茶樹のポリフェノール成分に関する研究 (第1報) *

茶樹の各部分におけるポリフェノール成分の分布

農林省茶業試験場 岩 浅 潔・中川 致之

Polyphenolic Compounds in the Tea Plant (Part 1)

Distribution of Polyphenolic Compounds in the
Various Parts of the Tea Plant

By Kiyoshi IWASA and Muneyuki NAKAGAWA

1 緒 言

従来茶のポリフェノール成分に関する研究は、葉を対象にして行なわれ、多くの成果があげられている¹⁾。このほか、花、種子についても研究がされているが、茶樹の主要構成部である幹、根等の木部については、ほとんどその報告をみない。一方、産業的に重要な木材のポリフェノール成分については多くの研究があり、当然茶の木部にもその存在が予想される。

そこで、茶樹の各部分におけるポリフェノール成分の分布を知るため、1本の茶樹を各部分に分け、主としてペーパークロマトグラフィーによって、成分の検索を行なった結果、二、三の知見を得たので報告する。

2 材料および方法

2.1 材 料

1955年、当場のほ場に定植された台湾種とアッサム種の一代雑種 (F₁-CA-5 (X-5)) の成木を、1964年8月に掘り取り、直ちに次の14部分に分割した。

新葉、成葉、青茎 (夏期に伸びた新梢の1~3葉と、それ以外の成熟葉および茎)。

古葉、細枝 (春に出た葉および茎)。

樹皮、幹辺、幹心 (樹皮をはく離した木質部の辺材と心材)。

根皮、根辺、根心、細根、果皮、種子。

以上のように分けた各部分の2~5gを適当に細断して25mlのアセトンに浸漬、抽出し、ペーパークロマトグラフィーの試料液とした。

2.2 ペーパークロマトグラフィー

ワットマン No. 1 ロ紙を用い、一般のポリフェノール成分については、次の2方法を併用した。

- I { 一次: フェノール-水 (3:1)
二次: *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2)
- II { 一次: *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2)
二次: 2%酢酸

スポットの検出には、紫外線ランプのほかアンモニア (蒸気)、モール塩 (0.5%メタノール溶液)、塩化第二鉄+赤血塩 (0.3%水溶液、浸漬)、塩化アルミニウム (1%アルコール溶液)、*p*-トルエンスルホン酸 (3%アルコール溶液) 等の試薬を用いた。

アントシアニジンの場合は、酢酸-塩酸-水 (5:1:5) または *n*-ブタノール-2*N* 塩酸 (1:1) で一次元展開した。

3 結 果

3.1 葉および青茎のポリフェノール成分

これらの部分は、いずれも葉緑素を含む器官であり、よく似たクロマトグラムを呈した。展開後、紫外線下の蛍光、アンモア蒸気にさらした後の蛍光の変化、塩化アルミニウム噴霧による呈色、蛍光、2種の鉄塩による呈色等をもとにして、さらに ROBERTS の報告によるクロ

図 1 茶葉および青茎ポリフェノールの
クロマトグラム

1~17 表1参照

18~20 ロイコアントシアニン

* 茶業技術研究 No. 31, 120~124 (1965) より転載

表 1 葉および青茎で検出された
ポリフェノール成分

スポット 番号	ポリフェノール成分	新葉	成葉	古葉	青茎
1	(-)エピカテキン ガレート	+	+	+	+
2	(-)エピカテキン	+	+	+	+
3	(-)エピガロカテ キンガレート	+	+	+	+
4	(-)エピガロカテキン	+	+	+	+
5	(+)カテキン	+	+	+	+
6	(+)ガロカテキン	+	+	+	+
7	アストラガリン	+	+	±	
8	ケンフェロール- ラムノグルコシド	±	+	+	
9	ケンフェトリン	+	+	+	+
10	イソケルシトリン	+	+	+	+
11	ルチン	+	+	+	+
12	ケルトリン	+	+	+	+
13	ミリセチン配糖体	+	+	+	+
14	テオガリン	+	+		
15	没食子酸	+	+		
16	クロロゲン酸	+	+	+	
17	5,7-ジオキシ クマリン	+	+	±	

マトグラム上の相互位置も参照して、スポットの同定を行なった。それらの結果のうち、展開方法Ⅱによるクロマトグラムを図1に示す。さらに、検出結果をまとめて表1にした。このほかロイコアントシアニンと考えられるスポットが2〜3個存在し、紫外線照射で青白色の蛍光を出し、鉄塩で発色しないスポットも2〜3個存在した。

なお、量的な検討は行なわなかったが、スポットの大きさからみて、葉の成熟につれて減少し、青茎が最も少ないように思われた。

3.2 幹および根部のポリフェノール成分

この部分のクロマトグラムは、葉のものとかなり違った型状を示した。展開方法Ⅱにより、塩化第二鉄+赤血塩で発色させると、原点から扇状にひろがった青色帯が現われ、これは2%酢酸で分離、ままとりの悪い成分が存在すると考えられた。この成分は展開方法Ⅰにより、モール塩で発色させると、図2に示すようなスポットに分離し、いずれも汚緑色に現われた。これらスポットの各部分における分布は(表2)、皮の部分に多くの種類が含まれ、内部へいくほど少なくなった。この成分は3.4で述べるようにロイコアントシアニンが主体となっており、幹根部ポリフェノールの主要成分であった。

図 2 幹、根で検出されたポリフェノール
成分のクロマトグラム

1〜7 未同定ポリフェノール、表2参照

表 2 幹根部における未同定ポリフェノールの分布

図2の スポット 番号	細枝	樹皮	幹辺	幹心	細根	根皮	根辺	根心
1	+	+						
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	±						
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+		±	+	+	+
6	+	+	+			+	+	
7	+	+	+	±	+	+	+	±

このほか、(一) エピカテキンがすべての部分に検出された。なお、(一) エピカテキンの証明は3.5で述べる。(一) エピカテキン以外のカテキン類の存在が確認されたのは、細枝と樹皮のみであった。細枝では、(一) エピカテキンガレートと(一) エピガロカテキンガレートの明りょうなスポットのほか、(一) エピガロカテキンと(+) カテキンの薄いスポットが認められた。また、樹皮では(一) エピカテキンガレートが検出された。

葉の場合と同様、蛍光物質が11種類検出されたが、これの幹根部における各部分の分布は木質部と細根に多く、皮、細枝では1個が検出されたのみであった。

3.3 果実部のポリフェノール成分

供試果実は未熟であり、果皮の表面は緑色を呈し、種子の内容は透明なゼリー状をなしていた。

果皮からは、葉に含まれている6種のカテキン類が検出されたが、フラボノールはミリセチン配糖体を確認したにとどまった。このほか、クロロゲン酸とロイコアントシアニンの存在も推定された。果皮のクロマトグラム

は葉部のものに類似しており、含有ポリフェノールは葉型に近いと考えられた。

種子からは多くのスポットが検出されたが、カテキン類は(一)エピカテキンと(十)カテキンのみが確認され、それ以外はモール塩で緑色を呈するスポットで、図2の1~7に相当し、幹根部と同じ成分の存在が推定された。このほか蛍光物質1個が検出された。

3.4 幹のロイコアントシアニン

幹、根、種子には(一)エピカテキン以外の成分が多量存在していたので、幹からこのフラクシオンを次の操作で分離した。幹木質部の乾燥粉末を10%含水アセトンで抽出、アセトンを減圧留去、残液をエーテル、酢酸エチルで洗浄、水層を減圧で乾固し固形物を得た。この操作による収量は、材料 200 g から約 1 g であった。このフラクシオンは図2のスポット4~7を含んでおり、各種定性反応の結果(表3)、ロイコアントシアニンの存在が強く推定されたので、イソアミルアルコール-塩酸反応のイソアミルアルコール層の赤色素をペーパークロマトグラフィーと吸収スペクトルによって試験した。

アントシアニン標品には、ペラルゴニン、シアニン、ナスニンを加水分解して得たペラルゴニン、シアニン、デルフィニジンをを用いた。また、吸収スペクトルの測定は、イソアミルアルコール溶液で行なった。

表 3 幹から分離したフラクシオンの定性反応

塩 化 第 二 鉄	緑 褐 色
ホルマリン-塩酸	沈 殿
酢 酸 鉛	沈 殿
塩 酸 (加 熱)	赤 色
カセイソーダ	黄 橙 色
マグネシウム-塩酸	赤 色
亜 鉛-塩 酸	赤 紫 色
イソアミルアルコール-塩酸 (加熱)	赤 色
バニリン-塩酸	赤 色

表 4 アントシアニジンの R_f 値

アントシアニン	酢酸-塩酸-水 (5:1:5)	<i>n</i> -ブタノール-2 <i>N</i> 塩酸 (1:1)
ペラルゴニン	0.45	0.86
シアニン	0.29	0.69
デルフィニジン	0.14	0.36
試 料	0.29	0.69

図 3 アントシアニジンの吸収スペクトル (イソアミルアルコール溶液)

表4、図3の結果、シアニンであると決定された。

幹のフラクシオンをペーパークロマトグラフィーで分離し、*o*-トルエンスルホン酸を噴霧後、103°Cで5分間加熱すると、すべてのスポットは赤褐色に呈色した。この呈色は Roux の報告によるロイコアントシアニン類の呈色(赤、桃⁶⁾~深紅⁷⁾)と若干異なるが、ロイコシアニジン-ヒドラー⁸⁾ (K. FREUDENBERG 教授の合成した

もの)の呈色と同じであったので、このフラクシオンはロイコシアニジンの誘導体が主体をなしているものと推察された。

3.5 幹のエピカテキン

最近中林によると、それまで左旋性と考えられていたリンゴ、ツバキのエピカテキンは右旋性⁹⁾であることが決定された。茶葉のエピカテキンは左旋性⁹⁾であることは、

すでに決定されているが、幹根部のものの旋光性を葉と同じ左旋性としてよいか疑問が生じてきた。この点は、幹根部から分離したエピカテキンの旋光度を測定して解明するのが最も正確であるが、純品の結晶を得ることができなかったで、二次元ペーパークロマトグラフィーでの添加試験によって決定した。

標準エピカテキンとして、ツバキの葉から結晶化した(+)エピカテキン($[\alpha]_D^{25} = +44.6$)と、茶葉から分離した(-)エピカテキンを用いた。添加試験の結果幹のエピカテキンは葉と同じ左旋性であると、暫定的に決定された。

4 考 察

以上のように茶樹の各部分に存在するポリフェノール成分をフラボノイド化合物を中心に、ペーパークロマトグラフィーで検索したが、なお微量の成分については、検出されなかったものもあると考えられる。主要成分についての結果を総括し、若干の考察を加えると次のようになる。

茶の成分で最も重要なものの一つであるカテキン類は、葉、青茎、果皮の緑色の部分がおもな存在の場所であった。水野³⁾によると、硬化した種子の殻皮にもカテキン類が存在していることから、必ずしも緑色部分に局在しているとは言えない。種子殻皮のカテキン類は未熟な時期に生成され、種子の硬化とともに分解や他の部分への移動等の変化をしないで、そのまま残ったものと考えられる。細枝でも、カテキン類がロイコアントシアニンとともに検出された。これは青茎の時期に生成、蓄積したカテキンと、木質化に伴って生成したロイコアントシアニンが共存しているものと推察される。

カテキン類のうち、(-)エピカテキンのみが茶樹全体に分布していることは、このカテキンが(+)カテキンとともに植物界に広く分布していること、また、カテキン生合成の最初の生成カテキンであるという仮説¹⁰⁾等を考え合わせて興味ある事実である。カカオ樹¹¹⁾においても、(-)エピカテキンがすべての部分に存在すると報告されている。

フラボノール類も、葉部で多くの種類が存在したが、木部では検出されなかった。その分布はカテキン類、とくにピロガロール型およびエステル型カテキンの分布と一致していた。

ロイコアントシアニン類は葉に少量含まれ¹²⁾、その大部分はロイコデルフィニジンで、ロイコシアニジンも存在する¹³⁾とされている。一方、幹のロイコアントシアニンはロイコシアニジンであることが明らかになった。根のものと同じと考えられるから、フラボノイド化合物の側フェニル核の水酸基置換の様式について、葉と木部を比較すれば、葉にはピロガロール型の水酸基配置をもつカテ

キン、ロイコアントシアニンが多く、少量のカテコール型があるのに対し、木部ではカテコール型のみが存在するという相違がみられた。このような現象は、ユーカリ樹の樹皮と葉におけるアントシアニン¹⁴⁾、形成層とその他の組織におけるロイコアントシアニン¹⁵⁾について報告されている。

以上のほかフェノールカルボン酸の存在が葉にみられたが、その他の部分では詳細な検討をしなかった。また、カテキン、フラボノール、ロイコアントシアニン以外のフラボノイド化合物の存在、蛍光物質群の定性等についても精査しなかった。

この試験に用いられた茶樹はアッサム雑種であり、中国、日本系統のものにもこの結果が適用される否かは今後の研究にまちたい。

終わりに、有益な助言をいただき、また、貴重な標品を使わせて下さった坂本裕室長、供試茶樹について配慮いただいた渡辺明技官に厚くお礼申上げる。

5 文 献

- 1) STAHL, W. H. : *Adv. Food Res.*, **11**, 201 (1962).
- 2) 坂本 裕 : 茶研報, No. 8, 82 (1956); No. 13, 92 (1959).
- 3) 水野 卓 : 茶研報, No. 22, 115 (1964).
- 4) HERBERT, H. L. : *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, p. 553, Pergamon Press (1962).
- 5) ROBERTS, E. A. H. : *J. Soc. Leather Trades, Chemists*, 1956, 87.
- 6) ROUX, D. G. : *Nature*, **180**, 972 (1957).
- 7) FREUDENBERG, K. and K. WEINGES : *Angew. Chem.*, **70**, 51 (1958).
- 8) 中村敏郎 : 農化中部支部講演会 (1965, 4)
- 9) 辻村みちよ : *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res.*, **10**, 253 (1929).
- 10) ZAPROMÉTOV, M. N. : *Biokhimiya*, **27**, 366 (1962).
- 11) GRIFFITHS, L. A. : *Biochem. J.*, **70**, 120 (1958).
- 12) BATE-SMITH, E. C. : *Biochem. J.*, **58**, 122 (1954).
- 13) ROBERTS, E. A. H., R. A. CARTWRIGHT, and D. J. WOOD : *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 253 (1956).
- 14) HILLIS, W. E. : *Australian J. Biol. Sci.*, **9**, 554 (1956); *C. A.*, **51**, 3747 d (1957).

- 15) HILLIS, W. E. : *Australian J. Biol. Sci.*, **9**,
263 (1956) ; C. A., **50**, 10860h
(1956).

Summary

The distribution of polyphenolic compounds in the various parts of the tea plant was examined by paperchromatography.

Catechins, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and (+)-gallocatechin were present in leaves and other green parts of the

plant. Flavonols, several kinds of glycosides of kempferol, quercetin, and myricetin were also contained to a varying degree in the above parts. Leucoanthocyanins yielding cyanidin on heating with hydrochloric acid existed in wood-tissue as a major component of polyphenolic substances. Epicatechin was present in seed, trunk and root in addition to the green parts, and provisionally determined to be (-)-isomer by co-chromatography, therefore, this compound was seemed to be the generally occurring catechin in every part of the tea plant.

(July, 15, 1965)

茶の公定分析法の改良(第1報)*

全窒素定量法の検討

農林省茶業試験場 鳥井 秀一・太田 勇夫

Improvement of Official Chemical Analysis of Tea (Part 1)

Examination of Total Nitrogen Determination

By Hideichi TORII and Isao ÔTA

1 ま え が き

わが国において公定された茶の一般分析法は、1925年農林省茶業試験場彙報 No. 1 に掲載されたものが骨子となって現在に至っている。

この間分析技術の進歩、測定器機の改良、開発等めざましく、また、現実の応用面においても彙報記載のとおり施行されることは少なく、随所に小改良を加えたり、新しい方法に切り換えたものもあるので、この際これら公定分析法を全面的に改訂する必要を認め、あわせてそれら分析法の精度をも評価することとした。

1961年茶試験研究打合せ会議化学部会での話合いにより、まず、第一着手として、茶の分析法中最も多く利用されている全窒素定量法を検討し、茶においての定量条件を設定した。

2 縮分による誤差

化学分析値の信頼性については、分析法そのものの精

度のほかに、分析試料のサンプリングや調製操作に基づく誤差を考慮しなければならない。しかし、この報文においては試料採取の精度は別途に検討することとし、それ以後の縮分と分析操作による誤差を対象とした。

2.1 実験方法

煎茶 20 g を次のように分割した。

煎 茶 20 g				
A 10 g		B 10 g		
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄ → B ₅
	2.5 g	2.5 g	2.5 g	2.5 g

A, B は粉砕前に分割し、B は 1 mm のふるい目を通るまで粉砕後、よく混合しないで 2.5 g ずつ B₁ ~ B₄ に分け、その後よく混合してからおのおの 5 点ずつ全窒素を定量し、残部はまとめてよく混合し B₅ とした。

A は B 同様粉砕、混合して、B₅ とともにそれぞれ 10 点ずつの試料をとって全窒素を定量した。

この時の分析操作は、茶粉末 100 mg を約 100 ml の分

* 茶業技術研究 No. 31, 124~131 (1965) より転載