ン)を挟んで chelation をなす機構にある事を良く証明するものと考える。

終りに悔み御指導御鞭撻を頂いた恩師東大名誉教授飯田貞治郎博士、東大教授住木諭介博士に謹んで謝意を表するとともに研究費の大部分を文部省自然科学研究費に仰いだ事を記して深く感謝する次第である。

(1) 玉利勤治郎, 加治 順 農化, 27, 1000 (昭28).

(2) 北川松之助, 白川正治: 農化, 22, 115 (昭23); 白川正治: 同, 23, 361 (昭24)

Summary

1) In the previous paper (Part 1) authors reported on the effect of 2-methylpyridine-4-carboxylic acid on the respiration of rice seedling on the consideration that the injurious action of this acid on plant-growth must be identical with that of fusarinic acid based on its chemical structure, namely the injurious action of this acid to be due to its intermolecular chelation with metal ion such as Fe^{+++} , Cu^{++} etc. in plant tissue, which is essentially necessary for the formation of Feoporphyrin oxidase, and, it was authenticated that the type of injurious action of this acid on plant respiration is entirely identical with that of fusarinic acid. Continuously to Part 1 in this experiment authors further investigated the injurious effect of 2-methylpyridine-4-carboxylic acid on the formation of catalase and peroxidase in rice seedlings and authenticated that the type of the injurious action of this acid is entirely identical with that of fusarinic acid. Then, in regard to the intensity of injurious action, fusarinic acid had higher power than 2-methylpyridine-4-carboxylic acid. This was ascribable to the intensity of chelation power of these acids.

2) Authors recognized 2-methylpyridine-4-carboxylic acid was to be entirely deprived of its injurious action on the function of crystalline catalase by the esterification of its carboxyl group in the same way as fusarinic acid.

We assert this fact to be the authentication for our conclusion that the injurious effect of this acid on the catalase action bases on the function of its carboxyl group namely, on the mechanism, this carboxyl group chelates by holding metal ion (Fe^{+++}) between N atom in pyridine nucleus.

茶葉の Anthoxanthin に関する研究 (第1報)

Anthoxanthin の分離*

滝野 慶 則, 今 川 弘 (東京教育大学農学部生物化学研究室),

吉 田 宏 之 (埼玉県農試茶葉支場)

昭和27年10月6日受理

Studies on the Anthoxanthins in Tea Leaves. Part 1: Isolation of the Anthoxanthins.
By Yoshinori TAKINO, Hiroshi IMAGAWA (Biochem. Laboratory, Faculty of Agriculture,
Tōkyō University of Education) and Hiroyuki YOSHIDA (Branch of Tea Research,
Saitama Agricultural Experimental Station).

茶葉の anthoxanthin 類は製茶の主要品質の一つである水色に密接な関係を有し、其の含有量は茶樹の選別に当り一つの基準となつている⁽¹⁾。然るに其の本体は未だ充分明かにされていない。茶葉中の anthoxanthin に関

* 茶葉の生化学的研究 第1報

本報文の要旨は昭和27年4月4日、日本農芸化学会大会にて講演した。

して今日迄に分離されたものは quercetin と kaempferol の2種の flavonol である。Quercetin は古くから HLASIWETZ⁽²⁾ 及び DEUSS⁽³⁾等によつてアッサム茶葉中に見出され、大島⁽⁴⁾及び辻村⁽⁵⁾氏等は之が支那種中にも存在する事を認めた。Kaempferol は大島・何⁽⁴⁾氏によつて台湾在来の支那種から分離されたが、又日本緑茶中にも存在する事が辻村氏⁽⁵⁾によつて報告された。然し之等は aglycone であつて茶生葉中に於ては HLASIWETZ 等⁽⁶⁾並に DEUSS⁽³⁾も quercetin に就て述べているように、其の大部分は配糖体をなしているものと推考されるが、如何なる配糖体であるかは詳かでない。最近 ROBERTS 等⁽⁷⁾はアッサム種に就き paper chromatography によつて anthoxanthin に属すると推測される12種類程の spots を認めた事を報じ、其の位置から rutin 及び quercitrin の存在を推定している。

著者等は支那種系統の數北種の茶葉を用いて色素配糖体の分離精製を試み、3種の anthoxanthin を分離する事が出来たので報告する。

実 験 の 部

1. 供試茶葉 埼玉県農試茶葉支場茶園に栽培されている緑茶用の奨励品種の一つである數北種の春葉 (昭和26年5月中旬摘採) 及び秋葉 (昭和26年11月中旬摘採) を使用した。

2. 色素の分離 3~4 葉摘した數北種の茶葉を60秒蒸熱して酵素を不活性化した後乾燥粉碎して1mmの篩を通す。秋葉粉末は春葉に比較して黄色が強い。之に約4倍量の醋酸エチルを加えて60°の湯浴中に1時間宛数回反復抽出して、醋酸エチルに可溶性の catechin 類の大部分を除去する。其の際色素の多くは抽出せられずに残存する故に此の残渣を色素分離の試料とする。即ち残渣に5倍量の水を加えて沸騰した湯浴中に1時間半宛加熱抽出を繰返し、熱時濾過して得られる熱水抽出液を合して濃縮しシラップ状となす。之に methanol を加えて生ずる沈澱を除去し、methanol 溶液を減圧濃縮する。シラップ状の残渣に再び methanol を添加して沈澱物を除去した後減圧濃縮して methanol を溜去する。此の濃縮物を水に溶解して醋酸エチルにて数回反復振盪して混在する catechin 類を除去し、水層中に溶存する醋酸エチルを溜去した後 *n*-butanol と反復振盪して色素を butanol 層に移す。Butanol 層を合して減圧濃縮すれば黄色微粒状沈澱を生ずる。収量は茶葉粉末の醋酸エチル抽出残渣 400g から春葉の場合 2g (I), 秋葉の場合 3.6g (II)。

此等の色素沈澱を paper chromatography にて検する時は鉄塩溶液によつて尙僅かに青紫色の tailing を示して夾雑物の存在が認められるので、更に精製する為に之を水に溶解し20%醋酸鉛溶液を加えて生ずる沈澱を除き、其の濾液に NH_4OH を加えて塩基性とする。生ずる橙黄色沈澱を methanol に懸濁させ H_2S で分解して鉛を除去し、濾液を減圧濃縮して methanol を溜去する。濃縮物を少量の水に溶解し *n*-butanol にて反復抽出して butanol 層を減圧濃縮すれば黄色微粒状の色素の沈澱を生ずる。収量は先の粗沈澱色素 1g から 200mg。春葉及び秋葉からの色素製品をそれぞれⅢ及Ⅳとする。

3. 分離した色素製品の Paper Chromatogram 斯様にして得られた黄色微粒状の色素製品は、何れも水に極めて溶解し易く、其の水溶液は丁度緑茶浸出液と同様の水色を呈する。Methanol 溶液を Mg 及び塩酸で還元すれば深紅色を呈し、精製したものは殆んど Fehling 溶液を還元しない。之等の色素に就き paper chromatography を適用してそれぞれ単一の物質から成るかを吟味し、又 chromatogram 上に於て如何なる位置を示すかを試験し Table 1 の結果を得た。展開条件は次の通りである。

使用濾紙 東洋濾紙 No.2, 長さ 22cm.; 原点 位置は紙辺から 3cm., 直径6mm.; 試料濃度: 約2%; 展開剤: *n*-BuOH : AcOH : H_2O (4 : 1 : 5) 及び phenol (水飽和); 展開法: 室温 (10—15°) で上昇法により原点から 18cm. 迄展開した.; 呈色試薬: 1% 鉄明礬水溶液。

Table 1. Analysis of Pigment Preparations by One-dimensional Paper Chromatography.

Developing Solvent	Sample	Sign of Spot	R_F	Color
BuOH : AcOH : H_2O (4 : 1 : 5)	Pigments Ⅲ	b	0.44	Brown
		c	0.38	Green
	Pigments Ⅳ	a	0.48	Green
		c	0.38	Green

之等の spots は何れも ammonia 蒸気又は塩基性醋酸鉛溶液の噴霧では黄色を呈する。色素Ⅲは春葉から得られた anthoxanthin で、之には2個の顕著な spot が認められ一つは褐色、他は緑色を呈する。之に対し興味ある事は秋葉から分離された

Phenol (saturated with water)	Pigments III	{b	0.55	Brown
		{c	0.35	Green
	Pigments IV	{a	0.44	Green
		{c	0.35	Green
Pigments III...Anthoxanthins prepared from spring tea leaves.				
Pigments IV...Anthoxanthins prepared from autumn tea leaves.				

色素Ⅳに就ては褐色を呈する部分は極めて微弱で、別に緑色を呈する spot が butanol を展開剤とした場合に其の上方に出現する事である。下方の緑色 spot は何れにも顕著である。

以上の結果により茶葉から分離された色素製品中には少くも 3 種の色素成分が存在する事が判る。

4. Silica-gel column による Anthoxanthin の分別 春葉及秋葉から分離された微粒状の色素製品は何れも少くも 2 種以上の成分を含む故、之等を分別単離する為に Silica-gel column による partition chromatography を適用した。

(1) 装置 内径 3cm 長さ 40cm の硝子管 (下端は漏斗型をなす) の底部に目皿板をはめ濾紙を敷く。上部にはゴム栓を介して分液漏斗を取付け、分液漏斗の上部と column 管の上部は硝子管を連結し、且之より圧力を加え得る如く装置する。加圧装置としては簡便の為にキップの装置を用い、之にゴム栓を介して硝子管を立て其の下端を塩酸液中に挿入して管内の適當の高さに塩酸の液面が来る様にすれば常に一定の圧力を加える事が出来る。

(2) 分別操作 市販の和光製粒状 Silica-gel を軽く磨砕して篩別し 120~200mesh の粒子を集め、之を稀硫酸に懸濁して KMnO_4 溶液を加え暫く放置する。過剰の KMnO_4 を SO_2 にて還元脱色した後濾過して水洗する。更に塩酸次に熱湯に浸漬した後冷水にて充分洗滌し 110~120° に乾燥する。冷後其の 80g を取り之に水 54cc を加え更に水を飽和した *n*-butanol 200cc に懸濁して気泡の入らぬように注意して column 用硝子管に注入する。Gel が沈降して butanol の液面が gel 層の上面に達する直前に試料 150mg を *n*-butanol (水飽和) に溶解した液を注加して分液漏斗を取付ける。試料を溶解した butanol 溶液が gel 層に殆んど透過した時、分液漏斗のノックを適宜の開度に調節して水飽和 *n*-butanol を流下せしめて僅かに加圧し、展開剤の流出する速度は毎分 2.0cc に保つ。色素成分が gel column を降下して其の先端が流出する時から流出液を 5cc 宛試験管に分取し、色素が完全に流出し終る迄継続する。得られた各 fraction に就き paper chromatography により其の成分を検する。

先に分離した微粒状色素沈澱Ⅲ及びⅣに就き分別した結果は Fig. 1 の通りである。単一で同一 R_F の fraction

Developing solvent : *n*-BuOH : AcOH:H₂O (4 : 1 : 5)
Color reagent : 1% solution of aqueous iron alum.
Procedure Ascended 18cm long from the original spot
at ordinary temp. (10°C).

Fig. 1. Paper chromatogram of each fraction, separated by the method of partition chromatography on silica-gel column.

のみを合し〔沈澱Ⅲに於ては第 5~9 fraction (B の部分) 及び第 17 以降 (C の部分) ; 沈澱Ⅳに於ては第 3~9 fraction (A の部分) 及第 17 以降 (C の部分), butanol を溜去すれば 3 成分は単離される。斯くして B 及び C は黄色微粒状粉末として得られ、A に就ては butanol を溜去した後水に溶解して濃縮冷却すれば淡黄色針状結晶を析出する故、更に数度再結晶を繰返す。

5. 単離した色素の Paper Chromatogram 之等の 3 種の色素並に比較の為に純 rutin に就き BuOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 5) 及び phenol (水飽和) を展開剤として paper chromatography を行い Table 2 の結果を得た。展開条件は先と同様である。

Table 2. R_F values of Tea Leaf Anthoxanthins and Rutin.

Anthoxanthin	R_F -value*		Color
	BuOH : AcOH : H ₂ O	Phenol	
A	0.48—0.52	0.43—0.45	Green
B	0.44—0.46	0.54—0.57	Brown
C	0.38—0.42	0.34—0.36	Green
Rutin	0.48—0.52	0.43—0.45	Green

* Range of R_F -values, obtained by several repeated experiments.

H, 5.42%.

6. 色素構成成分の検索 各色素A, B及びCの構成成分, 即ち aglycone 及糖成分を検索する為それぞれ 5%硫酸と沸騰水中に1時間加熱して加水分解を行つた。分解中に aglycone が結晶状に析出する。冷却後濾別し、濾液は BaCO₃ を以て硫酸を除去した後濃縮し、aglycone は methanol に溶解して BuOH : AcOH : H₂O

Table 3. Constituents of Tea Leaf Anthoxanthins.

Anthoxanthin	Aglycone	Sugar component	
		Glucose(+)*, Rhamnose(+)	Glucose(++), Rhamnose(+)
A	Quercetin	Glucose(+)*, Rhamnose(+)	Glucose(++), Rhamnose(+)
B	Kaempferol	Glucose(+), Rhamnose(+)	Glucose(++), Rhamnose(+)
C	Quercetin	Glucose(+), Rhamnose(+)	Glucose(++), Rhamnose(+)

* Marks (+) and (++) (more remarkable) represent the intensity of color of spots on the paper chromatogram.

に示す構成成分が検出された。

Anthoxanthin A は quercetin を aglycone とし糖成分として glucose 及び rhamnose が検出せられ、先の分析結果、融点測定及び rutin との混融結果を総合して rutin に一致するものと判定される。Anthoxanthin B は kaempferol を、C は quercetin をそれぞれ aglycone とし、何れも糖成分として glucose 及び rhamnose を含むものと推測される。A 及び rutin の加水分解液に就ては glucose と rhamnose の spot は同程度の強さの呈色を示すが、B 及び C の加水分解液に於ては何れも同じように rhamnose に比較して glucose の spot の呈色が強い事が注目される。

考

察

薮北種の春葉及び秋葉を用いて anthoxanthin の分離を試み3種の色素を分離したが、中1種は rutin に一致する。最近 ROBERTS 等⁽⁷⁾はアッサム種に就き paper chromatography により rutin の存在を報告しているが、著者等は薮北種から之を分離して確認する事が出来た。

興味ある事は葉の発育時期によつて含有される色素に消長のある事が推測される事である。即ち色素Cは春葉及び秋葉の何れからとも相当程度に分離されるが、他の2種の色素に関しては5月中旬の伸育期の春葉からは色素B即ち恐らく kaempferol 配糖体が多く得られ rutin が少いのと比較して、11月中旬の成熟後の硬化葉からは rutin が多く得られ逆に色素Bが極めて少い。然しかような葉中色素の時期的消長の問題に関しては更に定量的に検討しなければならず詳細は今後の研究に俟つ。最近服部氏等⁽⁹⁾がカラタチの葉の flavonoid に関して摘葉時期により naringin, poncirin 及び rhoifolin の含有に消長のある事を報じている点を考え合せて興味深い。

尙未決定の茶葉 anthoxanthin B 及びCの構成成分の確認並に色素の構造に関しては目下研究実施中で次の報告に俟つ。

要

約

1. 薮北種の茶葉から3種の anthoxanthin (A, B, C) を分離した。中1種(A)は淡黄色針状結晶をなし rutin に一致する。他の2種の色素は paper chromatography によりそれぞれ kaempferol (B) 又は quercetin (C) を aglycone とし、糖成分として共に glucose 及び rhamnose を含むものと推測される。

2. 之等の色素の paper chromatogram 上の位置を判別する事が出来た (Table 2 参照)。

3. 春葉から主として色素B及びC、秋葉からは主として rutin 及びCが分離され葉の伸育に伴い色素含量に消長のある事が推測される。

本研究を行うに際して終始懇篤な御指導と御鞭撻を賜つた山本亮博士、大島康義博士、農林省改良局研究企劃

官上野健二氏並に種種御便宜を与えられた埼玉県農試茶業支場長太田義十氏に感謝の意を表する 尙本研究の費用の一部は農林省応用研究費によつた。

- (1) 山本亮：輸入農産物資の研究，277頁（1947）。
- (2) H. HLASIWETZ : *J. prak. Chem.*, 101, 109 (1867).
- (3) J. J. B. DEUSS : *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.*, 42, 623 (1923).
- (4) 大島康義，何芳陔：農化，12, 975 (1936).
- (5) M. TSUJIMURA : *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res. (Tōkyō)*, 38, 490 (1941).
- (6) H. HLASIWETZ and MALIN : *Jahres*, 1867, 732 ; 尙 A. E. BARDFIELD : *Chem. and Ind.*, 26, 242 (1946) 参照。
- (7) E. A. H. ROBERTS and D. J. WOOD : *Biochem. J.*, 49, 414 (1951).
- (8) N. WALIASCHKO : *Arch. Pharm.*, 242, 226 (1904) ; C. E. SANDO and H. H. BARTLETT : *J. Biol. Chem.*, 41, 495 (1920).
- (9) 服部静夫，長谷川正男，和田英之助，松田弘明：科学，22, 312 (1952) ; S. HATTORI and H. MATSUDA : *Arch. Biochem.*, 37, 85 (1952).

Summary

Three anthoxanthins (A, B and C) have been isolated from fresh tea leaves ("yabukita") ; viz. mainly B and C from spring leaves, but A and C from autumn leaves. One of them (A) has been obtained in pale yellow needles and identified as rutin. By the method of paper chromatography, the other two anthoxanthins have been supposed to be kaempferol- (B) and quercetin-glycoside (C), respectively, and to contain glucose and rhamnose as their sugar components. R_f -values of these anthoxanthins are shown in table 2.

樟腦 azulene に関する研究

小 幡 弥 太 郎, 福 士 俊 一 (北海道大学農学部農芸化学教室)

昭和 27 年 10 月 13 日 受 理

On the Azulene of Campher Blue Oil.

By Y. ORATA and S. FUKUSHI. (Dept. Agric. Chem., Hokkaido Univ.)

緒 論 精油の chromogen としての azulene の研究は A. E. SHERNDAL⁽¹⁾ に依つて初めて行われた。SHERNDAL は樟腦油，クベーベ油の azulene を分離し，これ等が hydrocarbone $C_{15}H_{18}$ である事を提示した。1923年 R. E. KREMER⁽²⁾ はノコギリ草の azulene を分離し，この水素添加物 $C_{15}H_{26}$ が無色の物質である事を報告した。一方 L. RUZICKA⁽³⁾⁽⁴⁾ 等はエレミー油等の数種の精油の sesquiterpene の脱水素反応生成物として azulene を得，之の前駆物質は cadalene，並びに eudalene 同様 sesquiterpene に外ならぬ事を究明し，此等 azulene の母体となる sesquiterpene 類即ち azulene 系 sesquiterpene (hydroazulene 型 sesquiterpene) について研究を進め，ついで azulene と cadalene 或は eudalene 等の naphthalene 誘導体との関係を明かにした。

1936年 PL. A. PLATTNER⁽⁵⁾ 等は樟腦木の sesquiterpenalcohol, guaialol 及びグエチパー油の sesquiterpene 等からの azulene について研究し，此等化合物の骨核に完全に脱水素した cyclopentacycloheptene 核を想定し，青色の guaiazulene，赤紫色の vetiazulene の 2 種の azulene の構造を決定し，前者に 1,4-dimethyl-7-isopropylazulene，後者に 4,8-dimethyl-2-isopropylazulene の式を与えた。

ついで PLATTNER⁽⁶⁾ 等は各種 azulene を合成して色と構造との関係を追究し，最近に至り guaiazulene⁽⁷⁾ の合成に成功した。而して PLATTNER の 1936 年の研究以来，各種 hydroazulene 型 sesquiterpene 及びそれ等