78. 山岸正治, 横尾 亮, 増田 亨, 浅井満子: アゾトメトリーの応用 (第2報)
アゾトメトリーにおける沝紙電気泳動法の利用

Masaharu Yamagishi, Makoto Yokoo, Toru Masuda, and Mitsuko Asai:

Application of Azotometry. II. Utilisation of Paper
Electrophoresis in Azotometry.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

最近の定量分析法は極度に微量化されつつあるが, 同時にその操作の簡易化も要求されている. 岩崎によつて創案されたアゾトメトリー¹⁾が種々の定量に際してその微量を対象とするにかかわらず極めて正確な定量値を与え, その操作も極めて簡単, 迅速であることはこの目的によく合致している.

本法は反応によって生成する N_2 を測容することがその基盤となつており, 本反応を種々の方面に利用駆使しているから, その応用可能の分野が広く利用面の拡大が期待される. しかし応用分野が広いということはその反面特殊性に欠けていることを示し, 混合物中の一定物質を定量する等の際不便なことも事実である. 本法は試薬, 手段等によつてそれぞれ特殊性ある定量法に種別されているけれども, なお NaOBr-AZM (NaOBr-azotometry の略, 以下同じ) にはケルダール N 定量法, $NH_2 \cdot NH_2$ -AZM には iodometry が含まれる等の程度の種別であつて, 検体個々の物質に対して特殊性を発揮することはできない. たとえば尿中の尿素定量の場合尿中には尿素以外に尿素と同様 NaOBr によつて N_2 を発生する物質が種々存在するから, 尿に対して直接 NaOBr-AZM を行つて尿素を定量することはできない. ただし岩崎等は尿素をキサントヒドロールによつて非 NaOBr- N_2 物質 (NaOBr によつて N_2 を発生しない物質) に変ずる手段を講じて尿素の特異的定量法²⁾を樹立したが, 他の種々の物質に対し常にかかる手段を考究し, 処理していくことは相当の困難を伴うであらう. そこで本法のこのような欠点を補うためには本法に先行する簡単な分離操作が望ましい.

近時微量物質を分離精製する手段は著しい進歩を遂げたが, なかんづくクロマトグラフィーは操作简单で定量法に先行する分離手段として最も好適と思われる. 著者等はアゾトメトリーの測定量域, 検体の調製等から考えてアゾトメトリーに先行する分離操作として沝紙電気泳動法を採用することにした. 我々は本法を既に poliodine 中の不純物 choline の定量³⁾に応用し, また続報で述べるように streptomycin の定量に際して好結果を収めた. 本稿実験の部には前報 nitrite-AZM で好定量値を与える数種のアミン類について行つた結果を述べるが, これ等種々の実験の経験から次のように操作するのが適当と思われる.

操作法: 東洋沝紙 No. 131 の巾 5 cm, 長さ 40 cm の沝紙片 (A) および同巾 1 cm, 長さ 40 cm の沝紙片 (B) を用意し, A の中央部にアゾトメトリーの好適測定量域の約 5 倍量の検体を塗布し, B 中央部には, A の場合の約 1/5 量の検体を塗布する. 次に桑田, 増田⁴⁾の方法に従い, 両沝紙片を同一硝子枠にはさみ検体に好適の条件で泳動させる. A, B 両沝紙片を乾燥後適当な試薬で B 片について顯色を行い検体の泳動部位を知る.

Fig. 1

Fig. 1 に示すように A 片から B 片の泳動部位に相当する部分を切り取り試験管に収め, 適当な抽出液 (一般には蒸留水, streptomycin の場合は 2% HCl) 5 cc で加温, 抽出する. 抽出液 1 cc あるいは 2 cc をアゾトメトリーの検液とする.

本稿の実験例として後述するアミン類の場合は本操作による損失約 3% を示したが, 第3報の streptomycin, dihydrostreptomycin の場合殆んど 100% の回収率を示したことから考えて, 本損失は抽出操作を更に検討することによつて解決されるものと信ずる.

本研究に当り終始御指導, 御鞭撻を賜つた研究所長桑田 智博士に謹謝する.

1) 岩崎: 生化学 23, 207 (1952).

2) 岩崎, 早稲田, 中島: 十全会雑誌 42, 2829 (1937).

3) 桑田, 増田, 山岸, 吉田: ビタミン 6, 102 (1953).

4) 桑田, 増田: ビタミン 6, 97 (1953).

実 験 の 部

I. アゾトメトリーによるアミン類定量の測定量域およびその精度 後述の実験例に用いるグルタミン酸、ヒスタミン-HCl, ホモスルファミン-HCl, グルコサミン-HCl についてそのアゾトメトリーの好適測定量域, 精度を Table I, II に示した. アゾトメトリーは第1報に記述した操作に従う.

Table I

グルタミン酸		N_2-v_0 (実験値) mm^3	N_2-v_0 (理論値) mm^3	検 出 率 %
量 γ	アミノ-N γ			
420	40	64.0	64.0	100.0
263	25	40.3	40.0	100.7
210	20	32.2	32.0	100.6
132	13	20.4	20.0	103.0
53	5	8.3	8.0	103.7

Table II

ア ミ ン	量 γ	N_2-v_0 (実験値) mm^3				N_2-v_0 (理論値) mm^3	検出率 %
		1	2	3	平均		
ヒスタミン-HCl	185	44.9	45.3	44.8	45.0	44.8	100.5
ホモスルファミン-HCl	186	38.0	37.2	37.8	37.7	37.5	100.6
グルコサミン-HCl	308	63.9	65.2	65.6	64.9	64.0	101.4
グルタミン酸	167	32.7	32.2	31.7	32.2	32.0	100.6

II. 泳動条件ならびに泳動像の作成 グルタミン酸, ヒスタミン-HCl, ホモスルファミン-HCl, グルコサミン-HCl の滲紙電気泳動は Table III に示す条件で実施された.

Table III

pH (Theorell buffer)	電 圧 V	時 間 hr	ア ミ ン	泳動像位置 cm
6.3	250	4	グルタミン酸	(+) 3
"	"	"	ヒスタミン	(-) 10
"	"	"	ホモスルファミン	(-) 8
"	"	"	グルコサミン	(-) 6

顕色にはニンヒドリン反応を利用し, それぞれのアミンに対して Fig. 2 に示すような泳動像を得た.

Fig. 2

III. アミン混合体の分離定量 グルタミン酸-ヒスタミン, グルタミン酸-ホモスルファミン, グルタミン酸-グルコサミンの3混合体につき本文記載の操作法に従い, pH 6.3, 電圧 250 V, 4 時間を泳動条件として滲紙上に分離し, 泳動部位を 5 cc の水で加温, 抽出してその 2 cc につきアゾトメトリーを行った. 結果は Table IV, V, VI に示す. ただし N_2-v_0 は抽出液 5 cc に換算して記載した.

Table IV. グルタミン酸-ヒスタミン

検 体	アミン	塗布量 γ	N_2-v_0 (実験値) mm^3	N_2-v_0 (理論値) mm^3	検出量 γ	検出率 %
I	G	890	52.7×2.5	54.3×2.5	869	97.0
	H	667	31.7×2.5	32.4×2.5	653	97.9
II	G	755	44.5×2.5	46.0×2.5	730	96.7
	H	1002	47.3×2.5	48.8×2.5	971	97.7

但し G: グルタミン酸 H: ヒスタミン-HCl

Table V. グルタミン酸-ホモスルファミン

検 体	アミン	塗布量 γ	N_2-v_0 (実験値) mm^3	N_2-v_0 (理論値) mm^3	検出量 γ	検出率 %
I	G	773	45.8×2.5	47.1×2.5	751	97.2
	Ho	1000	39.5×2.5	40.2×2.5	980	98.0
II	G	759	44.5×2.5	46.3×2.5	730	96.2
	Ho	1000	39.1×2.5	40.2×2.5	972	97.2

但し G: グルタミン酸 Ho: ホモスルファミン-HCl

Table VI. グルタミン酸-グルコサミン

検 体	アミン	塗布量 γ	N_2-v_0 (実験値) mm ³	N_2-v_0 (理論値) mm ³	検出量 γ	検出率 %
I	G	778	45.6×2.5	47.5×2.5	747	96.0
	Gl	1000	40.4×2.5	41.6×2.5	972	97.2
II	G	500	30.0×2.5	30.5×2.5	492	98.3
	Gl	520	21.0×2.5	21.6×2.5	504	96.8
但し	G: グルタミン酸 Gl: グルコサミン-HCl					

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

As the preliminary measures of isolation and purification prior to azotometry, paper electrophoresis was found to be quite suitable. Separatory determination of three kinds of mixtures of glutamic acid-glucosamine, glutamic acid-homosulfanilamide, and glutamic acid-histamine was carried out and good results were obtained, thereby experimentally proving the feasibility of this method.

(Received January 18, 1954)

79. 山岸正治, 横尾 亮, 増田 亨, 浅井満子: アゾトメトリーの応用 (第3報)
ストレプトマイシン, ジヒドロストレプトマイシンの定量

Masaharu Yamagishi, Makoto Yokoo, Toru Masuda, and Mitsuko Asai:

Application of Azotometry. III. Determination of Streptomycin
and Dihydrostreptomycin.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

ストレプトマイシン (St.) およびジヒドロストレプトマイシン (Dihydro-St.) の化学的定量法に関しては既に数多くの報告¹⁻⁹⁾があるが, 主として比色定量法であり, 殆んどすべての場合生物学的検定を経た標準品を対照とするからその基盤は生物学的定量法で, 誤差が加算される結果高度の正確さは望めない. またこれ等の定量法は St., Dihydro St. のストレプトチジン部あるいは糖部の呈色反応によるものが多いから, 安定後の検討に際して分解生成物の共存下これ等を定量せねばならない時等には相当の困難を伴う. 今回著者等は岩崎¹⁰⁾のアゾトメトリーによつて St., Dihydro St. の定量が可能であることを知り, かつこれを沱紙電気泳動法と併用して好結果を収めたのでここに報告する.

St., Dihydro-St. はそれぞれ2個のグアニジル基を有するから NaOBr によつて (I) 式の如く N_2 を発生することが予想される.

- 1) J. Forgacs, G. B. Kornegey, T. F. Henley: J. Lab. Clin. Med. **31**, 514 (1946).
- 2) S. A. Waksman: Science **102**, 40 (1945).
- 3) G. E. Boxer, V. C. Jelinek, P. M. Leghorn: J. Biol. Chem. **169**, 153 (1947).
- 4) J. V. Scudi, G. E. Boxer, V. C. Jelinek: Science **104**, 486 (1946).
- 5) G. E. Boxer, V. C. Jelinek: J. Biol. Chem. **170**, 491 (1947).
- 6) E. A. Garolck, D. C. Grove: J. Clin. Invest. **28**, 843 (1949).
- 7) W. V. Aubrey, E. B. Clark: Anal. Chem. **24**, 975 (1952).
- 8) H. E. Carter, R. K. Clark: J. Biol. Chem. **160**, 337 (1945).
- 9) F. Monastero: J. Am. Pharm. Assoc. **41**, 322 (1952).
- 10) 岩崎: 生化学 **23**, 207 (1952).