

茶葉中のビタミンCの定量について (第1報)

松 浦 康

緒 言

ビタミンCの定量法には、インドフェノール滴定法¹⁾、インドフェノール・ブタノール法²⁾、インドフェノール・キシレン法³⁾、ヒドラジン法⁴⁾、その他かなりの報告があるが、なかでも2・6-ジクロールフェノールインドフェノール色素を使う方法が一般的である。

生体組織中のビタミンCを定量する際、ビタミンCと同様な挙動をする非ビタミンC物質(以下、非C物質)との分離定量が大きな問題になっている。2・6-ジクロールフェノールインドフェノール(以下DPIと記す)色素を使用する時、ビタミンCと同様な挙動をする物質は、レダクトン類、SH化合物、第一鉄塩、亜硫酸塩などとされているが、これらのうちSH化合物はpH4以下でDPIに対する還元性を示さないとされており、第一鉄塩、亜硫酸塩については、過酸化水素を反応液に加えることにより、ビタミンCに影響を与えないで、そのDPIに対する反応性を除きうるとされている。一方、レダクトン類とビタミンCとの分離定量は、試料液にホルマリンを加えてビタミンCの還元力を選択的にとり除いて、残ったレダクトン類を定量することにより、その分離定量が可能であるとされている⁵⁾。野村⁶⁾はこのホルマリン法を検討し、各種食品中のビタミンCとレダクトン類の分離定量をしている。また、郷⁷⁾はアスコルビン酸酸化酵素を使用して、ビタミンCを特異的に酸化することにより、ビタミンCと非C物質との分離定量をしている。しかしホルマリン法にしても、アスコルビン酸酸化酵素を使った方法にしても、使用したレダクトンは合成品であり、自然界に存在する複雑なレダクトン類とDPIに対する反応性が同じであるかどうか疑問である。

最近、齊藤⁸⁾らは半発酵茶中のビタミンCの定量を行なっているが、この中でインドフェノール滴定法よりも、インドフェノール・ブタノール法の方が、良い結果を与えるとしている。その理由は反応時間の差によるものであるとしているが、であるとすれば反応時間だけでなく、反応の状態も異なるインドフェノール・ブタノール法と、インドフェノール・キシレン法の間にも問題があるはずである。

本実験は以上、二つの点に関して茶葉をつかって検討をおこない、知見を得たので報告する。

実験方法とその結果

茶葉中 DPI 還元物質の定量

a) インドフェノール・キシレン法

野村⁶⁾の方法による。

b) インドフェノール・ブタノール法

原則として満田²⁾の方法に従い、ホルマリン処理の場合は野村⁶⁾の方法に従って処理し、その後、ブタノール法を適用した。なお、この条件では、ホルマリンを加えることによって、ブタノール層の容積が増加するため、対照にくらべて、その吸光度は86.8%に減少する。このため、ホルマリン処理の場合はこの補正を行なっている。

比色は日立 139 型光電分光光度計を使用し、検量線の作製には、L-アスコルビン酸を使用

した。

結果は表1に示すとおり、インドフェノール・キシレン法、インドフェノール・ブタノール法の間でかなりの差を示し、ホルマリン処理の場合、キシレン法では増加し、ブタノール法では増加する場合と、変化しない場合があり一定しない。また、抽出方法、試料に供した抽出液の量によっても大きな差が出て来る。最初、表中のC~Dという条件で定量したのであるが、DPIの消費量が多過ぎて、残存DPI量が少なくなり、反応条件が満たされないと考えて、試料の量を少なくしていった結果、A~Bという条件で、はじめて適当なDPI消費量となった。

表 1 茶葉中の DPI 還元物質の定量値：定量法および抽出条件による差異

試験品	定量法	キシレン法		ブタノール法	
		未処理	ホルマリン処理	未処理	ホルマリン処理
玉露	A	1510	1970	(1240 1210)	(800 1120)
	B	690	—	660	520
	C	262	—	—	—
	D	80	86	—	—
ウーロン茶	A	476	780	—	—
	B	470	633	386	304
	C	103	145	—	—
紅茶	D	72	89	—	—

単位はL-アスコルビン酸に換算したmg%

A：2%メタリン酸で茶葉の100倍抽出液をつくり、そのうち1mlを試料としたもの。

B：2%メタリン酸で茶葉の100倍抽出液をつくり、そのうち5mlを試料としたもの。

C：2%メタリン酸で茶葉の33倍抽出液をつくり、そのうち5mlを試料としたもの。

D：2%メタリン酸で茶葉の10倍抽出液をつくり、そのうち5mlを試料としたもの。

茶葉抽出液のペーパークロマトグラフィー

玉露、煎茶、番茶、紅茶について、2%メタリン酸液で5倍抽出液をつくり、そのまま東洋濾紙 No.52 にスポットし、n-ブタノール・酢酸・水（4：1：2）にて上昇法で展開した。

DPI還元物質はDPIの30mg/100ml水溶液を噴霧して検出した。

結果は図1に示すとおり、玉露、煎茶、番茶はともに、同じスポット、 R_f 0.15, R_f 0.35, R_f 0.68, R_f 0.70を与える。番茶は R_f 0.15のスポットが大きくなり、紅茶は R_f 0.15のスポットが大部分を占めているが、 R_f 0.45にもスポットを与える。

一方、玉露と紅茶について、2%メタリン酸抽出液に8%になるようにホルマリンを加え、10分間反応させたものについて、ペーパークロマトグラフィーをおこなうと、図2に示すとおり、玉露では R_f 0.68のスポットが消えて、tailingする物質が現われ、紅茶ではtailingする物質のみか、または、 R_f 0.15のスポットが大きくなることもある。なお、チオ尿素を使った場合、玉露、番茶、煎茶では R_f 0.45に不明瞭なスポットが出る。L-アスコルビン酸はチオ尿素溶液に溶かしてスポットした場合、 R_f 0.45のスポットを与える。トリオースレダクトンは R_f 0.74であり、チオ尿素は0.55を与える。

茶葉より DPI 還元物質の抽出

茶葉を2%酢酸で抽出し、遠沈して(8,000×g)上清をとり、これに酢酸鉛の飽和溶液を
もはや沈澱が出なくなるまで加え、室温で30分間攪拌する。沈澱は遠沈によってあつめ、これ
をアセトンで一回洗い、ついで、10倍量のアセトン中にて攪拌しながら希硫酸を沈澱が出なく
なるまで滴下する。生じた硫酸鉛は汙別して、汙液に少量の水を加え、石炭ガスを通じなが
ら、40°C以下で減圧濃縮する。水を加えて濃縮をくり返し、アセトンを除いた後、飽和水酸
化バリウム溶液でpH 2.8~3.0とする。生じた沈澱を取り除き、溶液は0.5N塩酸でpH2.0と
して、石炭ガスを通じながら、濃縮するとシラップ状物質を得る。これに水を加えて、2回濃
縮をくり返し、塩酸を除去する。ここに得たシラップ状物質を無水アルコールにとかし、活性
炭処理をした後、約20倍量のエーテルを加えて、沈澱をつくり、汙過後、汙液を濃縮すると淡
黄色のシラップ状物質を得る。このものは茶葉抽出液をそのままスポットしたものと、ほぼ同
じスポットを与える。

トリオースレダクトンの調製

Euler⁹⁾の方法に従った。

非C・DPI還元物質に対するホルマリンの影響

玉露を2%の酢酸を含むアセトンで抽出し、抽出液を東洋汙紙No.52(40cm×40cm)にスポ
ットし、前記溶媒で展開後、R_f0.35, R_f0.68物質の箇所を切り取り、2%メタリン酸液で抽
出し、インドフェノール・キシレン法、インドフェノール・キシレン・ホルマリン法、インド
フェノール・ブタノール法、及び、インドフェノール・ブタノール・ホルマリン法で定量し
た。結果は表2に示す。

表 2 非C・DPI還元物質の還元力に対するホルマリンの影響

	R _f 0.35 物質	R _f 0.68 物質	汙紙のみ
未処理	88 r	68 r	11 r
ホルマリン処理	120	112	11

玉露を2%の酢酸を含むアセトンで濃厚に抽出し、そのまま40×40cmの東洋汙紙No.52にスポットして展
開し、R_f0.35, R_f0.68に相当する箇所を2%メタリン酸で抽出し、キシレン法で定量した。数値はL-ア
スコルビン酸に換算したものの。

トリオースレダクトンに対するホルマリンの影響について

トリオースレダクトンを2%メタリン酸に溶かし、キシレン法、ブタノール法におけるホル
マリンの影響を検討した。結果は表3に示した。

表 3 トリオースレダクトンの還元力に対するホルマリンの影響

方 法 反応時間	キシレン法		ブタノール法	
	1 分	2 分	5 分	5 分
未処理	320 r	106 r	149 r	
ホルマリン処理	187	25	56	

トリオースレダクトンの同一溶液についておこなった。ブタノール法における反応時間は振盪した時間で
ある。ホルマリン処理は10分間おこなった。数字はL-アスコルビン酸に換算した。

茶葉中非 C・DPI 還元物質のキシレン法とブタノール法の比較

茶葉より調製した DPI 還元物質を、更にペーパークロマトグラフィーを行ない、 R_f 0.35, R_f 0.68 物質 について、インドフェノール・ブタノール法、インドフェノール・キシレン法における反応の状態を検討した。結果は表 4 に示す。

表 4 茶葉中非 C・DPI 還元物質のキシレン法とブタノール法における反応の状態

	反 応 時 間	R_f 0.35物質量	R_f 0.68物質量
キシレン法	1 分	4 5 r	7 2 r
ブタノール法	1.5 分	2 4	3 1
	1 0 分	3 5	4 0

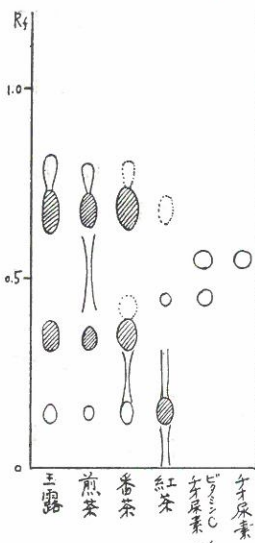
ウーロン茶より抽出した DPI 還元物質をペーパークロマトグラフィーし、その 0.35 物質、0.68 物質の箇所を 2% メタリン酸で抽出して、定量した。ブタノール法における反応時間は振盪した時間である。数値は L-アスコルビン酸に換算してある。

考 察

野村⁶⁾らは茶葉中のビタミン C とレダクトンとの分離定量をキシレン・ホルマリン法で行ない、両者の比は玉露で 55:45 であるとしている。また、この際ホルマリンの作用によって R_f 0.87 (n-ブタノール・酢酸・水 = 4:1:5) の新しいスポットを得、また、定量値も時には増加すると報告しており、その中で新しいレダクトン類の生成を推論している。

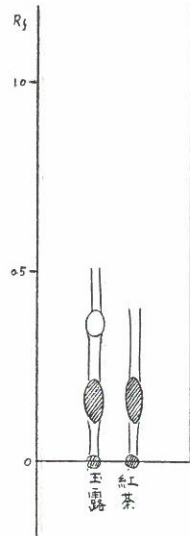
本実験ではキシレン法の場合、ホルマリン処理によってむしろ、その定量値が増加するとい

図 1: 茶葉抽出液のペーパークロマトグラフィー。



茶葉の 2% メタリン酸抽出液を東洋浜紙 No.52 にスポットし、n-ブタノール・酢酸・水 (4:1:2) で展開した。

図 2: DPI 還元物質に対するホルマリンの影響



茶葉の 2% メタリン酸抽出液をホルマリン処理し (8% ホルマリン, 10 分間) 図 1 の方法で展開した。

う結果を得た。しかし、玉露の場合、その比較的試料濃度の高い場合に、時にはホルマリン処理によって、その定量値が小さくなることもあった。

ブタノール法では、キシレン法に比し、定量値は小さく出る。また、ホルマリン処理のものは未処理のものよりも更に小さく出ることもあり、あまり変化しないこともあり、一定しない。

ホルマリン処理による定量値の変化の理由を知るため、まず、玉露、紅茶の抽出液をホルマリン処理したものをペーパークロマトグラフィーしたところ、実験結果において記したとおり、非 C・DPI 還元物質に変化のあらわれることを認めた。

(図 1, 2)

そこで $R_f 0.35$, $R_f 0.68$ 物質について、キシレン法でホルマリンの影響を検討した結果、表2に示すとおり、 $R_f 0.68$ 物質はホルマリン処理により、DPI還元力が2倍になっており、 $R_f 0.35$ 物質は約1.4倍になっている。これは分子内に変化が生じたか、新しく還元性物質が生成したことを示している。したがって、キシレン・ホルマリン法において、茶葉抽出液の定量値が増加するのは、茶葉中の非C・DPI還元物質のあるものがホルマリン処理によって、その還元力の増加を来たすことによるものであると考え得る。

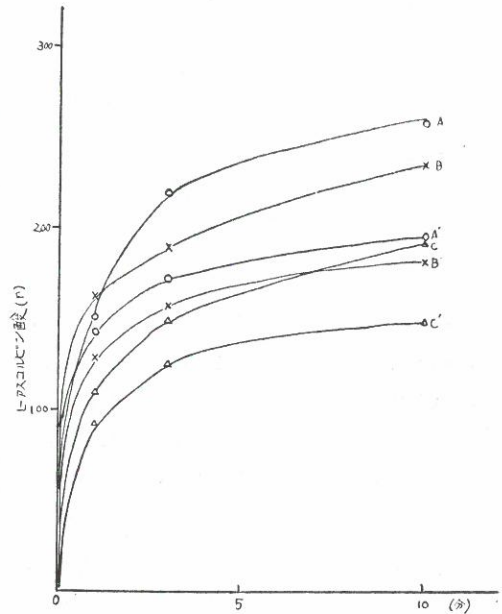
ブタノール法におけるホルマリンの非C・DPI還元物質の定量値に対する影響を検討したところ、図3のようになった。ブタノール法においてもホルマリン処理によって増加の傾向を示すが、キシレン法のように大きなものではない。茶葉抽出液のブタノール・ホルマリン法における定量値は未処理のものに較べて変化しない例と減少する例があるが、どちらかといえば、減少する例の方が多いのであって、この場合、ここに得た結果と相反するがこの原因は不明である。

レダクトン類の一つであるトリオースレダクトンについてホルマリンの影響を検討したところ、表3のようになり、ホルマリン処理によってその還元力は減少する。また、この際キシレン法とブタノール法を試みたが、ブタノール法の方が反応速度がかなり小さいことが示された。図4に示すとおり、トリオースレダクトンの定量をブタノール法で行なった場合、15分間の振盪によってはじめてキシレン法の1分間の反応の値に達するのである。また、同時にL-アスコルビン酸とDPIの反応の状態をみたが、キシレン法で1分間反応して50%のところ、ブタノール法では1.5分の反応で48.5%とL-アスコルビン酸の場合は反応速度はあまりかわらない。

ウーロン茶の $R_f 0.35$ 物質、 $R_f 0.68$ 物質についてキシレン法、ブタノール法の比較を行なったが、表4に示すとおりブタノール法においてはL-アスコルビン酸の反応がほぼ完了する1.5分において、キシレン法の約47%のものが定量される計算になる。これはトリオースレダクトンの48%とよく一致し図4に示すとおり、ブタノール法においては茶葉中の非C・DPI還元物質とトリオースレダクトンの反応の状態はよく似ている。

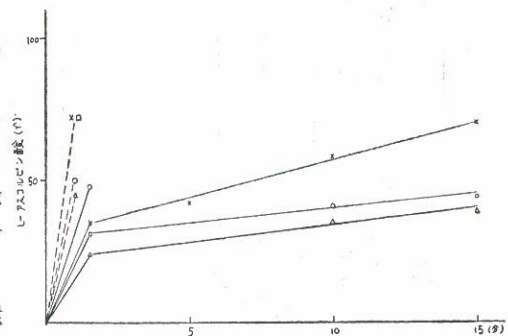
以上、キシレン法においては合成品であるト

図3：茶葉中非C・DPI還元物質のブタノール法、ブタノール・ホルマリン法における反応の状態



×: $R_f 0.35$ 物質 ○: $R_f 0.68$ 物質 △: ウーロン茶中非C・DPI還元物質 A, B, C: 未処理 A', B', C': ホルマリン処理

図4：DPI還元物質のキシレン法、ブタノール法における反応の状態



○: L-アスコルビン酸 ×: トリオースレダクトン △: $R_f 0.35$ 物質 □: $R_f 0.68$ 物質
-----: キシレン法 ———: ブタノール法

リオースレダクトンと、茶葉中の非C・DPI還元物質は共にその反応は速やかであり、一方、ホルマリン処理後の還元力は一方は増加し、一方は減少しており両者の性質はこの点で異なっている。一方、ブタノール法においては、両者の反応の状態はよく似ている。しかしホルマリンに対する性質はキシレン法の場合と同じ傾向となる。

また、反応の速度はL-アスコルビン酸は水溶液中ではDPIとほとんど瞬間的に反応し、ウーロン茶より抽出したDPI還元物質は図5に示すような経過をたどり、1分を過ぎた頃から反応は緩やかとなり、40分に至っても反応は続いているが、大部分のものは1分以内に反応が終っている。ブタノール法においては、L-アスコルビン酸の定量値は1.5分でほぼキシレン法の1分の値と同じ値となり、一方非C・DPI還元物質の反応は図4に示すとおり、キシレン法の1分の定量値に達するのに15分以上もかかっている。このようにL-アスコルビン酸の反応の状態はキシレン法とブタノール法の間で大きな差はないが、非C・DPI還元物質では全体としての速度はブタノール法の方がかなり小さくなっている。また反応の経過をみるとDPI消費は直線的にすすむものではなく、途中で反応速度に変化が生じている。このようにキシレン法、ブタノール法の間で非C・DPI還元物質の反応の状態が異なっているので、茶葉抽出液のDPI還元物質の定量値にも差が出るものと考え得る。

齊藤ら⁸⁾は、ブタノール法においては反応は瞬間的であるので、ビタミンC以外の物質は定量にかからないとしているが、茶葉中の非C・DPI還元物質は図4に示すとおり、全体としての反応速度はかなり小さいものであるが、全体の約半量は、比較的速やかに反応するのであって、このような理由で齊藤らの考察は否定されなければならない。

表1に示した茶葉中のDPI還元物質の定量値は、茶葉の抽出条件、抽出液の使用量によって、非常に大きな差を示すが、これについての検討は今後の実験にゆずりたい。

結 論

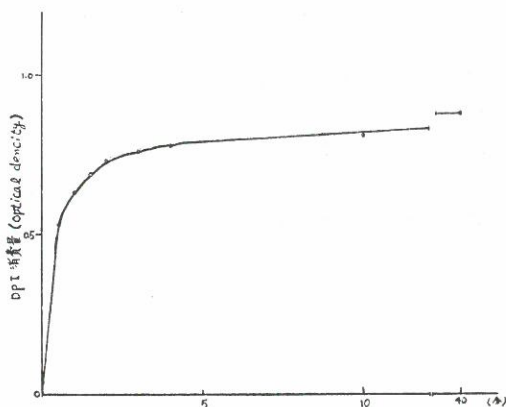
茶葉中のビタミンCの定量をDPI色素を使って行なう時は、茶葉中に含まれる非C・DPI還元物質(レダクトン類と考えられる)を考慮に入れなければならない。

茶葉中の非C・DPI還元物質の定量値はキシレン法とブタノール法、およびキシレン・ホルマリン法とブタノール・ホルマリン法の間でかなりの相異がでて来る。

茶葉中の非C・DPI還元物質はブドウ糖から調製したトリオースレダクトンと反応性が似ている面もあるが、また、異なった性質も持っている。したがって合成品を使って検討した結果をそのまま天然のレダクトン類に適用するのは危険である。

茶葉中の非C・DPI還元物質はキシレン法では反応は速やかである。一方ブタノール法では、全体としては比較的緩やかであるが、その約半量はすみやかに反応するので、必ずビタミンCの定量値の中に入って来る。また、一般に用いられている概念とは反対に、ホルマリン処理によって、その還元力は増加するので、ホルマリン処理によってもビタミンCと非C・DPI

図5：非C・DPI還元物質の水溶液中でのDPIとの反応の状態



還元物質との分離定量は困難である。

終りに、常に適切な御指導をして下さいました岡本賢一先生に心から感謝致します。

文 献

- 1) 永原太郎, 岩尾裕之, 久保彰治: 全訂 食品分析法 P232 (1965) (柴田)
- 2) 満田久輝, 鹿田健彦: ビタミン 13 394 (1957)
- 3) E, H, Stotz: J. Lab. Clin. Med., 26 1542 (1956)
- 4) 永原太郎, 岩尾裕之, 久保彰治: 全訂 食品分析法 P239 (1965) (柴田)
- 5) L, W. Mapson: J. Soc. Chem. Ind., :63 223 (1943)
- 6) 野村男次, 福谷敬三: 農産加工技術研究会誌: 6 163 (1959)
- 7) 郷 千枝子: 発酵工学 28 224 (1950)
- 8) 齊藤芳枝, 町田哲子, 須崎みちよ, 慶田雅洋: 栄養と食糧: 19 340 (1967)
- 9) H・フオン・オイラー: レダクトン化学の基礎とビタミンCの生化学的成果 P47 (1960) (内田老鶴圃)