

# Application News

## No. L543A

高速液体クロマトグラフィー

### べにふうき緑茶中メチル化カテキンの高速分析

機能性表示食品のべにふうき緑茶には、抗アレルギー作用をもつメチル化カテキンが多く含まれていることが報告されています<sup>1)</sup>。メチル化カテキンは、茶葉に含まれるポリフェノールの一種であり、エピガロカテキンガレートの一部がメチル化されたもので、ハウスダストやほこりなどによる目や鼻の不快感を軽減することが報告されています。

また、2018年には日本農林規格等に関する法律（JAS法）に基づいて、「べにふうき緑茶中のメチル化カテキンの定量-高速液体クロマトグラフ法」<sup>2)</sup>が規格として制定されました。

ここでは、システムに Nexera™ X3、分析カラムとして Shim-pack™ GIST シリーズを用い、JAS 試験方法に基づくべにふうき緑茶中のメチル化カテキンの分析とその高速分析例をご紹介します。

N. Iwata

#### ■ メチル化カテキン標準溶液の分析

メチル化カテキン ((-)-エピガロカテキン 3-(3"-O-メチル)ガレート (EGCG3"Me)) 標準溶液 (10 mg/L) を分析しました。表 1、2 に JAS 試験方法準拠条件と高速分析条件を示します。また、図 1 の上段には JAS 試験方法に準拠した分析カラム Shim-pack GIST C18 (粒子径 5 μm) を、下段には同シリーズの高速分析用カラム Shim-pack GIST-HP C18 (粒子径 3 μm) を用いて採取したクロマトグラムを示します。

粒子径 3 μm の高速分析用カラムを用いることにより、分析時間、移動相消費量をそれぞれ約 1/4 に抑えることができました。

表 1 JAS 試験方法準拠条件

System	: Nexera X3
Column 1	: Shim-pack GIST C18 (150 mm L×4.6 mm I.D., 5 μm)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Mobile phase	: A) 0.2% Phosphoric acid in water B) Methanol/Acetonitrile=18/5 (v/v)
Time Program 1	: 23%B (0-12 min) → 70%B (12.01-20 min) → 23%B (20.01-30 min)
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 10 μL
Detection	: UV 272 nm

表 2 高速分析条件

System	: Nexera X3
Column	: Shim-pack GIST-HP C18 (75 mm L×3.0 mm I.D., 3 μm)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Mobile phase	: A) 0.2% Phosphoric acid in water B) Methanol/Acetonitrile=18/5 (v/v)
Time Program	: 23%B (0-3 min) → 70%B (3.01-5 min) → 23%B (5.01-7.5 min)
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 4 μL
Detection	: UV 272 nm

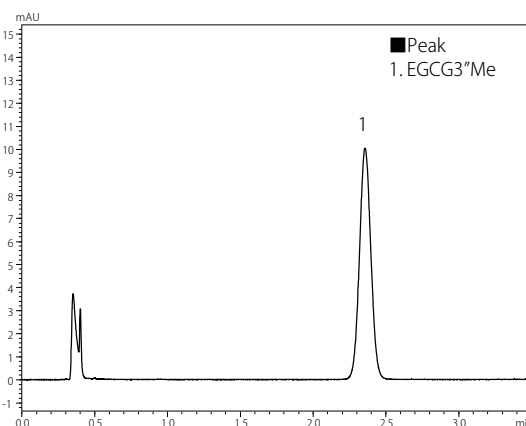
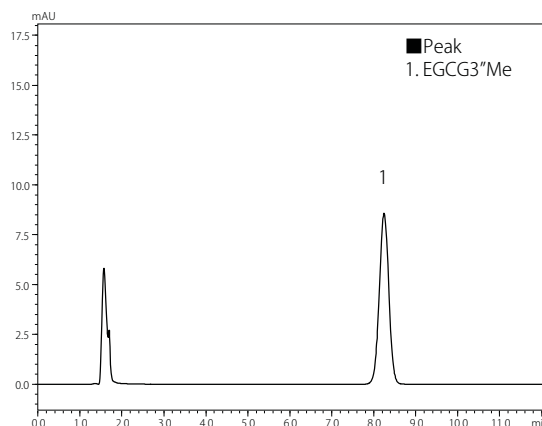


図 1 メチル化カテキン標準溶液のクロマトグラム

上図：JAS 試験方法準拠分析

下図：高速分析

#### ■ 検量線

図 2 にそれぞれの分析における 1~50 mg/L の検量線を示します。いずれも寄与率  $R^2=0.99999$  以上と良好な直線性が得られました。

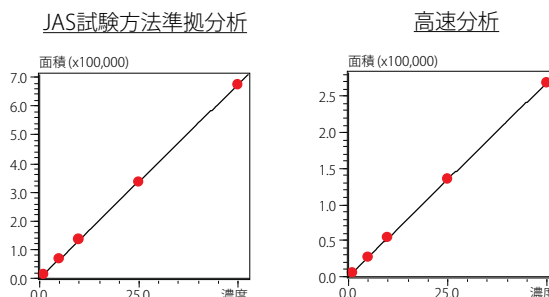


図 2 検量線

左図：JAS 試験方法準拠分析

右図：高速分析

## ■再現性

表3に、検量点の最低濃度である1 mg/Lの標準溶液について、6回繰り返し分析における保持時間と面積の相対標準偏差(%RSD)を示します。いずれの分析においても保持時間、面積ともに相対標準偏差は1%以下の結果が得られました。

表3 6回繰り返し分析における相対標準偏差(%RSD)

analytical condition	Column	Retention time	Area
JAS method compliment	Shim-pack GIST C18 (particle size: 5 μm)	0.05	0.79
high speed analysis	Shim-pack GIST-HP C18 (particle size: 3 μm)	0.02	0.53

## ■べにふうき緑茶の分析

試料は、市販のべにふうき緑茶を使用しました。前処理法は、JAS試験方法を参考にしました<sup>2),3)</sup>。

図3に前処理プロトコルを示します。粉碎した試料から30℃でりん酸/エタノール混合溶媒によって抽出しました。次いで、ろ紙にてろ過し、0.2 μmのメンブランフィルターでろ過後、水で10倍希釈した液をHPLCに供しました。

図4にべにふうき緑茶を分析した結果を示します。上段には、JAS試験方法に準拠した分析カラム Shim-pack GIST C18 (粒子径 5 μm) を、下段には同シリーズの高速分析用カラム Shim-pack GIST-HP C18 (粒子径 3 μm) を用いて採取したクロマトグラムを示します。いずれの分析においても、メチル化カテキンは他の成分から分離できました。

定量値からメチル化カテキンの含有量を計算しました。その結果、JAS試験方法に準拠した分析と高速分析のいずれにおいても、この試料には12 g/kgのメチル化カテキンが含有されていました。

Weigh 250 mg of Benifuuki green tea (homogenized) in 25 mL of volumetric flask
Add 20 mL of phosphoric acid/ ethanol/ water (1:50:49), then stir
Stand in a water bath (60 min, 30 °C)
Allow to stand to R.T.
Add water to make 25 mL
Swing roll mixing
Filtrate with filter paper (discard initial flow)
Filtrate with membrane filter (discard initial flow)
Dilute ten times with water
HPLC

図3 前処理プロトコル

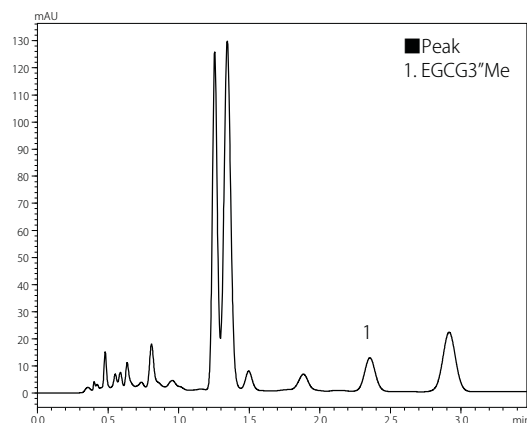
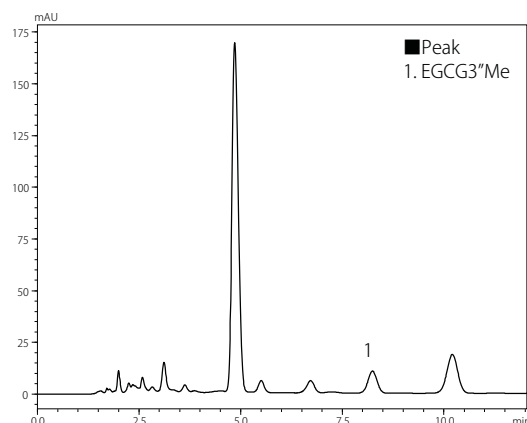


図4 べにふうき緑茶のクロマトグラム

上図：JAS試験方法準拠分析

下図：高速分析

## ■まとめ

Nexera シリーズと Shim-pack GIST C18 カラムを用いて、べにふうき緑茶中のメチル化カテキンの分析を行いました。また、同シリーズの高速分析用カラムを用いることにより、分離と定量精度を保ったまま、分析時間と移動相消費量をそれぞれ約1/4に短縮できました。

上記のいずれの分析においても、今回使用したべにふうき緑茶中には、メチル化カテキンが12 g/kg含有されていました。

### [参考文献]

- 山本(前田)万里、佐野満昭、松田奈帆美、宮瀬敏男、川本恵子、鈴木直子、吉村昌恭、立花宏文、袴田勝弘、茶の品種、摘採期と製造法によるエピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート含量の変動、日本食品科学工学会誌、48、64-68 (2001)。
- 日本農林規格、べにふうき緑茶中のメチル化カテキンの定量-高速液体クロマトグラフ法 (JAS 0002)、農林水産省 (2018年3月29日)
- 法邑雄司、稗島佑介、児玉貴志、田中真澄、堀江秀樹、鈴木忠直、安井明美、べにふうき緑茶中のメチル化カテキン測定法の室間共同試験による妥当性確認、日本食品科学工学会誌、63 (7)、312-318 (2016)。

Nexera および Shim-pack は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年6月  
A改訂版発行：2019年10月  
島津コールセンター ☎0120-131691  
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。  
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。