

No. 73.

September 1955

BULLETIN  
OF THE NATIONAL  
HYGIENIC LABORATORY

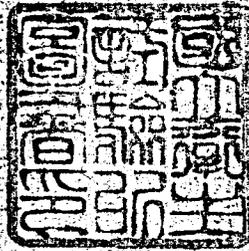
Yôga, Setagayaku, Tokyo, Japan.

---

衛生試験所報告

第七十三号

昭和三十年九月



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

インシュリンの薬化学的研究 (第16報) アイソフェンインシュリンの試製について……………	長沢佳熊, 三橋謙一…………… 1
インシュリンの薬化学的研究 (第17報) 日局インシュリン標準品の力価検定について……………	長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤 浩, 白井浄二…………… 7
卵胞ホルモンの研究 (第8報) ペーパクロマトグラムの面積測定法による妊馬尿及び雄馬尿中のエスト ロン, エストラジオールの定量……………	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一…………… 11
卵胞ホルモンの研究 (第9報) 幼若白鼠の子宮重量法による卵胞ホルモン及び発情物質の検定(その2) 2-2用量検定法によるパニシングクリーム中のエストロンの定量……………	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一…………… 17
卵胞ホルモンの研究 (第10報) $\alpha$ -dl-cis メチルビスデヒドロドアジール酸の呈色反応について……………	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一…………… 21
性腺刺戟ホルモンの研究 (第2報) 白鼠卵巣重量増加法による妊馬血清性腺刺戟ホルモンの検定……………	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一…………… 25
脳下垂体後葉注射液のアゾトメトリーによる窒素定量及びホルモンの純度について……………	長沢佳熊, 竹中祐典…………… 29
国立衛生試験所標準品中ステロイド系物質の物理化学的恒数の測定値について (資料) ……………	長沢佳熊, 渡辺俊雄…………… 33
国立衛生試験所標準品中ステロイド系物質の紫外線吸収について (資料) ……………	長沢佳熊, 渡辺俊雄, 太幡利一…………… 37
ジギタリスの検定 (第2報) 冬眠カエルによるジギタリス葉末の検定及び LD50 の季節的変動について ……………	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢 淳…………… 43
アヘンアルカロイドのペーパクロマトグラフィによる定量 (第1報) 塩酸モルヒネの定量……………	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一…………… 53
濾紙クロマトグラフィによるアヘン中のモルヒネ定量について (其の1) ……………	朝比奈晴世, 大野昌子…………… 59
アヘン産地鑑別法について (第7報) "Porphyroxine-Meconidine" の比色定量 (その2) ……………	朝比奈晴世, 水町彰吾…………… 63
日本産アヘンのモルヒネ含量について (資料) ……………	朝比奈晴世, 大野昌子, 水町彰吾, 志内賢彦…………… 65
国際連合寄贈アヘン中のモルヒネ, コデイン含量 (資料) ……………	朝比奈晴世, 志内賢彦…………… 67
メチオニン製剤中のメチオニンの化学的定量法 (I) ……………	平岡栄一…………… 69
メチオニン製剤中のメチオニンの化学的定量法 (II) ……………	平岡栄一, 中路幸男…………… 75
メチオニン製剤中のメチオニンの化学的定量法 (III) ……………	平岡栄一, 中路幸男, 小川俊太郎…………… 79
混合ビタミン剤のマイクロバイオアッセイ……………	新村寿夫, 新村和枝…………… 81
ビタミンCの存在に於けるビタミンB <sub>1</sub> の比色定量法……………	小川俊太郎, 南原精一…………… 89
融点標準品について (資料) ……………	長沢佳熊, 鹿島 哲, 西崎笹夫…………… 93
非水溶液滴定による医薬品の定量 (第12報) 氷酢酸を溶媒とする局方医薬品の定量……………	鹿島 哲…………… 103
アゾトメトリーの研究 (第1報) セミカルバチツトの定量……………	川城 巖, 細貝祐太郎…………… 109
覚せいアミン剤の検出法 (第1報) Phenylmethylaminopropane, Phenylaminopropane, Ephedrine, 若干のアミン及びアミノ酸類の呈色反応について……………	長沢佳熊, 大熊誠一…………… 113
覚せい剤及びその類似化合物の識別について……………	板井孝信, 井下田 浩, 神谷庄造, 石垣和子…………… 127
バルビツール酸類の定量法 (第1報) 中和滴定法, 硝酸銀滴定法並びに紫外部分光分析法 (その1) ……………	板井孝信, 大場琢磨…………… 131

(2)

パルピツール酸類の定量法 (第2報) 非水溶液滴定法 (その1) .....板井孝信, 佐子 茂... 137  
 逆性石鹼について (I) 燐タンゲステン酸による定量.....吉村 淳, 守田 実... 141  
 マーキュロクロム中の不溶性水銀の定量 (セレン硫化物の分析的応用) .....北川純男, 八木諒子... 145  
 タンニン酸アルブミンに対する含糖ペプシンの消化能.....  
 .....喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 伊藤西一, 遠藤 勝... 147  
 γ-B. H. C. 及び D. D. T. 水和剤の懸垂液に於ける沈降率の研究 .....藤井正道, 佐藤 寿... 151  
 湿度が歯科用石膏の機械的性質に及ぼす影響について.....藤井正道, 堀部 隆, 亀田 務... 159  
 化粧品規格検査法について (第4報) 米国法定色素に該当する国産タール色素の品質試験成績につい  
 て (資料) .....市川重春, 南城 実... 165  
 化粧品規格検査法について (第5報) 粉白粉中の無機性常成分の定量法について.....  
 .....市川重春, 汐見 信... 169  
 局方ケイ酸アルミニウムの試験法について 附 合成ケイ酸アルミニウムの試製.....市川重春, 山手 昇... 179  
 昭和29年度新潟県産米の放射能汚染に関する研究.....長沢佳熊, 川城 巖, 河村正一, 竹中祐典, 西崎笹夫... 187  
 蛍光法による米粉中のチトリニンの定量.....川城 巖, 田辺弘也, 竹内末久, 西村千昭... 191  
 病変米の解剖的所見.....下村 孟, 西本和光... 197  
 水, 野菜, 果実等のパラチオン試験法 (第2報) .....川城 巖, 福沢富美, 江島 昭... 201  
 植物体中のベストツクス-3の残留試験.....川城 巖, 藤井清次, 林 敏夫, 江島 昭, 加藤三郎... 205  
 法定半田及び高鉛半田を使用した罐詰の内容食品に移行する鉛量について.....  
 .....川城 巖, 藤井清次, 原田基夫... 213  
 ソルビン酸の食品保存効果について (第1報) .....川田公平, 磯田由子... 223  
 防腐剤の雑糸状菌発育阻止効果について.....浦久保五郎... 231  
 食品防腐剤に関する研究 (I) 特にパラオキシ安息香酸ベンゼールエステルと各種防腐剤との抗菌性の  
 比較.....石関忠一, 青山好作, 八田貞義, 藤田洋一, 小田幸子, 浦部幹雄... 237  
 ストレプトドルナーゼ (溶連菌デスオキシリボ核酸分解酵素) の作用に関する研究.....  
 .....朝比奈正人, 岡 万千子... 245  
 医薬品の副作用についての免疫学的実験.....浦久保五郎... 251  
 X線照射のマウス, ラツテに及ぼす作用についての細菌学的研究.....  
 .....山地幸雄, 田中弘子, 八田貞義, 山内 信, 恵畑欣一... 253  
 分離赤痢菌のスルファ剤感受性.....越沼きみえ, 岩原繁雄, 大淵令子... 263  
 赤痢菌の Phage Typing に関する研究 (第1報) .....岩原繁雄, 越沼きみえ, 大淵令子... 265  
*Claviceps purpurea* TUL に対する普通小麦の抵抗性の品種間差異とアルカロイド含量.....川谷豊彦... 269  
 土壌水分がレモンガラスの生育並に含油量に及ぼす影響.....宮崎幸男, 高城正勝... 277  
 レモンガラスの生育並に含油量の時期的変化 (第1報) 植付初年度の成績.....宮崎幸男, 高城正勝... 289  
 有用植物目録 (資料) .....宮崎幸男, 高城正勝... 305  
 医学的応用を目的とする各種金属の生体内移入に関する実験的観察.....藤井正道... 311  
 濾紙クロマトグラフィによるタール色素分析法の研究.....藤井清次... 335

速 報

アゾトメトリーの研究 (第2報) 含窒素ビタミン類の定量.....細貝祐太郎... 377  
 陽性石鹼と各種消毒薬及び化学療法剤との併用効果について.....  
 .....八田貞義, 青山好作, 栗栖弘光, 宮沢文雄, 藤田洋一, 浦部幹雄... 378  
 オーレオマイシン (Chlortetracycline), アクロマイシン (Tetracycline) 及びパラオキシ安息香酸エス  
 テルの *Candida* に対する作用 .....山地幸雄, 田中弘子, 八田貞義, 山内 信... 379  
 ヨーグルト製造の失敗原因について.....山地幸雄, 田中弘子, 八田貞義, 山内 信... 380

抄 録

業務報告 (昭和29年1月~12月) .....総合調整部... 391

## CONTENTS

On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No. 16) On the Preparation of Crystalline Protamine Insulin (Isophane Insulin; NPH Insulin).....Kakuma NAGASAWA and Kenichi MITSUHASHI .....	1
On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No. 17) The Assay of the Japanese Pharmacopoeia Insulin Standard (1954).....Kakuma NAGASAWA, Gōichi NAKAYAMA, Hiroshi SATO and Jōji SHIRAI .....	7
Studies on Follicular Hormones VIII Quantitative Analysis of Estrone and Estradiol in Pregnant Mare and Stallion Urine by Paper Chromatography Measuring the Area of Coloured Spot.....Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI.....	11
Studies on Follicular Hormones IX Quantitative Analysis of Follicular Hormones and Synthetic Estrogens by Rat Uterine Increasing Method (2) Quantitative Analysis of Estrone in Vanishing Cream by the Two and Two Dose Assay method.....Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI .....	17
Studies on Follicular Hormones X A Colour Reaction of $\alpha$ -dl-cis- methylbisdehydrodoisynolic Acid.....Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI .....	21
Studies on Gonadotrophic Hormones II An Assay of Serum Gonadotrophin Rat Ovarium Increasing Method.....Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI.....	25
Nitrogen Determination of Posterior Pituitary Injections and on the Purity of the Hormones .....	29
On Physical and Chemical Constant Values of Reference Standard of Steroids.....Kakuma NAGASAWA and Toshio WATANABE.....	33
On Ultra-violet Absorbancy of Reference Standard of Steroids.....Kakuma NAGASAWA, Toshio WATANABE and Toshikazu TABATA .....	37
On Digitalis Assay Assay of Digitalis Leaf by Hibernating Frog and Seasonal Variation of LD50.....Kakuma NAGASAWA, Gōichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA .....	43
Quantitative Analysis of Opium Alkaloids by Paper Chromatography I Morphine Hydrochloride.....Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI .....	53
Quantitative Determination of Morphine in Opium by Paper Chromatography I.....Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO.....	59
Research on the Methods of Determining the Origin of Opium VII The Colorimetric Determination of "Porphyroxine-Meconidine" (2).....Haruyo ASAHINA and Shōgo MIZUMACHI.....	63
Morphine Content in Japanese Opium..... Haruyo ASAHINA, Masako ŌNO, Shōgo MIZUMACHI and Yoshihiko SHIUCHI.....	65
Morphine and Codeine Contents in Opium Samples Received from the United Nations.....Haruyo ASAHINA and Yoshihiko SHIUCHI .....	67
Chemical Determination of Methionine in the Commercial Methionine Preparations (I)..... Eiichi HIRAOKA.....	69
Chemical Determination of Methionine in the Commercial Methionine Preparations(II)..... Eiichi HIRAOKA and Yukio NAKAZI.....	75
Chemical Determination of Methionine in the Commercial Methionine Preparations (III)..... Eiichi HIRAOKA, Yukio NAKAZI and Shuntaro OGAWA.....	79
Microbiological Assay of Multiple Vitamin Preparations.....Tosio NIHMURA and Kazue NIHMURA.....	81

(4)

On the Colorimetric Assay of Vitamin B <sub>1</sub> in Presence of Ascorbic Acid.....Shuntaro OGAWA and Seiichi NAMBARU.....	89
Reference Standards for Determining Melting Points.....Kakuma NAGASAWA, Tetsu KASHIMA and Sasao NISHIZAKI.....	93
Titration in Nonaqueous Solutions of Drugs and Chemicals XII Determination of Pharmaceuticals of J. P. VI in Anhydrous Acetic Acid..... Tetsu KASHIMA.....	103
Studies on Azotometry (No. I) On the Determination of Semicarbazide.....Iwao KAWASHIRO and Yūtarō HOSOGAI.....	109
Detection of Some Nerve Stimulants I Color Reactions of Phenylmethylaminopropane, Phenylaminopropane, Ephedrine, Some Amines and Amino Acids.....Kakuma NAGASAWA and Seiichi OHKUMA.....	113
On the Detection and Identification of Amphetamine and its Analogs.....Takanobu ITAI, Hiroshi IGETA, Shōzo KAMIYA and Kazuko ISHIGAKI.....	127
The Assay Methods of Barbiturates I.....Takanobu ITAI and Takuma ŌBA.....	131
The Assay Method of Barbiturates II Titration in Nonaqueous Solution.....Takanobu ITAI and Shigeru SAKO.....	137
Studies on Invert Soaps (1) Gravimetric Determination with Phosphotungstic Acid..... Kiyoshi YOSHIMURA and Minoru MORITA.....	141
Determination of Metallic Mercury in Mercurochrome.....Sumio KITAGAWA and Syunko YAGI.....	145
Studies on the Digestive Power of Saccharated Pepsin to Albumin Tannate.....Ichirōemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Yūichi ITO and Masaru ENDO.....	147
Studies on Sedimentations of Aqueous Suspensions of the Wettable Powders Containing $\gamma$ -B. H. C. or D. D. T. ....Masamichi FUJII and Hisashi SATO.....	151
Effect of Humidity on the Physical Properties of Dental Gypsum.....Masamichi FUJII, Takashi HORIBE and Tsutomu KAMEDA.....	159
Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (IV) On the Result of Examination of Japanese Tar-Dyes Corresponding to the Legally Permitted Tar-Dyes of U. S. A. ....Shigeharu ICHIKAWA and Minoru NANJŌ.....	165
Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (V) On the Determination of Inorganic Constituents in Face Powder.....Shigeharu ICHIKAWA and Shin SHIOMI.....	169
On the Improvements of the Tests for Natural and Synthetic Aluminium Silicate in J. P. VI; and on the Preparation of Aluminium Silicate.....Shigeharu ICHIKAWA and Noboru YAMATE.....	179
Radiochemical Studies on Radiocontaminated Rice Cropped in Niigata Prefecture in 1954..... Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Shōichi KAWAMURA, Yūsuke TAKENAKA and Sasao NISHIZAKI.....	187
Determination of Citrinin Contained in Rice by Fluorometry.....Iwao KAWASHIRO, Hiroya TANABE, Hidenaga TAKEUCHI and Chiaki NISHIMURA.....	191
Microscopical Anatomy of Deteriorated Rice.....Tsutomu SHIMOMURA and Kazumitsu NISHIMOTO.....	197
Examination of Parathion in Water, Vegetables, Fruits, etc. (No. 2) .....Iwao KAWASHIRO, Fumi FUKUZAWA and Akira EJIMA.....	201
Determination of Residual Pestox-3 in Plants.....Iwao KAWASHIRO, Seiji FUJII, Toshio HAYASHI, Akira EJIMA and Saburo KATO.....	205

Comparison of Lead Contents in Canned Foods in Cases of Using Low-Lead (Recognized by Food Sanitation Law) and High-Lead Solders.....Iwao KAWASHIRO, Seiji FUJII and Motoo HARADA .....	213
Studies on the Effect of Sorbic Acid as a Preservative for Sausage (1).....Kohei KAWATA and Yoshiko ISODA .....	223
Studies on the Growth-inhibiting Effect of Five Fungicidal Drugs against Various Species of Fungi.....Gorō URAKUBO .....	231
Studies on Food Antiseptics (1) Especially on Comparison of Antibacterial Powers of Paraoxybenzoic Acid Benzyl Ester and the Other Various Food Antiseptics.....Tiuichi ISHIZEKI, Kosaku AOYAMA, Sadayoshi HATTA, Yōiti FUJITA, Mikio URABE, and Satiko ODA...	237
Studies on the Action of Streptodornase (Streptococcal Desoxyribonuclease).....Masato ASAHINA and Machiko OKA.....	245
A Immunochemical Experiment on the Allergic Side-reaction of Drugs.....Goro URAKUBO.....	251
On the Effect of X-Irradiation against Mice and Rats with Special Reference to the Observation from the Bacteriological Viewpoint.....Yukio YAMAZI, Hiroko TANAKA, Sadayoshi HATTA, Makoto YAMAUCHI and Kinichi EBATA.....	253
Sulfoamide Sensitivity of Isolated Dysentery Bacilli.....Kimie KOSHINUMA, Shigeo IWAHARA and Reiko ŌFUCHI.....	263
Bacteriophage Typing of Dysentery Bacilli (I).....Shigeo IWAHARA, Kimie KOSHINUMA and Reiko ŌFUCHI.....	265
Varietal Difference of Resistance in Common Wheat to <i>Claviceps purpurea</i> TUL. and Content of Alkaloids.....Toyohiko KAWATANI.....	269
Effect of Soil Moisture upon the Growth and the Oil Content of Lemon-grass.....Yukio MIYAZAKI and Masakatsu TAKI.....	277
Seasonal Variation in the Growth and the Oil Content of Lemon-grass (1) Results in the First Year of Planting.....Yukio MIYAZAKI and Masakatsu TAKI.....	289
List of Useful Plants in the Green-house Izu Pharmaceutical Garden.....Yukio MIYAZAKI and Masakatsu TAKI.....	305
The Experimental Studies on the Effect of Various Metals inserted into Vivo for the Purpose of Medical Applications.....Masamichi FUJII.....	311
Studies on Paper Chromatography of Coal-Tar Dyes.....Seiji FUJII.....	335
<b>Preliminary Reports</b> .....	377
<b>Abstracts</b> .....	381
<b>Annual Report (1954)</b> .....	391

インシュリンの薬化学的研究 (第16報)\*  
 アイソフエンインシュリンの試製について  
 長沢 佳 熊, 三 橋 謙 一

On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No. 16).

On the Preparation of Crystalline Protamine Insulin (Isophane Insulin;  
 NPH Insulin).

By Kakuma NAGASAWA and Kenichi MITSUHASHI ,

まえがき 1935年, Hagedorn 等<sup>1)</sup>は, インスリンにプロタミンを加え, pH7として得た懸濁液は, 通例のインシュリン注射液に比し, 非常に長い持続作用を有することを発見した. 更に1936年, Toronto大学のScott, Fisher<sup>2)</sup>は, このプロタミンインシュリンの懸濁液に少量の亜鉛を加えると, その安定度, 持続性がともに増加すると報告した. この製剤は, プロタミン亜鉛インシュリン注射液として現在も広く治療界に用いられている. ついで1946年, プロタミンとインシュリンによつて生成する沈澱に関する物理的, 化学的研究をつづけていた DenmarkのKrayenbühl, Rosenberg<sup>3)</sup>は, ある種の条件下で, しばしばプロタミンインシュリンの沈澱が結晶として生ずることを見出し, 完全な結晶化に必要な条件と, その組成等について詳細な報告を行つた. この結晶の懸濁注射液は, 国局委員会からアイソフエンインシュリン注射液 Isophane Insulin Injection (通称名: NPHインシュリン注射液)と命名され, 現在外国数社によつて市販されており, 我国でも二社から発売されている.

著者等は最近, アイソフエンインシュリン製造用のインシュリン結晶\*\*と, プロタミン\*\*を用い, その調製を試みたので報告する.

実 験 の 部

A. Isophane Ratio の試験

FDAの試験法<sup>4)</sup>に準じ, isophane ratio を定めた.

試験法: インスリン溶液 (1cc中40単位を含む0.42 w/v %塩化ナトリウム溶液) 12.5cc ずつを6本の尖頭沈澱管にとり, それぞれにプロタミン溶液 (1cc中5mgを含む) 0.30, 0.36, 0.42, 0.48, 0.54, 0.60ccを加えてよく混和し, 40分間放置後遠心分離する. 各沈澱管から上澄液 5cc ずつを2本の試験管にとり, 一方にはインシュリン溶液 (前記) 0.5ccを, 他方にはプロタミン溶液 (前記) 0.5ccを加えて混和し, 10分間放置する.

それぞれの濁度を, 光電管比色計でフィルター400m $\mu$ を用いて測定する.

試験結果: 濁度測定の結果をTable 1に示す.

Table 1. The Results of Measurements of Turbidity.

cc. prot./12.5cc. ins.	Turbidity (+protamine)	Turbidity (+insulin)
0.30cc. (0.30%)	————— ※※	————— ※※※
0.36 (0.36%)	————— ※※	————— ※※※
0.42 (0.42%)	0.540	————— ※※※
0.48 (0.48%)	0.155	0.070
0.54 (0.54%)	0.125	0.122
0.60 (0.60%)	0.020	0.170

\* 第15報は 長沢佳熊, 西崎笹夫: ペーパークロマトグラフによるインシュリンの定量法 昭和30年5月日本薬学会東京第1例会にて講演

\*\* 本品の調製には, 高純度のインシュリンとプロタミンとを必要とし, インスリンは, その溶液を pH7 とするとき, 比較的濁っていないものを用いる. 我々の用いたインシュリンは 23u/mg であつた.

※ インスリン 100 単位に対するプロタミンの mg 数.

※※ 析出物多量のため測定不能.

※※※ ほとんど澄明のため測定不能.

これをグラフに移し、プロタミンの isophane ratio の量を求める (Fig. 1).

Fig. 1. Determination of the Point of Isophany.

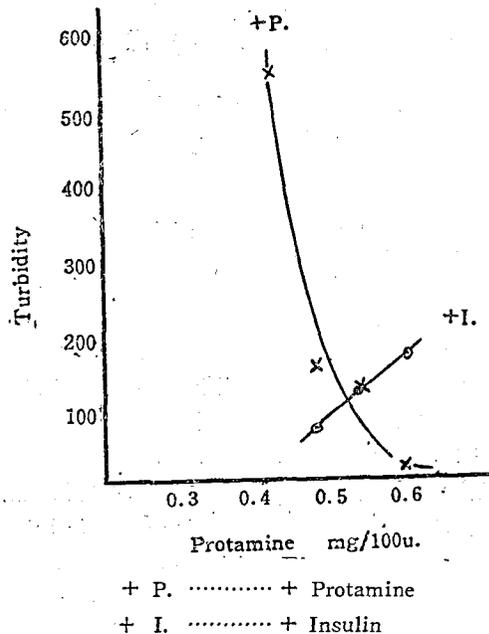


Fig. 1 では、インシュリン 100 単位量についてのプロタミンの isophane ratio の点を決定するにはいたらなかつたが、大略 0.5~0.55mg と推定することができる。検体量の不足から再びこの試験を繰返すことができなかったため、これにもとずいて、プロタミンインシュリンの結晶製造を試みた。

#### B. 製造実験

実験 1. Insulin 80u./cc. protamine 0.441mg/cc. alkaline buffer solution\*を加えて pH7.2 とする。12時間後鏡検すると、Fig2. のようなプロタミンインシュリンの結晶を認めた。

実験 2. Insulin 80u./cc. protamine 0.24mg/cc. alkaline buffer solution\*を加えて pH7.5 とする。12時間後鏡検するも結晶をみず、24時間後、Fig. 3 にみられるような結晶を得た。

実験 3. Insulin 80u./cc. protamine 0.463mg/cc. alkaline buffer solution\* を加えて pH7.1 とする。12時間後結晶生起、Fig. 4 のものを得た。

実験 4. Insulin 80u./cc. protamine 0.28mg/cc. alkaline buffer solution\*を加え、pH7.1 とする。18時間後の結晶を Fig. 5 に示す。

実験 5. Insulin 80u./cc. protamine 0.28mg/cc. alkaline buffer solution\*を加えて pH7.5 とする。52時間後の鏡検で結晶を認めた。72時間後の結晶は Fig. 6 に示す。

実験 6. Insulin 80u./cc. protamine 0.425mg/cc. alkaline buffer solution\* を加え、pH7.2 とする。48時間後の結晶を Fig. 7. に示す。

\* 0.2w/v% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.42w/v% NaCl, 0.8w/v% glycerin, 0.2w/v% m-cresol を含み、水酸化ナトリウム液を加えて適当な pH とする。



Fig. 2. Experiment 1.  
( $\times 320$ )

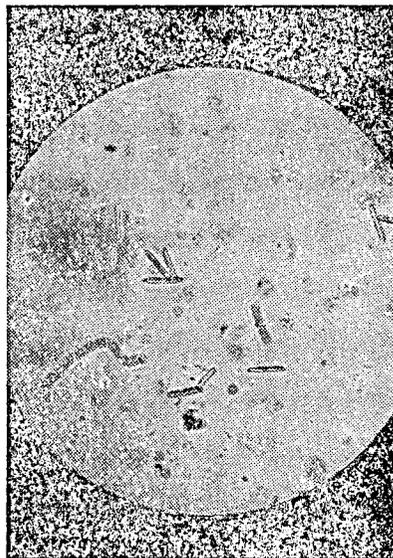


Fig. 3. Experiment 2.  
( $\times 320$ )



Fig. 4. Experiment 3.  
( $\times 320$ )



Fig. 5. Experiment 4.  
( $\times 320$ )



Fig. 6. Experiment 5.  
( $\times 320$ )



Fig. 7. Experiment 6.  
( $\times 320$ )

以上の実験におけるインシュリン100単位についての protamine 量, 液の pH等については, Table 2 に示す.

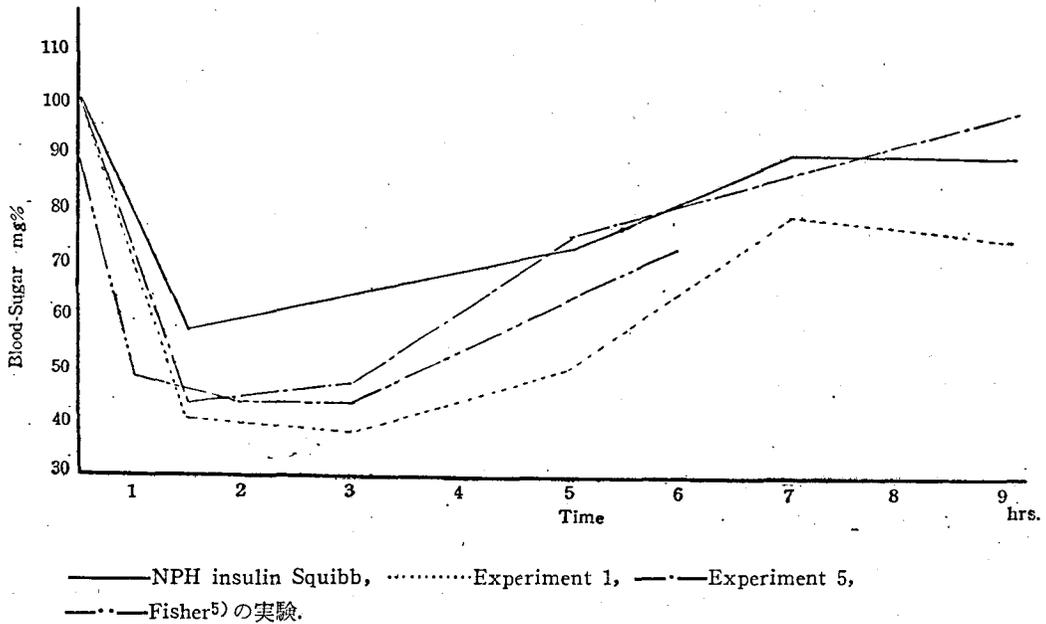
Table 2.

Insulin	Protamine	pH of solution
100 units	0.55 mg	7.2
"	0.30	7.5
"	0.58	7.1
"	0.35	7.1
"	0.35	7.5
"	0.53	7.2

### C. 持続力の試験

家兎6匹を用い, 2匹ずつの3群に分け, 第1群には参考品として米国 Squibb 社製NPHインシュリン注射液を, 第2群には実験1の調製品を, 第3群には実験5の調製品を, それぞれ家兎体重 2 kg につき, 1.2 単位ずつ注射し, 注射後9時間目までの血糖量の変化につき観察した. 各群の平均をとり, その結果を Fig. 8 に示す.

Fig. 8. A Comparison-test of Retarding Activity between Our Preparation and NPH Insulin Injection Squibb.



D. 上澄液中のインシュリン量の試験

実験3の調製品を遠心分離し、その上澄液につき、インシュリン量が全効力の2.5%以下であることを確認した。家兎6匹を用い、3匹ずつ2群に分け、1群には体重2kgにつきインシュリン標準品0.8単位を、他の1群には体重2kgにつき上澄液0.8ccをそれぞれ注射し、血糖量を測定した。1週間後交叉試験を行い、同様に血糖量を測定した。この結果をTable 3に示す。

Table 3. The Results of Assay of Insulin in Supernatant Liquid.

First day

Rabbit No.	Body weight	Dose injected	Blood sugar mg%				Reduction blood sugar%
			Before injection	1.5hrs. after injection	3 hrs. after injection	5hrs. after injection	
85	2.45	St. 0.8u.	99	35	38	86	46.5
86	2.2	"	101	40	36	90	45.5
87	2.4	"	101	38	50	90	41.6
88	2.5	Supernatant 0.8cc	97	83	100	98	3.1
89	2.3	"	100	75	96	96	11.0
90	2.2	"	93	67	84	101	9.7

## Second day

Rabbit No.	Body weight	Dose injected 2kg	Blood sugar mg%				Reduction blood sugar%
			Before injection	1.5hrs. after injection	3hrs. after injection	5hrs. after injection	
85	2.4	Supernatant 0.8cc	92	64	90	94	9.8
86	2.2	"	103	88	97	103	6.8
87	2.4	"	98	76	98	96	8.2
88	2.55	St. 0.8u.	100	36	38	76	50.0
89	2.3	"	107	41	41	87	47.7
90	2.2	"	97	33	45	80	45.3

両日の血糖減少率平均

標準品 …… 46.1%

上澄液 …… 8.1%

## む す び

1. アイソフェンインシュリンの調製について報告した。
2. 我々の実験範囲の pH では、pH と結晶形の大小との関連は認められず、protamine の量によつてのみ、結晶形の変化がみられた。

(註. アイソフェンインシュリン注射液に比して、protamine 量の多いプロタミン亜鉛インシュリン注射液の沈澱中に、往々Fig. 4にみられるような巨大なアイソフェンインシュリンの結晶をみることがある。)

3. 試製品の持続力試験は、本来、動物の個性による差異が甚しいものであるが、文献記載のデータ<sup>5)</sup>とほぼ同様と思う。
4. 上澄液中のインシュリン含量は、全効力の 2.5% 以下である。

## 文 献

- 1) H. C. Hagedorn, B. N. Jensen, N. B. Krarup: J. Am. Med. Assoc. 106, 177 (1936).
- 2) D. A. Scott, A. M. Fisher: J. Pharm. Exp. Therap. 58, 78 (1936).
- 3) Ch. Krayenbühl, Th. Rosenberg: Reports of the Steno Memorial Hospital and the Nordisk Insulinlaboratorium. 1, 60 (1946).
- 4) Federal Register, Title 21-Food and Drugs. chapt. 1. Food and Drug Administration. Federal Security Agency. Part 144. 13, 144. 14.  
長沢佳熊: ホルモン薬品学, p. 263 (立川図書. 1954).
- 5) A. M. Fisher et al.: Canad. M. A. J. 65, 20 (1951).

## Summary

The preparing method of Crystalline Protamine Insulin (NPH insulin) was described.

- 1) In our experiments, pH values, 7.1-7.5, do not influence upon crystal size of NPH insulin.
- 2) The quantity of protamine seems to have some influence upon crystal forms as well as complete crystallization.
- 3) Our comparison test shows no differences between our preparation and NPH Insulin Injection Squibb.

Received April 30, 1955

## インシュリンの薬化学的研究 (第17報)\*

## 日局インシュリン標準品の力価検定について

長沢 佳熊, 中山 豪一, 佐藤 浩, 白井 浄二

## On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No. 17)

## The Assay of The Japanese Pharmacopoeia Insulin Standard (1954)

By Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Hiroshi SATO and Joji SHIRAI

まえがき 日局インシュリン標準品 (1954) を調製する目的で, デルタ社製結晶インシュリンを国際標準品 (1952) (以下 ISt と略す) 及び日局標準品 (1952) (以下 NSt と略す) を用いてその力価を検定したのでその結果を報告する。

実験方法 1 検定法 本報告では日局Ⅵ法, 英局Ⅷ記載の (2-2) 用量方式による交叉試験法<sup>2)</sup>を用いた。

2 標準液及び検液の調製法 標準品, 検体共に, 日局Ⅵ記載の溶媒で溶かし, [ISt] は 1 cc 中 24.5 単位, [NSt] は 1 cc 中 20 単位の力価を含むように稀釈し, 標準原液とする。検体は 1 cc 中 1 mg を含むように稀釈し, 検体原液とする。試験当日, 上記溶媒で適当に稀釈し, 稀標準液, 稀検液として用いる。

3 実験動物 体重 1.8~2.6kg の健康な家兎を試験前 18~20 時間絶食させ, 試験直前に測つた体重に応じて注射量を定める。採血が終るまで飼料, 水を与えない。

実験結果 1 予試験 検体の大体の力価を知る為に, 数回予試験を行つた。その例を Table 1, Fig. 1 に示す。予試験の結果, 検体の力価は 1 mg 当り 18~23 単位であると想定した。

(例 1) 使用家兎数 16 匹。検体の想定力価 1 mg 当り 18.5 単位。[NSt] の高用量 (NS<sub>2</sub>) を 1 cc 中 1.67 単位, 低用量 (NS<sub>1</sub>) を 1 cc 中 0.83 単位, 検体の高用量 (T<sub>2</sub>) を 1 cc 中 0.09mg, 低用量 (T<sub>1</sub>) を 1 cc 中 0.045mg を含むように調製した。この結果を Table 1 に示す。

Table 1.

Animal	1st Day	2nd Day	y = T - S	d
1	33.0	40.2	7.2	13.3333
2	convulsion	—	—	—
3	36.6	20.2	- 16.4	- 10.2667
4	23.6	14.4	- 9.2	- 3.0667
			$y_2 = -6.1333$	
5	2.9	25.4	22.5	5.2
6	27.3	51.2	23.9	6.6
7	22.5	28.0	5.5	- 11.8
8	convulsion	—	—	—
			$y_1 = 17.3$	
9	23.5	23.8	- 0.3	- 4.6666
10	24.2	17.9	6.3	1.9334
11	27.7	20.6	7.1	2.7334
12	convulsion	—	—	—
			$y_4 = 4.3666$	
13	15.8	25.8	- 10.0	1.075
14	24.5	45.4	- 19.9	- 8.825
15	11.2	11.3	- 0.1	10.975
16	20.2	34.3	- 14.3	- 3.225
			$y_3 = -11.075$	

\* 第 16 報は本誌 1 頁

$E = 17.3 + 6.1333 + 11.075 + 4.3666/4 = 9.7187$

$F = 17.3 - 6.1333 - 11.075 + 4.3666/4 = 1.1146$

$I = \log 2 = 0.3010$

$b = 9.7187/0.301 = 32.288$

$M = 1.1146/32.288 = 0.0345$

Potency ratio = 1.082

Mean number of animals per group =  $3 + 3 + 3 + 4/4 = 3.25$

$S^2 = 745.3/9 = 82.811$

$V = 82.811/6.5 = 12.74$

t with 9 degrees of freedom = 2.26 ;  $t^2 = 5.11$

$A = 12.74/2 = 6.37$  ;  $B = 12.74/0.1812 = 70.31$

$g = 70.31 \times 2.26^2/32.288^2 = 0.344$

Log (fiducial limits per cent)

$$= 2 + \frac{0.344 \times 0.0345}{0.656} \pm \frac{2.26}{32.288 \times 0.656} \sqrt{6.37 \times 0.656 + 70.31 \times 0.0345^2}$$

$= 2 + 0.0181 \pm 0.2203$

$= 1.7978 \text{ to } 2.2384$

Fiducial limits of error = 62.8 to 173.2% (P=0.95)

Table 1の結果から効価比 1.082が得られ、従つて検体 1 mg 当りの力価は 20.01 単位となる。

(例2) 使用家兎数 18 匹。検体の想定力価 1 mg 当り 18 単位。この結果は第 1 図に示す通り。1 mg 当り 19.3 単位であつた。

2 本試験 (実験 1) 使用家兎数 16 匹。検体の想定力価 1 mg 当り 18 単位。[IS<sub>2</sub>] の高用量 (IS<sub>2</sub>) を 1 cc 中 1.67 単位、低用量 (IS<sub>1</sub>) を 1 cc 中 0.83 単位、検体の高用量 (T<sub>2</sub>) を 1 cc 中 0.092mg、低用量 (T<sub>1</sub>) を 1 cc 中 0.046mg を含むように調製した。この結果を Table 2 に示す。

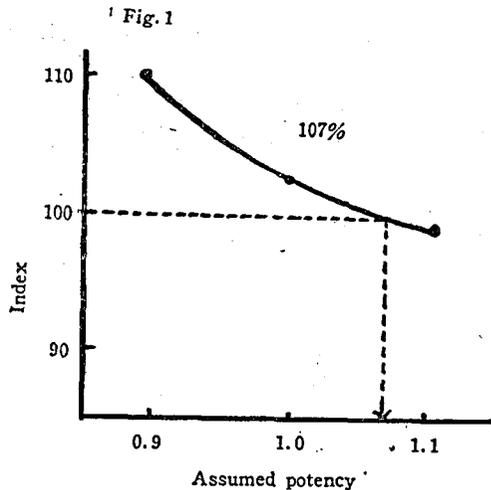


Table 2.

Animal	1st Day	2nd Day	y = T - S	d
1	23.4	10.0	- 13.4	1.2333
2	45.2	25.3	- 19.9	- 5.2667
3	30.6	20.0	- 10.6	4.0333
4	convulsion	—	—	—
} $y_2 = -14.6333$				
5	28.7	40.4	11.7	1.125
6	21.4	38.3	16.9	6.325
7	25.8	37.8	12.0	1.425
8	16.1	17.8	1.7	- 8.875
} $y_1 = 10.575$				

9	40.5	} T <sub>2</sub>	20.5	} IS <sub>1</sub>	20.0	} y <sub>4</sub> = 20.575	- 0.575
10	41.2		19.4		21.8		1.225
11	37.4		11.6		25.8		5.225
12	32.0		17.3		14.7		- 5.875
13	8.5	} T <sub>1</sub>	17.4	} IS <sub>2</sub>	- 8.9	} y <sub>3</sub> = - 5.4666	- 3.4334
14	14.0		18.7		- 4.7		0.7666
15	9.4		12.2		- 2.8		2.6666
16	convulsion		—		—		—

E = 12.8125 ; F = 2.7625 ; I = log 2 = 0.3010

b = 42.566 ; M = 0.0649 ; Potency ratio = 1.161

S<sup>2</sup> = 25.0728 ; V = 3.5818

t with 10 d. f. = 2.23 ; t<sup>2</sup> = 4.97

A = 1.7909 ; B = 19.7671 ; g = 0.054

Log (fiducial limits per cent) = 1.9283 to 2.0717

Fiducial limits of error = 84.78 to 118.0 % (P=0.95)

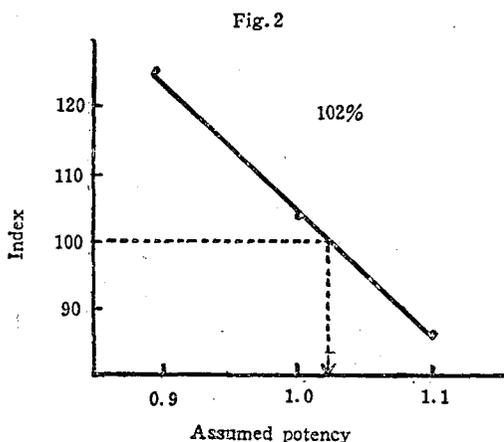


Table 2 の結果からでは, 検体の力価が 1 mg 当り 20.9 単位となる。

(実験 2) 使用家兎数 18 匹。検体の想定力価 1 mg 当り 20 単位。この結果は第 2 図に示す通り。1 mg 当り 20.5 単位であつた。

むすび 以上の結果から検体の力価を 1 mg 当り 20 国際単位強であると判定し, これを 20 日局単位とする。

## 文 献

- 1) 日局Ⅵ; 59
- 2) 英局Ⅷ; 786, 816 (1953).

## Summary

In preparation for the new J. P. Insulin Standard (1954), we determined the potency of the Delta's crystalline insulin comparing with the International Standard and J. P. Standard by J. P. VI<sup>1)</sup> and B. P. VIII<sup>2)</sup> methods.

From the result of assays, we found that sample preparation contains 20 J. P. Units per 1 mg.

Received April 30, 1955

## 卵胞ホルモンの研究 (第8報)\*,\*\*

ペーパクロマトグラムの面積測定法による妊馬尿及び雄馬尿中のエストロン, エストラジオールの定量

長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一

## Studies on Follicular Hormones. VIII.

Quantitative Analysis of Estrone and Estradiol in Pregnant Mare and Stallion Urine by Paper Chromatography Measuring the Area of Coloured Spot.

By Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA  
and Seiichi OKAZAKI

著者は妊馬尿及び雄馬尿中のエストロンの Koder 法<sup>1)</sup>による比色定量を報告<sup>2)</sup>したが, 夾雑するエストラジオールがエストロンより弱い同様な呈色をするため過大値を与えるのでその影響をさけるため, アルミナ濾紙<sup>3)</sup>を用いて面積測定法によるクロマトグラフ法を報告<sup>4)</sup>した. 本法によるとエストロンとエストラジオールが分離され, 同一濾紙上で一度に定量されるから, 好都合である. 又英国薬局方の生物分析の項に示されている 2-2 用量検定法<sup>5)</sup>を応用して, 標準品と既知量のエストロン及びエストラジオールを用いて検定すると生物検定法による誤差の信頼限界, 例えば白鼠又はマウスの発情試験法の 80~125%<sup>6)</sup> (P=0.95) 或は白鼠の子宮重量増加法の 81~124%<sup>7)</sup> (P=0.95) よりも小さく, 精度がよいと考える (実験 I 参照). 排泄直後の妊馬尿を直ちに氷冷して実験室へ運び, 第5報<sup>8)</sup>で述べた方法を少しく変更した方法 (ベンゼン抽出物を N/10NaOH に溶かし, エーテルで抽出する操作を省く) でできるだけ速に抽出し, 本法で定量すると遊離型ホルモンは極めて少量で, 大部分は結合型である. 室温に約3週間放置した雄馬尿中には遊離型と結合型がほぼ同量検出されたが, これは保存中加水分解<sup>9)</sup>されたためであると思う. Levin<sup>9)</sup>は雄馬尿中の発情物質は平均 54,000 R.E./l で, その発情作用の 42~90%はエストラジオールであるというが, 著者の実験では, エストロンとエストラジオールはほぼ同量で, エストラジオールがエストロンの3倍強いと仮定すると, 効力の75%がエストラジオールにもとづく (実験 II 参照). 雄馬尿中にはエストロン, エストラジオール以外にステロイドと思われる呈色像を2個認め, これについては目下研究中である.

## 実験の部

実験 I. ペーパクロマトグラムの面積測定法の統計学的検討 標準品エストロン 7.50 $\mu$ g 及び 15.00 $\mu$ g, 検体エストロン 6.75 $\mu$ g 及び 13.50 $\mu$ g をアルミナ処理をした東洋濾紙 No.50 (2 $\times$ 40cm) に附し, 水飽和ベンゼンで展開, ヨウ素で発色後面積を測定する. 濾紙は1用量に4枚使用した. その結果を次の Table に示す.

\* 第7報は長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一, 黒馬敏子: 衛生試験所報告, 72, 45 (1954).

\*\* 日本薬学会東京11月第2例会講演 (昭.29.11.27); その大要は Pharm. Bull., Ⅲ, 144 (1955) に掲載.

Table 1. Paper Chromatogram of Estrone

Standard					Sample				
No. of Strips	Amount of Estrone $\mu\text{g}$	Log Amount of Estrone	Area of Spot $\text{mm}^2$	Deviation from Mean	No. of Strips	Amount of Estrone $\mu\text{g}$	Log Amount of Estrone	Area of Spot $\text{mm}^2$	Deviation from Mean
		(x)		(d)			(x)		(d)
1	7.50	0.8751	52	0	1	6.75	0.8293	36	0
2	7.50	0.8751	48	-4	2	6.75	0.8293	40	4
3	7.50	0.8751	52	0	3	6.75	0.8293	32	-4
4	7.50	0.8751	56	4	4	6.75	0.8293	36	0
Mean.....52 (S <sub>1</sub> )					Mean.....36 (T <sub>1</sub> )				
1	15.00	1.1761	120	4	1	13.50	1.1303	104	-2
2	15.00	1.1761	112	-4	2	13.50	1.1303	100	-6
3	15.00	1.1761	116	0	3	13.50	1.1303	116	10
4	15.00	1.1761	116	0	4	13.50	1.1303	104	-2
Mean.....116 (S <sub>2</sub> )					Mean.....106 (T <sub>2</sub> )				

上表から効果比 (R) 及び誤差の信頼限界 (f.l.e) 等を求めると次の通りである。

R=0.874 (which was 97.1% of the theoretical value), f. l. e. =105.9~95.0%

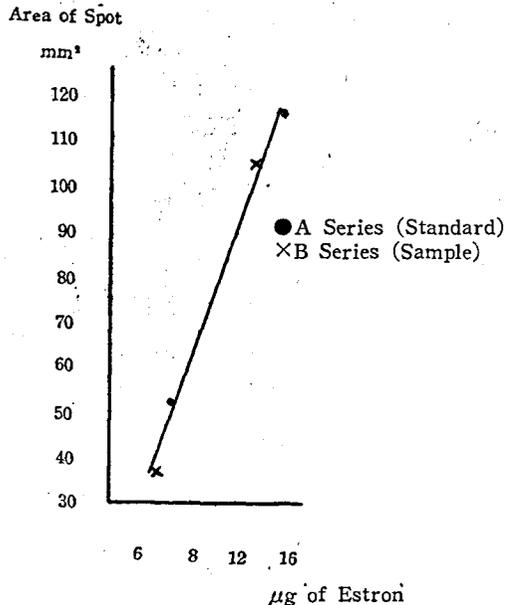
検体の2用量と標準品の2用量の示す面積が同一用量反応直線上にあるか否かについて直線性の検定を行うと次の通りである。

Adjustment for Mean.....96100

Nature of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	17536.15	
Deviation from Regression	2	94731.8	47365.9
Between Amounts	3	112268.0	
Within Amounts	12	336726.5	28060.54
Total	15	448994.5	

F (From Data) = 1.69

従つて4用量の示す面積は同一用量反応直線上にある。又回帰直線\* を求めると Fig の通りである。



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

$\mu\text{g}$  of Estrone

エストロン及びエストラジオールについての 2, 3 の実験結果を示すと次の Table 2 及び 3 の通りである。

Table 2. Two and Two Amount Analysis of Estrone

Expt. No.	Strip No.	Standard		Sample		t (P)	R*	f. i. e. % (P=0.95)
		15.00 $\mu$ g	7.50 $\mu$ g	12.00 $\mu$ g	6.00 $\mu$ g			
		Area of Spot mm <sup>2</sup>						
1	1	128	76	108	72	1.14 (0.3~0.2)	97.8	92.2~136.5
	2	124	72	100	60			
	3	112	80	104	64			
	4	120	80	104	64			
2	1	188	80	164	68	4.07 (0.01~0.001)	106.1	95.4~104.8
	2	200	76	160	60			
	3	188	72	160	64			
	4	184	72	152	68			
3	1	88	60	80	48	1.16 (0.3~0.2)	97.4	98.9~101.1
	2	88	60	80	48			
	3	92	60	80	52			
	4	88	64	80	48			
4		15.00 $\mu$ g	7.50 $\mu$ g	13.50 $\mu$ g	6.75 $\mu$ g	1.23 (0.3~0.2)	97.1	94.8~105.4
		Area of Spot mm <sup>2</sup>						
	1	120	52	104	36			
	2	112	48	100	40			
	3	116	52	116	32			
4	116	56	104	36				
5	1	148	72	136	60	1.60 (0.2~0.1)	104.6	95.3~104.7
	2	144	64	128	68			
	3	140	64	140	64			
	4	140	64	128	60			
6	1	120	76	116	64	0.82 (0.5~0.4)	108.3	90.6~120.4
	2	120	72	108	60			
7	1	124	72	108	68	1.00 0.4~0.3	105.1	91.3~108.6
	2	128	76	112	64			
8	1	108	72	96	64	1.73 (0.2~0.1)	101.6	91.2~109.6
	2	112	68	96	60			
9		15.00 $\mu$ g	7.50 $\mu$ g	13.50 $\mu$ g	6.75 $\mu$ g	1.00 (0.4=0.3)	93.2	81.5~122.8
		Area of Spot mm <sup>2</sup>						
	1	100	72	88	68			
	2	100	64	92	60			
10	1	112	72	100	68	8.47 (0.01~0.001)	94.3	92.1~108.5
	2	122	76	100	72			

\* % of the theoretical value.

Table 3. Two and Two Amount Analysis of Estradiol

Expt. No.	Strip No.	Standard		Sample		t (P)	R*	f. l. e. % (P=0.95)
		15.00 $\mu$ g	7.50 $\mu$ g	13.50 $\mu$ g	6.75 $\mu$ g			
		Area of Spot mm <sup>2</sup>						
1	1	92	68	80	60	0.08 (10.9)	94.2	83.0~120.4
	2	88	68	84	64			
	3	92	72	88	64			
	4	84	64	84	64			
2	1	92	68	100	44	1.16 (0.4~0.3)	104.3	85.5~116.5
	2	100	68	92	52			

実験Ⅱ. 妊馬尿及び雄馬尿中のエストロン, エストラジオールの定量 排泄直後の妊馬尿を直に氷冷して実験室へ搬び, エーテルで抽出し (遊離型ホルモン), 次に塩酸 $\alpha$ 性として加熱加水分解後ベンゼンで抽出する (結合型ホルモン). エーテル及びベンゼン抽出液はそれぞれ, 稀硫酸, 炭酸ナトリウム液で洗い, 減圧乾燥し, 残留物を検体とする. 雄馬尿は採取後室温に約3週間放置してあつたものを同様に処理した. これらについて実験Ⅰと同様にして検定した結果を次の Table に示す.

Table 4. Quantitative Analysis of Estrone and Estradiol in Pregnant Mare and Stallion Urine.

Material	Estrone					Estradiol				
	Free		Conjugate		Total	Free		Coujngate		Total
	$\mu$ g/cc	%**	$\mu$ g/cc	%**	$\mu$ g/cc	$\mu$ g/cc	%***	$\mu$ g/cc	%***	$\mu$ g/cc
P. M. U.	0.7+	0.9	81.0 (95.2-105.0)	99.1	81.7	0.4+	1.9	20.5 (86.6-115.5)	98.1	20.9
P. M. U.	1.9 (94.7-105.6)	1.4	138.1 (95.5-104.7)	98.6	140.0	1.4 (82.6-121.0)	3.8	35.5 (91.2-110.1)	96.2	36.9
P. M. U.	4.3 (85.5-117.0)	4.1	100.7 (82.6-118.2)	95.9	105.0	2.2 (86.4-115.6)	13.2	15.0 (83.5-119.9)	87.2	17.2
P. M. U.	0.6+	1.5	39.5 (94.4-106.0)	98.5	40.1	0.3+	13.6	1.9 (91.1-109.7)	86.4	2.2
Average	3.2	2.1	89.8	97.9	93.0	1.1	5.7	18.2	94.3	19.3
S. U.	17.6	44.9	21.6	55.1	39.2	19.6	49.6	19.9	50.4	39.5

\* % of the theoretical value.

( ).....f. l. e. % with n=2 and P=0.95

+ .....Dilution Method

P. M. U. ....Pregnant Mare Urine

S. U. ....Stallion Urine

\*\* .....Free Estrone+Estrone after Hydrolysis=100%

\*\*\* .....Free Estradiol+Estradiol after Hydrolysis=100%

## 結 論

ペーパクロマトグラムの面積測定法によるエストロン及びエストラジオールの定量に 2—2 用量検定法を応用し好結果を得た。本法で新鮮な妊馬尿中のエストロン及びエストラジオールを定量すると、遊離型は極めて少量でエストロンは平均約 3%, エストラジオールは約 6% で他は結合型である。雄馬尿中にはエストロン (39 $\mu$ g/cc) とほぼ同量のエストラジオール (40 $\mu$ g/cc) を検出した。

本研究に使用した妊馬尿, 雄馬尿は帝国臓器製薬株式会社及び太陽製薬株式会社の御厚意により贈与頂き, 或は又現地で採取の便を与えられたもので厚く感謝する。

## 文 献

- 1) Kober, S. : *Biochem. J.*, **32**, 357 (1938)
- 2) 長沢佳熊, 越村栄之助: 衛生試験所報告, **71**, 1 (1943)
- 3) Bush, I. E. : *Biochem. J.*, **50**, 370 (1952)
- 4) Koshimura, E. and Okazaki, S. : *Pharm. Bull.*, **II**, 65 (1954) ; 衛生試験所報告, **72**, 41 (1954)
- 5) *Brit. Pharm.*, **VII**, 778 (1953)
- 6) Emmens, C. W. : *Hormones, A survey of their Properties and Uses*, P. 135, The Pharmaceutical Press, London, 1951.
- 7) Lawson, H. D., Heller, C. G., Golden, J. B. and Severinghaus, E. L. : *Endocrinol.*, **24**, 35 (1935)
- 8) 長沢佳熊, 越村栄之助: 衛生試験所報告, **72**, 37 (1954)
- 9) Levin, L. : *J. Biol. Chem.*, **185**, 725 (1945).

## Summary

The two and two amount assay method was applied for the quantitative analysis of estrone and estradiol by paper chromatographic analysis measuring the area of spots and satisfactory results were obtained. In a fresh pregnant mare urine, quantities of free estrone and estradiol were very small, the former was about 3% and the later was about 6%. About same amount of estrone 39 $\mu$ g/cc and estradiol 40 $\mu$ g/cc were found in stored stallion urine.

Received April 15, 1955

## 卵胞ホルモンの研究 (第9報)\*,\*\*

幼若白鼠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2)\*\*\*

## 2—2 用量検定法によるバニシングクリーム中のエストロンの定量

長沢 佳熊, 越村 栄之助, 岡崎 精一

## Studies on Follicular Hormones IX.

Quantitative Analysis of Follicular Hormones and Synthetic Estrogens by  
Rat Uterine Increasing Method (2).Quantitative Analysis of Estrone in Vanishing Cream by the Two and Two  
Dose Assay Method.

By Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI

卵胞ホルモンを配合したホルモンクリームが多数あるが、この中の卵胞ホルモンを比色法で定量するときは抽出、精製等の操作が繁雑で又損失も多く、満足すべき結果を得ることは容易でない。著者等はプロピレングリコールに溶かした数種の卵胞ホルモン及び合成発情物質を幼若白鼠に皮下注射し、ホルモン量の対数と子宮重量増加量とが直線関係を示す大体の範囲を第7報<sup>1)</sup>で報告したが、直線範囲はかなり広く、感度もよいので英国薬局方の2—2 用量検定法<sup>2)</sup>を適用し、第7報と同一操作により子宮重量増加法でクリーム中のエストロンの定量を行つた。その結果では子宮重量そのままを用いて計算した場合よりも、体重に対する子宮重量比を用いて計算した方がよい結果を得たがこのことについては更に多数の実験を行い、結論する必要があると考える。本法の誤差の信頼限界はLawson<sup>3)</sup>によれば81—124% (P=0.95)であり、これと比較してクリーム中の卵胞ホルモンの検定に利用できると思われる。プロピレングリコールの1回注射量は0.2ccとしたが0.1cc程度が適当と考えている。エストロン以外のもの及び他種クリーム剤中のホルモンの定量については別に報告する。

## 実験の部

標準品及び検体注射液を次のように調製する。

1. 標準品高用量注射液: エストロン1  $\mu\text{g}$ をプロピレングリコールに溶かし2 ccとする。
2. 標準品低用量注射液: 高用量注射液を2倍にうすめたもので2 cc中にエストロン0.5  $\mu\text{g}$ を含有する。
3. 検体高用量注射液: 1 g中にエストロン100  $\mu\text{g}$ を含むバニシングクリーム10mgをプロピレングリコールに溶かして2 ccとする (2 cc中にエストロン1  $\mu\text{g}$ を含む)。
4. 検体低用量注射液: 高用量注射液を2倍にうすめる (2 cc中にエストロン0.5  $\mu\text{g}$ を含む)。
5. クリーム注射液: エストロンを含まないクリーム10mgをプロピレングリコールに溶かして2 ccとする。

以上の注射液を体重40g前後の幼若正常白鼠10匹を1群としたもの5群に1日2回、1回0.2ccずつ3日間皮下注射し、4日目に子宮を摘出し、トーションバランスで秤量する。その結果をTable 1及びTable 2に示す。

\* 第8報は長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一: 日本薬学会東京11月第2例会講演 (昭29.11.27); Pharm., Bull., III 144 (1955) 掲載; 衛試報, 73, 11 (1955)。

\*\* 本研究の概要は日本薬学会年会 (昭30.4.11); 並びに昭和29年度厚生科学研究報告, 薬剤部長会年報(1955) (予定) に報告した。

\*\*\* その1は長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一, 黒馬敏子: 衛試報, 72, 45 (1954)。

Table 1. Rat Uterine Increasing by Standard and Sample

Standard								
High Dose (Estrone 0.6 $\mu$ g)					Low Dose (Estrone 0.3 $\mu$ g)			
Body Wgt. (g)	Uterine Wgt. (mg)	Uterine Wgt.	d	Body Wgt. (g)	Uterine Wgt. (mg)	Uterine Wgt.	d	
		Body Wgt. $\times 100$				Body Wgt. $\times 100$		
43.0	96.7	224.9	14.95	41.0	57.8	141.0	- 7.74	
29.5	82.7	280.3	70.35	37.5	45.4	121.1	-27.64	
33.0	73.2	221.8	11.85	32.2	48.5	150.6	1.86	
37.8	97.4	257.7	47.75	48.1	57.9	120.4	-28.34	
50.1	100.0	199.6	-10.35	30.9	55.0	178.0	29.26	
54.5	90.9	166.1	-43.85	33.8	44.0	130.2	-18.54	
35.9	73.9	205.8	- 4.15	32.5	64.8	199.4	50.66	
42.2	78.1	185.1	-24.85	36.0	41.6	115.6	-33.14	
44.5	87.6	196.9	-13.05	31.8	38.0	182.4	33.66	
44.0	71.6	161.4	-48.55	—	—	—	—	
n		10				9		
Total		2099.5				1338.7		
Mean		209.95(S <sub>2</sub> )				148.74(S <sub>1</sub> )		

Sample								
High Dose (Estrone 0.6 $\mu$ g)					Low Dose (Estrone 0.3 $\mu$ g)			
Body Wgt. (g)	Uterine Wgt. (mg)	Uterine Wgt.	d	Body Wgt. (g)	Uterine Wgt. (mg)	Uterine Wgt.	d	
		Body Wgt. $\times 100$				Body Wgt. $\times 100$		
39.0	86.0	220.5	0.39	35.7	56.4	150.4	24.42	
35.8	83.6	233.5	13.39	52.5	60.3	114.9	-11.08	
34.0	75.9	223.2	3.09	46.8	59.5	127.1	1.12	
30.0	72.2	240.7	20.59	35.9	48.7	135.7	9.72	
37.5	83.5	222.7	2.59	36.5	46.5	127.4	1.42	
38.8	72.5	186.9	-33.21	39.5	41.8	105.8	-20.18	
38.1	70.7	185.6	-34.51	45.1	49.0	108.6	-17.38	
29.7	73.6	247.8	27.69	37.9	57.8	152.5	26.52	
—	—	—	—	56.5	52.8	93.5	-32.48	
—	—	—	—	33.5	48.2	143.9	17.92	
		8				10		
		1760.9				1259.8		
		220.11(T <sub>2</sub> )				125.98(T <sub>1</sub> )		

Table 1から効価比R, 誤差の信頼限界f.l.e. を求めると次の通りである。

体重に対する子宮重量比による場合

$$R = 0.9455, f.l.e. = 119.3 \sim 83.8\%$$

子宮重量だけからによる場合,

$$R = 0.9050, f.l.e. = 114.3 \sim 87.5\%$$

Table 2. Effect of Vanishing Cream to Uterine Weight Increasing (Blank test)

Sample				Control			
Vanishing Cream 6mg							
Body Wgt. (g)	Uterine Wgt. (mg)	Uterine Wgt.	d	Body Wgt. (g)	Uterine Wgt. (mg)	Uterine Wgt.	d
		Body Wgt. ×100				Body Wgt. ×100	
36.8	16.1	43.8	- 8.36	38.8	23.0	59.3	1.82
42.2	21.0	49.8	- 3.36	41.0	20.0	48.8	- 8.68
27.9	18.5	66.3	13.14	31.5	25.5	81.0	23.52
44.9	24.3	54.1	- 0.94	34.1	18.2	53.4	- 4.08
37.5	16.5	44.0	- 9.16	52.5	27.4	52.2	- 5.28
30.5	18.0	59.0	5.84	49.0	32.5	66.3	8.82
40.5	21.9	54.1	0.94	48.8	24.6	50.4	- 7.08
29.0	14.3	49.3	- 3.86	52.2	29.0	55.6	- 1.88
35.2	20.1	57.1	3.94	47.9	24.1	50.3	7.18
34.2	18.5	54.1	0.94	—	—	—	—
n		10		n		9	
Total		531.6		Total		517.3	
Mean		53.16		Mean		57.48	

Table 2 からクリームだけが子宮重量増加に及ぼす影響について平均値の差を検定すると

$$VE=74.37, Fo=0.278$$

従つてクリームだけでは子宮重量増加に影響を与えないと認められる。

### 結 論

バニシングクリーム中のエストロンを定量するのに、クリームをプロピレングリコールに溶かし、幼若白鼠に皮下注射し、子宮重量の増加を2-2用量検定法を適用して定量すると簡易で結果もよい、動物総数40匹を用い、子宮重量の体重比で計算すると、効価比は95%、誤差の信頼限界は119~84%、子宮重量だけで計算すると効価比は91%、誤差の信頼限界は114~88%の結果を得た。

本研究は昭和29年度厚生科学研究費で行つたもので厚く感謝する。

### 文 献

1. 長沢佳熊, 越村榮之助, 岡崎精一, 黒馬敏子: 衛生試験所報告, 72, 45 (1954).
2. Brit. Pharm, VII, 778 (1953)
3. Lawson, H. D., Heller, G.G., Golden, J.B. and Severinghaus, E.L.: Endocrinol, 24, 35 (1939).

### Summary

A vanishing cream containing the follicular hormone was assayed by the uterine increasing method applying the two and two dose assay design, when the propylene glycol solution of the vanishing cream and the standard estrone were injected. This method was simple and gave a satisfactory results when the ratio of uterine weight to a body weight was adopted. The potency ratio obtained was 95% and fiducial limits of error, 119-84%.

Received April 15, 1955

## 卵胞ホルモンの研究 (第10報)

 $\alpha$ -dl-cisメチルビスデヒドロドアジエ酸の呈色反応について

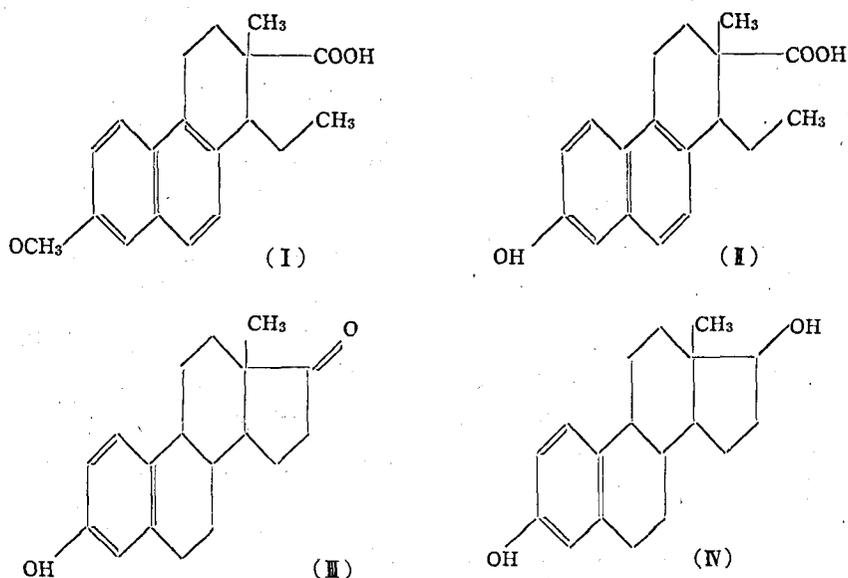
長沢 佳熊, 越村 栄之助, 岡崎 精一

## Studies on Follicular Hormones. X.

A Colour Reaction of  $\alpha$ -dl-cis-methylbisdehydrodoisynolic Acid

By Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI

Hohlweg<sup>1)</sup>らがエタレニンをアルカリ熔融して得たビスデヒドロドアジエ酸 (I) は強力な発情作用を有し、殊に内服でも注射と同程度に有効であることが発見されて以来注目され、Miescher<sup>2,3)</sup>、Johnson<sup>4)</sup>が全合成を行った。その中で、 $\alpha$ -l-cis 型化合物は既知物質中最も発情作用が強く、エストラジオール-17 $\beta$  (IV) の注射よりも本品の内服の方が強い。本品はエストロン (III)、エストラジオール (IV) 等と類似構造を有するから、Kober 反



応<sup>5)</sup>を呈すると考えられるのでその dl-cis 型化合物のメチルエーテル (I) について呈色反応を試みた。濃硫酸ではかなり著明に呈色するがエストロン(III)の数分の1の強さであり、呈色液の加熱をつゞけると速に褪色し (実験II参照)、又呈色液に水を加えても褪色する (実験I参照)。エストロン(III)、エストラジオール(IV)は約50v/v%硫酸でも著明に Kober 反応を呈するが本品は呈色しない (実験I参照)、などの点がステロイドの場合と異なる。呈色液の冬期室温における安定度は60分以内では殆んど変化を認めない (実験IV参照)。又10~100 $\mu$ gの間についてしらべると Lambert-Beer の法則が成立し (実験V参照)、比色定量が可能と思う。

## 実験の部

**実験I 呈色に及ぼす硫酸濃度の影響** 検体を小試験管にとり、発色試薬に98%硫酸及び50%硫酸を用いて呈色反応を行つた結果を次に示す。

\* 第9報は長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一: 衛生試験所報告, 73, 17 (1955)

Table 1. Effect of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Concentration

Sample	Reagent	Treatment and Colour Reaction
α-dl-cis-Bisdehydro- doisynolic Acid (20μg)	98% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1cc	Yellow $\xrightarrow[3\text{Min}]{\text{Heat (100}^\circ)}$ Orange-Pink with Fluorescence
	50v/v% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1cc	$\xrightarrow[\text{H}_2\text{O Add}]{\text{Cool}}$ Fade $\xrightarrow[1\text{Min}]{\text{Heat (100}^\circ)}$ Colourless Colourless $\xrightarrow[3\text{Min}]{\text{Heat (100}^\circ)}$ Colourless
Estrone 20μg	"	Yellow $\xrightarrow[3\text{Min}]{\text{Heat (100}^\circ)}$ Orange with Fluorescence $\xrightarrow[\text{H}_2\text{O Add}]{\text{Cool}}$ Orange $\xrightarrow[1\text{Min}]{\text{Heat (100}^\circ)}$ Pink with Fluorescence

50v/v%硫酸では呈色しない。

実験Ⅱ 加熱時間の影響 検体を小試験管にとり発色試薬 (98%硫酸) を加えて100°に加熱したときの呈色反応を次に示す。

Table II. Effect of Heating Period

Sample	Heating Period	Colour Reaction
α-dl-cis-Bisdehydro- doisynolic Acid 20μg	100°, 1 Min	Yellow → Orange-Pink with Fluorescence
" "	100°, 5 Min	Yellow → Pink with Fluorescence
" "	100°, 10 Min	Yellow → Faint Pink
" "	100°, 20 Min	Yellow → Colourless

3分半以上加熱すると純粋な桃色を呈するが、長く加熱すると漸時褪色し、15分後には殆んど無色となる。

実験Ⅲ 呈色反応の感度 以上の実験から発色試薬として濃硫酸を用い、4分間100°に加熱するのが最もよいと考えるので、検体の種々の量を小試験管にとり、濃硫酸1ccを加えて100°に4分間加熱した結果を次に示す。

Table III. Sensitivity of Colour Reaction

Sample	Colour Reaction
α-dl-cis-Bisdehydro- doisynolic Acid 2.5μg	Very Faint Yellow → Questionable Pink
5.0 "	Faint Yellow → Faint Pink*
10.0 "	Yellow → Pink*
20.0 "	Brilliant Yellow → Pink*

\*These colour densities were equivalent to about one-fifth of those of estrone.

確認限度は5.0~2.5μgで、その呈色の強さはエストロンの約1/5である。蛍光も弱い。

実験Ⅳ 呈色液の安定度 検体10μgを小試験管にとり、濃硫酸1ccを加え100°に4分間加熱して直に冷却し、光電比色計でS-53のフィルターを用いて一定時間毎に吸光度を測定した結果を次に示す。

Table IV. Stability of Colour Solution

Time (Min)	Reading of Photometer
0 - 3	83
5	82
10	82
20	82
60	83

Filter S-53, Room Temperature 10~12°

60分以内では殆んど変化を認めないから、呈色液はかなり安定である。

#### 実験V 検体量と呈色度の関係

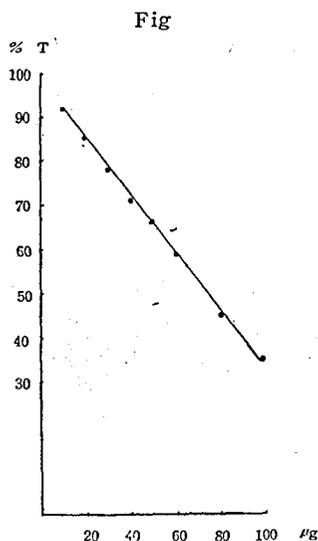
体検 10~100  $\mu\text{g}$  を小試験管にとり、濃硫酸 1 cc を加えて 100° に 4 分間加熱した後直に冷却し、光電比色計で S-53 のフィルターを用いて吸光度を測定した結果を次に示す。

Table V. Colour Density

Sample ( $\mu\text{g}$ )	Reading of Photometer (%)
10.0	91.5
20.0	85.5
30.0	78.0
40.0	71.0
50.0	66.5
60.0	59.0
80.0	45.0
100.0	35.0

Filter S-53, Room Temperature 10~12°

本表をグラフに表わすと次の通りで、図で明らかなように 10~100  $\mu\text{g}$  の間は直線を示し、Lambert-Beer の法則が成立する。



## 結 論

$\alpha$ -dl-cis メチルビスデヒドロジアシール酸は濃硫酸でステロイドの Kober 反応類似の呈色反応を現わし、その確認限度は 5.0~2.5  $\mu\text{g}$  で、呈色液は安定で且 10~100  $\mu\text{g}$  の間では Lambert-Beer の法則が成立する。本研究に使用した検体の御贈与を頂いた友田製薬株式会社村上雄研究部長に厚く感謝する。

## 文 献

- 1) Hohlweg, W. and Inhoffen, H. H. : Deutsch. Pat. 705862 (1941); 719572 (1942).
- 2) Heer, J., Billeter, J. R. and Miescher, A. : Helv. Chim. Acta, 28, 1349 (1942).
- 3) Anner, G. and Miescher, A. : Ibid., 29, 1889 (1946), 30, 1422 (1947).
- 4) Johnson, W. S. and Graber, R. P. : J. Am. Chem. Soc., 72, 925 (1950).
- 5) Kober, S. : Biochem. Z., 239, 209, (1931).

## Summary

$\alpha$ -dl-cis-Methylbisdehydroisynolic acid gave a colour reaction by concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  which was like to the Kober's colour reaction of steroids. The sensitivity was about 2.5~5.0  $\mu\text{g}$ . The colour solution was stable within 60 minutes and Lambert-Beer's law was applicable in the range between 10 and 100  $\mu\text{g}$ , therefore, a colorimetric analysis might be possible.

Received April 15, 1955

## 性腺刺戟ホルモンの研究 (第2報)\*,\*\*

## 白鼠卵巢重量増加法による妊馬血清性腺刺戟ホルモンの検定

長沢 佳熊, 越村 栄之助, 岡崎 精一

## Studies on Gonadotrophic Hormones. II.

## An Assay of Serum Gonadotrophin by Rat Ovarium Increasing Method

By Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI

英国薬局方の妊馬血清性腺刺戟ホルモン<sup>1)</sup>の検定法<sup>2)</sup>では, ホルモンを注射した白鼠の卵巢重量増加は低用量を与えたものは対照動物の卵巢重量の平均約10mgに対して40~50mg (4~5倍増加), 高用量を与えたものは80~100mg (8~10倍増加)になるような量を与え, 2-2用量検定法を行うように指示している。我国の白鼠の卵巢重量はやゝ小さく, 平均7mgであるから, 低用量は28~35mg, 高用量は56~70mgを示すような量を与えるのが適当と考えて用量と反応が直線関係を示す大体の範囲を調べた結果は英局方の記載とも一致する (実験I参照)。ただし, 動物の個体差による卵巢重量にかなりの差を認めるからその検討が必要であると考え, 各用量水準の卵巢重量増加の標準誤差を求め, 平均値±標準誤差の範囲外のを棄却して計算を行うと, 傾斜が幾分異なるが直線性は成立する (実験II参照)。2-2用量検定法にこの方式を適用すると誤差の信頼限界はかなり小さくなり, 効果比には余り変化がないからこの方法を採用するのがよいと考える (実験III, IV参照)。本法は我国の在来種の白鼠を用いても検定に利用できるとの結論を得たが更に精密な検討については別に報告する予定である。

## 実験の部

実験I 0.5cc中に妊馬血清性腺刺戟ホルモン標準品10, 20, 40, 80国際単位(iu)を含む水溶液を体重40~45gの白鼠に0.5cc皮下注射し, 6日目に卵巢を摘出し秤量した結果を次の表に示す。

Table I Ovarian Weight Increasing by Serum Gonadotrophin

Ovarian Weight							
Dose	10iu	Dose	20iu	Dose	40iu	Dose	80iu
Log Dose (x)	1.0000	Log Dose (x)	1.3010	Log Dose (x)	1.6021	Log Dose (x)	1.9031
mg	(d)	mg	(d)	mg	(d)	mg	(d)
17.2	-4.73	32.0	-14.41	52.1	-7.93	61.5	-20.90
16.6	-5.33	52.9	6.49	35.6	-24.43	107.0	25.00
26.6	4.37	47.5	1.09	58.5	-1.53	40.9	-41.50
30.6	4.67	40.2	-6.21	79.5	19.47	96.1	13.70
23.8	8.67	51.2	4.79	48.5	-11.53	101.5	19.10
21.2	1.87	43.5	-2.91	49.4	-10.63	32.8	-49.60
16.1	-0.73	39.5	-6.11	75.3	15.27	95.2	12.80
15.5	-5.83	72.5	16.09	117.8	57.77	70.0	-12.40
25.4	-6.43	38.4	-8.01	50.6	-9.43	133.2	50.80
26.3	3.47	46.4	0.00	33.0	-27.03	85.8	3.40
Total							
219.3		464.1		600.3		824.0	
Mean							
21.9300		46.4100		60.0300		82.4000	

\* 第1報は長沢佳熊, 越村栄之助: 衛生試験所報告, 70, 9 (1952).

\*\* 本研究の概要は昭和29年度厚生科学研究報告に報告した。

前表から回帰直線\*を求め、その直線性を検定すると次の通りである。

$$Y = 52.693 + 64.786(x - 1.4516)$$

Adjustment for Mean.....111059.982

Nature of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	19018.52	
Deviation from Regression	2	203.237	101.619
Between Amounts	3	19221.757	
Within Amounts	36	16252.43	451.456
Total	39	35474.19	

F (From Data) = 0.23

従つて標準品の4用量, 10, 20, 40, 80国際単位(iu)を与えたとき, 用量と反応は直線関係を示す。

実験Ⅰ 第1表から各用量に対する卵巢重量増加の標準誤差(S.E.)を求めた結果を次の表に示す。

Table Ⅱ Standard Error of Uterine Increasing

Dose	S. E. *	S. E. × 100 / Mean
10iu	5.357	24.43
20iu	8.700	18.75
40iu	25.116	48.40
80iu	31.108	37.75

$$* S. E. = \sqrt{\sum d^2 / (n-1)}$$

第Ⅰ, Ⅱ表からMean ± S. E. の範囲外のを棄却すると次の通りである。

Table Ⅲ Ovarian Weight within the Range of the Mean ± S. E.

Ovarian Weight								
	Dose 10iu		Dose 20iu		Dose 40iu		Dose 80iu	
	Log Dose(x) 1.0000		Log Dose(x) 1.3010		Log Dose(x) 1.6021		Log Dose(x) 1.9031	
	mg	(d)	mg	(d)	mg	(d)	mg	(d)
	17.2		52.9		52.1		61.5	
	16.6				35.6			
	26.3		47.5		58.5		107.0	
	26.6		40.2		79.5		96.1	
	23.8		51.2		48.5		101.5	
	21.2		43.5		49.4		95.2	
	25.4		39.5		75.3		70.0	
	—		38.4		50.6		85.8	
	—		46.4		—		—	
Total	157.1		359.6		449.5		617.1	
Mean	22.4429		44.9500		56.1875		88.1571	

本表から回帰直線を求め、その直線性を検定すると次の通りである。

$$Y = 52.935 + 69.679(x - 1.4516)$$

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

Adjustment for Mean.....83561.296			
Nature of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	15619.85	
Deviation from Regression	2	166.659	83.3495
Between Amounts	3	15786.551	
Within Amounts	26	3499.4	134.592
Total	29	19286.5	

F (From Data) = 0.62

この場合にも直線性は成立する。実験Ⅰ及びⅡの結果を次のグラフに示す。

実験Ⅱ 0.5cc中に妊馬血清性腺刺激ホルモン標準品 10, 20 国際単位 (iu) を含む水溶液及び市販妊馬血清性腺刺激ホルモン 10, 20 国際単位 (iu) を含む水溶液を製し、実験Ⅰと同様に操作した結果を次の表に示す。

Fig.

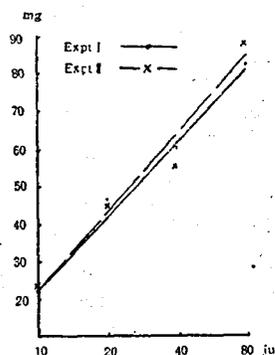


Table IV Ovarian Increasing by Serum Gonadotrophin

	Ovarian Weight							
	Standard				Sample			
	Dose	10iu	Dose	20iu	Dose	10iu	Dose	20iu
	mg	(d)	mg	(d)	mg	(d)	mg	(d)
	26.4	-1.822	50.5	-0.156	25.8	-3.180	31.9	-20.23
	29.7	1.478	41.2	-9.144	25.1	-3.880	48.2	-39.33
	29.5	1.278	46.2	-4.144	26.5	-2.480	62.5	10.367
	52.0	23.778	81.3	30.856	26.3	-2.680	68.2	16.067
	24.7	-3.522	49.0	-1.344	37.0	8.020	58.8	6.667
	18.9	-9.322	57.0	6.656	29.9	0.820	52.8	0.667
	28.4	0.178	48.3	-2.044	26.0	-2.980	53.8	1.667
	18.7	-9.522	30.3	20.036	24.4	-4.580	44.2	-7.933
	29.3	1.078	49.3	-1.044	37.4	8.420	48.8	-3.333
	—	—	—	—	31.4	2.420	—	—
Total	257.6		453.1		289.8		469.2	
Mean	28.222 (S <sub>1</sub> )		50.344 (S <sub>2</sub> )		28.980 (T <sub>1</sub> )		52.133 (T <sub>2</sub> )	

上表から効果比R及び誤差の信頼限界f. l. e. を求めると次の通りである。

$$I = 0.3010, E = (T_2 - T_1 + S_2 - S_1) / 2 = 22.638, F = (T_1 + T_2 - S_1 - S_2) / 2 = 1.274, b = E / I = 75.21,$$

$$M = F / b = 0.0169, R = \text{Antilog} M = 1.0396, S^2 = \sum d^2 / \sum (n-1) = 103.106, V = S^2 / 4 = 25.777$$

$$t \text{ (At } p=0.95 \text{ with 30 degrees of freedom)} = 2.04.$$

$$t \text{ (From Data)} = (T_1 + S_2 - T_2 - S_1) / 2\sqrt{V} = 0.10, A = V = 25.777, B = V / I^2 = 284.514, g = Bt^2 / b = 0.20942,$$

$\log f. l. e. = 2 + gM / (1 - g) \pm t \sqrt{A(1 - g) + BM^2 / b(1 - g)} = 1.8493 \sim 2.1597$ ,  $f. l. e. = 70.7 \sim 144.4\%$

実験IV 標準品及検体の各用量に対する卵巢重量増加の標準誤差 (S. E.) を求めた結果を次の表に示す。

Table V Standard Error of Ovarian Increasing

Table Vの結果からTable IV中の各用量の卵巢重量中, Mean  $\pm$  S. E. の範囲外のもの棄却すると次の通りである。

Dose		S. E*	S. E. $\times$ 100/Mean
Standard	10 iu	9.770	34.62
"	20 iu	13.770	27.35
Sample	10 iu	4.815	16.61
"	20 iu	11.136	21.36

\* S. E. =  $\sqrt{\sum d^2 / (n - 1)}$

Table VI Ovarian Weight within the Range of the Mean  $\pm$  S. E.

本表からR及びf. l. e. を求めると次の通りである。

t (From Data) = 0.073, R = 1.075, g = 0.02412, f. l. e. = 89.8 ~ 111.4%  
Table IVから計算した結果と比較するとRは大して差違がなく, f. l. e. はかなり小さい。

	Ovarian Weight							
	Standard				Sample			
	Dose	10iu	Dose	20iu	Dose	10iu	Dose	20iu
	mg	(d)	mg	(d)	mg	(d)	mg	(d)
	26.4	0.700	50.5	1.714	25.8	-1.125	48.2	-4.529
	29.7	4.000	41.2	-7.586	25.1	-1.825	62.5	9.771
	29.5	3.800	46.2	-2.586	26.5	-0.425	58.8	6.071
	24.7	-0.700	49.0	0.214	26.3	-0.625	52.8	0.071
	18.9	-6.800	57.0	8.214	29.9	2.975	53.8	1.071
	28.4	2.700	48.3	-0.486	26.0	-0.925	44.2	-8.529
	18.7	-7.000	49.3	0.514	24.4	-2.525	48.8	3.929
	29.3	3.600	—	—	31.4	4.475	—	—
Total	205.6		341.5		215.4		369.1	
Mean	25.700		48.786		26.925		52.729	

## 結 論

妊馬血清性腺刺激ホルモン標準品を用い, 用量と反応の直線範囲の検討及び市販品の検定を行つたところ, 英国薬局方の記載とはほぼ同様な結果を得, 幼若白鼠の卵巢重量増加法による検定法は我国の在来種の白鼠でも充分使用できるが, 動物の個体差の著明に大きなもの影響を除くため, 平均値 $\pm$ 標準誤差の範囲内にあるものだけを採り, 計算を行うと更に好い結果を得る。

本研究は昭和29年度厚生科学研究費によつて行つたもので厚く感謝する。

## 文 献

- 1) Brit. Pharm., VII, 252 (1952)
- 2) Brit. Pharm., VII, 815 (1952).

## Summary

To eliminate the error caused by individual difference, in an assay of serum gonadotrophin by rat ovarian increasing method, the authors preferred to omit the extremely large or small ovarium weight, over the range of the mean  $\pm$  S. E. in the experiment, thereby the more accurate result was obtained.

Received April 15, 1955

## 脳下垂体後葉注射液のアゾトメトリーによる窒素定量及び ホルモンの純度について\*

長沢佳熊, 竹中祐典

### Nitrogen Determination of Posterior Pituitary Injections and on the Purity of the Hormones

By Kakuma NAGASAWA and Yusuke TAKENAKA

脳下垂体後葉注射液のN含量については、Van Dyke<sup>1)</sup>の米国の市販製品及び、米局標準品についての報告がある。近年岩崎憲教授により創案されたアゾトメトリー法<sup>2)</sup>(以下AZM法と略す)は検体のきわめて微量を用いてNを定量することができるので、我々はこの方法を以て国産又は米国製のこの注射液についてN含量を測定し、市販品中のこのホルモンの純度及び使った原料の脳下垂体の新鮮度について若干の考察を行うこととした。

岩崎<sup>2)</sup>によれば、ケルダール-NのAZM法での測定域はNとして15~20 µg, 最適域は25~60 µg, 更にN<sub>2</sub>ガス発生率はNaBrO作用時の温度に著しく影響されることが示されているが、硫酸アンモニウムを用いての我々の実験条件下ではNとして50 µg附近が最適であった(実験I, Table I)。

薬局方に採用されているセミマイクロケルダール法は、蛋白質系物質のN含量を正確に求めるには種々の障害があり、特に使用する分解剤の種類によりそのN値には大きな変動があるといわれる(Miller,<sup>3)</sup> Hiller<sup>4)</sup>)。

次に我々は、分解条件の若干異なるセミマイクロケルダール法及びAZM法により、米国のNational Bureau of Standards (NBSと略す)のシスチン標準品、市販インシュリン注射液及びその粉末についてNを定量し、比較した(実験2, Table 2, 3)。

実験1から(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>態-Nについては、Nとして50 µg前後に相当する検体をとれば、室温の範囲ではNaBrOの作用時の温度とは無関係に定量率約98.6%を得ること、実験2からアミノ酸及び蛋白質製剤中のN測定値はセミマイクロケルダール法を基準にすると、AZM法ではそれぞれ約±5%, ±10%の差のあることを知った。

Table 4に示すとおり、国産品は同一社の製品でも1単位についてN量にかなりの差を示し、米製品はほとんど同じ値を示す。これは前者の純度が一様でなく、後者は一様であることを意味する。又前者はH製品2個を除き、いずれも後者より純度が悪く、オキシトシン注射液ではその性質上からも純度が優る。

又、当所で製造した脳下垂体後葉標準品のN含量の少いことは、原料鮮度のよいことを示すもので、市販品の多くが鮮度の悪い脳下垂体を原料としていることが察知される。

脳下垂体後葉注射液のN含量即ち純度をセミマイクロケルダール法で定量するには、検体約2.5cc(アンプル約5管)を必要とし、従来各国の薬局方ともN測定法を採用していないが、AZM法によればアンプル1管で充分であり、薬局方検査法としても可能である。なお、Van Dyke<sup>1)</sup>の報告しているN量をTable 5に示す。

最後に、アゾトメトリー法につき懇切に御指導下さった、金沢大学教授岩崎憲博士に深甚の謝意を表す。

### 実験の部

**ケルダール-N-AZM法** ケルダール酸化によつて得た硫酸アンモニウムに直接にNaBrOを作用させて次式の反応により発生するN<sub>2</sub>ガス容をアゾトメータによつて測定する。



- 試薬1) 稀硫酸液: 濃硫酸1容を飽和硫酸カリウムで5倍に稀釈しブドウ糖を0.3%の割合に加える。  
2) NaOH-NaCl液: 10%水酸化ナトリウム液2容と飽和塩化ナトリウム液5容とを混合する。  
3) NaBrO試液: 臭素0.5ccを氷冷した10N-水酸化ナトリウム液20ccに溶かす。  
4) 補給液: 飽和塩化ナトリウム水溶液。

操 作 検液1ccと稀硫酸1ccとを曲頸酸化フラスコにとり、無色澄明になるまで加熱し、冷後NaOH-NaCl液

\* 日本薬学会昭和29年11月第2例会 口演

4 ccを混和してアゾトメータに吸入し、更にフラスコを2ccづつで2回洗い、吸入する。アゾトメータ中に炭酸ガスを5分間通じてメータ内の空気を完全に炭酸ガスで置換し、NaBrO試液1ccを吸入し、約100回振りまぜたのち、メータ中に補給液を満たし、水槽中に30分間入れN<sub>2</sub>ガス容を読む。表により標準状態のときの容量に換算する。

実験1 最適測定域の検討 硫酸アンモニウム (JIS一級 純度99%以上)を80°で4時間乾燥し、1cc中(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50γを含む水溶液 (この1cc中にはNとして10.5γを含む)を製し、検液とする。

Table 1.

Study on the Best Fit Amount of N when Measured by Kjeldahl-Azotometry in Our Laboratory  
Sample: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (JIS 1st Grade, Purity 99%) 50γ/cc (Each cc contains 10.5γ of N)

cc of Sample Solution Used	N (γ)		Expr./Theor. × 100	Temp. of oxydation by NaBrO	
	Expr.	Theor.			
1	9.06	10.5	86.2	20°C	
1	9.27	10.5	88	17.5	
2	18.9	21.0	90	17.5	
2	18.2	21.0	86.5	21	
3	27.3	31.5	87.0	19	
3	27.8	31.5	88.3	19	
4	36.8	42.0	87.6	15	
4	37.0	42.0	88	19	
5	52.3	52.5	99.6	Mean 98.6	21
5	52.6	"	100.2		20
5	52.5	"	100		20
5	50.4	"	96		20
5	51.0	"	97.3		19
6	60.1	63.0	95.5	19	
6	59.5	63.0	94.8	19	
7	70.3	73.5	95.6	15	
7	70.2	73.5	95.5	21	

実験2 セミマイクロケルダール法 (SK法) と AZM法 との比較 酸化剤としてSK法ではK<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AZM法ではK<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>のみ (試薬参照) を用いた。

1) Cystine (NBS Standard)

AZM: Cystineを硫酸酸性の水に溶かし400γ/ccとする。

SK: " 3000γ/ccとする。

Table 2.

	γ of Sample	N-content (γ)					mean	Expr. Value by NBS	%	Oxidizing Time(h)
		1	2	3	4					
A Z M	400	48.5	49.0	49.0	48.2	48.6	46.6	104.3	12	
S K	3000	347	344	346	361	349.5	350	99	8	

AZM.....Azotometry Method by Dr. K. Iwasaki

SK.....Semi-micro Kjeldahl Method by U. S. P.

2) Insulin Injection.

AZM: 20u./ccの注射液を水で4倍に稀釈し、5u./ccとする。

SK: 20u./cc × 2を使用。

## 3). Insulin Powder

AZM: 鯨膵臓から製したInsulin結晶 (22u./mg) 4 mgを4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100ccに溶かす.

8.8u./cc

SK: 22u./mg × 2 を使用.

Table 3.

Name of Sample	SK N(γ)/100u.	AZM N(γ)/100u.	Ratio of Value obtained SK and AZM	Oxidizing Time	
				SK	AZM
S-1	1090	1200	100 : 110	9h.	12h.
S-2	1070	1160	100 : 180	9	12
S-3	898	1045	100 : 116	9	12
N	1195	1150	100 : 96.2	12	14
T	675	610	100 : 90.5	8	12
Powder(whale)	635	660	100 : 104	14	14

実験3 脳下垂体後葉ホルモン注射液のN含量 注射液の1ccを正確にとり, 水で10倍に稀釈し検体とする.  
1u./cc

1u./cc含有の検体についてそのN量を測定し, 概量が50γ以下のものについては, 50γ前後になるように検液cc数を増して6回づゝ測定を行い, その平均値を求めた。

Table 4.

Sample	Unit measured by J.P. Method in our Laboratory	N(γ)/1u. (Mean of six Experiments)	σ (S.D.)	Oxidizing Time (h)
A-1*	10	47.6	0.179	20
A-2*	10	27.2	0.210	18
A-3*	10	34.4	0.746	12
H-1*	12	14.3	0.537	12
H-2*	10	14.9	0.95	12
H-3*	8	24.0	0.313	12
P-1*	9	62.0	1.11	12
P-2*	9.5	53.7	0.224	12
P-3*	10	32.2	0.487	12
Pt *	11	46.1	0.560	18
Am-1**	9	19.8	0.173	10
//-2**	10	19.2	0.40	10
//-3**※		8.2	0.197	18
J.P. Standard		12.7	0.162	10

\* : Preparations made in Japan

\*\* : " U.S.A.

※ : Oxytocin Injection

S.D. : Standard Deviation  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{N}}$ 

Table 5.1)

Sample	N(γ)/1u.
U.S.P. Standard	20.3
Commercial Posterior Pituitary Powder	35
Pitocin	4.6
Pitressin	3.9

## 文 献

- 1) Van Dyke, H. B., : J. Pharmacol. Exp. Therap. 74, 190 (1942)
- 2) 岩崎 憲, : 生化学, 23卷4号24 (1951)
- 3) Miller, L., Houghton, J. A. : J. Biol. Chem. 159, 373 (1945)
- 4) Hiller, A., Plazin, J., Van Slyke, D. D., : J. Biol. Chem. 176, 1401 (1948).

## Summary

Nitrogen contents of some Posterior Pituitary Injections prepared in Japan, in U. S. A. and of the Japanese Pharmacopoeia Standard were determined by Dr. K. Iwasaki's azotometry method.

Comparing with the U.S. Commercials, the Japanese showed generally high and variable value in the nitrogen content per unit, these facts suggested the purities of the later were inconstant and low. The nitrogen contents of some Oxytocin Injections were allgedly low.

The low value of nitrogen content of Japanese Pharmacopoeia Standard prepared in our laboratories was due to the use of the high freshness of the starting materials, while most commercials in Japan having high value of that depended on the starting materials of low freshness. By the use of azotometry method, only one ampoule of a sample was enough to assay, but by the semi-micro Kjeldahl method described in the Japanese or U. S. Pharmacopoeia, more than five ampoules must be required in the assay.

Received April 11, 1955

## 国立衛生試験所標準品中ステロイド系物質の

## 物理化学的恒数の測定値について

長沢 佳 熊, 渡 辺 俊 雄

## On Physical and Chemical Constants of Reference Standard of Steroids

By Kakuma NAGASAWA and Toshio WATANABE

昭和27年6月厚生省告示により当所が数種の国立衛生試験所標準品を製造し配布することとなつた。著者等は米局参考標準品を標準として、日局Ⅴ<sup>1)</sup>、国局<sup>2)</sup> (1953)、米局Ⅷ<sup>3)</sup>、英局Ⅳ<sup>4)</sup>法に準拠して、エストロン、エストラジオール、安息香酸エストラジオール、プロピオン酸テストステロン、酢酸デスオキシコルトン、プロゲステロン、及びジエチルステルベストロール、重酒石酸エピレナミン等の純度を測定し、国立衛生試験所標準品を製造した。

## 実 験 の 部

材料：国立衛生試験所標準品=エストロン、エストラジオール (estradiol-17 $\beta$ )、プロピオン酸テストステロン、安息香酸エストラジオール、酢酸デスオキシコルトン、プロゲステロン、ジエチルステルベストロール、重酒石酸エピレナミン、米局参照標準品=エストロン、エストラジオール (estradiol-17 $\beta$ )、安息香酸エストラジオール、プロピオン酸テストステロン、プロゲステロン、ジエチルステルベストロール、重酒石酸エピレナミン。

試薬：塩酸ヒドロキシラミン：再結晶した後減圧乾燥し融点 151° のもの。氷酢酸：過マンガン酸カリウムを加えて精留し沸点 117~118° のもの。塩化ベンゾイル：沸点 197° の精留したもの。ジオキサン：N塩酸を 10% 加えて約 7 時間煮沸し、空気を通じてアルデヒドを除き、炭酸カリウムを加えて水層をとり、更に炭酸カリウムを加えて 1 日放置し、乾燥後蒸留し更にナトリウムを加えて数日放置後精留し沸点 101° のもの。

操作法：融点、確認試験、比旋光度は、日局<sup>1)</sup>、国局<sup>2)</sup>、米局<sup>3)</sup>に従い、融点測定法については特に融点標準品測定法に準じた。

[実験 1] : Table 1 は各標準品の融点を示す。

Table 1.

Compounds	Manufactured Date	m. p.	※
Estrone	1953	259 - 260.2	259 - 260.2
	1954	259 - 260.2	259 - 260.2
Estradiol-17 $\beta$	1953	176 - 177.4	176 - 177
	1954	174.5 - 175.5	176 - 177
Estradiol Benzoate	1953	192.6 - 194.2	192.4 - 193.7
	1954	192.7 - 193.9	192.7 - 193.7
Diethylstilbestrol	1953	169.5 - 172	170 - 171
	1954	170.0 - 171.5	170 - 171
Testosterone Propionate	1953	120.5 - 121.5	120 - 121
	1954	120.5 - 121.5	120 - 121
Epinephrine Bitartrate	1953	149.5 - 151	150.5 - 152
Progesterone	1953	128 - 129	128.5 - 129.5
	1954	128 - 129	128.5 - 129.5

Compounds	Manufactured Date	m. P.	※
Desoxycorticosterone Acetate	1952	155.3-157.6	
	1953	158.4-160.0	
	1954	158.1-160.0	

※ Melting point of U.S.P. Reference Standards, tested at the same time with National Hygienic Laboratory Standards.

〔実験2〕 確認試験：各標準品のオキシム、ベンゾエート、アセテート、及び遊離物の融点でエストロンのオキシムは日局、米局により、プロピオン酸テストステロンのケトオキシムは国局、プロゲステロンのジオキシムは国局及び米局の両者によるが同一値を示した。エストラジオールのベンゾエートは日局、国局、ジエチルステルベストロールのアセテートは国局、米局により、安息香酸エストラジオールの遊離エストラジオールは日局、国局、米局、プロピオン酸テストステロンの遊離テストステロンは国局、米局、酢酸デスオキシコルトンの遊離デスオキシコルトンは米局、国局による。各々の融点を Table 2 に示す。

Table 2. Identification test : oxime, ketoxime, benzoate, acetate, original material.

Compounds	Manufactured Date	Derivatives	M. P.	※※
Estrone	1953	oxime	232 -233	232 -233
	1954	oxime	232 -233	
Estradiol-17 $\beta$	1953	benzoate	192.6-194.0	194 -195
	1954	benzoate	192.6-194.0	
Estradiol Benzoate	1953	original	176.7-177.4	174.3-174.6
	1954	original	177 -178	
Diethylstilbestrol	1954	diateate	121 -121.8	121.8-122.6
Testosterone Propionate	1953	original	152 -153.5	
	1954	original	151 -152	
	1953	ketoxime	168 -170	
	1954	ketoxime	168 -170	
Progesterone	1953	dioxime	238 -240	237 -240
	1954	dioxime	237 -238	
Desoxycorticosterone Acetate	1953	original	141 -143	
	1954	original	141 -142	

※※ By the description of the U.S.P. Reference Standards. (1953)

〔実験3〕 Table 3. に各標準品の比旋光度を示す。室温 20° 又は 25° において測定した。

Table 3. Specific rotation.

Compounds	Manufactured Date	Specific rotation	※※
Estrone	1953	= +164~165	165.8
	1954	= +164~165	
Estradiol-17 $\beta$	1953	= + 78~ 79	77.3
	1954	= + 78~ 79	
Estradiol Benzoate	1953	= + 59	59.9
	1954	= + 60	

Compounds	Manufactured Date	Specific rotation	※※
Testosterone Propionate	1953	= + 84	86.3
	1954	= + 83	
Progesterone	1953	= +179~180	180
	1954	= +180	
Desoxycorticosterone Acetate	1952	= +170	
	1953	= +170	
	1954	= +170	

※※ By the description of the U. S. P. Reference Standards. (1953)

Table 4. Quantitative assay

Compounds	Manufactured date	%	※※
Diethylstilbestrol	1953	99.9	99.7
	1954	99.76	
Epinephrine Bitartrate	1953	100	100 ※※※

※※ By the description of the U. S. P. Reference Standards (1953)

※※※ Quantitative analysis (UV absorbancy) results 100% by U. S. P., J. P. for the U. S. P. Reference Standard.

以上国立衛生試験所の各ステロイド系標準品は、日局、国局、米局に準じて測定し、一部は英局を参照として試験した。使用法及び綜説的説明については、"ホルモン薬品学"<sup>6)</sup>及び"標準品と標準品による試験について"<sup>7)</sup>を参照されたい。

## 文 献

- 1) 日局Ⅵ, 667, 44, 69, 71, 649.
- 2) 国局 (1953), 154, 155, 156, 88, 90, 193, 238.
- 3) 米局Ⅳ, 766, 228, 225, 231, 216, 165, 172, 492, 608, 756.
- 4) 英局Ⅷ, 365, 366, 160, 488, 436, 553.
- 5) 長沢, 鹿島, 西崎: 本誌. 本号, 93 (1955)
- 6) 長沢佳熊; ホルモン薬品学 (昭29年), 立川図書出版.
- 7) 長沢佳熊; 標準品と標準品による試験について (1953).

## Summary

Comparing the physical and chemical constants by U. S. P. XIV, I. P. 1953, B. P. VIII, and J. P. VII method, between standard materials of National Hygienic Laboratory estrone, estradiol-17 $\beta$ , desoxycorticosterone acetate, progesterone, testosterone propionate, and those of U. S. P., the values were almost similar.

Received April 30, 1955

## 国立衛生試験所標準品中ステロイド系物質の紫外線吸収について

長沢 佳熊, 渡辺 俊雄, 太幡 利一

## On Ultra-violet Absorbancy of Reference Standard of Steroids

By Kakuma NAGASAWA, Toshio WATANABE and Toshikazu TABATA

国立衛生試験所標準品中には, エストロン, エストラジオール (estradiol-17 $\beta$ ), 安息香酸エストラジオール, プロピオン酸テストステロン, プロゲステロン, 酢酸デソキシコルトン, 等が製造されているが, ステロイド系化合物では現在完全な化学的定量試験がなく, 純度の検定に紫外線の吸収試験が重要視されている。上記の化合物についての紫外線吸収に関する報告はかなりあるが, 今回著者等は標準品としての純度測定に際し, 米局標準品を対照として両者につき測定を行つた結果を次に報告する。

## 実験の部

国立衛生試験所標準品: estrone, estradiol-17 $\beta$ , testosterone propionate, progesterone, desoxycorticosterone acetate, 米局参考標準品: estrone, estradiol-17 $\beta$ , testosterone propionate, progesterone.

試薬 (溶媒): 95%無アルデヒドアルコール, (国民医薬品集無水アルコールを蒸留後アルカリ性酸化銀上煮沸した後蒸留し, 更にヨウ素を加え24時間煮沸後過量のヨウ素を亜鉛末で沈澱させた後精留し, 95 V/V%としたもの)

測定装置: Beckmann Spectrophotometer DU 形

操作: 100ccのメスフラスコに各々の紫外線吸収 log $\epsilon$  が0.7~0.8に極大値がくるように試料1~数mgを微量天秤で精密に秤取し, エチルアルコールに溶かして測定する。測定時の温度は大体15~25°で行つた。夏期高温時は測定誤差が大きい。

i) **estrone**: fig. 1は術試及び米局標準品と吸収曲線はほぼ同一の曲線を示し, 吸収極大値は一致する。1954年度標準品も1953年度のものと同じである。参照として合成エストロンについては fig. 2), 尿抽出エストロンについては fig. 3), 4), 5), 6) の報告がある。

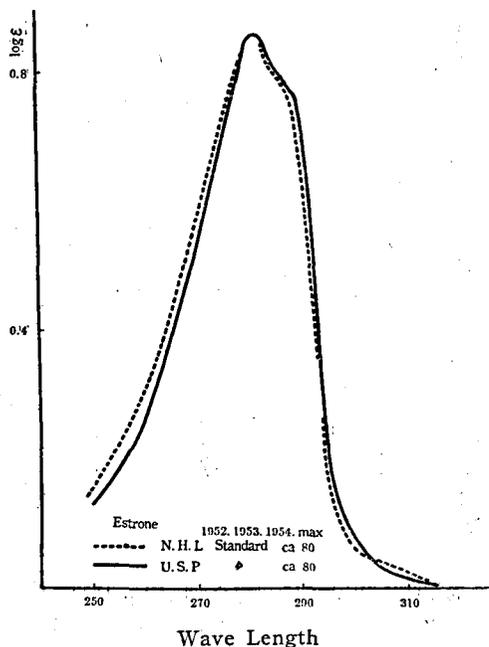


Fig. 1. Estrone in absolute alcohol

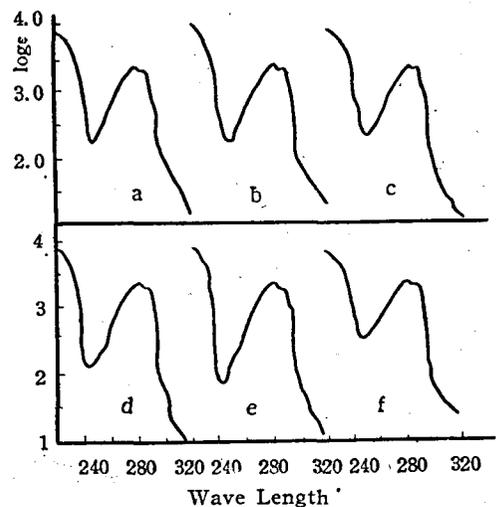


Fig. 2. a: Natural Estrone. b-f: Synthetic Estrone in absolute alcohol

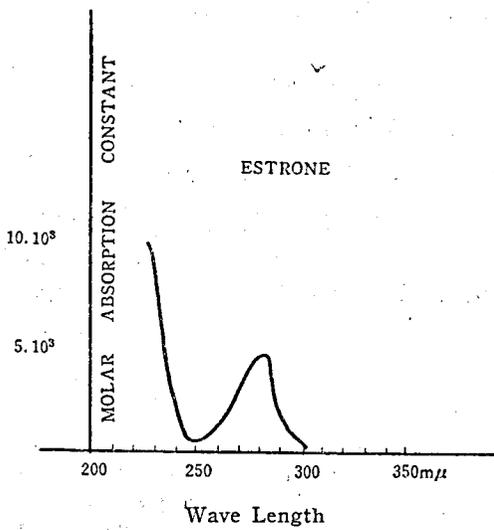


Fig. 3. Estrone in alcohol

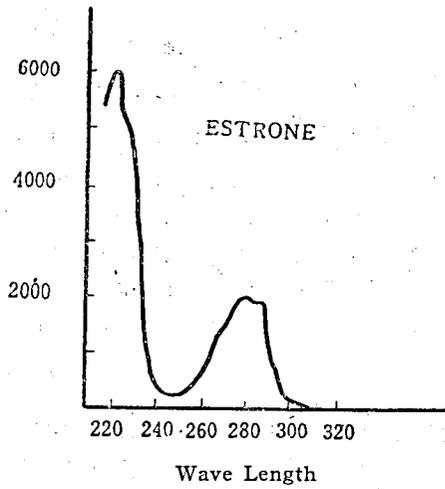


Fig. 4. Estrone in alcohol

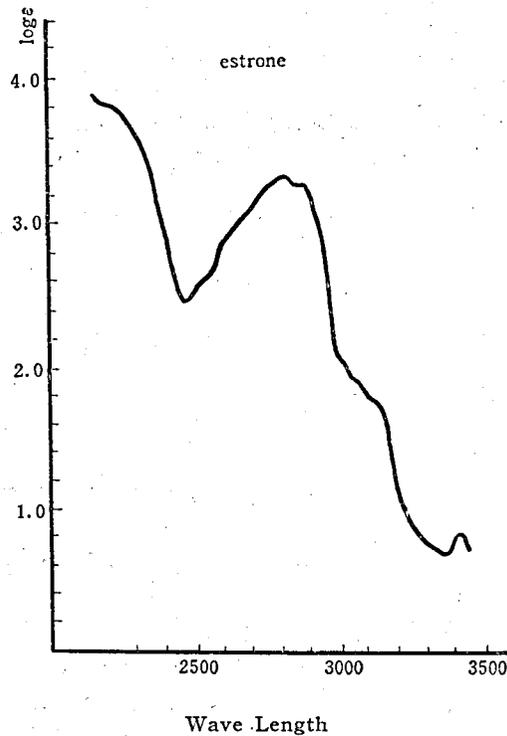


Fig. 5. Estrone in alcohol

ii) **estradiol-17 $\beta$** ; fig 6 に示すように衛試標準品及び米局標準品の吸収曲線はほぼ同一で、1953, 1954 両年度とも同一である。吸収極大値は一致する。fig 7<sup>5)</sup> は尿抽出エストロンからのエストラジオールの吸収曲線である。

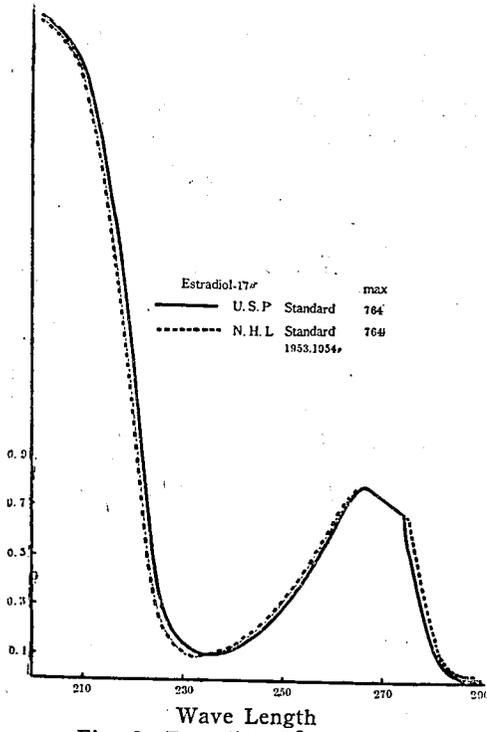


Fig. 6. Estradiol-17 $\beta$  in alcohol

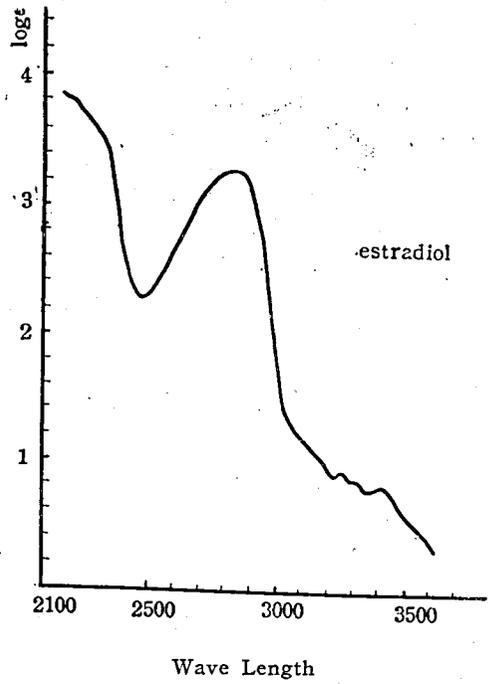


Fig. 7. Estradiol-17 $\beta$

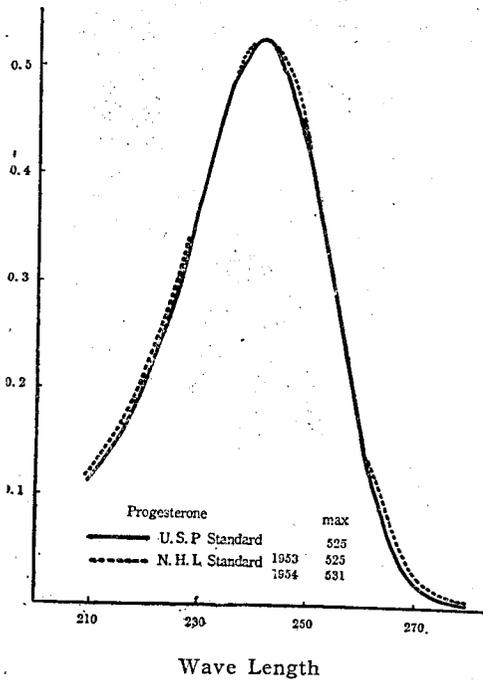


Fig. 8. Progesterone in absolute alcohol

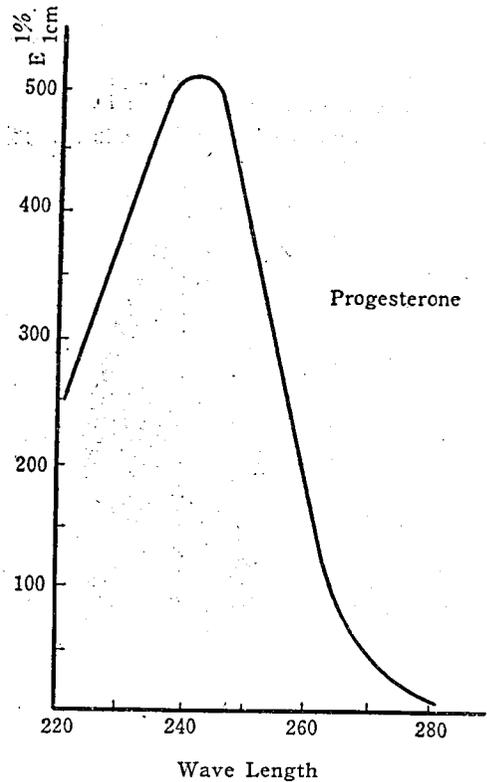


Fig. 9. Progesterone in absolute alcohol

iii) progesterone: fig.8に示すように衛試, 米局の両者はほぼ曲線は一致し極大値は同一である。参照として fig.9) を示す。

iv) desoxycorticosterone acetate: fig.10 に示す吸収曲線は衛試標準品の中のもので, 1952, 1953 年度のものに曲線, 及び極大値は同一で 1954 年度製造のものは曲線はほぼ一致するが極大値は 455 である。参照として fig.11) を示す。

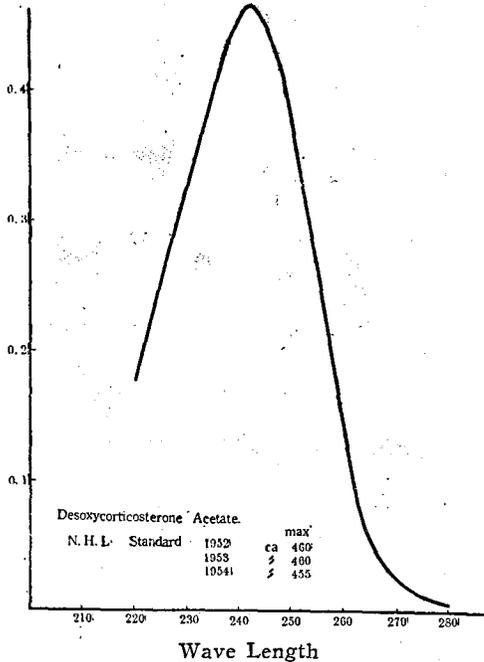


Fig. 10. Desoxycortone acetate in alcohol

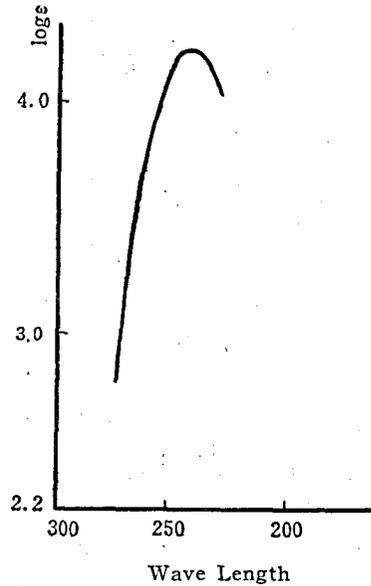


Fig. 11. Desoxycortone acetate in alcohol

V) testosterone propionate: fig.12 に示す米局, 衛試, 両者の吸収曲線はほぼ同一で極大値は一致する。

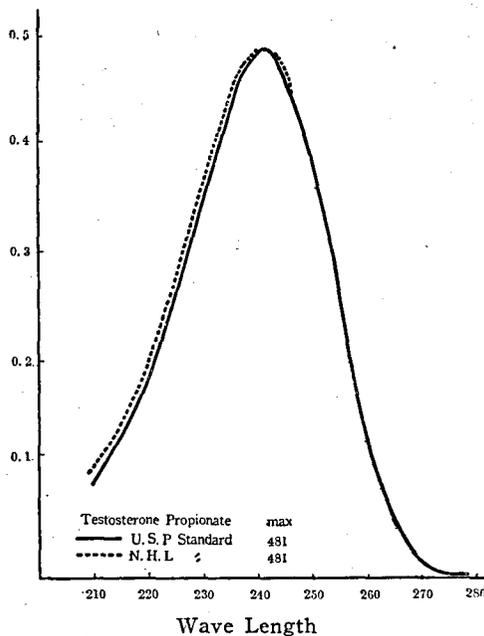


Fig. 12. Testosterone propionate in alcohol

以上の結果からして国立衛生試験所標準品と米局参考標準品との前述の種目のステロイド系物質はほぼ紫外線吸収曲線及び極大値は一致し, また吸収曲線については既発表の報告とほとんど同様である。

#### 文 献

- 1) G. Anner, K. Miescher: *Helv. Chim. Acta*, **33**, 1383, (1950).
- 2) W. Dirscherl, F. Hanusch: *Z. physiol. Chem.*, **233**, 18 (1935).
- 3) A. Butenandt, K. Tscherning, Dannenbaum: *Z. physiol. Chem.*, **229**, 167, 185, 192, (1934).
- 4) R. A. Morton: *The Application of Absorption Spectra* 42, (1951).
- 5) R. A. Morton: *The Application of Absorption Spectra* 43, (1951).
- 6) W. H. Pearlman, Emilg Cerceo: *J. Biol. Chem.*, **176**, 848 (1948).
- 7) T. Reichstein, M. Steiger: *Helv. Chim. Acta*, **20**, 1164, (1937).

#### Summary

Comparing the absorption by ultra-violet between standard materials of National Hygienic Laboratory estrone, estradiol-17  $\beta$ , desoxycorticortone acetate, progesterone, testosterone propionate, and those of U. S. P., the absorption curves are similar and their maximum values coincide each other.

Received April 30, 1955

ジギタリスの検定 (第2報)<sup>1)</sup>

冬眠カエルによるジギタリス葉末の検定及び LD50 の季節的  
変動について

長沢 佳 熊, 中山 豪 一, 芹 沢 淳

On Digitalis Assay (2) Assay of Digitalis Leaf by Hibernating Frog  
and Seasonal Variation of LD50

By Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA

まえがき ジギタリスの検定法については第1報<sup>1)</sup>でカエル法, 鳩法につき詳細に報告した。カエル法では, その LD50 の季節的変動が, 特に冬眠カエルに於て考えられるので, 冬眠カエル (2月中旬) を用いて, その LD50 を求め, 第1報の夏期カエル及び晩秋カエルの資料からの LD50 と比較検討した。次に冬眠カエルを用いて, ジギタリス葉末 (武田A葉及びB葉, 三共C葉及びD葉) 四種の力価を検定したので報告する。

標準品 国際標準品 (1949年度, 以下 Ist と略す) 及び日局標準品 (1952年度, 以下 NSt と略す) を用いた。

実験方法 A 標準液及び検液の調製法 ソックスレット法<sup>1)</sup>によりアルコール抽出して調製し, 検定当日 0.6%塩化ナトリウム液で適当に稀めて使用した。

B 操作法 本実験に用いたカエルは, 二月中旬業者より購入し, 3~4日間, 22° の恒温室内に放置した後, 第1報<sup>1)</sup>のカエル法に準拠して検定を行つた。使用したカエルは1群当り20匹とし, LD50 は Bliss<sup>2)3)</sup>, Finney<sup>4)</sup>の報告に準拠して計算し, 効価比及び信頼限界は英局Ⅷ法<sup>5)</sup>, 及び Gaddum<sup>6)</sup>の報告に準拠して求めた。

実験結果 A 冬眠カエルの LD50

1) NSt: Table 1 に 4 時間観察から得た NSt 5 用量による冬眠カエルの LD 50 の計算例を示す。Fig 1 に用量反応曲線を示す。

Table 1. Estimation of LD 50

Dose (mg)	Modified log dose x	r	n	%	Empirical probit	Expected probit Y	nw	Working probit y	nwx	nwy
0.16665	-2	1	20	5	3.36	3.12	3.6	3.38	-7.2	12.168
0.19998	-1	3	20	15	3.96	4.0	8.8	3.96	-8.8	34.848
0.239976	0	7	20	35	4.61	4.9	12.7	4.62	0	58.674
0.2879712	+1	5	20	75	5.67	5.2	12.5	5.64	12.5	70.500
0.34556544	+2	19	20	95	6.64	6.5	5.4	6.63	10.8	35.802
							43.0		7.3	211.992

$$\bar{x} = 7.3/43.0 = 0.1698$$

$$\bar{y} = 211.992/43.0 = 4.9300$$

$$S_{nwx}^2$$

$$S_{nwy}^2$$

$$S_{nwx}^2$$

$$\begin{array}{r} 57.3 \\ - 1.2393 \\ \hline S_{xx} = 56.0607 \end{array}$$

$$\begin{array}{r} 82.020 \\ - 35.9893 \\ \hline S_{xy} = 46.0307 \end{array}$$

$$\begin{array}{r} 1085.1871 \\ 1045.1304 \\ \hline S_{yy} = 40.0567 \end{array}$$

$$\begin{array}{r} 37.7952 \\ \hline 2.2615 \dots \dots x^2[3] \end{array}$$

$$b = S_{xy}/S_{xx} = 0.8211$$

$$V(b) = 1/S_{xx} = 0.0233$$

The Regression equation is

$$Y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) = 4.93 + 0.8211(x - 0.1698) = 0.8211x + 4.7906$$

$$\text{Log LD50} = \bar{x} + \frac{5 - \bar{y}}{b}$$

$$\therefore \text{LD 50} = 251\text{mg}$$

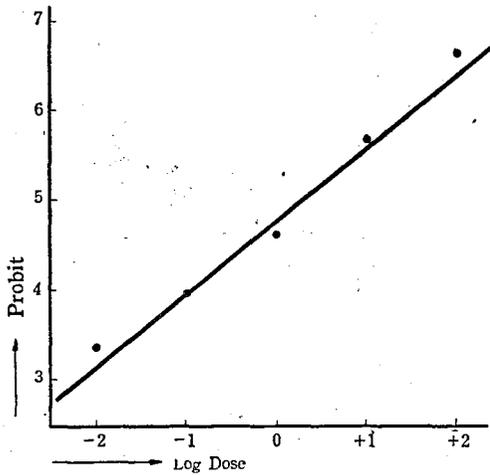


Fig.1. Regression line of log-dose-response (Probit)

$$g = t^2(Vb)/b^2 = \frac{(1.96)^2 \times 0.0233}{(0.8211)^2} = 0.102$$

log fiducial limits of error =

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

= 1.9905 ~ 0.0514

fiducial limits of error = 0.9783 ~ 112.6

∴ fiducial limits of error (%) = 93.4 ~ 107.5% (P = 0.95)

Table 2 に夏期カエル, 晩秋カエル, 冬眠カエルの LD50 をまとめて示す.

Table 2. Seasonal Variation of LD50 (NST)

	LD50 (mg)	Fiducial limits of error (P=0.95) %	Mean LD50 (mg)	Variance × 10 <sup>6</sup>	Degrees of freedom	Calculated t value
Hibernating frog Jan. ~ Feb.	0.240	88.2-117.9	0.238	227	6	8.55*
	0.220	91.4-108.6				
	0.214	84.6-114.0				
	0.247	93.1-107.4				
	0.252	94.2-106.9				
	0.241	92.3-110.8				
Summer frog (Aug.)	0.251	93.4-107.5	0.329	460	3	7.45**
	0.297	89.7-119.7				
	0.338	93.6-111.8				
	0.344	99.9-101.2				
Late Autumn frog (Oct. ~ Nov.)	0.366	89.8-129.5	0.247	247	7	1.13***
	0.210	97.5-107.3				
	0.248	95.5-107.0				
	0.261	95.2-107.4				
	0.253	94.0-107.6				
	0.252	93.0-113.8				
	0.243	94.3-108.8				
0.254	94.8-108.8					
0.253	95.9-106.3					

\* Between hibernating and summer frog, \*\* Between summer and late autumn frog, \*\*\* Between late Autumn and hibernating frog.

Table 2 の結果から夏期カエルと冬眠カエル間, 夏期カエルと晩秋カエル間, 及び晩秋カエルと冬眠カエル間の分散には有意差が認められないので, それぞれの平均 LD50 間の差を検討した結果, 冬眠カエルと夏期カエル間, 及び晩秋カエルと夏期カエル間には有意な差が認められ, 晩秋カエルと冬眠カエル間には有意な差が認められない.

2) ISt: Table 3に4時間観察から得た ISt による冬眠カエル, 晩秋カエルの LD50 を示す.

Table 3. Seasonal Variation of LD50 (ISt)

	LD50 (mg)	Fiducial limits of error (P=0.95) %	Mean LD50 (mg)	Variance $\times 10^6$	Degrees of freedom	Calculated t value
Hibernating frog (Feb.)	0.138	91.5-107.1	0.146 (93.0-108.9%)	211	6	6.67*
	0.175	94.0-113.8				
	0.148	90.1-110.1				
	0.149	92.9-108.0				
	0.141	92.6-106.5				
	0.146	92.3-108.7				
0.128	97.0-104.6					
Late Autumn frog (Oct.)	0.213	93.5-111.5	0.186 (94.1-108.2%)	506	4	
	0.193	93.5-112.7				
	0.151	96.8-102.0				
	0.184	93.7-105.7				
	0.190	93.1-109.0				

\* Between hibernating and late autumn frog.

Table 3の結果から冬眠カエルと晩秋カエルの分散に有意差が認められないので, 平均 LD50 間の差を検討した結果, 両者間に有意な差が認められない.

#### B 冬眠カエルを用いたジギタリス葉末の検定.

1) NSt と ISt の効価の比較: Table 4に2-2用量検定成績を示す. Table 5に3-3用量検定成績を示す.

Table 4. The Results of 2 and 2 Dose Assay (NSt/ISt)

Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	Unit/g	Mean potency (unit/g)
3 hour	1.078	92.7-110.0	9.30	7.72 (84.1-119.2)*
	1.056	84.6-129.3	7.64	
	0.987	83.6-118.9	7.14	
	0.882	82.8-115.5	7.71	
	0.858	80.9-119.3	7.45	
	0.946	81.9-121.4	8.22	
	0.913	82.3-119.1	6.61	
4 hour	1.025	87.6-116.3	8.84	8.26 (86.4-118.3)*
	0.866	84.5-110.5	9.34	
	1.190	88.8-127.6	8.21	
	1.122	84.4-123.1	9.68	
	1.068	92.6-109.8	7.37	
	0.927	90.5-108.1	8.00	
	0.939	86.2-115.3	8.16	
	0.939	86.0-114.1	8.10	
	0.900	82.1-116.4	7.82	
	0.898	82.3-118.7	7.80	
	1.104	86.9-130.1	7.99	
	1.127	83.7-124.2	8.16	
1.303	87.2-123.9	7.86		

Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	unit/g	Mean potency (unit/g)
5 hour	1.074	90.8—113.7	7.41	7.14
Next morning	0.949	88.2—110.6	8.19	8.23 (88.7—117.1)*
	1.190	88.8—127.7	7.83	
	0.997	88.3—113.2	8.65	
	1.168	89.5—122.8	8.45	
	0.925	88.8—111.0	8.03	

\* Fiducial limits of error

Table 5. The Result of 3 and 3 Dose Assay (NSt/IST)

Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	Parallelism		Curvature		u/g	Mean potency (u/g)
			t	P	t	P		
3 hour	1.021	85.5—118.0	0.79	0.4—0.5	{ 0.18 0.45 0.17	{ 0.8—0.9 0.6—0.7 0.8—0.9	7.39	7.78 (85.9—114.6)*
	0.856	82.7—114.8	0.46	0.6—0.7	{ 0.17 2.10	{ 0.8—0.9 0.02—0.05	7.44	
	0.980	89.6—111.1	0.34	0.8—0.9	{ 0.93	{ 0.3—0.4	8.5	
4 hour	1.060	86.3—119.1	1.11	0.2—0.3	{ 1.56 0.59 1.00	{ 0.1—0.2 0.5—0.6 0.3—0.4	9.15	8.08 (89.0—113.0)*
	1.096	93.9—107.4	2.65	0.001—0.01	{ 0.60 0.11	{ 0.5—0.6 0.9<	9.46	
	0.873	90.6—108.7	1.09	0.2—0.3	{ 1.58 0.83	{ 0.1—0.2 0.4—0.5	7.53	
	0.878	90.7—108.6	0.74	0.4—0.5	{ 0.28 0.36	{ 0.02—0.05 0.7—0.8	7.58	
	0.939	88.6—111.0	0.15	0.8—0.9	{ 0.35 1.10	{ 0.7—0.8 0.2—0.3	8.15	
	0.912	85.4—113.0	0.33	0.7—0.8	{ 0.70 0.1	{ 0.4—0.5 0.9<	7.92	
	0.992	90.4—110.4	1.75	0.05—0.1	{ 1.92 0.52	{ 0.05—0.1 0.6—0.7	7.18	
	0.844	88.9—109.9	2.44	0.01—0.02	{ 2.13 0.11	{ 0.01—0.02 0.9<	7.33	
	1.375	87.2—124.3	0.36	0.7—0.8	{ 0.21 0.53	{ 0.8—0.9 0.5—0.6	8.29	
	1.128	87.8—118.0	0.09	0.9<	{ 0.22	{ 0.8—0.9	8.16	
	Next morning	0.973	92.5—107.8	0.45	0.6—0.7	{ 0.85 0.66 0.12	{ 0.3—0.4 0.5—0.6 0.9<	
1.087		91.4—110.8	0.64	0.5—0.6	{ 0.36 0.64	{ 0.7—0.8 0.5—0.6	9.44	
0.983		91.0—109.5	0.69	0.4—0.5	{ 0.03	{ 0.9<	8.54	

\* Fiducial limits of error(%)

2) NSt と検体4種 (武田A葉, 武田B葉, 三共C葉, 三共D葉) の効価の比較: Table 6 に 2—2 用量検定成績を示す。Table 7 に 3—3 用量検定成績を示す。但し武田A葉は強力価のジギタリス葉末力価 17.7 単位 (鳩法)

のものをジギタリス葉末の抽出残留物(力価0)を加えて12.6(鳩法), 12.3単位(カエル法)に落したものである。武田B葉は弱力価12.6(鳩法), 12.3単位(カエル法)のジギタリス葉末である(1954.11月, 武田薬品工業株式会社研究所検定)。三共C葉は強力価のジギタリス葉末力価15.7単位(カエル法)のものをジギタリス葉末の抽出残留物(力価0)を加えて力価11.9単位(カエル法)としたもので, 三共D葉は弱力価11.9単位(カエル法)のジギタリス葉末である(1954.12月, 三共株式会社品川工場検定)。

Table 6. The Results of 2 and 2 Dose Assay (A, B, C, D/NS<sub>t</sub>)

Sample name	Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	unit/g	Mean potency (unit/g)
Takeda leaf A	4 hour	1.055	83.9—131.3	12.87	12.71 (85.3—117.9)*
		0.969	80.1—119.0	11.83	
		1.081	84.8—120.9	13.25	
		0.888	85.5—110.4	13.55	
		0.987	92.3—108.4	12.04	
Takeda leaf B	4 hour	0.978	88.3—111.9	9.78	9.72 (87.6—113.1)*
		0.939	81.7—119.6	9.39	
		1.000	92.7—107.8	10.00	
	Next morning	1.066	91.0—112.9	10.66	10.66
Sankyo leaf C	4 hour	1.021	91.6—110.9	15.19	15.22 (91.1—110.2)*
		1.000	90.6—110.4	15.25	
	Next morning	0.893	85.9—110.3	13.62	13.25 (86.7—111.5)*
		0.943	87.5—112.7	12.88	
Sankyo leaf D	4 hour	0.993	83.7—118.5	14.77	15.11 (87.1—114.9)*
		1.013	90.4—111.3	15.45	
	Next morning	0.949	85.3—112.8	14.47	

\* Fiducial limits of error(%)

Table 7. The Results of 3 and 3 Dose Assay (A, B, C, D/NS<sub>t</sub>.)

Sample name	Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	Parallelism		Curvature		unit/g	Mean potency (unit/g)
				t	P	t	P		
Takeda leaf A	4 hour	1.034	87.6—115.0	1.05	0.2 —0.3	{ 0.86	{ 0.3 —0.4	12.62 14.56 12.65	13.28 (88.9—115.5)*
		1.193	87.5—121.8	1.41	0.1 —0.2	{ 0.66	{ 0.5 —0.6		
		1.037	91.5—109.8	1.03	0.3 —0.4	{ 0.60	{ 0.5 —0.6		
						{ 1.63	{ 0.1 —0.2		
Takeda leaf B	4 hour	0.718	72.9—118.3	1.64	0.05—0.1	{ 2.09	{ 0.02—0.05	8.76 9.36 10.41 10.98	9.88 (85.8—112.9)*
		0.936	85.8—114.3	0.73	0.4 —0.5	{ 0.86	{ 0.3 —0.4		
		1.041	93.1—109.9	0.28	0.7 —0.8	{ 0.66	{ 0.5 —0.6		
		1.098	91.2—111.2	1.85	0.05—0.1	{ 1.30	{ 0.1 —0.2		
						{ 1.16	{ 0.2 —0.3		
						{ 2.45	{ 0.01—0.02		
						{ 0.87	{ 0.3 —0.4		
						{ 0.37	{ 0.001>		
				{ 0.11	{ 0.2 —0.3				

Sample name	Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	Parallelism		Curvature		unit/g	Mean potency (unit/g)
				t	P	t	P		
Takeda leaf B	Next morning	0.917	85.8—113.7	1.80	0.05—0.1	{ 0.87 0.73 1.11	{ 0.3—0.4 0.4—0.5 0.2—0.3	9.17	9.37 (88.0—111.9)*
		0.957	90.2—110.1	1.39	0.1—0.2	{ 0.49	{ 0.6—0.7	9.57	
Sankyo leaf C	4 hour	1.275	91.7—112.1	0.24	0.8—0.9	{ 0.67 0.81 0.86	{ 0.5—0.6 0.4—0.5 0.3—0.4	15.17	15.19 (92.2—110.1)*
		0.993	92.6—108.0	0.45	0.6—0.7	{ 0.11	{ 0.9<	15.20	
	Next morning	0.946	92.9—107.2	1.07	0.2—0.3	{ 1.36 0.81 0.44	{ 0.1—0.2 0.4—0.5 0.6—0.7	14.43	13.60 (90.4—109.6)*
		0.935	87.9—112.0	0.38	0.7—0.8	{ 0.59	{ 0.5—0.6	12.77	
Sankyo leaf D	4 hour	1.270	90.5—114.6	2.53	0.01—0.02	{ 0.89 1.65 0.08	{ 0.3—0.4 0.05—0.1 0.9<	15.11	15.67 (91.1—112.3)*
		1.060	91.7—109.9	1.65	0.1—0.2	{ 0.12	{ 0.9<	16.22	
	Next morning	0.978	92.8—107.6	0	0.9<	{ 2.06 0.88 1.17	{ 0.02—0.05 0.3—0.4 0.2—0.3	14.97	14.42 (92.4—108.3)*
		1.019	91.9—108.9	3.34	0.001>	{ 0.53	{ 0.5—0.6	13.86	

\* Fiducial limits of error(%)

3) IStと検体四種の効価の比較: Table 8に2—2用量検定成績を示す。Table 9に3—3用量検定成績を示す。

Table 8. The Result of 2 and 2 Dose Assay (A, B, C, D/ISt)

Sample name	Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	unit/g	Mean potency unit/g
Takeda leaf A	3 hour	1.049	87.2—120.1	11.00	10.94
		1.033	84.2—122.0	10.87	(85.6—121.1)*
	4 hour	0.848	71.4—114.8	11.16	10.28
		0.980	91.8—108.2	10.31	(85.7—111.7)*
		1.010	87.5—114.5	10.63	
		0.926	91.6—107.4	9.75	
0.905	86.4—113.6	9.53			
Next morning	1.015	90.1—105.9	10.68	10.68	
Takeda leaf B	3 hour	1.029	89.8—112.9	8.88	8.88
		4 hour	1.143	90.0—119.6	7.89
	1.048		85.4—118.6	9.05	(85.5—116.2)*
	0.898		80.7—113.1	7.74	
	0.985		85.7—113.3	8.51	
	Next morning	1.039	85.1—118.8	10.94	9.85
1.015		90.1—105.9	8.76	(87.6—112.4)*	

Sample name	Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	unit/g	Mean potency (unit/g)	
Sankyo leaf C	3 hour	0.948	88.3—110.5	12.17	11.71 (87.5—114.2)*	
		1.096	86.7—117.9	11.25		
	4 hour	1.074	93.2—108.9	11.02	11.57 (91.4—108.8)*	
		0.920	89.5—108.7	12.11		
	Next morning	0.850	83.6—110.7	11.18	11.47 (87.1—114.7)*	
		1.134	89.7—121.2	12.02		
		0.946	88.0—112.2	11.20		
Sankyo leaf D	3 hour	1.072	89.0—117.9	10.97	12.05 (86.5—126.3)*	
		1.283	82.8—134.7	13.12		
	4 hour	1.081	91.1—113.6	11.09	11.35 (85.4—115.2)*	
		0.993	83.7—118.5	10.19		
		1.195	87.0—119.3	12.26		
		0.895	79.6—110.7	11.78		
			0.869	85.4—114.0	11.43	
	Next morning	0.889	80.6—112.7	11.70	11.70	

\* Fiducial limits of error(%)

Table 9. The Results of 3 and 3 Dose Assay (A, B, C, D/1st)

Sample name	Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	Parallelism		Curvature		unit/g	Mean potency (unit/g)
				t	P	t	P		
Takeda leaf A	3 hour	1.094	83.2—127.7	1.08	0.2 —0.3	{ 0.56	{ 0.5 —0.6	11.52	11.52
						{ 1.22	{ 0.2 —0.3		
	4 hour	0.967	90.3—110.1	0.86	0.3 —0.4	{ 0.63	{ 0.5 —0.6	10.17	9.72
						{ 2.57	{ 0.01—0.02		
	0.890	89.1—110.5	0	0.9<	{ 2.19	{ 0.02—0.05	9.37	(89.7—110.3)*	
	Next morning	1.105	89.4—113.1	0	0.9<	{ 1.65	{ 0.05—0.1	11.63	11.63
Takeda leaf B	3 hour	0.964	89.9—110.5	2.26	0.02—0.05	{ 0.15	{ 0.8 —0.9	8.32	8.32
						{ 0.20	{ 0.8 —0.9		
	4 hour	0.991	88.1—113.3	0	0.9<	{ 1.27	{ 0.2 —0.3	8.55	8.29
						{ 0.59	{ 0.5 —0.6		
						{ 2.30	{ 0.02—0.05		
	0.922	91.5—108.3	1.01	0.3 —0.4	{ 2.26	{ 0.02—0.05	7.96	(91.5—109.0)*	
	0.968	94.8—105.4	0.80	0.4 —0.5	{ 3.48	{ 0.001>	8.36		
	Next morning	0.992	91.0—109.7	1.85	0.05—0.1	{ 1.60	{ 0.1 —0.2	8.56	8.56
	3 hour	1.144	89.7—114.9	1.36	0.1 —0.2	{ 1.11	{ 0.2 —0.3	11.74	11.74
						{ 0.86	{ 0.3 —0.4		

Sample name	Time of observation after injection	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	Parallelism		Curvature		unit/g	Mean potency (unit/g)
				t	P	t	P		
Sankyo leaf C	4 hour	1.141	91.6—111.5	0.50	0.6 —0.7	{ 0.65	{ 0.5 —0.6	11.71	11.52 (90.9—110.3)*
		0.860	90.1—109.0	0.66	0.5 —0.6	{ 2.18 { 0.66 { 1.62	{ 0.02—0.05 { 0.5 —0.6 { 0.1 —0.2	11.31	
	Next morning	0.919	92.3—107.5	1.50	0.1 —0.2	{ 1.36 { 0.46 { 0.43 { 0.03	{ 0.1 —0.2 { 0.6 —0.7 { 0.6 —0.7 { 0.9<	12.09	11.51 (90.6—109.3)*
3 hour	0.923	88.8—111.0	0.31	0.7 —0.8			10.93		
	3 hour	1.201	85.7—127.9	0.92	0.3 —0.4	{ 1.93 { 1.51	{ 0.05—0.1 { 0.1 —0.2	12.33	12.33
Sankyo leaf D	4 hour	1.093	90.1—113.3	1.69	0.05—0.1	{ 0.86 { 2.42 { 0.08 { 1.66	{ 0.3 —0.4 { 0.01—0.2 { 0.9< { 0.05—0.1	11.22	11.56 (89.5—111.8)*
		0.903	88.8—110.2	0.56	0.5 —0.6			11.89	
	Next morning	0.949	92.2—107.8	0.45	0.6 —0.7	{ 2.06 { 0.49 { 1.16 { 0.02	{ 0.02—0.05 { 0.6 —0.7 { 0.2 —0.3 { 0.9<	12.49	12.19 (92.3—108.1)*
	1.004	92.4—108.3	2.69	0.001—0.01			11.89		

\* Fiducial limits of error(%)

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 10 に示す。

Table 10. The Summnerized Result for Data from Table 4, 5, 6, 7, 8 and 9.

		3 hr. (unit/g)	4 hr (unit/g)	Next morning (unit/g)
2 and 2 dose assay	Takeda leaf-A/NSt		12.71 (85.3—117.9)* 9.72	10.66
	Takeda leaf-B/NSt		(87.6—113.1)* 15.22	(91.0—112.9)* 13.25
	Sankyo leaf-C/NSt		(91.1—110.2)* 15.11	(86.7—111.5)* 14.47
	Sankyo leaf-D/NSt		(87.1—114.9)* 8.26	(85.3—112.8)* 8.23
	NSt/ISt	7.72 (84.1—119.2)* 10.94	(86.4—118.3)* 10.28	(88.7—117.1)* 10.68
	Takeda leaf-A/ISt	(85.6—121.1)* 8.88	(85.7—111.7)* 8.30	(90.1—105.9)* 9.85
	Takeda leaf-B/ISt	(89.8—112.9)* 11.71	(85.5—116.2)* 11.57	(87.6—112.4)* 11.47
	Sankyo leaf-C/ISt	(87.5—114.2)* 12.05	(91.4—108.8)* 11.35	(87.1—114.7)* 11.7
	Sankyo leaf-D/ISt	(86.5—126.3)*	(85.4—115.2)*	(80.6—112.7)*
3 and 3 dose assay	Takeda leaf-A/NSt		13.28 (88.9—115.5)* 9.88	9.37
	Takeda leaf-B/Nst		(85.8—112.9)* 15.19	(88.0—111.9)* 13.60
	Sankyo leaf-C/NSt		(92.2—110.1)* 15.67	(90.4—109.6)* 14.42
	Sankyo leaf-D/NSt		(91.1—112.3)*	(92.4—108.3)*

		3 hr. (unit/g)	4 hr. (unit/g)	Next morning (unit/g)
	NSt/ISt	7.78 (85.9—114.6)* 11.52	8.08 (89.0—113.0)* 9.72	8.79 (91.6—109.4)* 11.63
	Takeda leaf-A/ISt	(83.2—127.7)* 8.32	(89.7—110.3)* 8.29	(89.4—113.1)* 8.56
	Takeda leaf-B/ISt	(89.9—110.5)* 11.74	(91.5—109.0)* 11.52	(91.0—109.7)* 11.51
	Sankyo leaf-C/ISt	(89.7—114.9)* 12.33	(90.9—110.3)* 11.56	(90.6—109.3)* 12.19
	Sankyo leaf-D/ISt	(85.7—127.9)*	(89.5—111.8)*	(92.3—108.1)*

\* Fiducial limits of error(%)

### 考察と総括

夏期, 晩秋, 冬眠カエルにつき相互間の LD50 の季節的変動を, 日局標準品と国際標準品を用いて検討した所, 夏期カエルでは NSt=0.247mg, 晩秋カエルでは NSt=0.329mg, ISt=0.186mg, 冬眠カエルでは NSt=0.238mg, ISt=0.146mg であつた。これら結果より冬眠カエルと夏期カエル間及び晩秋カエルと夏期カエル間の LD50 には高度の有意差が認められたが, 冬眠カエルと晩秋カエルとの間には有意な差が全く認められなかつた。ただし夏期カエルについての資料数が少ないので, 今後の検討により, その値が幾分変る事も考えられるが, 夏期カエルで行つた 2-2 用量検定の用量をも考慮する時, 大した変化が起るとは考えられないので, 一応統計学的検討を行つた。又春期カエルについては例数が少ないので今後の実験資料と共に別に報告する。

次に冬眠カエルを用いて武田 A 葉及び B 葉, 三共 C 葉及び D 葉の力価を日局標準品を用いて 2-2 用量検定及び 3-3 用量検定により定量した結果, 2-2 用量検定ではそれぞれ 12.71, 9.72, 15.22 及び 15.11 単位, 3-3 用量検定では 13.28, 9.88, 15.19 及び 16.99 単位であつた。

最後に日局標準品 (1952 年) と国際標準品 (1949 年) との力価を比較した。その結果日局標準品は 2-2 用量検定では平均 8.26 単位, 3-3 用量検定では平均 8.08 単位であつた。この結果は前報の 2-2 用量検定で得た 9.9 単位, 3-3 用量検定で得た 9.7 単位に比しそれぞれ 16.7% の力価の減少を示す。この力価の減少は経時変化によるものか, 検定の誤差によるものか, 目下検討中である。

終りに本実験の費用の一部は文部省科学研究費に仰いだことを記し謝意を表わす。

### 文 献

- 1) 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: 衛試, 72, 21—35 (1954).
- 2) C. I. Bliss: Ann. appl. Biol. 22, 134, 307 (1935).
- 3) C. I. Bliss: Quart. J. Pharm. Pharmacol. 11, 192 (1938).
- 4) D. J. Finney: Probit Analysis (1947), Cambridge University Press, London.
- 5) 英局 VIII, 829, 790, (1953).
- 6) J. H. Gaddum: J. Pharm. Pharmacol. 6, 345 (1953).

### Summary

1. The authors determined the seasonal variation of LD50 in relation to Japanese Pharmacopoeia (NSt) and International (ISt) Standard of Digitalis by a frog method. LD50 of NSt concerning summer, late autumn, and hibernating frogs were 0.247, 0.329 and 0.238 mg., respectively, and those of ISt concerning late autumn and hibernating frogs were 0.186 mg. and 0.146 mg. The difference between mean LD50 of summer and late autumn and of summer and hibernating frogs showed highly significant, but of late autumn and hibernating frogs gave no significant difference.

2. We determined the potency of 4 kinds of digitalis powders-Takeda's A and B, and Sankyo's C and D leaf-comparing with ISt, and NSt, according to 2 and 2 dose assay and 3 and 3 dose assay using hibernating frogs.

3. When NSt compared with ISt, we found that the potency of NSt was 8.26 i.u. per g. by 2 and 2 dose assay, and 8.08 i.u. per g. by 3 and 3 dose assay. These values was 16.7% lower than that of the 1st. report. In respect of these results, we are studying whether this difference is due to the error of assays or the storage-degradation.

Received April 26, 1955

## アヘンアルカロイドのペーパクロマトグラフィによる定量 (第1報)

## 塩酸モルヒネの定量

長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一

Quantitative Analysis of Opium Alkaloids by Paper  
Chromatography. I. Morphine Hydrochloride

By Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI

アヘンアルカロイドのペーパクロマトグラフィによる分離, 定性については多数の報告<sup>1-5)</sup>がある。著者はアルミナ処理をした濾紙を用い, 卵胞ホルモンを面積測定法で定量し, 好結果を得たことを報告<sup>6,7)</sup>したがアヘンアルカロイドがステロイドと類似骨核を有する点に着眼し卵胞ホルモンの定量と全く同様な方法で定量を試みた。

アルミナ処理をした濾紙で塩酸モルヒネを酢酸エチル, 稀アンモニア水等で展開後, 濾紙にヨウ素飽和石油ベンゼン試液を噴霧すると卵胞ホルモンと同様の呈色像を得る。酢酸エチルを用いると感度はよいがRf値が小さく倍数稀釈法<sup>8,9)</sup>を利用すると極めて微量で定量できる。(実験I参照)。呈色面積は塩酸モルヒネの濃度の対数と直線関係を示す(実験II参照)から英国薬局法の2-2用量検定法<sup>10)</sup>を利用して面積測定法により定量が可能である(実験III, IV, V参照)。

## 実験の部

実験 I 東洋濾紙No. 50 (2×40cm) にアルミナ処理を行い, 検体の水溶液 (0.001ccが塩酸モルヒネ 2.5 $\mu$ g及び5.0 $\mu$ gを含有する) を濾紙の一端より7cmの所へマイクローピペットでつけ自然に乾燥し, 水飽和酢酸エチル, 稀アンモニア水 (6:100) を用い上昇法により22°Cで3.5~6時間展開し, 濾紙を乾燥後直ちにヨウ素飽和石油ベンゼン試液を噴霧すると黄褐色の呈色像を生ずる。その感度は第1表の通りである。

Table I Sensitivity of Colour Reaction

Amount of HCl-Morphine ( $\mu$ g).	Developing Solvent			
	Ethylacetate (H <sub>2</sub> O Saturated)		Diluted Ammonia Sol. (6:100)	
0.313	-		-	
0.625	+		-	
1.250	++		-	
2.500	+++		+	
5.000	+++		++	
	Rf	0.05	Rf	0.75
	22°	5.5hr.	22°	6.0hr.

-.....Negative

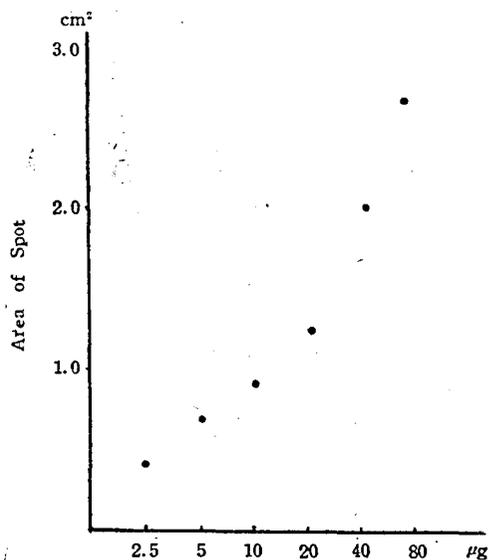
+.....Positive

実験 II. 塩酸モルヒネ 2.5 $\mu$ g~80.0 $\mu$ gを稀アンモニア水で展開し, 検体量と呈色面積の関係を示すと Table I及びFig Iの通りである。

Fig 1 Amount-Area Relationship

Table II Amount-Area Relationship

Amount of HCl-Morphine ( $\mu\text{g}$ )	Area of Spot ( $\text{cm}^2$ )
2.5	0.44
5.0	0.68
10.0	0.96
20.0	1.28
40.0	2.04
80.0	2.56



実験 III 塩酸モルヒネ 5, 10, 20 $\mu\text{g}$ , をそれぞれ濾紙 4 枚につけて展開後呈色面積を測定した結果は Table III の通りである。

Table III Amount-Area Relationship

Amount of HCl-Morphine ( $\mu\text{g}$ )	5	10	20
Log Amount	0.6990	1.0000	1.3010
Area of Spot ( $\text{cm}^2$ )	0.28	0.60	0.96
	0.24	0.60	0.92
	0.24	0.52	0.84
	0.28	0.56	0.92
Total	1.02	2.28	3.64
Mean	0.255	0.570	0.910

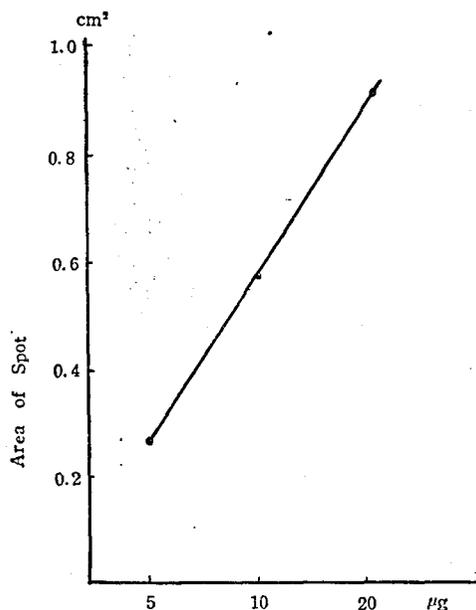
前表から直線性を検討すると次の通りである。

Adjustment for Mean.....4.0136

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F
Regression	1	0.8567		
Deviation from Regression	1	0.0018	0.0018	0.66
Between Amounts	2	0.8585		
Within Amounts	9	0.0239	0.0027	
Total	11	0.8824		

従つて直線性は否定できない。Table III をグラフに表わすと次の通りである。

Fig 2 Amount-Area Relationship



実験 IV 塩酸モルヒネ標準品 10μg 及び 20μg, 検体 8 μg 及び 16μg をそれぞれ濾紙 4 枚につけて稀アンモニア水で展開し, 呈色面積を測定した結果は Table IV 通りである.

Table IV Amount-Area Relationship of Standard and Sample

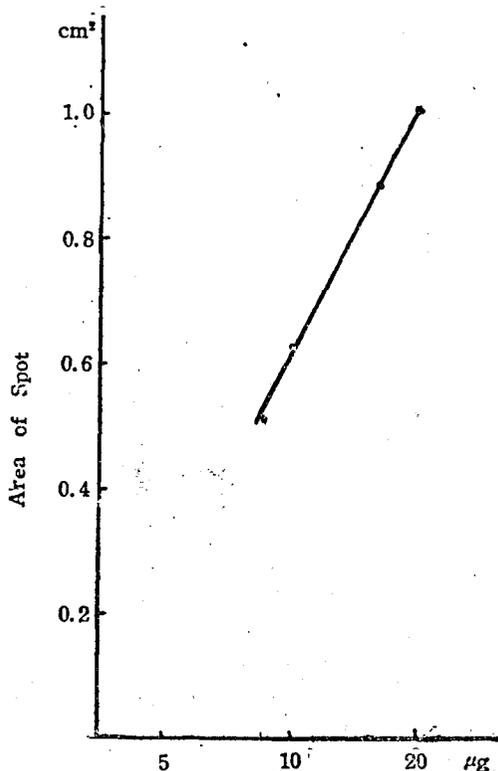
	Standard		Sample	
	10μg	20μg	8μg	16μg
	Area of Spot (cm <sup>2</sup> )		Area of Spot (cm <sup>2</sup> )	
	0.60	1.08	0.52	0.88
	0.64	1.00	0.56	0.92
	0.64	1.00	0.48	0.88
	0.64	1.04	0.48	0.88
Total	2.52	4.12	2.04	3.56
Mean	0.63 (S <sub>1</sub> )	1.03 (S <sub>2</sub> )	0.51 (T <sub>1</sub> )	0.89 (T <sub>2</sub> )

前表から効価比 (R), 誤差の信頼限界 (f.l.e.), 等を求めると次の通りである.

R=0.7914 (which was 98.9% of the theoretical value)

f.l.e. = 106.5~93.9 % Table IV をグラフに表わすと次の通りである.

Fig 3 Area-Amount of Relationship.



他の1, 2の実験例を示すと次の通りである。

Table V Two and Two Amount Analysis of HCl-Morphine

Expt. No.	Strip No.	Standard		Sample		t (P)	R*	f. l. e. % (P=0.95)
		20µg	10µg	16µg	8µg			
		Area of Spot (cm <sup>2</sup> )						
1	1	1.00	0.50	0.92	0.48	1.823 (0.2~0.1)	108.1	97.5~102.5
	2	1.04	0.56	0.92	0.52			
2	1	0.96	0.40	0.80	0.36	1.414 (0.2~0.1)	105.1	90.9~110.0
	2	1.00	0.52	0.84	0.40			
	3	1.04	0.52	0.88	0.44			
3	1	1.08	0.60	0.88	0.52	0.655 (0.6~0.5)	98.9	93.9~106.5
	2	1.00	0.64	0.92	0.56			
	3	1.00	0.64	0.86	0.48			
	4	1.04	0.64	0.88	0.48			

\* % of the theoretical value

実験 V 塩酸モルヒネ標準品 10µg 及び 20µg と塩酸モルヒネ注射液 (第二改正国民医薬品集収載, S社製品, 本品 1cc 中塩酸モルヒネ 10mg を含む) を標準品と同一濃度に稀釈して 10µg 及び 20µg に相当する量をつけ実験 IV と同様に操作を行つた結果は Table VI の通りである。

Table II Two and Two Amount Analysis of HCl-Morphine Injection

Strip No.	Standard		Sample		t (P)	R*	f l.e. % (P=0.95)
	20 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	10 $\mu$ g			
	Area of Spot (cm <sup>2</sup> )						
1	1.04	0.60	1.04	0.64	1.26 (0.3~0.2)	101.6	95.9~104.3
2	1.04	0.64	1.04	0.64			
3	1.04	0.56	1.04	0.64			
4	1.08	0.64	1.04	0.64			

\* % of the theoretical value

### 結 論

アルミナ処理をした濾紙を用い酢酸エチル, 稀アンモニア水を展開剤として塩酸モルヒネを展開し, 展開後ヨウ素飽和石油ベンゼン試液を噴霧し, 塩酸モルヒネの濃度の対数が呈色面積と直線関係にあることを利用して5~20 $\mu$ gの間で2-2用量検定法で定量を行うと誤差は約2%, 誤差の信頼限界は94~107%で極めて簡易に定量ができ, 又倍数稀釈法を利用すれば約0.6 $\mu$ gで定量が可能である。

### 文 献

- 1) Munier, R. and Macheboeuf, M. : Bull. Soc. Chim. biol. 31, 1141 (1949)
- 2) Munier, R. Macheboeuf, M. and Cherrier, N. : ibid., 34, 204 (1952)
- 3) Mesnard, P. and Baussenart, E. : Bull. trav. Soc. Pharm, 88, 175 (1951)
- 4) Cariess, J.E. and Woodhead. H.B. : Nature, 168, 203 (1951)
- 5) Mannering, G.J. Dixon. A.C. Corroll. N.V. and Cepe. O.B. : J. Lab. Clin. Med., 44, 292 (1954)
- 6) Koshimura, E. and Okazaki, S. : Pharm. Bull., 2, 65 (1954); 越村栄之助, 岡崎精一: 衛生試験所報告, 72, 41 (1954)
- 7) Nagasawa, K., Koshimura, E. and Okazaki, S. : Pharm. Bull., 3, 144 (1955); 長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一: 衛生試験所報告; 73, 11 (1955)
- 8) 北条進: 医学と生物学, 17, 85 (昭25)
- 9) 武田スミ, 柴谷篤弘: 科学, 21, 136 (昭26)
- 10) Brit. Pharm. VIII, 778 (1953).

### Summary

After developing of morphine hydrochloride with H<sub>2</sub>O saturated ethylacetate or diluted ammonia water on the alumina impregnated filter paper, and spraying iodine-saturated petroleum benzene reagent on it, the relation between logarithm of amount of morphine hydrochloride and area of spot showed a straight line and so the two and two amount assay method was applicable. 5~20 $\mu$ g. of morphine hydrochloride gave a successful result.

Received April 15, 1955

濾紙クロマトグラフィーによるアヘン中の  
モルヒネ定量について (其の1)

朝比奈晴世, 大野昌子

Quantitative Determination of Morphine in Opium by  
Paper Chromatography. I.

By Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO

**まえがき** アヘン中のモルヒネ定量法として従来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、アヘンの水酸化カルシウム抽出液にエーテル、塩化アンモニウムヲ加え、析出するモルヒネを濾取し滴定するのであるが、試料の相当量を要し、温度の変化や定量時の僅かの条件の変動が、定量値に大きく影響するので、濾紙クロマトグラフィーによりアヘン中のモルヒネをコデイン等アヘン中の副アルカロイドと分離し、濾紙上のモルヒネの吸光度を Beckman DU型分光光度計を用いてそのまま測定、定量への応用を試みた。

実験の部

**濾紙の検討** この定量に用いる濾紙は、予めその均質性、透過率について調べておく必要があるので、東洋濾紙 No. 50, No. 51, Whatman No. 1につき透過率を測定した。此の結果東洋濾紙 No. 50は前処理後(使用展開剤を出来るだけ上まであげ、逆に吊して乾燥)始めて透過率が均等になるに反し、No. 51では均等で、Whatman No. 1より優れていた。又 No. 50の透過率は他の二者よりも非常に悪く、Whatman No. 1の透過率を100%として僅か5%にすぎず、濾紙の厚みからの誤差も考えられるので、此の定量には東洋濾紙 No. 51か、Whatman No. 1を使用することが望ましい。次に濾紙の透過率測定値の一例を挙げる。(第I表)

**測定法** 幅2cm、長さ40cmの濾紙を11等分し、各濾紙の第二区劃を基準(100%)とし、一端から順次巻き取り各部分について波長286m $\mu$ (モルヒネの吸収極大)で透過率を測定する。

第 I 表

濾紙	東洋濾紙 No. 50	No. 51	Whatman No. 1
区画	%	%	%
1	66	100	100
2	100	100	100
3	63	100	100
4	72	100	93
5	85	104	100
6	89	102	100
7	72	102	100
8	93	102	85
9	93	102	97
10	107	102	107

**展開剤の検討** 通常用いられている酸性展開剤より、n-Bu(OH) : NH<sub>4</sub>OH (28%) : H<sub>2</sub>O = 50 : 9 : 15はモルヒネ、コデイン分離の点で特によく、此の目的に沿うものである。

第 I 表 展開剤 n-Bu(OH) : NH<sub>4</sub>OH (28%) : H<sub>2</sub>O = 50 : 9 : 15によるアヘンアルカロイドの Rf 値

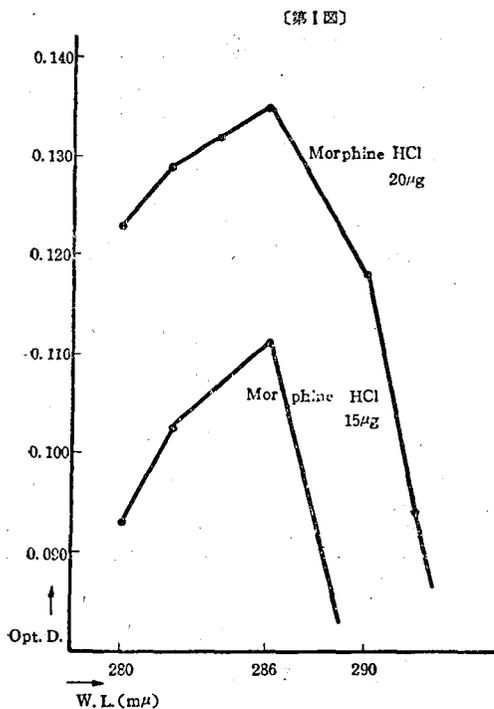
Alkaloid	Filter Paper	No. 50	No. 51	Whatman No. 1
Morphine HCl		0.72	0.68	0.64
Opium	Morphine	0.74	0.70	0.61
	Codeine	0.93	0.86	0.86
	Narcotine		0.93	0.92

Alkaloid	Filter Paper	No. 50	No. 51	whatman No. 1
Codeine H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		0.93	0.86	
Codeine H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.94		
Narcotine		0.94	0.93	
Narceine		0.58	0.54	
Papaverine		0.94	0.90	
Thebaine		0.94	0.95	

**モルヒネの吸光度測定** 試料として塩酸モルヒネ1%水溶液を用い、次の基礎実験を行った。

(A) 試料を上記展開剤を用いて展開後、塩化白金沃素溶液を噴霧発色させ、そのまま Beckman DU 型分光光度計を用い吸光度を測定した処、予期に反し全く変動の多いデータが得られたのみであった。此の原因として、モルヒネの塩化白金沃素溶液による発色が沈澱反応である点及び此の試薬を濾紙上に均等に噴霧することが技術的に困難である点が考えられ、次に反射率の測定を試みたが、之も発色試薬自身の色の影響が著く、無意味であった。従つて発色試薬が無色であるか、発色させた後試薬の色をなくし得ない限り此の方法は困難であろうと思われたので、濾紙上のモルヒネの吸光度を未処理のまま測定することにした。

(B) (1) **濾紙上モルヒネの吸収極大測定** モルヒネ溶液の吸収極大 ( $\lambda_{max}$ ) が286 $\mu$ であることは、山村氏等の報告<sup>1)</sup>があるが、濾紙上のモルヒネについて測定した結果も同様で、286 $\mu$ に於て吸収は最大であった。(第1図)



(2) **吸光度の検討** 試料：塩酸モルヒネ10~60 $\gamma$ 、波長：286 $\mu$

(a) 展開済みの東洋濾紙 No. 50 (当時 No. 51 が市販されていなかったため No. 50 を用いた。)を自然乾燥後、濾紙を一端から順次巻き取り、スポットの部分の吸光度測定を行ったが、濾紙の透過率も悪かつたので好成績が得られなかつた。

(b) 濾紙の透過率をよくし、表面反射を防ぎ、且つ単色光の純粋性をよくするため、濾紙をベンゼンに浸した状態で測定した。即ちスポットの部分セルの大きさ10mm × 45mm に切り取り、吸収セルに入れベンゼンを加えて充分浸し、透過率を増加させて吸光度を測定した。

(i) **ベンゼンによる透過率の増加について** 東洋濾紙 No. 50, 51, Whatman No. 1 の三種の濾紙で行つた結果を挙げると、波長286 $\mu$ に於ける Whatman No. 1 の透過率を100%として、

東洋濾紙 No. 50……5% No. 51……69%

Whatman No. 1 をベンゼンに浸したものと透過率を100%として

濾紙	ベンゼンに浸した状態	そのままの状態
	%	%
No. 50	37	0
No. 51	82	6

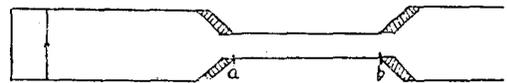
(ii) ミクロピペットを用い、塩酸モルヒネ10~60 $\gamma$ に相当する量の1%塩酸モルヒネ水溶液をとり、幅25mm、長さ400mmの東洋濾紙 No. 51 の下端から5cmの処につけ、自然乾燥し約28cm展開した後、スポットの最大吸収部を中心に10mm × 45mm大に切り取らなければならないのは前記の通りであるが、スポットの切り取

り方に幾多の難点があり, 次の様な方法を試みた.

(i) 同一条件で展開を行つて対照を作り, 対照に発色試薬を噴霧してスポットの位置を確かめ, 一方からスポットを切り取つてみたが確実性に乏しく, 無意味であつた.

(ii) 一定距離まで展開を行い, モルヒネの Rf 値からスポットの来るべき位置を推定, その部分は第Ⅱ図の如く, 幅をセルの幅に等しく 10mm, 長さ約 60mm に濾紙を切り, 斜線部にパラフィンを滲ませ<sup>2)</sup> スポットを a b 間にまとめ, 対照に発色試薬を噴霧し, スポットの位置, 状態を確かめた後, 長さ 45mm に切り取ろうとする試みであつたが, パラフィンの滲ませ方によりスポットの形が不同, 又は濾紙の幅が狭いため濾紙の両縁に出たり, 余り良い結果が得られなかつた.

【第Ⅱ図】

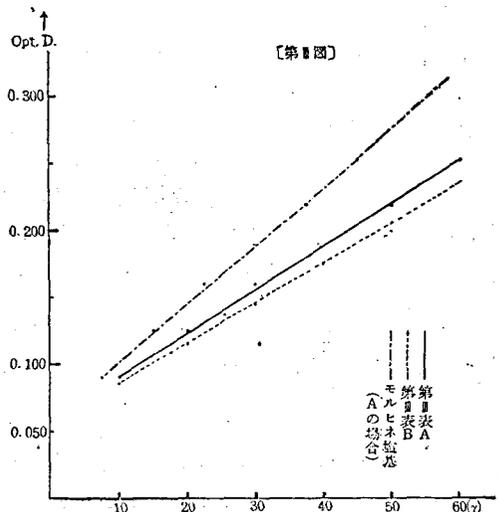


(iii) 以後, 展開済みの濾紙を自然乾燥後, 一端から巻き取り乍ら, 波長 286m $\mu$  で吸収最大部を求め, 更に此の部分を中心に 10mm  $\times$  45mm 大に切り取り, ベンゼンに浸して吸光度を測定, 何れも比較的好成績を得た. (第Ⅲ表, 第Ⅲ図).

第Ⅲ表

増設 モルヒネ量	吸光度	A	B
$\gamma$			
10		0.090	0.086
20		0.125	0.115
30		0.160	0.145
40		0.195	0.175
50		0.220	0.200
60		0.253	0.250

Beckman D U 型分光々度計を用いて測定,  
波長: 286m $\mu$  濾紙; 東洋濾紙 No. 51  
A; 濾紙上のモルヒネ最大吸光度  
B; スポットを切り取り, ベンゼンを滲ませて測定したモルヒネの吸光度.

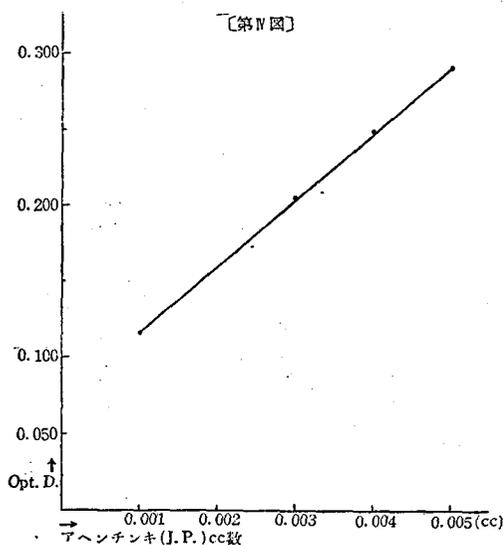


**アヘンチンキへの応用** 以上の基礎実験の結果から, 10 $\gamma$ ~50 $\gamma$  のモルヒネ濃度と, 濾紙上のモルヒネ吸光度との間に直線関係が成立するから (第Ⅲ図) 展開後のスポットの位置が濾紙の中央にある様にすること, trailing しない様にすること, 又若しスポットが濾紙の両縁に来た様な場合の確認法, 及びそれでもなお測定可能である様な測定装置の改良, 或は展開の条件をきめることなど, 検討の余地があるが, 濾紙の幅を広くすることでスポットを丸くまとめ trailing が防げるので, アヘンチンキの場合でも, モルヒネとアヘン中の副アルカロイドとのスポットが重なる虞れなく分離し得るので, 使用濾紙は 25mm  $\times$  400mm の東洋濾紙 No. 51, 試料の日本薬局方アヘンチンキ (武田薬工製造, モルヒネ含量, 1%) は濾紙の下端から 5cm の部分につけ, 前記の展開剤を用いて展開を行い, 基礎実験に於けると同様にして濾紙上モルヒネの最大吸収部を求めた結果は, 第Ⅳ表, 第Ⅳ図の通りである.

第Ⅳ表

アヘンチンキ (J.P.) cc 数	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
モルヒネ吸光度	0.116	0.170	0.205	0.249	0.290

Beckman 分光々度計 (島津製) を用いて測定,  
波長: 286m $\mu$ , 濾紙; 東洋濾紙 No. 51



アヘンチンキに於ても、モルヒネ濃度と、その吸光度との間に直線関係が得られ、第Ⅲ図からアヘンチンキ中のモルヒネ含量を計算すると第Ⅴ表の通りである。

第Ⅴ表

アヘンチンキ cc 数	モルヒネ $\gamma$ 数	モルヒネ含量 %
0.005	53	1.06
0.004	43	1.08

アヘンチンキ中のモルヒネ含量は1.07%となり、比較的一致した値が得られた。

**むすび** 展開剤として、n-BuOH : 28%NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O = 50 : 9 : 15を用い、塩酸モルヒネ溶液を展開後、濾紙上でモルヒネの吸収極大 286m $\mu$  に於て Beckman DU 型分光光度計を用い吸光度を測定したところ、10~50 $\gamma$  の範囲でモルヒネ濃度と、濾紙上の吸光度との間に直線関係が成立した。此の方法を利用して、アヘンチンキ中のモルヒネを定量したが、モルヒネと、他のアヘンアル

カロイドとが完全に分離され、且つ又定量が可能であつた。

本実験に関し種々御教示下さつた当所太幡技官に厚く感謝する。なお測定につき三共株式会社試験課の御援助を得、研究費の一部は厚生科学研究費より仰いだ。併せて謝意を表する。

#### 文 献

- 1) 山村醇一、丹羽口徹吉：科学と捜査，5，No. 3，27 (1952)
- 2) Itsuhiko Mori：Science，119，653~4 (1954)。

#### Summary

After developing morphine with ammoniacal n-butanol solvent (n-BuOH : 28%NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O = 50 : 9 : 15) on filter paper Toyo No. 51, absorbance of morphine spot on the filter paper was measured by Beckman DU spectrophotometer at 286m $\mu$  (absorption maxima of morphine).

The relation between the amount of morphine (10~50 $\gamma$ ) and its absorbance showed a straight line.

By this process, morphine in opium tincture was completely separated from other alkaloids and was quantitatively determined.

Received April 16, 1955

## アヘン産地鑑別法について (第7報)

## “Porphyroxine-Meconidine” の比色定量 (その2)

朝比奈晴世, 水町彰吾

## Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. VII.

## The Colorimetric Determination of “Porphyroxine-Meconidine” (2)

By Haruyo ASAHINA and Shôgo MIZUMACHI

**まえがき** 前報<sup>1)</sup>に於て東洋産アヘンの“porphyroxine-meconidine”測定の結果戦前の日本内地産が特に多量であることが判明したので、戦後始めて試験的に大阪, 京都, 和歌山, 愛知の諸府県にて栽培されたケシよりのアヘンについて“porphyroxine-meconidine”を測定し, 日本内地戦前品, 朝鮮, インド, イラン, トルコ諸国のものと比較することにした。

**実験材料** 日本内地戦前品, 朝鮮産は厚生省麻薬課より分与のもの, インド産は国際連合よりの寄贈品, 日本内地試験栽培品, イラン, トルコ産はいづれもモルヒネ定量を求められた試料の一部を用いた。これらのアヘンは乾燥粉末とせずそのまま実験に使用した。

**実験方法** 前報の方法に従うが呈色度が強いために5%酢酸で正確に20ccに稀釈し1cmのキュベットで波長511m $\mu$ でBeckman分光光度計B型を用いて吸光係数を測定した。それ以上に呈色の強すぎる場合は5%酢酸で40ccに稀釈した。このようにしてえた吸光係数をアヘン0.1gよりの酢酸10cc溶液の値に換算して比較した。

**実験結果** 日本, 朝鮮, インド, イラン, トルコ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つた。

アヘン			
番号	産地	吸光係数	備考
37	朝鮮	0.365	朝鮮で生産され戦後内地へ移入したもの
39	日本	2.500	戦前の内地生産品
117	インド	1.220	国際連合よりの寄贈品, Malwa州産で国内品
401	日本	1.464	愛知県渥美郡神戸村で生産されたもの
402	日本	0.338	京都市武田農園栽培品, 種子ドイツより輸入
403	日本	2.008	大阪府三島郡福井村で生産されたもの
404	日本	1.376	
405	日本	2.276	大阪府茨木市
408	日本	2.778	和歌山県有田郡南広村で在来種より生産されたもの
409	日本	2.704	
435	日本	1.000	国立衛生試験所薬用植物園和歌山分場のもの, 種子は種子商より入手
436	日本	3.344	和歌山県産の混合物, 種子在来種
437	イラン	0.328	イラン商務官よりの商品見本
438	トルコ	0.411	昭和29年度輸入品

**考察** アヘン中の“porphyroxine-meconidine”を測定した結果, インド, イラン, トルコ諸国のアヘンではFulton; Farmilo, Kennett; 及び前報の報告通りインドが多く次にトルコ, イランであつた。

日本産については京都武田農園のアヘン以外は内地戦前品を含めていづれも“porphyroxine-meconidine”が著しく多量であり朝鮮産は前報通り含量が少ないことがわかつた。

**むすび** 昭和29年に試験栽培したケシよりのアヘンについて比色法にて“porphyroxine-meconidine”を測定した結果, 日本産アヘンは特に著しく多量であることが判明した。

比色定量に関し御援助を賜った福島技官，アヘン分与に御厚志を示された厚生省麻薬課市川課長，布施事務官，平瀬技官諸氏に，又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共に感謝の意を表す。

### 文 献

- 1) 朝比奈晴世，水町彰吾：衛試，72, 73 (1954).

### Summary

We have determined the absorption intensity values of "porphyrroxine-meconidine" in opiums from various countries by using Beckman B spectrophotometer and found the experimental production of Japan during 1953-54 extremely high.

Received April 13, 1955

## 日本産アヘンのモルヒネ含量について

朝比奈晴世, 大野昌子, 水町彰吾, 志内賢彦

## Morphine Content in Japanese Opium.

By Haruyo ASAHINA, Masako ŌNO, Shōgo MIZUMACHI and Yoshihiko SHIUCHI

**まえがき** 昭和28年戦後初めて約10年の空白期間の後ケン栽培が許可されアヘンが試験的に生産されることになった。我々はアヘン法第32条によりこれら納付したアヘンについてモルヒネ含有量を鑑定することになったので、ここにその結果を報告する。

**鑑定材料** 昭和29年に和歌山, 大阪, 京都, 愛知の諸府県で試験的に生産されたアヘンを用いた。

**モルヒネ定量法** 薬局方追補4 (昭和30年3月15日) で改正されたアヘン末定量法を応用した。なお検体少量の場合は Eder & Wackerlin 法 (1937)<sup>1)</sup>を用いた。

**試験成績** 日本産アヘンのモルヒネ含量は次の通りである。

番号	モルヒネ含量%	場所
401	13.99	愛知県渥美郡神戸村
402	10.75	京都市左京区一乗寺, 武田薬工京都農園
403	10.75	大阪府三島郡福井村
404	14.24	大阪府三島郡福井村
405	10.29	大阪府茨木市
406	11.97	大阪府茨木市
407	11.53	大阪府高槻市
408	15.61	和歌山県有田郡南広村
409	15.37	和歌山県有田郡南広村
410	15.64	和歌山県有田郡南広村
411	12.07	和歌山県有田郡津木村
412	15.73	和歌山県有田郡南広村
413	11.80	和歌山県有田郡津木村
414	13.87	和歌山県有田郡南広村
415	15.91	和歌山県有田郡南広村
416	17.60	和歌山県有田郡南広村
417	15.49	和歌山県有田郡津木村
418	15.95	和歌山県有田郡広町
419	12.55	和歌山県有田郡津木村
420	11.64	和歌山県有田郡津木村
421	15.23	和歌山県有田郡南広村
422	13.66	和歌山県有田郡南広村
423	14.08	和歌山県有田郡広町
424	14.60	和歌山県有田郡広町
425	13.30	和歌山県有田郡広町
426	13.51	和歌山県有田郡広町
427	14.25	和歌山県有田郡広町
428	14.55	和歌山県有田郡広町
429	15.18	和歌山県有田郡広町
430	15.29	和歌山県有田郡南広村

431	15.08	和歌山県有田郡南広村
432	13.94	和歌山県有田郡南広村
433	10.62	和歌山県有田郡津木村
434	11.96	和歌山県有田郡津木村
435	14.12	和歌山県日高郡矢田村

国立衛生試験所薬用植物園和歌山分場

402, 435 は Eder & Wäckerlin 法によつた。

考察 昭和29年試験的に生産されたアヘン35種についてモルヒネ定量を行つたところ、最高は17.60%で、15%以上12, 13-15%12, 10-13%11であり、大阪府に比して和歌山県のものが大体に於て高含量であり和歌山県の中でも南広村で栽培されたものが良好であつた。

### 文 献

- 1) R. Eder and E. Wäckerlin: Quart. Journ. of Pharm. and Pharmacol. X, 680 (1937).

### Summary

We determined the morphine content in Japanese opiums produced experimentally during 1953-54 in four provinces of Wakayama, Aichi, Osaka and Kyoto.

Morphine percentages obtained thus far are as follows.

Total number of samples.	35	
Morphine content	10-13%	11 samples.
	13-15%	12 samples.
	above 15%	12 samples.

Received April 13, 1955

## 国際連合寄贈アヘン中のモルヒネ, コデイン含量

朝比奈晴世, 志内賢彦

Morphine and Codeine Contents in Opium Samples Received  
from the United Nations.

By Haruyo ASAHINA and Yoshihiko SHUUCHI

まえがき 我々はさきにアヘン中のモルヒネ定量法 (I法)<sup>1)</sup>及びモルヒネ, コデイン同時定量法 (II法)<sup>2)</sup>を報告し両者を比較検討したが, その後国際連合より各国産アヘンの寄贈を受け, これらについて乾燥減量及び上記二方法によりモルヒネ及びコデインを定量したのでここに報告する。

実験材料 国際連合より寄贈のトルコ, インド, インドシナ, パキスタン, 朝鮮, ユーゴスラビア, エクアドル産のアヘンである。

実験結果 国際連合寄贈のアヘンについての乾燥減量, モルヒネ, コデイン含量は次の通りである。

## Determination of Morphine and Codeine in Opium Samples Received from the United Nations

Nr.	Opium Origin	Loss in Weight on Drying	Morphine					Codeine		Codeine-Morphine Ration
			as determined		Discrepancy	on dry basis		as determined II	on dry basis	
			I	II		I	II			
101	Turkey Zile	7.33	18.13	18.63	0.50	19.56	20.10	1.68	1.81	0.9
102	Turkey Nallihan	7.79	11.77	12.69	0.92	12.76	13.76	1.17	1.27	1.0
103	Turkey Çorum	7.83	17.65	18.73	1.08	19.15	20.32	1.40	1.52	0.7
104	Turkey Usak	8.88	15.00	15.89	0.89	16.46	17.44	0.88	0.97	0.6
105	Turkey Zile	8.82	4.02	6.06	2.04	4.41	6.65	3.19	3.50	5.3
			3.88	5.80	1.92	4.26	6.36	3.22	3.53	5.6
106	Turkey Malatya	9.22	13.12	14.69	1.57	14.45	16.18	2.50	2.75	1.9
107	Turkey Isparta	8.37	14.60	14.92	0.32	15.93	16.28	0.78	0.85	0.5
108	Turkey Çorum	8.40	15.25	15.88	0.63	16.65	17.34	0.98	1.07	0.6
109	Turkey Aksehir	8.24	11.81	12.76	0.95	12.87	13.91	1.20	1.31	1.0
110	Turkey Aydin	9.01	15.71	16.33	0.62	17.27	17.95	1.29	1.42	0.8
111	Turkey Kula	8.57	11.43	12.38	0.95	12.50	13.54	1.33	1.45	1.2
112	Turkey Afyon	9.08	13.03	13.72	0.64	14.39	15.09	1.55	1.70	1.2
113	Turkey Burdur	8.61	13.26	12.97	-0.29	14.51	14.19	0.76	0.83	0.6
			13.25	13.03	-0.22	14.50	14.26	0.87	0.95	0.7
114	India Himachal Pradesh	9.55	8.55	9.99	1.44	9.45	11.04	2.36	2.61	2.8
115	India Malwa	10.01	9.11	10.87	1.76	10.12	12.08	2.17	2.41	2.4
116	India Uttar Pradesh	8.78	10.07	11.77	1.70	11.04	12.90	2.68	2.94	2.7
117	India Malwa (Excise)	8.52	8.99	10.47	1.48	9.83	11.45	2.51	2.74	2.8
118	Indo-china Vietnam-Laokay	6.48	11.59	12.52	0.93	12.39	13.39	1.85	1.97	1.6
119	Indo-china Vietnam-Laokay	6.73	13.85	14.49	0.64	14.85	15.54	1.85	1.98	1.3
120	Pakistan	7.33	12.24	13.31	1.07	13.21	14.36	2.39	2.58	2.0
121	Korea	8.76	9.22	10.48	1.26	10.11	11.49	2.51	2.75	2.7
122	Yugoslavia	8.33	15.56	16.41	0.85	16.97	17.90	1.24	1.35	0.8
123	Ecuador	8.30	14.24	15.47	1.23	15.53	16.87	1.41	1.54	1.0

codeine-morphine ration はアヘン中モルヒネ 10%に対するコデインの含量を示す。

考察 I法とII法との定量値を比較すると1例を除いて外すすべての場合、II法のモルヒネ定量値が0.3~2.0%高い。差の最も大きいものはモルヒネ含量が最も低くコデイン含量が最も高い従つてコデイン-モルヒネ比が非常に大きいアヘンである。コデイン-モルヒネの比が2以上のアヘンのすべてはI法とII法とのモルヒネ定量値が1%以上の差を示す。

なおこの報告は国際連合より United Nations document ST/SOA/SER. K/32 として発表されたものである。アヘン輸入に関して御高配を賜つた厚生省麻薬課の諸氏及び武田薬品工業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).
- 2) 朝比奈晴世, 志内賢彦: 衛試, 72, 57-62 (1954).

#### Summary

Morphine and codeine percentages are given that we obtained on some samples furnished by the United Nations Opium Distribution Center.

Shaking with benzene increased the morphine results in all but one case, by amounts ranging from 0.3 to 2.0 per cent of the opium weight. The greatest discrepancy was associated with the lowest morphine and the highest codeine, and thus with an exceptionally high codeine-morphine ratio. All the samples having a codeine-morphine ratio of 2.0 or more ( and some of the others as well) showed discrepancies of more than 1.0 per cent of the opium weight.

Received April 15, 1955

## メチオニン製剤中のメチオニンの化学的定量法（I）

平岡 栄一

Chemical Determination of Methionine in the Commercial  
Methionine Preparations (I)

By Eiichi HIRAOKA

**まえがき** 昨今抗脂肪肝及び肝臓機能増進剤として多数のメチオニン製剤が市販されている。著者はこれ等のメチオニン製剤中のメチオニンを正確迅速に定量する方法を研究しその目的を達したので報告する。

従来蛋白質加水分解物中のメチオニンを、ニトロプルシッドナトリウムによる比色法で定量する方法は今迄に数種報告されているが<sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>、これ等は殆んど他のアミノ酸が共存しているときのメチオニンの定量法であつて、著者の目的である混合ビタミン剤や更に簡単なメチオニン製剤中のメチオニンの定量に應用するには多少の変更を必要とする。すなわち、著者の場合には他のアミノ酸の妨害は殆んど考慮を要せず、むしろ種々のビタミンや安定剤、賦形剤、崩壊剤等の影響が重大となる。従つて在来法に於けるグリシン添加又はアミノ酸混液添加等の妨害アミノ酸除去法は全部省略し、酸の濃度、種類及び反応温度等に若干のくい違いがあるのでこれらについて検討した。

**改訂定量法**

〔器具〕 光電分光光度計又は光電濾光板光度計

波長 510m $\mu$  の部分に於ける吸光度を直読しうるもの。

〔試薬〕 (1) 5N 水酸化ナトリウム液

(2) 1%ニトロプルシッドナトリウム液。冷蔵し毎週新たにつくる。

(3) 20%塩酸

(4) メチオニン標準液。なるべく純度の高いメチオニン結晶約100mgを精密に秤り、水にとかして500ccにする。

〔操作〕 (1) **検体の調製** 試料の一定量を精密に秤り、乳鉢内でよくすりつぶした後、水を加え約30分間加温抽出し、濾過又は遠心して検液とする。本液5cc中にメチオニン0.2~1.5mg含有するようにしなければならない。

(2) **反応** 試験管3本に検液、メチオニン標準液及び水のおの5ccずつをとる。これらにそれぞれ5N水酸化ナトリウム液1ccを加え、更に1%ニトロプルシッドナトリウム液1ccを加えて後、約10分間室温に放置する。次に、20%塩酸3ccを加えてよくふりまぜ、室温に30分間放置する。

(3) **比色** 第三の管の液を対照液に用いて、60分以内に波長510m $\mu$ に於ける吸光度を光度計又は比色計(S53)にて測定し、第一及び第二の管の読みをそれぞれE<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>とする。

〔計算〕 次の式より検液5cc中のメチオニン量(mg)を算出し、更に試料のメチオニン含量を算出する。

$$\text{検液 5cc 中のメチオニン量 (mg)} = \frac{E_1}{E_2} \times 1$$

**定量法の検討 (1) 酸の種類、濃度及び呈色の安定度 (Table 1)**

酸の種類及び濃度が呈色に及ぼす影響については、上掲の報告の間に若干の相違が認められるので追試して見たところ、呈色の強さは殆んど同じであつた。濃塩酸は発煙刺戟し、燐酸は粘稠でしかも試薬として一般的でないので、著者は20%塩酸を使用することにした。なお後述する様に、ビタミンその他の共存物に対する影響や試薬の盲検値が低い点等でも20%塩酸が良いと思う。また、呈色の安定度は、少くとも60分間は実験誤差内で一定であつた。従つて原報のように数分間に測定する必要はない。

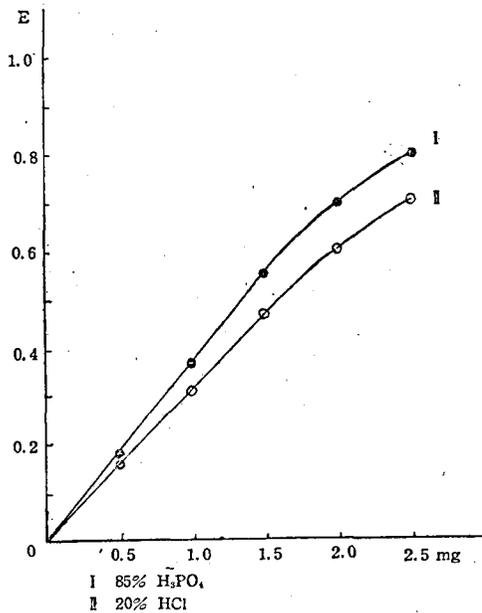
**(2) 反応温度による呈色度の変化**

従来の方法では殆んど反応温度を35~40度にし、5~10分間加温している。葡萄糖、乳糖、澱粉等の炭水化物の共存を考えると温度が低い方がよいので、この点を検討して見た。(Table 2)の様に反応温度が上昇すれば呈色度もあがるが、試薬の盲検値を差引くと同じ値であるので、室温で反応させるのが良いと思われる。

## (3) 色素液増減による呈色度の変化 (Table 3)

メチオニン 1.88mg に対し 1%ニトロプルシッドナトリウム液 0.5cc 添加では不足する。他は殆んど変りないが試薬の盲検値を考慮し 1%, 1cc ときめた。

Fig 1. Calibration Curve of Methionine



## (4) 検量曲線作成 (Fig 1)

20%塩酸 3cc 及び 85%磷酸 2cc 使用して検量曲線をつくつた。共にメチオニン 1.5mg/5cc までは濃度と吸光度の間に直線関係が成立する。

## (5) 共存物の影響

市販メチオニン製剤の中で最も組成の複雑なものは各種ビタミンを含有している糖衣錠である。各種共存物を市販品中の最大含量以上の割合に加えて、その影響を調べた結果を (Table 4) に示す。これらの中でビタミンC 以外は殆んど影響がない。

## (6) ビタミンCの影響

ビタミンCがメチオニンと共存する場合には上述のように吸光度が低下するが、20%塩酸を加えて後の放置時間を延長すればその影響を除くことができる (Table 5)。85%磷酸では添加後60分経ても吸光度は10%低くなる。

## (7) ヒスチチン及びトリプトファンの影響

上掲の文献によればヒスチチン及びトリプトファンはこの呈色反応を妨害する。これらの影響を調べた結果を (Table 6) に示す。又これらの色素のブチルアルコール、キシレン、クロロホルム及び酢酸エチルエステルに対する溶解性を調べたが、ブチルアルコール以外のものでは全然抽出し得なかつた。

ブチルアルコールはメチオニン、ヒスチチン及びトリプトファンによる色素をそれぞれ 15%、29%及び 75%抽出した。これは Mc Carthy<sup>1)</sup> 等の、トリプトファンによる色素のみ抽出されるという報告と相違する。(Table 6) よりヒスチチン及びトリプトファンは可成りの程度に本呈色反応を行ない、メチオニン定量を妨害することがわかる。

## (8) 含硫化合物の影響

含硫アミノ酸としてシスチン及びシステイン、含硫安定剤としてチオ尿素及びチオグリコール酸ナトリウムの影響を調べた (Table 7a)。チオ尿素は非常に影響があり、チオグリコール酸も若干影響するが、共に常用量 (0.01~0.005%) では影響はない (Table 7b)。

## (9) 各種共存物存在下の影響と誤差

(Table 4) に示す組成の添加物を全部加えたものについて、20%塩酸及び 85%磷酸により定量した結果は前者 100.5%、後 96%であつた。前者の 10 回測定結果を (Table 8) に示すが、バラツキは測定誤差範囲内である。

## (10) 市販メチオニン糖衣錠に対する回収率試験

市販メチオニン剤中、最も組成の複雑な糖衣錠 2 種につき行つた回収率試験を (Table 9) に示す。回収率はどちらも殆んど 100%であつた。

## 総 括

メチオニン以外のアミノ酸を含有しないが、各種ビタミン類や賦形剤、安定剤等を含有するメチオニン製剤に対して、在来のニトロプルシッドナトリウムによる比色定量法を改良し、簡易迅速正確な定量法をつくつた。ヒスチチン又はトリプトファンを含有するメチオニン製剤があれば、この方法は使用できない。

終に臨み御指導と御校閲を賜つた小川部長並びに試薬の一部を提供された住友化学工業株式会社、三共株式会社及び武田薬品工業株式会社に深謝する。

## 文 献

- 1) Mc Carthy T. E., and Sullivan M. X., : J. Biol. Chem., 141, 871 (1941)
- 2) Hess W. C., and Sullivan M. X., : ibid 151, 635 (1943)
- 3) Horn M. J., and Jones D. B., : ibid 163, 313 (1946)
- 4) Csonka F. A., and Denton C. A., : ibid 163, 329 (1946)
- 5) Rudra M. N., and Choudhury L. M., : Analyst 76, 432 (1951).

Table 1. Influence due to acid on color reaction

Acid		Extinction after Min.			
added	cc	5	15	30	60
conc. HCl	2	0.330	0.332	0.327	0.330
20% HCl	3	0.295	0.300	0.305	0.310
		(0.330)*	(0.333)*	(0.340)*	(0.343)*
85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2	0.340	0.348	0.338	0.345

\*Corrected value Methionine content 1 mg

Table 2. Influence due to temperature on color reaction

Temperature	Extinction (A)	Blank (B)	(A) - (B)
15°C	0.655	0.05	0.605
20~25	0.665	—	—
25~30	0.670	—	—
35~40	0.680	0.075	0.605

Methionine content 1.88mg

Table 3. Influence due to Nitroprusside Solution added on color reaction

Nitroprusside Solution		H <sub>2</sub> O added	Extinction (A)	Blank (B)	(A) - (B)
%	cc				
10	1	0	0.900	—	—
10	0.5	0.5	0.770	—	—
10	0.3	0.7	0.740	0.137	0.603
10	0.2	0.8	0.710	0.087	0.623
10	0.1	0.9	0.635	0.05	0.585
1	1	0	0.635	0.05	0.585
1	0.5	0.5	0.435	0.03	0.405

Methionine content 1.88mg

Table 4. Influence due to added Substances on color reaction

Substances added		Acid added	
Name	Content*	20%HCl	85%H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
—	—	100%	100%
CaCl <sub>2</sub>	0.2mg	100	100.5
Glucose	2mg	99	98.5
Starch	1mg	98	101
Talcum	0.5mg	100.5	100.5
Lactose	3mg	98	101
Sucrose	2mg	99	101
B <sub>1</sub>	200μg	100	102.5
B <sub>2</sub>	20μg	100	100
B <sub>6</sub>	20μg	100	102.5
B <sub>12</sub>	0.15μg	98.5	100
C	1mg	91.5	75
Niacin amide	50μg	100.5	101
Rutin	1mg	101.5	100
Biotin	20μg	100	101

\*per Methionine 1 mg

Table 5. Influence due to Vitamin C

Time of reaction (Min)	Acid added	
	20%HCl	85%H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
5~10	* 90.5%	*72 %
25~30	100	82
45~60	101	88.5

\*Methionine alone 100%

Table 6. Color due to Histidine or Tryptophane

Amino acid		20%HCl	Remained after butanol extraction
Name	Content		
Methionine	1mg	100%	85%
Histidine	1.03	45	71
Tryptophane	0.925	16	25

Table 7 a. Influence due to HS compounds on color reaction

HS-compound added (same wt.)	20%HCl added	Color
Cystine	* 98.7%	Red
Cystaine	100.5	Red
Thiourea	196	Deep blue
Na-thioglycorate	103	Red

\*Methionine alone 100%

Table 7 b. Influence due to HS compounds on color reaction

HS-compound added		20%-HCl added	Color
Thiourea	* —	100%	Red
	1mg	195	Deep blue
	0.5	160	Grape
	0.1	102.5	Red
	0.05	101.5	Red
	0.03	100	Red
	0.01	98.5	Red
Na-thioglycorate	—	100	Red
	1	103	Red
	0.5	102	Red
	0.1	101	Red

\*Methionine content 1 mg

Table 8. Influence due to gross substances added on color reaction

	Extinction	
Methionine alone	0.300	
Methionine	0.310	0.302
+	0.305	0.302
Substances added*	0.300	0.302
	0.300	0.302
	0.300	0.297
	(Average)	0.302

\*Gross substances added in Table 4.

Table 9. Recovery tests

*Sample	Methionine added	Methionine in Sample	Total methionine		Recovery
			calculated	found	
1	0.4925mg	0.49 mg	0.9825mg	0.985mg	100.2%
2	0.4925	0.5375	1.03	1.015	98.7

\*Commercial preparation: Sugar coated tablets

### Summary

- 1) A colorimetric method (sodium nitroprussid reaction) is described for the quantitative determination of methionine in commercial methionine preparations
- 2) Modified colorimetric Method is as follows;
  - a: place a 5cc of sample extract containing 0.2~1.5mg methionine in a test tube.
  - b: Place each 5cc of methionine standard solution containing 1mg of methionine and water in another two test tubes, the latter will serve as blank.
  - c: To each of three tubes, add 1cc of 5N-NaOH and 1cc of 1% sodium nitroprussid solution.
  - d: After 10 minutes, standing at room temperature, add 3cc of 20%-HCl and shake vigorously.
  - e: Allow to stand for 30~60 minutes at room temperature, measure color intensity at the wave length of 510m $\mu$ .
- 3) This method is applicable to commercial complex methionine preparations and gives satisfactory results.

Received April 30, 1955

## メチオニン製剤中のメチオニンの化学的定量法 (Ⅱ)

平岡 栄一, 中路 幸男

Chemical Determination of Methionine in the  
Commercial Methionine Preparations (Ⅱ)

By Eiichi HIRAOKA and Yukio NAKAJI

まえがき 従来メチオニン定量法として国民医薬品集<sup>1)</sup>及び N. N. R.<sup>2)</sup>にヨウ素法が載っている。しかしこれ等はいずれも対象がメチオニン結晶又はメチオニン錠等であるから昨今多数現われてきた混合ビタミン糖衣錠等の中のメチオニン定量に対しては応用できるかどうか疑わしい。我々は前報<sup>3)</sup>に於てニトロプルシッドナトリウムを使用する比色法が好結果を与えることを報告したが、今回はヨウ素法の組成複雑なメチオニン製剤に対する応用を目標として実験を行い、相当の成功を収めたので報告する。

## I 第二改正国民医薬品集収載法

改訂定量法 本品を 105° で 4 時間乾燥し、その約 100mg を精密に秤り、共栓フラスコに入れ、水約 50cc、無水酢酸ナトリウム 6g 及びヨウ化カリウム 1g を加え、ふりまぜてとかす。これに N/10 ヨウ素液 25cc を加え、密栓しよく振りまぜ、15 分間放置した後、過剰のヨウ素を N/10 チオ硫酸ナトリウム液で滴定する。別に同様の方法で空試験を行う。

N/10 ヨウ素液 1cc = 7.461mg メチオニン

定量法の検討 (1) 試薬の量の減少による影響 国民医薬品集の方法ではメチオニン 300mg を使用するが、高価なメチオニンの使用量を減らして 100mg とし、これに応じて他の試薬の量も減らしたが何らの不都合もない事が判つた (Table 1)。

(2) ヨウ素液との反応時間の影響 メチオニンとヨウ素液との反応時間による影響を調べた (Table 2)。原報の様に 30 分の必要はなく、15 分で充分である。

(3) 誤差 メチオニン 100mg をとり 5 回定量を行つたが、(Table 3) に示すように本法は正確である。

(4) 共存物の影響 複雑なメチオニン製剤中の各種共存物を市販品中の最大含量の割合に加えて、その影響を調べたのが (Table 4) である。ビタミン B<sub>1</sub> 及び C 以外は影響しない。

(5) ビタミン B<sub>1</sub> の影響 B<sub>1</sub> は中性又は酸性でヨウ素液と赤褐色沈澱を生ずる。B<sub>1</sub> がメチオニンに対し 5% 以上含まれるときには本法そのままでは応用できない。そこで我々は B<sub>1</sub> が酸性白土及びゼオライトにより吸着される事を利用して、B<sub>1</sub> を可及的に除けば良からうと考え、(Table 5) に示すように pH を 4.5 に調節した検液に酸性白土 0.3g を加えて吸着し良好な結果を得た。また、チオクロム法で使用する吸着管にゼオライトを入れたものを作り、これに pH を 4.5 に調節した検液を注ぎ 1 分間 1cc の割合で流出させ、その後温湯 5cc で 4 回水洗して流出液と洗液を合し、水を加えて約 50cc としこれを検液とすることによつても、酸性白土法と同様に目的を達した。

(6) ビタミン C の影響 C による妨害は活性炭による酸化で C を酸化型にし、ヨウ素との反応を妨げることにより C の影響を除きうると考えられる。(Table 6) に示すようにノーリット(活性炭)を加えて行つた結果では、ノーリットの量が増すにつれて回収率は一旦 100% に近付くが、さらに炭量も増すと、C の除去とともにメチオニンの損失がおこるらしく、回収率が 100% 以下に減少した。従つてこの吸着条件では C の影響は除けない。

## II N. N. R. 収載法

本法は蛋白質加水分解物中のメチオニン定量法として Lavine<sup>4)</sup> が報告した方法に準拠したものと思われるが我々の対象とした製剤にはメチオニン結晶を添加してある為、他のアミノ酸の影響よりもむしろビタミンや賦型剤等の影響を顧慮すべきであろう。したがつて原報及び N. N. R. 法にある様な他のアミノ酸による盲検を除く複雑な方法は必要がないと考える。

改訂定量法 メチオニン 15mg を含む液 5cc を三角フラスコにとり磷酸緩衝液 (0.1N KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 容, 0.1N K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 容の混液) 2cc, 5 M ヨウ化カリウム液 2cc 及び N/10 ヨウ素液 2.5cc を加えて、15 分間放置した後、過剰

のヨウ素を N/10 チオ硫酸ナトリウム液及び N/40 チオ硫酸ナトリウム液で消失させ (ヨウ化カリウム澱粉試液), 次に 5 M ヨウ化カリウム液 1cc, 2 N 塩酸 2.5cc を加え, 遊離するヨウ素を N/40 チオ硫酸ナトリウム液で滴定する. 別に同様の方法で空試験を行う.

N/40 チオ硫酸ナトリウム液 1cc = 1.865mg メチオニン

**定量法の検討 (1) N/10 ヨウ素液の量** メチオニン 15mg に対応する N/10 ヨウ素液は約 2.01cc に当るので, 原法に於ける使用量 2cc は桜井, 恒松<sup>5)</sup> の報告する如く 2.5cc に改むべきである.

(2) **過剰のヨウ素を中和するチオ硫酸ナトリウム液について** 過剰のヨウ素を中和する際に N/10 チオ硫酸ナトリウムを用いるのと, このもので大部分のヨウ素を中和した後, N/40 チオ硫酸ナトリウム液で完全に中和する方法とについて, この両方を国民医薬品集法の改訂法と比較したものが (Table 7) である. すなわち N/40 チオ硫酸ナトリウム液を併用する方が良い.

(3) **共存物の影響** 各種共存物の影響を見たがビタミン C 以外は妨害しない (Table 8)

(4) **ビタミン C の影響** 検液中にビタミン C の共存する場合には N/10 ヨウ素液 2.5cc で不足することがある. かようなときには明確な持続性のあるヨウ素色を与える様にヨウ素液を加えればよい. この様にすれば C の共存も殆んど支障を来さない (Table 8).

### 総 括

① 国民医薬品集の方法を改訂した我々の方法により, 酸性白土又はゼオライトを使用すればビタミン B<sub>1</sub> の影響だけは除きうるが, C による妨害がさけられぬ. またこれ以外のビタミン及び賦形剤等は何等影響がない.

② N. N. R. 法改訂法によれば現在のメチオニン製剤はすべて定量し得る. ただし C 共存の時にはヨウ素の過剰を加えねばならない.

終りに臨み御指導と御校閲を賜わつた小川部長並びにメチオニン結晶を供与された三共株式会社及び住友化学工業株式会社に深謝する.

### 文 献

- 1) 第二改正国民医薬品集: 368 (1955)
- 2) New and Nonofficial Remedies: 627 (1952)
- 3) 平岡栄一: 衛生試験所報告 第73号 69頁
- 4) Lavine T. F.,: J. Biol. Chem., 151, 281 (1943)
- 5) 桜井寛, 恒松不二夫: 薬剤部長年報 第13号 127頁.

Table 1. Quantity of reagents used

Methionine (mg)	H <sub>2</sub> O (cc)	CH <sub>3</sub> COONa (g)	KI (g)	Recovery (%)
300	100	12	2	100
100	50	6	1	100.2

Table 2.

Methionine (mg)	Time of reaction (min)	Recovery (%)
100	5	100
100	10	99.7
100	15	100
100	20	100
100	30	100.2

Table 3.

N/10 I <sub>2</sub> soln. (cc)	*Recovery (mg)
13.23	98.8
13.28	99.1
13.23	98.8
13.23	98.8
13.28	99.1
Average	
13.25	98.92

\*Methionine about 100mg

Table 4. Influence due to added substances  
(Modified J. N. F. I method)

Added Substances	Content (per Methionine 100mg)	Recovery (%)
B <sub>1</sub>	20 mg	—
B <sub>2</sub>	1.5mg	100.3
B <sub>6</sub>	1.5mg	100.3
B <sub>12</sub>	15 μg	100.0
C	100 mg	195.1
Rutin	75 mg	100.4
Glucose	200 mg	100.0
Sucrose	200 mg	100.4
Lactose	300 mg	99.6
CaCl <sub>2</sub>	20 mg	100.0
Talcum	50 mg	100.4

Table 5. Removal of VB<sub>1</sub> by adsorbents

Methionine (mg)	B <sub>1</sub> (mg)	Adsorbents (g)	Recovery (%)
78.4	20	Japanese acid clay 0.1	105.6
78.4	20	" 0.2	100.0
78.4	20	" 0.3	100.0
78.4	20	" 0.5	99.1
78.4	20	" 0.7	99.1
98.3	20	Zeolite 2	100.3

Table 6. Removal of VC by Norit

Methionine (mg)	C (mg)	Norit (g)	Recovery (%)
99.5	100	0.1	158.5
99.5	100	0.3	114.8
99.5	100	0.5	78.9
99.5	—	0.1	90.7
99.5	—	0.3	70
99.5	100	—	190

Table 7.

Modified *J. N. F. I Method (%)	Hodified N. N. R. Method	
	N/10 Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> treatment	N/10, N/40 Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> treatment
98.4	97.8	98.5
98.4	97.8	98.5
99.5	97.2	99.1
98.4	97.2	98.5
99.5	97.8	99.1
Average 98.85	97.56	98.74

\*Formulae Nationales Japonicae I.

Table 8. Influence due to added Substances  
(Modified N. N. R. Method)

Added Substances	added (per Methionine 15mg)	Recovery (%)
B <sub>1</sub>	3 mg	100
B <sub>2</sub>	0.25mg	99.6
B <sub>6</sub>	0.2 mg	100
B <sub>12</sub>	3 μg	101
C	15 mg	98.6*
Glucose	30 mg	100.2
Sucrose	40 mg	98.6
Lactose	50 mg	99.2

\*Excess of iodine solution added.

### Summary

- 1) Iodometric assay of Methionine in J. N. F. I and N. N. R. were modified so as to applicable to the quantitative assay of commercial complex methionine preparations.
- 2) Subsidiary components in commercial complex methionine preparations including B-Vitamins except B<sub>1</sub>, Rutin, carbohydrates, inorganic salts or binders bear no influence upon modified method but B<sub>1</sub> and Ascorbic acid is not the case.
- 3) In modified J. N. F. I method, both B<sub>1</sub> and C interfere and the former can only be removed by suitable adsorption prior to titration.
- 4) In modified N. N. R. method, interference due to C still remains, but can be nullified by addition of excess iodine.
- 5) Modified N. N. R. method with excess of iodine will be the best for routine analysis.

Received April 30, 1955

## メチオニン製剤中のメチオニンの化学的定量法 (Ⅲ)

平岡 栄一, 中路 幸男, 小川 俊太郎

## Chemical Determination of Methionine in the Commercial Methionine Preparations (Ⅲ)

By Eiichi HIRAOKA, Yukio NAKAJI and Shuntaro OGAWA

まえがき 本報告は前報 (I) 及び (II) において検討した3種の定量法の実用性を市販製剤をかりて比較し、かたがた製剤の試験を行つた成績である。

試料 各製造者より提供された製剤の内訳は (Table 1) の通りである。

Table 1.

Injections	6
Sugercoated tablets	7
Total	13

試験法 前報のニトロプルシッドナトリウム比色法<sup>1)</sup>, 国民医薬品集法改訂法及び N. N. R. 法改訂法<sup>2)</sup> によつた。

試験成績 (Table 2) 参照。

## 総 括

ビタミンCを含有する製剤を除いては3種定量法による定量結果は良く一致する。またビタミンC含有製剤にあつても比色法と N. N. R. 法改訂法はよく一致した。我々の入手したメチオニン製剤に関する限りではメチオニン実含有量の表示量に対する割合は90~110%であつた。

終りに臨み試料を提出された製造者各位に謝意を表する。

Table 2. Methionine content on commercial preparations

Samples	Nitroprusside Method (%)	Improved N. N. R. Method (%)	Improved J. N. F. II Method (%)
Injections			
1	98.0	98.6	98.8
2	100.5	101.4	101.0
3	97.5	95.5	95.0
4	98.5	100.3	100.5
5	103.5	100.5	104.0
6	95.5	96.5	94.9
Suger coated tablets	ditto	ditto	ditto
1	103.5	101.7	104.2
2	95.5	93.4	94.4
3	96.0	94.5	94.2
4	108.0	106.4	110.2
5	101.0	98.4	98.9
6	98.0	96.6	* 105.1
7	100.7	99.7	* 178.2

\* Preparations involving Vitamin C.

## 文 献

- 1) 平岡栄一: 衛生試験所報告, 第73号 69頁.
- 2) 平岡栄一, 中路幸男: 衛生試験所報告, 第73号 75頁.

---

### Summary

Sets of analytical data of commercial methionine preparations by three method, i.e. colorimetric, modified J.N.F. I and modified N.N.R. were tabulated. They were in good agreement.

Received April 30, 1955

混合ビタミン剤のマイクロバイオアッセイ

新村 寿夫, 新村 和枝\*

Microbiological Assay of Multiple Vitamin Preparations

By Tosio NIHMURA and Kazue NIHMURA

まえがき E. E. Snell 等による乳酸菌の栄養要求の研究が進むにつれて、これ等ビタミンの微生物学的定量が容易となり、米局方にも収載されるに至った。著者等は *L. arabinosus* を用いるニコチン酸の定量をかりて基礎的条件を、次いで、*L. leichmannii*, *Stre. faecalis*, *Sacch. carlsbergensis* を用い、 $B_{12}$ ,  $B_6$ , ビオチン、パントテン酸、葉酸、の試験法を逐次追試し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 菌株 菌株は東大農学部坂口教室及び American Type Culture Collection より入手した。
2. 保存 (1) *L. leichmannii* 以外の乳酸菌 (*L. arabinosus* Strain 17-5 ATCC 8014, *Stre. faecalis* "R" ATCC 8043) : 1 l 中粉末酵母エキス 5 g, ポリペプトン 10g, ブドウ糖 10g, 醋酸ナトリウム ( $3H_2O$ ) 10g, 塩 A 液 5 cc ( $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$  各  $\approx 50mg/cc$ ), 塩 B 液 5 cc ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , NaCl おのおの 1 mg/cc 及び  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  20mg/cc), 粉末寒天 20g を含む保存培地 (PH6.8; 15/b. 15min. 滅菌) に *L. arabinosus* は 37°, *Stre. faecalis* は 30° で 20hr. 穿刺培養し、1 週間毎に移植を行い氷室に貯える。  
(2) *L. leichmannii* ATCC 4797 : 米局方に準ずる。  
(3) *Sacch. carlsbergensis* ATCC 9080 : 乾燥麦芽 200g に水 1 l を加えて時々攪拌しつつ 50°~63° に約 5 hr. 保ち、少量の液を採り、ヨウ素・ヨウ化カリ液にて澱粉の反応の消失したことを確めた後、綿栓で濾過し煮沸後に遠心する。上清を PH5.0~5.2 に調整し、粉末寒天を 2.5% の割に加えて溶かしてから全量 1 l とする。15/b. 10 min 滅菌する。この斜面に 30° で 20hr 培養する。1 週間毎に移植を行い氷室に貯える。
3. 接種菌液 (1) *L. leichmannii* を除く乳酸菌 : 上記保存培地より寒天を除いた液体培地 2 cc を尖形遠心管に分注し、15/b. 10min. 滅菌したものに接種し、*Stre. faecalis* は 30°, *L. arabinosus* は 37° で 16~20hr 培養後遠心し、滅菌生理食塩水で 3~5 回洗滌し、再び生理食塩水に懸濁する。A. K. A. 光電比色計 (S. 61. Sb 光電管) で *Stre. faecalis* は約 90%, *L. arabinosus* は約 80% になる様に滅菌生理食塩水で稀釈する。  
(2) *L. leichmannii* : 米局方に準じて行うが、接種菌の培養は 2 cc で行い、遠心沈澱は 3~5 回、菌液は 50% に稀釈する。  
(3) *Sacch. carlsbergensis* : 上記斜面培養より 1 白金耳をとり、滅菌生理食塩水に懸濁し、菌液の透過率を 20% とする。
4. 検液の調製 ニコチン酸 : 試料のニコチン酸含量に依り異なるが、一般に天然物 (酵母剤等) は 1 g の試料に N 硫酸 (又は N-HCl) 50cc を加え、15/b. 30min. 加圧する。冷後水酸化ナトリウム液で pH. 6.8 とし、全量 100cc とする。混合ビタミン剤は温湯抽出する。その他のビタミン : 混合ビタミン剤は総て温湯抽出する。但し  $B_{12}$  源として肝臓エキスを含有するものは、試料の適当量に pH4.5 の磷酸ナトリウム-クエン酸緩衝液 (4.5 cc 0.2 M  $Na_2HPO_4 + 5.46cc$  0.1M クエン酸) 10cc 及び  $NaHSO_3$  100mg を加え 15/b. 15min. 加圧し適当に稀釈する。
5. 基礎培地 (1) ニコチン酸 (*L. arabinosus*) : 米局方に準ずる。  
(2) パントテン酸及びビオチン (*L. arabinosus*) : 米局方ニコチン酸定量用基本培地の組成中ビオチン及びパントテン酸をニコチン酸で入れ代える。  
(3)  $B_{12}$  (*L. leichmannii*) : 米局方に準ずる。  
(4) 葉酸 (*Stre. faecalis*) : A. O. A. C.<sup>2)</sup> 及び Tepley S Elvehjem<sup>3)</sup> 法 (1945) に準ずる。  
(5)  $B_6$  (*Sacch. carlsbergensis*) : Atkin., L. Schultz, A. S. et al<sup>4)</sup> 培地にニコチン酸 500 $\mu g$ /100cc 加える。  
(6) パントテン酸 (*Sacch. carlsbergensis*) : Atkin, L. Schultz, A. S. et al<sup>5)</sup> の法に準ずる。
6. 定量方法 培養 : *L. leichmannii* を除く乳酸菌は、総て 2 cc 培養、*L. leichmannii* は 5 cc 培養、酵母は 10cc 培養を行った。

脚註\* 所員外

接種：上記菌液を $1/2$ 皮下用注射針で、ニコチン酸1滴 $B_{12}$ 2滴、 $B_6$ 及びパントテン酸 (*Saech. carlsbergensis*) は5滴、葉酸1滴づゝ接種する。

測定：Stre. faecalisの $30^\circ$ を除いて、他の乳酸菌は $37^\circ$ で72hr. 培養後、B. T. B. 指示薬 (0.2%) を用いてN/20水酸化ナトリウム液にて滴定する。酵母は $30^\circ$ で17hr. 培養後内容を2倍 (20cc) として比濁する。

### 実験結果及び考察

#### 1. *L. arabinosus* によるニコチン酸の定量

(1) 接種量の影響：伊藤超短波光電池比色計で50%, 60%, 70%, 91%, の透過率の菌液を用い、接種量の影響を検した。濁度に依り response を測定するときには培養時間も短くなるので、接種量の多寡が、検量曲線に影響

Fig 1 Effect of Inoculum on Nicotinic Acid Dose Response Curve with *L. arabinosus*

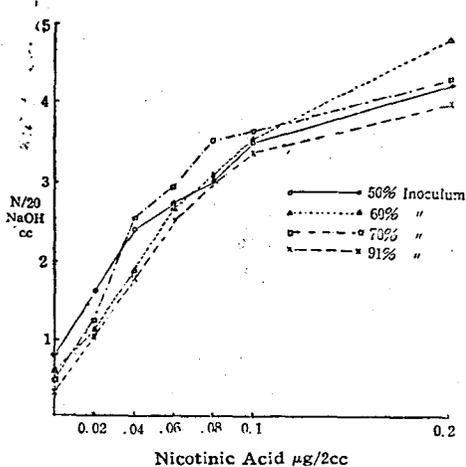
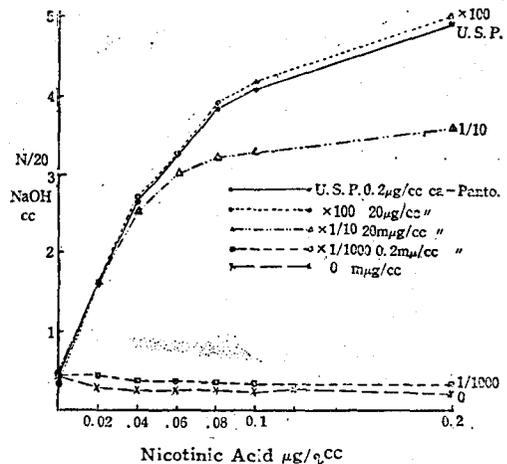


Fig 2 Effect of Pantothenic Acid on Nicotinic Acid Dose Response Curve with *L. arabinosus*



響を及ぼすことも考えられるが、72hr. 培養後滴定する場合は、定量範囲内では盲値が高くなるのみで検量曲線は並行する。しかし、接種量が極端に少い時はフレ易くなり、Max. growthは接種量の多い程大きい。結論として生成した酸滴定で測れば、接種量にそれ程留意する必要はない (Fig 1)。

(2) 基本培地に加えるビタミン類の添加量の影響：混合ビタミン剤の定量時などでは、定量目的以外のビタミンが多量に基本培地中に入る恐れもある。これとビタミンの貯蔵液が壊れた場合を考えて、米局方基本培地中の各種ビタミン含量を基準として、1,000倍、100倍 $\sim 1/100$ 倍、 $1/1000$ 倍及び0量を加えて検量曲線に及ぼす影響をみた。

(a)  $B_1$ ,  $B_2$  及び  $B_6$  の場合：米局方基本培地は  $B_1$  0.1  $\gamma$ /cc を含む、その0 $\sim$ 1,000倍濃度の  $B_1$  を含むときを検したが、全く  $B_1$  が含まれないときは、滴定値がフレ易くなるのみで、曲線に影響はない。 $B_2$ ,  $B_6$  もまた  $B_1$  と同様であつた。

(b) パントテン酸の場合： $B_1$ ,  $B_2$  等とは異つて、*L. arabinosus* には必須で、0 $\sim$ 0.4  $m\mu$ g/cc (米局方の  $1/1000$ ) では全く成育しない。米局方の  $1/10$  量の 40  $m\mu$ g/cc ではニコチン酸が過剰でもパントテン酸が不充分のときには成育が制限される。しかし、逆に100倍量のパントテン酸を添加しても検量曲線は変化しない (Fig 2) これは、*L. arabinosus* を用いれば、パントテン酸が定量できるということである。

(c) ビオチンの場合：ビオチンはパントテン酸と同様 *L. arabinosus* の成育には必須である (Fig 3)。

(3) 保存培地：保存培地が適当でないとき成育因子に対する response が鈍くなる。然し反応のにぶつた *L. arabinosus* 及び *L. casei* を Liver-Tryptone agar に移植すると酸生成量の増すことが、Mavis & Nymon et al 6) により報告されているので、従来用いている保存培地とそれより無機塩を除いた培地及び Liver-Tryptone agar (Tryptone はポリペプトンを代用) に約8ヶ月間毎週移植した菌を用いて、それぞれの検量曲線を比較したが、

Fig 3 Effect of Biotin on Nicotinic Acid Dose Response Curve with *L. arabinosus*

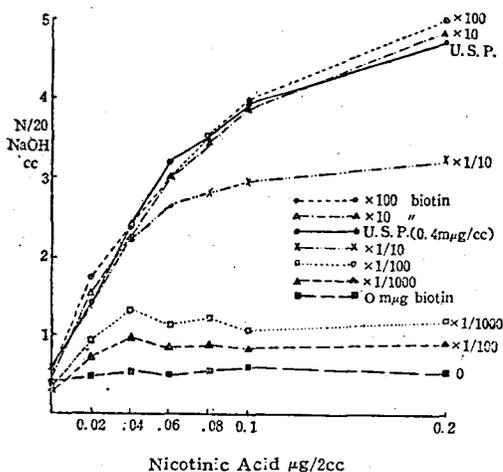
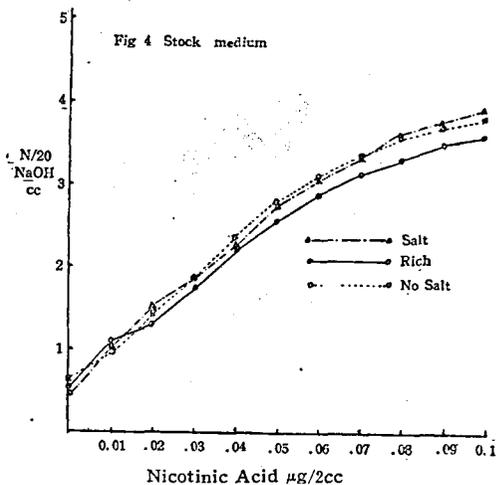


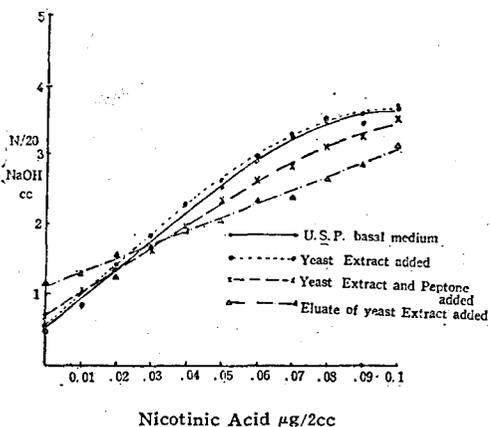
Fig 4 Stock Medium



大差はない (Fig 4)。従つて、著者等の用いている保存培地は *L. arabinosus* のニコチン酸の定量に適當と思われる。

(4) アデニン, グアニン, ユラシルの代用: 著者等がニコチン酸の定量を始めた頃には入手困難であつたので、酵母エキス, 肝臓エキス及びペプトンを活性炭処理して代用してみたところ、ペプトン又は肝臓エキス単独では結果がフれるが、酵母エキスならば米局方と同様の検量曲線が得られた。また、ペプトン, 酵母エキス, 及び肝臓エキス内の二者を組合せてみたが、酵母エキスを含まぬ場合は非常にフれて使用できぬ。(肝臓エキス+酵母エキス)又は(ペプトン+酵母エキス)を用いた場合でも、酵母単独の場合に比べて稍 フレが大きい。三者共に含むものは、ニコチン酸量が  $0.08 \mu\text{g}/2\text{cc}$  以上になると酸生成量が減り且つフレが非常に大きい。また酵母水を活性炭処理して 50% エタノールで誘出したものでは、検量曲線が非常に傾斜した。結局 (アデニン+グアニン+ユラシル) の代用としては酵母エキスを活性炭処理したもののみが使用できる。(Fig 5)

Fig 5 Effect of Yeast extract and Peptone in Adenine, Guanine, Uracil-free Medium



(5) 7種のニコチン酸用基本培地による検量曲線の比較: Flynn L. M. et al. (1951)<sup>7)</sup> の培地は葉酸, B<sub>12</sub>, B<sub>2</sub>, ニコチン酸定量用の万能培地でシステイン, グルタミン酸を含む。Sarett, H. P. et al.<sup>8)</sup> (1946) はロイド試薬及び活性炭処理酵母エキスを用いる。他の基本培地

9) 2) 1) 10) はシステイン, トリプトファン, ブドウ糖, アスパラギン, キシローゼの添加量及び添加, 不添加の差異があるのみで、培地組成は本質的には変わらない。(Fig 6, 7)

2. *L. arabinosus* によるピオチン及びパントテン酸の検量曲線 1. の(2)項より明かな如く、ピオチンとパントテン酸は *L. arabinosus* に必須であるので、米局方培地のニコチン酸をピオチン及びパントテン酸に変えて検量曲線を作つて見た (Fig 8)。Food & Drug Administration が採用しているかようなパントテン酸の定量法に就ては、既に著者の訳文がビタミン誌 4 巻 362 頁に収載されている。

Fig 6 Acid production by *L. arabinosus* in Various Media (72hr.)

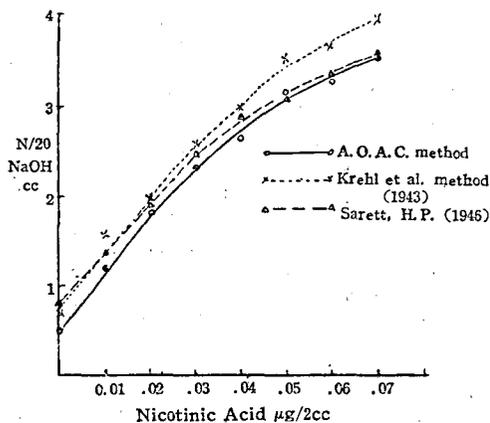


Fig 7 Acid production by *L. arabinosus* in Various Media (72 hr.)

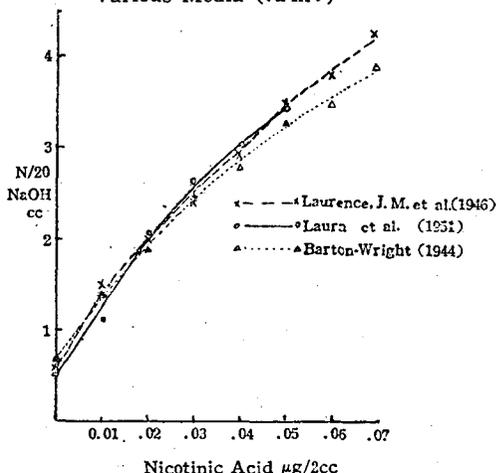
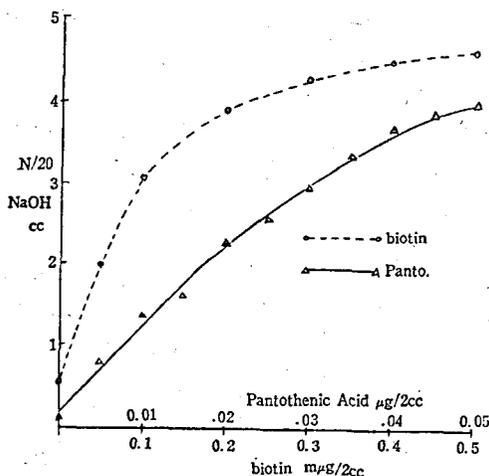


Fig 8 Biotin and Pantothenic Acid Dose Response Curve with *L. arabinosus*



3. *L. leichmannii* による  $B_{12}$  の定量 米局方により最初は他の菌と同様に 2 cc 培養 (17×180mm 試験管) を行つたが、1m $\mu$ g/2cc でようやく成育が見られる程度しか増殖しない。10cc 培養にすれば結果は良いが、節約の意味で小試験管 (13×135mm) 5 cc 培養を行うことにした。

(1) 基本培地に加えるトマト汁及び醋酸ナトリウムの検量曲線に及ぼす影響: U.S.P., A.O.A.C 法共に基本培地中の醋酸ナトリウムは無水物として 2 倍濃度で 5g/250cc 加えるが、普通の結晶醋酸ナトリウム (3H<sub>2</sub>O) をそのまま 5g (U.S.P の 1/1.66) 用いると酸の生成もより高く、検量曲線も良くなる。この現象は U.S.P. 法, A.O.A.C. 法共に見られるので、トマト汁の有無には関係が無い (Fig 9)。(実験に用いた醋酸ナトリウムは純正化学試薬 1 級)

トマト汁の効力の有無に就ては、とかく議論があり、U.S.P. 法の改良法である A.O.A.C. 法ではトマト汁を除いている。著者等の実験ではトマト汁を加えた方が酸生成量も多く、直線部も長い (Fig 9)

(2) NaHSO<sub>3</sub> 1% 含有 磷酸ナトリウム-クエン酸緩衝液の検量曲線に及ぼす影響: 天然物中の  $B_{12}$  の定量では試料の処理が非常に定量値に影響し、 $B_{12}$  の安定剤が必要であることが明かで、A.O.A.C. 法では 1% の NaHSO<sub>3</sub> を含有した pH4.5 の 磷酸ナトリウム-クエン酸緩衝液を用いている。混合ビタミン剤一般には必要でないが、肝

蔵エキスを含有するものもあるので、そのようなものには、用いた方がよいと思ひ、検量曲線に及ぼす影響をみた。B<sub>12</sub> 標準液1 $\mu$ g/cc 1ccに緩衝液 10ccを加え、15lb, 15min, 加圧し、B<sub>12</sub> 標準液未処理のものと比較した。その結果 B<sub>12</sub> は NaHSO<sub>3</sub> 1%含有 pH4.5の緩衝液で加圧しても B<sub>12</sub> は分解しないし、又検量曲線にも変化は無い。

Fig 9 Effect of Tomato Juice and Sodium Acetate on Vitamin B<sub>12</sub> Dose Response Curve with *L. leichmannii*

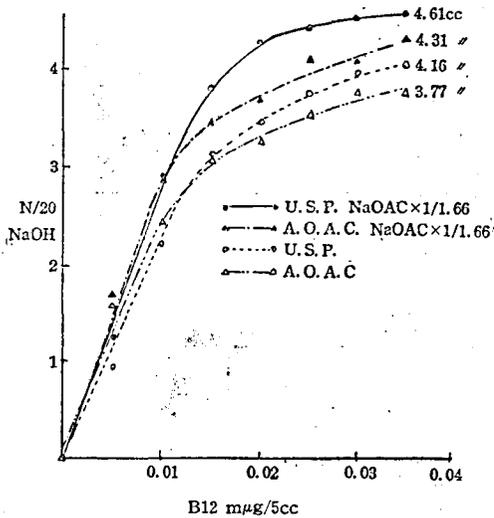
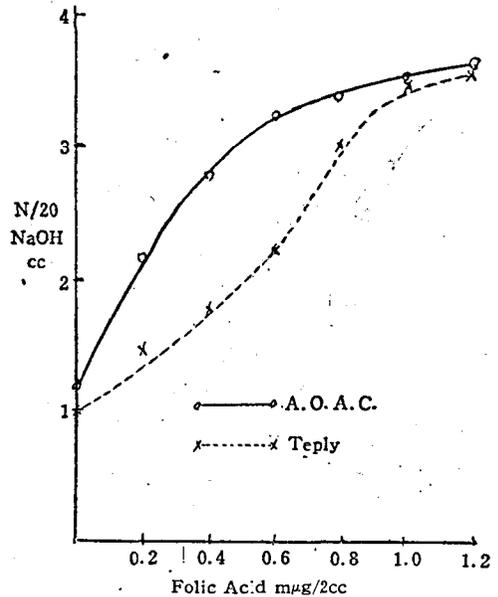


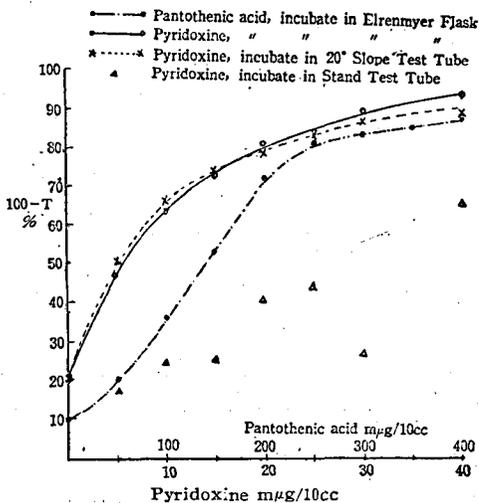
Fig 10 Folic Acid Dose Response Curve with *Stre. faecalis*



4. *Stre. faecalis* による葉酸の検量曲線

牛乳カゼインをそのまま活性炭吸着したものは盲験値が高く、使用できぬ。アルコール浸出したメルク製 Hermerstein 氏法精製カゼインは A. O. A. C. 法では盲験値が高く、Teply 法では盲験値は低いが、成育がわるい。葉酸定量用カゼイン分解物は、牛乳カゼインを Hermerstein 氏法で 5 回繰返し精製したものを DarcoG-60 (100° で 1 hr. 乾燥) で 80°, 1 hr. づゝ 2 回吸着したものが良かった。

Fig 11 Pyridoxine and Pantothenic Acid Dose Response Curve with *Sacch. carlsbergensis*



葉酸定量用カゼイン分解物は、牛乳カゼインを Hermerstein 氏法で 5 回繰返し精製したものを DarcoG-60 (100° で 1 hr. 乾燥) で 80°, 1 hr. づゝ 2 回吸着したものが良かった。

A. O. A. C. 法及び Teply & Elvejem 法 (1945) の検量曲線には一長一短があり、A. O. A. C. ではフレが少ないが直線部は短い。Teply はフレは大きい、直線部は長い (Fig 10)。

他のビタミンの定量ではみられなかつたことであるが、葉酸定量の場合、カゼイン分解物は 2~3 日経過すると盲験値が高くなって使用できなくなる。但し、基本培地を作り、100° で 10min, 滅菌又はトルオールを添加して冷蔵庫に貯えれば約 1 ヶ月は使用し得た。結論として、葉酸の定量は不満足であつた。高い盲験値の原因は不明ではあるが、試験菌の保存培地が適当でない為、菌の葉酸に対する response が鈍つたのかも知れない。

5. *Sacch. carlsbergensis* による B<sub>6</sub> 及びパントテン酸の定量 (1) B<sub>6</sub>: Atkin, L. J., Schultz, A. S.

et al (1943)<sup>5)</sup>に準じ試験した。この方法では振盪培養を行うのであるが、Hopkins & Pennington<sup>11)</sup>によれば、ニコチン酸を加えれば、少しフレるが振盪培養しなくても、 $\angle 25$ 度以下の傾斜培養で目的を達し得るといので。ニコチン酸  $2.5\mu\text{g}/\text{cc}$  (double strength  $5\mu\text{g}/\text{cc}$ ) 添加し更に  $125\text{cc}$  の三角コルベンを用い、液面を大にして培養し、これと  $\angle 20$ 度傾斜及び直立培養との比較を行つたところ、直立時にはフレるが、 $\angle 20$ 度傾斜と三角コルベンによる時は共に好結果を得た (Fig 11)。

(2) パントテン酸: Atkin, L., Williams, W. L., 法により  $B_6$  と同じ操作で試験した (Fig 11)

#### 6. 試料の定量結果

試料の定量結果を Table に掲げる。

Table Results of Assay

Vitamin	Sample	$\mu\text{g}$ Labeled Amount	Once		Twice	
			Found $\mu\text{g}$	Recovery%	Found $\mu\text{g}$	Recovery%
$B_{12}$ L. leichmannii	Multivitamin Preparation (MP) I A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , NA, Na-panto, C, D <sub>2</sub>	1/cc	1,006/cc	98.2	1,015/cc	104.7
	MP II A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , ca- panto, NA, FA, C, D <sub>2</sub> , minerals	1/tab	0.613/tab	93.6	0.636/tab	105.4
	Liver Ext. (Lilly)	10/cc	10.3/cc	87		
Pyridoxine Sacch. carlsbergensis	MPI A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , NA, Na-Panto. , C, D <sub>2</sub>	1000/cc	Average Result $\mu\text{g}$		Recovery %	No. of Estimation
			1025/cc $\pm$ 24.3		103 $\pm$ 1.4	5
Pantothenic acid Sacch. carlsbergensis	MPI A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , NA, Na-Panto, C, D <sub>2</sub>	500/cc	478/cc		96	3
	MP II A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , NAA, Ca-Panto, C, D <sub>2</sub> , FA	200/capsule	197/capsule		103	1
Nicotinic acid L. arabinosus	MPW B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , NAA, Ca- Panto.	10mg/capsule	9.93mg/capsule			1
	MPV B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , NAA, C, A, D <sub>2</sub>	20mg/capsule	18.32mg/capsule			1
			Found $\mu\text{g}$	Recovery %	No. of Estimation	
	Nutrient I		199.6 $\pm$ 4.4	100 $\pm$ 1.4	7	
	Nutrient II		425.2 $\pm$ 4.2	99.1 $\pm$ 1.2	8	
	Pig-Liver Ext.		1650		2	
	Whale-Liver Ext.		546		1	

\* Multivitamin Preparation (MP)

### 総 括

1. L. arabinosus を用い、ニコチン酸定量の基礎実験として、接種菌量、保存培地及び基本培地中の各種ビタミンの量等を検討した。又7種のニコチン酸用基本培地を用いて検量曲線を比較した。米局方により混合ビタミン剤、酵母剤及び肝臓エキスのニコチン酸を定量した。
2. L. arabinosus を用いビオチン、パントテン酸の検量曲線を画いた。
3. L. leichmannii を用い U. S. P. 及び A. O. A. C. 法を基にして、混合ビタミン剤中の  $B_{12}$  定量を検討し、基本

培地中のトマト汁及び醋酸ナトリウムの検量曲線に及ぼす影響等を試験した。

4. *Stre. faecalis* を用い葉酸の検量曲線を描いた。
5. *Sacch. carlsbergensis* を用い, 三角フラスコで培養し, 混合ビタミン剤中の B<sub>6</sub> 及びパントテン酸を定量した。

附 記 本実験を始めるに当つて御高配を賜つた東大農学部坂口教室の各位及び宮沢滋氏, 資料を分与されたワカモト製薬株式会社及び大日本ビタミン製薬株式会社に深謝します。

本実験は小川俊太郎部長指導の下に行つた。

## 文 献

- 1) U. S. P., XIV, 737 (1950)
- 2) A. O. A. C. (1950)
- 3) Teply, L. J., and Elvehjem, C. A. : J. Biol. Chem., 157, 303 (1945)
- 4) Atkin., L, Schultz, A. S., Williams, W. L. and Frey, C. N. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 15, 141 (1943)
- 5) Atkin, L., Williams, W. L., Schultz, A. S. and Frey, C. N. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 16, 67, (1944)
- 6) Mavis, C. Nyman and Willis. A. Gortner : J. Biol. Chem. 163, 277, (1946)
- 7) Flynn, L. M., Williams, V. B., Odell, B. L., and Hogan, A. G. ; Anal. Chem, 23, 180 (1951)
- 8) Sarett, H. P., Pederson, R. L. and Cheldelin, V. H. : Arch. Biochem, 7, 77 (1946)
- 9) Barton, Wright. E. C. : Biochem. J. 38, 314, (1944)
- 10) Krehl, W. A., Strong, F. M. and Elvehjem, C. A. : End. Eng. Chem Anal. Ed, 15, 471 (1943)
- 11) Clegg, K. M., Kodicek, E. and Mistry, S. P. : Biochem. J. 50, 326 (1952).

## Summary

1. Versatile medium containing Yeast extract, peptone, glucose, salts and agar was available to stock culture for *L. arabinosus*.
2. Slope or effective range of dose response curve does not alter even when the amount of inoculum transplanted to assay medium varies considerably.
3. Higher B-vitamin's concentration in basal medium expected to encounter in multiple-vitamin assay was not detrimental to nicotinic acid assay, however deterioration of necessary vitamin affects the result seriously.
4. Adenine, guanine and uracil in nicotinic acid assay could be replaced by charcoal-treated yeast extract.
5. Dose responses of *L. arabinosus* for nicotinic acid in seven different basal media were substantially equal.
6. *Sacch. carlsbergensis* could grow enough in liquid medium with a large surface area.
7. Acid production was enhanced by lowering the NaOAc concentration in U. S. P. basal medium for vitamin B<sub>12</sub> assay and addition of tomato juice also acts similarly.
8. Phosphate-citrate buffer containing NaHSO<sub>3</sub> had no undesirable influence upon vitamin B<sub>12</sub> assay.
9. Dose responses of *L. arabinosus* and *Stre. faecalis* to nicotinic acid, biotin pantothenic acid and folic acid were confirmed.
10. Multiple-vitamins or other vitamin preparations were assayed for their nicotinic acid, pantothenic acid, pyridoxine and vitamin B<sub>12</sub> contents.

Received April 22, 1955

ビタミンCの存在に於けるビタミンB<sub>1</sub>の比色定量法

小川 俊太郎, 南原 精一

On the Colorimetric Assay of Vitamin B<sub>1</sub> in Presence of Ascorbic Acid.

By Shuntaro OGAWA and Sei-ichi NAMBARU

1)

まえがき Prebluda, Mc. Collumの創案にかかるジアゾ呈色法は、其後数多くの研究者により各自の立場から定量法の検討並びに改良が積まれ、現在比色定量法としては最も鋭敏かつ特異的なものである。本法は操作が比較的簡易かつ迅速であるので、食品各種医薬品製剤其他のB<sub>1</sub>の定量に汎く用いられ、実用価値が甚だ高い。しかしながら、本法の適用範囲にも自ら限度があり、ビタミンCの共存する場合著しく障害される。近時ビタミン製剤は長足の進歩を遂げ各種混合ビタミン剤が出現するに及び、この種製剤の定量にあたつてもかかる妨害の事実に遭遇した。

Emmet<sup>2)</sup>によればB<sub>1</sub> 30 μgに対し、C 2 mg共存の場合に於てはジアゾ呈色は全く阻止され、Kirch<sup>3)</sup>はC 2~5 mgの共存でジアゾ呈色は部分的に或は完全に阻止されると報じ、Auerbach<sup>4)</sup>、Tastaldi<sup>5)</sup>等も又Cによる妨害の事実を報告している。

したがつて、Cの妨害を排除する種々なる方式が提出されている。過マンガン酸カリウムで酸化除去する方式<sup>3)</sup>、ヨウ素又は赤血塩を使用するか<sup>2)6)</sup>、スーパーフィルターロールで除去する方式<sup>2)</sup>、臭素水で酸化除去する方式<sup>4)</sup>、フランコナイトで除去する方式<sup>5)</sup>等がある。これらの内、共存するCを過マンガン酸カリウムで酸化除去する方式の追試の結果では、ジアゾ呈色は酸化試薬の少過剰によつて全く阻止されるに反し、操作中加える重亜硫酸ソーダの如き還元剤の少過剰は何等悪影響を及ぼさないという事が報告され<sup>7)</sup>、又白土を使用する分離定量は、白土が其種類によりB<sub>1</sub>に対する吸着能や色素の誘出能を異にし、比色法に常用されているようなB<sub>1</sub>の稀薄状態に於ては吸着B<sub>1</sub>を分解する事実があるといわれ<sup>8)</sup>、白土吸着による分離定量は信用出来ないという報告がある<sup>7)</sup>。別の方式の例として、Kirch<sup>3)</sup>は各種医薬品剤のB<sub>1</sub>を前述の如く共存するCを酸化除去し、しかる後吸着を伴わない直接呈色法によつて定量し得た事を報告した。Auerbach<sup>4)</sup>も同様に酸化処理を行つて直接呈色法によつて医薬品製剤のB<sub>1</sub>を定量している。小川<sup>7)</sup>はさきに2倍試薬を使えばB<sub>1</sub> 20 μgに対して0~2 mgのCの共存は酸化処理をせずとも全く無影響であると報告したが、その後の実験ではこのようなB<sub>1</sub> 20 μgに対し100倍のCの共存下では呈色の不良が顕著にみられた。直接呈色法は簡便であるので今回は吸着を伴わない直接呈色法による定量法検討の経過とそこに得られた定量法の条件とを報告したいと思う。

## 基礎実験

1. Cの共存がB<sub>1</sub>のジアゾ呈色法に及ぼす影響 既に述べたようにCの共存ジアゾ呈色を著明に妨害する。そこで共存するCのB<sub>1</sub>に対する種々なる混合比の検液を作製してこの妨害の程度を検索した。pH 4.5の酢酸緩衝液で調製した検液4 ccに対しジアゾ試薬(2倍)を加えて呈色させる定量方式によつて行つた。Table 1はその成績で何れも10回の分析によるものである。

Table 1

B <sub>1</sub> 10μg			B <sub>1</sub> 20μg			B <sub>1</sub> 40μg		
共存するC(mg)	B <sub>1</sub> に対するCの倍率	C不含の時を100とした比率	共存するC(mg)	B <sub>1</sub> に対するCの倍率	C不含の時を100とした比率	共存するC(mg)	B <sub>1</sub> に対するCの倍率	C不含の時を100とした比率
0.5	50	100	0.4	20	100	0.4	10	100
1.0	100	100	0.5	25	93	0.8	20	100
1.2	120	100	0.8	40	93	1.6	40	88
1.4	140	100	1.0	50	91	2.4	60	-
1.6	160	100	1.2	60	87			

B <sub>1</sub> 10 $\mu$ g			B <sub>1</sub> 20 $\mu$ g			B <sub>1</sub> 40 $\mu$ g		
共存するC(mg)	B <sub>1</sub> に対するCの倍率	C不含の時を100とした比率	共存するC(mg)	B <sub>1</sub> に対するCの倍率	C不含の時を100とした比率	共存するC(mg)	B <sub>1</sub> に対するCの倍率	C不含の時を100とした比率
1.8	180	85	1.6	80	86			
2.0	200	80	0.2	100	73			
			2.2	110	69			
			2.4	120	69			
			2.8	140	25			

かつて小川が報告した成績に反して100倍のCの共存下に於てジアゾ呈色はB<sub>1</sub> 20 $\mu$ gの場合は73%程度に低下し、B<sub>1</sub> 40 $\mu$ gの場合は全く発現しないことが判つた。

ここにみられるようにCの妨害はB<sub>1</sub>に対するCの倍率によるものではなく共存するCの絶対量に強く影響せられることがわかる。このようにジアゾ試薬と反応する物質が共存する場合この共存物質により試薬が消費されるためB<sub>1</sub>の呈色が間接に妨害されるものであろう。

**I. Cの妨害を排除する試み 1. 試薬増加のみによる方法:** EmmetはB<sub>1</sub>に対して妨害を及ぼさぬCの最大倍率をCの酸化した後でも約70倍としている。

本報ではB<sub>1</sub>10 $\mu$ g, 20 $\mu$ gに対しC2mgをとつて2~5倍の試薬をもつてジアゾ呈色を行つた。Table 2はその成績で10回の分析によるものである。こゝでいう3, 4, 5倍試薬とは、パラミノアセトフェノン溶液のみを0.3, 0.4, 0.5ccに増量し、亜硝酸ナトリウム溶液0.2cc, 水10cc及びアルカリ溶液6ccの混合割合の呈色試薬のことである。

B<sub>1</sub>10 $\mu$ g, 20 $\mu$ gに対しC2mgの共存下では5倍試薬を使用して初めて呈色E値がB<sub>1</sub>のみの呈色にもどる。しかし、この場合には試薬の過剰による誤差が生じる。実際の定量にあつては必然的にC以外の随伴物質の妨害が介入するわけであるから試薬増加のみによる妨害排除の試みは余り望ましくないといえる。

**2. 酸化除去する方法:** 200ccのメスフラスコ内にPH 4.5の酢酸緩衝液少量をとりこれにB<sub>1</sub> 500 $\mu$ g C100mgを加えN/10ヨウ素液でCを酸化し然る後PH 4.5の酢酸緩衝液で200ccにする。この検液4cc中にはB<sub>1</sub> 10 $\mu$ g C2mgを含有する。このようにして4cc中B<sub>1</sub>

20 $\mu$ g C2mg及びB<sub>1</sub> 40 $\mu$ g C4mgを含有する検液を作製し方式に従いこれにジアゾ呈色を行つた。Table 3はその成績で10回の分析によるものである。

B<sub>1</sub>及びC共存の純粋液について酸化処理後ジアゾ呈色を行つた場合2倍試薬ではなお呈色が不良で3倍試薬で初めてB<sub>1</sub>は完全に検出される。4倍試薬では試薬の過剰に由来する黄色物がキシロールに移行するため値が過大となり、5倍試薬では更に顕著に現れる。なお、酸化処理に際してヨウ素の過剰はB<sub>1</sub>をもこわすから酸に注意せねばならない。

なお、酸化処理後3倍試薬による種々なB<sub>1</sub>量の示す呈色E値はTable 4に示すごとくで、100倍のCの共存下でもB<sub>1</sub>10 $\mu$ g~40 $\mu$ gに於て呈色E値との関係は直線をなす。

検液	試薬	E %
B <sub>1</sub> 10 $\mu$ g C1mg	2	100
	3	92
B <sub>1</sub> 10 $\mu$ g C2mg	4	97
	5	108
B <sub>1</sub> 10 $\mu$ g	2	100
	3	73
B <sub>1</sub> 20 $\mu$ g C2mg	3	90
	4	93
B <sub>1</sub> 20 $\mu$ g	5	106
	2	100

検液	試薬	E %
B <sub>1</sub> 10 $\mu$ g C2mg	2	85
	3	100
	4	105
B <sub>1</sub> 10 $\mu$ g	2	100
	3	80
B <sub>1</sub> 20 $\mu$ g C2mg	3	100
	4	104
B <sub>1</sub> 20 $\mu$ g	2	100
	2	86
B <sub>1</sub> 40 $\mu$ g C4mg	3	100
	4	102
B <sub>1</sub> 40 $\mu$ g	5	104
	2	100

Table 4

検液	B <sub>1</sub> 10 $\mu$ g C1mg	B <sub>1</sub> 10 $\mu$ g	B <sub>1</sub> 20 $\mu$ g C2mg	B <sub>1</sub> 20 $\mu$ g	B <sub>1</sub> 40 $\mu$ g C4mg	B <sub>1</sub> 40 $\mu$ g
E	0.105~0.110		0.210~0.220		0.435~0.440	

Ⅲ. 各種ビタミン混合液についての試験 Ⅱ. 2.の実験によつて得られた定量条件による各種水溶性ビタミン混在の下での特異性の有無を調べた。すなわち100cc中にB<sub>1</sub>:B<sub>2</sub>:B<sub>6</sub>:NAA:Pan-Ca\*:C=0.5:1:0.5:5:0.5:50(mg)ずつを含む検液を試製した。この混合成分比は現在市販混合ビタミン剤の最高混合比である。この検液4ccをとりジアゾ呈色を行つたが呈色E値はB<sub>1</sub>のみで行つた場合と全く一致している。したがつてこれらのビタミンによる妨害は全く惹起されないと考える。

応用実験

基礎実験で得た成績とその結果確立した定量条件による操作法をB<sub>1</sub>を含有する市販混合ビタミン剤に応用した。ただし混合ビタミン剤には某2社の製造にかかるB<sub>1</sub>のみ不含の試製品を使用した。

Ⅰ. 呈色比例性の試験 A社製品の930mgを秤量し、N/10 HClにて抽出し27.5%の酢酸ナトリウム溶液にてpHを4.5に調整し、pH4.5の塩酸水にて50ccとし、濾液を作る。この検液10ccをとり、これにB<sub>1</sub>800μgを加え、N/10ヨウ素液にて酸化処理を行い、pH4.5の塩酸水にて20ccとする。この検液1cc中にはB<sub>1</sub>40μgを含有する。上記濾液を2倍稀釈及び4倍稀釈した検液10ccにつき、同様に操作して1cc中夫々B<sub>1</sub>20μg及び10μgを含有する検液を作る。

又B社製品の1.45gを秤量し、A社製品の場合の如くして50ccとし、濾液を作る。この検液10ccをとり、これにB<sub>1</sub>2mgを加え酸化処理を行い、50ccとする。この検液1cc中にはB<sub>1</sub>40μgを含有する。濾液の2倍及び4倍稀釈した検液10ccにつき同様に操作して1cc中夫々B<sub>1</sub>20μg及び10μgを含有する検液を作る。操作中の添加B<sub>1</sub>量は両社製品の製剤当量によつた。これらの検液についてジアゾ呈色を行つた成績をTable 5の(1)及び(2)に示す。各検体とも3回以上分析を行つた。

表示の如く、B<sub>1</sub>10~20μgに於ては、呈色E値はよく直線を示すが、ジアゾ呈色に於けるB<sub>1</sub>量をあげるとそれにつれて随伴物質の妨害もひどくなり、B<sub>1</sub>40μgに於ては呈色E値は低下し、かつ変動も多い。それゆゑに混合剤の比色定量に於て、呈色に於けるB<sub>1</sub>量を余りあげることが望ましくない。

Ⅱ. 回収率の試験 一般に随伴物質の共存下で直接呈色法による定量にあつては、試薬の不足を来す公算が大い。市販の混合ビタミン剤は組成含量形態等多種多様でこれらの製剤の定量にあつても試薬の下足を来す可能性を孕んでいる。

そこでB<sub>1</sub>20μg相当量の試料AとB<sub>1</sub>10μg, 20μg, 40μgを混合した場合に於ける呈色E値との関係及び変動を調べるために11回の分析を行つた。成績はTable 6に示す。

ここに得られた成績によると個々の試験では、B<sub>1</sub>10μg~40μgでよく直線を示すが、40μgB<sub>1</sub>を定量するとき限り呈色が不安定な感みがあつた。いかえればB<sub>1</sub>20μgを含むA試料中のB<sub>1</sub>の呈色は100%顕れても、これに更に加えた20μgのB<sub>1</sub>の呈色が必ずしも100%回収されぬこともあるのである。こういう現象の有無は、試料によつて異なり、画一的には論じ難いが、実際にはおのおのの試料につ

Table 5の(1)

B <sub>1</sub> (μg)	E	値
10	0.095	0.10
20	0.195	0.195
40	0.370	0.380

Table 5の(2)

B <sub>1</sub> (μg)	E	値
10	0.095	0.095
20	0.195	0.195
40	0.370	0.360

Table 6

B <sub>1</sub> (μg)	10		20		40	
E	0.10	0.10	0.20	0.20	0.420	0.420
	0.10	0.10	0.20	0.20	0.420	0.420
	0.10	0.10	0.20	0.20	0.420	0.430
	0.10	0.095	0.210	0.20	0.430	0.420
値	0.105	0.105	0.205	0.210	0.420	0.410
			0.210		0.410	
$\bar{X}$	0.1004		0.2031		0.42	
R	9.4		4.8		4.5	
$\sigma$	0.0085		0.0121		0.02	
P=0.95	0.0057		0.0081		0.013	
Error%	±8.4		±5.9		±4.7	

いて確認することが必要であろう。

Ⅱ. 4倍試薬に関する試験 Lyman<sup>9)</sup>等は米の中のB<sub>1</sub>を4倍のジアゾ試薬を使用する直接呈色法によつて定量し満足な成績を得たことを報告

している。

本報に於ても4倍試薬を使用して、前述と同様な条件に於て、試料Aについて11回の分析を行った。成績は Table 7に示す

表示の如く B<sub>1</sub>10 $\mu$ g~40 $\mu$ gに於てよく直線を示し、呈色は極めて安定で、同時に、呈色E値は、標準液について2倍試薬を用いたものと全く一致している。したがつて試料中のB<sub>1</sub>は完全に呈色していると思われる。

上述のように、実際の混合ビタミン剤の定量に、3倍及び4倍試薬の何れも満足に適用出来るが、3倍試薬によるよりも、4倍試薬の方が、呈色が安定で回収率も100%顕れるので、4倍試薬を使用する方がよいであろう。

終りに試料を提供された第一製薬株式会社及び三共株式会社に謝意を表す。

### 総 括

混合ビタミン剤中のB<sub>1</sub>は100倍量のCの共存下でも、酸化処理及び試薬の増加によつて、直接呈色法により定量できる。従つて、酸化を行わずに、2倍試薬により定量できるという小川の前報は訂正する。

### 文 献

- 1) Prebluda, Mc. Collum., J. Biol. Chem., 127, 495 (1939)
- 2) Emmet, A. D., Peacock, G., and Brown, R. A., J. Biol. Chem., 135, 131 (1940)
- 3) Kirch, E. R., and Bergeim, O., J. Biol. Chem., 143, 575 (1942); J. Am. Pharm. Assoc., 33, 56 (1944)
- 4) Auerbach, M. E., J. Am. Pharm. Assoc., 29, 313 (1940)
- 5) Tastaldi, H., O. Hospital., 23, 537, 545 (1943)
- 6) 渡辺, 武田年報, 6, 32 (昭16)
- 7) 小川, ビタミン., 3, 265 (1951)
- 8) 小川, 日衛化誌., 15, 163 (1943)
- 9) Lyman, C. M., Ory, R., Trant, M. and Rich, G., Anal. Chem., 24, 1021 (1952).

### Summary

Without any adsorption technique, colorimetric assay of vitamin B<sub>1</sub> in multiple vitamin preparations which is accompanied by a hundred fold amount of ascorbic acid can be done successfully using increased amount of diazotized reagent with previous oxidation of ascorbic acid by iodine.

Received April 18, 1955

Table 7

B <sub>1</sub> ( $\mu$ g)	10		20		40	
E	0.120	0.115	0.215	0.215	0.440	0.435
	0.115	0.115	0.220	0.220	0.435	0.440
	0.115	0.115	0.220	0.220	0.435	0.440
	0.115	0.115	0.215	0.220	0.440	0.440
値	0.115	0.115	0.220	0.220	0.440	0.435
	0.120		0.215		0.440	
$\bar{X}$	0.116		0.218		0.438	
R	4.3		2.4		1.1	
$\sigma$	0.0064		0.008		0.008	
P=0.95	0.004		0.005		0.005	
Error%	±5.5		±3.6		±1.8	

## 融点標準品について

長沢 佳熊, 鹿島 哲, 西崎 笹夫

## Reference Standards for Determining Melting Points

By Kakuma NAGASAWA, Tetsu KASHIMA and Sasao NISHIZAKI

まえがき 薬局方でいう標準品とは実用上得られるなるべく純粋な物質で, それによつて天然物から得られた, または市販されている同じ物質, あるいはそれによつて規定される事柄の標準となる物質のことである。従つてそれが一度定められると, たとえそれが少し不純であつても他のものは総べてそれと比較して論じられることになるから, その決定は慎重を要するのである。従つてそれはまた世の中の技術や材料の進歩向上につれて標準品の品質をいやが上にも改善する必要もあるわけである。

融点標準品は物質の融点を定める上の規準となる物質である。通常融点は水銀温度計を用いて測定されているが, その形式や大き並びに材質は非常にまちまちであるので, 度量衡の検定に合格しているとはいえ1目盛りの誤差は許されているから, それをもつて測定した値は用いる温度計がちがえばすぐ2度ぐらゐは違ふし, 200度を越える高温では数度にもなりかねない。それは水銀の露出部の補正を行つてもあまり正確を期しにくいので<sup>43)</sup>, それらの条件の違いによつて起る誤差を相対的に少なくするために, U. S. P. XIV<sup>42)</sup> や B. P. 1948<sup>8)</sup> 及び第六改正日本薬局方で浸点付き局方温度計を規定しているわけである。そういった種々の温度計も経年変化などもあり, どのくらい狂つているかを時には校正する必要がある。その時にもこの融点標準品は役立つのである。

融点は固相と液相との蒸気圧曲線の交点, または1気圧の大気中で固相と液相とが平衡にある温度と定義されているが, 実用上大気圧の変化の影響は考慮する必要がないので一般的には少量の物質をとり温度を次第に上げて行つて完全に透明な液体になつたときの温度を融点といつている<sup>28)</sup>, そのとき測定方法を適切に選んで, その測定した温度を融点の定義の温度と一致させるようにすることが望ましいのである。しかし実際には真の融点とは少し違つていても再現性のよい見分け易い点を融点としているが, それはそれによつて物質の確認, 温度の比較をするのに実用上十分であるからである。たとえば薬局方の第1類薬品(たやすく粉末にしうるもの)の局方融点試験においては, 毛細管に約3mmの高さに検体をつめて硫酸浴中で熱して融点を観察しているのであるが, 多くは物質が完全に液化した時の温度を融点としている。ところが B. P. 1948<sup>7)</sup> では物質が崩壊液化して毛細管内でメニスカスを形成したときの温度を融点としている。それに対して U. S. P. XIV<sup>40)</sup> では溶け初めと溶け終りの温度つまり融点範囲を観察しているのである。

物質が純粋で温度を上げて分解しないならば, 融解し始めてから透明な液体になるまでの温度の上昇は一般に $2^{\circ}\sim 3^{\circ}$ 以内であるのが通例である。従つて混融試験<sup>20)21)24)</sup>を併用して物質の識別確認を一段と正確にすることができるのである。なお融ける前に分解が起るときは一定値が得にくいが一応分解点として参考に供する。それに対して融解が起つてからすぐ引續いて分解が起るときは, それを融点と同じような恒数と見なし得るので, このような場合には分解が伴ふことを融点を記載するときに併記するのが通例である。また石鹼などの如く液晶をつくるものは, 溶けるとまず濁つた複屈折をする異方性の液体(液晶)となり, それがある温度以上になつて初めて透明な液体となるから注意を要する。また検体が加熱中に着色するのは多くは分解によるものであり, 泡が出るのは分解が起つたか, あるいは結晶溶媒があつた証拠である。その他加熱の途中で昇華が始まる場合もある<sup>23)</sup>。また融けてからも引續いて温度を上げると再び固まり, 更に温度を上げるとまた融けて二重融点を示したり分解したりする物質があるが, それはたとえば結晶水の数のちがう多形の結晶を有するものとか<sup>4)5)15)27)</sup>, 異性化とか転位その他の化学変化が起る場合である。結局実際問題としては大体同じ方法と装置で幾度繰返しても異状な変化を起さずに一定の範囲で融ければ, それをその物質の融点として取扱ふことになるわけである。

融点標準品は U. S. P. XIV<sup>41)</sup> に規定され, 製品が市販されているが, ここに国立衛生試験所の融点標準品を制定配布するにあつて調査検討したところを報告する。

実験材料 融点測定にあつて検体は硫酸デシケートで24時間以上乾燥した。

ワニリン: 標準品用として特に製造したもの。

アセトアニリド：標準品用として製造したものの融点範囲がやや低く  $112^{\circ}\sim 115^{\circ}$  であつたので、U. S. P. の標準品と混融試験をしたところ  $111^{\circ}\sim 115^{\circ}$  であつた。そこでアルコールに融かしその大部分のアルコールを蒸散させ水を加えて再結晶したが、融点は約  $0.5^{\circ}$  しか上昇しなかつた。よつて約  $150^{\circ}$ 、 $10\text{mmHg}$  程度で減圧蒸留したところ、およそ正規の融点を示し混融試験をしても温度の低下は認められなくなつた。

アセトフェネチジン：標準品用として特に製造したもの。

スルファニルアミド：標準品用として特に製造したもの。

スルファピリジン：標準品用として特に製造したもの。

カフェイン：標準品用として天然物から製造したもの2種の内、融点が  $0.5^{\circ}$  ほど高い方を用いた。

実験装置 測定装置、第1図の如く1リットルの硬質ビーカーに流動パラフィンを入れ、それにモーターで駆動される攪拌棒を挿入し、ビーカーの中央に第六改正日本薬局方の規定にのつとつた融点測定装置を入れた。

測定用温度計、第六改正日本薬局方の浸点付き温度計3本組を用いた。それを度量衡検査所で所定の検査方式に従つて試験したところ、経年変化によるためかいずれもやや高い値を示した。すなわち1号型式温度計は  $80^{\circ}$  で  $+0.3^{\circ}$ 、2号型式温度計は  $120^{\circ}$  で  $+0.3^{\circ}$ 、 $140^{\circ}$  で  $+0.9^{\circ}$ 、 $150^{\circ}$  で  $+1.0^{\circ}$ 、 $170^{\circ}$  で  $+0.9^{\circ}$ 、 $190^{\circ}$  で  $+0.1^{\circ}$ 、3号型温度計は  $230^{\circ}$  で  $+0.3^{\circ}$  それぞれ高い値を示したので、それに従つて補正を行つた。

標準温度計、Dr. Siebert & Kühn (Oberkaufungen-Kassel) 製の Kahlbaum Thermometer,  $0.1^{\circ}$  目盛り、測定範囲  $-10^{\circ}\sim +360^{\circ}$  (7本組)、おのおのの温度計は皆  $0^{\circ}$  と  $100^{\circ}$  の目盛りを有している。またそれには1本ごとに Eichdirektion Berlin の検定書がついていて  $10^{\circ}$  ごとの較正值が出ている。その精度は  $100^{\circ}$  以下は  $0.02^{\circ}$ 、 $200^{\circ}$  までは  $0.1^{\circ}$ 、 $300^{\circ}$  までは  $0.2^{\circ}$  それ以上は  $0.5^{\circ}$  で、検定日は 1953.1.6 であつた。

実験方法 硬質ガラスの試験管を良く洗い乾燥してからブンゼン燈で回転しながら焼き赤熱して柔くなつたら炎から出して引伸し、内径約  $1\text{mm}$  の適当な厚さの毛細管をつくる。均一な太さのところ  $20\text{cm}$  ほどをアンプルカッターで切り取りその中央で2つに焼き切る。この毛細管は開いた口を下にして広口瓶に入れて乾燥器の中に保存する。微細な粉末にした試料に毛細管の口を押しつけてとり、その底を素焼板などに軽くたたきつけて落着かせ、それをくり返して約  $3\text{mm}$  の高さに固くつめる。その毛細管を細いスズ引き銅線で温度計に2箇所結びつけ、水銀球の中央に検体が行くようにする。第1図のビーカーの流動パラフィンをモーターで攪拌しながらブンゼン燈で加熱し、1分間に  $3^{\circ}$  程度で上昇するように調節し、検体の融点から  $30^{\circ}$  低い温度まで上昇したとき毛細管をつけた温度計を装置の中央に立てその攪拌棒を上下して融点より  $3^{\circ}$  ほど下まで温度を上げ、ついで上昇速度をゆるめ1分に  $1^{\circ}$  程度上昇するように炎を調節する。それから検体の融点範囲の諸点を必要ならば2~3倍のルーペを用いて注意深く観察し、傍らの他の1人がその温度を記録する。

測定する点は次の5点である。(第2図) 湿潤点, B. M. (Beginning of Melting) とは試料の毛細管に接する面に細かい液滴が一様に生ずるときの温度。

収縮点, S. P. (Sintering Point or Coalescence) とは試料の収縮が起り明らかに試料と毛細管との間にすき間を生じたときの温度。

崩壊点, C. P. (Collapse Point) とは収縮した試料が下方

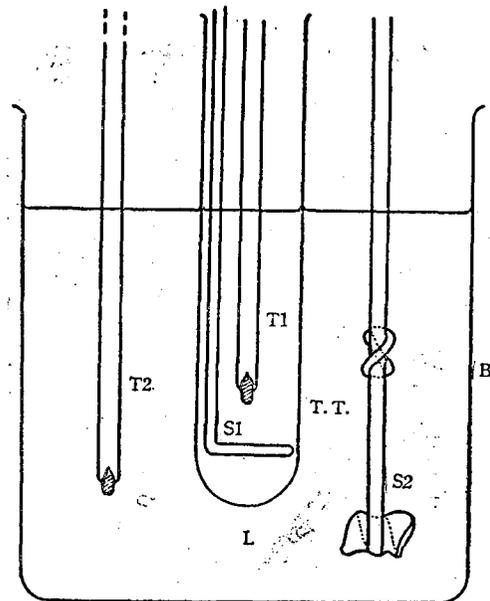


Fig. 1. Apparatus for Measuring Melting Points.

- B : 1 L Beaker  
 S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> : Stirrer  
 T. T. : Large Test Tube  
 T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> : Thermometer  
 L : Liquid Paraffin

に崩壊し液化が始まるときの温度で、U. S. P. XIV<sup>(40)</sup> ではこの点を溶け初めの点としている。

液化点, M.P. (Meniscuss Point) とは崩壊した試料が幾分個体のまま液中に残っているが, 液面の上部が完全なメニスカスを形成したときの温度で, B.P. 1948<sup>7)</sup> ではこの点をもつて融点としている。

融解終点, E.M. (End of Melting) とは液中に残存する固形の試料が完全に液化したときの温度で, U.S.P. XIV<sup>40)</sup> ではこの点をもつて融解の終点としている。通例融点といわれている点である。

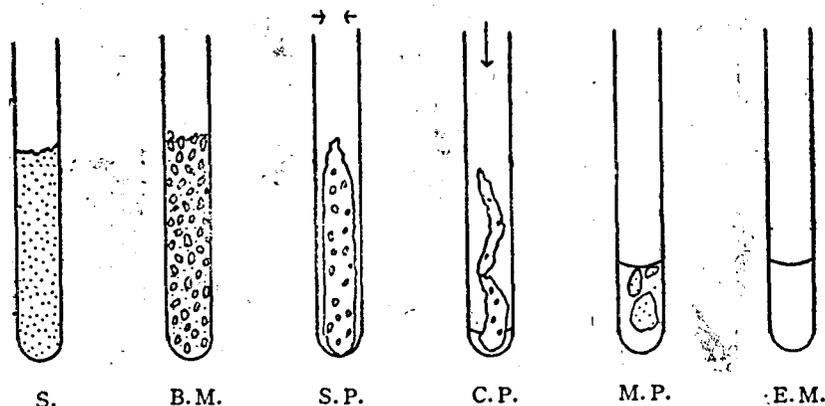


Fig. 2. Features of the Substance which is melting.

S. (Sample) : The sample in the capillary.

B.M. (Beginning of Melting) : Very small droplets appear all over the surface of the sample.

S.P. (Sintering Point or Coalescence) : The sample shows evidences of shrinking in volume and its appearance is altered.

C.P. (Collapse Point) : The sample collapses definitely against the side of capillary at any point. This point is identical with the "Beginning of Melting" of U.S.P. XIV Method.

M.P. (Meniscus Point) : The liquid phase of the sample forms a distinct meniscus at any level within the sample. This point is identical with the "Meniscus Point" of B.P. 1948 Method.

E.M. (End of Melting) : The last point where the evidences of solid disappear and the sample is completely liquid. This point is identical with U.S.P. XIV "End of Melting". It is so called "Melting Point".

実験結果 前記の方法に従つて国立衛生試験所 (J) 並びに U.S.P. (A) の融点標準品各 6 種及びそれらの混合物 (M) を各 3 回ずつ測定した結果を第 I ~ VI 表に示す。その平均値を第 3 図に示した。

Table I. Comparison of Melting Range Determination Using Vanillin (81°~83° U.S.P.)

	B. M.	S. P.	C. P.	M. P.	E. M.
J 1	80.6	80.7	81.7	82.2	82.7
2	80.1	80.7	82.0	82.3	82.7
3	80.2	81.2	82.0	82.2	82.5
Average	80.3	80.9	81.9	82.2	82.6
A 1	80.6	80.8	81.7	82.1	82.6
2	80.2	80.7	82.0	82.3	82.7
3	80.4	81.0	81.9	82.2	82.7
Average	80.4	80.8	81.9	82.2	82.7

	B. M.	S. P.	C. P.	M. P.	E. M.
M 1	80.5	80.7	81.7	82.1	82.6
2	79.9	80.6	82.1	82.4	82.8
3	80.5	81.1	82.0	82.2	82.8
Average	80.3	80.8	81.9	82.2	82.7

Table II. Comparison of Melting Range Determination Using Acetanilide (114°~116°, U. S. P.)

	B. M.	S. P.	C. P.	M. P.	E. M.
J 1	113.2	114.9	115.7	116.2	117.1
2	112.7	114.1	115.1	115.8	117.2
3	112.5	113.5	114.5	115.0	115.5
Average	112.8	114.2	115.1	115.7	116.6
A 1	113.2	115.2	116.0	116.4	117.1
2	112.7	114.1	115.0	115.7	117.0
3	112.6	113.7	114.5	114.9	115.3
Average	112.8	114.3	115.2	115.7	116.5
M 1	113.2	114.9	115.7	116.0	116.9
2	112.7	114.1	115.1	115.8	117.1
3	112.4	113.5	114.0	114.9	115.4
Average	112.8	114.2	114.9	115.6	116.5

Table III. Comparison of Melting Range Determination Using Acetophenetidine (134°~136°, U. S. P.)

	B. M.	S. P.	C. P.	M. P.	E. M.
J 1	133.5	134.2	134.9	135.3	135.9
2	133.2	134.1	134.7	135.1	135.6
3	133.6	134.3	134.7	135.2	135.5
Average	133.4	134.2	134.8	135.2	135.7
A 1	133.5	134.4	134.9	135.3	135.9
2	133.2	134.0	134.8	135.2	135.7
3	133.6	134.3	134.9	135.2	135.5
Average	133.4	134.2	134.9	135.2	135.7
M 1	133.5	134.2	135.0	135.3	135.8
2	133.3	134.1	134.8	135.1	135.6
3	133.7	134.4	134.9	135.2	135.4
Average	133.5	134.2	134.9	135.2	135.6

Table IV. Comparison of Melting Range Determination Using Sulfanilamide (164.5°~166.5°, U. S. P.)

	B. M.	S. P.	C. P.	M. P.	E. M.
J 1	163.6	165.3	165.9	166.0	166.1
2	163.4	165.1	165.4	165.9	166.3
3	164.8	165.4	165.7	165.9	166.1
Average	163.9	165.3	165.7	165.9	166.2
A 1	163.6	165.2	165.9	166.0	166.1
2	163.4	165.1	165.4	165.7	166.1
3	164.7	165.4	165.7	165.9	166.1
Average	163.9	165.2	165.7	165.9	166.1

	B. M.	S. P.	C. P.	M. P.	E. M.
M 1	163.6	165.4	165.9	166.0	166.1
2	163.4	165.1	165.4	165.9	166.3
3	164.8	165.5	165.7	165.9	166.1
Average	163.9	165.3	165.7	165.9	166.2

Table V. Comparison of Melting Range Determination Using Sulfapyridine (190°~193°, U. S. P.)

	B. M.	S. P.	C. P.	M. P.	E. M.
J 1	189.6	191.7	192.2	192.4	192.5
2	189.9	191.9	192.1	193.0	193.9
3	190.2	191.9	192.2	193.1	193.8
Average	189.9	191.8	192.2	192.8	193.4
A 1	189.5	191.7	192.4	192.6	192.8
2	189.9	191.9	192.1	193.1	193.8
3	190.2	192.0	192.2	193.0	193.9
Average	189.9	191.9	192.2	192.9	193.5
M 1	189.5	191.7	192.2	192.4	192.7
2	189.9	191.9	192.1	193.0	193.9
3	190.2	192.0	192.2	193.0	193.9
Average	189.9	191.9	192.2	192.8	193.5

Table VI. Comparison of Melting Range Determination Using Caffeine (235°~237.5°, U. S. P.)

	B. M.	S. P.	C. P.	M. P.	E. M.
J 1	235.3	235.5	235.9	236.9	237.6
2	234.9	235.0	235.8	236.5	237.1
3	235.0	235.4	236.1	236.9	237.5
Average	235.1	235.3	235.9	236.8	237.4
A 1	235.6	235.7	236.0	236.8	237.3
2	235.0	235.5	235.9	236.6	237.1
3	235.5	235.7	236.0	236.7	237.3
Average	235.4	235.6	236.0	236.7	237.2
M 1	235.5	235.7	236.1	237.0	238.1
2	235.0	235.3	235.9	236.5	237.0
3	235.1	235.6	236.0	236.8	237.6
Average	235.2	235.5	236.0	236.8	237.6

J : Reference Standards of National Hygienic Laboratory of Japan.

A : U. S. P. Reference Standards.

M : Mixtures of the above two samples.

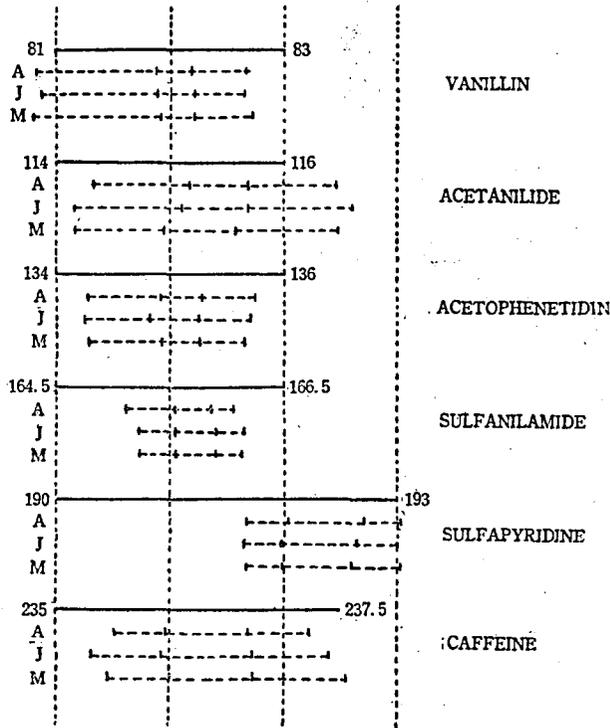


Fig. 3. Comparison of Averages of Melting Range

- A : U. S. P. Standards of Melting Point.
- J : Standards of National Hygienic Laboratory of Japan.
- M : Mixtures of the above two samples.
- : U. S. P. XIV Official Range.
- : Melting Range and Observed Points  
(S. P., C. P., M. P. and E. M.)

考 察 融点は一般にはその物質が完全に透明な液体になる点としている<sup>28)</sup>。Reissert<sup>33)</sup>は毛細管の中心部の温度は温度計の指示より遅れるとの理由から毛細管壁に附着した物質が融ける点すなわち融解し始める点を融点としているが、この点はやや見分け難いのが欠点である。B. P. 1948<sup>7)</sup>ではその中間の示度を示す液化点 (Meniscus Point) をとつている。それは固相と液相とが平衡状態が真の融点であるという理由によるのであろう。その点は割合に識別し易いが、毛細管が完全に清潔で、物質が均一な微粉末になつて一樣につまつていることが必要である。また物質が完全に純粋でない限り加熱速度をいくら遅くしても融け始めてから融け終るまでに1°以上の温度の上昇が起るので融点範囲 (崩壊点と融解終点) を記載する方が実際の現象に忠実であり、それはまた物質の純度を推測する手掛りともなるので、現在はそれを記載する方向に進んでいるのである。

融点を測定する方法には1個の結晶でも測定できるKoflerの装置<sup>22)</sup>や近年外国では広く用いられ始めた銅のブロックを用いるもの<sup>6)</sup>などがあるが、液体の加熱浴に検体を毛細管につめて温度計に接触させて測定するのが一般に多く用いられているのでその方法をとつた。液を加熱するとき全体を均一な温度にすることが難かしいので<sup>3)</sup>、その欠点を補うように装置を工夫した。用いる液体は通常硫酸であるが、変色したり発煙したり危険でもあり吸湿し易いので、流動パラフィンを用いたが200°以上加熱すると発煙したり変色したりするので具合はあまり良くなかつた。そのため最近変化しにくいシリコン油が広範囲の温度の測定に適するため用いられ始めた<sup>12)</sup>。なお度量衡検

査所では大豆油を用いていた。

温度を測定するには理論的にいつて気体温度計が良いわけであるが実用に供し難いので、精密測定には通例白金線などを用いた電気抵抗温度計が実際に利用されている<sup>1)30)</sup>。最近その一種の変形であるサーミスターが用いられた<sup>48)</sup>。その他種々の金属を組合せた熱電対も用いられているが再現性が悪く5分の1度以上の精度を得ることは困難であつた<sup>30)</sup>。これらはいずれも熱の伝導の良い金属線を用いるから、そのための熱の損失によつて案外な誤差を生ずることがあつた。そこで結局使用し易く案外正確な水銀温度計を用いることにした。

液体温度計では温度と体積の膨脹が比較的良く正比例する水銀を用いた温度計が一番精度がよい。その水銀は熱伝導性がよく、比熱が小さいのも有利な点である。しかし温度計の水銀の見掛けの膨脹は水銀とガラスの体膨脹の差であるから、良質のガラスを用いてもその差が温度に $0.1^{\circ}$ 以内で良く比例するのは $-10^{\circ}$ から $+200^{\circ}$ までで、その範囲外では $0.2^{\circ}$ 以上の誤差を生ずるから注意を要する。また水銀の表面張力と毛細管の洗滌不十分なためなどから、温度が連続的に変化しても管の中の液頭は連続的に変化しないで飛び飛びに動くから、温度を読むときは軽く叩く必要がある<sup>26)</sup>。また固溶体であるガラスは経年変化によつて収縮するので、温度の標準点や標準温度計によつて使用温度計を校正する必要がある<sup>9)</sup>。信頼できる標準温度計を入手できたが、そのまま使用するには水銀が多すぎて遅れを生じ易いので、それを用いて使用温度計を校正したかつたが標準温度計を全浸(水銀柱を全部液の中に入れること)させることのできる均一な温度を得る加熱浴を入手することができなかつたので、測定用の温度計は度量衡検査所をわずらわして浸点状態での校正をして貰つたのである。

測定にあつて試料の乾燥が完全でないといふ一般に低い値が求まり<sup>38)</sup>、またできるだけ細かい一様な大きさの粒子が均一に固く毛細管につまつていないと円滑に融解することができ難い。その毛細管も良質で清潔で乾燥していなければならない。もし遊離アルカリの痕跡でもあるとケト化合物などはエノル化が促進されてしまう。測定条件によつても求められる値が違ふ。たとえば温度を急速に上げると高くなり、ゆつくり上げると一般に低く求まる<sup>3)</sup>。従つて薬局方に従つたが、それより融点に近い温度で試料を浴中に挿入し、もう少し早く加熱した方がよいといふ例もあつたが<sup>12)</sup>、それについては検討しなかつた。なお現在は装置の自動化、マイクロ化などの進歩が非常に盛んである<sup>29)47)</sup>。

ワニリンの融点は今までの文献<sup>10)18)19)22)31)34)45)</sup>によると $80^{\circ}\sim 82.5^{\circ}$ が多いが、用いた標準品の融点範囲は $80.5^{\circ}\sim 83^{\circ}$ であつた。しかしそれはU. S. P. の融点標準品の $81^{\circ}\sim 83^{\circ}$ よりは全体としてやや低く目であつたと表現する方が正確である。

アセトアニリドは $113^{\circ}\sim 115^{\circ}$ といふ報告が多く<sup>16)19)22)25)32)33)34)</sup>、この実験のように $114^{\circ}\sim 116.5^{\circ}$ の如く高いものはなかつた。これは減圧蒸留したことによるためかも知れない。しかし融点範囲が広いから、温度計の示度が $0.5^{\circ}$ ほど狂つているためとも考えられないことはない。そうすればこのアセトアニリドはU. S. P. の融点範囲に大体入ることになる。

アセトフェネチジンは $134^{\circ}\sim 135^{\circ}$ といふ報告<sup>19)34)</sup>があるが、この実験ではU. S. P. の融点範囲と同じく $134^{\circ}\sim 136^{\circ}$ であつた。

スルファニルアミドのU. S. P. の融点範囲は $164.5^{\circ}\sim 166.5^{\circ}$ であるが、この実験から他のデータ<sup>12)14)22)34)</sup>を参照しても $165^{\circ}\sim 166.5^{\circ}$ とした方がよい様に思う。

スルファピリジンのU. S. P. の融点範囲は広く $190^{\circ}\sim 193^{\circ}$ であるが、多くの文献<sup>12)22)34)46)</sup>ではその範囲は $1^{\circ}\sim 2^{\circ}$ であり、この実験からも $191.5^{\circ}\sim 193^{\circ}$ を融点範囲とした方が適切であろう。

カフェインには無水のものとして1分子の結晶水を持つてゐるものがあるが、結晶水を持つてゐるものはそれが $50^{\circ}\sim 55^{\circ}$ で飛び始める。しかし $150^{\circ}$ に加熱しても完全に脱水することができないが<sup>38)</sup>、濃硫酸で乾燥すれば脱れる<sup>23)</sup>、またそれは空気中から水分をとり1分子の結晶水を持つようになる。従つて検体は測定前に硫酸デシケーターで完全に乾燥するのである。 $120^{\circ}$ で長く熱していると昇華する<sup>23)</sup>から、規定通り $200^{\circ}$ を過ぎてから検体を浴中に挿入しなければならない。むしろそれより融点に近くまで温度を上げてから毛細管を挿入した方が望ましいようである。文献によれば $234^{\circ}\sim 236.5^{\circ}$ の融点範囲を示すものが多いが<sup>11)13)17)19)22)34)</sup>、この場合はU. S. P. と同じく $235^{\circ}\sim 237.5^{\circ}$ であつた。

これら6つの融点で大体 $60^{\circ}\sim 250^{\circ}$ の範囲の融点を測定するのに役立つことができるから、大多数の物質の融点<sup>19)44)</sup>を測定するに十分間に合う融点の標準品の役をするものと思われる。なお $0^{\circ}$ は簡単な装置で正確に校正

することができるから<sup>36)</sup>、温度計のその点は必ず較正することが望ましい。

なお100g ぐらい標準品をとり、その固相と液相との平衡状態の温度(融点)を白金抵抗温度計を用いて精密に測定して、その融点を検討する予定である。

### 結 論

融点標準品を造り、その融点範囲の諸点(混濁点、収縮点、崩壊点、液化点及び融解終点)を毛細管法を用いて測定し種々検討した。その6種の融点標準品は次の如き融点範囲を有していたが、それはU.S.P.の標準品の融点範囲とやや違っているものもあつた。

ワニリン	80.5° ~ 83°
アセトアニリド	114° ~ 116.5°
アセトフェネチジン	134° ~ 136°
スルファニルアミド	165° ~ 166.5°
スルファピリジン	191.5° ~ 193°
カフェイン	235° ~ 237.5°

融点としては融解中の特定の状態の温度を示すよりも、その融点範囲を示した方が実際に適した忠実な表現であると思われる。

御援助を受けた度量衡検査所、高砂香料株式会社、田辺製薬株式会社、第一製薬株式会社並びに静岡カフェイン工業所に対して感謝の意を表する。

### 文 献

- 1) American Institute of Physics : "Temperature, Its Measurement and Control in Science and Industry" (1941), Reinhold Publishing Corporation, New York.
- 2) Anschuetz, R. & Schultz, S. : Ber., 10, 1800 (1877).
- 3) Baeyer, A. & Villiger, V. : Ber., 37, 2848 (1904).
- 4) Bamberger, E. & Suzuki, U. : Ber., 45, 2740 (1912).
- 5) Behrend, R. : Ber., 32, 544 (1899).
- 6) Berl, E. & Kullmann, A. : Ber., 60, 811 (1927).
- 7) B. P. 1948, p. 705, Appendix IV.
- 8) ibid. p. 713.
- 9) Bunce, S. C. : Anal. Chem., 25, 825 (1953).
- 10) Carles : Bull. soc. chim., (2) 17, 13 (1877).
- 11) Dunstan, A. E. & Shephard, F. G. : J. Chem. Soc., 63, 197 (1893).
- 12) Felker, W. S. : Drug Standards, 20, 169 (1952).
- 13) Fischer, E. & Bromberg, O. : Ber., 30, 219 (1897).
- 14) Gelmo, P. : J. prakt. Chem., (2) 77, 374 (1908).
- 15) Grove, D. C. & Keemann, G. L. : J. Am. Chem. Soc., 63, 97 (1941).
- 16) Inoue, H. : Bull. Chem. Soc. Japan, 1, 177 (1926).
- 17) Kempf, R. : J. prakt. Chem., (2) 78, 258 (1908).
- 18) ibid., 259 (1908).
- 19) Kempf, R. & Kutter, F. : "Schmelzpunktstabellen, zur organischen Molekular-Analyse" (1928), Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.
- 20) Kofler, L. & Kofler, K. : Angew. Chem., 53, 434 (1940).
- 21) Kofler, L. : Ber., 76, 1076 (1943).
- 22) Kofler, L. & Kofler, A. : "Mikro-Methoden, zur Kennzeichnung organischer Stoffe and Stoffgemische" (1945), Verlag Chemie, Berlin.

- 23) Kley : *Rec. trav. chim.*, 20, 350 (1901).
- 24) Kords, E. : *Z. anorg. allg. Chem.*, 167, 97 (1927).
- 25) Mathews, J. H. : *J. Am. Chem. Soc.*, 39, 1131 (1917).
- 26) 松野吉松: 理論化学実験法 (昭11), 第1章, 山海堂, 東京.
- 27) Mattiessen, G. : *Arch. Pharm.*, 284, 62 (1951).
- 28) Meyer, H. : "Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen" (1931), p. 63, Schmelzpunktsbestimmung, Julius Springer, Berlin.
- 29) Mueller, R. H. & Zenchelsky, S. T. : *Anal. Chem.*, 24, 844 (1952).
- 30) 大石二郎: 温度及びその測定法 (昭21), 産業図書, 東京.
- 31) Pauly, H. & Feuerstein, K. : *Ber.*, 62, 298 (1929).
- 32) Raffo, M. & Balduzzi, O. : *Gazz. chim. ital.*, 47 I, 71 (1917).
- 33) Reissert, A. : *Ber.*, 23, 2241 (1890).
- 34) Rosin, J. : *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 35, 56 (1946).
- 35) Roth, C. F. : *Ber.*, 19, 1970 (1886).
- 36) 鮫島実三郎: 物理化学実験法 (昭14), 第2章, 裳華房, 東京.
- 37) Schudel, H., Eder, R. & Buechi, J. : *Pharm. Acta Helv.*, 23, 33 (1948).
- 38) Tassilly : *Bull. soc. chim.*, (3)17, 596 (1896).
- 39) Thiele, J. : *Ber.*, 40, 996 (1907).
- 40) U. S. P. XIV (1950), p. 734.
- 41) *ibid.*, p. 746.
- 42) *ibid.*, p. 766.
- 43) 添原義之: 化学実験学, 第2部, 第3巻 (昭16), p165, 融点, 河出書房, 東京.
- 44) Utermark, W. : "Melting Point Tables of Organic Compounds" (1951), Walter J. Johnson, New York.
- 45) Winkler, L. W. : *Arch. Pharm.*, 266, 49 (1928).
- 46) Winterbottom, R. : *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 160 (1940).
- 47) Witschonke, C. R. : *Anal. Chem.*, 24, 350 (1952).
- 48) Zemaný, P. D. : *Anal. Chem.*, 24, 348 (1952).

### Summary

Six reference standards of melting point of National Hygienic Laboratory of Japan are made. The melting range and the five points—beginning of melting, B. M.; sintering point, or coalescence, S. P.; collapse point, C. P.; meniscus point, M. P., and end of melting, E. M.—are measured by the capillary method using a modified apparatus, and they are compared with U. S. P. reference standards. They will have the next melting ranges, which are a little different from those of U. S. P. Standards.

Vanillin	80.5° ~ 83°
Acetoanilide	114° ~ 116.5°
Acetophenetidine	134° ~ 136°
Sulfanilamide	165° ~ 166.5°
Sulfapyridine	191.5° ~ 193°
Caffeine	235° ~ 237.5°

As the melting point of the material in the Pharmacopeia, it is better to indicate it with the melting range than with a special point of melting.

Received April 30, 1955

## 非水溶液滴定による医薬品の定量（第12報）

## 氷酢酸を溶媒とする局方医薬品の定量

鹿島 哲

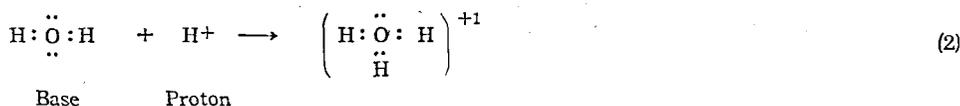
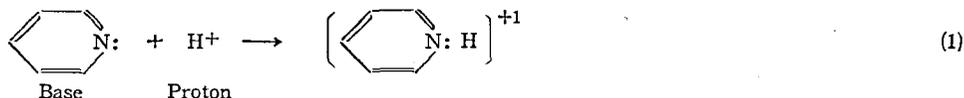
## Titration in Nonaqueous Solutions of Drugs and Chemicals. XII.

## Determination of Pharmaceuticals of J. P. VI. Using Anhydrous Acetic Acid.

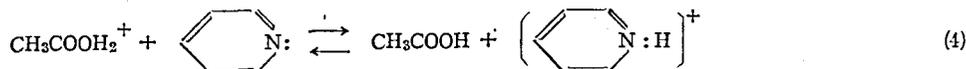
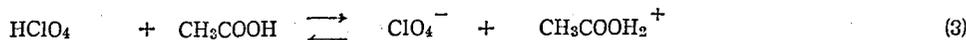
By Tetsu KASHIMA

まえがき 第六改正日本薬局方についての塩基性有機医薬品は80種ほどであるが、その内半数しか定量法が定められていない。それも抽出法や逆滴定など余り好ましくない方法によつて多い。ところが氷酢酸を溶媒として過塩素酸で直接滴定すれば、その内40種ほどはクリスタルバイオレットを指示薬として正確簡便に定量できる。それは溶媒の差異効果によつて大多数の無機酸塩<sup>7)16)</sup>及び有機酸塩<sup>16)</sup>がそのまま滴定できること、およびヘロゲン酸塩が酢酸第2水銀を当量以上加えれば正確に直接滴定できる<sup>6)</sup>と云うこの非水溶液滴定の特色によるためである。この方法に関して外国では多くの報告<sup>5)や綜説1)3)4)19)20)</sup>が出されているが、その大多数は指示薬によつて定量できるというだけで、その測定精度や酸塩基性に渡つて詳しく報告されている例が少ないので、ここに電位差滴定の結果を基とし、局方品の滴定に関し検討したところを報告する。

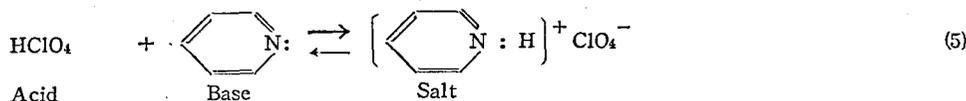
非水溶液滴定の理論 塩基性の窒素とは不共有電子対を持つていて、プロトン供与体である酸からプロトンをとつて配位結合を形成する傾向を持つているものである<sup>18)</sup>。しかしそこに両性電解質である水などが存在するとその水は塩基として働きプロトンを得ようと競争するから、弱塩基である一般の有機塩基はその塩基性を表わし難い。



ところが溶媒としてプロトンを受取り難い酸性溶媒を用いれば水に近いような弱塩基もその塩基性を相対的に強めるから滴定できるようになるわけである。しかしそのとき用いる相手の酸はその酸性溶媒でも強酸性を呈しうような酸であることが必要であるから、氷酢酸を溶媒とするときは硫酸や塩酸ではやや不十分なので通常過塩素酸を用いる。そのときの中和反応を次の如く表わすことができる。



故に



有機酸塩に対する中和反応については第3報<sup>10)</sup>に述べたが、その場合と比較してこの塩基性窒素による中和反応を考えてみると、反応の結果生成する塩は前者が普通のものであるのに対して後者のものは錯塩である場合が多く、それが前者ではイオンに解離する程度が多く、後者ではその程度が低くほとんど解離していない場合すらある。従つてその両者は広義には同じ酸塩基反応で<sup>18)</sup>、指示薬を同じように変色させるが、幾分違う要素、共鳴の变化、電子の分子内移動なども含んでいるものと考えられる。

実験材料 氷酢酸、0.1~0.2%の過塩素酸を加え、共通磨り合せの蒸留装置にヘンペル型の蒸留塔をつけ塩化カ

ルシウムで防湿して徐々に蒸留し116°以上の留分をとり、ついで無水酢酸2~3%を加えて再蒸留し118°の留分を用いる。

氷酢酸の回収、使用した氷酢酸はカリウム塩を加えて過剰の過塩素酸を沈澱させて除き、過マンガン酸カリウムを十分着色するまで加えて蒸留し、次いで無水クロム酸を加えて再蒸留し、それに無水酢酸を加えて再び蒸留して118°の留分を用いれば十分使用することができる。

無水酢酸、0.1~0.2%の過塩素酸を加え前述の装置で蒸留し、136°~138°の留分を氷酢酸の精製に用い、138°~140°の留分は標準液を造るときに用いる。

過塩素酸、70%の特級品。

フタル酸水素カリウム、National Bureau of Standards (U. S. A.) の標準品または Merck の緩衝液用を粉末にし105°で4時間以上乾燥する。

酢酸第2水銀、1級品。

クリスタルバイオレット、Merck 製。

0.05N 過塩素酸標準液、氷酢酸約800ccをとり氷水で30°以下になるように冷しつつかき混ぜながら過塩素酸4.2ccを徐々に加え、数時間放置してから無水酢酸20ccを加え2昼夜以上放置後、フタル酸水素カリウムで標定する。液は微褐色以上に着色してはならない。

実験方法 粉末とし薬局方に従つて良く乾燥した検体0.1~0.4gを精密に秤り、カールフィッシャー滴定装置のフラスコに入れビュレットから氷酢酸約25ccを加えよくかき混ぜて完全に溶解し0.05N (溶けないときは0.02N) の検液をつくり、その液をかき混ぜながら0.05Nの過塩素酸標準液で徐々に滴定した。電位差滴定<sup>17)</sup>をするときにはベックマンのpHメーターG型にpH(-1)まで測れるというType "42" のガラス電極と "Fiber" 型の甘汞半電池とを組合せて行なう、指示薬による場合にはクリスタルバイオレットの0.2%氷酢酸溶液を1、2滴加えた検液の紫乃至赤紫色が、電位差滴定の結果と比較して、青乃至緑色を呈する点を終点とする。ハロゲン酸塩には理論当量よりやや過量の酢酸第2水銀を加えて直接滴定する。測定は22.5°±1°の恒温室で行い、測定中の室温の変化は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<sup>-3</sup>, 20°)をもつて補正した。

実験結果 遊離塩基を主として第1表に挙げたが、アンチピリン、アミノピリン、ピラビタール及びサリチル酸アンチピリン<sup>9)</sup>は十分正確に定量できた。ミグレニンはやや不十分で、スルピリンは1モル2当量としてやつと実用分析に堪える成績であつた<sup>9)</sup>。カフェイン及びテオフィリン並びにそのカフェインの塩基性によつて滴定される安息香酸ナトリウムカフェイン及びサリチル酸ナトリウムカフェインの測定精度も悪く、指示薬では直接滴定し難いから逆滴定によるがそれでも不十分であつた<sup>12)</sup>。尿素も前述のものに似ている上一層測定精度が悪かつた。ニコチン酸及びニコチン酸アミドも正確に定量できるが、それらは氷酢酸に溶け難かつた<sup>11)</sup>。エチル炭酸キニーネは1モル2当量としてその測定精度は良いが、アクリノールは再現性が悪く反応速度が遅かつた。サリチル酸エゼリンは1モル2当量として2段に滴定され、その測定精度は良くなかつた。特に言及しないものは皆1モル1当量の点で滴定されたものである。

ハロゲン酸塩は第2表に掲げたが、その塩酸塩及び臭化水素酸塩は当量より少し過剰の酢酸第2水銀を加えて直接滴定すれば、その遊離塩基と同じく良好な測定精度で定量できた。しかし塩酸キニーネは1モル2当量として滴定されるが再現性があまり良くなかつた。モルヒネ類は第6報<sup>13)</sup>、トロパンアルカロイドは第8報<sup>14)</sup>、エフェドリンは第9報<sup>15)</sup>を参照されたい。ビタミンB<sub>1</sub>には2当量より少し多い酢酸第2水銀を加えて滴定する。

ハロゲン酸塩を除いた無機酸塩は第3表に掲げた。すなわち硫酸、硝酸及び磷酸塩であるが、それらの酸のためやや測定精度が悪かつた<sup>16)</sup>。コデイン類は第6報<sup>13)</sup>、アトロピンは第8報<sup>14)</sup>を参照されたい。硫酸キニーネは1モル3当量として滴定されるがやや再現性が悪かつた。

有機酸塩は第4表に掲げたが、カリウム塩の測定精度が一番良く、それに次いでナトリウム塩で、カルシウム塩はやや悪かつたが再現性は良かつた。バルビタール類、溶性サッカリン及びジフェニルヒダントインナトリウムは第1報<sup>8)</sup>、その他のナトリウム塩は第3報<sup>10)</sup>を参照されたい。

Table I. Determination of Organic Bases of J. P. VI. in Anhydrous Acetic Acid with Perchloric Acid.

Organic Bases		Taken g	Found %	Sensitivity %
アクリノール	Acrinol	0.1327	98.2 ± 0.3	0.1
アミノピリン	Aminopyrine	0.2458	99.85 ± 0.05	0.1
安息香酸ナトリウム カフェイン	Caffeine and Sodium Benzoate*	0.2363	99.8 ± 0.6	0.6
アンチピリン	Antipyrine	0.2178	99.9 ± 0.1	0.1
エチル炭酸キニーネ	Quinine Ethyl Carbonate*	0.1136	96.7 ± 0.1	0.06
カフェイン	Caffeine	0.1899	99.1 ± 0.2	0.4
サリチル酸アンチピリン	Antipyrine Salicylate	0.4090	99.8 ± 0.1	0.1
サリチル酸エゼリン	Eserine Salicylate*	0.1265	99.3 ± 0.15	0.4
サリチル酸ナトリウム カフェイン	Caffeine and Sodium Salicylate*	0.3103	99.9 ± 0.5	0.5
スルピリン	Sulpyrine*	0.2128	97.1 ± 0.2	0.5
テオフィリン	Theophylline	0.2052	99.4 ± 0.4	0.4
ニコチン酸	Nicotinic Acid	0.1568	99.9 ± 0.1	0.1
ニコチン酸アミド	Nicotinamide	0.1626	100.05 ± 0.05	0.04
尿素	Urea	0.0629	98.7 ± 0.2	1.0
ピラビタール	Pyribital	0.3198	99.9 ± 0.05	0.1
ミグレニン	Migraenin	0.2306	99.3 ± 0.2	0.2

Table II. Determination of Salts of Organic Bases and Halogen Acid of J. P. VI. in Anhydrous Acetic Acid with Perchloric Acid.

Organic Base		Taken g	Found %	Sensitivity %
塩酸エチルモルヒネ	Ethylmorphine HCl	0.1812	99.65 ± 0.1	0.06
塩酸エフェドリン	Ephedrine HCl	0.1370	99.05 ± 0.05	0.04
塩酸キニーネ	Quinine HCl*	0.0989	100.8 ± 0.3	0.08
塩酸コカイン	Cocaine HCl	0.1709	98.45 ± 0.15	0.04
塩酸トロパコカイン	Tropacocaine HCl	0.1257	99.6 ± 0.1	0.04
塩酸パパベリン	Papaverine HCl	0.1875	97.4 ± 0.1	0.03
塩酸ピロカルピン	Pilocarpine HCl	0.1267	100.1 ± 0.1	0.04
塩酸プロカイン	Procaine HCl	0.1895	99.0 ± 0.2	0.04
塩酸モルヒネ	Morphine HCl	0.1476	100.1 ± 0.1	0.06
臭化水素酸スコポラミン	Scopolamine HBr	0.1914	98.7 ± 0.2	0.04
臭化水素酸ホマトロピン	Homatropine HBr	0.1796	99.8 ± 0.15	0.04
ビタミン B <sub>1</sub>	Thiamine HCl	0.1191	98.6 ± 0.1	0.03

Added mercuric acetate more than the equivalent of the sample.

Table II. Determination of Salts of Organic Bases and Inorganic Acid (Except Halogen Acid) of J. P. VI. in Anhydrous Acetic Acid with Perchloric Acid.

Organic Base		Taken g	Found %	Sensitivity %
硝酸ストリキニーネ	Strychnine Nitrate	0.2202	99.2 ± 0.2	0.2
硫酸アトロピン	Atropine Sulfate	0.3141	97.2 ± 0.2	0.2

Organic Base		Taken g	Found %	Sensitivity %
硫酸キニエネ	Quinine Sulfate**	0.1529	98.9±0.15	0.12
硫酸コデイン	Codeine Sulfate	0.2945	99.3±0.2	0.3
燐酸コデイン	Codeine Phosphate	0.2139	98.1±0.3	0.2
燐酸ヒドロコデイン	Hydrocodeine Phosphate	0.2039	99.6±0.3	0.2

Table IV. Determination of Alkali Salts of Organic Acids of J. P. VI. in Anhydrous Acetic Acid with Perchloric Acid.

Organic Base		Taken g	Found %	Sensitivity %
安息香酸ナトリウム	Sodium Benzoate	0.1689	99.95±0.05	0.06
エチルヘキサビタール カルシウム	Ethylhexabital Calcium*	0.2598	97.35±0.15	0.15
クエン酸ナトリウム	Sodium Citrate**	0.1253	99.9 ±0.1	0.05
酢酸カリウム	Potassium Acetate	0.1333	101.5 ±0.2	0.03
溶性サッカリン	Saccharin Sodium	0.2448	99.35±0.1	0.06
サリチル酸カルシウム	Calcium Salicylate*	0.1568	99.4 ±0.1	0.15
サリチル酸ナトリウム	Sodium Salicylate	0.1999	99.7 ±0.1	0.05
ジフェニルヒダントイン ナトリウム	Diphenylhydantoin Sodium	0.2766	100.3 ±0.1	0.06
乳酸カルシウム	Calcium Lactate*	0.1147	99.7 ±0.15	0.15
溶性バルビタール	Barbital Sodium	0.2645	99.75±0.05	0.06
溶性フェノバルビタール	Phenobarbital Sodium	0.2936	98.2 ±0.2	0.07
溶性メチルヘキサ ビタール	Methylhexabital Sodium	0.2405	101.3 ±0.2	0.07

Each value is the average of three samples.

\* One mole of it is two equivalents.

\*\* One mole of it is three equivalents.

Sensitivity =  $\frac{\text{Volume of 0.05N HClO}_4 \text{ causing the difference of E. M. F. of 5mV}}{\text{Total volume of 0.05N HClO}_4}$

(At the end point).

考察 まず第1表について考えて見ると、アミノピリンの塩基性はジメチルアミノ基によるため強いが、カフェインの塩基性は弱いため、それらの混合物であるミグレンはアミノピリンの塩基性によつて1モル1当量として滴定されるが、カフェインの弱塩基性に影響されて測定精度がやや落ちた。しかしサリチル酸やバルビタールは氷酢酸中ではほとんどその酸性を表わさないから、サリチル酸アンチピリン及びピラビタールはそれぞれアンチピリン及びアミノピリンと同じように滴定されるのである。ニコチン酸アミドはそのアミノ基の塩基性が非常に弱くしか表われないのでピリジン核の塩基性により1モル1当量として滴定され、その上そのアミノ基の影響によつてニコチン酸より精度よく滴定できた。アクリノールは3個の窒素有するが、やはりそのアミノ基の塩基性が弱いため、環状窒素の塩基性により1モル1当量として滴定される。サリチル酸エゼリンはその有する2つのメチルアミノ基の塩基性に差があるため、1モル2当量として2段に滴定された。尿素が1モル1当量として滴定されるのは一方のアミノ基が中和されると他方は全く塩基性を表わさなくなるからで、なお全体の塩基性も極めて弱かつた。

有機塩基のハロゲン酸塩は一般に当量以上の酢酸第2水銀を加えると氷酢酸に溶け易くなるが、それでもその溶解性はあまり大きくなかつた<sup>13)</sup>。また添加する酢酸水銀が当量以上存在すると、その影響により過少または過大に定量されることがあり<sup>14)15)</sup>、当量以下だと測定不能になるから、当量より少し多く加えて滴定することが望まし

い、そのため未知検体は酢酸水銀を多量加えて滴定し大体の量を求めてから、2回目に正確な定量値を得るようにすればよい。塩酸ピロカルピン及び塩酸プロカインは塩基性の窒素を2個有しているが、一方の強さが非常に弱いから1モル1当量として滴定される。しかし塩酸キニーネは酢酸水銀を加えたときは2つの塩基性にあまり差がないの1モル2当量として1つの終点で正確に定量できるが、そのまま滴定するとその有する塩酸によつて塩基性が半分中和され、強弱2つの塩基性を持った化合物が2段に滴定される場合に類似した滴定曲線を示した<sup>13)</sup>。従つていずれの終点によるもの測定精度は余りよくない。ビタミンB<sub>1</sub>は塩素イオンを2個放出するから酢酸水銀を2当量加えて滴定するわけである。

ハロゲン酸を除いた無機酸の塩は、その酸性の影響を除去する手段が見出されてないので<sup>3)</sup>、滴定が進行するにつれて過塩素酸と入れかわつてその酸が氷酢酸中に解離してくるために、その酸性が強いほどまた塩基が弱いほど測定精度が悪くなる。硫酸は氷酢酸中ではその第1段の解離は大きく表われるが、第2段目は非常に少さいから、硫酸コデインは1モル1当量、硫酸キニーネは1モル3当量として滴定され、後者の滴定精度は前者に比して良いわけである。しかしこれらの無機酸塩は直接滴定によつて十分定量することができる。

大多数の有機酸は氷酢酸中では殆んどその酸性を表わさないから<sup>13)</sup>、有機酸塩はそのまま滴定しても正確に定量できる。しかしカルシウムの塩基性はかなり弱いため少し測定精度が悪く、それに対してナトリウム及びカリウムの塩基性は強いから良好である。

氷酢酸中での塩基性の強さは水溶液中でのそれと厳密な比例関係はないが、大体において順序は更らないようである。しかし今までの実験結果を総合すると水溶液中で $10^{-9}$ より大きな解離恒数を有する塩基は0.1%以内の測定精度で滴定でき、また $10^{-10}$ ~ $10^{-13}$ までのものは0.2~0.5%で定量できるが、 $10^{-14}$ より少さい弱塩基は定量困難であると云えよう。また $10^{-3}$ より小さい解離恒数しか有しない弱酸は氷酢酸中では殆んどその酸性を示さないから、そのような酸の存在は滴定の妨害をしなかつた。しかし $10^{-2}$ ~ $10^{-1}$ の酸はかなり測定精度を下げ、それ以上の強酸が存在すると滴定困難となる<sup>16)</sup>。

非水溶液滴定においては求められた定量値がやや過大になる傾向があるが、それは検体より分子量の小さい塩基性の不純物が含まれている場合、あるいは検体が弱塩基性の基を有していて実際に滴定される塩基性に影響を及ぼす場合などがある。従つて溶媒もできるだけ良く精製することが望ましい。なお検体が金属を含まぬときは灰分を検査することによつて不純物の有無を調べることができるが、塩基性窒素を持った不純物は調べにくい。

我が国では良質の溶媒が得にくいので使用する氷酢酸と無水酢酸は過塩素酸で処理しないと標準液が着色するなど具合が悪い、実験材料のところで述べた回収処理をした氷酢酸は何度も使用可能である。有機塩基は一般に氷酢酸に溶けにくい、同じ量の検体を用いたときには検液と標準液との濃度が等しく、かつ濃い方が指示薬の変色を識別するためには望ましいので、過塩素酸標準液は一般に用いられている0.1Nより0.05Nを用いた方が滴定の進行につれて沈澱を生ずることが少いなどのことから有利であると考えられる。滴定は必ずしも恒温室で行なう必要はないが、測定中の温度変化は $0.5^{\circ}$ 以内に止めないと氷酢酸の膨脹係数が大きいから誤差を0.1%以内にするのができ難い。

ここに掲げた医薬品以外にも入手できなかったニピレナミン、塩化コタルニン、塩酸エメチン、塩酸ジブカイン及び塩酸ロベリンなど数種のものも正確に定量できるはずである。以上のことから氷酢酸を溶媒とする有機医薬品の滴定法は局方試験法として適切であると云える。

## 総 括

1. 薬局方中の塩基性有機医薬品約40種（有機塩基、その有機酸並びに無機酸塩及び有機酸アルカリ塩）を氷酢酸中でクリスタルバイオレットを指示薬として過塩素酸で正確簡便に直接滴定することができた。その測定精度は電位差滴定の結果から、大多数のものは0.1%前後であると云える。従つてこの方法は局方試験法としても適切である。

2. 今までの報告その他から、その化合物のいかなる塩基性によつて滴定されるかを検討することができた。また滴定に際して共存する無機酸並びに有機酸の影響についても論じた。その結果から水溶液中でpK<sub>b</sub>が13より小さい塩基は実用上定量可能であり、pK<sub>a</sub>が3より大きい弱酸はこの滴定にほとんど影響を及ぼさないと云えよう。

## 文 献

- 1) Auerbach, M. E. : Drug Standards, 19, 127 (1951).
  - 2) Bates, R. G. : "Electrometric pH Determinations" (1954), Chapter 6, John Wiley & Sons, New York.
  - 3) Ekeblad, Per and Erne, E. : J. Pharm. Pharmacol., 6, 433 (1954).
  - 4) Furman, N. H. : Anal. Chem., 26, 84 (1954).
  - 5) Herd, R. L. : J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 31, 9 (1942).
  - 6) Higuchi, T. and Concha, J. : Science, 113, 210 (1951).
  - 7) Higuchi, T. and Concha, J. : J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 40 173 (1951)
  - 8) 鹿島 哲 : 薬誌, 74, 101 (1954).
  - 9) 鹿島 哲 : 薬誌, 74, 463 (1954).
  - 10) 鹿島 哲, 加納宏一郎 : 本誌, 72, 145 (1954).
  - 11) 鹿島 哲 : 本誌, 72, 151 (1954).
  - 12) 鹿島 哲 : 薬誌, 74, 1078 (1954).
  - 13) 鹿島 哲, 朝比奈晴世, 志内賢彦 : 薬誌, 75, 329 (1955).
  - 14) 鹿島 哲, 朝比奈晴世, 志内賢彦 : 薬誌, 75, 586 (1955).
  - 15) 鹿島 哲 : 薬誌, 75, (1955).
  - 16) 鹿島 哲, 加納宏一郎 : 薬誌投稿中.
  - 17) Lingane, J. J. : "Electroanalytical Chemistry" (1953), Chapter V, Interscience Publishers, New York.
  - 18) Luder, W. F. and Zuffanti, S. : "The Electronic Theory of Acids and Bases" (1946), Chapter 3, John Wiley & Sons, New York.
  - 19) Pifer, C. W., Wollish, R. G. and Schmall, M. : J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 42, 509 (1953).
  - 20) Reilley, C. N. and Schweizer, B. : Anal. Chem., 26, 1124 (1954).
- \* 1953年以前の文献は既報, 特に第3報<sup>10)</sup>を参照されたい.

## Summary

About forty Pharmaceuticals of J. P. VI.— organic bases, salts of organic bases and organic or inorganic acid and alkali salts of organic acids— can be directly titrated with 0.05N perchloric acid in anhydrous acetic acid using crystal violet as the indicator. Most of the determination can be made nearly with an accuracy of 0.1 per cent.

It is supposed from the titrations, that organic base which  $pK_b$  is smaller than thirteen in water, can be determined practically, and the presence of inorganic or organic acid which  $pK_a$  is larger than three in water, does not disturb the titration in anhydrous acetic acid. And the basicity of organic base can be discussed with the results of this experiment and others.

Received April 27, 1955

## アゾトメトリーの研究 (第1報) セミカルバチツトの定量

川 城 巖, 細 貝 祐 太 郎

## Studies on Azotometry (No. I) On the Determination of Semicarbazide

By Iwao KAWASHIRO and Yutaro HOSOGAI

**まえがき** 著者等は, セミカルバチツト類を使用するカルボニル化合物の定量をアゾトメトリーに応用することを考え, そのためまず第1段階として塩酸セミカルバチツト及びチオセミカルバチツトについてアゾトメトリーを行つた. 従来岩崎<sup>1)</sup>等によつて報告されているアゾトメトリーの酸化剤としては, 次亜臭素酸ナトリウム, 及びフェリシアン化カリウムがあるが, 著者等はこれらの外に新たに硫酸銅を酸化剤として採用し, それらによる精度及び測定域を比較検討し若干の知見を得たので報告する.

**本 論** アルカリ硫酸銅液 (アルカリ性酸化銅) の酸化作用については周知の通りであるが, このものをフェニルヒドラチン類の酸化剤として利用し, 発生する窒素ガスの容量を測定して, もとの物質を定量する報告は, S' t-rache<sup>2)</sup> Watson<sup>3)</sup>, 等によつて行われている. しかしセミカルバチツト類に応用された例はなく, 又アゾトメトリーの酸化剤として使用されたこともない.

## 実 験 の 部

**試 薬** 1. 飽和塩化ナトリウム液. 洗液, 補給液, 遮断液, として使用する.

2. 次亜臭素酸ナトリウム. 臭素, 及び40%水酸化ナトリウム液をそれぞれ零度以下に氷冷し, 両者が良く冷えたら臭素0.5ccに40%水酸化ナトリウム液20ccを加えよく攪拌し臭素を完全に溶解させマホー瓶中に氷冷して貯える.

3. フェリシアン化カリウム液. フェリシアン化カリウム1%水溶液に比重を高めるために硝酸カリウムを飽和させ, これに炭酸ガスを通じ, 溶解している空気を追出したもの.

4. 硫酸銅液. 硫酸銅10%水溶液に前記と同様に硝酸カリウムを飽和し, 炭酸ガスを通じたもの.

以上実験材料はいずれも精製薬品を使用し, 酸化剤については盲検を行つて空気, 及びその他のガスの混入しないもののみを使用した.

**定量法.** 塩酸セミカルバチツト, 及びチオセミカルバチツト, の水溶液 (含量 250~50  $\mu\text{g}/\text{cc}$ ) 1cc を10ccの小ビーカーにとり, それぞれ3.5ccの飽和塩化ナトリウム洗液で2回アゾトメーターに洗い込む, つぎに炭酸ガス導入装置よりアゾトメーターに炭酸ガスを5min通じ, メーター内の空気を炭酸ガスに換え, アゾトメーターの上部からアスピレーターその他, 適宜の方法で吸引し, メーター内部を減圧とする. この減圧を利用して前記酸化剤0.5ccと40%水酸化ナトリウム0.5ccを静かにメーター内に吸い上げる. (40%水酸化ナトリウム液0.5ccをとる操作は, メーター内の炭酸ガスを吸収して減圧を作るためのものであり, 酸化剤として次亜臭素酸ナトリウムを使用した場合は, この40%水酸化ナトリウム液を吸引する操作は必要がない.) 計内液と試薬との比重差により試薬は計内液と層を作り境界は明瞭であり附した目盛によつて試薬の必要量をとることが出来る. 次いでメーターを水平に片手に持ち約1min激しく振盪したのち, メーターを飽和塩化ナトリウム補給液の中に立て, メーターの最下部の活栓を開けば, メーター内は減圧となつているから飽和塩化ナトリウム液はアゾトメーター内に進入し平圧化され, 反応によつて発生した窒素ガスのみが小気泡となつて, オイヂオメーター及びその基部に溜る. 次いで上部活栓を開き上端に繋いだゴム管を通じ, ロで圧を加え中部の活栓を瞬時開けば遮断液はオイヂオメーター内に吹き下され, そのため総ての窒素ガスはオイヂオメーターの基部に集まる. メーターを適当に傾けガスを待避球に入れたのち, ゴム管により遮断球内を陰圧にしなが, 中部の活栓を開きオイヂオメーターの栓を遮断球にうつし, 中部の活栓を閉ぢる. 次に窒素ガスを待避球からオイヂオメーター基部に移し, さらに中部活栓の開閉によつてオイヂオメーター内に進入させる. 全活栓を閉じメーター全体を水中 (水槽使用) に浸して放置し, 水温と等しくする. (約10~15min) 次いでメーターの最下部の活栓を開き計内液と外液を連通し, 外圧と内圧を等しくして測容する. しかしこの場合, 計内液の比重, 毛管現象等を考慮し, 外液面をメーターの目盛約10mm<sup>3</sup>のところを保ち, 中部活栓

の調節によつてオイヂオメーター内の気圧の下部をメーターの目盛の零点に置き、窒素ガスの体積を読み取り測容時の水温、気圧から所定の換算表によつて標準状態のガスの容積を知るのである。なお測定結果は次の通りである。

### 精度

#### a. 次亜臭素酸ナトリウム法

第 1 表

	含 量 μg	理論値	実 測 値 μg				平 均	N <sub>2</sub> % 発 生 率
			1	2	3	4		
塩酸セミカルバチット NH <sub>2</sub> CONHNH <sub>2</sub> ·HCl	278	69.7	69.4	69.7	69.7	70.0	69.7	100
チオセミカルバチット NH <sub>2</sub> CS'NHNH <sub>2</sub>	227	69.6	69.7	69.4	69.3	69.7	69.5	99.8

#### b. フェリシアン化カリウム法

第 2 表

	含 量 μg	理論値	実 測 値				平 均	N <sub>2</sub> % 発 生 率
			1	2	3	4		
塩酸セミカルバチット NH <sub>2</sub> CONHNH <sub>2</sub> ·HCl	278	69.7	65.8	66.0	66.2	66.1	66	94.0
チオセミカルバチット NH <sub>2</sub> CS'NHNH <sub>2</sub>	227	67.6	67.8	68.0	68.2	68.1	68	97.7

#### c. アルカリ硫酸銅法

第 3 表

	含 量 μg	理論値	実 測 値				平 均	N <sub>2</sub> % 発 生 率
			1	2	3	4		
塩酸セミカルバチット NH <sub>2</sub> CONHNH <sub>2</sub> ·HCl	278	69.7	70.1	70.0	69.8	69.8	69.8	100.1
チオセミカルバチット NH <sub>2</sub> CS'NHNH <sub>2</sub>	227	69.6	69.6	69.6	69.5	69.7	69.6	100.0

### 測定範囲

#### a. 次亜臭素酸ナトリウム法

第 4 表

塩酸セミカルバチット NH <sub>2</sub> CONHNH <sub>2</sub> ·HCl				チオセミカルバチット NH <sub>2</sub> CS'NHNH <sub>2</sub>			
含 量 μg/cc	理論値	実験値	発生率%	含 量 μg/cc	理論値	実験値	発生率%
278	69.7	69.7	100	227	69.6	69.6	100
250	62.7	62.7	100	113	34.8	34.0	99.7
139	34.8	34.8	100	56	17.4	15.8	90.8
69.5	17.4	17.3	99.4				
41.7	10.4	8.2	78.9				

## b. フェリシアン化カリウム法

第 5 表

塩酸セミカルバチット $\text{NH}_2\text{CONHNH}_2 \cdot \text{HCl}$				チオセミカルバチット $\text{NH}_2\text{CS}'\text{NHNH}_2$			
含量 $\mu\text{g}/\text{cc}$	理論値	実験値	発生率%	含量 $\mu\text{g}/\text{cc}$	理論値	実験値	発生率%
278	69.7	66.0	94.0	227	69.6	68	97.7
139	34.8	30.0	86.0	113	34.8	30.5	87.0
69.5	17.4	14.5	83.3	56	17.4	14.0	85.0

## c. アルカリ硫酸銅法

第 6 表

塩酸セミカルバチット $\text{NH}_2\text{CONHNH}_2 \cdot \text{HCl}$				チオセミカルバチット $\text{NH}_2\text{CS}'\text{NHNH}_2$			
含量 $\mu\text{g}/\text{cc}$	理論値	実験値	発生率%	含量 $\mu\text{g}/\text{cc}$	理論値	実験値	発生率%
278	69.7	69.8	100.1	227	69.6	69.6	100
139	34.8	34.9	100.2	113	34.8	34.75	99.8
69.5	17.4	16.8	96.0	68.1	20.7	20.7	100
				56.5	17.4	17.4	100
				11.3	3.4	2.8	82.3

なおヒドラチンは、次亜臭素酸ナトリウムで酸化されてその一分子から窒素ガス一分子を発生するが<sup>1)</sup>、セミカルバチット類のガス発生は実験の結果、両者いずれもその化学的組成中の全窒素量の $\frac{2}{3}$ を窒素ガスとして発生している。

## 総 括

アゾトメトリーで塩酸セミカルバチットを定量する場合には、前記結果よりみて、次亜臭素酸ナトリウム法が良く、チオセミカルバチットの場合は、アルカリ硫酸銅法が良いと思われる。フェリシアン化カリウム法の場合は、いずれも発生率は良くなかった。なお酸化剤として使用する硫酸銅の濃度の検討を行った。即ち、チオセミカルバチット 227 $\mu\text{g}/\text{cc}$ を対称として、同試薬の1%、5%、及び10%の三溶液を用いて、それらによる窒素ガス発生率をしらべたが10%濃度のものが一番良好であつた。さらにカルバチット類を利用し、カルボニル化合物とこれらの縮合物を作り試料と縮合しなかつた一定過剰のセミカルバチット類を定量することによりカルボニル化合物の定量が可能であると思われるが、此等については次回に報告する。

## 文 献

- 1) 岩崎: 十全雑誌, 42, 2125
- 2) Strache: M. (1891) 12, 524 ; (1892) 13, 299
- 3) Watson: Chem. News, 13, 83 (1906).

## Summary

Microdetermination of semicarbazide and thiosemicarbazide was successfully established by introducing into the azotometry. The sodiumhypobromide, potassium ferricyanide, and copper sulphate, are used as oxidizing agents for the determination method of semicarbazide and thiosemicarbazide.

Optimal determination ranges are as follows.

oxidizing agent→	NaBrO	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	$\text{CuSO}_4$
semicarbazide	130 $\mu\text{g}$ (100%)	278 $\mu\text{g}$ (94%)	130 $\mu\text{g}$ (100%)
thiosemicarbazide	227 $\mu\text{g}$ (100%)	227 $\mu\text{g}$ (97%)	56 $\mu\text{g}$ (100%)

## 覚せいアミン剤の検出法 (第1報)\*

## Phenylmethylaminopropane, Phenylaminopropane, Ephedrine,

若干のアミン及びアミノ酸類の呈色反応について

長沢 佳 熊, 大 熊 誠 一

## Detection of Some Nerve Stimulants. I. Color Reactions of Phenylmethylaminopropane, Phenylaminopropane, Ephedrine, Some Amines and Amino Acids.

By Kakuma NAGASAWA and Seiichi OHKUMA

覚せいアミン剤としては phenylmethylaminopropane (I) (通称 philopon), phenylaminopropane (II) (通称 zedrin) がある。これ等アミン類の連用は習慣の獲得を来し、種々の弊害を生ずるので、一般にはこれら覚せいアミン剤の使用は禁止されている。最近はこの等覚せいアミン剤に ephedrine (III) を混合し、(III) の製剤であると称し販売、悪用するものが現われるに至つたので、著者等は (I), (II) 及び (III) (Fig I) に特異的な検出法を検討し、若干の知見を得たのでここに報告する。

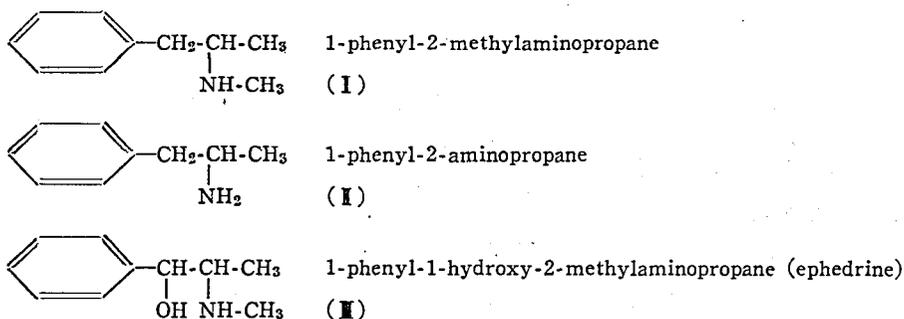


Fig 1

1)  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-}$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{NHCH}_3)\text{-}$  アミノエチル基, N-メチルアミノエチル基の呈色反応 次亜臭素酸ナトリウムとピリジンで  $\text{CH}_3\text{COR}$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{R}$  型化合物が赤色~紅色を呈するという安達<sup>1)</sup>の方法をアミノエチル基又はN-メチルアミノエチル基をもつた (I), (II) 及び (III) に適用してみたが、赤色~紅色を呈しない。そこで次亜臭素酸ナトリウムの濃度を安達<sup>1)</sup>の方法より若干低めてピリジンと共に (I), (II) 及び (III) に作用させたところ赤色~紅色を呈するようになった (実験1, Table I)。なおこの方法によつて若干のアミン類, メチルケトン類, 及びエチルアルコールも赤色~紅色を呈するが、他のアミン類は赤色~紅色を呈しない (実験1, Table II)。したがつてこの方法 (実験I, A液使用) は (I), (II) 及び (III) のアミノエチル基又はN-メチルアミノエチル基の一検出法として利用できる。

(1) アミン類はアミノ基が水酸基に類似するためアルコールに準じた反応を行う<sup>2)</sup>。即ちアルコールが酸化されてアルデヒド, ケトンを生成するように、アミンは脱水素されてイミンになり、これが更に加水分解を受けてアルデヒド, ケトンを生成する。

(2) オキシエチル, メチルケトン類は次亜臭素酸ナトリウムにより bromoform を生成する<sup>3)</sup>。

(3) (III) は次亜臭素酸ナトリウムにより bromoform を生成する<sup>4)</sup>。

(4) bromoform はピリジンと反応して赤色~紅色を呈する<sup>1), 5)</sup>。

\* 本報告の要旨は薬学雑誌 74, 773 (1954) に発表した。なお本検出法は「覚せいアミン剤の検出法」として厚生省薬務局監視課より各都道府県当局に通達された。

(5) ハロゲン化合物とピリジンが反応して生成する赤色素の吸収スペクトルはハロゲン化合物の種類に関係なく同一である<sup>6)</sup>。

以上実験1, Table I, Table II及び(1)~(5)の文献を照合して, この次亜臭素酸ナトリウムとピリジンによる(I), (II)及び(III)の呈色反応機構を次のように推定する。(I)を例に挙げて図示するとFig 2のようになる。

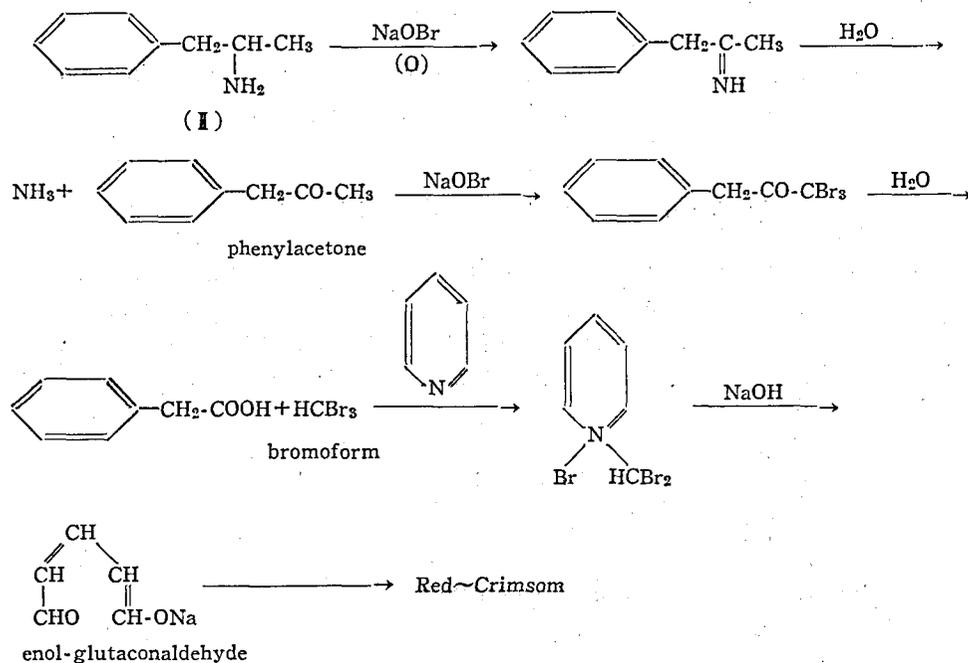


Fig 2

即ち次亜臭素酸ナトリウムにより (I), (II) 及び (III) が酸化され, ついで加水分解されて phenylacetone を生成し, これが更に次亜臭素酸ナトリウムの作用により bromoform を生成する。ついでこの bromoform がピリジンと四級アンモニウム塩を形成し, これがアルカリにより分解し enol-glutaconaldehyde を生成して赤色素を形成し発色する。

以上のように次亜臭素酸ナトリウムは試料のアミン類に対して酸化剤, ブロム化剤として作用し, その結果生成する bromoform と添加したピリジンによつて呈色が起こると考えられるため, 試薬の次亜臭素酸ナトリウムの量よりアミン類が過剰に存在するときは反応が陰性となる。例えば (I) においては試料が 50~1000 $\gamma$  の間では呈色するが, それ以上又はそれ以下の量では呈色しない。

2) **Phenylmethylaminopropane (I)** 及び若干のアミン類の呈色反応 1899年 Levin<sup>7)</sup>は若干の脂肪族アルデヒド類特に acetaldehyde がニトロブルシッドナトリウム (以下 NP と略称) と piperidine 又は diethylamine とによつて鋭敏に青色を呈することを報告し, 1937年, Feigl, Anger<sup>8)</sup>はこの反応を逆に脂肪族二級アミン類の呈色反応に拡張した。即ち NP と acetaldehyde が炭酸ナトリウム, アルカリ性下で脂肪族二級アミン類と反応して青色を呈することよりその検出法とした。この方法は青木, 岩山<sup>9)</sup>により脂肪族二級アミノ基をもつ (I) の検出法として利用されるに至つた。この NP-acetaldehyde 法は鋭敏性にとむので (I) の検出に広く使用されている<sup>10)</sup>。著者等の実験によるとこの検出法は脂肪族二級アミンに特有の反応のようである (実験2, Table III)。なおこの反応は NP の反応であつて, Sodium Pentacyanoaquoferroate, Sodium Pentacyanoammineferroate, Sodium Pentacyanonitriteferroate 等では呈色しない反応なので (実験2), NP 溶液は用時調製したものでなければならない。

著者等はつぎに (I) のN-メチル基の呈色反応を検討した。(III)はアルカリ性下, フェリシアン化カリウ

△ (以下 FC と略称) で酸化すると, benzaldehyde と methylamine を生成するが<sup>11)</sup>, (I) については酸化が進行しがたい (実験3, Table IV). この場合 NP を酸化剤として併用すると遙かに酸化がよく進行するようになることが認められた (実験4, Table IV). この際酸化により生成するアルデヒド類を反応系から除去する目的で水蒸気留を行いながら酸化し, 留液を 2,4-ジニトロフェニルヒドラチン試液 (以下 DPH と略称) に吸収させる. (I) と (II) の留出液から黄色沈澱, (II) からは赤褐色の結晶が析出する (実験4, Table IV). これ等の沈澱, 結晶をメチルアルコール飽和 n-ヘキサンを展開溶媒<sup>12)</sup> として, 濾紙クロマトグラフにかけると, その Rf 値は (I) から得た黄色沈澱では Formaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone, (II) から得た黄色沈澱では acetaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone の Rf 値に一致した (実験5, Table V). 従つて FC と NP による酸化によつて, (I) からは formaldehyde, (II) からは acetaldehyde が生成したものと推定できる. (II) からの赤褐色結晶の Rf 値は 0 なので (II) は formaldehyde, acetaldehyde のいずれも生成しないものと推定できる. N-メチル化合物の demethylation に FC を使用していることと<sup>13)</sup>, 上記実験結果を照合して, (I) においては, その N-メチル基が脱メチル化され formaldehyde を生成し, (II) においては水酸基とアミノ基の結合する炭素間結合が酸化分解されて acetaldehyde を生成したものと推定する.

以上の実験から (I) のみが FC と NP の酸化により formaldehyde を生成するので, この酸化反応を利用して (I) の N-メチル基の呈色反応を検討した. 著者等は formaldehyde が塩酸酸性下, FC と phenylhydrazine で赤色を呈する Rimini 反応<sup>14)</sup> と上記酸化反応とを組合せて次のような (I) の N-メチル基の呈色反応を考案した. (実験6, 操作1, 2, Table VI). 即ち炭酸ナトリウム-アルカリ性下, FC と NP で (I) を酸化し, formaldehyde を生成させたのち, 反応液を塩酸酸性とし phenylhydrazine を加えて赤色~橙色に発色させた. この呈色反応において FC は (I) の N-メチル基を formaldehyde とする酸化剤, formaldehyde と phenylhydrazine の縮合酸化剤の二作用を示す. またこの (I) の N-メチル基の呈色反応において FC 又は NP 各単独では反応が陰性であるから (実験6). この反応は両シアン鉄錯塩の協力作用によつて起きることは明らかである. この (I) の FC, NP 及び phenylhydrazine による呈色反応機構は上記実験結果と Paget-Desodt<sup>15)</sup> の FC と phenylhydrazine とによる glyoxylic acid の呈色反応機構から推定すると Fig 3 のように説明することができる.

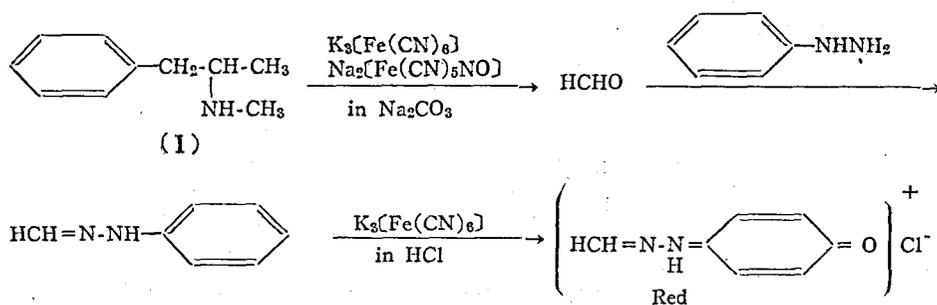


Fig 3

著者等の実験した範囲内の化合物では, この方法により formaldehyde 及び aminopyrine が (I) とやゝ類似の呈色を示す以外は赤色~橙色を呈しないので, この反応は (I) の一検出法として利用できる. なお操作の FC と NP 試薬は通常 guanidine 化合物と反応して赤色~橙色を呈することが知られているが<sup>16)</sup>, 著者等の実験によるとこの試薬は hydrazine, hydrazide 類とも赤色を呈する. またこの試薬により芳香族アミン類は緑色~青色を呈し, sodium pentacyanoammineferroate, sodium pentacyanoammineferriate 類を使用する場合より, 芳香族アミン類の呈色範囲が広いので有用である. また diethylamine はこの FC-NP 試薬により特異的に紫色を呈するので, その定性には有効である. その呈色反応機構について著者等<sup>17)</sup> は Fig 4 のように推定した.

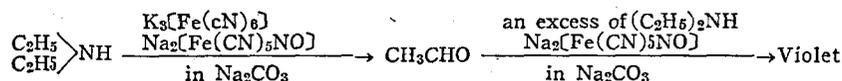


Fig 4

3) phenylaminopropane (I), 脂肪族一級アミン及びアミノ酸の呈色反応 (I) の呈色反応として methylorange<sup>18)</sup>, =トロ反応<sup>19)</sup>, 二硫化炭素<sup>20)</sup>, fluoresceinchloride<sup>21)</sup>, p-nitroanilinediazonium 塩<sup>22)</sup> 等による方法があるが, これらの方法は (I) 又は脂肪族一級アミンに特有反応でない. 著者等は (I) の検出法として先ず (I) の分子内の脂肪族一級アミノ基を検出することが必要と考え, その呈色反応を追求した. 1898年, Rimini<sup>23)</sup> により報告された NP とアセトンによる反応は遊離脂肪族一級アミンでは赤紫色を呈するが, (I) の硫酸塩, 他の脂肪族一級アミン鈹酸塩及び脂肪族一級アミノ基を含むアミノ酸類は赤紫色を呈しない (実験7, Table VII). よつて (I) 硫酸塩に NP 及びアセトン, 更にアルカリとして炭酸ナトリウム, 重炭酸ナトリウム, アンモニア水等のアルカリ試薬を加えてその呈色を観察した. (水酸化ナトリウムはアセトンが添加してあるため Legal 反応<sup>24)</sup> となるので使用しなかつた). 重炭酸ナトリウムの場合のみ対照と異つて赤紫色を呈した (実験8, Table VIII). この赤紫色溶液の pH を測定したところ約 9.5 であつた. (I) 硫酸塩に NP, アセトンを加えた溶液に水酸化ナトリウム, 炭酸ナトリウム, アンモニア水を加えて反応溶液の pH を約 9.5 附近に調整すると重炭酸ナトリウムを使用した場合と同じように赤紫色となつたので, この呈色反応は適当なアルカリ性下, 例えば重炭酸ナトリウム, アルカリ性下の反応であると考えられる. 従つて重炭酸ナトリウムは反応溶液の pH を約 9.5 程度にして反応を促進させる緩衝試薬の役目を果しているものと考えられる (実験8, Table VIII). この NP とアセトン及び重炭酸ナトリウム法を各種脂肪族一級アミン, アミノ酸について実施すると, 脂肪族一級アミン (鈹酸塩, 遊離塩基) 及びアミノ酸類は赤紫色を呈し, 脂肪族二級, 三級アミン, 芳香族アミン及び他の各種化合物は赤紫色を呈しない (実験9, Table IX). 従つてこの NP, アセトン及び重炭酸ナトリウムによる方法は脂肪族一級アミン及びアミノ酸に特異的な検出法として利用できる. NP とアセトンによる Rimini の方法ではアミノ酸は呈色しないのに重炭酸ナトリウムを添加すると赤紫色を呈するようになるのは過剰の重炭酸ナトリウムにより溶液の pH が至適 pH となるため反応呈色すると考えられる. これらの反応機構を図示すると Fig 5 のようになる.

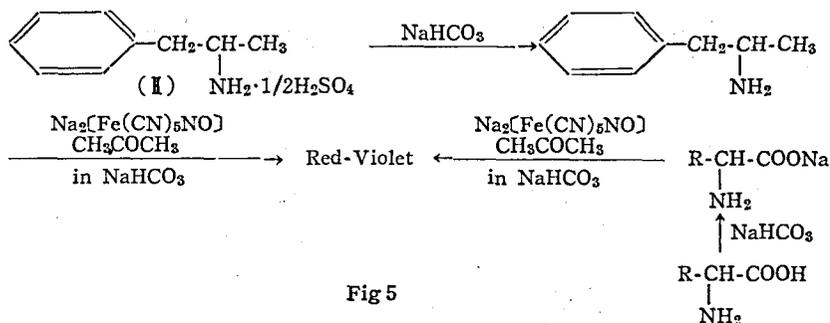


Fig 5

遊離脂肪族一級アミンは NP とアセトンでは橙色, 赤色を経て紫色となるが, 重炭酸ナトリウムを共存させておくと最初から赤紫色を呈する. また ethylenediamine のような二酸塩基は加温すると反応が進み過ぎて紫色から直ちに褐色となるので常温で反応させる必要がある. これは NP の性質から ethylenediamine が酸化されるため起る現象と考えられる. aminophylline\* のような ethylenediamine と theophylline の分子化合物も急速に赤紫色を呈する.

4) ephedrine (II) の呈色反応 ニンヒドリンはアミノ酸の呈色試薬として広く使用されているが, また脂肪族一級アミンの呈色試薬<sup>25)</sup> としても使用できることが知られている. Wachsmuth,<sup>26)</sup> はニンヒドリンと炭酸ナトリウムで (II) が紫色を呈することを報告しているが, 著者等の追試によるとこの方法はニンヒドリンを単独で使用する方法より鋭敏度が低いが, この場合炭酸ナトリウムの濃度を低めるとニンヒドリンを単独で使用する場合より強く呈色することが観察された (実験10, Table X). 更に炭酸ナトリウムの代りにピリジンを使用すると呈色が遙かに強くなり. (II) の微量検出法として有効なことが判つた. (実験11, Table XI) なおこの方法によると (II) は脂肪族一級アミンなので紫色を呈するが, (II) に比較して呈色するに時間がかゝると共にその呈色度

\* 本法は硫酸アンフェタミン, アミノファイリン (第二改正国民医薬品集) の確認試験に採用された.

がなかり弱い, このことは一般に  $\begin{matrix} R_1 \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ R_2 \end{matrix} \text{CH-NH}_2$  型の脂肪族一級アミンが=ニヒドリン反応を営みたい<sup>27)</sup> こととよく一致している。またこの反応により (I) は全く紫色を呈しないが, (II) と類似構造の adrenaline 及びアミノ酸類は紫色を呈するので, (実験11. Table XI), この反応によつて (III) を検出する場合はこれらのことを念頭におく必要がある。

終りにのぞみ試料の一部を提供された本所所員各位に感謝する。

### 実験の部

**実験1 次亜臭素酸ナトリウムとピリジンによるアミノエチル基, N-メチルアミノエチル基の呈色反応 (検出法) 次亜臭素酸ナトリウム溶液の調製法 (著者等の方法と安達法との比較)**

著者等の方法: 水酸化ナトリウム 1.1g を水 40cc に溶かしたのち臭素 1g を加え, よくふりませ溶解させる。必要ならば濾過し, その濾液を使用する (A液)。

安達の方法: 0.6N 水酸化ナトリウム溶液 25cc に臭素 1g を加えてよくふりませ溶解させる。必要ならば濾過し, その濾液を使用する (B液)。

呈色操作: 試料の微量又はその 1 滴にピリジン 2 滴, A液又はB液の 1 滴を加え小火炎で注意しながら加熱する。(I), (II) 及び (III) に対する実験結果を Table I に示す。B液では赤色~紅色を呈しないが, A液では (I), (II) 及び (III) は赤色~紅色を呈する。このA液を使用する方法を各種化合物に実施した結果を Table II に示す。(I), (II) 及び (III) の他に若干のアミン類, acetone, phenylacetone, acetophenone 及び ethylalcohol 等の化合物も赤色~紅色を呈する。

Table I. Color Reaction of (I), (II) and (III) with Sodium Hypobromide (A or B soln) and Pyridine.

Amine(0.2mg) Reagent	(I). HC	(II). 1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(III). HCl	Blanc
A soln.	R~C	R~C	R~C	ft-BrY
B soln.	ft-BrY	ft-BrY	ft-BrY	ft-BrY

Table II. Color Reaction of Amines and other Compounds with Sodium Hypobromide (A soln.) and Pyridine.

Compound	Color	Compound	Color
(I). HCl	R~C	Isonicotinic acid hydrazide	ft-OY
(II). 1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	R~C	Dimethylamine. HCl	1-BrO
(III). HCl	R~C	Piperidine	1-BrO
2-Aminopropane, HCl	R~C	Guanidine. H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	OY
Antipyrine	R	Creatine	ft-BrY
Aminopyrine	R	N-Ethylpiperidine	1-P
Caffeine	R~C	Aniline	Br
Atropine. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	R~C	Acetanilide	1-PC
Quinine. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	R~C	Dibenzylamine	ft-O
Bromovalerylurea	R~C	Procaine. HCl	BrR
Cyclobarbitone	R~C	Sulfadiazine	RO
Phenobarbitone	R~C	Sulfathiazole	BrR
Mehtylamine. HCl	1-Y	Acetone	R~C
Ethylenediamine	1-Y	Acetophenone	R~C
Glycocol	1-Y	Phenylacetone	R~C
l-Proline	1-Br	Dimethylglyoxime	R

Compound	Color	Compound	Color
<i>dl</i> -Tryptophane	1-Br	Cholesterol	colorless
Hydrazine. 2HCl	colorless	Glucose	BrY
Semicarbazide. HCl	ft-O	Fructose	BrY
dk.....dark	B.....blue	P.....purple	
ft.....faint	Br.....brown	R.....red	
int.....intense	C.....crimson	V.....violet	
l.....light	G.....green	Y.....yellow	
	O.....orange		

確認限度 (A液使用): (I), (III) 塩酸塩 50 $\gamma$  (II) 硫酸塩 75 $\gamma$ ,

この反応は加熱時間を長くすると盲試験でも赤色~紅色を呈することがあるから注意を要する。次亜臭素酸ナトリウム溶液は用時調製する。

実験2 ニトロプルシッドナトリウムと acetaldehyde による phenylmethylaminopropane (I) 及び脂肪族二級アミンの呈色反応 (検出法), 試料の微量またはその1滴に1% NP溶液1滴, 50% acetaldehyde溶液 (80% acetaldehyde水溶液5部にアルコール3部を加えて製する) 1滴, ついで2N炭酸ナトリウム溶液1滴を加える。各種化合物に対する実験結果を Table IIIに示す。試料が (I) 又は脂肪族二級アミンであると青色~紫色を呈するが, 他の化合物は呈色しない。試料の脂肪族二級アミンが多量 (例えば (I)-塩酸塩 100 $\gamma$ ) の場合は直ちに青色を呈するが, 微量 (例えば (I) 塩酸塩 10 $\gamma$ ) の場合は2~3分以内に青色を呈する。この反応に使用する炭酸ナトリウムの濃度は Feigl, Anger<sup>8)</sup>は1%, 青木, 岩山<sup>9)</sup>は20%, 著者等は2N-濃度を使用した。いずれの場合でも呈色する。この反応を濾紙クロマトグラフの呈色反応に応用する場合は20%濃度が有効である<sup>28)</sup>。しかし盲試験では炭酸ナトリウム濃度が高い程, 赤紫色を帯び易いので試料が微量の場合には盲試験を併用するのが望しい。NP溶液は褐色瓶に入れ冷暗所で貯蔵する場合は1週間位有効であるが, 水溶液の状態で放置すると NP が sodium pentacyanoaquoferrate に変化し易いので用時調製する。NPの代りに Sodium pentacyanoaquoferrate, sodium pentacyanoammineferrate 又は sodium pentacyanonitriteferrate を使用する場合は反応陰性である。

確認限度: (I) 塩酸塩 10 $\gamma$ 。

Table III Color Reaction of Amines and other Compounds with Sodium Nitroprusside and Acetaldehyde in the Presence of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Compound	Color	Compound	Color
Dimethylamine, HCl	B	Dipheylamine	Pink
Diethylamine. HCl	B	Thiourea	Pink
Diethanolamine	B	Thioglycolic acid	C
(I). HCl	B	Phenylthiourea	Pink
(III). HCl	Pink	Nitrobenzen	Pink
Streptomycine. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Pink	<i>m</i> -Dinitrobenzene	Pink
Piperidine	B	Phenol	Pink
<i>l</i> -Proline	B	Pyrocatechol	RO
Methylamine. HCl	Pink	Resorcinol	G
Buthylamin, HCl	Pink	Hydroquinone	BrY
(II). 1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Pink	Ethylalcohol	Pink
Glycocol	dk-R	Glycerol	Pink
Methylephedrine. HCl	Pink	Formaldehyde	colorless
N-Ethylpiperidine	Pink	Benzaldehyde	Pink

Compound	Color	Compound	Color
<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde	Pink	Cinnamic aldehyde	Pink
Pyridine	Pink	Glucose	Pink
Histidine. HCl	Y	Fructose	Pink
Phenylhydrazine. HCl	Pink	<i>p</i> -Quinone	Pink
Benzylaniline	Pink	Acetone	1-R
Semicarbazide. HCl	colorless	Acetophenone	1-R
Isonicotinic acid hydrazide	O	Acetic acid	Pink
Guanidine. H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	colorless	Benzoic acid	Pink
Creatinine	colorless	Maleic acid	Pink
Barbituric acid	Pink	Ethyl acetate	Pink
Antipyrine	Pink	Ethyl benzoate	Pink
Aniline	Pink	Cumarine	Pink

実験3 フェリシアン化カリウムによる Phenylmethylaminopropane (I) の酸化実験。(I) 塩酸塩 20 mg を水 1 cc に溶かし, これに 5% FC 溶液 1 cc, 2N-炭酸ナトリウム溶液 1 cc を加え水蒸気蒸留を行う。留液を DPH<sup>29</sup>) に吸収させると僅かに濁濁する。1夜放置し, 生成した黄色沈澱を濾取, 素焼板上で乾燥, 秤量する。実験結果を Table IV に示す。

実験4 フェリシアン化カリウムとニトロプルシッドナトリウムによる Phenylmethylaminopropane (I), Phenylaminopropane (II) 及び ephedrine (III) の酸化実験。

(I), (II) 塩酸塩及び (III) 硫酸塩の各 20 mg を水 1 cc に溶かし, これに 5% FC 溶液 1 cc, 5% NP 溶液 1 cc 及び 2N-炭酸ナトリウム溶液 1 cc を加え水蒸気蒸留を行う。反応溶液は茶褐色となる。留液を DPH に吸収させ 1夜放置する。(I), 及び (III) の場合は黄色沈澱 (II) の場合は赤褐色結晶を生成する。沈澱又は結晶を素焼板上で乾燥, 秤量する。実験結果を Table IV に示す。

Table IV Amounts of Aldehyde 2,4-Dinitrophenylhydrazones formed after Oxidation of (I), (II), and (III) with K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] and Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO] in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Alkaline Solution.

Amine (100mg)	2,4-Dinitrophenylhydrazone	
	Description	Yield (mg)
(I). HCl※	yellow amorphous matter	5
(I). HCl	yellow amorphous matter	65
(II). 1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	red brown needle crystal	120
(III). HCl	yellow amorphous matter	250

※using K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] only, not Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO].

実験5 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン類の濾紙クロマトグラフ Meigh<sup>12</sup>) は脂肪族アルデヒド, ケトンの 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン類の濾紙クロマトグラフ用の展開溶媒としてメチルアルコール飽和ヘプタンを使用した。著者等は試薬の都合により展開溶媒としてメチルアルコール飽和 *n*-ヘキサンを使用した。この溶媒による時も脂肪族アルデヒドの 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン類相互の分離に良い結果が得られ, また芳香族アルデヒド, ケトン及びキノン類の R<sub>f</sub> 値は 0 であつた。そこで実験4 で得られた黄色沈澱, 赤褐色結晶をこの展開溶媒を用いて濾紙クロマトグラフにかけた実験結果を Table V に示す。スポットは黄色~黄橙色として移動するから顕色試薬は必要としない。

Table V Paper Chromatography of Some 2,4-Dinitrophenylhydrazones.

2,4-Dinitrophenylhydrazone	Rf value	2,4-Dinitrophenylhydrazone	Rf Value
Obtained from (I)	0.58	formaldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone	0.58
Obtained from (II)	0	2,4-dinitrophenylhydrazine	0
Obtained from (III)	0.78	acetaldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone	0.78

Method: one dimension, ascending method. Solvent: hexane(saturated with methylalcohol). Temperature:  $20^{\circ} + 0.5^{\circ}$ .

Time: 2 hours. Paper: Toyo Filter Paper No.50.

実験6. フェリシアン化カリウム及びニトロプルシッドナトリウムによる Phenylmethylaminopropane (I) 及び若干のアミン類の呈色反応 (検出法). 試料の微量又はその1~2滴に5% FC 溶液1滴, 5% NP 溶液1滴及び2N-炭酸ナトリウム溶液2滴を加え, 試験管の底部を水面に少し浸し, 振りながら $80^{\circ}$ で60~90秒間加熱後 (操作1), 塩酸6滴, 1%塩酸フェニルヒドラチン溶液1滴を加え, 再び $80^{\circ}$ で15秒間加熱し, ついで濾過し濾液の呈色をみる. (操作2). この操作1,2を各種化合物に実施した結果をTable VIに示す. 試料が(I)のときは赤色~橙色となる.

確認限度: (I) 塩酸塩150 $\gamma$ . 操作1により hydrazine, hydrazides 及び guanidines 類は赤色~橙色を呈し, 芳香族アミン類は緑色, diethylamine は紫色を呈する. この反応において FC, NP を単独で用いると (I) に対する反応は陰性となる. 操作1は FC と NP で, (I) のN-メチル基を酸化して formaldehyde とする反応で, 操作2はこの formaldehyde を FC の存在下, 塩酸酸性でフェニルヒドラチンと反応させて赤色~橙色を生成させる反応である. 操作1において試験管を深く水面に浸して加熱することは避けねばならない. また加熱温度は正確に $80^{\circ} \pm 3^{\circ}$ 程度とし高が過ぎても低く過ぎても呈色は不良となる. 操作2で濾過するのは FC, NP から生成した緑色~青色の微細沈澱を除去するのが目的である. FC, NP 及び塩酸フェニルヒドラチン溶液は用時調製する.

Table VI Color Reaction of (I), (II), (III), and other Compounds with  $K_3[Fe(CN)_6]$ ,  $Na_2[Fe(CN)_5NO]$  and Phenylhydrazine.

Compound	Procedure		Compound	Procedure	
	1	2		1	2
(I). HCl	BrY	O~R	Urea	RY	1-G
(II). $1/2H_2SO_4$	1-BrY	ft-GY	Guanidine, $H_2CO_3$	RO	G
(III). HCl	1-BrR	ft-G	Creatine	OR	G
Methylamine. HCl	Y	ft-G	Glycolol	Y	ft-G
Buthylamine. HCl	Y	ft-G	Barbituric acid	Y	G
Ethylenediamine	Y	ft-G	Pyridine	Y	G
Dimethylamine. HCl	Y	ft-BG	Antipyrine	BrY	G
Diethylamine. HCl	V	1-GY	Aminopyrine	BrY	Y~O
Dibenzylamine	Y	1-G	Atropine. $H_2SO_4$	Y	GB
N-Ethylpiperidine	BrY	1-G	Quinine. $H_2SO_4$	Y	1-G
Aniline	G	G	Caffeine	Y	G
<i>o</i> -Toluidine. HCl	GB	G	Nitrobenzene	Y	G
<i>o</i> -Aminophenol	GB	G	<i>m</i> -Dinitrobenzene	Y	G
<i>m</i> -Aminophenol	GB	Y	Thiourea	Br	B
<i>p</i> -Aminophenol	BG	G	Thioglycolic acid	Y	G
<i>p</i> -Anisidine	BG	BrY	Cystine	1-YG	ft-G

Compound	Procedure		Compound	Procedure	
	1	2		1	2
<i>o</i> -Chloroaniline	G	Y	Phenol	Br	Y
<i>p</i> -Chloroaniline	G	GY	Buthyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	Y	1-G
Anthranilic acid	G	G	Resorcinol	Y	1-Y
Procaine. HCl	1-G	BrY	Methylalcohol	RY	Y
<i>p</i> -Nitroaniline	G	1-G	Ethyleneglycol	BrO	G
Sulfathiazol	G	Y	Formaldehyde	OY	RO
$\alpha$ -Naphthylamine	G	1-G	Acetaldehyde	BrR	Y
<i>m</i> -Phenylenediamine	GB	1-BrO	Benzaldehyde	Y	1-G
Methol. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	GB	1-G	Furfural	Y	Y
Benzylaniline	GY	1-G	Vaniline	Y	1-G
Dimethylaniline	G	Y	Acetone	Y	G
<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde	YG	GY	Acetophenone	Y	G
Acetanilide	G	G	<i>p</i> -Quinone	RBr	Y
Thioacetazone	1-G	1-G	Acetic acid	Y	G
Hydroxylamine. HCl	Y	ft-G	Benzoic acid	Y	1-G
Hydrazine. 2HCl	R	ft-G	Salicylic acid	BrY	GY
Semicarbazide, HCl	RO	1-GY	Tartaric acid	Y	G
Isonicotinic acid hydrazide	RO	Y	Glucose	BrY	1-G
Nitrofurazone	RO	G	Fructose	BrY	1-G

実験7. ニトロプルシッドナトリウムとアセトンによる脂肪族一級アミンの呈色反応 試料の微量又はその1滴に5% NP 溶液1滴, アセトン1滴を加え60°で30秒間加温する. 若干のアミン及びアミノ酸に実施した結果を Table VII に示す.

Table VII Color Reaction of Aliphatic Primary Amines and their Salts and of Amino Acids with Sodium Nitroprusside and Acetone without Alkali.

Compound	Color	Compound	Color
(II). 1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ft-BrO	Ethylenediamine	O→R→V
Phenyl- $\omega$ -diaminopropane. HCl	ft-BrO	2-Aminoheptane	O→R→V
Methylamine. HCl	ft-BrO	Glyocol	ft-BrO
Buthylamine. HCl	ft-BrO	<i>l</i> -Glutamic acid	ft-BrO
Amylamine. HCl	ft-BrO	<i>dl</i> -Tryptophan	ft-BrO
Glucosamine. HCl	ft-BrO	<i>l</i> -Histidine. HCl	ft-BrO
Benzylamine	O→R→V	<i>l</i> -lysine	ft-BrO

実験8. ニトロプルシッドナトリウム, アセトン及びアルカリによる脂肪族一級アミン及びアミノ酸の呈色反応. 試料の微量又はその1滴に5% NP 溶液1滴, アセトン1滴に2N-炭酸ナトリウム溶液, 10%アンモニア水のいずれかの1滴を加えるか, 重炭酸ナトリウム粉末約20~30mgを加え60°で30秒間加温する. (I) 硫酸塩, (I) 塩酸塩に対する実験結果を Table VIII に示す. (II) 硫酸塩 6.7mg を水1ccに溶かし, これにアセトン1cc, 5% NP 溶液1ccを加え, つぎに N/15 水酸化ナトリウム溶液 0.4cc, 0.4N-炭酸ナトリウム溶液 0.08cc, 2% アンモニア水 0.32cc のいずれかを加えると丁度赤紫色を呈する. これらの赤紫色溶液の pH は上記のアルカリ類の代りに重炭酸ナトリウム粉末約200mgを加えて赤紫色を呈せしめた溶液の pH 9.4~9.5 に殆んど等しく 9.5~9.6 である.

Table VIII Color Reaction of Aliphatic Amine Salts with Sodium Nitroprusside and Acetone in the Presence of Alkali.

Compound	Alkali		
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> OH
(II). 1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	O→PR	V~P	O→PR
(I). HCl	O→OR	1-O	O→PR
Blank test (H <sub>2</sub> O)	O→OR	1-O	O→OR

実験9. ニトロプルシッドナトリウム, アセトン及び重炭酸ナトリウムによる Phenylaminopropane (II), 脂肪族一級アミン及びアミノ酸類の呈色反応(検出法). 試料の微量又はその1滴に5% NP溶液1滴, アセトン1滴を加えてよくふりまぜたのち重炭酸ナトリウム粉末約20~30mgを加え60°で30秒加熱する. 遊離脂肪族一級アミン, その鉍酸塩, アミノ酸及びその他の化合物に対する実験結果を Table K に示す. この反応は常温で放置しても呈色するが, 加熱により反応が促進される. ethylenediamine, aminophylline のような還元性の強いアミンは加熱により反応が行き過ぎ, アミンが酸化され退色するから加熱は避けた方がよい. この反応は sodium pentacyanoferroate, Sodium pentacyanoammineferroate 及び sodium pentacyanonitriteferroate では生成しない.

Table K Color Reaction of Amines, Amino Acids and Other Compounds with Sodium Nitroprusside and Acetone in the Presence of NaHCO<sub>3</sub>.

Compound	Color	Compound	Color
Methylamine. HCl	V~P	Hydrazine. 2HCl	O
Buthylamine. HCl	V~P	Phenylhydrazine. HCl	O~Pink
Amylamine. HCl	V~P	Semicarbazide. HCl	Pink
2-Aminopropane	V~P	Isonicotinic acid hydrazide	RO
Ethylenediamine (aminophylline)	V~P	Guanidine. H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	O
Glucosamine. HCl	V~P	Creatine	Pink~O
Benzylamine	V~P	Barbituric acid	ft-O
(II). 1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	V~P	Antipyrine	1-O
Phenyl-ω-diaminopropane. HCl	V~P	5-Nitrofurfural semicarbazone	OY
Phenylethylamine	V~P	5-Nitrofurfuridene-aminoguanidine. HCl	O
Glyocol	V~P	Aniline	Br
<i>l</i> -Leucine	V~P	<i>p</i> -Anisidin	dk-G
<i>l</i> -Isoleucine	V~P	Anthranilic acid	ft-YBr
<i>dl</i> -Cystine	V~P	<i>m</i> -Phenylenediamine. HCl	ft-BrY
<i>l</i> -Methionine	V~P	Diphenylamine	1-O
<i>l</i> -Lysine	V~P	Thiourea	dk-O
<i>dl</i> -Valine	V~P	Thioglycolic acid-Na	1-O
<i>dl</i> -Threonine	V~P	Phenylthiourethane	ft-O
<i>l</i> -Glutamic acid	V~P	<i>p</i> -Acetaminobenzaldehyde thiosemicarbazone	dk-Y
<i>l</i> -Aspartic acid	V~P	Potassium xanthogenate	Y
<i>l</i> -Arginine. HCl	V~P	Nitrobenzene	1-O
<i>l</i> -Phenylalanine	V~P	<i>m</i> -Dinitrobenzene	1-O
<i>l</i> -Tyrosine	P	Phenol	O
<i>dl</i> -Tryptophane	P	Resorcinol	O
<i>l</i> -Histidine. HCl	V~P	Vaniline	ft-BrY
Diethylamine. HCl	BrO	Ethylalcohol	1-O

Compound	Color	Compound	Color
Piperidine	BrO	Glycerol	O
Dibenzylamine	1-O	Formaldehyde	O
(I). HCl	1-O	Acetaldehyde	O
(II). HCl	1-O	Benzaldehyde	O
N-Benzylaniline	1-O	Acetone	1-O
N-Ethylpiperidine	1-O	Acetophenone	1-O
<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde	O	Acetic acid	ft-O
Pyridine	ft-OY	Benzoic acid	O
Hydroxylamine. HCl	Pink	Ethyl acetate	O

実験10. ニンヒドリン及び炭酸ナトリウムによる ephedrine (II) の呈色反応. (II) 塩酸塩に1%ニンヒドリン. アルコール溶液2滴, 各種濃度の炭酸ナトリウム溶液1滴を加えて最大濃色が得られるまで沸騰水浴中で加熱する. その実験結果を Table X に示す. 炭酸ナトリウム溶液濃度が0.1%~0.05%のときは炭酸ナトリウムを加えない場合より濃い紫色を呈し, 0.5%以上の濃度のときは呈色が弱まるか, 又は全く紫色を呈しなくなることが判明した.

Table X Color Reaction of Ephedrine with Ninhydrine and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Amine	Concentration of Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> solution					
	2 N	1 %	0.5%	0.1%	0.05%	non
(II). HCl (0.4mg)	1-Br	ft-Br	VP~VR	int-V	int-V	V

実験11. ニンヒドリン及びピリジニンによる ephedrine (III) の呈色反応 (検出法). 試料の微量又はその1滴に1%ニンヒドリン. アルコール溶液2滴, ピリジニン1滴を加え沸騰水浴中で最大濃色が得られるまで加熱する. (III), adrenaline 及びアミノ酸に対する実験結果を Table XI に示す. 試料が(III), adrenaline 及びアミノ酸の場合は紫色を呈する.

確認限度: (III) 塩酸塩 3γ.

(II) は脂肪族一級アミンであるためニンヒドリン又は上記のニンヒドリン-ピリジニン法で紫色を呈するが, その呈色は初め淡褐橙色, ついで赤紫色, 紫色と呈色するが, その呈色の度合は(III)に比較して可成り弱く, 且つ紫色を呈するのに(III)より長時間を要する. 60γ程度でも淡褐紫色を呈するので一応(II)との判別に際しては注意を要する.

Table XI Color Reaction of Some Amines and Amino Acids with Ninhydrine and Pyridine

Compound	Color	Compound	Color
(I). HCl	BrY	<i>l</i> -Lysine. HCl	V
(II). 1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Br~VBr	<i>l</i> -Glutamic acid	V~P
(III). HCl	V	<i>l</i> -Methionine	V
Adrenaline bitartrate	V	<i>l</i> -Phenylalanine	V
<i>l</i> -Leucine	V	<i>l</i> -Arginine. HCl	V
<i>dl</i> -Valine	V	<i>l</i> -Histidine. HCl	V~P

## 総括

1) 1-phenyl-2-methylaminopropane (I), 1-phenyl-2-aminopropane (II) 及び ephedrine (III) は次亜臭素酸ナトリウムとピリジンで赤色～紅色を呈する。

2) (I) は炭酸ナトリウム・アルカリ性下、ニトロプルシッドナトリウム及びアセトアルデヒドで青色を呈する。確認限度：(I) 塩酸塩 10 $\gamma$ 。この呈色反応は脂肪族二級アミンに特有の反応である。

3) (I) は炭酸ナトリウム・アルカリ性下、フェリシアン化カリウム及びニトロプルシッドナトリウムで反応後、塩酸性としフェニルヒドラチンの添加により赤色～橙色を呈する。この呈色反応は I の N-メチル基の反応である。

4) (II) に 5% ニトロプルシッドナトリウム 1 滴とアセトン 1 滴及び 20～30 mg の重炭酸ナトリウムを加え 60° で 30 秒間加温すると赤紫色を呈する。この呈色反応は脂肪族一級アミン (遊離塩基及び塩類) 及びアミノ酸に特有の反応である。

5) (II) 及び (III) は 1% ニヒドリン・アルコール 2 滴、ピリジン 1 滴と加熱すると紫色を呈する。確認限度：(III) 塩酸塩 3 $\gamma$

## 文献

- 1) 安達：日化 71, 566, (1950).
- 2) 化学実験学 反応篇 1 133頁, (昭和19年).
- 3) Fuson, Bull. Chem. Rev. 1935, 275.
- 4) Piñol: Rev. asoc. bioquim. argentina 16, No. 65, 32, (1949).
- 5) Fujiwara: Sitz. Nat. Ges. Rostock, 6, 33, (1916).  
Cole: J. Biol. Chem. 71, 173, (1926).
- 6) 阪本：薬誌 71, 173, (1951).
- 7) Levin: Ber. 32. 3388 (1899).
- 8) Feigl, Anger: Microchim. Acta, 1, 138 (1937).
- 9) 青木, 岩山：薬学研究 23, 273, (1951).
- 10) 長沢：「覚せいアミン剤の検出法」ケミカルタイムス, 14号, 235頁, (昭和29年8月)。「覚せい剤試験法」公衆衛生年報, 1, 142, (1953).
- 11) 日局Vのエフェドリンの実性反応。
- 12) Meigh [Nature, 170, 579, (1953).] はメチルアルコール飽和ヘプタンを使用した。
- 13) Perrine: J. Org. Chem. 16, 1303, (1951). 於勢, 吉村：日本薬学会, 近畿2月例会講演, (昭和29年).
- 14) Rimini: Bull. Soc. Chim. France (3), 20, 896 (1898).
- 15) Paget, Desodt: Ann. Pharm. France, 7, 442, (1949).
- 16) Mnastero: J. Am. Pharm. Assoc. 42, 332, (1952). 牧：日化 73, 737, (1952).
- 17) 大熊：薬誌 75, 232, (1955).
- 18) Keller, Ellenbogen: J. Pharmacol. Exptl. Therapy. 106, 77, (1952).
- 19) Illing: Analyst, 65, 3, (1940).  
Rathenasinkam: Analyst, 76, 115, (1951). ibid, 77, 135, (1952). 長沢, 大熊：第8回日本薬学会大会, 分析化学部会講演 (昭和30年4月).
- 20) Feigl: Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. 410, (1938).
- 21) Eeigl: ibid. 414, (1938).
- 22) Merley, Bueding: J. Lab. Clin. Med. 33, 371, (1948).  
Pesetz, Poirier: Bull. soc. chim, France, 1953, 754.
- 23) Rimini: Annali. France et Chim. 1898, 193.
- 24) Legal: Jahresber. uber Fortschr. Chem. 1883, 1648.

- 25) Bremner, Kenten : Biochem. J. 49, 651, (1951).
- 26) Wachsmuth : J. pharm. Bel. [N.S]. 4. 186, (1949).
- 27) 山岸 : 薬誌 74, 1233, (1954).
- 28) 未発表データ.
- 29) 日局Ⅵの調製法による.

### Summary

1) 1-Phenyl-2-methylaminopropane (I), 1-phenyl-2-aminopropane (II), and ephedrine (III) color red to scarlet with sodium hypobromide and pyridine.

2) (I) colors blue with sodium nitroprusside, acetaldehyde, and sodium carbonate. limit of detection being 10 $\gamma$  of (I). This is a characteristic coloration for aliphatic secondary amines (free and salts).

3) (I) colors red to orange with potassium ferricyanide, sodium nitroprusside, and sodium carbonate, and then hydrochloric acid and phenylhydrazine.

4) (II) colors reddish violet with 1 drop each of 5% sodium nitroprusside and acetone and 20-30 mg. of sodium hydrogen carbonate followed by 30 seconds warming at 60°. Limit of detection being 50 $\gamma$  of (II) sulfate. This is a characteristic coloration for aliphatic primary amines (free and salts) and amino acids.

5) (II) and (III) colors violet on heating with 2 drops of 1% alcoholic solution of ninhydrine and 1 drop of pyridine. Limit of detection being 3 $\gamma$  of (III) hydrochloride.

Received April 15, 1955

## 覚せい剤及びその類似化合物の識別について

板井 孝信, 井下田 浩, 神谷 庄造, 石垣 和子

## On the Detection and Identification of Amphetamine and its Analogs.

By Takanobu ITAI, Hiroshi IGETA, Shōzō KAMIYA and Kazuko ISHIGAKI

**まえがき** 近来, 覚せい剤の取締りが強化され, これらの類似体を識別する必要が起つてきた。現在の覚せい剤の試験法<sup>1)</sup>は青木<sup>5)</sup>及び長沢, 大熊等<sup>2)</sup>の研究を骨子として成立して居る。試みにこの試験法で類似体の試験を行つて見ると, Table 2 に於ける如く, 赤血塩とニトロプルシッド・ナトリウムによるメチルプロパミンの呈色反応では, この他に4種類の類似化合物が同様な呈色反応を呈する。又, 次亜臭素酸ナトリウムとピリジンによる反応は, ほとんどすべてのアミンに陽性である。故に呈色反応のみではこれらの類似体を識別することは困難である。又交感神経興奮剤アミンのペーパークロマトグラフィによる分離検出は既に報告<sup>3), 4)</sup>もあるが, それらの Rf 値が接近したり又各々のペーパークロマトグラムを識別する検出反応にとぼしい状態である。このため, 我々は現在, 覚せい剤として指定されて居るプロパミン及びメチルプロパミンの他にオルトキシソ, フェニルエチルアミン, フェニルエチルメチルアミン, デメチルプロパミン, フェニルエチルデメチルアミン, エフェドリン, メチルエフェドリンの9種類についてペーパークロマトグラフィで分離確認する方法を研究し良好な結果を得たので報告する。なお, これらの類似化合物の確認のために, Table 3 の如く種々の塩を作つてその融点を測定したので, あわせて報告する。

## 実験の部

## (1) ペーパークロマトグラフィによる分離検出

1) 溶媒について n-ブタノール:エタノール:水, n-ブタノール:酢酸:水, n-ブタノール:ギ酸:水, アンモニア性ブタノール等の他にピリジソ, コリジソ, フェノール, ベンゼソ, トルエソ, クロホルム等20種余の溶媒について検討した結果, アルカリ性の溶媒及びn-ブタノール系の溶媒は, その Rf 値及びスポットの出具合が良好でなく Table 1 の如く酸性の溶媒が良く, トルエソ:酢酸:水(40:40:5)及び(40:40:10)が良好であつた。使用溶媒は調製後, 3日以上放置して使用し, 展開は3.5時間位で30cm以上上昇するから時間的に便利である。

液端が不明の場合が起るから, かゝる場合は紫外線で判定後検出反応を行う。

2) ペーパークロマトグラムの検出と確認限度 現在行われて居る覚せい剤の特異反応及び一般的な反応をペーパークロマトグラフィに応用すべく検討した。各々の検出反応及び確認限度は Table 2 のようで, プロパミンについてはジアゾ化した $\alpha$ -ニトロアニリン<sup>3)</sup>, メチルプロパミンについては, 従来用いられて居る青木法<sup>5)</sup>を検討して, このペーパークロマトグラムの検出に応用した。又先に国立衛試法として報告されたエフェドリンのニンヒドリン-ピリジソによる検出法<sup>2)</sup>も応用して3 $\gamma$ まで検出可能である。ブロム・フェノール・ブルー<sup>6)</sup>によると全部は黄色の地に青色のスポットを与える。次に各々の検出法を述べる。

1. ジアゾ化 $\alpha$ -ニトロアニリン<sup>3)</sup> 0.25gの $\alpha$ -ニトロアニリンを水浴上加熱しつつ, 25ccのN-塩酸に溶解し, エタノールで50ccとした液10ccを氷冷しつつ亜硝酸ナトリウム0.1gを加えて溶解し, 直ちにスプレイする。
- 2, 3分後, これを2%アルコール製カリ液中に浸せば赤色のスポットとして5 $\gamma$ まで検出可能である。
2. 青木法<sup>5)</sup> 風乾した濾紙片を15~20%炭酸ナトリウム液に浸し, 過剰の試薬を濾紙で除き, 次で50%アセトアルデヒド・アルコール溶液及び新製の1%ニトロプルシッド・ナトリウム溶液中に順次浸すか, 又はスプレイすれば青色のスポットを得る。青木法特有の呈色を保持するには30 $\gamma$ 以上の試料が必要である。20 $\gamma$ 位のときは赤紫色で10 $\gamma$ 位のときは桃色である。
3. ニンヒドリン-ピリジソ反応<sup>2)</sup> 0.25%ニンヒドリンアルコール溶液とピリジソの同量を直前に混和しスプレイ後, 100~110°に2~3分熱すれば紫~赤紫色に呈色する。
4. Dragendorff 試液<sup>7)</sup> 普通の Dragendorff 試液である。スプレイ後, 水洗すればスポットの位置は判別し

易い。

5. ニンヒドリン反応 0.2gのニンヒドリンを5ccの水酢に溶解しn-ブタノールで100ccとした液をスプレイ後、2~3分間加熱すれば紫色のスポットを得る。

6. ブロムフェノールブルー 0.04%に95%アルコールに溶解したものである。

(II) 塩について 常法に従つて各々のアミンより塩をつくる。プロパミンは硫酸塩の他は、結晶困難である。

### 総 括

覚せい剤の確認にさいして、現在行われて居る呈色反応のみでは Table 2 の如く同様な反応を呈するので類似化合物の判定は困難である。そのため我々は、

- 1) 検体が単一である場合、種々の塩をつくりその融点をしらべる。
- 2) 微量で且単一でない場合にはペーパークロマトグラフィによつて分離確認する。(この際、対照物質のペーパークロマトグラフィを同時に行う)。

以上、2つの試験法を併用することにより良好な結果を得た。

### 文 献

- 1) 衛生試験法, 犯罪科学試験法, 55, (1953)
- 2) 長沢, 大熊: 薬誌, 74, 235, (1954); ケミカルタイムス, 14, 235, (1954)
- 3) A. Winkström and B. Salvesen: The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 4, 631, (1952)
- 4) 梶本, 佐野: 日本医事日報, 1592, 18, (1949)
- 5) 青木, 岩山: 薬学研究, 23, 273, (1951)
- 6) F. A. Ishwood and C. S. Hans: Biol. J., 55, 824, (1953)
- 7) 刈米, 橋本: 薬誌, 71, 436, (1951).

Table 1. Rf-Values

Side chain	Solvents		n-BuOH		Benzene		Toluene		Toluene	
	n-BuOH	H <sub>2</sub> COOH	50	10	40	40	40	40	40	40
-CH <sub>2</sub> -CH-NH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ·1/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			0.68	40	0.78	40	0.34	40	0.49	40
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> ·HCl			0.62	40	0.48	40	0.21	40	0.40	40
-CH <sub>2</sub> -CH-NH-CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> ·HCl			0.71	10	0.70	10	0.40	5	0.61	10
-CH <sub>2</sub> -CH-NH-CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> ·HCl o. OCH <sub>3</sub>			0.74		0.82		0.53		0.63	
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CH <sub>3</sub> ·HCl			—		—		—		0.36	
-CH <sub>2</sub> -CH-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ·HCl			0.74		0.91		0.31		0.55	
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·HCl			—		—		—		0.30	
-CH-CH-NH-CH <sub>3</sub>   OH CH <sub>3</sub> ·HCl			0.68		0.37		0.28		0.25	
-CH-CH-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   OH CH <sub>3</sub> ·HCl			0.66		0.58		0.30		0.29	

Table 2. Detecting Reactions and their Limits.

Reactions Side chain	Diazotized <i>p</i> -nitroani- line	Aoki's method	Ninhydrin + Pyridine	Dragendorff's reagent	Ninhydrin	0.04% Bromphenolblue	5% Sodium nitro- prusside + Acetone + Sodi- um bicarbonate	Sodium hypobromite + Pyridine	Potassium ferri cyanide + Sodium nitroprusside
$-\text{CH}_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{NH}_2$ $\cdot \text{CH}_3 / 2\text{H}_2\text{SO}_4$	⊕ 5γ	-	+	-	-	⊕	+	+	-
$-\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2$ $\cdot \text{HCl}$	⊕	-	⊕	-	⊕ 2γ	⊕	+	+	-
$-\text{CH}_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_3$ $\cdot \text{CH}_3 \cdot \text{HCl}$	-	⊕ 30γ	-	+	-	⊕	-	+	+
$-\text{CH}_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_3$ $\cdot \text{CH}_3 \cdot \text{HCl}$ $\text{O} \cdot \text{OCH}_3$	-	⊕ 30γ	+	+	-	⊕	-	+	+
$-\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_3$ $\cdot \text{HCl}$	-	⊕ 30γ	-	+	-	⊕	-	+	+
$-\text{CH}_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\cdot \text{HCl}$	-	-	-	⊕ 5γ	-	⊕	-	+	+
$-\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\cdot \text{HCl}$	-	-	-	⊕	-	⊕	-	+	+
$-\text{CH} \cdot \text{CH} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_3$ $\text{OH} \cdot \text{CH}_3 \cdot \text{HCl}$	-	-	⊕ 3γ	+	-	⊕	-	+	-
$-\text{CH} \cdot \text{CH} \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\text{OH} \cdot \text{CH}_3 \cdot \text{HCl}$	-	-	-	⊕	-	⊕	-	+	-

Notes  
+ or -, examined in a test-tube or on spot-test plate.  
⊕, examined on a paperchromatogram.

Table 3. Melting Points of their Salts

Acid Side chain	HCl	HBr	HI	HgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	HAuCl <sub>4</sub>	Picric acid
$-\text{CH}_2\cdot\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\cdot\text{NH}_2$	not cry.	—	—	—	—	—	—
$-\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{NH}_2$	217° white scaly cry.	257~259°	267°	*163°~166° white scaly cry.	253~255°	98°~100°	167°
$-\text{CH}_2\cdot\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_3$	172° white prisms	*134° needles	—	150~153° white needles	213°~214° orange yellow feathers	127~128°	146~149°
$-\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_3$	156~157° white scaly cry.	*132~136° white scaly cry.	113~115°	*171~172° white needles	225~226°	—	141~143°
$-\text{CH}_2\cdot\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_2$	182° white prisms	—	*148~149° white needles	—	*163~165°	*156°	*139~140°
$-\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_2$	205° white scales or needles (hygroscopic)	—	108°	—	206~208° orange yellow scales	*117~120 yellow needles	136° yellow needles
$-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}\cdot\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_3$	218~222° white scales or plates	—	155~156° prisms	—	184~186° yellow needles	130~131° scales or needles	—

\* unknown in literatures.

### Summary

For the purpose of identifying the Central Stimulants, the use of the present color reactions alone is not sufficient. Because the analogous compounds produce similar color reaction, and it is difficult to distinguish each other. (Table 2) Then, besides above mentioned color reactions, we worked as follows, and got good results.

1) When the sample contained two or more ingredients in small quantity, we separated them by paperchromatography method, using a control substance. Then many color reactions were used on their chromatograms. (Table 2)

2) When the sample contained only one compound, we prepared its various salts and identified them by their melting points. (Table 3)

Received April 30, 1955

パルビツール酸類の定量法 (第1報) 中和滴定法, 硝酸銀滴定法  
ならびに紫外部分光分析法 (その1)

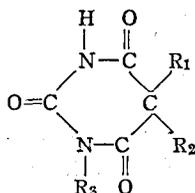
板井 孝信, 大場 琢磨

The Assay Methods of Barbiturates. I

By Takanobu ITAI and Takuma ŌBA

まえがき 日本薬局方, 国民医薬品集及び外国薬局方に収載されているパルビツール酸類の名称とその定量法を調べると次の如くである (Table I). 名称はその記載のまゝとする。

Table I. Barbiturates in Pharmacopoeias and the Others.



Name	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	-R <sub>3</sub>	Pharmacopoeia	Assay Method
1. Allylbarbituric acid	-CH <sub>2</sub> -CH:CH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	N. N. R.	Alkalimetry
2. Allobarbitalum	"	-CH <sub>2</sub> -CH:CH <sub>2</sub>	"	J. P.	"
Diallyl barbituric acid	"	"	"	N. N. R.	"
3. Amobarbital	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	"	N. F., F. N. J.*	None
4. Aprobarbital	-CH <sub>2</sub> CH:CH <sub>2</sub>	-CH·(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	"	N. N. R.	Alkalimetry
5. Barbital	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	"	U. S. P.	None
Barbitone	"	"	"	B. P.	"
Barbitalum	"	"	"	I. P.	"
Barbitalum	"	"	"	J. P.	"
6. Butethal	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ·CH <sub>3</sub>	"	"	N. N. R.	Alkalimetry
7. Cyclobarbital		"	"	"	"
8. Ethyl hexabitalum		"	"	J. P.	"
9. Hexobarbiton	"	-CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	B. P.	None
Methylhexabitalum	"	"	"	J. P.	"
10. Methylphenobarbitone		-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	"	B. P.	"
Mephobarbital	"	"	"	N. N. R.	Electrometry
11. Metharbital	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	"	"	"	U. V Spectrophotometry, semi-micro Kjeldahl.
12. Pentobarbital	-CH·(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ·CH <sub>3</sub>	"	H	N. N. R.	Gravimetry
"	CH <sub>3</sub>	"	"	F. N. J.	None
13. Phenobarbitone		"	"	B. P.	None
Phenobarbital	"	"	"	I. P.	"
Phenobarbitalum	"	"	"	J. P.	"

\* F. N. J. 第二改正国民医薬品集

以上の定量法を分類すると

- (1) 重量法：遊離酸をクロロホルム、エーテル等の溶媒で抽出して重量を秤量する。
- (2) 中和法：イミド基の水素1原子とナトリウム1原子とが置換する方法で、0.1N NaOH で滴定する。指示薬で終点を決める。
- (3) 電流滴定法：(2)と同様、中和法を行い電流を測定して終点を決める。
- (4) 紫外部吸収スペクトル法：特定波長に於ける吸光度を測定する。
- (5) セミマイクロキールダール法：総窒素を測定する。

その他の方法。

(6) 硝酸銀滴定法：イミド基の水素がメチル化されていない時は、硝酸銀に対して一塩基酸又は二塩基酸として反応する。

(7) 非水溶液滴定法：有機溶媒に溶かし、適当な滴定液で滴定する。

著者等は次の三つの方法の検討を行った。

- i) 中和法：バルビツール酸類は何れも解離度が非常に小さいので指示薬による変色も極めて漸進的であるため、中和点をはつきり見分けられない欠点がある。
- ii) 硝酸銀滴定法：液外及び液内指示薬を用いて硝酸銀で滴定。
- iii) 紫外部吸収スペクトル法：強アルカリ溶液中に於て、吸光度を検討し、定量を行った。

### 実験の部

i) 中和法 日局のアロバルビタールの定量法に従つて試料約0.5gを精秤し、アルコール25cc及び水25ccの混液に溶かし、指示薬としてチモールフタレインを7滴加え、N/10NaOH溶液で滴定した。同時にpHを測定した。

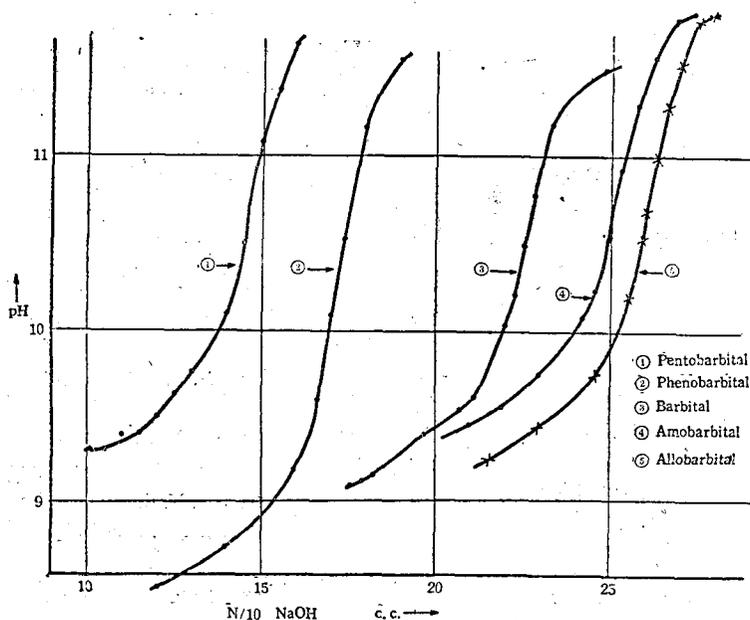


Fig. 1. pH curves of alkalimetry

Table I. Results by Alkalimetry

Sample	Results %			
Barbital	100.3	101.2	101.1	100.6
Phenobarbital	98.8	102.0	102.6	102.0
Pentobarbital	100.2	101.8	98.7	100.6
Allobarbital	102.1	100.9	101.3	100.9
Amobarbital	101.9	100.7	101.5	102.0

又 Fig. 1 よりチモールフタレインの変色点の pH は 10.3~10.7 で、この時の NaOH 所要量の差は 0.4cc である。試料 0.5g をとる時には N/10NaOH の所要量は約 20cc であるから、その誤差は 0.4/20 即ち 2% で、局方の定量法として検討の余地があると思われる。又 pH 曲線の傾斜はいずれも大差ない。此事から日局に於てアロバルビタールのみ中和法を用いられている事も検討されるべきである。指示薬のチモールフタレインの終末点は明瞭でないで、pH10.5 附近に変色点をもつ双色性指示薬として、フェノールフタレインとニールブルー (Diethylamino-aminonaphthophenazonium,  $C_{20}H_{20}N_3O \cdot SO_4H$ ) の混合指示薬を用いて滴定を試み好結果を得た (Table II)。この指示薬はフェノールフタレインの 0.05% アルコール溶液 25cc とニールブルーの 0.1% アルコール溶液 50cc とを混合し N/10 NaOH 1.6cc を加える。終末点は青色が段々と薄くなり、藍色になり、やゝ赤味を帯びる所で明瞭である。

Table II. Alkalimetry with Phenolphthalein-Nileblue as Indicator

Sample	Results %		
Barbital	100.4	99.7	100.7
Phenobarbital	100.1	100.4	100.6
Allobarbital	99.8	99.3	99.1
Amobarbital	101.0	98.4	99.5

## ii) 硝酸銀法

(A) 液外指示薬法、バルビツール酸類の銀塩がクロム酸銀より易溶である場合当量点以前にクロム酸銀の赤沈を生じて定量出来ない。掛見、真田氏は硼砂溶液を用いて弱アルカリ性とし、硝酸銀が定量的に解離し又生じた硝酸は硼砂によつて中和され指示薬としてのクロム酸カリの鋭敏度が阻害されないと報告している。又コルトフ氏はクロム酸銀の溶解積  $2 \times 10^{-12}$  に比較して硝酸銀の溶解積  $3.6 \times 10^{-8}$  とは大なる距りがあり、且弱酸の塩の溶液としては最大である。従つてバルビタールの銀塩の溶解積がその中間に存在し定量が可能となると報じている。定量法は試料約 0.1g を精秤し、5% 硼砂水溶液 25cc を加え加熱して溶解する。この熱溶液に N/10 硝酸銀を滴下して煮沸し、暫く静置して得られる澄明液 1 滴を取出し、之に 5% クロム酸カリ 1 滴を加え、赤変する時を終末点としている。2 モルの  $AgNO_3$  は 1 モルのバルビツール酸に相当する。実験の結果、液外指示薬法は時間がかかりやや正確さを欠く様であつた。

(B) 液内指示薬法、P. Charanne 氏等<sup>2)</sup>は試料約 0.6g を精密に取り、1N・酒精カリ液 7cc に溶解し水 33cc を加え、硼酸 0.45g を加え加熱して硼酸を溶解し冷後 10% クロム酸カリ溶液 1.5cc を指示薬として加え、N/10 硝酸銀を以て滴定している。別に沈降性炭酸カルシウム 2g、水 55cc、指示薬 1.5cc を混合した黄濁の比較液を作り、之と色が異つた所を終末点とする。1 モルの  $AgNO_3$  は 2 モルのバルビツール酸に相当する。実験の結果、本法は終末点の判別が明白であり、液外法よりも優れていると思われる。しかし、フェノバルビタールの場合には硼酸を 1.2g 用い、ペントバルビタール及びヘキサバルビタールの場合には沈澱を生じないので比較液には沈降性炭酸カルシウムを加えないでよい。

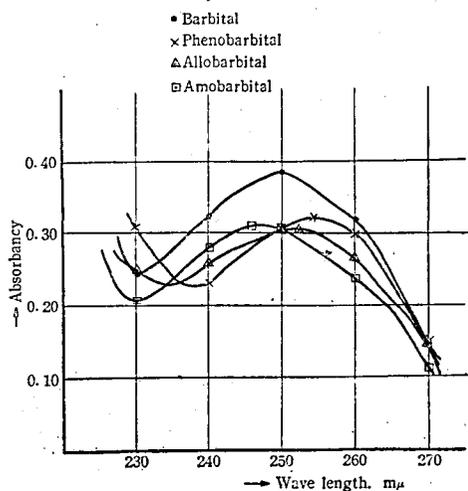
iii) 紫外部吸収スペクトル法 バルビツール酸類の紫外部吸収スペクトル測定は、初めて Metharbital (1953年 版 N. N. R.) について定量法として記載されたが今後各々の確認試験、定量法に用いられると思われる。Goldbaum

氏3)4) は数種のパルビツール酸類を pH10.5 の緩衝溶液中と 0.45N 苛性ソーダ溶液中との吸光度を測定し、その波長 260m $\mu$  の時の差が濃度に比例すると報告している。著者等はアルカリ溶液中に於ける吸光度を測定した所、それはアルカリ濃度に著しく敏感に作用することを知つた (Table IV)。パルビタールの濃度は同一でも、苛性ソーダの濃度の変化と共に最大吸光度とそれを示す波長が変化する。

Table IV Relation between Conc. of NaOH and Max. Absorbancy of Barbital Solutions

pH	Conc. of NaOH (%)	Max. Absorbancy	Wave Length (m $\mu$ )
7.6	0.0004	0.446	213
10.2	0.0024	0.580	240
10.5	0.004	0.550	240
10.8	0.044	0.508	240
12.0	0.124	0.442	241
13.0	0.404	0.355	250

Fig. 2. Ultra-Violet Absorption Spectra of Several Barbiturates



そこで、アルカリ濃度を正確に定めることにより簡単に定量を試みた。先ず NaOH 溶液の濃度を丁度 N/10 にした。この時のファクターは少くとも 1.00 の桁迄に調節する必要がある。試料 0.100 g を正確に秤取し N/10NaOH 溶液に溶解し 100cc とし、この 1 cc を取り更に 100cc に稀釈しこの溶液の吸光度を測定した (Fig. 2)。Table V には各々の最大吸光度とその時の波長との関係を示す。

Table V. Max. Absorbancy and Wave Length of Several Barbiturates

Sample	Max. Absorbancy	Wave Length (m $\mu$ )
Barbital	0.385	250
Phenobarbital	0.324	254
Allobarbital	0.302	252
Amobarbital	0.311	246

Methylhexabital はアルカリ溶液中で極めて不安定のため溶液調製後時間と共に吸光度は変化するので不適當である。

次に各々の特定波長に於て、試料の濃度と吸光度の関係を測定した結果、Fig. 3 に示す如く、ランベール・ベールの法則によく従つた。

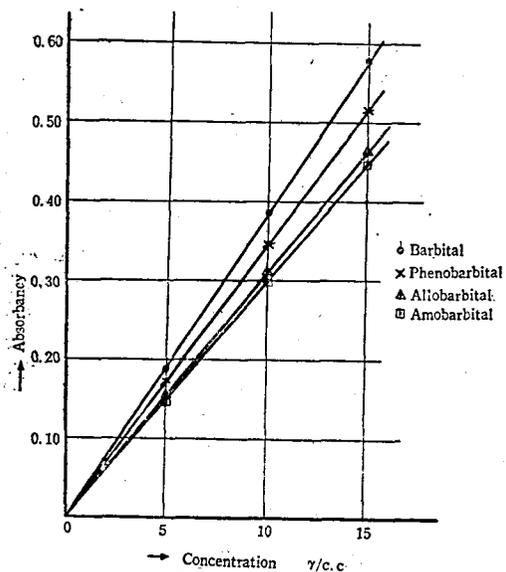
実際に各々の定量を試みた所、Table VI の如き結果を得た。

Table VI. Determination of Barbiturates

Sample	Taken (mg)	Absorbancy	Found (mg)	Found (%)
Barbital	110.0	0.435	113.0	102.8
Allobarbital	103.0	0.307	101.6	101.4
Amobarbital	108.4	0.339	106.6	98.4
Phenobarbital	90.0	0.330	92.5	102.5

上表の如く精度がよくないので、本法は未だ検討の必要があると思う。

Fig. 3. Relation between Absorbancy and Concentration.



### 総 括

- (1) 中和滴定法: 中和滴定の pH 曲線はいずれもゆるい傾斜をもち、指示薬として普通チモールフタレインを用いているが、その終末点は判然としないために誤差が入り得るので問題がある。
  - (2) 硝酸銀滴定法: 液外指示薬法でも滴定は可能であるが、液内指示薬法の方が終末点が判り易い。
  - (3) 紫外部吸収スペクトル法: アルカリの濃度により、吸光度が著るしく変化するので、精度が悪い。
- 以上のバルビツール酸類の定量法の中では、硝酸銀液内指示薬法が最もよいと思われる。

ベックマン D U 型分光器使用に際し、便宜を計られた太幡・塚本両技官に謝意を表す。

### 文 献

- (1) 掛見喜一郎, 真田幸良: 薬学研究, 16, 246 (1948)
- (2) P. Charanne et al: Ann. pharm. frans., 11, 91 (1953)
- (3) L.R. Goldbaum: J. Pharmacol. Expt. Therap., 94, 68 (1948)
- (4) L.R. Goldbaum: Anal. Chem., 24, 1604 (1952).

### Summary

Alkalimetry, Argentometry and Ultraviolet absorption spectrophotometry for the assay of several barbiturates were examined. As the results,

- (1) Alkalimetry: End point used thymolphthalein was not so clear that 2% error occurred, and pH curves were sharpless.
  - (2) Argentometry: Internal indicator method was superior to external indicator method.
  - (3) Ultraviolet absorption spectrophotometry: In strong alkali solution (N/10, pH13.1), barbiturates was determined except methylhexabital, but accuracy was low.
- Argentometry using internal indicator was better than the others.

Received April 30, 1955

## バルビツール酸類の定量法 (第2報) 非水溶液滴定法 (その1)

板井 孝 信, 佐 子 茂

## The Assay Methods of Barbiturates II. Titration in Non-aqueous Solutions.

By Takanobu ITAI and Shigeru SAKO

まえがき Fritz<sup>2)</sup> は多くのエノール類がジメチルホルムアミド, 或はエチレンジアミン中チモールブルー等を指示薬とし, 0.1N ナトリウムメチラートで酸として滴定される事を報告して居り, Vespe, Fritz<sup>10)</sup> は多くのバルビツール酸系医薬品を, やはりジメチルホルムアミド中, チモールブルーを用い, 0.1N ナトリウムメチラートで滴定して居る. Ryan 等<sup>9)</sup> はバルビツール酸類の滴定に同じ溶媒指示薬を用いて 0.1N-リチウムメトオキシドで滴定すると, 滴定中に沈澱が出来ないでよいと述べている. 又 Rolf Heiz がバルビツール酸類をピリジン中ガラス-アンチモン電極により電位差滴定又はチモールブルーとフェノールフタレインを指示薬として滴定している.<sup>11)</sup>

現在, 純粋なジメチルホルムアミドを比較的多量入手する事は困難なので, 著者等は容易に入手出来る溶媒中で指示薬を用いて, バルビツール酸類を酸として滴定する事を試みた.

これまでに多くの溶媒, 指示薬が用いられたが, 著者等の目的の参考となるものとしては, 次の如きものがある.

古く Folin 等<sup>1)</sup> は, 多くの酸類がベンゼン, トルエン, クロロホルム, 四塩化炭素中, フェノールフタレインを指示薬とし, 0.1N ナトリウムエチラート無水エタノール溶液, 及びナトリウムアミラート無水アミルアルコール溶液で酸として正確に滴定される事を指摘している. Moss 等<sup>6)</sup> は, 弱酸性物質がエチレンジアミン中では強酸の如く作用し, ナトリウムアミノエトオキシド-エチレンジアミン溶液で滴定される事を示して居る. Fritz 等<sup>5)</sup> は, 多くの弱酸性物質をベンゼン-メタノール, ブチルアミン, ピペリジン, アセトニトリル, ピリジンを溶媒とし, チモールブルー-メタノール溶液を指示薬として, 0.1N ナトリウムメチラートベンゼン-メタノール溶液で滴定して居り, 比較的酸性が弱い物質に対し, ベンゼン-メタノールが好ましい溶媒である事を発見した. Fritz, Keen<sup>3)</sup> は, ジメチルホルムアミド, エチレンジアミン, アセトニトリル, アセトンを溶媒とし, アゾバイオレット, オルトネトロアニリンを指示薬として, フェノール類をナトリウムメチラート或はカリウムメチラートで滴定している. 又ジメチルホルムアミド, ブチルアミンを溶媒とし, アゾバイオレット, チモールブルーを加えてスルホン酸アミド誘導体を酸としてナトリウムメチラートで定量出来る事を報告している.<sup>4)</sup> Palit<sup>7)</sup> はグリコール系溶媒と炭化水素との混合溶媒を発表している.

著者等は指示薬としてはチモールブルーを用い, 溶媒はベンゼン, メタノール, ピリジンの中から適当なものを選んで, 0.1N ナトリウムメチラートで滴定する事とした. Riddick<sup>8)</sup> の綜説にも混合溶媒が単一溶媒より, 溶解度, 指示薬による色の変化, 電位差滴定に於ける滴定曲線の変化に於て一般に優れて居る事が述べられているので, ピリジン以外は, ベンゼン-メタノール (3:1), ピリジン-メタノール (1:1), ベンゼン-ピリジン-メタノール (1:1:1) の混合溶媒とし, 安息香酸を用いて電位差滴定により滴定曲線を描き, 鋭敏な当量点を示すものを選んでバルビツール酸類の滴定溶媒とする事とした.

## 実 験 の 部

**試薬と溶液** 検体 市販品を硫酸デシケーター中乾燥; 安息香酸 カロリー測定用品; ベンゼン 精製しナトリウムで乾燥; メタノール ナトリウムを加えて蒸溜; ピリジン (特級) を水酸化カリウムで乾燥, 蒸溜する.; ベンゼン-メタノール ベンゼン3容メタノール1容; ベンゼン-ピリジン-メタノール 1:1:1; ピリジン-メタノール 1:1; 0.1N ナトリウムメチラート Fritz<sup>5)</sup> の方法による. もし作った液が二層に分れる時はメタノールを加えると均一層となる.; チモールブルー溶液 チモールブルーをメタノールに飽和させる.

**滴定法** 0.1N ナトリウムメチラートの標定には安息香酸を用いる. 安息香酸及び検体は 0.1N ナトリウムメチラートが 4~8 cc 消費されるように取り, 溶媒 30cc に溶かして 10cc の自動ビュレットを用いて 0.1N ナトリウムメ

チラートで滴定する。ピリジン中ではチモールブルー2滴、その他の溶媒では4滴用い、濃青色を終末点とする。溶媒は予め30ccに対しチモールブルー1滴を加え緑色となるまで0.1N ナトリウムメチラートを加えて中和しておく(ベンゼン-メタノールでは殆んどその必要がない)。滴定中は攪拌には磁気攪拌器を用い、 $H_2O$ ,  $CO_2$ を遮る為容器の口はビュレット等の先が入る穴をあけた板で蓋をしておく。バルビタール、ペントバルビタールは終末点の標準色を作つて置き、それと比較して終末点を決める。溶媒の選択にはガラス電極 pH 計(甘汞電極-高アルカリ用ガ

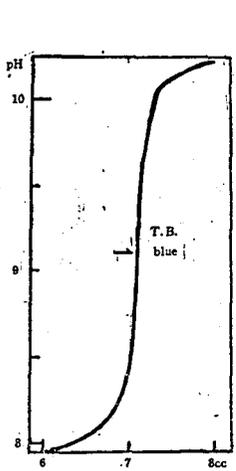


Fig. I. Titration of Benzoic Acid in Benzene-Methanol with 0.1N Sodium Methoxide.

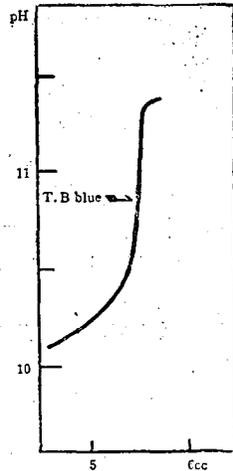


Fig. II. Titration of Benzoic Acid in Pyridine with 0.1N Sodium Methoxide.

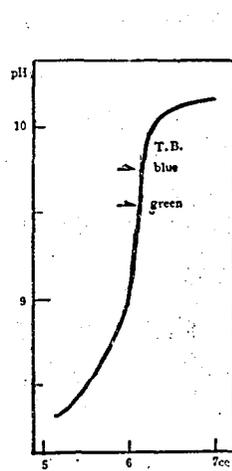


Fig. III. Titration of Benzoic Acid in Benzene-Pyridine-Methanol with 0.1N Sodium Methoxide.

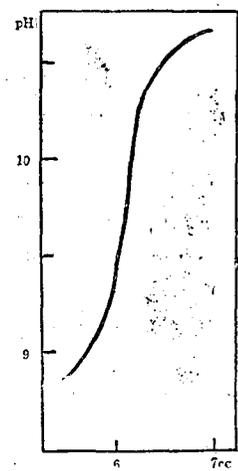


Fig. IV. Titration of Benzoic Acid in Pyridine-Methanol with 0.1N Sodium Methoxide.

Table I Titration of Barbiturates in Benzene-Methanol

Compound	Taken (g)	Base (cc)	N. of Base	Recovery %
Barbital	0.1111	5.37	0.1122	99.9
	0.1203	5.81	0.1122	99.8
	0.1020	3.69	0.1480	98.6
	0.1127	4.10	0.1480	99.2
	0.1091	3.97	0.1480	99.2
Phenobarbital	0.1233	4.77	0.1121	100.7
	0.1194	4.62	0.1121	100.7
	0.1218	4.70	0.1121	100.4
	0.1101	3.22	0.1480	100.5
	0.2037	5.94	0.1480	100.2
Amobarbital	0.1185	4.63	0.1121	99.1
	0.1227	4.83	0.1121	99.9
	0.1113	4.94	0.0991	99.5
	0.1099	4.89	0.0991	99.8
	0.1007	4.46	0.0991	99.3
Allobarbital	0.1294	5.51	0.1122	99.5
	0.1224	5.24	0.1122	100.0
	0.1000	4.28	0.1122	100.0
Pentobarbital	0.1242	4.84	0.1122	98.9
	0.1192	4.62	0.1122	98.4
	0.1223	4.75	0.1122	98.6

Table II Titration of Pentobarbital in Pyridine

Compound	Taken (g)	Base (cc)	N of Base	Recovery %
Pentobarbital	0.1209	4.44	0.1201	99.8
	0.1160	4.34	0.1190	100.8
	0.1120	4.19	0.1190	100.7

ラス電極)を用いて、電位差滴定を行う。各溶媒に安息香酸約80mg位を正確に秤つて溶かし、滴定曲線を書きその鋭敏度を比較した。この時チモールブルーも加えておき色の变化も比較してみる。

結果 安息香酸の電位差滴定に於て、Fig.4の如くピリジン-メタノール(1:1)はあまりよい当量点を示さず、殊にチモールブルーの変色点は、はつきりしないので目的の溶媒としては用いられない。他の三者はFig 1~3の如く共にはつきりした当量点を示す。特にピリジンはチモールブルーの変色が鋭敏であるが、滴定中Fritz<sup>5)</sup>が誤差の原因となると述べているゲル状の沈澱を作る(電極にゲル状物が附着してpHを測定し難いが、指示薬の変色には悪影響ないように思われる)ので、バルビツール酸類の滴定にはベンゼン-メタノール(当量点でのpHの飛躍最大)を用いた。Table Iに示す如くこの溶媒中バルビタール、フェノバルビタール、アモバルビタール、アロバルビタール、ペントバルビタールが滴定された。ペントバルビタールは変色点が非常に見わけ難くよい値が得られないが、ピリジン中で滴定すると比較的はつきりと終末点が示され、Table IIの如くよい値が得られた。バルビタールもベンゼン-メタノール中で明瞭な変色点を示さないが、終末点の標準色と比較する事により辛じて滴定出来る。残りの三者は正確に定量出来た。

この実験により、バルビツール酸類の中、比較的酸性の強いものはベンゼン-メタノール中で、又酸性の弱いものはピリジン中で、チモールブルーを指示薬とし、0.1N ナトリウムメチラートベンゼンメタノール溶液で滴定される事が示された。

## 文 献

- 1) Folin O., Flanders F. F. : J. Am. Chem. Soc., 34, 774 (1912)
- 2) Fritz J. S. : Anal. Chem., 24, 674 (1952)
- 3) Fritz J. S., Keen R. T. : Anal. Chem., 25, 179 (1953)
- 4) Fritz J. S., Keen R. T. : Anal. Chem., 24, 303 (1952)
- 5) Fritz J. S., Lisicki N. M. : Anal. Chem., 23, 589 (1951)
- 6) Moss M. L., Elliott J. H., Hall R. T. : Anal. Chem., 20, 784 (1948)
- 7) Palit S. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 18, 246 (1946)
- 8) Riddick J. A. : Anal. Chem., 24, 41 (1952)
- 9) Ryan J. C., Yanowski L. K., Pifer C. W. : J. Am. Pharm. Assoc., 43, 656 (1954)
- 10) Vespe V., Fritz J. S. : J. Am. Pharm. Assoc., 41, 197 (1952)
- 11) Heiz R. C. A., 46, 6551 (1952); Dansk Tids Farm., 26, 69 (1952).

## Summary

We investigated the titration of barbiturates in nonaqueous solutions using a visual end point. Phenobarbital, allobarbital, amobarbital, barbital, and pentobarbital were titrated in benzen-methanol with 0.1N sodium methoxide, using thymol blue indicator. The former three could be accurately titrated. Barbital could be titrated comparing the colour of the solution with the standard colour solution which was made by mixing pure barbital and the calculated amount of 0.1N sodium methoxide. Pentobarbital gave a definite end point in pyridine, but an indefinite end point in benzen-methanol.

Received April 30, 1955

## 逆性石鹼について (1) 燐タングステン酸による定量

吉村 淳, 守田 実

Studies on Invert Soaps (1) Gravimetric Determination  
with Phosphotungstic Acid

By Kiyoshi YOSHIMURA and Minoru MORITA

**まえがき** 最近逆性石鹼の用途が激増し極めて薄い濃度のものが使用されるようになって来たので、それに相応しい定量法を考究した。逆性石鹼の定量法としては、赤血塩溶液を作用させて附加化合物を作り、濾過後、過剰の赤血塩をヨードメトリーで滴定し定量する U. S. P. *XV* 及び第二改正国民医薬品集の方法、又過剰の重クロム酸カリウムを作用させて同じく濾過後、過剰の重クロム酸カリウムをヨードメトリーで滴定し定量する方法<sup>1)</sup>があるが、是等の方法は検体を比較的少量に必要とする。又色素類と結合する事を利用して種々の比色法或いは光度計による法等の定量法<sup>2)</sup>がある。又コバルトロダニドと特異的な青色化合物を作りこれをクロロホルムに溶かして行う比色定量法<sup>3)</sup>があるが此の方法は操作が繁雑である。其の他アルキルサルフェイト又はアルキルサルフォネイトを逆性石鹼で適定する方法<sup>4)</sup>及びライネツケイトで沈澱を作り重量分析する方法<sup>5)</sup>等がある。

**本論** 著者等は逆性石鹼について研究を行うに当り、Benzalkonium Chloride (塩化ベンザルコニウム) について、それが燐タングステン酸と沈澱を生ずる事を見出し、これを用いて比較的少量の試料を重量法により定量し得る事を確めたのでここに報告する。燐タングステン酸が各種の四級アンモニウム化合物、例えば、Choline, Acetylcholine,  $\alpha$ -Methylcholine 等と沈澱を生じる事及びそれらを分析に应用到する事については既に 1930 年の文献<sup>6)</sup>に現れている。

著者等は種々の濃度の Benzalkonium Chloride に燐タングステン酸を作用させ、その際の試薬の量、放置時間、沈澱洗滌用の水の量、pH 等につき検討した。

約 0.4% の Benzalkonium Chloride の溶液 5 cc に 2% 燐タングステン酸を作用させたところ Fig. 1 に示すように 3 cc 以上で沈澱の生成量は一定になるので、試料が更に高濃度の場合を考えて 4% 燐タングステン酸溶液 5 cc を用いる事にした。更に pH により沈澱の生成状態が大いに影響されるが、約 0.4% の試料溶液 5 cc を入れたもの 5 本に夫々 4 N, 3 N, 2 N, N の硫酸及び蒸留水を 5 cc づつ加え、更に 4% 燐タングステン酸溶液を同じ

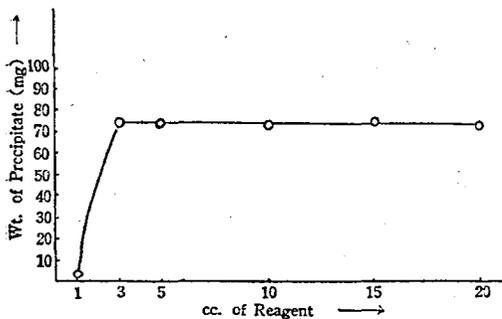


Fig. 1 Effect of Amt. of Reagent

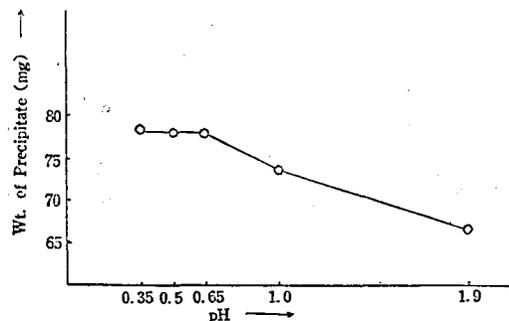


Fig. 2 Effect of pH

く 5 cc づつ加えて反応させたところ Fig. 2 に示すような結果を得たので 2 N 硫酸を用いる事にした。又 Table 1 及び Table 2 の結果より解るように放置時間の長短及び沈澱洗滌用の水の量はあまり影響がない。但し Table 3 より明らかなように温度は影響するので氷水で冷して反応させるようにした。

Table 1 Effect of Length of Standing Period

Time (min)	Wt. of Ppt. (mg)
15	78.1
30	78.2
120	78.1

Table 2 Effect of Amt. of Water for Washing

Amt. of Water (cc)	Wt. of Ppt. (mg)
20	77.5
40	77.4
60	77.5
80	77.4
100	77.3

Table 3 Effect of Temp.

Temp. (C°)	Wt. of Ppt. (mg)
0	78.6
15	78.3
25	76.8
40	76.2

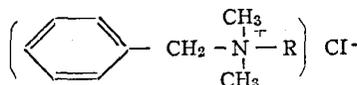
実験の部

試薬1) 4% 燐タンゲステン酸溶液 (燐タンゲステン酸はメルク製分析用) (2) 2N 硫酸

標準液 Benzalkonium Chloride の10%水溶液をうすめて約1%の溶液を作り、これの5ccをとり、セミミクロゲルダール法で3回窒素を定量しそれらの平均値をとり、これより逆算して Benzalkonium Chloride の濃度を決め順次うすめて約0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%の7種の溶液を作り是等の5cc宛をとり、2N 硫酸5ccを加え氷水中で冷却し、これに4%燐タンゲステン酸溶液5ccを加えてよくふりませ、更に時々ふりませ乍ら15分以上氷水中に放置しついで予め乾燥し秤量したガラスフィルター (口径約22mm 高さ約35mm のるつぼ型) に沈澱を移して後洗滌する。そして吸引濾過後、減圧硫酸デシケーター中で乾燥する。この乾燥は3時間も行えば十分である。

此の様にして7種の濃度の Benzalkonium Chloride について実験を行つた結果は Table 4 のようになる。是等のデータをもとにして最少自乗法で回帰式を求めると、 $Y = 0.2889X$  となる。更に本法を Alkyltrimethylammonium Chloride (以下 ATAC と略す) に応用するために ATAC の溶液を、過剰の重クロム酸カリウムをヨードメ

Table 4 Benzalkonium Chloride



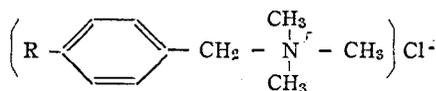
Av. Mol. Wt. 357.33  
R : C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> ~ C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>

Amt. of B. C. (mg)	0	2.85	5.71	11.41	22.83	34.24	45.66	57.07	
Wt. of Precipitate (mg)	0	9.3	19.4	39.1	77.5	80.3	117.8	157.8	196.4
		9.5	19.1	38.5	80.0	79.6	120.1	156.3	195.9
		9.9	19.7	39.6	80.0	78.7	120.5	158.7	199.7
				38.4	78.9	79.2			
			39.1	80.5	80.6				
				79.4	78.5				

$Y = 0.2889 X$  Y : Amt. of B. C. X : Wt. of Precipitate

トリーで定量する定量法 (ATAC の Maker である Oronite Chemical Company の規格も本法によつている) により3回定量してその平均値より濃度を求め、順次うすめて7種の濃度の溶液を作り実験を行つた。所で此の場合には pH を更に小さくしないと微量の試料の場合には沈澱が不完全である事を見出したので前記の2N 硫酸のかわりに4N 硫酸を用いる事にした。それ以外の操作は Benzalkonium Chloride の場合に準じた。その結果は Table 5. のようになる。これより最少自乗法で  $Y = 0.2387 X$  という回帰式を得る。

Table 5 Alkylbenzyltrimethylammonium Chloride



Av. Mol. Wt. 358  
R : C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>~C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>

Amt. of ATAC(mg)	0	2.50	5.00	10.00	20.00	30.00	40.01	50.01	
Wt. of Precipitate (mg)	0	10.0	21.0	43.0	76.4	81.5	119.7	157.3	191.9
		10.9	20.5	44.1	82.8	85.4	119.7	155.9	193.9
		10.3	19.9	40.0	80.3	80.6	117.6	154.7	196.0
		10.0	19.4	41.0	80.8	81.4	125.4	158.7	199.6
					90.0	87.5			

$$Y = 0.2387 X \quad Y : \text{Amt. of ATAC} \quad X : \text{Wt. of Precipitate}$$

### 総 括

Benzalkonium Chloride 及び ATAC の濃度を算定する為に前者に於いてはセミマイクロセルダール法, 後者に於いては, 重クロム酸カリウム法 (Maker の定量法) で夫々計算し一応の値を定めたがもとよりこれは便宜上のもので, 将来もつと純粋な標準品が得られるならばそれをもとにして定量を行えばよい. 本法により定量する場合あまり試料が少いと誤差が大となるが, 20mg 附近で定量するならば Benzalkonium Chloride の場合は誤差 2% 以内で充分微量分析として使用出来る. ATAC の場合は沈澱の濾過性が稍悪くなり誤差も大きくなるが著者等の行つた実験では 9% 以内であつた. 尚グラスフィルターなるものは Maker によつて規格が必ずしも一致しないので一般的な事は言えないが, 大阪の I 製作所のものに就いて言えば 2 号以上のものならば使用可能である.

本法は比較的微量の試料を定量出来, 操作も簡単で, 而も何等特殊の装置を必要としない.

### 文 献

- 1) Flotow, E. : Pharm. Zentralhalle, 83, 181~5 (1942); C. A., 37, 4857 (1943).
- 2) Auerbach, M. E., : Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 15, 492 (1943); Ibid., : 16, 739 (1944); Colichman, E. L., Anal. Chem., 19, 430 (1947); Epton, S. R. : Nature, 160, 795 (1947); Gain, J. F. and Lawrence, C. A., : Science, 106, 525 (1947)
- 3) 青木 大他 : 医薬品試験法の研究, 第 4 輯 51 (1954)
- 4) 青木, 岩山 : 1954 年薬学会近畿支部 1 月例会にて発表
- 5) Wilson, J. W. : J. A. O. A. C. 37, 379-81 (1954)
- 6) Lematte, L. et al : Compt. rend., : 191, 1130-2 (1930); C. A., 25, 657 (1931).

### Summary

Invert soaps, such as Benzalkonium Chloride or Alkylbenzyltrimethylammonium Chloride, give water-insoluble precipitates with phosphotungstic acid in acid solution.

Experiments were carried out to investigate effects of pH, of length of standing period, of amounts of reagent, and the like.

By the method presented here, we found that a small amount (20 mg or so) of sample could be determined gravimetrically.

Received April 19, 1955

## マーキュロクロム中の不溶性水銀の定量 (セレン硫化物の分析的応用)

北川 純 男, 八 木 諄 子

## Determination of Metallic Mercury in Mercurochrome.

By Sumio KITAGAWA and Syunko YAGI

マーキュロクロム中の不溶性水銀化合物は主としてジヒドロキシメルキュリ化合物より遊離した金属性水銀よりなるという<sup>1)</sup>。従つて水銀が微細な粒子となつて析出することも考えられる。この様な場合の水銀粒子の捕獲が困難で、良い分離方法が少い。

Nordlander<sup>2,3)</sup> は水銀蒸気の検出に硫化セレンが非常に鋭敏で硫黄の数百倍の感度があることを報告している。著者らは硫化セレンを用いてマーキュロクロム中の不溶性水銀を分離する目的で、種々の条件について検討を行ったところ、充分水銀の定量に供し得ることを知つた。

即ち、亜セレン酸  $H_2SeO_3$  に過剰の硫化アンモニウム溶液を加え、析出した沈澱 (硫化セレン) を溶解させて得た液は水銀と黒色の沈澱を生ずる。これはセレン化水銀、硫化水銀、硫黄、セレン、及び水銀よりなると思われるもので、このものは発煙硝酸、硝酸と酸化剤、或は王水と加熱することにより溶解させ得る。著者らは、水銀を硝酸塩となし、ロマン滴定を行った。本法によると局方の規格の限度を越える傾向があり、従来の方法では水銀の損失があつたのではないかと考えられる。

## 実 験 の 部

## 試薬及定量

**硫化セレン溶液の調製:** 亜セレン酸 (試薬 1 級品) 0.1g を局方アンモニア水 (10%) 1 cc に溶解し、局方硫化アンモニウム試液で 50cc とする。暗赤橙色の液で、着色瓶に遮光して冷所に保存するときは数ヶ月使用に耐える。

**マーキュロクロム:** マーキュロクロムは局方の試験に適合し、その不溶性水銀化合物は、日本薬局方の方法に従つて滴定を行い、N/10J-液の消費数 0.4~0.38cc のものである。

**定量法:** マーキュロクロム 2.0~2.5g を水 50cc に溶解し、1 夜放置後、硫化セレン溶液 5~15cc を加えて 30~60 分後、No. 4 のグラスフィルターで濾過し、沈澱を水で洗滌し、発煙硝酸 10cc と加熱して沈澱を溶解し、水 30cc で稀めて冷後 N/50 又は N/100  $NH_4SCN$  液で滴定を行う (指示薬: 硫酸第二鉄アンモニウム液)。

## 硫化セレンと水銀の反応条件の検討

**硫化セレン溶液の量について:** 硫化セレン液の添加量の影響について検討を試みた。即ち、マーキュロクロム 2g を水 50cc に溶解し、1 夜放置した液について硫化セレン溶液を 5, 10, 15cc 宛を加えて、30 分後前記の定量法に従つて沈澱を濾過、溶解せしめ、N/50- $NH_4SCN$  液で滴定を行った。それらの結果は第 1 表の如くである。硫化セレン溶液は 10cc 及 15cc の場合でも変化はないものと考えられ、10cc を加えることで充分と思われる。

## マーキュロクロムの溶解と硫化セレン溶液添加の

**時期:** マーキュロクロム中の金属水銀はジヒドロキシメルキュリ化合物の分解で生ずるものであるから、マーキュロクロム溶解後、遊離水銀の析出が完了した後硫化セレン溶液を加える必要がある。しかし、第 2 表の如く二三の条件について行つた結果では、マーキュロクロム溶解後 1 夜放置して硫化セレン溶液を加える必要がある。又、沈澱の濾過には No. 3

のグラスフィルターを使用した場合は非常に小さい値で、これは水銀の沈澱がフィルターを通過することによるものらしく、濾過操作には No. 4 のグラスフィルターを使用すべきである。又、一夜放置後、日局の方法に準じ遠心分離をなし、不溶性水銀を分離、マーキュロクロムの色の消える迄水洗、遠心分離をなした後、硫化セレン溶液を加えて反応させたものは若干滴定値が低い。これは遠心分離、水洗等の操作中、水銀を損失するものと考えられる。

第 1 表 硫化セレン溶液の量の影響

マーキュロクロム g	硫化セレン溶液* cc	N/50 $NH_4SCN$ 消費数 cc
0.2	5	2.46
0.2	10	2.50
0.2	15	2.49

\*  $H_2SeO_3$  0.1g を局方  $(NH_4)_2S$ -試液 50cc に溶解

マーキュロクロムに対する反応について； 硫化セレン溶液がマーキュロクロム自体と反応するか否かについて検討を行った。即ち、マーキュロクロム 2g を水 50cc に溶解し、一夜放置後遠心分離し、その上澄液 40cc について硫化セレン溶液 10cc を加え、上の方法と同様に操作し、N/50  $\text{NH}_4\text{SCN}$  液で滴定を行った。その結果は第3表に示した如く全く反応が見られなかつた。従つて本法は金属性水銀の分離に充分利用し得るものと思われる。

第2表 マーキュロクロムの溶解と硫化セレンの反応

マーキュロクロム g	滴 定 液		硫化セレン溶液の添加
	N/100 $\text{NH}_4\text{SCN}$	消費数cc	
2.5	N/100- $\text{NH}_4\text{SCN}$	5.5	試料溶解後1夜放置後添加
"	"	4.75	" " *
"	"	0.75	" , No. 3 グラスフィルター使用
"	"	5.60	" 2 昼夜放置後添加
"	"	3.36	" 1 時間放置後 " "
"	"	0.73	" 直ちに添加

\* 1夜放置後、遠心分離し、上澄液を除き、残渣に試薬を加える。

第3表 不溶性水銀と硫化セレンの反応時間について

反 応 時 間 (時)	マーキュロクロム				空 試 験	
	0.5	1.0	1.5	2.0	0.5	1.0
N/50 $\text{NH}_4\text{SCN}$ 消費数cc	2.84	2.72	2.80	2.83	0.0	0.0

不溶性水銀と硫化セレンとの反応時間の関係； マーキュロクロム液調製後1夜放置し、硫化セレン溶液 10cc を加え、30分より120分の間について反応させ、試薬の反応に必要な時間について検討を行った。それらの結果は第3表に記載した通りで、30分或は60分間反応させることで充分である。

結果及考察 本試薬はマーキュロクロムと反応することなく、痕跡の金属性水銀と反応し、黒色の複雑な組成の沈澱を生ずる。従つて、日局の遠心分離及沃素滴定で捕獲し難い微細な粒子の金属水銀も定量し得る沈澱型を得るものである。然して、今回の報告の如きロマンメトリーによりその微量の水銀を定量することは精度を低くする恐れがあるが、今後比色法、電気的滴定法等の利用によりその精度を高め得るものと考えられる。

一方局方のマーキュロクロムの不溶性水銀の試験に適用する場合、その試験方法及規格と併せ考えるとき充分ロマンメトリーの精度で利用し得るものと考えられる。

## 文 献

- 1) 長瀬, 大野: 薬学研究, 20, 261 (1948)  
同 : 昭和24年薬学会総会
- 2) B. W. Nordlandor: Ind. Eng. Chem., 19, 518 (1927)
- 3) F. Feigl: Spot Tests, vol. 1, p. 336 (1954), Elsevier Publishing company.

## Summary

We studied on a new available method for determination of metallic mercury in a insoluble matter of mercurochrome (I) in J.P. VI. The reagent, selenous acid dissolved in excess of ammonium sulfide solution in J.P. VI, reacted with mercury in I resulting a black precipitate. This precipitate, which was composed mainly of mercuric selenide and mercuric sulfide, was dissolved by heating with fuming nitric acid and titrated with a rhodanate solution.

Received April 19, 1955

## タンニン酸アルブミンに対する含糖ペプシンの消化能

喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 伊藤酉一, 遠藤勝

## Studies on the Digestive Power of Saccharated Pepsin to Albumin Tannate

By Ichirōemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Yūichi ITO and Masaru ENDO

まえがき 局方タンニン酸アルブミンの J.P. VI. 消化試験を行うに際して非常に実験誤差が生じ易い。そこでその原因と考えられる諸点につき検討し知見を得たので報告する。

消化度の測定には局方規定の消化残渣を測定する方法, 並びに蛋白消化液中の分解アミノ酸(チロジン)の量を比色により測定する2法を比較しながら用いた。後者はカゼイン分解物中のチロジンの定量法に種々<sup>1)2)3)4)</sup>あるうちのアンソン法を準用した方法で, これによつて通常タンニン酸アルブミンの製造原料とせられるカゼインが, 消化される状態, 及び反応中に振盪等の外的影響がもたらす結果等が比較的簡易に検出し得られた。尚試験用の含糖ペプシンの消化効力による影響も検討した。

## 実験方法及び結果

(1) 含糖ペプシンに依るカゼインの消化度 (カゼインの比色定量) *Hammarsten Casein* (Merck 製) 1.5g を精秤し蒸留水及び稀塩酸 1 cc を加え, 水浴中にて加温溶解させて全量を 100cc とする。之をカゼイン原液とし, pH 1.8 の水 (水 100cc + 稀塩酸 1 cc) にて稀釈して, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0, 10.5, 12.0, 13.5, 15.0 mg/cc の各カゼイン溶液をつくる。各カゼイン溶液 1 cc に含糖ペプシン溶液 (500mg の含糖ペプシンを pH1.8 の水に溶かし全量を 100cc とした液) 1 cc を加え, 3 時間 40° の恒温水槽に浸漬し, 消化反応後 2 cc の 0.4M-三塩化酢酸溶液 (TCA 試薬) を加えて振盪して酵素反応を停止させ, 10 分間放置後析出する沈澱を濾去し, 濾液 1 cc に 0.4M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 20cc, 五倍稀釈フォーリン試薬 1 cc を加えて振盪混和し, 35° の恒温槽に 20 分間浸漬し, 呈色する色をフィルター-S66 を用いて光電管比色計にて比色し Fig. 1 を得た。

(2) 含糖ペプシンによるカゼイン消化の時間的推移 13 本の共栓試験管に含糖ペプシン溶液 (5 mg/cc) 1 cc を取り 40° に保つて, カゼイン溶液 (10.5 mg/cc) 1 cc を添加する。試験管を 20 分毎に一本づつ恒温槽より取り出し, TCA 試薬を加え, 前述の如くにして吸光度を測定すると Fig. 2 が得られた。この実験によりカゼイン溶液に含糖ペプシン液が作用する際, 最初の一時間に殆んど反応が進行してしまう事が確認せられる。

(3) 含糖ペプシンに依るタンニン酸アルブミン消化の時間的推移 局方規定の方法により 3 時間消化させた検体の濾液 2 cc に酢酸鉛試液 (0.4M) 2 cc を加え, 10 分間放置し沈着するタンニンを濾去し, その濾液 2 cc に 0.4M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 液 8 cc を加え 40° の水浴上に 5 分間浸漬して過剰の鉛塩を沈澱させ, その濾液 5 cc を取り, フォーリン試薬 0.5cc を加え 35° の水浴に 20 分浸漬して前法に従い比色する。かくして Table 1, Fig. 3 を得る。別に局方規定に従つて消化残渣を測定する。この値と比色による吸光度と比較すると大凡比例しており, この比色法にて消化度の判定

Fig. 1 The Calibration Curve of Hydrolysed Casein

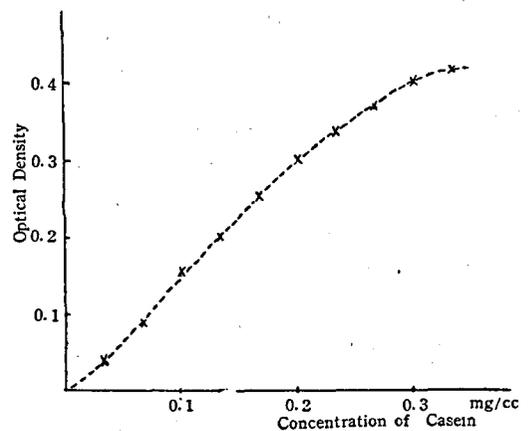
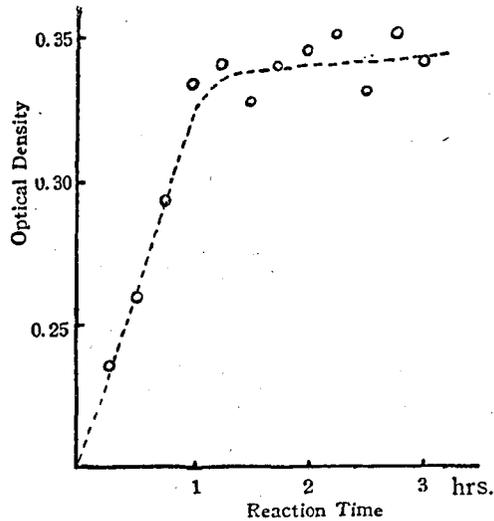


Fig. 2 Influence of Incubation Time on Casein Hydrolysis



をし得る事が解つた。

尚本実験により含糖ペプシンにて消化させた時、タンニン酸アルブミンの消化は大凡、時間に比例する事が視える。従つて局方試験実施の際3時間を厳守して消化させ、反応時間終了の時出来るだけ速やかに濾過操作を実施して、余分の消化をさせない様にしなければならない。しかし実際問題として非常に濾過に時間を要する検体があるので、3時間経過後一旦液温を下げるか、遠心分離して上澄液を去るか、適当な別法を構じて余分の消化を防がなければならない。

Table 1 Amounts of Albumin Tannate Digested in Various Times

	Time of digestion (min)	Condition	J, P, VI test		Optical density
			Undigested amount (g)	Digested amount (g)	
1	20	unstirring	0.714	0.286	0.217
2	40	„	0.688	0.312	0.257
3	60	„	0.666	0.334	0.276
4	80	„	0.640	0.360	0.295
5	100	„	0.628	0.372	0.3122
6	120	„	0.577	0.423	0.344
7	140	„	0.523	0.477	0.360
8	160	„	0.522	0.478	0.405
9	180	„	0.511	0.489	0.375
10	200	„	0.528	0.472	0.390
11	220	„	0.504	0.496	0.470
12	240	„	0.477	0.523	0.580
13	180	stirring every 10 min.	0.355	0.665	0.820
14	180	blank test	0.540	0.460	0.028

(4) 消化反応中の振盪の問題 タンニン酸アルブミンの消化試験の際, USPⅪ, 中華藥典等は最初の間10分毎に揺動する様に記載されているが, 日局, 独局等は3時間静置する様に規定されている。5, 10, 30分毎に揺動したものと, 振盪せずに3時間静置したものとを比べると Table 2 の如くなる。斯の如く振盪の条件によつていちぢるしい差異があるから, 常に一定条件を保たさせる為には現局の如く3時間静置した方がよい。但し充分に検体に消化液が接触し均一に働く様にす為, 最初1分間はゆるく揺動せしめた方がよい様である。

(5) 試験用含糖ペプシンの効力 含糖ペプシンの局方試験を予め行い, 消化残渣量が夫々0.5, 1, 1.5(局方限度), 2.0(不適品) ccの品を使用してタンニン酸アルブミンに作用させ Table 3 の如き結果を得た。これで見られ

Fig. 3 Comparison of the Optical Density by the Tyrosin Method with the Amount of Undigested Albumin Tannate by the Method in J. P. Ⅱ

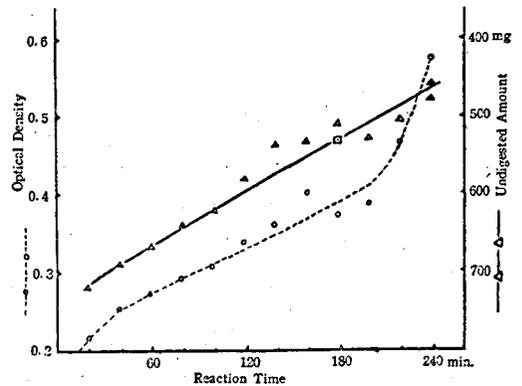


Table 2 Effect of Stirring on Digestion

	Stirring			Unstirring 3 hrs.	Hours for filtration
	every 5 min.	every 10 min.	every 30 min.		
A	0.402	0.407	0.467	0.570	30~40 min
B	0.484	0.426	0.446	0.596	60 min
C	0.472	0.457	0.488	0.567	24 hrs
D		0.335		0.528	30 min

る様に含糖ペプシンの効力が非常に消化量に影響して来るから, 試験実施の際その効力に充分留意せねばならない。

Table 3 On the Activity of Saccharated Pepsin for Use in J. P. Method

	Undigested amount of Egg-Albumin by Saccharated Pepsin (cc.)	Judgment on Sacch. Pepsin (J. P. test)	Undigested amount of Album. Tann. (g)	Optical density
A	0.5	suitable	0.568	0.257
B	1.0	"	0.589	0.237
C	1.5	limit	0.632	0.170
D	2.0	unsuitable	0.657	0.168

(6) 予製した際の含糖ペプシン消化液の効力 含糖ペプシン消化液(含糖ペプシン0.25g, 水100cc, 稀塩酸1cc)を予製しておいて, それを数日後使用する際ペプシン自身が自己消化して酵素力を減退し, タンニン酸アルブミンの試験の際悪影響を及ぼさないかを検討する目的で本実験を行い, Table 4 の結果を得た。即ち冷暗所に保存せる消化液であれば, 効力減退を懸念する必要は余りなく試験結果にそれ程の悪影響が認められなかつた。

Table 4 Stability of Saccharated Pepsin in Solution for Preservation

Days	1	2	3	4	10
Undigest amount	0.568	0.575	0.580	0.572	0.582
Optical density	0.378	0.368	0.352	0.365	

(7) 比色によるタンニン酸アルブミンの消化試験 前述(3)に於てタンニン酸アルブミンの消化濾液中の分解チロジンの比色を行つたが、その吸光度と局方による消化試験の値は、Fig 3に見られる様に大凡比例している。そこで消化液中のチロジンをフォーリン試薬によつて呈色させ、その吸光度を求めて Fig 3によつて消化残渣量を比較的短時間に簡易に測定し得る。

### 総 括

タンニン酸アルブミンの消化試験実施に際し次の諸点に留意する必要がある。

- 1) 含糖ペプシンにてカゼインを消化する際は最初の一時間に反応が始ど完了するに拘わらず、タンニン酸アルブミンは大凡時間に比例し、徐々に消化反応が進行するから現局方の3時間の規定は正確に守り、濾過時間に暇取つてより以上の消化をさせない様留意する事。
- 2) 振盪、その他の原因で消化中に特別に反応が進行するからそれを防ぎ、常に一定の条件を保つ様静置を厳守する事。
- 3) 含糖ペプシンの消化力の強弱によりいちぢるしく影響を受けるから、局方適品の含ペプといえども安心出来ず、より優秀なる常に一定の効力のものを使用せねばならない。その為にペプシンの力価を明確に試験する事。
- 4) 冷暗所に貯蔵するのであれば、含糖ペプシン溶液を予製しておいても、それ程酵素力は減退しないから適時試験に使用する事が出来る。
- 5) 消化濾液をフォーリン試薬によつて呈色させ比色によつて簡易に消化度を測定し得る。

この研究は一部昭和29年度厚生科学研究費によつて行つた。

### 文 献

- 1) Folin, O. and Ciocaltiu, V. : J. Biol. Chem., 73, 6 (1927)
- 2) Anson M. L. : J. Gen. Physiol., 22, 79 (1938)
- 3) Northrop, T.H. : J. Gen. Physiol., 16, 267 (1933)
- 4) 標準生化学実験, 文光堂, 1953, P207
- 5) 衛生試験所報告, 72, 109 (1954).

### Summary

In the digestion test using Sacarated Pepsin for Albumin Tannate in J.P., the experimental error is liable to become large. Therefore, experiments were carried out to investigate the causes of the error.

We modified Anson's method in which trichloroacetic acid-soluble tyrosine produced in hydrolysis is colorimetrically determined. This modified method is available for the digestion test for Albumin Tannate and the amount of digested protein can be found.

We also found the following facts for the digestion test for Albumin Tannate : (1) Albumin Tannate is generally digested in proportion to the digestion period even after three hours, while casein is almost digested in an hour, and (2) the rate of digestion is remarkably affected by external conditions such as stirring and (3) by the activity of Saccarated Pepsin solution which is not so much reduced even after long time of preservation.

Received April 19, 1955

$\gamma$ -B. H. C及びD. D. T水和剤の懸垂液に於ける沈降率の研究

藤井 正道, 佐藤 寿

## Studies on Sedimentoratics of Aqueous Suspensions of the Wettable

Powders Containing  $\gamma$ -B. H. C or D. D. T

By Masamichi Fujii and Hisashi SATO

**まえがき** 防疫用殺虫剤として重要性を認められている $\gamma$ -B. H. C及びD. D. T水和剤は用時水と混合すれば容易に任意の濃度の懸垂液が出来るので大変便利であるが、反面欠点としては時間の経過とともに水中に懸垂している懸垂物(原薬: $\gamma$ -B. H. C, D. D. T等及び稀釈剤:カオリン, ベントナイト, 珪藻土等)が沈降するので、絶えず攪拌していても撒布器のノズル及びパイプ等に沈降物質(懸垂物)がつまり易い。従つて本剤は出来るだけ長時間水中に懸垂物が懸垂していることが必要であり、その為に界面活性剤を約5%前後加えて懸垂物粒子の界面張力を低下させて、水分が充分にこれらの粒子を湿らせて水中に浮遊させるようにしてある。勿論水和剤の粒子を出来るだけ微細にし又強力な界面活性剤を使用すればする程懸垂物が懸垂する時間は長くなる訳であるがそれも一定の限度がある以上、乳剤のように半永久的に懸濁させることは難かしい。何れにしても此等水和剤が水に分散して懸垂液を作る場合、時間と懸垂物との関係)を研究する必要があると考えこゝにその理論及び実験結果を報告する。

**理論の部** 懸垂液の容積をV水の単位容積重量を $\rho_w$ とし、其中に含まれている懸垂物の重量をW, その比重を $\rho_p$ とすれば、最初は十分に攪拌してあるから各部は同濃度であるとする。此の時の単位容積内に含まれる懸垂物の重量はW/Vであり、懸垂物の容積は $W/\rho_p\rho_w V$ である。単位容積は水の容積と懸垂物の容積よりなるから水の容積は $1 - (W/\rho_p\rho_w V)$ であり、水の重量は $\rho_w - (W/\rho_p V)$ である。故に沈降の始まる初期の単位容積重量、即ち懸垂液の見掛比重 $\rho_{so}$ は

$$\rho_{so} = \frac{W}{V} + \left( \rho_w - \frac{W}{\rho_p V} \right) = \rho_w + \frac{\rho_p - 1}{\rho_p} \frac{W}{V} \quad (1)$$

今懸垂液の深さzに於て沈降し始めてから任意の時間 $\theta$ 後に於ける懸垂物の重量と最初にあつた懸垂物の重量との比をRとすると単位容積当り懸垂物の重量はRW/Vとなるから $\theta$ 時間後の単位容積重量、即ちその時の懸垂液の見掛比重 $\rho_{s\theta}$ は

$$\rho_{s\theta} = \rho_w + \frac{\rho_p - 1}{\rho_p} \frac{RW}{V} \quad R = \frac{\rho_p}{\rho_p - 1} \frac{V}{W} (\rho_{s\theta} - \rho_w)$$

故に懸垂液の深さzに於て単位容積当り重量、即ち見掛比重を各瞬間毎に測定すれば懸垂物の沈降曲線が求められる。尚Stokesの法則を適用して此の曲線より懸垂物の粒径分布曲線を得られるが此処では沈降率を求めるのが目的であるから省略する。

懸垂液の見掛比重を測定する方法としては、Wiegnerの連通管法<sup>2)</sup>、Andreasenのピベット法<sup>3)</sup>、浮秤法<sup>4)</sup>、光電管法及び天秤法<sup>5)</sup>、がある。此等の方法は各々一長一短があり何れが最良であるか判定しにくい、比較的容易に測定出来るのは浮秤法である、故に著者は本法を採用して懸垂液の沈降率を求めた。

浮秤(Areometer)は15°Cの水中で1を示すようになっていて、使用に際しては予め15°Cにした液に浮秤を浮遊、静止せしめ毛細管現象で浮秤の軸に上つた液の上端の目盛を読む。但し外国製例えばドイツ製の浮秤は毛細管現象の底面の接線で読まなければならない。

一般に液体(懸垂液をも含める)中での浮秤の読みをrその単位容積重量を $\rho$ とし、15°Cの水の単位容積重量を $\rho_c$ とすれば

$$r = \frac{\rho}{\rho_c} \quad \rho = r\rho_c$$

浮秤が液体中に浮いている時、その重量 $WA$ は浮秤と同容積の液体の重量即ち浮力に等しい。今深さzに於る浮秤の断面積をAとすれば

$$WA = \int \rho A dz \quad (2)$$

A. Casagrande の報告<sup>6)</sup>によれば、 $\rho$ は $z$ の函数であり、約3%の誤差内で次式が成立するという。

$$\rho = C_1 + C_2 z \tag{3}$$

浮秤の読み $r$ はそれが浮いている深さ附近の液体の平均比重 $\rho_c$ を表す。実際にある深さ $zr$ では比重が $\rho_c$ であるから  $r = \rho_c = C_1 + C_2 z r$  (4)

(2)え(3)を代入すれば  $W_A = C_1 \int Adz + C_2 \int z Adz$

(4)より  $W_A = \int (C_1 + C_2 z r) Adz$

故に  $zr = \frac{\int Azdz}{\int Adz}$

上式から浮秤の読みはそれが液体中にある部分の重心に於ける比重を示すことが判る。

次に時間と水和剤の懸垂液との関係を考えることにする。今メスシリンダ中に懸垂液を入れ、15°Cの水中で1を示す浮秤でこの液の平均比重を計るとき、沈降開始後 $\theta$ 分後の平均比重を $\rho_{s\theta}$ とし、此の液の最終的平均比重 $\rho_{s\infty} = \rho_w$ とすれば(水和剤の懸垂液に於ては、僅かの界面活性剤を含む水であるから近似的に水の平均比重 $\rho_w$ に等しい)  $\rho_{s\theta} - \rho_w$ なる差即ち浮秤の読みは現に液中に懸垂している懸垂物の重量 $M\theta$ に起因するものであると考えられる。従つて次式が成立する。

$$M\theta = k (\rho_{s\theta} - \rho_w) \tag{5}$$

$\theta = 0$ に於ける懸垂物の重量 $M_0$ は、(但し $\rho_{s0}$ は $\theta = 0$ に於ける懸垂液の平均比重を示す)

$$M_0 = k (\rho_{s0} - \rho_w) \tag{6}$$

沈降開始後 $\theta$ 分後に沈降した懸垂物の重量 $G\theta$ は、  $G\theta = M_0 - M\theta$  (7)

$\theta$ 分後に於ける懸垂液中の懸垂物の沈降率 $S\%$ は(7)より、

$$\left. \begin{aligned} S(\%) &= \frac{M_0 - M\theta}{M_0} \times 100 \\ &= \frac{G\theta}{M_0} \times 100 \\ &= \frac{G\theta}{M_0 + G\theta} \times 100 \end{aligned} \right\} \tag{8}$$

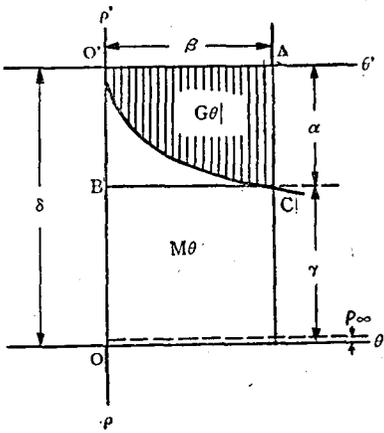


Fig. 1 Sediment curve

次に Fig. 1 に於て  $\theta > 0$  とし

$$\left. \begin{aligned} \rho_{s0} - \rho_w &= |\alpha| \\ \theta &= |\beta| \\ \rho_{s\theta} - \rho_w &= |\gamma| \\ \rho_{s0} - \rho_w &= |\delta| \end{aligned} \right\} \tag{9}$$

とおけば、此のときの懸垂液の沈降曲線の $O'-\theta'\rho'$ 座標に於ける方程式を  $\rho' = -a\theta'^{\frac{1}{2}}$  とすれば交点Cに於ける方程式は原式より

$$|\beta| = -a|\alpha^{\frac{1}{2}}| \tag{10}$$

求むる面積 $O'CA$ 即ち $\theta=0$ から $\theta$ 分後迄に於ける沈降量 $G\theta$ は

$$G\theta = -a \int_0^{|\alpha|} \theta'^{\frac{1}{2}} d\theta' = -\frac{2a}{3} |\alpha \cdot \alpha^{\frac{1}{2}}| \tag{11}$$

(11)へ(10)を代入すれば

$$G\theta = \frac{2}{3} |\alpha\beta| \tag{12}$$

次に $O-\theta\rho$ 座標に於て、 $\theta=0$ から $\theta$ 分後迄に於ける懸垂及び沈降せる即ち全懸垂物の重量 $M_0$ と(8)(9)(12)式とより

沈降率 S%は

$$S(\%) = \frac{G\theta}{M_0} \times 100 = \frac{2}{3} \frac{|\alpha\beta|}{|\delta\beta|} \times 100 = \frac{2(\rho_{so} - \rho_{s\theta})}{3(\rho_{so} - \rho_w)} \times 100 \quad (13)$$

全く同様にして一般に沈降曲線の方程式を,  $\rho' = -a\theta'^n$  (但し  $\theta' > 0$  nは正整数) とすれば,  $G\theta = \frac{n}{n+1} |\alpha\beta|$

となり今  $\frac{n}{n+1}$  をKとおけば

$$\left. \begin{aligned} \rho_{s\infty} &= \rho_w \text{ のときは} & S(\%) &= K \frac{(\rho_{so} - \rho_{s\theta})}{(\rho_{so} - \rho_w)} \times 100 & 1 \geq K \geq \frac{1}{2} \\ \rho_{s\infty} &\neq \rho_w \text{ のときは} & S(\%) &= K \frac{(\rho_{so} - \rho_{s\theta})}{(\rho_{so} - \rho_{s\infty})} \times 100 & 1 \geq K \geq \frac{1}{2} \end{aligned} \right\} \quad (14)$$

実験の部 (1) 実験材料 国内A, B, C, D, E, F社製の $\gamma$ -B. H. C10%水和剤, 国内G社製D. D. T50%, 75%水和剤, 国内H社製D. D. T20%, 70%水和剤及び米国Pest B. Gon社製D. D. T50%水和剤, E社製の界面活性剤を含むキャリアー, 其他のキャリアー, 即ちタルク, カオリン, ベントナイト及び珪藻土何れもタイラー300メッシュ標準篩を通過したものをを使用した。

懸垂液をつくる際の溶媒は蒸留水及標準硬水を, 界面活性剤としてはTritonX-100 (Polyethylene glycol, alkyl aryl ether) を使用した。尚標準硬水はW. H. O規格の硬水即ち炭酸カルシウム2.74g酸化マグネシウム0.28gを2N塩酸の最小量にとかし湯盪上で乾固し蒸留水100ccにとかしその中の10ccをとり蒸留水で1000ccとして製したものをを使用した。蒸留水, 標準硬水共に15°Cで比重1である。

(2) 実験器具 メスシリンダ高さ約30cm, 内径約4cmで250ccの容量に対して目盛をしたもの, 15°Cに保つ為の恒温水槽, 精度1°Cの温度計, 浮秤は比重1.000~1.060及び1.060~1.120のもの。その寸法は次の通り

全長 約16cm; 球部の長さ 約7.5cm; 球部の容積 比重1.000~1.060のもの 約11cc, 比重1.060~1.120のもの約10.5cc; 球部の直径 比重1.000~1.060のもの 約1.5cm, 比重1.060~1.120のもの約1.4cm

(3) 実験方法 I. 国内, 国外全水和剤製品及びキャリアーを蒸留水で5%w/v或は10%w/v濃度の懸垂液とし, これ等を15°Cに保つた恒温水槽内のメスシリンダ中に一定量約250cc入れ激しくガラス棒で攪拌して沈降を防ぎ, 懸垂液が15°Cになった時再びメスシリンダに栓をして1分間十分にふりませた後, 直ちに浮秤を入れ平均比重を測定する。此の操作を数回行ってその平均値を $\theta=0$ に於ける平均比重とする。一方各水和剤の比重をピクノメータにて測定しておき前記の(1)式で計算する。

次にその実験結果をTable 1.に示す。

Table 1. Specific Gravity of  $\gamma$ -B. H. C or D. D. T. Suspension at Initial Time

Name of Sample	Maker	S. G. of Sample	$\gamma$ -B. H. C or D. D. T. Suspension in Distilled Water			
			% (w/v basis) Conc.	Theoretical Value of S. G.	Actual Value of S. G.	Temp. °C
$\gamma$ -B. H. C 10%; Water-Dispersible Powder*	A	2.19	5	1.027	1.028	15
"	B	1.90	"	1.024	1.026	"
"	C	2.03	"	1.025	1.024	"
"	D	1.89	"	1.024	1.026	"
"	E	2.15	"	1.027	1.028	"
"	F	2.13	"	1.027	1.028	"
D. D. T 50%; W. D. P	G	1.66	"	1.020	1.021	"
" 75%; W. D. P	"	1.57	"	1.018	1.018	"
" 20%; W. D. P	H	1.95	"	1.024	1.024	"
" 70%; W. D. P	"	1.57	"	1.018	1.018	"
" 50%; W. D. P	Pest B. Gon	1.63	"	1.019	1.019	"

Name of Sample	Maker	S. G. of Sample	$\gamma$ -B. H. C or D. D. T. Suspension in Distilled Water			
			% (w/v basis) Conc.	Theoretical Value of S.G.	Actual Value of S.G.	Temp. °C
Kaolin	—	2.56	5	1.030	1.030	15
Talc	—	2.46	"	1.030	1.031	"
Bentonite	—	2.02	"	1.025	1.025	"
Silicious Earth	—	1.83	"	1.023	1.024	"
Carrier + Wettable Agent	—	2.20	"	1.027	1.028	"
D. D. T 50%; W. D. P	G	1.66	10	1.041	1.040	"
" 75%; W. D. P	"	1.57	"	1.039	1.036	"
" 20%; W. D. P	H	1.95	"	1.050	1.049	"
" 70%; W. D. P	"	1.57	"	1.035	1.036	"
" 50%; W. D. P	Pest B. Gcn	1.63	"	1.040	1.039	"

\* or Wettable Powder

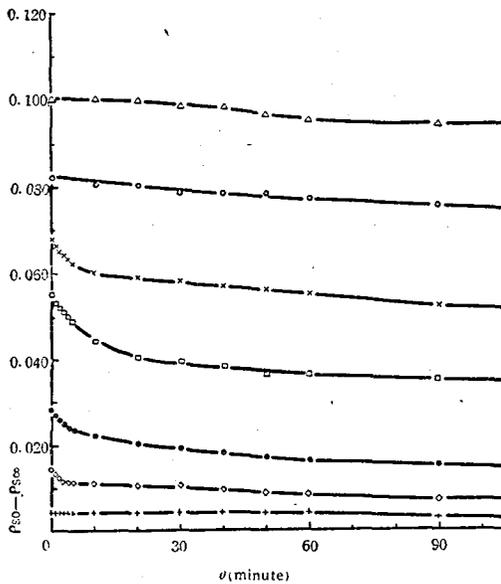


Fig. 2 Sedimentocurves of Various % W/V ( $\gamma$ -B. H. C 10% W. D. P) Suspensions in Distilled Water at Various Times (Sample: Maker E)

- △— 20.0% W/V Suspension
- 15.0% " " "
- ×— 12.5% " " "
- 10.0% " " "
- 5.0% " " "
- ◇— 2.5% " " "
- +— 1.0% " " "

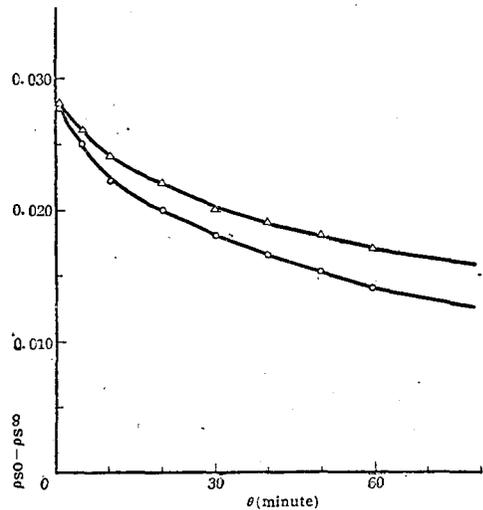


Fig. 3 Sedimentocurves of 5% W/V ( $\gamma$ -B. H. C 10% W. D. P) Suspensions in Distilled Water or Standard Hard Water at Various Times (Sample : Maker A)

- △— in Distilled Water
- in Standard Hard Water

Ⅰ. 懸垂液の  $\theta=0$  に於ける平均比重測定と全く同様の操作で国内E社製の $\gamma$ -B. H. C 10%水和剤を濃度1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 12.5, 15.0, 20.0 %w/vの懸垂液として各々の沈降曲線を求めるとき、得た値  $\rho_{s\theta}$  より  $\rho_{s\infty}$  を減じた値をグラフ紙上のY軸にとり測定時間  $\theta$  分をX軸にとり各点を結べばこれら各濃度に於ける懸垂液の沈降曲線が求められる。尚この場合は近似的に  $\rho_{s\infty}$  は  $\rho_w$  に等しいと考えてよい。次にその実験結果を Fig. 2 に示す。

Ⅱ. 同様に国内A, B, C, D, F社製の $\gamma$ -B. H. C 10%水和剤の5%w/v濃度に於ける各々の沈降曲線を求める。次にその実験結果を Fig. 3, 4, 5, 6, 7 に示す。

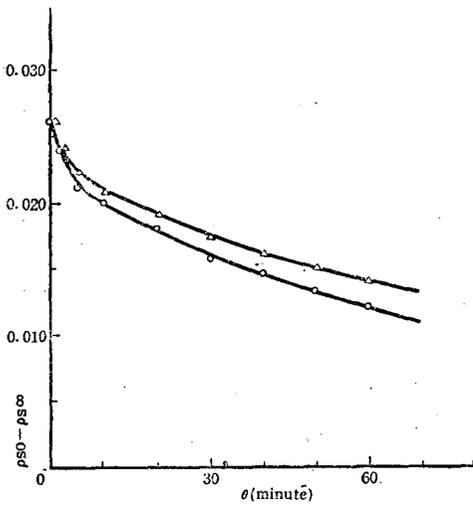


Fig. 4 Sedimentocurves of 5% W/V ( $\gamma$ -B.H.C 10% W.D.P) Suspensions in Distilled Water or Standard Hard Water at Various Times (Sample:Maker B)  
 —△— in Distilled Water  
 —○— in Standard Hard Water

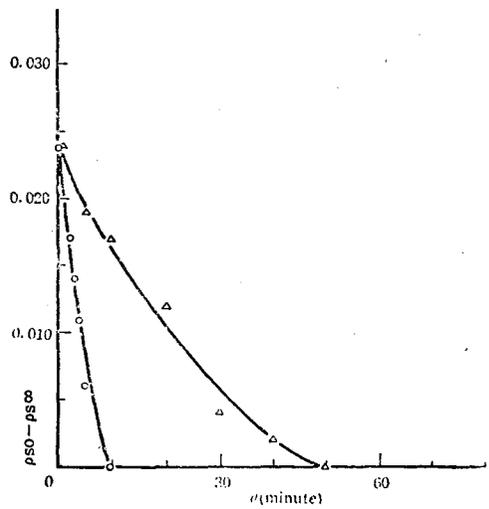


Fig. 5 Sedimentocurves of 5% W/V ( $\gamma$ -B.H.C 10% W.D.P) Suspensions in Distilled Water or Standard Hard Water at Various Times (Sample:Maker C)  
 —△— in Distilled Water  
 —○— in Standard Hard Water

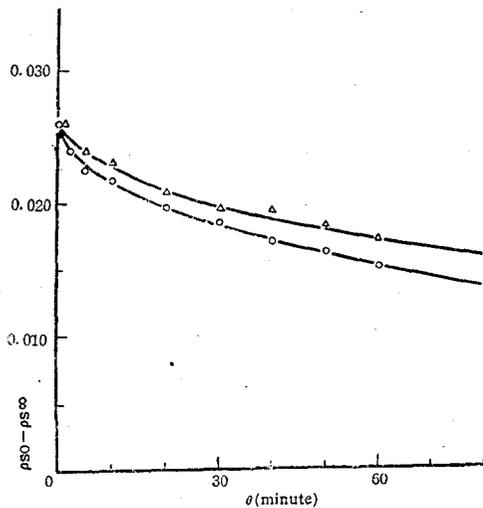


Fig. 6 Sedimentocurves of 5% W/V ( $\gamma$ -B.H.C 10% W.D.P) Suspensions in Distilled Water or Standard Hard Water at Various Times (Sample: Maker D)  
 —△— in Distilled Water  
 —○— in Standard Hard Water

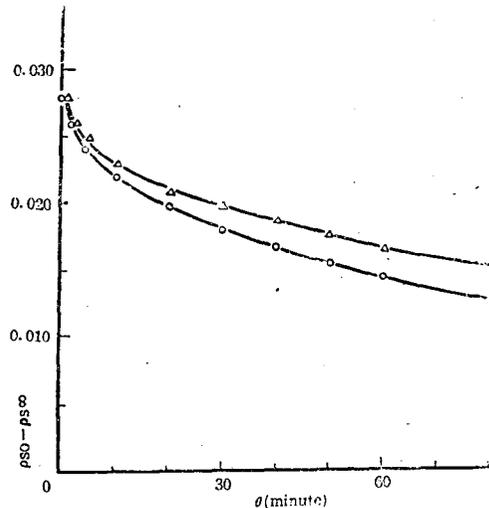


Fig. 7 Sedimentocurves of 5% W/V ( $\gamma$ -B.H.C 10% W.D.P) Suspensions in Distilled Water or Standard Hard Water at Various Times (Sample:Maker F)  
 —△— in Distilled Water  
 —○— in Standard Hard Water

IV. 同様に国内 G, H 社製及び米国 Pest B. Gon 社製の D.D.T 20, 50, 70, 75%水和剤の 5 及び 10%w/v 濃度に於ける各々の沈降曲線を求める。次にその実験結果を Fig. 8 に示す。

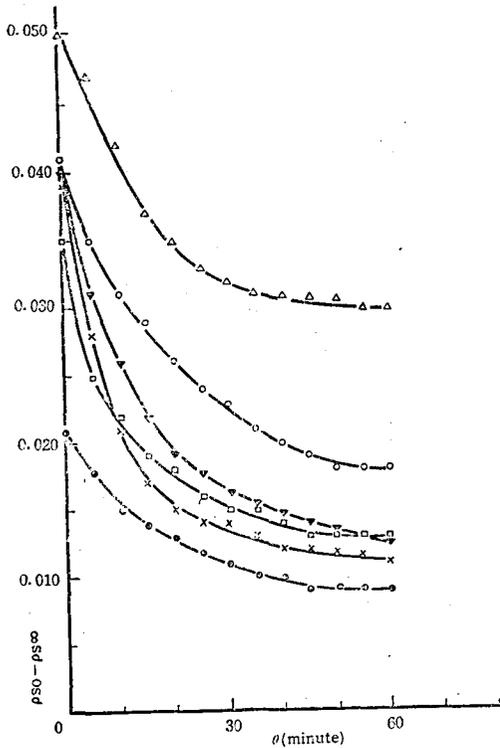


Fig. 8 Sedimentocurves of 5 or 10% W/V (W.D.P) Suspensions in Distilled Water at Various Times

- △— 10% W/V (D.D.T 20% W.D.P) Suspension: Maker H
- 10% W/V (D.D.T 50% W.D.P) Suspension: Maker G
- ▽— 10% W/V (D.D.T 50% W.D.P) Suspension: Maker Pest B. Gon
- ×— 10% W/V (D.D.T 75% W.D.P) Suspension: Maker G
- 10% W/V (D.D.T 70% W.D.P) Suspension: Maker H
- 5% W/V (D.D.T 50% W.D.P) Suspension: Maker G

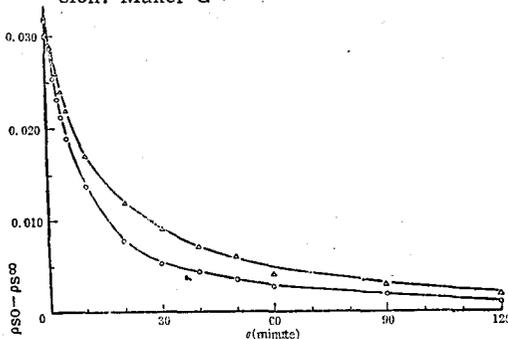


Fig. 11 Sedimentocurves of 5% W/V Bentonite Suspensions in W. A. Soln. at Various Times

- △— in 1.0, 2.5, 5.0, 10.0% W.A. Soln.
- in 0.5% W.A. Soln. (Wettable Agent: Triton X-100)

V. 次に水和剤のキャリアーとして使用される可能性のあるカオリン, タルク, ベントナイト, 珪藻土に界面活性剤 (Triton X-100: Polyethylene glycol, alkyl aryl ether) を其々0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0%加えて上記のキャリアーの5%w/v濃度の懸垂液として各々の沈降曲線を求める。次にその実験結果を Fig. 9, 10, 11, 12に示す。

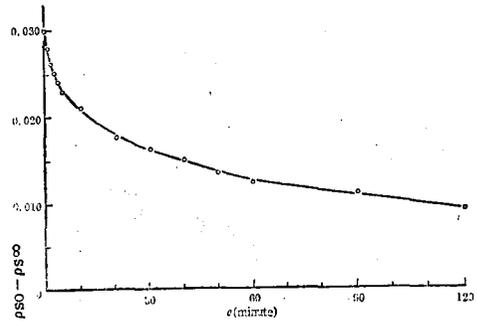


Fig. 9 Sedimentocurves of 5% W/V Kaolin Suspensions in W.A. Soln. at Various Times

- in 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0% W.A. Soln. (Wettable Agent: Triton X-100)

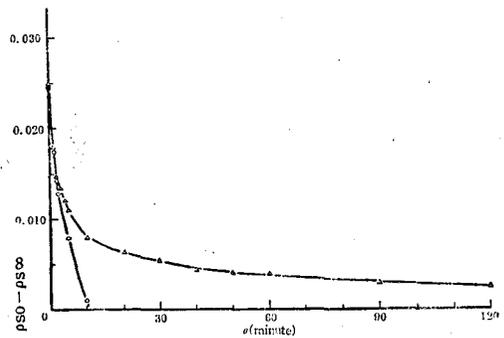


Fig. 10 Sedimentocurves of 5% W/V Talc Suspensions in W.A. Soln. at Various Times

- △— in 10.0% W.A. Soln.
- in 0.5, 1.0, 2.5, 5.0% W.A. Soln. (Wettable Agent: Triton X-100)

IV. 次に国内E社製のγ-B.H.C 10%水和剤に塩化ナトリウムを夫々0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0%加えてγ-B.H.C 10%水和剤の5%w/v濃度の懸垂液として各々の沈降曲線を求める。次にその実験結果を Fig. 13に示す。

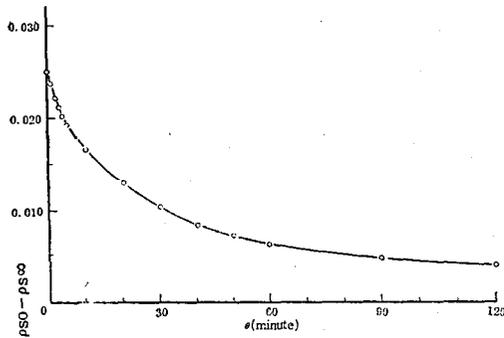


Fig. 12 Sedimentocurves of 5% W/V Silicious Earth Suspensions in W. A. Soln. at Various Times  
 —○— in 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0% W. A. Soln. (Wetttable Agent: Triton X-100)

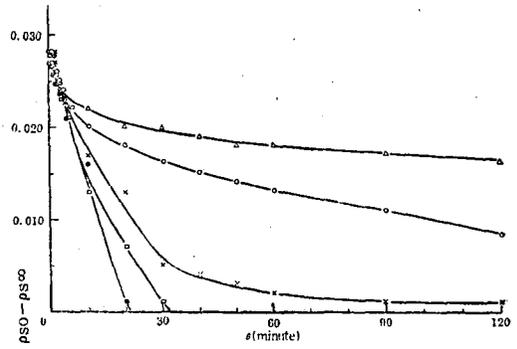


Fig. 13 Sedimentocurves of 5% W/V ( $\gamma$ -B. H. C 10% W. D. P) Suspensions in Sodium Chloride Soln. at Various Times (Sample: Maker E)  
 —△— in 0% Sodium Chloride Soln.  
 —○— " 1.0% " " " "  
 —×— " 2.5% " " " "  
 —□— " 5.0% " " " "  
 —●— " 10.0% " " " "

考察 本実験に使用した実験材料の比重は約2前後その粒径は約3~30ミクロンで、水和剤に於て界面活性剤の含有量は約5%前後である。故にそれらの沈降曲線は一部のものを除いては大体近似している。但し懸垂液の濃度を極端に高めた場合には沈降曲線は変化する (Fig. 2, 参照) これは懸垂物粒子相互間の運動状態が変化するからだと言われている。粒子が水中に多すぎる影響は1l.中に50g.以下ならば大したことはないと言われている。併し乍ら反対に濃度を極端に下げた場合には平均比重の変化が僅かなのでこれも亦実験し難い。故に沈降曲線を得るに適当な濃度は5~10%w/vではないかと思われる。

5%濃度の水和剤の懸垂液の  $\theta=0$  から60分迄の沈降曲線に於いては Fig. 5を除いては Fig. 3, 4, 6, 7等は大体皆前記実験式(14)に於いて  $K = -\frac{2}{3}$  とおかれる様にみえる。実際これらの沈降曲線の上部面積 Fig. 1に於ける  $G_\theta$ を図積分して(8)式より沈降率S(%)を計算し、他方実験式(3)より計算して得た沈降率S(%)とを比較すると Table 2.の通りになる。

Table 2. Comparison of Sedimentorations between the Calculated Values for Formula 8 and for Formula 13 ( $\theta: 0 \sim 60$ minutes)

No. of Fig.	Maker	Mark	for Formula 8	for Formula 13
3	A	—△—	25.4 %	26.2 %
		—○—	33.0 "	33.3 "
4	B	—△—	30.7 "	30.8 "
		—○—	35.8 "	35.9 "
6	D	—△—	20.3 "	20.5 "
		—○—	26.0 "	25.6 "
7	F	—△—	26.9 "	26.2 "
		—○—	31.8 "	31.0 "

Table 2. より5%濃度の  $\gamma$ -B. H. C10%水和剤懸垂液の平均比重  $\rho_{s0}$ より  $\rho_w$ を減じた値  $\rho$ をY軸に測定時間の  $\theta$ をX軸にとるとき、 $\theta=0$ から60分迄の沈降曲線の方程式は略  $\rho = -a\theta^{\frac{1}{3}}$ であることが判つた。

次に水和剤の原料たるキャリアー (Fig. 9, 10, 11, 12参照)について云えば、それらの沈降曲線に於いて沈降する速度の早い方からならべると次の通りになる。ベントナイト, タルク, 珪藻土, カオリン, 即ち水和剤のキャリアーには以上よりしてカオリンが最も適していると思われる。

次に  $\gamma$ -B. H. C或はD. D. T何れの水和剤でも、(Fig. 8参照)此れを懸垂液にした場合、濃度が一定ならば大体類似の沈降曲線を示す様である。即ち粒径, 比重, 粒子量, 液粘度, 温度等が略々一定ならば Stokesの法則に依

つて明らかな通りその示す沈降曲線も一定である筈である。

最後に5%w/v濃度の $\gamma$ -B. H. C 10%水和剤 (E社製品)の懸垂食塩水液に於いて (Fig. 13参照), 同食塩水の濃度は1%位迄は沈降曲線に大して影響を与えないが, 2.5, 5.0%では相当影響し, 10%ではその沈降曲線は略々直線となる。これは食塩の様な電解質に依つて界面活性剤の作用が低下する為であろうと思われる。標準硬水も此の作用があることは Fig. 3, 4, 5, 6, 7等を参照すれば明らかである。尚メスシリンダえ浮秤を入れる際液面が高くなる為の補正值は断面積の十分大きなメスシリンダを用いればこれは殆ど無視出来る。

### 総 括

浮秤を使用して濃度5%w/vの $\gamma$ -B. H. C及D. D. T水和剤懸垂液の種々の状態に於ける夫々の沈降曲線を求めて考察した結果。一般に水和剤の沈降率S (%)は次の実験式に依つて表されるものと思われる。

$$S(\%) = K \frac{(\rho_{so} - \rho_{s\theta})}{(\rho_{so} - \rho_{s\infty})} \times 100$$

$\rho_{so}$  : 懸垂液の最初の平均比重;  $\rho_{s\theta}$  : 懸垂液の $\theta$ 分後の平均比重;  $\rho_{s\infty}$  : 懸垂液の最終の平均比重; K : 恒数

$1 \geq K \geq \frac{1}{2}$  (例えば5%w/v濃度の $\gamma$ -B. H. C 10%水和剤の懸垂液 $\theta$  : 0~60分迄の沈降率S (%)は上式に於いて実験的に  $K = \frac{2}{3}$ とおかれる。)

終りに本研究の一部に協力された辻楠雄, 篠崎正阿氏に感謝の意を表す。

### 文 献

- 1) 佐藤寿, 薬学大全書補遺(3) D. D. T 製剤の物理的考察, P. 100 (1951)
- 2) Gessner, Kolloid-Ztschr., 38, 115 (1926)
- 3) Taggart, Handbook of Mineral Dressing, 19, 122 (1950)
- 4) JIS A 1204 : 土の粒度試験方法
- 5) 京大化学研究報告, 22, 7 (1950)
- 6) 最上武雄, 土質力学, P. 30 (1955).

### Summary

Sedimentocurves were obtained under various conditions by the areometric method about a certain per cent (for Ex. : 5--10%w/v) suspensions of the wettable powders containing  $\gamma$ -B. H. C or D. D. T. General speaking, it seems that the sedimentoratio is shown the following experimental formula :

$$S(\%) = K \frac{(\rho_{so} - \rho_{s\theta})}{(\rho_{so} - \rho_{s\infty})} \times 100$$

S (%) : Per cent sedimentoratio

$\rho_{so}$  : Mean specific gravity of suspension at initial time

$\rho_{s\theta}$  : Mean specific gravity of suspension after  $\theta$  minutes

$\rho_{s\infty}$  : Mean specific gravity of suspension at final time

K : Constant  $1 \geq K \geq 1/2$  (for Ex. :  $K = 2/3$   $\theta$  : 0~60 minutes 5% w/v aqueous suspension of the wettable powder containing 10%  $\gamma$ -B. H. C)

Received April 30, 1955

## 湿度が歯科用石膏の機械的性質に及ぼす影響について

藤井 正道, 堀部 隆, 亀田 務

## Effect of Humidity on the Physical Properties of Dental Gypsum.

By Masamichi FUJII, Takashi HORIBE and Tsutomu KAMEDA

**まえがき** 歯科用石膏は義歯作製時の型材料として歯科材料中では重要な地位を占め、且消費量も可成多量に及んで居り、其の品質の判定は特に慎重に行つて居る。著者等が行つた試験成績は、昭和27年1月より昭和30年3月迄の間に扱つた検体は259で、検査基準に適合するもの252、不適のもの7であつた。又各四半期毎の温度湿度及機械的性質の平均値を第1表、第3図に示した。

然るに焼石膏の一般的性質として試験片作製時の気候、其の他の環境条件により強度の測定結果が大きく左右されるもので、此の事は我々が歯科用石膏の検査を行つて居る際にもしばしば体験させられることである。よつて我々は茲に歯科用石膏の強度が湿度により如何に左右されるかを昭和27年1月より現在に至る迄の間に取扱つた国家検査の成績より推定すると共に、人為的に湿度を変えた場合の強度の変化を検討した結果を報告する。

## 実験の部

(1) **試験片の作製** 規格の定める所により練和して金型に流し込み、凝結後直ちに型より取出し、強度測定迄の経過時間を変化して圧縮強さを測定し、更に試験片を種々の湿度に保つた後表面硬度、圧縮強さ、引張強さを測定した。尚試料は全て同一ロットのものを使用した。

(i) **練和法** J I S T 6604 (1954) によつて行い、所定の練和容器(第1図)中に予め適量の水(標準稠度の必要水量)を取り、之に100gの試料を30秒間に投入し、1分間100回転の速度で2分間練和した後、所定の金型に流し込み、凝結後取出した。

(ii) **試験片の寸法** 圧縮強さ測定用試験片は金属製円筒割型(内径2cmφ高さ3cm)を使用し、作製し、同じく引張強さには第2図に示す如き歯科材料検査基準の所定の金属製割型を使用し、作製した。

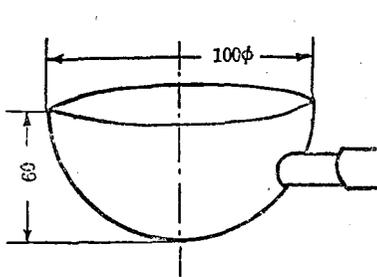


Fig. 1. Mechanical Spatulator

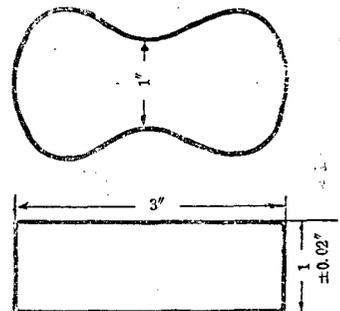
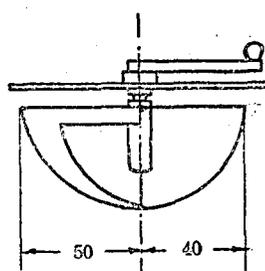


Fig. 2. Briquet Specimen for tensile strength test

**実験Ⅰ** 前記操作により作製した試験片を室内に放置し、強度測定迄の経過時間を夫々30分、1時間、2時間、4時間、1日後と変化させて、常法により圧縮強さを測定した。

**実験Ⅱ** 前記操作により作製した試験片を各々湿度の異なる条件に保つた容器中に夫々2時間、1日、2日間放置した後測定を行つた。此放置時間はJ I S及現行歯科材料検査基準によつたものである。

湿度の異なる条件を保つには下記の方法を採用し、各々の相対湿度は括弧内に附記した。

- 送風室中 毎秒5m大気送風 島津製作所製 Model GM-2型
- デシケーター中 直径40cm 塩化カルシウム乾燥(20~40%)

- c) 室内放置 (50~80%)
- d) 密閉硝子鐘中 直径20cm 高さ30cm (95~100%)
- e) 濡れたガーゼで巻く (約100%)
- f) 水中に投入 (約100%)

使用した試験機は圧縮強さ、引張強さ測定にはアムスラー型万能抗張力試験機を用いて荷重速度は各々10 kg/secとし、硬度の測定は目下我々が考案中の自作せる硬度計を使用して測定した。此硬度計は直径1.25mmの円線(鋼製)の先端を45°に尖らし試料に対する押込みの抵抗を測定し、その大小より硬度を表現するものである。尚試料は各々10個宛作製し、その平均値を採用した。

実験結果 昭和27年1月より現在に至る迄の各四半期毎の温度、湿度及機械的強度の平均値は次の通りである。

Table 1. Physical Properties of Dental Gypsum

Period	Number of sample	Number of failed	Mean value of room temperature	Mean value of relative humidity %	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	
1952	1~3	9	0	4.6	66	11.2	76.7
	4~6	15	0	17.5	74	10.7	73.3
	7~9	17	0	24.6	82	10.1	74.9
	10~12	8	0	11.5	73	10.5	71.3
1953	1~3	29	0	5.6	61	12.7	75.8
	4~6	33	0	17.0	71	13.2	75.4
	7~9	14	1	24.0	82	11.2	74.8
	10~12	19	0	11.7	67	12.3	77.6
1954	1~3	38	1	4.5	65	13.1	77.9
	4~6	25	4	17.7	74	10.1	55.2
	7~9	7	1	24.6	78	10.5	77.0
	10~12	23	0			12.4	77.7
1955	1~3	22	0			11.7	80.3

之を图示すれば次の通りになる。

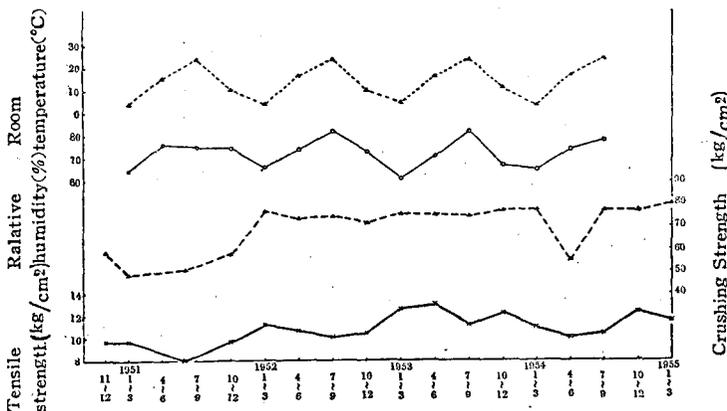


Fig. 3. Physical Properties of Dental Gypsum

此図より各年の7~9月の成績は他の四半期に比較して多少低下して居る傾向が見られる。此原因としては、各期間の温度、湿度の傾向と密接な関連があることが想像される。

室内に放置せる歯科用焼石膏の経過時間による圧縮強さの変化は第4図の如くである。

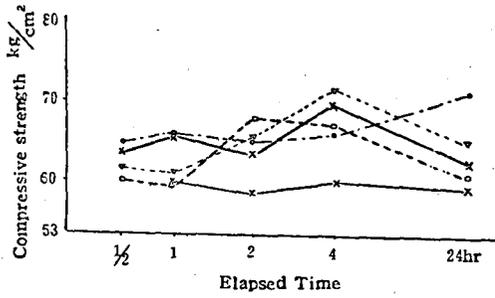


Fig. 4. Effect of Elapsed Time on the Compressive Strength of Dental Gypsum

図中の太実線C, 太点線Dは夫々試料C及Dの各経過時間に於る圧縮強さの平均を示すものである。細線のC-1 D-1 D-2は夫々試料C及Dの同時練和により作製せる試験片の成績の一例を示したものであり、同一試料による練和作製せる試験片でも成績に差異があり、且経過時間が1日後になるとその差は大となる事が観察された。平均圧縮強さC, D直線より観察するに、硬化せる歯科用焼石膏は湿度の多少で幾分変るが練和開始後2~4時間で最大強度を示し、其後は漸次低下する事が判る。

歯科用焼石膏の湿度変化による圧縮強さ、表面硬度測定の結果は第2表の如くである。

Table 2. Effect of Humidity on the Physical Properties of Dental Gypsum

Sample	P/W Ratio	Room temperature	Water temperature	Elapsed time hr	Dry in blast room		Dry in deciccator	
					Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness
A	60	21	20	24	—	—	79.7	78
"	"	20	17	"	103.5	78	—	—
"	"	20	16	"	108.4	82	90.8	80
B	65	18	15	2	—	—	78.1	78
"	"	18	15	24	—	—	67.7	80

Sample	In room		Wet in bell glass		Covered wet gauze		In water	
	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness						
A	78.9	78	72.4	68	—	—	—	—
"	—	—	—	—	83.3	68	80.0	67
"	84.9	78	73.8	70	—	—	—	—
B	77.7	78	74.7	70	—	—	—	—
"	67.7	78	65.1	68	—	—	—	—

又歯科用焼石膏の湿度及練和開始後試験迄の放置時間の変化による引張強さ、圧縮強さ及表面硬度の測定結果は第3表の如くである。

Table 3. Effect of Humidity & Elapsed Time on the Physical Properties of Dental Gypsum

Sample	P/w Ratio	Room temperature	Water temperature	Elapsed time hr	In room		
					Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness
A	60	18	16	2	84.8	12.3	68
"	"	"	"	24	90.3	12.9	78
"	"	"	"	48	145.8	13.2	82

Sample	Wet in bell glass			Covered wet gauze			In water		
	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness
A	83.8	12.1	68	75.1	11.2	68	73.6	10.9	68
"	82.0	12.0	70	72.4	11.0	68	70.9	10.4	66
"	82.0	11.8	70	68.3	10.4	70	68.0	9.9	65

此表より判る通り、練和開始2時間後の強度には湿度の影響は判然と表われていないが、24時間後の結果では、低湿度に保たれたものや、送風をうけ表面に常に低湿度の空気で囲まれた試験片では圧縮強さ、表面硬度共に比較的強く、明かに湿度の影響が表われて居る事が確認された。

同様に引張り強さを測定した結果は第3表の如く、圧縮強さとほぼ同様の傾向が認められた。

市販歯科用硬石膏(国産3種及米国製2種)の練和開始より試験迄の放置時間の変化による引張強さ、圧縮強さ及表面硬度の測定の結果は第4表の如くである。之より国産硬石膏が米国製品より稍々劣る成績を示して居る。

Table 4. Effect of Elapsed Time on the Physical Properties of Dental Plaster

Sample	Water powder ratio	3hr			24hr		
		Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness
Japan A	29.5	24.0	165	70	24.8	224	87
" B	33.0	23.4	154	83	23.8	240	87
" C	33.0	18.2	116	85	26.4	139	87
U. S. A. Artificial Stone	33.6	—	—	—	—	—	—
" Coecal	30.0	—	176	90	—	—	—

Sample	48hr			72hr			168hr		
	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness	Tensile strength kg/cm <sup>2</sup>	Crushing strength kg/cm <sup>2</sup>	Hardness
Japan A	25.5	287	88	28.3	374	91	49.1	422	93
" B	24.3	271	88	27.6	329	90	44.4	355	93
" C	28.9	235	90	30.7	291	90	39.8	351	92
U. S. A. Artificial Stone	—	279	91	—	—	—	—	—	—
" Coecal	—	374	91	—	—	—	—	442	94

以上の如く湿度の影響については明かに確認出来たが温度の影響については今後実験を続行する予定である。

又過去3年間の歯科用硬石膏の歯科材料検査基準による検査成績より引張強さ、圧縮強さを数理統計的に分布を求めて見ると第5表の如くなり、引張強さは9~12.5 kg/cm<sup>2</sup> 圧縮強さは65~86 kg/cm<sup>2</sup>の間に集つて居り、各々の平均を求めると引張強さは12.056 kg/cm<sup>2</sup> 圧縮強さは74.972 kg/cm<sup>2</sup>となる。此際の共分散は1.4111 相関係数

は 0.3006 標準偏差は夫々 2.337 及 12.056 である.

Table 5. Correlation Table

X Y	~53.0	53.0 ~59.0	59.0 ~65.0	65.0 ~71.0	71.0 ~77.0	77.0 ~83.0	83.0 ~89.0	89.0 ~95.0	95.0 ~101.0	101.0 ~107.0	107.0~
~ 7.5	1		2	1	3		1	1			
7.5~ 8.5	2	2	1	2	2	1					
8.5~ 9.5	2	3	4	9	9	4	1	1			
9.5~10.5	1	6	5	11	13	6	6	4	1		
10.5~11.5			10	11	14	9	5	4	3	1	
11.5~12.5	1	3	4	5	10	7	9	5	1		
12.5~13.5	1	6	4	1	1	4	2	2	1	2	
13.5~14.5			1		5	6	3	2		1	
14.5~15.5				4	2		3	3	1		2
15.5~16.5		1	1	2	1	1	2	1			2
16.5~			1	1	1	4		1	1		

Covariance  $p = 1.4111$

Coefficient of Correlation  $r = 0.3006$

Standard deviation of tensile st  $\sigma_y = 2.337$

" " " Compressive. st.  $\sigma_x = 12.056$

Mean value of tensile st.  $\bar{Y} = 11.461 \text{ kg/cm}^2$

" " " Compressive st.  $\bar{X} = 74.972 \text{ kg/cm}^2$

機械的強度の測定は現行基準では1日後で行う事になつて居るが、気温湿度の影響を出来るだけ除去するために、練和開始2時間後に測定し、練和時の水温を一定にし、恒温恒湿の容器中に保存する事が望しく、又恒温恒湿の条件の満たされぬ現状に於て石膏の基準を決定するには、機械的性質の最低を示す7~9月の成績を考慮して練を引くべきと思う。

総 括

- (1) 国家検査の歯科用焼石膏の機械的性質は、昭和25~26年と、夫以後を比較すると強くなり、且各月の成績も平均して来た。又7~9月は他の期間に比較して幾分低下して居る。
- (2) 過去3年間の国家検査の平均の引張強さは  $12.07 \text{ kg/cm}^2$ 、圧縮強さは  $74.97 \text{ kg/cm}^2$  である。
- (3) 歯科用焼石膏の機械的強度は練和開始後2~4時間が最大強度を示す。
- (4) 歯科用焼石膏の湿度による機械的性質の変化は2時間後では余り表れないが、長時間経過すれば表れる事が認められた。

Summary

From the present investigation, the authors obtained the following:

- (1) In the physical properties of dental gypsum under the National assay, the strength of products on and after 1953 was stronger than the products in 1951-2, and that of the products of summer period (July-Sept) was weaker than the other periods.
- (2) In the National assay during the past three years, the mean value of tensile strength was  $12.07 \text{ kg/cm}^2$  and that of compressive strength was  $74.97 \text{ kg/cm}^2$ .
- (3) On 2-4 hours after preparing the test mixture with standard consistency, the compressive strength was strongest.
- (4) The effect of humidity on the physical properties was not clear 2 hours after preparing the test mixture, but after a long time (over 24 hours) it was clearly observed.

Received April 30, 1955

## 化粧品の規格検査法について(第4報)

米国法定色素に該当する国産タール色素の品質試験成績について

市川重春, 南城実

Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (IV)  
On the Result of Examination of Japanese Tar-Dyes Corresponding  
to the Legally Permitted Tar-Dyes of U. S. A.

By Shigeharu ICHIKAWA and Minoru NANJO

**まえがき** 現在薬事法で許可されている22種のタール色素だけでは、現今社会の化粧品の、欲求を充すのは不可能であつて法定外の色素が広く使用せられているので、吾等はいこれらの規格制定と併せて範囲の拡大の必要を屢々強調してきたのであるが、昭和28年11月化粧品工業会より薬務局長宛米国法定色素(第1表)と同様117種の使用許可申請が提出せられ、更に又本年2月緊急最少限度の品目として37種(第1表△印)の許可申請がなされたので、これら品目並に規格を検討する過程として、次の事項につき調査、試験した結果を報告する。

1. 米国法定タール色素の入手について。
2. 現在我国において化粧品に使用されているタール色素の調査。
3. 輸入化粧品に使用されているタール色素の検査例。
4. 米国法定タール色素に該当する国産タール色素の品質試験結果と米国規格との比較。

## 調査並に試験の部

1. **米国法定タール色素の入手について** 我国の法定タール色素を米国と同様に拡大する前提としてその標準となるべき米国の保証染料(Certified dyes)を入手しようと思ひ、我国薬品会社、米国商社等を通じて種々調査したが、117種の全品目を収集することは出来ず、次の72種を入手することが出来た。(第1表○参照)この結果から判断すると、米国でも117種を法定許可品目に指定しているが、需要供給の関係により全品目は使わなくとも72品目位で間に合つてゐるのではないかと思われる。

## 入手出来た米国法定タール色素

FD&C	19種(赤5; 橙2; 黄6; 緑3; 青2; 紫1)
D&C	41種(赤21; 橙7; 黄4; 緑3; 青3; 紫1; 黒1; 褐1)
Ext. D&C	12種(赤5; 橙1; 黄3; 緑1; 青1; 紫1)

以上の詳細は次表の通りである。表中○印は入手品目、△印は工業会許可申請品目である。

第1表 米国法定タール色素一覧表

第一群 食品、薬品及び化粧品用

法 定 名	市 販 名	法 定 名	市 販 名
○ FD&C Blue No. 1	Brilliant Blue FCF	○ " No. 4	Ponceau SX
○ " No. 2	Indigotin	○ " No. 32	Oil Red XO
○ FD&C Green No. 1	Guinea Green B	○ FD&C Yellow No. 1	Naphthol Yellow S
○ " No. 2	Light Green SF Yellowish	○ " No. 2	" K-salt
○ " No. 3	Fast Green FCF	○ " No. 3	Yellow AB
○ FD&C Orange No. 1	Orange I	○ " No. 4	Yellow OB
○ " No. 2	Orange SS	○ " No. 5	Tartrazine
○ FD&C Red No. 1	Ponceau 3R	○ " No. 6	Sunset Yellow FCF
○ " No. 2	Amaranth	○△ FD&C Violet No. 1	Wool Violet 5BN
○ " No. 3	Erythrosine		

計 19

## 第二群 薬品及び化粧品用

法定名	市販名	法定名	市販名
○△ D&C Black No. 1	Naphthol Blue Black	○△ " No. 11	" CA
○ D&C Blue No. 4	Alphazurine FG	○△ " No. 12	" BA
" No. 5	Alizarine Astrol B	" No. 13	" SR
○△ " No. 6	Indigo	△ " No. 14	Lake Red D
△ " No. 7	Patent Blue NA	" No. 15	" DBA
△ " No. 8	" CA	△ " No. 16	" DCA
○△ " No. 9	Carbanthrene Blue	○ " 17	Toney Red
○△ D&C Brown No. 1	Resorcin Brown	○△ " 18	Oil Red OS
D&C Green No. 4	Light Green CF Yellowish	○△ " 19	Rhodamine B
○△ " No. 5	Alizarin Cyanine Green F	" 20	" Acetate
○△ " No. 6	Quinizarin Green SS	○ " 21	Tetrabromofluorescein
○△ " No. 7	Acid Fast Green	○ " 22	Eosin YS
" No. 8	Pyranine Concentrated	" 23	" YSK
○ D&C Orange No. 3	Orange G	△ " 24	Tetrachlorofluorescein
○△ " No. 4	Orange II	" 25	" NA
○△ " No. 5	Dibromofluorescein	" 26	" K
" No. 6	" Na	○△ " 27	Tetrachlorotetrabromofluorescein
" No. 7	" K	○ " 28	Phloxine B
" No. 8	Dichlorofluorescein	" 29	Bluish Orange TR
" No. 9	" NA	○ " 30	Helindone Pink CN
○ " No. 10	Diiodofluorescein	△ " 31	Brilliant Lake Red R
○ " No. 11	Erythrosine Yellowish NA	○ " 33	Acid Fuchsin D
" No. 12	" K	○△ " 34	Deep Maroon
" No. 13	" NH	○△ " 35	Toluidine Red
" No. 14	Orange TR	○ " 36	Flaming Red
" No. 15	Alizarin	○ " No. 37	Rhodamine B Stearate
○ " No. 16	Dibromodiiodofluorescein	△ " No. 38	Deep Red (Maroon)
○△ " No. 17	Permatone Orange	○ " No. 39	Alba Red
○ D&C Red No. 5	Ponceau 2R	○ D&C Violet No. 2	Alizuroil Purple SS
" No. 6	Lithol Rubin B	○ D&C Yellow No. 7	Fluorcscein
○△ " No. 7	" BCA	○ " No. 8	Uranine
○△ " No. 8	Lake Red C	" No. 9	" K
○△ " No. 9	" CBA	○△ " No. 10	Quinoline Yellow WS
○ " No. 10	Lithol Red	○ " No. 11	" SS

計 68

## 第三群 外用医薬品及び化粧品用 (除粘膜)

法定名	市販名	法定名	市販名
Ext. D&C Black No. 1	Coomassie Fast Black	○△ Ext. D&C Orange No. 1	Fanchon Orange
○△ Ext. D&C Blue No. 1	Methylen Blue	" No. 2	Indelible Orange
" No. 2	" Zinc Double Chloride	○ Ext. D&C Red No. 1	Amidonaphthol Red 6B
" No. 3	Erioglaurine X	" No. 2	Pigment Scarlet NA
" No. 4	Alizarin Saphirol	△ " No. 3	Violamine R
" No. 5	Hexyl Blue	" No. 4	Dichlorotetraiodofluorescein
○△ Ext. D&C Green No. 1	Naphthol Green B	" No. 5	Rose Bengale TD

法定名	市販名	法定名	市販名
" No. 6	" TDK	Ext.D&C Violet No. 1	Anthraquinone Violet-B
" No. 7	Alizarin Carmine	○△ " No. 2	Alizuroil Purple
○ " No. 8	Fast Red S	○Ext.D&C Yellow No. 1	Metanil Yellow
△ " No. 9	Bordeaux Red	" No. 2	" CA
○△ " No. 10	Azo Rubin Extra	○ " No. 3	Fast Light Yellow
○ " No. 11	Fast Crimson GR	" No. 4	Polar Yellow 5G
" No. 12	Royal Scarlet	○△ " No. 5	Fanchon Yellow
○ " No. 13	Croceine Scarlet Moo	" No. 6	Du Pont Yellow
計	30		

2. 現在我国において化粧品に使用されているタール色素の調査 昭和28年11月化粧品工業会より薬務局長宛提出の「化粧品に使用許可のタール系色素の品目追加に関する陳情書」に基いて、我国の化粧品に使用されていると云うタール系色素を調査して分類すると次の通りである。

種別	色別								合計
	数	赤	橙	黄	緑	青	紫	茶	
FD&C	7 種	2	0	3	1	0	1	0	} 37 種 } 90 種
D&C	22 種	14	3	2	2	1	0	0	
Ext. D&C	8 種	4	0	4	0	0	0	0	
米 国 法 定 外	53 種	30	0	13	2	5	2	3	
日 本 法 定	12 種	7	0	4	1	0	0	0	

3. 輸入化粧品に使用されているタール色素の検査例 著者等が昨年中輸入化粧品の試験中口紅について検出したタール色素は、第2表に見られるように、我国法定外の色素を使用しているが、口紅以外の化粧品を考える時、我国と較べて、各国共多数の色素を使用している事が推定せられる。

第2表 輸入化粧品含有のタール色素試験成績表

検体番号	種類別	検出タール色素
1	口紅(米国製)	エオシン
2	" "	エオシン
3	" "	エオシン; ローダミン B
4	" "	ローダミン B
5	" "	ローダミン B
6	" (仏国製)	エオシン; ローダミン B; フルオレッセン
7	" (独逸製)	エオシン; フロキシシン; フルオレッセン

4. 米国家定色素に該当する国産タール色素の品質試験結果と米国規格との比較 米国家定タール色素に該当する国産タール色素中数種について試験した成績を米国の規格と比較対照してみると、その品質に著しい差が認められる(第3表参照)。もつともこれらは化粧品や医薬用として製造されているだけでなく只の繊維の染色を目的として製造されたものであるから製造に当っては、その毒性については衛生上の考慮が払われていないのが当然であるが、化粧品メーカーはこれらを実際に使用しており、又その使用に際しても厳密な試験は行っていない現状である。

第3表 国産タール色素試験成績と米国規格との比較表

色 素 名	米 国 規 格			試 験 成 績		
	純色素 %	鉛 ppm	砒 素 ppm	純色素 %	鉛 ppm	砒 素 ppm
D & C Green No. 4 Light Green SF Yellowish	82.0以上	10.0以下	1.4以下		196.60	限度内
" " " No. 7 Fast Acid Green	80.0	"	"	58.0	655.19	"
" Blue No. 7 Patent Blue	80.0	"	"	59.0	1880.5	"
" Violet No. 1 Violet 5 BN.	80.0	"	"	21.0	111.14	"
" Yellow No. 7 Fluorescein	96.0	"	"	91.46	16.53	"
" " No.10 Quinolin Yellow	82.0	"	"		20.39	"
" Orange No. 3 Orange G	82.0	"	"	55.0	16.92	"
" " No. 4 Orange II	85.0	"	"	84.88	23.06	"
" " No.15 Alizarin	95.0	"	"		316.46	"
" Red No. 7 Lithol Rubin BCA	85.0	"	"	48.0	46.21	3.05
" " No.10 Lithol Red	90.0	"	"	96.10	39.08	13.43
" " No.14 Lake Red D	90.0	"	"	51.0	22.3	限度内
" " No.21 Tetrabromofluorescein	93.0	"	"	96.28	323.92	1.89
" " No.27 Tetrachlorotetrabromofluorescein	90.0	"	"	97.40	815.53	限度内
" " No.33 Naphthalene Red B	82.0	"	"	92.94	63.35	"
" " No.34 Deep Maroon	85.0	"	"	88.18	316.46	"
" " No.35 Toluidin Red	95.0	"	"		20.7	"

## 総 括

以上の調査により、米国においても需要と供給の関係により、実際製造し使用されているタール色素は、法定品目の約半数余と思われるから、我国でも現在の22種では不足であるが、今直ちに米国と同様に117種に拡大する必要はなく、先ず早急に許可を希望する品目37種を拡大すれば、従来の薬事法規定の22種と合計59種になるから充分間に合うものと思われる。次に国産タール色素の品質であるが、現在市販のものは全て染織、塗料及びその他の用途を主目的として製造されているため、衛生的見地からの考慮が払われていないため化粧品用としては不適當である。化粧品は皮膚に直接塗布することが多いので有害なものや、刺激性のものは使用してはならないのは勿論、殊に口紅や眉墨系のものの著色料は絶対無害のものでなければならない。従つて以上の調査並びに試験の結果から法定タール色素の範囲の拡大と規格の制定が望ましいのが痛感せられる。

## 文 献

- 1) Coal-tar color regulations, Issued September, 1940.
- 2) A. O. A. C. 7th. Ed. (1950).
- 3) The principles and practice of modern cosmetics. Vol. 2. Cosmetic Materials.

## Summary

The results obtained here show that the tar dyes used in Japanese cosmetics are much different from the American Standard. It is, therefore, necessary to increase the number of and establish the standard for the legally permitted tar dyes for cosmetics in Japan.

Received April 19, 1955

## 化粧品規格検査法について (第5報)

## 粉白粉中の無機性常成分の定量法について

市川重春, 汐見信

## Research on the Standard Determination Method of Cosmetics (V)

## On the Determination of Inorganic Constituents in Face Powder

By Shigeharu ICHIKAWA and Shin SHIOMI

**まえがき** 粉白粉の一般基礎材料として亜鉛華, カオリン, 絹蛋白, 金属石鹼 (ステアリン酸亜鉛, ステアリン酸マグネシウム, ステアリン酸アルミニウム等), タルク, 炭酸カルシウム, 酸化マグネシウム, 二酸化チタニウム, 無機性着色料, 有機性着色料, 硫化亜鉛, 硫化バリウム等が使用される関係上粉白粉中の無機性常成分としては亜鉛, カルシウム, 鉄, ケイ酸, バリウム等が考えられる。これら各成分の分離定量法は化学分析書に多数の方法が記載されているが, 特に粉白粉の各成分の分離法として発表されたものは少い。稍々系統的な分離法としては Harry 法<sup>1)</sup>及び Mc. Clellan 法<sup>2)</sup>のみであつて A. O. A. C. 法<sup>3)</sup>も Mc. Clellan 法を改良して粉白粉の定量法として採用している。

著者等は A. O. A. C. 法を追試の結果, 本法は良好なる成績を得るが, その操作煩雑で時間を要するのが欠点であるのを認めたので本法の簡易化を企てまず重量法を容量法に改め E. D. T. A. 法を採用したところカルシウム, マグネシウム, 亜鉛については極めて満足すべき結果を得た。またチタニウム及び鉄の分離定量についても誤差の起り易い Jones 還元器を使用せず液状アマルガムを使用する小林, 中園法<sup>4)</sup>によつて還元した後示差滴定により鉄を定量するように改変し, また極めて不安定な三塩化チタニウム液による滴定を避け良好な結果を得たので改良試案法として提案した。本報においてはその比較試験成績について報告する。

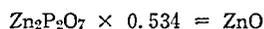
## 試験の部

## [1] A. O. A. C. 法

## (1) 総亜鉛

**試薬:** (a) Wulfing 液: 炭酸アンモニウム微粉末 80g をアンモニア水 90cc 及び水 375cc の混和物に溶かしアルコール 475cc を加える (温度に依り沈澱が生ずるかもしれない) 沈澱が生じたときは放置して上澄液を使用する。 (b) 洗滌液: Wulfing 液とアルコールの等容量の混液

**定量法:** 試料約 2g (試料中に硼酸が共存するときは硼酸定量の際の残渣を使用する) を白金皿に秤り, 微に灰色になるまで熱灼し (600~650°) で灰化する (必要以上に永く加熱しない事)。灰分を 500cc の共栓エルレンマイエルフラスコ中に広口ロートを用いて移し Wulfing 液 100cc をロートを洗いながら加える。栓をして 1 分間はげしくふりまぜ (時々栓を開いて圧力を除く) 一週間放置する。内容物を 12.5cm の濾紙にて濾過しフラスコは洗滌液で洗い, この洗液は濾紙上に注加する (しかし残留物を完全に移さなくともよい。フラスコは後述の酸可溶成分の定量用に保存する)。濾紙上の残留物は洗滌液で充分に洗い, 濾洗液中の亜鉛は次のようにして定量する, 塩酸で正確に中和し (メチルレッド) 水 200cc を加え, 熱板上で沸騰近くまで加熱する。10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液 60cc を加え, 沸騰手前で 30 分間加熱を継続する。熱板より取り外し徐々に室温にまで冷却する。次いでグーチのルツボ (予めフィッシャーのバーナーで 30 分間熱灼後目方を秤量しておいたもの) で濾過し, 新しく調製した 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液で洗い, 最後に 50% アルコール 50cc で洗い濾洗液は捨てる。グーチルツボは適当な大きさの磁製ルツボ中におき, 温度の低い焔で乾燥し次いで温度を上昇し充分な熱で恒量になるまで熱灼する。



(2) 酸可溶カルシウム 亜鉛定量の際に得た濾紙上の残渣を濾紙と共に白金皿にとり, 650° 以下で燃焼させて, 250cc のビーカーに移し, 亜鉛の分離に使つたフラスコの外部の残渣を HCl (1+9) 100cc で洗い, この

洗液をビーカーに加える。(フラスコの内側になお残渣がいくらかくっついていならばビーカーの上に急勾配に傾けて噴射ビンから水を噴射して洗う)。よくかきまぜて10分間放置し濾紙で濾過する(濾液の濁濁は考慮しなくてよい。)(濾紙上の残渣は水で3回洗い、白金皿(径6cm以上、高さ2cm以上)にとり後で回収される酸可溶のFe、Al及びBaSO<sub>4</sub>を合併するまで保存する)。濾液はアンモニア水で殆んど中和し(メチルレッド)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200mgを加え、指示薬をこわすためにBr-H<sub>2</sub>Oを溶液が明らかに着色するまで加え、次いで煮沸してBrを除去し、更にメチルレッドを加え、そしてなお殆んど沸騰している中にアンモニア水を黄色を呈するまで滴加する(過剰を避ける)。約3分間放置後濾紙で濾過する。熱NH<sub>4</sub>Cl溶液(2%)で洗い、濾紙及び残渣は酸不溶成分を含む白金皿に移す。濾液中のカルシウムは次の様にして定量する。濾液を煮沸するまで加熱し、カルシウムを(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>溶液で沈澱せしめ、ビーカーを3時間蒸気浴上に放置し、溶液を濾過し、沈澱は水で洗う。沈澱はH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1+4)25ccを含む水200ccに溶かし約70°に加熱し、KMnO<sub>4</sub>溶液で滴定し、消費したKMnO<sub>4</sub>溶液のccからCaOの%を計算する。

(3) 酸可溶マグネシウム 酸可溶カルシウムからの濾液中のマグネシウムは次の方法で定量する：酸可溶カルシウム定量の際Ca<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>の沈澱の濾液を200ccに濃縮しHCl(1+1)で酸性とし(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2~3g及びHCl(1+1)(全(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>が溶解した際に透明な溶液を生ずるに充分な量)を加える。冷後絶えずかきまぜながらアンモニア水で微にアルカリ性とし、更にNH<sub>4</sub>OH 2ccを過剰に加えて約12時間放置する。上澄液を濾去し、傾瀉法でNH<sub>4</sub>OH(1+10)で4回洗う。沈澱はHCl(1+1)に溶解し約150ccに稀釈し、少量の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を加え、沈澱は前のようにNH<sub>4</sub>OHで沈澱させ、12時間放置後濾過し、NH<sub>4</sub>OH(1+10)で塩化物の反応がなくなるまで洗い、磁製ルツボに入れ、熱灼し、送風lampで熱しMg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>として秤量しMgに換算する。

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 0.2187 = \text{Mg} \text{ 又は } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 0.3621 = \text{MgO}$$

(4) 硫酸バリウム装置 空気浴：Fisher burnerの上の三脚台上に3%磁製三角架を置く、この三角架上にNi又はFeのルツボ(内容約125cc)をおきルツボの頂に2- $\frac{1}{2}$ %磁製三角架をおく。この三角架で残渣を熔融するには白金皿を使用する。

定量法：白金皿中にとつておいた残渣(酸不溶部分及びカルシウムを沈澱前に回収した残渣の合併物)を650°以下で灰化する。灰分を平たい硝子棒で粉末とし水4ccで潤おし、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4ccを加え、覆蓋の下におき48%HFを皿の深さの約 $\frac{1}{4}$ まで満たす。空気浴上で時々その内容物を混和する様に揺動しながら、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>のみが残留している様に見える迄蒸発する。次いで注意してFisherバーナーの低い焰の上で煉物稠度になるまで加熱する(完全な乾固にしない様に注意する)次に粉末にしたK<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 15gを加え、熔融する迄加熱する。(加熱は徐々に温度をあげ透明な熔融物が得られるまで継続する)皿が赤熱され熔融物が橙赤色になつたならば熔融は完了する。皿をアスベスト板上に放置して冷却させて、熔融物を内容600ccのビーカーに移し、皿は熱硫酸(1+19)少量ずつ全量約150ccとなる迄洗い、熔融物が溶解する迄煮沸する。BaSO<sub>4</sub>はこの際沈降する。(若し沈澱がなければ溶液を500ccとし総Ti及総Feの定量を行う)。沈澱があれば溶液を蒸気浴上で1時間浸漬し、放冷して約400ccにうすめ、よくかきまぜてから更に2時間放置する。次いで最も微細な有効品質の濾紙で濾過し、濾液は500ccのメスフラスコ中に採集する。沈澱は水で3回充分に洗い、濾液は合併し500ccとし(Fe、Ti及びAlの定量用とする。沈澱は已知重量の磁製ルツボに移し、先ず低温度で濾紙を燃焼してから暗赤熱で熱灼し、BaSO<sub>4</sub>として秤量する(0.5%以下の残留物のときはBaSO<sub>4</sub>として計算すべきでない)。

### (5) 総チタン及び鉄

装置 Jones還元器：50ccのピンチコックビュレット(ピンチコック取附のない)をとり長いガラス管でガラス綿の充填物を底部の端に詰め込む、ビュレットの約15ccの標線の処まで20~30メッシュのアマルガム化した亜鉛\*)を充填し、ビュレットの下端を4"の長さの厚壁ゴム管(略々中間の処にScrewclampを付けてゴム栓(No7)に通せるガラス管に接続している)と固定する。このゴム栓(No7)は内容500ccの真空フラスコ及びフラスコの底から約2"以内に達する様な長さの硝子管を取付けたフラスコに合わせる。Jones還元器は使用しないときは水を充填しておく。

\*) 亜鉛はHgCl<sub>2</sub> 4g及びH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10ccを含む水200cc中に沈めることに依つてアマルガム化される。これはビュレットに入れる前に傾瀉法で水洗せねばならない。

測定法: BaSO<sub>4</sub> の濾洗液 500cc 中から 100cc を吸引してビーカー中に入れ, かきまぜながら H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5cc を加える。真空フラスコ中に 10% 鉄明ばん溶液 (Fe<sup>2+</sup> 及び KMnO<sub>4</sub> を還元するその他の物質を含まぬ) 10cc を入れ, フラスコを還元器に連絡させ, 真空を応用して, フラスコ中に液の通過するのを調整できる様に screwclamp を充分に開き, ビュレットのメニスカスが亜鉛のレベルに近く降下した時に更に溶液を加える。(アマルガム化した亜鉛を空気に決して晒さないようにするのが望ましい)。全溶液を添加し終つたときに同じ方法で水約 100cc を加える。最後の洗液のメニスカスが亜鉛のレベルに丁度達する前に screwclamp を閉じフラスコを取外す。内容物を内容 300cc の高壁ビーカーに移し H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3cc を加える。10cc のマイクロビュレットを使つて白色板上で 0.1 NKMnO<sub>4</sub> で先ず初の紅色となるまで滴定する。K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 3g 及び H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6.5cc. を水 100cc に含む溶液で盲験を行い検液と同一処理をして最後に同一の紅色を呈するまで滴定する。検体の滴定値から盲験の滴定値を差引く。

$$\text{補正滴定値} \times 0.008 = \text{TiO}_2 + \text{Fe}_2\text{O}_3$$

#### (6) 総鉄

試薬: 標準 TiCl<sub>3</sub> 溶液—0.05N: 15% TiCl<sub>3</sub> (市販品) 100cc に HCl 150cc を加え 2l にうすめ約 0.05N 溶液とし, 水素気流の設備ある容器中において残留する O を吸収せしむるため 2 日間放置する。

TiCl<sub>3</sub> 力価検定: FeSO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 3g を秤り 500cc のフラスコに移し, CO<sub>2</sub> の気流を導入し新に煮沸した水 50cc 及び 40% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25cc を加える。CO<sub>2</sub> の気流を遮ることなく速に 0.1NK<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 40cc を加える。次いで TiCl<sub>3</sub> 溶液を計算量の終末点近くまで加える。然る後速に NH<sub>4</sub>CNS 5g を加え滴定を完了する。Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 3g について H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>CNS, 及び CO<sub>2</sub> の気流を同一量使つて盲験を行う。

TiCl<sub>3</sub> 溶液の力価検定は普通の精密ビュレットで開放ビーカー中で行い, 普通の共栓ビン中に保存し定量に使う度毎に前以て再検定すればよい。

測定法: BaSO<sub>4</sub> の濾洗液 100cc を内容 150cc のビーカー中に吸引してとり, NH<sub>4</sub>CNS 1g を加え, 徐々によくかきまぜながら 0.05N TiCl<sub>3</sub> を精密ビュレットから滴加して赤色の消失するまで滴定する。K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 3g 及び H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6.5cc を水 100cc 中に含む溶液で盲験を行う。

$$\text{補正滴定値} \times 0.004 = \text{Fe}_2\text{O}_3$$

#### (7) 総チタン %総 (TiO<sub>2</sub> + Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) - %総 (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) = %総 TiO<sub>2</sub>

(8) 鉄, チタン及びアルミニウムの総酸化物 BaSO<sub>4</sub> の濾洗液 250cc を内容 600cc のビーカー中に吸引し, Me. Red. 指示薬数滴を加え, NH<sub>4</sub>Cl 5g を加え煮沸する。NH<sub>4</sub>OH を滴加して中和し (丁度明らかに黄色を呈する程度) 約 3 分間放置し, 12.5cm の濾紙で濾過する。熱 NH<sub>4</sub>Cl 溶液 (2%) で数回洗う。濾紙は目方を秤量したルツボに置き炉又は空気浴で乾燥する。室温でマッフル炉に移し, 約 1.100° にまで加熱し, 恒温となるまで熱灼すると Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + TiO<sub>2</sub> の総酸化物を得る。

#### (9) 総アルミニウム %総 (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + TiO<sub>2</sub>) - %総 (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + TiO<sub>2</sub>) = %総 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

(10) 酸不溶カルシウム アンモニア沈澱の濾洗液中の Ca は次の様にして定量する: 濾洗液を煮沸するまで加熱し, Ca を (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 溶液で沈澱させる。ビーカーを 3 時間水浴上に放置後濾過し, 沈澱は熱湯で洗う。

次いで沈澱を H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1+4) 25cc を含む水 200cc に溶かし, 約 70° に加熱し, KMnO<sub>4</sub> 液で滴定する。消費した KMnO<sub>4</sub> の cc 数から % CaO を計算する。

(11) 酸不溶マグネシウム 酸不溶カルシウムの濾洗液中の Mg は次の様にして定量する。濾洗液を 200cc に濃縮し, HCl(1+1) で酸性とし (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2~3g と HCl(1+1) を全 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を溶解したときに透明な溶液となる迄加える。冷後絶えずかきまぜながら NH<sub>4</sub>OH で微にアルカリ性とし, NH<sub>4</sub>OH を 2cc 過剰に加え, 約 12 時間放置する。上澄液は濾去し, 沈澱は NH<sub>4</sub>OH(1+10) で傾瀉法により 4 回洗う。沈澱を HCl(1+1) にとかし約 150cc にうすめ, 少量の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を加え, 前の様に NH<sub>4</sub>OH で沈澱させる。12 時間放置後濾過し, NH<sub>4</sub>OH(1+10) で塩化物の反応のなくなる迄洗い, 後磁皿に移し, 熱灼し, Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> として秤量し Mg 又は MgO に換算する。

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 0.2187 = \text{Mg} \text{ 又は } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 0.3621 = \text{MgO}$$

## [2] 改良試案法

(1) 総亜鉛 試薬: ① Wulfing 液; 炭酸アンモニウム 80g をアンモニア水 90cc 及び水 375cc の混液に

溶かし、アルコール475ccを加える。

② 洗滌液：Wulfing液とアルコールの等容量の混液

③ アンモニア塩化アンモニウム緩衝液：塩化アンモニウム 67.5gを強アンモニア水（比重0.90）570ccに溶かし水で1ℓとする。

④ Murexide 指示薬：Murexide (Ammonium Purpurate) の乾燥粉末0.1gと食塩2.5gを研磨混合する（本指示薬は徐々に力価が減ずるから2ヶ月経たものは使用しない方がよい）。本指示薬はpH11.2以上でCa<sup>2+</sup>に紫色を呈する。

⑤ EBT指示薬：Eriochrome Black T粉末0.5gと塩酸ヒドロキシルアミン4.5gをメチルアルコール100ccに溶かす。（本指示薬は、pH9.6~10.4でZn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>及びCa<sup>2+</sup>に青色を呈する。）

⑥ N/50EDTA液：Disodium Ethylenediamine Tetraacetic Acid 4gを水に溶かし全量を1ℓとする。（本液は使用前に標定する。）

#### EDTA液の標定

(a) 標準カルシウム液の調製；純炭酸カルシウムの130°で3時間乾燥したものの約1gを正確に秤り、水10ccを加え稀塩酸10ccを用いて、注意して溶かし煮沸して炭酸ガスを除き水で1ℓ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；i) Murexide 指示薬法；300ccのビーカー中に標準カルシウム液20ccを精密に量り水を加えて50ccとし、5N水酸化ナトリウム液2cc、Murexide 指示薬0.2gを加えてN/50EDTA液で紫色を呈するまで滴定する。ii) E. B. T. 指示薬法；300ccのビーカー中に標準カルシウム液20ccを精密に量り水を加えて50ccとし、③の緩衝液1cc、E. T. B. 指示薬6滴を加え、N/50EDTA液で青色を呈するまで滴定する。

$$\begin{aligned} \text{N/50EDTA 液 1cc} &= \frac{R \times 20}{\text{滴定に要した EDTA 液の cc 数}} && \text{Ca(mg)} \\ &= \frac{R \times 27.98}{\text{〃}} && \text{CaO(mg)} \\ &= \frac{R \times 12.13}{\text{〃}} && \text{Mg(mg)} \\ &= \frac{R \times 20.11}{\text{〃}} && \text{MgO(mg)} \\ &= \frac{R \times 32.61}{\text{〃}} && \text{Zn(mg)} \\ &= \frac{R \times 40.60}{\text{〃}} && \text{ZnO(mg)} \end{aligned}$$

#### 試験操作

検液の調製；試料約2gを白金皿に秤り、微に灰色になるまで熱灼して灰化する。（600~650°），灰分を500ccの共栓三角フラスコに宏口漏斗で移し、Wulfing液100ccを漏斗を洗い乍ら加える。栓をして1分間はげしくふりまぜて1~2時間放置し、沈澱物を12.5cmの濾紙で濾過し、フラスコは②洗滌液で洗い、その洗液は濾紙上に注加して濾紙上の残留物（沈澱物Ⅰ）をよく洗い、洗液を濾液に合し（濾液Ⅰ），水を加えて200ccとし検液とする。

・ 定量試験；検液50ccを300ccのビーカーにとり、水30cc、アンモニア塩化アンモニウム緩衝液2cc、E. B. T. 指示薬6滴を加え、N/50EDTA液で青色を呈するまで滴定する。N/50EDTA液1ccはZn0.8138mg又はZn0.6538mgに対応する。

#### (2) 総カルシウム及び総マグネシウム

a 酸可溶カルシウム及び酸可溶マグネシウム 試薬：①Murexide 指示薬；前掲 ②E. B. T. 指示薬；前掲 ③N/50E. D. T. A. 液；前掲 ④アンモニア塩化アンモニウム緩衝液；前掲 ⑤5N水酸化ナトリウム液 ⑥2%塩化アンモニウム液 ⑦塩酸(1+9) ⑧臭素水

#### 試験操作

検液の調製；(4) 総亜鉛定量の際に得た濾紙上の残渣（沈澱物Ⅰ）を濾紙と共に白金皿にとり、650°以下で燃焼したのち、250ccのビーカーに移し、亜鉛の分離に使ったフラスコに附着している残渣をHCl(1+9)100cc

で洗い, この洗液をビーカーに加える. よくかきまぜて10分間放置し濾紙で濾過し水で3回洗う. (沈澱物Ⅱ) 濾洗液Ⅱはアンモニア水で殆んど中和し(メチルレッド) 硫酸アンモニウム 0.2g を加え, 臭素水を溶液が明らかに着色するまで加える. 次いで煮沸して臭素を除去し, さらにメチルレッドを加えてなお殆んど沸騰している中にアンモニア水を黄色を呈するまで滴加する. 約3分間放置後沈澱物(沈澱物Ⅲ)を濾紙で濾過し, 熱2%塩化アンモニウム液で洗い, 濾洗液を合し, 臭素水の過剰を加え, 次いで煮沸して臭素を除去し無色とした後水を加えて250ccとし, これをカルシウム及びマグネシウム定量用検液とする. 濾紙及び沈澱物は酸不溶成分を保存してある白金皿に合併する(沈澱物Ⅱ+Ⅲ)

#### 定量試験

i) カルシウム及びマグネシウムの定量; 検液25ccを300ccのビーカー中にとり, 水25cc, アンモニア塩化アンモニウム緩衝液2-3cc, E. B. T. 指示薬6滴を加えて, N/50EDTA液で青色となるまで滴定し, その消費数を Acc とする.

ii) カルシウムの定量; 検液25ccを300ccのビーカー中にとり, 5N水酸化ナトリウム液5cc, Murexide指示薬0.25gを加えて, N/50EDTA液で紫色を呈するまで滴定する. その消費数を Bcc とする.

iii) マグネシウムの定量; (A-B) cc N/50EDTA液1ccはCaO 0.5608mg 又はCa 0.4008mgに対応する. N/50EDTA液1ccはMgO 0.4032mg 又はMg 0.2432mgに対応する.

#### b 酸不溶カルシウム及び酸不溶マグネシウム

試薬; aに同じ.

#### 試験操作

検液の調製; 上記aの検液調製の際白金皿中に保存しておいた合併残渣(沈澱物Ⅱ+Ⅲ)を650°以下で灰化する. 灰分を平たいガラス棒で粉末とし水4ccで潤おし, 硫酸4ccを加え, 48%弗化水素酸を皿\*の深さの約1/4まで滴したのち, 覆蓋下小火焰で蒸発し, 次いで小火焰上で煉物硬度になるまで注意して加熱する. さらに焦性硫酸カリウム粉末15gを加え熔融するまで加熱する. 熔融が終れば皿をアスベスト板上に放置して冷却し, 熔融物を500ccのビーカーに移し, 皿は熱硫酸(1+19)少量ずつで全量約150ccになるまで洗い, 熔融物が溶けるまで煮沸する. 完全に溶解したならば全量を500ccとし, アルミニウム, 鉄, チタニウム, 酸不溶カルシウム及び酸不溶マグネシウム定量用の検液とする. リトボン含有の白粉の場合はBaSO<sub>4</sub>(沈澱物Ⅳ)があつて完全に溶けないから濾過洗浄し. 濾洗液Ⅳを500ccとし検液とする.

定量試験; 検液250ccを500ccのビーカーにとり, メチルレッド指示薬数滴を加え, 塩化アンモニウム5gを加え煮沸する. 次いでアンモニア水を滴加して中和し, 約3分間放置後沈澱物Ⅴを12.5cmの濾紙で濾過し, 熱2%塩化アンモニウム液で数回洗い濾洗液Ⅴに過剰の臭素水を加え, 煮沸し無色となるに至り, 水を加えて\*\*250ccとし, 以下a試験操作の定量試験と同様にして酸不溶カルシウム及びマグネシウムを定量する.

\*白金皿, 径6cm以上, 高さ2cm以上. \*\*濃縮する必要のあることもある.

### (3) チタニウム, アルミニウム及び鉄

#### a (チタニウム, アルミニウム, 及び鉄)の酸化物総量

試験操作 定量試験; (2)bの定量試験操作中のアンモニア水で生じた沈澱物Ⅴは濾紙と共に予め秤量した白金ルツボにとり, 炉または空気浴で乾燥した後マッフル炉に移し, 約1100°になるまで加熱し, 恒量となるまで熱灼すると(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + TiO<sub>2</sub> + Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)の酸化物を得る.

#### b チタニウム及び鉄

試薬 ①液状亜鉛アマルガム; 精製水銀450gに特級亜鉛10gを加え, 稀硫酸の少量を加え表面を覆い, 水浴上に熱し, とどき振り動かし金属亜鉛の消失するのを待つて冷却したのち密栓して保存する. ②2.5%硫酸 ③10%鉄アラム液 ④飽和硫シアン化アンモニウム液 ⑤N/10過マンガン酸カリウム標準液 ⑥N/10塩化第二鉄液; 純塩化第二鉄(FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O)27gに適量の水及び塩酸(比重1.12)10ccを加え, 温めて溶かし, 冷後水を加えて1lとする.

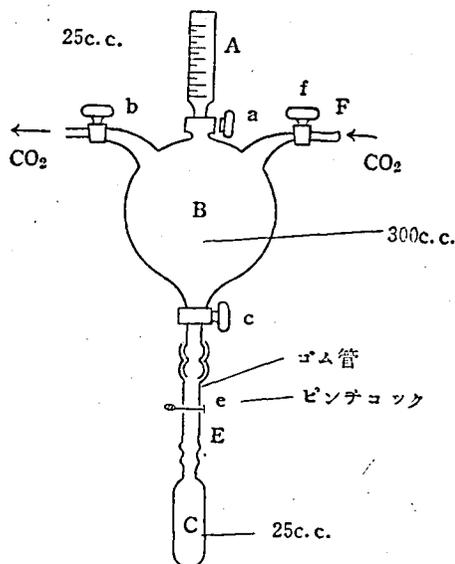
本液1ccはFe 0.005585gに対応する.

\* [この液20ccに塩酸10ccを加え還元したのち, 後記の如く液状亜鉛アマルガムで濃度既知のN/10過マンガン酸カリウム標準液で滴定し力価を定める. この液1cc中に含まれる鉄の量を求めておく.]

a/N-KMnO<sub>4</sub>液 vcc を要したとすれば

$$55.85 \times a \times \frac{v}{1000} \times \frac{1}{20} = \text{塩化第二鉄標準液 1cc 中の Fe (g)} \quad ]$$

装置



試験操作

定量試験；まずCに2.5%硫酸を入れ、ゴム管EでBに接続し、Cの活栓を開いてCを少し上げ硫酸が活栓cの所まで達しているようにする。Cを閉じAに液状アマルガム約25ccを入れ、活栓aを開いて液状亜鉛アマルガムをB内に落下させる。次に(2b)で調製した検液50ccに硫酸2.5ccを加えた試料をAから注入し、水でA内を洗浄する。10%鉄アラム液5cc及び燐酸3ccを加え、活栓aを閉じ活栓b及びfを開いて炭酸ガスを通じ、B内の空気を炭酸ガスで置換し、b及びfを閉じる。そして還元器を15~20分間激しくふり動かして還元する。還元が終つたならば活栓cを開きEの部分を軽くおさえ、また、ゆるめる操作を繰返してB内の液状亜鉛アマルガムを全部Cに入れ、C中の稀硫酸と置換する。Eの接続を離しaの活栓を開いて出来るだけ速にN/10過マンガン酸カリウム液で滴定し(淡紅色となる点を終末点とする)、チタニウム及び鉄の含量に相当するN/10過マンガン酸カリウム液の消費cc数(V<sub>1</sub>)を

求める。

別に、検液50ccをとり再び同様に還元し飽和硫シアン化アンモニウム液約5ccを加え、塩化第二鉄標準液で滴定し(消滅しない微赤色を呈する点を終末点とする)含有するチタニウムに相当するN/10過マンガン酸カリウム液の消費cc数(V<sub>2</sub>)を求める。

別に検液を加えないで空試験を行い補正する。

$$V_1 (\text{補正值}) \times 0.0799g = \text{試料 500cc 中の TiO}_2 + \text{Fe}_2\text{O}_3$$

$$V_2 (\text{補正值}) \times 0.0799g = \text{試料 500cc 中の TiO}_2$$

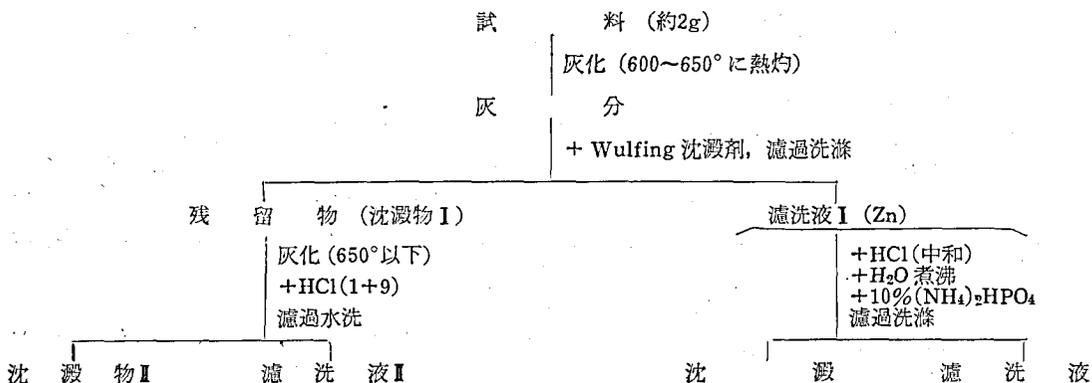
$$[V_1 (\text{補正值}) - V_2 (\text{補正值})] \times 0.0799g = \text{試料 500cc 中の Fe}_2\text{O}_3$$

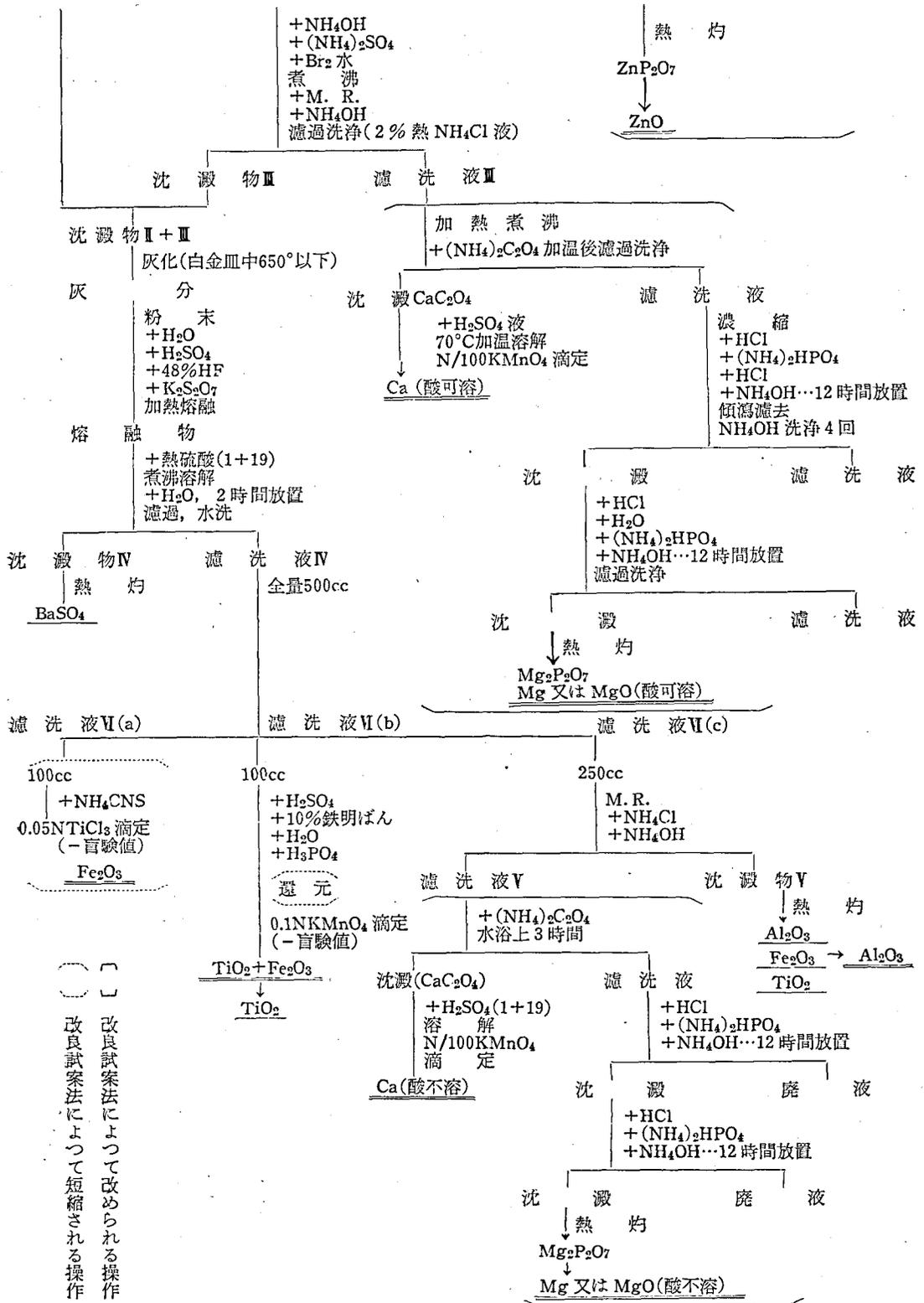
C アルミニウム

$$(\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2 + \text{Fe}_2\text{O}_3) \% - (\text{TiO}_2 + \text{Fe}_2\text{O}_3) \% = \text{Al}_2\text{O}_3 \%$$

上記〔1〕及び〔2〕両法の試験法を比較対照に便利のようにその操作を図示すると第1表のようになる。即ち改良試案法は〔 〕内の操作をE. D. T. A. 法に依つて簡易化し、又〔 ( ) 〕内の操作は改変を加えた。

第1表 白粉類中の常成分の系統的定量分析法





〔 〕 改良試案法によつて改められる操作  
 ( ) 改良試案法によつて短縮される操作

## [3] 試験結果

上記の A. O. A. C. 法及び改良試案法によつてパピリオ化粧品株式会社から提供をうけた粉白粉(表示処方;タルク49.5%;カオリン26.5%;ステアリン酸亜鉛5%;亜鉛華2%;澱粉3%;炭酸カルシウム10%;色素1%;香料1%)を検体として試験の結果,次の成績を得た.

## (A) 総亜鉛 (第1表濾洗液Ⅰの条項)

A. O. A. C. 法(1)総亜鉛 (ZnOとして)	改良試案法(1)総亜鉛 (ZnOとして)
① 2.48%	① 2.38%
② 2.53%	② 2.29%
③ 2.40%	③ 2.36%
	④ 2.51%
	⑤ 2.27%

## (B) 酸可溶カルシウム (第1表濾洗液Ⅱの条項)

A. O. A. C. 法(2)酸可溶カルシウム (CaCO <sub>3</sub> として)	改良試案法(2)総カルシウム及び総マグネシウム (a) 酸可溶カルシウム (CaCO <sub>3</sub> として)
① 9.56%	① 9.68%
② 9.74%	② 10.05%
③ 9.75%	③ 10.06%
④ 9.69%	④ 9.96%
⑤ 9.59%	⑤ 9.72%

## (C) 酸可溶マグネシウム (第1表濾洗液Ⅱの条項)

A. O. A. C. 法(3)酸可溶マグネシウム (MgOとして)	改良試案法(2)総カルシウム及び総マグネシウム (a) 酸可溶マグネシウム (MgOとして)
① 0.74%	① 0.66%
② 0.63%	② 0.66%
③ 0.65%	③ 0.68%
④ 0.68%	④ 0.76%
⑤ 0.71%	⑤ 0.72%

## (D) 酸不溶カルシウム (第1表濾洗液Ⅴの条項)

A. O. A. C. 法(10)酸不溶カルシウム (CaOとして)	改良試案法(2)総カルシウム及び総マグネシウム (b) 酸不溶カルシウム (CaOとして)
0%	0%

## (E) 酸不溶マグネシウム (第1表濾洗液Ⅴの条項)

A. O. A. C. 法(11)酸不溶マグネシウム (MgOとして)	改良試案法(2)総カルシウム及び総マグネシウム (b) 酸不溶マグネシウム (MgOとして)
① 16.41%	① 16.21%
② 16.56%	② 16.03%
③ 16.96%	③ 16.52%
④ 16.42%	④ 16.21%
⑤ 16.09%	⑤ 16.39%

## (F) 硫酸バリウム (第1表濾洗液Ⅳの条項)

本試験に使用した検体からはBaSO<sub>4</sub>は検出されなかつた.

## (G) チタニウム及び鉄 (第1表濾洗液Ⅵ(b)の条項)

A. O. A. C. 法(5)総チタン及び鉄 (TiO <sub>2</sub> +Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	改良試案法(3)チタニウム, アルミニウム及び鉄(b)チタニウム及び鉄 (TiO <sub>2</sub> +Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
① 2.37%	① 2.45%
② 2.27%	② 2.28%
③ 2.41%	③ 2.34%
④ 2.28%	④ 2.12%

## (H) 総鉄 (第1表濾洗液Ⅵ(a)の条項)

A. O. A. C. 法(6)総鉄 (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として)	改良試案法(3)の(b)チタニウム及び鉄 計算値[% (TiO <sub>2</sub> +Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) - %TiO <sub>2</sub> ]    (G)    (I)
① 0.378%	① 0.39%
② 0.376%	② 0.25%
③ 0.376%	③ 0.38%
④ 0.280%	④ 0.27%

## (I) チタニウム (第1表濾洗液Ⅵ(b)の条項)

A. O. A. C. 法(7)総チタン計算値[% (TiO <sub>2</sub> +Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) - %Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ]	改良試案法(3)の(b)チタニウム及び鉄 (TiO <sub>2</sub> として)
① 1.99%	① 2.06%
② 1.99%	② 2.03%
③ 2.03%	③ 1.96%
④ 2.00%	④ 1.85%

(J) チタニウム, アルミニウム及び鉄の総酸化物

(第1表沈澱物Vの条項)

A. O. A. C. 法(8)鉄, チタン及びアルミニウムの総酸化物=改良試案法(3)の(a) Ti, Al及びFeの酸化物総量

- ① 12.33%
- ② 12.16%
- ③ 12.79%
- ④ 12.49%

(K) 総アルミニウム (第1表沈澱物Vの条項)

A. O. A. C. 法(9)総アルミニウム 計算値(J)-(G)	改良試案法(3)の(C)アルミニウム 計算値(J)-(G)
① 9.96%	① 9.98%
② 9.89%	② 9.88%
③ 10.38%	③ 10.45%
④ 10.21%	④ 10.37%

第2表 検体の表示処方と試験結果との比較表

粉白粉処方	A. O. A. C. 法	改良試案法
タルク 49.5%	33.78~59.59%	33.38~58.61%
カオリン 26.5%	25.58~27.9%	25.73~28.07%
ステアリン酸亜鉛 <sup>*1</sup> 5% } ZnOとして約	2.47%	2.36%
亜鉛華 <sup>*2</sup> 2% } 2.63%		
酸化チタン <sup>*3</sup> 2%	2.00%	1.97%
澱粉 3%	—	—
炭酸カルシウム <sup>*4</sup> 10%	9.67%	9.89%
着色料 1%	—	—
香料 1%	—	—

上記(A)~(K)の試験結果の平均値を求め本検体白粉の処方と比較すると第2表となる。

考 察

(1) 総亜鉛の項で A. O. A. C. 法では Wulfing 液で振盪後、一夜間放置することになっているが、これは 1~2 時間で充分なので改良試案法では、1~2 時間に短縮した。

(2) 酸可溶カルシウムの項で、第1表Ⅱの処理中、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えるのは NH<sub>4</sub>塩の存在で Mg<sup>2+</sup>を溶存せしめるためであるが、特に硫酸アンモニウムを使用するのは、試料中のバリウムを硫酸バリウムとして沈澱させる為である。然し、バリウムが存在しない場合には、カルシウムが、硫酸塩よりも塩酸塩の方が遙かに水に対する溶解度が大であるから、塩化アンモニウムを使用した方が、カルシウムを溶存させるために、より確実である。

また、A. O. A. C. 法で使用する KMnO<sub>4</sub>液は、修酸カルシウムの沈澱の多少により、N/10 又は N/100 を選定する。

(3) 硫酸バリウムの項を A. O. A. C. 法では、一項目としているが、一般には、粉白粉中に主成分としては使用されていないから、改良試案法では、特別に一項目として採用することを止めた。

(4) チタニウム及び鉄の定量の場合、A. O. A. C. 法の Jones 還元器による還元法よりも、所謂“小林、中園法”の液状アマルガムを使用する還元法が、種々の利点がある<sup>\*5</sup>ので、改良試案法では後者を採用した。

また、A. O. A. C. 法では、わざわざ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を TiCl<sub>3</sub>液滴定で求めているが、TiCl<sub>3</sub>液は力価が常に変化するもので、長期の保存に耐えないばかりでなく、H<sub>2</sub> gas, CO<sub>2</sub> gas を使用するため特別な装置を必要とする不便がある。しかも、鉄は夾雑物として来るだけであるから、常成分分析上特にそれを求める必要はなく、A. O. A. C. 法の様に TiO<sub>2</sub>を計算的に求めるよりも、むしろ、改良試案法の様に、Fe 共存下で TiO<sub>2</sub>を求め、これからその差によつて Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を計算的に求める方が合理的であろう。

(5) 第1表によつて明かなように改良試案法は操作が簡易化されたから時間的にも非常に短縮される。即ち、(A) 総亜鉛では処要時間約 16 時間が約 5 時間に、(B), (C)酸可溶カルシウム及びマグネシウムでは処要時間約 35 時間が、僅か約 5 時間に、(D), (E)酸不溶カルシウム及びマグネシウムも同じく約 35 時間が約 5 時間というように大幅に時間の節約が出来る。

(6) 第2表の検体白粉の表示処方と試験結果との比較表中タルクの%は、タルクの組成を△印は 2MgO · SiO<sub>2</sub> · nH<sub>2</sub>O (化粧品原料規格案)とし、●印は 2MgO · 3SiO<sub>2</sub> · xH<sub>2</sub>O (第二改正国民医薬品集)と見做し、n=1, x=1

として、酸可溶及び酸不溶マグネシウムの総和から換算したが、タルクは品質が一定しないので、分子量が一定しない。分子量のとり方如何によつて非常に大差を生ずるから MgO のみで推定値を求めるのは無理である。A. O. A. C. 記載の別法 SiO<sub>2</sub> の定量法により SiO<sub>2</sub> を定量し、カオリン中の SiO<sub>2</sub> を差引き、これと併せて推定すれば処方量 49.5% にかかなり近い数値が得られる。またカオリンの%は、その組成を△印は Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 2SiO<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (日局Ⅵ) とし、●印は Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 3SiO<sub>2</sub> (JIS) と見做し、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の定量値から換算した。

### 結 論

試験結果 (第2表参照) から明らかなように、煩雑な A. O. A. C. 法によらないで、改良試案法によつて、遙かに迅速に同精度の分析値を得る事が出来た。

註 \*1. ステアリン酸亜鉛 純度規準は, Toilet Good Association で ZnO として 13~15.5% \*2. 亜鉛華 純度規準は化粧品原料規格案では, 99%以上, \*3. 炭酸カルシウム 純度規準は, T. G. A. で 98.5%以上 \*4. 酸化チタン 純度規準は第二改正国民医薬品集で 98.5%以上 \*5. 後記文献中 \*5 とあるもの

### 文 献

- (1) Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists.
- (2) Methods of Toilet Good Association.
- (3) Modern Cosmeticology.
- (4) Formulae Nationales Japonicae.
- (5) 化学工業試験法上巻 p. 601
- (6)\*5. 化学実験学, 第1部分分析化学Ⅱ, p. 11 液状アマルガム応用分析法
- (7) 中園環: 日化. 42, 526, (1921)
- (8) 菊地末太郎: 日化. 43, 544, (1922)
- (9) 加納直綱: 日化. 43, 550, (1922)
- (10) 木羽敏泰: 日化. 59, 54, (1938)
- (11) 日化. 59, 667, (1938)
- (12) 木羽敏泰: 日化. 59, 1280, (1938).

### Summary

- (1) The authors found that some procedures in the A. O. A. C. method of the determination of the major inorganic substances in face powder are tedious, for instance, the separation and the gravimetric determination of Ca, Mg, and Zn. They modified it, therefore, into volumetric one by using E. D. T. A.
- (2) For the determination of Ti and Fe, the authors modified the method of precarious reduction by Jones reductor into liquid zinc amalgam method of KOBAYASHI and NAKAZONO.
- (3) The authors determined Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by the differential titration with FeCl<sub>3</sub> solution instead of TiCl<sub>3</sub> solution.

Received April 30, 1955

## 局方ケイ酸アルミニウムの試験法について 附 合成ケイ酸アルミニウムの試製

市川重春, 山手昇

On the Improvements of the Tests for Natural and  
Synthetic Aluminium Silicate in J.P. VI; and on  
the Preparation of Aluminium Silicate  
By Shigeharu ICHIKAWA and Noboru YAMATE

まえがき ケイ酸アルミニウムは U.S.P., N.F., B.P., 等に収載されていないが日局VIには合成ケイ酸アルミニウム及び天然ケイ酸アルミニウムが新たに収載された。我々は市販のケイ酸アルミニウムについて日局VIの試験を行つている中に種々の疑義を生じたのであるが、前述の様にケイ酸アルミニウムは外国薬局方ではなく日本独特のものであるから外国薬局方と比較対照する訳にもゆかないので、この疑義を解決するためにケイ酸アルミニウムを試製し、この試製品と市販品と比較試験を行つたところ、日局VIの試験法中不合理な点を認めたのでその試験成績について報告する。

## 1 市販ケイ酸アルミニウムの局方試験

- I) 市販天然ケイ酸アルミニウムの局方試験の結果を表示すると Table 1 となる。  
II) 市販合成ケイ酸アルミニウムの局方試験の結果を表示すると Table 2 となる。  
III) 市販合成ケイ酸アルミニウムについて NaOH液 (1:5), NaOH液 (1:6) に対する溶状試験の結果を表示すると Table 3, 4 となる。

Table 1 Tests for Commercial Natural Aluminium Silicate in J.P. VI

Sample		A	B	C	Limit
Adsorption		22cc	24cc	20cc	0.15% methylene blue 25cc (20cc)
Purity	Soluble salt	3.3mg	4.5mg	12.4mg	not more than 40mg
	Chloride	0.1cc	0.12cc	0.2cc	not more than N/50 HCl 0.3cc
	Sulfate	0.5mg	0.6mg	2.3mg	not more than 30mg
	Arsenic	sample 0.6g	sample 0.7g	sample 1g	sample 1g (0.5g)
	Heavy metals	0.004%	0.0043%	0.0046%	not more than 0.003% (0.005%)
Free acid or alkali		neutral (pH=5.8)	neutral (pH=5.9)	neutral (pH=6.2)	neutral to* litmus paper
Loss on drying		16.64%	19.23%	14.23%	not more than 20%

註: 日局VI規定欄中 ( ) 数字は昭和 28. 10. 2 厚生省告示第 319 号第六改正日本薬局方追補改正

\* Free acids or alkali: 局方は 1g に水 20cc を加えふりまぜて濾過した液についてリトマス紙で試験するが試みに pH で測定した値を ( ) 内に示す, なお酸性白土 pH=4.9, ペントナイト pH=8.6 を示した。

Table 2 Tests for Commercial Synthetic Aluminium Silicate in J.P. VI

Sample		A	B	C	Limit
Antacid power		6.51%	6.99%	6.69%	more than 5%
	Soluble salt	9.6mg	14.8mg	6.4mg	not more than 40mg
	Chloride	0.08cc	0.10cc	0.17cc	not more than N/50 HCl 0.3cc



- 4) Alumino tetra Kieselsäure  $Al_2O_3 \cdot 4SiO_2 \cdot H_2O$   
 5) Alumino hexa Kieselsäure  $Al_2O_3 \cdot 6SiO_2 \cdot 3H_2O$ ;  $Al_2O_3 \cdot 6SiO_2 \cdot 9H_2O$

なおカオリン及び陶土はアルカリ長石から化成したもので(2)の Kaolinite,  $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$  に属す,  $Al_2O_3 \cdot K_2O \cdot 6SiO_2 + 2H_2O = K_2O \cdot 4SiO_2 + Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$ , 又酸性白土は  $Al_2O_3 \cdot 6SiO_2 \cdot xH_2O$  の式が与えられ, (5)に属することになっているが, 小林久平氏は  $Al_2O_3 \cdot 4SiO_2 \cdot H_2O + aq$  と非晶質ケイ酸  $xSiO_2 \cdot yH_2O$  との複合物であるといっている。

さて酸性白土とメチレンブルウとの反応は純粋な物理的吸着作用ではなく造塩反応であつて液の pH によつて著しく影響される。又酸性白土の石油, 油脂に対する脱色作用はメチレンブルウに対する脱色機構と異なるからメチレンブルウ試験で酸性白土を評価する事は不適当であるという説もあるが, 酸性白土メチレンブルウ吸着力はカオリンに比し遙かに大であるから, 酸性白土系のものを選んで採用すれば吸着力の不適の点は解決できる。

昭和28年10月2日厚生省告示第319号で第六改正日本薬局方追補を行い天然ケイ酸アルミニウム吸着力中「25cc」を「20cc」に改め, 純度試験中砒素は「本品1g」を「本品0.5g」に改め, 又重金属は「0.003%」を「0.005%」と改正されたので Table 1 検体は合格することになった。

■ 市販合成ケイ酸アルミニウムの局方試験成績についての考察. 市販合成ケイ酸アルミニウムについて日局Ⅵの試験を行つたところ, Table 2 に見る様に制酸力, 純度試験及び乾燥減量等はいずれも適合するが, 性状及び確認試験の一部に疑義を認めた。

i) 性状: 「本品1gは水酸化ナトリウム液(1:5)10ccと加熱すれば分解して溶け」とあるが10ccでは加熱してもとけなかつたが30ccを用いると各試料とも澄明に溶けた。

ii) 確認試験※) 「本品0.2gを水酸化ナトリウム液(1:6)10ccに溶かし, 塩酸を加えて酸性としたのちアンモニア試液で中和した液は, 一般試験法第3項のアルミニウムの反応を呈する」というアルミニウムの確認試験を市販の合成ケイ酸アルミニウムについて行つたところ Table 4 に見るように, 各試料共室温では水酸化ナトリウム液(1:6)10ccには溶けない。又液を増量しても溶け難いが少し加熱すれば各試料とも溶け, 放冷後も澄明を保ちアルミニウムの確認試験を行うことができた。この事実はケイ酸アルミニウムがアルカリと反応することによつて, アルミン酸ナトリウムとなり, ケイ酸はケイ酸ナトリウムとなつて溶けることに基づくもので室温では生起し難く加熱することによつて反応が促進されるものと思われる。

※) JESの規定は「0.2gを10%水酸化ナトリウム液10ccに溶かし」となつている。

IV 市販合成ケイ酸アルミニウムの組成  $Al_2O_3$ ,  $SiO_2$ , 水分並びに熱灼減量を定量したところ Table 5 の結果を得た。

Table 5 Quantitative Analysis of Commercial Synthetic Aluminium Silicate in J. P. Ⅵ

Sample	$SiO_2$ (%)	$Al_2O_3$ (%)	Loss on drying (110°C) (%)	Loss on ignition (%)	$Al_2O_3 : SiO_2$
A	60.35	9.74	17.34	23.43	1:6.20
B	59.05	11.00	17.76	23.41	1:5.37
C	58.88	9.96	19.16	27.29	1:5.91

V 合成ケイ酸アルミニウムの製造試験 上記の性状及び確認試験の疑点を解決するために合成ケイ酸アルミニウムを試製し, この自製品と市販品との比較試験を行つた。

文献による主な合成ケイ酸アルミニウムの製法

i) Patrick<sup>2)</sup>: ケイ酸ナトリウム (bisilicate, 比重1.15~1.22) から得たシリカゲルを原料としている。このシリカゲルの製法によつて製品の吸着能力に差異を生ずるといふ。

ii) Nckritsche法<sup>3)</sup>: A) 硫酸アルミニウム 666.6 分に  $Na_2SiO_3$  240 分を加え沈澱を16°で乾燥する。B) 硫酸アルミニウム 85g に水ガラス 50cc を加えて製する。反応式は A, B 両方共  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O + 3Na_2SiO_3 = Al_2(SiO_3)_3 + 3Na_2SO_4 + 18H_2O$

iii) 磯部法<sup>4)</sup>: 水ガラス溶液にアルミニウム塩溶液を加えて, ケイ酸アルミニウム塩溶液を工業的に製造し

た。即ち水ガラス600lにつきケイ酸ナトリウム約600ポンドを加えて溶かし、これに濃塩酸20ポンドを加えてよく混合し沈澱するケイ酸を溶かす。この液を10%ミョウバン液約1000l中に80°で徐々に混和しながら注ぎ、生じた沈澱を圧搾して充分に液を除き、金網から押出して200~400°で乾燥し、これを水洗し溶性塩類を除いて再乾燥する。

上記のように合成ケイ酸アルミニウムの製法はケイ酸ナトリウム溶液に溶性アルミニウム塩を作用させるのであるが、ケイ酸ナトリウムはケイ酸とアルカリの割合に種々のものがある。すなわち  $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$ ;  $\text{Na}_2\text{O} (\text{SiO}_2)_3$ ;  $\text{Na}_2\text{O} (\text{SiO}_2)_4$  はその代表的のものであつて、この他にこれ等の中間の割合のケイ酸ナトリウムが無数に存在する。磯部氏<sup>4)</sup>によればケイ酸アルミニウムを造るに當つて、ケイ酸含量の多い水ガラスから造つたものは極端に収縮する事なく沈澱物の有するコロイドの吸着性を多分に保有したまゝの形で固型体とすることができし、又吸着用のケイ酸アルミニウムを造るに最も適当なものと考えられるケイ酸ナトリウム中の珪酸の割合は、約  $\text{Na}_2\text{O} \cdot (\text{SiO}_2)_{2.5}$  から  $\text{Na}_2\text{O} (\text{SiO}_2)_4$  の範囲のもので、 $\text{Na}_2\text{O} (\text{SiO}_2)_{2.5}$  に近い成分の水ガラスから造つたケイ酸アルミニウムは相当の収縮を来すが吸着力強く、又アルミニウム塩水溶液中に水ガラス溶液を加え沈澱させる反応の温度は40°~50°が最も好結果を与え、アルミニウム塩としてはミョウバンが最も吸着力の大きなものを与えるといふ。

合成ケイ酸アルミニウムは原料や製法により組成は一定しないが、我々はミョウバン、硫酸アルミニウム及び水ガラスを用いて種々の条件において試製を行つた。

### 実 験

原料: i) ミョウバン  $\text{KAl} (\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  特級, ii) 硫酸アルミニウム  $\text{Al}_2 (\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  特級, iii) 水ガラス  $\text{Na}_2\text{O} (\text{SiO}_2)_2$ , その分析:  $\text{SiO}_2$ , 37.08%,  $\text{Na}_2\text{O}$  17.87%,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  0.012%,  $\text{CaO}$  0.006%,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  0.09%,  $\text{MgO}$  0.012%,  $\text{TiO}_2$  0.035%,  $\text{SO}_4^{--}$  0.12%,  $\text{Cl}^-$  0.10%,  $d=1.709$  (22°),  $\text{SiO}_2$  と  $\text{Na}_2\text{O}$  との比(ケイソウ比) = 2.14

操作 A: 酸性溶液での反応: 3lのフラスコ中に10%ミョウバン溶液1l (100g)を作りこれに水ガラス溶液100gを45°でかきまぜながら徐々に加える。こゝに生成した沈澱は吸引濾集し(濾液のpH = 4.0), 熱蒸留水を用いて  $\text{SO}_4^{--}$  の反応のなくなるまで洗い, 110°で約5時間乾燥し, 粉末とし更に1時間乾燥する。取得量49g

B: 中性溶液での反応: 3lのフラスコ中に10%ミョウバン溶液1l (100g)を作り, これに水ガラス溶液を45°でかきまぜながら中和点まで徐々に加える(水ガラス約140g使用)。こゝに生じた沈澱を吸引濾集し, 熱蒸留水を用いて  $\text{SO}_4^{--}$  の反応の無くなるまで洗い, 110°で約5時間乾燥後更に1時間乾燥する。取得量64g

C: アルカリ性溶液での反応: 3lのフラスコ中に10%ミョウバン溶液1l (100g)を作り, これに水ガラス溶液を45°でかきまぜながらアルカリ性を呈するまで徐々に加える(水ガラス約160g)。こゝに生成した沈澱を吸引濾集し(濾液pH 9.8), 熱蒸留水を用いて  $\text{SO}_4^{--}$  の反応がなくなるまでよく洗い, 110°で約5時間乾燥後粉末とし, 更に1時間乾燥する。取得量69.3g

上記反応条件の異なる製造法A, B, Cの成績を表示するとTable 6となる。

Table 6 Preparation of Synthetic Aluminium Silicate

Sample	A	B	C	D ※	E ※
Raw material (g)	Alum 100 Water glass 100	Alum 100 Water glass 140	Alum 100 Water glass 160	Alum 100 Water glass 129.4	Aluminium Sulfate 100 Water glass 198
Temperature of reaction	45°	45°	45°	45°	45°
pH at end point of reaction	4.0	6.6	9.8	6.2	6.4
Temperature (hours) of drying	110° (6)	110° (6)	110° (6)	130° (8)	130°C (8)
Yield (g)	49	64	69.3	52.5	70.2
Yield (%)	101.1	131.1	142.1	108.1	101.1

※ Sample D及びEはBと同様中性溶液で作つた。

## Ⅵ 自製合成ケイ酸アルミニウムの日局Ⅵ試験

I) 自製合成ケイ酸アルミニウムの局方試験の結果を表示すると Table 7 となる。

II) 自製合成ケイ酸アルミニウムについて NaOH液 (1:5), NaOH液 (1:6) に対する溶状試験の結果を表示すると Table 8, 9 となる。

Table 7 Tests for Experimentally Prepared Synthetic Aluminium Silicate in J. P. Ⅵ

Sample		A	B	C	D	E	Limit
Antacid power		8.86%	7.59%	7.14%	7.51%	6.60%	more than 5%
Purity	Soluble Salt	3mg	2.1mg	3.3mg	13.2mg	12.6mg	not more than 40mg
	Chloride	0.08cc	—	0.13cc	0.2cc	0.1cc	not more than N/50 HCl 0.3cc
	Sulfate	0.98mg	1.88mg	0.5mg	1.5mg	0.5mg	not more than 30mg
	Arsenic	—	—	—	—	—	not more than 2p. p. m.
	Heavy metals	—	—	—	—	—	not more than 0.003%
Free acid or alkali		neutral (PH=5.4)	neutral (PH=6.4)	neutral (PH=6.8)	neutral (PH=6.2)	neutral (PH=6.4)	neutral to litmus paper
Loss on drying		2.22%	6.4%	0.91%	3.7%	4.1%	not more than 20%

Table 8 Tests of Solubility with Sodium Hydroxide (1:5) Solution for Experimentally Prepared Synthetic Aluminium Silicate in J. P. Ⅵ※

Sample (each 1g)	Temperature	NaOH (1:5) (cc)					
		10	15	20	25	30	35
A	hot	---	-	+	++	+++	+++
	cold	---	--	-	+	+++	+++
B	hot	---	-	+	++	+++	+++
	cold	---	--	-	+	+++	+++
C	hot	---	-	+	++	+++	+++
	cold	---	--	-	+	+++	+++
D	hot	---	--	-	+	+++	+++
	cold	---	---	--	-	+++	+++
E	hot	---	-	+++	+++	+++	+++
	cold	---	--	+	++	+++	+++

※ Table 3 を参照

Table 9 Tests of Solubility with Sodium Hydroxide Solution (1:6) for Experimentally Prepared Synthetic Aluminium Silicate in J. P. Ⅵ※

Sample (each 0.2g)	Temperature	NaOH (1:6) (cc)					
		10	20	30	40	50	60
A. B. C. D. E. (five samples)	room temperature	-	-	-	-	-	-
	hot	+	+	+	+	+	+
	cold	+	+	+	+	+	+

※ Table 4 を比較参照.

Ⅶ 自製合成ケイ酸アルミニウムの組成  $Al_2O_3$ ,  $SiO_2$ , 水分, 熱灼減量等を定量し, これに文献による定量成績と比較対照したのが Table 10 である.

Table 10 Quantitative Analysis of Experimentally Prepared Synthetic Aluminium Silicate

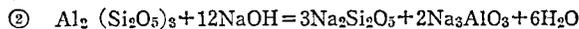
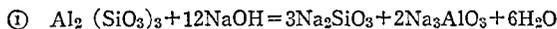
Sample	$Al_2O_3$ (%)	$SiO_2$ (%)	Loss on drying (110°C) (%)	Loss on ignition (%)	$Al_2O_3 : SiO_2$
A	17.98	66.30	2.22	13.28	1 : 3.69
B	15.00	64.00	6.40	17.32	1 : 4.27
C	14.02	67.66	0.91	12.62	1 : 4.83
D	15.17	64.38	3.7	14.58	1 : 4.26
E	10.63	64.85	4.1	17.03	1 : 6.10
Nckritsche※ A	9.05	50.97	22.13 (120°)	39.16	1 : 5.63
Nckritsche※ B	7.78	60.92	24.01 (120°)	29.36	1 : 7.18

※ 前出Ⅴ項のii) Nckritsche 法, Table 5 参照.

Ⅷ 自製合成ケイ酸アルミニウムの局方試験成績についての考察 各種自製合成ケイ酸アルミニウムについて日局Ⅵの試験を行ったところ, Table 7 に見るように制酸力, 純度試験, 乾燥減量等はいずれも適合するが, 性状及び確認試験の一部が市販品と同様接触するのを認めた.

#### Ⅸ 合成ケイ酸アルミニウムの組成と局方試験成績等との関係についての考察

I) 組成と水酸化ナトリウムの関係についてケイ酸アルミニウムが水酸化ナトリウムに溶ける場合にその組成の異なるに従って次の二つの反応式が考えられる.



ケイ酸が多いケイ酸アルミニウム即ち②の方が水酸化ナトリウムに溶け易い理である. 市販品及び自製品を分析した結果, 組成はほぼ  $SiO_2/Al_2O_3 = 4 \sim 6$  であるが, 水酸化ナトリウムに対する溶状は  $SiO_2/Al_2O_3$  の値が大きい方即ちケイ酸の多い組成をもつケイ酸アルミニウムの方が僅かながら溶けやすいのを認めた (Table 3, 5, 8, 10 参照)

II) 組成と制酸力の関係について, 組成の分析表 (Table 5, 10) 及び試験成績 (Table 2, 7) から  $SiO_2/Al_2O_3$  の値の小さい程制酸力は大きい値を示している. 即ち制酸力の大小は組成アルミナの多少によることを認めた.

III) 組成と製法の関係について, 原料等が異れば製品の組成が異なるのは勿論であるが, 同じ可溶性アルミニウム塩類の一定量に対して水ガラスを漸次増量して液性を酸性, 中性, アルカリ性とし沈澱させた製品の組成は異なる. 水ガラスの増量に従い  $SiO_2/Al_2O_3$  の値の大きい即ちケイ酸量の多い組成の製品ができ, 又取得率も水ガラスの増量に従いよくなることを認めた.

### 総 括

I 市販の天然ケイ酸アルミニウムを試験した結果, 試験法中次の様に一部改正を希望する.

1) 吸着力中「25cc」を「20cc」と改める. 2) 純度試験の砒素中「本品 1g」を「本品 0.5g」と改める. 重金屑中「0.003%以下」を「0.005%以下」と改める.

II 自製及び市販合成ケイ酸アルミニウムについて性状及び確認試験の比較試験を行った結果合成ケイ酸アルミニウムの試験法中次の様に一部改正を希望する.

1) 性状中「水酸化ナトリウム液 (1:5) 10cc」を「水酸化ナトリウム液 (1:5) 30cc」と改める. 2) 確認試験(1)中「水酸化ナトリウム液 (1:6) 10ccに溶かし」を「水酸化ナトリウム液 (1:6) 10ccと加熱して溶かし澄明となし冷後」と改める.

III 市販及び自製合成ケイ酸アルミニウムの組成を分析し組成と水酸化ナトリウム液との溶状関係, 制酸力の大小

小との関係及び製法による組成の変動を調査した。

### 文 献

- 1) 田中, 桑田: 工化, 649 (昭7)
- 2) Patrick: Kolloid Z., 4, 16, (1915)
- 3) Nckritsche: Z. anorg. u, allgem. 86, 177 (1926)
- 4) 磯部: 理研彙, 9, 211 (昭3).

### Summary

I We tested many samples of commercial Natural and Synthetic Aluminium Silicate in J.P. VI, and found some unreasonable points in the tests.

a) Natural Aluminium Silicate. We insist on the following improvements of the tests in J.P. VI: 「20cc instead of 25cc in adsorption」, 「0.5g」 instead of 「1g」 in arsenic, and 「not more than 0.005 per cent」 instead of 「not more than 0.003 per cent」 in heavy metals.

b) Synthetic Aluminium Silicate. To study about the unreasonable points, we synthesized Aluminium Silicate from alum and water-glass, and compared the results of tests for it with that for commercial samples. We insist on the following improvements of the tests in J.P. VI: 「dissolve 0.2g of Synthetic Aluminium Silicate by heating in 10cc of a solution of sodium hydroxide (1:6) and after cooling」 instead of 「dissolve 0.2g of Synthetic Aluminium Silicate in 10cc of a solution of sodium hydroxide (1:6)」 in identification, 「30cc of a solution of sodium hydroxide (1:5)」 instead of 「10cc of a solution of sodium hydroxide (1:5)」 in description.

II We analysed several kinds of Synthetic Aluminium Silicate and studied on the relation among their composition, their solubility in sodium hydroxide solution, and their antacid power, and also the variation of their composition caused by their methods of preparation.

Received April 19, 1955

## 昭和29年度新潟県産米の放射能汚染に関する研究

長沢 佳 熊, 川 城 巖, 河 村 正 一  
竹 中 祐 典, 西 崎 笹 夫Radiochemical Studies on Radiocontaminated Rice Cropped  
in Niigata Prefecture in 1954By Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Shoichi KAWAMURA,  
Yusuke TAKENAKA and Sasao NISHIZAKI

**まえがき** 昭和29年3月1日ビキ=環礁で行われた水爆実験により被災した第五福龍丸事件以来, 南方海域で魚獲された魚類にかなりの放射能汚染が認められ, その後汚染魚類は近海産のまぐろ類にも発見されるに至つた。<sup>1)</sup> 次いで同年5月以来日本各地で降つた雨水中に人工放射能が検出され, 米, 野菜類, 牛乳, 茶等にも放射能汚染の懸念が生じたので, 当所に於てもこれらの汚染状況を詳細に調査検討した。<sup>2)</sup>

特に米は日本人の主食であるため摂取量も多く食品衛生上関心が深い, 同年9月新潟県産米に人工放射能による汚染を認めたという報告に接し<sup>3)</sup>, 当所においても昭和29年度新潟県産米2種類の試料について昭和28年度産米と比較調査したところ, 汚染の原因は主に雨水等による外部的な汚染によるもので, 根から吸収されたものではないと結論する。

これは又当所で実験したところの茶では覆いをして栽培する玉露は, 他の茶に比べて汚染度が少く<sup>2)</sup>, しいたけでは裏面は表面に比べて明らかに汚染度が少く<sup>2)</sup>, 又汚染野菜類は水洗によつて放射能をほとんど認めなくなる<sup>2)</sup> という実験的事実等とよく一致している。

## 実 験 経 過

米の人工放射能汚染の調査に当つては, 人工放射能のないと見做される昭和28年度産米と, 汚染の疑いのある昭和29年度産米とを比較検討する必要がある。

元来米には「カリウム」が含有されているから, 人工放射能の有無は試料の計測値と, 同じ計測条件における試料中の「カリウム」に起因する天然放射能の計測値と比較しなければならない。

そのためまず昭和28, 29年度産のモミ米10gをそれぞれのフラクションに分離し, 各々を定量的に灰化して得られた灰分の c. p. m. (1分間の平均カウント数)を計り (Table 1 第5行), 他方個々の灰化物中の「カリウム」をジピクリルアミン法<sup>4)</sup>により定量し (Table 2 参照) 灰化前の試料に対する「カリウム」の含有%から炭酸カリウムに換算して, 自己吸収等を吟味し, 前記灰分試料と均等な条件で計測するため適宜量の塩化ナトリウムを加えて検体の灰分と等量とした後放射能を測定した。(Table 1. 第7行)

この測定値を検体の灰分の測定値から除いたものが検体の人工放射能の値である。(Table 1. 第8行)

又塩化ナトリウムを使つたのは粒子の状態, 比重が灰分と等しいと考えたからである。

## 被検試料

- I 昭和28年度新潟県産米
- II 昭和29年度新潟県産米 (A)
- III 昭和29年度新潟県産米 (B)\*

\* 新潟県立巻農業高校試作田にて採取したもの。

**放射能測定方法** 計測には神戸工業 K. K. 製 Model EA-11 の G. M. カウンター (マイカ窓厚さ  $3.13\text{mg}/\text{cm}^2$ ) を用いた。

予め60分間連続的に自然計数を測定し, 次に試料 (直径25mm, 高さ6.5mmのステンレススチール製試料皿に検体を入れ底面部に高さが一樣になる様に検体をひろげ検体表面を出来るだけ平らにしたもの) をマイカ窓からの距離が1cmの段に挿入し, 60分間連続的に計測し, 再び試料を除いて連続60分間自然計数を計測した。試料が

ら得た c. p. m. から前後2回の自然計数を算術平均した c. p. m. を差引いた値を試料の測定値とした。

試料調製法及びその計測値 被検試料各々10gをとり、脱穀してモミ、玄米、に分け、Ⅲの試料については玄米を更に精白して白米、ヌカ、に分離した。

それぞれの重量を Table 1 第3行に示す。

次に各フラクションをそれぞれ粉末とし、重量既知の「ルツボ」に入れ硝酸(比重1.4)を加えて分解した後、更に硫酸と硝酸の混液(1:4)を加えて加熱灰化すると白色灰となる。得た灰分の重量%を Table 1 第4行に、又同灰分の計測値を第5行に示した。

Table 1. Experiment on radio-contamination of rice. Comparison with ash potassium counts.

Cropped year (1)	Material name (2)	Weight (mg.) (3)	Ash (%) (4)	Count/Ash (5) (mg) (6)	Weight of $K_2CO_3$ (7)* (mg)	Count of** mixture (8) (per min.)	Count of Contaminated Radioactivity in the Material (per min.) (5)-(8)
1953	Unhulled Rice	10000	6.32	2.3/632	64	2.3	0
	Chaff	2010	15.48	1.8/311	36	1.8	0
	Unpolished Rice	7990	3.44	0.9/275	28	1.0	-0.1
1954	Unhulled Rice	10000	4.93	5.7/493	57	1.8	3.9
	Chaff	2840	17.97	4.9/510	27	0.7	4.2
	Unpolished Rice	7160	1.44	0.8/102	30	0.8	0
1954	Unhulled Rice	10000	4.37	8.6/437	78	3.0	5.6
	Chaff	2180	14.81	7.3/323	42	1.2	6.1
	Unpolished Rice	7820	1.23	1.2/96	35	1.0	0.2
	Polished Rice	6700	0.77	0.3/52	12	0.3	0
	Rice-bran	1120	2.89	0.7/32	24	0.7	0

(7)\* Equivalent weight of K-content described in the seventh coloum of Table 2.

(8)\*\* Count of  $K_2CO_3$  (mg.) in the Table (7) plus NaCl (mg.) which equal to (6)-(7).

被検試料中の「カリウム」の定量 灰化した試料の各フラクションにつき、次の方式に従つて「カリウム」を定量した。

灰分 (Table 2 の第3行参照)

濃塩酸 5cc, 水 50cc を加え加温, 濾過する。

溶液

不溶物

Amberlite column\* に通し, 燐酸イオンのなくなる迄水洗する。

Amberlite column\*

6 N-塩酸 300cc を通す。

溶離液

水浴上で蒸発乾固し, 水 50cc を加える。

溶液

3%ジピクリルアミンマグネシウム液\*\* を過剰に加え, 2時間放置後濾過する。

沈澱

濾液

冷無水エーテルで洗滌後 80°C で乾燥する。

ジピクリルアミンカリウム

(Table 2 の第5行参照)

\* Amberlite IR-120 (50-80mesh, 直径1cm, 長さ32cm)

\*\* 三角フラスコにジピクリルアミン 12g と酸化マグネシウム 5g を入れ, かきまぜながら水 400cc を加えた後, 約 20 時間放置後濾過した濾液.

以上の分析操作により「カリウム」の重量を計り, 灰化前の被検試料に対する含有%を算出して (Table 2 第7行参照) 以上の結果を Table 2 に示す.

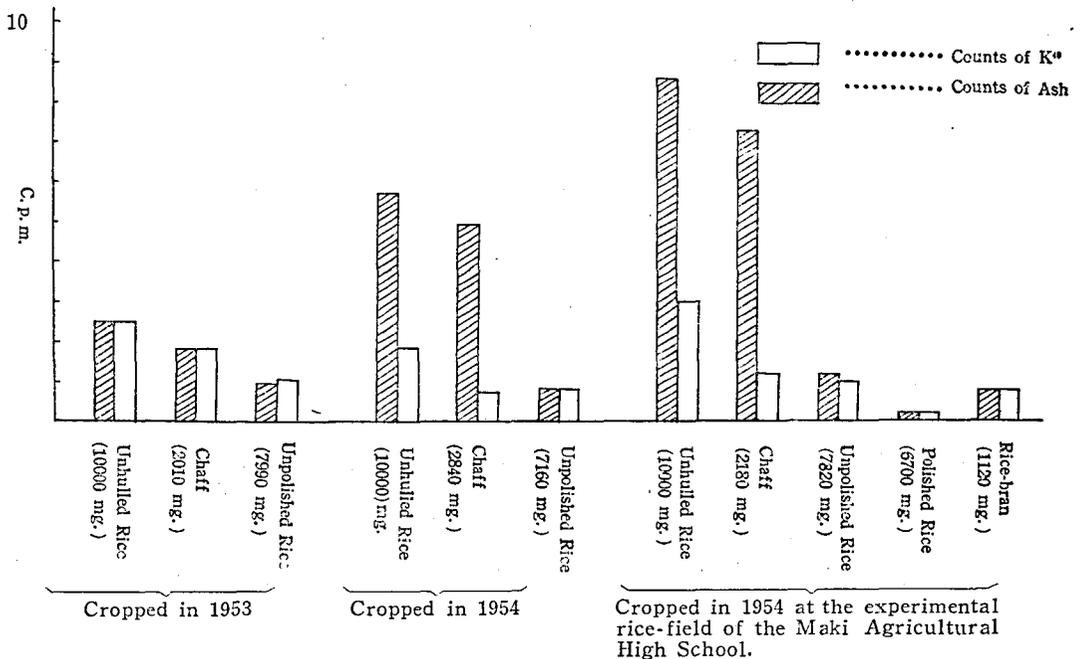
Table 2. Potassium contents determined by analysis in various parts of rice.

Cropped year	Material name	Weight of ash. (mg.)	Equivalent weight of original material (mg.)	Weight of Potassium dipicrylamidine (mg.)	Weight of K (mg.)	K-content (%)
1953	Unhulled Rice	543.9	8606	377.8	30.9	0.36
	Chaff	499.9	3229	397.8	32.6	1.01
	Unpolished Rice	604.7	17580	428.4	35.1	0.20
1954	Unhulled Rice	592.3	12020	469.8	38.5	0.32
	Chaff	849.6	4727	651.6	53.4	1.13
	Unpolished Rice	517.7	35950	1053.3	86.3	0.24
*1954	Unhulled Rice	581.1	13290	713.9	58.5	0.44
	Chaff	893.0	6029	801.8	65.7	1.09
	Unpolished Rice	502.6	40860	1247.2	102.2	0.25
	Polished Rice	210.7	27360	334.3	27.4	0.10
	Polish	97.0	33570	4956.6	406.1	1.21

\* Cropped at the experimental rice field of Maki Agricultural High School in Niigata Prefecture (Shin-shi-go)

又米の灰分のカウント数, (Table 1 第5行) と灰分の分析結果からカリウムに起因すると思われるカウント数 (Table 1 第7行) とを棒グラフに作図して比較したものを Fig 1 に示す.

Fig. 1. Results of radio-contamination of rice cropped in Niigata Prefecture, showing Counts of ash and potassium in various parts of unhulled rice.



## あ　と　が　き

著者らは昭和28年度産米及び29年度新潟県産米について人工放射能の汚染状況を調査研究した結果、モミ米、モミ、には明らかに人工放射能汚染を認められたが、玄米、白米、ヌカ、には認めなかつた。したがつて従来報告された米放射能汚染の実験では、天然に含まれるカリウムの分析及びそのカリウムのGM管によるカウント数を知る上に、  
確実な方法を欠いたものと思われる。

米以外の動植物の弱い放射能汚染の場合でもほぼ同様のことが云える。

## 文　　献

- 1) 長沢等：放射能汚染について (第1報) 昭和29年6月12日薬学会例会に発表。
- 2) 長沢等：放射能汚染について (第2報) 昭和29年11月13日薬学会例会に発表。
- 3) 昭和29年9月朝日新聞その他。
- 4) Frank J. Welcher : Organic Analytical Reagents (2nd Printing) Vol. 4, 8~17 (1948).

## Summary

Since the middle of May, 1954, radiocontaminated rain often fell in Japan.

Some researchers in this country reported that the rice was also contaminated due to the absorption of fission products in the soil.

In this report, the authors found that the contamination of the rice cropped in the fall of 1954, was only limited to the chaff, and the unpolished, polished rice and rice-bran were not contaminated, therefore, the authors concluded that the contamination of radioactivity in the rice were caused by drying up and the adhering of the rain water containing fission products on the surface of the plants.

Received May 10, 1955

## 螢光法による米粉中のチトリニンの定量

川城 巖, 田辺 弘也, 竹内 末久, 西村 千昭

## Determination of Citrinin Contained in Rice by Fluorometry

By Iwao KAWASHIRO, Hiroya TANABE, Hidenaga TAKEUCHI

and Chiaki NISHIMURA

所謂泰国黄変米菌が *Penicillium. citrinum* なることを当所において決定して以来, 著者等は本菌の産生する諸毒物に付き数年来研究して来たが, 最近黄変米の問題が緊迫化するに及び本菌の主産生毒物たるチトリニンに関する毒性並に検出法が注目されるに至つた。チトリニンは Hetherington & Raistrick<sup>1)</sup> が本菌より発見した黄色色素で抗菌性物質として夙に知られた化合物である。同氏等は培養濾液中のチトリニンの定量に沃度法を用いたが, 本法は共存する還元性物質のため天然物中のチトリニン定量には不適當である。又大和谷氏等<sup>2)</sup> は塩化第二鉄による呈色反応に着目して, 比色法により定量を行つているが著者らの研究により培養濾液中にチトリニン以外の塩化第二鉄反応陽性物質の存在することを確認したので本法も正確なる値を示すものとは考へられない。この外チトリニンに関する種々の呈色反応が報告<sup>3)</sup> されているが, 著者らは本物質の極めて特異的且つ鋭敏な螢光に着目し, この性質を利用する微量チトリニンの検出並に定量法を確立せんとして本実験を始めた。該螢光の諸性質に関しては既に太幡, 八木氏<sup>4)</sup> 等の報告がある。

検出定量に當つて先づ問題となることはその抽出法であるが黄変米の場合は基質たる澱粉の吸着性の為米粉の量と回収率の関係は極めて複雑である。従つて著者らは溶液中の微量チトリニンの検出定量法と同時に米粉中よりのチトリニンの抽出法についても詳細に検討した。

チトリニンの安定度はその毒性を考慮する場合は勿論のこと, 抽出定量に際しても先づ注意すべき問題と考えられる。通常の場合は米粉中のチトリニンの抽出にはアルカリ性水溶液を用い, 検出は pH 0~2 の酸性水溶液でおこなう。著者らはチトリニンの安定度に及ぼす pH の影響を検討し次の結果を得た。即ち常温に於いては短時間に著変は認められないが, pH 0~2 に於いて1時間に0.2%, 24時間後には約10%分解する。アルカリ性に於いては影響が稍々大で pH 13 に於いて24時間後24%, 2% NaOH 溶液中では24時間後には殆んど完全に分解する。

DECOMPOSITION%

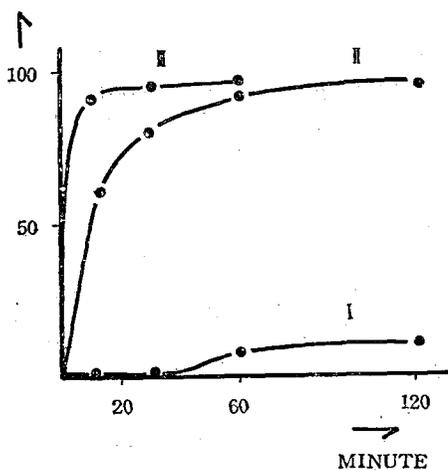


Fig. 1. Relationship between decomposition and heating time in a neutral, acidic and alkaline solution.

I: H<sub>2</sub>O, II: 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, III: 0.1 N HCl

FLUORESCENCE

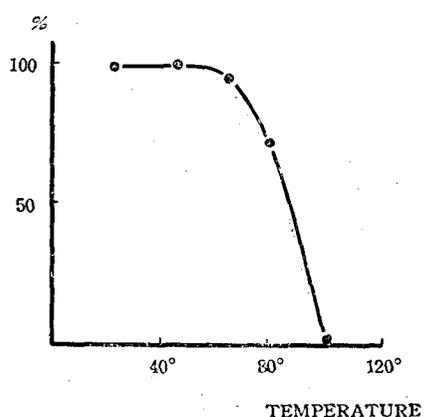


Fig. 2. Heat stability of citrinin. (pH 3.2)

尚チトリニンの耐熱性についてはその構造より強酸性或いは強アルカリ性に於いては熱時分解することは容易に推定されるが、中性附近に於いては短時間では熱に比較的安定である。即ち5%炭酸ソーダ (pH 11), 0.1N塩酸 (pH 1.0) 中では沸騰水浴上15分間の熱処理で殆んど分解するが、pH 4.9~10.3では比較的安定である。又一定のpHで一定時間の熱処理に於ける温度の影響をみるに、例へばpH 3.0, 30分間では60°から分解が始まり、これ以上の温度ではその分解は急激に増加する。(Fig 1及Fig 2).

次に著者らはチトリニンの検出、定量をおこなう場合の溶媒についても検討を行つた。今迄チトリニンの蛍光による検出は主としてpH 0~2の水溶液又は含水アルコールが用いられていたが、著者等はこのほか種々の有機溶媒についてチトリニンの検出確認限度を検討したところ、その蛍光はクロロホルム中で特に著明であり、酸性水溶液の場合の約 $\frac{1}{10}$ 量をも検出し得る事を知り、且つクロロホルムを溶媒としたチトリニンの標準溶液について蛍光測定を行つた結果、クロロホルムはチトリニンの定量用溶媒としても優れていることを確認した (Fig 3).

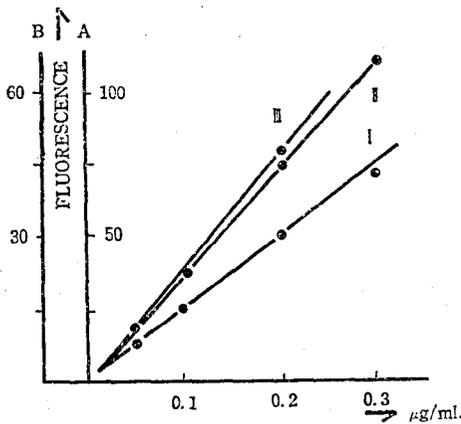


Fig. 3. Standard curves of citrinin by fluorometry.

- I: acidic aqueous solution.
- II:  $\text{CHCl}_3$  layer which extract Citrinin from I.
- III: citrinin standard solution in  $\text{CHCl}_3$ .

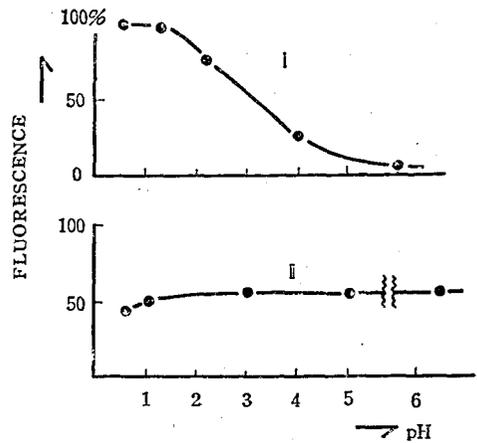


Fig. 4. Intensity of citrinin and non-specific fluorescent substance from rice at various pH.

- I: citrinin
- II: non-specific fluorescent substance

次にチトリニンを米粉より抽出、検出する際に注意すべきことは米粉そのものに由来する類似波長の蛍光を発する異種物質である。実際に健康米をチトリニン抽出と全く同様にアルカリ溶液で抽出すると黄褐色蛍光性物質が抽出されて来る。この蛍光はpHの変北に依つてその強さが殆んど変化しないが (Fig 4), 酸性水溶液中ではチトリニンの蛍光との加算性は必ずしも成立しない事が分つた (Table 5参照)。一方本物質は主として中性物質より成りクロロホルムで抽出する場合、水層のpHに関係なくクロロホルム層に移行する。従つてこの性質を利用しチトリニンをアルカリ抽出後抽出液を等量に二分し、一部はアルカリ性のまゝでクロロホルム抽出後その蛍光を測定し、その値を補正すればチトリニンの定量に当つて伴する異種蛍光性物質による定量誤差を除くことが出来る。

人工培養黄変米に含まれるチトリニン及びそれ以外の類似蛍光性物質に関しては別に次の結果を得ている。培養米500~700gにメタノール3lを加えて振盪抽出後濾過し、得られた抽出液を減圧下に濃縮してその蛍光性物質をイオン交換樹脂 (IR120, IRA410) により分別溶離した。その結果、カチオニック Groupとして吸着交換される蛍光性物質は得られなかつたが、アニオニック Groupとして吸着交換される Peak II, Peak III, peak IV及び、何れの交換樹脂にも交換吸着されない非イオン性の Peak I の四成分に分離する\*) ことが出来た。培養米の蛍光成分は主として Peak I 及び Peak IV の蛍光物質より成り、Peak II Peak III は通常の定量操作 (米粉10~30gを用いる場合) には無視される程に少ない、著者らが上に述べた N. F. 物質 (非特異性蛍光物質) は主として

\* 病変米エキスのイオン交換分析に関しては Peak I, II, IIIは目下検討中である。

Peak I より成り, 僅かに Peak II が含まれていた。Peak IV はその螢光の性質及び吸収曲線よりチトリニンであることが分つた (Fig 5)。更に著者らは  $2 \times 10^{-3}$  % チトリニン混和米粉中からアルカリ抽出法によつて回収試験をおこなつた結果, 0.5~1.0 % 炭酸ソーダ溶液で米粉 10 g を使用すれば 90 % 近く回収することが出来た (Table 1)。尚米粉による吸着損失を除く目的から酵素による澱粉の消化後チトリニンを抽出する方法を試みたが, 上記濃度に於ては却つて回収率が低い結果を得た。これは  $\alpha$ -化中における分解によるものと考えられる (Table 2)。

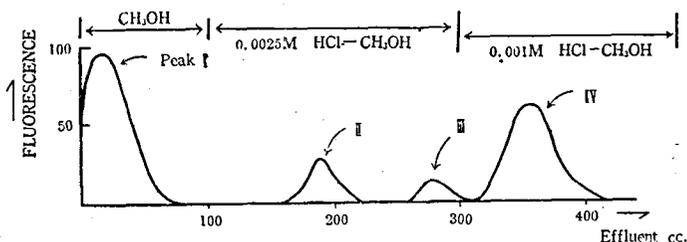


Fig. 5. Anionic and non-ionic group of fluorescent substances from a cultured yellow-rice extract. anionic exchanger; IRA 410 (100 mesh). velocity; 0.5~0.7 cc/minute. type of exchanger; Cl-form. column; 85×10mm.

Table 1. Recovery of citrinin in the determination by fluorometry.

rice	citrinin	recovery %		
		50 $\gamma$	100 $\gamma$	200 $\gamma$
10g		85.2	88.2	89.0
30g		77.9	—	—

Table 2. Comparison of recovery between alkaline extraction and digestion method.

rice	citrinin	recovery %	
		alkaline ext.	digestion.
10g	100 $\gamma$	90.5	77.8
20g	"	81.5	77.5

Digestion : diastase 6g, pancreation 2g and sodi. chloride 2g in 200cc M/5 phosphate buffer, and centrifuged. Supernatant was used as digestion enzymes.

Incubation : 53° for 5 hrs, pH 7.4

以上の結果を総括して著者らは黄変米中に含まれるチトリニンの定量法として次の方法が優れていることを知つた。即ち米粉を 0.5~1 % の炭酸ソーダ水溶液で抽出後, 等量に二分し, その一分をその儘でクロロホルムにて抽出し, N. F. の値を測定し, 他の一分は塩酸で pH 0~2 としてクロロホルムに抽出し螢光を測定する。後者の値には N. F. 値が含まれているから, 補正すれば米粉中のチトリニンを精度良く定量することが出来る。

著者らは更にチトリニンの定性及び定量を簡易化するために, 各種の溶媒系でペーパークロマトグラフィーを行いその Rf 値を検討した。その結果水飽和有機溶媒系 (リグロイン, ブタノール, 酢酸エチル, アセトン) ではいづれも適せず, 酢酸エチル, アセトン, 水 (5 : 5 : 2) の混合溶媒でチトリニンの螢光を Rf 値 0.6~0.7 の位置に得ることが出来, この方法によれば 2.0~20 $\gamma$  の間で簡易定量が可能である。但し著者らの場合, ペーパークロマトグラフィーによる簡易定量を未だ実際に米粉中のチトリニンに適用するには至っていない。

## 実験の部

**チトリニンの安定性** 本実験に用いたチトリニンは泰国黄変米より分離した *Penicillium citrinum* を Czapek-Dox 培地に接種し, Raistrck らの方法に従つて処理して得たもので mp. 166~167°, 収量は 10 l 培養濾液よ

り約10gである。チトリニンの定量にはコタキ蛍光光度計を用いた。蛍光標準物質には0.17 $\gamma$ /mlのフロレッセンソーダ溶液を用い、照射光及び蛍光の撰択には夫々UV-Do及びUV-Oフィルターを用いた。又pHによる安定性を測定するためには酸性側は夫々のpHの塩酸溶液として、アルカリ性側は炭酸ソーダ溶液として実験を行つた (Fig 2. Fig 3. 参照)。

Table 3. Heat stability of citrinin in aqueous solutions at various pH.

pH	1.3	3.3	4.9	7.2	10.3	11.3	12.
decomposed %	99	92	16	0 ca.	13	67	96%

0.2 $\gamma$ /ml citrinin, temperature 98°~100°, 15 minutes.

各溶媒によるチトリニンの確認限度 5 $\gamma$ /ml~0.01 $\gamma$ /mlのチトリニン溶液を作製し、水、アルコール、ブタノール、クロロホルムを溶媒とした場合の確認限度を比較した。第四表に示した結果はどれも紫外線を当て、眼で見た場合の定性的な確認限度である (Table 4. Table 5.)。

Table 4. The limit for detection of citrinin in various solvents.

concent solvent	5.0	1.0	0.5	0.1	0.05	0.01 ( $\gamma$ /ml)
acidic-aqueous	++	++	+	-	-	-
acidic-alkohol	++	++	+	-	-	-
acidic-butanol	++	++	+	-	-	-
chloroform	++	++	++	++	+	-

++ easily detected.

+ the limit for detection.

- not detected.

Table 5. Comparison of the limit for detection between colorimetry and fluorometry.

method	reagent or solvent	the limit for detection
colorimetry	HCl-FeCl <sub>3</sub>	5~7 $\gamma$ /ml
fluorometry	0.1N-HCl	0.5~0.6
	in CHCl <sub>3</sub>	0.03~0.04
	chromatography	0.1 $\gamma$

チトリニンの蛍光と米自体に由来する蛍光 (N.F.) との関係 本実験に用いた米に由来する蛍光成分は次の如くにして調製したものである。健康米100gに0.5%炭酸ソーダ700~1000ccを加えて振盪抽出(4~5hrs)し、濾過後更に清澄剤として微アルカリ性で15%フェリシアンカリ、10%硫酸亜鉛(1:1)の混液<sup>5)</sup>を加えて攪拌する。得られた上清を減圧下に20~30ccに迄濃縮する (Fig 4. 参照) (Table 6, Table 7)。

人工培養米蛍光成分のイオン交換樹脂による分別溶離 カチオンニク Groupの検索にはIR 120 (100メッシュ) アニオンニク Groupの蛍光成分の検索には強塩基性交換樹脂 IR A410を用いた。カラムは85×10mm、流速は0.5~0.6cc/minute。で交換樹脂は100~150メッシュのものをを用いた。\* 即ち人工培養米500gをメタノールで抽出し、減圧濃縮して、抽出物をIR 120に通じ、更にIR 120を通過した液はIRA 410を通じて吸着交換させ、両カラムをメタノール-塩酸(0~0.02MHCl)で溶離し、蛍光を測定した。(Fig 5. 参照)。

ペーパークロマトグラフィによるチトリニンの簡易定性及び定量 東洋濾紙No.50を用い展開した。面積法による簡易定量は酢エチ、アセトン、水(5:5:2)の混合溶媒により室温で展開し、乾燥後希塩酸を噴霧して蛍

\* 交換樹脂は3M食塩水で夫々R-Cl型 (IRA 410) 及び Na-R型 (IR 120) とし蒸留水で洗つて後、更にメタノールを通じて蛍光成分を認めなくなる迄洗つて使用した。

光スポットの面積をプランメータで測定した (Table 8.).

Table 6. Fluorescent intensity of citrinin mixed with a non-specific fluorescent substance at various pH.

exp. No	pH	citrinin	N. F.	fluorescent intensity	
				in acidic	in CHCl <sub>3</sub>
1	0.7	5 $\gamma$ /20cc	2cc	56.3	65.3
2	1.5	"	"	48.8	66.8
3	3.3	"	"	42.1	61.6
4	5.3	"	"	39.6	59.2
5	7.9	"	"	40.4	2.2
6	5.3~7.9	—	"	39.6	2.2
7	0.7	5 $\gamma$ /20cc	—	35.2	64.3

Table 7. Fluorescent intensity of citrinin being compensated for that of N. F.

	fluorescent intensity	
	pH 0.7~1.5	7.9~9.5
a citrinin	64.3	—
b non-specific fluorescence	2.2	2.2
c citrinin +N. F.	66.8	2.2
citrinin (corrected)	64.6	—

Table 8. Determination of citrinin by paperchromatography.

citrinin	log (citrinin)	planimeter value			mean
		exp 1	2	3	
0.5 $\gamma$ /ml		33			33
1.0	0	58	56	54	56
2.0	0.303	90	85	79	85
5.0	0.696	118	112	109	111
10	1.00	148	150	159	152
20	1.303	188			188

Solvent system: ethyl acetate, acetone, H<sub>2</sub>O (5:5:2)

病変米よりチトリニンの抽出及び定量 検体米粉10~30gに0.5%炭酸ソーダ約150ccを加え, 2~3時間振盪後一定容とし, その10~20ccを二本の共栓遠心管にとり, 一本はそのまま, 同容のクロロホルムを加えて振盪抽出し, 芒硝で脱水後螢光を測定する (N. F. 値). 他の一本は塩酸で pH 1 として同量のクロロホルムで抽出し, クロロホルム層は芒硝で脱水して, 螢光を測定する. 後者の値より N. F. 値を差引いて得た値を測定値とする (Table 9. Table 10.).

Table 9. Determination of citrinin in artificially deteriorated-rice.

exp.No	rice	fluorescent intensity	detected citrinin	$\bar{x} + \sigma$
1	10.0g	39.1	15.2 $\gamma$ /g	15.4 $\pm$ 0.2 $\gamma$ /g
2	"	40.1	15.4	
3	"	41.1	15.6	
4	"	40.1	15.4	

Table 10. Determination of citrinin in deteriorated rice.

rice	fluorescent intensity		$\Delta$ det. -nat.	
	natural	deterirated	$\Delta$ fluor. int.	$\Delta$ citrinin
10.0g	{ 2.6 2.4 2.6	{ 2.3 2.2 2.2	- 0.1	0.0 $\gamma$ /g
30.0g	{ 5.7 5.4	{ 5.8 5.7	+ 0.1	0.0 $\gamma$ /g

## 総 括

著者らは蛍光法によるチトリニンの微量定量に関し種々の条件を検討して次の結果を得た。

チトリニン溶液は酸性及びアルカリ性では熱に対して不安定で、蛍光はクロロホルム中で特に強くその確認限度は0.04  $\gamma$ /mlである。したがって蛍光法による微量定量にはクロロホルムを溶媒とすればよい。チトリニンのペーパークロマトグラムは酢エチル、アセトン、水(5:5:2)でRf値0.6~0.7に蛍光のスポットを得る。ペーパークロマトによる定量可能域は2.0~20  $\gamma$ で、蛍光光度計によるそれは0.02~0.25  $\gamma$ /mlである。米粉中のチトリニンを抽出する際に同時に抽出される非特異性蛍光は別にpH 8~10においてクロロホルム中に抽出定量することにより補正することが出来る。

この報文は当所における黄変米に関する緊急研究の一部として行つたもので、御指導御鞭撻を賜つた刈米達夫所長、蛍光測定について御指導をいただいた規格研究部長小川俊太郎博士に謝意を表する。

## 文 献

- 1) Hetherington and Raistrick: Philos. Trans. Roy. Soc. London, B. 220, 269 (1931).
- 2) 平, 大和谷: ペニシリン, I-5, 275 (1948).
- 3) Tauher and Laufer: J. Am. Chem. Soc., 64, 2, 228 (1943); J. Am. Chem. Soc., 65, 736 (1943).
- 4) 太幡, 八木: 化学の領域, 8, (1953).
- 5) Carrez: Lebensmittel Chem, 2, 881 (1931).

## Summary

In order to prescribe the determination of citrinin produced by *Penicillium citrinum* in rice, we have examined some practical conditions for fluorometry.

Citrinin was decomposed when boiled for 30 minutes in acidic or alkaline aqueous solution. Its fluorescence in chloroform was stronger than that in acidic aqueous solution, and was stable within 60 minutes. The limit for detection in the former was 0.04  $\gamma$ /ml and was about a tenth of the latter, so chloroform is good for use as a solvent in fluorometry after alkaline extraction from the rice.

In practical use of this method, it is interfered by a non-specific fluorescent substance from natural rice, but we could determined only the substance by extracting at above pH 7.9 in a chloroform layer and obtained more exact value of citrinin in the rice after the correction.

Based on these findings we have estimated citrinin in so-called yellow-rice by the fluorometry. It was impossible to detect even citrinin-like fluorescence by this method.

Received May 9, 1955

病変米の解剖的所見

下村 孟, 西本和光

Microscopical Anatomy of Deteriorated Rice

By Tsutomu SHIMOMURA and Kazumitsu NISHIMOTO

**まえがき** 病変米についての研究は各部門において検討されているが、吾々は次の項目に関し、主として顕微鏡による解剖的所見を得たので報告する。

- 1) 輸入米を再搗精するとき糊粉層の除去の状態。
- 2) 病変米菌は米粒のどの部分に寄生するか。
- 3) 營養菌絲は明確に認められるか又その侵入状況は如何。
- 4) 營養菌絲の染色法。

材料 輸入米

	原料米	5%再搗精	10%再搗精	15%再搗精
ビルマ米	No. 4206	No. 4207	No. 4208	No. 4209
ビルマ米	No. 4210	No. 4211	No. 4212	No. 4213
シャム米	No. 4214	No. 4215	No. 4216	No. 4217
スペイン米	No. 4238			

**1 再搗精による糊粉層の除去** イネの果実を形態的に見るとその胚及び胚乳は種皮、果皮及び最外層のエイでつつまれている。このエイは外エイと内エイの二枚からなり、各々の両縁は重なり合っている。これ等の辺縁は内方に圧迫するが如く曲り込んだ状態にあるため、果皮及び種皮を通して胚乳(米粒)に形態的影響をおよぼし、米粒に縦走するミゾが形成されている。このミゾは米によつてその深さを異にしている。

各再搗精度の米粒切片標本を鏡検するとミゾの部分に多く糊粉層の残存する傾向がみられる。米粒にミロン試薬を加えると搗精度によつて異なるが特に糊粉層の残存するミゾの部分が赤褐色を呈す。又これと反対に澱粉層を染めるために水でうすめたヨウ素ヨウ化カリウム試液(1:50)を米粒に加えると糊粉層の残存するミゾの部分は白く残り、澱粉層が露出している部分は暗青紫色を呈す。これ等の外形的観察はよく鏡検結果と一致する。5%, 10%, 15%再搗精米をこれ等の方法で観察すると、搗精度が進むに従つて残存する糊粉層は減少するが、15%再搗精においてもミゾの部分に顕微鏡的ではあるが糊粉層又はその残基をとどめるものがある。この残存程度は米粒全体から見ればきわめて僅少なものであるが、再搗精によつて糊粉層を完全に削り取る事は困難である。

**2 病変米菌の寄生部位** 輸入米400粒について切片標本及び米粒を粉末として鏡検した結果、3粒においてその糊粉層に菌の寄生を認めた。しかしこれは病変米菌であるかどうか確認しうるに充分な形態をとどめていなかった。

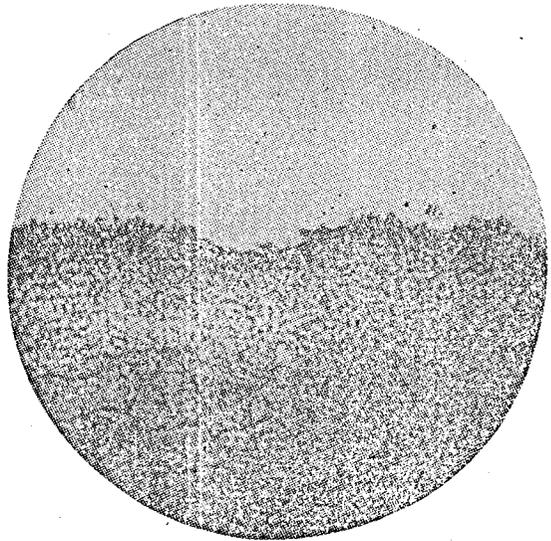


Fig. 1 再搗精米(15%)の横断切片顕微鏡写真(150×) 凹部になお糊粉層の残基をとどめている。

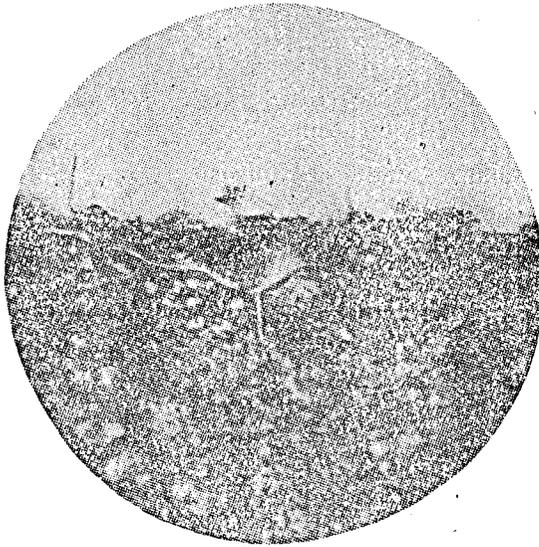


Fig 2 人工病変米 (*P. citrinum* 接種) の横断切片顕微鏡写真 (600×) 糊粉層に conidia が形成されるところ。

片標本及び米粒を粉末として鏡検したが營養菌絲の澱粉層内部へ侵入しているものは認められなかつた。前記培養米 (人工病変米) では培養初期において營養菌絲は米粒の表面附近の澱粉層に侵入鎖走している。培養が進み米粒が conidia の形成で包囲された状態になると營養菌絲は米粒の中心部へ向つて侵入して行くのがみられる。この場合 *P. citrinum* の營養菌絲は太さ  $1\sim 2\mu$  で、澱粉粒の間又は澱粉細胞の間を通つて内部へ侵入し、この附近の澱粉粒は消化変形している。

4. 營養菌絲の染色法 營養菌絲は米粒組織中では非常に認めにくいのでこれを染色するか又は米粒を粉末として鏡検するとその存在が見やすくなる。營養菌絲は前記の色素でも染色されるがこれと同じく米粒組織も染色されるので見にくい場合がある。亦従来營養菌絲の適当な染色法はないようであるが、この場合次のような染色法で比較的良好な結果を得た。

アミン飽和水溶液にクリスタルバイオレットを飽和溶解し、濾過して得た染色液で切片を2~3分染色する。

染色液を吸取り、洗う事なくヨウ素ヨウ化カリウム試液 (局方) を加えて1~2分固定する。

固定したものを80%アルコールで色素が溶出しなくなる程度に洗う。

このままではヨウ素により澱粉粒が暗青紫色~褐色を呈し菌絲の存在が認めがたい場合があるので、2%チオ硫酸ソーダ水溶液で脱色する。

更に菌の寄生状態を観察する為、滅菌水で洗滌した内地産米に *Penicillium citrinum* を接種し、これを湿室中 (ペトリジャーレに滅菌水でしめした濾紙をしきこれに接種米粒を入れる) で  $25^{\circ}\text{C}$  24~48時間培養し切片標本を作り鏡検した。氣中菌絲の染色にはゲンチアナバイオレット、エオシン、コットンブルー、サフランニン、コンゴレッド等を使用した。培養の初期においては conidia の形成が糊粉層に多く認められる。この時糊粉層の存在しない部分即ち澱粉層にも菌絲の発生がいくらか見られるが更に培養が進むとこの部分にも conidia が形成される。培養中外観的に観察しても初めは糊粉層の存在している部分が青緑色の conidia で覆われ、米粒全体が黄変する。更に培養が進むと他の部分にも conidia の形成がみられる。従つてこの菌は比較的糊粉層に好んで繁殖する事が認められる。亦繁殖の条件さえよければ澱粉層表面にも寄生する可能性は考えられる。

### 3 營養菌絲の侵入状態 輸入米400粒を切

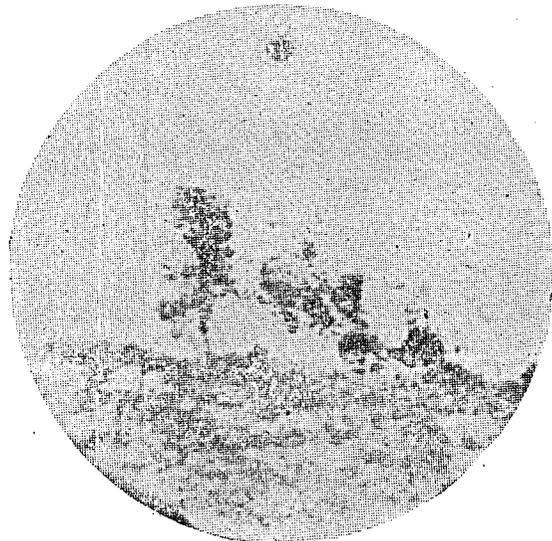


Fig 3 人工病変米 (*P. citrinum* 接種) の横断切片顕微鏡写真 (600×) 澱粉層表面に形成された conidia

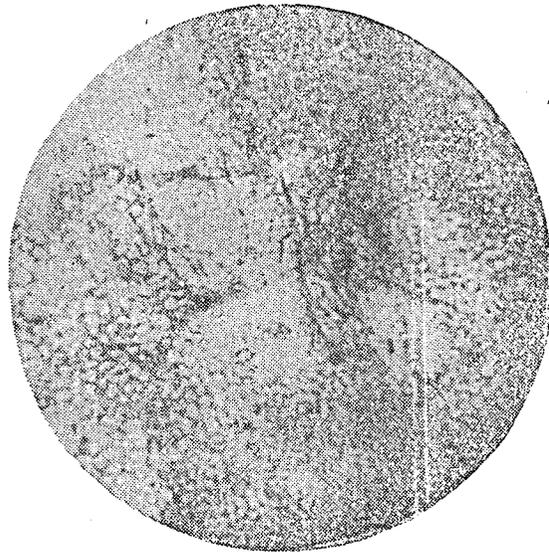


Fig 4 人工病変米 (*P. citrinum* 接種) の横断切片  
顕微鏡写真 (600×) 表面より 300 $\mu$  内方の澱粉層組織  
中に侵入せる營養菌絲 (黒い絲状のもの) グラム染色後  
チオ硫酸ソーダ処理

これによつて營養菌絲の原形質は青紫色に染色され、澱粉層組織は染色されないので營養菌絲の存在が明瞭となる。

### 総 括

以上の実験によつて次の事実が認められた。即ち

- 1 輸入米を搗精度 15% に再搗精してもなお顕微鏡的には糊粉層の残存を認める。
- 2 菌は米粒の表面即ち糊粉層に好んで寄生するが、条件さえよければ澱粉層にも寄生して繁殖する。
- 3 人工病変米では營養菌絲の侵入状態を殊に (4) の染色法によつてきわめて明瞭に認め得る。

### Summary

The authors studied on the microscopical anatomy of deteriorated rice, and obtained the following results:

1. Even 15% refined rice has a small quantity of aleuron layer, detected by microscope.
2. The molds usually grow on the aleuron layer of rice seed.
3. By artificially deteriorated rice, submerged hyphae grow down into the tissue of starch layer, and are easily found by altered gram-staining.

Received April 30, 1955

## 水, 野菜, 果実等のパラチオン試験法 (第2報)

川 城 巖, 福 沢 富 美, 江 島 昭

## Examination of Parathion in Water, Vegetables, Fruits, etc. (No. 2)

By Iwao KAWASHIRO, Fumi FUKUZAWA and Akira EJIMA

まえがき 昨年我々は標題について第1報を報告したが, 本年度も更に研究を続行し, 以下に述べる如き成績を得たので報告する. 今回行つた研究の主要点は定性試験を一法追加してパラチオンの検出を一層確実ならしめた事と麦及びトマトが従来の方法では妨害物質のため試験不可能であつたので, この妨害物質除去法を検討した事の2点である.

## 理 論 の 部

パラチオンをアルカリで分解して得たパラニトロフェノールを還元するとパラアミノフェノールを生ずる. これにオルトクレゾールを加えるとインドフェノールを生じ, これが青色を呈するのでこの方法を定性試験に追加した. パラニトロフェノールを単離する方法として, 尿及び血液の場合, Mountain 等<sup>1)</sup>は試料に酢酸鉛と第二磷酸ナトリウムを加えてエーテルで抽出し, Waldman と Krouse<sup>2)</sup>は塩化バリウムと過マンガン酸塩を加えて同じくエーテルに抽出している. しかしながら Lawford と Harvey<sup>3)</sup>は試料を塩酸性としてエーテル, 石油エーテル, アミルアルコールの混合溶媒を用いて抽出を行い, 90%以上の回収率を得ている. この方法は先ず上記の混合溶媒で試料を2回ふりまぜてパラニトロフェノールを抽出したのち, 2 Nアンモニア水に移行させ, さらに亜鉛末を加えてアルカリ性で還元を行い, この上澄液に1 w/v% オルトクレゾール溶液及び2 Nアンモニア水を加えてインドフェノール青色を作り定量を行うのである. 我々も定性 ii) 法を行つたのち塩酸性として上記混合溶媒で抽出し, 以下 Lawford の方法を適用して実験した結果, 可成の成績を収めることが出来た. しかし我々はさらにこの操作中の溶媒抽出を省略する方法を考えるとともに還元を酸性にて行い, 所期の目的を達成することが出来た. この方法により, 操作は甚だ簡便となり, i), ii) 法と合せてパラチオン検出を一層効果的にすることができた. 以下にその操作法を記述する, 即ち ii) 法を行つたのち, これに10% 塩酸5 cc 亜鉛末0.5g を加え, 還流冷却器をつけて再び水浴上10分間沸騰させ, 冷後濾過しアンモニア試液(日局V 10%) 5 cc, 1 w/v% オルトクレゾール液0.5cc を加えて発色せしめる. この方法によれば, 5  $\mu$ g の検出限度を得ることが出来た.

次に麦及びトマトはパラチオン不含の場合でも, いずれも定性第一法においてパラチオン類似の呈色を現し, 例えば麦のベンゼン抽出液を第1報の如く処理して得た残渣をアルコール数cc に溶かし, 定性第一法を行つて発色せしめると肉眼的には全くパラチオン類似の桃色を呈し, このものの最大吸収波長は大麦及び小麦ともに550m $\mu$ を示し, パラチオンの555m $\mu$ に甚だ近接していた. そこで我々はこの類似反応生起物質除去法を検討したのであるが, Blinn 及び Gunther<sup>4)</sup>はブドウ, オレンジ等についてこれらのベンゼン抽出液を10% 塩酸で洗滌することによつてこの第一法妨害物質を除去しているのだから, これを麦に應用したところ良好な結果を得た. 即ち麦のベンゼン抽出液を第1報の方法に従つてアルミナ層を通過させ天然色素を除去したのち, それぞれ10% 塩酸25cc を用いて3回分液漏斗中にてふりまぜ洗滌し, 更に水25cc で1回洗滌したのち, ベンゼンを蒸発させて検液を調製し定性 i) 法を行つたところ, 前記の類似呈色は全く消失し10分間経過後はじめて極めて微かに発色したのみであつた. そこでパラチオン含有の麦について上記方法を行つたところ, パラチオンを殆んど損失することなく検出に成功した. 続いてトマトにこれを應用したが, 妨害物質は除去出来なかつた. トマトは又定性第二法類似の呈色を現し, 従つて定量不可能ともなるので次にトマトの定性第二法妨害物質の除去を検討した. その結果 Buckley と Colthurst<sup>5)</sup>はn-ヘキサンを抽出溶媒とし, これを蒸発させた残留物に水酸化ナトリウム液と過酸化水素を加えてパラニトロフェノール類似呈色物質を除去しているのに対し, 我々はベンゼン抽出液に30% 過酸化水素を用いて完全に妨害物質を分解除去出来た.

## 実験の部

(1) **インドフェノール呈色反応に及ぼすアンモニア濃度の影響** パラチオン 12.3 $\mu$ g/cc のアルコール溶液 1 cc をとり、これにアルコール 5 cc, Nアルコール製水酸化ナトリウム液 5 cc を加えて水浴上 15 分間煮沸分解した後、これに稀塩酸 5 cc, 亜鉛末 0.5g を加え、再び水浴上 10 分間沸騰させ冷後濾過し、この濾液を 2 等分して a, b とする。a には 2 N (3.4%) のアンモニア水を、b には 10% アンモニア水を加えたのち、各々にオルトクレゾール液 0.5cc を加えて発色せしめたところ a は 15 分後に微かに青色を現したのに対して b は 3 分後に青色を現し、a よりも色の濃さは大であつた。(Table I)

Table I Effect of Concentration of Ammonia on the Coloration of Indophenol

conc. of Amm.	color-intensity
2 N (3.4%)	±
10%	+

(2) **大麦及び小麦中の妨害物質** パラチオンを含有せざる大麦及び小麦(籾のまま)を 30g とり、これを前年度報告した通りに処理してえた残渣をアルコール 10cc に溶かし、定性試験 i), ii), iii) を行つたところ、i) は前記の如く類似呈色を現し、その最大吸収波長をベックマンのスペクトロフォトメーター B 型を使用して測定した結果は Fig. 1 の通りで甚だ近接

している。このパラチオン類似の呈色物質は前記の如くベンゼン液 120cc に対して 10% 塩酸 25cc で 3 回分液漏斗中よくふりまぜると完全に除去出来たので(塩酸洗滌後更に 1 回水 25cc でベンゼン液を洗う)。次にパラチオンを

添加した麦について操作を行つたところ、塩酸洗滌によるパラチオンの損失は殆んどなく、その吸収曲線もパラチオンそのものの曲線と全く同一であつた (Fig. 1)。又塩酸、水にて洗滌したベンゼン液は相当水分を含むので、この水分が呈色反応に妨害を与えるのではないかと考え、硫酸ナトリウムを用いて脱水を行つた場合と行わない場合を i) 法において比較した結果は殆んど変化なく、操作の簡略化と、硫酸ナトリウムによる脱水操作中パラチオンが微量なりとも損失するのを防止するため、この脱水操作は省略した。次に ii) 法であるが上記のパラチオン不含の麦検液に Nアルコール製水酸化ナトリウム液を加えると直ちに黄色を呈したが、これを常法に従つて水浴上に加温するとき黄色は消失し、稍々白濁を生ずるのみで ii) 法は妨害を受けなかつた。又 iii) 法は全く異常なかつた。

(3) **アルミナ層使用を止め、10%塩酸洗滌操作のみを行つた場合** 小麦のベンゼン抽出液をアルミナ層を通すことなく、これに 10% 塩酸を加えてふりまぜたところ白色浮遊物を析出し、ベンゼン層と水層とは分離困難となつてこの操作は実際には行へなかつた。

(4) **トマト中の天然色素の除去** パラチオンを含有しないトマトの果皮及び果肉を含めて厚さ約 0.5cm の部分を取り、これを小片として、その 40g を円筒濾紙に入れベンゼンを用い、ソックスレツト抽出を行い以下第 1 報の

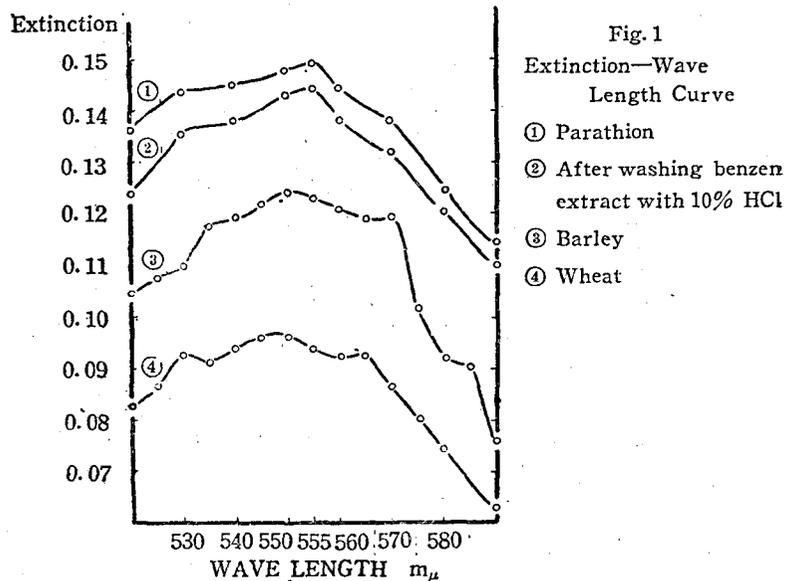


Fig. 1

Extinction—Wave Length Curve

- ① Parathion
- ② After washing benzen extract with 10% HCl
- ③ Barley
- ④ Wheat

方法に従つて検液を調製し定性試験を行つたところ, 前記の如く i) 法に於て麦の場合と同様の類似反応を呈し, ii) 法も黄色を呈したが iii) 法は妨害されなかつた. そこで先に麦の場合に行つた 10% 塩酸洗滌を行つたが i) 法を妨害する物質の除去は不成功であつた. ii) 法において発現する黄色色素の除去は次の如く行つた. 即ち上記に従つてトマトのベンゼン抽出液を作り, アルミナ層を通過させて一応天然色素の大部を除去したのち, 常法通り検液を調製し, これにNアルコール製水酸化ナトリウム液 5 cc を加え, 更に還流冷却器の上より注意しながら 30% 過酸化水素 1 cc を加えて水浴上 15 分間静かに煮沸すると完全に不純物を分解除去することができた. この操作中注意すべき事はアルミナを通す前にベンゼン抽出液に混入している水層を注意して出来るだけ完全に分離しておく事である. これを行わないと過酸化水素による妨害色素の除去が出来にくい.

### 総 括

麦及びトマトはパラチオン還元体が形成するジアゾ色素の呈する色に非常に類似した呈色を現すのでこれら妨害物質の除去を検討した. 麦ではそのベンゼン抽出液を 10% 塩酸で 3 回洗滌することにより目的達成が出来たが, トマトでは不成功であつた. 又トマトはベンゼン抽出残渣をアルカリ性で煮沸するとき黄色を呈し, 従つてパラチオンと区別し難く又定量も行えないので, この妨害物質除去は必須である. そこで我々はアルカリ分解を行うときに 30% 過酸化水素を加えて全く完全にこの黄色呈色物質を除去することが出来た. 又先年度報告した定性法<sup>6)</sup>に更に一法追加しパラチオン検出を一層確実ならしめた. それは定性 ii) 法を行つたのち酸性に戻して亜鉛末還元を行い, 10% アンモニア水及び 1 w/v% オルトクレゾール液を加えてインドフェノール青色を発現させる方法である. この方法は甚だ簡易にして定性 ii) 法に引続き操作することができる.

### 文 献

- 1) J. T. Mountain, H. Zlotolow and G. T. O'Conor; Ind. Hlth. Mon., 11, 88 (1951)
- 2) R. K. Waldman and L. A. Krouse; Occup. Hlth., 12, 37 (1952)
- 3) D. J. Lawford and D. G. Harvey; Analyst, 78, 63 (1953)
- 4) R. C. Blinn and F. A. Gunther; Anat. Chem. 22, 1219 (1950)
- 5) R. Buckley and J. P. Colthurst; Analyst 79, 285 (1954)
- 6) 川城 巖, 江島 昭; 衛生試験所報告, 72, 177 (1954).

### Summary

The authors have studied to remove interfering substances to the diazocoloration of parathion in barley, wheat and tomato. This could be done by washing the benzene extract of barley and wheat three times with 25cc of 10% hydrochloric acid solution. But this method was not available with tomato, and also when the benzene extract of tomato was hydrolysed by N-alcoholic sodium hydroxide solution, a bright yellow color like that from parathion was produced. This interfering substance could perfectly be removed by the application of Buckley's method that uses 100-volume (30%) hydrogen peroxide.

Now the authors add the third method for detection of parathion, by that indophenol blue is produced, to the two methods reported on this bulletin last year. This test can easily be achieved in succession after the second qualitative test.

Received April 26, 1955

## 植物体中のペストックス-3の残留試験

川城 巖, 藤井 清次, 林 敏夫

江島 昭, 加藤 三郎

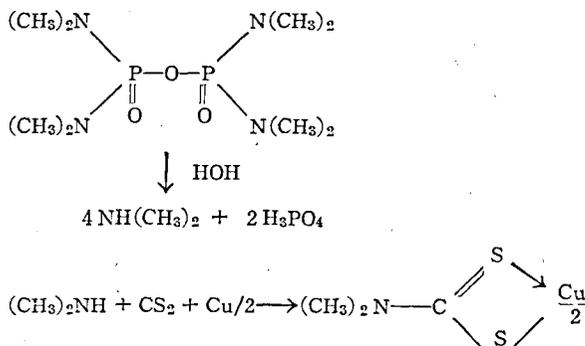
## Determination of Residual Pestox-3 in Plants

By Iwao KAWASHIRO, Seiji FUJII Toshio HAYASHI,

Akira EJIMA and Saburo KATO

まえがき 植物体中の OMPA (Octamethylpyrophosphoramidate) の定量法には, その抗コリンエステラーゼ作用を利用した酵素法<sup>1) 2) 3)</sup>, 加水分解して生ずる磷酸塩<sup>4), 5)</sup>又はデメチルアミンを定量する方法<sup>6)</sup>及びその代謝生成物のホルムアデヒド比色定量によるもの<sup>3)</sup>等が報ぜられている。いずれもクロロホルムを用いて抽出し, 定量を妨害する天然物の除去に苦心している。これらの化学的方法の外に放射性元素 P<sup>32</sup>の利用<sup>8), 9)</sup>により, 又昆虫を利用した Bioassay 等によつて<sup>2)</sup>, 植物体中の吸叫又は残留 OMPA を追求した報告がある。

我々は食品衛生上の見地から, Pestox-3 (OMPA の市販製剤) が, それを散布した場合に, 果実や野菜中に残留する量を追求した。我々の採用した, デメチルアミンの比色定量による Hall の OMPA 定量法の概要は次の通りである。植物体中からクロロホルムで抽出し, 塩酸で加水分解し, 生じたデメチルアミンを, アルカリ性で水蒸気蒸溜して希塩酸中に取り, 銅アンモニア液及び二硫化炭素のクロロホルム溶液を加えて振りまぜ, クロロホルム層に生じたデメチルデチオカルバミン酸の銅塩の黄色を比色する。この反応機構は次の通りであると考えられる。



第二級アルキルアミン類はこの反応を示すが, 之は普通生体内に存在せず, 第一級及び第三級アミン類はこの反応に影響しないと述べられている<sup>6)</sup>。実際には植物の種類及び時期により類似の呈色を示すことがあるので, Pestox-3 を使用しない同一植物試料について対照試験を行い, その値をさし引かねばならない。

## 実験の部

## I 定量法

1) 抽出. 試料は全果又は全葉を出来るだけ細かく切り, ホモジナイザーで処理するか又は乳鉢ですりつぶして, その一定量 (20~100g) をとり, クロロホルム 50~100cc を加えて 1 時間振盪する。この後, 濾過又は遠心分離してクロロホルム層を分取し, この一定量 (10~20cc) をとつて試験する。

2) 定量操作 試料一定量を三角フラスコにとり, 塩酸 10cc を加えて, クロロホルムを溜去した後残留液を 1 時間弱く煮沸させて加水分解する。この分解液をケールダール蒸溜フラスコに移し, 飽和水酸化ナトリウム溶液 10cc を加え, 水蒸気蒸溜する。受器は 25cc の標線付分液ロートを用い, 予め N-HCl 2 cc を入れて冷却器の先端を充分没入させておく。約 25cc まで溜液を集めた後冷却器を液より上げて暫く蒸溜を続け, 蒸溜水で外側を洗い込んだ後蒸溜を止める。これに飽和水酸化ナトリウム液 5 滴, 銅アンモニア液 (0.5g CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O を 10cc の水に

溶かし28%アンモニアで500ccとする) 1ccを加え、0.5%二硫化炭素—クロロホルム液20ccを加えて3分間振る。クロロホルム層を共栓三角フラスコに移し、約1gの脱水硫酸ナトリウムを加え、栓をして少し振りまぜて放置し、30分後1時間以内にこの上澄液の吸光度を測定する。島津光電比色計で中心波長450m $\mu$ のフィルターを用いた。予め標準液によつて作成した検量線によつてその含量を求める。なお Pestox-3 を含まない同一試料によつて盲験及び回収率を求めて補正を加える。本操作に使用するCS<sub>2</sub>-クロロホルム溶液は用時調製し、ゴム及びコルクをさけて全部共通スリ合せ硝子器具を用いた。

3) 検量線 撒布に使用した Pestox 原液 (66%w/v) を正確に10 000倍希釈して標準液とした。これを順次、所要濃度にして上記の操作を行つて吸光度を測定し検量線を作つた。この呈色の分光吸収曲線を Beckman spectrophotometer Model B で測定した結果では  $\lambda_{max}$  は432m $\mu$ であつた。概ね5 $\gamma$ ~200 $\gamma$ の範囲で Beer の法則が成立することを認めた。

4) 呈色の経時変化 上記呈色の吸光度は Fig. 1 の如く時間によつて減衰するが、30分後1時間が比較的安定で、操作上便利であるので常にこの時間に測定することとした。

Fig. 1 Influence of Time upon Color Density

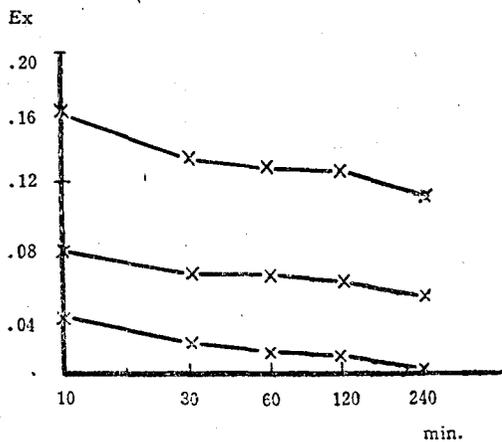
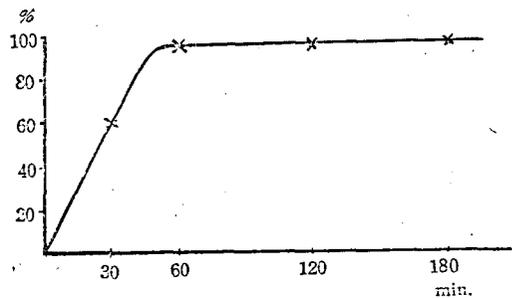


Fig. 2 Relation of Decomposition and Time of Heating



5) 加水分解時間 Pestox-3 10 $\gamma$ に塩酸7ccを加えて加熱加水分解し、上記操作で定量するとき、その回収率はFig. 2のように1時間で既に一定に達する。

6) 回収試験 Pestox-3 10 $\gamma$ を含む蒸溜水20ccをクロロホルム40ccで1時間振りまぜて抽出し定量した処、平均96.05%の回収率を示した。実際の試料は、種々の植物体であるから、各々について Pestox を使用していない同一試料を、同様に細切又はホモゲナイズして、一定量の Pestox-3 標準液を加えて試験し、各回収率を求めた。

II 植物体中の残留試験 試験の対象とした植物はいずれも出来るだけ実際の栽培法に近い条件を取り、7月初旬より下旬にかけて撒布法によつて Pestox-3 を使用した。然し中には撒布適時より少し前後したものもあり、特にたばこはこの試験のために特に鉢植にしたもので実際よりはるかに遅い栽培である。試料は一般に全果又は全葉を用いた。

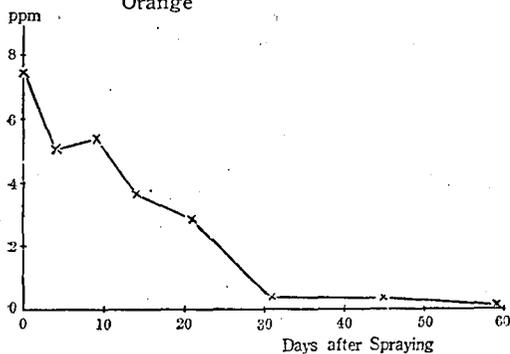
1) みかん 宮川早稲 (15年生)、7月9日に800倍希釈液 (実測濃度1089ppm) を1樹当たり約4 $\gamma$ 撒布した。試料は全果を未成熟の間は細切し、No. 7以後はホモゲナイズして各50gを用いた。回収率は101%。対照とした無撒布のみかんも幾分呈色を示し、成長によつて変動した。(最高はNo. 7の0.62ppm相当である。)

経日残存量を Table 1 (Fig. 3) に示す。Pestox-3 撒布以前に使用した農薬は、3月に硫黄合剤、4月にボルドー石灰、5月に石灰亜鉛+硫黄合剤+パラチオン剤、6月に石灰ボルドー液、7月に松脂合剤及び青酸ガス燻蒸である。これらの農薬は本試験に影響を与えなかつたと考えられる。

Table 1 Residual Pestox-3 in Mandarin Orange

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	
Date	7.10	7.14	7.19	7.24	7.31	8.10	8.24	9.7	
Days after spraying	0	4	9	14	21	31	45	59	
Residue (ppm)	1 (max.)	7.60	5.58	6.53	4.17	3.04	0.37	0.46	0.15
	2	7.55	5.42	—	—	2.76	0.31	0.39	0.13
	3 (min.)	7.20	4.15	4.28	3.13	2.76	0.28	0.15	0.07
	aver.	7.45	5.05	5.40	3.65	2.85	0.34	0.33	0.12

Fig. 3 Residual Pestox-3 in Mandarin Orange



2) りんご スターキングデリシヤス(16年生), 7月2日に1000倍希釈液(実測濃度1020ppm)を1樹当たり1斗, 楨杆半自動噴霧機で撒布した。試料は細切し, 乳鉢で擦りつぶしてその50gをとり, クロロホルム50ccを用いて抽出した。回収率は100%。無撒布のりんごからの呈色は最初は全然なかつたが, 途中から微かに現れ, 少しずつ増加した。しかし他の植物に比して少なく最大0.17ppmに過ぎなかつた。

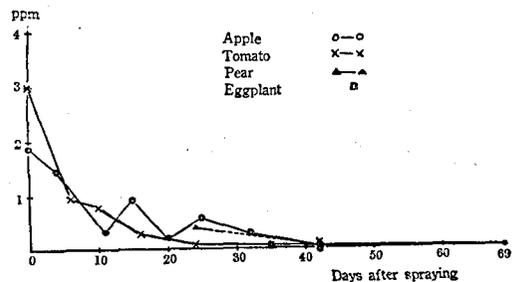
経日残存量を Table 2 (Fig. 4) に示す。Pestox-3 以外の撒布薬は砒酸鉛である。

Table 2 Residual Pestox-3 in Apple

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Date	7.2	7.6	7.13	7.15	7.22	7.27	8.3	8.13	9.9	
Days after spraying	0	4	11	15	20	25	32	42	69	
Residue (ppm)	1 (max.)	2.13	1.60	—	1.47	0.22	0.75	0.42	0.04	0.06
	2	1.74	1.56	0.30	0.79	0.20	0.55	0.22	0.04	0.04
	3 (min.)	1.74	1.21	—	0.59	0.09	0.40	0.13	-0.04	-0.06
	aver.	1.87	1.46	0.30	0.95	0.17	0.57	0.29	0.013	0.013

3) ホツブ 信濃早生(15年生), 7月2日及び7月22日に, 各々1500倍希釈液(実測濃度604ppm)を1株当たり1升, 第1回のみ(A), 両回共(B), 第2回のみ(C)の三種にわけて, 楨杆半自動噴霧機で撒布した。第1回の撒布をした7月2日にはまだ蕾がなかつたが, 第2回目の7月22日から蕾の採取が可能となつた。従つて22日以前は葉(a)のみにつき, 以後は蕾(b)について試験した。蕾を収穫(8月20日)後乾燥処理(直射日光下に約50°Cで6~7時間曝乾)したものについても試験した。いずれも試料を細切し, 乳鉢で擦りつぶしてその20gをとり, クロロホルム50ccを用いて抽出した。回収

Fig. 4 Residual Pestox in Apple, Tomato, Pear and Eggplant



率は葉 (a) は 54.6%, 蕾 (b) は 98%. 無撒布のホップは葉からは呈色せず, 蕾は微かに (0.67ppm 相当以下) 呈色した.

経日残留量を Table 3 及び 4 (Fig. 5) に示す.

Table 3 Residual Pestox-3 in Hop (a : leaves)

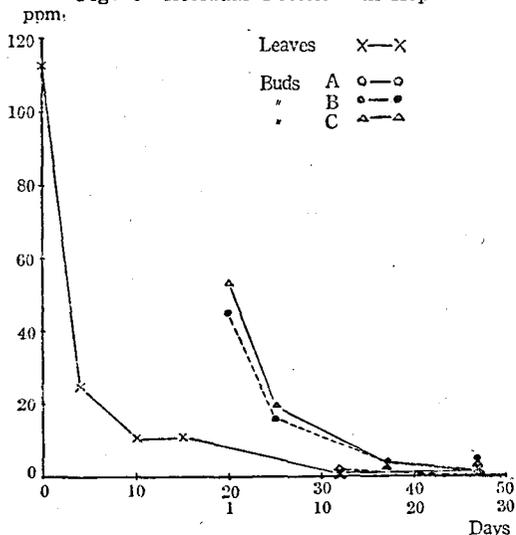
No.		1	2	3	4	5	6
Date		7.2	7.6	7.13	7.17	8.3	8.18
Days after spraying		0	4	11	15	32	47
Residue (ppm)	1 (max.)	119.06	25.79	10.68	11.28	0.81	2.22
	2	111.01	24.58	—	10.68	0.81	1.31
	3 (min.)	107.98	24.38	10.28	10.47	0.50	0.71
	aver.	112.68	24.91	10.48	10.81	0.71	1.41

Table 4 Residual Pestox-3 in Hop (b : buds)

(A : spray at July 2) (B : spray st July 2 and 22) (C : spray at July 22)

		A		B					C				
No.		1	2	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Date		8.3	8.18	7.22	7.27	8.8	8.18	8.20	7.22	7.27	8.8	8.18	8.20
Days after spraying		32	47	0	5	17	27	Drying	0	5	17	27	Drying
Residue (ppm)	1 (max.)	0.95	0.34	46.13	16.67	3.76	2.36	0.43	54.32	22.00	3.81	0.67	0
	2	—	0.17	—	16.67	3.65	2.36	0	—	19.14	3.25	—	-0.66
	3 (min.)	0.67	0	43.67	13.92	2.98	1.07	-1.75	52.36	16.39	2.08	0.11	-3.07
	aver.	0.81	0.17	44.90	15.62	3.46	1.93	-0.44	53.34	19.18	3.05	0.39	-1.24

Fig. 5 Residual Pestox-3 in Hop



Pestox-3 以外の撒布薬は D. D. T. 20%水和剤加用 6 斗式等量ボルドー液を適時使用した.

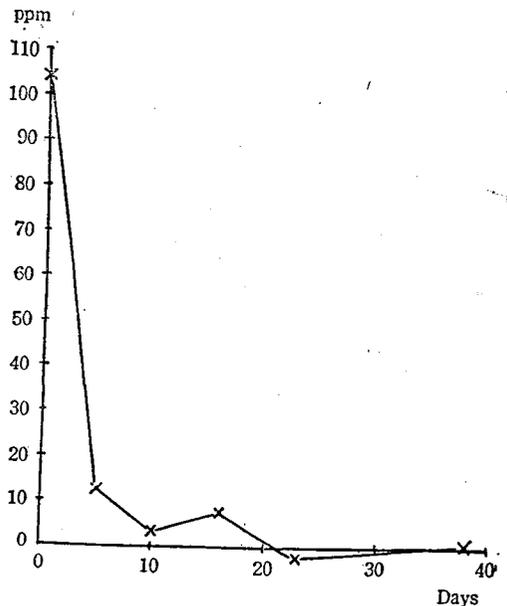
4) たばこ プライトエロー (6月3日播種, 7月1日定植, その生育状況を Table 5 に附した). 7月23日に, 1000倍希釈液 (実測濃度 858ppm) を1株に 15ccづゝ小型ガラス噴霧器で可及的全量が附着するように撒布した. 試料は薬液附着量が多いのを考えて 20g をとつた. 回収率は 59.3% 無撒布のたばこ生葉の呈色はやゝ濃く, 成長によつて変化があつた. (最高は No. 3 のときの 3.30ppm 相当である.)

経日残存量は Table 5 (Fig. 6) に示す. Pestox-3 以外には, 7月3日に DDT + 除虫菊を使用した.

Table 5 Residual Pestox-3 in Tobacco

No.	1	2	3	4	5	6	
Date	7.23	7.28	8.2	8.8	8.15	8.30	
Days after spraying	0	5	10	16	23	38	
Residue (ppm)	1 (max.)	104.3	13.35	3.43	9.09	0.09	0.46
	2	104.3	—	3.06	9.09	-0.46	0.19
	3 (min.)	104.3	11.31	3.06	5.75	-0.73	-0.56
	aver.	104.3	12.33	3.18	7.98	-0.37	0.03
Weight per one stump(g)	10.5	22	38	53	125	155	

Fig. 6 Residual Pestox-3 in Tobacco



5) トマト 世界一, 7月6日に1000倍希釈液(実測濃度949ppm)の4lを9株に如露で撒布した。試料は全果を1~2個宛直ちにホモゲナイズして各々50gとつて試験した。成熟したものがなかつたときは, 未成熟のものを用いた(表中Gを符した)。回収率は96.8%。無撒布のトマトの呈色は極めて僅かで(凡そ0.18±0.04ppm相当程度), 成長による変動も認められなかつた。

経日残存量をTable 6 (Fig. 4)に示す。Pestox-3以外の撒布薬はボルドール液である。また7月下旬の生育, 結果状態はやゝ不良であつた。

Table 6 Residual Pestox-3 in Tomato

No.	1	2	3	4	5	6	
Date	7.6	7.12	7.16	7.22	7.30	8.17	
Days after spraying	0	6	10	16	24	42	
Residue (ppm)	1 (max.)	3.11	1.00	0.82	0.48	G 0.11	0.09
	2	3.04	0.95	0.79	0.43	—	0.09
	3 (min.)	2.86	0.89	0.71	G 0.02	G 0.02	0
	aver.	3.00	0.95	0.77	0.28	G 0.07	0.06

6) こかぶ 霜被, 11月21日に1000倍希釈液2.5lを80株に撒布した。試料は全草をとつて細切し, 乳鉢ですりつぶし, 最初は約40g, 漸次増量して100gまでを, 毎回5検体とつた。回収率は88%。対照のこかぶからの呈色は途中で少し現れたが, 後消滅した。

経日残存量をTable 7 (Fig. 7)に示す。

7) なす 甲真二号, 7月6日1000倍希釈液(実測濃度994ppm)の2lを9株に如露で撒布した。試験は出来るだけ細切し, その50gをとりクロロホルム50gを用いて抽出した。回収率は100%。無撒布のなすからは呈色しなかつた。

経日残存量はTable 8 (Fig. 4)に示す。

8) なし シンチュウ (30年生), 7月19日に1000倍希釈液を1樹当たり2.6l撒布した。試料は全果をホモゲナイズしてその50gをクロロホルム50ccを用いて抽出した。回収率は85%。無撒布のなしは0.54ppm相当の呈色を示した。

経日残存量は Table 8 (Fig. 4) に示す。

Table 7 Residual Pestox-3 in Turnip

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Date	11.21	11.25	11.30	12.5	12.10	12.15	12.20	12.25	1.5	1.9	1.14	1.19
Days after spraying	0	5	10	15	20	25	30	35	46	50	55	60
Residue (ppm)	(max.)	59.75	21.10	15.51	7.09	6.33	3.26	3.01	2.80	0.66	0.18	0
	(min.)	28.43	6.24	4.29	5.75	2.53	0.42	0.38	0	0	0	0
	aver.	39.28	12.64	9.44	6.34	4.58	2.01	2.63	1.42	0.13	0.036	0

Fig 7. Residual Pestox-3 in Turnip

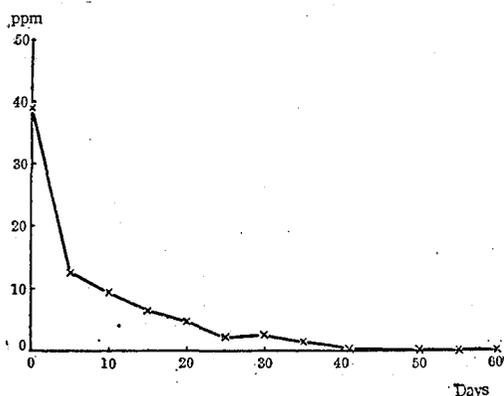


Table 8 Residual Pestox-3 in Eggplant and Pear

No.	eggplant		pear
	1	2	1
Date	7.30	8.17	8.20
Days after spraying	24	42	35
Residue (ppm)	1 (max.)	0.55	0.30
	2	—	0.22
	3 (min.)	0.24	0.18
	aver.	0.39	0.23

9) 馬鈴薯 A) 男爵, 6月2日及び7月7日に800倍希釈液を坪当り第一回3合, 第二回4合撒布し8月28日に採取したもの。及びB) 紅丸, 6月18日及び7月18日に800倍希釈液を各反当り6斗撒布し, 10月7日に採取したもの, について, 各々試料をホモゲナイズして50gをクロロホルム50ccを用いて試験した。回収率は77.6%。無撒布の馬鈴薯も0.14ppmの呈色を示した。

Table 9 Residual Pestox-3 in Potato

No.	A)	B)		
Date	11.15	11.25		
Days after spraying	132	131		
Residue (ppm)	1 (max.)	1.75	1.02	0.71
	2	0.79	—	—
	3 (min.)	0.48	0.93	0.34
	aver.	1.00	0.97	0.52

## 総 括

この試験はHallのDimethylamineの定量による植物体中のOMPAの定量法を検討し、その方法によつて、Pestox-3を撒布した果実や野菜の経日残存量を追求したものである。

以上の成績を総括すると次の通りである。

- a) みかんは撒布時の附着は比較的少ない(平均7.45ppm)が、45日後に0.33ppm、59日後に殆んど認められなくなる。これはMetcalf *et al*<sup>8)</sup>の分析結果に近似する。
- b) りんごはみかんと同様撒布時の附着は極めて少ない。減衰は緩徐であるが42日後には殆んど残留が認められない。
- c) ホップの葉の撒布時の附着は本実験中の最大値(112.68ppm)であつたが減衰は急速であつた。20日後これに生成した蕾には僅微な残留しか認められなかつた。  
7月2日及び7月22日の2回にわたつて撒布した蕾も、7月22日のみ撒布した蕾も、類似した傾向を示し、7月22日の撒布直後には相当な附着(44.9~53.4ppm)があつた。27日後収穫直前にも若干の残留(1.93~0.39ppm)が認められたが、乾燥処理したものには全く認められなかつた。
- d) たばこは撒布時の附着が相当多く(104.3ppm)、其の後は激減して23日以後には認め得なかつた。
- e) トマトは撒布時の附着僅少で24日後に残留が認められなくなつた。
- f) こかぶの撒布時附着量は若干多く(平均39.28ppm)、50日後に消失した。
- g) なすは撒布後24日目に平均0.39ppmを示し、42日後には殆んど残留しないものと認められる。
- h) なしは35日後で、殆んど残留しないものと認められる。
- i) 馬鈴薯には130日経過後0.5~1ppmの残存が認められた。

なお本研究に協力戴いた長野県農事試験場、同ホップ乾燥場、秦野タバコ栽培試験場、東海近畿農事試験場興津分場、東京農業大学農場、千葉大学農学部に御礼申し上げる。なお本研究は厚生省科学試験研究費を受けた、謝意を表する。

## 文 献

- 1) Giang, P. A. and Hall, S. A. : *Anal. Chem.*, 23, 1830 (1951).
- 2) Casida, J. E., Chapman, R. K. and Allen, T. C. : *J. Econ. Ent.*, 45, 568 (1952).
- 3) Casida, J. E., Chapman, R. K., Stahman, M. A. and Allen, T. C. : *J. Econ. Ent.*, 47, 64 (1954).
- 4) Ripper, W. E., Greenslade, R. M. and Hartley, G. S. : *Bull. Ent. Res.*, 40, (1950).
- 5) David, A., Hartley, G. S., Heath, D. F. and Pound, D. W., : *J. Sci. Food Agr.*, 2, 310 (1951).
- 6) Hall, S. A., Stohlman, J. W. M. and Schechter, M. S. : *Anal. Chem.*, 23, 1866 (1951).
- 7) Heath, D. F., Lane, D. W. J. and Llewellyn, M. : *J. Sci. Food Agr.*, 3, 60 (1952).
- 8) Metcalf, R. L. and March, R. B. : *J. Econ. Ent.*, 45, 988 (1952).
- 9) March, R. B., Metcalf, R. L. and Fukuto, T. R. : *J. Agri. Food Chem.*, 2, 732 (1954).

## Summary

Residual Pestox-3 (commercial OMPA) in the fruits and vegetables which were sprayed with it was determined according to the modified Hall's method. As the results, the amount of residual Pestox-3 was very small or not recognizable in pear, apple, eggplant, tunip and mandarin 40-50 days, in tobacco 23 days, in hop (buds) 47 days and in dried one 27 days after spraying, respectively. But we found 0.5-1 ppm of it in potato on 130 days after spraying.

Received May 9, 1955

法定半田<sup>1)</sup>及び高鉛半田を使用した罐詰の  
内容食品に移行する鉛量について

川城 巖, 藤井 清次, 原田 基夫

Comparison of Lead Contents in Canned Foods in Cases of Using  
Low-Lead (Recognized by Food Sanitation Law) and High-Lead Solders

By Iwao KAWASHIRO, Seiji FUJII and Motoo HARADA

**まえがき** 現在広く用いられているサニタリー罐は、ブリキ板の端を重ねて真空巻締機にかけ密着させたものであるが、サイドシーム部の接合に半田付された若干の部分は、罐内容物に常に接触し、半田成分がこれら内容物に移行することが考えられる。現在、本邦においては外装用半田としての規定には、鉛 60 部、錫 40 部の割合の合金となつてはいるが、戦時中米国において鐵付強度と錫の節約の両面から代用半田<sup>2)3)4)5)</sup>の研究が行われ、その結果鉛 95 部、錫残部という高鉛半田が採用されている。その後、本邦<sup>6)</sup>においても錫 5%以下、鉛残部という組成の半田が最適であることが証明された。これらの鉛含有率の高い半田を製罐ラインに採用しても、罐内容食品が鉛による汚染の危険をもたらすものでないことが実験されている。即ち米国戦時冶金委員会<sup>7)</sup> (War Metallurgy Committee) は、罐詰食品中に吸収される鉛量は極めて僅かであることを認めている。その実験によれば 97.5%鉛、2.5%銀、又は 95%鉛、2.5%錫、2.5%銀及び 93%鉛、2%銀、5%錫の代用半田を用い、98°F、9ヶ月貯蔵の食品について試験した結果、食品に吸収された鉛量はコンビーフ、0.09 p.p.m.、コンデンスミルク、0.34 p.p.m.、オレンジジュース、0.08 p.p.m.、グリーンビーンズ、0.03 p.p.m.、であつた。なお、H. Cheftel<sup>8)9)</sup>等は貯蔵数ヶ月の製品或いは溶液について実験した結果、内容物中に存在する鉛量は無視出来ると報告している。以上のことから我々は法定半田及び高鉛半田を使用して製造された罐詰の内容食品中に移行する鉛量を測定したので報告する。

実験の部

**I 試験罐詰** 罐のサイドシーム部は法定半田 (錫 40 部、鉛 60 部、普通半田とも謂う) 及び高鉛半田 (錫 2 部、鉛 98 部、強力半田或いは低錫半田とも謂う) で半田付されたもので、試験罐詰の種類及び製造条件を第一表に示す。

第 1 表

種 類	製 造 条 件
蜜 柑	原料：伊東産、90° 約 1 分蒸煮後、皮、ムキ身割をする。アルカリ、酸処理：0.45% HCl、22° にて 50 分処理後、次に 0.6% NaOH にて 15 分間処理。水晒：当日晒、8 時間。詰込量：M 級、果糖 10%、PH 3.3、果肉 230 g、液汁 87g。
鯖 フレーク	原料：鯖仕上の時のフレーク並にヘラモ肉。詰込量：フレーク肉 200g、調味液 85g (生姜少々混入)。調味液は醤油 1 升に対し砂糖 (精製三益白) 120 匁調合し 43° S とする。巻締：6 M 型真空巻締機、真空計の目盛 15 吋。殺菌：予備加熱 15 分、本加熱 7 封度 80 分。
コンデンス ミ ル ク	原料：富士庵原地の原乳。乳質検査：比重、脂肪の検定。冷却：20° 程度に冷却、貯乳槽に静置。荒煮：原乳 100 に対して 15~16% の精糖を溶解し 75° にて 30 分殺菌。濾過：真空濃縮：内容量 412 g、クリンパーヘッドについて巻締
お 多 福 豆	原料→煮込 4 時間→味付 (B×65° 以上の糖液にて 4 時間→1 昼夜放置→肉詰 (固型量 220 g、注入液 B×65° 409g) →密封 (5 M.V.S) →殺菌 (5 Lbs, 1 時間 20 分) →冷却 (40 分) →製品、函詰。 註 1 煮込の際、水晒は充分行ふ。 註 2 水飴、人工甘味料は全然使用せず

種類	製造条件
福神漬	詰込量：固型量 170 g, 液 60 cc. 脱気：95°, 15分. 殺菌：4Lbs, 7分.
鯖油漬	原料処理：常法通り. 蒸煮：2Lbsで4時間. 放冷：12時間室温に放置. 仕上：常法通り (皮, 血合肉をとる). 殺菌：7Lbsで95分.
コンビーフ	固型量：325g. 脱気：70°, 20分. 殺菌：6Lbs, 90分.
鯨大和煮	固型量：168g. 脱気：90°, 15分. 殺菌：110°, 60分.

なお、鯖フレーク、蜜柑、コンデンスミルク、お多福豆、コンビーフ及び鯨大和煮は5号罐、福神漬は6号罐、鯖油漬は内面塗装の平2号罐である。

## II 試験法 (ジチゾン単色法)

1. 試薬. A. O. A. C. 法<sup>10)</sup>に従った。

2. 検液の調製

a. 灰化. よくかき混ぜた試料の10~50gをとり磁製ルツボに入れ、灰化補助剤5cc\* 或いは10cc\*\*<sup>11)</sup>を加え乾燥したのち、電気炉に入れ500°を超えない温度で灰化する。灰化が充分でないときは、ときどきとり出し、濃硝酸を加えて灰化を継続し完了させる。得られた白色の残渣に濃塩酸の10~20ccを加えて水浴上に乾固する。塩酸、これを繰返して無水ケイ酸を析出せしめ、最後に数倍量の熱水でうすめ酸洗滌濾紙を用いて濾過し、残留物は熱稀熱塩酸クエン酸液、40% 醋酸アンモニウム液各々10ccをもつて洗い、濾液、洗液を合して一定量とする。

b. 湿式分解. 試料の5~10gをケルダール分解フラスコにとり、硫硝酸混液で常法の如く分解する。液が透明になつたならば磁製皿に移し、直火で白煙の出なくなるまで加熱し、濃塩酸10~20ccを加え以下a.と同様に処理する。

3. 抽出 灰化液の一定量を磁製皿にとり、臭素水を加えて水浴上に温め、臭素を揮散せしめ、若し沈澱の生ずるときは酸洗滌濾紙を用いて濾過し、少量の熱水で洗い濾液、洗液を合し冷却してこれを小型硬質分液漏斗に移し、50% クエン酸液20ccを加え、これに精製アンモニア水を注意して加え僅かにアルカリ性とし、チモールブルー指示液を滴下したのち、10% シアン化カリウム液5~10ccを加えてpHを約9.7 (チモールブルー指示液により青緑→青色に変わった点) に調整し、抽出用ジチゾン液を少量宛加えて、クロロホルム層が過剰のジチゾンを含むまで完全に抽出する。抽出したクロロホルム層を他の分液漏斗に移し、水層は純クロロホルムを用いて洗い、さきのクロロホルム層に合す。約1時間放置後、2%シアン化カリウム液を用いて強く振れば、過剰のジチゾンは黄色となつて水層に移行するから、水層無色となるまでこの操作を繰返す。この際、浮遊しているクロロホルムの小球をも出来得る限りクロロホルム層に落下せしめる。ここに得られた純ジチゾン鉛の赤色塩は再蒸溜水にて洗い、洗液は更に純クロロホルムで洗つてさきの赤色塩に合す。これに精製1%硝酸液の10~20ccを加えて強く振り、ジチゾンを離遊せしめて別の分液漏斗に移し、水層は純クロロホルム少量を用いて洗い、さきのクロロホルムに合す。ここに得た緑色のジチゾンクロロホルム溶液を酸洗滌濾紙を用いて濾過し、濾紙に附着したジチゾンは純クロロホルムを用いて完全に洗い落し一定量とする。

4. 比色 3項によつて得られた純ジチゾンクロロホルム溶液を直ちに Beckman 分光光度計 (Madel B) を用いて、その吸光度を測定した。

## III 試験成績

1. 予備試験 罐詰食品をジチゾン法によつて定量するときは、しばしば錫の妨害が論ぜられている。即ちジチゾンは錫に対しても鉛と同様の錯塩を生ずるからである。A. O. A. C. 法の如く混色法を行う場合は、錫は高次酸化物として反応外に出す必要がある。塩化第二鉄、臭素水等で酸化し、或は過塩素酸液及び臭素臭素水素酸液の混液とともに加熱して、錫を揮散せしめたのちにジチゾン抽出を行うのが普通である。然し我々が錫の妨害の程度について試験した結果では、大過剰に存在しない限り妨害を認めなかつた。錫のジチゾン塩は非常に不

\* 硝酸アルミニウム 40 g 及び硝酸カルシウム 20 g を再蒸溜水にとかして 100 cc とする。

\*\* 硝酸マグネシウム 10 g を再蒸溜水にとかして 100 cc とする。

安定であり(ジチゾン鉛塩はかなりの時間安定である)1時間以内に分解<sup>12)</sup>され、2%シアン化カリウム液に移行することを認めた。即ち錫の塩酸溶液につきジチゾン抽出を行い、1時間放置後2%シアン化カリウム液で強く振り、シアン化カリウム層を分離し、ベルリン青を作つてシアンを除いた液につき、カオチリン反応を行つたところ著明の錫を見出したが、クロロホルム層は反応陰性であつた。錫の100 $\mu$ g, 150 $\mu$ g, 200 $\mu$ gを含む液に硝酸鉛液の一定量を加えて、前記の如くジチゾン抽出を行い、2%シアン化カリウムで振つたのちその吸光度を測定した結果では、100 $\mu$ g, 150 $\mu$ gでは加えた硝酸鉛液の吸光度に一致し、200 $\mu$ gに至つて妨害が認められた。なお、錫100 $\mu$ gを含む液を過クロール鉄或いは臭素水で処理し、沈澱の生じたときは濾過して得た液、或いは錫含有液に硝酸鉛液の一定量を加えて、同様に処理した液につきジチゾン抽出を行い、上記の如く操作して吸光度を測定した結果は、前者は零を示し後者は加えた硝酸鉛液の量に一致した。即ち Sn<sup>+++</sup>はジチゾンと全く反応せず、ただ過剰の鉄の存在はジチゾンを酸化して、造塩能力を失わしめる懸念がある。臭素水を用いたときは水浴上に加熱して完全に揮散せしめることが必要である。以上からジチゾン単色法を用いて鉛を定量するときは、混在する錫の妨害から殆どさげ得るものと思われる。

2. 分光吸収曲線及び測定濃度範囲 標準鉛液(1cc=0.01mg Pb)の0.5, 0.7, 1.0, 1.5ccをとり、試験法における如く操作して得たジチゾンクロロホルム溶液を、Beckman 分光光度計を用いて、各波長における透過度を測定した結果を Fig. 1 に示す。この吸収曲線の  $\lambda$  max は 600 m $\mu$  である。また測定するときの最適の濃度は、検液の一定量中に含まれる鉛量が 7.5 $\mu$ g~15 $\mu$ g の範囲内<sup>13)14)</sup>にあることを示している。

3. 検量線 標準鉛液の10倍稀釈液(1 $\mu$ gPb/cc)の1, 2, 3, 5, 7, 7.5, 10, 15, 20ccをとり、試験法における如く操作して得たジチゾンクロロホルム溶液を Beckman 分光光度計を用い、波長 600 m $\mu$ 、温度 10° のときのそれぞれの吸光度を測定した結果を Fig. 2 に示す。即ちこの範囲内では濃度に比例する。

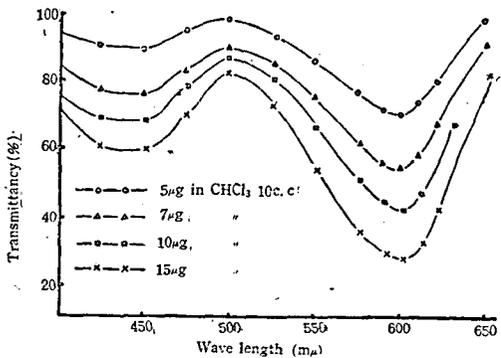


Fig. 1 Absorption Spectra

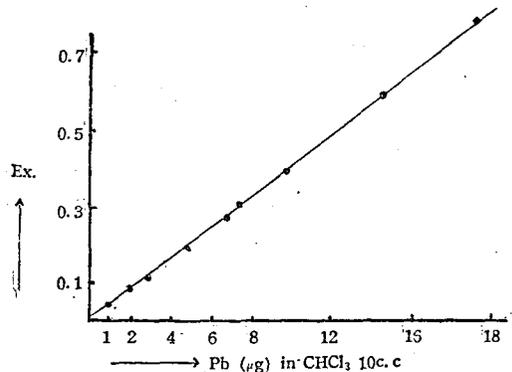


Fig. 2 Calibration Curve

4. 試験結果 試験罐詰は 37° の定温器に保温し、一部は室温に放置した。この保温罐の 15 日、30 日、室温放置罐の 30 日を経過した法定半田及び高鉛半田のそれぞれの罐につき分析した結果、第 2~9 表の如き鉛が検出された。また法定半田を対照としたとき高鉛半田 (Two-ninety eight solder) を使用したために、余分に検出した鉛量を第 10 表に示す。

Table 2 Lead amount in canned tunny flake

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	Weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found, $\mu$ g	Lead in blank, $\mu$ g	Lead in sample $\mu$ g	Results, p. p. m
	kept at 37°C for 15 days	1	10	wet ash	34.33	19.20	15.13	1.51
		2a	50	dry ash, no ash-aid	77.25	18.50	58.75	1.18
		2b	50	dry ash with Mg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	72.60	15.15	57.45	1.15
		3	50	dry ash with Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> +Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	64.10	8.45	55.65	1.11

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	Weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found, $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample, $\mu\text{g}$	Results, p. p. m	
Sn : Pb 40 : 60	Kept indoors for 1 month	1a	10.50	wet ash	22.26	12.04	10.22	0.97	
		1b	11.10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	12.74	3.16	9.58	0.86	
		2	20.30	"	19.77	1.77	18.00	0.89	
		3	11.71	wet ash	20.16	7.90	12.26	1.05	
		4	50.08	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	42.73	7.31	35.42	0.71	
	Kept at 37°C for 1 month	1	10	wet ash	25.55	12.65	12.90	1.29	
		2	10	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	14.80	1.60	13.20	1.32	
		3	10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	13.35	4.30	9.05	0.91	
	Sn : Pb 2 : 98	Kept at 37°C for 15 days	1	10	wet ash	30.03	17.63	13.40	1.34
			2a	50	dry ash no ash-aid	80.60	18.00	62.60	1.25
2b			50	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	67.85	10.50	57.35	1.15	
3			50	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	82.18	19.55	62.63	1.25	
Kept indoors for 1 month		1a	10.80	wet ash	16.02	9.41	6.62	0.61	
		1b	20.20	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	17.02	2.39	14.63	0.72	
		2	21.10	"	30.29	5.60	24.69	1.17	
		3	11.10	wet ash	24.30	10.86	13.44	1.21	
Kept at 37°C for 1 month		4	50.06	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	48.59	11.19	37.40	0.75	
		1	10	wet ash	26.15	11.50	14.65	1.47	
		2	10	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	22.05	5.00	17.05	1.71	
		3	10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	16.20	2.85	13.35	1.34	

Table 3 Lead amount in canned mandarin orange

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample, $\mu\text{g}$	Results p. p. m
Sn : Pb 40 : 60	Kept at 37°C for 15 days	1	17.13	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	9.53	2.75	6.78	0.40
		2	15.06	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5.65	0.60	5.05	0.34
	Kept indoors for 1 month		15.55	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	5.91	2.29	3.62	0.23
		1	20	wet ash	22.08	12.45	9.63	0.48
	Kept at 37°C for 1 month	2a	50	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	45.40	23.10	22.30	0.45
		2b	50	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	21.80	4.50	17.30	0.35
		3	10.9	wet ash	9.62	5.65	3.96	0.36
		4	12.2	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	4.66	0.48	4.18	0.35
	Kept at 37°C for 15 days	1	17.76	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	12.60	5.05	7.55	0.43
		2	16.66	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	10.90	3.80	7.10	0.43

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	Weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found, $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample, $\mu\text{g}$	Results p. p. m
sn : Pb 2 : 98	Kept indoors for 1 month		15.20	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	8.22	2.26	5.96	0.39
		1	20	Wet ash	25.50	14.10	11.40	0.57
	Kept at 37°C for 1 month	2a	50	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	40.60	18.30	22.30	0.45
		2b	50	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	39.30	20.10	19.20	0.38
		3	13.2	wet ash	11.12	5.72	5.40	0.41
4	13.8	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	7.03	0.85	6.18	0.45		

Table 4 Lead amount in canned condensed milk

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	weight of sample g	Method of breakdown	Lead found, $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample, $\mu\text{g}$	Results p. p. m	
Sn : Pb 40 : 60	Kept at 37°C for 15 days	1	11.87	wet ash	7.62	5.53	2.09	0.18	
		2a	50.57	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	33.28	21.58	11.70	0.23	
		2b	50.30	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	30.58	16.88	13.70	0.27	
	Kept indoors for 1 month	1	10.04	wet ash	13.99	11.18	2.81	0.28	
		2	10.32	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	4.45	2.52	1.93	0.19	
		3	7.02	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	3.85	1.74	2.11	0.30	
	Kept at 37°C for 1 month	1	5.35	wet ash	9.13	7.27	1.86	0.35	
		2	10.92	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	4.18	0.70	3.48	0.32	
		3	5.30	wet ash	1.62	1.48	0.14	0.03	
		4	10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	2.56	0.46	2.10	0.21	
		5	10	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2.01	2.01	0	0	
	Sn : Pb 2 : 98	Kept at 37°C for 15 days	1	13.50	wet ash	11.93	8.55	3.38	0.25
			2a	50.30	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	31.35	16.88	14.47	0.29
			2b	49.90	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	20.72	9.88	10.84	0.22
		Kept indoors for 1 month	1	10.18	wet ash	14.25	10.66	3.59	0.35
2			10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	3.74	1.67	2.07	0.21	
3			9.89	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	3.64	0.78	2.86	0.29	
Kept at 37°C for 1 month		1	5.05	wet ash	9.60	7.56	2.04	0.40	
		2	11.65	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	4.70	1.21	3.49	0.30	
		3	6.40	wet ash	3.40	2.11	1.29	0.20	
		4	10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	2.96	1.20	1.76	0.18	
		5	10.40	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	4.58	0.63	3.95	0.38	

Table 5 Lead amount in canned "OTAFUKUMAME"

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found, $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample, $\mu\text{g}$	Results p. p. m
Sn : Pb 40 : 60	Kept at 37°C for 15 days	1	15.45	wet ash	5.90	2.50	3.40	0.22
		2	24.45	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	9.65	1.00	8.65	0.35
		3	25.10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	10.40	0.80	9.60	0.38
	Kept at 37°C for 1 month	1	13.0	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	10.94	2.49	8.45	0.65
		2	13.1	"	4.92	1.71	3.20	0.24
	Sn : Pb 2 : 98	Kept at 37°C for 15 days	1	9.29	wet ash	9.26	5.08	4.18
2			29.60	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	16.0	2.70	13.30	0.45
3			32.57	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	15.15	0.68	14.48	0.44
Kept at 37°C for 1 month		1	13.4	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	7.33	2.03	5.30	0.40
		2	13.1	"	7.67	1.51	6.16	0.47

Table 6 Lead amount in canned "EUKUJINZUKE"

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	Weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found $\mu\text{g}$	Lead in blank $\mu\text{g}$	Lead in sample $\mu\text{g}$	Results p. p. m
Sn : Pb 40 : 60	Kept indoors for 1 month	1	10	wet ash	16.26	11.96	4.30	0.43
		2	10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	7.90	2.33	5.57	0.56
		3	10	"	6.87	1.48	5.39	0.54
	Kept at 37°C for 1 month	1	10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	7.36	1.96	5.40	0.54
		2	10.1	"	7.77	1.41	6.36	0.63
		3	10	wet ash	11.49	8.70	2.79	0.28
Sn : Pb 2 : 98	Kept indoors for 1 month	1	10	wet ash	16.19	8.71	7.48	0.75
		2	10.5	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	9.69	2.71	7.98	0.80
		3	10	"	3.78	1.37	2.41	0.24
	Kept at 37°C for 1 month	1	10	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	11.96	3.85	8.11	0.81
		2	10	"	7.31	1.85	5.46	0.55
		3	10	wet ash	14.37	8.70	5.67	0.57

Table 7 Lead amount in canned "Tunny" in oil

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample, $\mu\text{g}$	Results p. p. m
	Kept indoors for 1 month	1	9.7	wet ash	26.60	14.91	11.69	1.21
		2	10.1	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	10.99	1.03	9.96	0.99
		3	10.3	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	12.81	3.91	8.90	0.86

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	Weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample, $\mu\text{g}$	Results p. p. m
Sn : Pb 40 : 60	Kept at 37°C for 1 month	1	11.2	wet ash	16.78	3.83	12.95	1.16
		2	8.0	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	4.97	1.29	3.68	0.46
		3	10.7	"	8.94	1.66	7.28	0.68
		4	8.0	"	3.26	0.71	2.56	0.32
		5	14.1	"	15.83	1.06	14.77	1.05
Sn : Pb 2 : 98	Kept indoors for 1 month	1	9.0	wet ash	27.94	15.74	12.20	1.36
		2	10.2	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	12.68	1.20	11.48	1.13
		3	10	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	8.32	4.03	4.29	0.43
	Kept at 37°C for 1 month	1	10.1	wet ash	19.40	2.80	16.20	1.66
		2	9.0	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	7.59	1.11	6.48	0.72
		3	11.5	"	11.03	1.40	9.63	0.84
		4	8.0	"	8.12	2.03	6.09	0.76
		5	14.2	"	24.54	2.01	22.53	1.59

Table 8 Lead amount in canned corned beef

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found, $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample, $\mu\text{g}$	Results p. p. m	
Sn : Pb 40 : 60	Kept indoors for 1 month	1	11.35	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	4.63	2.05	2.58	0.23	
		2	10.70	"	7.97	4.16	3.81	0.36	
	Kept at 37°C for 1 month	1	20	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	6.15	0.75	5.40	0.27	
		2	20	"	6.02	0.62	5.40	0.27	
		3	10	"	3.01	1.16	1.85	0.19	
		4	20	wet ash	14.55	8.47	6.08	0.30	
		5	20.3	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	7.04	0.72	6.32	0.31	
	Sn : Pb 2 : 98	kept indoors for 1 month	1	12.23	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	9.69	6.30	3.39	0.28
			2	10.35	"	8.42	3.78	4.64	0.45
		kept at 37°C for 1 month	1	20	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	6.11	0.71	5.40	0.27
2			20	"	4.99	0.84	4.15	0.21	
3			10	"	3.87	1.85	2.02	0.20	
4			20	wet ash	15.45	8.28	7.17	0.36	
5			20.1	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	9.12	0.45	8.67	0.43	

Table 9 Lead amount in canned "YAMATONI" of whale-meat

Solder (%)	Temp. and storage term	Number of samples	Weight of sample, g	Method of breakdown	Lead found, $\mu\text{g}$	Lead in blank, $\mu\text{g}$	Lead in sample $\mu\text{g}$	Results p. p. m	
Sn : Pb 40 : 60	Kept at 37°C for 15 days	1	14.60	wet ash	16.62	12.82	3.80	0.26	
		2	25.65	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	12.83	2.10	10.73	0.42	
	kept indoors for 1 month	1	12.0	wet ash	4.76	2.84	1.92	0.16	
		2	10.2	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	2.88	1.00	1.88	0.18	
		3	11.0	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5.59	1.08	4.51	0.41	
	kept at 37°C for 1 month	1	10.2	wet ash	12.22	8.43	3.79	0.37	
		2	20	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	6.97	2.34	4.63	0.23	
		3	10	"	7.46	5.15	2.31	0.23	
	Sn : Pb 2 : 98	kept at 37°C for 15 days	1	13.8	wet ash	16.91	13.60	3.31	0.24
			2	23.4	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	12.05	1.58	11.47	0.49
		kept indoors for 1 month	1	11.2	wet ash	6.61	3.09	3.52	0.31
			2	11.1	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	3.65	0.34	3.31	0.30
3			11.7	dry ash with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5.48	2.02	3.46	0.30	
kept at 37°C for 1 month		1	11.1	wet ash	11.67	7.60	4.07	0.37	
		2	22.2	dry ash with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	11.38	2.65	8.73	0.39	
		3	10	"	10.22	5.15	5.07	0.51	

Table 10 Difference

Kinds	Temp. and storage term	Av. of lead amounts (p. p. m)		Difference
		40:60 Solder	2:98 Solder	
Tunny flake	Kept at 37°C for 15 days	1.26	1.26	0
	Kept indoors for 1 month	0.89	0.95	0.06
	Kept at 37°C for 1 month	1.17	1.51	0.34
Mandarin orange	Kept at 37°C for 15 days	0.37	0.43	0.06
	Kept indoors for 1 month	0.23	0.39	0.16
	Kept at 37°C for 1 month	0.40	0.46	0.06
Condensed milk	Kept at 37°C for 15 days	0.22	0.25	0.03
	Kept indoors for 1 month	0.25	0.28	0.03
	Kept at 37°C for 1 month	0.18	0.29	0.11
"OTAHUKUMAME"	Kept at 37°C for 15 days	0.32	0.34	0.02
	Kept at 37°C for 1 month	0.45	0.44	- 0.01
"HUKUJINZUKE"	kept indoors for 1 month	0.51	0.60	0.09
	kept at 37°C for 1 month	0.48	0.60	0.12
"TUNNY" in oil	kept indoors for 1 month	1.02	0.97	- 0.05
	kept at 37°C for 1 month	0.73	1.11	0.38

Kinds	Temp. and storage term	Av. of lead amount (p.p.m)		Difference
		40 : 60 Solder	2 : 98 Solder	
Corned beef	kept indoors for 1 month	0.30	0.37	0.07
	kept at 37°C for 1 month	0.27	0.29	0.02
"YAMATONI" of whale-meat	Kept at 37°C for 15 days	0.34	0.37	0.03
	Kept indoors for 1 month	0.25	0.30	0.05
	Kept at 37°C for 1 month	0.28	0.42	0.14

## 結 論

1 我々の実験についてジチゾン法を採用した根拠は次の如くである。小田氏<sup>15)</sup>がポーログラフによる実験で、0.83 p.p.m 以下の鉛含量のときは鉛波検出せずと報告しており、小田切氏<sup>16)</sup>は両者を比較して、ジチゾン法が約10倍の感度を有するという。

2 同種の試験罐詰において若干の差異が認められたが、これは半田が内容食品に接触する面積の多少に原因すると思われる。

3 貯蔵条件及び時間における変化を見るに、保温罐が僅かに鉛の増大する傾向が認められた。

4 この8種の罐詰食品について検出された鉛量は、本来その食品中に存在する鉛と半田から溶出された含量である。従来の法定半田を対照として、高鉛半田 (Two-ninety eight solder) を比較するとき第10表で示す通り、高鉛半田を使用したために、著しく鉛が溶出したと云うことはない。米国における聯邦安全機構<sup>17)</sup> (Federal Security Agency) によれば、果実罐詰中の鉛の最大許容量は 7.14 p.p.m であると発表している。米国医学会の食品会議<sup>18)</sup> においては食品中の鉛の最大許容量は 2 p.p.m であるという結論を出している。なお、英国<sup>19)</sup> では罐詰の魚肉及び肉類で 5 p.p.m が限度であるとしている。我々の検出した鉛量はこれらの許容限度から比較するとき、遙かに少ない値を示している。

本実験に使用した罐詰は、東洋製罐株式会社の御厚意によるものである。茲に厚く感謝する次第である。

## 文 献

- 1) 厚生省告示第54号
- 2) American Can Campaign Research report : Technical Bulletin No.10, Nov. 1947
- 3) Dewey and Aimy Chemical Company. Technical Bulletin (file number A-14-6), Jan. 22, 1947
- 4) C.H. Bloodorn : Continental Can Co., Inc. Research Dept., March 1951
- 5) H.W. Gillete, E.J. Cameron, Robert F. Griggs : Metal Prog., 44, (3), 420. 1943
- 6) 東洋鋼板K.K. 下松工場研究所. Sept 21. 1954
- 7) H.W. Gillete, E.J. Cameron, Robert F. Griggs : Metal Prog., 44, (3), 420. 1943
- 8) H. Cheftel : Ann. Fals., No. 486-6, P.168-174. 1949
- 9) H. Cheftel : Ibid, No. 490-2, P435-37. 1949
- 10) Methods of A.O.A.C., 7th. Ed., P400-401. 1950
- 11) Report of the Lead Panel of the Metallic impurities in Foodstuffs Sub-Committee. THE ANALYST, 79, 401. 1954
- 12) 内藤 : 有機試薬による分析法, 広川書店, 昭.23
- 13) G.H. Ayres : Anal. Chem., 21, 652 1949
- 14) N.T. Grigeman : Ibid., 24, 445. 1952
- 15) 小田 : 罐詰時報 33, (2), 昭 29
- 16) 小田切 : 私信による Jan. 1955

- 17) American Can Company Research Division : The Canned Food Reference Manual, 3rd. Ed., 1947
- 18) Ibid.,
- 19) London HER MAJESTY'S STATIONARY OFFICE : Food standards Committee Report on Lead. Revised recommendations for limits for lead content of foods. 1954.

### Summary

The solders for can-making tested were the lead-low (Sn : Pb=40 : 60) and the lead-high (Sn : Pb=2 : 98). The kinds of canned foods tested were the Tunny flake, Mandarin orange, Condensed milk, Otafukumame, Fukujinzuke, Tunny in oil, Corned beef and Yamatoni of whale-meat.

Measurement classes were the following 3 kinds :

- the 1st class kept at 37° for 15 days,
- the 2nd class kept indoors for 1 month,
- the 3rd class kept at 37° for 1 month.

The amount of lead in canned foods was determined by the dithizone method. The foods canned with high-lead solder showed only slightly greater increase of lead content than with low-lead one, and the increase proceeds more rapidly with the can kept at 37° than at room temperature.

Received May 11, 1955

## ソルビン酸の食品保存効果について ※ (第1報)

川田 公平, 磯田 由子

## Studies on the Effect of Sorbic Acid as a Preservative for Sausage (1)

By Kohei KAWATA and Yoshiko ISODA

まえがき 肉製品中ソーセージは保存性が低く夏季に於ては変敗し易く屢々食中毒問題の対照となることなどからその保存性を増強することが要望されている。著者等はその目的に対して最近比較的毒性が少なく、1), 3), 4) 又食品保存料として主にチーズの防黴剤として5), 6), 7), 8) 有効であると言われるソルビン酸を使用することにより或程度ソーセージの保存性を高め得るのではないかと考え2~3の実験を行つたのでその結果を報告する。ソルビン酸は2), 10),  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{COOH}$  の式を有し  $M_w. = 112$ ,  $M_p. = 134^\circ$  アルコール・エーテルに可溶性で水に不溶、沸騰水に僅かに溶ける白色無臭無味の結晶性粉末である。実験にはそのナトリウム塩 (台東株式会社製品), を使用した。

試験方法 ソーセージの一般的製法 (原料肉の漬込, チョッパー, カッター, スタッパー, 燻煙, ボイル, 工程) により一定の条件でワイレナーソーセージを試作し, これにソルビン酸ナトリウムを各種の濃度及び条件で添加したもの及び比較検討のため安息香酸ナトリウム, デハイドロ酢酸ナトリウム (以下 D. H. A. と略称), 及びニトロフルアクリル酸アミド (以下 Z-フランと略称), を夫々同様に処理して対照品と共に後述の如く試料 (後出第一回・第二回・及び第三回試験試料参照), を調製し, 何れも温度  $25^\circ$ , 湿度飽和の恒温槽中に保存しその経日変化を試験した。試料調製に用いた原料は豚赤肉 40%, 豚脂 20%, 兎肉 40% の混合物で更に塩化ナトリウム 3%, グルタミン酸ナトリウム 0.1%, 蔗糖 0.8%, 硝酸カリウム 0.3%, 及び香辛料 0.3% を添加したものである。試料は何れも日進畜産株式会社工場で作した。保存試験においては次の項目について試験を行いその消長について検討した。

## 試験項目:

[1] 酸度・試料 100g 中の遊離酸の中和に要する N. 水酸化ナトリウム液の cc 数を酸度とし次の方法によつて夫々実施した。

a) 酸度 (I) (水溶性酸度), 試料 5g を水約 100cc と共に Homogenizer にかけて均一な懸濁液としこれを濾過し水で洗つて約 200cc とし, N/10 水酸化ナトリウム液を用いて滴定した。

b) 酸度 (II) (アルコール, エーテル, 可溶酸度), 日本薬局方酸度及びその測定法に準じて試料 5g を用いアルコール, エーテルの等量混液で浸出し濾紙を用いて濾過し N/10 水酸化ナトリウム液で滴定した。

[2] 揮発性塩基窒素, 衛生検査指針<sup>9)</sup>の方法にもとづいて試料 10g から検液を調製し, 温度  $45^\circ$  で 30 分間通気を行い試料 100g 中の揮発性塩基窒素量 (mg) を求めた。

[3] 官能検査・香味, 色相の変化及び発黴状況並に通称「ねと」と呼ばれる粘稠性物質の発生について検査を行い食用適否の判定を行つた。

第一表 第一回 調製試料 (ソーセージ)

区分 容器	対 照	ソルビン酸ナトリウム (ソルビン酸として $\frac{1}{1000}$ ) 添加		安息香酸ナトリウム (安息香酸として $\frac{1}{1000}$ ) 添加	
		燻 込	ボイル用 水中	燻 込	ボイル用 水中
羊腸詰	1	3	5	6	8
ライフアン詰	2	4	—	7	—

数字は試料の No. を示す。

※ 本研究は昭和30年4月第8回日本薬学大会において発表。

## 試験成績

## 第一回試験：

〔1〕 試料の調製。所定の方法に従い第一表の如く対照品、ソルビン酸ナトリウム、及び安息香酸ナトリウム使用の試料8種 (No.1~8) を調製した。試料の容器に羊腸及びライファンを用いた。ソルビン酸及び安息香酸の各ナトリウム塩を夫々遊離酸として  $\frac{1}{1,000}$  原料中へ練込使用したもの、及び調製中ボイル工程の温湯中に溶解し成品の外側からボイルしたものとに分けた。試料のボイル温度は何れも65~70°で実施した。

〔2〕 試験成績。試料8種について所定の保存試験を行つたところ第二表及び Fig. I. に示す成績を得た。

第二表 第一回試験成績

試料	経過日数		1	2	3	4	5	6	
	試験項目								
No. 1	酸 度 I		2.44	2.30	2.44	1.88	2.22	2.63	
	酸 度 II		2.16	2.30	2.63	2.07	2.50	3.38	
	-N mg%		—	11.00	14.47	31.32	—	76.33	
	官能	「ね と」		(-)	(-)	(+)	(卅卅)		
		そ の 他		(-)	(-)	僅微発微異臭	×異臭変色		
No. 2	酸 度 I		2.26	2.32	2.44	2.63	2.54	3.19	
	酸 度 II		2.07	2.10	2.26	2.28	2.80	2.82	
	-N mg%		—	9.20	9.41	19.74	—	39.48	
	官能	「ね と」		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
		そ の 他		(-)	(-)	(-)	ヤ、粘靱性膨張	×異味, 異臭	
No. 3	酸 度 I		2.82	2.51	2.26	2.07	2.20	2.26	
	酸 度 II		1.88	2.00	2.26	3.76	3.60	3.76	
	-N mg%		—	8.70	14.47	30.26	—	65.8	
	官能	「ね と」		(-)	(-)	(±)	(卅)		
		そ の 他		(-)	(-)	(-)	⊗微に異臭	×	
No. 4	酸 度 I		2.63	2.49	2.35	2.26	2.65	3.01	
	酸 度 II		2.07	2.10	2.07	1.50	2.40	3.57	
	-N mg%		—	11.84	11.84	15.00	—	25.50	
	官能	「ね と」		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		そ の 他		(-)	(-)	(-)	軟化す	⊗微に異臭味	×
No. 5	酸 度 I		2.63	2.30	2.07	2.07	2.48	3.01	
	酸 度 II		2.26	2.35	2.63	2.82	3.45	3.76	
	-N mg%		—	9.50	25.00	25.00	—	39.50	
	官能	「ね と」		(-)	(-)	(+)	(卅卅)		
		そ の 他		(-)	(-)	発微, 異臭	×悪臭		
	酸 度 I		2.82	2.50	2.07	2.07	2.00	1.15	
	酸 度 II		2.16	2.31	2.44	2.82	3.30	3.76	

試料	経過日数		1	2	3	4	5	6
	試験項目							
No. 6	-N	mg%	—	10.52	11.84	22.12	—	35.00
	官能	「ね」と	(-)	(-)	(±)	(+++)	/	/
		その他	(-)	(-)	微に発微	×異臭変色	/	/
No. 7	酸度	I	2.63	2.30	2.07	2.07	2.20	2.26
	酸度	II	1.88	2.00	2.26	2.44	3.30	4.32
	-N	mg%	—	11.84	15.79	19.74	—	30.26
	官能	「ね」と	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		その他	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	×異味, 異臭
No. 8	酸度	I	2.82	2.50	2.26	2.82	2.30	1.70
	酸度	II	1.88	2.40	2.63	3.38	5.40	6.77
	-N	mg%	—	10.52	18.42	26.32	—	63.17
	官能	「ね」と	(-)	(-)	(±)	(+++)	/	/
		その他	(-)	(-)	微に発微	×	/	/

表中 酸度 I = 水溶性酸度, 酸度 II = アルコール, エーテル可溶性酸度. -N = 揮発性塩基窒素.  
 ⊗ = 食用困難, × = 食用不適, (-) = 異状を認めない, (±) = 痕跡, (+) = 発生

即ち [1] 酸度 (I) の成績においては試料 No. 2 の値は増加するが No. 6 No. 8 は減少し, 他の5種は何れも減少後増加する傾向がみられた. 酸度 (II) においては概ね増加する傾向であるが試料 No. 1 及び No. 4 は減少後増加する傾向を示した.

[2] 揮発性塩基窒素の成績は各試料共何れも増加する傾向がみられた. この成績を各試料について比較すると次の如くである.

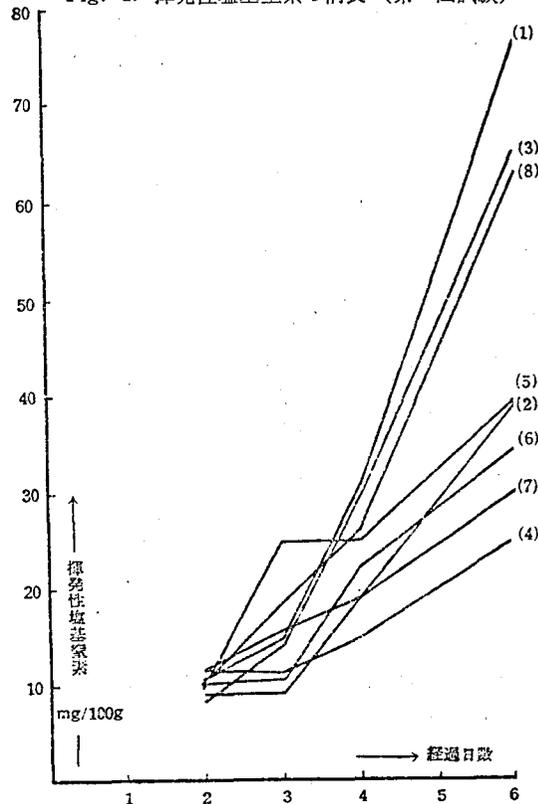
(a) 羊腸詰とライファン詰では何れもライファン詰試料 (No. 2 No. 4 No. 7) が低い値を示した.

(b) 煉込添加とボイル処理ではソルビン酸試料ではボイル処理 (No. 5) の方が低く, 安息香酸試料では煉込添加 (No. 6) の方が低い値を示した.

(c) ソルビン酸ナトリウム及び安息香酸ナトリウム使用と対照試料を比較すると羊腸詰試料 (No. 3 No. 6) 及びライファン詰試料 (No. 4, No. 7) 並にボイル処理試料 (No. 5 No. 8) の何れも低い値を示した.

(d) ソルビン酸ナトリウムと安息香酸ナトリウムを夫々使用した試料について比較すると, 煉込添加羊腸詰では安息香酸試料 (No. 6) が低く, ライファン詰ではソルビン酸ナトリウム試料 (No. 4) が低く, 又ボイル処理試料でもソルビン酸ナトリウム試料 (No. 5) が低い成績を示した.

Fig. 1. 揮発性塩基窒素の消長 (第一回試験)



[3] 官能検査の成績は次の如くである。羊腸試料は何れも保存中異味異臭を生ずると殆んど同時に外側に「ねと」の発生を認めた。ライファン詰の外側には認められなかつた。

(a) 羊腸とライファン詰の比較ではライファン試料の方が何れも1~2日間保存性が高い成績を示した。

(b) ソルビン酸及び安息香酸使用の試料は対照に比較して(イ)羊腸試料でソルビン酸試料 (No. 3). は  $\frac{1}{2}$  ~1日間延長し, 安息香酸試料 (No. 6) は対照と殆んど変りないが「ねと」の発生が少ない傾向であつた。(ロ) ライファン試料ではソルビン酸試料 (No. 4) は  $\frac{1}{2}$  ~1日間延長し, 安息香酸試料 (No. 7) も約1日間延長した。(ハ) ボイル処理の試料はソルビン酸試料 (No. 5) では煉込試料 (No. 3) に劣り, 対照と同程度であつた。安息香酸試料においては煉込添加と同程度の成績を示した。(ニ) ソルビン酸試料 (No. 3) は対照試料 (No. 1). 及び安息香酸試料 (No. 5) に比較して防黴の効果がみられた。

以上第一回の検査成績を総合すると次の如く言うことが出来る。

(1) ソルビン酸ナトリウム及び安息香酸ナトリウムを夫々遊離酸として0.1% 煉込使用したものは僅かに保存性を高める ( $\frac{1}{2}$  ~1日間)。 (2) ソルビン酸と安息香酸の間には大なる差を認め得ないがソルビン酸の方が防黴の効果が認められた。 (3) ライファン詰は羊腸詰より何れも1日間程度保存性が高い。 (4) ボイル処理のものは余り効果は認められない。 (5) 揮発性塩基窒素の値が約25mg% 以上で変敗が生じた。

#### 第二回試験：

[1] 試料の調製。所定の方法に従い第三表の如く対照品、ソルビン酸ナトリウム及び安息香酸ナトリウムを夫々遊離酸として  $\frac{1}{1,000}$  原料中に添加し、夫々羊腸詰及びライファン詰とした試料6種を調製した。本試料は何れも中心温度70°で10分間ボイルし80°で40分間燻煙を行つた。

第三表 第二回調製試料 (ソーセージ)

容 器	対 照	ソルビン酸ナトリウム添加 (遊離として $\frac{1}{1000}$ )	安息香酸ナトリウム添加 (遊離酸として $\frac{1}{1000}$ )
羊 腸 詰	1	3	5
ライファン詰	2	4	6

数字は試料 No. を示す

[2] 試験成績・試料6種について所定の試験を行つた結果第四表及び Fig. 2. に示す成績が得られた。

第四表 第二回試験成績

試 料	経過日数		1	2	3	4	5
	試験項目						
No. 1	酸 度 I		—	3.00	4.05	4.05	—
	酸 度 II		—	2.40	4.30	4.70	—
	—N mg%		1.34	10.75	26.88	61.82	—
	官能	「ね と」	(-)	(-)	(+)	(+++)	—
		そ の 他	(-)	(-)	僅に発黴異臭	×異臭, 発黴	—
No. 2	酸 度 I		—	3.00	2.80	4.10	5.60
	酸 度 II		—	2.80	3.20	4.10	4.70
	—N mg%		1.34	10.75	13.44	30.00	—
	官能	「ね と」	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		そ の 他	(-)	(-)	ヤ、膨張	膨張, 軟化	×異臭, 粘穢性

試料	経過日数		1	2	3	4	5
	試験項目						
No. 3	酸 度 I		—	2.80	3.00	2.70	—
	酸 度 II		—	2.60	3.80	4.70	—
	—N mg%		4.03	4.03	36.29	55.10	—
	官能	「ね と」	(-)	(-)	(+)	(#)	—
		そ の 他	(-)	(-)	僅微に異臭	× 異臭	—
No. 4	酸 度 I		—	2.80	3.00	4.40	5.60
	酸 度 II		—	3.00	3.40	4.70	4.70
	—N mg%		1.34	1.34	14.78	26.88	—
	官能	「ね と」	(-)	(-)	(-)	(-)	—
		そ の 他	(-)	(-)	ヤ、膨張糸状粘稠物	⊗膨張、軟化微に異臭	× 異臭
No. 5	酸 度 I		—	2.50	2.40	2.40	—
	酸 度 II		—	2.80	2.80	3.80	—
	—N mg%		1.34	8.06	30.91	49.73	—
	官能	「ね と」	(-)	(-)	(#)	(#)	—
		そ の 他	(-)	(-)	発微, 変色, 異臭	×	—
No. 6	酸 度 I		—	3.40	3.40	6.60	—
	酸 度 II		—	3.40	3.40	5.60	—
	—N mg%		5.37	6.50	10.75	25.50	—
	官能	「ね と」	(-)	(-)	(-)	(-)	—
		そ の 他	(-)	(-)	膨 張	× 異臭, 軟化	—

表中の各記載事項及び記号等は、第二表のものと同一である。

即ち〔1〕酸度(I)の成績はライファン詰試料(No. 2, 4, 6.)は何れも増加の傾向であるが羊腸詰では減少又は増加の傾向がみられた。酸度(II)においては何れも増加する傾向がみられた。

〔2〕揮発性塩基窒素の成績は何れも増加する傾向がみえた。その成績を各試料間に比較すると次の通りである。

(a) 羊腸とライファンでは何れもライファン試料(No. 2, 4, 6.)が低い値を示した。

(b) ソルビン酸及び安息香酸を使用した試料と対照試料との間では羊腸及びライファン試料の何れも低い値を示した。

(c) ソルビン酸試料と安息香酸試料の間では羊腸及びライファン試料共ソルビン酸試料が値を示した。

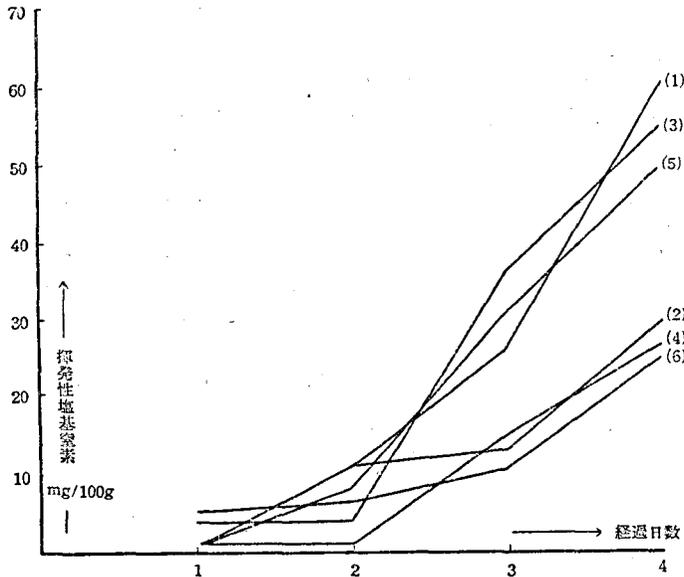
〔3〕官能検査の成績は次の如くである。

(a) 羊腸とライファン試料を比較するとライファン試料は対照で1日間、ソルビン酸試料で $\frac{1}{2}$ ~1日間延長、安息香酸試料ではやゝ良好の保存性がみられた。

(b) ソルビン酸ナトリウム及び安息香酸ナトリウム添加試料と対照試料を比較すると(i)羊腸試料(No. 3 No. 5)は「ねと」の発生少なく内容肉の状況等より約 $\frac{1}{2}$ 日程度保存性が延長された。(ii)ライファン試料(No. 4 No. 6)は夫々対照試料(No. 2)に比べて略同程度であつた。

(c) ソルビン酸試料と安息香酸試料の両者においては殆んど同様であるがソルビン酸試料の場合は防微効果

Fig. 2. 揮発性塩基窒素の消長 (第二回試験)



が認められた。

以上第二回の成績を総合すると次の如く言うことが出来る。即ちソルビン酸及び安息香酸を $\frac{1}{1000}$ 加えたものは第一回試験と略々同様に $\frac{1}{2}$ ~1日間保存力を延長し、両者殆んど同程度であるが、ソルビン酸の方に防衛効果が認められた。ライファン詰は羊腸に比較して保存性が高い。揮発性塩基窒素は25mg%以上で変敗を生じた。

第三回試験：

〔1〕 試料の調製。第五表に示す如く所定の方法により対照試料、ソルビン酸ナトリウム $\frac{1}{500}$  (遊離酸として) 添加試料、D. H. A. のナトリウム塩 $\frac{1}{500}$  及び $\frac{1}{1000}$  (何れも遊離酸として) 添加試料及び-Zフラノ $\frac{1}{50,000}$ 、 $\frac{1}{20,000}$  を夫々添加した試料の6種を調製した。

各試料は何れも中心温度70°で10分間ボイル処理を行い又80°で40分間燻煙処理を行った。

第五表 第三回調製試料 (ソーセージ)。

試料No.	添 加 物 質	添 加 量
1	対 照	—
2	ソルビン酸ナトリウム	(遊離酸として) $\frac{1}{500}$
3	デハイドロ酢酸(D. H. A.)	$\frac{1}{500}$
4	同	$\frac{1}{1000}$
5	ヒドロフリルアクリル酸アシド	$\frac{1}{50000}$
6	同	$\frac{1}{20000}$

〔2〕 試験成績。試料6種について所定の保存試験を行った結果第6表の如き成績を得た。

第六表 第三回試験成績

試料	経過日数 試験項目	1	2	3	4	5	6	7
		No. 1	—N mg%	—	11.62	20.08		
	ねと	(-)	(-)	(#)	(##)	—	—	—
	その他	(-)	(-)	異臭 ×	悪臭, 発微 ×	—	—	—
No. 2	—N mg%	—	11.62	17.43				
	ねと	(-)	(-)	(-)	(±)	(#)	—	—
	その他	(-)	(-)	(-)	ヤ、緑色となる	周辺緑色, 微異臭 ×	—	—
No. 3	—N mg%	—	6.97	19.75	—	—	—	—
	ねと	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	—
	その他	(-)	(-)	(-)	(-)	緑色の斑点生ず	発微 ×	—
No. 4	—N mg%	—	8.13	20.92	—	—	—	—
	ねと	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	—	—
	その他	(-)	(-)	(-)	(-)	僅異臭, 発微 緑色斑点	×	—
No. 5	—N mg%	—	8.13	17.43	—	—	—	—
	ねと	(-)	(-)	(#)	(##)	—	—	—
	その他	(-)	(-)	(-)異臭	×	—	—	—
No. 6	—N mg%	—	13.94	22.08	—	—	—	—
	ねと	(-)	(±)	(+##)	—	—	—	—
	その他	(-)	ヤ、粘稠性	異臭 ×	—	—	—	—

表中:—Nは揮発性塩基窒素, (-)は異状ない, (±)は痕跡, (+)は発生, ×は食用不適を示す。

即ち官能検査において試料 No. 1 は第3日で「ねと」の発生, 異臭を生じ第4日で発微食用不適となつた。No. 2 は第4日に於て「ねと」を生じ淡緑色に変色し第5日に於て食用不適, No. 3 は第5日において緑色の斑点を生じ第6日に発微, 第7日で食用不適となつた。

No. 4 は第6日で食用不適となり, No. 5 は第4日, No. 6 は第3日で食用不適となつた。揮発性塩基窒素は何れも増加し 25mg% 以上で変敗を生じた。

### 総 括

ソルビン酸の食品(ソーセージ)保存効果につき試験を行つた。試験項目は酸度測定, 揮発性塩基窒素定量, 及び官能検査とし, なお比較として安息香酸ナトリウム, デハイドロ酢酸ナトリウム及びニトロソフルアクリルアミド(Z-フラン)を用いて平行的に試験を行つた。その結果ソルビン酸は0.1%の使用の場合対照より $\frac{1}{2}$ ~1日間保存性を延長した。また安息香酸ナトリウムより防微効果の点に於て稍々優つていた。次に0.2%使用の場合は1日間以上の保存性の延長をみたが比較として用いたデハイドロ酢酸の効果に及ばなかつた。Z-フランは全々効力がなくむしろ悪い影響があつた。

#### 「附 記」

- (1) ソーセージのライファン詰は羊腸詰より保存性が高いが外観的に腐敗の判別が困難である。
- (2) ソルビン酸含有の温湯でボイルしても効果は認められない。
- (3) 揮発性塩基窒素は保存中何れも増加し 20mg% 以上で変敗する傾向がみられた。

本実験に当り御指導を賜った東大教授農学博士佐々木林治郎先生並に国立衛生試験所生化学試験部長薬学博士川城巖先生に対し深く感謝の意を表し、試料その他について御尽力を賜った日本食肉加工協会々長川辺長次郎氏へ厚く御礼を申上る。

### 文 献

- 1) 霜三雄：書信；台東株式会社研究部
- 2) Lange, N. A. : Hand Book of Chemistry, 3rd. ed. (1939)
- 3) Deuel, H. J., Alfin-Slater, R., Well, C.S. and Smyth, H. F. : Food Research, 19, 1 (1954)
- 4) Deuel, H. J., Calbert, C. E., Anisfeld, L., Mokeehan, H. and Blunden, H. O. : Food Research, 19, 13 (1954)
- 5) Melnick, D. and Luckmann, F. H. : Food research, 19, 28 (1954)
- 6) Melnick, O., Luckmann, F. H. and Gooding, C. M. : Food research, 19, 33 (1954)
- 7) Melnick, O. Luckmann, F. H. and Gooding, C. M. : Food research, 19, 44 (1954)
- 8) Smith, D. P. and Rollin, N. J. : Food research, 19, 59 (1954)
- 9) 衛生検査指針 Ⅱ (1951)
- 10) Heilbron, I. M. : Dictionary of organic compounds, 3, 632 (1937).

### Summary

The effect of sorbic acid as a preservative for sausage was examined. Sorbic acid, when its concentration was 0.1 per cent, had the same effect for preservation as benzoic acid, but the former was superior to the latter for prevention against molds. When it was 0.2 per cent, sorbic acid was effective for longer period than some other preservatives except dehydroacetic acid.

Received May 6, 1955

## 防腐剤の雑糸状菌発育阻止効果について

浦久保 五郎

Studies on the Growth-inhibiting Effect of Five  
Fungicidal Drugs against Various Species of Fungi.

By Gorō URAKUBO

まえがき 食品などに用いる防腐剤の効力試験には、普通培養基に防腐剤を種々の濃度に加えこれに糸状菌を接種培養して発育の有無を見ることが行われるが、これに使用する菌株としては現在規定のものあるいは慣用というようなものがきまつていない。従来報告では *Sclerotinia (Botrytis)*, *Stemphyllium*, *Alternaria*,<sup>1)</sup> *Helmintosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, などが各個別々に用いられているようであり、あるいは醤油を空气中に放置して感染せしめたものをそのまま試験菌として用いる方法なども行われている。空气中に分布し食物などを汚染する糸状菌には多くの種類があり、<sup>2)</sup> 筆者はこれらの雑菌の防腐剤に対する抵抗がどの程度相違があるかという点およびその他糸状菌自身の条件について若干の実験を行った。以下に報告する。

## 1 菌株の種類について

## 実験方法

使用菌株 普通空气中に見られる糸状菌を一応対象とし、*Penicillium* 属 16 種、*Aspergillus* 属 9 種、*Fusarium* 属 4 種、*Mucor* 属 3 種、その他の属 14 種、酵母菌 6 種、総計 54 種を用いた。

孢子浮遊液 以上の菌株をチャベック寒天に約 20 日間培養後（孢子形成のおそい種では孢子形成より約 20 日間後）少量の滅菌蒸留水を加えて振盪して得た。この際必要あればガラス棒で菌叢表面をこすり、また菌糸その他の組織の混入した場合は滅菌ガーゼで数回濾過し鏡検下にこれらの混入のないことを確かめたのち使用した。

試験薬品 従来報告のあるものから (I) ロズン酢酸エチルエステル、<sup>3)</sup> (II) パラオキシ安息香酸エチルエステル、(III) ヘキシルレゾルシン<sup>4)</sup>、(IV) 硫酸 8-オキシキノリン、(V) デハイドロ酢酸ナトリウム<sup>5)</sup> の 5 種を用いた。

試験方法 培養基はサブローの培地<sup>6)</sup> を用い各薬品をとかしたものを段階的に稀釈滅菌し、試験管に 10cc ずつ分注した。稀釈法は 1, 2, 4, 8, 10, 20, 40, …… 倍数とし、難溶なものはエチレングリコールを必要最少量加えて溶解した。なおエチレングリコールは 2% の濃度まで全く発育阻止力のないことをあらかじめ確かめた。

孢子浮遊液はトーマの血球計算器を用いて鏡検下に含有孢子数を計数し適当にうすめて特記する以外には試験管 1 本に約 10000 個の孢子（液量約 0.1cc）を加えた。これを 25°10 日間培養し発育の有無を肉眼で判定し最小発育阻止濃度を求めた。

実験結果 結果は Table 1 に示すように最小発育阻止濃度 (mg/cc) は (I) 0.125~1.0, (II) 0.25~1.0, (III) 0.025~0.1, (IV) 0.0125~0.125, (V) 0.0125~0.25 という値であり、これらの薬品に対する雑糸状菌の抵抗にさほどの差はないことを認めた。なおこのほか分生孢子と内生孢子、孢子の大きさ、属の区別などとこれらの薬品の効力との関係についても何の特徴も見られなかった。

## Table 1 の説明

1) 数値は各稀釈試験管 2 本ずつ 1 回の実験結果で、まれには 2 本の結果が揃わないことがありそのときは再び実験を行った。2) 各実験毎に防腐剤を加えない対照の培養を行ったがいずれも発育良好であった。3) \*の各菌株は筆者が空气中から分離同定したものである。4) *Asp. sp No1* は黒変米菌 *Asp. chevalieri (Mangin) Thom & church* である。5) *Pen sp No1* は黄変米菌 *Pen toxicarium Miyake & Tsunoda*,<sup>7)</sup> *No2* はイスランジア黄変米菌 *Pen islandicum*,<sup>8)</sup> *No5* は神戸において牛の飼料中に発見された有毒株 *Pen urticae Bainier*,<sup>9)</sup> である。

## 2. 接種孢子の数の相違について

実験方法 肉眼で判定する実験であるので試験管 1 本に接種する孢子数を変えてその影響を見た。実験方法は 1) と同じく、薬品には (I), (IV) を、菌株には *Pen multicolor*, *Fus sp No3* を用いた。なお *Fus sp No3* は大小 2 種の孢子を同時に形成するがこの両方共をかぞえた。

Table 1 The minimum growth-inhibiting concentrations of 5 drugs against 54 species of fungi (mg/cc)

species of fungi	drugs					species of fungi	drugs				
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)		(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
<i>Mucor javanicus</i>	1.0	0.5	0.025	0.1	0.125	" sp No5	1.0	0.25	0.05	0.1	0.25
" <i>mucedo</i>	1.0	0.25	0.025	0.05	0.1*	" sp No6	0.5	0.5	0.05	0.025	0.1
" <i>hiemalis</i>	0.25	0.25	0.025	0.1	0.1	<i>Neurospora</i>					
<i>Rhizopus nigricans</i>	0.5	0.5	0.05	0.025	0.1	<i>sitophila</i>	0.5	0.5	0.025	0.0125	0.1
<i>Cunninghamella</i> sp	1.0	0.5	0.1	0.25	0.125	* <i>Cephalothecium</i> sp	0.5	0.25	0.025	0.1	0.1
<i>Thamnidium</i> sp	0.5	0.5	0.025	0.25	0.125	* <i>Cephalosporium</i> sp	0.25	0.5	0.05	0.025	0.1
<i>Aspergillus niger</i>	1.0	0.5	0.05	0.125	0.1	<i>Trichoderma</i> sp	0.25	0.5	0.025	0.025	0.125
* " <i>glaucus</i>	1.0	1.0	0.1	0.125	0.25	* <i>Helminthosporium</i> sp	1.0	0.5	0.05	0.025	0.1
" <i>oryzae</i>	0.5	1.0	0.1	0.1	0.1	* <i>Brachysporium</i> sp	1.0	0.5	0.05	0.05	0.1
* " <i>candidus</i>	0.25	0.25	0.05	0.05	0.0125	<i>Alternaria</i> sp No1	1.0	0.5	0.05	0.025	0.1
" <i>terreus</i>	0.5	0.5	0.05	0.1	0.1	* " sp No2	1.0	0.5	0.05	0.025	0.1
" <i>clavatus</i>	1.0	0.5	0.025	0.1	0.1	* <i>Thyrospora</i> sp	1.0	0.5	0.05	0.1	0.1
" sp No1	0.25	0.25	0.025	0.025	0.05	<i>Cladosporium</i> <i>herbalum</i>	0.5	0.5	0.025	0.025	0.1
* " sp No2	0.5	0.5	0.05	0.05	0.1	<i>Phoma</i> sp	0.25	0.25	0.025	0.05	0.1
* " sp No3	0.5	0.5	0.05	0.1	0.1	* <i>Chaetomella</i> sp	0.25	0.25	0.025	0.025	0.05
<i>Penicillium multicolor</i>	1.0	0.5	0.1	0.05	0.1	* <i>Pestalotia</i> sp	0.5	1.0	0.05	0.025	0.1
" <i>claviforme</i>	0.5	0.5	0.1	0.05	0.1	<i>Gibberella saubinetii</i>	0.25	0.5	0.025	0.05	0.05
" <i>roquefortii</i>	0.25	0.25	0.025	0.05	0.1	<i>Fusarium</i> sp No1	0.5	1.0	0.05	0.1	0.1
" <i>rugulosum</i>	0.25	0.25	0.05	0.025	0.1	" sp No2	0.125	0.5	0.05	0.1	0.1
" <i>oxalicum</i>	1.0	0.25	0.025	0.05	0.1	* " sp No3	0.5	0.5	0.05	0.125	0.1
" <i>herquei</i>	0.25	0.5	0.05	0.05	0.1	<i>Torula utilis</i>	1.0	1.0	0.05	0.025	0.25
" <i>notatum</i>	1.0	0.5	0.05	0.05	0.1	" <i>rufula</i>	0.25	0.25	0.025	0.025	0.125
" <i>glaucum</i>	0.5	0.5	0.05	0.1	0.1	<i>Debariomyces</i> <i>globosus</i>	0.5	0.5	0.05	0.025	0.25
" <i>citrinum</i>	0.5	0.5	0.05	0.05	0.125	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	1.0	0.5	0.05	0.025	0.125
" <i>javanicum</i>	0.5	0.5	0.05	0.05	0.25	<i>Zygosaccharomyces</i> <i>chevalieri</i>	0.5	0.5	0.05	0.025	0.25
" sp No1	0.5	0.25	0.05	0.1	0.25	<i>Pichia farinosa</i>	0.5	0.5	0.05	0.025	0.25
" sp No2											
* " sp No3	0.5	0.5	0.05	0.025	0.1						
* " sp No4	0.25	0.25	0.05	0.1	0.1						

実験結果 結果は Table 2に示すごとく孢子数 1600~100000の間では全く誤差はないようである。Fus sp No3では3日間、6日間、10日間の観察の間には差があるがこれは発育がおそいため肉眼で見られたもので、10日以後では差はない。

Table 2 The minimum growth-inhibiting concentrations of drug (I) & (IV) against 2 species of fungi—The influence of the number of inoculated spores. (mg/cc)

drug (I)					
species of fungi	number of inoculated spores	after 3 days incubation	after 6 days incub.	after 10 days incub.	after 14 days incub.
<i>Pen. mult</i>	100000	0.5	"	"	"
	10000	0.5	"	"	"
	1000	0.5	"	"	"
<i>Fus. No3</i>	100000	0.5	"	"	"
	10000	0.5	"	"	"
	1000	0.25	0.5	"	"
drug (IV)					
<i>Pen. mult</i>	100000	0.05	"	"	"
	10000	0.05	"	"	"
	1000	0.05	"	"	"
<i>Fus. No3</i>	100000	0.1	0.125	"	"
	10000	0.1	0.125	"	"
	1000	0.05	0.1	0.125	"

3. 前培養の影響について

実験方法 薬品には(I), (IV), 菌株には *Pen. multicolor*, *Asp. niger* を用い, チャベック, 抗菌試験と全く同じもの, 米, 馬鈴薯の4種の培養基に14日間と20日間2代植継培養したものについて同じ操作を行った。

実験結果 結果は Table 3 に示すようにここに用いたような培養基の相違では前培養の影響は全く見られなかつた。

Table 3 The minimum growth-inhibiting concentrations of drug (I) & (IV) against 2 species of fungi—The influence of fore-incubation on 4 different media (mg/cc)

drug (I)					
species of fungi	culture media	survey after 3 days incub.	after 6 days	after 10 days	after 12 days
<i>Pen. mult</i>	Czapeks	0.5	"	"	"
	Sabourauds	0.5	"	"	"
	rice	0.5	"	"	"
	potato	0.5	"	"	"

species of fungi	culture media	survey after 3 days incub.	after 6 days	after 10 days	after 12 days
<i>Asp. niger</i>	Czapeks	0.5	1.0	"	"
	Sabourauds	0.5	1.0	"	"
	rice	0.5	1.0	"	"
	potato	0.5	1.0	"	"
drug (IV)					
<i>Pen. mult</i>	Czapeks	0.05	"	"	"
	Sabourauds	0.05	"	"	"
	rice	0.05	"	"	"
	potato	0.05	"	"	"
<i>Asp. niger</i>	Czapeks	0.05	"	"	"
	Sabourauds	0.05	"	0.1	"
	rice	0.05	"	0.1	"
	potato	0.05	"	0.1	"

## 4. 菌株培養の古さについて

実験方法 薬品には(I), (II), (III)を用い, *Asp. terreus* と *Neurospora sitophila* のサブロー寒天に培養したものを氷室内および室温に放置し接種後1ヵ月, 3ヵ月, 6ヵ月放置したものをを用いて同じ実験を行った。

実験結果 結果は Table 4 に示すように, これにも殆ど差は見られなかつた。

Table 4 The minimum growth-inhibiting concentrations of drug (I), (II) & (III) against 2 species of fungi—The influence of keeping of inoculum cultures in different conditions before the test (mg/cc)

species of fungi	drugs	temp. for keeping	after 1 months	after 3 months	after 6 months
<i>Asp. terreus</i>	(I)	in ice-box	0.5	"	"
	(II)		0.5	"	"
	(III)		0.05	"	"
	(I)	room temp.	0.5	"	"
	(II)		0.5	"	"
	(III)		0.5	"	"
<i>Neurosp. sitoph.</i>	(I)	in ice-box	0.17	0.25	"
	(II)		0.5	"	"
	(III)		0.025	0.017	0.025
	(I)	room temp.	0.17	"	0.25
	(II)		0.5	"	"
	(III)		0.025	"	"

## 5. 菌糸と胞子の比較について

実験方法 薬品には (I), (IV), (V) を用いた。 *Gibberella saubineti* および *Pestalotia sp* はチャベック寒天に接種培養すると菌糸は直ちに発育するが胞子の形成はおそく、短くも 20~30 日間を要する。それで菌糸については接種後約 10 日間培養し胞子の形成のないことを確かめたのち、白金耳でとつて大体粟粒大を試験液に浮べ、胞子については形成後約 20 日間経過したものを前と同じ操作により接種した。いずれも 10 日間観察し、菌糸については接種時と全く同じ状態およびそれ以下にあるものを発育なしとした。

実験結果 結果は Table 5 に示す。この条件では殆ど差はない。

Table 5 The minimum growth-inhibiting concentrations of drug (I), (IV) & (V) against 2 species of fungi—  
The comparison of inoculation with hypha & spores

species of fungi	drugs	against hypha	against spores
<i>Gibber. saub.</i>	(I)	1.0 > >0.25	0.25
	(IV)	0.1 > >0.05	0.05
	(V)	0.1 > >0.05	0.05
<i>Pestal. sp.</i>	(I)	1.0 > >0.5	0.5
	(IV)	0.1 > >0.05	0.025
	(V)	0.1 > >0.05	0.1

## 考 察

1 について、液体培地に防腐剤を加えこれに菌を接種培養し、発育の有無を肉眼で判定する方法は簡単であるが、加えた胞子が一部は液表面に浮き一部は液中に沈むため、好気性の糸状菌の試験としては不都合な点がある。また培養基、培養温度も各菌株に公平な条件ではなく、胞子数を同数にして接種したが例えば *Penicillium* と *Helminthosporium* では 1 個の胞子の価値が全く同じと見られないかも知れない。それでこのような方法で各菌株に対する薬品の効果を比較することは厳密に正確とは言えない。

以上実験法として欠点はあるが、ここに用いた雑糸状菌に対する各防腐剤の発育阻止濃度にはさほどの差はなく大体その差は 10 倍以内である。なおここに用いた菌株は概して空气中に一般に分布しているもので、そのまま食品などに発育する種類であるとは言われないが、まず防腐剤の試験対象としては適当なものであろう。

2 について、接種胞子の数をかえて行つたこの実験においても全く差が見られなかつた。これは糸状菌は一般に発育がおそく対照培養においても肉眼で発育を認めるには少くとも 3~4 日間を必要とする。そのためこの程度の胞子数の多寡では影響はないと思われる。

3 について、糸状菌の生活環境に順応する性質の影響を見たわけであるが、ここに用いたような培養基の相違では全く考慮する必要はないようである。

4 について、特に *Neurospora* では保存することにより菌叢に肉眼的に変化があつたが、防腐剤の効力には影響はなかつた。

5 について、この実験条件では正確に菌糸と胞子の比較として疑義があると思われるが、他に適当な方法も考えられない。

以上簡単に考察を加えた。この実験は防腐剤の実用を目標とし薬品の作用機序および各試験菌の代謝様式の相違などを度外視してのことであるが、まず次のことは言い得る。

新しい合成薬品などを防腐剤として用いるには、その対象物例えば醤油なら醤油を培養基としこれに薬品を稀釈し、種を問わず適当な糸状菌を試験株として、培養の古さ、前培養にかまわず、菌糸でも胞子でも少量を用いて培

養試験を行い、その最小発育阻止濃度を求める。そして実際にはその約10倍濃度量を用いれば防腐の目的は達せられる。

防腐剤の試験菌株としてはこのような簡単な試験操作では結局他の要素例えば培養し易い、発育が早い、肉眼判定が容易であるなどという事だけで充分である。筆者は *Neurospora sitophila*, *Pen multicolor*, *Pen rugulosum*, *Asp. glaucus*, *Sacc. cerevisiae* などで間に合うと思う。

### 総 括

空气中に一般に分布するような54種の糸状菌に対する (I)ロダン酢酸エチルエステル, (II)パラオキシ安息香酸エチルエステル, (III)ヘキシルレゾルシン, (IV)硫酸8-オキシキノリン, (V)デハイドロ酢酸ナトリウムの発育阻止効力を階段稀釈法により培養試験を行った。その結果これらの菌株に対する最小発育阻止濃度 (mg/cc) は (I)0.125~1.0, (II)0.25~1.0, (III)0.025~0.1, (IV)0.0125~0.125, (V)0.0125~0.25という値を得、これらの薬品に対する雑糸状菌の抵抗にはさほどの差のないことを認めた。なおこの他接種孢子数の多寡、前培養の相違、菌株の古さ、菌糸と孢子の区別による効力試験に対する影響についても簡単な実験を行ったが、いづれも影響は見られなかった。

本実験に当り便宜を与えられた川城部長、岡田太郎技官、協力された佐々木睦江嬢、薬品を分与された科学研究所中村啓二氏に感謝する。

### 文 献

- 1) S. E. A. Mc Callan: Contribution of. Boyce. Thompson Inst. 16, 7, 299~302, 1951.
- 2) 浦久保五郎; 公衆衛生年報 2, 2, 19~21 (昭30)
- 3) 塚本久雄; 薬誌 71, 5, 400~402 (昭26)
- 4) A. T. Leao & F. W. Eichbaum. : Rev. Brasil. Biol. 8 281~5, (1948), C. A. 43, 1827, (1949)
- 5) 宮木高明: 腐敗研究所報告, 4, 1~3 (昭26)
- 6) 第六改正 日本薬局方, 一般試験法
- 7) 三宅市郎: 日新医学 34, 3, 161 (昭22)
- 8) 角田広: 食糧研究所報告, 8, 41~68 (昭28)
- 9) 山本丈夫: 薬誌, 74, 8, 797~801 (昭29).

### Summary

The growth-inhibiting effect of (I)ethyl thiocyanacetate, (II)ethyl p-hydroxybenzoate, (III)hexylresorcinol, (IV)8-hydroxyquinoline sulfate, and (V)sodium dehydroacetate against 54 species of fungi was studied in vitro by the dilution-incubation method. Their minimum growth-inhibiting concentrations (mg/cc) were (I)0.125~1.0, (II)0.25~1.0, (III)0.025~0.1, (IV)0.0125~0.125, and (V)0.0125~0.25.

In this method, the influences of following conditions for test inoculums were very slightly observed; the number of inoculated spores, fore-culture on 4 different media, keeping of inoculum cultures in ice-box or at room temperature before the test, inoculating with hypha or spores.

Received April 21, 1955

## 食品防腐剤に関する研究(1)

特にパラオキシ安息香酸ベンゼールエステルと各種防腐剤との抗菌性の比較

石関 忠一, 青山 好作, 八田 貞義, 藤田 洋一\*,  
小田 幸子\*, 浦部 幹雄\*

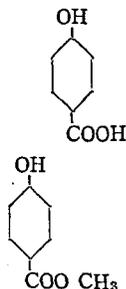
## Studies on Food Antiseptics (1)

Especially on Comparison of Antibacterial Powers of Paraoxybenzoic Acid  
Benzyl Ester and the Other Various Food AntisepticsBy Tiuiti ISHIZEKI, Kosaku AOYAMA, Sadayoshi HATTA, Youiti FUJITA,  
Yukiko ODA and Mikio URABE

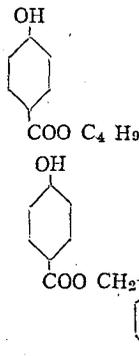
まえがき 著者らは新たに合成された, パラオキシ安息香酸ベンゼールエステルの防腐剤としての価値を索る目的で供試薬に同属或は他種の薬剤を選び, まず In vitro に於ける抗菌活性を, なるべく広い範囲の菌種について調べてみた。一般に食品の防腐剤は一定の条件で①これを添加すれば標示通りの効果が常に確実に得られ②食品の品質或は価値に悪影響を与えず③毒性はないが極めて低く④使用量を誤らない限り長期に亘り使用しても, 生体に害を与えないものでなければならないとされるが, パラオキシ安息香酸及び, そのエステル類は, これらの条件を, ほぼ満足しうる代表的防腐剤と考えられ, 食品衛生法に於ても, そのエチル, プロピール, ブチール, の各エステルの3種を醤油1 lにつき, 各0.298g, 0.323g, 0.348g の範囲内で混入することが許可されている。それらの基礎的或は応用実施方法などについては, Sabalitschka<sup>1)</sup>, 黒野<sup>2)</sup>, 石尾, 伊藤<sup>3)</sup>らの報告に明らかであるが, 特にパラオキシ安息香酸のエステル類中エチル, プロピール及びブチール等のエステルは防腐剤として食品に供した場合, サリチル酸又は安息香酸などに較べ, その効果は同等か或はそれ以上で毒性では却つて僅少なことが, 明らかにされており, また清酒及び醤油に対する防腐試験では遊離の, パラオキシ安息香酸は醤油に対する防腐効果は殆んどないが, そのメチールエステルは0.03%で, プロピールエステルは0.005%で顕著な防腐効果を認めると報じている。また著者らが対照の一部として選んだ, ヘイアミン(1622)は無害な消毒薬として, すでに広く用いられており, 一方キノホルムは奥津<sup>4)</sup>, 中溝<sup>5)</sup>, 森<sup>6)</sup>らにより, 細菌性の下痢及び一部の原虫に対しての臨床及び基礎実験が行われ効果のあることが報告されている。また, ヒノキチオールについては岡<sup>7)</sup>, 川村<sup>8)</sup>, 野副<sup>9)</sup>らにより防腐殺菌作用のある事が報告され, 特に岡らにより, ひば油及びその各フラクシヨンの抗微性が試験され興味ある報告がなされている。著者らは, この報告では, In vitro での抗菌試験成績について述べることで各薬剤の毒性並に実地応用したときの効果については改めて報告する。

## 実験方法

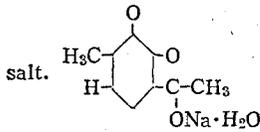
1) 実験に使った薬剤 実験に使った薬剤は4種の, パラオキシ安息香酸及びそのエステル類, パラオキシ安息香酸 Paraoxy benzoic acid; パラオキシ安息香酸メチールエステル Paraoxy benzoic acid methyl ester, パラオキシ安息香酸ブチールエステル Paraoxy benzoic acid butyl ester, パラオキシ安息香酸ベンゼールエステル Paraoxy benzoic acid benzyl ester.



\* 日本医科大学衛生学教室

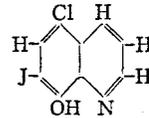


と、5種の合成薬、デハイドロ酢酸ソーダ Dehydroacetic acid sodium



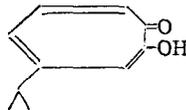
salt. ハイアミン (1622 以下略す) Di isobutyl phenoxy ethoxyethyl dimethyl benzyl

ammonium chloride monohydrate. キノホルム Iodochloroxy quinoline



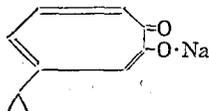
キノキチオール Meta

iso propyl proporon



キノキチオールナトリウム塩 Meta iso propyl proporon sodium

salt



である。

2) 実験に使った菌株 実験に使った菌株は一般細菌では、グラム陽性菌11株、グラム陰性菌13株、糸状菌(カンディダ属を含め)23株、放線菌3株、酵母菌3株の計54株で、いずれも当教室に継代保存されたものである。

3) 実験に使った培地 実験には次に示す培地を用い、培地は、それぞれの処方に従つて調製し濾過後供試薬剤を所定濃度に溶解し、ついで小試験管に最終液量5ccになるように分注し100° 30分3回滅菌して実験に用いた。

a) 普通培地：牛肉浸出エキス10.0g, ポリペプトン10.0g, 塩化ナトリウム3.0g, 蒸留水1,000cc, pH7.2.

b) 半合成培地：燐酸ニ水素ナトリウム2.5g, 燐酸ニ水素カリウム0.35g, カゼイン塩酸水解物(日之出製菓製)0.4g, 1-シスチン0.05g, 1-トリプトファン0.02g, ブドウ糖10.0g, ニコチン酸 $10^{-4}$  mol, ビタミンB<sub>1</sub>,  $10^{-4}$ mol, 蒸留水1,000cc pH7.2.

c) 合成培地：Salmonella typhimurium に対する培地：硫酸アンモニウム0.5g, 塩化ナトリウム0.05g, 燐酸ニ水素カリウム0.2g, ブドウ糖0.1g, 蒸留水1,000cc, pH7.0; Aerobacter aerogenes に対する培地：燐酸ニ水素アンモニウム1.5g, 燐酸ニ水素カリウム1.0g, 硫酸マグネシウム(7H<sub>2</sub>O)0.2g, クエン酸ナトリウム2.5g, 蒸留水1,000cc, pH7.2. 糸状菌, 放線菌などに対する培地：硝酸ナトリウム3.0g, 硫酸マグネシウム(7H<sub>2</sub>O)0.01g, 塩化カリウム0.1g, ブドウ糖30.0g, 燐酸ニ水素カリウム1.0g, 硫酸第一鉄0.01g, 蒸留水1,000cc, pH. 無修正.

4) 菌のうえ方と観察の方法：菌のうえ方は次の2通りとした。一般細菌では37°24時間培養菌を、供試菌とし、これを生理食塩液で所要濃度に稀釈し5~10万個の菌量を接種した、接種後は37°に培養し菌発育の有無により生ずる培地濁濁の度合により判定し、その観察は24時間ごとに168時間をもつて止めた。なお接種48時間目に一白金耳量を後培養して菌殺菌の有無を検べた。糸状菌, 放線菌及び酵母菌では供試培地で25°7~10日間培養の新鮮芽胞2白金耳量を5cc分注の生理食塩液に平等浮遊液としたもの0.1cc量とした。培養温度は25°とし、その観察は隔日ごとに10日間に及んだ。

## 実験成績

1) 一般細菌に対する抗菌活性 パラオキシ安息香酸エステル類では, パラオキシ安息香酸メチルエステルを除く3種の薬剤では, 一部の供試菌を除けば比較的良好な抗菌活性を示し, グラム陽性菌とグラム陰性菌とでは前者に良好な感受性を示している. 即ちパラオキシ安息香酸ベンゼンエステルでは, グラム陽性菌には11株中10株までは10,000倍濃度で菌の発育を阻止し安定した抗菌性を示しているが, パラオキシ安息香酸ブチルエステル及びパラオキシ安息香酸では, その濃度よりも増減した値を示し抗菌活性の動揺するのがみられた.

グラム陰性菌では, むしろ陽性菌のときの成績と全く逆の結果を示した. パラオキシ安息香酸メチルエステルでは, いずれの供試菌も5,000倍濃度で菌の発育を許し阻止し得なかつたが, その他の試剤ではその有効濃度域では, 一部の菌を除くと発育阻止のよりも積極的に殺菌的に作用するのがみられた(第1表参照). そのほかの供試薬中では, ハイアミンが最も秀れ, ついでヒノキチオール, ヒノキチオールナトリウム塩, キノホルム, デハイドロ酢酸ソーダの順といえるが, これらの合成薬も, グラム陰性菌よりは陽性菌に強い感受性を示し, ハイアミンでは800,000倍以上, ヒノキチオール, ヒノキチオールナトリウム塩では, 50,000~300,000倍以上, キノホルムでは30,000~300,000倍以上という抗菌価がみられた. グラム陰性菌に対しても各合成薬ともに, 30,000~100,000倍濃度で菌の発育を完全に阻止するのがみられた. またその抗菌型式をみると, デハイドロ酢酸ソーダを除くと, いずれも殺菌的に作用し阻止的な面は少く, ハイアミンでは特に, その作用発現は強かつた(第2表参照).

第1表 パラオキシ安息香酸及びそのエステル類の一般細菌に対する抗菌活性

		Drugs		Action		E-Z		B-T		B-M		B-C	
				Bacte-									
Strains		rio st-	rio ci-										
		atic	dal										
Gram positive	Micrococcus pyogenes var aureus (寺島)	10	10	8	8	< 5				8	5		
	" " " " (F.D.A.209P)	10	8	10	8	< 5				10	8		
	" " albus (No. 11)	10	10	10	8	< 5				10	10		
	Tetragenès sp (G. 4)	10	10	10	10	< 5				30	30		
	" " (G. 5)	10	8	10	10	< 5				30	30		
	Bacillus mesentericus	10	8	8	5	< 5				8	8		
	" subtilis	10	8	10	10	< 5				8	8		
	" " (G. 66)	10	10	8	5	< 5				10	10		
	" natto	10	5	10	10	< 5				10	10		
	Micrococcus subflanus	10	10	10	10	< 5				10	10		
Micrococcus chon (G. 10)	< 5		5	5	< 5				< 5				
Gram negative	Proteus vulgaris (OX.19)	10	10	10	10	< 5				10	8		
	Bacillus prodigiosus	10	10	8	8	< 5				8	8		
	Salmonella enteritidis (S. 64)	< 5		5	5	< 5				8	8		
	" typhi (S. 58)	8	8	8	8	< 5				8	8		
	" cholerae suis (S. 34)	5	5	5	5	< 5				5	5		
	" typhi murium (S. 9)	< 5		< 5		< 5				5	5		
	" paratyphi A (S. 1)	< 5		< 5		< 5				5	5		
	" " B (Java)	< 5		5	5	< 5				8	8		
	Shigella dysenteriae (志賀)	5	5	5	5	< 5				10	10		
	" " (大野)	10	10	10	10	< 5				10	8		
	Escherichia coli	10	10	5	5	< 5				5	5		
	Aerobacter aerogenes (327)	10	10	5	5	< 5				5	5		
Pastrella sp	< 5		< 5		< 5				< 5				

註: (1) 表中数値は菌発育阻止力を示し, 数値の単位は $N \times 1,000$  とす. 以下の表もこれに準ず.

(2) B-Z は Paraoxy benzoic acid benzyl ester

B-T は Paraoxy benzoic acid butyl ester  
 B-M は Paraoxy benzoic acid methyl ester  
 B-C は Paraoxy benzoic acid の略

第2表 ハイアミン (1622) ヒノホルムなどの一般細菌に対する抗菌活性

Strains	Drugs Action	DHA		Hyamine (1622)		Chinoform		Hinokitiol		Hinokitiol Na	
		Bacte- rio st- atic dal	Bacte- rio ci- atic dal								
Gram positive	Micrococcus pyogenes var aureus(寺島)	< 0.25	> 800	> 800	100	100	> 300	> 300	> 300	80	80
	" (F. D. A. 209P)	< 0.25	> 800	> 800	100	100	> 300	80	> 300	80	80
	" // albus (No. 11)	< 0.25	> 800	> 800	100	100	> 300	> 300	> 300	80	80
	Tetragenes sp (G. 4)	< 0.25	> 800	> 800	100	100	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	" " (G. 5)	< 0.25	> 800	> 800	100	100	> 300	> 300	> 300	> 300	80
	Bacillus mesentericus	< 0.25	50	50	30	10	50	10	50	30	30
	" subtilis	< 0.25	> 800	> 800	> 300	100	100	100	100	100	100
	" " (G. 66)	< 0.25	> 800	> 800	100	100	100	100	100	100	100
	" natto	< 0.25	> 800	> 800	> 300	> 300	100	100	100	100	80
	Micrococcus subflanus	< 0.25	> 800	> 800	100	50	> 300	80	100	80	80
Micrococcus cohn (G. 10)	< 0.25	30	30	100	50	100	50	80	30	30	
Gram negative	Proteus vulgaris (OX. 19)	< 0.25	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Bacillus prodigiosus	< 0.25	50	50	30	10	50	30	50	10	10
	Salmonella enteritidis (S. 64)	< 0.25	50	50	80	30	80	80	80	80	80
	" typhi (S. 58)	< 0.25	100	100	80	50	80	80	100	80	80
	" cholerae suis (S. 34)	< 0.25	30	30	100	100	100	80	100	50	50
	" typhimurium (S. 9)	< 0.25	30	30	80	30	100	100	80	30	30
	" paratyphi A (S. 1)	< 0.25	30	30	100	80	100	100	100	100	100
	" " B (Java)	< 0.25	50	50	80	30	100	80	80	80	80
	Shigella dysenteriae (志賀)	< 0.25	100	100	100	100	100	100	100	100	80
	" " (大野)	< 0.25	300	300	100	100	100	100	100	100	100
	Escherichia coli	< 0.25	50	50	100	50	100	50	100	50	50
	Aerobacter aerogenes (327)	< 0.25	50	50	50	30	80	30	80	50	50
	Pastrella sp	< 0.25	30	10	80	10	50	10	80	30	30

註: DHAは Dehydroacetic acid sodium salt の略

2) 供試培地を代えたときの抗菌活性 多くの合成薬或は一部防腐剤は諸種の有機及び無機物質により拮抗され抗菌性を減弱することが知られているが、著者の選んだ供試薬が、どのような拮抗の、せり合いを示すか、普通培地、半合成培地、合成培地と培地を変えたときの抗菌力の差の、あらわれかたによつて比較してみた。実験には、パラオキシ安息香酸及びそのエステル類(4種)とデヒドロ酢酸ソーダ及びハイアミンとを用いた。この結果は第3表に示したが、パラオキシ安息香酸ベンゼンエステル、ハイアミンでは普通培地を用いたときは抗菌力は微弱で半合成培地、合成培地の順に上昇し培地成分によつて影響を受けることが観察される。このほかのものも類似の傾向を示しているが、パラオキシ安息香酸では一部の菌には特に、半合成培地の場合に障害を受け抗菌活性を消失するのがみられた。

第3表 供試培地を変えたときの抗菌活性

Drugs	Strains Media	Aero. aerogenes (327)			S. typhimurium (S.9)			Micro. pyogenes var aureus (F. D. A209P)	
		B	C	S	B	C	S	B	C
	B-Z	0.5	0.8	1	<0.5	0.8	0.8	1	3
B-T	1	0.8	1	<0.5	<0.5	<0.5	1	8	
B-M	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.5	
B-C	0.5	<0.5	1	0.5	<0.5	<0.5	3	<0.5	
D. H. A	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	
Hyamine (1622)	8	30	30	3	30	30	>80	>80	

註: Bは普通培地, Cは半合成培地, Sは合成培地を示す。

3) 糸状菌, 放線菌, 酵母菌などに対する抗菌活性 パラオキシ安息香酸及びそのエステル類は良好な抗菌性を有することが知られているが, この点についてみると, パラオキシ安息香酸及びパラオキシ安息香酸メチルエス

第4表 パラオキシ安息香酸及びそのエステル類の糸状菌, 放線菌などに対する抗菌活性

Strains	Drugs Action	B-Z	B-T	B-M	B-C
		Bacterio static	Bacterio static	Bacterio static	Bacterio static
Fungi	Penicillium toxicarium	10	10	<5	<5
	" islandicum	10	10	<5	<5
	" citrinum	10	10	<5	<5
	" chrysogenum (Q176)	30	10	<5	<5
	" sp (GM3)	10	10	<5	<5
	" " (C51)	10	10	<5	<5
	" " (BW)	10	10	<5	<5
	Candida albicans	10	10	<5	<5
	" "	10	8	<5	<5
	" "	10	10	<5	<5
	" tropicalis	10	10	<5	8
	" "	10	10	<5	<5
	" gwiller mondi	<5	10	<5	<5
	" krusei	10	8	<5	<5
	" parakrusei	10	10	<5	10
	" pseudotropicalis	10	10	<5	<5
	" steratoidea	10	10	<5	<5
	Aspergillus niger	<5	10	<5	<5
	" uianus	<5	10	<5	<5
	" oryzae (鬼木)	<5	10	<5	<5
" " (溜味)	<5	10	<5	<5	
Trichophyton sp (A)	100	50	5	<5	
" gypseum	100	100	5	<5	
" purpureum	100	50	5	<5	
Actinomycetes & yeast	Actinomyces griseolus (No. 14)	10	10	<5	<5
	" violaceus (No. 20)	10	10	<5	<5
	" " (No. 22)	30	30	<5	<5
	Torula utilis	10	10	<5	<5
	Saccharomyces sake	<5	10	<5	<5
" sp	<5	10	<5	<5	

テルでは大部分の菌に対し、その発育を許したが、パラオキシ安息香酸ベンゼールエステル及びブチールエステルでは良好な菌発育阻止が見られ、この抗菌力価は、ベンゼールエステルの方が高位を示すものが幾分多く、Trichophytonには100,000倍濃度でも発育を阻止し興味深い。しかし、Aspergillus属に対しては、期待し得る効果はみられず菌の発育がみられた。ハイアミンは一般細菌の場合と同様、糸状菌その他の菌に対しても高位の抗菌活性を現わし特に放線菌、一部のCandida属の菌には800,000倍濃度でも発育を阻止し、そのほかの菌にも10,000~500,000倍濃度で抑制した。ヒノキチオールとキノホルムでは一般細菌の場合にはヒノキチオールの方が、キノホルムよりも、有効例を多く認めたが、糸状菌、放線菌では逆に、キノホルムの方がヒノキチオールよりも菌に対する感受性は強く、キノホルムはCandida属に対しては、すべての供試菌を100,000倍濃度で発育を阻止するのがみられた。ヒノキチオールとそのナトリウム塩とでは、ヒノキチオールの方が抗菌価は高くみられた。デハイドロ酢酸ソーダはCandida属には無効であるが、その他の菌には250-30,000倍濃度で効果がみられた(第4及び5表参照)。

第5表 ハイアミン(1622)ヒノホルムなどの糸状菌、放線菌などに対する抗菌活性

Drugs		DHA	Hyamine	Chinoform	Hinokitiol	Hinokitiol Na
		Bacterio static				
Strains	Action					
		Bacterio static				
Fungi	Penicillium toxicarium	0.5	100	30	50	10
	" islandicum	0.5	100	50	50	10
	" citrinum	0.8	10	10	50	10
	" chrysogenum (Q176)	0.8	100	10	50	10
	" sp (GM3)	0.8	50	10	50	10
	" " (C51)	1	30	10	50	10
	" " (BW)	1	30	10	50	10
	Candida albicans	<5	<800	100	80	50
	" "	<5	<800	100	80	50
	" "	<5	<800	100	80	50
	" tropicalis	<5	100	100	50	50
	" "	<5	<800	100	80	50
	" gwiller mondi	<5	100	100	80	50
	" krusei	<5	100	100	50	50
	" parakrusei	<5	100	100	80	50
	" pseudotropicalis	<5	100	100	80	30
	" steratoidea	<5	<800	100	80	50
	Aspergillus niger	1	10	10	50	10
	" uianus	0.8	30	10	50	10
	" oryzae (鬼木)	1	30	10	50	10
	" " (溜味)	0.5	10	10	30	10
	Trichophyton sp (A)	3	80	80	50	10
	" gypseum	3	50	100	50	10
" purpureum	3	50	80	50	10	
Actinomyces & yeast	Actinomyces griseolus (No. 14)	3	100		50	10
	" violaceus (No. 22)	0.8	<800		50	
	" " (No. 20)	0.8	<800		50	10
	Torula utilis	0.5	500	10	50	10
	Saccharomyces sake	0.25			30	
	" sp	1	30	30	50	10

総 括

新たに合成された、パラオキシ安息香酸ベンゼールエステルの防腐効果を知る目的で、対照に安息香酸及びそ

のエステル類3種及び、ハイアミン、キノホルム、ヒノキチオール等を用い、それらの抗菌性を *In vitro* で較べてみた。この結果

1) 試みた安息香酸及びそのエステル類のうちでは特に優れた効果を示すという薬剤は見出されなかつたが新たに合成された、パラオキシ安息香酸ベンゼールエステルは他の安息香酸及びそのエステル類よりは秀れているといえる。その抗菌力価は、パラオキシ安息香酸メチルエステルを除く。他のものでは、病原、非病原菌に対し供試菌のうちの約70%は5,000~10,000倍濃度で完全にその発育を阻止した。糸状菌、放線菌及び酵母菌に対しては、パラオキシ安息香酸ブチルエステル及びベンゼールエステル共に10,000倍濃度で菌の発育を完全に阻止したが他の試剤では、この濃度域では殆んど阻止作用を示さず、更に高い濃度を必要とした。

2) 次に供試培地を代えた場合の抗菌力価を供試菌に大腸菌、ブドウ球菌、ネズミチフス菌を用いて調べたところ、供試薬剤(パラオキシ安息香酸ベンゼールエステル及びブチルエステル、パラオキシ安息香酸、ハイアミン、デハイドロ醋酸ソーダ)は普通培地<半合成培地<合成培地、の順に、その抗菌力価は上昇し、培養基成分によつて、軽度ながら影響されるのがみられた。

3) 対照の一部に選んだ、ハイアミン、キノホルム及びヒノキチオールでは共に稍々類似の抗菌力価を示し病原、非病原菌の場合100,000倍乃至それ以上の濃度域で、すべての供試菌の発育を阻止したが、ヒノキチオールのナトリウム塩では幾分その抑制作用は低下し50,000~100,000倍の濃度の場合に阻止するのがみられた。糸状菌、放線菌、酵母菌に対しては、ハイアミン、キノホルムは10,000~100,000倍の濃度域で、またヒノキチオールは10,000~20,000倍の濃度域で、はじめて菌の発育を阻止したがヒノキチオールのナトリウム塩では、ヒノキチオールに較べると、幾分その抗菌力価は低下した。

終りに臨み、本研究に際し貴重な試薬を御提供下さつた、吉富製薬株式会社、八州化学株式会社、小川香料株式会社の研究部の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 黒野, 岩下, 鳥山: 醸造試験所報告, 117, 1, (1934).
- 2) 黒野, 岩下, 鳥山: 醸造試験所報告, 119, 37, (1934).
- 3) 石尾, 遠藤, 伊東: 衛試, 50, 31, (1938).
- 4) 奥津汪, : 日本臨床結核(昭和25年4月所載).
- 5) 中津他: 臨床内科小児科, 7, 10, (1952).
- 6) 森: 診療之実際, 2, 6, (1950)
- 7) 岡崎, 本間: 薬学雑誌, 74, (2), 124 (1954).
- 8) 川村: 林業試験所報告, 30, 59 (1930).
- 9) 野副: 薬学, 3, 174 (1949).

## Summary

Antibacterial activity of paraoxybenzoic acid benzyl ester was compared with benzoic acid, three esters of paraoxy benzoic acid, Hyamine (1622), Chinofom and Hinokitiol *in vitro*.

Paraoxybenzoic acid benzyl ester showed more excellent activity in the test than the other esters of benzoic acid. The order of antibacterial activity obtained was as follows:

Paraoxybenzoic acid benzylester > paraoxybenzoic acid butylester > paraoxybenzoic acid methylester > paraoxybenzoic acid, and by Hyamine (1622) > Chinofom=Hinokitiol > Hinokitiol-Na > dehydro acetic acid.

Received April 13, 1955

ストレプトドルナーゼ (溶連菌デスオキシリボ核酸分解酵素)  
の作用に関する研究

朝比奈 正人, 岡 万千子

Studies on the Action of Streptodornase  
(Streptococcal Desoxyribonuclease)

By Masato ASAHINA and Machiko OKA

**まえがき** 溶連菌の培養濾液より製した "Varidase" (米国 Lederle 研究所製) の主要成分は Streptokinase<sup>1)</sup> と Streptodornase である。Streptodornase は, Tillett 等<sup>2)</sup> と McCarty<sup>3)</sup> によつて発見され, Sherry 等<sup>4)5)</sup> によりその性質が調べられ, Christensen<sup>6)</sup> によりその定量法が述べられている。Streptodornase は一種の Desoxyribonuclease であるから, 最もよく知られている膵臓の Desoxyribonuclease に関する研究を参考にすることができる。たゞ後者 (結晶) が Depolymerase であるのに対し, 前者は Depolymerase を含むいくつかの酵素が混合していると考えられている<sup>5)</sup>。膵臓の Desoxyribonuclease については McCarty<sup>7)</sup> Kunitz<sup>8)</sup> 等多くの人々によつて研究されている。その作用が  $Mg^{++}$  または  $Mn^{++}$  によつて活性化されることはよく知られた事実であり<sup>7)</sup>, また Greenstein 等<sup>9)10)</sup> は多くの 1 価または 2 価の金属イオンが多かれ少なかれこの酵素の作用を活性化し, 活性化の最適の濃度と pH がそれぞれの金属イオンで異つていると述べている。Streptodornase についても  $Mg^{++}$  により活性化されることが知られている<sup>2)</sup>。

われわれは Streptodornase の定量をするための基礎資料を得る目的で, 粘度法を用い, 金属イオンによる影響やその他の作用条件を検討し, 若干の新知見を加えることができた。

**実験材料および実験方法**

(1) 緩衝液 0.025M Veronal 緩衝液 (pH7.5) を用いた。基質, 酵素, 塩等は特に記載したものを除いてすべてこの緩衝液に溶かしたから, 反応液の緩衝液濃度も 0.025M である。

(2) コウシ胸腺デスオキシリボ核酸 Na 塩 (DNA) Carter, Hall 法<sup>11)</sup>, Hammarsten 法<sup>12)</sup> を変形して用い, クロロホルムゲル法を併用して作った。これを DNA-I とする。しかし製造の途中, 濃厚な食塩水と共にホモジナイズしたりクロロホルムゲル法を行う場合, 銅製の容器を使用したためいくらか銅が混入し, 製品が淡緑色に着色してしまつた。後で  $Cu^{++}$  が著るしく酵素作用を阻害することがわかつたので, これを除くことを試みた。

上記の DNA を水に溶かし (0.2~0.5%), Amberlite IR120 の Na 型のカラム (径 3cm×7cm) を数回通すと大部分の  $Cu^{++}$  を除くことができたが, まだ  $Cu^{++}$  の除去は充分でなかつた。これを DNA-II とする。

DNA-I または DNA-II を水に溶かし (0.2~0.5%), アラニン (約 0.2% となるように, また食塩を 1M となるように加えてから, 2 倍量のアルコールで沈澱させたところ, きわめて簡単に  $Cu^{++}$  をほとんど全く除去することができた。これを DNA-III とする。 $Cu^{++}$  は DNA と著るしく結合しやすく, アルコール沈澱の際  $Cu^{++}$  は必ず DNA と結合して落ちるから, 単なるアルコール沈澱を何回くり返しても  $Cu^{++}$  は除去できない。しかしこの際アラニン (その他のアミノ酸でも同様だと思ふ) を添加すると,  $Cu^{++}$  とアラニンが錯塩を形成して母液中に溶解したまゝ残るのであると思われる。

なお, DNA の溶液がまだ白濁している場合は, Celite をしいた濾紙で吸引濾過すると, ほとんど完全に透明にすることができる。

DNA-III の分析値は, N 13.3% (Micro Kjeldahl 法), P 7.4% (Fiske, Subbarow 法) で, N/P は 1.8 である。

(3) 魚精虫デスオキシリボ核酸 Na 塩 (Sp-DNA) チャダイの白子を原料とし, Mirsky, Pollister 法<sup>13)</sup>, Hammarsten 法を変形して用い, クロロホルムゲル法を併用して作った。この場合も  $Cu^{++}$  が混入したので, 上記のアラニンを加えアルコールで沈澱させる方法で除去した。分析値は胸腺からの DNA と同様で, N 13.3%, P 7.4%, N/P は 1.8 であつた。

(4) ストレプトドルナーゼ (SD) Varidase を0.04%ゼラチンを含む緩衝液に溶解して用いた。ゼラチンはSDを保護する。

(5) 塩 Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, は硫酸塩, Co<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup> は塩化物, Pb<sup>++</sup> は酢酸塩を用い, Cu<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup>, Pb<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup> は水に, その他は緩衝液に溶解して用いた。

(6) SD作用測定法(精度法) DNAをはじめ約0.4%になるように水に溶かし, 水に対し1~2日透析し, 水および0.1M緩衝液を加えDNAは0.2%緩衝液は0.025Mとなるようにし, 10000r.p.mで5分遠心分離し少量のごみや不溶物を除いてDNA溶液を作る。このDNA溶液は氷室に保存すれば少くも1ヶ月粘度の減少はない。反応液は計2.0ccで, DNA液1.0cc, SD液0.5cc, その他0.5ccとする。反応液中DNAは0.1%(比粘度3~4), ゼラチンは0.01%, 緩衝液は0.025Mで, 他に普通Mg<sup>++</sup>を $3 \times 10^{-3}M$ となるように加える。Varidaseは反応液2.0cc当り0.5~5 $\mu g$ 程度が適当である。

使用したオストワルド粘度計は, 水の流下速度30~45秒のもので, 1~2ccの試料で粘度測定ができ, 上部の球は0.5ccのものである。反応液の混合は粘度計内で行い, 最後にSD液を加えて反応を開始し, 30°で20~30分間粘度の減少を観察する。0分の値は別にSDを除いたものについて測定した。粘度はすべて水に対する比粘度で表わした。多くの場合, 10分後の比粘度減少でSD作用の大きさを比較した。

またこの報告中のMはM/lの意である。

実験結果

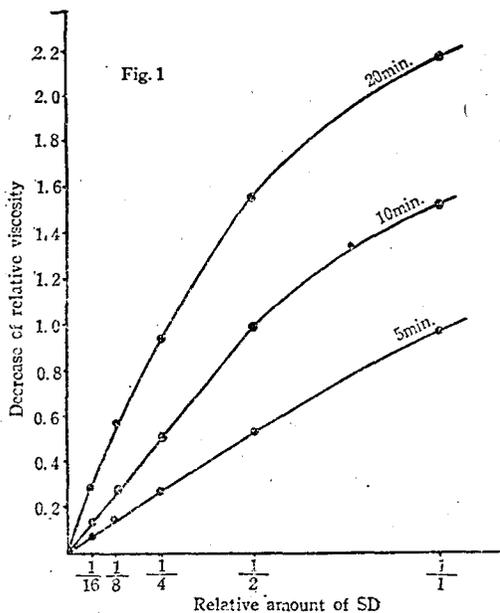
Varidase液中のSDの安定性 Varidaseを約10 $\mu g/cc$ の割合で0.04%ゼラチンを含む緩衝液に溶かし,

Table 1. Stability of Streptodornase in Gelatin-Buffer (pH7.5) at 13°

Time of standing (hrs)	0	1/2	1	3	6	overnight in refrigerator
SD activity ※	1.34	1.31	1.35	1.32	1.31	1.32

※ decrease of relative viscosity in 10 min.; initial relative viscosity, 2.98

Fig. 1 Relation between Streptodornase Amounts and Amounts of Relative Viscosity Decreased in Constant Times



13°で放置, 一定時間後0.5ccをとり活性を測定した。測定にはDNA-IIを用い, Mg<sup>++</sup>( $3 \times 10^{-3}M$ ), アラニン( $5 \times 10^{-3}M$ )を含む反応液を用いた, アラニンを加えたのは後で述べるように混入しているCu<sup>++</sup>の影響を除去するためである。結果はTable 1に示す。別の実験で, ゼラチンを含まない時は, この条件でSDは著しく活性を減じてゆくことを認めたが, ゼラチンを加えることにより極めて安定となり, 一連の実験を試みる事が可能となる。ゼラチン添加の必要は膵臓DesoxyribonucleaseについてMcCartyが述べている7)。

SD量と粘度減少量の間関係 DNA-IIを用い, Mg<sup>++</sup> $3 \times 10^{-3}M$ の条件でSD量を変えて, 10分後の比粘度減少量を測定した。0分の比粘度は3.94である。結果はFig. 1に示す。比粘度減少約0.8~1.0以下でSD量と比粘度減少量の間には直線的関係がある。

DNA-IIを用い, 同条件で(ただしアラニンを添加)同様な実験をしたところ, 同様な結果を得たが, 初めの比粘度2.98で, 直線関係の成立する範囲はやゝ狭かつた。

このような直線関係はSherry等7)も既に述べている。

一定量のSDによる比粘度減少量とDNA濃度との関係

DNA-III を用い, 0.05~0.1% (比粘度 2~4) DNA を含む反応液で, 一定量の SD を作用させた結果を Fig. 2 に示す。ただし  $Mg^{++}$  はすべて  $3 \times 10^{-3}M$  で, SD は比粘度減少の曲線がほぼ直線的になるような僅かな量 (約  $0.75 \mu g$ ) を用いた。

Fig. 2 から 10 分後の比粘度減少量を比較すると, Table 2 を得る。

McCarty は膵臓 Desoxyribonuclease でこれとほぼ同様な実験をして, 最初の比粘度 3~5 の範囲で, 比粘度減少速度は同じであり, 基質濃度に関係であると言っている<sup>7)</sup>。われわれの得た結果からすると, 大体同じことが言えるが, 最初の比粘度 2~4 で, 基質濃度が大きいほど, 比粘度減少速度は少し大きくなる傾向がある。しかしこのような実験の場合に,  $Mg^{++}$  濃度をすべて  $3 \times 10^{-3}M$  にすることが適当かどうかは疑問である。Kunitz<sup>8)</sup> は最適  $Mg^{++}$  濃度は DNA 量によつて異ると言っている。

最適  $Mg^{++}$  および  $Mn^{++}$  濃度について DNA-III を用い, 最適  $Mg^{++}$  および  $Mn^{++}$  濃度を求めた結果を Fig. 3 に示す。DNA の濃度は 0.1%, で SD 量は  $Mn^{++}$  の場合は  $Mg^{++}$  の場合よりごく僅か少ないだけで大体等量である。

Fig. 3 によれば,  $Mg^{++}$  も  $Mn^{++}$  も最適濃度は 1~3

Fig. 2 Effects of DNA Concentrations on Rates of Decreasing in Viscosity by a Constant Amount of Streptodornase

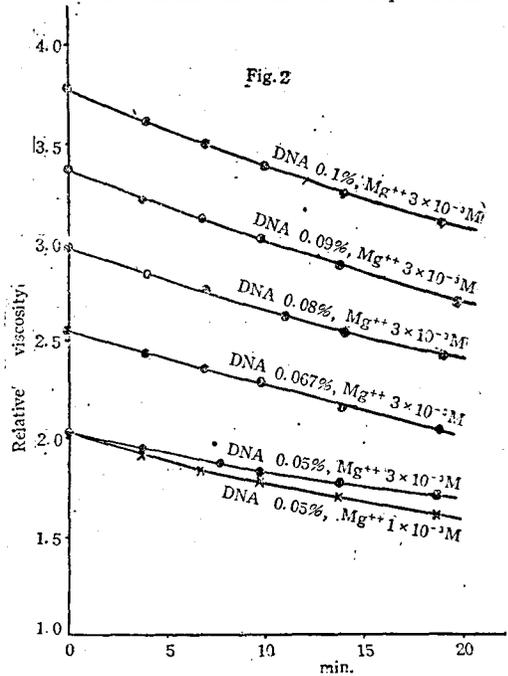
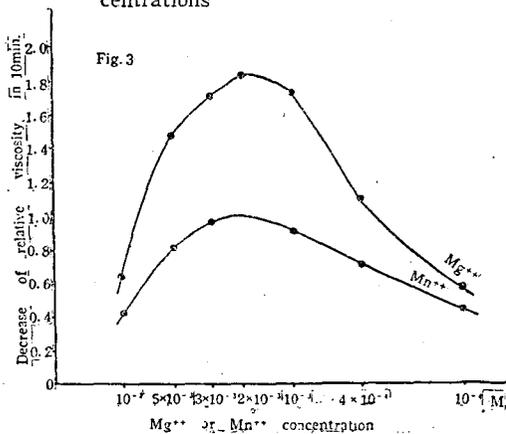


Table 2. Amounts of Relative Viscosity Decreased in 10 min. in Fig. 2

DNA conc. %	$Mg^{++}$ conc.	0 min.	10min.	Decrease in 10 min.
0.1	$3 \times 10^{-3}M$	3.78	3.39	0.39
0.09	"	3.38	3.02	0.37
0.08	"	2.98	2.67	0.31
0.067	"	2.56	2.28	0.28
0.05	"	2.04	1.82	0.22
0.05	$1 \times 10^{-3}M$	2.04	1.77	0.27

Fig. 3 The Optimum  $Mg^{++}$  and  $Mn^{++}$  Concentrations



$\times 10^{-3}M$  で, SD の作用はそれらのイオンの濃度により著しく影響を受けるものである。膵臓 Desoxyribonuclease で McCarty は, われわれとほぼ同様な条件で, 最適  $Mg^{++}$  濃度は  $0.003M$  であると述べており<sup>7)</sup>, われわれの結果はこれと大体一致している。

種々の金属イオンの賦活効果について  $Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++}, Ca^{++}, Zn^{++}$  について, SD 作用に対する賦活の効果あるいは有無を調べた結果を Table 3 に示す。

この結果によると, 同じ  $3 \times 10^{-3}M$  で  $Mn^{++}$  は  $Mg^{++}$  の約  $1/2$ 。  $Co^{++}$  はそれより更に僅かの賦活効果しかもたず,  $Ca^{++}$  は影響なく,  $Zn^{++}$  は SD 作用を全く失わせる。McCarty によれば<sup>7)</sup>,  $Mn^{++}$  の効果は同濃度で  $Mg^{++}$  と同様であり,  $Zn^{++}$  は少し賦活効果を有し,  $Ca^{++} Fe^{++}$  は無影響であるとしている。測定法はわれわ

Table 3. Comparison of Activating Effects of Some Metal Ions on SD Activity

Metal ions		Relative viscosity at 0 min.	Decrease of relative viscosity in 10 min without alanine; with alanine		DNA used
conc.					
Exp. 1	—	4.35	0.18		DNA-III
	Mg <sup>++</sup> 3 × 10 <sup>-3</sup> M	3.94	1.61		
	Mn <sup>++</sup> "	3.87	0.97		
Exp. 2	—	3.24	0.11	0.20	DNA-I
	Mg <sup>++</sup> 3 × 10 <sup>-3</sup> M	3.00	0.80	1.22	
	Mn <sup>++</sup> "	2.91	0.44	0.74	
	Co <sup>++</sup> "	2.93	0.25	0.40	
Exp. 3	—	4.35	0.19		DNA-III
	Mg <sup>++</sup>	3.94	1.44		
	Ca <sup>++</sup>	3.91	0.17		
	Zn <sup>++</sup>	3.88	0		

れとは同様である。われわれの結果と少し違っているのが、酵素の相異に基因するかどうかまだ明らかでない。Miyaji 等<sup>10)</sup> はそれぞれ固有の濃度と pH で種々の 2 価金属イオンが、多かれ少なかれ臓腑 Desoxyribonuclease の作用を賦活することを述べ、その中で、Mn<sup>++</sup>、Co<sup>++</sup> が Mg<sup>++</sup> と同条件で (pH 5.2) 同様に効果のあることを、DNA の酸可溶性分解物を 260 m $\mu$  の吸収で測定する方法で見出しているが、条件が相違するから、われわれの結果との相違は当然かも知れない。金属イオンの影響は pH や濃度を変えて調べないと、よくわからない。

Cu<sup>++</sup>、Zn<sup>++</sup>、Pb<sup>++</sup> 等の SD 作用に対する阻害 Cu<sup>++</sup>、Zn<sup>++</sup>、Pb<sup>++</sup>、Hg<sup>++</sup> について、Mg<sup>++</sup> 3 × 10<sup>-3</sup>M で活性化された SD 作用に対する阻害を調べた結果を Table 4 に示す。

Table 4. Inhibition of Cu<sup>++</sup>, Pb<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, etc. on the Action of SD

Metal ions added		Decrease of relative viscosity in 10min. without alanine; with alanine (5 × 10 <sup>-3</sup> M)		DNA used
conc.				
Exp. 1	—	1.37		DNA-III
	Cu <sup>++</sup> 1 × 10 <sup>-5</sup> M	0.94		
	Zn <sup>++</sup> 1 × 10 <sup>-5</sup> M	1.20		
	" 5 × 10 <sup>-5</sup> M	0.75		
Exp. 2	—	0.64	0.92	DNA-I
	Cu <sup>++</sup> 1 × 10 <sup>-5</sup> M	0.35	0.90	
	" 5 × 10 <sup>-5</sup> M	0.05	0.87	
Exp. 3	—	0.68		DNA-I
	Pb <sup>++</sup> 1 × 10 <sup>-5</sup> M	0.39		
Exp. 4	—	0.86		DNA-I
	Hg <sup>++</sup> 2.5 × 10 <sup>-4</sup> M	0.60		
	" 1 × 10 <sup>-3</sup> M	0.37		

Initial relative viscosity is 3.34; Mg<sup>++</sup> (3 × 10<sup>-3</sup>M) is contained in all reaction mixtures.

この結果によれば、Cu<sup>++</sup> Pb<sup>++</sup> Zn<sup>++</sup> の阻害は著しく、10<sup>-5</sup>M位で既に SD 作用に対する阻害が現われる。Exp. 2 で Cu<sup>++</sup> を加えなくてもアラニンの添加で作用が増すのは、こゝで用いた DNA-I の中にわずかの Cu<sup>++</sup> が混入しているからである。Cu<sup>++</sup> が存在してもアラニンの添加で作用が全く回復する。これは Cu<sup>++</sup> が

アラニンと錯化合物を作り反応系から除去されるからであろう。リジン, アルギニン, ヒスチジン, グルタミン酸等でも効果があり, 一般にいかなるアミノ酸でも有効であろう。

DNA-I, II, III について, アラニンの影響を比較した一例を Table 5 に示す。Cu<sup>++</sup> が DNA-I, II, III と次第に少くなり, DNA-III ではほとんど全く除去されていることがわかる。

Table 5. Susceptibility of Three Kinds of DNA Preparations to the Action of SD

	DNA Preparations	Relative viscosity at 0 min.	Decrease of relative viscosity			
			without alanine;		with alanine	
			5 min.	10min.	5 min.	10min.
Exp. 1	DNA-I	3.23	0.16		1.47	
Exp. 2	DNA-II	3.34		0.64		0.92
Exp. 3	DNA-III	3.94		1.61		1.68

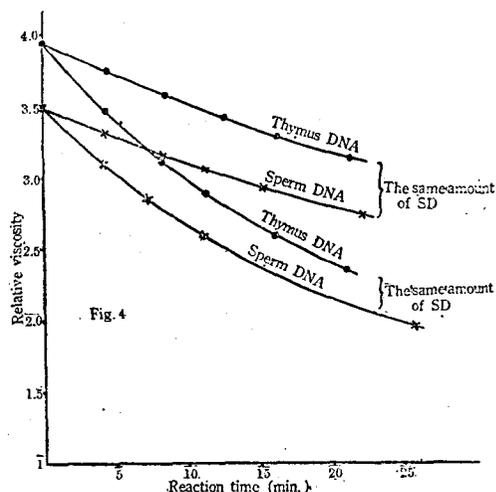
SD amounts were not the same among these three experiments

上に述べた金属イオンによる阻害に関しては, Desoxyribonuclease についてはまだ報告がないようであるが, Zittle<sup>14)</sup> は Ribonuclease (結晶) の作用が, Cu<sup>++</sup> Zn<sup>++</sup> で著しく阻害されることを報告している。彼はある核酸の製品は, 酢酸による沈澱法で低分子の核酸部分を除いて精製しても, Ribonuclease の作用を受けやすくならないことから, この製品中に Cu<sup>++</sup> が混入しており, 酢酸で沈澱させても Cu<sup>++</sup> 含量はかえって増加して除去できないことを見出している。彼はこれら金属による阻害の機構を, 酵素中に存在するかも知れぬ -SH 基と結びつけて考えているようであるが, 種々の矛盾に相遇している。例えば, ある核酸製品中に Cu<sup>++</sup> による阻害を部分的に除く物質が含まれていることを見出し, この物質が -SH 基を有するのではないかと考え, Cystein もやはり部分的に Cu<sup>++</sup> 阻害を除くことを見ている。しかし核酸中の物質は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で酸化しても, 定量的に破壊されないことを理解困難であるとしている。

これに対しわれわれは Cu<sup>++</sup> 等の阻害作用は, 酵素よりむしろ基質と結合して酵素作用を受け難くするからだと考えてもよいのではないか, Cu<sup>++</sup> 等による阻害を -SH 基と関係づけなくてもよいのではないか, 従つて Cu<sup>++</sup> による阻害を回復する物質としては -SH 基は必ずしも必要ではなくアミノ酸のように Cu<sup>++</sup> と錯塩を形成するものでよいのではないか, と考えるのである。

**魚精虫 DNA の SD による分解速度** 魚精虫 DNA と胸腺 DNA (DNA-II) が一定量の SD によつて分解される速さを比較すると Fig. 4 の通りである。両 DNA の分解される速さは大体似ており, 著しい差は認められない。

Fig. 4 Comparison of Susceptibilities of DNA Preparations from Two Origins to the Action of SD



## 総 括

コウサン胸腺デスオキシリボ核酸に対するストレプトドルナーゼの作用を, 粘度法を用いて検討し, 次の結果を得た。

- (1) 酵素量と一定時間後の比粘度減少量の間には, ある範囲で比例関係がある。
- (2) 一定量の酵素による比粘度減少量は基質濃度が大である程, 僅か大きくなる傾向がある。
- (3) Mg<sup>++</sup> および Mn<sup>++</sup> の最適濃度は共に  $1 \sim 3 \times 10^{-3}M$  である。(ただし DNA は 0.1%)
- (4)  $3 \times 10^{-3}M$  の Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> の賦活効果は, この実験条件で Mg<sup>++</sup> > Mn<sup>++</sup> > Co<sup>++</sup> で, ま

たこの濃度で  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  には賦活作用はない。

(5)  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  は,  $\text{Mg}^{++}$  で活性化された酵素作用を著しく阻害する。  $\text{Cu}^{++}$  の阻害作用はアラニン等のアミノ酸を添加すると除くことができる。

(6) 魚精虫デオキシリボ核酸も, 胸腺のものと大体同様な速度で分解され, 著しい差は認められない。

(7) デオキシリボ核酸の製造中に混入してきた  $\text{Cu}^{++}$  を除く方法について述べた。

## 文 献

- 1) 朝比奈, 岡: 衛試, 72, 113 (1954) 参照
- 2) Tillett, W. S., Sherry, S., Christensen, L. R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68, 184 (1948)
- 3) McCarty, M. : J. Exp. Med., 88, 181 (1948)
- 4) Sherry, S., Johnson, A., Tillett, W. S. : J. Clin. Invest., 28, 1094 (1949)
- 5) Sherry, S., Goeller, J. P. : J. Clin. Invest., 29, 1588 (1950)
- 6) Christensen, L. R. : J. Clin. Invest., 28, 163 (1949)
- 7) McCarty, M. : J. Gen. Physiol., 29, 123 (1946)
- 8) Kunitz, M. : J. Gen. Physiol., 33, 363 (1950)
- 9) Carter, C. E., Greenstein, J. P. : J. Nat. Cancer Inst., 7, 29 (1946)
- 10) Miyaji, T., Greenstein, J. P. : Arch. Biochem. Biophys., 32, 414 (1951)
- 11) Carter, R. O., Hall, J. L. : J. Am. Chem. Soc., 62, 1194 (1940)
- 12) Hammarsten, E. : Biochem. Z., 144, 383 (1924)
- 13) 江上不二夫: 核酸及び核蛋白質, 上巻, 共立出版, 1951, p177 参照
- 14) Zittle, C. A. : J. Biol. Chem., 163, 111 (1946).

この研究は昭和29年度厚生科学研究費によつて行つた。

## Summary

The action of streptodornase on thymus desoxyribonucleic acid was studied by the viscosimetric measurement, and the following results were obtained.

1 Amounts of relative viscosity decreased in a constant time are proportional to enzyme amounts within some range.

2 It seems that the decreased amount of viscosity by a constant amount of enzyme is slightly larger, as the substrate concentration increases.

3 The optimum concentration of  $\text{Mg}^{++}$  or  $\text{Mn}^{++}$  which activates the enzyme action is  $1 \sim 3 \times 10^{-3}$  moles. (The DNA concentration is 0.1 per cent.)

4 Activating effects of  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  or  $\text{Co}^{++}$  ( $3 \times 10^{-3}\text{M}$ ) on the enzyme become smaller in the order of  $\text{Mg}^{++} > \text{Mn}^{++} > \text{Co}^{++}$  under the experimental condition used here.  $\text{Ca}^{++}$  or  $\text{Zn}^{++}$  ( $3 \times 10^{-3}\text{M}$ ) can not activate the enzyme.

5  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$  or  $\text{Zn}^{++}$  strikingly inhibits the enzyme action activated by  $\text{Mg}^{++}$ . The inhibitory effect of  $\text{Cu}^{++}$  is eliminated by the addition of amino acid.

6 There is no noticeable difference in the susceptibility to the enzyme action between sperm desoxyribonucleic acid and thymus one.

7 A simple method to remove  $\text{Cu}^{++}$  from the desoxyribonucleic acid, which had unfortunately been contaminated by the metal ion in the preparation procedure, was described.

Received April 15, 1955

医薬品の副作用についての免疫学的実験

浦久保 五 郎

A Immunochemical Experiment on the Allergic Side-reaction of Drugs

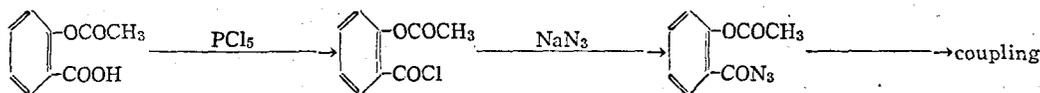
By Gorō URAKUBO

まえがき 薬品の服用によりアレルギー性副作用を呈することは例が多く、アレルギーは生体内の抗原抗体反応であるから、この薬品に対する抗体の存在が当然想像される。筆者はアスピリン、アンチピリン、スルファチアゾールを例にとり、これらを決定群とする抗原に対する抗体の存在について簡単な実験を行った。以下に報告する。

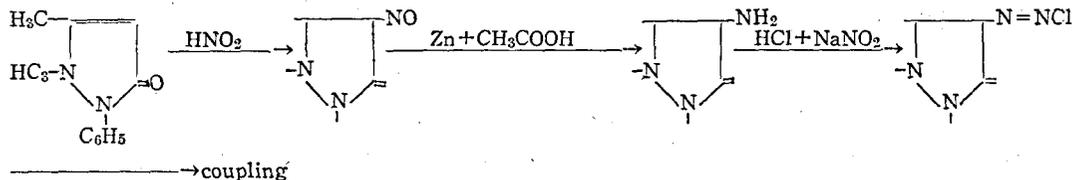
実験方法

抗原の調製. アスピリンは acetylsalicylazide として coupling に用い<sup>1)</sup>、アンチピリンはアミノ化しスルファチアゾールはそのまゝそれぞれ常法によりチアゾ化して健康人血清と coupling した。次にそれを図示して詳細な実験データは省略する。

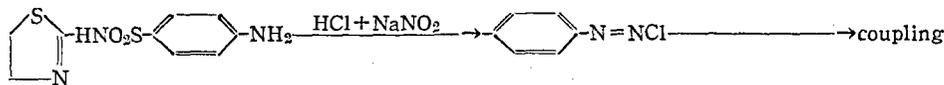
Aspirin



Antipyrin



Sulfathiazol



coupling は人血清 100cc に対しもとの薬品 1g を用いた。アスピリンについては文献記載に従い、他のものは<sup>2)</sup>、チアゾ化物と血清を氷冷下に混合しかきまぜながら nNaOH 液を滴下してリトマスアルカリ性として氷室に一夜放置した。このあと 2nHCl で pH4.5 として沈澱させて集め再びアルカリ性の水にとかす。この操作を 3 度繰返し最後に約 100cc の水に浮べ nNaOH 液を滴下してとかし、流水に 24 時間透析し、pH6.9 に修正後遠心分離して不溶物を除き、食塩 0.9% および石炭酸 0.5% を加えた。

沈降反応. 試験血清には任意に集めた数百例の人血清を用い、抗原には前述の 3 種の人工抗原液をそれぞれもとの血清の容量に対し 10 倍と 30 倍に 0.9% 食塩水でうすめたものを用いて、重畳法を行った。判定は室温 (20~28°) で 30 分、1 時間、2 時間、3 時間後に 4 回行い、一度でも反応の見られたものを陽性とした。また反応の陽性および疑わしい血清については再検して確認した。

実験結果

結果は Table 1 に総括して示すようにこれらの人工抗原に対しそれぞれ 8.8, 3.7, 6.3% の血清が沈降反応陽性を示した。なお反応の進行は非常に早くほとんどの例が 20~30 分間で白濁環を示した。

Table 1. The precipitation of human sera with the artificial antigens.

serum-coupling Antigens	total number of test sera	number of (+)	" (+)	% of (+)	dilution of antigen			
					× 30		× 10	
					number of (+)	" (+)	" (+)	" (+)
Aspirin	580	51	21	8.8	44	20	25	19
Antipyrin	427	16	3	3.7	16	2	13	5
Sulfathiazol	427	27	8	6.3	27	8	16	6

考察 試験血清が極めて少量のため沈降反応以外の手段で確めることが出来なかつたが、これらの薬品を決定群とする抗原に対する抗体の存在を考えることは出来る。それでこの実験結果は、これらの薬品の発疹、胃痛、嘔気などの副作用をアレルギーとして説明するのに一応の裏付けを与えると思われた。なおこの実験により抗体の存在を唱えるならば (1)この抗体は薬品を服用することにより産生されるものであるか、(2)産生されるならば如何なる機序によつておこりまたどの位の日数持続して存在するであろうか、(3)あるいは薬品の服用とは全く無関係に存在しているのであろうか、という事が今後の問題として残っている。

#### 総 括

アスピリン、アンチピリン、スルファチアゾールを健康人血清に coupling したものを抗原とし、人血清数百例と沈降反応を行つたところ、それぞれ数%のものが陽性を示した。それで人血清中にこれら決定群の薬品に対する抗体の存在を考えた。

本実験にあたり便宜を与えられた川城部長、東京血液銀行村上省三博士、東京大学血清学教室松橋直博士、材料を分与された東京都性病予防協会、実験を行つた当時東京薬科大学々生佐藤久美子ほか3名の諸氏に感謝する。

#### 文 献

- 1) G. C. Butler, C. R. Harington & M. E. Yuill: Biochem. J., 34, 2,838 (1940)
- 2) W. C. Boyd: Fundamentals of immunology. Interscience publishers, inc. New York N. Y.: 1945.

#### Summary

In vitro test, several percentage of human sera precipitated with the artificial antigens containing aspirin-, antipyrin-, sulfathiazol-serum complexes. So the author suggested the existence of antibodies against these drug-serum complexes in human blood.

Received April 22, 1955

## X線照射のマウス, ラットに及ぼす作用についての細菌学的研究

山地 幸雄, 田中 弘子, 八田 貞義\*,  
山内 信\*, 恵畑 欣一\*\*

On the Effect of X-Irradiation against Mice and Rats with Special  
Reference to the Observation from the Bacteriological Viewpoint

By Yukio YAMAZI, Hiroko TANAKA, Sadayoshi HATTA,

Makoto YAMAUCHI and Kinichi EBATA

**まえがき** X線或は放射線の生体に及ぼす作用については、広汎な実験報告がなされている。動物のX線照射による致死の傷害については、物理的条件の変化<sup>1)</sup>、代謝毒<sup>2)</sup>、ビタミン<sup>3)</sup>、ホルモン<sup>4)</sup>、臓器浸液<sup>5)</sup>、などによる防禦<sup>6,7)</sup>或は増強に関する実験などにより、その本態についての手掛りが与えられているが、細菌学的観察を行なつた実験者は、急性放射線死の原因が細菌感染であることを強調した。すなわち Bowers ら<sup>8)</sup>は広島或は長崎における原子爆弾被爆後、数日で死んだ人の血液または組織の顕微鏡標本に細菌をみとめ、Miller ら<sup>9)</sup>は実験的X線被照射マウスにみられる菌血症の出現と、死との間に相関ありとし、血液或は脾より検出された菌は、大部分腸管内に通常存するグラム陰性杆菌すなわち大腸菌群及び *Pseudomonas* であつたと報告し、Gustafson ら<sup>10)</sup>は同様の事実をマウス以外の動物にも認めた。Bond, Shechmeister らはラットにX線を照射すると肺疾患の蔓延を促進し、静止していた感染が活動化されることを示唆し<sup>11)</sup>、また潜伏していたマウスの *Pseudotuberculosis* はX線照射により活性化され<sup>12)</sup>、そしてマウスの放射線死の一因は細菌感染である、といつた。従つて当然ストレプトマイシン、テラマイシンなどの抗生物質投与が、放射線による死を或程度防ぐことも実証された<sup>14,18)</sup>。

われわれ<sup>19)</sup>はさきに、X線を全身照射したマウス、モルモット及びウサギに、照射数日後、腸炎菌強毒株を経口投与し、X線照射が菌の侵襲性の増強と、宿主の抗体生成の低下を惹起する、との報告を行なつた。今回の報告には比較的成熟の度の進んだマウス及びラットに、X線を全身照射した際の所見を述べる。

**実験方法** 1. **実験動物** マウスは体重20~25g, ラットは140~350gのものを用いた。

2. **X線照射** X線発生装置は日医大第一医院放射線科の深部治療用装置を用いた。照射条件は管電圧 150kv, 管電流 3 mA, 濾過板 Cu 0.5mm, Al 1.0mm, Tubusなし, 皮膚焦点距離 30cm, 毎分r量11.4r とした。

3. **観察** 観察は30日間、必要の場合にはそれ以上の期間行なつた。この間に斃死したものは心血、脾乳剤をドリガルスキー平板、血液寒天平板に直接塗抹、及びVF寒天に混釈、並びにサイオグロコロート培地にて増菌後、上記平板塗抹及びVF寒天混釈により培養試験を行なつた。生残動物の一部は30日後に撲殺して同様の菌検索を行なつた。ラットでは体重、体温及び流血中白血球(尾端より採血)の検査を行なつた。

**実験成績** 1. **マウスを使用した実験** 第1表に示すように28匹のマウスを7群に分け、6群に800~30rの全身照射を行なつた。

800r被照射群では4匹中2匹が4、15日後に死に、それらの血液及び脾からは菌が検出された。400r被照射群では3日後に1匹死んだが、夜間斃死していたため、菌の検索は行わなかつた。200及び100r被照射群は全例生残し、50r被照射群では1匹が17日後に死んで、その血液及び脾から菌が検出された。30r被照射群では25日後に1匹死んだが血液及び脾は無菌であつた。これらの菌検出例では分離菌は殆んど純培養としてみられた。30日後に各群の生残動物より夫々1匹をとり、血液、脾の菌検索を行なつたところ、400及び200r被照射例の脾からは菌が検出され、他は無菌であつた。

No.5 マウスより分離された菌は普通培地に生え難い連鎖球菌であつたが、No. 8, 10, 13, 及び21 マウスより検

\* 日医大衛生学教室

\*\* 日医大放射線科

Table 1.  
Total Body X-Irradiation in Mice.

Dose (r)	Days after Irradiation	Animal No.	3	4	15	17	25	30	Culture	
									Blood	Spleen
800	5		○	○	⊙				Streptococcus	Streptococcus
	6		○	○	○	○	○	○	Sterile	Sterile
	7		○	○	○	○	○	○		
	8		○	⊙					Salmonella	Salmonella
400	9		⊙							
	10		○	○	○	○	○	○	Sterile	Salmonella, Coliform
	11		○	○	○	○	○	○		
	12		○	○	○	○	○	○		
200	13		○	○	○	○	○	○	Sterile	Salmonella
	14		○	○	○	○	○	○		
	15		○	○	○	○	○	○		
	16		○	○	○	○	○	○		
100	17		○	○	○	○	○	○	Sterile	Sterile
	18		○	○	○	○	○	○		
	19		○	○	○	○	○	○		
	20		○	○	○	○	○	○		
50	21		○	○	○	⊙			Salmonella	Salmonella
	22		○	○	○	○	○	○	Sterile	Sterile
	23		○	○	○	○	○	○		
	24		○	○	○	○	○	○		
30	25		○	○	○	○	⊙		Sterile	Sterile
	26		○	○	○	○	○	○	Sterile	Sterile
	27		○	○	○	○	○	○		
	28		○	○	○	○	○	○		
0	29		○	○	○	○	○	○	Sterile	Sterile
	30		○	○	○	○	○	○		
	31		○	○	○	○	○	○		
	32		○	○	○	○	○	○		

X-Irradiation: 150KV, 3mA, Filter-Cu 0.5mm, Al 1.0mm, Distance 30cm, 11.4r/min.

○:Survival, ⊙:Death.

出された菌はいずれもグラム陰性杆菌で、生物学的性状は Table 2 に示すとおりであつた。すなわち No.10 マスの脾より分離された1株は大腸菌群であつた。そこでその他の菌株につき血清学的検査を行なつたところ、Table 3, 4, 5 に示すように、いずれも *Salmonella enteritidis* と判定され、また検出菌により免疫したウサギ血清凝集素は *S. enteritidis* 標準菌により吸収され、吸収后血清の凝集価は25倍稀釈においても陰性であつた。そして分離 *S. enteritidis* のマスに対する菌力を腹腔内接種により測定したところ、Table 6 に示すように 8-B-6 株を除いては、ブイヨン培養の  $5 \times 10^{-5} \sim 6$  ml でマスを2週間以内に斃死させた。8-B-6 株の菌力の弱かつたのは、保存中の毒力の低下のためと考えたい。

Table 2.  
Biological Reactions of Bacteriae, Isolated from Irradiated Mice.

Strain	Glucose	Lactose	Sucrose	Mannitol	Milk	H <sub>2</sub> S	Indole	Gelatin	Urea	Motile	Source
8-B-6	⊕	-	-	⊕	-	+	-	-	-	+	Blood of No. 8 Mouse
8-M-12	⊕	-	-	⊕	-	+	-	-	-	+	Spleen of No. 8 Mouse
10-M-3	⊕	-	-	⊕	-	+	-	-	-	+	Spleen of No. 10 Mouse
10-M-6	⊕	+	-	⊕	a.c	-	+	-	-	+	
13-M-1	⊕	-	-	⊕	-	+	-	-	-	+	Spleen of No. 13 Mouse
21-B-2	⊕	-	-	⊕	-	+	-	-	-	+	Blood of No. 21 Mouse
21-M-3	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	+	Spleen of No. 21 Mouse

a. c : acid and coagulation.

Table 3.  
Titers of O-Agglutination

Serum	Antigen						
	S-1	S-9	S-42	S-51	S-74	S-78	S-84
8-B-6	<25	100	<25	<25	200	<25	<25
8-M-12	<25	25	25	<25	200	<25	25
10-M-3	<25	50	<25	<25	200	<25	<25
13-M-1	<25	50	<25	<25	200	<25	25
21-B-2	50	400	<25	<25	1600	<25	<25

Table 4.  
Titers of OH-Agglutination.

Serum	Antigen				
	S-1	S-40	S-51	S-57	S-64
8-B-6	100	<25	50	25	51200
8-M-12	100	50	100	<25	51200
10-M-3	200	<25	25	<25	25600
13-M-1	3200	400	25	400	51200
21-B-2	50	<25	<25	<25	51200

Table 5.  
Titers of OH and O-Agglutination.

Antigen	Serum	Titers	
		OH	O
S-1	8-B-6	<25	<25
	10-M-3	<25	<25
	13-M-1	<25	<25
	21-B-2	<25	<25
S-40	8-B-6	400	100
	10-M-3	<25	<25
	13-M-1	<25	<25
	21-B-2	50	<25
S-51	8-B-6	200	100
	10-M-3	<25	<25
	13-M-1	<25	<25
	21-B-2	25	<25
S-57	8-B-6	<25	<25
	10-M-3	<25	<25
	13-M-1	<25	<25
	21-B-2	<25	<25
S-64	8-B-6	12800	800
	10-M-3	12800	800
	13-M-1	12800	800
	21-B-2	12800	400

Table 6.  
Survival of Mice Infected Peritoneally with *S. enteritidis*,  
Isolated from Irradiated Mice. (2 Mice per Group).

Days after Infection	Strain Dose of Infec- tion (cc)	8-M-12					8-B-6					10-M-3				
		$5 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$
1		1	2	2	2	2	2					0	2	1	2	2
2		1	2	2	2	2	2						1	1	2	2
3		0	1	1	1	2	2						0	1	2	1
4			1	1	1	2	2							1	2	1
5			1	1	1	2	2							1	2	1
6			1	1	1	2	2						0	2	2	0
7			0	1	1	2	2							2	2	
8				0	1	2	2							1	1	
9					1	2	2							1	1	
10					1	2	2							0		
11					1	2	2									
12					1	2	2									
13					0	2	2									
14						2	2									

Days after Infection	Strain Dose of Infec- tion (cc)	13-M-1					21-B-2				
		$5 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$
1		0	2	2	1*	1*	0	0	2	2	2
2			2	2	1	1		1	2	2	
3			1	1	1	1		0	2	2	
4			1	1	1	1			2	2	
5			1	1	1	1			2	2	
6			0	0	0	1			2	1	
7						1			2	1	
8						0			2	1	
9									1	0	
10									0		
11											
12											
13											
14											

Inoculum: Bowillon Cultur, 37°C, 18hrs.

\* : No Bacteriaemia in One Mouse.

Table 7.  
 Total Body X-Irradiation in Rats

Dose (r)	Days after Irradiation Animal No.		Before	1	3	5	7	9	12	16	30	
			2									
400	11	W	290	275	260	275	295	295	380	295	275	
		T	36.6	37.9	36.9	36.8	37.3	36.4	38.0	37.2	37.3	
		L				5100	3300		2800	7900	7400	
	12	W	270	260	290	250	265	265	250	240		Death, 25Days after Irr.
		T	36.4	37.6	36.8	37.0	37.7	36.8	36.7	37.0		
		L				6800	6700		4600	19300		
	13	W	195	195	200	205	210	220	215	215	205	
		T	37.0	38.1	38.1	37.8	38.2	37.6	38.0	38.0	37.6	
		L				5700	2900		600	10100	10800	
	14	W	210	220	210	225	235	230	245	235	250	
		T	37.8	37.4	36.9	37.9	37.2	37.5	37.8	37.6	37.5	
		L				5600	2600		4700	6100	9100	
	15	W	310	315	300	315	330	330	355	345	390	
		T	37.7	38.4	38.6	38.7	37.4	38.0	38.0	37.8	38.3	
		L				6900	3100		4000	5600	7600	
200	6	W	180	180	170	205	205	200	215	210	250	
		T	37.5	37.8	37.2	37.3	37.3	37.3	37.7	36.4	37.3	
		L				9700	2600		5100	4100	9000	
	7	W	290	275	250	275	280	290	290	220	255	Death, 34Days after Irr.
		T	36.6	37.1	37.5	37.1	37.5	36.7	37.3	36.5	36.8	
		L				12100	5000		7100	10600	42300	
	8	W	210	205	200	225	225	220	225	205	250	
		T	37.3	37.9	37.5	37.3	37.6	37.0	37.5	36.8	37.4	
		L				9200	6800		10300	16000	9800	
	9	W	270	255	270	265	275	285	300	300	330	
T		37.1	38.1	36.8	37.7	37.5	37.2	39.5	37.2	390		
L					4800	4000		13700	6100	17900		
10	W	140	165	180	180	185	180	195	170	180		
	T	36.6	37.3	37.0	37.9	37.5	38.0	37.7	37.5	37.7		
	L				8100	3200		8600	6500	15200		
100	1	W	190	170	170	190	195	190	210	210	250	
		T	36.4	37.5	37.1	37.5	37.2	36.8	37.6	37.3	37.3	
		L				5100	8100		14100	5800	15900	
	2	W	220	215	210	225	235	220	235	240	290	
		T	36.9	37.4	36.9	38.2	37.5	37.2	37.2	37.2	37.1	
		L				9700	6900		14900	7500	8800	

Dose (r)	Animal No.	Days after Irradiation.	Before 2	1	3	5	7	9	12	16	30	
			100	3	W	230	210	205	205	220	225	225
		T	37.4	37.5	37.4	38.1	37.9	37.2	38.5	37.5	37.8	
		L				17200	8400		15500	9100	6800	
	4	W	250	235	245	230	230	240	235			Death, 17Days after Irr.
		T	37.1	36.9	37.5	37.6	37.4	37.7	37.4			
		L				20400	9000		10100			
	5	W	240	230	230	240	245	250	255	265	310	
		T	37.0	38.0	37.0	37.6	37.9	36.7	38.3	37.5	37.9	
		L				12700	8200		9600	11200	7100	
	26	W	160	165	160	175	175	170	195	180	190	
		T	37.4	37.8	36.9	37.8	37.4	37.4	37.5	38.3	37.9	
		L				11400	6100		11100	9400	7300	
	27	W	240	230	225	240	245	220	240	220	225	
		T	36.7	37.3	37.3	37.3	37.3	37.7	37.2	37.8	37.5	
		L				4200	3100		30700	6300	11100	
	28	T	210	220	210	225	230	225	255	250	285	
		L	37.3	38.2	37.5	38.0	37.8	37.7	37.7	37.7	37.5	
		W				15900	12000		17900	25100	15300	
	29	W	230	225	210	220	235	220	235	235	270	
		T	37.0	37.4	37.8	38.2	37.7	37.3	37.5	38.5	38.9	
		L				7600	14500		9400	19800	8300	
	30	W	270	240	230	255	255	255	275	275	325	
		T	37.3	37.1	37.5	38.1	37.4	36.9	37.9	37.0	37.6	
		L				8800	9100		12600	14300	6400	

X-Irradiation :150KV, 3mA, Filter Cu 0.5mm, Al 1.0mm, Distance 30cm, 11.4r/min.

W:Weight of the Body, (g) T: Temperature of the Body, (c).

L: Leucocytes in the Peripheral Blood, (per mm<sup>3</sup>).

2. ラットを使用した実験 実験の結果は Table 7, 8 に示したとおりである。すなわち 20 匹のラットを 4 群に分け、その 3 群に 400~100r X線照射したところ、400r 被照射群では 5 匹中 1 匹が 25 日後に死に、200r 被照射群は 34 日後に 1 匹死に、100r 被照射群では 1 匹が 17 日後に死んだ。そして No. 4 ラットでは血液、肺より変形菌が、No. 12 ラットでは死後 1 日を経過後の培養であるが、血液より変形菌、肺より変形菌、α-連鎖球菌、ブドウ球菌、脾より変形菌、α-連鎖球菌が検出された。死後 4 日前に白血球数 42,000 で、脱毛が顕著であった。

体重、体温、白血球数ならびに白血球百分率の平均値は Table 8 に示した。それによると体重、体温は著しい変化はみられず、白血球数は 400r 被照射 7, 12 日後、及び 200r 被照射 7 日後に照射前の半数以下に減少した。白血球の種類については第 8 表には百分率で示したが、血液学的研究に際しては誤った解釈を避けるために、百分率のみならず実数をも表現しなければならない、との Haley ら<sup>20)</sup>の主張に従い、400r 被照射 7, 12 日後、200r 被照

射7日後の白血球種類の実数についても検討したところ, Table 8, 9に示すように中性嗜好白血球の減少が著しく, 単球, リンパ球はX線に対しいくらか抵抗が強いようであつた。

斃死例では体重減少がみられたが照射前の体重が軽いものが, 特に抵抗が弱いとは認められず, X線に対する抵抗には特殊の個体差があるように考えられる。

Table 8.  
Total Body X-Irradiation in Rats (Average Value.)

Dose (r)	Days after Irradiation	Before	1	3	5	7	9	12	16	30	
		2									
400	Weight of the Body	255	253	252	254	267	268	249	260	280	
	Temperature of the Body	37.1	37.1	37.5	37.6	37.6	37.3	37.7	37.5	37.7	
	Absolute No. of Leucocytes	11500			6020	3700		3300	9800	8700	
	Relative No.	Lymphocytes	39.1			39.1	45.8		53.4	59.7	48.2
		Neutrophiles	48.9			38.7	42.1		25.6	23.5	40.4
		Eosinophiles	2.3			1.6	1.2		4.6	3.0	4.1
		Basophiles	0.1			0.1	0		0	0	0.2
Monocytes		8.4			19.2	7.5		15.4	12.5	6.9	
200	Weight of the Body	218	217	214	230	234	235	245	221	253	
	Temperature of the Body	37.0	37.6	37.2	37.5	37.5	37.2	37.5	36.9	37.6	
	Absolute No. of Leucocytes	11000			8780	4300		9000	8700	18800	
	Relative No.	Lymphocytes	40.9			41.6	51.0		44.4	53.7	47.5
		Neutrophiles	50.6			41.2	39.0		39.7	30.8	39.7
		Eosinophiles	2.5			2.7	1.0		5.4	1.5	3.3
		Basophiles	0.2			0.2	0		0	0	0
Monocytes		5.8			14.0	10.7		14.3	10.8	8.0	
100	Weight of the Body	226	212	202	218	225	225	232	228	270	
	Temperature of the Body	37.0	37.5	37.2	37.8	37.6	37.1	37.8	37.4	37.5	
	Absolute No. of Leucocytes	8400			13020	8100		12800	8400	9700	
	Relative No.	Lymphocytes	64.5			35.8	40.5		57.1	54.6	61.0
		Neutrophiles	29.0			47.6	45.8		29.4	28.1	25.5
		Eosinophiles	2.8			3.5	3.4		3.2	2.1	2.7
		Basophiles	0			0.3	0		0	0	0
Monocytes		3.5			11.1	11.0		9.1	16.1	10.7	
0	Weight of the Body	222	216	207	223	218	218	240	232	259	
	Temperature of the Body	37.1	37.6	37.4	37.5	37.5	37.3	37.6	37.9	37.9	
	Absolute No. of Leucocytes	13900			9580	9000		16300	15000	9700	
	Relative No.	Lymphocytes	35.1			53.2	55.8		57.2	56.0	54.0
		Neutrophiles	49.1			28.1	32.3		33.8	28.5	32.8
		Eosinophiles	2.3			1.4	1.7		0.9	2.2	3.0
		Basophiles	0.2			0	0		0	0	0
Monocytes		14.3			17.2	10.2		10.0	13.0	11.6	

考察 Laurence ら<sup>21)</sup>は 1000r のX線照射後1~4日に殺されたマウスでは、血液及び内臓は無菌であり、最初の1週間に自然死した数匹は陽性培養を呈し、700~800r照射後5~11日間に死んだものゝ大部分も、同様菌陽性であつたとみとめ、照射後の死の機転は組織の破壊及び、腸管由来感染の合併によると述べた。Miller ら<sup>9)</sup>はマウスに600r全身照射後2~15日間に、それらの血液及び脾を培養したところ、陽性培養率は9日目に85%で最大となり、その時期は被照射マウスの自然死の最も多い(致死率9%)時期と一致し、450r照射後には10日目に培養陽性率54%で最大となり、同じ時期に自然死も最も多かつた(致死率6%)とし、分離された8菌株のうち7株は通常大腸にあるものであつたことから、血液或は脾から検出された菌は、マウスの下部腸管より由来したものであると結論し、主としてE. coliによる菌血症とX線曝露後の致死率とは順相関があるといつた。

Shechmeisterらは或る系統のマウスに、他の系統に対しては致死量以下である放射線量(200~350r)を照射すると、多くのものが死に、斃死獣の殆どすべてはいくつかの器官に Pseudotuberculosis 病巣を有し、そこから *Corynebacterium pseudotuberculosis murium* が分離されることを認め、これは潜伏状態にあつた Pseudotuberculosis の、X線照射による活性化であろうといひ、ラッテにも同様の現象をみとめた。

われわれの実験結果からX線のLD50量を算出することはできないが、マウスに対するX線の致死量については、先人<sup>12,21)</sup>の報告と大差はないように考えられる。そしてX線被照射マウスに菌血症が出現し、それが死の原因となることはみとめられ、それらの菌がマウスの腸管内に自然に存するものであることは、われわれが同一出所のマウスによる予備実験において認めたのみならず、板橋ら<sup>22)</sup>もマウスよりの *S. enteritidis* 検出を報告している。

ラッテにおいて、われわれは Bondら<sup>11)</sup>のいうような特殊の菌を、被照射ラッテの肺より検出せず、変形菌、 $\alpha$ -溶連菌などを検出したが、これはラッテの出所の異なる点から容易に考えられることである。そしてわれわれの得た菌は通常動物の腸管内に存在する菌である。

放射線の大量全身照射が感染に対する動物の抵抗を減弱させることは、実験的感染の放射線による増強に関する多くの報告<sup>12,19,23-26)</sup>によつても証明されているが、その理由は完全には説明されていない。Taliaferro ら<sup>27)</sup>は

Table 9.  
Decrease of Leucocytes of Rats after Total Body X-Irradiation

Dose (r)	Cell	Days after Irradiation		Before 2	7	12
		A	R			
400	Lymphocytes	A		4500	1695	1760
		R		100	37.7	39.1
	Neutrophiles	A		5620	1560	845
		R		100	28.2	15.0
	Eosinophiles	A		264	44	152
		R		100	16.7	57.6
	Basophiles	A		12	0	0
		R		100	0	0
	Monocytes	A		966	278	508
		R		100	28.8	52.5
200	Lymphocytes	A		4500	2190	
		R		100	51.0	
	Neutrophiles	A		5570	1680	
		R		100	30.2	
	Eosinophiles	A		275	43	
		R		100	15.6	
	Basophiles	A		22	0	
		R		100	0	
	Monocytes	A		648	460	
		R		100	71.0	

A: Absolute No.

R: Relative No.

リンパ球或は血液母細胞の破壊は、或る重要な mesenchymal reserve を侵して、貧喰能及び抗体生成を関接に低下させると述べ、Marcus<sup>28)</sup>は650~725rのX線全身照射は、ウサギ血清の正常殺菌作用を5日後に低下させ、この低下は20日後に回復したといつた。Shechmeister<sup>ら</sup>13, 29)はマウスにX線を照射した後、30日間にわたり腸炎菌の腹腔内接種を試み、250~350r照射8時間後に、著るしい感受性の増加をみとめたが、同時に顆粒細胞が増加していたことから、感染に対する抵抗の放射線による減弱は、必ずしも顆粒細胞減少によるのではないとし、放射線により侵されるのは呼吸器粘膜、腸管上皮などの次に位する“第二の防禦機構”であると論じた。牛場<sup>26)</sup>もX線照射後のマウスには微量菌腹腔内接種により感染が成立するが、微量菌経口感染は成立し難いことを認めた。中原<sup>30)</sup>はX線照射による白血球の貧喰能の低下を主張した。X線照射後の動物血清の殺菌力ならびにオプソニン作用の減弱はわれわれも確認報告した<sup>31)</sup>。しかし放射線によりラット、モルモットに発生する菌血症は腸管上皮の破壊のためである、と結論している研究者<sup>32)</sup>もある。

この実験において斃死動物から分離された菌の由来は、われわれは一応腸管或は呼吸器と考えたい。マウスの場合同一種の菌がいくつか検出されたこと、その菌株が弱毒株でなかつたこと、並びに有毒腸炎菌は元来経口殺菌によりマウスを斃し得ることは、この分離菌株が食餌或は飼育装置に偶然附著していたのではないか、との疑を生ずる。しかし800r被照射マウスのNo.8は照射4日後に、50r被照射のNo.21は17日後に死に、30r以下照射したものからは菌が検出されなかつたことは、菌血症の原因が、単なる飼料・敷藁などの汚染のみではないことを示すと思う。

放射線による白血球減少について、Bloom<sup>33)</sup>は大喰細胞が放射線感受性の低いことを、Laurence<sup>ら</sup>34)、Jacobson<sup>ら</sup>35)はリンパ球の減少が著るしいことを述べ、松島<sup>ら</sup>36)はCc<sub>61</sub>による障害と思われる例に、各種白血球の減少とリンパ球の比較的早期の回復を報告した。Betz<sup>ら</sup>37)は致死量に近い量のX線を照射するとマウスの血液像には2~3週間で概ね再生がみられたが、数ヶ月間完全には回復しなかつたといつた。われわれの得た成績はHaley<sup>ら</sup>20)のモルモットにおいて得た結果と概ね一致する。

## 総 括

マウスに800~30r全身照射して25日間観察したところ、800rでは2/4、400r、50r、30r照射では各々1/4斃死し、200r、100r照射群は全部生残した。800r及び50r被照射の斃死例のうち各1例よりは、血液、脾より腸炎菌が検出され、800r被照射の今1匹の斃死マウスの血液、脾からは連鎖球菌が検出された。各群生残例の1匹宛を培養試験したところ、400r、200r被照射群の生残マウスの脾からは、腸炎菌或いは大腸菌群が検出された。30r以下の被照射例からは菌は全く検出されなかつた。

ラットに400~100r全身照射したところ34日以内に各群とも1/5宛死に、400r被照射の致死ラットからは、血液より変形菌、肺より変形菌、α連鎖球菌、ブドウ球菌、脾より変形菌、連鎖球菌が分離された。200r被照射の斃死例では死の数日前に、脱毛及び白血球増多42,300が目された。そしてラットでは必ずしも体重の少ないものが放射線により死に易いのではなく、特殊の個体差の存在が想像された。白血球数は400r照射7,9日後、及び200r照射7日後に著しく減少し、中性嗜好白血球の減少が顕著であつた。

以上の所見につき考察を加えた。

この論文の要旨は第23回日本衛生学会(昭28)において講演された。

終りに、御助言を与えられた日医大放射線科山中太郎教授、斎藤達雄助教授および高橋良吉学士に御礼申上げる。

## 文 献

- 1) Gerschman, R. Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. and Fenn, W. O. : Science, 119, 623—626 (1954).
- 2) Feinstein, R. N., Cotter, G. J. and Hampton, M. M. : Am. J. Physiol. 177, 156—160 (1954)
- 3) Clark, W. G., Uncepher, R. P. and Jordan, N. L. : Science, 108, 629 (1948).
- 4) Mirand, E. A., Reinhard, M. C. and Goltz, H. L. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 81 397 (1952).
- 5) Congdon, C. C. and Lorenz, E. : Am. J. Physiol. 176, 297—300 (1954).
- 6) Parr, W. O., Neill, T. O., Bush, S. and Krebs, A. : Science, 119, 415—416 (1954).
- 7) 矢追, 木村: 第27回日本細菌学会講演 (1954).
- 8) Bowers, J. S. : J. A. M. A. 145, 63 (1951).
- 9) Miller, C. P., Hammonds, C. W. and Tompkins, M. : J. Lab. and Clin. Med. 38, 331—343

- (1951). 10) Gustafson, G. E. and Koletsky, S. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **84**, 266. (1953), 11) Bond, V. P., Shechmeister I. L., Swift, M. N. and Fisher, M. C. : J. Inf. Dis. **91**, 26—32 (1952). 12) Shechmeister, I. L. and Adler, F. L. : J. Inf. Dis. **92**, 228—239 (1953). 13) Shechmeister, I. L., Paulissen, L. J. and Fishman, M. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **83**, 205 (1953). 14) Miller, C. P. Hammond, C. W. Tompkins, M. and Shorter, G. : J. Lab. and Clin. Med. **39**, 462 (1952). 15) Gonsbery, L., Marston, R. Q. and Smith, W. W. : Am. J. Physiol. **172**, 359—364 (1953). 16) Marston, R. Q., Gonsbery, L., Alderman, I. M. and Smith, W. W. : Am. J. Physiol. **172**, 365—371 (1953). 17) Marston, R. Q. Ruth, H. J. and Smith W. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **83**, 289—291 (1953). 18) Smith, W. W., Smith, F., Ruth, H. J., Cauter, H. Y. and Grenan, M. M. : Am. J. Physiol. **172**, 351—358 (1953). 19) 八田, 山地, 田中, 平林, 山内 : 第23回日本衛生学会講演 (1953). 20) Haley, T. J. and Harris, D. H. : Science, **111**, 88—90 (1950). 21) Lawrence J. H. and Tennant, R. : J. Exp. Med. **66**, 667—678 (1937). 22) 板橋, 田島, 西, 波多野 : 動物の腸内細菌, 動物の腸内細菌委員会 1952. 23) Greiff, D., Chiga, M., Blumenthal, H. T. and Pinkerton, J. : J. Exp. Med. **97**, 139 (1953). 24) 中川, 神田, 大隈 : 日本細菌学雑誌, **8**, 891—891 (1953). 25) Silverman, M. S., Chin, P. H., Green man, V. and Young, J. C. : J. Inf. Dis. **94**, 47—52 (1954). 26) 牛場 : 第27回日本細菌学会講演 (昭29). 27) Taliaferro, W. H. and Taliaferro, L. G. : J. Immunol. **66**, 181—212 (1951). 28) Marcus, S. and Donaldson, D. H. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **83**, 184—187 (1953). 29) Shechmeister, I. L. Bond, V. P. and Bwift, M. N. : J. Immunol. **63**, 87 (1952) 30) 中原 : 放射線障害班報告, 31) 八田, 山地, 田中, 山内 : 第24回日本衛生学会講演 (1954) ; 八田, 山地, 田中, 山内, 山中 : 第25回日本衛生学会講演 (1955). 32) Mottram, J. C. and Kingsburg, A. N. : Brit. J. Exp. Path. **5**, 220 (1924). 33) Bloom, W. : Histopathology of Irradiation from Exfernal and Infernal Sources, Mc Graw-Hill Book Co., Inc. N. Y. 1948. 34) Laurence, J. S., Dowdy, A. H. and Valentine, W. N. : Radiology, **51**, 400 (1948). 35) Jacobson, L. O., Marks, E. K. and Lorenz, E. : Radiology, **52**, 371 (1949). 36) 松島, 津村 : 日本衛生学雑誌, **8**, 51—51 (1953). 37) Betz, H. and Fruhling, L. : Chem Abst. **45**, 1241—1241 (1951).

### Summary

Twenty four mice were exposed to 800—30 r whole body X-irradiation and observed during 25 days. Two quarters of 800 r, each 3/4 of 400, 50, and 30 r X-irradiated mice were survived. Salmonella enteritidis was detected from the blood and spleens of each one mice of the groups, which had been 800 and 50 r X-irradiated and died. From the blood and spleens of another mice, 800 r X-irradiated and spontaneously died, Streptococcus was detected. The cultures of organs of survival animals indicated that, S. enteritidis or Coligroup were detected from the spleen of 400r, or 200r irradiated animal, and organs of other survived groups were sterile. The organs of animals, irradiated less than 30 r, were all sterile.

Fifteen rats were divided into 3 equal numbers and each groups were exposed to 400, 200 and 100r whole body X-irradiation respectively. One fifth of each group died within 34 days, and the culture of rat, 400 r irradiated and died, resulted in: Proteus from the blood; Proteus,  $\alpha$ -Streptococcus and Staphylococcus from the lung; Proteus and  $\alpha$ -Streptococcus from the spleen. In the rat, 200r irradiated and died, the depilation and leucocytosis ( $42,300/\text{mm}^3$ ) were observed several days before the death. The rats, whose body weights were light, were not always apt to die after X-irradiation, and so the peculiar constitution to X-irradiation is assumed. The leucocytes counts in the blood of rats were remarkably decreased 7 and 9 days after 400 r, and 7 days after 200 r X-irradiation, and the decrease of neutrophiles was evident.

The discussion was added to the data above described.

Received April 15, 1955

## 分離赤痢菌のサルファ剤感受性

越沼 きみえ, 岩原 繁雄, 大淵 令子

## Sulfonamide Sensitivity of Isolated Dysentery Bacilli

By Kimie KOSHINUMA, Shigeo IWAHARA and Reiko ŌFUCHI

まえがき サルファ剤が赤痢症の治療に広く用いられるようになったのは、昭和21~22年頃からで、当時はすぐれた治療効果を期待することができたが、昭和23~24年頃からサルファ剤の効かない赤痢症がふえてきて、このような症例から分離された赤痢菌は、試験管内でもサルファ剤に対して高度に耐性を獲得していることが知られるようになった。そして昭和25~26年になると分離株の70~90%<sup>1)</sup>またはそれ以上が耐性菌で占められるに至つて、この頃から分離株についてのサルファ剤感受性試験が各地で広く行われる機運となつた。このような状態では分離菌のすべてが耐性となつてしまうのも間近かであろうと予想されたが、これを裏切つて最近では耐性菌の出現率の増加は頭打ちになつてきた傾向がみられる。この原因としては、クロロマイセチン、テラマイシン、オーレオマイシン等の抗生剤がサルファ剤に代つて赤痢症の化学療法剤としての主導権をにぎり、サルファ剤が使用される機会が減つてきたため新たな耐性の獲得も、耐性菌のセレクションも行われ難い環境となつてきたことが挙げられるであろう。

ところで、サルファ剤感受性試験に関する数多くの文献を検討すると菌型によつて耐性菌の出現頻度にかかなりの差がみられ、したがつて全体としての耐性菌の検出率は菌型の分布状態によつてかなり左右されることがわかる。吾々は、昭和29年度以降の群馬、埼玉、東京の分離株の一部についてサルファ剤感受性試験を行つた。なお昭和27年の茨城県分離株及び28年度の茨城、群馬、神奈川、東京の分離株の一部についてはすでに報告した。<sup>2)3)4)</sup>

## 実験方法

赤痢菌を普通ブイヨンに24時間培養し、その1白金耳を、サルファチアゾール100mgを普通寒天1dlに混入して固めた平板に画線し、37°C、24時間培養し、菌の発育をみたものを耐性とし、菌の発育しないものを感性とした。

## 結果と考察

落合(1953)<sup>5)</sup>、小林(1952)<sup>6)</sup>、及び吾々<sup>7)</sup>の結果によれば、*S. flex.* 1b, 2b, 3b, Var. X, Var. Yの多くは耐性であるが、*S. dys.* 2, *S. flex.* 3a, *S. flex.* 4, *S. flex.* 5, *S. flex.* 6, *S. sonnei*等の大部分はサルファ剤感性であるが、なお表に示す如く今回の実験結果に於いても、この傾向に変化はない。しかもこのような傾向は、我が国内の広範囲にわたつて共通の現象であると云えるので、赤痢症のサルファ剤による治療は感受性試験を行うか、或は菌型からの推定にもとづいて行えば今日と云えども利用価値は大なるものがある。地域によつて若干の差はあるが、*S. flex.* 3a, *S. sonnei*は、20~30%程度を占めている。

## 総括

サルファ剤耐性菌の出現率は菌型によつて大きな差があるが、*S. dys.* 1, 2, *S. flex.* 3a, 4, 5, 6, Var. X(3a系), *S. sonnei*の大部分は感性、*S. flex.* 1b, 2a, 2b, 3b, Var. X(2b系), Var. Yの多くは耐性である。

終りにのぞみ、種々御援助を与えられた東京都、埼玉県、群馬県の各衛生研究所に対し深い感謝の意を表する。

## 文献

- 1) 秋葉：日本医事新報, No. 1472, 3, 1952.
- 2) 岩原：医学と生物学, 28, 30, 1953.
- 3) 岩原：日本公衆衛生学会, 1953 6月.
- 4) 岩原：日本細菌学会関東支部総会, 1953 11月.
- 5) 落合：日本医事新報, No. 1532, 23, 1953.
- 6) 小林：新潟県衛生試験所研究報告, No. 64, 1952.
- 7) 秋葉：日本医事新報, No. 1609, 2, 1955.

## Summary

Sulfonamide sensitivity of 737 dysentery strains isolated in Japan, from Jan. 1954 to Mar. 1955 were tested.

Almost all strains of *Sh. flex.* 3a and *Sh. sonnei* were sulfonamide sensitive, and above 90 percent of *Sh. flex.* 2a and 2b were sulfonamide resistant.

All strains of *Sh. flex.* 1b were resistant.

	昭29(1~12月)			昭 30 ( 1 ~ 3 月 )								
	群 馬			群 馬			東 京			埼 玉		
	感 性	耐 性	耐性%	感 性	耐 性	耐性%	感 性	耐 性	耐性%	感 性	耐 性	耐性%
1a				2	6	(75)						
1b	0	5	(100)	0	11	(100)	0	45	(100)			
2a	12	126	(91.2)	2	27	(93.1)				1	34	(97.1)
2b	1	197	(99.5)	2	53	(96.3)						
3a	67	4	(5.6)	7	0	(0)	70	0	(0)			
3b	1	10	(91)	0	5	(100)						
4	2	0	(0)									
5												
6												
Var. X	3	4	(57)				0	1	(100)	0	1	(100)
Var. Y				0	1	(100)						
Sonnei	23	0	(0)	13	1	(7.1)						
計	109	346		26	104		70	46		1	35	

Received April 15, 1955

## 赤痢菌の Phage Typing に関する研究 (第1報)

岩原 繁雄, 越沼 きみえ, 大淵 令子

## Bacteriophage Typing of Dysentery Bacilli (I)

By Shigeo IWAHARA, Kimie KOSHINUMA and Reiko OFUCHI

まえがき *Salmonella* 菌やブドウ球菌の型分けには Phage が広く用いられ, 実用化されているが, 赤痢菌についての報告は比較的少ない。古くは Burnet 等<sup>1)</sup>によつて, 赤痢菌分離株の型分けをはじめとして, 基礎的な事項についての研究が行われているが, 赤痢菌特に B 群についての Phage typing は今日行われている血清学的分類法以上のものではなからうという考えに傾いているのが現状であろう<sup>2)</sup>。しかし D 群 (Sonne 菌) については Hammarström<sup>3)</sup>が 11 株の Phage を用いて 31 型に分類し, Cooper 等<sup>4)</sup>もその Phage を用いて 7 型の Sonne 菌を確認し, 疫学的考察を加えている。しかし, Sonne 菌については, その抗原がきわめて変異を起しやすいことから考え, 慎重に行わなければならない。いずれにしても, B 群の赤痢菌についての此の種の研究が系統的に行われた報告にはいまだ接していない。

現在赤痢菌, 特に B 群については血清学的にかなりこまかく分類されてはいるが, Phage を用いることによつてさらにこまかく型分けすることができればきわめて有意義であつて, 伝染経路をつきとめるための手段として役立つであろうし, 血清学的分類と Phage type との間の関連をしらべることも興味がある。また, 菌の生化学的性状, 病原性, 化学療法剤に対する感受性などを, Phage に対する感受性の面からながめることも意義がある。

そこで我々は赤痢菌に作用する 51 株の Phage を分離し, 1954 年 1 月以降, 東京都, 埼玉県, 群馬県において分離された B 群の赤痢菌約 700 株を対象として Phage に対する感受性をしらべた。今回 B 群の菌をとり上げた理由は, 此の群の菌が現在我国の赤痢流行の主流となつているため数多くの菌株を入手しやすく, したがつてその Phage typing の結果を実際面とむすびつける機会も多いであろうし, 此の群の菌は共通抗原でたがいにつながりを持つているので, Phage の感受性の面でのつながりと比較することも興味があると考えたからである。

## 実験材料及び方法

1. phage *Salmonella* 菌及び赤痢菌の分離株又は保存株をプロタミラーゼ加ブイオンに 37°C, 24 時間培養し, そのシャンペラン濾液から Phage を分離したのち平板にひろげ, 単個の無菌孔をひろつて継代することを 2 回くり返えしたうえ, ブイオンで増強し, このシャンペラン濾液を原液としてアンプルに封入し氷室に保存した。今回の実験にさいしては各 Phage とも継代することなしに同一の原液を使用した。実験用の稀釈 Phage 液は後述の方法で宿菌について試験したさいに, 融合した溶菌を示す最高の稀釈を用いた。この場合, 稀釈には生理食塩水もしくはリンゲル液を用い, 氷室に保存した。稀釈液の保存にともなう力価の低下度は株によつてことなるが, 4 ヶ月程度は使用し得た。

51 株の Phage が分離されたが, 中和試験による分類の結果, 42 株が 6 つの群に大別され, host-range の点では 40 株が 7 群に大別された。今回の実験においてはこれらの Phage のうち host-range のことなるものをえらんで使用した。

2. 赤痢菌株 Typing の対象として用いた菌は約 700 株で, *Shigella flexneri* 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, X, Y の諸菌型を含む。1954 年 1 月以降の東京都, 埼玉県, 群馬県下分離株である。

3. 実験方法 被検菌の培養をブイオンに移し, 37°C に 1 晩培養し, その 0.1~0.2 cc をあらかじめ表面を乾燥させた普通寒天平板上にガラス棒で塗布し, 乾燥を待つて, 1 白金耳づつの稀釈 Phage 液を適当な順序と間隔で円形に塗抹する (直径約 1 cm)。注射器の針先から Phage 液を滴下する方法も行つたが, 此の方法によれば最少約 0.01 cc の量を比較的正確に滴下し得るが, 平板上で液が拡がるため三寸シャーレー一枚につき 16 株程度の Phage を用いるのが限度であろう。白金耳を用いれば 36 株ぐらゐは容易である。

Phage を塗抹した平板は 37°C, 1 晩培養ののち溶菌の程度を記載する。記載の方法は、完全に融合した溶菌を示すものを 3, 多少なりとも溶菌斑をみとめるものを 2, 溶菌斑はないが Phage の作用によると思われる何等かの徴候がみとめられる場合には 1, 全くみとめられないものを 0 とする。

### 実験結果

1. 分離株の菌型別の phage type [Table] 1b は他の菌型に比べ溶かされ難く、供試 65 株のすべてが同一の型を示した。267 株の 2a は 3 型に大別された。なお、これらの型のうちのあるもの間には血清学的にも差がみとめられた。232 株の 2b, 14 株の 3b は夫々 1 つの型に属した。91 株の 3a のうちマンニト非分解性の 1 株以外は、使用したすべての Phage によつて溶かされた。X 及び Y は他の菌型に比べて溶菌が不揃いであつて、既述の記載方式による 1 乃至は 2 のような不完全溶菌を示すものが多い。なお D 群の Sonne 菌は使用したいずれの Phage によつても溶かされなかつた。

Table Phage Sensitivity of Isolated Flexner Dysentery Strains

	Bacteriophage							Number of strains
	2	3	5B	6	7	8	13	
Sh. flex. 1a	0	0	—	0	—	—	3	2
" " 1b	0	0	—	0	—	—	2~3	60
	0	0	0	0	0	0	2~3	5
" " 2a	0	3	—	0	—	—	3	76
	0	0	—	0	—	—	3	167
	0	0	—	0	—	—	0	24
" " 2b	3	3	3	3	0	3	3	58
	3	—	—	—	—	—	—	174
" " 3a	3	3	3	3	3	3	3	15
	3	3	—	—	3	—	3	75
	0	0	0	3	3	3	0	1*
" " 3b	3	3	3	2~3	3	3	3	8
	3	3	—	2~3	3	—	3	6
" " var. X	3	3	1~3	3	0	3	3	5
	3	3	0	3	0	0	3	3
	1	3	3	3	3	3	3	1
" " var. Y	3	3	0	3	0~1	1~3	2~3	8
	3	3	1	3	3	3	3	1
	3	3	0	3	0	0	3	1

3 : Confluent lysis

0 : No sign of phage action

2 : Isolated plaques

\* Mannitol (-)

1 : No plaque, but any sign of phage action

2. 培養条件による phage type の変化 a) 普通寒天斜面での継代 : 2a 3 株, 2b 及び 3b 各 1 株をそれぞれ普通寒天斜面に 1 週間の間隔をおいて 4 代継代した場合, Phage type の変化はみとめられなかつた。

b) プイヨンでの長期間培養 : 1b 4 株, 2a 2 株, 2b 1 株をプイヨンに 37°C, 2 週間培養したのち平板にひろげ、外観を異にする集落をひろつた場合には、すべての例において異つた Phage type を示すものが得られた。

3. 同一人から時を異にして分離された菌株の Phage type の比較 2a の保菌者 1 例, 2b 4 例, 3a 2 例について夫々数回にわたつて分離された菌株の Phage type をしらべた結果、同一人については夫々同一の型を示した。

菌の分離回数は各人について2~5回で、期間は最長4ヶ月であった。

4. 同一家族内において同時に分離された菌及び集団発生時の分離株について Phage type をしらべた結果、少数の例については異なつた型の菌が検出された。

5. 赤痢菌以外の菌の phage type 糞便をSS寒天平板上に塗布し、生じた集落のうち40個(乳糖分解性或いは非分解性のものを1名につき1個づつ)を任意にえらんで Phage type をしらべた結果、使用した12種の Phage のうちのいずれか1株によつて溶かされたもの3株、2種乃至3種の Phage によつて溶かされたもの夫々1株づつがあつたほか2aの示す型のうちの1つに相当するものが1株あつて、この株は血清学的に2aと同定された。要するに40個の集落のうち34個はいずれの Phage に対しても感受性を示さなかつた。

## 考 察

Felix 等がチフス菌の typing に用いたものは、1種の Phage を種々の宿菌に adapt させることによつて得られた一連の Phage 群であつて、型特異性がきわめて強いものであるが、我々が今回の実験で分離した Phage のうちにはこのように特異性の強いものは見出されなかつた。また宿菌を変えることによつてもその目的を達しなかつた。したがつて我々が今回行つた typing は、いわゆる Phage-Pattern をしらべるという方式によるものである。

Phage を利用する菌の分類法の1つとして、菌がどのような種類の Phage を lysogenic の状態で保有しているかをしらべることによつて菌を分類しようという試みがあるが、lysogenic の状態にある Phage のすべてを確実にとり出す方法は現在のところ知られていないので、此のような方法は実施困難である。

今回の実験の結果から、同一血清型の菌(2a, X, Yを除く)は夫々均一の溶菌型を示すこと、1a, 1b及び2aの一部が同一の型を示すこと、及び2aにはいくつかの Phage type があることが明らかとなつた。また2aの示す Phage type の一部の間には抗原的な差異を見出すことが出来たことは興味深いことである。2bの Phage type が均一であるのに反して2aのそれが複雑であることは我国における前者の流行が未だ新しく、一方2aは古くから流行していたことと関係があるかもしれない。

Phage type はかなり安定なものようであるから、分離後数代植え継いだものについて得られた結果をもつて、分離当初に得られたであろう成績としてよいと思うが、確認培養の菌について検査するのが最も良いであろう。いずれにしてもブイオン培養の時間は24時間以内がよい。また Phage の test-dilution の決定も比較的容易であるから、ある程度の条件を守りさえすれば、一定の結果を得ることは困難ではない。

人から人への伝染にさいしても、また同一人の腸管内でも Phage type が変化することは比較的少ないものようであるから、感染経路の追及というような目的には、従来の血清学的手技と併用してかなりの利用価値がある。集団発生時に分離された幾株かの菌のうち異なる型を示す少数の菌が見出されることがあるという事実は、赤痢菌が我国内に広く蔓延しているために他系統の菌が混ざつているためと解釈したい。

要するに、今回の実験の結果から見れば、Phage を用いてB群の赤痢菌を分類することが可能である。ただし、2a以外の菌を分類し、また2aも更にこまかく分類するためには今回と異つた方法で Phage を分離して使用する必要がある。その理由は、まえにものべた通り、今回分離した51株の Phage の大部分が host-range の上でわずかに7群に大別されたにすぎないからである。

此の実験に用いた Phage はB群赤痢菌に対して、かなり特異的に作用するようであるから、菌の同定に利用することも可能であろう。

## 結 論

51株の Phage を用いて、約700株のB群赤痢菌の溶菌型をしらべた結果、各血清型は比較的均一な型を示した。しかし2aは3型に分けられた。1a, 1b及び2aの一部が同一の型を示すことは興味深い。3aは使用した Phage のすべてに対して感受性を持つていた。

溶菌型は試験管内でもまた生体内でも比較的安定である。

Phage typing はB群赤痢菌についても有望と考えられる。

終りにのぞみ、多数の菌株を分与くださった東京、埼玉、群馬の各衛生研究所に感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) F.M. Burnet and Margot Mc Kie : Bacteriophage reactions of flexner dysentery strains, J. Path. Bact., 33, 637~646, 1930.
- 2) J.S.K. Boyd : Bacteriophage typing and epidemiological Problems, Brit. Med. J., I : 4786~4792, 1952.
- 3) Hammarström : Acta Med. Scand., 133, Suppl., 223,
- 4) K.E. Cooper and A. Mayr-Harting : Phage typing and epidemiology of shigella dysenteriae Sonne, Brit. Med. J., I : 271~272, 1951.

## Summary

Fifty-one strains of bacteriophage were isolated, and phage sensitivity of about 700 strains of freshly isolated flexner dysentery bacilli were tested.

Each serotype belonged to a single phage type, but sh. flex. 2a was divided into three phage-types.

It was very interesting that all strains of sh. flex. 1a, 1b, and about 63 per cent of sh. flex. 2a belonged to a same phage-type.

Almost all strains of sh. flex. 3a were sensitive to all bacteriophages tested.

The phage-type of flexner dysentery bacilli proved rather stable in vitro and in vivo.

Practical applications of bacteriophage for the typing of flexner dysentery bacilli are very promising.

Received April 16, 1955

*Claviceps purpurea* TUL. に対する普通小麦の抵抗性の

## 品種間差異とアルカロイド含量

川谷 豊彦

## Varietal Difference of Resistance in Common Wheat to

*Claviceps purpurea* TUL. and Content of Alkaloids

By Toyohiko KAWATANI

まえがき 1952年1月, 2月カナダから輸入された小麦約67,000トンに麦角を混じ食品衛生上の問題となつたことがあつた。当時, 小麦穀粒に対する麦角混入率は0.0004—0.005%平均0.003%と言われる。著者の分析によれば総アルカロイド含量は0.251—0.555%であつた (Table I)。又カナダ産小麦に自然発生した麦角のそれは0.224—0.518%でかなりの高低を示している (Table I)。

小麦に寄生する麦角菌は *Claviceps purpurea* TUL. で, ライ麦を冒すものと同一生態種 (BARGER の方式に従えば *cl*) とされている。本邦に於ける小麦麦角の発生は1940年岩手県下で発見の1例があるだけで<sup>1)</sup>, 外国に於ても小麦に麦角の発生は稀であり, 被害もライ麦程甚しくないと言われる。著者が曾つて小麦について開花時に注射接種した実験によれば, ライ麦の場合の寄生率 (麦角菌に冒された小花の百分率) の80.89—86.99%に対し, 小麦の場合は20.55—23.83%で<sup>1)</sup>, 小麦はライ麦より抵抗性が大きいことを示している。又1949年小麦 (農林26号) に噴霧法を以つて1日3回6日間接種した場合10アール当り麦角収量は0.330kgであり, ライ麦の場合の11.475—36.354kgに対し遙かに少く<sup>2)</sup>, 前記のことを裏書する。

麦角をライ麦で寄生的栽培する場合, 当然近傍に栽培される小麦に伝染する可能性があるが, 前記からその可能性としても非常に少いことをも曾つて報告した<sup>2)</sup>。

かくて著者は食品衛生上の理由から又作物保護上の見地から, 本邦の代表的な普通小麦117品種を蒐集し, 麦角菌 *Cl. purpurea* に対する小麦の抵抗性の品種間差異及び総アルカロイド含量について調べたので, その結果を茲に報告する。

本研究を遂行するに当り小麦種子を分譲された農林省各地域農業試験場及び都道府県各農業試験場の各位に対し敬意を表する。又研究を援助された大野忠郎技官と田中美栄子嬢に謝意を表する。

Table I. Content of Total Alkaloids of Wheat Ergot from Canada

No.	Place collected	Collector	Date collected	Date received	Date analysed	Content of total alkaloids(%)*
1	Unknown (mixed in imported wheat in 1952)	Inspector of Osaka Branch, National Hygienic Lab.	Crop in 1951?	31/I 1952	12/II 1952	0.251
2	"	"	"	"	4/III 1952	0.281
3	"	"	"	13/III 1952	22/IV 1952	0.555
4	Kinistino, Sask.	R. J. Ledingham & R. C. Russell	28/VIII 1950	3/X 1950	18/III 1952	0.518
5	Indian Head, Sask.	R. J. Ledingham & R. D. Tinline	8/X 1950	"	"	0.304
6	Balcarres, Sask.	"	8/X 1950	"	"	0.224
7	Weyburn, Sask.	"	7/X 1950	"	"	0.309
8	Macoun, Sask.	"	6/X 1950	"	"	0.345
9	Redvers, Sask.	"	7/X 1950	"	"	0.380

\* as ergotamine ; on moisture free basis

## 材料及び方法

1. 供試品種 本邦各地より蒐集した代表的な普通小麦117品種で、主として各地方の奨励品種で一部に準奨励品種、有望品種、認定品種を含む。対照として供試したライ麦は春日部4号と仮称する品種で短稈早生である。

2. 供試菌株 B<sub>12-3</sub>. 米国産ライ麦寄生麦角より分離したもので高アルカロイド含量を示す優秀菌株。

3. 栽培経過 1953年10月31日播種。1品種の栽培畦長は小麦3m, ライ麦10m. 10アール当り肥料(基肥のみ), 堆肥120貫, 硫安7.4貫, 過石9.2貫, 硫加3.2貫. 中耕2回, 除草3回, 踏圧3回, 土入2回。

4. 実験方法 小麦がなかば出穂し開穎し始めてから終る迄の開穎期間中, 4月22日より5月24日迄, 1日3—15回平均8.1回, 5—16日間平均9.7日, 噴霧法により接種した。孢子密度1mm<sup>3</sup>当り1,000個. pH 5.0. 1品種1日当りの使用液量1,330cc. ライ麦は開穎期間中, 5月3日より5月17日迄, 1日5—13回平均7.8回, 15日間, 小麦の場合と同様にして噴霧法で接種した。

5. 調査項目 普通の如くして収穫して次の各項を調査した。

(1) 寄生穂率: 100穂当りの麦角菌寄生穂。

(2) 麦角混入率: 穀粒100g中の麦角重量(g)。

又麦角菌感染を認めた小麦品種50を採り、この各品種について麦角発生穂10—20を無作意に採り次の事項を調査した。

(3) 1穂当り麦角数

(4) 1穂当り麦角重量(g)

(5) 総アルカロイド含量: 竹本の0.1g法による<sup>3)</sup>。小麦は1品種1検体宛, ライ麦は20検体について分析した。

Table II. Varietal Difference of Resistance in Common Wheat to *Claviceps purpurea* TUL. and Content of Total Alkaloids in Comparison with those of Rye

No.	Variety (wheat)	Producing district	Period of inoculation (1954)	No. of infected ears per 100 ears	Wt. (g.) of ergot per 100 (g.) of wheat corn	Infected ear		Content of total alkaloids (%)*
						No. of ergot per ear	Wt(g.) of ergot per ear	
1	Nôrin-3-gô	Hokkaido	18/V—24/V	0	0	0	0	
2	Nôrin-29-gô	"	1/V—12/V	0	0	0	0	
3	Nôrin-35-gô	"	2/V—13/V	0.39	0.037			
4	Nôrin-75-gô	"	2/V—13/V	0.78	0.024			
5	Hokkai-178-gô	"	6/V—21/V	0.08	0.012			
6	Nôrin-1-gô	"	1/V—8/V	0.85	0.033			
7	Nôrin-62-gô	"	8/V—13/V	0.20	0.017			
8	Akakawa-aka-1-gô	"	13/V—21/V	0.22	0.026			
9	Dôson-1-gô	"	18/V—24/V	0	0	0	0	
10	Akasabishirazu-1-gô	"	18/V—24/V	0	0	0	0	
11	Honkei-300-gô	"	18/V—24/V	0.25	0.010			
12	Nôrin-27-gô	Aomori	4/V—16/V	1.12	0.381	2.3	0.108	0.496
13	Nôrin-31-gô	"	5/V—12/V	0	0	0	0	
14	Nôrin-58-gô	"	5/V—12/V	0.87	0.056	1.0	0.049	0.486
15	Nôrin-66-gô	"	2/V—11/V	0.27	0.010			
16	Mutsubenkei	"	8/V—16/V	0	0	0	0	
17	Tôhoku-97-gô	Iwate	10/V—19/V	0.57	0.037			
18	Tôhoku-103-gô	"	6/V—16/V	0.12	0.072			
19	Nôrin-33-gô	"	28/IV—6/V	7.92	0.345	2.0	0.116	0.574
20	Nôrin-39-gô	"	6/V—14/V	0.23	0.007			
21	Nôrin-55-gô	"	2/V—10/V	1.20	0.116			

No.	Variety (wheat)	Producing district	Period of inoculation (1954)	No. of infected ears per 100 ears	Wt. (g.) of ergot per 100(g.) of wheatcorn	Infected ear		Content of total alkaloids(%)*
						No. of ergot per ear	Wt.(g.)of ergot per ear	
22	Hokuriku-39-gô	Iwate	4/V-11/V	0	0	0	0	
23	Nôrin-6-gô	Miyagi	4/V-14/V	0	0	0	0	
24	Nôrin-16-gô	"	1/V-5/V	0.32	0.008			
25	Nôrin-57-gô	"	24/IV-6/V	6.89	0.518	1.9	0.115	0.410
26	Nôrin-24-gô	Akita	2/V-10/V	1.66	0.105	1.6	0.059	0.498
27	Furutsu-1-gô	"	2/V-10/V	0.88	0.046			
28	Nambu-komugi	"	28/IV-6/V	0	0	0	0	
29	Hokuriku-33-gô	"	4/V-12/V	1.23	0.360			
30	Nôrin-10-gô	Yamagata	8/V-16/V	0	0	0	0	
31	Nôrin-17-gô	"	4/V-12/V	0	0	0	0	
32	Nôrin-38-gô	"	26/IV-5/V	3.61	0.211	2.2	0.088	0.423
33	Nôrin-81-gô	"	1/V-8/V	0	0	0	0	
34	Aoba-komugi	"	28/IV-8/V	0	0	0	0	
35	Hokuriku-34-gô	"	4/V-11/V	0	0	0	0	
36	Nôrin-64-gô	Fuku-shima	28/IV-5/V	0.51	0.029			
37	Nôrin-69-gô	"	29/IV-5/V	1.62	0.074			
38	Hokuriku-37-gô	"	2/V-8/V	0.36	0.025			
39	Yukichabo	"	3/V-8/V	0.48	0.036			
40	Nôrin-44-gô	Ibaragi	26/IV-6/V	0	0	0	0	
41	Nôrin-50-gô	"	26/IV-5/V	0	0	0	0	
42	Nôrin-67-gô	"	2/V-8/V	0.61	0.033			
43	Nôrin-70-gô	"	4/V-12/V	0	0	0	0	
44	Shirosaya-ibaragi-2-gô	"	26/IV-6/V	5.92	0.412	1.6	0.067	0.610
45	Sekikan-ibaragi-1-gô	"	11/V-19/V	1.80	0.142			
46	Nôrin-61-gô	Tochigi	24/IV-3/V	8.77	0.690	1.4	0.106	0.640
47	Yûyake-komugi	"	1/V-8/V	0.69	0.034			
48	Tochigi-sekitori-1-gô	"	26/IV-4/V	7.13	0.645	1.8	0.087	0.538
49	Nôrin-68-gô	Gumma	26/IV-4/V	6.41	0.273	1.9	0.068	0.476
50	Nôrin-26-gô	Saitama	24/IV-3/V	3.81	0.217	2.0	0.076	0.751
51	Saitama-27-gô	"	26/IV-6/V	2.04	0.091			
52	Nôrin-9-gô	Chiba	26/IV-5/V	0.31	0.015			
53	Nôrin-53-gô	Tôkyô	26/IV-5/V	10.67	0.841	3.0	0.141	0.525
54	Shônan	Kanagawa	26/IV-5/V	0.20	0.013			
55	Tôkai-51-gô	"	26/IV-5/V	6.18	0.346	2.2	0.091	0.570
56	Nôrin-54-gô	Niigata	24/IV-6/V	12.87	1.045	2.9	0.153	0.640
57	Hokuriku-35-gô	"	5/V-11/V	0	0	0	0	
58	Hokuriku-30-gô	Toyama	26/IV-4/V	3.75	0.719	3.2	0.140	0.582
59	Hokuriku-31-gô	"	3/V-10/V	0.58	0.043			
60	Nôrin-15-gô	Ishikawa	3/V-14/V	0	0	0	0	
61	Nôrin-25-gô	Fukui	26/IV-6/V	10.85	1.000	3.4	0.158	0.577
62	San-in-42-gô	"	3/V-12/V	0	0	0	0	
63	Nishimura	"	1/V-8/V	3.73	0.147	0.8	0.058	0.584
64	Nôrin-4-gô	Yamana-shi	26/IV-4/V	1.93	0.039	1.1	0.039	0.493
65	Nôrin-72-gô	"	24/IV-5/V	0.98	0.034			

No.	Variety (wheat)	Producing district	Period of inoculation (1954)	No. of infected ears per 100 ears	Wt.(g.) of ergot per 100(g.) of wheatcorn	Infected ear		Content of total alkaloids(%)*
						No. of ergot per ear	Wt.(g.) of ergot per ear	
66	Susono-komugi	Yamanashi	3/V-12/V	0	0	0	0	
67	Nôrin-43-gô	Gifu	24/IV-4/V	19.55	1.470	2.5	0.104	0.487
68	Wasekomugi-26-gô	"	26/IV-5/V	10.08	0.592	2.0	0.078	0.561
69	Gifu-komugi-1-gô	"	1/V-8/V	1.19	0.059			
70	Gifu-komugi-3-gô	"	1/V-10/V	0.84	0.041			
71	Nôrin-59-gô	Shizuoka	26/IV-6/V	5.85	0.303	2.5	0.087	0.430
72	Nôrin-30-gô	Aichi	24/IV-6/V	9.27	0.701	1.3	0.097	0.465
73	Satsuki	"	26/IV-6/V	0.56	0.036			
74	Akabôzu	"	28/IV-8/V	1.16	0.057			
75	Nôrin-32-gô	Mie	28/IV-8/V	1.20	0.027	1.1	0.043	0.461
76	Nôrin-34-gô	"	26/IV-5/V	5.73	0.253	1.9	0.084	0.536
77	Nôrin-47-gô	Shiga	26/IV-5/V	6.75	0.352	1.5	0.097	0.511
78	Igachikugo-2-gô	Kyôto	26/IV-5/V	0.93	0.037			
79	Kyôto-aka-komugi	"	1/V-8/V	4.02	0.108	1.1	0.042	0.510
80	Nôrin-23-gô	Ôsaka	24/IV-6/V	8.85	0.247	1.5	0.057	0.546
81	Nôrin-52-gô	Hyôgo	26/IV-5/V	3.31	0.093	1.8	0.068	0.442
82	Shin-nakanaga	"	26/IV-6/V	3.25	0.093	1.2	0.058	0.555
83	Nakae	"	26/IV-3/V	4.42	0.303	1.6	0.110	0.569
84	Seikai-77-gô	"	24/IV-6/V	1.18	0.037	1.8	0.058	0.428
85	Nôrin-63-gô	Nara	24/IV-6/V	2.43	0.037	1.1	0.031	0.366
86	Nôrin-19-gô	Wakaya- ma	24/IV-3/V	2.98	0.076	1.2	0.051	0.443
87	Nôrin-56-gô	"	28/IV-4/V	1.69	0.072	1.3	0.074	0.517
88	Nôrin-73-gô	Tottori	1/V-6/V	1.2	0.042	1.0	0.040	0.604
89	Hiraki-komugi	"	28/IV-6/V	1.39	0.069			
90	Nôrin-71-gô	Shimane	29/IV-4/V	0.63	0.032			
91	Shikoku-84-gô	"	26/IV-3/V	3.48	0.184	2.2	0.100	0.643
92	Nôrin-46-gô	Okayama	23/IV-3/V	0.74	0.030			
93	Nôrin-83-gô	"	26/IV-3/V	4.20	0.125	1.6	0.059	0.453
94	Hatakeda-komugi	"	24/IV-4/V	0.71	0.035			
95	Seichiko	"	28/IV-6/V	1.2	0.059			
96	Shikoku-65-gô	Hiroshima	23/IV-3/V	28.85	3.84	4.1	0.142	0.396
97	Nôrin-20-gô	Yamagu- chi	23/IV-3/V	7.46	0.294	1.7	0.078	0.479
98	Nôrin-74-gô	"	28/IV-4/V	2.31	0.043	1.1	0.032	0.443
99	Nôrin-65-gô	Toku- shima	2/V-8/V	0	0	0	0	
100	Nôrin-51-gô	Kagawa	23/IV-4/V	23.13	1.831	2.2	0.134	0.582
101	Shikoku-87-gô	"	23/IV-3/V	4.44	0.115	1.6	0.054	0.585
102	Iyo-komugi	Ehime	22/IV-5/V	25.46	1.794	2.9	0.108	0.543
103	Nôrin-49-gô	Kôchi	26/IV-5/V	4.46	0.260	2.1	0.098	0.588
104	Ebisu-komugi	"	26/IV-3/V	1.31	0.043			
105	Seikai-93-gô	"	26/IV-6/V	2.64	0.076	1.8	0.040	0.471
106	Eshimajinriki	Fukuoka	26/IV-4/V	8.84	0.431	1.2	0.072	0.543
107	Nôrin-45-gô	Saga	24/IV-3/V	6.58	0.162	1.2	0.099	0.368
108	Nagasaki-komugi	Nagasaki	26/IV-5/V	12.94	1.339	2.5	0.164	0.391

No.	Variety (wheat)	Producing district	Period of inoculation (1954)	No. of infected ears per 100 ears	Wt.(g.) of ergot per 100 (g.) of wheat corn	Infected ear		Content of total alkaloids (%)*
						No. of ergot per ear	Wt.(g.) of ergot per ear	
109	1-gô-haya-komugi	Kuma-moto	26/V—6/V	0.88	0.043			
110	Shirobumbu	"	6/V—14/V	0.41	0.020			
111	Nôrin-2-gô	Ôita	3/V—16/V	0.59	0.031			
112	Shirobôzu	"	4/V—16/V	0	0	0	0	
113	Nôrin-36-gô	Miyazaki	23/V—4/V	0.47	0.024			
114	Nôrin-60-gô	"	26/V—6/V	3.64	0.142	1.4	0.064	0.401
115	Nôrin-80-gô	"	1/V—8/V	6.4	0.207	1.7	0.046	0.400
116	Sadabôzu-1-gô	"	2/V—8/V	0	0	0	0	
117	Hatamasari	Kago-shima	28/V—11/V	1.95	0.098			
Mean :				4.02	0.277	1.8	0.084	0.512
Kasukabe-4-gô (rye)			3/V—17/V	94.24	21.89	7.1	0.305	(0.373—0.628) 0.516

\* as ergotamine ; on moisture free basis

#### 実験結果及び論議 (Table II)

供試した小麦 117 品種の内、麦角菌の寄生を全然認めないものが 24 品種 (総数の約 1/5)、残りの 93 品種 (総数の約 4/5) に寄生が認められその寄生穂率は 0.08—28.85% 平均 4.02% であった。これをライ麦の 94.24% に比較すれば著しく低いことが解る。

麦角発生の状況を重量的に麦角混入率から見れば、麦角の発生のない 24 品種を除き、0.007—3.84% 平均 0.277% を示し、ライ麦のその 21.89% に比較すれば著しく少い。ソ連ではライ麦に麦角の混入は 0.15% 迄差支えないとのことであるから、一応基準をここに置くならば、混入率 0.15% 以上を示す品種は 33 品種 (総数の 28%) あつて、食品衛生上及び作物保護上から看過できない。

1 穂当りの麦角数及び 1 穂当りの麦角重量について見るに、小麦の場合は夫々 1.0—4.1 個平均 1.8 個、0.031—0.164g 平均 0.084g で、これらをライ麦の夫々の平均 7.1 個、平均 0.305g に比較すれば著しく麦角の発生が少い。

小麦麦角の平均 1 個体重量は 0.046g で、ライ麦のその 0.043g と大差を認めない。麦角の色彩についても両者はほぼ同様であつた。

小麦麦角の総アルカロイド含量は 0.366—0.751% 平均 0.512% で、ライ麦麦角のその 0.373—0.628% 平均 0.516% とほぼ同様であつた。これは寄主を異にしても同一菌株により得られた麦角がほぼ同様のアルカロイド含量を持つことを示すもので興味深い。著者は嘗つて *Cl. litoralis* の同一菌株を以つて大麦及びハマニソクに得られた麦角の場合も両者はほぼ同様のアルカロイド含量を示した<sup>4)</sup>。

かくして小麦の *Cl. purpurea* に対する抵抗性はライ麦よりも大きく、品種の間に甚しい相違のあることが明らかにされた。自然状態で小麦がライ麦より冒され難い理由について、STÄGER (1923)<sup>5)</sup> は小麦は開穎時間が短く (15分) 柱頭は短く閉じ込められたままに止まることであると、FORLANI (1946)<sup>6)</sup> はライ麦は他家授粉で開穎するに対し小麦は自家授粉で開穎せず麦角菌胞子の発芽と生育には授精子房を必要とするとしている。小麦の開穎時間はライ麦より短いとするのは必ずしも当たらない。ライ麦の開穎時間は普通 57—73 分、小麦の場合は北海道に於て南及び御園生によれば 13—107 分平均 47 分、山口の台湾に於ける観察によれば 30—168 分平均 86 分 (1号熊本) 及び 10—106 分平均 55 分 (江島神力) であり、小穂により気象状態により相当著しい偏差がある<sup>7)</sup>。著者が No. 111 (農林 2号) について観察したところによると 83—90 分平均 87 分であつた。尚この品種について、ライ麦と同様に、手指による摩擦刺激によつて 3—5 分後に入為的開花 (開穎) が可能であつた。著者が供試した 117 品種は、開穎の微弱なものから顕著に開穎するもの迄程度に差異はあるが全品種に開穎を認めることができた。開

穎の顕著なものはその角度もライ麦にあえて劣らない。それにも拘らず麦角菌に無感染のものが24品種あつたことは前記の通りである。開穎の特に顕著な品種、例えば No. 38 (北陸37号), No. 42 (農林67号), No. 55 (東海51号), No. 58 (北陸30号), No. 63 (西村), No. 75 (農林32号) No. 108 (長崎小麦), No. 111 (農林2号) に於てすら、麦角の発生は混入率で0.025—1.339% (平均0.334%) を示し激しい品種間差異を認め、勿論ライ麦には遠く及ばない。このことははしがきで述べたように、著者が注射接種によつて指摘したこと即ち小麦の寄生率がライ麦のそれより著しく低いこととを裏書するものである。然して小麦がライ麦より麦角菌に対する抵抗力が大きく激しい品種間差異を示すことは、小麦の開花の特性によるのみでなくむしろ先天的素因によるものと解される。従つてライ麦による *Cl. purpurea* 麦角の寄生的栽培を実施するに当つて近傍の小麦に対する伝染の問題に関しては、その品種の開穎性のみでなく麦角菌に対する先天的素因としての抵抗力(罹病性)を考慮に入れねばならない。

### 摘 要

1952年カナダから輸入された小麦に麦角を混じ食品衛生上の問題となつたことがあつた。一般に小麦の麦角は稀であり、被害はライ麦より少いとされ、本邦には1940年に岩手県下に発生した1例を除いては知られていない。著者は食品衛生上及び作物保護上の見地から、本邦の代表的普通小麦117品種を用いて、米国産ライ麦麦角菌 *Claviceps purpurea* TUL. から分離した同一菌株を以つて噴霧法により接種し、麦角菌に対する小麦の抵抗力の品種間差異及び総アルカロイド含量を調べた。

1. 小麦の *Cl. purpurea* に対する抵抗力はライ麦より著しく大きい。このことは曾つて著者により注射接種によつても認められた。

2. 小麦の *Cl. purpurea* に対する抵抗力は品種間差異が甚しい。

3. 供試117品種の内24品種(総数の約1/5)は麦角菌の感染なく、残り93品種(総数の約4/5)に感染が認められた。

(1) その寄生率率は0.08—28.85% 平均4.02% で、ライ麦の94.24% に比し著しく低い。

(2) 麦角混入率から見れば0.007—3.84% 平均0.277% を示し、ライ麦の21.89% より著しく低い。

(3) 1穂当りの麦角数及び1穂当りの麦角重量は夫々1.0—4.1個平均1.8個、0.031—0.164g 平均0.084g であり、これに対しライ麦は夫々平均7.1個、平均0.305g であつた。

(4) 小麦麦角の平均1個体重量は0.046g ライ麦のそれは0.043g で両者の間に大差を認めなかつた。

4. 供試117品種は程度に差はあるが総てに開穎を認めた。開穎時間及び開穎角度も必ずしもライ麦に劣らない。にも拘らず前記の様に麦角菌に感染しない品種があること、他方、開穎の特に顕著な品種に於ても麦角菌感染に激しい品種間差異(混入率で0.025—1.339% (平均0.334%)) を示した。これらは、小麦が *Cl. purpurea* に対しライ麦より抵抗力の大きいこと及び激しい品種間差異を示すことは小麦の開花の特性によるのみでなくむしろ先天的素因によることを示唆すると解される。

5. 小麦麦角の総アルカロイド含量は0.366—0.751 平均0.512%、ライ麦のそれは0.373—0.628% 平均0.516% で、両者に殆んど差異を認めなかつた。同一菌株による麦角が寄主を異にしてもほぼ同一のアルカロイド含量を示したことは興味深い。

### 文 献

- 1) 川谷豊彦(1951): *Claviceps litoralis* KAWATANI による麦角の寄生的栽培に関する研究(其の3) 衛生試験報 69: 165—221.
- 2) 川谷豊彦(1954): 麦角の寄生的栽培 医学のあゆみ 17: 44—49; 122—128; 196—207.
- 3) 竹本常松(1944): 内外野生麦角の「アルカロイド」含有調査(第2報) 定量試験 薬誌 64: 228—231.
- 4) 川谷豊彦(1948): ハマニシク麦角に関する研究(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.
- 5) STÄGER, R. (1923): Impfversuche mit dem Mutterkorn des Weizens. Mitt. Naturf. Ges. Bern, 1922, pp. 11—20. (Bot. Abst. 13: 282. No. 1911.)
- 6) FORLANI, R. (1946): Sterilità in alcune graminacee e infezioni da *Claviceps* sp. Genetica Agraria 1 (Fasc.2): 218—224.
- 7) 永井威三郎(1947): 実験作物栽培各論 第1巻 禾穀類篇 540pp. 第5版 東京: 養賢堂より引用

## Summary

Ergot was found to mingle in wheat imported from Canada in 1952, and this was the topic of interest from the point of view of food hygiene. It has been said that ergot of wheat is very rare and is not usually so severe as that of rye. In this country, however, no ergot of wheat has ever been known except an instance occurred in Iwate Prefecture in 1940. From the standpoint of food hygiene and plant protection, varietal difference of resistance in common wheat to *Claviceps purpurea* TUL. was examined by spraying inoculation with the same strain of *Cl. purpurea* separated from the rye ergot of American origin, using 117 typical varieties of common wheat cultivated in this country. At the same time the content of total alkaloids (as ergotamine) was also examined.

1. Resistance in common wheat to *Cl. purpurea* is far greater than that in rye. This was also confirmed by the author with injecting inoculation (Bull. Nat. Hyg. Lab., 69, 165—221, 1951.).

2. There is extreme varietal difference of resistance in common wheat to *Cl. purpurea*.

3. Of 117 varieties examined, 24 ones (about a fifth out of the total) showed no infection; 93 ones (about four fifths out of the total) showed various degrees of infection.

(1) The number of infected ears per 100 ones was 0.08—28.85(%) (Mean: 4.02(%)), while that of rye was 94.24(%)

(2) The weight (g.) of ergot per 100 g. of wheat corn was 0.007—3.84(%) (Mean: 0.277(%)), while that of rye was 21.89(%)

(3) The number and the weight (g.) of ergot per ear were 1.0—4.1 (Mean: 1.8), 0.031—0.164g. (Mean: 0.084g.), respectively, while those of rye were 7.1, 0.305g., respectively.

(4) The average weight of single ergots was 0.046g., while that of rye was 0.043g. There was little difference between the two.

4. The opening of glumes was observed in all 117 varieties examined, though degrees of opening being various. The duration and the angle of opening of glumes in wheat were not always less than those in rye. Nevertheless, as written above, there were 24 varieties showing no infection; on the other hand, there were some varieties with widely opened glumes (such as varieties of nos. 38, 42, 55, 58, 63, 75, 108, and 111) showing extreme varietal difference of infection, the weight (g.) of ergot per 100g. of wheat corn being 0.025—1.339(%) (Mean: 0.334(%)). These facts suggest that the greater resistance in common wheat to *Cl. purpurea* as compared with rye and extreme varietal difference of resistance in common wheat are attributed not only to the biological peculiarities of the flowers but also to the permanent or natural disposition.

5. The content of total alkaloids in wheat ergot was 0.366—0.751% (Mean: 0.512%), while that of rye ergot was 0.373—0.628% (Mean: 0.516%); there being little difference between the two. It is noteworthy that the same strain produced nearly the same content of alkaloids on the two different hosts.

Received April 30, 1955

## 土壤水分がレモングラスの生育並に含油量に及ぼす影響

宮崎 幸男, 高城 正勝

## Effects of Soil Moisture upon the Growth and the Oil Content of Lemon-grass

By Yukio MIYAZAKI and Masakatsu TAKI

まえがき レモングラスは元来広く熱帯或は亜熱帯地域に栽培されている香料植物でその葉より得られる油は Citral を主成分とし之は萵系の花香を出す Ionone の合成原料として不可欠のものであるが、近年  $\beta$ -ionone より Vitamin A の合成が行われる様になつてレモングラス油の用途が更に拡大されるに至り、我国に於ても第 2 次大戦以後種ヶ島、八丈島等の暖地に於て小規模乍らレモングラスの栽培が行われている。一般に土壤水分が作物の生育に著しい影響を及ぼす事は云う迄もなく既に数多くの研究が行れておりレモングラスに於ても此の事は当然考えられる事である。Hood<sup>1)</sup> は土性に応じて土壤水分の異なる数種の土壤でレモングラスの含油率を比較した結果排水良好な軽い砂土が最も含油率が高い事を報じており彼の研究から土性と關聯して土壤水分が含油率に影響を及ぼす事が暗示される。又 Loustalot 等<sup>6)</sup> 及び Robles 等<sup>7)</sup> は Puerto Rico に於るレモングラスの栽培試験に於て降雨量が植物の生育に極めて著しい影響を及ぼす事を報じ、Guenther<sup>3)</sup> も比較的近年に於る世界の主なレモングラスの産地に於る栽培状況を述べている中で降雨量が植物の生育並に含油量に大なる影響を及ぼす事を報じているが、之等降雨量は必然的に土壤水分と密接な關係があるわけで降雨量の影響は或程度土壤水分の影響と看做す事が出来る。次に Jones 等<sup>5)</sup> はハイチで灌漑が非常に成功している事、Guenther<sup>3)</sup> は同島で灌漑の無い場合は 1 年間の収穫回数は 2 回であるのに対し灌漑を行う事により 3 回の収穫が可能になる事を述べ、Bruno 等<sup>1)</sup> はシチリーの非常に乾燥する地域でも灌漑が非常に成功し灌漑によつて取油量が倍加する事を報じているが、之等灌漑の影響は大部分土壤水分の影響と看做してよいと思われる。然し直接土壤水分とレモングラスの生育乃至含油量との關係についての研究は未だ殆ど行われていない様であるので著者等は之等の問題を明かにする目的を以て昭和 28 年伊豆分場に於て本研究を行つた。本研究では尚土壤水分と油の Citral 含量其他 1, 2 の油の物理的性質との關係についても若干の研究を行つた。尚本研究は一部厚生科学研究費の補助の下に行われた事に対し謝意を表す。

材料及び方法 材料 静岡県立有用植物園より分譲された所謂西印度レモングラス *Cymbopogon citratus* Stapf に属すると思われる系統で昭和 28 年 3 月 19 日に一本宛株分して温室内で仮植し生育状態の略々等しい株を撰択供試した。

方法 ポットは内径、深さ共に約 17 cm の磁製燗壺を用い底に含水率 3.35% の風乾砂 600g (深さ約 2cm) を敷きその上に含水率 5.32% の風乾土 3kg 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 本立てその下が底砂に接する様にし給水管とした。

肥料はポット当 N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O 各 0.3g とし夫々硫酸、過燐酸石灰、硫酸加里を用い、又炭酸石灰 10g 宛加用し何れも全上とよく混和した。

土壤水分の區別は容水量に対する%を以てし 100%, 80%, 60%, 40%, 及び 25% の 5 区とした。土壤並に底砂の容水量は夫々 56.39% 及び 36.78% 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。

5 月 26 日に地上 30cm にて切断し深さ約 5cm に定植し直ちに土壤面より 1 l 宛灌水して日蔭に置き其後除々に日光に当て、苗の活着を図つた。ポットは終始硝子室内に置き 6 月 5 日より重量法にて土壤水分の調節を開始したが 40% 及び 25% の両区は未だ水分多く前者は 6 月 13 日後者は 6 月 28 日に至り所定の量に調節可能となつた。其後毎日数回調節を行つたが水は総て井戸水を用いた。又 7 月 7 日より 8 月 5 日迄 2 週間毎に別に栽培した植物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。

供試個体は各区共 6 個体とした。

次に 6 月 9 日に地上 25cm にて切断し其後 1 週間毎に草丈及び 25cm 以上の分蘖数及び葉数の調査を行うと共に 8 月 10~13 日に収穫を行い地上部、地下部の各部の生育状態を調査した。

収穫直後各区共 3 個体を供試し主茎の上位より第 5 番目の葉を用いて葉身、葉鞘の別に生葉の含水率を測定し之

より更に全葉の含水率を計算した。

又生葉を直ちに蒸溜してその含油量を測定したが蒸溜には含水率測定に供試した葉を除き残る全部の葉を用い、蒸溜器は局方精油定量器を使用し蒸溜時間は溜出開始より2時間とした。

次に蒸溜によつて得られた油は各区共全個体の油を合計し無水芒硝で脱水した後 Citral 含量、比重並に屈折率の測定を行つた。Citral 含量の定量は Guenther<sup>2)</sup> の Standard Procedure による Hydroxylamine 法を用い、比重は 1cc 及び 2cc のオストワルド比重瓶により、屈折率はアッペ屈折計により測定した。但し比重は試料の関係で 100%、80%、及び 60% の 3 区のみしか測定を行う事が出来なかつた。

#### 実験結果並に考察

1. 実験期間中の土壌水分の変化 土壌水分の調節を開始した 6 月 9 日より収穫直前迄 1 週間毎に計算した給水量は第 1 表に示す様に 80% 区は総給水量並に 1 回当給水量共に最大であるが該区に於ても 1 回当給水量は 1% 前後に過ぎず 60%、100% の両区では 80% 区と大体近い値を示しているが 40% 区次で 25% 区の順にその値は更に減少している。

Table 1. Amount of Water Supplied in the Course of Soil Moisture Adjustment.

	Jun. 9—Jun. 15					Jun. 16—Jun. 22					Jun. 23—Jun. 29																			
	100%	80%	60%	40%	25%	100%	80%	60%	40%	25%	100%	80%	60%	40%	25%															
Number of times of water supplyment	19	18	18	12	0	29	29	29	22	0	23	23	23	16	16															
Total amount of water supplied (g)	384	380	360	102	0	546	522	498	229	0	303	293	284	155	27															
Amount of water supplied per once	20.2		21.1		20.0		8.5		0		18.8		18.0		17.2		10.4		0		13.2		12.9		12.3		9.7		1.7	
	1.1		1.2		1.1		0.5		0		1.0		1.0		0.9		0.6		0		0.7		0.7		0.7		0.5		0.1	
	Jun. 30—Jul. 6					Jul. 7—Jul. 13					Jul. 14—Jul. 20																			
	100%	80%	60%	40%	25%	100%	80%	60%	40%	25%	100%	80%	60%	40%	25%															
Number of times of water supplyment	29	29	29	20	19	51	51	51	36	28	39	38	38	28	23															
Total amount of water supplied (g)	348	349	322	180	59	810	857	800	393	155	525	567	510	248	100															
Amount of water supplied per once	12.0		12.0		11.1		9.0		3.1		15.9		16.8		15.7		10.9		5.5		13.5		14.9		13.4		8.9		4.3	
	0.7		0.7		0.6		0.5		0.2		0.9		0.9		0.9		0.6		0.3		0.7		0.8		0.7		0.5		0.2	
	Jul. 21—Jul. 27					Jul. 28—Aug. 3					Aug. 4—Aug. 10																			
	100%	80%	60%	40%	25%	100%	80%	60%	40%	25%	100%	80%	60%	40%	25%															
Number of times of water supplyment	81	81	81	68	41	90	91	91	90	50	81	82	82	80	42															
Total amount of water supplied (g)	1,099	1,248	1,117	562	265	1,195	1,615	1,433	647	339	997	1,582	1,419	629	339															
Amount of water supplied per once	13.6		15.4		13.8		8.3		6.5		13.3		17.7		15.7		7.2		6.8		12.3		19.3		17.3		7.9		8.1	
	0.7		0.8		0.8		0.5		0.4		0.7		1.0		0.9		0.4		0.4		0.7		1.1		1.0		0.4		0.4	
						Whole period																								
						100%	80%	60%	40%	25%																				
Number of times of water supplyment						442	442	442	372	219																				
Total amount of water supplied (g)						6,207	7,413	6,743	3,145	1,284																				
Amount of water supplied per once						14.0		16.8		15.3		8.5		5.9																
						0.8		0.9		0.9		0.5		0.3																

次に植物重による水分の補正值は第2表に示した。之は余り正確とは云えないが収穫時の実際の植物重との差は第3表に示す様に補正值は実際値よりも何れも小さく両者の差は80%区では2.6%で最大であるが60%, 40%, 25%, 100%の各区の順に小さくなっている。従て全期間を通じて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土壤水分の変化はその最も大かつたと思われる80%区で最高4%乃至精々5%位でなかつたかと思われる。次で60%区は之と比較的近い値を示した事と思われるが100%区或は40%区では更に土壤水分の変化は少かつた事は確かで最少の25%区では精々1%前後の変化しなかつたものと思われる。

Table 2. Supplemental Amount (g) of Water Added to the Initial Water-supply per Pot according as the Increase of Plant Weight.

Treatment	Date		
	7/VII	21/VII	5/VIII
100%	33.5 (1.8)	10.1 (0.6)	15.0 (0.8)
80%	33.3 (1.8)	10.1 (0.6)	21.7 (1.2)
60%	30.8 (1.7)	10.1 (0.6)	21.7 (1.2)
40%	14.0 (0.8)	5.0 (0.3)	10.0 (0.5)
25%	4.3 (0.2)	0 (0)	5.0 (0.3)

Table 3. Difference between Assumed Weight and Measured Weight of the Plant at the Harvest Time.

Treatment	Assumed weight-Measured weight	
	g	percentage of water capacity
100%	10.0	0.5
80%	46.0	2.6
60%	40.2	2.2
40%	30.7	1.7
25%	15.1	0.8

Figures in parentheses represent percentage of water capacity.

2. 地上部の生育過程 先ず草丈の伸長状態は第1図に示す様に100%, 80%, 60%の3区は区間の差異は殆ど認められず最も良好であるが40%区は之等3区に比べ稍々劣り25%区は更に著しく劣っている。

Fig. 1. Comparison of the Plant Height of Lemon-grass among Different Treatments.

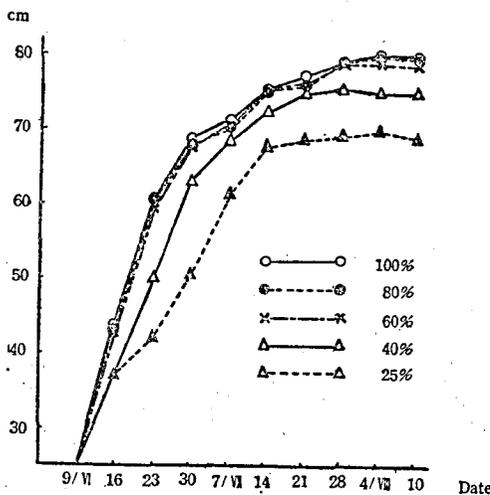
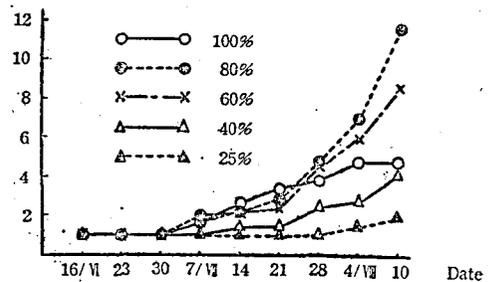


Fig. 2. Comparison of the Number of Tillers of Lemon-grass among Different Treatments.



分蘖数は第2図に示す様に生育中期頃迄は100%, 80%, 60%の3区間の差異は殆ど認められないが其後100%区では増加率衰え後期には80%及び60%の両区に比べると相当劣る傾向が認められる。80%区は分蘖数の増加率最も大で60%区は前者に比べると稍々劣る傾向が認められる。次で40%区は比較的初期より分蘖数の増加少く25%区は40%区よりも更に劣り分蘖数の増加率極めて緩慢である。

従て生葉数に於ても第3図に示す様に80%区は最大であるが生育の中期迄は100%, 80%, 60%の3区間の差異は殆ど認められない。後期には60%区は之等両区に比べると更に著しく劣る。40%区は生育の比較的初期より上記3区に比べると劣り生育の進むにつれてその差異は益々顯著になるが、25%区は40%区に比べて更に著しく劣る傾向が認められる。

次に収穫時に於る地上部の生育状態を第4図に示す。

Fig. 3. Comparison of the Number of Alive Leaves of Lemon-grass among Different Treatments. →

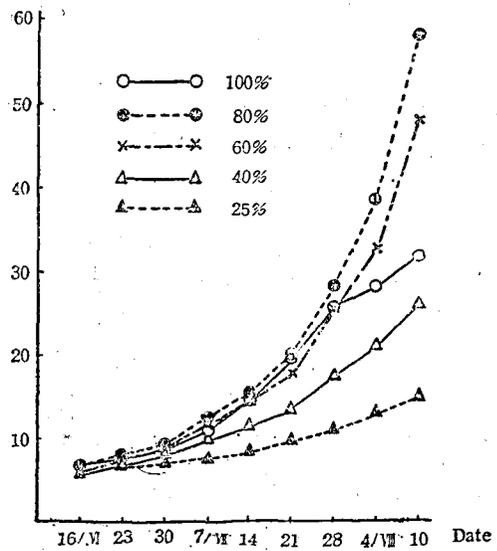


Fig. 4. Comparison of the Growth of Lemon-grass at he Harvest Time among Different Treatments.



A, B, C, D, and E represent 100%, 80%, 60%, 40%, and 25% respectively.

3. 収穫調査 地上部並に地下部の収穫調査の結果を第4表に示した。

Table 4. Comparison of the Yield of Lemon-grass among Different Treatments.

Treatment	Fresh weight of top		Fresh weight of whole leaves		Fresh weight of leaf-blades		Fresh weight of leaf-sheaths		Leaf-blades / Leaf-sheaths	Fresh weight of stem		Fresh weight of roots		Air-dried weight of roots	
	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio	%	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio
100	80.1	64	69.5	64	30.9	61	38.3	67	80.4	7.8	65	22.7	43	2.9	41
80	125.1	100	108.4	100	50.4	100	57.3	100	87.8	12.0	100	53.1	100	7.0	97
60	113.6	91	99.0	91	44.6	88	53.7	94	83.0	10.5	88	49.5	93	7.2	100
40	61.5	49	53.7	50	24.1	48	29.0	51	83.0	6.3	53	31.5	59	4.9	68
25	37.8	30	33.0	30	14.3	28	18.6	32	75.6	4.3	36	17.0	32	2.6	36

1) 地上部 a) 全地上部重 80%区最大で60%区は稍々劣るがその差は比較的少い。然し100%区は之等両区に比べると相当劣り過湿による生育の阻害が相当顕著に認められる。一方40%区は100%区よりも更に劣り乾燥による生育の阻害が顕著に認められる。25%区は80%区に比べると僅かに1/3程度に過ぎず乾燥による生育の阻害が更に著しく認められる。

b) 全葉重 全地上部重と殆ど同様の傾向が認められるが分散分析並に各区間の差の有意性は第5表及び第6表に示す様に各区間の差は何れも有意義で特に80%区と60%区との差を除く各区間の差の有意性は極めて高い。

Table 5. Analysis of Variance of Fresh Weight of Whole Leaves.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	23572.755	5893.188	151.66**
Individual	5	2339.259	467.852	12.04**
Error	20	1942.941	38.859	
Total	29	27854.955		

\*\* Represents significance at the 1% level.

Table 6. Comparison of Differences of Fresh Weight of Whole Leaves and Their Significance among Different Treatments.

	100% 69.5	80 108.4	60 99.0	40 53.4	25 33.0
100% 69.5	—				
80 " 108.4	38.9**	—			
60 " 99.0	29.5**	9.4*	—		
40 " 53.4	12.1**	55.0**	45.6**	—	
25 " 33.0	36.5**	75.4**	66.0**	20.4**	—
L. S. D. (5% level)	7.5				
L. S. D. (1% level)	10.2				

\* Represents significance at the 5% level.

\*\* Represents significance at the 1% level.

c) 葉身重並に葉鞘重 葉身重並に葉鞘重共に全葉重と略々同様の傾向を示すが葉身重に対する葉鞘重の比率は80%区最も高く60%及び40%の両区、次で100%区更に25%区の順に低下するので、80%区と他区との差は葉身重では葉鞘重に比べて更に大となる。従つて過湿、乾燥共に葉の生育を阻害するが葉鞘よりも葉身の生育を一層阻害する傾向が認められる。

d) 茎重 茎重も80%区最大で60%、100%、40%、及び25%の各区の順に低下しているが、分散分析並に区間の差の有意性は第7表及び第8表に示す様に100%と40%、80%と60%、及び40%と25%の各区を除く他区間の差は有意義で特に100%区と60%区との差を除く他区間の差の有意性は極めて高い。

Table 7. Analysis of Variance of Fresh Weight of Stems.

Source of Variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	228,789	57,192	16.87**
Individual	5	32,699	6,540	1.93
Error	20	67,791	3,390	
Total	29	329,279		

\*\* Represents significance at the 1% level.

Table 8. Comparison of Differences of Fresh Weight of Stems and Their Significance among Different Treatments.

	100%	80%	60%	40%	25%
	7.8	12.0	10.5	6.3	4.4
100% 7.8	—				
80% 12.0	4.2**	—			
60% 10.5	2.7*	1.5	—		
40% 6.3	1.5	5.7**	4.2**	—	
25% 4.4	3.4**	7.6**	6.1**	1.9	—
L. S. D. (5% level)	2.22				
L. S. D. (1% level)	3.02				

\* Represents significance at the 5% level.

\*\* Represents significance at the 1% level.

2) 地下部 生根重は80%区最大で60%区は稍々劣るがその差は比較的少い。然し40%区は之等に比べると著しく劣り更に100%区、25%区の順に相当顕著に劣っている。一方風乾根重では60%区最大であるが80%区との差は殆ど無く次で40%、100%、25%の各区の順に劣っている。風乾根重の分散分析並に各区間の差の有意性は第9表及び第10表に示す様に80%区と60%区、及び100%区と25%区の差を除く他区間の差は極めて有意義である。従つて地下部の發育は80%及び60%の両区では殆ど差異なく最も良好であるが100%区及び40%区では夫々過湿並に乾燥による地下部の生育の阻害が極めて顕著に認められ25%区では乾燥による生育の阻害が更に顕著に認められるわけである。

Table 9. Analysis of Variance of Air-dried Weight of Roots.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	115,537	28,884	22.85**
Individual	5	22,979	4,596	3.64*
Error	20	25,271	1,264	
Total	29	163,787		

\* Represents significance at the 5% level.

\*\* Represents significance at the 1% level.

Table 10. Comparison of Differences of Air-dried Weight of Roots and Their Significance among Different Treatments.

	100%	80%	60%	40%	25%
	2.9	7.0	7.2	4.9	2.6
100% 2.9	—				
80% 7.0	4.1**	—			
60% 7.2	4.3**	0.2	—		
40% 4.9	2.0**	2.1**	2.3**	—	
25% 2.6	0.3	4.4**	4.6**	2.3**	—
L. S. D. (5% level)	1.35				
L. S. D. (1% level)	1.84				

4. 生葉の含水率 生葉の含水率は第11表に示した。葉身に於ては80%区最高で60%、40%、100%、25%の各区の順に除々に低下しているが各区間の差は比較的少く最高区と最低区との差は3%に足りない。一方葉鞘に於ては80%区最高で60%区、25%区、40%区の順に除々に低下しているが100%区は最も低く他区に比べると相当顕

著に劣り最高の80%区との間には約9%の差が見られる。従つて全葉に於ては80%区最高で60%, 40%, 25%の各区の順に低下しているが之等区間の差は比較的少い。然し100%区は最低で他区に比べると相当顯著に劣っている。以上の結果より生葉の含水率は葉身, 葉鞘共に80%区最高で過湿, 乾燥共に含水率を低下させる傾向が見られるが特に過湿による葉鞘の含水率の低下が顯著に認められるわけである。

Table 11. Comparison of the Water Content of Fresh Leaves of Lemon-grass among Different Treatments.

Treatment	Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths
%	%	%	%
100	72.5	72.7	72.4
80	78.2	75.1	81.9
60	77.3	74.0	79.7
40	77.0	74.9	78.6
25	76.4	72.5	78.4

5. 生葉の含油量 生葉の含油量を測定した結果を第12表に示した。先ず全葉の含油率(vol/wt)についてみるに100%区最高で土壤水分の減少と共に低下しているが40%区迄は隣接区間の差は比較的少い。然し25%区では40%区に比べ可なり劣り最高区と比べると0.1%以上低下している。

Table 12. Comparison of the Oil Content of Fresh Leaves of Lemon-grass among Different Treatments.

Treatment	Oil content (vol/wt)	Total yield of oil per clump	
%	%	cc	Ratio
100	0.57	0.40	65
80	0.56	0.62	100
60	0.53	0.52	84
40	0.52	0.28	45
25	0.46	0.16	26

分散分析並に各区間の差の有意性は第13表及び第14表に示す様に100%区より40%区迄は隣接区間の差の有意性は認められないが隣接しない区間の差は有意義で更に25%区と他区間の差の有意性は一層高い。

Table 13. Analysis of Variance of Oil Content of Fresh Leaves.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	0.038	0.0095	7.92**
Individual	5	0.017	0.0034	2.83*
Error	20	0.023	0.0012	
Total	29	0.078		

\* Represents significance at the 5% level.

\*\* Represents significance at the 1% level.

Table 14. Comparison of Differences of Oil Content of Fresh Leaves and Their Significance among Different Treatments.

		100%	80%	60%	40%	25%
		0.57	0.56	0.53	0.52	0.46
100%	0.57	—				
80%	0.56	0.01	—			
60%	0.53	0.04*	0.03	—		
40%	0.52	0.05**	0.04*	0.01	—	
25%	0.46	0.11**	0.10**	0.07**	0.06**	—
L. S. D. (5% level)		0.03				
L. S. D. (1% level)		0.04				

\* Represents significance at the 5% level.

\*\* Represents significance at the 1% level.

以上の如く生葉の含油率は100%区と80%区との差は有意義ではないが一応100%区に於て最高値が得られている。然し既述の様に該区では過湿の為葉の含水率が相当低下しているので該区に於て含油率が最高値を示しているのも一はこの葉の含水率の低下に基いている事は疑なく、過湿により特に植物体内に於る精油の生成が盛になつたと考えるわけには行かない様である。一方大体40%以下になると既述の様に土壤水分の低下と共に葉の含水率が低下する上に生葉の含油率も低下する傾向が顕著に認められるので、土壤の乾燥に伴い精油の生成は阻害されるのではないかと思われる。

所でGuenther<sup>3)</sup>は世界各地に於るレモングラスの栽培に於て降雨量の多い時は乾燥期に比べて含油率が低下する事を述べ、Hood<sup>4)</sup>は含油率は排水良好な砂質乃至軽鬆な土壤で高く湿気の多い底土或は湖の近くの様な湿度の高い土壤では含油率は低下する事を報じており、之等の事から土壤水分と含油率との関係については一応湿度の高い時には含油率低く湿度の低い時に含油率が高いという事が云える様であつて、この事は本実験の結果とは寧ろ逆の結果になるわけである。然し之等の報告は直接土壤水分と含油率との関係について研究したものではなく之等の場合に於ては土壤水分の外に精油の生成に重大な影響のある日照等の気象条件や或は又水分以外の土壤の諸性質が必然的に含油率に大きな影響を及ぼしている事は当然考えられるので之等含油率の高低が直接土壤水分の影響であると考えるわけには行かない。

次に1株当全収油量に於ては80%区最大で60%、100%、40及び25%の各区の順に減少し大体全葉重の場合と似通つた傾向が認められるが、既述の様に土壤水分の減少に伴い含油率は低下しているので乾燥区に於る1株当全収油量の減少は全葉重の場合よりも更に顕著である。分散分析並に各区間の差の有意性は第15表及び第16表に示す様に全区間の差に有意性が認められるが80%区と60%区との差を除く他区間の差の有意性は極めて高い。

Table 15. Analysis of Variance of Total Yield of Oil per Clump.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	0.806	0.202	40.40**
Individual	5	0.099	0.020	4.00*
Error	20	0.098	0.005	
Total	29	1.003		

\* Represents significance at the 5% level.

\*\* Represents significance at the 1% level.

Table 16. Comparison of Differences of Total Yield of Oil per Clump and Their Significance among Different Treatments.

		100%	80%	60%	40%	25%
		0.40	0.62	0.52	0.28	0.16
100%	0.40	—				
80%	0.62	0.22**	—			
60%	0.52	0.12**	0.10*	—		
40%	0.28	0.12**	0.34**	0.24**	—	
25%	0.16	0.24**	0.46**	0.36**	0.12**	—
L. S. D. (5% level)		0.08				
L. S. D. (1% level)		0.11				

\* Represents significance at the 5% level.

\*\* Represents significance at the 1% level.

6. 油の Citral 含量, 比重並に屈折率 油の Citral 含量, 比重並に屈折率を測定した結果を第 17 表に示した。Citral 含量は 80%区最高で 60%区は僅かに劣るが大した差は見られない。然し 100%区では稍々劣り更に 40%区, 25%区の順に之等の区では著しく劣っている。従つて Citral 含量に於ても生育の最も旺盛な 80%乃至 60%の両区に於ても最も高く過湿, 乾燥共に Citral 含量を低下させる傾向が認められるが特に乾燥による Citral 含量の低下が顕著である。Hood<sup>4)</sup>は (1) 乾燥した砂土 (2) 僅かに湿気のある砂質壤土 (3) 湖の近くの湿度の高い壤土の 3 種の土壤で栽培して得られた油の Citral 含量を比較した結果 (1) 最も高く (2) 之に次ぎ (3) は最も劣っていた事から之は高い Citral 含量は排水の極めて良好な土壤で生育した植物からのみ得られる事を示すものであると云つている。唯彼の研究では含油率の場合と同様土性の異なるに従つて土壤水分に相当大きな変化のある事が当然

Table 17. Comparison of the Citral Content, the Specific Gravity and the Reflective Index of Lemon-grass Oil among Different Treatments.

Treatment	Citral	Specific gravity	Reflective index
%	%	$d_{25}^{25}$	$N_D^{25}$
100	66.2	0.907	1.4890
80	69.4	0.901	1.4868
60	68.7	0.902	1.4861
40	62.1	—	1.4892
25	58.1	—	1.4899

考えられるので或一定の土壤での土壤水分と Citral 含量との関係は明かでないが, 本実験に於ても過湿が Citral 含量を低下させる傾向が認められるので排水の良好な事が Citral 含量を高めるのに必要な事は一致する所である。次に彼の研究では乾燥した砂土で Citral 含量が最高であつたとあるが乾燥の程度は明かでないが本実験の結果では寧ろ乾燥の度が進むと共に Citral 含量は低下しており, 彼の研究に於て果して乾燥そのものが Citral 含量を高めた原因であるか否かについては尚検討を要する様に思われる。

比重はその測定方法に於て正確さを欠く虞れがあるが 100%, 80%, 及び 60%の 3 区間では 100%区は 80%, 60%の両区に比べてかなり高いので過湿は比重を増大させる傾向がある様に思われる。乾燥の影響については不明で今後の研究を要する。

屈折率は 60%区最低で 80%, 100%及び 40%, 25%の各区の順に増大しており過湿, 乾燥共に屈折率を稍々増大させる傾向が認められる。

### 総 括

土壤容水量の 100%, 80%, 60%, 40%, 及び 25%の 5 区を設け土壤水分が主としてレモングラス (*Cymbopogon citratus Stapf*) の生育並に含油量に及ぼす影響について研究したが同時に油の Citral 含量其他 1, 2 の油の物理的性質についても研究を行った。その結果の概要は次の通りである。

1) 地上部の生育は 80%区最も良好で生葉重, 生茎重共に最大であり 60%区は之より稍々劣るが両区間の差は比較的少い。次に 100%区, 40%区の順に之等の値著しく低下し之等両区では過湿並に乾燥による生育の阻害が顕著に認められるが, 25%区では乾燥による生育の阻害が更に顕著に認められる。

2) 地下部の生育は 80%, 60%の両区で最も良好で且つ之等両区間の差は殆ど認められないが 100%及び 40%の両区では夫々過湿並に乾燥による地下部の生育の阻害が顕著に認められ, 25%区では乾燥による生育の阻害が特に顕著に認められる。

3) 生葉の含水率は 80%区最大で過湿, 乾燥共に含水率を低下させる傾向があるが特に過湿による葉鞘の含水率の低下が顕著である。

4) 生葉の含油率 (vol/wt) は 100%区最高で土壤水分の減少に伴い低下しているが 100%区より 40%区迄は隣接区間の差の有意性は認められない。然し 40%区と 80%区との差の有意性は高く, 又 25%区と他区間の差の有意性は一層高い。従つて乾燥による含油率の低下の傾向が特に顕著である。

- 5) 1株当全収油量は全葉重の場合と大体同様の傾向が認められるが土壌水分の減少に伴い含油率が低下しているので乾燥区に於る1株当全収油量の低下は全葉重の場合よりも更に顕著である。
- 6) 油の Citral 含量は80%区最高で60%区之に次ぐが両区間の差は少い。然し100%区では稍々低下し40%区25%区の順に更に低下し過湿、乾燥共に Citral 含量低下せる傾向が認められるが特に乾燥による低下が顕著である。
- 7) 油の比重は100%、80%、及び60%の3区間では100%区特に大きく過湿による比重の増大の傾向が認められる。
- 8) 油の屈折率は60%区最低であるが80%区との差は極めて少く、100%区、40%区、25%区の順に増大し過湿、乾燥共に屈折率を増大させる傾向が認められる。

#### 文 献

- 1) Bruno, F. and Sorges, F. : Agr. Colon., 18 : 81—86, 1927. Through Jones and Arrillaga 5)
- 2) Guenther, E. : The Essential Oils, Vol. I, D. Van Nostrand, New York, P. 279—291, 1949.
- 3) — : The Essential Oils, Vol. IV, D. Van Nostrand, New York, P. 20—65, 1950.
- 4) Hood, S. C. : U. S. Dept. Agr. Bull., 442 : 375—378, 1917.
- 5) Jones, M. A. and Arrillaga, N. G. : Puerto Rico Fed. Expt. Sta. Bull. 50 : 1—41, 1950.
- 6) Loustalot, A. J. and Pol, R. F. : Agron. J., 41 : 375—378, 1949.
- 7) Robles, P. S. and Arrillaga, N. G. : Puerto Rico Fed. Expt. Sta. Rpt., 1946 : 43—46, 1947.

#### Summary

The effects of soil moisture upon the growth and the oil content of lemon-grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) were investigated. At the same time, the effects upon the citral content and some physical properties of the oil were also studied. These investigations were carried out in five plots having respectively, 100%, 80%, 60%, 40%, and 25% of water capacity. Results obtained are summarized as follows :

- 1) In the 80% moisture plot, the growth of the top is best, and fresh weights of leaves and stems are both greatest among all plots. In the 60% moisture plot, they are inferior slightly to those in the 80% moisture plot. In the plots of 100% and 40% moisture, they decrease remarkably and an obstruction in the growth due to an excess or a deficiency in the soil moisture is recognized. In the 25% moisture plot, the obstruction in the growth is more remarkable.
- 2) The growth of the roots is best in the plots of 80% and 60% moisture and differences between these plots are hardly recognized, but in the plots of 100% and 40% moisture, an obstruction in the growth of the roots due to an excess or a deficiency in the soil moisture is recognized remarkably, and in the 25% moisture plot, the obstruction in the growth is more significant.
- 3) The water content of fresh leaves is highest in the 80% moisture plot, and it tends to decrease with an excess or a deficiency in the soil moisture. The excessive soil moisture especially cause a decrease in the water content of the leaf-sheaths.
- 4) The oil content (vol/wt) of fresh leaves is highest in the 100% moisture plot and decreases according to the decrease in the soil moisture. The differences in the oil content between adjacent plots from 100% to 40% moisture are not so significant, but the differences between the 40% moisture plot and the 80% moisture plot and between the 25% moisture and the other plots are highly significant, namely, the decrease in the oil content due to a deficiency in the soil moisture is especially remarkable.
- 5) As to the total yield of oil per clump, a tendency similar to the fresh weight of leaves is recognized on the whole. However, a decrease in the total yield of oil per clump due to a deficiency in the soil moisture is more pronounced than that in the fresh weight of leaves, because the oil content (vol/wt) decreases

according to the decrease in the soil moisture as above mentioned.

6) The citral content of oil is highest in the 80% moisture plot and decreases slightly in the 60% moisture, but the difference between these plots is very small. However, it decreases somewhat in the 100% moisture plot and decreases more remarkably in the plots of 40% and 25% moisture respectively. Though the citral content tends to decrease with both an excess and a deficiency in the soil moisture, the decrease due to a deficiency in the soil moisture is especially pronounced.

7) Among three plots of 100%, 80%, and 60% moisture, the specific gravity of oil is highest in the 100% moisture plot.

8) Although the refractive index of oil is lowest in the 60% moisture plot, the difference between this plot and the 80% moisture plot is very small, and it increases in the plots of 100%, 40%, and 25% moisture respectively. That is, it tends to increase with an excess or a deficiency in the soil moisture.

Received April 12, 1955

## レモングラスの生育並に含油量の時期的変化 (第1報)

## 植付初年度の成績

宮崎 幸男, 高城 正勝

Seasonal Variations in the Growth and the Oil Content of  
Lemon-grass (I) Results in the First Year of Planting

By Yukio MIYAZAKI and Masakatsu TAKI

まえがき レモングラスは元来熱帯或は亜熱帯地域で栽培されているので之等の地域では本植物の生育が気温の影響を受ける事は比較的少く寧ろ降雨量が最も重要な要素になつている様である<sup>3) 5) 9)</sup>。一方我国に於ては第2次大戦後種ヶ島, 八丈島等に於て小規模乍らレモングラスの栽培が行われる様になつたが之等の地方では暖地とは云い乍ら冬季は最低0°C附近迄降下するのが一般である。伊豆分場に於ても既に昭和24年以来圃場で小敷乍ら本植物の試作を行つているが当分場での昭和24年以来の気象観測の結果によれば冬季は最低-3~-4°C時には-5°C附近迄降下するので地上部は殆ど褐色に枯れるが完全に枯死する事は殆どなく翌春再び新葉が発生し夏から秋にかけて相当大きな株になる事が認められている。之等の事からも本植物の我国に於る栽培に於ては植物の生育が気温の変化によつて著しく影響を受ける事は当然考えられる事である。更に含油量についても我国に於ては薄荷に於て時期変化のある事が報告されているが<sup>1) 6)</sup>, レモングラスに於ても含油量が気象要素の影響を受ける事は世界各地での栽培に於て認められているので<sup>3)</sup>, 特に我国に於るレモングラスの栽培に於てはその含油量が時期的に気温其他の気象要素の影響によつて変化する事が考えられる。従つて本研究は昭和27~28, 及び28~29年の2回に互り特に之等気象要素の影響に注目しつゝ, 主としてレモングラスの生育並に含油量の時期的変化の状態を明かにする目的を以て行つた。尚本研究に於ては油のチト랄含量其他若干の油の物理的性質の時期的変化についても併せて研究を行つた。尚本研究は一部厚生科学研究費の補助によつて行われた事に対し謝意を表する。

材料及び方法 材料 1) 第1実験\* 西印度レモングラス *Cymbopogon citratus Stapf* に属するものと思われるが春日部分場より分譲された系統で昭和27年4月初旬1本宛に株分してフレーム内に仮植し分蘖数2本の生育状態の比較的揃つた株を供試した。2) 第2実験\*\* 静岡県立有用植物園より分譲された系統で同じく *C. citratus* に属するものと考えられるが第1実験の供試系統とは明かに異なる\*\*\*。4月初旬1本宛に株分してフレーム内に仮植し分蘖数4~5本の生育状態の略々等しい株を撰び供試した。

方法 1) 第1実験 a) 耕種概要 定植 予め耕起整地し畦幅, 株間共に3尺, 深さ約5cmに5月21日に定植した。1列10株, 13列合計130株を定植し第1列及び第13列及び各列の最初と最後の株は供試外とした。又定植直後地上30cmで切断した。施肥 基肥として1株当堆肥250匁を施し其後追肥として5月21~28日に硫酸, 過燐酸石灰各5.6匁, 塩化加里1.5匁を施した。除草・中耕 除草は努めて頻繁に行い雑草がレモングラスの生育に影響を及ぼす事のない様注意した。中耕は除草を兼ねて地表浅く行つた。病虫害 全期間を通じていねよう *Sesomia inferno Walker*\*\*\*\*の被害が若干見られ特に7月頃被害が比較的大きい様と思われたが其後次第に被害は減少した。尚このいねように対しては特別の防除法は行わなかつた。其他特に注意を惹く様な病虫害は認められなかつた。其他の事項 6月23日夜ダイナ颱風の来襲により葉の先端部或は周縁部が風害により褐色に枯れるものが多かつたが其他の被害は殆ど見られず此の被害も其後の生育にはそれ程大きな影響はない様と思われた。其他特に注意すべき事項は認められなかつた。b) 生育調査 5月28日より大体1週間毎に草丈及び分蘖数\*\*\*\*\*の調査

\* 昭和27年5月より28年2月に亘る実験

\*\* 昭和28年6月より29年3月に亘る実験

\*\*\* レモングラスの系統の分類について目下研究中

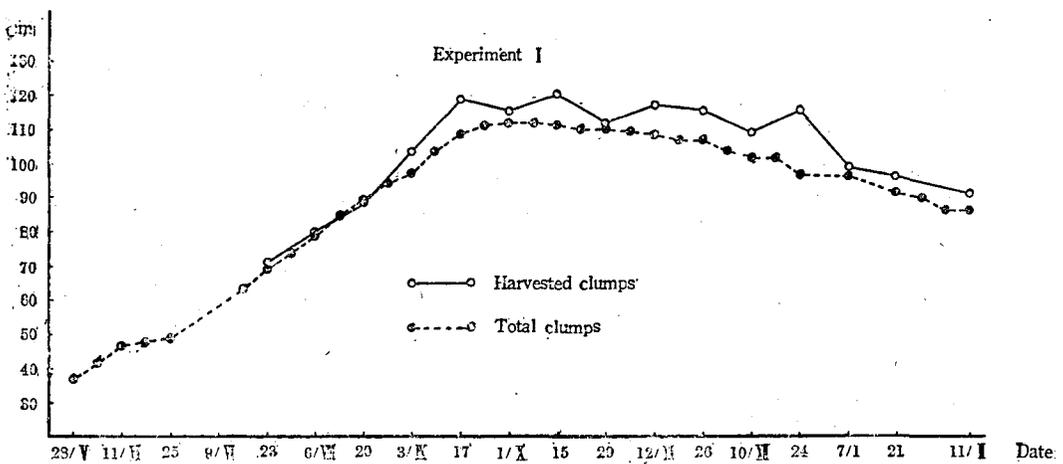
\*\*\*\* 農林省東海近畿農業試験場園芸部奥代重敏技官の鑑定による

\*\*\*\*\* 地上30cm以上のもの

を行い草丈は2月11日, 分蘖数は1月28日迄調査した. c) 収穫 7月23日より大体2週間々隔に1列置きに1株宛各列の生育状態の大体平均に近いと思われる株を選び合計4乃至6株宛掘取り全地上部, 全葉, 葉身, 葉鞘, 及び茎の各部に分けて之等の生体重を測定した. 只各株の生育状態に可なり差異があつたので後期には収穫株の生育状態に可なり大きな差異が見られた. d) 蒸溜 収穫後直ちに全葉, 葉身, 葉鞘の別に全量を蒸溜した. 蒸溜器は局方精油定量器を使用し蒸溜時間は溜出開始より4時間とし, 終了後25°Cで油の容積を読んだ. 熱源は600Wの電熱器を用い一度に6~8個宛蒸溜したが熱量の調節は正確に為し得なかつたので蒸溜条件は必ずしも一様とは云えない. 得られた油は全葉, 葉身, 葉鞘何れも全個体の油を合計し無水芒硝で脱水してチト랄含量の定量等に供した. e) 油のチト랄含量 9月17日よりGuenther<sup>2)</sup>のStandard Procedureによるヒドロキシルアミン法で定量した. 2) 第2実験 a) 耕種概要 定植 定植の場所は第1実験と異なるが土壌の性質其他殆ど前者と同様と思われる. 1列12株, 20列合計240株を6月12日に第1実験と同様の方法で定植した. 施肥 基肥として1株当堆肥150匁を施し其後追肥として硫酸, 過磷酸石灰各5.6匁, 塩化加里1.5匁宛6月29日, 8月26~31日, 10月12~27日の3回に亘り施用した. 除草・中耕 第1実験と同様の方法をとつた. 病虫害 第1実験と同様全期間を通じていねよとの被害が稍々見られたがその程度は前者より稍々軽い様に思われた. 又前回同様之に対して防除法は行わなかつた. 其他注意すべき病虫害は認められなかつた. 其他の事項 7月下旬より8月初旬にかけて犬が圃場内に侵入し一部機械的な折傷を受けた株が若干あつたが其後の生育には大した影響はない様に思われた. 又9月25日午後より颯風13号の米製あり塩分を含んだ強風により葉の先端及び周縁部の褐色に枯れたものが相当多かつたが其後の生育にはそれ程著しい影響は認められなかつた. b) 生育調査 6月23日より第1実験同様大体1週間毎に草丈, 分蘖数の調査を行い夫々2月2日, 1月5日迄之を行つた. c) 収穫 8月18日より大体2週間々隔に第1実験と同様の方法で収穫調査を行い2月2日で一先づ打切つたが3月16日に補足的に今一度行つた. d) 生葉の含水率 収穫株の中3或は4株につき各株の代表的な分蘖1本をとり上位より第4, 5, 6, 及び7の4葉を用い葉身, 葉鞘の両部に分けて各部の含水率を求め更に之より全葉の含水率を計算した. e) 蒸溜 蒸溜時間を2時間とした外は全て第1実験と同様の方法によつた. f) 油のチト랄含量, 比重及び屈折率 チト랄含量の定量は第1実験の場合と同一方法のヒドロキシルアミン法で行うと共に一部中性亜硫酸ソーダ法<sup>2)</sup>でも行つたが後者では供試油量が10cc以下の場合が多かつたので得られた結果も稍々正確を欠く恐れがあるがヒドロキシルアミン法と対照的に示す事とした. 比重は2ccオストワルド比重瓶, 屈折率はアッペ屈折計により何れも25°Cの値を求めた.

実験結果及び考察 1. 地上部の生育過程 両実験により系統が異なる上に定植時期, 定植時の分蘖数, 気象要素

Fig. 1. Growth Curves of the Height of Lemon-grass.



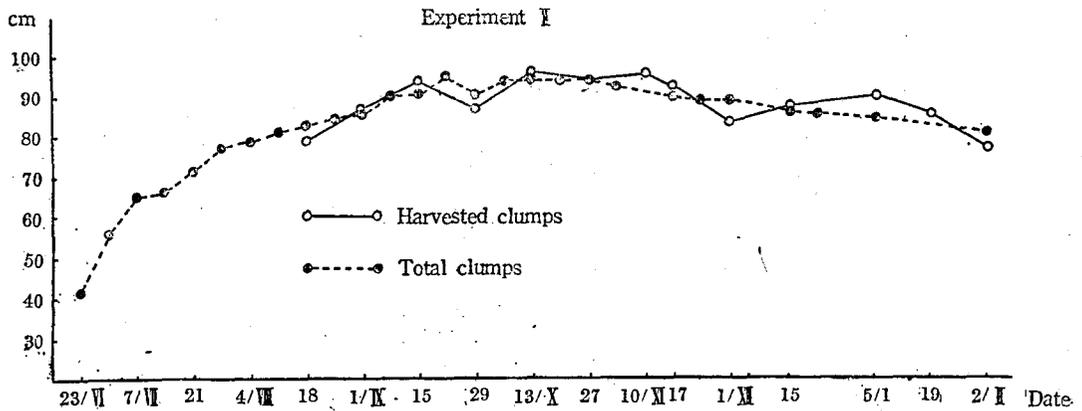


Table 1. Chief Climatic Factors during the Experiments.

Experiment I							
Date	Air temperature					Rainfall Total	Number of days with frost
	Mean	Maximum		Minimum			
		Mean	Absolute	Mean	Absolute		
	C°	C°	C°	C°	C°	mm	
V 28 1952	17.8	21.8	24.0	13.8	9.0	32.2	0
VI 4 "	19.5	22.6	26.0	16.4	14.0	26.3	0
11 "	20.3	23.2	25.0	17.4	13.0	23.6	0
18 "	21.4	24.6	27.0	18.1	16.0	51.3	0
25 "	22.1	24.4	26.5	19.8	16.0	108.3	0
VII 2 "	22.9	24.9	27.0	20.9	17.5	153.0	0
9 "	22.8	25.1	27.0	20.6	17.5	137.8	0
16 "	25.0	26.6	28.5	23.3	20.5	82.4	0
23 "	23.3	27.8	30.0	18.9	18.0	0	0
30 "	25.6	28.1	29.0	23.1	21.0	69.7	0
VIII 6 "	26.2	28.7	30.0	23.6	22.0	109.2	0
13 "	25.1	28.4	30.0	21.9	20.0	10.7	0
20 "	25.7	28.9	30.5	22.6	20.0	47.0	0
27 "	26.0	30.1	31.0	21.9	20.0	0	0
K 3 "	26.2	29.1	30.0	23.2	20.5	48.8	0
10 "	25.3	27.6	29.0	23.0	21.0	31.6	0
17 "	23.8	26.3	29.0	21.2	18.0	31.9	0
24 "	21.2	25.2	28.0	17.1	13.0	14.8	0
X 1 "	20.1	23.9	26.0	16.4	9.0	0	0
8 "	19.4	23.3	26.0	15.6	11.0	25.9	0
15 "	19.0	22.2	23.5	15.7	10.5	42.0	0
22 "	15.5	20.8	24.0	10.2	6.0	10.1	0
29 "	15.3	18.8	20.0	11.9	6.5	63.5	0
XI 5 "	16.8	20.0	22.5	13.6	7.0	104.8	0

Date	Air temperature					Rainfall Total	Number of days with frost
	Mean	Maximum		Minimum			
		Mean	Absolute	Mean	Absolute		
	C°	C°	C°	C°	C°	mm	
12 "	13.6	18.3	22.5	9.0	5.0	16.8	0
19 "	13.1	17.5	21.5	8.8	4.0	9.1	0
26 "	12.1	15.9	16.5	8.3	2.0	15.8	0
XI 3 "	11.5	15.4	20.0	7.7	1.0	0	1
10 "	6.6	10.9	14.0	2.3	-1.5	24.5	4
17 "	9.1	14.6	18.0	3.5	-1.5	11.9	1
24 "	6.8	9.9	13.0	3.6	-2.0	7.5	2
31 "	7.1	10.5	13.0	3.6	-2.5	0	2
I 7 1953	5.6	11.1	19.0	0.1	-4.0	12.6	2
14 "	6.5	9.9	16.0	3.1	-1.0	16.0	1
21 "	4.8	10.2	12.0	-0.6	-5.5	0	2
28 "	5.5	8.6	11.5	2.3	-1.0	8.3	0
II 4 "	4.0	7.9	10.0	0.1	-3.0	0	3
11 "	7.7	11.5	16.5	3.9	-2.5	12.3	0

## Experiment I

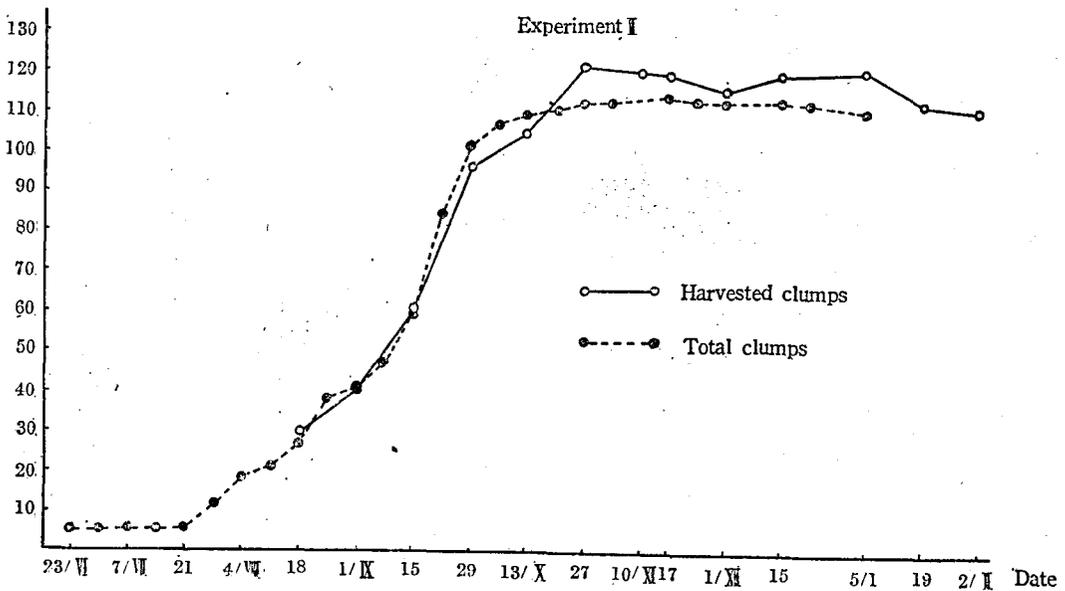
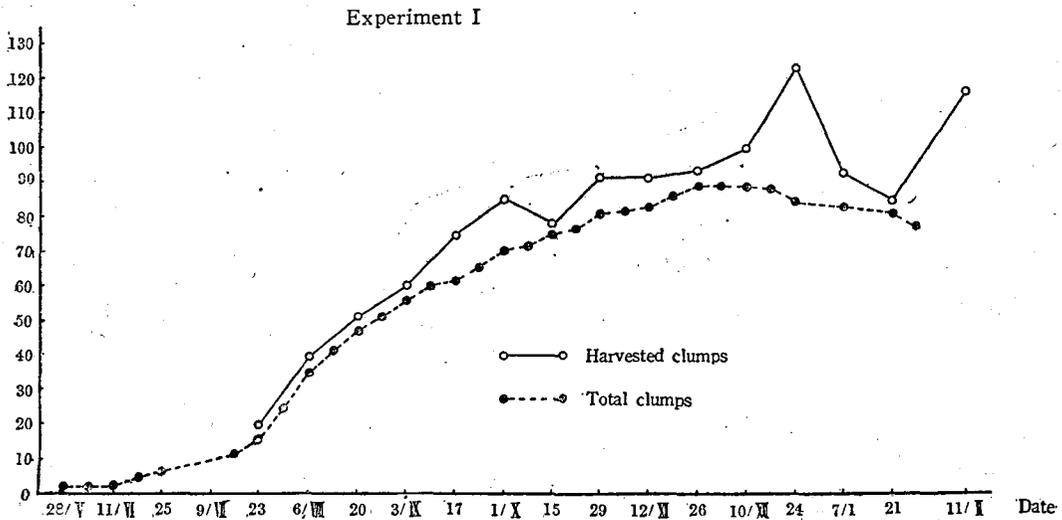
Date	Air temperature					Rainfall Total	Number of hours with sunshine Total	Number of days with frost Total
	Mean	Maximum		Minimum				
		Mean	Absolute	Mean	Absolute			
	C°	C°	C°	C°	C°	mm		
VI 23 1953	21.1	23.5	26.5	18.7	16.5	139.4	15.6	0
30 "	22.6	25.1	27.4	20.1	18.9	107.7	13.9	0
VII 7 "	23.5	25.7	28.7	21.2	20.0	71.7	9.9	0
14 "	21.7	25.6	28.0	17.8	15.0	38.0	50.8	0
21 "	26.2	28.0	29.8	24.5	23.8	162.7	14.5	0
28 "	26.3	30.0	31.0	22.6	21.0	25.0	66.8	0
VIII 4 "	26.1	28.4	31.0	23.8	22.5	0	28.5	0
11 "	26.1	28.5	29.0	23.7	22.0	116.1	18.0	0
18 "	26.7	29.5	32.0	24.0	22.2	151.7	33.1	0
25 "	23.8	26.9	31.5	20.8	18.5	36.5	12.1	0
IX 1 "	22.5	24.4	28.0	20.5	18.0	82.5	22.4	0
8 "	22.3	25.7	27.5	18.8	16.0	151.9	39.4	0
15 "	25.5	27.8	29.0	23.1	21.0	136.0	16.5	0
22 "	22.4	25.2	27.0	19.5	16.0	166.0	33.6	0
29 "	22.4	26.1	29.0	18.7	14.0	120.4	28.9	0
X 6 "	17.2	22.0	24.0	12.3	10.5	0	31.0	0
13 "	16.8	21.1	24.3	12.6	9.0	48.0	23.9	0
20 "	18.0	22.2	24.0	13.9	8.5	0	43.3	0
27 "	17.1	20.9	21.5	13.4	10.0	25.1	32.1	0
XI 3 "	16.5	20.6	23.5	12.4	6.0	0.1	28.7	0
10 "	10.8	15.6	19.5	5.9	1.0	13.8	22.6	1
17 "	11.4	15.5	18.0	7.3	1.5	18.0	30.6	1
24 "	9.8	15.0	16.3	4.6	-0.5	57.5	35.8	1

Date	Air temperature					Rainfall Total	Number of hours with sunshine Total	Number of days with frost Total
	Mean	Maximum		Minimum				
		Mean	Absolute	Mean	Absolute			
	C°	C°	C°	C°	C°	mm		
XI 1 "	9.6	14.4	20.5	4.8	-0.5	8.3	32.3	2
8 "	9.1	12.4	17.0	5.9	4.0	26.7	21.3	0
15 "	8.8	14.2	18.0	3.4	0	3.0	34.1	0
22 "	10.5	15.6	17.5	5.4	0.5	6.9	31.0	0
29 "	7.1	12.5	13.3	1.8	-5.2	23.2	31.3	0
I 5 1954	7.4	11.8	14.5	2.9	-4.0	48.1	31.5	1
12 "	8.5	12.5	18.0	4.6	0.5	41.0	10.6	0
19 "	8.5	11.9	13.0	5.0	1.0	27.0	7.2	0
26 "	4.1	7.9	10.0	0.2	-3.5	33.8	29.3	2
II 2 "	4.3	8.1	10.0	0.5	-4.0	0	47.5	3
9 "	5.8	11.6	16.0	-0.1	-0.4	2.3	53.1	2
16 "	8.2	13.3	18.0	3.1	-1.5	38.1	23.3	1
23 "	5.3	10.8	16.0	-0.1	-5.0	0	41.5	2
III 2 "	12.0	15.8	19.0	8.3	3.5	71.6	19.9	0
9 "	7.0	9.8	11.0	4.2	1.5	22.8	14.2	0
16 "	6.5	11.5	14.0	1.5	-3.0	0.7	44.8	2

其他の栽培条件にも若干の差異があるので植物の生育状態にも或程度の相違が認められるが全般的な生育状態の時期的変化については大体一定した傾向が認められる。先づ草丈についてみるに第1図に示す様に定植後直ちに旺盛な伸長が見られ8, 9月頃は草丈の伸長最も旺盛である。第1表に示す様に5月下旬頃には気温も相当高く降雨量も比較的多いが、其後気温は上昇すると共に梅雨期に入り降雨量も一層多くなり更に7, 8月乃至9月にかけて高温の時期が続くのでこの頃はレモンガラスの生育には最も好適の時期と考えられる。そして阿実験共颱風の影響により一時草丈は減少したが大体に於て9月下旬乃至10月初, 中旬頃草丈は最高に達するものゝ様である。10月下旬以降になると草丈の伸長は殆ど見られず逆に除々に低下し11月下旬乃至12月初旬頃から一層草丈の低下が認められる様になる。之は元来葉が成熟すると葉身の先端部は褐色に枯死して折落するので草丈は自然に低下する傾向があるが、更に此の頃には気温もかなり低下し早い時は11月中旬頃から初霜を見る様になり更に此の頃から南伊豆に於ては特に強い季節風(主として西風)が吹き始め先端部の枯死折落の度が促進されるので草丈は一層低下する事になる。又葉色も次第に緑色淡く淡黄色を帯びる様になり1月初旬頃には気温も極めて低下するので葉色は益々淡く灰色を帯び、葉身は寒害の爲乾燥状態を呈し葉鞘も上部は稍々乾燥状態を呈し且つ何れも組織は正常時の硬さを失い柔軟性を帯びる様になる。其後続く低温と強風により葉の枯死状態は進み1月下旬頃になると株の外側は殆ど褐色に枯れ、葉身は上位葉の葉鞘に包まれた下部は稍々淡黄緑色を呈するが他は殆ど褐色に枯れ、葉鞘も株の中心部の下部のみ淡黄緑色を呈する外株の外側は枯れて褐色を呈する様になる。従つて草丈は益々低下する事になるが2月初旬頃には之等枯死状態は殆ど極点に達する。第2実験では3月中旬に補足的に最後の収穫を行つたが葉身は既に殆ど完全に枯死しているので外見的には2月初旬頃と殆ど区別なく葉鞘は2月初旬よりも更に若干枯死程度が進み基部の緑色更に淡く地上5~7cm迄僅かに淡黄緑色を呈する状態であつた。尚此の頃には気温も稍々上昇しているので各株共中心部で短い新葉が1, 2枚発生し始めていたが緑色極めて淡く黄色が強かつた。

次に分蘗数についてみるに第2図に示す様に定植後2, 3週間を経てその増加が認められる様になり両実験により増加の状態は稍々異なるが何れも7, 8, 9月頃にかけて増加率最も大で大体11月中, 下旬乃至12月初旬頃最高に達する様である。第2実験に於て8月中, 下旬頃より9月下旬頃にかけて特に分蘗数の増加大であるが之は第1実験では此の頃の雨量が比較的小いのに對し第2実験では極めて豊富であつた事が大きな原因でないかと想像される。11月中, 下旬乃至12月初旬以降分蘗数は除々に減少しているが之は既述の様に葉身の先端が枯死折落する為であつて1月初旬以降枯死状態の進むにつれて益々この傾向が顕著になる。

Fig. 2. Growth Curves of the Number of Tillers of Lemon-grass.



尚収穫株の草丈、分蘖数と圃場の全株の之等との間に若干の差異が見られ特に第1実験に於て相当大きな差異の見られる場合がある。

2. 地上部の収量 地上部各部の収量を第2表に示す。

1) 葉身重 収穫を始めた7月下旬乃至8月中旬頃より9月中、下旬頃は葉身重の増加極めて大であるが其後次第に緩慢になり第1実験では10月中旬に最高値が見られ、第2実験では11月中旬に最高値が得られているが10月下旬頃のものと同程度に差はない。一方既述の様に分蘖数は11月中、下旬頃は僅か乍ら増加の傾向が見られるが草丈は9月下旬乃至10月初、中旬頃最高に達し其後次第に低下するので之等の事からも考えて葉身重の最高に

Table 2. Seasonal Variations in the Yield of Lemon-grass per Clump.

Experiment I								
Date of harvest	Number of harvested clump	Fresh weight					Leaf-sheaths	Whole leaves
		Top	Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Stem	Leaf-blades	Stem
VII 23 1952	5	g 237	g 205	g 95	g 104	g 25	1.1	8.3
VIII 6 "	5	593	528	245	271	52	1.1	10.5
20 "	5	872	780	362	396	70	1.1	11.0
IX 3 "	5	1,750	1,569	700	837	149	1.2	10.6
17 "	4	2,962	2,626	1,184	1,385	281	1.2	9.5
X 1 "	4	2,904	2,530	1,134	1,371	258	1.2	9.8
15 "	4	3,514	3,112	1,353	1,722	309	1.3	10.3
29 "	4	3,403	2,994	1,249	1,727	275	1.4	9.8
XI 12 "	4	3,670	3,209	1,313	1,868	344	1.4	9.4
26 "	4	3,173	2,793	1,128	1,644	285	1.5	10.0
XII 10 "	4	3,464	3,019	1,148	1,842	338	1.6	9.1
24 "	4	4,559	3,799	1,294	2,470	480	1.9	7.9
I 7 1953	4	1,978	1,671	362	1,293	250	3.5	6.7
21 "	4	1,836	1,504	246	1,240	258	5.0	5.8
II 11 "	4	2,358	1,905	352	1,530	354	4.7	5.5

Experiment II								
Date of harvest	Number of harvested clump	Fresh weight					Leaf-sheaths	Whole leaves
		Top	Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Stem	Leaf-blades	Stem
VIII 18 1953	6	g 599	g 501	g 206	g 292	g 53	1.4	9.4
IX 1 "	6	853	709	292	397	76	1.5	9.3
15 "	6	1,447	1,231	484	736	139	1.5	9.0
29 "	6	1,644	1,388	537	853	146	1.6	9.5
X 13 "	6	1,790	1,547	601	921	170	1.5	9.2
27 "	6	2,036	1,759	686	1,058	197	1.6	8.9
XI 10 "	6	2,095	1,786	678	1,079	223	1.6	8.0
17 "	6	2,168	1,865	700	1,153	235	1.7	7.9
XII 1 "	6	1,759	1,547	532	973	197	1.8	7.7
15 "	7	1,852	1,605	568	1,029	204	1.8	8.0
I 5 1954	7	1,757	1,463	346	1,108	245	3.8	6.0
19 "	6	1,254	1,013	206	800	192	3.9	5.5
II 2 "	8	948	733	125	603	192	4.9	3.8
III 16 "	4	966	718	125	581	201	—	—

達するのは大体10月中,下旬乃至11月初旬頃と思われる。其後葉身重は次第に減少の傾向を示すが之は葉身の生育は停止する上に低温或は強風により葉身の含水率が低下する為と思われる。この含水率の低下は第3表では12月下旬頃はそれ程明瞭に認められないが1月初旬以降には極めて顕著に認められる。然し第1実験では12月下旬の収穫株は特に大きな株で葉鞘重及び茎重は最大値を示しているにも拘らず葉身重は10月中旬或は11月中旬のものよりも劣っており此の頃には既に葉身の含水率は可なり低下の傾向にあつたものと考えてよい様に思われる。そして2月初旬頃には葉身の含水率は殆ど最低に達する様であり従つて其後葉身重の減少は殆ど無いものゝ様である。尚葉身重のみならず下記の葉鞘重に於ても第1実験では第2実験に比べて1月初旬頃の減少が顕著の傾向が見られるが之は12月以降1月初旬頃迄の気温特に最低気温が第1実験の方が稍々低い為と思われる。

Table 3. Seasonal Variations in the Water Content of Fresh Leaves of Lemon-grass in Experiment II.

Date of harvest	Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	
	%	%	%	
VIII 18 1953	81.42	76.51	85.11	
IX 1 "	81.00	76.12	83.70	
	15 "	81.83	76.62	84.70
	29 "	82.70	75.69	85.97
X 13 "	82.69	76.59	85.51	
	27 "	82.51	76.17	85.06
XI 10 "	81.09	76.89	83.14	
	17 "	79.48	75.01	81.38
XII 1 "	78.04	75.31	79.41	
	15 "	77.52	74.96	78.70
I 5 1954	77.42	61.12	81.67	
	19 "	70.33	31.01	77.53
II 2 "	66.80	11.86	74.38	
III 16 "	64.65	15.19	72.91	

2) 葉鞘重 葉鞘重も9月中、下旬頃は増加率極めて大で其後は稍々緩慢の傾向を示しており、又葉鞘重と葉身重の比からも判る様に葉鞘の生育は葉身の生育よりも若干遅れるので葉鞘重の最高に達するのは葉身重の場合よりも稍々遅れて11月初旬乃至下旬頃の様に思われる。12月下旬頃には分蘖数は減少する上に葉鞘に於ても含水率が稍々低下するので葉鞘重も若干減少するものと思われるが葉身重の場合程明瞭には認められない。然し1月初旬頃になると葉鞘重もかなり顕著に減少し其後益々減少の傾向が認められ、2月初旬頃には葉鞘重の減少も略々極点に達するがその程度は葉身重の場合程顕著でない。この事は葉鞘の含水率の低下が葉身のそれに比べると極めて少い事或は葉鞘と葉身の比が1月初旬より特に大きい事によつても判る。次に系統により葉鞘重と葉身重との比に若干の差異がある様であるが葉鞘重は葉身重に比べてかなり大きく生育の進むにつれてその差は一層大きくなる傾向が見られる。

3) 全葉重 9月中、下旬頃は全葉重の増加も当然極めて大であり既述の葉身重、葉鞘重の結果より全葉重は大体11月初旬頃から下旬頃にかけて最高に達するものと思われるが第2表の数値も大体以上の傾向を示している。そして其後次第に減少し12月下旬乃至1月初旬頃より特に顕著に減少するが之は勿論葉鞘重の減少にもよるが特に葉身重の減少に基いている事は明かである。そして全葉重の減少も2月初旬頃には殆ど極点に達する。

4) 茎重 茎重も葉身重或は葉鞘重と同じく生育の旺盛な9月中、下旬頃は其の増加率大で其の後も葉身重、葉鞘重の増加と共に増大しているが茎の生育は葉身は勿論葉鞘の生育よりも更に遅れる傾向があり、茎重は大体11月下旬乃至12月初旬頃最高に達するものゝ様である。そして其後茎重は葉身重或は葉鞘重の様な寒害による顕著な減少は認められないが除々に減少している事は確かで2月初旬頃になると相当減少している事が判る。

5) 全地上部重 全地上部重は全葉重と茎重の合計であるので9月中、下旬頃は全地上部重の増加率も極めて大であるが其後次第に緩慢となり既述の各部の変化からも大体11月中、下旬頃最高に達するものと思われるが第2表の結果も大体以上の傾向を現わしている。尚茎重は全葉重に比べると極めて小さいので全地上部重は大体全葉重と同様の变化の傾向を示すのであるが、12月下旬乃至1月初旬頃より茎重に比し全葉重の減少が特に著しいので此の頃より全地上部重の減少は勿論極めて顕著ではあるが全葉重の場合に比べるとその程度は僅か乍ら緩慢である事になる。然し2月初旬頃には全地上部重の減少も大体極点に達するものと考えてよい。

以上地上部の生育過程及び各部の収量よりレモングラスは7, 8, 9月頃生育最も旺盛で各部の収量の増加率も最も大であるが其後次第に生育緩慢となり各部の収量の増加率も低下する事が認められたわけであるが、此の生育の変化には気温の変化が大きな原因になっている事は間違なくレモングラスは適当に降雨量のある時は高温の下で生育極めて旺盛であり気温の低下と共に生育は緩慢になるものと考えてよい様である。そして地上部の生育は部分により若干異なるが大体11月中旬乃至下旬頃には各部共生育は停止する様であるが之は気温特に最低気温の低下が最も大きな原因でないかと思われる。此の頃は平均最低10~5°C, 最低5~0°C附近になつていたので気温が此の程度に低下する様になれば地上部の生育は大体停止するものと考えてよい様に思われる。Hood<sup>4)</sup>は28°F(即ち約

Table 4. Seasonal Variations in the Oil Content of Fresh Leaves of Lemon-grass.

Experiment I										
Date of harvest	Number of distilled clumps		Oil content (vol/wt)				Total yield of oil per clump			
	Whole leaves	Leaf-blades and Leaf-sheaths	Whole	leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Whole	leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths
			W <sub>1</sub> *	W <sub>2</sub> **	B	S	W <sub>1</sub> *	W <sub>2</sub> **	B	S
			%	%	%	%	cc	cc	cc	cc
VII 23 1952	3	2	0.21	0.21	0.29	0.14	0.353	0.416	0.336	0.174
VIII 6 "	3	2	0.24	0.24	0.35	0.14	1.085	1.208	0.962	0.431
20 "	3	2	0.23	0.24	0.36	0.13	1.713	1.778	1.358	0.518
IX 3 "	3	2	0.21	0.21	0.33	0.11	2.320	2.877	2.720	0.994
17 "	2	2	0.22	0.21	0.29	0.10	4.389	5.283	4.346	1.548
X 1 "	2	2	0.23	0.22	0.33	0.13	5.628	5.471	3.766	1.548
15 "	2	2	0.24	0.23	0.34	0.13	5.682	6.999	5.632	2.685
29 "	2	2	0.23	0.22	0.32	0.13	6.677	6.183	3.701	1.989
XI 12 "	2	2	0.24	0.22	0.35	0.14	6.186	6.375	3.729	2.835
26 "	2	2	0.23	0.22	0.34	0.14	5.914	6.085	3.882	2.222
XII 10 "	2	2	0.20	0.19	0.31	0.12	4.233	5.037	3.232	2.610
24 "	2	2	0.18	0.17	0.28	0.13	5.444	6.068	3.599	3.092
I 7 1953	2	2	0.22	0.21	0.47	0.13	2.662	3.398	2.004	2.131
21 "	2	2	0.18	0.21	0.69	0.13	3.096	2.982	1.515	1.353
II 11 "	2	2	0.21	0.20	0.32	0.14	3.592	3.729	1.941	1.925

Experiment II										
Date of harvest	Number of distilled clumps		Oil content (vol/wt)				Total yield of oil per clump			
	Whole leaves	Leaf-blades and Leaf-sheaths	Whole	leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Whole	leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths
			W <sub>1</sub> *	W <sub>2</sub> *	B	S	W <sub>1</sub> *	W <sub>2</sub> *	B	S
			%	%	%	%	cc	cc	cc	cc
VIII 18 1953	3	3	0.39	0.39	0.62	0.25	1.592	1.967	1.489	0.853
IX 1 "	3	3	0.39	0.38	0.58	0.24	2.478	2.704	1.853	1.777
15 "	3	3	0.40	0.39	0.61	0.22	4.890	4.762	2.966	1.669
29 "	3	3	0.42	0.41	0.66	0.24	4.549	5.655	4.288	2.473
X 13 "	3	3	0.42	0.41	0.66	0.25	6.976	6.414	3.638	2.215
27 "	3	3	0.38	0.37	0.62	0.23	7.150	6.727	3.977	2.328
XI 10 "	3	3	0.37	0.37	0.62	0.20	6.437	6.563	4.380	2.307
17 "	3	3	0.38	0.35	0.57	0.23	6.197	6.920	3.983	2.660
XII 1 "	3	3	0.37	0.35	0.58	0.19	5.460	5.267	3.196	1.879
15 "	3	4	0.36	0.34	0.57	0.19	5.558	5.453	3.371	2.004
I 5 1954	3	4	0.33	0.33	0.93	0.15	3.941	4.478	3.307	1.776
19 "	3	3	0.38	0.39	1.33	0.17	3.882	3.941	2.612	1.388
II 2 "	5	3	0.39	0.40	1.50	0.19	2.890	2.932	1.844	1.153
III 16 "	2	2	0.46	0.45	1.39	0.23	3.215	3.182	1.784	1.365

-2°C)で地上部は枯死するといっているが本実験の結果によれば此の程度の低温に1, 2度遭つても地上部が直ちに枯死する事は認められない。然し之が1ヶ月近く続けば地上部は殆ど枯死してしまう事は確かである。

\* Values determined by the distillation of whole leaves

\*\*  $\frac{W_1 + (B + S)}{\text{Number of total clumps}}$

3. 生葉の含油量 生葉の含油量を第4表に示す。1) 含油率 (Vol/wt) a) 葉身 第1実験では7月下旬及び9月中旬に稍々低い値が見られ、8月中旬に最も高い傾向が見られるが11月下旬頃迄は大体0.32~0.35%の範囲内にありこの間の含油率の若干の変化については時期的に一定の傾向を認め難い。然し乍ら12月初旬頃より稍々低下の傾向を見せ12月下旬には0.28%と最低値を示している。然し1月初旬には再び0.47%と急昇し同月下旬にかけて極めて高い値を示すが2月中旬には再びかなり低下している。第2実験では9月初旬に稍々低い値が見られる外は8月中旬より11月初旬迄は0.6%以上の値を示し特に9月下旬乃至10月初旬には最も高い値が見られる。そして11月中旬より12月中旬にかけて稍々低下の傾向を示すが1月初旬には相当急激な上昇を示し其後1月中旬より3月中旬迄極めて高い値を示している。以上の如く両実験により若干の相異があるが時期的にみて大体8月初旬頃から10月中旬頃迄の間に最も高い値の見られる傾向があるが7月下旬頃より11月初旬頃迄は特に大きな変化はない様である。然し11月下旬乃至12月初旬頃から稍々低下の傾向を示し12月中、下旬頃最低に達し其後1月初旬頃より急激に上昇し3月中旬頃迄は極めて高い値を示す傾向が認められる。

b) 葉鞘 第1実験では9月初旬、中旬及び12月初旬に0.10~0.11%の稍々低い値が見られるが他は何れも0.13~0.14%の値を示し全期間を通じて比較的变化が少い。然し第2実験に於ては時期的変化が明かに認められ8月中旬より10月中旬頃迄は全般的に高いが11月中旬頃迄はそれ程大きな変化はなく0.20%以上主として0.22~0.25%の範囲にある。然し12月初旬には稍々低下し1月初旬には0.15%と最低値を示している。その後若干上昇の傾向を示し3月中旬にはかなり高くなつて0.23%程度に過ぎない。以上両実験の間に若干の差異はあるが大体に於て葉鞘に於ても8月初旬頃より10月中旬頃迄の間に最も高い値の見られる傾向があるが7月下旬頃より11月中旬、下旬頃迄はそれ程大きな変化はないものゝ様である。然し12月初旬頃より同月下旬乃至1月初旬頃にかけて除々に低下し其後再び稍々上昇する傾向が見られる。

c) 全葉 両実験共に直接測定した値  $W_1$  と  $W_2$  及び葉身、葉鞘の別に測定した値の合計より得られた値  $W_3$  との差は極めて少く、差のある場合でも偶に0.02或は0.03%の値も見られるが主として0.01%である。全葉の含油率は  $W_3$  が全体の平均に近いと思われるので之についてみると第1実験では9月初旬より下旬にかけて最も高い値を示しているが7月下旬より11月下旬頃迄は大した変化はない。然し12月初旬より下旬にかけてかなり低下し其後稍々上昇している。第2実験に於ても9月下旬より10月中旬にかけて最も高い値が見られるが8月中旬より11月初旬、中旬頃迄は含油率の変化は比較的少い。然し12月初旬頃より稍々低下し1月初旬頃最低値を示し同月中旬頃より再び稍々上昇している。両実験を綜合すれば既述の葉身及び葉鞘の含油率からも大体推定出来る事であるが、全葉の含油率も8月上旬頃より10月中旬頃迄の間に最も高い値の見られる傾向があるが7月下旬頃より11月初旬、中旬頃迄はそれ程顕著な時期的変化はない様である。然し11月下旬乃至12月初旬頃から稍々低下の傾向を示し12月下旬乃至1月初旬頃最低に達し其後再び稍々上昇する傾向を示している。

2) 1株当全収油量 a) 葉身 葉身及び葉鞘の1株当全収油量は供試株数が少く特に第1実験に於ては2株に過ぎないので第4表に示す数値のみによつて全般的な傾向を把握する事は困難であるが全収油量は葉の重量とその含油率によつて決るので大体次の様に考えてよい様と思う。即ち葉身の重量は7月下旬頃より9月中、下旬頃にかけてその増加率大であるのみならず含油率も全般的に高いので全収油量の増加率も当然大である筈であるが第4表の数値もこの傾向を示している。其後葉身重の増加率は次第に緩慢になり10月中旬、下旬乃至11月初旬頃葉身重の最高に達するが含油率も11月初旬頃迄は未だ比較的高いので全収油量の増加率も其後次第に緩慢になり葉身重の最高に達する10月中、下旬乃至11月初旬頃全収油量も最高に達するものと思われるが第4表の数値によつては正確には判らない。然し12月初旬頃になると葉身の重量、含油率共に低下するので全収油量の低下するのは当然であるが第4表の数値も此の傾向を示している。そして1月初旬頃になると含油率は急昇しているが葉身重は著しく減少するので全収油量の増加は認められず逆に相当顕著に減少している。即ち此の頃の含油率の急昇は葉身内の全油量の増加によるものではなく葉身の含水率の急激な低下によるものである事は明かである。其後含油率は更に上昇するが之は上記同様葉身の含水率の低下によるものであつて全収油量は逆に更に減少しており2月初旬頃にはこの全収油量の減少は極点に達し3月中旬頃迄は最早顕著な減少は殆ど認められない様である。

b) 葉鞘 葉鞘に於ても7月下旬頃より9月中、下旬頃迄は重量の増加率大であるのみならず含油率も全般的に高いので全収油量の増加率も極めて大であり第4表の数値も此の傾向を示している。含油率は11月中、下旬頃迄はそれ程大きな変化はないが葉鞘重の増加率は其後次第に減少するので全収油量の増加率も次第に緩慢となり葉鞘重の最高に達する11月初旬乃至下旬頃全収油量も最高に達するものと思われるが第4表の数値では余り正確な事は判らない。然し12月初旬頃より葉鞘重は減少する上に含油率も12月下旬乃至1月初旬頃にかけて稍々低下するので全収油量は一層減少する事になる。そして1月中旬頃葉鞘重は益々減少する一方含油率は稍々上昇しているが之

は葉身の場合と同様葉鞘の含水率の低下によるものであつて葉鞘内の全油量の増加によるものではなく全油量は葉身の場合と同様逆に減少している事は確かで第4表の数値も此の傾向を明かに示している。尚葉鞘は葉身に比べ重量は著しく大であるが含油率は逆に著しく低いので全取油量は大体に於て葉鞘は葉身より遙かに少い。

c) 全葉 両実験共に  $W_1$  と  $W_2$  との間に相当差が見られるが  $W_2$  が全体の平均に近いと考えられるので之についてみると両実験共9月中, 下旬頃は葉身, 葉鞘共に全取油量の増加極めて大であるので全葉の全取油量の増加も当然大である筈であるが第4表の数値もこの傾向を明かに示している。其後全葉重の増加率は稍々緩慢となるので全取油量の増加率も稍々緩慢となり第4表では10月中旬及び11月中旬に最高値が得られている。既述の様に全葉の重量は11月中, 下旬頃最高に達し一方含油率は8月初旬頃から10月中旬頃は全般的に高いが11月初, 中旬頃はそれ程大きな低下はないので全取油量は10月中旬には殆ど最高に達し其後更に多少の増加或は逆に減少があるとしても11月中, 下旬頃はそれ程大きな変化はないものと考えてよい様に思われる。然し12月初旬頃より全葉の重量のみならず含油率も稍々低下の傾向を示すので全取油量は当然低下する事になり第4表の数値も明かに此の傾向を示している。其後全取油量の減少の傾向は益々顕著になり1月初, 中旬頃含油率は稍々上昇するが之は葉身重, 葉鞘重の場合に述べた様な葉の含水率の低下によるものであつて全葉内の全油量は引続き低下しておりこの全油量の低下は2月初旬頃になると略々極点に達するものゝ様である。

以上の様に含油率は7月下旬より11月初, 中旬頃は左程大きな変化はないが8月初旬頃より10月中旬頃迄の間に高い傾向が見られるので含油率は大体に於て高温の時期に最も高いものと考えてよいのではないかと思われる。然し含油率はかゝる気象条件等の栽培環境の外植物の生育に伴う植物体内に於る必然的な生理化学的变化によつて増減のある事も考えられるので7月下旬より11月初, 中旬頃の含油率の若干の変化については尚更に研究を要するが此の期間に於る程度の気温其他気象要素の変化では含油率に特に著しい影響を及ぼす事はない様に思われる。然し其後12月初旬頃から葉身, 葉鞘共に含油率の低下の傾向が明らかに認められ, 1月初旬頃には葉身の含油率は一見著しく上昇するにも拘らず葉の中の全油量は逆に減少している事が明かに認められたわけで, 此の12月初旬頃からの含油率の低下更に全油量の顕著な減少の機構については尚今後の研究を要するが気温の低下が直接乃至間接に最も大きな原因になつている事は間違ない事と思われる。尚両実験共葉鞘の含油率は葉身のそれに比べて著しく低い之は Hood<sup>4)</sup> Naves 等<sup>7)</sup> 及び Rakshit<sup>8)</sup> が葉を上, 下の2部分に分けて各部の含油率を比較した結果下部は上部よりも低く, 又 Hood<sup>4)</sup> 及び Robles 等<sup>9)</sup> が葉を上, 中, 下の3部分に分けて各部の含油率或はチト랄含量を比較した結果含油率は上部最も高く中部, 下部の順に低下していた結果と一致する性質のものである。

4 油のチト랄含量 油のチト랄含量を第5表に示す。1) 葉身 第1実験では9月中旬より12月初旬頃迄に75~76% 台の値も見られ全般的に高い傾向を示しているが12月下旬より70~71% 台の比較的低い値も見られ2月中旬頃迄は低下の傾向を示している。第2実験では11月中旬に72% 台, 12月初旬に69% 台の値が見られる外は8月中旬より1月初旬頃迄は大体70~71% 台の値を示し全般的に変化が極めて少い。然し1月中旬頃から稍々低下し2月初旬から3月中旬にかけて67% 台の相当低い値を示している。以上両実験の間に若干の

Table 5. Seasonal Variations in the Citral Content of Lemon-grass Oil.

Experiment I					
Date of harvest			Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths
			%	%	%
K	17	1952	73.9	73.3	75.0
X	1	"	76.5	72.5	76.8
	15	"	76.8	75.9	76.8
	29	"	75.8	72.0	70.5
XI	12	"	73.3	73.3	69.6
	26	"	74.5	75.3	69.7
XII	10	"	73.1	76.0	69.1
	24	"	69.7	71.5	66.9

Date of harvest			Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths
I	7	1953	67.9	70.5	63.9
	21	"	66.0	72.9	66.3
II	11	"	66.6	72.1	62.0

## Experiment II

Date of harvest			Hydroxylamine method			Neutral sulfite method	
			Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Whole leaves	Leaf-blades
VIII	18	1953	%	%	%	—	—
			72.0	70.9	75.2	—	—
IX	1	"	73.7	71.6	76.4	—	—
			15	"	75.5	71.8	76.6
X	13	"	71.8	71.9	74.6	—	—
			29	"	71.8	71.9	74.6
XI	10	"	72.4	70.8	73.1	73.8	71.7
			29	"	72.6	70.3	72.8
XII	1	"	71.4	71.0	70.0	—	—
			17	"	72.5	72.3	72.3
I	5	1954	72.2	69.5	70.3	—	70.3
			15	"	71.1	71.2	70.1
II	2	"	68.9	71.4	67.3	69.9	71.7
			19	"	68.2	69.1	67.1
III	16	"	66.6	67.4	67.1	65.2	—
			68.0	67.8	69.1	—	—

差異はあるが葉身に於ては8月中旬頃より12月初旬乃至1月初旬頃迄は殆ど変化はないが其後稍々低下の傾向が認められる。

2) 葉鞘 両実験共葉鞘は葉身に比べチトラルル含量の時期的変化が極めて大きい事が認められる。第1実験に於ては10月中旬頃迄は74~76%台の極めて高い値を示しているが10月下旬頃から70%前後にかなり顕著に低下し12月下旬頃より更に低下の傾向を示し2月中旬頃には62%台の最低値を示し最高値と比べると15%近い差を示している。第2実験に於ては8月中旬より9月下旬頃迄は74~76%台の最も高い値を示しているが其後次第に低下の傾向を示し11月中旬頃迄は大體72~73%台の値を示している。其後12月初旬頃から70%台となり1月初旬頃からは大體67%台の極めて低い値が見られ最高値と比較すると10%近い差を示している。以上両実験の間に若干の差異はあるが大體に於て8月中旬頃より9月下旬乃至10月初旬頃迄は葉鞘のチトラルル含量は全般的に高く其後稍々低下して12月下旬乃至1月初旬頃より更に顕著に低下する傾向が認められる。次に葉身と葉鞘のチトラルル含量を比較すると10月中、下旬頃迄は葉鞘は葉身よりもチトラルル含量が相当高い事が明かに認められる。そして其後葉身のチトラルル含量の変化は少いが葉鞘のチトラルル含量は次第に低下するので両者の差は殆ど無くなり或は逆に葉鞘は葉身より低い場合が見られる様にもなる。

3) 全葉 第1実験では9月中旬より10月下旬頃迄は75~76%台の最も高い値を示すが其後稍々低下の傾向を示し特に12月下旬頃からかなり顕著に低下し其後1月下旬乃至2月初旬頃には66%台に迄低下し最高値と比較すると10%近い差が見られる。第2実験では9月初旬頃には73~75%台の最も高い値が見られ其後若干低下の傾向を示すが12月中旬頃迄は71%以上主として72%台の値が見られる。然し1月初旬頃になると70%以下となり其後更に低下し2月初旬頃には最低値の66%台の値が見られ最高値と比較すると9%近い差が見られる。以上両実験の間に若干の差異は認められるが前記の葉身、葉鞘のチトラルル含量をも考慮に入れて考えると全葉のチトラルル含量は8月中旬頃より9月下旬乃至10月初旬頃迄は最も高く其後若干低下するが12月初旬頃迄はその低下は比較的少い。之は此の頃迄は葉身のチトラルル含量の低下が極めて少く且つ葉身の油量は葉鞘の油量よりも遙かに大であるからであろう。然し12月下旬乃至1月初旬頃からは葉鞘のみならず葉身のチトラルル含量も低

下するので全葉のチトラル含量は相当顕著に低下する事になる.

以上の様に葉身ではチトラル含量の時期的変化は比較的少いが葉鞘のチトラル含量は時期的変化極めて大きく之等チトラル含量の時期的変化の原因については更に研究を要するが, 12月下旬乃至1月初旬頃から葉鞘のみならず葉身に於ても低下の傾向が認められるわけである. 此の頃は植物の生育, 含油量共に低温の影響の最も顕著に現れ始めた時であり此の頃よりの低温或は之による葉身, 葉鞘の枯死がこのチトラル含量の低下の大きな原因になつているものと想像される. 尚10月中, 下旬頃迄は葉鞘は葉身に比べて常にチトラル含量が相当高いが之はRakshit<sup>7)</sup>の研究に於て葉の下部よりもチトラル含量高く又 Hood<sup>4)</sup>, Robles<sup>9)</sup>の研究に於て葉の下部最も高く中部, 上部の順に低下している結果と一致する性質のものである. 然し其後葉鞘のチトラル含量の低下が著しいので両者間の差は殆ど無くなり逆に葉鞘が葉身よりも劣る傾向の見られる事は此の頃からの含油率の低下の傾向と共に我国に於けるレモングラスの栽培に於ては特に注意すべき問題であると考えられる.

5. 油の比重並に屈折率 油の比重並に屈折率を第6表に示す. 比重, 屈折率共に大体に於て葉鞘は葉身よりも著しく高く全葉は之等の中間にあつて寧ろ葉身に近い値を示している. 但し場合により上記葉身, 葉鞘, 全葉の三者の間に若干の矛盾の見られる事があるが之は比重の場合には測定方法の正確を欠く事の外比重, 屈折率共に蒸溜条件の不均一さ或は又収穫株の個体変異等による事も考えられる. 然し全般的な傾向として比重, 屈折率共に又葉身, 葉鞘何れも植物の生育の進むにつれて之等の値の高くなる傾向が認められる. そして比重, 屈折率共に葉身は

Table 6. Seasonal Variations in the Specific Gravity and the Reflective Index of Lemon-grass Oil in Experiment II

Date of harvest	Specific gravity, $d_{25}^{25}$			Reflective index, $N_D^{25}$		
	Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths
VIII 18 1953	—	—	—	—	—	—
IX 1 "	0.8776	0.8710	0.8807	1.4810	1.4803	1.4822
	0.8748	0.8728	0.8821	1.4809	1.4799	1.4817
	0.8747	0.8723	0.8794	1.4809	1.4801	1.4819
X 13 "	0.8751	0.8758	0.8859	1.4817	1.4811	1.4832
	0.8761	0.8728	0.8863	1.4813	1.4807	1.4829
XI 10 "	0.8765	0.8719	0.8812	1.4820	1.4812	1.4828
	—	—	—	1.4819	1.4819	1.4839
XII 1 "	—	—	—	1.4819	1.4839	1.4842
	0.8765	0.8731	0.8830	1.4831	1.4823	1.4842
I 5 1954	0.8810	0.8799	0.8906	1.4837	1.4837	1.4853
	0.8807	0.8775	0.8926	1.4830	1.4824	1.4857
II 2 "	0.8789	0.8771	0.8893	1.4830	1.4826	1.4851
III 16 "	—	—	—	1.4818	1.4821	1.4843

1月初旬頃, 葉鞘は1月中旬頃最高に達し従つて全葉は1月初, 中旬頃最も高く其後各部共稍々低下の傾向が見られるが全般的に極めて高い値を示している.

以上の如く比重, 屈折率共に生育の進むと共に之等の値は増大し1月初, 中旬頃から特に高い傾向が見られるが此の頃は既述の様に生育, 含油量, チトラル含量共に低温の影響が顕著に認められた時であるので比重, 屈折率の特に高いのも此の低温或は之による葉の枯死がその原因になつている事が想像されるが之等の事については尚更に研究を要する.

6. 油の色 油の色は生育の初期のものは淡黄色であるが生育の進むにつれて黄色が濃くなり特に1月初, 中旬以降葉の枯死状態の進むにつれて黄色が強くなる. 又葉鞘は葉身に比べて著しく色が淡く特に収穫初期のものは黄色極めて淡く殆ど無色に近いが後期には可なり黄色を呈する様になる.

## 文 献

- 1) 福島要一 : 日作紀, 11 : 147—164, 1939.
- 2) Guenther, E. : The Essential Oils, Vol. 1, D. Van Nostrand, New York, P. 279—291, 1949.
- 3) ——— : The Essential Oils, Vol. IV, D. Van Nostrand, New York, P. 20—65, 1950.
- 4) Hood, S. C. : U. S. Dept. Agr. Bull., 442 : 1—12, 1917.
- 5) Jones, M. A. and Arrillaga, N. G. : Puerto Rico Fed. Expt. Sta. Bull., 50 : 1—41, 1950.
- 6) 三宅康次, 石塚喜明 : 土肥雜, 12 : 374—394, 1938.
- 7) Naves, Y. R. and Auriol, R. F. : Chem. Indus., 17th Cong., Commun., P. 83—89, 1937. Through Jones and Arrillaga 5)
- 8) Rakshit, J. N. : Sci. and culture, 5 : 108—111, 1939. Through Jones and Arrillaga 5)
- 9) Robles, P. S. and Arrillaga, N. G. : Puerto Rico Fed. Expt. Sta. Rpt., 1946 : 43—46, 1947.

## Summary

With two varieties of Western Indian lemon-grass (*Cymbopogon citratus Stapf*), experiments were carried out twice, from the end of May in 1952 to the middle of February in 1953 and from the end of June in 1953 to the middle of March in 1954. The investigations were carried out on the seasonal variations chiefly in the growth and the oil content of the plants. At the same time, the seasonal variations in the citral content and physical properties of the oil were also investigated. Results obtained are summarized as follows :

1) During the period of high temperature from about the end of June to about the middle or the end of September, the growth of the plant is most vigorous, and a rapid increase in both plant height and number of tillers is recognized. Consequently, during the period from about the end of July when harvesting is begun, to about the middle or the end of September, the rate of increase is highest in the weights of both leaves and stems.

2) With the descent of air temperature, the growth becomes slower and plant height and number of tillers seem to reach their maxima at about the beginning or the middle of October, and at about the middle or the end of November respectively. Therefore, the rate of increase becomes also slower, in the weights of both leaves and stems, and the time when the weight of whole leaves reaches its maximum seems to lie between the beginning and the end of November. The leaf-blades attain maximum growth first, followed by the leaf-sheaths and stems respectively.

3) After reaching maximum growth, the weight of each part of the top tends to decrease, and after about the beginning of January, a remarkable decrease in the weight of leaves, especially of leaf-blades, due to a descent in the water content of leaves caused by cold injuries, is recognized. Following this, a collapsed condition in the tops due to low temperatures and hard winds, becomes more noticeable. This damage seems to reach its extremity at about the beginning of February.

4) The oil content (vol/wt) of fresh leaves is conspicuously lower in leaf-sheaths than in leaf-blades. The oil content of leaf-sheaths tends to decrease somewhat, probably due to the low temperatures after about the beginning of January. The seasonal variations in the oil content is less in leaf-sheaths than in leaf-blades. On the other hand, the oil content of leaf-blades tends to become highest during the period from about the beginning of August to about the beginning or the middle of October, but wide variations are not recognized during the period from about the end of July to about the beginning or the middle of November. After about the end of November or the beginning of December, a decrease in the oil content of leaf-blades is recognized, probably due to low temperatures.

5) The rate of increase in the total yield of oil per clump is very rapid during the period from about the end of July to about the middle or the end of September. Thereafter, the rate of increase

becomes lower and the total yield of oil in the whole leaves reaches its maximum during the month of November. Thereafter, the total yield of oil per clump tends to decrease remarkably. This means that, though the oil content of leaf-blades increases suddenly at about the beginning of January and that of leaf-sheaths increases somewhat at about the beginning or the middle of January, such increases are due not to the increase in the total quantity of oil, but to the decrease in the water content of the leaves. The total quantity of oil is found to decrease still more remarkably. Although the weight of leaf-blades in one clump is much less than that of leaf-sheaths, the former gives a higher total oil yield per clump because of its higher oil content.

6) In leaf-blades, though a little decrease in the citral content of oil is recognized after about the middle of January, its seasonal variations are relatively small. But in leaf-sheaths, seasonal variations in the citral content are very large. It is highest during the period from about the beginning of August to about the end of September or the middle of October, and then it decreases gradually, until the rate of decrease becomes greatest at about the end of December or the beginning of January. This is probably due to the low temperatures. Until about the middle or the end of October, the citral content of leaf-sheaths is definitely higher than that of leaf-blades, but thereafter, differences between them become less and finally, leaf-sheaths tend to be inferior to leaf-blades. Therefore, in whole leaves, though the citral content tends to be highest during the period from about the beginning of August to about the end of September or the middle of October, it then decreases gradually. A remarkable decrease is not recognized until about the beginning of December. It decreases somewhat remarkably from the middle or the end of December, and further more remarkably after about the beginning of January.

7) Both the specific gravity and the refractive index of the oil from leaf-sheaths are significantly higher than those of the oil from leaf-blades. They tend to increase according to the growth of the plants. Both the specific gravity and the refractive index seem to reach their maxima at about the beginning of January in the oil from leaf-blades, and at about the middle of January in the oil from leaf-sheaths. They decrease somewhat thereafter.

8) The colour of the oil from young plants is light yellow becoming progressively deeper yellow with the aging of the plants, until finally at the death of the leaves during the first half of January, the colour is at its maximum density. The colour of the oil from leaf-sheaths is very lighter than that from leaf-blades. The oil from leaf-sheaths of young plants is nearly colourless, but it becomes yellow at the later period.

Received April 12, 1955

## 有用植物目録

宮崎 幸男, 高城 正勝

## List of Useful Plants in the Green-house

Izu Pharmaceutical Gardens

(Attached to the National Hygienic Laboratory)

155, Shimokamo, Minaminaka-Mura, Shizuoka-Ken, Japan

By Yukio MIYAZAKI and Masakatsu TAKI

1. This list contains plants which are growing in the green-house, as of January 1, 1955. But some of these plants have been found to grow also outdoors.

2. The scientific names of the plants are derived from the following books.

Bailey L. H. : The Standard Cyclopedia of Horticulture, 1925.

Brown, W. H. : Minor Products of Philippine Forests, 1921.

Burkill, I. H. : A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula, 1935.

Honda, M. and Sakizaka, M. : Nomina Plantarum Japonicarum, 1939.

Kirtikar, K. R. and Basu, B. D. : Indian Medicinal Plants, 1918.

## GYMNOSPERMAE 裸子植物亜門

Pinaceae マツ科

Agathis alba Foxw. マニラコパール

## ANGIOSPERMAE 被子植物亜門

## DICOTYLEDONEAE 双子葉植物綱

Amaryllidaceae ヒガンバナ科

Crinum latifolium L. インドハマユウ

Anacardiaceae ウルシ科

Anacardium occidentale L. カシュー

Mangifera indica L. マンゴー

Anonaceae バンレイシ科

Anona muricata L. トゲバナレイシ

- squamosa L. バンレイシ

Canangium odoratum Baill. イランイランノキ

Apiaceae セリ科

Hydrocotyle asiatica L. ツボクサ

Apocynaceae キョウチクトウ科

Aspidosperma Quebracho-blanco Schlecht.

ケブラチョー

Carissa carandas L. カリッサ

Plumeria acutifolia Poir. インドソケイ

Rauwolfia serpentina Benth. インドジャボク

Strophanthus gratus Franch. ストロファンツス

- hispidus DC. ストロファンツス

- Kombe Oliv. ストロファンツス

- Sarmentosus ストロファンツス

Thevetia nereifolia Juss. キバナキョウチクトウ

Araliaceae ウロギ科

Tetrapanax papyriferum K. Koch. ツウダツボク

Aristolochiaceae ウマノスズクサ科

Aristolochia elegans Mast.

- Asclepiadaceae ガガイモ科  
*Asclepias curassavica* L. タウワタ  
*Hemidesmus indicus* R. Br.
- Bixaceae ベニノキ科  
*Bixa Orellana* L. ベニノキ
- Bombacaceae キワタ科  
*Pachira macrocarpa* Schlecht.
- Caricaceae チチウリノキ科  
*Carica Papaya* L. パパイア
- Casuarinaceae トキハギョリウ科  
*Casuarina equisetifolia* Forst. モクマワウ
- Clusiaceae テリハボク科  
*Calophyllum inophyllum* L. テリハボク  
*Garcinia mangostana* L. マンゴーステン  
 - *xanthochymus* Hook. f. タマゴノキ
- Combretaceae シクンシ科  
*Quisqualis indica* L. インドシクンシ  
 - var. *villosa* Clarke シクンシ  
*Terminalia Bellerica* Roxbg. ミロバラン  
 - *Chebula* Retz. ミロバラン
- Convolvulaceae ヒルガホ科  
*Ipomoea digitata* L.  
 - *reputans* Poir. カンコン
- Crassulaceae ベンケイサウ科  
*Bryophyllum calycinum* Salisb.  
 セイロンベンケイ
- Cucurbitaceae ウリ科  
*Citrullus Colocynthis* Schrad. コロシント
- Ehretiaceae ムラサキ科  
*Heliotropium pervianum* L. キダチルリサウ
- Erythroxylaceae コカ科  
*Erythroxylon Coca* Lam. コカ
- Euphorbiaceae タカトウダイ科  
*Aleurites moluccana* Willd. ククイノキ  
*Euphorbia Tirucalli* L. ミドリサンゴ  
*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. パラゴムノキ  
*Jatropha Curcas* L. ナンヤウアブラギリ  
*Manihot utilissima* Pohl. キャッサバ  
 - *Graziovii* Muell. Arg.  
 マニホットゴムノキ  
*Mallotus philippinensis* Muell. Arg.  
 クスノハガシハ
- Phyllanthus *Embllica* L. ユカン
- Fagaceae ブナ科  
*Quercus suber* L. コルクガシ
- Flacourtiaceae イヒギリ科  
*Hydnocarpus anthelmintica* Pierre ダイフウシ  
 - *Kurzii* Warb.
- Geraniaceae フウロサウ科  
*Pelargonium denticulatum* Jacq.  
 ニホヒテンジクアフヒ  
 - *graveolens* L' Her.  
 - *odoratissimum* Ait.  
 - *quercifolium* Ait.  
 カンワバテンジクアフヒ  
 - *Radula* L' Her.

## Lamiaceae ラドリコサウ科

- Ocimum basilicum* L. メバウキ  
 - *gratissimum* L. インドメバウキ  
 - *sanctum* L.  
*Orthosiphon stamineus* Benth. クミスクテン  
*Pogostemon Cablin* Benth. パチュリー  
 - *heyneanus* Benth. パチュリー

## Lauraceae クス科

- Cinnamomum camphora* Sieb.  
 var. *linaloolifera* Fujita ホウショウ  
 - *zeylanicum* Nees. セイロンニクケイ  
*Persea americana* Mill. アボカド

## Loganiaceae フヂウツギ科

- Strychnos Nux-vomica* L. マチン

## Lythraceae ミソハギ科

- Lagestroemia Flos-Reginae* Reiz.  
 オホバナサルスベリ  
*Lawsonia inermis* L. ツマクレンアイノキ

## Malvaceae アフヒ科

- Hibiscus Rosa-sinensis* L. ブッソウゲ  
 - *Sabdariffa* L. ローゼル  
 - *tiliaceus* L. ヤマアサ

## Meliaceae センダン科

- Melia Azedarach* L. タイワンセンダン  
*Swietenia macrophylla* King. オホバマホガニ  
*Toona Calantas* Merr. et Rolfe

## Menispermaceae ツツラフヂ科

- Cissampelos Pareira* L.  
*Cocculus laurifolius* DC. カウシウウヤク  
*Stephania cepharantha* Hayata  
 タマサキツツラフジ

- *Sasakii* Hayata コウトウツツラフジ

## Moraceae クワ科

- Ficus elastica* Roxbg. インドゴムノキ  
 - *retusa* L. ガジュマル

## Myrtaceae テンニンクワ科

- Barringtonia acutangula* Gaertn.  
*Callistemon rigidus* R. Br. カリステモン  
*Eucalyptus citriodora* Hook. レモンユーカリ  
 - *globulus* Labill. ユーカリ  
 - *robusta* Smith ユーカリ  
*Eugenia caryophyllata* Thunb. チョウジ  
 - *Jambos* L. フトモモ  
*Leptospermum citratum* Challinor, Cheel et Penfold  
*Melaleuca Leucadendron* L. カユブテ  
*Myrtus communis* L. マートル  
*Psidium cattleianum* Sabine ストロベリグアバ  
 - *Guajava* L. バンジロー

## Oleaceae モクセイ科

- Jasminum grandiflorum* L. タイワンソケイ  
 - *odoratissimum* L. キソケイ  
 - *Sambac* Ait. マツリカ

## Papilionaceae マメ科

- Acacia arabica* Willd. アラビアゴムモドキ  
 - *Baileyana* F. V. M. ギンバアカシヤ  
 - *confusa* Merr. ソウシジュ  
 - *Farnesiana* Willd. キンガウクワン  
 - *mollissima* Willd. モリシマアカシヤ  
*Adenantha pavonia* L. ナンバンアカアヅキ  
*Bauhinia alba* Buch-Ham.  
 - *purpurea* L. ムラサキモクワンジュ  
*Caesalpinia Bonducella* Flem. シロツブ  
 - *Sappan* L. スホウボク  
*Calopogonium mucunoides* Desv.  
*Cassia alata* L. ヘネセンナ  
 - *Fistula* L. ナンバンサイカチ  
*Ceratonia Siliqua* L. イナゴマメ  
*Enterolobium tinbouva* Mart.  
*Erythrina indica* Lam. ハリギリ

Delonix regia Rafin. ホウオウボク  
 Derris elliptica Benth. デリス  
 - malaccensis Prain. デリス  
 - sinuata Benth. デリス  
 Haematoxylon campechianum L. ロッグウッド  
 Leucaena glauca Benth. ギンガウクワン  
 Milletaria taiwaniana Hayata ドクフジ  
 Pterocarpus indicus Willd. インドシタン

## Passifloraceae トケイサウ科

Passiflora edulis Sims. クダモノトケイサウ

## Piperaceae コセウ科

Piper nigrum L. コセウ

## Plumbaginaceae イソマツ科

Plumbago capensis Thunb. ルリマツリ

## Proteaceae ヤマモガン科

Grevillea robusta A. Cunn. キヌガシハ

## Rhamnaceae クロウメモドキ科

Zizyphus Jujuba Lam. イヌナツメ

## Rubiaceae アカネ科

Cinchona succirubra Pav. キナ

Coffea arabica L. コーヒーノキ

- liberica Ball. コーヒーノキ

- robusta Hort. コーヒーノキ

Manettia glabra Cham. et Schlecht. カエンソウ

## Rutaceae ヘンルウダ科

Citrus bergamia Risso et Poiteau ベルガモット

Murraya exotica L. ゲッキツ

Pilocarpus pennatifolius Lam. ヤボランヂ

## Santalaceae ビャクダン科

Santalum album L. ビャクダン

## Sapindaceae ムクロシ科

Euphoria Longana Lam. リウガン

Litchi chinensis Sonn. レイシ

Sapindus Saponaria L.

## Sapotaceae クロテツ科

Achras Sapota L. サボデラ

## Solanaceae ナスビ科

Datura suaveolens Homb.

キダチテウセンアサガホ

## Tiliaceae シナノキ科

Elaeocarpus serratus L. セイロンオリーブ

## Verbenaceae クマツツラ科

Lantana Camara L. シチヘンゲ

Lippia citriodora Kunth. コウスイボク

Vitex Agnus-castus L. セイヤウニンジンボク

## MONOCOTYLEDOMEAE 単子葉植物綱

## Bromeriaceae アナナス科

Ananas comosus Merr. パインアップル

## Commelinaceae ツユクサ科

Rhoeo discolor Hance ムラサキオモト

- - var. vittata Hook.

フィリムラサキオモト

## Coryphaceae シュロ科

Areca Catechu L. ビンラウ

Arenga saccharifera Labill. サタウヤシ

Caryota urens L. クヂャクヤシ

Cocos nucifera L. ココヤシ

Elaeis guineensis Jacq. アブラヤシ

*Livistona chinensis* R. Br. ビラウ  
*Phoenix dactylifera* L. ナツメヤシ

## Liliaceae ユリ科

*Aloe arborescens* Mill. var. *natalensis* Berger  
 キダチロカイ  
 - *Hanburiana* Naudin  
 - *saponaria* Haw. シャボンロカイ  
 - *vera* L. var. *chinensis* Haw.

トウロカイ

*Herreria salsaparilla* Mart.

## Musaceae バセウ科

*Musa cavendishii* Lam. サンジャクバナナ  
 - *minor* Nakai キンクバナナ  
 - *sapientum* L. バナナ

## Orchidaceae ラン科

*Vanilla planifolia* Andr. ザアニラ

## Poaceae イネ科

*Cymbopogon citratus* Stapf レモングラス  
 - *flexuosus* Stapf マラパールグラス  
*Cymbopogon Winterianus* Jowitt シトロネラ  
*Vetiveria zizanioides* Stapf ベチベル

## Zingiberaceae ショウガ科

*Alpinia chinensis* Rosc. アラノクマタケラン  
 - *speciosa* K. Schum. ゲッタウ  
*Amomum amarum* ヤクチ  
*Curcuma aeruginosa* Roxbg.  
 - *longa* L. ウコン

*Elettaria Cardamomum* White et Maton

カルダモン

*Hedycium spicatum* Ham. サンナ  
*Zingiber zerumbet* Smith ハナショウガ

Received April 12, 1955

医学的応用を目的とする各種金属の生体内移入に関する実験的観察

藤井正道

The Experimental Studies on the Effect of Various Metals  
inserted into Vivo for the Purpose of Medical Applications

By Masamichi FUJII

目 次

第一章 緒 言

第二章 歯科補綴用合金の腐蝕試験

1. 化学試薬による浸漬試験

A. 従来 の 規 格

B. 従来 の 試験方法の検討

2. 異種金属間電位差試験

第三章 各種金属の生体内移入に関する実験的観察

A. 各種合金を筋肉内に挿入せる場合

B. 各種合金を骨内に挿入せる場合

C. 腐蝕試験に対する考察

第四章 歯科補綴用合金の機械的性質

1. 非 鑄 造 用 合 金

2. 鑄 造 用 合 金

3. 線 材

4. 歯科補綴用合金の機械的性質に対する考察

第五章 総 括

第一章 緒 言

歯科補綴用合金中、非鑄造用合金（主として金冠作製用合金）、鑄造用合金（主としてインレー鑄造用合金）及び線材（鈎用、リングバー及びパラタルバー等）に関して著者は日本歯科材料協会歯科材料調査委員会の委嘱により昭和八年以来研究し、その結果は昭和十三年七月及び昭和十八年六月に歯科材料規格中、第4号規格非鑄造用合金、第5号規格非鑄造用合金、第6号規格鑄造用合金、第8号規格非鑄造用合金、第9号規格鑄造用合金、第10号規格非鑄造用銀パラヂウム合金、第11号規格鑄造用銀パラヂウム合金、第13号規格金合金代用非鑄造用銀合金、第14号規格金合金代用鑄造用銀合金として発表されたのである。

然るにその後社会情勢の変化に伴い金合金、白金合金、銀パラヂウム合金等の貴金属合金のみを以て之等歯科補綴用合金を賄うことが不可能となり之に伴つて各種代用合金及び低カラット金合金の研究が盛んとなり、その結果貴金属以外の合金を以て之にあてる現状となつたのである。而してこの傾向は特に補綴用合金中非鑄造用合金及び鑄造用合金に於て著しい。鈎用合金中鈎用線は、その使用が茲数年前より盛んになつた關係上既に金合金よりもむしろその代用とも云うべき合金線が現在盛んに使用されているのである。

又之等の金属類以外に充填用合金として銀アマルガム用合金があり、之に対する規格は歯科材料協会第1号規格銀アマルガム用合金として、米国に於ては American Dental Association Specification No.1. For Dental Amalgam Alloys. として発表されている。

著者は昭和八年歯科材料協会歯科材料調査委員会が発足して以来その研究員として諸般歯科材料規格設定に従事した關係上近年使用されている之等合金の諸性質を研究した。

なお今日迄歯科材料に関しては材料強度その他に就ての研究は充分に行われたのであるが生物学的研究はあまり

行われていなかった。近時これらの歯科用金属が歯科のみならず医学的方面、殊に骨関節外科等に補綴充填材料として使用される機会が多くなって来たのであるが、未だその材料学的研究と、生物学的研究が同時に相関聯して行われることが少なかった。

この点について、この機会に研究を進めることも意義あることと考えられるので、この一聯の研究を行った。

## 第二章 歯科補綴用合金の腐蝕試験

口腔内に装着した補綴用合金類は食物、食物の歯間残渣の醗酵生成物即ち有機酸類及び硫化物、胃酸、唾液の作用及び空気、熱の作用を受ける。又種々の電氣的作用も発生する。

之等の作用は相複合し、その作用は複雑微妙であつて現在之等の作用を実験室に於て実現することは不可能であるが、歯用合金としては可及的に口腔内生理作用に近似した化学的試験法を定めて、耐蝕性を試験し、腐蝕減量の少い合金を使用に供することは誰しも異論の無いことである。

### 1. 化学試薬による浸漬試験

#### A. 従来の規格

米国 Bureau of Standards に於ける歯科補綴用合金類に対する腐蝕試験は次の如きことを考慮しているに過ぎない。

- i 口腔内の酸化作用に対しては 30% 過酸化水素水中に 24 時間浸漬して腐蝕及び変色しないこと。
- ii 硫化に対しては卵黄中に之が腐敗する間金属を浸漬する。或はアンモニヤ水 100cc に硫化水素ガスを飽和し、之にアンモニヤ水 100cc を加え更に之を水にて 500cc として、ピーカー中にて 96 時間浸漬して腐蝕及び変色しないこと。

即ち主として貴金属類、不銹鋼類及び Co 系合金を使用している故に腐蝕試験に関しては深く研究する必要が無いからである。

日本歯科材料協会規格に於ては試薬として 1% 乳酸溶液、0.05% 塩化水素溶液、1% 食塩溶液、1% 硫化ソーダ溶液を使用し、3 日間 37° にて浸漬することになっている。而して之等の試薬及び方法は著者の研究した成績によるものであつて、乳酸に対しては、食物の口腔内残渣が醗酵して生ずる有機酸が乳酸であることを考慮したものである。

著者の研究によれば隣接歯間の空隙に於て局部的には約 3% 乳酸が生ずることもあるが、之は極めて口腔内が不潔になつた場合であつて、普通 1 日 1 回口腔内を清掃する場合を考慮して、米飯、パン等によつて口腔内に 24 時間後生ずる有機酸は乳酸として 0.5~0.95% である。それ故に乳酸溶液の濃度を 1% と定めた。

塩化水素溶液は塩酸リモノード等飲料水として口腔に入り得る塩酸と、又胃液中の遊離塩酸 (0.05~0.2%) を考慮したが、口腔内に於ける濃度としては 0.05% なる故に之を以て試験することとした。

食塩溶液は食品に於ける含量を考慮して 1% 食塩溶液を定めた。

硫化ソーダは蛋白質の分解に基因する硫化作用を考慮し、1% 硫化ソーダ溶液を使用することとした。

之等の試薬に合金類を 1 週間 37° に保ち、その腐蝕及び変色の程度を検する如く規定したのであるが、その後浸漬日数は 3 日間でも可なることが著者によつて判明し (衛生試験場彙報第 59 号昭和 17 年 3 月) 浸漬日数は 1 週間より 3 日間に短縮した。

歯用軟質 Ni-Cr 合金板規格調査会規格に於ては浸漬試験に使用する試薬は 1% 硫化ソーダ及び食塩 1% 含有 1% 醋酸溶液とし、1 週間 37° に保ちたる後、腐蝕減量を検する如く規定したのであるが、食塩 1% 含有 1% 醋酸溶液は酢物の料理を考慮して定めたものである。

著者は以上の既存規格により歯科補綴用合金を試験し第 1 表に示す如き成績を得た。

第 1 表 歯科補綴用合金の浸漬試験成績

資料	浸 漬 液	0.05% HCl (mg/cm <sup>2</sup> )	1% Lactic Acid (mg/cm <sup>2</sup> )	1% NaCl	1% Na <sub>2</sub> S
Ni-Cr 合金板 Cr 4.09~9.72		0.85~3.35	0.03~1.96	変色せず	変色せず

資 料	浸 漬 液	0.05%HC1 (mg/cm <sup>2</sup> )	1%Lactic Acid (mg/cm <sup>2</sup> )	1%NaCl	1%Na <sub>2</sub> S
Ni-Cr-Fe合金板 Ni 61.7 Cr 12.39 Fe 11.77 Mn 6.36 Co 0.17 Cu 0.1		0.25~0.51	0.02~0.15	"	"
Ni-Cr合金線 Ni-Cr-Mo-V合金線		0.9~2.28	0.2~1.04	"	"
18-8鋼線		0	0	"	"
Co-Cr合金線 Co20~55		0~0.3	0~0.13	"	"
銅合金板 Cu 60~70 Zn 20~40 Al 0.1~10		0.38~1.68	0.95~2.05	灰色~ 赤褐色	黄褐色 ~黒褐色
洋銀系合金 Cu 21.8~43.2 Ni 10.4~32.5 Zn 0 ~44.8 Sn 0 ~42.8		0.46~4.86	0.60~2.76	灰 色	"
銀合金板 Ag 75.9 ~83.84 Zn 2.73~14.65 Sn 0 ~ 4.56		0~0.14	0~0.13	変色せず~ 灰色	"
銀合金鑄造用 Ag 64.4~69.5 Zn 0 ~15.1 Sn 20 ~24.5 Cd 0 ~10.28		0~3.57	0.02~4.29	"	僅かに黄褐色 ~黄褐色
錫アンチモン合金 Sn 65~70 Sb 25~30		3.04~3.96	3.79~4.32	灰 色	黒灰色
銀アマルガム		0.04~0.52	1.39~3.25	"	黒褐色
銅合金鑄造用 板用を鑄造した場合 組成板用と等し		0.87~3.83	1.18~3.29	灰色~赤褐色	黄褐色 ~黒褐色

資 料	浸 漬 液	1%NaCl + 1%CH <sub>3</sub> COOH 7日(mg/cm <sup>2</sup> )	3日(mg/cm <sup>2</sup> )	1%Lactic Acid 3日(mg/cm <sup>2</sup> )
Ni-Cr合金板	1	2.50	1.20	0.45
"	2	1.47	0.97	0.87
"	3	1.87	1.00	0.68
"	4	2.23	1.03	0.45
"	5	2.23	1.07	0.50
Ni-Cr-Mo-V合金線		1.00	0.97	0.57
Co-Cr合金線		0.03	0.03	0
18-8鋼線		0.03	0.03	0
銀合金板		0.03	0.03	0.03
銀合金鑄造用	1	1.09	0.49	0.44
"	2	1.39	0.52	0.35
"	3	4.86	3.22	2.48
銀アマルガム	1	1.36	0.29	1.15

資 料	浸 漬 液	1%NaCl + 1%CH <sub>3</sub> COOH		1%Lactic Acid
		7日(mg/cm <sup>2</sup> )	3日(mg/cm <sup>2</sup> )	3日(mg/cm <sup>2</sup> )
銀アマルガム	2	2.39	0.84	3.25
"	3	2.78	0.52	1.39
"	4	2.55	0.51	1.55
銅合金板		4.03	2.63	1.35
銅合金鑄造用		2.95	1.03	1.85
洋銀系合金		3.95	2.07	2.55
錫アンチモン合金		4.09	2.05	3.79

### B. 従来の試験方法の検討

前項の試験成績によれば、錫アンチモン合金、洋銀系合金、銀アマルガム及び鑄造用銀合金等は1%乳酸溶液に対しては3日間37°にて約3mg/cm<sup>2</sup>腐蝕減量する。(銀アマルガム No.2, 鑄造用銀合金 No.3 参照) もしも之等の合金が口腔内に於て斯くの如く腐蝕減量するものとする、之等が単純窩洞に使用されたとすれば、使用合金量0.5~1gは500~1000日にて全部溶解し尽すこととなる。

又Ni-Cr合金は1%乳酸溶液に対して腐蝕減量は3日間に約0.6mg/cm<sup>2</sup>であり、厚さ0.2mmの板は約800日にて全部溶解し尽すこととなる。

然るに此等の合金は何れも十数年間口腔内に装着しても溶解し尽すことは無い、それ故従来の試験方法による成績は事実にあてはまらない。

0.05%塩化水素溶液及び食塩1%含有1%醋酸溶液による腐蝕試験成績に於ても全く同様の結果となる。

斯くの如く事実と反する結果の生ずる原因を検討するに、従来の試験方法は何れも浸漬時間が長過ぎる傾向がある。それ故著者は0.05%塩化水素溶液、1%乳酸溶液及び食塩1%含有1%醋酸溶液に就て37°にて24時間浸漬した結果第2表に示す如き成績を得た。

第2表 24時間浸漬せる場合の腐蝕減量

資 料	浸 漬 液	0.05%HCl	1%Lactic Acid	1%NaCl 1%CH <sub>3</sub> COOH
		(mg/cm <sup>2</sup> )	(mg/cm <sup>2</sup> )	(mg/cm <sup>2</sup> )
Ni-Cr合金板	1	1.01	0.35	0.43
"	2	0.92	0.52	0.66
"	3	0.88	0.74	0.54
"	4	1.14	0.46	0.66
"	5	1.45	0.38	0.50
"	6	0.98	0.41	0.54
"	7	0.78	0.54	0.66
"	8	0.93	0.40	0.66
銀合金鑄造用	1	0.65	0.48	0.60
"	2	0.45	0.40	0.34
銅合金(板鑄)		1.21	0.95	1.13
錫アンチモン合金		1.85	2.78	0.75
銀アマルガム	1	0.02	1.52	0.68
"	2	0.08	0.92	0.49
"	3	0.13	2.16	1.58

本試験成績によればNi-Cr合金の腐蝕減量は0.05%塩化水素溶液に於ては約1mg/cm<sup>2</sup>であり、1%乳酸及び食塩1%含有1%醋酸溶液に於ては約0.5mg/cm<sup>2</sup>である。もし口腔内に於て、斯くの如く腐蝕減量するとせば、厚さ0.2mmの板は約165日乃至330日で全部溶解し尽すこととなり、前記3日間の浸漬試験成績よりも著しく事実と反することとなる。其他の銀合金、銅合金及び錫アンチモン合金に於ても亦事実と反する結果となる。

以上の成績よりして、更に浸漬時間を短縮する必要ありとして、浸漬時間を12時間として試験せる結果第3表

に示す如き成績を得た。

第3表 12時間浸漬せる場合の腐蝕減量

資 料	浸 漬 液	0.05% HCl (mg/cm <sup>2</sup> )	1% Lactic Acid (mg/cm <sup>2</sup> )	1% NaCl 1% CH <sub>3</sub> COOH (mg/cm <sup>2</sup> )
Ni-Cr 合金板	1	0.25~1.00	0.00~0.25	0.05~0.43
"	2	0.34~0.68	0.08~0.43	0.14~0.58
"	3	0.14~0.59	0.14~0.68	0.45~0.58
"	4	0.02~1.15	0.35~0.59	0.01~0.45
"	5	0.48~0.94	0.21~0.38	0.15~0.40
"	6	0.05~0.48	0.15~0.40	0.08~0.53
"	7	0.21~0.58	0.01~0.48	0.21~0.58
"	8	0.14~0.85	0.00~0.40	0.09~0.60
銀合金鑄造用	1	0.01~0.35	0.00~0.40	0.14~0.55
"	2	0.24~0.40	0.01~0.35	0.04~0.28
銅 合 金 (板 鑄)		0.75~0.90	0.05~0.85	0.88~1.00
錫アンチモン合金		1.98~2.65	1.58~2.21	0.35~0.65
銀アマルガム	1	0.48~1.35	1.15~1.50	0.04~0.60
"	2	0.35~0.85	0.15~0.75	0.14~0.38
"	3	1.75~2.10	1.48~2.00	0.58~1.43

試験の結果 Data は著しく変動し正確なる腐蝕減量を定めることが困難である。

以上の試験結果よりして浸漬時間は24時間とし、試薬の濃度を従来の $\frac{1}{2}$ とした場合につき試験せる結果第4表に示す如き成績を得た。

第4表 試薬の濃度を $\frac{1}{2}$ とし24時間浸漬せる場合の腐蝕減量

資 料	浸 漬 液	0.025% HCl (mg/cm <sup>2</sup> )	0.5% Lactic Acid (mg/cm <sup>2</sup> )	0.5% NaCl 0.5% CH <sub>3</sub> COOH (mg/cm <sup>2</sup> )
Ni-Cr 合金板	1	0.21~0.89	0.00~0.08	0.00~0.34
"	2	0.29~0.68	0.00~0.38	0.08~0.21
"	3	0.10~0.58	0.09~0.60	0.15~0.48
"	4	0.02~1.08	0.28~0.51	0.01~0.28
"	5	0.45~0.89	0.09~0.40	0.06~0.35
"	6	0.05~0.50	0.09~0.35	0.00~0.45
"	7	0.21~0.58	0.00~0.39	0.15~0.55
"	8	0.14~0.88	0.01~0.40	0.01~0.60
銀合金鑄造用	1	0.01~0.30	0.02~0.38	0.00~0.50
"	2	0.21~0.39	0.03~0.40	0.00~0.09
銅 合 金 (板 鑄)		0.65~0.88	0.05~0.61	0.09~0.86
錫アンチモン合金		1.76~2.33	0.93~1.86	0.02~0.35
銀アマルガム	1	0.35~1.21	1.00~1.35	0.07~0.18
"	2	0.25~0.65	0.10~0.55	0.02~0.36
"	3	1.55~2.00	1.33~1.99	0.23~0.78

本試験成績によれば試薬の濃度を $\frac{1}{2}$ としても腐蝕減量には殆んど変わらず等しいが、Data が変動して再現性が乏しくなる。

以上の試験成績よりして、歯科補綴用合金の酸類に対する腐蝕試験を事実と矛盾せず且つ Data が変動せず再現性をもたせる為めには寧ろ酸の濃度を上げて、浸漬時間を短時間にすることが望ましい。

然るに乳酸は口腔内に於ては、食物残渣の發酵により生ずるものであり、歯用合金の腐蝕試験試薬として棄て難

いものであるが、化学薬品としては、純良なものが殆んど無く且つ光学異性体を有し又無水乳酸を混入し、不適当である。

著者が Ni-Cr 合金に就て、市販数種の乳酸を以て 1% 乳酸溶液を作り 37°、3 日間浸漬試験せる結果第 5 表に示す如き成績を得た。

第 5 表 市販乳酸による浸漬試験成績  
使用金属 Ni-Cr 合金 1~7 (溶液は遊離乳酸 1% 溶液とす)

浸漬資料	乳酸	減 量 (mg/cm <sup>2</sup> )				
		L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>
1		1.68	0.77	0.47	0.42	0.45
2		1.72	0.96	0.55	0.36	0.51
3		2.20	1.69	1.35	0.84	0.91
4		2.46	1.49	1.15	0.16	0.25
5		1.58	0.76	0.42	0.45	0.68
6		1.49	0.55	0.31	1.48	1.66
7		3.98	2.53	2.25	1.04	1.25

又之等市販乳酸に水を加えて水浴上にて 3 時間加熱したる後遊離乳酸 1% 溶液を作り、同様に試験せる結果第 6 表に示す如き成績を得た。

第 6 表 処理せる各種乳酸による浸漬試験成績  
使用金属 Ni-Cr 合金 (溶液は遊離乳酸 1% 溶液とす)

浸漬資料	乳酸	減 量 (mg/cm <sup>2</sup> )				
		L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>
1		1.5	0.85	0.57	0.88	0.95
2		1.33	0.97	0.42	0.73	1.28

以上の試験成績よりして乳酸は試薬とすることは望ましく無い。

又塩酸は合金類に対する作用が強く、前記せる如く浸漬時間の短縮による腐蝕減量の変動が大である。

故に著者は飲食物用器検査法に採用する 4% 醋酸を採用し、歯用合金を試験片 1cm<sup>2</sup> に付き醋酸 2cc に 10 分間浸漬し、溶出せる金属を比色定量せる結果第 7 表に示す如き成績を得た。

第 7 表 4% 醋酸による溶出金属量

資 料	溶出金属量 (g/cm <sup>2</sup> )
銀合金 鑄造用	10 <sup>-4</sup> ~ 5×10 <sup>-4</sup>
洋銀系 鑄造用	1.2×10 <sup>-4</sup> ~4.8×10 <sup>-4</sup>
銅合金 鑄造用	5×10 <sup>-4</sup> ~6.2×10 <sup>-5</sup>
銅合金 板	2.5×10 <sup>-4</sup> ~2.3×10 <sup>-5</sup>
銀合金 板	2×10 <sup>-6</sup>
銀アマルガム	10 <sup>-6</sup> ~5.4×10 <sup>-7</sup>
Ni-Cr 合金線板	—
Ni-Cr-Mo-V 合金線	—
18-8 鋼線	—
Co-Cr 合金線	—
金合金 (18k 以上)	—

本試験成績によれば、金合金、18-8 鋼、Co-Cr 系合金及び Ni-Cr 合金は殆んど溶出せず、その他の合金に於ては 1cm<sup>2</sup> に付き 10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup>g であつて上記腐蝕試験成績に於ける如く短日月に溶解し尽すが如き事実と反する結果とならず、且つこれ等合金類の腐蝕傾向も事実と矛盾しない。

それ故に著者は化学試薬による浸漬試験方法としては本方法が最も適切であると結論するものである。

## 2. 異種金属間電位差試験

歯科補綴用合金の優劣或は合金が歯用として適するや否やを電氣的に測定せんとして著者はこれ等合金類の Pt に対する電位差を測定した。

測定方法は 1% 食塩水中にて 37° に於て Pt を陰

極として陽極に各種補綴用合金を使用し、極の大きさは15×20mmとし、その $\frac{1}{2}$ の15×10mmを浸漬し、両極間距離を約30mmとした。

試験の結果第8表に示す如き成績を得た。

第8表 歯用合金の電位差  
対極 Pt 37° 1% NaCl 溶液中

資料 時間	18-8鋼 鉤用線	18-8鋼 パラタ ルバー	Co-Cr 合 金 リンガ ルバー 1	Co-Cr 合 金 パラタ ルバー 2	Co-Cr 合 金 鉤用線 3	Ni-Cr- Mo-V 合 金 パラタ ルバー 1	Ni-Cr- Mo-V 合 金 リンガ ルバー 2	Ni-Cr 合 金 1	Ni-Cr 合 金 2	Ni-Cr 合 金 3	Ni-Cr 合 金 4	Ni-Cr 合 金 5
	浸漬直後	0.23867	0.21717	0.20000	0.41289	0.26737	0.21337	0.25928	0.26137	0.24748	0.30410	0.26244
1 hr	0.21545	0.16541	0.15487	0.22368	0.24384	0.16549	0.19358	0.25951	0.22346	0.24204	0.18454	0.18546
2 "	0.16833	0.12766	0.12098	0.13593	0.20692	0.14494	0.14523	0.23151	0.19814	0.18425	0.18004	0.17036
3 "	0.15001	0.10043	0.09825	0.16954	0.21560	0.12984	0.14034	0.19036	0.17032	0.15011	0.17900	0.16062
1 dag	0.07300	+0.00077	0.05728	0.28320	0.22443	0.08561	0.11346	0.19217	0.18624	0.17508	0.15034	0.18466
2 "	0.03423	+0.01452	+0.02032	0.34006	0.23517	0.15656	0.19838	0.14387	0.15786	0.13407	0.18042	0.18627
3 "	0.02552	—	—	—	0.28468	—	—	0.15574	0.18204	0.14937	0.15937	0.18170

資料 時間	Ni-Cr- Fe 合 金	銀合金 板	銀合金 鑄造用 1	銀合金 鑄造用 2	銀合金 鑄造用 3	銀合金 鑄造用 4	銀合金 鑄造用 5	銀合金 鑄造用 6	銀ア マルガ ム 1	銀ア マルガ ム 2	銀ア マルガ ム 3	錫アン チモン 合 金
	浸漬直後	0.24293	0.43104	0.15354	0.19923	0.33835	0.18806	0.18217	0.19480	0.47463	0.54805	0.65780
1 hr	0.20094	0.42896	0.16004	0.18315	0.30154	0.17446	0.17324	0.18114	0.43828	0.50941	0.60082	0.42951
2 "	0.13666	0.42785	0.15496	0.17001	0.31263	0.17879	0.15500	0.16940	0.41547	0.46110	0.46777	0.40724
3 "	0.10906	0.40541	0.16542	0.17095	0.30025	0.14354	0.12395	0.17001	0.49668	0.45342	0.45638	0.42349
1 dag	0.09812	0.37822	0.18408	0.15534	0.28367	0.12497	0.10667	0.16417	0.50002	0.47835	0.47653	0.44756
2 "	0.06002	0.44907	0.24803	0.24832	0.43858	0.25541	0.18645	0.33914	0.62685	0.59777	0.52953	0.62453
3 "	0.07044	0.35104	0.19418	0.18874	0.50132	0.50000	0.15288	0.27404	0.55460	0.55994	0.51068	0.52917

試験成績は上記化学薬品による浸漬試験成績と殆んど平行する故に本試験を以て浸漬腐蝕試験を代行することを得。但し電解質を食塩としたために Cl に反応し易い銀合金板は電位差が他の合金に比較して大である。

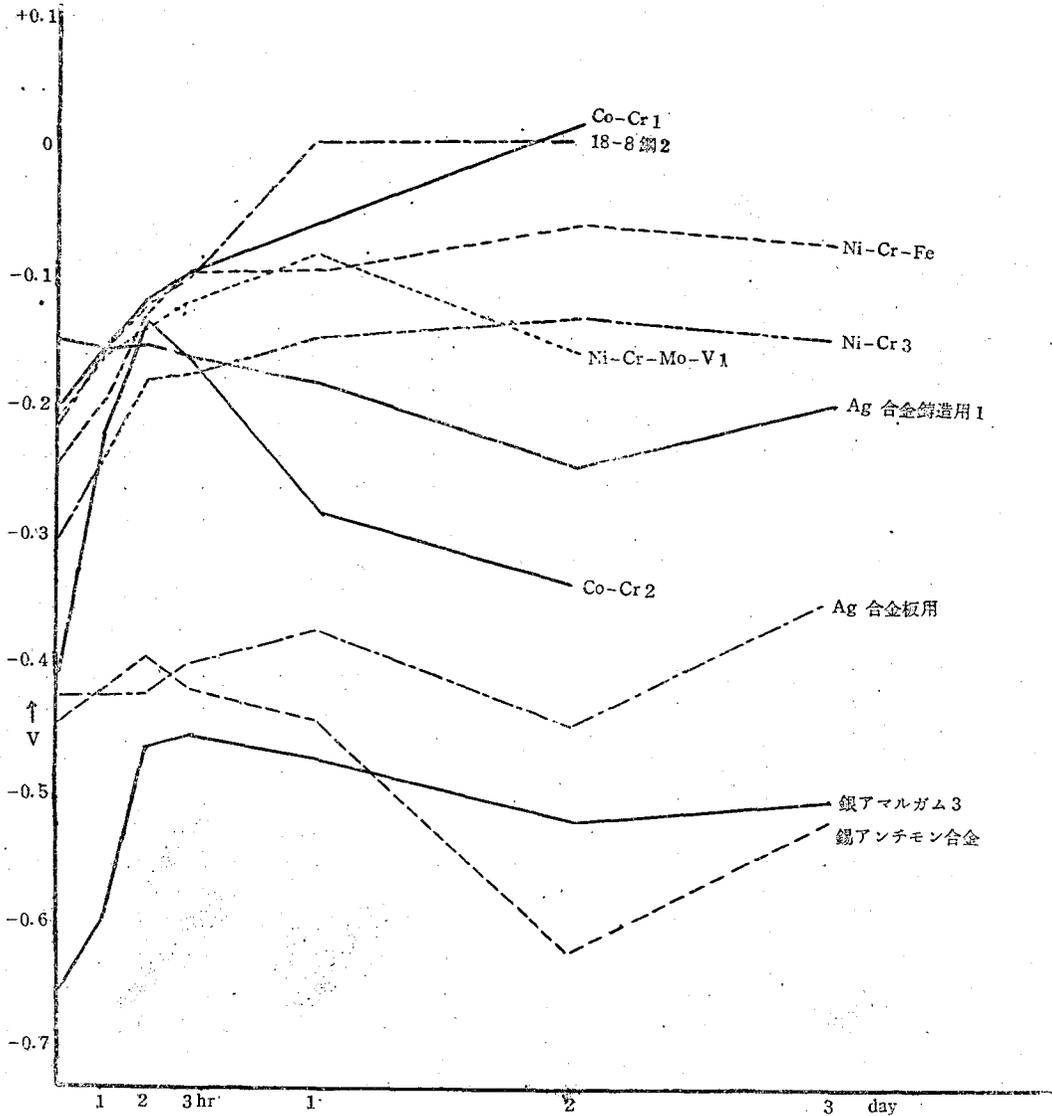
又 Co-Cr 系合金として市販されている線材に於ても第8表に於ける Co-Cr 合金 No. 1 は Fe の含量の少い所謂“Vitallium”系に属する Co-Cr 系合金であり、18-8鋼とともに電位差は小さいが、No. 2 及び No. 3 は、試験中溶液中に水酸化鉄の沈澱を生ずる程 Fe の含量の多いものであり、所謂“Multimet”系に属する Ni-Cr-Co-Fe 系合金に属するものであり、Fe 35~45%を含有するものである故に電位差は Co-Cr 合金 No. 1 よりも遙かに大である。即ち Cl に反応し易い合金は電位差が大となる故に、歯用としての合金類を、この試験成績のみを以て判定することは出来ない場合もある。

以上の研究によつて判明せる如く、歯用合金に対する腐蝕試験は従来規程に於ける如く1%乳酸溶液及び食塩1%含有1%醋酸溶液中に37°にて3日間或は1週間浸漬する方法は口腔内に於ける実情とは全く異なる腐蝕減量を示し、又0.05%塩化水素溶液による腐蝕減量も亦全く同様に著しく事実とは異つた過度な腐蝕減量を示すものである。

それ故著者は腐蝕試験としては4%醋酸による試験方法及び之と平行して電位差測定を推奨するものであるが、歯用合金としての腐蝕の限度を決定する為めに、これ等歯用合金を家兎を使用して病理学的に研究した。

### 第三章 各種金属の生体内移入に関する実験的観察

現在市販されている歯科補綴用合金に於て歯用として発売されるに先立つて之を動物を使用して病理学的に研究した上で、更に之を臨床実験し、発売されているものは殆んど無く、金合金は慣習に従つて使用し、銀アマルガ



補綴用合金の電位差 (対極Pt) 1%NaCl 37°

△、錫アンチモン合金、不銹鋼、コバルト系合金は米国歯科医術に従つて之を使用し、その他の銀合金、Ni-Cr合金、洋銀系合金、銅合金等は歯科技工に適する範囲に於て直接口腔内にて著しく変色しないものを作製し発売している現状である。それ故に屢々之等の合金に対して衛生上の問題が討議される。

著者は此等各種合金の家兎による生体組織反応を研究し、前記化学試薬による腐蝕減量に対し歯用上の限度を決定し、歯用としての適否を検討した。

A. 各種合金を筋肉内に挿入せる場合

1. 実験材料

- a. Ni板 (電解ニッケル)
- b. Ni-Cr合金板 (Ni 88.65 Cr 8.21 Fe 1.25 Mn 1.21 Co 0.23 Cu 0.41)
- c. 不銹鋼 (18-8鋼)
- d. Co-Cr合金 (Co 55 Cr 20 W 5 Ni 18 Mo 2)
- e. 銅合金 (Cu 60 Zn 38 Al 1.5 Fe 0.5)
- f. 銀合金板 (Ag 80 Zn 15 Cd 5)

g. 銀合金铸造用 (Ag 68 Zn 20 Cd 8 Sn 4)

h. 洋銀系合金 (Cu 40 Ni 15 Sn 5 Zn 40)

2. 実験方法 上記の合金を以て直径約 5 mm 厚さ約 0.5mm の円板を作製し、家兔の後肢大腿部内側の筋肉に挿入し、3ヶ月後検査した。又対照の意味に於て白金板に就て同様に検査した。

3. 実験成績 各種合金板挿入3ヶ月後、挿入部の筋肉の組織及び合金を検査せる結果、次の如き成績を得た。試験成績を表示すれば第9表に示す如し。

第9表 各種金属の生体内移入実験成績 (筋肉内挿入)

資料	結合織			膿瘍形成	色素沈着	沈ヘモジデリン着	筋萎縮	筋変性	細胞浸潤					赤血球 (血管外)	金属面
	幼若度 (f)	厚さ (r)	粗密						偽エオジン細胞	リンパ球	組織性細胞	細細胞	プラスマ細胞		
白金	-	+	粗	-	-	+	+	±	-	±	± (+)	-	-	-	変化ナシ
純 Ni	+	+	粗	+	-	+	±	+	+	+	+	不明	±	+	灰色
Ni-Cr	-	+	粗	±	-	+	+	±	+	+	+	不明	±	+	殆んど変化ナシ
18-8 鋼	-	+	稍々密	-	-	+	-	不明	-	±	±	-	-	-	変化ナシ
銅合金	-	+	稍々密	-	不明	+	-	±	-	±	±	-	-	-	赤褐色
銅合金 (铸造用)	-	+	密	-	-	+	+	-?	-	+	±	-	-	-	僅かに灰色
銀合金 (板用)	-	+	密	-	+	+	+	-?	-	±	±	-	-	-	黒褐色
Co-Cr合金	-	+	密	±	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	殆んど変化ナシ
洋銀系合金 Ni-Sn	+	+	粗	±	-	+	+	-?	+	+	+	不明	±	-	黒褐色
-Cu-Zn															

(f) 幼若度は (+) の増加する程幼若なものとする。

(r) 厚さは (+) の増加する程厚みの増加を示す。

(+) 組織性肥伴細胞を認めた。

試験成績の詳細は次の如し。

a. Ni 板 金属面は灰色を呈し、金属を中心として、稍々厚く粗い肉芽組織よりなる囊状の被包に包まれ膿瘍を形成して居り (主として偽エオジン嗜好白血球よりなる) 肉芽組織は網目状を呈し、毛細血管多く、偽エオジン嗜好細胞、組織球、リンパ球及び小数のプラスマ細胞の浸潤ある他、ヘモジデリンの沈着を認める。又膿との境界面附近には出血がある。周囲の筋組織には混濁を認める。

b. Ni-Cr 合金 金属面は殆んど変化無く、幾分幼若な結合織に包まれ、結合織内には主にリンパ球、組織球性細胞又一部には偽エオジン嗜好細胞より成る浸潤があり、金属の存した腔との境界面には少量の膿 (変性崩壊に陥つた游走細胞集団) が見られ又赤血球が散在して居る。周囲の筋組織には結合織の増生及び筋繊維の軽度の変性を認める。

c. 不銹鋼 金属面は変化無く、組織は、比較的密な結合織の被包を形成し、筋組織との境界は鮮明である。ヘモジデリンの沈着を認めるが円形細胞浸潤は殆んど認めない。

d. Co-Cr 合金 金属面は殆んど変化無く、薄い緻密な結合織によく包裹され、その外側は粗い結合織に囲まれている。該部にはリンパ球、組織球の浸潤、ヘモジデリンの沈着及び上記の結晶様の物質を見る。小血管は良く発達している。金属の存在した腔との境界には出血及び極めて少量の膿を見る。周囲の筋組織には結合織の増生を認める。

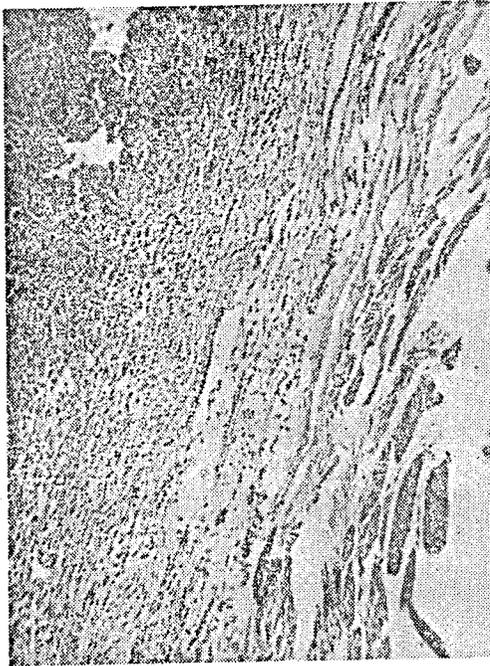
e. 銅合金 金属面は赤褐色を呈し、組織は、稍々密な結合織の被包を形成している。但し不銹鋼の場合よりも幾分幼若なものと思われる。結合織内には、如々小数の主としてリンパ球より成る浸潤が散在して居り、ヘモジデリン沈着がある。周囲の筋組織には余り変化がない。

f. 銀合金板 金属面は黒褐色を呈し、薄い密な結合織に包まれ、その外側には粗い結合織が囲んで居る。

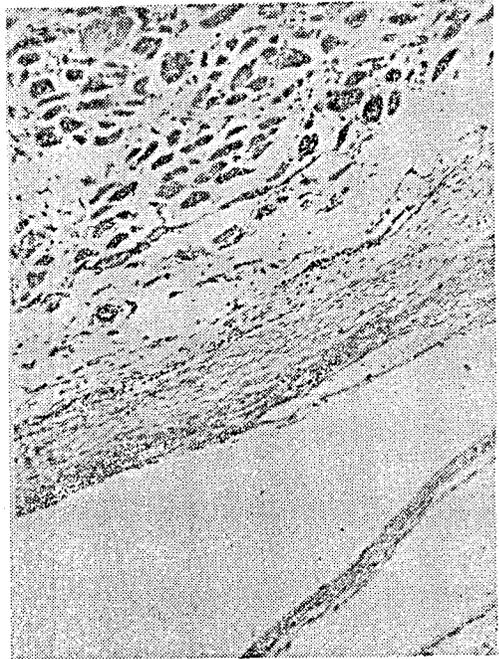
組織写真(A)

(各種金属を筋肉内挿入3ヶ月後)

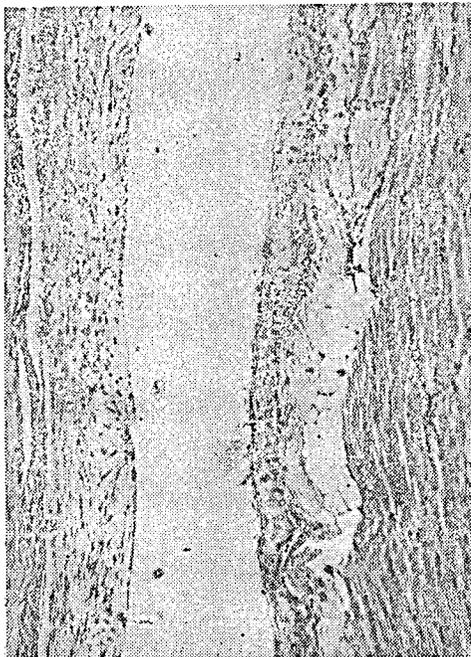
倍率100×



a. Ni板



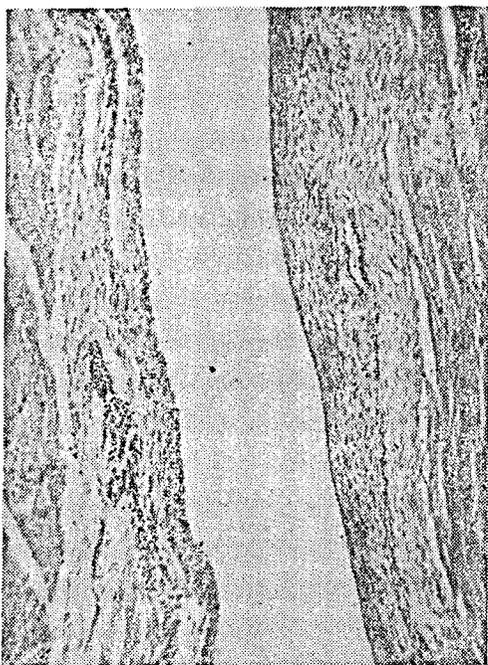
b. Ni-Cr合金板



c. 不銹鋼 (18-8鋼)



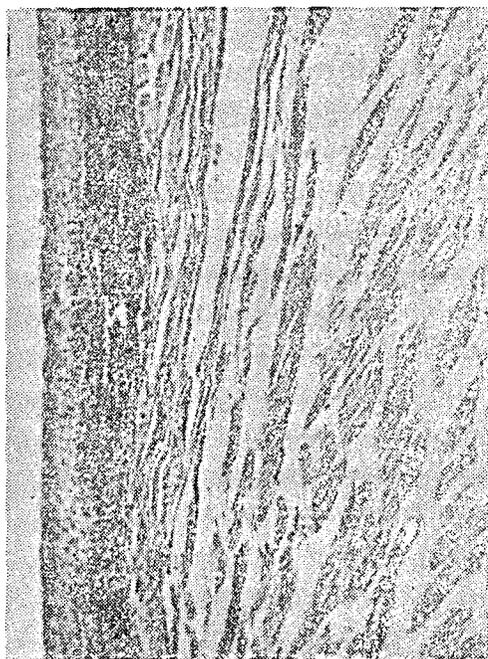
d. Co-Cr合金



e. 銅合金



f. 銀合金(板用)



g. 銀合金(鑄造用)



h. 洋銀系合金



i. 白金

て居る。結合織の間隙には極めて小数のリンパ球が散見され、又ヘモジデリンの沈着を認める。周囲の筋組織には筋繊維の変性が認められ又筋間結合織の増生により一部萎縮した筋繊維が島嶼状に散在しているのが認められる。

本実験の範囲内に於て、各種合金の局所刺激作用の軽重を付けるならば、Ni板最も悪く、洋銀系合金、铸造用銀合金、銅合金、銀合金板、Ni-Cr合金、Co-Cr合金、不銹鋼、白金の順となる。

## B. 各種合金を骨内に挿入せる場合

### 1. 実験材料

- Co-Cr合金 (Co 55 Cr 20 W 5 Ni 18 Mo 2)
- Ni-Cr合金 (Ni 88.65 Cr 8.21 Fe 1.25 Mn 1.21 Co 0.23 Cu 0.41)
- 銅合金 (Cu 60 Zn 38 Al 1.5 Fe 0.5)
- Ag-Pd合金 (Pd 25 Au 5 Ag 70)
- 不銹鋼 (18-8鋼)
- Ta

2. 実験方法 上記の合金を以て作製せる直径1mm、長さ約5mmの丸線を中央にて直角に曲げ、家兎の大腿骨にドリルにて内径約1mmの孔を開け試料の一端を挿入し、他端は骨面に平行に骨膜下に縫合固定し、挿入5ヶ月後検査した。

3. 実験成績 各種合金線挿入5ヶ月後、挿入部の骨の組織及び合金を検査せる結果、次の如き成績を得た。

- Co-Cr合金 金属面は殆んど変化無く、金属除去後の空洞は円滑で、その内壁は何等の反応を示していない。
- Ni-Cr合金 金属面は殆んど変化無く、一部稍々厚い結締織と、それから延びる細い繊維束を見るのみである。
- 銅合金 金属面は褐色を呈し、骨組織面に可成厚い結締織を認め、その骨面よりの部分は鬆粗、内腔よ

その部に黒褐色不正形の色素様の沈着物が散見され、又ヘモジデリン沈着を認める。この部の外側筋組織との境には不規則細長な核を多数有す。繊維様、硝子様の組織が存在する。この組織はエオジン染色性、アザンマローリー染色にて青染する。恐らく筋萎縮と思われる。細胞浸潤は余り認められないが、周囲の筋組織の萎縮及び混濁は比較的著明である。

g. 銀合金铸造用 金属面は僅かに灰色を呈し、薄い結合織に包まれ、その外側は更に粗い結締織に囲まれている。その部は稍々多数のリンパ球及び組織球が処々に局限して認められる。又ヘモジデリンの沈着を認める。又一部には上記の結晶様の物質が存在して居る。周囲の筋繊維は軽度の萎縮が認められる。

h. 洋銀系合金 金属面は黒褐色を呈し、粗い網目状の稍々幼若な結合織に包まれ、間隙にリンパ球及び組織球が散在している。又小数の偽エオジン嗜好細胞を認める。ヘモジデリンの沈着は他例と同様。結合織の内側には少量の機化しつつある膿を認める。外側の筋組織には変性混濁があり又結合織の増生がある。

i. 白金板 金属面は変化なく、粗い網目状の結合織に良く包裹され、その外側は粗雑な結合織網が覆つ

りの部分は稍々稠密である。

d. Ag-Pd 合金 金属面は殆んど変化無く、空洞は骨面と筋肉面の両面を有するが、骨面には変化がなく、筋肉面に於て稍々厚い結締織層を有す。

e. 不銹鋼 金属面は変化無く、他の所見は Ag-Pd 合金の場合と同様である。

f. Ta 金属面は変化無く、極く細い結締織繊維を周壁に認めるのみで、その他殆んど反応を見ない。

以上の成績を総括すると、本実験の範囲内に於ては、銅合金は結締織増生からみて、稍々局所反応が他のものよりも強い様に思われるが、骨組織そのものに対しては何れの金属も殆んど反応を示さない様である。なお膿瘍形成、色素沈着、細胞浸潤等は認めない。

上記の如き生体組織反応試験は之等の合金を口腔内に装著した場合とはその条件が相違したものであり、金属の腐蝕状況及び之に伴う生体への作用も異なるが、本試験に於ては合金は生体組織につままれて、合金そのものは口腔内よりも遙かに安定した条件にある。

しかし合金の生体への作用は直接的であり、口腔内に於ては金冠の如く合金が歯頸部下約 2 mm 歯内に接する部分、或は金属牀の如く歯肉及び口蓋に接する部分等に於ては、合金類は稍々等しい条件にあり、又インレー用合金の如く歯牙に充填され直接歯肉内に接触することの無い場合に於ても本試験結果よりして次の如き結論を得。

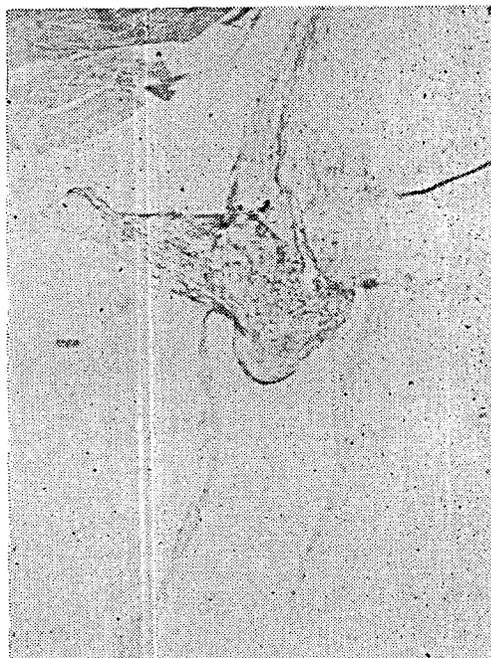
組 織 写 真 (B)

(各種金属を骨内挿入 5 ヶ月後)

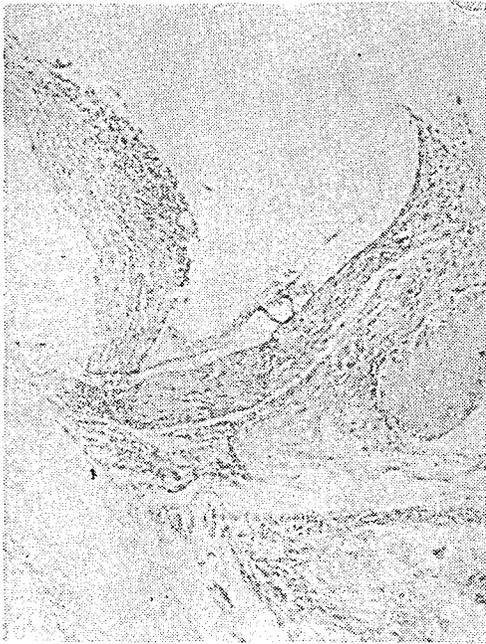
倍率 100×



a. Co-Cr 合金



b. Ni-Cr 合金



c. 銅合金



d. Ag-Pd合金



e. 不銹鋼 (18-8鋼)



f. Ta

非鑄造用合金に於て金冠及び牀等直接歯肉及び口蓋に接する合金に於ては、Ni板、洋銀系合金、銅合金等は使用を禁ずべく、Ni-Cr合金及び不銹鋼等は使用し得る合金である。銀合金はNi-Cr合金に劣る。

鑄造用合金に於てインレーに使用する場合に於ては、鑄造用銀合金、銅合金及び洋銀系合金はともに現在臨床上使用されているものであり、本試験成績よりして直ちに衛生上有害なりとは断定し難い。これ等インレー用合金に於ては金属面は常に飲食物及び唾液により洗われ、之等は曝下される。

銀アマルガムに就ては永井氏の研究(昭和25年4月第4回日本医学会口腔科学会分科会にて発表)によれば生体組織に対する試験成績は著しく悪い。

然るに我国に於ても米国に於ても共に衛生上無害なりとして、その使用を認めているものであり、臨床上の見地よりすれば、アマルガムは歯牙に充填するものであり、その口腔への露出面はインレーと等しく概して小さく且つ歯肉に直接接触しないものである。

C. 腐蝕試験に対する考察

歯用合金の種類は多種多様であり、夫々合金の系統を異にするものである。而して合金は各系統によつて夫々異つた耐蝕特性を有するものである。例えば化学試薬による上記腐蝕試験成績を見るに、1%乳酸溶液に対して銀アマルガム及び錫アンチモン合金は他の合金に比較して可成著しく腐蝕されるが、食塩1%含有1%醋酸溶液に対しては他の合金とは逆に腐蝕減量は小さくなつてゐる、それ故にこれ等の合金を或特定の薬品に対する耐蝕性を以て一律に論ずることは不可能である。

しかし歯用としては何れの系統の合金を使用するにしても、腐蝕に対して或程度の限度を規定する必要がある。然るに従來の規格による浸漬試験方法によれば口腔内に於ける腐蝕作用とは全く異り余りに腐蝕作用が促進され過ぎてゐる。又浸漬時間の短縮及び濃度を低下し試験せる結果は何れも好結果を得なかつた。又乳酸は純品が乏しく且つ光学異性体及び無水物が存在し、製品によつて合金類に対する作用が異なる故に歯用合金の腐蝕試薬としては、その使用を禁ずべきである。それ故に著者は化学試薬による浸漬試験として4%醋酸を採用し、合金試験片の表面積1cm<sup>2</sup>に付き2ccの割分に4%醋酸を取り、之に合金類を10分間浸漬し、溶出する金属量を比色定量する方法を推奨する。

而して歯用としての溶解限度は、各種金属の生体内移入に関する実験的観察よりして、非鑄造用合金及び線材に於ては殆んど溶解しないこと、インレー用合金としての鑄造用合金に於ては10<sup>-4</sup>g/cm<sup>2</sup>を限度とすることが妥当なりと思惟す。斯くするときは現在歯用合金として市販されているものは殆んどその使用を認めることとなるが、しかし非鑄造用合金としての銅合金板は禁止される。インレー用の合金に於ては、銅合金、洋銀系合金、錫アンチモン合金及び鑄造用銀合金は従來の規格による腐蝕試験に於ても1日の腐蝕減量は1%乳酸に対して0.03~0.7mg/cm<sup>2</sup>であり、例え口腔内に於て之と同程度の腐蝕が起つたとしても人体に有害なりとは云えない。むしろ鉄、銅、亜鉛、マンガン、コバルト、マグネシウム等に於ては成人1日の必要量以下である。

異種金属間電位差は化学薬品による腐蝕試験と殆んど平行し、之を代行することを得るもこの試験成績のみを以て判定することは出来ない。即ち歯用として使用出来る合金系の化学組成が定められた場合、その範囲に入るや否やを決定する場合に電位差の測定はその判定の補助となる。

次に歯用合金として最も強く要望される口腔内不変と云う観点よりすれば、著者が20年来施行した歯用合金類の浸漬試験成績よりして、1%食塩溶液及び硫化により変色する合金は、たとえ酸に対する耐蝕性があつても口腔

第10表 歯用合金の口腔内変色及び飽和硫化水素水、1%食塩溶液による変色

資 料	飽和硫化水素水 室温 24時間	1%食塩溶液 37° 24時間	口 腔 内
金 合 金 18K以上	変 色 せ ず	変 色 せ ず	変 色 せ ず
Au 380	僅かに黄褐色	殆んど変色せず	僅かに黄褐色
" 9K			
Cu 45			
Zn 15			
Ni 2			

資 料	飽和硫化水素水 室温 24時間	1%食塩溶液 37° 24時間	口 腔 内
Ag-Pd合金 Pd 25 Cd 8 Ag 67	殆んど変色せず	殆んど変色せず	殆んど変色せず
銀合金板用	黄褐色～黒色	殆んど変色せず ～僅かに灰色	黄褐色～黒褐色
銀合金鑄造用	〃	〃	僅かに褐色 ～黒灰色
Ni-Cr合金板及び線 Ni-Cr-Mo-V線	変色せず	変色せず	変色せず
18-8 鋼	〃	〃	〃
Co-Cr合金線	〃	〃	〃
洋銀系鑄造用	黄褐色～灰黒色	灰 色	灰 黒 色
銅合金板及び鑄造用	黄褐色～黒褐色	灰 褐 色	淡 黄 褐 色
錫アンチモン合金	灰 黒 色	灰 白 色	灰 黒 色
銀アマルガム	〃	〃	〃

内に於ては必ず変色する。

口腔内変色を観察せる結果は第10表に示す如し。

本試験成績よりして、歯用合金としての浸漬試験は上記の醋酸による試験以外に、1%食塩溶液に37°に於て24時間及び飽和硫化水素水に室温に於て24時間浸漬する、浸漬試験を施行すべきである。

Ni-Cr合金に関しては屢々衛生上為害作用ありと云われるも、著者は上記の試験成績よりして、腐蝕による化学的為害作用ありとは認め難い。而してNi-Cr合金が化学薬品に対して完全に耐蝕性を示す為めには Tamman 氏の  $\frac{n}{8}$  ( $n=1\sim 8$ ) mol 説よりすれば  $n=1$  即ち Cr 11.24% 以上含有する Ni-Cr 合金であるが、しかし生体内移入試験結果よりして、Cr がその半量にて好結果を得た。この事はまた歯科臨床結果と一致する。それ故に歯用 Ni-Cr 合金のCr量は理論量の半量以上即ち Cr 5.62% 以上となる。

#### 第四章 歯科補綴用合金の機械的性質

歯用合金として現在市販されているものは多種多様であるが、著者はこれ等の合金類を用途別に分類して、非鑄造用合金（主として金冠作製用合金）、鑄造用合金（主としてインレー鑄造用合金）及び線材（主として鈎及びバー合金）とし、夫々の用途に必要な之等合金の機械的性質を測定し従来規格を再検討するとともに、歯用合金の改良及び未だ歯用となつていない合金類の歯用への導入を研究した。

##### 1. 非鑄造用合金

非鑄造用合金（主として金冠作製用合金）に於ては抗張力が著しく大なるもの及び伸張度の小なるものは加工が

第11表 非鑄造用合金の機械的性質

資 料	抗 張 力 (kg/mm <sup>2</sup> )			伸 張 度 (%)		
	min.	max.	平均値	min.	max.	平均値
Ni-Cr 合金板	33.9	58.9	48.5	15	41	23.8
銅 合金板	38.5	45.5	40.4	21	35	26
銀 合金板	20.9	35.6	26.0	25	64	49.5
Ni-Cr-Fe 合金板	—	—	44.0	—	—	35

困難であり、従来の規格に於ては抗張力 50kg/mm<sup>2</sup> 以下、伸張度 15% 以上なることを規定している。

この規定は著者の研究した成績によるものであるが、其後 Ni-Cr 合金板が歯用として登場するに及び、之が金冠作製用合金として歯科技工に適するや否やが問題となり従つて抗張力 50kg/mm<sup>2</sup> 以下と云う規格の数値が論議されるに至つたのである。

現在市販されている非铸造用合金板の抗張力及び伸張度を試験せる結果は第 11 表に示す如し。それ故に著者は之等の非铸造用合金が鍍合金冠の作製に適するや否やを研究した。即ち各種合金板を以て内径 10mm 高さ約 10mm の鍍を作製し、支台歯に擬えた鉄製截頭円錐、側面の傾斜 (Taper) は 2° 及び 5° の 2 種とし、上縁より約 3mm 下部の直径 10mm とした截頭円錐型に鍍を適合し、鍍の下縁が、それより 2mm 圧進されるに要する圧力を測定した結果第 12 表に示す如き成績を得た。

第 12 表 鍍の適合試験成績

截頭円錐の Taper	資料厚径 鍍著法	金合金 Au 916 Cu 42 Ag 42(0.39mm)	銀パラジウム合金 Pd 25 Au 5 Cd 8 Ag62(0.39mm)	銀合金 (0.39mm) Ag 80 Zn 15 Cd 5			Ni-Cr-Fe 合金 (0.17mm) Ni 61.7 Cr 12.39 Co 0.17 Fe 11.77 Mn 6.36 Cu 0.1		
		A kg	A kg	Akg	Bkg	Ckg	Akg	Bkg	Ckg
2°		16	20	16	17	20	21	23	24
5°		21	23	21	25	25	36	38	40

截頭円錐の Taper	資料厚径 鍍著法	Ni-Cr 合金 (0.24mm) 1			Ni-Cr 合金 (0.24mm) 2			Ni-Cr 合金 (0.23mm) 3			Ni-Cr 合金 (0.23mm) 4		
		Akg	Bkg	Ckg									
2°		24	26	30	24.5	26.5	31.5	24	25	28	24	26	28
5°		58	65.7	72.8	52	55.8	57.6	53	68.4	68.4	41	47.7	49.5

即ち本試験成績よりして、金合金、銀パラジウム合金、銀合金は適合され易く、Ni-Cr 合金に於ては、Taper 2° の場合は適合可能なるも、Taper 5° の場合は約 2 倍以上の圧力を要し適合は困難である。

又著者が各種合金板に就て金冠製操作に適するものとして歯科医師によつて分類されたものに就て、抗張力及び伸張度を測定した結果、抗張力は何れも

40kg/mm<sup>2</sup> 以下であり、伸張度は何れも 15% 以上であつた。而してこれ等の合金は何れも明瞭なる降伏点を示さない金合金、銀パラジウム合金、銀合金及び銅合金である。

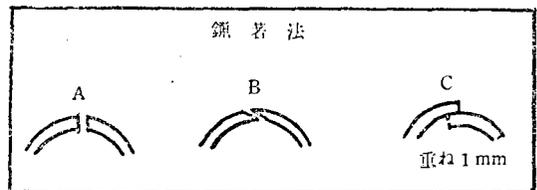
## 2. 铸造用合金

、铸造用合金の主なる用途はインレーである。インレー用としては対合歯の保存上なるべく硬度の低いものの方が良いとされている。

米国歯科医師会規格第 5 号インレー铸造用合金暫定規格に於ては HB 40~140、伸張度 12~18%、降伏点 15.4~18.9kg/mm<sup>2</sup> としているが、著者は此等合金の諸性質よりして、金冠装着の爲めの支台歯形成用及び単純窩洞に対するインレー用として使用する場合は HB 30~150 のみ規定すれば充分なりと思惟する。

市販铸造用合金の諸性質は第 13 表に示す如し。

本試験成績に示す如く錫アンチモン合金は他の合金類よりも著しく硬度低く、口腔内耐久力は劣る。又洋銀系合金及び銅合金を除き、銀合金、錫アンチモン合金等は何れも融点低く、鍍著の操作は困難である。而して伸張度は何れも 5% 以下であり、脆弱であり辺縁強度が低い。銀合金に於ては銀の量を 70% 以上に増加せしめると此の欠



第13表 鑄造用合金の性質

資 料	硬 度 (HB)	鑄造収縮 (%)	融 点 (°C)	備 考
銀 合 金 Ag 64.4~69.5 Zn 0 ~15.1 Sn 20 ~24.5 Cd 0 ~10.28	145~155	0.95~1.15	650~680	脆弱なり
洋銀系合金 Cu 21.8~43.2 Ni 10.4~32.5 Zn 0 ~44.8 Sn 0 ~42.8	150~160	1.11~1.25	900~950	脆弱ならず
Sn-Sb系合金 Sn 65~70 Sb 25~30 Cu 1~3 (Al 0~1)	18 ~23	0.5 ~0.9	320~350	脆弱なり
銅 合 金 Cu 60 ~70 Zn 20 ~40 Al 0.1~10 Fe 0 ~2	120~148	1.15~1.25	890~950	脆弱ならず

点は除かれるが、硫化に対する耐色性を悪くし、60%以下にすると、酸に対する耐蝕性を悪くする。それ故に貴金属を含有しない鑄造用銀合金の銀の含有量は60~70%に限定される。又 Cd を含有せしめる事により幾分脆弱性を補う効果を得られるも10%以上含有せしめると口腔内に於て褐黄色を呈する。

著者の試作合金として第14表に示す如きものがある、

第14表 鑄造用合金の試作品

	Ag	Zn	Cd	Sn	Mn	In	Pd	Au
1	75	18	7					
2	64	5	10	21				
3	69	15	3	3	10			
4	68		8	24				
5	70			5		25		
6	70	5				25		
7	68	6	4			22		
8	65	8		1		26		
9	60			5		10	25	
10	60	5		5		5	25	
11	62		8				25	5

11番は板鋳用、11番以外は融点低く鑲着困難なり

口腔内に於て僅かに灰色黄褐色となる

2番は酸に対する溶解稍々大なるも口腔内に於ては変色微なり

1番は口腔内に於て黄褐色となる

又精密なるインレーを行う為めには合金の鑄造後室温に冷却する迄に生ずる収縮を測定し、之を示す必要がある。即ち鑄造時の合金の収縮を埋没材の膨張を以て補い原型に等しいインレー体を作製する必要な Data であるからである。

収縮度の測定は著者は石英管(内径約10mm高さ約3mm)の中に常法に従いワックスを充填し、そのまま埋没材にて埋没し鑄型を作り、之に合金を鑄入し、石英管と合金との間隙の測定によつた。本測定法は日本歯科材料協

会規格に採用された著者考案の方法である。

### 3. 線材

線材に於て主として使用されるものは鈎用線及びバー（パラタルバー、リンガルバー）用線である。

線材に要求される主要性質は弾性のあること、折れないこと及び鑢著操作を加えるものに於ては加熱しても弾性を失わぬこと等であり、日本歯科材料協会規格は著者の研究成績よりして抗張力  $60\text{kg/mm}^2$  以上、伸張度 15% 以上、屈曲回数 16 回以上と規定した。

又鑢著操作による加熱により機械的性質の低下の度合の少いものとして、原品を  $900^\circ$  にて 3 分間加熱後放冷し、抗張力  $70\text{kg/mm}^2$  以上、伸張度 15% 以上を規定し、現在かかる性質を有する線材を特殊合金と称している。

日本歯科材料協会規格が規定された当時は線材としては主として 18-8 鋼が使用されていたのであるからして規格としても上記の程度で充分であつたのであるが、その後の研究により線材としてはより以上に弾性に富み厚径の小なるものを必要とし、且つ各種の系統を異にする合金が研究されるに至つた故に、かかる規定にては線材の必要性質を判断することが困難となつたのである。

それ故に著者は線材に於ては、抗張力、伸張度以外に降伏点の測定を施行し、市販線材の機械的性質を測定した結果第 15 表に示す如き成績を得た。

第 15 表 線材の機械的性質

資料	抗 張 力 ( $\text{kg/mm}^2$ )		降 伏 点 ( $\text{kg/mm}^2$ )		伸 張 度 (%)	
	原 品	熱 処 理 後	原 品	熱 処 理 後	原 品	熱 処 理 後
Ni-Cr 鈎用線	131	69.1	—	—	4	21
〃 パラタルバー	90.8	75.9	62.1	48.0	26.3	35.16
〃 リンガルバー	90.15	76.74	67.45	51.9	22.8	28.3
18-8 鋼 鈎用線	121.4	38.4	114.7	65.3	11.2	48.5
〃 パラタルバー	75.56	63.2	49.02	40.8	51.25	52.5
〃 リンガルバー	84.54	73.4	54.23	59.8	49.91	55
Ni-Cr-Mo-V 鈎用線	135.5	85.57	121.3	56.51	6.1	31.35
Co-Cr 鈎用線	125.5	108.0	115.0	80.9	20.5	39.6
〃 パラタルバー	106.4	91.2	105.8	72.2	32.3	47.5
〃 リンガルバー	116.0	95.0	115.0	78.5	31.5	44.7

即ち本成績に示される如く、Ni-Cr 合金線、不銹鋼 (18-8 鋼) 線、Ni-Cr-Mo-V 合金線及び Co-Cr 系合金線等があり、これ等は何れも加熱 ( $900^\circ$  にて 3 分間) することにより機械的性質は低下する。但し Ni-Cr 合金線及び 18-8 鋼線の低下の度合は著しく、故に加熱を伴う鑢著操作は行うことが出来ない。これ等は、原品は線引加工により機械的強度を付与されたまゝであり、之をそのまま鑢著を必要としない鈎に加工し使用する。

Ni-Cr-Mo-V 合金線及び Co-Cr 系合金線は現在歯用としては特殊合金線として取扱われているもので所要性質として  $900^\circ$  にて 3 分間加熱後放冷し、抗張力  $70\text{kg/mm}^2$  以上、伸張度 15% 以上と規定されている。

然るに歯用線材として現在最も理想的なものは白金合金線であつて、米国歯科医師会規格第 7 号歯科用合金線暫定規格は白金合金線に対する規格であり、所要機械的性質として、 $700^\circ$  にて 10 分間加熱後急冷し、伸張度 15% 以上、 $700^\circ$  にて 10 分間加熱後急冷し、更に  $450^\circ$  にて 2 分間加熱後 30 分間に徐々に  $250^\circ$  に冷却し、抗張力  $105.5\text{kg/mm}^2$  以上、降伏点  $87.9\text{kg/mm}^2$  以上、伸張度 4% 以上と規定している。

かくの如く白金合金線は熱処理改善の出来るものであるが、現在市販されている線材はかかる操作を行うことは全く出来ない。それ故に特殊合金線に於ても歯科技工上の屈曲成形操作は鑢著後行い、鑢著加熱による機械的性質の低下をその後の変形操作により幾分なりとも回復せしめるべきである。

又特殊合金線としての所要性質が上記のものとするれば、斯くの如き性質を有する合金は 18-8 鋼中にも存在する。即ち第 16 表に示す如きものである。

又現在 Co-Cr 合金として使用されているものの中には Ni-Cr-Co-Fe 合金が混同されている。

第16表 線材として使用し得る耐熱合金 (所謂特殊合金)

種類	成分	C	Mn	Si	Cr	Ni	Co	Fe	W	Mo	Cb	V	Ti
Co-Cr 合金		0.5	0.6	0.7	25	10	55	0.6	7				
		0.4	0.6	0.3	20	20	45	2	4	3	4		
		0.35~ 0.45	1.0	1.0	18.50~ 20.50	19.0~ 21.0	42.0~ 44.0	Rem	3.50~ 4.00	3.50~ 4.00	3.50~ 4.00		
Ni-Cr-Co-Fe 合金		0.4	0.5	0.6	15	20	20	32	4	4	4		
		0.5	0.9	0.6	20	20	20	26	4	4	4		
		0.40~ 0.50	2.0	1.0	18.5~ 20.50	19.0~ 21.0	19.0~ 21.0	11	3.50~ 4.00	3.50~ 4.00	3.50~ 4.00		
Ni-Cr-Mo-V		0.04~ 0.15			13~ 15.5	55~60		4.5~7	3.75~ 5.25	15~18		0.2~ 0.4	
(耐熱) 18-8 鋼		0.11	0.60	0.42	18.87	8.63			1.36	0.4	0.28		0.45
		0.26	0.52	0.57	18.95	9.05			1.96	1.22	0.29		0.21
Ni-Mo 合金 (Cr)		0.02~ 0.12				66.5~ 62.5		4~5		26~30			
		0.10	1.35	0.70	16.72	25.23		Rem		6.52			

以上の如きものが歯用として使用され、又導入される故に線材に対する所要性質としては弾性に就て規定する必要がある。而して屈曲回数は測定上誤差多く、実際の数値ではあるが、規格としては取入れる必要は無い。

それ故に普通線材に於ては原品のままにて抗張力 70kg/mm<sup>2</sup> 以上、降伏点 50kg/mm<sup>2</sup> 以上、伸張度 4% 以上、とし特殊合金線に於ては原品を 90° にて 3 分間加熱後放冷し、抗張力 80kg/mm<sup>2</sup> 以上、降伏点 70kg/mm<sup>2</sup> 以上、伸張度 15% 以上として、白金加金線よりも幾分低い性質の要求を規定すべきであると思惟す。

4. 歯科補綴合金の機械的性質に対する考察

a. 非鑄造用合金 主として金冠作製に使用せられる合金に於て、金合金、銀パラジウム合金、銀合金等は加工し易く何れも抗張力 25~40kg/mm<sup>2</sup>、伸張度 15% 以上を示している。然るに Ni-Cr 合金は抗張力 50kg/mm<sup>2</sup> 程度のものである。而して上記の実験よりして、金冠作製に際して、現在の Ni-Cr 合金は、歯頸部の Taper が 2° に近い小臼歯に於けるが如き場合には銀の適合は、金合金及び銀合金の、歯頸部の Taper が 5° に近い大白歯に対する銀の適合に等しく容易に適合し得るも、大白歯に於けるが如く歯頸部の Taper が 5° に近いものに対しては 2~3 倍の力を必要とする。それ故に手圧による適合は困難である。Black 氏の咬合圧の測定によると、咬合圧は 11.3~124.7kg、平均値 77.6kg である。それ故に咬合圧を利用すれば模型上からは銀の適合が行われる場合もあるが、咬合圧の低い場合もあり、且つ支台歯の状態如何によつては強圧を加えることの不可能な場合もあり、Ni-Cr 合金が冠用合金として完全なる為めには、現在よりも加工力を低下さす必要がある。

著者は第12表に於ける Ni-Cr 合金 No.2 及び No.4 を更に圧延し厚径 0.18mm とし、之を 950° にて 30 分間焼鈍したる後、前記せる如く銀の適合試験を施行したるに第17表に示す如き成績を得た。

第17表 圧延焼鈍せる Ni-Cr 合金による銀の適合試験成績

資料 Taper	Ni-Cr 合金 No.2			Ni-Cr 合金 No.4		
	A <sub>kg</sub>	B <sub>kg</sub>	C <sub>kg</sub>	A <sub>kg</sub>	B <sub>kg</sub>	C <sub>kg</sub>
2°	19	22	28	17	20	25
5°	23	26	31	21	22	27

即ち何れも現品よりも厚径を小にし、焼鈍を完全に行うことにより、殆んど銀合金に等しく、歯頸部の Taper 2°、及び 5° の何れの場合も容易に銀の適合を行うことが出来る。

而してこれ等の合金の原品及び圧延焼鈍後の機械的性質は 18 表に示す如し。

第 18 表 Ni-Cr 合金及びその処理後の機械的性質

資 料	抗 張 力 (kg/mm <sup>2</sup> )		伸 張 度 (%)	
	原 品	処 理 後	原 品	処 理 後
Ni-Cr No. 2	50.1	48.9	22.5	35.6
Ni-Cr No. 4	45.2	42.5	28.4	39.5

即ち本試験成績よりして、抗張力は殆んど変化しないが、伸張度が何れも大となる。斯くの如く伸張度が大となつた事は、現品は完全に焼鈍された状態ではなく、仕上加工が行われた状態にあることを示す。而して焼鈍により伸張度が大となり且つ厚径を小にした事により、鑲の適合が前記 12 表に示した場合よりも著しく低い圧力を以て行われる結果となつたのである。従つて主として金冠作製に使用せられる非鑄造用合金に於ては、金合金、銀パラジウム合金及び銀合金の如く厚径 0.3mm 前後の板を使用するものに於ては、従来の規格、抗張力 50kg/mm<sup>2</sup> 以下、伸張度 15% 以上の規定は、歯頸部適合操作を考慮して、銀合金の機械的性質を最低とし、金合金の一部及び銅合金の機械的性質を最高として、抗張力 25~40kg/mm<sup>2</sup>、伸張度 15% 以上とすべく、Ni-Cr 合金に於ては、銀合金等よりも強靱なる為め厚径約 0.2mm に於ても充分使用に耐えるものであり、抗張力は従来の規格と等しく 50kg/mm<sup>2</sup> 以下にて可なるも、伸張度 30% 以上と改正すべきである。

即ち性質の異なる合金を従来の規格の如く、規定することは無理である。

b. 鑄造用合金 単純窩洞のインレーに使用するものに於ては Hb30-150 の規定にて充分である。

複雑窩洞に對するインレーに使用する合金に於ては、米国歯科医師会規格第 5 号インレー鑄造用合金暫定規格に示されている如く、Hb 以外に伸張度及び降伏点をも規定する必要があるが、現在市販されている代用合金に於ては、現在なお金合金に比較してその性質の相違は著しく、金合金以外に於ては之と同等の規格を規定することは困難である。

但し金合金に於ては米国歯科医師会規格にて充分である。

c. 線材 18-8 鋼線、Ni-Cr 線等は鑲著操作による加熱により、線引加工により付与された機械的性質を失い、弾性に乏しくなる。

Co-Cr 系合金及び Ni-Cr-Mo-V 合金はその点が幾分改良されるが 900° にて 3 分間の加熱により抗張力 100~130kg/mm<sup>2</sup> より 70~80kg/mm<sup>2</sup> に、降伏点 90~120kg/mm<sup>2</sup> より 50~80kg/mm<sup>2</sup> に低下する。又所謂 Co-Cr 合金と称しているものの中には Co-Cr 系合金とは別な Ni-Cr-Co-Fe 合金が混同されている故に、これ等は明かに区別さるべきである。

線材としては現在白金加金線が最も理想的であり、加工前に焼鈍して軟化し、加工後に 450° にて 2 分間保ちたる後 30 分間に徐々に約 250° に冷却することにより、抗張力 105.5kg/mm<sup>2</sup> 以上、降伏点 87.9kg/mm<sup>2</sup> 以上を有するもので、現在かくの如く歯用に適した合金線を貴金属合金以外に求むることは困難である。

## 第五章 総 括

1. 日本歯科材料協会規格に於ける浸漬法による腐蝕試験法は著者の研究成績よりして、規定されたものであり、昭和十三年決定の規格に於ては、浸漬液は 1% 乳酸溶液、0.05% 塩化水素溶液、1% 食塩溶液、1% 硫化ソーダ溶液を使用し、37° にて 1 週間浸漬するが如く規定したのであるが、著者の其後の研究により浸漬日数を 3 日に短縮することに改めた。

然るに爾後続行せる研究の結果、1% 乳酸溶液及び 0.05% 塩化水素溶液による浸漬試験成績は、浸漬時間を短縮しても口腔内の腐蝕作用よりも著しく事実と相違することが判明した。又浸漬時間を 24 時間以下に短縮し或は浸漬溶液の濃度を  $\frac{1}{2}$  に減ずると正確な腐蝕減量が得られないことが判明した。又乳酸は光学異性体及び無水物等あり試薬として使用することは困難である。

以上の理由により酸類に対する耐蝕試験は4%醋酸に10分間浸漬(試験片の表面積1cm<sup>2</sup>に付き4%醋酸2cc)する方法を推奨する。

而して溶解金属量の限度は之等金属の生体内移入試験成績を考慮して決定する。

2. 使用目的により、要求される機械的性質の範囲が定まり、この条件を満足する合金系の化学組成が或範囲に定められる如き場合に於て、生体による病理学的研究上為害作用が無いと定まり、臨床上使用可なりと決定された合金系に於ては、腐蝕試験は、化学組成を以て之にかえることが妥当である。

例えば金合金、銀パラジウム合金、ニッケル-クロム合金及び18-8鋼等である。

但しかゝる合金に於て、合金が完全に作製されて居らず成分が不均等である如き場合を検査する意味に於て腐蝕試験を行うことは必要であり、かゝる場合に行う腐蝕試験は、上記の如き試薬による試験方法に拘泥する必要無く、工業用金属の腐蝕試験法にて可なり。

3. 異種金属間電化差は化学薬品による腐蝕試験と殆んど平行し、金属学的には興味ある問題なるも、実際に於ては、その影響は多からず使用上単に考慮する程度でよい。

但し歯用として、使用出来る合金系の化学組成が上記の如く定められた場合に、或合金が定められた合金系に入るや否やを定める場合に電位差の測定はその判定の補助となる。

4. 各種金属の生体内移入による生体組織反応試験よりして、非鑄造用合金に於ては、Ni板、洋銀系合金及び銅合金はその使用を禁ずべく、鑄造用合金に於ても、合金が直接歯肉に接する場合は上記の如きAg70%以下でSn、Zn等を多量に含有する銀合金は使用を禁ずべきである。

而して歯肉に接しない場合即ちインレー用としては現在市販されている合金は、本試験成績よりして衛生上有害なりとは断定し難い。

次に本試験成績を考慮して、著者の提案せる各種金属の酸類に対する耐蝕試験即ち4%醋酸に10分間浸漬する試験方法に於て溶解金属量の許容限度は、非鑄造用合金に於ては殆んど溶解せざることとし、鑄造用合金に於ては牀を作製するもの又線材の如く歯肉及び口蓋に接するものに於ては、非鑄造用合金と同程度とし、鑄造用合金中インレーに使用するものに於ては10<sup>-4</sup>g/cm<sup>2</sup>を限度とし、之以上溶解するもの使用は禁ずべきである。

5. 鑄造用合金中上記の如き銀合金、洋銀系合金、銅合金等は、直接歯肉に接すると、生体組織反応試験成績よりして有害なるも、インレー等直接歯肉に接触せず且つ口腔内露出面積の小なる場合に於ては、溶出金属の全量を嚥下するも人体に有害なりとは考えられず、例え1%乳酸溶液による腐蝕作用と同程度の腐蝕が口腔内に於て生じたとしても、人体に必要な量として、例えばCu(成人1日1~2mg)、Fe(成人1日10mg)、Mn(小児体重1kg当り0.2~0.3mg)、等の必要量以下であり、又Zn、Co、Mg、等もその溶出量は上記試験成績よりして極微量であることよりすれば、銅合金、洋銀系合金は銀アマルガム合金と共にインレー用として又充填用として何等衛生上為害作用に対する懸念は無い。

6. 歯用合金としては口腔内に於て変色しないことが重要な条件である。

各種金属の口腔内試験結果よりして、化学薬品による浸漬試験としては、1%食塩溶液は従来の規格のままにて可なるも、1%硫化ソーダ溶液はアルカリ性強きをもつて、むしろ飽和硫化水素水中に室温に於て24時間浸漬する方法が妥当である。

7. 金冠作製に使用される非鑄造用合金は、日本歯科材料協会規格に於ては、抗張力50kg/mm<sup>2</sup>以下、伸張度15%以上と規定してあるも、金合金及び銀合金とNi-Cr合金の如く性質の異なる合金系をこの規格にて規定することは無理であつて、金合金、銀パラジウム合金及び銀合金の如く柔軟にして、厚径約0.3mmの板を使用するものに於ては、抗張力25~40kg/mm<sup>2</sup>、伸張度15%以上とすべく、強靱なるNi-Cr合金の如く0.2mm程度の厚径板を使用し得るものに於ては、抗張力50kg/mm<sup>2</sup>以下、伸張度30%以上と規定すれば、鑲の歯頭部適合試験にも適する。即ち従来の規格は上記の如く改正すべきである。

鑄造用合金は熔融より凝固し室温に冷却する迄に生ずる収縮度を明記する必要がある。この測定には種々の方法があるが、著者の考案せる、現在規格に採用されている石英管(内径約10mm高さ3mm)中に常法により合金を鑄入し、合金と石英管との間隙を測定する方法が最も簡便である。

機械的性質に就ては現在市販されている金合金以外のインレー用合金に就ては、従来の規格にて可なるも、金合金に於ては米國歯科医師会規格に於て規定されている如く、伸張度及び降伏点を規定し、之により辺縁の強靱性を

規定する必要がある。

鈎用合金は尚お幾多の研究を必要とするが、特殊合金線に就ては、Ni-Cr-Mo-V 合金及び Co-Cr 合金の 2 種類に限定せず、機械的性質によつて規定すべきである。

即ち普通線材に於ては、原品のまま特殊合金線に於ては、原品を 900° にて 3 分間焼鈍した後測定することとし、前者は抗張力 70kg/mm<sup>2</sup> 以上、降伏点 50kg/mm<sup>2</sup> 以上、伸張度 4% 以上とし、後者は、抗張力 80kg/mm<sup>2</sup> 以上、降伏点 70kg/mm<sup>2</sup> 以上、伸張度 15% 以上とし、白金加金線よりも幾分低い性質の要求を規定すべきである。

擧筆するに當つて御指導と御校閲を賜つた京都大学医学部教授美濃口玄博士に対して深甚なる感謝の意を捧げる。又常に御鞭撻を賜つた国立衛生試験所々長刈米達夫博士に対し深謝する。尚実験に際し御援助を頂いた国立衛生試験所薬理部長池田良雄博士に謝意を表する。

## 文 献

Coleman, R.L. : Physical Properties of Dental Materials. Research Paper No. 32, U.S. Gov't Printing Office.

L. Lewin : Gift und Vergiftung 1929.

Taylor, N.O., Paffenbarger, G.C. and Sweeney, W.T. : Inlay Casting Golds : Physical Properties and Specifications. J.A.D.A., 19 : 36—53 (Jan.) 1932.

Paffenbarger, G.C., Sweeney, W.T. and Isaacs, Aaron : Wrought Gold Wire Alloys : Physical Properties and a Specification. J.A.D.A., 19 : 2061—2086 (Dec.) 1932.

Freidlander, Ruth : Electrolytic Manifestations in Oral Cavity in Presence of Two or More Metals, Monat. f. Zahnheilk., Aug. 15, 1932.

Souder, Wilmer : Standard for Dental Materials. J.A.D.A. 22 : 1873—78 (Nov.) 1935.

Lain, E.L. and Caughron, G.S. : Electrogalvanic Phenomena of the Oral Cavity Caused by Dissimilar Metallic Restorations. J.A.D.A., 23 : 1641—1652 (Sept.) 1936.

Kanner, Oscar : Metals and Galvanic Current in Mouth. J.D. Res., 17 305 (Aug.) 1938.

Reed, G.J. and Willman, W. : Galvanism in the Oral Cavity. J.A.D.A., 27 : 1471—1475 (Sept.) 1940.

Schoonover, I.C. and Souder, W. : Corrosion of Dental Alloys. J.A.D.A., 28 : 1278—1291 (Aug.) 1941.

Crawford, W.H. and Phillips, R.W. : Physical Properties of Wrought Alloys Used in Dentistry. J.A.D.A., 29 : 359—374 (March) 1942.

Paffenbarger, G.C., Caul, H.J. and Dickson, G. : Base Metal Alloys for Oral Restorations. J.A.D.A., 30 : 852—862 (June.) 1943.

Tamman, Gustav : A Text Book of Metallography.  
Metals Handbook

W. Skinner : The Science of Dental Materials.

多賀谷, 山上 : Ni—Cr を主体とする白色合金の腐蝕試験, 日本之歯界 No. 221.

多賀谷, 山上, 茨木 : 歯科用金属間の電位差, 日本之歯界 No. 233.

山上, 多賀谷, 寺野 : ニッケル・クロム合金の為害作用の有無, 第一報クロムの毒性, 第二報ニッケル塩類の生体に及ぼす影響, 日本之歯界 240.

巖 : 歯科医療の特性と歯用金属の価値に就て, 日本之歯界 240.

花沢 : 金合金代用合金に就て, 歯科学報 44. 1, 2, 3

多賀谷, 茨木 : 歯科用合金の耐蝕性並に電気化学的性質, 日本金属学会誌 4 No. 3 1940.

池下 : 口腔内に於ける異種金属間のガルバニー作用に関する生理衛生的並に歯科金属学的研究, 歯科学雑誌

第8巻 第4, 5, 6, 7号.

国井, 槽谷, 他: Cr-Nr 系合金の生体組織適応と金相学的所見との相関に就て, 日本歯科材料器械学会誌 1.1.

多賀谷, 日野, 戸祭: ニッケル・クロム合金の口腔内に於ける耐蝕性, 日本歯科材料器械学会誌 1.

清藤: 種々なる重金属塩類による根管充填の実験的研究, 歯科学報 1951~2.

鈴木, 鍾美他: 各種歯科用金属の口腔粘膜に於ける組織反応に関する実験的研究, 日本病理学会誌 41, (1952) 42, (1953).

北村: 金冠所懐, 日本歯科医師会雑誌 4, 6, 1952.

渡辺, 大山, 原田: 金冠継続歯の鑲の適合性について, 歯科学報 52, 11, 1952.

山本: 歯科用ニッケル合金の耐蝕性について, 臨床歯科 196号 1952.

多賀谷, 加藤, 永井: 鈎用線の物理学的性能の判定, 臨床歯科 196号 1952.

金竹: 銀インヂウム合金の研究, 歯科学報 53, 1, 1953.

金竹: 銀-パラヂウム-金合金に就いて 歯科学報 54, 6, 1954.

出井: 歯冠補綴物支台の力学的考察, 歯科学報 54, 11, 1954.

石田: 歯科医療用金属材料の歯科衛生学的研究.

(1955年7月25日受入)

## 濾紙クロマトグラフィによるタール色素分析法の研究

藤井清次

## Studies on Paper Chromatography of Coal-Tar Dyes

By Seiji Fujii

## 目次

## 緒言

## 第一章 酸性色素

第一節 Nitroso-及び Nitro-色素

第二節 Monoazo-色素

第三節 Thiazoleazo-及びPyrazoloneazo-色素

第四節 Disazo-色素

## 第二章 塩基性色素

第一節 Monoazo-及び Disazo-色素

第二節 Diphenylmethane-色素

第三節 Triphenylmethane-色素

## 第三章 油溶性(アルコール溶性)色素

第一節 Monoazo-及びDisazo-色素

## 第四章 総括

第一節 酸性色素

第二節 塩基性色素

## 第五章 色素分析法

第一節 色素分析法

第五節 Xanthene-色素

第六節 Triphenylmethane-色素

第七節 Anthraquinone-色素, Quinoline-  
色素及びIndigoid-色素

第四節 Xanthene-色素

第五節 Aciridine-, Azine-及びThiazine-色素

第二節 Xanthene-及びQuinoline-色素

第三節 油溶性(アルコール溶性)色素

第二節 食品中色素の鑑別に対する応用

## 緒言

先に横山<sup>1)</sup>は毛管分析法によつて多数のタール色素について分析を行つたが、その後濾紙クロマトグラフィにより色素の分離、確認並に夾雑色素を検出せんとする試みは既に分析用指示薬について Lederer<sup>2)</sup> Kitionlichtgelb 3 GRL 等数種の酸性色素について Zahn<sup>3)</sup>、Xanthene 色素について Graichen<sup>4)</sup>、米国法定色素について Tilden<sup>5)</sup>、我が国の法定色素について石田及び協力者、新井及び協力者等が報告している。著者は現職の立場より市販食用色素中不許可色素夾雑の有無、また市販着色食品の色素の分離及び確認法設定の必要にせまられ、広く 95 種の色素を対象として濾紙のクロマトグラフィによる試験法を研究し、衛生試験法として一の体系をつくり得たと信ずるのでここに報告する。

## 第一章 酸性色素

酸性色素はその分子内に  $-SO_3H$  基、 $-COOH$  基または  $-OH$  基を有し、通例これら色素酸の  $Na$  塩で時には  $K$  塩、或いは  $NH_4$  塩の形をなし水溶性である。酸性色素は水を溶媒としてクロマトグラフィすると、酸性基殊に  $-SO_3H$

1) 横山:薬学雑誌, 63, 492(1943):63, 595(1943).

2) M. Lederer:Science, 112, 504(1950).

3) H. Zahn:Textilpraxis, 1951, 127.

4) C. Graichen:J. Assoc. Official Agr. Chem., 34, 795(1951),

5) D. H. Tieden: J. Assoc. Official Agr. Chem., 35, 423(1952).

6) 石田, 稲垣, 塩田, 渡辺:薬学雑誌, 73, 736(1953),

7) 新井, 三雲, 松井, 松本, 遠藤:東京都立衛生研報告, 3, 1(1952)

基の多いもの程 Rf 値が大きくなり、また水を飽和した n-Butanol を用いると水の場合と全く反対の傾向を示した。これらの溶媒に於いてはいずれも色素の Rf 値が大き過ぎたり、或いは小に過ぎたりするばかりでなく、Spot が尾を引き且つ重なる色素が多い。そこで著者はこれら反対の結果を示す溶媒を適当に混合すれば、酸性色素の分離に適した溶媒が得られるものと考え、これについて研究した結果、Alcohol または Pyridine<sup>8)</sup> を加え n-Butanol の含水率を調整することによつてこの目的を達することができた。

第1表 酸性色素の溶媒

溶媒番号	溶媒の組成 (容量比)
I	n-Butanol : Alcohol : N/2NH <sub>4</sub> OH (6 : 2 : 3)
II	n-Butanol : Alcohol : N/2AcOH (6 : 2 : 3)
III	n-Butanol : Pyridine : H <sub>2</sub> O (6 : 3 : 4)
IV	n-Butanol : Pyridine : N/2NH <sub>4</sub> OH (6 : 3 : 4)
V	水酢酸 : Methyl glycol : H <sub>2</sub> O (5 : 0.5 : 4.5)

著者が研究して得た酸性色素に適する溶媒は第1表に示した通りである。

前表中溶媒 V は Xanthene 色素の分離及び確認に用いる。

なお溶媒はすべて精製して使用した。

**実験の方法** 東洋濾紙 No. 50 (2×30cm) の一端より 5 cm の箇所に鉛筆で横線を引きここを出発線とし、この線上に約 0.1w/v% 色素水溶液を直径約 5 mm (色素約 3 μg) の円を形成するように点じ風乾する。次にあらかじめ適量の溶媒を入れたガラスシリンダ内に吊し、濾紙を溶媒中に約 0.5cm 浸した後シリンダを密栓する。シリンダを恒温槽 (20 ± 1°) 内に静置し溶媒が出発線より高さ 20cm まで浸透上昇したとき、濾紙を取り出し鉛筆で溶媒前線に印しをつけた後風乾する。展開時間は約 10 時間である。

Rf 値は色素 Spot の最濃色部で測定した。

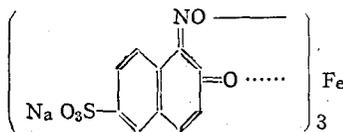
**試料** 試料は、National Aniline, G, Griibler, 国内製品、及び自製品を精製して用いた。

**色素名について** 色素名は現在我が国で常用されているものを採用し、色素名の後に附記した括弧内の数字は Rowe, Colour Index, Society of Dyers and Colourists, Bradford, 1924 の色素番号を示した。

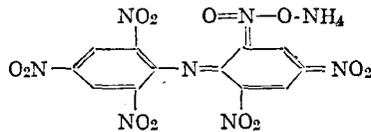
著者は化学構造による分類法に従い、酸性色素を Nitroso-, Nitro-, Azo-, Triphenylmethane-, Xanthene-, Quinoline-, Anthraquinone- 及び Indigoid- 色素に分ち、これらの代表的色素を選び前記の実験方法に従い、Rf 値を測定した。以下化学構造と Rf 値との関係について論述する。

第一節 Nitroso- 及び Nitro- 色素

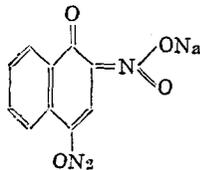
Nitroso- 及び Nitro- 色素として次の4種を選んだ。



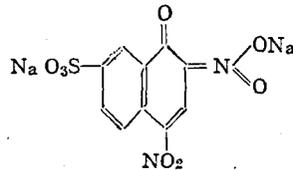
Naphthol Green B (5)  
(Green)



Aurantia (12)  
(Brown yellow)



Martius yellow (9)  
(Yellow)



Naphthol yellow S (10)  
(Yellow)

溶媒 I ~ III を用いて求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第2表の通りである。

8) 藤井：食品衛生研究, I, 31 (1951)

第2表 溶媒とRf値との関係

溶媒	色素名	Rf値	溶媒	色素名	Rf値
I	Nitroso-色素	0.15	III	Nitroso-色素	0.19
	Naphthol green B (5)			Naphthol green B (5)	
I	Nitro-色素	0.95	III	Nitro-色素	0.95
	Aurantia (12)			Aurantia (12)	
"	Martius yellow (9)	0.83	"	Martius yellow (9)	0.86
"	Naphthol yellow S (10)	0.48	"	Naphthol yellow S (10)	0.54
II	Nitroso-色素	0.03	IV	Nitroso-色素	0.26
	Naphthol green B (5)			Naphthol green B (5)	
II	Nitro-色素	0.90	IV	Nitro-色素	0.98
	Aurantia (12)			Aurantia (12)	
"	Martius yellow (9)	0.69	"	Martius yellow (9)	0.92
"	Naphthol yellow S (10)	0.40	"	Naphthol yellow S (10)	0.58

n-Butanol : Alcohol :  $N_{1/2}NH_4OH$  系溶媒について 本溶媒で最も小さい Rf 値を示す色素は Naphthol green B (5) である。この色素は Nitroso 色素に属し  $Fe$  (III) を中心として 3 個の 1-Nitroso-2-naphthol-6-sulfonic acid より成り 3 個の  $-SO_3H$  基及び  $-OH$  基を有する。従つてこの色素は溶液内に於いては色素イオンの電荷も大で固定相の水と色素イオンとの間の親和力即ち水和作用が強く、n-Butanol 相に分配される色素量が少くそのため Rf 値が小さくなつたものと考えられる。

Nitro 色素である Aurantia (12), Martius yellow (9) 及び Naphthol yellow S (10) のうち Rf 値が最も大きい Aurantia (12) は 6 個の  $NO_2$  基を有するため水和性が弱くこの色素は Butanol 相へ殆んど分配されるため移動度が大きくなつたものと思われる。Martius yellow (9) と Naphthol yellow S (10) との Rf 値を比較すると前者が大きくなつている。Martius yellow は  $-NO_2$  基と  $-OH$  基とを Naphthalene 核に 1 個ずつ置換し、 $-OH$  基と  $-NO_2$  基とが共存する場合  $-OH$  基は  $-NO_2$  基の影響を受け強い酸となるから、 $-NO_2$  基のみを有する Aurantia (5) より水和性が強く、従つて Rf 値はそれよりやや小さくなつている。

Martius yellow に  $-SO_3H$  基 1 個増加した Naphthol yellow S (10) は更に酸性度が強く色素アニオンの水和性が大となりその Rf 値は Martius yellow より著しく低下している。

n-Butanol : Alcohol :  $N_{1/2}AcOH$  系溶媒 I について 本溶媒では各色素の Rf 値は全体的に低下の傾向を示している。この原因は本溶媒が AcOH 性で各色素の移動相への分配量が幾分減少したためであると考えられる。

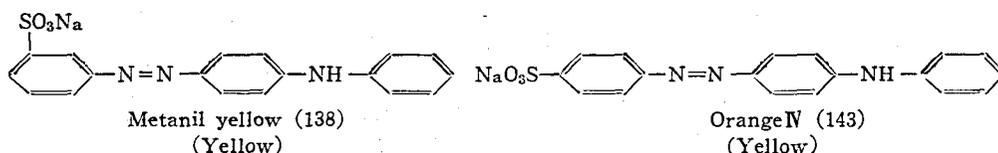
n-Butanol : Pyridine :  $H_2O$  系溶媒 II について 本溶媒では各色素の Rf 値は前記溶媒 I 及び II より全体的にやや大きくなつている。これは本溶媒が Pyridine を含みこれが色素アニオンの水和性を弱める結果、n-Butanol に移行する色素量が幾分増加するためと思われる。この場合も各色素の移動順位には変化がない。

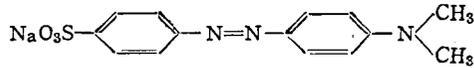
n-Butanol : pyridine- $N_{1/2}NH_4OH$  系溶媒 III について 本溶媒で得た各色素の Rf 値は前記 3 種の溶媒に比べ最も大きい。この溶媒は溶媒 II と同様 Pyridine を含有しているが、 $NH_4OH$  性となつているため n-Butanol 相に移行する色素量が溶媒 II に比較し増加したものと考えられる。本溶媒に於ける色素の移動順位は前記 3 種の溶媒と同様である。

## 第二節 Monoazo-色素

Monoazo-色素として下記の 25 種を選んだ。

(A) Benzene-誘導体 これに属する色素は第 1 及び第 2 成分がいずれも Benzene 誘導体より成る。





Methyl orange (142)  
(orange)

これら3種の色素について溶媒Ⅰ～Ⅳで求めた Rf 値を表示すれば第3表の通りである。

第3表 溶媒と Rf 値との関係

溶媒	色素名	Rf 値	溶媒	色素名	Rf 値
Ⅰ	Metanil yellow (138)	0.83	Ⅲ	Metanil yellow (138)	0.83
	Orange Ⅳ (143)	0.79		Orange Ⅳ (143)	0.79
	Methyl orange (142)	0.70		Methyl orange (142)	0.73
Ⅱ	Metanil yellow (138)	0.80	Ⅳ	Metanil yellow (138)	0.90
	Orange Ⅳ (143)	0.75		Orange Ⅳ (143)	0.88
	Methyl orange (142)	0.60		Methyl orange (142)	0.73

n-Butanol : Alcohol : N<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>OH 系溶媒Ⅰについて、本溶媒ではこれら3種の色素の Rf 値は次の如くなっている。

Metanil yellow (138) > Orange Ⅳ (143) > Methyl orange (142)

Metanil yellow (138) 及び Orange Ⅳ (143) は1個の -SO<sub>3</sub>H 基を有する異性体でその -NH<sub>2</sub> 基は1個の -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> 基で置換され塩基性が弱められているが、一方に於いて3個の Benzene 核による有機性が増大しているため水和性の減少を表し Rf 値が相当大となつている。また Metanil yellow (138) と Orange Ⅳ (143) とを比較するとその差は僅かであるが前者が大きな Rf 値を示しているのは -SO<sub>3</sub>H 基の位置の影響によるものと考えられる。

Methyl orange (142) は Orange Ⅳ (143) の -NH-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> の代りに -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> を置換しているため有機性が弱まり逆に -SO<sub>3</sub>H 基の影響が強くなつた結果 Rf 値が低下したものと思われる。

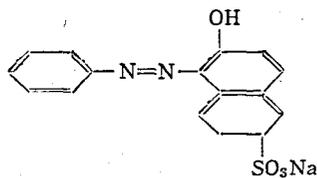
n-Butanol : Alcohol : N<sub>2</sub>AcOH 系溶媒Ⅱについて、本溶媒では前記溶媒Ⅰ場合より僅かに小さい Rf 値を示している、移動順位は溶媒Ⅰと同様である。

n-Butanol : Pyridine : H<sub>2</sub>O 系溶媒について、本溶媒で得た各色素の Rf 値は溶媒Ⅰと殆んど同じである。

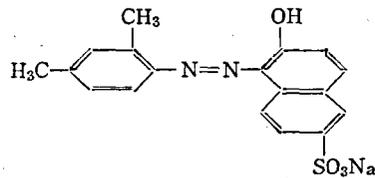
n-Butanol : Pyridine : N<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>OH 系溶媒Ⅳについて、本溶媒では色素の移動順位は前記各種溶媒と同様である。ただ Metanil yellow (138) 及び Orange Ⅳ (143) の Rf 値が大きな値を示している。

(B) Naphthalene 誘導体 これに属する色素は第2成分が Naphthalene 誘導体より成る。

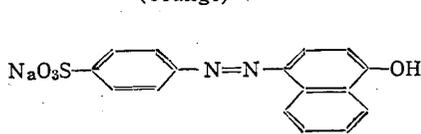
(a) 第1成分が Benzene 誘導体の色素



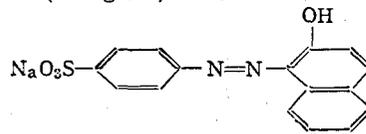
Crocein orange (26)  
(Orange)



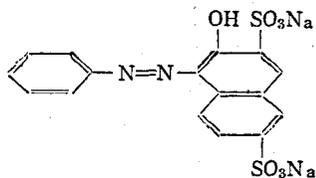
Brilliant orange R (78)  
(Orangered)



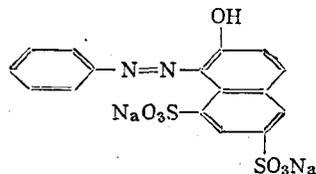
Orange 1 (150)  
(Orange)



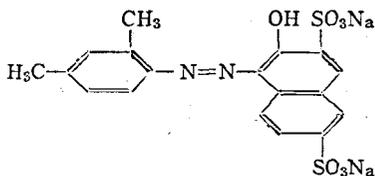
Orange 2 (151)  
(Orange)



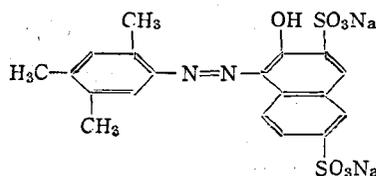
Ponceau G (28)  
(Orangered)



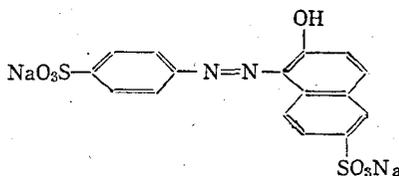
Orange G (27)  
(Orange)



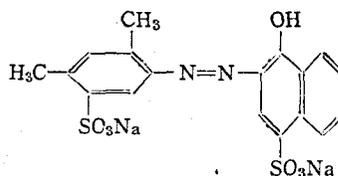
Ponceau R (79)  
(Red)



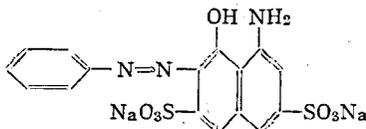
Ponceau 3R (80)  
(Red)



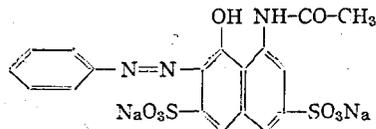
Sunset yellow FCF (-)  
(Orange)



Ponceau SX (-)  
(Red)



Fast acid fuchsine B (30)  
(Violet red)



Amido naphthol red G (31)  
(Red)

以上12種の色素について溶媒I~IVで求めたRf値を示せば第4表の通りである。

第4表 溶媒とRf値との関係

溶媒	色素名	Rf値	溶媒	色素名	Rf値
I	Crocein orange (26)	0.74	I	Crocein orange (26)	0.68
"	Brilliant orange R (78)	0.75	"	Brilliant orange R (78)	0.70
"	Orange 1 (150)	0.54	"	Orange 1 (150)	0.62
"	Orange 2 (151)	0.72	"	Orange 2 (151)	0.62
"	Ponceau G (28)	0.40	"	Ponceau G (28)	0.25
"	Orange G (27)	0.42	"	Orange G (27)	0.35
"	Ponceau R (79)	0.40	"	Ponceau R (79)	0.33
"	Ponceau 3R (80)	0.40	"	Ponceau 3R (80)	0.33
"	Sunset yellow FCF (-)	0.43	"	Sunset yellow FCF (-)	0.30
"	Ponceau SX (-)	0.30	"	Ponceau SX (-)	0.37
"	Fast acid fuchsine B (30)	0.24	"	Fast acid fuchsine B (30)	0.16
"	Amido naphthol red G (31)	0.25	"	Amido naphthol red red G (31)	0.21

III	Crocein orange (26)	0.73	IV	Crocein orange (26)	0.82
"	Brilliant orange R (78)	0.76	"	Brilliant orange R (78)	0.85
"	Orange 1 (150)	0.73	"	Orange 1 (150)	0.62
"	Orange 2 (151)	0.73	"	Orange 2 (151)	0.80
"	Ponceau G (28)	0.39	"	Ponceau G (28)	0.39
"	Orange G (27)	0.44	"	Orange G (27)	0.48
"	Ponceau R (79)	0.42	"	Ponceau R (79)	0.46
"	Ponceau 3R (80)	0.42	"	Ponceau 3R (80)	0.46
"	Sunset yellow FCF (←)	0.39	"	Sunset yellow FCF (←)	0.45
"	Ponceau SX (←)	0.44	"	Ponceau SX (←)	0.39
"	Fast acid fuchsine B (30)	0.31	"	Fast acid fuchsine B (30)	0.38
"	Amido naphthol red G (31)	0.37	"	Amido naphthol red G (31)	0.39

n-Butanol : Alcohol :  $N/2NH_4OH$  系溶媒 I について Brilliant orange R (78) は m-Xylidine を第1成分, 2-Naphthol-6-succinic acid (Schaeffer acid) を第2成分とした色素で Rf 値は12種の色素のうち最も大きい。この色素の Rf 値に最も近い値を示している Crocein orange (26) は m-xylidine を Aniline に代えたもので  $-CH_3$  基2個少ないが本溶媒では  $-CH_3$  基の影響は殆んど見られない。Orange 2 (151) は Sulfanilic acid を第1成分 2-Naphthol を第2成分とした色素で、 $-SO_3H$  基の位置は Crocein orange (26) とは反対に第1成分の Benzene 核に置換している。両者の Rf 値の差は極めて僅少であるが Orange 2 (151) は小となつてゐる。

Orange 2 (151) の異性体である Orange 1 (150) は Sulfanilic acid を第1成分, 1-Naphthol を第2成分とした色素で構造上 Orange 2 (151) とは  $-OH$  基の位置が相違する。Orange 1 (150) は本溶媒の如く  $NH_4OH$  を含有する液を使用すると展開中橙色の Spot が赤変する現象が認められる。この場合 Orange 1 (150) は p-Quinonoid 型構造をとり赤変し、その結晶 Orange 2 (151) より小さい Rf 値を示すものと考えられる。

Ponceau G (28) は Aniline を第1成分, 2-Naphthol-3,6-disulfonic acid (R酸) を第2成分とした色素で、Crocein orange (26) の Naphthalene 核に更に  $-SO_3H$  基1個増加したもので、これらの Rf 値を比較すると Ponceau G (28) は Crocein orange (26) より著しく小さく、また Orange 1 (150) 及び Orange 2 (151) と比較しても Ponceau G (28) の Rf 値は小さい、この原因は Ponceau G (28) の  $-SO_3H$  基が他の色素より1個多く、 $-SO_3H$  基増加の影響によるものである。

Ponceau G (28) の第2成分を 2-Naphthol-6,8-disulfonic acid (G酸) に代えたものが Orange G (27) で、この色素の Rf 値は Ponceau G (28) より僅かに大きくなつてゐる。この事実は同数の  $-SO_3H$  基を有する場合、色素分子の骨格及び他の置換基が等しければ  $-SO_3H$  基の置換している位置によつて色素の Rf 値が影響を受ける一例である。

Ponceau R (79) は m-xylidine を第1成分, R酸を第2成分としたもので、この色素の Rf 値は Ponceau G (28) と全く同じであり、また m-xylidine を Pseudocumidine に代えた Ponceau 3R (80) の Rf 値もまた同じである。この実験結果から見ると本溶媒では Rf 値に及ぼす  $-CH_3$  基の影響は殆んど認められない。Ponceau R (79) と Brilliant orange R (78) との Rf 値を比較すると Ponceau R (79) は著しく小さく、この場合も  $-SO_3H$  基の増加は Rf 値を低下させてゐる。

Sunset yellow FCF (←) は Sulfanilic acid を第1成分, Schaeffer 酸を第2成分とした色素で、Orange 2 (151) の Naphthalene 核の6位に  $-SO_3H$  基を増加したものに相当しているが、この色素の Rf 値を Orange 2 (151) と比較すると Sunset yellow FCF (←) の値は小さく、前記 Crocein orange (26) と Ponceau G (28) または Orange G (27) の場合と同様  $-SO_3H$  基の増加が Rf 値に影響を与えている。

Ponceau SX (←), Fast acid fuchsine B (30) 及び Amido naphthol red B (31) はその  $-N=N-$  基が Naphthalene 核の  $\beta$  位に結合している点に於いて他の色素と異なつてゐる。Ponceau SX (←) は 1-Amino-2,4-dimethylbenzene-5-sulfonic acid を第1成分, 1-Naphthol-4-sulfonic acid を第2成分とした色素で  $-NH_2$  基がない。そのため  $-NH_2$  基を有する Fast acid fuchsine B (30) より Rf 値が大となつてゐる。Fast acid

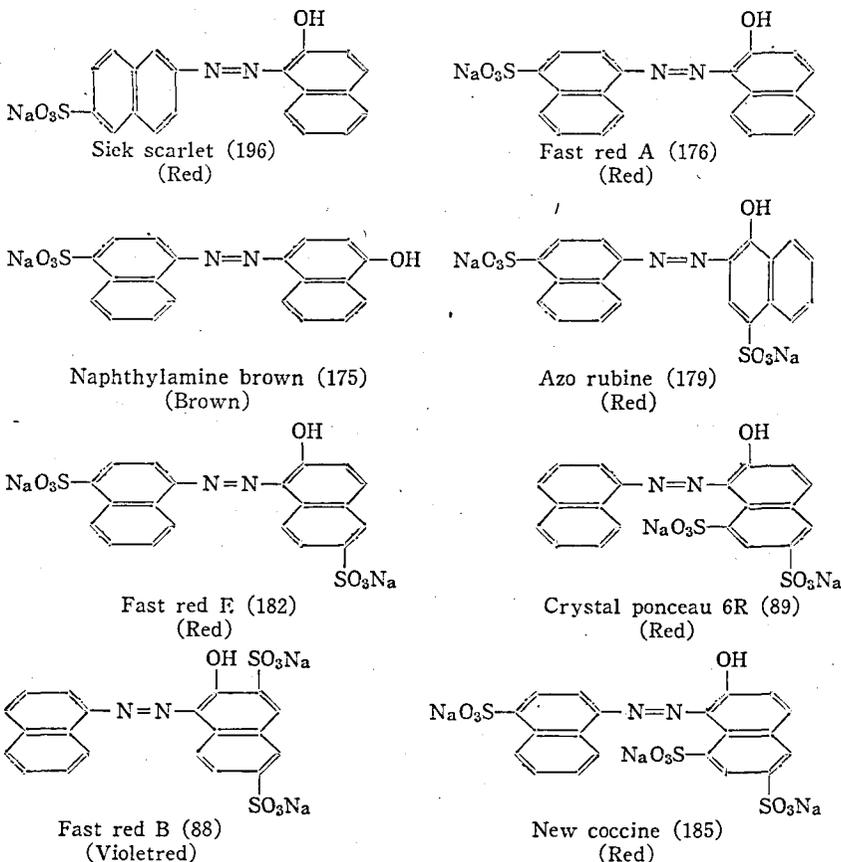
fuchsine B (30) は Aniline を第1成分, 1-Amino-8-naphthol-3,6-disulfo-nic acid (H酸) を第2成分とした色素で2個の  $-SO_3H$  基を有するが,  $-NH_2$  基の影響を受け親水性がやゝ増加したため Rb 値が他の同数の  $-SO_3H$  基を有する色素と比較して Rf 値が低下したものと考えられる. Amido naphthol red G (31) はその第1成分が前者と同じであるが, 第2成分は N-Acetyl-H酸で  $-NH_2$  基が Acetyl 化されているため Rf 値は Fast acid fuchsine B (30) よりやや大となつている.

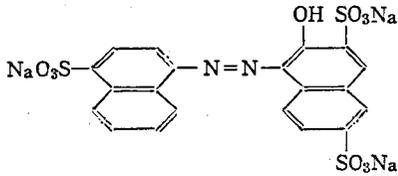
**n. Butanol : Alcohol :  $N/2$  AcOH 系溶媒 II について** 本溶媒では Brilliant orange R (78) が12種の色素のうち最高の Rf 値を示しているが, その値は前記溶媒 I の場合に比べると少しく低下している. Orange 1 (150) は同じ Rf 値を示している. これは Orange 1 (150) が本溶媒では展開中赤変せず, 従て溶媒 I の場合の如く P-Quinonoid 型とならないため両者の間に Rf 値の差を生じなかつたものと思われる. Ponceau R (79) 及び Ponceau 3R (80) は溶媒 I の場合よりやや低くなつているが両者の Rf 値は等しく, 本溶媒でもこれらの色素を分離することは不可能である. Sunset yellow FCF (←) はこれらより更に低下しているが, Ponceau SX (←) は逆に上昇の傾向を示している. Fast acid fuchsine B (30) は溶媒 I と同様12種の色素のうち最低の値を示し, またこの色素の  $-NH_2$  基が Acetyl 化された Amido naphthol red G (31) の Rf 値との差がやや大となり, 両者の Spot は完全に分離し Acetyl 化の影響が明瞭に認められる.

**n. Butanol : Pyridine :  $H_2O$  系溶媒 III について** 本溶媒による色素の移動順位は前記の溶媒 II とほぼ同じであるが, 色素の Rb 値は全般的にやや大きくなつている.

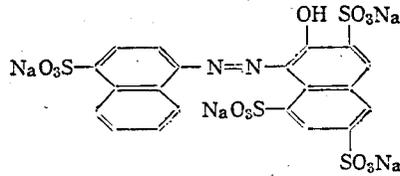
**n. Butanol Pyridine :  $N/2$   $NH_4$  OH 系溶媒 IV について** 本溶媒に於いては置換基及びその位置の相違が Rf 値に及ぼす影響は溶媒 I の場合と大差ないが, 各色素の Rf 値は溶媒 I に比較し少しく大となつている.

(b) 第1成分が Naphthalene 誘導体の色素





Amaranth (184)  
(Violet red)



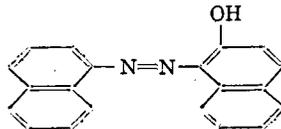
Ponceau 6R (186)  
(Red)

溶媒 I ~ IV で求めたこれら色素の Rf 値を示せば第5表の通りである。

第5表 溶媒と Rf 値との関係

溶媒	色素名	Rf 値	溶媒	色素名	Rf 値
I	Siek scarlet (196)	0.77	III	Siek scarlet (196)	0.76
	Fast red A (176)	0.78		Fast red A (176)	0.77
	Naphthylamine brown (175)	0.58		Naphthylamine brown (175)	0.80
	Azo rubine (179)	0.19		Azo rubine (179)	0.46
	Fast red E (182)	0.49		Fast red E (182)	0.45
	Crystal ponceau 6R (89)	0.55		Crystal ponceau 6R (89)	0.50
	Fast red B (88)	0.43		Fast red B (88)	0.42
	New coccine (185)	0.21		New coccine (185)	0.27
	Amaranth (184)	0.15		Amaranth (184)	0.20
	Ponceau 6R (186)	0.06		Ponceau 6R (186)	0.14
II	Silk scarlet (196)	0.68	IV	Silk scarlet (196)	0.84
	Fast red A (176)	0.70		Fast red A (176)	0.84
	Naphthylamine brown (175)	0.74		Naphthylamine brown (175)	0.67
	Azo rubine (179)	0.40		Azo rubine (179)	0.35
	Fast red E (182)	0.31		Fast red E (182)	0.50
	Crystal ponceau 6R (89)	0.44		Crystal ponceau 6R (89)	0.55
	Fast red B (88)	0.29		Fast red B (88)	0.46
	New coccine (185)	0.11		New coccine (185)	0.27
	Amaranth (184)	0.04		Amaranth (184)	0.25
	Ponceau 6R (186)	0.02		Ponceau 6R (186)	0.16

n-Butanol ; Alcohol/N<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>OH 系溶媒 I について 前記10種の色素のうち Fast red A (176), Fast red E (182), Crystal Ponceau 6R (89), Fast red B (88), New Coccine (185) Amaranth (184) 及び Ponceau 6R (186) の7種は次の共通の骨格を有する。



この骨格に相当する色素は Naphthylamine bordeaux (82) と称する油性 (アルコール溶性) 色素で本溶媒でこの色素は Rf 値 0.95 を示す。次に Rf 値と -SO<sub>3</sub>H 基との関係をグラフで示せば第1図の通りである。

第1図をみると本溶媒では同一の骨格を有する色素は -SO<sub>3</sub>H 基が増加するに従い Rf 値は規則的に小さくなっていく。即ち -SO<sub>3</sub>H 基の増加は Rf 値を低下させ、その減少は逆に Rf 値を増大させる傾向がある。色素分子に -SO<sub>3</sub>H 基が導入されると色素アニオンの電荷は -SO<sub>3</sub>H 基の数が増すほど、益々大となり水和作用が強くなり親水性が増大するが同時に有機溶媒に対する溶解度が減少する。従つて本溶媒の如く n-Butanol を移動相とする場合、-SO<sub>3</sub>H 基の少ない色素ほどよく移動し、-SO<sub>3</sub>H 基の多いものほど移動率が小となることわかる。なお本溶媒には Alcohol が添加されているが、これは Butanol 単独の場合よりも -SO<sub>3</sub>H 基を有する色素の移動相への分配量を大ならしめるものと考えることができる。溶媒 II に於ける Alcohol は勿論同様であるが、溶媒 III 及び

IVの Pyridine もまた同じ効果を有するものと思われる。

Fast red A (176) は第1成分に  $-SO_3H$  基1個を置換し、この系列の色素のうち Rf 値が最も大きい。この色素よりやや Rf 値が低下している Fast red E (182), Crystal ponceau 6R (89) 及び Fast red B (88) はいずれも  $-SO_3H$  基2個を有しているが、これらの Rf 値を比較すると

Crystal ponceau 6R (89) > Fast red E (182) > Fast red B (88) となつている。Crystal ponceau 6R (89) は  $\alpha$ -Naphthylamine を第1成分、G 酸を第2成分とした色素であり、Fast red B (88) は Crystal Ponceau 6R (89) の第2成分を R 酸に代えた色素で2個の  $-SO_3H$  基は共に第2成分に置換しているがその位置が異なつている。即ち G 酸を第2成分とした Crystal Ponceau 6R (89) の Rf 値は、R 酸を第2成分とした Fast red B (88) より大きな値を示し、この関係は前記 Orange G (27) と Ponceau G (28) との場合と全く同様である。

Fast red E (182) は Naphthionic acid を第1成分、2-Naphthol-6-sulfonic acid (Schaffer 酸) を第2成分とした色素で、第1成分と第2成分に  $-SO_3H$  基を1個ずつ置換しているが、その Rf 値は Crystal ponceau 6R (89) と Fast red B (88) と中間にある。

Naphthionic acid を第1成分、G 酸を第2成分とする New cocchine (185) と R 酸を第2成分とする Amaranth (184) を比較すると、Rf 値は New cocchine (185) > Amaranth (184) となつている。この関係は前記 Orange G (27) と Ponceau G (28), Crystal Ponceau 6R (186) と Fast red B (88) の場合と全く同様で、これらの実験結果は同じ骨格を有する色素が同数の  $-SO_3H$  基を置換しているとき、その位置の違いによつて Rf 値が影響を受ける事実を明らかに示している。

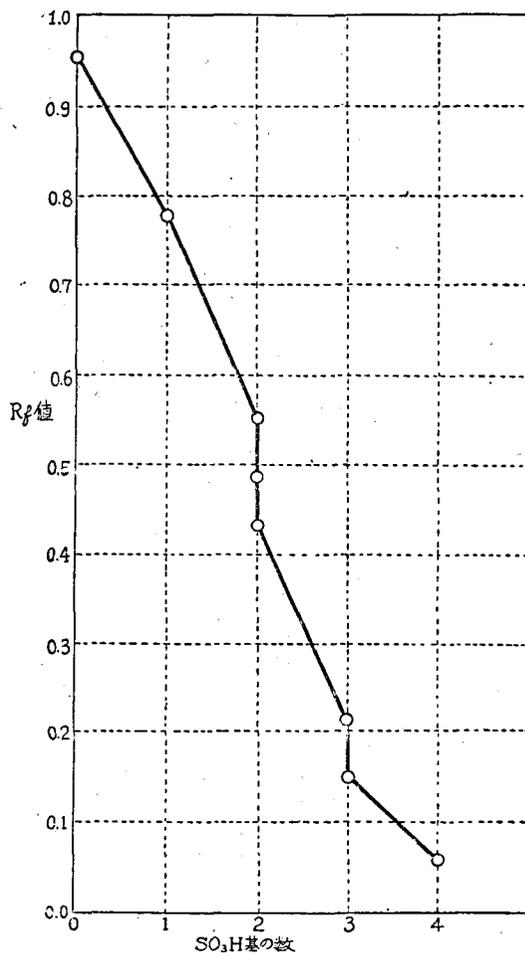
Ponceau 6R (186) は Naphthionic acid を第1成分とし、2-Naphthol-3, 6, 8-trisulfonic acid を第2成分とした色素で  $-SO_3H$  基4個を有し極めて親水性であり、移動相の Butanol に難溶性となるためこの色素の Rf 値が著しく小さくなつたものである。

Silk scarlet (196) は 2-Naphthylamine-6-sulfonic acid (Broenner 酸) を第1成分、2-Naphthol を第2成分とした色素でその Rf 値は Fast red A (176) とほぼ同じある。この色素は Fast red A (176) と第1成分が異なつているが、本溶媒では  $-SO_3H$  基の影響が強いため第1成分の違いは打消されるものと思われる。

Naphthylamine brown (175) は Naphthionic acid を第1成分、1-Naphthol を第2成分としているが、2-Naphthol を第2成分としている Fast red A (176) よりやや小さい Rf 値を示している。これは  $-OH$  基の位置の相違によることは明らかで、前記 Orange 1 (150) と Orange 2 (151) の場合と同様の理由によるものである。

Azo rubine (179) は Naphthionic acid を第1成分、1-Naphthol-4-sulfonic acid (NW酸) を第2成分とした色素で、この Rf 値を同数の  $-SO_3H$  基を有する Fast red E (182), Crystal Ponceau 6R (89) 及び Fast red B (88) と比較すると著しく低下している。これは Orange 1 (150) 及び Naphthylamine brown (175) と同様に第2成分の Naphthalene 核に置換している  $-OH$  基が  $\alpha$  位に存するため、この基の影響が強く現われた

第 1 図



ものである。

**n. Butanol : Alcohol  $N/2$  AcOH 系溶媒Ⅱについて** 本溶媒で求めた各色素の Rf 値は一般に前記溶媒Ⅰより少しく低下しているが, Naphthylamine brown (175) 及び Azo rubine (179) は逆に Rf 値が大きくなっている。これは Naphthylamine brown (175) の Rf 値が Fast red A (176) に, Azo rubine (179) の Rf 値が Fast red E (182) に接近したため、本溶媒では -OH 基の位置の相異による影響が溶媒Ⅰの如く強く現われず、この関係は Orange 1 (150) と Orange 2 (151) の場合と全く同様である。

本溶媒に於いても Rf 値と  $-SO_3H$  基の関係については同じ骨格を有する Fast red A (176), Fast red E (182) Crystal ponceau 6R (89), Fast red B (88), New cocchine (185), Amaranth (184) 及び Ponceau 6R (186) の7種の色素は前記溶媒Ⅰと全く同じ結果を示している。

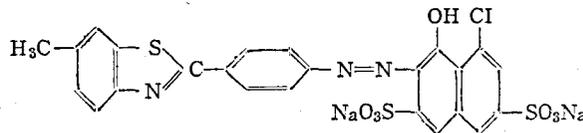
**n. Butanol : Pyridine :  $H_2O$  系溶媒Ⅲについて** 本溶媒では New cocchine (185), Amaranth (184) 及び Ponceau 6R (186) の Rf 値が溶媒Ⅱよりやゝ大となつているが、各色素の移動順位は大差がない。

**n. Butanol : Pyridine :  $N/2 NH_4OH$  系溶媒Ⅳについて** 本溶媒で得た色素の移動順位は溶媒Ⅰと同様であるが、ただ  $-SO_3H$  基の多い色素が溶媒Ⅰと比較してやゝ大きな Rf 値を示している。これは本溶媒に添加されている Pyridine によるものである。

### 第三節 Thiazoleazo- 及び Pyrazoloneazo -色素

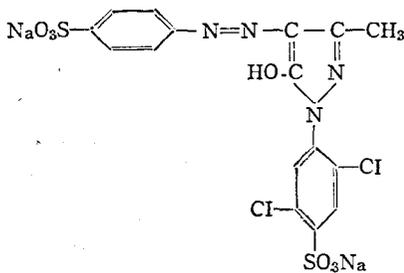
Thiazoleazo- 色素は1種, Pyrazoloneazo- 色素は3種を選んで実験に供した。

#### (A) Thiazoleazo- 色素

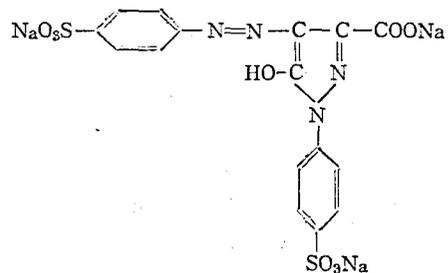


Diamine rose BD (128)  
(Red)

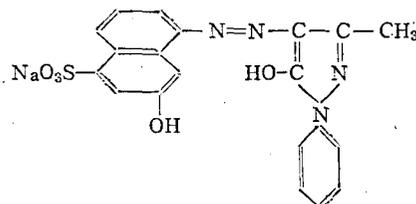
#### (B) Pyrazoloneazo 色素



Xyline light yellow (639)  
(Yellow)



Tartrazine (640)  
(Yellow)



Eriochrome red B (652)  
(Yellow red)

溶媒Ⅰ～Ⅳで求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第6表の通りである。

第6表 溶媒と Rf 値との関係

溶媒	色素名	Rf 値	溶媒	色素名	Rf 値	
Ⅰ	(A) Thiazoleazo- 色素 Diamine rose BD (128)	0.33	Ⅱ	(A) Thiazoleazo- 色素 Diamine rose BD (128)	0.40	
	(B) Pyrazoloneazo- 色素 Xylene light yellow (639)			Ⅲ		(B) Pyrazoloneazo- 色素 Xylene light yellow (639)
	Tartrazine (640)					Tartrazine (640)
	Eriochrome red B (652)			Eriochrome red B (652)		
Ⅱ	(A) Thiazoleazo- 色素 Diamine rose BD (128)	0.16	Ⅳ	(A) Thiazoleazo- 色素 Diamine rose BD (128)	0.54	
	(B) Pyrazoloneazo- 色素 Xylene light Yellow (639)			Ⅳ		(B) Pyrazoloneazo- 色素 Xylene light yellow (639)
	Tartrazine (640)					Tartrazine (640)
	Eriochrome red B (652)			Eriochrome red B (652)		

n. Butanol : Alcohol :  $N/2NH_4OH$  系溶媒Ⅰについて Diamine rose BD (128) は Thiazoleazo- 色素に属し  $-SO_3H$  基 2 個  $-OH$  基 1 個を有し、この色素の Rf 値をこれら酸基の同数を有する他の Monoazo 色素と比較するとほぼ同じであるが、Spot が他の Monoazo- 色素の如く円形とならず著しく紡錘状となつている。この原因は Thiazole 核が直接性を有するためその影響を受けたものと思われる。

Pyrazoloneazo- 色素 3 種の Rf 値を比較すると

Eriochrome red B (652) > xylene light yellow (639) > Tartrazine (640) の順序になつている。Eriochrome red B (652) は  $-SO_3$  基が 1 個であり且つ  $-N=N-$  基に Naphthalene 核が結合しているため分子が増大し親水性が 3 種の色素のうち最も弱く Rf 値が最大となつたものである。Xylene light yellow (639) は Eriochrome red B (652) の Naphthalene 核が Benzene 核となり炭素数が減少し逆に  $-SO_3H$  基 1 個増加し Eriochrome red B (652) より親水性が増加し Rf 値が小さくなつている。更に Pyrazolone 核に置換している  $-CH_3$  基が  $-COOH$  基となっていない Tartrazine (640) は一層強く酸基の影響を受け Rf 値は著しく小さくなつている。

n. Butanol : Alcohol :  $N/2AcOH$  系溶媒Ⅱについて Diamine rose BD (128) は前記溶媒Ⅰより Rf 値は小さくなつているが Spot の状態は溶媒Ⅰと同様紡錘状をなしこの場合も直接性の影響が見られる。

3 種の Pyrazoloneazo 色素の移動順位は溶媒Ⅰと同様であるが、Eriochrome red B (652) 及び Tartrazine (640) はやや低下の傾向を示しているが、Xylene light yellow (639) は逆に少しく上昇している。

n. Butanol : Pyridine :  $H_2O$  系Ⅲについて Diamine rose BD (128) は本溶媒では溶媒Ⅰ及びⅡに比べ少しく上昇を示し且つ Spot は溶媒Ⅰ及びⅡの場合と異なり紡錘状をなさずほぼ円形をなしている。これは本溶媒が pyridine を含み直接性が幾分弱められたためと思われる。

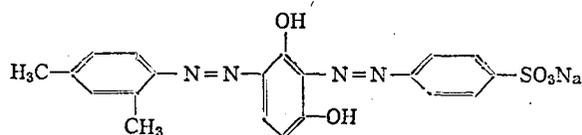
pyrazoloneazo- 色素は総べてその Rf 値が大きくなつているが移動順位は変化しない。3 種のうち Eriochrome red B (652) , Rf 値は著しく大きくなつている。

n. Butanol : Pyridine :  $N/2NH_4OH$  系溶媒Ⅳについて 本溶媒では Diamine rose BD (128) の Rf 値は前記溶媒 3 種のいずれよりも大きく spot は円形をなしている。

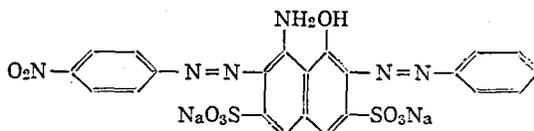
pyrazoloneazo- 色素の移動順位は溶媒Ⅲと同様である。

#### 第四節 Disazo- 色素

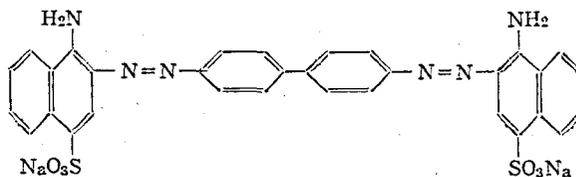
Disazo- 色素として次の 7 種を選んだ。



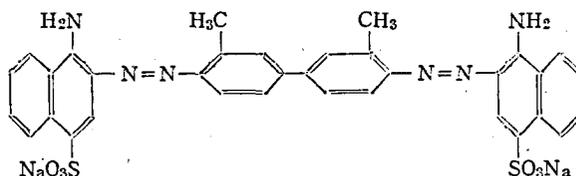
Resorcin brown (234)  
(Brown)



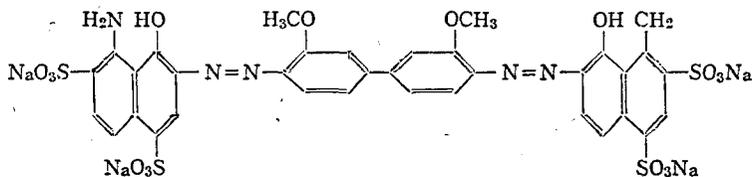
Naphthol blue black (246)  
(Dark blue)



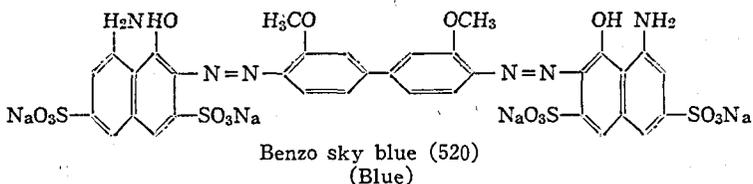
Congo red (370)  
(Red)



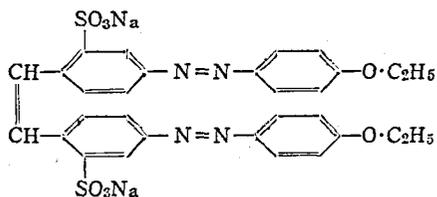
Benzopurpurine 4 B (448)  
(Red)



Diamine sky blue FF (518)  
(Blue)



Benzo sky blue (520)  
(Blue)



Chrysophenine (365)  
(Yellow)

溶媒 I ~ IV で求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第 7 表の通りである。

第 7 表 溶媒 と Rf 値 と の 関 係

溶 媒	色 素 名	Rf 値	溶 媒	色 素 名	Rf 値
I	Resorcin brown (234)	0.65	III	Resorcin brown (234)	0.68
	" Naphthol blue black (246)	0.20		" Naphtol blue black (246)	0.48
	" Congo red (370)	0.04		" Congo red (370)	0.22
	" Benzopurpurine 4 B (448)	0.04		" Benzopurpurine 4 B (448)	0.22
	" Diamine sky blue FF (518)	0.02		" Diamine sky blue FF (518)	0.19
	" Benzo sky blue (520)	0.00		" Benzo sky blue (520)	0.01
	" Chrysophenine (365)	0.50		" Chrysophenine (365)	0.63
II	Resorcin brown (234)	0.53	IV	Resorcine brown (234)	0.69
	" Naphthol blue black (246)	0.19		" Naphthol blue block (246)	0.53
	" Congo red (370)	0.02		" Congo red (370)	0.25
	" Benzopurpurine 4 B (448)	0.02		" Benzopurpurine 4 B (448)	0.25
	" Diamine sky blue FF (518)	0.00		" Diamine sky blue FF (518)	0.21
	" Benzo sky blue (520)	0.00		" Benzo sky blue (520)	0.04
	" Chrysophenine (365)	0.39		" Chrysophenine (365)	0.71

n-Butanol : Alcohol : N/2NH<sub>4</sub>OH 系溶媒 I について Resorcin brown (234) 及び Naphtol blue black (246) は第一 Disazo 色素に属する。Resorcin brown (234) は Resorcinol の両側に Sulfanilic acid と xylydine を coupling した色素でこの Rf 値は Monoazo 色素の Benzene 誘導体に近い。これはこの色素が -SO<sub>3</sub>H 基 1 個を有し、しかもその構造が Monoazo 色素の Benzene 誘導体に類似していたためと思われる。

Naphtol blue black (246) は 1-Amino-8-naphtol-3,6-disulfonic acid (H酸) の両側に Aniline と P-Nitroaniline を coupling した色素で、Rf 値は Resorcin brown (234) より著しく小さい。これは Naphthalene 核に -SO<sub>3</sub>H 基 2 個、-NH<sub>2</sub> 基及び -OH 基各 1 個を有する結果、これらの置換基がこの色素に極めて強い水合性を与えているためである。

Congo red (370), Benzopurpurine 4 B (448), Diamine sky blue FF (518) 及び Benzo sky blue (520) は Diphenyl-disazo 色素に属しこれらの色素は分子内に共軛二重結合が存在し直接性を有する。

Congo red (370) は Diphenyl 核の -N=N- 基の両端に Naphthionic acid を coupling した色素で 8 個の共軛二重結合を有する。この色素の Rf 値は極めて小さい。この原因は分子が大なることとその強い直接性によるものと考えられる。Benzopurpurine 4 B (448) は Congo red (370) より -CH<sub>3</sub> 基 2 個多いが、共軛二重結合-SO<sub>3</sub>H 基及び -NH<sub>2</sub> 基及び -NH<sub>2</sub> 基の数並びに位置が全く同じである。そのためか Rf 値も同じ値を示している。

Benzopurpurine 4 B (448) より Rf 値が小さく、原点より僅かに移動している Diamine sky blue FF (518) は Dianisididine に 1-Amino-8-naphtol-2,4-disulfonic acid (Chicago 酸) を coupling した色素で Benzopurpurine 4 B (448) より -SO<sub>3</sub>H 基 2 個多く分子も増大している。また原点に止まつて移動しない Benzo sky blue (520) は Chicago 酸の代りに H酸を coupling した色素で、Diamine sky blue FF (518) と同数の置換基を有する。この色素が Diamine sky blue FF (518) より小さい Rf 値を示すのは -SO<sub>3</sub>H 基の置換位置の相違によるものと考えられる。

Chrysophenine (365) は Stilbeneazo 色素に属し直接性を有する。この色素の Rf 値は前記の直接性色素と比較すると著しく大きくなっている。これはこの色素が Naphthalene 核を有せず Benzene 核のみより成り分子が小さいこと、-SO<sub>3</sub>H 基 2 個を置換しているが、一方に於いて -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> 基 2 個を有するためこの基の影響を受けて水合性が減少していること等の原因によるものである。

n-Butanol : Alcohol : N/2 AcOH 系溶媒 II について 各色素の Rf 値は溶媒 I と比較するとやや小さくなっている。溶媒 I で僅かに移動を示した Diamine sky blue FF (518) は本溶媒では動かない。この色素を除けば他の色素の移動順位は溶媒 I と同様である。

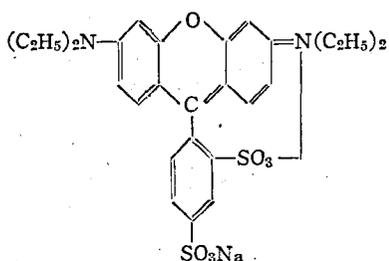
**n. Butanol : Pyridine : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅱについて** 本溶媒では各色素の移動順位は溶媒Ⅰと同様であるが、Rf 値は溶媒Ⅰより大きい。ただ Diamine sky blue FF (518) と Benzo sky blue (520) との Rf 値の差が大きく開いているが、これは溶媒Ⅰの場合で述べた如く -SO<sub>3</sub>H 基の置換位置の影響によるものである。

**n. Butanol : Pyridine : N<sub>2</sub>/NH<sub>4</sub>OH 系溶媒Ⅳについて** 本溶媒では各色素はよく移動し、4種の Butanol 系溶媒のうちで、最大の Rf 値を与えている。Congo red (370) と Benzopurpurine 4B (448) とは他の溶媒と同様本溶媒でも分離不可能である。また溶媒Ⅰ及びⅡでは全く移動しない Benzo sky blue (520) が本溶媒で少しく移動しているが、-SO<sub>3</sub>H 基の Rf 値に及ぼす影響は溶媒Ⅰ及びⅡの場合と同様 Diamine sky blue FF (518) より小さい。Chrysophenine (365) は極めてよく移動し Resorcin brown (234) より僅かであるが大きくなっている点が他の溶媒と異なっている。

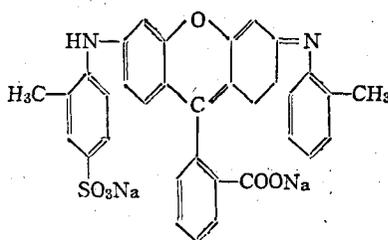
### 第五節 Xanthene-色素

Xanthene-色素として下記の11種を選んだ。

#### (A) Rhodamine 属

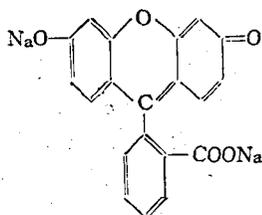


Sulforhodamine B (748)  
(Violet red)

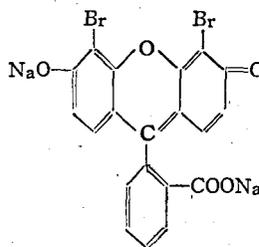


Violamine R (758)  
(Violet red)

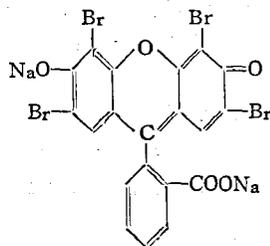
#### (B) Fluorescein 属



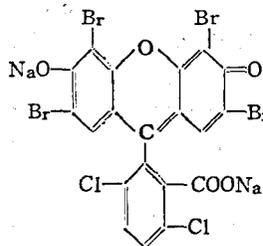
Uranine (766)  
(Yellow)



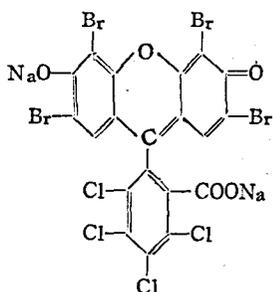
Dibromofluorescein NA (-)  
(Orange)



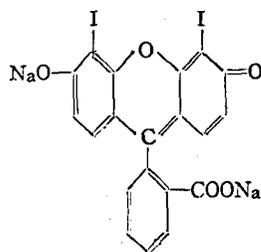
Eosin YS(768)  
(Yellow red)



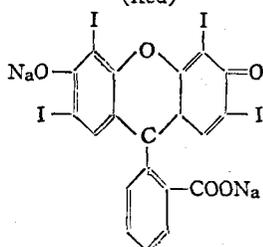
Phloxine (774)  
(Red)



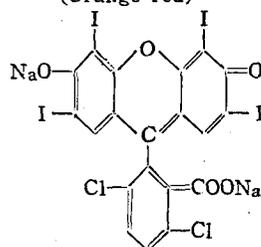
Phloxine B (778)  
(Red)



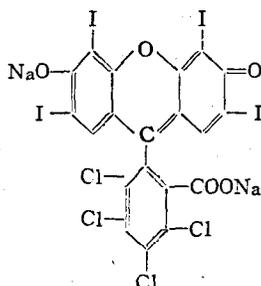
Erythrosine yellowish (772)  
(Orange red)



Erythrosine (773)  
(Red)



Rose bengale (777)  
(Violet red)



Rose bengale B (779)  
(Violet red)

溶媒 I ~ V を用いて求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第 8 表の通りである。

第 8 表 溶媒と Rf 値との関係

溶媒	色素名	Rf 値	溶媒	色素名	Rf 値		
I	(A) Rhodamine 属		II	(A) Rhodamine 属			
	Sulforhodamine B (748)	0.68		Sulforhodamine B (748)	0.54		
"	Violamine R (758)	0.88	"	Violamine R (758)	0.94		
I	(B) Fluorescein 属		II	(B) Fluorescein 属			
	Uranine (766)	0.37		Uranine (766)	0.94		
	"	Dibromofluorescein NA (←)		0.45	"	Dibromofluorescein NA (←)	0.93
	"	Eosine YS (768)		0.53	"	Eosine YS (768)	0.87
	"	Phloxine (774)		0.57	"	Phloxine (774)	0.84
	"	Phloxine B (778)		0.67	"	Phloxine B (778)	0.77
	"	Erythrosine Yellowish (772)		0.45	"	Erythrosine yellowish (772)	0.93
	"	Erythrosine (773)		0.53	"	Erythrosine (773)	0.88
	"	Rose bengale (777)		0.68	"	Rose bengale (777)	0.81
	"	Rose bengale B (779)		0.72	"	Rose bengale B (779)	0.75

■	(A) Rhodamine 属		"	Phloxine (774)	0.77
	Sulforhodamine B (748)	0.60		Phloxine B (778)	0.82
"	Violamine R (758)	0.93	"	Erythrosine Yellowish (772)	0.46
■	(B) Fluorescein 属		"	Erythrosine (773)	0.72
	Uranine (766)	0.40	"	Rose bengale (777)	0.74
"	Dibromofluorescein Na (-)	0.58	"	Rose bengale B (779)	0.85
"	Eosine YS (768)	0.68	Y	(A) Rhodamine 属	
"	Phloxine (774)	0.68		Sulforhodamine B (748)	1.00
"	Phloxine B (778)	0.74	"	Violamine R (758)	1.00
"	Erythrosine Yellowish (772)	0.59	Y	(B) Fluorescein 属	
"	Erythrosine (773)	0.83		Uranine (766)	0.91
"	Rose bengale (777)	0.74	"	Dibromofluorescein Na (-)	0.87
"	Rose bengale B (779)	0.83	"	Eosine YS (768)	0.81
IV	(A) Rhodamine 属		"	Phloxine (774)	0.75
	Sulforhodamine B (748)	0.65	"	Phloxine B (778)	0.50
"	Violamine R (758)	0.92	"	Erythrosine yellowish (772)	0.81
IV	(B) Fluorescein 属		"	Erythrosine (773)	0.73
	Uranine (766)	0.45	"	Rose bengale (777)	0.62
"	Dibromofluorescein Na (-)	0.48	"	Rose bengale B (779)	0.30
"	Eosine YS (768)	0.60			

#### n. Butanol : Alcohol : N/2 NH<sub>4</sub>OH 系溶媒 I について

(A) Rhodamine 属 Sulforhodamine B (748) は塩基性色素 Rhodamine B (749) に2個の -SO<sub>3</sub>H 基を導入した色素である。塩基性色素 Rhodamine B (749) は本溶媒で Rf 値 0.95 を示すが Sulforhodamine B (748) の Rf 値はこれより小さい。これは明らかに -SO<sub>3</sub>H 基の影響を受けたものである。また Violamine R (758) の Rf 値は Sulforhodamine B (748) より大きく、Rhodamine B (748) より小さいがその値は Rhodamine B (748) に近い、Violamine R (758) は Benzene 核が2個増加しているため酸基の影響が弱められ Rhodamine B (748) の Rf 値に接近したものと考えられる。

(B) Fluorescein 属 この属の色素は Fluorescein (766) を基本としその Benzene 核の種々の位置に Halogen 原子を導入した色素である。Uranine (766) は Fluorescein (766) の Na 塩でその Br- 置換体である Dibromofluorescein (-) 及び Eosine YS (768) と Rf 値を比較すると Eosine YS (768) [4Br] > Dibromofluorescein Na (-) [2Br] > Uranine (766) [-] の順序を示し、置換した Br 原子の数が増加するに従って Rf 値が大となっている。

次に I- 置換体の Rf 値を比較すると Erythrosine (773) [4I] > Erythrosine yellowish (772) [2I] > Uranine (766) [-] の順序を示し、置換した I 原子の数が増加するに従って Rf 値が大となり、この傾向は Br- 置換体の場合と全く同様である。

また Eosine YS (768) に2個の Cl 原子を導入した Phloxine (774) 及び4個の Cl 原子を導入した Phloxine B (778) を比較すると Rf 値は Phloxine B (778) [4Cl, 4Br] > Phloxine (774) [2Cl, 4Br] > Eosine YS (768) [4Br] となる。この関係は I- 置換体の場合も全く同様で、Erythrosine (773) に2個の Cl 原子を導入した Rose bengale (777) と4個の Cl 原子を導入した Rose bengale B (779) の Rf 値を比べると Rose bengale B (779) [4Cl, 4I] > Rose bengale (777) [2Cl, 4I] > Erythrosine (773) [4I] となり Halogen 原子の増加は Rf 値を大ならしめている。

次に Dibromofluorescein Na (-) と Erythrosine yellowish (772) 及び Eosine YS (768) と Erythro

sine (773) との Rf 値を比較すると Dibromofluorescein Na (-) [2Br]=Erythrosine yellowish (772) [2I], Eosine YS (768) [4Br]=Erythrosine (773) [4I] となり同数の Br 原子及び I 原子の Rf 値に及ぼす影響は本溶媒ではその差が認められない。然しこれらの色素にそれぞれ Cl 原子を導入した Phloxine (774) と Rose bengale (777) 及び Phloxine B (778) と Rose bengale B (779) との Rf 値を比較すると Phloxine (774) [2Cl, 4Br] < Rose bengale (777) [2Cl, 4I] Phloxine B (778) [4Cl, 4Br] < Rose bengale B (779) [4Cl, 4I] となり、同数の Cl 原子を置換している場合、Rf 値は Br 置換体 < I 置換体となり、従つて Halogen 原子の Rf 値に及ぼす影響は Br < I となるものと考えられる。分子量が最小の Uranine (766) は Rf 値最も小さく、分子量が最大の Rose bengale (779) は Rf 値が最も大きい。また Br 置換体、Cl-Br 置換体、I 置換体並に Cl-I 置換体に於いてはそれぞれ分子量の大なるもの程 Rf 値が大きくなっている。

なお前記各色素の Spot に紫外線 (3650Å) を照射すれば、Uranine (766) は緑黄色、Dibromofluorescein NA (-) は橙黄色、Eosine YS (768) は黄色、Phloxine (774) は橙赤色、Phloxine B (778) は赤色、Erythrosine yellowish (772) は橙色、Erythrosine (773) は弱赤色の蛍光を発する。Rose bengale (777) 及び Rose bengale B (779) は蛍光を発しない。

#### n-Butanol : Alcohol N/2AcOH 系溶媒 I について

(A) Rhodamine 属 本溶媒で求めた Sulforhodamine B (748) 及び Violamine R (758) の Rf 値は溶媒 I の場合に比べ、前者がやや小となり後者が少し大きな値を示しているのは溶媒の液性変化の影響によるものであるが、これら色素の移動順位には変りがない。

(B) Fluorescein 属 本溶媒では各色素の Rf 値は溶媒 I より総べて大となつているのみならず、移動順位は全く反対の傾向を示している。即ち Uranine (766) が最大、Rose bengale B (779) が最小の Rf 値を示しその他の色素はこの両種の色素の間にあるが各色素の Rf 値は置換 Halogen 原子が増加するに従つて小となる本溶媒では分子量の増大は Rf 値を低下させる。

#### n-Butanol : Pyridine : H<sub>2</sub>O 系溶媒 II について

(A) Rhodamine 属 本溶媒では Sulforhodamine B (748) 及び Violamine R (758) の移動順位は前記 2 種の溶媒と同じであり、また Rf 値は溶媒 II と大差がない。

(B) Fluorescein 属 本溶媒では溶媒 I と同様に Uranine (766) が最小の Rf 値を、Rose bengale B (779) が最大の Rf 値を示し、その他の色素はこの両者の間にあるが、これらの移動順位は溶媒 I の場合と少しく異なつている。これらの色素を Br 置換体、Cl-Br 置換体、I 置換体及び Cl-I 置換体に分けて Rf 値を比較すると、Br 置換体に於いては Dibromofluorescein NA (-) < Eosine YS (768), Br-Cl 置換体に於いては Phloxine (774) < Phloxine B (778), I 置換体に於いては Erythrosine yellowish (772) < Erythrosine (773), Cl-I 置換体に於いては Rose bengale (777) < Rose bengale B (779), となり、分子量の大なるものはいずれも Rf 値が大きい。

#### n-Butanol : pyridine : H/2NH<sub>4</sub>OH 系溶媒 III について

(A) Rhodamine 属 Sulforhodamine B (748) 及び Violamine R (758) の Rf 値は前記溶媒 I II 及び III と大差がない。

(B) Fluorescein 属 各色素の移動順位は溶媒 I と同様で Uranine (766) が最小値を Rose bengale B (779) が最大値を示し、置換原子の増加即ち分子量が増大するに従つて Rf 値が大となつている。

#### 氷酢酸 : Methyl glycol : H<sub>2</sub>O 系溶媒 IV について

(A) Rhodamine 属 Sulforhodamine B (748) 及び Violamine R (758) は本溶媒でいずれも溶媒前線と共に移動し Rf 値は差を示さない。これは本溶媒が水と自由に混合する成分より成つているため濾紙に対する吸着力が主要な因子をなすものと考えられ、これらの色素のアニオンは溶濾紙との間の反撥力が強く、その結果溶媒前線と共に移動したものである。

(B) Fluorescein 属 Uranine (766) とその Br 置換体たる Dibromofluorescein NA (-) 及び Eosine YS (768) の Rf 値を比較すると Eosine YS (768) [4Br] < Dibromofluorescein NA (-) [2Br] < Uranine (766) [-] の順序となり、置換した Br 原子の数が増加するに従つて Rf 値が小となつている。次に I 置換体の Rf 値を比較すると Erythrosine (773) [4I] < Erythrosine yellowish (772) [2I] < Uranine (776) [-] となり、Br 置換体の場合と同様置換 I 原子の数が増加するに従つて Rf 値は小となつている。

また Cl-Br 置換体の Rf 値は Phloxine B (778) [4Cl, 4Br] < Phloxine (774) [2Cl, 4Br] となり、Halogen 原子の増加は Rf 値を小ならしめている。Cl-I 置換体の場合も全く同様の関係を示し、Rose bengale B (779) [4Cl, 4I] < Rose bengale (777) [2Cl, 4I] となる。

Dibromofluorescein NA (-) と Erythrosine yellowish (772) 及び Eosine YS (768) と Erythrosine (773) の Rf 値を比較すると、Dibromofluorescein NA (-) [2Br] > Erythrosine yellowish (772) [2I], Eosine YS (768) [4Br] > Erythrosine (773) [4I] となり、置換原子の Rf 値に及ぼす影響は I 原子が Br 原子より Rf 値を小ならしめている。

また Cl-Br 置換体及び Cl-I 置換体の場合は

Phloxine (774) [2Cl, 4Br] > Rose bengale (777) [2Cl, 4I]

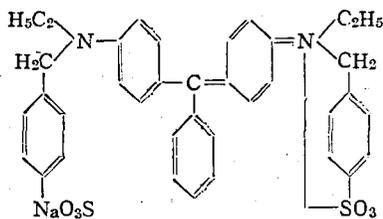
Phloxine B (778) [4Cl, 4Br] > Rose bengale (779) [4Cl, 4I]

となり置換原子の影響は前記と同様である。即ち本溶媒では置換 Halogen 原子の増加によつて Rf 値が小となり、また同数の Halogen 原子を置換している場合は原子量の大なるもの程 Rf 値が小さい。分子量が最小の Uranine (766) の Rf 値が最も大きく、分子量が最大の Rose bengale B (779) の Rf 値が最も小さい。Br 置換体、Cl-Br 置換体、I 置換体及び Cl-I 置換体にあつては分子量の大なるもの程 Rf 値が小さくなつている。

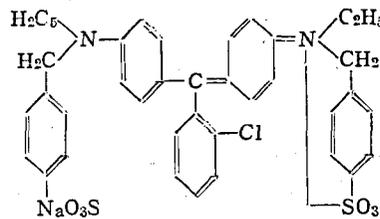
#### 第六節 Triphenylmethane-色素

Triphenylmethane-色素として下記の10種を選んだ。

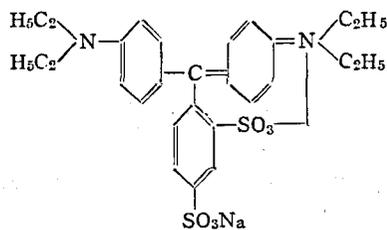
##### (A) Malachite green 属



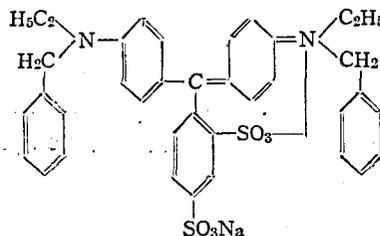
Guinea green B (666)  
(Green)



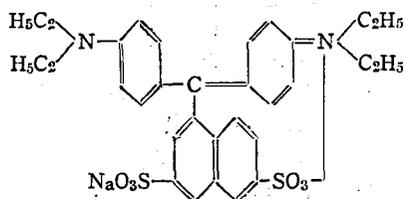
Brilliant milling green B (667)  
(Green blue)



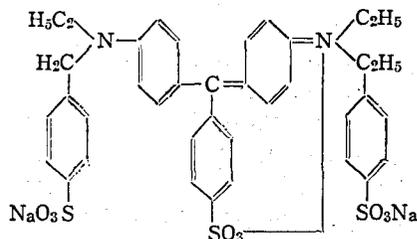
Xylene blue VS (672)  
(Blue)



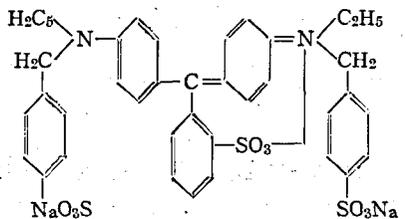
Xylene blue AS (673)  
(Blue)



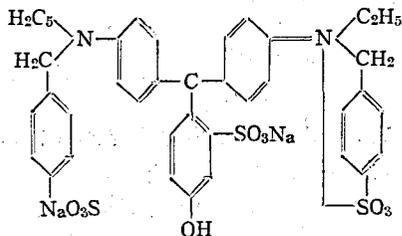
Naphthalene green V (735)  
(Green)



Light green SF yellowish (670)  
(Green)

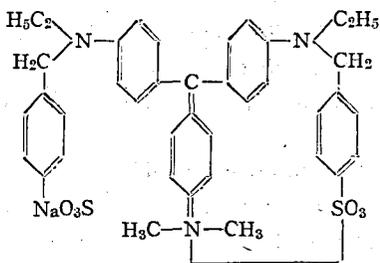


Brilliant blue FCF (-)  
(Blue)

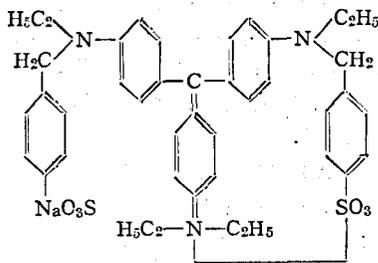


Fast green FCF (-)  
(Green)

(B) Rosaniline 属



Acid violet 6B (697)  
(Violet)



Formyl violet S4B (698)  
(Violet)

溶媒 I ~ N を用いて求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第 9 表の通りである。

第 9 表 溶媒と Rf 値との関係

溶媒	色素名	Rf 値	溶媒	色素名	Rf 値
	(A) Malachite green 属			(A) Malachite green 属	
I	Guinea green B (666)	0.68	I	Guinea green B (666)	0.60
"	Brilliant milling green B (667)	0.72	"	Brilliant milling green B (667)	0.59
"	xylene blue VS (672)	0.67	"	Xylene blue VS (672)	0.53
"	Xylene blue AS (673)	0.86	"	Xylene blue AS (673)	0.68
"	Naphthalene green V (735)	0.66	"	Naphthalene green V (735)	0.54
"	Light green SF yellowish (670)	0.45	"	Light green SF yellowish (670)	0.35
"	Brilliant blue FCF (-)	0.45	"	Brilliant blue FCF (-)	0.35
"	Fast green FCF (-)	0.27	"	Fast green FCF (-)	0.36
	(B) Rosaniline 属			(B) Rosaniline 属	
I	Acid violet 6B (697)	0.70	I	Acid violet 6B (697)	0.62
"	Formyl violet S4B (698)	0.81	"	Formyl violet S4B (698)	0.67

	(A) Malachite green 属		(A) Malachite green 属	
■	Guinea green B (666)	0.62	IV	Guinea green B (666)
〃	Brilliant milling green B (667)	0.64	〃	Brilliant milling green B (667)
〃	Xylene blue VS (672)	0.55	〃	Xylene blue VS (672)
〃	Xylene blue AS (673)	0.70	〃	Xylene blue AS (673)
〃	Naphthalene green V (735)	0.57	〃	Naphthalene green V (735)
〃	Light green SF yellowish (670)	0.40	〃	Light green SF yellowish (670)
〃	Brilliant blue FCF (-)	0.40	〃	Brilliant blue FCF (-)
〃	Fast green FCF (-)	0.40	〃	Fast green FCF (-)
	(B) Rosaniline 属		(B) Rosaniline 属	
■	Acid violet 6B (697)	0.70	IV	Acid violet 6B (697)
〃	Formyl violet S4B (698)	0.74	〃	Formyl violet S4B (698)

### n-Butanol : Alcohol : N/2NH<sub>4</sub>OH 系溶媒 I について

(A) Malachite green 属 Guinea green B (666) は2個の -NH<sub>2</sub> 基を有し、-NH<sub>2</sub> 基の H は -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> 基と Benzyl 基で置換され、各 Benzyl 基には1個の -SO<sub>3</sub>H 基が導入されている。この -SO<sub>3</sub>H 基を中心炭素原子に対し ortho 位及び para 位に移した坪の色素は Xylene blue AS (673) で色相も緑から青へ変化している。両者の Rf 値を比較すると Guinea green B (666) の値は Xylene blue AS (673) より小さい。これは -SO<sub>3</sub>H 基の置換位置の差異が Rf 値に影響を与えたもので、分子量が同じでも同一置換基の位置の違いによつて Rf 値が影響を受ける一例である。Guinea green B (666) は中心炭素原子に対し ortho 位に置換基を有していないためアルカリによつて脱色し易い。従つてこの色素は展開中脱色するが展開終了後シリンドラより取り出して空气中に放置すると復色する。Guinea green B (666) に Cl 1個を増加した Brilliant milling green B (667) の Rf 値は Guinea green B (666) よりやや大きくなつている。これは中心炭素原子に対し ortho 位に置換している Cl 原子の影響によるものである。

Xylene blue AS (673) と同位置に同数の -SO<sub>3</sub>H 基を有する Xylene blue VS (672) は前者より Rf 値が小さい。これは Xylene blue VS (672) には Benzyl 基がなく、Xylene blue AS (673) より分子量小となり、また Benzene 核2個少ないため芳香環による有機性が減少し逆に親水性が増大した結果と考えられる。

Naphthalene green V (735) は Xylene blue VS (672) の -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> 基を有しない Benzene 核を Naphthalene 残基で置換した色素で同数の -SO<sub>3</sub>H 基を有するが Xylene blue VS (672) と殆んど同じ Rf 値を与えている。

Guinea green B (666), Brilliant milling green B (667), Xylene blue VS (672), Xylene blue AS (673) 及び Naphthalene green V (735) はいずれも2個の -SO<sub>3</sub>H 基を有するが、更に -SO<sub>3</sub>H 基1個を増加した Light green SF Yellowish (670), Brilliant blue FCF (-) 及び Fast green FCF (-) の Rf 値を前記5種と比較すると、3個の -SO<sub>3</sub>H 基を有する色素は総べて Rf 値が小さい。これは -SO<sub>3</sub>H 基増加の影響によるものであるが、この関係は Guinea green B (666) と Light green SF yellowish (670) を比較すると極めて明瞭である。

Light green SF yellowish (670) の -SO<sub>3</sub>H 基が ortho 位に移つた色素は Brilliant blue FCF (-) であるが、これらの Rf 値は本溶媒では差は認められない。Fast green FCF (-) は著者が実験した Malachite green 属色素8種のうち最も小さい Rf 値を示している。この色素は Brilliant blue FCF (-) と同数しかも同位置に -SO<sub>3</sub>H 基を有しているにもかかわらず Brilliant blue FCF (-) より著しく小さい Rf 値を示しているのは中心炭素原子に対し para 位に存在する -OH 基の影響によるものである。

(B) Rosaniline 属 この属は Triamino 誘導体である。2個の -SO<sub>3</sub>H 基を有する Acid violet 6B (697) 及び Formyl violet S4B (698) の Rf 値は前記 Diamino 誘導体のうち、同数の -SO<sub>3</sub>H 基を有するものとはほぼ同じ値を示している。Acid violet 6B (697) と Formyl violet S4B (698) の Rf 値を比較すると

Acid violet 6B (697) < Formyl violet S4B (698)

となり、これは -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 基と -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> 基との違いによるもので炭素数の増加が Rf 値を大ならしめている。

**n. Butanol : Alcohol : N/2 AcOH 系溶媒 I について**

(A) Malachite green 属 本溶媒では各色素の Rf 値は全般的にやや小さい値を示し、且つこれらの順位は Brilliant milling green B (667) 及び Fast green FCF (←) を除けば他は溶媒 I と同様である。Brilliant milling green B (667) は Guinea green B (666) と、Fast green FCF (←) は Light green SF Yellowish (670) 及び Brilliant blue FCF (←) と殆んど同じ Rf 値を示し本溶媒では Rf 値に及ばず Cl 原子並に -OH 基の影響は認められない。

(B) Rosaniline 属 この属の色素も前記溶媒 I と比較すると Rf 値はやや低下しているが色素の順位には変化がない。

**n. Butanol : Pyridine : H<sub>2</sub>O 系溶媒 II について**

(A) Malachite green 属 各色素の移動順位は溶媒 I と殆んど同じである。Fast green FCF (←) のみが Light green SF yellowish (670) 及び Brilliant blue FCF (←) と同じ Rf 値を示し溶媒 II と同様に -OH 基の影響は認められない。

(B) Rosaniline 属 Acid violet 6B (697) 及び Formyl violet S 4 B (698) の移動順位は溶媒 I と同じであるが、両者の Rf 値は接近している。

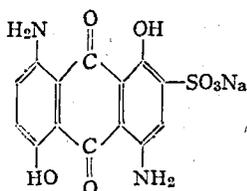
**n. Butanol : Pyridine : N/2NH<sub>4</sub>OH 系溶媒 N について**

(A) Malachite green 属 各色素の移動順位は溶媒 I と同様である。

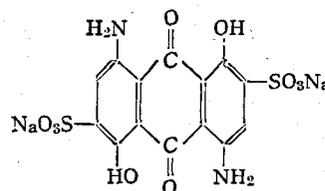
(B) Rosaniline 属 この属の色素も移動順位は溶媒 I と同じである。

**第七節 Anthraquinone- 色素, Quinoline- 色素及び Indigoid- 色素**

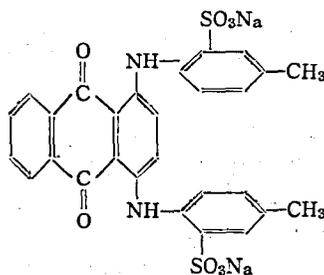
Anthraquinone- 色素として Alizarin saphirol SE (1053), Alizarin saphirol B (1054) 及び Alizarin cyanine green (1078) を, Quinoline- 色素として Quinoline yellow (801) を, Indigoid- 色素として Indigo carmine (1180) を選び実験に供した。

**(A) Anthraquinone- 色素**

Alizarin saphirol SE (1053)  
(Blue)

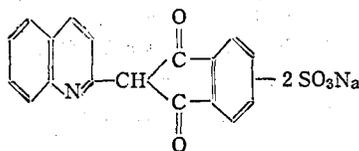


Alizarin saphirol B (1054)  
(Blue)



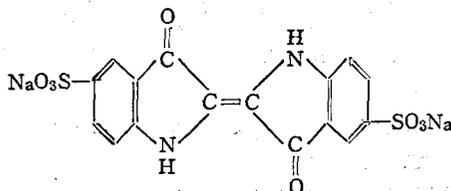
Alizarin cyanine green (1078)  
(Green)

## (B) Quinoline-色素



Quinoline Yellow (801)  
(Yellow)

## (C) Indigoid-色素



Indigo carmine (1180)  
(Blue)

溶媒 I ~ IV を用いて求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第10表の通りである。

第10表 溶媒と Rf 値との関係

溶媒	色素名	Rf 値	溶媒	色素名	Rf 値
I	(A) Anthraquinone-色素	0.34	III	(A) Anthraquinone-色素	0.50
	Alizarin saphirol SE (1053)			Alizarin saphirol SE (1053)	
	Alizarin saphirol B (1054)			Alizarin saphirol B (1054)	
"	Alizarin cyanine green (1078)	0.61	"	Alizarin cyanine green (1078)	0.61
I	(B) Quinoline-色素	0.53	III	(B) Quinoline-色素	0.59
	Quinoline Yellow (801)			Quinoline yellow (801)	
I	(C) Indigoid-色素	0.19	III	(C) Indigoid (1180)	0.23
	Indigo carmine (1180)			Indigo carmine	
II	(A) Anthraquinone-色素	0.40	IV	(A) Anthraquinone-色素	0.59
	Alizarin saphirol SE (1053)			Alizarin saphirol SE (1053)	
	Alizarin saphirol B (1054)			Alizarin saphirol B (1054)	
"	Alizarin cyanine green (1078)	0.55	"	Alizarin cyanine green (1078)	0.68
I	(B) Quinoline-色素	0.41	IV	(B) Quinoline-色素	0.63
	Quinoline Yellow (801)			Quinoline yellow (801)	
II	(C) Indigoid-色素	0.05	IV	(C) Indigoid-色素	0.29
	Indigo carmine (1180)			Indigo carmine (1180)	

n-Butanol: Alcohol: N/2 NH<sub>4</sub>OH 系溶媒 I について

Alizarin saphirol SE (1053) と Alizarin saphirol B (1054) は Anthraquinone 核に -OH 基と -NH<sub>2</sub> 基とが各 2 個ずつ導入されている色素で、両者を比較すると 2 個の -SO<sub>3</sub>H 基を有する Alizarin saphirol B (1054) は全く移動しないが、この色素より -SO<sub>3</sub>H 基が 1 個少ない Alizarin saphirol SE (1053) は移動している。これは -SO<sub>3</sub>H 基の影響によるもので、これらの色素に於いても -SO<sub>3</sub>H 基の増加は Rf 値を低下させている。Alizarin cyanine green (1078) は 2 個の -NH<sub>2</sub> 基を有し各 -NH<sub>2</sub> 基の H は Toluene sulfonic acid で置換されている。この色素の Rf 値は同数の -SO<sub>3</sub>H 基を有する Alizarin saphirol B (1054) より著しく大となつている。これは Alizarin cyanine green (1078) には -OH 基がなく、Benzene 核及び -CH<sub>3</sub> 基が各 2 個多くその結果分子が増大し -SO<sub>3</sub>H 基の水和性が減少したためと考えられる。

Quinoline yellow (801) は Quinoline yellow SS (800) を Sulfonation した色素である。Quinoline yellow SS (800) は油性 (アルコール溶性) 色素で、この色素の Rf 値を本溶媒で測定すると 0.90 を示し Quinoline yellow (801) の Rf 値より著しく大となつている。即ち両者の Rf 値の差は  $-SO_3H$  基の影響によるものである。Indigo carmine (1180) は低い Rf 値を示しているがこれは色素分子の両端に  $-SO_3H$  基を有し色素アニオンの水和性が強大となつているためである。

**n. Butanol : Alcohol : N/2 AcOH 系溶媒Ⅱについて** Anthraquinone- 色素 3 種の移動順位は溶媒Ⅰと同様である。

Quinoline yellow (801) 及び Indigo carmine (1180) はいずれも溶媒Ⅰより Rf 値が低下している。

**n. Butanol : Pyridine : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅲについて** Anthraquinone- 色素の移動順位は前記の 2 種の溶媒と同様であるが、本溶媒ではこれらの色素は Quinoline yellow (801) 及び Indigo carmine (1180) と同じく上昇の傾向を示している。

**n. Butanol : Pyridine : N/2 NH<sub>4</sub>OH 系溶媒Ⅳについて** Anthraquinone- 色素の移動順位は前記 3 種の溶媒と同様である。

Quinoline yellow (801) 及び Indigo carmine (1180) の Rf 値は本溶媒が最も大である。

## 第二章 塩基性色素

塩基性色素は分子内に塩基性原子団  $-NH_2$  基、 $-N(CH_3)_2$  基、 $-N(C_2H_5)_2$  基等を有し、 $-SO_3H$  基がなく、水に溶けて色素カチオンを生じ染色的性質も酸性色素と反対である。塩基性色素は第一章で述べた Butanol 系溶媒を用いて Rf 値を測定すると、その値は殆んど総べて 0.90~1.00 を示し従つて本溶媒では塩基性色素相互分離の目的を達することができない。これは一般に塩基性色素は水に対する溶解度より有機溶媒に対する溶解度が大きいため、前記 Butanol 系溶媒を用いて濾紙クロマトグラフィを行うと、塩基性色素は移動相たる Butanol に多量に分配される結果 Rf 値が大となり Rf 値に殆んど差違を生じないためと考えられる。依つて著者は塩基性色素の分離は分配型濾紙クロマトグラフィによつて行うより寧ろ非分配型濾紙クロマトグラフィによるのが最も適当であると認め、これら色素に適する非分配型溶媒について研究した結果、塩基性色素の溶媒として第 11 表に掲げた 3 種を選定した。

第 11 表 塩基性色素の溶媒

溶媒番号	溶媒の組成 (容量比)
Ⅵ	Methanol : NH <sub>4</sub> OH : H <sub>2</sub> O (6.3 : 4.0 : 7.7)
Ⅶ	Alcohol : NH <sub>4</sub> OH : H <sub>2</sub> O (3.0 : 8.0 : 13.0)
Ⅷ	Pyridine : NH <sub>4</sub> OH : H <sub>2</sub> O (3.0 : 10.0 : 17.0)

Alcohol 及び Pyridine は前章で述べたものと同じであり、また Methanol は精溜し、NH<sub>4</sub>OH は比重 0.90 のものを用いた。

実験の方法は第一章酸性色素の場合と全く同様に行つたが、試料濃度は 0.05 w/v% とし、50v/v% Alcohol 液に溶かして用いた。展開時間は 5~6 時間である。

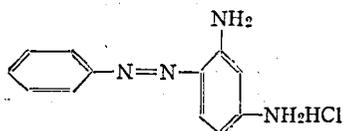
著者は化学構造による分類法に従い、塩基性色素を Monoazo-, Disazo-, Diphenylmethane-, Triphenylmethane-, Xanthene-, Acridine-, Azine- 及び Thiazine- 色素に分ち、これらの代表的色素を選び第一章で述べた実験方法に従い Rf 値を測定した。以下化学構造と Rf 値との関係について論述する。

### 第一節 Monoazo- 及び Disazo- 色素

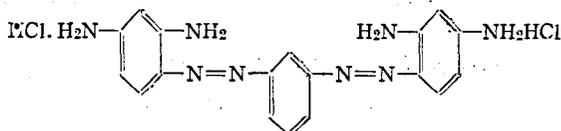
実験に供した Monoazo- 色素は Chrysoidine G (20)、Disazo- 色素は Bismarck brown G (331) である。

(A) Monoazo- 色素

(B) Disazo- 色素



Chrysoidine G (20)  
(Orange brown)



Bismarck brown G (331)  
(Brown)

溶媒Ⅴ～Ⅷを用いて求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第12表の通りである。

**Methanol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅵについて**

Chrysoidine G (20) はやや移動しているが, Bismarck brown G (331) は移動しない。前者が -NH<sub>2</sub> 基2個, 後者は4個有している。-NH<sub>2</sub> 基の増加は親水性を増す筈であるが, Bismarck brown G (331) が移動しないのは -N=N- 基の増加によつて分子量が増大したためと考えられる。

**Alcohol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅶについて**

前記の溶媒Ⅵと同様であるが Chrysoidine G (20) のみは溶媒Ⅵより少しく上昇している。

**Pyridine : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅷについて**

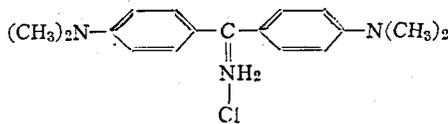
前記の溶媒Ⅵ及びⅦと同様 Bismarck brown G (331) は移動しない。Chrysoidine G (20) の Rf 値は本溶媒では最も小さい。

第12表 溶媒と Rf 値との関係

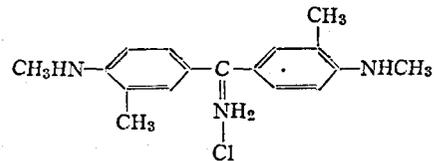
溶 媒	色 素 名	Rf 値
Ⅵ	(A) Monoazo- 色素 Chrysoidine G (20)	0.39
	(B) Disazo- 色素 Bismarck brown G (331)	0.00
Ⅶ	(A) Monoazo- 色素 Chrysoidine G (20)	0.42
	(B) Disazo- 色素 Bismarck brown G (331)	0.00
Ⅷ	(A) Monoazo- 色素 Chrysoidine G (20)	0.26
	(B) Disazo- 色素 Bismarck brown G (331)	0.00

第二節 Diphenylmethane- 色素

実験に供した色素は次の2種である。



Auramine O (655)  
(Yellow)



Auramine G (656)  
(Yellow)

溶媒Ⅵ, Ⅶ及びⅧで求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第13表の通りである。

**Methanol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅵについて**

Auramine O (655) 及び Auramine G (656) はいずれも3個の -NH<sub>2</sub> 基と4個の -CH<sub>3</sub> 基とを有する。Auramine O (655) は Benzene 核に置換している2個の -NH<sub>2</sub> 基は4個の -CH<sub>3</sub> 基によつて完全に置換されているが, Auramine G (656) の場合はそれぞれ1個の -CH<sub>3</sub> 基によつて置換され, 他の -CH<sub>3</sub> 基は Benzene 核に導入されている。これらの色素はいずれもよく移動し両者は殆んど等しい Rf 値を示し, 置換基による影響は本溶媒では認められない。なおこれらの色素の Spot に紫外線 (3650Å) を照射すれば Auramine O (655) は黄色, Auramine G (656) は緑黄色の蛍光を放つ。

**Alcohol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅶについて** 本溶媒では -CH<sub>3</sub> 基の置換位置の相違が Rf 値に与える影響が著明に認められる。即ち Auramine O (655) の Rf 値は Auramine G (656) より小となり両者の Spot は完全に分離する。

**Pyridine : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅷについて** Auramine O (655) 及び Auramine G (656) は前記溶媒Ⅵと同様いずれもよく移動しているが, Auramine O (655) は Auramine G (656) より Rf 値が小さく -CH<sub>3</sub> 基の影響は溶媒Ⅶと同じである。

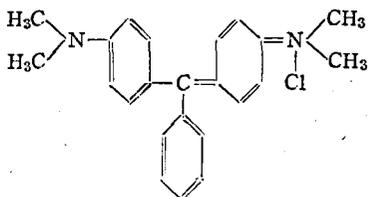
第13表 溶媒と Rf 値との関係

溶 媒	色 素 名	Rf 値
Ⅵ	Auramine O (655)	0.57
	Auramine G (656)	0.59
Ⅶ	Auramine O (655)	0.36
	Auramine G (656)	0.45
Ⅷ	Auramine O (655)	0.56
	Auramine G (656)	0.63

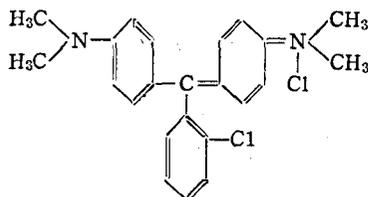
第三節 Triphenylmethane- 色素

実験に供した Triphenylmethane- 色素は次の 8 種である。

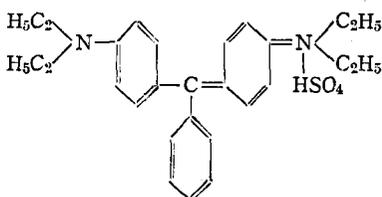
(A) Malachite green 属



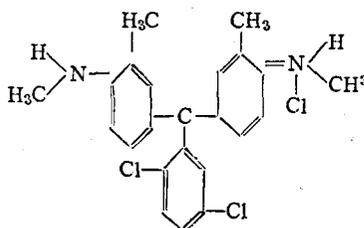
Malachite green (657)  
(Blue green)



Setoglaurine (658)  
(Blue green)

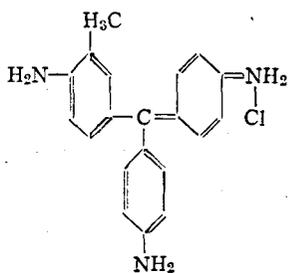


Brilliant green (662)  
(Green)

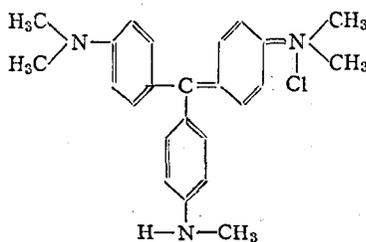


Aronol brilliant blue (664)  
(Green blue)

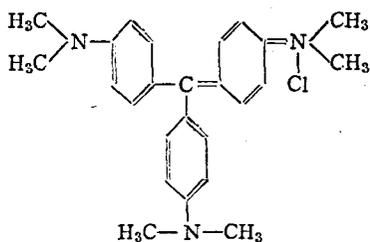
(B) Magenta 属



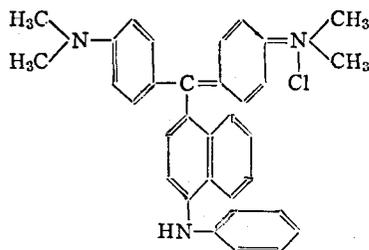
Magenta (677)  
(Violet red)



Methyl violet B (680)  
(Violet)



Crystal violet (681)  
(Violet)



Victoria blue B (729)  
(Blue)

溶媒Ⅱ, Ⅶ及びⅧで求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第14表の通りである。

Methanol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O系溶媒Ⅵについて

(A) Malachite green 属 実験に供したこの属の色素のうち Malachite green (657) の Rf 値が最も大である。この色素より Cl 原子1個多い Setoglauricine (658) の Rf 値は Malachite green (657) よりやや小さい。これは Cl 原子増加の影響と認められる。Acronol brilliant blue (664) は Setoglauricine (658) より更に Cl 原子1個多いが、Rf 値は前者が僅かに大きくなっている。これは Setoglauricine (658) が -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 基を有するに反し Acronol brilliant blue (664) ではこの基が CH<sub>3</sub>NH 基に変じ、更に -CH<sub>3</sub> 基が Benzene 核に導入されているため、これらの基の影響を受けたものである。Brilliant green (662) の Rf 値は Malachite green (662) より著しく小さい。これは Malachite green が -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 基を有するに反し、Brilliant green (662) は -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> 基を有し、これらの置換基の違いによつて Rf 値が影響を受けたもので、本溶媒では -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> 基は -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 基より Rf 値を低下させる影響が強い。

(B) Magenta 属 Magenta (677) は Paromagenta と Monomethyl magenta との混合物である。本溶媒ではこれらを分離することができないが Rf 値は大である。Methyl violet B (680) は3個の -NH<sub>2</sub> 基の H が5個の CH<sub>3</sub> 基で置換され、また Crystal violet (681) は Methyl violet B (680) より -CH<sub>3</sub> 基1個多く3個の -NH<sub>2</sub> 基の H は悉く、-CH<sub>3</sub> 基で置換されている。これら3種の色素の Rf 値を比較すると Magenta (677) > Methyl violet B (680) > Crystal violet (681) の順序を示している。即ち Magenta (677) の -NH<sub>2</sub> 基の H が -CH<sub>3</sub> 基で置換される数が多くなる程、Rf 値が小さくなる。Victoria blue B (729) は Crystal violet (681) の Dimethylaniline 残基を Phenyl-naphthylamine で置換した色素である。この色素の Rf 値は極めて小さい。これは分子増大の影響によるものである。

前記 Malachite green 属及び Magenta 属の各色素は NH<sub>4</sub>OH を含有する溶媒で展開すると展開中脱色する。しかし展開終了後濾紙を容器より取り出し空气中に放置すると復色する。

Alcohol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O系溶媒Ⅶについて

(A) Malachite green 属 本溶媒では各色素の移動順位は前記溶媒Ⅵと大差ないが、Rf 値は溶媒Ⅵより全般的に小となり、Brilliant green (662) は全く移動せず、且つ Setoglauricine (658) と Acronol brilliant blue (664) の Rf 値は差違を示さない。

(B) Magenta 属 Magenta (677) を除けば他の色素の Rf 値は全般的に溶媒Ⅵより小となつている。しかし色素の移動順位には変化がない。

Pyridine : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O系溶媒Ⅷについて

(A) Malachite green 属 本溶媒では各色素の Rf 値は溶媒Ⅵより全般的にやや大となつているが、これらの移動順位は変らない。

第14表 溶媒と Rf 値との関係

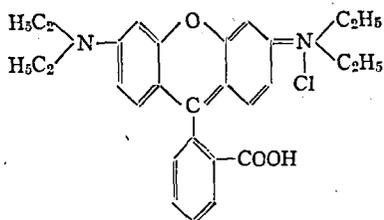
溶媒	色素名	Rf 値
Ⅵ	(A) Malachite green 属	
	Malachite green (657)	0.48
	Setoglauricine (658)	0.37
	Brilliant green (662)	0.05
	Acronol brilliant blue (664)	0.44
	(B) Magenta 属	
	Magenta (677)	0.72
	Methyl violet B (680)	0.69
	Crystal violet (681)	0.56
	Victoria blue B (729)	0.08
Ⅶ	(A) Malachite green 属	
	Malachite green (657)	0.28
	Setoglauricine (658)	0.14
	Brilliant green (662)	0.00
	Acronol brilliant blue (664)	0.14
	(B) Magenta 属	
	Magenta (677)	0.73
	Methyl violet B (680)	0.44
	Crystal violet (681)	0.26
	Victoria blue B (729)	0.01
Ⅷ	(A) Malachite green 属	
	Malachite green (657)	0.58
	Setoglauricine (658)	0.41
	Brilliant green (662)	0.08
	Acronol brilliant blue (664)	0.42
	(B) Magenta 属	
	Magenta (677)	0.80
	Methyl violet B (680)	0.63
	Crystal violet (681)	0.48
	Victoria blue B (729)	0.06

(B) Magenta 属

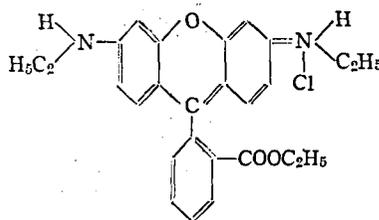
この属の色素の移動順位は前記の溶媒Ⅵ及びⅦと同様である。

第四節 Xanthene- 色素

実験に供した色素は次の Rhodamine 属の 2 種である。



Rhodamine B (749)  
(Red)



Rhodamine 6G (752)  
(Red)

溶媒Ⅵ, Ⅶ及びⅧで求めたこれらの色素の R<sub>f</sub> 値を表示すれば第 15 表の通りである。

Methanol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅵについて

Rhodamine B (749) は 2 個の -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> 基と 1 個の COOH 基を有する両性体で本溶媒ではよく移動している。これは COOH 基の影響を受け -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> 基の塩基性が弱められた結果濾紙に対する吸着親和力が減じたためと考えられる。Rhodamine 6G (752) は Rhodamine B (749) より R<sub>f</sub> 値が小さい。Rhodamine 6G (752) に於いてはその COOH 基がエチルエステルとなつているため、酸としての影響を与えることができず従つて塩基性が強く濾紙に対する吸着親和力が Rhodamine B (749) より大となつたものと思われる。

第 15 表 溶媒と R<sub>f</sub> 値との関係

溶 媒	色 素 名	R <sub>f</sub> 値
Ⅵ	Rhodamine B (749)	0.78
	Rhodamine 6G (752)	0.33
Ⅶ	Rhodamine B (749)	0.60
	Rhodamine 6G (752)	0.09
Ⅷ	Rhodamine B (749)	0.82
	Rhodamine 6G (752)	0.25

これら色素の Spot に紫外線 (3650Å) を照射すれば Rhodamine B (749) は橙赤色, Rhodamine 6G (752) は橙黄色の蛍光を発する。

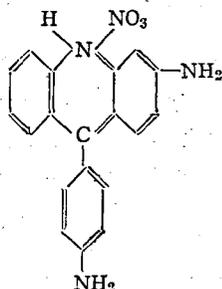
Alcohol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅶについて 本溶媒では各色素の移動順位は前記溶媒Ⅵと同様であるが、R<sub>f</sub> 値は全般的に小さくなり殊に Rhodamine 6G (752) の移動は著しく低い。

Pyridine : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅷについて 各色素の移動順位は前記 2 種の溶媒と同じであるが Rhodamine B (749) の R<sub>f</sub> 値は本溶媒が最も大きい、Rhodamine 6G (752) の R<sub>f</sub> 値は前記溶媒ⅥとⅦとの中間にある。

第五節 Acridine-, Azine- 及び Thiazine- 色素

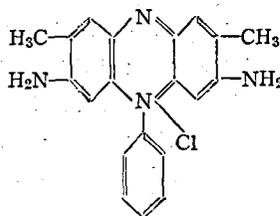
Acridine- 色素として Phosphine (793) を, Azine- 色素として Safranine (841) を Thiazine- 色素として Methylene blue (922) を選び実験を行った。

(A) Acridine- 色素



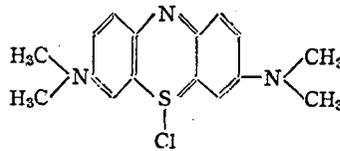
Phosphine (793)  
(Yellow brown)

(B) Azine- 色素



Safranine (841)  
(Red)

## (c) Thiazin-色素



Methylene blue (922)  
(Blue)

溶媒Ⅵ, Ⅶ及びⅧを用いて求めた各色素の Rf 値を表示すれば第16表の通りである。

**Methanol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅵについて**

Phosphine (793), Safranine (841) 及び Methylene blue (922) はいずれも強塩基性色素に属する。これらのうち Phosphine (793) がやや移動しているのみで, Safranine (841) 及び Methylene blue (922) は共に移動度が小さい。これは塩基性が強い色素程濾紙に強く吸着されるためと思われる。

これらの色素の Spot に紫外線 (3650Å) を照射すれば, Phosphine (793) は黄褐色, Safranine (841) は紅色の蛍光を放つ。

**Alcohol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅶについて** 本溶媒では各色素の濾紙に対する吸着親和力が強く発揮されるためか, 各色素の Rf 値は前記溶媒Ⅵに比べ半減している。殊に Safranine (841) 及び Methylene blue (922) は原点より僅かに移動するのみで本溶媒では両者の分離は不可能である。

**Pyridine : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅷについて** 本溶媒では各色素はやや移動し, 前記2種の溶媒と同様に Phosphine (793) が最大の Rf 値を示している。ただし前記2種の溶媒と異なる点は Safranine (841) と Methylene blue (922) の Rf 値が僅かであるが逆転していることである。

第16表 溶媒と Rf 値との関係

溶 媒	色 素 名	Rf 値
Ⅵ	(A) Acridine-色素 Phosphine (793)	0.33
	(B) Azine-色素 Safranine (841)	
	(C) Thiazine-色素 Methylene blue (922)	0.08
		0.04
Ⅶ	(A) Acridine-色素 Phosphine (793)	0.15
	(B) Azine-色素 Safranine (841)	
	(C) Thiazine-色素 Methylene blue (922)	0.03
		0.02
Ⅷ	(A) Acridine-色素 Phosphine (793)	0.40
	(B) Azine-色素 Safranine (841)	
	(C) Thiazine-色素 Methylene blue (922)	0.12
		0.15

## 第三章 油溶性 (アルコール溶性) 色素

第一章及び第二章に於いて酸性並びに塩基性色素の Rf 値と化学構造の関係について論述した。本章では食品着色用として使用される油溶性 (アルコール溶性) 色素について述べる。

油溶性 (アルコール溶性) 色素は水を溶媒として展開すると全く移動しない。また有機溶媒で行うと Rf 値は 1.00 に近い値を示し色素相互の分離は不可能である。依つて著者は適当な含水率を保持させた有機溶媒を使用すれば分離の目的を達し得ると予想し研究の結果, 最も適当であると認めた次の3種の溶媒を選定した。

Methanol, Alcohol 及び Pyridine は前章で述べたものと同じであり, Acetone は特級品を精溜して使用した。

実験の方法は第一章で述べたところと全く同様な条件で行った。試料は 0.05w/v% Alcohol 液とした。展開時間は 5~6 時間である。

第17表 油溶性 (アルコール溶性) 色素の溶媒

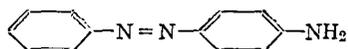
溶媒番号	溶 媒 の 組 成 (容量比)
Ⅸ	Methanol : Acetone : H <sub>2</sub> O (25 : 25 : 50)
X	Actone : Pyridine : H <sub>2</sub> O (25 : 10 : 65)
XI	Alcohol : Acetone : H <sub>2</sub> O (50 : 25 : 25)

著者は化学構造による分類法に従い、油溶性（アルコール溶性）色素を Monoazo-, Disazo-, Xanthene- 及び Quinoline- 色素に分ち、これらの代表的色素を選び前記の実験方法によつて Rf 値を測定した。以下化学構造と Rf 値との関係について論述する。

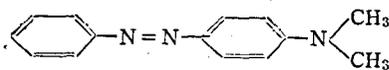
### 第一節 Monoazo- 及び Disazo- 色素

実験に供した Monoazo- 色素は 7 種、Disazo- 色素は 3 種である。

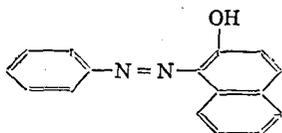
#### (A) Monoazo- 色素



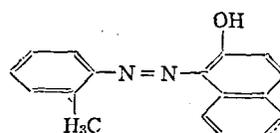
Amino azo benzene (15)  
(Brown yellow)



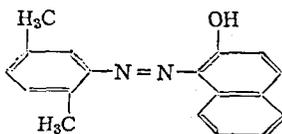
Oil yellow (19)  
(Yellow)



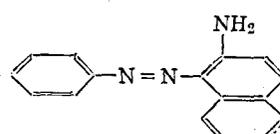
Sudan I (24)  
(Orange yellow)



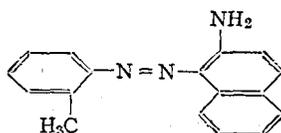
Orange SS (-)  
(Orange)



Oil red XO (-)  
(Orange red)

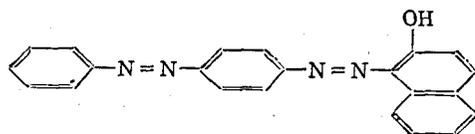


Oil yellow AB (22)  
(Blown yellow)

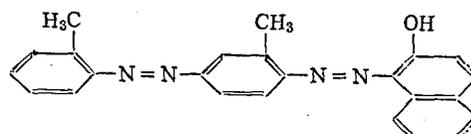


Oil yellow OB (61)  
(Blown yellow)

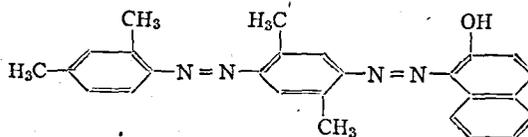
#### (B) Disazo- 色素



Sudan III (248)  
(Red)



Sudan IV (258)  
(Red)



Oil red OS (-)  
(Violet red)

溶媒 K, X 及び M で求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第 18 表の通りである。

Methanol : Acetone : H<sub>2</sub>O 系溶媒Kについて

(A) Monoazo- 色素 Amino azo benzene (15) 及び Oil yellow (19) は比較的よく移動し Rf 値は Amino azo benzene (15) > Oil Yellow (19) となつてゐる。前者は -N=N- 基に対し para 位に NH<sub>2</sub> 基を、後者は -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 基を有しこれら置換基の相違が Rf 値に影響を及ぼしたものである。

Sudan I (24), Orange SS (-) 及び Oil red XO (-) はいずれも  $\beta$ -Naphthol を第二成分とした色素で、第一成分はそれぞれ Aniline, o-Toluidine 及び p-Xylydine である。これらの Rf 値は Sudan I (24) > Orange SS (-) > Oil red XO (-) の順序となつてゐる。これは -CH<sub>3</sub> 基の増加即ち炭素数の増加が Rf 値に影響を与えたものである。

$\beta$ -Naphthylamine を第二成分とする Oil yellow AB (22) 及び Oil yellow OB (61) の場合も前記 Sudan I (24), Orange SS (-) 及び Oil red XO (-) の関係と類似し、-CH<sub>3</sub> 基1個多い Oil yellow OB (61) の Rf 値は Oil yellow AB (22) より小さい値を示している。これは前記の場合と同様の理由によるものである。

また Benzene 誘導体は Naphthalene 誘導体より Rf 値が大きく、これまた炭素数の影響が明らかに現われてゐる。以上の実験結果から炭素数の増加、換言すれば分子量の増大は Rf 値を低下させる。

(B) Disazo- 色素 Sudan III (248), Sudan IV (258) 及び Oil red OS (-) は本溶媒では移動しない。これは -N=N- 基及び炭素数の増加によるものである。

Acetone : Pyridine : H<sub>2</sub>O 系溶媒Xについて

(A) Monoazo- 色素 各色素の Rf 値は前記の溶媒Kと殆んど同じで移動順位も変化しない。本溶媒に於いても分子増大が Rf 値に及ぼす影響は溶媒Kと同様である。

(B) Disazo- 色素 Sudan III (248), Sudan IV (258) 及び Oil red OS (-) は溶媒Kと同様移動しない。

Alcohol : Acetone : H<sub>2</sub>O 系溶媒Mについて 本溶媒では各色素の Rf 値は著しく大となり、Amino azo benzene (15) 及び Oil yellow (19), oil yellow AB

(22) 及び Oil yellow OB (61) は同じ Rf 値を示し、また Sudan I (24), Orange SS (-) 及び Oil red XO (-) の Rf 値の差は極めて僅少であるが移動順位は溶媒Kと同様である。

(B) Disazo- 色素 前記の溶媒K及びXで全く移動しなかつた Sudan III (248), Sudan IV (258) 及び Oil red XO (-) は本溶媒でよく移動し Rf 値の順位は Sudan III (248) > Sudan IV (258) > Oil red XO (-) となつてゐる。この結果を見ると -CH<sub>3</sub> 基の増加が Rf 値を小ならしめていることが判る。従つて Disazo- 色素に於いても Monoazo- 色素と同様分子が増大すれば Rf 値が低下する傾向を示している。

## 第二節 Xanthene- 及び Quinoline- 色素

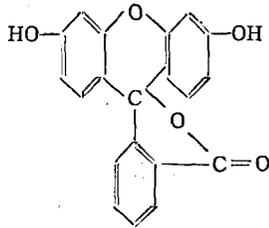
Xanthene- 色素として Fluorescein (766) を、Quinoline- 色素として Quinoline yellow SS (800) を選び

第18表 溶媒とR<sub>f</sub>値との関係

溶 媒	色 素 名	Rf 値
K	(A) Monoazo- 色素	
	Amino azo benzene (15)	0.70
	Oil yellow (19)	0.55
	Sudan I (24)	0.50
	Orange SS (-)	0.25
	Oil red XO (-)	0.21
	Oil yellow AB (22)	0.44
	Oil yellow OB (61)	0.33
	(B) Disazo- 色素	
	Sudan III (248)	0.00
	Sudan IV (258)	0.00
	Oil red OS (-)	0.00
X	(A) Monoazo- 色素	
	Amino azo benzene (15)	0.75
	Oil yellow (19)	0.66
	Sudan I (24)	0.48
	Orange SS (-)	0.41
	Oil red XO (-)	0.30
	Oil yellow AB (22)	0.46
	Oil yellow OB (61)	0.34
	(B) Disazo- 色素	
	Sudan III (248)	0.00
	Sudan IV (258)	0.00
	Oil red OS (-)	0.00
M	(A) Monoazo- 色素	
	Amino azo benzene (15)	0.88
	Oil yellow (19)	0.88
	Sudan I (24)	0.84
	Orange SS (-)	0.81
	Oil red XO (-)	0.76
	Oil yellow AB (22)	0.80
	Oil yellow OB (61)	0.80
	(B) Disazo- 色素	
	Sudan III (248)	0.62
	Sudan IV (258)	0.57
	Oil red OS (-)	0.50

実験に供した。

## (A) Xanthene-色素



Fluorescein (766)  
(Yellow)

溶媒Ⅹ, X及びⅥで求めたこれら色素の Rf 値を表示すれば第19表の通りである。

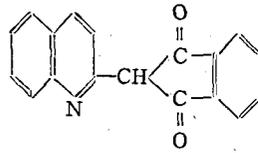
Methanol : Acetone : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅹについて

本溶媒では Fluorescein (766) が大きく移動しているが、これはこの色素が遊離酸型をとりその -COOH 基が Lactone 環を形成し親媒性が強くなっているためと考えられる。Quinoline yellow SS (800) は Quinoline 核の塩基性の影響を受け幾分濾紙へ吸着されるためか Rf 値はやや低くなっている。

Acetone : Pyridine : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅹについて 本溶媒では各色素の Rf 値は溶媒Ⅹより大となっている。Fluorescein (766) が大きな Rf 値を示しているのは前記溶媒Ⅹの場合と同様の理由によるものであるが、Quinoline yellow SS (800) は濾紙に対する吸着力が Pyridine によつて弱められたためである。

Alcohol : Acetone : H<sub>2</sub>O 系溶媒Ⅵについて Quinoline yellow SS (800) の Rf 値は Fluorescein (766) よりやや低いが、いずれも著しく大きな Rf 値を示している。本溶媒の如く含水率の少ない溶媒ではこれら色素の親アルコール性が強大となるため大きく移動したものである。

## (B) Quinoline-色素



Quinoline yellow SS (800)  
(Yellow)

第19表 溶媒と Rf 値との関係

溶 媒	色 素 名	Rf 値
Ⅹ	(A) Xanthene-色素 Fluorescein (776)	0.79
	(B) Quinoline-色素 Quinoline yellow SS (800)	
Ⅵ	(A) Xanthene-色素 Fluorescein (776)	0.85
	(B) Quinoline-色素 Quinoline yellow SS (800)	
Ⅵ	(A) Xanthene-色素 Fluorescein (776)	0.91
	(B) Quinoline-色素 Quinoline yellow SS (800)	

## 第四章 総 括

酸性色素、塩基性色素及び油性 (アルコール溶性) 色素について得た実験の結果を総括すれば次の通りである。

### 第一節 酸 性 色 素

酸性色素は Butanol 系の分配型溶媒を用いた場合、その Rf 値は色素の有する酸性基によつて影響を受ける。即ち酸性基は Rf 値を低下させ、この基の数が増す程益々 Rf 値は小さくなりこの影響は -SO<sub>3</sub>H 基が最も強い。また同数の -SO<sub>3</sub>H 基を有する同系列の色素にあつては分子量が大なる程 Rf 値が大きく、分子量が等しい場合は -SO<sub>3</sub>H 基の置換位置によつて Rf 値が影響を受ける。-SO<sub>3</sub>H 基は疎水基と共存すると -SO<sub>3</sub>H 基の Rf 値に及ぼす影響は幾分弱められるが、親水基と共存すると、その作用は増強される。前述の -SO<sub>3</sub>H 基の Rf 値に及ぼす影響は酸性色素に共通する事実であるが、直接性を有する Diphenyldisazo-色素のみは例外である。直接性を有する色素はその分子内に共軛二重結合が存在するため、-SO<sub>3</sub>H 基の Rf 値に及ぼす影響は著しく弱められる。

酸性色素のうち Xanthene-色素の如く -SO<sub>3</sub>H 基がなく -COOH 基を有する色素の Rf 値は溶媒の液性によつて著しく影響を受ける。即ち NH<sub>4</sub>OH 性溶媒では分子量の大なるもの程 Rf 値が大となり、また色素分子に置換している Halogen 原子の影響は Br 原子より I 原子が大であり、且つ Halogen 原子の置換数が増加する程 Rf 値は

大となる。然るに AcOH 性の溶媒ではこの結果は全く反対となり、分子量が大なるもの程 Rf 値が小となり、置換 Halogen 原子及びその増加の影響も逆となり Rf 値を小ならしめる。

-OH 基は Rf 値に及ぼす影響が弱い。Monoazo- 色素の Orange 1 (150) と Orange 2 (151), Triphenylmethane- 色素の Brilliant blue FCF (-) と Fast green FCF (-) の如く、-OH 基の置換位置及びその有無が液性の影響を受けて色素の Rf 値を著しく変動させる場合がある。

-NO<sub>2</sub> 基は疎水性を有するためこの基のみを有する色素は Rf 値が極めて大きい。然し -OH 基と共存する場合は -NO<sub>2</sub> 基の影響を受けて -OH 基が強い酸性を呈する結果色素の Rf 値はやや低下する傾向を示す。

以上酸性色素の分配濾紙クロマトグラフィの結果について述べたが、著者は Xanthene- 色素についてのみ AcOH 性の非分配型溶媒 (V) を用いて Rf 値を測定した。この結果について見ると分子量の増加、置換 Halogen 原子の種類及びその増加の影響は前記 AcOH 性分配型溶媒で得た結果と同様の傾向を示した。また Xanthene 色素のうち -SO<sub>3</sub>H 基を有する Rhodamine 属色素はこの非分配型溶媒を用いると Rf 値はいずれも 1.00 を示したが、これはこれらの色素が -SO<sub>3</sub>H 基を有しその色素アニオンは濾紙の負電荷と相反し、濾紙上に止まることができず溶媒と共に移動したためである。

## 第二節 塩基性色素

塩基性色素は総べて非分配型溶媒を用いたが、その結果塩基性色素の Rf 値は分子量と密接な関係があることを認めた。即ち同系列の色素に於いて分子量の大なるものは Rf 値が小さく、分子量の小なるものは Rf が大である。また分子量が等しい場合は置換基の位置の違いによつて Rf 値は影響を受ける。Azo- 色素に於いて -N=N- 基の増加は Rf 値を低下する。Xanthene- 色素のうち Rhodamine 属の如く -COOH 基を有するものはその -COOH 基がエステル化したものより Rf 値が大である。これは -COOH 基が Amino 基に影響を与えた結果である。Triphenylmethane- 色素のうち Malachite green 属に於いて -NH<sub>2</sub> 基の H が Alkyl 基で置換されている場合、-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> 基は -CH<sub>3</sub> 基より Rf 値を小ならしめる。また Magenta 属に於いて -NH<sub>2</sub> 基の H が -CH<sub>3</sub> 基で置換されている場合、この基の増加は Rf 値を低下する。Acridine-, Azine- 及び Thiazine- 色素の如く塩基性が強い色素はその影響を受け Rf 値が小さい。

## 第三節 油溶性 (アルコール溶性) 色素

油溶性 (アルコール溶性) 色素は塩基性色素と同様、非分配型溶媒を用いて Rf 値を測定した。油溶性色素の Rf 値は分子量と密接な関係があり、特に Monoazo- 及び Disazo- 色素に於いてこの関係が明らかに認められた分子量が大なるもの程 Rf 値が小さい。

# 第五章 色素分析法

## 第一節 色素分析法

著者は第一章の実験結果より酸性基特に -SO<sub>3</sub>H 基の有無及びその数によつて水溶性色素を濾紙クロマトグラフィにより数群に分類し得るものと予想し、また斯く分類すれば色素を判定する上に於いて極めて有利であると考え、この目的に適する分類用溶媒について研究した結果、Isoamyl alcohol : Acetone : H<sub>2</sub>O (5 : 6 : 5, 容量比) の溶媒が最も適していることが判つた。然かも本溶媒では展開距離も短く従つて短時間で色素を分類することができる。本溶媒で濾紙クロマトグラフィ (上昇法) を行くと -SO<sub>3</sub>H 基のない色素は溶媒前線に近く上昇し、-SO<sub>3</sub>H 基の数が増加するに従い出発線に近づく。これは各系の色素に共通であり、濾紙上の移動順位と -SO<sub>3</sub>H 基との関係は第一章に於いて述べた事実と全く同様である。

依つて著者は分類用基準色素として Martius yellow (9) [2,4-Dinitro-1-naphthol, Na 塩], Naphthol yellow S (10) [2,4-Dinitro-1-naphthol-7-sulfonic acid, Di-Na 塩] 及び New coccine (185) [1-(4-Sulfo-1-naphthylazo)-2-Naphthol 6,8-disulfonic acid, Tri-Na 塩] を選びこれら色素が占める位置を基準として各色素を一群ずつにまとめることとした。即ちこれら3種の色素の占める位置を境界線とし溶媒前線と出発線との間を四区間に分割し、各区間内の色素をまとめて一群とすれば濾紙上を移動する色素は四群に大別され、更に移動しない色素即ち出発線に止まっている色素を一群としてこれに加え五群とする。著者は溶媒前線より出発線に向つて各群を第一、第二、第三、第四及び第五族と命名した。また水に溶解しない色素即ち油溶性 (アル

コール溶性)色素を別に一群とし第六族とした。

著者は以上述べた分類法を経とし、第一章乃至第三章で述べた各種溶媒による分離確認法を緯として色素分析法を作成した。本法によれば試料は極めて少量で足り、従来の方法では不可能であつた微量に存在する色素の分離及び確認が容易に行われ、迅速確実に色素を判定することができる。

**分析法の大要** 水溶性色素(第一族乃至第五族)と非水溶性色素(第六族)とに大別し、水溶性色素は濾紙クロマトグラフィを利用し前記の基準色素及び分類用溶媒を用いて五族に分類する。各族の色素は酸性  $\text{SnCl}_2$  液による脱色反応により亜族に分類し、亜族の色素はタンニン酸沈澱反応によつて各類に分けた。かく色素を分類した後、溶媒 I ~ X を用い Rf 値を測定し確認する。

**実施法** 試料を水で処理し色素が水溶性であるか、水に不溶性であるかを検し、水に溶解しない色素は直ちに第六族の分析法に従つて検査する。即ち第三章で述べた方法に従い溶媒 X, X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> を用い Rf 値を測定し色素を確認する。

水溶性色素は約 0.1w/v% 液 (50v/v% Alcohol に溶かす) とし濾紙 (4 × 22cm) の一端から 5 cm の箇所に鉛筆で横線を引き、この線上にまず基準色素液\* をその中央部に径約 5 mm の円を形成するように毛细管で点じ、その左右いずれかの線上に Spot と濾紙縁との中間に基準液を点ずる。濾紙を風乾した後試料液を中央の基準液 Spot の両側 (基準液 Spot と濾紙縁との中間) に点ずる。従つて一方の試料液の Spot は基準液の Spot と重なる。かくして更に風乾した後これを適量の分類用溶媒を入れたガラスシリンダ (内径約 5 cm, 高さ約 30cm) 内に吊し濾紙端が約 0.5cm 液中に浸るようにして密栓する。溶媒は室温で出発線より 12cm 上昇させた後濾紙を取り出して風乾する。

**色素の分類法** 展開が終つた濾紙上には基準色素が 3 個の Spot を形成する。即ち溶媒前線に近いものよりあげると、Martius yellow (9) (Yellow), Naphthol yellow S (10) (Yellow) 及び New cocchine (185) (Red) の順である。依つて各 Spot の上端を境界とし出発線と溶媒前線との間を四分し試料 Spot の占める位置を定めた後、その位置から色素を次の如く分類する。

第一族 溶媒前線より Martius yellow (9) の黄色 Spot の上端までの間に位置を占める色素。

第二族 Martius yellow (9) の黄色 Spot の上端より Naphthol yellow S (10) の黄色 Spot の上端までの間に位置を占める色素。

第三族 Naphthol yellow S (10) の黄色 Spot の上端より Newcocchine (185) の赤色 Spot の上端までの間に位置を占める色素。

第四族 New cocchine (185) の赤色 Spot の上端より出発線までの間に位置を占める色素。

第五族 出発線上に止まり移動しない色素。

上の如く分類した後、この濾紙に酸性  $\text{SnCl}_2$  液\*\* 液を噴霧し風乾し酸の大部分を除去し、なお残留する酸を  $\text{NH}_3$  ガスに曝して中和する。この操作によつて脱色したまま復色しない色素 (Nitroso-, Nitro 及び Azo-色素) を I 亜族とし、復色する色素 (Diphenylmethane, Triphenylmethane, xanthene, Quinoline, Anthraquinone, Indigoid-, Acridine-, Azine- 及び Thiazine 色素) を II 亜族とする。酸性  $\text{SnCl}_2$  液を噴霧する際酸によつて変色するものがあるから  $\text{NH}_3$  で中和した後観察することが必要である。

次に別に試料水溶液 1 ~ 2 cc を小形試験管に取りタンニン酸試液\*\*\* 1 ~ 2 滴を加え振りまぜ暫らく放置して有色の沈澱を生ずるや否やを見る。沈澱を生じない場合は 1 類、沈澱を生じた場合は 2 類とする。

以上述べた如く色素を分類した後、新たに試料液を取り第一章及び第二章に於いて示した方法に従い、後記分析表記載の溶媒を用いて Rf 値を測定し色素を確認する。

本分析表記載の Rf 値は温度  $20 \pm 1^\circ$ 、東洋濾紙 No. 50 で得た結果を示してあるが、他の温度及び別種の濾紙を使用する場合は予想される既知の色素と同時に試料を同一濾紙上で展開し確認しなければならない。

\* Martius yellow (9), Naphthol yellow S (10) 及び New cocchine (185) 各 0.1g を水 100cc に溶かす。

色素含量は前 2 種は 85% 以上、後者は 75% 以上のもの

\*\* 塩化第一スズ 10g を塩酸 (d=1.18) 100cc に溶かす。

\*\*\* タンニン酸 10g 及び酢酸ナトリウム 10g を水に溶かす。

## 濾紙クロマトグラフィを応用した色素分析表

## 第一族

I 亜族 酸性 SnCl<sub>2</sub> 液で処理しアンモニアで中和後復色しない。

1 類 タンニン酸で沈澱しない。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値			
		溶媒 I	溶媒 II	溶媒 III	溶媒 IV
Aurantia (12)	BY	0.95	0.90	0.95	0.98

2 類 タンニン酸で沈澱する。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値		
		溶媒 VI	溶媒 VII	溶媒 VIII
Chrysoidine G (20)	OB	0.39	0.42	0.26
Bismarck brown G (331)	B	0.00	0.00	0.00

II 亜族 酸性 SnCl<sub>2</sub> 液で処理しアンモニアで中和後復色する。

1 類 タンニン酸で沈澱しない。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値				
		溶媒 I	溶媒 II	溶媒 III	溶媒 IV	溶媒 V
Uranine (766)	Y	0.37	0.94	0.40	0.45	0.91

2 類 タンニン酸で沈澱する。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値		
		溶媒 VI	溶媒 VII	溶媒 VIII
Auramine O (655)	Y	0.57	0.36	0.56
Auramine G (656)	Y	0.59	0.45	0.63
Malachite green (657)	BLG	0.48	0.28	0.58
Setoglauanine (658)	BLG	0.37	0.14	0.41
Brilliant green (662)	G	0.05	0.00	0.08
Acronol brilliant blue (664)	GBL	0.44	0.14	0.42
Magenta (667)	VR	0.72	0.73	0.80
Methyl violet B (680)	V	0.69	0.44	0.63
Crystal violet (681)	V	0.56	0.26	0.48
Victoria blue B (729)	BL	0.08	0.00	0.06
Rhodamine B (749)	R	0.78	0.60	0.82
Rhodamine 6G (752)	R	0.33	0.09	0.25
Safranine (841)	R	0.08	0.03	0.12
Phosphine (793)	YB	0.33	0.15	0.40

## 第二族

I 亜族 酸性 SnCl<sub>2</sub> 液で処理しアンモニアで中和後復色しない。

1 類 タンニン酸で沈澱しない。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値			
		溶媒 I	溶媒 II	溶媒 III	溶媒 VI
Martius yellow (9)	Y	0.83	0.69	0.86	0.92
Metanil yellow (138)	Y	0.83	0.80	0.83	0.90
Orange VI (143)	Y	0.79	0.75	0.79	0.88
Methyl orange (142)	O	0.70	0.60	0.73	0.73
Crocein orange (26)	O	0.74	0.68	0.73	0.82
Brilliant orange R (78)	OR	0.75	0.70	0.76	0.85
Orange 1 (150)	O	0.54	0.62	0.73	0.62
Orange 2 (151)	O	0.72	0.62	0.73	0.80
Silk scarlet (196)	R	0.77	0.68	0.76	0.84
Fast red A (176)	R	0.78	0.70	0.77	0.84
Naphthylamine brown (175)	B	0.58	0.74	0.80	0.67
Eriochrome red B (652)	YR	0.50	0.42	0.73	0.75
Resorcin brown (234)	B	0.65	0.53	0.68	0.69
Chrysophenine (365)	Y	0.50	0.39	0.63	0.71

2 類 タンニン酸で沈澱する。この類には食品の着色に使用される色素はない。

II 亜族 酸性 SnCl<sub>2</sub> 液で処理しアンモニアで中和後復色する。

1 類 タンニン酸で沈澱しない。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値				
		溶媒 I	溶媒 II	溶媒 III	溶媒 VI	溶媒 V
Guinea green B (666)	G	0.68	0.60	0.62	0.73	—
Brilliant milling green B (667)	GBL	0.72	0.59	0.64	0.80	—
Xylene blue VS (672)	BL	0.67	0.53	0.55	0.69	—
Xylene blue AS (673)	BL	0.86	0.68	0.70	0.81	—
Naphthalene green V (735)	G	0.66	0.54	0.57	0.67	—
Acid violet 6B (697)	V	0.70	0.62	0.70	0.69	—
Formyl violet S4B (698)	V	0.81	0.67	0.74	0.74	—
Sulforhodamine B (748)	VR	0.68	0.54	0.60	0.65	1.00
Violamine R (758)	VR	0.88	0.94	0.93	0.92	1.00
Dibromofluorescein NA (-)	O	0.45	0.93	0.58	0.48	0.87

Eosine YS (768)	OR	0.53	0.87	0.68	0.60	0.81
Phloxine (774)	R	0.57	0.84	0.68	0.77	0.75
Phloxine B (778)	R	0.67	0.77	0.74	0.82	0.50
Erythrosine yellowish (772)	OR	0.45	0.93	0.59	0.46	0.81
Erythrosine (773)	R	0.53	0.88	0.83	0.72	0.73
Rose bengale (777)	VR	0.68	0.81	0.74	0.74	0.62
Rose bengale B (779)	VR	0.72	0.75	0.83	0.85	0.30
Alizarin cyanine green (1078)	G	0.61	0.55	0.61	0.68	—

2類 タンニン酸で沈澱する。(この類には食品の着色に使用されるものはない。)

### 第三族

I 亜族 酸性  $\text{SnCl}_2$  液で処理しアンモニアで中和後復色しない。

1類 タンニン酸で沈澱しない。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値			
		溶媒Ⅰ	溶媒Ⅱ	溶媒Ⅲ	溶媒Ⅳ
Naphthol yellow S (10)	Y	0.48	0.40	0.54	0.58
Ponceau G (28)	OR	0.40	0.25	0.39	0.39
Orange G (27)	O	0.42	0.38	0.44	0.48
Ponceau R (79)	R	0.40	0.30	0.42	0.46
Ponceau 3R (8)	R	0.40	0.30	0.42	0.46
Sunset yellow FCF (-)	O	0.47	0.30	0.39	0.46
Ponceau SX (-)	R	0.33	0.30	0.44	0.39
Azo rubine (179)	R	0.19	0.40	0.46	0.35
Fast red E (182)	R	0.49	0.31	0.45	0.50
Crystal ponceau 6R (89)	R	0.55	0.44	0.50	0.55
Fast red B (88)	VR	0.43	0.29	0.42	0.46
Amido naphthol red G (31)	R	0.25	0.21	0.37	0.39
Diamine rose BD (128)	R	0.33	0.16	0.40	0.54
Xylene light yellow (639)	Y	0.33	0.40	0.45	0.39
Naphthol blue black (246)	BLABL	0.20	0.19	0.48	0.53

2類 タンニン酸で沈澱する。(この類には食品の着色に使用されるものはない。)

II 亜族 酸性  $\text{SnCl}_2$  液で処理しアンモニアで中和後復色する。

1類 タンニン酸で沈澱しない。

色素名	Spot の色	Rf 値			
		溶媒Ⅰ	溶媒Ⅱ	溶媒Ⅲ	溶媒Ⅳ
Light green SF yellowish (670)	G	0.45	0.35	0.40	0.42
Brilliant blue FCF (-)	BL	0.45	0.35	0.40	0.42
Fast green FCF (-)	G	0.27	0.36	0.40	0.27
Alizarine saphirol SE (1053)	BL	0.34	0.40	0.50	0.59
Quinoline yellow (801)	Y	0.53	0.41	0.59	0.63

2類 タンニン酸で沈澱する。(この類には食品の着色に使用される色素はない。)

#### 第四族

I 亜族 酸性 SnCl<sub>2</sub> 液で処理しアンモニアで中和後復色しない。

1類 タンニン酸で沈澱しない。

色素名	Spot の色	Rf 値			
		溶媒Ⅰ	溶媒Ⅱ	溶媒Ⅲ	溶媒Ⅳ
Naphthol green B (5)	G	0.15	0.03	0.19	0.26
Fast acid fuchsine B (30)	VR	0.24	0.16	0.31	0.38
New cocchine (185)	SR	0.21	0.11	0.27	0.27
Amaranth (184)	VR	0.15	0.04	0.20	0.25
Ponceau 6R (186)	R	0.06	0.02	0.14	0.16
Tartrazine (640)	Y	0.11	0.02	0.15	0.23
Congo red (370)	R	0.04	0.02	0.22	0.25
Benzopurpurine 4B (448)	R	0.04	0.02	0.22	0.25
Diamine sky blue FF (518)	BL	0.02	0.00	0.19	0.21

2類 タンニン酸で沈澱する。(この類には食品の着色に使用される色素はない。)

II 亜族 酸性 SnCl<sub>2</sub> 液で処理しアンモニアで中和後復色する。

1類 タンニン酸で沈澱しない。

色素名	Spot の色	Rf 値			
		溶媒Ⅰ	溶媒Ⅱ	溶媒Ⅲ	溶媒Ⅳ
Alizarine saphirol B (1054)	BL	0.00	0.03	0.07	0.00
Indigo carmine (1180)	BL	0.19	0.05	0.23	0.29

2類 タンニン酸で沈澱する。

色素名	Spot の色	Rf 値		
		溶媒Ⅵ	溶媒Ⅶ	溶媒Ⅷ
Methylene blue (922)	BL	0.04	0.02	0.15

## 第五族

I 亜族 酸性  $\text{SnCl}_2$  液で処理しアンモニアで中和後復色しない。

1 類 タンニン酸で沈澱しない。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値			
		溶媒I	溶媒II	溶媒III	溶媒IV
Benzo sky blue (520)	BL	0.00	0.00	0.01	0.04

2 類 タンニン酸で沈澱する。(この類には食品の着色に使用される色素はない。)

II 亜族 酸性  $\text{SnCl}_2$  液で処理しアンモニアで中和後復色する。

1 類 タンニン酸で沈澱しない。(この類には食品の着色に使用される色素はない。)

2 類 タンニン酸で沈澱する。(この類には食品の着色に使用される色素はない。)

## 第六族

I 亜族 酸性  $\text{SnCl}_2$  液で処理しアンモニアで中和後復色しない。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値		
		溶媒K	溶媒X	溶媒M
Amino azo benzene (15)	BY	0.70	0.75	0.88
Oil Yellow (19)	Y	0.55	0.66	0.88
Sudan I (24)	OY	0.50	0.48	0.84
Orange SS (←)	O	0.25	0.41	0.81
Oil red XO (←)	OR	0.21	0.30	0.76
Oil yellow AB (22)	BY	0.44	0.46	0.80
Oil yellow OB (61)	BY	0.33	0.34	0.80
Sudan III (248)	R	0.00	0.00	0.62
Sudan IV (258)	R	0.00	0.00	0.57
Oil red OS (←)	VR	0.00	0.00	0.50

II 亜族 酸性  $\text{SnCl}_2$  液で処理しアンモニアで中和後復色する。

色 素 名	Spot の 色	Rf 値		
		溶媒K	溶媒X	溶媒M
Fluorescein (776)	Y	0.79	0.85	0.91
Quinoline yellow SS (800)	Y	0.31	0.60	0.86

略号 BY=brown yellow, B=brown, Y=yellow, BLG=blue green, G=green, V=violet, GB=green brown, VR=violet red, R=red, YB=yellow brown, OR=orange red, O=orange, YR=yellow red, BL=blue, BLABL=black blue, SR=scarlet red, OY=orange yellow, GBL=green blue.

## 第二節 食品中色素の鑑別に対する応用

濾紙クロマトグラフィを応用して着色食品中の色素を分離確認する場合、蛋白質、糖類、脂肪、塩類等が多量に

共存すると、本法を妨害し正確な Rf 値を与えない。従つて本法を実施するにあつてこれら妨害性物質をあらかじめ除去し、できるだけ色素を純粋な状態で分離しておかねばならない。この目的に用いられる方法は毛糸染色法と溶媒による色素抽出法の二方法があるが、前者は色素の繊維に対する染色性、即ち酸性色素は酸性で、塩基性色素は中性またはアルカリ性で毛糸に染色する性質を利用したもので、水溶性色素（酸性及び塩基性色素）は毛糸染色法によつて迅速且つ完全に上述の妨害性物質と分離することができる。依つて著者は着色食品より水溶性色素を抽出分離する手段として毛糸染色法を用いた。然し油溶性（アルコール溶性）色素は繊維に対する染色力が微弱であるため、水溶性色素の如く毛糸染色法では満足な結果が得られない。そこで著者は油溶性（アルコール溶性）色素の分離に溶媒による抽出法を用いた。この際色素と共に抽出される少量の脂肪はこれを鹼化し、本鹼化液より色素を溶媒で抽出した。

著者は市販着色食品数種について次の如く行つた。

ジュース、シロップ、ブドウ酒等はその 10cc に約 5 倍量の水を加えてうすめ、また飴菓子類は 5～10g を取り約 5 倍量の水を加えて溶かしこれを試料とした。

つくだに、でんぷ、こんぶ、ケチャップ、あん、ソーセージ等は 5～10g に約 5 倍量の 50v/v% Alcohol を加え加温して色素を抽出した。たくあんは例えばおろし金でおろしこの 10g を 50v/v% で浸出した。これらの色素抽出液を遠心分離して不溶物を除去した後、着色した上澄液を蒸発して大部分の Alcohol を除去し、水を加えて原容に復し試料とした。

以上の如くにして得た試料抽出液に稀  $\text{NH}_4\text{OH}$  数滴を加え弱アルカリ性とした後、この液に脱脂白色毛糸約 0.3g を投じ加熱して塩基性色素を毛糸に染色した後、毛糸を取り出してよく水洗する。次にこの染色毛糸を小形ビーカーに入れ少量の稀  $\text{AcOH}$  を加え加温し色素を溶出した後毛糸を除去する。かくして得た着色液を濃縮しこれに同量の Alcohol を加え、毛細管でこの液を濾紙に点じ第一節で述べた分析法に従つて分析した。次に前記の稀  $\text{NH}_4\text{OH}$  でアルカリ性とした試料抽出液を稀  $\text{HCl}$  で弱酸性としこれに毛糸約 0.3g を投じ加熱し毛糸に色素を染色させる。この染色毛糸を水洗後稀  $\text{NH}_4\text{OH}$  で加温し色素を溶出し、毛糸を除去し、液を濃縮する。この液に同量の Alcohol を加えた後毛細管で濾紙に点じ第一節の方法によつて分析した。

マーガリンはその 10g を取り約 2 倍量の 90v/v% Alcohol を加え還流冷却器を付して温浸した後、冷却し濾過し濾液を濃縮しこれに 50v/v%  $\text{NaOH}$  を加えて約 1 時間鹼化した。鹼化後水でうすめ石油エーテルで色素を抽出した。石油エーテルを蒸発した後、残留物を少量の Alcohol に溶かし、この液を毛細管で濾紙に点じ第一節の分析法に従つて分析した。

以上述べた方法によつて市販着色食品より検出した色素は第 20 表に一括して掲げた。

第20表 市販着色食品についての実験例

食品名	検出した色素名	食品名	検出した色素名
オレンジジュース	混合色素 Tartrazine (640) Sunset Yellow FCF (←)	ブドウ酒 (1)	混合色素 Amaranth (184) Naphthol blue black (246)
シロップ (ストロベリー)	混合色素 Amaranth (184) Ponceau R (79)	ブドウ酒 (2)	混合色素 Tartrazine (640) Brilliant blue FCF (←) Amaranth (184)
ペパーミント(1)	混合色素 Guinea green B (666) Naphthol Yellow S (10)	トマトケチャップ(1)	Ponceau 3R (80)
ペパーミント(2)	混合色素 Brilliant blue FCF (←) Tartrazine (640)	トマトケチャップ(2)	混合色素 Ponceau R (79) Tartrazine (640)

ジャム(赤色)	New cocchine (185)	あん(パン)	混合色素 Rhodamine B (749) Acid violet 6B (697)
キャラメル(緑色)	混合色素 Brilliant blue FCF (→) Tartrazine (640)		あん(大福餅)
ドロップ(赤色)	New cocchine (185)	あん(大福餅)	Amaranth (184)
ドロップ(緑色)	Guinea green B (666)	らくがん(赤色)	Rhodamine B (749)
ドロップ(黄色)	Tartrazine (640)	桜でんぶ(1)	Sulforhodamine B (748)
ゼリービーンズ(赤色)	New cocchine (185)	桜でんぶ(2)	Phloxine B (778)
ゼリービーンズ(紅色)	Rhodamine B (749)	桜えび	混合色素 Ponceau R (79) New cocchine (185) Tartrazine (640)
ゼリービーンズ(橙色)	Orange 1 (150)		紅しょうが
ゼリービーンズ(黄色)	Tartrazine (640)	福神漬	Sunset yellow FCF (→)
ゼリービーンズ(黄緑色)	混合色素 Tartrazine (640) Guinea green B (666)	ソーセージ(魚肉)	混合色素 Orange 2 (151) New cocchine (185)
ゼリービーンズ(チョコレート色)(1)	混合色素 Amaranth (184) Tartrazine (640) Indigo carmine (1180) Orange 1 (150)	わさび粉	混合色素 Light green SF yellowish(670) Naphthol yellow S (10)
ゼリービーンズ(チョコレート色)(2)	混合色素 Amaranth (184) Naphthol yellow S (10) New cocchine (185) Indigo carmine (1180)	梅干	Fast acid fuchsine B (30)
金平糖(赤色)	混合色素 Eosine (768) Phloxine B (778)	つくだに(1)	Orange 2 (151)
金平糖(赤色)	混合色素 Eosine (768) Rose bengale B (779)	つくだに(2)	Phloxine B (778)
金平糖(赤色)	混合色素 Rhodamine B (749) Rose bengale B (779)	刻こんぶ(1)	Malachite green(657)
金平糖(緑色)	Guinea green B (666)	刻こんぶ(2)	Brilliant blue FCF (→)
ビスケット(緑色)	混合色素 Brilliant blue FCF (→) Tartrazine (640)	たくあん(1)	混合色素 Auramine O (655) Tartrazine (640)
		たくあん(2)	混合色素 Naphthol yellow S (10) Tartrazine (640)
		マーガリン	Oil yellow OB (61)

本研究に際し御懇篤なる御指導を賜つた京都大学教授, 国立衛生試験所長刈米達夫博士に衷心感謝し, 併せて御鞭撻をいただいた田中稔博士, 長沢佳熊博士, 服部安藏博士, 前厚生省食品衛生課長尾崎嘉篤氏, 大岡増二郎博士, 川城巖博士に謹みて感謝する。また研究用色素を提供された三栄化学工業, 大和染料, 保土谷化学工業, 日本化薬, 三井化学工業, 住友化学工業株式会社に謝意を表す。なお本研究は文部省科学試験研究費及び厚生省科学研究費を受けた。本研究に助力された神蔵美枝子, 細貝祐太郎両君に心から感謝の意を表す。

### Summary

Studies were made on the paper chromatography of acid (water-soluble), basic (water-soluble), and oil-soluble dyés.

Acid dyes included 66 kinds chosen from nitroso, nitro, monoazo, disazo, stilbene-azo, thiazolylazo, pyrazolone-azo, xanthene, triphenylmethane, anthraquinone, quinoline, and indigoid dyes. Solvents most suitable for their isolation and detection were examined and the following five were selected.

#### (1) List of Solvents for Acid Dyes

Solvent

No.	Composition (volume ratio)
I	BuOH:EtOH:0.5N NH <sub>4</sub> OH (6:2:3)
II	BuOH:EtOH:0.5N AcOH (6:2:3)
III	BuOH:Pyridine:H <sub>2</sub> O (6:3:4)
IV	BuOH:Pyridine:0.5N NH <sub>4</sub> OH (6:3:4)
V	Glacial AcOH:Methylglycol:H <sub>2</sub> O (5:0.5:4.5)

Basic dyes included 17 kinds chosen from monoazo, disazo, diphenylmethane, triphenylmethane, xanthene, acridine, azine, and thiazine dyes, and the following three solvents were selected.

#### (2) List of Solvents for Basic Dyes

Solvent

No.	Composition (volume ratio)
VI	MeOH:NH <sub>4</sub> OH (d=0.90):H <sub>2</sub> O (6.3:4.0:7.7)
VII	EtOH:NH <sub>4</sub> OH (d=0.90):H <sub>2</sub> O (3.0:8.0:8.0)
VIII	Pyridine:NH <sub>4</sub> OH (d=0.90):H <sub>2</sub> O (3.0:10.0:17.0)

Oil-soluble (spirit-soluble) dyes included 12 kinds chosen from monoazo, disazo, xanthene, and quinoline dyes and the following three kinds of solvents were selected as being most suitable.

#### (3) List of Solvents for Oil-Soluble Dyes

Solvent

No.	Composition (volume ratio)
IX	MeOH:Me <sub>2</sub> CO:H <sub>2</sub> O (25:25:50)
X	Me <sub>2</sub> CO:Pyridine:H <sub>2</sub> O (25:10:65)
XI	EtOH:Me <sub>2</sub> CO:H <sub>2</sub> O (50:25:25)

These 95 kinds of dyes were submitted to paper chromatography by the ascending method, their R<sub>f</sub> values were measured, and their relationship with chemical structure was discussed. With solvents I to IV, the R<sub>f</sub> values of the acid dyes becomes smaller as the number of -SO<sub>3</sub>H groups increases. With the dyes of the same series possessing the same number of -SO<sub>3</sub>H group, the R<sub>f</sub> values become larger as the molecular weight increases. When the molecular weight is the same, the R<sub>f</sub> values vary in accordance with the substituted position of -SO<sub>3</sub>H group. In xanthene dyes, the R<sub>f</sub> value is markedly affected by the reaction of the solvent. In solvent V, R<sub>f</sub> values of xanthene dyes tend to become smaller as the molecular weight increases.

The Rf values of basic dyes (with solvents VI, VII, and VIII) and oil-soluble dyes (with solvents IX, X, and XI) tend to become smaller as the molecular weight becomes larger.

Coal-tar colors (dyes) were divided roughly into water-soluble (1st to 5th group) and water-insoluble dyes (6th group) and the water-soluble dyes were classified into five groups by paper chromatography. The solvent used for this classification was a mixture of isoamyl alcohol:acetone:water (5:6:5 by volume) and a mixture of 2,4-dinitro-1-naphthol (Martius Yellow, Sodium salt), 2,4-dinitro-1-naphthol-7-sulfonic acid (Naphthol Yellow S, Sodium salt), and 1-(4-sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-6,8-disulfonic acid (New Cochine, Sodium salt) was used as the standard for classification. The sample was developed on the same paper as the standard substance with the foregoing solvent, and the dyes were classified into five groups based on the position of the standard substances. The spots on the paper were then sprayed with a hydrochloric acid solution of stannous chloride, allowed to stand for some time, and neutralized with dilute ammonia water. The dye which failed to color by this procedure was classified as the Sub-group I, and the one which regained the color, as Sub-group II. Each sub-group was further divided into smaller groups by whether each precipitated with tannic acid or not, and each dye was confirmed by paper chromatography, using the solvents I to XI.

Received May 26, 1955

## 速 報

## アゾトメトリーの研究(第2報) 含窒素ビタミン類の定量 細貝祐太郎

含窒素ビタミン類の、結晶純度測定法は、米局、日局、等いずれも、その化学的組成中の窒素をキールダール法によつて測定し、純度を定量するものであるが、このキールダール法をアゾトメトリーに応用することによつて、それ等の純度測定法を従来のもより微量の試料で、迅速に定量することが出来た。即ち、米局、日局、等によれば、試料はビタミンB<sub>2</sub>の場合 300mg で、分解時間が5 hr 以上であり、分解促進剤として安息香酸を使用している。しかし本法によれば分解促進剤も必要とせず。又分解時間も約2 hr であり、さらに試料はμg 単位で定量出来た。なお含窒素ビタミン類(VB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>等)中の窒素は硫酸で分解すると、硫酸アンモニウムとなり、このものは次亜臭素酸ナトリウムで窒素ガスを発生するので、この窒素ガスをアゾトメトリーの常法により測定するのである。今回はとりあえずVB<sub>2</sub>の測定結果を報告する。

**試 薬** 1. 硫酸 硫酸カリウム飽和溶液4容に対し、濃硫酸1容を混和し、この全容にブドウ糖を0.3%の割に加える。

2. 塩化ナトリウム洗液・飽和塩化ナトリウム液5容に対し、10%水酸化ナトリウム液2容を加える。

3. 次亜臭素酸ナトリウム 臭素及び40%水酸化ナトリウム液をそれぞれ零度以下に冷却し、この臭素0.5ccに、上記40%水酸化ナトリウム20ccを加え、よく攪拌し、臭素を完全に溶解する。氷冷して貯える。

**定量法** アゾトメトリー用曲径フラスコに、試料50~250μg/ccの水溶液1ccをとり、硫酸1ccを加え加熱し、分解液が透明となつてからもなお約1hr加熱を続ける。そのうち内容物が冷却するまで(約15min)放置し、次にそれぞれ塩化ナトリウム洗液3.5ccずつで2回曲径フラスコの内壁を洗い落とし、此の液をアゾトメーターにうつし、5min炭酸ガスを導入、さらに次亜臭素酸ナトリウム液0.5~1ccを吸上げ、激しくふりまぜたのち常法により窒素ガスを測定する。その結果は次の如くである。なお詳細に関しては目下検討中である。終りに臨み御校閲を賜つた部長川城巖博士に深謝する。

第1表 測定結果

含量 μg/cc	N <sub>2</sub> -V <sub>0</sub> 実験値 μg				平均	理論値	N <sub>2</sub> -発生率%
250	37.0	37.2	37.1	37.2	37.12	37.2	99.7
100	14.8	14.7	14.75	14.7	14.73	14.8	99.5
50	7.4	7.4	7.35	7.4	7.38	7.4	99.7

Received April 28, 1955

## 陽性石鹼と各種消毒薬及び化学療法剤との併用効果について

八田 貞義, 青山 好作, 栗栖 弘光  
宮沢 文雄, 藤田 洋一, 浦部 幹雄

近時陽性石鹼の臨床応用範囲がひろまるにつれて、陽性石鹼と各種薬剤とを共存させた場合、化学的或は生物学的に特異現象のおこることが注目され、C. A. Lawrence からもこの特異現象が時に拮抗的に或は相加的に現われることを指摘した。しかしこの方面の研究は、主に化学的な分野からの究明が進められているので、著者らは主に消毒薬の殺菌力試験の方法に準じ、生物学的な面からの考察を試みてみた。

まず陽性石鹼と石炭酸とを併用した場合について見ると、両者の供試濃度が比較的低濃度の場合、石炭酸150倍とハイアミン(1622以下略す)45,000倍とでは、ハイアミン単独のときの石炭酸係数の約9倍となり、石炭酸200倍とハイアミン16,000倍とでは約3倍、石炭酸250倍とハイアミン8,000倍とでは約1.5倍と、いずれも上昇し、鮮明な相乗作用が認められた。両者の供試濃度が高濃度のときは、逆に拮抗的に作用した。即ち10%ハイアミンと5%石炭酸とでは石炭酸係数はむしろ約1/3に減弱し注目された。

次にアクリノールと併用した場合についてみると、2%アクリノール液、10%ハイアミン液の等量混合液に於ては、石炭酸係数は61で全く変化は見られず、拮抗も増強もみられなかつた。クレゾール石鹼液と10%ハイアミン液を同様に混合して行なつたときは、著しく拮抗的に作用して、石炭酸係数は測定し得なかつた。ヨードチンキと10%ハイアミン液とを等量に混合すると、ヨードが遊離してくるが、このときの上澄液について石炭酸係数を求めたところ、殺菌力は著しく損耗し石炭酸係数は求められなかつた。

又水銀製剤である昇汞、エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム、マーキュロクロムでは、昇汞を除いた試剤では併用により軽度の拮抗作用が見られたが、昇汞ではむしろ若干の相加作用が認められ、この点については目下詳細に検討中である。

Received April 13, 1955

## オーレオマイシン (Chlortetracycline), アクロマイシン (Tetracycline)

及びパラオキシ安息香酸エステルの *Candida* に対する作用

山地 幸雄, 田中 弘子

八田 貞義\* 山内 信\*

*Candida* 症の発症機転には近年抗生物質の使用が関係があるといわれ、その詳細についても種々の実験報告がある。われわれは臨床材料より分離された 11 株の *Candida* を、Martin らの分類に従って同定を試み、更に標記の薬剤を加えた培地における、7 種の標準 *Candida* 株及び上記 11 株の発育を観察した。

臨床材料 (主に喀痰) より分離された 11 株のうち *C. albicans* と思われたものは 6 株で、その他の株の同定は *Candida* の分類同定に異論のある現在、更に慎重な検査によらなければならないと考える。

抗生物質はそれぞれ経口用カプセルの内容及び静注用薬剤を用い、パラオキシ安息香酸 (Paraben) はブチルエステルを用いた。基礎培地はサブロウ寒天培地を用い、平板 1 枚 (15cc) に対し抗生物質は 10mg, Paraben は 5 mg (飽和) の割合に加えた。実験方法としてはサブロウ液体培地培養液の  $10^4$ 、及び  $10^5$  倍希釈液 0.2cc ずつを、上記薬剤加サブロウ寒天平板表面に一樣に塗り、 $37^{\circ}\text{C}$ 、48 時間培養後に集落の性状及び集落数を検した。

経口用オーレオマイシン、経口用並びに静注用アクトマイシン添加平板上における、*C. albicans* の集落性状には、対照平板上のそれとの間に差をみとめず、集落数については t 分布表による平均値の差の検定を行なつたが、有意の差はなかつた。Paraben 添加サブロウ平板上には、*C. albicans* 及び他の *Candida* 種は全く発育しなかつた。経口用及び静注用オーレオマイシンの間には、*Candida* 標準株の発育に及ぼす作用に著しい差はみられず、経口用及び静注用アクトマイシンでは、臨床材料よりの分離株について作用を比較したが、*Candida* の発育に及ぼす作用に、著しい差はなかつた。

標準株すなわち長期間試験管内に累代保存された株と、臨床材料より分離された比較的新鮮な株との間の、抗生物質に対する反応の差異、各標準菌株間における差異の判定については、更に実験回数を重ねなければならない。

オーレオマイシンが試験管内で直接 *Candida* の発育を促進するか否か、或は経口用と静注用とで、試験管内の *Candida* の発育に対する作用が異なるか否かについては、いくつかの異論があり、アクトマイシンについては詳細な実験報告はみられない。われわれはサブロウ寒天において経口用オーレオマイシン、経口用並びに静注用アクトマイシンが、*C. albicans* の発育になんらの影響をも与えないと認めた。パラオキシ安息香酸エステルについては、諸家の報告と一致する結果を得た。

終りに、菌株入手の便宜を与えられた日医大臨床検査所葦茂上、同衛生学教室乗木秀夫及び東邦医大細菌学教室桑原省吾、三博士に御礼申上げる。

Received April 30, 1955

\* 日本医大衛生学教室

## ヨーグルト製造の失敗原因について

山地 幸雄, 田中 弘子

八田 貞義\*, 山内 信\*

ヨーグルトはあらかじめ煮沸または殺菌した全乳または脱脂乳に, *Lactobacillus bulgaricus* 及び *Streptococcus lactis* を移植し, 32~40°C に培養して醗酵させたもので, 凝固した固形状を呈する。

都内某ヨーグルト工場で早春から晩夏にかけて, ヨーグルト製造に際し材料中に雑菌が繁殖し, このような場合に原材料1~2 l中に1~2本の割合で, 凝乳のできないものがあり, これを検索したところ酵母或は耐熱性菌が検出された例があつた。そしてこのような失敗は, ヨーグルト材料分注用のパイプを分注の途中で屢々滅菌すること, 失敗材料を今一度殺菌し直して, 乳酸菌を移植することにより防除された。

チーズ製造法の一部はヨーグルトのそれと全く同一であり, チーズ製造工場で, 突如としてチーズができなくなる事例が知られている。そしてその原因は, *Streptococcus* に対するバクテリオファージによることが知られ, このファージについて詳細な研究が行われた<sup>1)</sup>。またストレプトマイシン生産に際しても, アクチノファージによる障害が報告された。

しかし一方においてペニシリナーゼ生産菌によるペニシリン製造失敗例もある。そこでわれわれは, 混入雑菌による凝乳阻止ということもあつたのでないかと考え, ヨーグルト製造に失敗した材料より, 血液寒天, 普通寒天, サイオグリコレート培地, VF寒天などを用いて31株の細菌を分離し, それらの性状を検したところ, 100°C, 7時間加熱により発芽能力を失わない胞子を早期に形成する *Bacillus mesentericus* 或は *subtilis* に類縁を求め得る菌と, *Streptococcus* に類縁を求め得るが同定のできない易熱性の菌とに大別された。そこでそれらの菌の, *Streptococcus lactis* の牛乳凝固作用との関連をみたところ, いずれも牛乳凝固阻止能は認められなかつた。分離菌のうち, 弱いペニシリナーゼ産生能を有する菌があつたが, ペニシリナーゼ産生能とゼラチン液化能との間には, 一定の関係はみられなかつた。

われわれはファージの検索は行わなかつたが, 以上の所見よりヨーグルト製造失敗例の原因は, *Streptococcus* に対する拮抗菌によるのではなく, ファージによるものであろう。*Streptococcus* に類縁を求め得る同定不能の球菌が, ファージの作用により生じた *Streptococcus lactis* の変異菌であるかどうかは, 後の研究にまたねばならない。

1) Whitehead, H. R. : Bact. Reviews, 17, 109~123 (1953).

材料入手に便宜を与えられた明治乳業会社の各位に深謝する。

Received April 30, 1955

## 抄

## 録

**卵胞ホルモンの研究 (第8報) ペーパクロマトグラムの面積測定法による妊馬尿及び雄馬尿中のエストロン、エストラジオールの定量** 長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一 日本薬学会 11 月第 2 例会講演 (昭 29. 11. 27); Pharm. Bull., III-2 (1955) 掲載予定本誌 11 頁参照 エストロン及びエストラジオールをアルミナ濾紙を用いて面積測定法により定量した結果を統計学的に検討した。本法を用いて妊馬尿中のホルモンを定量すると、エストロン、エストラジオールともに遊離型は極めて少量である。雄馬尿中のエストラジオールは比較的大量でエストロンと殆んど同量である。

**卵胞ホルモンの研究 (第9報) 幼若白鼠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2) 2-2 用量検定法によるバニシングクリーム中のエストロンの定量** 長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一 日本薬学会第 8 回大会講演 (昭 30. 4. 11); 昭和 29 年度厚生科学研究報告 本誌 17 頁参照 エストロン標準品及びエストロン含有バニシングクリームをそれぞれプロピレングリコールに溶かして幼若白鼠に皮下注射し, 子宮重量増加法により 2-2 用量検定法を行うと極めて簡易にホルモンの定量ができる。誤差の信頼限界は約 119~84% 又は 114~88% である。

**性腺刺激ホルモンの研究 (第2報) 白鼠卵巣重量増加法による妊馬血清性腺刺激ホルモンの検定** 長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一 昭和 29 年度厚生科学研究報告 本誌 25 頁参照 英国薬局方の示す方法により我国の在来種の白鼠を用いて検定を行った結果, 本法は我国でも充分使用ができるが個体差が大きいから其の影響を少なくするため平均値±標準誤差の範囲内にあるものだけを採ると更に良い結果を得る。

**食品の放射能汚染について (第1報) 放射能に汚染されたマグロ、カジキ及びカツオの試験について** 長沢佳熊, 川城 巖, 平田 穂, 中山豪一, 芹沢 淳, 西村千昭, 松島 崇, 西崎笹夫 日本薬学会 6 月第 1 例会講演 (昭和 29 年) ビキニ環礁による水爆実験のために放射能によつて汚染された魚類につき, 食品衛生的見地から調査した結果について報告した。

魚肉, 臓器, 血液, 野菜などの放射能の測定法を提出し, その成績により魚類の汚染度を次のように示した。1, 乾燥物が最も放射能を強く有するから, 測定には乾燥物を用いることが大切であること。2, キワダマグロ, ピンナガマグロ, フウライカジキ, パショウカジキ, クロカワ, メバチ, カツオ, シイラを検査

した。4 月 9 日の演者等の試験によつて内臓に汚染の甚だしいことを認め, 特に消化器に著しく, 当時は幽門垂, 胃内容物, 肝臓の順に弱かつたが, 5 月中旬頃からは腎臓に最高の汚染を認めるものも多く, これは吸収が長期に亘つて行われ, 血液循環から腎臓に沈着したものである。シイラでは特にエラに強く汚染を認め, その血液中には 1 cc につき 40 カウントを示した。腎臓では最高 1015 カウント (キワダ), 肝臓では 100 カウント (シイラ), 幽門垂では 93 カウント (カツオ) を示す。胆汁は少く, 4.8 カウント (サンマカジキ) 肉は 1 カウント以下 3 例, 1~10 カウント 3 例, 13 カウント 1 例, 39 カウント 1 例, 42 カウント 1 例で比較的弱い (いずれも科研式 GM 管 32 進法, マイカの厚さ 3 mg/cm<sup>2</sup>, 測定距離 1 cm, 検体は 1 g 当り)。それらの放射能の減衰曲線をも示した。最大許容量には米国での飲料水の基準に標準局と原子力委員会の 2 種があり, その差は 5,000~50,000 倍の差があると解される。標準局基準は安全量という方が適切なもので, 1 日量 (2.2 l の水を飲むとして) は 2.2 × 0.0001 マイクロキュリで, これを前記のカウントに換算すると 1 日約 48 カウントとなる。以上の検体と比較して検体の許容量につき米国の飲料水基準と比較して論じた。

**食品の放射能汚染について (第2報) 魚類, 野菜, しいたけ, 茶, 米及び雨水の放射能汚染** 長沢佳熊, 川城 巖, 中山豪一, 芹沢 淳, 松島 崇, 西崎笹夫, 大熊誠一, 河村正一, 竹中祐典, 日本薬学会 11 月第 1 例会講演 (昭和 29 年) 放射能によつて汚染された魚類, 野菜, しいたけ, 茶, 米及び雨水について放射能分析を行った結果について報告した。1, 当所で収去した汚染魚類の体表の各部分及び内臓の測定値を表示した。このうち大正丸の漁獲したキハダの白肉及び腎臓部分を灰化し, それについて放射化学分析を行った結果, 放射能の大部分は Zn 等の重金属により, Sr による放射能は全放射能の 0.27% であることが判明した。2, 放射能により汚染された野菜類は水洗によつて著しく放射能を除去できることが判明した。3, 雨水を直接うけるしいたけの表面は裏面より明らかに汚染度の高いことが判明した。4, 覆をして栽培する玉露は他の茶より若干汚染度の弱い傾向にあることが判つた。5, 昭和 28 年度, 29 年度の新潟県産米の放射能を比較した結果, 29 年度産米のモミ米, モミ殻に若干の汚染が認められたが, 玄米, 白米, 及びヌカに

は放射能が殆んど認められなかつた。6、全国各地より取去した雨水についてその放射能を計測したところ、中には若干の放射能の認められるものもあつた。

以上1~6の放射能実験結果から今度の水爆実験による放射能汚染は大部分外部汚染であると判定した。

**覚せいアミン剤の検出法** 長沢佳熊 ケミカルタイムス No. 14, 235 (1954). 覚せいアミンの 1-phenyl-2-aminopropane (I), 1-phenyl-2-methylaminopropane (II) 及び ephedrine (III) の検出法について種々解説し、その代表的な検出法を挙げた。

(I) についてはニトロプルシッドナトリウム(NP)-アセトン法 (国立衛試法), (II) については NP-アセトアルデヒド法 (青木法), (III) についてはニンヒドリン-ピリジン法 (国立衛試法) がそれらの微量特異的検出法として適当であることを説明した。なお次亜臭素酸ナトリウム-ピリジン法 (国立衛試法), コバルト・ロダニド法 (青木法), 赤血塩-NP法 (国立衛試法), ニトロ化法 (岡崎法) についても解説した。

**覚せいアミン剤の検出法について** 長沢佳熊, 大熊誠一 薬誌 74, 773 (1954). 1-phenyl-2-methylaminopropane (I), 1-phenyl-2-aminopropane (II) 及び ephedrine (III) の呈色反応について検討した。(I), (II) 及び (III) は次亜臭素酸ナトリウム及びピリジンで赤色を呈する。(I) はフェリシアン化カリウム, ニトロプルシッドナトリウム, 次でフェニールヒドラチンで赤色~橙色を呈する。(II) 及びアミノ酸はニトロプルシッドナトリウム, アセトン及び重炭酸ナトリウムで赤紫色を呈する。(III) はニンヒドリン及びピリジンで紫色を呈する。

**覚せいアミン剤の検出法 (第2報) 1-phenyl-2-dimethylaminopropane 及び三級アミン類の呈色反応について** 長沢佳熊, 大熊誠一 日本薬学会 3月第2例会講演 (昭和30年), 1-phenyl-2-dimethylaminopropane (I) の検出法としてその三級アミノ基の呈色反応を検討した。その結果, クエン酸及び無水酢酸, 又はアロニット酸及び無水酢酸と三級アミン類を加熱するときは鋭敏に赤色, 紫色系統に呈色し, 三級アミンに特有の反応であることを発見, 認認した。なお (I) の N-ジメチル基, N-ジメチルアミノエチル基, フェニール基の検出法 [長沢, 大熊: 薬誌 74, 773 (1954) 及び長沢: 覚せいアミン剤の検出法, ケミカルタイムス, 14号, 235頁 (昭和29年8月) を参照] について検討した結果を併せて報告した。

**ニトロプルシッドナトリウムとフェリシアン化カリ**

**ウムとによるジエチルアミンの呈色反応について** 大熊誠一 薬誌 75, 232 (1955). ジエチルアミンはニトロプルシッドナトリウム (NP) とフェリシアン化カリウム (FC) によつて炭酸ナトリウム, アルカリ性下で紫色を呈する。この反応はジエチルアミンに特有反応である。この呈色はジエチルアミンが NP と FC により酸化されてアセトアルデヒドを生成し, 更にこれが未酸化のジエチルアミン及び NP と脂肪族二級アミンの呈色反応を行うため生成するのである。

**ジメチルグリオキシムとオキシベンツアルデヒドによるセミカルバゾン及びチオセミカルバゾン類の呈色反応について** 長沢佳熊, 大熊誠一, 佐野寛子, 斎藤列子 第8回日本薬学会 分析化学部会講演 昭和30年4月。アルデヒド又はケトンセミカルバゾン類はジメチルグリオキシムと塩酸で加熱すると赤色~紫赤色を呈する。これに反して一般のアルデヒド又はケトンチオセミカルバゾン類はこの反応を呈しないが, オルト又はパラオキシベンツアルデヒド類を反応溶液に加えるとチオセミカルバチッド, アルデヒド又はケトンチオセミカルバゾン類も赤色~紫赤色を呈するようになることが判明した。アルデヒド及び糖類はトリプトファンと塩酸で青色, 紫色, 緑色等に呈色するが, ペプトンを使用しても同様の結果が得られ可成り鋭敏である。

この反応は芳香族アルデヒド及び一部の糖類の呈色反応として利用できる。

**ニトロ化合物の検出法について** 長沢佳熊, 大熊誠一, 斎藤列子, 佐野寛子 第8回日本薬学会 分析化学部会講演, 昭和30年4月。芳香族ニトロ化合物は緩衝剤に酢酸ナトリウムを使用して亜鉛末中性還元を行つたのち, Sodium pentacyanoammine ferroate (PAF) を作用させると紫色, 緑色, 青色等に呈色する。この方法は芳香族ニトロ化合物の微量検出法に適する。なおニトロピリジン, ニトロピリミジン等のニトロ基の検出は上記亜鉛末法によるよりアルミニウム, アマルガム還元したのち, PAF を作用させる方法の方が遙かに良好な結果が得られ紫色, 赤色等に呈色する。有機化合物を硫酸-硝酸で処理して m-dinitrobenzene-誘導体としたのちアセトンとアルカリで呈色させる方法は, 各種有機化合物に特有な反応でなく, ベンゼン核を有する化合物に共通な反応である。

**ビキニ調査船俊鷗丸の調査結果について** 浦久保五郎: 公衆衛生年報 2, 1, 5~10. (昭29) 筆者は当所芹沢淳氏と共にビキニ海域調査団に参加し, 得られた調査団全体の結果を空気, 雨水, 海水, 船体, ミクロ

プランクトン及び稚魚網採集物、延縄漁獲物及び其の他魚類の放射能汚染状況、航海中連続して計測したバックグラウンドの値、乗組員の健康状態について紹介し、航海に対する環境衛生的考察およびマダロ漁業に対する食品衛生的考察を行った。

**空気中の浮遊微生物に関する研究 (Ⅲ) 室内空気中に浮遊する糸状菌の種類について** 浦久保五郎：公衆衛生年報 2, 2, 19~21. (昭29) 昭和28年4月より4回にわたり注射薬工場2カ所、食品工場2カ所、図書館書庫、雑貨倉庫各1カ所、計6カ所の室内において落下法により約3000株の糸状菌を分離しその属を同定し、その見られた属種について前報の屋外空気における成績と比較考察を加えた。

**ピリダチン誘導体の合成 (第1報) ピリダチン及びその 3-, 3,6-置換体について** 板井孝信, 井下田浩 日本薬学会年会講演 (昭29.4.6); 薬学雑誌 74, 1195 (1954). ピリダチン誘導体の多くは核合成又はフタラチン系化合物の酸化によつて作られている。我々は先ず 3,6-Dichloropyridazine を出発としてアンモニアを加えたメタノール中 Pd-炭を用いる常圧接触還元により脱ハロゲン化してピリダチンを得た。この2つのクロル基の活性を検討するため Alkoxy, Aryloxy, Arylthio, Amino 基との置換を試み、夫々 Mono- 及び Di-置換体を得た。その結果2つの塩素の中1つはピリジンの  $\alpha$ -又は  $\gamma$ -位の塩素よりはるかに活性であるが、他の1つはそれより活性が低い、然し結局2つともに置換し得ることを知った。

**3-Picoline 1-oxide 誘導体の合成** 板井孝信, 小倉治夫 薬学雑誌; 75, 292 (1955) 3-Picoline 1-oxid を硫硝酸でニトロ化し, 4-Nitro-3-Picoline 1-oxide (Ⅲ) と少量の 4-Nitro-3-Picoline (Ⅵ) を得た。これを Pd-炭を用いて接触還元するとき、塩酸酸性では 4-Amino 1-oxide (Ⅳ) を得、無水酢酸中に行えば脱酸素を起し 4-Acetylamino-3-picoline (Ⅶ) を得る。若し Fe + HOAc で還元すれば 4-Amino-3-picoline (Ⅴ) を得る。この (Ⅴ) は又 (Ⅶ) の加水分解でも得られる。(Ⅲ) に三臭化磷を反応させると脱酸素のみ起り 4-Nitro-3-Picoline (Ⅵ) となる。

(Ⅲ) のニトロ基の活性を調べるため Na-Benzylate を作用させると 4-Benzylloxy 体を生じ、アセチルクロリド又は臭化水素酸で夫々 4-クロル-又はブロム-体を生じ、無水酢酸と加熱すると 4-Oxy-5-

nitro-3-picoline 1-oxide (Ⅱ) を、この際 Dimethylaniline を存在させると 4-Acetoxy-3-picoline 1-oxide (Ⅷ) を得る。

(Ⅱ) を三塩化磷で処理すると 4-Oxy-5-nitro-3-picoline (Ⅸ) が得られ、これにオキシ塩化磷を作用すれば 4-Chloro-5-nitro-3-picoline (Ⅹ) となり、これは (Ⅷ) を氷酢中ニトロ化したものに、オキシ塩化磷を作用せしめた成績体と一致した。

**$\omega$ -Chloro-2-picoline 及びその誘導体の合成** 板井孝信, 小倉治夫 薬学雑誌; 75, 296 (1955) 2-Pyridylcarbinol が簡単に得られるようになったので、これにオキシ塩化磷を作用して  $\omega$ -Chloro-2-picoline (Ⅰ) を作り、熱時シアンソーダを反応すると  $\omega$ -Cyano-2-picoline (Ⅱ) が出来る。(Ⅰ) の得量 80%, (Ⅱ) の得量 87% である。(Ⅰ), (Ⅱ) はともに不安定で放置すれば着色し、更に樹脂物質を生ずる。

(Ⅱ) を濃硫酸、エタノールと加熱すると 90% の収率で Ethyl 2-pyridylacetate を得る。(Ⅱ) に NaOH 液中過酸化水素水を作用させれば 2-Pyridyl acetamide (Ⅲ) を生成する。(Ⅲ) は又 (Ⅳ) とアンモニア水とを加熱しても得られる。

上記に得た化合物の紫外部吸収スペクトルを示した。

**カルバゾール誘導体の合成** 板井孝信, 関島正昭 日本薬学会年会 (昭30.4.11) 講演 3-Aminocarbazol をアセト酢酸エチルと加熱放置すれば Ethyl  $\beta$ -Carbazylamino-crotonate (Ⅰ) を生じ、これを Conrad & Limpach 反応で閉環すると 2'-Methyl-4'-oxypyridocarbazol (Ⅱ) を1種のみ得る。これをオキシ塩化磷と加熱して 4'-クロル体 (Ⅲ) とし、Pd-BaCO<sub>3</sub> を触媒として接触還元すると 2'-Methyl pyridocarbazol (Ⅳ) となる。又 (Ⅲ) のクロル基は活性で Diethylamino ethylamine と加熱すれば 4'-Diethylaminoethylamino 体 (Ⅴ) を生ずる。

(Ⅱ) の構造を定めるために我々は 6-Hydrazino-quinaldine より出発して Cyclohexanone quinaldylhydrazone (6) (Ⅵ) を作り、これを Fischer のインドール合成性に付して 2-Methyl-10,11-tetramethylene-5,6 (N)-pyroquinoline (Ⅶ) を合成した。この閉環の方向は今回特に証明はしなかつたが、6-Hydrazino-quinoline 又は 6-Hydrazino-5,8-dimethylquinoline その他のインドール閉環に於て常に 5-位に閉環の起ることより推して間違いないものと思われる。

(Ⅷ)をPd-炭で脱水素して得られたものと(Ⅳ)と混融して降下を認めなかつた。従つて(Ⅰ)はCarbazol環の4-位に閉環したものと認めた。

**大腸菌のアミノ糖代謝の研究(第1報) 生菌および抽出液によるグルコサミンの好氣的分解。** 朝比奈正人, 山羽 力: 生化学, 26, 666 (1955) 衛試, 72, 321 (1954) 抄録参照

**大腸菌のアミノ糖代謝の研究(第2報) 抽出液による嫌氣的なグルコサミンの磷酸化と脱アミノ** 朝比奈正人, 山羽 力: 生化学, 26, 617 (1955) 大腸菌抽出液によつて, 嫌氣的条件下でグルコサミンが磷酸化され, その生成物がグルコサミン-6-磷酸であることをペーパクロマトグラフィで確めた。グルコサミン-6-磷酸はまた化学的に合成した。抽出液により, グルコサミンが脱アミノされる場合はATPの存在が必要であるが, グルコサミン-6-磷酸はATPがなくても脱アミノされることから, グルコサミンは先ず磷酸化されてグルコサミン-6-磷酸となり, 次に脱アミノされると言う代謝経路を提出した。

**非水溶液滴定による医薬品の定量(第5報) 氷酢酸を溶媒とするメチルキサンチン類及びそれらを含む医薬品の定量** 鹿島 哲: 薬誌, 74, 1078 (1954), テオフィリン, テオブロミン及びカフェインは氷酢酸中で過塩素酸で1モル1当量として0.4%の測定精度で電位差滴定できた。クリスタルバイオレットを指示薬として滴定するときは, その変色の関係で逆滴しなければ定量できない。カフェインと有機酸塩との混合物である医薬品, 安息香酸ナトリウムカフェイン及びサリチル酸ナトリウムカフェインは2段に滴定され, かくうじて定量できた。それはカフェインとカリウム塩との混合物より測定精度が悪い。それはナトリウムの方がカリウムより塩基性が弱いからである。滴定曲線からテオフィリンとカフェインの塩基性はほぼ等しく, テオブロミンはそれらより弱いといえよう。

**非水溶液滴定による医薬品の定量(第6報) 氷酢酸を溶媒とするモルヒネ類の滴定** 鹿島 哲, 朝比奈晴世, 志内賢彦: 薬誌, 75, 329 (1955)。モルヒネ及びジアセチルモルヒネとそれらの塩酸塩並びにコデイン, テバイン及び塩酸エチルモルヒネは氷酢酸中で過塩素酸で滴定したところ, そのメチルアミノ基の塩基性により1モル1当量として約0.05%の測定精度で定量できた。塩酸塩にはあらかじめ酢酸第2水銀を当量より少し多く加えて滴定した。コデイン及びヒドロコデインの磷酸塩並びに硫酸コデインを直接滴定するとその測定精度はやや悪く約0.2%であつた。電位差

滴定にはガラス-甘汞電極を用い, 指示薬によるときはクリスタルバイオレットを用いた。滴定曲線からモルヒネ, エチルモルヒネ, コデイン及びジアセチルモルヒネの塩基性は相互にほぼ等しく, テバインの塩基性が氷酢酸中では一番強いといえる。

**非水溶液滴定による医薬品の定量(第7報) 氷酢酸を溶媒とする抗ヒスタミン剤(ジメチルアミノエタン誘導体)の滴定とその塩基性について** 鹿島 哲: 薬誌, 75, 332 (1955)。ジメチルアミノエタンの誘導体と考えられる抗ヒスタミン剤7種を滴定した処, そのジメチルアミノ基及びその他の環状窒素の塩基性により0.03~0.06%の測定精度で定量できた。ドキシラミン, クロロフェンピリダミン及びピリラミンは有機酸塩なので直接滴定によつて正確に定量できた。塩酸塩を滴定するとき加える酢酸第2水銀は当量よりあまり過剰に加えることは好ましくなかつた。滴定曲線から氷酢酸中における相互の塩基性を比較できるが, それによつて似ている塩基の窒素に関する構造と塩基性の強弱との関係を論ずることができた。

**非水溶液滴定による医薬品の定量(第8報) 氷酢酸を溶媒とするトロパンアルカロイドの滴定** 鹿島 哲, 朝比奈晴世, 志内賢彦: 薬誌, 75, 586 (1955)。塩酸コカイン, 塩酸トロパコカイン, 臭化水素酸ホマトロピン, 臭化水素酸スコボラミン及びアトロピンはそのメチルアミノ基の塩基性により1モル1当量として0.04%の測定精度で定量できた。しかし硫酸アトロピンの測定精度は悪く0.2%であつた。この滴定ではブドウ糖やエタノールが共存しても少しも妨害作用をしなかつた。滴定曲線からL-コカインの塩基性が一番強く, L-スコボラミンがそれに次ぎ, トロパコカイン, ホマトロピン及びアトロピンの塩基性は大体等しく一番弱いと云えよう。

**非水溶液滴定による医薬品の定量(第9報) 氷酢酸を溶媒とするエフェドリン類(1-フェニル-2-アミノプロパン誘導体)の滴定** 鹿島 哲: 薬誌, 75, (1955)。メタンフェタミン(ヒロポン), フェニルジメチルプロパン, エフェドリン及びメチルエフェドリンの塩酸塩はアミノ基の塩基性により1モル1当量として約0.04%の測定精度で定量できた。アンフェタミンは硫酸塩であつたので0.2%の測定精度であつた。滴定曲線から氷酢酸中では溶媒の水平効果により相互の塩基性にあまり差異が認められなかつた。しかし一応メチル基及び水酸塩が附加されるごとに少し塩基性が増加することが認められよう。

**Colorimetric Determination of Homosulfamine** Kiyoshi YOSHIMURA and Minoru MORITA: Pharm. Bull. 3, 62, (1955). ホモスルファミンをシアゾ化したパラニトロアニリンと pH 7.5 の緩衝液中で反応させ、此処に生じた橙赤色の着色を光電管比色計 (S-53のフィルターを使用) 又は分光光電光度計 (520 m $\mu$ を使用) で測定する事に依り、5~25  $\mu$ g/cc のホモスルファミンを誤差約 2 % 以内で定量する事が出来る。

**安定剤を含むビタミンC注射剤の定量法** 平岡栄一, ビタミン, 8, (2), 137 (1955) 市販のビタミンC製剤には種々の安定剤が、種々の割合に加えてあるので、これをヨウ素法で滴定するときには過大な定量値を与える恐れがある。かような試料の正しい定量を行うため通常のインドフェノール滴定法に Levy のオキシドール酸化法を応用して定量条件を検討し、満足すべき結果を得た。

**抵抗力減弱処置を加えた動物血清の殺・抗菌的作用**  
八田貞義, 山地幸雄, 田中弘子, 山内 信, 山中太郎: 第 25 回日本衛生学会総会演説要旨 (1955) 菌力と血清の殺・抗菌的作用並びにオプソニンの関係、X線照射或は、マロン酸ソーダ腹腔内注射を行った動物血清の殺・抗菌的作用の低下について報告した。(1) 腸炎菌強毒 RG-3 株は腹腔内接種によりラッテを斃したが、同弱毒 S-64 株及びブドウ球菌寺島株はラッテを斃さなかつた。(2) 上記3菌株に対するラッテ血清の抗菌力を検したところ、RG3 株は血清に抵抗して最も発育し易く、S-64 及び寺島株は発育し易かつた。(3) 上記の菌株に対するラッテ血清のオプソニン作用を検したところ、寺島株、S-64 株、RG-3 株の次に貪食され易いようであつた。(4) モルモットに 200r X線照射し、その前後の血清の RG-3 株に対する殺・抗菌作用を検した。生血清中では照射前には菌数の減少がみられ、照射4日後には増殖を示し、11日菌の血清中には更に急速な増殖がみられた。非働化血清では照射前及び照射4日後にその殺・抗菌力に大差はなく、照射11日後の血清中では前二者と比べて菌の増殖は著るしかつた。(5) モルモット白血球のX線照射による減少について述べた。(6) マロン酸ソーダ 0.7g を1時間おきに2回モルモットに注射し、注射前及び2回目の注射30分後の血清の殺・抗菌作用を検した。生血清では注射後には注射前に比べて菌は発育し易く、非働化血清では注射前後に差を認めなかつた。(7) X線照射によるウサギ血清の殺・抗菌力の低下を全身照射及び腹部を覆つて照射した場合につ

き検討した。照射線量は 600r とした。腹部を覆つて照射した後の血清殺・抗菌力の低下は全身照射の場合より顕著でなかつたが、両者の差はそれほど大きくはなかつた。

**細菌感染に関する研究** 八田貞義, 山地幸雄, 田中弘子, 山内 信: 第 24 回日本衛生学会総会演説要旨 (1954) われわれはトリパンプルーによつて填塞された動物の細菌感染、ワクチンによる感染防禦実験、酵素阻害剤による細菌感染の増強、並びにX線被照射動物の液性抵抗について実験を行ない、次の成績を得た。(1) モルモットにトリパンプルーを 60 mg/kg ずつ14回腹腔内注射すると、ゲルトネル菌に対する感受性が増強し対照に比べて菌投与後の凝集素価の上昇が顕著であつた。(2) ラッテにトリパンプルーを 30 mg/kg ずつ14回注射し、ゲルトネル菌を腹腔内注射したところ、対照動物には耐過生残したものがあつたが、填塞ラッテは全部4日以内に死んだ。(3) マウスに 14 mg/kg ずつ14回トリパンプルーを注射すると、注射期間中に5匹中3匹が斃死し、生残マウスにゲルトネル菌を経口投与したところ、対照に比べて早期に斃死した。(4) Berry らによつて報告された酵素阻害剤による鼠チフス菌感染の増強を、マロン酸ソーダ及びゲルトネル菌について、追試確認し得た。(5) われわれはさきにX線照射による細菌感染の増強を報告したが、今回は 200r 照射されたモルモットの血清についてオプソニン及び抗菌力を検し、被喰菌数の減少と抗菌力の低下とを認めた。照射4日後にモルモットの血糖は低下し血中無機燐は増加した。被照射モルモットは、4匹中3匹が11~14日後に死に、1匹は46日以上生残した。斃死モルモットの血液及び脾は無菌であつた。

**マロン酸ソーダの Salmonella enteritidis 感染に及ぼす影響** 八田貞義, 山地幸雄, 田中弘子, 山内 信: 日本細菌学雑誌, 9, 405~408 (1954) マウスに *S. enteritidis*  $4.7 \times 10^4$  個を腹腔内接種し、その直後よりはじめて 10 mg ずつの malonate を 8 回、1時間おきに腹腔内注射すると、それらのマウスは接種後 24~144 時間で全部 (10/10) 斃死した。しかるに malonate の代りに生理食塩水を、同様の方法で注射された対照マウスは、接種 72~96 時間後に死に始め (1/10), 192 時間後にも半数以上 (6/10) が生残した。腹腔内接種菌量を  $3.5 \times 10^2$  個とした際には、malonate を注射されたマウスは対照よりいくらか早く死んだものがあつたが、対照との間に顕著な差はなかつた。

マウスに malonate 25 mg を1回腹腔内注射しその直後に *S. enteritidis* を経口投与したところ、それらのマウスは食塩水を注射された対照マウスと同様1~2週間後に斃死した。

以上感染動物の malonate による生存期間の短縮は、宿主体内の tricarboxylic acid cycle の障害によるとの推論について論じた。

**レプトスピラの研究** 八田貞義, 山地幸雄, 山羽力, 田中弘子, 山内 信: 第24回日本衛生学会総会演説要旨(1954) 大豆レチチン及び卵黄リポビテルニンの, *Leptospira icterohaemorrhagiae* 及び, *Leptospira pyrogenes* の発育に及ぼす影響を検討し次の成績を得た。10%ウサギ血清加コルトフ培地に、武田製大豆レチチンのエタノール溶液を加えると、レチチンはレプトスピラに対するアルコールの抑制作用を中和した。3%ウサギ血清加コルトフ培地では、武田製大豆レチチンは *L. icte.* の発育を阻止し *L. pyro.* は発育を促進された。Glidden 製大豆レチチンは、*L. icte.* では血清の代りにならず、*L. pyro.* もその添加培地での継代は不可能であつた。卵黄リポビテルニンには発育促進作用はみとめられなかつた。石灰窒素のレプトスピラに対する作用本態を検討し、次の成績を得た。

石灰窒素またはその留水浮遊液の殺レプトスピラ作用は:(石灰窒素) > (100°C, 30分加熱液) > (濾液の100°C, 30分加熱液) > (ゼイツ濾液)(純シアナミド) > (18日間氷室放置した100°C, 30分加熱液及びゼイツ濾液) = (ジシアンジアミド) の順であつた。石灰窒素添加によりレプトスピラの培養液はかなりアルカリ性となるが、石灰窒素浮遊液のアルカリ性は100°C, 30分加熱及び氷室放置により中性付近に近づく。以上より石灰窒素の殺レプトスピラ作用の本態は、石灰窒素に含まれる生石灰、シアナミド、及びカーバイドが関与するものと推定される。

**石灰窒素のレプトスピラに対する作用—石灰窒素浮遊液の試験管内におけるレプトスピラ殺滅作用並にその加熱による減弱—** 八田貞義, 山地幸雄, 田中弘子, 山内 信: 公衆衛生, 15, 104~105(1954)コルトフ培地に培養した *Leptospira icterohaemorrhagiae* に0.1及び0.02%に石灰窒素を加えると、レプトスピラは夫々1~7日後に消失し、0.01%では減少した。*Leptospira pyrogenes* は石灰窒素0.1%添加により、5日後に殆ど死滅したとみなされ、0.02及び0.01%では減少した。石灰窒素添加直後のレプトスピラ液のpHは、0.1%では9.6以上、0.02及び0.01%

では8.0~8.6前後で、時日の経過につれ中性に近付いた。遠山によると、水稻栽培に際し石灰窒素を施肥した水田水中の石灰窒素含量は約0.04%である。石灰窒素の留水浮遊液を100°C, 30分加熱してレプトスピラ液に加えた際には、石灰窒素をそのまま加えたときと比べて、レプトスピラ殺滅力は弱かつた。従つて石灰窒素に含まれる殺レプトスピラ作用を有する因子の一部は、浮遊液として加熱すると失われると判断される。レプトスピラ液に加えた石灰窒素浮遊液はレプトスピラ液の1/10量であるから、石灰窒素をそのまま加えたときとの条件の差異は、あまり問題にならないと思う。石灰窒素浮遊液は、加熱前は0.01及び0.01%で夫々pH 9.6及び7.2であつたが、加熱後は0.1及び0.01%で夫々pH 9.6及び7.4であつた。従つて石灰窒素の殺レプトスピラ作用を有する因子の消長の一部は、アルカリ性を呈する部分と関係がある。

**レチチンのレプトスピラの発育に及ぼす作用について—大豆レチチン及び卵黄リポビテルニンの作用—** 八田貞義, 山地幸雄, 山内 信: 東京医事新誌, 71, 567~568(1954)血清を含まない培地で、レプトスピラを培養しようとの試みは、未だ完全には成功していない。われわれは大豆レチチン及び卵黄リポビテルニンの、レプトスピラの発育に及ぼす影響について二、三の知見を得た。培地はコルトフ培地を基礎培地とした。大豆レチチンは武田製品及び Glidden Co. 製の Soja Lecithin を用いた。リポビテルニンは東大理学部より分与された N:8.8%, P:1.8% の試料を用いた。供試種は *Leptospira icterohaemorrhagiae* 及び *Leptospira pyrogenes* で、培養は30±1°Cとし判定は暗視野検鏡による計数によつた。大豆レチチン武田製品のエタノール溶液0.5ccを、コルトフ基礎培地4ccに加え、100°C, 15分加熱後、ウサギ血清を0.5cc加え、これにレプトスピラ培養液0.5ccを移植して培養したところ、エタノールは、レプトスピラの発育を阻害したが、レチチン0.01%はこのエタノールの阻害作用を中和すると認められた。ウサギ血清3%加コルトフ培地を基礎培地とし、レチチンのエタノール溶液添加量を0.15ccとして実験したところ *L. icte.* はレチチン0.02%添加培地に発育せず、0.002%添加により5代までしか継代できず、レチチンはむしろ阻止的に作用した。同じくウサギ血清3%加培地を基礎培地とした場合、*L. pyro.* は0.02%では発育が促進されたが、ウサギ血清10%加培地には及ぼさず、0.002%では明らかな発育促進はみられなかつた。卵黄リポビテルニン0.01%添加では明らかな発育促進はみられ

なかつた。

**レチチンのレプトスピラの發育に及ぼす作用について—大豆レチチン及び卵黄レチチンの作用—** 八田貞義, 山地幸雄, 山内 信: 東京医事新誌, 72, 12~12 (1955) 三淵らと同様の実験方法により, 大豆レチチン及び卵黄レチチンの作用を検討した。大豆レチチンは武田製品を, 卵黄レチチンは住友化学製の梅毒診断用1.0%純アルコール溶液を用いた。コルトフ基礎培地5ccに, 上記アルコール溶液0.05ccを加えると0.01%となる。アルコールの影響を除くため, レチチンを加えない試験管にもアルコール0.05ccを加え, いずれも100°C, 15~20分間加熱した後に, 血清及びレプトスピラを加えた。レプトスピラの移植量は駒込ピペットの1滴とした。(1) ウサギ血清8%加コルトフ基礎培地。(2) ウサギ血清0.4%加コルトフ基礎培地。(3) ウサギ血清0.4%及びレチチン0.01%加コルトフ基礎培地。(4) レチチン0.01%加コルトフ基礎培地。(5) コルトフ基礎培地, の5種の培地に *Leptospira icterohaemorrhagiae* 及び *Leptospira pyrogenes* を移植したところ, (2) にレプトスピラは少数發育したが, 3代以上の累代は不可能であつた。大豆レチチンはむしろ阻止的に作用した。卵黄レチチンは *L. icte.* ではなんらの影響も示さず, *L. pyro.* は, (4)の培地において稍々發育を支えられたが, (1)に比べれば甚だしく弱く3代以上の累代は不可能であつた。すなわち三淵らの, 卵黄レチチンは少くとも2代まで血清の無い培地において, レプトスピラの發育を可能ならしめる, との実験報告は必ずしも追試し得ず, また大豆レチチンは無効であつた。従つて卵黄レチチンは, レプトスピラの栄養要求に関し一つの手掛りを与えるが, 血清の代用という意味では, 發育素としての価値は甚だしく低いとみとめられた。

**悪性腫瘍の化学療法に関する研究(1). 吉田肉腫及び130系腹水肝癌に対する細菌多糖体及び各種抗腫瘍性物質の効果について** 八田貞義, 青山好作, 宮沢文雄, 栗栖弘光, 赤坂京子, 新井秀男, 藤田洋一, 青木孝好. 昭和30年4月第14回日本医学会総会第36分科日本公衆衛生学会講演 *Pseudomonas aeruginosa* からの細菌多糖体及び Nitrogen mustard N-oxid, 8-azaguanine, Sarkomycin poppy-extract などを用い, 吉田肉腫並に130系腹水肝癌に対する抗腫瘍作用をラットを基に究明した。この際各供試薬の投与量, 投与開始日などを移動させ抑制機作の吟味を行い, 更に抗腫瘍作用と抗菌性との相関について調べた。また供試薬を連続1ヶ月間投与(腹腔内)したと

きの亜急性中毒發現の状態について精査したときの成績などを報告した。

**飲食品着色料の食品衛生学的研究** 八田貞義, 青山好作, 宮沢文雄, 大竹作左衛門, 小田幸子 公衆衛生16巻4号. 37~57頁 昭29. 飲食品に使用される着色料は, 食品衛生法により法的に規制されているが, 実際にはこれらの法定着色料よりも堅ロウ性, 鮮麗性に富む法定外着色料を使用したものが多く, 時にはこれによる幼児の中毒例も経験されている。よつて著者らは市販飲食品について過去4ヶ年間に於ける法定外着色料の使用実数を明かにすると共に, 最も繁用されているローダミンとナーラミンについて食品衛生学的な見地から, 系統的な実験的研究を行った。

特に有害色素使用の実態, 堅ロウ性, 急性慢性中毒所見, 血中及び尿中便中などの吸収, 排泄試験, 血液及び肝臓機能に対する影響, 消化酵素に及ぼす影響などについて綜的に述べた。

**食品着色料の衛生学的研究(第4報) 緑色々素特にマラヒット緑及びブリリアントミーリング緑に関する研究** 八田貞義, 青山好作, 宮沢文雄, 栗栖弘光, 川浪 昇, 藤田洋一 昭和30年4月第14回日本医学会総会第12分科 日本衛生学会講演 マラヒット緑に代るべき着色料を見出す目的でブリリアントミーリング緑を選び, これの理化学的な堅ロウ度試験を行い, 更にマウス及びラットを基に急性, 慢性中毒量並びにその病理組織学的所見などについて究明した。この際対照にマラヒット緑, ギニヤ緑(食用緑色1号), ライト緑SF黄(食用緑色2号)を用い比較した。またこれら着色料の食品中の含量, 各種細菌, 糸状菌などに対する防腐効果などについて検討した成績について報告した。

**タイ国黄変米及びイスランジア黄変米の毒性について** 大森義仁, 磯野千冬, 内田浜子 昭29.6.26. 日本薬理学会関東部会講演, 日本薬理学雑誌50(6) §246, (1954) 両黄変米は *Penicillium citrinum* 及び *Penicillium islandicum* を白米に接種25°で2~7日間培養し, 3ヶ月に亘るラットの飼育試験を行なつた。0.1%, 1%, 10%, 50%及び100%食餌を与えた各群の生長も対照に比し大差なく, 肝臓及び腎臓の重量にも差がなかつた。両黄変米投与により10日以後に腎細尿管の拡張, 腫脹, 上皮剥離等を認めた。

*Citrinin* 及びタイ国黄変米アルコールエキスのLD50をマウス皮下注射により求めたところ, 夫々77.8mg/kg及び1.5g/kgであつた。

病変米の毒性に関する研究 (第2報) *Penicillium islandicum* の液体培養エキスによる肝臓の組織学的変化 池田良雄, 大森義仁, 磯野千冬, 昭和29.1.7. 第11回日本薬理学会関東部会講演 日本薬理学雑誌 51 (2) § 106, (1955) 約3年前に食研角田により Czapek 液体培養菌蓋から得られたメタノールエキスを用い, マウスに10 mg/10 g の割合で1日1回, 3日間, オリーブ油に懸濁し経口投与したところ, 中毒症状は著明ではなかつたが, 4例は, 6日目迄に死亡した。これら死亡例及び生存例を病理組織学的に検索したところ, 肝小葉中心部より発生する, 肝硬変初期像と考えられる所見を認め得た。

*1- $\alpha$*  および *1- $\beta$*  サントニンの理化学的ならびに投与試験の比較について 川谷豊彦, 久保木憲人, 金子勇一: 日新医学, 41, (5), 266—271 (1954)。天然に存在するただ二つの光学的異性体, *1- $\alpha$*  および *1- $\beta$*  サントニンの物理的・化学的性状を比較し, また両者の投与試験を実施し駆回効力の比較を行った。1) 供試した *1- $\alpha$*  サントニンはミブヨモギより抽出した局方サントニン, *1- $\beta$*  サントニンは川谷が中欧原産の3種の *Artemisia* spp. にその含有を初めて発見したものでこれらを栽培し抽出したものである。2) *1- $\beta$*  サントニンは *1- $\alpha$*  に比較して, 味, 物理的性状を異にし, 一般に溶媒に対する溶解度が低い, 化学的性状は酷似している。*1- $\beta$*  サントニンは初めほとんど無味, 後になつてもほとんど苦味を感じない。3) *in vivo* 実験による駆回効力は, *1- $\alpha$*  および *1- $\beta$*  サントニンの間に推計学的有意差を認め得なかつた。この事実は *1- $\beta$*  サントニンの作用機転が Baldwin のブタ回虫を用いての *in vitro* 実験による直接作用のみを以てしては説明できないようである。4) 副作用としての主訴に於ては *1- $\beta$*  サントニンのそれは *1- $\alpha$*  のそれより少く, 推計学的に有意差が認められた。5) *1- $\beta$*  サントニンの服用によつて肝および腎に障害を認め得なかつた。6) また黄視現象を認め得なかつた。7) *1- $\beta$*  サントニン服用者の尿は, *1- $\alpha$*  のそれの場合と異なり, 著しく淡色でありむしろ平常尿と大差なく, また苛性アルカリ溶液の添加によつて赤変を認め得なかつた。これらの事実は *1- $\beta$*  サントニンが理化学的性状に於て *1- $\alpha$*  と異なる事実と相まつて, 体内に於て変化の様相を異にするのであろうことが推察される。8) いまや著者等の *in vivo* 実験によつて *1- $\beta$*  サントニンの実地応用上の可能性あることが明らかにされた。

麦角の寄生的栽培 川谷豊彦: 医学のあゆみ, 17,

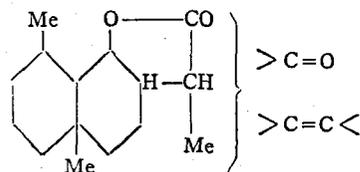
(1), 44—49; (2), 122—128; (3), 196—207 (1954)。

麦角の寄生的栽培に関する総説的論文, 13章よりなり, 麦角の需給, 麦角菌, 麦角の人為的生産, 人工培養法, 寄生的栽培の歴史と現況, 寄生的栽培のためのライ麦とその栽培, 菌株の選択, 接種源, 接種法, 収穫及び収量, 栽培麦角のアルカロイド含量, 他作物への伝染, の各章がある。図12, 引用文献98。

*Ammi visnaga* Lam. の栽培 (第1報) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎, 久保木憲人: 薬誌, 74, (5), 558—559 (1954)。本植物の染色体数は  $n=10$ ,  $2n=20$ , 類似植物 *Ammi majus* は  $n=11$ ,  $2n=22$  であり, また外部形態にも相違がある。播種時期試験によれば, 秋期播種は遅くとも10月末日迄に行うを可とすることが認められた。本栽培実験では枯死株の発生が多く収量極めて悪く, また果実にケリンの含有が認められなかつた。この原因は6月下旬より7月中旬に雨量ならびに降雨回数が例年に比して著しく多かつたこと, 結実期が異状に冷涼であつたこと等の気象的悪条件と, これに伴う病虫害, 当試験場の土壌が地下水位高く排水不良であつたこと等であると思われる。本植物の栽培は夏期の雨量少く, 既報のように排水良好な土壌を択ぶことが必須条件である。

コルヒチンによつて育成したシロバナムシヨケギク (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Bocc.) の倍數体特にそのピレスリン含量について 川谷豊彦, 大野忠郎, 木下孝三: 薬誌, 74, (7), 786—787 (1954)。コルヒチンによつてシロバナムシヨケギクの四倍体を育成した。四倍体は二倍体に比し, 気孔, 花は大きく, 舌状花数を増し, また乾花のピレスリン含量の有意な増加を認めた。このことは染色体倍加によつて薬用植物の有効成分を増加せしめ優良品種を育成し得ることの可能性を示すものである。ピレスリン I 及び II には, 四倍体と二倍体の間に有意差を認め得なかつた。

Two Crystalline Compounds from *Artemisia finita* Kitagawa; Further Discovery of an *Artemisia* containing *1- $\beta$* -Santonin. Kawatani, T. and Takeuchi, T.: J. Pharm. Soc. Japan, 74, (7), 793—794 (1954)。満洲産セメンシナモドキ *Artemisia finita* に *1- $\beta$*  サントニンを含有することを発見した。



(1)

なおこのほか、本植物に一新セスキテルペンラクトン体を発見しこれを finitin と命名しその部分構造式(1)を提出した。新物質 finitin  $C_{16}H_{20}O_3$  は  $l$ - $\beta$ -サントニンを抽出後の母液より分離され、エタノールに僅かに溶解しこれより無色柱状晶として結晶する。m. p. 153—155°.  $[\alpha]_D^{12}$ : -167.7° (C=1.7,  $CHCl_3$ )。日光に1週間曝しても着色せず。濃硫酸に黄褐色に着色する。ナトリウムメチラート、アルコール製水酸化カリウム試液に僅かに黄色着色する。 $l$ - $\beta$ -サントニン及び finitin の含量は共に約0.1%であった。

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4報) クラムヨモギについて その4 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎, 逸見誠三郎: 薬誌, 74, (11), 1168—1173 (1954)。1) クラムヨモギの馴化の影響を知る目的で、1951年以降当場に栽培し1952年1月採種のもの及び原産地パキスタンからの種子より生育の2年株を用いて、1953年6月16日から10月1日まで、生育、取草量、サントニン含量の時期的変化を比較追求した。その結果馴化区は原産地区より生育、取草量、サントニン含量の何れに於ても極めて優れ、馴化区の10アール当風乾取草量及び含量の最高は夫々163.2 kg (7月1日収穫) 1.98% (8月1日収穫) であり、原産地区のものは夫々77.2 kg (8月1日収穫) 1.47% (7月1日収穫) であつた。世代を重ねて採種しこの栽培を反復することにより馴化は愈々飛躍的に進行するものと思われ、早急な採種栽培の確立が要望される所以である。2) クラムヨモギは1年株は生育未だ進まず取草量少くサントニン含量も低い、2年株に至つて急激に生育旺盛となつて取草量及びサントニン含量共に著しく増加することが認められた。3) 3年株及び4年株のサントニン含量の時期的変化は2年株とほとんど同様の傾向を示し、

また含量それ自身も2年株のものと相違を認めなかつた。1950年より引続き4回の栽培試験によれば、サントニン含量は1年株にてはおよそ9月上旬、2、3、4年株にては7月の頃特にその上中旬に極大に達し、しかして極大を示す時期は何れも花蕾の発生に無関係であり栄養生長最盛の時期である。4) 収穫法について、一度に全枝条を収穫するよりも枝条の一侧のみ半分を収穫する方が収穫後の生存期間を延長し得ることを認めた。5) 露地育苗の1年株はガラス室内育苗のものに比較して生育が優れサントニン含量も良好であつた。6) 開花、結実について詳細に観察した。本植物は自家不稔、短日性植物である。7) 10月から1月迄ビニル屋根下又はガラス室内で雨を遮つて栽培したものには結実を認め、これに反し露地栽培のものには結実を認め得なかつた。このことは結実に適湿を必要とすることを示すと思われる。8) 花粉の発芽の適温は15—20°にあるようである。乾燥剤を入れたデシケーター中に保存すれば約1月間発芽力を保つたが、自然状態に保存のものは僅かに6日であつた。

Detection of  $l$ - $\alpha$ -Santonin in *Artemisia ramosa* C. Sm. Kawatani, T. and Chno, T. : J. Pharm. Soc. Japan, 75, (1), 116 (1955)。バーバシナ花 *Flores Cinae Barbarici* は *Artemisia ramosa* C. Sm. の未開の花蕾であつてシナ花 *Flores Cinae* の偽和に用いられている。しかしてサントニンを含有しないものとされている。本植物にサントニンの含有することを述べた如何なる文献も知られていない。新しいサントニン原料植物を育成する目的で *Seriphidium* 節植物を広く世界的に蒐集し、細胞遺伝学的、形態学的、植物化学的研究に従ううち、1954年11月、本植物に  $l$ - $\alpha$ -サントニンを含有することを発見した。含量は約0.1%であつた。

国家検定，国家検査等の試験成績報告

総合調整部

昭和29年の当所に於ける試験，検査の状況を報告する。

国家検定については，7月1日付でイソニコチン酸ヒドラジド注，イソニコチン酸ヒドラジドメタンスルホン酸ソーダ，同錠，4-エチルスルフォニルベンズアルデヒドチオセミカルバゾン，同錠及同散等5品目が追加指定され現在に到っている。取扱件数としてはブドウ糖注，リンゲル液等が最も多く又イソニコチン酸ヒドラジド及び同錠等は大阪支所に於ても大量に取扱っている。

国家検査については，4月30日を以つて従来の国家検査命令は解除され，前年度に於て一件以上の不合格品を出した製造業者又は厚生省が行う一斉検査の結果不良医薬品を製造販売した製造業者に対して期間を限つて検査命令を発する様に改められた。今度28年度一斉検査の結果ヨードチンキ，稀ヨードチンキ，ヨードチンキ製剤，マキューロクロム液，アルコール，純アルコール，消毒用アルコール，パンクレアチン，含糖ペブシン等，9品目が指定された。

取扱件数としては衛生材料，療品等が最も多く，薬品ではクレゾール石鹼液等は割合多量に取扱っている様である。

製品検査については11月30日よりニトロフソリアクリル酸アミド，及び同製剤が追加指定された。

取扱件数としては過酸化ベンゾイルが最も多い様である。

その他の件数としては輸入食品が最も多く次いで特行試験，一般依頼試験等と云つた工合である。

衛生試験所に於ける検査状況 (昭和29年)

件名	試験機関			合計	
	東京	大阪	門司		
国家検定	1,433	302	—	1,735	
国家検査	3,536	1,366	—	4,902	
製品検査	5,128	1,932	—	7,060	
輸出検査	薬品	419	6	—	425
	食品	2	66	21	89
輸入検査	薬品	156	—	—	156
	食品	1,250	1,746	515	3,511
特行試験	1,033	—	—	1,033	
特需試験	32	—	—	32	
一般依頼試験	818	374	—	1,192	
	13,807*	5,792	536	20,135	

輸入食品は小樽も含む。

国 家 検

品 名	種 別 検査機関	1		2		3		4		5		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			
															月	別	
インシュリン注射液	東京大阪	3	3	—	1	1	—	2	2	—	5	5	—	3	3	—	3
プロタミン亜鉛液	東京大阪	—	—	—	2	2	—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	2
インシュリン注射液	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
脳下垂体液薬注射液	東京大阪	2	2	—	2	2	—	6	5	1	6	6	—	2	2	—	3
ハキシルレゾルシン丸	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ハキシルレゾルシン丸	東京大阪	5	5	—	4	4	—	1	1	—	4	4	—	3	3	—	1
避妊薬ゼリー剤	東京大阪	19	19	—	15	15	—	7	7	—	3	2	1	7	6	1	6
錠剤	東京大阪	1	1	—	1	1	—	6	6	—	5	5	—	2	2	—	—
クリーム	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
坐剤	東京大阪	1	1	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—
親水性坐剤	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
泡発性坐剤	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
泡発性粉剤	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ブドウ糖注射液	東京大阪	50	50	—	49	45	4	62	57	5	53	52	1	57	55	2	52
転化糖注射液	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ロック液	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
リンゲル液	東京大阪	24	24	—	20	19	1	29	28	1	22	22	—	21	20	1	23
イソニコチン酸ヒドラジド	東京大阪	2	2	—	8	8	—	3	3	—	5	5	—	5	5	—	4
イソニコチン酸ヒドラジド錠	東京大阪	13	13	—	9	9	—	6	6	—	11	11	—	8	8	—	16
イソニコチン酸ヒドラジド錠	東京大阪	1	1	—	4	4	—	7	7	—	1	1	—	3	3	—	2
イソニコチン酸ヒドラジド錠	東京大阪	13	13	—	7	7	—	8	8	—	9	9	—	5	5	—	13
イソニコチン酸ヒドラジド注射液	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
メタンスルホン酸ソーダ	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
メタンスルホン酸ソーダ錠	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
チオアセタゾン	東京大阪	—	—	—	2	2	—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—
チオアセタゾン散	東京大阪	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
チオアセタゾン錠	東京大阪	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
4-エチルスルホニルベンズアルデヒドチオセミカルバゾン	東京大阪	—	—	—	—	—	—	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—
4-エチルスルホニルベンズアルデヒドチオセミカルバゾン錠	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4-エチルスルホニルベンズアルデヒドチオセミカルバゾン散	東京大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
合計	東京大阪	109	109	—	109	104	5	129	122	7	106	104	2	104	99	5	96
	東京大阪	29	29	—	17	17	—	14	14	—	20	20	—	15	15	—	29

定 成 績 (昭和29年)

6		7		8		9		10		11		12		合 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						
3	—	6	5	1	2	2	—	6	5	1	5	5	—	2	2	—	4	4	—	42	40	2
2	—	2	2	—	1	—	1	2	2	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—	14	13	1
3	—	2	2	—	2	2	—	1	1	—	2	2	—	2	2	—	7	7	—	37	36	1
1	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—	1	1	—	3	3	—	1	1	—	25	25	—
5	1	20	18	2	26	25	1	10	9	1	3	3	—	3	3	—	6	6	—	125	118	7
—	—	2	2	—	5	4	1	4	4	—	2	2	—	3	3	—	2	2	—	33	32	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
—	—	1	1	—	2	2	—	2	2	—	2	2	—	2	2	—	1	1	—	14	14	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
51	1	59	56	3	48	46	2	47	43	4	46	46	—	63	62	1	49	48	1	635	611	24
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	1	23	23	—	30	25	5	24	24	—	33	31	2	28	27	1	28	26	2	305	291	14
4	—	5	5	—	8	8	—	8	8	—	4	4	—	2	2	—	4	4	—	58	58	—
16	—	12	12	—	31	31	—	15	15	—	11	11	—	12	12	—	24	24	—	168	168	—
2	—	3	3	—	2	2	—	3	3	—	5	5	—	3	3	—	6	6	—	40	40	—
13	—	5	5	—	11	11	—	6	6	—	16	16	—	16	16	—	14	14	—	123	123	—
—	—	25	25	—	12	12	—	4	4	—	7	7	—	3	3	—	4	4	—	55	55	—
—	—	8	8	—	1	1	—	2	2	—	2	2	—	6	6	—	6	6	—	25	25	—
—	—	5	5	—	2	2	—	1	1	—	2	2	—	2	2	—	1	1	—	13	13	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—
—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	2	2	—	7	7	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	—
93	3	161	155	6	141	131	10	117	111	6	118	116	2	123	121	2	118	115	3	1,433	1,382	51
29	—	19	19	—	42	42	—	21	21	—	28	28	—	28	28	—	40	40	—	302	302	—

国 家 検

品 名	種 別	月 別 検査機関	1			2			3			4			5			計
			計	試験済	不適	計	試験済	不適	計	試験済	不適	計	試験済	不適	計	試験済	不適	
			脱 脂 綿	東京 大阪	63 94	60 93	3 1	63 79	62 79	1 —	87 92	86 92	1 —	46 127	46 125	— 2	61 52	
衛 生 家 庭 綿	東京 大阪	13 3	13 3	— —	9 6	9 6	— —	13 8	13 8	— —	3 5	3 5	— —	8 1	8 1	— —	1 2	
ガ ー ゼ	東京 大阪	18 9	15 9	3 —	20 9	18 9	2 —	19 8	18 7	1 1	14 12	14 12	— —	18 2	18 2	— —	9 —	
歯 科 材 料	東京 大阪	43 —	43 —	— —	46 —	46 —	— —	29 —	29 —	— —	51 —	48 —	3 —	21 —	21 —	— —	13 —	
注 射 筒	東京 大阪	39 —	39 —	— —	81 —	77 —	4 —	75 —	73 —	2 —	107 —	102 —	5 —	30 —	27 —	3 —	9 —	
注 射 針	東京 大阪	53 —	53 —	— —	134 —	134 —	— —	125 —	121 —	4 —	107 —	105 —	2 —	41 —	41 —	— —	7 —	
縫 合 針	東京 大阪	— —	— —	— —	10 —	5 —	5 —	5 —	3 —	2 —	10 —	8 —	2 —	— —	— —	— —	2 —	
縫 合 糸	東京 大阪	9 —	3 —	6 —	3 —	3 —	— —	8 —	7 —	1 —	4 —	4 —	— —	1 —	1 —	— —	— —	
羊 腸 線	東京 大阪	— —	— —	— —	3 —	3 —	— —	2 —	2 —	— —	3 —	3 —	— —	2 —	2 —	— —	— —	
コ ン ド ー ム	東京 大阪	23 —	18 —	5 —	20 —	15 —	5 —	33 —	24 —	9 —	22 —	12 —	10 —	7 —	4 —	3 —	13 —	
ビ タ ミ ン B <sub>1</sub> 注 射 液	東京 大阪	33 33	32 33	1 —	50 33	49 33	1 —	40 74	39 74	1 —	38 42	33 42	5 —	36 28	36 28	— —	9 10	
ビ タ ミ ン C 注 射 液	東京 大阪	3 13	3 13	— —	9 8	9 8	— —	4 12	4 12	— —	7 15	7 15	— —	9 16	9 16	— —	— 2	
オ キ シ ド ー ル	東京 大阪	28 10	28 10	— —	17 13	17 13	— —	22 26	22 26	— —	27 12	27 12	— —	8 7	8 7	— —	2 1	
ヨ ー ド チ ン キ 製 剤	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
稀 ヨ ー ド チ ン キ	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
ヨ ー ド チ ン キ	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
イ ー キ ュ ロ ク ロ ム	東京 大阪	3 1	3 1	— —	5 1	4 1	1 —	6 1	6 1	— —	6 1	6 1	— —	2 1	2 1	— —	1 1	
イ ー キ ュ ロ ク ロ ム 液	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
エ ー テ ル	東京 大阪	2 —	2 —	— —	2 —	2 —	— —	— —	— —	— —	3 —	3 —	— —	— —	— —	— —	— —	
麻 酔 用 エ ー テ ル	東京 大阪	1 —	1 —	— —	2 —	2 —	— —	— —	— —	— —	2 —	2 —	— —	— —	— —	— —	1 —	

査 成 績 (昭和29年)

6		7		8		9		10		11		12		合 計								
試験済	不適	計	試験済	不適	計	試験済	不適	計	試験済	不適	計	試験済	不適	計	試験済	不適						
31 32	1	39 21	34 21	5	32 21	27 21	5	50 17	45 17	5	41 21	38 21	3	35 17	32 14	3 3	45 27	38 27	7	594 600	559 592	35 8
1 2																				47 25	47 25	
8	1	14	12	2	9	8	1	22	21	1	19	17	2	8	8		25	25		195 40	182 39	13 1
12	1	6	6		6	5	1	19	19		14	14		9	9		29	27	2	286	279	7
9		14	14		10	10		25	22	3	20	16	4	32	27	5	24	17	7	466	433	33
7		19	19		8	7	1	12	11	1	19	18	1	11	10	1	18	18		554	544	10
1	1				2	2					2	2		2	2		1	1		34	24	10
																	4	4		29	22	7
		2	2		1	1		1	1		1	1								15	15	
6	7	13	6	7	10	6	4	7	6	1	4	4		13	9	4	9	9		174	119	55
8 9	1 1	3 2	3 2		2	2		4 2	4 2		5	3	2	3	3		4	4		227 224	216 223	11 1
2																				32 66	32 66	
2 1		3	3		3	3		5	5		3	3		2	2		1	1		121 69	121 69	
																	1	1		1	1	
																	2	1	1	2	1	1
																	1	1		1	1	
1 1		1 1	1 1		1	1		2 1	2 1		3	3		1 2	1 2		4	4		34 11	33 11	1
																	2	2		2	2	
																	2	2		2	2	
																				7	7	
1		2	2		2	2		2	2		2	2		2	2		2	2		18	18	

品名	種別 検査機関	1		2		3		4		5		計					
		計	試験済	不適	計	試験済	不適	計	試験済	不適	計		試験済	不適			
															月	別	
アセチルサリチル酸	東京 大阪	8 5	8 5	—	3 3	3 3	—	1 1	1 1	—	8 7	7 1	—	—	—	1 1	
クレゾール石鹼液	東京 大阪	36 16	36 16	—	43 11	43 11	—	62 29	60 24	2 5	58 26	58 25	—	26 10	25 9	1 1	29 6
D D T	東京 大阪	2 8	2 8	—	21 14	21 14	—	12 17	12 17	—	32 25	32 24	—	14 9	14 9	—	—
アルコール	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
純アルコール	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
消毒用アルコール	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
タニン酸アルブミン	東京 大阪	3 3	3 2	— 1	6 —	6 —	—	2 3	2 3	—	4 7	4 7	—	2 3	2 3	—	1 —
安息香酸ナトリウムカフェイン	東京 大阪	8 3	8 3	—	5 2	4 2	1 —	9 3	8 3	1 —	8 4	7 3	1 —	3 3	3 3	—	3 —
カフェイン	東京 大阪	17 2	17 2	—	12 1	12 1	—	12 —	12 —	—	10 2	10 2	—	2 —	2 —	—	1 —
サリチル酸ナトリウム テオブロミン	東京 大阪	1 —	1 —	—	3 —	3 —	—	3 —	3 —	—	3 1	3 1	—	5 —	5 —	—	3 —
塩酸エフェドリン	東京 大阪	5 —	5 —	—	4 4	4 4	—	2 3	2 3	—	4 1	4 1	—	— 1	— 1	—	—
プロムワレリル尿素	東京 大阪	8 12	8 12	—	4 9	4 9	—	4 13	4 13	—	5 7	5 7	—	4 —	4 —	—	—
杏仁水	東京 大阪	5 3	5 3	—	2 2	2 2	—	— 6	— 6	—	2 2	2 2	—	2 —	2 —	—	—
ホミカチンキ	東京 大阪	— —	— —	—	— —	— —	—	— —	— —	—	1 —	1 —	—	— 1	— 1	—	—
ホミカエキス	東京 大阪	— —	— —	—	— 1	— 1	—	— 3	— 3	—	— 1	— 1	—	— —	— —	—	—
バクカク流エキス	東京 大阪	3 1	3 1	—	2 —	2 —	—	4 —	4 —	—	— 1	— 1	—	1 —	1 —	—	—
合計		427 216	409 214	18 2	579 196	559 196	20 —	579 299	555 293	24 6	585 291	556 286	29 5	303 135	295 132	8 3	137 55

6		7			8			9			10			11			12			合計			
試験済	不適	計	試験済	不適																			
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	22	21	1	
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11	11	—	
20	9	33	33	—	24	24	—	19	19	—	15	14	1	11	11	—	17	17	—	373	360	13	
4	2	6	5	1	5	5	—	2	2	—	2	2	—	4	3	1	2	2	—	119	108	11	
—	—	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	83	83	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	74	73	1	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	2	1	—	3	2	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	—	—	5	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	1	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	1	—	
1	—	2	2	—	1	1	—	1	1	—	2	2	—	—	—	—	—	—	—	24	24	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	18	16	2	
2	1	—	—	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—	2	2	—	2	2	—	43	39	4	
—	—	2	2	—	1	1	—	1	1	—	2	2	—	—	—	—	2	2	—	23	22	1	
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	54	54	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	—	
3	—	2	2	—	2	2	—	1	1	—	1	1	—	3	2	1	3	3	—	30	29	1	
—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	4	4	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15	15	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9	9	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25	25	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	41	41	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11	11	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13	13	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	10	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—	
115	22	155	141	14	113	101	12	171	160	11	152	139	13	134	120	14	201	184	17	3,536	3,334	202	
52	3	32	31	1	29	29	—	26	25	1	26	26	—	23	19	4	38	37	1	1,366	1,340	26	

製 品 検 査 成 績 (昭和29年)

月別	検査機関	品名	溶性サッカリン			ゾルチン			食用色素			ニトロン		ニトロフ		ニトロフ		過酸化		セリイ		合 計		
			計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	計	合格	計	合格	計	合格	計	合格	計	合格	不合格
1	東大 京阪	83 81 2 12 12	37 37 43 43	40 40 14 14													144 144	3 3	307 305 69 69	2				
2	東大 京阪	104 104 13 13	29 29 34 34	68 66 114 113	2 1 1 1												199 199	1 1	401 399 162 161	2 1				
3	東大 京阪	91 91 37 37	13 13 35 35	43 43 136 132	4 3 3 3												268 268		415 415 212 208	0 4				
4	東大 京阪	58 53 43 43	27 27 75 72	28 28 15 15	3 1 6 6												222 222	2 2	332 332 153 150	0 3				
5	東大 京阪	58 58 57 57	13 13 39 39	60 57 105 99	3 2 6 2												203 203	1 1 3 3	335 332 219 213	3 6				
6	東大 京阪	74 71 66 66	3 4 64 64	51 51 51 50	1 2 2 2												217 217	1 1 2 0	384 381 192 189	3 3				
7	東大 京阪	75 74 68 68	1 3 55 55	47 47 120 120	1 1 4 4												251 251	1 1	408 407 248 248	1 0				
8	東大 京阪	96 92 21 21	4 4 20 20	71 70 58 56	1 2 5 5												177 177	2 2	391 386 114 112	5 2				
9	東大 京阪	32 28 19 19	4 4 4 4	42 41 112 110	1 2 2 2												292 263	29 1 1 1	388 354 141 139	34 2				
10	東大 京阪	97 97 31 31	24 23 5 5	54 51 82 80	3 2 1 1												377 377		552 548 122 120	4 2				
11	東大 京阪	113 113 15 15	24 24 10 10	57 57 86 86													380 380		574 574 111 111	0 0				
12	東大 京阪	102 101 36 34	1 2 24 24	73 73 123 117	6 3 3 3												430 430		641 640 189 181	1 8				
計	東大 京阪	978 963 418 416	15 34 4 4	1634 1624 3106 2992	10 24 24 24												3160 3131	29 12 6 4	5128 5073 21932 1901	55 31				

訂 正

- 衛 試 72, 1 (昭和29年) =ピレナミンの検定 (第2報)  
実験方法 1. 標準液及び検液の調製法の3行目 [40.475mg] を [45.48mg] に訂正する。
- 同 71, 109 (昭28)  
上から1行目 M (効価比) = 1.033; 信頼限度 (P=0.95) = 108.8~91.8%  
を M (効価比) = 0.9677; 信頼限度 (P=0.95) = 93.1~107.5% と訂正する。
- 同 72, 24 (昭29)  
脚註: \* Standard deviation = G/V, H<sub>1</sub> or H<sub>2</sub>/6V を  
= √V, √6V, √6V に訂正する。  
\* \* From t distribution table をとつて G/S.D., H<sub>1</sub>/S.D., H<sub>2</sub>/S.D. とする。