%. b) 0.2 M thiourea was added. c) 2×10⁻⁶ M KIO₄ and 0.04% Tiron were added.

示す。通常の陰イオン、アルカリ金属イオン、Ba(II)、クエン酸は全く影響を与えなかった。Mg(II)、Ca(II)、Al(III)などは1 μg ml⁻¹まで共存可能であった。Cu(II)、Fe(II)、Ni(II)はPDTとキレートを生成するため、微量(1 ng ml⁻¹程度)共存しても正の誤差を与えた。しかし、Cu(II)は0.2 M チオ尿素、Fe(II)は2×10⁻⁶ M KIO₄及び0.04% タイロンを添加すると、許容限界濃度は0.1 μg ml⁻¹に増加した。鉄は不純物としてビタミン剤中に微量混在する可能性があり、Coの定量に正の誤差を与えることが予測される。そこで、選択的にCoを定量するために、前述のマスキング剤を添加する必要がある。

3・6 複合ビタミン剤中のビタミン B₁₂ の定量

注射剤、粉末、錠剤などのビタミン剤を適当量(V.B₁₂を0.1~3 mg含む量)量り取り濃硝酸20 ml加え、時計皿をかぶせて約200°Cで2時間加熱した後、更に濃硝酸10 ml、過塩素酸2 ml加え乾固近くまで加熱した。これに1 M塩酸30 mlを加え10分間加温溶解し、水を加えて50 mlとし試料溶液とした。

試料溶液(10~60 μgのV.B₁₂を含む量、A mlとする)を採り水を加え、1 Mアンモニア水を用いてほぼ中和した後、2・3の定量操作に従って抽出し、有機相の吸光度を測定した。3・4に従って作成した検量線よりCo濃度(C ng ml⁻¹とする)を求める。ひょう量した複合ビタミン剤中のV.B₁₂含有量(B mg)は次式によって求められる。

$$B = C \times \frac{50}{A} \times \frac{M}{58.93} \times 50 \times 10^{-6}$$

ここでMは分子量を表し、シアノコバラミンは1355.4、ヒドロキシコバラミンは1346.5、メコバラミンは1344.4である。

定量結果をTable 2に示す。試料にはビタミンB₁、ビタミンB₆化合物が共存するが、ビタミンB₁₂化合物であるシアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン、メコバラミンを間接的に精度よく定量することができ、ICP-AESより求めた定量値とよく一致した。

本法はモル吸光係数も大きく、定量操作も簡便なことから、複合製剤中のビタミンB₁₂の間接定量に有用であると思われる。本実験では試料の分解は通常の酸分解法を用いたが、Isoyamaら⁷⁾による試料分解装置を用い

Table 2 Determination of vitamin B₁₂ in commercial preparations

Sample	Nominal/mg	Vitamin B ₁₂ /mg [†]	
		Proposed method	ICP-AES
1 (Powder for injection)			
Hydroxocobalamin	1	0.999±0.015	0.997±0.027
Fursultiamine	50		
Pyridoxine phosphate	50		
2 (Injection)			
Hydroxocobalamin	1	1.002±0.017	1.014±0.024
3 (Tablet)			
Mecobalamin	0.5	0.485±0.005	0.487±0.013
4 (Tablet)			
Cianocobalamin	0.5	0.488±0.007	0.501±0.011
Pyridoxine hydrochloride	33.3		
γ-Oryzanol	3.3		
Bisbentiamine	33.3		

† Mean values±SD of three determinations

れば微試料を短時間に分解することができ、迅速にビタミン剤中の V.B₁₂ を定量することが可能であると思われる。

文 献

- 1) 第 11 改正日本薬局方, C-782, 847 (1986), (廣川書店).
- 2) R. K. Mitra, P. C. Bose, G. K. Ray, B. Mukerji: *Indian J. Pharm.*, **24**, 152 (1962).
- 3) R. K. Sharma, S. K. Sindhwani: *Talanta*, **35**, 661 (1988).
- 4) S. Tsurubou, T. Sakai: *Analyst (London)*, **109**, 1397 (1984).
- 5) T. Sakai, N. Ohno, N. Ichinobe, H. Sasaki: *Anal. Chim. Acta*, **221**, 109 (1989).
- 6) T. Sakai, N. Ohno, S. Tsurubou, M. Tanaka, M. Horigome: *Analyst (London)*, **109**, 1043 (1984).
- 7) H. Isoyama, T. Uchida, K. Oguchi, C. Iida, G. Nakagawa: *Anal. Sci.*, **6**, 385 (1990).



Indirect spectrophotometric determination of vitamin B₁₂ using 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-cobalt complex formation. Tadao SAKAI, Noriko OHNO* and Hideto SASAKI** (*Department of Chemistry, Asahi University, 1851, Hozumi, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02; **Department of Industrial Chemistry, Tottori University, 4-1-1, Minami, Koyama-cho, Tottori-shi, Tottori 680)

A sensitive spectrophotometric determination of vitamin B₁₂ (V.B₁₂) in complexing vitamin preparations is proposed. Since V.B₁₂ contained cobalt, it is possible to use cobalt for the V.B₁₂ assay. Cobalt reacts with 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine (PDT) to form a cationic chelate ion and the complex can be extracted into 1,2-dichloroethane with tetrabromophenolphthalein ethyl ester (TBPE) at pH 9.0. The composition of the ternary complex is assumed to be Co(PDT)₃(TBPE)₂. A predetermined amount of V.B₁₂ (0.1~3 mg) was heated at 200°C for 2 h with 20 ml of nitric acid. After adding 10 ml of nitric acid and 2 ml of perchloric acid, the mixture was evaporated to dryness. The residue was dissolved in 30 ml of 1 M hydrochloric acid by heating and diluted to 50 ml with distilled water. The required volume of the sample solution containing 0.5~2.5 μg cobalt (10~60 μg V.B₁₂) was transferred to a 50-ml volumetric flask. To this, 1 ml of 10⁻⁴ M potassium periodate, 2% Tiron, 7.5×10⁻³ M PDT, 10 ml of the borate-phosphate buffer (pH 9), and 1 ml of 1.35×10⁻³ M TBPE, were added. It was then diluted to 50 ml with distilled water. The mixture was transferred to a separatory funnel and shaken for 5 min with 10 ml of 1,2-dichloroethane. The organic phase was centrifuged and the absorbance was measured at 610 nm against a reagent blank. Molar absorptivity was 134000 mol⁻¹ cm⁻¹, and relative standard deviation, 1.7% for ten determinations of 30 ng ml⁻¹ cobalt. Fe(II) was tolerated up to 0.1 μg ml⁻¹ (5-fold for cobalt) by addition of 2×10⁻⁶ M potassium periodate and 0.04% Tiron and also Cu(II), 0.1 μg ml⁻¹ by adding 0.2 M thiourea. This method can be applied to the indirect assay of V.B₁₂ compounds such as cyanocobalamin, hydroxocobalamin and mecobalamin in commercial preparations containing other vitamins.

(Received January 11, 1991)

Keyword phrases

indirect determination of vitamin B₁₂; 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-cobalt complex formation; extraction of ternary complex.