

## 茶飲料中のカフェイン及びカテキン類の定量方法<sup>†</sup>

久延 義弘, 朝賀 昌志, 松田 良子  
原 京子, 末松 伸一, 小松 美博

### Quantitative Determination of Caffeine and Catechins in Tea Drinks

Yoshihiro Hisanobu, Masashi Asaka, Ryoko Matsuda, Kyoko Hara,  
Shinichi Suematsu and Yoshihiro Komatsu

To clarify the behaviour of functional constituents in tea drinks, a method for the quantitative determination of caffeine and catechins by high performance liquid chromatography was established.

High recoverly yields were obtained for both methods which determine caffeine after separation of catechins and simultaneously with catechins. A high recoverly yield was also obtained for catechins in simultaneous determination of caffeine. In the simultaneous determination method, no influence was observed on the recoverly yields of caffeine and catechins by the addition of 5% sugars such as glucose, fructose and sucrose to tea drinks. Effect of pH of infusion in a range of 3.0 to 7.3 by the addition of L-ascorbic acid and its sodium salt, citric acid and its sodium salt, and sodium hydrogen carbonate on the recoverly yield of caffeine and catechins was not observed.

**Key words:** tea drinks, caffeine, catechins, high performance liquid chromatography, simultaneous determination.

お茶類飲料缶詰やPETボトル詰の品質向上を計る為には、それらの有効成分の把握が不可欠である。その中でも、茶飲料の代表的な成分であるカフェイン及びカテキン類の挙動を知る事は重要であるので、これらカフェイン及びカテキン類の定量方法を高速液体クロマトグラフ法を用いて検討した。

カフェインについては、カテキン類を除去した後に定量する池ヶ谷の方法<sup>1)</sup>とカフェイン及びカテキン類を同時に定量する寺田らの方法<sup>2)</sup>について比較試験を実施した。また、カテキン類については、寺田らの方法における回収試験を実施し、さらに茶飲料に添加される添加物およびpH調整によるカフェイン及びカテキン類の回収率への影響も併せて検討したので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 実験材料と試薬

カフェインは和光純薬工業(株)製試薬特級を、カテキン類として(-)-Epigallocatechin (-EGC), (+)-Catechin (+C), (-)-Epicatechin (-EC), (-)-Epigallocatechin gallate

<sup>†</sup> 容器詰茶類飲料に関する研究 (第1報)

(-EGCG), (-)-Epicatechin gallate (-ECG) は栗田工業㈱製分析用標準試薬を、高速液体クロマトグラフ (HPLC) の移動相は液体クロマトグラフ用試薬を、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

煎茶の茶葉としては、市販のやぶきた種中級品を使用した。

## 2. 煎茶の抽出方法

池ヶ谷の方法に準じ、粉碎した茶葉 1 g を採取し、これに沸騰水約 80 ml を加え 80°C で 30 分間保温した後冷却し、水を加えて 100 ml としたものを Na 2 の濾紙で濾過した。この場合カテキン類の濾紙への吸着を避ける為に、最初の 20 ml 程度は捨てた。

## 3. カフェインの抽出方法

1) 直接法 池ヶ谷の方法に準じ、10倍に希釈した煎茶抽出液中のカフェインが適当量になる様に水で希釈後、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターを用いて加圧濾過した。

2) Polyvinylpyrrolidone (PVP) 添加法 池ヶ谷の方法に準じ、10倍に希釈した煎茶抽出液 50 ml に PVP 200 mg を加え、室温で 30 分間保持してから Na 2 の濾紙で濾過しカテキン類を除去した後、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターを用いて加圧濾過した。

3) クロロホルム抽出法 池ヶ谷の方法に準じ、10倍に希釈した煎茶抽出液 50 ml を分液ロートに採取し、クロロホルム 50 ml を加えて振とう抽出した。

この抽出操作を 3 回繰り返した後、クロロホルム層を集めロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固した。これを水 10 ml に溶解後、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターを用いて加圧濾過した。

4) 寺田らの方法 煎茶抽出液に等量のアセトニトリルを加え、試料中のカフェインが適当量になるように 50% アセトニトリルで希釈後、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターを用いて加圧濾過した。

## 4. カテキン類の抽出方法

寺田らの方法に準じ、煎茶抽出液に等量のアセトニトリルを加え、試料中のカテキン類が適当量になるように 50% アセトニトリルで希釈後、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターを用いて加圧濾過した。

## 5. 煎茶抽出液の pH 調整方法

煎茶抽出液 95 ml に 10% のクエン酸または L-アスコルビン酸 (L-AsA) 溶液、さらに 10% のクエン酸ナトリウムまたは重炭酸ナトリウム (重曹) 溶液を pH を確認しながらマイクロシリンジで注入し、これに水を加えて 100 ml とした後、最終 pH を測定した。

## 6. カフェインの分析条件

HPLC: 島津製作所製 HPLC LC-6A. 検出器: 島津製作所製分光光度計 SPD-6AV. 本カラム: ケムコ製逆相系カラム CHMCOSORB 5-ODS-H, 内径 4.6 mm, 長さ 250 mm. ガードカラム: 本カラムと同じ, 内径 4.6 mm, 長さ 30 mm. カラム温度: 40°C. 移動相: 25% のメチルアルコールを含む 1% 酢酸溶液. 流速: 0.5 ml/min. 検出器の条件: 波長 272 nm, Range 0.08 AUFS. 試料注入量: 5  $\mu$ l.

## 7. カフェイン及びカテキンの同時分析条件

HPLC: 島津製作所製 HPLC LC-6A. 検出器: 島津製作所製分光光度計 SPD-6AV. 本カラム: クロマトパッキングセンター製逆相分配系カラム ULTRON N-C18, 内径 4.6 mm, 長さ 150 mm. ガードカラム: クロマトパッキングセンター製 Permaphas ETH, 内径 4.6 mm, 長さ 50 mm. カラム温度: 43°C. 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を含む 0.1% リン酸溶液. 移動相 (B 液): アセトニトリル. 流速 1 ml/

min. グラジエント条件：試料注入時B液1%，分析開始と同時にグラジエント，35分後B液18%，以後B液90%，45分後B液1%。検出器の条件：波長280nm，Range0.08AUFS。試料注入量：10 $\mu$ l。

## 8. ピークの同定

標準品を用いた標準添加法での保持時間及びカラム温度変更による相対保持比変動の一致によった。

## 結果と考察

### 1. カフェインの分析方法の検討

カフェインの標準品を用いて池ヶ谷の方法で標準曲線を求めてみた結果 (Fig. 1)，カフェイン量0.82mg/100mlから4.11mg/100mlの範囲において，相関係数は0.9998と高く十分な定量性がある。

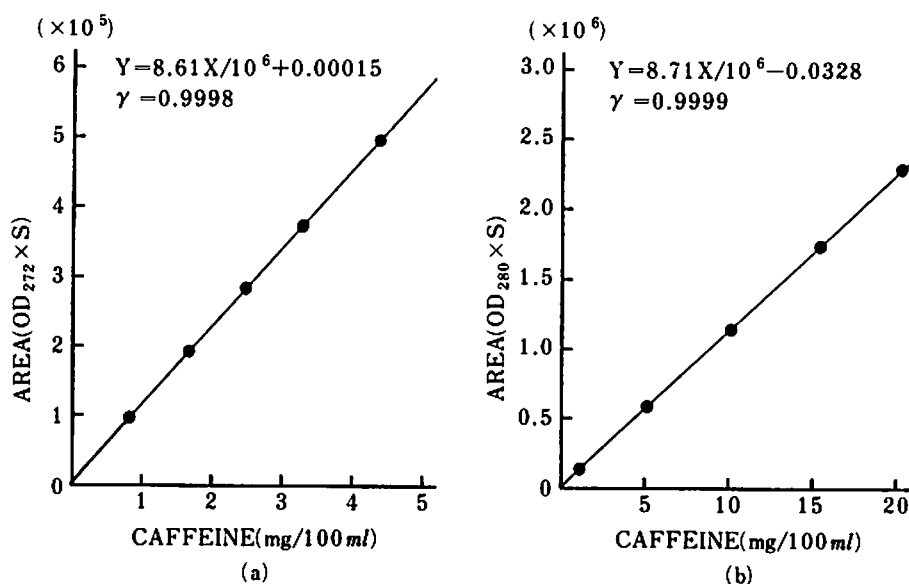


Fig.1. Calibration curves of caffeine standard solution.

(a): Method of Ikegaya.

(b): Method of Terada *et al.*

また、煎茶抽出液を用いて3種類のカフェイン抽出方法（直接法，PVP添加法，クロロホルム抽出法）でのクロマトグラムを求めた結果 (Fig. 2)，直接法及びPVP添加法ではカフェインのピーク直前に未知成分のピークがありカフェインのピークと重なるが，クロロホルム抽出法ではカフェイン以外のピークは認められなかった。

さらに、これらの方法を用いて煎茶抽出液での添加回収試験を実施した結果 (Table 1)，直接法とPVP添加法は未知成分とカフェインのピークが重なる為に若干のばらつきが認められるのに対し，クロロホルム抽出法では回収率が101~103%で変動係数が1.1~1.2%と安定していた。

一方、カフェインとカテキン類を同時に定量する寺田らの方法で、カフェインの標準品を用い

て標準曲線を求めてみた結果 (Fig. 1), カフェイン量 1 mg/100ml から 20mg/100ml の範囲におい

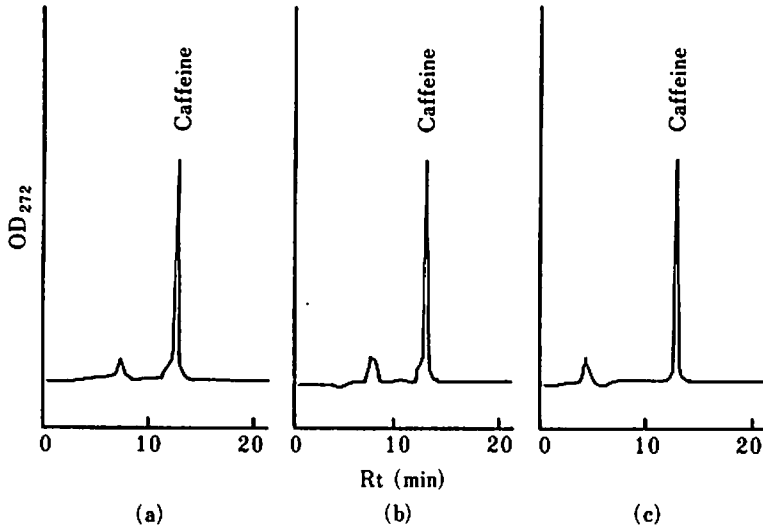


Fig.2. HPLC chromatograms of several preparations prepared from tea drinks.

(a): Hot water (80°C) extract.

(b): PVPP treatment for (a).

(c): Extract from (b) with chloroform.

Table 1. Recovery of caffeine determined by HPLC.

	Caffeine content (mg/100 ml)			Determined* (mg/100 ml)	Variance of coefficient (%)	Recovery (%)
	Original*	Added	Total			
(a)	1.98	0.90	2.88	2.98	1.4	103.5
	1.98	1.80	3.78	3.89	1.6	102.9
	1.98	2.71	4.69	4.84	1.5	103.2
(b)	2.06	0.90	2.96	3.03	5.6	102.4
	2.06	1.80	3.86	4.02	4.5	104.4
	2.06	2.71	4.77	5.02	2.4	105.2
(c)	1.86	0.90	2.76	2.79	1.0	101.1
	1.86	1.80	3.66	3.76	1.1	102.7
	1.86	2.71	4.57	4.69	1.1	102.6

(a) : Hot water (80°C) extract.

(b) : PVPP treatment for (a).

(c) : Extract from (b) with chloroform.

\* Average of four determination.

て、相関係数が0.9999と高く十分な定量性がある。

また、池ヶ谷の方法と寺田らの方法での一次回帰式の係数が異なっているのは、寺田らの方法ではカテキン類を同時定量する事から、検出波長を池ヶ谷の方法の272nmと異なり280nmとして

いる為である。

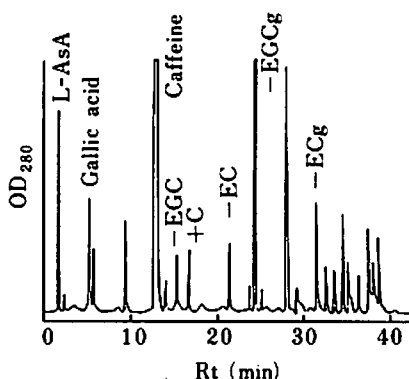


Fig.3. A HPLC chromatogram of caffeine and catechin components in green tea drink.

Table 2. Recovery of caffeine determined by HPLC.

Caffeine content (mg/100ml)			Determined <sup>※</sup> (mg/100ml)	Recovery (%)
Original <sup>※</sup>	Added	Total		
2.37	1.52	3.89	3.91	100.5
2.37	3.04	5.41	5.41	100.0
2.37	4.56	6.93	6.97	100.6

※ Average of four determination.

次に、煎茶抽出液中のカフェイン及びカテキン類を寺田らの方法で分離してクロマトグラムを求めた結果 (Fig. 3), カフェインの分離は良好で他のピークと重なり合う事はなかった。さらに煎茶抽出液を用いて添加回収試験を実施した結果 (Table 2), 回収率は100~101%と高い値を示した。

この事から、カフェインについては池ヶ谷の方法及び寺田らの方法ともに十分定量は可能であるが、カテキン類を同時に定量出来る利点から寺田らの方法を以て使用する事とした。

## 2. カテキン類の分析方法の検討

お茶類の代表的なカテキン類である-EGC, +C, -EC, -EGCg, -ECgの標準品を用いて、寺田らの方法で標準曲線を求めてみた結果 (Fig. 4), -EGCgの相関係数が0.9995, その他のカテキン類が0.9999と高く十分な定量性がある。さらに煎茶抽出液を用いて添加回収試験を実施した結果 (Table 3), -EGCが99~101%, +Cが101~106%, -ECが99~101%, -EGCgが103~107%, -ECgが95~103%の回収率を示した。その中において、-EGCgと-ECgの回収率がばらつくのは、僅かに他のピークと重なる為と考えられる。しかし、カフェインと同時定量出来る利点を考えると、回収率が95~107%の範囲にあれば可成り良好な定量方法であると言える。

## 3. カフェイン及びカテキン類の同時定量に及ぼす添加物の影響

標準品のカフェイン及びカテキン類を用いて、各濃度2.5%と5%のグルコース、フラクトー

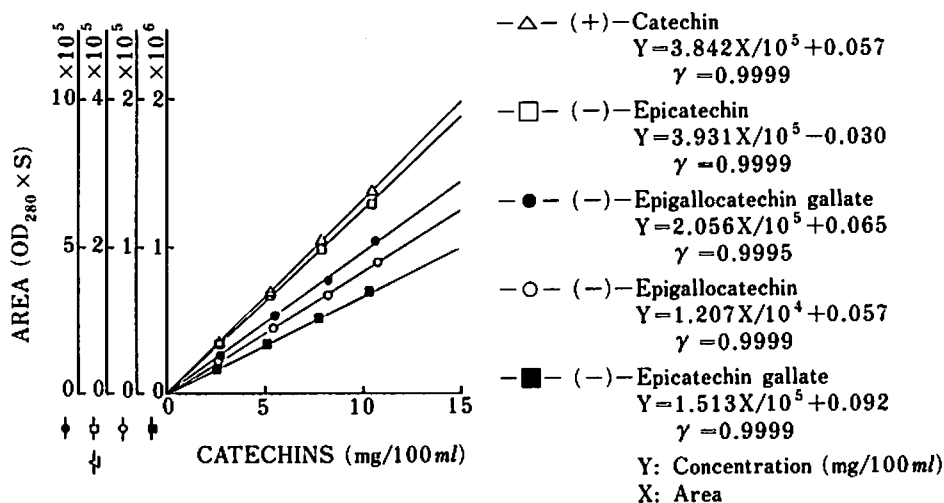


Fig.4. Calibration curves of catechins standard solution.

Table 3. Recovery of catechins determined by HPLC.

Catechins	Catechins content (mg/100ml)			Determined (mg/100ml)	Recovery (%)
	Original <sup>※</sup>	Added	Total		
-EGC	6.95	3.98	10.98	10.80	98.8
	6.95	7.96	14.91	14.80	99.3
	6.95	11.94	18.89	19.02	100.7
+C	0.14	0.93	1.07	1.12	104.7
	0.14	1.86	2.00	2.02	101.0
	0.14	2.79	2.93	3.01	102.7
-EC	1.99	0.89	2.88	2.90	100.7
	1.99	1.78	3.77	3.76	99.7
	1.99	2.67	4.66	4.69	100.6
-EGCg	5.39	2.96	8.35	8.91	106.7
	5.39	5.92	11.31	11.85	104.8
	5.39	8.88	14.27	14.82	103.9
-ECg	0.85	0.66	1.51	1.52	100.7
	0.85	1.32	2.17	2.10	96.8
	0.85	2.98	2.83	2.77	97.9

<sup>※</sup> Average of four determination.

ス、シュクロース共存下での回収試験を実施した結果 (Table 4), 糖無添加区に対して回収率は99~103%と高い値を示した。さらに、煎茶抽出液を用いて標準品と同様の回収試験を実施した結果 (Table 5), 糖無添加区に対して回収率は99~101%と高い値を示し、茶飲料への5%以内の加糖による回収率への影響は認められなかった。

また、容器詰茶飲料の製造工程において添加が予想されるL-AsA (70mg/100ml), クエン酸 (50mg/100ml), L-アスコルビン酸ナトリウム (30mg/100ml), 重曹 (5mg/100ml) 共存

**Table 4.** Recovery of caffeine and catechins in standard solution containing sugars by HPLC.

Additives		Caffeine* <sup>1</sup>	Catechins (%) * <sup>1</sup>				
Compound (%)	(%)	-EGC	+C	-EC	-EGC <sub>g</sub>	-EC <sub>g</sub>	
(mg/100 ml)* <sup>2</sup>		(2.26)	(2.40)	(2.34)	(2.93)	(2.45)	(2.49)
Glucose	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	2.5	100.1	101.1	99.4	100.0	100.7	100.8
	5.0	100.2	100.7	100.2	100.8	102.1	100.8
(mg/100 ml)* <sup>2</sup>		(2.24)	(2.38)	(2.32)	(2.91)	(2.44)	(2.48)
Fructose	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	2.5	101.2	102.0	101.3	101.4	102.3	101.4
	5.0	101.8	102.7	102.2	101.7	101.8	101.7
(mg/100 ml)* <sup>2</sup>		(8.90)	(7.90)	(2.80)	(3.10)	(7.90)	(3.10)
Sucrose	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	2.5	99.7	100.0	99.3	99.4	99.4	100.0
	5.0	100.2	100.8	99.6	100.9	100.0	99.7

\*<sup>1</sup> Average of three determination.\*<sup>2</sup> Contents of caffeine and catechins in standard solution.**Table 5.** Recovery of caffeine and catechins in tea drinks containing sugars by HPLC.

Additives		Caffeine* <sup>1</sup>	Catechins (%) * <sup>1</sup>				
Compound (%)	(%)	-EGC	+C	-EC	-EGC <sub>g</sub>	-EC <sub>g</sub>	
(mg/100ml)* <sup>2</sup>		(23.4)	(40.5)	( 1.8)	(15.6)	(40.9)	(11.4)
Glucose	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	2.5	99.7	99.2	98.9	100.4	100.2	100.0
	5.0	99.7	99.5	98.9	100.1	99.9	99.7
(mg/100ml)* <sup>2</sup>		(23.4)	(40.5)	( 1.8)	(15.6)	(40.9)	(11.4)
Fructose	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	2.5	99.6	99.1	100.0	100.4	99.5	99.2
	5.0	100.2	99.1	98.7	99.9	98.9	99.7
(mg/100ml)* <sup>2</sup>		(23.4)	(40.1)	( 2.0)	(15.3)	(39.0)	(11.1)
Sucrose	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	2.5	100.2	100.0	100.0	99.7	99.7	99.8
	5.0	99.8	99.6	100.0	99.5	99.5	99.6

\*<sup>2</sup> Average of three determination.\*<sup>2</sup> Contents of caffeine and catechins in tea drinks.

**Table 6.** Recovery of caffeine and catechins in tea drink containing additives by HPLC.

Additives (mg/100ml) <sup>※2</sup>	Caffeine <sup>※1</sup> (%)	Catechins (%) <sup>※1</sup>				
		-EGC	+C	-EC	-EGC <sub>g</sub>	-EC <sub>g</sub>
Non	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
L-Ascorbic acid(a)	99.4	100.0	100.0	100.7	100.3	101.3
Citric acid(b)	100.0	99.7	100.0	100.0	100.3	100.0
(a)+(b)	99.9	99.8	100.1	100.2	100.2	100.9
Sodium L-Ascorbic acid(c)	99.9	99.7	99.2	99.7	99.8	99.7
Sodium bicarbonate(d)	99.8	99.7	99.0	99.8	99.9	99.6
(c)+(d)	99.9	99.8	98.8	99.9	99.9	99.8
(a)+(b)+(c)+(d)	99.9	99.7	99.9	100.1	100.2	100.3

(a) : 70mg/100ml, (b) : 50mg/100ml, (c) : 30mg/100ml, (d) : 5mg/100ml.

※<sup>1</sup> Average of three determination.

※<sup>2</sup> Contents of caffeine and catechins in tea drink.

下での回収試験を実施した結果 (Table 6), 無添加区に対し回収率は99~101%と高い値を示し, 茶飲料へのこれら添加物の添加による回収率への影響は認められなかった。

この事から, 上記濃度範囲内において, これら添加物が茶飲料中に共存しても, 寺田らの方法でカフェイン及びカテキン類は十分定量出来ると考えられる。

#### 4. カフェイン及びカテキン類の同時定量に及ぼすpHの影響

煎茶抽出液にクエン酸, L-AsA, クエン酸ナトリウム, 重曹を添加してpHを調整したものの回収試験を実施した結果 (Table 7), pH未調整区に対し, pH 3.00~4.92の酸添加区の回収率は99~101%と高い値を示し, この範囲内では茶飲料のpH調整による回収率への影響は認められなかった。

**Table 7.** Recovery of caffeine and catechins in tea drink adjusted pH with additives by HPLC.

Additives (mg/100ml) <sup>※2</sup>	pH	Caffeine <sup>※1</sup> (%)	Catechins (%) <sup>※1</sup>				
			-EGC	+C	-EC	-EGC <sub>g</sub>	-EC <sub>g</sub>
Non	6.00	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Citric acid	3.00	99.6	100.1	99.9	99.7	100.2	99.8
	4.01	100.2	100.2	100.1	98.9	99.9	99.6
	4.92	100.4	99.9	100.0	99.4	99.9	100.9
Sodium citric acid	7.00	100.2	99.5	102.6	99.1	99.7	100.9
	7.30	100.5	99.0	104.1	98.1	99.3	100.1
L-Ascorbic acid	3.10	99.9	99.4	100.1	99.8	99.9	100.2
	4.00	99.5	99.6	100.2	100.4	99.4	100.2
	4.80	100.7	100.0	100.1	100.0	100.1	99.6
Sodium bicarbonate	6.60	100.3	99.8	102.7	100.3	100.0	100.9
	7.30	100.4	99.8	106.2	100.0	100.0	100.9

※<sup>1</sup> Average of three determination.

※<sup>2</sup> Contents of caffeine and catechins in tea drink.



しかし、pH 6.60~7.30のアルカリ添加区における回収率は98~106%の値を示し酸添加区に比較すると若干値がばらつき傾向にあるが、寺田らの方法における標準添加法での回収率(95~107%)の範囲内にあるので実用上問題は無いと考えられる。このアルカリ添加区における回収率のばらつき傾向は、カテキン類の異性化反応が室温であってもアルカリ添加によって加速される為と考えられるので、アルカリ添加後は直ちにHPLCによる定量を実施する必要がある。

この事から、上記pHの範囲内においても、寺田らの方法で茶飲料中のカフェイン及びカテキン類は十分定量出来ると考えられる。

### 要 約

高速液体クロマトグラフ法を用いて、茶飲料中のカフェイン及びカテキン類の定量方法を検討した。

1. カフェインについては、カテキン類を除去した後に定量する池ヶ谷の方法及びカフェインとカテキン類を同時に定量する寺田らの方法とも高い回収率を示した。
2. カフェイン及びカテキン類の同時定量において、カテキン類も高い回収率を示すので、茶飲料中のカフェイン及びカテキン類の定量には寺田らの方法が迅速性の点で優れている。
3. 茶飲料へのグルコース、フラクトース、シュクロースによる5%以内の加糖及びL-アスコルビン酸、クエン酸、L-アスコルビン酸ナトリウム、重炭酸ナトリウムなどの添加において、予想される添加量の範囲内では、カフェイン及びカテキン類の同時定量に及ぼす影響は認められなかった。
4. L-アスコルビン酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、重炭酸ナトリウムによって茶飲料のpHを調整しても、pH 3.0から7.3の範囲内においてカフェイン及びカテキン類の同時定量に及ぼす影響は認められなかった。

### 文 献

- 1) 池ヶ谷賢次郎：日本食品工業学会誌，32，61-66 (1985)。
- 2) 寺田志保子，前田有美恵，増井俊夫，鈴木裕介，伊奈和夫：日本食品工業学会誌，34，20-27 (1987)。