イオンクロマトグラフィによるギャバロン茶の γ -アミノ酪酸の定量法

中川致之*・山田嘉隆**・澤井祐典***

Analysis of γ -Aminobutyric Acid in Gabaron Tea by Ionchromatography

Muneyuki NAKAGAWA*, Yositaka YAMADA** and Yusuke SAWAI***

* Past following Association, 1121 Kanaya, Kanaya, Shizuoka 428-0014 (home adress)

** Tea Commerce & Industries Association of Shizuoka Prefecture, 81 Kitabancho,
Shizuoka 420-0005

*** National Institute of Vegetables and Tea Science, 2769 Kanaya, Kanaya,
Shizuoka 428-8501

Gabaron tea is the special tea enriched with γ -aminobutyric acid by anaerobic treatment of fresh tea leaves. For analyzing γ -aminobutyric acid in gabaron tea an ionchromatographic method was newly developed. Optimum mobile phase concentration attaining more separative analysis and preparation methods obtaining complete extraction of γ -aminobutyric acid were investigated. A low coefficient of variation in determined values and high recovery percentages of pure γ -aminobutyric acid added to sample teas were obtained. Experimental values obtained here agreed well with those obtained by the conventional method in the γ -aminobutyric acid content. The proposed method in this paper provides simple and accurate analysis of γ -aminobutyric acid; there is no need to use precolumn derivatization by *o*-phthalaldehyde and removal of polyphenols in sample preparation, and employment of gradient elution and internal standard in measurement as required in the conventional method.

(Received Oct. 18, 2001; Accepted Dec. 14, 2001)

陽イオン、陰イオンの微量分析法の一つとして、イオンクロマトグラフィ (IC 法) がある。緑茶の分野においては、着味茶 (グルタミン酸ナトリウムを添加して、味付けをした茶に添加茶ともいう) の鑑別のためのナトリウムイオンの測定や発色茶 (重炭酸アンモニウム処理により人為的に鮮緑色にした茶) の鑑別のためのアンモニウムイオンの測定に使用されることが多い¹⁾。また、硝酸態窒素の定量にも使用されている²⁾。

ナトリウムイオンやアンモニウムイオンの測定は、1価、2価の陽イオンを測定する条件で行われるが、この時、数種のアミノ酸が同時に検出される。その中には、

γ -アミノ酪酸が認められ、クロマトグラム上で独立したピークとして存在するので、この装置を所有していれば、ギャバロン茶の γ -アミノ酪酸の測定が可能と考えられる。

ところで、ギャバロン茶とは、茶の生葉を嫌気処理する工程を加えることにより、人為的に γ -アミノ酪酸の含有量を高めた茶の名称である。 γ -アミノ酪酸は、通常の茶中には、100 g 中数十 mg 以下程度しか含まれていないが、この処理により数倍にも増加し³⁾、さらに、最近では、製法の改善により 500 mg に達するものもつくられている。また、この茶には、血圧を下げる効果があるこ

* 元静岡県茶商工業協同組合 (〒428-0014 静岡県榛原郡金谷町金谷 1121)

** 静岡県茶商工業協同組合 (〒420-0005 静岡市北番町 81)

*** 独立行政法人農業技術研究機構野菜茶業研究所、茶業研究拠点 (〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769)

とが報告⁴⁾されている。近年, GABA (γ -アミノ酪酸) 富化食品の保健性が注目されているが, ギャバロン茶は, その一つである。

現在, γ -アミノ酪酸の測定には, アミノ酸類の測定に, 多く使用されている *o*-フタルアルデヒド (OPA) によるプレカラム誘導体化 HPLC 法⁵⁾⁶⁾ が慣行法として適用されている。

また, 最近, 酵素法⁷⁾, 近赤外分光法⁸⁾ によるギャバロン茶の γ -アミノ酪酸の測定も検討されている。

そこで, IC 法による γ -アミノ酪酸の定量法を検討し, 慣行法より簡便な手法で, しかも高い精度で, γ -アミノ酪酸を測定できる方法を開発したので報告する。

実験方法

1. 供試試料

実験に供試したギャバロン茶は, 野菜茶業試験所製茶システム研究室製 28 点 (γ -アミノ酪酸含有量 123~515 mg/100 g) である。

2. 分析条件

イオンクロマトグラフとして島津 LC-10ADvp, 検出器 CDD-6A, データ処理装置としてクロマトパック C-R 5A, カラムは Shimpack IC-C3 (4.6 mm $\times$ 150 mm), ガードカラム IC-GC3 を使用した。移動相の濃度については, 分離の改善を検討した結果, 前報 (引用文献 1) の 80% に相当する 1.2 mM ジピコリン酸含有 0.8 mM シュ

図 1 普通の煎茶とギャバロン茶のクロマトグラム

1. 普通の煎茶 A 浸出液 2. ギャバロン茶 A 浸出液 3. ギャバロン茶 B 浸出液 GABA: γ -アミノ酪酸

ウ酸水溶液を採用し、1 ml/1 分の流速、40℃ の温度で測定した。

3. 測定液の調製方法

A: ギャバロン茶 (そのまま) 3 g に、1 mM HNO_3 , 60 ml を加え 2~3 回攪拌しながら 10 分浸出し、ろ過 (アドバンテック No. 5A 使用)、8.5 倍に希釈して、さらに、0.45 μm のフィルター (GL クロマトディスク) でろ過する。

B: 粉末 300 mg に 1 mM HNO_3 , 60 ml を加え 2~3 回攪拌しながら 10 分浸出し、A と同様な手順でろ過、さらにフィルターろ過する。

C: 粉末 150 mg に 1 mM HNO_3 , 60 ml を加え 2~3 回攪拌しながら 10 分浸出し、A と同様な手順でろ過、さ

らにフィルターろ過する、の 3 方法で行い、測定値を比較した。

実験結果

1. 分析時のクロマトグラム

上記の分析条件で、普通の煎茶 A、及び、ギャバロン茶 A (γ -アミノ酪酸 220 mg/100 g 含有)、ギャバロン茶 B (γ -アミノ酪酸 513 mg/100 g 含有) を分析したクロマトグラムを図 1 に示したが、ギャバロン茶には、保持時間 (RT) 6.2 前後の位置に特有の大きなピークが存在し、含有量の多いものがピーク面積が大きかった。

そこで、普通の煎茶 B の 2 倍希釈液、同液に γ -アミノ

図 2 普通の煎茶と γ -アミノ酪酸のクロマトグラム

1. 普通の煎茶 B 浸出液 (2 倍希釈) 2. 1 に γ -アミノ酪酸添加 3. γ -アミノ酪酸単独液
GABA: γ -アミノ酪酸

酪酸を添加したもの、及び、 γ -アミノ酪酸単独液を分析したところ、図2に示すように、 γ -アミノ酪酸の添加により、 γ -アミノ酪酸単独液と同じ位置である RT 6.2 前後のところにピークが出現することから、茶の場合、この位置に存在するピークは、 γ -アミノ酪酸であると考えられた。なお、グルタミン酸のピークは、RT 2.2 近辺に認められるが、セリンと重なっている可能性がある。また、煎茶 B は少ない。テアニンのピークは、RT 3.5 近辺に単独で認められる。 γ -アミノ酪酸の直後の巨大なピークはカリウムイオンによるものである。

2. 分析法の精度

IC 法による γ -アミノ酪酸の定量域を検討するため、2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 ppm の 5 段階の濃度の液をつくり、検量線を作成したところ、図3に示すように、この濃度範囲では直線性を示した。

次に、測定値の繰り返しの精度を検討するため、C の方法で測定液を調製し、同一液を 7 回繰り返して測定したところ、測定値は、265, 252, 257, 260, 259, 260 および 251 mg/100 g であり、平均値 257.7, 標準偏差 4.9 で、変動係数は 1.9% となり、精度が高かった。

また、5 点ずつ、2 組、計 10 点のギャバロン茶、それぞれ 10 g に、1 組には 10 mg の γ -アミノ酪酸 (100 mg/100 g に相当) を、もう 1 組には 20 mg の γ -アミノ酪酸 (200 mg/100 g に相当) を加えて粉碎した試料について、調製方法 C で測定液をつくり、 γ -アミノ酪酸の含有量を測定し、添加前の含有量との差から回収率を計算した。

その結果、表1に示すように、82~104% の良好な回収率が得られた。

3. 慣行法で得られた測定値との比較

慣行法で得られた測定値としては、野菜茶業試験所製茶システム研究室において、OPA によるプレカラム誘導体化 HPLC 法によって得られた分析値を使用した。

28 点のギャバロン茶 (No. 1~28) について、IC 法によって得られた定量値と慣行法で得られた定量値を比較したもの、及び、その比率を表2に示した。

まず、8 点 (No. 1~8) について、A, B, C の 3 方法で測定液を調製し比較したところ、茶を粉碎せずそのままの形で浸出する A の条件では、抽出が不十分であったが、B, C に関しては、同程度の値が得られた。

つぎに、No. 9~20 の 12 点の試料について、茶を粉末にして浸出する B, C の方法で測定液を調製し比較したところ、この場合は、C では同程度の値が得られたが、B は、抽出が不十分であった。

そこで、さらに、No. 21~28 の 8 点の試料について、

図3 γ -アミノ酪酸定量の検量線

$R^2=0.999$, 各濃度 5 回測定

表1 γ -アミノ酪酸添加時の回収率

添加量 mg	添加前 測定値 (mg/100 g)	添加後 測定値 (mg/100 g)	回収率 %
100	190	283	93
	463	559	96
	221	303	82
	291	382	91
	151	242	91
200	246	427	91
	311	504	97
	392	582	95
	164	372	104
	512	698	93

C の方法で測定液を調製し、再度、比較したところ、慣行法と同程度の結果が重ねて得られた。

これらの結果を総合して、B の条件では、抽出が不十分の場合もあるが、C の条件を採用すれば、慣行法による定量値と同様な値が得られると判断した。

考 察

IC 法は、本来アミノ酸の測定を目的とした分析法ではないので、ここで報告する方法は、 γ -アミノ酪酸の定量法として一般的なものとはいえない。

表 2 定量値の比較 (慣行法と IC 法)

試料番号	慣行法 定量値	IC 法		
		A (比率)	B (比率)	C (比率)
1	345	317 (91.9%)	360 (104.3%)	365 (105.8%)
2	368	341 (92.7%)	372 (101.1%)	388 (105.4%)
3	419	357 (85.2%)	414 (98.8%)	433 (103.3%)
4	413	400 (96.9%)	427 (103.4%)	429 (103.9%)
5	277	212 (76.5%)	257 (92.8%)	257 (92.8%)
6	278	202 (75.2%)	288 (103.6%)	277 (99.6%)
7	342	292 (85.4%)	363 (106.1%)	361 (105.6%)
8	344	282 (82.0%)	347 (100.9%)	346 (100.6%)
平均		85.7%	101.4%	102.1%
9	340		292 (85.9%)	340 (100.0%)
10	508		440 (86.6%)	488 (96.1%)
11	497		432 (86.9%)	440 (88.5%)
12	515		444 (86.2%)	512 (99.4%)
13	511		441 (86.3%)	499 (97.7%)
14	250		222 (88.8%)	246 (98.4%)
15	285		241 (84.5%)	290 (101.8%)
16	335		279 (83.3%)	309 (92.2%)
17	304		265 (87.1%)	295 (97.0%)
18	333		287 (86.1%)	311 (93.3%)
19	405		358 (88.3%)	392 (96.8%)
20	391		349 (89.2%)	327 (83.6%)
平均			86.7%	95.1%
21	194			190 (97.9%)
22	200			164 (82.0%)
23	228			224 (98.2%)
24	230			221 (96.1%)
25	123			124 (100.1%)
26	154			144 (93.5%)
27	169			165 (97.6%)
28	182			164 (90.1%)
平均				94.4%

定量値 : mg/100g

しかし、現在、着味茶、発色茶の鑑別のため、イオンクロマトグラフを所有している大手茶商などは、かなりあるので、現存の装置を利用して、 γ -アミノ酪酸を簡単に測定できることは、大きなメリットと考えられる。

図 4 に、 γ -アミノ酪酸の定量に関して、慣行法と IC 法の基本操作の比較を示したが、現在アミノ酸類の定量に多く使用されている、OPA により誘導体化して蛍光発色を測定する方法では、蛍光の強さが刻々と変化するた

め、内標準物質を加えておくことが必須であり、検量線も内標準のピーク面積との比率により作成するが、この方法では、その必要はない。

従って、プレカラムの操作は必要とせず、また、分析条件としてグラジエントのタイムプログラムも不要である。

測定液の調製に関しても、慣行法で行われている加温抽出と冷却、及び、除タンニン処理も不要になる。

図 4 γ -アミノ酪酸測定手法の比較
慣行法と IC 法

このように、操作法は大いに簡略化される。

ただし、IC 法によるこの方法では、テアニンのピークは独立しているため測定可能であるが、グルタミン酸の分離が不十分で測定できない。

従って、ギャバロン茶の製造法の研究に当たって、グルタミン酸などから如何に効率よく γ -アミノ酪酸が生成されているかを知る上では慣行法に及ばないが、 γ -アミノ酪酸そのものを定量する上においては、迅速、簡便で精度の良い方法であると判断する。

要 約

茶業界において、着味茶、発色茶の鑑別のため使用されている IC 法を利用して、ギャバロン茶の γ -アミノ酪酸を簡便に測定できる方法を開発した。

(1) この分析法は、測定域における、 γ -アミノ酪酸濃度とピーク面積との R^2 が 0.999、7 回繰り返し時の測定値の変動係数が 1.9%、 γ -アミノ酪酸添加時の回収率が 82~104% で、精度は高かった。

(2) 定量値は、慣行法によって得られる測定値と、よく一致した。

(3) プレカラム OPA 誘導体化、内標準物質の添加、グラジエント分析や加温抽出、冷却、除タンニンの測定液調製の操作が不必要で簡便である。

文 献

- 1) 中川致之：茶業研究報告，No. 81, 43 (1995).
- 2) 坂本 彬・杉山弘成・中川致之・富田 勲・此本晴夫・王 効拳・加藤忠司：茶業研究報告，No. 88, 49 (2000).
- 3) TSUSIDA, T. and MURAI, T.: *Agri. Biol. Chem.*, **51**, 2865 (1987).
- 4) 大森正司・矢野とし子・岡本順子・津志田藤二郎・村井敏信・樋口 満：農化，**61**, 1449 (1987).
- 5) 高柳博次・阿南豊正・池ヶ谷賢次郎：茶業研究報告，No. 69, 29 (1989).
- 6) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博：茶業研究報告，No. 77, 29 (1993).
- 7) HORIE, H.: *JARQ*, **34**, No. 3, 191 (2000).
- 8) 山本 芽・渕上賢一・関口礼司・丹野憲二・大森正司：日本食品科学工学会，第 47 回大会講演要旨集，p. 44 (2000).

(平成 13 年 10 月 18 日受付，平成 13 年 12 月 14 日受理)