HCl 10 cc に溶解し、浴温 40~42° で 4 hr 加水分解し、NaHCO₃ 20 mg を加えて中和し、減圧で濃縮すると 1,2-isopropylidene-D-glucose (III) の結晶が析出する。

Calcium 1,2-isopropylidene-D-glucuronate[¹⁴C](V-¹⁴C) (III) を 30 cc の水に溶解し、Pt-C⁵³ 0.5 g, NaHCO₃ 液 (NaHCO₃ 0.6 g を 9 cc の水に溶解) 3 cc を加え激しくかきまぜつつ、浴温を 50~53°, 約 100 L/hr の空気を通して酸化を行なう。2.5 hr 後に 3 cc, さらに 3.5 hr 後に 1.5 cc の NaHCO₃ 液を加え、さらに酸化をつづけ、計 8 hr 酸化を行なつた。酸化液 (淡黄色) を直接ナス型コルベンに汙取、触媒は 0.1% の温 NaCl 水で洗浄。酸化液を 5~7 cc まで減圧濃縮し、CaCl₂·2 H₂O 0.2 g を加えて析出する修酸カルシウムを 70° に加温して脱色炭とともに汙過、汙液に CaCl₂·2 H₂O 0.3 g を加えて冷却すると calcium 1,2-isopropylidene-D-glucuronate-¹⁴C の結晶が析出する。結晶を汙取し 75% EtOH で洗浄後乾燥。得量 440 mg (0.895±0.012 μc/mg)。汙液に新たに Ca 塩 (V) 300 mg を collector として加え加熱溶解しさらに 300 mg (0.467±0.006 μc/mg) を得た。

D-Glucuronolactone-¹⁴C (VI-¹⁴C) (V) 740 mg に修酸 160 mg を水 8 cc に溶解して加え、沸騰水浴上で 1 hr 45 min 加熱。脱色炭を加え析出した修酸カルシウムを汙別し、汙液に D-glucuronolactone 250 mg を溶解し、約 2 cc まで減圧濃縮、AcOH 15 cc を加え水浴上 10 min 加熱、脱色炭少量を加えて汙過し汙液を僅かに減圧濃縮すると D-glucuronolactone-¹⁴C が結晶となり析出する。汙過し冷 MeOH で洗浄。得量 443.5 mg, mp 172~173°(decomp), (0.759±0.014 μc/mg)。

本実験に御指導を賜わつた東京大学薬学部石館守三教授に謹謝する。なお本実験は東京大学薬学部において行なつた。

中外製薬株式会社研究所

UDC 547.576 : 547.233.1

塚本赴夫^{*2}, 由比頸之介^{*3}: ハロゲンサリチルアルデヒドの研究 (第3報¹⁾)

3,5-Dibromosalicylaldehyde による脂肪族一級アミンの定量

Takeo Tsukamoto^{*2} and Kennosuke Yuhi^{*3}: Studies on Halosalicylaldehyde. III.

Colorimetric Determination of Aliphatic Primary Amines by

3,5-Dibromosalicylaldehyde.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyushu,^{*2} and Labor Hygienic Institute of Yawata Hospital, Yawata Iron & Steel Works, Ltd.^{*3})

3,5-Dibromosalicylaldehyde, whose suitability as colorimetric agent for determination of aliphatic amines was reported in the preceding paper,^{*1} was used for determination of 5 kinds of aliphatic amines and its practicability was confirmed. This reagent makes it possible to determine aliphatic primary amines in the range of concentration of the amine of 2~100 γ/cc. at pH 5.1 of the coloring solution, measured at 434 mμ.

(Received September 19, 1959)

前報¹⁾において 3,5-ジブロムサリチルアルデヒドを用いた一級アミン定量法につき報告し脂肪族アミンの定量に適している旨のべたが、今回ブチルアミン、イソブチルアミン、イソプロピルアミン、エタノールアミン、塩酸 D-グルコサミンの5種の脂肪族アミン水溶液につき定量条件を検討し、脂肪族アミンの定量試薬として実用的であることを確認した。

グルコサミンの定量法にはアセチルアセトンを用いる Elson-Morgan 法²⁾ およびその改良法³⁾ が実用されているが、著者はこれを一級アミンとして定量することを試み、脂肪族アミンの定量操作により定量し得ることを

*1 第 79 回日本薬学会年会で発表 (1959).

*2 Katakasu, Fukuoka.

*3 Tori-machi, Yahata.

1) 塚本, 由比: 本誌 79, 1294(1959).

2) L. A. Elson, W. T. J. Morgan: Biochem. J. 27, 1824(1933).

3) O. W. Neuhaus, M. Letzring: Anal. Chem. 29, 1230(1957).

知つた。本法とアセチルアセトン法を比較すると、試薬の安定性、定量操作の簡易、再現性等の点で本法が優れている。しかしアミノ酸の影響が考えられる蛋白分解液中のグルコサミンの定量には、本法をそのまま応用することの出来ない欠点がある。

前報にのべた如く脂肪族一級アミンの比色定量法にはナフトキノンスルホン酸⁴⁾、ピクリン酸⁵⁾等が用いられているが、前者は試薬および発色の不安定なる点に欠点があり、後者は感度低く低級アミンに應用出来ない。またいずれもその定量操作中に有機溶媒による抽出操作が必要で、これが誤差の一因となつている。著者は前報に用いた 74% エタノールにて発色させる方法を採用したが、感度、再現性ともに前記定量法にまさっている。

発色液の極大吸収波長は発色時の液性が酸性よりアルカリ性に移るにつれて長波長に移動し、pH 5.0 ± 0.1 においては $430 \sim 435 \text{ m}\mu$ に最大値を示す。それ故前報と同じ定量操作により行ない、後述の緩衝液を用い測定波長 $434 \text{ m}\mu$ にて比色する方法を採用した。最終液中のアミン濃度 $2 \sim 100 \gamma/\text{cc}$ の範囲において、発色液の吸光度とアミン濃度との間に Beer の法則が成立する。

5 種のアミンと 3,5-ジブロムサリチルアルデヒドとの Schiff 塩基の分離はエタノールアミンを除き成功しなかつた。

実験および考察

定量操作 中性の検液 1 cc, 蒸留水 1 cc を内容 30 cc の目盛付試験管にとり、それぞれに酢酸緩衝液 0.1 cc, EtOH (95%) 3.0 cc を加えよく振盪混和後 DBSA 試薬 1 cc を加えよく振盪混和、 75° に調節した湯浴上にて 5 min 加温後冷水中にて冷却、蒸留水の方をブランクとして $434 \text{ m}\mu$ にて吸光度を測定、検量線よりアミン量を算定する。

吸収曲線の作製 前述の定量操作により発色せる各アミン $10 \gamma/\text{cc}$ を含む反応液につき、蒸留水を同様に処理した液をブランクとして各波長における吸光度を測定し吸収曲線を作製した。Fig. 1 のように各アミンとも $430 \sim 435 \text{ m}\mu$ に極大吸収を生ずる。それ故吸収波長 $434 \text{ m}\mu$ にて測定を行なつた。

Fig. 1.
Absorption Spectra of Amines
Colored by this Reagent

- I Ethanolamine $10 \gamma/\text{cc}$.
- II Isobutylamine $10 \gamma/\text{cc}$.
- III Butylamine $10 \gamma/\text{cc}$.
- IV Isopropylamine $10 \gamma/\text{cc}$.
- V Glucosamine HCl $10 \gamma/\text{cc}$.

Fig. 2.
Calibration Curve for Amines
(at $434 \text{ m}\mu$)

検量線の作製 $50 \gamma/\text{cc}$ の各アミン標準液 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 cc を目盛付試験管にとり蒸留水にて 1 cc と

4) D. H. Rosenblatt, P. H. Linka: Anal. Chem. **27**, 8(1955).

5) T. Takayama: Japan Analyst **6**, 306(1957).

する。そのおのおのを前記の操作により発色させ、蒸留水を同様に処理しこれをブランクとして吸光度を測定する。原点を通る直線となる (Fig. 2).

pH の影響 アミン標準液 1 cc に種々の pH 値の AcOH-AcONa 緩衝液 0.1 cc を加え種々の pH のアミン水溶液を調製、前記操作を行ない吸光度を測定し試料の pH の発色におよぼす影響を検討したが、pH 5.1 (AcOH 1 cc, AcONa 5 g を蒸留水にて 200 cc とする) の緩衝液を加えアミン水溶液の pH が 5.1 ± 0.1 となつたとき最良の結果を示した (Fig. 3).

Fig. 3.
Effect of Buffer Solution on
Absorbance (434 mμ)

DBSA 試薬量の影響 他の条件は変えずに DBSA 試薬の濃度のみを 0.1% から 0.4% に順次変えた場合、Table I のように 0.2% の時最良の結果を示した。

Table I. Effect of Reagent Concentration on Absorbance

Concentration of DBSA (%)	0.1	0.2	0.3	0.4
Ethanolamine	0.485	0.490	0.470	0.470
Isobutylamine	0.410	0.420	0.415	0.410
Butylamine	0.330	0.340	0.325	0.325
Isopropylamine	0.265	0.275	0.270	0.270
Glucosamine HCl	0.150	0.150	0.145	0.145

本研究の実施を許可された八幡製鉄所桑本病院長、元田労研課長に謝意を表します。

九州大学医学部薬学科
八幡製鉄所病院労働医学研究課