

度を測定した結果を次に示す。

第 10 表

B ₂ 初 濃 度	20000	10000	5000	2000	1000	500
中和後の 濾液 B ₂ 濃 度	800	1000	800	800	227	250
沈 降 率 (%)	92	80	68	20	46	0

即ち水で稀釋した場合と少々趣きを異にし結晶析出後の液濃度は一旦 800 γ /cc 附近に落着くが之は過飽和の準安定溶液で更に 250 γ /cc に迄低下することは 0.05~0.1% B₂ 溶液の側で明らかである。しかし對照として飽和食鹽水に對する溶解度を測定した所 110 γ /cc という値を得たが、之に比べるとなお高い値を示している。中和によつて析出した結晶が純 B₂ か或いは變形であるかは確認していない。

總 括

B₂ の鹽酸に對する溶解度に就いて實驗し次のような結果を得た。

(1) B₂ の溶解度は鹽酸濃度の増加と共に上昇するが、その間に直線的な比例關係は成立しない。特に30%鹽酸に對しては20%に及ぶ。

(2) 飽和平衡に達する迄の時間は攪拌すれば10分で充分であり且つ濾過して得た液は過飽和溶液ではない。

(3) 溫度上昇により溶解度は著るしく増加し加熱して得た過飽和溶液は不安定である。

(4) 濃厚鹽酸の B₂ 飽和溶液は水で稀釋するか中和すると結晶を析出する。

濃厚鹽酸がこのように大きい溶解能をもつ理由に就いては續報する豫定である。

本研究は日本學術會議ビタミンB綜合研究として行つたものである。

終りに臨み御指導を賜つた高田教授に深謝致します。

(高田研究室報告第298)

文 献

- 1) 陳: 本誌, 24, 56 (昭21).
- 2) 高田, 永田: 本誌, 27, 97 (昭24).
- 3) 高田, 永田, 島本: 本誌, 27, 7 (昭24).
- 4) 高田, 永田: 本誌, 27, 12 (昭24).
- 5) 齋藤, 高田: 本誌, 20, 327 (昭17).

Riboflavin の理化學的性質に関する研究 (第1報)

還元型リポフラビンとその溶解度

清 水 祥 一

(京都大學工學部工業化學教室)

Eremothecium Ashbyii 胚芽培養物抽出液から Riboflavin 結晶を得る方法として、還元によつてより難溶性の還元型フラビンとして沈降させて分離し酸化して Riboflavin に戻し精製して結晶を得る方式を採用している¹⁾。

しかるに Kuhn, Ströbele によると²⁾ 合成 1-Araboflavin の還元型には Leukoflavin に至

(140)

(清水) Riboflavin の理化學的性質に関する研究 (第1報)

るまでに Verdo-, Chloro-, 及び Rhodo-flavin の3段階が有り夫々若干性質を異にする。Riboflavin の場合も同様の還元中間段階が存在し還元型 Araboflavin の単離法が適用し得る筈であるが溶解度関係からかなり困難であるとし詳細な研究はないようである。

従つて如何なる還元条件の時にどの段階迄反応が進行するか、又どの段階の還元型が最も難溶性であるかという問題は未解決である。そこでこの點に關して實驗した結果を報告する。

〔I〕 各還元型の單離

1. Verdoflavin

還元第1段階である Verdoflavin は比較的容易に生成する。即ち中性、アルカリ性液における Na-hydrosulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) による還元、中性、アルカリ性液における PdO 接觸還元、中性液における Raney-Ni 接觸還元等の還元反應を適用した所、何れの方法によつても生成はするが純離するには Na-hydrosulfit 法 (Kuhn 法) 及び PdO 接觸還元法が適當である。

種々の条件下で行つた中最適と考えられる方法を次に述べる。

還元型フラビン是一般に濕潤状態で空氣中の酸素に極めて不安定であるので操作中酸素の存在を避ける爲反應容器はすべて氣密とし窒素氣流中に行つた。

(a) Na-hydrosulfit 法

Riboflavin (B_2) 500mg を 0.2~0.5n NaOH 水溶液約 10cc に溶解し之に 5~15% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液を滴下して行くとコロイド狀の暗綠色粗沈澱が生成する。約 15~40cc で次の滴下によつて最早や沈澱が生じなくなるから中止し徐々に加熱する。粗沈澱が溶解して透明な液となれば再び冷却すると綠色沈澱が析出して来る。この結晶を吸引濾過後水及びアセトンで洗滌しそのまゝ減壓として水分を除き P_2O_5 上に移して減壓乾燥する。

(b) PdO 蝕媒接觸還元法

B_2 500mg を 0.1~0.2n NaOH 水溶液 20cc に溶解し PdO 觸媒 50mg を添加して水素を導入する。1分間 80 泡程度で約 30 分導入すると相當量の Verdoflavin が沈降して来るからこの點で水素を窒素に變えて後一旦加熱溶解し熱時濾過して觸媒とわけ冷却して析出する結晶を (a) と同様に濾過洗滌乾燥する。

このようにして得た Verdoflavin の結晶は黃綠色針狀晶であるが、かなり金屬様光澤を有し B_2 との差は明白である。

2. Chloroflavin

Kuhn は Chloroflavin の單離法として PdO 接觸還元によつて Rhodoflavin に迄還元を進め之を HCl 鹽として單離し空氣酸化により Chloroflavin の段階迄戻す方法を採用している。この方法も便利に Chloroflavin を單離し得るが、Na-hydrosulfit を使用して單離する事も可能である。

(a) Na-hydrosulfit 法

B_2 100mg を 0.1n NaOH 水溶液約 10cc に溶解し $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ の 30~50% 水溶液を加えて還元する。約 10cc 添加して生成する沈澱を窒素氣流中で濾過し暫く空氣を通すると褐色の粗沈澱が美しい綠色に變化する。この點で窒素を導入して空氣酸化を中止し熱水から再結晶する。

(b) PdO 接觸還元法

次に述べるようにして Rhodoflavin-HCl 鹽を作り之を水洗して加水分解し遊離型とすると共に空氣酸化して眞綠色の Chloroflavin の段階迄戻し遠心分離して上澄液と分ち熱水から再結晶する。

このようにして得た Chloroflavin の結晶は針状晶で融點 255°C を示す緑色物質である。各還元型フラビンの中では最も酸化に對し安定であつて上述のように熱水からの再結晶も融點測定も可能である。

3. Rhodoflavin

Rhodoflavin は B_2 の中性溶液に Na-hydrosulfit を投入して強力に還元すると赤橙色沈澱として生成する。又褐色の沈澱として得ることもあるが之は酸化に對し極めて鋭敏であつて單離しようとするれば緑色の Chloroflavin に戻る。又亜鉛と鹽酸とで還元すると烈しく反應して深赤色の溶液となる。之は Rhodoflavin HCl 鹽の水溶液であつて Rhodoflavin の段階迄反應が進行するか結晶として單離するには最適 pH の調節が困難である。Kuhn は PdO 接觸還元法を用いて HCl 鹽として單離している。 B_2 の場合には生成した結晶が Araboflavin の場合と若干性質を異にしそのまゝ適用できないので若干改良を施した。即ち B_2 500 mg を 0.1 n NaOH 水溶液 10 cc に溶解し PdO 觸媒 100 mg を加え水素を通じつつ振盪する。液の色調が橙色から黄色、黄緑色となり Verdoflavin の暗緑色沈澱が先ず沈降するが更に還元を続けると再び溶解する。すべて溶解してからなお10分間還元を続け窒素で水素を置換し觸媒と濾別し濾液に濃鹽酸 20 cc を加えると血赤色溶液となる。之に水 30 cc を加えて冷蔵庫内に5日間放置し結晶が析出し終れば遠心分離して 3 n 鹽酸で數回洗滌する。

このようにして得た結晶は Rhodoflavin HCl 鹽の針状赤色物質である。

これから遊離型の Rhodoflavin とするには窒素氣流中で水洗すれば赤色から褐色になるが褐色のものは極めて酸素に鋭敏であるから單離は困難である。

又 B_2 の弱アルカリ性溶液に Na-hydrosulfit を投入した場合褐橙色の沈澱を得ることもあるが之は Na 鹽ではないかと考えている。

4. Leukoflavin

Kuhn は Leukoflavin の單離法については何等言及していない。

アルカリ性溶液で PdO 接觸還元を行つてもその Na 鹽が易溶性である爲結晶として單離できない。又酸性では液はその酸性度によつて赤色乃至無色となるが結晶を單離するに至らなかつた。この赤色溶液は Rhodoflavin であると思われる。そこで中性溶液で行つた所液は黄橙色から直ちに無色となり結晶様のものは生成するが之を加熱して熱時濾過し冷室中に約1ヶ月放置したが結晶は得られなかつた。

以上 Kuhn の指摘した還元型の4型の單離法について實驗したが、各還元型フラビンの結晶を得るには各々最適の pH があるらしくその調節如何が成否を支配するものと思う。

〔Ⅱ〕還元型フラビンの溶解度

先に述べたように還元型フラビンは特に水の存在で酸化され易いのでその溶解度測定の場合も空氣中の酸素から遮斷する必要がある。そこで次のような方法を用いて測定した。

(a) 還元型フラビンを窒素氣流中で水に投入し充分振盪して溶解し窒素氣流中で濾過し濾液に空氣を吹き込んで Riboflavin に迄酸化する。

(b) 還元型フラビンを窒素氣流中で水に溶解し豫じめ Benzol を入れた遠心分離管中に注ぎ Benzol で空氣との接觸を断ちつつ攪拌及び遠心分離を行い上澄液をとり出して空氣酸化により Riboflavin とする。

この Riboflavin 溶液の濃度を比色法により測定して溶解度を求めた。

なお Leukoflavin は純結晶として單離出来なかつたので中性にて接觸還元した液を窒素氣流

(142)

(清水) Riboflavin の理化學的性質に関する研究 (第1報)

中で吸引濾過した濾液を用いた。

結果を次表に示す。

	温度 °C	溶 媒	遊離型	Na 鹽	HCl 鹽
Verdo-	10	水		35	
	13	"		50	
	18	"		70	
Chloro-	10	"	16		
	13	"	20		
	18	"	20	45	
Rhodo-	10	"	8		
	13	"	10		30
	18	"	15		
	13	10% HCl			13
	13	20% HCl			50
	13	30% HCl			80<
Leuko-	10	水	5		
	13	"	8	60<	
	18	"	10		

即ち上述の方法で単離した各還元型フラビンの結晶は、遊離型、Na 鹽、HCl 鹽の差異があるので直接比較し難いが、一般的傾向として還元段階の進行と共に溶解度が減少するものと考えられる。唯、Leukoflavin は結晶を単離していないので正確でなく且つ還元反應中沈澱の生成が極めて少ない点から もつと溶解度が大きいのではないかと考えられる。少くとも Leukoflavin の Na 鹽は Rhodoflavin の Na 鹽より溶解度が大きいことは確實である。

次に遊離型のものは Na 鹽より難溶性であり、pH の調節を適當に行えばもつと簡単に還元型フラビンの析出や溶解を支配し得るものと思われる。

従つて反應の難易と溶解度の大小との両面から考えると沈澱採取の爲には Rhodoflavin の段階還元を進めるのが得策である。

總 括

Riboflavin を用い Kuhn の所謂還元型4型の單離法を研究し Verdo-, Chloro- 及び Rhodoflavin の單離に成功した。Leuko-flavin は結晶として得られなかつた。

各還元型の溶解度は Verdo- が 50 γ /cc, Chloro- が 20 γ /cc, Rhodo- が 10 γ /cc 附近である。Leuko-flavin は 8 γ /cc 位であろう。

本研究は日本學術會議ビタミンB綜合研究として行つたものであり、その概要は日本ビタミン學會第1回講演會(昭和24年4月)に發表した。

終りに臨み終始御指導を賜つた高田教授に深謝致します。

(高田研究室報告第300)

文 献

- 1) 高田: ビタミン, 1, 378 (1949). 高田, 原: 本誌, 26, 382 (1948). 高田, 永田: 本誌, 27, 14 (1949).
- 2) Kuhn und Ströbele: Ber. 70, 753 (1937).