

# Urobilin 体の定量に関する研究

## 第 1 篇

### Urobilin 体 定 量 法 の 検 討

岡山大学医学部第 1 内科教室 (主任: 小坂教授)

渡 辺 春 生

【昭和34年8月28日受稿】

#### 緒 言

1901年 P. Ehrlich によつて見出された尿 aldehyde 反応は、肝機能検査の中でも最も鋭敏なものとして現在も尙広く使用されているが之を臨床面に応用する場合、その赤着色は、試薬の組成、試薬の添加量、反応温度等の外、尿色素、尿中の他の反応物質即ち: 尿素、indican、諸種薬物等により本来の呈色に影響を受け、その陽性、陰性の判定は必ずしも容易ではない。

一方尿中 urobilinogen 量の多寡は、胆汁の腸内流出状況及び体内血色素破壊量の必須の示標であるが、尿中に存する indole, skatole は aldehyde 試薬によつて、urobilinogen と極めて類似の反応をなし、為に尿の urobilinogen 試験法なるものは実施されて居らず、僅かに urobilin の定性及び schmidt 氏昇汞試験等が行われているにすぎない。

従つて肝機能障碍、胆汁の腸内流出状況、体内血色素の破壊量を明確にする為には、尿及び尿中の urobilin 体の排泄量を知る事が極めて大切であり、之を定量しようとする試みは古くから行われて来た。初期に行われた重量法とでも称すべきものを除けばその方法は大きく二つに大別し得る。

即ち一は、urobilin 体を urobilin にまで酸化して定量しようとする方法であり、もう一つは、之を urobilinogen にまで還元して定量しようとする方法である。

Urobilin の定量を応用した代表的なものは Adler<sup>1)</sup>の方法であるが、1933年 L. Heilmeyer<sup>2)</sup>はこの方法を批判して、urobilinogen を jod にて酸化する際 urobilinogen が必ずしも定量的に urobilin に酸化されない事、螢光の判定は装置個人差等によつて異なつた値の出て来る事、更に根本的なものとし

て、Adler が urobilin として標準に用いた物質は、恐らく urobilin より更に酸化分解された不純物を含んで居り、之を用いた Adler の定量値が驚くべき高値であること等を揚げ之を排析した。

一方 urobilinogen は比較的以前より結晶として取出され、aldehyde 反応物質の分光化学的性状もその吸光係数も明にされていたが、これを応用して urobilin 体の定量を行う場合には、urobilin を urobilinogen に還元する方法が必要であつた。1914年 Charnass<sup>3)</sup>は尿に alkali 性酸酵を行わせて urobilin を urobilinogen に還元し、aldehyde 反応を用いる定量法を発表したが、更に1928年 A. J. L. Terwen<sup>4)</sup>は Mohr 氏塩を用いる還元法を発表し、この方法が現在最もすぐれた還元法として用いられている。urobilinogen の比色による定量は、Charnass 及び Terwen は alkali 性 phenolphthalein を用いたが1931年 Heilmeyer 及び Krebs<sup>5) 6)</sup>は、mesobilinogen 結晶を標準液として Pulfich の Photometer を用いる比色法を発表し、次いで1947年 Watson<sup>7)</sup>は Pontacyl-Dye と Orange-G を標準液として光電比色計を用いる方法を発表した。現在行われている精密な測定法は、殆んどが Terwen 還元法を用いて urobilin を urobilinogen に還元後、上記二つの方法の何れかに依り urobilinogen を定量する方法にしぼられている観がある。著者は之等の方法につき詳細な再検討を行い、興味ある成績を得たので報告する。

#### 実験方法並びに成績

##### I Terwen 還元法の検討

##### I 1. 実験方法

##### I 1. 1 試料

Table 1

還 元 時 間		前	2	4	6	8	10	12	16	24
ウロビリ ン含有尿	1 Urobilin 極大 U-gen (mg%)	+ 3.75	- 4.41	- 4.41	- 4.41	- 4.41	- 4.41	- 4.41	- 4.41	- 4.41
	2 U 極大 U-gen	+ 0.55	- 2.08	- 2.08	- 2.08	- 2.08	- 2.08	- 2.08	- 2.08	- 2.08
	3 U 極大 U-gen	+ 5.54	± 7.47	± 7.47	± 7.58	± 7.58	- 7.51	- 7.71	- 7.71	- 7.71
	4 U 極大 U-gen	+ 0.1	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67
ウロビリ ン液	5 U 極大 U-gen	+ 0	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67	- 0.67
	6 U 極大 U-gen	+ 0.19	- 0.98	- 0.98	- 0.98	- 0.98	- 0.98	- 0.98	- 0.98	- 0.98

Urobilinogen 含有尿を放置し、自然酸化により urobilinogen の一部を urobilin にまで酸化させたもの、及び尿及び尿より Watson<sup>2)</sup> に倣い urobilinogen を醋酸々性下に ether 及び石油 ether にて抽出し、ether、石油 ether 層を蒸留水にて2回水洗後之を常温に放置し橙色に変色させた後 1/10N 苛性曹達液を加えて振盪し、urobilin を苛性曹達層に移行させ 1/10N 塩酸で B.T.B 紙を指標として稍々中性に持来したもの（以下 urobilin 液と称す）の両者を用いた。

#### I 1. 2 還元法の実施

以上の試料 40cc を大型褐色試験管に入れ之に14% Mohr 氏塩水溶液 10cc を加え、次いで10%苛性曹達液 10cc を細い Pipett より管を動かしながらよく混合する様に滴下し、流動 Paraffin を重疊して空気を遮断し、冷暗所に放置した。

#### I 2. 実験成績

##### I 2. 1 還元完了時間の検討

還元開始後2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24時間の各時間後、上記試験管より還元液の一部を取り濾過後、濾過液について Beckman 型自記光電分光光度計によつて分光化学的に 510m $\mu$  に於ける alkali 性 urobilin の吸収極大の有無を検し、又一方該濾過液について Heilmeyer-Krebs 法によつて urobilinogen の定量を行つて比較検討した。その結果は Tab. 1 に示す通りである。

##### I 2. 2 試料と還元液の量的割合

上記試料 40cc に Mohr 氏塩液及び苛性曹達液をそれぞれ20, 10, 5, 2.5cc 宛加え同様に還元を行つ

た後 urobilinogen 定量を行つた成績は Tab. 2 の通りである。

#### I 2. 3 新鮮尿について還元法の必要ありや否やに対する検討

新鮮尿を適当に稀釈し、自記光電分光光度計によつて urobilin の 494m $\mu$  の吸収極大の有無を検すると殆んど urobilin 極大は認められなかつた。一方之等

Table 2 還元液混合の割合と定量値

混合の割合	終末反応液の液量	Es <sub>533</sub>	定量値
40:10:10	15cc	0.135	0.55mg/dl
40:5:5	15cc	0.185	0.63mg/dl
40:25:25	15cc	0.160	0.59mg/dl

Table 3

No.	$\lambda_{max}$ 490	Before Reduction	After Reduction
1	(-)	2.37mg/dl	2.44mg/dl
2	(-)	0.27 "	0.26 "
3	(-)	8.08 "	7.71 "
4	(±)	0.35 "	0.36 "
5	(+)	0.59 "	0.61 "
6	(±)	0.31 "	0.32 "
7	(+)	0.15 "	0.16 "
8	(-)	0.61 "	0.61 "
9	(-)	0.39 "	0.40 "
10	(-)	0.73 "	0.71 "
11	(-)	0.55 "	0.49 "
12	(-)	1.06 "	0.94 "

の尿について、そのまま urobilinogen 定量を行ったものと、これを一旦 Terwen 法に従つて還元した後 urobilinogen 定量を行ったものを比較すると Tab. 3 の如く何れの場合も殆んど同値を示し、含有量の多いものではかえつて低値を示すものもある。

I 2. 4 尿保存の条件について

多量の urobilinogen を含む新鮮尿を稀釈し、之を次の各条件で保存した。即ち

- 1) 氷室内で褐色瓶に入れ流動paraffinにて空気を遮断して放置
- 2) 氷室内にて褐色瓶に入れ、空気遮断を行わず放置
- 3) 室温 (20°C) で褐色瓶に入れ、paraffin 重畳を行つて放置
- 4) 室温にて褐色瓶に入れ paraffin 重畳を行わないで放置
- 5) 室温で白色瓶に入れ、そのまま放置

上記各保存尿につき24, 48, 72時間後その一部を取り、Terwen 法によつて還元を行い、分光化学的に urobilin 極大の消失を確かめた後、Heilmeyer & Krebs 法で直接 urobilinogen 定量を行つた成績は、Tab 4 に示す通りである。

II 抽出過程の検討

II 1 抽出時の pH について

新鮮尿及び糞便濾液を urobilinogen 濃度が大約 1 mg/dl になる様稀釈した液 10cc に、種々の濃度量の酸, alkali, 塩類を加え, ether 20cc を以て抽出し, 2 回水洗後, Heilmeyer & Krebs 法に従つて urobilinogen 定量を行つて比較した成績は Tab. 5, Tab. 6 の如くである。

II 2 抽出溶媒についての検討

抽出溶媒の条件として 1) urobilinogen の抽出力の大きい事は言うまでもなく最も大切な事であるが、その他に 2) 尿色素の抽出力の少い事 3) 類似反応物質及び反応妨害物質を余り抽出せず 4) 呈色操作に際し urobilinogen-aldehyde 縮合物の水層への分離の良好な事、即ち色素の水及び溶媒間の分配係数の少い事 5) 水との混合性の少い事 6) 沸点の高い事が必要であり更に 7) 水より軽い方が操作を行う上に便利であると考えられるので、脂肪族炭化水素, Ether 族, Ester 族, 芳香族炭化水素の内から適當のものを選び、上記各条件につき検討を加えた。その結果は Tab. 7 の通りで、ここに urobilinogen 及び indole の抽出力は、urobilinogen に関しては Heilmeyer & Krebs 法と同様に試料 10cc より溶媒 20cc を用いて抽出、2 回水洗後のものにつき定量したものを示し、indole に対しては、1 mg/di の indole 液 10cc に氷酢 1 cc を加えた

Table 4

	保存時間	(時間)	12		24		48		72	
			原 値	還元前	還元後	還元前	還元後	還元前	還元後	還元前
尿 保 存 条 件	氷室遮光	3.18	3.10	3.08	3.06	3.08	3.06	3.06	2.71	2.83
	空気遮断	1.71			1.37	1.47	0.54	1.22		
	氷室遮光	3.18	2.91	2.97	2.77	2.79	2.66	2.88	2.04	2.27
		1.71			1.08	1.59	0.88	0.98		
	室温遮光	3.18			2.58	2.93	2.22	2.85		
		1.71			0.98	0.73	0.18	0.51		
	室温遮光	3.18	2.57	2.74	2.25	2.25	1.55	1.95	0.63	1.47
室温曝光	3.18	2.20	2.28	1.62	1.80	1.22	1.34	0.04	0.49	
		1.71			1.22	0.88	0.18	0.74		

Table 5 各種物種添加による抽出量の変化

添加物質	H <sub>2</sub> O	conc. HCl	1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	氷酢	乳酸	0.1N 蔞酸	0.1N NaOH	5 N NH <sub>4</sub> OH	1/15M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1/15M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	45% ZnSO <sub>4</sub>
添加量 cc	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5	3
抽出量 E × V	0.02	0.63	5.55	57.5	6.00	6.00	0	0	0.67	0.15	0.63
pH	6.4	0.1	1.4	2.0	2.4	4.4	8.9	>10	6.0	7.0	5.6

Table 6 各種濃度塩酸及び酢酸添加による抽出量

塩酸	濃 度	水 酢	0.1N		0.2N				2 N		
	量		1	0.5	1.0	1	2	3	5	1	3
酸	E × V	8.2	3.6	7.8	8.2	8.2	8.2	8.1	7.6	5.2	4.1
	pH	2.3	6.2	5.8	5.2	3.2	2.4	1.4			(尿)

酢酸	濃 度	水 酢	0.01N		0.1N	I N	30%	水 酢			
	量		0.5	1.0	1	1	1	1	2	3	5
酸	E × V		5.4	5.6	5.7	5.6	5.6	5.6	4.5	4.5	3.7
	pH		5.8	5.4	3.4	2.4	2.2	2.0			(U-gen液)

Table 7

性 状	溶 媒	Ether	Isopro- ether	Ethyl- acet.	Petrol- ether	Petrol- Benzin	Ligroin	Benzen	Toluen	Xylen
U-gen 抽出力 E × V		4.8	3.8	3.9	3.9	3.6	3.0	3.0	3.4	3.0
Indol " E × V		6.4	0.2	5.1	2.6	2.6	1.8	3.1	3.2	3.2
尿 色 素 抽 出 力		大	小	大	小	小	小	中	中	中
乳 化 度		小	小	小	大	大	大	中	中	中
沸 点		34.6°	68°	77.1°	40~80°	60~120°	95~120°	80°	110.6°	142°
対 水 溶 解 度 (%)		6.48	0.65	7.9	0.005	0.005	0.005	0.082		

後各種溶媒 20cc で抽出，2回水洗後 aldehyde 試薬 1cc を加えて振盪し，次いで飽和醋酸曹達液 1cc を加えて振盪後，着色水層を Messcylinder に移し，以下同様に着色しなくなるまで操作を続け，着色水層の量 V と Pulfich の光度計の Filter S<sub>53</sub> を以て測定した吸光度 E の積 E × V を以て現わした。

### III 発色条件の検討

#### III 1 Aldehyde 試薬の組成とその有する意義について。

先ず濃塩酸を 1/2 に希釈したもの，及び p-dimethylaminobenzaldehyde の 2% alcohol 溶液を種々量を変じて urobilinogen 液 5 cc に加え，蒸留水を加えて全系列の反応液量を 8 cc に補正し，20°C に 10 分放置後反応液の着色度を S<sub>53</sub> で測定すると Tab. 8 の成績を得る。次に p-dimethylaminobenzaldehyde の濃度を一定にし塩酸濃度を種々変じた組成の

Table 8

2% p-Dimethylami- nobenz aldehyde 添加量 (cc)	ES <sub>53</sub>	1/2 塩酸添加量 (cc)							
		0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5
0.1	0.1	0.05	0.19	0.33	0.36	0.36	0.34	0.33	0.24
0.2	0.2	0.20	0.34	0.39	0.55	0.55	0.54	0.52	0.34
0.4	0.4	0.39	0.59	0.68	0.71	0.72	0.72	0.60	0.53
0.6	0.6	0.39	0.60	0.67	0.71	0.72	0.72	0.57	0.50
0.8	0.8	0.45	0.59	0.70	0.72	0.73	0.73	0.66	0.49
1.0	1.0	0.48	0.40	0.61	0.66	0.72	0.73	0.66	0.52
1.5	1.5	0.51		0.64	0.68	0.73	0.73	0.71	0.61

試薬を urobilinogen 液に加えて時間的にその呈色度を S<sub>53</sub> で測定すると Fig. 1 の如くなる。

教室中川<sup>9)</sup>に従い，urobilinogen の ether 抽出液に p-dimethylaminobenzaldehyde の ethanol 溶液を加えた後，塩酸 gas を通じて urobilinogen-aldehyde 縮合物を赤色物質として沈澱させ，その水溶液を作り，その 1cc に各種 pH の緩衝液 5cc を加えて希釈し，その pH と呈色度を S<sub>53</sub> で測定したものを対比すると Tab. 9 の如くである。

次に飽和醋酸曹達液の添加量につき検討するため組成を変えた試薬を urobilinogen 液に加えて混合液の塩酸と p-dimethylaminobenzaldehyde の濃度

Fig. 1

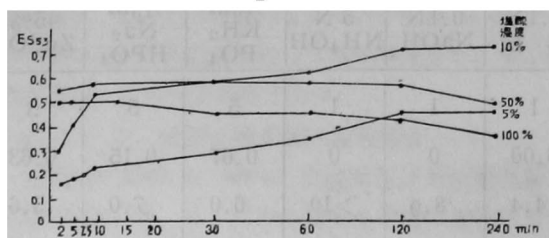


Table 9 Urobilinogen-Aldehyde 反応物質の pH による呈色度の変化

緩衝系	HCl-KCl		CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> COONa		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.1N HCl	40% 酢酸		
pH	1.2	2.1	3.1	4.1	5.2	6.0	7.0	8.2	1.0	2.3
E560 30分	0.64	0.68	0.75	0.75	0.75	0.66	0.55	0.23	0.80	0.64
60分	0.53	0.64	0.72	0.72	0.72	0.58	0.49	0.12	0.80	0.53
6 st	0.35	0.48	0.65	0.69	0.59	0.46	0.17	0.06	0.78	0.32

Table 10

U-gen(Indole)液 変化Aldehyde- Reagens 1/2v conc HCl	2	2	2	2	2
上記混液 5 ccの 組成	p.D.A.B.A 2%, HCl 50H <sub>2</sub> O 50%				
40% Na-Acet	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5
A.R: Na-Acet 比率	1:1.5	1:2	1:2.5	1:3	1:3.5
H <sub>2</sub> O	10	7.5	5.0	2.5	0
U-gen E <sub>560</sub>	0.46	0.54	0.52	0.52	0.48
Indole E <sub>560</sub>	0.98	0.08	0.05	0.006	0.008
pH	1.0	3.4	4.0	4.2	4.6

Table 11

U-gen(In- doie)液変 性-Aldeh- yde試験 conc. HCl	2	2	2	2	2	2
上記混液 5ccの組成	p.D.A.B.A 0.3% HCl 60%					
40% Na-Acet.	7.5	10.0	12.5	1.50	1.75	20.0
A.R: Na- Acet 比率	1:1.5	1:2	1:2.5	1:3	1:3.5	1:4
H <sub>2</sub> O	10	7.5	5.0	2.5	0	0
U-gen E <sub>560</sub>	0.24	0.43	0.52	0.52	0.25	0.52
Indole E <sub>560</sub>	0.51	1.35	0.09	0.01	0.006	0.006
pH	0.55	3.6	4.1	4.2	4.3	

を Hildebrandt 処方及び Watson 処方と等しくなる様にし、之に種々量の40%飽和醋酸曹達液を加えて混合後 ether と振盪して反応液の混濁を除き、水を適量加えて反応液量を等しくし、呈色度を S<sub>560</sub> で測定すると Tab. 10 及び Tab. 11 の成績を得る。

urobilinogen 液に変えて 1 mg/dl の indole 液を用いて同様の実験を行つた成績を上記 2 表の下段に並示したが urobilinogen 呈色についての最適の条件下で indole の着色は全く消失した。

次に各 aldehyde 試薬の種々量を加えた場合の呈色度につき検討するため urobilinogen 液 3 cc に上記原処方, Hildebrandt 処方, Watson 処方の 3 種試薬の諸種量を加え 20°C, 10 分間反応後呈色度を S<sub>560</sub> で測定すると Tab. 12 の成績を得た。

Table 12

添加量	3.0	2.0	1.5	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	0.05
Hide- brandt	0.25	0.41	0.41	0.74	0.49	0.49	0.49	0.44	0.35	0.13
Hp	0.1	0.4	0.7	0.9	1.1		1.4	1.7	2.3	
Wats- on	0.13	0.22	0.25	0.34	0.37	0.37	0.38	0.28	0.14	0.05
Original	0.82	0.77	0.77	0.68		0.48			0.05	0.03

III 2 有機溶媒抽出液についての発色機転の検討

III 2. 1 飽和醋酸曹達液添加の時間的間隔

p-dimethylaminobenzaldehyde の濃度を 2% に一定し塩酸濃度を種々に変じた 試薬を作り urobilinogen の石油 ether 抽出液に各試薬を加えて短時間振盪し試薬層を分離して試験管に移し、時間的経過を追つてその 1 cc を予め用意した飽和醋酸曹達液 3 cc に加えてよく混合振盪し島津製 Beckman DK 型光電分光々度計で E<sub>560</sub> を求めると Tab. 13 の如くなる。この成績より以下の実験に於いて試薬と飽和醋酸曹達液との添加の間隔は 1 分と定めた。

Table 13

E560		Nat.-Acet. 添加間隔					
		30 sec	1 min.	2 min.	3 min.	4 min.	5 min.
Aldehyde	20%	1.25	1.30	1.30	1.31	1.31	1.34
Reagens	40%	1.25	1.28	1.23	1.25	1.24	1.20
中の	50%	0.700	0.715	0.175	0.175	0.725	0.725
塩酸	60%	0.640	0.660	0.660	0.670	0.660	0.665
濃度	100%	1.20	1.23	1.19	1.24		1.21

III 2. 2 試薬中の塩酸濃度と反応

Urobilinogen の石油 ether 抽出液 10cc に塩酸濃度を種々に変じた aldehyde 試薬 1cc を加え一定時間振盪後、1分の間隔をおいて飽和醋酸曹達液 3cc を加えて再び振盪後着色層を分離し E<sub>560</sub> を求めると結果は Tab. 14 の通りである。而して之等の結果から以下の実験では塩酸は50%のものと60%のものをを用いる事とした。(便宜上濃塩酸を 100% 塩酸と呼ぶ。他も之に準ず)

Table 14

E 560		Aldehyde 試薬添加後の振盪時間				
		直後	30"	1分	2分	5分
塩酸濃度	100%	0.570	0.822	0.875	0.875	0.753
	60%	0.132	1.44	1.20	1.20	1.08
	50%		0.820	0.860	0.880	0.850
	40%		0.680	0.815	0.950	0.900
	20%		0.488	0.575	0.655	0.730

III 2. 3 試薬中の p-dimethylaminobenzaldehyde と濃度についての検討

塩酸濃度を50%と60%に一定し、p-dimethylaminobenzaldehyde の濃度を 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%の各種に変じた試薬を作り、その各 1cc を urobilinogen の石油 ether 抽出液 20cc に加え、30秒及び1分間振盪後飽和曹達液 3cc を加えて再び振盪し、着色液を分離し、560m $\mu$  の吸光度を求めると Tab. 15 の如くである。

Table 15

Aldehyde 試薬の組成	E 560	塩 酸 濃 度			
		50%		60%	
		振盪時間		振盪時間	
		30"	60"	30"	60"
p-Dimethyl aldehyde	0.3%	0.450	0.480	0.510	0.516
	0.5%	0.490	0.483	0.535	0.540
aminobenz 濃度	2.0%	0.544	0.520	0.540	0.550

III 2. 4 反応機構について

Urobilinogen の ether 又は石油 ether 抽出液に aldehyde 試薬を加えて反応を行う場合、urobilinogen が試薬中に移行して後反応するか、又は振盪中色素となつたものが塩酸中に移行するかを明にするために次の実験を行った。

Urobilinogen の石油 ether 抽出液に各種濃度の塩酸 1cc を加えて1分間振盪後、塩酸層を流下し、

之に aldehyde 試薬 1cc と飽和醋酸曹達液 3cc を加えて発色させ、別に残つた石油 ether 抽出液につき型の通り urobilinogen 定量を行った。その両者の値は Tab. 16 の通りである。

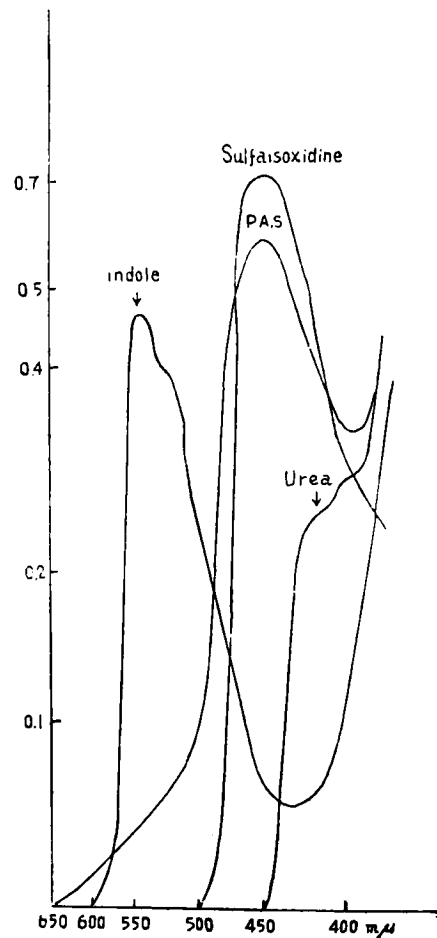
Table 16

		塩酸層 6 cc	残留 Pet Ether 層 12cc
添加塩酸濃度	100%	0.132	0.345
	60%	0.525	0.115
	50%	0.492	0.130
	40%	0.465	0.100
	20%	0.085	0.450
Watson 法定量値		0.850	

IV 反応妨害物質乃至類似反応物質の除去についての検討

常尿成分として重視すべき物質として尿素, indican, 尿のそれとして indole, skatole, 薬物のそれとして P.A.S 及び Sulfonamid 剤をえらび先ず之等

Fig. 2



物質 aldehyde の反応液の吸収 spectrum を Beckman 型自記光電分光光度計を用いて描いたものを一括すると Fig. 2 の通りである。

次に之等の物質につき定量法に際しその呈色を除きうるか否かにつき検討を加えた。

溶媒は ether と石油 ether の両者を用い、ether を用いた場合は抽出発色醋酸曹達添加の操作は Heilmeyer & Krebs 法に準じ石油 ether を用いた際は上記操作は Watson 法に準じて施行した。

#### VI 1 Indole

先ず 1 mg/dl の indole 水溶液を作りその 10cc を定量法の場合と同じく 20cc の ether に抽出し Hildebrandt 処方 of aldehyde 試薬 1cc を加えてよく振盪し、之に飽和醋酸曹達液の種々量を加えて再び振盪し下層の水層を分離して 560m $\mu$  に於ける吸光係数を測定すると Tab. 17 右欄の如くなる。

次いで Watson の定量法に準じ石油 ether 100cc を用いて抽出したものにつき Watson 処方の試薬を用い同様に実験した成績は Tab. 17 左欄の通りである。

Table 17

A.Rcc	Na-Acet. cc	石油抽出	Ether E <sub>560</sub>	Ether 抽出 E <sub>560</sub>
1	5		0.005	0.007
1	4		0.012	0.007
1	3.5		0.012	0.007
1	3		0.014	0.006
1	2.5		0.020	0.010
1	2		0.068	0.010
1	1.5		0.150	0.088
1	1		0.255	0.180

#### IV 2 Indoxyl-Sulfate

Indole を健康人に負荷した尿から Weiss 分割法を用いて indican 液を作りその 10cc を用いて indole と同様の実験を行うと ether には多少抽出されるが石油 ether には全く抽出されない。而して ether 中に抽出されたものも indole と全く同様の呈色態度を示し醋酸曹達液添加により全く脱色される。

#### IV 3 Sulfonamide

1 g/dl の Sulfaisomidine の水溶液を作りその 10cc を用い Heilmeyer Krebs 法及び Watson 法と同様に抽出発色操作を行つて終末反応液の 560m $\mu$ 、535m $\mu$ 、450m $\mu$  の吸光係数を測定すると Tab. 18 の通りである。

Table 18 Sulfonamid による影響

	Ether 抽出	石油 ether 抽出
E <sub>560</sub>	0.015	0.000
E <sub>535</sub>	0.015	0.005
E <sub>450</sub>	0.015	0.005

Table 19 PAS による終末液の影響

	Ether 抽出	石油 ether 抽出
E <sub>560</sub>	0.045	0.005
E <sub>535</sub>	0.050	0.005
E <sub>450</sub>	0.510	0.015

#### IV 4 P.A.S

2 g/dl の P.A.S -Na 水溶液を作りその 10cc を用いて同様の検討を行つた結果は Tab. 19 の通りである。

#### IV 5 尿素

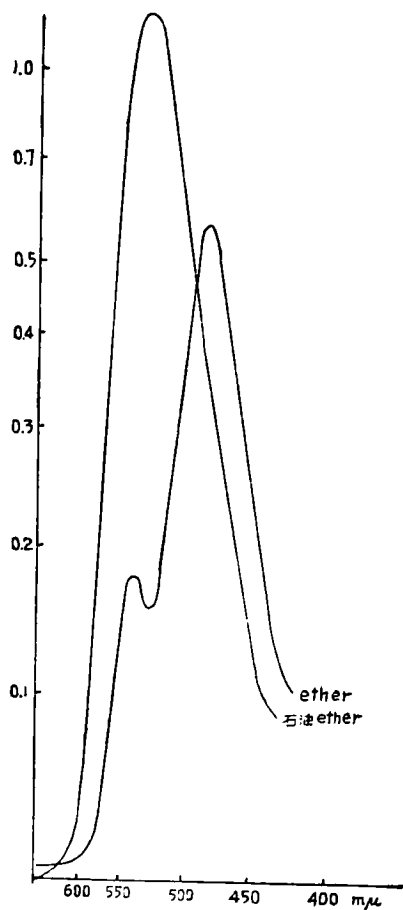
5 g/dl の尿素水溶液を作り同様の実験を行つたが ether、石油 ether 抽出液共に試薬を加え振盪した際にも殆んど着色を認めず、尿素が之等溶媒に抽出されない事が分る。

#### IV 6 反応妨害物質

Heilmeyer & Krebs 法に従い醋酸酸性尿を ether で抽出し aldehyde 試薬を加えると強い橙色の呈色が起り醋酸曹達液添加によつても橙色調のまま留る場合が稀に認められる。かかる場合同一の尿を石油 ether で抽出すると発色操作により鮮明な赤紫色の反応液を得、定量値も ether 抽出の場合より高い。かかる反応液の吸収係数曲線を描くと Fig. 3 の如く ether 抽出の際には 490m $\mu$  の極大が葉明に現われ石油 ether 抽出の際には 490m $\mu$  の極大は軽度にししか認められず 560m $\mu$  に大きい極大を示す。ether 抽出液に石油 ether を同量加えて水洗後発色操作を行うと橙色調は遙かに弱くなる。又 ether 抽出液に塩酸を加えただけでも直ちに強い橙色を現わす。之等の点から試薬添加の際生ずる橙色調は urobilin であり、尿中には一種酸化物質が含まれこのものは ether には抽出されるが石油 ether には抽出されず、且試薬を加えて初めて橙色となる点から塩酸によつて酸化力が賦活され抽出された urobilinogen を urobilin にまで酸化するものと考えられる。

この物質が何であるかは明らかにし得なかつたが、尿中には稀にかかる酸化物質を含んでいる事を注意しなければならない。

Fig. 3



### V 溶媒としての ether と石油 ether との優劣について

#### V 1 Urobilinogen 抽出力について

Tab. 7 の成績で明かな如く同一量の溶媒を用いて抽出した場合は、石油 ether の抽出力は ether のそれに比し遙かに劣る。次に Watson<sup>10)</sup> の提唱した試料 10cc に対し 3 回に亘つて計 100cc の石油 ether を以て抽出する方法によつて抽出定量した値と ether 20cc を用いて 1 回抽出定量した値と比較すると Tab. 20 の如く Watson 法は ether 抽出法より良好の値が得られる。

尙この成績から注意すべきは ether 抽出時の短波長側の吸光係数が石油 ether の場合に比し遙かに高

Table 20 Urobilinogen 抽出力

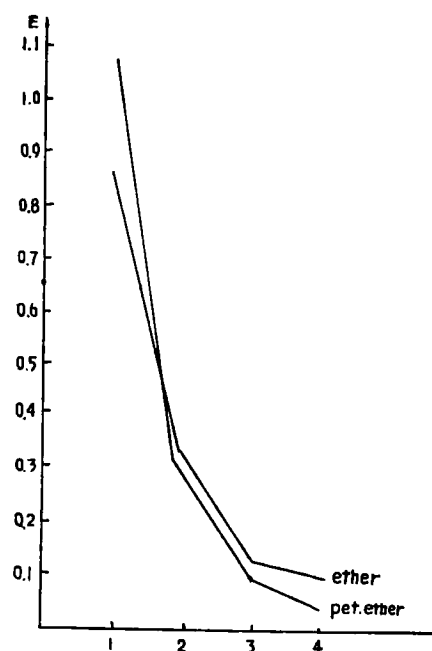
抽出条件	石油 ether 100cc	Ether 20cc
E <sub>558</sub>	0.560	0.490
E <sub>535</sub>	0.391	0.355
E <sub>494</sub>	0.95	0.150
E <sub>450</sub>	0.015	0.048

値を取る事であつて ether の尿色素 抽出力の大きい事を示す。

#### V 2 反応色素の試薬層への分離の検討

試料 10cc から Watson 法及び Heilmeyer & Krebs 法に従い urobilinogen を石油 ether 及び ether に抽出し urobilinogen 定量を行うに当り毎回の着色液を毎回別々に試験管に取り呈色操作を 4 回実施後各着色液について 560mμ の吸光係数を測定し ether と石油 ether を比較すると Fig. 4 の如く着色色素の分離は石油 ether の方が ether よりよい事が分る。

Fig. 4



#### V 3 溶媒の水層溶解による影響の検討

多量の urobilinogen を含む尿 10cc を醋酸酸性下に 50cc の ether に抽出し、之を 10cc の蒸溜水で 2 回水洗し水洗に用いた蒸溜水 20cc を集めて之に食塩を飽和すると水洗液に溶解して居た ether が上部に分離して来る。その ether を出来るだけ採取すると 1.4cc あつた。この 1.4cc の ether を ether 10cc を加えて稀め、urobilinogen 定量を行うと 0.42 mg/dl の値を得た。一方抽出 ether 層から 1.4cc 取り之も同様にして定量を行うと 1.74mg/dl の値を得た。

#### V 5 Ether を用いた場合と石油 ether を用いた場合の終末反応液の分光化学的性状

両者を抽出剤として用いて発色操作を行つた後、終末反応液を比較すると、石油 ether 抽出時の反応液



は鮮明な赤紫色であるに反し, ether を抽出剤として用いた時の反応液は多少黄色調を帯びている事が分る. この両者の反応液を Beckman 型自記光電分光光度計を用い吸光曲線を描いて比較すると, 石油 ether を抽出剤として用いた時の方が, 上向脚, 下向脚が急峻でありこの曲線が純粹の urobilinogen-aldehyde 反応物質の吸収係数曲線により近いものである事が分る.

### 考 按

Terwen 還元法について検討してみると, 先ず還元完了時間では2時間以内で還元完了する事及び余り長時間放置すると還元液の alkali によつて urobilinogen の破壊されるためか, 却つて定量値の減少する事が明らかとなつた. 還元完了時間については, Terwen<sup>4)</sup>は24時間, Heilmeyer & Krebs<sup>5)</sup>は6時間, 野呂及び大島<sup>12)</sup>は16時間 Watson<sup>10)</sup>は2時間としているが, 還元を行う物質が alkali 性水酸化鉄であり且 Heilmeyer<sup>6)</sup>の言う如くこの物質中に urobilin 体が吸着されないとすれば, 該物質の管底への沈澱が起り初めた時期には既に還元は完了しているものと考えなければならず, さまで長時間を要するものとは思われない.

次に試料と還元液の量的割合では, 割合が40:5:5の時に最も高い定量値が得られる. 恐らく還元液が少量では還元が十分に行われず, 大量に過ぎると alkali による破壊が大となる為と考えられる. 尚還元液の量の多い事は, 最後の計算に際し誤差を大きくする意味からも適当でないと思われる. 又新鮮尿について還元法の必要であるか否かを検討すると, 新鮮尿については還元法を行う必要のない事, 換言すれば尿中への urobilin 体の排泄は殆んど urobilinogen として行われている事が分る. 又尿保存の条件を褐色瓶中での保存と流動 paraffin の重畳操作に分けて検討したが, 還元法を実施して少々原値に近い値を得るには, 1) 氷室内で褐色瓶に入れ流動 paraffin にて空気を遮断して放置する場合と, 2) 氷室内にて褐色瓶に入れ, 空気遮断を行わずに放置する条件下で48時間, 3) 室温 (20°C) で褐色瓶に入れ Paraffin 重畳を行つて放置する条件下で24時間以内であり, 且つ1)の条件下では24時間以内では還元を行わないでも原値に近い値が得られる. 然し本法でも如何に慎重に保存しても72時間を経過すると或は他の条件下では還元法を実施しても原値に近い値は得られないし, 又還元液の吸収係数曲線上に urobilin 極大を認めず還元法

は完全と思われるので上記の条件では urobilinogen は urobilin を超えて更に酸化分解されたものと考えられる. 従つて還元法実施に当り良好な成績を得るには予め被検尿はなるべく低温で日光と空気を遮断して保存する必要のある事が分る.

次に抽出過程に就いて検討すると, 先ず抽出時の pH については urobilinogen の ether への抽出には pH 1~4 前後を最適とし, alkali 性では殆んど抽出されず, 強酸性下では却つて抽出度が低下する. 以上の点から被検液 10cc に氷酢 1 cc を加える原法で抽出時の pH 条件は至適であると考えてよい. 次に抽出溶媒について見ると L. Heilmeyer & Krebs<sup>5)</sup>は ether を Watson<sup>7)</sup>は石油 ether を用いている. そこで最も抽出に好条件な脂肪族炭化水素, ester 族, ether 族, 芳香族, 炭化水素中より適当のものをえらび検討を加えてみると ether は urobilinogen の抽出力は最も強いが, indole や尿色素の抽出性の大きい事, 沸点の低い事, 水に混じり易いこと等の欠点を有し, 石油 ether は urobilinogen の抽出力はやや劣るが水と混じり難く, 沸点もさまで低くなく, indole, 尿色素の抽出性の少い利点がある. 石油 benzol, ligroin 等も之と類似の欠点, 利点を有し石油 ether に優るものとも思われない.

Benzen 等の芳香族炭化水素は urobilinogen 抽出力の劣る他微細な粒子となつて終末反応液中に移行して液を混濁させ, 高値を得る欠点がある. ester 族は urobilinogen 抽出力は割に強いが, その aldehyde 反応色素を溶解する力が割に強く, 色素が水層に移行し難い. 即ち溶媒としては ether 又は石油 ether が優れて居り他の種々の条件を加味すると之より勝れた溶媒は見当らず, Heilmeyer & Krebs 法が ether を, Watson 法が石油 ether を溶媒として用いている点は, 当を得ていると言わなければならない.

次に発色条件につき検討するため, 先ず aldehyde 試薬の組成につき検討を加えると, 従来その組成は人により, 種々のものが用いられ, 代表的なものをあげると次の3つである. 即ち

1) p-dimethylaminobenzaldehyde を 2% の割に 5~10% 塩酸に溶解する. …… Berlin 大学第一内科処方

2) p-dimethylaminobenzaldehyde      2 g  
濃 塩 酸                                      50cc  
蒸 溜 水                                      ad 100 cc

……Hildebrandt 処方

3) p-dimethylaminobenzaldehyde	0.7 g
濃 塩 酸	150cc
蒸 溜 水	100cc

…… Watson 処方

1) は原法とも言うる処方であり 2) は Hildebrandt 処方 Heilmeyer & Krebs がその定量法に応用したもの 3) は Watson がその定量法に際し、組成を変更して用いた処方である。そこで p-dimethylaminobenzaldehyde 及び塩酸の濃度が反応の上で如何なる意義を有しているかを検討してみると、塩酸は50%液にして全量 8 cc に対し 0.4cc 以上、p-dimethylaminobenzaldehyde は 2%液にして 0.4cc 以上が最高呈色を得るに必要である事が分る。次に p-dimethylaminobenzaldehyde の濃度を一定とし、塩酸濃度を種々に変じた場合には塩酸濃度の濃厚な試薬程早く最高呈色に達するが、着色度は弱く、塩酸濃度の稀い試薬は最高呈色に達する時間が遅れるが着色度は却つて高い。従つて塩酸が反応促進剤となる事は確かであるが、一方 urobilinogen-aldehyde 縮合物の着色の強さに関しては別箇の因子を考えざるを得ない。ここにおいて問題となるのは urobilinogen-aldehyde 縮合物の pH による呈色の变化である。そこで教室中川<sup>14)</sup>に従い urobilinogen-aldehyde 縮合物を調製してその呈色の变化を検討すると pH 3~4 附近に於て最高となり、且つ醋酸中においては塩酸中より着色が強く且つ褪色し難い事実が明らかとなつた。以上の点から反応を速かに行わせる為には試薬中の塩酸濃度を濃くする事が必要であり、且 p-dimethylaminobenzaldehyde もある程度以上の濃度が必要であるが、反応色素は強塩酸下では着色度が弱く且つ褪色し易いので何等かの形で pH を変化させ至適着色域である pH 4 附近に反応液の pH を持来する必要がある。ここで問題となつて来るのが ether 抽出液に aldehyde 試薬を加えて振盪後追加する飽和醋酸曹達液である。そこでその添加量につき、検討してみると Hildebrandt 処方では試薬 1 : 醋酸曹達 2 以上の比の場合、Watson 処方では試薬 1 : 醋酸曹達 3 以上の場合の時、着色は最高且安定となり、pH も 4 附近となる事実を明らかとした。

又 urobilinogen に代え indole を用いて検討すると上記の最適の条件下で indole の着色は全く消失した。即ち醋酸曹達液添加の意義は一には之によつて試薬中の塩酸を醋酸に置換し pH を低下させて反応色素の呈色を最高且安定させると共に、indole の着色を消失させる事にある事が分る。

次に各種試薬の呈色度について検討すると着色度は p-dimethylaminobenzaldehyde の濃度が高く塩酸濃度の低い原処方が最も高く、Hildebrandt 処方の着色度はやや劣るが割合に少量で強い着色を得る利点がある。Watson 処方の呈色度は最も劣る。即ち原処方及び Hildebrandt 処方の aldehyde 試薬は定性用として用いるが、Watson 処方のものは定性用としては用いられない事が分る。

次に定量法の場合は urobilinogen を一応溶媒に抽出後、溶媒層に試薬を加えて振盪し、生じた色素を水層に移行させる方法が取られて居り、上記成績とは同一に論ぜられない。そこでこの場合の発色機転につき先ず飽和醋酸曹達添加の時間的間隔につき検討を加えることとした。所で urobilinogen-aldehyde 色素の形成機構は山岡教授<sup>14)</sup>及び教室中川等<sup>15)</sup>の業績によれば p-dimethylaminobenzaldehyde の塩酸塩が urobilinogen の中央 methene 基に縮合し脱水酸化して Quinoide 型の色素団を有する triphenylmethane 型の色素となる事が明かとなつている。従つて urobilinogen が p-dimethylaminobenzaldehyde 塩酸塩と縮合後発色に至るまでにはその塩酸濃度に従つてある時間的間隔が必要であるべきであり、一方余り長く放置すると塩酸による色素の破壊が考えられるので、醋酸曹達添加により塩酸を醋酸に置換するには至適の時間的間隔があると考えられる。そこで p-dimethylaminobenzaldehyde の濃度を一定とし、塩酸濃度を種々に変じた試薬を作り、反応完了後に時間をおいて醋酸曹達を加え、至適条件を検討してみると塩酸濃度が低下するに従い多少反応完結に時間を要するようであるが、大約 1 分前後の間隔をおいて醋酸曹達を加えた時最高着色が得られ、時間の経過による色素の破壊は予期に反して明かには現われなかつた。

次に試薬中の塩酸濃度の影響について検討すると反応の最高に達する迄の時間は濃塩酸(100%塩酸と便宜上呼ぶ。以下之に準ず)で 30 秒、60%、50%塩酸で 1 分、40%塩酸で 2 分、20%塩酸では 5 分となり低濃度塩酸では明かに反応が遅れ、定量用の試薬の塩酸濃度は 50%以下にはなし得ぬ事が分る。然しながら塩酸濃度が余り濃厚となると之を中和するに必要な醋酸曹達液の量が多くなり不便となるので塩酸は 50%のもの 60%のものをを用いるのが至適である。

又 p-dimethylaminobenzaldehyde の濃度につき検討すると最高呈色を得るには 50%塩酸の場合には p-dimethylaminobenzaldehyde は 0.5%以上、60%塩酸の場合振盪を 1 分間行う場合には 0.3%でも充

分である事が分る。

次に urobilinogen の ether 又は石油 ether 抽出液に aldehyde 試薬を加えて反応を行う場合、urobilinogen が試薬中に移行して後に反応するか、又は振盪中に色素となつたものが塩酸中に移行するかを明かにする様検討してみると urobilinogen は石油 ether 層から塩酸へ塩酸濃度が50~60%の間においてはよく抽出されるが濃塩酸中及び稀塩酸中へは殆んど移行しない。即ち普通定量に用いる50%, 60%の塩酸濃度の試薬を加え振盪する時は urobilinogen は唯石油 ether 層から試薬の塩酸中に抽出され、水層中で縮合着色が行われるものと考えてよいであろう。

次に本反応に妨害を与える物質乃至類似反応を与える物質として1936年 Naumann<sup>16)</sup> は以下のものを挙げてゐる。

(Substance)	(Colour of react)
Indole	Red
Skatole	Blue
Indoxyl-Sulfat	Yellow
Protein & Protelinderivat	Redorange to violett
Tryptophan	Yellowish to reddish
Pyrrrole & Pyrrolederivat	Red
Urea	Yellow
Salvalsan	Yellow
Extr. Rhei	Brown
Phenazone	Salmoncoloured
Aldehyde & Urotropin	Inhibit

之等の物質中重要なのは常尿成分としての尿素, indican, 尿では indole, skatole, 及び薬物として P.A.S 及び Sulfonamid 剤であろう。そこで先ずこれらの物質の aldehyde 反応液の吸収曲線を描いておき、以後の反応液につき、これらの物質が影響するかを検討した。処で Heilmeyer & Krebs 法乃至 Watson 法によつて urobilinogen の定量を行う際、之等物質によつて影響を受けるか否かは、一に之等物質が抽出操作に際し ether 又は石油 ether に抽出されるか否か、更に第二にはもし抽出された場合之等物質の aldehyde 反応物質の終末反応液中への移行が行われるか否かにかかつてゐる。

そこで先ず indole について検討したが、既に抽出溶媒の項で検討した如く ether, 石油 ether の何れを用いても溶媒中への indole の抽出はさげられない。唯石油 ether の indole 抽出力は ether に比し遙かに弱い。先にのべた通り indole による呈色が Hildebrandt 処方を用いた場合、試薬1に対し飽和

醋酸曹達2以上加えた場合 ether と振盪後無色となる事を明かにした。而し之等の実験方法は定量法の場合と異つた所があるので更に定量法につき検討した。すると Hildebrandt の試薬を用いた定量法では試薬1:醋酸曹達2以上の比に於いて indole による着色が消失する事が明かとなつた。又 Watson 処方による試薬を用いた場合では試薬1:飽和醋酸曹達3以上の比率の場合に indole による呈色は殆んど無視し得るに至るが、唯この場合 indole-aldehyde 縮合物は石油 ether 層と試薬層の接触面に赤色の架状物として集り水層は ether の場合の如く完全には無色透明とはならず indole の着色の除外という点では ether の方が秀れている様である。次に indoxyl-sulfat を用いた場合では ether には多少抽出されるが、石油 ether には全く抽出されず、ether に抽出されると indole と同様な態度を示す。

次に Sulfonamide では ether には多少抽出され試薬添加時には黄着色を試薬層に認めるが醋酸曹達を加えて振盪すると殆んど無色となり、石油 ether には全く抽出されず、試薬を加えて振盪した時にも全く着色を認めない。次に P.A.S では ether 抽出の場合にはかなり強い着色が認められ定量に不適當であるが、石油 ether 抽出の場合には多少の黄色を認めるが定量法には殆んど影響を与えない事が分る。又尿素については ether, 石油 ether とともに抽出されなかつた。以上定性法の場合に種々不都合を生ずる類似反応物質は定量法の場合には殆んど終末反応液の色調に影響を与えない事が明かとなつた。

次に Heilmeyer & Krebs 法に従い ether で尿の抽出を行い、次いで aldehyde 試薬を加えると強い橙色を呈し、醋酸曹達を添加しても urobilinogen-aldehyde 縮合物本来の赤紫色とならず urobilinogen 定量に際し過少の値を得る事がある。この橙着色の本態を分光化学的に追求すると共に、その橙色が塩酸添加のみでも生ずることから、urobilin である事が分明した。而してこの生成には尿中に不明な酸化物質が含まれている場合塩酸の賦活により urobilinogen より生じたものと考えられた。

次に溶媒としての ether と石油 ether との優劣について、先ず以上の諸実験において明かとなつた点では、

- 1) urobilinogen の抽出力は ether の方が強い。
- 2) 尿色素, indican, P.A.S, sulfonamide, 上述した反応妨害物質の影響から考えると石油 ether の方が優つてゐる。

3) indole については抽出力は石油 etherの方が弱いが発色操作に際しての indole-aldehyde の呈色除去の点では石油 ether は ether にやや劣る。

そこで更に他の優劣を明かにするため、先ず urobilinogen の抽出力につき検討してみると、同一量の溶媒を用いた場合は石油 ether の抽出力は ether のそれに比し遙かに劣るが、Watson の提唱した石油 ether 3回抽出法では却つて優れている。又 ether 抽出液に就て吸光曲線を描写すると、その際は尿色素の抽出力も大きいことが分る。次の反応色素の分離状態を比較すると、石油 ether の方がすぐれていた。

次に尿を ether にて抽出、水洗を2回繰返す間に次第に ether 層は減少し、20cc を抽出に用いた場合最後には 16~17cc しか残らないし、夏季等では更に減量が甚しい。之は一部は ether の蒸発により、一部は ether が水に溶解して失われる事によると考えられる。そうすると蒸発は致し方ないとしても水に溶解して失われる ether 層中に果して残部 ether 層と同濃度に urobilinogen を含んでいるか、或は urobilinogen を含まない単なる ether として水に溶解するかの点である。前者の場合ならば水洗後の ether 層を抽出に用いた量の半量を取り之を定量した値を倍量してもよいであろうが、もし後者だとすると倍量した場合は過大な値を得る事となる。そこで ether で抽出した際、抽出 ether 層を水洗した蒸溜水中の ether に含まれる urobilinogen 量を、食塩飽和の操作によつて分離した ether を用いて測定すると、残部 ether 中の濃度に比し極めて少い事が明となつた。即ち洗滌水中に溶解して流失する ether 中にも urobilinogen が含まれて居り、而も抽出 ether 層中の濃度とはかなりの差がある。そこで Heilmeyer & Krebs 法の如く抽出に用いた ether 量の半量を以て定量した値を倍量したのでは正確ではない。この点については既に 1942年 With<sup>17)</sup> が注意し、彼は抽出、水洗した ether の全量を用いて定量を行つているが之とて urobilinogen を含んだ ether が水洗と共に失われる以上、誤差はさげられないであろう。

尚 ether、石油 ether を夫々用いて行つた終末反

応液の着色度並びに吸光曲線と urobilinogen 水溶液の aldehyde 反応物質のそれとを比較すると、石油 ether を用いた方が urobilinogen 水溶液に近似した aldehyde 反応物質を得たことになる。

以上の諸点から考えれば、石油 ether は urobilinogen 抽出溶媒としては ether より優れており、之を用いた Watson 法は Heilmeyer & Krebs 法より更に精密な方法と言いうる。

## 結 論

Terwen 還元法及び Heilmeyer & Krebs 及び Watson による urobilinogen 定量法に検討を加え以下の結果を得た。

1) Terwen 還元法の還元完了時間は2時間以内であり、試料と還元液の混合の割合は 40 : 5 : 5 が最も適当である。尿の保存はなるべく低温で、空気と光線を遮断して行わなければならない。且保存時間には限度がある。

2) Urobilinogen を溶媒に抽出するに際し至適の pH 域は 1~4 である。

3) 抽出溶媒としての種々の点を比較した結果、ether と石油 ether が残るが、更にこの両者につき検討を加えた結果石油 ether に優れた点の多い事を明かした。

4) 試薬の組成は 60% 塩酸では p-dimethylamino-benzaldehyde の濃度は 0.3%、50% 塩酸の場合は 1% の濃度を必要とする。

5) 試薬添加後醋酸曹達添加迄に約 1 分間振盪操作を行うことが必要であり、この操作によつて溶媒中の urobilinogen は試薬に含まれる塩酸中に抽出され水層中で反応が行われる。この場合の aldehyde 反応の進行は稍々定量的である。

6) 醋酸曹達添加の意義は一は之によつて終末反応液の pH を 4 附近に持ち来し、urobilinogen の着色を最高且安定にすると共に、indole 体による着色を除くことにある。

7) 定性試験に於いて類似反応を与える indole indican, P. A. S., sulfonamid 等の影響は定量法では全く除去し得る。

## 文 献

- 1) Adler u. M. Sachs : Z. gesamt exp. Med., 31, 370, 1923.
- 2) Rudert. Heilmeyer, L. : Biochem. Z., 261, 336, 1933.
- 3) Charnass : Biochem. Z., 20, 401, 1909.

- 4) Terwen, A. J. L. : Dtsch. Arch. Klin. Med., 149, 72, 1925.
- 5) Heilmeyer, L. & Krebs, W. : Biochem. Z., 231, 393, 1931.
- 6) Heilmeyer, L. : Z. exp. Med., 76, 220, 1931.

- 7) Watson, C. J. & Hawkinson, V. : Amer. J. clin. Path., 17, 108, 1947.
- 8) Watson, C. J. : J. Biol. Chem., 200, 691, 1953.
- 9) 中川 : 医学研究, 23, 9号, 昭28. 74.
- 10) Watson, C. J. : Am. J. Clin. Path., 6, 458, 1936.
- 11) 野呂 : 医学研究, 21, 7号, 昭26. 853.
- 12) 大島 : 実験消化器病学, 5, 10号, 1642.
- 13) Schwatz, S., Sborov, V. & Watson, C. J. : Amer. J. Clin. Path., 14, 598, 1944.
- 14) 山岡 : 日本内科学会雑誌, 42, 8号, 531.
- 15) 矢田 : 医学研究, 25, 10号, 昭30. 138, 148.
- 16) Naumann, H. N. : Biochem., J. 30, 347, 1936.
- 17) With, T. K. : Z. phys. Chem., 275, 176, 1942.
- 18) Naumann, H. N. : Biochem. J., 30, 1021, 1936.
- 19) Wilbur, R. L. & Addis, T. : Arch. Int. Med., 13, 235, 1914.
- 20) Wallance, C. B. & Diamond, J. S. : Arch. Int. Med., 35 698. 1925.
- 21) Flatow u. Brünnel : Münch. Med. Wschr. 60, 234, 1913.
- 22) Brugsch u. Retzlaff : Z. exp. Path. u. Ther., 11, 508, 1912.
- 23) Niemann : Z. phys. Chem., 146, 181, 1925.

---

## Studies on the Quantitative Determination of Urobilin Body

### Part 1

### Studies on the Quantitative Methods of Urobilin Body

By

Haruo WATANABE

The First Department of Internal Medicine,  
Okayama University, Medical School

(Director : Prof K. Kosaka)

#### Conclusions

The Terwen's reduction method and the methods reported by Heilmeyer, Krebs and Watson were fully observed. And the results were as follows.

1. Urobilin was completely reduced to urobilinogen within 2 hours by the Terwen's method, and the highest urobilinogen value was observed on the mixed rate of the materials and the reducing agents in 40 : 5 : 5. The materials should be stored, under the isolation of air and light, at the low temperature as possible and there was a limitation for the preserved time.

2. The optimal range of pH for the extraction of urobilinogen into the solvent.

3. It was demonstrated that petroleum ether was the best solvent for the extraction of urobilinogen since the comparative studies on the various solvent, especially between ether and petroleum ether.

4. The composition of reagent needed the concentration of 0.3% P-dimethylaminobenzaldehyde on the use of 60% hydrochloric acid and of 1 % P-dimethylaminobenzaldehyde on the use of 50 % hydrochloric acid.

5. The shaking process for one minute was needed till the addition of sodium acetate after the addition of reagents, urobilinogen in the solvent was extracted into hydrochloric acid in the reagent and the reaction was performed in the water layer by the above treatment. The progress of aldehyde reaction on this occasion was considerably quantitative.

6. The significance of adding sodium acetate was to shift to nearly the pH 4 after the terminal reaction and was to remove the coloration by indole body, with bringing the coloration of urobilinogen up to the highest and keeping the stability of it.

7. The influence of indole, indican, P.A.S. and sulfonamid derivatives shown the similar reaction in the qualitative test could be eliminated on the quantitative method.

---