

## 緑茶のカテキン類分析法（異性体カテキン類も含む）

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
食品研究部門 山本（前田）万里

### 【はじめに】

カテキン類は、多くの植物に含まれる強力な抗酸化物質であり、フラバン-3-オールを基本骨格とするフラボノイド類の総称である。(+) -catechin が一般的な物質である。特に茶には苦汁味や水色に大きく影響するカテキン類が多く含まれており、抗酸化作用、抗腫瘍作用、発ガン抑制作用、血圧上昇抑制作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗う蝕性、抗アレルギー性、消臭作用、脂質代謝改善作用等といった生体調節作用があることがわかってきた。カテキン類は、縮合することにより、縮合型タンニンを形成するが、他のフラボノイド類と異なり、配糖体としては存在していないようである。緑茶に含まれているカテキン類は 10~20 %で、その主要なものは、カテキン類の約半量を占めるエピガロカテキン-3-O-ガレート (EGCG)、その他エピガロカテキン (EGC)、エピカテキン-3-O-ガレート (ECG)、エピカテキン (EC) である。近年、エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート (EGCG3"Me) やエピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート (EGCG4"Me) などの機能性も明らかにされ、注目されている。紅茶にはそれらの重合したテアフラビン (TF1)、テアフラビン-3-ガレート (TF2A)、テアフラビン-3'ガレート (TF2B)、テアフラビン-3-3'-ジガレート (TF3)、テアシネンシン類、テアルビジン類が含まれており、オレンジ色の水色に関連している。烏龍茶では、緑茶や紅茶には存在しない多様なカテキン類が見いだされている。現在まで、50 種以上のカテキン類が茶で見いだされている。カテキン類の分析法としては、従来、酒石酸鉄法やフォーリンチオカルト法による比色法（タンニン分析法）、ペーパークロマトグラフ法、薄層クロマトグラフ法等が用いられてきた。これらの方法では、多様なカテキン類の正確な分別は難しく、現在では、ほとんど逆相カラムによる高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法が用いられている。また、キャピラリー電気泳動法（ミセル動電クロマトグラフイ）を用いて、カテキン類、アミノ酸、カフェイン、アスコルビン酸の同時分析<sup>1)</sup>も試みられている。

### 【分析方法の概要】

茶葉中のカテキン類を 2%リン酸：エタノール（1：1）で抽出し、抽出液中のカテキン類を 0.2%リン酸水溶液（溶離液 A）とメタノール、アセトニトリル混合液（溶離液 B）を移動相とする逆相クロマトグラフ法によって分離して、波長 242 nm、272 nm で検出、カテキン類の標準品を用いて定量する。

### 【準備するもの】

#### 1. 実験器具・機器

- 1) 高速液体クロマトグラフ装置：2液グラジエントが可能な送液ポンプ、冷却器付きオートインジェクター、オンライン脱気装置、カラムオープン、UV 検出器（もしくは PDA 検出器）、データ処理システムを備えたもの。ここでは島津製作所製 LC-10ADvp HPLC(PDA)を使用した。
- 2) 高速液体クロマトグラフ用カラム：Wakopak Navi C18-5（内径 4.6 mm X 長さ 150 mm、粒子径 5 μm、和光純薬製、Wakopak Navi C18-5 (4.6 mm X 10 mm、粒子径 5 μm のガードカラム

を装着)

- 3) 超低温冷凍庫： -80℃以下で冷凍保存できるもの。
- 4) 電子天秤： 0.0001 g 単位で測定可能なもの。
- 5) 恒温水槽： 30±1℃で制御できるもの。
- 6) 超音波洗浄器： 1 L のメジューム瓶を浸けられるサイズ。
- 7) ボルテックスミキサー®： 同等の機能を有する機器でも良い。
- 8) マグネットスターラー
- 9) 加熱型水分測定装置： 例；加熱乾燥式水分計 (A&D、MX-50)
- 10) タイマー
- 11) プッシュボタン式液体用微量体積計： マイクロピペッター。容量は 1000 μL および 100 μL のもの。必要に応じて、ポジティブディスプレイメント方式のもの。適合するチップも必要。例：ピペットマン P-1000、P-100
- 12) 葉さじ
- 13) メスフラスコ(5 mL、25 mL、100 mL)： 日本工業規格(JIS R3505:1994)で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの。
- 14) ホールピペット(2 mL、5 mL)： 日本工業規格(JIS R3505:1994)で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの。
- 15) メスシリンダー(20 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1 L)： 日本工業規格(JIS R3505:1994) で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの。
- 16) ビーカー (100 mL)： 日本工業規格 (JIS R3503 : 2007) で規定されているもの又はそれに準ずる。
- 17) メジューム瓶(100 mL、500 mL、1 L)： ガラス製のもの。または同等の保管容器。
- 18) メンブレンフィルター： 親水性 PTFE 製(孔径：0.45μm、フィルター直径：13 mm)。メンブレンフィルターとハウジングが一体で、シリンジが装着可能なもの。例：ADVANTEC 社製 DISMIC-13HP PTFE non-sterile)。
- 19) シリンジ： メンブレンフィルターが装着可能なもの。望ましくはディスポーザブルのプラスチック製のもの。
- 20) 薬包紙： パラフィン紙。
- 21) コニカルチューブ： ポリプロピレン製 (15 mL 容量以上) で、濾過した試料希釈液が入るもの。または同等の容器。
- 22) マイクロチューブ： ポリプロピレン製(1.5 mL 容量)。
- 23) 濾紙： 日本工業規格(JIS P3801:1995)で規定されている 2 種に相当する原料が α セルロースのもの。推奨サイズは直径 110 mm。
- 24) バイアル： オートインジェクターに適合したバイアル。
- 25) ガラス製バイアル： 標準品の Stock Solution を調製する際に使用。
- 26) PTFE 製攪拌子
- 27) パラフィルムシール

## 2. 使用試薬

- 1) HPLC 用アセトニトリル (CAS 登録番号 75-05-8、医薬外用劇物に指定) (和光純薬)
- 2) 特級リン酸 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>：純度 85%以上、CAS 登録番号 7664-38-2) (和光純薬)
- 3) HPLC 用メタノール (CAS 登録番号 67-56-1、医薬外用劇物に指定) (和光純薬)

- 4) 特級エタノール (純度 99.5%以上、CAS 登録番号 64-17-5) (和光純薬)
- 5) エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート (EGCG3"Me)、ガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート (GCG3"Me)、エピカテキン 3-O-(3-O-メチル)ガレート (ECG3"Me) (常磐植物化学研究所)
- 6) エピガロカテキンガレート (EGCG)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECG)、エピカテキン (EC)、+カテキン (+C)、カテキンガレート (CG)、ガロカテキン (GC)、ガロカテキンガレート (GCG) (和光純薬)
- 7) L-アスコルビン酸(純度 99.6%以上、CAS 登録番号 50-81-7) (和光純薬)
- 8) 超純水 (DDW)

### 3. 標準品 (スタンダード) の作製

- 1) カテキンスタンダードは、冷蔵庫から常温に戻しておく (室温になるまでは、吸湿するので絶対蓋を開けてはいけない)。
- 2) 11 種のカテキン (もしくは測定するカテキン) の数のマイクロチューブそれぞれに、アスコルビン酸 (カテキン酸化防止のため、重量比約 10 倍量添加する) を予め添加し、正確に秤量しておく。
- 3) カテキンをそれぞれのマイクロチューブに正確に量りこむ。
- 4) 少量の DDW で溶解した後、5 mL メスフラスコにすべてのカテキン溶液を移し、DDW でフィルアップする。
- 5) 1.5mL マイクロチューブに 40  $\mu$ L ずつ分注して、パラフィルムで密封し、冷凍保存 (-85°C 超低温冷凍庫で 3 年以上保存可能)。
- 6) HPLC 分析時、解凍して 160  $\mu$ L の DDW を添加し、メンブレンフィルターを通した後、スタンダード液として HPLC 分析に供する。

具体例 : EGC:3252  $\mu$ g(アスコルビン酸(AsA) 1.4mg)、+C:1485  $\mu$ g(AsA 1.1mg), EGCG:2700  $\mu$ g (AsA 3.3mg), EC:2109 $\mu$ g (AsA 1.1mg), GCG: 363  $\mu$ g(AsA 1.6mg), EGCG3"Me:957  $\mu$ g(AsA 2.1mg), ECG:1183  $\mu$ g(AsA 1.9mg), CG:401 $\mu$ g(AsA 2.3mg), GCG3"Me: 584 $\mu$ g(AsA 4.1mg), GC: 145 $\mu$ g(AsA 3.6mg)

### 4. 抽出

- 茶葉を湯で抽出した抽出液の場合はこの操作は必要なし。抽出液を適宜溶解して HPLC 分析に供する。(希釈例 : 抽出液 5 mL をホールピペットで 25 mL メスフラスコにはかりとり、DDW でフィルアップして (5 倍希釈)、HPLC 測定に移る。)
  - エキス粉末 (抽出液をスプレードライ等で乾燥した乾燥物) の場合はこの操作は必要なし。適宜溶解して HPLC 分析に供する。(溶解例 : 0.1 g のエキス粉末を 20 mL のメスフラスコに入れて DDW でフィルアップ (0.5 %溶液) した後、さらに 6 倍希釈して使用する。)
- 1) 茶葉粉末 250 mg (後述方法より水分%を求めておく : 0.2505g を目標に) を薬包紙に量り取る
  - 2) 乾いた 25 mL 容メスフラスコに茶粉末を入れた後、2%リン酸 ( $H_3PO_4$ ) (DDW490g にホールピペットでリン酸を 10 mL 添加。外側をキムワイプでふきとり、3 回共洗いを 10 mL メスシリンダーで秤量して加えた後、ボルテックスでよく攪拌する。

- 3) 分散後、さらに特級エタノールを 10 mL メスシリンダーで秤量し、壁を洗うように加える。蓋をして、やさしくボルテックスで攪拌する。
- 4) 30 °C の恒温水槽内で、60 分間インキュベートする。
- 5) DDW にてフィルアップ後、攪拌する。
- 6) 5 分ほど静置して、濾紙で濾過する。濾液は 15 mL コニカルチューブに採取する。
- 7) 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過する。濾液は 1.5 mL マイクロチューブに採取する。
- 8) 上清をピペットマンで 10 倍希釈 (DDW で) する (1.5 mL マイクロチューブに 900 μL の DDW + 上清 100 μL) (100 μL とるときは、何回かピペッティングして DDW へ滴下する)。
- 9) オートインジェクター用チューブに(8)を約 100 μL とり以下の条件で分析する。  
(スタンダードを打つ前に DDW を 1 回インジェクトする)

## 5. HPLC による測定

- 1) 移動相 A の調製 (水 (DDW) : アセトニトリル : リン酸(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) を体積比で 400:10:1) 400 mL の DDW にアセトニトリル 15.5 g を DDW で洗いこんで 800 mL にする。その途中でリン酸 2 mL をホールピペットで添加 (3 回共洗い) し、1 L メジューム瓶に移して PTFE 攪拌子で攪拌する。10 分以内に調整するようにし、調製後、超音波洗浄器に 5 分かけて脱気する。(密栓、遮光瓶にて常温 1 週間保存可)
- 2) 移動相 B: メタノール(HPLC 用) : 移動相 A を体積比で 1:2 に調製後、超音波洗浄器に 10 分かけて脱気する。(要事調製)
- 3) オートサンプラ : 4 °C、リンス (洗浄液はメタノール) は最初の立ち上げの時に 1 回、ページとともに行うのみ。分析中はリンスしない。
- 4) カラム温度 : 40 °C
- 5) 注入量 : 20 μl、流速 : 1 mL/min
- 6) 検出波長 (UV-VIS もしくは PDA 検出器で検出する)  
UV242nm (GC, EGC を検出)  
UV272nm (+C, EGCG, EC, GCG, EGCG3''Me, ECG, CG, GCG3''Me, ECG3''Me を検出)  
(AUX RANGE=2:1AU/V)
- 7) グラジエント条件 :

	A	B
0 ~ 2 分 :	80%	20%
2 7 分 :	20%	80% (直線的に上昇させる)
2 7 ~ 3 7 分 :	上記条件を保つ	
3 7 . 0 1 分	80%	20% (圧力を安定させる)
4 5 分	80%	20%

(タイムプログラム)

時間	ユニット	命令	数値
2	ポンプ	B.conc.	20
27	"	"	80
37	"	"	80
37.01	"	"	20

## 留意事項

- \* 45分周期で試料の注入を行う（使用した LC-10ADvp では、メソッド=>LCパラメータの設定=>SPD-10Avp 上で分析時間を 45 にしておく。ステータスログでポンプBの圧力にチェックを入れる）
- \* ピーク解析のルール：
  - (1) 面積値 5000 以上のピークを読む
  - (2) 疑わしいピークは、RT（リテンションタイム）を STD と厳密にあわせ（チャートを重ねる）、PDA でスペクトルを STD と比較する
  - (3) ベースラインを水平に引き直し、その上でショルダー、テーリングは垂直に切る。

## 6. 茶葉中の水分含量

茶葉中の水分含量は、加熱乾燥式水分計（A&D、MX-50）を使用して求める。

## 7. 計算方法（乾物%）

次式に得られた数値を代入して計算を行う。

（茶葉粉末の場合）

試料中(乾物)のカテキン W の含量 (g/100g) = ((標準液中の W の含量 (μg/mL) × W のピーク面積 (Area)) × 10) / 標準液中の W のピーク面積 (Area) / (100 - 試料の水分%)

（抽出液の場合）

抽出液中のカテキン W の含量 (mg/100 mL) = ((標準液中の W の含量 (μg/mL) × W のピーク面積 (Area)) / 標準液中の W のピーク面積 (Area)) × 希釈率 × 0.1

## 8. 後片づけ

次の日に続けて使用するのであれば、HPLC 内部は移動相 A でよく洗浄する。しばらく使用しない場合は、カラムをはずして、含水メタノールで洗浄する。

## 【分析法のポイント】

- 1) 植物体中のカテキン類は、破碎等の処理により酸化酵素の働きで、酸化されて変化しやすい。特に茶の生葉では、摘採後、長時間放置すると、萎凋のため、カテキン類の変化（重合等）がおこる。そのため、試料調整をする前に何らかの方法で加熱して酸化酵素を失活させる必要がある。蒸気で短時間蒸すか（1分程度）、釜で炒るか、最も簡便なのは、電子レンジで加熱して殺青するとよい。しかし、加熱温度が高すぎたり長い場合、熱によりカテキン類の構造変化（エピ化）が生じるので注意する必要がある。また、試料を乾燥するときも高温にすることは好ましくなく、80℃以下で乾燥するか、減圧乾燥するのが望ましい。加工された茶（荒茶、仕上げ茶）では上記のような操作は必要ないが、室温で長時間、窒素充填もせず放置しておく、カテキン類の自動酸化が起きて、カテキン組成の変化が起きている可能性があるため、注意する必要がある。そのため、乾燥試料を長期保存する際は、窒素充填して-20℃以下の冷凍庫へ保管する。
- 2) 加熱により、例えば EGCG が GCG（エピマー：熱異性体）に構造変換する。茶の抽出液をレ

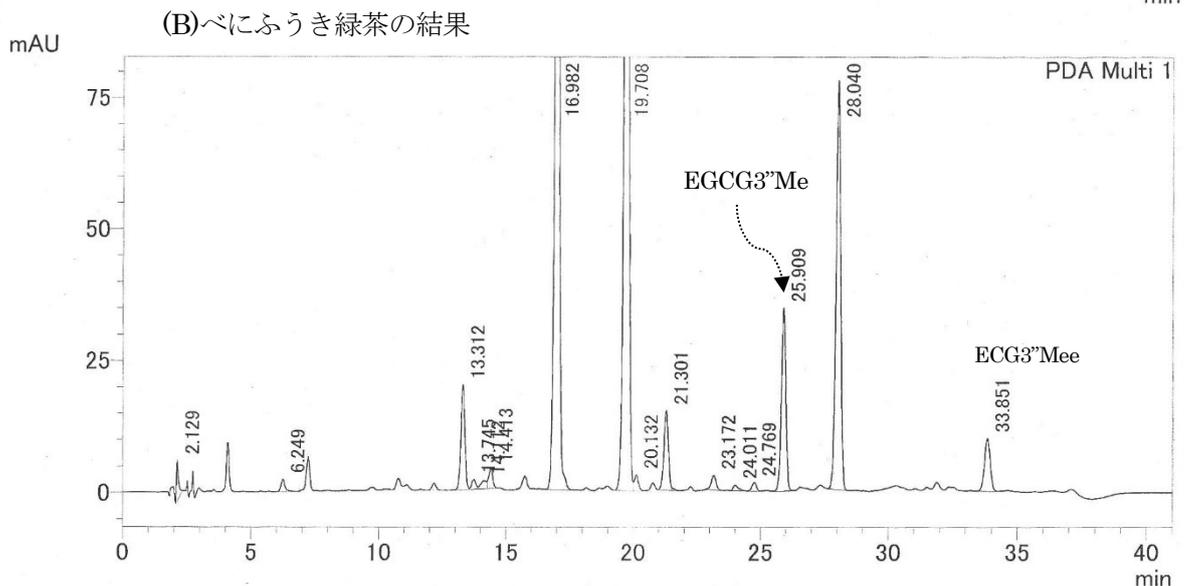
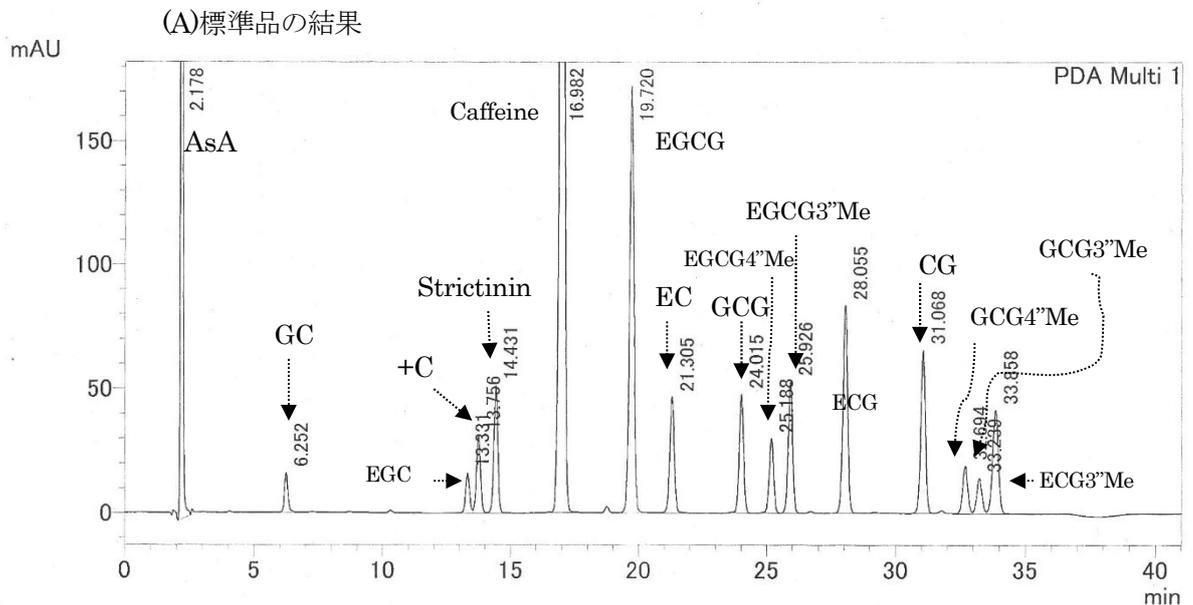
トルトするような過激な条件では、約 50%がエピ化する。

3) ここでは、異性体を同時分析する方法を紹介した。EGCG3"Me を機能性関与成分とする機能性表示食品で異性体が含まれないと考えられる試料の場合は、妥当性が確認された分析法\*があるので、そちらを利用されたい。

\*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)

参考 クロマトグラムでのリテンションタイム例

GC(6.3min), EGC(13.5), +C(13.9), EGCG(19.3), EC(21.5), GCG(24.2), EGCG3"Me(26.1), ECG(28.2), CG(31.2), GCG3"Me(33.4), ECG3"Me(34.1)



## 【おわりに】

緑茶のカテキン類は、機能性表示食品や特定保健用食品の機能性関与成分として知られている。機能性表示食品では機能性関与成分の分析方法も今後開示することとなっており、分析法の標準化が今後益々求められてくると思われる。ここでは、11種類のカテキンを同時に分析できる（標準品を追加すれば、カフェインなども同時分析できる）方法を紹介したが、用途によっては必要なカテキンだけを分析する方法の確立も今後必要になってくるものと思われる。

## 【参考文献】

- 1) Sano M, Tabata M, Suzuki M, Degawa M, Miyase T, Maeda-Yamamoto M. Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst*, 126:816-820 (2001)
- 2) 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 (2003)
- 3) Maeda-Yamamoto M, Ema K, Monobe M, Tokuda Y, Tachibana H.. Epicatechin-3-*O*- (3''-*O*-methyl)-gallate content in various tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) and its in vitro inhibitory effect on histamine release. *J Agric. Food Chem.*, 60:2166-2170 (2012)
- 4) カテキン類標準溶液の長期保存方法(農研機構 2003 年度研究成果情報)  
<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/vegetea/2003/vegetea03-35.html>