茶タンニン定量における試料液の*

調製条件による差異

農林省茶業試験場 中川 致之・鳥井 秀一

Fluctuations of Tannin Content due to the Preparation of Sample Solution in the Determination of Tea Tannin

By Muneyuki NAKAGAWA and Hideichi TORII

1 ま え が き

茶タンニンの定量には、現在レーベントール酸化法の少量法や、岩浅・鳥井²⁾が簡便な実用法として発表した酒石酸鉄による比色法などがよく用いられている。

これらの定量法においては、試料液の調製は1回の熱湯浸出で最終的な測定に必要な濃度の範囲になるように行なわれているが、試料中のタンニン系物質が完全に抽出されているかどうかは不明である。

また、従来レーベントール法において、測定液を得るための口過の際、口紙がタンニンを吸着して最初うすい液が出てくるので、その部分を除去すべきであるといわれていたが、実際にどの程度の吸着があるのかは明らかでない。

そこで両定量法について、試料からのタンニンの抽出状況、浸出温度による差異、さらに浸出液を口過して測定液とする場合、口液のフラクション別による相違などを分析、調査した。

2 試 料

當場製煎茶(やぶきた、'62年5月3日製)を粉末とし、1mmのふるいを通したものを使用した。

3 定 量 方 法

3.1 レーベントール酸化法

レーベントール酸化法の実験操作は、現在までいろいろな改良が加えられ、試料液の調製方法についても、古くは40%エタノールで3回反復して浸出していたが、続いて熱湯で3回となり、現在の常法およびA.O.A.C.³⁾では熱湯1回浸出になっている。また、試料に対する熱湯の量の比率にも多少の相違があるが、この報告では500mgの試料を約70mlの熱湯で90分浸出し、冷却後100mlに定容し、口過したものを測定液として、現在の常法とみなされる少量法の操作に準拠して行なった。

3.2 酒石酸鉄による比色法

岩浅・鳥井の報告のとおりに行ない、試料100mgを

約70mlの熱湯で30分浸出し、冷却後100mlに定容し、口過したものを測定液とした。

3.3 カテキン類の分別測定法

レーベントール法で定量された結果などを検討するために、クロマトグラム切り取り抽出法によって、(一)-エピカテキンガレート、(一)-エピカテキン、(一)-エピガロカテキンガレート、(一)-エピガロカテキン、(±)-ガロカテキンなどのカテキン類を分別測定し、420mμにおける吸光度の大小から、それぞれのカテキンの濃度を推定した。なお、それぞれのカテキンの一定量に相応する吸光度には、それほど大きな差はないと想像されるので、一応カテキン類の吸光度の合計値をタンニン含量に相当するものと考えた。なお、比色法の試料液については、液の濃度がうすいため、分別測定は困難であった。

4 両定量法試料液のタンニン抽出程度の検討

4.1 レーベントール法の試料液

熱湯の代わりに、それと等量の10%含水アセトン、水飽和酢酸エチル、70%エタノールで、試料を室温で一昼夜浸出して得た抽出液と、常法試料液のタンニン含量を分析比較したが、有機溶媒抽出液においては、溶媒自体による過マンガン酸カリウムの消費とか、ゼラチンとタンニンとの反応阻害などの現象がみられたので、次の方法によって定量を試みた。

まず、有機溶媒抽出液を湯浴上で加温して、有機溶媒を蒸発し去った残物を熱水に溶かし、後は常法どおりに行なったが、溶媒除去のための加熱処理による影響が考えられるので、参考のために抽出液をそのまま過マンガン酸カリウム液で滴定し有機溶媒による消費量を補正したものから、常法によるゼラチン処理液の滴定値を差引いて推定値を算出してみた。

また、さらに常法試料液および有機溶媒抽出液のカテキン類を分別測定した。それらの結果をまとめると表1のとおりである。

表1からわかるように、アセトン抽出液がいずれも最

* 茶業技術研究 No. 27, 61~65 (1963) より転載

高の値を示したが、反復抽出してもタンニン量の増加はなく、試料中の可溶性タンニンが完全に抽出されていると考えられたので、これとの対比から熱湯を用いる常法

試料液では、70%程度しか抽出されていないと推定され、とくに(一)-エピガロカテキンガレートなどエステル型のカテキン類が抽出され難いことがわかった。

表 1 レーベンタール法の常法試料液と有機溶媒抽出液のタンニン含量

抽出溶媒	レーベンタール法 タンニン定量値		カテキン類フラクション別吸光度				合計値
	1	2	エピカテキン ガレート	エピカ テキン	エピガロカ テキンガレート	ガロカ テキン	
熱 水	9.8 [%]	9.9 [%]	0.043	0.063	0.247	0.267	0.620
アセトン	13.4	14.0	0.087	0.087	0.440	0.326	0.938
酢酸エチル	7.7	12.3	0.087	0.080	0.423	0.271	0.861
エタノール	12.6	10.4	0.073	0.077	0.411	0.298	0.858

注：1) レーベンタール法タンニン定量値の1は、有機溶媒を蒸発する方法によったもので、2は有機溶媒による過マンガン酸カリウムの消費を補正して算出したものである。

2) エピガロカテキンガレートの吸光度のなかで、熱水のみは没食子酸と思われるものの吸光度との合計値である。

4.2 比色法の試料液

レーベンタール法の場合と同様に、常法試料液と10%含水アセトン、水飽和酢酸エチル、70%アルコールの3種の有機溶媒抽出液について比色定量を行なったが、有機溶媒の存在により発色の低下が認められたので、これを補正するため、没食子酸、カテキン混合物、インスタント緑茶3点について、一定量の水および有機溶媒に溶かして、それぞれ比色した。なお、インスタント緑茶では有機溶媒に不溶の物質がかなり含まれていたが、タン

ニン類はほとんど溶解したものと仮定した。

その結果は表2に示すとおりで、同一含量の液でも有機溶媒の存在により、吸光度にはかなりの相違があり、その程度もものによって一定しなかったが、一応この5点について、有機溶媒溶液と水溶液の吸光度の比率を算出し、この平均値から補正係数を出し、これを有機溶媒抽出液をそのまま比色した数値にかけて、抽出程度検討のための推定値とした。

表 2 比色法における有機溶媒溶液の吸光度

溶 媒	水 溶 液 を 1 と し た 場 合 の 吸 光 度						補正係数 (平均値 の逆数)
	没食子酸	カテキン 混 合 物	イ ン ス タ ン ト 緑 茶			平 均 値	
			A	B	C		
ア セ ト ン	0.92	0.92	0.90	0.88	0.84	0.89	1.12
酢 酸 エ チ ル	0.89	0.89	0.81	0.83	0.79	0.84	1.19
エ タ ノ ール	0.77	0.76	0.82	0.83	0.79	0.79	1.26

表 3 比色法の常法試料液と有機溶媒抽出液のタンニン含量

抽出溶媒	吸 光 度		タンニン 定量値
	測定値	補正值	
熱 水	0.277	0.277	11.7 [%]
アセトン	0.298	0.334	15.1
酢酸エチル	0.268	0.318	14.4
エタノール	0.266	0.316	14.3

表3からわかるように、常法試料液では完全抽出とみなされるアセトン抽出液に比べ、80% ぐらいの抽出程度

と推測されるが、この理由はレーベンタール法と同様エステル型カテキンの抽出不十分によるものではないかと考えられる。

5 浸出温度による差異

100℃の熱湯で抽出する両定量法の常法試料液と室温(25℃)、40℃、60℃、80℃で同時間浸出して得た試料液とのタンニン含量を比較し、レーベンタール法の試料液についてはカテキン類の分別測定も行なったので、その結果をまとめて表4に示す。

表4からわかるように、低温では抽出の効率が落ちるが、60℃以上ではレーベンタール法と比色法のいずれの試料液においてもタンニン定量値にはほとんど差がな

表 4 浸出温度によるタンニン含量の差異

浸出温度 °C	比色法 試料液 タンニン 定量値	レーベンタール法試料液							
		タンニン 定量値	カテキン類フラクション別吸光度						合計値
			エピガロカ テキンガレ ート	エ ピ カ テ キ ン	エピガロカ テ キ ン ガ レ ー ト	没食子酸	エピガロ カ テ キ ン	±ガロ カ テ キ ン	
25	10.0	7.8	0.030	0.066	0.176	0	0.225	0.049	0.546
40	10.9	8.4	0.034	0.066	0.189	0	0.245	0.038	0.572
60	12.2	9.7	0.039	0.062	0.221	0	0.226	0.049	0.597
80	12.4	10.0	0.043	0.063	0.199	0.048	0.177	0.090	0.620
100	12.3	9.9	0.044	0.060	0.150	0.091	0.140	0.131	0.616

かった。

しかし、レーベンタール法試料液のカテキン類を個別に検討すると、80°C 以上ではかなりの質的、量的変化が生じており、没食子酸と思われる物質の発現、(±)-ガロカテキンの著しい増加と、これに伴う (−)-エピガロカテキンガレートと (−)-エピガロカテキンの減少が認められた。(−)-エピガロカテキンガレートと (−)-エピガロカテキンが加熱により没食子酸と (±)-ガロカテキンに変化したと仮定すると、温度が上がるにつれてエステル型カテキンの含量が増加するが、低温下では遊離型よりはるかに抽出され難く、従来エステル型のほうが遊離型カテキンより溶解度が高いといわれているので、常識的な想像と全く逆の事実が認められたのは注目すべきである。

6 口液のフラクション別差異

6.1 比色法の試料液

試料浸出液をろ過して測定液を採取する操作において、東洋口紙 No. 6, No. 2, Whatman No. 1 の 9 cm, 11 cm の円形口紙を用い、口液の最初の 20 ml の部分と、それに続く 20~40 ml, 40~60 ml, 60~80 ml, 80~100 ml の部分の、五つのフラクションに分けて採取し、これを 3 反復して比色定量を行なった。表 5 はその結果を示すものである。

この値を分散分析した結果は表 6 のとおりで、フラクションおよび口紙の種類に有意差が認められたが、口紙の径による差はなかった。また、フラクションと口紙の径の交互作用が有意となったが、この場合はたいした意味を持たない。

表 5 比色法測定液のフラクション別タンニン含量

ロ 液		東 洋 ロ 紙 No. 6						東 洋 ロ 紙 No. 2						
フラクション		9 cm			11 cm			9 cm			11 cm			
ml		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%		
0 ~ 20		11.6	11.1	10.6	11.1	11.1	10.6	11.6	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.6
20 ~ 40		12.1	11.6	11.1	11.6	11.6	11.1	12.1	11.6	12.1	11.6	11.6	11.6	11.6
40 ~ 60		12.1	11.6	11.6	12.1	12.1	11.6	12.1	12.1	12.1	12.6	12.1	12.6	12.6
60 ~ 80		12.6	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.6	12.1	12.1	12.6	12.1	12.6	12.6
80 ~ 100		11.6	11.1	11.1	11.1	11.1	10.6	12.1	11.6	11.6	11.6	11.6	11.6	11.6
ロ紙別平均値		11.5						11.9						

ロ 液		Whatman No. 1						フラクション別	
フラクション		9 cm			11 cm			平 均 値	
ml		%	%	%	%	%	%	%	
0 ~ 20		11.1	11.1	11.6	11.1	10.6	11.1	11.1	
20 ~ 40		11.6	11.6	12.1	11.6	11.1	11.6	11.6	
40 ~ 60		11.6	11.6	12.1	12.1	12.1	12.6	12.0	
60 ~ 80		12.1	12.1	12.6	12.6	12.1	12.6	12.3	
80 ~ 100		11.6	11.6	11.6	11.6	11.1	11.6	11.4	
ロ紙別平均値		11.7							

表6 比色法測定液のフラクション別タンニン
含量の分散分析

要 因	自由度	平均平方
全 体	89	
フ ラ ク シ ョ ン	4	158**
ロ 紙	2	35**
ロ 紙 の 径	1	0
フラクション×ロ 紙	8	2
フラクション×ロ紙の径	4	13**
誤 差—1	10	2
誤 差—2	60	3

次に有意と出た主要因の平均値について 区間検定したところ、いずれのフラクションおよびロ紙の間の差も有意であった。

それぞれのフラクションについてみると、最初タンニン含量の少ないロ液が出てくるが、だんだんに多くなり60~80 ml で最高に達し、最後にまた落ちることがわかった。

また、ロ紙については No. 6 を使用したものは、No. 2 を使用したものよりタンニン定量値が低かった。

6.2 レーベンタール法の試料液

レーベンタール法の試料浸出液は、比色法浸出液の5倍の濃度にあたりロ過速度はきわめて緩慢である。そこで No. 6 と No. 2 の 11 cm の円形ロ紙を使用したロ液の、最初に出てくる 0~20 ml の部分と続く 20~40 ml の部分についてのみ、3 反復して定量を行なった。(表7)。

これについて分散分析した結果(表8)は誤差-1の自由度が少ないため、フラクションおよびロ紙のいずれについても有意差は認められなかったが、表7からわかるように、最初に出てくる 0~20 ml のロ液のフラクションは 20~40 ml に比べてタンニン含量がかなり低いこと、また、比色法と同様に No. 6 を使用したものは No. 2 を使用したものよりタンニン定量値が低いことが

表7 レーベンタール法測定液のフラ
クション別タンニン含量

ロ 液 フラク ション	東洋ロ紙 No. 6			東洋ロ紙 No. 2			フラクシ ョン 別 平 均 値
	11 cm			11 cm			
ml	%	%	%	%	%	%	%
0~20	9.4	9.8	9.6	10.1	10.4	10.5	10.0
20~40	10.8	10.8	10.0	10.6	10.6	11.4	10.7
ロ紙別 平均値	10.1			10.6			

表8 レーベンタール法測定液のフラク
ション別タンニン含量の分散分析

要 因	自 由 度	平 均 平 方
全 体	11	
フ ラ ク シ ョ ン	1	162
ロ 紙	1	80
誤 差—1	1	11
誤 差—2	8	13

判明した。

7 要約および考察

現在行なわれているレーベンタール 酸化法の小量法と酒石酸鉄による比色法について、試料から試料液へのタンニンの抽出状況、浸出温度による試料液のタンニン含量の差異、さらに浸出液をロ過して測定液とする場合、ロ液のフラクション 別による相違などを分析調査した。

まず、タンニンの抽出状況については、熱水抽出液(常法)と有機溶媒抽出液との比較、およびカテキン類の分別測定の結果から、試料中のタンニン系物質は、レーベンタール法試料液では70%程度、比色法試料液では80%程度しか抽出されていないと推測され、この理由は(一)エピガロカテキンガラートなどエステル型カテキンが抽出され難いためと判断された。

しかし、常法試料液では浸出液をロ過して測定するのに対し、有機溶媒抽出液ではそのまま上澄部をとって測定し、ロ過は行っていないのでロ紙による吸着のいかんによっては相違が生じてくる可能性がある。

浸出温度による差異については、両定量法試料液とも、60℃以上ではタンニン定量値にはほとんど差がなかったが、80℃以上になるとカテキン類の質的な変化が生じ、没食子酸と思われるスポットと(±)-ガロカテキンの著しい増加と、これに伴う(一)-エピガロカテキンガラートおよび(一)-エピガロカテキンの減少が認められた。また、低温では意外にも従来溶解度が高いとみられている(一)-エピガロカテキンガラートなどエステル型カテキンの含量が少なかった。

試料浸出液のロ液のフラクション別差異については、両定量法測定液とも最初のフラクションのタンニン含量が低いことおよび東洋ロ紙 No. 6 でロ過したものは No. 2 を使用したものより定量値が低いことであった。

比色法測定液の場合、ロ液のタンニン含量は最初は低くだんだんに高くなるが、最後にまた急落した。この原因は全く不明であり、この点についての究明は、ロ紙による吸着の実態とカテキンの種類による相違の有無の調査などととも、さらに検討を要する問題と考えられる。

8 文 献

- 1) 鳥井秀一：茶技研，No. 4, 1 (1951).
- 2) 岩浅 潔，鳥井秀一：茶技研，No. 26, 87 (1962).
- 3) 芝 時孝，出村要三郎：茶試彙報，No. 1, 6 (1925).
- 4) Official Methods of Analysis of A. O. A. C., 9th ed. p. 185 (1960).
- 5) 鳥井秀一，中川致之：茶技協講要，23 (Oct. 1960).

Summary

With the determination of tea tannin by the Löwenthal method and the colorimetric method using ferrous tartrate, the extraction rates of tannin in the green tea with several solvents, the temperature effect on the extraction of catechin fractions, and the reduction of tannin content by the filtration of infusion were investigated.

The preparations of determining solutions were carried out as follows: in the Löwenthal method, 500 mg. of powdered tea was infused

with ca. 70 mL. of hot water for 90 min. and in the colorimetric method, 100 mg. of sample was treated in the same way for 30 min. After cooling, both infusions were filled up to 100 mL. and filtered, then the tannin content in the filtrates was determined.

Tea tannin, especially ester-type catechins, most of which consisted of (–)-*epi*-gallocatechin gallate, were less extractable in hot water than in aq. acetone and other organic solvents.

The infused tannin content increased as the extraction temperature rose till 60°C., then reached almost a constant level.

At a low temperature, the extraction rate of ester-type catechins was remarkably small, however, at a high temperature (over 80°C.) pyrogallol-type catechins seemed to be decomposed yielding gallic acid and (±)-gallocatechin.

The tannin content was considerably lower in the first 20 mL. of filtrate through several filter papers than in the succeeding 20~40 mL.

(Dec., 28, 1962)