茶アミノ酸類の高速液体クロマトグラフィによる定量

大分県農業技術センター畑作部 広瀬 真一・玉田 重吉

A Quantitative Determination of Amino Acids in Tea by High Pressure Liquid Chromatography

By Shinichi, HIROSE and Shigeyoshi, TAMADA

Oita Prefecture Agricultural Research Center.

1 ま え が き

緑茶中のアミノ酸含量は、茶品質と密接な関係のあることが中川¹⁾によって報告されており、茶品質を検討する場合においてアミノ酸は重要な要因となって来たことから、育種や栽培試験でアミノ酸分析を行う場所が多くなって来た。このことからアミノ酸を迅速かつ高精度に分析することができれば、茶の試験研究を進めていくうえにおいて意義があると思われる。

茶アミノ酸の定量法は、久保田²⁾らのアミノ酸自動分析機を用いた分析法が最も新しい手法として報告されており、現在、茶アミノ酸分析に広く利用されている。この分析法は試料中のタンニンがニンヒドリン反応を阻害することから試料中のタンニン除去の処理が必要である。またアミノ酸自動分析機は2本のカラムを用いアミノ酸を塩基性部、酸性部、中性部の順にカラム溶出させることから分析操作および、溶出に多くの時間を必要とするなどの問題がある。高速液体クロマトグラフィはオルトフタルアルデヒド反応でけい光検出(オルトフタルアルデヒドとアミノ酸の反応生成物はけい光を発する。)であることからニンヒドリン反応よりも高感度でしかも夾雑物の影響は受けず³⁾、カラム溶出も1本のカラムで酸性部、中性部、塩基性部の順に溶出し、カラムに高圧をかけることから溶出時間は2時間でアミノ酸自動分析機よりも短時間である。

そこで筆者らは最近開発された高速液体クロマトグラフ装置を用いて茶アミノ酸を分析する際の、分析条件、分析精度、試料液の調製について検討したので報告する。

2 実験方法および結果

2.1 分析条件

分析条件は表1のように設定し、分析機は島津製作所KK, LC2型を用いた。

表1 分析条件

区 分	条 件
カラム	イオン交換樹脂カラム GEL AA-1
カラムサイズ	4mm ϕ $\times$ 25cm
カラム温度	40°C
カラム圧力	70kg/cm ²
緩衝液流量	0.5ml/min
第1緩衝液	0.2N クエン酸ソーダ PH3.1 過塩素酸で調整
第2 " "	0.6 N クエン酸ソーダ PH9.0 カセイソーダで調整
第1緩衝液と第2緩衝液の濃度配	0% — 20 min Hold (第1緩衝液) 0 ~ 15% 1%/min 15 ~ 100% 4%/min 100% — 70 min Hold (第2緩衝液)
反応液流量	0.5 ml/min
反応液の組成	1. オルトフタルアルデヒド 800mg を 12 ml のエタノールに溶解 2. ホウ酸 18.5 g カセイソーダ 9.6 g 3. 2-メルカプトルエタール 2ml ブリッジ 35 1 g 1, 2, 3を加えて 1 l にする。
サンプル量	10 μ l
検出器	けい光検出器 FLD-1 EX 300 ~ 400 nm

2.2 分析精度および回収率

2.1 の分析条件で 0.1 μ mol/ml のアミノ酸標準液ならびに試料液を用いて 5 回反復した時の変動係数は表 2.3 のとおりである。また、0.05, 0.1, 0.2, μ mol/ml のアミノ酸標準液を用いて回収率を検討した結果は表 4 のとおりで、変動係数および回収率はほぼ満足する結果が得られた。

表2 アミノ酸標準液による測定値の変動係数

反 復 アミノ酸	1	2	3	4	5	平 均	C V %
アスパラギン酸	3.40	3.35	3.10	3.25	3.20	3.26	3.66
ス レ オ ニ ン	4.35	4.20	4.00	4.20	4.20	4.19	2.97
セ リ ン	7.50	7.60	7.20	7.40	7.30	7.40	2.14
テ ア ニ ン	1.70	1.70	1.70	1.70	1.80	1.72	2.60
グ ル タ ミ ン 酸	2.20	2.10	2.00	2.00	2.00	2.06	4.34
グ リ シ ン	5.85	5.70	5.80	5.90	5.90	5.83	1.44
ア ラ ニ ン	3.15	3.15	2.95	3.00	3.00	3.05	3.07
シ ス チ ン	0.38	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	2.24
バ リ ン	3.35	3.40	3.20	3.10	3.20	3.25	3.77
メ チ オ ニ ン	3.80	3.90	3.80	3.70	3.70	3.78	2.21
イ ソ ロ イ シ ン	2.65	2.70	2.60	2.50	2.45	2.58	4.02
ロ イ シ ン	3.80	3.95	4.10	4.00	3.85	3.94	3.03
チ ロ シ ン	2.10	2.15	2.10	2.00	2.10	2.09	2.62
フェニルアラニン	2.40	2.45	2.35	2.20	2.30	2.34	4.11
ヒ ス チ ジ ン	11.75	11.40	11.65	11.50	11.60	11.58	1.17
リ ジ ン	4.30	4.30	4.25	4.50	4.55	4.38	3.08
ア ル ギ ニ ン	1.20	1.25	1.20	1.20	1.25	1.22	2.24

表3 試料液測定値の変動係数

反 復 アミノ酸	1	2	3	4	5	平 均	C V %
アスパラギン酸	5.85	6.30	5.75	6.10	6.30	6.06	4.18
スレオニン+セリン	6.15	6.00	5.85	6.05	6.20	6.05	2.26
テ ア ニ ン	15.80	17.00	15.60	16.65	15.70	16.15	3.92
グ ル タ ミ ン 酸	4.80	5.10	4.50	4.95	4.70	4.81	4.79
ア ラ ニ ン	0.55	0.60	0.59	0.57	0.55	0.57	4.00
ア ル ギ ニ ン	0.35	0.35	0.35	0.38	0.36	0.36	3.62

表4 アミノ酸標準液の回収率

濃 度 アミノ酸	0.2 μ mol /ml	0.1 μ mol /ml	0.05 μ mol /ml
アスパラギン酸	104.1%	100.0%	104.1%
ス レ オ ニ ン	97.7	100.0	100.0
セ リ ン	96.6	100.0	99.3
テ ア ニ ン	103.1	100.0	103.1
グ ル タ ミ ン 酸	105.9	100.0	102.9
グ リ シ ン	95.6	100.0	100.9
ア ラ ニ ン	101.7	100.0	101.7
シ ス チ ン	105.0	100.0	100.0
バ リ ン	101.6	100.0	100.0
メ チ オ ニ ン	98.7	100.0	104.0
イ ソ ロ イ シ ン	100.0	100.0	101.9
ロ イ シ ン	97.3	100.0	94.6
チ ロ シ ン	100.0	100.0	97.6
フェニルアラニン	95.8	100.0	91.7
ヒ ス チ ジ ン	97.4	100.0	102.6
リ ジ ン	100.0	100.0	102.4
ア ル ギ ニ ン	97.0	100.0	103.0

注) 1. アミノ酸標準液は和光純薬KKの2.5 μ mol/ml
溶液を用いた。

2. 表中の数字はピーク高法により計算した。

なお本試験での定量にはピーク高法を用いた。

2.3 試料液の調製方法

アミノ酸自動分析機ではタンニンがニンヒドリン反応を阻害することから、久保田²⁾は酢酸エチルで試料液のタンニンを除去する方法を用いているが、高速液体クロマトグラフィーはオルトフタルアルデヒド反応であるため夾雑物の影響は受けないが、浸出液の不純物は除去しないとカラムの汚れが著しいので瀬田⁵⁾は高分子物質の除去にミリポアフィルターを用いている。

そこで、久保田²⁾らの熱湯浸出法で合計5回浸出した試料液を1.0 μ mのミリポアフィルターでろ過しクロマトグラフィー用の試料とした。またミリポアフィルターを使用したことから浸出直後のアミノ酸量と、フィルターろ過後のアミノ酸量に差が生じるとこの方法は利用できないので、浸出直後の試料液にテアニンを添加して回収率を検討した結果、回収率95%でほとんど回収されることが認められた。このことから試料液の調製にはこの方法を用いることとした。

2.4 緑茶の遊離アミノ酸の分析および不明物質の存在

2.2 の分析法で分析したクロマトグラムは図2に示すように 18 種類の アミノ酸類が検出され、A B C D など 4 種の不明物質の存在も認められた。なお、クロマトグラムのパターンは 緑茶の種類や質により量的にかなり変動がみられる。

3 考 察

高速液体クロマトグラフィにより 茶のアミノ酸定量の検討を行った結果、変動係数 5 % 以内、回収率 100 % ± 5 % の精度で分析可能であることが判明した。また試料液の調製においても ミリポアフィルターでろ過するだけ

図1 標準アミノ酸 0.1 μ mol/ml のクロマトグラム

図2 緑茶のアミノ酸類のクロマトグラム

の操作で十分試料液とすることができた。しかしこの方法は10回分析するとベースラインの変動がみられることから、0.2N 水酸化ナトリウム液で10分間程度カラムを洗浄する必要が認められた。カラムの溶出時間は2時間程度でアミノ酸自動分析機よりも短時間で分析が可能で、さらに操作においてもグラジェント溶出装置により1本のカラムで2種類の緩衝液を同時に適当な濃度こう配に調整できることから分析操作は簡単であり、省力化分析が可能になったと言える。

しかしながらこの分析法は、けい光検出器による測定であることからプロリンなどの第2アミンの検出は不可能であることと、図1に示すようにスレオニンとセリンの分離が悪いなどの問題点が残されている。

次に図2のチャートに示されているように緑茶を分析した際にアスパラギン酸の前に不明物質Aのピークがあり、このAはアミノ酸と糖の結びついた物質と推定されるが、茶の種類や品質の違いによってピークの高さの変動が比較的大きいことからこの物質の究明は興味ある問題と思われる。また本試験ではアミノ酸分析機では検出されなかったγ-アミノ酪酸を検出した。

4 要 約

高速液体クロマトグラフィーを用いて茶アミノ酸の定量法について検討した。その結果は次のとおりである。

1) スレオニンとセリンの分離は十分でないが18種のアミノ酸類と4種の不明物質を検出した。

2) 試料の調製方法は、熱湯で5回浸出した試料液の不純物を除去するのにミリポアフィルターを用いた。また、ミリポアフィルター使用による、ろ液のアミノ酸含量の影響は浸出液にテアニンを添加して検討した結果、回収率95%であったことからほとんど影響がないことが

認められた。

3) 2.2の分析条件および試料液の調製法で分析した結果、測定値の変動係数は5%以内、アミノ酸の回収率は $100 \pm 5\%$ であった。

5 引 用 文 献

- 1) 中川致之：茶研報，No. 40，3～5（1973）。
- 2) 久保田悦郎，中川致之：茶技研，No. 45，51～57（1973）。
- 3) 鏡山博行，関得一郎：生化学講座，11（東京化学同人），31～52（1976）。
- 4) 小島次雄，春木達郎：高速液体クロマトグラフィー（東京化学同人），194～220（1978）。
- 5) 瀬田和夫：分析化学，27，73～74（1978）。

Summary

A method of determination of amino acids in tea was investigated by using high pressure liquid chromatography, after prior removal of the impurities from tea extract with milliporefilter.

Amino acids in tea were determined with 3.0-5.0% of coefficients of variation and $100 \pm 5\%$ of recovery by this method.

Eighteen amino acids and 4 unknown compounds were detected but the secondary amine such as proline could not be detected and also the complete separation of threonine and serine was not accomplished by this method.

(Sept. 11, 1978)