Nature, 164, 1107 (1949).

(15) WASSINK, E. C., TJIA, J. E. and WINT-

RMANS, J. F. G. M. : *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, 52, 412 (1949).

Summary

The phosphate metaboism of *Chlorella ellipsoides* was investigated under several conditions using $H_3P^{32}O_4$ as a tracer. In the light, the activity added to the external medium incorporated into the chlorella cells much more quickly than in the dark. Presence of CO_2 and /or O_2 showed little effects. The incorporation in the light was inhibited by NaN_3 or KCN. The chlorella cells treated in various conditions were harvested and the distribution of the amount of phosphate and of the activity was compared. Any remarkable change caused by presence and absence of light, CO_2 or CO_2+O_2 , was not detected.

樟腦 azulene に関する研究 (第 2 報) Chromatostrip に依る分別, 定性

福 士 俊 一, 小幡彌太郎 (北海道大学農学部農芸化学教室)

昭和 27 年 12 月 16 日 受 理

Studies on the azulene of Campher Blue Oil. Part 2. Separation and Identification of Azulene by a Chromatographic Technique.

By Shun-ichi FUKUSHI and Yataro OBATA (Dept. of Agric. Chem., Hokkaido Univ.)

緒 論

従来の azulene の分離には SHERNDAL⁽¹⁾, KREMER⁽²⁾等の強鉍酸抽出或は濃硫酸と無水醋酸の混液で抽出後 ferrocyanic acid との complex に導く RUHEMANN⁽³⁾ 法等がある. PLATTNER⁽⁴⁾等は distribution method を azulene の分離に応用したが好結果を得なかつた. 現在最も一般的な azulene 分離法⁽⁵⁾は強鉍酸抽出の後 trinitrobenzolate に導き, アルミナによる吸着分別に依り精製する方法である. 然しこの方法を樟腦油に適用するには含まれている sesquiterpene 群が複雑で分溜に依つて hydroazulene 型 sesquiterpene のみを得る事が極めて困難である上に, 脱水素反応生成物から azulene と cadalene を分別するには鉍酸抽出, 分溜等煩雑な操作の繰回えしを余儀なくされるからこれらの簡易な分別法が要望されている.

1951 年 KIRCHNER, KELLER⁽⁶⁾等は chromatography の新方法として chromatostrip 法を考案し, レモン油の hydroxyterpene の分離に応用し, ついで terpenes の定性分別に利用し得る事を報告した. 我々はこの方法を樟腦 azulene 分別に応用して見たいと考え, 先ず sesquiterpene の脱水素反応生成物として一般的な cadalene, 1, 6-dimethylnaphthalene 及び azulene に就てこの chromatostrip 法を適用した処極めて有利である事が判つた. ついで樟腦油の sesquiterpene 部を脱水素して得た粗反応物に此の方法を応用すると簡単に cadalene と樟腦 azulene が分別され, この方法が terpene のみならず sesquiterpene の脱水素反応生成物の分別にも便利な事を確め得たので報告する. なお従来全く未知の橙黄色の油状物を分離した.

R_f 値からして hydrocarbon ではなくて oxy 化合物, oxyazulene 系の物質と思われる.

実 験 の 部

1. Azulene, cadalene の chromatography

Strip の調製 : Strip の調製は KIRCHNER, KELLER の方法に準じその大要は紅藻オホソソの精油成分⁽¹⁰⁾に記載した通りである.

試料 : Azulene は樟腦藍油の sesquiterpene⁽⁷⁾⁽⁸⁾の脱水素反応物から一般法⁽⁵⁾を繰回して精製し, cadalene はヒバ材質油の sesquiterpene⁽⁸⁾を脱水素して得たものである. 1, 6-dimethylnaphthalene⁽⁹⁾は cadinene を高温で脱水素して得た物を使用した.

Chromatography : 紅藻精油⁽¹⁰⁾の場合と同様に調製した strip の底部から 2.5 cm の処に鉛筆で基線を引きその中心 (原点) に試料を小点として落し暫時デシケーター中に保存の後 paper chromatography に準じ, 展開剤 alcohol 又は petroleum ether を入れた容器中に収め, 溶剤が一定の高さ迄上昇した時に strip を取出し, 溶剤の揮発後 trinitrobenzol の alcohol petroleum ether 混合溶液 (濃度 2%) を噴霧する. Cadalene, 1, 6-dimethylnaphthalene は黄色, azulene は黒褐色の spot として発色する. なお azulene

は青色を呈しているので噴霧発色しなくても判別できる。Cadalene, 1,6-dimethylnaphthalene, azulene の R_F 値は次の通りである。吸着剤の alumina は市販の cica 印, シリカは市販 silica gel を粉碎, 100 mesh

R_F Values.

I. Adsorbent. silicic acid

Sample	Solvent	
	petroleum ether	alcohol
azulene	0.76	0.02
cadalene	0.88	0.61
1,6-dimethylnaphthalene	0.90	0.64

II. Adsorbent. alumina

azulene	0.96
cadalene	0.98
1,6-dimethylnaphthalene	0.98

temp. 18°

(Spots were colored by 2% trinitrobenzol-alcohol-petroleum ether mixture)

Solvent: Petroleum ether. temp. 18°

Spot	R_F	Color	Color after spray
1	0.00	orange	orange
2	0.35	pale green	green
3	0.76	blue	brown
4	0.89	—	yellow

Solvent: Alcohol. temp. 18°

Spot	R_F	Color	Color after spray
5	0.02	blue	dark brown
6	0.22	pale blue	brown
7	0.60	—	yellow

Trinitrobenzulates.

Spot	Color	m. p.
1	orange	
2	pale green	114°C
3	brown	117
4	yellow	111
5	dark brown	118
6	brown	116
7	yellow	111

Fig. 1

の吸収スペクトルを測定すると Fig. 1 の如き曲線を与える。

Spot 7 のスペクトルは前に得た cadalene⁽⁸⁾ のそれと全く一致し, spot 5 の曲線は文献記載⁽⁸⁾⁽¹¹⁾ の dialkylazulene 又は trialkylazulene⁽¹²⁾ の曲線に類似し前報の azulene⁽⁷⁾ のそれと一致する。Spot 1 の紫外部のスペクトルは Fig. 2 にしめす如く cadalene, azulene とは全く相違した型をしめしている。しかして又先に報告した紅藻オホソソ精油の sesquiterpene から得た橙色油状物のスペクトルとも著しい相違をしめす。之については更に検討する機会を得たい。吸収スペクトルは Beckman Model D. U. を用いた。測定者は北海道水産物検査所 小泉進氏である。1,6-dimethylnaphthalene は北大農学部安藤芳明氏の分与を得た。

の物を使用した。

2. 樟脳 azulene の分離精製

試料 樟脳藍色油の sesquiterpene 部 (b. p. 105 ~ 130°/10mm, $[n]_D^{20}$ 1.5072) 20 g に硫黄粉末 7 g を加え, 150~180° で 1 時間, ついで 180~200° で 2 時間加熱, 反応物は直接分溜に附し, 先ず 2 mm で ~ 100°, ~ 130°, 130° 以上の 3 部に分け, ~ 130° の溜分を再溜し, azulene 溜分と覚しい b. p. 130°/2 mm (収量 2.0 g) の部分を試料とした。

Chromatography: 試料を silicic acid-chromatostrip の原点に落し, 石油エーテルを展開剤として展開する。一定の高さ迄溶剤が上昇した時に chromatostrip を取り出し, 溶剤揮発後実験 1 と同じく trinitrobenzol を発色剤として噴霧, 各 spot を分別する。

R_F 値からして spot 3 は樟脳 azulene, spot 4 は cadalene に該当する。Spot 3 は石油エーテルで溶出した後, 溶剤を減圧で追出し, 再度 chromatostrip 上に取つてアルコールで展開する。

R_F 値は spot 5 が樟脳 azulene, spot 7 が cadalene である事をしめす

Spot の確認同定 多数の chromatostrip を用い, 各 spot の部分をナイフで切り落して集め, 石油エーテルで溶出し濃縮の後 trinitrobenzolate に導く。trinitrobenzolate は石油エーテル, アルコール混液 (10:1) に溶解, 濾過の後減圧で溶剤を追出し析出して来る結晶を濾取, 融点を測定。各 trinitrobenzolate の性状は次の通りである。

Spot 1 は赤橙色の trinitrobenzolate を与える物の様であるが油状で分解し易い為精査し得なかつた。

Spot 2 は trinitrobenzolate の性状から先に報告した緑色油状物と思われ, spot 3 は少量の cadalene を含む樟脳 azulene である。Spot 4, spot 7 の trinitrobenzolate は cadalene の同誘導体に該当する。噴霧発色前の spot 5, spot 7 を切り取りイソプロピルアルコールで溶出, 適当濃度に稀釈, 紫外部

Fig. 2. Spectra of Spot 1.

両氏に謝意を表明する。研究費の一部は文部省科学研究助成補助金に依つた。

- (1) SHERNDAL : *J. Am. Chem.*, 37, 165 (1915).
- (2) KREMER : *ditto*, 45, 717 (1923).
- (3) RUHEMANN *Ber.*, 60, 2459 (1927).
- (4) PLATTNER *et al.* : *C. A.*, 44, 3468 (1950).
- (5) PLATTNER *et al.* : *Helv. Chim. Acta.*, 19, 858 (1936).
- (6) KIRCHNER *et al.* : *Anal. Chem.*, 23, 420 (1951).
- (7) 小幡, 福士 : 農化, 印刷中.
- (8) 小幡, 福士 : 農化, 26, 113 (1952).
- (9) 高岡, 安藤 : 日化, 72, 999 (1951).
- (10) 小幡, 福士 : 農化, 印刷中.
- (11) GORDON : *Chem. Rev.*, No. 1, 127 (1952).
- (12) TREIBS *et al.* : *Ann.*, 564, 43 (1949).

Summary

Separation and identification of blue campher azulene have been introduced by using adsorbent coated glass strips.

R_F Values.

Adsorbent coating	Silicic acid		Alumina petr. ether
	petr. ether	alcohol	
azulene	0.76	0.02	0.96
cadalene	0.88	0.61	0.98
1,6-dimethyl naphthalene	0.90	0.64	0.98

家蚕体内のビタミン B₁₂ について (第 1 報)

高 橋 重 作 (宇都宮大学農学部農芸化学教室)

昭和 27 年 12 月 26 日 受理

Studies on Vitamin B₁₂ in Silk Worm. Part 1.

By Jusaku TAKAHASHI (Dept. of Agr., Faculty of Agr., Univ. of Utsunomiya)

著者は生体成分の paper chromatography による研究を行う機会を得、家蚕、桑葉のビタミン B₁₂ の測定を *Euglena gracilis* var. *bacillaris* によるバイオアッセイ法で行つたが、これに paper chromatography 分離, bioautography 等を繰返し、蚕体内にビタミン B₁₂ が存在し、桑葉内には存在しないことを確めた。なお研究すべき項目多きも一応大要をここに報告する。

実 験 の 部

1. 実 験 材 料

蚕は「夏蚕支 108 号」について幼虫 (熟蚕) より始め、各変態毎に逐次実験した。又桑は「改良鼠返」について 9 月上旬より 10 月中旬にわたつて数回実験した。

2. 実 験 方 法

(1) 試料の調製 蚕体 : 適宜細挫し、更に乳鉢内にて海砂と共に磨碎し、7~8 倍量の蒸留水と共に 70~80°, 30 分間熱水抽出を行い、濾過後透明液を供試液とした。

蚕卵 : 蚕体と同様に処理した。

桑葉 : 予備試験の結果 pectin 質多く、熱水処理困難のため ethyl alcohol 抽出を行つた。即ち桑葉 100 g をとり、細切後鉄製乳鉢内にて搗碎し、70% ethyl alcohol 5~6 倍量を注ぎ、70° に於いて 30 分処理して濾過し、残渣に対して以上の操作を 2 回反復し、濾液を 40~45° に於いて減圧濃縮し、更に ether にて 2~3 回処理し、chlorophyll, carotinoid 等の色素を除き、水層を供試液とした。以下これを ethyl alcohol-extracts と呼ぶ。なお、桑葉中微量の B₁₂ をも検出せんがため供試液を濃厚にする目的で benzyl alcohol 抽出