あおみどろタンニンの研究 (其の5)

あおみどろタンニンの構造に就て

中 林 敏 郎 (静岡大学農学部農芸化学科)

昭和 30 年 8 月 5 日 受 理

Studies on Tannins of *Spyrogyra arcta*. Part 5.On the Structure of *Spyrogyra* Tannin.By Toshio NAKABAYASHI (Dep. of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Iwata)

先に著者⁽¹⁾はあおみどろのタンニン主成分 (あおみどろタンニン) について, そのペーパークロマトグラム, 定性反応及び加水分解物の検討の結果等より, あおみどろタンニンが五倍子タンニンに類似したところのグルコースと gallic acid とよりなるデブシード型タンニンであろうと推定した. しかしながらその際使用したあおみどろタンニンはあおみどろを 70% メタノールに浸し原形質吐出を行わしめて得たものであり, 部分的に変化を受けていたことがその後の研究⁽²⁾の結果から推定されると共に, フコーザンと推定される多糖類等の不純物を含んでおり, 更にグルコースや gallic acid も単にペーパークロマトグラフ法で同定したのみであつて, あおみどろタンニンの構造を正確に決定するには不十分であつた.

しかしながらその後更にあおみどろよりのタンニンの抽出にはアセトンを用いれば原形質の吐出, 従つてタンニンの変化を伴うことなく抽出できることを知つたので⁽³⁾, 今回はアセトンを用いてあおみどろの新鮮藻体よりタンニンの分離を行い, 得られた純粋なタンニンに就てその構造を明らかにする目的で実験を行つた.

実 験 の 部

1. タンニンの分離 昭和 30 年 5 月下旬学内の池で採集したあおみどろの新鮮藻体を水洗後よく圧搾し, その 1 kg (水分 92%) に 4 倍量のアセトンを加え, 還流冷却器を附して 3 時間煮沸浸出し, 冷却後濾過, 残渣に 80% アセトン 2 倍量を加えて 2 時間同様に浸出して濾過, 濃緑色の濾液を合してアセトンを溜去し, 残液を活性炭で処理した後, 石炭ガス気流中で減圧濃縮して約 200 cc とし, アスベストの層を通して濾過, 黄色の濾液をクロロホルムで洗滌後エーテルで 20 時間連続抽出し, エーテル抽出液を脱水後大部分のエーテルを溜去, 残液を真空乾燥すればタンニンの白色無定形の粉末 1.46 g を得た.

2. タンニンの諸性質 得られたタンニンはベンゾール, クロロホルムに不溶, 冷水にやや難溶, 温水, エーテル, アセトン, アルコール, 醋酸エチルに溶け, その水溶液は前回⁽¹⁾のようにゼリー状を呈せず, 強い収斂性を有し, ゼラチン, アンチピリン, カフェイン, ビリジン, キノリン及びキニンによつて白色の沈澱を生じ塩

Fig. 1. Spectrum of *Spyrogyra* tannin in Ethyl alcohol (0.002%)

ST : *Spyrogyra* tannin, $\lambda_{\max}$ 280 $m\mu$
CT : Chinese gallotannin, $\lambda_{\max}$ 277 $m\mu$

化第二鉄によつて青藍色を, 鉄明礬で紫青色を, 磷モリブデン酸とアンモニアで藍色を呈する. 又醋酸鉛で白色沈澱を, 石灰水で淡青色沈澱を, 飽和重クロム酸カリ溶液で褐色沈澱を与え, 微量の沃度で瞬間的に赤紫色を生じ, アルカリによつて黄色を経て橙赤色となり加熱すれば淡黄色となる. またそのペーパークロマトグラムは単一のスポットを与え, 前報⁽¹⁾のあおみどろタンニンのそれと一致する. エタノール溶液中でのあおみどろタンニンの吸収スペクトルは Fig. 1 に示すように五倍子タンニンのそれとよく類似している.

3. 加水分解 前報⁽²⁾に準じあおみどろタンニンの水溶液に *Asp. niger* より新たに調製した tannase を 30° で 12 時間作用せしめ, 反応生成物をペーパークロマトグラフ法で検討すれば gallic acid とグルコースとのみが検出される.

更にあおみどろタンニン 200 mg を 5% 硫酸 20 cc に溶かし、石炭ガス気流中 100° で 20 時間加水分解後エーテルで抽出し、抽出液のエーテルを溜去、残渣を熱水より再結すれば無色の針状結晶 122 mg を得る. m. p. 234~235°. FeCl_3 により藍青色を呈し、純 gallic acid と混融しても融点の降下を認めず、これを無水醋酸と濃硫酸とでアセチル化し 50% メタノールより再結すれば無色の針状結晶を得る. m. p. 168~169°, FeCl_3 反応陰性で純 3, 4, 5-triacetyl gallic acid と混融しても融点の降下を認めない。

エーテル抽出残渣は中和後濃縮乾固し、アルコールで抽出、抽出液のアルコールを溜去した残渣はペーパークロマトグラフ法でグルコースのみのスポットを与え、前回⁽¹⁾のようにフコースと推定されるスポットは見出されない。この残渣を phenylhydrazine と氷醋酸とより osazone を作れば黄色の針状結晶を得る。稀アルコールより再結すれば m. p. 204°, 純 glucosazone と混融しても融点の降下を認めない。

4. **Methanolysis** 前報⁽²⁾に準じ tannase を 50% メタノール中であおみどろタンニンに作用せしめ、生成物をペーパークロマトグラフ法で検討すれば多量の methylgallate と gallic acid とのみが認められる。

またあおみどろタンニンを 90% メタノールに溶かし、6 時間煮沸後、同様に生成物を検討したが、多量の未変化のタンニンの他に少量の gallic acid 及び methylgallate のみが検出された。

5. **グルコースと gallic acid の結合割合** あおみどろタンニン 42 mg 及び 95 mg をそれぞれ水 100 cc に溶かし、tannase 20 mg ずつを加えて 30° に保ち、24 時間後に 42 mg の方を、48 時間後に 95 mg の方をそれぞれ石炭ガス気流中で減圧濃縮して約 30 cc となし、HINTON の混合指示薬を用いて $N/20$ NaOH で滴定して gallic acid を定量後、それぞれを硫酸酸性となし、エーテルで 6 時間抽出して抽出された gallic acid の重量を測り、両者の平均を以て遊離した gallic acid の量とした。残渣は中和後 micro-BERTRAND 法により遊離したグルコースを定量した。その結果を Table 1 に示す

Table 1. The Combining Ratio of Glucose and Gallic Acid in Spyrogyra Tannin.

Tannin (mg)	Found		Molecular ratio (glucose : gallic acid)
	glucose (mg)	gallic acid (mg)	
42.0	5.9	34.5	1 : 5.5
95.3	14.5	78.0	1 : 5.1
	average		1 : 5.3

m. p. 167°, FeCl_3 反応陰性、別に gallic acid より合成した 3, 4, 5-trimethylgallic acid と混融しても融点の降下を認めない。この trimethyl ether 再結の母液を合して濃縮乾固し稀アルコールを加えて放置すれば少量の褐色の針状結晶が残留する。そのアルコール溶液は FeCl_3 によつて暗褐色を呈し 3, 4-dimethylgallic acid の存在を認めることが出来た。

上述のメチル化物加水分解液のエーテル抽出残渣を中和後濃縮乾固してアルコールで抽出、抽出物をペーパークロマトグラフ法により $n\text{-BuOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 2) で展開し Benzidine 試薬を噴霧して糖を検討したが遊離のグルコースは認められず、 R_F 0.72~0.81 のスポットが検出され methyl glucose の存在が予想された。そこで HIRST⁽⁴⁾ 等の報告に従い、 $n\text{-BuOH} : \text{AcOH}$ (4 : 1) で展開して methyl glucose の検討を行つたところ、別に合成した 2, 3, 4, 6-tetramethyl glucose に対する R_G が 0.25~0.30 の monomethyl glucose に相当する spot のみが検出された。

考 察

以上の実験であおみどろタンニンがグルコースと gallic acid とよりなることをそれぞれの結晶を分離して証明したわけであるが、従来グルコースと gallic acid とよりなるデプシード型タンニンとしてはスマックタンニン、没食子タンニン及び五倍子タンニンが知られている⁽⁵⁾。構造上グルコースには直接 5 個の gallic acid しか結合できないから、nonagalloyl glucose を主成分とする五倍子タンニンの平均した構造は I のようにグルコースの 5 個の水酸基のうち 1 個は galloyl 基と 4 個は *m*-digalloyl 基と結合しており、その他に *m*, *m*-trigalloyl 基を含む成分も存在している。これに対し pentagalloyl glucose を主成分とする没食子タンニンやスマックタンニンの平均した構造は、例えば II のようにグルコースの 5 個の水酸基のうち、3 個は galloyl 基と 1 個は *m*-digalloyl 基と結合し、残りの 1 個は遊離している。

従つてあおみどろタンニンが先に著者が推定したように、五倍子タンニンに類似しているとすれば、グルコー

スと gallic acid との結合割合がほぼ 1 : 9 で、メチル化後の加水分解で gallic acid の 3, 4, 5-trimethyl 及び 4, 5-dimethyl ether がほぼ同量ずつ生じ、且遊離のグルコースが検出されると共に、先に報告⁽²⁾したようにメタノリシスによつて gallic acid や methyl gallate の他に methyl-*m*-digallate や trigallate の生成が認められなければならない。しかるに実際にはタンナーゼ分解によるグルコースと gallic acid との結合割合の実測値が 1. 5. 3 で pentagalloyl glucose に近似し、メチル化後の加水分解によつて gallic acid の大部分が trimethyl ether として得られ、dimethyl ether の生成は少量しか認められなかつたことは *m*-digalloyl 基が少いことを示すものであり、このことはメタノリシスによつて methyl-*m*-di-又は trigallate の生成が検出されなかつたことからもうなずける。更にメチル化物の分解で遊離のグルコースが生成せずに monomethylglucose のみが検出されたことはグルコースの 5 個の水酸基のうち 1 個が遊離していることを示すものである。

以上の結果はいずれもあおみどろタンニンの主成分が五倍子タンニンよりもむしろ没食子タンニンに類似したところの II のような構造をもつ pentagalloyl-D-glucose であることを支持するものであり、これに *m*-digalloyl 基を 2 個以上含むものも少量存在するものと推定される。

この研究を行うにあたり御懇篤な御指導並に種種の御援助を頂いた九大農学部生物化学研究室の大島康義教授に深く感謝する。

(1) 中林, 波田 : 農化, 28, 387, 788 (1954).

(2) 中林 : 農化, 29, 161 (1955).

(3) 中林 : 農化, 28, 958 (1954).

(4) F. BROWN, E. L. HIRST, L. HOUGH,

J. K. N. JONES and H. WADMAN :
Nature, 161, 720 (1948).

(5) 大島 : 化学実験学, 天然物取扱法 I, 135~140.

Summary

White amorphous *Spyrogyra* tannin was prepared from fresh *Spyrogyra arcta* by the use of acetone. This tannin gave 1 mole of glucose and 5.3 moles of gallic acid when hydrolyzed with tannase. (Table 1). Methyl gallate and gallic acid were detected on the paper chromatogram by methanolysis; then 3, 4, 5-trimethylgallic acid, a small quantity of 4, 5-dimethylgallic acid, and monomethylglucose were obtained by the hydrolysis of the methylated tannin with sulphuric acid.

It has, therefore, been proved that *Spyrogyra* tannin is pentagalloyl-D-glucose similar to Turkish gallotannin, and for example, assumes the chemical structure of I as its main component. It contains moreover, a small quantity of galloylglucose, possessing two or more *m*-digalloyl groups.