

## 茶 類 の 分 析

——高速液体クロマトグラフ法による  
茶類中のカフェインの定量分析法——

大八木 美榮子

(実験協力者 坂口 朋子)

## § 1. 茶についての概説

茶は、ツバキ科に属する常緑の低木である *Thea sinensis* L.\* の葉や茎から製造する飲料を言う。この学名の示す通り、中国（支那）のチャという意味であるが、その原産地はインドと中国との国境をなす高山・高原地帯である。ヒマラヤ山系 (Fig. 1 b, c, d—1, 2) とその東側に位置する横断山脈 (Fig. 1 e, f—1, 2, 3) とからなるこの高山・高原地帯は一名モンスーン（季節風）地帯と呼ばれており、そこには西からガンガ河 (Fig. 1 c, d—2, 3) ブラーマプトラ河 (Fig. 1 c, d—2, 3) イラワジ河 (Fig. 1 d, e—2, 3, 4) サルウィン河（怒江） (Fig. 1 d, e—1, 2, 3, 4), メコン河（瀾滄江） (Fig. 1 e, f—2, 3, 4), 金沙江（長江） (Fig. 1 d, e, f, g, h—1, 2), ソンコイ河（紅河） (Fig. 1 f—3) 西江 (Fig. 1 f, g—2, 3) 珠江 (Fig. 1 g—3), 閩江 (Fig. 1 h—2) などの大河が貫流し、昼間は高温で夜間は低温のため、深い霧が発生する高湿度地帯を形成している。このような条件が達成されれば、その他の地域でも茶の栽培適地となり得るのである。

古来、茶の名産地として知られているのは、北インドではヒマラヤ山脈の南麓のシッキム (Fig. 1 d—2) とくにその中心をなすダージリン附近 (Fig. 1 d—2), ブータン国の南にあるアッサム地方 (Fig. 1 d—2), 中インドではボンベイ東南方の西ガッツ山脈中にあるニルギリ高地 (Fig. 1 a, b—4), さらにスリランカ国 (Fig. 1 b—5) では古代から現代に伝わる産地として、ウバ, ディンブラ, ヌワラエリアなどがよく知られている。

中国では雲南 (Fig. 1 f—3), 広西 (Fig. 1 f, g—3), 広東 (Fig. 1

\* リンネ : Carl von Linné (1707~1778)

スウェーデンの博物学者。属名・種名による二名式命名法により、動・植物の学名を決めた人。種名のあとに命名者の名前を列記するのがふつうである。

g, h—3), 福建省 (Fig. 1 h—2, 3) などにおいて優れた茶を産出し、紅茶としては有名な<sup>キーミン</sup>祁門茶が知られている。ジャワ島においてもコーヒーとならんで茶が産出されている。

わが国へは既に奈良朝以前から、遣唐使とその随行の人たち、僧侶、学者、商人によって持ちこまれ、主として高貴な人達の飲料として嗜まれたが、元来、わが国は山地と河川が多く、多湿で霧が発生しやすい土地柄なので、大陸からの技術と種子の持ち込みによって、様々の良い茶を造りだすことになった。よく知られているように、宇治川流域の宇治茶、塩田川などから由来された<sup>うれしの</sup>嬉野茶、大井川流域の静岡茶、多摩川・入間川・荒川流域の<sup>きやま</sup>狭山茶など、それぞれ特色を持った茶が産出されている。

ヨーロッパへの茶の進出は比較的小そく、17世紀の後半で、消化剤、興奮剤（カフェイン、テオブロミン、テオフィリンなどを含んでいるため）、強心剤、利尿剤などの薬用として用いられたが、嗜好飲料として、砂糖、ミルク、レモンなどを加えて大量に用いるようになったのは、主としてイギリス人が始めたことであり、ロシアに入ってはジャムを加えることなどが始められた。いずれにしてもインドやその他アジア地方から茶をヨーロッパへ運ぶには、すべて帆船に頼らねばならず、中世以来インドや東インド諸島から、胡椒その他の香辛料や香料などを独占的に運んで来たスペイン、ポルトガル、オランダ、イギリス人達が、同時に茶も運んで来るようになったのであるが、その途中の運賃、手間賃、税金、保険料などがかさみ、19世紀においてはイギリスでの茶の価格は原産地の4倍にも達したと言われている。

さて、このようにしてヨーロッパなどに輸出された茶はみな紅茶であった。一方わが国で用いられてきたのは、殆んどすべてが緑茶である。この両者の肉眼的な差異は色相やかたちなど著しいものがあるが、原料の茶樹には次に示すような変種としての差しかない。

#### a. インド・アッサム種

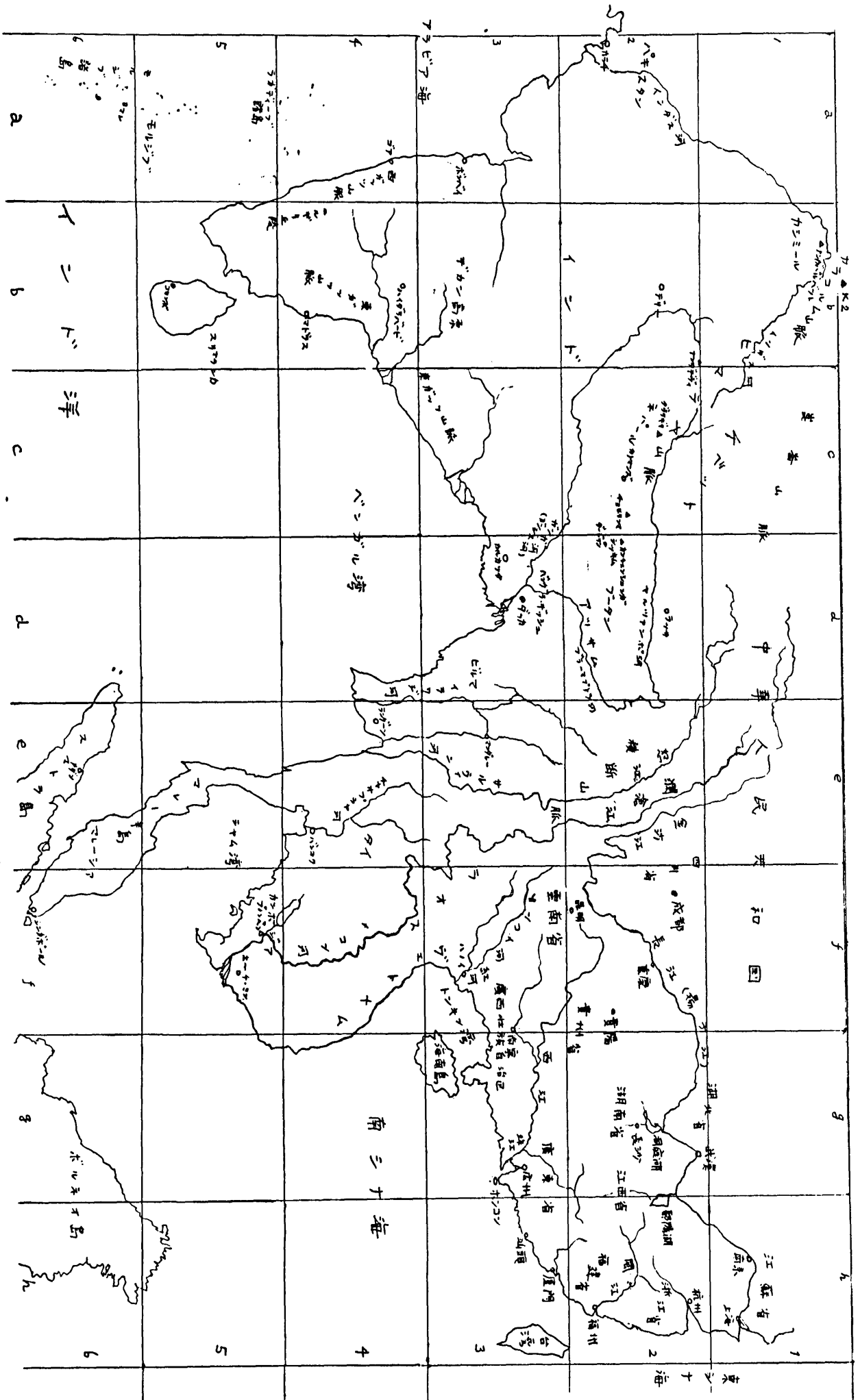


Fig. 1 インド・インドシナ・中国地図

インド・セイロン（スリランカ）、ジャワ、スマトラ（Fig. 1 c—6）の栽培種で、高木性2～3mに達し、葉は軟らかくて広く大きい。寒さに弱い。主として紅茶をつくる。

b. シナ種

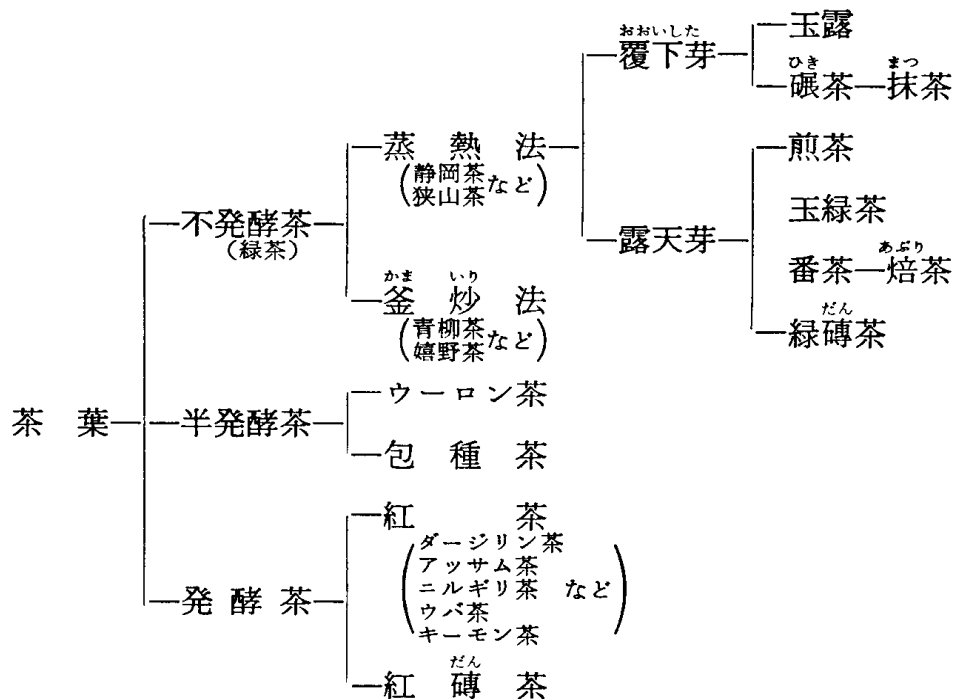
中国と台湾およびわが国にふつうに栽培されている種類で、低木性であり葉は小さくて比較的硬い。耐寒性がある。主として緑茶をつくる。

c. シナ大葉種。インド雑種など。

これらについて製茶の方法、条件によって紅茶、緑茶などがつくり分けられるのである。

製法による差は、Table 1 のようであるが、わが国や中国のような温帯では緑茶、台湾や福建省など亜熱帯ではウーロン茶や包種茶などを、そしてインドやスリランカのように熱帯では紅茶がつけられている。

Table 1 製法による茶の分類



この Table 1 に示したように、紅茶は茶葉に含まれている酸化酵素をそのままに生かして十分に発酵させるので、葉の色は黒褐色となるが、緑



Photo. 1 茶摘み（5月の一番茶）



Photo. 2 なまめつば  
生芽葉

茶は酸化酵素を失活させるために高温水蒸気で蒸すか（蒸熱法，わが国独特の方法），釜の中に入れて外から火で加熱して煎るか（釜炒法）の方法をとるので，茶葉は発酵せず，緑色を保つのである。ウーロン茶などは釜炒を少し行って，両者の中間のかたちにする。また覆下芽とは，茶葉を摘む20日くらい前から日覆をして日照を和らげたときの品質の高い芽のことをいい，露天芽は自然のままの日照を受けた芽のことをいう。茶特有の香気が，いかなる成分によるものかは諸説があって，不明の点が多い。

## § 2. 緑茶の製法

静岡県立小笠農業高等学校にて見学（昭和63年5月）  
（Fig. 2 及び Photo. 1~6）

### (1) 荒茶の製造工程

茶摘み (Photo. 1)

古くから茶の木の芽葉を手で摘みとっていたが，近年は自動式の刃で摘みとり，芽葉を布袋に吹き入れていく。「機械摘み」という。

生葉 (Photo. 2)

前日摘みとった生芽葉 (Photo. 2. のかごに入っているもの) を金属製の網の上にひろげて下から通風し，ざっと乾かす。それを給葉機にのせていく。

給葉機

生芽葉を自動的に蒸機に運びこむ。

蒸機 (Photo. 3)

ボイラーから 100°C 程度の水蒸気を送りこんで茶葉を蒸す。これは葉の中にある酸化酵素が働かないよう失活させるためである (100 kg の葉で約30分)。

冷却機 (Photo. 3)

蒸された茶葉の表面の水分を取り除きながら冷やす。

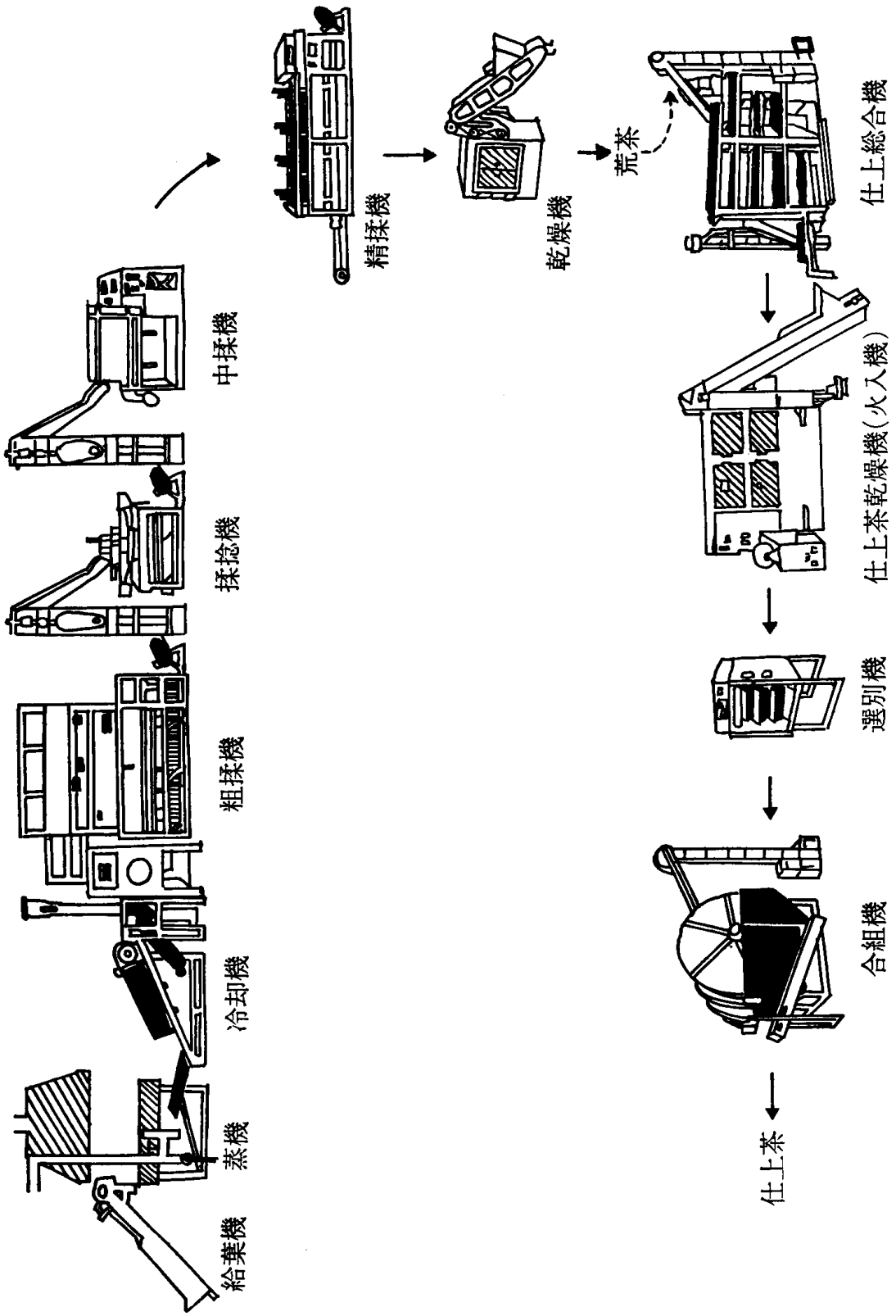


Fig. 2 緑茶の製造工程



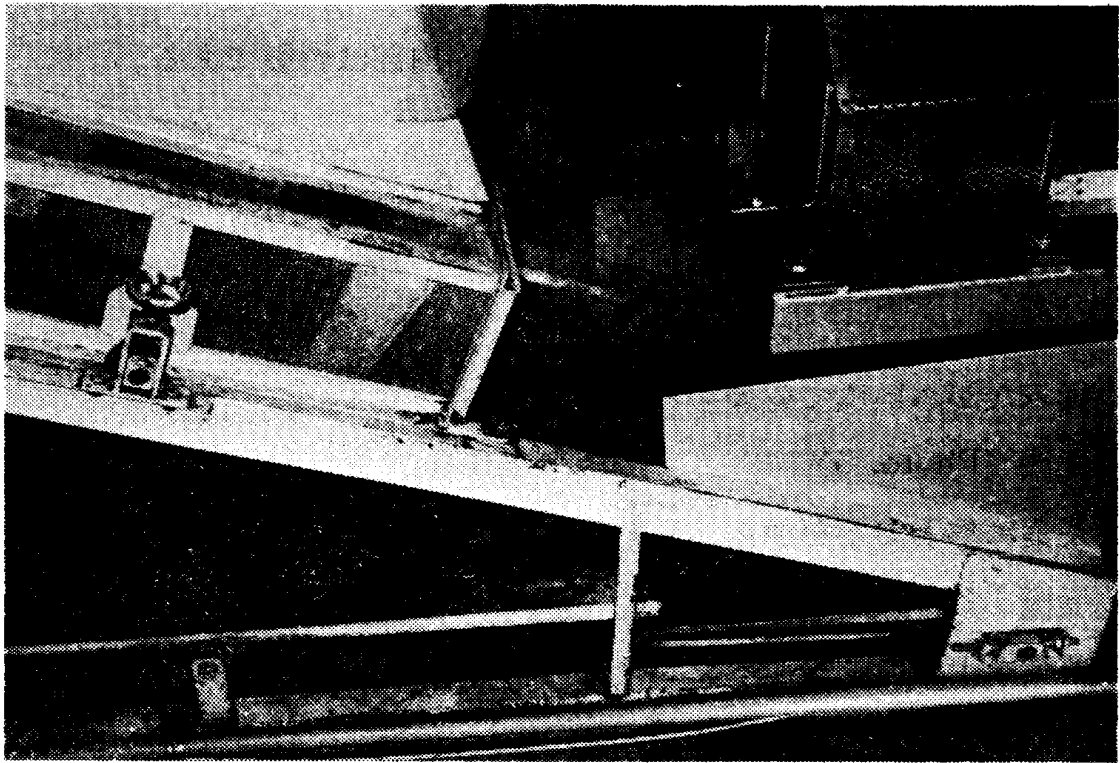


Photo. 3 左↙ 冷却機 右↑ 蒸機

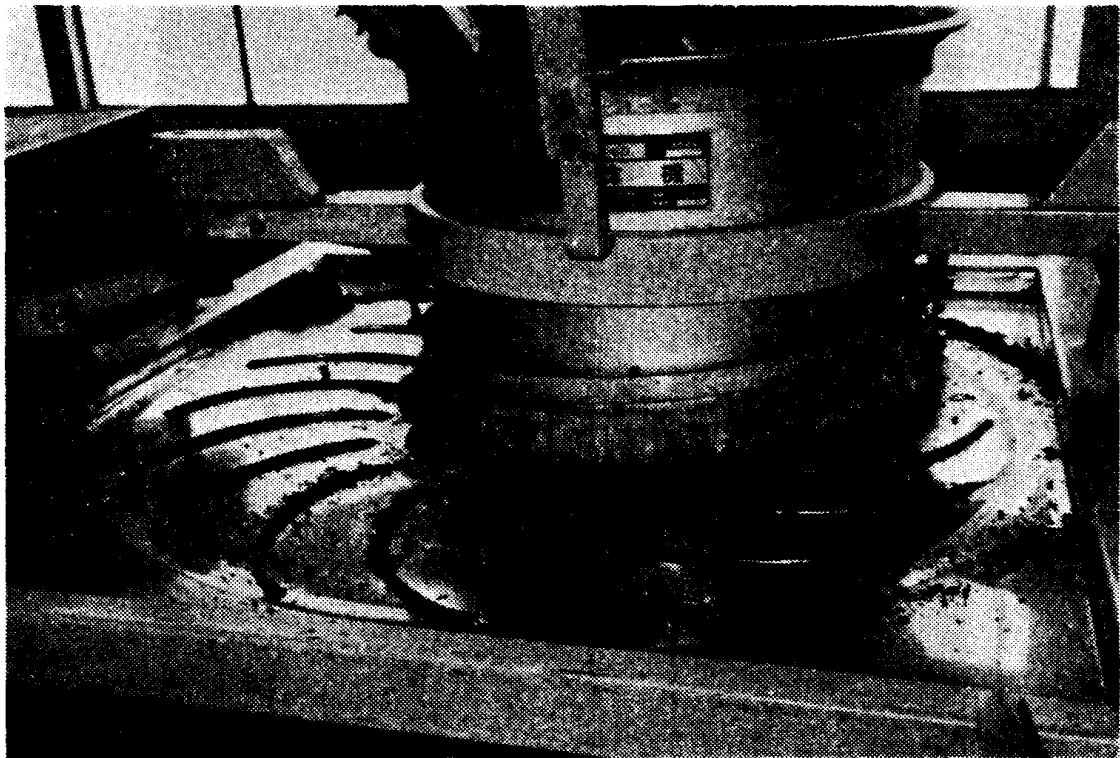


Photo. 4 揉捻機

そじゆう  
粗揉機

↓揉みながら熱風で乾燥する（約40分）。内部は竹製である。

じゆうねん  
揉捻機 (Photo. 4)

茶葉に力を加え、水分の均一をはかりながら揉む（約10分）。これに  
↓よって、葉がよれてくる。

ちゆうじゆう  
中揉機

↓揉みながら熱風で乾燥する（約20分）。

せいじゆう  
精揉機 (Photo. 5)

↓茶葉に熱と力とを加え、形を整えながら乾燥する（約40～50分）。

乾燥機

↓茶葉を十分に乾燥する。



Photo. 5 精揉機

あらちや  
荒茶

↓ 水分含有量約4～5%の茶ができる（269ページにおいての仕上茶の  
↓ 水分は約2～3%に減る）。

(2) 仕上げちや  
仕上茶の製造工程

荒茶

↓

ぼうと  
棒取り機

↓ 水分含有量に応じて葉と茎との部分を分ける。

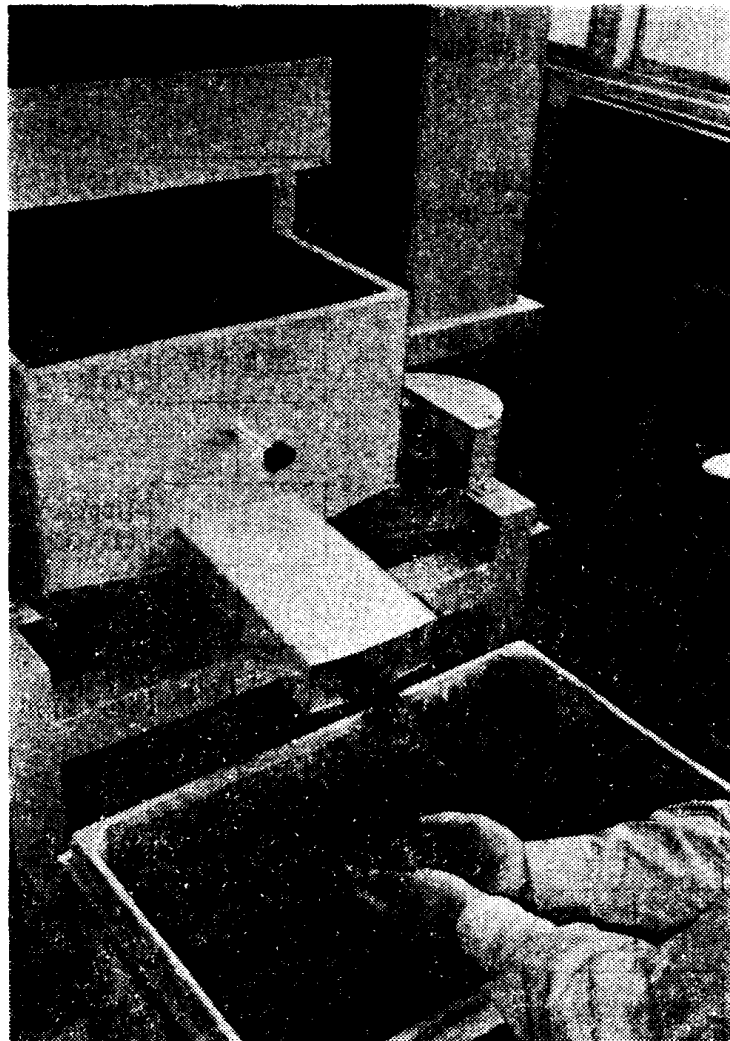


Photo. 6 合組機から出てくる仕上茶

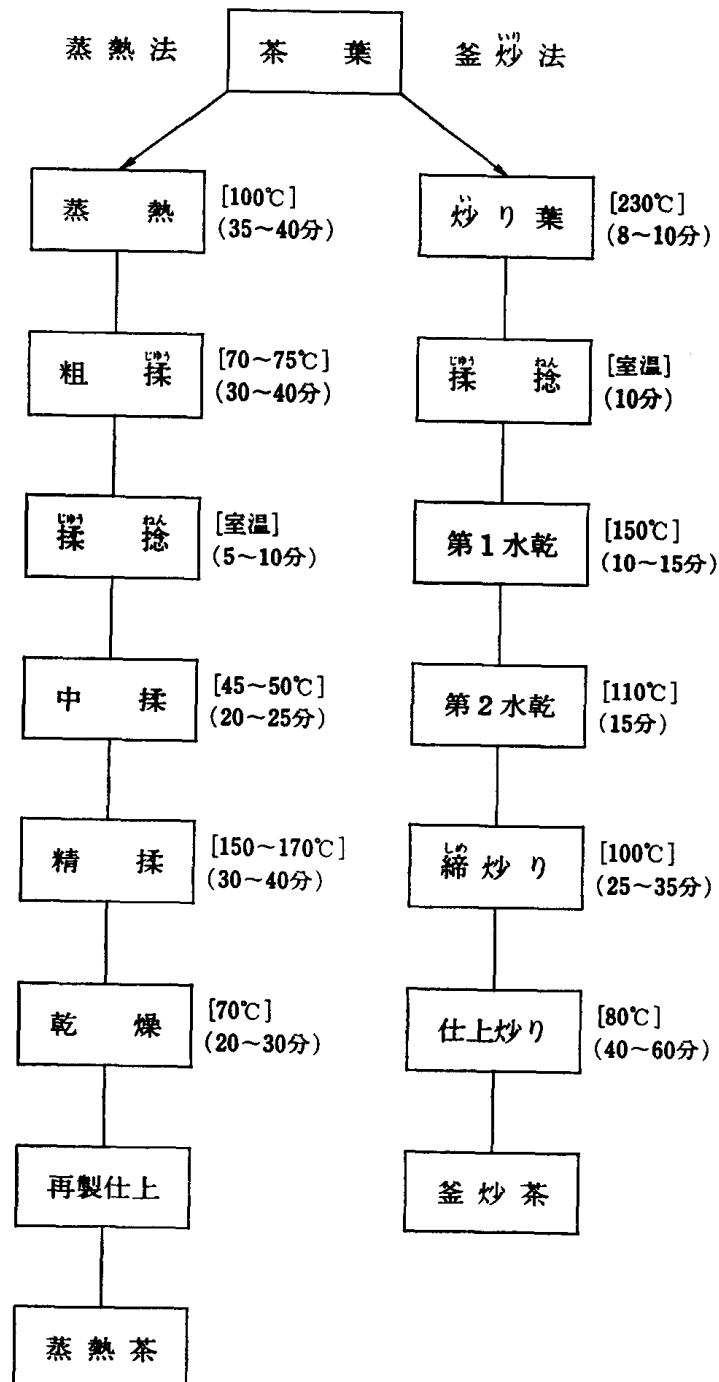
仕上げ総合機  
仕上総合機

↓ ふるいの目に応じて荒茶を分け，長いものを切断し，形を整えていく。「ふるい分け」「切断」「木茎分離」「風撰」の順序である。

仕上茶乾燥機（火入機）  
仕上げ茶乾燥機（火入機）

↓ 茶をさらによく乾燥させ，茶の香味をひきだす。

Table 2 緑茶の製法



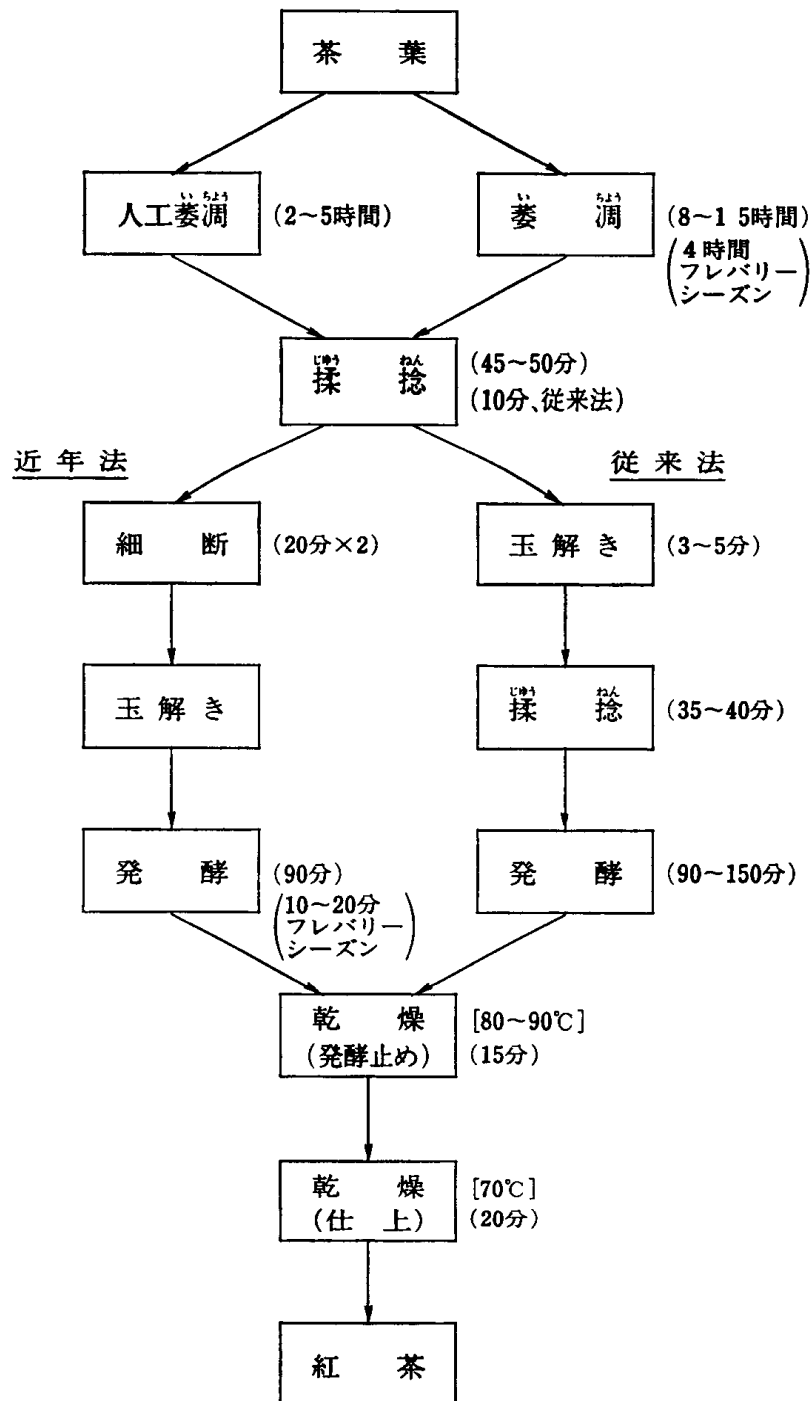
せんべつ  
選別機

↓色に応じて選別する。

ごうくみ  
合組機 (Photo. 6)

↓選別された茶を調整・配合し均一化をはかり仕上茶とする。1日に約 <sup>しあげ</sup>

Table 3 紅茶の製法



1, 300kg の茶の生葉を処理するが、生葉と製品（仕上茶）との比は5  
↓ 対1くらいになる。

仕上げ  
仕上茶

以上を要約し、釜炒茶の製法とならべると Table. 2 のようになる。

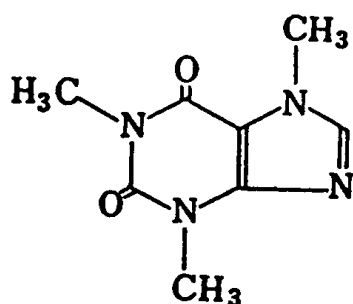
### § 3. 紅茶の製法

紅茶については既に記したように、茶葉の中にある酸化酵素を十分に作用させてつくる発酵茶で、この発酵の段階が比較的あとの方に来るとい  
う差があるが、他は緑茶と同じ工程を経て製品とする。Table. 3 に紅茶の  
製造工程を示す。

### § 4. 研究の目的

茶葉の化学成分としては、タンニン（カテキンなど）、タンパク質、う  
まみと風味に関係するアミノ酸およびアミド（テアミン（L-グルタミン酸  
- $\gamma$ -エチルアミド）、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、セリン  
など）、苦味成分であるカフェイン、灰分、ビタミンC、色素（クロロフ  
イル、カロチノイド、フラボン類）などが含まれている。

この化学成分の中、タンニン、アミノ酸類などと共に茶葉の主要成分の  
一つであるカフェインに着目した。



カフェイン (Caffeine)

1, 3, 7-トリメチルキサンチン

$C_8H_{10}N_4O_2=194.19$

無色柱状結晶，密度： $d_4^{18}=1.23$

融点 [238°]

茶葉のカフェインの分析には、古くから、重量法、比色法、滴定法、可  
視・紫外スペクトル法 (UV 法)、ガスクロマトグラフ法などが行われて  
いた。近年、分析機器のめざましい進歩開発により分析技術も高度化しつ

つあり、今回はその新しい分析機器の中で、従来の液体クロマトグラフ法に比べ、迅速且つ正確にカフェインを分離することの出来る高速液体クロマトグラフを使用し、緑茶、紅茶、ウーロン茶など茶類中のカフェインを定量し、比較検討した。

## § 5. カフェインの分析

緑茶、紅茶、ウーロン茶など、茶類中のカフェインを、高速液体クロマトグラフ (High Performance Liquid Chromatograph, HPLC と略する) を用いて分析する。

### 5.1. 実験

#### 5.1.1. 装置と器具

a. 高速液体クロマトグラフ：日本分光製 800 シリーズ。

(Fig. 3, Photo. 7)

b. 分光光度計：日本分光製 UVIDEC-660 型(可視・紫外). (Photo. 8)

c. 赤外分光光度計：日本分光製 IR-810 型. (Photo. 9)

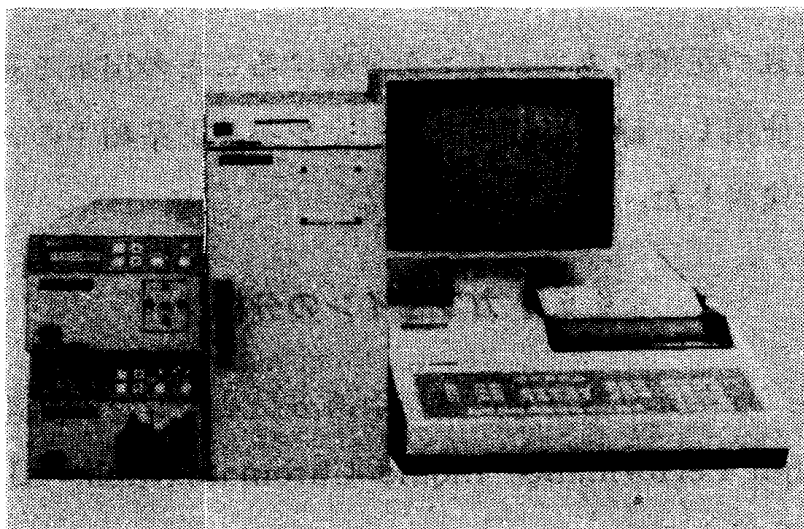
a. は茶葉の抽出液を直接に試料として成分分離の処理と定量とを行うに用いる。

使用したカラム Finapak SIL C<sub>18</sub>S (日本分光) は、極性の低いシリカ-ODS 系のカラムである。

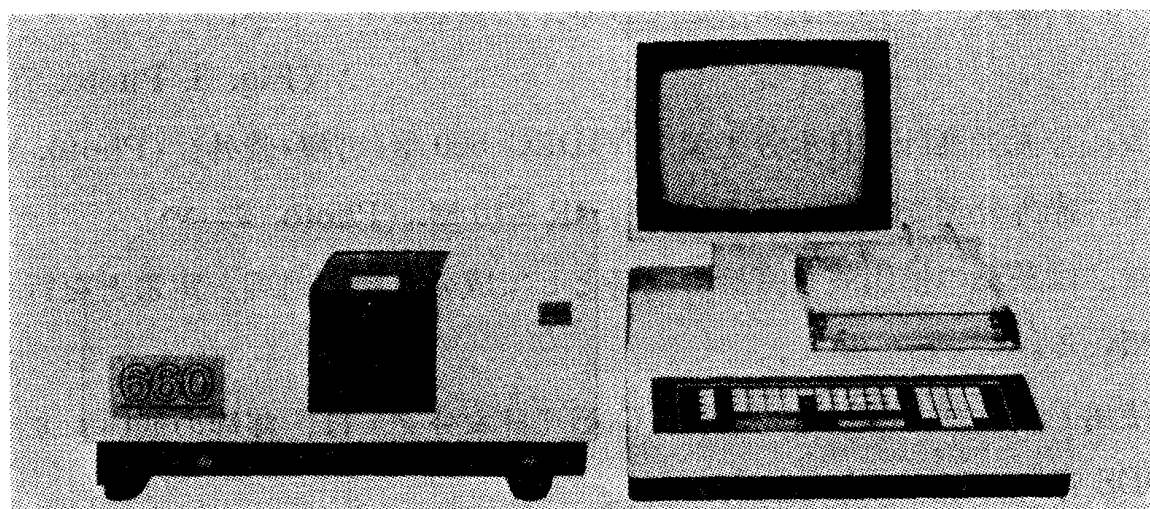
可視・紫外分光検出器 (870-UV) のフローセルに試料の分画を通過させ、目的物質の極大吸収波長の吸光度を測定する。結果は、データ処理システム (SIC Chromatocorder II) で、ベースラインの補正を行い、ピーク面積測定にもとづく、絶対検量線法によって濃度を計算する。

b. は標準試薬のカフェインにつき、可視・紫外吸収スペクトルを測定して、吸収曲線及び極大吸収波長の測定を正確に行った。

c. はカフェインと考えられる成分の分画を濃縮し、それを臭化カリウ



**Photo. 7** 高速液体クロマトグラフ  
日本分光 800 シリーズ



**Photo. 8** 分光光度計  
日本分光 UVIDEC-660 (可視・紫外)



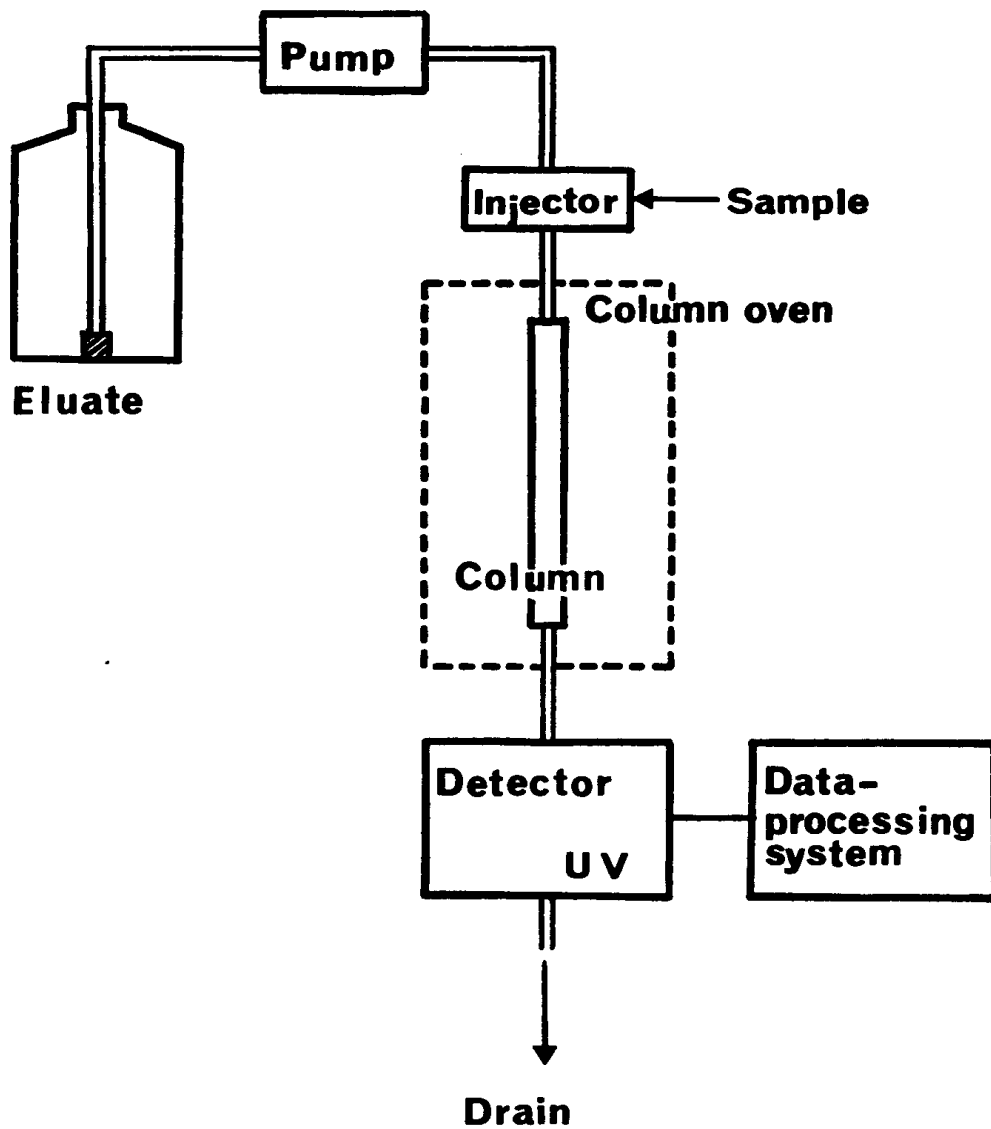


Fig. 3 高速液体クロマトグラフ 測定系

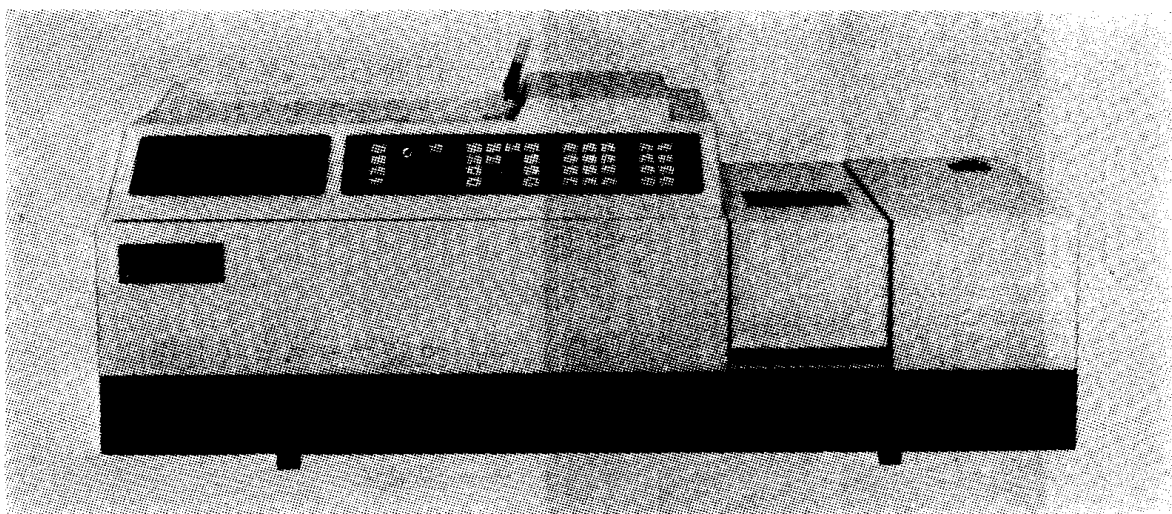
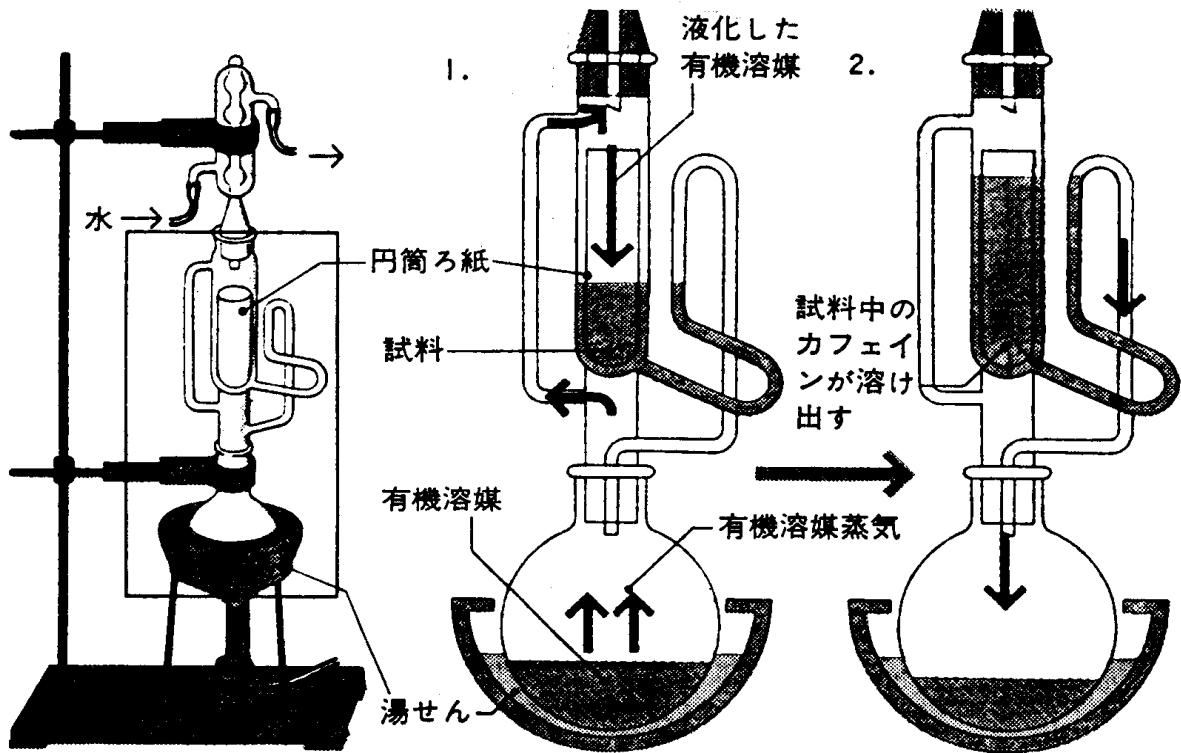


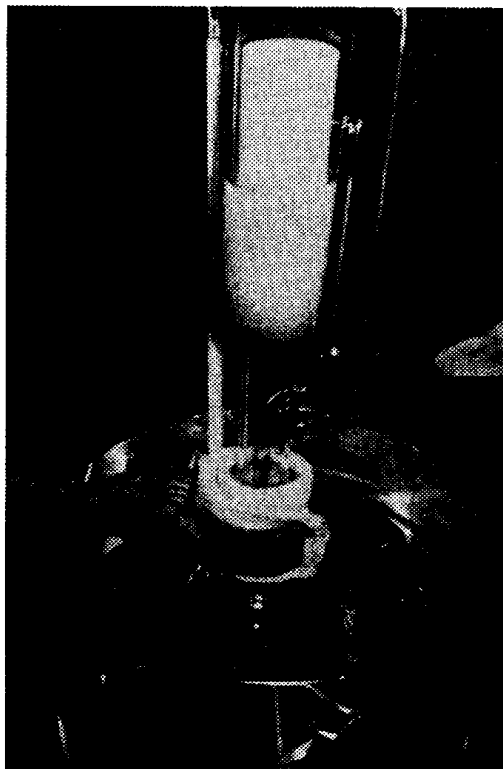
Photo. 9 赤外分光光度計  
日本分光 IR-810

## ソックスレー抽出器の使い方



①蒸発した有機溶媒が冷却器で液化して試料の上に落ちる。②サイホンの中にカフェインをとかした有機溶媒がたまると、フラスコに落ちる。

Fig. 4 ソックスレー抽出器



←円筒ろ紙 (乾燥量 2g の茶葉を入れる)

←丸底フラスコ (有機溶媒を入れる)

←湯せん

Photo. 10 使用中のソックスレー抽出器

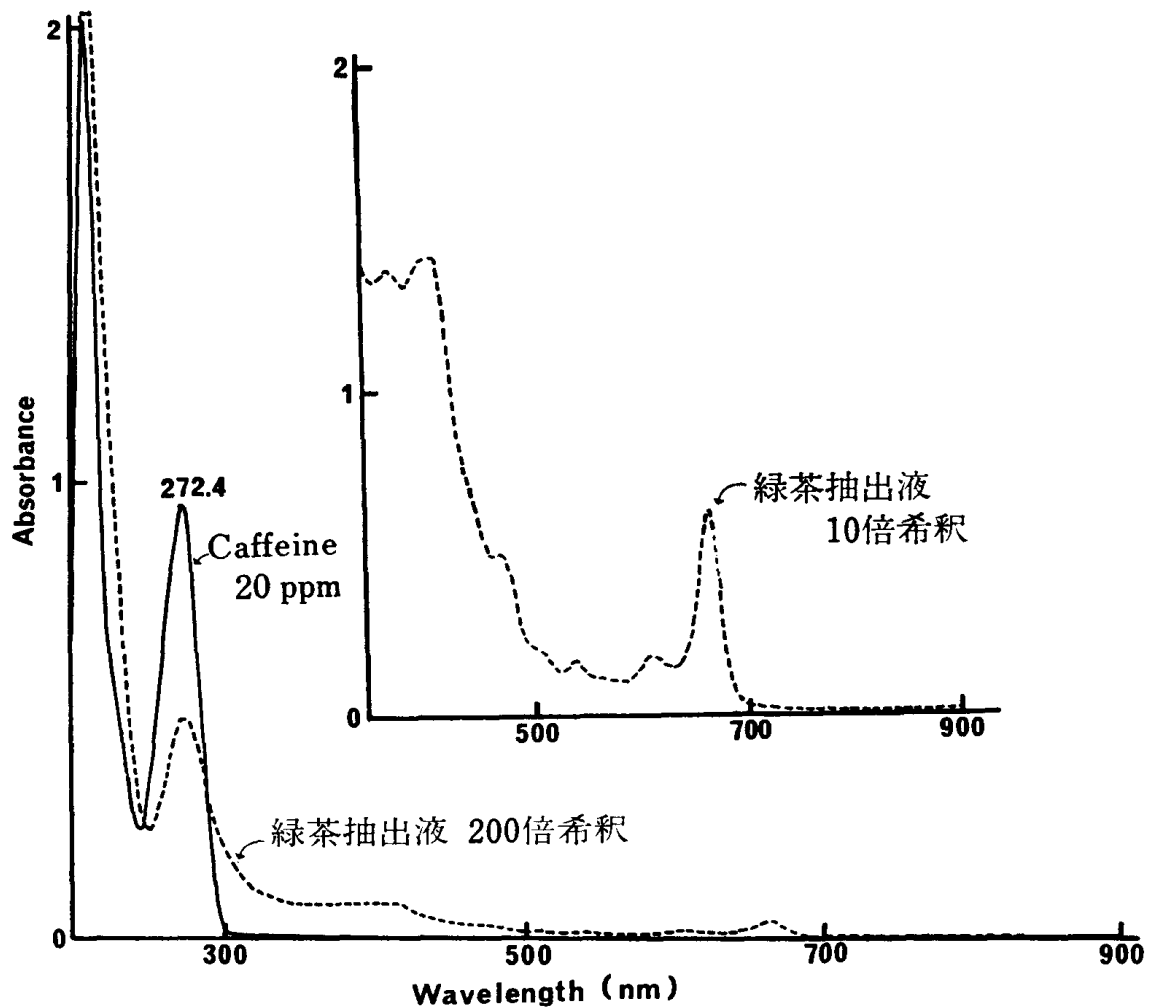


Fig. 5 カフェイン及び緑茶の吸収曲線

ム KBr 錠剤法によって赤外吸収分析を行い、カフェインであることが証明された。

#### d. ソックスレー抽出器 (Soxhlet extractor)

試料の茶葉から種々の溶媒を用いて、目的成分であるカフェインを抽出するのに利用した。この抽出器はとくに有機溶媒による抽出には便利で、再現性が高い。(Fig. 4 と Photo. 10)

### 5.2. 試薬

メタノール, リン酸, カフェインとも和光純薬製特級品を使用した。

### 5.3. 測定条件の決定

#### 5.3.1. 測定波長

カフェイン 20 ppm メタノール溶液および緑茶抽出液10倍および 200 倍

希釈溶液の吸収スペクトルを Fig. 5 に示す。

272nm から 272.8nm の間に吸収スペクトルの極大吸収値があり，モル吸光係数が約 $10^4$ と大きいので，カラムで分離されたカフェインの定量は可視・紫外分光検出器を用い 272.4nm の測定波長で行った。

### 5.3.2. 溶離液

カフェインが無極性であることから，溶離液としては極性の高い溶液で，保持能力があり，カフェインの溶解度が大きい溶媒であるメタノール-水系の溶媒を用いることにした。

溶離液は，すべて 0.45 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過後，脱気して使用した。溶離液は通常 1.0ml/min の流速で流し，圧力は 50kg/cm<sup>2</sup>～170kg/cm<sup>2</sup> 程度である。水としては 0.5% のリン酸水溶液を用いることにした。メタノール-0.5% リン酸溶液の混合比を変化させたときのカフェインの保持時間を Fig. 6 に示す。100%～0.5% リン酸溶液ではカフェインはカラムに保持されたまま溶出せず，またメタノール 80% 以上の溶液では，カフェインがカラムに保持されずに溶出してくる。溶離液におけるメタノールと 0.5% リン酸溶液との混合比を 3:7, 4:6, 5:5, 6:4 と変化させたときの試料溶液のクロマトグラムを Fig. 7 に示す。各溶離液とも完全分離はできていないが，0.5% リン酸溶液の割合が増加すると，共存物のカラムへの保持時間が長くなることを考え，メタノール-0.5% リン酸溶液 5:5=1:1 を溶離液とした。この溶離液でカフェインの各波長でのクロマトグラムを調べた結果，波長 272.4nm が最も感度が高く，最も効果的に分離が行われることがわかった。

### 5.3.3. 測定温度

メタノール-0.5% リン酸溶液 1:1 を 1.0ml/min の流速でカラムに流すと，メタノール 100% の時と比べて，系の圧力の増加が著しい。この混合比での溶液の粘度が極めて高いためである。20°C で 98.4% メタノール溶

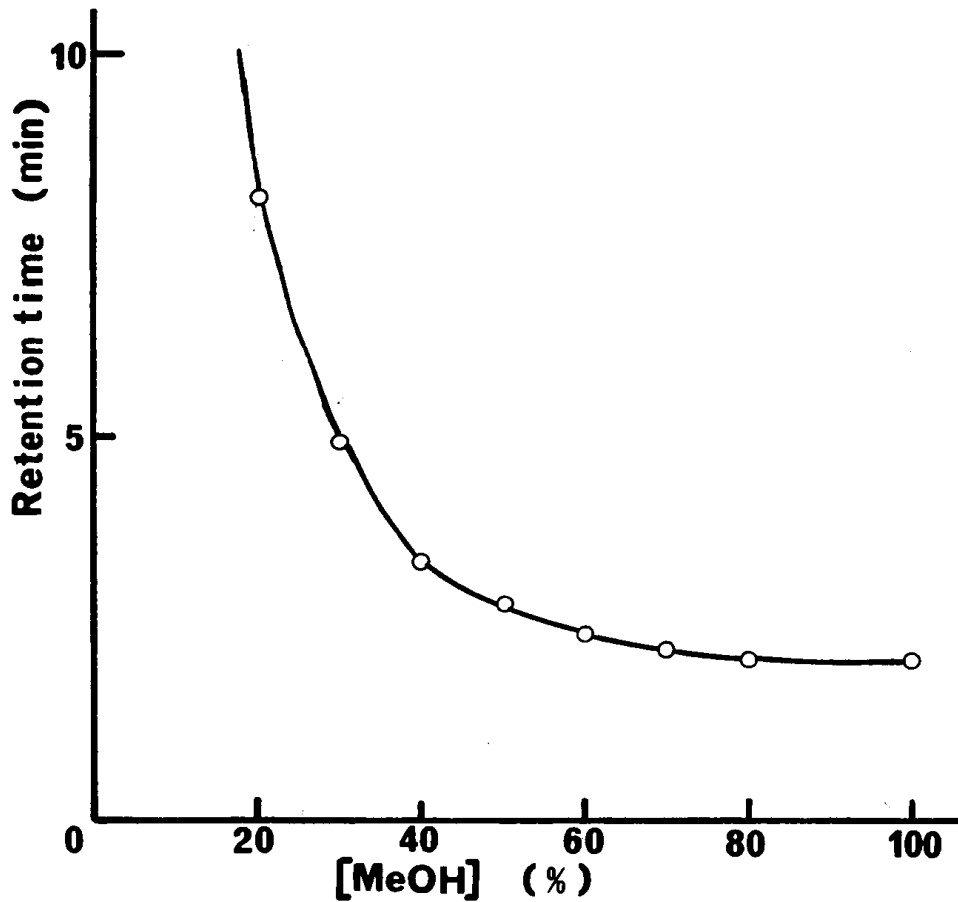


Fig. 6 メタノール-0.5%リン酸溶液のメタノール混合率とカフェインの保持時間との関係

Table. 4 カラム温度と系の圧力との関係

温度 (°C)	圧力 (kg/cm <sup>2</sup> )	温度 (°C)	圧力 (kg/cm <sup>2</sup> )
20	196	40	124
25	178	45	111
30	157	50	103
35	138	55	91

液の粘度が 0.62cp\* であるのに対し、メタノール50%溶液では 1.79cp と約3倍にも達する。粘度は溶液の温度上昇とともに減少するので、カラム温度と圧力との関係を調べた (Table 4)。カラムはカラムオープンで加熱し測定を行った。

\* cp センチポイズ：粘度の単位は1ポイズ (poise) で  $1\text{g}/\text{cm}\cdot\text{sec}$ 、この  $1/100$  がセンチポイズで cp と記す。水の粘度は  $20^\circ\text{C}$  のときほぼ1センチポイズである。

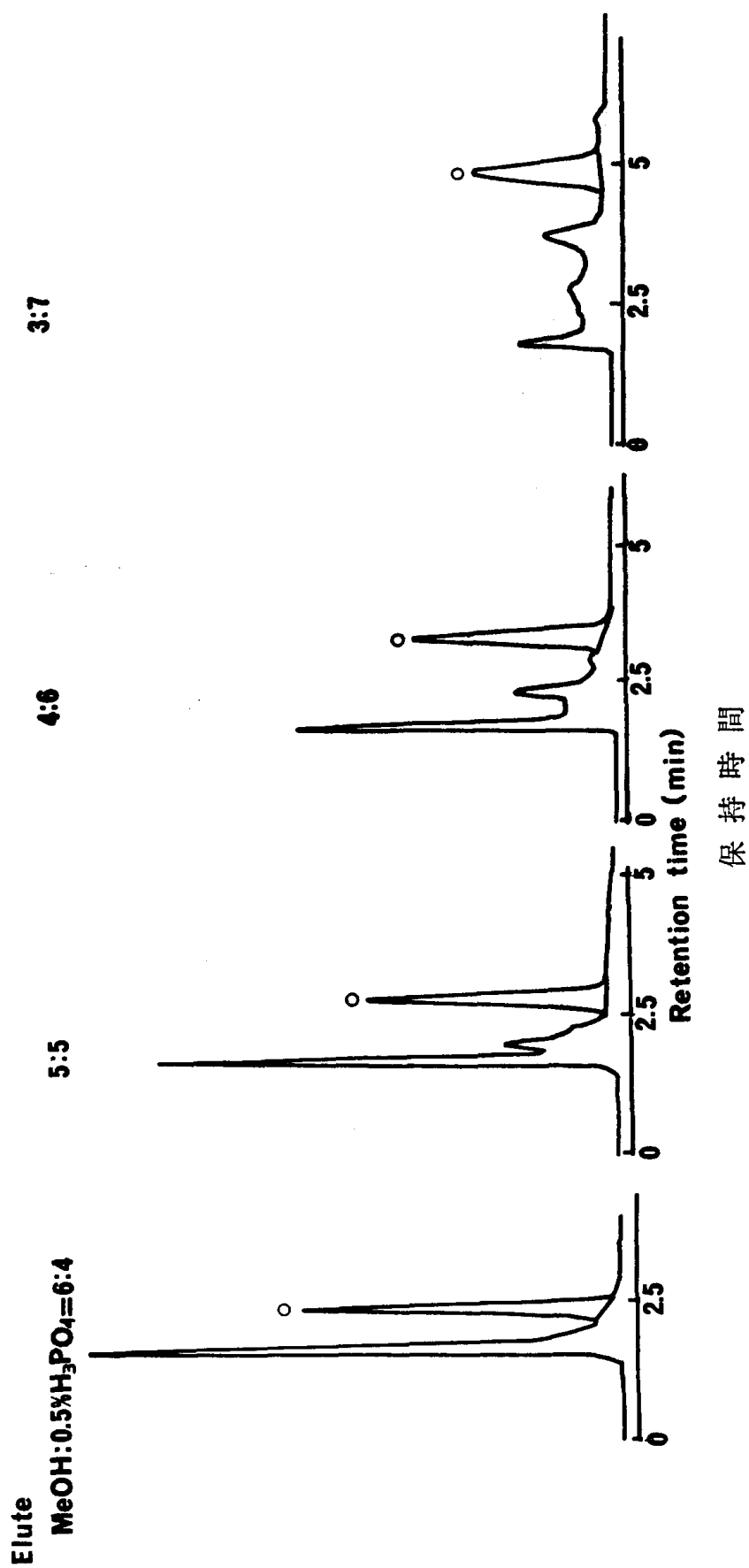


Fig. 7 各溶離液による緑茶抽出液 (10倍希釈) のクロマトグラム  
○はカフェインのピーク

#### 5.3.4. 測定条件

以上に述べた結果により，次に記す条件において，実試料の分析測定を行った。

カラム：Finepak SIL C<sub>18</sub>S

溶離液：メタノール-0.5%リン酸溶液1：1

流量：1.0ml/min

測定温度：40C°

検出器：可視・紫外分光検出器，870-UV

測定波長：272.4nm

#### 5.4. 実試料の分析測定

##### 5.4.1. 試料の調製

各種茶は，シリカゲルデシケーター内で2週間乾燥させて使用した。

カフェインはソックスレー抽出器を用いて，メタノール溶液中に抽出した。

精秤した試料茶 2g を円筒ろ紙に入れ，ソックスレー抽出器にセットし，97°Cの湯浴（湯せん）上で抽出を行った。2時間ごとに抽出液を測定し，カフェインのピークが検出されなくなるまで抽出をくり返した。各茶の抽出時間と抽出率との関係を Fig. 8 に示す。

緑茶はもっとも早く抽出され，3時間で100%抽出されるのに対して，紅茶は18時間以上抽出しても，わずかなカフェインの残留が認められた。茶の発酵の程度が進むのに応じて抽出に要する時間がかかることから，発酵の過程でカフェインが他の共存物質と結びつくのであろうと考えられる。緑茶は，3時間抽出を行った後，残留物について，さらに2時間抽出を行い，カフェインの残留がないことを確認して定量を行った。

##### 5.4.2. カフェインの検量線

カフェイン標準溶液の濃度とクロマトグラムピーク面積との関係を

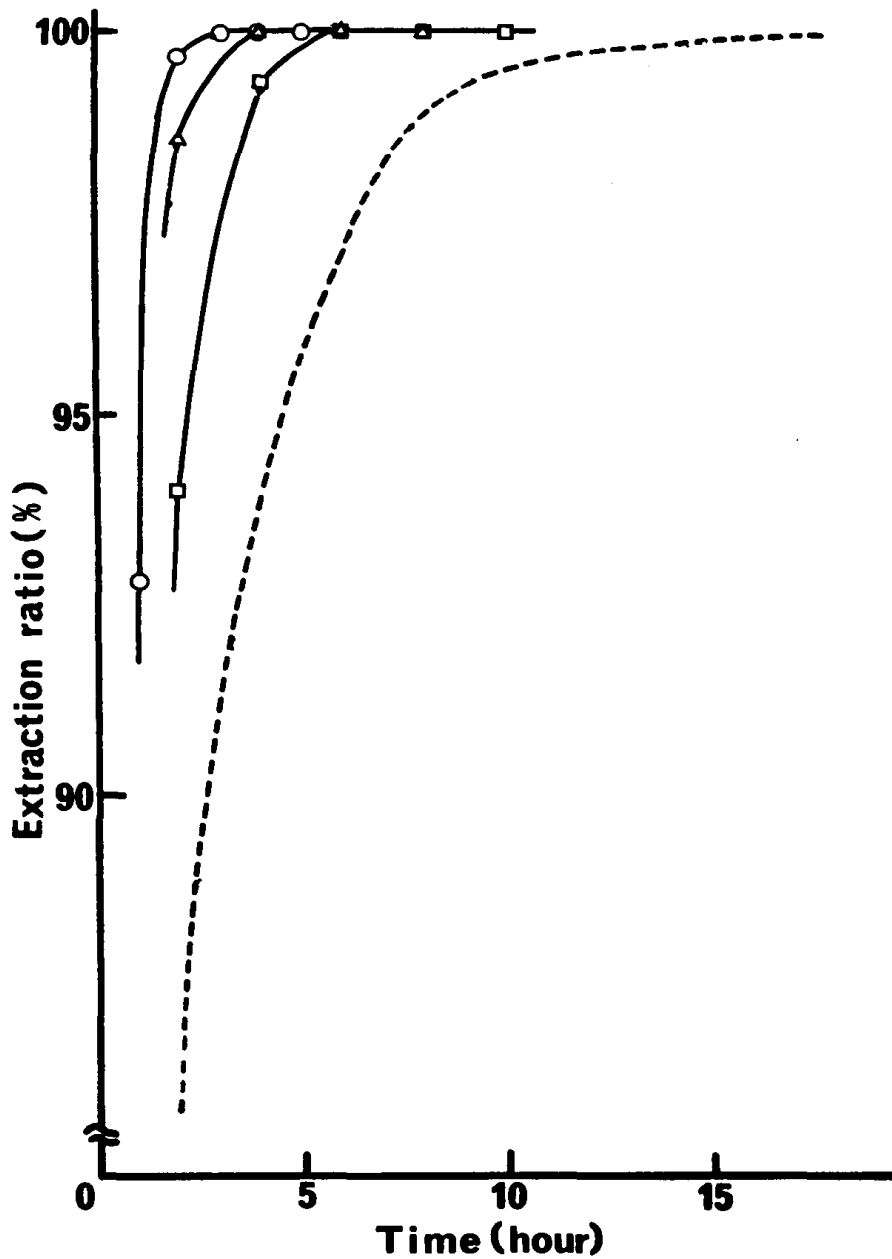


Fig. 8 各茶の抽出時間とカフェインの抽出率との関係  
○緑茶 △ウーロン茶 □ほうじ茶…紅茶

Fig. 9 に示す。グラフよりカフェイン濃度 250 ppm まで直線関係があることが分る。試料はカフェインの濃度が 200ppm 以下になるように、希釈して測定に用いた。今回は緑茶を中心とした結果を Table. 5 に示した。

#### 5.4.3. 赤外吸収測定

本実験では、赤外吸収スペクトルを用いて、さらにカフェインの確認を行った。



Table 5 各種茶の乾燥葉中及び茶汤中のカフェイン濃度

茶の種類	乾燥葉中		茶湯中					
	濃度 (%)	抽出時間 (時間)	濃度 (%)	茶葉量 (g)	湯量 (ml)	温度 (°C)	時間 (分)	
不発酵茶	煎茶(A)	3.21	3	0.069	5.00	150	80	1.5
	煎茶(B)	3.18	3	0.069	5.00	150	80	1.5
	煎茶(C)	2.92	3	0.042	5.00	150	80	1.5
	粉茶(A)	3.21	3					
	玉露(B)	4.28	3	0.099	5.00	100	60	2.0
	抹茶	4.17	3					
	玉緑茶	3.18	3	0.050	5.00	150	80	1.5
	ほうじ茶	2.33	6	0.045	5.00	200	100	1.0
半発酵茶	ウーロン茶	2.18	4					
	鉄観音茶	3.21	5					
発酵茶	紅茶 (ダーズリン)	4.41	18	0.049	3.00	150	100	3.0

A 静岡県立小笠農業高等学校1987年度 製造

B 静岡県立小笠農業高等学校1988年度 製造

C 狭山茶

粉茶・抹茶は抽出液と葉体とを同時に飲用することとなるため、茶汤としては測定不可能である。

試料中のカフェインと予測されるピークの部位を分取し、これを濃縮する。濃縮には、まず100%の水を溶離液として流し、ここに分取した溶液を注入していくと、カフェインはカラムに吸着したまま殆んど溶出して来ない。カラム上に濃縮されたカフェインを、100%メタノール溶液を溶離液にして溶出させる。この溶出液は、カフェインのメタノール溶液であるから、メタノールを蒸発させて追い出せば、濃度の高いカフェイン溶液が得られる (Table 6)。これによって Fig. 11 の様な結果を得た。標準のカフェイン (Fig. 10) と比較して 746, 1238, 1485, 1548, 1658, 1703  $\text{cm}^{-1}$  の波数と合致する吸収波数が実試料に存在するか否かを確認することによって、カフェインであるかどうかの同定が出来るはずである。

試料において 1100  $\text{cm}^{-1}$  近傍に大きな吸収が見られるのは、カラムから

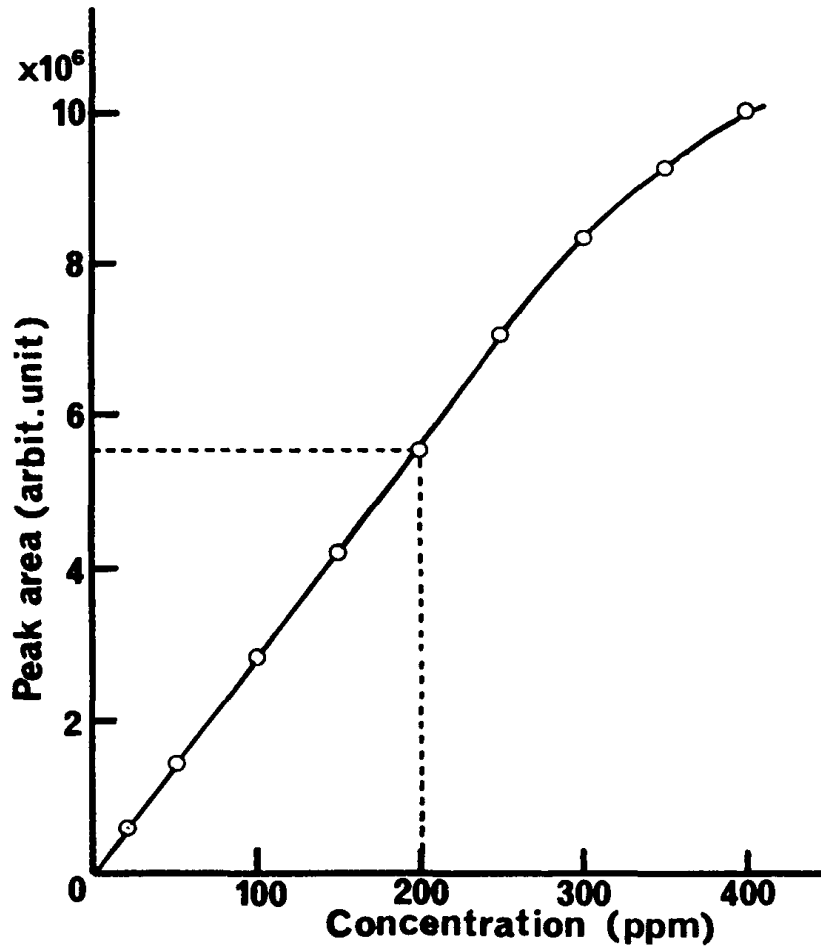


Fig. 9 カフェインの検量線

Table. 6 高速液体クロマトグラフを用いた赤外測定試料の製法

- ① カフェインと想定されるピークの部分を分取する (約 1 ml を 15 回)。
- ↓
- ② カラムをメタノールで洗浄後, 溶離液を水に交換する。(水ではカフェインが殆んど溶出しないことを確認してある)
- ↓
- ③ 10 $\mu$ l ずつ試料を注入していく——多数回 (カラム上にカフェインが吸着しているので濃縮される)。
- ↓
- ④ 溶離液をメタノールにかえ, カラム上のカフェインを溶出させ, 採取する。
- ↓
- ⑤ メタノールを蒸発させる。
- ↓
- ⑥ 残滓を測定試料とする。  
(赤外吸収分析の測定は, 日本分光工業株式会社に依頼した)

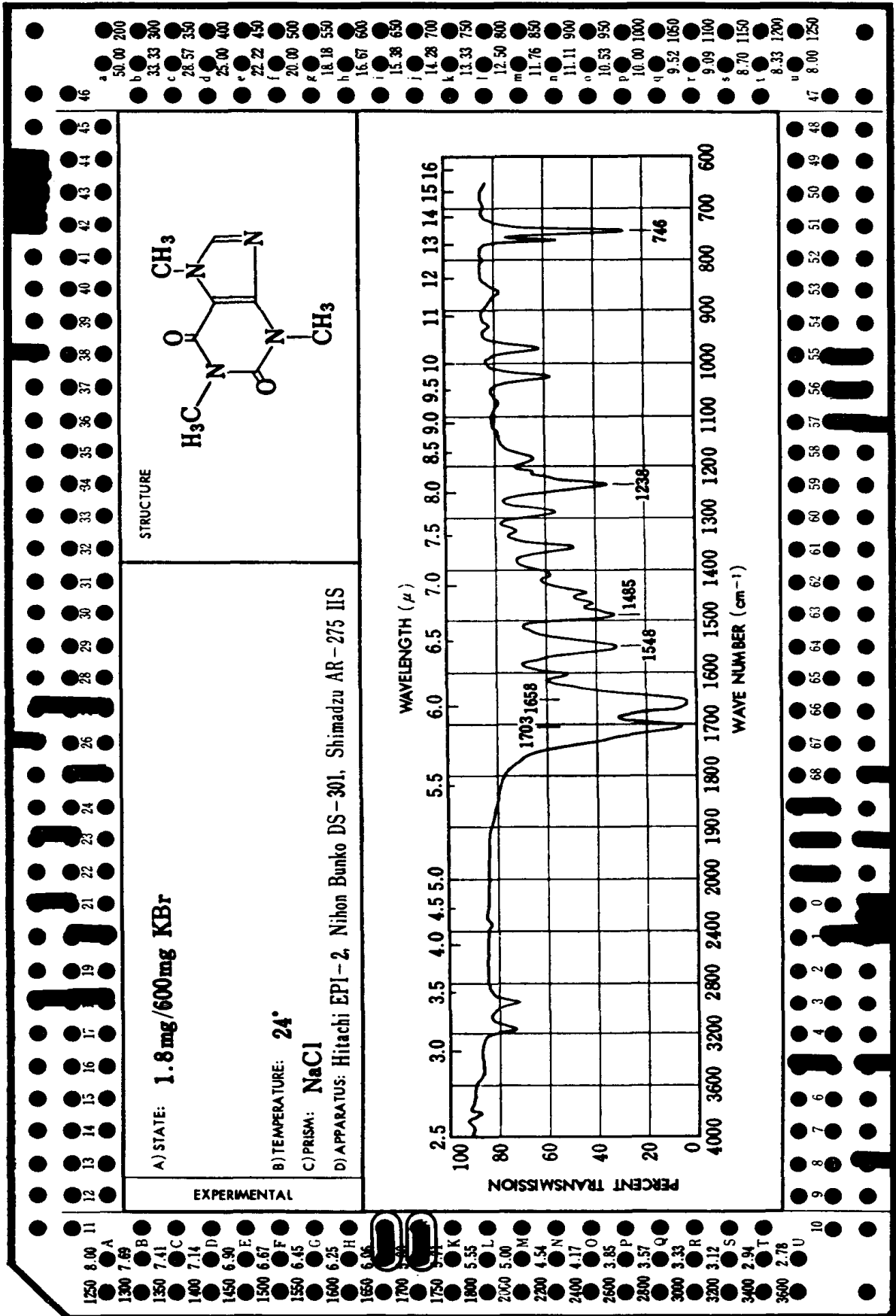
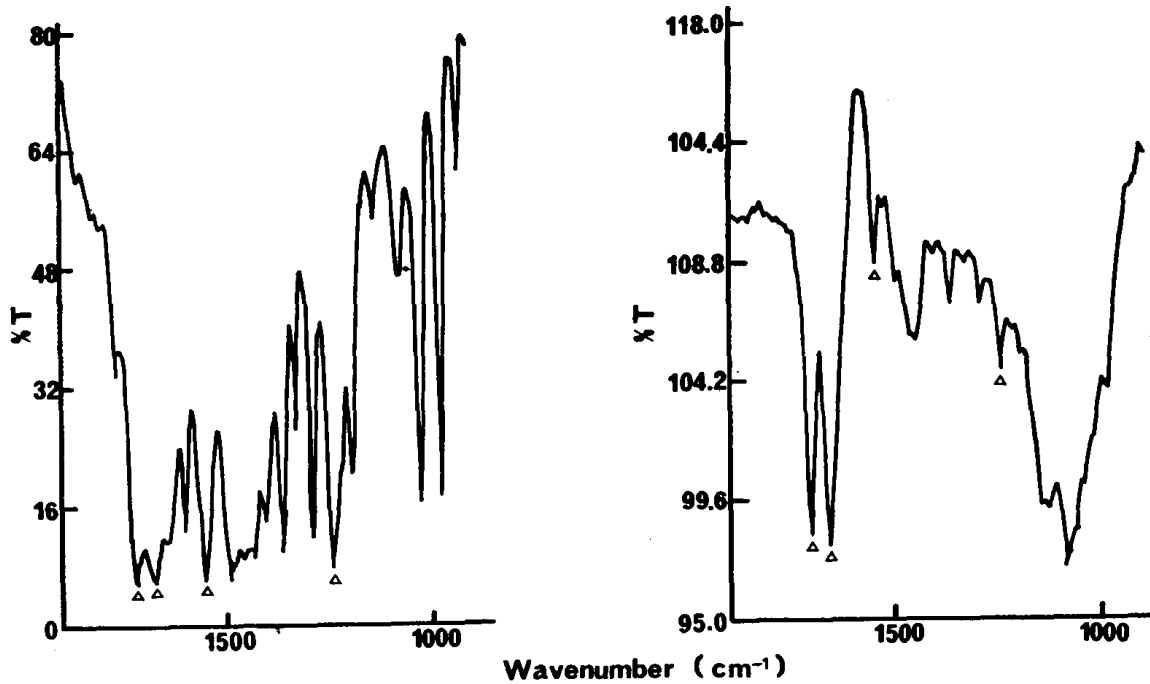


Fig. 10 カフェインの赤外吸収の標準スペクトル



(a) カフェイン標準クロロホルム溶液 (b) 緑茶抽出液からの濃縮試料  
測定法：拡散反射法

Fig. 11 赤外吸収スペクトル

溶出したシリカによるものと推定される。Fig. 11 の結果より，実試料溶液において標準カフェインと同一の保持時間に現われたピークは，ほぼカフェインと同定できる。

### おわりに

茶類の成分の分析は，有機成分および無機成分を含めて，従来，主として農学系統の研究者によって，多くの成果が発表されている。その結果，茶類は産地，製造過程および飲用方法などをもとにくわしく分類され，茶類の成分が私達人間にとっていかなる役割を果すかということ，また，それは将来とも永く私達に用いられるべきすぐれた食品であること，日本は緑茶の関係において世界に冠たる実績を有していることが明白にされている。したがって，私達が研究を始めるに当り，少くとも分析の立場に立つ限りは，みな先人の業績をあとづけするだけであると考えやすいが，ここに高速液体クロマトグラフという生物関係試料の成分を分離するのに決定

的な能力を有する機器が開発され、僅々7～8年間にぼう大な測定値が発表された。しかし、幸か不幸か茶類に関しては、あまり広く利用されていない。そこで茶の成分の中でもっとも飲用、薬用として大きな意義を有するとされているカフェインについて、この機器を適用したところ、予想通り極めて再現性が高く、また感度もすこぶる高い結果が得られた。もちろん従来の測定値を否定するものではないが、私達はこの方法を駆使して茶類の一つの新しい研究方法をつくりあげていこうと思う。ひきつづき今後の研究をこの方向で発展させていく予定である。

この研究を遂行するにあたり、種々御教示を頂いた静岡県立小笠農業高等学校、特に茶業科の先生方および測定にあたって御協力を頂いた日本分光工業株式会社の皆様方に厚く御礼を申し上げます。そして研究の方向づけについて指導して下さった千葉大学名誉教授（理学部）大八木義彦氏に感謝致します。

#### 参考文献

- 栄養化学分析書, (1949).
- 食品科学事典, 講談社 (1981).
- 世界大百科事典, 20巻 平凡社 (1981).
- 食品分析法, 日本食品工業学会編 (1982).
- 高速液体クロマトグラフ分析, 日本分析化学会関東支部編, 産業図書 (1982).
- 大百科事典, 平凡社 (1985).
- 高速液体クロマト法, 共立出版 (1986).