茶の公定分析法の改良(第3報)*

タンニン定量法の検討

農林省茶業試験場 岩浅 潔・太田勇夫・鳥井秀一

Improvement of Official Chemical Analysis of Tea (Part 3)

Examination of Tannin Determination

By Kiyoshi IWASA, Isao ÔTA and Hideichi TORII

1 ま え が き

すでに報告した全窒素¹⁾、可溶分定量法²⁾と同様に、全国茶業試験研究機関の協力をえて、タンニン定量法についても検討した。ここでとりあげたタンニン定量法は Löwenthal 法と酒石酸鉄比色法である。その結果、後者の方法が簡便で精度もよいことがわかり、現在ではこの方法で分析が行なわれている。ここに、検討結果の概要を報告するとともに、酒石酸鉄比色法を実施する場合のカテキン検量線等についても報告する。

2 実験材料および方法

2.1 Löwenthal 法の検討

同じ試料茶から調製した茶粉末を、埼玉、東京、静岡、三重、京都の各都府県茶業試験研究機関、静岡輸出品検

査所、茶業試験場の茶樹第1、茶樹第3、土壌肥料、製茶第1、製茶第2、化学、支場製茶の各研究室において、Löwenthal 少量法により分析した。

2.2 酒石酸鉄比色法の検討

Löwenthal 法と同様に、東京、静岡、京都の各都府県茶業試験研究機関、茶業試験場の茶樹第1、茶樹第3、土壌肥料、製茶第1、製茶第2、化学、支場製茶の各研究室において分析した。同時に没食子酸エチルを用いて検量線を作成した。

2.3 カ テ キ ン

(-)エピカテキン、(-)エピガロカテキン、(-)エピカテキンガレート、および(-)エピガロカテキンガレートを、水から再結晶して精製した。融点は、それぞれ 235°C、215°C、254°C、220°C で文献記載^{4,5)}の値に近かった。そのほか、ペーパークロマトグラフィー、紫外線および赤

表 1 分析者個々のタンニン定量値 (Löwenthal 法)

分析者	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
定 量 値	6.7%	9.0%	10.9%	9.0%	8.1%	9.8%	8.2%	9.5%	11.1%	7.3%	10.1%	10.7%	9.2%
	6.7	8.5	11.1	9.6	8.1	10.3	8.1	9.8	11.0	7.3	9.9	11.5	9.3
	6.7	8.2	11.3	9.6	8.1	9.4	8.5	8.9	10.4	8.1	10.2	11.4	9.1
	6.7	8.6	10.7	9.6	8.1	8.9	8.2	10.0	10.9	7.0	9.8	10.8	9.6
	6.7	8.2	10.3	9.6	8.1	9.8	8.0	9.6	11.0	7.3	10.3	10.5	9.9
	6.6	8.7	10.9	9.0	8.1	11.2	8.2	9.2	11.6	6.8	10.0	10.6	9.6
	6.7	8.9	10.9	9.0	8.1	10.7	8.5	9.9	11.7	6.4	10.3	11.6	9.1
	6.7	8.6	11.1	9.3	8.1	9.8	8.2	9.6	11.4	6.4	9.9	11.3	9.6
	6.7	8.2	11.8	9.0	8.1	9.8	8.5	9.6	11.3	7.7	10.2	10.5	9.8
	6.6	9.0	10.9	9.3	8.1	9.8	8.0	9.6	11.4	7.5	10.3	11.0	9.5
平 均 値	6.68	8.59	10.99	9.30	8.1	9.95	8.24	9.57	11.18	7.18	10.10	10.99	9.47
C. V.	0.62	3.70	3.55	3.04	0.00	6.50	2.37	3.27	3.42	7.57	1.87	3.89	2.99

* 茶業技術研究 No. 40, 69~74 (1970) より転載

外線吸収スペクトルの測定によって純粋であることを確めた。

3 実 験 結 果

3.1 分析者を異にした場合の Löwenthal 法の誤差

13名の分析者が10回反復定量した結果は表1のとおりである。これを分散分析すると表2のとおりになり、誤差の分散から分析法の精度を C. V. として求めると $(\sqrt{0.1258/9.257}) \times 100 = 3.83\%$ 、また、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は、

$$\sigma_e^2 + \sigma_a^2 = 2.1809 \quad \text{C. V.} = 15.95\%$$

となった。この値は他の分析項目に比べて非常に大きく、特に、個人差の大きいことは異常であった。この要因は、滴定終点の見方にかかなりの個人差があるためと考えられた。このため、Löwenthal 法の操作を詳細に規格化して検討し直すより、個人差のはいる余地の少ない比色法を検討することにした。

表 2 分 散 分 析 表

要 因	自 由 度	平 方 和	平 均 平 方	F	分 散 の 期 待 値
全 体	129	262.8588			
分 析 者	12	248.1328	20.6777	164***	$\sigma_e^2 + 10 \sigma_a^2$
誤 差	117	14.7260	0.1258		σ_e^2

3.2 分析者を異にした場合の酒石酸鉄比色法の誤差

検量線作成のために、没食子酸エチルの5, 10, 15, 20 mg%水溶液について酒石酸鉄法を行なった結果、表3に示す回帰式を得た。この回帰式からタンニン量を没食子酸エチルとして表わした結果が表4である。各分析者の不偏分散の最小と最大値の比 $F_{\max} = 0.1068/0.00944 = 11.3^*$ (Hartley の検定) は有意となり、各人の実験技術に精疎があると判断された。最もばらつきの大きい分析者 J の値を除いて最大分散比を求めると、 $F_{\max} = 0.05433/0.00944 = 5.76$ となり、5%水準値以下となつ

表 3 分析者個々の回帰式

A	$x = 1.749 y - 0.0153$
B	$x = 1.784 y + 0.0107$
C	$x = 2.051 y + 0.0369$
D	$x = 1.994 y + 0.0090$
E	$x = 1.738 y - 0.0113$
F	$x = 1.933 y - 0.0222$
G	$x = 1.717 y - 0.0033$
H	$x = 1.697 y + 0.0017$
I	$x = 1.757 y - 0.0022$
J	$x = 1.710 y - 0.0079$

x: 没食子酸エチル mg y: 540 mμ の吸光度

表 4 分析者個々のタンニン定量値 (酒石酸鉄比色法)

分 析 者	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
定 量 値	10.0%	9.6%	11.3%	10.8%	10.7%	10.7%	9.9%	10.2%	10.4%	9.2%
	9.9	10.1	11.5	11.1	10.4	10.2	9.9	10.3	10.3	9.7
	9.9	9.7	11.4	10.9	10.7	10.3	10.0	10.2	10.4	9.3
	9.9	10.0	11.6	11.3	10.5	10.7	10.2	10.3	10.6	9.2
	10.0	9.9	11.3	11.2	10.2	10.5	9.9	10.5	10.6	9.0
	9.9	9.6	11.3	11.6	10.6	10.5	9.8	10.2	10.4	9.4
	9.8	10.1	11.5	11.4	10.6	10.6	9.9	10.3	10.4	9.7
	10.1	9.9	11.5	11.2	10.2	10.5	10.0	10.4	10.6	9.7
	10.1	9.5	11.2	11.3	10.4	10.5	10.0	10.2	10.6	8.7
	9.9	9.8	11.5	11.1	10.7	10.6	10.0	10.4	10.4	9.4
平 均 値	9.95	9.82	11.41	11.19	10.50	10.51	9.96	10.30	10.47	9.33
C. V.	0.98	2.19	1.13	2.08	1.85	1.52	1.08	1.02	1.11	3.50

表 5 分散分析表 (Jを除く)

要 因	自 由 度	平 方 和	平 均 平 方	F	分散の期待値
全 体	89	25.881			
分 析 者	8	23.848	2.981	119***	$\sigma_e^2 + 10 \sigma_a^2$
誤 差	81	2.033	0.0251		σ_e^2

た。また、J の C. V. 値も Smirnov の棄却検定にかけて捨てることのできるもので、J を除いた 9 人について分散分析した (表 5)。

分析者間の差は誤差 (分析精度) に比べて著しく大きく、他の分析項目の個人差より大きい値になった。この原因について若干考察すると次ぎのようになる。没食子酸エチルの検量線が表 3 のように分析者によって異なっているのは、各分析者が調製した没食子酸エチル液の濃度に、ある程度の誤差があったと考えられる。また、この分析法は、抽出液 100 ml のうちの 5 ml を使用するため、測定されたタンニン量に係数 (20) をかけて含量を出す。このため、測定値のわずかな違いでも大きな差になると考えられる。したがって、没食子酸エチルや茶粉末のひょう量を正確に行なう必要がある。

分析法精度は変動係数で表わして $C. V. = (\sqrt{0.0251} / 10.457) \times 100 = 1.52\%$ 、1 人の分析者が 1 回分析したときの分析値に伴う誤差分散は、

$$\sigma_e^2 + \sigma_a^2 = 0.3207 \quad C. V. = 5.42\%$$

1 人の分析者が 2 回分析したときの平均値に伴う誤差分散は、

$$\sigma_e^2 / 2 + \sigma_a^2 = 0.3082 \quad C. V. = 5.31\%$$

となり、Lewenthal 法の $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{3}$ になった。分析法精度の C. V. は全窒素の 2.5 倍程度であるが、可溶分、水分と同程度であった。また、この方法は分析操作が簡単で、分析時間も半分以下ですむため、茶のタンニン公定分析法に採用することにした。

3.3 酒石酸鉄比色法の検討

(1) 検 量 線

この方法の原報³⁾には、Lewenthal 法で求めたタンニン量を用いた検量線が記載されている。ところが Lewenthal 法はタンニン量を実際より低く出すといわれているので、正確なタンニン (カテキン) 量を出すために、カテキンの純物を用いて検量線を作り直す必要がある。この場合、個々のカテキンの呈色度が違うため、1 種類のカテキンで代用できない。また、カテキンの入手が困難なため、使用範囲が限られるおそれがある。それで、純度の安定した市販品として入手できる没食子酸エチルを標準に用いた。

茶葉に含まれる主要カテキン 4 種と没食子酸エチルの検量線は図 1 のとおりである。(—)エピカテキンと (—)エ

図 1 カテキンおよび没食子酸エチルの検量線

- 1 没食子酸エチル
- 2 (—)エピガロカテキンガレート
- 3 (—)エピカテキンガレート
- 4 (—)エピガロカテキン
- 5 (—)エピカテキン

• 茶葉カテキン (べにほまれ) の実測値

ピガロカテキンガレートの検量線は前に求めたものとはほとんど同じであったが、(—)エピガロカテキンの検量線は勾配が大きくなった。これはカテキンの純度が上がったためと考えられる。この図から、没食子酸エチル 1 mg の呈する吸光度と同じ吸光度を示す各カテキンの mg 数を求めると次ぎのようになった。

(—)エピカテキン	8 mg
(—)エピガロカテキン	1.8 mg
(—)エピカテキンガレート	1.5 mg
(—)エピガロカテキンガレート	1.3 mg

次ぎにカテキン混合物の呈色をみるため、表 6 のような組成の混合物を作り、酒石酸鉄法で比色したところ、その吸光度は個別に検量線から計算した吸光度の和によく一致した。計算によって混合物の吸光度を出せることがわかったので、中川⁷⁾らが報告した 28 品種の平均カテキ

ン組成を参考にして、カテキン混合物 1 mg の呈する吸光度を計算した。その結果、一番茶では 0.362、二番茶では 0.374、三番茶では 0.375 となり、(-)エピカテキンガレートの吸光度 (0.372) に近い値を示したので、この検量線が茶葉カテキンの検量線として使用できることがわかった。実際の検量線作成作業は、没食子酸エチルを使用して、その 1 mg が(-)エピカテキンガレート 1.5 mg に相当するので 1.5 倍した mg 数を取り、茶葉タンニン (カテキン) の検量線とすることができる。

べにはまれの新芽について、酒石酸鉄比色法とペーパークロマトグラフィーを用いるカテキンの個別定量法を実施し、カテキン量と吸光度の関係をプロットすれば、図 1 のように (-)エピカテキンガレートの検量線にのり両者のよく一致していることが明らかになった。

表 6 カテキン混合物の吸光度

カ テ キ ン	重 量	吸光度 (540 mμ)	
		検量線からの計算値	測定値
(-)エピカテキン	0.094 mg	0.007	0.368 0.366
(-)エピガロカテキン	0.253	0.080	
(-)エピカテキンガレート	0.171	0.064	
(-)エピガロカテキンガレート	0.510	0.217

図 2 吸光度に及ぼすリン酸緩衝液濃度の影響

(2) リン酸緩衝液

酒石酸鉄比色法は $M/15$ の Sørensen リン酸緩衝液を用いるよう規定されている。この濃度を $1/2$, $1/3$ に下げて発色させた結果、薄いものほど吸光度が高くなった。

すでに $M/15$ 濃度で実施されているので、この濃度は変更しないことにしたが、リン酸濃度を適当に変更するようなことは避けなければならない。

中林は各種ポリフェノールや植物タンニンに対する第 1 鉄塩の反応を調べ、リン酸のほかにクエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、酒石酸が発色を著しく妨害すると報告している。したがって、試葉中の酒石酸根も発色に影響すると考えられたので、酒石酸カリウムナトリウムの秤取量を 500 ± 10 mg の範囲内で変えて実験したが、吸光度に対する影響は認められなかった。また、硫酸第 1 鉄の量も 100 ± 5 mg の範囲では吸光度に影響しなかった。

4 総 括

茶タンニン定量法を検討する目的で、L. wenthall 法と酒石酸鉄比色法によって茶のタンニンを分析した結果、L. wenthall 法の定量値は個人差が非常に大きく、分析精度も劣ることがわかった。酒石酸鉄比色法の誤差は L. wenthall 法の $1/2 \sim 1/3$ であり、この方法を茶タンニン定量の公定法とすることにした。

分析者 9 人の定量値から、酒石酸鉄比色法の分析精度は C. V. 1.52%，分析者 1 人が 1 回分析したときの定量値に伴う誤差は C. V. 5.42%，分析者 1 人が 2 回分析したときの平均値に伴う誤差は C. V. 5.31% と計算された。

酒石酸鉄比色法の茶タンニン検量線に、(-)エピカテキンガレートのものを使用すれば、茶葉または緑茶のカテキン量に近い値を示すことがわかった。(-)エピカテキンガレートは入手困難であるから、検量線の作成は没食子酸エチルで代用した。この場合、没食子酸エチル 1 mg の呈する吸光度は、(-)エピカテキンガレート 1.5 mg の呈する吸光度に等しいので、没食子酸エチル mg 数を 1.5 倍して検量線を作成することによって、実際のカテキン量に近い値が得られた。

比色法で使用するリン酸緩衝液の濃度によって、吸光度が変わるため、緩衝液のリン酸濃度は一定に保たなければならないことがわかった。

この試験においては、紅茶タンニンについて検討しなかったため、この報文の結果は紅茶タンニンの定量には適用できない。

5 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、京都府立茶業研究所、農林省静岡輸出品検査所ならびに当場茶樹第 1 研究室、茶樹第 3 研究室、土壌肥料研究室、製茶第 1 研究室、製茶第 2 研究室、枕崎支場製茶研究室に厚くお礼申し上げる。また、カテキン標品をいただいた当

場中川致之, 岡田文雄両技官にお礼申し上げる。

6 文 献

- 1) 鳥井秀一, 太田勇夫 : 茶技研, No. 31, 124 (1965).
- 2) 岩浅 潔, 坂本 裕, 鳥井秀一 : 茶技研, No. 33, 69 (1966).
- 3) 岩浅 潔, 鳥井秀一 : 茶技研, No. 26, 87 (1962).
- 4) BRADFIELD, A. E. and M. PENNEY : *J. Chem. Soc.*, **1948**, 2249.
- 5) VUATAZ, L., H. BRANDENBERGER and R. H. EGLI : *J. Chromatog.*, **2**, 173 (1959).
- 6) 鳥井秀一, 太田勇夫, 岩浅 潔 : 茶技研, No. 40, 74 (1970).
- 7) 中川致之, 鳥井秀一 : 茶技研, No. 29, 85 (1964).
- 8) 中川致之, 鳥井秀一 : 茶技研, No. 29, 67 (1964).
- 9) 中林敏郎 : 日本食品工業学会第 16 回大会講演, (1969).

Summary

The accuracy of analysis and the personal error of analyst were examined with the Löwenthal method and the colorimetric method using ferrous tartrate reagent for determination of tannin in tea except black tea.

The colorimetric method was more accurate than the Löwenthal method and the error of analytical value obtained by the colorimetric method was one-third of that by the Löwenthal method. Therefore, the colorimetric method was decided as the official method for determination of tea tannin.

The accuracy of analysis was computed as C. V. 1.52%; the error accompanied with a single determination by an analyst was C. V. 5.42% and that with a mean value of double determinations by an analyst was C. V. 5.31%.

Calibration curve of (–)-epicatechin gallate was shown to be suitable for measurement of tea tannin (catechins). Ethyl gallate was also able to be used as substitute for (–)-epicatechin gallate. As 1 mg. of ethyl gallate is equivalent to 1.5 mg. of (–)-epicatechin gallate, the amount of ethyl gallate must be converted to that of (–)-epicatechin gallate.

(Jan., 31, 1970)