(5) 緑葉は代謝の盛んな組織であるにもかかわらず、FR が極めて多く 40~60% を占める。然してこの FR 量を控除して、FAD と FMN の含量について両者の比率を計算する時は、肝、腎等と同程度の比率である。即ち動植物を通じ代謝の盛んな部位のフラビンの形態比率は同程度である。

(6) 緑葉等の組織に含まれる FR は、何等かの存在意義があることを推定した。

(7) 白鼠の肝及び緑葉について細胞内の分布を調べた。

(8) D-アミノ酸オキシダーゼを用いて FAD の定量値を検討し、蛍光法とよく一致した結果を得た。

終りに臨み標準リボフラビン溶液及び FAD 粉末を贈与された武田薬工 KK 研究所に厚く感謝します。

本報の要旨は昭和 32 年 4 月、日本農芸化学会大会で発表した。

(1) O. A. Bessey, O. H. Lowry, R. H. Love :
<i>J. Biol. Chem.</i> , 180, 755 (1949).	(11) A. S. Holt, C. S. French : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 19, 368 (1948).
(2) 堀田一雄 : ビタミン, 9, 267 (1955).	(12) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, 2 巻, 455 (1956).
(3) 堀田一雄, 滝口きよ子 : ビタミン, 7, 555 (1954).	(13) S. Ochoa, R. T. Rossiter : <i>Biochem. J.</i> , 33, 2008 (1939).
(4) 近藤 弘 : 本誌, 30, 690 (1956).	(14) 堀田一雄, 其の他 : ビタミン, 14, 62 (1958).
(5) R. Kuhn, P. György, T. Wagner-Jauregg : <i>Ber.</i> , 66, 1034 (1933).	(15) A. W. Galston, J. Bonner, R. S. Baker : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 42, 456 (1953).
(6) R. Kuhn, P. György, T. Wagner-Jauregg : <i>Ber.</i> , 66, 576 (1933).	(16) 八木国夫著 : フラビンの生化学, p. 15~23 (1957).
(7) H. B. Burch, O. H. Lowry, A. M. Padilia, A. M. Combs : <i>J. Biol. Chem.</i> , 223, 29 (1956).	(17) F. R. Whatley, M. B. Allen, D. I. Arnon : <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 16, 605 (1955).
(8) K. Yagi : <i>J. Biochem.</i> , 38, 161 (1951).	(18) L. P. Vernon, E. D. Ihnen : <i>ibid.</i> , 24, 115 (1957).
(9) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, 1 巻, 469 (1956).	
(10) S. P. Colowick, N. O. Kaplan : <i>Method in Enzymology</i> , 1, 16 (1955).	

マレイン酸ヒドラチド・その硫酸-亜鉛での還元分解 による微量定量法と緑豆種子による吸収*

永 井 康 豊 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 33 年 3 月 19 日受理

緒 言

マレイン酸ヒドラチド (Maleic hydrazide, 以下 MH と略す) は高等植物の生長に対して種々な作用を示す⁽¹⁻³⁾。このものは還元的な分解を受けてヒドラジンを遊離するので、Wood⁽⁴⁾ は微量 MH を 55% の水酸化ナトリウム中で亜鉛とともに 180° に加熱し、溜出するヒドラジンを硫酸中に捕捉して Pesetz⁽⁵⁾, Watt⁽⁶⁾ らの方法で比色することによって MH を定量した。Wood はこのときに生成するヒドラジンの自動酸化を防ぐため、特殊の分解装置を考案し、全操作を窒素気流中で 15 分以内に行う、という方法で動植物組織中の MH を定量している。

このほか、ポーログラフ法⁽⁷⁾や紫外線吸収による定量法⁽⁸⁾も報告されているが、著者は MH を 4N 硫酸中で亜鉛とともに 100° で 120 分間加熱すれば、定量的にヒドラジンが遊離されることを知り、この事実に基づいて MH の微量定量法を考案した。この方法は窒素気流中で行う必要がなく、空気中で何ら特殊の装置を要せず実施でき、操作も極めてやさしい。

著者は微量 MH による緑豆の発芽生長阻害* を認めているが⁽⁹⁾、この定量法を用いて緑豆種子による MH 吸

* A Microdetermination of Maleic Hydrazide by Reductive Cleavage in Acid Medium and Its Absorption by Mung Bean.

By Yasutoyo NAGAI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

** 著者はここでは、1) 種子の吸水による胚の活動開始を発芽、2) 子葉蓄積物による胚の生長を発芽生長とし、具体的には胚の活動開始は発根現象により肉眼的に認められるとし、発芽と発芽生長という言葉とを区別して用いた。

収試験を行い、MH が緑豆種子により速かに吸収されることをみ、肉眼的に観察できる限りの発芽現象自体、またこの発芽の際の酸素吸収に関しては MH はあまり影響をなしていないことを知った。なお、この MH 分析法はフルクトースなどの共存により妨害を受けるので、吸収試験に際しては常に対照区の試料について回収試験を行って測定値を補正した。この種子の MH 処理液は一般に紫外線部に強い吸収を示す物質を含むので、直接的な紫外外部吸収による定量は不可能である。

試 薬 お よ び 方 法

MH は日産化学会社製の結晶を再結して用いた。分解点 260°

分析：計算値 ($C_4H_4N_2O_2$) C 42.86, H 3.60, N 24.99；測定値 C 42.83, H 3.49, N 24.83

硫酸ヒドラジンは和光純薬会社製品（試薬用）を Koltthoff⁽¹⁰⁾ の方法で精製し、このものをヒドラジンの標準品として用いた。他の試薬は市販品のうち純度最高のものをそのまま用いた。

比色は Wood の方法に準じて行い、日立製光電比色計にフィルター B（主波長 $460\text{ m}\mu$ ）を付して比色したが、紫外外部吸収の測定には Beckman Model DU 分光光度計を用いた。

緑豆の発芽の際の酸素吸収はワールブルグ検圧計により測定した。方法の細部についてはその都度記載する。

実 験 お よ び 結 果

1. MH の吸光曲線および分子吸光係数 0.2 N 硫酸および 0.2 N 水酸化ナトリウム中で終濃度 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ の MH の吸光曲線を作製し、第 1 図の結果を得た。MH は酸性では $300\text{ m}\mu$ に、中性 (0.1 M 燐酸緩衝液, pH

第 1 図 マレイン酸ヒドラチド溶液の吸収スペクトル

a: 0.2 N-NaOH (中性およびアルカリ性)
b: 0.2 N-H₂SO₄ (酸性)

第 2 図 マレイン酸ヒドラチドの分解経過

● ● 吸光度法による分解経過
○ ○ 比色法による分解経過
a: 4 N-H₂SO₄ b: 3 N-H₂SO₄ c: 2 N-H₂SO₄

7.0) およびアルカリ性では $330\text{ m}\mu$ にそれぞれ一つの極大吸収を示し、分子吸光係数を算出すると、それぞれ $\lambda_{\text{max}}^{300\text{ m}\mu} 2.67 \times 10^3$, $\lambda_{\text{max}}^{330\text{ m}\mu} 2.75 \times 10^3$ (3 回平均) となった。なお武内ら⁽⁸⁾ は $0.0015 \sim 0.15\text{ M}$ 硫酸溶液中での MH の極大吸収を $302\text{ m}\mu$ に認めている。

2. MH 分解条件の検討 10 ml 容量のメスフラスコ 8 本にそれぞれ $130\text{ }\mu\text{g/ml}$ の MH 水溶液 1 ml, 8 N 硫酸 1 ml および砂状亜鉛約 300 mg を加え、水浴中で 100° に加熱しながら経時的にその 1 本をとり冷却し、水で 10 ml に充し、生成ヒドラジンの定量および MH の吸光度の変化の測定により分解過程を追跡した。比色には上記分解液 1 ml に水 8 ml と 2% パラジメチルアミノベンズアルデヒドの 2 N 硫酸溶液 1 ml を加え、生ずるパラジメチルアミノベンズアジンの黄色を 30 分後に比色して当量の硫酸ヒドラジンによる呈色と比較した。吸光度の変化は上記分解液を波長 $300\text{ m}\mu$ において測定して求めた。その結果を第 2 図に示した。すなわち、上記の分解条件では、MH の分解はまず還元もしくは開裂に始まり、続いてヒドラジンの放出が起るようになる。120 分間の加熱により MH は定量的に分解されてヒドラジンとなった。分解時の硫酸濃度を 3 N あるいは 2 N としても、 $300\text{ m}\mu$ における吸光度の変化はほとんど 4 N の場合と同様であるが、ヒドラジンの遊離過程は酸濃度の低下につれて遅くな

第3図 マレイン酸ヒドラチドの標準検量曲線
○—○ マレイン酸ヒドラチド ●—● 硫酸ヒドラチン
a: 0.6N H₂SO₄ b: 1N-H₂SO₄

第2表 マレイン酸ヒドラチドの定量に及ぼす糖
及びアミノ酸類の影響

対 照 区	0.120*	アスパラギン酸	0.116
グルコース	0.105	グリシン	0.117
ガラクトース	0.105	ヒスチジン	0.113
マンノース	0.103	リシン	0.127
アラビノース	0.103	メチオニン	0.118
ソルボース	0.080	ヒドロキシ プロリン	0.120
フルクトース	0.058	セリン	0.114
フルフラール	0.056	トレオニン	0.117
アスコルビン酸	0.065	トリプトファン	0.115
イヌリン	0.055	カゼイン	0.120
アラニン	0.115	卵アルブミン	0.118
アルギニン	0.117	ペプトン	0.116

* 値はすべて比色計のよみて示した。

4. 糖およびアミノ酸類の分解、比色におよぼす影響

レズルシンなど二、三の物質が妨害すると報じているが、著者は、著者の方法では分解時のカルボニル化合物の共存が著るしい妨害を与えることを認めた。この際、糖類による妨害は第2表に見られるようにアルドースによる妨害が僅かであるに反し、ケトースによる妨害が顕著であった（揮発性の強いアセトン、ベンズアルデヒドなどでは妨害が認められなかった）。これら糖類は MH の分解時に共存すると妨害を与えるのであって比色に対しては影響がなかった。

糖類による妨害は糖量の増加とともに分解液の着色度が増すことも加わるので、多量の糖の共存下の MH の分

第3表 緑豆種子によるマレイン酸ヒドラチドの吸収速度

MH初濃度	50 μg/ml	100	200
時間			
0	47 μg	90 μg	200 μg
2	29	77	—
4	15	67	150
6	0	64	—
8	—	45	130
24	—	—	75

* 数字は外液 1 ml 中の MH 残存量

第1表 マレイン酸ヒドラチド定量法の

再現性 MH, μg	12	24	36
実験 No.			
1	0.102*	0.170	0.232
2	0.105	0.177	0.230
3	0.103	0.173	0.235
4	0.103	0.170	0.230
5	0.105	0.180	0.242
6	0.112	0.182	0.235
平均	0.105	0.175	0.234
誤差 (±%)	0.1	0.4	0.5

* 数値はすべて比色計のよみを示す。

る傾向があった。亜鉛の量を 200、400 あるいは 500mg とし、また砂状亜鉛の代りに粒状亜鉛を用いても、ヒドラジン放出速度には影響がなく一検体の分析には粉状亜鉛 300mg の使用で充分であった。この条件では 700 μg までの MH を充分に分解することができる。

3. MH の標準検量曲線の作成 上述の比色法を用いて MH の標準検量曲線を作成し、当量の硫酸ヒドラジンによる呈色と比較してよく一致する結果を得た（第3図）。

既述の理由から分解時の酸度は 4N であるが、比色時の酸度は Wood⁴⁾ の 1N を用いるよりも 0.6N とした方が感度が高い。

検量曲線は MH として全容量 10 ml 中 13 μg 以下で直線となり、これ以上の量では曲線となるが、第1表に示すように曲線部においても再現性よく比色することができた。

Wood は MH の定量をピロロール、ピロガロール、

タンパク質およびアミノ酸の共存は、この方法では分解時、比色時ともに何らの影響も及ぼさなかった。

5. 緑豆種子による MH の吸収と呼吸

緑豆種子に MH 水溶液を吸収させ、残存量を定量することにより吸収量を追跡し、酸素吸収量の変化と比較した。すなわち、MH 吸収試験に対しては種子 250 粒 (9~10 g) を容量 50 ml の三角フラスコの各々にとり、これにそれぞれ 50、100、200 μg/ml の MH 水溶液 20 ml ずつを加え 27° に保ち、時間毎に液量を 20 ml として、その 1ml

第4図 マレイン酸ヒドラジド処理と発芽時の酸素吸収
($\mu\text{l O}_2/20$ 個体)
a: 対照区 b: 100 p.p.m. マレイン酸ヒドラジド
c: 200 p.p.m. マレイン酸ヒドラジド

を入れ 30° で毎分 120 回振とうし、一時間毎にその積算酸素吸収量を追跡して第4図に示す結果を得た。この図はそれぞれ平行的に三回測定を行って平均値をプロットして得たものである。

MH 処理により見かけ上若干の酸素吸収の低下があるように見えるが、発芽直後に処理しこれより 48 時間以降に認められる呼吸阻害程著しいものではない。この際の発芽過程で、肉眼的観察によれば裂皮発根の状況は同様であった。

考 察

Wood は先に天然物中の MH 定量法に関し報告したが、その中で妨害の除去については、あらかじめ検体をアルカリと共に煮沸したり、ベンゼンで洗滌するなどの方法を用いた。彼の MH 定量法は高温、濃アルカリ中での還元分解に基くもので操作は比較的複雑である。著者の方法は 100°、稀硫酸中での還元分解に基くもので操作が簡便ではあるが若干の時間を要し、フルクトースやアスコルビン酸の共存する時は使用できない。Wood の報告ではこれらの物質による妨害に関しては特別の記載がない。

著者の方法を用いて著者は緑豆種子による MH の吸収試験を行ったが、この吸収は与えた MH の濃度によって差はあるがかなり速かなものであった。一粒当り 10 μg の MH が吸収されると後の発芽生長にはかなり顕著な後作用が認められるが⁽⁹⁾、酸素吸収の面からみて、発芽に対し殆ど影響がみられないことは興味のあることである。上述の 30°、毎分 120 回振とうの条件下では、緑豆種子の殆どが 3~4 時間で裂皮し発根を開始するが、MH による生長阻害現象の発現が時間的に吸収からかなり遅れるところからみると、発芽は MH の作用を受け難く、発芽生長が MH の作用を受け易いように思われる。しかし或は吸収された MH の種子内での移動が遅く、作用点への到達に時間がかかるためこのように見えるのかも知れない。この点に関しては更に実験を要する。

要 約

(1) 4N 硫酸中 100° で砂状亜鉛と共に 120 分間加熱して MH を還元的に分解し、生ずるヒドラジンを比色することにより MH を定量する方法を述べた。

(2) この方法を用いて回収試験を行いつつ緑豆種子による MH の吸収試験を行い、発芽生長を充分阻害するに足る一粒当り 10 μg 程度の MH は種子により速かに吸収されるが、肉眼的観察並びに種子の発芽の際の酸素吸収量からみて発芽自体には殆ど影響がないことを認めた。

御指導を賜った舟橋三郎教授に感謝いたします。また結晶マレイン酸ヒドラジドを御恵与下さった日産化学株式会社ならびに微量元素分析を担当頂いた東京大学農芸化学教室マイクロ分析室の方々に対して感謝の意を表します。

- (1) H. T. Hartman, U. C. Davis : *Bot. Gaz.*, 117, 24 (1955).
(2) F. A. Haskins, H. W. Chapman : *Physiol.*

- Plantarum*, 9, 356 (1956).
(3) V. A. Greulach : *Bot. Gaz.*, 114, 481 (1953).

- (4) P. R. Wood : *Anal. Chem.*, 25, 1879(1953).
 (5) M. Pesez, A. Petit : *Bull. soc. chim. France*, 1947, 122.
 (6) G. W. Watt, J. D. Chrisp : *Anal. Chem.*, 24, 2006 (1952).
 (7) 武内次夫, 横内成人, 小野田潔 : 分析化学, 5, 399 (1956).
 (8) 武内次夫, 吉沢源久, 小野田潔 : 分析化学, 5, 404 (1956).
 (9) 永井康豊, 斎藤純一, 舟橋三郎 : 昭和32年度農芸化学学会大会発表.
 (10) I. M. Koltthoff : *J. Am. Chem. Soc.*, 46, 2009 (1924).

ブ タ ノ ー ル 醗 酵 (第 29 報)*

高濃度仕込み(その2) 活性炭による収着法(3)

活性炭収着ソルベントの回収

山崎何恵, 本江元吉, 赤星恭助**, 長田 健 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 12 月 31 日 受 理

活性炭に収着されたソルベントの回収状態如何が, この収着法を工業的に使用できるかどうかをきめる条件の一つになる。しかし, 実験室でソルベントの離脱回収装置をいろいろ製作することは困難であったため, ありあわせの器具を使ってこれを組み立てて検したので, 十分な検討は行い難かった。それでも一応の目安をつけることはできた。その次第をここに報ずる。併せて, 同一の活性炭で収着離脱を何回も繰り返して, これを反覆使用すると, その収着活性がどの程度低下して行くか, いいかえると, 活性炭を何回位繰り返して有効に使えるかを検したので, その結果を報ずる。なお, 通気培養による高濃度仕込みを付報する。

実 験

分析法 : 前報⁽¹⁾と同様。

I. 活性炭に収着されたソルベントの離脱回収

これには, できるだけ少量の熱量によってできるだけ高い濃度のソルベント液が得られることが望ましい。

硝子管(径 20 mm)中にソルベントを収着した活性炭を木綿袋につめていれ, これを煮沸飽和食塩水に浸し, できるだけソルベントを溜出させた後に, 管の下部から蒸気を通じて追い出すと, 結果は第1表。すなわち, 収着されたアセトンの回収は容易であるが, ブタノールのそれは困難で, ほぼ 90% 回収するのに溜液 200 ml 余りをとる必要があり, この液中のブタノール濃度は約 0.8% になる。これでは到底問題にならない。加熱温度をもっと上げて当初の溜出を多くし, 通ずる蒸気もできるだけ量を少なくすれば, 所期の目標に近づくことができると考えられたので, 電気炉を用いて 150° まで上げて結果を検した。すなわち, 電気炉の中の硝子管にソルベントを収着した活性炭をいれ, 炉の温度を上げて溜出するソルベントを氷冷した受器に捕集し, できるだけ溜出

第1表 蒸気によるソルベントの回収

溜液	時間	ア セ ト ン				ブ タ ノ ー ル				エ タ ノ ー ル			
		回収量 (計)	回収率 (計)	回収量 (計)	回収率 (計)	回収量 (計)	回収率 (計)	回収量 (計)	回収率 (計)	回収量 (計)	回収率 (計)	回収量 (計)	回収率 (計)
(ml)	(分)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
25	41	0.319	94.2	1.20	64.7	0.096	41.7						
蒸 25(50)	3	0.005 (0.324)	1.5(95.7)	0.11 (1.31)	5.9(70.6)	0.057(0.153)	24.8(66.5)						
50(100)	5	0.004 (0.328)	1.2(96.9)	0.22 (1.53)	11.8(82.4)	0.057(0.210)	24.8(91.3)						
50(150)	3	0.002 (0.330)	0.6(97.5)	0.067(1.60)	3.6(86.0)	0.002(0.212)	0.9(92.2)						
50(200)	3	0.002 (0.332)	0.6(98.1)	0.050(1.65)	2.7(88.7)	0.002(0.214)	0.9(93.1)						
50(250)	3	0.0015(0.334)	0.4(98.5)	0.043(1.69)	2.3(91.0)	0.003(0.217)	1.3(94.4)						
50(300)	3	0.001 (0.335)	0.3(98.8)	0.035(1.73)	1.9(92.9)	0.001(0.218)	0.4(94.8)						
100(400)	9	0.002 (0.337)	0.6(99.4)	0.054(1.78)	2.9(95.8)	0.004(0.222)	1.6(96.4)						
100(500)	10	0.0015(0.339)	0.4(99.8)	0.045(1.83)	2.4(98.2)	0.005(0.227)	2.1(98.5)						

* Butanol Fermentation. Part XXIX. Fermentation in High Concentration of Sugar (2).

Sorption Method by Use of Active Carbon (3). Recovery of Solvents from Carbon.

By Izue YAMASAKI, Motoyoshi HONGO, Kyosuke AKABOSHI and Ken NAGATA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

** 現在は三楽酒造株式会社に勤務