

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (12) 790-793 (1991)

高速液体クロマトグラフィーによる茶葉中の (–)-Epigallocatechin Gallate の定量分析

阪田 功,^a 池内昌子,^a 丸山 泉,^{*,a} 奥田拓男^b

東洋薄荷工業株式会社,^a 岡山大学薬学部^b

Quantitative Analysis of (–)-Epigallocatechin Gallate in Tea Leaves by High-Performance Liquid Chromatography

Isao SAKATA,^a Masako IKEUCHI,^a Izumi MARUYAMA,^{*,a}
and Takuo OKUDA^b

Toyo Hakka Kogyo Co., Ltd.,^a Satoshicho, Asakuchi-gun, Okayama
719-03, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama
University,^b Tsushima, Okayama 700, Japan

(Received June 6, 1991)

The quantitative analysis of (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) in tea (*Camellia sinensis* L.) was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a C-18 reversed-phase column. EGCG was then eluted within 20 min by using methanol-water-acetic acid (20 : 75 : 5 (v/v/v)) as an eluent. As an internal standard, tryptophan was used.

The content of EGCG in five kinds of green tea (sencha, gyokuro, bancha, matsucha and oolong tea) and in a cup of those was determined by both the extraction method with 50% (v/v) methanol and the infusion method with water.

The largest amount of EGCG was obtained from matsucha by the extraction method, or from sencha by the infusion method.

Furthermore, EGCG contents in various parts of the tea plant were examined. The first leaf had the highest concentration of EGCG, and the concentration of EGCG decreased with the aging of the leaf.

Keywords—*Camellia sinensis*; (–)-epigallocatechin gallate; seasonal variation; developing tea plant; HPLC

茶葉は種々のタンニン成分を含み、その抽出液は抗変異原性、¹⁾ 抗腫瘍作用、²⁾ 抗酸化作用³⁾など種々の生理活性を有することが知られている。

茶葉中のタンニンの主成分である (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) (Fig. 1) は *in vitro* で発癌プロモーターの作用を阻害すること⁴⁾や虫歯の原因菌である *Streptococcus mutans* MT8148 に対し抗菌作用を持つこと⁵⁾が認められている。

タンニンの定量法として従来、子ウシの皮粉を用いる皮粉法、⁶⁾ ヘモグロビンを用いる比色法 (RA 法)⁶⁾ などのタンパク結合活性を利用する方法が行われてきた。しかし、これらの方法ではタンニンの種類による個々の含量の分析ができず、EGCG のみの定量は困難である。

以前我々の1人が高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて絶対検量線法による EGCG の定量を行っている。⁷⁾ 今回我々はより簡便な内標準法を用いた HPLC による EGCG の定量法を検討した。我々が日常親しんでいるお茶の中の EGCG 含量を調べるために、本定量法を用いて各種茶葉中及

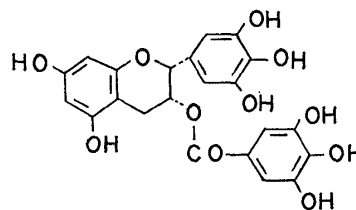


Fig. 1. Structure of (–)-Epigallocatechin Gallate

び茶飲料 1 杯あたりの含量を抽出と浸出の 2 方法で比較した。さらに茶樹の各部位における含量の分布も調べた。

実 験 の 部

1. 試薬及び試料 EGCG 標品は茶葉より HPLC を用いて分取し精製したものを用い、他の試薬は市販特級品をそのまま用いた。試料として 1989 年産の市販品 (煎茶, 玉露, 番茶 (以上八女産), 抹茶 (宇治産), ウーロン茶 (福建省産)) をそれぞれ使用した。茶樹は東洋薄荷工業敷地内で栽培したものを用いた。

2. 装置及び HPLC 条件 島津製作所製の高速液体クロマトグラフ LC-6A, 検出器 SPD-6AV 及び記録計 C-R4A を使用した。

カラムは Wakosil 5C18 (4 mm i.d.×25 cm), 溶離液にメタノール-水-酢酸 (20:75:5 (v/v/v)) を用い、流速は 0.7 ml/min とした。検出波長は 280 nm で測定を行った。

3. 試料の採取 茶葉は 8 月下旬に摘み取り、葉位別含量調査のために先端より芽, 第 1 葉, 第 2 葉, 第 3 葉, 第 4 葉, 第 5 葉, 第 6 葉, 第 7 葉に分け採取した。同時に実と茎も採取した。採取した各部はそのまま直ちに抽出に供した。

4. 試料溶液の調製 1) 浸出——試料として抹茶を除く煎茶, 玉露, 番茶及びウーロン茶を用い、一般的に生活習慣で行われている桑原らの方法⁶⁾に従って 3 回浸出を行い、一煎目, 二煎目, 三煎目の溶液を得た (Table I)。四煎目以後も浸出を行ったが, EGCG がほとんど含まれていなかったので以後三煎目までで浸出をやめた。得られた各溶液に内標準物質のトリプトファンを加え (煎茶には 20 mg のトリプトファンを, 玉露と番茶に 40 mg, ウーロン茶に 10 mg) HPLC 溶離液で正確に 100 g とし, 各試料溶液とした。

TABLE I. Infusion Conditions

	Sencha	Gyokuro	Bancha	Oolong tea
Leaves (g)	3	1.5	5	3
Water (ml)	100	25	100	100
Temp. (°C)	80	55	100	80
Time (s)	60	120	600	60
A cup of tea (ml)	90	20	135	90

2) 抽出——試料として先に述べた全種類を用いた。また, 3 (試料の採取) で得た各葉位別葉, 実, 茎も使用した。各試料 2 g に 50% (v/v) メタノール溶液 20 ml を加え, 1 時間還流後ろ過し, この操作を 3 回繰り返した。4 回目以後の抽出液中には EGCG が含まれていなかったので 3 回の抽出でやめた。3 回分のろ液をあわせ精製水を加えて全量を 50 g とした。このうち 1 g を採り内標準物質のトリプトファン 2 mg を加え HPLC 溶離液で正確に 10 ml とし, 試料溶液とした。抽出溶媒として 50% (v/v) アセトン溶液を用いたが, 50% (v/v) メタノール溶液の結果と変わらなかった。

5. 定量分析 トリプトファンを内標準物質として (0.2 mg/ml) 0.2, 0.4, 0.6 mg/ml の濃度の EGCG 各標準液を作り, 1 μ l 注入し検量線を作成した。各試料溶液を HPLC 分析し, 検量線より EGCG 含量を求めた。

結 果 及 び 考 察

1. HPLC 条件の検討

メタノール-水-酢酸の溶離液の系で分離条件検討を行った。溶離液の系の比を 20:75:5 (v/v/v) にすると, 分離のよいクロマトグラムが得られた (Fig. 2)。また内標準物質を種々検討し, EGCG のみならず茶葉中の他のカテキン類も分離定量できるトリプトファンが適当であるとの結果を得た。標品を用いて検量線を作成したところ, 良好な直線性が得られた。

2. 試料の分析

各種茶葉浸出液を本法により定量分析した結果を Fig. 3 に示す。茶の種類では煎茶の EGCG 含量が最も多かった。浸出順序では煎茶と玉露の場合二煎目の含量が多く, 番茶の場合一煎目の含量が多かった。この違いは煎茶と玉露の場合低温で少量の湯を用いて浸出するため, 一煎目の浸出が抑制されているところから生じたと思

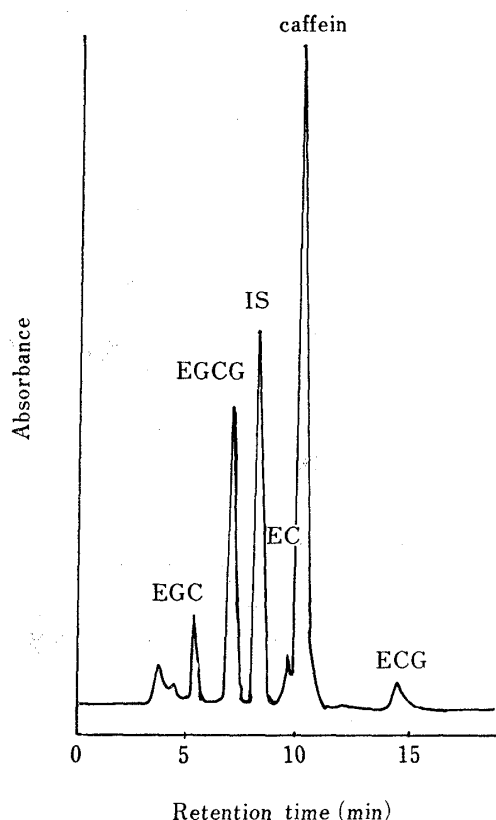


Fig. 2. A Typical HPLC Chromatogram

EGC, (-)-epigallocatechin; EGCG, (-)-epigallocatechin gallate; IS, tryptophan; EC, (-)-epicatechin; ECG, (-)-epicatechin gallate.

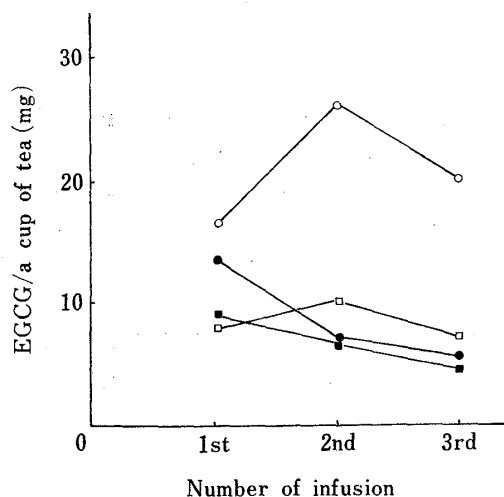


Fig. 3. Contents of EGCG in a Cup of Tea

○, sencha; □, gyokuro; ●, bancha; ■, oolong tea.

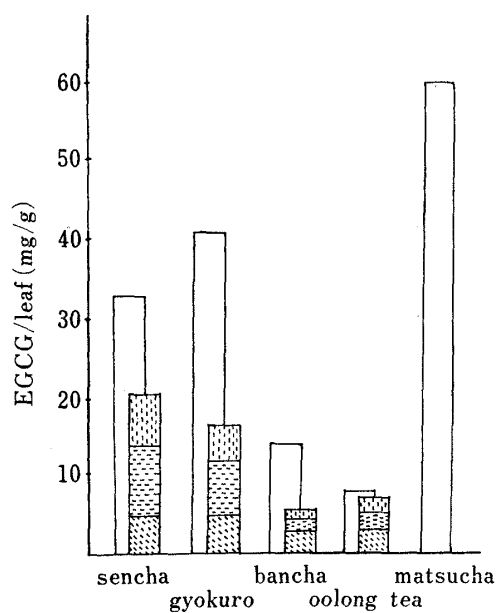


Fig. 4. Contents of EGCG in the Leaves

▧, 3rd tea infusion; ▨, 2nd tea infusion; ▩, 1st tea infusion; ■, tea extraction.

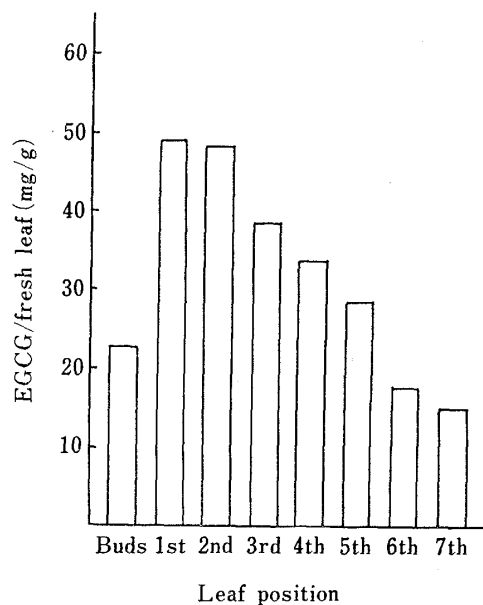


Fig. 5. Contents of EGCG in the Fresh Leaves

われる。

次に各茶葉抽出液を用いて同様に 3 回分析を行い, Fig. 4 に示す結果を得た。EGCG 含量は抹茶で多く, 次いで玉露, 煎茶の順であった。番茶とウーロン茶では少なかった。煎茶や玉露は新芽から製茶されているため含量が多いと思われる。他方半発酵茶であるウーロン茶の場合, 含量が少ないのは発酵中の損失によるものと考えられる。

玉露は浸出法と抽出法の違いによって EGCG 含量の差が大きかった。抽出に相当する玉露 1 g あたりの含量は多い。しかし、1 回に飲む液量が 20 ml と少ないため浸出に相当する茶 1 杯あたりの含量は少ない。一方、浸出が抽出に相当する抹茶も 1 g あたりの含量が多い。しかし、1 回に飲む葉の量が 0.08 g と少ないため茶 1 杯あたりの含量は少ない。

以上の結果を考えあわせると、各茶葉の EGCG 含量は茶の摘み方と関係があると思われた。そこで茶の樹の各部位における含量を調べた。その結果を Fig. 5 に示す。芽の含量は少なかったが、第 1 葉で最も多く以後は葉位が下になるにつれて減少していった。このことは上位葉を多く含む抹茶、玉露、煎茶の含量結果とよく一致していた。

茶は第 4 葉くらいの上位葉を摘むのがよいといわれている。⁹⁾ 我々が得た EGCG 含量データの面から考えた場合もこのことを支持している。

茶葉中には EGCG 以外の数種のタンニンが存在する。(−)-Epicatechin gallate (ECG) は、EGCG の次に多く含まれているタンニン成分である。この ECG についても EGCG と同時に定量分析を行ったところ、EGCG と同じ傾向を示した。

引 用 文 献

- 1) T. Okuda, K. Mori, H. Hayatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3755 (1984).
- 2) I. Oguni, K. Nasu, S. Yamamoto, T. Nomura, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1879 (1988).
- 3) T. Okuda, Y. Kimura, T. Yoshida, T. Hatano, H. Okuda, S. Arichi, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1625 (1983).
- 4) Y. Fujita, T. Yamane, M. Tanaka, K. Kuwata, J. Okuzumi, T. Takahashi, H. Fujiki, T. Okuda, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **80**, 503 (1989).
- 5) S. Sakanaka, M. Kim, M. Taniguchi, T. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2307 (1989).
- 6) T. Okuda, T. Yoshida, K. Mori, T. Hatano, *Heterocycles*, **15**, 1323 (1981); T. Okuda, K. Mori, T. Hatano, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1424 (1985); 奥田拓男, 化学の領域, **35**, 264 (1981).
- 7) 奥田拓男, 吉田隆志, 波多野 力, 毛利和子, 杉本恵子, 矢野敦子, 矢野洋子, 林 心炯, 日本生薬学会第 31 回年会, 東京, 1984 年講演要旨集, p. 46.
- 8) 桑原穆夫, 食の科学, **28**, 75 (1976); 山崎清子, 島田キミエ, 下村道子, 中里トシ子, 調理のための調理実験, 山崎清子編, 同文書院, 東京, 1984, p. 170.
- 9) 酒戸弥二郎編, “茶の化学—最近の進歩—,” 三協印刷, 静岡, 1970, p. 81.