Summary

A polyphenol in the black-rotten sweet potato, A₂ component was separated and divided into two componets, A₂-a and A₂-b, by the countercurrent distribution. They were hydrolyzed with alkali to give caffeic acid and quinic acid, and supposed to be position isomers of chlorogenic acid. Among them, A₂-b was presumed to be identical with isochlorogenic acid that was isolated from coffee beans by White and Barnes. It is supposed that A₂-a is contained in black-rotten sweet potato, and also transformed from the other component in the rotten sweet potato during the isolation treatment, such as heating, acidification, Pb-salt precipitation and its decomposition. A₁ component was found to have caffeic acid and quinic acid in it.

The authors wish to express their appreciation to Prof. Yusuke SUMIKI and Prof. Saburo FUNAHASHI for their guidances and advices.

黒斑病甘藷の病理化学的研究 (第 17 報)

罹病甘藷中のポリフェノール成分 (その 4)

瓜谷郁三, 宮野真光 (名古屋大学農学部生物化学教室)

昭和 29 年 10 月 21 日 受理

Phytopathological Chemistry of Black-rotten Sweet Potato. Part 17.

Polyphenols in the Rotten Sweet Potato. (4)

By Ikuzo URITANI and Masateru MIYANO (Lab. of Biol. Chem., Fac. of Agr., Nagoya Univ.)

黒斑病甘藷中の polyphenol 成分として chlorogenic acid⁽¹⁾, caffeic acid 及び methyl caffeate⁽²⁾ の外に A₁, A₂-a, A₂-b の 3 成分が存在し⁽³⁾, 共に chlorogenic acid と同じく caffeic acid が quinic acid とエステル様に結合したものであることを認め、A₂-b 成分は BARNES⁽⁴⁾が最近コーヒー豆から分離した isochlorogenic acid であることを推定した (Fig. 1 参照).

Fig. 1. Structures of the Polyphenols

A₂-a 成分は 1 新成分であり pseudochlorogenic acid と名付けた。最近 CORSE⁽⁵⁾ が chlorogenic acid の新しい立体異性体, neochlorogenic acid を桃から分離したが countercurrent distribution (c.c.d.) による分配位置から pseudochlorogenic acid とは明らかに異なるものである。

以上の 3 成分 (A₁, A₂-a, A₂-b) は共に結晶状に得られず, 又結晶性の誘導体にも導き得なかつた。従つて純粋化は前報の如く c.c.d. の方法によつた。この点 BARNES が分離した isochlorogenic acid も非結晶性で, c.c.d. で精製した。

これらの 3 成分の物理的, 及び化学的性質を chlorogenic acid 及び isochlorogenic acid と比較すると Table 1 の通りである。前報で b 成分が isochlorogenic acid であると推定したのは, コーヒー豆からとつた isochlorogenic acid と同一の c.c.d. curve を画くこと, 又アルカリ分解により caffeic acid と quinic acid とを分離したからであるが, 更に Table 1 の data (旋光度, 分子吸光係数, 中和当量, 分子量, 融点, 溶解度) から又紫外線吸収スペクトル (Fig. 2) 及び赤外線吸収スペクトル (Fig. 3) が BARNES の測定値に近似すること更に過沃素酸酸化の curve (Fig. 4) からその推定が正しいものと考えられた。

Table 1. Properties of A₁, A₂-a, A₂-b Components.

	A ₁	A ₂ -a	A ₂ -b	Chlorogenic acid (CA)	Isochlorogenic acid
Melting point (°C)	—	125° decomp.	118° decomp.	205~6°	115° decomq.
Optical rotation [α] _D ¹³	-94	-155	-196	-32	-230*
Molecular extinction	18,600	19,500	19,500	19,100	19,400
Neutralization equivalent		586	563	356	ca 580*
Titration amount (cc)	0.18	1.71	1.78	2.88	
Molecular weight		360	358	354	345*
K ₃ FeCN ₆ oxidation value 20 γ		0.26	0.25	0.22	
40 γ		0.52	0.505	0.43	
Analyses % C		55.19	56.99	54.38	56.12*
H		6.81	6.36	5.39	5.18*
Solubility in water	very small	small	small	large	small
in ethylacetate	larger than CA	larger than CA	larger than CA	small	larger than CA

* 'BARNES' data.

Fig. 2. Ultraviolet Absorption Spectra of the Polyphenols

- A₂-a(Pseudochlorogenic acid)
- ×—×—× A₂-b(Isochlorogenic acid)
- Isochlorogenic acid from coffee
- Chlorogenic acid (BARNES' datum)

次に a 成分は b 成分, 従つて isochlorogenic acid に近似していた。即ちアルカリ分解で b 成分と同じ割合に caffeic acid と quinic acid を生成し, Table 1 の data に示した如く分子吸光係数, 中和当量, 分子量, 赤血塩酸化価等は殆ど同一の値を示し, 更に紫外線吸収スペクトル (Fig. 2), 赤外線吸収スペクトル (Fig. 3) も一致し, 前者に於て a, b 両成分と chlorogenic acid とは等しく, 後者に於ては b 成分が chlorogenic acid と一致する以上に a, b 両成分はよく合つていた。異なる点は c.c.d. に於ての分配係数, 旋光度の相違であり, その外醋酸エチルの溶解度, ペーパークロマトグラフィーの R_F (前報記載) の僅かの相違があげられる程度である。従つて a 成分は isochlorogenic acid と同様に chlorogenic acid の位置異性体であると考えられた。即ち quinic acid に 4 個の -OH が含まれているが, その 3 の位置に caffeic acid が結合する場合は chlorogenic acid, 5 に結合する場合は isochlorogenic acid であるが, a 成分は 1 又は 4 の -OH と結合している可能性があるし, b 成分と酷似している点からして 4 の -OH と結合しているものと見られた。そのことは過沃素酸酸化により推定し得る筈である。これらの polyphenol にはその分子中に catechol を含みフェノール性の -OH が隣接して 2 個存在している。従つてそれによる過沃素酸の酸化をこれらの成分の酸化の値から差引かなければならない。そのため methyl caffeate を用いフェノール性の -OH 酸化を比較する事にした。最初に溶媒としてアルコールを用い時間を追つて酸化の度合を調べたところ, chlorogenic acid, a, b 両成分, それに methyl caffeate の間に明らかな差はなく polyphenol 成分の種類によりフェノール性 -OH の酸化の程度が一様でないものと推定された。それで BARNES が採用した POHLE の方法⁽⁶⁾を用いた。これには 80% 醋酸溶液を用いて

Fig. 3. Infrared absorption spectra of the polyphenols.

1. A_2 a comp. (pseudochlorogenic acid). 2. A_2 -b comp. (isochlorogenic acid).
3. Chlorogenic acid. 4. A_1 comp.

おり、酸性大のためか polyphenol を異にしてもフェノールの2個の $-OH$ の酸化の速度が殆ど同一であると推定された (Fig. 4 参照). 比較に methyl caffeate と ethyl caffeate を用い 0° と 25° とで実施した. a 成分が 1-caFFEylquinic acid である時には隣接した $-OH$ が3個ある故、chlorogenic acid の倍量酸化される筈であるが、Fig. 4 の curve はそうでなく 1-caFFEylquinic acid であると考えられなかつた. 又 4-caFFEylquinic acid である時には隣持した $-OH$ が無い故 methyl caffeate と同じ程度に酸化される筈であるが、むしろ b 成分即ち isochlorogenic acid と同一の curve を示し、然も b 成分よりも少しく酸化が速なようにみられた. そして共に酸化は遅いが結局大体1モルの酸化を示した. なお BARNES は isochlorogenic acid が徐々に酸化されてゆく理由として、醋酸溶液中で γ -lactone type として存在し、その環の開裂の速度が limiting factor となつているためと見做した. その外2個の $-OH$ の trans 配位, caffeic acid group の立体障壁も考慮している. a, b 両成分の酸化の違いのはこのような事が原因となつているのであろう.

上述の data からすると isochlorogenic acid が 5-caFFEYL quinic acid であるとした BARNES の結果に疑問が出て来た BARNES は過沃素酸の結果のみでなく、硼酸溶液中で電気伝導度が増加する事からも quinic acid の 5 の -OH に結合するとしたが、然し六員核の 1:3 diol, 又 α -hydroxy acid の場合にも伝導度の増加はみられるのであり、その結果は直に隣り合わせた 2 個の -OH が存在することにはならない。

むしろ a 成分が僅か

も b 成分即ち isochlorogenic acid よりも酸化の度合が大であるのは、a 成分が 5-caFFEYL quinic acid, b 成分が 4-caFFEYL quinic acid である可能性も考えられた。又両成分が割合近似の curve を画くのは、濃醋酸溶液中のため、4 から 5 へ、又 5 から 4 への caFFEYL group の移動、或いは一部加水分解による caFFEIC acid の遊離に原因するものとも考えられた。

或いは a, b 両成分は上述の如く位置異性体でなく更に別の構造をもっているかも知れない。然し Table 1, その他に示した性質を満足して然も他に考えられる構造は現在見当つきえない。今 quinic acid の 1 と 3, 又は 1 と 5 の 2 個の -OH に caFFEIC acid が 2 個結合したものがそれぞれ a, b 成分であると仮定した場合、この時の分子量は 468 であり中和当量 (ca. 580) に近い値を示すことになるが、その場合 $C_{26}H_{24}O_{12}$ の元素の計算値は C 64.2, H 5.13 となり、a, b 両成分の実験値 (Table 1 参照) とあまりにも相異しているので考えられないことである。同様に caFFEIC acid の phenol の -OH の中、いずれか 1 つと更に別の caFFEIC acid が結合したようなもの (タンニンにそのような構造が存在する) も同一の元素分析値を示すわけで矢張り考えられない。後者の場合紫外線吸収スペクトルは chlorogenic acid と相異してくる筈であるが全く同一であり、この点からもその可能性はない (例えば⁽⁸⁾ *p*-oxibenzalacetone の peak は 3,200 Å であるが *p*-acetoxibenzalacetone は 2,900 Å である)。

a, b 両成分の中和当量はそれぞれ 586, 563 で一定した値を得ず、時に 540~600 にも及んだ。これは BARNES が isochlorogenic acid に於て示したところであり、彼は中和当量 (ca. 580) が分子量 (354) より大きな値を持つところから、これは 3 の -OH と 1 の -COOH が一部 γ -lactone を形成していることに帰した (BARNES はこの成分の中に lactone が存在するため非結晶性を示すとした)。従つて a, b 両成分共に lactone を形成している可能性がある。なおこのように一部 lactone type の存在する例として pantothenic acid が挙げられ⁽⁹⁾、中和当量は分子量より大であり、又非結晶性である。

A₁ 成分は前報で示した如く caFFEIC acid と quinic acid の結合成分であるが、このことは紫外線吸収スペクトルからも云い得た。Table 1 に示した如く僅にアルカリで滴定されたが、これはそのものの持つ性質か、不純物によるのか疑問である。考えられる構造として 1 は 4-caFFEYL quinic acid 又は 5-caFFEYL quinic acid の lactone type か、他は一般に caFFEYL quinic acid の polymer であるが、この中 lactone type に就いては赤外線吸収の data (Fig. 3) に於て lactone の特有の吸収 (5.7 μ) がなく疑問である。

今後は a 成分 (pseudochlorogenic acid), b 成分 (isochlorogenic acid) 共に結晶性誘導体に導き、一方この

Fig. 4. Periodate Oxidation of the Polyphenols

Part I. at 25°

Part II. at 0°

1. A₂-a (pseudochlorogenic acid) 2. A₂-b (isochlorogenic acid)
3. Chlorogenic acid 4. Quinic acid 5. Me-caFFEate
6. Et-caFFEate

両成分を methylation し、次に caffeic acid group を離し、のち酸化して酸化生成物を検討することにより結合の位置を判定したい。又実際に caffeylchloride と quinic acid とを縮合させこれらの成分を合成してみたい。

実 験 の 部

旋光度 10 cm 測定管を用い各サンプル共に 1% のアルコール溶液にして測定した。但し chlorogenic acid は 2% の溶液である。BARNES は isochlorogenic acid の測定に、水：アルコール=1：1 の溶液中に 2% に溶し 20 cm 測定管で測定している。

吸収スペクトルの測定 紫外線吸収には Beckmann Quartz Spectrophotometer を用い、0.6~1.0 mg % の水溶液にして測定した。なお水溶液の場合の最大吸収は 3240~3250 Å にみられたが、イソプロパノール溶液の場合 3300 Å にみられた。又 methyl caffeate も caffeic acid と同一の吸収帯を示したが、分子吸光係数は chlorogenic acid, a, b 両成分と幾分相違し、methyl caffeate は水の場合 18,500 であった。赤外線吸収は Baird Infrared Recording Spectrophotometer を用い、サンプルは Nujol と混和して測定された。

中和当量及び滴定量 10 mg 前後のサンプルを 20% アルコール溶液に溶し、bromthymol blue-neutral red の混合指示薬を用い、0.01 N NaOH で滴定した。サンプル 10 mg を滴定するのに要する 0.01 N NaOH 量を滴定量とした。NaOH 1 N に相当するサンプルの量を中和当量とした。a, b 両成分共に BARNES が分離した isochlorogenic acid と同様に常に一定した値を得ず 540~600 に及んだ。

分子量 デオキシサンを溶媒とするマイクロ氷点降下法によつた。しかもサンプル少量しかなく、2度測定しただけであるので正確な値とは云い得ない。ラスト法でやるべきであったが、a, b 両成分は 115° 以上に加熱すると分解のおそれがあり、融点 110° 以下の溶媒として 3-bromcampher, camphen を用いたが、溶解度小で目的を果し得なかつた。

赤血塩酸化価 サンプル 5 cc (0~60 γ), 1/10 M 磷酸 Buffer (pH 7.0) 1 cc, 1/10 M 赤血塩溶液 1 cc を混合し、90° の温浴に 30 分間浸したのち 2 分間急冷し、これに 5% アラビヤゴム溶液 2 cc, 5% 硫酸第 2 鉄の稀磷酸溶液 2 cc を加え、発色する prussian blue を 5 分後に比色定量した。こうして γ 数と吸光度 (E) との間には殆ど直線的の関係がみられた。酸化価は 20 γ, 40 γ を用いた時のそれぞれの吸光度を以つて表した。a, b 両成分の価は殆んど一致し、両成分は chlorogenic acid より少しく大なる値を示した。各サンプル中ほぼ同一割合に catechol group 即ち caffeic acid group が存在するとみてよからう。

元素分析 Chlorogenic acid, $C_{16}H_{18}O_9$ 計算値, C 54.2, H 5.1; chlorogenic acid hemihydrate, $C_{16}H_{18}O_9 \cdot 1/2 H_2O$, C 52.55, H 5.17; lactonized isochlorogenic acid $C_{16}H_{16}O_8$, C 57.1, H 4.8; 1 個の quinic acid に 2 個の caffeic acid が結合した場合; $C_{33}H_{34}O_{12}$, C 64.2, H 5.13. a, b 両成分共に結晶状でなく, c.c.d. の curve から純粋であるとしたが、完全に純粋化されたか否か疑問はある。従つて元素分析の結果もおおよその見当を示していると思ふべきであらう。又 a, b 両成分を分ける前の A_2 成分については、実験値 C 55.48, H 5.68; C 54.48, H 5.54 であった。

過酸素酸化 80 vol. % 醋酸に KIO_4 0.3 g を溶解して 1 l にした。サンプル 2~5 μM (例えば chlorogenic acid の場合 10 mg 前後) を 100 cc 三角フラスコに入れ、100 cc の KIO_4 -醋酸溶液を滴下して溶し、直にその 10 cc を採つて反応開始時の測定をなし、以下時間を追つて 10 cc 採取して測定をして行つた。測定には 10 cc の液に 20% 沃度加里溶液 1 cc を加え、未分解の KIO_4 及び polyphenol の酸化により生じた KIO_3 から沃度を遊離させ、その沃度を 0.01 N チオ硫酸ソーダ溶液で滴定し、酸化されたサンプルのモル数を求めた。

総 括

1. b 成分は、その物理的・化学的性質から、先に BARNES がコーヒー豆から分離した isochlorogenic acid と同一であると見なした。

2. a 成分は種々の性質から isochlorogenic acid に酷似しており、これを pseudochlorogenic acid と命名した。

3. 先に BARNES は isochlorogenic acid に 5-caffeyl quinic acid の構造式を与えたが、必ずしもその様に推定し得ない理由の一つを提出した。

4. むしろ isochlorogenic acid は 4-caffeylquinic acid である可能性も存在することを指摘した。

本研究に対し終始御懇篤な御指導御鞭撻を戴いた住木論介教授、舟橋三郎教授に厚く感謝の意を表します。赤外線吸収スペクトルの労をとつて下さった鎌田仁講師、田村三郎助教授、マイクロ分析を担当して下さいた東大農学部マイクロ分析室の諸兄姉に感謝致します。

この原稿作成後、コーヒー豆から isochlorogenic acid を分離した W. V. WHITE の私信を受取つた。同氏は筆者の分離した pseudochlorogenic acid が isochlorogenic acid (酸と lactone の混合体) の中の free acid に相当する可能性を指摘した。併し甘藷から分離した両成分をそれぞれ c. c. d. にかけてもお互いに分配係数を異にする単一の curve を示した点 (第 14 報参照) から考えてもそうした可能性はないものと思われる。又 J. CORSE から neochlorogenic acid の結晶を頂いたので, isochlorogenic acid, pseudochlorogenic acid 及び neochlorogenic acid のペーパークロマトグラフィーを実施したところ、前 2 者は推定通り明らかに neochlorogenic acid と異なることを知つた。

(1) 瓜谷郁三, 村松敬一郎 農化, 27, 29 (1953).	J. H. COOK : <i>Oil. & Soap</i> 22, 115 (1945).
(2) 瓜谷郁三 : 農化, 27, 165 (1953).	(7) T. BÖESEKEN : <i>Adv. in Carbohydrate Chem.</i> , 4, 189 (1949).
(3) 瓜谷郁三 : 農化, 29, 151 (1955).	(8) R. A. FRIEDEL and M. ORCHIN <i>Ultraviolet Spectra of Aromatic Compds.</i> , (1951).
(4) H. M. BARNES, J. R. FELDMAN and W. V. WHITE <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 71, 4178 (1950).	(9) 舟橋三郎, 宮野真光, 瓜谷郁三 : <i>ビタミン</i> , 7, 323 (1954).
(5) J. CORSE ; <i>Nature</i> , 172, 772 (1953).	
(6) W. D. POHLE, V. C. MEHLENBACHER and	

Summary

From the physical and chemical properties, A_2 -b component was assured to be the same substance as isochlorogenic acid isolated from coffee beans by White and Barnes. A_2 -a component bears a close resemblance to isochlorogenic acid in its various properties, and was named pseudochlorogenic acid. White et al. had given a structure, 5-caFFEYLquinic acid, to isochlorogenic acid. The author, however, had a question to presume it as 5-caFFEYLquinic acid, and supposed there might be a probability that it was 4-caFFEYLquinic acid.

The authors wish to express their appreciation to Prof. Yusuke SUMIKI and Prof. Saburo FUNAHASHI for their guidances and advices.

あおみどろタンニンの研究 (其の 4) 糸状菌タンナーゼ によるタンニン酸より Alkylgallate の生成

中 林 敏 郎 (広島女子短期大学)

昭和 29 年 10 月 18 日 受理

Studies on Tannins of *Spirogyra arcta*. Part 4. Formation of
Alkyl Gallate from Tannic acid by Fungous Tannase

By Toshio NAKABAYASHI (Hiroshima Women's Junior College)

前報⁽¹⁾に於て著者はあおみどろの 70% メタノール抽出液より得られた gallic acid 及び methyl gallate は初めよりあおみどろ中に存在したものではなく、またこれらの生成は単なる methanolysis によるよりもむしろ主として 70% メタノール浸漬により吐出された活性な原形質の酸素的作用により、タンニン主成分であるデブシード型タンニンから二次的に生じたものであろうと推定した。その際かかる現象が *Asp. niger* より得られる tannase にも認められるかという点、及びこの両者がいかなる経路を経てタンニン主成分より生成されたものであるかという点は更に検討を要することを述べた。

そこで著者は以上の点を明かにする為にタンニン酸培地に培養して得た *Asp. niger* より tannase を調製し、これを用いて次の如き実験を行つた。

実 験 の 部

1. Tannase の調製 局法タンニン酸 100 g, 硫酸 100 g, K_2HPO_4 4 g, $MgSO_4$ 1 g を水 5 l に溶かし、これに 50 cc の米糠アルコールエキスを加え、濾過して得た培養液 (pH 3.8) に *Asp. niger* を 33° で 5 回反