これより pH が高くなると低い定量結果を与える。

酢酸フェニル水銀の純品 1 mg を含む水溶液について実験した結果, 各 5 回の平均値は Table I に示され, その誤差百分率の標準偏差の推定値は 0.5% である。

なお製剤に対する本法の適用については目下検討中である。

実 験 の 部

試 薬

1) $1.5 \times 10^{-4} M$ ジエチルジチオカルバミン酸銅液: ジエチルジチオカルバミン酸銅約 54 mg を CCl_4 1000 cc に溶解する。本溶液は遮光して貯え, 少なくとも 7~10 日に 1 度再標定する。

標定法: $1.5 \times 10^{-4} M$ $Hg(NO_3)_2$ 液 10 cc を正確にとり, あらかじめ少量の水をいれた分液ロートにうつす。ビュレットから $1.5 \times 10^{-4} M$ ジエチルジチオカルバミン酸銅液を滴加してふりまぜ, CCl_4 層が脱色すればその約 0.5 cc を残して余分の CCl_4 層を流し出し, ふたたび銅塩溶液を滴加してふりまぜる。これをくりかえして CCl_4 層の黄褐色が脱色しなくなる点を終点とする。終点近くでは標準液の滴加を少量ずつにする。 $1.5 \times 10^{-4} M$ ジエチルジチオカルバミン酸銅液 1 cc は $1.5 \times 10^{-4} M$ $Hg(NO_3)_2$ 液 1 cc に対応する。

2) $1.5 \times 10^{-2} M$ $Hg(NO_3)_2$ 液: Hg 1.5046 g を conc HNO_3 約 40 cc に溶解し, メスフラスコを用い水を加えて 500 cc とする。本溶液は貯蔵用で, 硬質びんに入れ, 遮光して貯える。

3) $1.5 \times 10^{-4} M$ $Hg(NO_3)_2$ 液: $1.5 \times 10^{-2} M$ $Hg(NO_3)_2$ 液 1 cc を正確に取り, メスフラスコを用い水を加えて 100 cc とする。本溶液は用に臨み調製する。

定 量 法

約 1 mg の酢酸フェニル水銀を含む試料溶液 10~20 cc をあらかじめ少量の水をいれた分液ロートにいれ, pH を 2~2.5 とし, ビュレットから $1.5 \times 10^{-4} M$ ジエチルジチオカルバミン酸銅液をよくふりまぜながら CCl_4 層が微に着色するまで滴加する。つぎに $1.5 \times 10^{-4} M$ $Hg(NO_3)_2$ 液 1 cc を正確に加え, よくふりまぜて CCl_4 層を脱色させた後その約 0.5 cc を残し余分を流し出し, 以下標定法の項に記述したと同様にして滴定する。

$1.5 \times 10^{-4} M$ ジエチルジチオカルバミン酸銅液 1 cc $\equiv$ 酢酸フェニル水銀 0.101 mg.

おわりに実験の一部に協力された村野洋子嬢に感謝します。

静岡薬科大学, エーザイ株式会社研究所

UDC 577.173.16 : 547.457

水谷 彰, 後藤 迪: パロチン中の糖について*1 (補遺)

Akira Mizutani and Susumu Goto: Studies on Sugar in Salivary Gland Hormone "Parotin" (Supplement).

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University*2)

汙紙クロマトグラフィーおよび汙紙電気泳動法によりパロチンに含有される糖について調べた。アミノ酸の共存する場合, 糖を汙紙上で直接発色させることが難かしいため, 汙紙の抽出液についてフェノール硫酸反応で発色させ, 分光光度計で吸光度を測定することにより galactose と mannose が含まれることがわかった。

牛の耳下腺から抽出した唾液腺ホルモン "パロチン" が galactose または mannose を含有することは水谷^{1,2)}が報告したが, 今回この糖を確かめるため, パロチンの加水分解物をコリジンを展開溶媒とした汙紙クロマトグラフィー (PPC) ならびに硼砂緩衝液を用いた汙紙電気泳動法により分析した。パロチン加水分解物中の糖の発色は共存するアミノ酸により阻害される場合があるため, 硫酸で加水分解した後燐タングステン酸でアミノ酸を除き, ついで水酸化バリウム水溶液で硫酸根と燐タングステン酸を除いたものを試料としたが, この試料について PPC を行なった場合でも汙紙上における発色は不充分であるため, 展開後の汙紙を抽出し, 抽出液につ

*1 本研究の一部は第 77 回日本薬学会年会で講演 (1957)。

*2 Hagiya-cho, Mizuho-ku, Nagoya.

1) 水谷: 本誌 72, 1511(1952).

2) 水谷: 水誌 72, 1514(1952).

いて、アミノ酸の影響の少ない色調の安定なフェノール硫酸法³⁾により発色後吸光度を測定した。

濾紙クロマトグラフィー Fig. 1, A に示すように原線上の一端から 0.8 cm の点に標準用として, mannose と galactose の混合液をつけ, さらに他の端から 3 cm の長さ亘つて試料をつけ, 展開後, 標準の糖が展開していると思われる部分 (a-b) を切り離し, aniline hydrogen phthalate (AHP) で発色させる. ついで試料の展開している c,e の部分を切り離し, 糖の存在すると思われる近辺を相当広い範囲に亘り, 巾 1 cm ずつに切り, 水で抽出後発色させ, 吸光度を測定して標準の糖の位置と比較した。

Fig. 1.

Preparation of Filter Paper for Chromatography and Electrophoresis

G : galactose, M : mannose

既知の糖 試料をつける場所 (Fig. 1, A. d-e) に galactose と mannose (各 250 γ /cc) の等量混合液をつけ, 標準用にも同じ液をつけて展開後上記の如く処理した場合, Fig. 2 からわかるように galactose および mannose に相応する位置に二つのピークが認められる. これら二つのピーク以外の場所でも, かなりの起伏はあるが, 大体 0.1 前後の吸収が認められる. これは濾紙そのものから抽出された糖質に基づくもので, 実験誤差と

Fig. 2.

Paper Chromatography of Mixture of Galactose and Mannose (collidine, discending method)

- criteria for the rejection of outlying observations at 0.05 probability level
- criteria for the rejection of outlying observations at 0.01 probability level
- mean level

Upper diagram : marking strip

Lower diagram : absorption patterns of eluted sugars, the color developed with phenol- H_2SO_4 .

3) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith : Ann. Chem. 28, 351(1956).

みなされるが、念のため、各々の吸光度から棄却限界⁴⁾を計算して、これら二つのピークの有意性を調べたところ、図中点線で示した危険率 1%における棄却限界を越えることがわかった。すなわち、二つのピークは濾紙から抽出された糖質その他の誤差に基づくものでないことが 99%の安全度でいえる。また、これらのピークが隣りに並行して展開している標準の糖の混入である疑いを検討するため、既知の糖液のみを原線上の端から 8 mm の点に (Fig. 1, A) つけて展開後、試料を展開させる部分(この場合は試料はつけられてない)を抽出して同様に処理した場合 Fig. 3 の下部に示すような結果を得た。吸光度にはかなりの起伏はあるが、5%の棄却限界を越えるピークは存在しないから、それらの起伏はすべて実験誤差に入り、標準の糖は影響しないことがわかった。

Fig. 3.
Blank Test

パロチン 粗パロチンを硫酸分画法⁵⁾で精製後、チゼリウス型電気泳動装置により Fig. 4 のような泳動図を示し、純度約 86%と判定される製品を PPC で分析したところ Fig. 5 に示す結果を得た。mannose と galac-

Fig. 4.
Electrophoretic Patterns
of Parotin

Fig. 5.
Paper Chromatography
of Sugars in Parotin
Upper diagram: marking
strips
Lower diagram: patterns
of sugars in Parotin
(collidine, descending
method)

tose に対応する位置にピークが認められる。この場合、別の実験から得た棄却限界の値をそのまま用いることは濾紙の均一性などの点から適当でないと思われるので、この実験のデータから棄却限界を計算したところ、1%の危険率でこれら二つのピークは有意であることがわかった。また、二つのピーク以外には、pentose に相当する位置およびその他の部分にも特にピークらしいものは認められない。

濾紙電気泳動法 硼砂緩衝液中で糖の濾紙電気泳動を行なった後、抽出した液に混入してくる硼砂が、糖の発色に及ぼす影響を調べるため、Fig. 1, B の i-j の部分には試料をつけないで、試料をつけた場合と同様に通

4) 増山元三郎: “少数例の纏め方と実験計画の立て方” p. 21(1950) 河出書房.

5) 伊藤, 水谷: 本誌 72, 244(1952).

電した後、h-j の部分を抽出し、一定汙紙巾当たりの硼砂の量を求め、それに相当する量の硼砂を糖液に加え発色後吸光度を測定したところ、発色の程度は幾分低くなるが、硼砂のない場合と同様に良好な直線になることがわかった。試料について泳動後処理した場合は Fig. 6 に示すように肉眼的に、はつきりと二つのピークを認めることができる。この場合はピークに属さない部分の汙紙面が少ないため、棄却限界は求めなかった。

Fig. 6.

Paper Electrophoresis of Sugars in Parotin
(1% borate buffer, 480 V, 2~5 mA, 5 hr.)
Upper diagram: marking strip
Lower diagram: pattern of sugars in Parotin

実 験 の 部

パロチンの加水分解および分解液からのアミノ酸の除去 パロチン 200 mg に $N H_2SO_4$ 10 cc を加え、沸騰水浴上 5 hr 加水分解。分解液に 55% 燐タングステン酸を沈殿が出なくなるまで加え、一夜冷蔵庫内に放置後、遠心分離して沈殿を除去。沈殿を約 5 cc の $N H_2SO_4$ で 3 回洗浄し、洗液は上澄液に合し、攪拌しながら飽和 $Ba(OH)_2$ 溶液を加え、 SO_4^{2-} と過剰の燐タングステン酸を沈殿させる。この場合沈殿がやや青味を帯びる pH 8 付近を終末点とする。冷蔵庫内に一夜放置後遠沈、上澄液に洗液を合したものを減圧で蒸発乾固後、300 cc の精製 EtOH を数回に分けて加温抽出し、抽出液から減圧で EtOH を留去、残渣を蒸留水に溶かして使用。

汙紙クロマトグラフィー並びに電気泳動 PPC はコリジン・ H_2O を展開剤として下降法により、汙紙は東洋汙紙 No. 51 を用いて行なつた。汙紙電気泳動は東洋汙紙 No. 50 を用い、装置は東洋汙紙製 B 号器を用い、泳動操作はすべて冷蔵庫内で行なつた。いずれの場合も汙紙は使用前に 1% NH_4OH に一夜浸漬し、つぎに蒸留水で充分洗浄後風乾して用いた。

展開後の汙紙の抽出 展開後、既知の糖をつけた部分 (Fig. 1, A. a-b および B. f-g) を巾 2 cm に切り取り AHP を噴霧して 105° に加熱、発色。galactose および mannose の各スポットの中間を境として左右に巾 1 cm ずつ目盛つて番号をつけ、基準とした。案内用の汙紙面に隣接する巾 0.5 cm の汙紙面 (b-c) を残して試料の展開している部分 (d-e) を切りとり基準の目盛にしたがつて小片に分ち、汙紙片をそれぞれ試験管に入れ、蒸留水 5 cc を加え、沸騰水浴上 5 min の加温抽出を 3 回繰り返す。抽出液を合してグラスフィルターで汙過、汙紙屑を除く。汙液を減圧で蒸発乾固後、残渣を少量の蒸留水に溶かし、全量 3 cc として検液とした。

発色ならびに吸光度の測定 検液 1 cc を試験管にとり、80% PhOH 0.1 cc を添加、つぎに conc H_2SO_4 3 cc を加えて直ちに混和し、発色後日立製分光光度計により吸光度を測定。別に同じ検液 1 cc をとり conc H_2SO_4 3 cc を加えたものを対照とした。

汙紙電気泳動の際の汙紙抽出液に混入する硼砂の測定 Fig. 1, B において h-j の部分に試料をつける場合と同様に緩衝液を用い、450 V, 2~5 mA で 5 hr 通電後汙紙を 15 cm 巾に切つて上記のように抽出、抽出液は減圧で蒸発乾固、 P_2O_5 上で減圧乾燥して秤量した場合 0.25 mg であつた。したがつて汙紙巾 1 cm 当たり 50 γ の硼砂を含有することになる。

結 語

パロチン製品中には galactose と mannose の二種の糖が含まれていることがわかつたが、両者の含量の比を求めるまでには至らなかつた。また本実験において pentose に相当するピークが認められないことから、存在する糖が核蛋白などに由来するものでないこともいえる。

本研究に当たり原料の粗パロチンを分与された帝國臓器製薬株式会社ならびに試料の精製その他に協力された吉原靖高氏、日立分光光度計の使用に当たり御便宜を与えられた本学医学部 明石修三教授に深謝します。

名古屋市立大学薬学部