

No. 72

September 1954

BULLETIN
OF THE NATIONAL
HYGIENIC LABORATORY

Yôga, Setagayaku, Tokyo, Japan.

衛生試験所報告

第七十二号

昭和二十九年九月

国立衛生試験所

東京都世田谷区玉川用賀町

衛 試

Bull. Hyg. Lab.

目 次

報 文

エビレナミンの検定 (第2報) 国立衛生試験所エビレナミン標準品の力価検定について……………	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢 淳…………… 1
インシュリンの薬化学的研究 (第12報) インシュリンの新資源としてのアブラカレイの Stannius 小体の価値について……………	長沢佳熊, 中山豪一, 池田伝市, 佐藤 浩, 芹沢 淳…………… 7
インシュリンの薬化学的研究 (第13報) インシュリンのマウスのケイレン法による検定……………	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢 淳…………… 11
ジギタリスの検定 (第1報) 標準粉末 (日局標準品) の力価検定について……………	長沢佳熊, 中山豪一, 越村栄之助, 芹沢 淳, 佐藤 浩, 伊藤 顕, 岡崎正彦…………… 21
卵胞ホルモンの研究 (第5報) 妊馬尿からのエストロンの簡易製造法……………	長沢佳熊, 越村栄之助…………… 37
ペーパクロマトグラフィによるエストロンの定量法 (その1) ……………	越村栄之助, 岡崎精一…………… 41
卵胞ホルモンの研究 (第7報) 幼若白ネズミの子宮重量増加法による卵胞ホルモン及び発情物質の検定 (その1) ……………	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一, 黒馬敏子…………… 45
アヘン産地鑑別法について (第2報) モルヒネ定量値の比較……………	朝比奈晴世…………… 55
アヘン産地鑑別法について (第3報) アヘン中のモルヒネ及びコデインの定量……………	朝比奈晴世, 志内賢彦…………… 57
アヘン産地鑑別法について (第4報) 主要アルカロイドの定量 (その1) ……………	朝比奈晴世…………… 63
アヘン産地鑑別法について (第5報) 朝鮮産アヘン (その1) 乾燥原料とモルヒネ含量……………	朝比奈晴世, 大野昌子, 水町彰吾…………… 71
アヘン産地鑑別法について (第6報) “Porphyrroxine-Meconidine” の比色定量 (その1) ……………	朝比奈晴世, 水町彰吾…………… 73
邦産麦角よりの麦角アルカロイド標準物質の製造試験……………	福島清吾, 伊藤みよ子…………… 77
バラニトロアニリンに依る PAS 中の MAP の比色定量及び一斉検査成績について……………	板井孝信, 井下田浩…………… 81
ビリジナルカルボン酸ヒドラジド類のペーパクロマトグラフィについて……………	板井孝信, 大場琢磨, 神谷庄造…………… 87
パラ・アミノサリチル酸ナトリウムの比色定量法……………	喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 笠原 閑…………… 91
イソニコチン酸ヒドラジドの比色定量法……………	喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 笠原 閑…………… 95
塩酸プロカイソーN-グルコシッドについて (第1報) Frostbite Solution の経時変化……………	海東常敏, 小林茂子…………… 99
塩酸プロカイソーN-グルコシッドについて (第2報) 二つの異性体及びその相互転移について……………	海東常敏…………… 101
エフェドリンとクロロホルムの反応に関する研究……………	伊藤西一, 北川純男…………… 105
比濁法によるペブシンの定量……………	山羽 力…………… 109
血清中の蛋白分解酵素の研究(1) 人プラスミノゲン及びストレプトキナーゼの定量法……………	朝比奈正人, 岡万千子…………… 113
血清中の蛋白分解酵素の研究(2) 人血清グロブリン及びストレプトキナーゼによる牛プラスミノゲンの活性化……………	朝比奈正人, 岡万千子…………… 117
化粧品品の規格検査法について (第1報) 化粧品中の鉛並びに砒素の試験法……………	市川重春, 小幡利勝, 汐見 信…………… 123
化粧品品の規格検査法について (第2報) 口紅中の色素の一検査例……………	市川重春, 南城 実…………… 129
化粧品品の規格検査法について (第3報) 化粧品中のクロロフィリンの検査法試案(1)……………	市川重春, 南城 実…………… 130
衛生上から見た化粧品品の容器について (第1報) 鉛製チューブ中の化粧品の汚染防止……………	市川重春, 汐見 信…………… 133

(2)

医薬品中の無機イオンの分離定量法に関する研究(第1報) リンゲル液中の Na^+ , K^+ 及び Ca^{++} の分離定量	市川重春, 山手 昇, 白井浄二	139
非水溶液滴定による医薬品の定量(第3報) 氷酢酸を溶媒とするカルボン酸ナトリウム塩類の滴定	鹿島 哲, 加納宏一郎	145
非水溶液滴定による医薬品の定量(第4報) 氷酢酸を溶媒とするピリジンカルボン酸とそのアミド及びイソニコチン酸ヒドラジドの滴定	鹿島 哲	151
0.5% γ -B. H. C. 油剤のポーラログラフ定量法(エタノール法)	藤井正道, 佐藤 寿, 辻 楠雄, 菅原 実	155
医薬品中の水分定量法の研究	喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 伊藤西一, 吉村 淳	159
食品中デハイドロ酢酸及びその塩類の試験法(第2報) 固体食品中の検出法	川城 巖, 福沢富美	161
食品中デハイドロ酢酸及びその塩類の試験法(第3報) 定量法	川城 巖, 福沢富美	163
製品検査から見たズルチン夾雑物について	川城 巖, 福沢富美	167
食品中のモノフルオール酢酸(殺鼠剤)の検出法	川城 巖, 大久保敬四郎	171
(附) 液体食品中のモノクロール酢酸検出法	川城 巖, 大久保敬四郎	174
水, 野菜, 果実等のパラチオン試験法	川城 巖, 江島 昭	177
肉及び肉製品中亜硝酸の定量について	野崎泰彦, 川田公平, 久保 章	181
パンの簡易異物検査法	野崎泰彦, 宮島弘衛, 清水央子	191
食品及び薬品の異物検査(I) 新考案の異物抽出装置	豊田勤治, 持田研秀, 永田 正	193
食品及び薬品の異物検査(II) 生薬製剤の異物検査	豊田勤治, 持田研秀, 永田 正	196
牛乳由来ブドウ球菌に関する研究(第3報) 牛乳飲用によるブドウ球菌性食中毒事例	鈴木 昭	199
牛乳由来ブドウ球菌に関する研究(第4報) エンテロトキシン(培養濾液)による基礎実験成績	八田貞義, 鈴木 昭, 林 富子	205
ハトムギ黒穂病の防除試験	平山重勝, 山本昌木, 坂部フミ, 古藤カヨ	219
野草食糧化の一例——ハマニソクの場合に就いて	川谷豊彦, 田村良修	225
ゼラニウム(<i>Pelargonium denticulatum</i> Jacq.)の生育に及ぼす肥料成分の影響	宮崎幸男	231
土壤成分がムラサキオモト(<i>Rhoeo discolor</i> Hance)の初期生育に及ぼす影響について(第1報)	宮崎幸男	241
土壤水分がムラサキオモト(<i>Rhoeo discolor</i> Hance)の初期生育に及ぼす影響について(第2報)	宮崎幸男	248
寄生虫殺卵剤の研究(I) 文献の追試及び市販殺虫, 殺菌剤の殺卵力について	佐渡正四郎	257

資 料

○ 学校給食用小麦粉強化剤に関する調査	小川俊太郎, 平岡栄一, 中路幸男	269
○ 還元性安定剤を含有する市販ビタミンC注射液に関する調査	小川俊太郎, 平岡栄一, 中路幸男	273
○ 人造米の化学試験及び異物検査について	川城 巖, 藤井清次, 林 敏夫, 宮島弘衛, 渡辺秀子, 原田基夫, 河村正一, 西村千昭	277
○ 食品の新鮮度保持に関する研究(其の11) 人造米・干麺類などの細菌試験成績	八田貞義, 青山好作, 栗栖弘光, 宮沢文雄, 赤坂京子, 中本ムツ江, 新井秀男, 川浪 昇, 藤波龍恵	281
○ 地下鉄駅構内空气中塵埃測定結果について	川城 巖, 浦久保五郎, 佐々木睦江	285
○ 腸腺についての実験(III) Chromic 腸腺の消化性について	八田貞義, 功刀 博, 石関忠一	289
○ 公定書収載砒素試験法に関する研究	喜谷市郎右衛門, 吉村 淳, 守田 実, 奥村恭子	293
○ 銀錫アマルガム合金の硬化膨脹の測定装置について	藤井正道, 堀部 隆, 亀田 務	295
○ 有用植物目録	川谷豊彦, 石原活磨, 逸見誠三郎	301

速 報	小麦粉中の2,4-Dの検出	川城 巖, 大久保敬四郎	319
抄 録			321
業務報告(昭和28年1月~12月)		綜合調整部	327

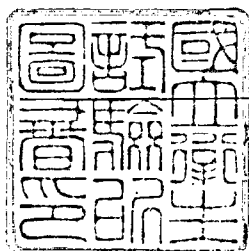
CONTENTS

On the Assay of Epinephrine. (No. 2) Comparison of Potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard and the U.S.P. Reference Epinephrine Standard.	
Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA & Jun SERIZAWA.....	1
On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No.12) On the Insulin Content of the Stannius' Body of "Reinhardtius Matsuurae & Snyder" as a Source for Insulin Preparations.	
.....Kakuma NAGASAWA, Denichi IKEDA, Hiroshi SATO & Jun SERIZAWA.....	7
On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No.13) Assay of Insulin by Mouse Convulsion Method.	
Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA & Jun SERIZAWA.....	11
On Digitalis Assay (1) The Assay of the Japanese Pharmacopoeia Standard by Frog and Pigeon Methods.	
Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Einosuke KOSHIMURA, Jun. SERIZAWA, Hiroshi SATO, Akira, ITO & Masahiko OKAZAKI	21
Studies on Follicular Hormones V. A Simple Productive Method of Estrone from Pregnant Mare Urine by Bacterial Hydrolysis.....	
Kakuma NAGASAWA & Einosuke KOSHIMURA.....	37
Quantitative Analysis of Estrone by Paper Chromatography (1)	
Einosuke KOSHIMURA & Seiichi OKAZAKI.....	41
Studies on Follicular Hormones VII. Quantitative Analysis of Follicular Hormone and Synthetic Estrogens by Rat Uterine Increasing Method (1)	
Einosuke KOSHIMURA, Seiichi OKAZAKI & Toshiko KUROMA.....	45
Research on the Methods of Determining the Origine of Opium II. Comparison of Morphine Assay Results.....	
Haruyo ASAHINA.....	55
Research on the Methods of Determining the Origin of Opium III. The Determination of Morphine and Codeine in Opium.....	
Haruyo ASAHINA & Yoshihiko SHIUCHI.....	57
Research on the Methods of Determining the Origine of Opium IV. Analysis of the Main Alkaloids I.....	
Haruyo ASAHINA.....	63
Research on the Methods of Determining the Origin of Opium V. Korean Opium I. Loss in Weight on Drying and Morphine Content.....	
Haruyo ASAHINA, Masako ÔNO & Shogo MIZUMACHI.....	71
Research on the Methods of Determining the Origin of Opium VI. The Colorimetric Determination of "Prophyroxine-meconidine" (1)	
Haruyo ASAHINA.....	73
Experimental Preparation of Standard Ergot Alkaloid from Japanese Cultivated Ergot.....	
Seigo FUKUSHIMA & Miyoko ITO.....	77
Colorimetric Determination of <i>m</i> -Aminophenol in Sodium <i>p</i> -Aminosalicylate by <i>p</i> -Nitroaniline	
Takenobu ITAI & Hiroshi IGETA.....	81
Studies on Paper-chromatography of Pyridine Carboxylic Acid Hydrazides.	
Takenobu ITAI, Takuma ÔBA & Shozo KAMIYA	87
A Colorimetric Determination of <i>p</i> -Aminosalicylic Acid.	
Ichiroemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Yoshitomo KÔCHI & Shizuka KASAHARA.....	91
A Colorimetric Determination of Isonicotinic Acid Hydrazide.....	
Ichiroemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Yoshitomo KÔCHI & Shizuka KASAHARA.....	95
Procaine-N-glucoside Hydrochloride. (1) Changes of Frostbite Solution with Time.	
Tsunetoshi KAITO & Shigeko KOBAYASHI.....	99
Procaine-N-glucoside Hydrochloride (2) Two Isomers and their Mutual Transformation	
Tsunetoshi KAITO.....	101

(4)

Studies on the Reactions of Ephedrine with chloroform. Yuichi ITO & Sumio KITAGAWA ...	105
A Nephelometric Method for Estimating Pepsin Activity..... Tsutomu YAMAHA.....	109
Studies on Serum Protease (1) Methods for Assay of the Activity of Human Plasminogen and Streptokinase.....Masato ASAHINA & Machiko OKA	113
Studies on Serum Protease (2) Activation of Bovine Plasminogen by Human Serum Globulin and Streptokinase.....Masato ASAHINA & Machiko OKA	117
Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (I) On the Assay of Lead and Arsenic in Cosmetics.....Shigeharu ICHIKAWA, Toshikatsu OBATA & Shin SHIOMI	123
Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (II) An Example of the Test of Dyes in Rouge.....Shigeharu ICHIKAWA & Minoru NANJO	129
Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (III) Tentative Determination Methods of Chlorophyllin in Cosmetics (I) Shigeharu ICHIKAWA & Minoru NANJO.....	130
Hygienic Studies on Containers of Cosmetics (I) Prevention of Lead Contamination of Cosmetics in Lead Tubes..... Shigeharu ICHIKAWA & Shin SHIOMI	133
Studies on the Determination Methods for Inorganic Ions in Drugs (I) On the Determination of Na ⁺ , K ⁺ and Ca ⁺⁺ in Ringer's Solution.....Shigeharu ICHIKAWA, Noboru YAMATE & Joji SHIRAI	139
Titration in Nonaqueous Solutions of Drugs and Chemicals III. Determination of Sodium Salts of Carboxylic Acids in Anhydrous Acetic Acid.....Tetsu KASHIMA & Koichiro KANO.	145
Titration in Nonaqueous Solutions of Drugs & Chemicals IV. Determination of Pyridinecarboxylic Acids, their Amides and Isonicotinic Acid Hydrazide in Anhydrous Acetic Acid Tetsu KASHIMA	151
Polarographic Assay of 0.5% γ -B.H.C. Spray (Ethanolc Method) Masamichi FUJII, Hisashi SATO, Kusuo TSUJI & Minoru SUGAWARA.....	155
A Research of Water Determination of Drugs. Ichiroemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Yoshitomo KŌCHI, Yuichi ITO & Kiyoshi YOSHIMURA	159
Examination of Dehydroacetic Acid and its Salts in Foods. (2) Detection of DHA in Solid Food.....Iwao KAWASHIRO & Fumi FUKUZAWA.....	161
Examination of Dehydroacetic Acid and its Salts in Foods (3) "Determination" Iwao KAWASHIRO & Fumi FUKUZAWA.....	163
On Impurities in Dulcin from Standpoint of Official Approval.....Iwao KAWASHIRO & Fumi FUKUZAWA.	167
Detection of Monofluoro Acetic Acid (Rodenticide) in Foods.....Iwao KAWASHIRO & Keishiro ŌKUBO.	171
Appendix: Detection of Monochloro Acetic Acid. Iwao KAWASHIRO & Keishiro ŌKUBO. ...	174
Examination of Parathion in Water, Vegetables, Fruits, etc. Iwao KAWASHIRO & Akira EJIMA.	177
Determination of Nitrites in Meat and Meat Products. Yasuhiko NOZAKI, Kohei KAWATA & Aya KUBO.	181
Simple Method of Filth Test of Bread..... Yasuhiko NOZAKI, Hiroe MIYAJIMA & Eiko SHIMIZU.	191
Tests on the Extraneous Materials in Food, Food Products and Mdicines (I) Kinji TOYODA, Kenshu MOCHIDA & Tadashi NAGATA.....	193
Tests on the Extraneous Materials in Food, Food Products and Medicines (II) Kinji TOYODA, Kenshu MOCHIDA & Tadashi NAGATA.....	196

Studies on the Biological Function of Staphylococci from Bovine Milk (3) On the Staphylococcus Food Poisoning due to Drinking City Milk. Akira SUZUKI	199
Studies on the Biological Function of Staphylococci from Bovine Milk (4) Standies on the Nature of Enterotoxin of Staphylococci from Bovine Milk. Sadayoshi HATTA, Akira, SUZUKI & Tomiko NAKAJIMA	205
Experiments in Coix Smut Control. Shigekatsu HIRAYAMA, Masaki YAMAMOTO, Fumi SAKABE & Kayo KOTO	219
An Example of Edible Wild Grass On the Case of American Dunegrass (<i>Elymus mollis</i> TRIN.) Toyohiko KAWATANI & Yoshimichi TAMURA	225
Studies on the Effects of the Manurial Elements upon the Growth of Geranium (<i>Pelagonium denticulatum</i> Jacq) Yukio YAMAZAKI	231
Studies on the Effects of the Soil Moisture upon the Early Growth of MURASAKIOMOTO (Rhoeo discolor Hance) Part 1. Yukio MIYAZAKI	241
Studies on the Effects of the Soil Moisture upon the Early Growth of MURASAKIOMOTO (Rhoeo discolor Hance) Part 2. Yukio MIYAZAKI	248
Studies on Parasito-ovo-cidal Activity of Several Remedies (1) Shoshiro SAWATARI	257
Survey on the Vitamin Compound for Enrichment of School Feeding Shuntaro OGAWA, Eiichi HIRAOKA & Yukio NAKAJI	269
Titrimetric Assay of Vitamin C Injections under Coexistence of Some Reducing Stabilizers Shuntaro OGAWA, Eiichi HIRAOKA & Yukio NAKAJI	273
Chemical Analysis of Artificial Rice and Test of Extraneous Materials in it. Iwao KAWASHIRO, Seiji FUJII, Toshio HAYASHI, Hiroe MIYAJIMA, Hideko WATANABE, Motoo HARADA, Masaichi KAWAMURA & Tiaki NISHIMURA	277
Studies on Holding Food Fresh (11) Results on Bacteriological Examination of Artificial Rices and Dried <i>Mens</i> Sadayoshi HATTA, Kosaku AOYAMA, Hiromitsu KURISU, Fumio MIYASAWA, Kyoko AKASAKA, Mutsue NAKAMOTO, Hideo ARAI, Noboru KAWANAMI & Tatsue FUJINAMI	281
Estimation of Air-borne Dusts at a Station of Tokyo-Subway Iwao KAWASHIRO, Goro URAKUBO & Mutsue SASAKI	285
Experimental Studies on the Catgut (III) Digestability of the chromic Catgut. Sadayoshi HATTA, Hiroshi KUNUGI & Chuichi ISHISEKI	289
Studies on the Arsenic Test Described in Some Official Books Ichiroemon KIDANI, Kiyoshi YOSHIMURA, Minoru MORITA & Kyoko OKUMURA	293
The Apparatus of Measurement for Dimentional Change of Dental Amalgam Alloys Masamichi FUJII, Takashi HORIBE and Tsutomu KAMEDA	295
List of Useful Plants Toyohiko KAWATANI, Katsuma ISHIHARA and Seizaburo HEMMI	301
Preliminary Reports	319
Abstracts	321
Annual Report (1953)	327



エピレナミンの検定 (第2報)*

国立衛生試験所エピレナミン標準品の力価検定について

長沢 佳熊, 中山 豪一, 芹沢 淳

On the Assay of Epinephrine (No. 2)

Comparison of Potency between the National Hygienic Laboratory
Epinephrine Standard and the U.S.P. Reference Epinephrine.

By Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA

まえがき エピレナミンの生物学的検定法としては、脳髄破壊猫¹⁾及び麻酔犬²⁾の血圧上昇作用を利用する方法、家兎腸管の運動抑制法³⁾などがある。著者等は血圧上昇法¹⁾²⁾により、国立衛生試験所エピレナミン標準品の生物学的検定を行つたので、その結果を報告する。

実験方法 1. 標準液及び検液の調製法 著者等は標準品として米局エピレナミン標準品を用い、検体として国立衛生試験所エピレナミン標準品を用いた。標準品及び検体はデシケート (硫酸) 中で18時間乾燥し、それぞれ40.475 mgを精密に秤りn/10HCl液2.5 ccに溶かし、蒸留水で25 ccとする (本液1 ccはエピレナミン塩基1 mgを含む)。この際亜硫酸水素ナトリウムを0.1 %の割合に加えて安定剤とし、光を遮断して氷室内に貯える。

試験当日上記標準液及び検液を生理食塩液で、操作法で述べるようにして稀め、稀標準液及び稀検液とする。

2. 試験動物 いずれも健康な成熟した動物を用い、猫の場合は体重3.8~4.2 kg、犬の場合は体重10~13.5 kgのものを用いた。猫では先ずエーテル麻酔した後、脳下垂体後葉ホルモンの検定第3報⁴⁾で述べた方法により脳髄破壊猫とし、犬では溶性フェノバルビタールで麻酔し、常法により動脈圧をキモグラフ上に描記させ、更に股静脈から、体重1 kgにつき0.1 %硫酸アトロピン溶液0.1 ccを注射し迷走神経を麻痺させた後、動物の感度及び適当な注射用量を定める。

3. 操作法 米局XIV法に準拠して行つた。即ち稀標準液の一定量と稀検液とを交互に5分間間隔で外頸静脈内に注射した。稀検液の用量はその2回が前後の稀標準液の血圧上昇より1/5小さく、その2回は等しく、その2回は1/5大きくなるように選ぶ。注射に際しては外頸静脈内に挿入したカニューレからロック・リンゲル液各2 ccを注入し、薬液を流し込む。

実験結果 A. 脳髄破壊猫による実験 実験 1. 体重: 3.8 kg 雄猫, 実験温度: 23°, 湿度: 60%, 初期血圧: 60~72 mmHg, 注射間隔: 5分。Table 1にその結果を示す (Fig. 1参照)。

稀検液1 cc中のエピレナミン塩基含有量は0.0220 mgであるから、国立衛生試験所標準品は米局標準品の98.9 %の効価を有する。標準誤差0.000164

実験 2. 体重: 4.2 kg 雄猫, 実験温度: 16°, 初期血圧: 52~59 mmHg, 注射間隔: 5分, Table 2にその結果を示す (Fig. 2参照)

Table 1のようにして計算すると、稀検液1 cc中エピレナミン塩基0.01076 mgを含む。従つて国立衛生試験所標準品は米局標準品の94.9 %の効価を有する。標準誤差は0.000498となる。

Table 1. Comparison of Potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard (N. H. L. St.) and the U. S. P. Reference Epinephrine Standard (U. S. P. St.) by spinal cat. (Calculations were obtained according to the U. S. P.). See Fig. 1.

Rise in Blood Pressure (mmHg)				Doses							
U. S. P. St.		N. H. L. St.	Ys-Yt	U. S. P. St Xs.		N. H. L. St Xt.		Xs-Xt			
Response	Mean response Ys	Yt		10 ³ × mg	log(10 ³ × mg)	10 ³ × cc	log(10 ³ × cc)		x ²	y ²	xy
41				5.5	0.7404						
50	45.5	36	9.5	5.5	0.7404	200	2.3010	-1.5606	2.4358	90.25	-14.8266
53	51.5	40	11.5	5.5	0.7404	200	2.3010	-1.5606	2.4358	132.25	-17.9480
54	53.5	51	2.5	5.5	0.7404	250	2.3979	-1.6575	2.7476	6.25	-4.1440
60	57.0	55	2.0	5.5	0.7404	250	2.3979	-1.6575	2.7476	4.00	-3.3152
60	60.0	68	-8.0	5.5	0.7404	300	2.4771	-1.7367	3.0161	64.00	13.8936
70	65.0	73	-8.0	5.5	0.7404	300	2.4771	-1.7367	3.0161	64.00	13.8936

N (Number injected
of N. H. L. St.)

→ 6

S(y)

9.5

$$\bar{y} = 1.5833$$

S(x)

-9.9100

$$\bar{x} = -1.6517$$

S(x²)

16.3990

S(y²)

360.75

S(xy)

-12.4466

$$b \rightarrow \frac{-12.4466 - \{(-1.6517) \times 9.5\}}{16.3990 - \{(-1.6517) \times (-9.91)\}} = 105.684$$

Epinephrine content per cc of the test dilution of the N. H. L. St =

$$\text{Antilog} \left\{ (-1.6517) - \frac{1.583}{105.684} \right\} = 0.02155 \text{mg}$$

The Standard error of the assay:

$$S. E. = 2.3 \times 0.02155 \times \sqrt{\frac{0.705}{105.684^2} \left\{ \frac{1.583^2}{105.684 \times 3.2445} + \frac{1}{6} \right\}} = 0.000164$$

$$y^2 = 360.75 - (1.583 \times 9.5) = 345.71$$

$$s^2 = \frac{345.71 - \{105.684 \times 3.2445\}}{6-2} = 0.705$$

Table 2. Comparison of Potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard (N. H. L. St.) and the U. S. P. Reference Epinephrine Standard (U. S. P. St.) by spinal cat (Calculations were obtained according to the U. S. P.). See Fig. 2.

U. S. P. St.	Order of injection	1	3	5	7	9	11	13
	Doses (mg)	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015
	Responses (mmHg)	49	54	50	53	55	49	55
N. H. L. St.	Order of injection	2	4	6	8	10	12	
	Doses (cc)	0.10	0.10	0.15	0.15	0.20	0.20	
	Responses (mmHg)	34	35	49	46	62	55	

B. 麻醉犬による実験 実験 1. 体重: 15.5kg 雌犬, 実験温度: 22°, 湿度: 55 %, 初期血圧: 86~110mm Hg, 注射間隔: 5 分.

Table 3. に結果を示す (Fig. 3 参照).

Table 3. Comparison of potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard (N. H. L. St.) and the U. S. P. Reference Epinephrine Standard (U. S. P. St.) by anesthetized dog (Calculations were obtained according to the U. S. P.). See Fig. 3.

U. S. P. St.	Order of injection	1	3	5	7	9	11	13	15
	Doses (mg)	0.004568	0.004568	0.004568	0.004568	0.004568	0.004568	0.004568	0.004568
	Responses (mmHg)	31	34	38	38	36	34	36	37
N. H. L. St.	Order of injection	2	4	6	8	10	12	14	
	Doses (cc)	0.35	0.35	0.40	0.40	0.45	0.45	0.45	
	Responses (mmHg)	28	30	39	38	38	38	41	

Table 1 のようにして計算すると,

力価: 稀検液 1 cc 中エピレナミン塩基 0.01076 mg を含む. 従つて国立衛生試験所標準品は 米局標準品の 99.6 % の効価を有する. 標準誤差は 0.000755 となる.

実験 2. 体重: 13kg 雄犬, 実験温度: 22°, 初期血圧: 90~116 mmHg, 注射間隔: 5 分. Table 4 に結果を示す (Fig. 4 参照).

Table 4. Comparison of Potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard (N. H. L. St.) and the U. S. P. Reference Epinephrine Standard (U. S. P. St.) by anesthetized dog (Calculations were obtained according to the U. S. P.). See Fig. 4.

U. S. P. St.	Order of injection	1	3	5	7	9	11	13
	Doses (mg)	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
	Responses (mmHg)	44	46	44	46	50	50	52
N. H. L. St.	Order of injection	2	4	6	8	10	12	
	Doses (cc)	0.3	0.3	0.35	0.35	0.40	0.40	
	Responses (mmHg)	40	44	44	50	56	57	

Table 1 のように計算すると,

力価: 稀検液 1 cc 中エピレナミン塩基 0.02025 mg を含む. 従つて国立衛生試験所標準品は 米局標準品の 97 % の効価を有する. 標準誤差は 0.07414 となる.

実験 3. 実験 2 と同一の犬で行う (Fig. 5 参照).

Table 5. Comparison of potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard (N.H.L.St.) and the U.S.P. Reference Epinephrine Standard (U.S.P.St.) by anesthetized dog (Calculations were obtained according to the U.S.P.). See Fig. 5.

U.S.P. St.	Order of injection	1	3	5	7	9	11	13
	Doses (mg)	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
	Responses (mmHg)	40	42	42	45	42	45	45
N.H.L. St.	Order of injection	2	4	6	8	10	12	
	Doses (cc)	0.2	0.2	0.25	0.25	0.30	0.30	
	Responses (mmHg)	38	36	41	47	48	48	

Table 1 のように計算すると、

力価：稀検液 1 cc 中エピレナミン塩基 0.02022 mg を含む。従つて 国立衛生試験所標準品は 米局標準品の 97 % の効価を有する。標準誤差は 0.001316 となる。

実験 4. 体重 10 kg, 実験温度: 22°, 初期血圧: 121~148 mmHg, 注射間隔: 5 分. Table 6 に結果を示す。(Fig. 6 参照).

Table 6. Comparison of potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard (N.H.L.St.) and the U.S.P. Reference Epinephrine Standard (U.S.P.St.) by anesthetized dog (Calculations were obtained according to the U.S.P.). See Fig. 6.

U.S.P. St.	Order of injection	1	3	5	7	9	11	13
	Doses (mg)	0.01694	0.01694	0.01694	0.01694	0.01694	0.01694	0.01694
	Responses (mmHg)	47	50	56	48	49	51	53
N.H.L. St.	Order of injection	2	4	6	8	10	12	
	Doses (cc)	0.30	0.30	0.35	0.35	0.40	0.40	
	Responses (mmHg)	40	50	50	46	55	58	

Table 1 のように計算すると、

力価：稀検液 1 cc 中エピレナミン塩基 0.04773 mg を含む。従つて 国立衛生試験所標準品は 米局標準品の 99.5 % の効価を有する。標準誤差は 0.001131 となる。

実験 5. 体重: 11.9 kg, 実験温度: 22°, 初期血圧: 98~118 mmHg, 注射間隔: 5 分. Table 7 に結果を示す (Fig. 7 参照).

Table 7. Comparison of potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard (N. H. L. St.) and U. S. P. Reference Epinephrine Standard (U. S. P. St.) by anesthetized dog (Calculations were obtained according to the U. S. P.). See Fig. 7.

U. S. P. St.	Order of injection	1	3	5	7	9	11	13
	Doses (mg)	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
	Responses (mmHg)	42	46	52	52	52	53	63
N. H. L. St.	Order of injection	2	4	6	8	10	12	
	Doses (cc)	0.25	0.25	0.30	0.30	0.35	0.35	
	Responses (mmHg)	35	36	49	49	60	62	

Table 1 のように計算すると,

力価: 稀検液 1 cc 中エピレナミン塩基 0.01908 mg を含む. 従つて国立衛生試験所標準品は米局標準品の 95.4% の効価を有する. 標準誤差は 0.000018 となる.

む す び

著者等は脳髄破壊猫及び麻酔犬の血圧上昇法により, 米局 XIV 法に準拠して, エピレナミンの国立衛生試験所標準品と米局標準品との効価を比較し, 前者によるとき, 国立衛生試験所標準品は米局標準品の有する効価の平均 96.9%, 後者によるときは平均 97.3% であつた.

文 献

- 1) C. W. Emmens: Hormone Assay, 92 (1950); Elliott: J. Physiol. 32, 447 (1905), 44, 376 (1912).
- 2) 米局 XIV, 214.
- 3) C. W. Emmens: Hormone Assay, 94 (1950).
- 4) 日本薬学会 2 月例会講演;

Summary

The authors made a comparison of the potency between the National Hygienic Laboratory Epinephrine Standard and the U. S. P. Reference Epinephrine Standard by blood pressure rising methods using spinal cats and anesthetized dogs. The assays were carried out in a similar manner as the one described in the U. S. P. XIV. The potency ratio of the former to the latter 96.9% was given by the method using spinal cats, and 97.3% by that using anesthetized dogs.

Received April 2, 1954

エピレナミンの検定附図

Fig. 1

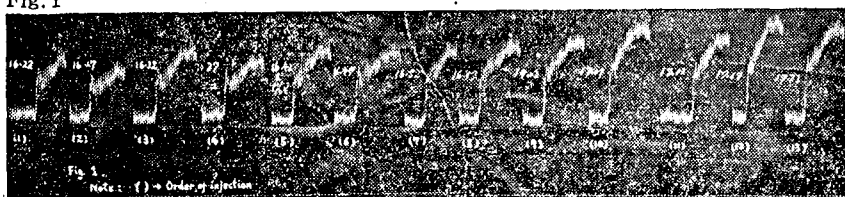


Fig. 2

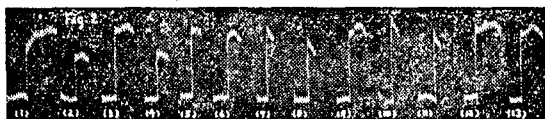


Fig. 3



Fig. 4

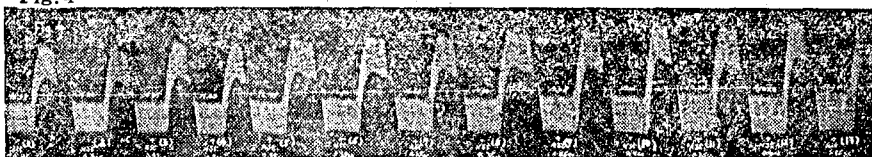


Fig. 5

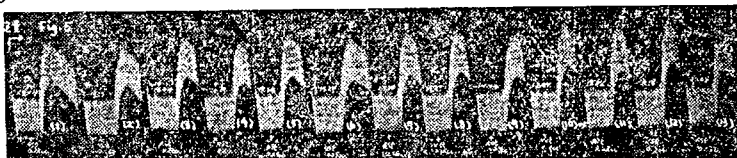


Fig. 6

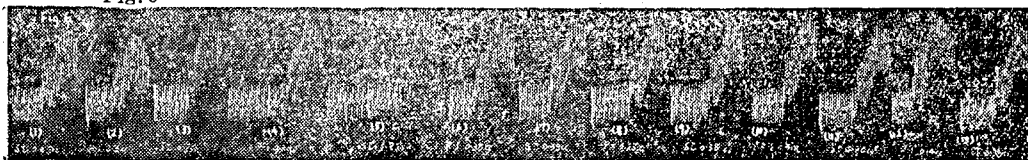


Fig. 7



インシュリンの薬化学的研究 (第12報)

インシュリンの新資源としてのアブラカレイの Stannius

小体の価値について*

長沢 佳熊, 中山 豪一, 池田 伝市, 佐藤 浩, 芹沢 淳

On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No. 12)

On the Insulin Content of the Stannius' Bodies of "Reinhardtius Matsurae Jordan & Snyder" as a New Source for Insulin Preparations.

By Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Denichi IKEDA,
Hiroshi SATO and Jun SERIZAWA

まえがき 現在我国のインシュリン注射液は著者等の研究¹⁾によるカツオ、マグロなど回遊魚の Stannius 小体を原料として生産されている。魚類のインシュリンを実用化しているのは我国のみであり、これはカツオなどのような漁獲量が多く、カツオブシ、罐詰などの製造時にまとまった臓器の集荷ができるからである。我国のインシュリン需要量は毎年増加し、現在1年間6000~8000万単位と推定され、その需要を満たすには不足を来し、新資源を他に求める必要が起つた。

クジラ臓臓を原料とする方法も現在企てられているが²⁾、新鮮な原料の大量の集荷と、採算上の点で企業化には困難が多い。

著者等は終戦直後当時の Stannius 小体の価格暴騰に対処するために昭和21年3月アブラカレイに着目し、解剖学的の検索、漁獲量の調査を行つたが、インシュリン注射液の規格制定と、国家検査及び検定の実施によつて技術の不完全な多数の製造会社はその生産を中止し、僅かに3社のみが製造を続けるのみとなり、一時は原料過剰となつたので著者等は一時この研究を中止したが、今回前述の必要に迫られて詳細な検討を行うことにしたのである。

原料 昭和27年12月八戸市において採取したアブラカレイの Stannius 小体を原料とした。その鮮度は外観上中程度であり、魚体の大きさはかなり差があるが、秤量できなかつた。原料の鮮度や大きさは生産工業上採取できると思う程度のものである。

定量的抽出法 著者の方法による (第1表参照)

第1表 Stannius 小体からインシュリンの抽出 (長沢法)¹⁾

Stannius 小体

↓ 飽和ピクリン酸水溶液に浸し実験室に持帰り、濾過

残 留 物

↓ アセトン抽出

アセトン液

↓ アセトン3~5容量を加え、濃塩酸数滴を加える。濾過

析 出 物

↓ アセトン、エーテルで洗い乾かす

粗インシュリン (ほとんど白色の粉末)

本法は加熱と濃縮とを避けることが特徴で、従来の Dudley法³⁾, Jensen, Wintersteiner, Geiling法⁴⁾, Best, Jephcott, Scott⁵⁾ 法とは趣旨が異なる。なお定量的に抽出するためには、アセトン多量を用いて数回抽出した。かくして得た粗インシュリン粉末はほとんど白色であるが、純度は低い。生産的に抽出製造を行う場合には第2表に示すように収量は低くとも、純度即ち 1mg のインシュリン量の多い方法もある。この粉末が着色するのは原料の鮮度が悪いか又は操作上の不完全によるもので、Dudley 法のように実験室で簡単に減圧濃縮する場合などにも見られる。原料 1mg 中インシュリン 4.5 単位、重量による 収得量 70 mg (3.2%), 1 尾当り 9 単位, 1g 当り 143 単位、これをきわめて新鮮な原料を用いたトラフグ、ホンマダコ⁶⁾の例 (第2表参照) に比して劣るのは、生産上の条件に適するように特にその鮮度を選ばなかつたためである (実験 1 参照)。

第2表 Stannius 小体中のインシュリン含量

魚 種 (産地)	全量(g)	数	1個平均 (g)	粗インシュリン の収量 (g)	同 収率(%)	・同 単位/mg	1尾当り 単位	1g当り 単位	研究者
マカツオ (静岡) ※ Katsunus vagans	8.9	120	0.07	0.128	1.4	9.5	10	137	長沢等 ¹⁾ (昭17)
トラフグ (戸畑) Spheroides rubripes	1.09	48	0.023	0.031	2.8	7.7	5	218	長沢等 ⁶⁾ (昭17)
ホンマダコ (森) Thynnus thynnus	0.3	1	0.3	0.013	4.5	5.0	67.5	225	長沢等 ⁷⁾ (昭18)
アブラカレイ (八戸) Reinhardtius matsuurae, Jordan & Snyder	2.20	35	0.062	0.07	3.2	4.5	9	143	長沢等 (昭28) (本報告)

単位検定法 標準品は日局インシュリン標準品 (1mg中21単位含有) を用いた。予試験として英局 VIII のマウスのケイレン法を採用し、その結果、1mg=5.3 単位であつた (実験 2 参照)。この値は標準品の純度 (1mg=21単位) と検体の純度 (1mg=約5.3単位) との差が大きいこと、マウスのケイレン率 (%) が 8%, 13% という低い値を以て計算していることの2点から、検定法としては成立しない (純度にこのような差があるとき、マウス法では一般に 10~30% も差のある値を示すことが知られ、又ケイレン率 15~85% で log 用量とケイレン率が直線関係を示すからである)。然しこの値をとつても大体の目標となり得るから、1mg=5 単位と仮定して日局 VII のインシュリン注射液の定量法⁹⁾ に従つて検定した結果は 1mg 中 4.5 単位を含むことを知つた (実験 3 参照)。

生産に関する考察 第3表により、アブラカレイの全国水揚量から計算するとインシュリン 0.6 億単位、実際に原料に供し得るもの 50%, 精製インシュリンにしたときの収量 70% と仮定しても、1年間のインシュリン収量 0.21 億単位が得られ、これを我国のインシュリンの現在の生産量 0.6 億単位、需要量 0.8 億単位に対照すると、それぞれの約 1/3 及び 1/4 に相当する。なおアブラカレイは現在肝油源として臓器の採取が行われ、原料の集荷には便宜が多い。

第3表 カレイの漁獲量とインシュリンの生産量 アブラカレイの全国水揚総量

(農林省水産統計課調査, 昭和27年1月~12月)

総 量 (kg)	尾数 (1尾600g = 2.25kgと仮定した)	インシュリン生産量 (単位)
14 903 515	6 623 784	0.6 億単位

八戸市場統計 (昭和26年1月~12月) 八戸市水揚量

魚 種	量 (貫)	魚 種	量 (貫)
アブラカレイ	796 050	浅羽 カレイ	29 292
サメ カレイ	243 325	母 カレイ	91 240
宗八 カレイ	54 424	松川 カレイ	6 308
赤 カレイ	18 886	マ カレイ	3 827
沖母 カレイ	53 255	水 カレイ	19 793

なお八戸市だけについて考察すると (第3表参照), アブラカレイ 1尾600匁と仮定し, 1 350 000尾, インシュリン量 1 215 万単位, 精製インシュリン量 850 万単位, その他のカレイを総計し, 1尾200匁平均と仮定し, 1尾から3単位を得るものと仮定して, カレイの総量 520 358貫, 2 600 000尾, 粗製インシュリン 780 万単位, 精製インシュリン量 550 万単位, 総計 1 400 万単位のインシュリンが八戸市 1年間に生産されることとなる。

実験結果 実験 1. 昭和 27 年 12 月初旬八戸市においてアブラカレイの Stannius 小体 35 個を採取し直ちにピクリン酸飽和水溶液に浸す。この原料は肝油製造用として八戸市大木工場が採取したものである。

当所に持参し, 約 40 日後に (実際の生産に際し, 原料採取から処理までに要する日数と考えた), 取出し, 水をぬぐい去り秤量した。

Stannius 小体を大体, 大型, 中型, 中小型, 小型に分け秤量した成績を次表に示す。

	大 型	中 型	中 小 型	小 型	合 計	平 均 (g)
数 (個)	5	5	15	10	35	
総 量 (g)	0.51	0.36	0.80	0.43	2.1	0.06
平 均 (g)	0.102	0.072	0.06	0.043		

これをすりつぶし, 80 %アセトン 35 cc, 35 cc, 15 cc, 15 cc, 95 %アセトン 30 cc で合計 5 回抽出し, 抽出液 125 cc を得, これに 95 %アセトン 400 cc を加え, 濃塩酸数滴を加え, 析出物を遠心分離し, アセトン及びエーテルで洗い減圧下に乾燥した。かくて得た粗インシュリンの収量: ほとんど白色の粉末 70 mg, 原料からの収率 3.2%。

実験 2. 予試験: マウスケイレン法。

英局Ⅷ⁸⁾による。但し, 1群 23 匹, マウスの体重: 14~20 g, 試験温度: 33°±0.5°, 注射量: 0.35cc, 試験前 2 日から食餌にミルクを添加, 試験前日正午から恒温室 (33°±0.5°) に入れ, 午後 4 時 30 分から絶食, 試験日は午前 11 時注射開始, 実験日: 昭和 28 年 1 月 27 日, 少雨。

		1 cc中のインシュリン量	注射後90分のケイレン	
			数	(ケイレン率 %)
標 準 品	高 用 量	0.14単位	11	48
	低 用 量	0.07単位	3	13
検 体	高 用 量	0.02338mg	10	42
	低 用 量	0.01169mg	2	8

この結果はケイレン%が 15~85 %に包含されないから, その範囲内でのみ用量の log とケイレン%が直線比例するという次式を使うことには疑問があるが, 一応単位の計算を行つた。

以上の成績を次式によつて計算する。

$$M = \frac{d}{c} \times \log \frac{S_1}{S_2} \quad \left[\begin{array}{l} \text{インシュリンの注射量の log と効価 (ケイレン\%)} \\ \text{は正規分布... (直線比例) をするとの理にもとづく} \end{array} \right]$$

M は検体及び標準品の力価比の対数

S₁: 標準品の高用量, その平均力価: f₁

S₂: " 低用量, その平均力価: f₂

T₁: 検体の高用量, その平均力価: f₃

T₂: " 低用量, その平均力価: f₄

$$c = \frac{f_1 + f_3}{2} - \frac{f_2 + f_4}{2} \quad d = \frac{f_1 - f_3}{2} + \frac{f_2 - f_4}{2}$$

S₁: 0.14単位, S₂: 0.07単位, T₁: 0.02338mg

T₂: 0.01169mg, f₁: 48, f₂: 13, f₃: 42

f₄: 8.

$M=0.048$, $\text{Antilog}M=1.117$

検液の単位=0.125単位/cc

検体の単位=5.35単位/mg

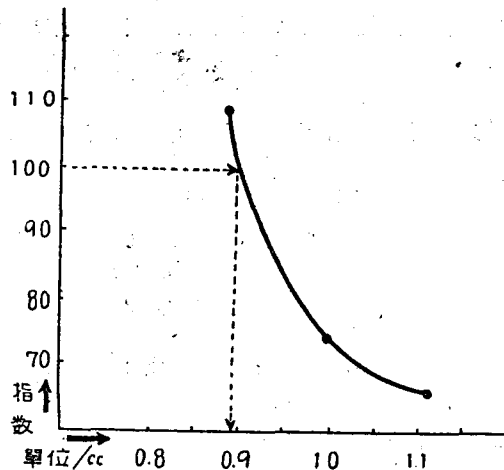
信頼限度を英局VIII⁸⁾記述の計算法によつて一応算出したところ、68.4~145% ($P=0.95$)であつた。

実験 3. 検体1mg 中に5単位を含むと仮定し、

日局VI⁹⁾のインシュリン注射液の定量法によつて単位を測定した結果、次図(第1図)に示す成績(本粉末1mg 中 $5 \times 0.9 = 4.5$ 単位含有)を得た。

この研究費の1部は昭和28年度厚生科学研究補助金を使用したことを附記して感謝する。

第 1 図



文 献

- 1) 長沢佳熊: 昭和15年日本薬学会総会講演, 長沢佳熊, 近藤政次郎: 薬学雑誌, 62, 288~291 (昭和17). 長沢佳熊: 日本衛生化学会誌, 15, 73~92 (昭和18).
- 2) 柴田 哲: 九州医学会雑誌, (昭和28).
- 3) I. H. W. Dudley: Bioch. J. 18, 665 (1924).
- 4) H. Jensen, O. Wintersteiner, E. M. K. Geiling: J. pharm. Ex. Therap. 36, 116 (1929).
- 5) C. H. Best, C. M. Jephcott, D. A. Scott: Am. J. physiol. 100, 285.
- 6) 長沢佳熊, 近藤政次郎: 医学と生物学, 1, 378~379 (昭和17).
- 7) 長沢佳熊, 近藤政次郎: 医学と生物学, 1, 137~140 (昭和18).
- 8) 第八英国薬局方, 816~819 (1953).
- 9) 第六改正日本薬局方 (厚生省版), 60 (1951).

Summary

In Japan, the demand for insulin had become so much, increasing year after year that it is necessary to search new source.

The authors prepared insulin powder from the Stannius' bodies of "Reinhardtius matsuurae" in accordance with Nagasawa's method, and assayed the preparation preliminarily by a mouse method and determined its potency by a rabbit method: the former gave 5.35 u./mg, fiducial limits of error 68.4~145% ($P=0.95$), the latter gave 4.5 u./mg. Insulin was prepared at the rate, 9 u./fish or 143 u./g. of the Stannius' body.

From this result, we can use the Stannius' bodies of the fish as a good source for insulin.

Received April 20, 1954

インシュリンの薬化学的研究 (第13報)

インシュリンのマウスのケイレン法による検定

長沢 佳熊, 中山 豪一, 芹沢 淳

On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No. 13)

Assay of Insulin by a Mouse Convulsion Method

By Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA

インシュリンの力価検定法として家兎の血糖量測定法とマウスのケイレン率測定法は、すでに公式の試験法として日局¹⁾, 米局²⁾では前者を, 国局³⁾, 英局⁴⁾では両者を採用している。これに関する従来の研究は多数あるが、後者に関しては Hemmingsen⁵⁾⁶⁾⁷⁾, Gaddum⁸⁾, Marks⁹⁾ 等により log 用量と効力とが平行することが認められて以来、統計学的方法の皆無型の検定法の研究の中心となり、現在では反応率を Probit に変換する方法が一般に行われている¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。我国では著者等は昭和27年秋頃より輸入 NPH インシュリン注射液の単位検定に使っている。又昭和28年伊藤、玉置¹⁸⁾のマウス法による2-2用量検定法、ED50、3-3用量検定法についての報告があるが、後二者の信頼限界は75.5~132.9%及び62.0~150.0%であり、2-2用量検定法では g-criterion が大き過ぎるため信頼限界は非常に広くなり、英局の規定を越え、検定成績としては不適当である。この原因は、用量比が大ききその割合に効力差が小さいために用量効力線の傾斜が小さい条件で実験が行われていることと、使用マウス数が少な過ぎるためと思う。

家兎法では動物数が少くてよいこと (12~18匹)、方法が医療目的と同じ血糖降下を目標とすること、交叉試験ができ、検定の精度が高いこと、標準品と検体との純度が著しく異るときでもかなり正確な値が得られること及び変量型検定法を用いることができるという長所がある。その欠点は通例1回の検定に1週間を要すること及び血糖微量測定操作のような特殊技術を必要とすることである。

マウス法の長所は試験を1日で終了でき、同一標準品を用いて、同時に数検体を検定できることであるが、皆無型の反応によるので多数の動物を必要とし、精度もやや劣るという短所がある。経済的には試験を行う土地柄、回数、検体数などによつて、両方法の優劣は連断できない。

著者等はインシュリンの単位検定の予試験及び NPH インシュリン注射液、グロビン・亜鉛・インシュリン注射液の単位検定についてマウスのケイレン法を試み、検定成績の平行性、直線性の検討及び ED50 の測定も行つたので、その結果を報告する。

実験方法 1. 標準液及び検液の調製: 日局インシュリン標準品 (21u/mg) の適当量を精密に秤り、日局規定のインシュリン稀釈液を用いて 1cc 中 20 単位を含む溶液を調製し、標準原液とし、検定当日更に上記稀釈液を用いて稀釈し、稀標準液とした。検液はインシュリン粉末のときは、標準液と同様にして調製し、NPH インシュリン、グロビン・亜鉛・インシュリンのときは予め濃塩酸少量を加えて澄明な溶液とし、次いで上記稀釈液で稀釈して調製した。

2. 試験動物: 体重 12~25g の雄マウスを用い、各検定では体重差 10g 以内のマウスを用いた。英局では体重差 5g 以内としているが、我国の現状では、96 匹以上のそのようなマウスを入手することは困難である。食餌は小麦、煮干、野菜を主とし、試験の2日前からミルクを与えた場合もある。

3. 試験条件: 試験前日午後4時に水以外の食餌を去り、換気装置を備えた室温 30~35°、湿度 30~40% の恒温室 (約2坪) に入れ、翌朝体重を g まで秤り、各マウスは、各群の平均体重がほぼ等しくなり、各群中の体重の重いもの、軽いものがほぼ同数となるように群分けした。午前11時~12時から注射を開始する。注射はマウスの背部皮下に 0.25cc 又は 0.35cc ずつ行う。1群 24 匹 (合計 96 匹) の場合の所要注射時間は約 5~6 分である。注射したマウスは径 19cm のガラス円筒内に 5~10 匹ずつ入れ、竹製スの子で蓋をし、注射終了時から 30, 60, 90,

120分間にケイレンを起したマウス数を記録した。ただし計算に採用した観察時間は90分とした。

4. 反応：特有のケイレンを起したマウス及びコンスイ状態となり、背位にしたとき、マウス自身で腹位にもどることのできないものを陽性として数えた。陽性のマウスには直ちに15%ブドウ糖液0.5ccを腹腔内に注射して助け、次の予試験用に供した。

実験結果 1. 一般検定：インシュリン粉末20種、同注射液4種について行つた検定成績をTable Iに示す。インシュリン粉末についてはその純度が低いため、純度の高いインシュリン標準品と比較することは適当でないが、一応実施した。

Table 1. Results of Assay of the Powders and Injections of Insulin (2 and 2 Dose Assay)

No.	Sample	According to B. P. VII		Unit/mg	Mouse number in group (n)	Remark
		Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)			
1	A	0.89	70~130	6.8	24	△
2	A	0.90	37~1128	7.6	24	
3	B	1.75	55~4438	14.5	20	
4	B	1.00	93~136	10.7	24	
5	B	0.24	56~2288	8.2	24	△
6	C*	1.48	74~165	4.9	24	△
7	D**	0.97	65~145	5.8	23	△
8	D	0.88	63~146	5.3	23	△
9	E	1.01	49~206	5.1	20	
10	F soln.	1.57	69~224	31.4/cc	20	△
11	F soln.	1.66	73~152	31.2/cc	20	△
12	G soln.	1.12	67~180	22.4/cc	20	△
13	H	0.78	71~125	3.9	24	
14	I	0.82	67~130	24.6/cc	24	
15	J	0.73	64~128	1.5/ cc	24	
16	K	0.91	77~130	2.7/ cc	24	
17	L	0.97	76~129	4.9/ cc	24	
18	M	1.11	72~140	1.1/ cc	24	
19	N	1.47	72~235	4.4/ cc	24	
20	O	1.06	80.6~126.7	15.2	20	
21	P	1.27	68~254	5.7/cc	24	
22	Q	0.75	46~132	0.8/cc	24	
23	R	1.15	69~239	1.2/cc	24	
24	S	0.96	80~123	1.0/cc	24	

Note: The temperature of Experiments No. 1~12 is $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses 2:1 is adopted.

The temperature of Experiments No. 13~24 is $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses is 2:1.2 adopted.

△: The experiment was unsuitable, for the percentage of convulsed mice was either less 15% or over 85%.

*: 4.2 units/mg by the rabbit method.

** : 4.5 units/mg by the rabbit method.

2. NPHインシュリンの単位検定：NPHインシュリン14種について行つた検定成績をTable 2に示す。

注射液は鹽酸でpH約3とし、澄明な液としたものを使つた。

Table 2. Results of Assay for NPH Insulin Injection (2 and 2 Dose Assay)

No.	Sample	According to B. P. VIII		Unit/cc	Mouse Number in group	Remark
		Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)			
1	1605-585703: L40u	1.15	71~153	46	24	
2	2M-11896A*: S40u	0.62	62~144	25	24	
3	3626-585703: L40u	1.18	77~141	47	25	△
4	8153-585913: L40u	0.91	59~113	32	20	△
5	8153-585913: L40u	1.13	77~134	45	20	△
6	6041-585713: L40u	1.12	73~145	45	20	△
7	2077-585316: L80u	0.95	52~180	76	20	
8	7038-585503: L40u	0.86	54~159	34	20	
9	2547-587113: L40u	0.85	64~142	34	23	
10	502039 : T40u	1.20	73~150	48	24	△
11	4332-591103: L40u	1.25	71~197	50	24	
12	2068-597706: L80u	1.11	71~159	89	24	
13	3011-600513: L40u	1.12	76~151	44.8	24	
14	3008-600506: L80u	0.97	66~146	77.6	24	

Note: The temperature of Experiment No. 1—10 is $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses is 2:1 adopted.

The temperature of Experiment No. 11—14 is $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses is 2 : 1. 2 adopted.

△ The experiment was unsuitable, for the percentage of convulsed mice was either less 15% or over 85%.

* 44 units/cc by the rabbit method.

3. グロビン・亜鉛・インシュリン注射液の単位検定: 本品の単位検定には英局VIII¹⁹⁾では, その英局標準品との比較法を採用し, Stewart, Smart²⁰⁾はモルモットによる持続試験法を報告しているが, 通常のインシュリン標準品を用いてどの程度まで単位の比較検定ができるかを試験した1例を Table 3 に示した.

Table 3. Result of Assay for Globin Zinc Insulin Injection (2 and 2 Dose Assay)

Sample	According to B. P. VIII		Unit/cc	Number of mouse in Group
	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error %		
G-283A 40u	0.96	71~138	38	24

Note: The temperature of Experiment is $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses : 2:1.

4. 実験温度, 用量比及び1群中のマウス数が2—2用量検定の“誤差の信頼限界”に与える影響: 実験温度 $33^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$, 用量比2:1, 1群中のマウス数20~24匹で行った20回以上の実験で得た誤差の信頼限界は, よい例で71.1~134%, 悪い例で55.0~44.38%であった. Table 4 にそのよい例を, 第5表に悪い例を示す.

Table 4. Experiment at 33°C (Dose Ratio is 2:1) (According to B. P. VIII)

Samle	Dose		Number of animals (n)	Number of convulsed animals (r)	Percentage of convulsion P (%)	Probit (Y)	Weight factor (w)
	cc	unit					
J. P. Insulin Standard	0.35	0.047	24	6	25	4.33	0.540
	0.35	0.095	24	16	67	5.44	0.593
Insulin powder from whale	0.35	0.0055mg	24	3	13	3.87	0.395
	0.35	0.0110mg	24	16	67	5.44	0.593

$I (\log \text{Dose ratio}) = \log 2/1 = 0.3010$, $V = 0.8878$, $b = 4.45$, $M (\log \text{potency ratio}) = 1.9483$,
 $R (\text{Potency ratio}) = \text{Anti log } M = 0.8878$, $g = 0.169$
 $\log (\text{fiducial limits } \%) = 1.8517 \sim 2.1273$, Fiducial limits of error = 71.1~134.1% ($P = 0.95$)

Table 5. Experiment at 33° (Dose Ratio is 2:1) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	u					
J. P. Insulin Standard	0.35	0.047	20	6	30	4.48	0.576
	0.35	0.095	20	10	50	5.00	0.637
Insulin powder from whale	0.35	0.0057mg	20	9	45	4.87	0.632
	0.35	0.0114mg	20	15	75	5.67	0.540

$I = 0.3010$, $V = 0.0839$, $b = 2.19$, $M = 0.242$, $R = 1.746$, $g = 0.741$

$\log (\text{fiducial limits } \%) = 1.7402 \sim 3.6472$, Fiducial limits of error = 55.0~4438% ($P = 0.95$)

実験温度 $35^\circ \pm 0.5^\circ$, 用量比 2:1, 1群中のマウス数 20~24 匹で行った実験ではその誤差の信頼限界は、よい例で 73.1~150%, 悪い例で 4.6~127% であった。Table 6 によい例を, Table 7 に悪い例を示す。なお後述の Table 9 も参照されたい。

Table 6. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2:1) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J. P. Insulin Standard	0.35	0.026	24	13	54	5.10	0.634
	0.35	0.052	24	20	83	5.95	0.455
NPH-Insulin Injection	0.35	0.026	24	12	50	5.00	0.637
	0.35	0.052	24	23	96	6.75	0.194

$I = 0.3010$, $V = 0.0868$, $b = 4.32$, $M = 0.081$, $R = 1.205$, $g = 0.198$

$\log (\text{fiducial limits } \%) = 1.8641 \sim 2.1757$, Fiducial limits of error = 73.1~149.8% ($P = 0.95$)

Table 7. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2:1) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J. P. Insulin Standard	0.35	0.026	20	8	40	4.75	0.618
	0.35	0.052	20	13	65	5.39	0.603
NPH-Insulin Injection	0.35	0.026	20	12	60	5.25	0.623
	0.35	0.052	20	14	70	5.52	0.578

$I = 0.3010$, $V = 0.0826$, $b = 1.53$, $M = 0.2091$, $R = 1.618$, $g = 1.509$

$\log (\text{fiducial limits } \%) = 0.6584 \sim 2.102$; Fiducial limits of error = 4.6~127% ($P = 0.95$)

即ち温度を高くすれば誤差の信頼限界の上・下限の巾が小さくなることを知った。

実験温度 $35^\circ \pm 0.5^\circ$, 用量比 2:1.2, 1群中のマウス数 24 匹で行った実験では、英局 VII 規定の誤差の信頼限界 80~125% ($P = 0.95$) 内に入る結果が得られた。Table 8 にその結果を示す。

Table 8. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2 : 1.2) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.35	0.42	24	15	63	5.33	0.611
Standard	0.35	0.72	24	21	88	6.18	0.377
J.P. Insulin	0.35	0.35	24	8	29	4.45	0.570
Standard	0.35	0.59	24	23	96	6.75	0.194

$I=0.2219$, $V=0.095$, $b=7.12$, $M=\bar{1}.9775$, $R=0.950$, $g=0.146$

$\log$ (fiducial limit %) = $1.9038 \sim 2.0884$, Fiducial limits of error = $80.1 \sim 122.6\%$ ($P=0.95$)

1群中のマウス数を52匹として行つた実験結果を Table 9 に示す.

Table 9. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2 : 1.2) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.25	0.060	52	11	21	4.79	0.500
Standard	0.25	0.100	52	31	60	5.25	0.621
J.P. Insulin	0.25	0.066	52	14	27	4.39	0.581
Standard	0.25	0.110	52	34	65	5.39	0.602

$I=0.2219$, $V=0.0334$, $b=4.64$, $M=0.0366$, $R=1.087$

$g=0.121$, $\log$ (fiducial limits %) = $1.9214 \sim 2.0886$

Fiducial limits of error = $83.4 \sim 122.7\%$

5. 3-3用量検定 次に同一用量を用い, 用量比2 : 1.2, 1群中のマウス数30匹で, 実験温度を30°及び35°で行つた3-3用量検定結果をそれぞれ Table 10 及び Table 11 に示す. 両表から明かなように30°ではケイレンを起す率が小さく, 更に用量の増加をしなければ検定できないが, 35°ではよい結果を与えることが分る, Fig. 1 参照). 3-3 用量検定の計算法については Gaddum²¹⁾が報告している簡便法によつた.

Table 10. Experiment at 30° (Dose Ratio is 2:1.2)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.25	0.025	30	6	20		
Standard	0.25	0.015	30	0	0		
(I)	0.25	0.009	30	0	0		
J.P. Insulin	0.25	0.0275	30	7	23		
Standard	0.25	0.0165	30	2	7		
(II)	0.25	0.0099	30	0	0		

Table 11. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2:1.2) (According to Gaddum²¹⁾)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.25	0.025	30	21	70	5.52	0.576
Standard	0.25	0.015	30	12	40	4.75	0.622
I	0.25	0.009	30	6	20	4.16	0.473

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.25	0.0275	31	23	74	5.64	0.548
Standard	0.25	0.0165	30	9	30	4.48	0.576
II	0.25	0.0099	30	7	23	4.26	0.508

$I = \log 2/1.2 = 0.2219$, $V = 0.0594$, $b = 3.11$, $M = 0.006$,

R (potency ratio) = Antilog $M = 1.014$.

Validity test

	Index	Variance	S.D.	t	P
Parallelism	$G = 0.01$	$V = 0.0594$	0.244	0.04	$0.9 <$
Curvature	$H_1 = 0.72$	$6V = 0.3564$	0.597	1.21	0.2~0.3
	$H_2 = 0.18$			0.30	0.7~0.8

Errors

$\lambda = 0.322$, $P = 0.95$, $t = 1.96$, $g = 0.12$

Fiducial limits of $M = 1.9544 \sim 0.0578$

Potency of J.P. Insulin Standard (II) is 101.4 (74.7~138.2) % of expected potency ($P = 0.95$).

Fiducial limits of error = 73.6~136.3%

Table 12も3-3用量検定例である。(Fig. 2参照)

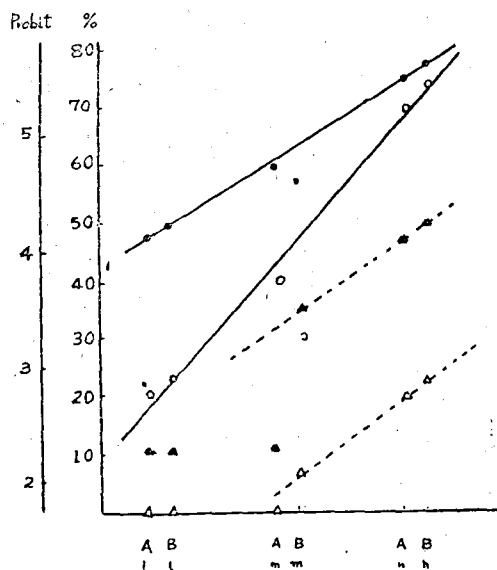


Fig. 1. From data of Table 10 and 11

— : Result at 35°
 : Result at 30°
 ●▲ : Probit ratio
 ○△ : % ratio

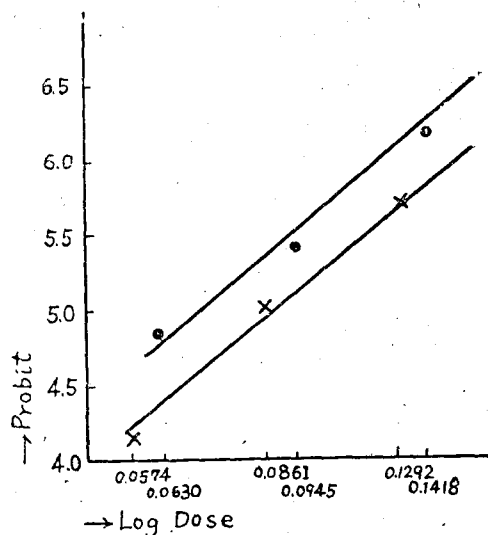


Fig. 2. From data of Table 12

● : J.P. Insulin Standard prep. I
 x : " " " " II

Table 12. 3 and 3 Dose Assay

Sample	Dose (r)	r	n	P (%)	Y	Sum	w	n × w
J. P. Insulin Standard I	0.1418 0.0945 0.0630	22 17 11	25 25 25	88 68 44	6.18 5.47 4.85	16.50	0.377 0.587 0.631	9.425 14.675 15.775
J. P. Insulin Standard II	0.1292 0.0861 0.0574	19 13 5	25 25 25	76 52 20	5.71 5.05 4.16		0.529 0.635 0.490	13.225 15.875 12.250

I=0.1761, V=0.076, b=4.09, M=0.1296

R=Antilog M=1.348

Validity test

	Index	Variance	S. D.	t	P
Parallelism	G = -0.11	V = 0.076	0.27	0.41	0.6~0.7
Curvature	H ₁ = 0.09 H ₂ = -0.23	6V = 0.432	0.66	{0.14 0.35	0.8~0.9 0.7~0.8

Errors

 $\lambda = 0.2445$, P=0.95, t=1.96, g=0.133

Fiducial limits of M=0.0282~0.2786

Potency of J. P. Insulin Standard (II) is 134.8 (106.7~190.0) % of expected potency ((P=0.95).

Fiducial limits of error=79.2~140.9%

6. 対数用量と效力線の直線性の検討及び ED50 値とその信頼限界: 日局標準品 6 用量を用い, 実験温度 $35^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$, 用量比 2 : 1.8, 1 群中のマウス数 25 匹で行った実験資料の分析結果を Table 13 に示す (Fig. 3 参照).

Table 13

Dose (unit)	log Dose $\times$ 100 (x)	Number of Mouse (n)	r	P (%)	Empirical Probit	Expected Probit (Y)	nw	y	nwx	nwy
0.0574	0.76	25	5	20	4.16	4.4	13.950	4.18	10.6020	58.3110
0.0630	0.80	25	11	44	4.85	4.6	15.025	4.86	12.0200	73.0215
0.0861	0.94	25	13	52	5.05	5.2	15.675	5.05	14.7345	79.1588
0.0945	0.98	25	17	68	5.47	5.3	15.400	5.46	15.0920	84.0840
0.1292	1.11	25	19	76	5.71	5.9	11.775	5.69	13.0703	66.9998
0.1418	1.15	25	22	88	6.18	6.0	10.975	6.16	12.6213	67.6060
Total							82.800		78.1401	429.1811

 $1/S_{nw} = 1/82.8 = 0.0120773$; $\bar{x} = 78.1401/82.8 = 0.9437$ $\bar{y} = 429.1811/82.8 = 5.1833$.

S_{nwx}^2	S_{nwy}^2
75.3366	2255.1569
73.7425	2224.5954
$S_{xx} = 1.5941$	$S_{yy} = 30.5615$
$S_{xy} = 6.6349$	27.6155

*
 $2.9460 \leftarrow \chi^2_{(4)}$. $b = S_{xy}/S_{xx} = 4.1612$; $V(b) = 1/S_{xx} = 0.6273$

The Regression equation is

$$Y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) = 4.162x + 1.356$$

$$\log ED50 = \bar{x} + \frac{5 - \bar{y}}{b} = 0.8997$$

$$\therefore ED50 = 0.0794 \text{ unit } (=3.78\gamma)$$

$$g = t^2(Vb)/b^2 = \frac{(1.96)^2 \times 0.6273}{(4.1621)^2} = 0.139$$

$$\log \text{fiducial limits } (g > 0.1) =$$

$$x + \frac{g}{1-g}(x - \bar{x}) \pm \frac{t}{b(1-g)} \sqrt{\frac{1-g}{S_{nw}} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

$$= 0.8926 \pm 0.059 = 0.8336 \sim 0.9516$$

$$\text{Fiducial limits} = 0.0682 \sim 0.0895u (=3.25 \sim 4.26\gamma)$$

$$\therefore \text{Fiducial limits of error} = 85.9 \sim 119.8\%$$

Note : * As the value of $\chi^2_{(4)}$ ($P=0.95$) does not exceed 9.5, there is no suspicion of non-linearity.

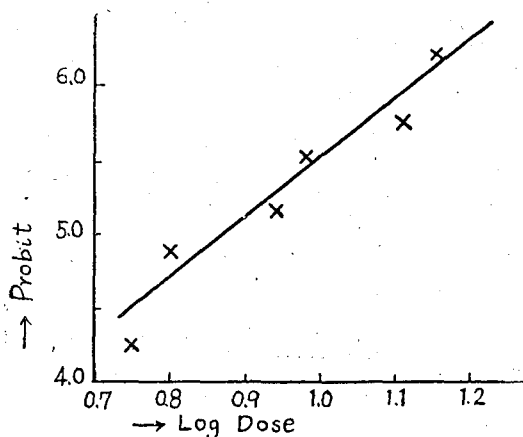


Fig 3. From Data of Table 13

を示す範囲外にあるので、Probit 変換、重み補正をしないで、log 法によつて計算すれば却つて真の値0.83に近い0.89という値が得られる。規定の信頼限界内に入れるためには1群中のマウス数を52匹(合計208匹)に増加すれば、一層容易となる (Table 9参照)。

2. 3-3用量検定を行えば、一層正確な検定ができる。

3. 日局標準品6用量を用いてED50値及びその信頼限界を求めると、ED50=0.0794単位(=3.78 γ)、信頼限界=85.9~119.8% ($P=0.95$)であつた。

4. 以上の結果からインシュリンの検定、特に予試験として、マウスのケイレン法を採用できることを知った。ただし純度の低い検体では家兎法に比して大きな値を与えるような結果を示すことを注意しなければならない。

考察とむすび

1 誤差限界 生物学的検定法では標準品を用いて、それと検体とを比較検定し、標準品の量又は標準品の一定重量で規定された単位によつて検体量又はその効価をあらわす。この際の誤差は従来大体 $\pm 20\%$ 以内のものを検定法として採用するのが通例であつた。近代統計学の適用によつて、現在の目標は、例えば英局VIIIでは一般に誤差の信頼限界=80~125% ($P=0.95$)を要求している。著者等の実験によると、高用量と低用量の比が英局のように2:1では信頼限界内に入ることは困難であるので、その比を2:1.2として、しかも実験温度35°として始めて至適に近い信頼限界が得られる (Table 8)。しかしこの実験ではケイレン率が85%以上である、88%又は96%というような正規分布

文 献

- 1) 日局 (厚生省版), 59. 2) 米局 XIV. 29. 3) 国局. 4) 英局 VIII. 278, 817. 5) A. M. Hemmingsen, A. Krogh : Pubs. League of Nations III, Health, III, C. H. 398 (1926). 6) A. M. Hemmingsen : Quart. J. Pharm. Pharmacol. 6, 39, 187 (1933). 7) A. M. Hemmingsen : Quart. Bull. Health Organisation 5, League of Nations, Geneva, 589 (1936). 8) J. H. Gaddum : Med. Research Council (British) Special Repts. Ser. No. 183 (1933). 9) H. P. Marks, C. k. : Quart. Bull. Health Organisation, 5, League of Nations, Geneva, 631 (1936). 10) C. I. Bliss : Ann. Appl. Biol. 22, 134, 307 (1935). 11) H. P. Marks : Quart. J. Pharm. Pharmacol., 13, 344 (1940). 12) 英局 VIII. 788. 13) J. H. Burn, D. J. Finney,

L. G. Goodwin: Biol. Standardization, Oxford Univ. Press (1950). 15) D. J. Finney: Statistical Method in Biological Assay, C. Griffin (1952). 15) C. W. Emmens: Principles of Bioassay, Chapman Hall (1948); Hormone assay, Academic Press (1950). 16) C. I. Bliss: Statistics of Bioassay, Academic Press (1952). 17) P. Gyoergy: Vitamin Method II., Academic Press (1951). 18) Y. Ito, B. Tamaoki and H. Sakamoto: Pharm. Bull 1, 236 (1953) 19) 英局 VIII, 819 (1953). 20) G. A. Stewart, J. V. Smart: J. Pharm. Pharmacol., 5, 939 (1953). 21) J. H. Gaddum: J. Pharm. Pharmacol., 5, 345 (1953).

Summary

1. The assays can be carried out within the limits of error 80~125% ($P=0.95$) in a (2 and 2) dose assay when the temperature of the experiments is 35°C, using 24 mice per group (96 mice in all), adopting 2:1.2 of the ratio of doses. If 52 mice per group (208 mice in all) are used, the assay may with ease be carried out within the above-mentioned limits of error. 2. A 3 and 3 dose assay is carried out with more accuracy than a 2 and 2 dose assay. 3. $ED_{50}=0.0794$ units ($=3.78\gamma$) was calculated, from 6 dose levels for J. P. Insulin Standard Preparation (the limits of error is 85.9~119.8 %, $P=0.95$). 4. These data showed that the mouse method may be adopted in the assay of insulin, especially as its preliminary test. But it should be remembered that this mouse method gives a higher value than the rabbit method when the samples are in low purity.

In Japan, authors have been assay¹⁸⁾ing imported NPH Insulin Injection by mouse method since 1952. Ito, Tamaoki and Sakamoto reported in 1953 on the mouse method of assaying insulin, but their result is unsatisfactory, for the fiducial limits of error is larger than that of B.P. regulation.

Received April 20, 1954

ジギタリスの検定 (第1報)*

標準粉末 (日局標準品) の力価検定について

長沢 佳熊, 中山 豪一, 越村 栄之助, 芹沢 淳,
佐藤 浩, 伊藤 顕, 岡崎 正彦

On Digitalis Assay (1)

The Assay of the Japanese Pharmacopoeia Standard

by Frog and Pigeon Methods

By Kakuma NAGASAWA, Gōichi NAKAYAMA, Einosuke KOSHIMURA,

Jun SERIZAWA, Hiroshi SATŌ, Akira ITŌ and Masahiko OKAZAKI

まえがき 日局ジギタリス標準品 (以下 NSt と略する) を調製する目的で、藤沢、三共、武田三社製ジギタリス末及びジギタリスのアルコール抽出残留物を混合し、国際標準品 (以下 Ist と略する)、米局標準品 (以下 ASt と略する) を用いて、その効価比を蛙法及び鳩法により検定したのでその結果を報告する。

標準品 ジギタリスの生理単位を設定するため、1926 年国際連盟保健部は Magnus の調製した乾燥ジギタリス葉末 (*Digitalis Purpurea* L.) を標準品とし、その 0.1g の力価を 1 単位として採用し、英国の国立医学研究所 National Institute For Medical Research が保管し、その 1 部を各国の中央研究所に配布した。1936 年国際連盟保健部生物学的検定法常設委員会は英国の標準品を新しい国際標準品として採用し、その効力を 1926 年の標準品の 1.25 倍、即ち 0.08g の有する効力を 1 単位とした。1949 年第 3 回目の国際標準品が新しく設定され、その 0.076g の有する効力を 1 単位とし、現在に至っている。この新国際標準品は各国の 16 ヶ所の実験室で検定された。

吾国では内務省東京衛生試験所 (当国立衛生試験所の前身) は昭和 5 年国際標準品の送附を受け、伊東氏等¹⁾ がその報告を行つた。戦後当所は G. H. Q. の P. H. W. の Mr. Pain の助力により、昭和 25 年米局参考標準品を購入し、昭和 27 年 8 月英国国立医学研究所の Dr. W. L. M. Perry の厚意により、新国際標準品の送附を受け、当所に保管してある。

検定法 ジギタリスの検定法には猫法²⁾、蛙法³⁾、モルモット法⁴⁾、鳩法⁵⁾がある。この内猫法の結果は臨床の効力とよく一致するといわれているが、所要数の猫を集めることが困難である。英国ではモルモット法を、米国では鳩法を広く採用している。吾国では蛙法が最も一般的に用いられ⁶⁾、日局Ⅵでも蛙法を採用している。国局、英局では上記 4 法を採用しているが、米局では鳩法のみを収載している。日局Ⅵに採用している蛙法は 4 時間観察法であるが、使用蛙数が少く、統計学的処理が全く不可能である。近代統計学を生物学的検定法に応用する場合、ジギタリスの検定は皆無型反応の応用例として、インシュリンのマウス・ケイレン法による検定法と共に進歩の中心をなしたにも拘らず、吾国では未だこの報告がなされていない。

実験方法 A. 標準液及び検液の調製法 1) ソクスレット法: ジギタリス標準品の適当量を精密に秤り、ソクスレット抽出器に入れ、ジギタリス粉末 1g につき無水アルコール約 25cc を加え、加熱還流して 6 時間抽出した後、アルコールを留去し、粉末 1g につき 5 cc 容量に濃縮し、メスシリンダに移し、粉末 1g が 10cc に含まれるように水で稀め、乾燥した硬質ガラス容器に移し、密栓し 5° ～ 5° で貯え、調製後 1 カ月以内に使用する。検液も同様にして調製する。

2) ふりませ法: ジギタリス標準品の適当量を精密に秤り、硬質共栓瓶に入れ、粉末 1g につき 80% アルコール 10 cc を加える。栓には上部 1/3 に軟質パラフィンを塗布し、密栓した後 20 ～ 30° で 24 時間ふりまぜる。混合物を直ちに遠心分離し、上澄液は密栓した硬質容器に入れ、5° ～ 5° で貯え、調製後 1 ヶ月以内に使用する。検液も同様にして調製する。

* 昭 28. 10 月日本薬学会東京例会に一部を発表した。

B. 蛙法 健康な雄トノサマカエルを用い、購入後22°の恒温室内に少くとも2日間放置し、この間1日2回水を取換える。試験当日蛙の皮膚表面の水分をガーゼでぬぐつた後、0.5gまで精密に秤量する。試験に用いる蛙の体重は15g~30gとする。標準液と検液(註:ソクスレット法で調製したもの)は、試験当日0.6W/V%塩化ナトリウム液で適当に稀め、注射は大腿部淋巴囊を経て腹部淋巴囊内に行い、注射後1, 2, 3, 4, 5, 6時間及び翌朝の7回観察し、各時間の終りの蛙の死亡数を記録する。使用した蛙は1群20~30匹とし、6~8群を用い、標準稀釈液及び検体稀釈液はそれぞれ3~4用量(各用量比は同じ)とする。試験結果は英局Ⅶ法⁶⁾及びGaddum⁷⁾の計算法に準拠して処理し、効価比及び誤差の信頼限界を求める。

C 鳩法 健康な成熟鳩を用い、体重の最も重い鳩でも最も軽いものの2倍を超えないように選ぶ。できるだけ雄を用いたが鳩の性別の判定は実際には困難である。恥骨の間が狭いものは雄であり、広いものは雌であるといわれているが、間違え易い。鳩は2群に分け、各群6羽以上の平均体重間の差は1.3:1以上に違わないように割当る。試験前日午後4時30分に水以外の食餌を取去り、翌朝22°の恒温室で実験を行う。鳩は横臥位に固定し、一方の翼を自由にしておき、先ず翼下静脈を露出する。血管は脆弱であるが確実に分離しないと第2回以後の注射が困難となる。著者等は最初軽くエーテル麻酔を行つた後、注射を始めたこともあるが、現在は無麻酔で行っている。注射筒は0.5ccのもので、0.01cc目盛のものを用い、ツベルクリン用注射針を用いた。殆んど注射出来ない程血管が細くなつたときは、注射部位の根元を指で軽く打てば、拡張する。注射は5分間隔で行い、注射後は脱脂綿で圧迫して止血する。往々止血困難な場合があるが、このようなときは加熱した生理食塩液に浸し、固く絞つた脱脂綿で圧迫するとよい。慣れれば1人で6羽の注射が可能である。注射回数が増すにつれ、鳩は嘔吐、排便をするから、その都度記録する。注射cc数は鳩体重1kgにつき1ccとし、鳩が死亡するまでの平均注射回数は13回以上、19回以下で、注射回数の最小のものと最大のものとは4回以上違つてはならない。試験結果は米局XIV法⁸⁾及び英局Ⅶ法⁶⁾で計算し、効価比及び標準誤差又は信頼限界を得る。

実験結果 A. 蛙法による実験 1) NStとIStの効価の比較: Table 1に2-2用量検定の計算例を示す。Table 2は2-2用量検定成績を示す。

Table 1. 2 and 2 Dose Assay

		Doses (mg)	Number of frogs in group (n)	Number of frog killed in group (r)	Percentage of frogs killed %	Probit	Weight factor (w)	nw
NSt	T ₁	0.23	28	8	29	4.45	0.569	15.932
	T ₂	0.26	28	19	68	5.47	0.587	16.436
ISt	S ₁	0.17	28	11	39	4.72	0.617	17.276
	S ₂	0.20	28	16	57	5.18	0.629	17.612

$$\sum nw \rightarrow 67.256$$

$$I (\log \text{ dose ratio}) = \log 1.15 = 0.0607, V = 4/67.256 = 0.0595$$

$$E = \{(5.47 - 4.45) + (5.18 - 4.72)\} / 2 = 0.74, b = \frac{0.74}{0.0607} = 12.19$$

$$F = \{(5.47 + 4.45) - (5.18 + 4.72)\} / 2 = 0.01, M = \frac{0.01}{12.19} = 0.0008$$

$$R (\text{Potency ratio}) = 1.002$$

$$A (= V) = 0.0595, B = \frac{0.0595}{0.0607^2} = 16.17$$

$$g = \frac{16.17 \times 1.96^2}{12.19^2} = 0.418$$

$$\log (\text{fiducial limits } \%) = 2 + \frac{0.418 \times 0.0008}{1 - 0.418} \pm \frac{1.96}{12.19 \times (1 - 0.418)} \sqrt{0.0595 \times (1 - 0.418) + 16.17 \times 0.0008^2}$$

Note: * is square of t value (degrees of freedom ∞ , $P=0.95$).

$$=2.0006 \pm 0.0514$$

$$=1.9492 \sim 2.052$$

Error of fiducial limits = 89.0 ~ 112.7%

Table 2. The Results of 2 and 2 Dose Assay (NSt/ISt)

Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)	unit/g	Mean potency ratio, ($\bar{R}$)	Weight factor (w)	Weighted $\bar{R}$ Antilog $\bar{M}\bar{W}$
4 hours	1.038 1.017 0.939 0.961 0.979 1.011 1.002 1.073 1.038 0.948	93.3~109.6 91.1~111.8 70.8~112.9 90.0~107.6 90.1~110.5 90.5~111.9 89.0~112.7 87.7~118.1 87.3~116.5 80.6~111.2	10.4 10.1 9.4 9.6 9.7 10.1 9.9 10.7 10.3 8.3	Mean potency ratio = 1.001 Fiducial limits of error = 87.0 ~ 112.3% 9.9 u/g	4493 3059 1625 3617 2204 2859 2501 1213 1237 3972	1.001
5 hours	1.019 0.998 0.980 0.956 0.947 0.972 0.983 1.074	94.5~106.6 92.5~108.2 98.4~113.1 91.9~106.5 85.5~112.9 90.7~109.6 87.3~113.9 90.1~113.0	10.2 9.9 9.8 9.5 9.4 9.7 9.8 10.7	Mean potency ratio = 0.991 F. l. of error = 91.4 ~ 110.5% 9.9 u/g	6597 4324 1908 4351 1252 2547 1362 1864	0.994
6 hours	0.994 0.967 1.051 0.962 0.956 0.959 1.051 1.061	93.9~106.3 89.7~110.5 90.6~111.8 90.3~109.7 83.2~112.0 92.3~106.6 88.4~115.4 91.7~110.3	9.9 9.6 10.5 9.6 9.5 9.6 10.5 10.6	Mean potency ratio = 1.000 F. l. of error = 90.0 ~ 110.3% 10.0 u/g	6388 2147 2142 2432 1886 5080 1432 2727	0.993
Next morning	0.988 0.989 0.964 0.967 1.062 0.973 1.050 1.065 1.035	93.4~106.4 89.4~111.5 85.2~116.6 92.0~107.1 90.5~113.3 90.2~110.3 84.3~155.7 90.4~112.4 88.7~114.1	9.9 9.8 9.6 9.6 10.6 9.7 10.4 10.6 10.3	Mean potency ratio = 1.010 F. l. of error = 89.3 ~ 116.4% 10.1 u/g	5903 1919 1643 4570 2029 2295 1120 2055 1545	1.004

Table 3. は3-3用量検定の計算例を示し, Table 4. はその成績を示す.

Table 3. 3 and 3 Dose Assay

		Doses (mg)	Number of frogs in group (n)	Number of frogs killed in group (r)	Percentage of frogs killed (%)	Probit	Sum	Weight factor (w)	nw
NSt	T ₁	0.20	28	6	21	4.19	14.11	0.500	14.000
	T ₂	0.23	28	8	29	4.45		0.570	15.960
	T ₃	0.26	28	19	68	5.47		0.587	16.436
ISt	S ₁	0.15	28	6	21	4.19	14.09	0.500	14.000
	S ₂	0.17	28	11	39	4.72		0.618	17.304
	S ₃	0.20	28	16	57	5.18		0.628	17.584

Difference = 0.02

$\Sigma nw = 95.284$

$$V=6/95.284=0.063; \quad F=0.02/3=0.01$$

$$T_3-T_1=5.47-4.19=1.28 \quad \left. \begin{array}{l} \text{Sum } 2.27 \div 4 = 0.57 \cdots \cdots E \\ \text{Diff. } 0.29 \div 2 = 0.145 \cdots \cdots G \end{array} \right\}$$

$$S_3-S_1=5.18-4.19=0.99$$

$$T_3+T_1-2T_2=5.47+4.19-8.90=0.76 \cdots \cdots H_1$$

$$S_3+S_1-2S_2=5.18+4.19-9.44=-0.07 \cdots \cdots H_2$$

$$I (\log \text{ dose ratio}) = 0.0607; \quad b = E/I = 9.4; \quad M (\log \text{ potency ratio}) = F/b = 0.0011;$$

$$R (\text{Potency ratio}) = \text{Antilog} M = 1.002.$$

Validity test

	Index	Variance	S. D. *	t**	P***
Parallelism	G=0.145	V=0.063	0.251	0.60	0.5~0.6
Curvature	H ₁ =0.76 H ₂ =-0.07	6V=0.378	0.615	$\left\{ \begin{array}{l} 1.24 \\ 0.11 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.2 \sim 0.3 \\ 0.9 < \end{array} \right.$

Errors

$$\lambda = 1/b = 0.11; \quad P = 0.95; \quad t = 1.96$$

$$A = 2V/3 = 0.042; \quad V(b) = V/4I^2 = 4.30; \quad g = V(b)t^2/b^2 = 0.186$$

$$\begin{aligned} \text{Fiducial limits of } M &= \frac{0.0011}{1-0.186} \pm \frac{1.96}{9.4 \times (1-0.186)} \sqrt{0.042(1-0.186) + 4.30 \times 0.0011^2} \\ &= 0.0014 \pm 0.0474 \\ &= 1.9540 \sim 0.0488 \end{aligned}$$

$$\text{Fiducial limits of error} = 89.8 \sim 111.7\%$$

Table 4. The Results of 3 and 3 Dose Assay (NSt/IST)

Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)	Parallelism		Curvature		u/g	Mean potency ratio, (R)	Weight factor (w)	Weighted R Antilog MW
			t	P	t	P				
4 hours	1.014	90.9~112.8	0.56	0.5 ~0.6	$\left\{ \begin{array}{l} 0.41 \\ 1.69 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.6 \sim 0.7 \\ 0.05 \sim 0.1 \end{array} \right.$	10.0	Mean potency ratio = 0.981 (F.I. of error = 90.3~110.6%) 9.7 u/g	2380	0.975
	0.954	86.2~105.0	1.47	0.1 ~0.2	$\left\{ \begin{array}{l} 2.12 \\ 1.64 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.02 \sim 0.05 \\ 0.1 \sim 0.2 \end{array} \right.$	9.4		2972	
	0.974	87.4~112.7	1.33	0.1 ~0.2	$\left\{ \begin{array}{l} 0.09 \\ 0.15 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.9 < \\ 0.8 \sim 0.9 \end{array} \right.$	9.6		1527	
	0.927	99.2~107.7	1.43	0.1 ~0.2	$\left\{ \begin{array}{l} 0.10 \\ 0.27 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.9 < \\ 0.7 \sim 0.8 \end{array} \right.$	9.2		2957	
	1.002	89.8~111.7	0.60	0.5 ~0.6	$\left\{ \begin{array}{l} 1.24 \\ 0.11 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.2 \sim 0.3 \\ 0.9 < \end{array} \right.$	9.9		1893	
	1.023	89.8~113.1	0.53	0.5 ~0.6	$\left\{ \begin{array}{l} 1.68 \\ 0.12 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.05 \sim 0.1 \\ 0.9 < \end{array} \right.$	10.1		1351	
	0.974	88.5~111.5	1.24	0.2 ~0.3	$\left\{ \begin{array}{l} 0.30 \\ 0.28 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.7 \sim 0.8 \\ 0.7 \sim 0.8 \end{array} \right.$	9.6		1414	
5 hours	0.997	92.9~107.7	1.69	0.05~0.1	$\left\{ \begin{array}{l} 1.20 \\ 1.29 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.2 \sim 0.3 \\ 0.1 \sim 0.2 \end{array} \right.$	9.9	Mean potency ratio = 0.970 (F.I. of error = 92.0~108.5%) 9.6 u/g	2931	0.959
	0.930	93.4~106.1	2.82	0.001~0.01	$\left\{ \begin{array}{l} 1.68 \\ 1.29 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.05 \sim 0.1 \\ 0.1 \sim 0.2 \end{array} \right.$	9.2		3997	
	0.976	93.7~107.4	1.37	0.1 ~0.2	$\left\{ \begin{array}{l} 0.78 \\ 0.59 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.4 \sim 0.5 \\ 0.5 \sim 0.6 \end{array} \right.$	9.7		3177	
	1.014	90.1~111.5	1.33	0.1 ~0.2	$\left\{ \begin{array}{l} 0.34 \\ 0.63 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.7 \sim 0.8 \\ 0.5 \sim 0.6 \end{array} \right.$	10.0		1414	
	0.990	89.5~111.1	0.84	0.05~0.1	$\left\{ \begin{array}{l} 1.85 \\ 0.77 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.05 \sim 0.1 \\ 0.4 \sim 0.5 \end{array} \right.$	9.8		1489	
	1.032	93.7~108.6	1.15	0.2 ~0.3	$\left\{ \begin{array}{l} 2.50 \\ 0.73 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.01 \sim 0.02 \\ 0.4 \sim 0.5 \end{array} \right.$	10.2		2795	
	0.850	90.8~107.0	0.27	0.7 ~0.8	$\left\{ \begin{array}{l} 0.63 \\ 2.36 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.5 \sim 0.6 \\ 0.01 \sim 0.02 \end{array} \right.$	8.4		3073	

* Standard deviation = G/V , H_1 or $H_2/6V$

** From t-distribution table

*** Probability

6 hours	0.903	91.5~107.1	2.58	0.001~0.01	2.68 1.56	0.001~0.01 0.1 ~0.2	Mean potency ratio = 0.957 (F.I. of error = 92.4~ 107.5%) 95u/g	1866	0.950
	0.974	92.9~107.0	0.71	0.4 ~0.5	1.42 1.66	0.1 ~0.2 0.05~0.1			
	0.981	94.3~105.7	1.87	0.05~0.1	1.70 0.86	0.05~0.1 0.3 ~0.4			
	1.008	92.7~108.1	1.03	0.3 ~0.4	1.36 0.73	0.1 ~0.2 0.4 ~0.5			
	1.020	91.7~109.7	0.25	0.8 ~0.9	2.00 0.72	0.02~0.05 0.4 ~0.5			
	1.078	93.4~108.6	1.44	0.1 ~0.2	1.58 0.68	0.1 ~0.2 0.4 ~0.5			
	0.846	91.1~107.0	0.71	0.4 ~0.5	1.07 2.49	0.2 ~0.3 0.01~0.02			
	0.853	91.7~106.6	0.59	0.5 ~0.6	0.20 1.85	0.8 ~0.9 0.05~0.1			
Next morning	0.936	93.7~105.7	3.46	0.001>	3.29 1.68	0.001~0.01 0.05~0.1	Mean potency ratio = 0.984 (F.I. of error = 92.6~ 107.8%) 9.7 u/g	3964	0.960
	0.982	92.3~107.8	0.18	0.8 ~0.9	1.86 1.23	0.05~0.1 0.1 ~0.2			
	1.014	92.5~108.4	0.87	0.3 ~0.4	1.51 0.73	0.1 ~0.2 0.4 ~0.5			
	0.983	92.7~107.4	1.27	0.2 ~0.3	1.25 0.73	0.2 ~0.3 0.4 ~0.5			
	1.073	93.1~108.9	1.64	0.1 ~0.2	1.34 0.55	0.1 ~0.2 0.5 ~0.6			
	1.041	91.9~110.2	0.25	0.8 ~0.9	1.11 0.57	0.2 ~0.3 0.5 ~0.6			
	0.858	91.9~106.5	0.61	0.5 ~0.6	0.67 1.68	0.5 ~0.6 0.05~0.1			

2) NSt と ASt の効価の比較: Table 5 に 2-2 用量検定成績を, Table 6 に 3-3 用量検定成績を示す。

Table 5. The Results of 2 and 2 Dose Assay (NSt/ASt)

Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)	unit/g	Mean potency ratio, (K)	Weight factor (w)	Weighted R Antilog MW
4 hours	1.923	88.9~118.1	10.2	Mean potency ratio=0.992 F.I. of error = 89.9~112.4% 9.9 u/g	2262	0.999
	0.995	94.5~106.8	10.0		6727	
	0.968	94.4~107.4	9.7		6285	
	0.978	90.0~110.6	9.8		2171	
	0.956	89.6~110.4	9.6		2176	
	0.966	88.9~111.2	9.7		1727	
	0.967	88.2~112.1	9.7		1677	
	1.056	90.8~112.0	10.6		2260	
	1.023	91.4~122.7	10.2		3098	
	1.007	93.4~107.4	10.1		5678	
	0.923	87.5~115.5	9.2		2230	
	0.913	83.8~114.3	9.1		1171	
	0.996	86.8~115.0	10.0		1136	
	1.007	92.3~108.9	10.1		3928	
	1.105	88.0~117.6	11.1		1283	
5 hours	0.957	91.1~107.4	9.6	Mean potency ratio=1.030 F.I. of error = 89.3~112.3% 10.0 u/g	4149	0.998
	1.053	86.8~118.5	10.5		1110	
	1.013	90.9~110.4	10.1		2428	
	0.995	91.2~109.5	9.9		2632	
	0.920	89.5~109.9	9.2		2292	
	0.951	87.9~111.9	9.5		1685	
	1.023	89.8~116.6	10.2		3251	
	1.033	93.9~108.2	10.3		5121	
	1.049	89.1~113.2	10.4		1578	
	0.966	84.7~117.0	9.7		1923	
	0.966	89.7~110.3	9.7		2248	
	1.014	90.0~113.4	10.1		2465	
	1.021	85.9~117.7	10.2		1053	
	1.040	87.8~119.2	10.4		989	
	1.027	92.6~101.1	10.3		3883	
	0.963	88.3~112.0	9.6		1685	

6 hours	1.091	86.1~123.2	10.9	Mean potency ratio=0.991 F.I. of error= 90.6~110.6% 9.9 u/g	947	0.988
	0.995	92.3~108.2	9.9		3415	
	0.969	89.6~110.7	9.7		2057	
	0.995	89.5~109.2	9.9		2961	
	0.987	90.7~110.0	9.9		2400	
	1.008	92.8~107.8	10.1		3256	
	1.013	91.6~109.2	10.1		2885	
	1.001	91.3~119.7	10.0		3442	
	0.988	90.0~110.6	9.9		2284	
	0.922	85.5~112.9	9.2		1588	
	0.937	89.4~110.3	9.4		2356	
	0.995	90.7~109.7	10.0		3298	
	0.993	89.7~111.2	9.9		2081	
	0.978	94.0~105.6	9.8		7079	
	1.017	93.9~107.4	10.2		5572	
	1.010	90.1~111.1	10.1		2120	
	0.992	92.8~107.4	9.9		4639	
	0.954	91.1~107.0	9.5		4357	
Next morning	0.969	92.9~106.4	9.7	Mean potency ratio=0.992 F.I. of error= 89.0~114.0% 9.9 u/g	5471	0.996
	0.962	89.7~108.6	9.6		3231	
	0.948	85.9~110.0	9.5		2387	
	0.957	86.1~110.5	9.6		2271	
	0.967	92.8~106.4	9.7		5393	
	1.050	90.4~111.9	10.5		2069	
	1.001	91.3~109.3	10.0		2686	
	1.024	80.8~155.2	10.2		5678	
	1.060	89.3~114.2	10.6		1608	
	0.980	90.0~110.6	9.8		2141	
	0.990	90.0~111.0	9.9		1974	

Table 6. The Results of 3 and 3 Dose Assay (NST/AS)

Time of observa- tion after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)	Parallelism		Curvature		u/g	Mean potency ratio (R)	Wei- ght fact- or (w)	Weighted R Antilog MW
			t	p	t	p				
4 hours	0.996	92.9~107.4	0.80	0.4~0.5	0.91 0.33	0.3~0.4 0.7~0.8	10.0	Mean potency ratio=0.991 (F.I. of error=90.2 ~109.3%) 9.9 u/g	2832	0.992
	0.971	96.7~103.4	1.34	0.1~0.2	0.16 1.92	0.2~0.3 0.05~0.1	9.7		2638	
	1.031	95.1~105.9	0.50	0.6~0.7	0.12 0.26	0.9< 0.7~0.8	10.3		2636	
	0.945	92.8~106.0	2.08	0.02~0.05	0.39 0.38	0.6~0.7 0.7~0.8	9.5		2121	
	0.969	76.4~118.1	0.69	0.4~0.5	0.73 0.18	0.4~0.5 0.8~0.9	9.7		431	
	1.031	90.7~111.7	1.13	0.2~0.3	1.46 0.79	0.1~0.2 0.4~0.5	10.3		1469	
5 hours	0.978	96.3~100.9	0.83	0.4~0.5	0.79 0.51	0.4~0.5 0.6~0.7	9.8	Mean potency ratio=0.966 (F.I. of error=90.7 ~107.8%) 9.7u/g	5354	0.970
	0.969	92.0~108.5	0.60	0.5~0.6	0.40 1.99	0.6~0.7 0.02~0.05	9.7		1934	
	0.885	78.7~111.3	0.75	0.4~0.5	0.68 2.05	0.4~0.5 0.02~0.05	8.9		1200	
	0.980	94.3~105.8	1.13	0.2~0.3	2.30 1.48	0.02~0.05 0.1~0.2	9.8		4495	
	0.986	93.0~107.3	2.99	0.001~0.01	2.85 2.59	0.001~0.01 0.001~0.01	9.9		3038	
	0.993	88.3~112.7	0.21	0.8~0.9	1.46 0.73	0.1~0.2 0.4~0.5	9.9		1222	
	0.962	90.9~108.8	1.42	0.1~0.2	0.99 0.56	0.3~0.4 0.5~0.6	9.6		1980	
	1.026	95.5~105.2	0.60	0.5~0.6	0.57 0.50	0.5~0.6 0.6~0.7	10.3		3277	
	0.995	90.1~105.7	0.56	0.5~0.6	0.05 0.33	0.9< 0.7~0.8	10.0		2401	

	0.870	89.9~107.8	3.69	0.001>	{1.78 0.80	0.05~0.1 0.4~0.5	8.7		2570	
	0.940	86.9~111.4	0.3	0.7~0.8	{0.48 0.98	0.6~0.7 0.3~0.4	9.4		1242	
	1.002	92.2~108.3	0.71	0.4~0.5	{1.17 1.54	0.2~0.3 0.1~0.2	10.0		2094	
6 hours	0.952	94.0~110.8	1.94	0.05~0.1	{0.52 0.71	0.6~0.7 0.4~0.5	9.5	Mean potency ratio=0.987 (F.l. of error=92.2 ~108.7%) 9.9 u/g	4691	0.978
	1.068	93.6~108.0	2.88	0.001~0.01	{0.33 1.64	0.7~0.8 0.1~0.2	10.7		3285	
	1.040	89.0~114.6	1.13	0.2~0.3	{2.10 1.85	0.02~0.05 0.05~0.1	10.4		1058	
	0.987	94.5~105.7	0.95	0.3~0.4	{1.33 0.00	0.1~0.2 0.9<	9.9		4518	
	0.987	94.1~106.0	0.33	0.7~0.8	{1.46 0.30	0.1~0.2 0.7~0.8	9.9		4263	
	0.925	92.2~107.0	2.03	0.02~0.05	{1.92 0.32	0.05~0.1 0.7~0.8	9.3		2980	
	0.983	91.8~108.3	0.61	0.5~0.6	{1.49 0.34	0.1~0.2 0.7~0.8	9.8		2245	
	0.992	93.6~106.7	2.25	0.02~0.05	{0.56 0.32	0.5~0.6 0.7~0.8	9.9		3365	
	0.839	90.1~107.3	1.70	0.2~0.3	{0.10 0.53	0.9< 0.5~0.6	8.4		3171	
	1.058	93.5~108.1	1.08	0.2~0.3	{0.07 0.38	0.9< 0.7~0.8	10.6		2951	
	1.011	91.6~109.6	0.97	0.3~0.4	{0.92 0.04	0.3~0.4 0.9<	10.1		1910	
	0.941	92.5~106.9	2.60	0.001~0.01	{0.28 0.15	0.7~0.8 0.8~0.9	9.4		3054	
	1.048	90.9~112.1	0.69	0.4~0.5	{2.23 1.10	0.02~0.05 0.2~0.3	10.5		1557	
	0.981	89.5~110.8	1.27	0.2~0.3	{0.66 0.98	0.5~0.6 0.3~0.4	9.8		1476	
Next morn- ing	1.039	93.4~107.8	2.89	0.001~0.01	{0.15 2.08	0.8~0.9 0.02~0.05	10.4	Mean potency ratio=0.985 (F.l. of error=92.9 ~107.5%) 9.8 u/g	2929	0.977
	0.968	87.1~112.6	0.23	0.8~0.9	{1.24 2.41	0.2~0.3 0.01~0.02	9.7		1088	
	0.971	94.7~105.5	1.55	0.1~0.2	{0.28 0.58	0.7~0.8 0.5~0.6	9.7		5244	
	0.970	92.6~107.4	1.63	0.1~0.2	{1.65 0.64	0.05~0.1 0.5~0.6	9.7		2732	
	0.920	93.7~105.7	2.90	0.001~0.01	{1.01 0.76	0.3~0.4 0.4~0.5	9.2		4592	
	0.991	94.4~105.9	1.51	0.1~0.2	{0.82 0.16	0.4~0.5 0.8~0.9	9.9		4466	
	0.954	94.7~105.0	1.59	0.1~0.2	{1.24 0.73	0.2~0.3 0.4~0.5	9.4		5552	
	1.014	93.6~106.9	2.93	0.001~0.01	{0.58 0.17	0.5~0.6 0.8~0.9	10.1		3350	
	1.005	92.4~108.4	0.98	0.3~0.4	{1.10 1.05	0.2~0.3 0.2~0.3	10.1		2446	
	0.998	93.3~107.2	1.93	0.05~0.1	{1.05 1.02	0.2~0.3 0.3~0.4	10.0		3039	
	0.869	92.0~106.7	1.13	0.2~0.3	{1.01 2.49	0.3~0.4 0.01~0.02	8.7		3508	
	1.048	92.2~110.0	1.07	0.2~0.3	{1.52 0.28	0.1~0.2 0.7~0.8	10.5		2529	
	1.050	92.5~109.4	2.52	0.01~0.02	{0.39 0.80	0.6~0.7 0.4~0.5	10.5		2336	
	0.991	93.5~106.9	1.86	0.05~0.1	{1.67 0.63	0.05~0.1 0.5~0.6	9.9		3186	
	0.982	93.5~106.6	0.67	0.5~0.6	{0.21 0.33	0.8~0.9 0.7~0.8	9.8		3359	

3) ASt と Ist との効価の比較: Table 7. に 2-2 用量検定成績を, Table. 8 に 3-3 用量検定成績を示す。

Table 7. The Results of 2 and 2 Dose Assay (AST/IST)

Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)	unit/g	Mean potency ratio (R)	Weight factor (w)	Weighted R Antilog MW
4 hours	1.016	89.8~113.3	10.1	Mean potency ratio = 1.046 F.I. of error = 91.1~112.4% 10.4u/g	2262	1.044
	1.043	93.1~110.6	10.4		4102	
	1.080	90.3~113.2	10.8		1859	
5 hours	0.967	76.8~124.8	9.6	Mean potency ratio = 0.987 F.I. of error = 84.0~117.7% 9.8u/g	545	1.029
	0.875	76.4~122.7	8.7		499	
	1.077	91.2~111.0	10.7		2415	
	0.948	88.0~112.0	9.4		1646	
	1.075	87.7~117.9	10.7		3527	
6 hours	0.988	81.0~122.9	10.2	Mean potency ratio = 0.987 F.I. of error = 84.0~117.7% 9.9u/g	594	1.019
	0.977	80.2~121.8	10.1		704	
	0.832	72.0~119.6	8.3		712	
	1.075	89.3~121.8	10.7		2693	
	1.061	91.5~110.0	10.5		4484	
	0.988	86.3~115.5	9.9		1057	
	0.991	87.5~112.6	9.9		1515	
Next morning	0.987	88.3~112.7	10.3	Mean potency ratio = 1.007 F.I. of error = 88.1~115.8% 10.2u/g	1615	1.021
	0.904	90.9~103.4	9.4		521	
	1.076	81.3~133.9	10.7		561	
	0.990	88.6~112.6	9.8		1618	
	1.076	91.6~116.6	10.6		2672	

Table 8. The Results of 3 and 3 Dose Assay (AST/IST)

Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)	Parallelism		Curvature		u/g	Mean potency ratio ($\bar{R}$)	Weight factor (w)	Weighted R Antilog MW
			t	P	t	P				
4 hours	0.902	86.2~110.5	0.38	0.7~0.8	{ 0.57 0.77	{ 0.5~0.6 0.4~0.5	9.0	Mean potency ratio = 1.062 (F.I. of error = 90.4~112.9% 10.7 u/g	1434	1.064
	1.032	92.9~108.5	1.98	0.02~0.05	{ 2.00 0.11	{ 0.02~0.05 0.9<	10.4		2290	
	1.150	92.1~112.1	0.79	0.4~0.5	{ 0.59 1.80	{ 0.5~0.6 0.05~0.1	11.6		2623	
	1.162	90.2~120.6	1.19	0.2~0.3	{ 0.12 1.44	{ 0.9< 0.1~0.2	11.7		1200	
5 hours	1.016	84.8~117.4	0.82	0.4~0.5	{ 0.35 0.59	{ 0.7~0.8 0.5~0.6	10.2	Mean potency ratio = 1.006 (F.I. of error = 91.1~110.1% 10.0 u/g	743	1.018
	1.055	94.0~107.4	2.24	0.02~0.05	{ 1.54 0.70	{ 0.1~0.2 0.4~0.5	10.4		3672	
	0.897	90.0~107.9	1.97	0.02~0.05	{ 0.54 2.62	{ 0.5~0.6 0.001~0.01	8.9		2216	
	1.054	95.7~107.7	0.49	0.6~0.7	{ 0.07 1.30	{ 0.9< 0.1~0.2	10.4		4264	
6 hours	1.016	84.8~117.4	0.82	0.4~0.5	{ 0.35 0.59	{ 0.7~0.8 0.5~0.6	10.1	Mean potency ratio = 0.988 (F.I. of error = 89.6~109.1% 9.8 u/g	743	0.994
	0.890	89.0~108.6	0.31	0.1~0.2	{ 0.73 2.76	{ 0.4~0.5 0.001~0.01	8.8		1977	
	1.059	95.0~106.3	0.39	0.6~0.7	{ 0.08 1.76	{ 0.9< 0.05~0.11	10.4		3196	
Next morning	1.024	85.0~121.3	0.67	0.5~0.6	{ 0.40 0.55	{ 0.6~0.7 0.5~0.6	10.2	Mean potency ratio = 1.03 (F.I. of error = 91.1~110.8% 10.2 u/g	700	1.049
	1.118	94.4~107.4	3.36	0.001>	{ 0.79 0.55	{ 0.4~0.5 0.5~0.6	11.0		4073	
	0.915	90.5~108.0	1.04	0.2~0.3	{ 1.27 2.76	{ 0.2~0.3 0.001~0.01	9.0		2165	

1.063	94.6~106.6	0.37	0.7~0.8	$\begin{cases} 0.95 \\ 1.61 \end{cases}$	$\begin{cases} 0.3\sim0.4 \\ 0.1\sim0.2 \end{cases}$	10.5	4083

4) 以上2-2用量検定及び3-3用量検定成績をまとめて Table 9 に示す。

Table 9. The Summarized Results for Data from Table 2, 4, 5, 6, 7, 8.

		4 hrs.	5 hrs.	6 hrs.	Next morning
2 and 2 dose assay	NSt/ISt	9.9 u/g 10.1 u/g* 10.3 u/g**	9.9 u/g 9.8 u/g**	10.0 u/g 9.8 u/g**	10.1 u/g 10.1 u/g
	ASt/ISt	10.4 u/g	9.8 u/g	9.9 u/g	10.2 u/g
	NSt/ASt	9.9 U.S.P. u/g	19.0 U.S.P. u/g	9.9 U.S.P. u/g	9.9 U.S.P. u/g
3 and 3 dose assay	NSt/ISt	9.7 u/g 10.6 u/g* 10.6 u/g**	9.6 u/g 9.7 u/g**	9.5 u/g 9.7 u/g**	9.7 u/g 10.0 u/g**
	ASt/ISt	10.7 u/g	10.0 u/g	9.8 u/g	10.2 u/g
	NSt/ASt	9.9 U.S.P. u/g	9.7 U.S.P. u/g	9.9 U.S.P. u/g	9.8 U.S.P. u/g

* weighted mean unit **converted unit from other two row.

5) カエル致死量の変動 (用量・反応線から求めた LD50 (mg/gカエル体重) : Table 10 に示す通りである。

Table 10. Variation of LD50 (mg/g frog body weight)

NSt	(4 hour method)	0.2~0.27 (Sept., Oct. 10 Samples), 0.34 (Aug., 2 Samples)
	(6 hour method)	0.21~0.26 (Sept., 3 Samples), 0.17~0.26 (Sept., 5 Samples)
ISt	(4 hour method)	0.09~0.18 (Aug., 7 Samples), 0.15~0.2 (Oct., 5 Samples)
	(6 hour method)	0.15~0.17 (Aug., 5 Samples), 0.15~0.18 (Oct., 3 Samples)
ASt	(4 hour method)	0.24~0.25 (Aug., 2 Samples), 0.22~0.25 (Oct., 4 Samples) 0.21~0.25 (Nov., 4 Samples)
	(6 hour method)	0.21~0.25 (Aug., 4 Samples), 0.18~0.21 (Nov., 4 Samples).

1~3月の実験数は不足であるが NSt では0.19 (4時間法, 3月1例), 0.21, 0.22 (4時間法, 1月2例), 0.16 (5時間法, 3月, 1例) となり, 以上の LD50 はカエル検定法の中用量の目標とする。

B 鳩法 (註: 標準液及び検体はソクスレット法及びぶりまぜ法の両方で調製したものを用了。

1) NSt 及び ASt の効価の比較: Table 11 にその成績を示す。

Table 11. The Results from Pigeon Method (NSt/ASt)

Extracting method	Number of pigeons		Potency ratio ASt : NSt (according to U. S. P. XIV)	Standard error	Potency ratio NSt : ASt (according to B. P. VIII)	Fiducial limits of error (%)
	NSt	ASt				
	Lethal dose g/kg	Lethal dose g/kg				
Soxhlet method	6 (0.137)	6 (0.105)	1 : 0.77	(0.097)	0.996 (2)	71.8~140.8
Shaking method	6 (0.112)	6 (0.104)	1 : 0.93	0.038	0.920 (6)	88.6~113.3
"	7 (0.097)	6 (0.100)	1 : 0.98	(0.091)	0.900 (3)	70.0~145.1

"	6 (0.111)	6 (0.106)	1:0.95	0.059		
"	6 (0.112)	6 (0.108)	1:0.97	0.064	0.970 (5)	88.7~112.6
Soxhlet method	8 (0.105)	7 (0.120)	1:0.14	0.060	1.140 (5)	88.1~112.5
Shaking method	7 (0.107)	7 (0.100)	1:0.93	0.016	0.920 (6)	92.8~106.7
"	7 (0.114)	6 (0.111)	1:0.97	0.035	1.020 (6)	90.4~110.5
"	6 (0.108)	6 (0.114)	1:1.06	0.33	1.050 (6)	80.4~118.2
"	6 (0.113)	6 (0.114)	1:0.99	0.059	0.920 (5)	85.2~118.0
"	6 (0.118)	6 (0.112)	1:0.94	0.050	1.004 (4)	87.8~113.8
Soxhlet method	7 (0.111)	6 (0.111)	1:0.95	0.080	0.870 (3)	80.6~124.5
"	7 (0.170)	6 (0.112)	1:0.98	0.033	0.950 (6)	84.6~116.8
mean value			1:0.96	0.055	0.972	84.1~119.4

Note: According to U.S.P. XIV, the standard error should be less than 0.03.

2) 実験温度 $25^{\circ}\pm 0.5^{\circ}$ で日局標準品と米局標準品の鳩の雌雄の致死量の変動: Table 12 にその結果を示す。

Table 12. The Results from Pigeon Method (NSt:ASt) at 25°C

Lethal dose, g/kg	NSt								ASt							
	Shaking method			Soxhlet method			Total		Shaking method			Soxhlet method			Total	
	Total No. of pigeons	♂	♀	Total No. of pigeons	♂	♀	♂	♀	Total No. of pigeons	♂	♀	Total No. of pigeons	♂	♀	♂	♀
0.085	1	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.086	—	—	—	—	—	—	—	—	3	2	1	—	—	—	2	1
0.090	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	1
0.092	2	1	1	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
0.093	2	2	—	1	—	1	2	1	9	6	3	—	—	—	6	3
0.095	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—	2	—
0.100	9	5	4	4	1	3	6	7	10	7	3	—	—	—	7	3
0.105	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	—
0.107	10	6	4	2	—	2	6	6	10*	5	4	1	1	—	6	4
0.108	8	4	4	—	—	—	4	4	—	—	—	—	—	—	—	—
0.113	1	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.114	9	8	1	1	—	1	8	2	6	2	4	3	2	1	4	5
0.115	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	1
0.116	2	1	1	—	—	—	1	1	1	1	—	—	—	—	1	—
0.120	1	1	—	—	—	—	1	—	2	1	1	—	—	—	1	1
0.121	4	2	2	2	1	1	3	3	4	3	1	1	—	1	3	2
0.123	1**	—	—	—	—	—	—	—	3	1	2	—	—	—	1	2
0.127	1	1	—	—	—	—	1	—	1	—	1	—	—	—	—	1

0.129	2	2	—	1	—	1	2	1	—	—	—	1	1	—	1	—
0.130	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	—
0.131	1	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
0.136	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.140	1	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
0.143	1	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	1	—	1	—
0.150	—	—	—	1	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
0.157	—	—	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.164	—	—	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	56	36	19	14	4	10	40	29	49	28	20	13	9	4	37	24
Total lethal dose	6.186	3.968	2.095	1.663	0.542	1.121	4.510	3.216	5.185	2.915	2.163	1.472	1.032	0.44	3.947	2.603
mean lethal dose	0.110	0.110	0.110	0.119	0.136	0.112	0.113	0.111	0.106	0.104	0.108	0.113	0.115	0.110	0.107	0.108

Note : * The sex of one pigeon was not accertained.

** The sex of pigeons was not accertained.

Table 12 の資料から鳩の致死量と累積度数及びその百分率を調べた結果を Table 13 に示す。

Table 13. Lethal Dose, Integral frequency and its Percentage from Data of Table 12

Lethal dose g/kg	NSt			ASt		
	Number of pigeons killed	Integral frequency	Integrated percentage frequency	Number of pigeons killed	Integral frequency	Integrated percentage frequency
0.085	1	1	1.4	—	0	0
0.086	—	—	—	3	3	4.8
0.090	—	—	—	1	4	6.5
0.092	2	3	4.2	—	—	—
0.093	3	6	8.5	9	13	20.5
0.095	—	—	—	2	15	24.2
0.100	13	19	21.8	10	25	40.3
0.105	—	—	—	1	26	41.9
0.107	12	31	43.7	11	37	59.7
0.108	8	39	54.9	—	—	—
0.113	1	40	56.3	—	—	—
0.114	10	50	70.4	9	46	74.2
0.115	—	—	—	1	47	75.8
0.116	3	53	74.6	1	48	77.4
0.120	—	54	76.1	2	50	80.5
0.121	6	60	84.5	5	55	88.7
0.123	—	61	85.9	3	58	93.5
0.127	—	62	87.2	1	59	95.5

0.129	3	65	91.5	1	60	96.7
0.130	—	—	—	1	61	98.4
0.131	1	66	92.9	—	—	—
0.140	1	67	94.4	—	—	—
0.143	1	68	95.8	1	62	100.00
0.150	1	69	97.2	—	—	—
0.157	1	70	98.6	—	—	—
0.164	1	71	100.0	—	—	—

Table 13 の資料から NSt 及び AS_t の致死量及び死亡数のヒストグラムを Fig. 1 に示す。又累積度数曲線を Fig. 2 に示す。Fig. 3 は致死量の分布状態を示したものである。

Fig 1. Relation between Lethal Dose and Number of Pigeons Killed.
(From the Data of Table 13.)

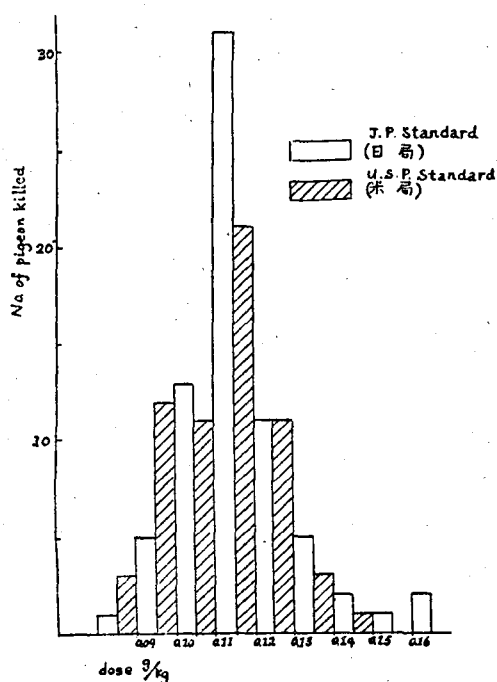


Fig 2. Cumulative Frequency Distribution Curve (From the Data of Table 13).

—: NSt ---: AS_t · · : NSt × : AS_t

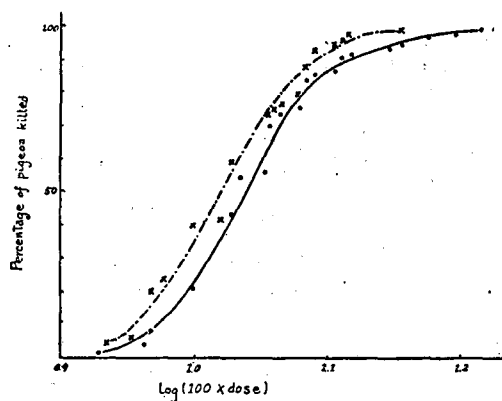
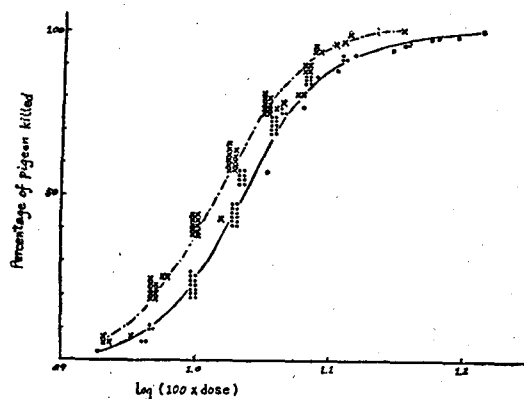


Fig 3. Distribution of Lethal Doses (From the Data of Table 13).

—: NSt
---: AS_t



3) ジギタリス抽出法と平均致死量: Table 12 の資料からふりませ法とソクスレット法間の平均致死量に差があるか否かを, 統計的に検討した結果を Table 14 に示す. この結果から抽出法によつては平均致死量間に有意な差は認められない.

Table 14. The Test of Significance between Extracting Methods.

NSt	Shaking method	Soxhlet method	ASt	Shaking method	Soxhlet method
Total (No. of pigeons)	56	14	Total (No. of pigeons)	49	13
Mean lethal dose (mg/kg)	111	119	Mean lethal dose (mg/kg)	106	113
s^2	210.0		s^2	149.4	
sd^2	18.75		sd^2	14.5	
sd	4.33		sd	3.81	
t-value	1.85		t-value	1.80	

4) 鳩性別と平均致死量: Table 12 の資料から雄雌間の平均致死量に差があるか否かを, 統計的に検討した結果を Table 15 に示す. この結果からNSt 及び ASt とも平均致死量間に有意な差は認められない.

Table 15. The Test of Significance between Sexes of Pigeons

NSt	♂	♀	ASt	♂	♀
Total (No. of pigeons)	40	29	Total (No. of pigeons)	37	24
Mean lethal dose (mg/kg)	113	111	Mean lethal dose (mg/kg)	107	108
s^2	221.6		s^2	160.7	
sd^2	13.2		sd^2	11.0	
sd	3.63		sd	3.32	
t-value	0.55		t-value	0.30	

5) 実験温度の鳩致死量に及ぼす影響: NSt, ASt を用いて, 実験温度 $35^\circ \pm 0.5^\circ$ のとき, 鳩致死量を求めれば, Table 16 に示した結果が得られた.

Table 16. Changes of Lethal Dose between Sexes of Pigeons at 35°

Lethal dose g/kg	NSt (Soxhlet method)			ASt (Soxhlet method)		
	♂	♀	Total	♂	♀	Total
0.079	1	1	2	—	—	—
0.086	1	—	1	—	1	1
0.093	—	—	—	2	1	3
0.100	—	2	2	—	3	3
0.107	1	1	2	3	—	3
0.114	2	2	4	1	2	3
0.121	—	1	1	—	—	—

0.136	—	1	1	—	—	—
Total (No. of pigeons)	5	8	13	1	7	13
Total (Lethal dose)	0.500	0.871	1.371	0.621	0.707	1.328
Mean (Lethal dose)	0.100	0.189	0.105	0.104	0.101	0.102

Table 16 の結果と Table 12 中 NSt 及び ASt についてのソクレット法の結果から検討すれば、Table 17 に示すように、致死量に関する2種の実験温度間についてはNSt では有意な差を認められないが、ASt では有意な差を認めた。

Table 17. The Test of Significance between Experimental Temperatures

NSt	25°	35°	ASt	25°	35°
Total (No. of pigeons)	14	13	Total (No. of pigeons)	13	13
Mean lethal dose (mg/g)	119	105	Mean lethal dose (mg/kg)	113	102
s^2	411.2		s^2	158.8	
sd^2	61.0		sd^2	24.4	
sd	7.8		sd	4.9	
t-value	1.79		t-value	2.24	

考 察 と 総 括

著者等は国際標準品及び米局標準品を用いて日局標準品の効価を蛙法及び鳩法で比較した。蛙法では2—2用量検定及び3—3用量検定を行い、Table 9に示したように日局標準品1g はほぼ10国際単位に等しいことを知った。上記検定法では1群中の蛙数は20匹以上を使用し、統計学的処理を行つた。蛙致死量の季節的変動に関してはTable 10に示したが、例数が少ないので確実な所は論じ得ない。冬眠蛙についての資料と共に別に報告する。

次に鳩法では米局 XIV 法に準拠して効価の比較を行つたが、日局標準品1g は9.6米局単位となり、蛙法で得た単位より約5%程少ない値となつている。鳩法では性別が困難であるので、1検定で雌が混入することを避けることは不可能である。従つて性別による致死量の関係を知る必要がある。著者等の実験では性別による致死量には何等有意な差を認めなかつたので、ある程度雌の混入も許せる。ジギタリス検体の抽出法にはふりまぜ法とソクレット法があるが、鳩で行つた実験ではその平均致死量間に有意な差を認めなかつた。実験温度25°と35°で行つた実験ではNSt では平均致死量間に有意な差を認めなかつたが、ASt では有意な差を認めたので、更に実験を繰返さなければ、結論を出すことができない。

文 献

- 1) 伊東幹愛, 松島義一: 衛試 35, 73 (昭4).
- 2) Hatcher, Brody: Am. J. Pharm. 82, 360 (1910); Lind van Wijngaarden: Arch. exp. Path. Pharmacol., 113, 40 (1926); Bliss: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 36, 73 (1947).
- 3) Trevan: Proc. Roy. Soc. B., 101, 283 (1927).
- 4) Knaffl-Lenz: J. Pharmacol., 29, 407 (1926).
- 5) Haag, Woodley: J. Pharmacol., 51, 360 (1934).
- 6) 英局 VIII, 829, 790 (1953).
- 7) J. H. Gaddum: J. Pharm. Pharmacol., 6, 345 (1953).
- 8) 米局 XIV, 178 (1950).
- 9) 長澤佳熊: 薬雑, 51, 521 (昭6), その他省略。

Summary

The authors determined the potency of the Japanese Pharmacopoeia Digitalis Standard by a frog and a pigeon methods, comparing it with the International and the U.S.P. Reference Standard.

1) In the frog method, a (2 and 2) and a (3 and 3) dose assay were used. The potency was 10 international units per gram (Table 9). In assays, not less than 20 mice were used for a group and the results were treated statistically. 2) In the pigeon method, the assays were carried out in accordance with the U.S.P. XIV. The potency was 9.6 units per gram. 3) In the pigeon method, it is difficult to distinguish difference between the sexes of pigeons. The test of significance for the data obtained from the assays in which only male or female pigeons were used showed that the difference between the sexes of pigeons used gave no significant difference. Thus, female pigeons may be used to some extent together with male pigeons without affecting the result of assay.

No significant difference was also observed between a Soxhlet extracting method and a shaking extracting one. The both may equally be used.

Received April 22, 1954

卵 胞 ホ ル モ ン の 研 究 (第5報)*

妊馬尿からのエストロンの簡易製造法

長 沢 佳 熊, 越 村 栄 之 助

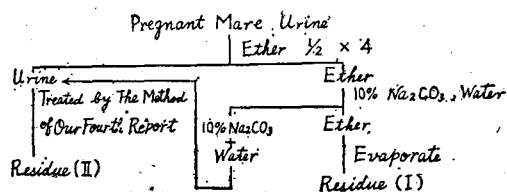
Studies on Follicular Hormones. V.

A Simple Productive Method of Estrone from Pregnant Mare Urine by Bacterial Hydrolysis.

By Kakuma NAGASAWA and Einosuke KOSHIMURA

我国においてエストロンの製造原料として最も重要な資源は妊馬尿である。従つてホルモン含量の多い尿を選ぶことが製造の第一条件であるが、従来は単に尿の比重の大小によつて品質鑑定を行う場合が多かつた。著者¹⁾はKober 法²⁾により妊馬尿中のエストロンを定量し、エストロン含量と比重は必ずしも一致しないことを示し簡易比色定量法を推奨し、不良原料の発見に役立つといふ報告³⁾を得た。著者の比色定量法では原料妊馬尿中のホルモン含量は1cc中10~50 γ で、多くは20~40 γ であるが、比色値がそのままホルモン含量とは言えないから実際の含量は更に少い。南米では雄馬尿⁴⁾を原料とするというが、著者の実験では妊馬尿と大差がないと考えられる。Levin⁵⁾は雄馬尿中には大量のエストラジオールが存在するといふ。卵胞ホルモン又は発情物質は自然界に広くみられるが製造原料としての価値は不明のものが多く、尿中に排泄されるエストロンは大部分が水溶性の結合型⁶⁾であるから、多くの場合前処理として鉱酸を加え加熱して加水分解を行い、有機溶媒に可溶の遊離型としてエーテル、クロロホルムなどで抽出するが、乳化を起し易く分離が極めて困難なことがあるので、長沢⁷⁾は工業的にはベンゼンを推奨した。加水分解と同時にホルモンの分解が起るといわれ、Dingemans⁸⁾は加水分解と同時に抽出を行い、或は保護剤^{9) 10)}を加えることも行われる。Edson¹¹⁾は尿を塩酸で pH 0.6 とし 28 日間放置して加水分解を行つた。尿をブタノールで抽出し、ブタノールエキスを加水分解する方法がよいという者¹²⁾もある。何れにしても加水分解には多くの問題があり、結合型だけを加水分解し、副反応が生じない方法が理想で Cohen, Butes¹³⁾ は Mylase P で加水分解し、酸加熱法より 20% 収量がよく且つ純粋なものを得たといふ。Cohen,¹⁴⁾ Buehler,¹⁵⁾ Oneson¹⁶⁾ は細菌、臓器等から得たグルクロニダーゼで結合型ホルモンを加水分解した。遊離型ホルモンは前述のように有機溶媒で抽出するほか活性炭¹⁵⁾、安息香酸¹⁶⁾などを加えて吸着する方法も行われる。何れの方法でもエストロンを製造するには大量の抽出剤やその他の薬品、大規模な抽出装置、溶媒の回収精製装置及び操作人員を必要とするから製品が高価になる。最近では合成^{19) 20) 21)}によるエストロン及びエストラジオールなどが市場に現われ、抽出法による天然品の前途はかなり憂慮されている。著者は以上の点に留意して安価にエストロンを製造する研究を行つて来たが、妊馬尿を長く放置すると遊離エストロンが増加し、器底の沈澱中には殊に多量が存在する事実に着目し、尿を種々の処理をして放置後次の方法でエストロンを抽出し、遊離及び結合型エストロンを第4報の方法で比色定量し、加水分解をしらべた (実験 I 参照)。その結果加水分解は *B. Subtilis* が繁殖したとき最も著明である

Figure 1.



ことを知つたので、尿をそのまままたは pH を調節し、必要なら他の薬品或は菌を加える等の処理をし、室温または 37° に放置し菌を繁殖させると、加水分解されたエストロンは他の沈澱と共に器底に析出するから、これを集め、メタノール、アセトン、ベンゼン又は水酸化ナトリウム液などで抽出し、長沢⁷⁾の方法で精製すると、従来の方法に比べはるかに簡易に収量よくエストロンを工業的に製造できることを知つた (実験 II 参照)。

* 日本薬学会東京 9 月第 1 例回 (附 28.9.12) 講義。第 4 報は長沢佳熊, 越村栄之助: 衛生試験所報告, 71, 1 (1953)。

実験の部

実験Ⅰ. 加水分解の比較 排泄直後の妊馬尿を40cc づつフラスコに分注し、それぞれに各種の処理をして放置した後遊離型及び結合型エストロンを抽出し、Kober 法で比色定量を行った結果は次の通りである。

Table 1. Material: Pregnant Mare Urine 1cc Containing Estrone 44 γ by Color Assay.

No. of Sample	Methods of Hydrolysis	Estrone (%)	
		Conjugate Form	Free Form
1	Add 10 mg of Ca(OH) ₂ per cc of urine	55	42
2	Edson's method 1)	50	47
3	Add 10 mg of CaCl ₂ per cc of urine	10	85
4	Add 10 mg of NaOH per cc of urine	14	84
5	Heat 120° for 20 minutes	93	4
6	Add 10 mg of CaCl ₂ per cc of urine and heat 120° for 20 minutes	96	4
7	Incubate at 37°	8	90
8	Non-treatment	12	85

実験Ⅱ. B. Subtilis による加水分解尿からエストロンの製造法 B. Subtilis の繁殖した尿1Lを放置し、析出した沈澱を遠心分離して集め、乾燥後エストロンの呈色反応が生じなくなる迄数回ベンゼンで煮沸抽出する。ベンゼン抽出液を合計約1/6量に濃縮し、その1/10量の5%硫酸及び10%炭酸ナトリウム液で洗い、1/6量の2N水酸化ナトリウム液で5回抽出し、アルカリ液を塩酸でpH 10としエーテルで抽出、エーテルを留去し、残渣を水蒸気蒸留し、残留物をアルコールから再結晶し活性炭で脱色すると融点250°の無色板状結晶を得る。収量は約30%。

結 論

妊馬尿をそのまま、又は必要なら pH を調節し、B. Subtilis を加え、室温或は37°に放置し生じた沈澱を集めベンゼン、メタノール、アセトン或は水酸化ナトリウム液などで抽出し精製すると極めて簡易にエストロンを製造でき工業的方法として利用されると考える。Edson の加水分解法は十分ではない。

本研究に当り使用した妊馬尿は日本科学研究所の御厚意により現地で採取の便を得たもので、又細菌学的研究について御援助を頂いた当試験所細菌試験部青山好作、丹治園枝両技官に厚く感謝する。

文 献

- 1) 長沢佳熊, 越村栄之助: 衛生試験所報告, 71, 1 (1953).
- 2) Kober, S.: Biochem. Z., 239, 209 (1931).
- 3) 佐々木究: 著者への私信.
- 4) Deulofeu, V.: Vitamin and Hormone for schung, 420, 引(用) 5) Levin, L.: J. Biol. Chem., 185, 725 (1945).
- 6) Marrian, G.F.: Lancet, 228, 674 (1935).
- 7) 長沢佳熊: 工業化学会九州支部大会講演 (昭和18年); 薬学大全書補遺, 1, 非凡閣, 1951; ホルモン薬品学, 63 (昭和29). 立川図書出版.
- 8) Dingemanse, E., Laquer, B. and Muehlbock, O.: Monath. Gebuertsh. Gynaek., 109, 37 (1937).
- 9) Doisy, E.A.: Biol. Symp. 9, Lancaster, 1942.
- 10) Smith, O.W.: Endo- crinol., 43, 189 (1948).
- 11) Edson, J.: J. Biol. Chem., 130, 575 (1939).
- 12) VanBruggen, J.T.: J. Lab. Clinical Med., 33, 207 (1948).
- 13) Cohen, H. and Bates, R.W.: Endocrinol.: 44, 317 (1949).
- 14) Buehler, F.Z., Katzman, P.A. and Doisy, E. A.: Federation Proc., 9, 157 (1950).
- 15) Bitman, J. and Cohen, H.: Ibid., 9, 152 (1950).
- 16) Oneson, I. B. and Cohen, S.L.: Endocrinol., 51, 173 (1952).
- 17) Sächsisches Serumwerks A.G., D.R.P., 579310.
- 18) Curtis, J.M., Mac Corquodale, D.W., Thayer, S. A. and Doisy,

- E. A.: J. Biol. Chem., 107 191, (1934). 19) Inhoffen, H.H. and Zuehlendorf, D.: Ber., 74, 1911 (1941), 76, 233 (1943). 20) Wilds, A.L. and Djerassi, C.: J. Amer. Chem. Soc., 68, 2125 (1946). 21) Hershberg, E.H., Rubin, M. and Schwenk, E.: J. Org. Chem., 15, 292 (1950).

Summary

For extraction of estrone, pregnant mare urine was stored with or without the treatment after adjustment of pH, addition of *B. Subtilis* and control of temperature, then the precipitate was collected, extracted with benzene, methanol, acetone or sodium hydroxide solution and purified by usual method. This procedure is very simple and seemed to be useful for industrial purpose. Edson's hydrolysis method is not satisfactory.

Received April 5, 1954

ペーパクロマトグラフィによるエストロンの定量法 (その1)*

越村 栄之助, 岡崎 精一

Quantitative Analysis of Estrone by Paper Chromatography (1)

By Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI

著者は第4報¹⁾で妊馬尿中のエストロンの Kober 法²⁾による比色定量法を報告したが, 定量的に精製できると思われるような分配による精製法では, 夾雑する不純物殊にエストロンよりやや弱いが同様な呈色をし生理作用の強いエストラジオールを分離できないから, エストロン含量は過大値を示す. 又生物検定では多数の動物³⁾⁴⁾を必要とするから, 少数の動物を用いた検定結果をそのまま信用できないし, その上エストロンとエストラジオールの混合物については本法は適用できないから高度の分離精製を必要とする. ペーパクロマトグラフィによるステロイドの分離については多くの報告^{5,6,7,9)}があるが, Bush⁸⁾はアルミナ処理した濾紙を, Kritchevsky 等¹⁰⁾は Quilon 処理した濾紙を, Kritchevsky 等¹¹⁾はシリカ処理をした濾紙を用いる方法を報告し, ステロイドのペーパクロマトグラフィによる定量法については, Tennent 等¹²⁾及び Axelrod 等¹³⁾はケトステロイドを Beckman DU 型分光光度計を用いて色度測定法で定量し, 又 Cramer¹⁴⁾は 17-オキシステロイドの抽出法による定量を述べた. Lubin 等¹⁵⁾及び Bagget 等¹⁶⁾も抽出法による定量を報告している.

著者は Bush^{11,17)}及び Kritchevsky¹⁸⁾等の報告した, アルミナ濾紙で 10% 水酸化ナトリウム液飽和とベンゼンで展開後, ヨウ素飽和石油ベンジン試薬を噴霧しステロイドを発色させる方法を用い, エストロンとエストラジオールを分離し, 呈色面積とステロイドの濃度の対数が直線関係のあることを利用し面積測定法による定量を試みた (実験Ⅰ参照). 妊馬尿から抽出しかなり精製したエストロン中にもエストラジオールが検出されることがある (実験Ⅱ参照). 第5報¹⁹⁾で述べた細菌で加水分解した妊馬尿から得た沈澱のベンゼン抽出物はエストロン約 56%, エストラジオール約 10% を含有する (実験Ⅲ参照).

実験の部

実験Ⅰ. 定量操作. 東洋濾紙 No. 50 (2×40cm) を 60° に加温した 20% アンモニア明バン液に 30 秒間浸し, 28% アンモニア水を入れアンモニアガスを充満した密閉容器中で 1 時間放置する. 次に流水中で 6 時間洗い, 19~20° で一夜乾燥し直ちに使用する. 検体のアルコール溶液 (0.001cc がエストロン又はエストラジオール 2.5 μ を含有する) を濾紙の一端から 5 cm の所へマイクローピペットでつけ自然に乾燥する. 検体をつけた時の点の直径は 7 mm をこえないような量を一度につけ, 大量をつける時は乾燥後更にくり返してつける. 10% 水酸化ナトリウムを飽和したベンゼンを用い上昇法により 20° で 4.5 時間展開し, ヨウ素飽和石油ベンジン試薬を噴霧すると発色像は第1図に示すように呈色の強い内部 (B) と弱い外輪 (A) との2部からなり, A は B よりも速かに退色する. A 及び B を鉛筆で印しをつけ A 及び B の面積をプランメータで測定し, 面積を縦軸に, ステロイド濃度の対数を横

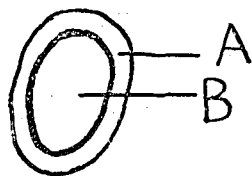


Fig 1

軸にとると直線が得られる. 同一実験中の Rf 値はほとんど同じであるが他の実験では通例異なる. エストロンの Rf 値は 0.30~0.50, エストラジオールは 0.08~0.30 であるからこの2つは完全に分離される. A よりも B の方が明瞭に判別できるから定量の際の面積測定には B 面積をとつた.

実験Ⅱ エストロン中のエストラジオールの検定 妊馬尿から抽出したエストロン製品につきエストラジオールの夾雑の有無をしらべた結果は次の通りである. (Table 1)

* 第5報は長沢佳徳, 越村栄之助: 衛生試験所報告, 72, 37 (1954)

本報告は長沢佳徳・卵固ホルモンの研究(第6報)(1954), 日本薬学会東京10月第2例会(昭.28.10.24)講演; その大要は Pharm. Bull. J. 65 (1954) に掲載.

Table 1 Purity of estrone

No. of Sample	m. p. (°)	Estradiol
1	225	adsent
2	248	"
3	195	present
4	234	"
5	225	absent

かなり精製し融点の高くなつたものでもエストラジオールが夾雑することがある。

実験Ⅱ 妊馬尿のエストロン及びエストラジオールの定量 妊馬尿をバクテリアで加水分解し、生じた沈澱を集めベンゼンで抽出し、ベンゼン液を10%炭酸ナトリウム液及び水で洗いベンゼンを留去した残渣をアルコールに溶かして検体とし、エストロン及びエストラジオールをそれぞれ5.0γと20.0γ及び検体の5.0γ、20.0γ及び

80.0γを濾紙につけて展開し定量した結果は次の表の通りである。

Table 2

	Standard				Sample				
	Estrone		Estradiol		For Estrone		For Estradiol		
Amount (γ)	5.0	20.0	5.0	20.0	5.0	20.0	5.0	20.0	80.0
B Area (mm ²)	110	250	70	190	80	180	None	None	110

第2表からエストロンについて2-2検定を行うと次の通りである。

$$\log \frac{U}{S} = -\frac{180+80-250-110}{180-80+250-100} \times \log 4 = -0.2509 = \bar{1}.7491 = \text{antilog } 0.5610$$

即ち検体は約56%のエストロンを含有する。エストラジオールは標準曲線上に検体のスポットの面積をプロットし、それから求めた結果は次の通りである。

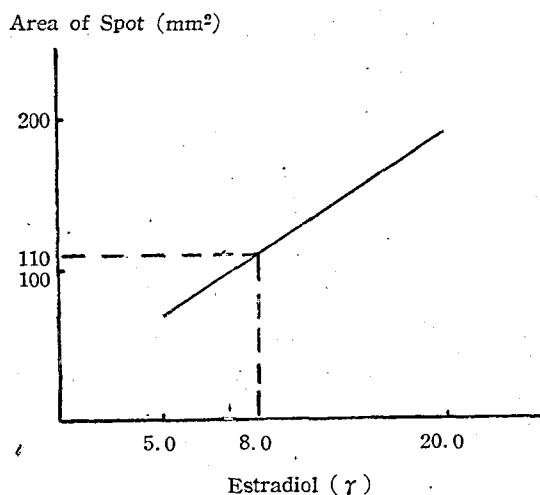


Fig 2

即ち検体はエストラジオールを約10%含有する。

結 論

アルミナ処理をした濾紙を用い、10%水酸化ナトリウム液飽和ベンゼンでエストロン及びエストラジオールを展開後ヨウ素飽和石油ベンジン試薬を噴霧し、呈色面積をプランメータで測定し面積とステロイドの濃度の対数が直線関係にあることを利用して2-2検定法で定量を行つた。本法を用いるとエストロンとエストラジオールが完全に分離され、一度でそれぞれが定量でき且又かなり粗製の検体にも適用することができる。

文 献

- 1) 長沢佳熊, 越村栄之助: 衛生試験所報告, 72, 1 (1953)
- 2) Kober, S.: Biochem. Z., 239 209 (1931)
- 3) 長沢佳熊: ホルモンと臨床, 1, 73 (1953) 引用.
- 4) 長沢佳熊: 化学の領域 7, 3 (1953) 引用.
- 5) Zaffaroni, A., Burton, R. B. and Keutman, E.H.: J. Biol. Chem., 177, 109 (1949).
- 6) Zaffaroni, A., Burton, R. B., and Keutman, E. H.: Science, 111, 6 (1950).
- 7) Heftman, E.: J. Am. Chem. Soc., 73, 851 (1951).
- 8) Bush, I. E.: Nature, 166, 445 (1951).
- 9) Heusghem, C.: Nature, 171, 42, (1955)
- 10) Kritchevsky, D. and Calvin, M.: J. Am. Chem. Soc., 72, 4330 (1950).
- 11) Kritchevsky, D. and Tisselius, A.: Science, 114, 229 (1951).
- 12) Pereira, A. and Serra, J. A.: Science, 113, 387. (1951)
- 13) Axelrod, L. K.: J. Biol. chem., 201, 59 (1953).
- 14) Cramer, F.: "Papierchromatographie", Verlag Chemie, Weinheim, W. Germany, (1953).
- 15) Lubin, L. B., Dorfman, I. R. and Pincus, G.: J. Biol. Chem., 203, 629 (1953).
- 16) Baggett, B., Kinsella, R. A. Jr. and Doisy, E. A.: J. Biol. Chem., 203, 1013 (1953).
- 17) Bush, I. E.: Biochem. J., 50, 370 (1952).
- 18) Kritchevsky, D. and Kirk, R.: Arch. Biochem. Biophys., 35, 345 (1952).
- 19) 長沢佳熊, 越村栄之助: 衛生試験所報告, 72, 37 (1954).

Summary

After developing estrone and estradiol with benzene which had been saturated with 10% sodium hydroxide solution on the alumina-impregnated filter paper, and spraying iodine-saturated petroleum benzene reagent on it, areas of the colored spots of estrone and estradiol were measured by a planimeter. The relation between logarithm of amount of the steroid and area of its spot showed a straight line. From this result, by the 2 and 2 test or locating the area of steroids on the standard curve of estrone and estradiol, both steroids were quantitatively analysed at the same time and this method was applied to the benzene extract from pregnant mare's urine prepared by the bacterial hydrolysing method reported previously. The result showed that the benzene extract contained about 56% of estrone and 10% of estradiol.

Received April 25, 1954

卵 胞 ホ ル モ ン の 研 究 (第7報)*

幼若白ネズミの子宮重量増加法による卵胞ホルモン及び

発情物質の検定 (その1)

長 沢 佳 熊, 越 村 栄 之 助, 岡 崎 精 一, 黒 馬 敏 子

Studies on Follicular Hormones. VII.

Quantitative Analysis of Follicular Hormone and

Synthetic Estrogens by Rat Uterine Increasing Method (1)

By Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA,

Seiichi OKAZAKI, and Toshiko KUROMA

卵胞ホルモンの効力検定法は、化学的検定法、物理的検定法及び生物学的検定法に大別される。

1. 化学的検定法. Kober¹⁾法及び Zimmerman²⁾法をもととしその改良法³⁻⁶⁾及びその他の方法⁷⁻¹¹⁾が多くある。何れも発色試薬を加えた呈色液を標準品の呈色液と比色定量する方法であるが本法によるとホルモン以外の夾雑物も呈色しホルモンとして算出され、実際よりも過大値を示し、ことに粗製品を検体に用いるときは誤差が大きく、Girard 試薬又はクロマトグラフ法などで高度に精製しないと安全には用いられない。螢光を測定する方法¹²⁾¹³⁾も同じである。ペーパクロマトグラムの面積測定による定量法¹⁴⁾は簡易で結果もよいがRf値の近似の物質が夾雑するときは用いられない。その他 Girard 化合物の重量法による定量¹⁵⁾も行われる。

2. 物理的検定法. ポーラログラフ法¹⁶⁾があるが夾雑物が存在すると用いられないことがある。

3. 生物学的検定法. 以上の1及び2の方法はそれぞれ極めて有効な方法ではあるがホルモンの生理作用自体の検定には生物学的方法によるほかない。これには多くの方法がある。

発情作用による方法: 去勢白ネズミ¹⁷⁾又はマウス¹⁸⁾にホルモンを注射し、発情を起す量を標準品と比較する方法で多くの改良法があり、子宮内へ検体を注入する方法¹⁹⁾は極めて感度が高い。

子宮重量増加作用による方法: 去勢白鼠²⁰⁾又は幼若白鼠²¹⁾及びマウス²²⁾にホルモンを注射し子宮重量増加を標準品と比較する。

その他の方法: モルモットの乳歯生長による方法²³⁾などがある。

著者は Lauson²¹⁾の方法をもととしホルモンをプロピレングリコールに溶かし、1日2回3日間皮下注射し、4日目に殺し子宮重量を秤量した。単位体重比とホルモン量の対数をグラフに描くと、大量を注射すると子宮重量増加はかえつて著明でなくなり(実験I参照)、適当な用量の撰択が大切であることを知った。また最良近似直線を計算し、子宮重量増加とホルモン量の対数が直線を示す範囲を求めると、かなりの範囲において直線関係がみとめられたのでここに報告する。

実 験 の 部

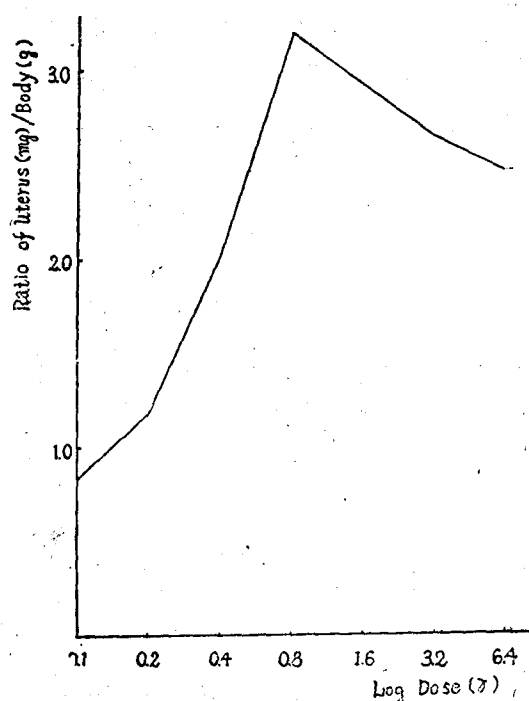
実験I. エストロンによる子宮重量増加 体重40~50g前後の幼若白ネズミにエストロンをプロピレングリコールに溶かした検体を1日2回3日間皮下注射し、4日目に殺し子宮を摘出しトーションバランスで手早く秤量する。その結果は第1表の通りである。グラフで表わす Fig. 1 となる。

* 日本薬学会東京12月例会講演(昭和28. 12. 12)。第6報は越村栄之助, 岡崎精一: 衛生試験所報告, 72, 41 (1954)

Table 1 Relations between Rat Uterine Increasing Response and Amounts of Estrone

Numbers of Animals	Estrone (γ)	Uterine Wgt(mg) Body Wgt (g)
20	Nil	0.70
10	0.1	0.84
9	0.2	1.18
10	0.4	2.02
10	0.8	3.21
10	1.6	2.94
10	3.2	2.68
10	6.4	2.51

Fig 1 Relation between Rat Uterine Increasing Response and Amounts of Estrone



実験II. エストロンによる子宮重量増加 体重・
40~50g 前後の白ネズミを用い実験Iと同様に行
った結果は次の通りである。

Table 2 Rat Uterine Increasing Response of Estrone

Estrone dose (γ)	0.2			0.4			0.8			1.6		
Log dose $\times 10$	0.301			0.602			0.903			1.204		
	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$
	39.0	47.0	121	46.0	40.0	87	34.7	100.5	290	41.6	107.5	265
	36.9	59.0	160	39.5	48.0	122	51.9	162.5	313	43.8	113.5	259
	48.5	85.0	175	51.4	125.0	243	48.7	139.5	286	40.7	105.0	258
	30.5	36.5	120	34.5	87.0	252	40.0	133.5	334	49.7	124.0	358
	45.5	73.5	162	40.1	67.5	112	38.1	164.5	432	38.1	136.5	249
	42.1	30.0	71	40.3	122.5	304	39.5	103.5	262	47.0	133.7	284
	32.9	42.5	129	40.7	102.5	252	47.0	139.0	296	36.5	136.5	374
	45.2	40.0	88	42.5	119.0	280	37.0	117.5	318	46.5	193.0	415
	49.5	79.0	160	—	—	—	31.7	115.0	362	35.0	110.5	316
	48.0	50.0	104	—	—	—	—	—	—	49.2	135.0	274
n			10			8			9			10
Sy			1290			1652			2894			3052
Mean			129.0			206.5			321.6			305.2

本表で明かなように 1.6 γ を注射したものは 0.8 γ 注射したものよりも遙かに子宮重量が少ないからこの用量は

適当でないと考えられ, 事実次に示すような計算を行うと直線性を示さないから 0.2γ , 0.4γ 及び 0.8γ の3用量についての計算を行うと次の通りである。

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy	ny ²
0.301	129.0	10	3.010	1290.0	0.906	388.290	166410.0
0.602	206.5	8	4.816	1652.0	2.899	994.504	341138.0
0.903	321.6	9	8.127	2894.4	7.339	2613.643	930839.0
Total		27	15.953	5836.4	11.144	3996.437	1438387.0
$\bar{x}=0.5908$					9.426	3448.448	1261613.5
$\bar{y}=2161630$					1.768	547.989	176773.5

$$b = 547.989 / 1.718 = 318.969$$

$$Y = 318.969x + 27.7161$$

$$\text{Adjustment for Mean} \dots\dots\dots 1261440.6$$

Source of Variation	d. f.	S. S.	M. S.	F
Regression	1	174791.6		
Deviation from Regression	1	1897.6	1897.6	0.55
Between Dose	2	176689.2		
Within Dose	24	82290.2	3428.8	d. f. $\left(\begin{smallmatrix} 1 \\ 24 \end{smallmatrix} \right) \dots 4.26(5\%)$ $\dots 7.82(1\%)$
Total	26	258979.4		

$$\text{Fiducial Limits of } b = 318.969 \pm 92.261$$

$$t = 7.13 \quad (P = 0.05, \text{ d. f. } = 24, \dots t = 2.06)$$

実験III. エストラジオールによる子宮重量増加 その結果は次の通りである。

Table 3 Rat Uterine Increasing Response of Estradiol

Estra- diol dose (γ) Log do- se $\times 100$	0.03			0.06			0.12			0.24		
	0.4771			0.7782			1.0792			1.3802		
	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$
	37.2	45.2	122	46.9	57.3	122	37.2	105.0	282	42.5	129.0	304
	49.0	37.4	76	40.6	51.9	128	51.2	109.5	214	40.8	94.1	231
	40.2	53.6	133	48.2	45.9	95	46.7	84.2	181	41.7	98.6	236
	44.7	36.0	81	36.6	47.4	130	41.8	88.0	212	43.2	124.5	288
	55.0	47.0	85	44.6	54.0	120	36.5	86.1	236	41.7	130.0	312
	40.2	37.5	93	39.3	66.8	170	36.1	86.6	240	43.7	108.0	247
	41.5	34.4	83	52.1	68.9	132	36.4	106.6	293	51.5	111.3	216
	50.7	40.0	79	37.8	61.0	161	37.2	90.0	242	41.2	119.2	289
	49.9	38.1	76	43.0	60.0	140	48.4	131.9	273	35.5	105.9	298
	43.0	42.0	98	38.8	52.0	134	—	—	—	40.2	119.9	298
n			10			10			9			10
Sy			926			1333			2172			2719
Mean			92.6			133.3			241.3			271.9

本表により計算すると次の通りである。

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy	ny ²
0.4771	92.6	10	4.7710	926.0	2.2762	441.7946	85747.60
0.7782	133.3	10	7.7820	1333.0	6.0560	1037.3406	177689.90
1.0792	241.3	9	9.7128	2171.0	10.4821	2343.6986	524031.21
1.3802	271.9	10	13.8020	2919.0	19.0495	3752.7638	739296.10
Total		39	36.0678	7149.7	37.8638	7575.5976	1526763.81
$\bar{x}=0.9248$					33.3561	6612.1526	1310723.33
$\bar{y}=183.3256$					4.5077	963.4450	216040.48

$$b=213.7332$$

$$Y=213.7332x-13.4099$$

Adjustment for Mean.....1310833.3

Source of Variation	d. f.	S. S.	M. S.	F
Regression	1	205920.2		
Deviation from Regression	2	10155.1	5077.6	0.60
Between Dose	3	216075.3		d. f. $\left(\begin{smallmatrix} 2 \\ 35 \end{smallmatrix}\right) \dots 3.26(5\%)$
Within Dose	35	29415.4	840.4	$\dots 5.25(1\%)$
Total	38	245490.7		

Fiducial Limits of $b = 213.733 \pm 27.846$

$$t=15.66$$

$$(P=0.05, d. f. = 35 \dots t=2.04)$$

実験IV. 安息香酸エストラジオールによる子宮重量増加 その結果は次の通りである。

Table 4 Rat Uterine Increasing Response of Estradiol Monobenzoate-3

Estradiol benzoate dose (γ)	0.03			0.06			0.12			0.24		
Log dose × 100	0.4771			0.7782			1.0792			1.3802		
	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt × 100	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt × 100	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt × 100	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt × 100
	41.7	41.9	100	36.4	46.5	128	45.2	67.0	148	43.4	120.1	277
	48.2	50.4	105	42.8	51.4	120	44.3	82.6	186	40.7	112.6	277
	36.4	42.4	116	43.8	45.0	103	49.5	62.0	125	42.5	118.5	264
	50.4	48.0	95	47.0	59.5	127	45.5	81.0	178	44.9	118.6	279
	38.2	29.5	77	38.7	49.5	128	46.2	95.0	206	41.0	110.5	270
	50.2	48.4	96	36.3	56.0	154	48.9	83.4	171	38.7	148.6	384
	35.9	24.9	69	38.5	57.5	149	41.0	100.0	244	42.0	125.5	299
	47.2	35.4	75	43.0	46.0	107	44.3	86.0	194	48.0	91.0	190
	38.3	29.0	76	36.2	33.0	91	41.3	74.9	181	47.2	135.5	287
	—	—	—	44.7	56.0	125	—	—	—	—	—	—
n			9			10			9			9
Sy			809			1232			1633			2527
Mean			89.9			123.2			181.4			280.8

本表により計算すると次の通りである。

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy	ny ²
0.4771	89.9	9	4.2939	809.1	2.0486	386.0216	72738.09
0.7782	123.2	10	7.7820	1232.0	6.0560	958.7424	151782.40
1.0792	181.4	9	9.7128	1632.6	10.4821	1761.9019	296153.64
1.3802	280.8	9	12.4218	2527.2	17.1446	3488.0414	709637.76
Total		37	34.2105	6200.9	35.7313	6594.7073	1230311.89
$\bar{x} = 0.9246$					31.6713	5734.3270	1039220.56
$\bar{y} = 167.5910$					4.1	860.3803	191091.33

$$b = 209.8484$$

$$Y = 209.8484x - 26.4339$$

Adjustment for Mean.....1039254.1

Source of Variation	d. f.	S. S.	M. S.	F
Regression	1	180597.14		
Deviation from Regression	2	10475.4	5237.7	0.50
Between Dose	3	191072.5		d.f. (2) ... 3.28(5%)
Within Dose	33	34304.4	10395.3	(33) ... 5.24(1%)
Total	36	225376.9		

$$\text{Fiducial Limits of } b = 209.8484 \pm 102.714$$

$$t = 41.67 \quad (P = 0.05, \text{ d. f. } = 36 \cdots t = 2.03)$$

実験V. スチルベストロールによる子宮重量増加 その結果は次の通りである。

Table 5 Rat Uterine Increasing Response of Stilbestrol

Stilbest- erol do- se(r)	0.10			0.20			0.40		
Log do- se × 10	0.000			0.301			0.620		
	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt ×100	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt ×100	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt ×100
	40.0	103.6	259	39.0	117.6	302	38.5	133.8	348
	45.0	81.4	181	34.7	100.0	288	40.5	140.5	347
	38.5	95.6	248	47.4	122.6	259	40.0	143.5	358
	40.0	92.3	231	38.4	118.3	308	34.7	118.1	378
	37.5	109.3	291	35.8	138.8	388	37.1	138.1	372
	36.8	103.3	281	37.9	132.5	350	34.9	124.7	357
	41.2	110.5	268	39.2	96.3	245	41.5	165.0	398
	40.0	95.5	241	43.0	125.0	291	41.2	135.0	328
	38.7	83.5	216	38.5	117.5	305	33.9	149.6	441
	—	—	—	38.0	116.4	306	35.7	149.0	417
n			9			10			10
Sy			2316			3042			3704
Mean			257.3			304.2			370.4

本表により計算すると次の通りである。

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy	ny ²
0.000	257.3	9	0.000	2315.7	0	0	595829.61
0.301	304.2	10	3.010	3042.0	0.9060	915.6420	92376.40
0.602	370.4	10	6.020	3704.0	3.6240	2229.808	1371961.60
Total		29	9.030	9061.7	4.5300	3145.450	2893167.61
$\bar{x} = 0.3114$					2.811	2821.626	2831531.27
$\bar{y} = 312.472$					1.719	323.824	61636.34

$$b = 188.3779$$

$$Y = 188.378x - 253.81$$

Adjustment for Mean.....1831718.76

Source of Variation	d. f.	S. S.	M. S.	F
Regression	1	61001.74		
Deviation from Regression	1	601.50	601.50	0.185
Between Dose	2	61603.24		d. f. (1) ... 4.22 (5%)
Within Dose	26	84524.00	3250.92	(26) ... 7.79 (1%)
Total	28	146129.24		

Fiducial Limits of $b = 253.811 \pm 89.395$ $t = 58.37$ ($P = 0.05$, d. f. = 26... $t = 2.06$)

実験VI. エチニルエストラジオールによる子宮重量増加 その結果は次の通りである。

Table 6 Rat Uterine Increasing Response of Ethinylestradiol

Ethinyl- estradiol dose (γ)	0.03			0.06			0.12			0.24		
Log do- se $\times 100$	0.4771			0.7782			1.0792			1.3802		
	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$	Body Wgt (g)	Uterine Wgt (mg)	Uterine Wgt Body Wgt $\times 100$
	37.0	50.0	135	39.0	67.5	173	40.0	110.1	275	38.2	141.0	368
	42.1	44.1	105	38.1	56.0	147	38.0	80.9	213	41.1	133.7	326
	45.0	30.5	68	48.0	84.7	176	39.0	133.0	341	41.0	139.1	339
	40.9	47.5	116	45.0	73.5	163	40.1	117.7	293	42.8	149.8	348
	44.0	48.5	110	36.1	80.2	223	38.9	99.1	254	40.9	145.9	356
	42.0	43.7	104	38.0	63.5	167	45.9	108.6	236	48.9	133.5	276
	37.0	42.5	115	33.2	64.2	194	39.0	102.2	262	39.0	138.6	355
	43.7	45.2	106	39.0	72.5	185	43.0	114.0	265	37.1	145.4	393
	37.8	56.5	149	37.9	72.2	189	40.8	69.4	169	39.0	118.9	305
	37.0	43.0	116	—	—	—	40.0	109.2	273	41.0	116.5	284
n			10			9			10			10
Sy			1124			1618			2582			3346
Mean			112.4			179.8			258.2			334.6

本表により計算すると次の通りである。

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy	ny ²
0.4771	112.4	10	4.771	1124.0	2.2762	536.2604	126337.6
0.7782	179.8	9	7.004	1618.2	5.4505	1259.3192	290952.4
1.0792	258.2	10	10.792	2582.0	11.6467	2786.4944	666672.4
1.3802	334.6	10	13.802	3346.0	19.0495	4618.1492	1119571.6
Total		39	36.369	8670.2	38.4229	9200.2232	2203534.0
$\bar{x} = 0.9325$					33.9154	8085.2950	1927496.6
$\bar{y} = 222.3128$					4.5075	1114.9282	276037.4

$$b = 247.3495$$

$$Y = 247.3495x - 8.3406$$

$$\text{Adjustment for Mean} \dots\dots\dots 1927407.7$$

Source of Variation	d. f.	S. S.	M. S.	F.
Regression	1	275770.1		
Deviation from Regression	2	284.2	142.1	0.124
Between Dose	3	2760543.3		d.f. $\left(\begin{smallmatrix} 2 \\ 35 \end{smallmatrix} \right) \dots 3.26 (5\%)$
Within Dose	35	40028.0	1143.7	$\dots 5.25 (1\%)$
Total	38	316092.3		

$$\text{Fiducial Limits of } b = 247.3495 \pm 102.7548$$

$$t = 49.107 \quad (P=0.05, \text{ d. f. } = 35 \dots t = 2.02)$$

以上の実験Ⅰ, Ⅱ, Ⅳ, Ⅴ及びⅥの結果をまとめると Table 7 及び Fig. 2 となる。

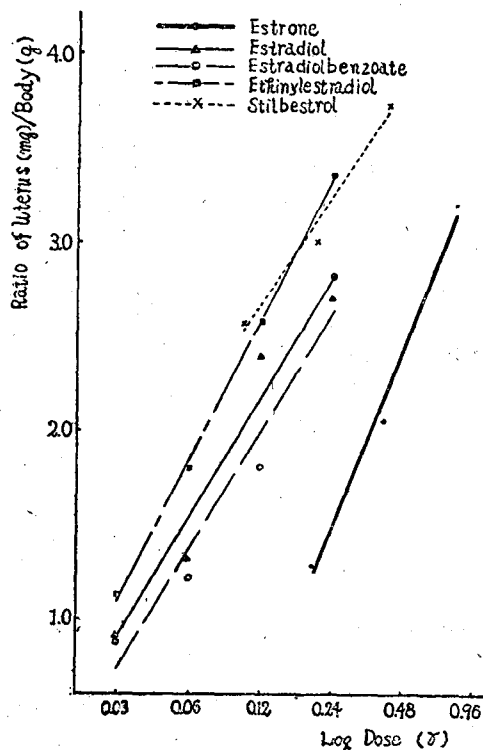
Table 7 Summarized Results of Table 2, 3, 4, and 5

	Uterine Wgt (mg)/Body Wgt (g)							
	Dose (r)							
	0.03	0.06	0.10	0.12	0.20	0.24	0.40	0.80
Estrone					1.24		2.20	3.16
					1.29		2.07	3.22
Estradiol	0.89	1.53		2.17		2.82		
	0.93	1.33		2.41		2.72		
Estradiol Monobenzoate-3	0.74	1.23		1.81		2.81		
	0.90	1.37		2.00		2.63		
Stilbesterol			2.53		3.11		3.67	
			2.57		3.04		3.70	
Ethinylestradiol	1.10	1.84		2.59		3.33		
	1.12	1.80		2.58		3.35		

Bald Type.....Data corrected by regression lines (see Fig 2)

第7表をグラフに表わすと次の通りである。

Fig2 Regression lines of Rat Uterine
Increasing Response and amount of estrogens



結 論

数種の卵胞ホルモン及び発情物質をプロピレングリコールに溶かし、幼若白ネズミに皮下注射し、子宮重量増加をしらべると大量を与えるとかえつて重量増加が著明でないから、用量の撰択が大切であるが、かなりの範囲にわたつて用量の対数と子宮重量増加は直線的關係を示す。その範囲はエストロン 0.2 ~ 0.8 γ, エストラジオール 0.03 ~ 0.24 γ, 安息香酸エストラジオール 0.03 ~ 0.24 γ, エチニルエストラジオール 0.03 ~ 0.24 γ, スチルベステロール 0.1 ~ 0.4 γ である。

文 献

- 1) Köber, S.: Biochem. Z., 239, 209(1931).
- 2) Zimmerman, W.: Z. physiol. Chem., 233, 259 (1933)
- 3) Szego, C.M. and Samuels, L.T.: J. Biol. Chem., 151, 587(1938).
- 4) Jayle, M.F., Crepy, O. and Judas, O.: Bull. soc. chim. biol., 25, 301(1943).
- 5) Callow, N. H., Callow, R. D. and Emmens, C. W.: Biochem. J., 32, 1312 (1938).
- 6) Holtorff, A. F. and Koch, F. C.: J. Biol. Chem., 135, 377 (1940).
- 7) Pincus, G. and Zahl, P. A.: J. Gen. Physiol., 20, 879 (1937).
- 8) Veitch, F. P. and Milone, H. S.: J. Biol. Chem., 158, 61(1945).
- 9) Talbot, N. B., Wolfe, J. K., MacLachlan, E. A., Karush, F. and Butler, A. M.: J. Biol. Chem., 134, 319(1940).
- 10) Schmulovitz, M. J. and Wylie, H. B.: J. Lab. Clinical Med., 21, 210 (1935).
- 11) Pincus, G., Wheeler, G., Young, G. and Zahl, P. A.: J. Biol. Chem., 116, 253 (1936)
- 12) Jailer, J. W.: Endocrinol., 41, 198 (1947).
- 13) Cohen, H. and Bates, R. W.: Endocrinol., 44, 317 (1949).
- 14) 越村栄之助, 岡崎精一: 衛生試験所報告, 72, 41 (1954).
- 15) Hughes, H. B.: J. Biol.

Chem., 140,21(1941). 16) Heusghem, C.: Bull. Soc. Chim. Biol., 31,1114(1949); C. A., 44,7918(1950)
17) Allen, E. and Doisy, E. A.: J. Amer. Med Assoc., 81,919(1923). 18) Butenandt, A. and Ziegner, E.: Z. physiol. Chem., 191,127(1930). 19) Emmens, C. W.: J. Endocrinol., 6,302(1950). 20) Bülb-ling, E. and Burn, J. H.: J. Physiol., 85,320(1935). 21) Lauson, H. D., Heller, C. G., Golden, J. and Severinghaus, E. L.: Endocrinol., 24,35(1939). 22) Rubin, B. L., Dorfman, A. S., Black, L. and Dorfman, R. I.: Endocrinol., 49,429(1951). 23) Jadassohn, W., Fierz-David, H. E. and Ruffoni, G.: Helv. Chim. Acta, 23, 569(1940).

Summary

Several natural estrogens and synthetic estrogens are dissolved in propylenglycole and these solutions are injected to young female rat subcutaneously. The relationship between uterine weight increasing and logarithm of dose shows a straight line over a fairly wide range, i.e., estrone 0.12~0.8 γ , estradiol 0.03~0.24 γ , estradiolbenzoate-3 0.03~0.24 γ , ethinylestradiol 0.03~0.24 γ , and stilbestrol 0.1~0.4 γ . In some cases, as large dose of estrogen makes rather lesser increasing so the selection of dose is very important.

Received April 25, 1954

アヘン産地鑑別法について（第2報）モルヒネ定量値の比較

朝比奈 晴世

Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. II.

Comparison of Morphine Assay Results

By Haruyo ASAHINA

まえがき International Opium Research Programme の一部として国際連合より寄贈されたアヘン標本33種について、乾燥減量とモルヒネ含量を定量しアヘン産地鑑別法（第1報）に報告した。¹⁾

其後この中の12種について国際連合よりモルヒネ定量値の報告に接したので²⁾、ここにこれらを比較考察することにする。

実験方法 第1報に報告した著者の方法は所謂石灰沈澱法であつて、アヘンを水酸化カルシウムとすりませ、その濾液を硫酸マグネシウムで精純にし次にエーテル、塩化アンモニウムを加えてモルヒネを析出させ、これを濾取りし滴定する方法である。

国際連合の方法は所謂抽出法³⁾であつて、その大略はアヘンを水酸化カルシウムとすりませ、その濾液に塩化アンモニウムを加えて、エーテル-アセトン（3：2）混液で連続抽出し溶媒を蒸発し残留物をクロロホルム-ジクロロ酢酸混液でふりませ、水を加えモルヒネを含有するジクロロ酢酸は合して、アンモニアアルカリ性にし（クロロホルムは他の副アルカロイドを含む）クロロホルム-イソブタノールとクロロホルム-エタノール混液でモルヒネを抽出し、溶媒を蒸発しモルヒネをメタノールにとかし滴定する。

実験結果 国際連合より報告に接した12種のアヘンは、トルコ産 Çorum, トルコ産 Export, イラン産 Fars, インド産 Excise, インド産 Banaras, インド産 Malwa, ラオス産 Xieng Khouang B, ユーゴ産 No. 2, 朝鮮産 No. 1, No. 2, 中国産台湾 B, ギリシア産である。

著者と国際連合では乾燥減量が異なるのでモルヒネ含量を乾燥状態に換算して比較すると Table 1 になる。

Table 1. Morphine Value

No.	Origin	ASAHINA			United Nations			Discrepancy
		Morphine			Moisture	Morphine		
		on I %	dry I %	basis aver. %		as determined on dry basis	%	
					%	%	%	%
3	Turkey Çorum C	19.28	19.12	19.20		18.49	19.3	0.1
15	Turkey Export	14.62	14.60	14.61	5.50	14.34	15.17	0.56
18	Iran Fars	12.62	12.32	12.47	6.23	12.68	13.52	1.05
22	India Excise	11.30	11.28	11.29	6.24	12.36	13.18	1.89
23	India Banaras	11.29	11.00	11.15	6.85	11.71	12.57	1.42
24	India Malwa	11.95	11.88	11.92	5.62	12.27	13.00	1.08
27	Laos Xieng Khouang B	13.32	13.57	13.45	6.12	12.98	13.59	0.14
29	Yugoslavia No. 2	17.35	17.25	17.30	5.85	16.53	17.56	0.26
30	Korea No. 1	2.84	2.94	2.89	6.00	4.37	4.65	1.76
31	Korea No. 2	8.57	8.66	8.62	5.69	9.27	9.83	1.21
32	China Taiwan B	8.37	8.50	8.44	5.55	10.21	10.81	2.37
33	Greece	17.27	17.29	17.28	5.82	16.37	17.38	0.10

国際連合ではトルコ産 Çorum の乾燥減量を測定しなかつたので6%として換算した。

トルコ産 Export についてはトルコ政府の定量は乾燥減量17.25%、モルヒネ定量値12.23%で著者の定量と比較すると Table 2 の如くなる。

Table 2. Morphine Assays on Turkish Export Opium

	Moisture %	Morphine Content	
		as determined %	on anhydrous basis %
ASAHINA	6.83	13.61	14.61
Turkish	17.25	12.23	14.78

Table 3 は著者と国際連合とのモルヒネ定量値の差の大きさの順序で配列したものでコデイン定量値及びコデインとモルヒネとの含量比を附記する。コデイン定量値はアヘン産地鑑別法 (第4報)⁴⁾ で報告する。コデインとモルヒネとの含量比は10%モルヒネに対するコデイン含量で示す。

Table 3. Discrepancy of Morphine Assays, Codeine Content and Ratio of Codeine to Morphine

No.	Origin	Morphine Content		Codeine Content		Ratio of Codeine to 10% Morphine
		Discrepancy	ASAHINA-United Nations	ASAHINA		
				as determined	on dry basis	
		%	%	%	%	
33	Greece	0.10	17.3—17.4	1.19	1.30	0.8
3	Turkey Çorum C	0.1	19.2—19.3	1.76	1.93	1.0
27	Laos Xieng Khouang B	0.14	13.5—13.6	2.37	2.60	1.9
29	Yugoslavia No. 2	0.26	17.3—17.6	1.10	1.22	0.7
15	Turkey Export	0.56	14.6—15.2	1.03	1.11	0.8
18	Iran Fars	1.05	12.5—13.5	3.91	4.35	3.5
24	India Malwa	1.08	11.9—13.0	3.06	3.42	2.9
31	Korea No. 2	1.21	8.6— 9.8	2.22	2.44	2.8
23	India Banaras	1.42	11.2—12.6	3.14	3.47	3.1
30	Korea No. 1	1.76	2.9— 4.7	1.06	1.19	4.1
22	India Excise	1.89	11.3—13.2	3.04	3.44	3.1
32	China Taiwan B	2.37	8.4—10.8	4.67	5.05	6.0

考察 国際連合より寄贈の同一アヘン12種について日本とアメリカに於て異つた方法で定量したモルヒネ含量値を比較してみると。

1) 12種いずれの場合も著者の沈澱法が国際連合の抽出法よりもモルヒネ定量値が低くその差は0.1—2.37%であつた。著者の沈澱法は国際薬局方⁵⁾、英局方⁶⁾と異りモルヒネ溶解度による補正を含んでいないから抽出法よりも低い値が得られるのは当然考えられることである。トルコ産 Export については著者と国際連合とは0.56%の相違があつたがトルコ政府の定量とはその乾燥減量が6.83—17.25%と大いに異なるにも拘らず乾燥状態に換算したモルヒネ含量は14.61—14.78%差0.17%で比較的良好一致していた。

2) 沈澱法と抽出法とのモルヒネ定量値が比較的良好一致していた場合 (差0.56%以下の場合) は、いずれもモルヒネ含量が13.5%以上の高含量であり、又逆にモルヒネ高含量の場合はいずれもこの中に入つていた。コデイン含量からみると比較的良好一致していた場合は、いずれも2.37%以下で3%以上のコデイン高含量のものは入つていなかった。

3) 沈澱法と抽出法との差が1%以上の場合はいずれもモルヒネ含量が12.5%以下でしかもコデイン含量が3%以上の高含量の場合か又はコデイン含量3%以下の場合にはモルヒネ含量8.6%以下であつた。

4) コデインとモルヒネとの割合から考えると一層明白であつて比較的良好一致している場合は10%モルヒネに対するコデイン含量がいずれも1.9以下であつて定量値の差が大きい場合はこの比が2.8以上であつた。

結論 アヘン中にコデイン含量が多い場合や或はコデイン含量が少くてもモルヒネ含量が少くモルヒネに対するコデインの比が比較的大きい場合沈澱法によるモルヒネ定量値が抽出法に比べて低い値が得られることがわかった。この原因はコデインがモルヒネの沈澱析出を妨げるためだと結論される。これは1918年 Annett, Singh⁷⁾が指摘しているのとは一致する。この点についてはアヘン産地鑑別法 (第3報)⁸⁾で考察する。

本報告に関して御助言を得た国際連合の Mr. Charles C. Fulton 及び米軍極東犯罪調査研究所沼井鉄太郎氏に感謝する。

文 献

- 1) 朝比奈晴世, 水町彰吾; 衛試, 71, 20—26 (1953); United Nations Document ST/SOA/SER. K/15, 11 March 1953.
- 2) Mr. Charles C. Fulton よりの 1952年 10月 16日附の私信.
- 3) United Nations Document ST/SOA/SER. K/1, 25 January 1951.
- 4) 朝比奈晴世; 衛試 72, 63(1954).
- 5) International Pharmacopoeia 1951版 161.
- 6) 英局方 1953版 376.
- 7) Annett, Singh, Analyst 43, 205—13 (1918).
- 8) 朝比奈晴世, 志内賢彦; 衛試, 72, 57(1954).

Summary

In the determination of morphine in opium, I obtained lower morphine values by the precipitation method than by the extraction method of the United Nations Secretariat.

When the codeine content or the ratio of codeine to morphine was high, the discrepancy in morphine figures by the two assay methods was remarkable.

It was concluded that the discrepancies were due to the hindering effect of codeine on the precipitation of morphine, which Annett had pointed out in 1918.

Received March 29, 1954

アヘン産地鑑別法について (第3報) アヘン中の

モルヒネ及びコデインの定量

朝比奈晴世, 志内賢彦

Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. III.

The Determination of Morphine and Codeine in Opium

By Haruyo ASAHINA and Yoshihiko SHIUCHI

まえがき アヘン中のモルヒネ定量法として各国薬局方に採用されている方法は所謂石灰沈澱法であつて、その骨子はアヘンの水酸化カルシウム抽出液にエーテル、塩化アンモニウムを加えて析出するモルヒネを濾取滴定する方法である。

朝比奈, 水町¹⁾ (1953)は第1報で石灰沈澱法によりアヘン中のモルヒネを定量報告した。

Annett, Singh²⁾ (1918)は石灰沈澱法についてアヘン中にコデインが多い時はモルヒネの沈澱を妨害しモルヒネ定量値を低くし、水酸化カルシウム抽出液からトルエンでコデインを除くとモルヒネの析出を容易にし高い定量値を得ると報告した。

町口, 城野³⁾ (1925)はエーテルの代りにエーテル:ベンゼン混液(8:2)を用いてモルヒネの高い値を得た。

桜井⁴⁾ (1952)は塩酸アヘンアルカロイドについて副アルカロイド除去にエーテルの代りにベンゼンを用いてモル

ヒネ以外の酸消費物質を余計に除きしかも高いモルヒネ定量値を得た。ベンゼンの方がよく水にまざる以外あまり理由を明らかにしていない。

同一のアヘンについて石灰沈澱法と国際連合の石灰抽出法とのモルヒネ定量値を比較した場合モルヒネ含量多くコデインの少ないアヘン例えばトルコ、ギリシャ、ユーゴ産では二つの方法の差が少く、コデインの多いアヘン例えばインド、中国産では差が大きいことがわかりこの原因はコデインの妨害作用によると推論した⁵⁾。

石灰沈澱法でコデイン其の他の副アルカロイドのモルヒネ析出に及ぼす作用は当然考えなければならないことであるから、アヘンの水酸化カルシウム抽出液より溶媒でコデイン其の他の副アルカロイドを除去して正しいモルヒネ定量値を求め石灰沈澱法をより完全なものにすると共に、同一試料より出発してモルヒネと同時にコデインをも定量せんとした。

従来コデインの定量はモルヒネと別個に行われていたが⁶⁾ ⁷⁾ コデインはアヘンの産地により含量が異り、この含量及びコデインとモルヒネとの含量比はアヘン産地鑑別の上に役立つので⁸⁾ モルヒネとコデインとを同時に定量し得ることは便宜なことである。

実験の部

アヘン抽出液より副アルカロイド除去について 第1報のアヘン中モルヒネ定量法に従つてアヘン抽出の澄明な濾液 30cc を溶媒 30, 20, 20, 10, 10cc でふりまぜて静置分離して溶媒層は集めてコデインを定量する。水層は濾過して濾液 20cc を正確にとり以下第1報と同じくしてモルヒネ定量を行う。液が乳濁化して分離し難い時には溶媒を多く用いできるだけ完全に分離する。

溶媒としてエーテル、トルエン、ベンゼン、クロロホルムを用いた結果は第1表の通りである。

第 1 表

アヘン		溶媒なし %	エーテル %	トルエン %	ベンゼン %	クロロホルム %
アヘン I	定量値	9.70	12.38	10.91	13.73	10.34
		9.68	12.41	10.91	13.71	10.30
	平均値	9.69	12.40	10.91	13.72	10.32
アヘン II	定量値	13.28	13.98	13.49	14.61	13.35
		13.35	14.14	13.35	14.69	13.31
	平均値	13.32	14.06	13.42	14.65	13.33

アヘンの水酸化カルシウム抽出液から溶媒で副アルカロイドを除去した場合はモルヒネ定量値が高くなることがわかる。

溶媒によつてモルヒネ定量値が異なるので溶媒を用いない場合よりの増加分を比較すると第2表になる。

第 2 表

	エーテル %	トルエン %	ベンゼン %	クロロホルム %
アヘン I	2.71	1.22	4.03	0.63
アヘン II	0.74	0.10	1.33	- 0.01

モルヒネ定量値はベンゼン、エーテル、トルエン、クロロホルムの順序でベンゼンが最も高くクロロホルムが最も低い。

アヘンの水酸化カルシウム抽出液にコデインを加えた場合について アヘンの抽出液にコデインを溶解させ第1報に従いモルヒネを定量した結果は第3表に示す。添加コデイン量はアヘン抽出液 20cc に対する量である。

第 3 表

	添 加 コ デ イ ン 量	モ ル ヒ ネ 含 量 %	減 少 %
1	な し	8.46	
2	20mg	8.13	0.33
3	40mg	7.93	0.53
4	エーテルを加えず	7.42	1.04

添加したコデインの量に比例してモルヒネ定量値が少くなることがわかる。エーテルを加えずにモルヒネを析出させた場合の定量値は7.42%で最も少い事は副アルカロイドを除去しないためであつてコデインがモルヒネ析出を妨げることがわかる。

アヘン抽出液 20cc にコデイン 40mg 添加した他のアヘンの例を第4表で示す。

第 4 表

	モ ル ヒ ネ 含 量	コ デ イ ン 添 加 40 mg	減 少
アヘン III	12.01	11.62	0.39
アヘン IV	11.00	10.38	0.62

これによつてコデイン添加によりモルヒネ析出量が減少することがわかる。

コデインのモルヒネ析出に及ぼす作用について

次の4つの場合の定量を行う。

- モルヒネの水酸化カルシウム液を作り第1報の通り定量する。
- モルヒネの水酸化カルシウム液にコデインを添加溶解させ第1報の通り定量する。
- モルヒネの水酸化カルシウム液にコデイン添加溶解後ベンゼンでふりませコデインを除き第1報の通り定量する。
- モルヒネの水酸化カルシウム液をベンゼンでふりませ第1報の通り定量する。

溶液 20cc 中にモルヒネ 0.1, 0.2, 0.4g 含有する場合を実験する。これはモルヒネ含量 5, 10, 20% のアヘンに相当する。コデインは溶液 30cc 中に 0.09g 添加する。これはアヘン中コデイン 3% に対応する。

第5表は5%の場合である。

第 5 表

	モ ル ヒ ネ (0.1000g)		
	定 量 値 g	回 収 率 %	平 均 %
A	0.09472	94.72	94.44
	0.09415	94.15	
B	0.07988	79.88	79.74
	0.07960	79.60	
C	0.09586	95.86	96.01
	0.09615	96.15	
D	0.09643	96.43	96.43
	0.09643	96.43	

AとBと比較したとき即ちコデインを加えることにより14.70%も低下しベンゼンでふることにより16.27%増加してしかもモルヒネだけの場合(A)より多くなる。CとDとは大体一致するが共にAよりも大きい。

第6表は10%の場合である。

第 6 表

	モ ル ヒ ネ (0.2000g)		
	定 量 値 g	回 収 率 %	平 均 %
A	0.19115	95.58	95.51
	0.19087	95.44	
B	0.18545	92.73	92.59
	0.18487	92.44	
C	0.19828	99.14	99.07
	0.19800	99.00	
D	0.19885	99.43	99.29
	0.19828	99.14	

コデインを加えることにより2.92%低下しベンゼンでふることにより6.48%増加して、しかもモルヒネだけの場合(A)より多くなる。CとDとは殆んど同じで共にAよりも大きい。5%と10%の場合は同じ傾向でコデインの妨害作用が明らかに認められる。

第7表は20%の場合である。

第 7 表

	モ ル ヒ ネ (0.4000g)		
	定 量 値	回 収 率 %	平 均 %
A	0.39434	98.59	98.56
	0.39406	98.52	
B	0.41034	102.59	102.48
	0.40946	102.37	
C	0.39720	99.30	99.34
	0.39748	99.37	
D	0.39805	99.51	99.44
	0.39748	99.37	

モルヒネ20%の場合はコデインを加えることにより逆にモルヒネ回収率が増加し、コデインがモルヒネと共に沈澱することがわかる。CとDが殆んど同じで共にAより大なることは5%、10%の場合と同じである。

モルヒネの回収率を比較すると第8表になる。

第 8 表

	5 %	10 %	20 %
A	94.44	95.51	98.56
B	79.74	92.59	102.48
C	96.01	99.07	99.34
D	96.43	99.29	99.44

モルヒネを第1報の通り定量した場合の回収率Aが5%、10%、20%の順で高くなるのはモルヒネの溶解度が、いずれの場合も同じであることを考えれば了解できる。

コデインを添加した場合Bは5%、10%はモルヒネ回収率を減じ20%は逆に増加して、モルヒネが少量のときはコデインの妨害作用があるが多量のときはないことがわかる。

ベンゼンでふりまぜる時はコデインを加えた時 (C) も加えない時 (D) も 5%, 10%, 20%, 3つの場合ともモルヒネ回収率がお互に殆んど同じでしかもベンゼンを用いないモルヒネだけの時 (A) よりも高い。このことはベンゼンとふることによりコデインを除去してコデインの作用をなくすると同時にモルヒネの溶解度を減じモルヒネの析出を助けるためであると考えられる。

ここで用いたモルヒネ, コデインは夫々局方適品の塩酸モルヒネ, 磷酸コデインより自製し再結晶乾燥したもので定量の結果夫々 100.03%, 100.05% の純度を有する。

アヘンへの応用 (アヘン中モルヒネ定量の改良法) ベンゼンでコデインを除くとモルヒネ定量値が高くなるのでアヘンに応用してみる。

第 9 表

	溶 媒 な し	ベンゼン法 (改 良 法)
ア へ ン I	9.69	13.72
ア へ ン II	13.32	14.65
ア へ ン V	10.35	11.00
ア へ ン VI	11.65	14.83
ア へ ン VII	11.26	12.02

5種のアヘンについていずれもベンゼンを用う改良法により高いモルヒネ定量値をうる。

コデインの定量 (モルヒネ定量と同時に) アヘン中のコデインは殆んど全部水酸化カルシウムで抽出されるから⁶⁾ モルヒネ改良定量法の場合のベンゼン層を集めコデインの定量を行う。このベンゼン層はコデインの他にテバイン, パパベリン等の副アルカロイドを含んでいるがこれらは塩酸酸性溶液でクロロホルムに溶解するから除去可能で次に水酸化ナトリウムアルカリ性にしてクロロホルムでコデインを抽出し滴定により定量する。

酸性溶液のクロロホルム抽出物はテバイン, パパベリンの定量に用うる。

定量法 アヘンの水酸化カルシウム抽出液 30cc を抽出したベンゼン層を合して 1% 塩酸 20, 20, 10, 10, 10cc でふりまぜアルカロイドを抽出する。この終末はマイヤー試液でみる。酸性液をクロロホルム 20, 20, 20, 10, 10, 10cc でふりまぜパパベリン, テバイン等を除き水酸化ナトリウム試液を加えて強アルカリ性とし, クロロホルム 20, 10, 10, 10cc でコデインを抽出する。クロロホルム層は合して 10cc の水で 2 回洗い洗液は更にクロロホルム 5cc で 3 回ふりまぜ抽出液と合し水浴上で蒸発し残留物を N/10 塩酸 10cc に溶解しメチルレッド試液 2 滴を指示薬として N/10 水酸化カリウム液で過剰の酸を滴定する。

N/10 塩酸 1cc = 29.94mg $C_{18}H_{21}O_3N$

これはアヘン 3g の中に含まれるコデインの量である。

アヘン中のコデインの定量について 5種のアヘンについてモルヒネと同時にコデインの定量を行う。

第 10 表

	コ デ イ ン 含 量 %
ア へ ン I	3.86
ア へ ン II	4.06
ア へ ン V	3.75
ア へ ン VI	2.68
ア へ ン VII	3.33

コデインの回収率について コデインのモルヒネ析出に及ぼす作用の場合に添加したコデインをこの方法で定量しコデインの回収率をみる。溶液 30cc 中のコデインの量は 0.09g である。

第 11 表

	コ デ イ ン (0.0900g)		
	定 量 値 g	回 収 率 %	平 均 %
5 %	0.08952	99.46	99.13
	0.08892	98.80	
10 %	0.08922	99.12	99.80
	0.09042	100.47	
20 %	0.08922	99.12	99.63
	0.09012	100.13	

回収率の平均は99.52%である。

むすび アヘン中よりモルヒネを水酸化カルシウムで抽出して定量する場合コデイン其の他の副アルカロイドを溶媒で除去するとモルヒネ定量値が増加しベンゼン、エーテル、トルエン、クロロホルムの中でベンゼンが最も良好なことがわかつた。

アヘンの水酸化カルシウム抽出液にコデインを添加するとモルヒネ析出量が少くなるのでコデインが妨害することを証明し得た。

モルヒネ析出に対するコデインの妨害作用をしらべこれが著しく作用するのはコデインに対しモルヒネの量の少い場合であつて、多くなると逆にコデインがモルヒネと共に沈澱することを認めた。この場合もベンゼンでふりまぜることでコデインの作用をなくすることができた。

ベンゼンを用うることによりアヘン中のモルヒネ定量法を改良しこのベンゼン抽出液から同時にコデインを定量する方法を考案し、この方法でアヘン中のモルヒネ及びコデインを定量した。この新しいコデイン定量法の特長はモルヒネ定量と直結しておりコデインをテバイン、パパベリン等の副アルカロイドから酸性溶液のクロロホルム抽出で分離する点にある。

文 献

- 1) 朝比奈, 水町: 衛試, 71, 20—26 (1953).
- 2) Annett, Singh : Analyst, 43, 205—13 (1918).
- 3) 町口, 城野: 薬誌, 524, 849—861(1925); 衛試, 28, 116—128(1926).
- 4) 桜井: 高峯研究所年報, 4, 103—108(1952).
- 5) 朝比奈: 衛試, 72, 55 (1954).
- 6) United Nations Document E/CN. 7/202. (1950).
- 7) United Nations Document ST/SOA/SER. K/20. (1953).
- 8) 朝比奈: 衛試, 72, 69 (1954)

Summary

In the precipitation method for determination of morphine on lime-water extract of opium, a higher morphine value was obtained by first shaking out the secondary alkaloids with an organic solvent. Benzene, ether, toluene, and chloroform were tried, and benzene was found the best. Addition of pure codeine to the lime-water extract resulted in a lower morphine figure, due to the hindrance of codeine to the precipitation of morphine.

This effect was remarkable when the ratio of codeine to morphine was high. In case of a low ratio, codeine did not so much hinder the precipitation of morphine, but co-precipitated with it. In either case, the effect on the precipitation of morphine was eliminated by shaking out the codeine with benzene.

The method of determining morphine by precipitation was improved and a new determination of codeine in connexion with the morphine assay was devised. The separation of codeine from other by-alkaloids. (thebaine, papaverine, etc.) was effected by extraction of the acidic solution with chloroform.

Received March 29, 1954

アヘン産地鑑別法について (第4報)

主要アルカロイドの定量 (その1)

朝比奈晴世

Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. IV.

Analysis of the Main Alkaloids. I.

By Haruyo ASAHINA

まえがき 押収アヘンを物理的や化学的方法で鑑定して産地を明確にきめることが可能ならば、アヘン不法取引を抑圧するのに役立つことである。この一つの手段としてアヘン中の主要アルカロイドを定量し産地との関係を明らかにせんとした。

このことは同時に各国産アヘンの特長を明瞭にすることであり、アヘンの品質鑑定や製薬原料用としてアヘンの価値を定める上に重要であるばかりでなく、近く栽培が開始されるケシの品種改良にも必要なことである。

アヘン中の主要アルカロイド分析法は従来多くの研究者により種々提案されその含量が報告されている。

欧米薬局方のアヘンは一般にトルコ産かバルカン産が用いられるために、この種類は副アルカロイドが少いので成書にはコデイン、テバイン含量は少く書いてある。例えば A. Pictet の The Vegetable Alkaloids はコデイン 0.3%, テバイン 0.4%; Allen の Commercial Organic Analysis はコデイン 0.2-0.4%, テバイン 0.15-1%となつてゐる。

町口²⁾(1926) は日本産アヘンに関する研究で次の如き外国産アヘンの主要アルカロイド含量表を引用し、アヘン 250-500g より日本産アヘンの分析を行った。

外国産アヘン主要アルカロイド含量表

	モ ル ヒ ネ %	ナ ル コ チ ン %	テ バ イ ン %	バ バ ベ リ ン %	コ デ イ ン %
イ ラ ン	6-16	1.9-8.4	0.86	—	0.7-1.5
ト ル コ	5-16	4.0-8.0	0.2-0.5	0.2-1.0	0.2-0.8
ギ リ シ ア	12-15	—	—	—	0.46
オーストラリア	4-11	6.50	—	—	0.60
ノールウェイ	—	1.90	—	0.30	—
ド イ ツ	7-20	6.3-8.4	—	—	—
イ ギ リ ス	10-14	4.8-7.6	—	—	0.7-1.5
フ ラ ン ス	5-22	11.0	—	—	2.8
北 米	6-15	5.0	—	—	0.4
イ ン ド	4-10	3.3-4.2	0.9	—	0.7
中 国	4-11	2.0-6.6	0.8-0.9	0.3-0.8	0.1-0.2

日本産主要アルカロイド含量表 (モルヒネ以外)

ナ ル コ チ ン %	コ デ イ ン %	テ バ イ ン %	バ バ ベ リ ン %
5.50	0.58	0.64	0.48
5.30	1.20	0.42	0.35
7.10	0.43	0.57	0.71
6.20	0.62	0.48	0.50
4.20	0.57	0.76	0.55
大 約 均	4.0-7.0	0.4-1.0	0.4-0.8
			0.4-0.7

Anneler³⁾(1936)はアヘン 12g よりモルヒネ以外の主要アルカロイドを次の如く定量した。

	モルヒネ %	コデイン %	テバイン %	ナルコチン %	パパベリン %
トルコ	12.39	1.06	1.09	3.93	0.81
ロシア	11.75	2.30	1.28	10.40	1.85
ロシア	11.84	2.35	1.43	11.20	1.98
イラン	10.51	2.81	3.70	5.06	1.60

モルヒネは Harrison, Self 法による。イラン産はテバイン、コデインが、ロシア産はコデイン、ナルコチンが多いとした。

有馬, 岩切⁴⁾(1938)は Kanewskaja 法 (1924) を一部変更して満蒙産アヘンの分析をした。(100gより)

	モルヒネ %	ナルコチン %	パパベリン %	テバイン %	コデイン %
北満産 { 東土一等上	11.71	3.92	0.84	2.68	2.92
北満産 { 東土三等上	9.11	1.47	0.57	4.21	3.98
北満産 { 東土等外	2.65	0.76	0.21	1.21	2.12
熱河産 { 西土一等上	11.33	3.87	0.62	2.45	3.30
熱河産 { 西土三等上	7.72	2.74	0.16	1.43	3.80
熱河産 { 西土等外	3.71	4.52	0.03	1.07	3.22

等級に拘らずコデイン含量は殆んど変化なく多量なることは特異な事実とした。

石原法⁵⁾(1947), 桜井のその改良法⁶⁾(1952)は共に産地別の分析結果を示していない。

実験材料 国際連合よりの寄贈アヘン 19 種, 厚生省麻薬課より分与された 7 種, モルヒネ定量を求められた混合アヘン末 10 種合計 36 種類で産地別にすると, トルコ 4, ギリシア 1, ユーゴ 2, イラン 3, インド 3, ジェトナム 1, ラオス 2, 中国 6 (混合検体 4), 満州 2 (混合 1), 蒙古 4 (混合 3), 朝鮮 6 (混合 1), 日本 2 (混合 1) である。

実験方法 乾燥減量, モルヒネ定量は第 1 報の方法による。副アルカロイドの定量は Anneler 法を一部変更して行つた。この方法はアヘン塩酸抽出液をクロロホルムで抽出しナルコチン, パパベリン, テバインの塩酸塩を移行させモルヒネ, コデインを酸性溶液に残し, 水酸化ナトリウムでアルカリ性にしてクロロホルムでコデインを抽出しモルヒネと分離する。

アヘンの抽出は Anneler の原報を変更し次の如くした。アヘン 12g を正確に秤り乳鉢で水 20cc とすりませ糊状とし, 1%塩酸 100cc を加え, 20分かきまぜる。コンゴ赤強酸性なることをたしかめた後濾過し濾液 100cc を連続抽出器でクロロホルムで抽出する。

クロロホルム蒸溜残留物のナルコチン, テバイン, パパベリン塩酸塩の混合物は弱酸性溶液で酢酸ナトリウムを加えて大部分のナルコチン, パパベリンを沈澱させる。この濾液をアンモニアアルカリ性にしてクロロホルムでテバインとナルコチン, パパベリンの残部を抽出する。この残留物をアルコールに溶解し, 酒石酸溶液をメチルレッド酸性になるまで加えて酒石酸テバインを沈澱さす。この酒石酸テバインを 0.5% 塩酸にとかし, アルカリ性でベンゼンにてテバインを抽出しベンゼンを蒸溜してテバインを乾燥秤量する。

酒石酸テバインの濾液はアルコールを蒸発して残留物を水に溶かし, 酢酸ナトリウムを加えて少量のナルコチン, パパベリンを沈澱させる。この沈澱を最初のナルコチン, パパベリンの沈澱と合して乾燥後, ベンゼンに温時溶解させ不溶物を除去する。このベンゼン溶液を水酸化ナトリウム液で洗った後, ナルコチン, パパベリンを 1% 塩酸に移行させ, アルカリ性にしてクロロホルムで抽出し溶媒を蒸溜してナルコチン, パパベリン混合物を得る。原報はベンゼン溶液からそのまま溶媒を蒸発しているが以上の如く改良した。

この混合物 1g に対してベンゼン 30cc, 15%アルコール製水酸化カリウム液 5cc の割合で加えてナルコチンを水に可溶性にしてパパベリンと分離する。水溶液は酸性にしてナルコチンにし, アルカリ性にしてクロロホルムで抽出し溶媒を蒸溜してナルコチンを乾燥秤量する。

ババペリンのベンゼン溶液はベンゼンを蒸溜して残留物0.1gに対して2%醋酸溶液5ccの割合で加えて温時溶解し放冷して醋酸ババペリンを析出さす。これを濾取して1%塩酸に熱時溶解しアンモニアアルカリ性にしてベンゼンで抽出する。溶媒を蒸溜してババペリンを乾燥秤量する。

コデインの定量は原報を変更して次の如くした。水酸化ナトリウム溶液のクロロホルム抽出残留物は10%酢酸3ccに熱時溶解し水60ccを加えアンモニアアルカリ性にして不純物を沈澱除去する。濾液よりコデインをクロロホルムにて抽出し残留物0.3gに対し1ccの割合で無水アルコールを加え水浴上温めて溶解し10%アルコール製塩酸をメチルレッド酸性になるまで加え塩酸コデインを析出させる。これを濾取し水にとかしアルカリ性にしてクロロホルムで抽出しクロロホルム残留物を過剰のN/10塩酸にとかしN/10水酸化カリウム液で逆滴定する。

この方法の特長は検体量が少いことと各アルカロイドを純粋に分離し融点を測つて純度を確め得ることである。しかしこのことは定量値を他の方法より低くする原因になる。又モルヒネ以外の4つのアルカロイドを同じアヘンより定量するので別々に定量する方法より低い値を得る。

Anneler の原報には4つのアルカロイドについて母液に溶存するための補正即ちデバイン7mg, ナルコチン46mg, ババペリン6.5mg, コデイン7mgが加えられているがこの補正は再検討するの必要があり本報告は各国産のアヘンの比較が目的であるから全部削除した。

実験結果 乾燥減量, モルヒネ含量は Table 1 の通りでNo. 62, 75, 78, 79, 80 以外は第1報で報告した。No. 40 以下は乾燥アヘン末である。

Table 1. Loss in Weight on Drying and Morphine Content of Opium and Opium Powder

No.	Origin	Loss in Weight %	Morphine Content %
1	Turkey Aydin D	9.36	15.59
2	Turkey Afyon B	9.30	12.24
3	Turkey Çorum C	8.72	17.53
15	Turkey Export	6.83	13.61
16	Iran Nehavand	10.19	9.36
17	Iran Kerman	11.47	10.40
18	Iran Fars	10.06	11.22
22	India Excise	11.65	9.98
23	India Banaras	9.38	10.10
24	India Malwa	10.53	10.66
25	Vietnam Laokay	7.97	11.45
26	Laos Luang Prabang B	9.42	6.89
27	Laos Xieng Khouang B	8.78	12.27
28	Yugoslavia No. 1	8.93	16.28
29	Yugoslavia No. 2	9.60	15.64
30	Korea No. 1	10.56	2.59
31	Korea No. 2	8.87	7.85
32	China B	7.60	7.79
33	Greece G	8.29	15.85
35	China (Manchuria)	8.35	11.01
36	Mongolia	9.04	10.22
37	Korea	9.60	11.11
38	China	13.12	6.20
39	Japan	9.55	10.29
79	Korea	12.29	9.99
80	Korea	13.46	8.95
40	Mongolia	1.92	8.40
41	Mongolia	2.82	11.94

No.	Origin	Loss in Weight %	Morphine Content %
42	Mongolia	3.49	11.93
43	China	2.61	10.27
44	China	1.06	9.13
45	China	1.74	10.03
46	China	0.65	7.40
62	Japan	5.67	12.08
75	China (Manchuria)	1.81	11.25
78	Korea	3.57	12.70

コデイン、テバイン、ナルコチン、パバベリンの含量は Table 2 の通りである。

Table 2. - Alkaloidal Content of Opium and Opium Powder

No.	Origin	Codeine %	Thebaine %	Narcotine %	Papaverine %
1	Turkey	1.91	1.60	4.34	1.45
2	Turkey	2.10	1.49	4.18	0.69
3	Turkey	1.76	0.88	4.47	1.83
15	Turkey	1.03	1.10	4.31	0.94
16	Iran	2.63	4.28	7.61	1.14
17	Iran	3.03	2.74	6.51	1.23
18	Iran	3.91	3.67	7.44	1.53
22	India	3.04	1.82	6.57	0.57
23	India	3.14	1.98	6.00	0.16
24	India	3.06	1.63	6.96	1.47
25	Vietnam	1.89	2.74	4.47	0.16
26	Laos	1.45	2.28	3.01	0.07
27	Laos	2.37	2.70	4.70	0.37
28	Yugoslavia	0.74	0.67	4.13	1.14
29	Yugoslavia	1.10	0.74	4.46	1.49
30	Korea	1.06	0.76	1.33	0.29
31	Korea	2.22	1.38	2.89	0.32
32	China	4.67	2.18	4.74	0.66
33	Greece	1.19	0.48	4.92	1.60
35	China (Manchuria)	4.18	1.43	4.92	0.88
36	Mongolia	3.65	2.40	5.32	0.90
37	Korea	3.60	3.42	4.87	0.59
38	China	2.63	0.88	10.68	1.83
39	Japan	2.65	1.64	2.95	1.28
40	Mongolia	2.86	0.82	7.19	1.53
41	Mongolia	4.10	2.06	5.65	0.94
42	Mongolia	4.04	1.93	5.72	0.87
43	China	3.38	0.82	5.78	0.86
44	China	4.35	2.31	4.85	0.80
45	China	3.30	1.27	4.23	0.61
46	China	4.47	1.93	5.29	0.78
62	Japan	2.83	1.57	3.25	1.44

No.	Origin	Codeine %	Thebaine %	Narcotine %	Papaverine %
75	China (Manchuria)	4.18	2.53	4.65	0.74
78	Korea	4.39	2.54	5.47	0.89
79	Korea	3.02	2.10	4.18	0.85
80	Korea	1.72	0.95	3.30	0.41

乾燥アヘン末についてアヘンよりの乾燥減量は Table 3 の通りである。

Table 3. Loss in Weight by First Drying of Opium Powder

No.	Origin	Loss in Weight %
40	Mongolia	13.77
41	Mongolia	13.49
42	Mongolia	12.13
43	China	10.34
44	China	14.87
45	China	13.83
46	China	14.67
62	Japan	13.00
75	China (Manchuria)	11.59
78	Korea	15.15

この数字は武田薬工、三共両会社の御好意による。

考察 比較のために乾燥アヘン末をもとの状態に換算すると Table 4 になる。

Table 4. Alkaloidal Content Calculated on Raw Basis

No.	Origin	Morph- ine %	Codeine %ine	Theba- %ine	Narco- %tine	Papave- %rine
40	Mongolia	7.24	2.47	0.71	6.20	1.32
41	Mongolia	10.33	3.55	1.78	4.89	0.81
42	Mongolia	10.48	3.55	1.70	5.03	0.76
43	China	9.21	3.03	0.74	5.18	0.77
44	China	7.77	3.70	1.97	4.13	0.68
45	China	8.64	2.84	1.09	3.64	0.53
46	China	6.31	3.81	1.65	4.51	0.67
62	Japan	10.51	2.46	1.37	2.83	1.25
75	China (Manchuria)	9.95	3.70	2.24	4.11	0.65
78	Korea	10.78	3.72	2.16	4.64	0.76

主要アルカロイドの含量を乾燥時に換算すると Table 5 になる。これにコデインとモルヒネの含量比及び5つのアルカロイドの総和を附記する。

Table 5. Alkaloidal Content Calculated on Dry Basis

No.	Origin	Morphine %	Codeine %	Thebaine %	Narcotine %	Papaverine %	Ratio	Sum %
1	Turkey	17.20	2.11	1.77	4.79	1.60	1.2	27.47
2	Turkey	13.49	2.32	1.64	4.61	0.76	1.7	22.82
3	Turkey	19.20	1.93	0.96	4.90	2.00	1.0	28.99
15	Turkey	14.61	1.11	1.18	4.62	1.01	0.8	22.53
16	Iran	10.42	2.93	4.77	8.47	1.27	2.8	27.86
17	Iran	11.75	3.42	3.09	7.35	1.39	2.9	27.00
18	Iran	12.47	4.35	4.08	8.27	1.70	3.5	30.87
22	India	11.30	3.44	2.06	7.44	0.65	3.1	24.89
23	India	11.15	3.47	2.18	6.62	0.18	3.1	23.60
24	India	11.91	3.42	1.82	7.78	1.64	2.9	26.57
25	Vietnam	12.44	2.05	2.98	4.86	0.17	1.7	22.50
26	Laos	7.61	1.60	2.52	3.32	0.08	2.1	15.13
27	Laos	13.45	2.60	2.96	5.15	0.41	1.9	24.57
28	Yugoslavia	17.88	0.81	0.74	4.53	1.25	0.5	25.21
29	Yugoslavia	17.30	1.22	0.82	4.93	1.65	0.7	25.92
30	Korea	2.90	1.19	0.85	1.49	0.32	4.1	6.75
31	Korea	8.61	2.44	1.51	3.17	0.35	2.8	16.08
32	China	8.43	5.05	2.36	5.13	0.71	6.0	21.68
33	Greece	17.28	1.30	0.52	5.36	1.74	0.8	26.20
35	China (Manchuria)	12.01	4.56	1.56	5.37	0.96	3.8	24.46
36	Mongolia	11.24	4.01	2.64	5.85	0.99	3.6	24.73
37	Korea	12.29	3.98	3.78	5.39	0.65	3.2	26.09
38	China	7.14	3.03	1.01	12.29	2.11	4.2	25.58
39	Japan	11.38	2.93	1.81	3.26	1.42	2.6	20.80
40	Mongolia	8.56	2.92	0.84	7.33	1.56	3.4	21.21
41	Mongolia	12.29	4.22	2.12	5.81	0.97	3.4	25.41
42	Mongolia	12.36	4.19	2.00	5.93	0.90	3.4	25.38
43	China	10.55	3.47	0.84	5.93	0.88	3.3	21.67
44	China	9.23	4.40	2.33	4.90	0.81	4.8	21.67
45	China	10.21	3.36	1.29	4.30	0.62	3.3	19.78
46	China	7.45	4.50	1.94	5.32	0.79	6.0	20.00
62	Japan	12.81	3.00	1.66	3.45	1.53	2.3	22.45
75	China (Manchuria)	11.46	4.26	2.58	4.74	0.75	3.7	23.79
78	Korea	13.17	4.55	2.63	5.67	0.92	3.5	26.94
79	Korea	11.39	3.44	2.39	4.77	0.96	3.0	22.95
80	Korea	10.34	1.99	1.10	3.81	0.47	1.9	17.71

i) 乾燥減量について 最高は朝鮮産 No.80 (13.46%), 最低はトルコ産 No.15 (6.83%) で9-10%が最も多い。

Table 6. Loss in Weight on Drying

Total Number of Samples	Number of Samples							
	6-7%, 7-8%, 8-9%, 9-10%, 10-11%, 11-12%, 12-13%, 13-14%							
26	1	2	6	8	4	2	1	2

町口²⁾によると日本産 4.12-9.48%, 外国産 9.20-30.02%; 有馬, 岩切の満蒙産アヘンでは 8.46-9.93% である⁴⁾。

ii) モルヒネ含量について 最高はトルコ産 No. 3 (17.53%, 乾燥時19.20%) 最低は朝鮮産 No. 30 (2.59%, 乾燥時2.90%) である。

トルコ, ギリシア, ユーゴ産はモルヒネ含量が高く風乾状態でトルコ輸出品 13.61%, ユーゴ産 15.64, 16.28%, ギリシア産 15.85% である。

イラン産, インド産は大略 10%, ラオス産は 12%, 日本, 満州, 蒙古, 朝鮮, 中国産は 6-11% で朝鮮, ラオス産で特に含量の低いものがある。(No. 26, No. 30)

この結果は偽和物のないアヘンは普通風乾状態でモルヒネ含量 8-19% で主なアヘン生産国ではユーゴ産 15%, トルコ産 13%, イラン産 11%, インド産 11% であるとの国連記録⁷⁾によく一致している。

この産地によりモルヒネ含量の異なる原因は Annett¹⁾, 町口²⁾ の示す如くケンより乳液の採取回数が多くなるに従い乳液の量及びその中のモルヒネ含量が少くなるので, トルコ, ギリシア, ユーゴ諸国では乳液を 1 回採取するのが習慣¹⁾ であるためにモルヒネ含量が高く他の諸国では 4-5 回も繰返して採取し乳液の出なくなるまで行い乳液を混合するので含量が低くとなると考えられる。

同一産地でモルヒネ含量が特に少いものは他のアルカロイドとの量的関係をみる必要がある。全体的にアルカロイドの含量の少い時には偽和物の疑がある。(No. 26, 30)

iii) コデイン含量について 最高は中国産 No. 32 (4.67%, 乾燥時5.05%), 最低はユーゴ産 No. 28 (0.74%, 乾燥時 0.81%) である。含量の低いのはトルコ輸出品 1.03%, ユーゴ産平均 0.9%, ギリシア産 1.19% であり, ラオス産 2%, 日本産 2.5%, イラン, インド, 中国, 満州, 蒙古産は大部分 3% 以上で朝鮮産は 3% 以上と低含量のものがある。

コデイン含量は産地により大いに差があり, 一般にモルヒネ含量が大なる場合は低いことがわかる。

この結果は次の国連記録⁷⁾ とも比較的に一致している。コデイン含量: ユーゴ産 1.25%, トルコ産 1.25%, イラン産 3.4%, インド産 3.0%。

iv) モルヒネとコデインとの量的関係について 有馬, 岩切⁴⁾ は満蒙産アヘンでモルヒネが少い場合, コデインの量はそれに比例せずに殆んど変化のないことを示した。Annett¹⁾ によれば幾度も採取すると乳液中のモルヒネ含量は急に減るが, コデイン含量は殆んど不変であり時には増加すると。

最初の採取に比べてあとの採取品はコデインのモルヒネに対する含量比が大きくなり, 乳液を混合する諸国ではアヘン中のコデイン含量が多くなるはずである。これをみるためにコデインとモルヒネとの比を算出した。Table 5 には薬用アヘンの標準含量モルヒネ 10% に対するコデイン含量で示す。

このコデインのモルヒネに対する含量比はユーゴ産 0.5, 0.7, ギリシア産 0.8, トルコ産 0.8-1.7 で少く次にラオス産 1.7-2.1, 日本産 2.3, 2.6, イラン産 2.8-3.5, インド産 2.9-3.1 で満蒙産 3.4-3.8, 中国産 3.3-6.0 は大きい。朝鮮産は 2.8-4.1 と 1.9 の 2 種がある。

コデインとモルヒネとの比は産地によつて異なり同じ産地では大体同じ傾向を持つており乳液を混合する諸国の方が大きいことがわかる。

同じ産地の他のアヘンに比べてモルヒネ含量が特に少い朝鮮産 No. 30, ラオス産 No. 26 の場合はコデインの量も少くコデインとモルヒネの含量比が同じ産地の他のアヘンの比とよく似ている所からこれらには偽和物があると考えられる。

このように偽和されたアヘンやアヘン煙膏の場合にはコデイン含量と同時にコデインとモルヒネとの比を考える必要がある。

モルヒネ含量が低い場合には他の副アルカロイドの多いことがある。この例として中国産 No. 38 をあげられる。モルヒネ 6.20%, コデイン 2.63%, テバイン 0.88%, ナルコチン 10.68%, パバベリン 1.83%。

v) テバイン含量について 最高はイラン産 No. 16 (4.28%, 乾燥時 4.77%) で最低はギリシア産 No. 33 (0.48%, 乾燥時 0.52%) である。イラン, ラオス産はテバインが多くイラン産は同時にパバベリンが多いがラオス産は極めて少い。インド, 朝鮮, 満州, 蒙古, 中国産は一般にテバインが多いがギリシア, ユーゴ産には少い。

vi) ナルコチン含量について 最高は中国産 No. 38 (10.68%, 乾燥時 12.29%) で最低は朝鮮産 No. 30 (1.33%。

乾燥時1.49%)である。一般に多いのはイラン、インド、満州、蒙古、中国産でトルコ、ユーゴ、ギリシア、ラオス産は4-5%で様である。日本産は2.8-3.0%で他に較べて少い。

ナルコチンが同じ産地の他のアヘンに較べて特に少いラオス産 No. 26, 朝鮮産 No. 30 は偽和物があると考えられ、コデインとモルヒネとの含量比の場合と同じ結論をうる。

vii) パパベリン含量について 最高は中国産 No. 38 (1.83%, 乾燥時 2.11%) で最低はラオス産 No. 26 (0.07%, 乾燥時 0.08%) である。一般にイラン、ユーゴ、ギリシア、日本産が多く(1%以上)、次にトルコ産でインド産には多いのと少いのがあり、ラオス産は特に少ない。満州、蒙古、朝鮮、中国産は一般に中間である。

viii) アルカロイドの総和について

Table 7. Sum of the 5 Alkaloids on Dry Basis

Total Number of Samples	Number of Samples				
	below 15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, above 30%				
36	1	4	17	13	1

乾燥時の主要アルカロイドの総和は20%以上が36種中31種で各個のアルカロイド含量が大いに異つていてもその総和が大体同じ範囲内にあることは注目すべきことで、これは Annett, Sen, Singh¹⁾ が述べた引続いて採取したアヘン中の全窒素の百分比は殆んど一定であるということと連関性があると思われ今後の研究を要する問題である。

総和の特に少い朝鮮産 No. 30 (6.75%), ラオス産 No. 26 (15.13%) は偽和物のあることを示している。

むすび 主要アルカロイドの定量により各国産アヘンの特長を次の如く総括することができる。

トルコ、ギリシア、ユーゴ産は相互によく類似してモルヒネが多くコデインが少い。パパベリンが比較的多くナルコチンは普通でギリシア、ユーゴ産はテバインが比較的少い。

イラン、インド産はモルヒネ10%程度でコデイン、ナルコチンが特に多くパパベリンについてはイラン産は多いがインド産は多いのと少いのがある。テバインはイラン産が特に多い。

ラオス、ヴェトナム産はコデインが比較的多くテバイン多くモルヒネ中間、ナルコチン普通でパパベリンが特に少い。

朝鮮、中国、満州、蒙古産はモルヒネは比較的少いがコデインが特に多くテバインも比較的多くナルコチン、パパベリンは中間である。

日本産は他の東洋産とパパベリンが比較的多いのとナルコチンが特に少いことで区別される。

主要アルカロイドの含量範囲は Table 8 の通りである。

Table 8. Range for Alkaloids

Alkaloid	on air-dry condition	on dry basis
	%	%
Morphine	2.59 - 17.53	2.90 - 19.20
Codeine	0.74 - 4.67	0.81 - 5.05
Thebaine	0.48 - 4.28	0.52 - 4.77
Narcotine	1.33 - 10.68	1.49 - 12.29
Papaverine	0.07 - 1.83	0.08 - 2.11

主要アルカロイドの定量特にコデイン含量及びコデインとモルヒネとの含量比はアヘンを産地別に分類することに役立つことがわかる。

乾燥減量及びモルヒネ定量の一部は水町助手の援助を得た。

御指導を賜った刈米所長、乾燥減量を教示下さった武田薬工、三共両会社の試験課の各位に謝意を表す。

文 献

- 1) The Opium Poppy and Other Poppies, 10-16 (1944). 2) 町口英三: 薬誌, 529, 185-228(1926); 衛試, 30, 1-48 (1927). 3) E. Anneler: Festschrift Herrn Emil Christoph Barell 344-362(1936). 4) 有馬純三, 岩切三雄: 大陸科学院報告, 2, 221-230 (1938). 5) 石原汎: 麻薬製造の実際, 171-189 (1947). 6) 桜井寛: 高峰研究年報, 4, 108-115 (1952). 7) Bulletin on Narcotics, Vol. V., No.3, 13-14 (1953).

Summary

As one means of determining the origin of opium, I studied the quantitative analysis of opium for the principal alkaloids.

In the examination of 36 samples from 12 different regions of the world (Yugoslavia, Greece, Turkey, Iran, India, Laos, Vietnam, China-- China proper, Manchuria, Inner Mongolia --, Korea, and Japan) for the 5 main alkaloids, i. e., morphine, codeine, thebaine, narcotine and papaverine, the following characteristics of the opiums were observed:

Turkish, Greek and Yugoslav opiums available were high in morphine, rather high in papaverine, low in codeine, low in thebaine, and average in narcotine.

Iranian and Indian samples available had medium morphine contents and high codeine and narcotine contents. Iranian was high in thebaine.

Opium samples available from Vietnam and Laos were fairly high in both codeine and thebaine, average in narcotine, and especially low in papaverine.

Far Eastern opium available (Korean and Chinese) were generally rather low in morphine, especially high in codeine, fairly high in thebaine, and average in both narcotine and papaverine.

Japanese former legal production was distinguished from other Far Eastern samples by rather high papaverine content and low narcotine percentage.

The ranges for the chief alkaloids were as follows:

Alkaloids	in air-dry opium %	on anhydrous basis %
Morphine	2.59-17.53	2.90-19.20
Codeine	0.74-4.67	0.81-5.05
Thebaine	0.48-4.28	0.52-4.77
Narcotine	1.33-10.68	1.49-12.29
Papaverine	0.07-1.83	0.08-2.11

Received March 29, 1954

アヘン産地鑑別法について (第5報)

朝鮮産アヘン(その1)乾燥減量とモルヒネ含量

朝比奈晴世, 大野昌子, 水町彰吾

Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. V.

Korean Opium. I. Loss in Weight on Drying and Morphine Content

By Haruyo ASAHINA, Masako ŌNO and Shōgo MIZUMACHI

まえがき 押収アヘンについて, その産地を鑑別する方法を見出すために, 朝鮮産アヘン 27 種を入手し特性に

ついて検討した。ここに朝鮮産アヘンの乾燥減量とモルヒネ含量を報告する。

実験材料 アヘン27種は「朝鮮総督府昭和19年度」或は「製造者住所、氏名」の明記のあるもので、明らかに朝鮮において生産されたものである。

実験方法 アヘン産地鑑別法第1報¹⁾による。

実験結果 乾燥減量とモルヒネ含量を Table 1 に掲げる。

Table 1. Loss in Weight on Drying and Morphine Content

Opium No.	Loss in Weight on Drying %	Morphine Content	
		as determined %	calculated on anhydrous basis %
79	12.29	9.99	11.39
80	13.46	8.95	10.34
81	12.78	13.53	15.51
82	11.56	9.68	10.95
83	12.26	11.48	13.08
84	14.99	10.39	12.22
85	11.97	12.34	14.02
86	19.11	4.76	5.89
84	14.03	10.59	12.32
88	13.18	12.69	14.62
89	9.85	13.15	14.59
90	9.03	11.52	12.66
91	9.05	15.99	17.58
92	9.51	12.70	14.03
93	9.01	17.19	18.89
94	9.85	14.37	15.94
95	10.73	14.29	16.01
96	9.94	12.41	13.78
97	10.04	10.63	11.82
98	9.98	11.07	12.30
99	9.42	13.89	15.33
100	10.51	8.75	9.78
124	10.38	13.40	14.95
125	10.12	12.45	13.85
126	9.43	11.15	12.31
127	9.74	15.27	16.92
128	11.02	7.76	8.72

むすび 朝鮮産アヘン27種について、乾燥減量は9—10% 11, 10—11% 5, 11—12% 3, 12—13% 3, 13—14% 2, 14—15% 2, 15%以上1であり、乾燥状態に換算したモルヒネ含量は10%以下3, 10—12% 4, 12—15% 13, 15—17% 5, 17%以上2であつた。

朝鮮産アヘンについて、モルヒネ以外の主なアルカロイド、コデイン、テバイン、ナルコチン、ババベリンの定量は続行中でその中2種 No. 79, 80については、アヘン産地鑑別法第4報²⁾に報告した。

なお、本実験はオーストリア、カナダ、中国、デンマーク、フランス、ドイツ、インド、イスラエル、日本、オランダ、ギリシア、スウェーデン、ノルウェー、トルコ、英国、アメリカ及び国連事務局の化学者の参加している International Opium Research Programme の1部としてなされたものである。

朝鮮産アヘンの入手に関して、種々御便宜を頂いた厚生省薬務局麻薬課市川課長、平瀬、荒川両技官、湯島事務官及び大日本製薬、三共両株式会社に謝意を表する。

文 献

- 1) 朝比奈晴世, 水町彰吾: 衛試, 71, 20-26 (1953); United Nations Document ST/SOA/SER. K/15, 11 March 1953. 2) 朝比奈晴世: 衛試, 72, 63 (1954).

Summary

We have been studying the characteristic and composition of Korean opium samples. Morphine percentages obtained thus far are as follows, calculated on the anhydrous basis:

Total number of samples 27		
Morphine content:	below 10%	3 samples
	10-12%	4 "
	12-15%	13 "
	15-17%	5 "
	above 17%	2 "

Received March 29, 1954

アヘン産地鑑別法について (第6報)

“Porphyroxine-Meconidine” の比色定量 (その1)

朝比奈晴世, 水町彰吾

Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. VI.

The Colorimetric Determination of “Porphyroxine-Meconidine” (1)

By Haruyo ASAHINA and Shôgo MIZUMACHI

まえがき “porphyroxine-meconidine” はアヘン中に含まれる一成分であつて稀薄な酸と加熱すると赤色を呈する特性がある。これは以前に porphyroxine 或は meconidine の二つの名前で知られていたものであるから、この二つの名前を連記ししかもこれらの名前で発表された性質は正しくないので引用符をつけることになつてゐる¹⁾²⁾。

この “porphyroxine-meconidine” の含量とアヘン産地との関係はインド産に多く、イラン産は少く、トルコ産は通常この中間であると報告されている²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。

東洋産のアヘン即ち日本、中国(満州、蒙古を含む)、朝鮮産のアヘンの “porphyroxine-meconidine” 含量を比色定量し、トルコ、イラン、インド産のアヘンと比較することにした。

実験材料 厚生省麻薬課より分与の中国、満州、蒙古、朝鮮、日本産のアヘンと国際連合より寄贈のトルコ、イラン、インド産のアヘンを用いた。これらのアヘンは乾燥粉末とせず、そのままで実験に使用した。

実験方法 アヘンより “porphyroxine-meconidine” を抽出するには色々の方法があるが²⁾³⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾、ここでは次の方法を行つた。

乳鉢でアヘン 0.15g を新しく作つた水酸化カルシウム 0.1g とよくすりまぜた後水 2.5cc を加えて糊状にし次に水 12.5cc を加えて 20 分開きまぜてできるだけ均等な溶液にする。濾過し濾液 10cc を正確にとり (アヘン 0.1g に相当する) 連続抽出器に入れ、過酸化物のないことをたしかめたエーテルで連続抽出する。3 時間後抽出器中のエーテル 2cc をとり水浴上で蒸発して残留物に稀塩酸 0.1cc を加えて水浴上にあたためて赤色又は紅色にならないことを確かめる。色がつけば再び抽出を続けるがすべての場合 3 時間で充分であつた。抽出が充分であれば、抽出器

中のエーテルを分液ロートにて分ち受器のエーテルに加え水浴上で蒸発する。殆んど蒸発すれば小容器にエーテルにて洗入れ、水浴上で乾固する。残留物に塩酸 (濃塩酸 1cc に水 99cc を加えたもの) 0.5cc を加えて沸騰水浴中で5分間加熱し赤色を呈させる。次にこれを 10cc のメスフラスコに 5vol% 酢酸で洗入れ 5vol% 酢酸で 10cc にする。これはアヘンの 1% 溶液になる。径 1cm のキューベットで S53 のフィルターを用いて光電比色計で吸光係数を測定した。呈色が強すぎる場合は 5vol% 酢酸で正確に 20cc にし、弱すぎる場合は 5cc にして吸光係数を測定し、10cc の場合に換算した。

実験結果 トルコ Export, イラン Fars, インド Malwa, 満州, 蒙古, 朝鮮, 中国, 日本各地産のアヘンについて測定した吸光係数は次の通りである。

アヘン			吸光係数		
番号	産地	検体量	測定値	0.1500g に対する 換算値	平均値
15	トルコ Export	0.1482g	0.345	0.349	0.331
		0.1599	0.334	0.313	
18	イラン Fars	0.1517	0.205	0.203	0.192
		0.1539	0.185	0.180	
24	インド Malwa	0.1588	0.870	0.838	0.835
		0.1497	0.830	0.832	
35	満州	0.1478	0.224	0.227	0.220
		0.1436	0.204	0.213	
36	蒙古	0.1576	0.260	0.247	0.240
		0.1384	0.215	0.233	
37	朝鮮	0.1452	0.321	0.332	0.324
		0.1531	0.321	0.315	
38	中国	0.1476	0.134	0.136	0.128
		0.1514	0.121	0.120	
39	日本	0.1525	0.980×2	1.928	1.917
		0.1526	0.969×2	1.905	

日本産の場合は 20cc にうすめた。

考察 アヘン中の “porphyroxine-meconidine” を比色法により定量したが, “porphyroxine-meconidine” の絶対量を示す検量曲線は作り得ないので呈色の強さを比較することにした。

インド, イラン, トルコ産のアヘンについては Fulton²⁾³⁾⁵⁾; Farmilo, Kennett⁴⁾¹⁰⁾ の報告通り, インド産に多くイラン産に少くトルコ産は中間であつた。

東洋産のアヘンについての測定の結果は, 中国産は少く, 満州, 蒙古, 朝鮮産は中間で日本産は特に著しく多量であつた。

なおこれら 8 種のアヘンの乾燥減量, モルヒネ, コデイン, テバイン, ナルコチン, パパベリンの含量は次の通りである¹²⁾。

番号	産地	乾燥減量	モルヒネ	コデイン	テバイン	ナルコチン	パパベリン
		%	%	%	%	%	%
15	トルコ	6.83	13.61	1.03	1.10	4.31	0.94
18	イラン	10.06	11.22	3.91	3.67	7.44	1.53
24	インド	10.53	10.66	3.06	1.63	6.96	1.47
35	満州	8.35	11.01	4.18	1.43	4.92	0.88

番 号	産 地	乾 燥 減 量	モ ル ヒ ネ	コ デ イン	テ パ イ ン	ナ ル コ チ ン	バ バ ベ リ ン
		%	%	%	%	%	%
36	蒙 古	9.04	10.22	3.65	2.40	5.32	0.90
37	朝 鮮	9.60	11.11	3.60	3.42	4.87	0.59
38	中 国	13.12	6.20	2.63	0.88	10.68	1.83
39	日 本	9.55	10.29	2.65	1.64	2.95	1.28

上の表よりみても、副アルカロイドが共に比較的多いイラン産とインド産の最もよい区別法は“porphyroxine-meconidine”定量値であることがわかる。

なお日本産について“porphyroxine-meconidine”が他の産地のものより著しく多いことは注目すべき事実である。

むすび 東洋産アヘンについて比色法により“porphyroxine-meconidine”を定量した結果、日本産が特に著しく多量であり、中国産は少く、満州、蒙古、朝鮮産は中間であることが判明した。

比色定量に関し御援助を賜った小川規格部長、平岡技官、アヘン分与に御厚志を示された厚生省麻薬課の諸氏に厚く感謝する。

文 献

- 1) Bulletin on Narcotics Vol. IV, No. 1. 15 (1952).
- 2) United Nations Document, ST/SOA/SER. K/4
- 3) United Nations Document, E/CN. 7/135.
- 4) United Nations Document, E/CN. 7/207.
- 5) United Nations Document, ST/SOA/SER. K/21.
- 6) United Nations Document, E/CN. 7/117.
- 7) United Nations Document, E/CN. 7/117. Add. 2.
- 8) United Nations Document, E/CN. 7/202.
- 9) United Nations Document, ST/SOA/SER. K/10.
- 10) United Nations Document, ST/SOA/SER. K/14.
- 11) United Nations Document, ST/SOA/SER. K/19.
- 12) 衛試, 72, 63 (1954).

Summary

We have studied the relation between the content of “porphyroxine-meconidine” and the origin of the opium. We compared the absorption intensity values of the red solution as measured by the photoelectric colorimeter using filter S 53.

Of 5 Far-Eastern opium samples, we found the former legal production of Japan extremely high, the sample from China proper especially low and samples from Inner Mongolia, Manchuria and Korea intermediate.

Received March 29, 1954

邦産麦角よりの麦角アルカロイド

標準物質の製造試験

福島 清 吾, 伊藤 みよ子

Experimental Preparation of Standard Ergot
Alkaloid from Japanese Cultivated Ergot

By Seigo FUKUSHIMA and Miyoko ITO.

まえがき 日局Ⅶでは麦角及びその製剤の項に, 定量法を収載していない。然し, これらは産科領域に於ける必需品であり, 而も劇薬に属するものであるから, 含有アルカロイドの定量は必要であると思われる。

著者等¹⁾は, 先にベツクマン光電比色計を用いる麦角アルカロイドの比色定量について, 報告したが, 更に本邦産人工栽培ライ麦麦角から, 標準品として使用出来るようなアルカロイドを単離し, その標準品としての価値を検討しようとして, 本研究を開始し, ほど, その目的を達成することが出来たので, ここに報告する。

実験の部

麦角より粗アルカロイドの抽出 粉末本邦産人工栽培ライ麦麦角 10.8Kg を石油エーテルで脱脂し, 麦角油 2 Kg を得た。

この粉末脱脂麦角を, 順次ソクスレー抽出器又はパーコレーターを用い, アンモニアアルカリ性エーテルで抽出し, 抽出液はエーテルを殆んど溜去し, 石油エーテルを加えて析出する帯黄緑色無晶形沈澱を集め, 合計 30.8 g (約 0.3%) を得た。

粗アルカロイドの精製 粗アルカロイド粉末 30.8g を大量の (約 400 倍) の 1% 酒石酸水溶液に振とう溶解し, 不溶物を除き, 炭酸ナトリウムで pH 8~9 とし析出する沈澱を遠沈後濾別乾燥し, 合計 16.95g の微黄色粉末を得た。

この粗アルカロイドを 20 倍量のクロロホルムに溶解し (液色濃褐色), 暗室内水素气流中で, 5 倍量のアルミナ層を通すと, アルミナ層上端に黒褐色着色帯が残る。之を更に約 200 倍量のクロロホルムで溶出すると, パラジメチルアミノベンツアルデヒド反応はほとんど陰性となる。溶出クロロホルムは, 褐色コルベンを用い減圧下 30° 以下で濃縮し, 石油エーテルを加えて析出する無晶形微帯黄色沈澱を集め, 合計 11g を得た。

粗アルカロイドより Ergotinin の分離²⁾ 上記粗結晶に 5 倍量のアルコールを加え, 僅かに加温溶解し器壁をまさつしながら冷却すると, 半結晶性沈澱が析出する。このようにして, 粗 Ergotinin 合計 2.2g を得た。この粗結晶を約 50 倍量のアルコールで数回再結晶し, 無色長針状晶 0.546g (Fig. 1) を得た。C₃₅H₅₀N₅O₅ (Ergotinin) 理論値 C 68.94, H 6.45, N 11.49, 実験値 C 69.19, H 6.32, N 11.59, 文献値(α)_D²⁰: +365° (CHCl₃) 実測値(α)_D¹⁶: 362.8° (C=1 CHCl₃) 文献値 Z. P229° 実測値 Z. P228°。

ペーパークロマトグラフィー³⁾ アルカロイドの塩酸酸性加水分解成積体によるアミノ酸の, またアルカリ性加水分解成積物によるケトカルボン酸の 2, 4-ジニトロフェニールヒドラゾンのペーパークロマトグラフィーを試みた。

アミノ酸では, Proline, Valine, Phenylalanine が検出出来たが, Ergokryptinin の特有アミノ酸である, Leucine は検出出来なかつた。

Ergotinin の構成アミノ酸は Proline, Valine, Phenylalanine, Leucine の 4 種である。

ケトカルボン酸の 2, 4-ジニトロフェニールヒドラゾンでは, ジメチルビルビン酸が検出され, Ergotinin のそれと一致した。

故に, ここに単離された結晶は Ergotinin であると確認した。

Ergotinin の Ergotoxin への転化 Ergotinin の結晶 0.27g に 1% アルコール性磷酸 7 cc. を加え, 水素気

流中で、1.5時間還流した後、減圧下に約半量まで濃縮して、放冷後析出した磷酸塩を集め、90%アルコールで2回再結晶を行い、之を同量の酸性炭酸ナトリウムと乳鉢中でよく摺り混ぜ10倍量の水を加えて更によくねり、分液漏斗に取つて、各々30倍量のクロロホルムを用いて3回抽出し、クロロホルム層は芒硝を用いて乾燥後、活性炭少量を加えて脱色濾別後、クロロホルムを減圧下に溜去し去り、ベンゾールで再結晶を繰返し、無色板状晶0.113gを得た。

Ergotoxin の分離 2) 上に述べた、粗 Ergotin 分を分離した後のアルコール母液に同量の4%アルコール性磷酸を冷時加えると、帯紫黒色沈澱が析出する。之は粗 Ergotoxin 磷酸塩にあたる物で、合計6.0g得られた。

この粗磷酸塩を90%アルコール約20倍量で数回再結晶し、母液を減圧濃縮することにより次の4種類の結晶に分けた。

第Ⅰ結晶 1.8g, 第Ⅱ結晶, 1.1g, (再結晶母液濃縮) 第Ⅲ結晶, 1.2g, (再結晶母液を更に濃縮) 第Ⅳ結晶, 約2g, (磷酸酸性アルコール母液を濃縮)。

第Ⅰ結晶は、1.8gの酸性炭酸ナトリウムと乳鉢中でよく摺り混ぜ90ccの水を加え更によくねり、分液漏斗に取り、クロロホルム50ccづつで3回抽出し、クロロホルム層を芒硝で乾燥後、活性炭を加えて脱色濾別し、減圧下30°以下でクロロホルムを溜去して、微帯黄色粉末1.08gを得た。

$[\alpha]_D^{24} : -140.1^\circ$ ($C=1$ CHCl_3)。

これを更に、約10倍量のベンゾールに熱時溶かし、先に Ergotin 分から転化して得た結晶を核とし結晶化させる方法を繰返し、ほとんど無色の板状結晶 (Fig.2) 0.665gを得た。 $[\alpha]_D^{13} : -150^\circ$ ($C=1$ CHCl_3)

第Ⅱ結晶, 第Ⅲ結晶, 第Ⅳ結晶, はいずれも同様の方法で遊離塩基にもどし、第Ⅱ結晶より, 0.45g, $[\alpha]_D^{24} : -55.0^\circ$, 第Ⅲ結晶より, 0.89g, $[\alpha]_D^{24} : +52.8^\circ$ ($C=1$ CHCl_3), 第Ⅳ結晶より, 0.8g, $[\alpha]_D^{24} : +94.7^\circ$, の無晶形帯黄色粉末を得た。

これらが、Ergotoxin と Ergotin 分の混合物であることは、その旋光度により推定されるから、Ergotin 分を Ergotoxin に転化させる例にならい、この混合アルカロイド, 1.96gに、1%アルコール性磷酸48ccを加え、水素気流中で1.5時間還流させた後、約15c.cまで減圧濃縮して、冷後析出する結晶を濾別乾燥し、之を更に2回再結晶し、ベンゾールで再結晶を繰返し、微黄色板状晶, 0.407gを得た。

更に、これ等のベンゾール再結晶母液より、ベンゾールを減圧溜去したものを、磷酸塩とし、再結晶後、浮離塩基に戻した上、再びベンゾールを用いて再結晶を行い、0.35gの結晶を得た。

この様にして得た、Ergotoxin $2\text{C}_6\text{H}_6$ 1.635g, は僅かではあるが着色していたので、更に磷酸塩を経て、再結晶を繰返し、完全に無色の結晶, 0.641gを得た。

Ergotoxin $2\text{C}_6\text{H}_6$ からの結晶溶媒の除去 : P_2O_5 上90°で真空乾燥, 5日間, $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{N}_5$ $2\text{C}_6\text{H}_6$ としての理論減量, 20.4%, 実測減量, 19.1%。

結晶溶媒を含め Ergotoxin : $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{N}_5$ (Ergotoxin), 理論値 C 68.94, H 6.45, N 11.49, 実験値 C 68.77, H 6.10, N 11.55, 文献値 $[\alpha]_D^{20} : -197^\circ$ (CHCl_3), 実測値 $[\alpha]_D^{16} : -188^\circ$ ($C=0.44$ CHCl_3), 文献値, $Z. P. 190 \sim 200^\circ$ 実測値, $Z. P. 170 \sim 180^\circ$ 。

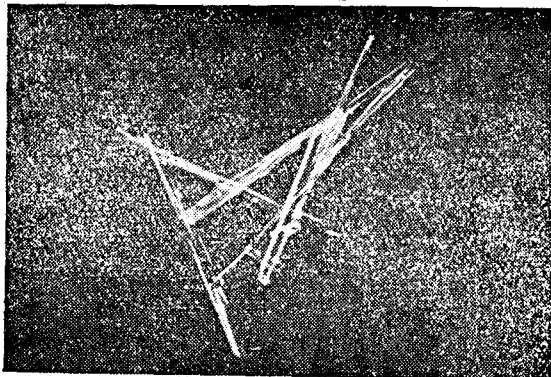


Fig.1 Ergotin

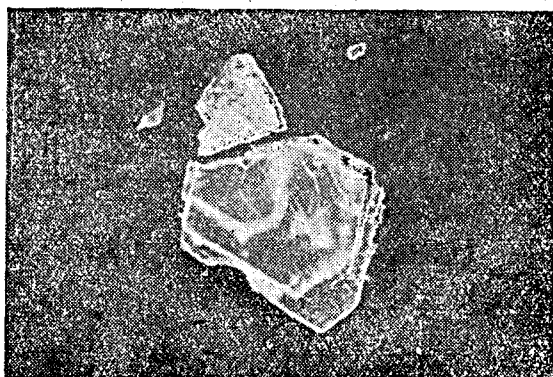


Fig.2 Ergotoxin $2\text{C}_6\text{H}_6$

ペーパークロマトグラフィー³⁾ 分解成積物のアミノ酸のペーパークロマトグラフィーにより, Proline Valine Phenylalanineが検出されたが, Ergokryptinの特有アミノ酸である Leucine は検出出来なかつた. Ergotoxinの構成アミノ酸は Proline, Valine, Phenylalanine, Leucine の4種である.

分解成積物のケトカルボン酸の2,4-デニトロフェニールヒドラゾンの, ペーパークロマトグラフィーにより, デメチルピルビン酸が検出され, Ergotoxin のそれと一致した.

故にここに得られた結晶は Ergotoxin であると確認した.

Ergotoxin と Ergotin の濃度-吸光度回帰方程式¹⁾ この実験で得た, Ergotoxin と Ergotin を夫々, 4.950mg, 6.985mg, 秤量し, 最低限のアセトンに溶かし, アセトンは, スプレーで出来るだけ飛ばした後, 1% 酒石酸水溶液を加えて50ccとしたものを原液とした. 原液は Table I 及び, Table II の通り希釈し, この希釈原液 I ~ X 及び対照 (1% 酒石酸水溶液) 各2ccに, パラジメチルアミノベンツアルデヒド試液, 4ccを加えよく振とう混和し, 45° に10分加温後放冷, 30分~1時間後に, その呈する青色についてベックマン光度計を用い, 550m μ 光で測定した成績は Table III, Table IV, 及び Fig 3 の通りである.

Fig 3 の示すように, Ergotoxin の場合は, その測定値がよく直線にのるが, Ergotin の場合は, 約700 γ /10cc までは, よく直線にのるが, 濃度がそれ以上になると, 次第に, 測定値は予想値より低い値を示すようになる. そこで, Ergotoxin については, その全測定値 (n=20) を基とし, Ergotin の場合は, 濃度694 γ /10cc までの測定値 (n=10) を基として, 山口等⁴⁾ がサントニン2-4-デニトロフェニールヒドラゾンの比色定量で行った様に, 測定値y (吸光度e) から濃度x (10cc中の γ 数) を推定する回帰方程式を最小自乗法で求めると, Ergotoxin の場合は,

Table I Diluted Solution of Ergotoxin

No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
γ in 10cc.	990	891	792	693	594	495	396	297	198	99
Standard soln. cc.	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5
1% Tartaric acid cc.	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5

Table II Diluted Solution of Ergotin

No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
γ in 10cc.	1387	1248	1110	971	832	694	555	416	277	139
Standard soln. cc.	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5
1% Tartaric acid cc.	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5

Table III Light Absorbency-Concentration (Ergotoxin, $\lambda=550m\mu$ l = 1 cm.)

Ergotoxin concentration γ in 10cc		99	198	297	396	495	594	693	792	891	990
y = Light absorbency [e]	I	0.088	0.179	0.272	0.373	0.456	0.560	0.650	0.748	0.826	0.919
	Vi	± 0	- 0.002	- 0.003	+ 0.005	- 0.005	+ 0.006	- 0.008	+ 0.007	- 0.008	- 0.008
	II	0.087	0.180	0.270	0.373	0.460	0.553	0.648	0.756	0.831	0.925
	Vii	- 0.001	- 0.001	- 0.005	+ 0.005	- 0.001	- 0.001	- 0.010	+ 0.015	- 0.003	- 0.002
y = 0.0009422x - 0.00534		0.088	0.181	0.275	0.368	0.461	0.553	0.658	0.741	0.834	0.927

Table IV Light Absorbency-Concentration (Ergotinin, $\lambda=550m\mu$ $l=1cm$)

Ergotinin concentration γ in 10cc.		139	277	416	555	694	832	971	1110	1248	1387
y=Light absorbency [e]	I	0.102	0.206	0.305	0.410	0.524	0.590	0.680	0.783	0.831	0.906
	VI	+ 0.003	+ 0.004	± 0	+ 0.001	+ 0.011	- 0.026	- 0.039	- 0.040	- 0.095	- 0.124
	II	0.100	0.200	0.306	0.398	0.510	0.597	0.678	0.765	0.843	0.906
	VII	+ 0.001	- 0.002	+ 0.001	- 0.011	- 0.003	- 0.019	- 0.041	0.058	- 0.083	- 0.124
y=0.0007452x - 0.00407		0.099	0.202	0.305	0.409	0.513	0.616	0.719	0.823	0.926	1.030

(註) VI VII は回帰方程式のあたえる標準値と測定値の差(変動)を示す。

$$x=1061y+5.67 \cdots \cdots (1)$$

$$\text{又は } y=0.0009422x-0.00534 \cdots \cdots (1')$$

Ergotininの場合は、

$$x=1341y+5.46 \cdots \cdots (2)$$

$$\text{又は } y=0.0007452x-0.00407 \cdots \cdots (2')$$

となる。

なお前報¹⁾による、Ergotaminの回帰方程式は、

$$x=1104y+0.35 \cdots \cdots (3)$$

であるから本実験で得られたErgotoxinは比色定量の標準物質として充分使用出来る。

Fig3及び(1), (2), 式に明かなように、ErgotoxinとErgotininの呈色度に明かな差が認められた事は予想に反し、奇異の感をもたされた。

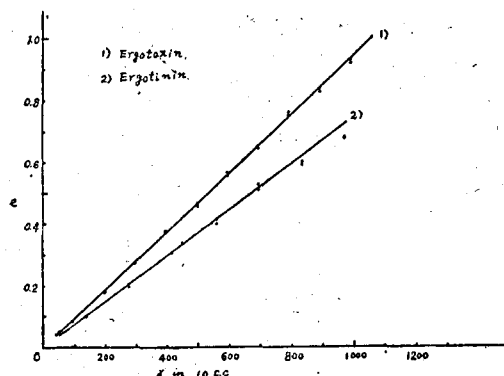


Fig. 3 Light Absorbency-Concentration
(Beckman Photometer $\lambda=550m\mu$ $l=1cm$)

この研究に当り機会を与えられ、且終始御指導を仰いだ当所山口部長、御指導御鞭撻をたまわつた、中村滝製薬片柳博士、田中氏、及び、分析の労をわずらわした、当所佐子氏、に厚く感謝の意を表する。又本研究の費用の一部は、厚生省科学研究費に仰いだことを記し、併せてここに感謝する。

文 献

- 1). 山口等: 薬誌, 73, 268 (1953). 2). Smith and Timmis J.C.S. 1930 p1390. 3). 田中, 須川, 薬誌, 72, 620 (1952). 4). 山口等: 薬誌, 72, 584 (1952)

Summary

In order to obtain the standard ergot alkaloid for colorimetric method, raw alkaloid was extracted from ergot parasitically cultivated in Japan, and from it, chemically pure ergotoxin and ergotinin were separated.

Light absorbency (e) at $550m\mu$ in different concentration (γ in 10cc) was measured by Beckman spectro photometer, and the following equation was calculated from experimental data obtained.

$$\text{Ergotoxin : } x=1061y+5.67$$

$$\text{Ergotinin : } x=1341y+5.46 \quad (X=\gamma \text{ in 10cc, } y=e)$$

It was strange for us to find apparent difference of light absorbency between ergotoxin and ergotinin.

Received April 2, 1954

パラニトロアニリンに依る P. A. S. 中の M. A. P.

の比色定量及び一斉検査成績について

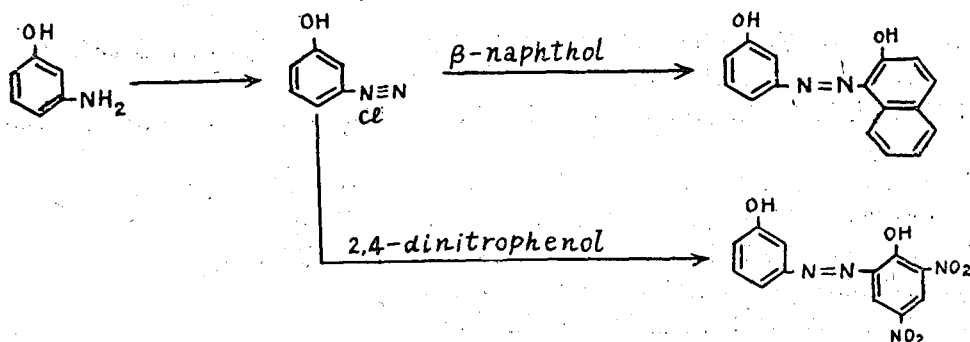
板井 孝 信, 井下 田 浩

Colorimetric Determination of *m*-Aminophenol
in Sodium *p*-Aminosalicylate by *p*-Nitroaniline

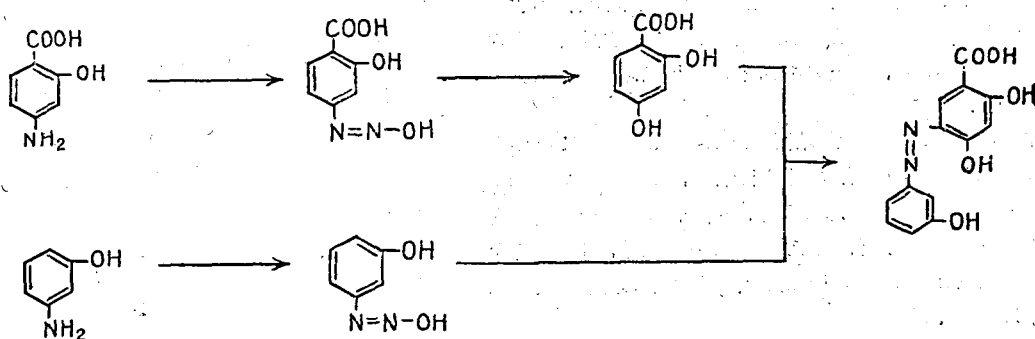
By Takanobu ITAI and Hiroshi IGETA

まえがき 現在迄に知られている P. A. S. 中の M. A. P. 定量法の概要は次の如くである。

- (1) M. A. P. をジアゾ化して適当な試薬, 例えば β -naphthol¹⁾, 2,4-dinitrophenol²⁾, 津田試薬³⁾等にカップリングせしめて, その呈色を比色するものがある。



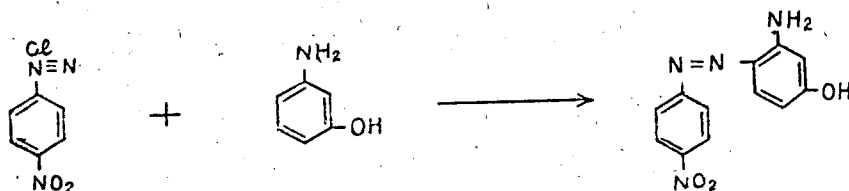
- (2) M. Pesetz⁴⁾は P. A. S. 及びそれに含まれる M. A. P. の両者をジアゾ化するとき, P. A. S. のジアゾニウム塩が M. A. P. のそれより不安定で加水分解されて 2,4-dioxybenzoic acid となり, アルカリ性となれば M. A. P. のジアゾニウム塩とカップリングし, 黄色を呈することを利用して定量を行つた。



- (3) 上記のものとは逆に *p*-nitroaniline をジアゾ化して M. A. P. にカップリングするものがある。
 (4) ジアゾ化以外の方法では G. Lenaers⁵⁾ がヨード酸カリウム及び酢酸を加えて呈する赤紫色を比色する方法があり, 又 2,6-dichloro-quinone monochlorimide⁶⁾ を作用させて呈する色を比色する方法がある。

我々は主として (3) 法について検討したが *p*-nitroaniline 法ではジアゾ化に際し氷冷の必要がないこと, 呈色が赤紫色なので肉眼でも比色し易いこと, 及び呈色が比較的に安定であること等の理由から我々はこの方法がすぐれている事を知つた。

なおこの外、*p*-aminoacetphenone, ethyl *p*-aminobenzoate, sulfanilic acid 等のジアゾニウム塩をカップリングさせてもみたが (何れも赤色を呈す), 呈色が不安定で褪色が早く, 実用には向かない。 *p*-Nitroaniline 法



によつて M.A.P. 量の $5\mu\text{g}$ ~ $100\mu\text{g}$ にわたつて吸光度を測定して検量線 (Filter S55) を作れば大体直線となり Lambert-Beer の法則に従ふ。よつて光電比色計で定量すれば簡易迅速且つ正確に M.A.P 量を知ることができ

実験の部

I 試薬 0.3W/V% *p*-Nitroaniline-N-HCl 液, 亜硝酸ナトリウム試液 (J.P. VI), 酢酸ナトリウム試液 (J.P. VI), 水酸化ナトリウム試液 (J.P. VII)

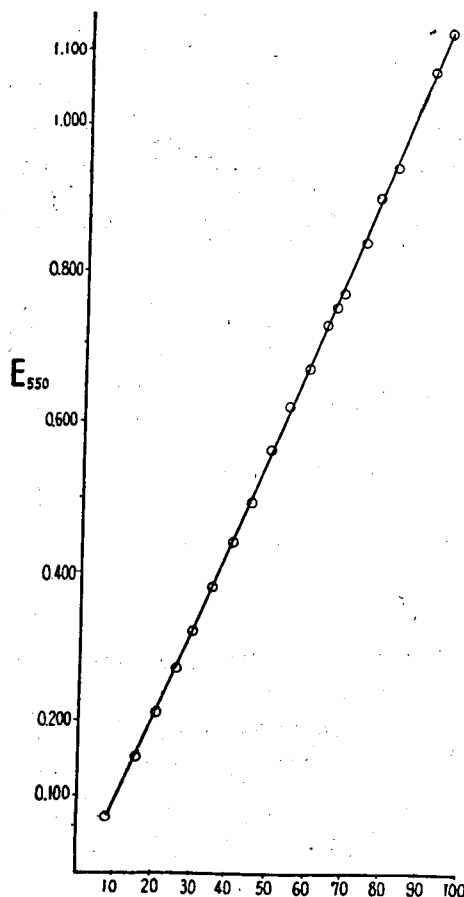
II 定量操作法 検体が粉末の場合は 10 % の溶液とする。注射液の場合, 市販品は 10 % のものが多いのでそのまま用いる。

検液 1 cc をガラス共栓瓶にとり, これにクロロホルム 8 cc とエーテル 12 cc の混液を加えよくふりまぜた後, 無水炭酸カリウム 5 g を加え 3 分間激しくふりまぜ, 10 分間放置後, 乾燥濾紙を用いて濾過し, 濾液 2 cc をネスラー管に入れ, 水約 2 cc を加えて水浴上で有機溶媒を溜去し, 水中にもはやクロロホルムの粒子が見えなくなるに至らしめる。次いで水を加えて 10 cc とし, 0.3W/V% *p*-Nitroaniline-N-HCl 液 3 滴, NaNO_2 試液 1 滴を加えてよくふりまぜ更に酢酸ナトリウム試液 1 cc を加えてから 1 分後に, 水酸化ナトリウム試液 0.5 cc を加え呈色せしめ光電比色計“小滝製作所製”を用いて $550\text{m}\mu$ にて吸光度を測定する。呈色が強すぎる時は, クロロホルム, エーテル混液の濾液の採取量を適宜減量して行ふ。

III M.A.P. の検量線 精製した *m*-Aminophenol を定量して 1 cc 中 $100\mu\text{g}$ 含有する溶液を作り, これを夫々 0.5 cc, 1 cc, 1.5 cc, …… 1 cc, 即ち $5\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$, $15\mu\text{g}$ …… $100\mu\text{g}$ をネスラー管に入れ, 水を加えて 10 cc とした後, 上記試薬を加えて呈色せしめた後, 吸光度を測定して, 検量線を作れば Fig. 1 になる。

IV 呈色の経時変化 M.A.P. $100\mu\text{g}$ 含有のものについて呈色後, ネスラー管の栓をして置いた場合とについての経時変化をみると, 第 1 表の如くであり, open の場合は 20 分位から褪色し始めるが, glass-stoppered の方では 1 時間は安定である。

Fig. 1 Quantity of M.A.P. (μg)



第 1 表

TIME \ E ₅₅₀	open	glass-stoppered
5min	1.120	1.120
10min	1.120	1.120
20min	1.070	1.120
30min	1.070	1.120
1 hr	0.974	1.120
2 hrs	0.827	1.095
4 hrs	0.460	1.062

V Recovery Test M.A.P. を 1 cc 中 50 μ g, 100 μ g, 含有のもの 1 cc ずつをとり夫々ガラス共栓瓶に入れ食塩 0.1g を各々に加えて溶かしたもののついて、上記定量操作法に従つて処置したものの吸光度を測定すると次表の如くになり略々定量的に移行するものと思われる。

第 2 表

M. A. P 量	E ₅₅₀ (Calc'd)	E ₅₅₀ (Found)
50 μ g	0.070	0.070
100 μ g	0.110	0.105

クロロホルム・エーテル混液(2容: 3容)は比重が水よりやや重く、丁度 10% P. A. S 注射液の比重に近いので、P. A. S. 溶液によく混和し、抽出に好適である。又クロロホルムのみを用いたときは少量の P. A. S が混じてきて、呈色が赤味がかかるので、この点からもクロロホルム・エーテル混液の方がすぐれている。

VI P. A. S 注射液中の M. A. P の定量成績 検体は販売許可前の試製品であり、会社においても安定剤について研究中のものである。

あるものは経日変化のため非常に M. A. P が過多になり、呈色が濃すぎて、吸光度測定に支障を来すものがあつたので、これらはクロロホルム・エーテル抽出液 2cc を採るべき所を、0.2cc にして測定した。検体はいずれも 10% 注射液である。

第 3 表

SAMPLE	Filtrate 採取量cc	E ₅₅₀	M. A. P 量 μ g	M. A. P/cc (%)	M. A. P/P. A. S (%)
A社(No.1)	2	0.100	7	0.007	0.07
A社(No.2)	2	0.640	58	0.058	0.58
A社(No.3)	2	0.700	63	0.063	0.63
B社	0.2	0.560	50	0.5	5.0

VII 昭和27年11月一斉収去に於ける注射用 P. A. S 末及び P. A. S 注射液に対する厚生省規格案、及び *p*-Nitroaniline 法による試験成績

a) 注射用 P. A. S 末について。

厚生省規格案によつて得たクロロホルム抽出液 20cc を 2 分し、一部を上記厚生省規格案に従つて行い、他の一部はネスラー管に入れ、水約 2 cc を加えて水浴上クロロホルムを溜去した後、*p*-Nitroaniline 法に従つて呈色せ

しめて吸光度を測定してみた。

これら15検体は、厚生省規格案によれば全部適品であり、又 *p*-Nitroaniline 法による M.A.P 量は第4表の如くである。

第 4 表

検体番号	E-550	M.A.P 量 μg	M.A.P (%)	検体番号	E-550	M.A.P 量 μg	M.A.P (%)
1	0.070	5	0.005	9	0.070	5	0.005
2	0.070	5	0.005	10	0.050	3.5	0.004
3	0.030	2.1	0.002	11	0.050	3.5	0.004
4	0.030	2.1	0.002	12	0.050	3.5	0.004
5	0.040	2.8	0.003	13	0.080	6	0.006
6	0.020	1.4	0.001	14	0.120	11	0.011
7	0.045	3.2	0.003	15	0.090	7	0.007
8	0.065	4.6	0.005				

なおこの場合はクロロホルムのみで溶出した結果、極少量の PAS が混入したと思われ、呈色が幾分赤味を帯びていた。

b) パス注射液について。

当所規格案を掲げると。

「本品を水でうすめて、その1ccがパラアミノサルチル酸ナトリウム10mgに対応する様にした後、その1ccを分液漏斗にとり、水4cc及び食塩1.5gを加えふりまぜて溶かし、次にエーテル15ccずつで2回抽出し、エーテル液は合併する。このエーテル液をN/100硫酸6ccずつで2回、水1ccで1回抽出し、抽出液を50ccのメスフラスコにとり、氷水中に浸し、0.1%亜硝酸ナトリウム溶液2ccを加えて、3分間ふりまぜ、ベタナフトール試液0.6ccを加え、更に5分間氷冷した後、常温で30分間放置し、水を加えて50ccとし検液とする。別にメタアミノフェノール液1ccを分液漏斗にとり、以下前記と同様に操作して得た液と比較するとき、検液の色は比較液の色より濃くてはならない。

メタアミノフェノール液：確認試験(1)で得たメタアミノフェノール100mgを水100ccに溶かし、その25ccを正確に量り、ヨウ素ビンに入れ、以下定量法を準用してメタアミノフェノールの含量を求めた後、水でうすめて、その1ccがメタアミノフェノール100μgに対応するようにする。

N/10 臭素液 1cc=1.819 mg C₆H₇ON」

4検体中当所規格案により不適となつたもの3検体であつた。いずれも10%注射液であるので此等についてその1ccをガラス栓瓶にとり、クロロホルム・エーテル混液20ccを加え、以下 *p*-Nitroaniline 法に従つて吸光度を測定した結果は第5表の如くである。

第 5 表

検体番号	種類	当規格案 適否	<i>p</i> -Nitro aniline 法				
			濾液採取量 cc	E ₅₅₀	M.A.P 量 (μg)	M.A.P/cc %	M.A.P/P.A.S %
16	10%	不適	1	0.600	54	0.108	1.08
17	10%	適	1	0.340	32	0.062	0.62
18	5%	不適	1	0.500	46	0.092	1.84
19	10%	不適	1	1.050	93	0.186	1.86

総 括

P. A. S中のM. A. P定量法の中でジアゾ化による方法を種々検討した結果, *p*-nitroaniline による方法が優れていることを知つたので, 此の方法に光電比色計を用いて吟味を行つた。又実際に注射用P. A. S末, P. A. S. 注射液について *p*-nitro aniline 法による試験成績は, よく厚生省及び当所規格案による試験成績と一致する。

なお注射用P. A. S末については, M. S. P量は殆んど問題にならないが, パス注射液では経日変化のため相当M. A. P量が増大するものと思われ, 安定剤の工夫を要する所である。

本実験の費用の一部は厚生省科学研究費を以て当てたのでここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 厚生省規格案。2) 青木大, 岩山陽治, 作山時之介: 薬誌, 71 1327 (1951)。
- 3) 根来玄忠: 薬誌, 71 209 (1951)。
- 4) M. Pesetz : C. A. 44, 4881; Bull. soc. chim. biol, 31, 1369~1372 (1949), 根来玄忠: 薬誌, 71, 1322 (1951)。
- 5) G. Lenaers: J. pharm. Belg. [NS], 5, 224~31, (1950)。
- 6) 渡辺厚, 鎌田政喜: 薬誌, 72, 972 (1952)。

Summary

We determined by electrophotometer *m*-aminophenol (M. A. P), an impurity in sodium *p*-aminosalicylate, using diazonium salt of *p*-nitroaniline as a coupling reagent to M. A. P.

We found that the method is excellent because of unnecessary cooling in coupling procedure, and of comparative stability of the color. The results of the experiments are follows :

By sodium *p*-aminosalicylate for injection, all 15 samples contained less than 0.05% of M. A. P., by injections (solutions), three of 4 samples contained more than 1% of M. A. P, and these results agreed with that followed by the standard established by the welfare ministry.

Received April 1, 1954

ピリジンカルボン酸ヒドラジド類のペーパー

クロマトグラフィについて

板井 孝信, 大場 琢磨, 神谷 庄造

Studies on Paper-Chromatography of Pyridine

Carboxylic Acid Hydrazides

By Takanobu ITAI, Takuma ŌBA and Shōzō KAMIYA

まえがき 1952年イソニコチン酸ヒドラジド(以後 **INAH** と略記)の出現した時, 臨床実験に供する検体の化学試験を依頼された。その際に夾雑成分を究明するよう希望されたので, 筆者等は α -, β -ピリジンカルボン酸ヒドラジド(以後 **PAH**, **NAH** と略記)及びヒドラジン(以後 **H** と略記)をペーパークロマトグラフィにより分離検出しようと試みた。先に佐竹, 関両氏¹⁾は脂肪酸($C_1 \sim C_6$)のヒドラジドのペーパークロマトグラフィを試みた結果, 溶媒には(コリジン: イソアミルアルコール: 水)がよいスポットを与えたと報告している。

実験の部

濾紙 東洋濾紙定性 N0.2 又は N0.50 (2×40cm) を使用。

操作法 上昇法で20~23時間(溶媒先端が30cm以上)室温15~24°。試料は5%水溶液を用い, スポット後乾燥してから展開管中に1夜間吊して後(溶媒蒸気が濾紙に飽和してスポットが黄色となる)展開液中に浸す。

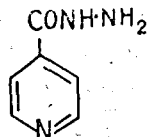
検出法 (I) アンモニア性硝酸銀飽和n-ブタノール液を噴霧して, 80~100°に加熱する。黄~淡褐色に呈色する。

(II) ブロムシアン蒸気に触れさせ, 飽和アニリン水を噴霧する²⁾。又はこの逆を行う。NAHは黄色, 他は紅色に呈色する。

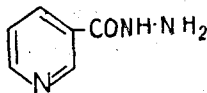
(III) 紫外線下で見ると黄~紫~褐色に見える。

確認限度 ヒドラジンは約20 μ g, モノヒドラジドは約40 μ g, ジヒドラジドは約80 μ gであつた。

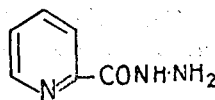
溶媒 [A]モノヒドラジド類 INAH及びNAHを試料として, 先ず2成分系溶媒を各種作つて, Rf値を測定した。(Table 1) この結果, よいスポットを得たのは10%含水n-ブタノールであつたが, 2つのRf値が近く, 分離判定が困難である。次に3成分系の溶媒を各種作つて, 同様にRf値を測定した。(Table 2) この内, 前3者はスポットが流れたり, 大きかつたりしてよくないが, 10%アンモニア水: n-ブタノール系溶媒では皆よいスポットを得た。10%アンモニア水飽和n-ブタノールは振動すると濁り, (1:10)によるとRf値の差が少い欠点がある。(2:10)によるとRf値の差が大きく最適と認めた。



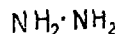
INAH



NAH



PAH



H

Table 1. Rf-Values of INAH and NAH

Solvents		Rf	
		INAH	NAH
Ethanol : H ₂ O	(95 : 5)	0.50	0.58
"	(90 : 10)	0.60	0.59
"	(80 : 20)	0.64	0.68
"	(70 : 30)	0.75	0.71
n-Butanol : H ₂ O	(95 : 5)	0.31*	—
"	(90 : 10)	0.40	0.36
iso-Amyl Alcohol : H ₂ O	(97 : 3)	0.47*	—
Phenol : H ₂ O	(80 : 20)	0*	—
Pyridine : H ₂ O	(95 : 5)	0.79	0.83
"	(90 : 10)	0.79	0.83
Collidine : H ₂ O	(97 : 3)	0*	—
"	(93 : 7)	0.42*	—

Table 2. Rf-Values of INAH and NAH

Solvents		Rf	
		INAH	NAH
n-Butanol : Ethanol : H ₂ O	(4:1:1.5)	0.63*	0.57*
Collidine : iso-Amyl Alcohol : H ₂ O	(1:5:0.5)	0.70*	0.68*
n-Butanol : Acetic acid : H ₂ O	(5:1: 4)	0.74*	0.73*
10%Ammonia-Water : n-Butanol	(1:10)	0.43	0.46
"	(2:10)	0.37	0.49
10%Ammonia-Water. sat. n-Butanol		0.47	0.49

次に10%アンモニア水: n-ブタノール (2:10) を用いて PAH, H の Rf 値を測定した (Table 3). 前同様に良好なるスポットを得た。

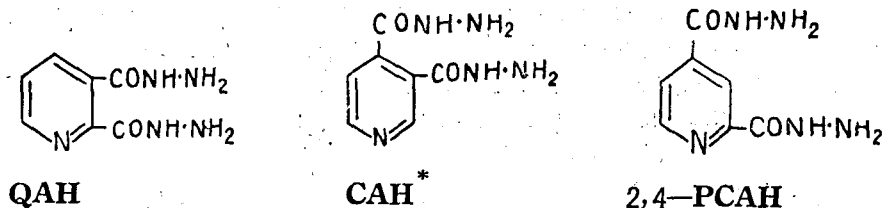
Table 3. Rf-Values of PAH and H.

Solvent	Rf	
	PAH	H
10% Ammonia-Water : n-Butanol (2:10)	0.64	0.15

又 H, INAH, NAH, PAH を同一濾紙上に重ねてスポットして、同溶媒で展開しても判然と4個のスポットを確認できた。(Fig. 1) 以上はすべて検出法 (I) により呈色した。たゞこの溶媒の欠点は純粹の INAH を用いても検出法 (I) で呈色させると多数のスポットが出るが、これはヒドラジドの加水分解その他の変化によるものと考えられる。この中 Rf 値 0.25 のものはイソニコチン酸 Rf 値 0.67 のものはイソニコチン酸アミドである事を確認したが、他は目下検討中である。

〔B〕ジヒドラジド類 10%アンモニア: n-ブタノール (2:10) でモノヒドラジドの分離に成功したので、更にジヒドラジド類中、キノリン酸ヒドラジド (以後 **QAH** と略記) シンコメロン酸ヒドラジド (以後 **CAH** と略記)、2,4-ピリジンジカルボン酸ヒドラジド (以後 **2,4-PCAH** と略記) に及ぼした。

※ 印はスポットが流れたり、大きかつたりして Rf 値算定に不適当。



この際 n-ブタノール : エタノール : 水 (4 : 1 : 2) がよいが, モノヒドラジドと共存する時は, 10%アンモニア水 : n-ブタノール (2 : 10) が最も良好な溶媒であつた. (Table 4, Fig 2, Fig 3)

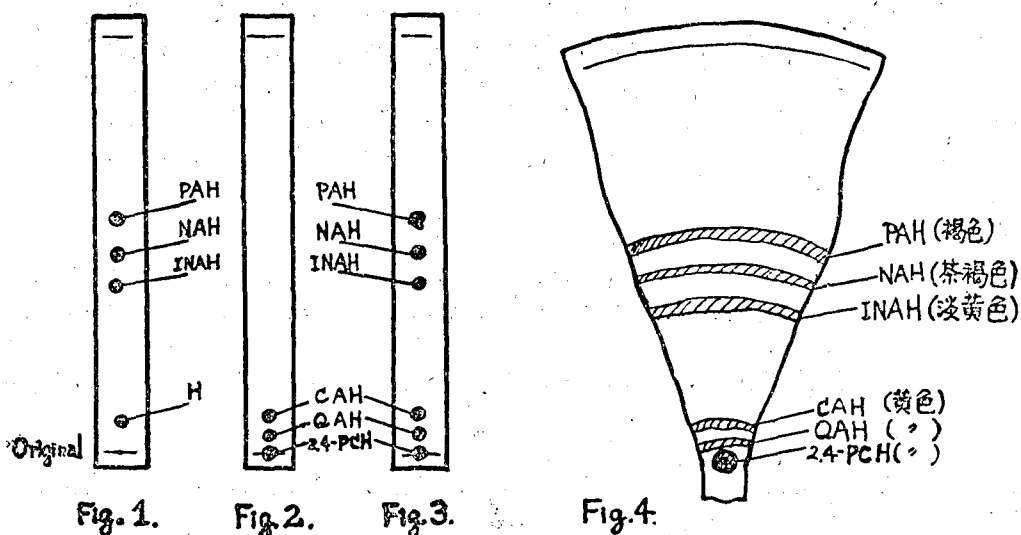


Table 4. Rf-Values of CAH, QAH and 2,4-PCAH.

Solvents		Rf		
		CAH	QAH	2,4-PCAH
n-Butanol : Ethanol : H ₂ O	(4 : 1 : 2)	0.25	0.17	0
n-Butanol : Acetic acid : H ₂ O	(4 : 1 : 2)	0.64	0.52	0
10%Ammonia-Water : n-Butanol	(2 : 10)	0.13	0.07	0

次に 10%アンモニア水 : n-ブタノール (2 : 10) でモノヒドラジド体とジヒドラジド体の混合試料について円形クロマトグラフ³⁾ (Round Paper Chromatography) を試みたが非常にうまく分離出来た. (Fig. 4). この場合の Rf 値は単独に展開するよりも 0.02 位少く出た. 以上はすべて検出法 (I) により呈色した.

〔C〕 ビリジンカルボン酸類 ビリジンカルボン酸類の分離について 4 種の溶媒を用いて試みた. (Table 5) その

* シンゴメロン酸ヒドラジドはモノヒドラジドしか得られない. 又 3, 4 カルボン酸の何れがヒドラジドになっているか, 或は開環しているかは証明しなかつた.

結果 *n*-ブタノール：醋酸：水 (4:1:2) で、モノ及ジカルボン酸ともによく分離する。QA と CA が比較的 Rf 値に近いが、之は 10 % アンモニア水：*n*-ブタノール (2:10) でよく分れるので、二次元クロマトグラフィーを行えば更によく分離できるものと思われる。検出法 (I) により呈色した。

Table 5. Rf-Values of Pyridine Carboxylic Acids.

Solvents	Rf					
	PA	NA	INA	QA	CA	2,4-PCA
10 % Ammonia Water : <i>n</i> -Butanol (2:10)	0.30	0.25	0.27 INA-amide=0.68	0.32	0.01	0
<i>n</i> -Butanol : Ethanol : H ₂ O (4:1:2)	—	0.44	0.45	—	—	—
<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : H ₂ O (4:1:2)	0.47	0.66	0.54	0.28	0.29	0.17
<i>n</i> -Butanol : H ₂ O (90:10)	—	—	0.14 INA-amide=0.65	—	—	—

応用 以上の実験結果を応用して、臨床試験用の INAH のペーパークロマトグラフィーを試みたが PAH, NAH, H は発見できなかった。溶媒は 10 % アンモニア水：*n*-ブタノール (2:10)、検出法 (I) で呈色。

又 bp 140~145° のピコリン油 (β -ピコリン, α -ピコリン, 2,6-ルチジンを含有すると思われる) をゼレンー硫酸で酸化し、エステルを経て、ヒドラジドとし、ペーパークロマトグラフィーを行つた。その結果 Rf 値が 0.49 のものと 0.37 の 2 個のスポットを得、各々 NAH 及び INAH の Rf 値と一致することを確認した。bp 140~5° 中に含まれる 2,6-ルチジンはゼレンー硫酸酸化の際に分解されるので発見されないものと思われる。

総 括

ピリジンカルボン酸ヒドラジド類をペーパークロマトグラフィーにより分離するには、溶媒として 10 % アンモニア水：*n*-ブタノール (2:10) が最適であることを知つた。又ピリジンカルボン酸類には *n*-ブタノール：醋酸：水 (4:1:2) が好適であつた。

この時、INAH は展開中に分解して、INA, INA-Amide 及その他 2,3 の物質を生ずることを知り、INAH の水溶液における分解と共に目下検討中である。

試料の一部は井下田浩、小倉治夫両氏の合成したもので、また本研究費の一部は昭和 27 年度厚生省科学研究費を充当したので謝意を表する。

文 献

- 1) 佐竹, 関; 化学の領域, 4, 557 (1950). 2) Huebner, C. F; Nature, 167, 119 (1951). 3) 佐竹; クロマトグラフィー, p. 60.

Summary

We investigated the paperchromatography of pyridine mono- and di-carboxylic acids, viz. picolinic acid (PA), nicotinic acid (NA), isonicotinic acid (INA), quinolinic acid (QA), cinchomeronic acid (CA), 2,4-pyridine dicarboxylic acid (2,4-PCA) and their hydrazides (-H) by ascending methods.

As a result, 10% ammonia : *n*-butanol=2 : 10 is the most preferable solvent for the separation of hydrazides, and *n*-butanol : glacial acetic acid : water=4 : 1 : 2 for free acids. Their Rf-values are indicated in Table 1~4.

When ammonia : *n*-butanol was used as a developing solvent in chromatography, INAH is decomposed into INA, iso-nicotinic amide and several undecided substances.

We are now trying to classify those substances and also the decomposition process of INAH in water solution.

Received April 1, 1954

パラ・アミノサリチル酸ナトリウムの比色定量法

喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 笠原 閑

A Colorimetric Determination of *p*-Amino-salicylic Acid.By Ichirōemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Yoshitomo KŌCHI
and Shizuka KASAHARA

パラ・アミノサリチル酸ナトリウム (PAS) の定量法としては厚生省検査基準に臭素法¹⁾が採用されているが、製剤の試験法として用いられるような比色定量法を確立するため本研究を行った。まず PAS の比色定量法には、現在 PAS の 4 位のアミノ基をジアゾ化した後 Bratton-Marshall 試薬をカップリングさせる方法²⁾があるがこの方法は呈色の条件が難しいようである。又 Tarnohy and Brens は PAS を硫酸々性で 1 時間沸騰水浴中において脱炭酸して *m*-aminophenol (以下 MAP と略称する) とした後ジアゾ化して Bratton-Marshall 試薬をカップリングさせる方法³⁾を報告し、Altobacki and Hurwitz⁴⁾は PAS のアミノ基の反応性を Marschall の方法で検討している。根来は津田試薬 (β -diethylaminoethyl- α -naphthylamine oxalate) を使用して PAS のジアゾ化合物にカップリングさせる方法^{5) 6)}を発表しているがこれ等はいずれも誤差が大きいようである。

我々は PAS のジアゾ化合物が不安定であるものと考え、PAS それ自体と反応して呈色する試薬として *p*-sulfanilic acid のジアゾニウム化合物を常法によりカップリングさせアルカリ性にする時橙赤色を呈する事を見出し、これを定量に応用したところ、良好な結果が得られたのでここに報告する。

PAS には 4 位にアミノ基があるからジアゾ試薬中に亜硝酸が存在すると第二次の反応を起すためか呈色度が悪いから、ジアゾ試薬中に混入して来る亜硝酸を完全に分解するため尿素を用いる必要がある。又スルファニール酸のジアゾニウム化合物と反応してできた色はホルマリンの存在の下で安定化される。PAS 特に注射液においては MAP の混在が予想されるが、これも PAS と類似の呈色をするが、此点に関しては未だ検討を加えていない。なお *p*-nitroaniline のジアゾニウム化合物を PAS にカップリングさせて呈する青色 ($\lambda = 620\text{m}\mu$) を比色して血液及び尿中の PAS を定量する報告⁷⁾もある。

実験の部

試薬: 1) 1%スルファニール酸試液: *p*-sulfanilic acid 1g に塩酸 10 cc 及び水を加えて 100 cc とする, 2) 1%亜硝酸ナトリウム試液, 3) 36%ホルマリン, 4) 稀塩酸, 5) N水酸化ナトリウム液, 6) 1%尿素試液

ジアゾ試薬: スルファニール酸試液 3 cc を 50 cc のメスフラスコに入れ、氷冷し亜硝酸ナトリウム試液 3 cc を徐々に加え、10 分後水を加えて 50 cc とし尿素液 2 cc を加え、40°の水浴中に放置し亜硝酸の臭気が発しなくなつたら (約 30 分), これを氷室に貯える。

標準液: 厚生省検査基準で検定したものの 100mg を精密に秤取し 100 cc のメスフラスコに入れ、水を加えて 100 cc とする。この液 1 cc 及 2 cc を更に 100 cc に希釈して 10 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 20 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の溶液を作り標準液とする。製剤中に PAS が 2 分子の結晶水を持ったものとして入っている場合は、 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3\text{NNa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ としての純度を求め、これを標準品として定量した方が計算が簡単になる。なお本標準液に用いた結晶は無水物 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3\text{NNa} = 175.14$ 純度 99.67% 含水物 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3\text{NNa} \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 211.16$ 純度 99.71% のものである。

検液の調製: 錠剤 10 個以上を秤取し、粉末とし表示量の 100mg に相当する量を精密に秤取し、10 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 20 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の溶液を作る。

呈色操作: 試験管に検液及標準液を夫々 2 cc 取り、36%ホルマリン 0.5 cc, 稀塩酸 0.1 cc 及びジアゾ試薬 3 cc を加え、40°水浴中に 20 分間放置後常温にもどして之に N水酸化ナトリウム液 10 cc を加え、呈色する橙赤色を 30 分後に A. K. A 光電管比色計 (濾光板 S 50) を用いて測光する。盲検は PAS の代りに水を用い同様操作した液を使用する。

吸収曲線：PASを110°で2時間乾燥したもの100mgを正確に秤取し、100ccの水に溶解し、その2ccを更に100ccに稀めた液2ccを常法に従い呈色させ30分後にBeckman Model B Spectrophotometerを用いて液槽1cm対照液には水を用いて吸収曲線を描いたところFig 1の如くでその吸収極大は500m μ にあり、そのE値は0.282であった。この場合盲検はPASの代りに水2ccを用いて同様に操作したものの吸収度を各波長につき測定し、この値を主検の値より差し引いて吸収度を求めた。

分析曲線 (検量曲線) 上記の方法により各濃度における吸収度を、A. K. A 光電管比色計で測光したところ20 μ g~40 μ gの範囲内においては呈色液の吸収度と濃度との間に Lambert-Beer の法則が成立し、その結果は Fig 2の通りである。

Fig. 1 Absorption Spectrum by Beckman Model B Spectrophotometer.

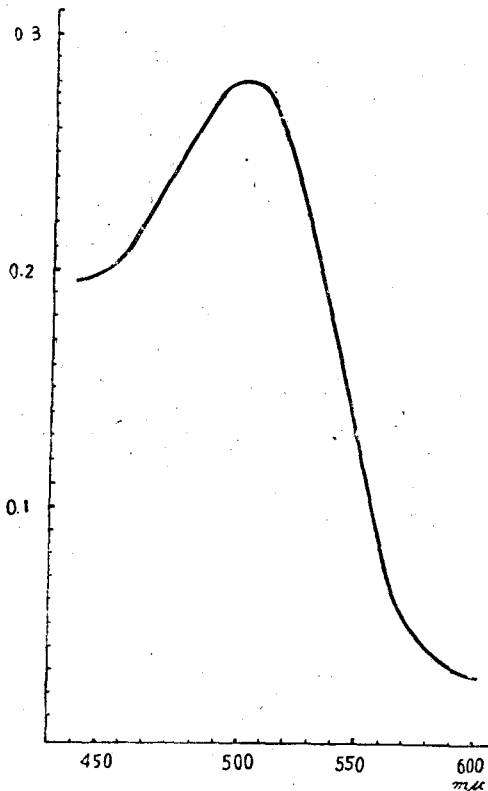
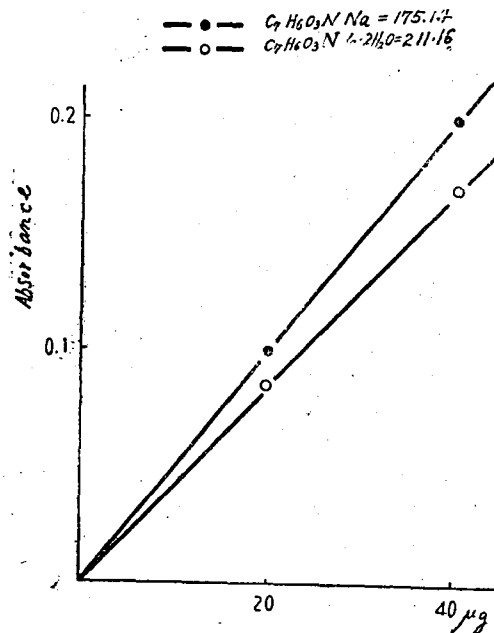


Fig. 2 Analytical Curve



我々は本法を用いて邦産錠剤 (1錠中含水物として0.5g含有) 及び注射液 (10% 溶液) について定量し、臭素法と比較したところ、Table 1の様な結果を得た。なお製剤中には安定剤として亜硫酸ナトリウムを用いている場合もあるので、臭素法で定量する場合は定量条件に合致する様に稀釈後一定量 (20cc) を取り、稀塩酸5ccを加え、直火で5分間煮沸し、冷後N水酸化ナトリウムで中和した後常法の如く定量した。

Table 1. Testing Results of the Commercial Preparations

剤形別	定量法	比色法	臭素法	備考
錠	剤	100.11%	100.58%	
注射液		98.93%	101.98%	
"			100.64%	但塩酸煮沸

考 察 :

1) ジアゾ試薬中に混入してくる亜硝酸は完全に分解する必要がある, 又液中に溶け込んでいる窒素を完全に追い出すために 40° の水浴中で反応を完結させ且つ亜硝酸の完全分解を行った。

2) PAS 製剤中特に注射液中には MAP が夾雑する事が予想される。これはジアゾ試薬に対し, PAS 同様の呈色をするので, 検液調製後クロロホルムで洗滌した液について同様の実験を行ったが, 検液中にクロロホルムの少量が混入してくるためか呈色が更に深色的になり不安定で測定中に急激に変化するので測光定量することができなかった。

3) 本呈色はN水酸ナトリウム液を加えてから30分後も比較的安定であるから測定は充分時間をかけてもよい。

結 語 PAS 製剤の試験法に応用し得る簡易な方法として, *p*-スルファニール酸のジアゾニウム化合物をカップリングさせる比色定量法を確立した。本法はPAS製剤の定量に充分応用することができ且つ試験の能率化に役立つものと思われる。

本研究の一部は厚生科学研究費に仰いだので謝意を表する。

文 献

- 1) “第六改正日本薬局方注解追補”(南江堂) 123 (1953). 2) E. K. Marshall: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 68, 471~472 (1948). 3) A. L. Tärnohy, K. Anne L. Brens: C. A., 44, 3068 (1950). 4) H. Altback, C. Hurwitz: Bull. Am. Soc. Hosp. Pharm., 7, No 3 (1950). 5) 根来: 薬誌, 71, 209 (1951). 6) 根来: 薬誌, 72, 1381 (1952). 7) Tennent, D. M. & Leland, M. L.: J. Biol. Chem., 177, 873 (1947)

Summary

An assay method for PAS involves the reaction with diazotized *p*-sulfanilic acid in acid medium, followed by development of a red color in alkaline solution. The maximum absorbance of this color is at 500m μ wave length by Beckmann Model B Spectrophotometer.

Photometric determination is carried out as follows: Diazotized *p*-sulfanilic acid solution: Take 3cc of 1% sulfanilic acid solution and 3cc of 1% sodium nitrite solution in an ice cooling 50cc volumetric flask. After ten minutes, adjust to the mark with distilled water. After adding 2cc of 1% urea solution, warm it on a waterbath at 40°.

To the sample solution containing 20~40 μ g of PAS in 2cc distilled water, add 0.5cc of 36% formaldehyde solution, 0.1cc of 10% hydrochloric acid, and 3 cc of diazotized *p*-sulfanilic acid solution, then warm it at 40° for 20 minutes. The color is developed by 10cc of N sodium hydroxide solution. The absorbance is measured at 500m μ wave length or through filter S50.

The amount is calculated from a standard curve.

Received April 1, 1954

イソニコチン酸ヒドラジドの比色定量法

喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 笠原 閑

A Colorimetric Determination of Isonicotinic Acid Hydrazide

By Ichirōemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Yoshitomo KŌCHI

and Shizuka KASAHARA

イソニコチン酸ヒドラジド (INAH) の定量法として現在行われている方法にはまず容量法としては各種酸化剤を使用する方法があり, 厚生省検査基準¹⁾は塩酸々性において臭素液で酸化する方法を採用しており, 一方比色定量法としては, *p*-dimethylaminobenzaldehyde (Ehrlich試薬) を用いる方法^{2) 3) 4)}, Cyanogen bromide を用いる方法^{5) 6)} Sodium nitroprusside と Potassium ferricyanide とを用いる方法⁷⁾, 1,2 naphthoquinone 4-potassium sulfonate を用いる方法^{8) 9)}, 及び Phosphomolybdic acid の還元による Molybdene Blue の呈色を利用する方法¹⁰⁾ 等が報告されているが定量操作の過程がいずれもはん雑で長時間を要し, 誤差が大きくなる場合もあるようである。我々は上記の方法を検討したが, INAH 製剤の試験法として更に簡便な方法の必要性を痛感したので本実験を行った。

まず INAH の Hydrazide 部が Aldehyde と結合し Hydrazone を形成する事に着目し, これを比色定量に应用せんとして種々の Aldehyde 試薬を検討したところ *p*-dimethylaminobenzaldehyde が黄色に呈色する事を知り, 上記の方法より更に簡易化する事ができ, しかもその黄色が比較的安定で, 且製剤の試験法として充分な感度を有するので, その呈色条件を A. K. A. 光電管比色計を用いて吟味し, その呈色が Lambert-Beer の法則に適合する事実及び製剤の試験法に利用できる程度の精度を有することを確認することができた。

ちなみに本法を2)の方法と比較してみると2)の方法は塩酸々性で INAH に *p*-dimethylaminobenzaldehyde を加えて加熱することにより一旦分解した Hydrazine hydrochloride に2分子の *p*-dimethylaminobenzaldehyde が結合して Hydrazone を形成して呈色するのであるが, 我々の方法は INAH を分解せずに Hydrazide 部に *p*-dimethylaminobenzaldehyde を結合させて呈色させる方法であるからその定量の感度は幾分落ちるが製剤の定量に用いるには充分である。又 INAH を加水分解する必要がないので塩酸々性で加熱する操作が要らず簡単且つ迅速になる。又反応後の液を酢酸で酸性にするので Hydrazone の加水分解速度が遅く24時間放置してもその呈色は変化しない等の特長をあげることができる。

実験の部

試薬〔1〕 *p*-dimethylaminobenzaldehyde 試液: *p*-dimethylaminobenzaldehyde 2g を秤りアルコールを加えて100ccとする。

〔2〕 Iso-butylalcohol: 再蒸留して bp 106~108° の留分を取る。

〔3〕 1% 酢酸試液:

標準液: デシケート (硫酸) で4時間乾燥し臭素法により検定し, 純度99%以上のもの100mgを正確に秤取し100ccのメスフラスコに入れ水を加えて100ccとする。この液5cc及10ccをとり更に水を加えて100ccとする。この液1ccはそれぞれ50 μ g 及100 μ g の INAH を含有する。

検液の調製: INAH の錠剤10個以上を秤取し, 粉末とし, INAH 約100mg に対応する量を精密に秤り, 三角フラスコに移し, 水約50ccを加え, 時々振盪し10分後遠心分離し残渣を水洗し洗液を合して100ccとする。

この液5ccを取り更に正確に100ccに稀釈し検液とする。

呈色操作: 標準液及検液各2cc (INAH100~200 μ g 含有) を50ccの共栓試験管にとり, *p*-dimethylaminobenzaldehyde 試液2cc, Iso-butylalcohol 3ccを加え10分間放置後酢酸試液1ccを加え呈色する黄色を光電管

比色計 (濾光板 S 40) を用いて測光する。

対照液として水 2 cc, *p*-dimethylaminobenzaldehyde 試液 2 cc, Iso-butylalcohol 3 cc 及 蔞酸試液 1 cc を加えたものを用いる。

吸収曲線: 標準液 (150 $\mu\text{g}/\text{cc}$) 2 cc を用いて上記の方法により呈色した液の吸収曲線を日立 EPBA 型分光電光度計を用いて求めたところ, Fig 1 の通りで, その吸収極大は 409 $\text{m}\mu$ にあり, その $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 値は 158 であつた。又 Hydrazine sulfate を用いて同様に操作した液の吸収曲線は Fig 1 の如くで, その吸収極大は 480 $\text{m}\mu$ にあり, その $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 値は 363 を示し, その吸収極大は 71 $\text{m}\mu$ 長波長に移動し, その吸収度は約 2 倍に増大する。故に本反応は Hydrazine と *p*-dimethylaminobenzaldehyde との反応ではなく, Hydrazide は加水分解することなく, Benzaldehyde と Hydrazone を形成して呈色するものと考えられる。ちなみに INAH の分子量は 137.14, Hydrazine sulfate の分子量は 130.13 である。

分析曲線 (検量曲線): 上記の方法により各濃度における吸収度を, A. K. A 光電管比色計で測光したところ 100 $\mu\text{g}/2\text{cc}$ ~ 300 $\mu\text{g}/2\text{cc}$ の範囲内においては呈色の吸収度と濃度との間に Lambert-Beer の法則が成立し, その結果は Fig 2 に示す通りである。

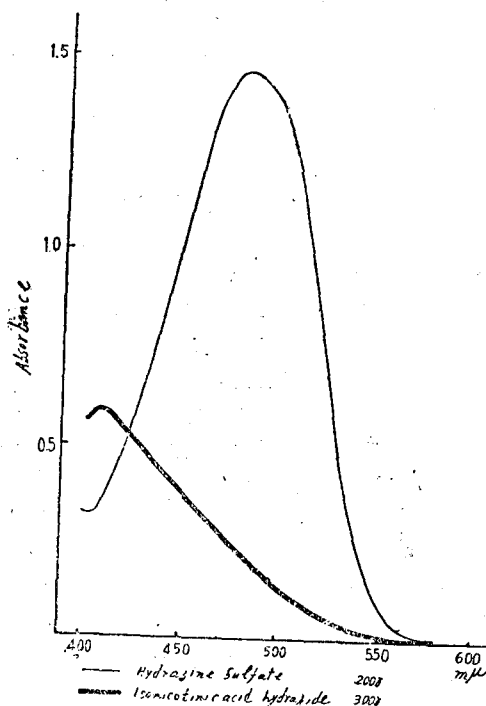


Fig. 1 Absorption Spectrum

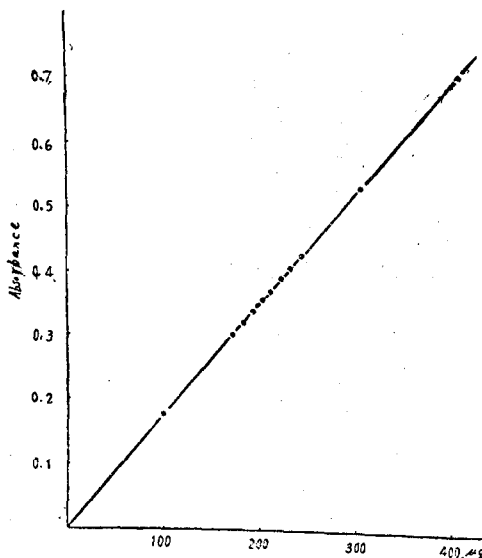


Fig. 2 Analytical Curve

本反応は各種アミン, アミノ酸, 尿素等でも呈色するから適当な前処理を必要とするが, 現在迄のところ市販製剤中には本定量法を障害するものはなかつた。

我々は邦産品 1 錠中 25 mg の INAH を含有する製品を定量し, 臭素法を比較したところ $\pm 0.2\%$ の範囲内でよく一致した。

考察 1. 吸収スペクトルにより呈色液の吸収極大は 409 $\text{m}\mu$ にあるから肉眼による比色は比較的誤差が大きいと思われるが光電管比色計等を利用すれば正確な値が得られ製剤の定量には充分利用できるものと思う。又臭素法に比較し短時間に測定できるので一度に多数の検体を処理する上に好適な方法と云えよう。

2. *p*-dimethylaminobenzaldehyde アルコール試液の濃度は INAH の濃度に対し過剰使用しなければ呈色が Lambert-Beer の法則に従わないので検液 2 cc 中 100 μg ~ 300 μg を含有する液に対して 2 ~ 5 % が適当である。

3. 本法による呈色は呈色後 24 時間放置するもその吸収度は不変であつたがアルコールの揮散による吸収度の増加を防ぐため呈色操作は共栓試験管を使用した方がよい。

本研究の一部は厚生科学研究費に仰いだ。当局に対し謝意を表する。

文 献

- 1) “第六改正日本薬局方註解追補” 114 (1953) (南江堂).
- 2) J. M. Kelly, R. B. Poet: American Review of Tuberculosis., 65, 484 (1952).
- 3) Otto Meyer: C.A., 47, 1954 (1953).
- 4) Deut. Med. Wochschr., 78, 104 (1953).
- 5) Mueller, A & Foo, S. H: J. Am. Pharm. Ass., (Sci. Ed.) 40, 513 (1951).
- 6) Hoffmann-La Roche: Rimifon 文献.
- 7) Chas. Pfizer & Co., : INHA 試験規格.
- 8) 堂野前, 青木: モダンテラビ-臨時増刊号., (昭 27.6.30) 14 (1952).
- 9) E. L. Pratt: Anal. Chem., 25, 814 (1953).
- 10) 小沢, 清水: 薬誌., 72, 1059 (1952).

Summary

We studied a colorimetric determination of isonicotinic acid hydrazide in commercial preparations, utilizing the yellow color of *p*-dimethylaminobenzaldehyde isonicotinic acid hydrazone produced by reaction of isonicotinic acid hydrazide and *p*-dimethylaminobenzaldehyde.

The colorimetric determination of isonicotinic acid hydrazide by this reagent reported by I. Dönomaë and O. Meyer is a colorimetry of hydrazine, produced from the hydrolysis of isonicotinic acid hydrazide by hydrochloric acid.

Photometric determination was carried out as follows: A sample is weighed exactly and dissolved in distilled water, as the solution contains 100~200 μ g of INAH per cc.

Take a sample solution corresponding to 100~200 μ g of INAH in a glass stoppered test tube, and make to 2 cc by distilled water. To each test tube add 2 cc of 2% *p*-dimethylaminobenzaldehyde solution (alcoholic solution) and 3 cc of isobutylalcohol. After standing for ten minutes, add 1 cc of 1% oxalic acid solution. The absorbance is measured through the filter S40 or at 409m μ wave length. Reagent blank: The reagent blank is prepared in the same manner as the sample solution, but with omission of the sample. The amount is calculated from a standard curve.

Received April 1, 1954

塩酸プロカイン-N-グルコシッドについて (第1報)

Frostbite Solution の経時変化

海 東 常 敏, 小 林 茂 子

Procaine-N-glucoside Hydrochloride (1)

Change of Frostbite Solution with Time

By Tsunetoshi KAITO and Shigeko KOBAYASHI

まえがき Frostbite Solution は朝鮮向特需として試験を行つた凍傷治療薬で、静脈注射用に供する。

その処方ブドウ糖 12.5g, エチルアルコール 12cc, 塩酸プロカイン 250mg, 蒸留水を加えて全量 250ccとする。許容範囲はブドウ糖: 4.75~5.25% (標示量の95~105%), エチルアルコール: 4.65~5.05% (標示量96.9~105.2%), 塩酸プロカイン: 0.90~1.05% (標示量の90~105%) となつている。

本品は加熱滅菌を行うと、塩酸プロカインが不活性となるため、滅菌は濾過によらなければならないと説明されている¹⁾。10検体について試験を行つたところ、ブドウ糖、エチルアルコールは許容範囲内にあるのにもかかわらず、塩酸プロカインはいずれも定量値が低く現われた。これは塩酸プロカインが加熱しなくてもブドウ糖と反応して、N-グルコシッドを作るために起ることがわかつたので、次にその結果を報告する。なお、のちに C. A. を見ると、塩酸プロカイン-N-グルコシッドは C. Sannie and M. Vincent²⁾ 及び John. S. Cannell³⁾ によつて報告されている。

実 験 の 部

1 定量法による確認 定量法は日局Ⅶ塩酸プロカイン注射液の定量法を準用した。

1) 検体試験成績

第 1 表

No.	経過日数	%
1	2	89.1
2	4	77.2
3	6	76.5
4	6	75.9
5	5	76.5
6	4	73.7
7	4	77.1
8	6	74.1
9	6	74.2
10	11	65.8
11	6	92.8
12	5	92.8

註Ⅰ 経過日数とは製薬製造年月日より定量を行つた日までの日数である。

註Ⅱ No.11 No.12についてはのちに説明する。

2) 処方通り調整して定量を行うと、明かに日時の経過するに従つて、塩酸プロカインの含量は減少する。しかし検体の場合に比べて、減少の割合が少なかつたので温度差によるものと考え、念の為 37° の孵卵器と冷蔵庫に貯蔵したものについて、定量をメーカーに依頼した。その結果を第2表に示す。

第 2 表

経過日数	室 温	孵 卵 器	冷 蔵 庫
1		91.7	97.1
2	92.8		
3		81.0	96.2
5	84.5	68.9	94.6
7	80.4	61.7	91.1

検体 No. 11, No. 12 はこの結果にもとづいて、メーカーが製造後直ちに冷蔵庫に貯えておいたものを定量した値であり、5~6日経過してもなお許容範囲内にあるわけである。しかしたとえ冷蔵庫に貯えても、10日も経過すれば90%以下になることは明かである。

3) 次に問題となるのは、どうしてこのような現象が起るかと言うことである。ブドウ糖のためか、エチルアルコールのためか、または両方が共存するためか、この3通りの場合が考えられる。これを確かめるために夫々調整して同様に定量を行つた。

第 3 表

経過日数	P+G+A	P+G	P+A
0	98.55	98.55	98.55
1	95.97	96.88	〃
2	93.21	95.52	〃
3	91.83	92.12	〃
4	90.45	90.74	〃
5	86.31	88.69	〃
7	84.93	85.92	〃

註 P:Procaine hydrochloride, G:glucose, A:ethyl alcohol

第 4 表

未 処 理	29.56
4 N 塩 酸 処 理	
放 置 24 時 間	93.26
煮 沸 5 分	93.02
10 分	93.74
15 分	93.02
20 分	91.58
4 N 水酸化ナトリウム処理	
放 置 24 時 間	72.09
煮 沸 10 分	66.56

第 5 表

未 処 理	0
4 N 塩 酸 処 理	
放 置 24 時 間	97.33
煮 沸 10 分	97.33
4 N 水酸化ナトリウム処理	
放 置 24 時 間	70.89
煮 沸 10 分	62.51

コシッドの Rf 値は元のアミノ酸及びアミンのそれよりも低く現われると述べている。従つて、塩酸プロカイン-N-グルコシッドにおいても、塩酸プロカインよりも低い Rf 値を示すことが予想される。

はじめブタノール、醋酸を展開溶媒として行つたが、上方の塩酸プロカインの spot が下方に流れて良好な結果が得られなかつたので、ブタノール、エタノール混液を用いた。この場合も塩酸プロカインの spot が拡がつて、あまり良好ではなかつたが前のブタノール、醋酸の場合よりはわかりやすかつた。

実験装置は東洋濾紙会社製の B 型を用い、

下降法で行い、濾紙は同じく東洋濾紙 No. 50 を用いた。展開溶媒はブタノール、エタノール、水を 4:1:2 の

表を見ると P+A は全く定量値に変化がないが、P+G は P+G+A とほぼ同一の値を示している。従つて Frostbite Solution 中で、塩酸プロカインの含量が低くなるのはブドウ糖が存在するためである。

4) この場合、塩酸プロカインは芳香族第 1 級アミンであるから、ブドウ糖と反応して N-グルコシッドを生成することが第一に考えられる。塩酸プロカイン-N-グルコシッドが生成したのだとすると、一般に N-グルコシッドは酸、アルカリ処理すると分解して、もとのアミンと糖に戻るわけである。従つて、Frostbite Solution 100cc' に対し、4N 塩酸、4N 水酸化ナトリウムの各 10cc を加え、放置ならびに煮沸したのち、定量を行つたところ第 4 表の値を得た。

塩酸プロカインの含量は未処理では約 30 % であるが、塩酸で処理したものは 24 時間放置したのと、5~15 分煮沸したものとは大体一致した値を示し、約 93 % となる。従つてはじめは、Frostbite Solution 中には許容範囲内の塩酸プロカインが存在していたことは間違いない、なお、水酸化ナトリウム液で処理したものの定量値は遙かに低くしか現われなかつた。

5) 更に確実を期するため、塩酸プロカイン-N-グルコシッドを合成し、Frostbite Solution と同様に塩酸プロカイン 0.1 % 水溶液を作り、定量を行つた。

第 5 表のようになり、大体第 4 表と一致するので、塩酸プロカイン-N-グルコシッドが生成することは明かとなつた。また未処理の場合、塩酸プロカインの定量値は 0 % であるから、N-グルコシッドはアンモニアアルカリ性にしてもプロカイン塩基を遊離せず、またクロロホルムによつて抽出されない。

II ベーバクロマトグラフィによる確認 A. Gottschalk and S. M. Partridge⁴⁾ はアミノ酸及び芳香族アミン類の N-グルコシッドのベーバクロマトグラフィをブタノール、醋酸を展開溶媒として行つたが、N-グル

第 6 表

	Rf 値
Frostbite Solution	0.66 0.34
塩酸プロカロン-N-グルコシッド (0.1%)	0.34
塩酸プロカイン (0.1%)	0.66
Frostbite Solution 塩酸処理液	0.65
塩酸プロカイン-N-グルコシッド塩酸処理液	0.65
塩酸プロカイン塩酸処理液	0.65

比率に混合し上層を用いる。展開時間は一夜放置（約15時間）。温度は室温。呈色は展開后濾紙を風乾し、まず4N塩酸を噴霧し、以下順次に0.1%亜硝酸ソーダ液、0.5%アミノスルホン酸アンモニウム液、0.1%津田試薬を噴霧すると、暫時のち紫色を呈する。

第6表に示す通り、Frostbite Solutionの2つのRf値は塩酸プロカイン、塩酸プロカイン-N-グルコシッドのRf値に一致する。また塩酸で処理したもののRf値はいずれも0.65となり僅かではあるがもとの塩酸プロカインのRf値と比較すると低くなっていることがわかる。

総 括

Frostbite Solution（ブドウ糖、エチルアルコール、塩酸プロカイン溶液）中の塩酸プロカインは定量を行うと、日時の経過するに従って含量を減じることがわかった。これは塩酸プロカインがブドウ糖と反応してN-グルコシッドを生成するためである。

終りに御指導を戴いた山本有機化学試験部長に感謝の意を表する。また御協力下さった日本製薬株式会社に御礼申上げる。

文 献

- 1) 406th MEDICAL GENERAL LABORATORY の MEMORANDUM. 2) C. Sannie and M. Vincent : C. A., 43, 758 (1949) ; Compt. rend. Soc. biol., 142 493 (1948). 3) John. S. Cannell : C. A., 46, 1709 (1952) ; J. Pharm. Pharmacol., 3, 741 (1951). 4) A. Gottschalk and S. M. Partridge : Nature, 165, 684 (1950)

Summary

In the quantitative determination of the Frostbite Solution containing glucose, ethylalcohol and procaine hydrochloride, it is observed that the content of procaine hydrochloride gradually decreases. This is due to the formation of procaine-N-glucoside hydrochloride.

Received April 1, 1954

塩酸プロカイン-N-グルコシッドについて（第2報）

二つの異性体及びその相互転移について

海 東 常 敏

Procaine-N-glucoside hydrochloride (2)

Two Isomers and their Mutual Transformation

By Tsunetoshi KAITO

まえがき 前報において、Frostbite Solution 中の塩酸プロカインをクロロホルム抽出により定量すると、その含量は日時の経過するに従って減少するが、これはN-グルコシッドを生成するためであると報告した。

芳香族アミン類のN-グリコシッドは古くから知られているが、その一般的製法は塩基と糖をそのまま、または塩化アンモニウム等を触媒¹⁾として、アルコール溶液中で放置或は加熱するのである。また少量の水の存在のもと

に、そのまゝ²⁾または酸³⁾を触媒として反応させても得られる。

塩酸プロカイン-N-グルコシッドについて、C. Sannie and M. Vincent は 1 分子の結晶水を含み、融点 $130\sim 131^\circ$, $[\alpha]_D^{25}:-100.7^\circ$ で水、アルコールに易溶であると述べている、実験によると、融点 $130\sim 131^\circ$ のものは含水アルコールより得られるが、さらに高融点のものが無水アルコールより得られ、この両者は互に転移することがわかつたので次に報告する。なお N-グルコシッドにおいて、含水アルコールと無水アルコールまたは無水メタノールから融点の異なる 2 異性体が得られ、互に転移することは Leo. Berger and John. Lee⁴⁾, G. P. Ellis and J. Honeyman⁵⁾によつて報告されている。

本 論

前記 J. Honeyman は含水アルコールより得られるものを B、無水アルコールより得られるものを A としているので、本報においてもこれに従うことにする。

塩酸プロカイン-N-グルコシッド B B は常法により含水アルコール中で煮沸するか、または少量の水を加え水浴上で加熱すれば得られる。融点は $129\sim 130^\circ$ で 90% アルコールから再結晶すると $133\sim 135^\circ$ となる。しかし半融したまゝで 135° で完全に熔融しない場合もある。メタノールから再結晶すると、はじめ $126\sim 127^\circ$ であるが、放置すると $130\sim 131^\circ$ となる。

塩酸プロカイン-N-グルコシッド A ブドウ糖と塩酸プロカインを無水アルコール中で加熱溶解させても、冷却後油状となつて沈着するだけで結晶として得られなかつた。そこで第 1 に煮沸時間を延長、第 2 に溶媒を増加、第 3 に塩化アンモニウムを添加して行つたが、良好な結果は得られなかつた。たまたま上澄液を傾斜して除き、更に無水アルコールを加え沸騰水浴中で振盪していたところ、突然沈澱が析出した。このものは融点 $168\sim 170^\circ$ で熔融後直ちに発泡分解する。はじめ単に無水物と考えたが、元素分析及び Karl-Fischer 法による結晶水定量の結果から、A も B と同様に 1 分子の結晶水を含んでいることがわかつた。

なお A、B とともに結晶水を除くことはできなかった。

A、B 間の転移

i) $A \rightarrow B$ A を 90% アルコールと水浴上で煮沸すると、冷却析出した結晶は $132\sim 136^\circ$ の融点を示す。メタノールでは単に加熱溶解しただけで B に変化する。無水メタノールを用いても同様である。この A が B に変化するところから、A はアマドリ転位⁶⁾によりできるイソグルコザミン⁷⁾でないことは明かである。

ii) $B \rightarrow A$ B を無水アルコール中で煮沸すると A に変化する。しかし無水メタノールを用いた場合は変化が起らない。

水の影響 A の製法において、上澄液を分けたのち、水 1 滴を加えた無水アルコールを加え加熱しても A (融点 $167\sim 169^\circ$) ができるが、B を無水アルコールに煮沸溶解したのち、水 1 滴を加え、更に煮沸した場合は A への変化は起らない。従つて A の生長にはそれ程嚴重に無水でなくてもよいが、B を A に変化させるにはできるだけ無水でなければならない。

比旋光度 メタノールを溶媒として測定したが、A、B の比旋光度は殆んど同一で明かな差は認められなかつた。即ちはじめ約 -90° で徐々に変旋光を示し -48° となる。前記 J. Honeyman の行つた実験では各種の N-グルコシッドの多くはメタノール溶液で測定すると、A、B の比旋光度ははじめ異なるが、変旋光を示し殆んど同一の値となると報告されている。塩酸プロカイン-N-グルコシッドでは、A はメタノール中で簡単に B に変化するため、A、B の値に殆んど差がないのだと考える。

実 験 の 部

塩酸プロカイン-N-グルコシッド B

塩酸プロカイン 0.75g ブドウ糖 0.5g に 95% アルコール 5cc を加え、還流冷却器をつけ水浴上で煮沸する。約 10 分で殆んど溶ける。更に 20 分煮沸し 1 夜放置する。得量 55%

また塩酸プロカイン 0.75g ブドウ糖 0.5g に水 0.2cc を加え、沸騰水浴中で加熱すると、約 5 分で液は淡黄色とな

る。更に5分加熱し、無水アルコール5ccを加えよく振盪したのち1夜放置しても得られる。

mp 130~131° (メタノールより), $[\alpha]_D^{20}$: -90°→-48° (c=0.5 メタノール), 分析値 (C₁₉H₃₁O₇N₂Cl·H₂O 計算値 C 50.38, H 7.34, N 6.19 実験値 C 50.30, H 8.75, N 6.35

塩酸プロカイン-N-グルコシッド A 乾燥した塩酸プロカイン0.75g及びブドウ糖0.5 に無水アルコール 5ccを加え、塩化カルシウム管をつけた還流冷却器をつけ、水浴上で煮沸反応させる。約80分で全く溶ける。水浴よりおろすとすぐ濁濁し油状物が沈着しはじめる。冷蔵庫に1夜放置したのち、上澄のアルコール溶液を傾斜して除き、無水アルコール5ccを加え、前と同様に塩化カルシウム管をつけた還流冷却器をつけ、沸騰水浴中でよく振盪しながら加熱すると、油状物はすぐ落けしばらくすると徐々に結晶が析出してくる。更に振盪加熱を続け、充分に結晶を析出させる。得量44%, mp 168~170° (発泡分解), $[\alpha]_D^{20}$: -91°→-48° (c=0.5メタノール), 分析値 C₁₉H₃₁O₇N₂Cl·H₂O 計算値 C 50.38, H 7.34, N 6.19 実験値 C 50.46, H 7.01, N 6.44

A, Bとも水、熱メタノールに容易に溶けるが、アルコールには溶けにくい。

塩酸プロカイン-N-グルコシッド A, B 間の転位

i) A→B A 0.3g に90%アルコール5ccを加え水浴上に1時間煮沸する。またはA 0.3g にメタノール3ccを加え約5分間加温すればBとなる。

ii) B→A B 0.2g に無水アルコール15ccを加え、塩化カルシウム管をつけた還流冷却器をつけ、水浴上で1時間煮沸すればAが得られる。

総 括

塩酸プロカイン-N-グルコシッドには融点の異なる2種の異性体がある。塩酸プロカインとブドウ糖を無水アルコール中で煮沸縮合させると、融点168~170° (A) が得られ、含水アルコールと煮沸すると、融点130~131° (B) が得られる。Bを無水アルコール中で煮沸するとAに変じ、Aを含水アルコール中で煮沸するとBに変化する。A, Bともに1分子の結晶水を含み、水、熱メタノールに容易に溶けるがアルコールには溶けにくい。

文 献

- 1) R. Kuhn and R. Ströbele : Ber., 71, 747 (1938).
- 2) F. Weygand : Ber., 72, 1663 (1939).
- 3) F. Weygand : Ber., 73, 1259 (1940).
- 4) Leo. Berger and John. Lee: J. Org. Chem., 11, 77 (1946)
- 5) G. P. Ellis and J. Honeyman: J. Chem. Soc., 1952, 1490.
- 6) M. Amadori: Atti. Accad. Lincei., 6, 2, 337 (1925).
- 7) R. Kuhn and F. Weygand : Ber., 70, 769 (1937).

Summary

Procaine-N-glucoside hydrochloride has two isomers, mp 168~170° (A) and 130~131° (B). (A) is obtained by the condensation of procaine hydrochloride and glucose in hot absolute alcohol and (B) in aqueous alcohol. By heating (B) in absolute alcohol, it is converted into (A) and (B) is formed from (A) by boiling in aqueous alcohol or methanol. Both isomers crystallize with one molecule of water, and are easily soluble in water, hot methanol and slightly soluble in alcohol.

Received April 1, 1954

エフェドリンとクロロホルムの反応に関する研究

伊藤 西一, 北川 純男

Studies on the Reactions of Ephedrine with Chloroform.

By Yūichi ITO and Sumio KITAGAWA

エフェドリンがクロロホルムすなわち、ポリハロゲンアルキルと反応して塩酸塩を生成することは、米、英薬局方¹⁾にエフェドリンの確認試験として採用されている。一方、日局 VI の塩酸エフェドリンの定量法ではエフェドリン塩基の抽出中、クロロホルムにより塩酸塩を生ずるので低い値を示しやすい (Table 1)。

エフェドリンがクロロホルムによつて塩酸塩を生成することは、J. B. Peterson²⁾によつて報告されており、その後、F. A. Stedlet 及び K. K. Chen³⁾によつて種々のハロゲンアルキル誘導体によるエフェドリンの反応が報告されているが、クロロホルムより HCl の脱離の過程はいまだ明かにされていない。

Table 1. Assay of Ephedrine-hydrochloride by J. P. VI and U. S. P. XIV

sample	Ephedrine found	
	J. P. VI	U. S. P. XIV
A	77.92	80.88
	78.73	80.22
B	78.41	80.56
C	78.67	80.76
C	79.58	80.82
D	79.29	80.93

著者らのクロロホルムについて行つた実験では、Table 4 の如く、クロロホルム精製後の経過時日によつて塩酸塩の生成速度がことなり、新に精製し、充分脱水を行つたクロロホルムでは 24 時間後も塩酸塩の生成が見られなかつた。この反応は 2 時間前後で平衡に達するが、濃度の高い溶液では反応速度はかなり遅くなつて進行する。そして、アルコールの存在は反応速度にほとんど変化がないが、水の存在は著しい影響がある。

実験の部

高周波滴定による塩素イオンの定量⁴⁾ N/100 - 塩酸エフェドリン水溶液 5 cc にアルコール 20 cc 及びクロロホルム 5 cc を加えて、柳本製高周波滴定装置を用いて N/100 - 硝酸銀液で滴定を行う。又、これと同じ条件で、エフェドリン-アルコール溶液及び塩酸エフェドリン水溶液の種々の混合比についてクロロホルム及びアルコールの存在で滴定を行つた。その結果は Table 2 及び Fig. 1 の滴定結果及び滴定曲線の如くで、終末点も明かである。

エフェドリンとクロロホルムの反応による塩酸塩の生成 エフェドリンのクロロホルム滴液を恒温槽に 25° (±0.5°) に保ち、その間 0 分より 360 分にわたつて生成した塩酸塩を測定した。すなわち、有栓試験管に 0.02M エフェドリン-クロロホルム溶液 10 cc をとり 25° に保ち、一定時間後、これに 10 cc のアルコールを加え、その 10 cc にアルコール 15 cc、水 20 cc を加えて N/100 - 硝酸銀液により、前記高周波滴定装置で滴定を行つた。その結果は Fig. 2 に示した。

加熱及水分の存在による塩酸塩の生成 エフェドリン及びブソイドエフェドリンの 0.5032 g を各々クロロホルム 100 cc に溶解し、その 10 cc について水 1.0 cc を添加した場合及びしからざる場合について、0, 60, 120, 180 分間水浴上で加熱煮沸し、次でクロロホルムを全く溜去し、残留物を水 20 cc に溶解、N/50 硝酸銀 5 cc、硝酸 2 cc、硫酸第

Table 2 Determination of Cl' in Solution of Ephedrine-base.

Sample ratio cc.			cc. of N/100AgNO ₃		
Ephedr. -HCl	Ephedr. -base		calcd.	found.	error.
5	: 0		5.149	5.17	0.02
4	: 1		4.12	4.17	0.05
3	: 2		3.09	3.17	0.08
2	: 3		2.06	2.02	-0.04
1	: 4		1.02	1.04	0.02
0	: 5		0.00	0.02	0.02

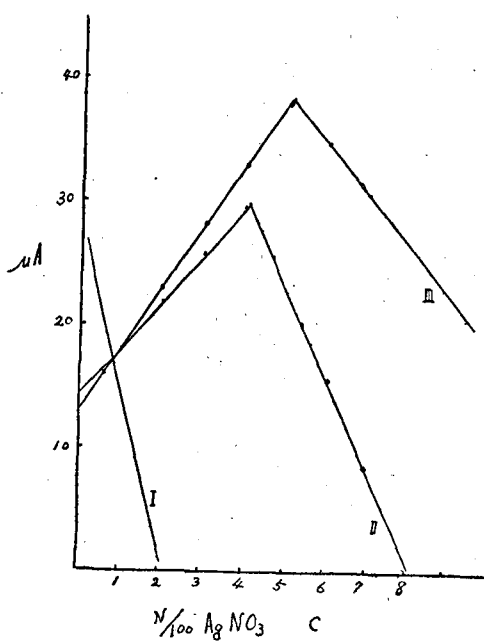


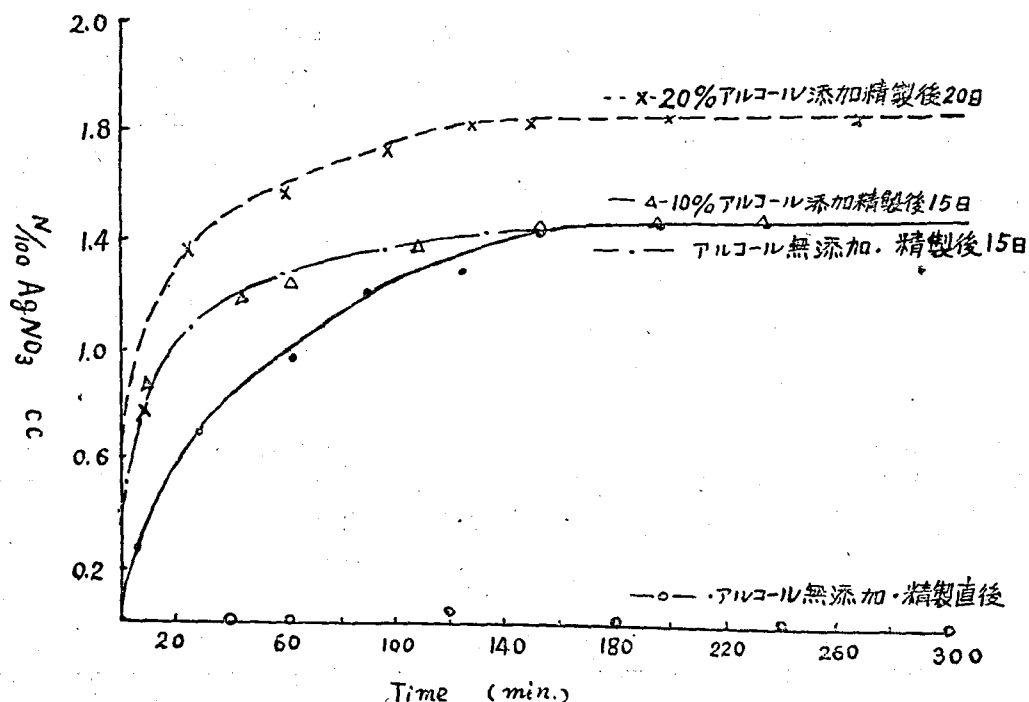
Fig. 1 Ephedrine-base及HCl-salt の種々混合比の滴定曲線

I Ephedr. base 5:0 Ephedr. HCl

II " " 4:1 " "

III " " 0:5 " "

Fig. 2 クロロホルム溶液中の時間対 HCl-Salt 曲線



二鉄アンモニウム試液 2cc を加えて、ロダアンモニウム液で滴定を行う。一方、同様にクロロホルムのみについての空試験を行う。その結果は Table 3 に示した。

Table 3 Effects by Heating of Ephedrine and Pseudoephedrine-Chloroform Solutions.

Time period.	Chloroform (blanc)	Ephedrine-Chloroform soln.		Pseudoephedrine-Chloroform soln.
min.	Cl'mg	Cl'mg	Cl'mg	Cl'mg
		(1)	(2)*	
0	0	0.0	9.9	13.5
60	0.6	7.1	24.1	14.2
120	0.7	10.0	24.1	13.5
180	0.0	10.0	30.5	13.5

クロロホルムの新鮮度による塩酸塩の生成 塩素イオン及び塩素の存在しない精製クロロホルムに、0.1M, 0.05M, 0.025M, 0.01M 濃度にエフェドリンを溶解し、25° に 2 時間保つた後、高周波滴定装置により塩酸塩を測定、且これらを精製後 0, 6, 10, 19 日を経たクロロホルムについて上記濃度の溶液を作り、クロロホルムの新鮮さ及び濃度の影響について測定を行つた。その結果は Table 4 の如くである。

*(2). add H₂O 1cc. per 25 cc. of solution

Table 4 Assay of Chlorine Ion at Various Concentrations
of Ephedrine-Chloroform Solution and by Freshness
of Chloroform.

Freshness of Chloroform.	N/100 AgNO ₃ cc			
days from refining	conc. of Ephedr. soln. (mol)			
	0.1M	0.05M	0.025M	0.01M
0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.97	0.31	0.21	0.05
10	0.97	0.49	0.25	0.10
19	1.84	0.82	0.31	0.10

文 献

- 1) U.S.P. XIV ED. p. 205; B.P. 1953. p. 211. 2) J. B Peterson: Ind. Eng. Chem., 20, 388 (1928).
3) Frank a. Steldet and K.K. Chen: J. Am. Pharm. Assoc., 29, 106 (1940). 4) W. J. Blaedel, H.
V. Malmstadt: Anal. Chem., 22, 734 (1950)・藤原, 林・電気通信大学報 N0.3, 93 (1951)

Summary

We studied the conditions of the reaction of chloroform with ephedrine-base in the U. S. P. XIV and B. P. 1953. We found that the equilibrium was reached in about 2 hours from begining of the reaction, following the appearance of the crystalline ephedrine hydrochloride, but the freshness of chloroform affected to the yeild of the hydrochloride, and the reaction little occured with fresh chloroform. We considered the existence of water may be necessary to this reaction.

Received April 1, 1954

比濁法によるペプシンの定量

山 羽 力

A Nephelometric Method for Estimating Pepsin Activity

By Tsutomu YAMAHA

まえがき 日局含糖ペプシンの効力試験は、その操作が煩雑で判定も明確を欠き、効力の倍率を定めるのにも不便である。これを簡便に定量する方法を試み一応満足する結果を得たので報告する。筆者は酵素によつて分解されない残存蛋白を適当な洗滌剤を加えて濁らせ、それを光電管比色計で比濁する方法をとつた。蛋白質の比濁定量法としては、人血清を強酸性でスルフォサルチル酸ナトリウムで濁らせたり¹⁾、カゼインを弱アルカリ性で Chinidin 塩酸塩で濁らせたり²⁾、また脊髄液³⁾、血清アルブミン、グロブリン⁴⁾を gum-ghatti を保護膠質にしてスルフォサルチル酸で濁らせたりする方法がある。最近では細菌抽出液の蛋白の定量に三塩化酢酸を用いた例もある。⁵⁾⁶⁾ これらの場合かなりの時間濁りが均質で凝集してしまわないことが必要である。このため蛋白質の濃度が限定されたり、保護膠質が用いられたりする。一方このような比濁法でペプシン⁷⁾、トリプシン²⁾⁸⁾によるカゼイン水解の検討も行われている。筆者は従来の方法を改良し、カゼインを基質にしアラビアゴムを保護膠質として三塩化酢酸添加による濁りから、含糖ペプシンの効力を定量する方法を得、これを濃ペプシンの力価の定量に応用した。

実験方法及び結果

(1) カゼイン濃度と濁度の関係 Hammersten Casein (Merck 製) 150mg に蒸留水約 30cc と N-HCl 約 0.7cc を加え、水浴中で加温しつつ完全に澄清に溶かし全容を 50cc にする。このカゼイン液 8cc を $\frac{N}{5}$ 塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH2.2) 3cc 及び pH2.2 の水 (蒸留水 500cc に N-HCl 2.3cc を加う) 1cc を加えカゼイン標準液 (2mg カゼイン/cc) とする。比濁法では塩類の影響が大きいので、これは後述の反応液と同じ塩類濃度にしてある。種々濃度のカゼイン液 (0.2~2.0mg) 1cc をとり、 $\frac{3}{40}$ N NaOH 1cc (後述の実験で反応を停止するため入れてある)、2%アラビアゴム水溶液 2cc を静かに加え振盪後室温に約 30 分間放置、400m μ フィルターを用い光電管比色計で比濁する。ブランクとしてカゼインの代りに水 (pH2.2) 1cc で同様の操作を行う。結果は Fig. 1 の通りである。

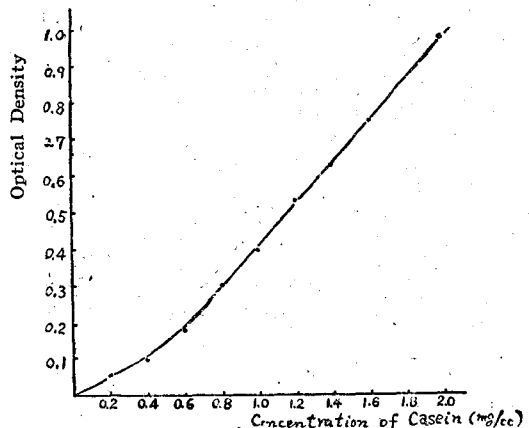


Fig. 1 The Calibration Curve of Casein Solution

(2) 反応条件の検討

(A) 至適 pH 前記の方法で作つたカゼイン液 (3mg/cc, pH2.2) 2cc と各種 pH の $\frac{N}{5}$ 塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液 1cc を混じり 50° とし、これにあらかじめ 50° にした酵素液 1cc (含糖ペプシン 2.7mg を含む) を加え正確に 20 分間反応させる、反応液 1cc を 2%アラビアゴム水溶液 2cc と $\frac{3}{40}$ N-NaOH 1cc 中に加えて反応止め、5%三塩化酢酸 2cc を加えて以下前記の方法で比濁する。なお酵素液の代りに水を加えた対照についても同様の操作を行う。Fig. 1 から各 pH における残存カゼイン量を求め、対照の値を 100% として分解カゼイン量 (%) を得た。pH は反応後ベックマン pH メーターで測定した。結果は Fig. 2 の通りである。Fig. 2 から含糖ペプシンの至適 pH は 1.8~2.2 の附近にあり、局方試験での pH 1.8~2.0 とよく一致する。以下の反応はすべて pH2.2 で行つた。

(B) 至適温度 カゼイン液 (3mg カゼイン/cc, pH2.2) 2cc と $\frac{N}{5}$ 塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2) 1cc に、それぞれ 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70° の恒温槽に 15 分間浸した含糖ペプシン液 (2mg 含糖ペプシ

ン 1 cc, pH2.2) 1 cc を加え, 各温度で 20 分間反応させ, その 1 cc につき上記の方法でカゼイン分解量 (%) を調べた。結果は Fig. 3 の通りである。

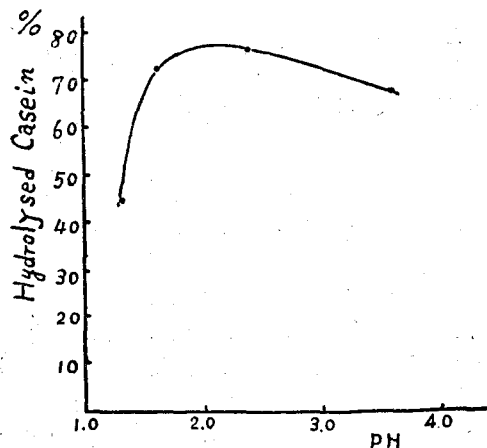


Fig. 2 The Influence of pH upon the Activity of Saccharated Pepsin (J.P.)

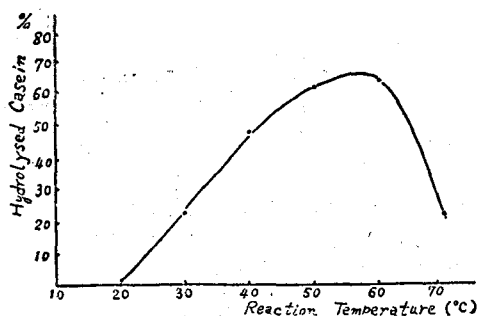


Fig. 3 The Influence of Temperature upon the Activity of Saccharated Pepsin (J.P.)

Fig. 3 から含糖ペプシンは 50~60° に至適温度がみられ, 日局の反応温度 50° の条件は合理的である。以下の実験では反応温度はすべて 50° で行つた。

(3) 比濁法と Anson 法の比較 酵素による蛋白質の加水分解を測定する場合, 残存基質を三塩化酢酸で沈澱させ, その濾液中のチロジンを Folin 試薬⁹⁾ で発色させる Anson 法¹⁰⁾ が可成り一般的に行われており¹¹⁾, 筆者も前報でこの方法を用いパンクレアチンによるカゼイン消化を測定した¹²⁾, この方法と本報で述べる比濁法との間には平行関係が成立するはずである。そこで両測定法を平行して実験を行つた。反応液組成は

カゼイン液 (3 mg カゼイン/cc, pH2.2)	4 cc
$\frac{N}{5}$ 塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH2.2)	2 cc
含糖ペプシン液 (1.6 mg 含糖ペプシン/cc, pH2.2)	2 cc

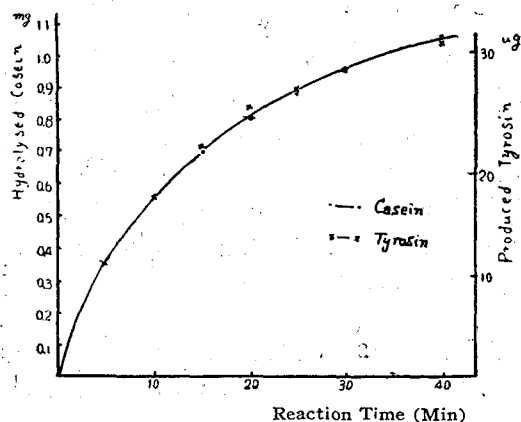


Fig. 4 The Comparison between the Amounts of Hydrolysed Casein and Produced Tyrosin

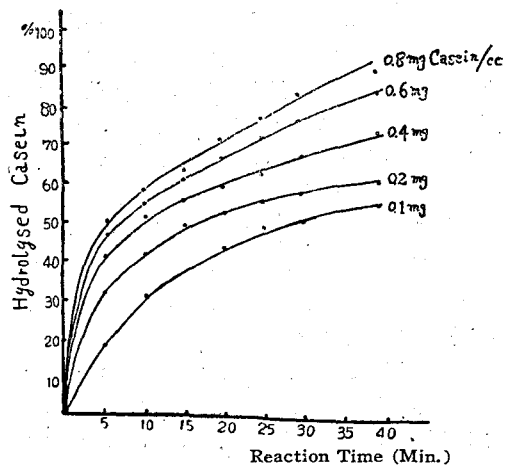


Fig. 5 The Hydrolysis of Casein by Various Concentrations of Saccharated Pepsin (J.P.)

5 分毎に反応液 1 cc をとり前述の比濁法により分解カゼイン量 (mg) を求め, また反応液 2 cc を 0.4M 三塩化酢酸 2 cc 中に加え, 30 分~1 時間後濾過しその濾液 1 cc に 0.4M 炭酸ナトリウム 5 cc, Folin 試薬 (1:5) 1 cc を加え, 37° で 20 分間放置し 660mμ フィルターを用い光電管比色計で比色し, 別にチロジン標準液で求めた検量曲線から分解チロジン量 (μg) を求めた。結果は Fig. 4 の通りである。

この結果から両方法で測定したカゼイン分解の過程はよく一致している。

(4) 種々酵素濃度によるカゼイン分解量の変化

上記の条件で種々の酵素量を用い、カゼイン分解量を時間的に追跡すると Fig. 5 のようになる。

次に丁度局方限界の適品と思われる含糖ペプシンを用い、反応時間20分におけるカゼイン分解量(%)を縦軸にとり、反応液1cc当りの含糖ペプシン量(mg)の対数を横軸にとると、Fig. 6 のようなグラフが得られる。

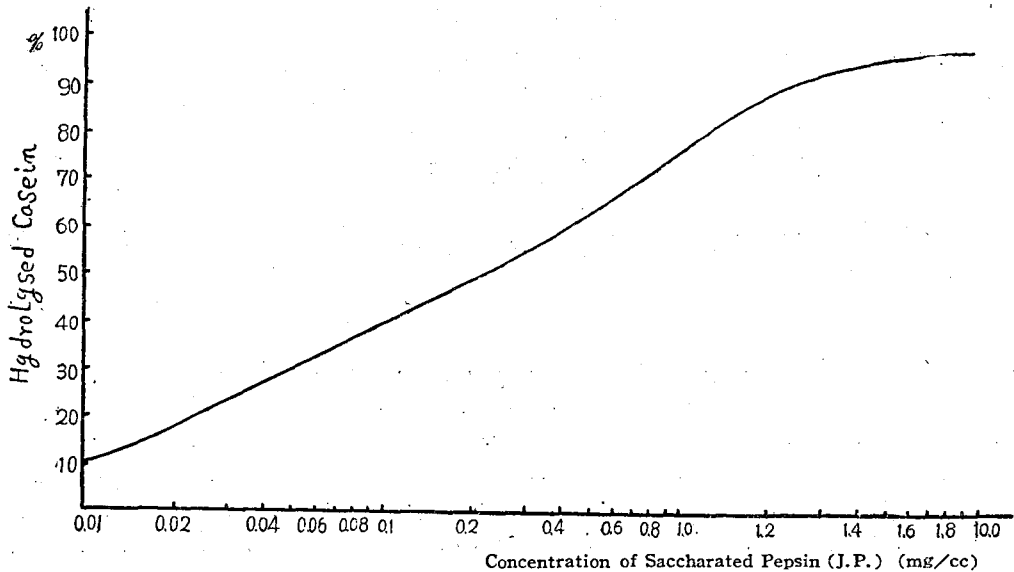


Fig. 6 The Standard Curve of Hydrolysed Casein by Various Concentrations of Saccharated Pepsin (J.P.)

上図から両者の間にかんがりの直線的関係がみられ、これを標準曲線として他のペプシンの力価倍数をきめることができる。

(5) 濃ペプシンの力価倍数のきめ方 濃ペプシン 100mg を水 (pH 2.2) 50cc にとかし、これを $\frac{3}{10}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{3}{100}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{3}{1000}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{3}{10000}$, $\frac{1}{10000}$ に希釈し、それぞれにつき上記の反応条件で20分間反応させたのちカゼイン分解量(%)を求め、これと反応液1cc当りのペプシン量(mg)の対数との間の関係を求めると Fig. 7 のようになる。

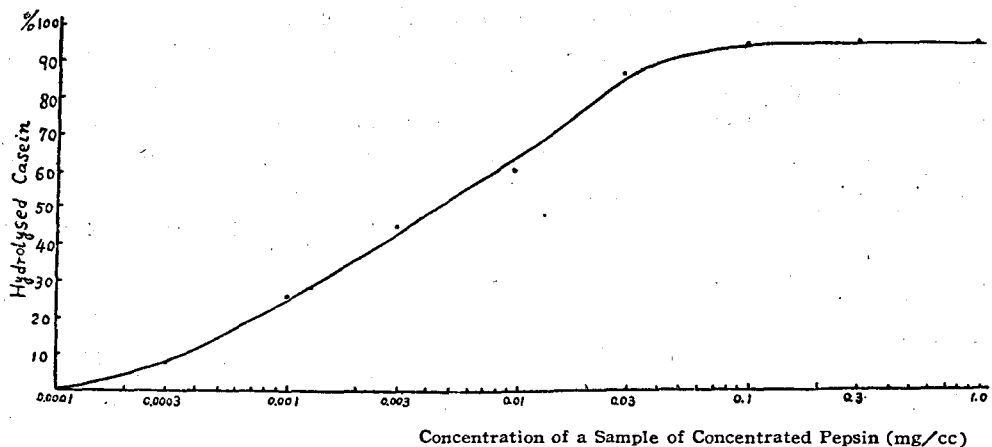


Fig. 7 The Curve of Hydrolysed casein by Various Concentrations of a Sample of concentrated Pepsin.

上図からカゼイン50%分解の時の酵素量は、0.0045mg/ccであり、Fig. 6の標準曲線では0.25mg/ccであるから、この濃ペプシンの力価は $\frac{0.25}{0.0045} = 55.5$ 倍である。この原末を乳糖で55倍に稀釈し局方試験を行つたところ、丁度局方限界の適品であつた。局方効力試験の判定は不明瞭なので、我々は反応の終つた卵白消化液を円錐型液量計にそそぎ、30分間室温に静置した時底に沈んだ消化残渣の容積が1.5cc以下のものを適品としている。

総 括

- (1) 0.15% カゼイン溶液を基質とし、アラビアゴム水溶液を保護膠質にし、三塩化酢酸でその残存カゼインを濁らせ、光電管比色計で比濁するペプシンの迅速簡便な定量法を定めた。
- (2) 本法により含糖ペプシンの至適pH 1.8~2.2, 至適温度 50~60°であつた。
- (3) この方法で効力未知の濃ペプシンの力価を簡単にきめることができた。

この研究は昭和28年度厚生科学研究費によつて行つた。

文 献

- 1) Rona, P. and Kleinmann, H.: Biochem. Z., 140, 461 (1923)
- 2) Rona, P. and Kleinmann, H.: Biochem. Z., 155, 34 (1925).
- 3) Looney, J. M. and Walsh, A. I.: J. Biol. Chem., 127, 117 (1939).
- 4) Looney, J. M. and Walsh, A. I.: J. Biol. Chem., 130, 635 (1939).
- 5) Stadtman, E. R., Novelli, G. D. and Lipmann, F.: J. Biol. Chem., 191, 365 (1951).
- 6) McNair Scott, D. M. and Cohen, S. S.: Biochem. J., 55, 23 (1953).
- 7) Rona, P. and Kleinmann, H.: Biochem. Z., 140, 478 (1923); 150, 444 (1924); 159, 146 (1925).
- 8) Rona, P. and Kleinmann, H.: Biochem. Z., 169, 320 (1926); 177, 89, 107 (1926).
- 9) Folin, O. and Ciocalteu, V.: J. Biol. Chem., 73, 627 (1927).
- 10) Anson, M. L.: J. Gen. Physiol., 22, 79 (1938).
- 11) 標準生化学実験, 文光堂, 1953, p.207
- 12) 山羽 力, 朝比奈正人: 衛試, 70, 71 (1952).

Summary

- (I) The activity of pepsin was determined by the following nephelometric method: 0.15% casein solution is used as the substrate and after incubating with pepsin the reaction mixture is added to the alkaline solution of gummi arabicum which stops the reaction and acts as a protective colloid. Then adding 5% trichloroacetic acid to it, the homogeneous turbidity is produced by the remained casein. It is determined by the photoelectric colorimeter using the 400m μ filter.
- (II) By this method, it was found that the pH optimum of a saccharated pepsin (J. P.) was 1.8 to 2.2 and the temperature optimum was 50 to 60°.
- (III) The activity of a sample of concentrated pepsin was conveniently determined using the standard activity curve of saccharated pepsin (J. P.) which showed approximately a linear relation between the activity and the logarithm of concentration of the enzyme.

Received April 8, 1954.

血清中の蛋白分解酵素の研究 (1)

人プラスミノゲンおよびストレプトキナーゼの定量法

朝比奈正人, 岡 万千子

Studies on Serum Protease (1) Methods for Assay
of the Activity of Human Plasminogen and Streptokinase

By Masato ASAHINA and Machiko OKA

まえがき 血清中の蛋白分解酵素は普通不活性な状態で存在し、これが種々の内的または外的原因によつて活性化されることが知られている。不活性なものは Serum Tryptogen, Profibrinolysin, Plasminogen (プラスミノゲン)等と呼ばれ、活性化されたものは Serum Trypsin (Trypsin), Fibrinolysin, Plasmin (プラスミン)等と呼ばれてきた。こゝでは Christensen¹⁾の提案に従つて、プラスミノゲンおよびプラスミンと呼ぶことにする。プラスミノゲンを活性化する物質は種々知られているが、1933~4年 Tillett, Garner²⁾³⁾等によつて発見され、のち Christensen¹⁾⁴⁾によつて作用機構が明らかにされ、ストレプトキナーゼ (Streptokinase) と命名されたものは最もよく知られている。これは溶血性連鎖球菌の培養液中から分離されたもので、基礎的研究に利用されるほか、米国 Lederle 研究所製“Varidase”の主要成分の一つとして臨床的にも応用されている。

多くの場合、人プラスミノゲンはストレプトキナーゼによりプラスミンに変えられてその作用が測定されている。プラスミンの作用測定に一番よく用いられる基質は人または牛のフィブリンである。一定の条件で作られたフィブリンクロット^{5)~9)}またはフィブリンプレイト¹⁰⁾等の溶解速度を測定するわけである。つぎによく用いられる基質はカゼインで、低濃度のカゼインを用い残存するカゼインを比濁法で測定する法¹¹⁾や、高濃度のカゼインを用いトリクロル酢酸または過塩素酸可溶のチロジン (およびトリプトファン) を種々の方法で測定する法¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾が用いられている。

こゝでは上記の諸方法を参考にして、若干の変更を加え、カゼインを基質としトリクロル酢酸可溶のチロジンを Folin のフェノール試薬で測定する人プラスミノゲン定量の一方法を定めた。またストレプトキナーゼの定量法としては従来主として人プラスミノゲンを含むフィブリンクロットの溶解速度をみる方法⁵⁾がとられているようであるが、こゝではカゼインおよび乾燥血漿を使用し、わが国でも簡単にいうような一新定量法を検討した。

実験方法

(1) 緩衝液 0.9%の塩化ナトリウムを含む M/15 磷酸緩衝液 (pH7.4) を用いた。酵素、カゼイン、ストレプトキナーゼ等の溶解稀釈にはすべてこの緩衝液を用いた。

(2) 人グロブリン (HG) 日局健康人血漿 (乾燥) を 1g 当り約 200cc の蒸留水に溶解、1%酢酸を滴加して pH 約 5.3 として遠心分離、沈澱を適当量 (5~10cc) の緩衝液に溶解した。プラスミノゲンはほとんど全部このオイグロブリンの部分にくることがわかつている。またここではすべて血漿からグロブリンをとつているので、この中には多量のフィブリンゲンが混入している。

(3) カゼイン溶液 カゼインは Merck 製ヘンマーステンのカゼインを用いた。カゼインをちょうど中和し最後の pH が 7.4 となるだけの水酸化ナトリウムを含む前記緩衝液にカゼインを溶解し 6% 溶液とした、溶解後必要ならば少量の塩酸または水酸化ナトリウム液で pH を調整する。

(4) ストレプトキナーゼ (SK) バリダーゼを使用した。

(5) 反応条件 すべての反応はカゼインと HG を混合し 37° にしたのち、最後に SK を加え反応を開始した。プラスミノゲンの作用測定の場合はあらかじめ充分過量の SK 量を調べておいてそれを使用した。普通反応液 6cc について使用したバリダーゼ 100~200 μ g で充分であつた。カゼイン濃度は反応液中 4% となるようにした。HG をあらかじめ SK と一定時間放置して活性化しつぎにカゼインを加えて反応を始めると、作用が著るしく落ちることを予備実験で認めた。活性化されたプラスミンはカゼインのない所で著るしく不安定で、急速に減少してゆくものであることはあとで確かめられた¹⁵⁾。反応温度は常に 37°。反応は SK により HG 中のプラスミノゲ

ンがプラスミンに変じ、これがカゼインを分解してトリクロル酢酸可溶のチロジンが増加してゆく過程を含んでいる。また予備実験で、HG 中には活性なプラスミンは存在しないこと、カゼインはこの条件で自然分解しないしまた SK のみでは分解されないこと、HG と SK の混合により混入しているフィブリノゲンの分解のために生ずるチロジン量は極めて少量であることを確めてある。

(6) トリクロル酢酸 (TCA) 可溶チロジンの定量 一定時間後一定量の反応液を等量の 0.5MTCA と混じ、暫時放置後濾過、濾液 1cc に 0.5M 炭酸ナトリウム液 5cc および Folin のフェノール試薬¹⁶⁾¹⁷⁾ の 3 倍稀釈液 1cc を加え急速に混合したのち、37° で 20 分放置後 S66 のフィルタを用いて光電比色計 (コタキ製) で吸光度の読みをとる。別に反応の初期に同様処理を施して、これを読み値のブランクとし上記の読みから差し引く。チロジン量はこの読み値 (E) で表わしたこともあり、またあらかじめチロジンを用いて作った標準曲線からチロジンの μg に換算して表わした場合もある。プラスミノゲンまたは SK の活性は、すべて一定条件下において生成するこのチロジン量で表わした。

実験結果

人プラスミンの反応曲線に対するカゼイン濃度の影響 Fig.1 において HG 量は I III では等量、II はその半量

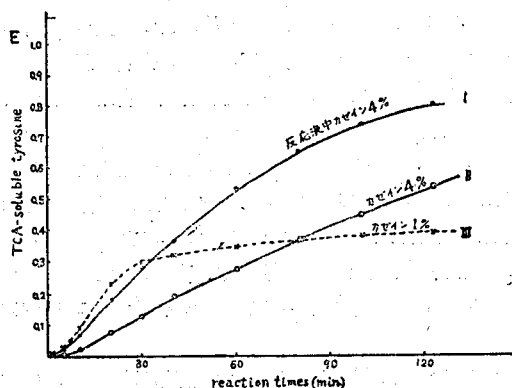


Fig. 1 The Influence of Casein Concentration on the Reaction Curve of Human Plasmin

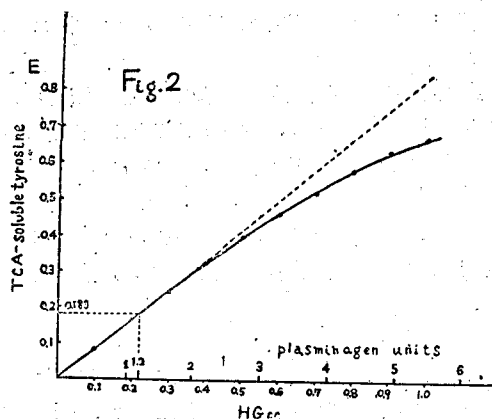


Fig. 2 The Standard Curve for Assay of the Activity of Human Plasminogen

を用い、SK 量は過量を用いた。カゼイン 1% の場合は 4% の場合に比し反応の初速度は若干大きい、カゼインがまだ充分に残っているにかかわらず少量の TCA 可溶チロジンの生成後反応はほとんど止つてしまう。この方法で普通の蛋白分解酵素 (トリプシン等) の作用を測定する場合には反応液中のカゼイン濃度は 1% で充分であるが、プラスミンの場合は少くも 4% 程度の高濃度にする必要がある。この結果は Remmert, Cohen¹⁴⁾ の実験結果とよく一致している。

人プラスミノゲンの定量法 Fig.1 からわかるように、反応液中 4% のカゼインを使用すれば、TCA 可溶チロジンは比較的多量の範囲までプラスミノゲン量に応じてほぼ直線的に増加してゆく。ただ反応の初め SK によるプラスミノゲンの活性化に若干の時間 (数分) を要することが認められる。そこで人プラスミノゲンの定量を行う場合つぎのようにすることにした。

HG (プラスミノゲン) 1cc にカゼイン (6%) 4cc を加え 37° とし、最後に過量の SK 液 1cc を加え計 6cc として反応を開始する。反応温度は 37°、5 分および 65 分で 2cc ずつ反応液をとり、この間に生成した TCA 可溶のチロジン量の読みをとる。乾燥血漿約 2g 中のオイグロブリンを緩衝液 10cc に溶かした液を原液とし、その種々量を取り上の方法で実験した結果を Fig.2 に示す。

人プラスミノゲン単位 (P.U.) として、反応液 6cc 中チロジン $1\mu\text{M}$ を生ぜしめる量を 1 単位と定めることにする。反応液 6cc 中 $1.2\mu\text{M}$ のチロジンを生じているとき、この方法で読みは 0.183 となるので、このことからプラスミノゲン単位の尺度を求め Fig.2 に記入してある。(文献 17 参照) Fig.2 を標準曲線とし、比色の際の読みから直ちに反応液 6cc 中のプラスミノゲン単位を求めることができる。

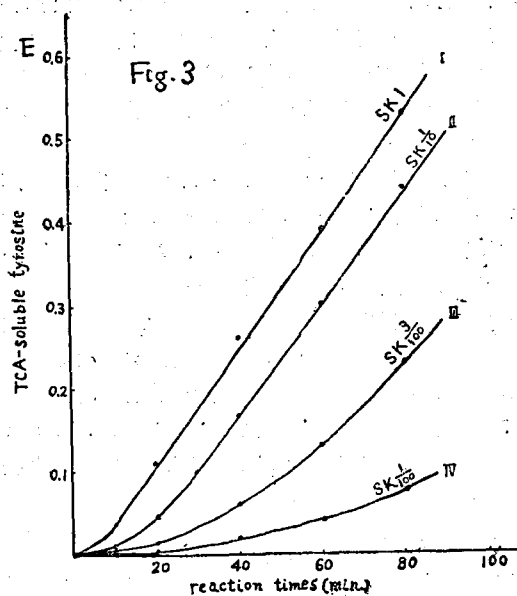


Fig. 3 The Influence of SK Amounts on Reaction Curves

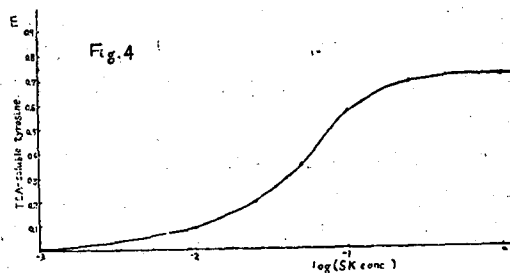
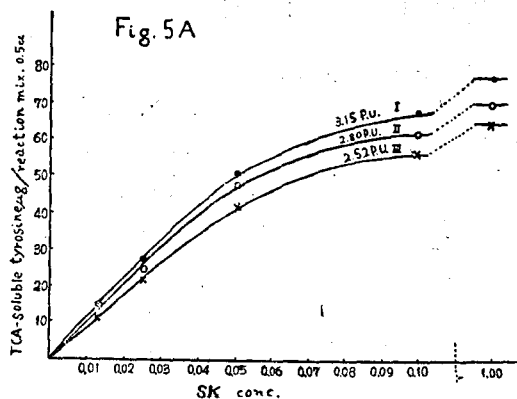


Fig. 4 TCA-soluble Tyrosine Produced during 60min., Using a Constant Amount of Plasminogen and Various Concentrations of SK



一定量のプラスミノゲンを用い、SK の濃度を減少してゆく場合 Fig. 3 に示すように、一定量のプラスミノゲンを用い SK 量を減少してゆくと、プラスミノゲンの活性化がしだいに遅くなり、時間に対するチロジン量の読みが直線的になるまでに相当の時間を要するようになる。曲線が直線的となり完全な活性化が起つたと思われる時でも、この直線の傾斜は一般に充分な SK を加えたときの傾斜に比較してゆるやかであることを別の実験で認めた。

一定時間後生成する TCA 可溶チロジン量が SK 量に応じて変化することを用いれば、SK の定量を行う可能性がある。そこでバリダーゼ約 2 mg を緩衝液 10cc に溶かしたものを原液とし、これを順次稀釈したもの 0.5cc を、HG 0.5cc (2.85P. U.) およびカゼイン 2 cc に加え、60 分後生成した TCA 可溶チロジンを測定した結果は Fig. 4 の通りである。SK のある範囲で生ずるチロジン量に急激な変化のあることがわかる。

ストレプトキナーゼ定量の際のプラスミノゲン量の変化の影響 少量の一定 SK 量を用いてもプラスミノゲン量が変わるときは生成する TCA 可溶チロジン量はどのように変動してくるかを時間的に調べたところ、反応の初期からすでに著しい影響をおよぼすものであることがわかった。すなわちプラスミノゲンの活性化の速度は、SK 量のみならずまたプラスミノゲン量 (人グロブリン量) にも関係するものであることがわかる。そこで SK 定量に当つてはプラスミノゲン量を一定にする必要がある。しかし、プラスミノゲンは溶液中でも甚だ安定なものでありある程度保存することができるとはいえ、使用するプラスミノゲン量を厳密に一定にすることはわずらわしいことである。

一体少しのプラスミノゲン量の変化がどの程度影響

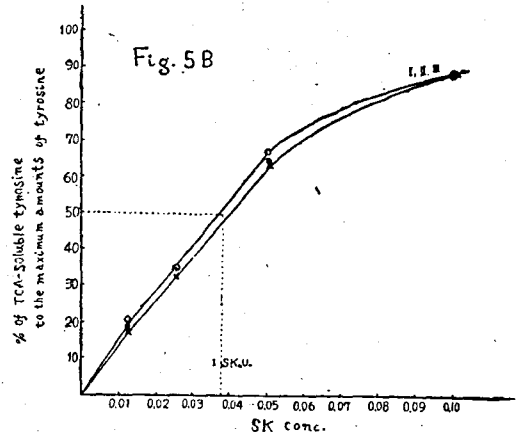


Fig. 5 The Influence of Small Changes of Plasminogen Amounts on the Activity Curve of SK

するものであろうか。Fig. 5A はそれを示している。2.52~3.15 P. U. の相違でも生成するチロジン量にはかなりの差が認められる。しかし Fig. 5B に示すように、過量の SK を用いた場合の最大チロジン量に対する%に換算してみると、この三つの曲線はわりあい重なつてきて、50 %の所で SK 量の誤差は多くても±5 %以内にとどめることができる。このことから SK の活性を示すのに上記のチロジン%をもつてすれば、使用するプラスミノゲン量は大体同じであればよいということになる。

ストレプトキナーゼの定量法 この際用いるプラスミノゲン量は、反応液3cc 当り2.8~3.2単位ぐらいが適当である。乾燥血漿は1g 当り23~28単位ぐらいのプラスミノゲンを含んでいるから、1.0~1.2g の乾燥血漿中のオィグロブリンを緩衝液5cc に溶かした割合の HG 液を作り、これを0.5cc ずつ用いる。少くも2年ぐらい保存した乾燥血漿でも使用できる。これにカゼイン液2.0cc を加え、試験すべき SK 液0.5cc を加え反応を初める。この際 SK 液を適当な稀釈法で種々稀釈したものについて一連の実験を行う。37° 60分後 TCA 3cc を加え、以下常法によりチロジン μg を測定する。ほかに TCA を加えてから SK を加え、0分のプランクを求める。また過量の SK を用いたものを行い、念のため別にプラスミノゲン単位を測定しておく。今上の条件で、過量の SK を用いた場合に対する TCA 可溶チロジンの%を求め、50 %の点をあたえる SK 量を1単位 (1SK. U.) と定めることにする。その点はグラフの上から直ちに求めることができる。Christensen法⁵⁾ による単位との比較は、試験材料の入手が困難なため行うことができなかった。

血清中にはいろいろな阻害物質が存在していることが知られているから、それらがこの定量にどの程度影響をおよぼしてくるのかについてわれわれはまだ充分な実験をしていないので、SK の絶対量の定量がどの程度の誤差をとまうのかについては確言しえない。

つぎに2.52~3.15 P. U. を用いた上のような幾組かの実験の結果の曲線を、チロジン50 %の点すなわち1SK.

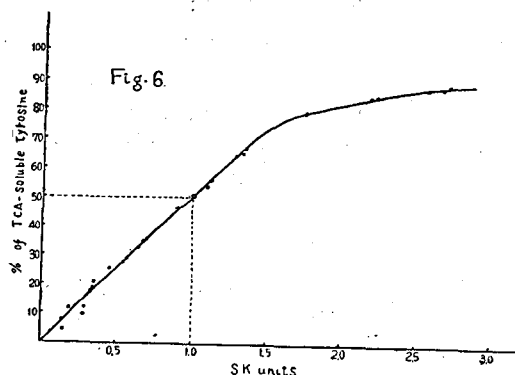


Fig. 6 The Standard Curve for Comparing SK Amounts

U. の点で合わせ、SK 単位とチロジン%との関係を示す標準曲線を作つてみると Fig. 6 のようになる。

少くも、同じ乾燥血漿で同時に測定を行えば、この標準曲線を使用してかなり正確に相対的な SK 量を比較することができる。

ストレプトキナーゼの熱安定性 上の SK 定量法の一つの応用例として、SK の熱安定性を調べた。SK を緩衝液に溶かした液 (2.1SK. U./cc) 2cc ずつを入れた試験管を、それぞれ一定温度の水の中におおの30分間漬け、熱処理しない対照と共に3.05 P. U. を用い SK 単位を測定し、不活性化された SK の%を計算した。SK 液は熱処理以外のときは約15°C の水中に漬けておいた。結果は Table I の通りである。

Table 1. The Heat Stability of Streptokinase at pH 7.4

No	Heat treatment	Tyrosine		SK	
		μg	%	Units	Inactivated %
1	—	38.0	52.3	1.05	—
2	40° 30min.	35.0	48.3	0.97	8
3	60° "	25.0	34.5	0.69	34
4	80° "	15.0	20.7	0.40	62
5	100° "	0.5	0.7	0	100
6※	—	72.5	100	—	—

* excess SK

総 括

- 1 カゼインを基質とする人プラスミノゲンの一定量法を定めた。
- 2 乾燥健康人血漿とカゼインを用いたストレプトキナーゼの一新定量法について検討し、少くも相対的なストレプトキナーゼ量の比較には満足な結果を得た。

この研究は昭和28年度厚生科学研究費によつて行つた。

文 献

- 1) Christensen, L.R. and Macleod, C.M. : J. Gen. Physiol., 28, 559 (1945); C.A., 40, 6519 (1946)
- 2) Tillett, W.S. and Garner, R.L. : J. Exp. Med., 58, 485 (1933). 3) Garner, R.L. and Tillett, W.S. : J. Exp. Med., 60, 239, 255 (1934). 4) Christensen, L.R. : J. Gen. Physiol., 28, 363 (1945); C.A., 39, 2299 (1945). 5) Christensen, L.R. : J. Clin. Invest., 28, 163 (1949). 6) Rocha e Silva, M. and Rimington, C. : Biochem. J., 43, 163 (1948). 7) Kaplan, M.H. : J. Clin. Invest., 25, 337 (1946); C.A. 40, 7255 (1946). 8) Lewis, J.H. and Ferguson, J.H. : J. Clin. Invest., 29, 486 (1950)
- 9) Guest, M.M., Ware, A.G. and Seegers, W.H. : Am. J. Physiol., 150, 661 (1947). 10) Astrup, T. and Mullertz, S. : Arch. Biochem. Biophys., 40, 346 (1952). 11) Ratnoff, O.D. : J. Exp. Med., 87, 199 (1948). 12) Downie, G.R. and Clifton, E.E. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 138 (1949)
- 13) Mullertz, S. and Lassen, M. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82, 264 (1953). 14) Remmert, L.F. and Cohen, P.P. : J. Biol. Chem., 181, 431 (1949). 15) 朝比奈, 岡: 衛試, 72, 117 (1954). 16) Folin, O. and Ciocalteu, V. : J. Biol. Chem., 73, 627 (1927). 17) 江上等: 標準生化学実験, 文光堂 208 (1953)

Summary

1. A method for assay of human plasminogen was described, in which casein was used as a substrate, reaction was initiated by addition of excess streptokinase and the amount of TCA-soluble tyrosine produced during one hour incubation (from 5 to 65 minutes) at 37° was colorimetrically estimated by using of the Folin's phenol reagent.
2. We studied on a new method for assay of Streptokinase activity, in which euglobulin fraction from dried normal human plasma was used as a plasminogen preparation and casein as a substrate. Satisfactory results were obtained, at least, in estimating relative amounts of streptokinase.

Received April 20, 1954

血清中の蛋白分解酵素の研究 (2)

人血清グロブリン及びストレプトキナーゼによる牛プラスミノゲンの活性化

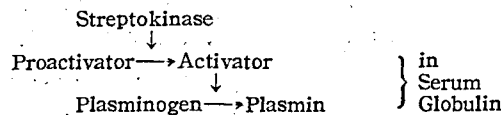
朝比奈正人, 岡 万千子

Studies on Serum Protease (2) Activation of Bovine Plasminogen
by Human Serum Globulin and Streptokinase

By Masato ASAHINA and MACHIKO OKA

まえがき Tillett, Garner¹⁾²⁾等が始めて溶連球菌の培養液中に人フィブリンを急速に溶解する物質の存在を発見したころは、この物質は直接フィブリンを溶解する酵素であると考えられ、“Streptococcal Fibrinolysin”と呼

ばれた、その後 Milstone³⁾ によつてこの作用には人血清のオィグロブリン中にある “lytic factor” の存在が必要であることが知られた、更に Christensen⁴⁾⁵⁾ は Streptococcal Fibrinolysin の作用機構を明らかにし、これが lytic factor すなわち血清中の不活性な蛋白分解酵素を活性化し、これによつてフィブリンが分解されるのであるとし、Streptococcal Fibrinolysin を “Streptokinase” と呼ぶことを提案した。最近 Mullertz⁶⁾ はフィブリン溶解の作用のある血液からの血清グロブリン中に、人や牛のプラスミノゲンを活性化する物質の存在を認め、これは種々の生理的、病的状態、またはある種の死後にあらわれるプラスミノゲンの自然活性化に関係のあることを暗示している。更に Mullertz, Lassen⁷⁾ はストレプトキナーゼと不活性な人血清グロブリンによつて、牛プラスミノゲンが完全に活性化されることを、主としてかれらのフィブリンプレート法を用いて見出し、ストレプトキナーゼの作用機構を次のように考えた。



ストレプトキナーゼが人プラスミノゲンに最も著しく作用し、他の動物のプラスミノゲンには作用し難いという事実は昔から認められていたことであるが、かれらは、人血清中には過量のプロアクチベータが存在し、牛では少いから、牛プラスミノゲンはストレプトキナーゼのみでは不完全にしか活性化されないが、ストレプトキナーゼと人血清グロブリンによつて完全に活性化されるのであると説明している。Astrup, Sterndorff⁸⁾ は更に人乳中にもストレプトキナーゼで活性化されるプロアクチベータの存在を認めている。

我々は我々の方法を用いて Mullertz, Lassen 等の結果を追試し、これに関連した二三の実験を試みた。

実験方法

- (1) 緩衝液、カゼイン (6%) 溶液、ストレプトキナーゼ (SK) 第1報⁹⁾ と同じ。
- (2) 人グロブリン (HG) 一般に第1報と同じである。ただし乾燥血漿を少量の水に溶解し1%酢酸で pH 約 7.5 とし、スロンビン溶液を加えてフィブリンを除いたのち、オィグロブリンをとつた場合もある。この場合プラスミノゲンは若干減少する。
- (3) 牛グロブリン (BG) 屠殺場で放血された牛血を直ちに1/10容の4%クエン酸ナトリウムと混じ実験室に持ち帰り、遠心分離、得られた血漿を氷室に保存する。この血漿を蒸留水で20倍にうすめ、1%酢酸で pH 約 5.3 とし、遠心分離、沈澱を普通もとの血漿の1/8~1/4量の緩衝液に溶解し保存する。保存中フィブリン様物質が生成するがこれは除去する。
- (4) 家兎グロブリン (RG) 家兎から心臓穿刺法により1/10容の4%クエン酸ナトリウムを含む注射器で血液を採取、以下 BG の場合と同様処理し、グロブリンをもとの血漿の1/2量の緩衝液に溶解した。
- (5) スロンビン溶液 Seegers 等¹⁰⁾ の方法に準じて牛血漿より製したプロスロンビンを、家兎脳からとつたスロンボプラスチン製剤¹¹⁾ と塩化カルシウムでスロンビンに変え、透析し、スロンビン溶液とした。効力は定量的には調べなかつた。
- (6) 反応条件及びトリクロル酢酸 (TCA) 可溶チロジンの定量 第1報と同様である。たゞ多くの場合 HG (0.5cc または 1.0cc) と BG または RG (1.0cc または 0.5cc) およびカゼイン液 (4.0cc) の混合液に過量の SK (0.5cc) を加え計 6.0cc とし、反応を始めた。反応は 37° で行い、1分と 61分で反応液 2.0cc をとり、この間に生成した TCA 可溶チロジン量 (吸光密度の読み E で示す) を測定した。この場合チロジンは HG と BG または RG 中の活性化された両プラスミンの作用によつて生ずる。

実験結果

牛または家兎プラスミノゲンの SK による活性化に対する HG の必要性 Table 1 の結果から、牛または家兎プラスミノゲンは SK のみでは活性化されないが、HG の添加によつて活性化されることが明らかである。Mullertz 等⁷⁾ によれば牛プラスミノゲンも SK のみにより一部活性化されるような結果を得ているが、我々の方法では、牛の場合も家兎の場合も SK のみではほとんど全く活性化されなかつた。

Table 1. A) Components Necessary to Activate Bovine Plasminogen

Components	Readings of TCA-soluble tyrosine produced in 1 hr
BG+HG+casein+SK	0.697
HG+casein+SK	0.185
BG+casein+SK	0
BG+HG+casein	0
BG+HG+SK	0.034※

※ Probably fibrinogen in BG and HG was hydrolysed.

B) Components Necessary to Activate Rabbit Plasminogen

Components	Readings of TCA-soluble tyrosine produced in 1 hr
RG+HG+casein+SK	0.650
HG+casein+SK	0.250
RG+casein+SK	0.001
RG+HG+casein	0.009

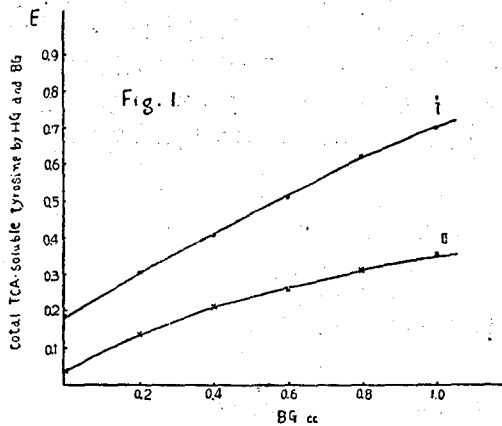


Fig. 1 TCA-soluble Tyrosine Produced by Increasing Amounts of BG and a Constant Amount of HG

一定量の HG を用い BG の濃度を変えた場合 Fig. 1 において I はこの BG 量の範囲で HG 量はほぼ充分であるため、チロジン生成は BG 量にほぼ比例して直線的となるが、II においては I の約 1/4 量の HG を使用したので、BG を十分に活性化し得ず、BG 量が大になるにつれて I との平行関係からずれてくるものと思われる。

一定量の BG を用い HG の濃度を変えた場合 Fig. 2 において BG 量は、II の場合 I の約半量を使用した。

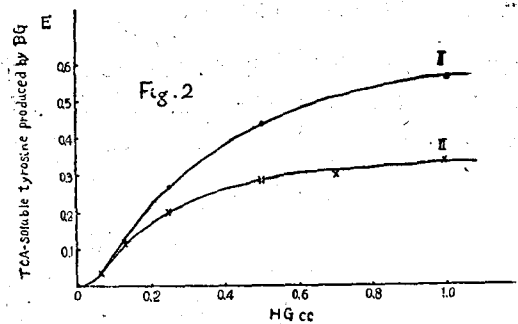


Fig. 2 TCA-Soluble Tyrosine Produced by a Constant Amount of BG and Increasing Amounts of HG

また生成した全チロジンの読みから HG のみによる読みを差し引いた。HG のみによる読みとしては、HG 1.0cc を用いたものについてだけ行い (I 0.212, II 0.213), HG 1.0cc 以下の場合の読みは、HG 量に比例するとして計算した。BG 量に対し充分な HG 量を用いると、牛プラスミノゲンはほとんど完全に活性化されるようで、チロジン量はほぼ最大値に達するが、ある範囲で HG 量と生成チロジン量の間に著しい相関関係があることがわかる。この条件を利用すれば HG 中の牛プラスミノゲンを活性化しうる因子 (Mullertz 等によればプロアクチベータあるいはアクチベータ) の活性を大體比較することができる。

人プラスミンと HG 中のいわゆるアクチベータの安定性 まえがきに記した SK の作用機構に対する Mullertz, Lassen 等の仮定の上に立つて、SK で活性化された人プラスミンとアクチベータの 37° における安定性を比較した。あらかじめ HG8.0cc と SK8.0cc (過量) を混合してプラスミンとアクチベータを生ぜしめ、ある時間 37° に放置してからこの液の一定量 (I では 2.0cc, II では 0.5cc) をとつて、I ではカゼイン 4.0cc 中に混じ、II では BG 1.0cc, 緩衝液 0.5cc およびカゼイン 4.0cc 中に混じ、1 時間に生成する TCA 可溶チロジン量を測定した。また II では I の読みの 1/4 を差し引くことにより BG のみによる読みを計算した。結果は Fig. 3 の通りである。生成チロジン量が人プラスミンまたはアクチベータの活性を大

体示しうるような条件で実験を行った。

この結果から 37° において人プラスミンもアクチベータも極めて不安定で直ちに不活性化されてゆくこと、そして両者の安定性はよく類似していることがわかる。ただしこの場合、アクチベータと活性なプラスミンとが共存している条件でこの実験を行つていることは注意しておく必要がある。

人プラスミノゲンと HG 中のいわゆるプロアクチベータの熱安定性 スロンビンであらかじめフィブリンを除去した血漿から HG をとり、その 1cc ずつを 50°, 56°, 60°, 70° の水中で 30 分間加熱し、人プラスミノゲンとプロアクチベータの安定性を調べた。すなわち a) では HG 1cc にカゼイン 4.0cc, SK 1.0cc を加え、b) では HG 1cc に BG 0.5cc カゼイン 4.0cc, SK 0.5cc を加え 1 時間に生成する

Fig. 3 The Stability of Human Plasmin and "Activator" in Human Globulin at 37°

TCA 可溶チロジン量を測定した。b) の HG は a) の 1/16 量を使用した。a) においては人プラスミノゲンの活性を、b) においてはプロアクチベータの活性を生成チロジン量で大體比較しうる条件で実験した。結果は Table 2 の通りである。

Table 2. The Heat Stability of Human Plasminogen and "Proactivator"

No.	Heat treatment	Readings of TCA-soluble tyrosine produced in 1 hr.	
		a) Activity of human plasminogen	b) Activity of proactivator
1	—	0.408	0.411※
2	50° 30min	0.407	0.291
3	56° "	0.326	0.211
4	60° "	0.111	0.186
5	70° "	0	0.071

※ The reading by only HG was 0.013.

この実験で, 人プラスミノゲンは 50° , 30 分ではまだ不活性化されないが, 60° までの間に急激に活性が落ち, 70° , 30 分では全く破壊される。それに対しプロアクチベータは 50° , 30 分でも若干こわれ, 温度が高くなるにつれ次第にこわれる量が多くなるが, 70° , 30 分でもまだ若干残っているような結果をえた。

総 括

1. 牛または家兎プラスミノゲンはストレプトキナーゼのみでは活性化されないが, ストレプトキナーゼと人血清グロブリンによつて活性化される。
2. カゼイン, 牛血清グロブリン, 人血清グロブリン及びストレプトキナーゼの混合系において, 1 時間後に生成されるトリクロル酢酸可溶のチロジン量と牛グロブリンまたは人グロブリンの濃度との関係を調べた。
3. ストレプトキナーゼによつて活性化された人グロブリン中のプラスミンといわゆるアクチベータの安定性はよく類似しており, 共に 37° で直ちに不活性化されてゆく。
4. 人グロブリン中のプラスミノゲンといわゆるプロアクチベータの熱安定性を比較したところ大体似ているが, 若干の相違がみられた。

この研究は昭和 28 年度厚生科学研究費によつて行つた。

文 献

- 1) Tillett, W.S. and Garner, R.L.: J. Exp. Med., 58, 485 (1933).
- 2) Garner, R.L. and Tillett, W.S.: J. Exp. Med., 60, 239, 255 (1934).
- 3) Milstone, H.: J. Immunol., 42, 109 (1941).
- 4) Christensen, L.R.: J. Bact., 47, 471 (1944).
- 5) Christensen, L.R.: J. Gen. Physiol., 28, 363, 559 (1945).
- 6) Mullertz, S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82, 291 (1953).
- 7) Mullertz, S. and Lassen, M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82, 264 (1953).
- 8) Astrup, T. and Sterndorff, I.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84, 605 (1953).
- 9) 朝比奈, 岡: 衛試, 72, 113 (1954).
- 10) Seegers, W.H., Loomis, E.C. and Vandenbelt, J.M.: Arch. Biochem., 6, 85 (1945).
- 11) Sumner, J.B. and Myrbäck, K.: The Enzymes, Vol. 1, Part 2, 1951, p1125

Summary

1. Bovine or rabbit plasminogen is not activated by only streptokinase, but activated by streptokinase and human serum globulin.
2. In the mixture of casein, bovine serum globulin, human serum globulin and streptokinase, the relation between the amounts of TCA-soluble tyrosine produced in 1 hour and the concentrations of bovine globulin or Human globulin was examined.
3. Human plamin and "activator" in human globulin activated by streptokinase are similar in the stability, and both are readily inactivated at 37° .
4. There may be a little difference between the heat stability of human plasminogen and that of "proactivator" in human serum globulin.

Received April 20, 1954

化粧品の規格検査法について (第1報)

化粧品中の鉛並びに砒素の試験法

市川重春, 小幡利勝, 汐見信

Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (1)

On the Assay of Lead and Arsenic in Cosmetics.

By Shigeharu ICHIKAWA, Toshikatsu OBATA and Shin SHIOMI

まえがき 薬事法にいう不良化粧品の項目中、有毒または有害な物質に該当するものに鉛及び砒素がある。我々は市販化粧品についてその処方^{*}から当然混入するそれらの量^{**}を算出し、その最大量を許容限度と考えた (第1表参照) 更にそれらの試験法を次に報告する。

第1表 推定による市販化粧品中鉛及び砒素の含量統計

成分 化粧品名 ↓	鉛			砒		
	最 小	最 多	最大 (推定限界量)	最 小	最 多	最大 (推定限界量)
粉 白 粉	5~10 2.8	21~25 54.2	35 2.8(1/35)	1~1.5 20	1.6~2.0 60	~3.0 11.4(4/35)
固 型 白 粉	5~10 16.6	16~20 33.3	35 4.11(1/24)	0.5~1.0 16.6	1.6~2.0 41.6	~2.5 4.11(1/24)
水 白 粉	2.1~3.0 4.5	6.1~8.0 54.4	11~13 13.6(3/22)	0.1~0.2 4.5	0.5~0.6 27.2	0.8~0.9 18.1(4/22)
口 紅	0~0.9 30.7	6~10 26.9	30 3.8(1/26)	0 32	0.1~0.5 52	~1.5 4(1/26)
頬 紅	0~1.0 13.5	6~10 31.8	25 9(2/22)	0~0.5 13.5	1.1~1.5 31.8	~2.5 45(1/22)
コールドクリーム	0 3.8	26~30 44.2	~40 5.7(3/52)	0 13.8	1.1~1.5 55.7	~2.0 3.8(2/52)
パニシングクリーム	0 19.1	0~0.5 52.9	1.5 1.4(1/68)	0 2.9	0.1~0.5 51.4	~2.0 1.4(1/68)
乳 液	0 20	0~0.5 51.4	6~7 5.7(2/35)	0 25.7	0~0.1 40	~2.0 5.7(2/35)
ローション	0 27.5	0~0.5 55	1.5 5(2/40)	0 7.5	0~0.1 40	~0.8 2.5(1/40)
化粧水	0 72.7	0~0.5 15.9	1.5 2.2(1/44)	0 0	~0.3 11.3	~1.0 6.8(3/44)
髯剃クリーム			0.33 100			~0.13 100

* 昭和25年12月登録更新の際全国化粧品製造業者から厚生省に申請した処方による。

** 処方にある原料は化粧品原料基準の適量とした数字である。

成分→ 化粧品名↓	鉛			砒素		
	最 小	最 多	最大 (推定限界量)	最 小	最 多	最大 (推定限界量)
粉 歯 磨	14.9 12	19~20 75	20 12(¹ / ₈)	1.49 10	1.9~2.0 80	2.0 10(¹ / ₁₀)
半 練 歯 磨	14 20	15~16 60	17.4 20(¹ / ₅)	1.41 12	1.6~1.8 75	1.9 12(¹ / ₈)
練 歯 磨	9.6 20	9~10 40	12 20(¹ / ₅)	0.96 20	1.4~1.5 60	1.8 20(¹ / ₅)
植物性ボマード	0 95	3.5~11.5 2.8	15 1.8(² / ₁₀₇)	0 98	0.18 1	0.46 1(¹ / ₁₀₇)
鉱物性ボマード	4.5 5.2	35~50 53	50 10(² / ₁₉)	0.14 10	0.6~2.0 69	20 10(² / ₁₉)
ブリアンチン	0 37	5~40 37	50 25.9(⁷ / ₂₇)	0 37	0 37	~2.0 25.9(⁷ / ₂₇)
香 油 類	0 14.4	40~50 61	50 61(⁷² / ₁₁₈)	0 14.4	1.6~2.0 63.5	~2.0 63.5(⁷⁵ / ₁₁₈)
打 粉 類	12.4 20	20~25 80	25 20(¹ / ₅)	1.6 20	1.8~2.0 80	~2.0 20(¹ / ₅)

備考：各化粧品欄の上段数字は含量のppm，下段中括弧内分数は，（該当製造業者/全製造業者）を示し，その数字はその%を示す。

1 鉛の定量試験

1 協定法 化粧品中の鉛の許容含量試験について昭和24年厚生省^{*}では通牒を發した。（以下これを協定法^{**}と呼ぶ）

種々の検体について協定法を行い，最後の検液をネスラー管にとり，クロム酸カリウム液及び硫化ナトリウム液により生ずる沈澱を標準鉛溶液の同試液による沈澱と比較する方法によつて，協定法を定量試験とすることの可否を検討した。

（i）鉛の試験法の鋭敏度¹ 著者等はまず協定法に使用している硫化鉛法，クロム酸鉛法，ならびに硫酸鉛法の鋭敏度を検討し次の成績を得た。

硫化鉛法： Pb 0.4ppmで+

クロム酸鉛法： 反応直後：Pb 20ppmで-，25ppmで+

反応2分間後： 5ppmで-，10ppmで±，15ppmで+

硫酸鉛法： 反応直後： Pb 35ppmで-，40ppmで±，45ppmで+

反応2分間後： Pb 25ppmで-，30ppmで±，35ppmで+

硫酸鉛の水及び硫酸溶液に対する溶解度については石尾等¹⁾の報告があるから参照されたい。

（ii）協定法の追試による批判 荻田・末永両氏²⁾は協定法に使用する同試薬による反応の鋭敏度を検討し，更に鉛の減失が成分中のタルクの吸着，混入する亜鉛による鉛の反応妨害，沈澱操作による損失，判定の個人差に基いておけると報告している。

著者等が協定法により種々の市販白粉類について追試して得た結論を要約すると次のようになる。

（1）個人の判定差：協定法によつて市販化粧品の鉛を定性試験の結果陰性であるものに一定量の標準鉛液を添加したものを検体として講習生及び実習生に定性試験を行わせた結果は1/30000を検出できた者33%，1/10000を検出できた者50%，1/5000では検出できた者100%であつた。

* 昭和24年10月24日，藥発第1784号

** 昭和24年7月6日薬学大会衛生技術者会議で化粧品中の鉛の検査法が日本薬剤師協会の協定法として可決された。

(2) 検液調製時における鉛の損失：タルクやカオリンを含む製品は硫酸処理のみでは不十分で、検体を弗化水素及び濃硫酸で白金皿中に加熱し珪酸塩を溶解するのがよい。

(3) 鉛の分離析出時における損失：硫酸鉛の沈澱を析出させる際、硝酸が存在すると硫酸鉛の溶解度を増大するから硝酸を完全に駆除するためシュウ酸アンモニウム飽和溶液を加えて再び加熱し SO_3 の白煙を生ずるのを確認してから 90V/v% アルコールを加えて一時間放置するのがよい。50% アルコールを加えて2時間放置する方法では硫酸鉛の沈澱析出は不十分である。

(4) 鉛の抽出処理時における損失：硫酸鉛の沈澱を溶かす熱酢酸酸性酢酸ナトリウム液の量は協定法に記す10ccでは不十分で、15ccを使用し沈澱を濾紙と共に磁皿にとり煮沸しながらガラス棒でよくつき砕いて抽出するとよい。殊にCaを多量に含有する製品では、 CaSO_4 も共に沈澱するから20cc以上必要である。

(5) 亜鉛の妨害作用：亜鉛華を原料とする粉白粉などでは硫化ナトリウム液の添加により白濁を生じ判定が困難となる。

協定法を定量法に準用する場合には上述のように種々の改変を必要とする。著者等は次に代表的な主原料の鉛試験法による検液の調製法を掲げ、化粧品品の組成に従つて調製法を取捨選択することを提案する。

(i) 溶液調製に対する化粧品品の前処理について：溶液調製に際し検体中の鉛を全部溶かすか、又は酸で抽出できる鉛だけを溶かすかの問題がある。熱硝酸で抽出できないような鉛は人体の皮膚に影響を与えないだろうという仮定からいえば、後者の酸抽出法で差支えない。しかし、Schultz 及び Goldberg³⁾ は酸で抽出できる鉛と総鉛との比較試験した結果、一般的には酸で抽出できる鉛のみを定量し、特殊な検体や精密な試験では総鉛を溶かす処理を推奨している。化粧品品の原料の種類に従つて処理法を適宜に選定することが望ましいが、原則として次に述べる化粧品原料中の鉛の試験法に準拠する。酸に不溶性の原料を含むものは総鉛を溶解する調製法（*印）も必要であるから併記する。

化粧品原料の検液調製法：

(1) 検体を水に溶かし検液とするもの：ホウ酸 (0.5:20)、トリエタノールアミン (5:15)

(2) 検体を塩酸に溶かし検液とするもの：ホウ砂 (1:水16:N-HCl 4)

(3) 検体1gに水約30cc及び硝酸10ccを加えて水浴上でかきまぜながら加温して溶かし冷後水を加えて50ccとしてふりまぜこの液20ccを検液とするもの：酸化マグネシウム、炭酸マグネシウム、沈降炭酸カルシウム、酸化亜鉛

(3)* 沈降炭酸カルシウムを主成分とする製品は硝酸で煮沸して溶解後硫化物として鉛を沈澱させCaを除いた後硝酸に溶かし検液とする。

(4) 検体2gに王水10ccを加えて水浴上で蒸発乾固し、稀塩酸20ccを加え加温して冷後濾過し水を加えて50ccとしその20ccを検液とするもの：カオリン、タルク、二酸化チタン。

(4)* カオリン及びタルクを主原料とする製品はHF及び濃硫酸と共に白金皿中に加熱し珪酸塩を溶解した後 (Berzelius 法)、硝酸に溶かし、硫化物として鉛を分離してから硝酸に溶かし検液とし総鉛を定量する。

また二酸化チタンを主成分とする製品は、 KHSO_4 粉末と共に熔融後硝酸で溶かし鉛を硫化物として分離してから硝酸に溶かし総鉛定量用の検液とする。

(5) 検体1gを水10cc稀硫酸5ccの混液に溶かしたものを水浴上に蒸発乾固しその残留物を水23ccにとかしN/10塩酸2ccを加え検液とするもの：過ホウ酸ナトリウム。

(6) 検体2gを水20cc及び塩酸10ccと煮沸し熱時濾過し分離した脂肪酸を少量の熱湯で洗浄し濾液及び洗液を合し水を追加して50ccとしその20ccを検液とするもの：ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸マグネシウム

(7) 検体10gを250~300°で灰化し、灰分に硫酸5ccを加えて加熱し溶かし（溶液暗色を帯びているときは硝酸を滴下して加熱淡黄~無色となし）更に加熱を続けて SO_3 の白煙を生ずれば冷却し注意して水5cc次に飽和シュウ酸アンモニウム液10ccを加えて再び SO_3 の白煙を生ずるまで加熱し冷後50ccとしその20ccを検液とするもの：セタノール、パラフィン、流動パラフィン、ワセリン。

(8) 検体5gを水浴上で加熱し蒸発乾固し500°で3時間加熱して灰化し冷後残留物に1%熱硝酸3~5ccを加えて溶かす。これに硫酸5ccを加えて時計皿でおおつて加熱し、 SO_3 の白煙を生ずれば冷却し注意して水5cc、次に飽和シュウ酸アンモニウム液10ccを加えて再び SO_3 の白煙を生ずるまで加熱し冷後50ccとして

その20ccを検液とするもの：チオグリコール酸、チオグリコール酸アンモニウム

(8)* 硫酸バリウムを主原料とする製品はアルカリ熔融を行つた後硝酸処理して検液とする。

(ii) 溶液から鉛の分離抽出 (i)の前処理法で得た溶液の中で酸性で硫化物を形成し沈澱する鉛以外の金属を除くためにはジチゾン法⁴⁾が最も簡単である、ジチゾンは種々の金属に対して至適pHで反応し、その反応性も異なるからである。ジチゾン法によらない場合はその分離操作は複雑となる、調製溶液をpH0.79 (メチル紫試験紙で青色)として約1%のHCl (=0.25N) 5)の濃度とし後硫化水素を通じた後硫化物を濾取し、硝酸に溶かし硫酸を加えて析出した硫酸鉛を濾取し酢酸酸性酢酸ナトリウム液で溶かし一定容量とし検液とする。

(iii) 鉛の比色定量 別に標準鉛液をつくりこれに検液と同量の酢酸ナトリウム溶液を加えた後各管を水で一定容量にうすめる。各比色管に氷酢酸2~3滴と新製硫化水素試液10ccとを加え各管をよくふりまぜて混和し標準溶液と比色して鉛の含量を測定する。

I 鉛の試験法試案 (実施例)

(i) 溶液調製に対する前処理。

例1 灰化法：化粧品各項に規定する量を磁製ルツボ中に精密に秤り、500~520°で灰化し、15%硝酸20ccを加えて水浴上で加熱溶解し更に加熱して蒸発乾固し、残留物に水20cc及び稀硝酸1ccを加え再び水浴上で加熱溶解し濾過し、残留物は稀硝酸1容量に水20容量を加えた液で充分洗い、濾液及び洗液を合し調製溶液とする。

例2 疎解法：化粧品各項に規定する量 (例えば5g)を内容500ccのキルダールフラスコにとりガス漏斗でおおい、硝酸15ccを加えた後褐色の蒸気の発生がおとろえるまで煮沸する。硫酸15ccを追加しときどき硝酸少量 (1~2cc)を加えながら加熱をつづけ、液が殆ど無色又は微黄色となり重い白煙を発生しフラスコ内の液量が少量 (3~5cc)となるまで加熱する。液を冷却し水15~20ccを加え加熱して再び白煙を発生させ冷後水100ccを加えて調製溶液とする。

例3 HF、硫酸法：化粧品各項に規定する量 (例えば1g)をHF (3g)及び硫酸 (1+1) 6ccを入れた白金ルツボ中にとり砂浴上で200~250°でSO₃の発生するまで熱し冷後HF (0.5g)を追加し再び加熱しSO₃を発生させ更にHF (0.5g)を加えてこの処理を繰り返す。冷後水少量を加えて調製溶液とする。

例4 KHSO₄法：化粧品各項における規定量 (0.2g)を、KHSO₄粉末 (2g)を磁製、石英製又は白金製のルツボ中で徐々に熔融し泡立が止んだ上へ加えて再び熔融し透明な熔融物となるまで加熱し冷後水少量 (5~6cc)を加えて注意して透明となるまで加熱し調製溶液とする。

例5 アルカリ熔融法：化粧品各項に規定する量 (1g)を白金ルツボ中で炭酸ナトリウム (2g)及び炭酸カリウム (3g)と混和しブンゼン燈上で透明な流動液となるまで熔融する。冷後少量の水を加えて注意して火炎上で加熱して熔融塊をほぐし、ピーカに移し、水20~25ccを加え塊が全く崩壊するまで煮沸し、熱時濾過し5%炭酸ナトリウム溶液4ccづつで洗液が硫酸の反応のなくなるまで6~8回洗う。濾液及び洗液を合し調製溶液とする。

(ii) 調製溶液から鉛の分離抽出 (検液の調製) 上記の調製溶液にアンモニア水を加えてメチル紫試験紙で青色 (pH0.79 $\approx$ 0.25 N HCl (約1%))を呈する程度とし30~40°に加熱してH₂Sを冷却するまで通じて密栓し放置する。生成した硫化物の沈澱をガラス濾器又はアリン氏管で濾取しH₂S含有の水で2回洗浄後熱硝酸に溶かし磁皿に移し硫酸2ccを加えて水浴上でSO₃の白煙が生ずるまで蒸発し、シュウ酸アンモニウム飽和溶液10ccを加えて更にSO₃の白煙が生ずるまで蒸発し冷後95%アルコール20ccを加え一夜放置し析出物を濾別し、50%アルコール10ccでよく洗った後濾紙と共に磁皿に取りこれに酢酸酸性酢酸ナトリウム液20ccを加えてガラス棒でつきくしながら加熱して溶かし冷後濾過し、残留物は充分に酢酸酸性酢酸ナトリウム液で洗い洗液は濾液に合しネスラー管Bに移し全量を35ccとする。

(iii) 鉛の測定 (比色定量) 別に化粧品各項で規定する対応量の標準鉛液をネスラー管Aに正確に量り酢酸酸性酢酸ナトリウム液を加えて全量を35ccとする。

A、B両管に硫化ナトリウム試液2滴づつ加えて混和し2分間放置後管を白紙上におき管の上部から液を通じて観察するとき検液Bの色は比較標準液Aの色より濃くしてはならない。

試薬

標準鉛液, 硫化ナトリウム試液: 日局Ⅵによる。

酢酸酸性酢酸ナトリウム液: 25%酢酸ナトリウム液1 l に氷酢酸 15cc を加える。

Ⅲ 化粧品の種類と鉛試験法試案の撰定

市販化粧品の組成は複雑であるからその処方に従つて上記試案法の実施例中適当なものを選定すべきである。

Ⅳ 化粧品中の砒素の試験法

従来日局で砒素の検出に採用していた Bettendorf 法は操作法が極めて簡単で、しかもかなり鋭敏(検出限度 10~15ppm)であるがやや不鮮明で有機物を含んでいたり僅かでも着色している検体には適しないし定量法でないのが欠点である。操作はやゝ複雑であるが極めて鋭敏で 0.001mg 以下でもほぼ定量的に検出できる Gutzeit 法が U.S.P.⁶⁾, A.O.A.C.⁷⁾ 及び T.G.A.S.⁸⁾ 食品衛生試験法⁹⁾, 日局Ⅵ, 化粧品原料標準規格に採用されている。

Gutzeit 法は多少の有機物が存在しても殆んど影響しないというが複雑な組成を有する化粧品の場合には、複雑な検液の調製操作中に砒素を失わないように細心の注意をする必要がある。

(i) 化粧品原料の砒素試験法検液調製法

(1) 検体 1g を水に溶かし検液とするもの: グライコール (1:10), グリセリン (1:10) プロピレングライコール (1:10), ホウ酸 (1:20), トリエタノールアミン (5:20)。

(2) 検体を塩酸に溶かし検液とするもの: ホウ砂 (1:水 16:N-HCl 4), 亜鉛華 (1+稀塩酸 20), $MgCO_3$ (1:稀塩酸 20), MgO (1:稀塩酸 15), $CaCO_3$ (1:稀塩酸 20)。

(3) 検体を水及び塩酸と煮沸し熱時濾過し分離した脂肪酸を熱湯で洗い濾洗液を合し検液とするもの: ステアリン酸亜鉛, ステアリン酸マグネシウム (1:20:10)。

(4) 検体 (10g) を 250~300° で灰化しその灰分に硫酸 (5cc) を加えて加熱し溶かし、硝酸を滴下して加熱し淡黄~黄色とし更に加熱を続け SO_3 の白煙を生じたとき冷却し水 5cc, シュウ酸アンモニウム溶液 10cc を加え再び SO_3 を生ずるまで加熱し冷後 50cc としその 20cc を検液とするもの: セチルアルコール, パラフィン, 流動パラフィン。

(5) 検体 2g をとり王水 10cc を加えて水浴上で蒸発乾固し飽和シュウ酸アンモニウム液 5cc を加え蒸発乾固し更に稀塩酸 20cc を加え加温して後濾過し水を加えて 50cc としその液 20cc を検液とするもの: カオリン, タルク, 二酸化チタン。

(6) 検体を 525~550° で 1~2 時間を費して灰化し硫酸 (1:1) で処理し熱板上で HF で処理し Si を除き冷後水でうすめ一定量とし濾過し濾液を検液とするもの: タルク, 沈降炭酸カルシウム, 酸化チタン。

(7) 検体を無水硫酸カリウムと濃硫酸で炭化し濃硝酸を加えて疎解, 疎解液をフラスコに移し $AsCl_3$ として蒸溜した蒸溜液を検液とするもの: 硫動パラフィン, ワセリン, パラフィン。

(8) 検体 (3g) を Pyrex 製キルダールフラスコにとり濃硫酸 (5cc) を加え無色となるまで煮沸し冷後濃硝酸 (1cc) を加えて最早褐色の煙が発生しなくなるまで煮沸し, 冷後メスフラスコにとり 50cc としその 25cc を検液とするもの: チオグリコール酸, チオグリコール酸アンモニウム。

(ii) 化粧品中の砒素試験法試案 各種化粧品中の砒素の試験は化粧品の種類によりその原料組成は判明するからその組成に従つて (i) の検液調製法の中から選んで処理した検液について日局Ⅵ一般試験法中の砒素試験法を行う。

総 括

原料の関係上化粧品中に混入してくる鉛及び砒素の許容限度について考察し市販化粧品について推定による鉛及び砒素の含量統計表を作成した。

化粧品中の鉛の試験法 (協定法) を定量法として採用するには多くの改変すべき点を認めた。

化粧品中の鉛及び砒素の試験の試案法を提案した。

本研究の費用の一部は厚生科学研究費 (昭和 26 年度) の補助によるものである。なお本研究に当り、東京都立衛生研究所佐々木元氏並に資生堂技師長小山常正氏の御協力を仰いだ。ここに関係機関各位に深謝する。

文 献

- 1) 石尾, 坪井, 遠藤, 松田: 衛試47, 108 (昭.10.8): 印刷工場内の推積塵埃中の Pb の試験. 2) 菰田, 末永: 昭和26年度厚生科学研究補助金による研究総合報告: 医薬品用具化粧品の検査に関する研究 23 頁 (1952). 3) J. Schultz and M. A. Goldberg: Ind, Eng, chem, Anal, Ed 15 155 (1943). 4) A. O. A. C. 7th Ed. (1950) 398: Standard Methods for the Examination of Water and Sewage 209 (1946). 5) 高木誠司著; 定性分析化学上巻63. 6) U.S.P.XIV. 7) A.O.A.C. 7th Ed. (1950) p.368. 8) Toilet Goods Association Specification: Boards of Standards (The Toilet Goods Association Inc, 9 Rockefeller Plaza, New York 20, N.Y.). 9) 食品衛生試験法: 厚生省告示第54号昭和23年7月13日

Summary

(1) We calculated the presumptive quantities of lead and arsenic in cosmetics from those in materials according to the prescriptions, and discussed on their limits.

(2) We found that the method for the determination of lead in cosmetics (Pharmaceutical Society of Japan Stipulated Method) was not applicable to a quantitative test. So we made a proposal for the determination methods for lead and arsenic (gutzeit method) in cosmetics, and studied on the preparations of samples, and the sensitivities and the errors of those methods etc.

Received March 31, 1954

化粧品規格検査法について (第2報)

口紅中の色素の一検査例

市川 重 春, 南 城 実

Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (II)

An Example of the Test of Dyes in Rouge

By Shigeharu ICHIKAWA and Minoru NANJŌ

まえがき 化粧品としては許可された法定タール色素¹⁾22種では充分その目的が達し得られない場合が多いので、現在それら以外の色素が広く使われている。

米国における法定色素は117種 (FD&C: 19種 D&C: 68種 ExtD&C: 30種) で厳重な純度規格を制定している³⁾。従つて今後輸出入化粧品の検査のためと、化粧品としての複雑な性格上法定色素を現在よりも増加する必要があるので、著者等は特に米国の法定色素についての規格及び検査法について検討中である。

化粧品中特に口紅のように直接皮膚や粘膜に接触するものでは、含有する色素中の不純物や賦形剤の作用以外に色素自身の還元性、酸化性、光線感受性²⁾などの特性により、炎症その他の危害を与えた多数の症例がある。

口紅に使う色素は油溶性のものが適する。水溶性色素は唾液とともに体内に入つて吸収され、飲食時に食器に附着し、衣服を着色するから、レーキ等にして使うのが好ましい。法定赤色色素10種の内油溶性色素はスダシ⁴⁾1種のみである。ローダミンは法定外色素で高価であるが、光線によつて変色しないので広く使われている。

この検査には(1)法定色素であるとの証明、(2)法定外色素であるときはその定性及び確認、(3)有害性の有無を試験する必要がある。著者等はペーパクロマトグラフの試験によつて、(1)及び(2)について一応の成績を得たので、1例について報告する。

実 験 の 部

試 料 ダークと称する口紅 (市販品)。

試料の水溶液の色調 試料に水を加えて加温するとき、一部の色素は水に溶けるから本品は水溶性色素を直接油脂その他に混合してあるものと考えた。法定赤色色素中2種のみが水溶液中で螢光を有する。

色素検体の調製 試料から色素を抽出するためには、口紅の基剤 (パラフィン、蜜蝋、流動パラフィン、ヒマシ油、木蝋、ワセリンなど) を考慮し、溶媒として無水アルコール、アミルアルコール、石油エーテル、エーテル、ガソリン、氷酢酸などを試みたが、この試料では、氷酢酸が、色素を非常によく溶かし、温時では基剤をも溶かすので最も適当と考えた。試料に氷酢酸を加えて加温し、温時にその液を多重濾紙クロマトグラフ装置を用いて濾紙 (東洋濾紙 No. 50) 上に点滴し、風乾し、70% 酢酸を展開溶媒とした。展開後濾紙を風乾し、スポットを切り取り、水及び無水アルコールを加えて水浴上で加熱して色素を完全に抽出し、抽出液を水浴上で加熱して得た濃縮液、又は更に蒸発乾固した残留物を検体とする。

操 作⁴⁾ 1. 固体検体の性状試験: (1) 外観: 緑色結晶または赤紫色粉末、(2) 水溶液: 帯青赤色、稀薄溶液は橙緑色螢石彩、(3) アルコール溶液: 帯青赤色、橙緑色螢石彩、(4) 硫酸溶液: 橙黄色に溶解、緑色螢石彩、水を加えると赤色となる、(5) 塩酸溶液: 多量の場合は猩紅色、水を加えると青赤色となる、(6) 水酸化ナトリウム溶液: 少量の場合は無変化、多量の場合はバラ紅色の絮状沈澱。

2. 水溶液に対する反応: (1) 塩酸: 殆ど変化はない、(2) アルカリ: 殆んど無変化、多量の場合は橙黄色沈澱、(3) 塩化バリウム溶液: 混濁する、(4) 塩化カルシウム溶液: 無変化、(5) 次酢酸鉛液: 混濁、(6) 重クロム酸カリウム溶液: 紅色沈澱。

3. 毛糸染色試験: アンモニアアルカリ性で赤色に染色する。

4. 染色糸の試薬に対する反応: (1) 硫酸: 橙黄色, (2) 10% 硫酸: 殆んど変化ない, (3) 塩酸: 帯赤橙色 (4) 10% 塩酸: 殆んど変化ない, (5) 硝酸: 橙黄色→黄色, (6) アンモニア水, 10% アルカリ液, 5% アルカリ液: いずれも帯赤青色, (7) 塩酸性塩化第一スズ液: 橙赤色。

5. ペーパークロマトグラフィ: 検液を濃度約 0.05~0.1% に稀釈し, (1) 一次元上昇展開, (2) 内挿法, (3) 混合展開法を行つた。予試験及び (1) の Rf 値から, 色素はローダミンと推定し, (2) 及び (3) ではローダミンを対照として実験した結果, 次表のように両者の Rf は一致した。(東洋濾紙 No.50, 1.5 × 40cm)

展 開 剤		Rf		展 開 剤		Rf	
検 体	ローダミン	検 体	ローダミン	検 体	ローダミン	検 体	ローダミン
70% 酢 酸	0.96	0.96		ブタノールアルコール 塩酸混液 (3:1:1)	0.9	0.9	
ブタノールアルコール N/2酢酸混液 (3:1:1)	0.9	0.9		ブタノールアルコール N/2アンモニア水混液 (3:1:1)	0.91	0.91	

以上の試験の結果ローダミンと全く一致したので検体中の色素はローダミンであるとみなした。

むすび 口紅中の色素の検査法としてペーパークロマトグラフィが応用できるものと認めたので試案として提案した。

文 献

1) 薬事法 第42条第5号, 薬事法施行規則第29条別記第2号表。2) 市川重春: 著色料から見た化粧品 of 毒性 薬局第3巻, 7号, 36 (1952), (Arch. Internat de Pharmacodyn et de Therap., 15, 263 (1905); Brit J. Derm. and Syph., 49, 485 (1937); J. A., M. A., 112 No. 23. 2411. (1939); Modern Cosmeticology Third Revised Edition (1947) P.408. : Text book of Occupational Diseases of the Skin, Henry Kimpton, London (1939). 3) Methods of Analysis of the A. O. A. C., 17, 34, 665 (1950). 4) 服部安蔵, 藤井清次: 飲食物著色料検査法。5) 食品研究: 第1巻, 6号, 5) 佐竹一夫: クロマトグラフ, 5) 橋本庸平: ペーパークロマトグラフィの実施法

Summary

We tested about a rouge that seemed to be injurious to health for the purpose of getting a easy and sure test method by paper chromatography. As a result of many kinds of tests, it was found that the coloring matter in it was Rhodamine. By applying this method, other coloring matters may be detected, too.

Received march 31, 1954

化粧品の規格検査法について(第3報)

化粧品中のクロロフィルの検査法試案(1)

市 川 重 春, 南 城 実

Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (Ⅲ)

Tentative Determination Methods of Chlorophyllin in Cosmetics (I)

By Shigeharu ICHIKAWA and Minoru NANJŌ

まえがき クロロフィルは近年各種の化粧品即ちクリーム, ボマード, ローション, ベイビーパウダ, 等々使用され特にこれを加えた歯磨は, その口臭防止, 殺菌作用等の効果により高価であるにもかかわらず使用が増加して

いる。クロロフィルの組成は性質のよく似た Chlorophyll a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) 及び Chlorophyll b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) の二種からなり, a (黄緑色で mp 117~120°C) と b (青緑色で mp 86~92°C) の比は陸上植物では約 3:1, 褐色の海藻では b の割合ははるかに小である。この a と b の分離は Winterstein 等^{1,2)} によつて, カラムクロマトグラム法で行われているが, 実用上は a と b の混合物のままで用いられ, 安定度を増すために概ね Mg を Cu 又は Fe で置き換え, 且つ水溶性とするため, アルカリで加水分解して Na 又は K 塩とした所謂クロロフィリンを使っている。

Chlorophyll の定性並びに定量試験法としては A. O. A. C に光電比色法や吸収スペクトル法,⁶⁾ ペーパクロマトグラフ法^{7), 8)} があるが, Chlorophyllin の製剤中の試験法については適確な化学的試験法は見当らない。我々は化粧品中の Chlorophyllin の試験法を研究するに当つて, 先ず Chlorophyllin の確認試験を色素の試験法に準じて, ペーパクロマトグラフィ,⁹⁾ 毛糸染色試験, 各種試薬に対する反応等を調査し, これにもとづき練歯磨中の Chlorophyllin の分離検出法を研究した結果を併せて報告する。この方法は他の化粧品にも適用できる場合が多いと考える。

実験の部

1 Chlorophyllin の確認試験

1 検体 日本葉緑素 KK から分与された Cu-Chlorophyllin-Na

2 性状 (1) 外観: 製法により異なりアセトン, ベンゼンで抽出したものはワックス様青黒色の光沢ある塊乃至粉末で僅かにアミン様の臭気がある。(2) 水溶液: 深緑色, 濃厚溶液は僅かに赤色蛍光を有する (クロロフィル溶液は, 著明な蛍光を有する)。(3) 溶解度: メタノール易溶; アルコール, クロロホルム僅溶エーテル極めて僅溶。(4) 硫酸: 黒褐色。(5) 硫酸溶液を水で稀釈: 緑色沈澱。(6) 塩酸: 褐色となり後緑色の沈澱。(7) 10%水酸化ナトリウム: 緑色に溶解

3 水溶液に対する反応。(1) 塩酸: 緑色の沈澱を生ずる。沈澱はアルコール, アミルアルコール, メタノール, ブタノール, アセトン, エーテルに可溶。ベンゼンに不溶。(2) 水酸化ナトリウム: 変化なし。(3) 塩化バリウム溶液: 緑色沈澱を生ずる。(4) 塩化カルシウム溶液: 同上。(5) 重クロム酸カリウム溶液: 橙色化。(6) タンニン酸溶液: 変化なし。(7) ピクリン酸溶液: 変化なし。

4 毛糸染色試験 塩酸酸性浴に入れ加温すると汚緑色に染色する。之を乾燥し, アンモニア性水溶液で加温すると Chlorophyllin は溶出する。

5 染色毛糸の試薬に対する反応 (1) 硫酸: 褐色。(2) 10%硫酸: 変化なし。(3) 塩酸: 汚緑色。(4) 10%塩酸: 変化なし。(5) 硝酸: 黄褐色。(6) 10%水酸化ナトリウム: 変化なし。(7) 5%水酸化ナトリウム: 同上。(8) アンモニア水: 同上

6 ペーパクロマトグラフィ 上昇法で行い濾紙は東洋濾紙 No. 50 (1.5 × 40cm) を使用した, 結果は次表に示す。

展 開 溶 媒	Rf		
	Na 塩 水 溶 液	塩 酸 塩 ブタノール 溶 液	塩 酸 塩 アミルアルコール 溶 液
ブタノール, アルコール, N/2 酢酸の混液 (60:20:20)	0.9	0.9	0.9
ブタノール, アルコール, N 酢酸の混液 (60:20:20)	0.89	0.89	0.89
酢 酸 性 ブ タ ノ ー ル	0.91	0.91	0.91
酢 酸 性 ア ミ ル ア ル コ ー ル	0.88	0.88	0.88

(註) 酢酸性ブタノール, 酢酸性アミルアルコール: 酢酸, 水, ブタノール (又はアミルアルコール) の混液 (5:4:1) を振りまぜて上層液を使用する。

上記 6 のペーパクロマトグラフィによれば検体が Na 塩, 塩酸塩, いずれの場合でも Rf は同一であるので, 製剤中の Chlorophyllin の確認試験については, 水で抽出できないときは, 塩酸で処理して抽出したものにつき, 直接試験を行うことができる。

I 化粧品中の Chlorophyllin の分離検出法

1 検体 サンスター歯磨kkから分与された歯肉塗擦剤グリーンサンスター (葉緑素配合). その内容成分は次の如くである.

公定書外医薬品: 葉緑素 0.080%. 米国薬局方: ニトロフラン 0.005%. 香料 0.110%. その他基礎剤 99.805%.

内 訳 日本薬局方: タンニン酸, 薬用石鹼, チモール, 薄荷腦, 炭酸カルシウム, 炭酸マグネシウム, グリセリン, 溶性サッカリン, その他ソルビット, グリセリンモノステアライド.

2 Chlorophyllin の分離 検体にメタノールを加え振りまぜると, 検体は細分される. これに塩酸を加えながら水浴上に加温すると, 検体は泡沸して溶け, 検体中の Chlorophyllin もまた溶けて緑色溶液となる. 検体が全く溶けるか, 又は残留物に Chlorophyllin を含まなくなつたら, これを濾過して, 濾液を水浴上で, 溶液の約半量まで蒸発する. これに多量の水を加え, 液中に浮遊する微細な沈澱を濾過して数回水洗し, 沈澱を濾紙と共に, 水を加え煮沸して不純物を溶かし, 沈澱の附着した濾紙を乾燥し, 塩酸性アセトンを加えて加温してアセトン溶液を濾過し水で希釈してエーテルで振りまぜ, エーテル層を2~3回水洗する.

(1) エーテル層を水浴上で蒸発すれば Chlorophyllin の塩酸塩が得られる.

(2) エーテル層に稀薄な炭酸ナトリウム溶液を注意しながら加え pH を7~8にすれば Chlorophyllin は炭酸ナトリウム溶液に移行し, これを2~3回エーテルで洗い水浴上で蒸発すれば, Na塩が得られる.

3 確認試験 前記1の2, 3, 4, 5, 6の各確認試験を行い, 検体中の緑色色素は Chlorophyllin であることを確認した.

総 括

1. 化粧品中の Chlorophyllin の確認試験を行うに際し色素の試験法に従つて Chlorophyllin の種々の性質を調査した.

2. ペーパークロマトグラフィの試験では Chlorophyllin の Na 塩, 塩酸塩のいずれについても同じであつた.

3. この試験法によつて, 従来行われている Spectrophotometer を用いないで簡単に Chlorophyllin を鑑識することができた.

4. 歯磨剤中の Chlorophyllin の確認試験を制定し, これによつて市販練歯磨剤中から Chlorophyllin を抽出して確認した.

文 献

- 1) A. Winsterstein, G. Stein: Z. Physiol. chem. 220, 263 (1934).
- 2) 佐竹一夫: クロマトグラフ, 143 (共立社), N. N. R. (1952).
- 3) A. O. A. C. 7th. Ed. (1950), 664.
- 4) N. N. R. 1952.
- 5) Thorpe, s Dictionary Applied Chem.
- 6) A. O. A. C. (1950), 112: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 877 (1942); J. Assoc. Official Agr. Chem. 27, 517 (1944).
- 7) Plant Physiol., 17, 198 (1942).
- 8) 浅見益吉郎: 植物学雑誌, 65, 771~772号 (1952).
- 9) 食品衛生研究11-16号

Summary

We studied on the varieous properties of chlorophyllin for the purpose of getting the method for its identification in cosmetics. Natrium salt and hydrochloride of chlorophyllin gave the same result in paper chromatography. We could identificate it in dental creams by our simple method without using a spectrophotometer.

Received March 31, 1954

衛生上から見た化粧品の容器について

(第一報) 鉛製チューブ中の化粧品の汚染防止

市川 重 春, 汐 見 信

Hygienic Studies on Containers of Cosmetics (I)

Prevention of Lead Contamination of Cosmetics in Lead Tubes.

By Shigeharu ICHIKAWA and Shin SHIOMI

まえがき 化粧品は容器の選定を誤ると薬事法第42条第4項によつて, 不良化粧品となる。ある化粧品の容器に使われるチューブには錫製, 錫引き鉛製, ときには鉛製のままで使用されている。

保健衛生上からは鉛の使用は避けたいが, 我が国の資源及び経済上から鉛の溶出をできるだけ防止する手段を構じた上でその使用を認めることも必要であろう。

米国では戦後鉛製チューブを禁止し, アルミニウム製を使用することにしたと聞くが, 最近業者が米国から持ち帰ったチューブ入り化粧品は大部分鉛及び鉛の合金を容器に使っている。

アルミニウム容器はアルカリ性製品により侵されるので, Colgate 社など若干の会社で使われているだけらしい。

ここに我々は, 鉛製チューブ中に市販及び自製練歯磨製品を入れて鉛が製品中に溶出する時間的变化と, その溶出を防止する加工法について調査試験した結果を報告する。

I 市販の鉛チューブ入り化粧品の試験 米軍の放出化粧品中鉛製チューブ入りの化粧品を検体として, 協定法1)及び我々の試案法2)によつて鉛の試験を行つた成績を第1表に示す。

第1表 市販のチューブ入化粧品中の鉛試験

品 名	チューブの種類	試験結果	試験法	検 定 年 月 日
1 Palmolive. Shave. Cream.	鉛	検出(黒沈)	協 定 法	25. 10. 18
2 Williams. Luxury Shaving Cream	"	"	"	"
3 Ingram Shaving Cream	"	"	"	"
4 Gillette Lather Shaving Cream	"	"	"	"
5 Palmolive Lather Shaving Cream	" (新品)	検出せず*	"	"
6 Mennen Lather Shaving-Original	" (新品)	" *	"	"
7 Barbasol	"	検 出	"	25. 10. 26
8 Cabot's Lather Shaving Cream	"	"	"	"
9 Lavender Shaving Cream	"	"	"	"
10 Velo-smooth Palm and Olive Oil	"	"	"	"
11 Marlin Lather Shave	"	"	"	"
12 Burma-Shave	" (新品)	検出せず*	"	"
13 Mennen Brushless shave	" (新品)	"	"	"
14 Mennen Lather Shave	" (新品)	"	"	"
練 歯 磨				
15 Magnesia Tooth Paste Mc. Kesson's	鉛	40ppm**	試 案 法	26.4.2 (2g押し出し)
16 Ispana Tooth Paste	"	700ppm	"	26.4.2 (切り開き内 容物をとり乳鉢中均 一とする)
17 Repsodent Tooth Paste	?	10ppm	"	26.4.2 (2g押し出し)

* 硫化鉛の黒色沈澱及びクロム酸鉛の黄色沈澱を明瞭に認め得たもののみを検出としたので, この判定で検出せずとなつたもの。

** 比色標準液と Dubosq 比色計で比色した値。

II 検体採取法の決定 第1表の成績を考察するに第1～14号までは定性的判定で、第15～16号は定量試験結果を示す、その含量の差違が大きい1原因として鉛チューブ中の鉛が溶出するものとすれば貯蔵時間と検体採取部位によつて当然このような差違を生ずるであろう。そこでチューブの尖端部、中央部、後尾部から採取した検体を試験して得た鉛の含量を第2表に示す。この結果から我々は検体採取法として一般使用者がするように、チューブからその約半量をガラス乳鉢中に押し出し乳棒でかきまぜて均一としたもの約2gを精密に秤取することに定めた。

第2表 チューブの各部位から採取した検体の比較試験

チューブの種類	検体採取部位	鉛含量 (ppm)	試験法	検定年月日	製造年月日	摘 要
1. 鉛 製	尖端部約2gを押し出す	60	協定法	26. 1. 22	26. 1. 16 (購入)	約3ヶ月目 " " "
	中央部約2gを押し出す	40	"	"		
	尖端部	300	試案法	26. 3. 14		
	中央部	50	"	"		
	後尾部	175	"	"		
2. 錫引き鉛製	尖端部	180	協定法	26. 3. 2	25. 11. 24	約3ヶ月目 " "
	中央部	40	"	"		
	後尾部	175	"	"		
3. アンチモン鉛合金製	尖端部	20	"	26. 3. 13	26. 2.	1ヶ月以内
4. 鉛合金製	中央部	80	"	26. 3. 2	26. 1. 18	約1ヶ月半 " "
	後尾部	45	"	"		
5. 鉛合金製		75	"	"		"
		30	"	26. 3. 13		1ヶ月以内

III 自製練歯磨中の含量 本試験に使用した自製練歯磨中の鉛の含量はすべて2～10ppmで平均5ppmであつた。

IV 自製の鉛チューブ入り練歯磨の経年変化試験 自製の練歯磨を鉛製チューブに入れ30°の恒温器に貯えてその鉛含量の経年変化を前記の検体採取法で試案法により試験して得た第3表の成績によると、1ヶ月では大体鉛40～60ppm、2ヶ月目以後は鉛100～150ppmを検出し、経年変化はあまり見られないが、この原因はこの検体では水分が非常に失われるため水分が鉛の侵蝕に影響を与えたものと思う。

第3表 鉛製チューブ入り練歯磨中の定量試験

検体番号	鉛含量 (ppm)	検定年月日	製造年月日	摘 要
1	126	26. 5. 28	?	
2	44	26. 8. 13	26. 2. 23	約 1 ヶ 月 目
3	146	26. 9. 13	"	約 2 ヶ 月 目
4	151	26. 10. 13	"	約 3 ヶ 月 目
5	144	26. 11. 5	"	約 4 ヶ 月 目
6	40	26. 11. 5	26. 10. 18	約 1 ヶ 月 目
7	59	27. 3. 8	27. 2. 一	"
8	12	27. 9. 10	27. 8. 30	約 10 日 目
9	115	27. 10. 10	"	約 1 ヶ 月 目
10	122	27. 11. 10	"	約 2 ヶ 月 目
11	119	27. 12. 10	"	約 3 ヶ 月 目
12	119	28. 1. 10	"	約 4 ヶ 月 目
13	110	28. 2. 10	"	約 5 ヶ 月 目
14	350	28. 3. 10	"	約 6 ヶ 月 目

V 鉛製チューブの鉛溶出防止 文献を見ると鉛製容器の化粧品汚染は単に鉛の混入だけでなく容器が侵蝕され

て化粧品を汚染する。Bruun³⁾ は錫引き鉛製チューブが、歯磨、ひげそりクリーム、化粧用クリームなどの容器に使用できる条件として次の項目を挙げている。

(1) チューブは厚さ 0.004 mm の錫層 (0.28g/100cm²) でよく被覆すること。(2) 錫の被覆は丈夫で破損しないこと。(3) 最も侵蝕の甚だしい筒口 (nozzle) は純錫で造ること。

D'Alelis⁴⁾ は化粧クリーム用容器の内部表面は少くとも錫引きにして、不溶性並に不熔融性の Amino-triazine aldehyde の重合物で被覆する特許を得ている。White⁵⁾ は錫、鉛、アルミニウム又は合金製チューブの侵蝕を防止するために塩化第二錫、錫のハロゲン酸、ホウ酸フッ化物、フッ化ホウ素或はスルホン酸で処理した柔軟な重合したゴム炭化水素からなる物質で内面塗装を施す特許を得ている。Logan⁶⁾ は純錫製または錫張鉛製チューブに長期間化粧品を貯蔵した際のチューブの侵蝕について研究し、ある種のラッカーは侵蝕を減少するのに役立つことを報告している。

上記のように容器の侵蝕及び鉛の汚染防止について種々の加工方法が構ぜられているが、錫引き鉛製チューブについて練歯磨では鉛溶出量 30 ~ 170 ppm (Neukam⁷⁾), 根跡 ~ 22 ppm (Beythien⁸⁾) 0 - 18 ppm, 31 ppm, 28 ppm (Froboese⁹⁾), シェービングクリームでは 100 ppm (Neukam⁷⁾) であると報告されている。

Bruun³⁾ が挙げたようなピンホールのない完全な被覆を作ることは非常に難かしいようである。この錫引きが不完全のときは、内容物の水分によつて局部的にイオン交換し、かえつて鉛の侵蝕を受け、またアルカリ性製品の場合は錫の侵蝕も相当激しいことが、我々の実験によつても認められた。よつて我々はこの鉛の溶出防止のためには、錫張りチューブにおいても内面塗装の必要を痛感し、アメリカで使われているシェファール・ロイ等の合金チューブ及び各種のチューブの内壁に種々のコート物質を塗装したものについて上記 IV と同様の経年変化試験を行つた結果第 4, 5 及び 6 表の成績を得た。

第 4 表 鉛合金チューブ入り練歯磨中の鉛の定量試験成績

検体番号	チューブの種類	鉛含量(ppm)	検定年月日	製造年月日	摘 要
1	合金 (38° 恒 温)	45	26. 4. 12	25. 12. 28	約 3 ケ月半
2	" (アンチモン合金)	18	26. 6. 13	26. 1. 18	約 5 ケ月
3	" (シェファール製)	21	"	26. 5. 10	約 1 ケ月
4	" (亜鉛含有)	50	26. 6. 23	?	
5	" (シェファール製)	15	26. 7. 5	26. 6. 5	約 1 ケ月目
6	"	18	"	"	"
7	"	24	26. 8. 5	"	約 2 ケ月目
8	"	44	"	"	"
9	"	35	26. 8. 30	"	約 3 ケ月目
10	"	20	"	"	"
11	"	47	26. 10. 5	"	約 4 ケ月目
12	"	40	"	"	"
13	"	41	26. 11. 5	"	約 5 ケ月目
14	"	25	"	"	"

第 5 表 錫引き鉛製及び内壁を塗装した鉛合金製チューブ入り練歯磨中の鉛の定量試験

チューブの種類及び加工法	鉛含有量 (ppm)	検定年月日	製造年月日	摘 要
1 錫引きコロチン入り被覆不完全	30	26. 4. 12	26. 2. 20	約 1 ケ月半
2 錫引き鉛製コロチン入り	25	"	"	"
3 錫引き鉛製バラ	20	"	26. 2. 24	"
4 錫引き鉛製バラ石ペン	50	"	26. 2. 22	"
5 錫引き鉛製バラ	15	26. 6. 13	26. 2. 24	約 3 ケ月半
6 鉛合金塗装	6	26. 11. 20	?	

チューブの種類及び加工法		鉛含有量 (ppm)	検定年月日	製造年月日	摘 要
7	"	6	"	?	
8	"	5	"	?	
9	"	6	"	?	

註) 鉛合金塗装チューブは鉛の溶出量が少いが更に今後充分な検討を行うこととする。

第6表 塩化ビニール被覆鉛製チューブ入り練歯磨中の試験

チューブの種類及び加工法		鉛含有量 (ppm)	検定年月日	製造年月日	摘 要
1	塩化ビニール被覆鉛製	10	27. 8. 7	27. 7. 7	約 1 ヶ月目
2	"	10	27. 9. 10	27. 8. 30	約 10 日目
3	"	13	27. 10. 10	"	約 1 ヶ月目
4	"	28	27. 11. 10	"	約 2 ヶ月目
5	"	21	27. 12. 10	"	約 3 ヶ月目
6	"	19	28. 1. 10	"	約 4 ヶ月目
7	"	15	28. 2. 10	"	約 5 ヶ月目
8	"	18	28. 3. 10	"	約 6 ヶ月目

総 括

- (1) 鉛製チューブの鉛溶出量は6ヶ月後には110～250 ppm であり、なお引き続きその侵蝕が進行する。
- (2) 錫引き鉛製チューブでは6ヶ月後には20～70 ppm の鉛溶出量となり、その上に錫の溶出を伴う。
- (3) 鉛合金チューブでは6ヶ月後に10～50 ppm の鉛が溶出し、また他の成分金属の溶出も認められる。
- (4) 鉛溶出防止の加工法として、各種チューブの内壁に種々の物質を被覆した場合、(a) 被覆物質の種類によつては大した効果が認められない。(b) 塩化ビニール約1.6 mg/cm² で内壁を覆うときは、6ヶ月間に鉛溶出を根跡～20 ppm まで防止できることを認めた。

すなわち、各種の鉛製チューブを用いる場合には鉛溶出防止のため適当な被覆物質を使用することが望ましい。

文 献

- 1) 薬発第1784号 (昭和24年10月24日) 「化粧品中の鉛の試験法」。
- 2) 本誌123頁第1報参照。
- 3) O. J. Bruun : Soap, Perfumery and Cosmetics, 15, 161～2, 144 (1942); C. A., 37, 225 (1943).
- 4) G. F. D'Alelis : (General Electric Co.) U. S. 2291379 July 28; C. A., 37, 732 (1943).
- 5) R. H. White : (White Metal Mfg. Co.) U. S. 2290928, July 28; C. A., 37, 1669 (1943).
- 6) R. M. C. Logan : Mfg. Chemist., 11, 263～4 (1940); Chem. Zentr., 11, 1326 (1944); C. A., 41, 3768 (1947).
- 7) K. Neukam; Chem. Ztg., 45, 301～2 (1921); C. A., 15, 2159 (1921).
- 8) A. Beythien : Z. Nahr. Genussm., 43, 47～55 (1922); C. A., 16, 2571 (1922).
- 9) V. Froboese : Z. Untersuch. Lebensm., 65, 176～81 (1933); cf. Zellner : C. A., 26, 3331; C. A., 27, 4625 (1933).

Summary

Widely varying amounts of lead were found, in cosmetics or dental creams preserved in lead, imperfectly tin-coated lead or lead alloy tubes.

- (1) 110 to 250 ppm of lead were found in the creams in lead tubes after six months, and the amounts

increase thereafter.

(2) 20 to 70 ppm. of lead and a trace to 26 ppm. of tin were found in the creams in tin-coated lead tubes after six months.

(3) 10 to 50 ppm. of lead and other metals were found in the creams in lead alloy tubes after six months.

(4) It is preferable that lead, tin-coated lead and lead alloy tubes are coated with suitable materials. Especially, vinyl chloride-coating ($1.6\text{mg}/\text{cm}^2$) was found to be effective to reduce increase of lead amounts in creams.

Received March 31, 1954

医薬品中の無機イオンの分離定量法に関する研究 (第1報)

リンゲル液中の Na, K 及び Ca の分離定量

市川 重春, 山手 昇, 白井 浄二

Studies on the Determination Methods for Inorganic Ions in Drugs (1)

On the Determinations of Na, K and Ca in Ringer's Solution.

By Shigeharu ICHIKAWA, Noboru YAMATE and Joji SHIRAI

まえがき 医薬品殊に多くの製剤では多種の無機イオンが混在している従つてこれらの各成分の迅速簡易な定性及び分離定量法が必要となる。この報告ではリンゲル液中の Na, K 及び Ca について研究した結果を報告する。

日局リンゲル液はその処方規定されているのみで各成分の定量法の規定がないが、昭和25年から国家検査が行われ各製造業者から送附された検体について総塩化物を定量した成績では処方に対する理論数の最小51.7%、最大125%のような不良品があつた。そこで総塩化物量を理論数の95~105%として適否の判定規準とし、ここに重点をおいた結果原料各成分の含量を無視する傾向を生じ、K又はCaを全く検出しない検体が現われてきたので、原料各成分の定性試験が必要になつた。

A. リンゲル液各成分の定性試験 自製リンゲル液につき日局一般試験法と確認試験法によつて試験し次の結果を得た。

a) 自製リンゲル液の調製法 塩化ナトリウム 8.63 g (NaCl として 8.6258 g), 塩化カリウム 0.30 g (KCl として 0.3026 g), 塩化カルシウム 0.33 g ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ として 0.3337 g) を水 1 l に溶かす。以上3成分の純度は日局により定量した結果各成分それぞれ 99.70% (無水物として), 99.14% (無水物として), 98.90% (そのまま) であつた。

b) 自製リンゲル液の総塩化物定量 リンゲル液 10 cc につき理論値: $\text{N}/10\text{-AgNO}_3$ 15.63 cc, 実測値: Mohr 法 $\text{N}/10\text{-AgNO}_3$ 15.56 cc (99.56%), Volhard 法 $\text{N}/10\text{-AgNO}_3$ 15.57 cc (99.62%)。

c) 自製リンゲル液各成分の定性試験 一般試験法中の確認試験を自製リンゲル液について行つた結果は塩化物, Na の炎色反応及び Ca の沈澱反応は陽性であるが, K 及び Ca の炎色反応, Na 及び K の沈澱反応は原液についてはいずれも陰性 (原液 50 cc を水浴上で約 10 cc に濃縮すると Na は陽性) であつて K は一般試験法は適用できないのを認めた。

d) リンゲル液各成分の定性試験法提案 前記試験の結果によつてリンゲル液各成分の定性試験法として次の試案を提案する。

- i) 塩化物: 本品は硝酸銀溶液を和すればアンモニア水に溶ける白色乾酪様の沈澱を生ずる。
- ii) ナトリウム: 本品を無色火炎中に加熱すれば其の火炎を黄色に染める。本品 10 cc に酢酸ウラニルニッケル試液を加えるとき黄色沈澱を生ずる。註 Na の沈澱試薬としては種々の UO_2 と二価金属 (Mg, Zn, Cu, Ni 等) の三重酢酸塩が使用されているが, $\text{Ni} \cdot \text{UO}_2 \cdot \text{Ac}^{-4}$ が他の試薬に比し鋭敏 (Na 10 γ 以下でも明瞭に沈澱を生ず) で、沈澱生成速度も早く最適であることを認めた。
- iii) カリウム: 本品 10 cc に亜硝酸コバルトナトリウム試液 1~3 cc を加えるとき直ちに淡黄色の沈澱を生ずる。註 K の沈澱試薬としては亜硝酸コバルトナトリウム試液が最も鋭敏⁵⁾で、ナフトール黄 S 溶液⁶⁾も鋭敏度は少し劣る ($1/2500$) が安定な試薬である。

iv) カルシウム: 本品 5 cc にアンモニア試液 0.1 cc を加えて pH 9.21 以上のアルカリ性とした後オキシソキシソ液を加えるとき淡黄色の沈澱を生ずる。又本品 10 cc に酢酸アンモニウム試液を加えるとき白色の沈澱を生じ、この沈澱は酢酸に溶けないが塩酸に溶ける。註 Ca の沈澱試薬としてオキシソキシソが共存する Na や K には反応せず Ca とのみ $\text{Ca} \cdot \text{Oxinate}$ を作る鋭敏度⁷⁾ (pH 9.2 以上で 0.1 mg/10 cc) を利用するのが最良と認めた。

B リンゲル液各成分の定量試験 a) 米局 XIV 規定の各成分の定量法を追試の結果次の結論を得た。

i) Ca の定量法(蓆酸カルシウム法)は濃縮、加熱、濾過、洗浄などに時間を要し操作もやや煩雑である(試験所要時間約7時間)。ii) K の定量法(セリメトリー法⁸⁾)は補正值が一定でないが規定の係数を使用すると誤差約2~3%を示した。iii) 蓆塩化物の定量法(Volhard 改良法)は Mohr 法と比較したが大差ない(A. b) 参照)から試薬の節約の意味で Mohr 法が経済である。b) 定量法の選択 適当と思われる次の数法を選んで検討した: i) オキシシ法⁷⁾による Ca の定量法(容量法): オキシシが Na や K の共存の下に Ca とのみ反応して Ca-Oxinate を形成する特性を利用する法。ii) E. T. A. 法による Ca の定量法(容量法): 1946 年 SCHWARZENBACH 等⁹⁾ が水の硬度測定法に推奨した E. T. A. (Ethylendiamine Tetraacetic Acid Disodium Salt, 又は Disodium Versenate 或は Complexon と云う) 試薬は Ca, Mg の容量分析に広く利用され最近医薬品の純度試験¹⁰⁾ にも応用され、国際薬局方¹¹⁾ にも採用された。iii) ヘキシル法¹²⁾による K の定量法(容量法): 予め重金属のみを分離すれば他の金属塩の存在の下において K のみが定量できる。iv) 比色法による K の定量法¹³⁾: K を亜硝酸コバルトカリウムナトリウムとして沈澱分離し、この沈澱をアセトン水で洗い、遠心分離後、少量の温湯に溶かし、硫シアン化アンモニウムの 80 %アセトン溶液を加えて生ずる青色を比色定量する。

実験の部

I) オキシシ法による Ca の定量試験 リンゲル液 50 cc を正確に量り、アンモニア試液 2 cc (pH=11.4, この反応は pH 9.21 より大きい必要がある)を加えた後、オキシシ試液(2w/v%アルコール液)3 cc を加え、よくかきまぜ約 30 分間放置する(加温すると沈澱は速かに分離し上澄液は黄金色となるが、沈澱は温時幾分溶けるので放冷して室温になるまで時間を要する)。沈澱をガラス濾過器(3G4)を用いて濾過し、ピーカに附着する沈澱は母液を用いて濃集し(Ca-Oxinate は水、アルコール(95, 70, 50v/v%)等に溶けるから母液でまず沈澱を濃集し、最後にできるだけ少量のアンモニア水で洗えば定量結果に影響を与えない)。最後にできるだけ少量のアンモニア水で洗う。濾過器内部の沈澱は 10 %塩酸(全量 50 cc)に溶かし、次に水 30 cc で洗い、濾液と洗液は共栓フラスコ中に移し、KBr 1 g 及びメチルレッド試液 3 滴を加えよくふりまぜながら黄色となるまで N/10KBrO₃ 液で滴定し、約 3 分間放置後、KI 1 g を加えて N/10Na₂S₂O₃ 液を用いて滴定する(指示薬澱粉溶液)。N/10KBrO₃ 1 cc = 1.8412 mg CaCl₂·2H₂O

第1表 オキシシ法と蓆酸法比較試験成績

(数値はリンゲル液 100 cc 中の CaCl₂·2H₂O の mg 数)

検 体	オキシシ法	蓆 酸 法	検 体	オキシシ法	蓆 酸 法
自 製 品	32.72	32.95	市 販 品 D	31.36	31.68
市 販 品 A	33.09	33.42	〃 E	36.53	36.82
〃 B	30.10	30.56	〃 F	32.75	32.43
〃 C	29.53	29.83			

I) E. T. A. 法による Ca の定量試験

試薬 i) N/50 E. T. A. 溶液: E. T. A. 8 g を水に溶かして 2 l とする(使用前に標定する)。

ii) Murexide 指示薬: Murexide (Ammonium purpurate) の乾燥粉末 0.1 g と NaCl 25 g を研 磨 混 合 する(本品は調製後 2 ヶ月以内に用いる)。本指示薬は pH 11.2 以上で Ca に特異呈色する。

iii) E. B. T. 指示薬: Eriochrome Black T 粉末 0.5 g と塩酸ヒドロキシラミン 4.5 g をメタノール 100 cc に溶かす。本指示薬は pH 9.6 ~ 10.4 で Mg 及び Ca に対し呈色する。

iv) NH₄OH-NH₄Cl 緩衝液: NH₄Cl 67.5 g を強アンモニア水 570 cc に溶かし水を加えて 1 l とする。

v) 5N-NaOH 液: NaOH 100 g を水に溶かし 500 cc とする。

E. T. A. 溶液の標定法 a) 標準カルシウム溶液の調製: CaCO₃ を 130° で 3 時間乾燥したもの 1 g を正確に秤り、水 10 cc を加え稀塩酸 10 cc を用いて注意して溶かし煮沸して CO₂ を除き水を加えて 1 l とする。

$$\text{CaCO}_3 (\text{g}) \times 0.4004 = 1 \text{ cc 中の Ca 相当量 (mg)} = R$$

b) 標定: (1) Murexide 指示薬法: 標準カルシウム溶液 20 cc を正確に量り水を加えて 50 cc とし, 5 N-NaOH 液 2 cc, Murexide 指示薬 0.2 g を加えて N/50 E. T. A. 溶液で紫色を呈するまで滴定する。

2) E. B. T. 指示薬法: 標準カルシウム溶液 20 cc を正確に量り水を加えて 50 cc とし, 緩衝液 1 cc, E. B. T. 指示薬 6 滴を加え, N/50 E. T. A. 溶液で青色を呈するまで滴定する。

$$F = \frac{R \times 20}{\text{滴定に要した E. T. A. 溶液 cc 数}} = \text{E. T. A. 溶液 1 cc に対する Ca mg 数}$$

E. T. A. 法によるリンゲル液の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の定量法は N/50 E. T. A. 標準液を用い, 指示薬として Murexide 又は E. B. T. を用いる 2 法と別に米局 XIV 蓚酸法とを比較検討した (第2表)

Ca の定量 (1) Murexide 指示薬法: リンゲル液 50 cc を正確に量り, 5 N-NaOH 液 2 cc, Murexide 指示薬 0.2 g を加えた後 N/50 E. T. A. 標準液を用いて滴定する (ピンク→紫)。

(2) E. B. T. 指示薬法: リンゲル液 50 cc を正確に量り, 緩衝液 1 cc, E. B. T. 指示薬 6 滴を加えた後 N/50 E. T. A. 標準液を用いて滴定する (赤→青)。

第2表 E. T. A. 法と米局 XIV 蓚酸法の比較試験成績

(数値はリンゲル液 100 cc 中の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の mg 数)

検 体	E. T. A. 法		米 局 XIV 蓚 酸 法
	Murexide 法	E. B. T. 法	
自 製 品	32.36	32.33	32.34
市 販 品 M	37.69	37.63	37.68
" H	29.53	29.44	29.40
" F	32.94	32.97	33.02
" T	32.68	32.74	32.51
" O	30.58	30.55	30.46
" S	39.32	39.27	39.27

Ⅲ) ヘキシル法による K の定量試験 リンゲル液一定量 (Acc) を 100 cc のメスフラスコ中にとり, 水を加えて約 50 cc とし, N/10 ヘキシルカルシウム液 25 cc を加え, 水を加えて 100 cc としよくふりまぜた後, 1 時間以上 $0^\circ \sim 5^\circ$ で放置する。次に上澄液を濾別し, 濾液 50 cc をピペットで量取し水を加えて約 150 cc とした後, 溶液が充分酸性となるまで過剰量の N/10 HCl (Bcc) を加え静かにふりまぜ, 水浴上に約 1 時間放置する。析出したヘキシルが充分凝固し, 上澄液が黄色透明となつた後, 室温に放置冷却し, 析出したヘキシルをガラス濾過器 (3 G 4) で吸引濾過し, 更に冷水 15 cc で洗う。濾洗液を合して煮沸し CO_2 を追出した後 B. T. B. を指示薬として N/10-NaOH 液で滴定し (Ccc), 次式により K の量を求める。

$$[\text{An}_1 - (\text{Bn}_2 - \text{Cn}_3) \times \frac{100}{D}] \times 3.91 = \text{Kmg}$$

但し n_1, n_2, n_3 は夫々 N/10 ヘキシルカルシウム試液, N/10 HCl, N/10 NaOH の力価, $D = 50 \text{ cc}$ 。

未反応物として残留する試薬濃度は次式による (規定) $\frac{N/10}{100} \times (\text{Bn}_2 - \text{Cn}_3) \times \frac{100}{D}$

自製リンゲル液及び市販品を検体として上記操作法に従つて K を定量した (第3表)。

Ⅳ) 比色法 (硫シアン化アンモニウムアセトン液による) による K の定量試験

試薬 i) 硫酸カリウム標準液: 試薬特級硫酸カリウム 2.2276 g を水 1 l に溶かす。本液 1 cc は K として 1 mg を含む。ii) 標準硫酸銅液: A 液 = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6 g を水に溶かし 50 cc とする。本液 1 cc = 0.3 mg K, B 液 = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 g を水に溶かし 50 cc とする。本液 1 cc = 0.2 mg K, C 液 = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3 g を水に溶かし 50 cc とする。本液 1 cc = 0.15 mg K. iii) 亜硝酸コバルトナトリウム液: 米局 XIV 試薬 (20%)。iv) アセトン: 50 %, 95 %。v) 硫シアン化アンモニウムアセトン液: 80 % アセトン 100 cc に硫シアン化アンモニウム 10 g を溶かす (用時調製遮光する)。

操作 リンゲル液 2 cc (K として 0.3146 mg) を 15 cc の目盛付沈澱管により, 亜硝酸コバルトナトリウム液

1 cc を滴加してよく混和した後、氷室中に3時間放置して5分間遠心分離し、その上澄液を先端の上を向いているスポイトで分取する。この際液の全部を分取しないで約0.3ccを残しておく。次に水約3ccを器壁に沿って滴加し、壁に附着する試薬を洗い落とす。この際沈澱をかきまぜぬように注意する。次に3分間遠心分離し上澄液なるべく下方までスポイトで吸いとる。沈澱に50%アセトン3ccを加え、沈澱をかきまぜた後遠心分離し上澄液を前のようにして除き、沈澱を更に90%アセトン3ccで上澄液が無色になるまで(通例2回)洗う。この黄色沈澱に水2ccを加えて水浴中でときどきふりまぜながら約30分間加温すると沈澱は溶けて無色の液となる。冷後硫シアン化アンモニウムアセトン液を加えて10ccとし、この青緑色の液を硫酸カリウム標準液(リンゲル液の場合は硫酸銅標準液とは色調が異なるので、この標準液を使つた)と光電比色計を用いて1時間後に暗室内で比色定量する。

第3表 ヘキシル法によるリンゲル液中のKの定量試験成績表

検 体	検体秤取量 CC (Kmg)	NaOH (C cc)	測 定 値 (Kmg)	温度による* 補正値(3°C)	定量値 (Kmg)	誤 差 (mg)
自 製 品	10 (1.57)	3.55	1.51	0.17	1.68	+0.11
市販品M.	" (")	4.70	1.70	"	1.87	+0.30
" H.	" (")	3.50	1.00	"	1.17	-0.40
" F.	" (")	3.52	1.19	"	1.36	-0.21
" M.	" (")	3.53	1.28	"	1.45	-0.09
" T.	" (")	3.55	1.51	"	1.68	+0.11
" N.	" (")	4.67	1.42	"	1.59	+0.02
" O.	" (")	3.55	1.51	"	1.68	+0.11

※ 日化, 72巻, 451頁表による。

第4表 硫酸カリウムを標準液とするリンゲル液2cc中のKの定量試験

検 体	吸 光 度	K 検 出 量 mg	理論含量に対する 百分率
自 製 品	0.450	※ 0.3070	97.6%
市 販 品 M	0.445	0.3035	96.5 "
" F	0.520	0.3545	112.7 "
" H	0.430	0.2932	93.2 "
" F.J.	0.460	0.3136	99.7 "
" O	0.400	0.2727	86.7 "

※ この理論数は0.3146 mg で、その吸光度は0.461 (呈色1時間後)である、これを理論含量100%とする。

V) 上記各法の実施結果の考察 I) オキシソ法は約2時間で試験が終了し、精度も米局XIV 蓆酸法に対し±1.5%の誤差である。(第1表参照) II) E. T. A. 法は操作極めて簡単で約10分以内で定量できるし、その精度も米局XIV 蓆酸法と同一である(第2表参照)。なおMurexide法よりE. B. T. 法の方が反応終了点がはつきり認められ、経済的でもある。III) ヘキシル法の長所としては、リンゲル液10cc中Na⁺500mg以下ならばNa⁺, Ca⁺⁺が共存してもK⁺の定量ができるし、操作も比較的簡単で短時間に定量できる(5検体を約7時間で終了)。その短所としては、測定温度により生ずる誤差、滴定誤差、測定溶液の濃度の相違により生ずる誤差など種々の誤差を生ずるから相対誤差を0.5%にするためにはKとして60~120mgを含む検液を必要とする。IV) 硫シアン化アンモニウムアセトン溶液による比色法は比較的簡単で短時間(5時間)で終了し誤差も少い(第4表参照)、但し硫シアン化アンモニウム試液が光に不安定であるという欠点がある、なお本試薬はリンゲル液の場合硫酸銅標準液では呈色する色調が異なるのでその代りに硫酸カリウム標準液を使つた。

総 括

I リンゲル液中に共存する各成分の定性試験法を提案した。即ちKの沈澱試薬として亜硝酸コバルトナトリウム試液を, Naの沈澱試薬としては酢酸ウラニルニッケル試液を又Caの沈澱試薬としてはオキシン試液を使用する。

II リンゲル液各成分の定量法としては米局XIVの各成分の定量法及びオキシン法によるCaの定量法(容量法), E. T. A. 法によるCaの定量法(容量法), ヘキシル法によるKの定量法(容量法), 比色法によるKの定量法を検討した。その結果塩化物の定量法としてはMohr法を, Caの定量法としてはEthylenediamine Tetraacetic Acid Disodium Saltを用い, Eriochrome Black Tを指示薬とする方法を, Kの定量法としては硫シアン化アンモニウムアセトン溶液による比色法を推奨する。

文 献

- 1) A. Streng: Chem. Zentrbl., 17, 488 (1886).
- 2) B. S. Tsyvina Zavodekaya. Lab., 15, 139~42 (1949); C. A., 43, 5333 (1949).
- 3) 加藤多喜雄: 日化, 56, 373 (1935).
- 4) Feldstein, Ward: Analyst, 56, 215 (1931); 重松・木村: 日化, 73, 117 (1952); B. S. Tsyvira Z. avodekaya Lab., 15, 134~42 (1949); 重松・木村: 日化, 73, 2, 120 (1952).
- 5) L. L. Konink: Z. anal. Chem., 20, 390 (1881).
- 6) A. W. Clark and C. O. Willitits: Ind. and Eng. Chem., 83, 209 (1936).
- 7) 斯波之茂: 東京工試報告, 27, 7~8号 (昭和7年).
- 8) Bennett and Hartwood: Analyst, 60, 677 (1935); Brown et al: Ind. Eng. chem., Anal., 12, 177 (1940).
- 9) Schwarzenbach, Biedermann and Bangenter: Helv. Chim. Acta., 26, 811 (1946).
- 10) R. L. Stephens: The Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5, 10 (1953), 709.
- 11) International pharmacopoeia 3 Feb. 1953. Appendix.
- 12) 佐藤省三: 日化, 72, 451~492 (1951); 73, 2 (1952).
- 13) R. S. Young and A. J. Hall: Ind. and Eng. Chem. Anal., Ed., 18, 264 (1946).

Summary

We studied on the tests of Na, K and Ca in Ringer's Solution in J. P. VI, and obtained the following results:

(1) Identification As we could not adopted methods of general tests in J. P. VI for identification of K, Na and Ca, we recommended to adopt Sodium cobaltnitrite T. S. for the precipitating agent of K, nickel uranyl acetate T. S. for the precipitating agent of Na and oxine T. S. for the precipitating agent of Ca.

(2) Assay We assayed Ca by the oxalic method and K by the Cerimetry according to the methods for Ringer's Solution in U. S. P. XIV, and compared them with other methods, that is, the E. T. A. method (Ethylenediamine Tetraacetic acid Disodium salt) and the oxine method for Ca the hexylmethod, and the Colorimetry for K. We found that the procedures with the E. T. A. method for Ca and the colorimetry for K were simpler and more rapid than other methods, and errors were less than these in other methods. From above results, we recommended to adopt the E. T. A. method for Ca and the colorimetry for K.

We assayed Na by the method of Ringer's Solution in U. S. P. XIV, and also we have studied on direct determination of Na.

Received April 1, 1954

非水溶液滴定による医薬品の定量 (第3報) 氷酢酸を溶媒とする

カルボン酸ナトリウム塩類の滴定*

鹿島 哲, 加納 宏一郎**

Titration in Nonaqueous Solutions of Drugs and Chemicals.

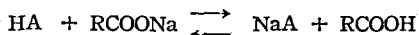
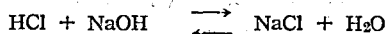
II. Determination of Sodium Salts of Carboxylic Acids
in Anhydrous Acetic Acid

By Tetsu KASHIMA and Koichirō KANO

まえがき 水に不溶または難溶性の物質を滴定するためにアルコールなどを加えて溶解して行なう方法は古くから用いられ³⁾, また非常に弱い酸及び塩基を滴定するために塩基性, 酸性または中性溶媒が使われている。1910年 Folin 及び Wentworth¹⁵⁾ は脂肪酸をベンゼンに溶かしナトリウムエチレイトで滴定したが, これが非水溶液滴定の始めであろう。1927~30年 Hall, Conant 及び Werner はクロルアニル電極を用いて弱塩基の滴定を行い¹⁸⁾²⁰⁾ また氷酢酸中における酸塩基性について検討している⁷⁾⁸⁾¹⁸⁾¹⁹⁾, 一方酸塩基の理論も水溶液に関する Arrhenius の説から, すべての溶液における Franklin-Germann の説を経て, Brönsted-Lowry のプロトン説へと発展し, それと共に Lewis の電子説に基づく説明²⁵⁾ が用いられている。1950年 Bjerrum⁴⁾ は Brönsted と Lewis の理論をより良く統合して, プロトン収受体または電子対供与体である塩基 (ba) とプロトン供与体である酸 (baH⁺) [H-acid] 並びに塩基収受体または電子対収受体である反塩基 (an) [L-acid] とに分類して酸塩基を統一して定義している。この酸塩基の理論の発展と実際の経験から各種の溶媒が多くの物質の滴定に用いられ, 非水溶液中の反応機構の研究とあいまつて非水溶液滴定は1950年前後より急に盛んになり Fritz, Markunas, Pifer 及び Tomiček らにより多くの発展をなし, *Analytical Chemistry* の1月号の綜説³⁰⁾に現われるまで盛んになった。またこれは今まで難かしかった有機性医薬品の定量に簡便正確な方法なのでその方面の研究も多い²⁸⁾。

弱塩基の滴定にはもつぱら氷酢酸が用いられ, それ以外の酸性溶媒としては透電恒数が大なため溶解度の大きく酸性のより強い義酸が使われる³³⁾ だけであり, 中性溶媒としては *o*-ジオキサン¹⁶⁾²⁹⁾ を初めとしてアセトニトリル¹⁷⁾, クロロホルム, アルコール類などが用いられている。著者の一人は氷酢酸を溶媒として弱塩基を滴定する方法が局方試験法に適するか否かを検討し, 溶性バルビタール類及び溶性サッカリン²²⁾ 及びアンチピリン類の滴定²³⁾ について報告したが, 今回はカルボン酸ナトリウム塩類について良い成績が得られたので報告する。

非水溶液滴定の理論 水溶液中での中和反応においては酸と塩基が交換反応を起して塩と溶媒である水を生ずる。一方氷酢酸中で有機酸塩に, 氷酢酸中でも強酸性を呈する酸を加えると塩と有機酸を生ずる。この特殊の場合として酢酸塩を滴定すると塩と溶媒である酢酸を生ずるから水溶液の場合と全く同じ様に考えられる。

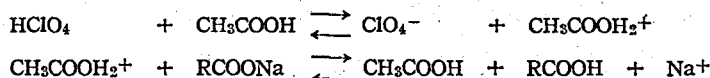


一般的に説明すると透電恒数 (ϵ) の小さい溶媒中では, 陰陽両イオン間の引力 (f) は $f = \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{e^2}{r^2}$ で表わされるから酸及び塩基はその強さを減少し⁸⁾²⁴⁾, その上酸性溶媒中では弱酸はプロトンを生ずる力がなくなる, つまり滴定の結果生じたカルボン酸は氷酢酸中では酸性を示さぬから水溶液の場合と同じように中和反応を起し, 中和点を過ぎて過塩素酸を加えると酢酸陽イオン ($\text{CH}_3\text{COOH}_2^+$) が急に増加し起電力が増す。また酢酸がプロトンをとつて酢酸陽イオンとなる力は水がプロトンをとつてヒドロニウムイオン (OH_3^+) となる傾向より非常に弱いので, 水溶液中では水にプロトンを奪われるような弱塩基も氷酢酸中では溶媒分解を起すことなく定量的にプロトンをとることができるから精度よく滴定できる。つまり強塩基と弱酸の塩は酸性または中性溶媒で塩基とし

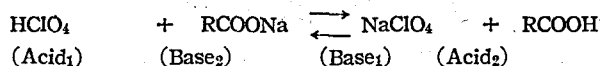
* 日本薬学会年会 (昭和29年4月5日) 講演

** 研究生, 興和化学研究所 (東京都杉並区下高井戸)

て、強酸と弱塩基の塩は塩基性または中性溶媒で酸として滴定されるわけである。



故に



実験材料 氷酢酸、特級の氷酢酸に十分着色するまで過マンガン酸カリウムまたは無水クロム酸を加えて蒸留し、ついで無水酢酸を加えて再蒸留し117~118°の留分を用いる¹⁴⁾³⁶⁾。蒸留装置は共通スリ合せのものを用い、塩化カルシウムで防湿して操作する。

無水酢酸、特級品を蒸留し136~139°の留分を用いる。

過塩素酸、70%水溶液の特級品をそのまま用いた。72.4% (重量) が1気圧で203°の定沸点を示し、減圧蒸留により精製する³²⁾。

フタル酸水素カリウム、National Bureau of Standards (U. S. A.) の標準品を粉末にし105°で4時間以上乾燥したものを標準物質として用いた²⁾。Merck の緩衝液用も用いられる。

0.1 N 過塩素酸標準液、氷酢酸 800cc をとり氷水で冷し 30° 以下になるようにかきまぜながら過塩素酸 8.5cc を少しずつ加え、それに脱水に必要な量の無水酢酸 10~25cc を加え、氷酢酸で 1 l とし 1 昼夜以上放置する。標定にはフタル酸水素カリウム約 0.5g を用いる。

義酸ナトリウム、白色粉末を 105° で 4 時間以上乾燥。

酢酸ナトリウム、3 水化物の 1 級品を 120° で 4 時間以上乾燥して無水物とする。

プロピオン酸ナトリウム、白色針状晶を 105° で 4 時間以上乾燥。

クエン酸ナトリウム、1 級品を 150° で 12 時間以上乾燥。

安息香酸ナトリウム、局方品を 110° で 4 時間以上乾燥。

サルチル酸ナトリウム、局方品を 105° で 4 時間以上乾燥。

パラアミノサルチル酸ナトリウム、注射用の針状晶を 110° で 2 時間以上乾燥。

実験方法 粉末とし良く乾燥した検体 0.2~0.5g を精密に秤り Karl Fischer 滴定装置の滴定 フラスコに入れ、ビュレットから氷酢酸 25cc を加えよくかきまぜて溶かし 0.1N の検液をつくる。その液をかきまぜながら 0.1N 過塩素酸標準液を徐々に滴加して滴定する。電位差滴定をする場合には Beckman pH 計 G 型に pH (-1) まで測れる Type "42" の電極と "Fiber" 型の甘汞半電池を組合せて用いた。指示薬による場合にはグリスタルバイオレット、マラカイトグリーン、メチルバイオレット及び中性赤の 0.5% 氷酢酸溶液を検液に 2~3 滴加えて滴定した。滴定は 22±2° で行い、測定中の温度変化は 0.5° 以内に止め、標準液の温度変化は氷酢酸の膨脹係数 (1.07×10⁻³, 20°) をもって補正した。

実験結果 滴定の成績は Table I に示す如く非常に良い結果と再現性を有し、その測定精度も電位差滴定によると 0.03~0.06% であった。また Table II でわかる通りグリスタルバイオレット、アラカイトグリーン及びメチルバイオレットを指示薬としても 0.1% 程度の精度で測定できる。なお滴定曲線は Fig. 1 に示す通りである。

Table I. Determination of Sodium Salts of Carboxylic Acids in Anhydrous Acetic Acid with 0.1N HClO₄

Sodium Carboxylate	Taken (g)	Found (g)	Accuracy (%)
Sodium Formate HCOONa	0.2208	0.2209	100.05
	0.2088	0.2088	100.0
	0.1822	0.1820	99.9
Sodium Acetate CH ₃ COONa. 3H ₂ O	0.3429	0.3431	100.05
	0.2576	0.2574	99.9
	0.2273	0.2271	99.9

Sodium Propionate	0.2400	0.2383	99.25	
C_2H_5COONa	0.1780	0.1763	99.05	0.04
	0.1131	0.1128	99.7	
Sodium Citrate	0.2534	0.2534	100.0	
$HO \cdot C_3H_4 (COONa)_3 \cdot 2H_2O$	0.2233	0.2231	99.9	0.04
	0.2151	0.2145	99.7	
Sodium Benzoate	0.3569	0.3566	99.9	
C_6H_5COONa	0.3500	0.3496	99.9	0.05
	0.3062	0.3062	100.0	
Sodium Salicylate	0.4327	0.4312	99.65	
$HO \cdot C_6H_4COONa$	0.3910	0.3907	99.9	0.03
	0.3760	0.3747	99.65	
Sodium <i>p</i> -Aminosalicylate	0.5307	0.5269	99.3	
$HO \cdot C_6H_3(NH_2)COONa \cdot 2H_2O$	0.4842	0.4809	99.3	0.06
	0.4377	0.4340	99.15	

Accuracy = $\frac{\text{Volume of 0.1N HClO}_4 \text{ causing the difference of E. M. F. of 5mV}}{\text{Total volume of 0.1N HClO}_4}$

At the end point.

Table I. Color Changes of the Indicators in Anhydrous Acetic Acid at the End Point

Sodium Carboxylate	Crystal Violet	Malachite Green	Methyl Violet	pH at 25°, 0.5M
Sodium Formate	B. → G. excellent	G. → Y.-G. good	G. → Y. good	7.3
Sodium Acetate	B. → G. excellent	G. → Y.-G. good	G. → Y. good	8.6
Sodium Propionate	B. → G. excellent	G. → Y.-G. good	G. → Y. good	8.1
Sodium Citrate	B. → G. excellent	G. → Y.-G. good	G. → Y. good	7.7
Sodium Benzoate	B. → G. good	G.B. → G. fair	G.B. → G. fair	6.8
Sodium Salicylate	B. → G. excellent	G. → Y.-G. good	G. → Y. fair	6.2
Sodium <i>p</i> -Aminosalicylate	B. → G. good	G.B. → G. fair	G.B. → G. fair	7.9

B. : Blue, G. : Green, Y. : Yellow.

"B. → G." : means that the blue color of the solution changes into green, through bluish green (B.-G.), at the end point of the titration.

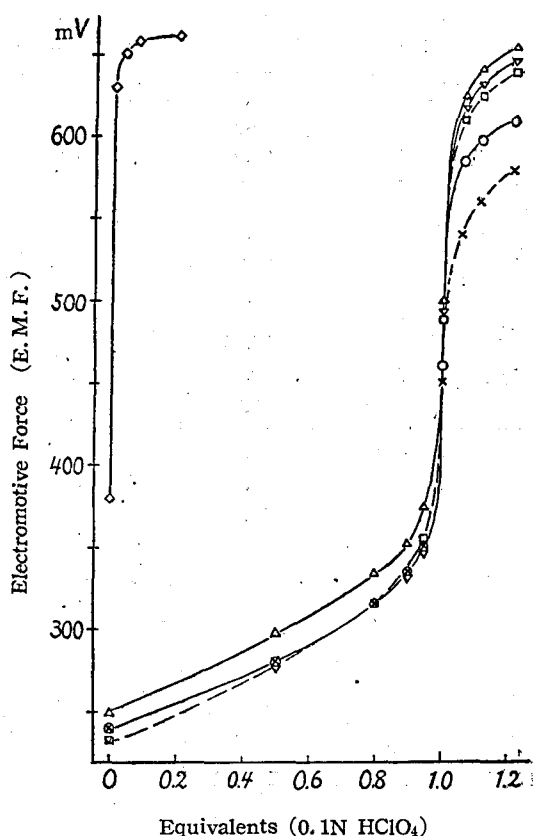


Fig 1. Potentiometric Titration Curves of Sodium Salts of Carboxylic Acids (0.1N Solution) in Anhydrous Acetic Acid with 0.1N HClO_4 at $22 \pm 2^\circ$ (Glass-Calomel Electrode)

- ◇— Blank
- Sodium Formate, Acetate and Propionate
- Sodium Benzoate
- △— Sodium Citrate
- ▽— Sodium Salicylate
- ×— Sodium *p*-Aminosalicylate

考 察 酢酸の水溶液における解離恒数は $K = [\text{H}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-] = 1.86 \times 10^{-5}$ であるが、酢酸の自己解離恒数は¹⁾¹⁰⁾ $K' = (\text{H} + \text{CH}_3\text{COOH})[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 2.5 \times 10^{-13}$ であるから、氷酢酸に溶けている物質の性質及び状態は、水溶液中のそれと比較して溶解度⁹⁾¹²⁾¹³⁾や溶媒¹¹⁾の変化からその酸塩基性ばかりでなく反応性などの性質が異なると考えられる¹⁰⁾。また氷酢酸中で水にプロトンを奪われるような弱塩基を滴定するのであるから、溶媒の脱水は完全であることが望ましく、通常1~1.5%までの水分は滴定精度に影響がないと報告²⁾²⁶⁾されているが、氷酢酸自体に電導性があるから0.1~0.5%まで脱水するか、検体が

アセチル化されぬときは無水酢酸を加えて滴定した方が好結果が得られた。

非水溶液滴定では滴定値が1%程度であるが過量に求められた報告⁶⁾²⁶⁾がかなりある。溶媒のブランクはFig. 1に示す通りその精製が十分であれば1~3滴に過ぎないが、精製が不十分であつたり水分が多いと過塩素酸を0.1~0.2cc消費することがあつた²⁶⁾³¹⁾。氷酢酸の透電恒数(6.4)が小さいため反応が遅れ、粘性が大であることとあいまって滴定に遅れを生じ易いが、30分もかけて徐々に滴定すればよい。また水に比較して溶液の膨脹係数が大であるが重量法によらずとも、氷酢酸の膨脹係数で温度補正をすれば十分である²⁾。検体が2箇処以上の塩基性の部分を有するとき、クエン酸ナトリウムのごとくそれらが皆同時に滴定される場合はよいが、塩基性の強い処だけとか、そこが先に滴定されるとき他の塩基性の部分が解離したり、分解すると過量に滴定されることになる。また検体にそれ自体より分子量の小さい不純物²²⁾²³⁾、カルボン酸ナトリウムのときは炭酸ナトリウムなどが混入していると同時に滴定される²¹⁾²⁷⁾。この場合検体の水溶液の水素イオン濃度は純品の場合より高くかつ安定に求められる。

電位差滴定において滴定曲線の彎曲点を滴定の終点としたが、ガラス-甘汞電極では過塩素酸が過量になるとその量ばかりでなくイオン活量も起電力と比例しないから正確には中和点はわからぬが、その誤差は最大0.2%であつた。そのため Pifer ら²⁾²⁶⁾は起電力の変化が最大な点を終点とする示差滴定を行っている。指示薬³⁵⁾による場合には明瞭な色調の変化を示すものを用いれば良いのであるが、この滴定ではpH0附近に終点があるため適当な指示薬は見出し難い。しかしカルボン酸ナトリウムの塩基性は比較的強いので中和点附近では0.1ccで100mV近く起電力が変化するから crystal violet, malachite green 及び methyl violet を用いて0.1~0.2%の精度で滴定できた。検体の中和点における起電力またはその成分によって指示薬に色調の変化があるから使い分けると一層良い成績が得られた (Table I)。指示薬が酸塩基を消費する量は0.1Nで滴定するときは問題にならなかつたが、0.01Nで滴定することは指示薬によつては困難である²⁹⁾。

滴定精度は電位差滴定においては中和点における電位差の変化 5 mV を起させるに要する過塩素酸標準液の量を中和に要した標準液の量で割った値で表わした。これは終点において滴定曲線の彎曲点において切線を引き、その切線の垂直軸に対する傾きを近似的に表わそうとしたものであり、5 mV というのは Beckman pH 計の感度 (2 mV) 以内であり、滴定曲線はその範囲内で十分再現性があつたからである。非常に酸性の処で滴定が行われるから用いるガラス電極は Mac Innes のガラスでは具合が悪いので pH (-1) まで測定できる Beckman の Type "42" の電極を用いた。甘汞電極は塩化カリウムの電橋の部分が汚れると拡散電位差が生じ起電力が低下したり不安定になる。用いる甘汞電極はその電橋の部分が汚れ難い "Fiber" 型が都合が良く、汚れた時は電極を蒸留水に浸せば塩橋の部分を洗うことができるから再現性よく起電力が求められた。また検液をかきまぜながら測定するときと静止の状態での測定するときとは起電力に 10 数 mV の差を生ずることがあつたので、静止の状態での測定を行つた³¹⁾。

透電恒数の小さい氷酢酸中では酸塩基の強さが総体に弱くなるから、検液の濃度が低くなくてもその強さは強酸強塩基の理論値の半分程度¹⁸⁾²⁰⁾であるので 0.1N よりむしろ 0.05~0.02N で滴定を行つた方が、一般に氷酢酸中では有機物の溶解度が低いから便利である。それ以下では検体の秤量誤差の方が問題となる。氷酢酸中の酸標準液としては実用上一番強い酸である過塩素酸³⁴⁾が広く用いられているが²⁾、標準液を造るとき溶媒に不純物が含まれていたり、冷却しないで過塩素酸を急激に加えると溶液は着色し滴定結果が悪くなる。標準物質にはフタル酸水素カリウム³¹⁾の標準品を用いたが、ジフェニルグアニジン²⁸⁾を用いている例もある。

検体は純品に近いほど望ましく、粉末にして十分乾燥し結晶水も皆脱つた方が結果がよい。滴定は Karl Fischer の滴定装置を利用し塩化カルシウムで防湿して滴定を行つたが、局方試験法としては塩化カルシウム管をつけたビュレットを用い滴定フラスコは綿栓しただけで十分であろう。結局氷酢酸の膨脹係数が大であるから 0.05% 以上の精度を望むことは重量法によらない限り不可能である。

溶媒の水平効果により羧酸、酢酸及びプロピオン酸のナトリウム塩はほとんど同じ滴定曲線を示し、安息香酸及びサルチル酸のナトリウム塩もそれらと大差がなかつた。クエン酸ナトリウムはその 3 個のナトリウムが同時に滴定されるため他のものより塩基性が弱く表われたのであろう。パラアミノサルチル酸ナトリウムは氷酢酸と四塩化炭素の混合溶媒で滴定すると好結果が得られると報告されている⁶⁾が氷酢酸のみでも十分滴定できる。しかし脂肪族第 2 級アミンであるアミノ基を有するから無水酢酸が存在するとアセチル化が起り滴定困難となる⁵⁾。なおそのアミノ基の塩基性は弱く滴定され難かつた。

総 括

1. 非水溶液滴定の発展の過程とその理論及び実験方法並びにこの方法の得失を氷酢酸を溶媒としカルボン酸ナトリウム塩を定量する場合を例にして述べた。この方法では滴定結果が最大 1% であるが過量に求められる例があるが、それは溶媒中の水分及びその他の不純物、検体中に含まれる分子量の小さい不純物や反応の遅れ及び試料の解離、分解などが原因となるものと思われる。

2. 氷酢酸を溶媒として過塩素酸で羧酸、酢酸、プロピオン酸、クエン酸、安息香酸、サルチル酸及びパラアミノサルチル酸のナトリウム塩を滴定した処 0.03~0.06% の精度で定量できた。電位差滴定にはガラス-甘汞電極を用いた。指示薬にクリスタルバイオレット、マラカイトグリーン及びメルチルバイオレットを用いた処 0.1~0.2% の精度で滴定できた。滴定曲線は溶媒の水平効果により皆類似していたが、クエン酸ナトリウムだけはその有する 3 個のナトリウムが同時に滴定されるため塩基性が他のものより弱かつた。またパラアミノサルチル酸ナトリウムだけは無水酢酸が存在するとアセチル化されて滴定が困難になつた。この定量法は局方試験法として適当である。

文 献

- 1) Audrieth, L. F. and Kleinberg, J. : "Non-Aqueous Solvents, Application as Media for Chemical Reactions", 1953, pp. 284, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 2) Beckett, A. H., Camp, R. M. and Martin, H. W. : J. Pharm. Pharmacology, 4, 399~407 (1952).
- 3) Bishop, E. R., Kittredge, E. B. and

- Hilderbrand, J. H. : J. Am. Chem. Soc., 44, 135~140 (1922). 4) Bjerrum, J. : Fisisk Tidsskrift, 48, 1 (1950); Naturwissenschaften, 38, 461 (1951); 化学の領域, 7, 281~5 (1953). 5) Blumrich, K. C. und Bandel, G. : Angew. chem., 54, 374~5 (1941); C. A., 36, 5730¹ (1942). 6) Butler, A. Q. and Ramsey, J. C. : J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 42, 338~9 (1953). 7) Conant, J. B. and Hall, N. F. : J. Am. Chem. Soc., 49, 3062~3070 (1927). 8) Conant, J. B. and Werner, T. H. : J. Am. Chem. Soc., 52, 4436~4450 (1930). 9) Davidson, A. W. : J. Am. Chem. Soc., 50, 1890~5 (1928). 10) Davidson, A. W. : Chem. Revs., 8, 175~190 (1931). 11) Davidson, A. W. and Chappell, W. : 55, 3531~7 (1933). 12) Davidson, A. W. and Geer, H. A. : J. Am. Chem. Soc., 55, 642~9 (1933); 60, 1211~4 (1938). 13) Davidson, A. W. and McAllister, W. H. : J. Am. Chem. Soc., 52, 507~9 (1930). 14) Eichelberger, W. C. and La Mer, V. K. : J. Am. Chem. Soc., 55, 3633~4 (1933). 15) Folin, O. and Wentworth, A. H. : J. Biol. Chem., 7, 421~6 (1910); J. Chem. Soc., Abstr. II, 757~8 (1910). 16) Fritz, J. S. : Anal. Chem., 22, 578~9 (1950). 17) Fritz, J. S. : Anal. chem., 25, 407~411 (1953). 18) Hall, N. F. : Chem. Revs., 8, 191~212 (1931). 19) Hall, N. F. and Conant, J. B. : J. Am. Chem. Soc., 49, 3047~3061 (1927). 20) Hall, N. F. and Werner, T. H. : J. Am. Chem. Soc., 50, 2367~2386 (1928). 21) Higuchi, T. and Concha, T. : J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 40, 173 (1951). 22) 鹿島 哲 : 薬誌, 74, 101~4 (1954). 23) 鹿島 哲 : 薬誌, 74, 463~6 (1954). 24) Kolthoff, I. M. and Willman, A. : J. Am. Chem. Soc., 56, 1007~13, 1014~6 (1934). 25) Luder, W. F. and Zuffanti, S. : "The Electronic Theory of Acids and Bases", 1946, pp. 165, John Wiley & Sons, Inc., New York. 26) Pifer, C. W. and Wollish, E. G. : Anal. Chem., 24, 300~6 (1952). 27) Pifer, C. W. and Wollish, E. G. : Anal. Chem., 24, 519~520 (1952). 28) Pifer, C. W., Wollish, E. G. and Schmall, M. : J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 42, 509~521 (1953). 29) Pifer, C. W., Wollish, E. G. and Schmall, M. : Anal. Chem., 25, 310~4 (1953). 30) Riddick, J. A. : Anal. Chem., 26, 77~84 (1954). 31) Seaman, W. and Allen, E. : Anal. Chem., 23, 592~4 (1951). 32) 柴田雄次編 : "無機化学全書Ⅱ", 昭20, p. 168~175, 丸善, 東京. 33) Shkodin, A. M., Izmailov, N. A. and Dzyba, N. P. : Zhur Obshe! Khim., 23, 27~32 (1953); C. A., 47, 6742c (1953). 34) Smith, T. L. and Elliott, J. H. : J. Am. Chem. Soc., 75, 3566~3571 (1953). 35) Tomiček, O. (Translated by A. R. Weir) : "Chemical Indicator", 1951, pp. 258, Butterworth Scientific Publications, London. 36) Weissberger, A. and Proskauer, E. : "Organic Solvents, Physical Constants and Methods of Purification", 1935, p. 146~8, Oxford.

Summary

At the nonaqueous titration, it is noticeable that the values obtained are seemed a little larger than the real ones. It is because that the using solvent contains water or other impurities, or the sample contains impurities which are smaller molecules than the sample, or it is dissociated or decomposed, and or the delay of the neutralization in organic solvents.

In anhydrous acetic acid, sodium salts of formic, acetic, citric, benzoic, salicylic and *p*-aminosalicylic acids can be determined with accuracies between 0.03 and 0.06 per cent potentiometrically (Glass-calomel electrode). Using crystal violet, malachite green and methyl violet as indicators, these samples can accurately be titrated also. By the leveling effect of the solvent, the titration curves of the sodium salts of carboxylic acids are similar each other in anhydrous acetic acid, but the salt of citric acid is the weakest base because it has three sodium molecules and they are all titrated at the same end point. The salt of *p*-aminosalicylic acid is acetylated with acetic anhydride, so the using solvent should not contain it.

Received April 14, 1954

非水溶液滴定による医薬品の定量（第4報）

氷酢酸を溶媒とするピリジンカルボン酸とそのアミド及び

イソニコチン酸ヒドラジドの滴定*

鹿 島 哲

Titration in Nonaqueous Solutions of Drugs and Chemicals. IV.

Determination of Pyridinecarboxylic Acids, Their Amides

and Isonicotinic Acid Hydrazide in Anhydrous Acetic Acid

By Tetsu KASHIMA

まえがき 有機塩基の塩基性はその窒素の不共有電子対がプロトンをとつて配位結合をつくろうとする傾向の力によるものであるが、それは水溶液中では表われ難いが酸性溶媒である氷酢酸中では酢酸のプロトンをとる力が弱いので、水溶液中での解離恒数が 10^{-12} という弱塩基も、氷酢酸中でも強酸性を示す酸、過塩素酸で正確に滴定できるのである。⁶⁾⁷⁾

今回はピリジンカルボン酸類とそのアミド及びイソニコチン酸ヒドラジドについて得られた結果を報告する（ピコリン酸類については試料が得られなかつた）。

実験材料 氷酢酸、無氷酢酸、過塩素酸、フタル酸水素カリウム及び過塩素酸標準液については第3報⁷⁾を参照されたい。

ニコチン酸、標準品用として製造したものを 105° で1時間以上乾燥。

ニコチン酸アミド、標準品用として製造したものを硫酸デシケータで4時間以上乾燥。

イソニコチン酸、 105° で1時間以上乾燥。

イソニコチン酸アミド、硫酸デシケータで4時間以上乾燥。

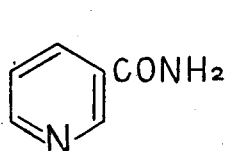
イソニコチン酸ヒドラジド、検定合格品で柱状結晶の品を硫酸デシケータで4時間以上乾燥。

ピリジン、特級品をそのまま用いた。

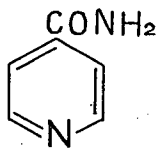
これらのピリジンカルボン酸類の大部分は有機合成工業株式会社より分与されたものである。

実験方法 第3報⁷⁾に述べた方法で行つたが、用いた試料が氷酢酸に溶け難かつたので滴定フラスコに入れたまま外部より熱湯で加温し10分以上かきまぜてよく溶かし、室温に近くなるまで放置してから滴定した。これらの試料の滴定では脱水のための無氷酢酸を氷酢酸に加えてはならない。

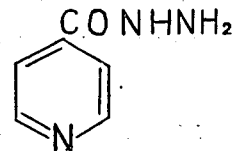
実験結果 滴定の成績はTable Iの如く再現性よく、また滴定精度も酸類は0.07%，アミド類は0.03%，イソニコチン酸ヒドラジドは0.06%程度の良好さであつた。指示薬による滴定もTable IIのように可能である。滴定曲線はFig 1に示した。



Nicotinamide



Isonicotinamide



Isonicotinic Acid Hydrazide

* 日本薬学会年会（昭和29年4月5日）講演

Table I. Determination of Pyridinecarboxylic Acids and Their Amides in Anhydrous Acetic Acid with 0.1N HClO₄

Organic Bases	Taken (g)	Found (g)	Found (%)	Accuracy (%)
Nicotinic Acid	0.3214	0.3213	100.0	0.07
	0.3118	0.3114	99.9	
	0.3072	0.3068	99.85	
Nicotinamide	0.3656	0.3663	100.2	0.03
	0.3332	0.3338	100.2	
	0.3032	0.3038	100.2	
Isonicotinic Acid	0.3077	0.3056	99.3	0.07
	0.2737	0.2705	98.85	
	0.2215	0.2190	98.85	
Isonicotinamide	0.3351	0.3340	99.65	0.03
	0.2973	0.2961	99.6	
	0.2605	0.2597	99.7	
Isonicotinic Acid Hydrazide	0.4956	0.4941	99.7	0.06
	0.4550	0.4543	99.85	
	0.3114	0.3112	99.9	
Pyridine	0.3057	0.3001	98.15	0.02
	0.2720	0.2681	98.55	
	0.2095	0.2072	98.9	

Accuracy = $\frac{\text{Volume of 0.1N HClO}_4 \text{ causing the difference of E.M.F. of 5mV}}{\text{Total volume of 0.1N HClO}_4}$ At the end point.

Table II. Color Changes of the Indicators in Anhydrous Acetic Acid at the End Point

Organic Bases	Crystal Violet	Malachite Green	Methyl Violet	Neutral Red
Nicotinic Acid	G. → G. Y.	G. → G. Y.	G. → G. Y.	P. → V.
	fair	fair	fair	poor
Nicotinamide	G. → Y.	G. → Y.	B. → G.	P. → R. V.
	good	good	good	poor
Isonicotinic Acid	G. B. → G.	G. → G. Y.	G. → G. Y.	P. → R. V.
	fair	poor	poor	bad
Isonicotinamide	B. → G.	B. → G.	B. → G.	P. → R. V.
	good	good	good	poor
Isonicotinic Acid Hydrazide	G. → Y.-G.	G. → Y.-G.	G. → G.-Y.	P. → R. V.
	fair	fair	fair	bad
Pyridine	V. → B.	B. → G.	B. → G.	P. → R.
	excellent	excellent	excellent	poor

B : Blue, G.:Green, P.: Purple, R.: Red, V.: Violet, Y. : Yellow. "G.→Y." means that the green color of the solution changes into yellow through greenish yellow (G.-Y.), at the end point of the titration.

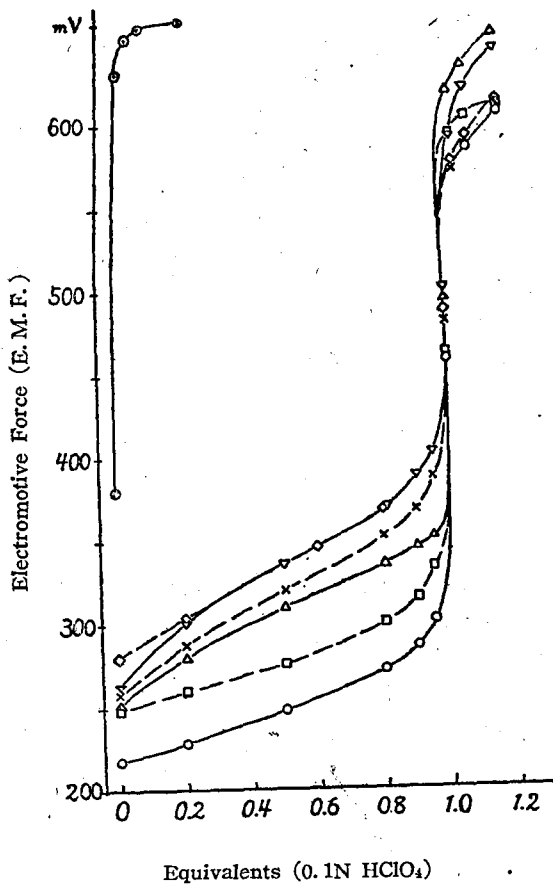


Fig 1. Potentiometric Titration curves of Organic Bases (0.1 N Solution) in Anhydrous Acetic Acid with 0.1 N HClO_4 at $22 \pm 2^\circ$ (Glass-Calomel Electrode)

—○— Blank
 —▽— Nicotinic Acid
 —△— Nicotinamide
 —◇— Isonicotinic Acid
 —□— Isonicotinamide
 —×— Isonicotinic Acid Hydrazide
 —○— Pyridine

考 察 アセチル化されるおそれのない試料を滴定するときは氷酢酸中の水分を除いて滴定精度を上げるために、計算量または1%以内で過量の無水酢酸を加えて滴定する方が便利でもあるし好結果が得られるが³⁾、ピリジンカルボン酸類を滴定するためには微量の無水酢酸の存在によつてもアセチル化されるため反つて滴定精度を低め、終点を不明瞭にするから注意しなければならない。その上水分も触媒作用するためできるだけ少い方がよいから、溶媒の精製には注意を要し、空試験のとき過塩素酸標準液1滴を加えただけで中和点を越えたものを用いる必要がある。またピリジンカルボン酸類は一般に氷酢酸にやや難溶であるので0.02 N 溶液で滴定を行つた方がよい。

滴定曲線から氷酢酸中では酸アミドはその酸より塩基性が強く、特にイソニコチン酸アミドは一番塩基性が強かつたが、それでもピリジンには及ばないと言える。滴定によつて生成される物質の溶解度や電導度などの関係により、ニコチン酸とそのアミド及びイソニコチン酸とそのアミド並びにピリジンの、当量点に到るまでの中和曲線の形がそれぞれ互に類似していた。いずれも環状窒素の塩基性のみにより滴定された。

ピリジンカルボン酸類の滴定精度はアミド類の滴定精度より倍以上悪かつた。ニコチン酸アミドが100%を越えたのはそのアミノ基または検体の分解などによるものと思われる。イソニコチン酸ヒドラジドは氷酢酸中でいろいろと滴定されている⁴⁾⁵⁾が、検体をジメチルアニリンに溶解してナトリウムメチレイトを用いてチモールブルーを指示薬として酸の部分を滴定した報告²⁾もある。

総 括

1. 氷酢酸を溶媒としてピリジンカルボン酸とそのアミドなどを0.1 N 溶液で0.1 N 過塩素酸標準液で滴定を行つたところ、その環状窒素の塩基性により、ニコチン酸とイソニコチン酸は0.07%、それらの酸アミドは酸より精度よく0.03%、イソニコチン酸ヒドラジドは0.06%、ピリジンは0.02%程度の精度で滴定できた。

電位差滴定にはガラス-甘汞電極を用い、指示薬としてクリスタルバイオレット、マラカイトグリーン及びメチルバイオレットを用いて正確に定量することができた。ただこれらの試料が氷酢酸に溶け難いことは欠点である。

2. 氷酢酸中ではニコチン酸及びイソニコチン酸のアミドはそれらの酸より塩基性が強く現われ、それよりピリジンは更に強かつた。終点到るまでの滴定曲線は滴定によつて生ずる溶解度及び電導度などの変化によりニコチ

ン酸とそのアミド及びイソニコチン酸とそのアミドはそれぞれ互に類似していた。

御援助を受けた興和化学研究所並びに有機合成工業株式会社に謝意を表する。

文 献

- 1) Alicino, J. F. : J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 41, 401~2 (1951); C. A., 46, 9786 i (1952).
- 2) Anastasi, A., Mecarelli, E. and Novacic, L. : Mikrochemi ver. Mikrochim., Acta, 40, 53~59 (1952); C. A., 47, 8317h (1953).
- 3) Beckett, A. H., Camp, R. M., and Martin, H. W. : J. Pharm. Pharmacology, 4, 399~407 (1952).
- 4) Kahane, E. : Bull. soc. chim. France, 1951, 92~94; C. A., 45, 6126h (1951).
- 5) Kahane, E. and Sachur, O. : Ann. pharm. franç., 11, 175~182 (1953); C. A., 47, 7375d (1953).
- 6) 鹿島 哲 : 薬誌, 74, 101~4, (1954).
- 7) 鹿島 哲, 加納宏一郎 : 本誌, 72, 145~150 (1954).

Summary

Nicotinic acid, nicotinamide, isonicotinic acid, isonicotinamide, isonicotinic acid hydrazide and pyridine can be titrated with 0.1 N perchloric acid by glass-calomel electrode potentiometrically in anhydrous acetic acid. Using crystal violet, malachite green and methyl violet as indicators, these preparations can be also titrated accurately by the basicity of the cyclic amine.

Nicotinic and isonicotinic acid can be determined with the accuracies of about 0.07 per cent; their amides, 0.03 per cent; isonicotinic acid hydrazide, 0.06 per cent and pyridine, 0.02 per cent. Nicotinamide and isonicotinamide are stronger bases than their acids, but pyridine is the strongest in anhydrous acetic acid. The parts of titration curves before the end points of nicotinic acid and its amide are similar each other, and also isonicotinic acid and its amide, too.

These preparations are acetylated with acetic anhydride in anhydrous acetic acid, so acetic anhydride should not be used for dehydration of the solvent, and it must contain water less than 0.5 per cent.

Received April 12, 1954

0.5% γ -B. H. C. 油剤のポーラログラフ定量法 (エタノール法)

藤井 正道, 佐藤 寿, 辻 楠雄, 菅原 実*

Polarographic Assay of 0.5% γ -B. H. C. Spray (Ethanol Method)

By Masamichi FUJII, Hisashi SATO,

Kusuo TSUJI and Minoru SUGAWARA

まえがき 殺虫剤の国際規格として知られている W. H. O 規格には, B. H. C. 油剤の項の記載がない。しかるに我が国では終戦以来確たる基準及び規格の決定をみぬまゝに, B. H. C. 油剤の生産及び使用が続けられ, リンデンの進出に伴い防疫用殺虫剤としての重要さが認識されて来た。従つて昨年厚生省より 0.5% 油剤の許可基準及び試験規格が新たに設定されたことは, 当然であろう。その際 γ -B. H. C. の定量法として記載されたのが, 著者等のポーラログラフ定量法 (エタノール法) である。

γ -B. H. C. のポーラログラフ定量法には, W. H. O 規格の基礎と見なされている Ingram (1948) 以来多数の報告¹⁾もあるが, B. H. C. 油剤中の γ -B. H. C. のポーラログラフ定量法 (エタノール法) は全く見当らない。故に著者等は, 従来の γ -B. H. C. ポーラログラフ定量法 (エタノール法) を改良しつつ, これを直接油剤に応用したところ, はなはだ好成績をおさめたので, ここに報告する。

試験方法及び成績

1. 装置 a. ポーラログラフ (又はポテンシヨメーター) b. 恒温槽 (又は恒温箱) c. 電解瓶
2. 試薬 a. γ -B. H. C. (mp. 112.5°) b. 無水アルコール (還元波を示すアルデヒド除去のため, 無水アルコールに硝酸銀を加えて蒸留したもの) c. ヨウ化カリウム (1:10) d. ゼラチン液 (1:400) e. ケロシン (試薬用)
- f. 窒素 (市販ボンベ詰の窒素をビルガロール及び後述のアルコール中を通して飽和したもの) g. 水銀 (硝酸洗条の上, 更に減圧蒸留したもの)
3. 標準原液 γ -B. H. C. 約 0.5g を精密に秤り, ケロシンを加えて 100cc とし標準原液 (γ -B. H. C 含量 0.5 w/v%) とする。

4. 操作法 検体 2cc を正確に量り 100cc のメスフラスコに入れ, これに無水アルコール 88cc を加えよくふりまぜ, 必要ならば約 40° の水浴上で静かに加温した後, 放冷する。次にヨウ化カリウム液 8cc 及び新たに製したゼラチン液 2cc を加えてふりまぜ更にヨウ化カリウム液を加えて 100cc とし検液とする。

標準原液 2cc をとり無水アルコール 88cc を加え, 前記「ヨウ化カリウム液 8cc」以下を準用して γ -B. H. C 0.01% を含む液を製して標準液とする。

底部に少量の水銀を入れて陽極とした電解瓶に検液適量 (約 5cc) を入れ, これにビルガロール及び検液と同濃度のアルコールで洗った窒素を $25 \pm 0.5^\circ$ の恒温槽中で 15 分以上通じて酸素を追い出したのち, -0.2 ~ -1.7 ボルトで 3 回ポーラログラフにかける。

ここに得たポーラログラフの拡散電流波の最大傾斜点においてその傾斜の方向線に切線を引き, これと残余電流の延長及び上部彎曲部における切線との交点を求め, 両交点間の垂直距離を測定してこの液の波高とする。

又標準液を用いて同様の操作を行い波高を求め, 次式により検体中の γ -B. H. C. の濃度を算出する。

$$\gamma\text{-B. H. C. の含量 (w/v\%)} = \frac{(\text{標準液中の } \gamma\text{-B. H. C. mg}) \times (\text{検液の波高 mm})}{2 \times 10^3 (\text{cc/1000}) \times (\text{標準液の波高 mm})} \times 100$$

著者等は先ず実験に使用する無水アルコール, ヨウ化カリウム液, ゼラチン液及び各石油会社製ケロシン等をポーラログラフにかけたところ, いずれも殆んど還元波を示さないことが認められた (Fig. 1)

次に上記ケロシン中に既知量の γ -B. H. C. をそれぞれ溶解して約 0.5 w/v% γ -B. H. C 油剤とし, これを検体としておのおの 3 回以上ポーラログラフにかけ, その平均値を示すと次の通りになった。

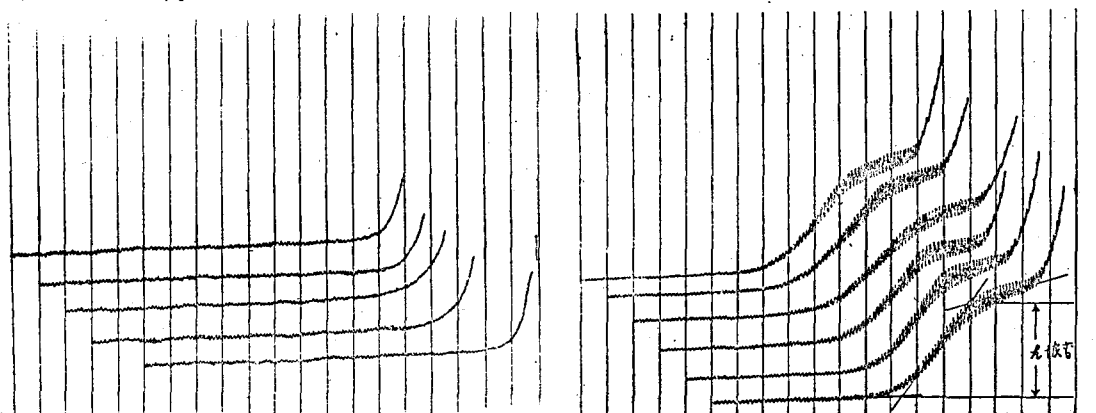
Table 1
Determination of γ -B. H. C in Spray of Known Concentration

Sample No. & Name	% (W/V basis) γ -B. H. C		% Recovery	In Electrolyte Soln.	
	In Sample	Found		Temp. °C	pH-
25 A	0.52	0.51	98	25±0.5	about 6
11 B	0.50	0.51	102	"	"
16 C	0.50	0.50	100	"	"
7 D	0.50	0.49	98	"	"

0.5% γ -B. H. C 油剤のポーログラフの1-例を Fig. 2 に示す。

Fig. 1 各石油会社製ケロシンのポーログラフの一例

Fig. 2 0.5% γ -B. H. C 油剤のポーログラフの一例



試験法の検討

(1) 本法で最も注意を要する点は、検体を良く補正されたビュレットで正確に 2cc 量り取らなければ、これが定量値に大きな誤差を出す原因となる。

(2) 電解瓶中の検液には N_2 ガスを少くとも 15 分以上通じて液中に溶存している O_2 ガスを充分除去しないと波形が乱れて計算が不可能となる。又アルコール濃度が高いために N_2 ガスの導入により濃度に変化を来さぬように、ピロガロール液の次に 88v/v % アルコール液で洗条しなければいけない。

(3) 電解瓶中の検液の温度は常に 25±0.5° に保たないと波高が変化して定量値に誤差を生じる。

(4) 標準原液は約 1 カ月の保存に耐えうるものと思われる。

(5) 波高は 1/10mm 迄スケール又はコンパスで測定し、波の中点を決定するには中点コンパスを用いると便利である。

(6) 本法で γ -B. H. C の見掛けの半波電位は約 -1.1 ボルトである。

総 括

本ポーログラフ定量法 (エタノール法) によれば、0.5% γ -B. H. C 油剤中の γ -B. H. C の定量はかなり正確であり、作図等の誤差をも考慮すれば、定量値の誤差は ±2.5 % 以内に留るものと考えられる。

文 献

- G. B. Ingram and H. K. Southern: Nature, 161, 437(1948)
G. Dragt: Anal. Chem., 20, 737(1948)

L.L. Ramsay and W.L. Patterson: J. Assoc. Offic. Agr. chem., 29, 337 (1946)

K. Schwabe: Z. Naturforsch., 3, 217(1948)

Summary

It is necessary to determine the percentage of the γ -B.H.C in commercial sprays. Several useful methods have been developed for determining γ -B.H.C, but they are not applicable to the quantitative estimation in commercial sprays.

This ethanolic method has proved most valuable for the assaying of the γ -B.H.C in commercial sprays.

Method to be used is as follows: Weigh accurately 2ml of the sample, into a 100ml, graduated flask and add 88ml of absolute ethanol. Add also 8ml of a 10% aq. soln. of KI and 2ml of a freshly-prepared 0.25% aq. soln. of gelatine to the solution. Make up to the graduation mark with 10% KI soln.

Transfer a portion of the prepared solution to a polarographic cell at the bottom of which is a small quantity of mercury to act as anode. Place the cell in a small thermostat bath at a temperature of $25 \pm 0.5^\circ$ and eliminate the dissolved O_2 by passing a stream of N_2 through the solution at least for fifteen minutes. Polarograph this solution in triplicate over an applied voltage range of -0.2 to -1.7 volts. Polarograph also under the same condition a 0.01% solution of pure γ -B.H.C prepared by dilution of a 0.5% standard kerosene stock solution.

Calculate the concentration of the γ -B.H.C. in the test solution of the sample by direct comparison of the wave heights obtained with those from the known concentration of pure γ -B.H.C. The percent γ -B.H.C of the sample is calculated from the formula:

$$\frac{\%(\text{W/V basis}) \gamma\text{-B.H.C. of the sample}}{\times 100} = \frac{(\text{mg. } \gamma\text{-B.H.C in the standard soln.}) \times (\text{mm. wave heights of the test soln.})}{(\text{ml/1000 basis}) 2 \times 10^3 \times (\text{mm. wave heights of the standard soln.})}$$

TABLE 1

Determination of γ -B.H.C in Spray of Known Concentration

Sample No. & Name	% (W/V basis) γ -B.H.C		% Recovery	In Electrolyte Soln.	
	In Sample	Found		Temp. $^\circ\text{C}$	pH.
25 A	0.52	0.51	98	25 ± 0.5	about 6
11 B	0.50	0.51	102	"	"
16 C	0.50	0.50	100	"	"
7 D	0.50	0.49	98	"	"

The apparent half-wave potential of the γ -B.H.C, using KI as base electrolyte under the above conditions, is approximately -1.1 volts.

The total errors at the polarographic assay of 0.5% γ -B.H.C spray are less than $\pm 2.5\%$.

Received April 20, 1954.

医薬品中の水分の定量法の研究

喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 伊藤酉一, 吉村淳

A Research of Water Determination of Drugs.

Ichirōemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Yoshitomo

KŌCHI, Yūichi ITO and Kiyoshi YOSHIMURA

まえがき 医薬品中の水分の定量法について公定書記載のものと他の方法と比較し, 若干の所見を得たのでその結果をここに報告する。

実施要領 試験方法としては同一の検体 (29 品目) について次記の四方法によつて試験した。

(A) 公定書の方法 デシケータ又は所定の温度, 時間で循環通風式電気乾燥器を用いて行つた。

(B) 定温真空乾燥器を使用する方法 乾燥器の中に検体を入れ, 真空度 10mm/Hg, 温度は日局で定めた温度 (80°) 又は 89° で恒量になるまで乾燥した。

(C) 迅速水分計を使用する方法 新しく設計された此装置は赤外線輻射熱を利用したものであるが, 試料を皿上に載せ, スライダックで電圧を試料に適応するよう調節し, スイッチを入れればランプが点灯して赤外線の輻射熱に試料をさらす。試料は直ちに蒸発乾燥を始め水分がしだいに減少して行き, その変化が目盛の指針の移動で読み取ることができ, 水分が完全に乾燥すると指針が止まるから, その時の目盛を読んで水分を直読する。公定書でデシケータ, 100° 以下の乾燥温度のものは 40V, 100°~120° のものは 50V, 150° のものは 70V をそれぞれ使用した。尚電圧, 内部温度, 経過時間との間の関係は次の如くなる。

乾燥時間 電圧	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'	40'	45'	50'	55'	60'
40V	64°	70	73.5	74.5	75.5	76.5	76.0	76.5	76.0	76.0	76.0	74.5
50 "	90°	97.5	104.5	107.0	110.0	111.5	111.5	113	113.5	113	113	113
60 "	116°	134	139.5	142.5	143.5	144.5	145	146	145.5	146.5	146.5	146.5
70 "	129°	158.5	169.5	171.5	174	176.5	178	176.5	176	178	179.5	181

(D) Karl-Fischer法 検体採取量は水分として約 20~30mg に相当する量を取り常法によつて処理する。尚メタノールはアルミニウムアマルガムで脱水すれば, 0.01 %以下とすることができる。

試験成績 前記実施要領に従つて試験した結果は別表に示す如くなる。

結論 四種の方法によつて比較実験を行つた処, 別表の如き成績を得た。これにより公定書法以外の三法を公定書法と比較すると次の様になる。

(A) 定温真空乾燥器を使用する方法 本器は構造上加熱槽の中には水を入れ電熱線で加熱する様になつていので, 乾燥器の内部は最高 89° を超えることができない。従つて公定書法で乾燥温度が 150° のもの (例えばクエン酸ナトリウム) には使用できず, 又温度が 120° のもの (例えば溶性サッカリン) では公定書法による方が短時間で乾燥できるので本器の使用は無意味となるが, 110° 以下のものは乾燥時間を早いものでは 1/10 に, 又遅いものでも 30 分間短縮可能である。

(B) 迅速水分計を使用する方法 公定書法で 100° 以下で乾燥するものは 40V を使用したので内部温度は最高 76.5° であつたから問題はないが, 100°~120° のものは 50V を使用したので内部温度 113.5° となり, 100° で乾燥するものは規定より高温となり表面が焦げたものが二点 (タンニン酸, ジアスターゼ) あつたが, 他のものは外観上異常なく 15分~1時間の乾燥時間で恒量に達することができた。(本器を使用して乾燥したものは赤外線により分解を受けているかどうかについては目下検討中) 本器を使用し電圧の調節を適当にすれば急速に乾燥することができる。

(C) Karl-Fischer 法 我々の実験によれば、本法によると他の方法より測定値が大きく出がちであるが、加熱による分解を考慮する必要がない。

別 表

品 名	公 定 書 法			真空乾燥器法			迅速水分計法			Karl-Fischer法	公 定 書 格
	減量%	乾燥時間	乾燥温度	%	時間	温度	%	時間	volt	%	%
ス ル フ ア ミ ン	0.08	4	100°	0.07	0.5	89°	0.04	0.3	50	0.10	0.5
ス ル フ ア メ ラ ジ ン	0.04	"	"	0.03	"	"	0.05	0.25	"	0.06	0.5
ス ル フ ア ジ ア ジ ン	0.04	"	"	0.02	"	"	0.04	0.3	"	0.09	0.5
ス ル フ ア チ ア ゴ ー ル	0.04	"	"	0.04	"	"	0.04	0.2	"	0.04	0.5
ス ル フ ア グ ア ニ ジ ン	7.78	"	110°	7.85	1.0	"	7.32	0.6	"	7.59	6.0~8.0
ビ タ ミ ン B ₁	3.90	3	100°	4.15	0.5	"	4.31	0.5	"	4.38	5.0
ブ ド ウ 糖	0.2	4	"	0.2	2	"	0.15	0.3	"	0.12	1.0
デ キ ス ト リ ン	8.36	"	"	8.23	1.5	"	8.08	0.6	40	8.55	10.0
小 麦 澱 粉	14.60	5	"	14.79	0.5	"	14.8	0.5	50	14.90	15.0
馬 鈴 薯 澱 粉	16.90	"	"	17.46	1.5	"	17.52	0.4	"	16.76	18.0
ジ ア ス タ ー ゼ	4.07	4	"	4.13	2	"	4.65	0.75	"	4.98	4.0
タ ソ ニ ン 酸	6.36	2	"	6.76	1	"	6.81	0.5	"	6.14	12.0
タ ソ ニ ン 酸 ア ル ブ ミ ン	5.99	3	"	5.65	1.5	"	6.10	0.5	"	5.99	6.0
テ オ サ リ シ ン	0.47	4	"	0.45	1.5	"	0.42	0.3	"	0.64	1.0
ジ ウ レ チ ン	3.70	3	110°	9.11	2.5	"	8.90	0.85	"	9.09	10.0
安息香酸ナトリウムカフェイン	1.90	4	80°	1.88	1.5	80°	1.84	0.45	40	1.52	3.0
カ フ エ イ ン	2.90	"	"	3.25	"	"	3.14	1	"	3.50	8.0
含 糖 ベ プ シ ン	0.41	3	100°	0.49	2	89°	0.47	0.65	50	0.50	0.50
合成ケイ酸アルミニウム	12.54	4	105°~110°	12.39	2.5	"	12.60	0.8	"	12.74	20.0
クエン酸ナトリウム	12.50	18	150°	—	—	—	12.2	1	70	12.80	10~13
溶 性 サ ッ カ リ ン	13.90	4	120°	13.91	7	89°	12.2	1	50	—	15.0
ジフエニルヒダントインナトリウム	11.90	"	100°	11.35	0.5	"	11.25	0.9	"	12.09	16.0~21.0
甘 汞	0.01	5	デシケーター	—	—	—	0.02	0.2	40	0.05	0.5
メチルヘキサビタール	0.15	3	100°	0.25	2	89°	0.10	0.3	50	0.68	1.0
塩 酸 エ フ エ ド リ ン	0.15	"	"	0.11	0.5	"	0.12	0.2	"	—	2.0
硫 酸 キ ニ ー ネ	4.7	3	100°	4.55	0.5	89°	4.52	0.8	50	4.48	5.0
ア ミ ノ ピ リ ン	0.03	"	デシケーター	—	—	—	0.08	0.25	40	0.09	1.0
ア ン チ ピ リ ン	0.27	18	"	—	—	—	0.16	0.4	"	—	1.0
アセチルサリチル酸	0.01	5	"	—	—	—	0.06	0.3	"	0.10	0.5

Summary

As a result of the investigation in which water contained in drugs was determined by the following three methods (1. Moisture balance method utilizing infra-red ray. 2. Electric vacuum dryer method. 3. Karl-Fischer method.) and compared with the value obtained by official method, we could shorten considerably the drying time described in the official method, by the former methods except special cases.

Received April 1, 1954

食品中デハイドロ酢酸及び其の塩類の試験法 (第二報)

固体食品中の検出法*

川 城 巖, 福 沢 富 美

Examination of Dehydroacetic Acid and its Salts in Foods (2)

Detection of D.H.A. in Solid Food.

By Iwao KAWASHIRO and Fumi FUKUZAWA

まえがき 液体食品 (酒類, しょう油) に添加されたデハイドロ酢酸及び其の塩類の検出法については既に発表した¹⁾。今回は更に固体食品, 主として魚肉ねり製品について検討を加えた。この検出法の主旨は大約前と同じであるが, 抽出方法について二三検討を要したので, その結果を報告する。

デハイドロ酢酸 (D. H. A.) 及びその誘導体は食品衛生法により魚肉ねり製品に使うことは許されない²⁾ので, ここでは定性的検出法にとり, 1/10,000 を含む場合をも検出し得るよう留意した。この実験には Table 2 に示した4種の試料について行い, 抽出溶媒としては前回実験²⁾を参考とし, 且 D.H.A. 及びそのソーダ塩をもとによく溶かす³⁾メチルアルコールを選んだ。抽出法は, アルカリ性水抽出法及び乾燥法について検討したが, 前者は抽出後の濾過及び後の操作による溶媒との分離が困難のため, 目的物の損失が考えられるので中止し乾燥法を採用した。この法においてメチルアルコール抽出液の溜去残留物は多少の蛋白質様及び脂肪様物質を夾雑している⁴⁾ので, これを除去するため, トリクロル酢酸 (T.C.A.) を沈澱剤として使用した。T.C.A. の使用による D.H.A. の損失及び確定反応 (1) 及び (2) に及ぼす影響については実験の結果影響はなかつた。(実験 I)

T.C.A. を用いて蛋白質様物質を除去した後酸性水液から試験法に示す方法により, アルカリ性 D.H.A. 検液を作るとき, 尚脂肪様物質が検液中に移行し液が濁濁することが多々ある。この場合は銅塩沈澱反応の検出限度が低下することを認めたので最後に D.H.A. アルカリ性検液を更にエーテルで洗滌することとした。魚肉ねり製品の種類によりこの操作は行わなくとも検液が澄明な場合もあるが, 多くの場合は必要である。

第一報⁴⁾において, 確定反応として銅塩の沈澱反応を採用したが, その他の金属塩に対する沈澱の生成状態について更に追試を行つた。その結果は銅塩を使用することが最も適当であつた (Table 1)

本試験法の検出限度は呈色反応では, 試料 5mg/100g, 沈澱反応では 10mg/100g である。(Table 2)

尚共存する防腐剤の影響の有無については, しばしば使用される数種について検討を加えたが, 何らの障害はなかつた。

実 験 の 部

I) T.C.A. 使用による D.H.A. の損失及び確定反応に及ぼす影響の有無 D.H.A. 原液⁵⁾ (0.2%) 3cc (6mg) に 10% T.C.A. 液 10cc を加えてよく混和し, この酸性液を 1~2 時間放置するとき, D.H.A. の結晶様物質の析出は認められなかつた。

D.H.A. 原液 1.5cc (3mg) に 10% T.C.A. 液 10cc を加えてよく混和し, 20 分間放置したのち, 試験法に示す方法に従い回収率を測定し, 空試験と比較した結果全く等しい吸光度を示した。

II) 確定反応 (2) に対する追試 D.H.A. 原液 (0.2%) 夫々 0.25cc をとり 10% 酢酸を加えて中和し, これに各金属塩試薬を加えその沈澱の析出状態を検討した。結果は Table 1 の通りである。

* 本試験法は昭和 28 年薬学総会公衆衛生協議会 (衛生化学) で発表。既に日薬会編「衛生試験法」及び厚生省編纂「衛生検査指針」に収載されている。

Table 1. Comparison of Precipitation of Various D.H.A. -Salts.

Reagent used	Precipitation	Microscopic
1) Cupric acetate test soln. stronger	slightly gray-violet ppt. at once.	needles
2) Mercuric chloride test soln.	slightly turbid after 30 min., white ppt. gradually.	not crystalline.
3) Ferric chloride test soln.	yellow turbid, at once.	"
4) Zinc sulfate test soln.	faintly yellow, shining rouge ppt. after a long time.	—
5) Lead acetate test soln.	not precipitate.	—
6) Silver nitrate test soln.	"	—
7) Cobalt nitrate test soln.	slightly reddish crystal after 24 hrs.	slightly reddish angular column
8) Cadmium sulfate test soln.	not precipitate.	—

Ⅱ) 以上の実験を総合し立案した試験法により種々の魚肉ねり製品を用いてその限度試験を行つた結果は Table 2 に示す通りであつた。

Table 2. Recovery of D.H.A. in Various Fish Meat Paste.

Name and quantities of sample	Ratio of D. H. A. Content	Amount of D. H. A. in 100g of Samp. (mg)	Amount of D. H. A. in 30g of Samp. (mg)	Identification (1) Colour reaction with Salicylaldehyde	Identification (2) Precipitation reaction with cu-salt
Hampen (g) 30g	1/5.000	20	6	+ 赤色	+ Apparent needles, microscopic (300×) after 15 min.
Yaki-chikuwa "	"	20	6	+ "	+ "
Hampen "	1/7.500	13	4	+ "	+ Apparent needles, microscopic (300×) after 1.5 hrs.
Yaki-chikuwa "	"	13	4	+ "	+ "
Hampen "	1/10.000	10	3	+ "	+ A few needles, microscopic (300×) after 1.5~2 hrs.
Yaki-chikuwa "	"	10	3	+ "	+ "
Satsumaage "	"	10	3	+ "	+ "
Kamaboko "	"	10	3	+ "	+ "
Hampen "	1/15.000	6.5	2	+ "	- no needle, microscopic, after a long time.
Hampen "	1/20.000	5	1.5	+ 橙赤色	- "

文 献

- 1), 4), 5) 川城, 福沢, 竹内: 本誌, 70, 41, (1952). 2) 川城, 福沢: 本誌, 71, 27, (1953).
 3) Spencer, H.C., Seevers M.H., Woods, L.A., Shideman, F.E, et al.: Pharmacol. Exptl. therap, 99 57, (1950)

Summary

We examined the method for the detection of D. H. A. (dehydro acetic acid) in Japanese fish meat pastes.

The identifications for it accord with reactions in the report I, but the Japanese fish meat pastes have so much fat-and protein-like substances in themselves that we examined about the extraction solvents, the method for extraction, and the reagents for removing above substances.

Received April 3, 1954

食品中デヒドロ酢酸及び其の塩類の試験法 (第三報) 定量法*

川 城 巖, 福 沢 富 美

Examination of Dehydroacetic Acid and its salts in
Foods (3) "Determination"

By Iwao KAWASHIRO and Fumi FUKUZAWA

まえがき 食品中の D. H. A. 及び其の塩類の定性的検出法は既に発表した¹⁾²⁾, 昭和 28 年 3 月厚生省令第 9 号により指定添加物中合成保存料として, 新に D. H. A. 及びそのソーダ塩が追加された. その使用許可品目は, チーズ, バター, マーガリン及び清涼飲料水 (炭酸を含有するものを除く) 又は保存飲料水に限られ, その使用基準は, 前者は 1 kg につき 2 g 以下, 後者は 1 kg につき 0.05g 以下と規定された. 従つてこれら許可品目について定量法が必要となつたので二三検計を加え, その結果をここに報告する.

I. チーズ, バター, マーガリンについて チーズ中に含まれている D. H. A. の定量法としては既に発表されている³⁾. この方法はベックマン DU 型分光光度計を用い波長 307m μ における吸収を測定している. しかし分光光度計の使用は我が国においてはまだ一般には普及していないので, 我々は, 前報に掲げた呈色反応即ちサリチルアルデヒドによる橙色~赤色を利用し, 光電比色計を用いて測定する方法を確立することとした. この呈色反応におけるアルカリの濃度及び加熱時間は既に第 1 報で最適の条件を決定したので, 今回は次の点につき検討を加えた.

A) 試薬サリチルアルデヒド液の使用量 D. H. A. のこの試薬による呈色反応は試薬の使用量により呈色度を異にするのでこれを検討した結果 1 cc が最も効果的であつた (実験 1).

B) 比色に用いるフィルタの選定 呈色反応は D. H. A. の濃度で橙黄色から赤色に至る色調を示し, ベックマン分光光度計 B 型により測定した結果 $\alpha_{\max}=450m\mu$ であつた (Fig. I). 試薬のみによる黄色は $\alpha_{\max}=400m\mu$ で, 450m μ では吸光度 0.053 を示すが, 510m μ では殆んど吸収を示さない (Fig. II). 試験法中検量線の項に示す 6 種の呈色液につき, 450m μ 及び 510m μ のフィルタにつき測定した結果試薬のみによる黄色の妨害作用を消去するためにはフィルタ 510m μ の測定を可とした. (Fig. II)

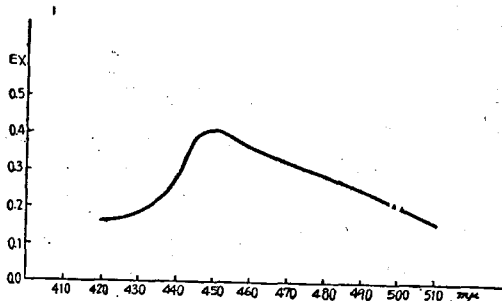


Fig. I. Curve of Coloured D. H. A. -Solution with salicylaldehyde. $\alpha_{\max}=450m\mu$

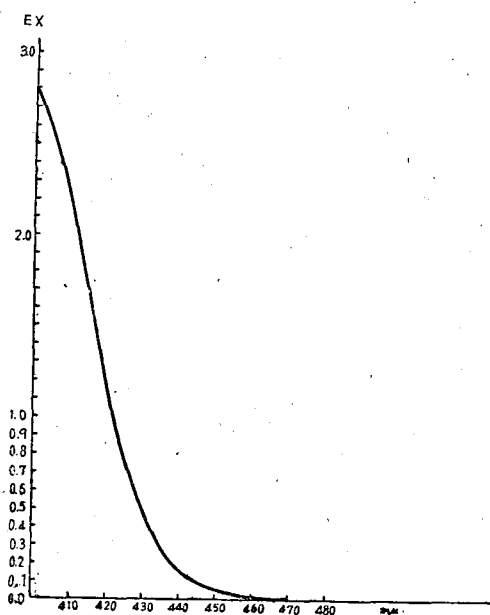


Fig. II. Curve of Blank test solution with Salicylaldehyde.

* この試験法は昭和 29 年薬学総会公衆衛生協議会 (衛生化学) で発表, 既に日薬会編「衛生試験法」(昭和 29 年度追加) に収載, 厚生省編纂「衛生検査指針」にも収載される予定である。

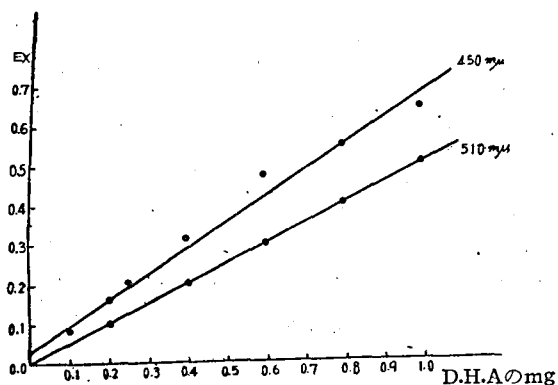


Fig 3. Standard Curve of D.H.A., or
Calibration curve of D.H.A.

して抽出を行う。尚 D.H.A. を全く含まないチーズ、バター、マーガリン等につき同様の抽出法を行い、吸光度を測定した処多少の吸収を示し、又試薬のみによる検液も水に比すれば多少の濁りを示した。然しこれらは何れも無視しうる程度のものであつたが定量をより正確にするため、同時に試薬のみの盲検検液を作り、標準比色液とし比色を行うことにした。又着色料として使用される油溶性色素、即ち食用黄色2号(エローAB)、食用黄色3号(エローOB)、及び食用だいだい色2号(オレンジSS)等の色素はこの法で、クロロホルム中に移行してくるが、アルカリ性水液中には溶けて来ないので何等考慮を要しない。本試験法⁵⁾の定量可能範囲は100mg/100gである。

Ⅱ 清涼飲料水、保存飲料水について 清涼飲料水及び保存飲料水中の D.H.A. 抽出法は第1報の法に従つたが今回の場合は多く着色料が使用されている。着色料としては法定の食用タール色素又は天然果実汁による天然色素が考えられる。前者は大體酢酸 α 性液からエーテル・石油エーテル混液に移行しないが、ザンテン色素即ちエオシン、フロキシソ、エリスロシン、ローズベンガル等は酢酸 α 性で明らかにエーテル・石油エーテル混液に移行してくる。後者もこの状態で混液に移行し、比色に影響を及ぼすので、これら色素の分離法について検討を加えた結果天然色素は微弱アンモニアルカリ性において、石油エーテル・エーテル混液中に移行することを認めた(実験Ⅲ)、この結果 Bire ley's 飲料につき検討したところ酢酸 α 性で D.H.A. と共に混液中に移行する色素を D.H.A. の損失なく完全にのぞき得た。人工着色料中ザンテン色素は酸性液では次第に沈澱を生じ、酸性食品の着色料として不適当で殆んど使用されないと思われるが、保存飲料の場合はこの限りでないと考えられたので、一応これらの色素の分離も試みた。これらの色素は、その性質上 D.H.A. と常に同様の条件で溶媒に移行し、その分離が困難であつたので、カラムクロマトグラフィーによる分離法も二三検討したが、定量法として良法とは考えられなかつた。然しこの実験中に無水硫酸ナトリウムがこの種の色素の吸着剤として好結果を示すことを見出した。(実験Ⅳ) そこで吸着カラムを使用する代りに、適当量の細末硫酸ナトリウムを D.H.A. と色素類の石油エーテル・エーテル溶液中に投入ふりまぜ色素類を吸着せしめた結果、D.H.A. は何等損失することなく溶液中から回収し得た。そこでこれら色素の除去には試験法に示す方法を採用した。本試験法⁶⁾の定量可能範囲は3mg/100gである。

実験の部

Ⅰ) サリチルアルデハイド液の使用量 D.H.A. 1mg の場合をとり下記使用量により呈色液を作り島津光電比色計 DF 型Ⅰ号により、液層 0.5cm 波長 510mμ で測定した。

C) チーズ、バター、マーガリン中 D.H.A. の抽出法に対する検討 チーズ中の D.H.A. 抽出法は大約文献³⁾にならつて行つたが、その回収率が時間の経過と共に減少し満足な値が得られなかつた(Table I)、これは D.H.A. が油脂中で変化したものと一応考えられたので更に検討を加えた結果試験法に示すように、クロロホルム抽出の際水浴上で10~15分間加温する操作を追加し、1ヶ月を経過した試料についても添加当時と大差なき回収率を得た(Table II)。文献 3) 法では抽出した D.H.A. の酸性濾液を直ちに比色に用いているが、この液は尚脂肪様物質及び蛋白質様物質を含んでいるので、10%トリクロル酢酸液を用いてこれら物質を除去することとした。D.H.A. は pH 3.4~3.6 の水液からエーテル・石油エーテル混液に移行し易いから⁴⁾指示薬を添加し中和したのち、正確に一定量の酢酸を加え酸性と

標準原液cc	サリチルアルデヒド液cc	水酸化ナトリウム液cc	Ex
1	0.5	1	0.435
1	0.7	1	0.47
1	1.0	1	0.48
1	1.2	1	0.48
1(水)	1.0	1	—

Ⅱ) 試験法中試料のクロロホルム抽出の際における加温の有無及び時日の経過による回収率の状態を比較した。結果は Table I 及び Table II の通りである。

Table I Difference of Recovery of D. H. A.

Sample	Amounts of sample g	Added D. H. A. mg	Recovery (%)		
			at once after add.	7days after add	a month after add
cheese	10	20	84.7	70.5	67.5
butter	10	20	86.0	62.5	60.3
margarine	10	20	96.2	78.2	77.7

Table II. Difference of Recovery of D. H. A., Using Warm CHCl_3 as Extraction Solvent.

Sample	Amounts of sample g	Added D. H. A. mg	Recovery (%)	
			at once after add.	a month after add.
cheese	10	10	89.0	88.2
butter	10	20	97.0	91.2
margarin	10	20	97.0	97.0

Ⅲ) みかん汁 (5倍稀釈液) 50cc を 10% 水酸化ナトリウム液で中和後, 10% アンモニア水 1~2 滴を加え, pH 8.2~8.4 とし毎回混液 80cc ずつで 4 回ふりまぜ抽出する。この際色素は殆んど混液中に移行した。

Ⅳ) 試料: D. H. A. 5mg 0.1% フロキシシン液 3 滴を水 100cc に溶し, 10% 酢酸 5cc を加え後エーテル・石油エーテル等容混液を用いて抽出し, 抽出液を蒸溜し約 20cc とする。

吸着層: 径 8 mm の硝子管中に細末とした無水硫酸ナトリウムを, エーテル・石油エーテル等容混液を用いて, 約 20cm の層となす。

上記試料溶液を吸着層中に極めて徐々に滴下するに色素はこゝで紅色を現し稍広い範囲ではあるが吸着状態を示した。

文 献

1), 4) 川城, 福沢, 竹内: 本誌, 70, 41 (1952). 2) 川城, 福沢: 本誌本号. 3) J. A. O. A. C. 36, No. 1 83 (1953). 5), 6) 日薬会編「衛生試験法」(昭和29年度追加)

Summary

The method for the quantitative determination of D. H. A. in cheese, butter, margarine and beverage was examined.

We devised the procedure for the extraction of D. H. A., then determined it by means of the colour reaction with salicylaldehyde and alkali- soln., utilizing the photoelectric colorimeter.

Received April 5, 1954

製品検査から見たズルチンの夾雑物について*

川 城 巖, 福 沢 富 美

On Impurities in Dulcin from the Standpoint of Official Approval

By Iwao KAWASHIRO and Fumi FUKUZAWA

まえがき 食品衛生試験法により不合格となつたズルチンにつき, 最近某県から検体中に混在する夾雑物判定の依頼があつたのでその主なる夾雑物の分離確認を行つたところ次のような成績を得たのでここに報告する。

検出し得た夾雑物の一つは製造上の不注意からくる Di-*p*-phenetyl carbamide (*p*) $\text{H}_5\text{C}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{Co}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_5$ (*p'*) (Di-*p*-Phe.) であり, 他の一つは増量のため故意に加えられた *p*-Toluensulfoamide $\text{CH}_3.\text{C}_6\text{H}_4.\text{SO}_2\text{NH}_2$ (*p*) (*p*-T.S.A.) である。これはサッカリンの製造行程において副成されるもので, 純粹の *P*-化合物のみでなく, *o*-化合物をも同時に混入している¹⁾。以上2種の夾雑物のいずれかが混在しているズルチンは食品衛生試験法で試験を行うときいずれも mp が低下し, 水, アルコールに対する溶解度及び塩化物の反応等が不良であつた, 試験成績は第一表の通りである。

第 一 表

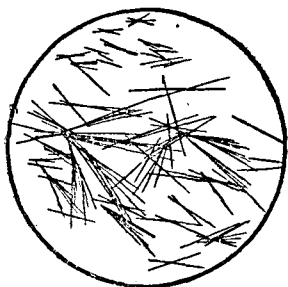
検体	外 観	mp	溶 解 度 (水, アルコール)	甘 味 度	塩 化 物
1	白色結晶性粉末	114~140°	不 良	合格品と比較し不良	不 良
2	微に紅色を帯びた結晶性粉末	108~147°	"	"	"
3	白色結晶性粉末	111~140°	"	"	"
4	白 色	117~140°	"	"	"
5	"	124~149°	"	"	"
6	"	129~154°	"	"	"
7	微に紅色	134~153°	"	"	"
8	白 色	154~161°	"	"	"
9	微に紅色	165~169°	"	"	"
10	"	152~158°	"	"	"
11	"	163~169°	"	合格品と比較し稍類似	"
12	"	119~145°	"	合格品と比較し不良	"

これら夾雑物の mp 及び結晶型は第1図~第4図に示すように明らかにズルチンと区別することができる (実験1), ズルチンから分離した夾雑物は夫々合成 Di-*p*-phe. 及び *p*-T.S.A. との混融試験により mp の低下は認められなかつた, 又鏡検により合成のものと全く同様の結晶を示した (実験Ⅱ, Ⅲ)。

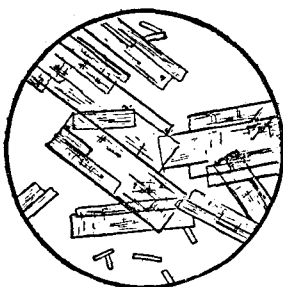
尙ズルチンの増量剤として不正に使用されるという未知物質について検討した結果これは *p*-T.S.A. 及び *o*-T.S.A. の混合物であることがわかつた (実験Ⅳ)。

* 本試験法は昭和28年6月国立公衆衛生院創立十五周年記念学会席上で発表, 厚生省編纂「衛生検査指針」中偽和物衛生検査法に収載された。

実験の部

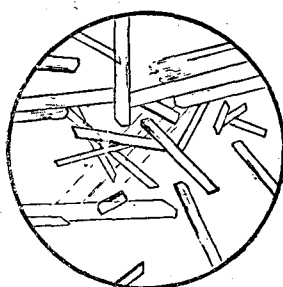
I Di-*p*-phe., *p*-T.S.A., (*o*-T.S.A) 及び Dulcin の鏡検第1図 Di-*p*-phe. (300×)

mp 224~226°

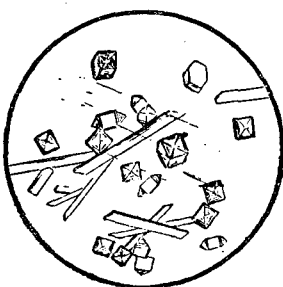


第2図 Dulcin (300×)

mp 171~173°

第3図 *p*-T.S.A. (300×)

mp 137°

第4図 *o*-T.S.A. (*p*-T.S.A)

(300×)

I Dulcin 中の Di-*p*-phe の分離確認

Di-*p*-Phe の分離は水及び氷酢酸に対する溶解度の差を利用する二法を行つたが、後法が mp の高い Di-*p*-phe が得られた。即ち検体 0.5g を氷酢酸 5cc に温時溶かし濾過後濾紙は温氷酢酸少量で洗い、洗液及び濾液を合し氷室中に冷却し、析出する結晶を濾取し氷酢酸少量で洗い乾燥する、この結晶につき次の試験を行つた。1) 合成 Di-*p*-phe と混融試験を行つた結果 mp の低下を示さなかつた。2) mp 225~226° 甘味なく、水に不溶であつた。3) 鏡検 Di-*p*-phe が存在すれば長形の針晶を認めた (第1図)。

尙参考のため、合格ズルチンに合成した Di-*p*-phe を種々の割合に添加し、mp の降下状態を測定した (第二表)。

第二表

Di- <i>p</i> -phe の添加量 (%)	mp
50	165~220°
20	166~169°
10	167~169°
2.5	168~169°
1.0	169~170.5°

Di-*p*-phe の含有量の多いもの程低温で熔けはじめ、完全に熔け終るまでの温度に差の多いことを示している。

II Dulcin 中の *p*-T.S.A. の分離確認 検体 1g を秤取し、これに水 100cc 及び 10% 水酸化カリウム液 10cc を加え温を与えて溶し、冷却濾過し、ズルチンの大部分を分離し、濾液はエーテル 80cc ずつで 4 回ふりまぜ残存するズルチンを除去し、アルカリ性の水層は中和後 10% 塩酸 10cc を加え酸性とし毎回エーテル 80cc ずつで 4 回ふりまぜ *p*-T.S.A. を抽出する。エーテル層は毎回水 30cc を用いて水洗し、洗液が酸性を呈さなくなつたら、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水し、エーテルを蒸留し去る。ここに得た残留物を少量の熱湯に溶かし、冷後析出した結晶につき次の試験を行つた。1) 合成 *p*-T.S.A. と混融試験を行つた結果 mp の低下を示さなかつた。2) mp 137°。3) 鏡検 *p*-T.S.A. が存在すれば特異の稜柱状結晶を認めた。 (第3図) 4) 残留物をアンチピリン (1:1.1) と共に小磁皿にとり、トルオール 1~2 滴を滴下し、砂浴上に注意して温め、熔融したのち氷室中に冷却し析出した結晶塊を粉末とし mp を測定するに 95° を示す分子化合物²⁾を生じた。

第三表

<i>p</i> -T.S.A. の添加量 (%)	mp
50	100~135°
20	130~160°
10	162~168°
2	168~170°

註 *p*-T.S.A. (20% の *o*-T.S.A. を添加したもの) mp = 108~130°

割合に添加し mp の降下状態を測定した (第三表)。

IV バラサツカリンについて mp は 105~120° を示し、水に溶解易く少々温を与えたものは全く溶解した。これを熱湯に溶し、熱時濾過し、濾液を冷却ここに析出した針晶を濾別、mp を測定するに 136~138° を示し鏡検では第3図と同様の結晶型を現し、更に濾液を水浴上で蒸発濃縮し析出した結晶は、mp 110~120° を示し、熱湯から再結晶し鏡検すれば明らかに *p*- 及び *o*-T.S.A. の 2 種の結晶を検出した。

総 括

以上の試験の結果, 依頼されたズルチン中から検出した重なる夾雑物として, I) 製造上の不注意からくる不純物 Di-*p*-phe. を, II) 故意に加えられたと考えられる偽和物 *p*-T.S.A. の2種を掲げた. 以上の夾雑物を混在する場合は食品衛生試験法により検査を行うとき, 溶解度, mp, 塩化物等の項目をのぞき 他の項目に不良の個所は殆んど見出されない. この点から試験項目中上記三項目は甚だ注意すべき点で mp は特に鋭敏である.

文 献

- 1) Chem Zentr., 11. 834 (1902). 2) Frdl. 10, 1144 (1910~1912).

Summary

Impurities in the dulcin which did not pass the examinations according to the method of analysis of foods prescribed by the Food-Sanitation Law were investigated.

Almost all of the impurities were (I) di-*p*-phenetylcarbamide and (II) *p*-toluensulfoamide.

I was separated from the dulcin by the difference of solubility with glacial acetic acid, and II by the difference of solubility with alkaline solution.

Both were identified by the microscopic examination of the crystalline forms and the measurement of their melting points.

Received April 3, 1954

食品中のモノフルオル酢酸(殺鼠剤)の検出法*

川 城 巖, 大久保敬四郎

Detection of monofluoro Acetic Acid (Rodenticide) in Foods.

By Iwao KAWASHIRO and Keishiro OKUBO

まえがき モノフルオル酢酸, CH_2FCOOH は現在米国等で「1080」(Ten-eight) の名で優秀な殺鼠剤として広く使用され, わが国でも昭和26年厚生省令第24号で毒物としての指定を受け, 使用上の各種制約の下で, すでに商品化されている。しかしこのものは鼠以外の温血動物に対しても猛毒性を有するため, しばしば本剤使用による食品及びその原料の汚染に基く中毒事件を発生し, 中毒防止上及び鑑識化学的立場から, 食品中のモノフルオル酢酸検出法をきめる必要に迫られた, そこで今回は食品2~3種に關してのその検出法につき, 一応の結論を得たので報告する。

実 験 の 部

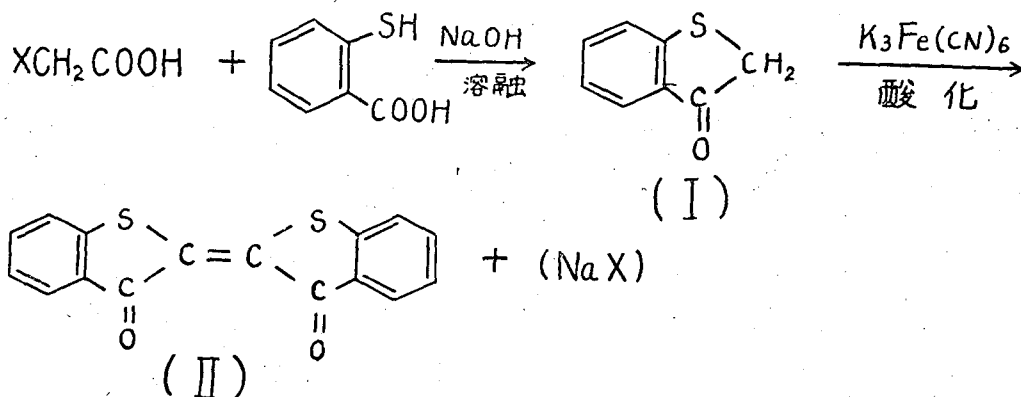
モノフルオル酢酸 (monofluoroacetic acid) CH_2FCOOH = 78.023, mp = 35°, bp = 165°

モノフルオル酢酸ナトリウム CH_2FCOONa = 100.033, mp(dp) = 180~190°

殺鼠剤として多く使用されるのは, このNa塩でこのものは水に溶け易い白色粉末, 殆んど無味, 無臭, 吸湿性である。

実験方針: モノフルオル酢酸そのものに対する検出反応は文献上見当たらないので, 我々は次の(1), (2)に大別して, その検出を試みた。

(1) モノハロゲン酢酸の検出 モノハロゲンとアントラニル酸を310~320°でアルカリ熔融し, 閉環してインジゴを生成させる呈色方法があるが¹⁾²⁾, 最近チオサリチル酸を用いる次の様な鋭敏な方法が報告された³⁾, すなわちモノハロゲン酢酸をアルカリ性でチオサリチル酸と加熱熔融して得たチオイソキシル(I)は空气中に放置すると, きわめて徐々に, またフェリチアン化カリウム溶液で酸化すれば急速にチオインジゴ(II)を化成一し, 著明な赤紅色を呈する。なおこの際ハロゲンのアルカリ塩(Na-X)を副生する。(下式)



(検体が CH_2FCOOH の場合は NaF が生成)

* 本試験法の詳細は昭和28年薬学協会公衆衛生協議会(犯罪科学)で発表し, 日本薬剤師協会編「犯罪科学試験法」に収載された。

反応条件の検討

試薬 (i) チオサリチル酸液 (チオサリチル酸 0.3g, N 水酸化ナトリウム液 2 cc に水 18cc を加える). (ii) 50% 水酸化ナトリウム液. (iii) 2% フェリチアン化カリウム液.

操作法 検体の水溶液 (検液) を蒸発皿で濃縮し, 内容物がほぼ固化したときチオサリチル酸液 5~10 滴及び 50% 水酸化ナトリウム液 5 滴を加え, ガラス棒でよくかきまぜながら水浴上で濃縮, 固化させる. 乾燥器中 100° 以上でしばらく加熱を続けたのち水少量でよく溶かしフェリチアン化カリウム溶液約 1 cc を加え混合する. モノヘロゲン酢酸が存在するとき液は赤紅色を呈する.

この操作中モノフルオール酢酸ナトリウムの 0.1mg/cc の水溶液を検液とし, 次の点について検討を加えた.

(i) 水酸化ナトリウム凝固形物の加熱温度及び時間. 検液 5 cc (CH_2FCOONa として 0.5mg) をとり前記の操作により, 水浴上で固化したのちの加熱温度及び時間の呈色度に及ぼす影響を Table I に示す.

Table I. Comparison of Colour-Intensity Appeared at Different Temp. and Heating-Hours.

Heating hours T emp	0 min	5 min	30 min	1 hour	1.5 hours	2 hours
room temp	-	-	-	-	-	-
110°	-	-	+	++	++	++
130°	-	+	++	+++	++++	++++
145°	-	+	++	+++	+++	+++

[+.....Colour Intensity]

以上の結果から加熱温度及び時間は 130°, 1.5 時間が適する.

(ii) チオインドキシルの酸化条件 フェリチアン化カリウム液は少し過剰になると呈色度は落ちるから, 試液 1 滴ずつを注意して加え, もはや呈色度が増大しなくなる迄加える. なお酸化剤として H_2O_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KClO_3 をも使ったが, フェリチアン化カリウムが最もよかった. 検出限度 $\text{CH}_2\text{F COONa}$ として 0.3mg.

(2) F' の検出 F' の検出には螢光法⁴⁾, 分光分析法⁵⁾, 比色法⁶⁾⁷⁾, 塩化弗化鉛法⁸⁾等があるが F' の微量検出には比色法が最も鋭敏であるといわれる. この比色法には鉄-硫シアン化カリウム法⁹⁾, 鉄-アセチルアセトン法¹⁰⁾, ジルコニウム・アリザリン法¹¹⁾¹²⁾, アルミニウム・ヘマトキシリン法⁶⁾⁷⁾があるが後の 2 方法が最もよく利用される. 両方法中アルミニウム・ヘマトキシリン法は共存イオンによる妨害度やや大であるが, 鋭敏度が高く, 短時間で操作できるのでこれを我々は選んだ.

この試験に用いるアルミニウム・ヘマトキシリン試薬はアルミニウムとヘマトキシリンの結合により生成したレーキで, これが弗素イオンにより褪色することを利用して検出を行う.

アルミニウム・ヘマトキシリン + 弗素イオン → ヘマトキシリン + アルミニウム・弗素
(紫紅色) (無色) (微黄色) (無色)

反応条件の検討

試薬 (i) アルミニウム液 (Al として 0.05g/l) 明バン 0.88g を水 1l に溶かす. (ii) ヘマトキシリン液 精製ヘマトキシリン⁷⁾ (微量の酸性亜硫酸ナトリウムを含む水で 2~3 回再結晶したもの) の 0.1g を 1% 酢酸 100cc にとかし濾過する. (iii) 重炭酸ナトリウム飽和液. (以前は $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 飽和溶液が使用されていたが⁶⁾, M. J. Price⁷⁾ 及び著者等の実験の結果, この液の方が安定度が大きい). (iv) 30% 酢酸. アルミニウム・ヘマトキシリン試薬は (i) 10cc に水を加えて 250cc とし (iii) 5 cc を混和し, 更に (ii) 5 cc を加え 15 分間室温に放置したのち (iv) を加えて pH=4.2~4.6 とする. なお pH=6.0 以上の場合には放置により試薬褪色し F' による褪色も困難となる. 我々の実験では pH=5.0~6.0 で $\text{Al}(\text{OH})_3$ の沈澱を生じ pH=4.2 以下では F' による褪色度は不鋭敏となることを認めた.

操作法 検液 (1 cc 中に F' で約 0.01mg を含む) の一定量 (1~10cc) をネスラー比色管にとり, アルミニウム・ヘマトキシリン試薬 10cc を加えると, F' の濃度に比例し, 時間の経過と共に液は褪色する.

操作上検討を加えた点は

(i) 試薬の使用量 F' の濃度に比し試薬の量が小なる場合は急速に褪色し, 大きい場合は褪色が不分明となる. F' 濃度 0.01mg~0.1mg に対し, 試薬 10cc を使うのがよい.

(ii) 反応時間及び温度 褪色は, はじめは大体時間の経過と共に進行するが 1 時間後の褪色度は極めて僅か

である。又反応時の室温によつて退色度にわずかの差がみられるから、同条件で同時に空試験を行うのがよい。

(iii) 検液の pH アルミニウム・ヘマトキシリン試薬自体の至適 pH の範囲を保つためには検液の pH は正確に 7 として用いる。pH の調整には指示薬としてパラニトロフェノールを使用し殆んど無色か僅かに黄色を呈するところで pH 7 とする。この最適条件で操作したときの検出限度は、F' として 0.02mg である。

なお本試験法では下記の共存イオンによる障害を相当認める。Cl 1mg 1cc, SO_4^{2-} 0.1mg 1cc, Na^+ 0.7mg 1cc, K^+ 0.2mg 1cc, Ca^{++} 0.1mg 1cc, Mg^{++} 0.02mg 1cc, これらのイオンを除去するための特殊な蒸溜法として厚生省編衛生検査指針中の鉱泉分析法(大分析法), 又は A. O. A. C.¹³⁾ 記載の方法によつて行い, 留液を約 $1/10$ 容に濃縮して, 正確に中和したものを検液とする。

(3) (1), (2) の連続操作 前述の(1), (2)の各試験を, 別個に行うことなく, これを連続的に操作するため(1)で副生する NaF を直ちに次の弗素検出に利用しようと試みた。即ち(1)の最終呈色液を直ちに弗素蒸溜装置中に移入し, その留液につき(2)の試験を行つたところ, 完全に弗素を検出することができた。又(1)中の他の共存物質は全く(2)の試験に影響しない事を, CH_2FCOOH の代りに CH_2ClCOOH を用いて確認した。検出限度は $\text{CH}_2\text{FCOO Na}$ として 0.5mg。

(4) 食品中の CH_2FCOONa 抽出法(検液の調製)

(i) 液体試料(清涼飲料水, 葡萄酒, 清酒, ビール等)

操作法: 試料 20cc を弱アルカリ性とし水浴上で 5~10cc に濃縮し, 弱硫酸酸性としエーテル抽出を行う。抽出液に弱アルカリ液を加え, 強くふりまぜこのアルカリ性液を分取, 検液とする。なお試料中にズルチンが含まれていると検出反応を妨害するので, 前記硫酸酸性で得たエーテル抽出液を弱アルカリ性水液でふれば CH_2FCOONa のみ水溶液の方に移行する。しかし微量のズルチンは水溶液の方にとどまるので, 更にエーテルで数回入念にふりまぜればズルチンは次第に除去できる。サッカリン及びサリチル酸, 安息香酸, パラオキシ安息香酸エステル類等は何れも本試験を妨害しない。又上記操作によると食用タール色素中キサンテン系色素(エオシン, エリスロシン, フロキシン, ローズベンガール等)は検液中に混入して来るからアルカリ性水液(CH_2FCOONa を含む)を水浴上で約 $1/3$ 量に濃縮し, 硫酸酸性とすれば上記タール色素は沈澱し, その濾液を再びアルカリ性として検液とする。

(ii) 固体試料(小麦粉, 砂糖, 食パン, ビスケット類)

操作法: 試料をよく乾燥し, 小麦粉, 砂糖はそのまま, 食パン, ビスケットは(糖衣等はあらかじめ除く)細末とし, その 20g に N 硫酸を注意して滴下, 試料の各部が均等にリトマス紙で酸性を呈する迄よく混和し, しばらく放置する。(この時硫酸を加え過ぎるとあとの抽出操作が困難となる。)次にエーテルで充分抽出を行い, その抽出液を合せて以下液体試料の項に従い検液を調製する。

検出限度: CH_2FCOONa として液体試料の場合 1.0mg/20cc, 固体試料の場合 i) 砂糖 1.5mg/20g ii) 小麦粉, 食パン, ビスケット 3.0mg/20g。

総 括

猛毒性殺鼠剤モノフルオル酢酸を液体食品, 固体食品各数種より検出する方法を検討し, 抽出したものにつき,

(1)チオサリチル酸によるチオインデゴ生成反応でモノハロゲン酢酸なることを確め, 続いて (2)その反応物中より弗素イオンを蒸溜分離し, アルミニウム・ヘマトキシリン法によつてこれを証明した。(1)及び(2)が陽性になるとき CH_2FCOOH なることを確認する。

文 献

- 1) Methods of Analysis of A. O. A. C., 7th. (1950), Sect. 27. 24. 2) Freedlander. P.: Ber., 39, 1060 (1906). 3) Ramsey, L. L. and Clifford, P. A.: A. O. A. C., 32, 788 (1949). 4) Willarm, H. H. and Horton, C. A.: Anal. Chem., 24, 862 (1952). 5) Horton, A. D. et al.: Anal. Chem., 24 548 (1952).
- 6) 奥野久輝 日化., 63, 23 (1942). 7) Price, M. J. and Walker, O. J.: Anal. Chem., 24, 1593

(1932). 8) Kinball, R.H. and Tufts, L.E.: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 19, 150 (1947). 9) Foster, M. D.: J. Am. Chem. Soc., 54, 4464 (1932). 10) Willard, H. H.: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 5, 7 (1933). 11) Talutit, N.A.: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 15, 620 (1943). 12) Lamer, w.L.: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 17, 148 (1945). 13) Methods of Analysis of A. O. A. C., 7th. (1950), Sect. 5.23.

Summary

A method of detection of Monofluoroacetic acid (a highly poisonous rodenticide) in various foods was presented.

The extracted poison from foods is identified as follows:

I Test of monohalogen acetic acid by means of this indigo-reaction with this salicylic acid (reddish-rouge in the presence of monohalogenoacetic acid).

II Test of fluorine with Al-hematoxylin reagent (the dye fades in the presence of fluorine).

But in this case the fluorine is separated immediately by the special water-steam distillation from the I reaction mixtures.

So we can examine the poison in a same continuous process.

Received April 3, 1954

附 液体食品中のモノクロール酢酸検出法*

川 城 巖, 大久保敬四郎

Appendix: Detection of Monochloro Acetic Acid

By Iwao KAWASHIRO and Keishiro OKUBO

まえがき モノクロール酢酸 (CH_2ClCOOH) は液体食品の防腐剤として密かに使用される傾向がある。従来モノクロール酢酸の検出法は種々報告¹⁾²⁾³⁾されているが、我々はさきにモノフルオール酢酸の検出法⁴⁾に採用したチオインジゴ生成反応が、この場合にも利用しうることを認めたので、これに更に Cl^- 検出反応を配して両者により CH_2ClCOOH の検出を行つたところ、一応の成績を得たので、ここに報告する。

実験の部

CH_2ClCOOH の性状 CH_2ClCOOH = 92.711, mp = 62.5~63.2°

透明な斜方晶、無臭、温時窒息性臭気と催涙性がある。潮解性を有し、水、アルコール、エーテルに容易に溶ける。

実験方針 前述の如く CH_2FCOOH の場合と全く同様にその前半を操作し、次に水酸化ナトリウム加固化物⁴⁾を 130~135° で 1.5 時間加熱、放冷後、少量の水を加えて固形物を溶かし、更に 25% 硝酸で酸性にしたのち、これを毎回 20cc のエーテルで 5 回抽出を行う、ここに得たエーテル性液(i)と水性液(ii)を分離し、夫々次の操作に供する。(i)にはチオインジギル、(ii)にはクロールイオンが含まれる。

〔1〕 **チオインジゴ試験** (i)よりエーテルを揮散させ、残留物に 50% 水酸化ナトリウム液を加え、アルカ

* 本項は昭和28年薬学総会衛生化学 分析化学部会席上にて発表した。

リ性にしたのち, 2%フェリチアン化カリウム液を滴加する。このとき CH_2ClCOOH が存在すれば液は紅色を呈する。

〔2〕硝酸銀試験 透明な(ii)に硝酸銀溶液 0.5cc を加えると Cl^- が存在すれば, 塩化銀の白濁を生ずる。〔1〕, 〔2〕の反応共に陽性なるとき CH_2ClCOOH の存在を確認する。

検出限度: CH_2ClCOOH として 0.5mg

尚液体食品(炭酸飲料, オレンジジュース, 葡萄酒等)中より CH_2ClCOOH の抽出は A. O. A. C. 5法による。

文 献

1), 2), 3), 5): Method of Analysis of the A. O. A. C. (1950). 4).: 本誌, 本号

Received April 3, 1954

水, 野菜, 果実等のパラチオン試験法*

川 城 巖, 江 島 昭

Examination of Parathion in Water, Vegetables, Fruits, etc.

By Iwao KAWASHIRO and Akira EJIMA

まえがき パラチオン (以下 Para と略す) が我国において農業としての使用が許可されて以来, これによる中毒が各方面に起つた. 我々はその予防対策の一助として水 (飲料水, 河川水を含む) や, 野菜, 果実等中に残存する Para の検出, 定量法を検討し, 一応の結論を得たのでここに報告する.

本 論

Para は $p\text{-O}_2\text{N C}_6\text{H}_4\text{-O-PS}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ mp=6°, bp=375° d=1.265 (25°/4°) 水にほとんど不溶 (15~20 ppm/20°~25°), 石油類に約 10% 溶け, その他の有機溶媒によく溶ける. 130° 以上で徐々に分解し, 水, 稀酸には安定であるが, アルカリに不安定である.

従来発表された定性及び定量法は, (i) Para のニトロ基を還元, シアゾ化し, 呈色試薬を加えて発色させる¹⁾²⁾. (ii) アルカリ分解して得たパラニトロフェノールが, アルカリによつて呈する黄色を比色する³⁾⁸⁾. (iii) 同じく得たパラニトロフェノールを還元し, 生じたパラアミノフェノールにオルトクレゾールを加え, インドフェノール青色を作る⁴⁾⁵⁾. (iv) 分解物より隣モリブデン酸アンモンを化生させ, 比色する⁶⁾⁷⁾. (v) ニトロ基を還元して亜硝酸ナトリウムで滴定する⁸⁾. (vi) ポーラログラフにてニトロ基の還元電位を測定する⁹⁾. (vii) 紫外線吸収スペクトル測定¹⁰⁾. (viii) 上記比色法の一部改変したもの等¹¹⁾¹²⁾ がある. これらのうち野菜等のパラチオン検出には (i) 法^{1), 2), 11), 12)} が用いられているのみで他法は製剤, 尿, 血液, 空気等中の Para 検出, 定量法である. しかしながら (i) 法は呈色条件が容易に一定せず, 定量には不適であつたので, (ii) 法を検討したところ以下に述べるような結果を得たので, 定性に (i) 及び (ii), 定量に (ii) をこの試験法に採用した, しかしこれらを実際に操作するに当つては尚検討を要する点があつたので, 実験的に次の結論を得た.

(i) の方法について,

(1) Para の -NO_2 還元条件: この場合は 5N 塩酸 2 cc, 亜鉛末 0.5g 使用すれば, 呈色至適 pH0.6~1.0 によく合致する. 加熱時間に微に煮沸して 5 分間でよい. (実験の部 (1)). (2) 還元中 Para 分解の有無: Para 抽出量によつては, 極めて微量ながら $\text{HO}-\text{O}-\text{NH}_2$ の生成を見るが, 呈色試薬添加後 10 分以内に色調を観察すれば實際上支障ない. (実験の部 (2)). (3) シアゾ化の温度: この場合は冷時よりも室温の方が結果がよい (実験の部 (3)).

尚 (i) 法では, 抽出 Para を (1) の条件で還元後 0.25% 亜硝酸ナトリウム液 1 cc でシアゾ化, 2.5% スルファミン酸アンモン液 1 cc で過剰の亜硝酸ナトリウムを分解, 1% N-(1-ナフチル) エチレンジアミンジヒドロクロリド液 2 cc で発色 (赤紫) させる.

(ii) の方法について 定量のとき, 文献ではスペクトロフォトメーターを使用しているが, 我が国の実情から, 光電比色計 (400m μ) を用いるよう考慮し, 又一定量 (50cc) の比色液を作る際アルコール 50v/v% 添加が, 吸光度, より大なることを確めた. 比色定量可能濃度はパラニトロフェノール 2~7.5ug/cc (実験の部 (4)). 試料 (水, 野菜等) より Para の抽出法は実験の部 (5) に掲げた.

実 験 の 部

(1) 還元条件 Para は揮発性であるからコニカルビーカーを使用する. 亜鉛末の量は文献¹⁾¹¹⁾ により区々である (0.2~0.5g) が, 5N 塩酸 2 cc に対し 0.5g を用いると還元, シアゾ化後の至適 pH¹⁾ = 0.6~1.0 によく合致する. 尚 pH が 7 以上になると全く黄色を呈する. 加熱時間は, 緩かに煮沸させて 5 分間で充分であることが Table

* 本試験法の詳細は昭和 29 年薬学総会公衆衛生協議会 (犯罪科学) で発表し, 日本薬剤師協会編「犯罪科学試験法」に収載された.

よりわかつた。

Table I Coloration of Parathion

Parathion (μg)	Time of boiling			10min. at room temp.
	1 min.	5 min.	20 min.	
2	±	+	+	-
5	+	++	++	-
10	++	+++	+++	+

(+.....Colour-Intensity)

(2) 還元中 Para の分解 パラチオンが還元中に分解して、一部パラアミノフェノールが生ずると、パラアミノフェノールジアゾ体の N- (I-ナフチル) エチレンジアミンによる呈色が Para 還元ジアゾ体からくる呈色に当然影響を及ぼすはずである。Para 還元液からクロホルムで Para 還元体を抽出し、残留水液 ($\text{HO}-\text{O}-\text{NH}_2$ が残る) に亜硝酸ナトリウムを加え、更に呈色試薬を加えると、Para が 4 mg 以上存在のとき、15 分後に青色 ($\text{HO}-\text{O}-\text{NH}_2$ による) が発現する。確認限度 $10\mu\text{g}$

(3) ジアゾ化の温度 ジアゾ化を 10 分間常温で行った場合と冷却して行った場合の比較は Table II の通りであつて、室温の方が結果がよい。

Table II Coloration of Parathion

Parathion (μg)	Room temp.	$0^\circ \sim -5^\circ$
1.6	+	very slight
1.0	+	"
0.6	±	"
0.3	very slight	"

(4) 本論の項 (ii) は定性と定量に用いる方法であるが、試料より抽出した Para を N-アルコール製水酸化ナトリウム液 5 cc と水浴上 15 分間煮沸し、生ずる黄色液を一定量 (50cc) として定量を行つた。検出限度は $10\mu\text{g}$ 。Ke-

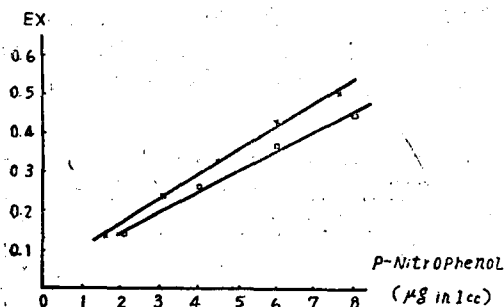


Fig. 1 Influence of 50% Ethylalcohol on the Extinction. —□—0.1N NaOH Solution, —×—0.1N 50% EtOH NaOH Solution.

水、野菜等を対象にするとときは、抽出溶媒として、水に混和しないこと、なるべく揮発し易いこと、天然色素類をなるべく溶かさないうこと、又溶かしても脱色の際それらが除去され易いこと等が望ましい。これらの条件に適合する溶媒は、実験の結果ベンゼンであつた。

telaar と Hellingman²⁾ は波長 $405\text{m}\mu$ でスベクトロフォトメーターを用いて測定したが、本器は我国では、まだ一般に普及していないので光電比色計を使用した。Kathryn O'keeffe と Averell³⁾ は 0.1N 水酸化ナトリウム液のみで比色液を作つたが、これにアルコールを 50 v/v% 加えた場合の方が吸光度、より大であり、又蔬菜類より同時に抽出されて来た不純物による混濁はアルコール添加により澄明になる。フィルター $400\text{m}\mu$ 、キューベット 2 cm で測定した結果は次の通りである。

パラニトロフェノールの濃度が $2\mu\text{g/cc}$ より $7.5\mu\text{g/cc}$ 迄が最も定量的である。

(5) 抽出操作 Para は殆んど有機溶媒にとけるが、

1) 水より Para の抽出 Para を含む水にベンゼンを約3分の1量加えて, ふりまぜ抽出したときの成績は Table IIIの通りである。尚抽出は3回行えば完全である。

Table III Recovery of Parathion in Water

Water (cc)	Parathion (Added) (μ g)	Recovery					
		Extraction once		Extn. twice..		Extn. thrice	
		Well water	River water	Well water	River water	Well water	River water
50	188	89.9	91.6	93.9	94.6	96.0	96.0
50	313	99.7	98.4	101.3	99.0	101.3	99.2
50	470	99.4	99.0	100.0	99.0	100.5	98.5
50	626	97.6	97.2	97.6	98.0	97.0	98.8

これらのベンゼンを合せてコニカルビーカー中送風, 蒸発, 残留物を試験に供する。

2) 野菜, 果実類より Para の抽出 直射日光をさけてなるべく風乾した野菜, 厚目の果実皮等約30gを細割し, ソックスレット浸出器で3時間ベンゼン抽出を行つた。抽出時間がこれで充分であることは実験上確かめた。しかし野菜, 果実類よりベンゼンで抽出される色素には葉緑素, カロチン, キサントフィル, フラボン等がある。これらは活性アルミナ層を通すことによつて完全に脱色できた。活性アルミナ層は径約1.5cm, 高さ17~18cm. 試料によつてはこれ以下でも充分である。ベンゼン抽出液約70ccを滴下する(滴下速度毎分11滴)。のちベンゼン50ccでアルミナ層を洗つた。この場合の Para 損失量は約10% (Table IV参照)

Table IV
Recovery of Parathion at Decolorisation by Alumina

Parathion (Added) (μ g)	(1) %	(2) %
313	91.9	87.8
313	89.4	89.5
626	93.1	93.1
626	92.1	90.2

(1) : Benzene Extract from Spinage

(2) : Benzene Extract from Apple

総 括

水, 野菜, 果実類に残留する Para の定性及び定量法を検討した。

その検出には 1) Para を酸性液中で亜鉛末還元を行い, デアゾ化して, N- (1-ナフチル) エチレンジアミンジヒドロクロリド液を加えて赤紫色を呈させる。このデアゾ化は冷時よりも室温で行つた方がよい結果を得た。2) N-アルコール製水酸化ナトリウム液と煮沸すると黄色となる。定量は定性 2) と同様 N アルコール製水酸化ナトリウム液と煮沸して得る黄色液の吸光度を 400m μ のフィルターで測定して行う。なお Para の抽出にはベンゼンを用い, その際随伴する天然色素類はアルミナ柱を通過 させて除去した。

文 献

- 1) P.R. Averell, M.V. Norris: Anal. Chem., 20, 753 (1948)
- 2) 割石憲一: 徳島県衛生研究所年報第一巻 (1953)

- 3) J. A. A. Ketelaar, J. E. Hellingman: Anal. Chem., 23, 646 (1951)
- 4) J. C. Gage: Analyst, 77, 123 (1952)
- 5) D. J. Lawford, D. G. Harvey: Analyst, 78, 63 (1953)
- 6) W. R. Simmons, J. H. Robertson: Anal. Chem., 22, 294 (1950)
- 7) H. W. Harvey: Analyst, 78, 110 (1953)
- 8) Kathryn O'Keffe, P. R. Averell: Anal. Chem., 23, 1167 (1951)
- 9) C. V. Bowen, Fred I. Edward: Anal. Chem., 22, 706 (1950)
- 10) Robert C. Hirt, J. B. Gisclard: Anal. Chem., 23, 185 (1951)
- 11) C. W. Wilson, Rodger Baier Dale Genune, James Mullooney: Anal. Chem., 23, 1487 (1951)
- 12) P. A. Clifford: J. A. O. A. C., 34, 533 (1951)

Summary

The method of detection and determination of residual parathion in water, vegetables and fruits, was studied. Identification:

- 1) Reduction with zinc dust in acid solution to the amino compound, diazotization, and coupling with N-(1-naphthyl)-ethylendiamine dihydrochloride produces a reddish-violet color.
- 2) Saponification by N alcoholic sodium hydroxide appears a yellow color.

Determination:

The extinction after saponification by N alcoholic sodium hydroxide is measured with a filter of maximum transmittance 400m μ .

Besides, parathion was extracted by benzene. Natural color compounds found in benzene extract were removed by filtration through alumina.

Received April 3, 1954

肉 及 び 肉 製 品 中 亜 硝 酸 の 定 量 に つ い て *

野 崎 泰 彦, 川 田 公 平, 久 保 章

Determination of Nitrites in Meat and Meat Products.

By Yasuhiko NOZAKI, Kohei KAWATA and Aya KUBO

我々は最近肉及び肉製品中亜硝酸の定量を“Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists” (以下 A. O. A. C. と略称) によつて行つたが、その際得た二三の知見を報告する。

亜硝酸定量法: A. O. A. C. (1950). 及びその改良法^{1)~5)}等にもとづき試料の抽出液に試薬を加えて呈色させ、光電比色計を用いて次のように比色定量を行つた。

1 試薬: (griess. 試薬)

(a) スルファニル酸液・スルファニル酸 1g を温湯に溶かし、冷後水を加え 100cc とする。

(b) α -ナフチルアミン液・ α -ナフチルアミン塩酸塩 0.5g に水 100cc を加え、10 分間加温して溶かし冷後水を加えて 100cc とし褐色瓶中に貯える。

(c) 亜硝酸標準液、乾燥亜硝酸銀^{**} 1.1g を亜硝酸を含まない温水約 200cc に溶かし、これに塩化ナトリウム 1g を加え銀を完全に沈澱させ水を加えて 1l にうすめ、この上澄液 100cc をとり水を加えて 1l とし、この 10cc をとり水を加えて 1l とする。この各段階に用いる水は亜硝酸を含まないものを用いる。本液 1cc は亜硝酸性窒素 0.0001 mg に対応する。

あるいは、特級亜硝酸ナトリウムを水に溶かし (1cc 中亜硝酸性窒素 0.0001mg 含有するように) して用いても差支えない (後述)。

2 操 作:

(a) 試料の調製。試料は脂肪と肉の組成割合に注意して採取し、予め肉挽器でひき均等にする。

(b) 検液の調製。試料 5g をホモジナイザー・のカップにとり 80° の水約 40cc を加え、均一な懸濁液とし、この内容物を 500cc のメスフラスコに移し、カップを 80° の温水でよく洗い、洗液をメスフラスコに加え、これに温湯を加えて約 300cc とし、ゆるく栓をして沸騰水浴上で時々ふりまぜながら 2 時間加熱抽出する。次に飽和塩化第二水銀液 (約 8 %) 5cc を加えよく振り混ぜる。冷後水を加えて 500cc とする。次に乾燥濾紙 (東洋濾紙 NO. 4) で濾過し、透明な濁液を検液とする。濾過時液を充分水冷すれば、濾過が容易になり澄明な濁液が得やすい。

(c) 比色 検液 100cc を比色管にとり、リトマス紙に酸性を呈するまで 10 % 塩酸を滴加し、スルファニル酸液及び α -ナフチルアミン液各 1cc を加えよくふりまぜて発色させ、45 分後に光電比色計を用ひ 2) 中心波長 530m μ の濾光板を用いて、吸光度を測定し、その結果を予め亜硝酸標準液を用いて作つた計量曲線に照して、亜硝酸の濃度を求める。

3 呈色液の吸光度曲線: 先に調製した亜硝酸標準液 50cc に水を加えて 100cc (亜硝酸性窒素 0.05P. P. M. 含有) となし、これを検液とし上記 (2) の (c) に準じて呈色させ、45 分後に吸光度曲線を求めたところ Fig1 の如く中心波長 530m μ の比較的狭い吸収を示す。

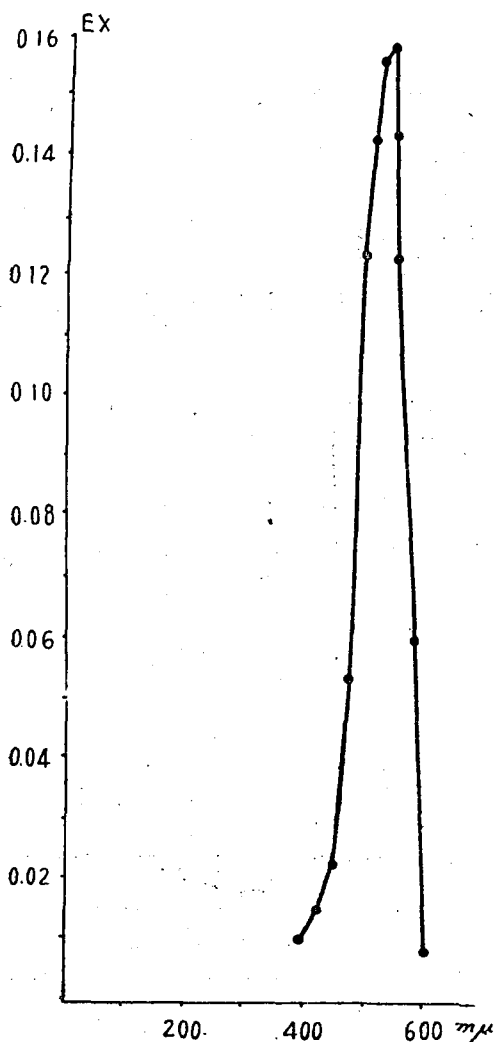
4 計量曲線: 亜硝酸標準液を水で希釈して、種々の濃度の溶液をつくり、(2) の (c) に準じて呈色させ亜硝酸性窒素の含量対吸光度の関係をあらわす曲線を描いた。その結果 Fig. 2. 及び Fig. 3. のように、亜硝酸性窒素の含量 0.007~0.1P. P. M. の範囲では一直線となつた。亜硝酸性窒素の含量が 0.007P. P. M. 未満では直線とならず、また、0.1P. P. M. 以上では沈澱を生ずる。なお亜硝酸標準液として亜硝酸銀から調製したものと、特級亜硝酸ナトリウムから調製したものとのいずれを用いても測定結果に差はない。

5 呈色の経時変化: 1cc 中亜硝酸性窒素の含量 0.02P. P. M. (亜硝酸ナトリウムとして 0.1 P. P. M.) の水溶液

* 本研究は昭和28年4月第6回日本薬学会において発表

** この亜硝酸銀は亜硝酸ナトリウム、又は亜硝酸カリウム約 2g を水 50cc に溶かしこれに硝酸銀液を沈澱の完結するまで加えて静置し、上澄液を傾斜し、冷水で充分洗つて熱湯から再結晶し碧色デシケート中で減圧乾燥したものである。

Fig. 1 呈色液の吸光度曲線



(a) 及び 0.04 P.P.M. (亜硝酸ナトリウムとして 0.2 P.P.M.) の液 (b) について、それぞれ上記方法により呈色させ、27° で 5 分毎に測定した結果 Fig. 4 に示すように、吸光度は (a), (b) 両者共、35 分で最高に達し、以後 25~145 分間不変であつた。

従つて、吸光度の測定は発色後 35~60 分に行うがよい。

Fig. 2 計量曲線

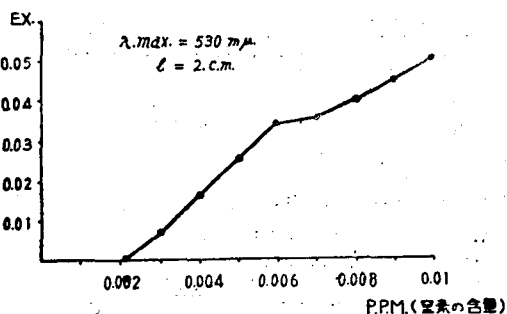
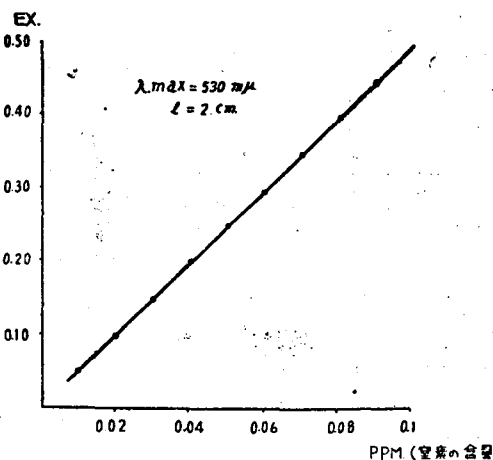


Fig. 3 計量曲線



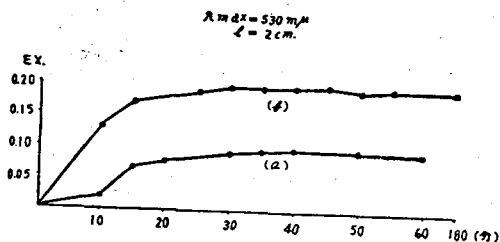
また豚生肉抽出液について呈色させた場合の呈色と時間の関係も、標準液の場合と同様の結果を示し、室温で 40 分後に最高呈色に達し 60 分後になつても同様の値を示した。

6 塩化第二水銀の影響：亜硝酸性窒素の含量 0.1 P.P.M. の液 100cc に飽和塩化第二水銀液 (約 8%) 1cc を添加したものと添加しないものとの両者について定量を行つたところ、定量値に差を認めなかつた。すなわち、塩化第二水銀の存在は呈色に影響を与えない。

生肉の亜硝酸含量：肉製品中ハム・ソーセージ等の原料肉として使用される、豚、兎、山羊、及び馬等の生肉の亜硝酸含有量を知るために前述の方法によつて定量した

結果は次の第 1 表の通りである。肉は 0° で保存した。定量成績は試料中の亜硝酸性窒素を求め、これを NO₂ に換

Fig. 4 呈色の経時変化



算して得た値である (以下同様に NO_2 で示す).

第1表 生肉の亜硝酸含量

(数値は試料中の亜硝酸 (NO_2 として) 含量 (P.P.M.) を示す)

屠殺後 試料	3 日	5 日	7 日	14 日
馬	—	3.48	3.28	17.22*
豚	3.64	3.48	1.58	6.57*
山羊	4.60	4.20	3.74	3.42
兎	6.63*	4.07*	5.52	6.24*
馬	5.92*	10.00*	1.31	1.97

* 検液が極度に混濁した。

この結果から生肉の亜硝酸含量は (NO_2 に換算して) 2~5P.P.M. であつて, 0° で2週間保存した場合の経日変化は著しくない。この成績は6) 菅野の報告とほとんど一致している。

肉製品 (ソーセージ及びハム) の亜硝酸含量 以上で, 抽出液に添加する塩化第二水銀は, 亜硝酸検出量に影響を与えないこと, 肉の亜硝酸含量はたいして多くないことがわかつたので, 次に肉に添加した亜硝酸塩の検出率を知るための実験を行つた。

(1) 試料 豚肉 50%, 兎肉及び山羊肉各 25% 宛混和したもの 22.5kg に塩化ナトリウム 675g, 味の素 30g を添加しこれを三分し, その一部をとつて無使用区とし, 次の一部に硝酸カリウム 15g を添加して硝石区とし, 他の一部に亜硝酸ナトリウム 1.5g を添加して亜硝酸区として, 上記三区毎に, それぞれハム, 及びソーセージを試作した。但し, 三区ともソーセージには各々原料 4.125kg に対し黒胡椒末 12g ずつを添加した。

試作試料はいずれも約 0° の冷蔵庫中に保存した。

(2) 定量成績 各試料 (6 種) について亜硝酸の定量を行つた結果は次の第2表に示した。

第2表 肉製品の亜硝酸含量

数値は試料の亜硝酸 (NO_2 として) 含量 (P.P.M.) を示す。

() 中は検出率 (%) を示す。

区 分	製造後 試 料	2 日	4 日	7 日	11 日
無使用区	ソーセージ	14.40	7.95	5.95	8.02
	ハム	12.20	9.34	9.66	9.54
亜硝酸区	ソーセージ (検出率)	65.00 (49.50)	60.00 (45.75)	55.20 (42.00)	32.85 (20.00)
	ハム (検出率)	59.85 (45.50)	120.50* (91.40)	55.80 (42.50)	60.50 (46.00)
硝石区	ソーセージ	30.50	22.83	39.36	43.52
	ハム	30.83	27.10	43.30	47.23

* 特に高い検出値を示したが亜硝酸ナトリウムの混合不均一のためか, それとも他に原因があつたのか不明である。

上表の結果から無使用区の亜硝酸含量が前出生肉類のそれに比して高い結果を得たのは, 製造工程中同一水槽中で他の二区分の試料と共にボイルしたためあるいは添加塩化ナトリウム中に亜硝酸塩が混入したためかであろう。亜硝酸区においては, 定量値が非常に低く且時日の経過と共に減少の傾向がみられる。硝石区では, 時がたつにつれむしろ定量値が増加する傾向がみられる。

ソーセージ製造工程中の亜硝酸の消長及び食塩の定量: 以上のように亜硝酸の検出率が少ないことの理由として、製造工程中の損失等が考えられるので、各工程で試料を採取し、亜硝酸の消長を調べ、同時に塩化ナトリウムを定量した。

(1) 試料 ソーセージ中にそれぞれ硝酸カリウム、及び亜硝酸カリウム、並にこの両者を併用したもの、更に対照としていずれも添加しないもの等を試作し、その各工程中で次のように試料を採取し、これ等を -15° の冷蔵庫中に貯蔵した。

(A) 試料の区分及び製造工程 試料は四区に区分し、それぞれ次の第3表のように製造工程四段階から採取した。

第3表 試料採取

工程 区分	塩漬後	填充後	乾燥燻煙後	水煮後
無使用区	—	—	—	(13)
硝石区	(1)	(4)	(7)	(10)
亜硝酸区	(2)	(5)	(8)	(11)
併用区	(3)	(6)	(9)	(12)

() 中の数字は試料を示す。

(B) 製造条件原料豚肉 (中ヨークシャー種、牝、体重165kg) は屠殺 (放血量5kg) 後22時間冷蔵庫中に貯蔵し、次のような条件で処理した。

(1) 塩漬時の原料配合割合及び区分は次の第4表の如くで、温度 $3\sim 6^{\circ}$ で46時間塩漬した。

第4表 原料配合割合

原料 区分	赤肉	脂肪	食塩	硝酸カリウム	亜硝酸カリウム
無使用区	7. kg	1. kg	220g	—	—
硝石区	7. kg	1. kg	220g	24g	—
亜硝酸区	7. kg	1. kg	220g	—	0.8g
併用区	7. kg	1. kg	220g	24g	0.8g

(2) 挽肉、煉合、細裁、填充、上の第4表の各区毎にコショウ30g、オイルスパイス5g、コリアンダー10g味の素7g、砂糖45g及び冷水1400cc合計1497gを混和し処理して豚の小腸に填充した。

(3) 乾燥・燻煙 乾燥は $30\sim 45^{\circ}$ で約2.5時間、燻煙は $45\sim 55^{\circ}$ で約1.5時間行なつた。

(4) 水煮 70° で約40分の水煮を行ない、製品とする。

(C) 製造工程中の重量変化、各製造工程において重量の変化する状況は次の第5表の通りである。

(D) 定量成績 前記試料について亜硝酸の検出値、及び検出率、並に塩化ナトリウムの定量成績を次の第6表に示した、塩化ナトリウムの定量としては亜硝酸定量の場合と全く同様にして得た抽出液より硫酸銅で脱蛋白した液について塩素を定量した。

以上第6表の成績で塩化ナトリウムの検出率は工程の進むに従つて減少の傾向があるが、85%以下を示すことは希である。しかるに、亜硝酸検出率は亜硝酸区においては、いずれも60%以下であつて塩化ナトリウムの場合に比べて著しく低い。この現象は、亜硝酸が肉の成分と冷時においても急速に反応して減少するのではあるまいかということ、また併用区にあつては、かような亜硝酸塩の減少と、硝酸塩により、殊に温度の上昇に伴い、細菌の作用その他によつて生ずる亜硝酸塩の増加⁷⁾とが相殺しているのではないかということを想像させる。

肉製品中亚硝酸定量法の検討 上に述べたように、肉製品の亜硝酸検出率が低いのでこの原因を明にするため市販生豚 (挽) 肉を用い次の様な実験を行つた。

第5表 重量変化 (数値は重量 (g) を示す)

状況 区分	① 原料合計	② 挽肉後量	③ 練合時 (加水1400) 総重量	④ 填充時の 重量	⑤ 填充後乾燥 した重量	⑥ 水煮前 重量	⑦ 水煮後の 重量
無使用区	8220.	7000+	8400	1745	1590	1590	1625
硝石区	8244.	7700	9100	2440	2270	2055	2050
亜硝酸区	8220.8	7700	8100	2440	2210	2010	2045
併用区	8244.8	8000+	9100	2280	2115	1895	1930

〔註〕 上表中 (1) の原料総計は (2) に於て何れも減少する, 特に十は 1220g 減少し, このうち約 700g が挽肉機に附着して十へ移行した, 従つて十は 8000g 中 7300g が真の併用区の品質である。(3) に於ては加水希釈される。(4) は (3) を分割填充したので減少したのではない。従つて両者は同一品質のものである。(5) は (4) の乾燥された時の重量で, (7) は (6) の水煮前の重量から水煮によつて増加したことを示す。

第6表 ソーセージ製造工程別中亜硝酸, 及び食塩の定量成績

工程別	試料	無使用区	硝石区	亜硝酸区	併用区
(I) 塩漬後	1 総重量 (kg)	8.220	8.244	8.2208	8.2448
	2 KNO ₃ 添加量 (g/g)	—	0.002910	—	0.00291
	3 KNO ₂ 添加量 (NO ₂ g/g)	—	—	0.000053	0.000053
	4 KNO ₂ 検出量 (NO ₂ P.P.M.)	—	0	32.2	30.1
	5 KNO ₂ 検出率 (%)	—	—	60.87	57.14
	6 食塩添加量 原料に対する (%)	—	2.67	2.68	2.67
	7 食塩検出量 原料に対する (%)	—	3.12	3.08	2.38
	8 食塩検出率 (%)	—	116.85	114.93	89.14
(II) 填充後 (乾燥前)	1 総重量 (kg)	8.400	9.100	8.100	9.100
	2 KNO ₃ 添加量 (g/g)	—	0.002460	—	0.002300
	3 KNO ₂ 添加量 (NO ₂ g/g)	—	—	0.0000505	0.0000417
	4 KNO ₂ 検出量 (NO ₂ P.P.M.)	—	0.66	17.1	17.1
	5 KNO ₂ 検出率 (%)	—	—	33.76	40.94
	6 食塩添加量 原料に対する (%)	—	2.26	2.55	2.14
	7 食塩検出量 原料に対する (%)	—	2.20	2.32	2.29
	8 食塩検出率 (%)	—	97.34	90.98	107.01
(III) 乾燥燻煙後	1 総重量 (kg)	1.590	2.270	2.210	2.115
	2 KNO ₃ 添加量 (g/g)	—	0.002555	—	0.00250
	3 KNO ₂ 添加量 (NO ₂ g/g)	—	—	0.0000541	0.0000463
	4 KNO ₂ 検出量 (NO ₂ P.P.M.)	—	25.00	26.2	43.9
	5 KNO ₂ 検出率 (%)	—	—	48.48	95.03
	6 食塩添加量 原料に対する (%)	—	2.43	2.82	2.31
	7 食塩検出量 原料に対する (%)	—	2.22	2.39	2.19
	8 食塩検出率 (%)	—	91.36	84.75	94.81
(IV) 水煮後	1 総重量 (kg)	1.625	2.050	2.045	1.930
	2 KNO ₃ 添加量 (g/g)	—	0.002630	—	0.002430
	3 KNO ₂ 添加量 (NO ₂ g/g)	—	—	0.000053	0.0000454
	4 KNO ₂ 検出量 (NO ₂ P.P.M.)	8.6	25.0	23.0	42.0
	5 KNO ₂ 検出率 (%)	—	—	43.47	92.75
	6 食塩添加量 原料に対する (%)	2.40	2.41	2.77	2.27
	7 食塩検出量 原料に対する (%)	2.04	1.90	2.06	1.95
	8 食塩検出率 (%)	85.00	78.84	74.37	85.90

(1) pH 豚生肉の水抽出液のpHを測定した結果は7.0~7.1で、飽和塩化第二水銀で脱蛋白後のpHは5.2~5.4、さらにこれに Griess試薬を加え発色させたもの、pHは約2.5であり余り大きな変化は認められない。

(2) 生肉に直接亜硝酸ナトリウムを添加した場合の亜硝酸の定量成績 (a)、市販生豚(挽)肉を乳鉢中で潰し、亜硝酸ナトリウムをそれぞれ200, 100及び50 P. P. M. の割合に添加し充分混和した後、直ちにこれ等について亜硝酸の定量を行つた、その成績は第7表に示した。

第 7 表

区 分	1	2	3	4
NaNO ₂ 添加量(P.P.M.)	—	200	100	50
同上NO ₂ に換算(P.P.M.)	—	131.2	65.6	32.8
NO ₂ としての検出値	3.28	108.2	55.5	26.3
NO ₂ 検出率(%)	—	(80.2)	(84.0)	(80.0)

すなわち、生肉に直接亜硝酸ナトリウムを添加し、直に検出した場合でも検出率は約80%である。

(b) (a)の経時変化、前項(a)の試料を約0°で保存した場合、検出率は4日後75%であり、8日後約50%に低下した。すなわち検出率は時日の経過と共に低下することがわかつた。

(3) 抽出法を変えた場合の検出成績 生豚(挽)肉を、既知濃度の亜硝酸ナトリウム液で温浸、又は冷浸して得た抽出液、及び生豚肉を水を用いて温浸、又は冷浸して得た浸液に一定量の亜硝酸ナトリウムを添加した得た抽出液の両液を飽和塩化第二水銀液で脱蛋白後濾過し、それぞれ検液としてこれについて亜硝酸の検出を行つた結果は次の通りである。

(A) 検液 (a) 1cc中0.328P. P. M. 含有の亜硝酸ナトリウム液を用いて所定の法で温浸して得た抽出液を脱蛋白後濾過する。(b) 所定の方法で水で温浸して得た抽出液に亜硝酸ナトリウムを1cc中0.328 P. P. M 含有するように添加し、脱蛋白後濾過する。

(c) 所定の法で水で温浸し抽出後塩化第二水銀液で脱蛋白後濾過する。

(d) 冷浸法を用い前項(a)と同様に処理した。

(e) 冷浸法を用い前項(b)と同様に処理した。

(f) 冷浸法を用い前項(c)と同様に処理した。

(B) 定量成績 各検液の亜硝酸定量成績は第8表に示した。

第 8 表

検 液	NO ₂ としての検出値 (P. P. M.)	検出率(%)
(a)	0.265	80.0
(b)	0.265	80.0
(c)	0.009	—
(d)	* 0.265	80.0
(e)	* 0.295	78.0
(f)	* 0.039	—

* 検液の混濁を示す。冷浸の場合は透明な濾液が得られない。

この結果より抽出の方法を変えても、脱蛋白濾液に対する亜硝酸の検出率は80%である。なお水浸液は検液が混濁するので真の検出値は80%より低いものと思われる。

(4) 塩化第二水銀による脱蛋白の影響 前項では脱蛋白後亜硝酸の定量を行つたが、次に生豚(挽)肉を用い所定の方法により水で抽出し、塩化第二水銀液を加え脱蛋白後の濾液に亜硝酸ナトリウムの一定量を加えたものを

検液とし、なお、対照として各濃度の亜硝酸ナトリウムの水溶液を用い、それぞれ亜硝酸の定量を行った。その成績は次の第9表の通りである。

第 9 表

検 液	亜硝酸(NO_2 として)検出量 (P.P.M.)	検 出 率
1 肉抽出液 (試料の 100 倍希釈液)	0.164	—
2 検液に NaNO_2 1. (NO_2 として 0.65) P.P.M. 添加	0.650	100
3 " " 0.5 (NO_2 として 0.325) "	0.325	100
4 " " 0.25 (" 0.16) "	0.160	100
5 対照亜硝酸度液 (NO_2 —0.65 P.P.M.)	0.650	100
6 " (NO_2 —0.325 P.P.M.)	0.325	100
7 " (NO_2 —0.16 P.P.M.)	0.160	100

この結果より、肉抽出液の脱蛋白液に対する亜硝酸ナトリウムの添加直後の検出率は 100 % である。従つて、脱蛋白処理によつて沈澱する物質が亜硝酸塩を消費するものと考えられる。

○肉製品中亜硝酸の消失について 脱蛋白処理によつて沈澱する物質中で、亜硝酸を消費する物質として先ずミオグロビン及ドヘモクロビンが考えられるが、他の蛋白質、アミノ酸も亜硝酸を消費⁸⁾ するかどうかを知るために、可溶性蛋白として卵黄及び卵白アミノ酸としてグルタミン酸等を用い次の実験を行った。

(1) 亜硝酸溶液中グルタミン酸の共存する場合の亜硝酸の定量成績 すでに述べたように肉製品中亜硝酸は亜硝酸カリウムとして 0.01 % 亜硝酸ナトリウムとして 0.02 % 程度に使用されグルタミン酸は調味料として製品 100g 中平均 0.1g が使用される。そこで次のように検液を作つた。

(A) 検液 (1) 亜硝酸ナトリウム 0.02g を Clark 及び Lubs の pH = 7.2 緩衝液 (肉の水浸液と同程度) にとかし、100cc とする。(2) 亜硝酸ナトリウム 0.02g 及びグルタミン酸 0.1g を前記緩衝液に溶かして 100cc とする。上記検液 (1) 及び (2) の両液をそれぞれ三分し、肉製品製造条件に準じて 5 日間室温に放置したもの及びその後

第10表 Glutamic Acid 共存亜硝酸液の定量成績

検 液 の 処 理	検液 (各 1cc を 1000 倍に希釈)	塩化第二水銀	亜硝酸検出率 (%)
(室温) 25° 5 日間	(1) の ①	添加した	95
	(2) の ①	"	95
(乾燥、燻煙) 30—40°—2.5 時間 45—55°—1.5 "	(1) の ②	"	90
	(2) の ②	"	95
(水煮) 70° — 40 分	(1) の ③	"	95
	(2) の ③	"	110
亜硝酸標準液	1cc 中 0.0003mg (NO_2 として)	"	98
(室温) 25°— 5 日間	(1) の ①	添加しない	95
	(2) の ①	"	95
(乾燥、燻煙) 30—40°—2.5 時間 45—55°—1.5 "	(1) の ②	"	80
	(2) の ②	"	90
(水煮) 70° — 40 分	(1) の ③	"	95
	(2) の ③	"	105
亜硝酸標準液	1cc 中 0.0003mg (NO_2 として)	"	100

続いて乾燥、燻煙、工程 (30~45° に 2.5 時間, 45~55° に 1.5 時間) 処理し、更に続いて、水煮工程 (70° で 40 分間) 処理したものの三段階に区分した。

(B) 定量成績 各検液 1cc をとり水でうすめて 100cc としたものは肉製品中亜硝酸定量の検液と同濃度であり、この希釈液 10cc をとり、更に 100cc にうすめ、次に塩化第二水銀液を添加したもの及び添加しないもの等について行つた亜硝酸の定量成績は第 10 表の通りである。なお対照として亜硝酸標準液を用いた。

亜硝酸の検出率はほとんど 90% 以上であり、検液中グルタミン酸及び塩化第二水銀の存否は亜硝酸の定量成績に影響を与えない。なお製造工程別に準じて処理したものについても定量成績に著しい差を認めなかつた。

(2) 鶏卵に亜硝酸ナトリウムを添加した場合の亜硝酸定量成績 市販鶏卵について鶏卵自体の亜硝酸を測定し卵黄、卵白に分離して次の検液を作つた。なお実験に用いた鶏卵一個の平均重量約 50g、外殻は全体の 12.5%、卵黄は 32.5%、印白は 55% で、卵黄は pH=6.32、印白は pH=9.3 であつた。又所定の方法によつて亜硝酸を定量した結果、卵黄自体より亜硝酸 (NO_2 として) 約 2 P. P. M.、卵白自体より約 1.5 P. P. M を検出した。

(A) 検液の調製 (a) 卵黄 100g に亜硝酸ナトリウム 0.02g を添加し充分混和し三等分し (a) の (1)、(2) 及び (3) に区分した。(b) 卵白 100g に前項 (a) と同様に処理して三等分し (b) の (1)、(2) 及び (3) に区分した。

(B) 検液の処理 上記検液 (a)、(b) の各々 3 種共 5 日間 0° で保存し、(a) の (1) 及び (b) の (1) はそのまま試験に供し、(a)、(b) の各 (2) 液は 30~45° に 2.5 時間、続いて 45~55° に 1.5 時間処理し、なお (a)、(b) の各 (3) 液は更に続いて 70° で 40 分間加温した。

(C) 定量成績 各検液の亜硝酸定量成績は第 11 表に示した。

第 11 表 数値は亜硝酸 (NO_2 として) 検出率 (%) を示す。

検 液	第 1 回	第 2 回	第 3 回	第 4 回
(a) の ①	76	80	80	85
" ②	80	90	85	90
" ③	80	80	85	80
(b) の ①	90	95	100	100
" ②	87	90	90	95
" ③	90	95	95	90

卵黄に亜硝酸ナトリウムを混和したものは 80~90% の検出率を、卵白に混和したものは 90% 以上の検出率を示した。又製造工程別に準じて処理したものの中には検出率の差を認めなかつた。

(3) 血液中亜硝酸の定量成績 前述の如く卵黄、卵白及びグルタミン酸等に亜硝酸を添加したものからは亜硝酸が殆んど定量的に検出されたので更に血液について亜硝酸の定量を行い、なお血清、血餅、血漿及び血球の各について同様の試験を行つた結果は次の通りである。

(A) 血液中亜硝酸の定量成績 約 0° で保存した猫血液 3 種について亜硝酸の定量を行つた結果、同血液中いずれも亜硝酸 (NO_2 として)、2~4 P. P. M. を検出し、これを 8 日間冷蔵庫中に保存しても定量値に著しい差を認めなかつた。

(B) 血液中に亜硝酸ナトリウムを添加した場合の定量成績 採血後約 0° で 2 日間保存した猫の血液 100g に亜硝酸ナトリウム 0.02g を添加し、直に亜硝酸の定量を行つた結果、その検出値は 70% であり、更に亜硝酸を添加した後 6 日間約 0° で保存した場合の検出率は 15% に減り、なお、同様にして 12 日間保存した場合の検出率は 7.5% に下つた。すなわち、血液に亜硝酸ナトリウムを添加したものからの検出率は、時日の経過と共に減少する。

(C) 血清及び血餅中亜硝酸の定量成績 (1) 兎の血液を採取し、37° の恒温器中 1 時間放置した後、冷蔵庫中に保存し、血清及び血餅に分離し、その各々について亜硝酸を定量した結果、血清の亜硝酸 (NO_2 として) は

15.6P. P. M., 血餅のそれは 13.8P. P. M. であつた。(2) 猫血液について前項同様に処理し, 血清及び血餅に分離し, その各々について亜硝酸の定量を行ひ, 又各々 100g に対し亜硝酸ナトリウム 0.02g を混和し, これについて定量を行つた結果は次の通りである。

(a) 猫の血清中より亜硝酸 (NO_2 として) 約 11.6~15.0 P. P. M. を検出した。(b) 血清に亜硝酸ナトリウムを添加した直後の亜硝酸検出率は 90~100 %。(c) 猫の血餅中より亜硝酸 (NO_2 として) 10.88P. P. M. を検出した。(d) 血餅に亜硝酸ナトリウムを添加した直後の亜硝酸検出率は約 68 %であつた。

(D) 血漿及び血球中亜硝酸の定量成績 猫の血液を採取しクエン酸を加えて凝固を防止し, 血漿と血球に遠心分離し, 血球には更に生理食塩液を加えて洗つた後遠心した。この血漿及び血球について亜硝酸を定量した結果は次の通りである。

(a) 検液の調製 (1) 血漿だけから所定の方法で検液を作つた。(2) 血漿 100g に亜硝酸ナトリウム 0.02g を添加した後同様にして検液を作つた。(3) 血球はそのまま用いた。血球の場合は所定の方法で澄明な検液が得られないので抽出液 50cc に精製酸性白土 2g を加えて濾過し, 更に活性炭 0.5g を加えて濾過し, 澄明な検液を得た。(4) 血球 100g に亜硝酸ナトリウム 0.02g を加え前項 (3) と同様にして検液を得た。(5) 前項 (3) 及び (4) の酸性白土及び活性炭が亜硝酸検出値に及ぼす影響を調査するため, 亜硝酸標準液に前項 (3) と同様に酸性白土及び活性炭を処理して検液とした。(6) 対照として亜硝酸標準液を用いた。

(b) 定量成績 上記各検液について亜硝酸の定量を行つた成績は次の通りである。(1) 血漿の亜硝酸 (NO_2 として) 含量は 12.8 P. P. M. である。(2) 血漿に亜硝酸を加えた場合の検出率は 100 %である。(3) 血球自体から亜硝酸 (NO_2 として) 約 13P. P. M. を検出した。(4) 血球に亜硝酸を加えた場合の検出率は検液調製中の消失を考慮して 37.72 %であつた。(5) 酸性白土及び活性炭を使用することにより亜硝酸添加量の約 40 %が吸着消失する。(6) 標準液より所定の法で行つた検出率は 100 %であつた。

以上の実験により血球に亜硝酸を添加した場合検出率が極めて少なく, 血球中に大量の亜硝酸が消費されることが解つた。

総 括

(1) 肉及び肉製品中亜硝酸はその抽出液に griess 試薬を加えて呈色させ, 光電比色計により 530m μ の濾光板を用い比色定量することができる。

(2) この場合の比色範囲は亜硝酸性窒素としての含量が 0.01~0.1P. P. M. のときである。

(3) 塩化第二水銀の存在は定量値に影響しない。

(4) この法で生肉 (馬, 山羊, 兎, 豚) 中から亜硝酸 (NO_2 に換算して) 2~5P. P. M. を検出し, 約 2 週間 0° で保存しても著しい変化を認めなかつた。

(5) 肉製品 (ハム, ソーセージ) に亜硝酸塩を添加したものからの亜硝酸定量値は, 時間の経過に伴い減少し, 硝酸塩を添加したものからの定量値は, これに反して増加する傾向にあつた。

(6) 更にソーセージの製造工程段階で試験した結果, 並行して行つた塩化ナトリウムの定量値は殆んど 100 %であることから, 工程中諸原料の消失が考えられないのにも拘らず, 亜硝酸の定量値は依然低い結果を示した。然るに, 亜硝酸塩及び硝石併用区は乾燥, 燻煙の加温工程で急激に増加し, 石井⁹⁾の報告に一致した。

(7) そこで, 試料の処理法について検討した結果, 豚生肉の抽出液に塩化第二水銀を加え濾過して得た澄明な検液に亜硝酸を加えた場合の検出率は 100 %であるに反して, 塩化第二水銀で脱蛋白を行う前に添加したものの検出率は 80 %以下で, 更に時日の経過と共に減少した。

(8) 故に塩化第二水銀で沈澱する物質中に亜硝酸を消費する物質があると考え, 可溶性蛋白として卵黄及び卵白, アミノ酸としてグルタミン酸について検討した結果, 卵黄共存時の検出率のみ僅かに少なかつた。

(9) 次に血液について検討した結果血清及び血漿の共存するときは, 殆んど 100 %検出され血餅の共存時には 68 %, 血球の共存時には 37 %検出されるに止まつた。

(10) 従つて, 肉製品中に添加した亜硝酸が定量に検出されない理由は, Haurowitz, Meier Drabkin, Austin の説¹⁰⁾ によると, 亜硝酸が血色素と結合するためと思われる。

本実験に当り、御指導を賜わつた川城生化学試験部長、試料の試作その他に関し御尽力を賜わつた農林省農業技術研究所石井技官及び矢野技官、厚生省乳肉衛生課梅香技官並に食肉加工協会川辺長次郎氏へ対し厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural chemists. (1950) P.204. 362. 2) Journal of A.O.A.C., 35, 80 (1952) 3) F.H. Calvin: Journal of A.O.A.C., 34, 278 (1952) 4) 衛生検査指針 (IV) (1950). 5) Jacobs M.B: The chemical Analysis of food and food-products.II. P.765 (1951) 6) 菅野三郎: 私信; 神奈川県衛生研究所年報に収載の予定. 7) M. Lemoigne, R. Desveaux, and R. Gavard; Compt rend, 218, 215 (1944); C.A., 40, 1552 (1946) 8) H.A.L. Morris; Analyst, 77, 98 (1952). 9) 日本食肉加工情報, 26, (1952) 10) L.A. Greenberg, D. Lester: J. Biol chem., 151, 665 (1943)

Summary

1) Nitrite in meat and meat products can be determined by the application of the Griess reagent to their extract and the coloration there by formed colorimetrically determined by photoelectric colorimeter (Absorption maximum, 530 m μ). The range of colorimetry in such a case is within a range of 0.01-0.1 p.p.m. of nitrite-nitrogen in the sample solution.

2) The presence of mercuric chloride does not affect the determination values.

3) Using this method, 2-5 p.p.m. of nitrite (as NO₂) was detected from fresh meat (horse, goat, rabbit, and hog). There was no marked change after storing for about two weeks at 0°C.

4) The determination values of nitrite in meat products (ham and sausage) to which various amounts of nitrite were added decreased with the passage of time but those added with nitrate tended to increase.

5) Examination during the process of manufacturing sausage showed lower values of nitrite, in spite of the fact that the determination value of sodium chloride was almost 100% and disappearance of various materials during such a process could not be assumed. On the other hand, the determination value of nitrite suddenly increased during drying, smoking, and warming processes in those using nitrite and nitrate.

6) Examination of the treatment of samples showed that the detection of nitrite was 100% when nitrite was added to the clear test solution obtained by the filtration of fresh pork extract after addition of mercuric chloride. On the other hand, the detection rate was 80% when nitrite was added to the extract before deproteinization with mercuric chloride, the value decreasing with the passage of time.

7) It was therefore assumed that there was a substance that consumes nitrite among that precipitates with mercuric chloride and examinations were carried out with yolk and white of an egg as a soluble protein, and glutamic acid as the amino acid. It was found that the detection rate in the presence of egg yolk alone was slightly smaller.

8) Examination with blood showed that the detection of nitrite was 100% in the presence of serum and plasma, while only 68% in the presence of blood clot, and only 37% in the presence of blood corpuscles.

9) It follows, therefore, that the reason for the disappearance of nitrite added to meat products is due to combination of nitrite with hemochromes, as was pointed out by H. Haurowitz, R. Meier, D.L. Drabkin, and T.H. Austin.

Received April 21, 1954

パンの簡易異物検査法

野崎 泰彦, 宮島 弘衛, 清水 央子

Simple Method of Filth Test of Bread

By Yasuhiko NOZAKI, Hiroe MIYAJIMA and Eiko SHIMIZU

パンの異物検査には、従来塩酸による加水分解法と、パンクレアチンによる加水分解法が発表され、後者がよりよい結果を与えるものとして、公定法²⁾に採用されているが、この方法は時間のかゝること、設備を要すること、試薬が高価なことなどの欠点を有するので、著者等は改めて、この二方法について再検討を加え、且つ多少の改良を試みたので、その結果をここに発表する。

なお、塩酸分解法を行つた後、異物をガソリンによつて捕集する際、パン組織、特に上面の薄皮が浮かび上つて異物と混り、鏡検の妨げとなることがしばしばである。著者等は、パンをあらかじめ石油エーテルで脱脂することによりある程度この困難を除くことができた。

実験材料 コッペパン：一個（約 100g）中にマウスの毛約 1cm ずつに切つたもの 5 本、コクゾウ 3 匹を入れて製造した。

実験方法 方法Ⅰ（MethodⅠ）衛生検査指針（Ⅲ）1952 年版異物衛生検査法中の、小麦粉製品（パン、うどん、マカロニ等）の項による方法で、パン 100g を 1 l のビーカーに入れ温湯を加えて軟化し、塩酸を 1% になる様加えて消化し、冷後稀水酸化ナトリウム溶液と第 3 リン酸ナトリウム溶液で pH7~8 とし、パンクレアチン溶液で一夜消化し、これを 140 メツシュの篩で濾し、熱湯とアルコールとクロロホルムで交互に洗う。残留物を濾紙に集めて鏡検する。

方法Ⅱ（MethodⅡ）試料一個を細かくちぎつて 1 l のワイルドマンフラスコに入れ、石油エーテルをパンが浸る程度に加え、時々振りまぜながら 1 時間放置した後、ブフネル漏斗で吸引濾過して、できるだけ石油エーテルを除き、漏斗上の試料を水でワイルドマンフラスコ中に洗い込んで 500cc とし、水浴上で加熱する。この間時々かきまぜ、かつ塊を細かくくだく。石油エーテルを除いた後冷し、塩酸を 1% になるように加え、約 1 時間煮沸し消化する。この間できるだけよく砕く。後冷し、ガソリン 25cc を加え、常法に従い捕集鏡検する。

結果と考察

Table 1.

Nos. of exper.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Method	Filth									
I	Hair	4	4	4	4	5	5	5	5	5
	Rice weevil	3	3	3	3	3	3	3	3	3
II	Hair	3	3	5	4	4	5	5	5	—
	Rice weevil	3	3	3	3	3	3	3	3	—

Table 2.

Nos. of exper.		1	2
Method	Filth		
I	Hair	5	5
II	Hair	5	5

Table 1. より見てコクゾウに関しては両方法とも完全に検出できて差がないが、マウスの毛については検出数が

異なっているので、手技に間違いがないか確かめるため、できたパンにあとから同様の毛5本を加えて行つたところ、Table 2. の如く全部捕集できたので、Table 1 のマウスの毛について、方法ⅠとⅡの結果を検定すると次の如くなる。

方法Ⅰの不偏分散 $V_1=0.27$

方法Ⅱの不偏分散 $V_2=0.785$

$V_2/V_1=2.80$

Ⅰの自由度 $\phi_1=n_1-1=8$

Ⅱの自由度 $\phi_2=n_2-1=7$

F分布表より5%の有意水準は3.50, 1%の有意水準は6.19であるから、方法ⅠとⅡは等分散である。そこで平均値の差の検定を行つた。方法ⅠとⅡを組合せた不偏分散をVとすると

$$V = \frac{\sum(X_1 - \bar{X}_1)^2 + \sum(X_2 - \bar{X}_2)^2}{\phi_1 + \phi_2} = 0.96$$

標準偏差の推定値 $6\sigma = \sqrt{V} = 0.98$

方法Ⅰの平均値 $\bar{X}_1=4.25$

方法Ⅱの平均値 $\bar{X}_2=4.56$

$$\therefore t = \frac{4.56 - 4.25}{0.98 \sqrt{\frac{1}{8} + \frac{1}{7}}} = 0.64$$

t分布表で自由度 $\phi = \phi_1 + \phi_2 = 8 + 7 = 15$ に対するtの値は、有意水準5%のとき2.13で、1%のとき2.94である。

故に両平均値間に有意な差は認められない。従つて方法Ⅰに比べてより簡単な方法Ⅱも同様の結果を与えるものと思われる。

本研究を行うに際し御援助を賜つた日本パン技術協会阿久津正蔵氏及び研究の趣旨を理解され、試料の製造に当られた三國パン店主故岡田浜造氏に対し感謝の意を表する。本研究の費用の一部は、厚生科学研究費より仰いだ。

文 献

- 1) Kenton L. Harris and Rosemary E. O'Brien: J. A. O. A. C., 29, 84~89 (1946).
- 2) Methods of Analysis of A. O. A. C., 714 (1950)

Summary

No significant difference between the pancreatin digestion and hydrochloric acid digestion methods of filth test of bread can be noticed on statistical evaluation.

Received May 6, 1954

食品及び薬品の異物検査 (I) 新考案の異物抽出装置

豊田 勤 治, 持田 研 秀, 永 田 正

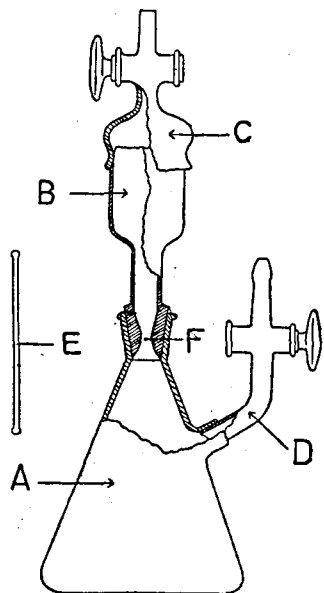
Tests on the Extraneous Materials in Food,
Food Products and Medicines (I)

By Kinji TOYODA, Kenshu MOTOMA and Tadasu NAGATA

まえがき 微細物の抽出には以前より数種の方法が採択されているが、その内、水よりも軽い有機溶剤を使用し、異物の抽出を実施する場合には、従来 Wildmann Trap Flask(以下 W. T. F. と略称する)を利用して来たが、操作上甚だ不便を感じたので第一図のような新考案装置を作り使用した。又水よりも重い液体中で沈澱する異物の抽出に当つては、従来分液漏斗やビーカを使用して来たが、此の操作のためには、第二図のような抽出装置を考案した。前者の装置は検体中の成虫又は其の破片や汚染物をガソリン、エーテル等の有機溶剤で混合し浮上させて分離する目的に使用し、後者の装置は検体中の砂粒、ねづみの糞、蠅の卵、うじのように水より重い液体(例えばクロロホルム)中で沈澱する異物を抽出し分離する目的に使用する。

実 験 の 部

操作 1. 水よりも軽い有機溶剤で抽出される異物の分離装置(第一図参照) 検体の所要量をフラスコ(A)内容500~300ccに入れ、有機溶剤として例えばガソリン50ccを加え、振盪しながら側管(D)の括栓を開き水を注入すると、ガソリン層は水の上部に汚染物や異物を含んで浮上する。其のガソリン層の上端がフラスコ(A)の上部



第一図

A…内容500cc~300cc三角フラスコ
B…トラップ管。C…トラップ管上蓋。
D…フラスコ側管。E…攪拌棒
F…小径通孔

に来た時に側管(D)の括栓を閉じ、一時水の注入を止め、攪拌棒(E)でフラスコ(A)の内面に附着している汚染物をガソリン層に浮上させて後、攪拌棒に附着している汚染物を噴射瓶で洗い落す。次にトラップ管(B)の上蓋(C)の括栓を開いたままトラップ管(B)をフラスコ(A)に差し込み、再び側管(D)の括栓を開いて水を注入させると水面の上昇に従つてガソリンは汚染物と共にトラップ管(B)の小径通孔(F)を通つてトラップ管(B)内に入る。ガソリン層の全部がトラップ管(B)内に入った時に側管(D)の括栓を閉じて数分間静置し次に上蓋部(C)の括栓を閉じてトラップ管(D)と共に垂直に保ちながらフラスコ(A)より抜き取り、トラップ管(B)を垂直に保ちながらブフナー濾斗或はヒッシュの濾斗の上に移し上蓋部(C)の括栓を開き濾斗上にガソリン層を移し、吸引濾過する。上蓋部(C)をはずし管内を水洗し汚染物を濾紙上に捕集し顕微鏡で其の数を求める。

第二回以後の操作は側管(D)の括栓を下方に廻転し、フラスコ(A)内の水層を小ビーカーに約20cc位取り、フラスコ(A)にガソリン約10ccを加え、振盪攪拌し、前回同様操作して汚染物を濾紙上に採取する。尚小ビーカーの水に少量のガソリンを加え攪拌し静置後ガソリン層を傾斜して前の汚染物と共に濾紙上に取る。

W. T. F. と改良型装置の操作及び実験結果の比較 W. T. F. は1lの容量で先ず試料を入れ、次にガソリン20ccを加えガソリン層が口頭の部分に来る迄ゴム栓の附いた攪拌棒で攪拌しながら水を加える。ゴム栓の附いた攪拌棒を上引きあげフラスコの肩にあてがつてガソリン

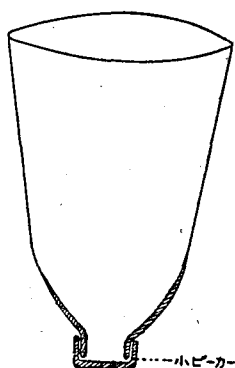
層だけを濾紙上に流し取る。この際相当の技術を要するが改良装置では此の点簡単である。

試料として米(輸入米)を選び、1回の試料50g宛25回、成虫、成虫の破片、夾雑物(植物繊維、ワラ)等について検査を行つた結果は第一表の通りである。

両者の成績に就いては類似の成績を得た。

第一表 T. T. A. (改良装置) と W. T. F. との比較成績

回数	異物名 装置	成 虫		成 虫 破 片		夾雑物(植物繊維)	
		T. T. A.	W. T. F.	T. T. A.	W. T. F.	T. T. A.	W. T. F.
1		8	6	17	19	45	43
2		6	7	16	16	38	46
3		9	9	14	16	41	42
4		5	6	17	14	40	38
5		7	5	18	17	39	41
6		9	7	21	20	39	41
7		7	7	19	21	41	43
8		7	5	21	19	41	40
9		6	4	18	18	45	43
10		6	6	19	17	43	45
11		6	9	16	17	40	39
12		9	7	15	16	46	44
13		10	9	16	15	45	42
14		9	12	14	19	41	44
15		10	10	15	18	44	46
16		6	6	14	14	41	42
17		4	7	17	15	42	43
18		7	5	16	12	45	45
19		5	4	16	13	42	42
20		5	7	14	14	43	41
21		6	7	15	16	43	46
22		7	7	14	16	44	45
23		9	9	16	17	42	46
24		6	8	17	17	42	41
25		7	10	15	19	46	42
合 計		176	179	410	415	1060	1070
平 均		7.04	7.16	16.4	16.6	42.4	42.8
標準偏差		1.89	1.99	2.0018	2.1688	2.199	2.225



第二図

操作 2. 水よりも重い液体中で沈澱する異物抽出の新装置(第二図) 土・砂・礫、ねづみの糞、蛹のうじ等のようなものは、比重1.4の附近の液体中では穀類は浮上するのに反して、これ等のものは沈澱するが、我々の考案した新装置は此の点を利用し、先ず検体を新装置に採り、クロロホルム又は四塩化炭素を加え混合しよく攪拌し、異物の沈着を待つて傾斜により上部からクロロホルム層を別のビーカーに流し移す。再び同溶剤を加えて浮上するものが無くなるまで攪拌し流し出す。次に下部の小ビーカーを取りはづし其のまま顕微鏡で個数を求めるか、又は内容物を水洗しながらブフナー漏斗に傾斜し、濾過した後濾紙を取りはづし、顕微鏡で個数を求める。

実験結果 我々が市販の票おこしについて検査した結果を第二表に示す。検体は10g宛20社のものを試験し、特に土砂の多い製品に対しては製造上の注意を要することがわかった。なお、水よりも軽い溶剤で抽出した異物の数も記載した。

第二表 市販票おこしの異物検査成績

異物名 検体番号	成虫及其の破片	織 維	夾 雑 物	ワ	ラ	石 粒	砂 粒
1	0	3	5	5	0	15	
2	0	2	5	4	0	11	
3	0	2	4	3	3	15	
4	0	3	8	4	0	9	
5	1	3	10	4	0	8	
6	0	3	5	3	0	7	
7	0	4	8	4	0	14	
8	0	2	5	3	0	11	
9	0	3	6	5	0	8	
10	0	2	3	1	0	2	
11	0	5	4	2	0	20	
12	0	3	10	2	0	14	
13	0	4	5	3	0	12	
14	0	4	7	4	0	6	
15	1	3	8	3	0	7	
16	0	3	8	2	0	7	
17	0	3	6	4	0	7	
18	0	4	4	5	0	7	
19	0	2	2	5	0	2	
20	0	3	2	6	0	16	

結論 以上の成績により両改良装置は異物検査に当つて従来の W. T. R. や分液漏斗、ビーカー等に比し多くの検体を迅速に、且簡便な操作で正確に実施できる事がわかった。

文 献

- 1) Microanalysis of Food and Drug Products. 2) 衛生検査指針, III, 107. 3) 食品衛生研究, Vol.1 No.4, No.7. 4) 衛生研究報告, 70, 49

Summary

We tested the extraneous materials in rice and Awaokosi (Japanese rice cake) by newly designed apparatuses. By these apparatuses we obtained the same results on the isolation of filths as that by the Wildmann Trap Flask. We found that the new apparatuses are more convenient and more rapidly operative than the Wildmann Trap Flask.

Received April 1, 1954

食品及び薬品の異物検査(Ⅱ) 生薬製剤の異物検査

豊田 勤治, 持田 研秀, 永田 正

Tests on the Extraneous Materials in Food,

Food Products and Medicines (Ⅱ)

By Kinji TOYODA, Kenshu MOTIDA and Tadasu NAGATA

まえがき 日局Ⅵの通則(13)生薬の項で“生薬はカビ、昆虫又は動物による汚損物又は混入物をできるだけ除いたものでなければならない”と記載されて居り、生薬の異物について規制されている。又一般試験法には異物検査の項があり“肉眼的抽出で異物を定量する”と言う記載がある。因に米局Ⅳの通則では“Vegetable and Animal Drugs”の項で、四目に分けて異物の定義を記載している。局方の規定では肉眼的抽出によつて実施されているので、我々は試みに食品の異物検査の抽出装置として使用したものを薬品に適用し、更に精度を高め、異物検査として興味ある結果を得る事ができた。

実験には主として内地製の生薬類で粉末品、カット品の市販のもの、及びその貯蔵中虫喰いに遭つた製品を使用した。

実験並実験成績 市販生薬製剤又は貯蔵中虫喰いに遭つた製品を細割し、20gを取り、80%アルコールで一昼夜浸漬放置し、浮上するものが無くなつてから、第一報に述べた装置を利用して主としてガソリンを有機溶剤として試験した。なお追加する水の代りに80%アルコールを使用した。

第一表に示すように市販生薬製剤(カット品)Ⅰ、Ⅱ、では石粒を若干認めただけで微生物の混入を認めなかつた。

第一表 市販生薬製剤異物検査成績

異物名 検体名	成虫	破片	幼虫	石粒	土砂
Ⅰ	0	0	0	5	0
Ⅱ	0	0	0	6	0

第二表に示す如く虫喰いの状態にある製剤については相当数の虫体：虫体破片、幼虫、土砂等を認めた。

虫体は“ひめまるかつをぶしむし”だに、くも、あり、幼虫は“ひめまるかつをぶしむし”の幼虫であつた。この試料は貯蔵中に虫喰いに遭つた生薬である。

検体は100gを取り、10gずつ10回に分け検査を実施した。

結論 医薬品中特に生薬及び其の製剤では現在まで余り異物検査はされていなかったもので、試みに生薬製剤について本実験を実施して見たが、正確且迅速簡易に検査できる事がわかつた。

第二表 生薬類の異物検査成績

異物名 検体名	成虫	破片	幼虫	石粒	土砂	その他	成虫及び幼虫の名称
牡丹皮	24	105	0	8	僅微	0	
地黄	110	28	0	0	僅微	0	ちびかくかに虫に類似
吉草根	114	326	0	0	微	0	ひめまるかつをぶし虫に類似
白芷	90	180	0	0	微	0	
当归	872	3152	68	微	少量	0	①だに、 ②昆虫の幼虫（げじげじ虫に類似）
黄耆	70	248	0	0	僅微	0	あり
粉末生薬	119	187	147	0	微	0	ひめまるかつをぶし虫に類似及びその幼虫
川芎	46	11	0	0	僅微	0	ひめまるかつをぶし虫に類似及びその幼虫
大蓍	246	150	0	0	僅微	0	
秦艽	76	812	0	0	微	0	ひめまるかつをぶし虫に類似
蘆根	256	840	0	0	微	0	①あり ②くも

終りに臨みこの検査の実施に当り、昆虫の鑑定をお願いした京都大学理学部市川教授に対し感謝します。又生薬製剤を提供された保栄薬工の西保氏に対し謝意を表します。

Summary

Tests on the extraneous materials in crude drugs were made. The isolation of filths was carried out according to the method described in the report 1. We found many kinds of insects, mites and sands.

Received April 1, 1954

牛乳由来ブドウ球菌に関する研究（第3報）

牛乳飲用によるブドウ球菌性食中毒事例

鈴木 昭

Studies on the Biological Function of Staphylococci from Bovine Milk(3)

On the Staphylococcus Food Poisoning due to Drinking City Milk

By Akira SUZUKI

まえがき 著者は先に第1報¹⁾、第2報¹⁰⁾において、牛乳由来ブドウ球菌（以下ブ菌と称す）の生物学的性状について、特に食中毒原因菌としての立場から、種々検討を加えた。その結果生物学的性状による病原性株、非病原性株の区別はなお困難であること、特にエンテロトキシン産生株、非産生株の区別の困難なことを確認した。かつ溶血性においては、 α/α 型、 α/β 型の特異の溶血型を示す菌株のなかに、エンテロトキシン産生株を見出すことが出来る点も併せて報告した。

更に原因食として牛乳はいうに及ばず、バター、チーズ等乳製品が数多く関係していた事実^{1), 4), 6)}を確かめ、牛乳由来ブ菌が公衆衛生上は勿論、酪農経営に及ぼす影響の甚大な事実⁸⁾にも論及し、著者の一連の研究が牛乳由来ブ菌を目標とした原因を説明した。

今回たまたま都下某療養所内において、原因不明の急性胃腸炎の頻発する事件にあい、症状が比較的ブ菌性食中毒によく類似していることから、その原因を一応常用している牛乳に求め、その牛乳飲用を中止させたところ、同様症状の中止するを見た。よつてその原因牛乳を詳細に調べたところ、ブ菌を数多く、しかも純培養状に分離し得、実験的に仔ネコ、仔イヌに対して、同様症状を起させることができた。

なお原因牛乳からサルモネラなどの検出は陰性であつた。

この報告では、その事件の臨床概要、原因牛乳試験成績、分離菌株の生物学的性状、原因牛乳の処理されたミルクプラントの衛生かんりの状況、分離菌株の動物（仔ネコ、仔イヌ）に対する病原性の試験成績について報告する。

1) 臨床概要（昭和26年9月14日）昭和26年9月14日某所に胃腸炎を主症状とする患者多数が一時に発生したので、食物に疑いをいただき、その原因食とおぼしきものを詳細に調べたところ、牛乳飲用者にはのみ発生し、しかも飲用量の多いものほど症状の重いこと、牛乳飲用を中止したら、同症状の全くやんだことから、牛乳に原因ありと推定し、之を調べるに、この牛乳は、都下某牛乳店より毎日配達されるもので、事件発生当日は、午前9時30分頃当所に配達され、直ちにビンのまま、患者に配られ、煮沸せずに、そのまま飲用した。患者の中には、粉乳を水に溶かしたような、又舌にザラザラしたものを感ぜずくて飲用を中止したものもあつた。

なお同様なことは以前から頻発し、配布された牛乳の大半が未飲用のまま捨てられたようなこともあつた。たまたま飲用した患者に急性胃腸炎症状の散発することがあつても、罹患者が、結核患者であつたために、他に原因を求める傾向があり、牛乳は余り問題にされていなかった。

2) 症状 症状については第1表に示す通りである。

第1表 症 状

氏 名	性	年齢	発病迄の時間	前 駆 症 状					中 毒 症 状				
				悪心	嘔吐	全身倦怠	頭痛	めまい	下痢	胃部痛	臍部及下腹部痛	食欲不振	発熱
1 爪 ○ て ○ 子	女	32	30	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
2 山 ○ 和 ○	女	21	35	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
3 出 ○ 純 ○	女	24	30	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4 三 ○ 房 ○	男	37	40	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5 谷 ○ 辰 ○ 雄	男	46	50	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+

氏 名	性	年齢	発病迄の時間	前 駆 症 状					中 毒 症 状				
				悪心	嘔吐	全身倦怠	頭痛	めまい	下痢	胃部痛	臍部及下腹部痛	食欲不振	発熱
6 山 ○ 平 ○	男	18	30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7 岩 ○ 酉 ○	女	23	60	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8 水 ○ 八 ○ 代	女	23	40	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
9 横 ○ 日 ○ 子	女	19	40	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
10 吉 ○ 道 ○	女	33	35	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
11 出 ○ 好 ○	女	29	30	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
合 計				9	0	6	3	0	0	8	8	5	4

3) 牛乳試験成績 患者の発生と共に、牛乳の飲用を禁止し、残余を直ちに検査した。その成績は、第2表に示す通りである。

第2表 牛乳試験成績

番 号	pH	塩素量	カタラーゼ	細胞数 万/cc	細菌数 万/cc	脂胞率%
1	6.2	卅	-	37	320	2.85
2	6.4	+	+	21	150	2.75
3	6.7	卅	卅	47	310	2.75
4	6.6	卅	-	18	170	2.75

す通りで、施設状況は各ビン共に不良で、風味悪く、pHは少々低下し、脂胞率が規格よりはるかに低く2.75%であり、細菌数も多く、特に細胞数が病的数値(50万/cc以上は異常乳)に近い数値を示した。これよりブ菌を純培養状に分離し得、サルモネラなどの分離は陰性であった。

4) 分離ブ菌の生物学的性状 供試牛乳中から分離したブ菌の中、代表菌株4株について、その生物学的性状を調べた。その成績は第3表に示す通りである。

その指標⁹⁾として、マンニト分解作用(M)、血漿凝固作用(C)、75% NaCl 抵抗性(N)、溶血性(H)をとりあげてみると M(C.N.H) 配列完全型〔+(+++)]であり、溶血型は $\alpha'\alpha$ 型、 $\alpha'\beta$ 型¹⁰⁾であった。

第3表 分離菌の生物学的性状

菌株番号	色素産生	マンニト分解	血漿凝固	7.5%NaCl抵抗	溶 血
食 I	黄色	+	卅	+	$\alpha'\alpha$ 型
食 II	〃	+	卅	+	$\alpha\alpha$
食 III	〃	+	卅	+	$\alpha'\beta$
食 IV	〃	+	卅	+	$\alpha'\beta$

5) 原因牛乳の処理されたミルクプラントの衛生かんりの状況 このミルクプラントに集収される農家乳の乳房炎の状態を調査するに、乳房炎乳、或は異常乳は60%もしめており、日本平均の42%を、はるかに上まわる状態で、農家乳の品質は必ずしも良好とはいえない状態である。このような農家乳を集配して、1日量4石程度の処理を行い、併せて、販売(小売)をも営んでいる。その処理行程をみると、農家から持ち込まれた牛乳は、濾過することなく、低温殺菌機(1石入)に送り込まれ、70~75°Cで35分以上の保持式加熱を受けた後、表面式クーラーで冷却され、自働ビン詰機にかけられ、型のように打栓、ビン装を終るのである。

中毒発生5日後の9月19日の朝行つた工場調査の結果によると、殺菌前の濾過を行っていない点以外は、殺菌前の処理行程には、疫学的異議をさしはさむ余地は一応ないようである。寧ろ前記の加熱程度はは所定の低温殺菌温度(64±1)°30分を、はるかに上まわっているほどである。但し殺菌機には自記温度計の設備なく、その時の加熱温度が、たまたま75°Cであったのを認めただけで、保持時間については、係員の申告以外には、よりどころのないことを附記しておく必要がある。

しかし、牛乳処理行程の要点ともいうべき加熱温度に、このような違反のあつたことは、当工場の衛生かんり状態に良心的なものの認められない第1の点である。

それに加えて、殺菌後の処理行程には甚だ問題になるところが多い。

即ち1) 冷却は特別の冷却室を使用しているにもかかわらず、クーラー最上部にある殺菌済み牛乳の受容器には、ガ、その他の昆虫類、塵埃などが多量に溜つており、又冷却室天井には、クモの巣が張つている状態であつた。

2) 冷却機から導かれた1本のパイプは、ビン詰機の上で直角に下向して、冷却牛乳が、ビン詰機の受槽に流下する仕掛けになっているが、当日最初の殺菌、冷却、ビン詰など作業開始前に、上記のパイプが、未だ空であつた時、パイプの直角下向部の盲管部を開いてみたところ、そこに稀薄な脱脂乳様の洗滌残さ液が多量に貯つているのを認めた、(その1ccを滅菌脱脂綿に取り、10cc 滅菌生理食塩水に採取し試験に供した)。

3) 自働打栓機は2本立であるが、牛乳ビン接触部は、使用後洗滌滅菌した形跡なく、不潔な黒褐色を呈するグリース様塊物の多量に固着しているのを認めたので、前記同様、内外4ヶ所から供試材料を採取した。打栓機の調子は甚だ悪く、完全に密栓のできるものは、数えるほどしかない状態であつた。

4) ビンの洗滌滅菌も極めて悪く、50%以上は、ビンの底に凝固牛乳残さが、附着している状態で、打栓不良ビンと併せると、満足にビン装されるものは、100本中20本を出ないだろうと推定される。

以上殺菌後における不良なかんり状況は、疫学上注目すべき第2の点である。

次にビン装後の牛乳は、すべて冷蔵庫に入れ、処理の翌日小売店又は直接消費者に配達されるといつていたが、その冷蔵庫はブラインを通してなく、調査当時の庫内温度は18°C(室外21°C)であつた。

庫内には配達残品(前日処理)98本を貯蔵してあつたが、さかさにすると、溢乳の認められるもの、或は溢れでてしまうものなど47本を認めた。その他牛乳輸送管の滅菌設備のないこと、従業員の中に化膿創のできている者の認められたこと、服装、作業などに衛生的教育訓練の不十分なることを思わせるもの等が多く、Hucker¹⁾も指摘するように、注目すべき第3の点として考えられる。

このように処理の全行程を通じて、特に殺菌後のかんり状態において、衛生上致命的な欠陥が多いが、上記5試料についての細菌学的検索では、枯草菌などのために、思わしい所見が得られなかつた。大腸菌群試験成績は第4表に示す。

第4表 大腸菌群試験成績

	採取所	サンプル	大腸菌群 M.P.N.	ブドウ 球菌	サルモ ネラ	枯草菌 其の他
1	下向パイプ盲管部	脱脂乳様洗滌残さ	1500	—	—	+
2	打栓部内側	グリース様塊物	3200	—	—	+
3	"	"	670	—	—	+
4	打栓部外側	"	2100	—	—	+
5	"	"	1500	—	—	+

6) 分離ブ菌をCO₂ 20%, O₂ (又は空気) 80%の嫌気性培養下で、Dolman²⁾培地を用い、72時間37°Cで培養し、その濾液を体重100gに対して、約0.5~1ccの割に腹腔注射及び経口投与により、実験的に中毒症状の起るや、否やを調べた。

実験方法

イ) 使用菌株

中毒時に飲用牛乳より分離せる代表ブ菌2株、及び対照として、牛乳由来エンテロトキシン非生産ブ菌2株計4株を用いた。

ロ) 使用培地。Dolman培地を使用した。

ヘ) 培養条件

CO₂ 20%, O₂ (又は空気) 80%の嫌気性条件で72間37°Cで培養。

ニ) 濾液製法

上記培養をガーゼで良く濾過し、寒天を出来るだけ除去し、遠心沈澱して、沈澱物を除去した後、ザイツ濾過器

で濾過したものを、100°C30分加熱して、他の毒素(溶血毒、壊死毒、致死毒)を完全に破かいし、一応エンテロトキシンのみにした後供試した。

実験成績 実験成績は第5表其の1及び其の2に示すように、今迄報告されている成績(2).3).4).5).6).7)と大体一致する。

第5表 エンテロトキシンの仔ネコ、仔イヌに対する病原性

其の1 腹腔注射による成績

接種別	動物別	体 重	接種或 は投与 量	発 症 時 間 及 び 症 状					備 考	
				1〜30分	30〜60分	60〜90分	90〜120分	150分		
腹 腔 注 射	第 1 例 仔ネコ	520gr	5.0cc	沈流 嘔吐 下痢	静涎 回1回	嘔吐 2 回 (胃液嘔吐) 下痢 3 回 (内 2 回水 様下痢)	食、欲なし	嘔吐 1 回 (胃液に血 液様物質混 在)	食、欲なし	2〜3 日 回 復 発熱なし
	第 2 例 仔ネコ	480gr	4.8 "	流嘔 嘔吐	涎回 2回	嘔吐 2 回 下痢 2 回 (内 1 回水 様下痢)	下痢 4 回 (内 3 回水 様下痢) 血液様物質 混在	沈 静	虚脱状態	翌朝死亡 "
	第 3 例 仔イヌ	2200 "	11.0 "	沈流 嘔吐	静涎 回3回	沈 静	嘔吐 1 回	嘔吐 1 回 下痢 2 回 (水様下痢)	食、欲なし	翌朝回復 "

其の2 経口投与による成績

経 口 投 与	第1例 仔ネコ	610 "	6.0	流 嘔 吐	涎 回 3回	食欲減退	下痢1回	食欲増加	回 復	発熱なし
	第2例 仔ネコ	320 "	3.2	流	涎	食欲なし	下痢1回	食欲増加	"	嘔吐なし
	第3例 仔イヌ	2100 "	21.0	沈 流	静 涎	悪心状態	漸次元気増 加	食欲増加	"	" 下痢なし

対照として、牛乳由来ブ菌で一応エンテロトキシン非産生株と思われるものを、同様実験を行うに、全く何等の変化もなく、嘔吐、下痢は勿論、食欲減退も認められなかつた。更に対照例は陽性例に比べて、腹腔注射、経口投与とも約1.5倍から、2倍量をやつても、全く陰性におわつた。

考察 著者は都下某療養所内に発生した市販牛乳飲用による中毒事件にあい、その症状が比較的ブ菌によるそれに良く類似していることから、一応ブ菌性食中毒症と考え、その中毒患者の臨床概要、原因牛乳の試験成績、分離ブ菌の生物学的性状、原因牛乳の処理されたミルクプラントの衛生かんり状態、分離ブ菌のいわゆるエンテロトキシンによる仔ネコ、仔イヌに対する病原性につき詳細に検査した。

1) ミルクプラントより某療養所に配達された牛乳は、風味悪く、粉乳を水で溶かしたようないわゆる品質不良牛乳で、事件発生当日前にも、しばしば同様な症状が散発していたが、罹患者の発生数の少いことから、余り問題にされず、特に本療養所は、結核患者のみ取扱っている関係から、他に原因を求め、牛乳によるものとは、余り考えられていなかった。

しかし患者の牛乳飲用者の減少する事実、又牛乳自身の品質不良から、一面において、牛乳自体にも、何等かの原因ありやと推定して、かねがね注意は一応していた。

たまたま事件発生当日、比較的多数、しかも一時に発生し、牛乳飲用者にもみえたことから、牛乳飲用を中止したところ、同様症状の全く起らぬを確認し、牛乳を容疑者として取上げた。中毒患者が結核患者で、体力抵抗性などは、健康人に比較して、弱いと想像される者に、発生したにかかわらず、比較的軽症で、典型的な中毒症状としての嘔吐、下痢のなかつたことは、ブ菌性のものであつたとしても、その毒素は余り強烈なものではなかつたと考えられる。

2) その原因牛乳を試験するに、その品質は著しく不良で、脂肪率は低く、細胞数は病的数値に近い値を示し、栄養的にも不良で、異常乳に等しい牛乳であつた。それらの牛乳中からは、何れもブ菌が純培養状に、しかも数多

く分離され、サルモネラなどは全く認められなかつた。

3) 原因牛乳より分離したブ菌の生物学的性状を見るに、M (C.N.H.) 配列完全型で、しかも溶血型は α/α 型及び α/β 型である点からみても、中毒原因菌としての可能性は一応肯定できる。

4) 原因牛乳の処理されたミルクプラントに集収される農家乳の品質、衛生かんりの状況を詳細にみるに、乳房炎の罹患状況は、全国平均を上まわり、品質必ずしも良好とはいえない。

その設備は勿論、取扱いにも物心両面に衛生思想の全く欠除している状態である。処理前の牛乳が、ブ菌性乳房炎からのものと仮定すれば、75℃30分の加熱処理では、中毒症状を起し得るものと考えてよからう。

たとえ、このことが否定されたにしても、殺菌後の牛乳が洗滌、滅菌不十分のパイプ、容器を通じて、二次汚染にさらされたことは、殺菌牛乳に、大腸菌群の陽性をみたことから想像できる。このことから比較的高温で処理したといわれる牛乳中に、ブ菌が純培養状に証明されたことは、何の不思議もない。処理完了後の牛乳の処置についても、甚だ問題があり、取扱などの不備、不注意から、菌の増殖、毒素産生等が、助長されたのではなからうか。

5) 分離ブ菌の仔ネコ、仔イヌによる実験成績を見るに、特に腹腔注射においては、実験的に典型的な急性胃腸炎症状を起し得、しかも経口投与によつても、前者に比べると軽症ではあるが、同様症状の起し得ることから、たとえ人体実験による成績をまたずとも、飲用牛乳中から純培養状に分離されたブ菌がその原因であり、ブ菌性食中毒と断定して、先ずあやまりはなからうと思う。

む す び

著者は都下某療養所内に発生した市販牛乳による食中毒事件にあい、その症状が、比較的ブ菌によるそれに良く類似していることから、一応ブ菌性食中毒と考え、その中毒患者の臨床概要、原因牛乳の試験成績、分離菌の生物学的性状、原因牛乳の処理されたミルクプラントの衛生かんりの状況、分離菌のエンテロトキシンによる仔ネコ、仔イヌの実験成績から次のように結論した。

1) 本食中毒事件は市販牛乳が、処理行程においてブ菌により汚染され、その後の処理の不完全による菌の増殖、腸管毒産生によるブ菌性食中毒症である。

此の稿をおわるにあたり、部長八田貞義博士、家畜衛生試験場北海道支場長山田俊雄博士、東大物療内科の足立舜二先生に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Hucker, G. J. : Am. J. P. H., 29, 1247—1249 (1939).
- 2) Dolman, c. E., Wilson, R. J., ; Am. J. P. H., 31, (2), 68—69 (1940).
- 3) 鶴見三三, 岩田謙, 入山謙三, 前山亮東, 杉山三郎, 藤見摘彦, : 東京医事新誌, 3102, 2524—2530, (1938).
- 4) 小島太郎 : 細菌学雑誌, 522, 445—465, 525, 705—721, (1939).
- 5) 児玉威, 畑正世, 渋谷よし : 東京医事新誌, 3166, 3149—3153 (1939).
- 6) 小島三郎, 八田貞義 : 食物中毒菌, 金原商店 (1940).
- 7) 小島三郎, 大橋久治 : 実験医学, 25, (5), 495—503 (1941).
- 8) 山田俊雄, 鈴木昭, 尾藤行雄 : 酪農事情, 10, (7)14—16, (8) 18—20, (1950).
- 9) 鈴木昭, 中野龍雄 : 総合医学, 7, (8), 883—885 (1950).
- 10) 鈴木昭 : 国立衛生試験所報告, 71, 73—81, 82—96 (1950).

Summary

A staphylococcal food poisoning case due to contamination by the staphylococcus aureus during pasteurization process of City Milk was reported.

Received April 1, 1954

牛乳由来ブドウ球菌に関する研究 (第4報)

エンテロトキシン (培養濾液) による基礎実験成績

八 田 貞 義, 鈴 木 昭, 林 富 子

Studies on the Biological Function of Staphylococci from Bovine Milk (4)

Studies on the Nature of Enterotoxin of Staphylococci from Bovine Milk

By Sadayoshi HATTA, Akira SUZUKI and Tomiko HAYASI

まえがき 鈴木はさきに牛乳由来ブドウ球菌 (以下ブ菌とする) の生物学的性状¹⁾, 特に溶血性²⁾と病原性, 非病原性の問題, 更にそのエンテロトキシンとの関係, 抗生物質に対する態度³⁾, 酪農に及ぼす影響^{4,5)}, 市販牛乳飲用による食中毒事例⁶⁾等について報告した。こゝにはブ菌のエンテロトキシンに就て, 精査した成績について報告する。

実験方法 1) 供試菌: 乳房炎乳及び異常乳由来29株, 食中毒由来 (市販飲用牛乳によるもの) 2株, 正常乳由来2株と対照に蛋白煉製品由来2株計35株を実験に供した。

2) 培養方法と濾液の製法: 800cc 入り大型シャーレに, 250cc ずつ注入した Dolman 培地に, プイヨン24時間培養菌250ccを加え, (CO₂20%, 酸素又は空気80%の混合気体嫌気培養下)に37°, 72時間培養する。

次いで前記の培地を「ガーゼ」で濾過, 寒天分を除去し, 遠沈して上清を得, これをザイツ濾過器で濾過する。濾液は100°30分加熱して原液とし, これを試験に供した。

対照には培地のみのを, 同様に操作して供試した。

3) 実験動物 (仔ネコ, 仔イヌ) ^{8) 9) 10)} と接種量: 仔ネコは生後1~2ヶ月, 体重250~1000g (至適体重500~600g), 仔イヌ¹¹⁾は生後1~2ヶ月, 体重1.0~5.0kg前後 (至適体重1.0kg~1.5kg), いずれも健康なものを実験に供した。

接種量は, 一応仔ネコの場合は体重100gに対して, 濾液1ccの割に接種し, 仔イヌの場合はこの半量とした。

実験成績 (基礎試験) 1) 牛乳由来株の疫学的考察: 成績は第1表に示すように, M. (C. N. H.) 配列³⁾によると, 臨床型→乾乳型→異常乳型→正常乳型の順に, 十から一へと次第に病因的意義がうすれて行く移行像が見られる。このことから, 乳房炎乳, 異常乳飲用による食中毒が, 一応肯定される。

第1表 牛乳由来株の疫学的考察

分 類	病 型	臨 床 型	乾 乳 型	異 常 乳 型	正 常 乳 型	対照(蛋白食品)
1. 菌 型						
staph. aureus.	22	2	11	53	0	
" albus.	16	5	17	109	1	
" citreus.	0	0	1	8	0	
" epidermidis.	0	5	15	189	1	
" muscae.	0	0	1	20	0	
其 の 他	0	1	2	57	4	
計	38	13	47	436	6	

2. M. (C. N. H.)

M. マンニト分解能	+	38	7	56	194	5
	-	0	6	21	242	1
C. 血漿凝固能	+	37	9	8	30	0
	-	1	4	39	406	6
N. 7.5 % NaCl 抵抗性	+	36	13	37	378	0
	-	2	0	10	58	6
H. 溶血性	+	38	10	12	16	0
	-	0	3	35	420	6

M. C. N. H

3. M. (C. N. H) 配列

+	(+ + +)	28	6	2	13	
+	(+ + -)	8	1	3	11	
+	(+ - -)	1				
+	(- + +)					
+	(- + -)			19	159	
+	(- - -)	1		2	9	5
-	(+ + +)		2		1	
-	(+ + -)			3	4	
-	(+ - -)				1	
-	(- + +)		2			
-	(- + -)		2	10	188	
-	(- - -)			8	48	I

M……マンニト分解 C……血漿凝固 N……7.5 % NaCl 抵抗性 H……溶血性を示す

2) エンテロトキシン産生株の生物学的性状: 溶血性²⁾, ゼラチン液化性¹⁾等に就いてみると(第2表), エンテロトキシン産生株は, すべて陽性であるが, 非産生株にも多くの陽性株が見出された。溶血性においては, 特異の型²⁾を示すものの中に比較的エンテロトキシン産生株から多いように見うけられた。なお非溶血株には, (Dolman, Wilson, Cockerott (1936)⁷⁾の提唱にもかかわらず, 肯定することは出来ず, むしろ Barber (1914)³⁰⁾, Dack, Cary, Woolpert, Wiggers (1930)³¹⁾等と同様否定する成績がえられた。エンテロトキシン産生株は M (C. N. H.)²⁹⁾配列完全型に包含されうが, 不完全型には, 1株も認められなかつた。

その他の生物学的性状と, エンテロトキシンとの相関関係は, 求めえなかつた。

第2表 エンテロトキシン産生株の生物学的性状

菌 株 名	M (C. N. H.)	ヒ ツ ジ, ウ 溶 血 シ 型	ゼラチン液化性	エンテロトキシン		
P 18	+	(+ + +)	α'α. αβ.	+	(濾 斗 状)	卅
P 19	+	(+ + +)	α'α. α'α.	+	(")	卅
食 I	+	(+ + +)	α'α. αβ.	+	(")	卅
食 II	+	(+ + +)	α'α. αβ.	+	(")	卅
P 8	+	(+ + +)	α. α'α.	+	(")	卅
P 65	+	(+ + +)	α. αβ.	+	(桿 状)	卅
P 66	+	(+ + +)	α. αβ.	+	(濾 斗 状)	卅
P 20	+	(+ + +)	α'α. α.	+	(")	卅
P 1	+	(+ + +)	α. α.	+	(")	+
P 81	+	(+ + +)	α. α.	+	(")	+
P 61	+	(+ + +)	— αβ.	+	(皿 状)	+
P 60	+	(+ + +)	β. β.	+	(濾 斗 状)	+

菌 株 名	M (C. N. H).	ヒツジ、ウシ 溶 血 型	ゼラチン液化性	エンテロトキシン
P 62	+	α .	+	+
P 63	+	α .	+	+
P 78	+	α .	+	+
P 79	+	α .	+	+
P 80	+	α .	+	+
P 82	+	α .	+	+
P 21	+	α .	+	+
P 76	+	α .	+	-
P 85	+	α .	+	-
P 2	+	β .	+	-
P 9	+	β .	+	-
P 59	+	β .	+	-
P 4	+	β .	+	-
P 5	+	-	+	-
1 C	+	-	+	-
P 30	+	-	+	-
P 36	+	-	+	-
P 64	+	-	+	-
P 83	+	-	+	-
P 6	+	-	-	-
P 10	-	-	-	-
A 2	+	-	-	-
対 照	-	-	-	-

3) エンテロトキシン以外の毒素の破壊: Fulton¹³⁾, ³²⁾ 等により Staphylolysin による急性胃腸炎症状の誘起が報告されているので, 100°C 30 分加熱操作により, 果してエンテロトキシン以外の毒素(溶血毒, 壊死毒, 致死毒)は破壊されるか, 否かを確認するため, 第3表の実験を行った。

すなわち, 加熱前に溶血毒 6,400 倍, 壊死毒 200 倍, 致死毒 860 倍を示した P18 株の毒素は加熱により陰性となった。

第3表 エンテロトキシン以外の毒素の破壊

加 熱 前											
菌株名	毒 素			200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800	25,600
	溶 血 毒	血 死 毒	毒 死 毒	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
P18	溶 壞 致	死 死	毒 毒	卅	-	-	-	-	-	-	-
	致	死	毒	卅	卅	卅	+	-	-	-	-
対 照	溶 壞 致	血 死 死	毒 毒 毒	-	-	-	-	-	-	-	-
加 熱 後											
P18	溶 血 毒	血 死 毒	毒 死 毒	-	-	-	-	-	-	-	-
	溶 壞 致	死 死	毒 毒	-	-	-	-	-	-	-	-
	致	死	毒	-	-	-	-	-	-	-	-
対 照	溶 壞 致	血 死 死	毒 毒 毒	-	-	-	-	-	-	-	-

本試験 1) 仔ネコの腹腔内注射による成績：その成績は(第4表)小島等²¹⁾の成績と大体同様である。使用菌株35株中12株(34%)に陽性、7株(20%)に疑陽性を認めた。いずれの場合にも、発熱は認められないが、陰性株において、注射直後、鎮静状態となり、まぎらわしい症状を呈することもあつたが、Rigdon 40)も述べているようにエンテロトキシンによる中毒症状と鑑別できないものではない。

第4表 仔ネコの腹腔内注射による成績

菌株名	体重	接種量	症 状		予 後	備 考
			嘔 吐	下 痢		
P 18	620g	6.2cc	7分~170分4回	(水様下痢) 120分 1回	300分回復	発熱なし 200分~250分(沈静)
P 19	525	5.2	—	200" 1"	300" "	30"~75"(")
食 I	540	5.4	9"~135" 9"	—	翌朝死亡	150"~250"(")
食 II	560	5.6	5"~200" 8"	(水様下痢2回) 85"~260" 3"	"	250"~400"(")
P 8	540	5.4	5"~135" 10"	(水様下痢) 15"~240" 4"	"	250"~500"(")
P 65	560	5.6	55"~65" 2"	—	150"回復	"
P 66	470	4.7	22"~150" 9"	(水様下痢1回) 20"~130" 3"	翌朝死亡	150"~300"(")
P 20	525	5.2	25"~120" 7"	(水様下痢) 90"~ 1"	250"回復	150"~230"(")
P 1	540	5.4	—	90" 1"	150" "	"
P 81	530	5.3	16"~180" 8"	(水様下痢) 90" 1"	350" "	200"~300"(")
P 61	370	3.7	18"~170" 5"	(水様下痢) 180" 1"	300" "	200"~230"(")
P 60	340	3.4	28"~90" 4"	150" 1"	300" "	170"~250"(")
P 62	320	3.2	—	200" 1"	300" "	発熱なし
P 63	620	6.2	—	250" 1"	300" "	"
P 78	600	6.0	—	200" 1"	300" "	"
P 79	600	6.0	—	150" 1"	300" "	"
P 80	540	5.4	—	120" 1"	150" "	"
P 82	530	5.3	—	300" 1"	400" "	"
P 21	700	7.0	—	150" 1"	200" "	"
P 76	900	9.0	—	—	異常なし	"
P 85	700	7.0	—	—	"	"
P 2	530	5.3	—	—	"	"
P 9	540	5.4	—	—	"	"
P 59	350	3.5	—	—	"	"
P 4	650	6.5	—	—	"	"
P 5	300	3.0	—	—	"	"
I C	380	7.5	—	—	"	"
P 30	300	6.0	—	—	"	"
P 36	250	5.0	—	—	"	"
P 64	540	10.0	—	—	"	"
P 83	620	12.0	—	—	"	"
P 6	350	7.0	—	—	"	"
P 10	350	7.0	—	—	"	"
A 2	370	7.4	—	—	"	"
D 1	420	8.4	—	—	"	"
対 照	750	15.0	—	—	"	"

2) 接種別による症状第：5表より腹腔注射による成績が最も典型的な症状がみられた。皮下注射においては、嘔吐がなく、下痢も一般におそく発現し、予後は腹腔注射の場合より不良で、死亡するものもある。静脈注射の優秀性を説く業績もあるが、われわれの成績では、心臓接種と同様、対照（培地）の注射にも認められたようなショックなどがあらわれて、果たしてエンテロトキシンによるものか、否かの判定に困難であつた。よつて以後の実験には接種方法を腹腔内注射法とした。Davison, Dack, Cary (1938) ³³⁾ は、エンテロトキシンの証明法として、静脈内接種法が他の方法に比較して、非常に優れているが、デリケートな試験であるから、接種量に注意しなければならないと述べている。又 Hammon (1941) ³⁴⁾ もこの方法は簡単で、親ネコでも使用出来ること、相当程度の抵抗性をかくとくするまで、使用出来るなど、その優秀性を説いているが、われわれはこれらの意見を肯定しえなかつた。

第5表 接種別による症状

接種別	例	体重	接種量	症 状		予 後	備 考
				嘔 吐	下 痢		
腹 腔	1	620	6.2	10～25分3回	—	100分 回復	発熱なし
	2	580	5.8	3～65" 4 "	(水様下痢1回) 35～150分4回	300" "	"
	3	370	3.7	15～90" 4 "	120～200" 2 "	300" "	"
皮 下	1	540	5.4	—	—	100" "	"
	2	670	6.7	—	120～180" 2 "	翌朝 死亡	20～60分(悪心沈静)
	3	470	4.7	—	200" 1 "	400" 回復	60～170" (")
静 脈	1	540	5.4	—	—	200" "	" 60～120" (")
	2	760	7.6	—	—	200" "	" 5～150" (") 10ショック
	3	420	4.2	—	—	200" "	" 15～90" (") 6ショック
心 臓	1	1150	10.5	—	—	翌朝 死亡	" 1～60分虚脱 60～120" (沈静)
	2	750	7.5	—	—	"	" "
	3	350	3.5	—	—	180" 回復	" "
対(培 照)地	腹腔	450	4.5	—	—	100" "	発熱なし
	皮下	750	7.5	—	—	200" "	"
	静脈	820	8.2	—	—	200" "	1～60" 虚脱 60～120" 皮静
	心臓	450	4.5	—	—	翌朝 死亡	1～60" " 60～120" "

3) 仔イヌの腹腔内注射による成績：仔ネコによる成績において、比較的強陽性を示す5株と、陰性5株につき

行つた成績は第6表に示す通りである。仔ネコにおける症状と全く同様で、成績もよく一致する。しかし接種量は、仔ネコの半量で足りた。

Dolman, Wilson Cokeroff (1936) 7) の意見とは反するが、寄生虫、ジステンパーなどの疾患に留意すれば、仔イヌは実験動物に立派に供し得られる。

第6表 仔イヌの腹腔内注射による成績

仔ネコに よるエン テロトキ シン産生	菌株名	体重	接種量	症 状		予 後	備 考
				嘔 吐	下 痢		
陽 性 株	P 18	2000g	10.0cc	2~190分 6回	(水様下痢1回) 150~160分 2回	300分 回復	発熱なし
	食 I	1900	9.5	3~45" 7"	(水様下痢1回) 21~250" 5"	350" "	"
	食 II	2300	11.5	20~150" 6"	(水様下痢1回) 130~210" 3"	300" "	"
	P 8	2100	10.5	5~150" 7"	(水様下痢1回) 30~200" 3"	300" "	"
	P 66	2100	10.5	90~200" 5"	(水様下痢1回) 250~320" 3"	400" "	"
陰 性 株	P 78	2100	10.5	—	—	異常なし	"
	P 85	2100	10.5	—	—	"	"
	P 4	2100	10.5	—	—	"	"
	1 C	2100	10.5	—	—	"	"
	A 2	2100	10.5	—	—	"	"
対 照	培 地	2300	11.5	—	—	"	"

4) 動物の個性と中毒症状：同一菌株の濾液を3匹の仔ネコに用いて、症状のあらわれ方を比較してみると、(第7表参照) 動物の個体差、感受性などにより症状のあらわれ方に強弱がある (Dack, Jordan, Woolpert (1931) 23.) したがってこれを毒素の強弱と直接結びつけて考えることはできないが同一菌株につき繰返し実験を行えば、或る程度相対的の強弱を推察することは、無理ではないようである。

第7表 動物の個性と中毒症状

菌株名	体重	接種量	動物	症 状		予 後	備 考
				嘔 吐	下 痢		
P 8	650	6.5	仔ネコ	5~280分 10回	(水様下痢) 15~230分 3回	死 亡	発熱なし 300~500分(沈静)
	300	3.0	"	7~90" 6"	(水様下痢) 55~75" 2"	200" 回復	" 120~150" (")
	470	4.7	"	45~400" 4"	(水様下痢) 250~450" 3"	600" "	" 450~530" (")
対 照	陰性 株	620	"	—	—	異常なし	発熱なし
	培地	580	"	—	—	"	"

5) エンテロトキシンに対する習慣性 エンテロトキシンの実験動物(仔ネコ、仔イヌ)には季節的に制限があるので、勢い同一動物を何回も実験に用いることがある。はたして何回実験に供し得るや、否やを見ると第8表の通りである。

第8表 エンテロトキシンに対する習慣性

(第1実験)

エンテロトキシン別	菌株名	体重	接種量	症 状		予 後	備 考	対 照地
				嘔 吐	下 痢			
陽性	P 8	590	5.9	15~120分6回	(水様下痢1回) 65~180分4回	400分回復	発熱なし 200~300分(沈静)	—
陰性	1 C	590	5.9	—	—	異常なし	発熱なし	—
陽性	P 18	590	5.9	6~165〃7回	50~250分4回	500分回復	300~400〃(沈静)	—
陰性	P 4	590	5.9	—	—	異常なし	〃	—

(第2実験)

陽性	P 8	750	7.5	12~ 80〃4回	45~150〃3回	200分回復	〃	—
陰性	1 C	750	7.5	—	—	異常なし	〃	—
陽性	P 1	882	8.2	15~ 25〃3回	40~150〃4回	200〃回復	〃	—
陰性	P 4	820	8.2	—	—	異常なし	〃	—

即ち第1実験における3日間休養の成績においても又第2実験の10日間休養においても、陽性株の場合は、常に陽性成績を得、陰性株の場合は、常に陰性成績で、陽性株が陰性に、陰性株で陽性に発現するようないわゆる習慣性の誘発は認められなかつた。これから、その飼養管理さえよければある程度、何回も実験に供し得るものといえる (Davison, Dack (1939) 39)。

6) 減圧濃縮と中毒症状: 濾液を濃縮した場合と、非濃縮の場合とにつき、同一仔ネコ、同一菌株の濾液を用いて比較検討した (第9表)。即ち非濃縮の場合は嘔吐は7回で、下痢を認めなかつたが、回復後3日間休養させた

第9表 減圧濃縮と中毒症状

区 分	体 重	接種量	症 状		予 後	備 考
			嘔 吐	下 痢		
非濃縮	625	6.2	9~135分7回	—	200分回復	発熱なし
対 照	800	8.0	—	—	異常なし	〃
濃 縮	625	6.2	95~210〃8回	(水様下痢3回) 97~300〃4回	翌朝死亡	300~500〃(沈静)
対 照	800	8.0	—	—	異常なし	発熱なし

後、濃縮したものを注射した場合には、嘔吐までの時間は長い、嘔吐、下痢は共にひどく翌朝死亡した。対照例は非濃縮、濃縮共に何ら異常は認められなかつた。

7) α 澱粉の影響: 培地中の α 澱粉とエンテロトキシン産生との関係をみるため、陽、陰各代表株4株について実験を行った (第10表)。即ち陽性株においては、 α 澱粉の存在の如何にかかわらず、その中毒性には影響がない。陰性株においても同様で、 α 澱粉の添加により、陰性株から陽性株に移行するようなことはなかつた。

Jordan, Burrow 35) は培地中に1%の澱粉の添加により、エンテロトキシンの産生が促進されること、更にこれに経代すること7代位が効果的であるとしている。ところが Shaughnessy, Grubb (1936) 36) はルゴール・イオデン溶液を用い、培養後にも澱粉は水解されずに残ることを知り、もし1%澱粉により、能力を回復し得るとすれば不思議なことであると反ばくしている。小島、大橋 (1941) 21) は大体において Jordan 一派の見解を肯定している。

第10表 培地中の α 澱粉の影響

菌株名	α 澱粉	仔ネコ別	体重	接種量	症 状		予 後	備 考
					嘔 吐	下 痢		
陽性株	加	A	650	6.5	5~95分8回	(水様下痢2回) 105~230分4回	翌朝死亡	発熱なし 280~400分(沈静)
		B	300	3.0	12~90"5"	55~95"2"	200分回復	100~180"(")
	非	C	650	6.0	30~60"3"	40"1" (水様下痢2回)	150"	70~100"(")
		D	540	5.4	3~120"6"	20~200~3"	翌朝死亡	210~300"(")
陰性株	加	A	650	6.5	—	—	異常なし	発熱なし
		B	300	3.0	—	—	"	"
	非	C	650	6.5	—	—	"	"
		D	540	5.4	—	—	"	"
対照	加		420	4.2	—	—	"	"
			560	5.6	—	—	"	"
	非		370	3.7	—	—	"	"
			480	4.8	—	—	"	"

8) 培養条件による影響: 以上の成績はすべて、CO₂20%, O₂(又は空気)80%の混合ガス嫌気培養下 7). 25). 26). 30). 37) でなされた培養濾液についてであるが、第11表のように好気培養下でも、軽い症状を出す菌株もあるので、炭酸ガス混合嫌気下培養は、絶対条件とはいえない。これに賛するものとして Dack, Jordan, Woolpert, (1931) 23) Dack, Woolpert, Noble, Halliday (1931) 24) の報告がある。

第11表 培養条件による影響

菌株名	培養条件	動物別	体重	接種量	症 状		予 後	備 考
					嘔 吐	下 痢		
P18	CO ₂ 20% 空気80%	仔ネコ	655	6.5	5~150分7回	35~250分4回	400分回復	発熱なし 300~400分(沈静)
	フラスコ (37°C)	仔イヌ	4100	10.0	35~70"3"	—	200" "	80~150"(")
	室温 (20°C)	仔ネコ	480	4.8	—	—	異常なし	"
	CO ₂ 20% 空気80%	仔ネコ	720	7.2	10~66"4"	(水様下痢1回) 60~150"3"	300分回復	150~230"(")
	フラスコ (37°C)	仔イヌ	4100	12.0	—	150"1"	300" "	30~120"(")
	室温 (20°C)	仔ネコ	520	5.2	—	—	異常なし	"
対照(培地)	CO ₂ 20% 空気80%	仔ネコ	655	6.5	—	—	"	"
	フラスコ (37°C)	仔イヌ	4100	10.0	—	—	"	"
	室温 (20°C)	仔ネコ	480	4.8	—	—	"	"
	CO ₂ 20% 空気80%	仔ネコ	720	7.2	—	—	"	"
	フラスコ (37°C)	仔イヌ	4100	12.0	—	—	"	"
	室温 (20°C)	仔ネコ	480	4.8	—	—	"	"

9) 耐熱性: エンテロトキシンの耐熱性に関する確認試験は第12表に示してある。

第12表 耐 熱 性

100°による成績

PM	動物別	作用 用時	体 重	接種 量	症 状		予 後	備 考	対 照
					嘔 吐	下 痢			
7.0	仔ネコ	1	480	4.8	10~40分3回	80分 1回	200分回復	発熱なし	—
	"	3	680	6.8	25~36"3"	70~90"2"	300" "	"	—
	"	5	750	7.5	6~8"3"	(水様下痢) 3~60"3"	200" "	100~200" (沈静) 60~130" (")	—
2.0	"	1	650	6.5	3~4"2"	—	100" "	"	—
	"	3	680	6.8	6~8"2"	—	200" "	60~100" (") 30~130" (")	—
	"	5	750	7.5	—	—	異常なし	"	—
9.0	"	1	750	7.5	—	120" 1"	200分回復	"	—
	"	3	700	7.0	—	—	異常なし	"	—
	"	5	480	4.8	—	—	"	"	—

120°による成績

7.0	仔イヌ	0.5	2300	11.5	2~25"9"	(水様下痢4回) 25~270"5"	500" "	"	—
	仔ネコ	0.5	620	6.2	8~45"4"	65~90"2"	200" "	300~400" (") 120~150" (")	—

Rigdon (1938) 40) はエンテロトキシンの耐熱性を疑っているが, Davison, Dack (1939) 39) もいうように, 長時間加熱するか, 或は高压下加熱に伴う毒性の減弱は, 動物実験により, はつきり測定することは困難のように思う。

10) 保存性並に耐酸, 耐アルカリ性: 第13表のように濾液を氷室, フラン器 (37°), 室温 (約20°) の3者に分ち, pH を 1.5, 9.0, 7.0 に分けて観察した。

第13表 保存性並に耐酸, 耐アルカリ性

温度 別	PH	感染 作日	体 重	接種 量	症 状		予 後	備 考	対 (培地) 照
					嘔 吐	下 痢			
氷	1.5	1	520	5.2	12~45分4回	(水様下痢1回) 90~130分2回	翌日死亡	発熱なし 50~300分(沈静)	—
		3	680	6.8	25~31"3"	" 1"	300分回復	"	—
		10	750	7.5	19~21"3"	(水様下痢) 240 1"	400" "	60~200" (")	—
	9.0	1	420	4.2	12~24"2"	70" 1"	200" "	"	—
		3	370	3.7	11~12"2"	—	200" "	"	—
		0	680	6.8	—	—	異常なし	"	—
	7.0	1	500	5.0	8~70"5"	60~150"3"	300分回復	"	—
		10	720	7.2	12~80"3"	40~150"3"	300" "	150~230" (")	—
		30	620	6.2	5~120"5"	(水様下痢1回) 23~200"2"	300" "	150~230" (") 200~230" (")	—
		60	340	3.4	60~90"3"	120~200"3"	300" "	200~230" (")	—

温度別	PH	感数 作日	体 重	接 種 量	症 状		予 後	備 考	対(培地) 照)
					嘔 吐	下 痢			
フ	1.5	1	510	5.1	1~80"10"	150~200"2"	翌日死亡	200~500" (")	—
		3	520	5.2	15~35"3"	(水様下痢) 90"1"	300"回復	200~200" (")	—
		10	750	7.5	—	—	異常なし	"	—
ラ	9.0	1	490	4.9	3~15"3"	—	150"回復	"	—
		3	550	5.9	2~10"3"	—	翌日死亡	"	—
		10	680	6.8	—	—	異常なし	"	—
器 (37°)	7.0	1	450	4.5	13~90"5"	200"1"	300"回復	"	—
		10	370	3.7	5~60"3"	90"1"	150" "	"	—
		30	470	4.4	14~20"2"	120"1"	150" "	"	—
		60	320	3.2	40~20"2"	—	150" "	"	—
室	1.5	1	690	6.9	19~34"3"	90~150"2"	300" "	150~230" (")	—
		3	570	5.7	35~42"3"	130"1"	300" "	150~230" (")	—
		10	750	7.5	40~46"3"	—	300" "	60~200" (")	—
温	9.0	1	470	4.7	27~41"3"	—	300" "	60~200" (")	—
		3	320	3.2	21~30"2"	—	150" "	"	—
		10	320	3.2	"	—	異常なし	"	—
温 (15°)	7.0	1	620	6.2	25~90"4"	65~150"2"	200分回復	"	—
		10	520	5.2	12~75"3"	47~150"3"	200" "	"	—
		30	670	6.7	21~60"3"	100~130"2"	200" "	"	—
		60	900	9.0	10~70"4"	120"1"	200" "	"	—

Jordan, Dack, Woolpert (1931)²³⁾によると3~4週間、67日後も変化なかったと述べ、Minet²⁷⁾ (1938)はHClでpH5.0にし室温下1週間後に破壊され、37°では24時間後に破壊されたという。Hammon (1941)³⁴⁾によると、pH4.5、37°で24時間保たれ、pH8.2にも酸同様影響なかったとある。この他胃液の酸度と中毒罹患の関係論じた(Borthwick (1933)⁴¹⁾, Tanner Ramsey (1932)¹⁰⁾, Shaughnessy, Grubb⁴²⁾報告も多数ある。

11) ホルマリンによる影響 エンテロトキシンのホルマリンに対する態度については、種々論議されているが、その抗原性、真性毒素との関係などについては、未だ確立された結論がない。われわれの成績は第14表に示してある。個々の成績、例えば0.4%のように嘔吐、下痢がなくても予後不良で翌日死亡している例や、又3日後に急性胃腸炎症状を示さず、5日後に嘔吐の認められる例など、幾多の不規則な成績から、エンテロトキシンによる症状か、或はホルマリンによるためか、この実験からははつきりしなかった。Dolman (1934)²⁶⁾はホルマリンにより無毒化されること、Minet (1938)²⁷⁾は0.3%で37°48時間は破壊されず、10日後に無毒化されたと述べている。

第14表 ホルマリンによる影響

濃度	感日 作数	菌株 名	体 重	接種 量	症 状			予 後	対 照
					嘔 吐	下 痢			
0.1%	1日	P 18	650	6.5	7~35分4回	150分 1回		3日後死亡	—
	3	"	570	5.7	3~120" 2"	45" 1"		300分回復	—
	5	"	370	3.7	4~25" 2"	70" 1"		翌日死亡	下痢2回
0.2"	1	"	700	7.0	13~150" 2"	35~120" 2"		"	—
	3	"	820	8.2	5~70" 4"	—		"	—
	5	"	670	6.7	—	45~200" 4"		3日後死亡	—
0.3"	1	"	620	6.2	3~45" 8"	130" 1"		翌日死亡	—
	3	"	520	5.2	9~13" 2"	—		300分回復	—
	5	"	650	6.5	45" 1"	—		200" "	翌日死亡
0.4"	1	"	720	7.2	40~45" 2"	—		200" "	—
	3	"	470	4.7	—	—		翌日死亡	—
	5	"	570	5.7	70~120" 3"	—		"	—
0.5"	1	"	550	5.5	24~35" 4"	—		150" 回復	—
	3	"	500	5.0	—	180~300" 3"		当日死亡	下痢1回
	5	"	720	7.2	—	—		異常なし	—

12) エンテロトキシンの簡易抽出法 培養濾液から、エタノール、エーテルによる直接抽出方法を試みるに、共に酸性メヂウムにおいて、その沈澱物に、濾液同様の急性胃液腸炎症状を起し得る物質がもとめられた (第15表)。エーテルの場合はエーテルと濾液層の中間析出部分に認められた。Davison, Dack (1939) 39) はエタノールで処理し、pH6.8, 7.2, 8.0 で沈澱する部分に、エンテロトキシンを証明している。粗製カゼイン水解培地及び infusion broth に培養した濾液は、エタノール或はエーテルで抽出出来ることを Jordan, Barrow (1933) 22) は述べている。しかし Hammon (1941) 34) はこれに反対している。クロロホルムによる抽出は、われわれの成績では陰性におわつた。Jordan, Barrow (1933) 22) はエタノール同様酸性メヂウムで、完全抽出されるというが、Davison, Dack (1939) 39) はこれを否定している。

第15表 エンテロトキシンの簡易抽出法

溶媒	pH	体 重	接種 量	症 状			予 後	備 考	対 照
				嘔 吐	下 痢				
エタノール	1.5	470	4.7	10~120分5回	(水様下痢1回) 72~150分3回		300分回復	発熱なし 150~230分(沈静)	—
	7.0	630	6.3	—	—		異常なし	発熱なし	—
	9.0	750	7.5	—	—		"	"	—
クロロホルム	1.5	620	6.2	—	—		"	"	—
	7.0	750	7.5	—	—		"	"	—
	9.0	340	3.4	—	—		"	"	—

溶媒	pH	体重	接種量	症 状		予 後	備 考	対 照
				嘔 吐	下 痢			
エーテル	1.5	4100	20.0	10~70〃7回	150 1〃	350〃回復	150~300分(〃)	—
	7.0	2200	11.0	—	—	異常なし	〃	—
	9.0	2300	11.5	1	—	〃	〃	—

む す び

われわれは牛乳由来ブ菌35株を用い、特にエンテロトキシンを中心に、生物学的性状との関係、濾液による基礎試験を系統的に検討し次のような結論を得た。

1) 牛乳由来ブ菌の中、特に乳房炎乳、異常乳由来のブ菌の一部は、食中毒を起し得ることが肯定される。その頻度は他の起原によるブ菌のそれよりもかなり大きいようである。

生物学的性状がM(C. N. H.)配列の完全型に一致し、特異の溶血型を示すものは、エンテロトキシン産生可疑菌株として取りあげ得る。

2) 実験動物としては、仔ネコが優秀であるが、仔イヌも、それに優るともおとらない成績を示し、十分に試験に供し得られる。

接種方法としては、いずれの場合も腹腔注射が最もよい。又動物のエンテロトキシンに対する習慣性は認められない。

3) 毒素産生は、CO₂20%、酸素(又は空気)80%の半嫌気培養がよく、エンテロトキシン産生量と培地中のα澱粉の存在との間には、はつきりした関係は認められない。

4) エンテロトキシンの化学的性状は、耐熱性で長期の保存にたえ、耐酸性で、アルカリには比較的不安定である。

5) エンテロトキシンは、酸性メヂウムで、エタノール、エーテルにより容易に抽出できる。

附 記：本研究は文部省科学試験研究費によつてなされた。

文 献

- 1). 鈴木昭.: 国立衛生試験所報告 71. 73—81. (1953).
- 2). 同左: 同左誌 82—96. (1953).
- 3). 鈴木昭, 中野滝雄.: 総合医学. 7. (8) 33—35. (1950).
- 4). 山田俊雄, 鈴木昭, 尾藤行雄.: 酪農事情. 10. (7). 14—16, (8). 18—20. (1950).
- 5). 鈴木昭.: 獣医畜産新報. 115. 674—677. (1953).
- 6). 鈴木昭, 足立舜二.: 獣医畜産新報. 117. 790—793. (1953).
- 7). Dolman. C. E., Wilson. R. T. and Cockerott. W. H.,: Canad. pub. Health. J., 27, 489—493. (1936).
- 8). Linder. B. A., Tanner. F. W., and Thom. C.,: Pub. Health. Rep., 41. 1647—1652. (1926).
- 9). Ramsey. R. T. Tracy. P. H.,: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 28. 390—391. (1931).
- 10). Tanner. F. W., Ramsey. R. T.,: Am. J. Med. Scie., 184. 80—85. (1932).
- 11). Minet. E. C.,: J. Hyg., 38, 623—637. (1938).
- 12). 小島三郎, 八田貞義.: 食物中毒菌. 281—314. 金原商店 (1939).
- 13). 小島太郎.: 細菌学雑誌. 522. 445—465. 523. 593—603. 525. 705—721. (1939).
- 14). Champan. G. H.,: J. Bact., 41. 431—446. (1945).
- 15). Evans. J. B.,: J. Bact., 55. (6). 793—800. (1945).
- 16). 児玉威, 畑正世, 渋谷よし.: 細菌学雑誌. 534. 545. (1940).
- 17). 藤正政人, 佐藤新一, 小山康夫.: 東京医事新誌. 3197. 1589—1595. (1940).
- 18). 藤正政人, 佐藤新一.: 日新医学. 29. (10). 1391—1415. (1940).
- 19). 佐藤新一.: 細菌学雑誌. 568. 283—293. (1943).
- 20). 畑正世, 木村順次.: 日本微生物病原雑誌. 36. 679—690. (1941).
- 21). 小島三郎, 大橋久治.: 実験医学. 25. (5). 495—503. (1941).
- 22). Jordan. E. O., Burrow. w.,: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 30. 448—449. (1933).
- 23). Dack. G. M., Jordan. E. O., and Woolpert.

- O.,: J. Prev., 5. 383—386. (1931). 24). Dack. G.M., Woolpert. O., Noble. J., and Halliday. E.G.,: J. Prev. Med., 5. 391—400. (1931). 25). Dolman. C.E., Wilson. R.J.,: J. Immun., 35. 13—30. (1938). 26). Dolman. C.E.,: J. Inf. Dis., 55. 172—183. (1938). 27). Minet. F.C.,: J. Hyg. 38. 623—637. (1938). 28). Dack. G.M.,: Food. Poisoning. 81—118. (1949). 29). 八田貞義. 鈴木昭. 中島富子. 西田正道.,: 第8回日本公衆衛生学会発表岡山. (1953). 30). Barber. M.A.,: Philine. J. Scie., 9. 515. (1914). 31). Dack. G.M., Cary. W.E., Woolpert. O., and Wiggers. H.,: J Prev. Med., 4. 167—175. (1930). 32). Fluton.,: Brit. J. Exp. Path., 24. 65—69. (1943). 33). Dack. G.M., and Cary. W.E.,: J. Inf. Dis., 62. 219—223. (1938). 34). Hammon. W.,: Am. J. Pub. Health., 31. 1191—1198. (1941). 35). Jordan. E.O., Burrow.W.,: J. Inf. Dis., 57. 121—178. (1935). 36). Shaughnessy. H.G., Grubb. T.C.,: J. Inf. Dis., 58. 318—328. (1936). 37). Jordan. E.O.,: J. A. M. A., 94, 1648—1650, (1930). 97. 1704—1707. (1931). 38). Burnet. E.M.: J. Path. Bact., 33, 1—16. (1930). 39). Davison. E., Dack, G.M.,: J. Inf. Dis., 64. 302—306. (1939). 40). Rigdon. R.H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 38. 82—84. (1938). 41). Borthwick. G.R.,: Brit. J. Exp. Path., 14. 236—240. (1933). 42). Shaughnessy. H.G., Grubb. T.C.,: 4 Canad. Pub. Health. J., 28. 229—234. (1938).

Summary

It was confirmed that staphylococcal enterotoxin is heat- and acid stable, but unstable to alkali (above pH 9.0) and we could ascertain that enterotoxigenic substance is concentrated from acidic culture media by extraction with ethyl alcohol and ethyl ether.

Received April 1, 1954

ハトムギ黒穂病の防除試験

平山重勝, 山本昌木, 坂部フミ, 古藤カヨ

Experiments in coix Smut Control

By Shigekatsu HIRAYAMA, Masaki YAMAMOTO, Fumi SAKABE

and Kayo KOTO

関東地方においてハトムギ (*Coix Lacymajobi* var. *frumentacea* MAK.) の病害として最も重要なものは *Helminthosporium coicis* NISHIKADO による葉枯病と *Ustilago coicis* BREF. による黒穂病とであろう。前者についてはその研究の1部を既に報じた。ハトムギの栽培は全国に亘つて行われてはいるが局所的な小面積であるために、あまり問題とはなっていないようであるが、黒穂病の被害もかなり大きく、1株全体の穂が侵害されるために殆んど収穫のない場合も見られる。

元来ハトムギの黒穂病は麦類の堅黒穂病のように、種子の内容全体と置換した厚膜胞子塊はほとんど収穫期まで穎に被われており、開花期に胞子が飛散することはない。すなわち本病は花器伝染をせず、収穫調製に際して厚膜胞子が健全粒に附着しあるいは土中に落ちて翌春発芽し寄主体へ侵入するものと予想される。本実験はこの想定の下に種子の薬剤及び温湯処理を主として行つたもので、2箇年間の成績でなお不備ではあるが一応ここに報告する次第である。

なお本研究の一部は文部省科学研究費に負うものでありその援助に対し感謝の意を表したい。

実 験

I. 厚膜胞子の発芽試験 前年度産のハトムギ黒穂病菌厚膜胞子の滅菌水懸濁液をブドウ糖2%を加えた寒天培地上に薄くひろげ、各種温度の定温器に24時間収めた後ホルマリンで固定し、この寒天層を切り取つて検鏡し発芽率を測定した。各区共観察胞子数は1000個である。その結果は第1表のようである。

Table 1. Effect of temperature on the germination of chlamydospores of *Ustilago coicis*. (percentage)

Temperature Exp. No.	Room temp. 6°—14°	16°	20°	24°	28°	32°	36°
I	0	0	0.2	0.7	3.3	9.1	2.3
II	0	0	0.5	0.9	5.7	8.2	2.0
III	0	0	0	0.2	7.3	10.1	2.1
IV	0	0	0	1.3	10.6	13.3	2.0
Average	0	0	0.18	0.78	6.73	10.18	2.10

この結果を見るに発芽率は意外に低く、その原因が供試胞子にあるか実験方法にあるのか理由は明かでないが、その適温は28°乃至32°に有ると見るべきであろう。

II. 防除試験 昭和24年及び25年と2箇年継続して種子の温湯浸法及び薬剤処理試験を並行したのであるが便宜上両者を分けて記すこととする。

A. 温湯浸法 1)昭和24年度圃場試験成績: 昭和23年度産の発病地より採集した種子を所定の温度に調節した恒温槽中に一定時間浸漬し、取出して直ちに水道水で冷した後、1米平方の区に100—150粒を播下(昭和24年5月16日)、其後発芽率及び発病株数を調査した。その結果は第2表の通りである。

Table 2. Results of hot water treatment of coix seeds in Preventing the smut. (1949)

Treatment		Germination of seeds (16th day)			Occurrence of smutted plants		
Temp. (°C)	Time (min.)	Total	Germi- nated	Per- centage	Total	Diseased	per- centage
40	5	100	89	89.0	100	3	3.0
"	10	110	103	93.6	109	6	5.5
"	30	100	94	94.0	97	11	11.3
"	60	100	67	67.0	86	4	4.7
"	180	100	72	72.0	87	4	4.6
45	5	100	68	68.0	83	3	3.6
"	10	100	77	77.0	87	5	5.7
"	30	100	72	72.0	85	7	8.2
"	60	100	100	100.0	100	10	10.0
"	180	110	107	97.3	110	17	17.0
50	5	100	61	61.0	84	7	8.3
"	10	100	75	75.0	96	52	54.2
"	30	100	65	65.0	76	5	6.6
"	60	100	96	96.0	81	12	14.8
"	180	100	95	95.0	100	50	50.0
52	5	100	79	79.0	89	21	23.6
55	5	100	70	70.0	80	18	22.5
57	5	100	76	76.0	82	18	22.0
60	5	100	53	53.0	71	6	8.5
Control 1 (untreated)		100	63	63.0	76	12	15.8
Control 2 (coated with smut-spores)		100	62	62.0	84	81	96.4

この結果では種子の発芽が60°C 5分間の温湯処理でやゝ悪くなつていように見られる他は、種子の発芽及び発病率は温度及び処理時間に関連して一定の傾向がなく、この実験の範囲内では有効な温度を発見することが出来なかつた。

2) 厚膜胞子の耐熱性：上記のような結果を得たのは、本実験で試みた温湯浸法では黒穂病菌厚膜胞子を殺滅するに不充分であるらしいので、昭和25年度には先ず本菌胞子の湿熱処理を行つて発芽試験を試みた。実験方法としては昭和24年度産黒穂菌胞子の滅菌水による懸濁液を試験管に5cc 入れ所定の温度に調節した恒温槽に浸し、絶えず動揺しながら一定時間保つた後、直ちに冷却し予めペトリ皿に流しこんだ1%ブドウ糖寒天培地の上に塗り、30°C の定温器中に収め翌日或は翌々日取り出してホルマリンにて固定する、この方法によつて調査した胞子の発芽率等は第3表に示した通りである。

Table 3. Effect of hot water treatment on the vitality of the smut spores.

Treatment		Exp. No. I			Exp. No. II		
Temp. (°C)	Time (min.)	Total	Germi- nated	Per- centage	Total	Germi- nated	Per- centage
53	5	357	340	95.2	177	139	78.6
"	10	294	244	83.0	235	43	18.3
"	15	384	165	42.9	225	13	5.8

Treatment		Exp. No. I			Exp. No. II		
Temp. (°C)	Time (min.)	Total	Germi-nated	Per-centage	Total	Germi-nated	Per-centage
54	5	290	204	70.4	207	58	28.0
"	10	228	48	21.1	326	10	3.1
"	15	223	20	9.0	260	2	0.8
55	5	269	77	28.6	333	26	7.8
"	10	268	15	5.6	267	2	0.8
"	15	288	16	5.6	222	2	0.9
56	5	289	26	9.0	299	1	0.3
"	10	235	17	7.2	274	4	1.5
"	15	237	20	8.4	255	1	0.4
57	5	300	8	2.7	278	2	0.7
"	10	332	6	1.8	468	6	1.3
"	15	346	5	1.4	304	3	1.0

第3表の第Ⅰ回実験の発芽試験は41.5時間の後固定した材料, 第Ⅱ回実験では24時間後に固定した材料について観察したものである。前者の発芽率が後者のそれに比して一般に高いのは, 孢子間の発芽時間に相当の遅速があるためと考えられる。一般に5分間の温湯処理で孢子の発芽力が著しく低下するのは56°以上であり, 53°では5—10分間の処理によつては著しい影響が見られず, 54°でも5分間処理で僅に発芽力が損われるにすぎない。しかし一面57°15分間の処理でも若干の発芽孢子が見られるのは注目すべきである。

3) 昭和25年度圃場試験成績: 上述の試験成績を得たので昭和25年度の圃場試験では56°以上の温湯浸法を行った。供試材料には前年度産のものをを用い, 更に種子には黒穂病菌孢子を十分にまぶしつけて使用した。結果は第4表の通りである。

Table 4. Results of hot water treatment of coix seeds in preventing the smut. (1950)

Treatment		Germination of seeds (6th day)			Occurrence of smutted plants		
Temp. (°C)	Time (min.)	Total	Germi-nated	Per-centage	Total	Diseased	Per-centage
56	10	100	66	66.0	70	7	10.0
"	15	100	69	69.0	70	0	0.0
57	5	100	87	87.0	88	36	40.9
"	10	100	84	84.0	87	2	2.3
"	15	100	88	88.0	88	0	0.0
58	5	100	89	89.0	85	5	5.9
Control (untreated)		160	122	76.3	114	2	1.8
Control (coated with smut spores)		100	77	77.0	76	67	88.2

この結果では57°及び58°5分間の処理でそれぞれ40.9%及び5.9%の発病を示し, これを10分間に延長しても56°で10.0%, 57°で2.3%の発病を見た。これに比し15分間の処理を行えば全然発病株を生ぜず, 昭和24年度の温湯浸法が不成績に終つた原因も処理時間の短いためであるらしいことが推察される。

B. 薬剤処理 昭和24年度及び同25年度に若干の農薬による種子消毒試験を行った。いずれも前年度に得た種子を用い薬剤に浸漬又は粉衣して後播種したのであるが, 24年度では発病地から得た種子を供用し, 25年度には

薬剤処理前に種子に黒穂病菌胞子を十分にまぶした。対照としては全然無処理の種子及び厚膜胞子をまぶしたものをういた。いずれも前述の温湯浸法のもの共通である。結果は第5表及び第6表に示した。

Table 5. Results of effectiveness of seed-treatment with various fungicides in preventing coix smut. (1949)

Treatment			Germination of seeds (16th day)			Occurrence of smutted plants		
Chemicals	Concentration (%)	Time (min.)	Total	Germinated	Percentage	Total	Diseased	Percentage
Formaline	0.1	60	100	72	72.0	85	24	28.2
"	0.2	60	100	68	68.0	89	6	6.7
"	0.4	60	100	53	53.0	79	1	1.3
Uspulun	0.1	30	100	71	71.0	85	9	10.6
Copper sulphate	0.5	180	100	59	59.0	89	1	1.1
"	2.0	180	100	17	17.0	79	0	0.0
Ceresan	0.5	coated	100	73	73.0	86	3	3.5
"Ôdo"	0.5	"	100	53	53.0	79	1	1.3
Mercuron	0.5	"	100	67	67.0	93	2	2.2
Control (untreated)			100	63	63.0	76	12	15.8
Control (coated with smut spores)			100	62	62.0	84	81	96.4

Table 6. Results of effectiveness of seed-treatment with various fungicides in preventing coix smut. (1950)

Treatment			Germination of seeds (6th day)			Occurrence of smutted plants		
Chemicals	Concentration (%)	Time (min.)	Total	Germinated	Percentage	Total	Diseased	Percentage
Formaline	0.2	60	100	87	87.0	84	58	69.0
"	0.4	60	100	83	83.0	81	3	3.7
Copper sulphate	0.3	180	100	84	84.0	80	9	11.3
"	0.5	180	100	88	88.0	87	7	8.0
"	1.0	180	100	89	89.0	88	7	8.0
"	2.0	180	100	83	83.0	84	6	7.1
Corrosive sublimate	0.1	5	100	82	82.0	82	4	4.9
"Ôdo"	0.1	60	100	80	80.0	79	28	3.5
Uspulun	0.1	30	100	90	90.0	89	1	1.1
"	0.1	60	100	97	97.0	84	1	1.2
Microsin	0.1	60	100	80	80.0	85	18	21.2
Mercuron	0.1	30	100	88	88.0	80	24	30.0
"	0.1	60	100	90	90.0	88	26	29.5
"Ôdo"	0.5	Coated	100	72	72.0	72	38	52.8
Mercuron	0.5	"	100	93	93.0	92	73	79.3
Semesan	0.5	"	100	83	83.0	74	61	82.5
Ceresan	0.5	"	100	89	89.0	87	54	62.1
Spergon	0.5	"	100	85	85.0	80	40	50.0
Phygon	0.5	"	100	86	86.0	82	28	34.2
Nocmate	0.5	"	100	88	88.0	82	66	80.5

Treatment			Germination of seeds (6th day)			Occurrence of smutted plants		
Chemicals	Concentration (%)	Time (min.)	Total	Germinated	Percentage	Total	Diseased	Percentage
Zerlate	0.5	Coated	100	90	90.0	92	38	41.3
Control (untreated)			160	122	76.3	114	2	1.8
Control (coated with smut spores)			100	77	77.0	76	67	88.2
Control (washed) *			100	76	76.0	74	47	63.5

* Seeds were washed with running water after coating with smut spores.

この2箇年の圃場試験の成績を通覧するとこの実験の範囲内では薬剤を以て完全に本病の発生を防止し得ないようである。しかしながら多くの液剤, 中でもホルマリン (0.4%, 1時間), 硫酸銅 (0.5—2.0%, 3時間), 昇汞 (0.1%, 5分) 王銅, ウスブルン等に浸漬することは消毒効果の著しいものと考えてもよいであろう。昭和25年度試験の粉剤処理による防止力が比較的低いのは, 種子表面の胞子の濃度が極めて高く, 液剤程には各胞子に薬剤の利用することがないためと考えるべきであろう。又一度種子が胞子によつて汚染されると水道水を以て洗滌した程度では, ハトムギ種子の表面が比較的滑沢であるとはいえ, 胞子の除去は困難であることが対照区の成績で判断される。

考 察 ハトムギの黒穂病が花器接種によつて種子中に菌糸が潜在しているものであるか又は健全な種子が発芽後に菌の侵入を受けてついに発病に至るものであるか未だ詳にされていないようであり, この解明によつて防除法は自ら明かとなるべきである。本実験によつてこの問題が解決されたとは未だいい得る段階には達していないのであるが, 厚膜胞子を種子にまぶしつけて播種することによつて発病率が高まり, これを薬剤によつて処理することによつて発病が低下することは誤ないことと信ぜられる。更に昭和23年度に開花期に袋掛けを行つて得た種子を播下した132株の内24株 (18.2%) が発病し, 又開花期に胞子の懸濁液を柱頭に滴下したものを播いた場合にも発病率は94株中2株 (2.1%) に過ぎなかつた。これ等の事実は本病が花器接種による感染によつて起るものでなく, 種子の外部からの感染によるものであるとの証拠の一つとも考えられよう。たゞし厚膜胞子の発芽適温が本実験で示すところによれば比較的高く, 夏期の気温に匹敵し, ハトムギの開花期の気温と一致するために, 花器接種の可能性がないとはいえないが, 発芽試験が不備であり, 實際的の意義については更に究明を要する問題と思われる。

本菌厚膜胞子の温熱に対する抵抗力は予想外に高い, 我々の行つた実験手技が悪く, 所要温度に所要時間全体の胞子がさらされなかつたとの疑があるにしろ, 53°乃至57°Cの温湯中で5—15分間保つても完全には発芽が抑制されないのであつた。もつとも実用的にはこの範囲内の温度で処理することも予防法としては有効であつた。

ハトムギ黒穂病の予防には種子の温湯及び薬剤による処理が有効であることは本実験結果によつて明かである。たゞ種子が黒穂病菌胞子によつて濃厚に汚染された場合には粉剤による予防効果は期待し得ないようであり, 今後の研究を必要とする。

総 括

1. *Ustilago coicis* BREF. に因るハトムギ黒穂病の種子消毒による予防法について実験した。
2. 本菌厚膜胞子の発芽適温は28°—32°Cにあるらしい。又55°C, 10分間以上或は56°C, 5分間以上の温湯処理によつて発芽力は著しく低下する。
3. 圃場試験の結果, 温湯浸法による56°C, 15分, 57°C, 10—15分間の種子消毒は本病の防除に有効である。
4. 薬剤による種子消毒では, 液剤なかんずくホルマリン (0.4% 1時間), 硫酸銅 (0.5—2.0%, 3時間), 昇汞 (0.1%, 5分間) 等の効果が著しかつた。種子が胞子によつて濃厚に汚染された場合には粉剤処理に効果を期待し得ない。
5. 本実験結果から本病は花器伝染によるものでないと推察される。

文 献

Thomas, C. C.: Phytopathology, 10: 331—333 (1920)

Summary

The Seed treatment tests to control the coix smut caused by *Ustilago coicis* BREF. were made.

The optimum temperature for the germination of chlamydospores of this fungus seems to lie between 25° and 32°. And their vitality was greatly influenced by the hot water treatment above 55° for 10 minutes or above 56° for 5 minutes.

Field experiments showed that the disease was successfully controlled by the hot water seed treatment at 56° for 15 minutes or 57° for 10—15 minutes.

Seed treatment using liquid fungicides such as formalin (0.4%, 1 hr.) copper sulfate (0.5—2.0 %, 3 hrs.) or corrosive sublimate (0.1%, 5 min.) seemed to be effective. When the seeds were heavily contaminated with smut spores, dust fungicides were not effective for the seed treatment.

From the results of the present experiments, it may be concluded that *Ustilago coicis* BREF. does not infect the coix by means of flower infection.

Received March 16, 1954.

野草食糧化の一例——ハマニシクの場合に就いて

川谷 豊彦, 田村 良修

An Example of Edible Wild Grass — On the Case of
American Dunegrass (*Elymus mollis* TRIN.)

By Toyohiko KAWATANI and Yoshimichi TAMURA

まえがき 今日食糧事情の緊迫時に、野草の食糧化は重要な問題である。この研究の端緒となつたのは、第二次世界大戦以来重要医薬品たる麦角の輸入杜絶の為、これが国内自給の対策として採りあげられた本邦北部方面に自生するイネ科植物ハマニシクに寄生する麦角 *Claviceps litoralis* KAWATANI に関連してあり、その業績は既に報告した(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)。その研究に従ううち、樺太・北海道では海岸線に沿うて殆ど連続して莫大な自生があり、又本州北部にも相当の自生があつて、その類果は食糧となるのではないかと感深く抱いたのである。^{*1}それで著者等は、秋田県南秋田郡船越町及び青森県上北郡百石町海岸自生のハマニシクを材料として、昭和19年5月より昭和20年1月迄研究を行つた。その要旨は昭和21年4月6日日本作物学会第71回講演会に於て発表した。

この研究を実施するに當つて、昭和19年度材料の採集に協力された秋田県船越小学校・青森県百石小学校、製粉試験に就いて援助された農林省農事試験場鴻巣試験地の各位に対し茲に深甚な敬意を表する。又研究中終始激励を賜つた元所長松尾博士に衷心より謝意を表する。

ハマニシク (*Elymus mollis* TRIN.) ハマニシクの一般性状、開花、稔実に就てはその詳細を既に本報告に発表したの(1)(5)省略する。

収穫 1. 収穫 収穫の時期は場所により気候により異なるが、一般に開花後1月半~2月である。すなわち、開花期の順序に従つて、

本州東北地方	7月中旬~7月下旬
北海道	7月下旬~8月下旬
樺太	8月中旬~9月上旬

である。

穂部が黄白色となれば収穫適期となるべく地際より刈取つて刈株を低くする。これは後の葉の利用に有益である。^{*2}刈取つた株は束にしてそのまま全体を乾燥させる。束を立て寄せるか、稲架の様なものに懸けて乾せば便利である。かくして充分に乾燥(水分14~16%)すれば脱落す。回転式脱穀機を使用すれば便利である。脱穀した穀(内外穎に被われたまゝの類果を言う。以下同じ。)には必らず多少の穂切れした穂片や葉片等を混ざるから風選して除去する。穀は席に広げて更によく陽乾する。穀の1升重は200g前後である。

第1表 ハマニシク穂刈取労力調査 (昭和19年7月20日秋田県船越町海岸)

場 所	海岸線の長さ	出 穂 数	人 数	所要時間	延 時 間	1人10時間 当収穂本数
A	100 m	1,254	9	13 分	1時間57分	6,431
B	100	2,108	9	17.5	2 37	8,030
C	100	469	9	7	1 3	4,467
D	100	2,700	10	23	3 50	7,043
E	100	916	10	6.5	1 5	8,455
平均	100	1,489			2 6	7,064

⁹⁾
*1 本研究終了後、はたして HITCHCOCK (1935) はアメリカインジアンは本植物の穂実を食物として用いているとの記述を見出した。

*2 藁は製紙原料としても利用出来よう。

2. ハマニシニク穂収獲労力に関する調査 昭和19年7月20日、秋田県南秋田郡船越町海岸自生地に於て、船越小学校6年生児童によつてハマニシニク穂収獲労力の調査を行つた結果は第1表の通りである。すなわち、A, B, C, D, E, 5個所の海岸線の長さ平均100m当の出穂数は1,489, 所要時間2時間6分であり、この数字を基礎とすれば1人10時間当7,064本を刈取り得る。因に、同地に於ける10m²内の出穂数は最高35程度であつた。10m²内の出穂数100にも及ぶ程度に密生し、且つ自生帯の広い地方(樺太・北海道)では更に能率的に刈取を行う事が出来る。

第2表 ハマニシニク脱稈試験(1)

供試穀重	I 番 摺		I 番 摺		(I+I) 番 摺	
	脱 稈		脱 稈		脱 稈	
	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合
4,000 g	1,500.0 g	37.5 %	24.0 g	0.6 %	1,524.0 g	38.1 %
4,000	1,475.0	36.88	92.0	2.3	1,567.0	39.18
平 均	1,487.5	37.19	58.0	1.45	1,545.5	38.64

供試材料：青森県 百石 (昭和17年産)

第3表 ハマニシニク脱稈試験(2)

供試穀重	I 番 摺				I 番 摺				(I+I) 番摺	
	脱 稈		未 脱 稈		脱 稈		未 脱 稈		脱 稈	
	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合
5,000 g	1,465.0 g	29.3 %	116.0 g	2.32 %	39.0 g	0.78 %	2.5 g	0.05 %	1,504.0 g	30.08 %
5,000	1,592.3	31.85	188.0	3.76	47.7	0.95	5.7	0.11	1,640.0	32.8
5,000	1,469.5	29.39	124.5	2.49	46.0	0.92	4.0	0.08	1,515.5	30.31
5,000	1,517.0	30.34	81.0	1.62	29.0	0.58	8.0	0.16	1,546.0	30.92
平 均	1,511.0	30.22	127.4	2.55	40.4	0.81	5.1	0.10	1,551.4	31.03

供試材料：青森県 百石 (昭和19年産)

第4表 ハマニシニク脱稈試験(3)

供試穀重	I 番 摺				I 番 摺				(I+I) 番摺	
	脱 稈		未 脱 稈		脱 稈		未 脱 稈		脱 稈	
	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合	穀 重	歩 合
1,000 g	319.0 g	31.9 %	18.5 g	1.85 %	7.4 g	0.7 %	1.2 g	0.12 %	326.4 g	32.64 %
1,000	322.5	32.25	25.5	2.55	12.0	1.2	1.0	0.1	334.5	33.45
1,000	291.5	29.15	35.0	3.50	21.6	2.16	0.8	0.08	313.1	31.31
平 均	311.0	31.10	26.3	2.63	13.7	1.37	1.0	0.1	324.7	32.47

供試材料：秋田県 船越 (昭和19年産)

調 製 脱穀したハマニシニク穀は脱稈せねばならない。この目的に次のものを試みたが何れも脱稈不良であつた。

穀摺機

ハロー式

羽根型 (岩田式穀摺機)

臼摺型 (土臼・ゴム臼)

精米機

佐竹式精米機堅型 (堅式循環摩擦式)

佐竹式精米機横型 (横式循環摩擦式)

清水式無砂精米機 (円筒摩擦式)

製粉機

中島式 (円錐鉄臼型)

唯粉碎機として池上式万能粉碎機（衝撃式）を使用したものは脱稈良好であつた。以下粉碎機による脱稈試験を述べる。

池上式万能粉碎機による脱稈

よく乾燥したハマニソニク籾（水分14—16%）を池上式万能粉碎機（200V, 1馬力）に入れ、荒い篩にかけて脱稈する。（第2～4表）

脱稈歩合（籾摺歩合）は31.03～38.64%である。

I 番摺30.22～37.19%, II 番摺0.81～1.45%, 未脱稈歩合は僅に0.1%程度であるからII 番摺迄で充分である。穀粒の1升重は710～790gである。

製粉 ハマニソニク穀粒*3 の製粉を行うに際して厳密な製粉歩合を明らかにする為、農林省農事試験場の小麦製粉歩合測定法に基き*4, 同場の製粉試験機を用いた*5。又全粒を粉碎して可食部分の増加を計る目的で前記の池上式万能粉碎機を使用して製粉試験を行った。

ハマニソニク製粉のコントロールとして、昭和19年農林省農事試験場鴻巣試験地産の普通栽培の小麦埼玉27号を用いた。尚製粉に先立ち水分を添加し、小麦14%, ハマニソニク14.5%とした。

1. 製粉試験機による場合 製粉歩合は昭和17年百石産55.32%, 昭和19年百石産52.48%, 昭和19年船越産43.16%であつた。小麦は70.40%であつたから、何れも小麦に比して低いことがわかる。これはハマニソニク穀粒が小麦に比して著しく瘠小であり、重量に対して表面積の割合が大であり、従つて麩の部分が大である事によると考えられる。然し穀粒の瘠小な割合には製粉歩合が高く、著者等の意外としたところであつた。

尚昭和19年船越産の製粉歩合は同年百石産のものに比し少であるが、これは稈稈不良であつた事によるものである。昭和19年船越産のものに就いて、水洗して水に浮上する穀粒と沈下するものに分別して行つた製粉試験は、後者51.44%であつた。

精粉は殆ど白色であるが僅に赤褐色を帯びる。

2. 粉碎機による場合 既に述べた様に可食部分の増加を目的として行つたもので、近時、小麦の製粉に際しても麩をも粉碎して利用部分の増加を計りつゝある。昭和17年百石産を供試し、昭和19年6月実施した。供試量毎回1,000g。製粉歩合は第1回90.4%, 第2回94.0%, 平均92.2%であつた。損耗率7.8%で比較的大きいのは、発熱による水分蒸発及び飛散によるロスである。

製粉は淡赤褐色を呈する。

第5表 ハマニソニク穀粒の一般成分及び他穀類との比較

穀 物	水 分	粗蛋白質	粗 脂 肪	含水炭素	粗 纖 維	無 機 質	カロリー
ハマニソニク	12.25%	18.43	2.20	59.42	4.81	2.87	339.6
玄米(粳)(関取)	12.70	8.80	2.20	74.40	0.84	1.20	360
玄 米 (糯)	11.40	10.20	2.36	73.80	0.42	1.48	366
小 麦(赤皮赤)	12.50	12.90	1.63	70.70	1.60	1.33	358
稈 麦(鬼稈)	11.80	12.50	1.90	69.20	1.81	1.87	353
梗粟(オオアワ)	18.41	11.20	3.56	63.91	1.55	1.73	341
糯粟(オオアワ)	11.00	11.50	2.36	71.90	1.20	0.90	364
梗 黍	16.03	8.56	4.18	60.23	5.57	4.35	321
糯 黍	12.20	11.40	4.82	64.90	4.10	1.88	358
稗	12.40	9.70	3.10	68.20	4.50	1.80	348
蜀 黍	10.90	9.20	4.00	72.20	1.50	1.02	371
玉 蜀 黍	14.10	8.40	4.00	70.80	0.70	1.08	362

*3 植物学的には稈果と称すべきであるが農学の慣例に従い穀粒と称する事にする。

*4 第5回挽砕遊行い製粉歩合を求める方法によつた。

*5 但しハマニソニクの製粉に際しては、ロールの開度を適宜に調節して最も能率的な製粉歩合を求める方法によつた。

第6表 ハマニシニク精粉の一般成分及び他穀粉との比較

穀 粉	水 分	粗蛋白質	粗 脂 肪	含水炭素	粗 纖 維	無 機 質	カロリー
ハマニシニク粉	11.92%	15.94	2.85	64.39	2.50	2.40	355.9
小 麦 粉	11.74	8.56	1.14	70.74	5.78	1.71	325
蕎 麦 粉	14.88	10.14	2.20	70.71	0.68	1.40	351
玄 米 粉	12.44	5.81	1.77	78.25	0.68	0.14	361
白 米 粉	9.04	6.62	0.29	83.47	0.17	0.41	371
大 麦 粉	10.55	9.09	1.38	76.00	1.37	1.61	361
玉 蜀 黍 粉	13.56	4.29	1.37	79.78	0.90	0.53	357
高 梁 粉	15.27	6.22	0.36	77.03	0.53	0.60	344

成 分 昭和17年百石産ハマニシニク穀粒(全粒)を当所に於て分析した結果は第5表の通りで、水分12.25%、粗蛋白質18.43%、粗脂肪2.20%、含水炭素59.42%、粗繊維4.81%、無機質2.87%である。カロリーは339.6で他の穀類¹⁰⁾に比して著差を認めない。

ハマニシニク精粉(挽上率70%としたもの)の成分は当所の分析によれば第6表の通りで、水分11.92%、粗蛋白質15.94%、粗脂肪2.85%、含水炭素64.39%、粗繊維2.50%、無機質2.40%であり、カロリーは355.9で他の穀粉類¹¹⁾に匹敵する。然して検索の結果は、全粒製粉・精粉中にアルカロイドを含有しない。

全粒製粉・精粉共に、小麦粉と混じ又は混じないで、蒸パン・団子・すいとん・うどん等に調理して食用とする事が出来る。

北海道・千島・樺太のハマニシニクにはハマニシニク麦角菌 *Claviceps litoralis* KAWATANI が寄生する。北海道に於ては西南部は東北部に比して概して麦角の発生は疎である³⁾。然して一般に、麦角の発生地は発生の多い地方であつてもハマニシニク自生地一面に一樣に寄生を認める事無く、局所的に疎密がある。麦角発生地のハマニシニクの利用に就ては、麦角を完全に除去する事が必要である。

著者の一人川谷は、本州に於てはハマニシニクに *Cl. litoralis* の寄生は無いものゝ様である事を述べたが¹⁾、昭和19年百石地方の一局部に類果1,000gに就き0.05gの小麦角*6を認めた。すなわちこれによつて本州産ハマニシニクにも *Cl. litoralis* の発生のある事が分つたわけである。

RODJESTVENSKY (1927)¹²⁾によればロシアではライ麦粉中に麦角の混入は0.15%迄は差支ないと認めているとの事であるから、この程度の混入率は無害と考えられる。百石以外の本州の自生地に於ては、*Cl. litoralis* の寄生を認めないようである。

総 括

野草食糧化の一例として、ハマニシニク類果の利用に就て研究を行つたもので、ハマニシニクの一般性状、開花出穂期、稔実、類果に就き詳細に調査を行い、収穫、調製、製粉、調理法を考案し、一般成分に就て検索を行つたものである。

(1) ハマニシニク穀粒(全粒)の一般成分は次の通りである。水分12.25%、粗蛋白質18.43%、粗脂肪2.20%、含水炭素59.42%、粗繊維4.81%、無機質2.87%、その100gは339.6カロリーで他穀類に比して著差を認めない。

(2) ハマニシニク精粉(挽上率70%としたもの)の一般成分は次の通りである。水分11.92%、粗蛋白質15.94%、粗脂肪2.85%、含水炭素64.39%、粗繊維2.50%、無機質2.40%、その100gは355.9カロリーで他穀粉類に匹敵する。

(3) 全粒製粉・精粉共に適当に調理して食用とすることができる。

*6 小麦角とは長径7mm、短径1.5mm、未潰のものを言う。⁴⁾

文 献

- 1) 松尾仁, 川谷豊彦, 田村良修, 小幡利勝, 市川忠次 (1944): ヘマニソニク麦角に関する研究 (第1報) 衛彙 65: 1—80. 2) KAWATANI, T. (川谷豊彦) (1944): 同 (第2報) *Clavicipitis species nova parasitica ad Elymum mollem* TRIN. (ヘマニソニクに寄生する一新麦角菌) 衛彙 65: 81—83; 植雑 59 (1946): 90—91. 3) 川谷豊彦 (1948): 同 (第3報) 麦類に対する *Claviceps litoralis* KAWATANI の寄生性に就いて 衛彙 66: 101—121, 235—237. 4) 川谷豊彦 (1950): *Claviceps litoralis* KAWATANI による麦角の寄生的栽培に関する研究 (其の1) 衛生試験 67: 219—260. 5) 川谷豊彦 (1950): 同 (其の2) 衛生試験 68: 150—160. 6) 川谷豊彦 (1951): 同 (其の3) 衛生試験 69: 165—221. 7) 川谷豊彦 (1952): 麦角菌 *Claviceps* の寄主植物 (其の1) 衛生試験 70: 127—152. 8) 川谷豊彦 (1953): 同 (其の2) 衛生試験 71: 161—171. 9) HITCHCOCK, A. S. (1935): Manual of the Grasses of the United States, 1040 pp. Washington: United States Government Printing Office. 10) 佐伯 矩, 樋口太郎, 近藤光之, 松沢九二雄 (1937): 新撰日本食品成分総覧 再増補 4版 383pp. 東京: 南江堂 11) 衛生試験所彙報 第43号 昭和9年(1934) 12) BARGER, G. (1931): Ergot and Ergotism. 279 pp. London: Gurney and Jackson. より引用

Summary

This studies were made with a view to utilizing grains of American Dunegrass (*Elymus mollis* TRIN.) as an example of edible wild grasses. Detailed examination of general character, flowering and fruiting of the plant, along with the investigation of the method of harvesting, preparation, pulverization, cooking and general components were made.

1) General components of the whole grains were as follows: water, 12.25%; crude protein, 18.43%; crude fat, 2.20%; carbohydrate, 59.42%; crude fibre, 4.81%; anorganic substances, 2.87%. 100 gr. of the grains are equivalent to 339.6 Cal., being comparable to those of other cereals.

2) General components of the purified flour (pulverization rate: 70%) were as follows: water, 11.92%; crude protein, 15.94%; crude fat, 2.85%; carbohydrate, 64.39%; crude fibre, 2.50%; anorganic substances, 2.40%. 100 gr. of the purified flour are equivalent to 355.9 Cal., being comparable to those of other cereals.

3) Both flour of the whole grains and purified flour are edible with suitable methods of cooking.

Received March 30, 1954

ゼラニウム (*Pelargonium denticulatum* Jacq.)

の生育に及ぼす肥料成分の影響*

宮崎 幸男

Studies on the Effects of the Manurial Elements upon the Growth of
Geranium (*Pelargonium denticulatum* Jacq.)

By Yukio MIYAZAKI

まえがき ゼラニウム油は石鹸香料其他各種化粧品に賦香或は高級香料である Rhodinol の原料として広く使用されるものである。その原料植物の種類について Guenther ²⁾は大要下記の如く述べている。即ち、商品としてのゼラニウム油を生産する目的で世界各地で栽培されている植物の分類は全く混乱し、又ゼラニウム油という呼称は実は誤称であつてゼラニウム油は *Geranium* 属の植物から採られるのではなく *Pelargonium* 属の数種の種、変種、系統から採られるもので、*P. graveolens*, *P. roseum*, *P. radula*, *P. capitatum*, *P. odoratissimum*, *P. fragrans*, *P. terebinthinaceum* 等が原料植物として従来記されているものである。然し Beckley の説によれば之等の中 *P. odoratissimum*, *P. fragrans* は採油を目的とする栽培には適せず、又 *P. roseum* は *P. graveolens* や *P. radula* 型のものに付けられた園芸名と思われる。又 *Pelargonium* 属の植物は交雑し易く、ヨーロッパに導入されると直ちに多くの雑種を生じたので現在では無数の変種、系統が存在し、之等を互に区別する事は殆ど出来ないと云つてゐる。彼は世界に於ける主なゼラニウムの生産地に於ける植物の種類及び生産状況等についてかなり詳しく述べているが *P. denticulatum* に関する記載は全然見られないし外にも外国に於て *P. denticulatum* よりゼラニウム油を採つてゐる報告は見当らない。一方我国に於ては古川氏 ¹⁾は大正8年に *P. graveolens*, *P. radula*, *P. denticulatum* を夫々大葉ゼラニウム、中葉ゼラニウム、小葉ゼラニウムという呼称の下に之等の含油量、油の物理的並に化学的性質に就いて研究した結果、小葉ゼラニウム油は香粧学的に最も優秀で外国で採香されている油に準ず可きものである。そしてレユニオン産油其他世界の主な産地の油と比較し、小葉ゼラニウム油は全ゼラニオールの%に於て稍々劣る感があるが芳香輕快なる故、其の品質は劣るものとは云えず且つ小葉ゼラニウム油の収量の多い事は優にその欠点を補ひ得るので、今後我国に於て最も望を囑す可きものと云つてゐる。其後 *P. denticulatum* に関する報告は殆ど見られないが、二、三の香料会社に於て小規模乍ら本植物の試作が行われていた。第二次大戦後国内に於けるゼラニウム油生産の声が高まるに至つたが、我国に現存する *Pelargonium* の種類の中では矢張り本種が最も優秀なものと看做され九州南部、伊豆南部等でその試作が活潑に行われ次第に栽培面積の増加する傾向が見られる様になつた。当分場¹⁾に於てもその栽培研究の必要を認めて之を行いつゝあるが、著者は昭和26年肥料三要素と本植物の生育、収量、含油量等との関係について実験を行い若干の成績を得たので茲に報告する次第である。

材料及び方法 材料 昭和25年12月18日伊豆分場温室内で育成した植物の各枝の先端を長さ約8cmに切り取り下部の葉を切除して展開葉6枚を残し重さ約5gの均等な苗40本を川砂を入れた木箱内に深さ5cmに挿した。之等は全部活着し、その中から更に均一な苗20本を撰択し供試した。

方法 鉢はワグナー氏2万分の1植木鉢を用い、底に礫其の上に粗砂を夫々3kg宛敷きその上に当分場圃場内の土壌を風乾重で9kg入れ、肥料は全土とよく混和した。試験区は三要素区(NPK)、無窒素区(PK)、無磷酸区(NK)、無加里区(NP)、無肥料区(O)の5区とし、各区共4個体宛供試した。窒素、磷酸、加里各2gとし夫々化学用の硫酸アンモニウム、磷酸一カルシウム、硫酸カリウムを用い、各区共炭酸カルシウム20g宛施用した。昭和26年2月2日上記の苗を5cmの深さに定植した。定植後鉢の上面及給水孔より1l宛給水し、其後は上面と給水孔より交互に適宜給水した。水は何れも井戸水を用いた。定植時より1週間毎に主茎長、主茎葉数、其他外見的に

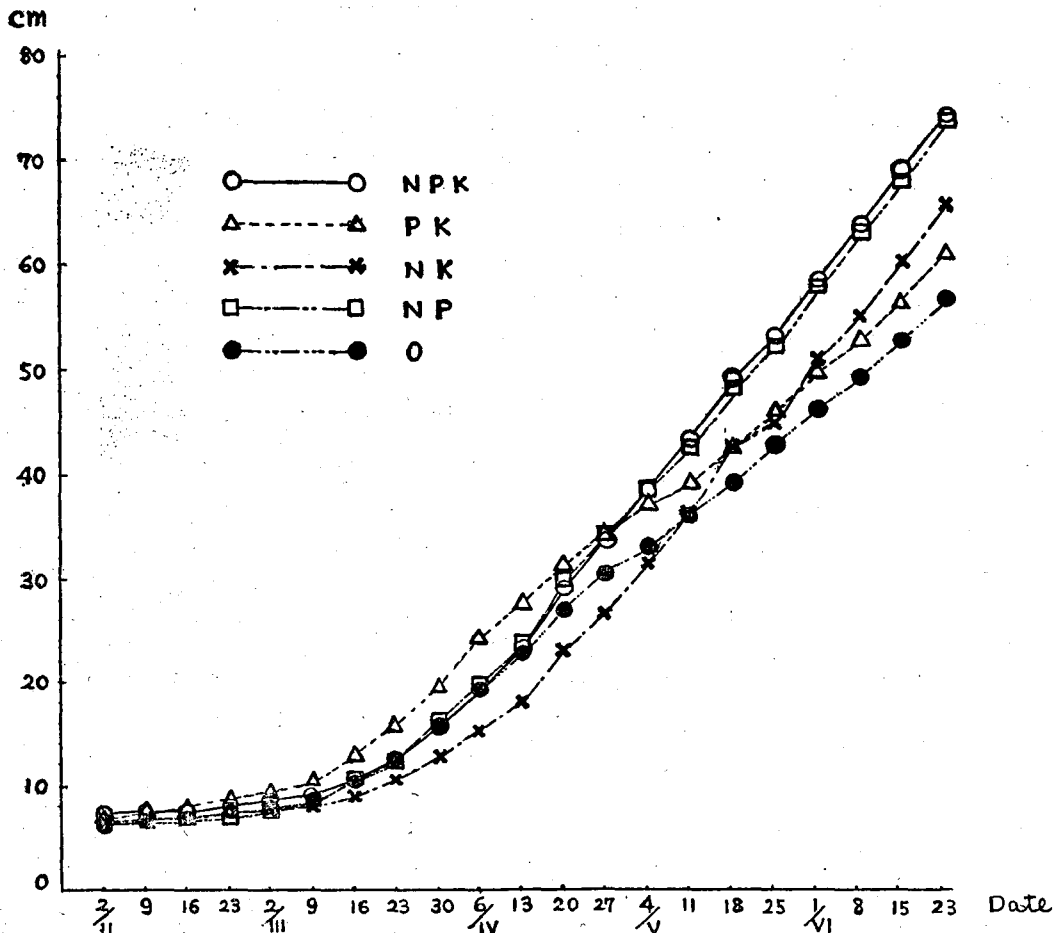
* 昭和27年4月2日、日本作物学会第95回講演会にて発表、日本作物学会紀要第22巻第3~4号に講演要旨登載予定。

認められる生育上の差異に就いて調査し、6月26日収穫し地上部、地下部の各部の生育状態に就いて調査し各区間の比較を行つた。実験は終始硝子室内で行つた。

実験結果 1. 一般生育状態

先づ主茎長についてみると第1図に見られる如く生育の初期に於てPKは他に比し稍々良好でNKは稍々劣る傾向が見られる。5月に入つてからNPK, NPは共に生育良好でPK, Oは次第に生育劣る傾向を示し、NKは両群の中間にある。

Fig. 1. Comparison of Growth of Main Stem in Different Treatments



次に主茎葉数は第2図に見られる如く初期にはNK稍々他に劣る傾向が見られるが5月に入つてからO, PKの劣る傾向が可なり顕著に認められる。之は新葉の発生の少い事と茎の下部の葉の枯死数の多い事に基いている。

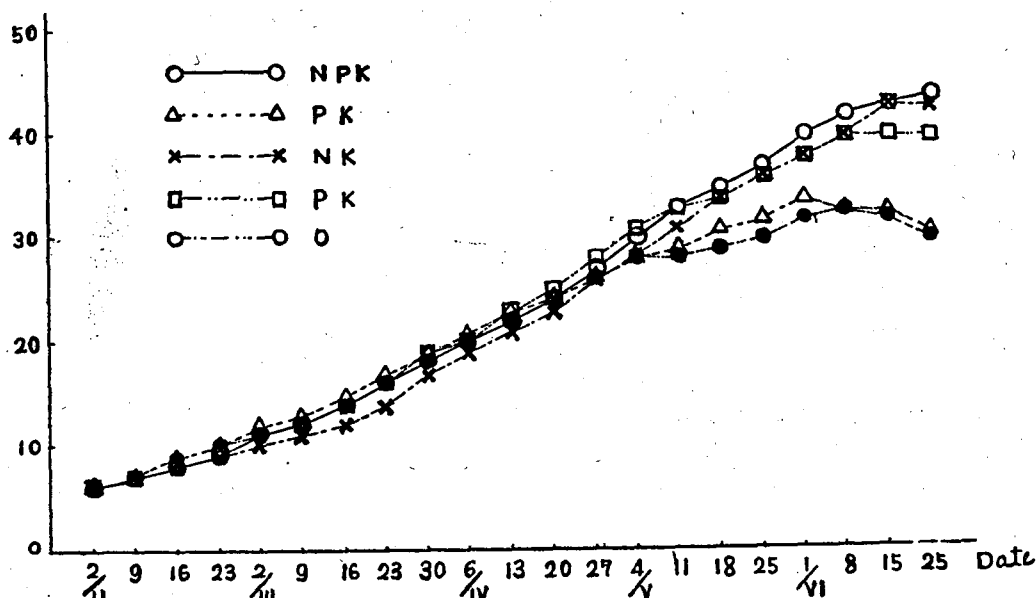
次に4月末頃より側枝の發育状態に差異を生じPK及びOは他区に比し發育劣りその数、長さ共に小であることが認められた。次でNKはNPK, NPに比し稍々劣る傾向が認められNPK, NPは最も良好であつた。此の傾向は生育の進むと共に益々顕著に認められた。

又4月末頃よりPK, Oは他区に比し葉の緑色淡く黄色を帯び、葉形小で稍々粗剛の感を呈し明かに窒素欠乏の徴候を呈し其後益々顕著にこの特徴が認められた。

即ち外面的に認められる一般生育状態に於ても窒素缺乏区では主茎の外側枝の發育著しく悪く従つて着生する葉の数も当然少く、且つ葉形小で黄色を帯び窒素欠乏による茎葉の生育の障害が顕著に認められた。磷酸は窒素程で

はないがその欠乏は主茎の外側枝の发育を可なり阻害する傾向が認められた。然し加里の影響は殆ど認められない。

Fig. 2. Comparison of Number of Leaves of Main Stem in Different Treatments



2. 収穫調査 収穫調査の結果を第1表に示す。

Table 1. Comparison of Yield of the Plant in Different Treatments

Treatment	Fresh weight of top		Fresh weight of leaves		Fresh weight of stem		Fresh weight of leaves	Air-dry weight of roots	
	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio	Fresh weight of stem	g	Ratio
NPK	675.0	100	436.3	100	234.3	100	1.9	18.7	100
PK	193.3	29	115.0	26	73.8	31	1.6	13.6	73
NK	445.3	66	289.3	66	153.5	66	1.9	15.2	81
NP	719.5	107	450.0	103	264.0	113	1.7	15.9	85
O	189.3	28	115.8	27	68.8	29	1.7	12.5	67

1) 地上部生体重量 NP は NPK に比し稍々大で最大値を示し NK は之等と比し可なり劣り、PK 及 O は更に著しく劣り且つ両者間の差異は極めて少い。

分散分析の結果は第2表に示した。その区間の差異は極めて有意義である。

Table 2. Analysis of Variance of Fresh Weight of Top

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	1,028,139.70	257,034.925	124.70 **
Individual	3	7,598.55	2,532.850	1.23
Error	12	24,734.70	2,061.225	
Total	19	1,060,472.95		

** Represents significance at the 1% level

次に各区間の差異及びその有意性について調べた結果は第3表の如くで NPKとNP 及び PK と O との間には有意差は認められないが他の区間の差異は極めて有意義である。

Table 3. Comparison of Differences of Fresh Weight of Top among Treatments and Their Significance

		NPK 2,700	PK 773	NK 1,781	NP 2,878	O 757
NPK	2,700	—				
PK	773	** 1,927	—			
NK	1,781	** 919	** 908	—		
NP	2,878	178	** 2,105	** 1,097	—	
O	757	** 1,943	16	** 1,024	** 2,121	—

L.S.D. (5 % level) 279.8

L.S.D. (1 % level) 392.3

Figures represent the total weight (g) of four plants

** Represents significance at the 1% level

地上部生体重は生葉重と生莖重とに分けられるが両者について同様の比較を行った。

2) 生葉重 地上部生体重の場合と略々同様の傾向が認められる。分散分析並に各区間の差異及びその有意性について調べた結果は第4表及び第5表に示した。

Table 4. Analysis of Variance of Fresh Weight of Leaves

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	430,379.50	107,594.875	124.15**
Individual	3	1,848.15	616.050	
Error	12	10,400.10	866.675	
Total	19	442,627.75		

** Represents significance at the 1% level

Table 5. Comparison of Differences of Fresh Weight of Leaves among Treatments and Their Significance

		NPK 1,745	PK 460	NK 1,157	NP 1,800	O 463
NPK	1,745	—				
PK	460	** 1,285	—			
NK	1,157	** 588	** 697	—		
NP	1,800	55	** 1,340	** 643	—	
O	463	** 1,282	3	** 694	** 1,377	—

L.S.D. (5% level) 181.4

L.S.D. (1% level) 254.3

Figures represent the total weight (g) of four plants

** Represents significance at the 1% level

3) 生莖重 之も地上部生体重の場合と大体同様の傾向が認められるが此の場合には NPK と NP との間に有意差が認められる。分散分析並に各区間の差異及びその有意性について調べた結果は第6表及び第7表に示した。

Table 6. Analysis of Variance of Fresh Weight of Stem

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	128,521.30	32,130.325	116.04**
Individual	3	1,828.55	609.517	2.201
Error	12	3,322.70	276.892	
Total	19	133,672.55		

** Represents significance at the 1% level

Table 7. Comparison of Fresh Weight of Stem among Treatments and Their Significance.

		NPK 937	PK 295	NK 614	NP 1,056	O 275
NPK	937	—				
		**				
PK	295	642	—			
		**				
NK	614	323	**	—		
		*	**			
NP	1,056	119	761	**	—	
		**		**		
O	275	662	20	339	782	—

L. S. D. (5% level) 102.5

L. S. D. (1% level) 143.8

Figures represent the total weight (g) of four plants

* Represents significance at the 5% level

** Represents significance at the 1% level

次に生葉重の生茎重に対する比をみると NPK と NK が最大で NP と O 次で PK の順に僅かに劣っている。

4) 風乾根重 NPK 最大で NP, NK 之に次ぎ PK 更に O と可なり劣る傾向が見られる。然し分散分析の結果区間の差異は有意義でない (第8表)。

Table 8. Analysis of Variance of Air-dry Weight of Roots

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	88.420	22.105	3.26
Individual	3	8.297	2.766	
Error	12	89.900	7.492	
Total	19	186.617		

以上より窒素の影響最も強く現われその欠乏は葉、茎共にその生育を著しく阻害する傾向が認められる。磷酸の影響は窒素程ではないが之の欠乏も可なり顯著に葉茎の生育を阻害する傾向が認められる。然し加里の影響は余り認められない。

3. 葉の形質 主茎中央部の生葉6枚をとりその形質を比較した結果を第9表に示す。

窒素の影響最も強く現われ窒素の欠乏は葉柄長、葉長、葉幅及び1ヶ当生葉重を著しく小ならしめる一方、乾物率を大とする傾向が極めて顯著に認められる。磷酸の欠乏も葉長、葉幅及び1ヶ当生葉重を僅かに小さくする傾向が認められるが左程顯著でない。加里の影響は磷酸より更に少い。

4. 含油量 1) 葉部 主茎中央部の6枚を除く全生葉を用い、長さ約1cmに細切して3/丸底フラスコに井

Table 9. Comparison of Leaf Characters in Different Treatments

Treatment	Length of petioles		Length of leaves		Width of leaves		Width Length	Fresh weight per leaf		Dry matter content ($\frac{\text{Dry matter}}{\text{Fresh weight, \%}}$)
	cm	Ratio	cm	Ratio	cm	Ratio		g	Ratio	
NPK	9.2	100	12.4	100	19.4	100	1.6	3.59	100	18.3
PK	7.8	85	9.2	74	13.9	72	1.5	2.09	58	24.9
NK	8.6	93	11.5	93	18.3	94	1.6	3.16	88	19.3
NP	9.3	101	11.6	94	18.1	93	1.6	3.45	96	17.7
O	8.4	91	9.6	77	14.8	76	1.5	2.23	62	24.3

戸水 1.8 l と共に入れ、局方精油定量器を使用し蒸溜した。蒸溜は6月28日より7月1日迄に行い、蒸溜時間は溜出開始より4時間とした。その結果を第10表に示す。

Table 10. Comparison of Oil Content of Leaves in Different Treatments

Treatment	Fresh weight of leaves (g)	Yield of oil (cc)	Oil content (vol/wt, %)	Oil content per plant	
				cc	Ratio
NPK	414.7	2.03	0.49	2.13	100
PK	102.8	0.49	0.48	0.55	26
NK	270.3	1.20	0.45	1.28	60
NP	429.2	2.11	0.52	2.28	107
O	102.5	0.44	0.42	0.50	23

含油率 (vol/wt, %) についてみると NP 最大で NPK, PK, NK, O の順に徐々に低下しているが、分散分析の結果は第11表のように区間の差異は有意義でない。

Table 11. Analysis of Variance of Oil Content (vol/wt, %) of Leaves

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	0.01323	0.00331	3.15
Individual	3	0.00304	0.00101	
Error	12	0.01261	0.00105	
Total	19	0.02888		

1株当含油量は NP 最大で NPK 僅かに劣り、次で NK は之等に比し相当劣り、更に PK, O の順に之等同区は著しく劣り且つ同区間の差異は少い。分散分析並に区間の差異及びその有意性は第12表、第13表の如くで、NPK と NP, PK と O とを除き他の区間の差異は極めて有意義である。之は生葉重の場合と殆ど同様の傾向である。

Table 12. Analysis of Variance of Oil Content (cc) of Leaves per Plant

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	11.28940	2.82235	148.86**
Individual	3	0.06461	0.02154	
Error	12	0.22756	0.01896	
Total	19	11.58157		

** Represents significance at the 1% level

Table 13. Comparison of Differences of Oil Content (cc) of Leaves per Plant among Treatments and Their Significance

		NPK 8.53	PK 2.19	NK 5.11	NP 9.09	O 2.03
NPK	8.53	—				
PK	2.19	**	—			
NK	5.11	**	**	—		
NP	9.09	0.56	**	**	—	
O	2.03	**	0.16	**	**	—

L. S. D. (5% level) 0.85

L. S. D. (1% level) 1.19

Figures represent the total volume (cc) of four plants

**. Represents significance at the 1% level

2) 茎部 茎は長さ約2mmに輪切りにして各区共4個体を合計し一度に蒸溜した。蒸溜時間を6時間とした他は葉部の場合と同様の方法により7月3日に蒸溜を行った。その結果は第14表に示した。含油率の高い区でも僅かに0.01%に達する程度で、茎部の含油量は極めて低く葉部に比べると問題にならない。又各区間の比較も困難である。

Table 14. Comparison of Oil Content of Stem in Different Treatments

Treatment	Fresh weight of stem (g)	Yield of oil (cc)	Oil content (vol/wt, %)
NPK	937	0.07	0.01
PK	295	T	0.00
NK	614	T	0.00
NP	1,056	0.06	0.01
O	275	0.03	0.01

T Represents trace

以上の結果から油は葉部に多く茎部には極めて少い事が判明した。従つて実際問題として植物の含油量は葉部についてのみ検討すればよいと考えられる。本実験によると含油率の区間の差異は有意義でないが窒素並に磷酸の欠乏は僅か乍ら含油率を低下させる傾向があるので1株当含油量は生葉重の場合よりも窒素並に磷酸の影響が僅かに大きく現われている。又加里欠乏区では三要素区に比し含油率僅かに高くなつていたので1株当含油量は生葉重の場合よりも差異が僅かに大になつており、本実験では加里欠乏の悪影響は認められない。

5) 油の比重並に屈折率 各区共4個体の葉部より得られた油を合したものについて7月6日比重並に屈折率を測定した。比重は1ccオストワルド比重瓶、屈折率は日立製作所製アッペ屈折計を用い測定した。その結果は第15

Table 15. Comparison of Specific Gravity and Refractive Index of Oil in Different Treatments

Treatment	Specific gravity d_{25}^{25}	Refractive index n_D^{25}
NPK	0.886	1.461
PK	0.887	1.462
NK	0.886	1.461
NP	0.886	1.461
O	0.887	1.462

表に示すように、PK 並に O は比重、屈折率共に他区に比し僅かに大なる傾向が認められ、残る3区間の差異は認められない。即ち窒素の欠乏は比重並に屈折率を稍々大ならしめる傾向が認められるが、磷酸並に加里の影響は認められない。

結 論

著者³⁾は当分場圃場の土壌を用いて行つたムラサキオモトの三要素試験に於て窒素及び磷酸の影響が相当顕著に認められるが加里の影響は殆どなく、当分場圃場の土壌は窒素及び磷酸が缺乏し加里は相当含まれると思われる事を報じた。本実験に於ても窒素の影響最も顕著に現われ、次で磷酸の影響も可なり見られるが、加里の影響は殆ど認められず、ムラサキオモトの場合と略々同様の結果が得られたわけである。

ゼラニウムの油は葉部に大部分存在し茎部には殆ど含まれていないので実際問題として収油量は葉の収量とその含油率によつて殆ど決定される事になる。所で本実験に於ては含油率については三要素の影響は余り明瞭に現れていない。即ち窒素、磷酸の欠乏の下では含油率は僅かに低下し加里の缺乏の下では僅かに高くなつてゐるが何れも殆ど問題にならない程度である。従つてかゝる場合は収油量は収葉量によつて決定される事になる。

本実験に於ては窒素の影響が最も顕著に現われその欠乏は主茎の外側枝の發育を著しく阻害するから葉数も当然少くなる上に葉形も小さく1ヶ当生葉重も小なる為全生葉重は著しく小となる。従つて1株当の収油量も著しく少くなる。故に實際の施肥に當つては窒素を十分に施用して茎葉の順調な生育を図り収葉量を大にする事が先決問題であると考ええる。

磷酸の影響は窒素程ではないがその欠乏は茎葉の生育を可なり阻害し収葉量をも相当低くする傾向が認められるので磷酸も適当に施用する事が必要である。

加里の影響は殆ど認められないのでかゝる土壌では加里の施用は殆ど問題にしなくてもよい様に思われる。

文 献

- 1) 古川晴治, 日本産ゼラニウム油に就いて, 工化, 22, 83~90 (大8).
- 2) Guenther, E, The Essential Oils, Vol IV, D. Van Nostrand, New York, 1950, P. 669~737.
- 3) 宮崎幸男, ムラサキオモトの肥料三要素試験 (予報), 日作紀, 20, 117~20 (1951).

Summary

1. Using the soil of the experimental farm of Izu Bunjo, the effects of the three manurial elements upon the growth of geranium (*Pelargonium denticulatum* Jacq.) were investigated, by providing five treatments, containing three elements (NPK), without nitrogen (PK), without phosphoric acid (NK), without potassium (NP), and containing no element (O).

2. Generally speaking, between NPK and NP, and also between PK and O, the growth of the plant resembles each other, but in the latter treatments, it is strikingly inferior to that in the formers; and that in NK is between the two groups. Therefore, the effects of nitrogen are recognized most conspicuously, and those of phosphoric acid are recognized tolerably, but those of potassium are hardly recognized.

3. The fresh weight of the top is maximum in NP, and in NPK, it is inferior slightly to that in NP, though the difference between them is not remarkable; and in NK, it is inferior tolerably to NP and NPK; and in PK and O, it is inferior conspicuously to the others. The differences among the treatments, except those between NPK and NP and between PK and O, are highly significant.

4. As to the fresh weight of the leaves and that of the stem, the similar tendency to the top is also recognized.

5. The air-dry weight of the roots is maximum in NPK, and decreases in order of NP, NK, PK,

and O, but the differences among the treatments are not significant.

6. As to the size of the leaves, both the length and the width of the leaves are maximum in NPK; and in NK and NP, they are inferior somewhat to the former; and in PK and O, they are inferior conspicuously to the others.

7. The fresh weight per leaf is maximum in NPK, and gradually it decreases in order of NP and NK, and it decreases remarkably in O and PK.

8. The percentage of the dry matter content of the fresh leaves is very high in PK and O, and it descends tolerably in NK, and then gradually it descends in order of NPK and NP.

9. The oil is contained chiefly in the leaves, but little in the stem. The percentage of the oil content of the fresh leaves is maximum in NP, and it descends in order of NPK, PK, NK, and O, but the differences among the treatments are not significant.

10. As to the oil content per plant, the similar tendency to the fresh weight of the leaves is recognized.

11. Both the specific gravity and refractive index of the oil in PK and O, are slightly higher than those in the others.

Received March 12, 1954

土壤水分がムラサキオモト (*Rhoeo discolor* Hance) の初期生育に
及ぼす影響に就いて（第1報）*

宮崎 幸男

Studies on the Effects of the Soil Moisture upon the Early
Growth of MURASAKIOMOTO (*Rhoeo discolor* Hance). Part 1

By Yukio MIYAZAKI

まえがき 一般に土壤水分が植物の生育に大きな影響を及ぼす事は言う迄もなく、土壤水分と各種作物の生育或は収量等との関係について既に数多くの研究が行われている。ムラサキオモトの葉は稍々多肉で貯水組織を有するので土壤の乾燥に強い事は当然予想される所であるが、乾燥に強くても乾燥に適してゐるか否かという事は別問題である。又多湿状態に於て如何なる生育をするか、そして生育の最適土壤水分は如何なる範囲内にあるか。かゝる問題を明かにする事は薬用植物として本植物を栽培するに当り極めて重要な問題であると考え、昭和25、26の両年に互り本実験を行った。

材料及び方法 1. 材料 昭和24年11月3—18日間に伊豆分場圃場で採取した種子300粒を砂質壤土を8分目に入れた長さ、幅、深さ夫々約90cm、42cm、12cmの木箱に1箱当り100粒宛、2cmの深さに昭和25年8月31日に播種した。灌水其他周到な管理を行い9月12—13日に地上に発生した3葉を有する均等な苗を選び供試した。

2. 方法 ポットは内径、深さ共に約17cmの磁製咲壺を用い底に風乾砂600g（深さ約2cm）を敷きその上に風乾砂質壤土3.5kgを入れ、ポットの内壁に沿つて内径、長さ夫々約1.8cm及び15cmの硝子管を2本立てその下部が底砂に接する様にし給水管とした。

肥料は1ポット当りN、 P_2O_5 、 K_2O 各0.3gとし夫々硫酸、過磷酸石灰、硫酸加里を用い、又炭酸石灰10g宛加用し、何れも全土とよく混和した。

土壤水分の区別は容水量に対する%を以てし90%、75%、60%、45%及び30%の5区とした。

土壤並に底砂の容水量は夫々45.67%及び34.62%で各区の土壤水分は之等土壤並に底砂の容水量に対する%の和である。

10月9日定植し定植直後各区共土壤面より17宛灌水し日蔭に置き其後除々に日光に当て、苗の活着を図つた。10月16日より重量法により土壤水分の調節を始めたが45%及び30%の両区は未だ水分多く前者は10月19日後者は10月27日に至り所定の量に調節可能となつた。毎日数回水分の調節を行い水は総て井戸水を用いた。又定植後2週間目より1週間毎に別に栽培した植物中より生育状態の略々等しいと思われる個体を計量し植物重による水分の補正を行い各区の土壤水分が所定の量に近い値を保持する様努めた。

供試個体数は各区共6個体とした。

定植後1週間毎に葉数並に草丈の調査を行い、11月22—24日に収穫し地上部、地下部の生育状態について調査し各区間の比較を行った。

本実験は終始温室内で行い、雨水の浸入を防ぐと共に暖房して温度の低下を防ぎ植物の生育に支障の無い様留意した。実験期間中の温室内の平均温度は最高31.0°C、最低18.8°C、平均24.9°Cであつた。尚最低温度は10月14日の12.8°Cであつた。

実験結果 1. 実験期間中の土壤水分の変化 全部の区が所定の土壤水分に調節可能となつてから収穫直前迄の1週間毎に計算した給水量は第1表に示すように全期間を通じて1回当りの給水量は最大区の90%でも1%に過ぎず最小区の30%では僅かに0.2%に過ぎない。

* 昭和28年4月3日 日本作物学会第99回講演会にて発表

Table 1. Amount of Water Supplied in the Course of Soil Moisture Adjustment
(1st Experiment)

	Oct. 27 — Nov. 2					Nov. 3 — Nov. 9					Nov. 10 — Nov. 16				
	90%	75%	60%	45%	30%	90%	75%	60%	45%	30%	90%	75%	60%	45%	30%
Number of times of water supplyment	24	24	24	24	24	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Total amount of water supplied (g)	332	336	316	270	64	323	324	313	257	65	383	364	363	293	82
Amount of water supplied per once (g)	13.8	14.0	13.2	11.3	2.7	14.0	14.1	13.6	11.2	2.8	16.7	15.8	15.8	12.7	3.6
% of water capacity	0.8	0.8	0.8	0.7	0.2	0.8	0.8	0.8	0.7	0.2	1.0	0.9	0.9	0.7	0.2
	Nov. 17 — Nov. 21					Whole period									
	90%	75%	60%	45%	30%	90%	75%	60%	45%	30%					
Number of times of water supplyment	16	16	16	16	16	86	86	86	86	86					
Total amount of water supplied (g)	258	252	249	188	60	1,296	1,276	1,241	1,008	271					
Amount of water supplied per once (g)	16.1	15.8	15.6	11.8	3.8	15.1	14.8	14.4	11.7	3.2					
% of water capacity	0.9	0.9	0.9	0.7	0.2	0.9	0.9	0.8	0.7	0.2					

Table 2. Supplemental Amount (g) of Water Added to the Initial Water-supply per Pot according as the Increase of Plant Weight.

	Oct. 23	Oct. 30	Nov. 6	Nov. 13	Nov. 20
90 %	3.0g (0.2)	8.3g (0.5)	21.0g (1.2)	36.2g (2.1)	53.3g (3.1)
75 "	3.0 (0.2)	8.0 (0.5)	21.0 (1.2)	35.5 (2.1)	50.8 (3.0)
60 "	3.0 (0.2)	8.0 (0.5)	20.3 (1.2)	32.0 (1.9)	45.0 (2.6)
45 "	3.0 (0.2)	6.3 (0.3)	13.7 (0.8)	20.0 (1.2)	25.8 (1.5)
30 "	3.0 (0.2)	4.0 (0.2)	5.5 (0.3)	7.2 (0.4)	9.2 (0.5)

Figures in parentheses represent percentage of water capacity.

Table 3. Difference between Assumed Weight and Measured Weight of the Plant at the Harvest Time.

	Assumed weight—measured weight	
	g	% of water capacity
90 %	11.4	0.7
75 "	10.7	0.6
60 "	6.7	0.4
45 "	-0.7	-0.0
30 "	-0.1	-0.0

植物重による水分の補正值は第2表に示した、之は勿論余り正確な値とは言えないが、最後の収穫直前の補正值と収穫時の実際の植物重とを比較した結果は第3表に示したように、90%、75%、60%の3区では補正值が実際値より稍々大になつてゐるかが何れも1%以下であり、45%、30%の両区では実際値とほとんど差異はない。

従つて全期間を通じて植物重の補正值と実際値との差、及び給水前の水分の減少を考慮に入れても土壌水分の変化はそれが比較的大きかつた90%、75%、60%等の区でも大体所定量の±1%の範囲内にあつたものと考えられ、残りの2区では更に変化範囲が小であつた事は間違ないと思はれる。

2. 一般生育状態 先づ生葉数は外見的に認められる数について調査したが第1図に見られる如く、90%、75%、60%、45%の各区間の差異は明かでないが30%は可なり顯著に劣つてゐる。

Fig. 1. Comparison of Number of Leaves among Different Treatments (1st Experiment).

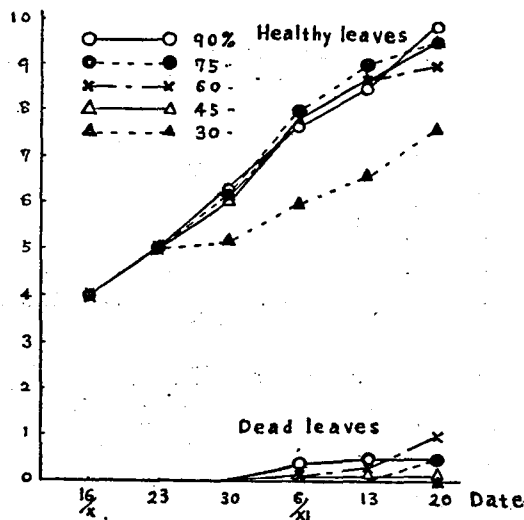
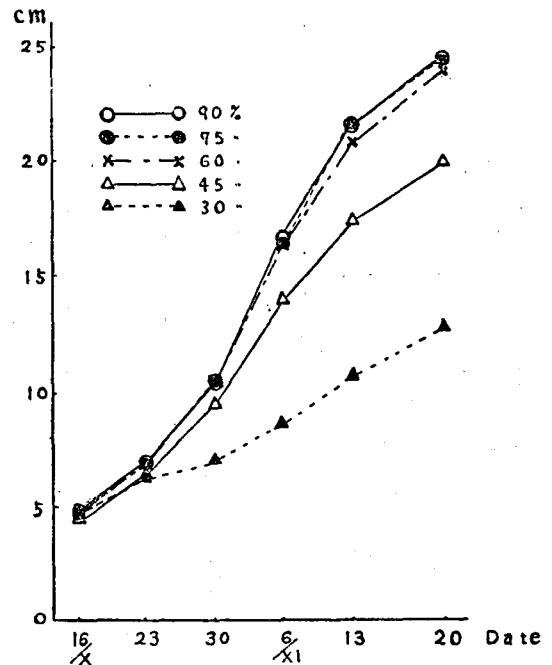


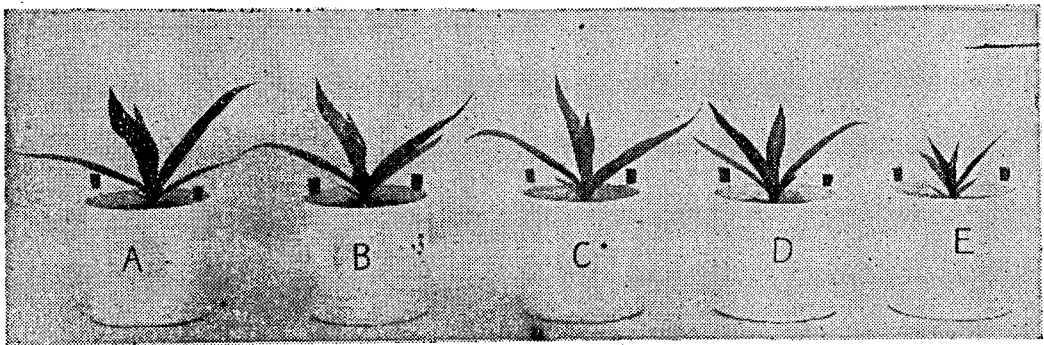
Fig. 2. Comparison of Plant Height among Different Treatments (1st Experiment).



枯葉数は何れの区も1以下で区間の差異も極めて少ないが土壤水分の少い区では枯葉数が少く傾向が認められる。草丈は第2図に見られる如く90%, 75%の2区は殆ど差異なく最大で, 60%は之等と比し僅かに劣り次で45%更に30%と土壤水分の減少と共に顕著に劣っている。

3. 収穫調査 収穫時の地上部の生育状態及び収穫調査の結果を夫々第3図及び第4表に示す。

Fig. 3. Comparison of Growth of Top at the Harvest Time among Different Treatments (1st Experiment)



A, B, C, D, and E represent 90%, 75%, 60%, 45%, and 30% respectively.

Table 4. Comparison of Yield of the Plant among Different Treatments (1st Experiment).

Treatment	Fresh weight		Main stem									Number of lateral buds	Roots	
	of top		Number of healthy leaves	Number of dead leaves	Number of total leaves	Fresh weight of healthy leaves		Length of main stem cm	Diameter of main stem cm	Fresh weight of main stem			Fresh weight g	Air-dry weight g
	g	Ratio				g	Ratio			g	Ratio			
90%	38.6	100	10.7	0.7	11.4	37.0	100	1.3	1.2	0.9	100	6.8	3.4	0.24
75 "	36.6	94.8	10.7	0.5	11.2	35.6	96.2	1.3	1.2	0.9	100	7.2	3.6	0.24
60 "	34.9	90.4	10.0	1.0	11.0	33.7	91.1	1.3	1.2	0.9	100	6.8	3.4	0.23
45 "	23.6	61.1	10.0	0.3	10.3	22.8	61.6	1.1	1.0	0.6	66.7	4.7	3.0	0.23
30 "	8.5	22.0	8.1	0	8.1	8.2	22.2	0.8	0.7	0.3	33.3	3.0	0.8	0.08

1) 地上部 a) 地上部生体重 90%最大で75%, 60%の順に徐々に低下しているが隣接区間の差異は少ない。然し45%ではこれらに比し著しく劣り30%は更に著しく劣っている。分散分析並に区間の差異の有意性は第5, 6表に示すように90%と75%, 75%と60%とを除く区間の差異は有意義で特に90%と60%とを除く区間の差異は極めて有意義である。

Table 5. Analysis of Variance of Fresh Weight of Top (1st Experiment)

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	3792.976	948.244	111.47**
Individual	5	146.855	29.371	3.45*
Error	20	170.148	8.507	
Total	29	4109.979		

* Represents significance at the 5% level

** Represents significance at the 1% level

Table 6. Comparison of Differences of Fresh Weight of Top and Their Significance among Different Treatments (1st Experiment)

		90%	75%	60%	45%	30%
		38.6	36.6	34.9	23.6	8.5
90%	38.6	—				
75%	36.6	2.0	—			
60%	34.9	3.7*	1.7*	—		
45%	23.6	15.0**	13.0**	11.3**	—	
30%	8.5	30.1**	28.1**	26.4**	15.1**	—
L. S. D (5% level)				3.51		
L. S. D (1% level)				4.79		

* Represents significance at the 5% level

** Represents significance at the 1% level

b) 主茎葉数 時期的変化については既に述べたが収穫時の調査でも生葉数は90%と75%が最大であるが60%及び45%との差異は極めて少く30%は可なり劣つてゐる。枯葉数は最大区の60%でも僅かに1で未だ極めて少いが土壌水分の少い区では枯葉数も少い傾向が認められる。全葉数は90%最大で土壌水分の減少するに従い小となつてゐるが45%迄は隣接区間の差異は少ない。

c) 主茎生葉重 全生葉重については地上部生体重の場合と殆ど同様の傾向が認められる。分散分析並に区間の差異の有意性は第7, 8表示した。

尚、葉を1枚宛分離して葉令別に生葉重を測定した結果は第4図の如くで下位葉と上位の新葉を除き十分に生育した葉では各区の特徴が明瞭に現われている。

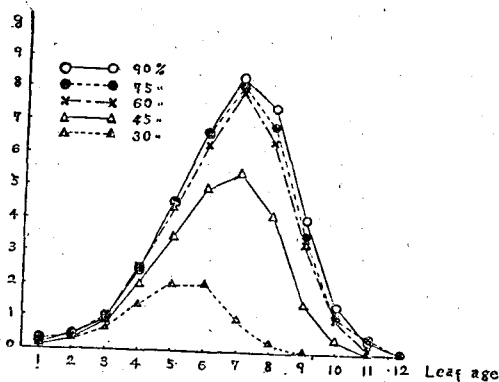
Table 7. Analysis of Variance of Fresh Weight of Leaves (1st Experiment)

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	3,528.915	882.229	119.770 **
Individual	5	129.088	25.818	3.505 *
Error	20	147.329	7.366	
Total	29	3,805.332		

* Represents significance at the 5% level

** Represents significance at the 1% level

Fig. 4. Comparison of Fresh Weight of Leaves by Their Ages among Different Treatments (1st Experiment).



d) 葉形 葉長，葉幅を葉令別に測定した結果は第5図及び第6図に示した。共に90%最大で土壤水分の小さなに従い小となる傾向が認められるが，90%と75%との差異は殆ど無く60%は之等2区に比し僅かに劣り，次で45%更に35%の順に著しく劣っている。

次に葉長に対する葉幅の比率は第7図に示すように90%，75%，60%の3区間の差異は明かでないが45%は之等に比し可なり大で30%は著しく大である。即ち土壤の乾燥は葉長，葉幅共にその生長を抑制するが特に前者ではこれが著しい。

Table 8. Comparison of Differences of Fresh Weight of Leaves and Their Significance among Different Treatments (1st Experiment)

		90% 37.0	75% 35.6	60% 33.7	45% 22.8	30% 8.2
90%	37.0	—				
75%	35.6	1.4 *	—			
60%	33.7	3.3 **	1.9 **	—		
45%	22.8	14.2 **	12.8 **	10.9 **	—	
30%	8.2	28.8 **	27.4 **	25.5 **	14.6 **	—

L.S.D. (5% level) 3.27

L.S.D. (1% level) 4.46

* Represents significance at the 5% level

** Represents significance at the 1% level

Fig. 5. Comparison of Length of Leaves by Their Ages among Different Treatments (1st Experiment).

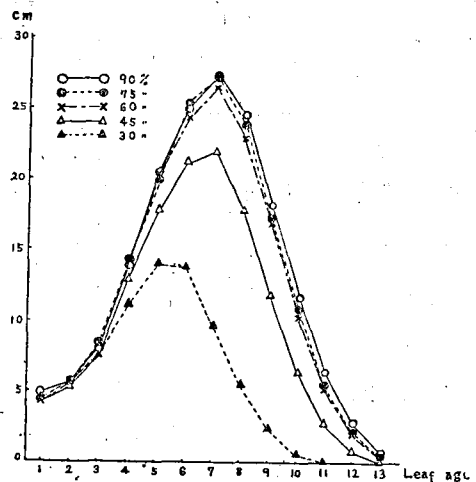


Fig. 6. Comparison of Width of Leaves by Their Ages among Different Treatments (1st Experiment).

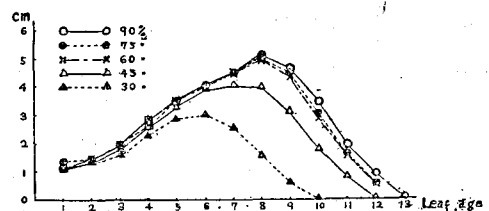
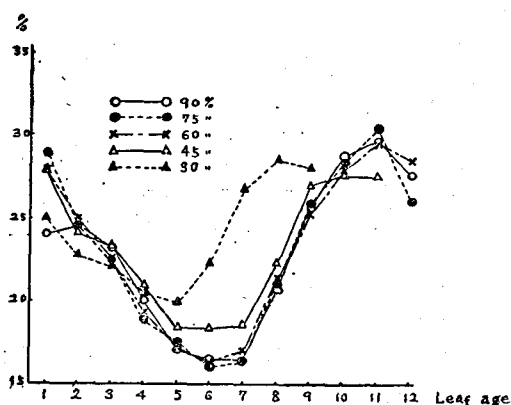


Fig. 7. Comparison of Percentage of Width of Leaves to Length of Leaves by Their Ages among Different Treatments (1st Experiment).



e) 生葉の乾物率並に水性エキス含有率 90%, 75%, 60% 及び 45% の 4 区では第 5, 6, 7 葉の 3 葉, 30% では第 5, 6 の 2 葉を用いて生葉の乾物率並に水性エキス含有率を測定した結果は第 9 表に示した。区間の比較を行ふには生育進度の等しい葉について行うのが合理的であるが 90%, 75%, 60% の 3 区は大体生育進度が揃っているが 45% は僅かに遅れ 30% は 1 令以上遅れている。従つて之等 2, 3 葉の数値で各区間の比較を行う事は稍々厳密さを缺くきらいはあるが 30% の第 5, 6 葉を夫々他区の第 6, 7 葉と対照して比較する事にする。乾物率, 水性エキス含有率共に区間の差異は殆ど認められないが, 30% では両者共他区に比して僅かに高い傾向が認められる。

f) 主 茎 主茎の長さ, 直径, 生体重共に 90%, 75%, 60% の 3 区間の差異は認められないが 45% は

Table 9. Comparison of Dry Matter Content and Water Extract Content of Fresh Leaves among Different Treatments (1st Experiment)

Treatment	Dry matter content ($\frac{\text{Dry weight of leaf}}{\text{Fresh weight of leaf}}$) %			Water extract content ($\frac{\text{Weight of water extract of leaf}}{\text{Fresh weight of leaf}}$) %		
	5 th leaf	6 th leaf	7 th leaf	5 th leaf	6 th leaf	7 th leaf
90 %	5.00	4.73	4.42	2.51	2.33	2.07
75 "	4.95	4.81	4.44	2.42	2.40	2.05
60 "	4.97	4.79	4.43	2.36	2.28	1.99
45 "	4.83	4.77	4.45	2.25	2.15	1.89
30 "	4.77	4.48	—	2.48	2.19	—

Table 10. Analysis of Variance of Fresh Weight of Main Stem (1st Experiment)

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	1.829	0.457	28.563**
Individual	5	0.119	0.024	1.500
Error	20	0.311	0.016	
Total	29	2.259		

** Represent Significance at the 1 % level

Table 11. Comparison of Differences of Fresh Weight of Main Stem and Their Significance among Different Treatments (1st Experiment)

		90% 0.95	75% 0.87	60% 0.90	45% 0.63	30% 0.28
90%	0.95	—				
75%	0.87	0.08	—			
60%	0.90	0.05	0.03	—		
45%	0.63	**	**	**	—	
30%	0.28	0.32	0.24	0.27	**	—
		**	**	**	**	
		0.67	0.59	0.62	0.35	—
L. S. D. (5 % level)		0.152				
L. S. D. (1 % level)		0.208				

** Represents Significance at the 1 % level

何れも之等 3 区に比し僅かに劣り, 30% は著しく劣っている。生茎重の分散分析並に区間の差異の有意性は第 10, 11 表に示したように 90%, 75%, 60% の各区間を除く他の区間の差異は極めて有意義である。

g) 側芽 側芽の生育は未だ極めて初期で何れの区に於てもその全量が1 g以下であり区間の比較を行うのは未だ早過ぎる感があるがその数に於て90%, 75%, 60%の3区に比し45%は稍々劣り30%は更に劣る傾向が既に或る程度認められる。

2) 地下部 地下部の生体重, 風乾重共に90%, 75%, 60%の3区間の差異は殆ど認められないが45%は生体重稍々劣り30%は両者の値何れも著しく劣っている。風乾重の分散分析並に区間の差異の有意性は第12, 13表に示すように30%と他区間との差異は極めて有意義である。

Table 12. Analysis of Variance of Air-dry Weight of Roots (1st Experiment)

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	0.11488	0.02872	6.650**
Individual	5	0.02912	0.005824	1.348
Error	20	0.08638	0.004319	
Total	29	0.23038		

** Represents Significance at the 1% level

Table 13. Comparison of Differences of Air-dry Weight of Roots and Their Significance among Different Treatments (1st Experiment)

		90% 0.24	75% 0.24	60% 0.23	45% 0.23	30% 0.08
90%	0.24	—				
75%	0.24	0	—			
60%	0.23	0.01	0.01	—		
45%	0.23	0.01	0.01	0	—	
30%	0.08	** 0.16	** 0.16	** 0.15	** 0.15	—
L. S. D. (5% level)		0.079				
L. S. D. (1% level)		0.108				

** Represents Significance at the 1% level

総 括

土壤容水量の90%, 75%, 60%, 45%及び30%の5区中では植物の生育は全般的に90%最も良好でそれより土壤水分の減少するに従い徐々に生育の劣る傾向が認められるが75%位迄は殆ど差異なく60%位になると稍々劣る傾向が認められる。そして45%位になると他下部の生育は90—60%に比し大した差異は認められないが地上部の生育は著しく劣る傾向が認められ、30%になると地上部、地下部共に更に著しく劣る傾向が認められる。従つて本実験に於ける土壤水分の範囲内では大体90—75%の範囲が最適土壤水分と考えられる。

生葉の乾物率, 水性エキス含有率共に大体90—45%の範囲内では土壤水分の影響はほとんど認められないが30%位になると之等の値は何れも僅かに高くなる傾向が認められる。

Summary

By providing five plots of soil moisture, 90%, 75%, 60%, 45%, and 30% of the water capacity, the effects of the soil moisture upon the early growth of MURASAKIOMOTO (*Rhoeo discolor* Hance) were investigated in 1951. Results obtained are summarized as follows.

1. Generally speaking, the growth of the plant is best at about 90% plot, and it becomes worse according to the decrease of the soil moisture, but the effects of the soil moisture are hardly recognized till about 75%.

2. At about 60% plot, the growth of the plant is somewhat inferior to that at about 90% plot, but difference between the growth at about 75% plot and that at about 60% plot is hardly recognized.

3. At about 45% plot, the growth of roots is not inferior to that at about 90-60% plots, but that of top is inferior tolerably to that of the latters.

4. At about 30% plot, the growth of top and roots, are both obstructed remarkably.

5. The dry matter content and water extract content of fresh leaves, are both hardly affected by

the variation of the soil moisture within the range from about 90% to about 45%, but at about 30% plot, they become both higher slightly.

Received March 12, 1954

土壌水分がムラサキオモト (*Rhoeo discolor* Hance) の初期生育に
及ぼす影響に就いて (第2報)

宮崎 幸男

Studies on the Effects of the Soil Moisture upon the Early Growth of
MURASAKIOMOTO (*Rhoeo discolor* Hance). Part II

By Yukio MIYAZAKI

まえがき 第1報では土壌水分の最大区は容水量の90%であつたが該区では生育最も良好で多湿の悪影響は認められなかつた。従つて該実験に於ては初期生育に対する最適土壌水分の範囲は決定出来なかつた。尙該実験は10月より11月にかけて温室内で行い、保温には留意したが第1報第3図に於ても認められるように5—9月頃の本植物の普通の生育時期のものに比して植物体が全般的に軟弱な感を呈していた。そこで土壌水分の範囲を広くし且つ時期を変えて昭和26年度に下記のような実験を行つた。

材料及び方法 1. 材料 昭和25年7月5日温室内で採種した種子300粒を第1実験の場合と同様の方法で昭和26年4月10日播種し4月27—29日に地上に発生した3葉を有する均等なる苗を撰び供試した。

2. 方法 本実験では水分調節に於て植物重による水分の補正を行わなかつた外はポットの種類、土壌並に底砂の風乾重、施肥量、給水方法等總て第1報と同様の方法を採用した。

土壌水分の区別は容水量の95%、80%、65%、50%、35%及び25%の6区とした。土壌及び底砂の容水量は夫々46.07%及び37.69%であつた。

5月15日定植し5月24日より水分調節を開始したが50%、35%及び25%の3区は夫々5月28日、30日及び6月6日より所定の量に調節可能となつた。

各区共6個体宛供試したが95%区の1個体は定植後活着不良で其後の生育異常となつたので供試数より除外した。

第1報同様生育調査を行い7月10—12日に収穫した。尙本実験も第1報同様終始硝子室内で行つたが本実験期間は暖房を行わなかつた。

実験結果 1. 実験期間中の土壌水分の変化 全部の区が所定の土壌水分に調節可能となつてから収穫直前迄の給水量は第1表に示したように全期間を通じ1週間毎の1回当給水量は最も大きな区で平均1.3%、小さな区では0.2%となつている。

次に本実験では植物重による水分の補正を行わなかつた為生育の進むにつれて給水直後でも土壌水分は所定の量より少なくなり、特に生育の旺盛な区では当然考えられるので実験の後期には水分調節の回数を多くしてなるべく土壌水分の変化を少くするよう努めた。然し乍ら収穫時の植物重と第1表の給水量より計算して収穫直前の給水前の各区の土壌水分は大體下記の範囲迄低下した事になる。95%—91.8%、80%—70.5%、65%—55.4%、50%—41.5%、35%—32.3%、25%—24.6%。

2. 一般生育状態 主茎生葉数については第1図に見られるように6月に入つてから各区間の差異が現われ80%区最大で65%、50%の順に僅か宛劣る傾向が認められる。次で35%は之等3区に比し稍々劣り95%は実験の中期迄は80%、65%、50%の3区と大差ないが其後次第に増加率衰え後期には35%よりもかなり劣る傾向が認められる。25%は比較的初期から他区に比し稍々劣つており生育の進むにつれ益々顕著に認められる。

Tabel 1. Amount of Water Supplied in the Course of Soil Moisture Adjustment
(2nd Experiment)

	June 6 — June 12						June 13 — June 19						June 20 — June 26					
	95%	80%	65%	50%	35%	25%	95%	80%	65%	50%	35%	25%	95%	80%	65%	50%	35%	25%
Number of times of water supplyment	11	11	11	11	11	11	22	22	22	22	22	22	27	27	27	27	27	27
Total amount of water supplied (g)	260	244	250	238	135	41	491	389	465	433	189	59	553	632	623	566	237	62
Amount of water supplied per once(g)	23.6	22.3	22.7	21.6	12.3	3.7	22.3	17.7	21.1	19.7	8.6	2.7	20.4	23.4	23.1	21.0	8.8	2.3
% of water capacity	1.3	1.3	1.3	1.2	0.7	0.2	1.3	1.0	1.2	1.1	0.5	0.2	1.2	1.3	1.3	1.2	0.5	0.1
	June 27 — July 3						July 4 — July 10						Whole period					
	95%	80%	65%	50%	35%	25%	95%	80%	65%	50%	35%	25%	95%	80%	65%	50%	35%	25%
Number of times of water supplyment	18	18	18	18	18	18	38	38	38	38	38	38	116	116	116	116	116	116
Total amount of water supplied (g)	247	343	335	305	129	22	380	625	597	566	218	48	1,931	2,233	2,270	2,108	908	232
Amount of water supplied per once(g)	13.7	19.1	18.6	16.9	7.2	1.2	10.0	16.4	15.7	14.9	5.7	1.3	16.6	19.3	19.6	18.2	7.8	2.0
% of water capacity	0.8	1.1	1.1	1.0	0.4	0.1	0.6	0.9	0.9	0.9	0.3	0.1	0.9	1.1	1.1	1.0	0.4	0.1

枯葉数は95%, 80%, 65%, 50%の各区間は殆ど差なく後期には下位の2葉位迄枯死しているが35%, 25%の両区では未だ全然枯葉を見ない。

Fig. 1. Comparison of Number of Leaves among Different Treatments (2nd Experiment).

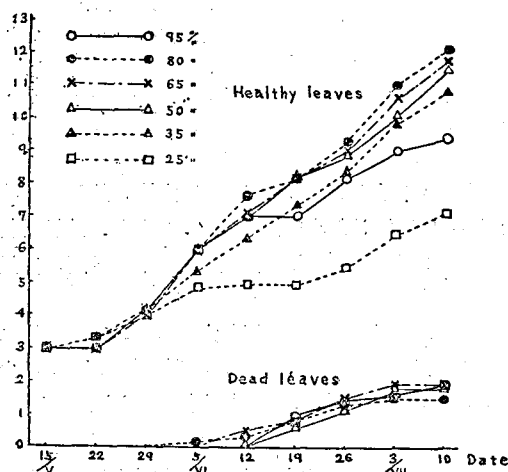
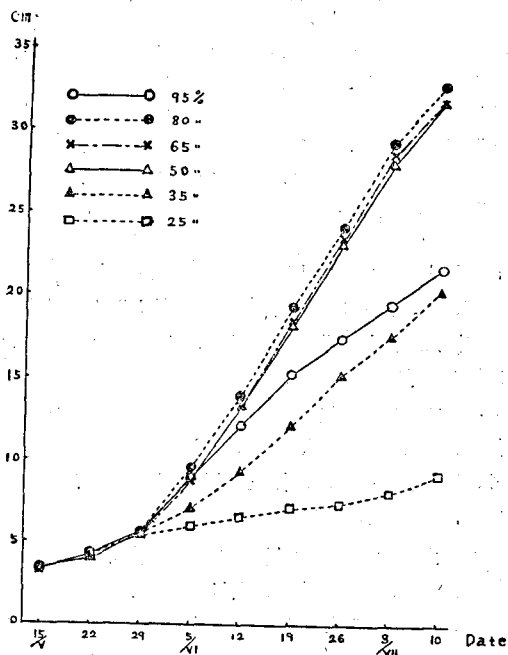


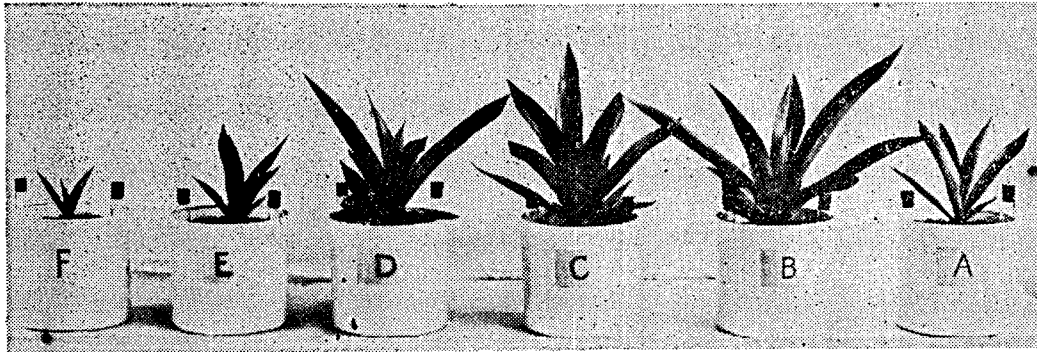
Fig. 2. Comparison of Plant Height among Different Treatments (2nd Experiment).



草丈についても第2図に見られるように6月に入ってから各区間の差異現われ此の場合も80%最大で65%, 50%の順に極めて僅か乍ら劣る傾向が認められる。次で95%は中期より上記3区に比し稍々劣る傾向現われ其後生育の進むにつれて益々顕著にその差異が認められる。次に35%は95%より更に劣るが後期には95%との差異が次第に少くなっている。25%は草丈の伸長極めて悪く他区との差異が特に顕著である。

3. 収穫調査 収穫時の地上部の生育状態及び収穫調査の結果は第3図及び第2表に示した。

Fig. 3. Comparison of Growth of Top at The Harvest Time among Different Treatments (2nd Experiment).



A, B, C, D, E, and F represent 95%, 80%, 65%, 50%, 35%, and 25% respectively.

Table 2. Comparison of Yield of the Plant among Different Treatments (2nd Experiment).

Treatment	Fresh weight of top		Main stem									Lateral buds			Roots	
			Number of healthy leaves	Number of dead leaves	Number of total leaves	Fresh weight of heathy leaves		Length of main stem cm	Diam- eter of main stem cm	Fresh wei- ght of main stem		Total numb- er	Fresh weight of total lateral buds		Fresh weight	Air- dry weight g
	g	Ratio				g	Ratio									
										g	Ratio		g	Ratio		
95%	36.2	29.2	9.8	2.0	11.8	33.1	36.1	1.3	1.5	1.6	41.0	0.5	1.0	3.4	8.8	0.49
80 "	123.1	99.2	12.5	1.5	14.0	91.7	100	1.9	2.1	3.9	100	6.3	24.7	83.2	27.8	1.34
65 "	124.1	100	12.3	1.7	14.0	89.3	97.4	1.9	2.1	3.8	97.4	6.2	29.7	100	29.1	1.17
50 "	105.4	84.9	12.1	1.8	14.0	83.3	90.1	1.8	2.0	3.5	89.7	5.8	17.3	58.2	27.1	1.28
35 "	29.5	23.8	10.1	0	10.1	28.3	30.9	1.3	1.3	0.9	23.1	0	0	0	12.8	0.69
25 "	4.7	3.8	6.7	0	6.7	4.5	4.9	0.6	0.7	0.2	5.1	0	0	0	0.6	0.04

1) 地上部 a) 地上部生体重 65%最大となつてゐるが80%との差異は殆どなく50%は之等と比し稍々劣つてゐる。次で95%は之等3区に比し著しく劣り35%は更に劣り25%は最小で極めて劣つてゐる。分散分析並に区間の差異の有意性は第3, 4表に示すように95%と35%, 80%と65%との各区間を除く他区間の差異は極めて有意義である。

b) 主茎葉数 時期的変化については既に述べたが収穫時の調査でも生葉数は80%最大で65%, 50%の順に僅かに少く次で35%, 95%, 25%の順に劣つてゐる。枯葉数は95%最大で50%, 65%, 80%の順に除々に少く, 35%及び25%は未だ全然枯葉を見ない。全葉数は80%, 65%, 50%は共に14で最大値を示し次で95%, 35%, 25%の順に少なくなつてゐる。

c) 主茎生葉重 全生葉重は80%最大で65%との差異は極めて少なく後は地上部生体重の場合と同様50%, 95%, 35%, 25%の順に低下している。分散分析並に区間の差異の有意性は第5, 6表に示すように95%と35%, 80%と65%, 65%と50%を除く区間の差異は有意義で特に80%と50%とを除く区間の差異は極めて有意義である。

Table 3. Analysis of Variance of Fresh Weight of Top (2nd Experiment)

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	5	84,109.89	16,821.978	176.059**
Individual	5	317.07	63.414	1.507
Error	24	2,293.14	95.548	
Total	34	86,720.10		

Table 5. Analysis of Variance of Fresh Weight of Leaves (2nd Experiment).

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	5	42,197.7	8,439.5	243.073**
Individual	5	172.7	34.5	
Error	24	835.8	34.8	
Total	34	43,206.2		

** Represents significance at the 1 % level

Table 6. Comparison of Differences of Fresh Weight of Leaves and Their Significance among Different Treatments (2nd Experiment).

	95%	80%	65%	50%	35%	25%
	33.1	91.7	89.3	83.3	28.3	4.5
95%	33.1	—				
80%	58.6**	—				
65%	56.2**	2.4	—			
50%	50.2**	8.4*	6.0	—		
35%	4.8	63.4**	61.0**	55.0**	—	
25%	28.6**	87.2**	84.8**	78.8**	23.8**	—
L. S. D. (among the plots except the 95% plot : 5 % level)					7.03	
L. S. D. (among the 95% plot and the other plots : 5 % level)					7.53	
L. S. D. (among the plots except the 95% plot : 1 % level)					9.53	
L. S. D. (among the 95% plot and the other plots : 1 % level)					10.20	

* Represents significance at the 5 % level

** Represents significance at the 1 % level

Table 4. Comparison of Differences of Fresh Weight of Top and Their Significance among Different Treatments (2nd Experiment)

	95%	80%	65%	50%	35%	25%
	36.2	123.1	124.1	105.4	29.5	4.7
95%	36.2	—				
80%	86.9**	—				
65%	87.9**	1.0	—			
50%	69.2**	17.7**	18.7**	—		
35%	6.7	93.6**	94.6**	75.9**	—	
25%	31.5**	118.4**	119.4**	100.7**	24.8**	—
L. S. D. (among the plots except the 95% plot : 5 % level)					11.65	
L. S. D. (among the 95% plot and the other plots : 5 % level)					12.47	
L. S. D. (among the plots except the 95% plot : 1 % level)					15.79	
L. S. D. (among the 95% plot and the other plots : 1 % level)					16.90	

** Represents significance at the 1 % level

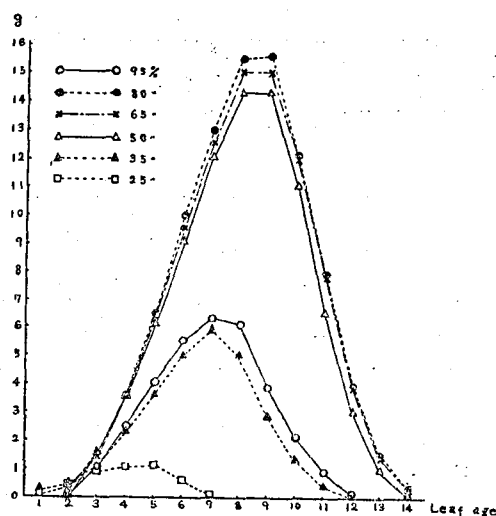


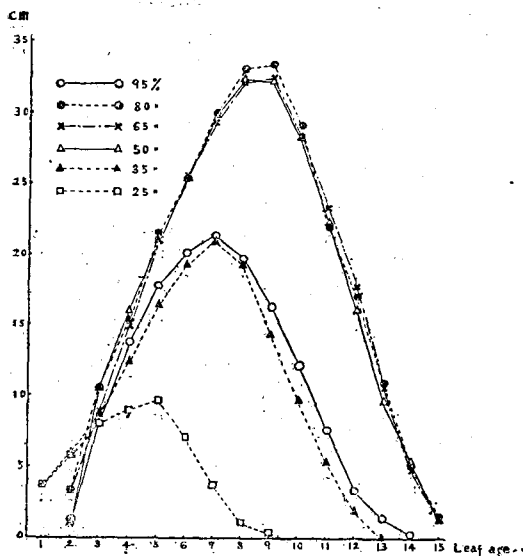
Fig. 4. Comparison of Fresh Weight of Leaves by Their Ages among Different Treatments (2nd Experiment).

葉令別に生葉重を測定した結果は第4図のに示すように第1報同様十分に生育した葉では各区の特徴が明瞭に現われてゐる。

d) 葉形 葉令別に葉長及び葉幅を測定した結果は第5, 6図のに示した。葉長は80%, 65%, 50%の3区間の差異は殆ど認められなく、次で95%は之等に比し著しく劣り、35%は95%よりも稍々劣り、25%は更に著しく劣っている。

葉幅は80%最大で65%, 50%の順に除々に劣る傾向があり、次で95%, 35%, 25%の順に劣り葉長の場合と殆ど同様の傾向が認められる。

Fig 5. Comparison of Length of Leaves by Their Ages among Different Treatments (2nd Experiment).



葉長に対する葉幅の比率については第7図に示したように大体に於て50%が最小であるが80%及び65%との差異は少い。次で35%, 95%の順に之等2区は前3区に比し稍々大となり更に25%は著しく大となつてゐる。

従つて土壤の乾燥が葉長、葉幅共にその生長を抑制し特に葉長の生長を抑制する事は第1報の場合と同様顕著に現われたが、過湿も亦乾燥と略々同様の影響を及ぼす事が認められる。

e) 生葉の乾物率並に水性エキス含有率 十分に生育し且つ生育進度の大体等しいと思はれる2葉を撰び乾物率並に水性エキス含有率を測定した結果は第7表に示した。95%, 80%, 65%及び50%では第7, 8葉, 35%では第6, 7葉, 25%では第4, 5葉の2葉を夫々供試したのであるが、第1実験の場合以上に各区の生育進度が不揃のため之等2葉で区間の比較を行うのは一層困難であつた。尙測定後95%は生育進度より見て35%と同様第6, 7葉を供試するのが合理的である事が判つたので該区では第7葉を80%等の第8葉と対照し比較を行う事とする。

Table 7. Comparison of Dry Matter Content and Water Extract Content of Fresh Leaves among Different Treatments (2nd Experiment)

Treatment	Dry matter content (Dry weight of leaf / Fresh weight of leaf) %					Water extract content (Weight of water extract of leaf / Fresh weight of leaf) %				
	4th leaf	5th leaf	6th leaf	7th leaf	8th leaf	4th leaf	5th leaf	6th leaf	7th leaf	8th leaf
95 %	—	—	—	5.41	5.10	—	—	—	2.08	1.86
80 "	—	—	—	4.76	4.52	—	—	—	1.99	1.87
65 "	—	—	—	4.80	4.57	—	—	—	2.10	1.97
50 "	—	—	—	4.70	4.54	—	—	—	2.02	1.86
35 "	—	—	4.90	4.43	—	—	—	2.14	1.83	—
25 "	5.42	5.15	—	—	—	2.55	2.23	—	—	—

Fig 6. Comparison of Width of Leaves by Their Ages among Different Treatments (2nd Experiment.)

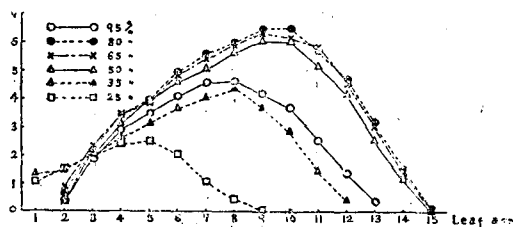
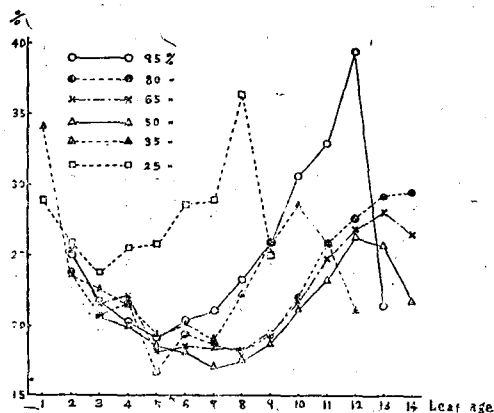


Fig 7. Comparison of Percentage of Width of Leaves to Length of Leaves by Their Ages among Different Treatments (2nd Experiment).



乾物率についてみると80%, 65%, 50%, 35%の4区間の差異は殆ど認められないが95%, 25%の両区では他区に比し相当高い。従つて過湿, 乾燥共に乾物率をかなり増大させる傾向が認められる。

水性エキスを含有率も95%, 25%の両区は他区に比し稍々高く過湿, 乾燥共に水性エキスを含有率を稍々高める傾向が認められる。

f) 主 茎 主茎の長さ, 直径, 生体重何れも80%, 60%は殆ど差異なく最大で50%は僅かに劣り次で95%, 35%の順に之等は前3区に比し相当劣り, 25%は更に著しく劣っている。生体重の分散分析並に区間の差異の有意性は第8, 9表に示すように80%, 65%及び50%の3区間を除く区間の差異は極めて有意義である。

Table 8. Analysis of Variance of Fresh Weight of Main Stem (2nd Experiment)

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	5	76.565	15.3130	101.55**
Individual	5	0.222	0.0444	
Error	24	3.620	0.1508	
Total	34	80.407		

** Represents significance at the 1% level

Table 9. Comparison of Differences of Fresh Weight of Main Stem and Their Significance among Different Treatments (2nd Experiment)

	95%	80%	65%	50%	35%	25%
	1.6	3.9	3.8	3.5	0.9	0.2
95%	1.6	—				
80%	3.9	2.3**	—			
65%	3.8	2.2**	0.1	—		
50%	3.5	1.9**	0.4	0.3	—	
35%	0.9	0.7**	3.0**	2.9**	2.6**	—
25%	0.2	1.4**	3.7**	3.6**	0.7**	—
L. S. D. (among the plots except the 95% plot: 5% level) 0.46						
L. S. D. (among the 95% and the other plots: 5% level) 0.50						
L. S. D. (among the plots except the 95% plot: 1% level) 0.63						
L. S. D. (among the 95% plot and the other plots: 1% level) 0.67						

** Represents significance at the 1% level

g) 側 芽 本実験でも側芽の生育は未だ初期であつて詳細については尙今後の研究に俟たなければならないが, その総数及び全生体重を調査した結果何れも80%及び65%はその値大で50%は何れも稍々劣つてゐる。95%は側芽数1未満で殆ど側芽の発生無く, 35%及び25%は未だ全然側芽の発生を見ない。

2. 地下部 生体重, 風乾重共に80%, 65%, 50%の3区は大であつて且つ之等3区間の差異はほとんど認められない。次で35%, 95%の順に前3区に比し著しく劣つてゐて, 95%では白色の細い新根の發育が悪く黒褐色の旧根が大部分であつた。25%では根の發育が全般的に極めて貧弱である。

風乾重の分散分析並に区間の差異の有意性は第10, 11表に示すように95%, 35%間及び80%, 65%, 50%の3区相互間を除く区間の差異は極めて有意義である。

Table 10. Analysis of Variance of Air-dry Weight of Roots (2nd Experiment)

Source of Variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	5	7.893	1.5786	21.08**
Individual	5	0.177	0.0354	
Error	24	1.798	0.0749	
Total	34	9.868		

** Represents significance at the 1% level

Table 11. Comparison of Differences of Air-dry Weight of Roots and Their Significance among Different Treatments (2nd Experiment)

	95%	80%	65%	50%	35%	25%
	0.49	1.34	1.17	1.28	0.69	0.04
95%	0.49	—				
80%	1.34	0.85**	—			
65%	1.17	0.68**	0.17	—		
50%	1.28	0.79	0.06	0.11	—	
35%	0.69	0.20**	0.65**	0.48**	0.59**	—
25%	0.04	0.45**	1.30**	1.13**	1.24**	0.65**
L. S. D. (among the plots except the 95% plot: 5% level) 0.326						
L. S. D. (among the 95% plot and the other plots: 5% level) 0.349						
L. S. D. (among the plots except the 95% plot: 1% level) 0.442						
L. S. D. (among the 95% plot and the other plots: 1% level) 0.473						

** Represents significance at the 1% level

総 括

第1報では容水量の大体90—75%の範囲内で生育最も良好で60%位では僅かに劣る傾向が認められるが、第2報では大体80—60%の範囲内で生育最も良好で50%位になると稍々生育の劣る傾向が認められる。従つて第1及び第2実験を総合すると大体90—60%の範囲が最適土壌水分であつて此の範囲内での土壌水分の変化は初期生育には殆ど影響を及ぼさないものと考えられる。

この範囲より土壌水分が大でも小でも共に生育の阻害される傾向が認められるが、大なる場合は95%位になると相当顕著に過湿による生育の阻害が認められ、小なる場合は50%位迄はその影響は余り顕著でないが、大体45—35%の範囲内で乾燥による生育の阻害が顕著に現はれる様である。30%以下になると土壌水分の減少するに従い乾燥による生育の阻害は益々顕著に認められる。

従つて既述の如くムラキオモトは貯水組織を有し耐乾性の強い植物ではあるが乾燥に適してゐるのではなく、少くとも初期生育に於ては寧ろ土壌水分の相当大なる場合に生育が極めて良好である事が判明した。

生葉の乾物率並に水性エキス含有率は第1及び第2実験を総合すると大体90—35%の範囲内では土壌水分の影響は殆ど認められない様である。之より大でも小でも両者の値高くなる傾向が認められ、30%位では土壌水分の影響は比較的少いが、25%或は95%位になると可なりその影響が認められる。之等乾燥或は過湿による乾物率及び水性エキス含有率の増大は主として著者が本植物の肥料3要素試験に於て研究した様な葉の内部組織特に貯水組織の発育の差異に基くものと想像されるが、この点は今後の研究で明かにする予定である。

摘 要

第1報では土壌容水量の90%、75%、60%、45%及び30%の5区、第2報に於ては95%、80%、65%、50%、35%及び25%の6区を設け土壌水分がムラサキオモトの初期生育に及ぼす影響について研究した。

1. 大体90—60%の範囲内で生育最も良好で草丈、地上部生体重、生葉数、生葉重、主茎の長さ・直径・生体重、側芽の数・生体重、地下部の生体重、風乾重等何れも最大で且つ此の範囲内に於る土壌水分の変化は初期生育には大した影響を及ぼさない。
2. 95%位になると地上部、地下部共に著しく生育阻害され草丈其他の値何れも顕著に低下し過湿の悪影響が顕著に認められる。
3. 50%位迄は地下部の生育は90—60%に比して劣らず良好であるが地上部の生育は稍々劣る傾向が認められる。
4. 大体45—35%の範囲内で乾燥による生育の阻害特に地上部の生育の阻害が顕著に認められる。
5. 大体35%以下になると土壌水分の減少するに従い地上部、地下部共に生育の阻害される傾向が益々顕著に認められる。
6. 生葉の乾物率、水性エキス含有率共に大体90—35%の範囲内では土壌水分の影響は殆ど認められないが、此の範囲より大でも小でも両者の値何れも増大する傾向が認められる。30%位では僅かであるが25%或は95%位になると之等の値が可なり高くなる傾向が認められる。

Summary

By providing five plots of the soil moisture, 90%, 75%, 60%, 45%, and 30% of the water capacity at the first experiment in 1951, and six plots 95%, 80%, 65%, 50%, 35%, and 25% at the second experiment in 1952, the effects of the soil moisture upon the early growth of MURASAKIOMOTO (*Rhoeo discolor* Hance) were investigated. Results obtained are summarized as follows.

1. Within the range from about 90% to about 60%, the growth of the plant is best; the plant height, the fresh weight of top, the number and the fresh weight of leaves, the length, the diameter, and the fresh weight of main stem, the number and the fresh weight of lateral buds, the fresh and air-dry

weights of roots, are all largest. And the variation of the soil moisture within the range above mentioned gives little effect upon the early growth of the plant.

2. At about 95%, the growth of top and roots, are both obstructed remarkably, and the values of the plant height etc., all decrease conspicuously as compared with those at about 90-60%.

3. At about 50%, the growth of roots is very good, not inferior to that at about 90-60%, but the growth of top is slightly inferior to that of the latter.

4. Within the range from about 45% to about 35%, the obstruction of the growth, especially in the top, is recognized.

5. Below about 35%, according to the decrease of the soil moisture, the growth of top and roots, are both obstructed more remarkably.

6. Both dry matter content and the water extract content of fresh leaves, are hardly influenced by the variation of the soil moisture, within the range from about 90% to about 35%. But at the soil moistures beyond the range above mentioned, they become higher; at about 30%, they become higher slightly, but at about 25% and also about 95%, they become higher tolerably.

Received March 12, 1954

寄生虫殺卵剤の研究（1）文献の追試及び市販殺虫、
殺菌剤の殺卵力について

佐渡 正四郎

Studies on Parasito-ovo-cidal Activity of Several Remedies

By Shoshiro SAWATARI

まえがき 寄生虫卵または仔虫を殺滅する方法としては熱、糞便棄却、腐熟、薬剤、超音波などが考えられているが、種々の欠点があるため未だ実用化されない。適当な殺卵剤が発見されたなら、駆虫剤と併用すれば短期間に寄生虫を根絶し得るであろうし、家畜寄生虫卵、害虫卵の殺滅に応用できるであろう。殺卵剤とは狭義の薬剤に限らず、菌類又はそれからの抽出成分、バイラス、昆虫でもよいと思う。殺卵剤が実用化されるためには、理想的には次の条件を必要とする。1. 糞便中に投じて12時間以内に、野菜をつけたとき30分間以内に殺卵すること。2. 人畜、有用植物や昆虫に無害であること。3. 無味。4. 無臭。5. 無着色性。6. 肥料価値に悪影響がないこと。7. 安価。8. 大量生産可能。したがって、以上の点を薬剤の選び方の目標とした。

寄生虫殺卵剤の研究は、吾国に多く、また最近、害虫駆除の目的で使用される農薬中にも寄生虫の殺卵性が存すると報告されているので、従来の報告を追試し更に市販殺虫、殺菌剤14種につき実験を行なつた。

実験方法

i **寄生虫卵** 最も抵抗性が強く、寄生率の高い蛔虫卵、特に人蛔虫 *Ascaris lumbricoides* の卵を用いた。この卵は成虫の子宮から圧出して得たものでなくて、新鮮な人糞から遠沈濾過を繰返してできるだけ精選し、多量の水と共に4°の氷室中に保存し、使用の際は沈澱した虫卵をピペットで吸取する。陳旧な虫卵で正常な発育をしなくなつたときは更新した。

ii **薬剤液** 溶剤はすべて水のみを用いた。水に不溶のものは酸・アルカリ等を加えるかまたはアラビアゴム、石鹸等乳化剤で乳剤とした。濃度は1, 2, 5倍稀釈とした。

調製して直ちに使用し、調製直後及び試験期間中のpH、外観、色、濁度及び臭等を比較観察するため対照を置き、作用薬液と同様に50ccを直径9cmのガラス皿に入れ28°に置いた。

iii **薬液中作用** 虫卵は大量の液中に放置すると沈下し酸素不足のため発育停止し薬剤の作用が不明となるので、下記培養法と同条件で薬液と作用させる為次の様にした。

薬液50ccを径9cmのガラス皿に入れ、これに虫卵適量（約0.6cc）を入れ直ちによくかきまぜて、28°の孵卵器中に7日間放置し、その間1, 2, 3, 7日目に、薬剤対照と同様に外観等を観察した後液をよくかきまぜその一部を採つて先ず鏡検し発育及び変形を観察した。本研究の目標には3日間で充分であると思つたが、殺卵作用が弱く且つその作用が永続する薬剤ではその後に殺卵するかも知れないので、7日まで試験することとした。観察は後培養と同様50個を検し%を記録する。

また1日で既に大部分が死滅した場合は更に時間的に30分・1時・2時・5時・10時間毎に同様の試験を行つた。

IV **後培養** 培養法としては吉田、小泉等の屢々用いた簡便なシャーレ法を採用した。

薬液中の虫卵を攪拌後、薬液中作用の観察用と同時にその一部を採り、3回以上水洗し上清に全く薬剤を残存しなくなつた後、虫卵を水50ccと共に径9cmのガラス皿に移し、28°で培養した。

観察には培養2, 4, 7, 10, 15, 20日、あるときは25日又は30日目に、毎回虫卵50個を鏡検し単細胞・複細胞・四細胞・桑実状・塊状・蝌蚪状、仔虫卵等の%を記載した。

虫卵の発育の対照として毎回水で薬液を加えぬ対照を置いた。対照では蛔虫卵は順調に発育し10~15日で全部包仔虫卵となり卵内で時々仔虫が運動するのが見られ、また十二指腸虫卵は2日で脱殻し第一期幼虫が浮遊し4~7日で第二期幼虫となり7日以後は被覆仔虫となる。

成績に疑いがあるものは2回繰返して試験した。表中、発育の+、-、%はそれぞれ薬液中のものでは薬液混合の時から発育を示し、後培養では仔虫卵に到達することを目標としてあらわした。

実験結果

i 文献の追試 成績の概略は第1表に示した。

第1表 文献の追試、其の1

註 寄生虫卵は人便蛔虫卵十は葉液中に於ては作用時よりの发育の有無を示し、後培養に於ては仔虫卵に到達した卵の有無を示す。％は夫々の百分率

薬剤名	(1) わさび 健康食品K 金印わさび	(2) しょうが	(3) 味噌	(4) 軽油	(5) 燈油	(6) ヨードチンキ (日局)	(7) ルゴール氏液 (日局)
濃度	1:100 混合	1:100 混合	1:100 混合	1:100 混合	1:100 不溶	1:200 不溶	1:100 1:200 1:500
薬液	刺戟臭+ pH 6.0	刺戟臭+ pH 5.6	臭著明 pH 6.0	臭稍強 pH 6.0		橙赤色 刺戟臭強	橙赤色 刺戟臭強 同左 黄金色 刺戟臭有
薬液中後	日1 2 3 7	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	(無色無臭) — — —	(無色無臭) — — —
培養時間	日1 2 3 7	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
文獻	6) 21)	21)	21)	36)	36)	39)	

薬剤名	(8) CS ₂	(9) CHCl ₃	(10) CCl ₄ (日曹)	(11) CH ₃ J	(12) エタノール 95 v/v % (和光純薬)	(13) タウロ ビヨル酸 (メルク)	(14) ホルマリン 試薬一級 (純正化学)	(15) 尿 素
濃度	1:200 不溶	1:500 1:1000	1:100 不溶	1:500 1:1000	10:100	1:100 +NaOH	4:70 2:70	1:100
薬液	強臭 (無臭)	微臭 (無臭)	殆無臭 (無臭)	臭強 (無臭)	微臭 (無臭)	臭+ pH 9.0	刺戟臭+ (臭+)	刺戟臭+ (臭+)
薬液中後	日1 2 3 7	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
培養時間	日1 2 3 7	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
文獻	35) 42) 3)	35)	35)	43)	3) 6) 35)	17)	3) 6)	18) 36)

薬剤名	(16) 尿酸	(17) 尿酸	(18) Hexyl- resorcin	(19A) 5% DDT液 味の素社	(19B) 30% DDT 乳剤	(20) KMnO ₄	(21) 石灰窒素	(22) Di- cyanidia- mide (自製)
濃度	1:100 不溶	1:100	1:100 乳剤	1:100 不溶	0.17:100 1:100	1:100	1:100 混合	1:100
薬液		pH < 1.2	乳化良好			加温溶解 紫黒色	pH > 9.6	pH 6.2
薬液中後	日1 2 3 7	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
培養時間	日1 2 3 7	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
文獻	36)	13) 37)	31) 36) 37)	36)	36)	37)	12) 13) 14) 15) 16)	

薬 剤 名		(23) CuSO ₄	(24) ZnSO ₄	(25) Pb(CH ₃ C- OO) ₂	(26)昇永 (日局) (武田薬品)	(27) AgNO ₃ (化学用最純武田化学)		
濃 度		1 : 100	1 : 100	3H ₂ O 溜水 1.2 : 100	1 : 100	溜水 1 : 200	溜水 1 : 500	溜水 1 : 1000
薬 液		pH5.0	pH5.8			pH5.3	pH5.3	pH5.4
薬液 中後 培 養	日	%	%	%	%	%	%	%
	1							
	2	+	57+	13+	17-			
	3	+	100+	90+	100	+	85+	75+
	7	+	100+	100+	100+	+	95+	95+
中後 培 養	日	%	%	%	%	%	%	%
	1							
	2	+	100+	100+	100+	+	95+	100+
	3	+	100+	100+	100+	+	85+	90+
	7	+	100+	100+	100+	+	60+	80+
文 献		3)36)	37)	37)	6)36)	37)		

文献の追試, 其の2

薬 剤 名		(6) ヨードチンキ (日局)	(7) ルゴール氏液 (日局)			(8) CS ₂	(11) CH ₃ J		
濃 度		1 : 100	1 : 200	1 : 20	1 : 50	1 : 100	1 : 200 不溶	1 : 100 不溶	1 : 200 1 : 500
薬 液		橙 赤 色 刺戟臭強	橙 赤 色 刺戟臭強						微 臭
薬液 中後 培 養	時	変形	不変形 不変形 不変形 一部変形	変形	不変形 不変形 殆ど変形	- 不変形	不変形		
	1								
	2	-							
	5								
	12								
中後 培 養	時					%		%	%
	1	-	-	-	-	30	-	+	70
	2	-	-	-	-	25	-	+	70
	5	-	-	-	-	10	-	+	25
	12	-	-	-	-	10	-	+	15
文 献			39)			35)42)43)	43)		

(1) わさび 市販の乾燥わさび2種を試験したが両者とも全く同様で、薬液は外観及びpHは不変であつたが、わさび臭は3日後にはなくなった。虫卵添加のものも同様であつたが7日後には雑菌多く繁殖し腐敗臭があつた。7日後には全く殺卵していたが変形は認めなかつた。この作用は辛味成分である揮発芥子油であろうと思うので、これについては後報で検討する。この物は前述の理想条件に合致する見込みがある。

(2) しょうが しょうがを細押し水を加えた液は1%では7日後に雑菌少数を認めたが3%では殆ど変化がなかつた。しょうが臭はいずれも7日後は殆ど認められない。pHはほとんど不変。薬液中の蛔虫卵はいずれも全く發育を制止される。後培養によつて3%では7日後に40%が死滅した。3%はしょうがの乾燥物について試験するために行つたものである。この有効成分もわさびのそれと同様に期待し追求する考えである。

(3) 味噌 市販の味噌1件を試験したが7日後には細菌が極めて著しく増殖するが全く殺卵性は認められなかつた。但し薬液中では發育は抑制せられる。

(4) 軽油及び (5) 燈油 全く無効であつた。1%より更に多量の油を用いるかまたは油のみを使用すれば塚本³⁶⁾の云うように虫卵の發育に影響を及ぼすかも知れないが、著者の目的には不適であると思つたので追求しなかつた。

(6) ヨードチンキ ヨウ素剤は数種試験されているが本剤については大浜信賢が *Necator* 並に *Ancylostoma* の成熟仔虫に対して使用した(1941)ものの他文献が見当らなかつたが、(7) ルゴール液と同様であるので本報

に記載することとした。本薬液は0.1%まで7日後も外観不変であるが、虫卵を混ぜると1%では2日後には橙赤色が全く退色して無色無臭となり、虫卵は蛋白膜が濃褐色となり後には幾分凝縮して薄くなる。0.5%では1日後に無色無臭となり3日で蛋白膜が濃褐色に着色し、0.2%では橙色、刺戟臭強いものが虫卵添加直後には微臭を留め1日で無色無臭となるが虫卵の蛋白膜には著変を認めない。(但しこのような微量の化学反応は蛔虫卵のみの作用とは見なし難い。集卵蛔虫卵には水に可溶性の成分又は大きさの相当に異つた物或は比重が著しく異なる物は水洗・濾過・遠沈・静置によつて殆んど除いたが、顕微鏡的に大きさが虫卵に近く比重の近似のものは大約虫卵の2×~4×は残存しているからである。)本剤に作用させた虫卵は鏡検する際に蛋白膜が濃色に着色しているため内容が判別し得ないので、鏡検直前にチオ硫酸ナトリウム液でヨウ素の色を除いて鏡検した。その虫卵は勿論再び前の培養に戻すことはせず棄却した。チオ硫酸ナトリウム液で脱色した虫卵は卵内容物は脱色せず明瞭に観察ができる。1%では1時間で全部卵黄細胞は褐色に着色し中心部に縮小している。0.5%液では12時間で2%、1日で80%、2日で全部同様に變形した。後培養によつて0.5%までは1時間以内に全く殺卵するが0.2%では7日後も無効であつた。勿論純粋な蛔虫卵であれば0.2%或は0.1%でも有効であろうが、同時に本剤は便池、畠地等には尙多量を用いなければ無効であろう。野菜にはそれ自体をも着臭するおそれがあるので有効であろうが本剤に期待し得ない。*Ancylostoma* 卵に対しては0.2%まで有効であるようだが、0.1%では3日後まで無効であつた。

(7) ルゴール氏液 本剤はDeshiens and Pick³⁹⁾が*Ascaris megalocephala*の卵に特殊な染色薬として報告しているが、原報を見る事ができなかつた。本剤も(6)ヨードチンキと全く同様で、ただその作用がヨードチンキの約1/2で、5%で1時間後に變形、2%で5時間後にほとんど全部變形、1%で7日後に變形する。また2%では1時間以内に全部殺卵するが、1%では第1表の2の様に徐々に作用し、1日で全く殺卵し、0.5%では7日後に始めて殺卵効果を認めた。十二指腸虫卵に対しては0.2%まで有効であるらしく0.1%では7日後も無効であつた。本剤もヨードチンキと同様期待できない。

(8) CS_2 本剤は和泉³⁵⁾が多数の薬剤と共に卵内浸透作用を試験した(柳沢等⁴¹⁾及び松村等⁴³⁾が殺卵性を発表した。著者の実験では0.5%までは1時間内に全部殺卵し0.2%では7日後も全部は殺卵しなかつたので、松村のいう肥ため中に0.05%を加えると夏では1週間冬では2週間で全滅する事には少しく疑問がある。しかも本剤は甚だ速効的の様で容易に卵殻内に浸透する事は和泉と同感で、その殺卵性は本剤を加えた直後にある様なので甚だ持続するものとは考えられない。しかしやや稀薄な溶液はかなり虫卵の發育に悪害を及ぼす様で、著者の実験でも0.2%に作用したものは1日後は後培養の際も發育が遅延し7日後は薬液中でも遅延しているが、後培養しても甚だ遅延し、また0.1%でも2日以後は後培養で遅延した。即ち対照は15日間て全部仔虫卵になるが本実験では25日間観察する必要があつた。又本剤は0.5%も強臭があり3日後も大差がなかつたが、之に虫卵を加えると直後に無臭となる。 CS_2 に溶性の物質が多いらしい。1%以下では卵形に変化は認められない。

(9) $CHCl_3$ 本剤も和泉³⁵⁾が最も浸透作用の強いものの一つと報告しているが、著者の実験では CS_2 より大分弱い様であつた。本剤の1%液は振りまぜるとやや混濁しているが、其の後間もなく不溶の $CHCl_3$ は器底に沈着し粒状を呈し上清は殆ど澄明となる。ほとんど無臭である。1日放置後は全く無臭でその後7日まで変化を見ない。虫卵を加えた薬液も全く同様であつた。薬液中の蛔虫卵は1日では不明瞭であつたが2日後には全部卵黄膨化した。後培養によつては1日では殆んど無効であつたが2日以後は有効である事が判つた。

(10) CCl_4 薬液は調製直後は臭気強いが3日後には微臭を呈する。本薬液中の蛔虫卵は發育し、後培養では3日までは稍々促進して全部發育するが7日後は65%が死滅していた。和泉³⁵⁾は CS_2 に次ぐ浸透し易い薬品だと云っているが1%では殆ど無効である。

(11) CH_3J 本剤は0.2%では全く溶解する様に見え臭気は微弱であるが、虫卵を添加すれば直ちに無臭となる。0.5%のものは臭気著明であるが虫卵を加えると臭気は殆ど無くなる。本薬液中の虫卵は0.2%までは全く發育せず變形もしない。後培養では1.0%では1時間で、0.5%では2時間で、0.2%では24時間で全く殺卵し、0.1%では7日後も全く無効であつた。又十二指腸虫卵は0.1%でも2日以内に殺卵する様であつた。

(12) C_2H_5OH 本剤は始めから期待しなかつたが他の実験のため試験した。和泉³⁵⁾も浸透作用が弱いと云い、又小泉⁶⁾及び吉田³⁾に C_2H_5OH は殺卵効果が殆どないと報告しているが、著者の実験でも同様であつた。

(13) タウロヒヨル酸 本剤は水に溶けないのでNa塩として溶かした。それでも薬液のみは変化はなかつたが、虫卵を添加した液は3日後にpH7.2となり再び本剤が析出した様である。薬液中では虫卵は全く發育しなかつた。

が後培養では全く無効であつた。

(14) ホルマリン HCHO 1%を含むような液を作つた。その2%濃度でも7日後、生存卵が55%あつた。臭気は対照液も虫卵添加液も同様で僅かに減少したのみであつた。

(15) 尿素 1%では全く無影響であつて、十二指腸虫卵も7日後まで生存した。

(16) 尿酸 1%薬液中では發育しなかつたが、後培養では7日後まで全卵完全に發育した。

(17) 蔞酸 1%液は pH 1.2 以下であるが其液中の蛔虫卵は却つて速やかに發育し2日で二細胞70%・四細胞17%・八細胞4%、3日で二細胞24%・四細胞66%・八細胞10%、7日で塊状100%であつた。なお本薬液の中に入れた蛔虫卵は速やかに蛋白膜を膨大し大部の虫卵は僅かの刺激によつても蛋白膜を剝離する。20分間で全卵蛋白膜膨化し30%は無蛋白膜卵となり、5時間では50%が無蛋白膜となつた。又十二指腸虫卵は薬液中で2日後に仔虫包蔵卵を見、後培養で3日後に仔虫を検出した。十二指腸虫卵が薬液中でも脱殻するか、又幾日まで生命を保っているかは、後に報告する。

(18) Hexylresorcin 乳化薬液は本剤0.5gをヒマシ油5ccに溶かしトラガントゴム2.5g及び水3.1ccと乳鉢で充分こねまぜた後水少量ずつを注加し全容を50ccとした。対照液は7日後も全く変化がなく乳化良好と認められた。虫卵を加えたものは3日後に油滴僅微を析出した。薬液中の虫卵は全く發育しなかつた。然し後培養では7日後も全く無効であつた。大体伏見³¹⁾及び塚本³⁶⁾の成績と一致する。

(19) DDT 5%DDT ガソリン液と30%DDT 乳剤の国産市販品を用いた。30%DDT 乳剤の1%液は3日後に沈澱少量を生じた外、之等の薬液に異状は起らなかつた。虫卵を加えたものは5%DDT 液が7日後に針状結晶著明、浮游物僅微で臭は僅微であつて、30%DDT 液は大差を認めなかつた。薬液中の虫卵は最も濃厚な1%乳剤では却つて發育促進したが他は大差がなかつた。後培養では1%乳剤（DDT 0.3%に相当する）まで無効であつた。十二指腸虫卵は1%乳剤では1日で死滅したようであつたが、5%DDT 1%では7日後も生存し仔虫が孵化したのを認めた。

(20) KMnO_4 1%液に虫卵を加えると直後には変化は認められないが7日後には液面に褐色薄膜を生じ、0.5%液は紅黒色で同様に3日後には器壁に褐色被膜を生じ、0.2%は紅黒色で3日後にほとんど全液褐色化し、0.1%はブドウ酒色で1日ではほとんど脱色し沈澱のみ黒色を呈した。此の場合も集卵蛔虫卵の不純物が影響を及ぼしている。蛔虫卵のみであれば更に1/2乃至1/5の濃度でかかる変化を認めるものと思う。従つて糞便、手指等には更に多量を必要とするので、本剤も実用には不適である。本薬液中の蛔虫卵は蛋白膜が黒変し0.1%1日でも殆んど内容が見えないので、すべて鏡検前に蔞酸溶液で之を脱色した。卵殻内容物は着色しない。薬液中では2日後は未だ殆んど發育しないが、3日では二細胞5%・四細胞65%・八細胞30%、7日で塊状10%・蝌蚪状90%で、甚だ促進される。0.5%及び0.2%液中でも略々同様に發育促進するが僅かに弱い。0.1%では殆んど無薬対照と差がない程弱くなる。後培養でも速やかに仔虫卵となつた。塚本³⁷⁾は薬液中培養で0.1%順調・0.5%~1.0%抑制・10%死滅と報告しているが、著者の成績は0.2%~1.0%促進である。

(21) 石灰窒素 薬液は7日まで pH 9.6 以上であつたが、何等影響を認めなかつた。

(22) Dicyandiamide 階堂¹²⁾は石灰窒素が有効なのはその分解物の Dicyandiamide のためであろうと報告しているので、石灰窒素 50g から本剤の純品 (mp 204~5°) 4g を得て実験に用いた。本剤も全く無影響であつた。

(23) CuSO_4 本剤液中で虫卵の發育は促進されたが、後培養では全部完全發育した。塚本³⁶⁾の成績とは反対で吉田³¹⁾の成績に一致する。

(24) ZnSO_4 薬液中の虫卵は發育促進し全部生存する。

(25) $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 同上

(26) 昇汞 同上

(27) AgNO_3 常水では銀が沈澱するので蒸留水に溶かした。本薬剤中の虫卵は0.5%~0.01%では發育促進し、後培養では極めて徐々に卵に作用し0.5%7日間でも約半数しか殺卵しないが0.05%7日でも90%が完全發育し0.02%で全く發育した（第1表）。又本薬液中では蛔虫卵の蛋白膜が黒変し卵内容が見えないので、硝酸の10倍液で遊離銀を溶出脱色して發育を観察した。この黒変は0.1%1日で約2/3、2日で多数、0.05%1日で約1/10、2日で多数、0.01%3日で約1/10であつた。塚本³⁷⁾は0.01%~0.3%では發育せぬと云っているが著者の実験とは異なる。

ii 市販製剤の検討 成績の概略は第2表に示す。

第2表 市販殺虫・殺菌剤の殺卵性 其の1

註：寄生虫卵は人便虫卵 十一は薬液中に於ては作用時よりの発育の有無を示し、後培養に於ては仔虫卵に到達した卵の有無を示す。％は夫々の百分率

薬 剤 名		(28) トリゾール 大 光 製 薬 研 究 所				(29) ネオ・ジクロン 明 治 薬 品 工 業 K K					
濃 度		1 : 100	1 : 200	1 : 500	1 : 1000	1 : 100	1 : 200	1 : 500	1 : 1000		
薬 液		乳白色 pH8.2	淡乳濁 pH7.6	白濁 pH6.4	淡白濁 pH6.0						
薬 液 中	日 1	%		%		%		%			
	2	変形				変形					
	3	"				"		不変形			
	7	"		+	50+	6-	+	2-	-		
	7	"		不変			+	2+	2+	14+	90
後 培 養	日 1	-	+	100+	100+	100-	+	80+	100+	100	
	2	-	+	100+	100+	100-	+	70+	95+	100	
	3	-	+	95+	90+	100-	+	+	+	100	
	7	-	+	85+	90+	100-	+	35+	80+	100	
	7										
薬 剤 名		(30) ホリドール (40%)				(31) 三共DN乳剤 (DN15%) 三共KK		(32) 三共DN機 械油乳剤 (DN0.5%)	(33) マシンゾール80 三共	(34) フラトール 三共	
濃 度		1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 100	1 : 200	1 : 20	1 : 20	1 : 50	原 液	
薬 液		乳濁 pH3.2	稍淡乳濁 pH3.2	淡乳白濁 pH4.0	黄色、濁 pH6.2	黄色、稍濁 無臭	淡黄色 濃乳濁	灰色、乳濁 重油臭	同 左	赤色、透明	
薬 液 中	日 1			%	%	%	%	%	%	%	
	2			(微臭)							
	3			+	40 (鱗晶+)	(鱗晶+)		(油浮游)	(油浮游)	-	
	7	(僅微臭)	(僅微臭)	+	100+	100+	100+	100+	100+	90	
	7										
後 培 養	日 1	+	70+	100+	100+	100+	100+	100+	100+	100	
	2	+	35+	35+	100+	70+	80+	100+	100+	100	
	3	+	15+	15+	100+	55+	75+	100+	100+	80	
	7	-	-	+	100+	25+	45+	100+	40+	100+	80
	7										
薬 剤 名		(35) EPN (27%) 三 共	(36) 硫酸 ニコチン (ブ ラックリー フ40%)	(37) ニッ カ リンT 日本化工	(38) TCP 三 井 染 料						
濃 度		1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100 +NaOH	1 : 100 石鹼乳剤	1 : 200 石鹼乳剤	1 : 500 石鹼乳剤	1 : 100 ゴム乳剤		
薬 液		淡黄緑色、 透 明	黄色	pH<1.2	紅褐色 pH8.4	白 色、 濃 乳 様 pH7.0	pH7.8	pH8.2	乳白色、 乳 化 良 pH5.8		
薬 液 中	日 1		%		%		%	%	%		
	2										
	3		-	+	+	75-	変形+	80+	5+	3	
	7		+	35+	+	100-	"	90+	100+	8	
	7										
後 培 養	日 1		%	100+	+	100-	変形+	100+	100+	30	
	2	+	100+	100	+	100-	+	100+	100+	6	
	3	+	100+	100	+	100-	+	100+	100-		
	7	+	100+	100+	+	40-	+	5+	100-		
	7										

薬 剤 名		(39) P C P 三 井 染 料				(40A) γ-BHC純 Merck	(40B) (95%) γ-BHC 三井染料		
濃 度		1:100 +NaOH	1:200 ゴム乳剤	1:500 ゴム乳剤	1:1000 ゴム乳剤	1:100 ゴム乳濁	1:50 ゴム乳剤	1:100 ゴム乳剤	
薬 液		蛋白濁 pH9.2	灰色, 稀乳濁 pH5.2	灰色, 濁 pH5.8	灰色, 稍濁 pH5.8	乳様白濁 pH4.6	淡乳濁 pH4.6	淡乳白濁 pH5.0	
薬 液 中 後	日	%		%		%		%	
	1 2 3 7	%		%		%		%	
中 後	+	95+	6+	40+	50-			-	
	+	100+	8+	35+	70				
後 培 養	日	%		%		%		%	
	1 2 3 7	%		%		%		%	
中 後	+	100-	+	100+	+	100+	100+	100	
	+	100-	+	10+	+	100+	100+	100	
中 後	+	100-	+	10+	+	100+	100+	100	
	+	45-	-	-	-	50+	100+	80+	45

薬 剤 名		(40C) BHC 水和剤 三 共	(41)逆性 石 鹼ミヨシ ミヨシ油脂	(42) CH ₃ OH (一 級) 平 沢 製 薬	(43) 薬 用 石 鹼 (日 局)	(44) アラビアゴム乳剤 自 製	
濃 度		1:100	1:30	1:10	1:50	原 液	1:4
薬 液		白濁 pH6.4	僅微蛋白濁		pH8.2	濃乳濁	稀乳様濁
薬 液 中 後	日			%			
	1 2 3 7			%			
中 後	+	+		12			
	+			100-		-	
後 培 養	日	%		%		%	
	1 2 3 7	%		%		%	
中 後	+	+	100+	100+	100+	100+	100
	+	100+	100+	100+	100+	100+	100
中 後	+	100+	95+	90+	100+	100+	100
	+	100+	85+	90+	100+	85+	100

市販殺虫・殺菌剤の殺卵性 其の2

薬 剤 名		(28) ト リ ゾ ー ル 大 光 製 薬 研 究 所		(29) ネ オ ・ デ ク ロ ソ ン 明 治 薬 品 工 業 K K			(39) P C P 三 井 染 料	
濃 度		1:50	1:100	1:20	1:50	1:100	1:20	ゴム乳濁
薬 液		牛乳様 pH8.3	乳白色 pH8.2					濃乳濁
薬 液 中 後	時							
	1	変形	不変	変形				
	2	"	"	"	変形約半			
	5	"	変形	"	変形	変形約半		
中 後 培 養	時							
	1	-	+	%	+	%	+	%
	2	-	+	80	+	40	+	95
	5	-	+	40	+	25	+	90
中 後 培 養	時							
	12	-	-	変形	-	変形	+	50

(28) トリゾール (Trizol) 大光製薬研究所製造。処方: トリクロロールエチレン 40%・クレゾール 30%・アルコール 8%・クロロホルム 2%・石鹼 20%。本剤の 50×液は牛乳様乳剤でクロロホルム様臭気稍著明であるが、3日後に上層約半量は淡黄色透明となつた。虫卵を浸漬した液は直後に臭僅微となり、3日後も変化を認めなかつた。100×液は同じく臭気稍著明で3日後に上層半量が微黄色透明となり7日には微クレゾール臭となつた。虫卵を浸漬すると直ちにほとんど無臭となり7日後には微クレゾール臭を残すのみである。本薬液中に加えた蛔虫卵

は50×までは一時間後には卵黄膨大し、100×では5時間で全部変形する。又10×以下では2日以内に蛋白膜膨化し20×～50×では7日で蛋白膜膨化を認めた。後培養は卵黄の膨化よりも速やかに死滅し第2表の通りである。なお、表中100×1時間及び200×・500×3日までの後培養は明らかに发育促進され、1000×の後培養では僅かに促進していた。之に反し200×・500×7日の後培養では发育が遅延した。薬液中の観察でも同様に100×では发育せずに死に至つたが200×では逆に发育促進し3日で四細胞6%・二細胞44%となり、500×・1000×となれば次第に対照と同様になる。此の事実は興味ある生物の一般性質であると思うが後の機会に詳述する考である。本剤の使用法中蛔虫卵の殺卵には30×～50×液を便壺に1.5～2l撒布すると云つてゐるが、直径50cmの小型便壺に深さ20cmの糞尿がある場合でも本実験の有効濃度1%に達する為には本剤原液400ccを必要とする。実際糞尿に応用した実験は試みなかつたが、恐らくは本実験成績から、より多量の薬剤を用いる必要があると考え。又昭和25年11月13日附東京都寄生虫病診療所の人蛔虫卵に対する殺滅試験成績書の写を見ると50%・30%・10%の試験として50%・30%では1日で100%殺滅し、10%では1日10%・2日15%・3日20%・4日及び5日30%と云う事になっているが、著者の実験成績及び本剤の使用法から推察すると50%・30%・10%と云うのは5.0%・3.0%・1.0%の誤りではないかと思ふ。然りとすれば著者の実験との誤差は1%前後となる。したがつて本剤も非常に多量に使用しなければ無効となり実効を期待し得ない事になり、更に有効な薬剤を希望したくなるのである。

(29) **ネオ-ジクロン (Neo Gikuron)** 明治薬品工業株式会社製造、処方：クレゾール類18%・メタノール45%・ブロムエチレン10%・パラジクロルベンゼン5%・石鹼類22%。本剤薬液に浸漬した蛔虫卵は蛋白膜の変化はなく、20×1時間・50×5時間で全卵の卵黄細胞膨化し、50×2時間・100×5時間で約半数、200×7日で僅かに同様変形した。又その发育は500×までは遅延し1000×では稍促進した。後培養では矢張り卵黄変形に先立ち死滅し第2表の通りであつた。50×2時間・200×1日～7日の後培養中死滅卵は桑実期～蛭蚪期まで发育して仔虫卵まで生長しきらずに中絶したと思われる物が多く、仔虫卵に達したものもその間の发育は著しく遅延した。

(30) **ホリドール40** 熊本県蚕業試験場から分与を受けた輸入品である。本薬の10×液は蒜様刺激臭著明であり7日放置するも不変。40×液も臭氣に大差はなく螢光を認める。虫卵を加えたものも大した変化は認めなかつた。殺卵効果は第2表に見る様に緩慢且つ弱い。後培養で死滅卵は大部分が蛭蚪状の中絶卵であつた。本品は人体に極めて有毒であるので此の程度の殺卵力では本研究の対象とならない。

(31) **三共DN乳剤 (ネオデーン1号)** 処方：2,4-ジニトロ-6-シクロヘキシルフェノール (DN) 15% 農業用殺虫剤。本剤の使用量は1000×～1200×～1800×液を撒布するが、著者はその5～10倍濃度を使用した。期待する成果は見られなかつた。此の濃度では本剤成分は過飽和であるのか洗滌物著明で後之が鱗片状結晶となり多量に析出した。本薬剤液中でも蛔虫卵は发育するが、後培養すると仔虫卵迄发育せず中絶するものが著明であつた。例えば100×液2日では25%・3日でも25%・7日では55%、200×液3日では20%・7日では50%が中絶卵であつた。此の中絶卵は蛭蚪状が多い様ではなく各期のものが見られた。確かに卵に対して有害ではある様だが其の作用が鮮かでないのは分子が大きすぎる為か又は作用対象が複雑な為か不明である。

(32) **三共DN機械油乳剤** 処方：DN 0.5%・精製マシン油95%。同上の殺虫剤である。300～500×液を使用するが20×液でも全く影響がなかつた。

(33) **マシンゾール80** 処方：精製マシン油80%。本剤も蚜虫・ダニ類等の殺虫又は越冬卵の殺滅に160～250×液を用いるが20×で7日後に僅かに効果があつた様である。

(34) **フラトール (Fratol)** 三共。処方：モノフルオール醋酸ナトリウム1%・其他トウガラシチンキ濃縮物・色素・水。本剤は強力な殺鼠剤であるが其の原液中7日後も殆んど生存していた。

(35) **デュボンNPE300** 米国デュボン・デ・ニーマース会社製。処方：エチル-パラニトロフェニルチオノベンゼン-フォスフォネート27%。本剤はヘダニ類・蚜虫等に1500～2000×液を使用するが、著者は100×液を試験したが全く無効であつた。

(36) **硫酸ニコチン40** 米国ブラックリーフ製。処方：硫酸ニコチン40%。本剤はシンクイ虫類・アカダニ・蚜虫類等の殺虫に900～1300×で使用するものであるが、又或経験者の話では1万×液で殺卵性を有する様に云はれてゐるので、蛔虫卵に使用して見たが全く影響がなかつた。

(37) ニッカリンT 日本化学工業株式会社製、処方：テトラ・エチル・ピロホスフェイト (TEPP) 35%・ヘキサエチル・テトラホスフェイト (HETP) 65%。本剤も強力な農業用殺虫剤であるが、全く無効であつた。

(38) トリクロル・フェノール (TCP) 樹木の害虫等に用いる殺虫剤である。三井染料製、本剤の純度は不明。水に難溶であるので NaOH を加えて溶かした。その1%液は紅褐色・透明・pH 8.4であつた。本液は3日後に pH 8.2で微量であるが結晶を析出した。本液中の虫卵は殆ど変形はなく、發育は促進された。後培養するに又促進し、7日後に漸く半数を殺卵していた。

次に石鹼乳剤として作用を試みた。100×～500×皆薬用石鹼は2% (50×) である。2%の石鹼液は(43)として第2表に掲げた通り全く影響がない。本乳剤の乳化度は略良好で200×液が3日で白色沈澱稍著明、500×液で3日後白色沈澱僅微であつた。虫卵を加えたものも変化は認めなかつた。本薬液の虫卵の外観は変化なく、100×液中では卵黄細胞膨化したもの1日で約20%・2日で約80%・3日以上は全部あつたが、200×以上は認めなかつた。又本薬液中の虫卵は100×では7日後も發育を認めなかつたが、200×では著明に發育促進し、500×では無薬対照と殆ど差がなかつた。後培養によつて100×液では1日で全滅しているが、200×では3日までは全く無効で却つて發育促進し7日では95%死滅し残りの生存卵の發育は著明に發育遅延していた。

又本剤をアラビアゴム乳剤として試験した。ゴマ油4ccに本剤1.0gを溶解しアラビアゴム2gと水2.8ccを乳鉢で強く撪拌し後水を加えて全容を100ccとして100×液を作成した。本薬液も上述の石鹼乳剤と大差はなかつたが、卵黄細胞の膨化は認めなかつた。本薬液中の虫卵は第2表に見る様に僅かに發育したのみで、その發育の速度は遅延していた。後培養に依つて生死を確認した成績は第2表の通りで、石鹼乳剤よりは明らかに効果が弱い様である。

(39) ペンタクロル・フェノール (PCP) TCPと同様に使用されるものでTCPより其効力が強いと言われる。三井染料製、本剤の純度95%以上。TCPと同様フェノラート溶液はほとんど無色であり、3日後にはpH 9.0であつたが白色結晶が液面に微量析出した。薬液中の虫卵はTCPと同様發育促進し7日で仔虫卵40%・蛭蚪状40%・塊状48%であつた。後培養によつてもほとんど無効であつた。

次に乳剤の作用を検した。石鹼乳剤は試みずアラビアゴム乳剤のみを用ひた。薬液の20×は稍淡乳濁・殆ど無臭・沈澱多量・pH 4.2、50×液は淡乳濁・沈澱著明・pH 4.4、100×は淡乳白濁・pH 4.8・微褐色浮游物著明、200×以上第2表の通りであつた。放置するも大差はなく例えば100×液は7日後に沈澱少許を生じたのみであつた。虫卵を混じても著変を生ぜず、薬液中の虫卵は20×液2日以内に全部、50×液1日70%・3日80%・7日100%、100×液7日ほとんど全部、200×7日約10%が卵黄膨大した。後培養による成績は第2表の通りであるが、薬液中で發育した虫卵が、後培養により更に發育するが、仔虫卵まで完全成熟することなく中絶したものが著明であつた。多くは蛭蚪状又は塊状で發育停止するものであるが、時には二細胞或は四細胞くらいで發育しなくなるものもある。例えば200×1日は後培養25日で發育は總べて完了した後も仔虫卵は全くなく又試験当初の一細胞卵は44%で残りは總べて中絶卵であり、それを精査すると蛭蚪状24%・塊状14%・桑突状14%・四細胞4%であり、同じく200×7日の後培養は一細胞78%・明瞭ではないが蛭蚪状14%・塊状8%であつた。又薬液の濃度に從つても之と同様の事が屢々觀察された。12時間以内は20×でも無効であつた。PCPはTCPの純度不明であるがそれでもTCPより幾分効果は強いものと思われる。

(40) BHC DDTに就てはiに於て検討したがBHCに就ては文献に見当らない。

メルク製γ-BHCは純度99%以上の結晶であり、又三井染料製γ-BHCは純度95%以上の同様な結晶であるが何れも100×では殆んど無効で、三井染料製の50×も同様であつた。三井染料製の50×・100×の7日では何れも多少死滅しているが此の程度の死滅は乳化剤液の影響と考えられる。(後述(44)参照)

三共製BHC水和剤も全く無効であつた。

(41) 逆性石鹼 ミヨシ油脂株式会社製、殺菌・洗滌剤。ドデシルピコリニウム・ブロマイドの10%水溶液。本剤は30×液で手指等に用い、器具・食器等には400×を用いるが、著者は30×液を試験したが殆んど無効であつた。

(42) CH₃OH 試薬一級、平沢製薬製。本剤は文献にも見当らず、又(29)ネオ・デクロン等の薬剤にも用いてあるので、iに於てC₂H₅OHが無効なる事を報告したが、之を試験した。本剤もC₂H₅OHと同様殆んど無効であつたが、C₂H₅OHより幾らか有害である様である。

(43) 薬用石鹼 前述の実験に石鹼乳剤を使用したものでその対照として行つた。殆んど影響がなかつた。

(44) アラビアゴム乳剤 之も前項と同じ目的で実施した。原液はゴマ油16cc・アラビアゴム8g・水11.2ccを乳鉢中で強く研磨した後少量ずつ水を注加し全容を100ccとした濃厚な乳液である。4×液は前述の100×薬剤液に使用した濃度と同一である。本液中の蛔虫卵は薬液中では全く發育せず、後培養によつても7日目に濃厚な方は少し死滅していた。之は濃厚乳剤中には多量の油の爲酸素が蛔虫卵に達しないための窒息死であると思ふ。石油等を多量に用いた場合と大差ないものであろう。

又本薬液中の虫卵を鏡檢又は後培養する際に、虫卵は油様泥状物により塊となつて容易に洗滌できないので、之をエーテルで1分間攪拌溶解した後水洗して行つた。エーテル1分間の対照試験も行つたが何等の影響も認めなかつた。

又乳化にはホモデナイザーを用いて操作した事もあつたが、大した差はないものと思ふ。

総 括

追試の結果有効と考えられたものは、わさび、しょうが、 CS_2 及び CH_3I のみであつた。

市販殺虫殺菌剤の中著者が試験した上記14種の中で、最も有効なのはトリゾール、次でネオ・デクロン、PCP、TCP であつた。然し之等とて便池中の虫卵を殺滅するにはまだその効力は不足である。又野菜・手指等の殺卵には PCP、TCP は短時間には殺卵せずトリゾール、ネオ・デクロンは20×の濃厚液でしかもリゾール臭があるので未だ理想的でない。

其の他の薬剤は殆ど無効であつた。野虫等の卵を殺滅すると云う薬剤の濃厚溶液でも蛔虫卵は殺滅できなかつた。

あ と が き

本研究の費用の一部は厚生科学研究補助金(昭和26年度)によつた。本実験に供する薬剤を提供された三共株式会社福岡支店農薬課並びに三井染料株式会社に謝意を表す。又終始御激励と御指導を賜つた恩師熊本大学薬学部加来天民教授並びに医学部大反田藤吉教授に衷心より感謝の意を捧げる。

文 献

- 1) 小林晴次郎：腸寄生虫卵の抵抗力(朝鮮医会(25号)[1919]；(日本之医会 11(1)[1921]；(朝鮮医会(38号)[1922].
- 2) 吉田貞雄、堀田：蛔虫卵の抵抗力に就て、東医事新 2125号、2126号[1919].
- 3) 吉田貞雄：蛔虫の研究二三、大阪医会 22(3) 244 [1923].
- 4) 小泉誠治：蛔虫成熟卵の抵抗力試験、同上 21(6) [1922].
- 5) "：蛔虫の發育に関する研究、東医事新(2293号)[1922]；(2322号)[1923].
- 6) "：渣物内に於ける寄生虫卵特に蛔虫卵の運命に就て(1)大阪医会 22, 896 [1923].
- 7) 大場辰之允：蛔虫卵の抵抗に就て、台湾医会(227号)[1923].
- 8) 浅田須一：蛔虫卵殻内仔虫の抵抗力試験、東医事新(2339号)[1923].
- 9) 石川精一：人糞中蛔虫卵の堆肥内運命、満洲医, 11(4) [1929].
- 10) 浜田良輔：活性汚泥中寄生虫卵の運命、国民衛生, 7(3) 356 [1930], 抄録医中, 33 [1931].
- 11) 伊藤慎一：十二指腸虫卵の發育に酸素の影響、海軍医会, 19(6) 694 [1930], 抄録同上.
- 12) 階堂嘉市：尿尿に混じた人工肥料が十二指腸虫卵並に蛔虫卵に及ぼす影響、国民衛生 8(4) 339 [1931], 抄録同上.
- 13) "：土壤の性質が寄生虫(十二指腸虫)卵の孵化及び其の仔虫に及ぼす影響、同上 8(6) 717 [昭6], 抄録同上.
- 14) "：土壤に混入せる人工肥料が十二指腸虫卵の孵化及び其の仔虫に及ぼす影響、同上 773, 抄録同上.
- 15) "：Necator americanus の生物学的性質を論じて予防撲滅法の研究に及ぶ、同上 789, 抄録同上.
- 16) "：石灰窒素が十二指腸虫卵及び其の仔虫を撲滅す、大阪医誌 12(5) 514 [1941], 抄録同上 72 [1941].
- 17) 中川雅美：胆汁の線虫卵發育に及ぼす影響、慶医 11(1) 237 [1931], 抄録同上 33 [1931].
- 18) 野村舜治、土橋静佳：諸種ガス体の蛔虫卵に及ぼす影響、同上(8) 1737, 抄録 34 [1932].
- 19) 土橋静佳：蛔虫卵發育の抑制現象、同上 12(7) 1371 [1932], 抄録同上 36 [1932, 3].
- 20) 石丸武信、池内進：蛔虫体腔液及び腸内容の蛔虫卵發育に及ぼす影響、同上(2) 189, 抄録同

- 上 35 [1932]. 21) 八木胤幸：常用調味料の蛔虫卵發育に及ぼす影響，同上 13 (3) 507 [1933]，抄録同上 38 [1933]. 22) 韓京淳：地上並びに便中に於ける十二指腸虫卵及び其の仔虫の運命，同上 (4) 587，抄録同上.
- 23) 毛受治郎八：蛔虫及び十二指腸虫卵の消石灰，灰汁に対する抵抗力，同上 (12) 1433，抄録同上 40 [1934]. 24) 佐藤千代三郎，千葉隆：蛔虫卵に対するクロール石灰の作用，同上 17 (2) 245 [1937]，抄録同上 53 [1937]. 25) 竹村栄：蛔虫体腔液並びに諸種薬物の蛔虫卵發育に及ぼす影響，朝鮮医会 22 (11) 1056 [1932]. 26) 秋葉朝一郎，風間美佐雄：堆肥並びに尿尿熟成促進細菌剤，衛生試験 41 号 48 [1933]；現代の獣医界 28 (2) 91 [1933]. 27) 川畑愛義：虫卵の尿，尿，汚泥中に於ける抵抗力，京都衛試報 12 回 114 [1936]. 28) 山中太木，里見恭一郎：寄生虫仔虫並びに虫卵に及ぼす超音波の影響，大阪高医誌 6 (1) 65 [1938]，抄録医中 63 [1939]. 29) 笠原道夫等：十二指腸虫卵に及ぼす亜硝酸の影響，医学と生物学 9 (4) 185 [1946]，抄録同上 91 [1946]. 30) 中尾健，中村悦郎：Alkylresorcinol 特に Hexylresorcinol の薬理，東医事新 66 (7) 324 [1949]. 31) 伏見純一：種々薬剤の蛔虫卵發育能に及ぼす影響，薬学研究 22 (6) 246, (10) 414 [1950]. 32) 西村猛：駆虫剤の鈎虫卵發育に及ぼす影響，公衆衛生 9 (2) 130 [1951]. 33) 長野寛治：糞便内虫卵の死滅因子，臨床医学 36 (1) 60 [1951]，抄録医中 97 (2) [1951]. 34) 石井，根本：便壺中の蛔虫卵殺滅法，同上 58，抄録同上. 35) 和泉精一：諸種化学薬剤の蛔虫卵浸透作用，臨床医学 36 (1) 59 [1951]；Japan. Journ. of Med. Sci. & Biol. 5, 21 [1952]；抄録同上 97 (2) [1951]；C. A. 46, 10462 [1952]. 36) 塚本忠行：駆虫薬の研究 (3)，日本薬理学雑誌 46 (4) 125 [1951]，抄録医中 97 (5) [1952]. 37) "：虫卵撲滅による蛔虫駆除の薬物学的研究 (1) 薬学研究 22 (6) 241 [1950]. 38) 三橋，宮川：超音波の乳汁並びに寄生虫卵に及ぼす影響，聯合微生物学会記録 11 回 82 [1937]，抄録医中 56 [1938]. 39) R. Deschiens and F. Pick: A peculiar staining property of the eggs of *Ascaris megeloccephala*, Bull. soc. path. exotique 41, 212 [1948], Abst. C. A. 42, 4977 [1948]. 40) Allen, Rex. W. and Johns Andrews: Observations on the viability of eggs of *Ascaris* removed from swine by treatment with NaF, Proc. Helminthol Soc. Washington 15 (1) : 38 [1948], Abst. Biol. Abst. 23, 621 [1949]. 41) 柳沢利喜雄等：農村衛生の研究，特に無寄生虫部落の栄養対策，第 8 回公衆衛生学会総会 [1953]. 42) 藤田浩三等：消毒薬の乳化状態と殺菌力，同上. 43) 松村龍雄等：尿尿の薬剤処理で蛔虫感染予防，同上.

Summary

Author used the eggs of *Ascaris lumbricoides* prepared from feces, which are most densely widely distributed in this country and most resistant against many chemicals. Twenty-seven kinds of medicines, which had been reported effective as having egg-killing activity of intestinal parasites of man in the 43 reports ever made, were re-examined. Among the examined medicines, Japanese mustard and ginger were most promising, and CH_3J , CS_2 and CHCl_3 were also effective. Tincture of iodine and Lugol's solution were very effective *in vitro*, but practically useless when applied in human waste or soil.

Among the newly examined 14 kinds of medicines, "Trizol" (tri-chlor ethylen 40%, cresol 30%, CHCl_3 2%, etc.), "Neo-Gikuron" (Bromethylen 10%, *p*-dichlor benzene 5%, cresol 18%, methano 145%, etc.), PCP (penta-chlor phenol) and TCP (tri-chlor phenol) were effective.

Received April 8, 1954

学校給食用小麦粉強化剤に関する調査

小川 俊太郎, 平岡 栄一, 中路 幸男

Survey on the Vitamin Compound for Enrichment of
School Feeding.

By Shuntaro OGAWA, Ei-ichi HIRAOKA and Yukio NAKAZI

昭和28年4月15日に決定した食品強化実施要綱に基づいて、5月15日に学校給食用小麦粉強化剤の試験規格が定められてから、1カ年を経過したが、我々には試験規格案を作製後、実際に強化剤を試験する機会が与えられなかつたので、1カ年の実施期間を経た今日果して現規格が実状に適していたかどうかを再検討するとともに、強化剤の品質調査も行いたいと考え、我々の要請により、各製造者より提供された試料につき本調査を実施した。

試料 昭和28年4月における指定製造業者11社の内、今回試料を提供されたのは9社である。

試験項目及び方法 現行試験規格に準ずる。ただし、ビタミンB₁の定量及びB₂定量の一部は都合上比色法によつた。

試験成績

試 験 成 績 表

試料	確認試験	純度試験	篩過残留分(%)	ビ タ ミ ン B ₁ (%)				ビタミンB ₂ (%)		第二磷酸カルシウム (%)
				第1回	第2回	第3回	平均	螢光法	比色法	
1	適	適	1.2	(83)	95	101	93	105	103	96
2	適	適	1.2	96	(94)	97	96	100	96	98
3	適	適	0.4	(83)	(89)	97	90	109	101	96
4	適	適	<0.1	(88)	(91)	(90)	90	99	98	97
5	適	適	(3.2)	(91)	106	115	104	96	99	95
6	適	適	1.2	(93)	(83)	(87)	88	104	100	100
7	適	適	1.3	(68)	(66)	(81)	72	102	96	96
8	適	適	(81)	(83)	(75)	(86)	81	(90)	(90)	(104)
9	適	適	(18)	105	—	110	108	(126)	120	(108)

()内の試料は不適品を示す。

試験成績のまとめ

イ 性状 特記すべきことはない。

ロ 確認試験 5項目に全試料が適合した。

ヘ 純度試験 2項目に全試料が適合した。本試験規格は一部訂正する必要を認めた(後出)。

ニ 粉末度試験の恕限量(2%の篩過残留分を許容する)に対し、3試料が不適であつた。

ホ 定量試験

(i) ビタミンB₁ 恕限量(規定の95~120%)に対し、第一回目の試験では2社が適合し、第二回目の試験では第1回目と異つた2社が適合し、成績が一定しないので、さらに第3回目の試験を行つて、適合品5種を得たが、その内の1種は前2回の試験に不適の試料であつた。算術平均によれば、6試料が不適品となる。本試験規格も一部改訂の必要を認めた(後出)。

(ii) ビタミンB₂ 恕限量(規定の95~120%)に対して、未満のもの1試料、超過したもの1試料を数えた。比色法と螢光法はよく一致している。

(iii) 第二磷酸カルシウム 総限量(規定の95~100%)を僅かに超えるものが2種あつた。

全体を通じ、B₁の含量を除けば成績は概ね良好とみられる。

試験成績に対する考察 成績中で注目すべき点は B₁ 含量の低い試料が意想外に多かつたことであろう。

原因の一つに共存水分が考えられる。これに関する某製造者の研究によれば、現処方のもとでは放置中の気温の高い程 B₁ の損失が大きく、本邦月別平均気温の範囲(60~90%)の内、最低に近い63%という環境で30°に保存した場合には製造後3カ月目の B₁ 含量が初めの78%位に落ち、もしこの時期に於ても規定された B₁ 含量を保とうとするならば、比湿約22%の空气中に貯えなければならぬまいという。

ただし、この成績は製品を直接こういう環境下にさらしたときの結果で、実際の製品は容器内の限られた空気と接しているにとどまるがゆえに、B₁ の損失もこれ程著しくはあるまいと期待されるが、その例として別の製造者の2カ月間に亘る実験では、一旦開封した容器内に栓をなして大氣中に放置しただけでは B₁ の目立つた破壊は認められなかつたといわれ、同様の成績は他の研究者からも報告されている。

我々の試料も完全な密封容器から、密封とはいえない程度の燻入りに至るまで、色々な包装状態の下に送られ、さらに本年2月から約1カ月の試験期間中、開栓の都度比湿の高い実験室の空気と接触している。定量のたび平均した試料をとるよう充分注意したのにもかかわらず、B₁ の定量成績が全般的に思わしくない上に、動揺しているのは、恐らく B₁ の分解が試料の内部で不均一に起つているためと想像される。この事実は今後抜取試験を行うような場合には充分に注意すべきことであると思う。

結論として、現在の強化剤は我邦の気湿の下では、保存方法に注意しないと B₁ を失う惧れを持つものといえよう。昨年の夏期をはさんで作られた各社の初期製品の中には、この注意を怠つたために、ケーキング(団塊化)による返品が見られ、其後密封容器や乾燥剤を用いることによつて、その厄を免れたと聞いたが、かような引湿した製品の B₁ 含量はかなり低かつたのではないかと考えられる。

上述したように、気湿が B₁ の消失に影響することは、ほぼ明白と思うが、しからばこの B₁ の消失は単に引湿した水分と B₁ との相互関係に於てのみ考慮すればよいかという点、そうではないようである。

某社の研究によれば、第二磷酸カルシウムも B₁ の分解に関係があり、例えば同じ局方品でも、粒子の細かい程分解を早くし、局方品(2分子の結晶水を持つ)はそれを加熱脱水して作つた無水磷酸カルシウムより B₁ の分解を促すという。また、これとは逆に比湿約40%を境として局方第二磷酸カルシウムは、B₁ の共存するとき、その持てる結晶水を放出し、この放水現象が B₁ の分解あるいはケーキングの発生にむしろ決定的な影響を与えると解される実験成績を得た。

かように考えると、市販強化剤中の B₁ の分解は、引湿、結晶水の放出等諸現象の総合的結果であると看做すべきであろう。

この事実は実際の製品が提供された後に気付かれたことであつて、これは強化剤のように B₁ に多量の第二磷酸カルシウムを混合した医薬品があまり類例のないものであつたためと見られる。従つて現在までのところでは、気湿、カルシウム塩の脱水及び B₁ の分解がどのような因果関係にあるのか不明であつて、今後速かに解明せねばならぬ問題であると思う。

試験規格の一部改正案

(イ) 改正案： 確認試験(4)の冒頭「本品0.1gに稀塩酸5cc及び」を「本品0.1gにN塩酸5cc及び」と改める。

改正理由： 現規格は現日本薬局方第二磷酸カルシウムの条中確認試験(4)に準じているが、反応液の酸性が強すぎるために磷酸カルシウムが沈澱しにくい傾きがある。本案はこの欠点を改めたものである。

(ロ) 改正案： 定量法(1)ビタミン B₁、定量操作の第二節中「N/10塩酸80ccを加え」につく「80~85°の水浴中で……加熱した後放冷し」の部分の削り、「て溶かした後」と改める。

改正理由： 現規格は現日本薬局方ビタミン B₁ 散の条中定量法に準じているが、強化剤の如き組成の品にあつては、加熱の必要を認めない。

附言 本調査の結果からいえば、強化剤中の B₁ は決して安定ではない。その原因の少くとも一つは気湿の高い

こと、逆にいえば、製品の防湿不足といえるであろう。しかし、一面からみると、現処方はその内に B₁ を分解させる何らかの因子を孕んでいるかのようにも見える。その真偽または発動機序はすみやかに確かむべきであろうと思う。

また、現処方と直接関係はないが、現処方中の局方第二磷酸カルシウムを脱水品に代えるかまたは局方ビタミン B₁ (塩酸塩) を米局方ビタミン B₁ 硝酸塩に代えれば、B₁ は安定であるといわれるが、この点を検討することも今後に於て必要であろう。

終りに、試料を提供された各社に対し厚く感謝する。

(1954. 7. 1 受入)

還元性安定剤を含有する市販ビタミンC注射液に関する調査

小川俊太郎, 平岡栄一, 中路幸男

Titrimetric Assay of Vitamin C Injections under Coexistence
of some reducing Stabilizers.

By Shuntaro OGAWA, Ei-ichi HIRAOKA and Yukio NAKAZI

市販の日本薬局方ビタミンC注射液には各種の安定剤を含むものが見られるが、還元性安定剤はヨウ素液を消費するので、これ等の市販品を現行薬局方ビタミンC注射液の条中に規定するヨウ素滴定で定量するときには、現存する安定剤のビタミンC当量だけ、真のビタミンC含量より高い見かけのビタミンC含量が得られるのではあるまいかと疑われる。もしこのような事実があれば、試料の薬局方合否を決定する上に支障を招くのみならず、通則並びに製剤総則にそむくことになるであろう。そこで我々は実験及び市販品に関する実状の調査を行つてこの点を確かめ、次の結論を得たのでここに報告する。なお詳細は別に発表する予定である。

結 論

- (1) 市販品9種の内7種は還元性安定剤を含む。その内2種には表示が欠けている。(第1表)

第1表 市 販 品 中 の 安 定 剤

No	含 量 (mg/cc)	安 定 剤	そ の 含 量		対VC含量 w/w%	表 示
			w/v%	mg/cc		
1	50	メタ重亜硫酸ナトリウム	0.05	0.5	1.0	有
2	50	不 含	0.0	0.0	0.0	不要
3	50	亜硫酸水素ナトリウム	0.1	1.0	2.0	有
4	50	同 上	0.02	0.2	0.4	有
5	50	ホルムアルデヒド-スル ホオキシレイト(ロンガリット)	0.15	1.5	3.0	有
6	100	不 含	0.0	0.0	0.0	不要
7	50	亜硫酸水素ナトリウム	0.2	2.0	4.0	無
8	50	同 上	0.5	5.0	10.0	無
9	50	メタ重亜硫酸ナトリウム	0.07	0.7	1.4	名称ノミ有

- (2) 市販品の安定剤による見かけのビタミンC含量の増加は1.9~16.9%であると推定され(第2表, 第4欄)実験によれば1.0~11%(第2表, 第5欄), 市販品に対する調査の結果では2~11.5%であつた(第2表, 第6欄)。

- (3) 市販品の見かけのビタミンC含量(即ち真のビタミンC含量と還元性安定剤による見かけのビタミンC含量の増加の和に当る)は表示の102~115.5%, 真のビタミンC含量は表示の101~106%で、総て局方に合格した(第3表)。

- (4) 従つて、今回の調査では現行局方のヨウ素法によつても市販品の局方合否の判定に誤りを生ずるような例はない。

- (5) 市販品の真のビタミンC含量を求めるには末尾に掲げる過酸化水素処理を伴うインドフェノール法を用いなければならない。

- (6) この方法は英国及び米国の現薬局方にビタミンC製剤の定量法として採用されているインドフェノール法と

第2表 安定剤の影響

No	安定剤	対VC含量 w/w%	増加率計算値		増加率実験値	増加率実測値
			結晶水含	結晶水含 不		
1	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	1.1	1.9	2.0	2.0
2	—	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5
3	NaHSO_3	2.0	—	3.4	1.5	4.0
4	NaHSO_3	0.4	—	0.68	1.0 (対VC含量1%)	2.5
5	$\text{NaHSO}_2 \cdot \text{HCOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.0	6.9	—	4.0 (対VC含量2%)	6.5
6	—	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
7	NaHSO_3	4.0	—	6.8	5.0 (対VC含量5%)	3.0
8	NaHSO_3	10.0	—	16.9	11.0	11.5
9	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.4	1.6	2.6	2.0 (対VC含量1%)	6.0

第3表 市販品のC含量 (表示に対する%)

No	ヨウ素液	H_2O_2 処理 インドフェ ノール法	U. S. P. インドフェ ノール法	(ヨウ素法) - (H_2O_2 処理 インドフェ ノール法)
1	104.5	102.5	102.5	2.0
2	108.5	106	106	2.5
3	107.5	103.5	103	4.0
4	106	103.5	103.5	2.5
5	112.5	106	106.5	6.5
6	102	101	101.5	1.0
7	109	106	106.5	3.0
8	115.5	104	105	11.5
9	107.5	101.5	101.5	6.0

同じく簡易であるが、さらに正確であり、薬局方の試験法として適当である。

(7) 但し、市販品に使われている安定剤の内、ロンガリット (ホルムアルデヒド・スルホオキシレイト) 及びその使用が今後考えられる安定剤の内、チオ硫酸ナトリウム及びビドロ亜硫酸ナトリウムはビタミンCに対し5~10%存在するとき右の定量法をも妨害する。

考察

(1) 安定剤の必要性について 溶液中におけるビタミンCの分解は主として酸化に基くのであるから、安定剤もアンプル内の酸素の除去及び酸化触媒作用の中絶を目的とするものが多く、それゆえに還元性物質が重用されるのであつて、また一面においてはこの還元性が加熱滅菌によつて現われる液の着色の漂白にも役立つと解される。

ただし、製剤原料、アンプル及び工程に留意すれば、安定剤を使わなくても、製造中のCの減少を少なからしめ、市販中のCの分解をも抑止しようといわれ、また製造中におけるCの減少は安定剤が存在すれば、その代償的分解によつて防げるけれども、その量はもとより僅少に止まり特に安定剤の使用を意義づけざるほどのものではなく、安定剤はむしろ液の着色防止にこそ効果を認めるとなすものもあり、さらに注射液を無痛化するために、液のpHを局方の許す最上限 (pH=7.4) に近ずければ、却つて滅菌時に着色しやすいので、どうしても安定剤が必要になつたとも評される。

今回の調査によれば、市販品中2種は安定剤を含まないが、国家検査中にも事故を起さず、また N. N. R(1952) に収載した12種のビタミンC注射液中安定剤を含む旨明記したものは1/3の4種にすぎない。

かように考えると、ビタミンC注射液に対して安定剤が必ずしも必要不可欠であるとは考えられない。

(2) 安定剤の定量結果に及ぼす影響について 還元性安定剤として通例用いるものは、亜硫酸水素ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウムで、添加量は1cc中ビタミンCの50mgに対し、0.1w/v% 即ち1mg で充分とされ、これはビタミンCに対して1~2w/w%に当る。添加量がこの程度で止まれば第2表に示すように、製品中に加えた安定剤がたとえ完全に残っていたとしても、ヨウ素法による定量値を1~4%過大にするだけであるから、これを現行局方ビタミンC注射液の含量規定、即ち表示の95~120% という幅と対比すれば、製品の局方合否の判定に大きい影響を与えないともいえるであろうが、安定剤の添加量が何かの原因で大きくなつたときには定量値に対して見逃し得ない影響を与えるおそれが生ずる。その例は第2表あるいは第3表中に一、二見受けられる。現在の市販品についてはこの影響も我々の提案する過酸化水素処理を伴うインドフェノール法で避け得られるが、安定剤の種類及び量によつては妨害の起る可能性が全くないとはいえない。かように考えるとビタミンC注射液に安定剤を用いることを仮に許容するとしても、その種類と添加の割合に制限を加えてもよいのではあるまいかと思う。

附: 過酸化水素処理を伴うインドフェノール法 ビタミンC注射液をメタ磷酸・酢酸試液でうすめ10cc がビタミンC約1mg を含むようにし、その10cc をとり過酸化水素試液2cc を混和し、直にインドフェノール試液で液が少くとも5秒間持続するバラ色を呈するまで滴定する。別に同様の方法で空試験を行う。後述するインドフェノール試液の力価を参照して、検液10cc 中のビタミンC含量を算出し、これより試料のビタミンC含量を求める。

メタ磷酸・酢酸試液: メタ磷酸15g を氷醋酸40cc 及び水400cc によく振りまぜながら溶かし、水を加えて500cc とした後、ヒダ付濾紙で濾過して製する。用時調製する。

インドフェノール試液: 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールのナトリウム塩約50mg をとり、あらかじめ炭酸水素ナトリウム42mg を溶かした温水約150cc に溶かし、冷後水で200cc とした後濾過して製する。光を遮り冷所に貯える。

力価を検するには、国立衛生試験所ビタミンC標準品 100 ± 0.1 mg を正確に秤り、500cc のメスフラスコに入れ、メタ磷酸・酢酸試液に溶かして500cc とし、その5cc を正確に量り、メタ磷酸・酢酸試液5cc を加えた後直ちにインドフェノール試液で液が少くとも5秒間持続するバラ色を呈するまで滴定する。別に同様の方法で空試験を行う。

終りに、試料を提供された各社に対し厚く感謝する。

(1954. 7. 1 受入)

人造米の化学試験及び異物検査について

川 城 巖、藤 井 清 次、林 敏 夫、宮 島 弘 衛、
渡 辺 秀 子、原 田 基 夫、河 村 正 一、西 村 千 昭

Chemical Analysis of Artificial Rice and Test of Extraneous

Materials in it.

By Iwao KAWASIRO, Seiji FUJII, Tosio HAYASHI, Hiroe
MIYAJIMA, Hideko WATANABE, Motoo HARADA,
Masaichi KAWAMURA and Tiaki NISIMURA

まえがき 人造米は昨年の凶作を機に市場に登場して世の注目を浴び、その栄養価等については種々議論¹⁾がおこなわれた。著者らは各府県を通じて送附された人造米につき化学分析及び異物検査をおこなったのでその成績を報告する。なお試験に供した人造米は日本農林規格公布以前のものである。

人造米の製造法 日本農林規格によれば「人造米とは澱粉及び穀類粉を原料として粒状に整型し、精米とは同様に使用できる性状を具へたものをいう」と規定されており、一般には澱粉、小麦粉、米粉を原料として製造し、又これにビタミン類、カルシウムなどを強化した製品も市販されている。現在おこなわれている製法の一例を挙げると次のようである。原料を混合機に入れ温水を加えて適当の固さに練つたのち、製帯機にかけて帯状に圧延したものを型打機にかけて米粒状にうち抜き、篩を通して米粒状のものだけを撰別し、圧力釜中で表面のみアルファ化する程度に蒸煮し乾燥する。農林省は製品に対して次のような規格を設けている¹⁾。

水分 14%以下、一升重量 360g以上、剛度 60kg未満の粒が粒数で15%以下(ラセル式剛度計による)。

砕粒及び接着粒合計 5%以下、熱量 100gにつき335cal以上、繊維0.5%以下、灰分 0.8%以下、性状形態、色沢等が精米に近く、異味、異臭のないもの、異物 混入しないもの。

化学試験の結果及び考察 粗蛋白質、粗脂肪、炭水化物、粗繊維、灰分、カルシウム及び水分の定量をおこない、その結果に基づき Atwater 係数を用い熱量を計算した。これらの成績は第一表に示す通りであるが、なお参考のため、白米及び干麺について同様の試験をおこない、その結果を併せて収載した。粗脂肪の量は白米、干麺に比べていずれも低い。粗蛋白質及び炭水化物は白米と大差なく、粗繊維は比較的少ない値を示している。灰分の含量は区々でカルシウム以外の灰分が0.8%以上含有されているものも比較的多く、中には7.6%にも達するものが一種あつた。これらは粗悪な原料によるものと考へられる。カルシウムはカルシウム塩添加以外のものでは白米よりやや少ない。水分はその大部分が白米よりは少なかつた。更に熱量の点では白米とほとんど同じであり、干麺に比べるとやや多い。

異物検査の結果及びその考察 第2表の結果より、人造米及び干麺は米に比し異物の多いことが目立っている。勿論、衛生面よりすれば、之等三者の中では米が良いことになる。又米は異物があつても消費者に対して指導如何によつて除くこともできるが、人造米、干麺は内部に練りこんであるためこれを除くことは困難である。

又この表より、これら異物は製造上除くことは不可能ではない。それは異物の種類及び多少のあることから考へられる。故に製造原料の撰定及び製造場所の衛生などに製造者が注意すればよいということが実験結果より充分予知出来ることである。

む す び

化学試験では人造米および白米を比較して各成分とも大きな差異は認められなかった。また灰分は白米に比べやや多かつたが、反面水分が白米より少なかった。熱量の点では殆んど相異は認められなかった。

異物検査においては、ねずみの毛、だに、昆虫破片、土砂などが検出されたものが多く、これは化学試験で灰分の多いのに関連して、原材料の粗悪によるものであり、今後衛生的に改善される必要があることが痛感された。

第1表 人造米、白米及び干うどんの化学試験成績

検体番号	検体名	原料配合比 (%)	粗蛋白質 (%)	粗脂肪 (%)	炭水化物 (%)	粗繊維 (%)	灰分 (%)	カルシウム (mg)	水分 (%)	熱量 (Cal)
1	人造米 (長野)	小麦粉 85 碎米粉 15	7.38	0.14	78.82	0.42	0.71	9.11	12.53	346
2	" (広島)		6.69	0.28	74.13	0.31	7.60	1097.0	10.99	326
3	" (兵庫)		5.88	0.32	84.25	0.19	0.34	5.97	9.02	363
4	" (")		7.56	0.17	80.41	0.37	0.98	9.32	10.51	353
5	" (神奈川)		8.44	0.20	77.80	0.25	1.24	19.42	12.07	354
6	" (")		8.06	0.31	77.91	0.34	1.16	9.20	12.22	347
7	" (京都)	小麦粉 85 碎米粉 15	7.19	0.12	79.60	0.32	0.75	10.13	12.02	348
8	" (和歌山)	小麦粉 80 澱粉 10 碎米粉 10	7.81	0.19	81.08	0.44	0.46	6.20	10.02	357
9	" (静岡)		7.13	0.20	79.74	0.38	0.53	9.70	12.02	349
10	" (石川)	小麦粉 70 澱粉 20 碎米粉 10	7.00	0.20	79.72	0.47	0.71	15.96	11.90	349
11	" (長崎)	澱粉 50 小麦粉 30 碎米粉 20	4.75	0.17	79.11	0.16	0.54	7.17	15.27	337
12	" (")		6.75	6.27	77.96	0.45	0.99	237.50	13.58	341
13	" (")		6.94	0.26	77.96	0.39	1.04	176.14	13.41	342
14	" (香川)	小麦粉 60 澱粉 30 碎米粉 10	6.81	0.26	78.72	0.43	1.50	8.33	12.28	344
15	外米 (ビルマ)		7.19	1.02	75.65	0.57	0.36	14.96	15.21	341
16	1952年産白米 (栃木)		7.22	0.45	76.69	0.57	0.45	19.53	14.62	340
17	1953年産白米 (山形)		6.89	0.48	79.50	0.49	0.40	17.37	12.24	350
18	" (秋田)		7.11	0.52	76.18	0.48	0.56	19.39	15.15	338
19	" (福島)		7.56	0.40	78.70	0.55	0.65	18.45	12.14	349
20	干 麺 (並品)		9.16	0.64	71.77	0.48	2.22	15.76	15.73	329
21	" (")		9.94	0.71	72.27	0.43	1.75	12.88	14.90	335
22	" (中等品)		9.27	0.57	72.59	0.46	1.62	20.49	15.49	333
23	" (")		9.19	0.61	74.31	0.41	1.24	18.30	14.24	339
24	" (上等品)		9.38	0.66	72.65	0.34	2.47	23.30	14.50	334
25	" (")		8.56	0.73	75.09	0.26	1.59	19.33	13.77	341

第2表 人造米, 白米及び干麴の異物試験 (50g中の異物を示す)

検体番号	検体名	検出物	備考
1	人造米(長野)	異物多く数不明(藻繊維, 昆虫破片等) ただ 1	濾紙一面に異物あり
2	" (広島)	異物多く数不明(昆虫片, 植物繊維, 土砂等) 約 1mm ³ の土砂 2	濾紙一面に異物あり
3	" (兵庫)	植物繊維 192, 動物破片 129, 土砂少量	動物破片は昆虫と判断出来ないものがあつたため
4	" (")	植物繊維 241, 動物破片 72, だに 2, 土砂少量	同 上
5	" (神奈川)	昆虫破片 6, 植物繊維多数, 土砂少量	
6	" (")	昆虫破片 5, 植物繊維多数, 土砂少量, 鼠毛 1	
7	" (京都)	昆虫破片 10, 植物繊維多数, 土砂少量	
8	" (和歌山)	異物多く数不明(昆虫破片, 植物繊維等)	濾紙一面に異物あり
9	" (静岡)	同 上	同 上
10	" (石川)	異物多く数不明(昆虫破片, 植物繊維等) 土砂少量	
11	" (長崎)	フスマ, 植物繊維少量, 鼠毛 1, 鼠糞片 6	
12	" (")	フスマ, 植物繊維多数, 昆虫破片 5, 鼠毛 1, 鼠糞片 3	
13	" (")	フスマ, 植物繊維少量, 昆虫破片 7, だに 1	
14	" (香川)	昆虫片 78, 植物繊維少数, 土砂少量	
15	外米(ビルマ)	土砂 15, 植物繊維 3, だに 3, 昆虫 8, 幼虫 15, 糠	
16	1952年産白米(栃木)	植物繊維 13, 糠	
17	1953年産白米(山形)	植物繊維多数, モミガラ 8, 糠	
18	" (秋田)	植物繊維 3, 糠	
19	" (福島)	植物繊維 3, モミガラ 3, 糠	
20	干麴(並品)	フスマ, 植物繊維少量, 昆虫破片 5, 動物性異物 1	動物性異物は普通の土砂とは異つていた。
21	" (")	フスマ, 植物繊維多数, 動物破片 9	動物破片は昆虫と判断出来ないものがあつたため。
22	" (中等品)	フスマ, 植物繊維多数, 昆虫破片 7, 鼠毛 1	
23	" (")	フスマ, 植物繊維多数, 昆虫破片 6	
24	" (上等品)	フスマ多数	
25	" (")	フスマ, 植物繊維多数, 昆虫破片 6	

Summary

The results obtained in the experiments of rice and artificial rice are following :

- 1) There was few difference between the ingredients of rice and artificial rice.
- 2) As extraneous materials, rat hair, mite, insect fragment and sand were found in artificial rice.
- 3) The calory of artificial rice was nearly equal to that of rice.

Received April 5, 1954.

食品の新鮮度保持に関する研究（その11）

人造米・干麺類などの細菌試験成績

八田貞義, 青山好作, 栗栖弘光, 宮沢文雄, 赤坂京子,

中本ムツ江, 新井秀男, 川浪 昇, 藤波龍恵

Studies on Holding Food Fresh. (11) Results on Bacteriological

Examination of Artificial Rices and Dried Mens.

By Sadayoshi HATTA, Kōsaku AOYAMA, Hiromitsu KURISU,

Fumio MIYASAWA, Kyoko AKASAKA, Mutue NAKAMOTO,

Hideo ARAI, Noboru KAWANAMI and Tatie FUJINAMI

まえがき 人造米は主に澱粉（馬鈴薯）、小麦粉および米粉（碎米）を原料として配合したものであるから衛生的に十分な注意が払われないと、原料は勿論製造工程中からも容易に細菌汚染をおこし易い。よつて人造米の実態を細菌学的に試験し、このときの値を干麺、白米などの値と対比してみた。

試験の方法 検体は、所轄保健所員によつて製造所から直接無菌的に採取され送付された人造米14種と、対照として市販品を著者らによつて無菌的に採取された干麺6種、白米5種である。

試験にはいずれの検体も予め十分にふりまぜた後、無菌的に15g量を秤量し生理食塩液75cc宛分注した容器内に加え、直ちに比較的是げしく25回ふりまぜた。このふりまぜた液を滅菌した容器内に移し、再び75cc量の滅菌生理食塩液を加え同じ操作を繰返し全量150ccの洗滌液（仮に㊸とした）を作つた。

次に十分に洗滌液を除いた後の試料に滅菌生理食塩液を加え、ホモジナイザーで磨砕し、150cc量の磨砕液（仮に㊹とした）を作つた。

調製された㊸及び㊹を基に、それらの1g中の一般生菌数、耐熱性菌、枯草菌、大腸菌群、腸球菌群および糸状菌数について検べた。

それらの術式は衛生検査指針に準拠したが、耐熱性菌は60°で30分加熱した後の生菌数をもつて示した。なお腸球菌群⁽²⁻⁴⁾は推定培地（0.5% Polypeptone, 0.5% Dextrose, 0.5% Yeast extract, 0.04% Sodium azide, 0.0032% Brom thymol blue）を用いて定量し、確認培地（0.5% Polypeptone, 0.5% Dextrose, 0.5% Yeast extract, 0.04% Sodium azide, 0.001% Methylene blue, 2.0% Agar）で分離し、ついで染色性、形態、糖分解能などを検べて菌の固定を行つた。

試験の成績 試験の成績は第1表及び第2表に示した。

成績の比較は生菌数を基に試みた。

まず人造米では生理食塩液2回洗滌液㊸の検出生菌数は最低が 2×10^2 、最高が $7,850 \times 10^2$ 、平均 $1,253 \times 10^2$ 、洗滌後の磨砕液㊹は最低が 2.5×10^2 、最高が $7,600 \times 10^2$ 、平均 $1,201 \times 10^2$ で平均値は㊸と㊹とで大体近似するが、個々にわたる調査では14検体中11検体において㊹は㊸よりも生菌数が多く算定された。干麺では㊸の最低が 110×10^2 、最高が $1,100 \times 10^2$ 、平均 505×10^2 、㊹では最低が 750×10^2 、最高が $89,000 \times 10^2$ 、平均 $20,225 \times 10^2$ で、人造米同様㊸よりも㊹の方が生菌数は多い。

白米では㊸の最低が 2×10^2 、最高が 270×10^2 、平均 141×10^2 、㊹の最低が 5×10^2 、最高が 340×10^2 、平均 120×10^2 で白米ではむしろ磨砕液よりも洗滌液の方が菌数は多く検出された。

そこで㊸と㊹とを加えて検体1g当りの平均値で三者を較べると汚染度は白米<人造米<干麺の順となり、人造米ではむしろ白米の約9.4倍、干麺では約80倍となる。

大腸菌群は人造米では14例中6例が、白米では5例中4例が、干麺では6例中6例から検出されたが、この検出菌の菌型は Intermediate、或は Aerobacter groupのもので、Escherichia groupのもの検出は認めなかつた。

腸球菌群は大腸菌群の存在した検体からは、ほとんど分離された。すなわち人造米では14検体中7検体が、干麺では全検体から検出され、その定量値も $10^3 \sim 10^6$ 乗オーダーと、かなりの高率を示した。ところが白米だけは5例中4例に大腸菌群の存在を認めたにもかかわらず、腸球菌群は全く検出されず注目された。

分離腸球菌群の菌型は生物学的な性状から(第3表参照)、人造米では分離株7株中、1株は *S. liquefaciens*, 6株は *S. faecalis*, 干麺では6株中、1株は *S. liquefaciens* 5株は *S. faecalis* と判定された。なおブドウ球菌はすべての検体中に証明された。

第1表 人造米、白米及び干麺類の細菌試験成績

検体 番号	検 体	Ⓐ				Ⓑ			
		生菌数	耐熱性菌	枯草菌	糸状菌	生菌数	耐熱性菌	枯草菌	糸状菌
1	人 造 米 (長 野)	12×10^2	90	80	40	16×10^2	530	40	20
2	" " (広 島)	29×10^2	210	40	180	2750×10^2	780	300	2200
3	" " (兵 庫)	3×10^2	40	20	30	400×10^2	100	90	30
4	" " (")	7200×10^2	3400	1600	380	7600×10^2	4890	800	210
5	" " (神奈川)	3×10^2	200	70	30	2.5×10^2	170	40	100
6	" " (")	5.3×10^2	290	120	0	5×10^2	220	170	0
7	" " (京 都)	7850×10^2	290	40	310	330×10^2	1700	270	70
8	" " (和歌山)	1620×10^2	160	90	160	1900×10^2	3000	100	130
9	" " (静 岡)	730×10^2	2700	180	480	3500×10^2	2800	120	3100
10	" " (石 川)	13×10^2	370	30	270	130×10^2	1300	800	110
11	" " (長 崎)	7×10^2	80	30	150	26×10^2	1260	1000	50
12	" " (")	5×10^2	330	300	300	26×10^2	1600	1300	2900
13	" " (")	14×10^2	500	460	300	16×10^2	4300	460	300
14	(ビタミンB ₁ 含有) " " (香 川)	47×10^2	350	200	180	110×10^2	430	310	200
15	外 米 (ビルマ)	25×10^2	150	150	370	5×10^2	80	40	30
16	52年産白米 (栃 木)	2×10^2	100	30	50	7×10^2	40	40	40
17	53年産白米 (山 形)	190×10^2	110	10	1100	140×10^2	30	10	1400
18	" " (秋 田)	220×10^2	840	840	90	110×10^2	470	470	30
19	" " (福 島)	270×10^2	80	60	760	340×10^2	50	30	200
20	干 麺 (並 品)	180×10^2	800	80	7000	1500×10^2	3200	3000	8300
21	" " (")	760×10^2	450	50	850	2800×10^2	660	190	2200
22	" " (中等品)	170×10^2	580	460	350	750×10^2	1100	450	1300
23	" " (")	110×10^2	50	20	1200	89000×10^2	10000	9600	1400
24	" " (上等品)	710×10^2	100	100	1100	10900×10^2	1030	600	7400
25	" " (")	1100×10^2	200	200	620	16400×10^2	730	630	2000

註 ①は人造米の表面を生理食塩液で2回洗滌したときの洗滌液を、②は洗滌後の人造米の懸濁液を示す。以下の表もこれに準ず

第2表 人造米、白米及び干麺類の細菌試験成績

検体 番号	検 体	Ⓐ			Ⓑ		
		大腸菌群 (M.P.N)	ブドウ球菌	腸球菌群 (M.P.N)	大腸菌群 (M.P.N)	ブドウ球菌	腸球菌群 (M.P.N)
1	人 造 米 (長 野)	0	+	0	0	+	0
2	" " (広 島)	0	+	34×10^3	220	+	1600×10^3
3	" " (兵 庫)	0	+	0	0	+	0
4	" " (")	0	+	2×10^3	0	+	49×10^3
5	" " (神奈川)	0	+	11×10^3	18	+	22×10^3
6	" " (")	0	+	33×10^3	0	+	$>1800 \times 10^3$

検 体 番 号	検 体	④			⑤		
		大腸菌群 (M.P.N)	ブドウ球菌	腸球菌群 (M.P.N)	大腸菌群 (M.P.N)	ブドウ球菌	腸球菌群 (M.P.N)
7	" (京 都)	45	+	$>1800 \times 10^3$	20	+	$>1800 \times 10^3$
8	" (和歌山)	0	+	0	0	+	0
9	" (静 岡)	0	+	7×10^3	20	+	12×10^3
10	" (石 川)	0	+	1600×10^3	190	+	$>1800 \times 10^3$
11	" (長 崎)	10	+	0	0	+	0
12	" (")	0	+	0	0	+	0
13	" (")	0	+	0	0	+	0
14	(ビタミンB ₁ 含有) " (香 川)	0	+	0	0	+	0
15	外 米 (ビルマ)	78	+	0	0	+	0
16	52年産白米 (栃 木)	0	+	0	0	+	0
17	53年産白米 (山 形)	45	+	0	0	+	0
18	" (秋 田)	1600	+	0		+	0
19	" (福 島)	1600	+	0		+	0
20	干 麵 (並 品)	0	+	23×10^3	2200	+	49×10^3
21	" (")	170	+	140×10^3	400	+	350×10^3
22	" (中等品)	0	+	920×10^3	1700	+	1600×10^3
23	" (")	0	+	49×10^3	1700	+	170×10^3
24	" (上等品)	20	+	26×10^3	790	+	170×10^3
25	" (")	20	+	34×10^3	2200	+	1600×10^3

第3表 分離腸球菌の生物学的性状

検体 番号	検 体	形 態	グラム 染色	耐熱性 (60°30分)	アルカリ 性(pH 9.6) 抵抗性	食 塩 (6.5%) 抵抗性	0.1% M.B加 牛乳培 地	溶血性	亜硝酸	ゼラ チン	糖 分 解 能			
											グリセ ロール	マンニ ト	ソルビ ト	サッカ ローゼ
2	人造米(広 島)	双球菌	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
4	" (兵 庫)	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
5	" (神奈川)	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	±	+	+
6	" (")	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
7	" (京 都)	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
9	" (静 岡)	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
10	" (石 川)	" "	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
20	干 麵(並 品)	双球菌	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
21	" (")	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
22	" (中等品)	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
23	" (")	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	±	+	+
24	" (上等品)	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
25	" (")	" "	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+

註 M.BはMethylenblauの略。

終りに臨み本実験に当り御援助、御助言を賜った厚生省公衆衛生局食品衛生課の尾崎課長、同課浜田技官、佐竹技官の諸氏並に貴重な文献を御恵与下された食糧庁食糧研究所角田技官に感謝する。

文 献

- 1) 食品の新鮮保持に関する研究 (VI). 電気漂白及び薬品漂白小麦粉中の細菌数及びその消長について, 八田他5名: 衛生試験所報告, 71, 135 (昭28). 2) 食物中毒菌の検査法, 八田: 公衆衛生, 15, (2) 35 (昭29). 3) Recommended Procedure for Detecting the Presence of Enterococci. Wintes. C. E. & Sarcholzei L. A: Commercial fisheries. T.L-2 November (1946). 4) Zinsser's Text-book of Bacteriology. (1948). 5) 目黒米に関する研究予報 (1) 三宅, 角田: 病虫害雑誌, 28, (7) 10 (昭16). 6) 目黒米に関する研究予報 (2) 三宅, 角田: 病虫害雑誌, 28, (8) 1 (昭16). 7) 「エビ」米に関する研究, 病虫害雑誌, 25, (9. 10. 11) 1 (昭13). 8) 微生物による貯蔵穀類の被害に関する研究 (1) イスランディア黄変米に関する研究, 角田: 研究報告 (食糧研究所), 8, 41 (昭28). 9) 微生物による貯蔵穀類の被害に関する研究 (3) 泰国産黄変米に就いて, 角田: 研究報告 (食糧研究所), 8, 77 (昭28).

Summary

1) The degree of contamination of artificial rices by bacteria is different in investigated objects and cleaned rices are very less contaminated than dried mens, however the quantity per gram of the investigated objects was estimated to range gram 10^2 - 10^7 .

2) Only in case that *B. coli* group was separated from artificial rices and dried mens, *Enterococcus* group was detected in the same objects as well, The degree of contamination by the latter is far higher than by the former.

3) We tried to fix the type of the separated *Enterococcus* group in biological method, and it was found out that the bacteria were, for the most part, thought to belong *S. fecalis* and resembled to *S. liquefaciens*.

Received March 31, 1954

地下鉄駅構内空气中塵埃測定結果について

川 城 巖, 浦久保五郎, 佐々木陸江

Estimation of Air-borne Dusts at a Station of Tokyo-Subway

By Iwao KAWASIRO, Goro URAKUBO and Mutue SASAKI

まえがき 著者等は昭和28年3月地下鉄駅構内各所に於て空气中的塵埃を測定して若干の結果を得たので報告する。

駅としては比較的乗降客の多いものを1カ所えらび Fig.1 に示す如くプラットホームで2カ所 (D, E), 改札口2カ所 (A, C), 通路1カ所 (B) の床上約1mの高さで空气を採取した。

測定方法 労研式塵埃計 10時前後より1時間おきに1日3回採気した。鏡検には光源を斜横により倍率400倍を用いた。

インビンジャー塵埃計 10時前後より30e/m 1時間吸気し30分おきに3回行つた。インビンジャーは労研式のものを用い, KMnO_4 を加えて再度蒸溜し静置して塵埃を除いた蒸溜水75ccを用いた。

吸気後は薬学会協定衛生試験法の重量法により総塵埃, 無機性塵埃, 有機性塵埃の重量を求めた。

鉄含有量の測定 インビンジャーによる塵埃熱灼残査を20% HCl 小量に加熱してとかし水でうすめて検液とした。これを KMnO_4 液で酸化した後比色管にとり, 20% HCl 及び水を加えて30ccとし2% KCNS 5ccを加えて振盪し3分間放置後, 生成するロダン鉄にイソアミルアルコールとエーテルの等量混合物10ccを加えて振盪してとかし, 5分間放置後硫酸第一鉄アンモニウムを用いて作つた標準液を同様に操作したものと比色した。

電気集塵器による空气中鉄含量測定 セルロイドの同筒内に電圧1300ボルトで放電しこの中を通して20l/m 1時間吸気した。吸気後セルロイド同筒内側に附着せる塵埃を熱した5% HCl で流し出し蒸発乾涸し約2時間熱灼後20% HCl に加温してとかし, 以下はインビンジャーの場合と同様に操作した。

測定結果 労研式塵埃計による塵埃数測定 結果は Table 1 に示すように検査日より相当の差があり多い日で空気1cc中1590~700, 少ない日で690~360であつた。なお各場所による差違はほとんど見られなかつた。

インビンジャー塵埃計による塵埃及び鉄含有量の測定 結果は Table 2 に示すように塵埃は検査日及び場所によりわずかに差はあるが一般に少い。プラットホーム4.7~2.4 mg/m^3 , 改札口3.8~2.4 mg/m^3 , 通路3.8~2.7 mg/m^3 であり無機性塵埃と有機性塵埃の比にも格別の特徴は見られなかつた。

鉄の含量は場所により相当の差がありプラットホームで Fe_2O_3 として1.7~1.0 mg/m^3 , 改札口1.0~0.6 mg/m^3 , 通路0.3~0.1 mg/m^3 であつた。なお総塵埃量に対する含量比は高くプラットホームでは総塵埃重量の48.6~27.7%が Fe_2O_3 として認められた。

電気集塵器による鉄含量測定 結果は Table 3 のように大体インビンジャーの場合と同程度の数値が得られた。

考 察 本駅は比較的乗降客が多いが塵埃量は少く, この原因としては測定は行わなかつたが湿度が常に非常に高いことによると思われる。鉄の含量

Fig. 1

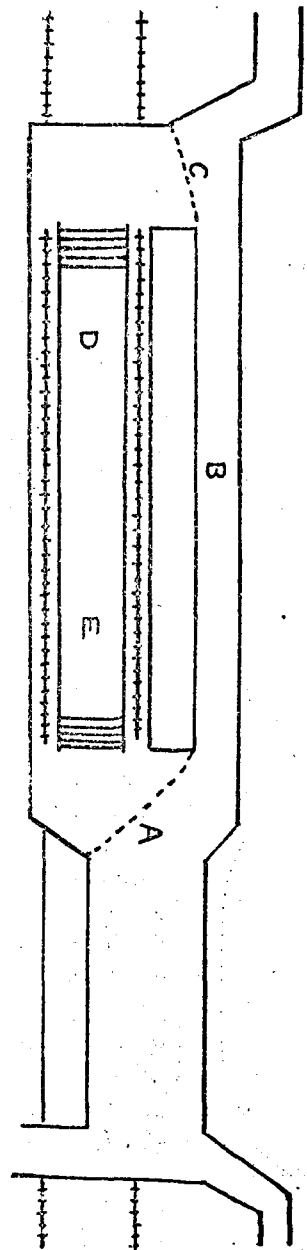


Table 1

場 所	検 査 日 天 候 時 刻	3月3日 (火)			3月7日 (土)			3月8日 (日)			3月13日 (金)		
		晴後く もり		前日く もり	晴		前日晴	くもり 後雨		前日晴 後雨	晴後雨		前日く もり
		9.45 ~	11.28 ~	12.59 ~	9.37 ~	11.17 ~	12.43 ~	9.35 ~	11.02 ~	12.28 ~	10.08 ~	11.03 ~	12.35 ~
A		1400	1250	700	980	1440	1470	510	400	390	510	540	490
B		1100	1590	920	990	1540	1490	640	360	370	460	550	440
C		1180	1330	1050	1110	1320	1370	480	380	350	450	640	470
D		1480	1380	790	1040	1430	1450	610	500	440	490	530	530
E		1560	1280	1050	1450	1370	1550	690	450	400	500	650	600

Table 2

場 所	検 査 日	総 塵 埃 mg/m ³	無 機 性 埃 "	有 機 性 " "	Fe "	as Fe ₂ O ₃ "	
A	3月2日	第 1 回	3.3	2.4	0.9	0.7	1.0
		第 2 回	3.4	2.1	1.3	0.7	1.0
		第 3 回	3.3	1.9	1.4	0.7	1.0
B	3月3日	1	2.2	1.4	0.8	0.1	0.1
		2	2.7	1.6	1.1	0.2	0.3
		3	2.8	1.3	1.5	0.2	0.3
C	3月4日	1	3.8	2.5	1.3	0.5	0.7
		2	2.7	1.6	1.1	0.4	0.6
		3	2.7	1.4	1.3	0.4	0.6
D	3月7日	1	3.6	2.7	0.9	1.0	1.4
		2	3.4	2.9	0.5	1.1	1.6
		3	3.0	2.4	0.6	1.0	1.4
E	3月8日	1	2.4	1.6	0.8	0.7	1.0
		2	2.4	1.4	1.0	0.7	1.0
		3	3.1	2.3	0.8	0.9	1.3
A	3月10日	1	2.5	1.7	0.8	0.6	0.9
		2	3.0	1.3	1.7	0.7	1.0
		3	2.4	1.4	1.0	0.7	1.0
D	3月12日	1	3.6	2.0	1.6	1.2	1.7
		2	3.5	2.5	1.0	1.2	1.7
		3	3.6	1.8	1.8	0.9	1.3
E	3月13日	1	4.7	3.3	1.4	0.9	1.3
		2	4.7	3.5	1.2	1.1	1.6
		3	4.7	2.8	1.9	1.0	1.4

Table 3

場 所	検 査 日	Fe mg/m ³	as Fe ₂ O ₃ //
E	3月8日	第1回	1.0
		第2回	1.3
		第3回	1.7
A	3月10日	1	0.5
		2	0.8
		3	0.8
D	3月12日	1	1.3
		2	1.7
		3	1.3

についても, Fe₂O₃ の総限量は 15mg/m³ と云われ, 30mg/m³の程度を含む空氣を長期吸入すると慢性氣管支炎の原因となるという記載¹⁾があるが, 測定の程度のものではさほどの危険も考えられない。地下鉄の空氣については塵埃以外に考える余地があるのではないかと思われる。

本調査にあたり御協力を賜った地下鉄当局に感謝する。

文 献

(1) M.B.Jacobs: The analytical chemistry of industrial poisons, hazards and solvents. 2nd ed. 1949. Interscience publishers Inc., New York.

Summary

We estimated the air-borne dusts at a station of Tokyo-Sub-way and reported here following results ; By dust-counting : 1590~360 in lcc of air. By impinging : 4.7~2.4mg/m³. Contents of iron oxide fume : 1.7~0.1mg/m³

Received April 14, 1954

腸線についての実験 (Ⅱ) Chromic 腸線の消化性について

八田 貞義, 功刀 博, 石関 忠一

Experimental Studies on the Catgut (Ⅱ) Digestability
of the Chromic Catgut.

By Sadayoshi HATTA, Hiroshi KUNUGI and Tiuiti ISHISEKI

まえがき 馬腸線の吸収性について試みた人工的消化実験及び病理学的所見^{1) 2)}はすでに述べてある。

このたび日本工業規格の改正により、腸線の種類(特に加工による種類)は、A、B、C及びD型の4種類、すなわち、無加工(特殊処理をしないもの)のA型は従来の Plain と同一のもの、B、C及びD型は加工(特殊処理)をされたもので、Chromic に一致する。つまり Chromic を加工の程度によりB、C及びD型の3種に区分された。特殊処理とは体内での吸収性をおくらせるためのもので、これはクロム酸³⁾で処理されている。たゞし各会社によりその処理方法は異にしているようで、その詳細は正確に知りえない。

この実験にはその対象として、B、C及びD型の吸収性の問題を取りあげたが、現在この区分になる市販腸線がないので、特に某2会社、(N及びS社とする)にA、B、C及びD型の各腸線を数本作製してもらい実験に供した。

実験の部

実験材料 Chromic B、C及びD型の3種類及び対照に Plain A及び Johnson & Johnson (Plain) を供試した。このうち Johnson & Johnson は羊腸線では馬腸線である。

実験方法 材料が少ないので人工的消化実験によつた。その方法は Kraissl⁴⁾、本間⁵⁾等がすでに実施したものとは類似している(第1報¹⁾参照)。

1) 2×15cm の試験管に2%パンクレアチン溶液(pH6.8及び8.0) 25cc 宛を入れ、これにアンブルから取出し2時間水洗後、無菌的に24時間乾燥(45°C)させ秤量した腸線を浸漬する。ついで上層にトルエンを加え37°、70時間保温作用させて試験品を取り出し、水洗24時間後前記のように乾燥して秤量し、始めの重量との差を見る。

2) 他は2%パレクレアチン溶液で消化後水洗し、24時間無水アルコールで脱水し、更にトルエン中に保存したものについて抗張力を試み、これと消化しない同じ番号の抗張力とを比較して抗張力減少の程度を観察する。たゞしパンクレアチン溶液中には防腐剤としてフラズキンが1.000倍濃度に加えてある。

実験成績 N及びS各社の腸線A、B、C及びD型の3本ずつについて行つた。パンクレアチン溶液による消化実験成績は第1及び第2表の通りである。又S社のみについて夫々の腸線の消化後の抗張力の減少程度を比較したのが第3表である。

第1表より、N社の Chromic は Plain よりもB、C、Dの順に消化性が減弱しているのがわかるが、Plain と Chromic の開きが僅少すぎる感がある。また第2表のS社の Chromic はB、C、Dの順に消化性は減弱せず、かつ Plain と各 Chromic との開きが大きすぎた。特に Chromic のC型はB及びD型より消化性が早い。次にS社の消化後の抗張力減少についてみると、Chromic は Plain より抗張力減少度が少ないが、第2表と同様にC型がB及びD型より抗張力が減少している。即ちS社のものは Chromic 中でC型が特に消化性が早く、抗張力も減少している。つまりC型は消化性も早く、しかも抗張力減少度も大である。

あとがき

Plain と Chromic では第1報に報告したように、Plain は両社とも Chromic よりもその消化性は早い。しかし Chromic のB、C及びD型はいずれもその消化性は不同で異つた数値が示された。これは未だクロム酸処理に不十分な点があると考えられる。又N及びS社のクロム酸処理方法にも多少異なるものがあると推察されたので、

一定様式によるクロム酸処理の実施が望まれる。

この実験に協力されたN社及びS社の御厚意に対し感謝する。

第1表 (N社)

Catgut 種類	No.	回数	初めの重量 (g)	後の重量 (g)	$\frac{\text{減少重量}}{\text{始めの重量}} \times 100$	3 回平均値
A Plain	000	1	0.061	0.048	21	21
	0	2	0.140	0.102	27	
	00	3	0.160	0.136	15	
B Chromic	000	1	0.173	0.142	17	20
	00	2	0.110	0.090	18	
	00	3	0.184	0.139	24	
C Chromic	00	1	0.139	0.104	25	17
	00	2	0.109	0.102	6	
	00	3	0.199	0.162	19	
D Chromic	00	1	0.145	0.130	10	14
	00	2	0.141	0.115	18	
	00	3	0.120	0.105	13	
J. & J. Plain	2	1	0.580	0.040	93	91
	2	2	0.535	0.064	88	
		3				

パンクレアチン溶液 pH $\begin{cases} 1 \dots \dots \text{pH} 8.0 \\ 2 \dots \dots " \quad 6.8 \\ 3 \dots \dots " \quad 6.8 \end{cases}$

第2表 (S社)

Catgut 種類	No.	回数	初めの重量 (g)	後の重量 (g)	$\frac{\text{減少重量}}{\text{始めの重量}} \times 100$	3 回平均値
A plain	1	1	0.317	0.227	28	26
	1	2	0.272	0.194	29	
	1	3	0.394	0.322	18	
B Chromic	1	1	0.444	0.435	2	3
	1	2	0.286	0.271	5	
	1	3	0.365	0.357	2	
C Chromic	1	1	0.410	0.390	5	8
	1	2	0.304	0.272	10	
	1	3	0.354	0.325	8	
D Chromic	1	1	0.318	0.305	4	3
	1	2	0.401	0.388	3	
	1	3	0.455	0.444	2	
A (N社) Plain	1	1				23
		2	0.212	0.162	23	
		3				

パンクレアチン溶液 pH $\begin{cases} 1 \dots \dots \text{pH} 6.8 \\ 2 \dots \dots " \quad 8.0 \\ 3 \dots \dots " \quad 6.8 \end{cases}$

第3表 S社の抗張力

Catgut (種類)	No	始めの抗張力 (kg)	後の抗張力 (kg)	$\frac{\text{減少抗張力}}{\text{始めの抗張力}} \times 100$
A (Plain)	1	4.100	2.700	34
B (Chromic)	1	4.400	3.950	10
C (Chromic)	1	4.300	3.450	20
D (Chromic)	1	4.125	3.950	4

数値 (kg) は4回の平均値

文 献

- 1) 八田, 功刀, 野口: 衛試, 70.95 (1952). 2) 八田, 功刀, 石関: 臨婦産, 8, 1 (1954). 3) Döderlein : Zentr. Gynäkol., 30, 534 (1890). 4) Kreissl : Surg. Gynecol. Obstet., 63, 561 (1936). 5) 本間: 婦人科, 36, 1090 (1941).

Summary

We tested the digestability of the samples of chromic catgut type B, C, and D, which are described in Japanese Industrial Standards, in vitro. The results show that their digestability are not always in the order of alphabet.

Received April 1, 1954

公定書収載砒素試験法に関する研究

喜谷市郎右衛門, 吉村 淳, 守田 実, 奥村 恭子

Studies on the Arsenic Test Described on Some Official Books

By Ichirōemon KIDANI, Kiyoshi YOSHIMURA,

Minoru MORITA and Kyōko OKUMURA

まえがき 日局(第六改正日本薬局方)の一般試験法中には砒素試験法として米局(第十四改正米国薬局方)とほとんど同様の, Gutzeit 法による非常に鋭敏な方法が採用されているが, これを実施するには無砒素の粗末(約 20 メッシュ)の亜鉛を使用することになっている。このものは著者等の知る範囲では, 現在国産品で見当たらない。これ等の点に関し, 英局法ならば国産品の棒状又はドロップ状(円盤状)の無砒素亜鉛を使用して充分満足な結果が得られることを知ったのでここに報告する。

本論 Gutzeit 法というのは, 砒素を砒化水素 AsH_3 として発生させ, それを 50%硝酸銀溶液でしめした濾紙にあてると黄変するので, それを比色する方法であるが, この着色は極めて不安定であるためその後昇汞溶液あるいは臭化第二水銀溶液でしめた方が感度は低下するが遙かに安定した着色の得られることが判り, 著者等が調べた方法もすべて此のどちらかを用いるものであった。

各公定書の方法をその着色させるための昇汞紙あるいは臭化第二水銀紙等の形状によつて区別するとリボン状試験紙を用いるものと円形試験紙を用いるものとに二大別され, 前者に属するものとしては日局, 米局, A. O. A. C 等で, 主として米国系統の試験法がこれに属するのに対し後者に属するものは英局及び国局(国際薬局方 I), JIS(日本工業標準規格)等である。どちらの試験紙を用いる方法も共に標準着色と比較するのであるが, 特にリボン状試験紙を用いる方法においては, それに用いる亜鉛の純度は勿論, その形状・サイズ・均一性等などの一つを欠いても着色状態に大きな影響を与える。本法を実施する際の注意事項は日局註解, A. O. A. C 等に記載されているが, 河内善一郎等¹⁾が詳しく報告している。

砒化水素と臭化第二水銀との反応過程は日局註解に記載されているが, 昇汞の場合もほぼ同様であると考えられる。その際の着色度と反応物質との関係については Partington²⁾によれば $AsH(HgCl)_2$ 黄色, $As(HgCl)_3$ 褐色, As_2Hg_3 黒色となっており, 砒化水素が多く作用する程, 色が濃くなるとともに色調も Lemon-Yellow→Cadmium-yellow→Cadmium orange と変化する。

著者等は英局法(国局法もほとんど同じ)に国産品の棒状亜鉛を 1.5cm 位に切断したものあるいはドロップ状亜鉛を適用して充分使用できること及び円形試験紙として昇汞紙の代りに臭化第二水銀紙を使用するならば感度を上げることが知った。

実験 本実験においては試験紙の着色が非常に退色し易いものであるからあらかじめ種々の色調及び濃淡の色を水彩絵具でケント紙に書いておき, それから砒素の一定含量による標準色を段階的に作成してそれと先の自家製の色調表とを比較して種々の標準色に該当するものを設定しておき, それを標準として使用する。

1) 標準色作成のための実験 亜鉛以外はすべて英局(1948)の規定にしたがつた。棒状亜鉛は約 1.5cm に切断したものであるが使用すると共に小さくなり, 同一重量をとると表面積が大きくなるので最初は約 20g, 個々の重量が約 1/3 となつたものは約 10g を使用した。

次に砒素含有の検体 3 種について試験した結果をあげると次のようになる。

現在では我々が入手できる種々の検体で本試験によつて検出する程度に砒素を含んでいるものは極めてまれで, 著者の一人吉村が昭和 26 年の 7 月以降調査した 200 以上の検体の中砒素を含んでいたものは僅かに第二表にあげた 3 検体のみであり, しかもそれ等の検体でも英局に規定された限度以下であつた。そこで砒素を含まないホウ酸及び安息香酸に砒素の標準液を $5\mu\text{g/g}$ の割合で混入し, デシケータで乾燥後本試験を実施したところ, $2\mu\text{g/g}$ の程度にしか着色しなかつた。

又本法に対する温度の影響を調べたが, 25° と 40° とでは何等差異が認められなかつた。

第 一 表 (実験 I)

	装 置	試 形 状 反 應 紙 物 質	As ₂ O ₃	Zn	温 度	時 間	着 色
1	B.P.	円 形 HgBr ₂	0.5γ	棒 状	25°C	40分	I Br
2	"	" "	1γ	"	"	"	I Br
3	"	" "	2γ	"	"	"	II Br
4	"	" "	3γ	"	"	"	IV Br
5	"	" "	4γ	"	"	"	V Br
6	"	" "	5γ	"	"	"	VI Br

第 二 表 (実験 I)

	装 置	試 形 状 反 應 紙 物 質	検 体	Zn	温 度	時 間	
1	B.P.	円 形 HgCl } HgBr ₂ }	硫酸亜鉛	棒 状	25°C	40分	呈色せず
2	"	" "	"	"	"	"	I Brの1/2以下
3	"	" HgCl } HgBr ₂ }	ホウ酸	"	"	"	呈色せず
4	"	" "	"	"	"	"	かすかに呈色
5	"	" HgCl } HgBr ₂ }	安息香酸	"	"	"	"
6	"	" "	"	"	"	"	I Br

総括及び考察 砒素試験法としては英局 (1948) 法により亜鉛は棒状又はドロップ状亜鉛を使用し、感度を上げる時は臭化第二水銀紙、そうでない時は昇汞紙を使用するようにすればよいと思う。本試験を実施するにあたっては検体の処理法の方が重要な問題であつて検体中の砒素は標準色作成のように理想的な条件で砒化水素が発生するものではないことを忘れてはならない。

砒素の微量定量法としては Gutzeit 法その他モリブデンブルーを生成させる方法があるが、Sandell の著書³⁾によれば、非常に微量の砒素 (恐らく 1μg/g 以下の場合を指すのであろう) を扱う場合はモリブデンブルーを比色する方法の方が操作も簡単で正確であるとしているし、大石等の報告⁴⁾でも分光光度計で比色しグラフ上に直線関係を得たとしている。然しあらゆる方面から考察する時、医薬品中の砒素の試験法としてどちらが良いかは、もつと広汎な実験データにまたなければ、急に断定できないと思う。

本研究は一部昭和27年度厚生科学研究費によつたこと及び武田薬工が無砒素の粗末亜鉛を分与され、又文献閲覧の便を与えられたことに關し、それぞれの当局者に深く感謝する。

文 献

- 1) 河内善一郎, 井上修, 森本万之丞; 厚生科学研究 (医薬品試験法の研究) 4, 133 (1954). 2) Partington: *General and Inorganic Chemistry*, McMillan, New York, 1952. 3) Sandell, E. B: *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, Interscience Publishers, New York, 1950. 4) 大石志名雄, 近藤安治, 清水勲彦: 広島県衛生研究所報, 2, 78 (1952).

Summary

We compared the J. P. VI method which uses the stripe shaped mercuric bromide paper with the B. P. method which uses the disk shaped mercuric chloride paper. We found that it was convenient to apply the disk shaped mercuric bromide paper and the rod shaped zink cut at 1.5cm length to the B. P. method, because the purest granular zink is not yet produced but the rod shaped one is produced in Japan.

Received April 1, 1954

銀錫アマルガム合金の硬化膨脹の測定装置について

藤井 正道, 堀部 隆, 龜田 務

The Apparatus of Measurement for Dimensional Change of
Dental Amalgam Alloys.

By Masamichi FUJII, Takashi HORIBE and Tsutomu KAMEDA

まえがき 銀錫アマルガム合金は歯用合金中歯牙の充填材料として, 重要な地位を占める。本合金の組成及物理的性質すなわち, 加圧変形, 破碎抗力, 硬化膨脹等は我国及び米国においてはそれぞれ, 日本歯科材料協会規格及び米国歯科医師会規格において規定されており, その大要は次表の通りである。

第 一 表

		日本歯科材料協会規格		米国歯科医師会規格	
組 成	銀	最低	65%	min	65%
	錫	最低	25%	min	25%
	銅	最高	6%	max	6%
	亜鉛	最高	2%	max	2%
		砒素及鉛を含有すべからず			
物理的性質	加圧変形	4%以下		max	4%
	破碎抗力	2500kg/cm ² 以上		—	
	硬化膨脹	1~13μ/cm		3~13μ/cm	

このうち, 硬化膨脹は特に重要視されている。それは, アマルガム充填が他の歯用合金類によるインレーに比較して, 窩洞に良く密接すると云う利点を有し, この性質はアマルガム合金の硬化膨脹によるからである。

1) 適当な組成の下に作製されたアマルガムは, 最初の 10~20 分間の間に 10mm 当り約 8μ 膨脹を行い, この膨脹によつて合金は歯牙の窩洞に間隙無く充填される。それで充填されたアマルガム合金と窩洞壁との間に間隙が無いから, その部に食物残渣または唾液等が浸入せず, 齲蝕の発生予防に大きな役割を演じている。もしアマルガムが硬化に際し収縮を起せば, 窩洞壁とアマルガム合金間に, 食物残渣または唾液等が浸入し, 第二次齲蝕を誘発し, また逆にアマルガム合金が過剰に膨脹すれば, 歯牙の破壊, 歯髄への圧迫による疼痛等の障害が生ずる。

硬化膨脹の測定には, 少くとも一定温 (37°C) において μ の単位を測定する必要がある。現在一定室温において, このような微小な長さの変化を測定し得る装置としては, 次の三種が考えられる。

- 1 干渉計 (Interferometer)
- 2 ミニメーター (Minimeter)
- 3 空気マイクロメーター (Air micrometer)

著者等はこれ等の測定装置の機構, 測定原理及び特長を述べ, (第1報) かつ著者等がこれ等の装置を用い, 市販製品及び試製した銀錫アマルガムの硬化膨脹その他の物理的性質を測定した結果 (第2報) を報告する。

測 定 装 置

1 干渉計 (Interferometer) 現今米国において使用されており, 我国においては昭和9年日本歯科材料協会が米国より購入し, 測定していたが今次戦災により焼失して以来, 現在我国には一台も無い。

その機構は Fig. 1, 2 に示すように, 練和した砲弾型の試験片 (X) を金属平板 B にセットし, Optical flat Glass (A) をのせ, 支点 SS の高さをねじで調整し, A に垂直に第二図の如く, ヘリウム光線を投射すれば, 反射光は A, D 間の空隙の僅かな傾斜によつて, 干渉を生じ, その干渉縞の数 (N本) の変化から試験片 X の膨脹収縮を次式によつて算出する。

金属平板(B)と Optical flat glass(A)の間隔(μ) $= \frac{\lambda}{2} \cdot \frac{D}{d} \cdot N$(1)

但し λ : Helium の波長; D : 支点 SS と試験片との距離; d : 干渉縞の出る部分の直径; N : 干渉縞の数

又(1)式により求め得た間隔(μ)は次式により温度補正をなし試験片の真の長さを得る.

$$C_x = \frac{\Delta L_x}{L_x \Delta T} = \frac{\Delta L_s}{L_s \Delta T} + \frac{\lambda d (N_2 - N_1)}{2d L_x \Delta T} \dots\dots\dots(2)$$

$$C_x = C_s + \frac{\lambda d (N_2 - N_1)}{2d L_x \Delta T} \dots\dots\dots(3)$$

但し C_x : 試験片の膨脹係数; C_s : 台の膨脹係数; L_x : 試験片の長さ; L_s : 支点 SS と M の間の標準物の長さ; ΔT : 温度の上昇; ΔL_x 及 ΔL_s : L_x 及 L_s の ΔT 度上昇による伸び; λ : 波長 (He)

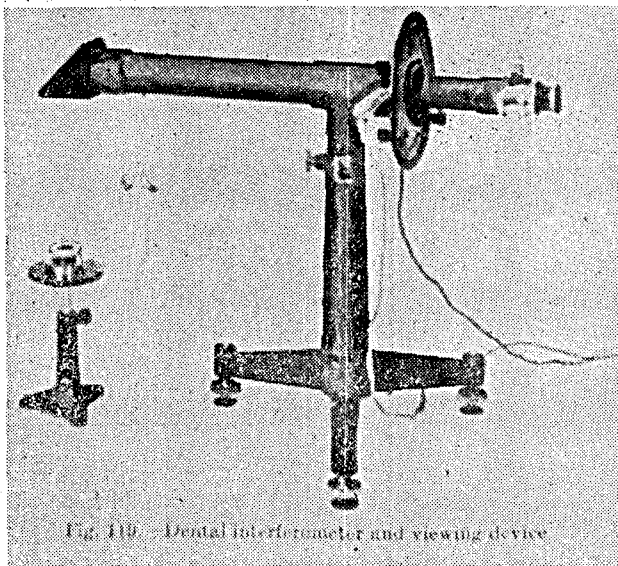


写真 1. Dental Interferometer

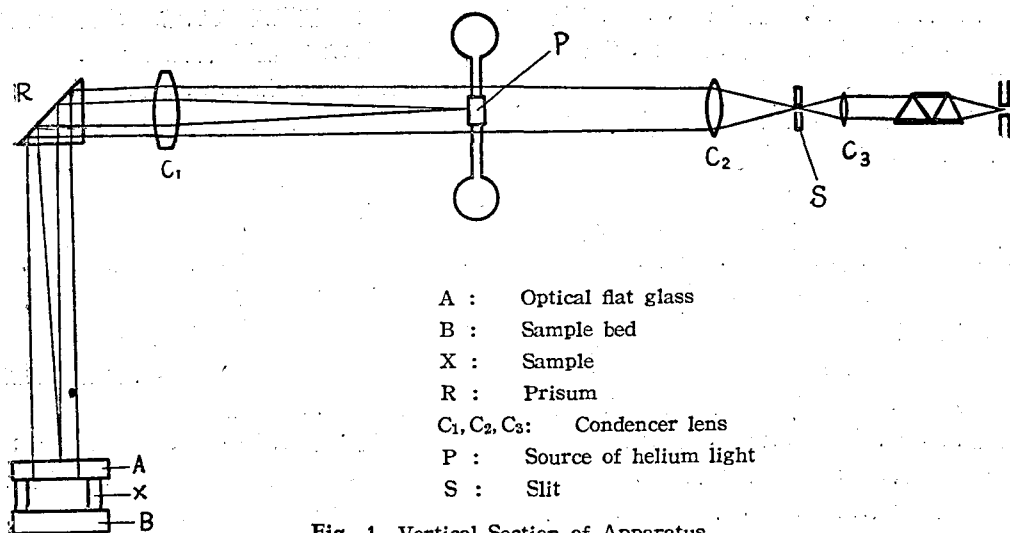


Fig. 1 Vertical Section of Apparatus.

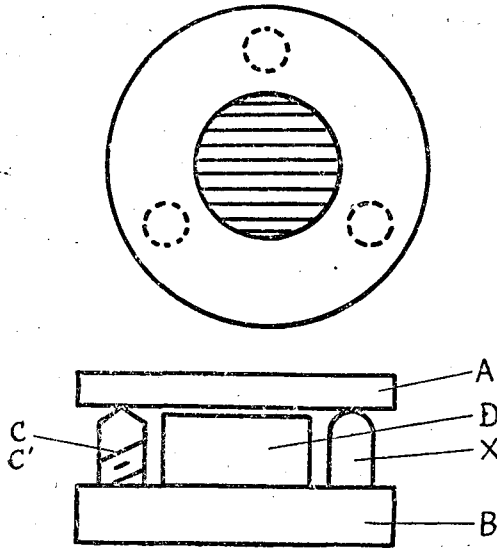


Fig. 2 Interferometer

- A : Optical flat glass
 B : Bed
 C : Knife edge (Support)
 D : Black flat glass

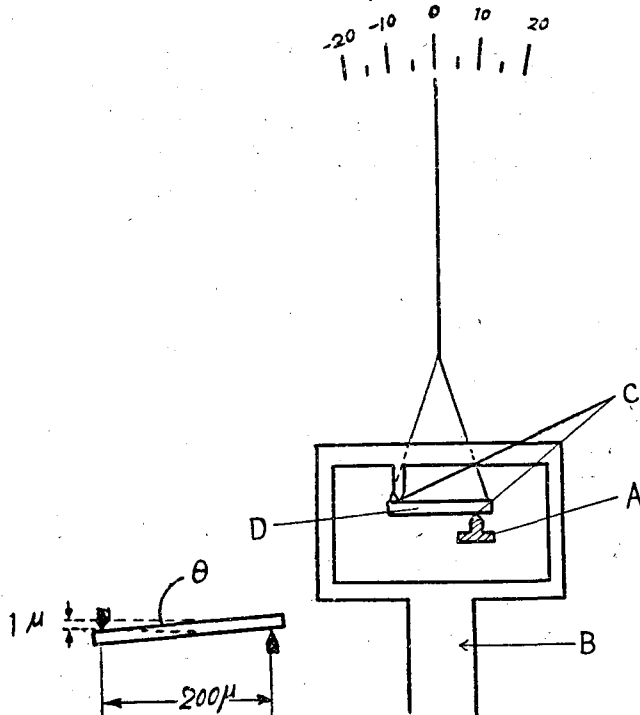


Fig. 3 Principal of Minimenter

- A : Fixed fulcrum
 B : Free fulcrum
 C : Knife edge
 D : Arm

II ミニメーター 本測定器機は、固定子A、測定子B、ナイフエッジC、及びそれに支えられた槓桿Dより成っている。先ず測定子の下部に試験片を密接させると、試験片の膨脹収縮により測定子は自由に動き得るようになっている。この測定子の移動はナイフエッジにより槓桿に伝えられ、槓桿作用により槓桿の傾きが拡大されて指針の振れとなつて読みとられる。

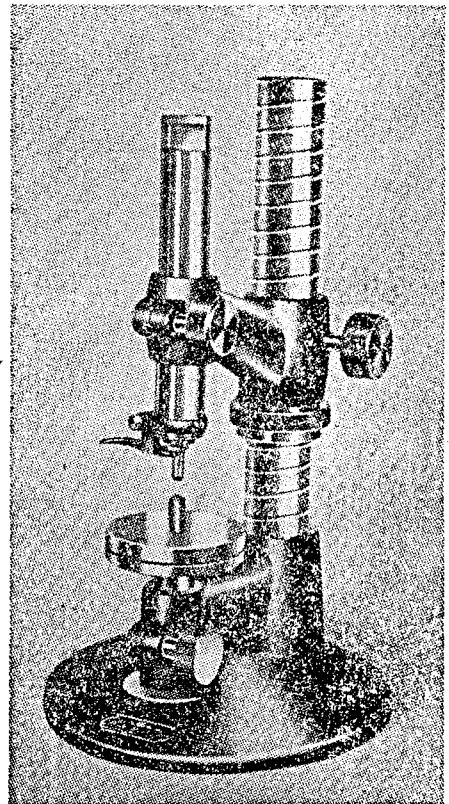


写真 2. Minimenter

測定子が 1μ 移動するとナイフエッジの間隔は 200μ であるから、針の振れの回転角 θ は次の式で求められる。

$$\tan \theta = \frac{1}{200} = 0.005$$

$$\theta = 18'$$

測定子の 1μ の移動に対し指針の振れの角は $18'$ であるから、それを 1μ として目盛つたものである。本測定装置の測定範囲は $\pm 20\mu$ である。

III 空気マイクロメーター 本測定器機は Fig. 4 に示すような構造のものである。

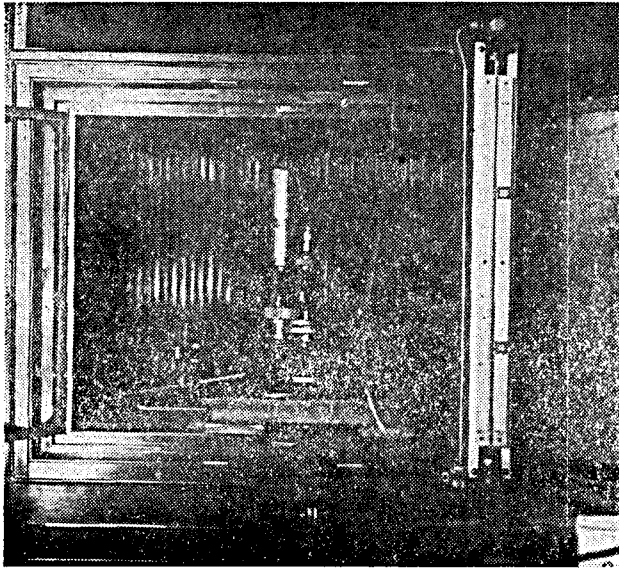
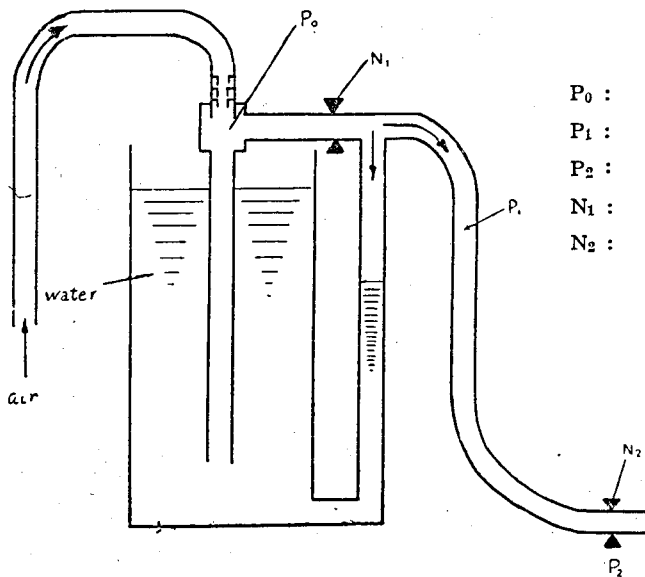


写真 3. Air Micrometer

定圧制御装置、指示装置、空気流出部 (測定部)より成り、絶えず供給される空気は水柱による定圧制御装置により一定圧 P_0 に保たれ、流入ノズル A_1 を通つて指示室に流入し、指示室につながる流出ノズル A_2 より更に大気圧 P_2 の中に流出し、平衡状態において P_1 なる指示室圧力を保つ、流入ノズル A_1 の流量と流出ノズル A_2 の量を相等しとおくことにより制御定圧 P_0 を見出すことができる。 c_1 c_2 をそれぞれ A_1 A_2 の流量係数、 a_1 a_2 をそれぞれ A_1 A_2 の断面積、 v_1 v_2 をそれぞれ A_1 A_2 部の流速とすると、空気圧は低圧(水柱500mm)であるから非圧縮性流体と見做すと、Bernoulliの式により

$$\frac{P}{\gamma} + \frac{1}{2g} V^2 = \text{Const より}$$



- P_0 : Constant pressure
- P_1 : Index pressure
- P_2 : Atmosphere pressure
- N_1 : Inflex nozzle
- N_2 : Efflex nozzle

Fig. 4 Vertical Section of Air Micrometer

$$v_1 = \sqrt{\frac{2g}{\gamma} (P_0 - P_1)}$$

$$v_2 = \sqrt{\frac{2g}{\gamma} (P_1 - P_2)}$$

流量を等しいと置き

$$c_1 a_1 \sqrt{\frac{2g}{\gamma} (P_0 - P_1)} = c_2 a_2 \sqrt{\frac{2g}{\gamma} (P_1 - P_2)}$$

これより

$$c_1 a_1 \sqrt{P_0 - P_1} = c_2 a_2 \sqrt{P_1 - P_2}$$

$c_1 = c_2$ 故に $a_2/a_1 \equiv a$ と置き

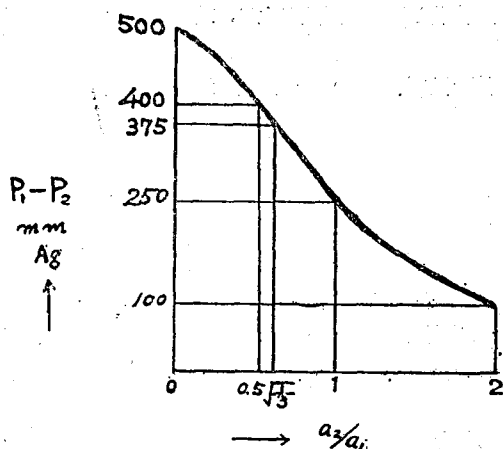


Fig. 5. Characteristic Curve of Low Pressure Type's Air micrometer.

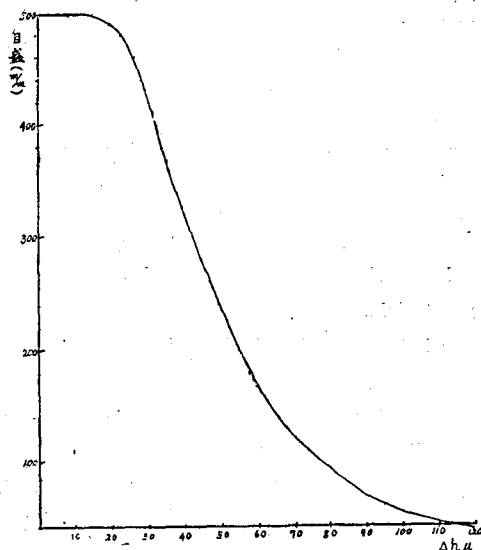


Fig. 6 P-H Curve (Pressure-Distance Curve) of Air Micrometer.

干渉計

長所 (1) ヘリウムの干渉縞を利用し光学的に測定するから、理論的には精密な ($1/100\mu$ 程度) 測定が可能である。

(2) 干渉装置を数個使用することによつて観測装置を水平回転させ数個の試験片の硬化膨脹が同時に測定できる。

短所 (1) 試験片を砲弾型として、その上に Optical flat glass を置くから、その重量のために試験片の先端がつぶれる。すなわち flow を起し、これを第一次収縮と見誤る。すなわち Optical flat glass の重量は約 50 g であり試験片の先端部の表面積は $1\sim 0.5\text{mm}^2$ であるとする、 $50\sim 100\text{g/mm}^2$ の圧が加わり試験片は硬化初期なるために flow を生ずる。

(2) 測定の際装置の固定ナイフエッジ CC' の高さの調整に時間を要し、練和開始後 15 分間中に測定を開始することが困難である。

$$\sqrt{P_0 - P_1} = a \sqrt{P_1 - P_2}$$

これにより a_2/a_1 及び $P_1 - P_2$ mm 水柱のグラフをかくと Fig. 5 を得る。

a の代りにノズルと試験片の間隙 h を置き換えると第 6 図のようになる。

測定台上にのせた試験片 (直径約 6 mm, 高さ 10 mm) 上に Cover glass を置き、その上に第二ノズルを垂直にセットし、間隙を適当に保ち水柱の高さ (P_1 の圧力) の時間と共に変化する変化量を読み、Fig. 6 のグラフにより試験片の硬化膨脹を測定する。

各種測定装置使用上の考察

以上の干渉計、ミニメーター、空気マイクロメーターには各々特長及び欠点があるが、それを述べれば次の通りである。

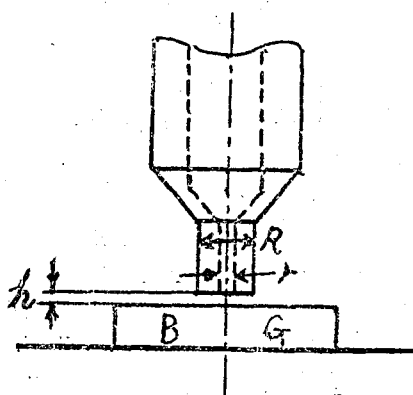


Fig. 7 使用ノズル
 $r = 1.0 \text{ m/m}$
 $R = 4.0 \text{ m/m}$

- (3) 僅かな振動により干渉装置に変動を来し、干渉縞が変化し測定に誤差を生じ、或は測定不能に陥り易い。
- (4) 干渉縞の数が多数になると本数が数えにくい。
- (5) 初期のセットの調整を上手にやらぬと、試験片の膨脹及び収縮何れも干渉縞の増加となり測定を誤る。
- (6) 輸入品故入手困難

ミニメーター

- 長所 (1) 機構が簡単でかつ小型で測定が容易である。
(2) 国産品であり、比較的廉価である。
(3) 可成の振動に耐える。

短所 (1) 精度は三器の中一番悪い ($1/5\mu$ 程度)

- (2) 試験片にかかる荷重が大で ($350\text{g}/\text{mm}^2$ 見当) 其為に硬化初期において flow を起す事及第一次収縮と見誤り易い事は干渉計と殆んど同程度である。

空気マイクロメーター

長所 (1) 容易に正確なる測定値が得られる。 ($1/10\mu$ 程度)

- (2) 試験片にかかる荷重が三器中最も少く (10g) 且一定であるために、flow を起さず、第一次収縮が正確に測定できる。

短所 (1) 比較測長器であるから、ブロックゲージあるいは基準ゲージを用いねばならない。

- (2) 試験片の面は平滑でかつノズル面に垂直でなければ誤差を生ずる。

文 献

- 1) C. Schonover W. Souder J. Beall; J, A, D, A. (Oct.), 1942. 2) 石原 ; 日本機械学会誌(1946), 110

Summary

We have studied on dimentional change of dental amalgam alloys. The dimentional change of this alloy is one of the important properties of dental filling materials.

We have measured the dimentional change of many market and trial-made amalgam alloys.

For this purpose, Now there are following three types of apparatus.

- (1) Interferometer (2) Minimeter (3) Air micrometer

In this report, we have discussed the merits and demerits of these appsratus.

Received April 21, 1954,

有 用 植 物 目 録

川 谷 豊 彦, 石 原 活 磨, 逸 見 誠 三 郎

List of Useful Plants

Experimental Farm for the Cultivation of Medicinal Plants

(attached to the National Hygienic Laboratory)

30, Kasukabe, Saitama-Ken, Japan

By Toyohiko KAWATANI, Katsuma ISHIHARA and Seizaburo HEMMI

This list contains plants which are growing in the Experimental Farm, as of Jan. 1, 1954. The scientific names of domestic plants adopted in this list conform to "Nomina Plantarum Japonicarum (1939)" by Prof. M. Honda.

GYMNOSPERMAE 裸子植物亜門

Ginkgoaceae イチョウ科

Abietaceae モミ科

Ginkgo biloba L. イチョウ

Cedrus Libani Bar.

Gnetaceae マオウ科

Cephalotaxaceae イヌガヤ科

Ephedra distachya L.

Cephalotaxus Fortunei Hk.

- equisetina Bunge

- Gerardiana Wall.

- intermedia S. et M.

Cryptomeriaceae スギ科

Juniperaceae イブキ科

Cryptomeria japonica D. Don スギ

Juniperus chinensis L. イブキ

Cunninghamiaceae コウヨウザン科

- communis L. トショウ

Cunninghamia lanceolata Hook. コウヨウザン

- rigida Sieb. et Zucc. ネズ

- virginiana L. エンビツノキ

Cupressaceae ヒノキ科

Pinaceae マツ科

Chamaecyparis obtusa Endl. ヒノキ

Pinus densiflora Sieb. et Zucc. アカマツ

- pisifera Endl. サマツ

- koraiensis Sieb. et Zucc. チョウセンマツ

Cupressus torulosa D. Don

- Thunbergii Parl. クロマツ

var. Corneyana Mast.

Thuja occidentalis L. ニオイヒバ

Taxaceae イチイ科

- orientalis L. コノテガシラ

Thujopsis dolabrata Sieb. et Zucc. アスナロ

Taxus cuspidata Sieb. et Zucc. イチイ

— *nucifera* Sieb. et Zucc. カヤ

ANGIOSPERMAE 被子植物亜門

DICOTYLEDONEAE 双子葉植物綱

Acanthaceae キツネノマゴ科

Acanthus longifolius Host

— *mollis* L.

— *spinosus* L.

Justicia procumbens L. キツネノマゴ

Aceraceae カエデ科

Acer nikoense Maxim. メグスリノキ

— *saccharinum* Wangh. サトウカエデ

Actinidiaceae サルナシ科

Actinidia arguta Planch. サルナシ

— *repanda* Honda マクダビ

Alangiaceae ウリノキ科

Marlea macrophylla Sieb. et Zucc.

var. *trilobata* Nakai ウリノキ

Amarantaceae ヒユ科

Achyranthes japonica Nakai イノコズチ

Celosia argentea L. ノゲイトウ

— *cristata* L. ケイトウ

Euxolus ascendens Hara イヌビユ

Amygdalaceae サクラ科

Prunus Ansu Komar. アンズ

— *tomentosa* Thunb. ヌスラウメ

— *yedoensis* Matsum. ソメイヨシノ

Anacardiaceae ウルシ科

Rhus javanica L. フシノキ

— *succedanea* L. ヘゼノキ

— *sylvestris* Sieb. et Zucc. ヤマヘゼ

— *verniciflua* Stokes ウルシ

Anonaceae パンレイシ科

Asimina triloba Dun.

Apiaceae セリ科

Aethusa Cynapium L.

Ammi majus L.

— *visnaga* Lam.

Anethum graveolens L. イノンド

Angelica acutiloba Kitagawa トウキ

— *dahurica* Benth et Hook. ヨロイグサ

Apium graveolens L. オランダミツバ

Bunium Bulbocastanum L.

Bupleurum scorzoneraefolium Willd.

var. *stenophyllum* Nakai ミシマサイロ

Carum Carvi L. ヒメウイキョウ

Cicuta virosa L. ドクゼリ

Cnidium officinale Makino. センキユウ

Conium maculatum L.

Coriandrum sativum L. コエンドロ

Cryptotaenia japonica Hassk. ミツバ

— *japonica* Hassk.

var. *atropurpurea* Makino ムラサキミツバ

Ferula Assa foetida L.

— *galbaniflua* Boiss. et Buhse

Foeniculum capillaceum Gilib.

— *dulce* DC.

— *vulgare* Gaertn. ウイキョウ

Glehnia littoralis Fr. Schm. ヘマボウフウ

Levisticum officinale Koch

Oenanthe javanica DC. セリ

Petroselinum sativum Hfm. オランダゼリ

Pimpinella major Huds.

Torilis japonica DC. ヤブジラミ

— *scabra* DC. オヤブジラミ

Apocynaceae キョウチクトウ科

Amsonia elliptica Roem. et Schult. チョウジソウ

Aquifoliaceae モチノキ科

Ilex crenata Thunb. イヌツゲ

— *integra* Thunb. モチノキ

Araliaceae ウコギ科

Acanthopanax spinosum Miq. ウコギ

Aralia cordata Thunb. ウド

— *elata* Seem. クラノキ

Fatsia japonica Dene. et Planch. ヤツデ

Hedera Tobleri Nakai キズタ

Kalopanax pictum Nakai ヘリギリ

Panax Ginseng C. A. Mey. オタネニンジン

— *japonicum* C. A. Mey. トチバニンジン

Tetrapanax papyriferum K. Koch ツウダツボク

Aristolochiaceae ウマノスズクサ科

Aristolochia debilis Sieb. et Zucc. ウマノスズクサ

— *mollissima* Hance

Asteraceae キク科

Achillea Herba-rotta All.

— *Millefolium* L.

— *moschata* Jacq.

— *ptarmica* L.

— *sibirica* Ledeb. ノコギリソウ

— *tanacetifolia* All.

Ambrosia artemisiaefolia L. ブタクサ

Ammobium alatum R. Br. カイザイト

Anacyclus officinarum Hayne

Anthemis Cotula L.

— *nobilis* L. ロウマカミツレ

— *tinctoria* L.

Arctium Lappa L. コボウ

Artemisia Abrotanum L.

— *Absinthium* L. ニガヨモギ

— *annua* L. クソニンジン

— *argentea* Herit.

— *borealis* Willd.

— *campestris* L.

— *camphorata* Vill.

— *capillaris* Thunb. カワラヨモギ

— *Dracunculus* L.

— *laciniata* Willd.

— *lavandulaefolia* DC.

— *maritima* L. (s. str.) ミブヨモギ

— *monogyna* Waldst. et Kit.

— *nana* Gaud.

— *nitida* Bert.

— *pontica* L.

— *Stelleriana* Bess. シロヨモギ

— *vulgaris* L.

Aster tataricus L. fil. シオン

Atractylis lancea Thunb. ホソバノオケラ

Atractylodes japonica Koidz. オケラ

Calendula officinalis L.

Carduus Gayanus Dur.

— *defloratus* L.

— *Kernerii* Simk.

— *nutans* L.

Carlina acaulis L.

form. *caulescens* Lam.

Carpesium abrotanoides L. ヤブタバコ

Carthamus lanatus L.

— *tinctorius* L. ベニバナ

Centaurea macrophylon Borb.

Chrysanthemum cinerariaefolium Vis.

ジロバナムシヨケギク

— *coccineum* Willd.

アカバナムシヨケギク

— *indicum* L. アブラギク

— *lavandulaefolium* Makino

var. *hortense* Makino アブラカンギク

— *vulgare* Bernh.

Cichorium Intybus L. キクニガナ

Cirsium spicatum Matsum. ヤマアザミ

Cosmos bipinnatus Cav. コスモス

Dahlia variabilis Desf. テンジクボタン

Eupatorium aromaticum L.

— *stoeadosumum* Hance フジバカマ

Gnaphalium multiceps Wall. ヘヘコグサ

Gynura japonica Makino サンシチソウ

— *bicolor* DC. スイゼンシナ

Helianthus annuus L. ヒマワリ

Heliopsis helianthoides Sweet

- *laevis* Pers.
- *scabra* Dun.

Inula ensifolia L.

- *britannica* L.
- *Helenium* L. オオグルマ
- *Royleana* DC.

Ixeris dentata Nakai ニガナ

Kalimeris incisa DC.

var. *yomena* Kitamura ヨメナ

Lactuca dracoglossa Makino リュウゼツサイ

- *Scariola* L. チシャ
- *squarrosa* Miq. アキノノゲシ
- *virosa* L.

Lappa tomentosa Lam.

Ligularia tussilaginea Makino ツツブキ

Matricaria Chamomilla L. カミツレ

- *inodora* L. イヌカミツレ

Onopordon Acanthium L. オオヒレアザミ

- *bracteatum* Boiss. et Heldr.
- *illyricum* L.

Petasites japonicus Miq. フキ

Rudbeckia laciniata L. オオヘンゴンソウ

Sanvitalia procumbens Lam. ジャノメギク

Scorzonera hispanica L.

- *laciniata* L.

Senecio jacobaea L.

- *vulgaris* L. ノボロギク

Serratula atriplicifolia Benth. et Hook.

- *coronata* L.
- *tinctoria* L.

Siegesbeckia pubescens Makino メナモミ

Silybum Marianum Gaertn.

Sonchus oleraceus L. ノゲシ

Tagetes erecta L. センジュギク

- *patula* L. コウオウソウ

Tanacetum vulgare L. ヨモギギク

Taraxacum albidum Dahlst. シロバナタンポポ

- *hondoense* Nakai タンポポ
- *kok-saghyz* Rodin
- *officinale* Weber

Tragopogon porrifolius L.

- *pratensis* L.

Tussilago Farfara L.

Vernonia anthelmintica Willd.

Xanthium canadense Mill. オオオナモミ

- *japonicum* Widder オナモミ
- *spinosum* L. トゲオナモミ

Zinnia elegans L. ヒヤクニチソウ

Balsaminaceae ホウセンカ科

Impatiens Balsamina L. ホウセンカ

Basellaceae ツルムラサキ科

Basella rubra L. ツルムラサキ

Begoniaceae シュウカイドウ科

Begonia semperflorens Link et Otto シュウカイドウ

Berberidaceae メギ科

Berberis brachypoda Maxim.

- *heteropoda* Schrank
- *Thalictum* Schn.
- *Thunbergii* DC.

var. *Maximowiczii* Franch. et Sav. メギ

- *vernae* C. K. Schn.

Epimedium diphyllum Lodd. バイカイカリソウ

- *macranthum* Morr. et Dcne.

var. *violaceum* Franch. イカリソウ

- *sagittatum* Baker おギキノイカリソウ

Podophyllum peltatum L.

Betulaceae シラカンバ科

Alnus japonica Steud. ヘンノキ

Bignoniaceae ノウゼンカズラ科

Catalpa bignonioides Walter アメリカキササゲ

- *ovata* G. Don キササゲ
- *speciosa* Warder ハナキササゲ

Brassicaceae アブラナ科

Alyssum argenteum Boiss.

- *saxatile* L.

Brassica campestris L.subsp. *Napus* Hook. f. et Anders.

セイヨウナタネ

- *nigra* Koch*Capsella Bursa-pastoris* Med.*Cochlearia Armoracia* L. フサビダイコン*Eruca sativa* Mill.*Isatis Boissieriana* Rechb.- *glauca* Auch.- *tinctoria* L. ホソバタイセイ- *tinctoria* L.var. *praecox* Kit.*Isatis tinctoria* L.var. *vulgaris* Koch.*Lepidium incisum* Roth- *sativum* L. コシヨウソウ*Raphanus acanthiformis* M. Morel ダイコン*Sinapis alba* L. シロガラシ**Buxaceae ツゲ科***Buxus japonica* Muell. Arg. ツゲ*Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc. フツキノウ**Calycanthaceae ロウバイ科***Calycanthus fertilis* Walt.var. *laevigatus* Bean**Campanulaceae キキョウ科***Adenophora Thunbergiana* Kudoform. *totoki* Hiyama ツリガネニンジン*Campanula Rapunculus* L.*Lobelia cardinalis* L.- *inflata* L. ロベリアソウ- *syphilitica* L.*Platycodon glaucum* Nakai キキョウ*Symphyandra Hofmannii* Pantoc.**Cannabinaceae アサ科***Cannabis sativa* L. アサ- *indica* Lam. インドアサ*Humulus Lupulus* L. ホップ**Capparidaceae フウチヨウソウ科***Capparis spinosa* L.*Cleome spinosa* Jacq. セイヨウフウチヨウソウ**Caprifoliaceae スイカズラ科***Ebulus chinensis* Nakai ソクズ*Lonicera japonica* Thunb. スイカズラ- *Morrowii* A. Gray キンギンボク*Sambucus nigra* L.- *Sieboldiana* Blume ニワトコ*Weigela grandiflora* Fort. ヘコネウツギ**Caryophyllaceae ナデシコ科***Dianthus Armeria* L.- *barbatus* L. アメリカナデシコ- *Carthusianorum* L.- *compectus* Kit.- *grationopolitanus* Vill.- *liburnicus* Bartl. et Wendl.- *pyrenaicus* Pourr.- *spiculifolius* Schur- *Sternbergii* Sibth.- *superbus* L.*Gypsophila actifolia* Fisch.- *Oldhamiana* Miq.*Sagina japonica* Ohwi ツメクサ*Saponaria officinalis* L. サボンソウ- *Vaccaria* L.*Silene Armeria* L. ムシトリナデシコ*Stellaria media* Cyr. ヘコベ*Telephium Imperatii* L.*Viscaria viscosa* Asch.**Celastraceae ニシキギ科***Celastrus orbiculatus* Thunb. ツルウメモドキ*Euonymus alatus* Sieb. ニシキギ- *Fortunei* H. Mazz.var. *radicans* Rehd. ツルマサキ- *japonicus* Thunb. マサキ- *Sieboldianus* Blume マユミ

Cercidiphyllaceae カツラ科*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc. カツラ**Chenopodiaceae** アカザ科*Atriplex hortensis* L.*Beta vulgaris* L.var. *Rapacea* C. Koch サトウダイコン*Chenopodium acuminatum* Willd.var. *japonicum* Franch. et Sav. マルバアカザ- *acuminatum* Willd.var. *ovatum* Fenzl ヒメアカザ- *acuminatum* Willd.var. *virgatum* Moquin カワラアカザ- *album* L. シロザ- *ambrosioides* L. アリタソウ*Chenopodium ambrosioides* L.var. *anthelminticum* A. Gray

アメリカアリタソウ

- *ambrosioides* L.var. *pubescens* Makino ケアリタソウ- *Bonus-Henricus* L.- *botrys* L.- *capitatum* Asch.- *centrorubrum* Nakai アカザ- *ficifolium* Sm. コアカザ- *foliosum* Archrs- *glaucum* L. ウラジロアカザ- *giganteum* D. Don- *hybridum* L.var. *gigantospermum* Rouleau- *intermedium* Mert. et Koch- *latifolium* Pall.- *murale* L.- *opulifolium* Schrad.- *polyospermum* L.- *purpurascens* Jacq.- *Quinoa* Willd.- *rubrum* L.- *Schraderianum* R. et. S.- *strictum* Roth- *urbicum* L.- *virgatum* Thunb. オオマルバアカザ**Vulvaria** L.*Kochia littorea* Makino イソホウキギ**Cistaceae** ハンニチバナ科*Cistus clusii* Dun.- *creticus* L.- *villosus* L.*Helianthemum Chamaecistus* Mill.**Clethraceae** リョウブ科*Clethra barbinervis* Sieb. et Zucc. リョウブ**Combretaceae** シクンシン科*Quisqualis indica* L. インドシクンシン- *indica* L.var. *villosa* Clarke**Convolvulaceae** ヒルガオ科*Calystegia japonica* Choisy. ヒルガオ*Convolvulus Scammonia* L.- *tricolor* L.*Ipomaea hederifolia* L.- *purpurea* Roth*Pharbitis Nil* Choisy. アサガオ**Coriariaceae** ドクウツギ科*Coriaria japonica* A. Gray ドクウツギ**Cornaceae** ミズキ科*Aucuba japonica* Thunb. アサキ*Cornus alba* L.- *contróversa* Hemsley ミズキ*Davidia involucrata* Baill.*Macrocarpium officinale* Nakai サンシュユ**Crassulaceae** ベンケイソウ科*Sedum alboroseum* Baker ベンケイソウ- *Sieboldi* Sweet ミセバヤ

Cucurbitaceae ウリ科

- Bryonia alba* L.
 - *dioica* L.
Ecballium elaterium Rich. テツボウウリ
Luffa cylindrica Roem. ヘチマ
Trichosanthes cucumeroides Maxim. カラスウリ
 - *quadricirrha* Miq. キカラスウリ

Dipsacaceae マツムシソウ科

- Dipsacus ferox* Loisl.
 - *Fullonum* L.
 - *pilosus* L.
 - *sylvestris* Mill.
Scabiosa arvensis L.
 - *columaria* L.
 - *maritima* L.
 - *rotata* Bieb.

Ebenaceae カキ科

- Diospyros Kaki* Thunb. カキ

Ehretiaceae ムラサキ科

- Anchusa azurea* Mill.
 - *Barrelieri* Vitm.
 - *italica* Retz.
 - *capensis* Thunb.
 - *officinalis* L.
 - *tinctoria* L.
 - *undulata* L.
Asperugo procumbens L.
Borrago officinalis L.
 - *laxiflora* DC.
Caccinia crassifolia Vent.
Cerinth major L.
Cynoglossum nervosum Benth.
 - *officinale* L.
 - *pictum* Ait.
Echinospermum Lappula Lehm.
Echium vulgare L.
Eritrichium strictum Decne

Lithospermum arvense L.

- *officinale* L.
 - *officinale* L.
 var. *murasaki* Honda ムラサキ

- Lappula deflexa* Garcke
Mertensia sibirica G. Don
Omphalodes linifolia Moench
Onosma viride Lam.
Paracaryum coelestinum Hook. f.
Pulmonaria montana Lej.
Symphytum asperrimum Donn.
 - *officinale* L. ヒレハリソウ
 - *peregrinum* Ledeb.

Euphorbiaceae タカトウダイ科

- Acalypha australis* L. エノキグサ
Aleurites cordata Steud. アブラギリ
 - *Fordii* Hemsley シナアブラギリ
Chamaesyce humifusa Prokhanov
 var. *pilosa* Hara ニシキソウ
Excoecaria Agallocha L. シマシラキ
Galarhoeus adeno-chlorus Hara ノウルシ
 - *ebracteolatus* Hara ベニダイゲキ
 - *helioscopius* Haworth トウダイグサ
 - *Lathyris* Haworth ホルトソウ
 - *pekinensis* Hara タカトウダイ
 - *Sieboldianus* Hara ナツトウダイ
Mallotus japonicus Muell. Arg. アカメガシワ
Mercurialis leiocarpa Sieb. et Zucc. ヤマアイ
Phyllanthus Urinaria L. コミカンソウ
Ricinus communis L. トウゴマ
Sapium sebiferum Roxb. ナンキンヘビ

Fagaceae ブナ科

- Castanea crenata* Sieb. et Zucc. クリ
Cyclobalanopsis myrsinaefolia Oerst. シラカシ
Quercus rubra L.
 - *variabilis* Blume アベマキ
Shiia Sieboldi Makino シイ

Fumariaceae エンゴサク科

- Corydalis platycarpa* Makino キケマン

Fumaria officinalis L.

Gentianaceae リンドウ科

Gentiana axillariflora Lé. et Vnt. エゾリンドウ

- *Burseri* Lap.
- *lutea* L.
- *procera* Holm.
- *scabra* Bunge
- var. *Buergeri* Maxim. リンドウ
- *tibetica* King.
- *Walujewii* Regel et Schmalh.

Geraniaceae フウロソウ科

Geranium Thunbergii Sieb. et Zucc. ゲンノショウコ

Pelargonium odoratissimum Willd.

Hamamelidaceae マンサク科

Hamamelis japonica Sieb. et Zucc. マンサク

- *virginica* L.

Liquidambar styraciflua L.

Hippocastaneaceae トチノキ科

Aesculus turbinata Blume トチノキ

Hypericaceae オトギリソウ科

Hypericum erectum Thunb. オトギリソウ

- *perforatum* L.

Juglandaceae クルミ科

Juglans Allardiana Dode

var. *acuta* Koidz. オニグルミ

Lamiaceae オドリコソウ科

Agastache rugosa O. Kuntze カワミドリ

Amethystanthus japonicus Nakai

Hyssopus officinalis L.

Lamium amplexicaule L. ホトケノザ

Lavandula spica L.

- *vera* DC.

Leonurus sibiricus L. メヘジキ

Marrubium vulgare L.

Melissa officinalis L.

Mentha aquatica L.

- *arvensis* L.
- *arvensis* L.
- var. *piperascens* Holm.
- *canadensis* L.
- *citrata* Ehrh.
- *crispa* L.
- *gentilis* L.
- *piperita* L.
- *Pulegium* L.
- *rotundifolia* Huds.
- *sativa* L.
- *silvestris* L.
- *silvestris* L.
- var. *crispata* Schrad.
- *spicata* L.
- *suavis* Guss.
- *velutina* Lej.
- *viridis* L.

Monarda clinopodia L.

- *citriodora* Cerv.
- *didyma* L.
- *fistulosa* L.
- *pectinata* Nutt.
- *punctata* L.
- *stricta* Wootn.
- *violacea* Desf.

Nepeta camphorata Boiss, et Heldr.

- *Cataria* L.
- *grandiflora* M.B.
- *japonica* Maxim.
- *Kokamica* Reg.
- *macrantha* Fisch.
- *Nepetella* L.
- *racemosa* Lam.
- *sibthorpii* Benth.

Ocimum Basilicum L. メボウキ

- *sanctum* L.

Origanum Majorana L.

- *onites* L.

- *virens* Hoffmg. et Link
- Orthodon grosseserratum* Kudo ヒメジソ
- *Hadai* Kudo オオヤマジソ
- *leucanthum* Kudo シロバナヤマジソ
- *perforatum* Ohwi ヤマジソ
- Perilla frutescens* Britton
 - form. *citriodora* Makino レモンエゴマ
 - *frutescens* Britton
 - var. *crispa* Dcne.
 - form. *crispa* Makino チリメンジソ
 - *frutescens* Britton
 - var. *crispa* Dcne.
 - form. *purpurea* Makino シソ
 - *frutescens* Britton
 - var. *crispa* Dcne.
 - form. *viridi-crispa* Makino チリメンアオジソ
- Prunella asiatica* Nakai ウツボグサ
 - *grandiflora* Jacq.
 - *vulgaris* L. ミヤマウツボグサ
- Salvia involucrata* Cav.
 - *officinalis* L. サルビア
 - *Sclarea* L.
 - *splendens* Ker. ヒゴロモソウ
 - *verticillata* L.
- Scutellaria baicalensis* Georgi コガネバナ
- Thymus britannicus* Ronn.
 - *camphoratus* Hoffmg. et Link
 - *carnosus* Boiss.
 - *cephalotus* L.
 - *Chamaedrys* Fr.
 - *lanicaulis* Ronn.
 - *Marschallianus* Willd.
 - *quinquecostatus* Celakovsky
 - var. *japonicus* Hara イワジヤコウソウ
 - *quinquecostatus* Celakovsky
 - var. *laxus* Hara イブキジヤコウソウ
 - *Serpyllum* L.

Lardizabalaceae アケビ科

- Akebia quinata* Dene. アケビ
- Stauntonia hexaphylla* Dcne. ムベ

Lauraceae クスノキ科

- Aperula citriodora* Blume アオモジ
- Lindera glaucum* Blume ヤマコウバシ
 - *umbellata* Thunb. クロモジ
- Cinnamomum Camphora* Sieb. クスノキ
 - *japonicum* Sieb. ヤブニツケイ
- Cinnamomum japonicum* Sieb.
 - var. *nervosa* Makino et Nemoto ウラジログス
 - *Loureirii* Nees ニツケイ
- Laurus nobilis* L. ゲッケイジュ
- Parabenzoin trilobum* Nakai シロモジ
- Sassafras officinale* Nees

Linaceae アマ科

- Linum flavum* L.
- *usitatissimum* L. アマ

Loganiaceae フジウツギ科

- Buddleia Davidii* Franch.
 - *Davidii* Franch.
 - var. *alba* Rehd. et Wilson
 - *fallowiana* Balf. f. et W. W. Smith
 - *globosa* Hope
 - *madagascariensis* Lam.

Lythraceae ミソハギ科

- Cuphea lanceolata* Ait.
- Lythrum anceps* Makino ミソハギ

Magnoliaceae モクレン科

- Illicium anisatum* L. シキミ
- Kadsura japnica* Dun. サネカズラ
- Liriodendron Tulipifera* L. ユリノキ
- Magnolia grandiflora* L. タイサンボク
 - *Kobus* DC. コブシ
 - *stellata* Maxim.
 - var. *Keiskei* Makino ヒメコブシ

Malaceae ナシ科

- Chaenomeles eburnea* Carr. シロボケ

- extus-coccine Carr. ボケ

- Maulei Lav. クサボケ

Crataegus cuneata Sieb. et Zucc. サンザシ

Eriobotrya japonica Lindl. ビワ

Pseudocydonia sinensis Schneid. カリン

Pyracantha angustifolia Schneid. クチバナモドキ

Rhaphiolepis umbellata Makino ジャリンバイ

Malvaceae アオイ科

Abelmoschus esculentus Moench. オクラ

- *Manihot* Med. トロロアオイ

Abutilon Avicennae Gaertn. イチビ

Althaea officinalis L. ウスベニクチアオイ

- *rosea* Cav. クチアオイ

Gossypium herbaceum L. ヲク

Hibiscus maculatus L.

- *mutabilis* L. フヨウ

Malva Alcea L.

- *moschata* L.

- *parviflora* L.

- *sylvestris* L. ウスベニアオイ

- *verticillata* L. フニアオイ

- *verticillata* L.

var. *crispa* MAKINO オカノリ

Paritium Hamabo Nakai ハマボウ

Melastomataceae ノボタン科

Melastoma candidum D. Don

var. *Nobotan* Makino. ノボタン

Meliaceae センダン科

Melia Azedarach L. タイワンセンダン

- *Azedarach* L.

var. *japonica* Makino センダン

Menispermaceae ツツラフジ科

Cocculus laurifolius DC. イソヤマアオキ

- *trilobus* DC. カミエビ

Menispermum dauricum DC. コウモリカズラ

Sinomenium acutum Rehd. et Wilson ツツラフジ

Stephania cepharantha Hayata クマサキツツラフジ

- *rotunda* Hayata

Menyanthaceae ミツガシワ科

Menyanthes trifoliata L. ミツガシワ

Mesembrianthemaceae ツルナ科

Tetragonia expansa Murr. ツルナ

Moraceae クワ科

Broussonetia Kazinoki Sieb. コウゾ

- *papyrifera* Vent. カジノキ

Ficus Carica L. イチジク

- *erecta* Thunb. イヌビワ

Morus alba L. マグワ

- *bombycis* Koidz. ヤマグワ

Myrtaceae テンニンカ科

Eucalyptus algeriensis Trabut

- *calophylla* R. Br.

- *robusta* Smith

Melaleuca Leucadendron L.

Myrtus communis L.

Psidium cattleianum Sabine

Nandinaceae ナンテン科

Nandina domestica Thunb. ナンテン

Nictaginaceae オシロイバナ科

Mirabilis Jalapa L. オシロイバナ

Nymphaeaceae ヒツジグサ科

Nymphaea tetragena Georgi

var. *angusta* Casp.

Oenotheraceae アカバナ科

Oenothera biennis L. メマツヨイグサ

- *Lamarkiana* Ser. オオマツヨイグサ

Oleaceae モクセイ科

- Fraxinus Ornus* L.
 - *Sieboldiana* Blume
Jasminum nudiflorum Lindl. オウバイ
 - *odoratissimum* L. キンケイ
 - *Sambac* Ait. マツリカ
Ligustrum obtusifolium Sieb. et Zucc. イボク
 - *sinense* Lour.
Olea europaea L. オリーブノキ
Osmanthus ilicifolius Stand. ヒイラギ
Rangium suspensum Ohwi レンギョウ
Syringa amurensis Rupr.
 var. *macrophylla* Nakai オオバヘシドイ
 - *reflexa* Schneid.
 - *vulgaris* L. ムラサキヘシドイ

Opuntiaceae サボテン科

- Opuntia Ficus-indica* Mill.
 - *minima* Lem.
 - *vulgaris* Mill. ヒラウチヲ

Oxalidaceae カタバミ科

- Oxalis Bowiei* Herb. ハナカタバミ
Xanthoxalis corniculata Small カタバミ

Paeoniaceae ボタン科

- Paeonia albiflora* Pall.
 var. *trichocarpa* Bunge シヤクヤク
 - *anomala* L.
 - *corallina* Retz.
 - *Delavayi* Franch.
 - *lutea* L.
 - *suffruticosa* Andr. ボタン

Papaveraceae ケン科

- Argemone mexicana* L.
Chelidonium majus L. クサノオウ
Dicranostigma Franchetianum Fedde
Glaucium flavum Crtz.
Macleya cordata R. Br. タケニグサ

Papaver alpinum L.

- *argemone* L.
 - *caucasicum* M. Bieb.
 - *cordata* R. Br.
 - *dubium* L.
 - *nudicaule* L.
 - *orientale* L. オニゲシ
 - *pilosum* Sibth. et Sm.
 - *Rhoeas* L. ヒナゲシ
 - *rupifragum* Boiss. et Reut.
 - *Schinianum* Fedde
 - *somniferum* L. ケシ

Papilionaceae マメ科

- Aeschynomene indica* L. クサネム
Albizia Julibrissin Durazz.
 var. *speciosa* Koidz. ネムノキ
Amorpha fruticosa L.
Arachis hypogaea L. ナンキンマメ
Astragalus Cicer L.
 - *glycyphyllus* L.
 - *odorata* Lam.
 - *pentaglottis* L.
Caesalpinia japonica Sieb. et Zucc. ジャケツイバラ
 - *Sappan* L. スオウ
Caragana Chamlagu Lam. ムレスズメ
Cassia laevigata Willd.
 - *nomame* Honda カワラケツメイ
 - *Tora* L. エビスグサ
 - *torosa* Cav. ヘブソウ
Colutea orientalis Mill.
Cytisus hillebrandtii Briq.
 - *ratisbonnensis* Schaeff.
 - *scoparius* Link エニシダ
Desmodium caudatum DC. ミソナオシ
 - *racemosum* DC. ススビトヘギ
Genista aetnensis DC.
 - *tinctoria* L.
Gleditschia horrida Schneid. サイカチ
 - *sinensis* Lam.
Glycine Max Merr. ダイズ
Glycyrrhiza echinata L.
 - *glabra* L. カンゾウ
 - *glabra* L.

var. glandulifera Wald. et Kit.
 - uralensis Fisch. ウラルカンゾウ
Indigofera Gerardiana R. Grah.
 - pseudo-tinctoria Matsum. コマツナギ
Laburnum alpinum B. et P.
 - anagyroides Med.
 - vulgare L.
Lathyrus japonicus Willd. ハマエンドウ
 - odoratus L. スイートピー
Lotus tetragonolobus L.
Lupinus angustifolius L.
 - elegans H.B. et K.
 - Hilarianus Benth.
 - nootkatensis Donn
 - polyphyllus Lindl.
Maackia amurensis Rupr. et Maxim.
 var. Buergeri Schneid. イヌエシジユ
Medicago denticulata Willd. ウマゴヤシ
 - sativa L. ムラサキウマゴヤシ
Melilotus alba Desr. シロバナノシナガワヘギ
 - officinalis Lam.
Mimosa pudica L. オジギソウ
Ononis arvensis L.
 - natrix Lam.
 - spinosa L.
Phaseolus chrysanthos Savi アズキ
Psoralea pinnata L.
Pueraria Thunbergiana Benth. クズ
Robinia pseudacacia L. ニセアカシヤ
Sophora angustifolia Sieb. et Zucc. クララ
Styphnolobium japonicum Schott エンジュ
Trifolium hybridum L. クチオランダゲンゲ
 - pratense L.
 form. sativa Ser. ムラサキツメクサ
 - repens L. シロツメクサ
Trigonella caerulea Ser.
 - cretica Boiss.
 - Foenum graecum L. コロハ
Vicia Cracca L. クサフジ

Pedaliaceae ゴマ科

Sesamum indicum L. ゴマ

Phytolaccaceae ヤマゴボウ科

Phytolacca americana L. アメリカヤマゴボウ
 - esculenta Houtte ヤマゴボウ

Plantaginaceae オオバコ科

Plantago asiatica L. オオバコ
 - coronopus L.
 - lanceolata L. ヘラオオバコ
 - psyllium L. プシリウムソウ

Platanaceae スズカケノキ科

Platanus orientalis L. スズカケノキ

Plumbaginaceae イソマツ科

Armeria maritima Willd.

Polygalaceae ヒメハギ科

Polygala Senega L. セネガ

Polygonaceae タデ科

Amblygonon pilosum Nakai オオケタデ
Bistorta hayachinensis Gross
 var. nitens Hara イブキトラノオ
Fagopyrum cymosum Meissn. シャクナゲ
 - tataricum Gaert. ダツタンソバ
 - vulgare Hill.
 var. autumnale Nemoto ソバ
Persicaria perfoliata Gross イシミカフ
 - Posumbu Gross ヘナタデ
 - Thunbergii Gross ミゾソバ
 - tinctoria Gross アイ

Pleuropterus multiflorus Turcz. ツルドクダミ

Reynoutria japonica Houtt. イクドリ

Rheum Emodi Wall.

- officinale Baill.
 - palmatum L.
 - Rhaponticum L. マルバダイオウ
 - undulatum L. カラダイオウ

Rumex Acetosa L. スイバ

- Daiwoo Makino マダイオウ

- japonicus Houtt. ギンギシ
- salicifolius Weinm.

Tovara filiformis Nakai ミズヒキ

Portulacaceae スベリヒユ科

Portulaca oleracea L. スベリヒユ

Primulaceae サクラソウ科

Primula japonica A. Gray サクラソウ

- officinalis Jacq.

Punicaceae ザクロ科

Punica Granatum L. ザクロ

Ranunculaceae ウマノアシガタ科

Aconitum Fauriei Lé. et Van. ヘナトリカブト

- japonicum Thunb. トリカブト

Adonis amurensis Regel et Radd. フクジュソウ

- autumnalis L.

Anemone flaccida Fr. Schm. ニリンソウ

- narcissiflora L.
- Pulsatilla L.
- silvestris L.

Aquilegia alpina L.

- californica A. Gray

Cimicifuga simplex Wormsk.

- var. *ramosa* Maxim. サラシナシヨウマ

Clematis heracleifolia DC.

- terniflora DC. センニンソウ
- Vitalba L.

Coptis japonica Makino オウレン

- *japonica* Makino
- var. *dissecta* Nakai セリバオウレン

Delphinium ornatum Bouché ヒエンソウ

Nigella damascena L. クロタネソウ

Ranunculus acris L.

- var. *japonica* Maxim.
- form. *pleniflorus* Makino キンボウゲ

- *acris* L.

- var. *japonica* Maxim.

form. *vulgaris* Makino ウマノアシガタ

- *sceleratus* L. クガラシ

Thalictrum Thunbergii DC.

- var. *hypoleucum* Nakai アキカラマツ

Resedaceae モクセイソウ科

Reseda luteola L.

Rhamnaceae クロウメモドキ科

Rhamnus catharticus L.

- *Frangula* L.

Zizyphus vulgaris Lam.

- var. *inermis* Bunge ナツメ

- *vulgaris* Lam.

- var. *spinosa* Bunge サネブトナツメ

Rhinanthaceae ゴマノハグサ科

Antirrhinum majus L. キンギョソウ

Digitalis amandiana Samp.

- *ambigua* Murr.
- *eriostachya* Bess.
- *lanata* Ehrh. ケジギタリス
- *mariana* Boiss.
- *orientalis* L.
- *parviflora* Jacq.
- *purpurea* L. ジギタリス
- *sanguinalis* Scop.
- *Thapsi* L.
- *Thapsi* L.

- var. *Amandiana* Telles Palh.

Gratiola officinalis L.

Mimulus guttatus DC.

- luteus* L.

- *moschatus* Dongl.
- *ringens* L.

Paulownia tomentosa Steud. キリ

Rehmannia glutinosa Libosch.

- var. *lutea* Makino

- form. *purpurea* Makino ジョウウ

Scrophularia nodosa L.

Verbascum austriacum Schott.

- *Blattaria* L. モウズイカ

- glabratum Friv.
- heldreichii Boiss.
- lanatum L.
- nigrum L.
- olympicum
- phlomoides L.
- phoeniceum L.
- speciosum L.
- thapsiforme Schrad.
- Thapsus L. ビロウドモウズイカ

Veronica officinalis L.

Rhodoraceae シャクナゲ科

- Pieris japonica D. Don アセビ
Rhododendron japonicum Suring. レンゲツツジ
Tritomodon cernuum Honda シロドウダン

Rosaceae バラ科

- Agrimonia pilosa Ledeb.
var. japonica Nakai キンミズヒキ
Filipendula purpurea Maxim. キヨウダノロ
Fragaria chiloensis Duchr.
var. ananassa Bailey オランダイチゴ
Geum japonicum Thunb. ダイコンソウ
- rivale L.
- urbanum L.
Kerria japonica DC. ヤマブキ
Potentilla Tormentilla Neck.
Rosa damascena Mill.
- pisocarpa A. Gray
- polyantha Sieb. et Zucc. ノイバラ
- rugosa Thunb. ハマナス
- rugosa Thunb.
var. albiflora Koidz. シロバナハマナス
Sanguisorba carnea Fisch. アレモコウ

Rubiaceae アカネ科

- Asperula odorata L. クルマバソウ
Galium spurium L.
var. echinospermum Hayek ヤエムグラ
Gardenia jasminoides Ell.
var. grandiflora Nakai クチナシ

- radicans Thunb. コクチナシ
- Paederia chinensis Hance ヤイトバナ
- Rubia Akane Nakai アカネ
- tinctorum L. セイヨウアカネ

Rutaceae ヘンルウダ科

- Evodia rutaecarpa Hook. et Thoms. ゴシユユ
Fagara ailanthoides Engler カラスザンショウ
- mantchurica Honda イヌザンショウ
Orixa japonica Thunb. ロクサギ
Phellodendron amurense Rupr.
- Lavalley Dode キヘダ
- amurense Rupr. × P. japonicum Maxim.

- Poncirus trifoliata Raf. カラタチ
Ruta chalepensis L.
- graveolens L. ヘンルウダ
Zanthoxylum piperitum DC. サンショウ
- planispinum Sieb. et Zucc. フニザンショウ

Salicaceae ヤナギ科

- Salix Gilgiana Seem. カワヤナギ

Santalaceae ビャクダン科

- Santalum album L. ビャクダン

Sapindaceae ムクロジ科

- Koelreuteria paniculata Laxm. モクゲンジ
Sapindus Mukorossi Gaertn. ムクロジ

Saururaceae ハンゲシヨウ科

- Polypara cordata Bueck ドクダミ
Saururus Loureiri Dcne. ハンゲシヨウ

Saxifragaceae ユキノシタ科

- Astilbe japonica Miq. アワモリシヨウマ
Hydrangea macrophylla DC.
var. Otaksa Honda アジサイ

- serrata Ser.
- var. Thunbergii Sugimoto アマチャ
- Itea virginica Hemsl.
- Saxifraga stolonifera Meerb. ニキノシタ

Simarubaceae ニガキ科

- Ailanthus altissima Swingle ニワウルシ
- Picrasma ailanthoides Planch. ニガキ

Solanaceae ナスビ科

- Atropa belladonna L. ベラドンナ
- belladonna L.
- var. lutea Döll.
- Browallia demissa L.
- viscosa H.B. et K.
- Capsicum annum L.
- annum L.
- var. acuminatum Fingerh. トウガラシ
- annum L.
- var. longum Sendt.

- Datura alba Nees チョウセンアサガオ
- fastuosa L.
- ferox L.
- inermis Jacq. ヘリナシチョウセンアサガオ
- Leichhardtii Hort.
- Metel L. ケチョウセンアサガオ
- meteloides DC.
- quercifolia H.B. et K.
- カシワバチョウセンアサガオ
- Stramonium L.
- シロバナヨウシュチョウセンアサガオ
- Tatula L. ヨウシュチョウセンアサガオ

- Hyoscyamus albus L.
- muticus L.
- niger L. ヒヨス
- niger L.
- var. pallidus W. et K.

- Lycium chinense Mill. クロ

- Mandragora officinarum L.

- Nicandra physaloides Gartn. オオセンナリ

- Nicotiana alata Link et Otto

- longiflora Cav.
- rustica L.

- Sanderae Hort.

- Petunia violacea Lindl. ツクバネアサガオ

- Physalis Alkekengi L.

- Francheti Mast.

- Francheti Mast.

- var. Bunyardii Makino ホオズキ

- Scopolia japonica Maxim. ヘシリドコロ

- Solanum glaucophyllum Desf. ルリヤナギ

- nigrum L. イヌホオズキ

- sisymbriifolium Lam. ヘリナスビ

- tubersum L. ジャガタライモ

- Withania frutescens Dun.

Spiraeaceae シモツケ科

- Spiraea cantoniensis Lour. コデマリ

- Thunbergii Sieb. コゴメバナ

- Stephanandra incisa Zabel コゴメウツギ

Staphyleaceae ミツバウツギ科

- Euscaphis japonica Kanitz ゴンズイ

Styracaceae エゴノキ科

- Styrax japonica Sieb. et Zucc. エゴノキ

Ternstroemiaceae ツバキ科

- Camellia japonica L.

- var. hortensis Makino ツバキ

- japonica L.

- var. rosacea Curtis オトメツバキ

- Sasanqua Thunb. サザンカ

- Eurya japonica Thunb.

- var. montana Blume ヒサカキ

- Ternstroemia Mokof Nakai モツコク

- Thea macrophylla Makino トウチャ

- sinensis L.

- var. bohea Szysz. チャ

Tropaeolaceae ノウゼンハレン科

- Tropaeolum majus L. ノウゼンハレン

- minus L.

Ulmaceae ニレ科*Celtis sinensis* Pers.var. *japonica* Nakai エノキ*Zelkova serrata* Makino ケヤキ**Urticaceae** イラクサ科*Parietaria officinalis* L.*Pilea Hamaoi* Makino ミズ*Urtica cannabina* L.- *dioica* L.**Valerianaceae** オミナエシ科*Valeriana officinalis* L. ヨイヨウカノコソウ- *japonica* Nakai カノコソウ*Valerianella coronata* DC.**Verbenaceae** クマツヅラ科*Callicarpa japonica* Thunb. ムラサキシキブ*Lantana Camara* L. ランタナ*Verbena officinalis* L. クマツヅラ- *venosa* Gill. et Hook.*Vitex cannabifolia* Sieb. et Zucc. ニンジンボク- *rotundifolia* L.f. ハマボク**MONOCOTYLEDONEAE** 単子葉植物綱**Agavaceae** リュウゼツラン科*Agave americana* L. アオノリュウゼツラン**Alliaceae** ネギ科*Allium odorum* L. ニホ- *Scorodoprasum* L.var. *viviparum* Regel ニンニク**Amaryllidaceae** ヒガンバナ科*Crinum asiaticum* L.var. *japonicum* Bak. ハマオモト*Lycoris radiata* Herb. ヒガンバナ*Narcissus Jonquilla* L. キズイセン- *Tazetta* L.var. *suiseen* Sieb. スイセン**Araceae** テンナンショウ科*Acorus asiaticus* Nakai ショウブ- *gramineus* Soland. セキショウ*Amorphophallus Konjac* C. Koch コンニャク*Arisaema japonicum* Blume ヤムシソウ- *Urashima* Hara ウラシマソウ*Pinellia ternata* Breitenb.var. *viridis* Makino ヘンゲ- *tripartita* Schott オオヘンゲ**Asparagaceae** キジカクシ科*Asparagus officinalis* L. マツパウフ- *pygmaeus* Makino グチテンモンゾウ**Asphodelaceae** ツルボラン科*Hemerocallis disticha* Donnvar. *kwanso* Nakai ヤブカンゾウ**Aspidistraceae** ハラン科*Aspidistra elatior* Blume ハラン**Cannaceae** ダンドク科*Canna coccinea* Mill. アカバナダンドク- *flaccida* Rosc. キバナダンドク- *indica* L.**Commelinaceae** ツユクサ科*Commelina communis* L. ツユクサ*Tinantia fugax* Schweidw.*Tradescantia canaliculata* Raf. ムラサキツユクサ**Convallariaceae** キミカゲソウ科*Convallaria Keiskei* Miq. スズラン

Polygonatum falcatum A. Gray ナルコユリ
 - *japonicum* Morr. et Dcne. アマドコロ
Reineckia carnea Kunth キチジョウソウ
Rhodes japonica Roth オモト

Coryphaceae シュロ科

Trachycarpus excelsus Wendl. シュロ

Cyperaceae カヤツリグサ科

Cyperus esculentus L.
 - *rotundus* L.

Dioscoreaceae ヤマノイモ科

Dioscorea japonica Thunb. ヤマノイモ
 - *Tokoro* Makino オニドコロ

Dracaenaceae リュウケツジュ科

Cordyline terminalis Kunth センネンボク

Iridaceae アヤメ科

Crocus sativus L. サフラン
Freesia refracta Klatt アサギズイセン
Gladiolus gandavensis Houtt. トウショウブ
Iris chrysographes Dykes
 - *ensata* Thunb.
 - *florentina* L. ニオイイリス
 - *germanica* L. ムラサキイリス
 - *japonica* Thunb. シャガ
 - *laevigata* Fisch. カキツバタ
 - *Nertchinskia* Lodd. アヤメ
 - *Pseudacorus* L. キショウブ
 - *sibirica* L. コアヤメ
 - *versicolor* L.
Tritonia lineata Ker.

Liliaceae ユリ科

Aloe Bergeana Haw.
 - *Eru* Berger
 - *ferox* Mill.

- *latifolia* Haw.
 - *Paefii* Ferr.
 - *saponaria* Haw.
 - *Schiniperi* Tod.
 - *striata* Haw.
 - *striatula* Haw.
 - *succotina* Lam.

Fritillaria verticillata Willd.

var. *Thunbergii* Baker アミガサユリ

Gloriosa superba L.

Lilium auratum Lindl. ヤマユリ

Scilla scilloides Druce ツルボ
 - *maritima* L. カイソウ

Melanthaceae シュロソウ科

Colchicum autumnale L. イヌサフラン
 - *luteum* Baker

Ophiopogonaceae ヤブラン科

Liriope muscari Bailey

var. *communis* Nakai ヤブラン

Ophiopogon japonicus Ker. ジャノヒゲ

- *planiscapus* Nakai オウバジャノヒゲ

Orchidaceae ラン科

Bletilla striata Reichb. f. シラン

- *striata* Reichb. f.

var. *Gebina* Reichb. f. シロバナシラン

Cremastra variabilis Nakai サイハイラン

Spiranthes amoena Spr. ネジバナ

Poaceae イネ科

Agropyron ciliare Franch. ケカモジグサ

- *semicostatum* Nees カモジグサ

Agrostis Matsumurae Hackel スカボ

Alopecurus geniculatus L. スズメノテッポウ

Andropogon citratus DC. レモングラス

- *Nardus* L. コウスイガヤ

- *squarrosus* L.

Anthoxanthum odoratum L. ヘルガヤ

Avena fatua L. カラスムギ

- *sativa* L. エンバク
- Coix Lachryma-Jobi* L.
 - var. *susutama* Honda ジュズダマ
- *Lachryma-Jobi* L.
 - var. *Toomuki* Ito ハトムギ
- Digitaria sanguinalis* Scop. コメイシワ
- Echinochloa crusgalli* Beauv.
 - subsp. *edulis* Honda ヒエ
- Elymus canadensis* L.
 - *mollis* Trin. ハマニンシク
 - *virginicus* L.
- Eragrostis multicaulis* Steud. ニワホコリ
- Imperata cylindrica* Beauv.
 - var. *Koenigii* Dur. et Schinz ナガヤ
- Lolium temulentum* L. ドクムギ
- Miscanthus sinensis* Anderson ススキ
- Cryza sativa* L. イネ
- Panicum miliaceum* L. キビ
- Paspalum Thunbergii* Kunth スズメノヒエ
- Phragmites longivalvis* Steud. ヨシ
- Poa annua* L. スズメノカタビラ
- Secale cereale* L. ライムギ
 - *montanum* Guss.
- Themeda japonica* Tanaka メガルガヤ
- Zea Mays* L. トウモロコシ
- Zizania latifolia* Turcz. マコモ
- Zoysia japonica* Steudel シバ
 - *macrostachya* Franch. et Sav. オニシバ

Smilacaceae サルトリイバラ科

Smilax China L. サルトリイバラ

- *nipponica* Miq. シオデ

Stemonaceae ビャクブ科

Stemona japonica Miq. ビャクブ

- *sessilifolia* Miq. クチビャクブ

Typhaceae ガマ科

Typha latifolia L. ガマ

Yuccaceae イトラン科

Yucca recurvifolia Salisb. キミガヨラン

Zingiberaceae ショウガ科

Alpinia chinensis Rosc. アオノクマタケラン

- *japonica* Miq. ハナミョウガ

- *speciosa* K. Schum. ゲットウ

Curcuma longa L. ウコン

Hedychium coronarium Koenig

- var. *chrysoleucum* Baker ハナシロクシャ

- *spicatum* Ham. サンナ

Zingiber Mioga Rosc. ミョウガ

- *officinale* Rosc. ショウガ

Received April 9, 1954

速 報

小麦粉中の2,4-Dの検出 川城 巖, 大久保敬四郎

2,4-D すなわち 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid は第二次大戦のころから、除草剤として利用されるようになり、我国においても1949年ごろ実用化された。このものは、人体に対する毒性の点では、さほど心配を要するものではないとされているが、穀類、穀粉中の異状分としては、一応の関心を持つ必要があるので、まず小麦粉中の検出法につき検討を加えた。

従来文献上、2,4-Dの微量定量法としてトウモロコシ苗の初生根に対する生長抑制作用を利用した生物学的方法や、284m μ における吸光係数測定による物理化学的方法等が報告されているが、近年に到つて、W. H. Freed (Science, 107, 98 (1948)) が、ホルムアルデヒドの検出試薬として有名な、クロモトロブ酸を用いて、検知(紫紅色)する方法を発表し、続いて宗像(分析化学, 1, 199 (1952))のその改良定量法が出された。

しかし上記報告は、いずれも食品(またはその原料)を対象にしたものでないから、我々はまず小麦粉中の2,4-Dを高収量(または定量的)に抽出する方法を求め、しかるのち、前記クロモトロブ酸反応を行うことにした。

実験の結果、抽出溶媒として、エーテルを使用し、エーテル抽出によつて随伴してくる2,4-D以外の物質(特にクロモトロブ酸反応を妨害する物質)を除去する方法として、アルミナによるカラムクロマトグラフィを利用することにした。これによると回収率約90%の成績を得たが、なお操作法の改良によつては、更にその率を高めようとの見込みのもとに目下検討中であるので、今回はとりあえず一応の試験法案について報告する。

抽出法 小麦粉20gをビーカーにとり、N硫酸を注意して滴加し、かきまぜながら、試料が均等に酸性を呈するまで湿潤させる。次にこれを毎回エーテル20ccで5回ふりまぜ、抽出を行い、次にこのエーテル抽出液を毎回弱アルカリ性の水10ccを用いて5回ふりまぜ、2,4-Dを水液の方に移す。この合わせた水液は、径1.5cm、高さ2.5cmのアルミナ柱(あらかじめN/10水酸化ナトリウム液を通過させて置く)を流下させる。その速度は2秒間に1滴ぐらいがよい。続いて水約10ccを通し、その洗液は流出液に合わせる。次にこの流出液をなるべく低温で蒸発濃縮し、ついに乾固させる。

検出反応 上記乾固物に、クロモトロブ酸0.03~0.05mgと濃硫酸2ccを加えて、よくかきまぜ、150°, 15分間加熱する。2,4-Dが存在すれば、濃紫紅色を呈する。検出限度は2,4-D 50 μ g/20gである。

(1954. 4. 3受入)

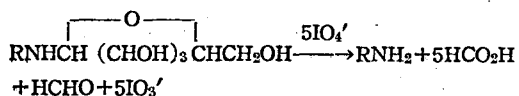
抄

非水溶液滴定による医薬品の定量 (第1報) 氷酢酸を溶媒とする溶性バルビタール類及び溶性サッカリンの滴定 鹿島 哲: 薬誌, 74, 101 (1954) 溶性バルビタール, 溶性フェノバルビタール, 溶性メチルヘキサビタール, エチルヘキサビタールカルシウム, シフェニルヒダントインナトリウム及び溶性サッカリンを0.1N 過塩素酸で滴定したところ, エチルヘキサビタールカルシウムは約0.1%, その他のものは約0.05%の精度で滴定できた。

非水溶液滴定による医薬品の定量 (第2報) 氷酢酸を溶媒とするアンチピリン類及びそれらを含む医薬品の定量 鹿島 哲: 薬誌, 74, 463 (1954) アンチピリン, アミノピリン, スルピリン, サリチル酸アンチピリン, ミグレン及びピラピタールを滴定したところ, スルピリンを除き0.05~0.2%の精度で滴定できた。

大腸菌のアミノ糖代謝の研究 (第1報) 朝比奈正人, 山羽 力: 1953年7月第6回酵素化学シンポジウム講演, 大腸菌の生菌及び菌体抽出液を用い, 主としてグルコサミンの分解の際の酸素吸収, グルコサミンの減少, アンモニアの生成, 焦性ブドウ酸の生成等を定量的に追求し, またそれらに対するKCN, NaN_3 , NaF, 2,4-dinitrophenol, NaAsO_2 , CH_3COOH 等の阻害剤の影響を調べた。

N-Glycosideの過沃度酸々化について (予報, 第1報) 川城 巖: 薬誌, 73, 722, 892 (1953) *o*-, *m*-, *p*-Toluidine, *m*-, *p*-Nitroaniline, *o*-, *m*-, *p*-Aminobenzoic acid の N-glucoside を合成し, 過沃度酸を作用させたところ, Nitroaniline-N-glucoside は5モル, 他は5モル以上の過沃度酸を消費した。一般に次の式で反応し, 次にこの生成物のいずれかがさらに過沃度酸を消費するものと思われる。



N-Glycosideの過沃度酸々化について (第2, 3報) 川城 巖: 薬誌, 73, 943 (1953), 74, 33 (1954) Toluidine 類及び Aminobenzoic acid 類の N-glucoside の過沃度酸々化における副反応の原因を検討し, Aniline 類と過沃度酸とが α -Glycol あるいは α -Aminoalcohol におけると同様な速度で反応することを知った。

録

ETA 試薬による水の総硬度測定について 川城 巖, 浦久保五郎: 公衆衛生年報, 1, 20 (1953) 人工硬水を作り, 薬学会協定衛生試験法の ETA 試薬を用いる方法で測定し次の知見を得た。(1) 石けん法に比較しかなり正確で個人差も少い。(2) Fe は 5ppm; Al は 20ppm, Mn は 50ppm まで影響なく総硬度として測定され, Co Cu は 1ppm でも障害を示した。

空気中の浮遊微生物に関する研究 I 落下細菌測定一般法についての実験 川城 巖, 浦久保五郎, 佐々木睦江: 公衆衛生年報, 1, 31 (1953) ビアホール, 映画館, デパート, 家庭, 実験室等において落下細菌を測定し, (1) 床からの高さにより相当の菌数の差のあること。(2) 培養基を種々用いてみた結果について報告した。

空気中の浮遊微生物に関する研究 II 大気中に浮遊する糸状菌の種類について 浦久保五郎, 佐々木睦江: 公衆衛生年報, 1, 33 (1953) 衛生試験所の屋上において, 1年間36回にわたり落下法により大気中の糸状菌を分離しその属を分類同定し, 通常よく見られる属その他について考察を行った。

チオクローム吸光法によるビタミン B_1 の定量 (第1報) ブロムシアン・アルカリによる B_1 の定量 河内敬朝, 笠原 閑: 日本薬学会近畿支部特別例会講演 (昭28. 10. 10); ビタミン, 7, 513 (1954) B_1 の酸性抽出液 (又は稀釈液) 10~20 $\mu\text{g}/\text{cc}$ にブロムシアン・アルカリを作用させその液の吸収度を A. K. A. 光電管比色計 (濾光板 UVD₁) で測定するか, ベックマン分光々度計の場合は, 368m μ における吸収度を測定することにより定量する。

チオクローム吸光法によるビタミン B_1 の定量 (第2報) 製剤中の B_1 の定量法 河内敬朝, 笠原 閑: 日本ビタミン学会第二回例会講演 (昭28. 11. 8); ビタミン, 7, 518 (1954) 第1報で報告した方法をビタミン B_1 製剤全般に応用しその実用性を立証した。検体の種類により直接法, ブタノール転溶法, パームット吸着法の三法に分けた。

ビタミン B_1 注射液の異物検査と経年変化について 河内敬朝, 笠原 閑, 松倉 幸: 第5回日本薬学会大会講演 注射剤の異物, 特にビタミン B_1 注射液の異物が今迄よく問題になっているので我々は B_1 注射液が国家検査品目に指定されたのを機会に国家検査の立場から検討を加えて見た, 即ち昭和26年4月から12月迄9ヶ月間に抜取, 提出された400検体, 1,200本

について検査した結果を纏め更にその内20検体200本について一ヶ年間にわたる異物の経年変化の状態を観察した結果を報告する。国家検査成績は不適品と判定したものが3.8%であった。その内この異物によって不適となつたものは約40%を占める状態であつた。検査基準及方法は日局に準じたが細部の撰別要領等に関しては各製薬会社で実施している要領を参考として妥当と思われる方法を用いた。異物の種類は大体において硝子片が最も多く次いでゴミ、コゲ、繊維といった順であつた。分解析出物と思われる異物は僅かしか発見されなかつたのは此等の検体が殆んど製造後二ヶ月以内に抜取、提出されたものであるからと思われる。次に経年変化について言えば、3ヶ月、4ヶ月、と分解析出物らしいものが漸増するのが認められ、6ヶ月で45%、10ヶ月で60%、1ヶ年で70%と云う数値が出ている。然しこれは平均値であるので中には製品により1ヶ年で100%の異物析出を見るもの、又僅か20%しか認められないものもあつた。又同一製品でもLot.により差異が見られるものもあつたので一概に言えないが、市販品で1ヶ年以上も経過したものは殆んど100%異物が発見できると言つても過言ではないと言われる。以上の結果からしてこの様に経年変化により異物が増える注射液は特別甚だしいものは別として検査にあつては製造年月日を考慮する等、何らかの配慮が必要ではないかと考える次第である。

2-Nitro, 3-Methoxyaniline によるビタミンCの定量 河内敬朝、笠原 閑：昭和28年10月日本薬学会近畿支部特別例会講演；薬誌 薬事日報(昭28.6.13)が報じたM. Schmall等によるCの新しい比色定量法を検討し、本試薬をジアソ化し、Cの2%メタ磷酸溶液(0.5~2.5mg%)に作用させ、アルカリ性にして生ずる青紫色をベックマン分光光度計($\lambda=570\text{ m}\mu$)又はA. K. A. 光電比色計(濾光板S57)を用いて測光する方法を確立し、その実用性を立証した。

食物中毒菌の検査法 八田貞義：公衆衛生, 15, 2号, 35, 昭29, 細菌性食物中毒の際の推定原因食のまとめ方、及びこれの検査方法につき詳細な系統的解析を記述した。

食品防腐剤の研究(綜説) ニトロフラン系及びキノンの抗菌機作と防腐力並びに生体臓器親和性について 八田貞義、青山好作：公衆衛生, 14, 3号, 30, 昭28, 標記二系の薬剤を食品防腐剤として使用する際に重要な基礎的事項についてなされた業績を著者らの報告を中心に綜説した。

食品着色(赤色)剤特にローダミン、スルフォローダミンに関する食品衛生学的研究(第1報) 八田貞義、小田幸子、青山好作、宮沢文雄、栗栖弘光：第8回日本公衆衛生学会総会講演, 昭28, 両者の理化学的堅牢度は類似するが、マウスの急性中毒量はローダミンが $LD_{50}=0.174\text{g/kg}$ で最も強く、両者共肝実質変性を来す外、その市販品の使用実態も報告した。

食品着色(黄色)剤特にオーラミンに関する食品衛生学的研究(第2報) 八田貞義、青山好作、大竹作左衛門、宮沢文雄、小笠原美知：第23回日本衛生学会総会講演, 昭28, ラット及びウサギを用い、オーラミンの投与により慢性中毒症が現れ、肝及び腎臓の実質変性を現す。酢リパーゼ及びペプシンの消化作用を抑制し、沢庵変敗菌及びジャガイモ菌の発育を抑制した。

食品の新鮮保持に関する研究(9) 冷凍貝類の細菌汚染の状態について 八田貞義、新井秀男、青山好作、宮沢文雄、尾崎嘉篤、神林三男：日本医科大学雑誌, 20, 11号, 93, 昭28, 冷凍アサリ、ハマグリ両検体むきみの大腸菌群数は米国製品に比し夫々120及び110倍多い。また、検体中のバラ大腸菌及び大腸菌群の分布について報告した。

細菌性発熱物質の生化学的性状と臨牀応用に関する研究(綜説) 八田貞義、青山好作：総合医学, 10, 9号, 2, 昭28, 外因的発熱因子の外、生体内の因子の介在を解明する必要性を説き、更にいわゆる発熱基構造はすべてある程度共通しているとの見解をのべた。

合成薬及び抗生物質による所謂「オンメカブレ」発疹の治療成績と基礎成績について 八田貞義、青山好作、新井秀男、栗栖弘光、宮沢文雄、西田正道：第8回日本公衆衛生学会講演, 昭28, カゼイン水解培地を基に尿素分解性菌8種の供試菌について調べたところ、陽性石鹼はニトロフラン系薬剤及びペニシリンよりも有効で、この撒布剤を作り臨牀実験を行なつたが、明確な優劣は認め得なかつた。

レントゲン線被照射動物の細菌感染について 八田貞義、山地幸雄、田中弘子、平林啓夫、山内 信、斎藤達雄：第23回日本衛生学会総会講演, 昭28, マウス、ラット、モルモット及びウサギに100~1800rの照射を行いゲルトネル菌を経口投与すると菌血症を起し易くなる。400~800r照射死亡マウスの血液及び脾臓からは、サルモネラ、バラコリ菌群と推定される菌の検出を見た例があつた。

腸線の吸収Ⅱ報 八田貞義、功刀 博、石関忠一：

臨牀婦人科産科, 8, (1), 24, 1954, 生体内に縫合した馬腸線実質が結合織に置換されてくるには、顕微鏡検査の結果 18~20 週を要するが, Johnson & Johnson 羊腸線は 6 週位で吸収される。

染色による人精子の生死判定について, I 報, エオジン染色に対する検討 八田貞義, 功刀 博, 近藤俊朗, 医学と生物学, 30 (4), 170, 1954, 不動性精子はエオジンに染るものと、染らないものがあることを認め、生体染色用にはメルク製品の優秀性を認めた。

染色による人精子の生死判定について, II 報, エオジン・ニグロシン染色, 八田貞義, 功刀 博, 近藤俊郎: 医学と生物学, 30 (6), 265, 1954.

ニグロシンの併用により、不動性のエオジンに染り難い精子の存在を認め、中間型と仮称することとした。

メゾ修酸塩の抗糖尿病作用に関する研究 第 4 報, メゾ修酸カルシウムの毒性と連続投与後の組織学的所見 大橋 茂, 竹内節彌, 小林芳人, 池田良雄, 菊池健三: 日本薬理学雑誌, 49, No. 3, 1953.

うさぎ及びラットに、50, 100 及び 200mg/kg のメゾ修酸を連続投与したが生長発育には影響なく、前者では 3~4 ケ月後者では 6 ケ月以後に脾臓ランゲルハンス氏の β 島細胞の増殖が特異的に認められた。

肝臓の中毒組織学的研究, 第 1 報, 正常肝細胞及び細胞内空胞について 池田良雄: 日本薬理学会第 9 回関東部会講演 (昭 28. 11. 25), 中毒組織学的見地から、最も主要要視される肝臓について、その中毒性変化の本質を把握せんとして諸種薬品又は食品による中毒時の組織標本を検討し、正常肝細胞像と原形質空胞について報告した。

ビタミン K₃ と脾臓 池田良雄, 菊池健三: 実験治療, No. 269, 1954, ラットに本剤を 0.1~100mg/kg の割合で 3 ケ月経口投与したところ、100mg 群では 1 ケ月目より脾臓の腫大が認められ、50mg 以上群では Hyperplasmia と考えられる興味ある構造の変化が見られた。

家兎体温測定用の固定器 横井泰生: 日新医学, 39, 613, 1952, 従来の固定器を用いることにより生ずる体温の降下は、首枷式固定器を用いることにより防ぎ得、発熱物質に対するうさぎの感受性も、固定を行わない場合と同様である。

ビタカンファアの解熱作用 (経口投与) について 横井泰生, 堀内茂友, 近藤 了, 糸嶺篤一: 日本薬理学会関東部会講演 (昭 28. 6. 28), 日本薬理学雑誌, 49, 199 §, 1953, 合成ビタカンファアは、パイ

ロジェン発熱に対し、経口、静脈いずれの投与法を用いても顕著な抑制作用がある。

発熱試験用のウサギ 横井泰生: 実験動物彙報, 2, 48, 1953, 医学研究用うさぎの品種改良目標を定めるような機会がある場合、今まで気付いている点を、パイロジェン・テストの立場から討論した。

微生物性発熱物質—その生体反応— 横井泰生: 生体の科学, 5, 21, 1953, 細菌とは限らず、かび、酵母にも由来する発熱物質を微生物性発熱物質として、その生体反応を中心に綜説した。引用文献 58.

注射液中の発熱物質と微生物検出との関係 横井泰生, 堀内茂友: 生体の科学, 5, 186, 1954, 製品となつた、ブドウ糖注射液及びリンゲル液 506 ロットにつき発熱物質試験と無菌試験とを行つた結果に統計学的考察を加え、注射液より検出される発熱物質と微生物とは無関係であることを明らかにした。

パイロジェンによる発熱に及ぼす因子 (種族, 環境温度) の検討, 横井泰生: 日本薬理学会関東部会講演 (昭 27. 11. 9), 日本薬理学雑誌, 49, 47§, 1953.

Pseudomonas 菌体成分 T. T. G. を静脈内に注射した場合の発熱とパイロジェン・テスト術式による家兎発熱とを比較した。体温上昇 0.6° に要する量を最小発熱量とすると、人体は家兎に比し約 10 倍の感度を有することになる。室温は 15°~30° の間では 25° のときは体温上昇が最大であつた。

Pharmacological Studies of Some Organic Thiocyanates Yasuo Yokoi: Jap. J. Pharmacol. 3, 99, 1954, In vivo 及び in vitro の実験の結果、有機ロダニ化合物が動物体内で青酸に変化すると推察され、これら化合物の毒性は、游離された青酸に基くものとの結論を得た。

麦角流動エキスの経時変化と安定剤の効果 山ロー孝, 福島清吾, 伊藤みよ子: 薬誌, 73, 1245, 1953, 麦角流動エキスを常温で保存すると急速にそのアルカロイド含量を減少し、21 日で 1/2 量となるが 0~2° で保存すれば 125 日以上を要する。またビタミン C, 塩酸システイン, チオ硫酸ナトリウム及びチオ尿素等 4 種の安定剤はすべて有効で、特にチオ尿素が優れている。

オウバク及びその製剤中のベルベリンの Beckman 光電計による定量 山ロー孝, 太幡利一, 伊藤 宏: 薬誌, 73, 1189, 1953, Beckman 光度計を用い、生薬及び製剤中のベルベリンを簡易正確に定量する方法につき報告し、オウレン及び脱脂オウバクの諸抽出法により得た抽出液の含量は大差を示さなかつた。

高等植物の殺虫性に関する研究 (第 4 報), 白樺油

の殺虫成分について、その2, 1, 2, 7-トリメチルナフタリンの合成 山口一孝, 庄司初枝: 薬誌, 74: 20, 1954, 吾々の実験の結果殺虫成分の一つが, triemthynaphthalene と推定されたので, α -methyl- γ -(*p*-tolyl)-butyric acid を用いて合成し, 比較した。合成は Ruzika 等の方法に準じたが, 反応条件等に若干の知見を得た。

局方粉末生薬の研究 第1報~第10報 下村 孟: 植研, 27, No. 9, No. 10, No. 11, No. 12, 1952; 28, No. 2, No. 4, 1953.

民間粉末産薬の研究: 第1報~第3報, 下村 孟: 植研, 28, No. 7, No. 9, No. 10, 1953. 6局に収載された粉末生薬中10種, 民間で多用の粉末7種の鏡検を行ない, その要素の図解及び記載を行った。尚, また, これら83種について検査した結果, 製剤の偽和物には, モミガラ末, 木材末, 他葉末, 澱粉類その他があることが判明した。

アメリカアリタソウの栽培特に冷涼地における栽培研究 川谷豊彦, 大野忠郎: 薬誌, 72, (11) 1478, 1952, 長野県高冷地, 東北及び北海道に於ける栽培実験の結果, 生育は春日部に比し遅延するが, 収果量及びそのアスカリドール含量は必ずしも劣つていず, むしろ多いものもあつた。

アメリカアリタソウの栽培特に冷地に於ける栽培研究(続報) 川谷豊彦, 大野忠郎: 薬誌, 73, (10), 1044, 1953. 前報同様の実験を更に行い, 同様な結果を得た。

ミブヨモギ 川谷豊彦: (佐々木喬監修) 総合作物学(全六巻) 工芸作物篇, 嗜好料の部薬用の部, 第7章 338~368頁, 378~379頁(昭28). 東京地球出版社, ミブヨモギに関する綜説で, その来歴, 栽培現況, 性状, 類縁植物と *Artemisia maritima* の分類, 用途, 品種, 土質, 繁殖, 本圃, 収穫及び調製, 病虫害とその防除法等について解説した。

アメリカアリタソウ 川谷豊彦, 同上誌, 第8章, 369~378頁(昭28), アメリカアリタソウに関する綜説でその来歴, 栽培現況, 性状, 類縁植物, 用途, 栽培, 製油等について解説した。

コルヒチンによつて育成したロベリアの倍数体 川谷豊彦, 大野忠郎, 遺伝誌, 28, (2), 79, 1953, イヌサフランから抽出した粗製コルヒチンを用い育成したロベリアの二倍体と四倍体とを比較し, 薬用植物の品種改良に人為的染色体倍加を応用することの可能性を示した。

Ammi visnaga Lam. の試作栽培について 川谷

豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎, 久保木懋人, 矢崎達雄, 薬誌, 73, (7), 781, 1953, ドイツ及びウルグアイより輸入した種子について栽培試験を行つた結果, 二年生作物として秋期播種し翌年降霜期迄に収穫するが良く, 繁殖には, 種子により埴に富み且つ排水の良好な土壌を択ぶ必要がある。

Discovery of *Arthemistas* containing 1- β -Santonin 川谷豊彦, 薬誌, 73, (7), 783, 1953, *A. hybrida* Sag (= *A. maritima* L. ssp. *salina* Gams var. *hybrida* Sag) に 1- β -サントニンを含有することを発見し, ミブヨモギの学名を *A. monogyna* とすることの誤りを植物化学的に立証した。

ルチン原料蕎麦の栽培試験(第1報), 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎, 片柳益二郎: 薬誌, 73, (8), 837, 1953, 夏蕎麦及び秋蕎麦共に春秋二回栽培し得, 春期栽培のものがルチンの含量並びに得量が大きく, 特に後者が優れる。韃靼蕎麦のそれは前二者に比し, 必ずしも優れてはいない。

ルチン原料蕎麦の栽培試験(第2報), 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎, 久保木懋人, 青柳喜典, 薬誌, 73, (11), 1185, 1953, 前報同様の試験を行ない, 略前回同様の結果を得たが, 二倍体及び四倍体蕎麦のルチン含量並びに得量は春期栽培のものの方が大きく, 韃靼蕎麦は有用部収果量に於ては, 夏, 秋蕎麦よりも優れていた。

サントニン含有 *Artemisia* 属植物の研究特に其の栽培について(第3報) クラムヨモギについて(その3) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎, 薬誌, 73, (8), 886, 1953, 秋期播種の越冬株について全草収量及びサントニン含量を比較したが, 春期播種のものと大差なく, 秋期播種栽培の可能性を示した。花蕾の発生株の大小とサントニン含量との関係はなく, 馴化により優れた種が得られる。

1- α -及び1- β -サントニンの理化学的並びに投与試験の比較について 川谷豊彦, 久保木懋人, 第6回日本薬学会大会, 第73回日本薬学会年会, 薬剤学部会に於て講演, (昭28. 4. 7,) 同サントニンの溶解度, 光線に対する着色性, 駆虫効果副作用の有無, 尿の変化等につき報告した。詳細は, 日新医学に掲載の予定。

ガラス毛细封管を用いる呈色反応(1) ステロイド系物質について 長沢佳熊, 渡辺俊雄: 日本薬学会東京6月第2例会(昭28. 6. 27)講演。

各種ステロイド系物質について, 硫酸反応, コーペル反応, フルフロール・硫酸反応, リーベルマン・ブチ

ャード反応, サルコウスキイ反応, リフシュツ反応などを行ない, 毛細封管を用い呈色状態の経時変化を観察報告した。

ガラス毛細封管を用いるステロイド系物質の螢光反応について (2) 長沢佳熊, 渡辺俊雄: 日本分析化学会年会 (昭 28. 10. 25) 講演, 硫酸を用いるステロイド系物質の呈色反応はガラス毛細封管を用いると呈色が長時間保たれることが明らかになった。硫酸反応及びベンズアルデヒド・硫酸反応では, ステロイド系物質中, エストラン系, プレグナン系, アンドロスタン系の各々が長時間 (6 ヶ月) 後にも夫々相似性がある。

ジギタリス葉末の検定法に関する研究 (第 1 報) 長沢佳熊, 斎藤十六, 中山豪一, 越村栄之助, 伊藤顕, 芹沢 淳, 佐藤 浩: 日本薬学会東京 10 月第 2 例会 (昭 28. 10. 24) 講演, 本誌本号 21 頁参照, 国際標準品及び半局標準品を用い, 日局標準品の効価を蛙法及び鳩法と比較し, 蛙法では日局標準品は略 10 国際単位, 鳩法では 9.6 米局単位に等しいことを知った。

インシュリンの薬化学的研究 (第 12 報) アブラカレイの Stanius 小体のインシュリン含量について 長沢佳熊, 中山豪一, 池田伝市, 佐藤 浩, 芹沢 淳: 日本薬学会東京 6 月例会 (昭 28. 6. 27) 講演, 本誌本号 7 頁参照, 八戸市で採取した鮮度中程度の Stanius 小体を用い, 長沢法により粗インシュリン粉を製し, マウスのケイレン法により検定し 1mg 中 4.5 単位を含むことを知った。現在の水揚量から計算すると, 需要量の $\frac{1}{3}$ に相当するインシュリンが得られることになる。

インシュリンの薬化学的研究 (第 13 報) マウスのケイレン法によるインシュリンの検定法 長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢 淳: 日本薬学会東京 2 月例会 (昭 29. 2. 13) 講演, 本誌本号 11 頁参照。

マウスのケイレン法によるインシュリンの検定で, 信頼限界 80~125% を満足するには, 1 群 30 匹以上のマウスを用い, 用量比は 2:1.2, 実験温度は, $35^{\circ}\pm 0.5^{\circ}$ とする必要があることを知り, この条件下に於ける実験で満足な結果を得, 本法がインシュリンの予試験として利用出来ることを明らかにした。

卵胞ホルモンの研究 (4) その定量法, その 2, 妊馬尿中のエストロンの比色定量法 長沢佳熊, 越村栄之助, 日本薬学会東京 9 月第 1 例会 (昭 28. 9. 12) 本誌, 7, 1, 1953, 従来の妊馬尿の抽出中, 抽出を免れたエストロンは, 加水分解中に生じる沈澱中に含ま

れることを明らかにし, N/10 水酸化ナトリウム液に沈澱を溶かし, 有機溶媒により定量的に抽出されることを利用し, 一定量法を考案した。

卵胞ホルモンの研究 (5) 妊馬尿からエストロンの簡易製造法 長沢佳熊, 越村栄之助: 日本薬学会東京 9 月第 1 例会 (昭 28. 9. 12) 講演, 本誌本号 37 頁参照, 妊馬尿中に *B. subtilis* の如き菌が発育すると結合型エストロンは加水分解されて遊離し, 他の沈澱と共に器底に析出することを利用し, 尿に必要な薬品, 菌を加え, pH を調節し室温又は 37° に放置して生じた沈澱を, 有機溶媒又は水酸化アルカリで抽出すると簡単で且つ収得量も良い。

卵胞ホルモンの研究 (6) ペーパクロマトグラフィによるエストロンの定量法, その 1 越村栄之助, 岡崎精一, 日本薬学会東京 10 月第 2 例会 (昭 28. 10. 24) 本誌本号 41 頁参照, Pharm. J. 2. に掲載予定。

Bush の方法を用いて発色させた面積をプランメーターで測定すると, エストロン及びエストラジオールの用量対数と発色面積は, 前者では $2.5\sim 80.0\gamma$, 後者では $1.25\gamma\sim 20.0\gamma$ の範囲内で直線関係を示すことを利用し, スタンダード曲線又は 2-2 量検定法により定量出来る。比色定量法では不可能な本 2 ステロイドの分離定量が出来る。

卵胞ホルモンの研究 (7) 幼若白ネズミ子宮重量増加法による卵胞ホルモン及び発情物質の検定, その 1 越村栄之助, 岡崎精一, 黒馬敏子, 日本薬学会東京 12 月第 1 例会 (昭 28. 12. 12) 本誌本号 45 頁参照, 数種の卵胞ホルモン及び合成発情物質を用い, 子宮重量増加法で検定したところ, ある範囲の用量では, ホルモン量の対数と子宮重量とは直線関係を示すが, ホルモン量が多いときには, 反応が, かえって低下することもあることを認めた。

脳下垂体後葉ホルモンの検定 (第 3 報) バソプレッシンの力価検定について 中山豪一, 芹沢 淳, 日本薬学会東京 2 月例会 (昭 29. 2. 13) 講演, 薬誌に発表の予定, 脳髄破壊動物の作り方を述べ, 脳髄破壊犬及び猫に並びに麻酔犬を用い, 日局標準品について米局 XIV 法及び 2-2 量検定を行った。用量 0.025~0.2mg 間では, 脳髄破壊犬を用いた際の用量-反応線は直線となった。

生物検定 (Bioassay) について 長沢佳熊, 第 27 回日本細菌学会総会 (昭 29. 4. 7) 講演, 各種ホルモン剤の検定上の信頼限界をのべ, この限界に到達するに要する動物数を論じ, 更にマウスのケイレン法によるインシュリンの検定及び蛙法によるジギタリスの

2・2用量検定, 3・3用量検定例を述べた。なお, 子宮重量及び卵巣重量の分布状態を論じた。

オキシム, セミカルバゾン類に対する2,4-ジニトロフェニールヒドラチン反応の応用(第1報)ペリラルチン, ニトロフラゾン, チオアセタゾンの定性及び定量分析 長沢佳熊, 大熊誠一: 日本薬学会東京12月例会講演(昭28. 12. 12) 薬誌, 74, 410. 1954, ペリラルデヒドオキシムに2,4-ジニトロフェニールヒドラチンを作用させると, ペリラルデヒド2,4-ジニトロフェニールヒドラゾン及びヒドロキシルアミンが生成することを確認, 定性及び定量分析に応用した。ニトロフラゾン, チオアセタゾンも同様な関係に

あることを確認し, 分析に応用した。

ペンタシアノ鉄錯塩によるチオ尿素及びチオセミカルバチドの一新呈色反応及び Sato 反応の訂正 大熊誠一: 薬誌, 74, 220, 1954, 本誌, 71, 172, 1953に一部抄録, ペンタシアノ鉄錯塩及びヒドロキシルアミンにより水酸化ナトリウム, アルカリ性下でチオ尿素, チオセミカルバチドは特異的に赤紫色を呈する。黄血塩がチオ尿素と緑~青色又は赤色を呈すると云う Sato 反応は誤りで, この反応は, 黄血塩の光分解により生成した $K_3[Fe(CN)_5H_2O]$ によるものであることを, 呈色反応及びペーパクロマトグラフィにより証明した。

国家検定，国家検査等の試験成績報告

総合調整部

昭和28年における当所の試験，検査の状況を報告する。本年度において従来の特定医薬品検定規則が廃止となり薬事法施行令第三条の規定により昭和28年9月1日より引続き検定を行うことになった。なお本年にスルファチアゾール及び同錠等7品目が国家検定より除外され，新たに4-エチルスルフォニールベンズアルデヒドチオセミカルバゾンが追加され合計22品目（昨年末29品目）となった。製品検査に於ては過酸化ベンゾイル製剤及び繊維素グリコール酸製剤が追加指定され計6品目となった。全般的に見て本年の総件数は22,259件と昨年の17,778件に比し増加を示している。

衛生試験所に於ける検査の状況（昭和⁸29年）

品名	試験機関				合計
	東京	大阪	小樽	門司	
国家検定	1,695	251	—	—	1,946
国家検査	6,597	2,608	—	—	9,205
製品検査	3,520	2,710	—	—	6,230
輸出検査(薬)	258	30	—	—	288
輸出検査(食)	78	158	170	163	569
輸入検査(薬)	158	116	—	—	274
輸入検査(食)	499	1,147	57	238	1,941
一般依頼試験	608	194	—	—	802
特行試験	717	—	—	—	717
特需試験	236	51	—	—	287
合計	14,366	7,265	227	401	22,259

国 家 検

品名			1			2			3			4			5			6	
			計	試験 落	不適	計	試験 落	不適	計	試験 落	不適	計	試験 落	不適	計	試験 落	不適	計	試験 落
脱脂綿	東京大阪	74 43	72 43	2	46 67	43 67	3	77 81	75 76	2 5	29 112	29 102	— 10	55 67	54 64	1 3	90 76	88 74	
衛生家庭綿	東京大阪	8 2	8 2	—	8 3	8 3	—	13 2	13 1	— 1	5 2	5 2	—	8 2	8 2	—	15 —	15 —	
ガーゼ	東京大阪	18 8	16 8	2	14 10	11 10	3	18 9	16 9	2	9 13	9 13	—	15 4	15 4	—	19 11	17 11	
歯科材料	東京大阪	33	33	—	17	16	1	39	38	1	32	31	1	36	36	—	53	48	
注射筒	東京大阪	42	41	1	51	50	1	73	69	4	51	50	1	68	65	3	51	49	
注射針	東京大阪	57	54	3	68	67	1	54	54	—	66	65	1	57	57	—	78	78	
縫合針	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
縫合糸羊腸線	東京大阪	3	3	—	6	6	—	6	6	—	10	10	—	3	3	—	14	12	
コンドーム	東京大阪	16	16	—	21	20	1	20	17	3	26	26	—	22	20	2	24	20	
ビタミンB ₁ 注射液	東京大阪	42 37	42 37	—	45 89	45 89	—	61 55	58 55	3	46 61	44 60	2 1	51 53	51 52	— 1	66 47	61 46	
ビタミンC注射液	東京大阪	— 7	— 7	—	17 4	17 4	—	12 6	12 6	—	8 7	8 7	—	3 1	3 1	—	25 22	25 22	
薬用炭	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
オキシドール	東京大阪	14 13	14 13	—	13 10	13 10	—	14 15	14 15	—	20 11	20 11	—	31 10	31 10	—	40 12	40 12	
マーキュロクローム	東京大阪	6	6	—	5	5	—	5	4	1	8	3	5	10	7	3	5	2	
エーテル	東京大阪	1	1	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—	2	2	—	1	1	
麻酔用エーテル	東京大阪	1	1	—	1	—	1	2	1	1	1	1	—	3	3	—	1	1	
アセチルサリチル酸	東京大阪	10 4	10 4	—	10 4	10 4	—	6 2	6 2	—	10 3	10 3	—	4 1	4 1	—	7 2	7 2	
クレゾール石鹼液	東京大阪	41 10	27 10	14	31 14	28 14	3	36 26	32 24	4 2	49 20	46 20	3	63 20	63 19	— 1	52 28	51 27	
DDT	東京大阪	16	16	—	31	31	—	36	36	—	75	75	—	84	84	—	88	88	
タシニン酸アルブミン	東京大阪	—	—	—	3	3	—	4	4	—	3	3	—	11 1	9 1	2	13 3	13 3	
カフェイン	東京大阪	9 1	9 1	—	11 1	11 1	—	11	11	—	10 1	10 1	—	9 1	9 1	—	11 2	11 2	
安息香酸ナトリウム	東京大阪	10	10	—	6	6	—	9	8	1	7	7	—	8 2	6 2	2	7 5	5 4	
サリチル酸ナトリウム	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
カフェイン	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
サリチル酸ナトリウム	東京大阪	2	2	—	2	2	—	4	4	—	4	4	—	3	3	—	4	4	
テオブロミン	東京大阪	—	—	—	2	—	2	3	3	—	1	1	—	5	5	—	—	—	
塩酸エフエドリン	東京大阪	5 2	5 2	—	6 3	6 3	—	7 2	7 2	—	5 3	5 3	—	3 2	3 2	—	4 1	4 1	
ブロムワレリル尿素	東京大阪	5 3	5 3	—	6 9	6 9	—	8 10	8 10	—	5 13	5 13	—	3 7	3 7	—	9 8	9 8	
ブロムヂエチル尿素	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
杏仁水	東京大阪	14 1	14 1	—	1 5	1 5	—	4 5	4 5	—	6 4	6 4	—	1 6	1 6	—	3	3	
ホミカチンキ	東京大阪	—	—	—	—	—	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ホミカエキス	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
バクカク流エキス	東京大阪	2	2	—	1 1	1 1	—	2	2	—	—	—	—	2	2	—	1	1	
合計	東京大阪	429 131	407 131	22	418 228	404 226	14 2	522 222	500 214	22 8	486 252	473 241	13 11	555 182	542 177	13 5	677 224	649 219	

査 成 績 (昭和28年)																					
7			8			9			10			11			12			合 計			
不 適	計	試 驗 落	不 適	計	試 驗 落	不 適	計	試 驗 落	不 適	計	試 驗 落	不 適	計	試 驗 落	不 適	計	試 驗 落	不 適	計	試 驗 落	不 適
2 2	61 67	60 65	1 2	57 94	54 93	3 1	61 81	57 81	4 —	73 85	66 84	7 1	59 72	59 67	— 5	71 117	67 113	4 4	753 962	724 929	29 33
—	8 2	8 2	—	9 4	9 4	—	10 2	10 2	—	10 2	10 2	—	11 1	11 1	—	7 3	7 3	—	112 25	112 24	— 1
2	14 8	14 8	—	17 9	16 9	1 —	10 7	6 30	4 7	16 10	15 10	—	23 9	22 9	1 —	21 8	21 8	—	194 106	178 106	16 —
5	42	42	—	36	36	—	32	30	2	34	33	1	36	36	—	41	41	—	431	420	11
2	53	52	1	108	102	6	98	91	7	125	116	9	73	69	4	72	69	3	865	823	42
—	100	99	1	99	99	—	137	136	1	78	77	1	111	111	—	132	132	—	1,037	1,029	8
—	—	—	—	—	—	—	11	11	—	13	13	—	7	7	—	6	6	—	37	37	—
2	—	—	—	16	16	—	16	10	6	6	6	—	3	2	1	4	4	—	87	78	9
4	24	17	7	21	18	3	20	19	1	24	19	5	16	12	4	16	12	4	250	216	34
5 1	40 34	38 33	2 1	22 33	20 33	2	30 23	30 23	—	36 61	34 59	2 2	45 41	43 41	2	44 51	38 51	6	528 585	504 579	24 6
—	23 9	23 9	—	19 10	19 10	—	16 8	16 8	—	10 14	10 14	—	13 12	13 11	— 1	7 12	7 12	—	153 112	153 111	— 1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	53 16	52 16	1	47 18	47 18	—	24 13	24 12	— 1	31 16	31 16	—	31 14	31 14	—	18 14	18 14	—	336 162	335 161	1 1
3	3	3	—	3	1	2	3	2	1	2	2	—	3	3	—	5	5	—	58 2	43 2	15
—	2	2	—	2	2	—	2	2	—	1	1	—	3	3	—	1	1	—	18	18	—
—	3	3	—	1	1	—	1	1	—	2	2	—	2	2	—	2	2	—	20	18	2
—	5 6	5 6	—	8 2	8 2	—	5 2	5 2	—	11 9	11 9	—	8 4	8 4	—	3 3	3 3	—	87 42	87 42	—
1 1	67 49	67 49	—	75 30	75 30	—	49 17	48 14	1 3	46 24	45 21	1 3	50 18	48 18	2	36 18	36 17	— 1	595 274	566 263	29 11
—	70	70	—	47	47	—	31	31	—	18	18	—	9 13	9 13	—	10 6	10 6	—	515 23	515 23	—
—	12 3	9 3	3	7 3	7 3	—	8	7	1	5 5	4 5	1	4 1	3 1	1	6 3	6 2	— 1	73 23	65 22	8 1
—	14	14	—	6 2	6 2	—	7 1	7 1	—	12 1	12 1	—	13 —	13 —	—	10 —	10 —	—	123 10	123 10	—
2 1	5 7	4 6	1 1	11 2	11 1	— 1	5 4	5 4	1 —	9 6	9 6	—	6 5	5 5	1 —	10 3	10 3	—	93 40	85 37	8 3
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	3 1	2 1	1	6 1	6 1	—	— 1	— 1	—	6 —	6 —	—	2 1	2 1	—	5 —	5 —	—	41 15	40 13	1 2
—	3	3	—	2	2	—	7	7	—	9	9	—	7	7	—	3	3	—	61	61	—
—	2	2	—	4	4	—	2	2	—	4	4	—	4	4	—	3	3	—	35	35	—
—	5	5	—	2	2	—	7	7	—	8	8	—	5	5	—	3	3	—	66	66	—
—	5	5	—	12	12	—	10	10	—	14	14	—	11	11	—	9	9	—	101	101	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	1	—
—	7	7	—	2	2	—	—	—	—	3	3	—	1	1	—	6	6	—	45 79	45 79	—
—	—	—	—	4	4	—	8	8	—	9	9	—	8	8	—	26	26	—	—	—	—
—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	5	5	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	2	1	1	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	3	2	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	1	1	—	3	3	—	2	2	—	3	3	—	2	2	—	17 4	17 4	—
28 5	617 212	599 207	18 5	624 229	607 227	17 2	593 179	564 175	29 4	590 267	562 261	28 6	544 214	528 208	16 6	542 277	525 271	17 6	6,597 2,608	6,370 2,549	227 59

国 家 検

品 名	月 別 種 別 検査機関	1			2			3			4			5			6	
		計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格
インシュリン注射液	東京 大阪	1 —	1 —	— —	2 —	2 —	— —	2 —	2 —	— —	3 —	3 —	— —	4 —	4 —	— —	2 —	2 —
プロタミン亜鉛 インシュリン注射液	東京 大阪	1 —	1 —	— —	1 —	1 —	— —	— —	— —	— —	2 —	2 —	— —	1 —	1 —	— —	2 —	2 —
脳下垂体後葉注射液	東京 大阪	2 —	2 —	— —	7 —	7 —	— —	4 —	4 —	— —	3 —	3 —	— —	6 —	6 —	— —	3 —	3 —
スルファチアゾール	東京 大阪	26 4	26 4	— —	22 3	22 3	— —	19 7	19 7	— —	22 5	22 5	— —	20 7	20 7	— —	14 1	14 1
スルファチアゾール錠	東京 大阪	5 2	5 2	— —	9 3	9 3	— —	7 1	7 1	— —	5 4	5 4	— —	3 —	3 —	— —	2 2	2 2
次サリチル酸普鉛注射液	東京 大阪	— —	— —	— —	1 —	1 —	— —	— —	— —	— —	1 —	1 —	— —	1 1	1 1	— —	1 —	1 —
塩酸オキソフェナルシン	東京 大阪	1 —	1 —	— —	— 1	— 1	— —	2 1	2 1	— —	1 —	— 1	— —	1 —	— 1	— —	— —	— —
注 射 用 塩 酸 オキソフェナルシン	東京 大阪	1 —	1 —	— —	1 1	1 1	— —	— —	— —	— —	1 —	1 —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
ヘキシールレゾルシン	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	1 —	1 —	— —	— —	— —	— —	3 —	3 —
ヘキシールレゾルシン丸	東京 大阪	4 —	2 —	2 —	3 —	3 —	— —	3 —	3 —	— —	3 —	3 —	— —	2 —	2 —	— —	3 —	3 —
避妊薬(ゼリー)	東京 大阪	15 —	15 —	— —	15 —	15 —	— —	14 —	13 —	1 —	11 —	10 —	1 —	7 —	7 —	— —	9 —	8 —
〃 (錠 剤)	東京 大阪	3 —	3 —	— —	2 —	2 —	— —	3 —	3 —	— —	5 —	5 —	— —	4 —	4 —	— —	2 —	2 —
〃 (クリム)	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
〃 (坐 剤)	東京 大阪	— —	— —	— —	1 —	1 —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
〃 (親水性坐剤)	東京 大阪	2 —	2 —	— —	3 —	3 —	— —	2 —	2 —	— —	1 —	1 —	— —	1 —	1 —	— —	1 —	1 —
〃 (泡発性粉剤)	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
〃 (泡発性坐剤)	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
イソアミルレゾルシン	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
イソアミルレゾルシン丸	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
ブドウ糖注射液	東京 大阪	61 —	60 —	1 —	43 —	43 —	— —	53 —	52 —	1 —	49 —	49 —	— —	73 —	71 —	2 —	70 —	68 —
リンゲル液	東京 大阪	17 —	16 —	1 —	17 —	17 —	— —	22 —	20 —	2 —	21 —	18 —	3 —	20 —	19 —	1 —	27 —	25 —
ロック液	東京 大阪	— —	— —	— —	1 —	1 —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
果糖注射液	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
転化糖注射液	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
イソニコチン酸 ヒドラジ	東京 大阪	6 15	6 15	— —	14 9	14 9	— —	16 11	16 11	— —	6 6	6 6	— —	2 7	2 7	— —	8 4	8 4
イソニコチン酸 ヒドラジ錠	東京 大阪	5 3	5 3	— —	3 6	3 6	— —	7 5	7 5	— —	5 1	5 1	— —	3 2	3 2	— —	— 1	— 1
チオアセタゾン	東京 大阪	7 11	7 11	— —	6 11	6 10	— 1	4 9	4 9	— —	1 3	1 3	— —	2 3	2 3	— —	1 —	1 —
チオアセタゾン錠	東京 大阪	1 3	1 3	— —	2 3	2 3	— —	10 11	9 11	1 —	2 —	2 —	— —	2 1	2 1	— —	— —	— —
チオアセタゾン散	東京 大阪	2 1	2 1	— —	— 4	— 4	— —	2 1	2 1	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
合 計	東京 大阪	160 39	156 39	4 —	153 41	153 40	— 1	169 47	164 47	5 —	143 19	138 19	— —	5 21	152 21	149 21	3 12	144 12

定 成 績 (昭和28年)

不 合 格	7			8			9			10			11			12			合 計		
	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格
—	4	4	—	5	4	1	4	4	—	3	3	—	4	4	—	7	6	1	41	39	2
—	1	1	—	1	1	—	2	2	—	3	3	—	1	1	—	—	—	—	15	15	—
—	4	4	—	4	4	—	1	1	—	1	1	—	2	2	—	4	3	1	41	40	1
—	20	20	—	37	37	—	4	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	174	174	—
—	5	5	—	3	3	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	36	36	—
—	3	3	—	9	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43	43	—
—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14	14	—
—	—	—	—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	4	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—
—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—
—	5	5	—	—	—	—	1	1	—	2	2	—	4	4	—	2	2	—	32	30	2
—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
1	17	16	1	9	9	—	6	6	—	11	11	—	12	12	—	19	19	—	145	141	4
—	5	5	—	9	9	—	4	4	—	4	4	—	2	2	—	2	2	—	45	45	—
—	1	—	1	—	—	—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	3	2	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	2	2	—
—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—	14	14	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	58	57	1	61	60	1	62	57	5	56	53	3	56	55	1	65	64	1	707	689	18
2	28	26	2	25	20	5	22	20	2	22	19	3	20	19	1	34	32	2	275	251	24
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	1	—	—	—	—	3	2	1
—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	1	1	—	1	1	—	4	4	—	3	3	—	3	3	—	1	1	—	65	65	—
—	4	4	—	5	5	—	4	4	—	9	9	—	6	6	—	10	10	—	90	90	—
—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	26	26	—
—	3	3	—	2	2	—	2	2	—	3	3	—	2	2	—	4	4	—	34	34	—
—	1	1	—	—	—	—	2	2	—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	26	26	—
—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	39	39	—
—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	18	17	1
—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	19	19	—
—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	6	—
5	153	148	5	153	145	8	115	108	7	110	103	7	109	107	2	134	129	5	1,695	1,639	56
—	15	15	—	14	14	—	9	9	—	12	12	—	8	8	—	14	14	—	251	250	1

製 品 検 査 成 績 (昭和28年)

月 別	品 名 種 別 検査機関	色 素			サッカリン			ヅルチン			ニトロ フラゾン			ニトロ フロン			過酸化ベ ンゾイル			纖維素 リコーダ 酸ソーダ			合 計		
		計	合 格	不 合格	計	合 格	不 合格	計	合 格	不 合格	計	合 格	不 合格	計	合 格	不 合格	計	合 格	不 合格	計	合 格	不 合格	計	合 格	不 合格
1 月	東京 大阪	13 64	13 64	—	20 1	20 1	—	7 2	7 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	40 67	40 67	—
2 月	東京 大阪	16 62	15 61	1 1	29 8	29 8	—	10 12	9 12	1 —	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	55 82	53 81	2 1
3 月	東京 大阪	42 60	40 59	2 1	16 36	16 36	—	8 25	8 25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	66 121	64 120	2 1
4 月	東京 大阪	25 65	25 65	—	15 10	15 10	—	12 3	12 3	—	—	—	—	5 5	—	—	—	—	—	—	—	—	52 83	52 83	—
5 月	東京 大阪	23 71	23 67	— 4	14 47	13 47	1 —	10 5	10 5	—	—	—	—	3 3	—	—	63 —	63 —	—	—	—	—	110 126	109 122	1 4
6 月	東京 大阪	13 61	13 61	—	22 31	22 31	—	17 15	17 15	—	—	—	—	—	—	—	139 —	139 —	—	—	—	—	191 107	191 107	—
7 月	東京 大阪	24 109	24 106	— 3	29 174	29 174	—	20 133	20 133	—	—	—	—	5 5	—	—	116 —	116 —	—	—	—	—	189 421	189 418	— 3
8 月	東京 大阪	19 98	18 98	1 —	162 233	157 231	5 2	55 161	51 161	—	—	—	—	7 7	—	—	220 —	220 —	—	—	—	—	456 499	450 497	6 2
9 月	東京 大阪	58 152	57 150	1 2	438 57	426 57	12 —	54 72	51 71	3 1	—	—	—	4 4	—	—	386 —	386 —	—	1 —	1 —	—	937 285	921 283	16 2
10 月	東京 大阪	50 190	49 190	1 —	285 64	283 64	2 —	74 76	72 76	2 —	—	—	—	—	—	—	198 —	198 —	—	12 —	12 —	—	619 330	614 330	5 —
11 月	東京 大阪	29 121	28 119	1 2	152 33	152 33	—	46 65	44 65	2 —	—	—	—	—	—	—	154 —	154 —	—	2 —	2 —	—	383 219	380 217	3 2
12 月	東京 大阪	53 225	49 223	4 2	133 73	132 73	1 —	45 72	42 72	3 —	—	—	—	—	—	—	181 —	181 —	—	—	—	—	412 370	404 368	8 2
計	東京 大阪	365 1278	354 1263	11 15	1315 767	1294 765	21 2	358 641	347 640	11 1	—	—	—	24 24	—	—	1457 —	1457 —	—	15 —	15 —	—	3520 2710	3477 2692	43 18