- TOLLENS : *Ann.*, 206, 229.
- (5) STONE. TOLLENS : *Ber.*, 21, 2150 ; *Ann.*, 249, 227.
- (6) W. BEECROFT BOTTOMLEY : *Biochem. J.*, 9, 260 (1915).
- (7) M. TOKUOKA : *J. Tohoku Soc. Agr. Forestry.* 3, 72 (1938); *C. A.*, 33, 3055⁵.
- (8) G. MEUNIER : *Chim. et ind. special No.*, 553 (1929); *C. A.*, 23, 4062⁹; T. TAKAHASHI : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20, 553 (1944); *C. A.*, 42, 8166⁶.
- (9) M. POPP *Brenn. Chem.*, 1, 58 (1920); *C. A.*, 15, 372⁹.
- (10) A. SCHWEIZER : *Rec. trav. Chim.*, 57, 345 (1938); *C. A.*, 32, 5381⁴.
- (11) W. FUCHS : *Kolloid Z.*, 52, 351 (1930).
- (12) H. TROPSH *Gls. alk. Kenntn. Kohle*, 6, 214 (1921); *C. A.*, 18, 2872.
- (13) W. SCHEELE : *Kolloid Z.*, 72, 301 (1935); *C. A.*, 29, 7998⁵.
- (14) W. SCHEELE : *ibid.*, 73, 84 (1935), *C. A.*, 30, 268³.
- (15) W. SCHEELE *Kolloid Beih.*, 46, 368 (1937); *C. A.*, 32, 2003⁴.
- (16) I. UBALDIN : *Ann. chim. applicata*, 27, 94 (1937); *C. A.*, 31, 6203⁸.
- (17) R. SMITH : *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 512 (1935); *C. A.*, 29, 3137⁵.
- (18) I. UBADIN : *Brenn. Chem.*, 18, 273 (1937); *C. A.*, 31, 8540⁷.
- (19) M. PLUNGIAN : *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 528 (1935); *C. A.*, 29, 2924⁷.
- (20) S. TYOCMÉ *Ann. agron.*, 17, 346 (1947), *C. A.*, 42, 2043⁶.
- (21) I. ANTIPPOU : *Dokuchaev. Soil Inst. Studies in the Genetics and Geography of Soils*, 187 (1935); *C. A.*, 30, 5341⁴.
- (22) C. ENDERS : *Kolloid Z.*, 85, 74 (1938).
- (23) 八浜 リグニンの化学 (1941).

Zusammenfassung

Chemische Eigenschaften des Hefebuch befördernden Stoffs, "Bärmigens", welcher aus Malzkleie durch verdünnte Salzsäure hydrolysierter Lösung isoliert wurde, worüber der Verfasser in der II. Mitteilung berichtet hat, wurden versucht. Vergleich die Bildungsbedingungen, die Gestalten, die Löslichkeiten, die Oxydations-Zustände, und -Produkten, das Gleichgewichtsgewicht, die Elementanalyse und pH der Lösung des "Bärmigens" mit denselben der Huminsäure, hat der erste mit der letzten in Übereinstimmung gestanden, woraus festgestellt war, dass "Bärmigen" eine der Huminsäuren ist.

In den Versuche für Hefeflockung mit "Bärmigen", Würze-Huminsäure, Karamel, Melanoidin, Pyrogallol-Huminsäure, Hymatomelansäure war es imstande, jeder der Konz. γ /c.c. die Brauerei Hefe, die in Essigsäure-Puffer Lösung (pH 4.4) in 1.5% iger suspendiert wurden, stark in Flockung zu setzen.

林檎果肉の褐変現象 (其の 1) 果肉より Chlorogenic Acid 及び L-epi-Catechin の分離並に定量^{*(1)}

中 林 敏 郎 (九州大学農学部生物化学研究室)

昭和 28 年 7 月 3 日 受 理

Browning of Apple Fruit. Part. 1. Isolation and Estimation of Chlorogenic acid and L-epi-Catechin in Apple Fruit.

By Toshio NAKABAYASHI (Biocchem. Lab., Fac. of Agr., Kyushu University)

林檎の果実を剥皮して空气中に放置すれば褐変する事はよく知られた現象であり、これに就ては従来多数の報告⁽²⁾があり、果肉の褐変は果肉中の polyphenol 系物質が酸化酵素により酸化された為であると言われているが、この polyphenol 系物質が何であるかは未だ明かでない。

従来林檎より分離された polyphenol 系物質としては、C. E. SANDO⁽³⁾ が果皮より quercetin, hyperin, 及び idein を分離し、E. L. OVERHOLSER⁽⁴⁾ 等が果肉中にタンニンが存在する事を報告しているにすぎない。之に関連のある報告としては最近 A. E. BRADFIELD⁽⁵⁾ 等は林檎及び梨の若芽より L-epi-Catechin を分離

* 分配クロマトグラフ法によるタンニン及び色素の研究 第 19 報

Studies on Tannins and Pigments by the Method of Partition Chromatography. Part 19.

しており、G. JOHNSON⁽⁶⁾ 等は桃の果実より D-catechin 及び coffetannin を分離している。

著者は林檎果肉の褐変現象を明にする第一歩として先ずこの polyphenol 系物質を paper chromatography で検討した結果、新鮮果肉中には 2 種の polyphenol 系物質の存在する事を知り、この両者の分離を試みた結果 L-epi-catechin 及び chlorogenic acid を結晶状に得て確認し、この両者が果肉褐変の基質である事を明にすると共に、catechin を比濁法により、chlorogenic acid を比色法により分別定量して林檎の品質との関係について若干の考察を行った。

なお本研究の終了後近着の雑誌により A. C. HULME⁽⁷⁾ が林檎果実より chlorogenic acid を得た事を知り著者の得た結果と一致する事を知った。

実 験 の 部

1. 検 出 市販の完熟した林檎（国光）を剥皮及び除芯後、果肉を直ちに氷冷した 3 倍量の無水メタノールと共にブレンダーで磨砕し、濾過して得た黄色透明の濾液を炭酸ガス気流中で減圧下にメタノールを溜去して得たシラップに就て paper chromatography により polyphenol 系物質を検討した。即ち東洋濾紙 No. 2, 2×40 cm を用い *n*-BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 1 : 5 (vol. %) 及び 20% 水含有の phenol で上昇法で 30 cm 展開後 2% FeCl₃ メタノール溶液及び diazobenzene sulfonic acid 50% メタノール飽和液で polyphenol 系物質の spot を現像すれば 3 個の spot を認める (Fig. 1, a, I. II. III.). 之を相当すると考えられる polyphenol 系物質の *R_F* 値及び呈色と比較して Table 1 に示す。

Table 1. *R_F* Value and Color of Spots of Paper Chromatogram of Polyphenolic Substances in Apple Fruit. (see Fig. 1)

Apple fruit				Standard			
Spot No. of Fig. 1. a, b.	Developing solvent		H ₂ O	Substance	Standard		
	<i>n</i> -BuOH : AcOH* (color)				<i>n</i> -BuOH : AcOH* (color)	Phenol**	H ₂ O
	a.	b.	b.				
vi.		0.87 (P)	0.30	caffeic acid	0.86 (P)	0.56	0.30
II. ii.	0.67 (P)	0.67 (P)	0.65	chlorogenic acid	0.67 (P)	0.45	0.66
III. iv.	0.73 (YB)	0.73 (YB)	0.32	D-catechin	0.73 (YB)	0.49	0.32
v.		0.58 (YB)	0.24	D-epi-catechin	0.59 (YB)	0.40	0.23
iii.		0.72 (YB)	0.25	L-catechin	0.72 (YB)	0.48	0.26
I. i.	0.61 (YB)	0.62 (YB)	0.28	L-epi-catechin	0.62 (YB)	0.39	0.28
G.		0.40 (YB)	0.24	L-epi-gallocatechin	0.41 (YB)	0.21	0.24

Toyo filter paper No. 2

Developing solvent : * *n*-BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 1 : 5

** Phenol (20% H₂O)

Color of spot P : purple

Y : yellow

B : brown

Color of spots was developed with diazobenzene sulfonic acid

Table 1, Fig. 1 及び抽出液を加熱すれば III が減少して I が増加する事（即ち epimerization）並に果肉の酸化により I, II, III 共に減少し *R_F* 0.50 以下に尾を引いたタンニンの spot IV が出現する事 (Fig. 1. a) より、林檎果肉中には chlorogenic acid 及び D- 又は L-catechin 並に其の epimer と推定される少くとも 3 個の polyphenol 系物質が存在し、之が果肉の褐変の基質となつているものと考えられる。

2. 分 離 昭和 28 年 2 月市販の国光種林檎 20 個（約 3.07 kg）を 1 個ずつ剥皮及び除芯後、果肉を細切して直ちに 2 倍量の氷冷メタノール中に入れ、氷冷しつつブレンダーで磨砕し濾過する。残渣を更に 2 回同様に処理し、全部で 2.36 kg の果肉を処理し、全抽出液を合して濾過すれば黄色透明の濾液を得る。これを炭酸ガス気流中で減圧下にメタノールを溜去して得られた濃濁した濃厚水溶液を硅藻土の層を通して濾過し、濾液をクロロホルムで数回洗滌して黄色色素を除く。次に残液を醋酸エチルで反覆抽出し、醋酸エチル抽出液を脱水後減

圧下に炭酸ガス気流中で濃縮し、これに無水クロロホルムを滴下すれば褐色の沈澱を生ずる。液が白濁し始めたらクロロホルムの注加を止め、1週間冷蔵後生じた沈澱を集め、乾燥粉碎後、脂肪抽出器を用いエーテルで抽出する。エーテル抽出液は脱水後エーテルを溜去し、残渣を少量の水に溶かし骨炭で脱色後真空濃縮し冷蔵すれば粗結晶を得る。之を少量の水より再結晶すれば無色の板柱状結晶 78 mg (結晶 I) を得る。エーテル抽出残渣を少量の水に溶かし脱色後真空濃縮し冷蔵すれば白色の結晶塊を生ずる。これを少量の水より再結晶すれば白色針状結晶 52 mg (結晶 II) を得る。

3. Chlorogenic acid (結晶 II) の分析 結晶 II は白色長針状結晶で mp. 161°, FeCl₃ で緑色、これにアルカリを加えると褐色となる。又塩酸フォルマリン試薬により沈澱を生ぜず、paper chromatography の R_F 値はコーヒー実より得た純 chlorogenic acid⁽⁸⁾ と一致し、純 chlorogenic acid と混融しても融点の降下を認めない。

Anal. Found : C 52.72%, H 5.41%.

Calcd. for C₁₆H₁₈O₉ · 1/2 H₂O C 52.87%, H 5.27%.

結晶 II を無水醋酸と濃硫酸とでアセチル化すれば白色針状結晶を得る。mp. 177°, 純 pentaacetyl chlorogenic acid と混融しても融点の降下を認めない。よつて結晶 II は chlorogenic acid である。

4. L-epi-Catechin (結晶 I) の分析 結晶 I は無色の板柱状結晶で mp. 235~238°, FeCl₃ で緑色、塩酸フォルマリン試薬で白色沈澱を生じ paper chromatography の R_F 値は Table 1 の I、及び Fig. 1 の I に一致する。

Anal. Found : C 49.34%, H 6.09%. Calcd. for C₁₅H₁₄O₆ · 4H₂O : C 49.72%, H 6.12%.

しかるに C₁₅H₁₄O₆ の分子式を有する catechin には D, L 及び其の epimer の 4 個の異性体が存在し、其の光学的異性の決定は最終的には旋光度測定によるべきであるが、試料が少く測定が不能である為、後に述べるように paper chromatography による考察を行った結果、結晶 I が L-epi-catechin に一致する事を知った。そこで茶葉より L-epi-catechin⁽⁹⁾ (mp. 236~238°) を得、結晶 I と混融するも融点の降下を認めず、paper chromatography の R_F 値も一致する。よつて結晶 I は L-epi-catechin である。

5. 果肉 Polyphenol 系物質の二次元 Paper-chromatography Table 1 より判るように catechin 及び epi-catechin の対応する D 及び L の光学的異性体 (optical antipode) の R_F 値は極めて近接し、通常の有機溶媒を用いる paper chromatography によつてはこれらを明確に分離確認する事は困難である。

1953 年 E. A. H. ROBERTS⁽¹⁰⁾ は茶葉中の各種 catechin 類の optical antipode が水を展開溶媒とする paper chromatography により分離される事を報告している。

著者は結晶 I の光学的決定を行うと共に林檎果肉中の polyphenol 系物質を精査する為に、ROBERTS の方法に従つて二次元 paper chromatography を行った。即ち果肉抽出液の醋酸エチル濃縮液に就て東洋濾紙 No. 2, 40×40 cm を用い、最初 *n*-BuOH : AcOH : H₂O = 4:1:5 で 30 cm 上昇展開後、次に水を以て直角の方向に同様に展開し、diazobenzene sulfonic acid で現像すれば Fig. 1. b の如き chromatogram が得られ、5 個 (i. ~v.) の spot が検出される。結晶 I は同様な操作により i に相当する事を知った。又醋酸エチル濃縮液をガラス管に封じ 130° で 1 時間加熱後、同様に操作して得た chromatogram では i, ii 及び iv が減少して iii 及び v が増大し、新しく vi の spot が出現する。これは catechin 類の epimerization 及び chlorogenic acid の加水分解が起つている事を推測せしめる。

Fig. 1. The Paper Chromatogram of Polyphenolic Substances in Apple Fruit.

○ secondary product.	○ no existence in apple fruit.
→ epimerization.	→ hydrolysis.
i : L-epi-catechin	v : D-epi-catechin
ii : chlorogenic acid	vi : caffeic acid
iii : L-catechin	G : L-epi-gallocatechin
iv : D-catechin	

Catechin 類の異性化は FREUDENBERG⁽¹¹⁾ によれば次のようになる。

即ち L-catechin と L-epi-catechin は相互に変移し得るが D-catechin はただ D-epi-catechin に変移するのみである。

更に D-catechin (阿仙葉より抽出), D-epi-catechin⁽¹¹⁾ (D-catechin 5 g を重炭酸加里 15 mg, 水 10 cc と共に封管中で 6 時間 130° に加熱後分別結晶により調製), L-epi-catechin⁽⁹⁾ (茶葉より抽出), L-catechin⁽¹¹⁾ (L-epi-catechin を封管中に 130° で 1 時間加熱して調製), L-epi-gallocatechin⁽¹²⁾ (茶葉より抽出), chlorogenic acid⁽⁸⁾ (コーヒー実より抽出), 及び caffeic acid⁽¹³⁾ (protocatechualdehyde より合成) を用いて同様に二次元展開を行い, 得られた chromatogram, R_f 値 (Table 1) 及び既述の epimerization の性質とを考え合せて Fig. 1. b の各 spot を次の如く固定した。

i: L-epi-catechin	ii: chlorogenic acid	iii: L-catechin
iv: D-catechin	v: D-epi-catechin	vi: caffeic acid

以上の結果を総合すれば新鮮な林檎果肉中には chlorogenic acid, L-epi-catechin 及び少量の D-catechin

が存在し, 抽出加熱等の操作により L-catechin, D-epi-catechin 及び caffeic acid が二次的に生ずると考えられる。

6. 果肉の酸化酵素による chlorogenic acid 及び catechin の酸化 林檎果肉 (約 150 g) を 2 倍量の氷冷した無水アセトンと共に氷冷しつつブレンダーで磨砕し濾過, 残渣を更に 2 回 70% アセトンで処理後真空乾燥すれば白色の軽い粉末 (約 5 g) を得, これを酸化酵素剤として用いた。之は catechol に対し原果肉の約 1/2 の酸化力を残有し, その酸化力は食塩の添加により阻害されるから, 本酵素剤中には林檎果肉を褐変せしめる酸化酵素が存在する。

WARBURG の検圧法により chlorogenic acid, catechin 及び数種の polyphenol 系物質に対する作用を検討した。即ち酵素剤 5 mg を磷酸-枸橼酸緩衝液 (pH 4.8) 2.5 cc に懸濁し, 基質溶液 0.5 cc を $5 \times 10^{-5} M$ の濃度になるように添加し 30° で酸素の吸収を測定した結果を Fig. 2 に示す。

本酵素剤中の酸化酵素の諸性質に就ては後に報告するが, 本酸化酵素は polyphenol oxidase に属し特に catecholase activity が顕著であり, catechol, catechin 及び特に chlorogenic acid を速かに酸化し反応液は褐色となるから, 果肉の褐変は果肉中の catechin 及び chlorogenic acid が果肉中の polyphenol oxidase

Fig. 2. O_2 uptake of some polyphenolic substances during the oxidation by the polyphenol oxidase of apple fruit.

polyphenols: $5 \times 10^{-5} M$. temp.: 30° McILVAINE buffer: pH 4.8

により酸化される為に起る事は明かである。

7. **Catechin の比濁定量法** 上述のように著者は林檎果肉中に chlorogenic acid 及び catechin 類の存在する事を明かにしたが、これらの含量が林檎の品質と関係があるか否かを検討する為に此の両者を分別定量した。

Catechin 定量の為には先に大島及び著者⁽¹⁴⁾が茶葉 catechin の定量の際に用いた比濁法を適用した。各種濃度の D-catechin 溶液 (D-catechin 5~60 mg/100 cc) 5 cc に塩酸-フォルマリン試薬 (35% HCl 100 cc, 30% フォルマリン 200 cc 及び水 50 cc の混合液、以下 HCl-For. 試薬と略記) 5 cc を加え振盪後 1 時間放置し生じた白濁を D-catechin 溶液 (50 mg/100 cc) に等量の HCl-For 試薬を加え 1 時間放置したものを標準として DUBOSCQ 型 nephelometer を用いて測定すれば Fig. 3 の如き標準曲線が得られ、catechin 濃度が 5~50 mg/100 cc の間では直線関係が得られるから試料濃度をこの範囲に希釈して測定した。

8. **Chlorogenic acid の比色定量法** 先述のように chlorogenic acid は HCl-For 試薬では沈澱せず其の濾液に残存するから、先に大島及び著者⁽¹⁵⁾が茶葉中の gallic acid の定量に用いた比色法が適用出来る。各種濃度の chlorogenic acid を含む溶液 (0.5~2.5 mg/cc) に等量の HCl-For. 試薬を加え、1 時間半の後乾燥濾紙で濾過、透明な濾液 2 cc に 20% Na_2CO_3 4 cc を加えて振盪後 5% 磷モリブデン酸水溶液 2 cc を加え全液を 10 cc とし、5~30 分の間に PLUFRICH photometer を用い S 73 の filter で液層の厚さ 1 cm の時の吸光度 (ϵ_{73}) を測定すれば Fig. 4 の如き標準曲線を得、之より HCl-For 試薬を加える前の試料溶液 5 cc 中の chlorogenic acid の濃度は実験式

$$\epsilon_{73} 0.1 = 0.278 \text{ mg/5 cc chlorogenic acid}$$

より求められる。よつて試料濃度を 2.5 mg/5 cc 以下に希釈して測定した。

Fig. 3. Nephelometric determination of catechin.

r : nephelometric ratio

Fig. 4. Colorimetric determination of chlorogenic acid.

PLUFRICH photometer. Filter : S 73. 1 cm. thick.

9. **林檎の品質と chlorogenic acid 及び catechin 含量との関係** 従来の知見によれば林檎の品質及び熟度は其の糖及び有機酸の含量により判定されるから数品種の林檎果実に就て糖及び有機酸を定量し之を catechin 及び chlorogenic acid の含量と比較して品種との関係を検討した。供試試料は市販の国光、紅玉及び印度の 3 品種に就て、剥皮除芯後果肉を 2 倍量の氷冷メタノールと共に氷冷しつつブレンダーで磨砕し吸引濾過、残渣を更に 3 回 70% メタノールで同様に抽出し全濾液を合し炭酸ガス気流中で減圧下に濃縮して 100 cc とし、これを乾燥濾紙 (No. 4) で濾過して透明な濾液を得る。之について還元糖は BERTRAND 氏法により葡萄糖として、非還元糖は塩酸で加水分解後 BERTRAND 氏法により転化糖として、有機酸は brom thymol blue と neutral red の混合指示薬を用い 1/10 N NaOH で滴定し林檎酸として、catechin は比濁法で、chlorogenic

acid は比色法により定量した。其の結果を Table 2 に示す。なお catechin 定量の際林檎抽出液に HCl-For 試薬を加えると試料により漸時桃赤色を呈するものがあり、純 catechin 及び chlorogenic acid のみではかかる呈色を示さないから、之は林檎果肉中に leucoanthocyan の如きものが存在し、之が HCl-For 試薬によつて呈色するものと考えられ、この色調は chlorogenic acid の濃度とは必ずしも比例しない。唯 Table 2 中国光種の中に特に赤色の著しいものがあり chlorogenic acid の含量がやや多くなつてゐる。

Table 2. The Contents of Catechins, Chlorogenic Acid, Sugars, and Organic Acid of some Apple Fruits.

Species (Japanese name)	Weight of fruit (g)	Tested fresh (g)	Water (%)	Catechin (mg%)	Chlorogenic acid (mg%)	Glucose (%)	Invert sugar (%)	Malic acid (mg%)
Kōgyoku	199.57	110.72	89.39	85.3	37.9	6.60	1.24	357.0
Indo	206.81	142.73	85.67	50.9	37.5	7.10	3.64	96.3
Kokkō	166.09	108.07	84.45	75.5	80.3	8.56	2.72	358.4
Kokkō	111.40	78.95	86.38	98.3	64.8	7.83	3.29	356.4
Kokkō	105.00	75.21	86.23	110.4	78.2	8.96	2.46	278.8

Table 2 より林檎果肉中の catechin 及び chlorogenic acid の含量は各品種のみならず各個体によつても相違し、糖及び有機酸の含量即ち林檎の品質との間には特別の関係は認められない。之は供試品種及び個体数が少い事に起因すると共に市販品を用いた為、産地、採取時期、熟期及び樹別等の生物学的諸条件が不明な為と考えられ、この点については今後品種別並に成熟に伴う成分の変化等について詳細な研究を行う必要があると考えられる。

本研究を行うに方終始御指導を頂いた本研究室の大島康義教授に深く感謝すると共に実験の一部を援助して頂いた熊本大学薬学部の中林志郎氏及び貴重な資料を頂いた名古屋大学農学部の瓜谷郁三氏に謝意を表する。

- (1) 中林：昭和 28 年 5 月日本農化会西日本支部総会で発表。
- (2) M. W. ONSLOW : *Biochem. J.*, 14, 541 (1920), 15, 113 (1921).
- (3) C. E. SANDO : *J. Agr. Research*, 28, 1243 (1924).
- (4) E. L. OVERHOLSER and W. V. CRUESS : *Calf. Agr. Exp. Sta., Tech. Paper*, 7, 40 (1923).
- (5) A. E. BRADFIED, A. E. FLOOD, A. C. HULME, and A. H. WILLIAMS : *Nature*, 170, 168 (1952).
- (6) G. JOHNSON *et al.* : *Food Research*, 16, 169 (1951).
- (7) A. C. HULME : *Biochem. J.*, 53, 337 (1953).
- (8) 瓜谷, 村松 : 農化, 27, 29 (1953).
- (9) 大島 : 農化, 12, 1 (1936).
- (10) E. A. H. ROBERTS and D. J. WOOD : *Biochem. J.*, 53, 332 (1953).
- (11) K. FREUDENBERG und L. PURRMANN : *Ann.*, 437, 274 (1924).
- (12) TUJIMURA : *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res. (Tokyo)*, 24, 149 (1934).
- (13) *Organic Reaction*, Vol. 1, 250.
- (14) 大島, 中林 : 農化, 26, 373 (1952).
- (15) 大島, 中林 : 農化, 26, 377 (1952).

Summary

By the method of two-dimensional paper chromatography of the polyphenolic substances in apple fruit, three spots were detected, i.e., L-epi-catechin which was epimerized to L-catechin by heating, D-catechin which gave a small spot and was epimerized to D-epi-catechin, and chlorogenic acid which was hydrolized to caffeic acid (Fig. 1).

In these, L-epi-catechin and chlorogenic acid were isolated in crystalline form from fresh apple fruit (Kokkō). These were expectedly oxidized by polyphenol oxidase of apple fruit (Fig. 2).

Catechins were estimated by nephelometry (Fig. 4), and chlorogenic acid was estimated by colorimetry (Fig. 4), and the relation was studied between the contents of these polyphenols and the quality of apple fruit, but no evidence was obtained (Table 2).