

Application News

No. L525

高速液体クロマトグラフィー

一体型LCシステムProminence™-iの自動前処理機能を用いた緑茶中のアミノ酸分析

緑茶は古くから馴染みの深い飲料ですが、近年は健康食品としても注目されています。緑茶に含まれるアミノ酸でもっとも多いのはテアニン¹⁾です。テアニンは緑茶の主要なうま味成分であり、緊張感を軽減したり、眠りをサポートするなど、機能面でもさまざまな効果が期待されています。緑茶にはテアニン以外のうま味成分や、健康に役立つとして注目されている成分も多数含まれています。

ここでは、煎茶とほうじ茶中のうま味成分であるテアニンとグルタミン酸 (Glu)、健康に役立つ成分とされるアルギニン (Arg) とγ-アミノ酪酸 (GABA) の4成分に着目しました。一体型LCシステム Prominence™-i (以下、Prominence-i) に搭載された自動前処理機能を用い、*o*-フタルアルデヒド (OPA) にて蛍光物質に誘導体化させて分析した例をご紹介します。

Y. Osaka

自動前処理機能

Prominence-i (LC-2030C) は標準でオートサンプラの自動前処理機能が搭載されており、「希釈」「添加」「共注入」の3つのモードがテンプレートで用意されています。ここでは「共注入」を用いた例をご紹介します。共注入は複数のバイアルから指定した順に試料を吸引でき、さらに混合動作をさせたり、待ち時間を設定したりすることが可能です。図1に設定した内容の動作を図2に示します。このように、試薬を次々と吸引するような動作であっても、簡単に設定できます。

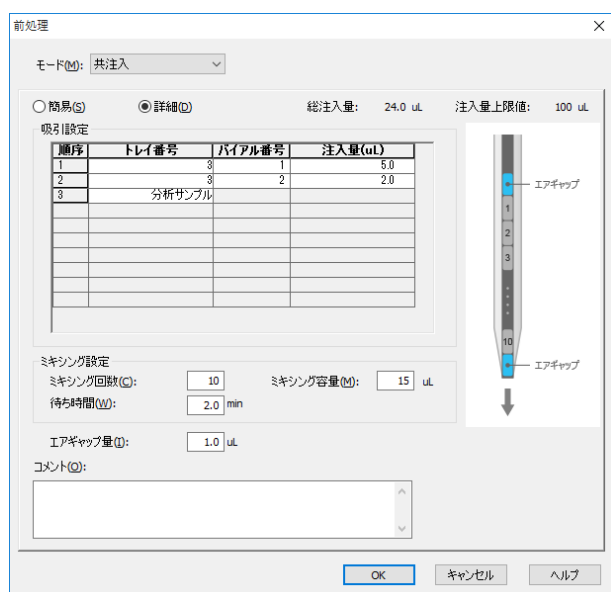


図1 Prominence-i (LC-2030C) の前処理 (共注入) 設定画面

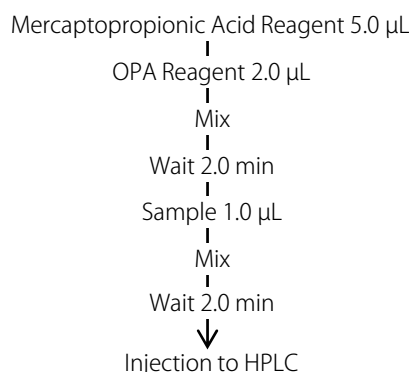


図2 Prominence-iによる自動プレカラム誘導体化の流れ

表1 誘導体化試薬

- Mercaptopropionic Acid Reagent
Add 10 μL of 3-mercaptopropionic acid into 10 mL of 0.1 mol/L borate buffer.
- OPA Reagent
Add 0.3 mL of ethanol into 10 mg of *o*-phthalaldehyde and dissolve completely. Then add 0.7 mL of 0.1 mol/L borate buffer and 4 mL of ultrapure water.

成分の抽出

緑茶は抽出する温度によって、渋味や香り変化します。一般的には玉露など高級とされる緑茶は渋味を抑えるために低温で抽出し、香りを楽しむほうじ茶は高温で抽出します。ここでは1gの茶葉に20、40、60、80、95℃の水またはお湯を50 mL加え、30秒間手で攪拌して抽出を行いました。それらをさらに0.1 mol/L塩酸水溶液にて煎茶は10倍希釈、ほうじ茶は5倍希釈しました。

分析結果

表2に分析条件を示します。図3に95℃で抽出した煎茶とほうじ茶のクロマトグラムを示します。

表2 分析条件

Column	: Shim-pack™ GIST C18 100 mmL. × 3.0 mmI.D., 3.0 μm
Guard column	: 10 mmL. × 3.0 mmI.D., 3.0 μm
Mobile phase	: A) 20 mmol/L Potassium phosphate buffer (pH6.5) B) Water/Acetonitrile/Methanol = 150/450/400
Flow rate	: 1.0 mL/min
Time program	: B Conc. 5 % (0 min) → 40 % (7 min) → 98 % (7.5 min)
Column temp.	: 25 °C
Injection volume	: 1 μL
Detection	: Fluorescence detector (Ex. 350 nm, Em. 450 nm)

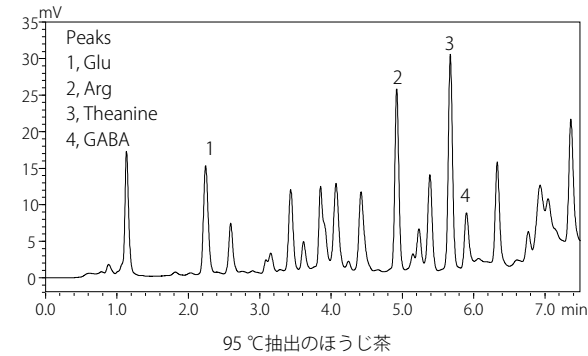
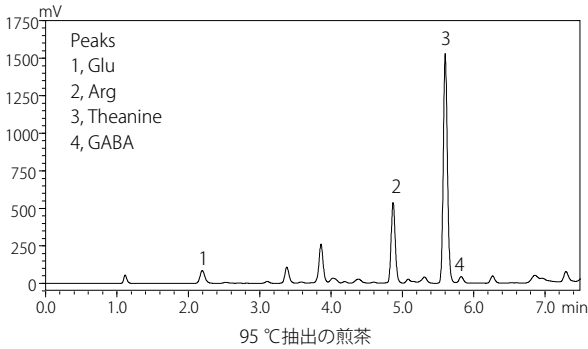


図3 煎茶とほうじ茶のクロマトグラム

■ 検量線の直線性

表3に表2の条件で分析した標準品の濃度を示します。図4に各成分の検量線を示します。各成分とも、寄与率 $R^2=0.999$ 以上と良好な直線性が得られました。

表3 各成分の検量線の直線性

Compound	Calibration Point ($\mu\text{mol/L}$)
Glu/Arg/GABA	0.5, 1.0, 5.0, 10, 50
Theanine	0.5, 1.0, 5.0, 10, 50, 100

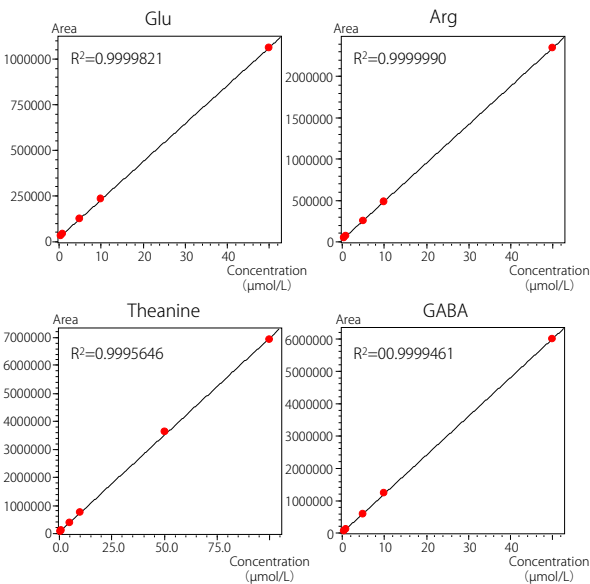


図4 各成分の検量線

■ 定量結果

検量線をもとに、煎茶とほうじ茶中に含まれる濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を計算しました。その結果を図5と図6に示します。一般的に煎茶はうま味が強く、ほうじ茶は香りが強いと言われるとおり、テアニンやグルタミン酸は煎茶の方が明らかに多量に含まれていることが確認されました。

うま味を楽しむ玉露は60°C前後で抽出するのが良いと言われますが、この結果を見る限り95°Cの方がテアニンがより多く抽出されています。しかしながら、渋味であるカテキン類は高温になるほど抽出されます²⁾ので、渋味を抑えつつ、うま味を引き出す温度として60°C前後が好まれることがこの結果からも分かります。

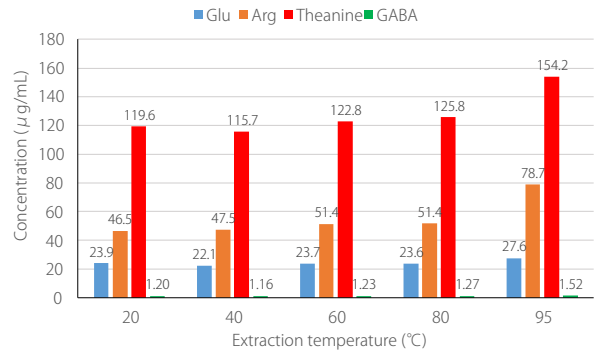


図5 各温度における煎茶の抽出結果

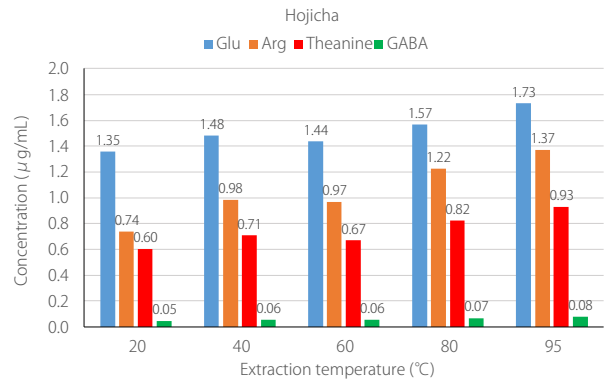


図6 各温度におけるほうじ茶の抽出結果

■ まとめ

以上のように、Prominence-iの自動前処理機能を用いると、プレカラムアミノ酸分析が簡単にできることが示されました。ラベル化反応をニードル(サンプルループ)内で行うため、反応用に空バイアルを用意する必要もありません。さらに反応させた試料を全てカラムへ導入するため、バイアル内で混合するよりも少量の試料で高感度に分析することが可能です。

【参考文献】

- 1) 石垣幸三、生物と化学 19巻5号(1981) 278-285
- 2) 池田重美、茶業研究報告書 37号(1972) 69-78

Prominence および Shim-pack は、株式会社 島津製作所の商標です。