323. 落合英二, 岡本敏彦, 上田 亨: メゾオキザル酸の薬学的研究 (第1報)

メゾオキザル酸及び関連化合物の微量定性定量

Eiji Ochiai, Toshihiko Okamoto, and Tohru Ueda: Pharmaceutical Studies on Mesoxalic Acid. I. Microestimation and -determination of Mesoxalic Acid and Related Compounds.

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

小林, 大橋等¹⁾はメゾオキザル酸塩がアロキサン糖尿家兎及び犬に対して, 顕著な血糖降下及び尿糖降下作用ある事を報じ, 更にそのナトリウム塩溶液の灌流実験により正常犬に於いて低血糖圧を起させる程強力である事を明らかにした. 著者等はこの研究に協力し, その薬学部門を担当し, メゾオキザル酸の生体内変化, これと関連ある化合物の薬理試験等の共同研究を行つているが, その先決問題としてこれ等化合物の微量定量法を樹立する必要がある. 著者等は薄紙クロマトグラフィー (以下 PPC と略す) を併用する事による微量定性定量法を検討し, 或程度満足すべき方法を決定した.

定性分析: まずジカルボン酸の PPC にならい2種の溶媒を用い Table I に示す結果を得た. 酢酸エチル-義酸-水系に於いて, 難点は蓆酸の tailing であつたが, 溶媒の混合比と Rf 値の関係は Table II のごとくで酢酸エチル 100, 90%義酸 30, 水 30 の場合に最も良好であつた. またメゾオキザル酸と他のケト酸との分離にはこれ等を *p*-ニトロフェニルヒドラゾンに導いて Table I に示すごとく良好な結果を得た. 次にメゾオキザル酸ナトリウムを薬理試験に供する際の注意すべき不純物を知るために, その再結晶母液の減圧乾固物質について PPC による分析を行つた所, 少量のグリオキシル酸と多量の蓆酸を検出した. これによりメゾオキザル酸が脱炭酸, 酸化をうけやすい事を知る (Table III).

Table I. カルボン酸の Rf 値

Acid	溶 媒			Acid	溶 媒		
	A	B	C		A	B	C
メゾオキザル酸	0.35	0.18		<i>p</i> -ニトロフェニルヒドラゾン	0.95	0.42	0.32
タートロン酸	0.52	0.29		メゾオキザル酸			
グリオキシル酸	0.45	0.62		グリオキシル酸	1.0	0.85	0.76
マロン酸	0.81	0.53		α -ケトグルタル酸	1.0	1.0	0.73
蓆酸	0.61	0.27*		ビルビン酸	1.0	1.0	0.85
グリコール酸	0.71	0.45		<i>p</i> -ニトロフェニルヒドラジン	1.0	1.0	0.95
α -ケトグルタル酸	0.74						0.0
ジオキシ酒石酸	0.58						

A: 酢酸エチル 100, 90%義酸 30, 水 30. B: イソアミルアルコール 40, 90%義酸 8, 水 10.

C: 水飽和イソアミルアルコール.

*: tailing を示す.

定量分析 メゾオキザル酸: 微量定量には Cavanilli 等²⁾の方法を参考とし, *p*-ニトロフェニルヒドラジンで対応するヒドラゾンに導いて PPC で分離後溶出し, アルカリ性に於ける発色を 510 m μ で比色する方法をとつた. Fig. 1 に示すごとく 2~10 γ /cc の間で濃度と optical density は直線関係を示し, 誤差は 4%以内である (Table IV), Cavanilli らは尿及び血中の α -ケトグルタル酸, ビルビン酸の定量に 2,4-DNP を用い, 酢酸エチルで抽出後 PPC 分離を行つているが, 尿からの抽出操作等の場合には酢酸エチルと尿との分離が不完全で完全に抽出しえない事が多いので 2,4-DNP よりも水溶性の *p*-ニトロフェニルヒドラジンをを用いて, 酢酸エチルによる抽出を行わず直接 PPC を行なう方法をとつた. この方法は操作が極めて簡便である.

タートロン酸: 次報で述べる様にメゾオキザル酸は, 生体内で還元を受けてタートロン酸になる事を確めた

* Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) 小林, 大橋, 竹内等: 日本薬理学雑誌 48, 348, 358(1952), 49, 143, 151(1953); 小林, 大橋: 最新医学 9, 508(1954).

2) Cavanilli, Frontali, Toschi: Nature 63, 568(1949); 164, 792.

ので, その微量定量法を検討した。著者等は磷酸酸性燐モリブデン酸溶液がタートロン酸によつてモリブデン青を生成する事を見出したので, この比色による定量の可能性を検した。常温では Folin-Wu³⁾ の燐モリブデン酸試液によつては, メゾオキザル酸, マロン酸, 蔞酸, 乳酸, グリオキシル酸, グルコース, トリクロル酢酸等は全くモリブデン青を生成せず, ただ レアスコルビン酸のみ呈色を示した (Table V)。沸騰水浴中ではメゾオキザル酸も呈色する。そこで常温2時間で 660 m μ に於ける比色によつてタートロン酸の定量が可能であつた。しかし燐モリブデン酸による方法はタートロン酸に特異ではなく還元性物質によつては呈色するものも多いので, なお改良の余地がある。

本研究は一部昭和 28, 29 年度文部省科学研究費によつた。謝意を表する。

実 験 の 部

カルボン酸の浮紙クロマトグラフィー: 試料は水またはエタノール溶液となし, 水溶液または塩の場合は陽イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 を通して検液となす。浮紙は東洋浮紙 No. 50 を用い, 一次元上昇法で展開, 溶媒は A (酢酸エチル 100, 90%義酸 30, 水 30) または B (イソアミルアルコール 40, 90%義酸 8, 水 10) を用いる。展開風乾後 BPB (50 mg/100 cc) エタノール溶液を若干塩基性となして噴霧する。Rf 値を Table I に示す。

蔞酸の tailing と溶媒混合比: 酢酸エチル, 義酸, 水の混合比をかえてメゾオキザル酸と蔞酸の分離能を上記の方法で調べた結果が Table II である。

p-ニトロフェニルヒドラゾンの PPC: ケト酸の *p*-ニトロフェニルヒドラゾンを水またはエタノールに溶かして検液となすか, ケト酸の水溶液に *p*-ニトロフェニルヒドラジンの塩酸酸性エタノール溶液を加えて数十分放置してそのまま検液とした。展開溶媒は C (水飽和イソアミルアルコール) で Table I に結果を示す。

メゾオキザル酸再結母液の分析: 微黄色粉末の検体 0.1 g に水 5 cc を加えて可溶分 (A) と不溶分 (B) にわけ, (B) には 5 cc の水を加えて, それぞれに陽イオン交換樹脂 (Amberlite IR-120) を加えて時々振盪しておく。イオン交換の進むにしたがつて (B) の不溶の Na 塩も溶解する。浮別してそのまま PPC にかける。また不溶分 (B) よりイオン交換で得た酸の溶液を減圧濃縮し生じた結晶をエタノールより再結して (mp 101°) 蔞酸と混融しても降下せず, 蔞酸なる事を証明した。(A), (B) 及び結晶の PPC の Rf 値を Table III に示す。これによりメゾオキザル酸と共にグリオキシル酸の少量と蔞酸を確認した。

メゾオキザル酸の微量定量: メゾオキザル酸-*p*-ニトロフェニルヒドラゾンの 10%苛性ソーダ, 10%炭酸ソーダ等容混液中の吸収曲線は Fig. 2 の如くであり, 510 m μ に於ける濃度と optical density は Fig. 1 のく直線関係を示す。また一定量をとつて PPC 分離, 溶出して測定せる際の誤差は Table IV の如くで 4%以内であつた。操作法: 検液一定量 (0.1~1 cc) に 0.3% *p*-ニトロフェニルヒドラジン塩酸酸性エタノール溶液一定量 (等量または倍量程度) を加え, 1 時間放置してヒドラゾンを生成せしめてからその約 0.005~0.05 cc を精密にマイクロピペットでとり浮紙に付し溶媒 C で展開する。微黄色のヒドラゾン部を紫外線をあてて (濃褐色となる) 切りとり, 10%炭酸ソーダ 2 cc で抽出, 更に 10%苛性ソーダ 2 cc を加えて発色せる紅色を直ちに Beckman spectrophotometer で 510 m μ に於ける optical density を求め Fig. 2 より濃度を求める。

Table II. 溶媒混合比と蔞酸, メゾオキザル酸の分離能

溶 媒 混 合 比			Rf 値		Tailing
酢酸エチル: 90%義酸: 水			Mesoxalic acid	Oxalic acid	
100	10	30	0.18	0.41	共に著し
"	15	"	0.22	0.42	蔞酸著し
"	20	"	0.30	0.47	かろうじて分離
"	30	"	0.35	0.59	完全に分離

Table III. ナトリウム塩再結母液濃縮物中の酸

	Rf 値		Rf 値		Rf 値
水可溶分 (A)	0.42 少	水不溶分 (B)	0.61 多	結 晶	0.61
	0.33 少		0.33 多	蔞 酸	0.61
	0.61 少			グリオキシル酸	0.43
				メゾオキザル酸	0.34

3) W. R. Campbell: J. Biol. Chem. **67**, 59 (1926).

4) S. Burstein: Anal. Chem. **25**, 422 (1953); 藤田, 古谷, 川奈: 本誌 **74**, 766 (1954).

Table IV. メゾオキザル酸測定誤差

メゾオキザル酸- <i>p</i> -ニトロフェニル ヒドラゾン (6.0 mg/10 cc) Spot (cc)	γ	測定時 (cc)	Optical density (510 m μ)	Fig. 2 よりの γ	平均	Δ (%)
0.009	5.4	4	0.080	5.2	5.2	-3.8
"	"	"	"	"		
"	"	"	0.081	5.3		
0.016	9.6	"	0.168	9.4	9.4	-2.4
"	"	"	"	"		
"	"	"	0.169	9.5		
0.025	15.0	"	0.264	13.8	14.4	-4.0
"	"	"	0.280	15.0		
"	"	"	0.274	14.4		
18.0 mg/10 cc						
0.03	54.0	5.4	0.830	54.0	53.8	-0.4
"	"	"	0.825	53.6

Fig. 1. メゾオキザル酸とタートロン酸の標準直線

- A: メゾオキザル酸-*p*-ニトロフェニルヒドラゾン γ /10% Na_2CO_3 ・10% NaOH 溶液 cc (510 m μ)
 B: タートロン酸 γ /Folin-Wu 隣モリブデン酸溶液 cc (660 m μ)

Fig. 2.

- A: メゾオキザル酸-*p*-ニトロフェニルヒドラゾン
の 10% Na_2CO_3 ・10% NaOH 溶液中の吸収曲線
 B: Folin-Wu 試薬中でのタートロン酸によるモ
リブデン青の吸収曲線

Table V. 各種酸のモリブデン青生成の比較

酸 (cc)	Folin-Wu 溶液 (cc)	2 時間後の Optical density (660 m μ)
タートロン酸 (431 γ /cc) 0.1	3.9	0.635
メゾオキザル酸 (200 γ /cc) "	"	-0.050
蔞酸 (400 γ /cc) "	"	0.000
マロン酸 (400 γ /cc) "	"	-0.010
グリオキシル酸 (400 γ /cc) "	"	0.000

Table VI. タートロン酸濃度とモリブデン青の Optical density

Tartronic acid (cc) (431 γ /cc)	Folin-Wu-reag. (cc)	Tartronic acid (γ /cc)	Optical density	Average
0.1	3.9	10.8	0.622	0.626
"	"	"	0.631	
"	"	"	0.626	
"	5.9	7.2	0.418	0.415
"	"	"	0.411	
"	"	"	0.416	
"	7.9	5.4	0.314	0.315
"	"	"	0.316	
"	"	"	0.314	
"	9.9	4.3	0.246	0.251
"	"	"	0.247	
"	"	"	0.259

Fig. 3. Folin-Wu 試液中に於けるモリブデン青の生成

A: tartronic acid (10.8 γ /cc)

B: mesoxalic acid (750 γ /cc)

タートロン酸の微量定量: タートロン酸, メゾオキザル酸, 蔞酸, グリオキシル酸, マロン酸の Folin-Wu の隣モリブデン酸試液による常温 2 時間後の 660 $m\mu$ に於ける Mo 青の optical density は Table V の如くでタートロン酸に特異である事が判る。また Mo 青呈色の経時変化は Fig. 5 の如くである。吸収曲線と標準直線は Fig. 1, Fig. 2 に示す通りである。定量操作: タートロン酸を含む検液 (0.1~0.5 cc) 一定量を取り, Folin-Wu の試液 10~100 倍量を正確に加えて常温 2 時間おき 660 $m\mu$ に於ける optical density を求めて Fig. 4 より濃度を求める。optical density と濃度は Table VI に示すようによく一致する。

東京大学医学部薬学科

Summary

As a preliminary to following biological change of mesoxalic acid, possessing glycopepic action, microdetection and microdetermination of mesoxalic acid were examined. For the microdetection, paper partition chromatography was employed. Mesoxalic acid was derived to its *p*-nitrophenylhydrazone, submitted to paper chromatography, the isolated spot was cut out, eluted, and the solution basified with sodium hydroxide was submitted to colorimetry. Tartronic acid formed by the reduction of mesoxalic acid was found to form molybdenum blue with phosphomolybdic acid solution and this was utilized for colorimetry.

(Received June 24, 1955)