

Cycasin を定量する方法

西田 孝太郎・小林 昭・永浜 伴紀

Methods for the Quantitative Determination of Cycasin

Kotaro NISHIDA, Akira KOBAYASHI and Tomonori NAGAHAMA
(Laboratory of Biochemistry)

緒 言

既に報告した如く cycasin は、著者ら⁽¹⁾が日本産ソテツ *Cycas revoluta* THUNB. の種子より単離証明した、glucosyloxyazoxymethane なる一新有毒配糖体であつて、その aglycone は単独の成分としてはえられず、糖成分から切離されると直ちに低分子化合物に分解するものである。このものを定量する方法としては、その糖成分または、aglycone 乃至その分解生成物を捕捉することが考えられる。

aglycone の分解産物のうち、アルカリ分解における cyan は特異的である。即ち試料液を稀アルカリ及び第一鉄塩と加熱後酸性とすれば、cycasin の存在によつて Prussian blue を生成するので、これを cycasin の唯一の定性反応としている。しかしながらこの分解は化学量論的には進行せず、cyan の反応もやや鋭敏ではないため定量には応用し難い。酸または emulsin による分解の際生成する formaldehyde は、同時に生成する glucose, methanol によつてその定量が著しく阻害され、操作も簡便ではない。その他の生成物、例えば窒素 gas, 蟻酸等も定量目的には不適當である。

本報においては、糖成分即ち glucose の還元力を利用する比色法、ならびに aglycone の azoxy group に基く polarogram による方法の2つについて検討した結果を報告する。

I 比 色 法*

cycasin の糖成分の反応を利用する場合には、試料中に共存する糖類、あるいは分解した cycasin に由来する glucose を、予め分別することが当然必要である。このために paper chromatography を定量的に行うこととした。その方法としては既に種々な試みが報じられているが、本法の目的には一次元展開後、spot を溶出して比色する方法が適當であろうと考え、糖の比色法のうち cycasin にも応用しうるものを検索した。その結果 PLUMEL⁽²⁾ の報じている Prussian blue 法は、微量の試料を比色しえて、試薬も簡便であることを知つた。

実験及び考察

1. 比色法 発色の試薬及び操作は次のとおりである。cycasin または糖 1~100 γ を含む試料液 5 ml を試験管にとり、アルカリ性赤血塩水溶液 1 ml (100 ml 中 $K_3Fe(CN)_6$ 0.66 gm, K_1Fe

(1) 西田 孝太郎, 小林 昭, 永浜 伴紀: 本誌第4号 151 (1955).

* 本報告の要旨は昭和30年11月4日日本農芸化学会西日本支部大会において講演し, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20, 74 (1956) に掲載した。

(2) PLUMEL, M.: *Ann. biol. chim.*, 9, 307 (1951), *Chem Abst.*, 47, 11082 (1952).

(CN)₆ 0.02 gm, Na₂CO₃ 1.06 gm) を加え、沸とう湯浴中で一定時間加熱する。流水で冷却後 Prussian blue の安定剤として、フッ化ソーダ水溶液 1 ml (100 ml 中 NaF 1.26 gm, NaOAc 1.36 gm) を加え、鉄明バン水溶液 2 ml (100 ml 中 FeNH₄(SO₄)₂·12H₂O 1.2 gm, 1N H₂SO₄ 13.75 ml) によつて発色せしめる。発色は 15 分後最高値に達し 2 ないし 3 時間安定であるが、さらに長時間経過後には沈澱する。比色はこれを 25 ml に稀釈し、filter S₅₇, 10 mm の cuvette を用い、島津光電管比色計によつて行つた。

sucrose にこの方法を応用するため、最高の発色を与える転化条件を検討した結果、1~100 γ の sucrose を含む試料液 5 ml に N/10 HCl 0.5 ml を加え、沸とう湯浴中で 20 分間加熱し、N/10 NaOH 0.5 ml で中和後、他の還元糖試料と同様、上記の如く発色せしめれば充分であることを知つた。

赤血塩の還元反応即ち沸とう湯浴中で加熱するに適切な時間を知るため、cycasin 及びソテツ種子中に見出される主な糖、sucrose, glucose, fructose のおのおのについて 100 γ ずつを含む試料液をとり、それぞれ時間を変えて加熱して発色せしめた。その結果は Fig. 1 に明らかな如く、fructose による還元が最も速やかであり、cycasin では最も遅いことがわかつた。cycasin はアルカリ性溶液中で極めて不安定であり、一旦これが分解した後、遊離された glucose によつて赤血塩が還元されることを示している。この結果から加熱時間として cycasin については 12 分間、glucose, inverted sugar は 10 分間、fructose は 8 分間とすることとした。

cycasin 及び 3 種の糖の検量曲線は Fig. 2 に示したとおりで、零点をとる直線をなし LAMBERT-BEER 律によく一致した。

2. Paper Chromatography 不純物の影響を避けるため、濾紙は東洋濾紙 No. 131 を予め蒸溜水により上昇法で、2 回洗滌したものをを用い、誤差を殆んど無視しうる程度に小ならしめえたが、なお溶出比色の盲験を並行して行い、濾紙ブランクによる吸光度 (0.02 程度) を補正した。

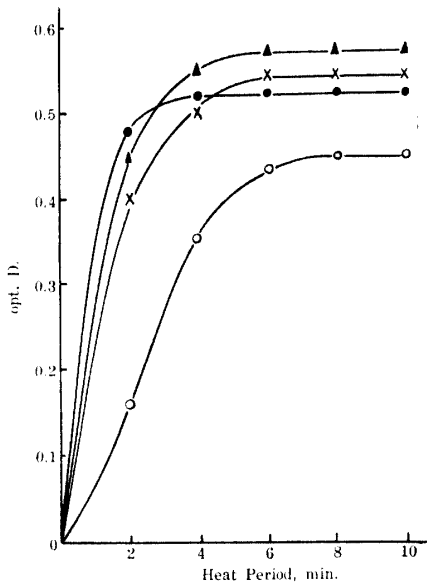


Fig. 1. Relationship between heat period and coloration.

○, cycasin. ●, fructose.
×, glucose. ▲, sucrose

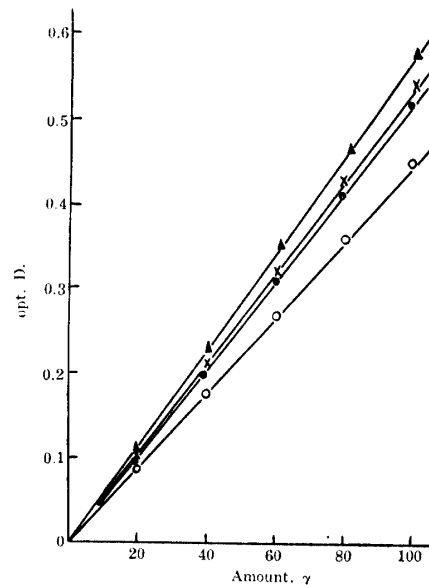


Fig. 2. Standard curves for cycasin and sugars. The symbols are the same as in Fig. 1.

試料は水溶液とし、20~30 μ l を micro pipette で spotting したが、この際 60 W 電球を用いた自作の装置により熱風を送つて、原点上の試料液を迅速に乾燥せしめるようにした。試料が多数の場合原点の間隔は 2 cm とした。常法の如く butanol・醋酸・水混液 (4:1:1) にて、一次元上昇法で約 30 cm 展開後溶媒を風乾し、resorcin または diphenylamine 試薬で発色せしめた guide strip に従い、cycasin 及び各糖の spot に相当する部分を定めた。溶出は中林⁽³⁾の方法を参考として行い、切取つた矩形 (20×18~24 mm) の濾紙片上の試料は、0.1 ml 程度の蒸留水で完全に溶出しうることを認めたが、便宜上溶出液は 2~3 ml とり、上記の如く比色を行つた。

cycasin 及び各糖の標品 0.2% の水溶液について、回収試験を行つた結果は Table 1 に示したとおりで、よく分離回収しうることを知つた。

Table 1. Recovery of cycasin and sugars

| Sugars | Calcd. | Found | Recovery | Δ |
|----------|---------------|---------------|----------|----------|
| Cycasin | 61.0 γ | 60.9 γ | 99.9 % | - 0.1 % |
| | 61.2 | 63.5 | 103.8 | + 3.8 |
| | 61.6 | 62.8 | 102.0 | + 2.0 |
| Fructose | 59.0 | 60.0 | 101.6 | + 1.6 |
| | 59.1 | 61.5 | 104.1 | + 4.1 |
| | 59.5 | 61.5 | 103.3 | + 3.3 |
| Glucose | 59.0 | 60.2 | 102.0 | + 2.0 |
| | 59.1 | 58.5 | 99.0 | - 1.0 |
| | 59.5 | 60.9 | 100.9 | + 0.9 |
| Sucrose | 56.6 | 59.2 | 104.6 | + 4.6 |
| | 56.8 | 58.5 | 103.0 | + 3.0 |
| | 57.3 | 58.6 | 102.1 | + 2.1 |

paper chromatogram 上に spot として、分別確認するに適当な cycasin 及び糖の量は 50 γ 前後であつて、Prussian blue 法による比色に好適な範囲と一致するので、本法によれば一連の操作を極めて便宜に行うことができる。

3. ソテツ種子についての定量 奄美大島におけるソテツの開花期は梅雨頃であり、種子は10月上旬頃より完熟採取の適期に入るので、未熟及び完熟の2例として、1955年7月31日及び10月10日、名瀬市近郊において採集したものを試料とした。前者については、その 18 \times 276.5 gm を注意深く脱殻し、119.6 gm の仁を得て直ちに沸とう methanol 中に投入、20分間沸とうをつづけた後乳鉢で磨碎し、水 100 ml を追加してさらに 30分間温浸後濾別した。残渣は 50% methanol 200 ml でなお3回温浸を繰返し行い、全抽出液を合して醋酸鉛、硫化水素で処理し、50°C 以下で減圧濃縮して 25 ml としたものを原液とした。10月10日採集の種子についても、ほぼ同様に抽出、処理を行つた。

これらの原液を適宜稀釈し、上記の如く cycasin 及び各糖の分別定量を行つた結果は Table 2 に示したとおりである。

Table 2. Analyses of cycasin and sugars in cycad seeds

| Date of sampling | July 31, 1955 | Oct. 10, 1955 |
|-------------------------|---------------|---------------|
| Moisture | 87.37 % | 46.84 % |
| Wt. of one fresh kernel | 7.1 gm | 10.9 gm |
| Cycasin | 0.28 % | 0.17 % |
| Fructose | 0.44 | 0.04 |
| Glucose | 0.24 | 0.26 |
| Sucrose | 0.69 | 1.93 |

Contents are represented as per cent in fresh kernel.

(3) 中林敏郎：農化 27, 272 (1953).

II Polarography *

上記比色法はやや煩雑であり、これとは別に aglycone を捕捉して cycasin に特異的な方法が期待される。その一つとして polarography による定量を試みた。即ち cycasin は、その azoxy group の還元に基づくと考えられる polarogram を与えることを知りえたので、先ずその polarography について一般的な研究を行った後、定量の条件について検討し、paper chromatography による結果と比較した。

試料及び方法

cycasin を $5 \times 10^{-3} M$ の濃度に蒸留水に溶し、この原液を $0.2 N$ KCl を含む緩衝溶液で一定容に稀釈した。緩衝液としては McILVAINE (pH 2 ~ 8) 及び SÖRENSEN (pH 9 ~ 12) 処方のものを用い、その pH は使用前硝子電極 pH 計で定めた。pH 1 及び 13 の溶液としてはそれぞれ $N/10$ HCl 及び $N/10$ NaOH を用いた。滴下水銀電極の毛管恒数は次のとおりである。 $0.2 N$ KCl 溶液中 $-1.5 V$ vs. N.C.E. にて、水銀の流出量 $m = 1.795 \text{ mg. sec}^{-1}$ 、滴下間隔 $t = 4 \text{ sec}$ ($m^{2/3} t^{1/6} = 1.860 \text{ mg}^{2/3} \text{ sec}^{-1/2}$)。全実験を通じ、1 規定甘汞電極を照合電極として用いた。また電解液中の溶存酸素は水素 gas の通気によつて除去し、外套管附の電解瓶を用いて電解液の温度を $25^\circ C$ に保つた。用いた polarograph は柳本製ペン記録型のものである。

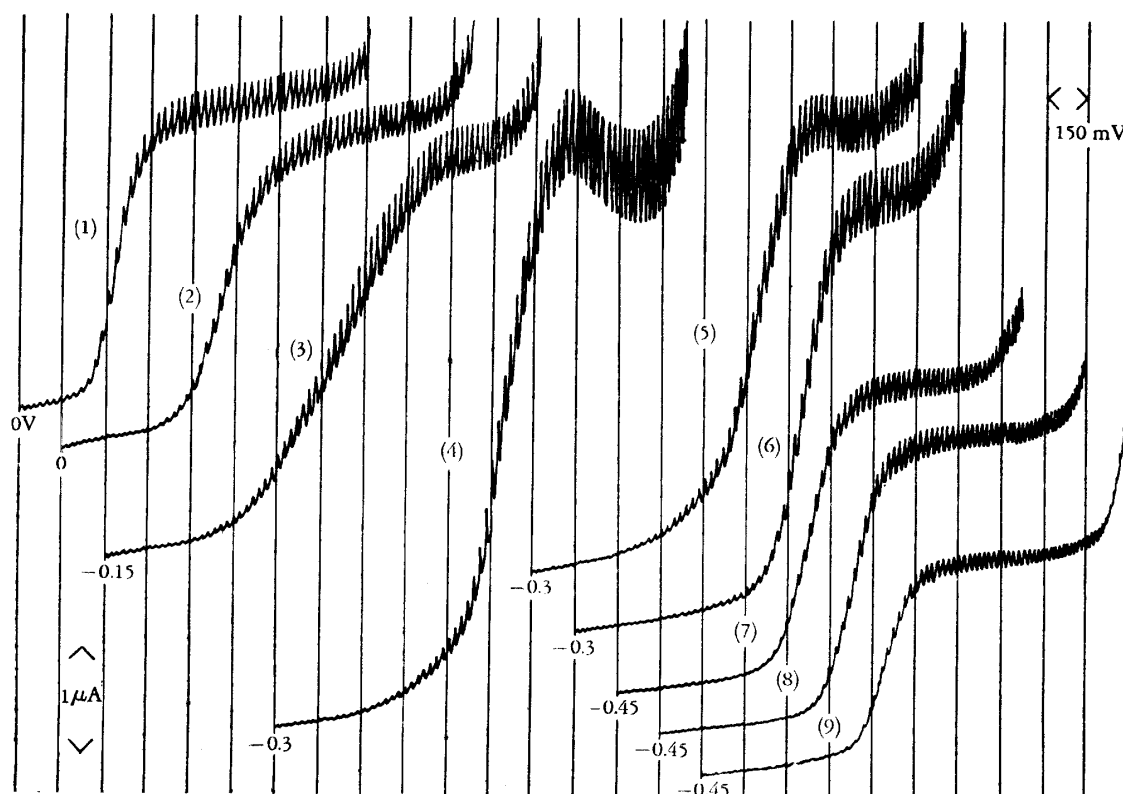


Fig. 3. Polarograms of cycasin.

$2.5 \times 10^{-4} M$ cycasin in $0.2 N$ KCl, at $25^\circ C$, at pH (1) 1.0,
 (2) 3.0, (3) 5.0, (4) 6.0 (gelatin non-added), (5) 6.0,
 (6) 7.0, (7) 9.0, (8) 11.1, (9) 13.0

* 本報告の要旨は、昭和31年4月1日日本農芸化学会大会において講演し、*Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20, 107 (1956) に掲載した。

実験結果及び考察

1. **polarogram に及ぼす pH の影響** Fig. 3 に示した如く, cycasin は pH の全領域において1段あるいは2段の還元波を示す. round maximum の現象が pH 6 乃至7において特に顕著に現われる. この極大は gelatin の添加によつて抑制された. Table 3 に pH, 半波電位ならびに

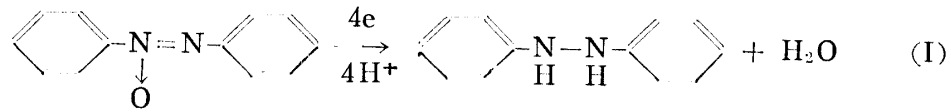
Table 3. Relationship between pH, the half-wave potential and the limiting current
 2.5×10^{-4} M cycasin in 0.2 N KCl, gelatin added, at 25°C

| pH | $E_{1/2}$, V vs. N. C. E. | i , μ A |
|------|----------------------------|---------------|
| 1.0 | -0.34 | 2.59 |
| 2.1 | -0.51 | 2.59 |
| 3.0 | -0.57 | 2.67 |
| 3.9 | -0.67 | 2.70 |
| 5.0 | -0.96 | 3.55 |
| 5.9 | -1.08 | 3.83 |
| 7.0 | -1.10 | 3.64 |
| 8.1 | -1.12 | 3.02 |
| 9.2 | -1.13 | 2.60 |
| 10.6 | -1.14 | 2.51 |
| 11.0 | -1.14 | 2.54 |
| 11.9 | -1.12 | 2.27 |
| 13.0 | -1.09 | 1.72 |

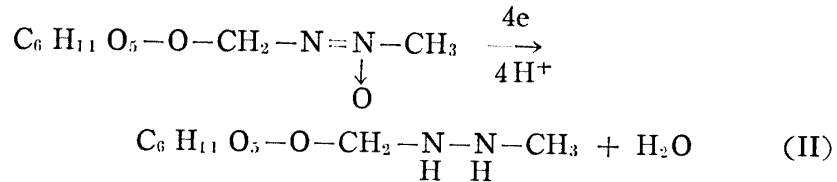
限界電流値の間の関係を示した. pH 1~4 及び 9~11 における限界電流値はほぼ等しく, pH 6 において見られた最大値の約 2/3 の値に相当する. 半波電位は pH 6 までは pH の増大と共に陰電位側に移動し, それ以上にアルカリ性側の pH では, ほぼ一定の値を示した. pH 4 から 7 までにおける還元波は 2 段波で, pH 6 及び 7 における見かけ上の 1 段波は, 2 つの波が重り合つたものと考えられる. これらの 2 段波は polarogram の作図上判別し難いので, Table 3 に示した半波電位は 1 段波として記載してある. このような現象のために, 半波電位—pH 間の関係を明らかにすることが出来難い.

cycasin はアルカリ性溶液中では不安定であるため, pH 8 以上においては, 電解液の調製後 polarogram をとる迄の時間をすべて一定 (25 分) にした. pH 1 及び 7 における限界電流値は, 60 分後においてもなお一定値を示し, また限界電流に及ぼす酸の影響は可逆的であつた. それに反して, pH 13 における波高は時間の経過と共に減少し, しかもアルカリ性溶液におけるこの反応は不可逆的に進行する. 即ち電解液を酸で中和した後, 緩衝液を用いて pH を適当な酸性値に調整しても, 波高はその調整した pH に対応するもとの値には戻らないのである. このように cycasin は稀薄なアルカリ溶液中において, しかも低温においてすら, 不可逆的に分解されることが明らかである. 従つて以下 cycasin の polarograph 的な挙動は pH 1 及び 7 において検討することとした.

2. **pH 1 及び 7 における限界電流** 従来 LEVITAN ら⁽⁴⁾, LESTER ら⁽⁵⁾, 及び COSTA⁽⁶⁾によつて報告されている, 芳香族 azoxy 化合物に関する polarograph 的研究によると, azoxybenzene の電解還元は (I) 式に従うとされている.

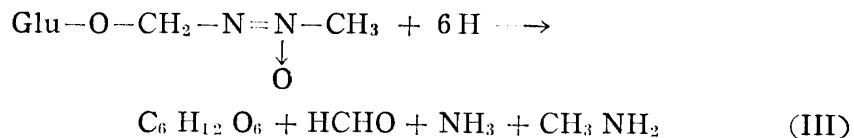


その aglycone 中に脂肪族 azoxy group を持つ cycasin についても、4 個の電子の関与する同様な電極反応が考えられる。即ち hydrazo 化合物への cycasin の還元は (II) 式の如くあらわされるであろう。

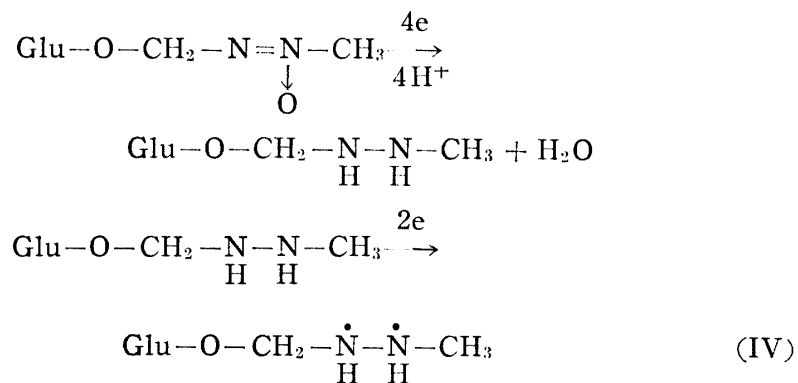


電極反応に関与する電子の数 n が知られて居れば、復極剤の拡散係数 D は、ILKOVIČ 式 $I_d = 605 n \text{CD}^{1/2} \text{m}^{2/3} \text{t}^{1/6}$ に従つて計算することができる。pH 1 における限界電流値、及び (II) 式に示した n の値から計算した D は、 $4.28 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ (25°C) である。

pH 7 における限界電流値は、pH 1 の場合に比べて遙かに大きく、この場合 n を 4 とすることは妥当でないと考えられる。 $n=6$ であるならば、 D の計算値は $4.94 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ (25°C) となり、その実測値は知りえ難いが、pH 1 の場合の計算値とほぼ一致する。かくて pH 7 における電極反応には、6 個の電子が関与するのではないかと考えられる。一方 SnCl_2 による cycasin の化学的な還元⁽¹⁾ においては、反応は (III) 式の如く進む。Glu は glucose 残基である。これらの事



実から pH 7 における電極反応を (IV) 式のように考えた。しかしながら幾個の水素イオンが、電極反応生成物と反応するかは明らかでない。何故ならば反応に関与する水素イオンの数を、半波電位



—pH 間の関係から知ることが、前項に述べた如く出来ないからである。

(4) LEVITAN, N. I., KOLTHOFF, I. M., CLARK, W. G. and TENENBERG, D. J. : *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 2265 (1943).

(5) LESTER, L. and GREENBERG, L. A. : *ibid.*, **55**, 496 (1944).

(6) COSTA, G. : *Ann. triestini univ. Trieste, Sez. 2*, **2223**, 115 (1953), *Chem. Abst.*, **48**, 4331 (1954).

Table 4. Dependence of the limiting currents on the height (h) of the mercury reservoir
 2.5×10^{-4} M cycasin, at 25°C

| h | \sqrt{h} | pH 1 | | pH 7 | |
|----|------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | | i | i/\sqrt{h} | i | i/\sqrt{h} |
| cm | | μA | | μA | |
| 80 | 8.94 | 3.20 | 0.37 | 4.53 | 0.51 |
| 70 | 8.36 | 3.01 | 0.36 | 4.29 | 0.51 |
| 60 | 7.75 | 2.80 | 0.36 | 4.00 | 0.52 |
| 50 | 7.07 | 2.58 | 0.37 | 3.73 | 0.53 |
| 40 | 6.32 | 2.39 | 0.37 | 3.32 | 0.53 |
| 30 | 5.47 | 2.01 | 0.37 | 2.85 | 0.52 |

限界電流に及ぼす水銀溜の高さ h の影響については, Table 4 に示した結果をえた. 即ち限界電流値と h の平方根とは, pH 1 及び 7 のそれぞれにおいて直線関係を示し, $h=60$ cm における両直線の傾斜はほぼ等しい. 従つてこれらの 2 つの限界電流は, 何れも拡散によつて律せられ⁽⁷⁾, 所謂 kinetic current の 性状を示さない⁽⁸⁾ものと考えられる.

Fig. 4 に示した如く, 限界電流値と cycasin の濃度との間には, $10^{-4} \sim 10^{-3}$ M の範囲において直線関係がえられた. 最小自乗法によつて計算した関係式は,

$$I_d = 1.0230 C + 0.0513 \quad \text{at pH 1}$$

$$I_d = 1.4395 C + 0.0320 \quad \text{at pH 7}$$

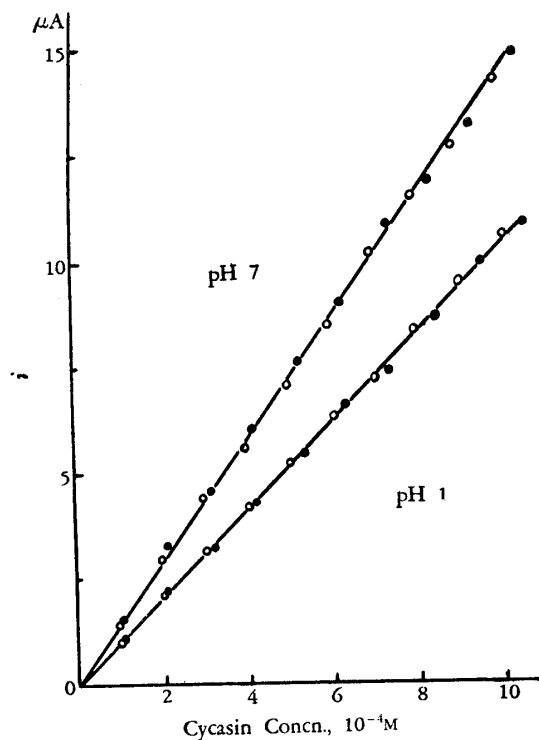


Fig. 4. Relationship between the limiting current and the concentration of cycasin.

○, solution of cycasin ; ●, mixed solution of cycasin, fructose, glucose and sucrose in the ratio of 0.17, 0.04, 0.26 and 1.93

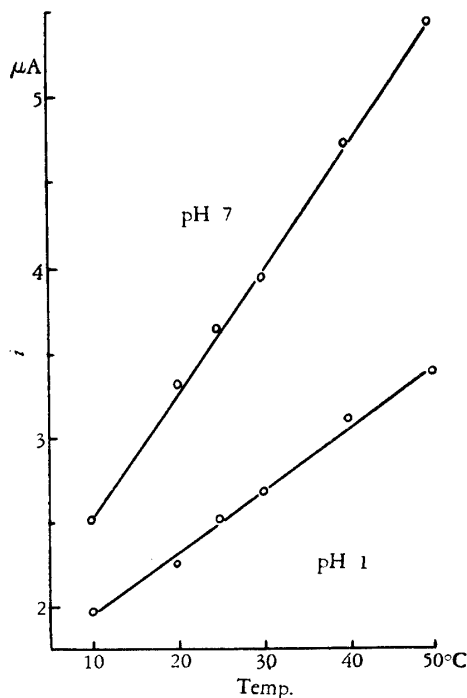


Fig. 5. Influence of temperature on the limiting current of 2.5×10^{-4} M cycasin.

(7) ILKOVIČ, K. : *Collection Czech. Chem. Soc.*, **6**, 498 (1934).

(8) BRDIČKA, R. and WIESNER, K. : *ibid.*, **12**, 138 (1947).

で示される。Id 及び C はそれぞれ限界電流値 μA 及び cycasin の濃度 $\times 10^{-1} M$ である。

限界電流に及ぼす温度の影響について検討した結果は、Fig. 5 に示した。25°C における温度係数は、pH 1 及び 7 においておのおの 1.67 及び 2.04 % deg^{-1} であつて、通常の拡散電流について見出された値⁽⁹⁾に比較して妥当な値である。

4. cycasin 定量の条件 ソテツ種子中の cycasin 含量を定量するため、比色法の検討に用いたと同様なアルコール抽出液について polarogram をとつた。polarography を妨害する蛋白質の如き不純物は、醋酸鉛及び硫化水素または 脣酸 カリによつて抽出液を処理することによつて、最も効果的にかつ簡単に除去できることがわかつた。この抽出液中に cycasin と共存する糖類の主なもの、sucrose, glucose 及び fructose である。文献によれば、glucose はアルカリ性溶液中高濃度の場合にのみ、polarograph 波を示す⁽¹⁰⁾。また fructose も還元波を示すが、その半波電位は高陰電位である⁽¹¹⁾。従つてこれらの糖による妨害は、還元波自身としてではなく、電解液中の cycasin の拡散係数に対する影響として、あらわれるのではないかと考えられる。これらの点を検討するため、cycasin 及び各糖の標品の混合溶液を、完熟ソテツ種子の抽出液に見出される割合*に調製した。この混合溶液についてえられた polarogram の波形には、糖の影響は何ら見られず、検量曲線もまた糖が共存しない場合の曲線とよく一致した (Fig. 4)。従つてこれらの糖が共存しても重大な妨害はなく、cycasin を定量しうることが明らかである。

試料として用いた抽出液は、名瀬市郊外にて、1955年10月10日及び1956年2月6日採集せる種子より調製した。前者は比色法の項において調製した抽出液をその儘用いた。試料抽出液を適宜稀釈して polarogram をとり、検量曲線に従つて cycasin の量を求めた。ソテツ種子仁の新鮮物中含量に換算した結果は、Table 5 に示したとおりで、paper chromatography によつて定量した結果とよく一致した。

Table 5. Contents of cycasin in fresh kernel of cycad seeds

| Determined by | | Date of sampling | |
|----------------------|---------|------------------|--------------|
| | | Oct. 10, 1955 | Feb. 6, 1956 |
| Polarography | at pH 1 | 0.170 % | 0.228 % |
| | at pH 7 | 0.166 | 0.221 |
| Paper chromatography | | 0.169 | 0.218 |

結 論

cycasin を直接定量するには、pH 1 あるいは 7 における polarogram をとる方法が、簡便で容易に行うことができる。pH 1 における polarogram は不純物による妨害が少なく、pH 7 のそれよりもよい結果を与える。前者はまた温度係数が小なる点からもすぐれている。paper chromatography による定量においては、spotting に多少誤差を生ずる欠陥があり、濾紙上の展開、溶出乃至は比色といった操作に時間を要して煩雑であり、polarography はこれらのすべての点において優つている。しかしながら polarography によつては定量し難い共存糖類を、同時に分別定量できる点、paper chromatography にもまた大きな利点があるのであつて、これらの2法は、目的によつて適宜選択的に応用さるべきである。

(9) 館 勇：ポーログラフイ p. 79 (1954)。

(10) CANTOR, S. M. and PENISTON, Q. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2113 (1940)。

(11) (9) の 357 頁。

* paper chromatography によつて定量した。

要 約

1. cycasin の糖成分に基く比色法として, PLUMEL の Prussian blue 法を適用しうることを明らかにした. 定量的 paper chromatography にこれを結びつけることにより, 試料中に共存する糖をも同時に定量した.

2. cycasin は全 pH 領域において, その脂肪族 azoxy group の電解還元による polarograph 波を示し, pH 4 乃至 7 においては 2 段階ならびに round maximum がみられた. pH 1 及び 7 における限界電流について詳細に検討し, 定量への応用条件を定めた.

3. ソテツ種子中の cycasin 含量こつて, 両法による結果はよく一致し, 両法の得失について論じた.

附記 ソテツ 種子 試料の採取について 鹿児島県農業試験場大島分場技師窪田広氏を煩わしたことを記して謝意を表す. なお polarograph による実験は著者の一人小林が京都大学木材研究所において行つた. 同所所長館勇教授ならびに北尾弘一郎教授のご厚意に対し深く感謝する.

R é s u m é

1. It was proved that cycasin can be determined according to the colorimetric micro analysis of sugars by Plumel, as a method based upon the sugar component of cycasin. This colorimetry was combined with a quantitative paper chromatography, and the co-existing sugars were separately determined at the same time.

2. In whole pH range, cycasin showed a polarographic wave, which was considered to be due to the reduction of its aliphatic azoxy group. The polarograms at pH 4 to 7 ran in two step wise, and showed a phenomenon of round maximum. The limiting currents at pH 1 and 7 were examined in detail, and the conditions of application of polarography for the quantitative purpose was established.

3. The cycasin content in the cycad seeds determined by both colorimetry and polarography showed a fare conformation to each other. The advantages in both methods were also discussed.

訂正 前報日本産ソテツの一新有毒配糖体 Cycasin に関する研究 (本誌第 4 号 p. 151, 1955) 中 cycasin acetyl 誘導体の比旋光度を次の如く訂正する.

$$[\alpha]_D^{30} = -25.4^\circ \text{ (C. 0.6, CHCl}_3\text{)}$$