

茶葉中のカフェイン・カテキン類の定量における[†] 熱水抽出法とアセトニトリル抽出法の比較

久延 義弘, 末松 伸一, 西郷 英昭
松田 良子, 原 京子*, 小松 美博

Comparison of Extraction Procedure with Hot Water, Acetonitrile, and Aqueous Acetonitrile on HPLC Determination of Caffeine and Catechins in Green Tea Leaves

Yoshihiro Hisanobu, Shinich Suematsu, Hideaki Saigo,
Ryoko Matsuda, Kyoko Hara, and Yoshihiro Komatsu

In our previous study, it was shown that tea catechins isomerized to its corresponding epimer during hot water extraction. This suggested that the analytical value of catechins in tea leaves closely depended upon the extraction temperature, time, and media.

For a simultaneous determination of caffeine and catechins by high performance liquid chromatography, a comparative study of extraction procedure to prevent the isomerization of catechins was performed with conventional hot water, acetonitrile, and aqueous acetonitrile at an ambient temperature.

Green tea leaves were extracted by 100 (W/V) times of cold water (20°C), hot water (80°C), acetonitrile(20°C), and aqueous acetonitrile(20°C) of different concentration [75, 60, 50, 40, and 25%(V/V)].

Behavior of catechins during extraction was investigated both by determination of extraction rate and detection of thermal reaction products. The reaction products were characterized with a comparison of those from authentic standard catechins under the same reaction condition.

The results obtained that catechins were almost slightly soluble in acetonitrile, but stable and maximum analytical value of catechins were obtained by extraction of aqueous acetonitrile with prevention of isomerization, and epimerization of catechins was proceeded in hot water extraction which resulted in unstable analytical value.

The proposed procedure was to extract green tea leaves by aqueous acetonitrile (50%) at 20°C for 40 min with stirring.

By the procedure, a maximum and stable value of catechins was obtained for the original concentration in green tea leaves. On the other hand, analytical value of caffeine was not affected by the extraction media except cold water and acetonitrile.

[†]容器詰茶類飲料に関する研究 (第4報).

*元東洋食品研究所.

Key words: drinks, green tea, catechins, isomerization, caffeine, hot water extraction, acetonitrile extraction, HPLC.

緑茶茶葉中のカフェイン・カテキン類組成を分析する場合、一般的には80℃以上での熱水抽出法が実施されている¹⁾²⁾。しかし前報³⁾⁴⁾及び続報⁵⁾でも報告の様に、カテキン類は異性化反応を起こし易く、特に82℃付近で異性化反応の活性化エネルギーが大きく変化する事から、この温度付近の熱水抽出では操作中にカテキン類の異性化が進み、高速液体クロマトグラフィーによる分析では、本来茶葉中に含まれているカテキン類組成とは異なる結果を与えてしまう。

カテキン類の温度による異性化反応を考慮せずに抽出すると、多くの場合天然型カテキン類が減少し、特にクロマトグラム上では(-)-epicatechinの異性化反応⁶⁾で生じた(-)-catechinが(+)-catechinと分離されない為に、(+)-catechinが本来茶葉中に含まれている量よりも、見かけ上多く検出されるという結果が生じる。

本来、茶葉中に含まれるカテキン類の量を正確に求める事は、茶葉の品質特性を位置づける為に重要であるのみならず、異性化反応や抽出速度を定量的に取り扱う場合に不可欠な要素である。

そこで、本来茶葉中に含まれるカテキン類の高速液体クロマトグラフィーによる定量を目的として、80℃で熱水抽出した場合のカテキン類の挙動と20℃で溶剤抽出した場合の挙動を比較し、抽出時におけるカテキン類の異性化反応の抑制が可能な条件について検討した。

実験方法

1. 実験材料と試薬

カフェインは和光純薬製試薬特級の無水カフェインを、カテキン類として(-)-epigallocatechin(-EGC)、(+)-catechin(+C)、(-)-epicatechin(-EC)、(-)-epigallocatechin gallate(-EGCG)及び(-)-epicatechin gallate(-ECg)は栗田工業製分析用標準試薬を、N,N-ジメチルホルムアミド及びアセトニトリルは和光純薬製高速液体クロマトグラフ(HPLC)用試薬を、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

80℃の熱水抽出にはヤマト科学製純水製造装置(Pure Line WL21)で製造した水を一旦沸騰させた後、急冷したもの(処理水)を用いた。

溶剤抽出の溶媒としてはHPLC用のアセトニトリル及び処理水を用いた。

緑茶(煎茶)は、市販のやぶきた種中級品を用い、これを粉碎し20~60メッシュの範囲内のものを用いて、茶葉の部位による個体差を小さくした。

2. 煎茶の抽出方法

100mlのメスフラスコを用いて、抽出倍数は100倍(W/V)を基準とした。

抽出する前にメスフラスコを20℃(±0.5℃)の水で定容とし、回転子を投入してから80℃の恒温水槽に入れ、液面に目盛り線(補正標線)をつける。補正標線をつけた空のメスフラスコに茶葉と回転子を投入し、80℃(±0.5℃)の熱水で定容にした後、茶葉から発生する気泡分の体積減少を補正する為、80℃の恒温水槽内で気泡の発生が止まる約2分後に再度定容した。

この茶葉を投入してからの時間を抽出時間として5, 10, 20, 30, 40, 50, 60分間の各時間同一条件で攪拌し、250メッシュのナイロン濾布で濾過後、内径1mm、長さ40cmのステンレス管(熱交換器)を通して25℃以下に急冷しながら吸引採取し、直ちに0.45µmの水系メンブランフィルターを用いて加圧濾過した。

一般的に実施されている熱水抽出法では、抽出後メスフラスコを冷却し定容にしてからNo.2の濾紙で濾過しており、これら操作中におけるカテキン類の異性化反応は考慮されておらず、操作

条件の違いによって値が可成り変動すると予想されるので、上記の急冷採取法を用いて抽出直後からのカテキン類の異性化反応を抑制した。

溶剤抽出の場合も熱水抽出の場合と同様に補正標線をつけたメスフラスコに茶葉と回転子を投入し、抽出温度を20℃(±0.5℃)として、水とアセトニトリル及びアセトニトリルと水の容積比1:3, 2:3, 1:1, 3:2, 3:1, に調製したもので定容にした後、熱水抽出同様、20℃の恒温水槽内で気泡の発生の止まる約4分後に再度定容にし、熱水抽出と同じ時間及び条件でもって抽出した後、200メッシュのステンレス金網を通して吸引採取し、直ちに0.45μmの非水系メンブランフィルターを用いて加圧濾過した。

3. カフェイン・カテキン類の抽出方法

前報⁷⁾同様寺田ら²⁾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、振とう後0.45μmの非水系メンブランフィルターで加圧濾過した。

4. カフェイン・カテキン類の定量方法

前報⁷⁾同様、カフェイン・カテキン類の定量は、HPLCを用いて同時に定量する寺田ら²⁾の方法に準じた。

5. HPLCの測定条件

H P L C : (株)島津製作所製H P L C L C - 6 A.

検 出 器 : (株)島津製作所製分光光度計 S P D - 6 A V.

本 カ ラ ム : クロマトパッキングセンター製 ULTRON N - C 18, 内径4.6mm, 長さ150mm.

ガードカラム : クロマトパッキングセンター製 Permaphas E T H, 内径4.6mm, 長さ50mm.

カラム温度 : 43℃.

移動相(A液) : 5%N,N-ジメチルホルムアミド及び0.1%アセトニトリル含有の0.1%リン酸溶液.

移動相(B液) : アセトニトリル.

流 速 : 1 ml/分.

グラジェントの条件 : 試料注入時はB液1%, 分析開始と同時にグラジェント, 35分後にB液18%, 以降B液を90%, 45分後にB液1%, 59分後次の分析を開始.

検出器の条件 : 波長280nm, Range 0.08 AUFS.

試料注入量 : 10μℓ.

6. クロマトグラムピークの同定

標準品を用いて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。また、中川ら⁸⁾の報告にあるように、カテキン類の異性化反応はエピメリ化が主体となっている事から、生成する異性体はエピマーと考えられ、実験方法5のHPLCの条件でエピマー及びシアステレオマーは分離可能であるが、エナンチオマーは現在分離技術が確立されていないので、+Cと±Cの分子吸光係数が等しい⁵⁾事から、各異性体の分子吸光係数も等しいとして定量した。

結果と考察

1. アセトニトリルでの抽出条件

茶葉成分の抽出にはアセトンを用いている場合もあるが⁹⁾、HPLCの移動相にアセトニトリルを用いている事から、アセトニトリルでの抽出を検討した。

また、カテキン類は水溶性で有機溶剤に難溶性である事から、アセトニトリルと水との容積比を変えて、煎茶の茶葉からのカテキン類の抽出濃度と抽出時間との関係を検討した結果 (Fig. 1), アセトニトリルのみでは殆ど抽出されず、逆に水だけでは20℃の場合、抽出濃度は時間と共に増加するものの、その増加速度は緩やかであった。

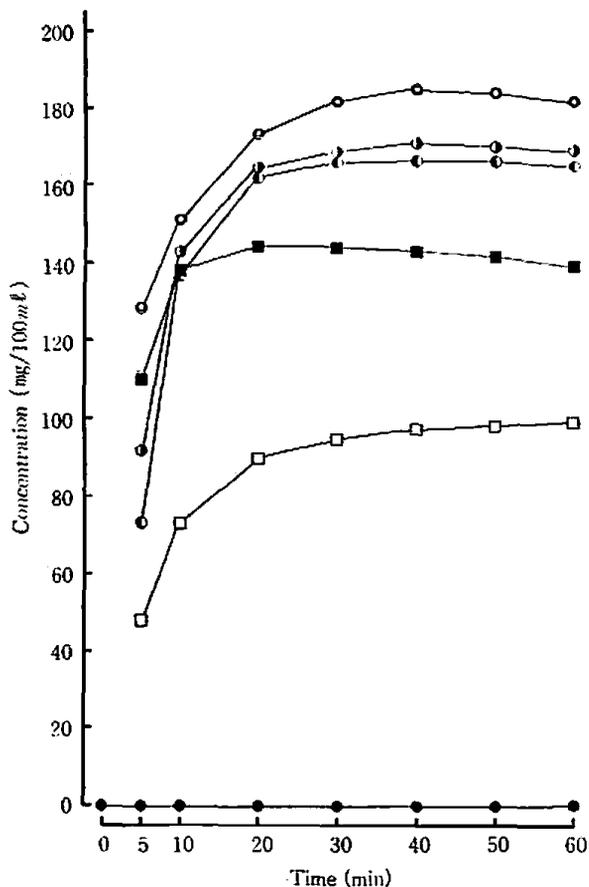


Fig. 1. Concentrations of Total Catechins Extracted from Green Tea Leaves.

- : acetonitrile (20°C)
- : acetonitrile-water (3:1 v/v, 20°C)
- : water (20°C)
- : hot water (80°C)
- : acetonitrile-water (1:1 v/v, 20°C)
- : acetonitrile-water (1:3 v/v, 20°C)

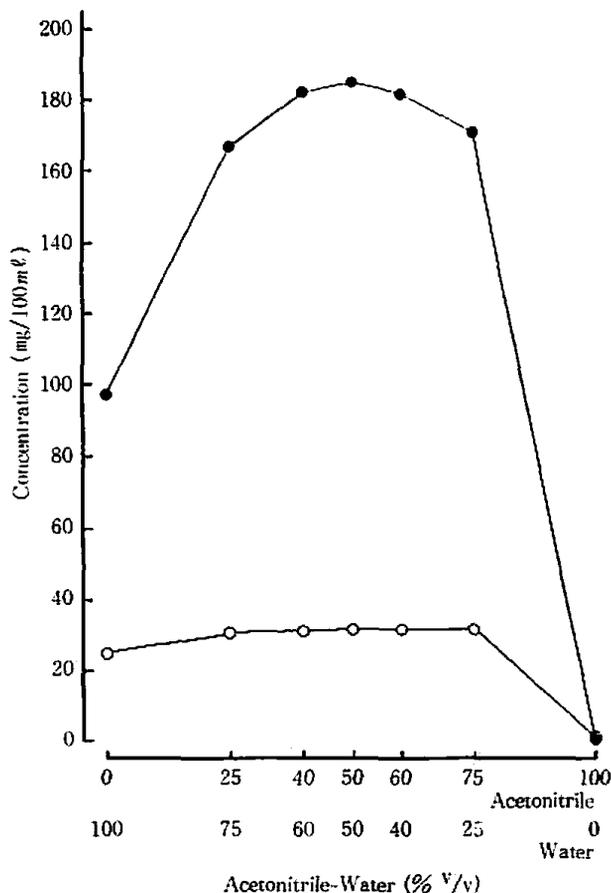


Fig. 2. Concentrations of Caffeine and Total Catechins Extracted at 20°C for 40 min from Green Tea Leaves.

- : total catechins
- : caffeine

さらに、水の温度を80°Cにすると、濃度は高くなるが抽出時間20分で最大値に達した後、時間の経過と共に減少し続けた。

しかし、アセトニトリル・水の容積比1:3から3:1の範囲内のものは、80°C熱水抽出よりも抽出濃度は高く、アセトニトリル・水の容積比1:1が最も高い濃度を示し、抽出時間約40分後に最大値が存在した。

そこで、抽出時間40分を基準としてアセトニトリル・水の容積比に対するカフェイン及びカテキン類の抽出濃度を検討した結果 (Fig. 2), カテキン類についてはアセトニトリル・水の容積比1:1前後の2:3及び3:2の結果を加えても、アセトニトリル・水の容積比1:1が最も高い濃度を示した。

しかし、カフェインについてはカテキン類と異なり、アセトニトリル・水の容積比1:3から3:1の範囲内において、殆ど抽出濃度に差が認められず、最大抽出値が得られた。

また、茶葉中のカフェイン・カテキン類の全量が抽出されているのかを確認する為、アセトニトリル・水 (1:1) を用いて20°Cで40分間攪拌抽出後、遠心分離 (3000RPM) を実施した。この上澄みの抽出液90mlを除去後、アセトニトリル・水 (1:1) で再度定容したもの、すなわち1回目抽出後その1/10希釈状態で2回目を抽出し、その1/10で再度3回目の抽出を実施した結

Table 1. Examination of Extraction Frequency

(n=3, mg/100ml)

Frequency	Caffeine	Catechins					Total
		-EGC	-EC	-EGC _g	-EC _g	+C	
First extraction	31.47	67.10	22.10	74.03	21.37	3.54	188.14
Second extraction (Calculated value)	3.15 (3.147)	6.71 (6.710)	2.21 (2.210)	7.40 (7.403)	2.14 (2.137)	0.35 (0.354)	18.81 (18.814)
Third extraction (Calculated value)	0.32 (0.3147)	0.67 (0.6710)	0.22 (0.2210)	0.74 (0.7403)	0.21 (0.2137)	0.04 (0.0354)	1.88 (1.8814)

Solvent: acetonitrile-water (1 : 1).

果 (Table 1)、1回目の抽出濃度から換算した値と殆ど差のない事から、1回目の抽出で茶葉中のカフェイン・カテキン類の殆ど全量が抽出されたと考えられる。

以上の結果から、アセトニトリル抽出の場合、アセトニトリルと水の容積比は1 : 1で抽出時間は40分とし、20℃で攪拌しながら抽出する事により最大抽出濃度が得られると考えられる。

2. 熱水抽出とアセトニトリル抽出の比較

80℃の熱水抽出とアセトニトリル・水 (1 : 1) による20℃の抽出におけるカフェイン及び各

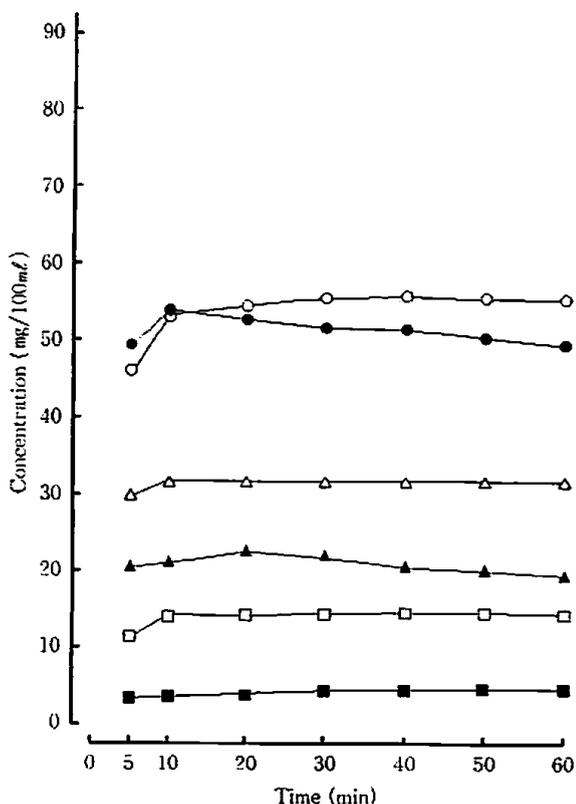


Fig. 3. Concentrations of Caffeine and Catechins Extracted by Hot Water (80°C) from Green Tea Leaves.

● : (-)-epigallocatechin ○ : (-)-epigallocatechin gallate
 ■ : (+)-catechin □ : (-)-epicatechin gallate
 ▲ : (-)-epicatechin △ : caffeine

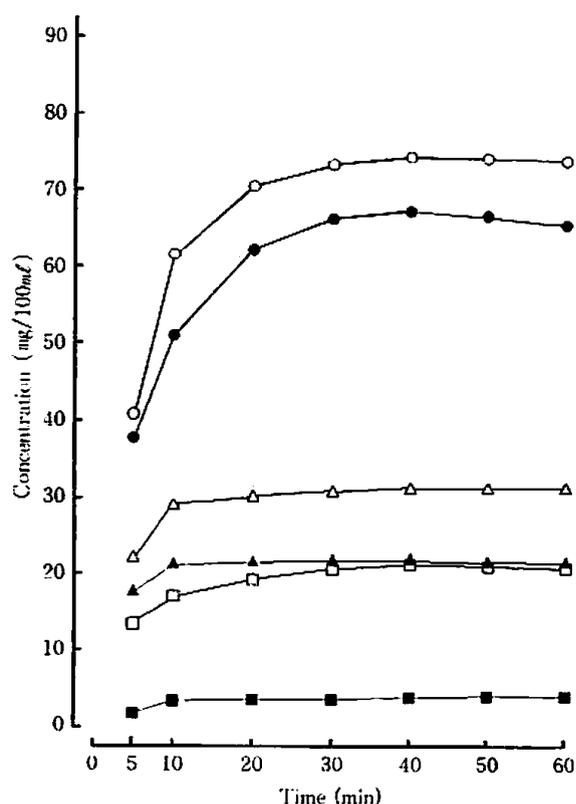


Fig. 4. Concentrations of Caffeine and Catechins Extracted by Acetonitrile-Water (1:1) at 20°C from Green Tea Leaves.

● : (-)-epigallocatechin ○ : (-)-epigallocatechin gallate
 ■ : (+)-catechin □ : (-)-epicatechin gallate
 ▲ : (-)-epicatechin △ : caffeine

カテキン類の抽出挙動を比較した。

カフェインについては、80℃の熱水抽出 (Fig. 3) 及び20℃のアセトニトリル・水 (1:1) 抽出 (Fig. 4) とともに殆ど差は認められなかった。

茶葉中に存在するカテキン類は (-)-エピ体と (+)-体及びそれらの3位の没食子酸エステル (gallate) が主体で、(-)-体や (+)-エピ体は製茶や抽出の過程で異性化によって生じたものである。

加熱によるカテキン類標準品のHPLCパターンの変化を Fig. 5 に示した。この図において -EC からは -C が生成するが、このピークはもともとある +C のピークと重なる。また、+C からは +EC が生成するが、これも -EC のピークと重なる。しかしながら、-EC g, -EGC g 及び -EGC からそれぞれ生成する -C g, -GC g 及び -GC は増加すると考えられる。

Fig. 6 に80℃の熱水抽出と20℃のアセトニトリル・水 (1:1) 抽出の結果を示した。

この図は、加熱によって異性化する成分に対応すると推定されるピークの、抽出時間に対する

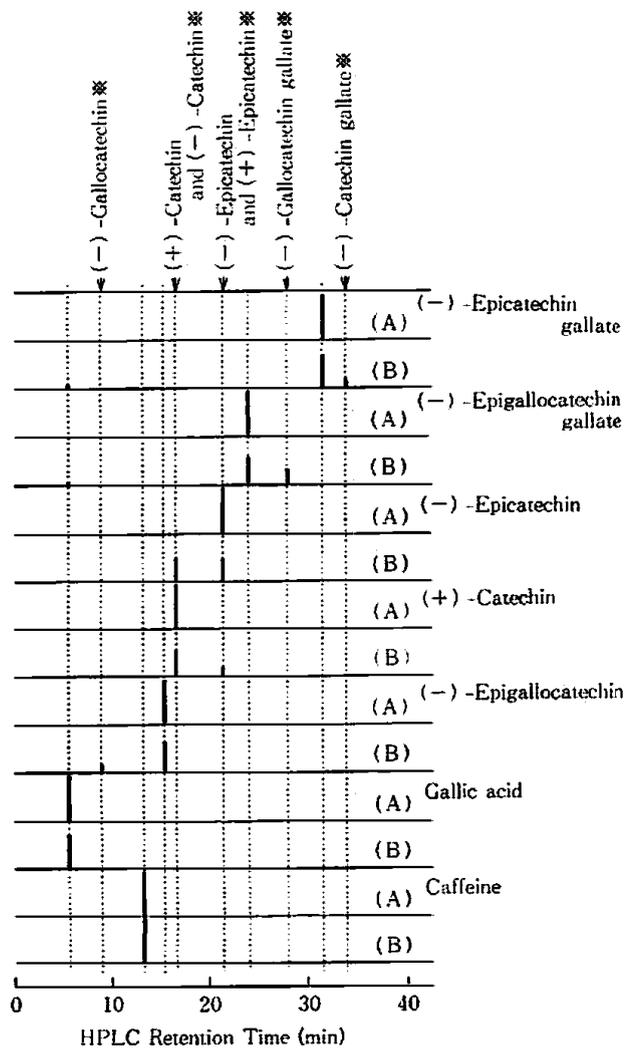


Fig. 5. Changes of Authentic Caffeine, Gallic Acid and Catechins in Purified Water by Heating.

※ : assumed isomers
(A) : before heating
(B) : after heating

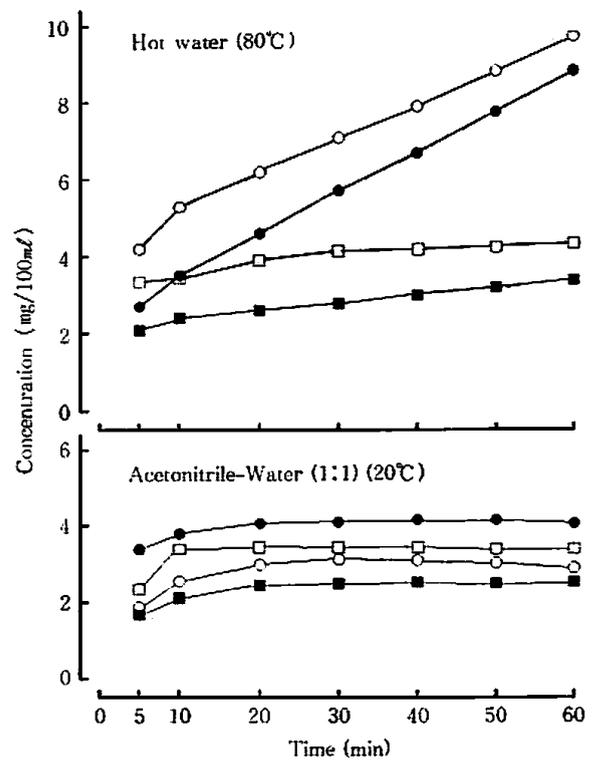


Fig. 6. Concentrations of Assumed Catechin Isomers Extracted from Green Tea Leaves.

● : (-)-gallocatechin ○ : (-)-gallocatechin gallate
■ : (-)-catechin □ : (-)-catechin gallate

変化量を示しており、80℃の熱水抽出では-G Cと-G C gが増加している。これは加熱による-E C gと-E G C gの異性化に由来するものと推定される。しかし、-C gと推定されるピークも増加すると考えられるが、わずかな増加に止まっている。この理由は明かでない。また、-E Cの異性化で生成する-Cは+Cの減少と相殺すると思われるので、その変化はさほど大きくないと考えて良いであろう。

以上のように、熱水抽出では抽出操作中に異性化が進行するので、茶葉中のカテキン類の組成を正確に定量するには、アセトニトリル・水（1：1）による20℃での抽出が最適であると考えられる。

要 約

煎茶茶葉中のカフェイン・カテキン類を抽出し、HPLC法で定量する場合において、従来から実施されている80℃の熱水抽出法と20℃の水、アセトニトリル及びアセトニトリル・水混合系による抽出法とを比較した。

1. 抽出濃度及び異性化反応などカテキン類の抽出挙動を考慮すると、80℃での熱水抽出よりも20℃でのアセトニトリル・水（1：1）による抽出の方が、茶葉中のカテキン類組成に対し正しい結果を与える。
2. アセトニトリル抽出においては、アセトニトリルと水との容積比は1：1とし、20℃で攪拌しながら40分間抽出する事により、カテキン類が異性化せず安定した状態で最大濃度を得る事が出来た。
3. カフェインについては、80℃での熱水抽出と20℃でのアセトニトリル・水（1：1）による抽出間に殆ど差は認められなかった。

文 献

- 1) 竹尾忠一、大沢キミ子：日本食品工業学会誌、19、406-412 (1972)。
- 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)。
- 3) 末松伸一、久延義弘、西郷英昭、松田良子、原 京子、小松美博：東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書、19、79-88 (1992)。
- 4) 小松美博、久延義弘、末松伸一、松田良子、西郷英昭、原 京子：東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書、19、89-98 (1992)。
- 5) Y. Komatsu, S. Suematsu, Y. Hisanobu, H. Saigo, R. Matsuda and K. Hara : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (6) 907-910 (1993)。
- 6) 化学大辞典編集委員会：化学大辞典、共立出版、東京 (1965)。
- 7) 久延義弘、朝賀昌志、松田良子、原 京子、末松伸一、小松美博：東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書、19、69-77 (1992)。
- 8) Nakagawa, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 31, 1283-1287 (1967)。