UDC 547.972 : 545.8-1 : 547.567.5

152. 村井好之助：Indophenol 反応による薬品分析法の研究 (第 5 報*)

Citrin 中の Hesperidin と Eriodictin の分離定量法

Konosuke Murai : Studies on the Analysis of Pharmaceuticals by Indophenol Reaction. V. Determination of Hesperidin and Eriodictin in Citrin.

(Hospital Pharmacy, Nara Medical College**)

Coloration of hesperidin and eriodictin by the indophenol reaction gives solutions whose absorption curves are almost without difference. Therefore, colorimetric determination of these substances must be preceded by their separation. Hydrolysis of citrin and paper chromatography of the hydrolyzate with distilled water saturated with benzene as the developing solvent, by the one-dimensional ascending method, gives the spots of the hydrolyzate of hesperidin and eriodictin respectively at R_f 0.44 and 0.11 (20~21°). By cutting out the papergram at respective R_f values, extraction with 20% aqueous solution (v/v) of pyridine, and addition of dimethyl-*p*-phenylenediamine hydrochloride solution and sodium hypochlorite solution to the extract to effect oxidative condensation in Kolthoff-Vleeschhauwer buffer of pH 8.2 gives a blue solution. Extraction of this blue pigment with isobutanol and measurement of its optical density at 620 $m\mu$ successfully effected separatory determination of hesperidin and eriodictin in citrin.

(Received January 22, 1958)

citrin は植物色素として広く自然界に存在する配糖体で、市販の citrin は主として hesperidin よりなり、通常少量の eriodictin を含んでいるが、再結晶法によつてこれ等を分離することは困難である。citrin の比色定量法としては Huszak 等による塩化第二鉄溶液を用いる方法¹⁾、Arcangeli 等による cyanidin 反応を利用した方法²⁾があり、また Wilson はホウ酸飽和アセトン溶液により生成する黄色の液を比色し³⁾、Armentano 等は乳酸銀溶液とシアン化ナトリウムにより呈色せしめて比色している⁴⁾が、citrin 中の hesperidin と eriodictin の分離定量法については未だ報告が見られない。著者はこの citrin 中の hesperidin と eriodictin の比較的簡便にして実用的な分離定量法を得る目的をもつて本実験を行つた。hesperidin 及び eriodictin を indophenol 反応により呈色せしめるときは Fig. 1 に示すように何れもその吸収曲線にほとんど差がなく、620 $m\mu$ において最大の吸収を示す。従つて citrin をそのままで呈色せしめるときは citrin 中の hesperidin と eriodictin の

Fig. 1.

— 100 γ /cc. Hesperidin, colored solution
 - - - - 100 γ /cc. Eriodictin, colored solution

* 第 4 報：薬剂学 16, 15(1956).

** Shijo-cho, Kashihara, Nara.

- 1) S. Huszak : Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's) 247, 214(1937).
- 2) E.F. Arcangeli, F.S. Trucco : Ann. Chim. appl. 34, 20(1944).
- 3) C.W. Wilson : J. Am. Chem. Soc. 61, 2303(1939).
- 4) L. Armentano, E.B. Hatz, I. Ruszyak : Klin. Wochschr. 17, 739(1938).

分離定量が困難であるから、予め汙紙クロマトグラフィーにより両者の加水分解物を分離し、それぞれ対応する R_f 値 (hesperidin の加水分解物 R_f 0.44, eriodictin の加水分解物 R_f 0.11) を示す部分を切り取り、ピリジン水溶液で抽出し、おのおのの抽出液にジメチルパラフェニレンジアミン塩酸塩水溶液及び次亜塩素酸ナトリウム液を加えて酸化縮合せしめ、生じた indophenol 色素をそれぞれイソブタノールで抽出し比色することによりかなりの好結果でこの両者を分離定量することが出来た。

本実験に際し終始御懇篤なる御指導を賜わった京都大学教授掛見喜一郎博士、京都大学教授宇野豊三博士、並びに京大薬学科助教授有田隆一博士に厚く感謝する。また一部試料を提供下さったカルホルニア大学化学学科教授 T. A. Geisman 博士に深謝する。

実 験 の 部

試 薬 (1) 50 mg% ジメチルパラフェニレンジアミン HCl 塩水溶液 (用時調製)。 (2) 0.02% 次亜塩素酸ソーダ液 (用時調製)。 (3) pH 8.2 Kolthoff-Vleeschhauwer 緩衝液 0.1 M KH_2PO_4 4.24 cc + 0.05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 5.76 cc)。 (4) iso-BuOH (精製)。 (5) 5% HCl-EtOH (局方 HCl を無水 EtOH で希釈し HCl を 5% 含むように調製する)。

標準液の調製 hesperidin 及び eriodictin の結晶 50 mg を精秤し、5% HCl-EtOH 20 cc を加え、沸騰水浴上で 2 時間加熱した後、 N NaOH で正確に中和し、更にピリジン 20 cc 及び蒸留水を加えて全量 100 cc となし標準液とする。

検量曲線の作製 標準液の一定量を取り、20 v/v% ピリジン水溶液で希釈し、10~50 γ /cc の溶液を調製する。この液 2 cc をそれぞれ共栓試験管にとり pH 8.2 の Kolthoff-Vleeschhauwer 緩衝液 2 cc を加えよく混和し、更に正確に iso-BuOH 4 cc を加える。次いで 50 mg% ジメチルパラフェニレンジアミン HCl 塩水溶液 0.5 cc 及び 0.02% 次亜塩素酸ソーダ液 0.3 cc を加え直ちに密栓して 1 分間はげしく振りまぜた後、室温に 5 分間放置し、分離した iso-BuOH 層 3.5 cc を他の乾燥試験管に分取する。これに無水 EtOH 0.2 cc を正確に加えて軽く振りまぜ澄明となし、波長 620 m μ における吸光度を測定する。同時に 20 v/v% ピリジン水溶液を用いて同様に操作してその吸光度を測定し、この値をブランクとして先に得た値から差引き、常法に従って検量曲線を作製する。Fig. 2 及び Table III に示すように hesperidin と eriodictin の加水分解物の検量曲線はほとんど等しく、吸光度と濃度との間には直線関係を示し、よく Lambert-Beer の法則に従う。従って実用的には hesperidin の加水分解物の検量曲線を eriodictin の定量の際に用いても差し支えない。(ベックマン分光光度計 DU 型)

Fig. 2 Calibration Curve

Table III. Absorbancy of the Colored Solution of Hesperidin Eriodictin and Their Hydrolysed Products						
		concn.				
Substance		10 γ /cc.	20 γ /cc.	30 γ /cc.	40 γ /cc.	50 γ /cc.
Hesperidin	Hydrolysed	0.090	0.180	0.260	0.350	0.460
	Non-hydro- lysed	0.090	0.180	0.270	0.370	0.470
Eriodictin	Hydrolysed	0.086	0.180	0.280	0.357	0.460
	Non-hydro- lysed	0.090	0.180	0.270	0.370	0.470

定量法 検体 citrin 50 mg を精秤し、5% HCl-EtOH 20 cc を加え、沸騰水浴上で 2 時間加熱して加水分解を行い、 N NaOH で中和した後ピリジン 10 cc 及び蒸留水を加えて全量 50 cc となし検液とする。東洋汙紙 No. 50 40×6 cm の下端より 4 cm の位置に原線を取り、前記の検液 0.5 cc を帯状に塗布し風乾した後、蒸留水にベンゼンを飽和せしめた液を展開溶媒として一次元上昇法により展開し (20~21°) 溶媒前線が約 30 cm に達したときこれを引き上げ風乾し、同時に対照として展開した hesperidin 及び eriodictin の各加水分解物の示す R_f 値 (0.44 及び 0.11) に対応する位置の上下各 2 cm の巾にこれを切り取り、それぞれ別に細切してフラスコに入れ、20 v/v% ピリジン水溶液 5 cc を加えて沸騰水浴上で約 30 分間しばしば振りながら抽出した後、ガラスフィルターで吸引汙過し、更に約 5 cc のピリジン水溶液を用いて細切した汙紙及びガラスフィルターをよく洗い、洗液は汙液に合し、汙液の全量を 10 cc となし、その 2 cc をとり、検量曲線の作製の項で述べた方法に従いそれぞれの吸光度を測定する。ここに得た値からブランクの値を差引き、さきに作製した検量曲線を用いてその対応する濃度を求め、これに 1000 を乗じて citrin 中の hesperidin 及び eriodictin の含量を算出する。

検 討 さきにも述べたように citrin, hesperidin 及び eriodictin の間ではその呈色物の吸収極大に差がなく、また加水分解を行ったものについても同様に検討したが、加水分解を行わないものとの間には差が認められなかつたので以下定量条件の検討には citrin を用いて行つた。

呈色度に及ぼす pH 及び試薬量の影響 50 γ /cc citrin 溶液について pH 7.6~9.4 の Kolthoff-Vleesch-hauwer 緩衝液を用い、本呈色に及ぼす pH 及び 0.02% 次亜塩素酸ソーダ液量の影響について検討した。検量

Table IV. Effect of pH and 0.02% NaOCl Solution on Absorbancy

pH	0.02% NaOCl					
	Absorbancy					
	0.1 cc.	0.2 cc	0.3 cc	0.4 cc	0.5 cc	0.6 cc
7.6	0.320	0.440	0.440	0.440	0.440	0.320
7.8	0.325	0.445	0.445	0.445	0.440	0.325
8.0	0.325	0.445	0.445	0.445	0.440	0.420
8.2	0.325	0.470	0.470	0.470	0.450	0.420
8.4	0.325	0.440	0.440	0.440	0.425	0.425
8.6	0.276	0.440	0.440	0.440	0.425	0.425
8.8	0.220	0.225	0.225	0.225	0.210	0.205
9.0	0.205	0.205	0.205	0.205	0.205	0.205
9.2	0.205	0.205	0.205	0.205	0.205	0.207
9.4	0.180	0.180	0.180	0.180	0.167	0.167

曲線の作製の項で述べた方法に準じて呈色せしめその吸光度を測定したところ Table IV に示すような結果を得た。即ち pH 8.2 において吸光度は最も高く、このときの 0.02% 次亜塩素酸ソーダ液の量は 0.2~0.4 cc の間でその呈色度に変化がなかつた。従つて本法では pH は 8.2 とし、0.02% 次亜塩素酸ソーダ液の量は 0.3 cc とした。また 50 mg/cc ジメチルパラフェニレンジアミン HCl 塩水溶液の量は 0.3~0.8 cc の間ではその吸光度にほとんど変化はないが、この過剰はブランクの吸光度を増大せしめる傾向があるので本法においては 0.5 cc を用いることとした。

呈色度に及ぼす温度の影響 A と同様にして本呈色に及ぼす温度の影響を検討したところ、10~30° の間で吸光度に差がなかつたので本法では室温で行うこととした。

呈色の安定性 呈色後の時間的経過にともなう呈色度の変化について同様に検討したところ、iso-BuOH 層への移行後は少なくとも 90 分間はその吸光度に何等の変化も認められず安定であつた。

Hesperidin 及び Eriodictin の各加水分解物の分離について hesperidin, eriodictin 及びこれ等の加水分解物は、さきにも述べたように何れも本試薬により呈色し、その吸収曲線は等しいので予じめこれを分離する必要がある。citrin 中の hesperidin と eriodictin を加水分解せずに浮紙クロマトグラフィーにより分離したところ、スポットの流れる傾向があつたので定量法に記載したように予じめ加水分解を行つた後、ベンゼンを蒸留水に飽和せしめた液を展開溶媒として分離を行つた。このとき hesperidin の加水分解物は Rf 0.44 を eriodictin の加水分解物は Rf 0.11 を示し両者の分離が可能であつた (展開温度 20~21°, 顕色法は各試薬を順次噴霧して浮紙上でインドフェノール反応を行い呈色せしめる)。

またこの分離操作による誤差の定量値に及ぼす影響を検討するため hesperidin 及び eriodictin の各種濃度の加水分解した溶液を用いて定量法に述べた方法により分離し抽出し、抽出液についてインドフェノール反応を行い呈色せしめその濃度を求めたところ Table V に示す如く比較的僅少な誤差で、本定量法に用い得ることを認めた。

Table V.

Hesperidin (γ /cc)		Eriodictin (γ /cc.)	
Calcd.	Found	Calcd.	Found
45	43.5	5	4.5
25	24	25	24
15	14	35	33.5
5	6	45	46

測定例 次に citrin 中の hesperidin 及び eriodictin の分離定量を行う際の本法の精度を検討するため、hesperidin と eriodictin を種々の割合に混合しさきに述べた定量法に従つて操作した結果 Table VI に示すように比較的良好な精度で実用分析として用い得ることを認めた。

次に市販の citrin を用いてその hesperidin と eriodictin の分離定量を同一検体について 4 回行つた結果 Table VII に示すような結果を得た。

Table VI.

Calcd. (mg.)		Found (mg.)	
Hesperidin	Eriodictin	Hesperidin	Eriodictin
45.0	5.0	46.0	4.5
40.0	10.0	41.5	8.5
41.5	8.5	41.9	7.9
50.0	0.0	51.5	0.0
35.0	15.0	37.0	13.5

Table VII. Determination of Hesperidin and Eriodictin in Citrin 50 mg.

No.	Hesperidin		Eriodictin	
	(mg.)	(%)	(mg.)	(%)
1	47.0	94.0	2.5	5.0
2	46.0	92.0	2.6	5.2
3	46.0	92.0	3.0	6.0
4	45.0	90.0	2.5	5.0
Average	46.0	92.0	2.65	5.3

奈良医大病院薬局

UDC 547.551.44 : 547.586.2 : 577.152

153. 亀田幸雄, 豊浦悦子, 木村行男, 松井勝彦, 堀田良子 : 微生物における
アンラーゼ能の研究 (第 1 報)

Phenylalanine, Phenylglycine, 及び *p*-Nitrophenylalanine の D 型及び L 型の
Benzoyl, Dichloroacetyl, Chloroacetyl 誘導体の酵素的加水解*

Yukio Kameda, Etsuko Toyoura, Yukio Kimura, Katsuhiko Matsui, and Yoshiko

Hotta : Studies on the Acylase Activities and Microorganisms. I.
Enzymatic Hydrolysis of Benzoyl, Dichloroacetyl, and Chloroacetyl
Derivatives of D- and L-Forms of Phenylalanine, Phenylglycine,
and *p*-Nitrophenylalanine.

(Laboratory of Antibiotics, Faculty of Pharmacy, Kanazawa University**)

The acetone-dried powder of soil bacteria KT 84 (*Pseudomonas* sp.) effected asymmetric hydrolysis of N-benzoyl-, N-dichloroacetyl-, and N-chloroacetyl-DL-phenylalanine respectively affording N-benzoyl- (V), N-dichloroacetyl- (VI), and N-chloroacetyl-D-phenylalanine (VII) in a good yield, besides L-phenylalanine. The acetone-dried powder of KT 83 easily hydrolyzed (V), (VI), and (VII) to afford acylated D-phenylalanine in a good yield. This soil bacteria also hydrolyzed N-benzoyl-, N-dichloroacetyl-, and N-chloroacetyl-L-phenylalanine.

The acetone-dried powder and bacterial suspension of KT 84 did not hydrolyze N-benzoyl-DL-phenylglycine but effected asymmetric hydrolysis of N-dichloroacetyl- and N-chloroacetyl-DL-phenylglycine to form the corresponding D-phenylglycines (XIII and XIV) and L-phenylglycine. The acetone-dried powder and bacterial suspension of KT 83 hydrolyzed (XIII) and (XIV) to form D-phenylglycine, and also hydrolyzed N-dichloroacetyl-, and N-chloroacetyl-L-phenylglycine. N-Dichloroacetyl derivative of phenylglycine is more easily hydrolyzed than the N-chloroacetyl derivative. The acetone-dried powder of KT 84 asymmetrically hydrolyzed DL-phenylglycine amide to form L-phenylglycine and D-phenylglycine amide (XVII) in a good yield. D-Phenylglycine was prepared by the hydrolysis of (XVII) with 10% HBr.

The acetone-dried powder of KT 84 effected asymmetric hydrolysis of N-benzoyl-*p*-nitro-DL-phenylalanine (XVIII) and afforded *p*-nitro-L-phenylalanine and N-benzoyl-*p*-nitro-D-phenylalanine. The N-benzoyl-*p*-amino-D- and -L-phenylalanine were synthesized. While KT 84 hydrolyzed only the L-form benzoyl derivatives of *p*-nitro- and *p*-amino-phenylalanines, KT 83 hydrolyzed both L- and D-forms.

(Received January 22, 1958)

さきに著者等は土壌細菌 KT 84¹⁾ の菌体浮遊液がフェニルアラニン, チロジン, アラニン, アミノ酪酸, *p*-methoxyphenylalanine, 3,4-methylenedioxypheylalanine 等の 6 種の アミノ酸の N-benzoyl 誘導体を不斉加水解することを観察し, これらのアミノ酸を収量よく光学的分割することが出来た^{2,3)}. また一方に於いて土壌

* 一部は日本薬学会年会 (1954 年 4 月) 及び例会発表 (1954 年 11 月).

** Tsuchitoribanaga-machi, Kanazawa.

1) Y. Kameda, E. Toyoura : 本誌 72, 791(1952).

2) Y. Kameda, E. Toyoura, Y. Kimura, H. Yamazoe : Nature 169, 1016(1952).

3) Y. Kameda, E. Toyoura, H. Yamazoe, Y. Kimura, Y. Yasuda : Nature 170, 888(1952).