

タブ葉粘質物に関する研究(第2報)

—精製粘質物の調製法と部分加水分解—

楠瀬 博三・鴛淵 武雄
(農学部農芸化学科農産製造学研究室)

Studies on the Mucilage of the Leaves of "Tabu" (*Machilus thunbergii*, Sibe et Zucc.)—Part 2.

Preparative method for the purified mucilage, and the partial hydrolysis of the mucilage.

Hirozo KUSUNOSE and Takeo OSHIBUCHI

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kochi University, Kochi)

The purified mucilage was obtained from the extract of the leaves of "Tabu" by the acetylation procedure and the fractional precipitation procedure. This mucilage was an arabinoxylan composed of 1 mole of D-Xylose and 1.2 moles of L-arabinose residues, $[\alpha]_D -138.5$ (c 0.26, water), D. P. 183.

The results of some experiments on partial acid hydrolysis led to the conclusion on chemical constitution of the mucilage that L-arabinose residue was a furanose type and that main chain of the mucilage was composed of D-xylose residues.

緒 論

粉末タブ葉の水抽出液よりアセトン添加によってえた粗粘質物および粗粘質物の高圧釜処理によってえた精製粘質物の化学組成は、すでに前報⁽¹⁾で報告したごとく、アラビノースおよびキシロースを主体とし、ラムノース、ガラクトースおよびウロン酸を有する複合多糖類より構成されている。しかしながら引続き実施した精製法の検討により、粘質物の本体はアラビノースとキシロースのみより構成され、また部分加水分解およびメチル化分析等によりキシロースを主鎖にアラビノースはフラノース型として側鎖に枝分れしていることの知見をえたので、これらについて報告する。

実験および結果

I. 粘質物精製法の検討

粘質物の精製法はその本体の化学構造を解明するうえにおいて先ず大切であることはいうまでもない。従来、かゝる粘質物の精製法には、前報⁽¹⁾のごとき粘質物水溶液(粘液)への有機溶媒添加による沈澱法の外、硫酸銅液あるいはアルカリ性銅液添加により粘質物を銅塩として分離したのち、銅を遊離せしめる方法等が採用されている。筆者らはアセチル化を行なったのち、脱アセチル化する方法とアセトン添加によりえた粗粘質物を水に再溶解したのち、再びアセトン添加により段階的に沈澱せしめる精製法の2法について検討した。

(1) アセチル化による精製法

粗粘質物10gを三口フラスコ(21)に採り、無水ピリジン100mlを加え、60°Cの温浴上でおだやかに攪拌して十分膨潤せしめた。ついで温度を40°Cに保って攪拌下に無水酢酸25gを数時

間にわたって滴下し、終了後さらに1時間激しく攪拌したのち、低温(5°C)に一夜放置した。反応液は遠心分離して不溶物を全く除去したのち、多量の氷水中に投入して繊維状のアセチル化物をえた。アセチル化物は酢酸およびピリジンがなくなるまで十分に水洗し、60°Cで予備乾燥後、デシケーター中で乾燥してアセチル化試料をえた。(収量8g, アセチル基含量39.3%, ジアセチルペントース残基としての理論含量39.8%)。かくしてえたアセチル化試料5gをとり、クロロホルム250mlに溶解し、別に調製した1%ソジウムメチレートメタノール液20mlを加えて常温に放置すると、脱アセチルによって粘質物が析出する。反応終了後粘質物を濾別し、アセトン、エーテルで順次に洗滌し、減圧下に乾燥した(収量3g, N含量なし)。以上の方法によってえた精製粘質物はアセチル基を全く含まず、構成糖として、キシロースとアラビノースの2成分を含み、稀硫酸による加水分解において第1表、第2表に示すごとく最高98.5%の分解率を示した。

Table 1. Hydrolysis Ratio of Deacetylated Mucilage with 8% H₂SO₄ at 100°C.

hour		0.5	1	2	4	8
Sample (g) (a)		0.1870	0.1565	0.1925	0.1838	0.1850
Cu (mg)		33.1	29.1	35.3	30.6	29.4
Hydrolysis Ratio(%) (b)		85.37	89.25	88.71	80.00	76.35
Residue (%)		0.59	0.64	1.66	2.50	5.89

(a) Water-Ash-free Sample
(b) for Arabinose

Table 2. Hydrolysis Ratio of Deacetylated Mucilage with 4% H₂SO₄ at Boiling State.

Hour		0.5	1	2	4	8
Sample (g) (a)		0.1226	0.1232	0.1236	0.1311	0.1202
Cu (mg)		22.1	23.5	24.4	27.0	23.7
Hydrolysis Ratio(%) (b)		85.36	90.53	94.21	98.47	93.65
Residue (%)		—	—	—	—	—

(a) Water-Ash-free Sample
(b) for Arabinose

(2) アセトン添加による分別沈澱法

粘質物の水溶液は高い粘性を示し、濾過による不純物の除去が一般に困難である。筆者らは透明な粘液をうる目的で、ガラス繊維を充填したガラス管により粘液を濾過することによってほど透明な液をえ、さらに濾紙による濾過により完全に透明な粘液を採取した。すなわちタブ葉よりえた粘液(15 l)を80×5cmのガラス管に約30cmの厚みにガラス繊維をつめ、ゆるやかに吸引して濾過し、ついで東洋濾紙 No. 25 を用いて再び濾過して透明な粘液をえた。ついで、粘液に、アセトンを等量加えて粘質物を沈澱せしめた。粘質物は分取したのち、アセトン水(2:1)で数回浸漬洗滌し、減圧下に乾燥した。この粘質物はさらに沸騰湯浴上で約70倍量の水に加熱溶解せしめ、不溶物を遠心除去したのち、アセトンを段階的に加えて4つの区分に分画した。その順序は第1図に示す通りである。

かくしてえた精製粘質物は第2図、第3図に示す如く、カラムクロマト⁽²⁾法及び超遠心法によりいずれも単一成分で、加水分解によってキシロースとアラビノースの2成分のみを生成した。したがって、これらは重合度の異なる同族体の混合物であると推察される。なお各フラクションの加水分解度の最高値、水分、灰分および全窒素量等は第3表、組成および旋光度は第4表に示した。

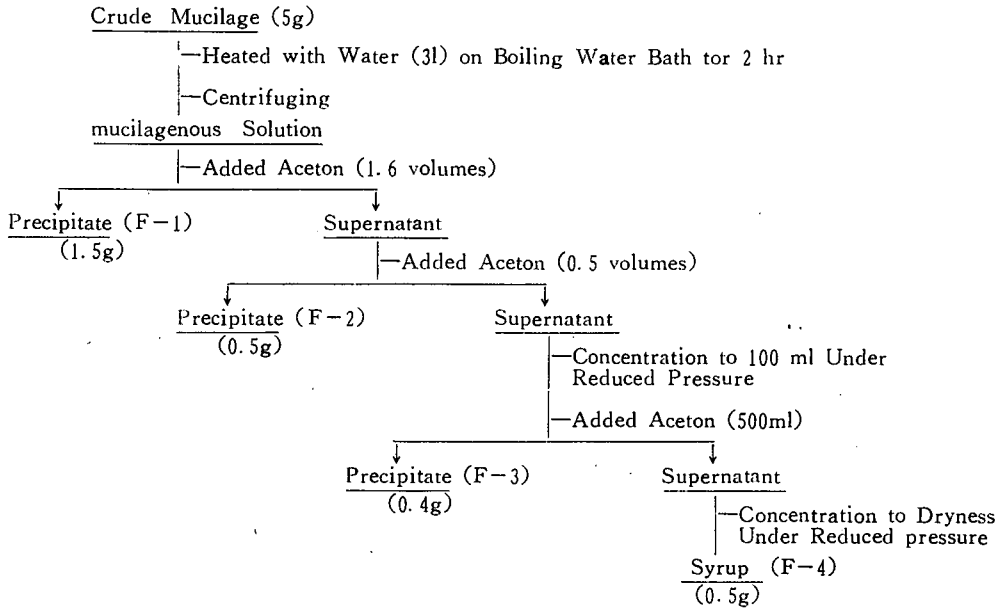


Fig. 1 Fractionation of crude Mucilage from the Leaves of "Tabu"

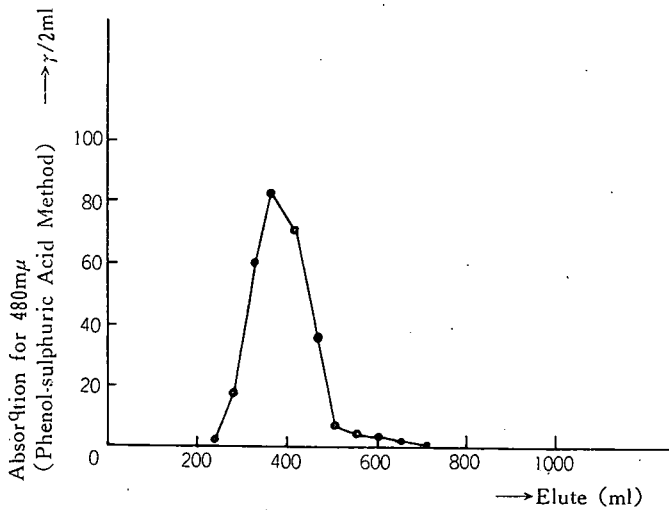


Fig. 2 DEAE-Cellulose chromatography of Crude Mucilage
 Column ; DEAE-Cellulose (30g), Borate Form
 Solvent ; Water 200ml, 0.01M-Na-Borate 400ml, 0.1M-Na-Borate 200ml, 0.5M-Na-Borate 200ml

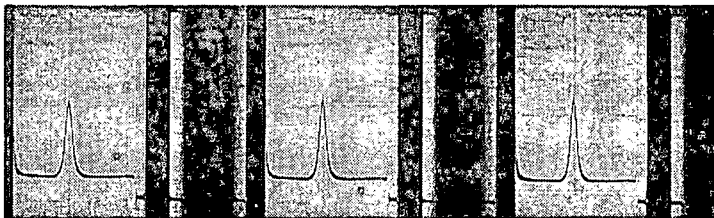


Fig. 3 Ultracentrifuge Pattern of the Mucilage from the Leaves of "Tabu"
 from Left to Right ; 59,780 r. P. m. for 54 min
 Sample Concentration ; Ca. , 1% ; Solvont 0.15 M KCl

Table 3. Maximum Hydrolysis Ratio of each Fraction with 4 % H₂SO₄ at Boiling State for 5 Hour.

Fractions	Hydrolysis Ratio (%) ^(a)	Moisture (%)	Ash (%)	Total-N ^(b)
F - 1	86.46	11.50	0.40	—
F - 2	91.91	5.77	0.16	—
F - 3	84.46	6.93	0.12	—
F - 4	—	—	—	—

(a) for Arabinose (Bertrand Method)

(b) micro Kieldahl Method

Table 4. Compositions and Specific Rotation of each Fraction.

Fractions	$[\alpha]_D^{15}$ in H ₂ O	Yield (g) ^(a)	Composition
F - 1	-117.6 (C, 0.17)	1.5	xylese Arabinose
F - 2	-138.5 (C, 0.26)	0.5	xylose Arabinose
F - 3	-157.1 (C, 0.14)	0.4	xylose Arabinose
F - 4	—	0.5	—

(a) Crude Mucilage 5g

(3) 両精製法についての比較

前述のごとく前記2法はともにキシロースとアラビノースの2成分のみよりなる粘質物を与えることにより、精製の目的は十分に達成されたものと認められた。しかしながら、多量の試料を調製するには(2)法が簡便であるので、以後の実験には主に(2)法によるものを採用した。

(4) 精製粘質物の構成糖の定量⁽³⁾

精製粘質物500mgを5%硫酸50mlで沸騰状態、6時間加水分解を行ない、常法にしたがってキシロースとアラビノースを含むシラップをえた。このシラップは適当な濃度に稀釈し、東洋濾紙No. 50を用い、下降法で室温48時間展開(n-BuOH-Benzene-Pyridine-H₂O = 5-1-3-3)後、濾紙の中央および両端部分を発色さし、それぞれの糖部分を未発色の濾紙より切り取り水10mlで浸出後、2mlを用いてフェノール-硫酸法(測定波長480m μ)で測定し、あらかじめ求めた標準曲線より、それぞれの糖量を定量した結果、キシロース:アラビノース = 1:1.2であることを確認した。

(5) 精製粘質物の重合度の測定⁽⁴⁾

一定量の試料を正確に秤取し、水50mlに溶解後、共栓付三角フラスコに洗い込む。0.02N-ヨウ素溶液20mlを加え、0.1N-苛性ソーダ溶液10mlにてアルカリ性とする。5分間静かにゆり動かしたのち、0.02N-硫酸11mlを加えて酸性化し、0.02N-チオ硫酸ソーダ溶液にて滴定した。試料によって消費されたヨウ素の量から重合度を算出し、その結果を第5表に示した。

本表より明らかなように4回の実験結果よりアルデヒド基含有率は平均0.12%となり、分子量24,167となる。この値を無水ペントース残基の質量で除すことにより平均重合度183.08という結果をえた。

Table 5. Degree of Polymerization ^(a) of F-2.

Sample (mg)	Consumed Iodine (mg)	-CHO (mg)	-CHO (%)
99.3	10.7	1.2	0.12
87.8	9.3	1.1	0.13
79.8	8.5	0.97	0.11
50.0	5.9	0.67	0.13
—		—	Average 0.12

(a) Willstätter-Schudel Method
Aldehyde Group 0.12% Correspond to D. P. 183.08

II. 部分加水分解法による分解生成物の検索

(1) 蓚酸による加水分解

粘質物を酸で水解するとき、ある程度時間が経過すると比較的少量の沈澱物が生成し、これを分離抽出後、その組成を検するに大部分がキシロースでごく少量のアラビノースを伴うか或は全く含まないものも存在することを認めた。よって

Table 6. Change of Optical Rotation Grade in Hydrolysis

Hydrolysis (hr.)	$[\alpha]_D^{18}$ (C, 1, 3 in H ₂ O)
Initial	- 160
5.5	- 100
8.0	-65.1
10.0	-63.0
12.0	-62.0 (ppt)
14.0	-59.0 (ppt)
26.0	-60.0 (ppt)

(a) Treatment with 0.01 N-Oxalic Acid Solution of Mucilage at 75°C

0.01N-蓚酸を用いて処理液中における沈澱物生成の限界点まで水解し、分解生成物を分離してその組成を検した。すなわち、粘質物約50mgをとり、0.01N-蓚酸20mlによって封管中で75°Cにおいて水解し、 $[\alpha]_D$ の変化と沈澱生成の有無を経時的に追跡した。その結果は第6表に示す如く12時間で沈澱物の生成をみた。よって11時間の処理後に水解を中止し、CaCO₃により中和後、濾過したのち、多量のアセトンにより分解物を沈澱分離せしめ、常法に従って沈澱物をアルコール、エーテルで順次洗滌後、減圧下に乾燥した。かくしてえた分解生成物は

稀酸で水解後ペーパークロマト法で組成を検した結果殆んどすべてがキシロースのみで、ごくわずかにアラビノースのスポットが見られた。なお沈澱物生成の上澄液は減圧濃縮してシラップとなし、同様にペーパークロマト法で検するにアラビノースのみを認めた。以上の結果よりアラビノースはきわめて遊離しやすい結合関係にあるものと推察される。酸として蓚酸以外に、稀薄な硫酸(0.01N, 0.02N)を用いた同様の処理においても蓚酸と全く同じ結果をえた。

(2) 部分加水分解によるオリゴ糖の分離

(i) 最適加水分解条件の検討

稀薄な蓚酸処理で殆んどすべてのアラビノースが遊離することにより、適当な条件下で水解すれば、分解生成物として、キシロースよりなるオリゴ糖がえられると推察して、オリゴ糖の分離を試みた。最適条件を求めるために粘質物約200mgをとり、酸液20mlによって、温度、時間を変化して、生成するオリゴ糖をペーパークロマト法で検した結果、0.1N-硫酸、100°C、45分の処理で最適と認めた。その結果は第7表の通りで3個のオリゴ糖を確認し、いずれもキシロースのみを構成分子としていることを認めた。なお Rxyl. 0.05の部分はキシロースとアラビノースを検出したが、これは原点部分であるので、アラビノースを結合したかなり分子の大きい部分を含んでいるためと推察した。また上記条件の他に0.05, 0.07, 0.25, 0.5N-硫酸, 5, 2.5, 1および0.5%の

蔘酸液を用いて、100°C、沸騰下、80°C、60°Cで15分、30分、60分、90分および120分についてそれぞれ検したがいずれも上記条件と同一かまたはやゝ劣ることを認めた。

Table 7. R_{xyl} (a) and Constituent Sugar of Oligosaccharides

R _{xyl} Composition (b)	xylose	Arabinose	Oligosaccharides			
	1	0.86	0.67	0.37	0.17	0.05
	—	—	xylose	xylose	xylose	xylose Arabinose

Solvent : n-BuOH-Pyridine-H₂O=6=4-3 v/v

Filter Paper : Toyo No. 50

Reagent : Aniline Hydrogen Phthalate

Method : Ascending Method, Room-temperature for 16 hr.

(a) : $\frac{\text{Rf of Sample}}{\text{Rf of Xylose}}$

(b) : Hydrolysis with 4 % H₂SO₄ for 5 Hour.

(ii) カラムクロマトグラフィーによるオリゴ糖の分離

粘質物約5gを0.1N-硫酸250mlに溶解し、100°Cで45分間加水分解し、水酸化バリウムおよび炭酸バリウムで中和後、脱色、脱塩して、さらに減圧下に濃縮してシラップとした。ペーパークロマト法でオリゴ糖の生成を検したところ、3ケの存在を認めた。ついで3×60cmのカラムにセライト：活性炭(1:1v/v)を約50cm充填し、その上端にシラップを吸着せしめた濾紙を置いたのち、水、2.5、5、10、15、20および25%エタノール水をそれぞれ500mlずつ用いて段階的に溶出せしめ、溶出液は5mlずつフラクションコレクターで分取した。受器は5本に1本ずつ濃縮してペーパークロマト法(上昇法)で溶出成分の検出を試みた。その結果15%および20%エタノール溶出部分にR_{xyl}=0.36のオリゴ糖(200~250本)がえられたが、それ以上溶出を続けてもその他のオリゴ糖はえられなかった。なお前者は収量283mg、後者は128mgであり、いずれも4%硫酸での加水分解によりキシロースのみの存在を示した。

(iii) オリゴ糖の重合度

重合度はWillstätterおよびSchudel法⁽⁴⁾によるアルデヒド基の測定およびBertrand法による還元力測定の方法によって測定した。なお、R_{xyl}=0.36のオリゴ糖は試料量が不足したために十分に実施しえなかった。R_{xyl}=0.64のオリゴ糖については第8表および第9表に示すごとく重合度(D.P.)2のDisaccharideに相当することを確認した。

またR_{xyl}=0.36の部分は水解によってキシロースのみを与えることより重合度3~4のオリゴ糖と推定した。

Table 8. Aldehyde Group Content in the Oligosaccharide (a)

Sample (mg)	Iodine Consumption (mg)	-CHO (mg)	-CHO (%)
30.4	27.6	3.15	10.36
11.8	10.4	1.19	10.08

(a) : R_{xyl} 0.67

Calc. for -CHO Content : 13.82% for Pentodisaccharide

: 27.86% for Pentose

Table 9. Degree of Polymerisation of Reducing Oligosaccharide (a)

Sample (mg) ^(a)	Cu (mg) = A ^(b)	Cu (mg) after Hydrolysis = B ^(b)	$\frac{B}{A}$ = D. P.
12.6	26.4	48.3	1.82
16.4	33.9	61.8	1.82

(a) : R_{xyl} 0.67

(b) : Bertrand's method

III. メチル化分析

(1) メチル化法⁽⁵⁾

多糖類の化学構造を明らかにするためには、メチル化分析による方法が、最もすぐれた手段として古くから実施されている。よって筆者らは、ジメチル硫酸と30%苛性ソーダ溶液とを用いる Haworth 法と、沃化メチルと酸化銀を用いる Purdie 法を併用して粘質物のメチル化を試みた、I-(1)に述べたピリジン-無水酢酸によるアセチル化法でえたアセチル化粘質物 3g をアセトン 100ml に溶解し、30%苛性ソーダ液 20ml を加えてアルカリ性としたのち、ジメチル硫酸 200ml と 30%苛性ソーダ液 400ml を激しく攪拌しつつ5時間にわたって滴下し、終了後アセトンを留去して部分メチル化物を分取した。部分メチル化物は再びアセトンに溶解してメチル化反応を繰り返した。このようにしてメチル化反応を7回反復すると、えられたメチル化物はクロロホルムに可溶性となる。かくしてそのクロロホルム可溶メチル化粘質物を 20ml のメタノールに溶解し、沃化メチル 50ml を加え、酸化銀 25g を少量ずつ添加して沸騰下に処理した。終了後クロロホルムで数回溶出し、抽出液は合して、減圧下に濃縮し、再び上記と同様にメチル化を繰り返した。前後3回このメチル化反応を実施してえたメチル化物は最後に石油エーテル中に投入して繊維状沈澱物として分離し、減圧下に乾燥して実験材料とした。本物質は収量 1.2g で第4図に示す如く赤外分光分析において OH 基による吸収バンド (3600cm⁻¹) を全く示さず、またメトオキシ基含有率は約 38.0

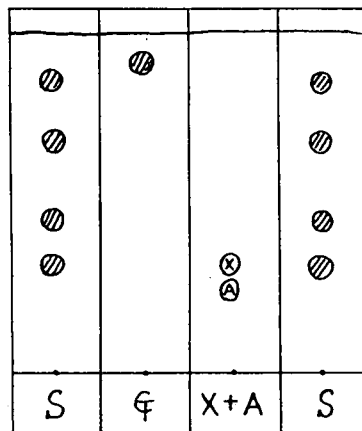


Fig. 5 Paper Chromatogram of the Methyl Sugars Produced by Hydrolysis of the Methyl Mucilage

Solvent : n-BuOH - EtOH - H₂O - NH₃ = 40 - 10 - 49 - 1

Filter Paper : Toyo No. 50

Reagent : Anilin Hydrogen Phthalate

Method : Ascending Method

S : Sample, X : Xylose, A : Arabinose

G : 2, 3, 4, 6 - Tetra-methyl-d-glucose

％であり、ほぼ完全にメチル化されているものと推察される（ジメチルペントース残基としての OCH_3 含有率の理論値38.75％）。

(2) 加水分解生成物について

メチル化粘質物約 200mg を採り、4%メタノール性塩酸 10ml により、沸騰下に6時間メタノリシスを行ない、炭酸銀で中和後、その濾液を減圧下に濃縮乾燥した。ついでこのものを5%硫酸 10ml にて5時間 100°C で加水分解し、常法のごとく炭酸バリウムで中和、脱塩してシラップとなし、これについてペーパークロマト法によるメチル化糖の検索を試みた。その結果第5図に示すごとく、4ヶのスポットを確認し、そのうち R_F 0.27 は遊離の D-キシロースに一致し、他の3ヶはメチル化糖であることを認めた。なおこれをメチル化糖の特性についてはさらに明らかにする必要があるが、本実験からは遊離のキシロースが存在することによりキシロース残基は、主結合の他に2ヶ所枝分れを有する部分が存在することが推察される。

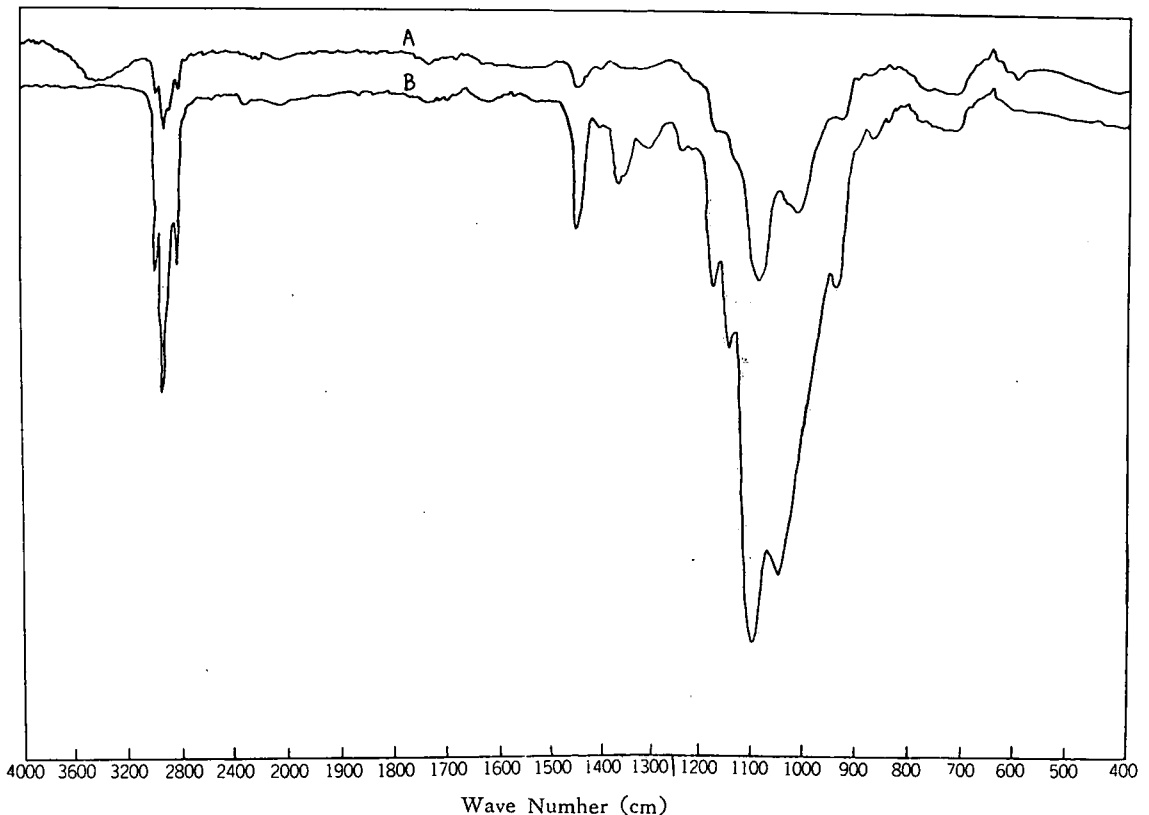


Fig. 4 IR-Spectrum (in CCl_4) of Methylated Mucilage
A : IR-Spectrum of Partial Methylated Mucilage
B : IR-Spectrum of Permethylated Mucilage

考 察

粘質物試料の精製法として、粗粘質物をアセチル化粘質物に誘導し、ついで脱アセチルする方法と、ガラス繊維により粘液を濾過してえた透明粘液にアセトンを加えて粘質物を沈澱分取し、ついでこれをアセトン水（2 : 1）で処理したのち、水に再溶解し、さらにアセトンを段階的に添加する方法との2つの方法を試みた結果、いずれの場合も構成糖としてキシロースとアラビノースの2

成分のみよりなる粘質物をえた。したがって粘質物の本体はキシロースとアラビノースの2成分より構成されて、かつその構成比はそれぞれ〔1:1.2〕のモル比であることを確認した。

粘質物の化学構造解明の手段として、部分加水分解法は有力な方法であることは衆知のことである。タブ葉粘質物については比較的多量のアラビノース残基を有しており、かつ多くの場合にこれらアラビノースはフラノース型として結合している報告がみられるので、まず比較的ゆるやかな条件下においての加水分解を試みた。即ち0.01N-硫酸、75°Cの処理を試みた結果、11時間の処理でアラビノースは殆んどすべて遊離することを認めた。なお稀薄な硫酸(0.01, 0.02N)の場合もほぼ同様の結果をえた。従って本粘質物のアラビノースはフラノース型で側鎖として結合する型をとっているものと推察される。かくのごとくアラビノースが遊離し易いので、加水分解により生成するオリゴ糖はキシロースよりなるものと推察される。よって0.1N-硫酸、100°C、45分の処理条件により加水分解を行ない、その分解生成物をシラップとしたのち、ペーパークロマト法で検した結果、第7表に示した如く遊離のキシロースとアラビノースの他にRf値の小さい3ヶのスポットの存在を見出した。これら3ヶのものをセライト:活性炭を充填したカラムで、水および2.5%~25%のエタノール水を用いて順次溶出せしめて、3成分の分離抽出を試みたが3ヶのうち分子の小さいと考えられる2ヶの成分の分離に成功した。これら2ヶの成分はいずれもキシロースのみよりなり、ペーパークロマト法での $R_{xyl}=0.64$ に相当するものは重合度測定によって二糖体であることを明らかにしたが、他の1つ($R_{xyl}=0.36$)は試料少量につき重合度を求めえなかったが、その R_{xyl} 値より推察して重合度3~4のオリゴ糖であると推察する。

以上の部分加水分解によりこの粘質物の主鎖がキシロースより構成されこれにアラビノースが多数側鎖として枝分れする構造をとっているものであろう。

なお、粘質物の完全メチル化物の加水分解においては、3ヶのメチル化糖と遊離のキシロースの存在がペーパークロマト法により確認された。各メチル化糖については更にその性質を明らかにせねばならないが、遊離のキシロースが比較的多く認められることは前述のキシロースよりなる主鎖においてグリコンド結合に関与するOH基以外のOH基がすべて枝分れに関与しているキシロース残基が、かなり多く存在するものではないかと推測せられる。

要 約

タブ葉粘質物は、アセチル化物に誘導し、ついで脱アセチルする方法およびガラス繊維で粘液を濾過したのち、アセトンで分別沈澱せしめる方法のいずれによっても、キシロースとアラビノースの2成分よりなる精製粘質物を与え、その構成比はそれぞれ〔1:1.2〕のモル比である。部分加水分解において、アラビノースがすべて極めて遊離し易く、かつオリゴ糖としてキシロースのみよりなるものを生成し、さらに完全メチル化糖の加水分解によってメチル化糖以外に遊離のキシロースがえられること等より、この粘質物は主鎖がキシロース残基より構成され、アラビノースはフラノース型で側鎖としてすべて結合している構造を有するものと推察した。

本報告の大要は昭和43年4月2日日本農芸化学会大会において講演した。

終りに、粘質物の超遠心分析をお引受け頂いた京都大学農学部生物化学教室平野茂博博士に深謝の意を表する。

文 献

- (1) 楠瀬博三, 鴛淵武雄: 高大. 学术研究报告, 10, No. 9 (1961).
- (2) H. Neukom, H. Deuel, W. J. Heri, W. Kündig: *Helv. Chim. Acta*, 43, 64 (1960)
- (3) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith: *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)
- (4) R. Willstätter, G. Schudel: *Ber.* 51, 780 (1918)
- (5) R. Montgomery, F. Smith: *J. Amer. Chem. Soc.*, 79, 695 (1957)

(昭和45年9月7日受理)