また Table I, II の実験値から Table III の統計値を得るがその結果は Table I, II の結果は同一母集団に属しているとの仮説はすてられないし, エストロンの有無に関して比色吸収値の母集団の間には有意の差を認められないことを示している。

友田製薬株式会社研究部

UDC 615.711.76-07

林 誠, 畝本 力, 宮木高明: Phosphorylcholine の簡易比色定量法

Makoto Hayashi, Tsutomu Unemoto, and Komei Miyaki: A New and Rapid Colorimetric Method for Determination of Phosphorylcholine.

(*Institute of Food Microbiology, Chiba University*^{*1)})

Phosphorylcholine forms a blue precipitate with Molybdenum Blue, obtained by reduction of phosphomolybdic acid with tin(II) chloride and colorimetric determination by this coloration reaction was devised. In this method, 0.4 cc. of Molybdenum Blue solution (an equivolume mixture of 12% phosphomolybdic acid solution and 2% solution of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 2.5N hydrochloric acid) is added to 1 cc. of the sample solution (0.1~0.4 μmole), the mixture is cooled in ice for 2 hours, and the precipitate formed is collected by centrifugation. After washing the precipitate with 0.5% solution of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 0.1N hydrochloric acid, it is dissolved in 10 cc. of equal mixture of acetone and 2.5N hydrochloric acid and colorimetric determination of this solution is carried out after 10~30 min. at 725 $\text{m}\mu$. Combination of this method with the cellulose column chromatography enabled rapid determination of phosphorylcholine in rat liver.

(Received November 18, 1960)

phosphorylcholine (P-choline と略) は生体内に広く分布し, acetylcholine¹⁾, lecithin²⁾ の生合成過程において重要な役割を演ずることが解明されており, その薬理学的研究も宮木等³⁾ により報告されているが, p-choline の定量法としてはこれを酵素的⁴⁾ あるいは化学的^{5,6)} に加水分解し, 生ずる choline またはリン酸を測定するものであった。

著者等はたまたま P-choline は錫イオン存在下モリブデン青と沈殿を生じ, この青色沈殿を塩酸加アセトンに溶解すれば Fig. 1 に示すような 725 $\text{m}\mu$ に吸収極大を有する溶液を得ることより P-choline の簡易比色定量法

Fig. 1.
Absorption Spectrum of the Blue Color

*1 Okubo, Narashino, Chiba-ken.

1) J.F. Berry, E. Statz: J. Biol. Chem. **218**, 871(1955).

2) E.P. Kennedy, S.B. Weiss: *Ibid.* **222**, 193(1956).

3) 宮木, 林, 小倉, 吐山, 田中: 本誌 **78**, 1249(1958).

4) R.M.C. Dawson: Biochem. J. **65**, 627(1957). 5) *Idem*: *Ibid.* **60**, 325(1955).

6) R.W.R. Baker, G. Porcellati: *Ibid.* **73**, 561(1959).

を考案した。

この沈殿の組成は不明であるが、 ^{32}P -choline を用いて行なつた実験で Fig. 2 に示すように、青色沈殿に回収される ^{32}P -choline は用いた P-choline 量に比例して増加した。

Fig. 2.

Recovery of Labeled Phosphorylcholine
in the Precipitate

Specific activity of ^{32}P labeled phosphorylcholine was 1.05×10^5 c.p.m. per $1 \mu\text{mole}$.

—●—●— Radioactivity in the precipitate.
—○—○— Sum of the radioactivity, recovered in the precipitate and the supernate.

しかし著者等の方法は Table I, II に示すように共存物による影響が比較的大で、塩類濃度が大になると 100% 阻害され、グリセリン酸も P-choline と等 mol の存在で約 10% の阻害を示した。choline, ethanolamine は無影響であるが、リン酸および phosphorylethanolamine は単独でも青色沈殿を生じ、P-choline 共存下では大体相加的に作用した。

Table I. Inhibition of the Present Method by Salts and α -Glycerophosphate (G-P)

Salt	Concn. (M)	Inhibition (%)	Salt	Concn. (M)	Inhibition (%)
NaCl	0.1	16	Na_2SO_4	0.2	1.5
	0.2	29		0.4	19
	0.8	100	G-P	0.2 $\mu\text{mol/tube}$	5.5
BaCl_2	0.05	28		0.4	9.5
	0.1	36		1.0	30
	0.4	100		2.0	51

0.4 μmole of P-choline was used.

Table II. Effect of Phosphorylethanolamine (P-E) and Inorganic Phosphate (I-P) on the Determination of Phosphorylcholine (P-C)

	Substance (μmole)	Calcd. as P-C (μmole)		Substance (μmole)	Calcd. as P-C (μmole)
P-E	0.2	0.04	P-C 0.2+ P-E	0.1	0.22
	0.4	0.13		0.2	0.26
	1.0	0.34		0.4	0.32
I-P	0.2	0.01		1.0	0.57
	0.4	0.08	I-P	0.2	0.24
	1.0	0.15		0.4	0.26
				1.0	0.34

本法はこのような種々の物質により障害をうけるので、組織抽出液などに直接適用することはできない。そこで、著者等はアンモニア含有フェノール溶媒によるペーパークロマトグラフィー (PPC) において P-choline は展開溶媒の前端近くに移動することより、セルロースカラムクロマトグラフィーを用いて P-choline と定量障害物とを分離後、本法により迅速にシロネズミ肝中の P-choline を定量し得た。なお、Dawson⁵⁾ は動物組織中の p-choline 量を二次元ペーパークロマトグラムの P-choline スポットのリン酸を定量して測定している。

実 験 の 部

試 薬 P-choline は Ca 塩を用い (この程度では Ca イオンの影響はない)、 ^{32}P -choline は ^{32}P -リン酸を

用いて合成し, 使用時の specific activity は 1.05×10^5 cpm/ μ mol であった. リンモリブデン酸, 第一塩化錫は特級市販品を用いた.

測定装置 吸収曲線は日立 EPU-2 型光電分光光度計, 比色には Coleman Universal Spectrophotometer を用いて測定し, 放射能測定には科研 Radiation Counter Model 100 に GM end-window tube を接続して使用した.

定量法

試薬 i) モリブデン青試液. 12%リンモリブデン酸水溶液と 2.5N HCl に 2%に $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を溶解した液を等量混合, 用時調製. ii) 沈殿洗浄液. 0.1N HCl に 0.5% $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を溶解, 用時調製. iii) 沈殿溶解液. Me_2CO と 2.5N HCl を等量混合.

操作 0.1~0.4 μ mol の P-choline を含む試料 1 cc を遠沈管にとり, モリブデン青試液 0.4 cc を加え, 混和後氷室に 2 hr 放置, 生じた沈殿を遠心分離, 上澄液を捨て, 遠沈管を倒立して充分に上澄液を除去後, 洗浄液 5 cc に沈殿を懸濁洗浄, 遠沈後, 沈殿を溶解液 10 cc に溶解後 10~30 min に 725 m μ において, 試料の代わりに蒸留水を用いて同様処理したものを対照として比色する. 検量曲線は Fig. 3 に示した.

Fig. 3.
Calibration Curve of Phosphorylcholine

肝臓中の P-choline 定量 シロネズミ肝よりの P-choline の抽出: 屠殺直後のシロネズミ肝臓 5 g を 10 cc の冷 10%三塩化酢酸 (TCA) で 3 回ホモジナイズしながら抽出し, 抽出液を合し, ノーリット 0.2 g を加え, ふりまぜ, 5 min 後に汙過, 水洗, 汙洗液を合し, Et_2O で TCA を連続抽出後, EtOH を 70% になるように加え, グリコーゲンなどを沈殿させ, 汉過, 水洗し, 汉洗液を減圧濃縮し 2.5 cc とする.

セルロースカラムクロマトグラフィーによる P-choline の分離: 100 mesh のセルロース粉末 (東洋汉紙製) を水で洗浄後, 直径 1 cm のガラス管に高さ 20 cm に詰め, 一旦水をきり, 80%フェノール-10% NH_4OH (80:0.2) 溶媒を 30~50 cc 流下し, 過剰の水を追出し, つぎにカラムの上層に分析試料 0.5 cc の水を吸収するに十分な量の乾燥セルロース粉末を積層し, 汉紙で押さえ, 直ちに 0.05% bromthymol blue (BTB) 1 滴を添加した肝臓抽出濃縮液 0.5 cc を流し込み, フェノール- NH_4OH 溶媒で展開した. BTB 溶出開始とともに 2 cc ずつ分画し, 総リン酸と P-choline について分析した. その結果は Fig. 4 に示した如くである. 各分画を PPC で検索

Fig. 4.
Separation of Phosphorylcholine by Cellulose Column Chromatography

Rat liver extract corresponding to 1 g. of wet tissue was applied to the column.

□ Total organic phosphorus.
■ Micromole estimated as phosphorylcholine by present method.

P.C.: Phosphorylcholine

P.E.: Phosphorylethanolamine

したところ P-choline は fraction 6 および 7 のみに存在し, fraction 11, 12 には phosphorylethanolamine が存在し, P-choline として定量されたが, fraction 6~7 の定量値をもって P-choline 量とした. すなわち, シロネズミ肝臓 1 g 中の P-choline は 1.44 μ mol である. なお, 同一検体を Dawson 法³⁾で行なった定量値は 1.33 μ mol であった.

phosphorylcholine の分与をうけた東亜栄養化学工業株式会社に深謝します.