報 文

茶葉中アブシジン酸の分析法と一、二番茶期における変動

農林水産省茶業試験場

永田 忠博・酒井 慎介

Analysis of Abscissic Acid in Tea Leaves and Changes in the Contents of Abscissic Acid during the 1st and 2nd Crop Seasons

By Tadahiro NAGATA and Shinsuke SAKAI

National Research Institute of Tea

1 ま え が き

植物における重要な生長制御系の一つは植物ホルモンと呼ばれる一群の化合物を介して動いている。茶芽の生長・休眠の各段階も、植物ホルモンにより制御されていると思われ、現在まで生物検定法を用いた茶樹の内生ホルモンに関するいくつかの研究が報告されている^{11,12,13-14)}。また2種のブラシノライドの茶樹体内の存在が物理化学的な方法により証明されている⁵⁾。

これらホルモンの中で、休眠誘導物質といわれるアブシジン酸 (ABA) は、生長に関与する他のホルモン (オーキシシン, ジベレリン, サイトカイニン) に対して拮抗的に働き生長を制御しているといわれ、その調査は茶芽の生長、休眠の機構解明のために役立つと思われる。これまで茶樹体内 ABA に関しては、長谷川らが新芽および新梢抽出物をカラムクロマトグラフィーにより分離しその存在を考察しているが、同じ手法によるナタマメの研究結果などに比べ生長抑制の分離が限定されず、ABA 分離と生物試験結果の相関が明瞭でない。

今回、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) を用いて、茶葉中 ABA の分析を検討し、一番茶期、二番茶期の葉中含量を葉位別に測定し、若干の知見を得たので、結果の概要を報告する。

2 試 験 方 法

2.1 茶葉中 ABA の GC-MS による検出

GC 分析のためには、ABA がカルボキシ基をもっているため誘導体にする必要がある。トリメチルシリル化とメチル化の二つの誘導体調製法を検討したが、前者は複数の生成物を生じるためジアゾメタンによるメチル化を採用した。

2.2 茶葉中 ABA 抽出法の検討

ABA の抽出法は多数報告されているが、倉石⁷⁾および吉田¹³⁾らの報告を参考に、図1に示す4つのフローシートに従い前処理法を比較検討した。

2.3 一番茶期における葉位別 ABA 含量の変動

1984年5月から6月にかけてやぶきた成木園の生育中の一番茶葉の上から第1, 第2葉を合せたものと、前年の秋芽および夏芽由来の越冬葉の計3部位の ABA 含量を、前半は4日毎、後半は1週間毎に調査した。

新葉は20~30枚、越冬葉は各5枚を採取後、直ちに抽出し、2反復で分析した。

2.4 二番茶期における葉位別 ABA 含量の変動

1984年6月下旬から7月にかけて、一番茶摘採後のやぶきた成木園の生育中の二番茶葉の上から第1, 第2葉を合せたものと、硬化した一番茶葉、さらに前年の秋芽

本報告の概要は、茶業技術研究発表会 (Nov., 1984) において発表した。

t1 農水省茶試：昭和45年度試験成績 (茶1研), pp. 21~29 (1971)。

t2 農水省茶試：昭和46年度試験成績 (茶1研), pp. 4~9 (1972)。

t3 吉田茂男, 青木 尚, 氏家雅美, 高橋信孝 W. D. Crew and D. M. Paton : 農芸化学会講要, Mar. 1984

(注1) Sep-pack処理

酢酸エチル：クロロホルム (1：4) 調製溶液 (1 ml)

Sep-packシリカカラム

酢酸エチル：クロロホルム (1：4) 溶出 5 ml

酢酸エチル：クロロホルム (3：2) 溶出 5 ml

酢酸エチル：クロロホルム (3：2) 溶出液 (5 ml)

図 1 茶葉中 ABA 分析の前処理法検討

由来の越冬葉の計3部位の ABA 含量を、一番茶期と同様の方法で1週間毎に調査した。なお用いた茶園は一番茶期の調査園とは別の園である。

3 結 果

3.1 茶葉中 ABA 分析法の検討

アブジジン酸標準品のメチル化物の電子衝撃(EI)法と化学イオン化(CI)法によるマススペクトルを図2に示す。EI法による選択イオンモニタリング(SIM)による定量は、リング中 ABA の分析に利用されており CI 法より容易である。しかし茶葉試料では EI 法の ABA-Me のベースピーク、 m/z 190 の SIM による定量は夾雑物のため困難であった。そこで CI 法の ABA-Me のベースピーク、 m/z 261 (MH-H₂O) の SIM を行い、茶葉中 ABA を検出した。

前処理法の比較結果は、セップパックを使用した吉田らの抽出法(図1に示すIVの方法)が、最も妨害ピークの影響が少なかったので、以下この方法をもとに実験を進めた。

すなわち、低温室(5℃)で新鮮葉2~4gを10倍量のメタノールとともに、ワーリングブレンダーにより3

回磨砕抽出した。3回目は1晩試料をメタノールに浸漬した後、抽出した。メタノールを減圧で蒸発させた後25 mlの水を加え、1N塩酸でpH3に調整し、等量のクロロホルムで3回抽出した。無水硫酸ナトリウムにより脱水後、クロロホルムを減圧で除去した。残渣を1 mlの酢酸エチル-クロロホルム(1：4)溶液に溶解し、これをセップパックシリカカラムに注入し、さらに酢酸エチル-クロロホルム(1：4)溶液5 mlを流し、次に酢酸エチル-クロロホルム(3：2)溶液5 mlを流し、この分画に一定量のステアリン酸エチルを内部標準物質として加え、濃縮後ジアゾメタンでメチル化してGC-MS試料とした。

以上の方法で得られた試料のクロマトグラムの1例を図3に、またGC-MSの条件を表1に示す。カラム液相はXE60を用いたがSE30でも、ほぼ同様のクロマトグラムを得た。

添加回収実験による本法の回収率は5反復で77.7%±4.8%であった。

3.2 茶葉中 ABA の定量結果

一番茶期および二番茶期の葉位別 ABA 含量の調査結果を図4および図5に示す。定量値は回収率補正を行っ

†4 野呂昭司, 工藤仁郎, 小原信実: 昭58年度寒冷地果樹に関する試験成績集録, pp. 205~206.

図 2 ABA-Me のマススペクトル

図 3 選択的イオンモニタリングによる
茶葉抽出液のクロマトグラム

表 1 GC-MS 分析条件

装 置	日立 M-80 A ガスクロマトグラフー質量分析計
カラム	1.5m×3mm, 1%XE60をUniport HP (60/80) に塗布したもの
キャリアーガス	ヘリウム, 60ml/min
カラム温度	185℃から210℃まで5℃/minで昇温
試料室温度	260℃
イオン化電圧	20mV
反応ガス	イソブタン, 3×10^{-6} torr (イオン室圧力)

て算出した。

また、ABA 含量は、水ストレスに応じて急激な変化をおこすことが多くの作物について知られているので、合せて調査期間中の降水量についても示した。

一番茶期の調査結果についてみると、新葉は5月初めから5月15日にかけて上昇し、5月18日には下降して5月上旬のレベルにもどり6月上旬まで推移して、以後さらに減少した。夏芽と秋芽由来の2部位の越冬葉の間で大きな差はなかったが、5月中旬から6月上旬にかけては新葉より濃度が低かった。また5月下旬には、新葉と同様に ABA 含量が低下したが、6月に入ると再び上昇した。

二番茶期の試験結果についてみると、6月下旬～7月上旬と7月中旬を比べると、いずれの葉位でも前者の方が ABA レベルが高かった。一番茶期の結果では新葉の方が成葉より濃度が高いという傾向が見られたが、二番茶期では葉令による大きな差はなかった。

4 考 察

ABA の分析法として、各種の植物を対象に生物検定法、イムノアッセイ法、種々のクロマトグラフを用いた手法が報告されている。一般に同定・定量は電子捕獲型検出器をもちいた GC により行われることが多いが、厳密には GC-MS によってマススペクトルを測定することが望ましいといわれている。またリング中アブシジン酸を水素炎イオン化検出器を用いた GC で測定したところ、アブシジン酸ピークに他成分が重なって分析不能となるため、GC-MS-SIM により定量したという報告もある¹⁴。

図 4 一番茶期の茶葉中 ABA 含量の変動

●；第1次伸育葉の上位2葉

□；前年の秋芽由来の越冬葉

△；前年の夏芽由来の越冬葉

□；降水量

今回の茶抽出液でもマススペクトルを測定しようとしたが、夾雑物由来のフラグメントが多くマススペクトルによる同定には至らなかった。今後、高分離のキャピラリーカラムを用いるか、さらに精製を進める前処理法を採用すれば、標準品と一致するマススペクトルも得られると考えられる。しかし、今回の結果でも特定イオンのみを検出する SIM 法を採用しているので、茶葉中アブジシン酸の同定は出来たと考えてよい。

木本植物の季節的変動を調査した例として、年間を通じてのリンゴの芽の ABA 含量の報告がある。その結果によると3月下旬から4月上旬が最低で8月中旬が最高である。

今回得られた結果を新葉（図4の●：生育中の一葉茶葉、図5の◆：生育中の二葉茶葉）、および成葉で比較してみると5月中旬から6月上旬までは新葉の方が高濃度であるのに対し、6月中旬以降は大きな差はなくなっているといえる。また5月2日から5月15日までの新葉中

ABA 含量の上昇の時期は3葉開葉期から5葉開葉期に当り、第1次伸育葉の生育と出開きという現象の制御に ABA が関与する可能性も考えられる。また落葉前に ABA が葉に集積することは広く認められており、今回の調査の6月の越冬葉の ABA 含量の上昇も同じ現象と考えられる。

しかし、水ストレスとアブジシン酸の関係も考慮せねばならない。平井らの総説によると、乾燥状態で芽キャベツ、コムギ、ホウレンソウの ABA 含量が、それぞれ52倍、39倍、10倍に増加したという報告がある。木本作物のブドウでも、乾燥により40 mg/kg 乾物重に増加した ABA が給水により、約1/2に減少し、蒸散の抑制が解除されたとの報告がある。今回は試料の水分条件など測定を行っていないのでなお不明確ではあるが、一番茶期の5月中旬の急激な低下は、降雨による水ストレスの解除によるものと考えられる。今後水条件と ABA 変動の関係についても調査したい。

図 5 二番茶期の茶葉中 ABA 含量の変動

- ◆; 第 2 次伸育葉の上位 2 葉
- ; 第 1 次伸育葉の成葉
- △; 越冬葉
- ; 降水量

5 要 約

茶葉中 ABA の GC-MS による分析法を検討した。分析試料は茶葉の溶媒抽出液をセップパックシリカカラムにかけた後、ジアゾメタンによりメチル化して調製した。茶葉中の夾雑物の多さから、電子衝撃法の選択イオンモニタリングでは測定不能であったので、化学イオン化法により m/z 261 の ($MH-H_2O$) イオンを用いて、ABA-Me を検出した。

本法を用いて一番茶期、二番茶期について 3 種の葉位の ABA 含量を経時的に分析した。5 月中旬から 6 月上旬までは第 1 次伸育葉中の上位 2 葉が、越冬葉より高かったが、6 月中旬以降は大きな差がなかった。二番茶期は調査した 3 種の葉位ともほぼ同じような変動を示した。

6 文 献

- 1) KULASEGARAM, S.: *Tea Quart.*, **40**, 31~46 (1969).
- 2) 津志田藤二郎, 竹尾忠一: 茶研報, No. 54, 59~65 (1981).
- 3) 津志田藤二郎, 竹尾忠一: 茶研報, No. 55, 37~42 (1982).
- 4) 長谷川宏司, 池田榮美子, 是枝正弘, 関谷直正: 茶研報, No. 56, 24~32 (1982).
- 5) MORISHITA, T., H.ABE, M., UCHIYAMA, S., MARUMO, S., TAKATSUTO and N.IKEKAWA: *Phytochem.*, **22**, 1051~1053 (1983).
- 6) YOKOTA, T. and N.TAKAHASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1251~1254 (1981).
- 7) 倉石 晉: 実験生物学講座 15巻 植物生理学, 丸善, pp. 199~206 (1983).
- 8) 横田孝雄: 同上, pp. 3~68 (1983).
- 9) SEELEY, S.D., L.E. POWELL, Jr.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **106**, 405~409 (1981).
- 10) 平井伸博, 小清水引一: 植物の化学調節, **16**, 79~92 (1981).
- 11) LOVEYS, B.R. and P.E. KRIEDEMANN: *Physiol. Plant.*, **28**, 476~479 (1973).

Summary

A method for the analysis of abscisic acid (ABA) in tea leaves was investigated by gas chromatography-mass spectrometry. The procedure based on Yoshida *et al.* was adopted, as follows. The fresh leaves were extracted with methanol and filtrated. After removal of methanol *in vacuo*, the residue was dissolved in water and adjusted to pH 3, then extracted with chloroform. The residue obtained after evaporation of chloroform was passed through the Sep-pack silica column. After the addition of ethyl stearate as an internal standard, the ABA fraction was methylated with diazomethan and chromatographed. Separation of compounds was achieved employing a temperature programme on a 1.5m×3mm I.D. 1% XE60 column. ABA-Me was detected by selective ion monitoring of m/z 261 ($MH-H_2O$) in CIMS (iso-buthan). Because selective ion monitoring of the base peak of ABA-Me in EIMS were not sufficient to detect ABA in tea leaves.

Using the method as described above, the ABA content of tea leaves sampled from three positions on the stem during the 1st and 2nd crop season. In the case of 1st crop season, the ABA content of new leaves was higher than that of old leaves until early June. However, the former

was equivalent to the latter after middle June due to decrease in the former. The ABA contents of overwintered leaves from two different positions on the stem did not showed significant

difference. In the case of 2nd crop season, the change in the content of ABA in new leaves was approximately similar to that in old leaves

(Oct. 12, 1984)