光度滴定装置を用いるレーベントール氏法によるタンニン定量について

中 林 敏 郎*

現在茶などのタンニンの定量には、インジゴカルミンを指示薬として KMnO_4 で滴定するレーベントール氏法が一般に行なわれているが、周知のように本法では滴定に伴うインジゴカルミンの青色から黄金色への変色が緩慢なため、滴定の終点を正確に判断することがむずかしい。

しかしこの変色に伴うインジゴカルミンの特性吸収の変化を光学的に追跡してゆくならば、滴定の終点を正確に知ることができるのではないかと予想された。

そこで KMnO_4 の添加に伴うタンニン類の酸化の模様を、その紫外外部吸収スペクトルの変化から明かにすることによってレーベントール氏法の原理を再検討し、それに基いてインジゴカルミンの吸光度の変化を追跡しながら滴定を行なう光度滴定装置を用いるタンニン定量法を検討することにした。

なおレーベントール氏法で使用する試薬はすべて農芸化学実験書¹⁾に記載のものを使用した。

実験および考察

1. タンニン類の KMnO_4 酸化に伴う紫外外部吸収スペクトルの変化

D-catechin 2.5 mg と 5% H_2SO_4 2.5 cc に水を加えて 50cc としたものを、 KMnO_4 (0.03886 N) で滴定した場合の紫外外部の吸収スペクトルの変化は第1図に示すとおりで、添加した KMnO_4 はただちに脱色されて D-catechin の 278 m μ の極大吸収が短波長側にずれて増大し、丁度滴定の終点で最大値に達する。それ以後は KMnO_4 の脱色に長時間を要し、極大吸収の位置はずれることなしにスペクトル全体の吸光度が低下してゆく。L-epigallocatechin および茶浸出液の場合(第2, 3図)も同様な経過をたどるが, gallic acid (第4図)では KMnO_4 の添加によりただちにスペクトル全体が低

第1図 KMnO_4 酸化に伴う D-catechin (2.5 mg) の紫外外部吸収スペクトルの変化

下してゆく。

以上の結果からタンニン類の KMnO_4 酸化は少なくとも2段階にわかれ、1次の酸化はすみやかで比較的安定な酸化物を生成するが、このものがさらに酸化分解される2次の酸化は長時間を要する。したがってインジゴカルミンの酸化変色は1次と2次の酸化の間で行なわれることになり、レーベントール氏法ではタンニンの1次の酸化を測定していることがわかる。

2. 光度滴定装置と実施法

東京光電式光度計7B型に光度滴定装置を付着せしめて使用した。本装置は第5図に示したように大型試験管に検液を入れ、小型モーターに直結した攪拌棒で攪拌しながらマイクロビュレットで滴定して、そのときの吸光度の変化をよみとるものである。

* 静岡大学農学部農芸化学教室 (静岡県磐田市見付4300)

Application of the Photo-Titration Apparatus for the Determination of Tannin by Löwenthal's Method.
By TOSHIO NAKABAYASHI.

第2図 KMnO_4 酸化に伴う L-epigallocatechin (2.8 mg) の紫外外部吸収スペクトルの変化

第3図 KMnO_4 酸化に伴う茶浸出液の紫外外部吸収スペクトルの変化

インジゴカルミンの可視部の吸収スペクトルは第6図にみられるように $601\text{m}\mu$ に極大吸収を有し、この吸収はタンニンの存在で KMnO_4 を添加してもほとんど動かないので、フィルターとしては #61 を使用した。

操作はつぎのように行なう。試験管に検液 47.5cc を入れ、フィルター 61 を用いて攪拌しながら吸光度を 0 に合わせたのちインジゴカルミン液 2.5cc を加える(吸光度約 1.4 となる)。メーターの指針が安定したときの吸光度を記録しながら、マイクロビューレットより KMnO_4

第4図 KMnO_4 酸化に伴う gallic acid (2.5 mg) の紫外外部吸収スペクトルの変化

第5図 光度滴定装置

第6図 KMnO_4 酸化に伴うインジゴカルミンと茶浸出液の混液の可視部吸収スペクトルの変化

を 0.2cc ずつ滴下し、吸光度が 1.0 付近になったら KMnO_4 の滴下量を $0.05 \sim 0.01\text{cc}$ とし、吸光度が 0.1 以下となったときに滴定を止め、 KMnO_4 の添加量に対する吸光度の減少曲線をグラフにかく。

3. 吸光度減少曲線の勾配

前述のようにレーベンタール氏法において、タンニンの1次酸化終了後にインジゴカルミンの酸化変色がおこ

第7図 吸光度減少曲線の勾配変化 (D-catechin 2.52 mg)

るのであれば、タンニンが存在するときと存在しなときの両者の吸光度減少曲線の位置はタンニン酸化に要した KMnO_4 量だけ横にずれるが、両曲線の勾配は同じでなければならない。

しかるに第7図にみられるようにインジゴカルミンのみの場合に比べて、D-catechin 2.52 mg が存在するときの減少曲線の勾配は著しくゆるやかである。

しかしこのとき、あらかじめ検液を硫酸酸性にして KMnO_4 を 1 cc, 1.5 cc と添加してからインジゴカルミン液を加えて滴定を行なうと、その曲線の勾配は次第に急となり、catechin を酸化するのに十分な KMnO_4 量 2 cc を加えたときの曲線の勾配は、インジゴカルミンのみの場合のそれとほとんど一致してくる。

これらの事実はインジゴカルミンの酸化がタンニンの1次酸化後に初めて起こるのではなく、タンニンの1次酸化に伴ってインジゴカルミンも少しずつ酸化されていることを示しており、これがインジゴカルミンの変色を緩慢にし、その終点を不鮮明にしている大きな原因である。

したがってレーベンタール氏法を実施するにあたって再現性のある値を得るためには、従来いわれているように KMnO_4 の滴定は、つねに一定の間隔をもって少量ずつ添加するとともに、検液をつねに一定の速度ではげしく攪拌しつづけるのが必要であることがわかる。

4. D-catechin の検量曲線

前述の方法で検液 50cc に種々の濃度の D-catechin を添加した場合の吸光度の減少曲線は、第8図に示しており、吸光度の減少がすみやかな 0.05 までの曲線は catechin の1次酸化が行なわれていることを示してい

第8図 D-catechin の滴定

るが、それ以後吸光度はほとんど変化せず、しかも指針が安定するのに長時間を要し、 KMnO_4 が2次酸化に消費されていることがわかる。

そこでそれぞれの曲線についてその吸光度が 0.1 になったときの KMnO_4 量と、インジゴカルミンのみの場合の値との差を catechin 量に対してグラフにかくと、第9図に示したように直線が得られ、光度滴定法で微量の catechin を正確に測定できることがわかる。

5. 各種タンニンの KMnO_4 消費量

D-catechin の場合と同様に、種々のタンニンについてそれぞれ検量曲線をかき (第9図)、これに基づいて滴定に使用した KMnO_4 の力価 (0.03886 N, この 1 cc はシュウ酸アンモン 2.76 mg に相当) からシュウ酸アンモン $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ 1 mg に相当するタンニン量を求めると、第1表の結果が得られた。これは滴定に使

第9図 タンニン類の検量曲線

第1表 シュウ酸アンモン $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ 1 mg に相当するタンニン量

タンニン類	mg	タンニン類	mg
D-catechin	0.3734	phenol	1.812
L-epigallo-catechin	0.5571	catechol	0.222
L-epigallo-catechin gallate	0.4459	pyrogallol	0.332
3つの平均	0.4588	distyryl	0.671
gallic acid	0.4048	rutin	1.052
chlorogenic acid	0.5328	naringin	18.116
tannic acid	0.5289	ascorbic acid	0.929

用した KMnO_4 1 cc がシュウ酸アンモン何 mg を消費するかを確かめておけば、その 1 cc が何 mg のタンニンに相当するかを示している。

この表によれば KMnO_4 の消費量はカテコール＞ピロガロール＞フェノールの順になること、およびタンニン以外にもフラボノイド色素やアスコルビン酸も KMnO_4 を消費することがわかる。

また茶タンニンの値としては3種の catechin の平均値 0.4588 mg を使用することにした。

なおカフェイン、テアニンおよびグルコースは KMnO_4 を全く消費しなかった。

6. ゼラチン処理の影響

レーベンタール氏法では通常検液中のタンニンをゼラチンで除く操作が行なわれるが、このとき添加する酸性飽和食塩水が多いと初めの吸光度が大きくなり（約 1.5～1.6）、その減少曲線が不規則でかつ指針が安定するのに長時間を要するようになる。この点について検討した結果、検液 50 cc 中酸性飽和食塩水が 2.5 cc 以下のときは、これが含まれない場合と同じ減少曲線を示すことを知った。

また従来 catechin のような低分子のタンニンはゼラチン処理では完全には除かれまいといわれているので、これを確かめるために D-catechin および chlorogenic acid の各濃度の液 1 cc に、ゼラチン液の代りに酸性食塩水（通常の酸性飽和食塩水 25 cc、水 50 cc、飽和食塩水 25 cc の混液）2.5 cc と水 44 cc およびインジゴカルミン液 2.5 cc を加えて滴定し、別に同じタンニン液 10 cc にゼラチン液 5 cc と酸性飽和食塩水 10 cc を加え、カオリン 1 g とともに振盪して除タンニンした液 2.5 cc に水 45 cc とインジゴカルミン液 2.5 cc を加えて滴定したところ、第10図の結果が示すように、D-catechin は約 39% がゼラチン処理で除かれたが、chlorogenic

第10図 ゼラチン処理による除タンニン効果

acid はわずか 6% しか除かれなことを知った。

7. 茶浸出液の滴定

茶葉 5 g を水 400 cc とともに 30 分煮沸、冷後水を加えて 500 cc として濾過、その濾液 1 cc およびこの濾液を上述のようにゼラチン処理した液 2.5 cc、対照として同様に水をゼラチン処理した液 2.5 cc ならびにインジゴカルミン液について、それぞれ吸光度減少曲線を描くと第11図の結果が得られ、水をゼラチン処理した液とインジゴカルミン液とは全く同じ曲線となる。曲線AとBとの差はゼラチンで除かれタンニンを示し、曲線BとCの差はいわゆる非タンニン質で、このなかにはゼラチンで除かれなかった一部の catechin やフラボノイド色素、アスコルビン酸などが含まれることになる。

同じ浸出液 0.4～2.0 cc について同じ操作を行ない、タンニンおよび非タンニン質の酸化に要した吸光度 0.1 までの KMnO_4 量を求めると第12図のように直線となり、光度滴定法で茶のタンニンを正確に定量できるこ

第11図 茶浸出液とそのゼラチン処理液の吸光度減少曲線

第12図 茶浸出液の検量曲線

とがわかる。

8. 実施例

試料5g(コーヒー豆は粉碎して使用)を400ccの水で30分間静かに煮沸、冷後水を加えて500ccとして濾過、その濾液1ccおよびこの濾液10ccにゼラチン液5cc、酸性飽和食塩水10ccおよびカオリン1gを加えて振盪後濾過した液2.5ccに、それぞれインジゴカルミン液2.5ccと水を加えて50ccとなして光度滴定を行ない、両者の吸光度が0.1になるまでのKMnO₄量を求め、兩滴定値の差に第1表の値を乗じてタンニン量を求めた。その結果は第2表に示すとおりである。

なおコーヒー豆のタンニンが著しく少ないのは、第10

第2表 各種試料中のタンニン含量の測定値

試料	タンニン(%)
煎茶	10.89 (茶タンニンとして)
紅茶	8.74 ("
マテ茶	9.75 ("
ホップ	6.20 ("
コーラナット	1.39 ("
コーヒー豆(モカ)	2.15 ("
" (ロブスター)	0.88 (chlorogenic acid として)
" (コロンビア)	1.91 ("
" (サントス)	1.91 ("
" (サントス)	1.32 ("

図で明らかにしたようにそのタンニンの主成分であり chlorogenic acid が、ゼラチン処理でほとんど除かれないため、このときの非タンニン質は chlorogenic acid として約6%であった。

要 約

これまでの実験結果が示すように、レーベントール氏法でタンニンを定量する場合、インジゴカルミンの変色、を光度滴定装置を用い追跡すれば、測定者の主観に左右されることなく滴定の終点を確実に知ることができるので、50cc中1mgのタンニンを正確に定量することが可能となる。

したがってさきに鳥井¹⁾が報告したレーベントール氏法の微量化方法にこの光度滴定法を用いればさらに有効であろうと考えられる。

以上の結果を要約すれば、

(1) KMnO₄によるタンニンの酸化は2段階に行なわれ、1次酸化はすみやかで2次酸化は徐々に進行し、レーベントール氏法は1次酸化を測定している。

(2) インジゴカルミンの変色はタンニンの1次酸化の終了後に起こるはずであるが、実際には1次酸化に伴って少しずつ酸化されるためにその変色が緩慢となる。

(3) 光度滴定装置を用いてインジゴカルミンの変色を追跡してゆけば滴定の終点を正確に知ることができる。

(4) 各種タンニンのKMnO₄消費量を測定し、シュウ酸アンモン1mgに相当するタンニン量を求めた。

(5) catechin, chlorogenic acid など低分子のタンニンはゼラチン処理で完全には除去されない。

(6) 光度滴定法によるレーベントール氏タンニン定量法を確立し、本法によれば各種試料中の微量のタンニンを正確に測定できることを明かにした。

終りに L-epigallocatechin gallate を御恵与下さった国立茶業試験場の中川致之技官に感謝する。

文 献

- 1) 京都大学農学部編：農芸化学実験書，中巻，4版，(産業図書)，p. 600 (1953)。
- 2) 鳥井秀一：茶業技術研究，第3号，8 (1950)；第4号，1 (1951)。

(1962年7月3日受理)