放置する。残存する octyl alcohol を除くため、毎日新しく水を取りかえて放置する。数日後に油滴状となつて水面に浮び、これは次第に固化し、ついで結晶化がはじまつて(約 2 週間後); その後更に数日後にほとんど完全に結晶化する。これを集めて陶土板上にぬつて放置の後、結晶を集めて 50 % アルコールから再結する。mp. 68°, 収量 1.4 g.

(a) 及び (b) の結晶の混融融点は降下を示さない。FEHLING 液を還元しない。 $[\alpha]_D^{23} -29.4^\circ$ (chlfrm., c 0.851) を示す。分析結果は次の通りである。

Analysis : Found ; C% 56.94, 56.90. H% 7.81, 7.72.

Calcd. for $C_{22}H_{36}O_{10}$; C% 57.36. H% 7.88.

- (1) 井上, 小野寺, 唐沢, : 農化, 24, 362 (1951).
- (2) W. J. HICKINBOTTOM : *J. Chem. Soc.*, 1928, 3145.
- (3) E. PACSU : *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 2503 (1930).
- (4) B. HELFERICH, J. GOERDLER : *Ber.*, 73, 539 (1940).

Summary

The synthesis of β -D-glucoside tetraacetates of some higher alcohols, in order to use them as the starting materials in the study of transformation of β -glucosides into α -form, has been studied. Out of the procedures investigated, it seems to be convenient for the preparation of the β -glucosides to react acetobromoglucose with higher alcohols, in chloroform solution. In the presence of silver oxide and absence of drierite.

The β -D-glucosides obtained in the present study are as follows : β -n-butyl-D-glucoside tetraacetate, mp. 61° (uncorr.), $[\alpha]_D^{21} -20.2^\circ$ (chlfrm., c 2.051), β -n-heptyl-D-glucoside tetraacetate, mp. 62° (uncorr.), $[\alpha]_D^{21} -20.3^\circ$ (chlfrm., c 1.576) and β -sec-octyl-D-glucoside tetraacetate mp. 68° (uncorr.), $[\alpha]_D^{23} -29.4^\circ$ (chlfrm., c 0.851).

Flavonoid のポーログラフ的研究 (第 1 報)

Rutin のポーログラムに就て*

大島康義, 菊谷元資,**梅田兼弘 (九州大学農学部生物化学研究室)

昭和 27 年 7 月 29 日 受理

The Polarographic Studies of Flavonoid. Part 1. On the Polarogram of Rutin.

By Yasuyoshi OSHIMA, Motosuke KIKUTANI, and Kanehiro UMEDA.

(Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka.)

Flavonoid の polarography による研究はわづかに ADKINS 等⁽¹⁾の研究があるのみであつた。著者等は天然の 10 数種の flavonoid について滴下水銀電極により polarogram を撮つた結果、測定可能の典型的 polarogram を現わすことを知つた。且つ還元波の波高とその溶液中の flavonoid の濃度とは比例関係にあり、特に rutin については後述するように、その定量も可能であることを知つた。各種 flavonoid の半波電位測定の結果を Table 1 に示す。この還元波生成の機構については未だ断定し得る結論に達していないが、還元波の生ずる原因は、2~3 位間の二重結合、4 位の carbonyl 基と 5, 7 位の hydroxyl 基との間の共鳴及び糖の結合等にあるものと推定していた。其の後 1951 年の *Chemical Abstracts* により、D. W. ENGELKEMEIR 等⁽²⁾⁽³⁾が flavonoid とその誘導体について滴下水銀電極による還元波生成の機構を研究し、又 O. CAPKA⁽⁴⁾等は rutin, quercetin 及び morin の水銀滴下電極による還元を行つてゐることを知つた。ENGELKEMEIR 等は主として quercetin とその誘

*この報告の一部は昭和26年4月21日、日本農芸化学会西日本支部総会に於て講演した。

**現在、長崎大学薬学部勤務。

Table 1. Half-wave Potentials of Flavonoid at pH 6.0.

Substances	$\pi_{1/2}$ (volt)	Substances	$\pi_{1/2}$ (volt)
Flavanols		Flavanones	
(1) Rutin	-1.71	(11) Hesperidin	-1.65
(2) Quercitrin	-1.72	(12) Hesperetin	-1.90
(3) Isoquercitrin	-1.83	(13) Naringin	-1.78
(4) Quercetin	-1.78	Flavones	
(5) Myricitrin	-1.75	(14) Baicalin	-1.58
(6) Myricetin	-1.65		-1.81
(7) Robinin	-1.75	(15) Baicalein	-1.54
(8) Kaempferol	-1.74	Catechine	
(9) Morin	-1.8	(16) <i>d</i> -Catechin	none
Flavanonol			
(10) 2, 3-Dihydro-quercetin	-1.74		

導体について行つた結果, 41, 5, 及び 7 位の hydroxyl 基と 4 位の carbonyl 基とのそれぞれの間の共鳴及び free hydroxyl 基の electron の転位によるものと推定し, 著者等の推定とはほぼ一致しているが, 更に同氏等は 38 種に及ぶ flavone, flavanone 及び chalcone とその誘導体について実験し, flavone では 2 段の, chalcone では 3 段の還元波を現わすと報告している. 然し同氏等は溶媒として isopropyl alcohol を, 緩衝

液として tetramethylammonium hydroxide 緩衝液を用い, 著者等の其と異なるので, 得られた半波電位も多少異つている.

之等 flavonoid の還元波の理論的解釋は後報にゆすり, ここでは flavonoid の一種で, 近來特にその薬効が重視されるようになった rutin の polarography による定量的実験について述べることにする.

従来 rutin の定量法としては重量法⁽⁵⁾, spectrophotometric method⁽⁶⁾⁽⁷⁾, fluorometric method⁽⁸⁾, 比色法⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾及び paper chromatography⁽¹¹⁾⁽¹²⁾による方法等の報告があるが, polarography による方法は O. CAPKA⁽⁴⁾によつて報告されている. O. CAPKA によると濃度と波高の關係は著者等と同様に直線的關係を満足し, 還元波と pH, 及び温度との關係について簡単に述べているだけである. 然しながら波高の測定には自らその高低に限度があり, 従つて測定し易い波形を現わすように測定溶液の濃度と其の pH との調節を行うことは絶対必要である. CAPKA 等はこの点に充分な検討を加えていないようである. 又同氏等は緩衝液に tetraethylammonium hydroxide を, 無關係塩として NH₄Cl, LiCl, LiOHを用い, 著者等のそれと異なるため, ここでも得られた半波電位は多少異つている.

実 験 の 部

(1) 供試料: Rutin は大島, 中林⁽¹³⁾がソバの葉から抽出したもので, mp. 183~190° のものを使用した. 又その他の flavonoid はそれぞれ天然物より分離し, 文献記載の mp. に合した結晶を使用した.

(2) 電解液の調製: 電解液は次の様な割合で調製した.

(a) Rutin ethanol solutions 4 cc; (b) 0.1 N KCl 1 cc; (c) Buffer solutions 5 cc.

Rutin の濃度はすべて上記の溶液容量に対してのモル濃度であつて, 測定に際して $1\sim7\times10^{-4}$ Mol. 濃度になるように調製する. Rutin は水に不溶性であるので, 予め純 ethanol に溶解し, その一定量をとり電解液に調製する. 又ここに用いる緩衝液は右のような組成のものを用いた.

Components of Buffer	pH
(a) 0.1 N HCl 0.1 M KH ₂ C ₂ O ₄	3.2
(b) 0.1 N NaOH-0.1 M KH ₂ PO ₄	6.0
(c) 0.1 N NaOH-0.1 M KH ₂ PO ₄	7.2
(d) 0.1 N NaOH-0.1 M H ₃ BO ₃	9.0

(3) 測定法: 検体一定量をとり, 前記電解液の組成にて $1\sim7\times10^{-4}$ Mol. 濃度になるように調製し, 電解中の容器内溶液の温度は $25\pm0.1^{\circ}\text{C}$ とし, 精製窒素ガスを通じて溶液中の酸素を除去して polarogram を撮る. この時は次のような条件の下に行う.

Sensitivity: 3.69×10^{-3} A/mm/m

Temperature: $25\pm0.1^{\circ}\text{C}$

Reduction ratio: 1/10

Drop. time: 3.1sec./drop at 0 volt.

得られた還元波の波高を測定し, 既知濃度と波高の關係から (Fig. 3) 逆に検体の濃度を測定する.

実 験 結 果 及 び 考 察

(1) 半波還元電位と水素イオン濃度との關係: Rutin の定量に當つては, 半波電位又は波高の最も測定し易い波形を得る必要がある. 半波電位は溶液の pH の変化によつて転移するので, 2×10^{-4} Mol. で pH をそれぞれ 3.2, 6.0, 7.2, 及び 9.0 に調製した溶液について polarogram を撮つた. その結果は, Fig. 1 及び Table 2 に示すごとく, pH がアルカリ性になるに従つて漸次負の方へ移動し, 波形は縦にのびて波高が測定し難くなる. pH 6.0 に於て最も測定し易い波形を示すので定量は pH 6.0 にて行えば良い.

Fig. 1. Polarograms of rutin at the several pH values. A : pH 3.2, B : pH 6.0, C : pH 7.2, D : pH 9.0

て供試溶液中の rutin の濃度を測定出来る。誤差範囲は $3 \sim 5 \times 10^{-4}$ Mol. 濃度範囲内では約 $\pm 2.7\%$ 以下である。

Table 3. Relationship between the Wave-height and the Concentrations of Rutin at pH 6.0.

Wave-height		Concentration ($\times 10^{-4}$ Mol.)	
Found	Calculated	Found	Calculated
5.0	6.88	0.73	1
11.3	13.76	1.64	2
21.2	20.64	3.08	3
27.0	27.52	3.92	4
34.5	34.41	5.01	5
44.0	41.29	6.39	6
49.0	48.17	7.12	7

Fig. 3. Relationship between the wave-height and the concentration of rutin at pH 6.0.

$$y = 6.88x, \quad y: \text{Wave-height}, \quad x: \text{Conc.}$$

(3) Rutin 定量の際, 混入 quercetin の及ぼす影響: Rutin は植物から抽出する際, quercetin が混入し易い。実験室に於ては再結晶を繰返して純粋の rutin を得ることが出来るが, 之も貯蔵中に一部分解して quercetin になる。このように quercetin の混入はなかなか防ぎ切れぬため, quercetin の混入が rutin 定量に如何なる影響を及ぼすかを知る必要がある。そこで rutin と quercetin とを Mol. 濃度比として 5 : 1, 5 : 2, 5 : 3, 及び

Table 2. Half-wave Potentials of Rutin at the Several pH Values.

pH	3.2	6.0	7.2	9.0
$\pi_{1/2}$	-1.61	-1.71	-1.75	-1.77

(2) 波高と濃度との関係: Rutin の濃度と得られた還元波の波高, 或は拡散電流との間に一定の相関関係が成立すれば定量が可能となるわけであるから, $1 \sim 7 \times 10^{-4}$ Mol. 濃度に於ける各の polarogram を撮った。その結果 Fig. 2, Fig. 3, 及び Table 3 に示すように濃度と波高は比例的関係を満足して, 原点を通る直線となる。濃度が高くなれば波高も高くなり, 濃度が低ければ波高も低くなり, 作図上誤差を生じ易い。特に波高が低い場合, 作図上のわずかの誤差も大きな誤差となる。従つて測定濃度範囲が限定されて来るわけで, 実験の結果では波高として 20~40 mm を示す $3 \sim 5 \times 10^{-4}$ Mol. の範囲が最適の濃度である。未知濃度の rutin の定量を行うにはこの濃度範囲即ち波高 20~40 mm になるように濃度を調節して polarogram をとり, その波高を測定し

Fig. 2. Polarograms of rutin.

A : Control. B : 1×10^{-4} Mol., C : 2×10^{-4} Mol., D : 3×10^{-4} Mol. E : 4×10^{-4} Mol., F : 5×10^{-4} Mol., G : 6×10^{-4} Mol. H : 7×10^{-4} Mol.

5:5 の割合に混合し, 2×10^{-4} Mol. 濃度になるように電解液を調製し, その polarogram を撮った. 結果は Fig. 4 に示すように 5:1 濃度比に於て既に 2 段の還元波を示し, quercetin の存在を認め得る. 従つて rutin 中の不純物としての quercetin の検出に利用出来る. 又此の際の rutin の濃度と波高の関係は Table 4 に示すように, 5:2 までは一定の値が得られ, その波形もくずれることなく測定可能であるから 5:2 の割合まで quercetin が混入しても rutin の定量に影響を及ぼさない.

Table 4. The Effect of Quercetin in Rutin

Solution to the Wave-height.

No. of Subst.	Rutin Conc. ($\times 10^{-4}$ Mol./l)	Quercetin Conc. ($\times 10^{-4}$ Mol.)	Wave-height of Rutin (mm)	Rutin : Quercetin (Ratio of Mol. Conc.)
Control	2	0	11.3	—
A	1.97	0.39	11.4	5 : 1
B	1.92	0.77	11.4	5 : 2
C	1.89	1.13	10.3	5 : 3
D	1.82	1.82	10.0	5 : 5

Fig. 4. Polarograms of the mixture of rutin and quercetin.

Rutin : Quercetin (Ratio of Mol. Conc.)
A : 5 : 1. B : 5 : 2. C : 5 : 3. D : 5 : 4.

総 括

Rutin を polarograph 法で研究し, 次の如き結果を得た.

(1) Rutin の polarogram を pH を変えて撮るとき, pH 6.0 に於て最も測定し易い還元波を示し, 濃度と波高は比例して直線となるので波高の測定から未知濃度溶液中の rutin を定量することが出来る.

(2) Rutin の定量には一定の濃度範囲があり, pH 6.0 に於て $3 \sim 5 \times 10^{-4}$ Mol. 濃度が最適である. 従つて未知濃度の検体の定量を行うには波高 20~40 mm の還元波を示すような濃度に調節すると誤差を少なくすることが出来る.

(3) Quercetin が混入している場合, 2 段の還元波が現われるが, 両者の混合モル濃度比が 5:2 の割合までは rutin の波高に全く影響を与えず, 定量は可能である.

(4) 最適条件の下に実施するときは, 約 $\pm 2.7\%$ の誤差範囲で定量出来る.

(5) 極めて微量にて測定出来, 且つ極微量の不純物として混入する quercetin も検出出来ることは paper chromatograph 定量法に匹敵する.

本実験に用いた費用の一部は文部省科学研究費によつた. 深く謝意を表する.

(1) HADKINS and F. W. COX : *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 1151 (1938).

(2) D. W. ENGELKEMEIR, T. A. GEISSMAN, W. R. CROWELL and S. L. FRIESS : *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 155 (1947).

(3) T. A. GEISSMAN and S. L. FRIESS : *ibid.*, 71, 3893 (1949).

(4) O. CAPKA and J. OPAVSKÝ : *Collection Czech. Chem. Commun.*, 15, 433 (1950).*

(5) C. O. BADGETT *et al.* : *Archiv. Biochem.*, 24, 245 (1949).

(6) R. V. SWANN, : *C. A.*, 43, 5538 c (1949).

(7) W. L. PORTER *et al.* : *C. A.*, 42, 2057 e (1948).

(8) A. J. GLAZKO *et al.* : *Science*, 105, 48 (1947).

(9) W. L. PORTER *et al.* : *Arch. Biochem.*, 21, 273 (1949).

(10) 刈米達夫, 橋本庸平 : 薬学研究, 22, 467 (1950).

(11) S. H. WENDER *et al.* : *Anal. Chem.*, 22, 708 (1950).

(12) 大島康義, 中村敏郎: 農化, 25, 212 (1951).

(13) 大島康義: 農化, 25, 22 (1951).

*この文献は京都大学館勇教授の御好意により読むことが出来た。附記して厚く謝意を表す。

Summary

The polarographic reduction of several flavonoids have been investigated at the dropping mercury electrode, and the half-wave potentials ($\pi_{1/2}$) have been determined as shown in Table 1.

Especially about rutin our studies have shown (1) the change of half-wave potential at several pH values (Fig. 1, Table 2), (2) the strict linearity (Fig. 3, Table 3) of the relationship between wave-height and concentration (Fig. 2) in one typical case, and (3) the determination is possible in the $3 \sim 5 \times 10^{-4}$ Mol. rutin solutions at pH 6.0, and at the contamination of quercetin between the range of the ratio rutin 5 quercetin 2 (Fig. 4, Table 4).

α -アミノイソ酪酸のペーパークロマトグラフィーによる研究

大島康義, 吉原壯三郎,* 坂元良弘 (九州大学農学部生物化学研究室)

昭和27年8月4日

Studies on α -Aminoisobutyric Acid by Paper Chromatography.

By Yasuyoshi OSHIMA, Sozaburō YOSHIIHARA and Yoshihiro SAKAMOTO.

(Lab. of Biochem., Fac. of Agr., Kyushu Univ.)

藪田氏⁽¹⁾は蛹を乾溜し、5-デメチルヒダントインを分離し、該物質は蛹蛋白質の α -アミノイソ酪酸 (以下イソと略す) から生成されるものであることを認め、この他カゼイン等数種の蛋白質中にも含まれていることを報告している。この様な第三級アミン形態のアミノ酸が天然蛋白質の一構成成分として発見されたことは注目すべきことであるが、本アミノ酸をそのままの形態で確認するに至っていない。依つて吾等はカゼイン中に於ける本アミノ酸の存在をペーパークロマトグラフィーによつて追跡した。この方法は微量物質の検定には非常に好適であるが多量を処理しての分離法としては些か不適当な為、本アミノ酸の存在は確認し得たが、之を結晶として分離するには至らなかった。

実験の部

試料の調製: 標準として用いた α -アミノノルマル酪酸 (以下ノルマルと略す) 及びイソは STRECKE 法² で合成した。

天然物としては藪田氏によるとカゼイン中にも蛹に劣らぬ程度にイソを含むというので、市販のカゼイン 1kg

Fig. 1

I : α -aminoisobutyric acid
S : Butanol-extract
of casein hydrolysate

Table 1. R_F Values of Several Amino Acids developed with Butanol-Acetic acid-Water Mixture (4 : 1 1.5 weight.).

Amino acid	R_F	Amino acid	R_F
canavanin	0.16	α -aminoisobutyric acid	0.43
serine	0.19	tyrosin	0.51
aspartic acid	0.22	α -aminocaproic acid	0.54
glycine	0.22	α -aminovaleric acid	0.63
γ -oxy- α -aminobutyric acid	0.23	L-valine	0.67
glutamic acid	0.29	phenylalanine	0.69
alanine	0.29	norleucine	0.73
α -aminonormalbutyric acid	0.43		

*現在名古屋市旭山学園女子大学