茶 の ビ タ ミ ン B₁ 分 解 因 子 (第 2 報)

Thiamine Decomposing Factors Contained in Tea (II)

(昭和 36 年 10 月 7 日 受 理)

和 田 せ つ 鈴 木 久 子
(Setsu Wada) (Hisako Suzuki)

Further studies were carried out on the fractions obtained from the aqueous extracts of green-tea which showed a stronger thiamine decomposing action than tannin and flavonoids.

Since the fraction obtained was still active for this action even after being ashed, the inorganic components therein were fractionated with ion exchange resins.

A strong decomposing action was demonstrated in the anionic fraction, and this was supposed to be attributable to iodide, iodate and nitrite in the extract.

Fluoride, present moderately high in amount in the anion fraction, showed slight influence on the reaction. A part of thiamine which was assumed to be decomposed by these anions were found to be present as the form of thiamine disulfide.

第 1 報¹⁾において茶葉浸出液に B₁ 分解作用(一部は不顕化作用)のあることおよびタンニンやフラボン系色素以外のフラクションに強い分解能のあることを報じたが、今回は茶葉に含有される無機質について B₁ 分解能を追究した。

茶葉には灰分多²⁾くその 60~70% が熱水可溶で、また特殊な無機成分もあるのでイオン交換樹脂によりカチオン、アニオンフラクションに分割し、ついで分解能の強いアニオンフラクションを検討した。

実 験 方 法

1) 作用液の調整

市販茶葉を粉砕し、5 倍量の水を加え沸騰浴上 10 分間浸出した後濾過、濾液に酸性白土を加え遠沈、上澄をとり白金皿で灰化、塩酸を加えて温め、蒸発乾固した後水を加えて温めてとかし、No. 7 の濾紙でこし、濾紙に残ったものを濾紙ごと再び白金皿に入れて灰化、弗化水素酸を加えて蒸発乾固した後、一度赤熱し残留物を塩酸にとかし pH7.0 に調整して灰液全容を 100ml に希釈したものを用いた。

2) B₁ 分解能の測定

第 1 報¹⁾に同じ。

3) イオン交換樹脂による分割

作用液 10ml ずつ採り一部はそのまま、一部はアニオン交換樹脂を、残りの一部はカチオン樹脂をそれぞれ pH

7 に調整して通す。使用したカチオン交換樹脂は Amberlite IRC-50、アニオン交換樹脂は Amberlite IRA-400 約 3ml で、それぞれ 1 規定の HCl または NaOH 200ml で活性化したのち蒸溜水で十分洗滌して使用した。流出液は濃縮しそれぞれ全容を 10ml にした。

4) 弗素の検出

アリザリン S (アリザリンスルホン酸ソーダ) による染点反応によった³⁾。すなわち、アリザリン S の 1% アルコール溶液 15ml、塩化ジルコニウムの 0.4% 水溶液 10ml を混合し濾紙を染めて乾かした試験紙上に 50% 醋酸の 1 滴を落とし、次に中性の検液 1 滴を滴加する。弗素イオンの存在するときは染点部分のジルコニウムアリザリンスルホン酸塩の赤堇色は黄色に変化する。

5) 沃素の検出

チオシアン酸第二鉄錯塩の接触の褪色促進度によって検出した⁴⁾。すなわち、試料液 20ml に $3 \times 10^{-3} M$ KCNS、 $3 \times 10^{-4} M$ NaNO₂ 混液 1ml と鉄明バン硝酸液 (鉄明バン 6g を 5.7N, HNO₃ 100ml にとかしたもの) 2ml を加えて振盪し、30 分後に蒸溜水を同処理したものを対照として測定した。

6) 硫酸、亜硫酸の検出

BaCl₂, Pb (CH₃COO)₂, 亜鉛末と HCl などによる沈澱の生成、沃素液の褪色などの方法で検した。

7) 硝酸、亜硝酸の検出

硝酸はブルシン、アニリンとアルファナフチルアミン

を用いる呈色反応で検した。亜硝酸は Griess-Romijn 試薬 (α -ナフチルアミン 1g, スルファニール酸 10g, 酒石酸 89 g の混合粉末) を加え, その呈色によった。

実験結果および考察

1) 茶浸出液を灰化した場合の V. B₁ 分解能

前述の方法でえた茶浸出液を二分し, 半分はそのまま残りの半分を灰化したのち HCl に溶解, もとの量に蒸留水で希釈して作用液とし, pH 7 における V. B₁ 分解能を比較したところ第 1 表に示す通り, 灰化したものの方が浸出液そのままよりも大きな分解能を示した。

第 1 表 茶浸出液を灰化した場合の V. B₁ 分解能

	添加 B ₁ 量 (μ g)	残存 B ₁ 量 (μ g)	分解 B ₁ 量 (μ g)	分解率 (%)
茶 浸 出 液	5.24	3.08	2.16	41.2
灰 化 した も の	5.24	1.77	3.47	66.2

2) 茶浸出液灰化物の V. B₁ 分解能

1) と同様の方法でえた茶浸出液の半分を白金ルツボで灰化し, これを 原容量と等量の蒸留水, 酸性蒸留水 (A) (1:3 HCl 1 滴/4ml) 酸性蒸留水 (B) (1:3 HCl 5 滴/4ml) で順次溶解し, 各溶液を作用液としてその V. B₁ 分解度を比較した。その結果は第 2 表に示す。

第 2 表 茶浸出液灰化物の V. B₁ 分解能

作 用 液	残存 B ₁ 量 μ g	分解 B ₁ 量 μ g	分解率 %
1 (対 照)	4.55	-	-
2 (茶浸出液)	3.76	0.79	17.4
3 (灰化, H ₂ O 溶解)	3.58	0.97	21.3
4 (3 の残渣を酸性 H ₂ O (A) 溶解)	3.96	0.59	13.0
5 (4 の残渣を酸性 H ₂ O (B) 溶解)	4.23	0.32	7.0

(作用液 2ml, B₁ 液 (1 μ g/ml) 5ml, buffer (pH7) 3 ml, H₂O 2ml を混合 60°C, 1 時間作用)

3) イオン交換樹脂による分割と V. B₁ 分解能

前述の方法で茶浸出液を灰化し調製した作用液のうち 10ml ずつをとり, それぞれ pH を調節して Amberlite IRC-50, あるいは Amberlite IRA-400 を通し, 得た流出液および樹脂を通さない対照液をそれぞれ濃縮して全容を 10ml とし, ふたたび pH を 7 に調整した。これを作用液として同様の方法で各フラクションの B₁ 分解能を測定した結果は第 3 表に示す通りである。すなわち, アニオン樹脂処理フラクションの B₁ 分解能は小さく, カチオン樹脂処理フラクションの B₁ 分解能はそれに比べてはるかに大であった。従って茶葉浸出液に含まれる無機質のうち, B₁ 分解能を有する主たるものはアニオン

であることが推測された。

第 3 表 樹脂処理各フラクションの V. B₁ 分解能

作 用 液	残存 B ₁ 量 μ g	分解 B ₁ 量 μ g	分解率 %
1 対 照	5.36	-	-
2 灰化液 (樹脂処理なし)	3.36	2.00	37.3
3 アニオン樹脂処理	5.04	0.32	6.0
4 カチオン樹脂処理	3.20	2.16	40.3
5 3. 4. 混合 (1:1)	3.60	1.76	32.8

(作用液 4ml, B₁ 液 (5 μ g/ml) 1ml, buffer (pH7.14) 3ml, H₂O 2ml を混合 60°C, 1 時間作用)

4) アニオンフラクションの B₁ 分解能

前記方法で作製したアニオンフラクションには灰化の際使用した弗化水素酸による残留弗素のほか, 茶葉成分より考ええられる弗素, 沃素, 硫酸, 硝酸など数種のアニオンの存在が推測される。そこで, これらのアニオンの検出を試み, ついで各々について B₁ 分解能の有無をしらべた。まず, アリザリン S を用いる染点反応により灰化液および樹脂処理フラクションの弗素イオンの存在をしらべたところ, 灰化液およびアニオンフラクションに約 500 μ g/ml に近い弗素が検出されたので弗化水素酸希釈液 (F 量 514 μ g/ml) を用いその B₁ 分解能をしらべた。その結果は第 4 表に示すごとく, 弗素の B₁ 分解能は認められなかった。

第 4 表 V. B₁ 分解におよぼす弗素の影響

(60°C, 1 時間作用)

HF 液 (弗素 514 μ g/ml)	B ₁ 液 (5 μ g/ml)	buffer (pH 7.17)	蒸留水	残 存 B ₁ 量 μ g
ml	ml	ml	ml	
-	1.0	3.0	6.0	4.19
0.2	1.0	3.0	5.8	4.25
1.0	1.0	3.0	5.0	4.25
2.0	1.0	3.0	4.0	4.28
3.0	1.0	3.0	3.0	4.30

次にチオシアン酸塩を用いる接触反応により沃素イオン (沃素酸イオンも同じ作用を示す) の存在をしらべたところ第 5 表のごとく iodide および iodate イオンの存在が認められた。これらの B₁ 分解能をそのカリウム塩でしらべた結果は第 6 表に示す通りで, 濃度の高いほど B₁ 分解は促進される傾向が認められた。なおアニオンフラク

第 5 表 沃 素 の 検 出

	光電比色計 (フィルター S) の よ み (47, 液槽 10 mm)	
	I	II
空 試 験	0.440	0.248
灰化液 (樹脂処理せず)	0.378	0.160
アニオンフラクション	0.372	0.169

第6表 沃素および沃素酸イオンによる V. B₁ の分解

B ₁ 液 (5μg/ml) (ml)	KI 液		KIO ₃ 液		buffer (pH 7.17) (ml)	蒸 溜 水 (ml)	残存 B ₁ 量 (μg)
	10 ⁻³ M (ml)	10 ⁻¹ M (ml)	10 ⁻³ M (ml)	10 ⁻¹ M (ml)			
1.0	-	-	-	-	3.0	6.0	4.53
1.0	2.0	-	-	-	3.0	4.0	4.47
1.0	-	2.0	-	-	3.0	4.0	3.10
1.0	-	-	2.0	-	3.0	4.0	4.00
1.0	-	-	-	2.0	3.0	4.0	1.04

ションは Ag NO₃ 添加による AgI の黄色沈澱はほとんど認められず、KI 液の添加により紅紫色を呈した。

次に亜硫酸、硫酸、亜硝酸、硝酸各イオンの存在を前記方法によりそれぞれしらべたところ硫酸、亜硝酸およびごく微量と考えられる硝酸が検出された。これらのソーダ塩あるいはカリウム塩による B₁ 分解に及ぼす影響は第7～9表に示すごとくである。すなわち 10⁻³M 液を作用させた場合はいずれも対照より残存 V. B₁ 量が多く、全く B₁ 分解を促進することは認められなかった。10

⁻¹M 液を作用させた場合は硫酸塩、硝酸塩にはほとんど影響が認められなかったが、亜硝酸塩は分解促進が示された。

5) アニオンフラクションによる分解 B₁ について
茶浸出液に含有される無機質によって分解された V. B₁ の生理的活性度をしらべるため、分解 B₁ 中に thiamine disulfide (TDS) が存在するかどうか検討した。すなわち、常法により作用液を加え pH 7, 60°C で 60 分間作用させたのち 10⁻³M Cysteine 液を添加してさらに 60°C

第7表 V. B₁ 分解におよぼす硫酸イオンの影響 (pH 7 60°C, 60 分作用)

B ₁ 液 (5μg/ml) (ml)	K ₂ SO ₄		Na ₂ SO ₄		buffer (ml)	蒸 溜 水 (ml)	残存 B ₁ 量 (μg)
	10 ⁻³ M (ml)	10 ⁻¹ M (ml)	10 ⁻³ M (ml)	10 ⁻¹ M (ml)			
1.0	-	-	-	-	3.0	6.0	4.53
1.0	2.0	-	-	-	3.0	4.0	4.95
1.0	-	2.0	-	-	3.0	4.0	4.71
1.0	-	-	2.0	-	3.0	4.0	4.90
1.0	-	-	-	2.0	3.0	4.0	4.20

第8表 V. B₁ 分解におよぼす亜硝酸イオンの影響 (pH 7 60°C, 60 分作用)

B ₁ 液 (5μg/ml) (ml)	KNO ₂		Na NO ₂		buffer (ml)	蒸 溜 水 (ml)	残存 B ₁ 量 (μg)
	10 ⁻³ M (ml)	10 ⁻¹ M (ml)	10 ⁻³ M (ml)	10 ⁻¹ M (ml)			
1.0	-	-	-	-	3.0	6.0	3.57
1.0	2.0	-	-	-	3.0	4.0	4.16
1.0	-	2.0	-	-	3.0	4.0	2.65
1.0	-	-	2.0	-	3.0	4.0	4.28
1.0	-	-	-	2.0	3.0	4.0	1.78

第9表 V. B₁ 分解におよぼす硝酸イオンの影響 (pH 7 60°C, 60 分作用)

B ₁ 液 (5μg/ml) (ml)	KNO ₃		Na NO ₃		buffer (ml)	蒸 溜 水 (ml)	残存 B ₁ 量 (μg)
	10 ⁻³ M (ml)	10 ⁻¹ M (ml)	10 ⁻³ M (ml)	10 ⁻¹ M (ml)			
1.0	-	-	-	-	3.0	6.0	4.53
1.0	2.0	-	-	-	3.0	4.0	4.89
1.0	-	2.0	-	-	3.0	4.0	5.03
1.0	-	-	2.0	-	3.0	4.0	4.86
1.0	-	-	-	2.0	3.0	4.0	4.64

で60分間放置し、顕化された B_1 量を測定して対照と比較した。その結果は次表に示す通り Cysteine は B_1 の酸化を抑制し、また、作用後 Cysteine を加えたものの B_1 残存量は Cysteine を加えないものより明らかに多かった。従ってこの酸化作用によって一部分と考えられるが TDS が生成されることが認められる。

第10表 茶浸出液中の無機質による
V. B_1 分解と TDS の生成

	残存 B_1 量 (μ g)	B_1 分解量 (μ g)	B_1 分解率 (%)
システイン無添加	2.54	1.68	39.9
システイン添加(同時)	4.10	0.11	2.6
〃 (作用後)	3.08	0.13	26.8
作用液を加えないもの	4.21		

(* 作用後システイン添加 60°C 60分作用)

次に茶浸出液の無機質中のアニオンフラクションによる V. B_1 分解物中の TDS について調べた結果は第11表に示す通りで TDS の生成が認められた。さらに TDS の生成総量を測り利用度を明らかにするためチオグリコール酸処理⁵⁾を行なうて、完全に存在する TDS を還元し、総 V. B_1 量を測定した結果は第12表に示す通りである。すなわち反応液に $N \cdot H_2SO_4$, 4 M Na-acetate を加えて pH を 5.0 に調整し、その 10ml/ に対し 0.4% TG A 1ml, モール氏塩 (0.1685 g をとかし 10ml/ としたも

第11表 茶浸出液アニオンフラクションに
よる V. B_1 分解物

	残存 B_1 量 (μ g)	B_1 分解量 (μ g)	B_1 分解率 (%)
システイン無添加	3.45	0.81	19.0
システイン添加(作用後)	4.22	0.04	1.0
作用液を加えないもの	4.26		

第12表 茶浸出液無機質による V. B_1 分解と
生理的利用度

	TGA 処理 総 B_1 量 (μ g)	分解 B_1 量 (μ g)	B_1 分解率 (%)
対 照	3.71	-	-
カチオンフラクション 添加	3.18	0.53	14.3
アニオン 〃	2.78	0.93	25.0
灰化液 〃	3.01	0.70	18.9

の) 1ml/ 加えて 50°C, 2時間作用させたものについて、V. B_1 量を測定した結果はいずれのフラクションとも生理的利用可能な総 V. B_1 量を対照より減少させ、分解促進作用があることが認められたが、やはりアニオンフラクションの方が分解促進作用大きく、V. B_1 利用度を低下させることが示された。なお検出された V. B_1 分解作用をもつアニオンにおいても TDS の生成が認められた(沃素酸イオンを除く)。

第13表 沃化物、亜硝酸塩による V. B_1 分解と TDS の生成

B_1 液 (5 μ g/ml)	KI 液 10 ⁻¹ M	KNO ₂ 液 10 ⁻¹ M	NaNO ₂ 液 10 ⁻¹ M	buffer	蒸 溜 水	Cysteine 液 10 ⁻² M	残存 B_1 量
ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	μ g
1.0	2.0			3.0	4.0		4.45
1.0	2.0			3.0	4.0	1.0	5.11
1.0		2.0		3.0	4.0		3.19
1.0		2.0		3.0	4.0	1.0	3.56
1.0			2.0	3.0	4.0		3.21
1.0			2.0	3.0	4.0	1.0	3.53

以上の実験結果より茶浸出液に含有される無機質が V. B_1 分解作用の一因子として考えられ、ことにアニオンにより大きく影響され、V. B_1 利用度は多少とも低減されることを認めた。

総 括

前報に引つづき茶葉浸出液の V. B_1 分解能を追究したところ、灰化してもなお強い分解作用が認められたので含有される無機成分をイオン交換樹脂を用いて分割、検討した。その結果アニオンフラクションにより強い分解能を認めたので、これをさらに追究し、沃素、亜硝酸などに分解促進作用乃至 V. B_1 不顕化作用を見出したが、これらの無機質によって V. B_1 は多少とも分解、利

用度を低下するところを認めた。

終りに本研究について終始ご懇篤なご指導をいただいた有山恒教授に厚く感謝申上ます。

文 献

- 1) 和田せつ: 鈴木久子: 本誌, 13, 326 (1961)
- 2) 鳥井秀一: 茶業技研 No. 9, 1 (1953), 化学の領域, 13, 207 (1959)
押田幹太: 農学大系作物部門, 茶編(養賢堂, 1954)
- 3) 高津寿雄: 有機分析試劑(改訂版)(続文堂, 1957)
- 4) 内海喩: 日化誌, 74, (No. 4) 298 (1953)
- 5) G. E. Bonvicini, D. J. Hennessy: *Int. Z. Vitaminforsch.* 30, 83 (1959)

(東北大学農学部食糧化学科)