

高速液体クロマトグラフィーによる緑茶浸出液の カテキン類の定量

—— 浸出方法及び保存方法の比較 ——

岡野 節子・水谷 令子・西村 亜希子

Measurement of Catechins in Green Tea by High Pressure Liquid Chromatography

—— Comparison of the Methods for a Preservation or an Infusion ——

Setsuko OKANO · Reiko MIZUTANI and Akiko NISHIMURA

要 旨

上級煎茶を70℃と90℃の湯でそれぞれ0.5分, 1分, 2分, 3分間浸出した試料と6ヶ月間異なる条件で保存した茶を, 70℃で3分間浸出した試料を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いてカフェイン, カテキン類の定量を行った。

浸出温度が高く, 浸出時間が長くなるにしたがって, カフェイン, カテキン類の溶出量は増加し, 特に, 90℃で2分間以上浸出すると, エステル型カテキンの溶出が多くなった。6ヶ月間保存後の緑茶の浸出液では, 貯蔵温度が低いほどカフェイン, カテキン類の含有量が多く, 室温で保存すると含有量が少なくなったことから, これらの成分は保存中に分解することがわかった。茶液への浸出は (-)-EGC が最も多く (+)-C, (-)-ECG が少なかった。

官能検査では70℃で2分間, 90℃では1分間浸出した場合が香りもよく, 総合評価においても有意に好まれ, 70℃浸出では1分間浸出では淡すぎ, 90℃では3分間浸出すると濃すぎるため有意に好まれないと評価された。6ヶ月間異なった条件で保存した緑茶は, 冷凍庫保存(-40℃)で有意に好まれ, 室温保存は有意に好まれないと評価された。

緒 言

今日広く世界各国の人々に, 日常欠くことのできない飲料として愛用される茶は, すでに2000年余りの歴史があると言われている¹⁾。茶が人間に利用されたきっかけは薬用であったことはよく知られている。茶葉に含まれる機能性成分の1つはポリフェノールであるカテキン類

で、緑葉固形物中に15~20%含まれ、茶葉の40%前後ある全可溶成分の大半を占めている。茶に含まれる主なカテキン類は遊離型カテキン類である (-)-エピカテキン (EC), (-)-エピガロカテキン (EGC), エステル型である (-)-エピカテキンガレート (ECG), (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) の4つでこれらが、血圧上昇の抑制効果²⁾, 血漿板凝集抑制作用³⁾, 抗腫瘍作用⁴⁾, 降コレステロール作用⁵⁾などの生理機能をもつと報告されている。前報⁶⁾において、私たちは緑茶をおいしく入れるための条件として水の種類、浸出温度、浸出時間、茶葉の量、保存方法等についていくつかの知見を報告している。すなわち、上級煎茶(やぶきた清芳)は70℃の湯で3分間浸出すると、日本人が好む緑茶としての色(緑色)と香り、味が得られる。

今回は、緑茶の浸出法を変えたときカフェイン、カテキン類の溶出量がどのように変わるかを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法により調べた。また、好ましい茶の保存方法を知るために方法を変えて保存したときの食味のちがいを官能検査により比較するとともに HPLC によって保存中のカテキン類の変化を調べた。

実験方法

1. 試料

茶は加藤清芳園(鈴鹿市)で買い求めたブレンドの上級煎茶である「やぶきた清芳」(100g 当たり1,000円)を用いた。

2. 試薬

(1) カフェイン標準品

カフェイン (CAFFE) は和光純薬工業(株)の特級試薬を用いた。

(2) カテキン類標準品

(-)-エピガロカテキン ((-)-EGC), (-)-カテキン ((+) C), (-)-エピカテキン ((-)-EC), (-)-エピガロカテキンガレート ((-)-EGCG), (-)-エピカテキンガレート ((-)-ECG) は栗田工業(株)の高純度試薬を用いた。

(3) その他の試薬

アセトニトリルは関東化学(株)、高速液体クロマトグラフィー用; N,N-ジメチルホルムアルデヒドは関東化学(株) 特級試薬; リン酸は半井化学薬品(株) 特級試薬を用いた。

3. 試薬溶液の調製

茶の浸出は水道水を1分間沸騰させた湯を用いた。200mlのビーカーに湯を100mlずつ分注し、その中に3.5gの茶葉の入ったパックを入れた。茶パックをすみやかに沈め、浸出時間のちょうど中間点で湯中の茶パックを箸で4秒間つまみ動かし、一定時間後に茶パッ

クを引き上げた。40℃になるまで自然冷却し、試験液とした。この原液1.0mlにアセトニトリル3.0mlを加えて4倍に希釈し、0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過して、HPLC用試験液とした。

4. カフェイン、各種カテキン標準溶液

CAFFE, (-)-EGC, (+)-C, (-)-EC, (-)-EGCG, (-)-ECGのそれぞれ2mgを秤取し、アセトニトリルと水の混合液(1:1)2mlに溶解し、標準原液とした。使用時にはこの標準原液をアセトニトリルで希釈して検量曲線の作成と保持時間の確認に用いた。

5. HPLCの条件

機器：日本分光 800

カラム：ULTRON N-C₁₈ (4.6mm ϕ ×150mm)

移動相：A液；0.1%アセトニトリル及び5%N,N-ジメチルホルムアミド含有の0.1%リン酸液

B液；アセトニトリル

グラジェント：試料注入時はB液(アセトニトリル)1%とし、30分後にB液15%、40分後にB液90%になるように、A液(0.1%アセトニトリル及び5%N,N-ジメチルホルムアミド含有の0.1%リン酸溶液)を用いて直線的グラジェントを行い65分を1サイクルとした⁷⁾。

カラム温度：43℃ 流速：1ml/min 検出：280nm

6. 定 量

各試験液溶液5 μ lをカラムに注入しクロマトグラフィーを行う。前述の測定条件で得られたクロマトグラム上の各標準物質の保持時間により各成分を同定した(図1)。試験溶液中の含有量は標準溶液により作成した検量線から算出した。

7. 保存方法

茶葉の保存は鈴鹿短期大学実験室(室温)、家庭用冷蔵庫(5℃)、冷凍庫(-15℃)、デープフリーザー(-40℃)内で行い、それぞれ茶葉3.5gを茶パックに小分けしたものを茶缶に入れて密封し、6ヶ月間保存をした。

8. 官能検査

鈴鹿短期大学生生活学科食文化コース1年(19歳)をパネルとし、順位法によって検査した。判定はクレーマーの検定法⁸⁾によった。検査は(24℃の室内)で行った。

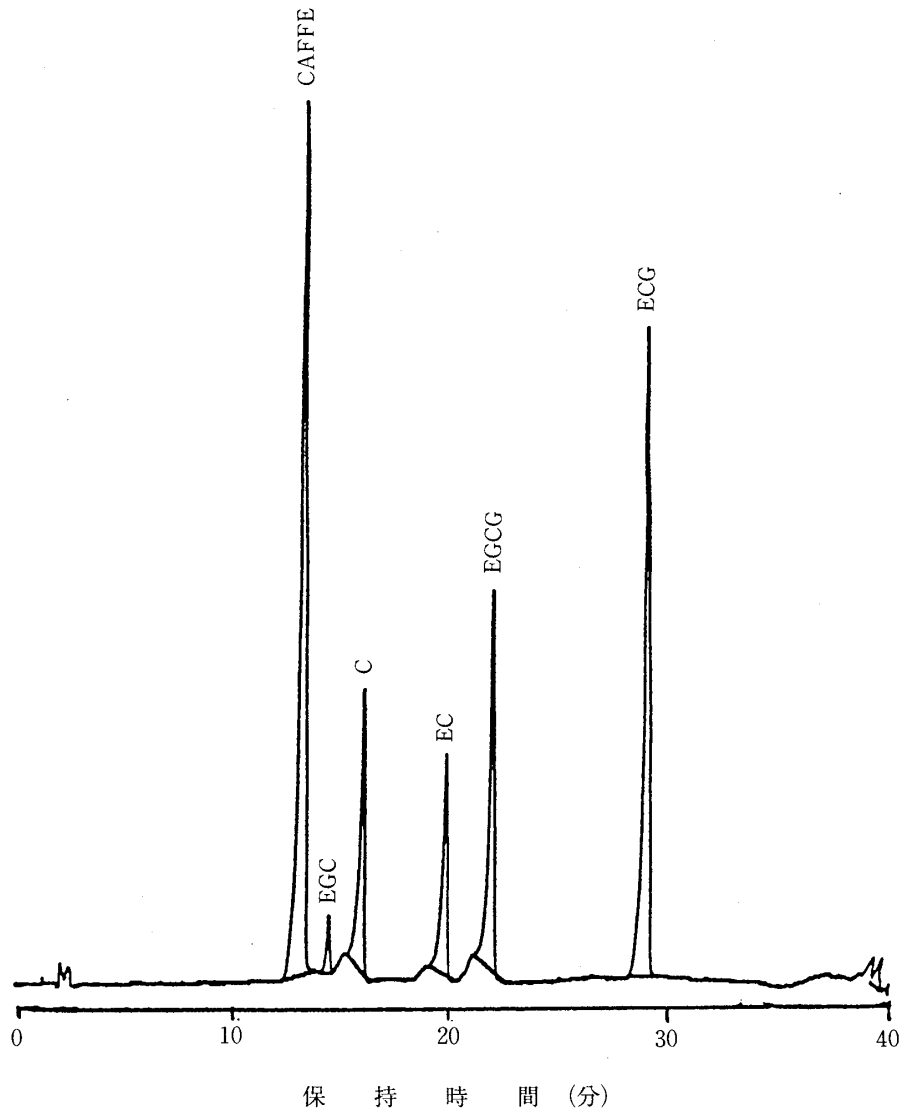


図1 標準カフェインとカテキン類のHPLCのクロマトグラム

HPLC条件

機器：日本分光800

カラム：ULTRON N-C₁₈ (4.6mmφ×150mm)

移動相：試料注入時はB液（アセトニトリル）1%とし、30分後にB液15%、40分後にB液90%になるように、A液（0.1%アセトニトリル及び5%N,N-ジメチルホルムアミド含有の0.1%リン酸溶液）を用いて直線的グラジエントを行った。

温度：43℃ 流速：1 ml/min 検出：280nm

結果と考察

1. 浸出温度と浸出時間がカフェイン、カテキン類の含有量に及ぼす影響

上級煎茶を用いて70℃及び90℃の湯で0.5分、1分、2分、3分間浸出した茶液のカフェイン、カテキン類を定量した。結果は表1、2に示した。どの浸出時間においても(-)-EGCが最も多く次にCAFFEが多かった。少ないのは(-)-EC、(-)-ECGであった。

浸出温度が高く浸出時間が長くなるにしたがってカテキン類の溶出量は増加した。低温70℃で2～3分と高温（90℃）で1分間浸出したときカテキン類の定量値はほぼ同じであった。

前報⁶⁾の試飲で色、香り、味が最も好まれた条件は70℃、3分間であった。上級煎茶ではカテキン類の溶出をおさえてアミノ酸などのうまみを生かすために比較的低温で時間をかけてゆっくり浸出することによりおいしいお茶が浸出される⁹⁾と言われるが、90℃浸出の場合より低温浸出によってカフェイン、カテキンの浸出がおさえられることが、カテキン類の定量によって確かめられた。

表1 70℃で浸出した茶液中のカフェイン、カテキン類

		(mg/ml)					
カテキン類 浸出時間	カテキン類	CAFFE	EGC	C	E C	EGCG	ECG
	0.5分		0.16	0.28	0.06	0.05	0.08
1分		0.16	0.29	0.06	0.06	0.09	0.06
2分		0.31	0.92	0.12	0.10	0.24	0.12
3分		0.35	0.96	0.14	0.11	0.28	0.14

表中の数字は3試料測定した平均値である。

表2 90℃で浸出した茶液中のカフェイン、カテキン類

		(mg/ml)					
カテキン類 浸出時間	カテキン類	CAFFE	EGC	C	E C	EGCG	ECG
	0.5分		0.28	0.46	0.08	0.06	0.14
1分		0.32	1.04	0.11	0.09	0.23	0.12
2分		0.53	1.44	0.22	0.16	0.46	0.24
3分		0.55	1.63	0.22	0.17	0.49	0.25

表中の数字は3試料測定した平均値である。

また、緑茶中のカテキン類のうち(－)-EGC、(－)-ECは遊離型カテキン類であり、渋味は弱く温和な苦みがあって高級茶に多く含まれるのに対し、エステル型である(－)-EGCG、(－)-ECGは強烈な渋味があるといわれている¹⁰⁾。90℃では1分以上浸出すると急速に渋味成分の溶出が増加する結果が得られた。一方70℃の湯は3分間浸出しても(－)-EGCGと(－)-ECGの溶出は増加しない。これらの結果より、緑茶を浸出する温度はカテキン類の溶出の状態からも低温が好ましいと考えられる。

2. 保存方法がカフェイン、カテキン類の成分に及ぼす影響

茶は乾燥食品であるから他の食品に比較して保存性にすぐれているが、管理が悪いと変質して風味が劣化する。変質はクロロフィル、カテキン、脂肪およびカロチノイド、アスコルビン酸などの成分の酸化反応による場合が多い。特に緑茶は、ウーロン茶、紅茶や後発酵茶に比べて貯蔵中に成分変化を起こしやすい。緑茶の保存は製造時の品質を保つことが最良であると考えられ、さまざまな変質防止法がとられている。保存方法として荒茶段階では0～5℃の冷蔵庫中で保管することが一般的で、高級茶ではさらにアルミ箔のラミネートフィルムなどを使用して窒素ガスを充填して変化防止効果を高めている¹¹⁾¹²⁾。家庭においては乾燥剤、脱酸素剤を茶缶に入れて冷蔵庫で保存するのがよいとされる⁶⁾。

そこで、茶保存後の品質変化を知るために、茶を異なる条件で6ヶ月間保存し、その茶葉を70℃の湯で3分間浸出して浸出液中のカフェイン、カテキン類の定量を行った。その結果を表3に示した。どの保存方法においても(–)–ECGは少なかった。室温保存の茶はカフェイン、カテキン類が少なくなり、保存中にこれらは分解すると考えられる。従って、茶のカテキン類に生理機能を期待するならば、保存方法にも考慮する必要がある。しかし、冷蔵庫(5℃)と冷凍庫(–40℃)保存した茶の分析値はほぼ同じ値で両者は優劣が付け難かった。

表3 茶浸出液のカフェイン、カテキン類含有量に及ぼす保存方法の影響

カテキン類 保存方法	(mg/ml)					
	CAFFE	EGC	C	E C	EGCG	ECG
室温	0.29	0.48	0.14	0.15	0.23	0.12
冷蔵(5℃)	0.38	0.60	0.19	0.16	0.24	0.12
冷凍(–15℃)	0.40	0.60	0.20	0.20	0.24	0.12
冷凍(–40℃)	0.44	0.64	0.22	0.20	0.30	0.15

浸出温度 70℃, 浸出時間 3分間

表中の数字は3試料測定した平均値である。

3. 官能検査

緑茶の好まれる浸出法を知るために、上級煎茶を70℃及び90℃で0.5分、1分、2分、3分間浸出したものについて官能検査を行った。結果を表4、5に示した。浸出温度70℃で浸出した場合(表4)は、0.5分間浸出した茶の色が有意に好まれ、3分間浸出は有意

表4 70℃で浸出した茶の官能検査

検査項目	浸出時間			
	0.5分	1分	2分	3分
色	47*	69	65	99*
香り	77	94*	41*	63
総合評価	65	86*	52*	77

表中数値は順位法により評価した点数の合計である。

* 5%の危険率で有意差がある。パネルは28名

に好まれなかった。2分間浸出は香りもよく、総合評価も優れ有意に好ましいと評価されたが、0.5分間と3分間浸出の茶では有意差が認められなかった。90℃で浸出した茶の官能検査（表5）では、0.5分間浸出した茶浸出液の色は有意に好まれ、3分間浸出は有意

表5 90℃で浸出した茶の官能検査

検査項目	浸出時間			
	0.5分	1分	2分	3分
色	55*	68	75	82
香り	62	55*	78	85*
総合評価	53	42*	88	97*

表中数値は順位法により評価した点数の合計である。

*5%の危険率で有意差がある。パネルは28名

に好まれなかった。これは70℃で浸出した場合と同じであり、短大生には明るい水色^{すいしょく}が好まれることがわかった。90℃での浸出では1分間のものが香りもよく、総合評価でも有意に好ましいと評価された。90℃で3分間浸出したものは香り、総合評価で有意に劣っていた。この結果から茶の色は短時間浸出したうすい色が好まれたが、おいしさという観点から評価すれば70℃では2分間、90℃では1分間浸出するのがよかった。

表6 保存方法の異なる緑茶の官能検査

検査項目	保存方法			
	室温	冷蔵(5℃)	冷凍(-15℃)	冷凍(-40℃)
色	79*	41	44	36*
香り	79*	40	42	39*
総合評価	77*	46	42	35*

検査に用いた茶液の浸出は、茶葉3.5g、湯量100ml、浸出温度70℃、浸出時間3分間で行った。

官能検査は6ヶ月貯蔵後の茶葉について行った。パネルは20名。

表中の数値は順位法により評価した点数の合計である。*5%の危険率で有意差がある。

保存方法の異なる緑茶の浸出液の官能検査（表6）では、室温で保存した茶の浸出液の水色、香り、総合評価とも5%の危険率で有意に好まれなかった。冷凍庫（-40℃）で保存した茶は、5%の危険率で有意に好まれた。しかし、冷蔵庫（5℃）、冷凍庫（-15℃）での保存には有意差はなかった。

以上より茶の保存法は-40℃が最もよく、ついで冷蔵庫（5℃）、冷凍庫（-15℃）がよいと考えられる。

参考文献

- 1) 中根敏夫, 伊奈和夫, 坂田完三: 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能, p43, 弘学出版 (1991)
- 2) 原征彦, 外岡史子: 栄食誌, 43(5), 345 (1990)
- 3) 並木和子, 山中みどり, 立山千草, 五十嵐紀子, 並木満夫: 日食工誌, 38(3), 189 (1991)
- 4) 原征彦, 松崎敏, 中村耕三: 栄食誌, 42(1), 39 (1989)
- 5) 竹尾忠一: 日食工誌, 35, 32 (1992)
- 6) 岡野節子, 水谷令子, 岩崎ひろ子: 鈴鹿短期大学紀要, 第13巻, 251 (1992)
- 7) 寺田志保子, 前田有美恵, 増井俊夫, 鈴木裕介, 伊原和夫: 日食工誌, 34(1), 22 (1987)
- 8) 川端晶子編: 身近な食べ物の調理学実験, p24, 建帛社 (1988)
- 9) 静岡県茶業会議所編: 新茶業全書, p412 (1989)
- 10) 梶田武俊, 日野昭子, 山崎寛子, 丸山悦子: 調理科学, 12(1), 40 (1979)
- 11) 茶の入れ方研究会: 茶研報, 第40号, 58 (1991)
- 12) 松村敬一郎: 茶の科学, p68, 朝倉書店 (1991)