

目 次

報 文

国際薬局法の試験法, 規格に関する研究 (第1報).....	
..... 板井孝信, 鈴木郁生, 大場琢磨, 関島正昭, 佐子茂, 神谷庄造, 升田望, 石垣和子.....	1
非水溶液滴定による医薬品の定量 (第13報) 氷酢酸を溶媒とするキニーネ類の滴定とその塩基性につ いて.....	鹿島 哲..... 9
非水溶液滴定による医薬品の定量 (第14報) 氷酢酸中における 1-フェニール-3-メチルピラゾロ ン (5) 類の塩基性について.....	鹿島哲, 庄司初枝, 土屋雅一.....15
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第1報) 通常法による日局クレゾール石鹼液 中の <i>o</i> -, <i>m</i> -及び <i>p</i> -クレゾールの定量.....	板井孝信, 大場琢磨, 田中誠之.....19
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第2報) 補償法による安息香酸中のフェノバ ルビタールの定量.....	板井孝信, 大場琢磨, 田中誠之.....25
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第3報) 森永ドライミルク中毒事件の毒物の 分析.....	板井孝信, 大場琢磨, 田中誠之.....29
バニリン及びクマリンのポーラログラフィー.....	佐藤 寿.....33
パニトロフェネトールのポーラログラフィー.....	佐藤 寿.....39
r-B.H.C. 乳剤のポーラログラフ定量法.....	藤井正道, 佐藤寿.....43
沔紙クロマトグラフィーによる亜鉛の定量法.....	岡崎精一.....51
沔紙クロマトグラフィーによるけし属植物中のモルヒネ検出について (第1報).....	朝比奈晴世, 大野昌子.....57
沔紙クロマトグラフィーによる, 家庭麻薬製剤中のコデイン, ヒドロコデインの定量法.....	朝比奈晴世, 大野昌子.....61
ドーフル散中のエメチンの検出について.....	朝比奈晴世, 志内賢彦, 中村良.....65
けし (<i>Papaver somniferum</i> L.) 乳液乾燥温度がモルヒネ含量に及ぼす影響について.....	木下孝三.....69
沔紙クロマトグラフィーによる <i>Ammi visnaga</i> LAM. 果実中ケリンの定量法.....	川谷豊彦, 大野忠郎, 伊藤巳代子.....73
逆性石鹼について (第3報) 塩化ベンゼソニウムの燐タングステン酸による重量定量法及び燐モリブ デン酸による比色定量法.....	吉村淳, 守田実.....77
シアン化塩または硫シアン化塩を使うチオクロム法の比較検討.....	南原精一.....81
混合ビタミン剤のマイクロバイオアッセイ (統) I, ビタミンB ₁₂ の定量.....	新村寿夫.....89
ヒスチジン製剤中ヒスチジンの化学的定量法.....	平岡栄一.....95
ヒスチジン製剤中ヒスチジンの微生物定量法.....	平岡栄一..... 101
メチルエフェドリンの検出法 (覚せいアミン剤の検出法第3報).....	大熊誠一, 城戸靖雅... 105
フェニルアセトン, フェニル酢酸及びフェニルアセトアセトニトリルの検出法 (覚せいアミン剤の 検出法, 第4報).....	大熊誠一, 城戸靖雅... 107
二酸化セレンによる呈色反応 (第1報) 二酸化セレンと硫酸によるステロイドの呈色反応.....	渡辺俊雄... 111
二酸化セレンによる呈色反応 (第2報) 二酸化セレンによるイソニコチン酸ヒドラジド中の遊離ヒド ラジンの検出.....	渡辺俊雄... 113
イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第1報) α -位オキシ, アルコキシ置 換体等の合成.....	板井孝信, 小倉治夫, 神谷庄造... 115
イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第2報) α -位チオアルキルまたはス ルフオアルキル置換体.....	板井孝信, 関島正昭... 119
イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第3報) α -位アミノ置換体.....	板井孝信, 関島正昭... 121

(2)

パソプレシンの新定量法 I. 脳髄破壊犬によるパソプレシンの定量法	中山豪	125
パソプレシンの新定量法 II. 脳髄破壊ラットによるパソプレシンの定量法及びその他の定量法との比較	中山豪	141
脳下垂体後葉ホルモンの研究 (第5報) 各種動物脳下垂体中のオキシトシン及びパソプレシン含量について	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢淳	151
脳下垂体後葉ホルモンの研究 (第6報) 牛脳下垂体後葉中のオキシトシン及びパソプレシンのイオン交換樹脂による分離について	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢淳	159
乾燥甲状腺中のヨウ素の定量	竹中祐典	163
インシュリンの薬化学的研究 (第14報) 鯨脾臓からインシュリン結晶の単離	長沢佳熊, 竹中祐典, 岡崎精一, 深沢真司, 芦沢宏, 柴田哲夫	167
インシュリンの薬化学的研究 (第15報) 沔紙クロマトグラフィを用いるアイソフェンインシュリン中のインシュリンの定量法	長沢佳熊, 西崎笹夫	171
インシュリンの薬化学的研究 (第18報) 魚類インシュリンの精製及び魚類, 鯨インシュリンの物理化学的性質について (その1)	長沢佳熊, 西崎笹夫	179
卵胞ホルモンの研究 (第11報) ナガス鯨卵巣中に含まれる卵胞ホルモンについて	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一	185
銀錫アマルガムの硬化膨縮について (第2報) 充填方法の変化による銀錫アマルガムの物理的性質の影響について	藤井正道, 堀部隆	189
歯科用珪酸セメントの透明度測定について	藤井正道, 堀部隆	195
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第2報) 緑茶の放射能汚染について	長沢佳熊, 川城巖, 鹿島哲, 河村正一, 西崎笹夫, 松島崇	201
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第3報) 牛乳及びその製品の放射能について	長沢佳熊, 川城巖, 榎本正義, 松島崇, 河村正一	205
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第4報) 飲料水, 野菜及び果実類の放射能汚染	長沢佳熊, 川城巖, 榎本正義, 鹿島哲, 松島崇	209
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第5報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析	長沢佳熊, 川城巖, 中山豪一, 鹿島哲, 榎本正義, 芹沢淳, 大熊誠一, 河村正一, 西崎笹夫	213
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第6報) 放射能で汚染された肝臓を原料とする肝油の製造について	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢淳, 西崎笹夫	231
オレンジジュース中より非イオン性界面活性剤の検出並に定量について	川城巖, 竹内未久	233
食品添加物の検出に関する研究 (第1報) 抗酸化剤の沔紙クロマトグラフィについて	川田公平, 細貝祐太郎	239
法定食用タール色素のポーラログラフ的研究	北川純男, 豊田勤治	243
法定食用タール色素分析用計算図表 (第1報) 純度定量 (チタノメトリー) 用ノモグラフ	井上勲	247
法定食用タール色素分析用計算図表 (第2報) 純度定量 (チタノメトリー以外) 用及び無機塩定量用ノモグラフ	井上勲	253
法定食用タール色素分析用計算図表 (第3報) 作図及び誤差に関する考察	井上勲	259
中毒粉ミルク中砒素の検出について	川城巖	265
砒素混入による粉乳中毒事件と慢性砒素中毒における肝障害について	池田良雄	269
食品の異物検査法 (第2報)	宮島弘衛, 小川秀子, 野崎泰彦	279
浜名湖産貝類の毒成分に関する研究 (第2報)	板井孝信, 神谷庄造	283
イカの初期腐敗にみられる含窒素化合物の消長: アミン類の生成	野崎泰彦, 西村千昭	289
沔紙電気泳動法による腐敗アミンの検出	野崎泰彦, 西村千昭	295
<i>Penillium citrinum</i> THOM の分離系統と Citrinin 産生力に就いて	宇田川俊一, 橋本賢範, 平山重勝	299
病変米菌の代謝生産物に関する研究 (第1報) <i>Penicillium rugulosum</i> THOM の一類似菌の菌学的		

性質	平山重勝, 倉田浩, 坂部フミ, 稲垣尙起, 宇田川俊一, 池谷三郎	305
病変米菌の代謝生産物に関する研究(第2報) <i>Penicillium concavo-rugulosum</i> ABE の培養並に代謝生産物の分離, 精製	平山重勝, 倉田浩, 坂部フミ, 稲垣尙起, 宇田川俊一, 池谷三郎	313
牛乳由来ブドウ球菌に関する研究(第5報) 学童給食用脱脂粉乳飲用によるブドウ球菌性食中毒事例について, 特に原因菌の生物学的性状及び各種抗生物質に対する抵抗性並びにフェージ型について	鈴木昭	317
陽性石鹼と各種消毒薬及び化学療法剤との併用効果について(第1報)	栗栖弘光	331
<i>Candida</i> 症の化学療法に関する実験的研究(第1報) 特に抗生物質及び Vitamin 類の発症機転に及ぼす影響	宮沢文雄	341
<i>Candida</i> 症の化学療法に関する実験的研究(第2報) 特に <i>Candida</i> 属真菌に対する合成色素類及び各種化学療法剤の抗菌作用について	宮沢文雄	349
発熱療法剤(細菌性発熱物質)の創製並に臨床応用に関する研究(第3報) 特に吉田肉腫及び130系腹水肝癌に対する細菌性発熱物質及び各種抗腫瘍性物質の効果について	青山好作, 宮沢文雄, 栗栖弘光, 八田貞義, 新井秀男, 藤田洋一, 浦部幹雄, 酒井雄学, 青木孝好	361
発熱療法剤(細菌性発熱物質)の創製並に臨床応用に関する研究(第4報) 細菌性発熱物質をもつてする癌皮内反応について	青山好作, 栗栖弘光, 宮沢文雄, 八田貞義, 塚川光直, 藤田洋一, 浦部幹雄, 酒井雄学	375
吉田肉腫に対する各種抗腫瘍剤の併用療法に関する実験的研究(第1報)	青山好作, 宮沢文雄, 栗栖弘光, 石関忠一, 赤坂京子, 八田貞義, 藤田洋一, 浦部幹雄, 酒井雄学, 青木孝好	381
トリパンプルを注射した動物の腸炎菌感染	山地幸雄, 田中弘子, 八田貞義, 山内信	391
土壌水分がクラムヨモギ (<i>Artemisia kurramensis</i> QAZILBASH) の初期生育に及ぼす影響について	木下孝三	399
玉咲ツツラフジの試植栽培(第1報) 実生栽培について	石原活磨	407
資 料		
褐色アンプルの遮光度と鉄の溶出度について	野崎泰彦, 河村正一	421
昭和30年度日本産あへんのモルヒネ含量について	朝比奈晴世, 大野昌子, 水町彰吾, 志内賢彦, 中村良, 茂森淑	429
ビタミン標準品に関する資料. I. ニコチン酸, ニコチン酸アミド及びビタミンK ₃ の試製とその品質	広瀬朝次	431
化粧品規格検査法について(第6報) 化粧品用タール色素の確認試験法について	市川重春, 南城実, 林悦子	437
地下室内空気検査成績について	市川重春, 浦久保五郎, 山手昇, 磯部淳子	441
輸入洋酒中のメタノール含量について	川田公平, 細貝祐太郎	443
遠 報		
ウサギ脊筋及びペプシン溶液内における馬腸線の抗張力の減少について	山地幸雄, 志波剛, 石関忠一, 岩原繁雄, 宮坂清次	445
食品, 食器類, 食品従業員手指, 人の大便, 実験的伝染性下痢症患者大便, 食中毒患者吐物よりバラ大腸菌の検出について	山地幸雄, 田中弘子, 志波剛, 石関忠一, 八田貞義	446
抄 録		
業 務 報 告		
国家検定, 国家検査等の試験成績報告, 昭和30年当所における試験, 検査等の状況について		総務課 451

インシュリンの薬化学的研究 (第14報)*

鯨膵臓からインシュリン結晶の単離**

長沢 佳熊, 竹中 祐典, 岡崎 精一, 深沢 真司***

芦沢 広,*** 柴田 哲夫****

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XIV.

Isolation of Insulin Crystals from Whale Pancreas

Kakuma NAGASAWA, Yusuke TAKENAKA, Seiichi OKAZAKI,
Shinji FUKASAWA, Hiroshi ASHISAWA and Tetsuo SHIBATA

インシュリン亜鉛塩の結晶は, 1926年 Abel¹⁾, 1929年 Harington²⁾, 1931年 Scott³⁾等により牛膵臓から単離され, 1940年 Romans等⁴⁾によりその工業的製法が報告され, 欧米の各製造会社では, ほとんど凡てがこの結晶を工業的に製造している。豚膵臓からも結晶が得られるが, 結晶化がやや困難であると Scott³⁾ (1931), Lens, Evertzen (1952)^{5), 6)}が述べている。羊膵臓についても同様であるという (Scott, 1931)⁵⁾。硬骨魚類 (タラ) の Stannius 小体からは Jensen, Wintersteiner, Geiling⁶⁾によつて結晶が得られた。佐藤等⁷⁾のカツオの Stannius 小体からの製法を追試した結果, 方法がきわめてまわりくどくて収量悪く, インシュリンの結晶はほとんど得られなかつた。彼等の方法によれば結晶化してもわずかの部分のみであつたらうし, 得られた結晶の生理的力価の検定には全く科学的根拠なく, その他の恒数も明かでなく再現できる報告とは考えられない。

なおカツオ, マグロ類の Stannius 小体からのインシュリンの結晶化については, いずれ詳細に報告する予定である (一部は六角板晶又は集針晶に結晶化するが, 極微細結晶と思われる粒状物をともなう)。

次に鯨膵臓からのインシュリンの結晶化については著者等の調べた限りでは報告がない。鯨膵臓からのインシュリンの抽出については著者の1人長沢⁸⁾は既に1942年膵臓1gから2.0~2.5単位を, Jacobsen (1941)⁹⁾等は1単位弱を得た。

著者等は南水洋産シロナガスクジラ *Balaenoptera borealis*, Lesson の膵臓から工業生産的にきわめて収量よくインシュリンを結晶化することができたのでここに報告する。*****

柴田¹⁰⁾の方法によつて得た1mg 中約16単位を含む粗インシュリン粉末1gを氷酢酸2ccを含む水180ccに溶かし, アセトン120ccを加え, 10%アンモニア水2ccを含む水120ccを加えpHを6.0とし, 沈澱を除去し, 母液に酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) 200cc及び2.5w/v% 酢酸亜鉛液0.75ccを加え, 室温に24時間, 更に2~4°の冷室に24時間放置した後, 沈澱を遠心分離してとり, 氷酢酸5.25ccを含む水300ccに溶かし, 前記の酢酸亜鉛液3cc, 10%アンモニア水6ccを含む水300ccを加え, 更にpHを6.0に調節する。これを室温に24時間, 更に2~4°の冷室に24時間放置した後沈澱を集める。(沈澱の収量665mg)。これがインシュリンの結晶で, 写真のようにほとんどが明瞭な立方体を示す。6回の実験による収量を次に記す。回数を経過するにつれて操作が熟練したためか, 最後の2回は力価の収率は97%に達した (Table 1)。

* 第13報は本誌72, 11~19 (昭和29), 第15報は本誌, 74, 177 (昭和31)

** 昭和29年4月日本薬学会で講演 [薬学研究 26, 565~566 (昭和29) 抄録]

Paper was read by the author at the meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, April, 1954

*** 所員外 清水製薬株式会社

**** 所員外 大洋漁業株式会社横須賀工場

***** 鯨膵臓中のインシュリンは牛膵臓からの場合と同様に結晶し易い。柴田, 伊丹によれば, 特にマツコウ鯨 *Physeter catodon*, Linné 膵臓からのものは結晶し易いという (私信), 又阿氏はその後 (昭和31年2月) シロナガスクジラ及びナガスクジラ, *Balaenoptera physalus*, Linné) の膵臓を原料としてインシュリン結晶の量産化を行つている。

Table 1. Yield of Crystalline Insulin

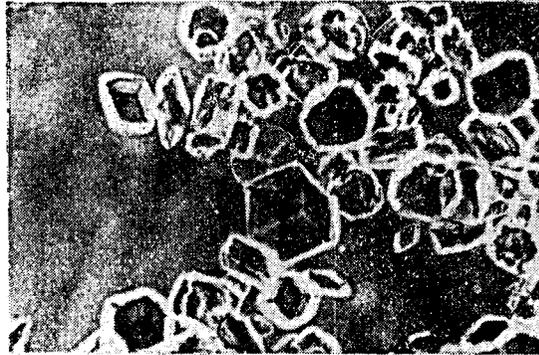
No. of experiments	Weight of crude insulin(mg)	Total units of crude insulin (units)	Yield of crystal insulin	
			in weight (mg)	in unit (%)
1	65	1040	22	46
2	50	800	25.5	70
3	478.5	7656	2.5	75
4	350	5600	142	56
5	1000	16000	700.5	97
6	1000	16000	665	97

この結晶について、米国薬局方¹¹⁾の方法で亜鉛含量を測定し、0.67%の値を得た。融点は216°で一部褐変、224°で全部褐変し、体積が著しく膨張し、231°で熔融分解し、黒色となる(融点は未補正)。

窒素含量は岩崎憲氏のアゾトメトリー法¹²⁾により測定した結果100単位につき0.67mg、生理的力価は日本薬局方インシュリン注射液の定量法に記述する方法¹³⁾で測定した結果1mg中に22.1単位を含む。

終りに昭和24年度文部省科学試験研究費の補助を得、その際御援助を得た東大菅沢重彦教授に感謝する。

鯨膵臓からのインシュリン結晶



Insulin Crystals from Whale Pancreas

文 献

- 1) Abel, J. J., Geiling, E. M. K. : J. Pharm. Exp. Therap. 25, 423 (1925)
- 2) Harington, C. R., Scott, D. A. : Bioch. J. 23, 393 (1929)
- 3) Scott, D. A. : J. Biol. Chem. 92, 281 (1931)
- 4) Romans, R. G., Scott, D. A., Fisher, A. M. : Ind. Eng. Chem. 32, 908-910 (1940)
- 5) Lens, J., Evertzen, A. : Biochemica et Biophysica Acta 3, 332 (1952)
- 6) Jensen, H., Wintersteiner, O., Geiling, E. M. K. : J. Pharm. Exp. Therap. 36, 116 (1929)
- 7) 佐藤武雄, 片野浜子 : 化学の領域 2, 132-133 (昭和23) ; 伊藤四十二, 佐藤武雄 : 化学療法とホルモン療法, 1, 24 (昭和23)
- 8) 長沢佳熊, 近藤政次郎 : 薬学雑誌, 62, 287 (昭和17)
- 9) Jacobsen, Alf. P. : HVALRADETS SKRIFTER, Scientific Results of Marine Biological Research, Oslo, 54 (1941)
- 10) 柴田哲夫 : 福岡医学会雑誌, 43, 41 (昭和27) ; 日本特許第200763号 (昭和28年8月6日)
- 11) U. S. Pharmacopeia XIV, 1950 (799)
- 12) 岩崎 憲 : 生化学, 23, 4 (昭和26)
- 13) 第六改正 日本薬局方 (厚生省版), 60 (昭和26).

Summary

In this report, the authors isolated the zinc insulin crystals from the pancreas of whales (*Balaenoptera borealis*, Lesson and *Balaenoptera physalus*, Linné) caught in the South Pole Sea, with good yield. The method was the following.

The crude insulin powder having 16 units per milligram, was obtained by Shibata's method.¹⁰⁾ This powder was dissolved in 180 cc of water containing 2 cc of glacial acetic acid, then added with 120 cc of acetone and 120 cc of water containing 2 cc of ammonia water to make pH 6.0 of the solution exactly. The precipitate caused was filtered off, and the filtrate was added with 200 cc of ammonia buffer solution to make pH 6.0 of the solution, to which 0.75 cc of zinc acetate solution (2.5w/v%) was added. After standing for 24 hours at the room temperature, the solution was kept in the cold place (2-4°) for 24 hours more.

The precipitate caused was taken by the centrifuge and dissolved in 200 cc of water containing of 5.25 cc of glacial acetic acid. To the solution 300 cc of water containing 3 cc of above zinc acetate solution and 6 cc of 10% ammonia water was added, then the solution was adjusted pH to 6.0. After standing 24 hours in the room temperature and another 24 hours in the cold place (2~4°), the precipitate was taken by centrifuge; yield was 0.665 grams, which was the zinc insulin crystals. As it is shown in the photograph (see p. 172) almost all the precipitate was crystalline, and had distinct crystal forms.

The yield of the crystals in the six experiments shown in the Table 1 (see p. 172).

These crystals have the melting points of 216° (partly color brown), and 224° (swell and turn into entirely brown), and finally decompose at 231°, turning into brownish black. The zinc content in the crystals is 0.67%¹¹⁾, the nitrogen (N), 0.67 milligram per 100 units¹²⁾, 1 milligram of the crystals has 22.1 units.

Received February 29, 1956

インシュリンの薬化学的研究 (第 15 報)*

濾紙クロマトグラフィを用いるアイソフェンインシュリン中のインシュリンの定量法**

長沢 佳 熊, 西崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XV.

Determination of Insulin in Isophane Insulin Injection by Paper Chromatography

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

まえがき アイソフェン (NPH) インシュリン注射液の力価の検定は従来家兎の血糖量降下法¹⁾ 又はマウスのケイレン法²⁾ により行われている。Robinson 等³⁾ はプロタミン亜鉛インシュリンについて濾紙クロマトグラフィにより得たインシュリンのバンドを溶出後光电比色計により定量し、同時に保留分析法によりプロタミン量をも定量した。朝岡, 東⁴⁾ は Robinson 法を粗インシュリンに応用し、ある純度の範囲ではインシュリン純度検定が可能であることを報告し、柴田等⁵⁾ は膵臓からインシュリンの工場生産に当り、朝岡, 東の方法により粗製品のインシュリン含量の測定に適用し好結果を収めている。

著者等はインシュリン溶液を Robinson 法によるクロマトグラフィで展開したとき得たスポットの面積を我々の研究室の越村, 岡崎⁶⁾ の方法で測定し、インシュリン量 7.7~26.0 r の範囲では用量の対数値と面積とが直線関係にあることを証明し、その範囲の量において、標準液と検液とを同一濾紙上にラテン方格の順列で展開し、2-2量検定法、又は3-3量検定法を行つた結果マウスケイレン法と比較してその力価はよく似た値を得、その検定の信頼限界もより小さいことを認めたのでここに報告する。

実 験 の 部

1. 標準液及び検液の調製法 インシュリン国際標準品 (24.5 u/mg) を精密に秤り、N/100-塩酸で 200 u/cc とした液を標準液 (S) とし、アイソフェンインシュリン注射液の場合上澄液中にはほとんどインシュリンを含まないから***約 20 分間 3000 r. p. m. で遠心分離し、上澄液をなるべく完全に分離した後沈澱を N/100-塩酸で 200 u/cc と予想される濃度に稀釈した液を検液 (T) とした。

2. この実験に使用した毛細管 ガラス管を一律の太さに延ばし、各部分の断面積に有意差のないものを使用した。

著者等の用いた毛細管は吸い上げた液の長さ、その重量との関係からそれぞれの換算値を Table 1 に示す。

Table 1. Calculated Value of Capillary Used

Length of liquia in the capillary (cm)	1.50	2.00	2.25	3.00	3.38	4.00	5.06
Volume (cc×10 ⁻⁴)	8	11	12	16	18	22	27
Unit calculated from 200 u/cc (u)	0.16	0.22	0.24	0.32	0.36	0.44	0.54
Weight calculated from 24.5 u/mg (r)	7.7	10.3	11.6	15.4	17.3	20.6	26.0

* 第 14 報は本誌 74 号 173 頁, 第 16 報は本誌 73 号 1~6 頁,

** 昭和 30 年 5 月 14 日 日本薬学会東京例会で講演

*** 国際薬局方では上澄液中のインシュリンは 4% 以下と規定し、当所の検定では従来すべて 1% 以下であったので誤差の範囲とした。また標準液と検液とは同一の溶媒に溶かして濾紙につけることが望ましい。

3. 展開操作法 角形濾紙 (Whatman No. 1 又は東洋濾紙 No. 51) の一辺から 6 cm のところに引いた直線上に 2 cm 間隔で (S) と (T) とをラテン方格の順序に、2-2 検定の際は 16 個処 (4×4)、3-3 検定のときは 24 個処 (4×6) へ前記と同一の毛細管を用いてつけて原点とする。

これを n-ブタノール：酢酸：水 (3:1:4) の展開溶媒で上昇法により約 15 時間室温 (約 20°) で展開した。

展開した濾紙を風乾後 0.02% の ブロムクレゾールグリーン (B. C. G.) 水溶液中に浸し、次に 2% 酢酸水溶液中に移し、スポット以外の部分が完全に脱色するまで酢酸溶液を数回換えて洗う。再び風乾後 アンモニア蒸気に曝すとスポットの部分のみ青色を呈し、面積を測定する場合その限界が明瞭になる。Rf は約 0.3 であった。

呈色したスポットはおよそ濃淡二段の色調を有するが面積法により力価を検定するには内側の濃部の面積を測らねばならない。又東洋濾紙 No. 51 (Whatman No. 1 に比し厚手である) はスポットの面積がやや小さい。

呈色したスポットを順次直接鉛筆で囲むか又はトレイシングペーパーに写しとつて、各スポットの周囲線上の 3 点を基準として 3 回ずつ プラニメータで面積を測定し、その算術平均を 1 個のスポットの面積とした。ただし面積の数値はプラニメータの目盛で示したから表中 Area of Spots の 1.0 は 0.4 cm² に相当する。

4. 測定面積の統計学的処理⁷⁾ 著者等は濾紙の不均一性、及び展開した時溶媒の先端がやや傾斜する場合などが面積の測定値に及ぼす影響を考慮してラテン方格の順列を以てスポットし、例へば 2-2 検定の場合、一端から Shi, Sli, Thi, Tli, を 1 つの i 番目の群として統計学的に処理した。(i=1, 2, 3, 4, の整数のいずれかに属す)

a) 直線性の検討 著者等は予備実験として約 1~5 cm (毛細管中の液層の長さの用量範囲では、ほぼ直線的関係にあることを推定して 1.5, 2.25, 3.38, 5.06 cm (用量比 1.5:1) の用量について直線性の検討をした (Table 2~Table 4, Fig. 1 参照)。

Table 2. Area of Spots of Linear Test

dose (cm)	1.50	2.25	3.38	5.06	Total
Area of Spots	0.67	1.23	2.19	3.14	7.23
	0.84	1.10	2.12	2.43	6.49
	0.68	1.47	2.11	2.87	7.13
	0.77	1.47	1.79	3.33	7.36
Total	2.96	5.27	8.21	11.77	28.21
Mean	0.74	1.3175	2.0525	2.9425	

これから分散分析表を作成する (Table 3)。

Table 3. Analysis of Variance from the Data of Table 2

Adjustment for Means.....49.7378			
Nature of Variation	d, f	Sum of squares	Mean square
Regression	1	10.7825	0.0488
Deviation from Regression	2	0.0976	
Between doses	3	10.8801	0.0624
Between groups	3	0.1121	
Error	9	0.5615	
Total	15	11.5537	

Table 3 から $F = \frac{0.0488}{0.0624} = 0.78 < F_{\alpha}^2 \begin{matrix} 4.26 (5\%) \\ 8.02 (1\%) \end{matrix}$

故に少くとも 1.5 ~ 5.06 cm の用量範囲で得た面積値は直線的関係を疑うわけにはいかない。したがってこれから回帰直線方程式を求めた (Table 4)。

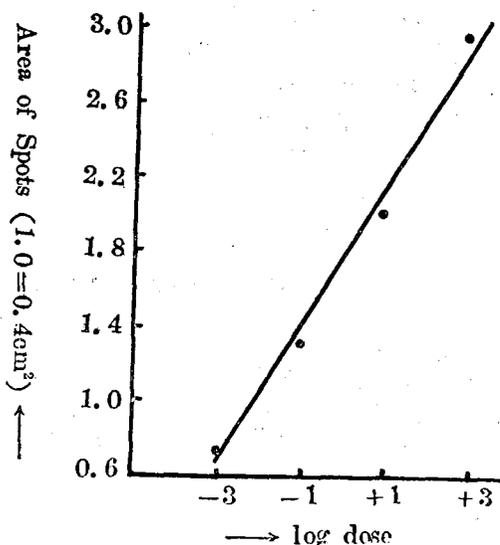


Fig. 1. Linear Test

従つて著者等は 2-2 検定の場合には低用量 (l) 2 cm, 高用量 (h) 4 cm を沓紙につけ (用量比 2: 1), 3-3 検定の場合には低用量 (l) 1.5 cm, 中用量 (m) 2.25 cm, 高用量 (h) 3.38 cm (用量比 1.5: 1) を沓紙につけた。

b) 2-2 検定の計算例 Table 9, No. 5' の検体を例にとり力価, 及びその信頼限界の算出を示す (Fig. 2 Table 5 Table 6 参照)。

Table 5. Area of Spots of 2 and 2 Amount Test

Dose	S _l	S _h	T _l	T _h	Total
Area	1.00	1.79	0.88	1.62	5.29
of	1.02	1.72	0.89	1.37	5.00
Spots	1.10	1.56	0.94	1.80	5.40
	1.02	1.49	0.81	1.53	4.85
Total	4.14	6.56	3.52	6.32	20.54
Mean	1.035	1.64	0.88	1.58	

これから分散分析表を作成する (Table 6),

Table 6. Analysis of Variance from the Data of Table 5

Adjustment for Mean.....26.3682			
Nature of variation	d. f.	Sum of Squares	Mean Square
Preparations	1	0.0463	
Regression	1	1.7030	
Parallelism	1	0.0090	0.0090
Between doses	3	1.7583	
Between groups	3	0.0485	
Error	9	0.1204	0.0134
Total	15	1.9272	

Table 4. Calculation of Regression Line

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy
-3	0.74	4	-12	2.96	36	-8.88
-1	1.3175	4	-4	5.27	4	-5.27
+1	2.0525	4	+4	8.21	4	+8.21
+3	2.9425	4	+12	11.77	36	+35.31
0	7.0525	16	0	28.21	80	29.37
\bar{x}	= 0				0	0
\bar{y}	= 1.763125				80	29.37
					↑ SS _{xx}	↑ SS _{xy}

$$b = SS_{xy}/SS_{xx} = \frac{29.37}{80} = 0.367125$$

The Regression equation :

$$Y = 0.367125X + 1.763125$$

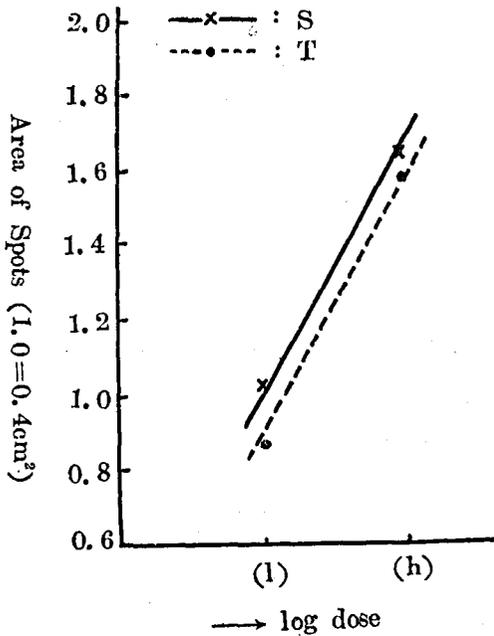


Fig. 2. 2 and 2 Amount Test.

Table 6 から $F = \frac{0.0090}{0.0134} = 0.67 < F_9^1 \begin{matrix} 5.12 (5\%) \\ 10.56 (1\%) \end{matrix}$

両者に平行性の有意な差は認められない。従つて力価及びその信頼限界を算出する。

$\bar{Y}_S = 1.33375 \quad \bar{Y}_T = 1.23$

$SS_{xx} = 16 \quad SS_{xy} = 5.22$

$b = 5.22/16 = 0.32625$

標準品及び検体の回帰方程式は

$Y_S = 0.32625X + 1.33375$

$Y_T = 0.32625X + 1.23$

$M = -\frac{1.33375 - 1.23}{0.32625} = -0.3295$

$M' = -0.3295 \times 0.1505 = -0.0496 = \bar{1}.9504$

Antilog $M' = 0.8921$

$g = \frac{2.26^2 \times 0.0134}{0.32625^2 \times 16} = 0.040$

$\frac{-0.3295 \pm 2.26 \times 0.11576}{0.96} \pm \frac{2.26 \times 0.11576}{0.96 \times 0.32625} \sqrt{0.96 \times \frac{1}{4} + \frac{(-0.3295)^2}{16}}$

$= -0.34323 \pm 0.41507$

$= -0.7583 \sim +0.07184$

両者を0.1505倍する

$-0.1141 \sim 0.0108$

Antilog をとると 0.7690~1.025

従つて力価に対する信頼限界(%)は

$86.20 \sim 114.90\%$

c) 3-3検定の計算例 Table9, No. 5の検体を例にとり力価, 及びその信頼限界の算出を示す (Fig. 3. Table7, Table 8参照).

Table 7. Area of Spots of 3 and 3 Amount Test.

Dose	S ₁	S _m	S _h	T ₁	T _m	T _h	Total
Area of Spots	0.71	1.17	1.74	0.61	1.33	1.63	7.19
	0.87	1.32	1.60	0.66	1.06	1.70	7.21
	0.80	1.06	1.89	0.67	0.91	1.56	6.89
	0.67	1.23	1.82	0.60	1.12	1.50	6.94
Total	3.05	4.78	7.05	2.54	4.42	6.39	28.23
Mean	0.7625	1.195	1.7625	0.635	1.105	1.5975	

これから分散分析表を作成する (Table 8).

Table 8. Analysis of Variance from the Data of Table 7

Adjustment for mean.....33, 2055			
Nature of Variation	d. f.	Sum of squares	Mean square
Preparations	1	0.0975	
Regression	1	3.8514	
Parallelism	1	0.0014	0.0014
Curvature	1	0.0083	0.0083
Deviation from Curvature	1	0.0042	0.0042
Between doses	5	3.9629	
Between groups	3	0.0138	
Error	15	0.2097	0.014
Total	23	4.1864	

Table 8 から $F = 0.10 < F_{5, 15}^{1, 4.54} (5\%)$
 $5, 8.68 (1\%)$

$F = 0.59 < \quad \quad \quad "$

$F = 0.30 < \quad \quad \quad "$

両者の平行性, 彎曲, 彎曲の差に有意の差は認められない。従つて力価, 及びその信頼限界を算出する。

$$\bar{Y}_S = 1.240 \quad \bar{Y}_T = 1.1125$$

$$SS_{xx} = 16 \quad SS_{xy} = 7.85$$

$$b = 7.85/16 = 0.490625$$

標準品及び検体の回帰方程式は

$$Y_S = 0.490625X + 1.24$$

$$Y_T = 0.490625X + 1.1125$$

$$M = -\frac{1.240 - 1.1125}{0.490625} = -0.2599$$

$$M' = -0.2599 \times 0.1761 = -0.0458 = \bar{1}.9542$$

$$\text{Antilog } M' = 0.8999$$

$$g = \frac{0.014 \times 2.13^2}{0.491^2 \times 16} = 0.016$$

$$\frac{-0.2599 \pm 2.13 \times 0.119}{0.984} \pm \frac{0.984 \times 0.491}{0.984 \times \frac{1}{6} + \frac{(-0.2599)^2}{16}}$$

$$= -0.2641 \pm 0.2151$$

$$= -0.0490 \sim -0.4792$$

両者を 0.1761 倍すると

$$-0.0086 \sim -0.0844$$

$$\text{Antilog をとると } 0.8233 \sim 0.9804$$

従つて力価に対する信頼限界 (%) は

$$91.49 \sim 108.95\%$$

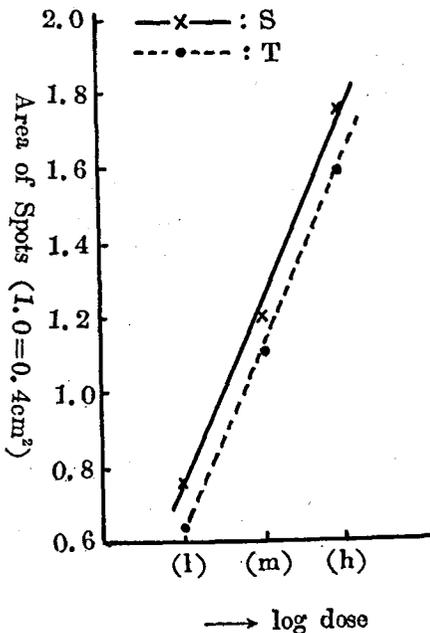


Fig. 3. 3 and 3 Amount Test.

実験結果

以上の如くして得られた実験結果をマウス・ケイレン法と比較対照して表示する (Table 9)。

Table 9. Comparison of Paper Chromatography and Mouse Convulsion Method

Sample No.	Values by Paper Chromatography		Experiment Design	Values by Mouse Convulsion Method, ※	
	Factors	f. l. e (%) (P = 0.95)		Factors	f. l. e (%) (P = 0.95)
1	0.9993	87 ~ 115	2-2	0.9450	70 ~ 139
1'	0.8740	88 ~ 112	2-2	0.8494*	—
2	0.8878	97 ~ 102	2-2	1.091	56 ~ 212
3	1.028	91 ~ 110	2-2	1.197	76 ~ 141
4	0.9904	90 ~ 111	3-3	1.000**	—
5	0.8999	91 ~ 109	3-3	0.9585	68 ~ 144
5'	0.8921	86 ~ 115	2-2	0.7704	59 ~ 143
6	1.032	83 ~ 120	2-2	0.9206	71 ~ 136
7	0.9217	91 ~ 110	2-2	1.216	77 ~ 139
8	1.024	92 ~ 109	2-2	1.006	71 ~ 141
9	0.9200	94 ~ 107	2-2	0.8758	71 ~ 133
10	0.9175	94 ~ 107	2-2	0.8906	53 ~ 152

※ Showed the value observed for 90 min. with 25~30 mouse.

※※ Showed the value observed for 60 min.

* Sample diluted 85% of No. 1.Calculated Value = $0.9993 \times 0.85 = 0.8494$

** Comparison of the same Standards.....Calculated Value = 1.0000

考察とむすび

検体 No. 1' は検体 No. 1 を 85% に希釈した検液で、実験値の誤差は実際値に対し約 2.5% であった。

検体 No. 4 は同一の標準液を用いて 3-3 検定した結果で、実験値の誤差は実際値に対し約 1% であった。

検体 No. 5 及び検体 No. 5' は同一検体を 2-2 検定、3-3 検定した結果であるが、その力価の誤差は 1% 以内であり、その信頼限界は 3-3 検定の方が 2-2 検定に比して小さい値を示した。

又信頼限界はマウスケイレン法に比してはるかに小さく、力価の差の著しいものでもマウスケイレン法の英局規定の信頼限界 80 ~ 125% の範囲にすべて入った。

本法の利点として、1) 操作が簡単でしかも経済的である。2) 精度がよく検液中のインシュリンの含量を定量するときかなりの正確性がある。

しかし濾紙、溶媒、温度等の諸条件により各回の実験による Rf 値及び面積の測定値は常に一定ではないから必ず標準液と対照する必要がある。

又標準品の Rf 値と同じ部位のスポットを検体中のインシュリンのスポットと断定したが、検体中のインシュリンスポットと同一の Rf 値を示す夾雑蛋白の混入については今後検討の余地があると思われる。

文 献

- 1) 第六改正日本薬局方 (厚生省版) p. 60 (昭和26)
- 2) 第八英国薬局方, (1953) p. 78, p. 817
国際薬局方, ; 2, (1955) p. 274
長沢佳熊 ホルモン薬品学 立川図書版 p. 242 (昭和29)
- 3) Robinson, F. A. et. al. : Biochem. J., 51, 298 (1952)
- 4) 朝岡 毅, 東 克巳: 薬学雑誌, 74, 788 (昭和29)
- 5) 柴田哲夫: 私信
- 6) Koshimura, E. and Okazaki, S. : Pharm. Bull., 2, 65 (1954)

- 7) Burn, J.H., Finney, D.J., and Goodwin, L.G. : Biological Standardization; Oxford Univ. Press, 1950, p.75, p.86.

Summary

When Isophane Insulin Injection was chromatographed on filter paper, a linear relationship was found between the areas of spots and logarithms of doses within a certain range (7.7-26.0 μ) of insulin. In that range, factors and fiducial limits of errors were calculated by a statistical method.

This method gave values close to those obtained with the mouse convulsion method for insulin and less fiducial limits of errors.

Received February 29, 1956

インシュリンの薬化学的研究 (第18報)*

魚類インシュリンの精製及び魚類, 鯨インシュリンの物理化学的性質について (その1)

長沢 佳熊, 西崎 笹夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XVIII.

On the Purification of Fish Insulin, and Physico-chemical Properties
of Fish and Whale Insulins. (Part 1.)

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

まえがき Abel (1926)¹⁾ は牛膵臓から, Jensen, Wintersteiner (1929)²⁾ はタラ Stannius 小体から, 長沢等³⁾ は第14報においてクジラ膵臓からインシュリン結晶を得た。我国では長沢等³⁾の研究によるマグロ, カツオなど回遊魚の Stannius 小体又は鯨膵臓からのインシュリンが臨床用目的のため製造されている。この魚類インシュリンの結晶化は現在収得量が悪く, 均質で典型的な結晶として大量に製することはむずかしい。著者等はそのインシュリンの精製, 結晶化の改良と魚類及び鯨からのインシュリンの性質を検討し先ず次のような知見を得た。

著者等³⁾ は前報において Robinson⁶⁾ 法を応用しインシュリンを定量したが, 牛インシュリンは最も Rf 値が大きく, 鯨インシュリンはやや小さく, 魚類インシュリンでは他と明かに区別できるほど小さい (実験1)。

次に魚類インシュリンの60%アセトン溶液をアルカリ性とし, pHを少しずつ酸性に移行させるとき生じた沈澱を区分して集め, マウスケイレン法⁷⁾ でその単位を検定した結果, pH=6.5~7.0附近の区分にインシュリンが集まる (実験2)。

また牛結晶インシュリン, 鯨結晶インシュリン, カツオインシュリン及びマグロインシュリンを塩酸で加水分解し, 濾紙クロマトグラフィにより構成アミノ酸の種類及び各アミノ酸のスポットの大きさと濃さを比較した結果, 鯨結晶インシュリン中にはメチオニンと推定される附近に1つのスポットが存し, 又カツオインシュリン中にはチロジンが比較的少ない (実験3)。

実験の部

実験1. 牛結晶インシュリン, 鯨結晶インシュリン及び魚類インシュリンの濾紙クロマトグラフィによるRf値の比較。

a) 試料: 牛結晶インシュリン (23.6 u/mg), 鯨結晶インシュリン (22 u/mg) 及び魚類インシュリン (20.8 u/mg, Table 2 pH 7.2~6.9 区分) を N/100-塩酸に溶かし約 200 u/cc とした。

b) 展開操作:

Whatman No. 1 濾紙の一端から 6 cm のところに引いた直線上に順次上記試料を 3 個ずつつけ, n-ブタノール: 酢酸: 水 (3:1:4) で上昇法により室温で約 15 時間展開後, ブロムクレゾールグリーン水溶液で呈色させた。それらの Rf 値を Table 1. に示す。

Table 1. Comparison of Rf Values of Insulins.

	Insulin Crystals from Ox	Insulin Crystals from Whale	Insulin from Fish
Rf values	0.30	0.23	0.15
	0.28	0.24	0.15
	0.24	0.22	0.16
Mean	0.273	0.230	0.153

* 第17報は本誌 73, 7~9 (昭和30)。

実験 2. 魚類インシュリンの pH による分割沈澱

a) 魚類インシュリン (12.5 u/mg) 1.35 g に 60% アセトンを加え塩酸酸性 (pH=2.05) にして完全に澄明とした。これに N-水酸化ナトリウム液を注意しながら徐々に加え絶えずかきまぜる。pH=4 附近より白沈を生じ、pH=6~7 で最大の濁度を示し pH=11.0 で完全に澄明となつた。

直ちに N-塩酸をかきまぜながら少量ずつ加えて pH 8.1, 7.2, 6.9, 6.3 で沈澱する区分を遠心分離して各区分の力価をマウスケイレン法により検定した (Table 2. 及び Fig. 1)。pH 6.3 で遠心分離後 pH 5.5 としたが沈澱を生じなかつたので多量のアセトンを加えて沈澱させた。

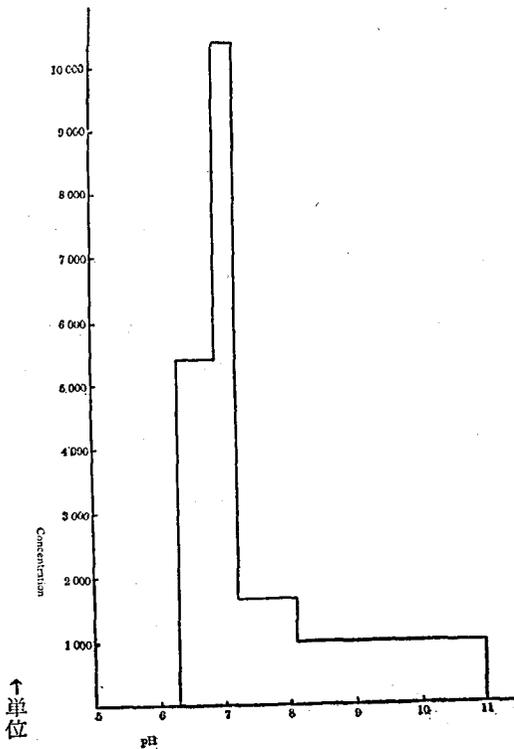
Table 2. Fractionation of Insulin through pH-precipitation
Total Units of Starting Fish Insulin : 12.4 u/(mg) × 1350(mg) = 16750 u

pH	ΔpH*	mg	u/mg and f.l.e.(%)**	Total Units	Units (%)	Concentration (units)***
11.0	2.9 0.9 0.3 0.6	732	3.7 (78~128)	2710	16	935
8.1		60	17.4 (71~141)	1450	9	1611
7.2		150	20.8 (73~207)	3120	19	10400
6.9		160	20.0 (74~184)	3200	19	5367
6.3 Recovery from mother liquor	—	173	—	—	—	—
Total	—	1274	—	10480	63	—
Unrecovery	—	76	—	6270	37	—

* Difference between two adjacent pH's.

** "Fiducial limit of error," The method used for estimating insulin in the samples was

Fig. 1



described in our previous report.⁷⁾ In these experiments, smaller number of mice, for example, about twenty, was used, so that the f.l.e. in this column was found rather large.

*** Total Units/ΔpH

b) 魚類インシュリン (7.8 u/mg) 200 mg に 60% アセトン 30 cc を加え、a) と同様の操作をした。

この試料は pH=10.8 の溶液中で澄明となりかきまぜながら塩酸を少量ずつ加えて pH=8.8, 6.9, 6.4, 5.5 に調節し、それぞれの区分で沈澱する物質を遠心分離して取つた。

更に pH 8.8 の沈澱をそのままアルカリ性 (pH=10.8) として完全に澄明としたのち少量の塩酸を加えて pH 7.1 とし遠心分離したとき沈澱は 35 mg, 更に上澄液を pH 5.5 として沈澱物 23 mg を回収した。

各区分の検定結果を Table 3. 及び Fig. 2 に示す。

Table 3. Fractionation of Insulin through pH-Precipitation
Total Units of Starting Fish Insulin : 7.8 u/(mg)×200(mg)=1560 u

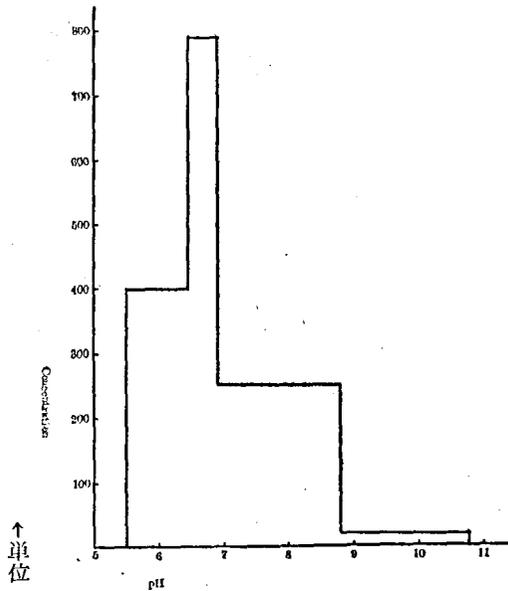
pH	ΔpH*	mg	u/mg and f.l.e * (%)	Total Units	Units (%)	Concentration (units)*
8.8 } 6.9 } 6.4 } 5.5 }	1.9 0.5 0.9	34 26 21	14.1 (95~114) 15.2 (81~127) 17.0 (***)	480 395 357	31 25 23	252 790 400
10.8 } ** } 8.8 } { 10.8 } { ** } { 7.1 } { ** } { 5.5 }	2.0 { 3.7 1.6	35 23	1 (***) —	35 —	2 —	18 —
Total	—	139	—	—	81	—
Unrecovery	—	61	—	—	19	—

* See Table 1.

** The pH 10.8~8.8 fraction was refractionated into two fractions, pH 10.8~7.1 and pH 7.1~5.5.

*** The fiducial limit of error could not be calculated because of $g > 1$.

Fig. 2



実験 3. 牛結晶インシュリン, 鯨結晶インシュリン, カツオインシュリン, マグロインシュリンの塩酸加水分解物の濾紙クロマトグラフィ⁸⁾

a) 試料の調製

各種インシュリンを 6N-塩酸に溶かし, アンプルに移して窒素ガスを封入し閉管後恒温箱中で加熱した. 各の加水分解の条件を Table 4 に示す.

Table 4. Hydrolysis Condition

	units/mg	Weight of Sample(mg)	Volume of 6N-HCl (cc)	Temp. (°C)	Time of Hydrolysis(hr)
Insulin Crystals from Ox	23.6	18	0.9	110	8
Insulin Crystals from Whale	22	6	0.3	110	8
Insulin from Bonito Fish	15.3	35	1.0	120	15
Insulin from Tunny Fish	16	30	1.0	120	18

b) 展開操作

各の加水分解物を水溶上で蒸発乾固し、数回水を加えては蒸発乾固をくり返し塩酸を除去。

東洋濾紙 No. 51 の角形濾紙に試料をつけ上昇法により最初 80% フェノールで展開し、風乾後次に n-ブタノール: 水: 酢酸 (4: 5: 1) で展開した。

展開濾紙を風乾後 0.2% ニンヒドリン-ブタノール溶液を噴霧し、100° に加熱して呈色させた。

別に 19 種類のアミノ酸を混合して展開し、各インシュリンの加水分解物を少くとも 3 回展開して得られたスポットの種類をアミノ酸単体のスポットを比較考察して各インシュリン中の構造アミノ酸の種類を推定した。

各インシュリン中の構成アミノ酸の種類及びその強さ (大きさ及び呈色濃度) を観察した結果を Table 5 に示す。

Table 5. Amino Acid Composition of Various Insulins

Amino acid	Color of Spot	Insulin Crystals from Ox	Insulin Crystals from Whale	Insulin from Bonito	Insulin from Tuna
Ala	RP	##	+	##	+
Gly	RP	+	+	+	+
Val	RP	##	##	##	##
Leu	RP	##	##	##	##
Ileu	RP	##	##	##	##
Pro	Y	+	+	+	##
Phe	P	+	##	##	##
Tyr	Br	##	##	±	##
Try	RP	-	-	-	-
Ser	RP	+	+	+	+
Thr	RP	+	+	+	+
Cys	RP	+	+	+	##
Met	RP	-	±	-	-
Arg	RP	+	+	+	+
His	BG	+	+	+	+
Lys	RP	+	+	+	+
Asp	RP	+	+	+	+
Glu	RP	##	##	##	+

RP : redish purple,

Y : yellow,

Br : brown,

BG : bluish gray

考 察

1. 牛、鯨及び魚類インシュリンについて第15報の方法により濾紙クロマトグラフィを行いそれらの Rf 値を比較するとき、牛インシュリンは最も高い Rf 値を示し、鯨インシュリンはそれよりやや低い Rf 値を示すが魚類インシュリンは明らかに両者より低い Rf 値を示した。

2. インシュリンを 60% アセトンのアルカリ性溶液とした後 pH を酸性に移行して種々の pH で沈澱する区分

をとつたとき Table 2, Fig. 1 の結果によると pH 7.2~6.9 区分に効力部分が最も多く集り, 又 1mg 当りの単位数は pH 11.0~8.1 区分は極めて低く, pH 8.1~7.2 区分はかなり高く, pH 7.2~6.3 区分は最も高いが pH 7.2~6.9 区分と pH 6.9~6.3 区分は同一程度の単位数と見なしてよい. 又未回収の力価 (37%) はほとんど回収物 Recovery from mother liquor 及びそのときのアセトン上澄液中に存すると思われる, 又 Table 3, Fig. 2 の結果によると pH 6.9~6.4 区分に効力部分が最も多く集り, 又 1mg 当りの単位数は pH 8.8~6.4 区分にかなり高く pH 6.4~5.5 区分で最高を示した. 又 pH 10.8~8.8 区分を再区分して 1mg = 1u で極めて単位が低いことは, この沈澱操作をくり返すことによりかなりアルカリ性夾雑蛋白を除去できると思われる.

3) 牛, 鯨インシュリンの結晶とカツオ, マグロ 無晶インシュリンについてそれらの加水分解物について浮紙クロマトグラフィを行つて比較実験をして, その中に含まれるアミノ酸の種類を想定した結果, 鯨インシュリン結晶中にメチオニンと思われる附近にスポットを発見し, * カツオインシュリン中にはチロジンのスポットが比較的うすく出た.

文 献

- 1) Abel, J. J., Geiling, E. M. K. : J. Pharm. Exp. Therap., 25, 423 (1925)
- 2) Jensen, H. Wintersteiner, O. and Geiling, E. M. K. : J. Pharm. Exp. Therap. 36, 116 (1929)
- 3) 長沢佳熊外 : インシュリンの薬化学的研究 第14報 : 本誌, 74, 171 (昭31)
- 4) 長沢佳熊, 近藤政次郎 : 薬誌, 62, 287 (昭和17)
- 5) 長沢佳熊, 西崎笹夫 : 本誌, 74, 175 (昭31)
- 6) Robinson, F. A. et al. : Biochem. J., 51, 298 (1952)
- 7) 長沢佳熊外 : 本誌, 72, 11 (昭和29)
- 8) Lederer, E. and Lederer, M. : Chromatography, Elsevier Publ. Co. 1954, p.74, p.197

Summary

1. Developing ox insulin, whale insulin and fish insulin by *n*-butanol-acetic acid-water through the paper chromatography, the R_f value of ox insulin was a little larger than that of whale insulin, while that of fish insulin, distinctly the smallest.

2. From the acetone-water solution of the crude fish insulin, several fractions were obtained through precipitating in various pH and biologically assayed by the mouse convulsion method. As a result, pH 6.5~7.2 precipitating fraction had the most activity, showing in Fig. 1 and Fig. 2.

3. The amino acid composition of insulin from whale, * bonito fish and tunny fish was preliminarily reported; the result was shown in Table 5, from which, methionine might be present in whale insulin crystals by paper chromatography and the existence of tyrosine in bonito fish insulin was doubtful.

Received February 29, 1956

* F. Sanger 博士から長沢宛での私信 (1956年6月5日附) によれば, 同博士の希望で著者等が送付した鯨インシュリン結晶は豚のものとそのアミノ酸組成と配列が同じ (グリシル鎖の 8~10 位置が Thr. Ser. Ileu) らしいという.

* According to Dr. F. Sanger's private communication (dated June 5th, 1956) in which he wrote on his study on whale insulin crystals sent from our laboratory, it appeared that the whale insulin had the same structure as the pig, namely three amino acids in position 8~10 in the glycy chain were Thr. Ser. Ileu.