と思われる事をのべ、又純品を使用しての成績ではないが、

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2 \\ | \\ \text{H} \end{array} \text{C} \begin{array}{l} \text{S} \cdot \text{CH}_2\text{COOH} \\ \text{S} \cdot \text{CH}_2\text{COOH} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{H} \end{array} \text{C} \begin{array}{l} \text{S} \cdot \text{CH}_2\text{COOH} \\ \text{S} \cdot \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$$
にも同じ作用があるらしい事にもふれた。即ち $\begin{array}{c} \text{R} \\ | \\ \text{R}' \end{array} \text{C} \begin{array}{l} \text{S} \cdot \text{CH}_2\text{COOH} \\ \text{S} \cdot \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$ なる構造の中、Rが鎖状の場合には coprecursor として有効なものが多いことを知つたので、本報に於てはRが環状の構造をもつ数例について coprecursor 作用をしらべたのであるが、cyclohexylidene bisthioglycolic acid を除いては、何れも coprecursor 作用はえられなかつた。cyclohexylidenebisthioglycolic acid を phenylacetic acid 又は phenylacetyl monoethanolamine と併用したものは、precursor 単独添加のものより培養最高力価は高いようであるが、上昇はむしろ幾分おくれるようである。

本実験とりまとめにあたり、種種有益なる御指導及び御示唆を賜つた東大、佐木教授、京大、田中正三教授に謹んで深甚なる謝意を表します。

(1) 若木, 朝比奈, 東門: 本誌, 掲載予定.	(5) HOLMBERG, B.: <i>Ing. Vetensk. Akad. Handl.</i> , No. 103, 5~75 (1930); C. A. : 25, 4, 3935.
(2) 同 上	(6) HOLMBERG, B.: <i>J. prakt. Chem.</i> , 135, 57~100 (1932); C. A. 27; 7043.
(3) BONGARTZ: <i>Ber. deut. Chem. Ges.</i> , 21, 478 (1888).	
(4) STONER, G.G., and DOUGHERTY, C.: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 63, 987~8 (1941).	

Summary

In our previous report, it has been ascertained that the compounds which have the structure of $\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ | \\ \text{R}_2 \end{array} \text{C} \begin{array}{l} \text{S}-\text{C}- \\ \text{S}-\text{C}- \end{array}$ in the molecules often indicate coprecursor effect if R₁ and R₂ are hydrogen atom or aliphatic radicals.

In this report, experiments have been done on the compounds which have the same fundamental structure as the above mentioned, and yet R₁ or R₂ are not aliphatic, but ring formed radicals. Coprecursor activity has been studied with the following five compounds.

Experimental results indicate that all the compounds except the last one have no coprecursor effect.

When $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array} \text{C} \begin{array}{l} \text{S} \cdot \text{CH}_2\text{COOH} \\ \text{S} \cdot \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$ is added to culture broth together with precursors, the maximum potency is enhanced but the potency in the earlier cultural stage is lowered comparing with the control culture.

茶葉の Anthoxanthin に關する研究 (第 2 報)

摘採時期を異にした茶葉から 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 (埼玉県立農業試験場茶葉支場)

昭和 28 年 10 月 23 日 受理

Studies on the Anthoxanthins in Tea Leaves. Part 2. Isolation of the Anthoxanthins from Tea Leaves in Various Seasons.

By Yoshinori TAKINO, Hiroshi IMAGAWA (Biochem. Laboratory, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education)

and Hiroyuki YOSHIDA (Branch of Tea Research, Saitama Agricultural Experimental Station)

先に著者等⁽¹⁾は茶葉の anthoxanthin 即ち黄色色素に就て攻究し、「やぶきた」種の茶葉から 3 種の色素を分

* 茶葉の生化学的研究 第 2 報

本報文の要旨は昭和 28 年 4 月 6 日, 日本農芸化学会大会にて講演した

離して、その中の 1 種は rutin に一致する事を確認したが、その後中林⁽²⁾もアッサム種系茶葉にその存在を報告した。然るに他の 2 種は極めて水溶性の高い色素で、その溶液はやや緑色を帯びた鮮明な黄色を呈し、優良製茶の水色に密接な関係を有するものと推測されて頗る興味が深い。得られた色素に就て構成成分を検索し、1 つは kaempferol の、他は quercetin の配糖体で、糖として glucose 及び rhamnose が検出される事、而も従来の多くの色素に比較して構成する糖の分子数が多いものと推測される事を見出した。由つて更に詳細にその本体を究める為に改めて純粋な色素製品を分離して準備するに際し、先の報告にも指摘したように春葉及び秋葉を用いた試験から、葉の伸育時期によりこれらの色素に消長があるように推考され、従つてその含量に応じて供試茶葉を選択する事が望ましいので、種種摘採時期を異にした葉を供試して色素の分離を試みて比較検討した。なおその間に上記の 3 種の色素の他に更に 2 種の色素の存在をも認めたのでこれらに就て報告する。

実 験 の 部

1. 供試茶葉 埼玉県農試茶業支場茶園に栽培されている「やぶきた」種の葉を使用し、次の如く時期別に摘採して供試した。即ち 1 番茶適期 (昭和 27 年 5 月中旬摘採) 及び同末期 (同年 5 月下旬摘採) の葉、2 番茶葉 (同年 7 月上旬摘採)、3 番茶葉 (同年 9 月上旬摘採)、秋の成熟葉 (同年 11 月中旬摘採) 並に冬の硬化葉 (昭和 28 年 2 月上旬摘採)。

2. 色素の分離 茶葉を醋酸エチルで抽出すると catechin 類及び chlorophyll の大部分が移行し、anthoxanthin は殆んど残存する。特に目的とする色素は醋酸エチルには溶解し難く、又中性醋酸鉛では沈澱し難いので、次の分離法を適用した。3～4 葉摘した茶葉を蒸熟後乾燥粉碎し、醋酸エチルにて加温抽出して catechin 類の大部分を除去し、残渣を色素分離の試料とする。残渣に methanol を加えて反復温浸して色素を抽出し、methanol を溜去後醋酸鉛を加えて生ずる沈澱を除く。濾液を ammonia で塩基性として生ずる色素類の沈澱を methanol に懸濁して硫化水素で分解し、methanol を溜去して色素の水溶液を得る。此の溶液中にはなお catechin 類が含まれるので少量の醋酸エチルと振つて之を除き、次に butanol と反復振盪すれば色素は butanol 層に移行する。秋葉又は冬葉のように rutin 含量の多い場合には、最初の 1～2 回の butanol 層を別にして、butanol を溜去して水に置換すると rutin の結晶が析出する。充分冷置して結晶を分つた母液は再び butanol と振盪して残存色素を転溶し、先の 2～3 回以後の butanol 液と合して濃縮すれば色素が微小な粒状に析出する。これを paper chromatography にかへ phenol を展開剤として検し、夾雑物殊に catechin 又はその酸化生成物と推定される物質の混在が認められる時は再び水に溶解し、更に醋酸鉛処理の操作から先と同様に反復する。これらの夾雑物の存否の判別には展開剤として phenol が BuOH-AcOH に勝る。後者の場合には夾雑物と色素の spot が近接重複してその混在を看過し易いが、phenol の場合にはその位置の開きが大きいので判別し易い。色素の収量は凡そ 0.2～0.3%。

3. 摘採時期別に調製した色素標品の Paper Chromatogram 前記各期別の茶葉を試料として上記の分離法によつて得られた色素標品を paper chromatography にかへ色素の組成を検した。使用濾紙：東洋濾紙 No. 2, 22×22 cm; 原点：位置は紙辺から 3 cm., 直径 6 mm; 試料濃度：2%; 展開剤：1 次元…phenol (水飽和), 2 次元…*n*-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5); 展開法 室温 (20～25°) で上昇法により原点から 18 cm 迄展開した; 呈色試薬：1% 鉄明礬水溶液。

葉の伸育期のものに於ては 1 番乃至 3 番茶葉を通じて鉄塩溶液にて褐色を呈する色素 B 及び緑色を呈する色素 C が最も顕著で、他に 3 種の色素の存在が認められる。その中緑色を呈する色素 A は前報に証明した rutin に相当する。然し 1 番茶末期には特に最下部の褐色を呈する色素 E が他の時期に比較して顕著であり、3 番茶の場合には色素 D が他の時期に比較して幾分濃厚であつた。然るに著しい相違が認められたのは秋の成熟葉並に冬期の硬化葉で、色素 B、D 等は著しく減少して褐色を呈する spot は極めて微弱となり、rutin 及び色素 C が大部分を占める。かような結果は葉の伸育並びに季節により含有色素の質及び量に消長のある事を示すもので、葉の生理作用と密接な関係があるものと思考される。

以上の結果を総合するに、「やぶきた」種の葉には少くも 5 種類の色素の存在が明確に認められ、その中で A、B 及び C の 3 種は特に顕著で、これらが恐らく茶葉 anthoxanthin の主体をなすものと思考されるが、詳細は各色素の構造及び性質を究めた上爾後の定量的研究に俟つ。

4. 色素の分別 かように摘採時期を異にする茶葉から分離した色素 fraction 中の構成色素の組成には時

Fig. 1. Paper Chromatograms of Anthoxanthin-fractions prepared from Tea Leaves in Various Seasons.

- (1) Growing leaves in the 1st (middle of May) and also in the 2nd crop-season (beginning of July).
- (2) Leaves in the late 1st crop-season (last decade of May)
- (3) Growing leaves in the 3rd crop-season (beginning of September).
- (4) Hardened leaves in late autumn and winter.

期別に差異があるので、その多寡に応じて各個の色素分離の試料を選択すればよい。例えば色素Cの分離材料としては冬期の茶葉が最も有利であり、色素Bに関しては伸育期の茶葉を供試しなければならない。然しそれにしても多少とも数種の色素が混在する事は免れないので、これらを相互に完全に分別しなければならない。その為に前報に記載した silica-gel column を用いる partition chromatography を適用し、水を飽和した butanol を溶剤として分別を行った。BuOH-AcOH-H₂O (4 : 1 : 5) を展開剤とした paper chromatogram 上に於て R_F の差が比較的大きい色素同志の場合にはこの操作でよく分別されるが、近接している場合には初回の分割溜出液に就き更に数回反復操作しなければならない。

分別の最も困難なのは色素CとEであつて、両者は butanol に対しては R_F が極めて近い為に、もともとEの少い試料を使用しても色素CからEを完全に除去する事は容易でない。然るにこの両者は phenol に対して R_F の差が大きいためを利用すればこれを完全に分離する事が可能である。即ち方形濾紙(東洋濾紙 No. 2) 30×50 cm の下辺より 4 cm の直線上に、上記の段階まで精製した色素Cの溶液を幅約 6 mm の帯状に塗抹し、phenol (水飽和)を用いて展開後、濾紙上の色素Cを含む部分だけを切り離し、これを ether 中に浸漬して phenol を洗い去る。然る後濾紙片を細断し、温水にて色素を抽出して濃縮する。なお斯る操作中に着色物質が生ずるので濃縮液を再び butanol と振つて目的の色素を転溶し、再度 silica-gel を用いて column chromatography を行えば色素Cは全く純粋となる。同様にして色素Eを精製する事が出来る。

単離した各色素の paper chromatogram 上の位置は Table 1 の如くである。展開条件は先と同様。但し各色素相互の関係を比較する為に同一濾紙上に各色素を併列して BuOH-AcOH 又は phenol を用いて一次展開を行った。

かように既に前報に報告した色素A即ち rutin, B 及びCの他に少量ではあるが、新に色素D及びEを単離しその存在を明かにする事が出来た。色素Dは paper chromatogram 上に於て BuOH-AcOH 展開の場合には rutin の上部に、phenol 展開の場合には色素Bの上部に位置する。色素Eは BuOH-AcOH 展開の場合には色素Cの下端に近接して出現するが、phenol を用いれば大きく開いて上記5種の色素中最も高い R_F を示す。こ

Table 1. R_F -values of Tea Leaf Anthoxanthins.

Anthoxanthin	R_F -value		Colour(c)
	BuOH-AcOH(a)	Phenol(b)	
A(rutin)	0.56	0.47	Green
B	0.52	0.60	Brown
C	0.46	0.43	Green
D	0.58	0.67	Brown
E	0.44	0.74	Brown

(a) BuOH-AcOH-H₂O(4:1:5). (b) Phenol saturated with water. (c) Colour reagent 1% solution of aqueous iron alum.

Table 2. Constituents of Tea Leaf Anthoxanthins.

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

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

異にする kaempferol(3, 5, 7, 4'-tetrahydroxyflavone) 又は quercetin(3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxyflavone) を aglycone とする多種類の配糖体が存在し、而も何れの色素にも糖成分として glucose 及び rhamnose のみが検出され、色素により両種の糖の割合を異にする事⁽³⁾は生葉中に於ける色素の生成と関連して興味深い。

要 約

1. 摘採時期を異にした「やぶきた」種の茶葉を試料として、anthoxanthin の分離を試み、既報の 3 種の色素(rutin, 色素 B 及び C) の他に更に 2 種の色素(D 及び E) の存在を認め且つこれを分別した。その R_F は Table 1 に示す通りである。

2. これらの色素は E を除き kaempferol 又は quercetin の配糖体で、糖成分としていずれにも glucose 及び rhamnose が検出された。各色素の構成成分は Table 2 に示す通りである。

3. 全期を通じて得られた色素中主体をなすものは rutin, 色素 B 及び C で、B は専ら伸育中の葉に多く、rutin は寧ろ秋又は冬期の硬化葉に多い。色素 C は各期を通じて多量に含まれる。

本研究を行うに際し終始懇篤な御指導と御鞭撻を賜った佐橋佳一博士、山本 亮博士並に試料採取に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文部省科学研究費によつた。附記して謝意を表する。

(1) 滝野慶則, 今川 弘, 吉田宏之: 農化, 27, 150 (1953).

(2) 中林敏郎: 農化, 27, 274 (1953).

(3) 滝野慶則, 今川 弘, 吉田宏之: 農化, 23, 186, 190 (1954).

(4) 本研究第 1 報即ち文献(1) 参照。

Summary

Isolation of water-soluble anthoxanthins from tea leaves "Yabukita" in various seasons was carried out, and the presence of other two pigments (D and E) was recognized besides rutin, pigment B, and C, the report on which was made previously. R_F values of the isolated pigments are shown in Table 1. As it is shown in the result of paper chromatography on the hydrolyzed products these pigments, except E, now under study, were supposed to be glycosides of either kaempferol or quercetin, and moreover glucose and rhamnose were both detected as sugar components in each of them. The constituents of each glycoside are summarized in Table 2.

But the main anthoxanthins of the tea leaves seemed to be rutin, pigment B, and C. It is to be noted that seasonal changes in their content take place as is shown in Fig. 1. Pigment B was found mostly in growing leaves in spring and summer, whereas rutin accumulated in hardened leaves in late autumn and winter. Pigment C, however, was contained in considerable amounts in leaves at each stage of growth.

これらの色素の spot は ammonia 及び塩基性醋酸鉛では何れも黄色を呈するが、鉄塩に対する呈色を異にする。rutin と色素 C は暗緑色、他は褐色の系統であるが、それぞれ多少その色調を異にする。色素 B は鮮明な茶褐色、色素 D 及び E は赤味を帯びる。

5. 色素構成成分の検索 これらの色素を加水分解し、前報と同様に一応 paper chromatography を適用してその構成成分の検索を行い、Table 2 の結果を得た。

色素 E を除き、他の色素に於ては何れも構成糖成分として glucose 及び rhamnose の存在が認められ、色素 D では rutin の加水分解物と同様に両種の糖の spot の大きさ及び呈色の強度が同等であつた。色素 B 及び C に就ては続報⁽³⁾に詳記する。尙色素 E は比較的加水分解し難く目下検討中である。

かように同一茶葉中に phenol 性水酸基 1 個のみを