173. 山岸正治, 森本 浩, 吉田慰子, 松岡敏郎: 海人草有効成分の
比色定量法 (第1報)

Masaharu Yamagishi, Hiroshi Morimoto, Toshiko Yoshida, and Toshiro
Matsuoka: Colorimetric Determination of the Active Principle of
Digenea simplex Ag. I.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.*)

海人草の有効成分ジゲニン酸 (digenic acid) はニンヒドリンによつて黄色に発色する¹⁾。著者等はジゲニン酸とニンヒドリンとの発色反応を検討し、本反応を利用したジゲニン酸の比色定量法 3 法を考察した。なお海人草中にはジゲニン酸の外にジゲニン酸同様ニンヒドリンによつて黄色に発色する物質が共存するから、海人草エキス及びその製剤についてジゲニン酸を定量する場合には予めこれ等の物質からジゲニン酸を分離、抽出する必要があり、ペーパーパーチションクロマトグラフィーはこの目的のために極めて有効な手段である。

I. ジゲニン酸とニンヒドリンとの発色反応 本反応には 2 種類あり、その 1 は酸性における発色反応で、例えば pH 4 の緩衝液中でジゲニン酸とニンヒドリンとを加温、反応させると $\lambda=400\text{ m}\mu$ に吸収極大を有する呈色液が得られ、その色素をイソアミルアルコール、ベンゼン等の有機溶媒に転溶させ得る。このイソアミルアルコール溶液の吸収極大は $410\text{ m}\mu$ であり、本色素は日光に対して不安定である。その生成に際してはアルカリ性の場合と異なりアスコルビン酸の存在を必要とせず、その存在は却つて色素の生成を妨害する。村上等の呈色条件即ち中性で得られる色素もその吸収極大が全く同じである点から同一のものと思われる。その他の発色反応はアルカリ性におけるもので例えばピリジン水溶液が pH 8~10 の緩衝液中アスコルビン酸の存在下で両者を反応させ、ニンヒドリンの還元体による赤色を空気酸化によつて除去すると、 $\lambda=425\text{ m}\mu$ に吸収極大を有する黄色の呈色液が得られる。この場合還元剤アスコルビン酸の存在は不可欠である点から考えて本反応はニンヒドリンによる発色というよりもむしろその還元体 hydrindantin による発色反応であろう。なおプロリンの本法による発色はきわめて弱い。

II. 比色定量法 前述の発色反応に関して種々の条件を検討し、次の 3 方法によつてジゲニン酸の比色定量が可能なことがわかつた。

1) 酸性ニンヒドリン法 (好適測定量域 10~50 γ) i) 試薬 1% ニンヒドリン水溶液, Theorell & Stenhagen の緩衝液 (pH 4.0), 飽和食塩水, イソアミルアルコール, 脱水芒硝, 標準試液: ジゲニン酸 50 γ /cc 水溶液。

ii) 操作 ジゲニン酸 50 γ /cc 以下を含む検液 1 cc を共栓褐色試験管にとり、これに緩衝液 3 cc 及びニンヒドリン溶液 1 cc を加えて 70° に 25 分間加熱した後氷冷。次に飽和食塩水 1 cc 及びイソアミルアルコール 5 cc を加え、約 1 分間激しくふりまぜた後静置。イソアミルアルコール層を別の試験管 (褐色) に取り、脱水芒硝で乾燥後 $\lambda=410\text{ m}\mu$ の単色光でその吸光係数を測定。同時に標準試液について同様に操作し、その吸光係数との比から検液中のジゲニン酸量を求める。

2) ピリジン・ニンヒドリン法 (好適測定量域 30~150 γ) 著者等の α -アミノ酸比色定量法²⁾ と同様に操作し (但し加熱時間 15 分) $\lambda=425\text{ m}\mu$ の単色光によつて吸光係数を測定、同時に 150 γ /cc のジゲニン酸標準試液から得た吸光係数との比から検液中のジゲニン酸量を求める。

3) アルカリ性ニンヒドリン法 (好適測定量域 30~150 γ) ピリジン・ニンヒドリン法におけるピリジン 1 cc, 蒸留水 1 cc の代りに Atkins の緩衝液 (pH 8.5) 2 cc を用いる。なお後述のように α -アミノ酸の発色を抑制する必要があるときは 4% ニンヒドリン水溶液を用い、pH 9.8, 70° で 40 分加熱。

III. α -アミノ酸による比色妨害及びその防止と除去 ジゲニン酸は海人草中種々の α -アミノ酸と共存し、海人草エキス中のジゲニン酸を定量する際、先にも述べたようにペーパーパーチションクロマトグラフィー等を

* Juso-nishino-cho, Higashiyodgawa-ku, Osaka. 1) 村上, 竹本, 清水: 本誌 73, 1026 (1953).

2) 山岸, 吉田: 本誌 73, 675 (1953).

利用してジゲニン酸を分離するが、それでも検液中に α -アミノ酸の混在を免れないことがしばしばある。そこでジゲニン酸の定量に当つて常に α -アミノ酸の混在を念頭に置く必要を生じる。即ちニンヒドリンとの発色反応において α -アミノ酸から生成する色素 Ruhemann purple による呈色液は 400 m μ 附近にも吸収極大を有するからジゲニン酸の上記比色定量法は大きな影響を受けることになる。このような妨害を防止、除去する手段として次の3法が考えられる。

i) pH 4 以下の酸性で反応を行う。Ruhemann purple は pH 4 以下では不安定で存在し得ないから、この場合 α -アミノ酸の影響を全く除去できる。

ii) 反応温度を下げる。反応温度を 60~70° にすれば Ruhemann purple の生成反応は抑制される。これは α -アミノ酸混在量の程度によるが、検液 1 cc 中 γ mol の α -アミノ酸の混在は殆んど影響がない。しかしこの場合ジゲニン酸の発色感度も低下するからアルカリ性ニンヒドリン法の項に述べたように試薬ニンヒドリン溶液の濃度を上げる等の手段を講じる。

iii) 吸光係数の補正 Ruhemann purple の 570 m μ における吸光係数からジゲニン酸比色定量の際使用する波長、即ち 425 m μ における吸光係数を算出して補正する。著者等の実験では両吸光係数の比は 1:0.4 であつた。比色定量に際し 425 m μ と 570 m μ における吸光係数 (A, B) を測定すれば $A-0.4 B$ がジゲニン酸に対応する吸光係数である。

IV. 海人草エキス中のジゲニン酸の定量 ブタノール・水・酢酸 (4:5:1) を展開剤としてペーパーパーティションクロマトグラフィーを行うとジゲニン酸は $R_f=0.5$ を示すが、エキス中のジゲニン酸を定量する場合比色定量法に先行するペーパーパーティションクロマトグラフィーはこれを次のように行う。すなわち Fig. 1 に示したりに幅 1 cm, 長さ 35 cm の沓紙片 A および幅 4 cm, 長さ 35 cm の沓紙片 B を用意し、B 片に比色定量法の測定量域のジゲニン酸相当量のエキス、A 片にはその約 1/4 量のエキスを塗布し、ブタノール・水・酢酸で展開。展開が終つたならば A 片に対しニンヒ

Fig. 1

- ① ビリジン・ニンヒドリン法
- ② 酸性ニンヒドリン法
- ③ アルカリ性ニンヒドリン法
- ④ アルカリ性ニンヒドリン法別法
- ⑤ ナフトヒノンスルホン酸ソーダ法
- ⑥ 村上法

Fig. 2

ドリンで顕色してジゲニン酸の展開部位を知り、B 片から相当部を切り取る。切り取つた沓紙片をそのまま共栓試験管に納め、蒸留水 1 cc を加えた後比色定量法に準じ、試薬を添加して発色操作を行う。この場合沓紙片を細片して行つた方がよい。比色に際しては切り取つた沓紙片と同面積の沓紙片 2 片を用意し、標準試液 1 cc に沓紙片を加えたものと及び盲検用として蒸留水 1 cc に沓紙片を加えたものについて同時に発色操作を行い、比色定量法に記載したように操作する。

いわゆる海人草エキス 3 種について本法の定量法を行つた結果ジゲニン酸含量は 0.81, 0.75, 0.83%, 従つてこれを海人草中のジゲニン酸に換算すると 1 kg 当り 450~500 mg となる。

V. 錠剤中のジゲニン酸の定量 市販駆虫剤には海人草エキスを錠剤にしたものがある。これ等錠剤中のジゲニン酸を定量するには次のようにする。

錠剤 5~10 錠を粉末となし 50%メタノール 5 cc を加えてよくかきまぜた後ガラスフィルターで沓過。沓器上の残留物を 50%メタノールでよく洗浄し、沓液、洗液を合して水浴上に蒸発して殆んど乾固。その残留物に蒸留水 2 cc を加え、よくかきまぜた後沓過し、沓液 0.01 cc を検体として前項記載の通りにペーパーパーティションクロマトグラフィーを行つた後ジゲニン酸を定量する。市販品について定量した結果は 1 錠中のジゲニン酸含量 400 γ 内外で、記載してある海人草エキス含量から推して妥当な結果であつた。

VI. 各種比色定量法の感度の比較 先に述べたニンヒドリンを試薬とする3方法、村上等³⁾による比色定量法および第2報で報告する1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウムを試薬とする比色定量法の感度を比較するために吸光係数と最終呈色液1cc中のジゲニン酸換算量との関係直線を同一グラフに記載するとFig. 2のようになる。

本研究に当り終始懇篤な御指導、御鞭撻を賜った研究所長桑田 智博士ならびに試料を恵与された阪大薬学科竹本常松博士に謹謝する。

実 験 の 部

酸性ニンヒドリン法 i) 呈色液の吸収スペクトル 約150 γ /ccのジゲニン酸水溶液1ccから定量操作に準じて(但し加熱100°, 15分)得た呈色液の吸収スペクトルについてアスコルビン酸添加の影響をFig. 3に示した。

ii) 反応温度と反応時間の関係 約75 γ /ccのジゲニン酸水溶液1ccについて発色操作を行い、100°及び70°加熱の場合の反応時間との関係を呈色液の吸光係数で表わすとFig. 4のようになる。この結果から定量法には70°, 25分加熱を採用した。

ピリジン・ニンヒドリン法およびアルカリ性ニンヒドリン法 両者共同一の吸収スペクトルを示し、反応時間の影響も亦同一なので以下主としてピリジン・ニンヒドリン法に関する実験結果を示す。

i) 呈色液の吸収スペクトル 約200 γ /ccのジゲニン酸水溶液1ccから定量操作を行つて得た呈色液の吸収スペクトルについてアスコルビン酸添加の影響をFig. 5に示した。

ii) 反応時間の検討 約100 γ /ccのジゲニン酸水溶液について発色操作を行う際その加熱時間を種々変えて見ると時間の経過と共に吸光係数は低下する(Fig. 6)。この結果から定量条件として加熱時間15分を採用した。

iii) 至適pHの検討 約150 γ /ccのジゲニン酸水溶液1ccについて発色操作時の添加緩衝液(Atkins)のpHを種々変えて見たところ下記の通りpH 8.5の場合の吸光係数が最も高かつた。

pH	吸光係数
9.4	0.629
9.0	0.938
8.5	1.170
8.0	1.152
7.5	0.928

ペーパー・パーティション・クロマトグラフィーの展開剤の検討 ニンヒドリンによつて黄色に呈色する物質ジゲニン酸、プロリン、オキシプロリンの展開剤に対するRf値は下記の通りである。

展 開 剤	Rf 値		
	ジゲニン酸	プロリン	オキシプロリン
ブタノール・水	0.07	0.10	0.05
ブタノール・水・酢酸(4:5:1)	0.50	0.31	0.22
フェノール・水	0.62	0.86	0.66

武田薬品工業株式会社研究所

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

武田薬品工業株式会社研究所

3) 村上等：本誌 74, 85 (1954)。

Summary

The coloration of digenic acid, the effective principle of *Digenea simplex*, with ninhydrin differs in acid and alkaline reaction. In acid solution, the dye produced transits to the organic solvent layer, and that in the isobutyl alcohol solution shows absorption maximum at $410\text{ m}\mu$, the color fading by light. In the case of alkaline solution, the production of the dye increases by the addition of a reductive agent, such as ascorbic acid, besides ninhydrin. The colored solution exhibits the absorption maximum at $425\text{ m}\mu$. Both reactions can be utilized for the colorimetric determination of digenic acid. After warming at 70° the solution of digenic acid with ninhydrin at pH 4, the dye is transited to the isobutyl alcohol layer, or the acid is heated in aqueous pyridine solution or in a buffer of pH 8.5, with the addition of a small amount of ascorbic acid, for 15 minutes at 100° , the red color of reduced ninhydrin is discolored by air oxidation, and the resultant solution is submitted to colorimetry. The optimal determination range is $10\sim50\%$ in acid reaction, and $30\sim150\%$ in alkaline reaction. With *Digenea* extract, digenic acid is isolated by paper partition chromatography and colorimetrically determined. The content of digenic acid in *Digenea simplex* Ag. is usually around $450\sim500\text{ mg. per kg.}$

(Received April 1, 1954)

174. 山岸正治, 吉田慰子: 海人草有効成分の比色定量法 (第2報)

Masaharu Yamagishi and Toshiko Yoshida: Colorimetric Determination of the Active Principle of *Digenea simplex* Ag. II.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

Troll¹⁾ は 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムを試薬としてプロリン, オキシプロリンの比色定量ができると報告したが, 該定量操作により ジゲニン酸は橙赤色に発色し, 呈色液の $\lambda=480\text{ m}\mu$ における吸光係数は ジゲニン酸量に比例するからこれを比色定量に應用することができる. 本法の呈色感度は ニンヒドリン法よりもやや低く, また海人草エキス中のジゲニン酸を定量する場合等には ニンヒドリン法よりもより多くの障害に遭遇するものと予想されあまり期待できないが, 操作の簡便および呈色液の色調等から単純なジゲニン酸製剤等の検定には有効な方法であらう.

I. 定量法 1) 試薬 a) 0.02 M 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウム水溶液 b) 1 M 重炭酸ナトリウム水溶液 c) 1 M 酢酸緩衝液 (pH 5) d) 0.1 M アスコルビン酸溶液 0.001 M HCl にアスコルビン酸を溶かして 0.1 M 溶液とする. e) 標準試液 純ジゲニン酸を蒸留水に溶かして 250% の溶液とする.

2) 操作 ジゲニン酸 250% 以下を含む検液 1 cc を共栓試験管にとり, これに b) 1 cc , a) 2 cc , 蒸留水 1 cc を順次に加えて室温に 10 分間放置する. 次に c) および d) をそれぞれ 1 cc 加えてよくふりまぜ, 更に 10 分間放置後 $\lambda=480\text{ m}\mu$ の単色光を用いてその吸光係数を測定する. 同時に標準試液, 盲験液について同様の操作を行い, 標準試液中のジゲニン酸に対応する吸光係数と検液中のジゲニン酸に対応する吸光係数の比から検液中のジゲニン酸量を求める.

II. 呈色液の吸収スペクトルおよび吸光係数とジゲニン酸量との関係 ジゲニン酸の 152.1% 水溶液に

1) W. Troll: J. Biol. Chem. **202**, 482 (1953).