

緑茶中に含有する catechin 類と caffeine の定量分析

池田 壽文*・井上 宮雄**・藤森 文啓***・宮本 康司****・二川 正浩*****・吉原 富子*****
(平成 27 年 1 月 7 日査読受理日)

Quantitative analysis of catechin derivatives and caffeine in green tea

IKEDA, Hisafumi INOUE, Miyao FUJIMORI, Fumihiro
MIYAMOTO, Koji FUTAGAWA, Masahiro and YOSHIHARA, Tomiko
(Accepted for publication 7 January 2015)

キーワード：緑茶, カテキン類, カフェイン, 定量分析, 高速液体クロマトグラフ質量分析計
Key words : green tea, catechin derivatives, caffeine, quantitative analysis, LC/MS

1. 緒言

茶 (*Camellia sinensis*) はツバキ科ツバキ属の常緑樹であり, 紀元前 2700 年ころに中国雲南省で発見されたと言われている. 嗜好品としての使用は紀元前 50 年頃に始まり, その後, 西暦 700 年頃には広く一般に飲用されるようになった. 我が国には, 平安初期に遣唐使により伝えられ, 平安後期には日本各地で茶栽培が始まり, 現在に至っている¹⁾. 狭山茶はこのころから生産が始まり²⁾, 現在の生葉収穫量は全国 13 位で埼玉県の名産品に数えられている³⁾.

近年, 緑茶成分を用いた疫学調査から, 「緑茶を多く飲む人は, さまざまな疾病にかかりにくい」ことが判明した⁴⁾. これを機に, 単なる嗜好品というだけでなく, 緑茶成分の健康増進効果が期待され, 我が国では茶ポリフェノールや茶カテキンなどのいわゆる catechin 類を関与成分とした特定保健用食品が承認されている⁵⁾⁶⁾. このうち, 茶カテキンは水溶性の多価ポリフェノールで, 緑茶や紅茶の渋み成分として多く含まれているが, 「抗酸化作用がある」「コレステロールを低下させる」「抗菌作用がある」などの効果⁷⁾だけでなく, 認知症予防効果⁸⁾・ガン予防効果⁹⁾¹⁰⁾・アレルギー抑制効果¹¹⁾などの効果が認められると報告されている. また, 緑茶に含まれる caffeine も覚醒作用があることが知られており¹²⁾, 緑茶の幅広い効果を期待して各方面で活用されている.

一方で, 我が国の緑茶は, 鹿児島県, 福岡県八女地区, 京都府宇治地区, 三重県伊勢地区, 静岡県, 埼玉県狭山地区, そして, 新潟県村上地区を北限とする広範な地域で盛んに生産されている. このうち, 各地域との差別化を図る目的でのブランド化も進んでいて, 「静岡茶」「宇治茶」「狭山茶」などが有名である. しかし, 品種としてはやぶきた種, さやまかおり種, ゆたかみどり種などがあり, これらの品種をブレンドして使用されることが多く, 成分レベルでの差別化が進んでいるとは言い難い.

以上のことから, 成分レベルでの相違が存在するかどうかを確認するために, 我が国でブランド化が進んでいる主要銘柄茶を用いて, 緑茶の主要成分である catechin 類と caffeine の含有量の定量化を実施した.

2. 研究方法

2.1. 調査試料

成分含量の比較を行う実試料として, 以下に示す主要銘柄茶 (製茶) 8 種類, 狭山茶生茶葉および狭山茶ペーストを使用した (表 1). ここで, 狭山茶生茶葉は埼玉県狭

表 1 実試料として使用した主要銘柄茶

ブランド名	商品名	製造者	略称
静岡茶	深蒸し煎茶やよい	掛川市農業協同組合	静岡
伊勢茶	上煎茶	(有)中森製茶	伊勢
宇治茶	宇治煎茶	(株)福寿園	宇治
かごしま茶	やぶ一番	(有)浮辺製茶	知覧
八女茶	八女煎茶牡丹	(株)中村茶園	八女
土佐茶	土佐の緑茶	全農高知県本部	土佐
村上茶	北限のがぶのみ茶	(株)九重園	村上
狭山茶	淡濃深むし茶	(株)増田園本店	狭山
	生茶葉	(株)増田園本店	生茶
	狭山茶ペースト	(株)ゼロワン	ペースト

* 環境教育学科 生物有機化学研究室
** 環境教育学科 環境分析研究室
*** 環境教育学科 生物工学研究室
**** 環境教育学科 生態応用研究室
***** 環境教育学科 教育実践学研究室
***** 環境教育学科 生活環境学研究室

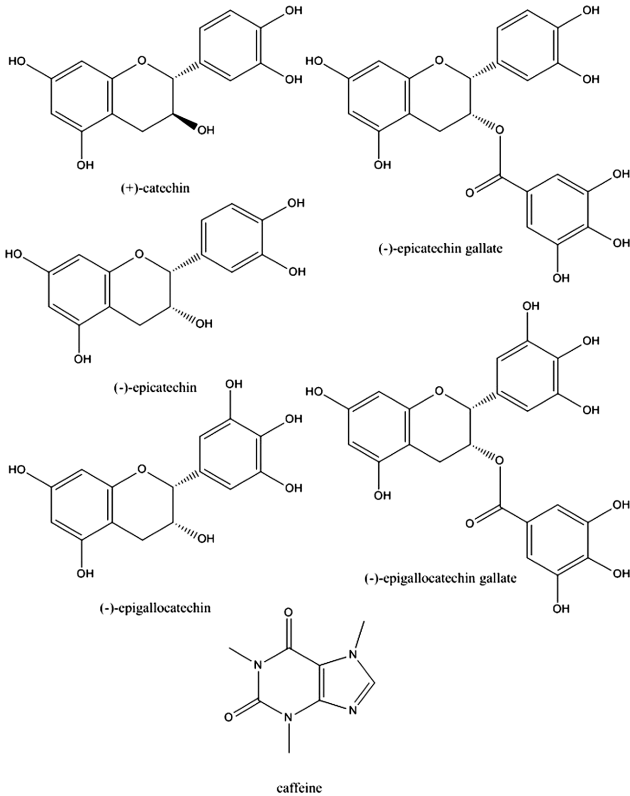


図1 茶に含まれる主な catechin 類と caffeine

山地区で栽培された製茶加工前の原料のことで、狭山茶ペーストとは狭山茶生茶葉から色素成分を抽出した後の残渣のことである。また、定量化のための標準試料として、(+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate, および caffeine の6種類を使用した(図1)。

2.2. 分析方法

標準試料を用いた検量線の作成および実試料から抽出した溶液中主要成分の定量を目的として、高速液体クロマトグラフ超高速トリプル四重極型質量分析計システム(島津製作所製 LCMS-8040 モデル)を使用した。また、LC-MS 分析条件は以下の方法を用いた(表2)。

2.3. 標準混合試料の調製

標準試料6種類のうち caffeine を除く catechin 類5種類をそれぞれ10 mg を正確に秤量し、10 mL メスフラスコに入れ、メタノールにて10 mL にメスアップし、1000 ppm 標準試料とした。また、caffeine を10 mg を正確に秤量し、10 mL メスフラスコに入れ、50%アセトニトリル水溶液にて10 mL にメスアップし、1000 ppm 標準試料とした。調製した1000 ppm 標準試料6種類をそれぞれ100 μ L ずつ取り、これに精製水400 μ L を加えて、100 ppm 標準混合試料とした。これを段階希釈し検量線用の標準混合試料(5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 ppb)とした。

表2 HPLC 及び MS 分析条件

カラム	Shim-Pack XR-ODSII (75 mm X 2.0 mm I.D., 2.2 μ m)		
溶離液	A液:0.1%ギ酸水溶液、B液:メタノール(100%) グラディエント条件:		
	時間 (min)	A濃度 (%)	B濃度 (%)
	0.00	90	10
	10.00	65	35
	12.50	20	80
	12.51	90	10
20.00	90	10	
流量	0.2 mL/min		
カラム温度	40°C		
注入量	20 μ L		
イオン化モード	ESI Positive, ESI negative同時測定		
印加電圧	4.5/-3.5 kV		
BH温度	400°C		

2.4. 実試料緑茶10点の抽出方法とLC-MS分析用前処理方法

実試料緑茶10点はそれぞれ5 g ずつ三角フラスコに計りとり、約90°Cの精製水を約90 mL 加え、浸透させた。30分間静置後、ろ紙(ADVANTEC製 No.5A, 110 mm)にてろ過し、ろ液を100 mL メスフラスコに移し、精製水で100 mL にメスアップして抽出溶液とした。この抽出溶液は、精製水で10倍、100倍、1000倍に希釈した。各希釈液は0.22 μ m の水系フィルターでろ過し、LCMS 分析試料とした。

2.5. 主要銘柄茶の catechin 類および caffeine の定量

定量計算方法は、各濃度の標準混合試料(5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 ppb)を用いて選択イオンモニタリング(Selected Ion Monitoring; SIM)法から求めた検量線を用いて外部標準法にて実施した。実試料の抽出液の濃度は、精製水で希釈したもので行い、検量線からその濃度を算出した。原液濃度への換算方法は以下の式に従った。

$$(\text{原液濃度}) = (\text{各希釈試料で求めた濃度}) \times (\text{希釈倍率})$$

また、狭山茶生茶葉と狭山茶ペーストは他の製茶と比較して水分量などが異なることから、原液濃度を算出するための換算係数を求めた。狭山茶生茶葉5 kg からは製茶原料1 kg が得られること、また、狭山茶ペーストは狭山茶生茶葉に加水したものを細粒化したものからクロロフィル等の色素成分を抽出した残渣分で、狭山茶生茶葉50 kg から狭山茶ペースト140 kg が得られることがわかった。これより、以下の式で狭山茶生茶葉と狭山茶ペーストの原液濃度への換算を行った。

(原液濃度) = (各希釈試料で求めた濃度) x (希釈倍率) x (換算係数)

但し、(換算係数) は狭山茶生茶葉の場合 5.0, 狭山茶ペーストの場合 17.5

3. 研究結果

3.1. 標準混合試料の検量線

LCMS-8040 を使用して、標準混合試料各濃度のピーク面積を求め、それぞれの相関関係を調べるために一次プロットした。その結果、各標準試料はほぼ直線上に位置することが確認された(表3)。このことから、本試験の分析条件により良好な定量試験ができることが示唆された。

3.2. 主要銘柄茶の catechin 類および caffeine の定量分析

今回選定した実試料緑茶 10 点について、LCMS-8040 を使用して、外部標準法にて各試料の原液濃度を算出した。その結果、各実試料 5 g 中には以下の成分量 (mg) が含まれることが分かった(表4)。

まず、狭山茶生茶葉と狭山茶ペーストを除く製茶 8 種類について比較を行ったところ、その成分含量には若干の相違しかないことが判明した。しかし、表4中に示す catechin 類 5 種類の総成分量を算出すると、「知覧茶」「宇治茶」「狭山茶」の順に他の製茶よりも少ないこと、「伊勢茶」「土佐茶」の順に多いことが分かった。また、caffeine を含む総成分量を算出すると、「知覧茶」「狭山茶」「宇治

茶」の順に他の製茶よりも少ないこと、「土佐茶」「伊勢茶」の順に多いという同様な傾向が見受けられた。

次に、狭山茶生茶葉は他の製茶 8 種類と異なりほとんどの成分含量が有意に低くなっていることが分かった。その成分量は、catechin 類 5 種類の総成分量の場合、製茶 8 種類と比較して約 100 ~ 150 分の 1 程度しか存在しなかった。その一方で、caffeine 成分量は製茶 8 種類の約 1.5 ~ 2 倍存在することが分かった。

さらに、狭山茶ペーストは製茶 8 種類と比較してほとんどの成分含量において有意に高くなっていることが分かった。特に、(-)-epigallocatechin gallate は製茶の約 5 倍、caffeine は約 3 倍の含量であった。

4. 考察

今回、日本各地で栽培されている緑茶 10 種類(製茶 8 種類、狭山茶生茶葉と狭山茶ペースト)を用いて、それぞれに含有する catechin 類 5 種類と caffeine の定量を行い、主要成分におけるブランド茶の間で成分量に相違点が存在するかどうかを確認した。

今回使用した実試料は、各地で生産されたやぶきた品種を主要原料とし、そこに他の品種を加えた、いわゆるブレンド茶であり、やぶきた品種のみを原料としている実試料は、静岡茶、狭山茶生茶葉と狭山茶ペーストの 3 種類であった。このうち、「伊勢茶」「土佐茶」はお湯を用いた catechin 類と caffeine の抽出効率に優れていることが判明したが、製茶間の成分量を比較すると、若干の相違しかないということは、日本における緑茶成分によるブランド差別化は難しいと思われる。

また、狭山茶生茶葉は他の緑茶 9 点と比較して、お湯を用いた catechin 類の抽出効率に劣るものの caffeine の抽出効率に優れていることから、caffeine が有する興奮作用などの薬理作用を期待した商品化に使用できると考えている。

さらに、狭山茶ペーストは狭山茶生茶葉から色素成分を抽出した後の残渣であることから、catechin 類 5 種類と caffeine に関しても、すでに抽出されていて各成分量は少

表3 各標準試料の検量線範囲と相関係数

成分名	検量線範囲(ppb)	相関係数(R)
(+)-catechin	5-10000	0.999859
(-)-epicatechin	5-10000	0.9996441
(-)-epigallocatechin	5-10000	0.9992886
(-)-epicatechin gallate	10-10000	0.9996685
(-)-epigallocatechin gallate	10-50000	0.9998405
caffeine	5-1000	0.9971883

表4 茶葉 5g あたりの catechin と caffeine の含有量 (mg)

成分名	静岡	伊勢	宇治	知覧	八女	土佐	村上	狭山	生茶	ペースト
(+)-catechin	28.4	22.9	21.3	24.1	27.3	24.5	26.1	27.3	0.3	224.9
(-)-epicatechin	226.2	203.4	186.8	178.7	218.8	217.5	234.6	202.7	4.2	293.7
(-)-epigallocatechin	825.9	846.3	689.2	630.3	802.5	787.0	880.6	711.3	6.4	855.8
(-)-epicatechin gallate	60.9	70.2	54.7	43.7	57.5	85.3	55.0	61.1	0.5	339.0
(-)-epigallocatechin gallate	433.9	532.2	419.3	321.9	423.7	531.8	390.2	384.3	0.4	1923.6
上記catechin類総成分量	1575.3	1675.0	1371.3	1198.7	1529.8	1646.1	1586.5	1386.7	11.8	3637
caffeine	561.5	530.8	620.1	559.1	568.4	608.7	498.8	540.0	949.7	1347.7
caffeineを含む総成分量	2136.8	2205.8	1991.4	1757.8	2098.2	2254.8	2085.3	1926.7	961.5	4984.7

ないと予想していたが、他製茶より多く含有していることが判明した。これは、“製茶から抽出して飲んで”有効成分を摂取するだけでなく、“お茶を食べて”有効成分を摂取するという新たな食材の提供という観点から考えても興味深い。

今回選定した各銘柄茶はそれぞれの地区での茶葉の収穫時期、ブレンドした茶葉品種の種類や割合、製茶方法などが明確になっていない。例えば、新茶は2番茶や3番茶と比較してcatechin類・caffeineの含有量が低く、アミノ酸類の含有量が比較的多いことが知られているように、収穫時期により各主成分含有量が異なる傾向にある。また、各銘柄茶の測定回数を確保することで、含有量の再現性を高くする必要もあると考えられる。今後はこれらの内容を明確にしつつ、主要成分6種類の比較検討を行うことが必要となるであろう。また、今回調査した成分は、catechin類5種類とcaffeineであることから、他の成分（例えば、アミノ酸や無機物）による比較も併せて検討することで、各銘柄茶の差別化が計れると考えている。

謝辞

狭山茶試料をご提供いただいた有限会社 増田園本店（埼玉県入間市）様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 日本茶業中央会企画編：茶の機能：ヒト試験から分かった新たな役割，農山漁村文化協会，2013
- 2) 入間市博物館編：狭山茶の歴史と現在，入間市博物館，2009
- 3) 農林水産省 HP：平成24年産作物統計 工芸農作物の収穫量－茶－茶期別摘採面積・生葉収穫量・荒茶生産量（主産県別），2014年6月13日公表
- 4) Oguni I, Nasu K, Kanaya S, Ota Y, Yamamoto S, and Nomura T: Epidemiological and experimental studies on the antitumor activity by green tea extracts. *Jpn. J.*

Nutri. and Diet. 47: 93-102, 1989.

- 5) 厚生労働省 HP：特定保健用食品許可（承認）品目一覧，平成26年8月28日公表
- 6) 長谷正，時光一郎：プロダクトイノベーション ヘルシア緑茶，化学と生物 43: 67-69, 2005
- 7) 伊勢村護編：機能効用ナビゲーション2013～緑茶と健康のメカニズム～，静岡県経済産業部農林業局茶業農産課，2013
- 8) Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Shimazu T, Matsui T, Ebihara S, Awata S, Nagatomi R, Arai H, and Tsuji I: Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *Am J Clin Nutr.* 83: 355-361, 2006.
- 9) Ui A, Kuriyama S, Kakizaki M, Sone T, Nakaya N, Ohmori-Matsuda K, Hozawa A, Nishino Y, Tsuji I: Green tea consumption and the risk of liver cancer in Japan: the Ohsaki Cohort study. *Cancer Causes Control.* 20: 1939-1945, 2009.
- 10) Inoue M, Sasazuki S, Wakai K, Suzuki T, Matsuo K, Shimazu T, Tsuji I, Tanaka K, Mizoue T, Nagata C, Tamakoshi A, Sawada N, and Tsugane S: Green tea consumption and gastric cancer in Japanese: a pooled analysis of six cohort studies. *Gut.* 58: 1323-1332, 2009.
- 11) Maeda-Yamamoto M, Ema K, and Shibuichi I: In vitro and in vivo anti-allergic effects of 'benifuuki' green tea containing O-methylated catechin and ginger extract enhancement. *Cytotechnology* 55: 135-142, 2007.
- 12) Reviews: Hursel R, Westerterp-Plantenga M: The effects of caffeine and green tea on energy expenditure, fat oxidation, weight loss, and *weight maintenance*. *Weight Control and Slimming Ingredients in Food Technologies* 161-176, 2010.

Abstract

Quantitative analysis of catechin derivatives and caffeine in Japanese green tea was carried out using liquid chromatograph Mass spectrometer (LCMS-8040, Shimadzu Corporation). We selected tea leaves from famous production areas such as Shizuoka, Ise, Uji, Kagoshima, Fukuoka-Yame, Tosa, Murakami and Sayama. We also selected original tea leaves and processed paste derived from Sayama area. Catechin derivatives and caffeine contents of each area were not significantly changed, but the processed paste contains five times the amount of (-)-epigallocatechin gallate and three times of caffeine as green teas.