

抹茶の総アミノ酸および遊離アミノ酸の HPLC-アミノ酸分析機による分析

大槻 耕三・奥野 忍・谷田 恭子・佐藤 健司・中村 考志

Analysis of Total and Free Amino Acids in Mat-cha (Powdered Green Tea) with an HPLC-Amino Acid Analyzer

KOZO OHTSUKI, SHINOBU OKUNO, KYOUKO TANIDA, KENJI SATO and YASUSHI NAKAMURA

Abstract: Free amino acids and total amino acids (6N-HCl hydrolysate at 150 °C for 1 hr) in Mat-cha (powdered green tea) were determined with an HPLC-amino acid analyzer using lithium citrate buffers.

The Mat-cha contained 2% of free amino acid and about 14.7% of bound amino acid (proteins and peptides). Theanine was the most abundant free amino acid.

When the ninhydrin-reagent pump was stopped, the effluent from the HPLC-a.a.analyzer was monitored with a UV-VIS detector at 254 nm, 280 nm, and 556 nm to detect and to collect the unknown compounds of the Mat-cha extract. (Received September 11, 1998)

I 緒 言

緑茶に含まれる各種化学物質や生理活性物質については多くの研究がなされてきた^{1)~4)}。近年は、従来からよく取り上げられて来たビタミンCやカフェインばかりではなく、カテキンやビタミンC以外の各種のビタミンにも目がむけられ、それらの有効利用についての研究が盛んである。煎茶や玉露を日常で使用する場合、湯抽出が最も一般的であって、抽出液を摂取することになる。この時に摂取できる栄養成分は主に水溶性又は湯にとけるもの、例えばビタミンC、カフェイン、カテキン、テアニンをはじめ各種アミノ酸類などである。

一方同じ緑茶でも抹茶は、玉露と同様に覆下茶として栽培された茶葉に蒸し行程の後、揉捻行程を行うことなく乾燥し、石臼で5 μm程度の粉末に加工し、製品とされる。そのため脂溶性の化合物例えばビタミンE、カロチン、クロロフィルなども摂取できるため、栄養的には煎茶や玉露より優れた健康食品といえる。抹茶の粉末が微粉とはいえ、固体であるから、実際に飲用した時、その成分が全部吸収されるかどうかは不明である所が多いが、煎茶の粗粉よりも消化、吸収量が多いであろうことは予想される。

本報告では、主に抹茶に含まれる遊離アミノ酸、総アミノ酸の分析を中心に、その分析チャート上に現われる各種成分の検討も行った。これにはニンヒドリン発色用ポンプを止めHPLC-アミノ酸分析機の検出波長を変えて測定することにより溶出されるニンヒドリン陽性物質以外の未知物質の有無を検討した。

II 実験方法

(1) 実験材料

京都府下の茶園で1997年に栽培、摘葉され加工された抹茶(並級)を商店で購入し分析に供した。

(2) 試料の前処理および塩酸加水分解

抹茶が30mgを精秤しエッペンドルフ小型遠心分離チューブに入れ1.5mlの蒸留水を加え超音波(ブランソン社製220型)に5分間照射する。懸濁状態で一定量とり、1.0 φ × 5 cmの小型試験管①に入れる。残部を12000r.p.m. 10分間の遠心分離にかけ上澄と沈殿に分ける(Fig. 1)。上澄液一定量を小型試験管②にとり、これは直接アミノ酸分析機に注入し、遊離アミノ酸の分析定量値とする。沈殿は一定量を小型試験管③にとり、上記小型試験管①と同時に25ml容ミニナートバイアルに入れ、バイアルの

内部に6N塩酸0.5mlを入れ、真空にする。これを150℃の加水分解炉に1時間入れ塩酸蒸気加水分解を行う。

なお回収率を補正するために、内部標準物質として α -アミノアジピン酸を一定量加水分解前、また遊離アミノ酸分析の場合には、分析直前に加え、最終データ計算の時に調整する。

(3) アミノ酸分析

緑茶中の遊離アミノ酸のなかでテアニンが多く含まれるため、ナトリウム・バッファー系の分析法¹¹⁾では妨害が多く正確に分析できない。ここではリチウムバッファー系の分析システム⁶⁾を改良して分析定量した。改良点は第1バッファーではステンレス部品を腐食させる塩化リチウムを使用せずにくえん酸リチウムでリチウムイオン濃度を調整した。第2, 第3バッファーは前報と同様の組成とした。第4バッファーは、第3バッファーに0.0025Mのホウ酸リチウムを加え、水酸化リチウムでpH 10.0に合わせた。第5溶媒は0.2N水酸化リチウムで5分間流してカラムを再生を行う。この時に分離カラム(Mitsubishi CK-10U 0.46 ϕ ×15cm)に吸着されていた有機物やイオン等が洗い出される。その後第1バッファーを15分間流すことで再生が完了する。この状態ではステンレス製の流路やカラムやその他の部品が第1バッファーに接するが、塩化物イオンが含まれていないので、これらが腐食させられる心配がない。なおニンヒドリン発色させて定量する場合は検出波長を570nmとし、溶出液の流速は0.5ml/min、ニンヒドリン溶液は0.25ml/minである。このHPLC-アミノ酸分析器では検出器に紫外-

可視吸光測定可能な島津社製UV-VIS LC-6Aを使用しているため、検出波長を容易に選べる便利さがある。このためニンヒドリンポンプを停止し、反応槽をoffにし溶出バッファーのみを流して試料を上記のように注入す

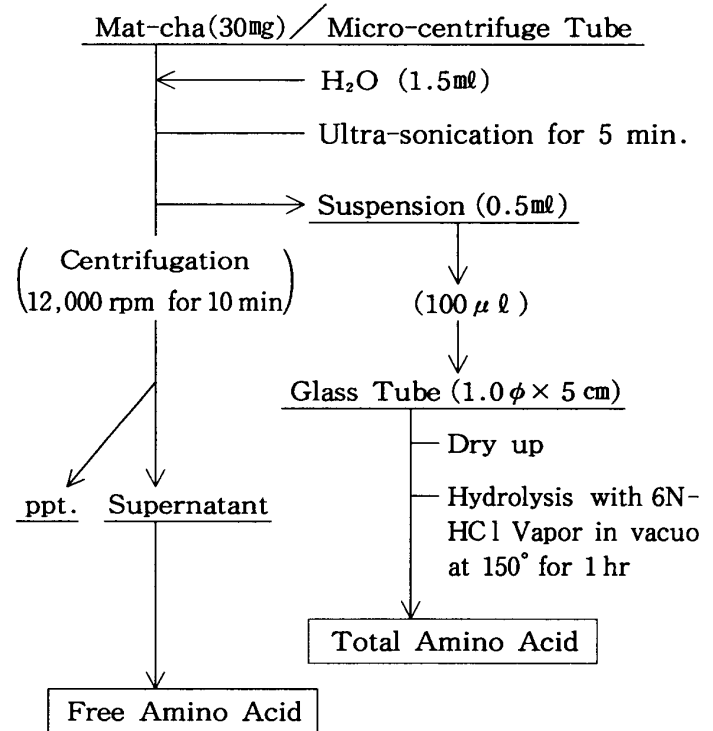


Fig.1. Preparation of Extract and Hydrolysate of Mat-cha.

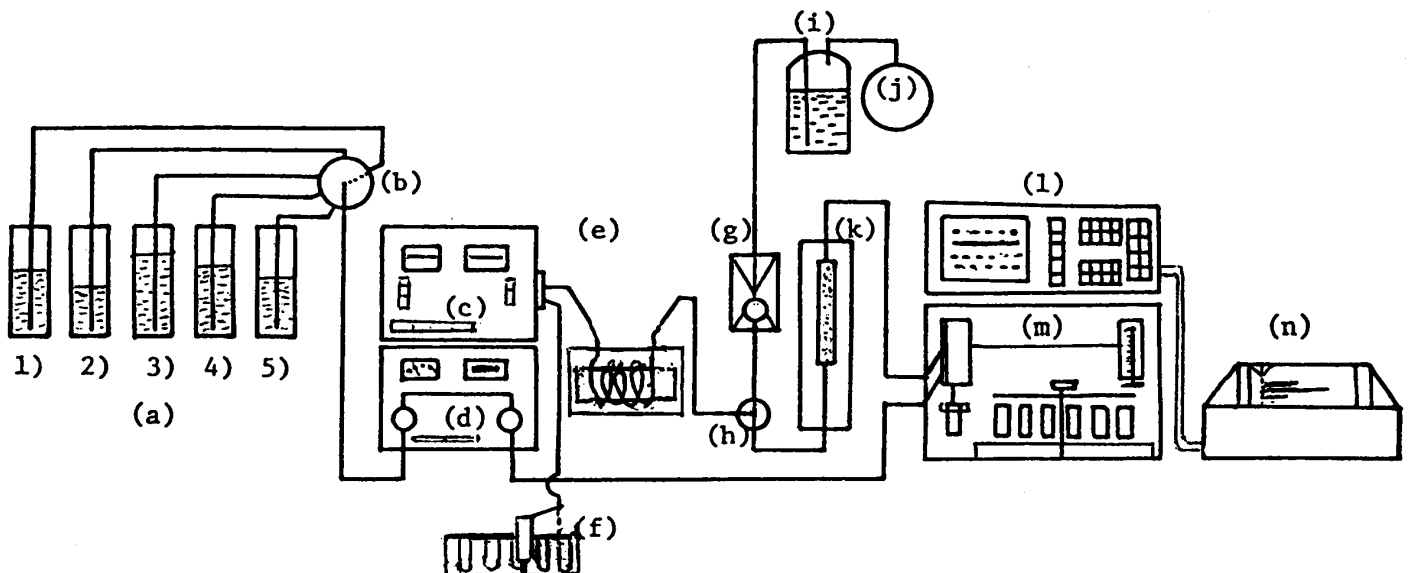


Fig.2. Flow Diagram of the HPLC for the Analysis of Free and Total Amino Acids.

(a) Buffer reservoirs: 1)~4) elution buffers; 5) 0.2N LiOH. (b) Buffer selector, changed with a system controller, SCL-6A. (c) UV-VIS spectrophotometric detector, Shimadzu SPD-6AV. (d) Eluent pump, Shimadzu LC-6A. (e) Reaction bath, 0.5 mm ϕ ×5m Teflon tube in a heater of 100°C. (f) Fraction collector. (g) Ninhydrin pump, Kyowa Seimitsu KHD-16. (h) T-Shaped mixer. (i) Ninhydrin solution. (j) Nitrogen gas. (k) Separation column, Mitsubishi MCI Gel CK-10U, 0.46 ϕ ×15cm, with a constant-temperature bath at 40°C. (l) System controller, Shimadzu SCL-6A. (m) Auto injector, Shimadzu Sil-6A. (n) Recording integrator, Shimadzu Chromatopac C-R6A.

れば、分離カラムで分離された未知物質が(f)の所のフラクションコレクターで分取できる。この分離カラムはカチオン交換樹脂であってスルホン酸基を持つポリスチレンの合成樹脂であるから勿論陰イオン物質は吸着あるいは遅れて溶出され、さらにイオンでないものでも疎水性のものは遅れて溶出される。そして第1～第5バッファ交換ごとのステップワイス溶出により、各バッファで溶出されるものごも吸光をもてば、その波長に検出器を合わせておくことで検出、定量できる。今回の実験では254nm, 280nm, 556nmの波長を選んだ。

III 結果および考察

遊離アミノ酸の分析については、前報⁶⁾では第4バッファの組成が低pH, 高イオン濃度であって、生体液中の特殊なアミノ酸分析のためには適している。しかし緑茶や抹茶の分析のためには今回使用した第4バッファが適していて、また分析時間が前報の方法より約40分間も短縮することが可能となった。

Fig. 2 にフロー図を示す。検出器が紫外と可視両方の

検出が可能であるので、紫外吸収性物質や色素を含んだ未知物質が溶出して来た場合は特に流路を変更することなく、容易に分析試料中のこれら未知物質検出が可能である。これは特に試料の水抽出物質などをそのまま分析機にかける時などに有効である。

Fig. 1 に示すような操作で総アミノ酸量の定量のための6NHCl蒸気による気相加水分解を行った。その総アミノ酸量の結果はTable 1 に示す。またFig. 1 に示すように同一試料から水可溶性の遊離のアミノ酸試料を得た。その分析結果はFig. 3 に示す。このチャート上には標準アミノ酸とほぼ溶出時間が同一のものを遊離アミノ酸としたが、これら以外にニンヒドリン陽性のピークは殆ど見られなかった。Table 1 の遊離アミノ酸量の結果から抹茶の場合も、煎茶の時と⁶⁾同様にテアニンの含量が多いが、今回用いた試料が市販の並級抹茶であったので前回の値2～2.7%ほど高い値ではなかった。今回の試料では遊離アミノ酸の総量で2%であって、結合型のアミノ酸量、即ち蛋白質体やペプチド状のアミノ酸量は17.9%であるが、もとの状態(結合状態)では脱水縮合しているから係数0.82を乗じた数は14.7%である。アス

Table 1. Total and Free Amino Acids of Mat-cha (Powdered Green Tea).

	Total Amino Acid* ¹	Free Amino Acid* ²	Bound Amino Acid* ³
	(mg %)	(mg %)	(mg %)
Asp	2435	298	2033
Thr	967	33	934
Ser	1127	81	1046
Asn	0	104	
Glu	3625	263	2726
Gln	0	116	
Theanine	0	740	
Gly	1264	5	1259
Ala	1451	47	1404
Val	919	31	888
Met	454	0	454
Ile	887	51	836
Leu	2451	29	2422
Tyr	814	51	763
Phe	1086	33	1053
GABA	0	14	0
His	676	33	643
Lys	1176	26	1150
Arg	385	64	321
Sum total	19717	2019	17932* ⁴

*¹ Hydrolysate with 6N HCl-Vapor at 150°C for 1 hr.

*² Water soluble amino acid.

*³ Amino acids in protein and peptide. (Bound a.a.) = (Total a.a.) - (Free a.a.)

*⁴ Net weight in 100 g Mat-cha was $17932 \times \frac{100-18}{100} = 14700$.

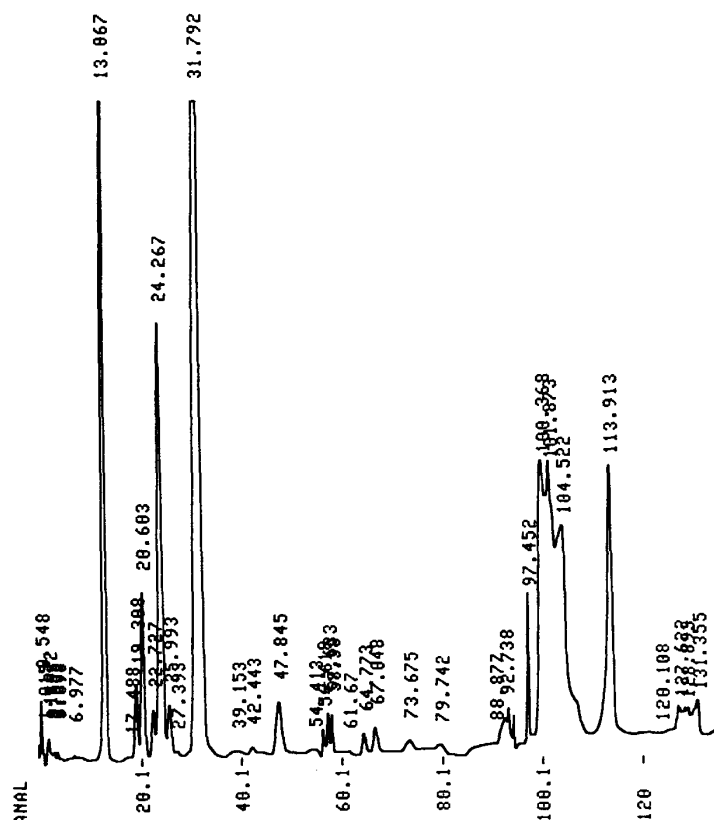


Fig.3. Chromatogram of Free Amino Acid in Mat-cha. Effluent was reacted with Ninhydrin reagent at 100°C and detected at 570nm and 0.32 aufs.

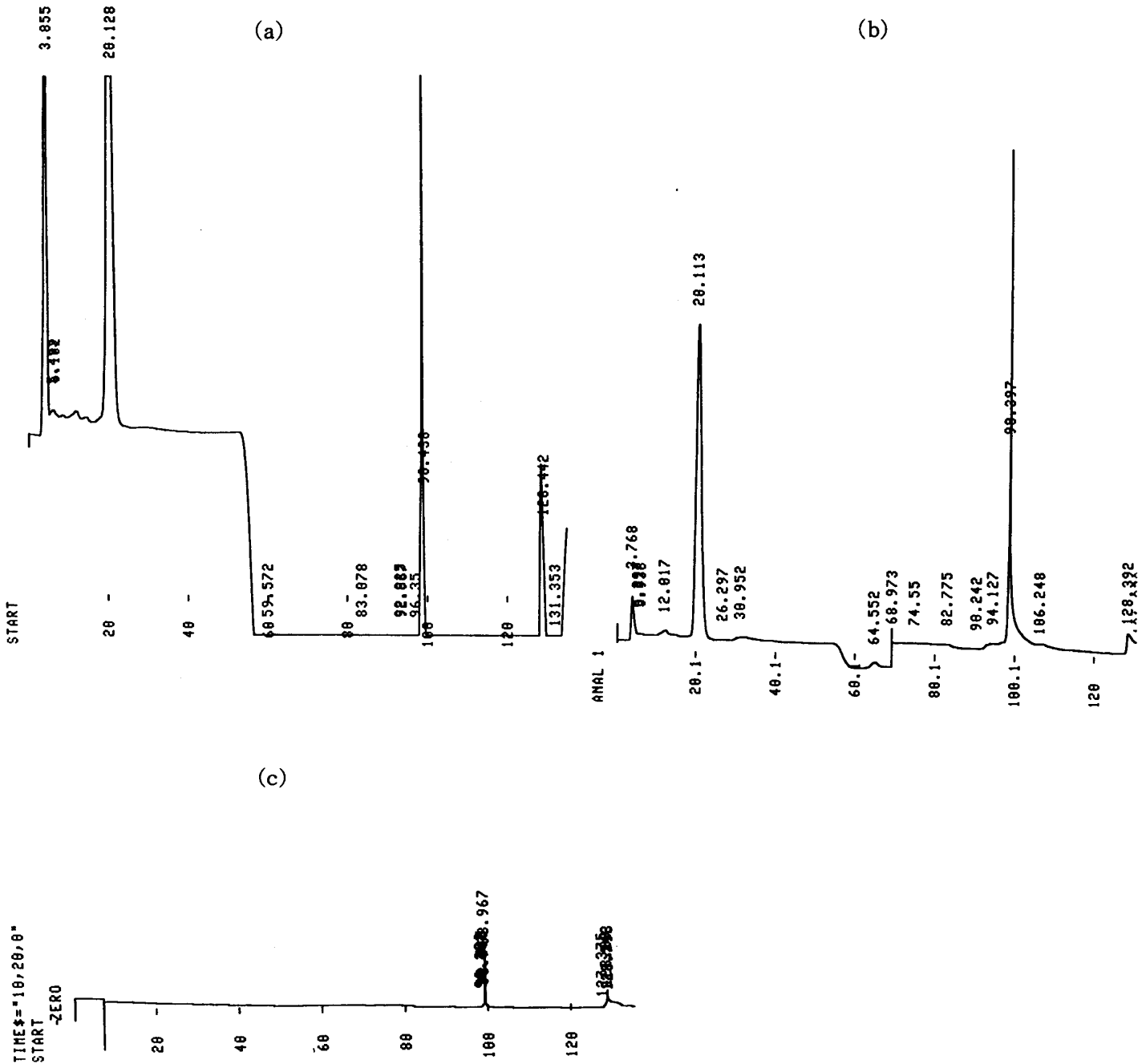


Fig.4. Chromatograms of Water Extract from Mat-cha. Effluent was not reacted with Ninhydrin reagent.

- (a) Detection at 254 nm and 0.32 auFS.
- (b) Detection at 280 nm and 0.64 auFS.
- (c) Detection at 556 nm and 0.16 auFS.

パラギン, グルタミンおよびテアニンは塩酸加水分解によりそれぞれアスパラギン酸, 後二者はグルタミン酸になるが, 遊離アミノ酸分析チャート上に見られていたGABA(ガンマーアミノ酪酸)は塩酸加水分解物の分析チャート上には, 原因が不明であるが検出されなかった。これらの結果から抹茶中には約15%ものタンパク質と2%の遊離アミノ酸が含まれることが明らかになった。煎茶の場合は湯浸によって遊離アミノ酸のみを摂取することになりテアニンやグルタミン酸, アルギニンのように味

覚に関係するものは多いけれども必須アミノ酸は含量が少ない。これに対し抹茶は微粉末(約 $5\mu\text{m}$)にすることで茶全体を摂取することになる。このうちどれ位のタンパク質, ペプチド類が実際に消化・吸収されるかは, 今回の実験からは明らかではないが, 結合型アミノ酸には必須アミノ酸も多く看過できないものがある。

Fig. 4では, Fig. 2のフロー図のうち, ニンヒドリン試薬のポンプ(g)を停止し, 反応槽(e)を通電せずに試料(抹茶の水抽出物)を分析し検出器(c)の波長を選択

して分析を行った結果である。もし必要な時にはフラクションコレクター(f)で分取しさらに未知物質の他の分析機器での検討を可能にした。

Fig. 4 の(a)では検出波長が254nmであって、第1バッファのくえん酸が他の第2, 第3, 第4 バッファのそれらにくらべて高濃度であるためカルボキシル基の端吸収の影響が大きく出ている。このチャート上で3.8分に出ているピークは還元型ビタミンCのピークであって、標準物質の分析から確認した。また20.1分に出ているピークはカフェインである。カフェインは280nmでも吸収が強いのでFig. 4 (b)のチャート上にも検出されるが、還元型ビタミンCは小さくなっている。チャート(a)の98.4分と128分に見られるピークは未同定である。感度を上げれば65分と68分にそれぞれフェニルアラニンとチロシンのピークが検出できるが、Fig. 3 で示すようにニンヒドリン発色させた方が感度が良好であった。Fig. 4 の(c)では可視光の吸収を見ているが、556nmの吸収物質は98分に出るピークと、カラム洗浄時に128分が出るピークが検出された。これらは、いずれも未同定であるが、抹茶のような有色試料の分析に本方法は今後、有用である。

IV 要 約

抹茶中の総アミノ酸および遊離アミノ酸をリチウムバッファ系のHPLC-アミノ酸分析機で定量した。総アミノ酸は抹茶を1.0φ×5cm試験管に入れ、ミニナートバルブ容器(25ml)中で6NHCl蒸気の気相加水分解法によった。遊離アミノ酸は試料抹茶中に2%含まれ、そのうちテアニンが最も多く含まれていた。結合型アミノ酸(蛋白態またはペプチド態アミノ酸)は約14.7%であっ

た。本アミノ酸分析機の検出器は、UV-VIS型であるため、ニンヒドリン反応の停止した状態で、検出波長を254nm, 280nm, 556nm等で検出でき、未知着色物質や紫外吸収物質の検出、分取に利用できる。

文 献

- 1) 村松敬一郎編, 「茶の科学」, 朝倉書店(1991)
- 2) Y. Sakato, J. Agric. Chem. Soc. Jpn, 23, 262 (1949)
- 3) T. Kiribuchi and T. Yamanishi, Agric. Chem., 27, 56 (1963)
- 4) M. Kawabata, K. Ohtsuki, H. Kokura and Y. Wakahara, Agric. Biol. Chem., 41, 2285 (1977)
- 5) K. Ohtsuki, M. Kawabata, K. Taguchi, H. Kokura and S. Kawamura, Agric. Biol. Chem., 48, 2471(1984)
- 6) K. Ohtsuki, M. Kawabata, H. Kokura and K. Taguchi, Agric. Biol. Chem., 51, 2479 (1987)
- 7) 原 征彦ら「茶の機能性」食品工業, Vol.38(1995)
- 8) K. Nakagawa and T. Miyazawa, Anal. Biochem., 248, 41 (1997)
- 9) T. Yamamoto, L. R. Juneja, D-C Chu, M. Kim Ed., Chemistry and Applications of Green Tea, CRC Press LLC (1997)
- 10) 小林龍二, G. E. Tarr, 蛋白質・核酸・酵素, 17, 991 (1986)
- 11) S. Moore, D. H. Spackman and W. H. Stein, Anal. Chem., 30, 1185 (1958)