品. $C_8H_7O_3N_3$ 計算値 C 49.74, H 3.63, N 21.76, 実験値 C 49.80, H 3.72, N 21.47.

東京大学医学部薬学科

Summary

Oxidation of the *p*-nitrophenylhydrazone of D-glucose with periodic acid gave glyoxal *p*-nitrophenylhydrazone. This compound was stable in a neutral medium but easily changed to glyoxal *p*-nitrophenylosazone and free glyoxal in an acid medium.

(Received August 11, 1952)

Gbsorption

442. 今井統雄, 古谷 潔: 槐花のルチン定量法

Kaneo Imai and Kiyoshi Furuya: Colorimetric Method for the Determination of Rutin in Flower Buds of *Sophora japonica* L.

(Takamine Research Laboratory, Sankyo Co., Ltd.*)

本研究はルチン原料たる槐花の試験規格を定めるに当り, 簡易迅速に生薬中のルチンを定量せんとする目的で実施した。我々は高能率の生薬抽出装置を用いて槐花を 99%メタノールで抽出し, 抽出液を濃縮後エーテルと振りまぜてエーテル可溶物質 (クエルセチン, クロロフィル等) を除いた後ルチンを Al-complex としてその absorption を光電比色計で測定し, ルチン濃度と absorption との相関関係より検体中のルチン含量を求める方法を検討した。

終りに吸収スペクトル測定を担当された当研究所員平井通博氏に深謝する。

実 験 の 部

Rutin-Al complex 0.01%ルチン**メタノール溶液 2 cc に, 試薬として 0.1 mol $AlCl_3$ 水溶液 3 cc 及び

Fig. 1
Absorption Spectrum of Rutin-Al
Complex

1 mol KOAc 水溶液 5 cc を加え¹⁾ 室温に 2 hr 放置後の吸収曲線を Beckman の spectrophotometer で描いて見ると Fig. 1 の如く 272 mμ 及び 418 mμ 附近に吸収の極大を示すが, 東京光電研究所製の光電比色計を用いた場合は Filter S-47 を使用した時吸収の極大を示す。

反応条件の absorption に及ぼす影響²⁾ ルチン溶液は本試薬に依り直ちに著明な黄色を呈するが, 反応温

* Nishi-Shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo.

** このルチンは Couch: AIC-159 (1947) の方法及エーテル処理を行い精製した。

1) Dechene: J. Am. Pharm. Assoc. 40, 93 (1951).

2) 今井, 古谷: 第5回日本薬学会大会 (1952) にて発表。

度及び試薬添加後の経過時間と absorption との関係を追求する為, 上記組成の Rutin-Al complex 溶液を作り Table I の如く 5° 及び 22° に於て 10 min, 1, 2, 3~4 hr 後に測定を行い, Table II の如き分散分析表を得た. 即ち温度間には有意の差は認められなかつたが時間の間には 1% の有意水準で有意差が認められた. 分散比の検定に於て A, B, C, D 間には夫々有意差は認められず (Table III), 次いで平均値の有意差の検定に於て A は B, C, D に対し夫々 0.1% の有意水準での有意差が認められた (Table IV). 又交互作用に関しては 5° の A は 22° の

Table I Influence of Temperature and Time on Absorption (Filter : S-47)

Time Temp.	A (10 min.)	B (1 hr.)	C (2 hrs.)	D (3~4 hrs.)
5° C (x_1)	0.169	0.171	0.171	0.172
	0.170	0.173	0.173	0.175
	0.165	0.178	0.174	0.175
	0.167	0.177	0.175	0.170
	0.172	0.174	0.177	0.177
	0.172	0.172		0.175
22° C (x_2)				0.177
				0.176
	0.166	0.172	0.174	0.173
	0.164	0.176	0.175	0.179
	0.162	0.178	0.178	0.176
	0.167	0.175	0.172	0.172
	0.170	0.176	0.176	0.178
	0.172	0.175	0.172	0.177
		0.172	0.175	0.176
			0.176	0.172
			0.172	0.174

$$X = (x - 0.173) \times 10^3$$

Table II Analysis of Variance

	S. S.	f	V	F_0	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
C (Temp.)	0.54	1	0.54			
R (Time)	424.37	3	141.48	26.13**	2.80	4.22
C × R	68.37	3	22.79	4.11*	2.80	
E	260.09	48	5.42			
T	753.96	55				

Table III Test of Variance Ratio

	A	B	C	D
n	12	13	14	17
σ_e	11.66	8.64	7.42	9.47

$$\text{where } \sigma_e = \frac{n}{n-1} \sqrt{\Sigma (X - \bar{X})^2}, \quad V = \sigma^2$$

$V_A/V_B, V_A/V_C, V_A/V_D, V_B/V_C, V_B/V_D, V_C/V_D$: insignificant

Table IV Significance Test for Averages

	σ_e	t	$t_{0.001}$	ϕ
A-B	2.90	5.60***	3.77	23
A-C	2.71	7.70***	3.75	24
A-D	2.81	6.73***	3.69	27

$$\text{where } \sigma_e = \sqrt{V_e} = \sqrt{\frac{\Sigma (X_1 - \bar{X}_1)^2 + \Sigma (X_2 - \bar{X}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}, \quad t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma_e \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

B-C, B-D, C-D: insignificant

Table V Interaction of Temperature and Time (Significance Test for Averages)

22° \ 5°	A	B	C	D
A		***	×	×
B	***			
C	***			
D	***	*	×	

× This mark shows the significance for the test of variance ratio.

Table VI Comparison of Standard Deviation at $n=13$

$$B : \sigma_B = 8.64$$

$$C : \sigma_C \times \frac{\sqrt{14}}{\sqrt{13}} = 8.02$$

$$D : \sigma_D \times \frac{\sqrt{17}}{\sqrt{13}} = 10.80$$

B, C, D に対し夫々 0.1% の; 22° の A は 5° の B に対し 0.1% の; 又 5° の B は 22° の D に対し 5% の有意水準に於て有意の差が認められた (Table V). 次に absorption の明かに小さい A は除き, B, C, D の測定回数 n を 13 に揃えて標準偏差 σ を求めると C の σ が最も小さい値を示す (Table VI).

依つて試薬添加後室温に 2 hr 放置した後測定する事に定めた.

ルチン濃度と absorption との関係²⁾ ルチン 0.004~0.016% 含有のメタノール溶液に就いて 0.002% の間隔で, 夫々 9 回 absorption を測定した. 測定条件は前述の如くルチン溶液 2 cc に AlCl_3 溶液 3 cc 及び KOAc 溶液 5 cc を加え室温に 2 hrs 放置後測定した. Table VII に示した如く之より相関係数 r を求むれば, 自由度 $\phi = 61$ に於て $r = 0.9978$ となり相関関係は明に成立し濃度 (x) に対する absorption (y) の回帰直線は

$$y = 16.3255x + 0.011745$$

この回帰線の標準誤差は $\sigma_y = 0.0043$ となる.

Table VII Correlation between Rutin Concentration and its Absorption (Filter: S-47)

Rutin % (x)	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012	0.014	0.016
Absorption (y)	0.076	0.110	0.141	0.178	0.208	0.234	0.272
	075	109	142	172	204	242	275
	072	107	139	175	210	240	270
	072	108	141	172	205	237	269
	073	107	142	176	206	238	271
	074	109	142	174	206	240	270
	072	110	141	172	207	238	269
	073	108	142	172	204	240	271
	075	110	142	174	205	238	266

$$X = (x - 0.010) \times 10^3$$

$$Y = (y - 0.175) \times 10^3$$

$$\Sigma X = 0, \bar{X} = 0, \bar{X}^2 = 0$$

$$\Sigma Y = -132, \bar{Y} = -2.095, \bar{Y}^2 = 4.389$$

$$\Sigma X^2 = 1008, \bar{X}^2 = 16.0$$

$$\Sigma XY = 16492,$$

$$\bar{X}\bar{Y} = 261.777$$

$$\Sigma Y^2 = 270124, \bar{Y}^2 = 4287.682$$

Sample Standard Deviation

$$s_X = \sqrt{\bar{X}^2 - \bar{X}^2} = 4$$

$$s_Y = \sqrt{\bar{Y}^2 - \bar{Y}^2} = 65.446$$

Correlation Coefficient

$$r = 0.9978^{**} (\phi = 61)$$

$$[r_{0.01} = 0.3248 (\phi = 60)]$$

Regression Line

$$Y - \bar{Y} = r \frac{s_Y}{s_X} (X - \bar{X})$$

$$\therefore x = 0.0612y - 0.00072$$

Standard Error

$$\sigma_y = s_Y \sqrt{1 - r^2} = 0.0043$$

逆に absorption より濃度を求むるには式を変形して

$$x = 0.0612y - 0.00072$$

より求むれば得られる. 又 95%信頼限界に於ける値はこの式から求めた x の値に $1.96 \sigma_y$ に相当する x の値即ち 0.00049 を±すれば得られる.

抽出装置の改良 従来の Soxhlet 抽出器は頗る便利な抽出器であるが物質によつては円筒濾紙の繊維に吸着される事もあり理想的とはいひ難い. この円筒濾紙を下端にガラスフィルターを付した耐圧円筒に代える事に依

Fig. 2 New Type Extractor

リ物質が繊維に吸着される事に起因する誤差は避け得られるが、更に抽出能率を高める為英局記載の生薬油出器を改良して Fig. 2 の如き装置を摺り合わせ式耐子器具で作り、本装置と Soxhlet との比較を行う為槐花末 1g を取り 5 cc/min の還流速度で抽出し一定時間毎のメタノール抽出液中のフラボノール (ルチン+ケルセチン) 量を前述の比色法に依り定量した結果は Table VIII に示す如く本装置が優れている。

Table VIII Yield of Flavonol from 1g. of Flower Buds (as Rutin)

Time of extraction	30 min.	1 hr.	2 hr.	4 hr.	8 hr.
Extractor					
Soxhlet			0.198	0.232	0.238 g
New type	0.216	0.234	0.241	0.244	0.248 g

槐花の抽出方法の検討 (1) 抽出時間の検討 本装置を用いる時は 10 hr 抽出した場合のフラボノール量を 100%とすれば、2 hr 抽出で 96%以上、8 hr 抽出で 99%以上抽出される。

(2) 抽出液の過熱に依るルチン損失の検討 槐花の 99%メタノール抽出液を 5 hr 及 10 hr 水浴上で加熱すると、5 hr に於ては加熱前の約 3%、10 hr に於ては約 5% のルチンが損失される。

(3) 抽出液中のケルセチンの除去 槐花のメタノール抽出液をペーパークロマトグラフィーに付するとルチンの他にケルセチン (槐花中約 1%) も証明せられ、このケルセチンはルチン同様 Al-complex を作りルチンの比色定量の際誤差の原因となる故之は除去しなければならない。抽出液を濃縮し少量の蒸留水を加えた後エーテルと振りまぜエーテルを傾瀉すればケルセチンのみならずクロロフィル等も除去され、このエーテル処理を行つた抽出液から析出するルチン結晶はペーパークロマトグラフィーに依つてケルセチンを定量するとケルセチン含量は 0.02~0.05%に過ぎない。

槐花のルチン定量法*** 以上各種条件を検討した結果次の定量法を確立した。

槐花末 1g を抽出筒中に精密に秤り約 99%メタノール約 100 cc で 2 時間温浸、次いで溶媒を交換し新しいメタノール約 100 cc で 6 時間温浸する。全浸出液を合してシロップ状となる迄濃縮した後蒸留水 10 cc 及びエーテル 60 cc を加えて良く振りまぜエーテル層を傾瀉した後 99%メタノールを加えて全量を 100 cc とする (エーテル処理の間ルチン結晶が析出した場合はメタノールを加えて加温溶解せしめた後全量を 100 cc とする)。之を更に 99%メタノールで 20 倍に稀釈して検液となし、検液 2 cc に 0.1 mol AlCl_3 水溶液 3 cc 及び 1 mol KAc 水溶液 5 cc を加えて良く振りまぜ室温に 2 hr 放置後光電比色計 (Filter: S-47) で absorbency (y) を測定し次式より 95%信頼限界に於ける検液のルチン%(x) を算出する。

$$x = (0.0612 y - 0.00072) \pm 0.00049$$

例えば槐花末 1g より得た検液の absorbency $y = 0.218$ の時は $x = 0.00125 \pm 0.00049$ となり稀釈倍数より原槐花中のルチン含量を算出すれば $(0.00125 \pm 0.00049) \times 20 = 25 \pm 0.97$ (%) となる。

比色法と重量法との比較検討 上述の比色法に依つて得た値及びエーテル処理後の槐花抽出液を放置して結晶を析出せしめ之をグーチの坩堝に取り秤量し、又この際の結晶母液を比色した値を Table IX に示した。即重

Table IX Comparison in Yield of Rutin from Flower Buds (%)

Lot	Method	Colorimetric	Gravimetric	
			Crystals	Mother Liquor
A		20.55 ± 0.97	19.20	2.20 ± 0.20
B		22.20 ± 0.97	19.80	3.00 ± 0.20
C		23.40 ± 0.97	19.10	3.40 ± 0.20
D		25.50 ± 0.97	23.70	3.50 ± 0.20
D		25.20 ± 0.97	21.95	3.40 ± 0.20
E		26.15 ± 0.97		
E		26.90 ± 0.97		
E		25.90 ± 0.97		

*** 0.01%ルチン溶液より製した Al-complex は、0.04% KCrO_4 水溶液とその absorption (Filter, S-47) がほぼ一致するから 花の試験規格に簡便法として採用出来よう。

量法に依る時は結晶母液中に著量のルチンが尙溶存し、しかもこの溶存量には可なり大きな変動が存する様に思はれる。

三井株式会社高峰研究所

Summary

Attempt was made to find a simple and rapid determination method for rutin in Kaika, a crude drug composed of the flower buds of *Sophora japonica* L. The reaction conditions of rutin-Al complex, and the correlation between rutin concentration and absorption were statistically examined. The flower buds were extracted with 99% methanol, using a new type extractor, treated with ether to remove quercetin, and diluted with a suitable amount of methanol to prepare a sample solution. To 2 cc. of this sample solution, 3 cc. of 0.1 mole aqueous solution of aluminum chloride and 5 cc. of 1 mole aqueous solution of potassium acetate were added, allowed to stand at a room temperature for two hours, and the absorption (y) of rutin-Al complex was measured by a photoelectric colorimeter, using S-47 filter. The percentage of rutin (x) at 95% confidence limit was calculated from the following equation: $x = (0.0612y - 0.00072) \pm 0.00049$.

(Received August 12, 1952)

443. 小田 武：ペニシリン生産糸状菌の色素の研究

Takeshi Oda: Studies on the Pigment of Penicillin-producing Mold.

(Institute for Infectious Diseases,* University of Tokyo)

著者は我国に於てペニシリン製造の初期に使用された長尾研究所の分離にかかる *Penicillium notatum* P 176 菌の培養液から黄色素を結晶状にとり出し、若干の性質を明にすることが出来た。その結果の一部は 1947年6月のペニシリン学術協議会で報告したが其の後種々の事情より之の研究の続行が困難となつたので今まで得られた結果をとりまとめて報告する。

P₁₇₆ 菌の培養液から当時ペニシリン精製法として採用されていた活性炭-アセトン法でペニシリンを精製する際、ペニシリンを吸着せる活性炭を含水アセトンで抽出し、アセトンを留去せるペニシリン含有液を稀硫酸で pH 3.2 にし、ペニシリンを酢酸エチルに移行せしめ、酢酸エチルからアンモニアで中和してペニシリンを水に転溶せしめ、之を稀硫酸で pH 3.2 にすれば黄色乃至褐色の沈澱を生じた。之の沈澱を乾燥しエーテルに可溶性のものをとり、エーテル液から炭酸ソーダ水に移行する部分を取り、炭酸ソーダ液を稀硫酸で酸性にすれば色素は沈澱する。之の沈澱を濾過し水洗して乾燥しメタノールから再結晶すれば黄色の結晶となつた。この物質は Stodola 等¹⁾が *Penicillium chrysogenum* 1249 B 21 の培養液から黄色素として抽出分離した penitric acid C₁₅H₁₇O₃N に一致した。更に之を 10%メタノール性硫酸で分解して、彼等が penitric acid に 2 N 硫酸を作用させて得た α -penitric acid C₁₄H₁₇O₃N mp 174~175° を得る事が出来た。又 penitric acid を 5%苛性ソーダで分解すれば彼等が penitric acid に 0.5 N 苛性カリを作用させて得た β -penitric acid C₁₄H₁₇O₃N mp 204~205° をも得た。

penitric acid を熱アセトンで再結晶を繰返していると一部はアセトンに難溶な一新物質 C₁₅H₁₇O₃N mp 242~243° (decomp), $[\alpha]_D^{25} -365.5^\circ$ に変化した。今回之を isopenitric acid と命名した。之は黄色砂状の物質で penitric acid は苦味を有して居るに対し苦味はなく比旋光性も penitric acid に比べて小さい。

* Shiroganedai-machi, Minato-ku, Tokyo.

1) Stodola, Wachtel, Moyer, Coghill: J. Biol. Chem. **159**, 67~70 (1945).