ペーパークロマトグラフィーによる茶葉タンニンの分離 (第1報)

鳥井 秀一, 古谷 弘三 (農林省茶業試験場)

昭和25年4月9日受理

On the Separation of Tea Tannin by Means of Paper-Chromatography. Part 1.

By Hideichi TORII and Kōzō FURUYA (National Tea Experiment Station)

緒言 茶葉に含まれているタンニンは、緑茶にも紅茶にも、その品質の上に大きな影響を與える重要な成分であるために、これについての研究は、既に茶が化學研究の對象となつた約100年も前から行われてきたが、その本體の一部がやつと20年程前になつて、辻村⁽¹⁾大島⁽²⁾兩氏によつて明かにされた。即ち茶葉タンニンの中から1-エピカテキン、ガロカテキン、結晶茶タンニンの3種のタンニン化合物を結晶に取り出して、構造を決定することができた。しかしなお茶葉タンニンの大部分は無定形にしか得られていないので、製茶品質というような微妙なものとの關係を明かにするには、更にこのタンニン化合物を精細に分離定量し、タンニン化合物の組成について検討しなければならない。

これまでにタンニン化合物の中、カテキン部分の分離法として、醋酸タリ性醋酸鉛法⁽³⁾や鹽酸ホルマリン法⁽⁴⁾などがあるが、何れも充分なものとは思えない。たまたまこの戦時中、CONDEN, GOLDEN, MARTINによつて有力な分析法としてペーパークロマトグラフィー⁽⁵⁾が創案せられ、アミノ酸の分離等に輝かしい成績を擧げているので、この方法を利用して茶葉タンニンの分離を試みた。

實 験

1) 實驗方法 東洋濾紙 No. 2 を 2×30 cm の短冊形に切り、密閉できるガラス容器中に懸垂し、展開液は下部から上昇させる方法を探つた。試料は茶葉を蒸熱、乾燥、粉碎したものの熱湯浸出液約0.03 cc 用い、濾紙上には直徑約1 cm の大きさとなつた。

展開を終つたものは溶劑を揮散させた後、硫酸第二鐵溶液を噴霧して呈色させた。

Table 1. Developing Solvent and R_F of Tannin Spots

Solvent	R _F	Color	R _F	Color	R _F	Color	R _F	Color	R _F	Color	R _F	Color
Ethyl acetate	0.00	(G)	0.23	B	0.69	(B)						
(saturated with H ₂ O)	0.00		0.23		0.68							
<i>n</i> -Butanol	0.05	(B)	0.22	B	0.28	G	0.34	B	0.38	G	0.67	(B)
(sat. with H ₂ O)	0.05		0.22		0.31		0.36		0.39		0.67	
<i>iso</i> -Butanol	0.03	B	0.16	B	0.26	B	0.55	(B)				
(sat. with H ₂ O)	0.03		0.17		0.28		0.55					
Amyl alcohol	0.00	(B)										
(sat. with H ₂ O)												
Benzyl alcohol	0.02	G	0.03~									
(sat. with H ₂ O)			0.30	B								
Toluene	0.00	(B)										
(sat. with H ₂ O)												
Phenol	0.05~		0.10~									
(sat. with H ₂ O)	0.10	B	0.20	G								
Water (sat. with ethyl acetate)	0.13	B	0.31	(B)								
	0.14		0.33									
Water (sat. with <i>n</i> -butanol)	0.23	B	0.47	(B)	0.75	B						
	0.23		0.48		0.81							
Water (sat. with <i>iso</i> -butanol)	0.26	B	0.50	(B)	0.76	B						
	0.25		0.48		0.80							
Water (sat. with amylalcohol)	0.11	(B)	0.32	(B)								
	0.12		0.31									
Water (sat. with toluene)	0.11	(B)	0.17	(B)	0.21	G						
	0.14		0.15		0.25							

Note.B: Blue G: Green (): Intense color

2) 展開剤の選定 茶タンニンの分離に最も適当な展開剤を選ぶために、醋酸エチル、*n*-ブタノール、*iso*-ブタノール、アミルアルコール、ベンジルアルコール、トルオール、フェノールの夫々の水飽和液及び水にこれらの有機溶剤の飽和液を用いて展開し、呈色されたタンニンの斑點の R_F と色調を調べた。試料は品種 C-8 の茶葉熱湯浸出液を用いた。その結果を第 1 表に示す。

これによるとアミルアルコール (水飽和) とトルオール (水飽和) では全然展開せず、又ベンジルアルコール (水飽和) とフェノール (水飽和) では展開はするが、長い帯状になつて斑點の判定に不都合である。

溶剤に水を飽和したものと、水にそれらの溶剤を飽和したものとを比較すると、前者では原點に止つて展開しない部分のあるのがあるが、後者では一應原點から皆動くが、出現する斑點の数は前者の場合より少い。そして斑點の呈色は緑がなく殆んどすべて青となる。

ここに使用した溶剤の中では *n*-ブタノールは出現する斑點の数も多く、その R_F も大きいことが分つたので、展開剤としてこれを選ぶことにする。

3) 展開温度の影響 展開液の上昇は温度によつて遅速があるので、これを室温と 20°, 30° の恒温槽の中で比較を行つた。試料は品種 C-8 茶葉の熱湯浸出液を用いた。展開時間は 22~25 cm の上昇に室温 (5~14°) では約 24 時間、20°, 30° では 8 時間以内であつた。又水に溶剤を飽和させた方が水飽和のものより幾分時間が早かつた。この結果を第 2 表に示す。

Table 2. Influence of Developing Temperature upon the R_F Value of Tannin Spots

i) Developing Solvent: <i>n</i> -Butanol Saturated with Water							
<div>Spot Color</div> <div>Temp.</div>		a	b	c	d	e	f
		B	B	G	B	G	B
Expt. 1	Room temp.	0.05	0.22	0.28	0.34	0.38	0.67
		0.05	0.22	0.31	0.36	0.39	0.67
	20°	0.05	0.21	0.29	0.36	0.39	0.63
		0.04	0.22	0.30	0.38	0.41	0.66
	30°	0.06	0.24	0.32	0.41	0.43	0.62
		0.06	0.26	0.33	0.41	0.43	0.63
Expt. 2	Room temp.	0.04	0.20	0.26	0.32	0.35	0.66
		0.04	0.20	0.28	0.34	0.37	0.67
	20°	0.06	0.25	0.35	0.39	0.45	0.64
		0.06	0.25	0.34	0.41	0.43	0.70
	30°	0.06	0.19	0.34	0.41	0.43	0.66
		0.06	0.23	0.34	0.41	0.44	0.66

ii) Developing Solvent: Water Saturated with *n*-Butanol

Temp.	Spot Color	a'	b'	c'
		B	B	B
Room temp.		0.23	0.47	0.75
		0.23	0.48	0.81
		0.21	0.43	0.71
20°		0.24	0.45	0.71
		0.23	0.46	0.74
		0.25	0.46	0.71
30°		0.34	0.60	0.73
		0.31	0.53	0.78
		0.32	0.52	0.75

各斑點について展開温度の影響を検討してみると、展開液が水飽和の *n*-ブタノールの場合も、*n*-ブタノール飽和の水の場合でも、室温と 20° の間には有意差は認められない。室温と 30° の間で有意差の認められたものも斑點 d, e, a' だけであるから、室温が 20° 程度までの時は R_F に対する温度の影響は深く考慮する必要はないものと思う。

Table 3. Test of Difference between Treatment

Spot	Difference between	F
d	Room temp. ~ 30°	$F'_{13} = 73.68 > 34.12 = F'_{13} (0.01)**$
e	" " ~ "	$F'_{13} = 43.11 > 34.12 = F'_{13} (0.01)**$
a'	" " ~ "	$F'_{12} = 100.00 > 98.49 = F'_{12} (0.01)**$
	20° ~ 30°	$F'_{12} = 98.03 > 18.51 = F'_{12} (0.05)*$

4) 展開剤 *n*-ブタノールの含水量の影響 展開剤である *n*-ブタノールの含水量の影響を、品種薮北の茶葉の熱湯浸出液を試料として試験した。展開は室温で行つた。結果は第 4 表に示す。

実験 1, 2 を総合して、展開剤の含水量がタンニンの斑點の R_F に及ぼす影響を検討すると、飽和と 2/3 飽和の間には有意な差は認められないが、飽和或は 2/3 飽和と 1/3 飽和の間には有意差が認められ、殊に R_F の小さい斑點の場合は顯著である。そして 1/3 飽和の場合には斑點の数も 1 つ減少している。

Table 4. Influence of Water Content of *n*-Butanol upon the R_F Value of Tannin Spots

Spot		c	d	e	f	Spot		c	d	e	f
Water Content	Color	G	B	G	B	Water Content	Color	G	B	G	B
Expt. 1						Expt. 2					
Saturated with H ₂ O		0.30	0.35	0.38	0.57	Saturated		0.34	0.39	0.43	0.63
		0.34	0.39	0.42	0.60			0.33	0.39	0.42	0.64
2/3 Saturated		0.30	0.36	0.40	0.59	2/3 Saturated		0.29	0.36	0.39	0.59
		0.30	0.37	0.40	0.57			0.27	0.35	0.37	0.56
1/3 Saturated		0.13	0.28	—	0.53	1/3 Saturated		0.12	0.25	—	0.52
		0.13	0.27	—	0.54			0.12	0.28	—	0.54

Table 5. Test of Difference between Treatment

Spot	Difference between	F
c	Saturated-2/3 Satur. 2/3 Satur.-1/3 Satur.	8.13 < 10.13 = F ₁₃ (0.05) 1089.00 > 34.12 = F ₁₃ (0.01)**
d	Saturated-2/3 Satur. 2/3 Satur.-1/3 Satur.	3.43 < 10.13 = F ₁₃ (0.05) 97.01 > 34.12 = F ₁₃ (0.01)**
e	Saturated-2/3 Satur.	2.11 < 10.13 = F ₁₃ (0.05)
f	Saturated-2/3 Satur. 2/3 Satur.-1/3 Satur. Saturated-1/3 Satur.	2.50 < 10.13 = F ₁₃ (0.05) 14.31 > 10.13 = F ₁₃ (0.05)* 22.00 > 10.13 = F ₁₃ (0.05)*

この結果から展開剤の含水量が減ると R_F も小さくなり、斑點の現出數も減るから、展開には *n*-ブタノール水飽和のものが最も良い。

5) 茶樹品種の茶葉タンニンの比較 以上の實驗結果から、室温で *n*-ブタノール (水飽和) を展開剤として、茶樹品種 C-8, U-17, 薮北の3種の茶葉タンニンを比較した、

Table 6. Comparison of Tannin Composition among Some Varieties of the Tea Plant

Variety	Spot						
	Color	a	b	c	d	g	f
		B	B	G	B	G	B
C-8		0.05	0.22	0.33	0.37	0.41	0.67
U-17		0.06	0.27	0.37	0.41	0.44	0.69
Yabukita		—	—	0.35	0.39	0.44	0.65

二鐵によつて呈色させた。

(2) その結果、茶葉タンニンには供試した7種の溶剤の中、*n*-ブタノールの水飽和液が最も好結果を示した。

(3) この方法によつて茶樹品種 C-8, U-17, 薮北の3種の茶葉タンニンの比較を行つたが、薮北は他の2種とはタンニンの組成が違ふことが分つた。

これで見ると薮北には斑點 a, b が出現せず C-8, U-17 とはタンニン化合物の組成を異にするもののようである。

要 約

(1) ペーパークロマトグラフィによる茶葉タンニンの分離方法を設定するために、展開剤の選定、展開温度、展開剤の含水量について試験した。展開されたタンニンは硫酸第

- (1) M. TSUJIMURA: *Sc. Paper Inst. Phys. Chem. Res.*, 10, 253 (1929); 14, 63 (1930); 15, 155 (1931); 24, 149 (1934); 26, 186 (1935)
- (2) 大島康義: 農化, 6, 564 (1930); 9, 948 (1933); 11, 750 (1935)
- (3) 初見泰助: 昭和8年茶試事業成績報告, 105
- (4) W. B. DELIS: *Rec. trav. chim.*, 58, 805 (1939)
- (5) 佐竹一夫: 化學の領域, 3, No. 7, 2 (1949)
藤岡小太郎: 藥學, 3, 115 (1949)

Summary

To find a suitable method for separating tea tannin compound by means of paper chromatography, we researched on developing solvents, and selected *n*-butanol saturated with water as the

most favorable developing material among 7 solvents used, e. g., ethyl acetate, *n*-butanol, *iso*-butanol, amyl alcohol, benzyl alcohol, phenol and toluene.

We examined developing temperature and water content of the developing solvent, and found that the temperature had little influence upon the R_F values of tannin spots below 20° and the solvent saturated with water was better than that of lower water content.

We compared tannin composition of 3 tea varieties, i. e. C-8, 3 U-17 and Yabukita, and found that the tannin composition of Yabukita variety was clearly different from that of other two varieties.

生澱粉に對する黒麹アミラーゼ作用の研究 (第 1 報)

山 崎 何 恵, 上 田 誠 之 助 (九州大學農學部資源微生物學教室)

昭和 25 年 4 月 10 日 受 理

Action of Black-Koji-Amylase on Raw Starch. Part 1.

By Izue YAMASAKI and Seinosuke UEDA

(Lab. of Zymology and Indust. Fermentn., Kyushu Univ.)

緒 言 著者等はさきに生甘藷の無蒸煮による酒精醱酵の研究⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾に於て、生澱粉が糊化なしに黒麹アミラーゼにて充分糖化し得る事を知つた。生澱粉に對するアミラーゼの糖化作用は糊化澱粉に於ける程容易でなく、その抵抗性の原因につき多年にわたり種々議論されて來た。WEICHSEL⁽⁴⁾はその抵抗性は外層の Amylopectin にあるとし、GORTNER 等⁽⁵⁾は蛋白質、TAYLOR & SHERMAN⁽⁶⁾は脂肪にあるとした。又 SCHRYVER⁽⁷⁾は Hemicellulose にあるとした。最近 SCHWIMMER 等⁽⁸⁾は脾臓アミラーゼと *Aspergillus oryzae* の maltase との協力により比較的迅速完全に小麥澱粉を糖化し得るを見出し、生澱粉には以上の如き抵抗性物質は存在せぬと云う。又一方 STANDSTEDT 等⁽⁹⁾は特別に生澱粉消化因子を考慮している。

著者等は黒麹アミラーゼが黄麹、麥芽アミラーゼに比し生澱粉に對し特に強力に作用するを知つたので此のアミラーゼを使用して、生澱粉糖化機作を解明し、次で植物代謝機構を窺知せんとしている。先ず第 1 報に於ては黒麹アミラーゼと他アミラーゼとの糖化作用の比較、各種生澱粉に對する糖化の難易につき報ずる。

實 験 の 部

1. 實 験 方 法

イ、使用菌種及び麥芽 黒麹菌； 河内屋黒麹菌。黄麹菌； 當教室所有酒麹菌。 麥芽； 日本ビール門司工場の緑麥芽

ロ、製麹； 麴 20 g, 粳穀 2 g, 水 13 cc を 500 cc 三角フラスコにとり 20 封度 30 分殺菌し、麹菌 1 白金耳接種し 3 日間 30° に培養したものを麹として使用する。

ハ、酵素液； 麹（又は麥芽）10 g に水道水 100 cc, トルオール 0.5 cc を加えよく攪拌後 5 時間室温に放置し、そのまま濾過して酵素液として使用する。

ニ、實驗要領； 共栓付 300 cc 容三角フラスコに澱粉 1 g, 水 120 cc, $\frac{1}{10}$ M 鹽酸-枸橼酸ソーダ緩衝液 20 cc (pH 3.6) 酵素液 20 cc を加え 30°C の恒温器に入れ、1 日 1 回攪拌、所定時間後その一部を濾過し濾液につきマイクロベルトラン氏法により生成糖を定量し 1 g 澱粉よりの生成糖を葡萄糖 g 數にて示した。

攪拌の影響は別に報告する。

2. 豫備實驗 豫備實驗には甘藷澱粉を使用する。

イ、作用温度の影響； 30°C, 37°C, 47°C 又は 50°C につき試験した。結果は Table 1, 2 及び Fig. 1, 2 の如し。