茶のクロロフィルの分離定量法*

農林省東海近畿農業試験場茶業部 古谷 弘三・鳥井 秀一

Determination of Chlorophyll in Tea

By Kôzô FURUYA and Hideichi TORII

1. ま え が き

茶の色沢に大きな影響を及ぼすと思われるクロロフィル^{1,2)}の定量法について研究を進めてきたが、その抽出条件、分離操作、測定方法について一応の結果を得ることができた。この定量法によれば、製茶中では、クロロフィル *a* は加熱の影響によつて大部分変化してクロロフィル *a* の形では存在せず、その分解物の一つである phaeophorbide *a* と思われる物質となつていることが、初めて明らかになった。

クロロフィルの定量法は WILLSTÄTTER 以来種々の方法が案出されているが、近年になつて、波長 660m μ 附近にあるクロロフィルの吸収の山を利用した、A. O. A. C. 公定法³⁾および C. L. COMAR, E. P. ZSCHEILE⁴⁾ の分光光電法が発表されている。これらの測定法を一応比較検討すべきであるが、基準となるクロロフィルを未分解の形で単離することが非常に困難であるため、理論的に最も妥当と考えられ、また *a*, *b* を同時に測定できる COMAR の方法が、茶のクロロフィルを測定する場合、そのまま応用できるかどうかを検討した。

2. 実 験 の 部

1. クロロフィルの抽出

試料からクロロフィルを抽出する溶剤としては、アルコール・石油エーテル等種々の有機溶剤が用いられてきているが、アルコールは直接クロロフィルと化合物を作るし、石油類はワックス等を抽出しない利点があるが、クロロフィルの完全抽出が困難であるなどそれぞれ一長一短がある。そのなかで含水アセトン⁵⁾は多くの色素・タンニン等も同時に抽出はするが、最も容易に、かつ、完全に抽出するので、定量の場合には最も適している。

アセトンは乾燥粉末の場合は 5~15% 含水のものがよく、5% 以下、または 15% 以上になると抽出力が減少する。したがつて生葉よりの抽出には、生葉 1g に 10cc 前後の脱水アセトンが最も抽出しやすい。

一般に生鮮試料の場合、酵素を不活性化し、かつ、抽出を容易にするために、蒸熱処理を行うが、これは後の

クロマトグラフのところで述べるように、クロロフィルの分解を伴う。ゆえに生葉の場合は脱水アセトン中で海砂とともに嚙砕抽出を行うのがよく、加熱乾燥した試料では、どうしても相当量のクロロフィルの分解を伴うことは避けられない。

2. クロロフィルの分離

アセトン抽出液そのまま（エーテルに転溶して濃縮したほうが容易である）マイクロペットで 0.01~0.1cc 程度を円型濾紙（径 11cm）の中央に滴下し、展開剤 I（石油エーテル：ベンゼン = 4:1 vol）で展開すると、外側よりカロチン（*b* がほとんど全部と思われる）、灰緑色色素（クロロフィル *a* の分解物）、黄緑色色素（クロロフィル *b* の分解物）、キサントフィル類 2（内側はルテインと思われるが、外側は不明）、クロロフィル *a*、クロロフィル *b*、とならび、カロチンが溶剤の先端に、クロロフィル *b* が原点の周辺に、おのおの同心円をなして分離吸着される。（第 1 図）

展開剤 I ではカロチノイド色素間の分離はよいが、クロロフィル *a*, *b* は近接して吸着され、完全に分離抽出することは困難である。それで展開剤 II（ベンゼン：四塩化炭素：エーテル = 10:10:1 vol）でクロマトグラフを行うと、カロチノイド色素は溶剤の先端附近に集まるが、クロロフィル *a*, *b* は中間に完全に分離して吸着され（第 2 図）、個々に切り取り、エーテルで抽出することができる。

なお、この植物色素のクロマトグラフは吸着クロマトグラフで *R_f* は一定せず、濃度により展開距離が異なるから、原点に滴下する量は、濾紙の大きさ、溶液の濃度により適当に調節しなければならない。

3. 定量法の検討

COMAR の分光光電法はアセトン抽出液を同量のエーテルと混合し、水を加えてクロロフィルをエーテルに転溶し、エーテル溶液を水で繰り返し洗浄してアセトンを完全に除き、硫酸ソーダで脱水、一定量に希釈し、その一部を分光光電光度計により、642.5 および 660m μ における吸光度を $\log I_0/I$ 値で測定し、次の式よりクロロフィル *a*, *b* および *a+b* を算出する方法である。

* 茶業技術研究 No.16, 32~36 (1957) より転載

$$a \text{ (mg/L)} = 9.93 \log I_0/I(660) \\ - 0.777 \log I_0/I(642.5)$$

$$b \text{ (} \mu\text{)} = 17.6 \log I_0/I(642.5) \\ - 2.81 \log I_0/I(660)$$

$$a + b \text{ (} \mu\text{)} = 7.12 \log I_0/I(660) \\ + 16.8 \log I_0/I(642.5)$$

$\log I_0/I(660)$, (642.5) はそれぞれ
660m μ , 642.5m μ における吸光度。

上の式は CoMAR らがみずから精製
したクロロフィルについて、数カ所の波
長の吸光係数を求めて導き出したもので
ある。

クロマトグラフで分離し、エーテルで
抽出したものについては、上の式により
直ちにその量は算出できるが、アセトン
抽出液をエーテルに転溶したものを直接
分光光度計にかけると、上式の二つ
の波長附近に大きな吸収を持つ物質の有
無を検討しなければならない。この点に
ついて調べた結果、製茶中にはこの附近
(665 および 655m μ) に吸収の山を示す
物質が相当量存在することが判明した。

すなわち、第 1 表に示すように、生葉
・玉露・煎茶・釜炒茶および紅茶につい
て CoMAR の方法で定量したものと、
クロマトグラフによつて a , b を分離し
エーテルで抽出した後、同じ数式で計算
したものとを比較すると、生葉・玉露に
も多少の差はみられるが、煎茶・釜炒茶
・紅茶では実際にはクロロフィル a はご
くわずかしき、または全く含まれていな
いの、CoMAR の定量法そのままの場合
は相当量が存在する値を示している。

第 1 図 製茶アセトン抽出液のクロマトグラム

第 2 図 製茶アセトン抽出液のクロマトグラム

第 1 表 各種製茶中のクロロフィル含有量 (mg%)

クロロ フィル	生 葉		玉 露		釜 炒 茶		煎 茶		紅 茶	
a	570	168	536	150	472	47	304	44	280	—
b	319	172	205	193	139	67	123	67	32	—
a'		369		426		477		484		555

備考：細字はアセトン抽出液そのまま、太字はクロマトグラフで分離後 CoMAR の式に従つて算出した
数値。 a' は係数63として計算した。生葉の a' はアセトン抽出前の熱処理の結果である。紅茶の a ,
 b はクロマトグラムにて認められなかつたので切り取り抽出しなかつた。

したがつて製茶中には、CoMAR の方法ではクロロ
フィル a として定量される他の物質が含まれていることが
考えられる。そこで、製茶のアセトン抽出液をエーテル
に転溶したものの吸収曲線を見ると、吸収の山が 660m μ

より 5m μ だけ長波長の側にずれていることがわかつた。
また、展開剤 II で展開したクロマトグラムの先端に集ま
る混合色素の吸収曲線を見ると、明らかに 665m μ に吸
収の山を現わしている。更に展開剤 I でこれら混合色素

を分離して、個々の色素の吸収曲線を見ると、カロチンとキサントフィルの間に展開されている灰緑色 (a' と仮称) と黄緑色 (b' と仮称) の二つの色素が、この附近に吸収の山を現わし、 a' はクロロフィル a とほとんど同型の曲線を描き、407.5 および 665 $m\mu$ (クロロフィル a は 430 および 660 $m\mu$) に大きな鋭い吸収の山を示し、 b' は 433.5 および 655 $m\mu$ に吸収の山を現わし、クロロフィル b (460 および 642.5 $m\mu$) と同型の吸収曲線を描く (第3, 4 図)。

第 3 図 クロロフィル a および a' のエーテル溶液の吸収スペクトル

第 4 図 クロロフィル b および b' のエーテル溶液の吸収スペクトル

その他のカロチンおよびキサントフィル類は、550 $m\mu$ より長波長部には大きな吸収の山を示さないから (第5 図)、 a' と b' の二つの色素がクロロフィル a として定量されており、これらはその吸収曲線の型からみて、クロロフィルの分解物質のように考えられる。

この二つの物質の影響の程度をみると、 b' は量も少いからほとんど大した影響はないようであるが、 a' は量も

第 5 図 カロチノイド色素のエーテル溶液の吸収スペクトル

多く 660 $m\mu$ で相当の吸収を現わしている。

また、この a' 、 b' 色素は茶葉だけでなく、多くの緑葉においても熱処理によつて生ずるので、660 $m\mu$ における吸光度を利用した定量法は、試料が熱処理されているものでは、この物質の影響を考慮しなければならない。

a' 色素の絶対量の算出は、現在クロマトグラフによつて単離中で吸光係数の算出はできていないが、クロロフィル a より導いた (後述) ものから算出すると、660 $m\mu$ で 55, 665 $m\mu$ で 63 の値を示し、クロロフィル a は 660 $m\mu$ で 102, 665 $m\mu$ で 61.2 となるから、これから次の式で a' を算出できる。

$$a = 20.6 \log_{10} I_0/I(660) - 17.1 \log_{10} I_0/I(665)$$

$$a' = 33.3 \log_{10} I_0/I(665) - 20.0 \log_{10} I_0/I(660)$$

ただし 上式の吸光係数はいまだ実験の繰返しが少ないので更に検討を加える必要がある。

4. a' および b' の同定

これら a' 、 b' は生葉になく、製茶に多く存在しており、また釜炒茶製造行程の各段階についての消長からみて (後述)、クロロフィル a 、 b の分解物のように考えられるので、展開剤 II で分離したクロロフィル a 、 b を酸 (a の場合塩酸 1:3、 b の場合 1:1)、あるいはアルカリ (メタノール・カリ溶液) で分解し、アルカリ処理液は水溶性のため、再び酸処理を行つてエーテルに転溶したもの (前者は phaeophorbide a 、 b で、後者は chlorin e , rhodin g である)、と比較すると、 a' と phaeophorbide a 、 b' と phaeophorbide b の吸収曲線は全く同型となり (第6, 7 図)、 a' 、 b' と chlorin e , rhodin g とはおおの少し異なつた型となる。また色調もクロマトグラフも同様に phaeophorbide と一致するので、chlorin e および rhodin g ではないが、加熱処理だけで、Mg および phytol を失つた phaeophorbide まで分解されるものか、またそれ以上分解の進んだものが含まれていな

いかなど種々の疑問はあるが、これらの点は今後の研究によつて明らかにするつもりである。

現在までに判明した点は以上のほかに、Mgを含んでいないこと、クロロフィルと異なつて、二硫化炭素に溶解することなどである。

第6図 Phaeophorbide *a* および *a'* 色素の
エーテル溶液の吸収スペクトル

第7図 Phaeophorbide *b* および *b'* 色素の
エーテル溶液の吸収スペクトル

5. 製茶工程中のクロロフィルの消長

製茶中最も高温処理を受ける釜炒茶の製造工程中のクロロフィルの変化を調べてみると、第2表に示すように、*a* は炒茶の段階ですでに大部分が分解され、更に工程が進むにつれてますます減少して、製品ではクロマトグラムに現われなくなるが、*b* は製品まで相当量残っている。この点、草食動物の体内において、クロロフィルは⁶⁾*a*のほうが*b*よりも速やかに分解するという報告と同じ傾向を示している。また工程が進むに従つて、*a*の減少とは比例しないが、*a'*は増加している。

なお、この表において生葉に*a'*が相当量含有されているのは、抽出前に熱水に30秒間浸漬したためで、その後の実験で生葉は摘採後速やかに脱水アセトン中で磨砕抽出すれば*a'*は出現しないことがわかつた。

第2表 釜炒茶製造工程中のクロロフィルの消長
(mg%)

クロロ フィル	生 葉	炒 葉	第 1 水乾葉	第 2 水乾葉	製 品
<i>a</i>	168	42	38	37	—
<i>b</i>	172	95	114	123	80
<i>a'</i>	369	530	516	603	572

備考：クロマトグラフにより分離後 COMAR の式により計算したもの。*a'*は係数63として計算した。生葉の*a'*はアセトン抽出前の熱処理の結果である。製品の*a*はクロマトグラムで認められなかつたので測定しなかつた。

3. 要 約

茶のクロロフィル定量法について研究し、抽出、分離・測定条件を決定した。

1. 製茶よりクロロフィルを完全に抽出するには、含水率10%前後のアセトンが最もよく、生葉の場合は第1回目の抽出に脱水アセトンを用いるほうがよい。ただし抽出前の加熱処理はクロロフィルの分解を伴うから避けなければならない。またクロロフィルを保存するには、過酸化物を除いたエーテルに転溶し、脱水後暗所におけば1年くらい変化しない。

2. アセトン抽出液の円形濾紙クロマトグラフにより、クロロフィル*a*、*b*、カロチノイド色素、およびクロロフィルの分解物と思われる2種の色素が完全に分離され、各色素の吸着部分を切り取つて抽出することができる。

3. 波長660mμの吸光度を利用するクロロフィル定量法では、カロチノイド色素は影響を及ぼさないが、クロロフィルの分解物と思われる色素が大きく影響する。製茶中にはこの色素が非常に多く含まれ、上の定量法をそのまま適用すると、生葉のクロロフィルの半分近くが製茶中に残っている計算になるが、実際には*b*が30%程度残っているのみで、*a*は大部分分解されている。

4. この二つの色素はクロロフィル*a*、*b*より導いたphaeophorbide *a*、*b*と吸収曲線が一致している。

5. 玉露の中にはクロロフィル*a*、*b*ともに相当量未分解で残っているが、煎茶・釜炒茶にはクロロフィル*a*はごく少量、クロロフィル*b*は30%ほど未分解で残っているにすぎない。紅茶では*a*、*b*ともに完全に分解されて

いる。

これらの結果から、玉露・碾茶の鮮緑色は未分解のクロロフィルに基因し、煎茶・釜炒茶等の黒味を帯びた色沢は、この分解物と思われる灰緑色の色素によるものと考えられる。

なおこの報告の要旨は昭和31年10月25日、奈良市における日本茶業技術協会研究発表会で講演した。

4. 文 献

- 1) 鳥井秀一、古谷弘三：茶技研講演要旨，Oct., 1952, p.10.
- 2) 古谷弘三：茶技研講演要旨，Oct., 1954, p.22.
- 3) *Method of Analysis of A. O. A. C.*, 7 ed., 111~12 (1950).
- 4) COMAR, C. L., F. P. ZSCHEILE: *Plant Physiol.* 17, 198~209 (1942).
- 5) " " : " " 16, 651~53 (1941).
- 6) 服部静夫：植物色素の研究成果, p.835 (1941).

Summary

For determining chlorophyll-*a* and -*b* in made tea or tea leaf, the following experiments were performed.

1. To extract chlorophyll completely from made tea, three or more successive extractions with acetone containing 10% water were necessary, but when the sample was fresh leaf, undild. acetone should be used at the first time and never had to give heating before extraction, unless otherwise the decomposition of chlorophyll could not be avoided.

2. By circular paper chromatography of

the acetone extract with the mixed solvents of petroleum ether : benzene (4:1) or benzene : carbon tetrachloride : ether (10:10:1), chlorophyll-*a*, -*b*, carotenoids and two unidentified pigments were separated clearly, and these pigments could be eluted by ether.

3. The ether solution of chlorophyll was estimated by measuring the optical density with a spectral monochromate near 660 m μ . The measurement was greatly interfered by the unidentified pigments but not by the carotenoids.

4. The two unidentified pigments which were contained in an appreciable quantity in made tea seemed to be the degradation products of chlorophyll-*a*, and -*b* whose absorption spectra agreed well with those of phaeophorbide-*a*, and -*b* and the color was greyish green and yellowish green respectively.

5. In *Gyokuro*, some amounts of chlorophyll-*a* and -*b* were contained, but in *Sencha* and pan-parched tea a trace of chlorophyll-*a* and a small amount of chlorophyll-*b* were merely detected and in black tea both chlorophyll-*a* and -*b* completely disappeared.

It was presumed that the fresh green color of *Gyokuro* and *Tencha* was due to the undecomposed chlorophyll but the dark green color of *Sencha* and pan-parched tea was characterized by the phaeophorbide-like pigments.

(Feb. 11, 1957)