茶の公定分析法の改良 (第2報)*

可溶分定量法の検討

農林省茶業試験場 岩 浅 潔・坂 本 裕・鳥井秀一

Improvement of Official Chemical Analysis of Tea (Part 2)

Examination of Water Extract Determination

By Kiyoshi IWASA, Yutaka SAKAMOTO, and Hideichi TORII

1 ま え が き

わが国における茶の可溶分定量法としては、農林省茶業試験場彙報第1号¹⁾に掲載された方法があり、これを骨子として部分的に改訂を加えられた方法²⁾が、今日慣用されている。アメリカにおいては、AOAC³⁾の公定法が公表され、広く用いられている。このほか抽出液の比重から算出する方法や抽出残物をひょう量する方法があるが、いずれも公定法となっていない。

1961年以来、農林省茶業試験場化学研究室において設定後長年月を経過した茶の一般分析法を再検討し改訂する仕事が続けられ、第1報⁴⁾で全窒素定量法について報告した。その研究の一環として、可溶分定量法を検討し、実施条件を設定したので第2報として報告する。すでにタンニン⁵⁾および水分⁶⁾についても実施しているが、なお、若干の検討を加えた上で報告する予定である。

2 茶試法と AOAC 法との比較

2.1 実験方法

粉末にした煎茶の可溶分を次の両法で定量した。

(1) 茶 試 法

茶粉末 3 g に 400 ml の熱水を加え、30分間煮沸抽出して上澄液をとる。この操作をさらに2回繰り返した後、上澄液を蒸発濃縮し、残物も含めて 1000 ml に定容する。これを石綿管でろ過、ロ液 50 ml をひょう量びんにとり、スチームバス上で蒸発乾固、98°C の定温器で恒量を求める。

(2) AOAC 法

AOAC 分析書に記載の操作法を以下のように若干変更した。

2 g の茶粉末に 200 ml の熱水を加え、1時間煮沸抽出し、冷却後 500 ml に定容する。これをろ紙 (東洋, No. 2) でこして、ロ液 50 ml をひょう量びんにとり、以下茶試法同様に蒸発乾固、ひょう量する。

2.2 実験結果

両法の差は抽出とろ過の方法に相違があるだけで、本質的には同じものと考えられる。したがって、両法の定量値に差がなければ、一般分析法としては操作の簡便な AOAC 法で十分であると判断された。

結果は表1のようによく一致しており、C. V. も AOAC 法は茶試法の 1/2 程度であったので、AOAC 法を採用することに決定した。

表 1 茶試法と AOAC 法との比較

区 分	定 量 値				平 均 値	C. V.
	%	%	%	%	%	%
茶 試 法	40.1	40.7	40.5	40.1	40.35	0.74
AOAC 法	40.4	40.4	40.3	40.1	40.30	0.35

3 分析者を異にした場合の誤差

3.1 方 法

煎茶粉末をよく混合し、50 g ずつ全国茶業試験研究機関12カ所に送って、次の方法によって可溶分を定量した。

茶粉末 2 g を精秤し、500 ml の三角フラスコに入れ、

200 ml の熱水を加える。三角フラスコにはガラス管 (長さ 75 cm, 直径 0.6 cm 程度) をつけ冷却器とする。冷却器の上から蒸気が出ない程度に加熱する。加熱中はフラスコ壁についた粉末をかく拌して落とす。加熱1時間後冷却して 500 ml に定容し、東洋ろ紙 No. 2 でろ過する。ロ液は最初の 20 ml 程度を捨てる。恒量を出したひょう量びんに 50 ml のロ液をとる、スチームバス上で乾

* 茶業技術研究 No. 33, 69~73 (1966) より転載

固させる。これを定温器 (98°C) で恒量まで乾燥する。

12名の分析者による定量値は表2のごとくであって、
これの分散分析は表3である。

3.2 結 果

表 2 分析者個々の可溶分定量値

分析者	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
定 量 値	39.8%	41.5%	40.7%	46.5%	39.8%	40.5%	39.4%	37.1%	38.7%	39.6%	40.4%	38.0%
	39.0	41.1	40.8	44.9	39.9	40.5	39.0	38.6	38.8	38.9	40.9	38.2
	40.3	41.0	40.8	45.6	39.0	40.4	38.8	39.4	38.6	39.7	41.9	37.6
	39.9	40.5	40.6	46.0	39.5	40.6	39.2	39.2	38.7	38.8	40.6	37.5
	39.5	40.8	40.8	46.0	39.5	40.5	39.2	37.4	38.7	38.8	40.7	38.6
	40.6	40.5	40.5	47.3	39.1	40.5	39.4	36.7	39.0	41.1	40.2	39.2
	40.3	42.0	40.6	45.2	39.2	40.3	39.2	36.8	39.0	37.4	41.0	38.8
	39.7	42.4	40.8	45.1	38.9	40.9	39.1	36.4	40.2	39.8	40.7	39.4
	40.2	40.7	40.6	44.9	38.8	40.0	38.6	36.2	39.5	37.5	40.2	38.4
	40.7	40.9	40.6	45.8	39.3	40.3	38.9	38.1	38.9	37.9	39.9	38.7
平均値	40.00	41.14	40.68	45.73	39.30	40.45	39.08	37.59	39.01	38.95	40.65	38.44
C. V.	1.31	1.55	0.28	1.68	0.94	0.57	0.66	3.10	1.26	2.96	1.37	1.64

表 3 分 散 分 析

要 因	自 由 度	平 方 和	平 均 平 方	F
全 体	119	514.473		
分 析 者	11	467.939	42.54	98.7***
誤 差	108	46.534	0.431	

表 4 分 散 分 析 (Dを除く)

要 因	自 由 度	平 方 和	平 均 平 方	F	分散の期待値
全 体	109	161.563			
分 析 者	10	120.310	12.0310	28.8***	$\sigma_e^2 + 10\sigma_a^2$
誤 差	99	41.253	0.4167		σ_e^2

各分析者の定量値の平均は、37.59%から45.73%までの間に分布し、著しい有意差が認められた。SMIRNOVの棄却検定により分析者Dの値を除くことができたので、これを除いて分散分析(表4)しても、なお残り11人の間に有意差があった。

分析者ごとの分散は、最小0.0129(C)から最大1.354(H)の間にあり、HARTLEYの最大分散比の検定によって、各人の分散は一樣でないと考えられた。これは各人の分析技術に精疎があるためであろう。

全窒素の場合と同様に、分析者間にはどうしても有意差を生ずるものとして、分析法の精度と個人誤差を評価すると次のとおりである。

表4の誤差分散を分析法の精度としてこれをC. V. で表わすと、 $(\sqrt{0.4167/39.57}) \times 100 = 1.63\%$ となる。次に分析者1人が1回分析したときの分析値に伴う誤差分散

$$\sigma_e^2 + \sigma_a^2 = 1.57813 \quad \text{C. V.} = 3.17\%$$

分析者1人が2回測ったときの平均値に伴う誤差分散、

$$\sigma_e^2/2 + \sigma_a^2 = 1.36978 \quad \text{C. V.} = 2.96\%$$

これらC. V. 値は全窒素の1.5~2.5倍の大きさであったが、タンニン、水分とは同程度であった。

4 可溶分定量法の検討

4.1 抽出

抽出時間を30分から4.5時間まで7段階にわたって可溶分を求めた結果を表5に示す。可溶分は抽出時間が長くなるにつれて増加したが、可溶分の増加量は減少していった。この結果から、1時間の抽出では不十分なことがわかったが、抽出時間を際限なく延ばすのは分析能率から得策でない。それで抽出時間がさらに30分長くなることによる増加量が0.57%である2時間で抽出を止めるのが適当でないかと考えられた。この増加量は2時間抽出の可溶分(43.13%)に対して1.3%程度の増加率になる。この値は分析法の精度と比べて大きいものでない。

表 5 抽出時間の影響

抽出時間	定 量 値 (%)				平均値	差
時間					%	%
0.5	39.5	39.6	39.2		39.43	1.30
1.0	40.5	40.6	41.1		40.73	1.64
1.5	42.1	42.5	42.5		42.37	0.76
2.0	42.9	43.3	43.2		43.13	0.57
2.5	44.0	43.5	43.6		43.70	0.33
3.5	44.1	44.0	44.0		44.03	0.50
4.5	44.8	44.3	44.5		44.53	

表 6 ロ 紙 の 影 響

東洋 ロ紙	定 量 値 (%)					平均値	C. V.
						%	%
No. 2	41.1	41.7	40.8	40.4	41.7	41.14	1.38
No. 6	40.8	39.8	40.8	41.8	40.9	40.82	1.73

4.2 ロ 過

ロ紙による抽出液のロ過は石綿によるほど完全に澄明にならない。そしてロ紙の種類によって可溶分に差異の出ることも予想された。そこで定性用および定量用ロ紙の代表として、東洋ロ紙 No. 2 と No. 6 を使って比較した。いずれも直径 11 cm のものを使用した。結果は表6のごとくで、No. 2 がわずかに高い値を示したが、両平均値には有意差を認めなかった。必要量をロ過するに要する時間は No. 6 の約3時間に対して、No. 2 は約1時間と迅速であり、No. 2 が適当であると考えられた。

中川らは、茶タンニン定量用の浸出液をロ過する際、最初のロ液のタンニン量が低いことを示し、ロ紙によるタンニンの吸着を推定している。茶の可溶分の $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{2}$ がタンニンであると計算されるので、ロ液のフラクションによって可溶分の定量値に差異を生ずることが推定され

表 7 ロ液フラクションによる差異

ロ液フラクション	定 量 値 (%)			平均値
	(1)	(2)	(3)	
0~50 ml	41.9	41.2	40.7	41.27%
50~100	41.0	41.0	42.5	41.50
100~150	42.1	40.8	42.4	41.77

表 8 分 散 分 析

要 因	自由度	平 方 和	平均平方
全 体	8	4.049	
フラクション	2	0.376	0.188
反 復	2	1.236	0.618
誤 差	4	2.437	0.609

表 9 加熱方法の影響

蒸発方法	定 量 値 (%)					平均値	C. V.
						%	%
A	39.3	39.5	39.8	39.9	40.0	39.70	0.73
B	39.5	39.8	39.8	40.2	39.8	39.82	0.63

注：Aはスチームバス，Bは電熱器→スチームバス

た。それでNo. 2ロ紙を用いて50 ml ずつのロ液に分画し、これを3反復して可溶分を求めた。表7はその結果を示したものである。この値を分散分析した結果は表8のとおりで、可溶分は徐々に増加する傾向にあったが、いずれも有意な差でなく、可溶分定量の場合はフラクションの差を考慮する必要のないことがわかった。また、最初のフラクションを20 ml とし、あと2回50 ml ずつ採取して可溶分を定量する実験も行なったが、この場合も有意差を認めなかった。

4.3 蒸 発

ロ液の蒸発、乾固を早く行なうため、最初電熱器等の直火上で濃縮してからスチームバスに移し、乾固させる方法がしばしばとられてきた。12人の分析者による定量の場合も、ある分析者たちはこの方法をとったことが判明したので、蒸発操作における加熱方法の影響を検討する必要性が生じた。

同一抽出液を5個ずつ用いて比較した。スライダックで60Vに落とした1200W電熱器上で約5 ml まで濃縮してから、スチームバスに移して乾固させたものと、始めからスチームバス上で蒸発乾固させたものとの可溶分定量値は表9のごとくである。平均値の差を検定した結果、有意差を認めず、以上の加熱方法の違いが可溶分に

影響するとは考えられなかった。なお、電熱器を併用すれば所要時間が半分に短縮されたが、電熱器上では乾固して焦がす危険があり、最初からスチームバス上で行なうほうがよいと思われる。

4.4 乾 燥

久保田らは、電気定温乾燥器の器内温度分布が一様でなく、とくに熱風循環式でない定温器での定量値のバラツキがはなはだしいと報告している。したがって、乾燥温度を100°Cと決めるとそれ以上の温度になる危険もあるため、分析誤差を求める試験では98°Cで恒量に達するまで乾燥するという方法をとった。AOACには100°C、1時間の乾燥と記載されており、これとの比較試験を行なった。

熱風循環式定温器を100°Cと97°Cにセットしておき、乾固させた試料を入れて一定時間後に取り出し可溶分を計算した。その結果は表10に示すとおりで、97°C乾燥では2.5時間後も100°C、1時間で得た平均値に達しなかった。100°C、1時間の平均値と97°Cの各時間の平均値との差を個別に検定して、97°C、1.5時間と2.5時間が100°C、1時間と有意差のないことがわかった。埼玉県茶研の吉田も98°Cで30分ずつの乾燥で3回目に恒量に達したと述べている。

表 10 乾燥条件の影響

乾燥条件		定 量 値 (%)					平均値
97°C	時間 0.5	42.9	42.3	42.9	42.9	42.1	42.62
	1.0	42.2	41.8	42.2	42.2	41.5	41.98
	1.5	42.2	41.6	42.2	41.8	41.5	41.86
	2.5	41.9	41.3	42.1	41.6	41.3	41.64
100°C	1.0	41.6	41.2	40.8	40.7	42.1	41.28

5 総 括

茶の可溶分定量法として、従来わが国で用いられていた茶試法の代りに、AOAC法を採用することにし、この方法で分析精度、個人誤差を検討した。

12人の分析者のデータから計算して、分析法精度はC. V. 1.63%であった。個人誤差は分析法精度に比べてかなり大きく、分析者1人が1回分析した数値に伴う誤差はC. V. 3.17%、分析者1人が2回測定した平均値に伴う誤差はC. V. 2.96%と計算された。

分析法操作の細目について検討を加えた結果、AOAC記載のものを若干修正して次のように定め、これを茶における可溶分定量の公定法とする。

茶粉末をよく混合して、その2gを500mlのフラスコに取り、熱水200mlを加える。冷却器（冷却器はガラス

管やロートで代用してもよい）をつけて、電熱あるいはガスでおだやかに2時間煮沸する。直ちに流水で冷却して、500mlに定容し、ろ紙（東洋 No. 2）でろ過する。恒量を出したひょう量びんにロ液50mlを取り、スチームバス上で蒸発乾固させる。これを定温器（98~100°C）で乾燥して恒量を求める。

6 あ と が き

この報文のうち、分析者間の誤差を検討するデータを提供して下さった当場土壌肥料研究室、製茶第1研究室、製茶第2研究室、支場製茶研究室を始め、農林省静岡輸出品検査所、埼玉県茶業研究所、東京都農業試験場、静岡県茶業試験場、三重県農業試験場茶業分場、京都府茶業研究所、鹿児島県茶業試験場に厚くお礼申し上げる。また、化学研究室中島花江技官には測定の一部を担当していただいた。記して感謝の意を表する。

7 文 献

- 1) 芝 時孝, 出村要三郎: 茶業試験場彙報, No. 1, 9 (1925).
- 2) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 9th ed., p. 184 (1960).
- 3) 鳥井秀一: 茶技協講要, 12 (Oct. 1957).
- 4) 鳥井秀一, 太田勇夫: 茶技研, No. 31, 124~131 (1965).
- 5) 茶試験研究打合せ会議資料, 茶業試験場化学研究室成績, 1962, 5~6; 1963, 5~6.
- 6) 同上資料, 茶業試験場化学研究室成績, 1963, 3~5.
- 7) 中川致之, 鳥井秀一: 茶技研, No. 27, 61~65 (1963).
- 8) 久保田 濃, 滝谷 洋: 茶技研, No. 21, 55~59 (1959).
- 9) 吉田宏之: 私信.

Summary

The accuracy of analytical method and the personal error of analyst were examined with A. O. A. C. method for determining water extract in tea.

The accuracy of analysis was computed as C. V. 1.63%; the error accompanied with a single determination by an analyst was C. V. 3.17% and that with a mean value of double

determinations by an analyst was C. V. 2.96%.

By modifying some procedures, the following operation is decided as the official method for determining water extract in tea.

Add 200 ml. of hot water to 2 g. of pulverized tea in a 500 ml. flask, and reflux slowly on an electric heater or gas flame for 2 hours.

Cool in current water, make up the volume to 500 ml., and filter through dry paper (Toyo No. 2). Transfer 50 ml. aliquot into a weighed bottle and evaporate to dryness on a steam bath. Place in an oven (98~100°C) and dry to a constant weight.

(June, 1, 1966)

タンニン迅速定量のための簡易抽出法*

農林省茶業試験場 中 川 致 之・岩 浅 潔

An Easy Extracting Method for the Colorimetric Determination of Tea Leaf Tannin

By Muneyuki NAKAGAWA and Kiyoshi IWASA

1 ま え が き

最近、育種における早期選抜などのため、一時に多数の試料を分析することが要求されているが、タンニンの定量においては測定に使用する試料液作製の操作の簡易化によって、かなりの労力の軽減となるので検討を行なったところ、アセトンに一夜浸漬しておくだけでほぼ抽出されることが認められた。また、この簡易法によって得られた抽出液がそのままクロロフィルの定量にも適用可能かどうかをあわせて検討した。

2 方 法

茶葉のカテキンの個別定量法やクロロフィルの定量法で常法として用いられるように、2 g 程度の茶芽あるいは茶葉を含水アセトン中で乳ばちで摩砕し、抽出を繰り返す方法によって得た液を完全抽出液とみなし、この液

と、別に 2 g 程度の試料をそのままの形あるいは 5 mm くらいの幅に切断し、有機溶媒中に浸漬、一夜放置して得た液（簡易抽出液）とを、比色測定値や特定波長の吸光度などに関して比較検討した。

3 結 果

3.1 タンニンの定量

8月17日(1964年)摘採のたまみどりの古葉、2葉、青茎（一心三葉芽の）の完全抽出液と、これらの試料 2 g ずつをそのまま 5% 含水アセトン、または 75% エタノール 50 ml に浸漬し一夜放置して得られた簡易抽出液をジアゾスルファニル酸および酒石酸鉄で比色測定し、比較した結果、表 1 のように古葉のアセトン抽出をのぞいて、葉、青茎をそのまま一夜つけておくだけでは完全には抽出されないことが判明した。

表 1 茶芽各部位の簡易抽出液のタンニン測定

条 件	ジアゾスルファニル酸			酒 石 酸 鉄		
	2 葉	古 葉	青 茎	2 葉	古 葉	青 茎
完 全 抽 出	100.0 [%]	100.0 [%]	100.0 [%]	100.0 [%]	100.0 [%]	100.0 [%]
アセトン抽出	90.8	101.2	71.2	89.7	102.1	64.4
エタノール抽出	51.1	79.5	23.7	56.9	78.1	25.9

注：数値は比色測定時の吸光度（ジアゾスルファニル酸 420 mμ, 酒石酸鉄 540 mμ）に関して、完全抽出液に対する比率を示すもので、3 反復の平均値である。

* 茶業技術研究 No. 33, 73~77 (1966) より転載