恒定する。

分析をお願いした東大農化佐橋研究室原田嬢に謝意を表する。

(1) WALBAUM: <i>J. pr. Chem.</i> , [2] 96, 245 (1917)	(9) CROMBIE: <i>Perfumery & E. O. Review</i> (1950) June p. 197 [<i>J. C. S.</i> , 177, (1950)]
(2) RUZIEKA: <i>Helv.</i> 17, 1602 (1934)	(10) WOHL: <i>Ber.</i> , 41, 3621 (190)
(3) 武居: 理研, 14, 510 (1935); 農化, 14, 709 (1938)	BANDRENGHIEN: <i>Chem., Ztr.</i> , 1, 191, (1924); 1, 414 (1924)
(4) M. STOLL: <i>Helv.</i> , 21, 1542 (1938)	PREVOST: <i>Chem. Ztr.</i> , 1, 864 (1929)
(5) BOURGUEL: <i>Bull. Soc. Chem.</i> , [4] 1067 (1929)	WINTERSTEIN: <i>J. A. C. S.</i> , 58, 104 (1934)
(6) GREY: <i>Chem. Ztr.</i> , 1405 (1937) I	(11) HUNSDIECKER: <i>C. A.</i> , 1872 (1948)
(7) 武居: 農化, 16, 772 (1940)	(12) 武居: 農化, 14, 717 (1938)
(8) STOLL: <i>Ber.</i> , 73, 1358 (1940)	

Summary

Ruzicka's $\Delta^{2,6}$ -nonandienal (2-*trans*-6-?), which was obtained by him from β, γ -hexenol prepared by means of subjecting ethyl ester of sorbic acid to the Bouveault's reduction, is identical with the natural substance, while Hunsdiecker's $\Delta^{2,6}$ -nonandienal which was derived from 2-penten-1-ol and Takei's $\Delta^{2,6}$ -nonandienal (2-*trans*-6-?) from leaf alcohol are different from the natural type.

From the above fact the latter two are considered to be 2-*trans*-6-*trans*, and Ruzicka's to be 2-*trans*-6-*cis*.

We prepared ethyl-vinylcarbinol (I) from ethyl magnesium bromide, and by subjecting it to allyl-transportation and the Grignard's reaction we could synthesize *trans*- β, γ -hexenol.

3,5-Dinitrobenzoate of the last mentioned substance is identical with that of natural leaf-alcohol in having mp. of 495~50°C)

Hence the stereo form of natural leaf-alcohol is *trans*-form.

分配クロマトグラフ法によるタンニン及び色素の研究

(第2報) 丸型濾紙クロマトグラフ法によるルチンの簡易定量法

大 島 康 義, 中 林 敏 郎 (九州大学農学部生物化学研究室)

昭和 26 年 1 月 27 日 受理

Studies on Tannins and Pigments by the Method of Partition Chromatography.

Part 2. A Simple Method for Quantitative Determination of Rutin
by the Chromatography with Round Filter Paper.

By Yasuyoshi ÔSHIMA and Toshio NAKABAYASHI.

(Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

近年 rutin は生理作用が研究され、その薬効が重要視されるに従つて、その定量法も既に數種が報告されている。例えば煙草の rutin 含量を重量法で測つた C. O. BADGETT 等⁽¹⁾, spectrophotometric method で quercetin と分割定量した R. V. SWANN⁽²⁾, W. L. PORTER⁽³⁾ 等, fluorophotometric method による A. J. GLAZKO⁽⁴⁾ 等, 尿中の rutin を AlCl_3 で発色せしめて比色定量した W. L. PORTER 等⁽⁵⁾, 醋酸アルミニウムを用いた刈米⁽⁶⁾ 等, 及び paper chromatogram より rutin の spot を AlCl_3 -水溶液をもつて抽出し、之を spectrophotometric method で定量した S. H. WENDER⁽⁷⁾ 等の報告がある。

先に私共は第1報⁽⁸⁾において rutin, isoquercitrin, quercitrin 等の quercetin-3-glycoside が paper chromatography により明確に分離できる事を報告したが、此の性質を利用して rutin の簡易定量法を研究した。

一般に paper chromatography においては得られた spot の面積が試料濃度の對數と直線的關係にある事⁽⁹⁾ が知られているが、Table 1 に見られる如く、醋酸エチル：醋酸：水 (50：2：50) の展開溶媒を用いた場合の rutin の R_f 値は 0.10 であり、spot の展開が充分とは言えず、原點における試料の spot の面積の影響が大と考えられる。しかしながら、水を飽和した *n*-ブタノールを用いた場合、rutin の R_f 値は 0.45 で、且つ他の

Table 1. Rf Values of Quercetin-3-glycosides

Flavonoid	Rf value	
	Et. O. Ac. : AcOH : H ₂ O	n-Butanol
Rutin	0.10	0.45
Isoquercitrin	0.43	0.68
Quercitrin	0.67	0.80
Quercetin	0.90	0.70

いれば、その spot は圓形の帶狀を形成するから、その半徑を測定する事により面積を容易に測定し得るであろうと考えて實驗を行つた。その結果、この丸型濾紙クロマトグラフ法による rutin の定量が一定の濃度範囲内で可能であり、且その装置及び操作も極めて簡便で實用的に有効なものであると考えられる。尙本法は rutin のみならず、同様な性質を持つ他の物質にも適用される事が考えられる。

實 験 の 部

1. 使用材料及び装置 本實驗に使用した rutin は第 1 報にて報告したそばより抽出したものである。濾紙は丸型の東洋濾紙定量用 No. 5 B 直径のもの 11 cm を用い、之にコンパスで半徑 4 cm の同心圓を畫しておく (Fig. 2)。

展開溶媒には水を飽和した n-ブタノールを用い、呈色試薬には鹽基性醋酸鉛の飽和水溶液を用いた。

Fig. 1. Apparatus for chromatographic determination of rutin

- d : desiccator
 p₁, p₂ : petri dish
 w : water saturated with n-butanol
 b : n-butanol saturated with water
 f : round filter paper
 c : conical cup packed with cotton
 wi : wick

く、芯の高さはその先端がベトリ皿の縁を僅かにこす程度にする。同型のベトリ皿 (p₁) を別に一個準備する。之を n-ブタノールを飽和した水 (w) をはつたデシケーター (d) の中段の所へ置き氣密に蓋をする。

2. 操 作 種々の濃度の rutin のアルコール溶液をその 1 滴が 0.02 cc となるマイクロペットで丸型濾紙の中央に 1 滴々下する。此の時の spot の半徑は 0.5 cm となる。Spot を乾燥した後、此の濾紙を水をはつたデシケーター中に放置して濾紙に水分を飽和せしめる。次に此の濾紙を取り出し、濾紙の中央、即ち spot の中心が芯の先端と接觸する様にベトリ皿の上に置き、濾紙を水平に保持する爲に別に準備したベトリ皿 (p₁) で上より蓋をする (Fig. 1)。

デシケーターを氣密に保ち、溶媒の前端が半徑 4 cm の同心圓に到達する迄展開する。約 30 分を要する。展開が終れば濾紙をとり出し、充分乾燥した後鹽基性醋酸鉛の飽和水溶液を噴霧して rutin の黄色着色帯を現像する。此の際濾紙が水平に保持されておれば着色帯は正しい圓形を示し、且展開が正確に行われておれば、その Rf' 値 (中心より色素の前端迄の距離 / 中心より溶媒前端迄の距離) は常に 0.75 附近を示す。

次に通常光又は紫外線の下で着色帯の外徑 (r₁) 内徑 (r₂) を測り、着色帯の面積 (S) を算出する (Fig. 2)。

flavonoid との分離も充分である。但し此の際得られる rutin の spot は所謂 "tailing" を起し、その面積の測定が困難である。

一方、濾紙クロマトグラフ法の一簡易法として、L. RUTER⁽¹⁰⁾ が丸型濾紙によるクロマトグラフ展開を報告しているが、今此の方法を rutin の定量に用

Fig. 2. Round filter paper

- s : Yellow coloured ring of rutin developed by basic-lead acetate
 f : Solvent front.

定量に用いた装置は Fig. 1 に示す。直径 10 cm、深さ 2 cm のベトリ皿 (p₂) の中に n-ブタノール (b) を入れる。その中央に中に綿をつめ直径 1 mm の木綿の芯 (wi) を有する圓錐形のガラス (c) を置

Fig. 3. The linear relation between area of ring and logarithm of rutin content.

Table 2. Rutin Content and Area of Yellow Coloured Ring

Rutin content		Radius of ring		Area of ring	Deviation *
in 10 cc mg	in 1 drop r	r ₁ cm	r ₂ cm	S cm ²	%
39.80	79.6	3.20	2.11	18.17	
		3.15	2.00	18.60	
		3.21	2.14	18.24	
26.50	53.0	3.10	2.00	17.60	±0.0
		3.08	1.98	17.48	-0.7
		3.15	2.07	17.07	+0.6
20.00	40.0	3.10	2.14	15.93	-0.4
		3.08	2.07	16.33	+2.1
		3.12	2.16	15.92	-0.5
18.42	36.8	3.10	2.17	15.39	-0.1
		3.08	2.14	15.41	+0.1
		3.11	2.16	15.72	+2.1
15.00	30.0	3.00	2.11	14.28	-0.8
		3.08	2.21	14.45	+0.3
		2.98	2.07	14.43	+0.2
10.74	21.5	2.90	2.09	12.96	+1.1
		2.90	2.10	12.56	+0.1
		3.00	2.25	12.36	-1.5
9.21	18.4	2.95	2.25	11.43	-2.2
		3.00	2.30	11.65	-0.4
		2.92	2.18	11.84	+1.2
6.14	12.3	3.00	2.45	9.41	-0.4
		2.90	2.34	9.21	-2.5
		2.92	2.34	9.58	+1.4
5.02	10.0	2.90	2.40	8.32	+0.2
		2.92	2.44	8.08	-2.7
		2.98	2.48	8.57	+3.3
3.07	6.1	3.00	2.56	7.68	
		2.98	2.53	7.79	
		2.95	2.50	7.70	

* The deviations are calculated from Fig. 3.

即ち殆んど影響を受けない事が判る。

醋酸ソーダの場合, Rutin の一部が Na 鹽となつて残留する爲測定できない。

(iii) 他の色素の影響 Quercitrin 及び isoquercitrin は 10 cc 中 50 mg 以下の濃度で混在する場合は rutin と同様の展開を行つても, その着色帯の内径は 3.5 cm 以上であり rutin 定量の阻碍とはならない。

Quercetin, chlorophyll 等は展開溶媒の最先端迄流される爲, 又 tannin 等の水に易溶の色素類は展開される事なく原點に残留する爲, いずれも rutin 定量の阻碍とはならない。

以上の結果より本法が rutin の實用的な定量法として有効なるものであると考えられる。

尙本實驗に用いた費用の一部は文部省科學研究費によつた。附記して謝意を表する。

3. 結果 上述の如くして得られた結果は Table 2. に示される通りとなり, この値を 10cc 中の rutin の mg 数の對數を横軸に面積を縦軸にとつた場合の兩者の關係は Fig. 3. に示される。Fig. 3 より判る通り rutin の濃度が 10 cc 中 5 mg より 25 mg 迄の間では ±2.5% の誤差の範圍内で定量が可能である。

4. 阻碍物の影響 (i) pHの影響:

苛性ソーダでアルカリ性とした場合 rutin の Na 鹽を生じ, 之が水に易溶性である爲展開されずに原點に残り測定が不可能となる。

醋酸酸性の場合には醋酸臭の残らぬ迄充分乾燥後展開すればその影響は認められない (Table 3)。

硫酸酸性の場合には pH の低下に伴い面積の減少が認められる (Table 3)。

Table 3. The Relation between pH and Area of Ring.

(Rutin content is 16 mg in 10 cc.)

pH	Sulfuric acid			Acetic acid		
	r ₁ cm	r ₂ cm	S cm ²	r ₁ cm	r ₂ cm	S cm ²
6.7 (control)	3.10	2.21	14.84	3.15	2.30	14.54
6.4	3.00	2.15	13.75	3.30	2.47	14.94
6.0	2.95	2.12	13.21			
6.0	3.05	2.28	12.89	3.17	2.30	14.94
5.6	3.00	2.20	13.06			
5.6	3.00	2.22	12.79	3.16	2.30	14.74
5.0	2.90	2.10	12.56			
5.0	2.88	2.10	12.20	3.10	2.23	14.56
4.0	3.01	2.27	12.27			
4.0	2.95	2.20	12.13	3.18	2.32	14.85
4.0	2.97	2.23	12.08			

(ii) 鹽類の影響: 硫酸ソーダ及び醋酸ソーダの溶液を rutin の spot に加えて展開を行つた。

硫酸ソーダの場合, 鹽は展開されずに原點に残り rutin のみが抽出展開される。

Rutin content = 16 mg/10 cc

r₁: 2.80 cm r₂: 1.80 cm S: 14.44 cm²

- (2) R. V. SWANN : *C. A.*, 43, 5538 c (1949).
- (3) W. L. PORTER *et al.* : *C. A.*, 42, 2057 e (1948).
- (4) A. J. GLAZKO *et al.* : *Science*, 105, 48 (1947).
- (5) W. L. PORTER *et al.* : *Arch. Biochem.*, 21, 273 (1949).
- (6) 刈米達夫, 橋本庸夫 : 薬學研究, 22, 467 (1950),
- (7) S. H. WENDER *et al.* : *Anal. Chem.*, 22, 708 (1950),
- (8) 大島, 中林 : 農化, 25, 21 (1951)
- (9) R. B. FISHER *et al.* : *Nature*, 161, 764 (1948),
- (10) L. RUTTER : *Nature*, 161, 436 (1948).

Summary

The principle of this method is based on the fact that when rutin is developed on the filter paper by *n*-butanol, its *R_f* value is smaller than that of other quercetin-3-glycoside pigments.

One drop of rutin solution is spotted at the centre of round filter paper and it is developed circularly outwards by *n*-butanol saturated with water in the desiccator as shown in Fig. 1. After developing, the paper is dried and a yellow-coloured ring is obtained by spraying a basic lead acetate solution. From the width, i. e. the difference $r_1 - r_2$, of this ring, its area is calculated as shown in Fig. 2.

In the concentration range between 5 and 25 mg of rutin in 10 cc, there is a linear relation between the area of the ring and the logarithm of rutin content as shown in Fig. 3 and Table 2.

泌乳性物質の利用に関する研究

特に山羊に對するシスチンの給與試験に就て

岩村 岳, 黒木正雄, 小島正秋, 米良満博 (宮崎大學農學部農業化學科, 畜産學科)

昭和26年1月29日受理

Studies on the Utilization of Lactation-stimulating Substances :

On the Feeding¹ Experiment of Goats with Cystine

By Iwao IWAMURA, Masao KUROKI, Masaaki KOJIMA, and Mitsuhiro MERA

(Dept. of Agr. Chem., and Zotech. Sci., College of Agr., Miyazaki Univ.)

緒言 OSBORNE 及び MENDEL⁽¹⁾ 以來信ぜられたシスチンの須要性は20餘年後 ROSE 他⁽²⁾の研究によつて根底からくつがえされ, 含硫黄アミノ酸としてはメチオニンの必須性が絶對的の支持をうけてシスチンに對する生化學上の興味が急に失われて來た感がある。然るに DAGGS⁽³⁾ は白鼠を實驗動物としてシスチンの泌乳性を證明し, 更にこの飼料にグルタチオンの添加により一層効力が増進せられることを報じた。但し HAAG 及び WRIGHT⁽⁴⁾ はこれと反對の立場をとり, シスチンの効力を認めないでメチオニンに泌乳性があることを確めておる。次で HUFFMAN 及び DUNCAN⁽⁵⁾ は始め白鼠を用いてシスチンの泌乳促進性を確め得たので, 次に牛を用いて經口的に1頭當り1日20gを與えて變化がなく, 40gを15日間與えたところ動物は食慾を減退し泌乳量も減少し却つて體重は増加したという。其後 SURE⁽⁶⁾ は白鼠の蛋白質源としてカゼインを用いこれにシスチンの添加が育兒率を高めることを認めている。

これ等の基礎實驗の示すようにシスチンの泌乳促進性が事實であるとすればアミノ酸中資源が低廉豊富で, しかも單離が簡單で比較的收量が大であるシスチンの利用が酪農業上有用であることが推測されるので, 著者等は最も小型の乳用家畜である山羊を用い且つその泌乳期における試験が適切である⁽⁷⁾ことを認め, 次に述べるようなシスチンの給與試験を行いその結果について検討することにした。

實 驗 方 法

1. 試験動物の品種並に生理的條件 試験動物は宮崎大學農學部附屬住吉牧場に飼養せられている山羊50頭の内から第1表に示したように品種, 年齢, 泌乳期, 泌乳量及び體重等諸條件の近似するものを選定し, 結局