SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ　Nexera XR

茶葉に含まれるカテキン類の定量分析

山部 恵子、吉岡 拓哉、市来弥生、川嶋 美帆

ユーザーベネフィット

- ◆ 農研機構と共同開発した試料前処理からHPLCによる測定までのバリデーション済み試験法です。
- ◆ 茶葉中のカテキン類 10 成分（熱異性体、メチル化カテキンを含む）とカフェインの含有量の確認が行えます。
- ◆ 簡便な前処理により、効率的な作業が可能です。

■はじめに

国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合
研究機構と島津製作所は、
「食」の機能性成分解析を目的とした共同研究により、農産物や食品に含まれる機能性成分の簡便で迅速かつ正確な分析手法の開発を行っています。本報では、茶葉中のカテキン類の分析方法を検討し、茶葉 2 種について含有量を確認した結果を報告します。

カテキン類はポリフェノールの一種で、フラボノイド系化合物のフラバノール類に分類されます。

茶葉には、主にエピガロカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピカテキンの4成分が含まれています。また、これらの成分に加えてエピガロカテキンガレート やエピカテキンガレート のメチル化体を多く含む品種が知られています。

本報ではこれらカテキン類6成分に、主要カテキンの熱異性体4成分とカフェインを加えた合計11成分を測定の対象としました。

表 1 対象化合物の一覧

化合物名	略号
カテキン	C
エピカテキン	EC
ガロカテキン	GC
エピガロカテキン	EGC
カテキンガレート	CG
エピカテキンガレート	ECG
ガロカテキンガレート	GCG
エピガロカテキンガレート	EGCG
エピカテキン 3-O-(3"-O-メチル)ガレート	ECG3"Me
エピガロカテキン 3-O-(3"-O-メチル)ガレート	EGCG3"Me
カフェイン	―

■分析条件

分析条件は、JAS 法等 [1), 2), 3)] を参考にして、表2 に示す条件を使用しました。

表2 分析条件

System	: Nexera™ XR
Column	: Shim-pack™ GISS C18 (150 mm×4.6 mm I.D., 3 µm P/N：227-30055-06)
Mobile phases	: A) 0.2% Phosphoric acid in H_2O B) MeOH
Gradient Program	: B conc. 16% (0-15 min) -45% (26 min) -90% (26.01-30 min) -16% (30.01-35 min)
Mixer	: MR180 µL II
Flow rate	: 0.85mL/min
Column Temp.	: 55 ℃
Injection volume	: 10 µL
Detection	: PDA 242 nm (GC, EGC), 272 nm (others)

■試料の前処理

抽出条件は、JAS 法等[1), 3)]を参考に決定しました。前処理のワークフローを図1に示しました。粉砕した茶葉ををりん酸水/エタノール混合溶媒で抽出後、水で10倍希釈し分析試料としました。

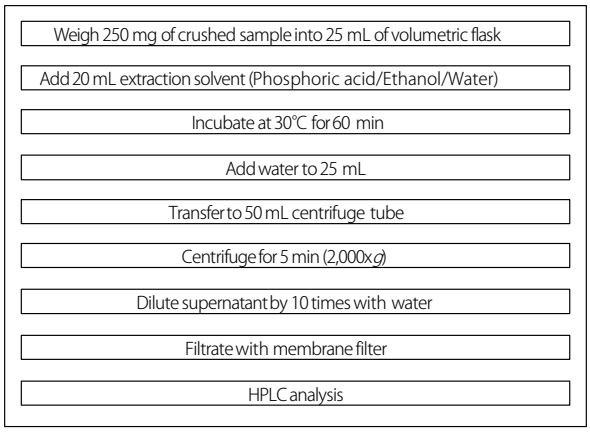

図 1 前処理のワークフロー

■標準液の測定

カテキン類およびカフェインの混合標準液のクロマトグラムを図2、主要カテキンと熱異性体のUVスペクトルを図3に示します。溶出の早いGCおよびEGCの2成分は、ピーク強度が大きい波長242 nmで検出しました。

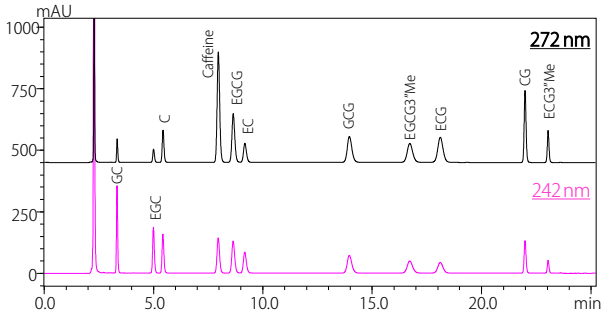

図 2 混合標準液のクロマトグラム

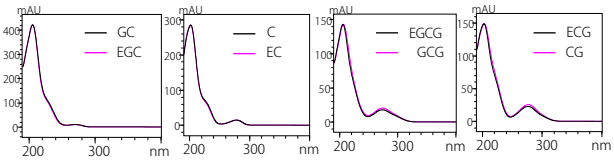

図3 主要カテキンと熱異性体のUVスペクトル (約10 µg/mL)

各化合物の検量線範囲および寄与率を表３に示します。

表３各化合物の標準試料の検量線範囲（μg/mL）

化合物名	検量線範囲			寄与率R²
C	0.51	-	23.7	0.9999
EC	0.96	-	24.0	0.9999
GC	0.47	-	23.7	0.9999
EGC	7.97	-	79.7	0.9999
CG	0.77	-	19.28	0.9999
ECG	4.21	-	84.2	0.9999
GCG	0.40	-	19.0	0.9999
EGCG	5.29	-	105.7	0.9999
ECG3"Me	0.18	-	17.5	0.9999
EGCG3"Me	0.40	-	40.0	0.9999
Caffeine	5.12	-	102.3	0.9999

■茶葉抽出液の測定

茶葉抽出液に混合標準液を5 μg/mLになるように加えた添加試料と無添加の試料の272 nmのクロマトグラムを重ねて図4に示します。

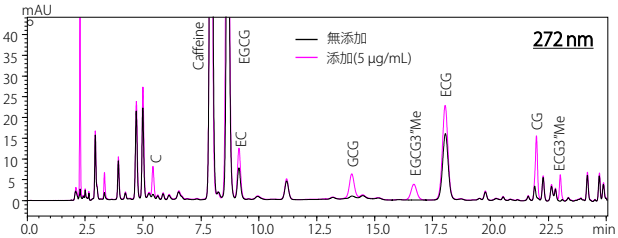

図４混合標準液添加試料と無添加試料のクロマトグラム

無添加の茶葉抽出液において、EGCG3"Meは未検出でした。GCGは、ピークのＵＶスペクトル、保持時間ともに標準試料と一致し同定できました。一方、微量の熱異性体CGやECG3"Meの保持時間周辺にピークが検出されましたが、UVスペクトルは標準試料と一致せず、茶葉に含有されていないことを確認しました。

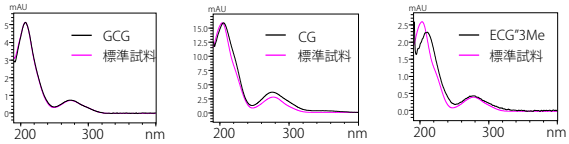

図5 無添加試料のGCG,CG,ECG3"Me検出ピークのUVスペクトル
(標準試料のUVスペクトルと比較)

各カテキン類の5 μg/mL添加試料の回収率を表4に示します。CG以外は101～108%の良好な回収率が得られました。

表4　カテキン類添加試料（5 μg/mL）の回収率

化合物名	Recovery(%)
C	104
EC	101
GC	101
EGC	105
CG	131（i-PDeA Ⅱ未使用） 105（i-PDeA Ⅱ使用）
ECG	101
GCG	105
EGCG	108
ECG3"Me	106
EGCG3"Me	101
Caffeine	105

RatioプロットでUVスペクトルの不均一が確認されたCG検出ピークは、PDAデコンボリューション機能により、夾雑成分と分離して良好な回収率（105%)を確認しました。

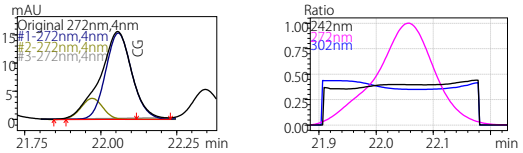

図6 標準液添加CGピークのi-PDeA Ⅱ解析(左)とRatioプロット(右)

■茶葉の比較

2品種の茶葉（やぶきた、べにふうき）の抽出液を分析し、試料中のカテキン類を定量しました。それぞれの茶葉抽出液のクロマトグラムを図７に、カテキン類の定量値を茶葉中の含有量に換算した結果を表５に示しました。

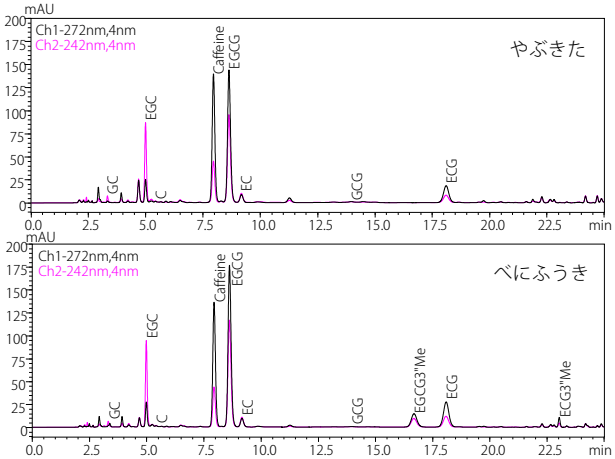

図７茶葉抽出液のクロマトグラム

表５　茶葉に含まれるカテキン類の含有量と繰り返し再現性 (n=5)

	やぶきた		べにふうき	
化合物名	(g/100g)	(%RSD)	(g/100g)	(%RSD)
C	0.14	0.88	0.16	0.97
EC	1.08	0.12	1.22	0.12
GC	0.20	0.17	0.20	0.35
EGC	3.83	0.05	4.16	0.18
CG	-	-	-	-
ECG	1.54	0.10	2.31	0.20
GCG	0.05	1.10	0.03	2.90
EGCG	7.90	0.03	9.76	0.21
ECG3"Me	-	-	0.31	0.27
EGCG3"Me	-	-	1.55	0.20
Caffeine	3.25	0.03	3.19	0.12

■まとめ

カテキン類 10 成分とカフェインの一斉分 析法により、茶葉 2 品種の定量を行い、品 種によるカテキン類の含有量の違いを確認できました。

<参考文献>
1) 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）
2) 山本（前田）万里、緑茶のカテキン類分析法（異性体カテキン類も含む）、食品機能性評価マニュアル（IV）
（http://fmric.or.jp/ffd/kinousei-hyoka4.html）
3) 堀江秀樹、山本（前田）万里、氏原ともみ、木幡勝則、茶葉中カテキン類分析のための抽出方法の検討、茶業研究報告、94、60-64（2002）

本分析手法は、島津製作所 ヘルスケア R&D センター内 食品機能性解析共同研究ラボでの国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構様との共同研究（2019 年 4 月～2022 年 3 月）における開発をもとに、夾雑物との分離改善を図るため、一部条件（カラム等）を変更しました。

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

初版発行：2020年 9月
B改訂発行：2022年12月
L-583B

島津コールセンター 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、https://solutions.shimadzu.co.jp/ よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2020