

## インヂカン定量に関する実験的研究

## 第一編

## Jolles's 反応の化学的本態に関する実験的研究

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

副 手 進 東 勉

〔昭和 31 年 3 月 15 日受稿〕

## 内 容 目 次

## 第一章 緒 言

## 第二章 Jolles's 反応の呈色物質製出に就いて

## 第 1 項 実験材料

## 第 2 項 製出方法

## 第 3 項 実験成績

## 第三章 Jolles・竹内・反応の呈色物質製出に就いて

## 第 1 項 実験材料

## 第 2 項 製出方法

## 第 3 項 実験成績

## 第四章 製出結晶の理化学的性状に就いて

## 第五章 Thymolindogenid の合成に就いて

## 第 1 項 合成過程の概要

## 第 2 項 合成方法

## 第 3 項 合成結晶の理化学的性状

## 第六章 考 按

## 第七章 結 論

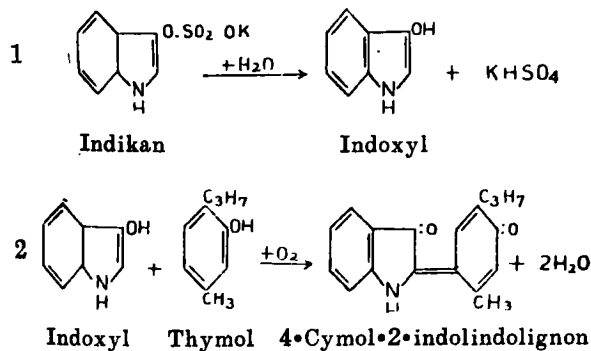
## 文 献

## 論文附図

## 第一章 緒 言

生体インヂカンの微量定量原理として専ら適用されつゝある Jolles's 反応<sup>1)2)</sup>の化学的本態は、衆知の如く今日一般に下式が承認されている。

第 1 図 Jolles's 反応



然るに、此の化学反応式に基いて測定された尿インヂカンの正常一日排泄量に関する諸家成績を見るに、9.5~21.0mg (Jolles)<sup>2)</sup>、

1.0~40.0 mg (Olivet)<sup>3)</sup>、39.0~148.0 mg (Sharlit)<sup>4)</sup>等が報告されて居り、其の成績には甚だしい相違がある事が指摘される。

4-Cymol-2-indolindolignon なる Thymolindogenid (以下 Ti と略す) は最初 Jolles<sup>2)</sup>によりインドオキシル酸から合成され、其の後 Haas<sup>5)</sup>、Baretzko<sup>6)</sup>等、極めて少数の合成者が文献上見られる所であるが、Ti を製出し以つて Jolles's 反応の化学的本態を確認せる業績は未だ見られない所である。此所に於いて私は Ti に誘導して測定された諸家正常尿インヂカン値に指摘される著しい相違の原因を究明し、以つて正常尿インヂカン値を決定せんとするに当り、解決すべき最も本質的な問題として、尿に於ける Jolles's 反応の呈色本態を化学的に確認せんと企図し、遂に所期の目的を達し得たるを以つて、此所に其の概要を報告せんとす。

## 第二章 Jolles's 反応の呈色物質 製出に就いて

### 第1項 実験材料

インドール負荷家兎24時間尿を使用せり。即ちインドール50~100mgを純胡麻油3~4ccに溶解して成熟家兎背部皮下に注射し、其の24時間尿を飼料及び糞塊の混入せざる様に注意して蓄尿した。

### 第2項 製出方法

インドール負荷家兎24時間尿全量を大型分液漏斗に濾過し、氷醋酸を加えて弱酸性となし、チモール2~5gを無水アルコール20ccに溶解して加え振盪す。濾尿同容量の0.5% Obermayer's 試薬を注下して室温に2時間放置したる後、クロ、フォルム300~400ccを加え強振盪して色素を抽出す。クロ、フォルム浸を分離して反覆水洗し、洗液が無色透明となるに至り、1/2容量の0.05%苛性ソーダ液で1回洗いたる後、更に数回反覆水洗す。斯くして得たる赤褐色透明なるクロ、フォルム浸を分溜コルベンに濾過し、水浴上で内容を15~20ccに濃縮したる後、内容を小型ベッヘルに移し断続的に真空蒸溜(3~5mmHg圧)を強行する事1~2日間に及ぶ時は、遂に深赤褐色油状濃縮物中より、微量ながら強く光線を反射する赤色色素及び青色色素が析出し沈澱するに至る。之を吸引濾集して遮光して乾燥す。チモール臭を有する暗褐色半流動状濾液を塩化カルシウム乾燥器内に1~2週間放置する時はチモール臭を有する大なる無色板状晶が析出し、最後に暗褐色非結晶性樹脂状物を残留す。製出結晶は次の如く再結晶せり。

#### 1. 赤色色素

赤色色素及び青色色素の混合物を50ccの無水アルコールに溶解せしめ吸引濾過して、先づアルコール易溶性赤色色素とアルコール不溶性青色色素を濾別したる後、アルコール濾液を水浴上に乾固して得たる金属様光沢を有する深赤色色素膜を無水アルコールから数回再結晶したる後、クロ、フォルム

ムから再結晶す。

#### 2. 青色色素

濾別したる青色色素は、無水アルコールで充分洗いたる後、冷却器を附し沸騰せるアセトンに溶解せしめ、之を水浴上に濃縮したる後、水冷して再結晶す。

#### 3. チモール臭を有する無色板状晶

少量の氷醋酸又は無水アルコールに溶解せしめたる後、稍々大量の水を振盪して放置すれば大なる斜方形板状晶として析出す。

### 第3項 実験成績

10例の製出実験成績は第1表の如く、赤色及び青色混合色素の最大収量は約9mgで、チモール5gを加えた実験例では赤色色素の析出を見ず、再結晶後の融点(補正せず)は赤色色素234°~236°C、青色色素386°~388°C、無色板状晶48.5°~49.0°Cである。

## 第三章 Jolles・竹内・反応の呈色 物質製出に就いて

### 第1項 実験材料

前章第1項の実験材料に準ず。

### 第2項 製出方法

インドール負荷家兎24時間全尿を分液漏斗に濾過して弱醋酸々性とし、チモール2~5gを無水アルコール20ccに溶解して加え、竹内氏試薬5~10cc、混液同容量の発烟塩酸を順次加えて振盪し室温に2時間放置したる後、クロ、フォルム300~400ccを加えて振盪し色素を抽出す。クロ、フォルム浸を分離し反覆水洗したる後、1%澱粉液数滴を加え1%次亜硫酸ソーダ液を加えて振盪し、クロ、フォルム浸中の沃度を完全に中和したる後、更に反覆水洗し、洗液が無色透明となるに至らしむ。斯くして得たる赤褐色透明なるクロ、フォルム浸に前章製出実験に於けると同様の濃縮方法を適用すれば、Jolles's 反応に於けると全く同一状態で赤色色素、青色色素及び無色板状晶が析出し、最後に暗褐色非結晶性樹脂状物を残留するを以つて、此等の製出結晶の再結晶は凡て前章製出実験に準拠せり。

第 1 表 Jolle's 反応呈色物質製出実験成績

実験番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
インドール負荷量(mg)	50	100	50	100	100	100	100	100	50	50	
家 兎	性	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♂	♂	♀	♀
	体重(kg)	3.15	3.00	4.05	4.10	3.80	3.95	4.05	3.25	3.05	3.65
尿	性	アルカリ	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
	色	淡黄褐	黄褐	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	淡黄褐
	比 重	1.016	1.018	1.019	1.020	1.017	1.016	1.019	1.018	1.020	1.016
	総 量(cc)	170	160	203	180	207	180	128	165	180	200
チモール量(g)	2	5	5	5	2	5	3	2	3	3	
色素析出量の概略(mg)	5	1	2	2	9	2	6	7	3	2	
色 素 析出状況	赤色色素	+++	-	-	-	+++	-	+++	+++	++	+
	青色色素	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+
融 点 (°C)	赤色色素	234 ~ 236									
	青色色素	386 ~ 388									
	無色板状晶	48.5 ~ 49.0									

第 3 項 実験成績

5 例の製出実験成績は第 2 表の如く、赤色及び青色混合色素の最大収量は約 12mg で、チモール5gを加えた実験例では赤色色素の析出を見ず、再結晶後の融点は赤色色素234°~237°C、青色色素 386°~388°C、無色板状晶 48.5°~49.0°C である。

第四章 製出結晶の理化学的性状

1. 赤色色素

融点 234°~237°C、美麗なる赤色プリズム晶、水に水溶、アルコール、エーテル、クロ、フォルム等の一般有機溶媒に易溶である。

酸及びアルカリに溶解して特有なる呈色反応を示し、濃硫酸に暗紫色、発烟塩酸に青紫色、濃硝酸に紫赤色、40%三塩化醋酸に紫色に溶解するも氷醋酸には赤朱色に溶解す。10%苛性ソーダ又は苛性カリには淡黄緑色に溶解す。赤色色素のクロ、フォルム溶液数 cc に 1~2 滴の紋上の濃厚なる強酸を含有せしめると、クロ、フォルム溶液

第 2 表

Jolles-竹内-反応呈色物質製出実験成績

実験番号	1	2	3	4	5	
インドール負荷量(mg)	100	100	100	50	100	
家 兎	性	♂	♂	♂	♀	♀
	体重(kg)	4.00	3.20	3.25	3.50	3.50
尿	性	アルカリ	〃	〃	〃	〃
	色	淡褐	黄褐	〃	〃	〃
	比 重	1.018	1.017	1.020	1.020	1.019
	総量(cc)	212	162	190	105	163
チモール量(g)	2	5	2	3	5	
色素析出量の概略(mg)	8	1	12	4	2	
色 素 析出状況	赤色色素	+++	-	+++	+++	-
	青色色素	+	+	+	+	++
融 点 (°C)	赤色色素	234 ~ 237				
	青色色素	384 ~ 386				
	無色板状晶	49.0 ~ 50.0				

は直に夫々の強酸に特有なる紫色（但し氷醋酸では赤朱色）となり，稀薄なる酸を含有せしめると帯紫赤色となり，水洗すれば瞬時にして元の赤褐色乃至赤橙色のクロ、フォルム溶液となる。之を苛性ソーダ又は苛性カリ液で振盪すると色素はアルカリ層に移行して淡黄綠色に溶解し，弱塩酸酸性として振盪すれば再び色素はクロ、フォルム層に移行す。以上の赤色色素の理化学的性状は，融点に関する以外は，後私に私がインドオキシル酸から合成したTi（融点 $239^{\circ}\sim 240^{\circ}\text{C}$ ）の理化学的性状に一致し，両者の混融点は $238^{\circ}\sim 240^{\circ}\text{C}$ を示せり。

## 2. 青色色素

融点 $384^{\circ}\sim 388^{\circ}\text{C}$ ，金属機光沢ある青色の紡錘状又は針状乃至無晶形結晶で，水，アルコールに不溶，エーテルに難溶なるもクロ、フォルムに青紫色，沸騰せるアセトンに青紫色～青綠色，氷醋酸に綠色，濃硫酸には暗綠色～濃青色に溶解す。以上の青色色素の理化学的性状は青藍（融点 $390^{\circ}\text{C}$ ）の其れに一致し両者の混融点は $386^{\circ}\sim 390^{\circ}\text{C}$ を示せり。

## 3. 無色板状晶

融点 $48.5^{\circ}\sim 50^{\circ}\text{C}$ ，無色半透明，チモール臭を有する大なる斜方形板状晶。水に不溶，アルコール，エーテル，クロ、フォルム，醋酸及び三塩化醋酸に易溶である。以上の無色板状晶の理化学的性状はチモールの其れに一致し，両者の混融点は $49^{\circ}\sim 50^{\circ}\text{C}$ を示せり。

## 4. 暗褐色非結晶性色素

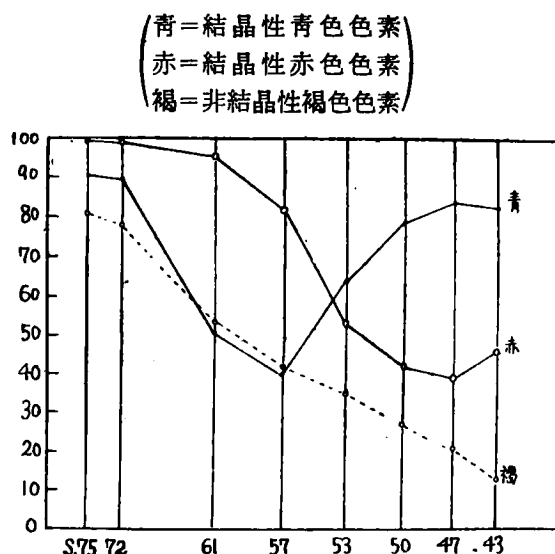
少々不快臭を有し，水に不溶，アルコール，エーテル，クロ、フォルム，ベンツォール等の一般有機溶媒に易溶。其のクロ、フォルム溶液に発煙塩酸又は三塩化醋酸を滴下するも特有なる呈色反応を認めない。

## 5. 定型的 Farbkurve

Pulfrich's Stufenphotometer を使用し，10mm 液層で測定した赤色色素及び暗褐色非結晶性色素のクロ、フォルム溶液並びに青色色素のアセトン溶液に於ける定型的

Farbkurve は第2図の如し。

第2図 各種製出色素の定型的 Farbkurve

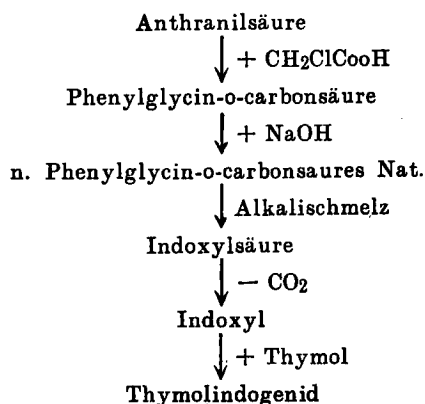


## 第五章 Thymolindogenid の合成に就いて

### 第1項 合成過程の概要

Jolles's 反応及び Jolles・竹内・反応を適用してインドール負荷家兔尿から製出した赤色色素の化学的本態を確認する必要性から実施した私の Ti の合成過程の概要は第3図の如し。

第3図 Thymolindogenid の合成過程



### 第2項 合成方法

#### 1. インドオキシル酸の合成方法

D. R. P. 52, 273 に準拠して合成したフェニールグリチン・オルト・カルボン酸 12g より得たる約 15g の中性ナトリウム塩を細末とし， $140^{\circ}\text{C}$  に 2 時間乾燥した後，D. Volländer<sup>8)</sup> のインドオキシル酸合成法を参考とし，可及

的無水の苛性ソーダ末 35g に密に混和して 500cc 容量の平底三角コルベンに移し、油浴上 250°~265°C に熱し、内容が均一なる橙黄色となるに至り、之を細末とし発烟塩酸 100g 及び氷片 200g の混液中に徐々に投入すれば、インドオキシル酸は灰白色の絮状物として沈澱するを以つて、之を速に濾集すれば、此の間インドオキシル酸は緑色に変色するも約 0.3g の収量を得。

## 2. インドオキシル酸からの Ti の合成方法

インドオキシル酸 0.3g を水 150cc と共に水浴上 65°~75°C に加熱し、炭酸瓦斯発生の止むに至り、熱時之を濾過して得たるインドオキシル含有淡黄緑色濾液を分液漏斗に移し、チモール 2g を氷醋酸 5cc に溶解して加え、10% Obermayer's 試薬 50cc を加えて振盪すれば、混液は直に濃紫色に変ず。室温に 2 時間放置したる後、クロ、フォルム 500cc を加えて色素を抽出す。クロ、フォルム浸を分離し反覆水洗し、洗液が無色透明となるに至り、深赤色透明なるクロ、フォルム浸を分溜コルベンに移し、水浴上で内容を約 20cc に濃縮し直に氷冷すれば、Ti 及び少量の青藍が同時に結晶状に析出す。之を濾集して無水アルコール 100cc 中に投じ、アルコール可溶性 Ti とアルコール不溶性青藍を濾別し、次で赤色アルコール濾液を水浴上に乾固したる後、無水アルコールから Ti を反覆再結晶して混在する微量の青藍を完全に除去し、最後にクロ、フォルムから再結晶すれば、約 0.4g の収量に於いて Ti の純粹結晶が得られる。

### 第 3 項 合成結晶の理化学的性状

融点 238°~240°C (補正せず) の赤色プリズム晶、溶解性及び酸、アルカリに対する呈色反応は Jolles's 反応及び Jolles・竹内・反応の呈色物質として製出に成功した既述の赤色色素の其れに完全に一致し、N 分析値は 5.1% で理論値 ( $C_{18}H_{17}NO_2$  として 5.02%) と殆んど一致した。

## 第六章 考 按

Ti を製出し以つて Jolles's 反応の呈色物質を化学的に確認せんとする試みは、遂に不成功に終つた Jolles<sup>1)</sup> の実験を以つて、文献上唯一の報告と認められるのであるが、Ti の製出に成功せる私の実験成績から推察するに、Ti の製出の成否は、反応媒質に加うべきチモール量は適量なるべき事並びに Ti 抽出クロ、フォルム浸の濃縮に際しては、加熱による濃縮方法に更に真空蒸溜を強力に併用する事の重要性が指摘される。

各種の製出結晶の理化学的性状及び混融点に関する成績から、製出せる赤色色素が Jolles's 反応及び Jolles・竹内・反応の呈色物質であり且つ私が合成せる Ti の純粹結晶と化学的に同一物質である事は疑義の存しない所であろう。

製出 Ti と合成 Ti との間に認められる僅少なる融点の相違は、前者か後者に比し其の化学的純度に於いて稍々遜色がある事を示すに過ぎないものと考えられる。Jolles's 反応の呈色物質に関する Jolles の報告と私の成績との間に見られる二つの注目すべき相違点は、Jolles's 反応の呈色物質の対氷醋酸呈色を紫色となし且つ又合成 Ti の融点を 218°~220°C とする Jolles に対し私の製出及び合成せる Ti は氷醋酸に赤朱色に溶解し、融点は Jolles の合成 Ti に比し夫々 16°~17°C 及び 20°~21°C の高値を示す事である。

由来 Ti の合成報告は極めて少数で然も Ti の理化学的性状に関しては Jolles 以外は詳細なる記載を欠ぎ、従つて私の製出又は合成せる Ti が Jolles の合成せる Ti と全く異なる新色素であるか否かは速断を許さない所であるが、Jolles's 反応に於ける neue Produkt がクロ、フォルムに赤色に、氷醋酸に紫色に溶解すると報告せる Jolles<sup>1)</sup> の記載中、対氷醋酸呈色に関しては疑義が存在する。次に青色色素及びチモール臭を有する無色板状晶を夫々青藍及びチモールと認定する事も其の理化学的性状から疑念を抱く余地は無いと考え

られる。然して非結晶性樹脂状物として最後に残留せる暗褐色色素の本態、就中此のものが尿インヂカンに由来する Indogenid であるか否かは遂に確認し得なかつたのであるが、Urocarmine なる Phenolindogenid は Fearon 及び Thompson<sup>9)</sup> に依ればクロ、フォルムには不溶解なる事が報告されている。

私の以上の実験成績は、文献上初めて尿から Ti を製出し、以つて Jolles's 反応の化学反応式を生体材料に就いて確認すると共に、Jolles's 反応及び Jolles・竹内・反応を適用するに於いてはクロ、フォルム中に抽出される色素は単に Ti のみならず同時に又青藍及び本態不明の褐色色素を含む少なくとも数種類の色素が混在する事を実証し、且つ Ti のクロ、フォルム溶液に於ける対酸呈色反応の種々なる様相から Jolles's 反応の化学反応式に立脚して測定し報告された諸家正常尿インヂカン値に見られる著しい相違の原因究明に甚だ興味ある成績を示したものと思考される所であり又 Ti の合成は其の目的の特殊性及び合成材料たるインドオキシル酸の入手難から極めて少数の合成報告を見るに過ぎない所であるが、大量のインドオキシル酸を要する Jolles の合成法に比し、私の合成法は少量のインドオキシル酸から Ti の純粋結晶を合成し得る点に於いて長所を有するものと信じている。

## 第七章 結 論

Jolles's 反応の化学的本態を生体実験に於

いて確認せんとして行いたる Thymolindogenid の製出並びに合成に関する実験成績から次の結論を得た。

1. Jolles's 反応の呈色物質を文献上初めて融点 234°~237°C の赤色プリズム晶として製出した。

2. 製出せる赤色プリズム晶は融点238°~240°C の純粋合成 Thymolindogenid と化学的に同一物質である。

3. Jolles's 反応及び Jolles・竹内・反応の呈色物質は同一色素にして何れも Thymolindogenid である。

4. 私が製出し又は合成せる Thymolindogenid は Jolles の合成せる Thymolindogenid に比し融点に於いて夫々 16°C 又は 20°C 高く且つ氷醋酸には赤朱色に溶解する。

5. Jolles's 反応及び Jolles・竹内・反応を適用せる製出実験に於いては、Thymolindogenid の他に尚お青藍及び本態不明の褐色色素が同時にクロ、フォルムに抽出される。

6. 少量の合成材料にて足る Thymolindogenid の合成方法に就いて記載せり。

(本論文の要旨は昭和29年内科学会第9回中国四国地方学会に於いて発表した。本研究は昭和18年満洲医大生化学教室で行つた。誌上発表の機会を得たるに当り、当時終始御懇篤なる御指導を頂いた戸田茂教授並びにインドオキシル酸合成に御協力を頂いた元大連病院内科副医長、現東京慈恵医大生化学教室牧野堅教授に深謝致しますと共に、御校閲を頂いた平木潔教授並びに水原舜爾教授に厚く感謝致します。)

## 文 献

- 1) Jolles . Hoppe-Seyler's Z., Bd. 87, S. 310 (1913)
- 2) Jolles: Hoppe-Seyler's Z., Bd. 94, S. 79 (1915)
- 3) Olivet · Klin. Wochschr., S. 2439 (1928)
- 4) Sharlit : J. of biol. chem., 99, S. 537 (1931)
- 5) Haas : cit. J. Olivet : Zeit. f. klin. med., 119, S. 195 (1929)
- 6) Baretzko: cit J. Olivet : Zeit. f. klin. med.,

110, S. 195 (1929)

- 7) 竹内慶次郎：東京医学会雑誌，第37巻，197頁，大正12年。
- 8) Volländer : Ber. deut. chem. Ges., 52, S. 325 (1919)
- 9) Fearon and Thompson : Bioch. J., Vol. 24, S. 1371 (1930)

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School.  
(Director: Prof. Dr. K. Hiraki)

## Experimental Studies on the Quantitative Determination of Indican.

### Part I. Experimental study on the chemical products resulted from Jolles's reaction.

by

Tsutomu Shindo

Out of the certain experimental results obtained in the isolation as well as synthesis of Thymolindogenide, which has been undertaken to determine certain products of Jolles's reaction in vivo, I could arrive at the following conclusions:-

1) For the first time in our literature, I have succeeded in isolating certain color substances of Jolles's reaction, in the form of a red prismatic crystal whose melting point has proved as  $234^{\circ}\sim 237^{\circ}\text{C}$ .

2) The red prismatic crystal that thus has been isolated proves just the same in its chemical sense with the pure synthetic Thymolindogenide (that has its melting point at  $238^{\circ}\sim 240^{\circ}\text{C}$ ).

3) Color substances which I get from Jolles's and Jolles-Takeuchi's reactions have proved one and the same, both being Thymolindogenide.

4) Those Thymolindogenides which I myself have isolated as well as synthesized have higher melting points respectively, compared to Thymolindogenide synthesized by Jolles, by  $16^{\circ}\text{C}$  or  $20^{\circ}\text{C}$ ; moreover, dissolve themselves into crimson when they should have met with glacial acetic acid.

5) In an isolation test in which Jolles's or Jolles-Takeuchi's reactions were adopted, we could observe Indigo and certain non-crystal brown pigment, to be extracted simultaneously into the chloroform, besides Thymolindogenide.

6) In this, I have mentioned the synthetic method of producing the Thymolindogenide out of scanty amount of stuff.

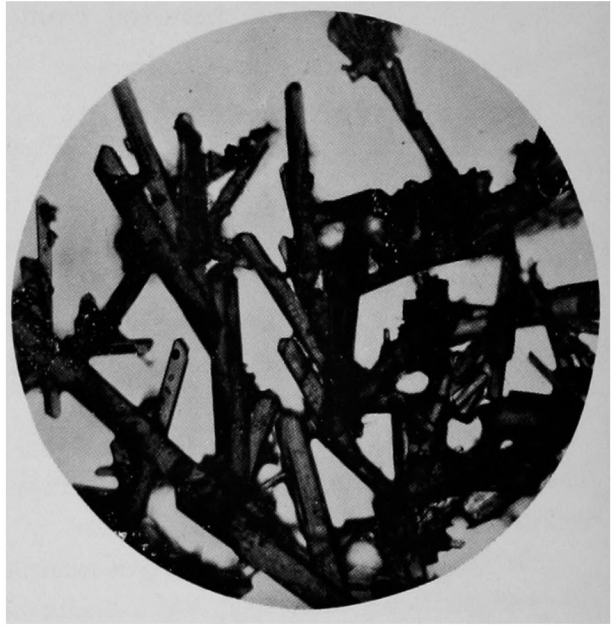
---

進 東 論 文 附 圖

Thymolindogenid  
(製 出 結 晶)



Thymolindogenid  
(合 成 結 晶)



Indigo  
(製 出 結 晶)

