Summary

Indirect quantitative determination of magnesium was carried out by dissolving $\text{Mg NH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, precipitated from a magnesium salt solution, in acid and the phosphoric acid thereby formed was led to oxine phosphomolybdate which was again dissolved in an acid and the oxine in the solution submitted to bromatometry. A good result was obtained by this method. Another method was the preparation of magnesium oxinate which was allowed to dissolve in a definite excess of an acid and the excess of the acid was titrated with the standard alkali solution. The error in this method was found to be comparatively large.

(Received May 12, 1953)

216. 福田幸平*, 小島 淳**: 蛋白酵素分解物の薬学的研究 (第5報****)

各種蛋白加水分解物中のヒスタミン, チラミン****

Kouhei Fukuda* and Atsushi Kojima**: Pharmaceutical Studies on Enzymatic Hydrolysates of Proteins. V. Analysis of Histamine and Tyramine in various Protein Hydrolysates by Paper Chromatography.

(Pharmaceutical Faculty, University of Kanazawa* and Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto**)

蛋白加水分解物は総合アミノ酸製剤として非経口的な蛋白源の補給に近來広く臨床的に用いられているが、その静脈注射等に於ける発熱、嘔吐、皮膚の紅潮発疹等の副作用の原因としては、種々の有害物質が蛋白加水分解物中に存在する事が考えられている¹⁾。ヒスタミン、チラミンもその一つと考えられており、Hopps, Campbell 等²⁾は1943年にモルモットの筋肉による試験によつて、カゼインの酸分解物或は酵素分解物の何れにもヒスタミン、チラミン又はペプトンに類似する物質が存在する事を推定している。そこで著者等はカゼインの酵素分解物、酸分解物、アルカリ分解物並びに市販の静脈注射用総合アミノ酸製剤のそれぞれについてペーパークロマトグラフィーによるヒスタミン、チラミンの検出及び概略の定量を試みた。ヒスタミン或はチラミンに関するペーパークロマトグラフィーによる従来の研究としては K. F. Urbach 等³⁾の血液或は尿中のヒスタミンに関する報告、又宮城、佐竹等⁴⁾の腐敗過程に於けるヒスタミン、チラミンについての報告等がある。然して現在、蛋白加水分解物製剤中のヒスタミン、チラミン等の試験は麻酔せる猫等を用いる血圧試験、或はモルモット等を用いる筋肉試験によつて行われているのであるが、ペーパークロマトグラフィーによる方法はその定量値の精度において此等の生物的試験より若干劣るが、微量のヒスタミン或はチラミンの存在に対しても特異的な化学的証明を与え得ると共に方法が簡単である点において優れていると考えられる。著者等は Urbach 等の方法を参照して多少の改良を加えたペーパークロマトグラフィーによつて本研究を行つた。又本研究に於て試料として用いた蛋白加水分解物及びその製法は次の如くである。(A) 脾臓のプロテアーゼ抽出液によるカゼイン酵素分解物……第3報⁵⁾で述べた方法によりカゼインの5%溶液を12日間酵素分解したもので α -Amino-N/Total-N は63%。(B) 市販ペ

* Tsuchitoriba-nagamachi, Kanazawa.

** Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

*** 第4報: 本誌 73, 329 (1953).

**** 1952年5月, 第5回日本薬学会大会(大阪大学)に於て発表.

1) R. Elman: "Advances in Protein Chemistry" III, 270 (1947).

2) Hopps, Campbell: J. Lab. Clin. Med. 28, 1203 (1943).

3) K. F. Urbach: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 68, 430 (1948); 70, 146 (1949); 72, 626 (1949).

4) 宮城, 佐竹: 日新医学 37, 256 (1950).

5) 福田: 本誌 73, 328 (1953).

プシンによるカゼイン酵素分解物……第1報⁶⁾で述べた方法により5%カゼイン溶液を加水分解したもので α -Amino-N/Total-N は20%。(C) カゼインの酸分解物……20%塩酸によりカゼイン濃度20%で30時間加水分解し中和後、カゼイン濃度5%になるように希釈したもので α -Amino-N/Total-N は86%。(D) カゼインのアルカリ分解物……2N 水酸化ナトリウムでカゼイン濃度10%で30時間加水分解後中和し、カゼイン濃度5%になるように希釈したもので α -Amino-N/Total-N は81%。(E) 市販製剤……トリプシンによるカゼイン加水分解物の5%溶液で静脈注射用製剤。(F) 市販製剤……カゼインを膵臓抽出液で加水分解し、未消化の高分子ペプチド部は更に別に酸で加水分解したものの5%溶液で静脈注射用製剤。(G) 市販製剤……牛血の酸分解物及びアルカリ分解物を混合し溶液としたもので静脈注射用製剤。(H) 活性炭で処理した酸分解物……(C)の溶液をその1%に当る活性炭で冷時脱色を行つたもの。なお対照試験として次の如きものに就ても実験を行つた。(I) 基質コントロール……5%カゼイン溶液。(J) 膵臓抽出液コントロール……膵臓抽出液を基質を加えずに酵素分解に於けると同濃度にまで希釈し直ちに90°, 10分加熱したもの。(K) ペプシンコントロール……市販ペプシンの0.15%溶液を90°, 10分加熱したもの。さて先づヒスタミン、チラミンの検出であるが、前記試料の(A), (B), (E), (G), (I), (J), (K)の各々に就てpH 12.5, 塩濃度約22%⁷⁾に於てヒスタミン、チラミンをブタノールで抽出して塗布試料を得、ブタノール(10%アンモニア水飽和)を溶媒にして一次元ペーパークロマトグラフィーを行つた。ニンヒドリンによる呈色の結果はFig. 1の如くである。即ち酵素分解物(A), (B), 市販製剤(E), (G)の何れに於ても明かにヒスタミン、チラミンが検出され、特に酸に及びアルカリ分解による市販製剤(G)は呈色度が強い。又対照試験では膵臓抽出液の場合はヒスタミン、チラミン部に微かな呈色が認められたが、ペプシン及び基質コントロールに就ての場合は何れも該当部分の呈色は全く認められなかつた。なおジアゾ試薬(*p*-bromoaniline)により呈色を行つても同様の結果が得られるが、ニンヒドリンによる呈色の方が

- A……Casein hydrolysate by pancreas extract
J……Control: Pancreas extract
I……Control: Casein
E……Parenteral preparation (Casein hydrolysate by pancreas protease)
G……Parenteral preparation (Cow blood hydrolysate by acid and by alkali)
B……Casein hydrolysate by pepsin preparation
K……Control: Pepsin preparation

Fig. 1

- (1) Pure histamin 2 γ
(2) " 5 γ
(3) " 10 γ
(4) " 20 γ
(5) Pure tyramine 10 γ
(A) Casein hydrolysate by pancreas extract
(C) Casein hydrolysate by HCl

Fig. 2

6) 福田: 本誌 73, 247 (1953).

7) F. C. McIntire: J. Biol. Chem. 170, 537 (1947).

8) 佐竹: "クロマトグラフ" 106 (1952).

鮮明で一定した結果が得られるので本実験ではすべてコンヒドリン呈色によつた。次にヒスタミン、チラミンの定量を試みたのであるが、ペーパークロマトグラフィーによる定量法としては呈色域の長さ或は呈色面積による方法が種々報告されているが⁽⁸⁾、本実験ではヒスタミン二塩酸塩及びチラミン一塩酸塩の一定既知量を含む種々の標準液について、同時にペーパークロマトグラフィーを行い、比較によつて概略値の定量を行つた。ペーパークロマトグラムの一例を示すと Fig. 2 の如くである。このようにして得た定量値を示すと Table I (a) 欄の如くである。又実際の含量に近似のヒスタミン及びチラミン標準液について試料に於けると同様のブタノール抽出操作を行い回収率を検したが、ヒスタミン、チラミン共に 40~50% であり、此の回収率よりヒスタミン含量を推定すると Table I (b) 欄の如くなる。なおヒスタミンの呈色最低限度は約 2 γ であるが、チラミンは呈色最低限度約 10 γ で大きく、又比較定量が困難で明確な値は示しにくい、酵素分解物 (A) 及び市販製剤 (E)、(F) に於ても 5~10 γ 程度のチラミンが含まれているものと推定される。

Table I 各種蛋白加水分解物 (5% 溶液) 中のヒスタミン含量概略値
Approximate Histamine Contents in various Protein Hydrolysate (5% Solution)

	(a) 実際検出した量 Found (γ per 10 cc)	(b) 回収率より算出した含量 Estimate by rate of recovery (γ per 10 cc)
Casein hydrolysate by pancreas extract (A)	5	10
Casein hydrolysate by pepsin preparation (B)	20	40
Casein hydrolysate by HCl (C)	5~10	10~20
Casein hydrolysate by NaOH (D)	50~100	100~200
Parenteral preparation (E) (Casein hydrolysate by pancreas protease)	5	10
Parenteral preparation (F) (Casein hydrolysate by pancreas extract and by acid)	5	10
Parenteral Preparation (G) (Cow blood hydrolysate by acid and by alkali)	50	100
Casein hydrolysate by HCl discolored with activated charcoal (H)	less than 2	—

以上の結果について考察するに、トルオールを防腐剤として出来るだけバクテリアの汚染に注意して調製した酵素分解物にも又市販の蛋白加水分解物製剤中にもヒスタミン、チラミンの如き有害物質が予期以上に存在する事が判明した。又此等アミンは酸分解物、アルカリ分解物中にも存在し、特にアルカリ分解物中には可成り多い。即ち蛋白質の加水分解法によつてヒスタミン、チラミンの生成に著しい差があり、アルカリ分解は酸分解よりもヒスチデンの脱炭酸を起し易く、従つて蛋白加水分解物製剤の製法としてはアルカリ分解はアミノ酸のラセミ化を起し易い事以外にこのアミン生成の点からも不適当と考えられる。又此等アミン類の除去には脱色炭処理が有力な事を知つた。なおアルカリ分解は酸分解に較べてトリプトファンの破壊が少いので現在も実際に用いられているが、アルカリ分解による製法では有害アミンの除去に特に注意を要する事が明である。

終りに本研究に終始御指導を賜つた京都大学高木誠司教授、鈴木友二教授、並びに金沢大学平本 実教授に厚く感謝する。尙本研究の一部は文部省科学研究費により行つた。ここに謹謝する。

実 験 の 部

(1) ペーパークロマトグラフィー塗布試料の調製 基質濃度 5% の中性の蛋白加水分解物 20 cc 及びブタノール 10 cc を内容約 50 cc のガラス栓付遠心分離管にとり、これに無水硫酸ナトリウム 6.25 g、第三磷酸ナトリウム (結晶水 1 分子) 1 g よりなる塩類混合物 6 g を加えて pH 12.5、塩濃度約 22%⁽⁷⁾ とする。1 時間振盪機にかけた後遠心分離してブタノール層を分取。このブタノール抽出液を $N/2$ H_2SO_4 5 cc、続いて蒸留水 2 cc で夫々振盪抽出し分離して得たる酸性の水溶液を中和。この水溶液に再びブタノール 2 cc 及び前記の塩混合物 1.5 g を加えて振盪後ブタノール層を分離。以上の操作でペーパークロマトグラフィーの障害物質を除くと共にヒスタミン、チラミンのブタノール抽出液一定量を得。

(2) ヒスタミン、チラミンの検出 各試料について夫々上の方法で得たブタノール抽出液を室温で減圧濃縮し、元の加水分解液 20 cc に相当するブタノール抽出液を濾紙上の原点に塗布し、10% アンモニア水を飽和させたブタノールを溶媒として上昇法により 30~40 時間展開。ブタノール飽和に用いた 10% アンモニア水は展開密

閉器中の底部に入れ密閉器中の水、アンモニア、ブタノール飽和に用いた。展開後濾紙を乾燥し 0.2%ニンヒドリンブタノール溶液（酢酸少量添加）を噴霧し、70~80° に加温して呈色を行った。

(3) ヒスタミン、チラミンの定量 各試料について (1) の方法で得た一定量のブタノール抽出液及び下記 6 種の標準液の各 1 cc (抽出液 1 cc は元の加水分解液 10 cc に相当する) を 0.1 cc のピペットを用いて濾紙 (巾 1 cm, 長さ 50 cm) 上の原点の区劃 (1 cm²) へ夫々均等に塗布し 10%アンモニア水飽和のブタノールを溶媒として同時に展開後乾燥し、0.2%ニンヒドリンブタノール溶液を均等に噴霧し各濾紙片を同時に加温して発色せしめて比較定量を行った。比較標準に用いたヒスタミン二塩酸塩又はチラミン一塩酸塩の標準液は 1 cc 中に夫々 2 γ, 5 γ, 10 γ, 20 γ, 50 γ, 100 γ を含むものについて行った。

金沢大学薬学部

Summary

Histamine and tyramine are assumed to be one of the substances responsible for side-effects attending the intravenous administration of protein hydrolysate preparations^{1,2)}. Detection of histamine and tyramine and approximate determination of their contents in various protein hydrolysates and marketed parenteral preparations were carried out by paper chromatography in reference to the method of Urbach³⁾. The results obtained are shown in Figs. 1 and 2, and in Table I. These results indicated that histamine and tyramine were present in casein hydrolysate prepared with toluene as the antiseptic and the marketed parenteral preparations in larger amounts than was expected. It was also found that there were a difference in the amount of histamine formed by the manner of hydrolysis and that in protein hydrolysate preparations obtained by alkaline hydrolysis, care must be taken to remove these harmful amines.

(Received May 29, 1953)

217. 福田幸平*, 村岡三郎, 小島 淳**: 蛋白酵素分解物の薬学的研究 (第 6 報) 各種蛋白加水分解物についての乳酸菌増殖度の比較 その 1.

Kouhei Fukuda, Saburo Muraoka, and Atsushi Kojima: Pharmaceutical Studies
on Enzymatic Hydrolysates of Proteins. VI. Comparison of Growth of
Lactic Acid Bacteria on Various Protein Hydrolysates. (1).

(Pharmaceutical Faculty, University of Kanazawa* and Pharmaceutical Institute,
Medical Faculty, University of Kyoto**)

人間及び動物のアミノ酸要求に関しては必須アミノ酸の種類を始め、アミノ酸相互間の転移等の関連性について種々の事実が明かにされて居り、又体内に於ける蛋白合成には血液中にその蛋白合成に必要な総てのアミノ酸が適当な混合比で同時に存在する事が必要な事等も明かとなつてゐる¹⁾。従つて蛋白源の補給を目的とする蛋白加水分解物製剤の効果はその中に含まれるアミノ酸の種類とその量的組成に左右される事は論を俟たないのであるが、蛋白加水分解物はその加水分解法の異なるに従つて、アミノ酸の二次的分解によるアミノ酸組成の変化、ラセミ化の度合、或は加水分解度等に相異があり、たとえ窒素量が同一の加水分解物でもその生物学的効果には差のある事が当然考えられ、又二次的分解を受けた二、三のアミノ酸を添加補正するだけでは良好な製品に改良する事の困難な点等も考えられる。さて人間に就ての D 型アミノ酸の有効度²⁾ 或はペプチッドの利用率とその影響

1) Ernst Geiger: J. Nutrition 34, 97 (1947); ibid. 36, 813 (1948).

2) Albanese: "Advances in Protein Chemistry" III, 227 (1947).