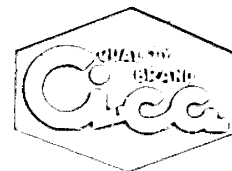


昭和五十五年七月一日 発行

発行者 関東化学株式会社

ケミカルタイムス編集委員会
編集責任者 山田 博



1980 No. 3
(通巻 97 号)

CHEMICAL TIMES

目 次

ご 挨拶.....	取締役社長	野 澤 俊 太 郎.....1706
味の化学話(Ⅲ)—呈味物質の構造と味—.....	静岡大学農学部教授 農学博士	水 野 卓.....1707
尿中の薬毒物の分析(XⅣ).....	科学警察研究所 医学博士 法科学第一部長	丹 羽 口 徹 吉.....1710
シダ植物の栄養葉と胞子葉の成分研究 その2.....	明治薬科大学助教授 薬学博士	奥 山 徹.....1712
ルシフェリン・ルシフェラーゼ発光反応による受光(Ⅱ).....	東京大学医学部講師 理学博士	大 澤 一 爽.....1716
薬学の先駆者・福原有信(24).....	薬学博士	根 本 曾 代 子.....1722

KANTO CHEMICAL CO., INC.

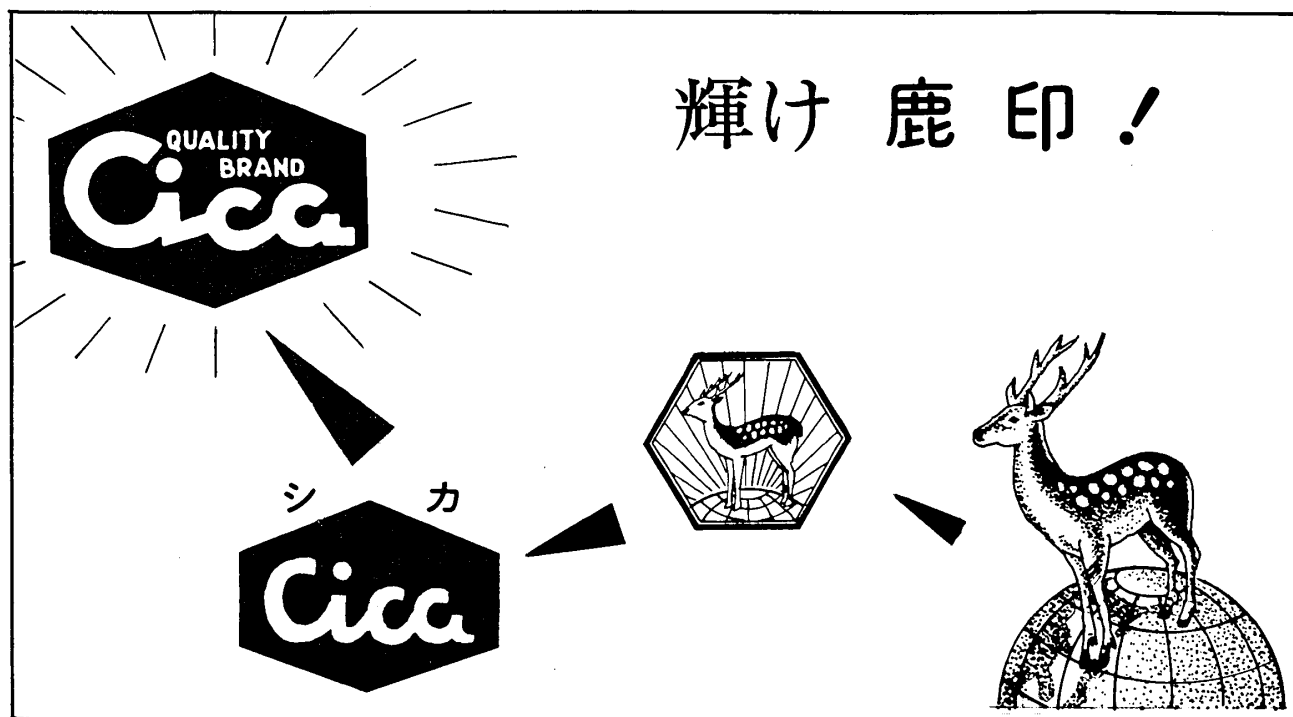
ご 挨拶

取締役社長 野 澤 俊 太 郎

盛夏の折柄、皆様には益々ご健勝のこととお慶び申し上げます。平素はまた格別のご高配を賜り有難く厚くお礼申し上げます。

さて去る3月、弊社は西ドイツのE.メルク社と試薬全般について協業することとなりました。この目的は相互の技術レベルと開発力の向上を目指し、より高品位、高品質の試薬類の製造、開発ならびに応用面の充実を計り、ご利用の皆様のご発展にいささかなりとも貢献できればと深く念願致して提携を推進した訳であります。E.メルク社は化学品メーカーとして世界最古、300有余年の歴史を誇り、技術の蓄積に基づく製品々質の安定は勿論のこと、その開発能力については、つとにわが国に於ても定評のある処であり、明治年代にすでに輸入されておりました。従いましてこの度の協業につきましては、関東化学のパートナーとして相応しい会社であります。E.メルク社との提携によって弊社工場で生産される試薬・臨床検査薬・その他のファインケミカル製品はCica印とE・Merckのダブルブランドを付して国内販売のみならず国外にも輸出することになりますが、伝統あるCica印ならびにE.メルクブランドの信用に恥じない品質の確保を第1と考え、開発、製造、販売に努力致す所存であります。なお弊社独自の技術による製品は従来通りCicaブランドで販売し、これまた内容の充実した製品群を形成してゆく計画であります。

7月1日以降、従前のメルク・ジャパン(株)試薬部のスタッフ全員が弊社に移籍し、関東化学(株)メルク試薬部として新たに発足し、当該業務を行うことになりました。何卒、ご需要家の皆様はじめ、販売お取扱いの代理店、特約店各位におかれましては、倍旧のご愛顧、ご支援ならびに従来に優るご指導、ご叱正を賜りますよう心からお願い申し上げます。



味の化学話 (III)

— 呈味物質の構造と味 —

静岡大学教授 農学博士 水 野 卓

5. 苦い話 (前号続き)

良薬口に苦し。苦汁を嘗める。

無機化合物には、苦汁 (MgSO_4) に代表される苦味を呈するものが多い。ハロゲン化アルカリ金属塩の味と分子量との関係を次表に示した。分子量が大きくなるに従い苦味が強くなる傾向が認められる。

ハロゲン化アルカリの味と分子量

アルカリ金属 ハロゲン	Li	Na	K	Rb	Cs
Cl	塩味 (42.40)	塩味 (58.45)	塩味 (74.55)	塩味 (120.94)	苦味 (168.37)
Br	塩味 (86.86)	塩味 (102.91)	両味 (119.01)	苦味 (165.40)	苦味 (212.83)
I	塩味 (133.86)	塩味 (149.92)	苦味 (166.02)	苦味 (212.40)	苦味 (259.83)

(注) () 内の数字はMWを示す

苦味を有する有機化合物を化学構造上から大別すると、アルカロイド、テルペン、配糖体、アミノ酸、ペプチドなどの天然物の他に、合成物としてはニトロ化合物、チオ尿素類などに苦味を呈するものも多く、苦味に関係深い原子団として $(\text{NO}_2)_2<$, $\equiv \text{N}$, $=\text{N}\equiv$, $-\text{SH}$, $-\text{S}-$, $-\text{SS}-$, $-\text{CS}-$ などが挙げられる。

ヒトに対する苦味物質の呈味閾値

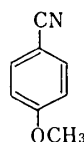
苦味物質	分子式	MW	閾値 ¹ (モル, 中間値)
尿 素	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	60.1	0.12
フェニル尿素	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCONH}_2$	136.15	0.025
硫酸マグネシウム	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.49	0.0046
カフェイン	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$	194.1	0.0007
フェニルチオ尿素	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCSNH}_2$	152.21	0.00002
ナリギン	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	580.53	0.000025
ニコチン	$\text{C}_5\text{H}_4\text{NC}_4\text{H}_7\text{NCH}_3$	162.2	0.000019
塩酸キニーネ	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$	360.88	0.00003
硫酸キニーネ	$(\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$	746.90	0.000008
ピクリン酸	$\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$	229.11	0.0000037
塩酸ストリキニーネ	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$	370.75	0.0000016
ブルシン	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$	394.45	0.0000007

各種の味感受性の閾値濃度の比較

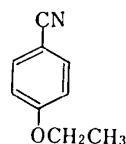
味の種類	呈味物質	閾値濃度 (%)
甘 味	ショ糖	0.7
酸 味	サッカリン	0.001
塩 味	塩 酸	0.045
	塩化ナトリウム	0.055
苦 味	ブルシン	0.0001
	キニーネ	0.00005

化学構造と苦味・甘味の関連性

(a) 炭素鎖長

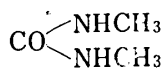


p-Anisonitrile 甘味



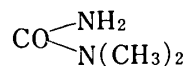
p-Ethoxybenzonitrile 苦味

(b) 構造対称性の変化



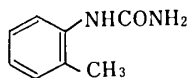
symetric Dimthyl urea

苦味

 α -Dimethyl urea

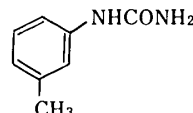
強甘味

(c) ベンゼン核上の相対位置



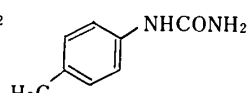
o-Tolyl urea

無味



m-Tolyl urea

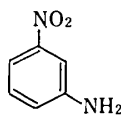
苦味



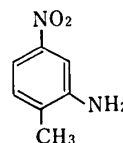
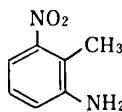
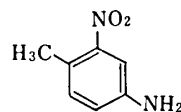
p-Tolyl urea

甘味

(b) ベンゼン核上の置換基の位置

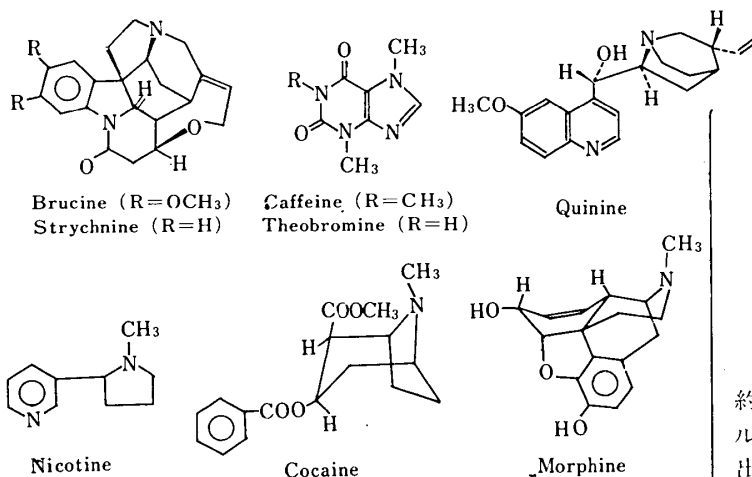


m-Nitroaniline 甘味

Nitrotoluidine 甘味
(1, 3, 4)Nitrotoluidine 無味
(1, 2, 3)Nitrotoluidine 微苦味
(1, 2, 5)

(1) 苦味アルカロイド

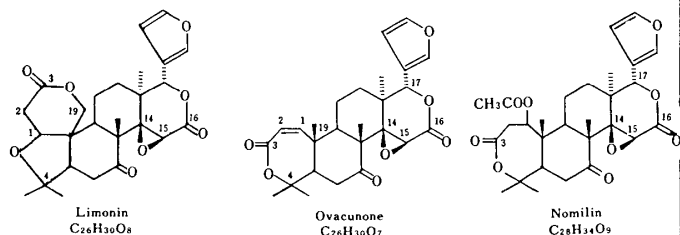
強い苦味を有する代表的な有機化合物にはアルカロイドが多い。苦味アルカロイドは左旋性のものが多く、苦味と化学構造の関係は明らかでないが、構造上右上部に3級N原子が位置し芳香環が左下部にくるという共通性が見られる。



(2) 苦味テルペン

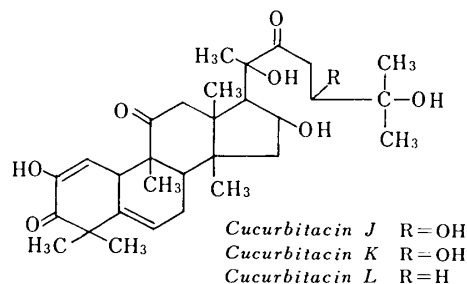
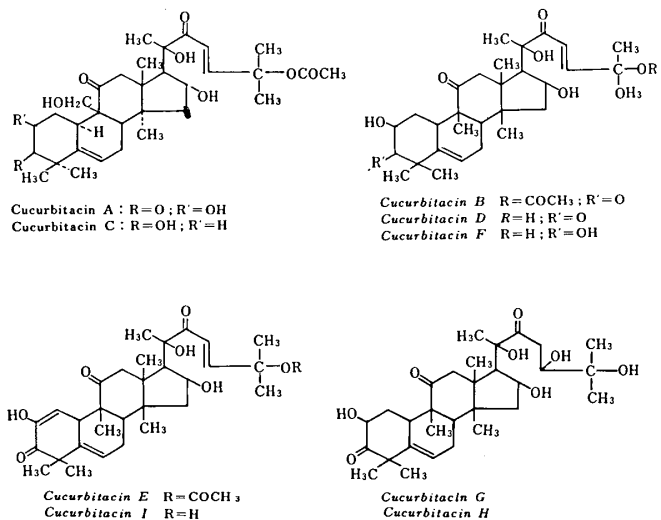
食品に関係のある柑橘類のリモノイド、ウリ類のククルピタシン類、ホップのフムロン類、黒斑病のサツマイモのイポメアマロンなどが詳しくしらべられている。

(a) リモノイド



この他、Deoxylimonin, Deacetylnomilin, Limonexic acid などの C₂₆トリテルペン類とともにクレブフルーツ、ナツミカン、ハッサク、ネーブル、カボス、ナツダイダイなどミカン属の苦味成分(リモノイド)である。含量は僅少。

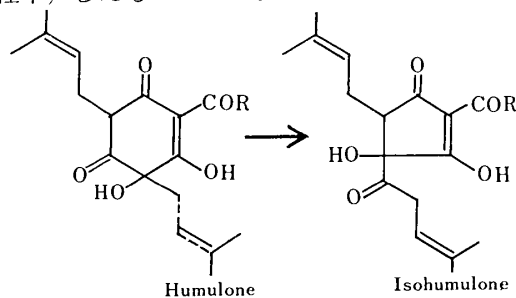
(b) ククルピタシン



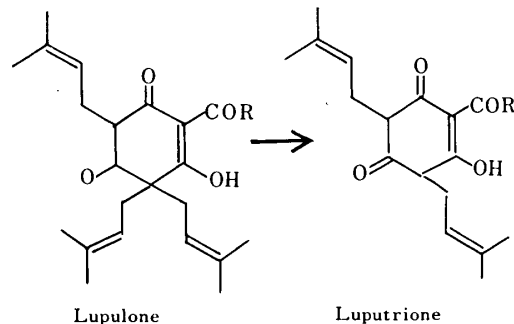
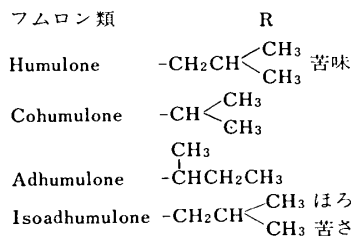
キュウリ、メロン、カボチャなどウリ科植物から、約20種の構造の近縁な C₃₀ または C₃₂ の四環性トリテルペン類であるククルピタシンが苦味成分として見出されている。

(c) フムロン、ルブロン

ビールの苦味成分として32種の化合物が知られている。これらはホップ雌花の苦味成分が二次的に変化生成(発酵過程中)したものである。

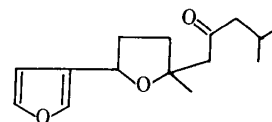


フムロン類



(d) イポメアマロン

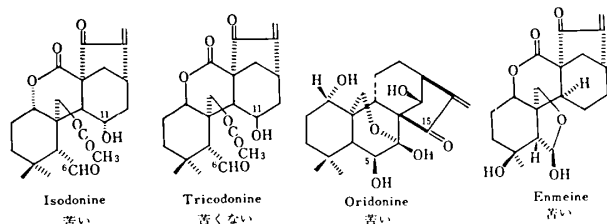
黒斑病に侵されたサツマイモの苦味はイポメアマロンによる。樋浦(1939)発見、久保田ら(1956)構造決定



Ipomeamarone

(e) テルペンの苦味と化学構造

久保田ら (1969) は、ヤマハツカ属の苦味テルペンと化学構造との関係について興味ある説を出した。それは、一つの分子中にプロトン供与基 DH とプロトン受容基 A が、分子内水素結合が形成可能な距離 $1.5 \text{ \AA}$ 以内に位置していることが苦味発現に必要な構造単位である。苦味物質分子内に先ず水素結合が存在し、これが苦味応答に際して開裂して受容器との間に分子間水素結合を形成するのである。この構造単位は多くの苦味テルペンに殆んど例外なく存在するという。

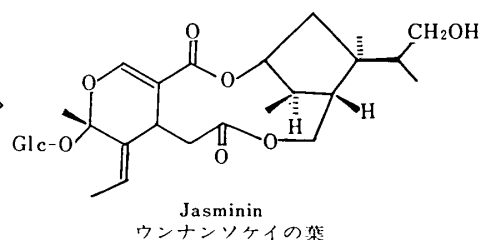
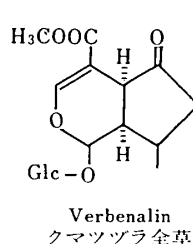
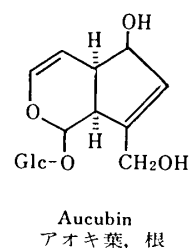
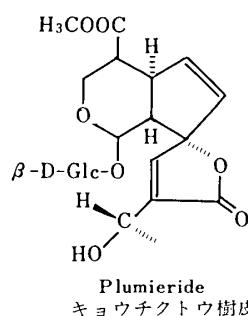
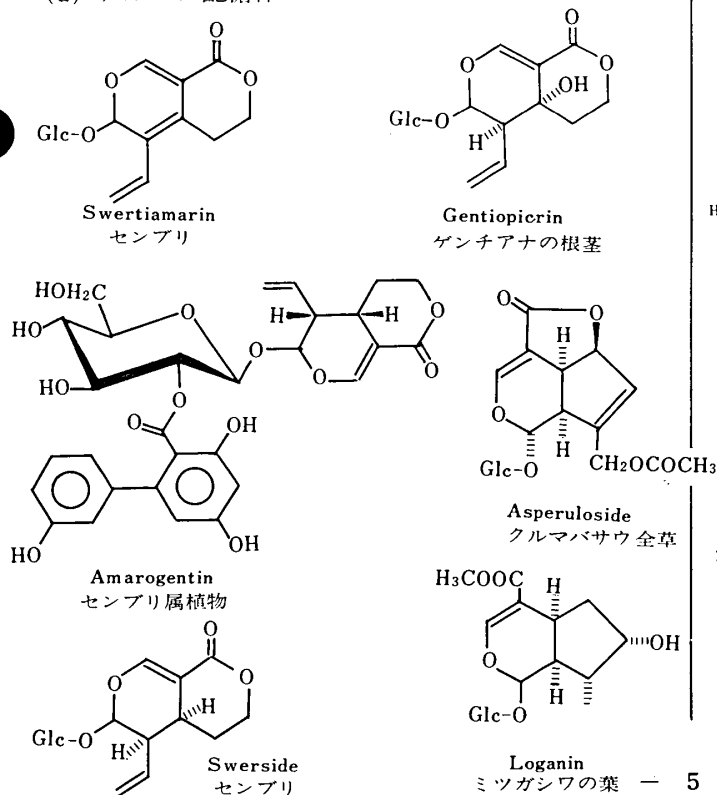


久保田らは、イソドニン、トリコドニン、オリドニンのようなカウラン骨格をもつもの、またそのセコ形に相当するエンメインなど多数の誘導体について詳しく検討した結果、 DH としては OH , $CHOCOCH_3$, $CHCOOCH_3$, $CHCO$, A としては CH_2O , CO , $COOH$, $COOCH_3$, $OCOCH_3$, $C=C-O-$ の存在を認め、 $DH \cdots A$ 間の距離が $1.5 \text{ \AA}$ 以内の場合は例外なく苦味をもつと主張した。

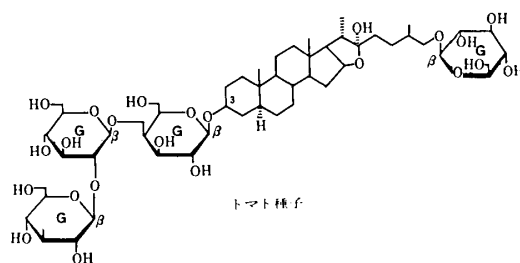
(3) 苦味配糖体

単糖、オリゴ糖は甘味を呈するが、 β -D-マンノース、ゲンチオビオース、レボグルコサン、メチル- β -D-グルコピラノシドなどは苦味かあるいは甘味のあとに苦味を残す。多くの苦味配糖体が単離されている。

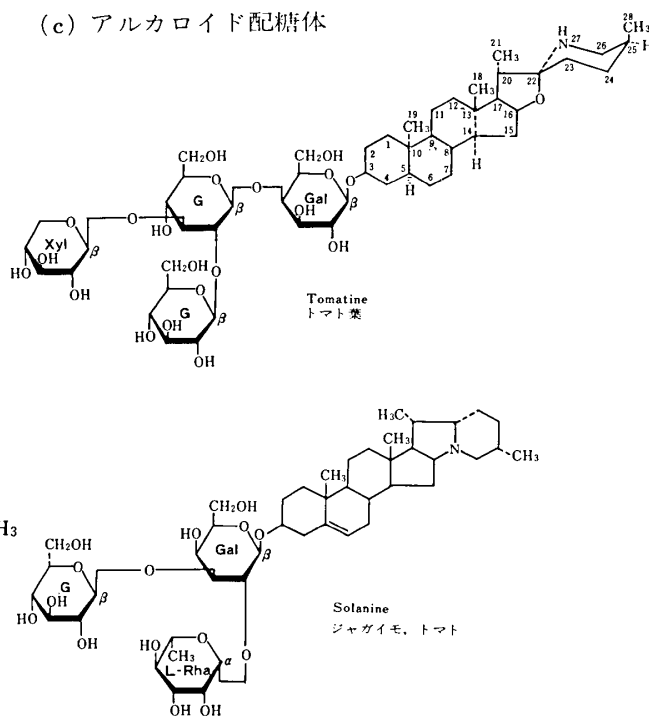
(a) テルペン配糖体



(b) サポニン配糖体



(c) アルカロイド配糖体



(以下次号)

尿中の薬毒物の分析 (XIV)

科学警察研究所 法科学第一部長 医学博士 丹羽 口 徹 吉

C) 尿中メタンフェタミンの確認

覚せい剤メタンフェタミン服用者発見の一手段として、尿中に排泄される未変化のメタンフェタミンを確認することがその代謝、排泄の面からみて妥当であること、またそのための前段階の検査としては、尿からの抽出物あるいは Amberlite XAD-2, Extrelut などを用いた前処理物について TLC ならびに GC を行うのが有用であることは先述したとおりである。^{183,184)}

確認の方法としては、尿抽出物あるいは前処理物を精製し、得られたものについて赤外吸収スペクトル (IR) の測定、質量分析 (MS) またはガスクロマトグラフ・質量分析 (GC・MS) などの機器分析を行う。ただし、GC・MS の場合は、抽出物などについて後述するような誘導体作製の操作を施し、直接装置に注入することができる。

C-1) 機器分析用試料の調製

GC・MS 以外の機器分析を行うには、尿からの抽出物または尿を前処理した物について preparative TLC を繰返し、目的物を精製する必要がある。IR 測定には、目的物を精製して塩酸塩としたものを用いるか、もしくはピクリン酸塩、塩化白金酸塩またはライネッケ塩などを作製して分離精製し、これらの複塩についてそのまま IR を測定して確認することもできる。

C-2) IR 測定

通常目的物の塩酸塩または複塩についてマイクロ臭化カリウム錠剤を作製し、顕微付属装置を用いて IR を測定する。しかし塩酸塩を用いて臭化カリウム錠剤を作製する場合は、塩酸塩と臭化カリウム末とを混合中、塩酸塩が徐々に臭化水素酸塩に変化し、長時間混合を続けると完全に後者の塩になる。その結果、IR における吸収ピークの波長は段階的にシフトすることがある。特に 1400~1600 cm^{-1} 付近、2400~3200 cm^{-1} の吸収ピークに明らかなシフトが見られ、相対強度の変化も認められる。前述したような目的物の複塩を用いて臭化カリウム錠剤を作製した場合、あるいは目的物の塩酸塩を用いて塩化ナトリウム錠剤を作製した場合には、IR にこのようなシフトは認められない。一般にエフェドリンを含むメタンフェタミン関連化合物の塩酸塩では臭化カリウム錠剤作製時に同様な変化を起こすことが明らかにされている。¹⁸⁵⁾

C-3) MS

メタンフェタミン及びその関連化合物は、電子衝撃イオン化 (EI) による MS において、極めてベンジル位における開裂 (β -開裂) を起こし易く、そのために普

通の条件下では分子イオンピーク (M^+) が全く表われな

いか、または表われ難い。この系の化合物の一般的な開裂様式は Fig. 1 に示すとおりであって、シフトテクニックを用いれば代謝物などの未知試料を容易に同定すること

ができる。また多くの化合物のベースピークは β -開裂の結果生じた側鎖部のフラグメント (B) である。

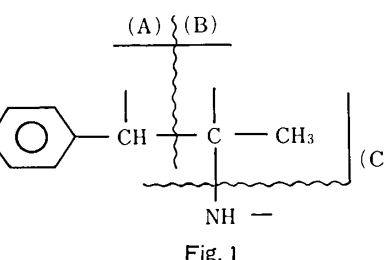


Fig. 1

M^+ を明らかにするための一方法としては、GC における場合と同様、目的物を誘導体として MS を測定することである。例えばトリフロロ無水酢酸 (TFA) を用いて TFA 化体としたもの、ヘキサメチルジシラザンやトリメチルクロロシランなどを用いてトリメチルシリル (TMS) 化体としたものなどを作製して測定用試料とする。このような処理は GC・MS の際にも必要な操作である。最近では、誘導体の安定性が高く、GC の固定相に対して吸着性が少なく、しかも誘導体を容易に作製することができるような種々の誘導体作製用の試薬が開発され、比較検討されている。^{186~188)} このようにしてこの系の化合物の誘導体を作製して EIMS を測定すれば、それぞれの M^+ を確認することができるが、それでも β -開裂が強いので、 M^+ の相対強度は 2~3% であるものが多い。¹⁸⁹⁾

次にメタンフェタミン及びその関連化合物について汎用される方法は、化学イオン化 (CI) による MS である。

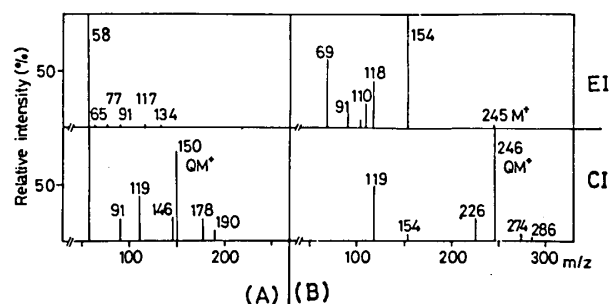


Fig. 2 Mass spectra of methamphetamine (A) and its trifluoroacetylated derivative (B)

メタンまたはイソブタンを反応ガスとして用い、CIMSを行うと、いずれの化合物も明確な擬分子イオンピーク(QM⁺)を示す。メタンフェタミン及びその関連化合物の尿中に排泄される代謝物の確認同定、あるいは関連化合物の混合物中の各成分の確認同定にCIMSを用いて好結果が得られた例が報告されている。¹⁹⁰⁻¹⁹³⁾ Fig. 2にメタンフェタミン及びそのTFA化体のEIMSとCIMSのスペクトルを示す。

GC・MSを行う場合には、前述したように誘導体を作製する必要がある。例えば最も一般的なTFA化体を作製するには、尿の抽出物または樹脂などを用いて前処理した物を少量の酢酸エチルに溶かし、同容のTFAを加えて55°で20分間加熱したのち、溶媒を減圧下で留去し、得られた残留物を少量の酢酸エチルに溶かし、その一部をとってGC・MSの試料とする。¹⁹³⁾

また尿の抽出物などをそのままGC・CIMSの試料とすることもできる。

GC・MSあるいはGC・CIMSによって尿中に排泄される覚せい剤、その関連化合物及びそれらの代謝物を確認する方法は、裁判化学の分野ばかりでなく、ドーピングテストなどの分野でも古くから検討され、広く利用されている。¹⁹⁴⁻¹⁹⁶⁾

また密売されているメタンフェタミン中に含まれている微量の各種不純物を、GC・MSでそれぞれ同定確認し、その密造方法を考察した例もある。¹⁹⁷⁾

最近、マスフラグメントグラフィ(MF)の方法を、メタンフェタミンやアンフェタミンなどの分析に応用した例が報告されている。本法によればこれらの化合物の検出感度は20pgであり、また内部標準物質として重水素置換体¹⁹⁸⁾あるいは3-フェニル-1-プロピルアミン(TFA化体)を用い、ngレベルの定量が可能であると報告されている。¹⁹⁹⁾ また実際にヒト血液中、尿中、各種組織中及び腐敗した生体試料中から覚せい剤を抽出し、MFによってその含量を測定し、好結果を得ている。^{199,200)}

d) その他の試料中のメタンフェタミンの確認、定量

尿中の薬毒物ではないが、現在日本を初め諸外国で社会問題となっている覚せい剤については次のようなことがあげられる。現在日本で密売買されている覚せい剤のほとんどはメタンフェタミンであり、粉末であることが多い。粉末以外の試料としては、使い残しの注射器、針、あるいは薬包紙などがある。粉末試料の場合には、密造品であるため精製不良で原料や反応中間体を含むもの、あるいは故意に増量の目的で白色粉末の医薬品や、その他種々のものを混入した例がある。従ってこれらはTLCなどによって予備的に試験を行ったのち、目的物を分離して尿の場合と同様機器分析などによって確認する。また、他の試料の場合は試料の量にもよるが、できればTLC, GCを行い、更に機器分析によって確認する。

覚せい剤及びその関連化合物の定量分析は、一般的にはGCによるが、^{201,202)} 超微量の場合には前述したMFを行う。また、特殊な方法としては、核磁気共鳴(NMR)

においてユーロピウムジピバロイルメタンなどのシフト試薬を用い、NMR-シフト法によって定量する方法についても検討されている。²⁰³⁾

目的物を7-クロロ-4-ニトロベンゾ-2-オクソ-1,3-ジアゾール(NBD-Cl)と反応させて蛍光を発する化合物とし、TLCを行ってクロマトグラム上のスポットの蛍光強度を直接測定して定量する方法が報告されている。²⁰⁴⁻²⁰⁶⁾ アンフェタミンの場合は1級アミンの試薬フルオレスカミンと反応させてTLCを行い、同様に定量することもできる。²⁰⁷⁾

文 献

- 183) 丹羽口：本誌，89，1553 (1978)。
- 184) 丹羽口：本誌，95，1674 (1980)。
- 185) 岸，丹羽口，西田：科警研報告，31，162 (1978)。
- 186) J. D. Nicholson：Analyst，103，1 (1978)。
- 187) J. D. Nicholson：Analyst，103，193 (1978)。
- 188) 南原，後藤：分析化学，23，704 (1974)。
- 189) 丹羽口，井上，坂井，中原：医用マス研究会講演集，4，75 (1979)。
- 190) 坂井，丹羽口，丹羽瀬，山内：第9回有機化合物のマススペクトロメトリ-討論会講演予稿集，43 (1974)。
- 191) 丹羽瀬，坂井，丹羽口：科警研報告，29，171 (1976)。
- 192) 丹羽瀬，坂井，丹羽口：科警研報告，29，176 (1976)。
- 193) 井上，丹羽口，丹羽瀬，松村：科警研報告，31，261 (1978)。
- 194) A. H. Beckett, G. T. Tucker, A. C. Moffat：J. Pharm. Pharmac., 19, 273 (1967)。
- 195) G. Döring, J. Marsel, G. Remberg, G. Spiteller：Z. Rechtsmedizin, 71, 274 (1973)。
- 196) K. Kamei, M. Murata, K. Ishii, M. Namekata, A. Momose：Chem. Pharm. Bull., 21, 1996 (1973)。
- 197) T. C. Kram, A. V. Kruegel：J. Forensic Sci., 22, 40 (1977)。
- 198) A. K. Cho, B. Lindeke, B. J. Hodshon, D. J. Jenden：Anal. Chem., 45, 570 (1973)。
- 199) 永田，原，影浦，十時，高本：日法医誌，31，146 (1977)。
- 200) 永田，原，影浦：医用マス研究会講演集，4，95 (1979)。
- 201) 丹羽瀬：衛生化学，22，181 (1976)。
- 202) 丹羽瀬：衛生化学，23，171 (1977)。
- 203) 中原，丹羽口：科警研報告，31，267 (1978)。
- 204) J. F. Lawrence, R. W. Frei：Anal. Chem., 44, 2046 (1972)。
- 205) F. Van Hoof, A. Hyndrickx：Anal. Chem., 46, 286 (1974)。
- 206) H. J. Klimisch, L. Stadler：J. Chromatogr., 90, 141 (1974)。
- 207) J. Sherma, M. F. Dobbins, J. C. Touchstone：J. Chromatogr. Science, 12, 300 (1974)。

シダ植物の栄養葉と胞子葉の成分研究 その2

— ヤマドリゼンマイの栄養葉から得られる

新 flavonol glycoside の構造 —

明治薬科大学 助教授 薬学博士 奥 山 徹

前報では、ゼンマイとヤマドリゼンマイの栄養葉と胞子葉の成分をシリカゲル TLC 上での比較検討を行うと共に数種の化学物を単離しその構造を明らかにした。今回は、ヤマドリゼンマイ *Osmunda asiatica* Ohwi (Osmundaceae) の新鮮な栄養葉から asiaticalin と名付けた新 flavonol glycoside を単離しその構造研究を行った。^{1,2)}

asiaticalin (I) は mp182—184°, 分子組成 C₂₁H₂₀O₁₁ を持ち、フラボノイドの呈色反応であるマグネシウム—塩酸反応ならびに塩化第二鉄反応が陽性の化合物である。

asiaticalin (I) は 267nm と 352nm に吸収極大を持つ UV 吸収スペクトルならびにその IR 吸収スペクトルが同じ原料から別に単離した kaempferol (II) や astragalin (=kaempferol 3-glucoside) のそれらと非常によく似ている。

asiaticalin (I) の ¹H-NMR スペクトルにおいて、糖部の C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6'' に結合した 6 個分の

水素が 3.2—3.9ppm にかなり複雑なシグナルとして認められ、重水素を添加することにより消失する。3.9—5.1ppm に認められるシグナルは糖に結合した 4 つの水酸基 (1 級水酸基 1 個, 2 級水酸基 3 個を decoupling 方式により確認) に帰属される。重水素添加によって変化しなかった 5.68ppm (1Hd, J=8.0 Hz) のシグナルはアノメリックプロトンに帰属される。芳香環領域において、6.12ppm と 6.42ppm (each 1Hd, J=2.0 Hz) に認められる 1 対のシグナルは A 環の C-6' 位と C-8' 位に帰属され、6.86ppm と 8.08ppm (each 2Hd, J=9.0 Hz) の 1 対のシグナル (A₂B₂タイプ) は C-4' 位に水酸基を持つ B 環上の C-3' 位と C-5' 位および C-2' 位と C-6' 位とにそれぞれ帰属される (Table 1)。

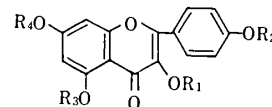


Table I NMR Signals of the Asiaticalin and the Related Compounds
(in C₅D₅N and DMSO-d₆, ppm from TMS)

Compounds	Solvents	2 ¹ -H 6 ¹ -H	3 ¹ -H 5 ¹ -H	6-H	8-H	Anomeric-H	-OCH ₃
I : R ₁ =C ₆ H ₁₁ O ₅ R ₂ =R ₃ =R ₄ =H (Asiaticalin)	C ₅ D ₅ N	8.46 ^{a)}	7.22 ^{a)}	6.62 ^{b)}	6.74 ^{b)}	6.36 ^{d)}	-----
	DMSO-d ₆	8.08 ^{a)}	6.86 ^{a)}	6.12 ^{b)}	6.42 ^{b)}	5.68 ^{d)}	-----
II : R ₁ =Glucose R ₂ =R ₃ =R ₄ =H (Astragalin)	C ₅ D ₅ N	8.44 ^{a)}	7.24 ^{a)}	6.74 ^{b)}	6.74 ^{b)}	6.34 ^{d)}	-----
	DMSO-d ₆	8.03 ^{a)}	6.91 ^{a)}	6.25 ^{b)}	6.47 ^{b)}	5.53 ^{d)}	-----
III : R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =H (Kaempferol)	C ₅ D ₅ N	8.48 ^{a)}	7.24 ^{a)}	6.66 ^{b)}	6.76 ^{b)}	-----	-----
	DMSO-d ₆	8.03 ^{a)}	6.96 ^{a)}	6.23 ^{b)}	6.47 ^{b)}	-----	-----
IV : R ₁ =C ₆ H ₁₁ O ₅ R ₂ =R ₃ =H R ₄ =CH ₃	C ₅ D ₅ N	8.46 ^{a)}	7.24 ^{a)}	6.48 ^{b)}	6.58 ^{b)}	6.36 ^{d)}	3.82
	DMSO-d ₆	8.10 ^{a)}	6.88 ^{a)}	6.36 ^{b)}	6.72 ^{b)}	5.68 ^{d)}	3.84
V : R ₁ =C ₆ H ₁₁ O ₅ R ₃ =H R ₂ =R ₄ =CH ₃	C ₅ D ₅ N	8.55 ^{a)}	7.23 ^{a)}	6.65 ^{b)}	6.72 ^{b)}	6.63 ^{d)}	3.80, 3.87
	DMSO-d ₆	8.20 ^{a)}	7.04 ^{a)}	6.34 ^{b)}	6.70 ^{b)}	5.66 ^{d)}	3.78
VI : R ₁ =C ₆ H ₁₁ O ₅ R ₂ =R ₃ =R ₄ =CH ₃	C ₅ D ₅ N	8.58 ^{a)}	7.30 ^{a)}	6.58 ^{b)}	6.78 ^{b)}	6.18 ^{d)}	3.90
	DMSO-d ₆	8.16 ^{a)}	7.06 ^{a)}	6.50 ^{b)}	6.78 ^{b)}	5.44 ^{d)}	3.80, 3.90

a) doublets (J=9 Hz), b) doublets (J=2 Hz), c) singlet, d) doublets (J=8 Hz), e) doublets (J=6 Hz)

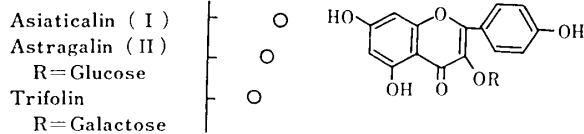
Asiaticalin (I)

mp 182-184° (from MeOH)

Colour reactions Mg-HCl: +, FeCl₃: +Anal. Calcd: C₂₁H₂₀O₁₁UV λ_{max}^{MeOH} nm: 267, 352IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3340, 1655, 1608

MS: m/e: 286 (base peak)

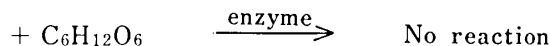
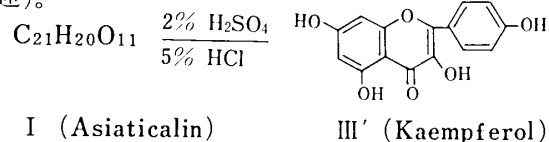
NMR (DMSO-d₆): 3.2-3.9 (6H), 3.9-5.1 (4H),
 5.68 (1H d, J=8), 6.12 (1H d, J=2),
 6.42 (1H d, J=2), 6.86 (2H d, J=9),
 8.08 (2H d, J=9)

TLC: developing system (CHCl₃: MeOH=4:1)

asiaticalin (I) は astragalin (II) と似た化合物であらうと思われるので TLC 上で I, II ならびに trifolin (=kaempferol-3-galactose) と比較した所右のような図で表わす事ができた。

つぎに I を 2% H₂SO₄ で処理することにより、非糖体 (III') と糖体を得る。III' は kaempferol の標品との混融

試験で融点降下を示さず、UV, IR, ¹H-NMR および ¹³C-NMR の各スペクトル (Table I, II, III を参照) ならびに TLC 上での知見も全く一致した事から、III' を kaempferol (III) と同定した。一方の糖部は常法に従い処理後 PPC GC を用い標品の糖と比較した (詳細については後述)。



Tollens reagent: +

Fehling solution: +

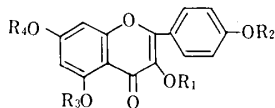
PPC developing system

AcOEt-py. -H₂O (12:5:4)n-BuOH-py. -H₂O (6:4:3)phenol-H₂O (5:1)

GC TMS imidazol/py.

NaBH₄→Ac₂O/py.

また asiaticalin (I) の UV スペクトル (Table I.) において、ナトリウムメチラートの添加により長波長側の吸収極大が、さらに酢酸ソーダ添加、ならびに酢酸ソ

Table II UV Spectral Data of the Asiaticalin and the Related Compounds (λ_{max}, nm)

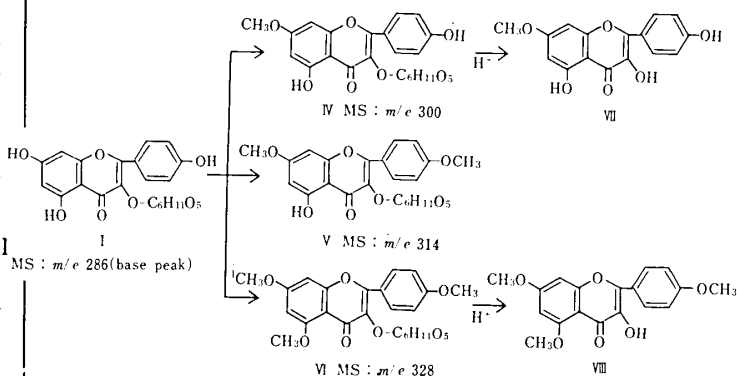
	I: R ₁ =C ₆ H ₁₁ O ₅ R ₂ =R ₃ =R ₄ =H (Asiaticalin)	II: R ₁ =Glucose R ₂ =R ₃ =R ₄ =H (Astragalin)	III': R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =H (Kaempferol)	IV: R ₁ =C ₆ H ₁₁ O ₅ R ₂ =R ₃ =H R ₄ =CH ₃	V: R ₁ =C ₆ H ₁₁ O ₅ R ₃ =H R ₂ =R ₄ =CH ₃	VI: R ₁ =C ₆ H ₁₁ O ₅ R ₂ =R ₃ =R ₄ =CH ₃
a	267 352	271 354	268 368	267 352	266 344	262 335
b	275 326 402	281 333 408	280 415	274 392	282 376	263 335
c	274 301 352 398	279 310 356 404	271 356 425	274 304 353 400	274 303 348 394	267 301 334 416
d	276 303 347 400	279 307 351 403	271 353 424	276 303 348 398	276 301 343 394	265 300 330 414
e	275 305 372	277 309 379	275 380	267 299 354	266 344	262 335
f	266 300 353	262 358	269 368	266 300 352	266 344	262 334

a: MeOH, b: a+NaOMe, c: a+AlCl₃, d: a+AlCl₃+HCl, e: a+NaOAc, f: a+NaOAc+H₃BO₄

ーダの存在下三フッ化ホウ素の添加によって短波長側の吸収極大が深色効果を示すことから、4'位、5'位および7位の水酸基は置換されていない事を示す (Table II.)。

この事はさらにつぎの事実からも支持される。すなわち、I を氷室中ジアゾメタンを用いてメチル化を行ったところ、chart に示すように対応するメチル化体 (IV, mp 212-214°, V, mp 230-231°, VI, 212-214°) を得た。つぎに IV と VI を 2% H₂SO₄ を用いて加水分解し、前者から 7-monomethyl kaempferol (VII), 後者から 4',5',7-trimethyl kaempferol (VIII) とに誘導し、VII と VIII は標品のそれらと直接比較することにより同定した。IV, V, VI の構造確認は UV, NMR, MS スペクトルなどから容易に行われた (Table I, II)。

以上の事を考え併せると asiaticalin (I) は kaempferol



(II) の3位の水酸基に糖が結合していることになる。

つぎに、Iの各メチル化体(IV, V, VI)ならびにその関連化合物のDMSO- d_6 中での ^1H -NMRスペクトルデータで anomeric proton と糖の OH 基の水素に基づくシグナルのうち、anomeric proton に基づくシグナルは

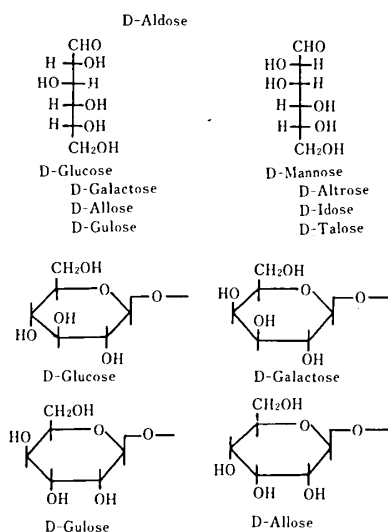
$J = 6 \sim J = 8 \text{ Hz}$ の範囲内に認められている。つぎに、triplet 1個と doublet 3個分のシグナルはいずれも D_2O を添加することにより消失することから、1級水酸基が1個、2級水酸基が3個存在しているものと思われる(Table III.)。

Table III. Chemical shifts of the coupling constants of the anomeric proton and the OH protons of sugar (in DMSO- d_6 , ppm from TMS, $J=\text{Hz}$)

	anomeric proton	OH signals of sugar				
IV : 7-mono-O-methylasiaticalin	5.68 d, $J=8$	4.14 t, $J=4.5$	4.56 d, $J=6.5$	4.92 d, $J=4$	5.06 d, $J=6.5$	
V : 4',7-di-O-methylasiaticalin	5.66 d, $J=8$	4.12 t, $J=4.5$	4.52 d, $J=6.5$	4.86 d, $J=4$	5.00 d, $J=6.5$	
VI : 4',5,7-tri-O-methylasiaticalin	5.44 d, $J=8$	4.23 t, $J=4.5$	4.64 d, $J=6.5$	4.98 d, $J=4$	5.62 d, $J=4$	
IX : 7-mono-O-methylastragalin	5.54 d, $J=6$	4.34 t, $J=5.5$	5.02 d, $J=4$	5.13 d, $J=4$	5.40 d, $J=4$	
X : 4',7-di-O-methylastragalin	5.60 d, $J=6$	4.22 t, $J=5.5$	5.08 d, $J=4$	5.19 d, $J=4$	5.45 d, $J=4$	
XI : 3',4',5,7-tetra-O-methylhyperin	5.42 d, $J=7.5$	4.58 d, $J=4$	4.59 t, $J=4.5$	4.94 d, $J=6$	5.36 d, $J=4$	d : doublet t : triplet

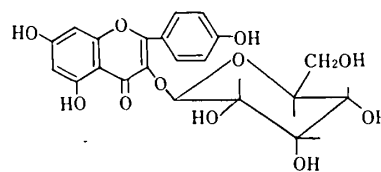
ここで、Lemieux ら³⁾は糖の ^1H -NMR スペクトルで anomeric proton の J_{vic} は 1,2-diaxal の関係にあれば 5-8 Hz, gaush の関係にあれば 2.5-3.2 Hz であるとしているが, asiaticalin (I) およびそのメトキシル体(IV, V, VI)の anomeric proton が $J=8 \text{ Hz}$ であることから, asiaticalin (I) の糖の 1' 位と 2' 位の水素は 1,2-diaxal, いわゆる β -結合という事になる。

さて D-aldose には 8 種の糖 (D-glucose, D-galactose, D-allose, D-gulose, D-mannose, D-altrose, D-idose, D-talose) が知られている。1' 位と 2' 位の水素が 1,2-diaxal の関係にあるという事実から D-glucose タイプ (D-glucose, D-galactose, D-allose, D-gulose) ということになる。



そこで先に asiaticalin (I) を 2% H_2SO_4 で加水分解を行った際に得た糖部について、常法に従い処理後 PPC, GC, ならびに糖分析を用いて標品と比較検討を行った。先に述べた理由から 4 種の D-allose が考えられ、このうち D-glucose, D-galactose であれば astragalin (kaempferol-3-glucoside) か trifolin (kaempferol-3-galactoside) という事になる。残る可能性の D-gulose⁴⁾ と D-allose⁵⁾ と直接比較し, asiaticalin (I) の糖を D-allose と同定することができた。

以上述べた諸事実から考えて asiaticalin (I) は kaempferol-3-alloside という事になり、その式は I 式で現わされると結論した。



NMR (in DMSO- d_6)

I : anomeric proton 5.68 ppm ($J=8 \text{ Hz}$)

R. U. Remiux, et al., J. Am. Chem. Soc., 80, 6098 (1958).

anomeric proton (J_{vic})

1,2-diaxial..... 5-8 Hz

gaush..... 2.5-3.2 Hz

つぎに asiaticalin (I) の ^{13}C -NMR スペクトルを検討した。asiaticalin (I) は kaempferol 骨格を有していることから、flavonol 骨格は kaempferol (II) と、糖の部分は II の C-3 位に glucose, galactose, rhamnose が結合した astragalin (III), trifolin (IX), afzelin (X) の

Table IV. Carbon-13 Chemical Shifts in DMSO-d₆

Carbon	Aglycone moiety			II	Carbon	Sugar moiety	
	I	X	XI			I	X
2	156.5	159.3	157.3	146.1	1"	99.9	100.7
3	133.7	132.7	134.4	135.5	2"	71.6	74.2
4	177.6	176.7	177.6	175.7	3"	71.6	77.3
5	156.5	155.8	156.5	156.0	4"	67.2	69.8
6	98.9	98.4	98.9	98.2	5"	75.1	76.4
7	164.3	163.4	164.3	163.8	6"	61.3	60.8
8	93.8	93.4	93.9	93.4			
9	161.3	160.6	161.3	160.5			
10	104.1	103.7	104.2	102.9			
1'	121.0	120.6	120.5	121.6			
2'	131.3	130.5	130.7	129.3			
3'	115.3	114.8	115.5	115.3			
4'	160.0	160.6	160.0	159.0			
5'	115.3	114.8	115.5	115.3			
6'	131.1	130.5	130.7	129.3			

それらと比較することによりすべての炭素が帰属できるものと考え、各化合物のスペクトルの帰属を明らかにするために完全デカップリングと不完全デカップリングを併用した (Table IV)。まず kaempferol (II) は B. Ternal と K. Markham⁶⁾ の方法に従いすべての炭素を帰属した。asiaticalin (I) の kaempferol 骨格に相当する領域 (ca. 95-180ppm) のケミカルシフトならびにその分裂様式は astragalin (III), trifolin (IX) および afzelin (X) 同様 kaempferol (II) のそれらとよく似ている。ただ C-3 位に結合する糖の種類により C-2 位 (0.05-9.74ppm) と C-3 位 (0.36-0.99ppm), 中でも C-2 炭素のシグナルに特に変化が認められる。一方, Ca. 61-100ppm 中のシグナルは各化合物ともかなりの差が観察される。この中で C-1", C-5", C-6" 位のシグナルは astragalin (III) と trifolin (IX) のそれらとほぼ同じケミカルシフト値を持つものと予想される。事実, anomeric proton の付く炭素は最も低磁場側に現われることから 99.9 ppm のシグナルを C-1" に最も高磁場の 61.3ppm のシグナルは off resonance (三重線) の結果と考え併せ C-6" 位に, 75.1ppm のシグナルはケミカルシフト値から C-5" 位にそれぞれ帰属できた。さてここで未だ帰属されていない炭素は C-2",

C-3", C-4" 位ということになる。この中で C-4" 位の炭素は astragalin (III) と trifolin (IX) の場合と同様 C-2" 位と C-3" 位よりも高磁場側で観察されるものとすれば, 67.2 ppm のシグナルを C-4" 位に, 71.6ppm の炭素 2 個分のシグナルを C-2" 位と C-3" 位に帰属すれば無理なく説明できる (Table IV)。

asiaticalin (I) は flavonoid の alloside として天然界から単離された初めての例である。

文 献

- 1) K. Koyama, F. Fuke (née Sato), J. Kimura, and T. Okuyama, *Shoyakugaku Zasshi*, **32**, 126 (1978).
- 2) T. Okuyama, K. Hosoyama, Y. Hiraga, G. Kurono, and T. Take-moto, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3071 (1978).
- 3) R. U. Lemieux, R. K. Kulling, H. J. Bernstein, W. G. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6098 (1958).
- 4) T. Osawa and S. Akiya, *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*, **8**, 299 (1961).
- 5) J. D. Stevens, "Methods in Carbohydrate Chemistry," Academic Press, VI, 1976, P.123.
- 6) B. Ternal and K. R. Markham, *Tetrahedron*, **32**, 565 (1976).

ルシフェリン・ルシフェラーゼ発光反応による受光 (II)

東京大学医学部講師 理学博士 大澤 一 爽

単一光子と波高分布

LL+ATPの1:1の化学量論を持つ分子反応⁽¹⁰⁾から、 $h\nu$ の単一光子が出ることを電気現象として観察するために、単一光子が持つエネルギーを、電子エネルギーeVに変換させて計測する必要が生じる。単一光子を波形に表現するためには、電磁波の光を粒子的に捉らえて、二次電子線という電気に近似させて考えるのが最も表現しやすい方法である。⁽¹¹⁾一光子とsingle photon eventの関係を模して描出すると図1のように 2.99×10^8 m/secの速度をもつ $h\nu$ が光電子変換面で電子 e^- になり、PMTを出ると時間軸tの上で、二次電子増倍の結果、パルス波高をもつ波形になっている。

光学領域での一般的な表現方法は、単一光子の持つエネルギーとsingle photon eventの波形増巾を説明するのに、タングステン電球の可干渉性のない熱エネルギーを粒子としてみている。タングステン電球の電源を、高電圧から低電圧に変化させると、at randomに発生していた発光数は減少していく。この場合は、バイアルにあるLL+ATP反応のATP濃度と発光数に置き換えても差し支えない。ここで単一光子が加算されて、大きな光子数になることは、確率的にも大変少ないことである。分光学で使用するRollefsonとBurtonによる光エネルギー換算図でみると、LL+ATP反応から発光するジアニオンの黄緑色の発光の565nm付近は、約2.2eV, 52Kcal $\cdot$ mol⁻¹を示している。ここで2~3eVの電子を発生させるような光源とPMTに与えることにより、光源のエネルギーを推定できる。この推定方法を利用して、図5と図3の実験から得られたように、LL発光反応から生じる単一光子 $h\nu$ も2~3eVの一定エネルギーを有していると推定された。それを4図Aのように時間軸t上に一定の長さの一本の直線として示すものとする。発光した多くの光子が全て消滅、減衰されることなく、PMTに到達した光電子増倍され単一波形の出力を出すとすると、図4Aと同じように出力が得られる筈である。ところが全光子がPMTの電子増倍経路を惹起させたのではなく、発生した光子がPMT出力として得られる間には①、空間的に放散し、②、バイアルの壁に吸収、反射され、③、PMT受光面は、限定された面積しかもたず、④、PMTによって光エネルギーが電子エネルギーに変えられる過程でもPMTの増倍感度に達し得ずに消滅してしまう等の種々の減弱消光の要因がある⁽¹⁰⁾。次頁で計算するこの消光要因の理由からsingle photon eventの数は減少して、図4Bのようにある限定された数になる。そのような単発の出力波形も、図2でみられたものと同一波形である。発光数を増加す

ると(図4A'), PMTのsingle photon eventの頻度も増加して至適なパルス計測範囲に入る(図4C)。さらに発光の頻度が大きくなると(図4A''), PMTによるsingle photon eventの頻度も増加してPMTの出力は、図4Dのように直流成分の上に棘波が重畳されるようになる。この直流成分の出現は、発光頻度が大きくなると時間的加算が起ることによって考えられるが、single photon eventの波高それ自体は、不変と考えられる。即ち、発光現象の単一光子による出力、single photon eventの波高値の頻度分布を調べた波高分布図をみると波高頻度が増加してもsingle photon eventの波高値は一定であった。この実験を図5と表1に示したので、図5の横軸と縦軸を説明する。

LL濃度を一定にして、ATP濃度を変化させると光子発光数は濃度に比例して増加する(表1)。図5で顕著なことは、縦軸の発光数が変化しても、single photon eventを示す横軸の波高値は全く変化していない。即ちATP濃度を $10^{-3} \sim 10^{-8}$ g/mlで変化させても、図5の矢印のように波高値を示す山は一ヶ所に固定されている。この結果から、図2に示したsingle photon eventの波形を維持していることが明らかになった。分布確率から起りうると予想される次の2つの事柄も否定されたことになる。その1つは、全く同時に $h\nu$ が2個、受光面に入り、恰も、 $2h\nu$ の如く光子エネルギーを出す確率が、図5の波高分布図から大変に少ないことが証明される。他の一つは、図4のA'とDの現象のように、single photon eventが時間的に重畳されて、直流成分に変化してしまうことであるが、ATP濃度を $10^{-3} \sim 10^{-8}$ g/mlに限定する限り、この測定系光量をPMTは直流成分にせずに計数していることである。以上のように波高分布の波高が一つである(図5)ことは、図4の単一光子によるsingle photon eventの模式図が正しいことを意味する。光子数が増加しても、時間的にはPMTによるsingle photon eventは、同一波高であるから、同一波高を数えることにより波高数を示すことが出来る。図5と表1より、波の数を縦軸に、ATP濃度を横軸に示すと図6を得た。図6の縦軸の波の数を光子数に変換するには、光源から発生する真の発光数を概算しなければならない。

単一光子と光電子数の関係

図7のような幾何学的関係にあるPMT受光面とパルス波高分析器の回路を使用して、発光反応から出る光信号がどこで消滅するかを調べると、光源の真の発光総数 N_0 が概算できる。そこでバイアルの発光源から波高分析計PHA (Camberra 2-1)に至る間で光子数が減少する個所を、

図4のPMT—光電子増倍現象の消光作用で述べたように4つに分けて計算した。

①光源からポリエチレンミニバイアルの壁を通過する時、約50%が吸収されると仮定した。

②点光源として、光子が受光面に入る入射角を図7のようにset upして、 $l=10\text{mm}$, $D=50\text{mm}\phi$ にすると、ラジアン表示による立体角は、

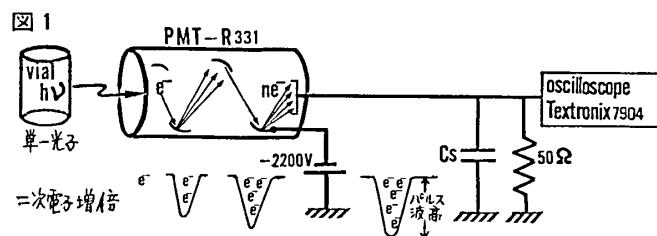
$$\frac{W}{W_0} = \frac{1.257\pi}{4\pi} = 0.314 \text{ となる。}$$

③本実験には、量子効率0.1のR1262×(浜松テレビ)PMTを用いた。LL+ATP発光反応による $h\nu$ の発光スペクトルの波長が 565nm ^{1,2)}と測定されていてもPMTの入射波長の量子効率は最大値でも0.1という小さい値をとる(H TVカタログより)。

④RMTに光子が変換され、電子増倍が起きても全てがsingle photon eventとして導出されず、このPMT収集効率、0.7と計測されている(HTVカタログより)。

この4つの総合効果を考慮すると、出力として得られた波の頻度 N_A から、発光総数 N_0 が計算できる。 $N_0 = N_A / (0.5 \times 0.314 \times 0.1 \times 0.7) = N_A / 0.011$, 故に、ここに用いた系では、single photon event 1個を得るために、バイアル中では約100以上の光子が発生していることが計算で

図 説明文



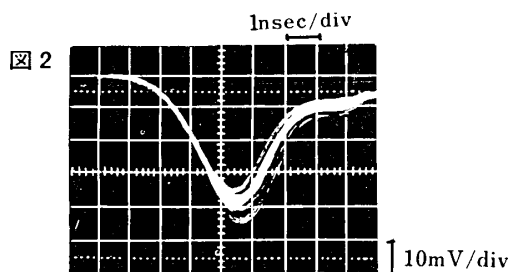
波形観測用回路図, Cs: stray capacity.

PMT: $h\nu$ を平均 10^6 倍の電子に増倍する。PMT出たところで、光子($h\nu$)の波形が負のパルスとなる。

きた。single photon eventに対して、波高値が変化するmulti photon eventsもあり、X線、 γ 線がこれに相当する。放射性同位元素より出る β 線は、0から数100 KeVの広いエネルギーバンドをもっている。例えば、 ^3H は、0~18 KeV, ^{14}C は0~155 KeV, ^{35}S は0~166 KeV, ^{32}P は0~1717 KeVである。LL発光反応から生じる2~3 eVの微弱エネルギーと比較すると β 線の波高値は、おびただしく大きい範囲に亘っている。2~3 eVのsingle photon eventをキャッチするには、液体シンチレーションカウンタと比較して、著しく高感度の受光系を必要とすることは、このエネルギーの差を見ても明らかである。

終りに、現在までに報告されたLL-ATP発光の測定値のdataを表2にまとめた。この中には、単細胞生物や、微生物等のLL-ATP測定応用例^{9,10)}は、含まれていないが、LL発光現象の基本的な $h\nu$ をとらえるPMTが開発され、その測光の基本的な原理が解明されるようになってきた¹⁰⁾。発光反応測定の原理が確立されれば、応用が更に拡大されることが期待される。

謝辞: 本研究の御援助及び議論を頂いている、浜松テレビ技術部、久米英浩氏、袴田敏一氏、アロカ株式会社、荒山寛氏に感謝いたします。



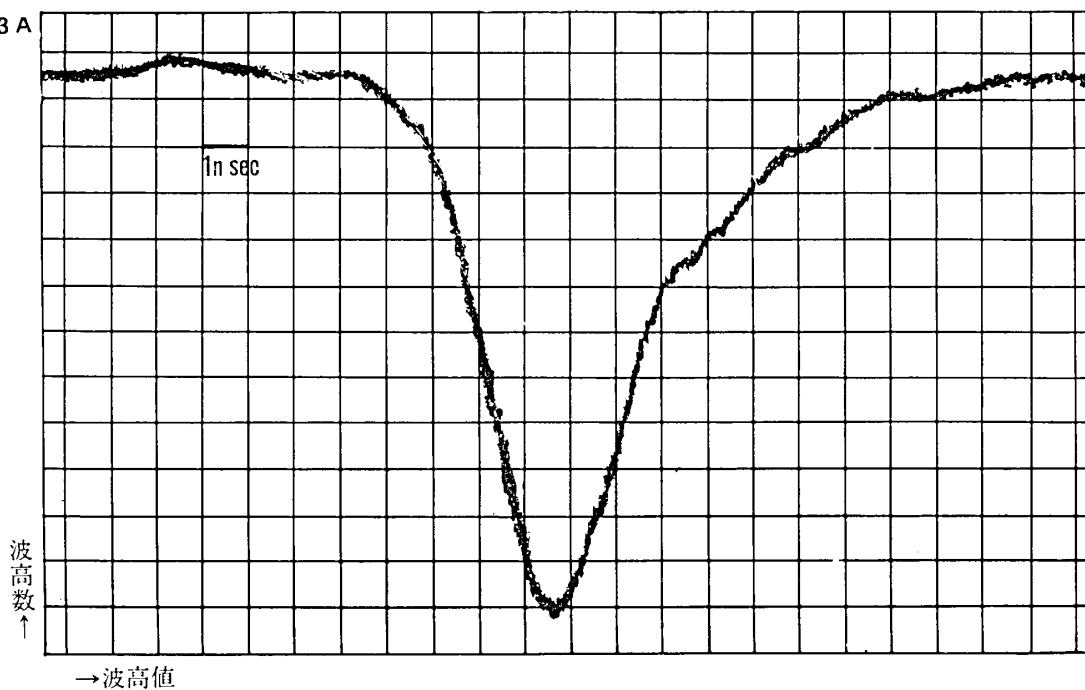
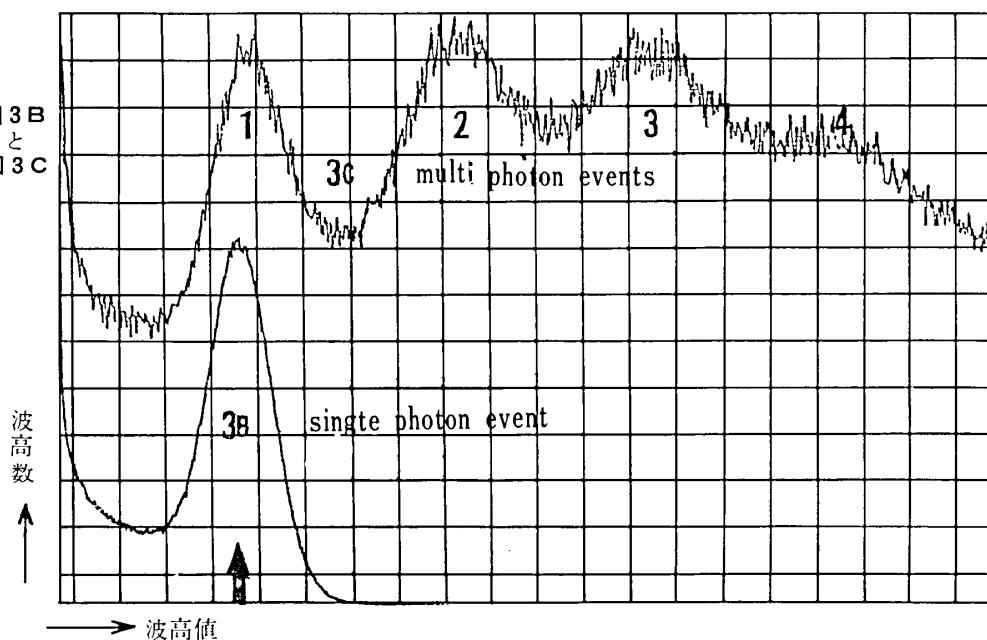
single photon event. PMT: R331, Textronics 7401 oscilloscope 使用、負側にふれるパルスが生じるように回路を組んだ。

ルシフェリン—ルシフェラーゼ (シグマ社製) + ATP 10^{-3}mg/ml 発光反応による発光単位のパルス重畳波形を示し、立上り時間 $\approx 2\text{n sec}$. 下降相 $\approx 3\text{n sec}$ である。PMTの物理的現象としては、立上り、立下りは同じ現象と解釈される。

立上り相は、スムーズに立上って約 2n sec . で頂点に達するが、下降相に小さな山(リンキング)をもっている。リンキングは、受光器と観測計器の雑音であるので、螢の光のもつ光子の情報ではない。雑音の一つにstray capacityがあり、信号伝送線の間に、見かけ上の容量に見合った周波数が入りこむ。下降相に時間がかかることは、測定回路のstray capacity 図1のCsによる影響が大きく、その他、PMTの残光性があることを示すが、この実験では、無視できる範囲を示した。この測光波形を、single photon eventとした。

図 3

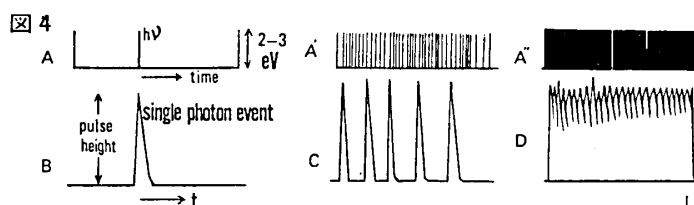
図 3 A

図 3 B
と
図 3 C

レーザーによるPMTの応答波形(図3A)と単一光子によるPMT応答の波高分布(一本矢印)(図3B),及び、光子エネルギー増加によるmulti photon eventsの波高分布(重印)(図3C)。

光源電圧を調節して、単一光子にして、それをPMTで電子増倍させると、図3Aのような波形を得る。これを図2と比較すると類似した波形となっている。さらに単一光子、2光子、3光子、及び4光子の確率を有しているパルス光をPMTに入射させると、PHD(波高分布)

の図3Bと図3Cが得られた。波高分布図3Bより、単一光子から出た波高値は、一つの山しか出現しない(一本矢印)。故にsingle photon eventである証拠となる。光源から出る一光子を増加させ、2光子、3光子、4光子と $h\nu$ のエネルギーを増加させると、波形の波高値は、2倍、4倍と光子数に比例して大きくなる例を、3C図重印で示した。波形の波高が、各々大きくなることを意味し、multi photon eventsとよぶ。



2倍, 3倍, 4倍と一光子と single photon event.

光源 (A, A', A'') は、バイアルの中にある。一光子 $h\nu$ は一定のエネルギーを持って、at randomに発光して、光子数を構成している。バイアルの壁を通過して、PMT 受光面に到達する光子数は減少して、A のようになったとする。

PMTによりその光子の中の単一光子が電子に変換されたとしても、PMT 特性により、さらに電子増倍される確率は減少して、光源の光子数100個 $h\nu$ に対して、1個が発火されるにすぎないことが計算された。PMTが単一光子をキャッチすると、B波形(図2と同じ波形)を生じて、

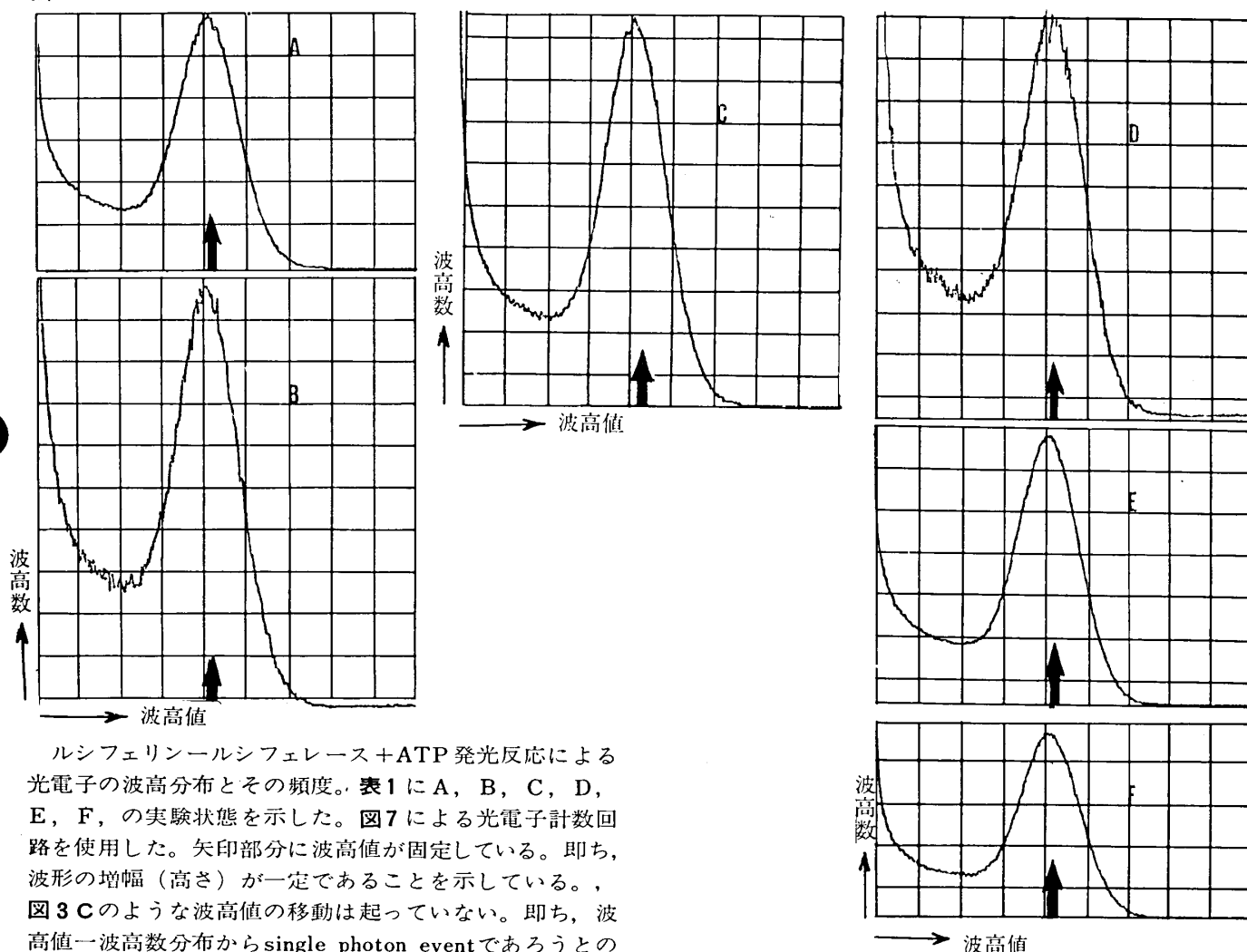
これを single photon event とした。

バイアルから、 10^n 個 ($n \approx 72$) の $h\nu$ が出て (A'), PMTにキャッチさせるとC波形になったとする。この場合、一個のphotonに対するPMTの出力波形は図4Cのように定形ではなく、場合によっては数倍~20倍にふれるために、通常ディスクリミネーターのレベルを広く設定して、PMT出力とするようにしている。このレベル内でのPMT出力を1個の光子から出たものとして数える。

パルス計測とよぶ。バイアルから出る一光子のエネルギーが一定でなく、2倍, 3倍, 数倍のエネルギーをもつとすれば、それをキャッチするPMTのsingle photon eventにも波形が2倍, 3倍, 数倍の増幅があるはずであるが、この現象は出ない(波高分布で説明)。

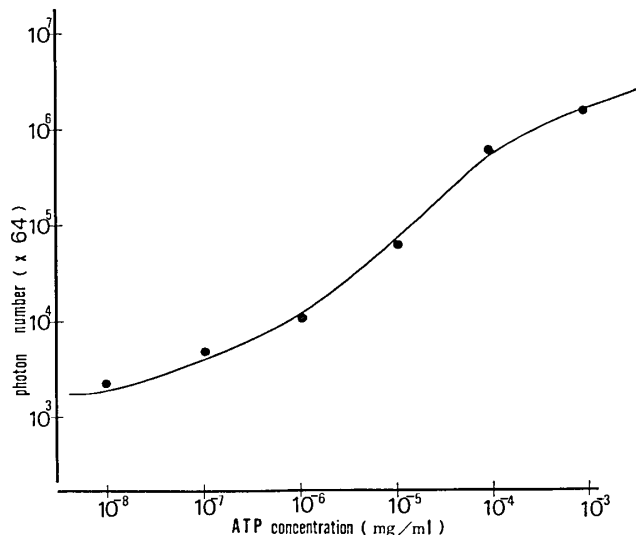
バイアルから 10^n 個 ($n \approx \infty$) の $h\nu$ が無限に近い頻度、で出ると (A''), PMT放電は、D波形の刺状になり、波形は直流領域、又は、DC level up となる。D波形の頂上がゆらいでいるのは、shot noise と呼ばれ、PMT 受光面と PMT 機器の光電子増倍度の誤差による。

図 5



ルシフェリン-ルシフェラーゼ+ATP 発光反応による光電子の波高分布とその頻度。表1にA, B, C, D, E, F, の実験状態を示した。図7による光電子計数回路を使用した。矢印部分に波高値が固定している。即ち、波形の増幅(高さ)が一定であることを示している。、図3Cのような波高値の移動は起っていない。即ち、波高値一波高数分布からsingle photon eventであろうとの一つの証拠となった。

図 6

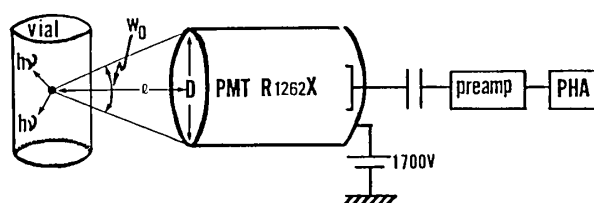


光電子計数。図5の光電子波高とその頻度による光電子数を計測した図で、ATP濃度—光電子数の標準曲線を示した。

表 1

図5	ATP濃度 mg/ml	波 高 /div (横軸) mV	頻 度 /div (縦軸) mV	光電子数 計数/5V CPS	NDフ ィルタ ー	光子数 /200秒
A	10^{-3}	200	200	10^5	10^{-3}	4.853×10^6
B	10^{-4}	200	100	10^4	10^{-3}	5.82×10^5
C	10^{-5}	200	50	10^5	10^{-1}	3.65×10^4
D	10^{-6}	200	100	10^4	10^{-1}	6.26×10^3
E	10^{-7}	200	200	10^5	ナシ	5203
F	10^{-8}	200	200	10^5	ナシ	3413
備考	ルシフェリン濃度は一定にした	1024 channel / 5V				ルシフェリン 0.2ml + ATP 0.2ml 混合による

図 7



光電子計数回路ブロック・ダイアグラムと消光の計算。

N_0 = バイアルの発光源にある光子 $h\nu$ の数。

l = 光源から受光面までの距離 = 10mm。

W_0 = 立体角 = 4π (rad)

D = 受光面の円の直径 = 50mm ϕ

この式からLL+ATPの発光反応による $h\nu$ の数と受光機器の効率が計算された。

文 献

- 1) 後藤俊夫・生物発光, 共立出版, (1975).
- 2) 大沢一爽, 星猛, 化学と生物, 16, 402 (1978).
K.Ohsawa ら, Brain Res., 161, 447 (1979).
- 3) S.Addanki, J.F. Sotos & P.D. Rearick, Anal. Biochem., 14, 261 (1966).
- 4) G.E. Lyman & J.P. DeVincenzo, Anal. Biochem., 21, 435 (1967).
- 5) P.S. Stanley & S.G. Williams. Anal. Biochem., 29, 381(1969). (1969).
- 6) R.A. Johuson, J.G. Hardman, A.E. Broodus & E.W. Sutherlaud, Anal. Biochem., 35, 91 (1970).
- 7) J.B. Gohn, Anal. Biochem., 37, 409 (1970).
- 8) 大沢一爽, 検査と技術. 8, 58 (1980).
- 9) F. Gorus & E. Schram, Clin. Chem., 25, 512 (1979).
- 10) Bioluminescence & Chemiluminescence, in Methods in enzymology 57 (1979).

表2

年 代	1966	1967	1969	1970	1970	1979	発光反応測定専用機器		
報告者(文献)	Addanki ③	Lyman ④	Stanley ⑤	Johnson ⑥	John ⑦	Ohsawa ⑧	JRB社 (カタログ)	アミンコ社 (カタログ)	Aloka社 (カタログ)
測定項目									
使用測定器	パツカード液 シンM3314	自 製	パツカード液 シン	Dupont	American Inst. Co	アロカ BLR-101	2000型 6桁デジタル	JA-7441S 4桁デジタル	BLR-101
光電子増倍管		RCA931A	EMI-9635AB		RCA-IP21	R331	特性不明	浜松TVを一部 に使用している	R464
測定方法	積 分	ピーク値	積 分	積 分	ピーク値、 積分	積 分	ピーク値、積分	ピーク値、積分	ピーク値、積分
積分時間 (秒)	—	—	6	—	30	100	6、60	1、3、5、10、 20、30、60	15、30、60
積分開始時間 (秒)	7	0	—	—	0	30	0、15	0、(任意)	0、15、30
雑音	機器					10	—	—	10
CPM	ルシフェリン・ ルシフェレース液 (LL)	10 ²				10 ³	—	—	10 ² ~10 ³
液を入れる順序	LL+ATP	ATP+LL	ATP+LL		ATP+LL	LL+ATP	LL+ATP		LL+ATP
Buffer (Mg含有)	As	glyciue	phosphate	As	Hepes	Hepes+Tris	Tris		Hepes+Tris
pH	7.4	7.7	7.4	7.4	7.5	7.4	7.6		7.4
反応停止液							As、沸騰液		沸騰液
液量 (mℓ)	ルシフェリン・ ルシフェレース液 (LL)	0.2	0.05	0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	0.2
	ATP	0.2	—	0.01	0.45	0.1		0.5 (10μℓ)	0.2
計 数 値 CPM & 直 線 性	ATP濃度 (mg/mℓ)			計	数	値	CPM		
	10 ⁻²						10 ³		
	10 ⁻³						10 ²		
	10 ⁻⁴	10 ⁴ ~10 ⁵	10 ⁶	使用液	10 ⁴	10 ⁶	10 ¹		
	10 ⁻⁵		10 ⁵		10 ³	10 ⁵			10 ⁵
	10 ⁻⁶		10 ⁴		10 ²	10 ⁴	10 ⁴		10 ⁴
	10 ⁻⁷					10 ³	10 ³		10 ³
	10 ⁻⁸						10 ²		10 ²
	10 ⁻⁹						10 ¹	10 ⁻¹⁰ 使用液可能	10 ¹
	10 ⁻¹⁰								

表2: LL+ATP発光反応による測定値, 試薬ATP濃度標準曲線で, 直線性を示す限界はATP10⁻⁸mg/ml付近であることが, この表から推察できる。生物発光を利用した微量定量は, LL+ATP 化学反応の場

合, 反応条件が満たされた時, ATP濃度依存性が広範囲にわたってsingle photon eventの計数値と一致していることを示した。



薬学の先駆者・福原有信 (24)

根本 曾代子

薬学開発の達人

福原有信先生(1848～1924)は、時代にさきがけて近代薬学を修めた達見をもって、明治5年(1872)わが国で初めて洋式薬局を開設し、医薬分業を実践した先覚者である。

その頃氾濫する不良薬品の排除に乗り出し、純良医薬品の輸入および製造に力を注ぐ。

明治17年(1884)画期的な半官半民の製薬会社設立に奔走し実現する。第1次世界大戦の影響で、合成医薬品の自給化の難局を打開して、製薬工業発展の基礎を築く。

先進の医薬分業の理想実現を目指して、日本薬剤師会創設に尽力し、財政的支援によって、会の運営を支えた。日本薬学会の最初の有功会員となり、薬学進歩の貢献も著しい。

また、明治21年(1888)帝国生命保険会社を興し、わが国生命保険事業の創始者として、実業界に重きをなした。

薬学志向の背景

福原有信先生は嘉永元年(1848)4月8日、安房国(千葉県)神戸村で、医業を営む福原市右衛門(有琳)の四男として生まれた。

天分に恵まれ、幼時から祖父有斎と父有琳について、医術を仕込まれる。慶応元年(1865)17歳の時江戸へ出て、織田研斎の門に学ぶ。

翌慶応2年幕府の医学所(東京大学医・薬学部の前身)に入り、オランダ流の医薬学に励む。当時の同窓には、後年明治医界に名をあげた池田謙斎、石黒忠恵、足立寛らが机を並べていた。

幕府の瓦解によって、福原学生20歳の明治元年(1868)6月、旧幕医学所は明治新政府所管となり、医学校と改称する。

旧幕時代のオランダ流は、戊辰戦争の際官軍に従軍して治療に功労のあった英国人医師W.ウィリスを医学校教師兼附属病院医師に任用したため、英国流に移行することになった。しかし、教授陣はオランダ流を修めた日本人医師で占められ、教育方針は一貫性を欠いていた。

激しい維新の変革に遭遇し、動揺する学内にあって、福原学生の志向は、医学を離れて、西洋薬学の研修に傾注していた。明治2年(1869)には中司薬に起用されて、病院薬局業務に従事する。

ウィリスの英国式処方や日本人医師のオランダ式処方の調剤に努めながら、西欧の医薬分業制度を認識していた。その作業の間に彼が注目した疑点は、処方箋に記

載される薬品は、同名であっても、その内容は必ずしも同一でないことであった。

これは基準の異なる各国薬局方によって製剤するためで、例えば、ヨード鉄含利別のヨード鉄の含量は、オランダ局方は20%、イギリスは5.6%、フランスは0.5%で、その含量が40倍の差のある同名薬品が市場に流通していた。当然の帰結として、品質不定の薬品の効力に差異を来とし、不測の事態を否定できなかった。

しかも洋薬に不慣れの取扱い業者が、安い不良薬品を取引するので、福原司薬は病院納入薬品は、石黒忠恵著の「贗薬鑑法」(明治2年刊)を参照して、薬品試験に努めた。

この頃医学校に入学した長井長義と生涯の友情の機縁が生まれる。同じく明治2年、医学校方針が当時世界に冠たるドイツ医学導入に一決したため、ウィリスは12月鹿兒島医学校に転任する。同月医学校は大学東校と組織を改める。

軍医寮司薬の業績

明治4年(1871)7月18日、大学を廃して文部省の設置に伴い、大学東校は文部省所管となり、単に東校と改称する。

同月28日、兵部省(明治5年2月兵部省を廃止、陸軍省・陸軍省を設置)に軍医寮が置かれた。軍の医事制度の始まりである。初代軍医頭に旧幕医学所頭取松本良順が任ぜられた。東校助教石黒忠恵は軍医正に補された。

このとき東校附属病院司薬・福原有信は、医学所時代の旧師、松本軍医頭の推挙により、軍医寮司薬となる。調剤に従事する傍ら、松本軍医頭主宰の陸軍薬局方編纂に参与する。東校病院薬局での経験を生かして、製剤の成分容量を統一するため、オランダ、イギリス両国薬局方を参照し、選りぬきの130品目が記載された。明治4年「陸軍軍医寮局方」として小冊子ながら、軍用の日本薬局方の原典が刊行された。

翌明治5年刊の「海軍軍医寮薬局方」の編纂にも、福原司薬はその力量を買われたが、英国薬局方から330種を収載したものである。この両局方は陸海軍軍医寮以外には適用されなかった。

洋式薬局の始まり

東校および軍医寮で、西洋薬学の理論と技術を修得した自負と、機を見るに敏な才覚から、新分野開発に機先を制する若者らしい大志に駆り立てられたのであろう。

着々と準備を進め、明治5年(1872)6月、京橋出雲町16番地(銀座)の建物を購入して、福原資生堂の本拠を構えた。わが国洋式薬局第1号で、医薬品の輸入、販売、調剤を始めた。時に24歳であった。

区画整理などで、2年後に同町内に調剤専門の薬舗を設けた。2階の回陽医院で松本良順らの医師が診療に当たり、階下の薬舗で調剤を行い、薬舗での医薬分業の走りであった。

一方、本所安宅町に東京製薬所を設けて、製薬事業を始めた。明治12年には規模を広げて、鎌倉河岸に製薬工場を建設した。主な製品は、大黃、肝油などの舎利別、ヨード丁幾類、麦角エキスその他、ガレヌス製剤に主力を注いでいた。これは当時の機械設備、技術面での洋薬製造の限界を示すものであった。

その頃、資生堂の支店で、医薬分業を看板にした医院と調剤薬舗の経営が行き詰まり、廃業を余儀なくされていた。

国策製薬事業のさきがけ

医薬品の製造、品質試験等に従事する者にとって、重要な指針となる日本薬局方が無いため、基準の異なる外国薬局方に拠らねばならぬ煩雑さが、悩みの種であった。

しかし日本薬局方の編纂は大事業で、政府は容易に踏み切れなかった。内務省衛生局長・長與専齋の要請が容れられ、明治13年(1880)末、内外人の一級の医薬学者を委員に任命して、懸案の日本薬局方編纂事業が発足した。

待ち構えた福原先生は、製薬奨励に力を入れる長與衛生局長に、日本の製薬事業発展のため、政府の補助を受ける画期的な製薬会社設立計画を提議して、その賛同を得た。

そこで東京・大阪の薬業家有志と諮り、福原有信を筆頭とする発起人が、半官半民の大本日本製薬会社設立願を山田顕義内務卿に提出し、明治16年(1883)5月2日認可とともに、命令書が下付された。

その主旨は、政府は製薬工場及び之に属する土地建物を、明治17年11月から向う20年貸渡し、薬品製造の事業を行わせる。会社は10万円を募集して営業資本金にあてる。会社は衛生局長の監督の下に、製薬の品種及び標度の指示に従うなど、規約が定められた。

役員は、社長・男爵新田忠純、副社長久原庄三郎、専務取締役福原有信、製薬長は13年間ドイツ留学中の長井長義が招かれた。工場設備、機械類、薬品、図書など、製薬資材はすべてドイツから取寄せて準備を進め、明治18年(1885)5月操業が開始された。

当初、局方品が主要製剤であったが、その後、官内省納入の香粧品の製造、外国産湿潤阿片の製粉化等に営業を拡げた。福原専務は創業の任務を果たして、明治24年に会社を勇退した。

それから約30年の間に、とくにドイツの合成医薬品の進歩は著しく、治療界の新薬に対する絶大な依存度が、輸入の増大に反応する一方、有機合成の難しさが、わが

国製薬工業の不振を招く因果関係を助長させていた。

図らずも大正3年(1914)に起こった第1次世界大戦の影響で、医薬品類の輸入が途絶した緊急事態に直面した。政府は応急対策の一環として、薬・工・医界の学者グループおよび福原有信らの薬業家を委員とする臨時薬業調査会を設置し、各自調査研究に着手した。

福原委員は67歳で既に老境にあったが、往年の卓抜な手腕が衆望をになって、再び半官半民の内国製薬株式会社を創立し、社長に就任した。福原社長は、顧問長井長義、技師長池口慶三らと協力して、合成医薬品製造研究の新分野開発に邁進し、製薬工業発展の基礎づくりの使命を果たした。

医薬分業の理想と現実

福原先生が医薬分業の先駆者で、時に利あらず、挫折の憂き目を見たことは前に触れたが、これに屈せず、個人の力では及ばずとして、同志の団結によって目的達成を図った。

同業者の中でも信頼する雨宮綾太郎氏らと協議を重ね、東京府下の薬舗主の参集を求めて、説得に努めた。その結果、個々の派閥を解消して、東京薬舗会に合同する件が衆議一決した。

かくして明治20年(1887)10月、117名の会員が調印して、東京薬舗会設立認可申請書を作成し、当局に提出して認可を得た。

東京薬舗会会長は福原有信、副会長比留間小六、常議員雨宮綾太郎ほか、役割分担を決めた。時を移さず、医薬分業実施建議案を当局に提出したが、受理されなかった。

期待を裏切られたが、分業実施には医師と薬剤師の数の比率の差が問題であるとして、会員層の拡大と会の組織の強化を図ることになった。

福原会長は協議して、東京薬舗会を解消し、明治21年(1888)8月、東京薬剤師会と機構を改めた。役員を改選して、会頭にドイツ留学から帰朝早々の下山順一郎帝国大学薬学科教授を推戴した。

副会頭福原有信、常議員は薬業家のほかに、薬学会幹部の応援を求めて、丹羽藤吉郎、丹波敬三、山田董ら5名の薬学者が参加し、医会に対抗する陣容を固めた。

翌明治22年2月、会員の交流、知性向上を目的とする機関誌「薬剤誌」が発刊された。これは福原有信、比留間小六ら4名が出資して、会員に無料配布し、経営上の損失は4名が平等に負担することを申し合わせた。

明治26年(1893)日本薬剤師会を創立したが、打ちつづく分業運動の不首尾で、会の経済面が苦境に陥った。福原理事は常に援助を惜しまず、会の存立を守ったといわれる。

生命保険事業の創始

東京薬剤師会を設立した年の明治21年に、福原先生は海軍軍医総監高木兼寛らと、わが国の生命保険事業の草

分けとなった帝国生命保険会社を設立して、常任理事となる。時に40歳であった。

専務取締役を経て、明治26年に創立した帝国生命保険株式会社社長に就任した。福原社長は明治34年(1901)欧米の薬業および生命保険事業視察の途に上り、各国を巡歴して見聞を広めた。

明治41年(1908)には社団法人生命保険協会理事に選任され、大正6年(1917)同会会長に推薦される。大正10年(1921)実業振興に貢献した功勞に対し、緑綬褒章が授与された。

徳行の君子

大正13年(1924)3月30日、世のため人のために、理想を追いつづけた76歳の偉大な生涯を閉じる。生前の功

績により、従五位勲四等を追贈された。

親交のあった長井長義日本薬学会会頭は、世にもまれな徳行の君子を失ったと、切々たる弔辞をささげた。薬学会発展のためにも援助を惜しかなかった一節を抜萃して、遺徳を偲びたい。

「……明治25年薬学会会計幹事に推されるや、同会の経済ゆたかならざるを憂え、しばしば私財を擲って窮境を救い、終始学会財政の安定を図り、大成を告ぐるを得たるは、偏に君の賜なり。……君資性温良にして、よく事務に通曉し、実践躬行して殆ど大成せざるはなし。浮沈曲折、幾多の変遷喜悲に逢うも動ぜず、沈着寛仁、唯人の憂いを憂え、人の楽しみを楽しむの風あり。まことに得易からざる徳行の君子なりき。……」

昭和五十五年七月一日 発行

発行者 関東化学株式会社

訂正

前号1980年第2号(通巻96号)に下記のとおり誤りがございましたので訂正致します。

	誤	正
目次	4行め 植物の	→シダ植物の
"	5行目 Osmunda	→Osmunda
"	7行め 1799	→1699
19ページ 左下14行め	Chematoxonomy	→Chemotaxonomy

お願い

7月から当社の下記の部署の住所及び電話番号が変更になっております。ご通話の際は大変ご面倒と存じますが下記の番号でお願い申し上げます。

臨床検査薬部
試薬部
メルク試薬部

電話 03(663)7631~9

住所 〒103 東京都中央区日本橋本町

4丁目6番地 東興ビル7階

関 東 化 学 株 式 会 社

本社	〒103 東京都中央区日本橋町3丁目7番地	TEL 03(279)1751(代)、1755(代)、1761(代) TELEX.2223446(CICAJ)
草加工場	日本工業規格表示許可工場 無機試薬 第6835号・有機試薬 第6836号	
伊勢原工場	〒259-11 埼玉県草加市稲荷町2048番地	TEL 0489(31)1331
柵原工場	〒708-15 神奈川県伊勢原市鈴川21番地	TEL 0463(94)8531
大阪支店	〒541 岡山県久米郡柵原町藤原30番地	TEL 08686(2)0710
札幌出張所	〒061-01 大阪市東区瓦町3丁目1番地	TEL 06(231)1672~4
仙台出張所	〒061-01 札幌市豊平区里塚314-3番地	TEL 011(882)1511~4
埼玉出張所	〒983 宮城県仙台市日の出町1丁目7番9号	TEL 0222(94)0175~6
国分寺出張所	〒364 埼玉県北本市中丸3丁目82番地	TEL 0485(92)2361
京葉出張所	〒185 東京都国分寺市東元町3丁目4番19号	TEL 0423(24)5311
京浜出張所	〒260 千葉県千葉市今井町2丁目14番15号	TEL 0472(61)1303~4
湘南出張所	〒223 神奈川県横浜市港北区新羽町2055番地	TEL 045(542)0801~3
静岡出張所	〒254 神奈川県平塚市大神2153番地	TEL 0463(55)2051~3
中京出張所	〒422 静岡県静岡市中村町393番地	TEL 0542(81)2010
九州出張所	〒491 愛知県一宮市大和町妙興寺字中之町4番地	TEL 0586(24)1725
宇都宮営業所	〒804 北九州市戸畑区天神2丁目2番14号	TEL 093(881)3961~2
広島営業所	〒321-01 栃木県宇都宮市雀の宮4丁目737番58号	TEL 0286(53)3724
筑波営業所	〒730 広島県広島市南区大州1丁目7番2号	TEL 0822(85)6221
草加分室	〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町大字通横場2336	TEL 02975(6)1438
	〒340 埼玉県草加市稲荷町2048番地	TEL 0489(31)3292

ケミカルタイムス編集委員会
編集責任者 山田 博