＜日本茶業技術協会技術賞受賞研究＞
緑茶浸出液における品質関連成分の迅速分析

農林水産省野菜・茶業試験場*

堀 江 秀 樹

(平成11年7月14日受理)

Development of the Rapid Methods for the Analysis
of Qualitatively Important Components in Tea Infusions

Hideki HORIE

National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea

1. は じ め に

茶業における1990年代のトピックスの一つに近赤外分光光度法の普及が上げられる。従来、専門家が独占していた化学分析法による同様の成分分析値が、この方法を用いることにより誰にでも簡単に得られるようになった。また一方で、カテキン類に代表される健康維持機能を持つ化学成分名が一般大衆へと普及したことで相まって、茶の生産・流通関係者の化学成分含量に対する関心は一層高まりつつある。近赤外分光光度法は、操作が簡便で迅速な点では画期的ではある。しかしながら、この方法の適用に当たっては検量線と類似の試料に限られ、さらに浸出液の分析は困難であり、近赤外法の適用範囲はきわめて限定されたものである。さらに検量線の作成・維持・管理には多大の労力を必要とするなど、必ずしも茶の品質関連成分分析の決定的手法とはいえない。品質を評価する上では、茶葉成分以外にも、実際に飲む状態での茶の分析も重要なので、茶の浸出液をも分析対象

とし、できるだけ簡易迅速にその品質に係わる重要成分を分析できるよういくつかの手法を開発したので紹介する。ここで取り上げる手法は大きく2つに分けられ、一つは酵素を用いた分析法であり、もう一つはキャピラリー電気泳動法に基づくものである。

2. 酵素を用いた茶成分の迅速分析

2. 1 アミノ酸の分析²⁻⁵⁾

茶浸出液成分の中でも最も重要な成分は遊離アミノ酸である。茶浸出液中の遊離アミノ酸はアミノ酸分析計や高速液体クロマトグラフィによっても分析できる¹⁾が、この場合1試料の分析に1時間程度を要するので、その簡易・迅速化が望まれてきた。そこで、図1のような原理に基づく、バイオセンサーを導入した²⁾。このアミノ酸センサーでは、酸素電極の先端にL-アミノ酸オキシダーゼを固定化した膜を装着している。L-アミノ酸オキシダーゼは、テアニン等のアミノ酸を酸化する際に、酸素を消費するので、消費による酸素濃度の低下を酸素電極で測定することによ

* 〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷2769

図1 アミノ酸センサーの原理

酵素膜：L-アミノ酸オキシダーゼを膜に固定化したもの。

図2 全アミノ酸・グルタミン酸同時分析用フローインジェクション分析装置

D：蒸留水（流速0.7ml/min）、B：緩衝液（pH6.4、1/15Mリン酸緩衝液、流速2.7ml/min）、P：ペリスタポンプ、I：インジェクションバルブ（100 μ l）、Sg：グルタミン酸センサー（グルタミン酸オキシダーゼ固定化膜使用）、Sa：アミノ酸センサー、O：高速液体クロマトグラフィ用カラムオープン（30 $^{\circ}$ C）、R：レコーダー、W：廃液。

り、アミノ酸の濃度を定量できる。

このような原理に基づくアミノ酸センサーとグルタミン酸センサーを組み合わせ、茶浸出液中の全アミノ酸とグルタミン酸を同時に迅速定量する手法を開発した（図2）³⁾。この方法では、分析の迅速化のためにフローインジェクション法を用い、茶浸出液をろ過した

試料を注射器から注入するだけで、2分以内に結果を得ることができた。同一条件で浸出した場合、高価な茶ほど全アミノ酸の濃度が高い傾向があり、また、グルタミン酸添加の表示のある茶ではグルタミン酸の濃度が著しく高かった（図3）。本法は茶の品質評価やグルタミン酸ナトリウム添加茶の判別への適用

図3 フローインジェクション法によって得られた茶浸出液中の全アミノ酸とグルタミン酸の濃度。数字は荒茶1kg当たりの単価を示す。G1及びG2は、グルタミン酸添加の表示のある市販茶。官能審査液をろ過し、ろ液を図2の装置に注入した。

図4 GABA分析用のフローインジェクション装置

D：蒸留水（流速0.2ml/min），B：緩衝液（pH8.0，100mMトリス塩酸緩衝液，400mM硫酸ナトリウム，1mM NADP⁺，5mM 2-ケトグルタル酸，2mMメルカプトエタノールを含む。流速0.2ml/min），P：ポンプ，I：インジェクションバルブ（20μl），GC：GABAseを固定化したガラスビーズを詰めたリアクター（内径1mm×長さ100mm），OC：ODS充填剤を詰めた高速液体クロマトグラフィ用ガードカラム，O：高速液体クロマトグラフィ用カラムオープン（30℃），A：1%酢酸水溶液（流速0.2ml/min），FD：蛍光検出器（励起波長360nm，検出波長460nm），IN：インテグレータ，W：廃液。

が期待される。

血圧上昇の抑制を目的に開発されたのがギャバロン茶であり，その重要成分であるγ-アミノ酪酸（GABA）についても簡便で迅速な測定法についての要望が高い。GABAseはGABAアミノトランスフェラーゼとコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼの混合標品として市販されている酵素で，式1の反応を触媒する。

そこでGABAseの作用により生成する補酵素NADPHを蛍光検出する方法で，フロー分析することを試みた^{4,5)}。すなわち，GABAseはガラスビーズに固定化し，これをシリコンチューブに詰めてリアクターとし，その下流に高速液体クロマトグラフィ用の蛍光検出器を配置した（図4）。さらに，高速液体クロマトグラフィ用充填剤をミニカラムに詰めて，茶中の蛍光物質による妨害の除去を行った。本法では4分毎にギャバロン茶の水抽出液を注入し，ギャバロン茶中のGABAの定量を行うことが可能であった。

図5 エステル型カテキン類分析用フローインジェクション装置

DW：蒸留水，B：緩衝液（500mM塩化ナトリウムを含む10mMフタル酸緩衝液，pH5.5），P：ペリスタポンプ（総流速0.7ml）D：ダンパー，I：インジェクションバルブ（100μl），C：ミキシングコイル，T：タンナーゼを固定化したガラスビーズを詰めたリアクター（内径1mm×長さ20mm），A：対照リアクター（牛血清アルブミンを固定化），F：半導体pH電極，RE：比較電極：M：pHメータ本体，R：レコーダー，W：廃液。

2. 2 カテキン類の分析^{6,7)}

茶のカテキン類は苦渋味を呈し，重要な味成分である。渋味を示すエステル型カテキン類（エピガロカテキンガレート，エピカテキンガレート等）については，酵素タンナーゼの作用により，没食子酸を遊離する（式2）。

そこで図5に示すような分析システムを組むことにより，エステル型カテキン類の分析が可能であった⁶⁾。すなわち，タンナーゼを固定化したリアクターの下流に，半導体のpH電極を置き，没食子酸の生成に伴うpHの低下をモニタするわけである。このとき茶自身のpHに由来する変化を差し引くため，アルブミンを固定化したリアクターと別のpH電極を並列に設置し，2つの電極の電位差をモニタした。この方法で3分毎に1試料の測定が可能となった。

また，ゴボウには酵素ポリフェノールオキシダーゼが含まれ，この酵素は酸素を消費してカテキン類を酸化する。従ってゴボウの組織片を酵素膜と同様に扱うことによって，

カテキン類の定量が可能と考えられる。実際にゴボウ切片と酸素電極を組み合わせることにより、茶出液中のカテキン類濃度の定量が可能であった(図6)⁷⁾。

図6 ゴボウ組織を用いたカテキン類の分析法

S: pH6.0, 0.1M酢酸緩衝液(ベースライン安定後, 同緩衝液で希釈した試料液と交換する。) A: 空気, P: ポンプ(流速: 各々2ml/min), O: 酸素電極, T: ゴボウ組織(厚さ0.2mm), F: フローセル, PS: ポテンショスタット, R: レコーダー, WB: 恒温水槽(25°C), W: 廃液。

なお、ここで述べた方法での分析結果は、いずれの方法においても従来法による分析結果と高い相関関係を得ている。

3. キャピラリー電気泳動法による茶成分の分析

3.1 主要品質成分の同時分析^{8~10)}

キャピラリー電気泳動法は内径0.1mm以下という細管で電気泳動を行い、分離分析する極めて新しい分析手法である。前章の酵素を用いた手法では、酵素の基質特異性に依存するため、迅速ではあるものの、複数成分の同時分析を行うには系を複雑化しがちである。一方、キャピラリー電気泳動法では、分離能が高いため、多成分の同時分析に適する。そこで、この手法を茶の品質関連成分分析に応用することを試み、茶葉抽出液および茶浸出液中の主要カテキン類とカフェイン、テアニン、アスコルビン酸を分離・定量することに成功した(図7)。ここでは、品質や価格と

図7 キャピラリー電気泳動法による茶主要成分の同時分析(一番茶浸出液を0.1%メタリン酸で希釈し、メンブレンフィルターを通した試料)

1: テアニン, 2: カフェイン, 3: エピガロカテキン, 4: エピカテキン, 5: エピガロカテキンガレート, 6: エピカテキンガレート, 7: アスコルビン酸。

電気泳動液: 50mMホウ酸, 10mMリン酸水素二ナトリウム, 50mMドデシル硫酸ナトリウム, 10%メタノール(pH8.2), 印加電圧: 25kV, キャピラリー温度20°C, 試料注入: 5秒間高圧注入, キャピラリー管: 内径75μm × 長さ57cm, 検出: フォトダイオードアレイ検出器を利用し200nmと270nmの二波長で検出。

の相関が高いことから分析需要の高い成分であるテアニン¹¹⁾は210nm以上の波長域では紫外線の吸収を示さないため、波長200nmを選択し、カテキン類とともにこの波長を検出に用いた。一方、アスコルビン酸もまた緑茶鮮度に関わる成分であり、可能なら同時分析が望まれる。そこでフォトダイオードアレイ検出器を用いて、270nmを第2の検出波長として選択することにより、アスコルビン酸も含めた同時分析を可能とした。最近カテキン類とカフェインの高速液体クロマトグラフィ分析に関する報告が多く発表されているが、その分析に要する時間は1試料につき30分以上かかる場合が大部分である。ここに示した方法では、キャピラリー管の洗浄を含めても20分以内に完了でき、しかも、カテキン類とカフェイン以外にテアニンとアスコルビン酸の分析も可能な点が特徴であり、近赤外分光法の検量線作成を含め多方面での利用が期待できる。

3. 2 アニオン、カチオンの分析^{12,15)}

高速液体クロマトグラフィやイオンクロマトグラフィを用いて、アニオンやカチオンの分析を行う場合には、高価な専用カラムを準備する必要がある。一方、ここで取り上げたキャピラリー電気泳動法においては、カテキン類などを分析したキャピラリー管をそのまま利用できる点が利点である。

キャピラリー電気泳動法により、茶浸出液中のシュウ酸、キナ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸などが短時間に分離・分析できる手法を開発した¹²⁾(図8)。本法により分析可能な有機アニオン類の中でも、特にシュウ酸に関しては、従来茶の品質との関連では注目されてこなかったが、今後分析の必要性が高くなるものと推察される。シュウ酸はホウレンソウなどで知られるエグ味物質であり、また著者らは、硬水で浸出した茶が白濁するのは、シュウ酸がカルシウム結合するためであると報告している¹³⁾。さらに、アルツハイマー

図8 キャピラリー電気泳動法による茶の有機アニオン分析(一番茶浸出液にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを0.25mM加え5倍希釈後メンブレンフィルターを通した試料)

1：シュウ酸，2：クエン酸，3：リンゴ酸，4：アスパラギン酸，5：グルタミン酸，6：キナ酸。

電気泳動液：10mMクロム酸ナトリウム，0.5mMテトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド，0.1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム，印加電圧：-20kV，キャピラリー温度20°C，試料注入：5秒間高圧注入，キャピラリー管：内径75 μ m×長さ57cm，検出254nm(インダイレクト法)。

図9 キャピラリー電気泳動法による茶抽出液中のアンモニウムイオン、ナトリウムイオンの同時分析
(グルタミン酸ナトリウム添加の表示のある茶を1mM硝酸で抽出後、ろ液を10倍希釈希釈しメンブレンフィルターを通した試料)

1：ナトリウムイオン，2：アンモニウムイオン，3：エチルアミン。

電気泳動液：10mMイミダゾール，20mM 18-クラウン6-エーテル(pH4.3)，印加電圧：25kV，キャピラリー温度20°C，試料注入：5秒間高圧注入，キャピラリー管：内径75 μ m×長さ57cm，検出：214nm(インダイレクト法)。

病などとの関連からアルミニウムの摂取が問題とされるが，著者らは，茶浸出液中のアルミニウムイオンの存在形態にもシュウ酸が影響することも報告している¹⁴⁾。また一方で，本法によるアスパラギン酸及びグルタミン酸の分析結果は，グルタミン酸ナトリウム添加茶の判別のためにも，利用できる可能性がある。

カチオンについては，アンモニウムイオンとナトリウムイオンの同時分析も可能であった(図9)¹⁵⁾。このような分析はイオンクロマトグラフィにおいても可能ではあるが，高価なカラムの寿命を延ばすためには，試料を十分に希釈する必要があった。この操作は煩雑であるばかりか，特にナトリウムイオンに関してはコンタミネーションの危険が大きくなる。本法では，キャピラリー管が安価であるため希釈しなくとも汚染を気にせずに分析することが可能で，キャピラリー電気泳動装置の普及に伴い，いわゆる添加茶や発色茶の判別^{16,17)}に用いられることが期待される。

4. おわりに

新たに開発した茶成分の分析法について述べた。これらの方法のうち酵素を用いた方法に関しては，生産や流通の現場での利用も考

えて開発を進めたが，残念ながら現在のところ市販の装置をそのまま使用して分析を行うことはできず，装置の組立から自ら行う必要がある。普及には，装置及び酵素膜や酵素リアクターの流通体制を整えることが必要である。一方，キャピラリー電気泳動法に関しては，市販の装置や試薬類がそのまま利用できるものの，手法の普及には装置自身の普及を待たねばならない。いずれにしても，手法を開発しただけでは片手落ちで，開発した分析法により分析が大幅に迅速化・省力化できるようになった利点を十分に活かし，茶業に残された多くの問題の解明に取り組むことが求められる。

なお本研究は安田環元茶利用加工部長，後藤哲久前品質化学研究室長の着想のもとに開始されたものであり，研究推進に当たっては，野菜・茶業試験場からは国内・海外留学の機会を与えていただいた。留学先では工業技術院水谷文夫・矢吹聡一両博士，ハワイ大学G. A. Rechinitz教授に御指導を仰いだ。また，本研究の一部は静岡製機株式会社電子事業部との共同研究の成果である。木幡勝則品質化学研究室長を始め，研究室で御助言いただいた向井俊博技官(現野菜・茶業試験場花き部流

通技術研究室長)ら研究推進にご協力いただいた全ての方々に感謝したい。

5. 引用文献

- 1) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博 (1993): 緑茶中の主要アミノ酸のOPAによるプレカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィーによる分析。茶研報, No.77, 29-33.
- 2) 堀江秀樹・向井俊博・後藤哲久・川中道夫・下原 融 (1992): 酵素センサーを用いた茶浸出液中の全アミノ酸濃度の定量。茶研報, No.75, 33-37.
- 3) 堀江秀樹・向井俊博・後藤哲久・権田実敏・川中道夫 (1993): 酵素センサーを用いた茶浸出液中のアミノ酸のフローインジェクション分析。茶研報, No.78, 53-60.
- 4) HORIE H. and G.A. RECHNITZ(1995): Enzymatic flow injection determination of gamma-amino butyric acid. Analytical Letters, 28, 259-266.
- 5) 堀江秀樹・澤井祐典・木幡勝則 (1999): キャバロン茶中のγ-アミノ酪酸のフローインジェクション分析。食科工, 46, 494-496.
- 6) HORIE H., T. MUKATA, K. KOHATA and T. GOTO (1997): Flow injection analysis of (-)-epigallocatechin gallate in green tea infusions with an immobilized tannase reactor. Food Sci. Technol. Int. Tokyo, 3, 27-30.
- 7) HORIE H., T. MUKAI, T. GOTO, M. KAWANAKA and T. SHIMOHARA(1994): Measurement of tea catechins using biosensors. 食工誌, 41, 433-435.
- 8) HORIE H., T. MUKAI and K. KOHATA (1997): Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A, 758, 332-335.
- 9) HORIE H. and K. KOHATA (1998): Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation. J. Chromatogr. A, 802, 219-223.
- 10) 堀江秀樹・山崎祐作・山内雄二・木幡勝則(1999): キャピラリー電気泳動法による茶の主要成分同時分析法の改良。茶研報, No.87, 59-65.
- 11) 向井俊博・堀江秀樹・後藤哲久 (1992): 煎茶の遊離アミノ酸と全窒素の含量と価格との関係について。茶研報, No.76, 45-50.
- 12) HORIE H., Y. YAMAUCHI and K. KOHATA(1998): Analysis of organic anions in tea infusions using capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A, 817, 139-144.
- 13) 堀江秀樹・山内雄二・木幡勝則 (1998): 緑茶の硬水浸出液に生じる白色沈殿。食科工, 45, 364-367.
- 14) 堀江秀樹・向井俊博・後藤哲久・永田忠博 (1994): ^{27}Al -NMRを用いた茶浸出液中のアルミニウムの存在形態の解析。食工誌, 41, 120-122.
- 15) 堀江秀樹・山内雄二・木幡勝則 (1999): キャピラリー電気泳動法による茶抽出液中のナトリウムイオン及びアンモニウムイオンの同時分析。茶研報, No.87, 81-84.
- 16) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博・谷口正樹(1991): イオンメーターによる茶葉中のアンモニウムの簡易分析法。茶研報, No.74, 11-13.
- 17) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博 (1992): 添加茶の化学成分による判別法。茶研報, No.75, 33-38.