技術論文

茶葉および浸出液中のフラボノール含量測定法

白 井 展 也*

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門茶業研究領域

Assay of Flavonol Contents in Tea Leaves and Infusions

Nobuya Shirai*

National Agriculture and Food Research Organization, Institute of Fruit Tree and Tea Science,
2769 Kanaya, Shimada, Shizuoka 428-8501

The purpose of this study was to establish the hydrolysis condition for flavonol glycosides in tea leaves and to clarify the flavonol contents of tea varieties. The hydrolysis condition for tea leaves was 72 % methanol, 0.6 mol/L hydrogen chloride in boiling water for 20 minutes. For tea infusions, the condition was 16 % methanol, 0.8 mol/L hydrogen chloride at 80°C for 50 minutes. All of the tea varieties contained abundant myricetin, quercetin, and kaempferol; thus, it is suggested that green tea is a useful source of these components.

(Received Jan. 9, 2018; Accepted Feb. 15, 2018)

Keywords : myricetin, quercetin, kaempferol, tea, variety

キーワード : ミリセチン, ケルセチン, ケンフェロール, 茶, 品種

野菜や茶葉などには栄養成分だけでなく、健康に有用な非栄養成分（ファイトケミカル）が、多く含まれている。特に茶葉には、エピガロカテキンガレートなどのカテキンが多く含まれ、抗酸化や血漿脂質の低下など、生体内で様々な機能性を発揮していることが報告されている¹⁾。また、茶葉にはカフェインやテアニンなどが多く含まれており、これらの摂取により、様々な疾病の予防につながる可能性がある²⁾³⁾。これまでの研究で、茶葉にはカテキン以外に、ケルセチンなどのフラボノールが含まれていることが分かっている^{4)~6)}。しかしながら、我々は、茶を浸出液の形態で摂取しているため、タマネギに比べると、茶葉浸出液中のケルセチンの含量は少なくなる。しかし、毎日の摂取が可能であるため、茶は主要なケルセチン摂取源の一つとされている^{7)~9)}。また、茶葉中には、ケルセチン以外にも、ミリセチンやケンフェロールなどのフラボノールが含まれており^{4)~6)}、これらの成分も抗がん作用、抗酸化、抗炎症作用等の健康に寄与している可能性が示唆されている^{10)~12)}。これらのことから、茶葉もしくは浸出液中のフラボノール含量を正確に把握することは、これからの茶の機能性研究について重要である。しかしながら、これまでのフラボノールの分析は、主にタマネギ中のケルセチン分析を中心にしたものであった。タマネギにはケルセチンが多く含まれているものの、ミリセチンやケンフェロールは含まれておら

ず¹³⁾、ミリセチンやケンフェロールを含む茶葉に、その加水分解条件を当てはめてよいのか不明である。また、既報⁵⁾で示された加水分解条件では、夾雑ピークの出現が認められ、十分な定量性が得られにくかった。そこで、本研究は、茶葉中のフラボノール類の分析するための最適な条件について検討し、その設定した条件で、茶葉中の各フラボノール含量を、品種および摘採期別に測定したので報告する。

実 験 方 法

1. 試 料

各品種の茶葉は、農研機構果樹茶業研究部門金谷茶業研究拠点の圃場で、2016年4~5月に摘採され、荒茶加工したものを使用した。なお、品種比較の試料は、熟度がほぼ同じになるように敵採した。茶葉試料は、同一試料を三分割し、それぞれを個別試料として、分析に供した。浸出液は、食品成分表に記載されている方法に従って、茶葉 10 g、蒸留水 430 ml、90°C、1 分間の条件で浸出した。なお、条件検討の茶葉は 2015 年 6 月に同圃場で摘採された「やぶきた」の二番茶を使用し、条件検討の浸出液は濃度調整が行えるように、同茶葉 6 g に 200 mL の熱湯を注いで、5 分間静置することで作成した。いずれの浸出液も、茶葉を取り除いた後、アドバンテック東洋株式会社製ろ紙 (No. 2) でろ過後、直ちに氷水に浸して冷却し、分析試料とした。

図 1 実験操作の流れ

2. 試 薬

ルチン (純度 98.8%, 水分 7.9%), ミリセチン (純度 99.5%, 水分 4.2%), ケルセチン二水和物, ケンフェロール (純度 99.6%), 6 mol/L 塩酸, メタノール, 酢酸, 酢酸エチルは和光純薬株式会社の特級試薬, アセトニトリルは Sigma-Aldrich 社の HPLC 用, ロイコキニザリン (純度 99.2%) は東京化成工業株式会社のものを使用した。

3. 試料の加水分解

図 1 に示す方法で, 操作を行った。各フラボノール標準品は, メタノールで溶解後, 80% メタノールで各濃度に調製した。ケルセチンについては, 361 nm で吸光度を測定し, 361 nm のモル吸光係数 $\log \epsilon = 4.34$ を利用して数値とした。各濃度の標準品は, フラボノールおよびロイコキニザリン (内部標準) の回収率が同様になるように, 塩酸の代わりに蒸留水を添加し, 非加熱の条件で試料と同様に操作した。

4. ルチン添加によるケルセチンの回収率の測定

5 段階の濃度のルチン溶液は, ケルセチン検量線の最低濃度の標準試料から検出器の定量下限を求め, その 2 倍量が最低濃度となるように作成した。その各溶液を茶葉および浸出液に添加し, 最適化された条件で加水分解を行い, ケルセチンの回収率を求めた。

5. HPLC 条件

HPLC 分析は以下の条件で行った。ポンプ: 日本分光 PU-980, カラムオープン: CO-1560, カラム温度: 30°C, カラム: Wakopak Navi C18-5 4.6 mm × 150 mm, 流速: 1.0 mL/分, 検出器: 870-UV, 波長: 370 nm, インテグレータ: C-R5 A。溶離液には, A 液: 1% 酢酸水溶液, B 液: アセトニトリルを使用し, 東京理器械株式会社の低圧グラジエント装置 LPG-1000 により, 0-5 分まで溶離液の割合を A 液 75% に保持し, 15 分で A 液の割合を 25% にし, その後保持するグラジエントをかけた。

実験結果および考察

茶葉および浸出液の加水分解時間の検討結果を図 2 に示した。茶葉中のミリセチンの値は, 10 分間で最高値を示し, ケルセチンおよびケンフェロールは, 20 分間で最高値を示した。このことから, ケルセチンおよびケンフェロールの値が最も高く, ミリセチンの値の減少が少ない 20 分間を分解時間とした。なお, 今回の検討に先立って, 添加するメタノール溶媒濃度 (60%, 80%, 100%) も検討したが, 60% および 100% では定量値が低く, また, 100% では夾雑物のピークが多く出現したため, 茶葉の加水分解には 80% 濃度のメタノールが適切であると判断した。したがって, 分解時の最終濃度はメタノール 72%, 塩酸 0.6

図 2 茶葉 (A) および浸出液 (B) の各加水分解時間における各フラボノール含量
(平均±SD: $n=3$)

表 1 茶葉および浸出液のルチン各添加濃度におけるケルセチンの回収率

茶葉		浸出液	
添加量 (μg)	回収率 (%)	添加量 (μg)	回収率 (%)
541	93.7 ± 0.8	54.1	96.6 ± 1.5
135	90.8 ± 6.9	13.5	97.1 ± 2.8
68	88.2 ± 7.4	6.8	96.4 ± 3.9
34	92.8 ± 4.5	3.4	96.2 ± 18.6
17	78.4 ± 15.8	1.7	91.0 ± 28.5

(平均±SD: $n=3$)

mol/L となる。分解時間 20 分間の相対標準偏差 (RSD) はミリセチン 3.9%, ケルセチン 2.0%, ケンフェロール 2.5% であった。

浸出液の加水分解時間の検討においては、ミリセチンの値は、40 分間で最大値を示し、その後緩やかに減少したのに対し、ケルセチンおよびケンフェロールは 60 分間で最大値を示した。このことから、浸出液中のフラボノールの測定には、得られたミリセチン、ケルセチン、およびケンフェロール含量の最高値から同等に低かった 50 分間を、浸出液の加水分解時間とした。分解時の最終濃度は、メタノール 16%, 塩酸 0.8mol/L となる。分解時間 50 分間の RSD は、ミリセチン 1.3%, ケルセチン 1.1%, ケンフェロール 0.7% であった。

茶葉および浸出液におけるルチン添加によるケルセチンの回収試験の結果を表 1 に示す。茶葉の条件では、34 μg 以上で 90% 前後の回収率であった。このことから、本研究の条件では、茶葉試料中に $6.8 \times 10^{-2}\%$ 以上のケルセチンアグリコンが含まれていれば安定して定量できるものと推定できた。浸出液は、各濃度で 90% 以上の回収が得られたものの、添加量 3.4 μg 以下で回収率の値が大きく分散した。そのため、浸出液の場合は、6.8 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度の試料を用いれば、安定して定量が可能であると考えられた。

図 3 「やぶきた」および「あさつゆ」のクロマトグラム

1. ミリセチン; 2. ケルセチン; 3. ケンフェロール; 4. 内部標準 (ロイコキニザリン)

茶葉フラボノールの主要なクロマトグラムと各品種の茶葉におけるミリセチン、ケルセチンおよびケンフェロールの含有量および総フラボノール含量を、図 3、図 4 および図 5 に示す。ミリセチン含量は、「おくゆたか」で最も低く、「はるみどり」で最も高かった。ケルセチンの含有量は「りょうふう」で最も低く、「あさつゆ」で最も高かった。ケンフェロールは「あさつゆ」で低く、「りょうふう」で最も高かった。総フラボノール含量は、「おくゆたか」で最も低く、「かなやみどり」で最も高かった。

異なる時期に摘採した「やぶきた」の各フラボノール含量を図 6 に示した。ミリセチンは摘採日が遅くなるにつれて、含量が高くなる傾向を示し、ケンフェロールは逆に遅くなるにつれて、低くなる傾向を示した。ケルセチンは、今回摘採した三摘採日の第二日目が最も高かった。このことから、摘採の時期により茶葉中の各フラボノール含量が

図 4 各品種の茶葉中ミリセチン，ケルセチンおよびケンフェロール含量
(平均±SD：n=3)

図 5 各品種の茶葉中の総フラボノール含量
(平均±SD：n=3)

変化することが示唆された。西條¹⁴⁾によれば，ケンフェロールの前駆物質であるジヒドロケンフェロールは，ジヒドロケルセチンを経て，ジヒドロミリセチンに合成，または直接ジヒドロミリセチンに合成する経路が示されている。これらのことから，茶葉中のフラボノールは摘採日が遅くなるにつれて，ケンフェロールよりもミリセチンを合成する方向に進むのと同様に推察された。今回用いた「やぶきた」の各摘採日における総フラボノール含量は，早い順に 6.0 ± 0.2 , 6.2 ± 0.1 , 5.5 ± 0.3 mg/g であり，摘採日により大きく変化しなかった。また，先の品種間の検討でも，総フラボノール含量は，特定の品種で低かったが，大きな差が認められていない。摘採日により各フラボノール含量が大きく変化することを考慮すると，各フラボノールがどの品種で高いということは難しいと考える。

「やぶきた」，「さえみどり」および「そうふう」の 90℃ における浸出液中のミリセチン，ケルセチンおよびケンフェロールの含有量は，ミリセチン 7.4 ± 0.5 , 6.9 ± 0.5 , 9.0 ± 0.4 μ g/mL，ケルセチン 17 ± 1 , 18 ± 1 , 19 ± 1 μ g/mL，ケンフェロール 19 ± 3 , 16 ± 1 , 19 ± 1 μ g/mL であった。品種により，ケルセチン配糖体の浸出に違いがあるのを見るために，浸出試料にはケルセチン含量が「やぶきた」に近く，市販されている品種を選んだが，「そうふう」および「さえみどり」で順序の逆転が見られているものの，ケルセチンの値は大きな差はなく，品種による，フラボノールの浸出の違いは，大きくないものと考えられた。これまでの研究で，日本人は一日 15mg 前後のケルセチンを摂取しているものと推定されている⁹⁾。そのなかで，緑茶は恒常的に摂取できる食品のため，ケルセチンの有力な供給源の一つとして考えられている⁹⁾。緑茶の摂取量は，一人一日 600~700 ml と推定されている⁷⁾¹⁵⁾。今回の検討における「やぶきた」「さえみどり」および「そうふう」の浸出液のケルセチン含量は，いずれも 100 ml 換算すると 2mg に近いケルセチン含量であり，報告されたケルセチン摂取の推定量から考えると，緑茶はケルセチンの有用な供給源の一つであることが示唆される。また，緑茶はケルセチンだけでなく，ミリセチンやケンフェロールを多く含む食品である。現在のところケルセチンと同時にこれらを摂取できる食品は少ない¹⁶⁾。そのため，緑茶は，各フラボノールを同時に摂取するには，効果的な食品であると考えられる。

本法は，内部標準としてロイコキニザリンを利用したフラボノール測定法である。内部標準を利用しているため，添加後の定量操作は，絶対検量線法より，溶媒の揮発による誤差を防ぐことができ，操作を行いやすい。しかしながら，ロイコキニザリンは疎水性が高いため，溶媒中の水の割合が多くなると，析出してくる可能性がある。今回の検討では，水の割合が多少変化しても問題がなかったが，そ

図 6 各摘採日における「やぶきた」茶葉中フラボノール含量
(平均±SD: n=3)

の点は注意する必要があるだろう。また、本研究では茶葉と浸出液とで、方法が異なる。茶葉においては、茶葉からフラボノールを効率的に抽出するために、メタノール主体の溶媒に設定し、さらに抽出効率を上げるため、セルロースを分解する目的で、茶葉の分解温度を高く設定した。一方、浸出液については、試料中のフラボノールが低濃度であっても分析できるように、水主体の分析方法を検討した。両者の設定の違いによる、定量値への影響は、検討をしていないが、茶葉試料のフラボノールの定量値は、茶葉からの抽出が大きく影響する。そのため、フラボノールの分解による定量値の低下よりも、抽出による影響の方が大きい。また、ルチンによるケルセチンの回収率の検討では、両方法とも 90% を越えており、これらのことから、設定の違いによる、定量値への影響は少ないものと考えられる。

本研究は、茶葉および浸出液の各フラボノール含量の加水分解条件を検討し、茶葉はメタノール 72%, 塩酸 0.6 mol/L, 沸水中, 20 分間, 浸出液では、メタノール 16%, 塩酸 0.8 mol/L で, 80℃, 50 分間の条件が適切と考えられた。また、緑茶は、ケルセチンだけでなく、ミリセチンおよびケンフェロールの供給源の一つとして有望と考えられた。

要 約

茶葉および浸出液中のフラボノール配糖体の、加水分解条件の検討を行った。茶葉では各フラボノール配糖体は、メタノール 72%, 塩酸 0.6 mol/L, 沸騰水中, 20 分間, 浸出液では、メタノール 16%, 塩酸 0.8 mol/L で, 80℃, 50 分間が適当であると考えられた。いずれの品種もミリセチン、ケルセチン、ケンフェロールが多く含まれ、緑茶はこれらの供給源の一つとして有用であると考えられた。

研究の遂行にあたり、茶葉試料の提供をしていただいた農研機構果樹茶葉部門水上祐造博士に感謝します。

文 献

- 1) Suzuki, T., Pervin, M., Goto, S., Isemura, M., and Nakamura, Y. (2016). Beneficial effects of tea and the green tea catechin epigallocatechin-3-gallate on Obesity. *Molecules*, **21**, pii: E1305.
- 2) McLellan, T.M., Caldwell, J.A., and Lieberman, H.R. (2016). A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **71**, 294-312.
- 3) Vuong, Q.V., Bowyer, M.C., and Roach, P.D. (2011). L-Theanine: properties, synthesis and isolation from tea. *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 1931-1939.
- 4) Jiang, H., Engelhardt, U.H., Thräne, C., Maiwald, B., and Stark, J. (2015). Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. *Food Chem.*, **183**, 30-35.
- 5) Jeganathan, B., Punyasiri, P.A., Kottawa-Arachchi, J.D., Ranatunga, M.A., Abeysinghe, I.S., Gunasekare, M.T., and Bandara, B. M. (2016). Genetic Variation of Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in the Sri Lankan Tea (*Camellia sinensis* L.) and Their Health-Promoting Aspects. *Int. J. Food Sci.*, Article ID 6057434.
- 6) Toyoda, M., Tanaka, K., Hoshino, K., Akiyama, H., Tanimura, A., and Saito, Y. (1997). Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2561-2564.
- 7) Ioku, K., Okuda, T., Higuchi, H., Kogirima, M., and Takei, Y. (2008). Investigation of the flavonoid intake in a daily meal of the Kansai in the middle-aged women. *Memoirs of Osaka Kyoiku University. II, Social science and home science*, **56**, 1-19 (井奥加奈, 奥田豊子, 樋口 寿, 小切間美穂, 竹井瑠子関西在住の中高年女性における食事由来フラボノイド摂取量およびイソフラボン摂取量の推定. 大阪教育大学紀要 2 社会科学・生活科学).
- 8) Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., and Kinai, N. (2000). Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.*, **130**, 2243-2250.
- 9) Nishimuro, H., Ohnishi, H., Sato, M., Ohnishi-Kameyama, M., Matsunaga, I., Naito, S., Ippoushi, K., Oike, H., Nagata, T., Akasaka, H., Saitoh, S., Shimamoto, K., and Kobori, M. (2015). Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*, **7**, 2345-2358.

-
- 10) Semwal, D.K., Semwal, R.B., Combrinck, S., and Viljoen, A. (2016). Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, **8**, 90.
 - 11) Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y., and Nishigaki, I. (2014). Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *Eur. J. Med. Chem.*, **86**, 103–112.
 - 12) Kumamoto, T., Hisanaga, A., and Hou, D.X. (2017). Polyphenol functions and Molecular targets. *Oleoscience*, **17**, 497–505 (隈元拓馬, 久永絢美, 侯 徳興. ポリフェノールの機能発現に関わる分子標的, オレオサイエンス).
 - 13) Slimstad, R., Fossen, T., and Vågen, I.M. (2007). Onions: a source of unique dietary flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 10067–10080.
 - 14) Saijo, R. (2012). Metabolic maps of flavonoids. *Tea research journal*, **114**, 79–88 (西條了康, フラボノイドの代謝マップ, 茶業研究報告).
 - 15) Takahashi, A., Nakajima, K., Okada, I., Kajiura, K., and Shimazaki, Y. (2004). Investigation of daily conditions of green tea drinking and catechins intake in Saitama prefecture. *Tea research journal*, **97**, 49–58 (高橋 淳, 中島健太, 岡田 格, 梶浦圭一, 嶋崎 豊, 埼玉県における日常の緑茶飲用実態及びカテキン類摂取量の推計, 茶業研究報告).
 - 16) Miesan, K.H. and Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3106–3112. (平成 30 年 1 月 9 日受付, 平成 30 年 2 月 15 日受理)
-