稲ポリフェノールの研究(第3報)*

トリシン配糖体「グルコトリシン」および「トリシニン」の分離並びに決定

鯨塚 昭三, 大島 康義 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 39 年 3 月 9 日 受 理

前報⁽¹⁾において、稲葉からトリシンを分離確認したが、トリシンは天然の分布は極めてまれなフラボンで、その配糖体は今までに分離された報告をみない。稲葉中にトリシンの配糖体が存在することは永井ら⁽²⁾もペーパークロマトグラフィーにより認めているが、ここに2種のトリシン配糖体を分離し、それぞれトリシン-7-β-グルコシドおよびトリシン-7-ラムノグルコシドであることを

確認し、glucotricin および tricinin と命名した。

稲葉中にはこれらの他に3種類のトリシン配糖体の存在を認めたが、これは別に報告する。

実験の部

I. トリシン配糖体の分離

1. 粗トリシン配糖体の分離：昭和 35 年度産農林 37 号出穂期の稲葉（茎を含む）の熱風乾燥物 6 kg より、

第1図のように分離を行なった。すなわち前報⁽¹⁾と同じ方法で稲葉の70%メタノール抽出液を濃縮し、これをエーテルで反覆抽出して可溶物を除き、酢酸エチルで反覆抽出して抽出液 4 l を得た。さらにその抽出残液はブタノールで抽出して抽出液 7 l を得た。

酢酸エチル抽出液は脱水して 200 ml まで減圧で濃縮し、5 倍量のエーテルを加え、生じた沈殿 2.5 g を濾し取る。これを熱水に溶かして可溶部分を取り、冷後エーテルで抽出して可溶物を除き、少量のブタノールに転溶した。これを抽出液 I とする。

最初のブタノール抽出液は水で 4 回洗い（この水洗液中に次報以下に述べる稲フラボンの大部分が転溶する）、残ったブタノール溶液を少量まで濃縮し、生じた沈殿を濾し取り、

4 倍量のエーテルを加え生じた沈殿を濾し取る。これを水に溶かして酢酸エチルで抽出して移す。反覆抽出したにもかかわらず抽出はなお不完全でかなりの量が抽出残液（残液 III とする）中に残った。酢酸エチル抽出液は脱水して濃縮し、エーテルを加えて生じる沈殿を濾し取り、

第1図 トリシン配糖体の分離

* Studies on Polyphenols in Rice plant. Part III. Isolation and Determination of Tricin-glycosides "Glucotricin" and "Tricinin".
By Shozo KUWATSUKA and Yasuyoshi OSHIMA
(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

水に溶かして, 少量のブタノールで抽出し, これを抽出液Ⅱとする. 残液Ⅲはブタノールで抽出した(抽出液Ⅲ).

これら抽出液Ⅰ, Ⅱ及びⅢにはなお数種類のフラボンが含まれるのでカラムクロマトグラフィー法で分離した.

2. フラボン B₁ の分離: 分離に用いたカラムは, 東洋濾紙製 200~300 メッシュの粉末濾紙を直径 5cm, 長さ 40cm に密につめ, 展開剤は水飽和ブタノールを用い, 溶出パーティションクロマトグラフィーを行なった.

抽出液Ⅰ (約 60 ml) の 20 ml を管の上端にしみ込ませた後, 水飽和ブタノールで展開溶出し, 溶出液各 10 ml ずつを定容分画した. 各分画 1 本おきまたは 3 本おきにフラボンを定量してその溶出分離の状態をしらべた. 定量は試験管に溶出液 1 ml をとり, 10% Na₂CO₃ aq. 0.5 ml と 40% メタノール 5 ml を加えて振りまぜ, 呈する黄色を 30 分以内に 430 mμ で比色定量した. Na₂CO₃ の量, 発色の安定度等試験したが, この条件で吸光度は試料濃度に比例し, この目的を達するためには

第2図 カラムクロマトグラフ (ブタノール-水) による分離

第3図 カラムクロマトグラフ (メタノール-水) による分離

この定量法で十分であった.

溶出分離の結果を第2図に示した.

抽出液Ⅰ, Ⅱ, Ⅲについて分離を行ない, 第2図の山の高い部分を集め, それぞれ減圧で濃縮した. 本実験で分離の目標においた主たるフラボン (フラボン B₁ と仮称する) は2番目の山に含まれ, 抽出液Ⅰ及びⅡから得た本区分中にはフラボン B₁ の他に1種類のフラボン (フラボン B₂ と仮称する) が, 抽出液Ⅲから得た本区分中にはさらに数種類のフラボンが混在した.

抽出液Ⅰ及びⅡから得たフラボン B₁ を含む区分のブタノール溶液を濃縮し, エーテルを加えて, 生じた沈殿を濾し取り淡黄色粉末 80mg を得た. これを少量の水に溶解し, 数週間冷蔵放置するとゼラチン様沈殿が析出した. 濾取した沈殿にはフラボン B₁ のみが検出された. これをさらに少量の水及びエタノールから精製を行ない, 淡黄色粉末 45mg をえた. 結晶化には成功しなかった.

3. フラボン B₂ の分離: フラボン B₁ を分離した残りの母液及び抽出液Ⅲの第2区分は, さらにカラムクロマトグラフィーを行ないフラボン B₂ を分離した.

これらの液を合わせて濃縮して 30% メタノールに溶かし, 前記と同様の濾紙カラムを用い, 同様の方法で, 30% メタノールを展開溶媒として展開溶出した. 約 500 ml 溶出後展開溶媒は 60% メタノールに切り替え溶出した. 溶出液は前記同様定量した. 溶出分離した結果を第3図に示す. B₂, B₁ で示した区分にフラボン B₂, フラボン B₁ がそれぞれ溶出された. 両区分はそれぞれ単一のスポットを示した.

フラボン B₂ の区分は少量まで濃縮し, 生じた絮状沈殿を濾去し, 濾液を濃縮して黄色粉末 30mg を得た.

フラボン B₁ 区分も同様に処理して黄色粉末 45mg (先に得たものとの合計 90mg) を得た.

両者とも, 水, アルコール等から精製を行なったが, これらの溶媒に溶け易く, 結晶化には成功しなかった.

II. フラボン B₁

1. 性質: 分離したフラボン B₁ は淡黄色. 水, メタノール, エタノールに可溶. アルカリ水溶液は鮮黄色を呈し紫外線下で黄色の蛍光を発する. FeCl₃ 反応は緑褐色, HCl-Mg 反応並びに HCl-Zn 反応はともに赤色. m. p. 240~241°.

2. 加水分解: (1) 塩酸加水分解: フラボン B₁ 12.0 mg を 5% HCl で 100°, 2時間加水

分解すると黄緑色沈殿が生成する。濾取し、水で洗浄。7.7 mg (64%)。ペーパークロマトグラフィーの結果はトリシンに一致した。少量のアルコールから再結して m. p. 278~282° の結晶を得た。トリシン m. p. 286~287° と混融し、m. p. 278~285° で降下をみない。

濾液は減圧濃縮後 NaOH 上で真空乾燥し、ペーパークロマトグラフィーで糖はグルコースと同定した(第 1 表)。以上の結果からフラボン B₁ はトリシンモノグルコシド(アグリコン 64%、理論値モノグルコシド 69%、ジグルコシド 53%) と判明した。

第 1 表 ペーパークロマトグラフィーの R_F 値

展 開 溶 媒	BuOH·AcOH·H ₂ O (4 : 1 : 2)	AcOH·H ₂ O (1 : 9)
フラボン B ₁ (F)	0.35	0.04
フラボン B ₂ (F)	0.27	0.13
トリシン (F)	0.86	0.00
グルコース (G)	0.24	0.95
ラムノース (G)	0.42	0.95
フラボン B ₁ 塩酸加水分解 (2 時間)	F 0.86 G 0.24	0.00 0.95
フラボン B ₁ 酵素加水分解	F 0.35 F 0.86 G 0.24	0.04 0.00 0.95
フラボン B ₂ 塩酸加水分解 (2 時間)	F 0.86 G 0.24 G 0.42	0.00
フラボン B ₂ 塩酸加水分解 (30 分間)	F 0.27 F 0.35 F 0.86 G 0.24 G 0.42	0.13 0.04 0.00

東洋濾紙 No. 50, 上昇法。

F: Na₂CO₃ aq. 噴霧により黄色 (紫外線下鮮黄色蛍光)

G: アニリンハイドロゼンフタレートによる検出, 糖

はアラビノース, キシロース等も比較, 一致せず。

(2) β -グルコシダーゼによる加水分解; フラボン B₁ 5 mg を M/5 酢酸-酢酸ソーダ緩衝液 (pH 5.0) 1 ml に溶かし, β -グルコシダーゼ (Worthington Biochemical Corp. 製, α -メチルグルコースに作用させペーパークロマトグラフィーで糖は検出されない) の α -グルコシダーゼを含まず) 1 mg を加えて 28° で 30 時間反応し, ペーパークロマトグラフィーでフラボンと糖の検出を行なった。その結果, フラボン B₁ の一部が分解されて新たにグルコースとトリシンが検出された(第 1 表)。フラボン B₁ のみ, または酵素のみの対照ではこれらは検出されなかった。

3. 糖の結合位置: 分離した量が少ないため常法によって決定することができなかったため, 吸収スペクトル

第 4 図 フラボン B₁ (グルコトリシン) の紫外線吸収スペクトル

0.88 mg/100 ml EtOH

— フラボン B₁ ($\lambda_{\max}$ 211, 273, 352 mμ)

--- Al(NO₃)₃ 呈色 ($\lambda_{\max}$ 281, 304, 362, 395 mμ)

- - - Na₂CO₃ 呈色 ($\lambda_{\max}$ 259, 427 mμ)

第 5 図 トリシンの紫外線吸収スペクトル

0.70 mg/100 ml EtOH

— トリシン ($\lambda_{\max}$ 212, 247, 272, 353 mμ)

--- Al(NO₃)₃ 呈色 ($\lambda_{\max}$ 282, 304, 363, 395 mμ)

- - - Na₂CO₃ 呈色 ($\lambda_{\max}$ 260, 428 mμ)

ルと, 誘導体のペーパークロマトグラフィーにより決定した。

(1) 紫外線吸収スペクトル; フラボン B₁ の紫外線吸収スペクトル (第 4 図) はトリシンの吸収スペクトル (第 5 図) に極めてよく一致し, また, Al(NO₃)₃ および Na₂CO₃ でそれぞれ黄色に発色させたものは, 吸収が長波長に移行し, トリシンを発色させたものと同様のスペクトルが得られた。これらのことは 5 位及び側フェニルの水酸基が遊離していることを示す。

これらの吸収帯の移行に関してはアピゲニン (5, 7, 4'-トリオキシフラボン) によって調べられている⁽⁴⁾が, さらにトリシンの誘導体について確認した。すなわち, 4'-メチルトリシン (5, 7-ジオキシ-3', 4', 5'-トリメトキシフラボン, m. p. 268~269°, 文献⁽⁵⁾ m. p. 268~269°,

第6図 5,7-ジオキシ-3',4',5'-トリメトキシ
フラボンの紫外線吸収スペクトル

0.69 mg/100 ml EtOH

— フラボン ($\lambda_{\max}$ 212, 272, 333 mμ)

--- $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 呈色 ($\lambda_{\max}$ 283, 303, 344, 385 mμ)

- - - Na_2CO_3 呈色 ($\lambda_{\max}$ 276, 303, 398 mμ)

第7図 5-オキシ-7,3',4',5'-テトラメトキシ
フラボンの紫外線吸収スペクトル

0.50 mg/100 ml EtOH

— フラボン ($\lambda_{\max}$ 212, 271, 332 mμ)

--- $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 呈色 ($\lambda_{\max}$ 283, 305, 344, 385 mμ)

- - - Na_2CO_3 呈色 ($\lambda_{\max}$ 272, 328 mμ)

第8図 5,7,3',4',5'-ペンタメトキシフラボンの
紫外線吸収スペクトル

0.54 mg/100 ml EtOH, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, Na_2CO_3 を加えても
スペクトルに変化ない ($\lambda_{\max}$ 212, 239, 268, 326 mμ)

第2表 メチル化フラボン B_1 加水分解物の同定
(ペーパークロマトグラフィーの R_F 値)

展 開 溶 媒	$\text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5:5)	$\text{C}_6\text{H}_6 \cdot \text{AcOH}$ (9:1)
フ ラ ボ ン B_1	0.64	
メチル化フラボン B_1	0.96	
同塩酸加水分解生成物	0.79	0.68
ト リ シ ン	0.42	0.10
トリシン-7,4'-ジメチルエーテル	0.83	0.98
トリシン-4'-メチルエーテル	0.79	0.68

東洋濾紙 No. 50, 上昇法, FeCl_3 反応.

(2) ペーパークロマトグラフィーによる決定; ジアゾメタンでフラボンをメチル化すると5位の水酸基はメチル化されないから, フラボン B_1 のメチル化物を加水分解すると, もし糖が7位にあれば5,7-ジオキシ-3',4',5'-トリメトキシフラボンが得られ, 糖が5位にあれば5-オキシ-7,3',4',5'-テトラメトキシフラボンが得られなければならない. 得られたフラボン B_1 の量が少ないのでペーパークロマトグラフィーにより確認した.

フラボン B_1 5 mg をマイクロ試験管に入れ, ジアゾメタンのメタノール溶液を加えて2日おき, ジアゾメタン及び溶媒を加温溜去した後, 5% HCl を加えて 100° で3時間加水分解し, 生成物をペーパークロマトグラフィーで調べた. その結果は生成物は5,7-ジオキシ-3',4',5'-トリオキシフラボンと一致した(第2表). 糖は1個しか存在しないから, トリシン-7-グルコシドである.

III. フラボン B_2

分離したフラボン B_2 は黄色粉末, 水, エタノール等にきわめてよく溶ける. 各種呈色反応はフラボン B_1 と全く等しい.

Badwar らの方法⁽⁵⁾に従って合成)の吸収スペクトル(第6図)では Na_2CO_3 添加による長波長側の吸収が消失し, Al 塩添加の吸収スペクトルは長波長側の吸収は弱くはなるが存在する. さらに7,4'-ジメチルトリシン(m. p. $187 \sim 188^\circ$, 前報⁽¹⁾参照)の吸収スペクトル(第7図)は, いずれの場合も4'-メチルトリシンと大差なく, 7位の水酸基が遊離か否かは影響しない. しかし5位の水酸基をも覆った5,7,4'-トリメチルトリシン m. p. 194° ⁽¹⁾の吸収スペクトルは Al 塩およびアルカリ添加による変化はない(第8図). 以上のことから, フラボン B_1 の吸収スペクトルが $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 添加, Na_2CO_3 添加のいずれの場合もトリシンの場合と一致することは, 糖が7位に結合していることを示す.

第9図 フラボン B_2 (トリシニン) の紫外線吸収スペクトル

— フラボン B_2 ($\lambda_{\max}$ 212, 248, 272, 352 $m\mu$)
 --- $Al(NO_3)_3$ 呈色 ($\lambda_{\max}$ 281, 305, 359, 395 $m\mu$)
 - - - Na_2CO_3 呈色 ($\lambda_{\max}$ 253, 415 $m\mu$)

紫外線吸収スペクトルは第9図に示すようにフラボン B_1 と同一のスペクトルを有し, $Al(NO_3)_3$ 及び Na_2CO_3 で呈色した場合のスペクトルもまたフラボン B_1 の場合に等しい。従って, フラボン B_2 もまたトリシニンの7位配糖体で, 5位及び4'位の水酸基は遊離している。

5% HCl で 100° で2時間加水分解してペーパークロマトグラフィーでしらべるとトリシン, グルコース, ラムノースが検出された。また30分間の加水分解では, その他に中間体としてフラボン B_1 が検出され, かつ2時間加水分解した場合に比べるとグルコースに比しラムノースの量が多い。フラボン B_1 以外の中間分解物は検出されなかった。

以上の結果からフラボン B_2 はフラボン B_1 , すなわちトリシン-7-グルコシドにさらにラムノースが1分子ついたものと考えられる。かつフラボン B_2 も5位及び4'位の水酸基は遊離しているから, ラムノースは7位にあるグルコースに結合している。従ってフラボン B_2 はト

リシン-7-ラムノグルコシドである。

要 約

(1) 稲葉乾燥重 6 kg のメタノール抽出液から2種類のフラボン配糖体 90 mg 及び 30 mg を分離した。

(2) 前者はトリシン-7- β -グルコシドであることを確かめグルコトリシンと命名した。

(3) 後者はトリシン-7-ラムノグルコシドであることを確かめトリシニンと命名した。

(4) トリシンの各種メチルエーテルを得て, その溶液及び $Al(NO_3)_3$ 並びに Na_2CO_3 によって呈色した溶液の紫外線吸収を測定し, 分離した配糖体の糖結合位置の決定の一手段に用いた。

グルコトリシンは第1報⁽³⁾の2次元クロマトグラム(第1報, 第1図)のスポット No. 3 のフラボンに相当する。また, トリシニンは同じくスポット No. 14 の位置に相当する。またこれらの他に2種類のトリシン配糖体の存在(第1報, 第1図 No. 4 及び No. 5)が認められた。

本研究の一部を本研究室千代丸功君(現在イハラ農薬株式会社勤務)に援助願った。謝意を表する。

また, 本研究に要した費用の一部は文部省科学研究費によった。

- (1) 鍬塚昭三, 大島康義: 本誌, **35**, 71 (1961).
- (2) 永井威三郎, 涼野 元, 鈴木建元: 育種学雑誌, **10**, 274 (1960).
- (3) 鍬塚昭三, 大島康義: 本誌, **35**, 67 (1961).
- (4) T. A. Geissman: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, **3**, 485 (1955).
- (5) J. C. Badwar, K. S. Kang, K. Venkataraman: *J. Chem. Soc.*, **1932**, 1107.