Summary

Separatory determination of digenic acid was carried out by filter paper electrophoresis and the effect of various buffer solutions was examined. It was found that the Theorell buffer of pH 8.5 was the best while 100 γ to 2 mg. of the sample spotted on the filter paper gave satisfactory results. Colorimetric determination was made with ninhydrin and the range of error was $\pm 2\%$.

(Received April 12, 1954)

182. 石館守三, 栗山 勲, 瀧谷昭司: グルクロン酸の定量法の研究 (第1報)
4,4'-Diaminodiphenyl Sulfone によるグルクロン酸の比色定量

Morizo Ishidate, Isao Kuriyama, and Shoji Takitani: Studies on Determination of Glucuronic Acid. I. Colorimetry of Glucuronic Acid with 4,4'-Diaminodiphenyl Sulfone.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo*)

生体内糖代謝の重要な一成分であるグルクロン酸の生体内における消長は、生化学的に重要な研究課題となつている。そのため、古くから、naphthoresorcinol による定量法を始めとし、色々の定量法が試みられてきたが、これらは何れも種々の点で満足すべきものでなく、殊に水溶液中における微量のグルクロン酸の定量に関しては、未だ良法の発表をみていない。そこで、各方面からグルクロン酸の新定量法の確立が強く要望されている現状であり、筆者等が本研究に着手したのも実にかかる理由によるものである。

そこで、まず、ペニシリンの定量法の新しい試みとして、ペニシリンの構造中に有するラクトン環に着目して、N-(4-phenylazo-1-naphthyl)-ethylenediamine による比色定量法が発表されたので、これを同じくラクトン環を有するグルクロンに應用してみた。ところがこの結果は少なくとも可視部においては特異的な呈色はみられなかつた。そこで更に我々は、改めて、20 数種の各種芳香族アミン類とグルクロンとの呈色反応を検索した結果、次の数種の有望な物質を選択しえた。

即ち、sulfanilic acid, N-phenyl-2-naphthylamine, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, diphenylamine, 2-amino-5-sulfanyllthiazole (Promizole), sulfathiazole, 4,4'-diaminodiphenyl sulfone.

これらの中、4,4'-diaminodiphenyl sulfone がグルクロン酸の定量に対して、比較的すぐれている事が判つたので、次にこの試薬による定量法を吟味し、グルクロンが 0.5~4.5 mg/cc の濃度範囲内の場合、調整液につき塩酸濃度が 14% となる様、塩酸及び呈色試薬を加え、沸騰水浴上で 30 分間加熱し、35 分間放冷後、定量用戸紙にて戸過後、バックマン光電分光光度計 (DU 型) にて 500 m μ における absorbance を測定し、予め求めておいた検量線から検体中のグルクロンの濃度を求めると、10% 以内の誤差で定量可能なる事が判つた。なお当該試薬による本反応の結果生じた色素に関しては、未だその本体は不明である。

実 験 の 部

1) 測定波長 グルクロンを 4,4'-diaminodiphenyl sulfone (以下 DDS と略記) と共に塩酸中で加熱した場合に生ずる色をバックマン光電分光光度計で測定した (Fig. 1)。この際同時にしばしば障害物質としてグルクロン酸の定量の際問題となるグルコースの吸収曲線もしらべたが、500 m μ において測定すればグルコースの影響は無視出来ることが判つた。

2) 塩酸濃度 塩酸濃度の増大と共に absorbance も増すが、余り塩酸濃度が大きいと、加熱呈色に際して、混濁を生じ、検体の測定可能な濃度範囲が狭くなり、更に DDS の安定性、加熱条件等を考慮し、調整液につき 14% とした。

* Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

3) **DDS の濃度** DDS は水に難溶で, 3.5%塩酸に溶解した 1%溶液を使用した. 定量には 5 cc 即ち 50 mg の DDS を使用する.

4) **加熱温度** 加熱時間一定では, 加熱温度の高いほど, absorbance も増大するが, しかも加熱温度の変化による absorbance の変化は大きく, 誤差の原因となるので温度は恒温を必要とし, そこで水浴上常に沸騰状態で加熱する.

5) **加熱時間** 加熱時間の増加と共に absorbance も増し, この影響は特に始めの方が著しい. 加熱時間の延長は混濁, 更に沈澱等を生ずるので不適当である. そこで加熱時間は 30 分と定めた.

6) **放置時間** (加熱終了後, 測定迄の時間) 放置時間と共に absorbance も増し, その関係は Fig. 2 に示した. そこで放置時間も可なり厳密に規定しなければならず我々はこれを 35 分と定めた.

Fig. 1

Fig. 2

7) **検量線及び測定濃度範囲** 1)~6)迄に吟味された諸条件にもつき検量線を求めた. 即ち各種濃度のグルクロン水溶液 1 cc, DDS の 1%溶液 (3.5%塩酸に溶解) 5 cc, 35%塩酸 3 cc に水を加えて全容 10 cc とし, よく攪拌し, 沸騰水浴上 30 分間, 随時振盪しつつ加熱し, 冷却, 35 分間放置後, 定量用濾紙にて濾過後, ベックマン光電分光光度計 (DU 型) にて 500 mμ における absorbance ($\log I_0/I$) を, グルクロンの代りに水 1 cc を加えて同時に行つた盲検に対して測定 (Fig. 3). 濾過せずに測定した結果は II で, 一般に放置しておくこと次第に, 僅か乍ら混濁を生ずるが, 測定直前に濾過してから測定すれば I の様な曲線となる. しかし 4.5 mg/cc 以上, 或いは 0.5 mg/cc 以下では再現性に乏しく, 従つて誤差も大きくなるので 0.5~4.5 mg/cc の濃度範囲内で測定することが望ましい. なお, それでも Fig. 3 から判る様に, 濃度と absorbance とは直線関係とならず, Beer の法則を満足していないので, 定量に際しては, 予め各濃度による検量曲線を作ることが必要である.

8) **グルコースの影響** 1) から大体影響のない事が判つたがこれを確かめるため次の実験を行つた. グルクロンを 3.2 mg/cc と定め, これに対して 0.5~8.0 mg/cc に至る各種濃度のグルコース溶液 1 cc を水 1 cc の代りに加え, 前記の一定条件下に呈色せしめ, 500 mμ の absorbance を測定した. その結果は Table I に

Fig. 3

Table I The Effect of Glucose (0.5~8.0 mg./cc.) on the Absorbance of Glucuron Solution (3.2 mg./cc.) at 500 mμ.

Glucuron (3.2 mg./cc.)	Glucose		Total absorbance
	Added mg./cc.	Absorbance	
0.384	0.1	0.000	0.384
0.375	0.5	0.002	0.380
0.370	1.0	0.004	0.366
0.380	2.0	0.024	0.385
0.387	3.0	0.026	0.376
0.385	4.0	0.037	0.392
0.381	5.0	0.037	0.366
0.389	7.0	0.078	0.390
0.390	8.0	0.087	0.376

示す如くでありグルコースの影響は無視出来ることが判つた.

9) **結論** 本定量法により検体のグルクロン濃度が 0.5~4.5 mg/cc の範囲内なら 10%以内の誤差で定量可能である. しかし濃度と absorbance とは厳密には Beer の法則を満足せず, また混濁等の現象もあり, 必ずしも, すぐれた定量法とは云えないが, グルコースの障害は少ない.

Summary

In order to study the determination method for glucuronic acid, coloration of 20 kinds of aromatic amines and glucuronic acid was examined. It was thereby found that coloration with 4,4'-diaminodiphenyl sulfone was comparatively good. Various conditions for its use in the determination were examined and the following procedure was found to be satisfactory. To 1 cc. of the sample, 5 cc. of 1% solution of 4,4'-diaminodiphenyl sulfone in 3.5% hydrochloric acid and 3 cc. of conc. hydrochloric acid are added, and the whole volume is brought to 10 cc. with water. After warming this on a boiling water bath for 30 minutes, it is cooled, allowed to stand for 35 minutes, and filtered. The absorbence at 500 m μ is determined with the Beckman photoelectric spectrophotometer and the concentration of glucuronic acid is obtained from the detection curve preliminarily calculated. The accuracy is within 10%. This method is not so satisfactory for the determination of glucuronic acid but is advantageous in that it is not hindered by the presence of other neutral sugars.

(Received April 13, 1954)