黒斑病甘藷の病理化学的研究(第7報)

罹病甘藷よりのポリフェノール成分の分離証明(その2)

瓜 谷 郁 三 (東京大学農学部 農芸化学科)

昭和27年7月9日受理

Phytopathological Chemistry of Black-rotted Sweet Potato. Part 7. Isolation and Identification of Polyphenols from the Injured Sweet Potato

By Ikuzo URITANI (Dept. Agr. Chem., Faculty of Agriculture, Univ. of Tokyo)

既報⁽¹⁾の如く、黒斑病菌に依り侵された甘藷健全部には多量に polyphenol 成分が集積されるが、RUDKIN⁽²⁾に習い counter current distribution (c.c.d.) により Component B より chlorogenic acid を結晶状⁽³⁾に、Comp. A より A₁, A₂ 成分を粉末状⁽⁴⁾に得た。今回はこれら polyphenol 成分の中 caffeic acid 及びその methyl ester を分離証明した故それについて報告する。

実 験

1. Caffeic acid (3,4-dihydroxy Caffeic acid) の分離証明

(1) **Comp. A の分離**：粗フェノールの抽出法は第4報の方法に従った故、本報に於ては簡単に記載する。甘藷約 26 kg (農林一号) を輪切にし黒斑病菌を接種後、25° に7日間おき、koch 釜で蒸煮後被害部を除去し、健全部約 11 kg を得た。これを acetone で温浸し、抽出液を減圧濃縮して得水溶液に醋酸鉛を加え、本成分を鉛塩として沈澱させた。此の鉛塩を醋酸に溶解させて不溶分と分ち、アムモニア水で pH 8.5 に上げて再び鉛塩として沈澱させた。この鉛塩を水に suspend して硫酸で分解し pH 2.0 の本成分の水溶液を得た。既報の如く pH 4.7 buffer と醋酸エチルによる c.c.d. に依り、Comp. A は極めてよく醋酸エチルに移る事を知った故、上記分解液を第2磷酸ソーダで pH 4.2 に調節し、同容量の醋酸エチルに依り3回振盪抽出を実施した。この抽出液を減圧濃縮し石油エーテルを添加することに依り、黄色の粗 Comp. A 約 28 g を粉末状に得た。

(2) **粗 Comp. A の paper chromatography**：展開剤として主に蒸留水飽和の butanol 並に butanol 9, acetic acid 1, water 10 の割合の混合溶媒を使用した。展開後の検出としては、多く次の方法を併用した。即ち、先ず紫外線照射に依り青色乃至青白色の斑点を調査し、次にアムモニアガスに当てて、黄色乃至赤桃色に顕れる斑点を調査した。次に 0.2 mol. phosphate buffer に 0.5% になるように赤血塩を溶解させた液を噴霧し、5 分間後に稀磷酸溶液に 2.5% になるよう硫酸第2鉄を溶解させた液を噴霧した。これにより prussian blue の青色が顕れ、極めて鋭敏である。本発色法は MIRSKY⁽⁵⁾ が SH-group の定量に使用した方法及び HOLTEN⁽⁶⁾ がアドレナリンの paper chromatograph に実施した方法を参考にして改良を加えたものである。本法は螢光或いはアンモニアによる呈色で検出し得ない場合にも十分に検出し得、且つ塩化鉄溶液、鉄明礬溶液或は PAULI の試薬よりも更に鋭敏である。以上の展開剤並に検出法により、粗 Comp. A の paper chromatography を実施したところ、少くも5箇所 polyphenol 成分を検出し得た (Table 1 参照)。

Table 1. The Paper Chromatography of the Crude Comp. A.

No.	Components	Butanol (RF)	Butanol, acetic acid, 1: water, 10 (RF)	Color occurred in ammonia vapour
I	A ₁	0.84	0.83	yellow
II	... caffeic acid	0.40	0.80	reddish brown
III*	A ₂	0.30	0.61	yellow
IV	Chlorogenic acid	0.21	0.31	yellow
V	Unknown	0.02	0.10	brown

* The spot of Comp. III is inclined to tail.

先に離した chlorogenic acid, A₁ 及び A₂ の試料に依り同様実施したところ、(I) は Comp. A₁, (II) (III) は Comp. A₂ に相当し、(IV) は chlorogenic acid であ

ることがわかった。これより Comp. A₂ は少くとも2種類の phenol 成分の混合物であることが理解された。この点第5報の counter current distribution の結果に一致した。なお此の中の (II) がここで分離証明を記す caffeic acid である。又 (IV)(V) の斑点が小であつたのは、前述の醋酸エチルと pH 4.2 buffer との振盪の際多く buffer 層に止まつたことに由る。

(3) **Caffeic acid の結晶化**：Comp. A₂ 成分の精製を目的とし、粗 Comp. A を ethyl acetate に溶解し、1 mol. phosphate buffer (pH 6.9) の同量を以て振盪抽出した。第5報の pH 6.3 の c.c.d. の結果

より推して pH 6.9 の場合には、 A_1 は醋酸エチル層に止り、 A_2 は buffer 層に移るものと見做された。事実 paper chromatography に依り、殆ど完全に A_1 , A_2 に分離していることを確かめた。次に A_2 成分を含む buffer を磷酸で pH 4.7 に落とし、同量の醋酸エチルをもつて振盪抽出した。Paper chromatography の結果本操作により少量混合していた chlorogenic acid 等の phenol 成分 (IV, V) は buffer 層に残り、醋酸エチル層は殆ど A_2 成分のみとなつた。次に醋酸エチル溶液を減圧濃縮し石油エーテルで分別沈澱を行つたところ (II) 成分が石油エーテルを多量に加える事に依り徐々に沈澱してくるに対し、(III) 成分は石油エーテルを少量加えても速かに沈澱する傾向のあることが、各 fraction について paper chromatography を実施することにより知り得た。

かくして paper chromatography を頼りにして分別沈澱法により、(II) 成分と (III) 成分とに分別していつた。此の中 (II) 成分の収量は約 1 g であり、(III) 成分に比し少量であるが、(III) に比して粘性小であり結晶し得る傾向がある故、更に少量の醋酸エチルに溶解し石油エーテル又はクロロホルムで分別沈澱して樹脂成分を除去し、次にアセトンに溶解してして自然蒸発させたところ、針状の結晶を得た。

(4) Caffeic acid の証明：更に稀アルコールより再結を繰返した試料は融点 $190\sim 2^\circ$ となり、同時に分解発泡した。VORSATZ⁽⁷⁾ の法に従い protocatechuic aldehyde と malonic acid とを、アニリン触媒の下に caffeic acid を合成し、混合融点を測定したところ、融点の降下は見られなかつた。次に両者を無水醋酸と硫酸とにより、アセチル誘導体を調製し混融点を実施したが、融点 ($180\sim 3^\circ$) の降下はみなかつた。更に元素分析 (Table 2 参照) 並に paper chromatography による R_F の比較より caffeic acid であることを証明した。

Table 2. Elementary Analysis of Caffeic acid

	C%	H%		C%	H%
caffeic acid from potato	60.05	4.46	acetyl der. of caffeic acid from potato	58.86	4.73
caffeic acid by synthesis	59.78	4.94	acetyl der. of synthesized caffeic acid	59.29	5.18
$C_9H_8O_4$ (theoretical)	60.0	4.4	$C_{13}H_{12}O_6$ (theoretical)	59.1	4.55

2. Methyl caffeate の分離証明

(1) 本成分の分離：既報⁽⁸⁾の coumarin 成分抽出の際、メタノール及びクロロホルムで抽出される 1 polyphenol 成分が coumarin 成分に混入していることを、paper chromatography により推定した。Butanol を展開剤とした時の R_F 0.87, A_1 成分の R_F 0.84 と極めて近似しており、 A_1 成分である可能性もあったが、 A_1 成分はクロロホルム不溶に対し本成分は可溶であり、別のものであることがわかつた。

それで本成分分離の目的で前述の A_1 粉末をクロロホルムで抽出し、抽出液を濃縮して得られる樹脂成分より純粋化を計つたが結晶化に導き得なかつた。併し paper chromatography に依り本成分が少量含有されていることを知つた。(A_1 粉末そのものの paper chromatography の場合、 A_1 成分の比大のためその斑点は大きく顕れ、且つ R_F 近似のため本成分の斑点は不明瞭であつた)

それ故方法を換えて先の coumarin 成分抽出の方法に従い次の如く実施した。即ち 2 日間黒斑病菌の侵入を受けた甘藷約 8 kg をメタノールに浸漬し搗碎後温抽出を実施した。その抽出液を減圧濃縮して溶液をクロロホルムで連続抽出した。1% 炭酸ソーダ溶液で転溶後、直ちに硫酸酸性として再びクロロホルムで抽出した。その溶液を蒸発乾固して固形物約 1 g を得た。次に少量の醋酸エチルに溶かして不溶の樹脂成分を除き、再び溶液を蒸発乾固し、固形物を 50% エチルアルコール 20 cc に溶解し不溶の樹脂成分を除去した。それに 10% 醋酸鉛溶液 90 cc を添加し、目的の成分を黄色の鉛塩として沈澱させた。鉛塩に吸着している coumarin 成分除去のため、80% メタノールで十分に洗滌した。次に 80% メタノールに suspend し、硫化水素を通して鉛塩を分解した。その濾液を減圧濃縮し、少量の水溶液となし、先ず生ずる樹脂成分を除去して、そのまま放冷すると結晶が析出して来た。その収量は約 0.15 g であつた。

(2) 本成分の証明：更に稀アルコールより再結を繰返し mp. $157\sim 8^\circ$ となつた。これは methyl caffeate のそれに同一であつた故、caffeic acid より methyl ester を合成し、混融点を測定したところ融点の降下は見なかつた。次に両者を無水醋酸と硫酸とで acetyl derivate を作り、混融点を測定したが融点 ($72\sim 3^\circ$) の降下を見なかつた。更に元素分析 (Table 3 参照)、paper chromatography に依る R_F Beckman's Spec-

trophotometer に依る吸収スペクトル (Fig. 1 参照) の比較により methyl caffeate であることを証明した。更に本成分は合成による methyl caffeate と同様に pH 8.0~9.0 の alkali solution に溶解し、甘藷 oxidase を添加⁽¹⁾することにより緑色に発色することを知った。

Table 3. Elementary Analysis of Methyl Caffeate

	C%	H%		C%	H%
Methyl caffeate from potato	61.81	5.15	Acetyl der. of methyl caffeate from potato	60.63	4.93
Methyl caffeate by synthesis	62.16	5.53	Acetyl der. of synthesized methyl caffeate	59.90	5.03
C ₁₀ H ₁₀ O ₄ (theoretical)	61.3	5.1	C ₁₄ H ₁₄ O ₆ (theoretical)	60.4	5.0

(3) 罹病甘藷に於ける本成分存在の確認：

本成分抽出溶媒としてメタノール (60~70%) を使用した故、本成分がもともと罹病甘藷に含まれていたのではなく、抽出操作中酵素作用又は単なる化学反応に依り他の polyphenol 成分 (chlorogenic acid, caffeic acid) とメタノールより二次的に生成される可能性もあるわけである。併し前述の如く、acetone 抽出に依り得た A₁ 成分中に methyl caffeate の存在することを paper chromatography に依り推定した故、もともと罹病甘藷に含まれていると考え得るが、更に此の点を確かめることにした。

甘藷 1 kg を輪切にし本菌接種後 5 日間 25° に置き、その健全部を賽の目に切り、全体を混じて均一となし、その 10 g 宛を採取し、次の 3 区を設けて抽出を実施した。即ち acetone 区として 30% acetone 22 cc を添加し、メタノール区として 30% メタノールを添加した。更に蒸煮区として予め 1 時間蒸煮した藷に 30% メタノールを添加した。後 24 時間 25° に放置し、全体を搗碎後更に溶媒を添加して 60% となし、温浸後濾過した。濾液を減圧濃縮し、更にクロロホルムで連続抽出した。抽出液を蒸発乾固し一定量のアルコールに溶解後、paper chromatography を実施した。此の結果は Table 4 の如く、(イ) 各区共に methyl caffeate と同一の位置

Table 4. The Identification of Methyl Caffeate in the Injured Sweet Potato by Paper Chromatography, using Various Extraction Method.

	Butanol, 1: water, 1 (R _F)	Butanol, 1: ligroin, 1: water, 2 (R _F)	Butanol, 1: pyridine, 1: NaCl saturated water, 1 (R _F)
Methyl alcohol(*1)	0.87	0.87	0.89
Acetone(*2)	0.88	0.86	0.92
Steamed(*3)	0.86	0.84	0.88
Methyl caffeate(*4)	0.87	0.87	0.90
Ethyl caffeate(*5)	0.92	0.92	0.90

* 1 and * 2 The methyl alcohol extract and the acetone extract of the injured potato respectively.

* 3 The methyl alcohol extract of the steamed injured potato.

* 4 For comparison, methyl and ethyl caffeates were used.

chromatography を実施したところ、chlorogenic acid は全然、caffeic acid よりは痕跡的 (最初の phenol の 1/200 以下) にしか生成されず、化学反応に依る生成は考慮する必要はないと見做された。以上より本成分は罹病甘藷の polyphenol 成分の一と見做されるが、その含量は他に比して少量であることが明らかにされた。尚メタノールを添加した場合、酵素作用により更に本成分が生成されるものと推定された。

総 括

(1) 黒斑病菌の甘藷侵入に依り、その健全部に集積される polyphenol 成分として、先に分離した chlor-

Fig. 1. The adsorption spectrum of the isopropanol solution of the polyphenol.

This spectrum is quite equal to that of the synthesized methyl caffeate.

に 1 箇所のみ spot を検出し得たが、(ロ) メタノール区は他の 2 区に比してその spot が大であり、(ハ) 他の 2 区はほぼ同一程度であつた。尚従来芳香族有機酸としてメチル及びエチルエステルが分離されている故⁽⁹⁾、対照として ethyl caffeate についても実施した。併し R_F は少しく異つていた。更に単なる化学反応による生成の可能性を別の面より検討するため、chlorogenic acid, caffeic acid を 70% メタノールに溶解し 70° に 10 時間加熱し、後 paper

ogenic acid の外に、今回 caffeic acid 並に methyl caffeate を分離した。両成分は未だ甘藷より分離された報告はなく、唯、同属の *Ipomea orizabensis*⁽¹⁰⁾より caffeic acid を分離した報告があるのみである。

(2) Chlorogenic acid は caffeic acid の誘導体であり、他の粉末状の polyphenol 成分もこの誘導体と推定されており、これ等成分の precursor と考えられる caffeic acid が分離されたことは意義深いことである。

(3) 罹病甘藷中の methyl caffeate の含量は他の polyphenol 成分よりも少量であり、又本成分は罹病甘藷健全全部を稀 methyl alcohol に浸しておくと、酵素作用に依り更に多量につくられることを知った。

(4) Paper chromatography に依り、chlorogenic acid, caffeic acid 及び methyl caffeate の外に、尙少くも 3 成分含まれていることを知った。

(5) Diphenol 類は赤血塩で酸化し硫酸第二鉄により生ずる prussian blue を利用する paper chromatography により、従来の文献以上に鋭敏に検出出来る事を知った。

本研究に当り終始御懇篤なる御指導御鞭撻を戴いた住木論介教授に深甚の謝意を表する。又実験の一部を担当して下さった星谷磐夫君並にミクロ分析を担当して下さった村瀬良子、中山道子両嬢に感謝する。尙研究費は文部省科学研究費によった。

(本研究は昭和 26 年 12 月第 124 回日本農芸化学会東京支部講演会に於て発表したものである。)

(1) 瓜谷郁三, 村松敬一郎: 農化, 20, 289 (1953).	<i>ibid.</i> , 23, 247 (1940), <i>ibid.</i> , 24, 399 (1941).
(2) G. O. RUDKIN, J. M. NELSON: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 69, 1470 (1947).	(6) HOLTON: <i>Nature</i> 163, 642 (1949).
(3) 瓜谷郁三, 村松敬一郎: 農化, 27, 29 (1953).	(7) UORSATZ: <i>J. prak. Chem.</i> , [2] 145, 265 (1936).
(4) 瓜谷郁三: 農化, 27, 57 (1953).	(8) 瓜谷郁三, 星谷磐夫: 農化, 27, 161 (1953).
(5) MIRSKY, ANSON <i>J. Gen. Physiol.</i> , 18, 307 (1934~5), <i>ibid.</i> , 19, 427 (1935~6).	(9) J. BONNER: <i>Plant Biochemistry</i> , p. 162 (1950).
	(10) R. POWER: <i>J. Chem. Soc. (London)</i> , 101, 5 (1901)

Summary

(1) Besides chlorogenic acid reported previously, two more polyphenols accumulated in sound part, adjacent to the injured, of the black-rotted sweet potato were isolated and identified to be caffeic acid and methyl caffeate.

(2) It implies biochemical significance that caffeic acid, which is a component of chlorogenic acid and regarded as the precursor of other polyphenols, was isolated.

(3) The amount of methyl caffeate in injured sweet potato was smaller than the other polyphenols, and the substance was produced more abundantly by enzyme action when the injured part was dipped in dil. methyl alcohol.

(4) The presence of three other polyphenols, besides chlorogenic acid, caffeic acid and methyl caffeate, was known, as the result of paper chromatography.

(5) The polyphenols could be identified in concentration of ca. 5% by paper chromatography with the detective method utilizing the color of prussian blue occurred in consequence of the oxidation of the polyphenols by K_3FeCN_6 followed by $Fe_2(SO_4)_3$.

黒斑病甘藷の病理化学的研究 (第 8 報) 罹病甘藷の呼吸の異状増加に就て

瓜谷郁三, 滝田智久 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 27 年 9 月 2 日 受理

Studies on the Phytopathological Chemistry of Black-rotted Sweet Potato. Part 8.

Abnormal Increase of the Respiration of the Injured Sweet Potato

By Ikuzo URITANI and Satohisa TAKITA (Department of Agricultural Chemistry,

Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo, Japan)

植物病原菌に侵された寄主の呼吸がしばしば増加することは多くの研究者⁽¹⁾⁽²⁾により報ぜられているが、詳細に寄主切片を用い呼吸酵素系との関連に於て研究された例は殆どなく、僅に TOMBERI⁽³⁾ が青黴に侵された馬