

茶の品質評価のための新規分析法の開発

堀 江 秀 樹

(平成 14 年 11 月 6 日受理)

Development of New Analytical Methods to Evaluate the Quality of Green Tea

Hideki HORIE

Synopsis

Analytical methods were developed to measure the qualitatively important components of green teas (theanine, caffeine, ascorbic acid and catechins) simultaneously using capillary electrophoresis. Organic acids and acidic amino acids in tea infusions could also be measured simultaneously using capillary electrophoresis. Analytical methods for catechins, ester-type catechins, γ -amino butyric acid were developed using enzyme reactions. Total amino acids and glutamic acid could be measured simultaneously, combining biosensors and flow injection system.

Key Words: capillary electrophoresis, biosensor, flow injection, rapid analysis, enzyme electrode, *Camellia sinensis*, simultaneous analysis

		要品質成分の同時分析.....	33
		c キャピラリー電気泳動法の茶品質成分研究への応用.....	37
	2	茶中の有機酸の分析とそれらの品質への寄与.....	38
		a キャピラリー電気泳動法による主要有機酸と酸性アミノ酸の同時分析.....	38
		b シュウ酸の茶の味への影響.....	40
	3	要約.....	42
	III	酵素反応を利用した茶品質成分の簡易迅速分析法の開発.....	44
	1	バイオセンサー法による茶浸出液中カテキン類の迅速分析.....	44
		a ゴボウの根切片を利用した茶のカテキン類の迅速分析.....	44
		b キャピラリー電気泳動法による茶葉中の主	
I	序 論.....	24	
1	茶の品質評価法の発展.....	24	
2	キャピラリー電気泳動法による多成分の同時分析.....	26	
3	酵素反応を利用した簡易迅速分析法.....	28	
II	キャピラリー電気泳動法を利用した茶の品質成分分析法の開発.....	31	
1	キャピラリー電気泳動法による茶の主要成分の同時分析.....	31	
	a キャピラリーゾーン電気泳動法による茶浸出液中主要成分の同時分析.....	32	
	b キャピラリー電気泳動法による茶葉中の主		

〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769 野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点
現・〒514-2392 三重県安芸郡安濃町大字草生 360 野菜茶業研究所機能解析部

† 本論文は東北大学学位審査論文を編集・加筆したものである。本論文の一部は茶研報, 75, 33-38 (1992); 茶研報, 78, 53-60 (1993); 食工誌, 46, 433-435 (1994); *Anal. Lett.*, 28, 259-266 (1995); *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, 3, 27-30 (1997); *J. Chromatogr. A*, 758, 332-335 (1997); *J. Chromatogr. A*, 817, 139-144 (1998); 食科工, 46, 494-496 (1999); 茶研報, 87, 59-65 (1999); 茶研報, 89, 23-27 (2000) および日本味と匂学会誌, 7, 611-614 (2000) において発表した。

b	タンナーゼリアクターを用いたエステル型カテ キンのフローインジェクション分析	47
2	バイオセンサー法による茶浸出液中遊離アミ ノ酸の迅速分析	51
a	酵素を用いた γ -アミノ酪酸 (GABA) の フローインジェクション分析	52
b	バイオセンサーによる茶浸出液中の全アミ ノ酸及びグルタミン酸の迅速分析	53
b-1	全アミノ酸測定用バイオセンサーの 開発	54
b-2	茶浸出液中の全アミノ酸とグルタミン 酸のフローインジェクション同時分析	56
3	要 約	60
IV	総 括	61
V	摘 要	63
	引用文献	64
	Summary	69

I 序 論

1 茶の品質評価法の発展

茶は「日常茶飯事」という言葉にも示されるように、日本人の生活にとってコメとならび重要な農作物である。また歴史的にも、19世紀の開国以来、重要な輸出品としてわが国の産業振興を支えてきた。これに伴い茶業研究も古い歴史をもち、すでに1896年に東京に官立の西ヶ原製茶試験所が設けられ、幾多の組織変遷があるものの、現在も(独)農業技術研究機構野菜茶業研究所に伝統を受け継いでいる。一方で、民間人による新品種の育成や製茶機械の開発等の研究も活発で、現在最も一般的な品種である'やぶきた'の育種や、製茶機械の原型は民間の研究者によってなされるなど、古くから官民の共同・連携により新技術の開発が茶の生産や品質向上に貢献してきた(大石, 1989)。

茶は嗜好品であるが故に、その品質による価格差が大きく、品質の理化学的解析についての関心は高かった。緑茶の品質と化学成分との関係の研究は高橋・石間(1938)、宮地(1941)まで遡ることができ、彼らの研究の結果、ケルダール法で測定した全窒素含量と品質の間に相関があることが示された。以後、半世紀以上にも及ぶ茶品質成分の研究が継続されてきた。なかでも、遊離アミノ酸は品質との関係が深いことに早くから着目されており、茶特有のアミノ酸であるテアニンが酒戸(1950)

によって単離され、これは、高品質でうま味の強い茶に多く含まれ、かつうま味を有することから、緑茶のうま味の本体として位置付けられてきた。緑茶の品質と遊離アミノ酸含量の相関が高いことは中川・天野(1974)により、茶の価格とテアニンやアルギニン含量の相関の高いことは、向井ら(1992)によって報告されている。さらに品評会に入賞した高品質な茶では、テアニンやアルギニンの含量が市販茶に比べて著しく高いことも確認された(後藤ら, 1993a, 1994a, b)。また、茶浸出液中の遊離アミノ酸濃度と滋味との関係についても、中川(1969, 1970)や加藤・鈴木(1970)によってまとめられ、遊離アミノ酸の多いものほど滋味評価が高いとされる。また、茶葉中の遊離アミノ酸の含量は、葉の熟度や茶期によって異なり、若い芽ほど含量は高く、春茶は夏茶よりも著しく高含量であることが中川ら(1977)によって報告されている。このことは、春茶(一番茶)でしかも初期のものほど、高品質であるとされ、高い値で取り引きされることと一致する。

緑茶の味にはうま味・甘味と苦渋味のバランスが重要とされる。アミノ酸がうま味・甘味の主体であるとすれば、苦渋味の主体は緑茶タンニンとも呼ばれるカテキン類である。カテキン類のうちの4種のカテキン類が主要カテキン類とされ、普通の茶葉中に多い順に(-)-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)(図-1)で、このうち、EGCgとECgが苦渋味、EGCとECが苦味を示す(中川, 1973)。カテキン類含量の高すぎる緑茶は渋味が強くて好まれないため、緑茶用の品種では紅茶用品種と比べてカテキン類の含量が低い(中川ら, 1964, 池田ら, 1993)ことが知られている。また、茶葉中のカテキン類の含量は遮光によって減少することが報告されている(築瀬ら, 1974; 西條ら, 1981)。このような性質を利用して、うま味を重んじる玉露では遮光栽培することにより、結果的に苦渋味成分であるカテキン類の含量が低くなる(大森, 1983)。さらに、葉の熟度が進むにつれ、EGCg及びECgは減少し、EGC及びECが増加することも報告されている(高柳ら, 1985)。

一方、アスコルビン酸は、紅茶、ウーロン茶など異なり、発酵や萎凋処理していない緑茶にのみ多く含まれる成分であり、生の葉を放置したり、製茶された茶を長期間保存することによって含量が低下することが知られている(中村ら, 1983)。このことから、アスコルビン酸の含量は茶の鮮度の指標として用いられている(古谷ら,

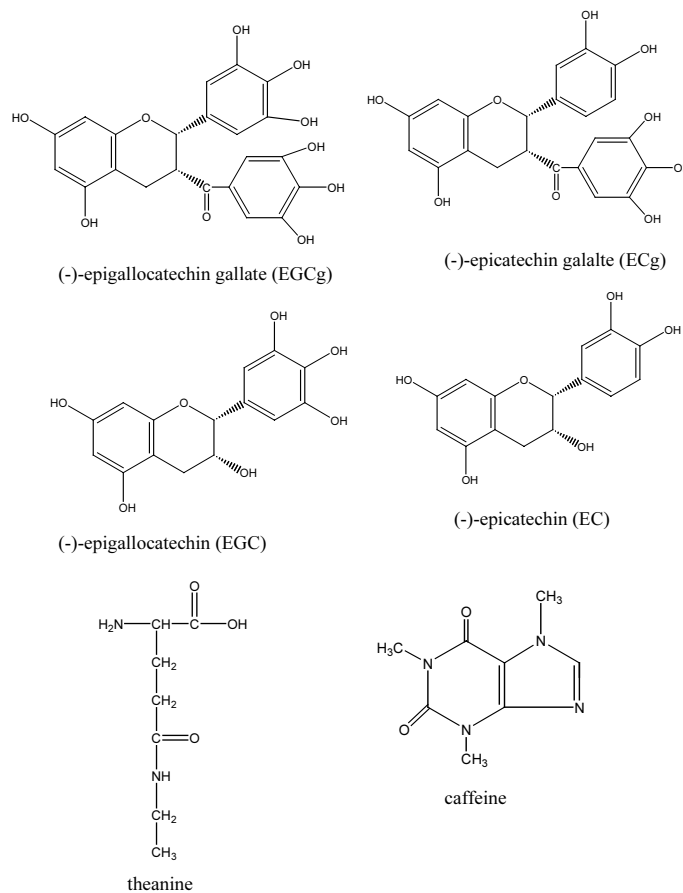


図-1 主要茶成分の構造式.

1961).

カフェインは、茶の他にはコーヒーやコーラにもみられる飲料の嗜好性に関連すると考えられる成分で、覚醒作用をもつことが知られている。カフェインも遊離アミノ酸同様、上質の茶に多く含まれる傾向にある（前田ら、1977）。

最近、茶と健康の関係について世間の関心が高く、また盛んに研究されているが、その先駆けとなったもののひとつに「ギャバロン茶」の開発が上げられる。これは、チャの生葉を嫌気処理した後製造した茶であり、通常の茶に比べてγ-アミノ酪酸（GABA）の含量を10倍以上に増加させたものである。このような茶の飲用により血圧上昇が抑制されたという報告があり、血圧上昇の抑制を目的に市販されている。血圧上昇抑制の主成分はGABAであると考えられている（大森ら、1987、1991；HAKAMATA, 1990）。

これら以外に品質指標として用いられる化学成分として、中性デタージェント繊維がある（後藤ら、1990）。これは、茶芽の熟度の進行に伴い増加するので、熟度指標として適するが、測定法が煩雑なため直接分析した例

は多くない。また、直接的な成分の測定ではないが、色差計を品質評価に用いることも検討され、この方法でおおざっぱな茶の格付けは可能とされる（久保田ら、1975）。

このように、化学分析が品質評価に有効であるという知見が得られてきたものの、茶の生産・流通の過程においては、従来から人間の五感のみで品質が評価されてきた。それは、既存の化学分析法は、分析作業に特殊な技能を要し、さらに煩雑で分析時間がかかることから、生産・流通現場での要望に応じられなかったためである。また、近年保存性を高めるため（上野ら、1960）、気密包装した状態で茶を販売することが主流となり、消費者が目で見ても品質を判断することさえできなくなった。しかしながらその一方で、品質に対する消費者のこだわりは強まり、客観性の高い品質表示法として、成分分析値の表示への要望も高い。さらに、茶業界においても官能評価技術に優れた熟練者が減少しつつある。このような状況のもとで、官能評価を補い、あるいはこれに代わるより客観的な評価手法として化学的な評価法への期待は大きく、しかも、必ずしも化学分析の訓練を受けていない人にも簡単に扱える手法の開発が望まれている。また、

この手法は、生産や流通の段階で多くの試料を扱う必要があり、迅速であることを必須とする。茶の化学成分分析の手法（芝ら、1925；化学研究室、1970；池ヶ谷ら、1990）もその時代における先端の分析手法を採り入れ、簡便化はされてはきたが、専門的な技能と測定に時間を要することは基本的には変わらない。

このような迅速で簡便な評価法への要請に応えるものとして、近年近赤外分光光度法（近赤外法）の適用が試みられ、すでに一部の茶流通関係者や茶生産者の間でも実用的に使われ始めている（IKEGAYAら、1987、1991；池ヶ谷ら、1988；後藤、1989；GOTOら、1991；HORIEら、1991；堀江ら、1992a；原ら、1994；原、1996）。これは、近赤外分光スペクトルのデータと成分含量の関係を統計手法を用いて解析する手法で、一度の測定で複数成分の分析値を得ることが可能である（OSBORNEら、1986）。そして、一旦検量線ができれば、抽出などの煩雑な化学分析の操作もなく、茶葉を粉碎しこれを専用のセルに詰めるだけで簡便に誰にでも分析値を出すことができる。このようなことから、十分調整された近赤外分光光度計を用いれば、製茶工場などで質的に類似した試料をルーチン分析するには適するものと考えられる。

しかしながら、検量線の作成には、あらかじめ求めたい成分の含量が既知の試料を多数用意する必要がある、また作成された検量線も作成に用いたものと類似の試料にしか適用できないという欠点も有する。例えば、煎茶で作成した検量線を抹茶にあてはめることは原理的に無理があり、茶の製法を少し変えたり、新品種を用いる度に新たに検量線を作成する必要が生じる。たとえ同様の試料を測定し続けるとしても、光学系の経時的な変化や茶試料の年次的な成分変化に伴い、かなり頻繁に検量線の再調整が必要となる。このような検量線の作製や再調整には多数の試料について既存の化学分析を行う必要があり、多大の労力と専門的な知識が必要になる。また茶の化学成分は味との関係で重要であるが、これを考える上では、茶葉中より浸出液中の成分濃度を求める方が直接的である。しかしながら、近赤外法は茶浸出液中の成分に関しては成分濃度が低すぎるため適用できない。

このように従来の化学分析法では、分析に要する時間と手間が問題となり、近年導入されつつある近赤外法についても利用範囲が極めて限定されたものになる。そこで、近赤外法とは全く原理の異なる手法の導入により、主要な茶品質成分を簡易迅速に分析することが望まれる。本論文においては、キャピラリー電気泳動法とバイオセンサーなど酵素反応を利用した分析手法を中心に、分析

の簡便化・効率化を図った。前者においては、高速液体クロマトグラフ（HPLC）法よりも迅速に多成分の同時分析を可能とし、一方後者においては、簡易迅速、さらに安価に分析できることを目的として、手法の開発に取り組んだ。

2 キャピラリー電気泳動法による多成分の同時分析

茶の品質成分の分析法としては、ケルダール法による全窒素含量の分析、酒石酸鉄法によるカテキン類の比色分析、ニンヒドリン法によるアミノ酸の比色分析、アスコルビン酸、カフェイン、個別カテキン類についてはHPLCの利用が現在標準的な手法とされている（池ヶ谷ら、1990）。しかしながら、1試料につきこれら成分について個々の分析をそれぞれ行っていたのでは、多大の労力と時間が必要となる。近年、HPLCにより、個々のカテキン類とカフェインが同時に分析できるようになるなど、分析法の改良は進んでいるものの、カテキン類分析に汎用される逆相系カラムでは、親水性のアミノ酸やアスコルビン酸は保持され難く、分離は困難である。

一方、HPLCよりも分離能に優れた新しい分析法として、キャピラリー管内で電気泳動を行うキャピラリー電気泳動法が注目されつつある。キャピラリー電気泳動法は、キャピラリー管の両端に高電圧をかけ、生じる電気浸透流と物質の電荷を利用して物質を分離分析する手法である。それまで多様な様式で分析されてきた電気泳動を1980年代になって、JORGENSEN & LUKACS (1981) がキャピラリー管を用いて行って以来、この手法が飛躍的に進歩し、1989年には分析装置として市販されるに至った。この手法は、歴史が浅く装置が高価なため、HPLCほど普及はしていない。しかしながら、キャピラリー電気泳動法においては、HPLC法に比べて有機溶媒を使用したとしてもごくわずかしか使用しないため、廃液処理のコストやランニングコストが低減できる。また理論段数も高いため、本論文において目的とする多項目の同時分析にも適すると期待される（CANALON, 1995；St. CLAUDE, 1996）。キャピラリー電気泳動法において、いくつかの分離様式が知られているが、キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）及びミセル動電クロマトグラフィー（MEKC）の3つが汎用される。CZEはキャピラリー管の両端にかけて起こる電気浸透流と物質のチャージに基づき分離するもっとも基本的な手法であり、MEKCはチャージを持たない物質と電荷をもつミセルの親和性に基づく分離法である。CGEは従来のゲル電気泳動法を

高速・高分離能化したもので、タンパク質や核酸の分離には適するが、これらのタンパク質や核酸は茶の品質成分としては重要視されていないため今回は用いなかった。

キャピラリー電気泳動法においては、一般的にキャピラリー管を通過する物質の吸収をそのままモニターするため、光路長 0.1mm 以下と HPLC と比べれば極めて短く、感度が不足するともいわれる。しかしながら逆にこの方法では短波長での検出が可能で、誘導体化していないアミノ酸類の検出も可能 (KLAMPFLら, 1998) であり、茶のアミノ酸とカテキン類を同時に分析することも原理的には可能と予想される。CANALON & BRYAN (1993) は、CZE 法を用いて 200nm の吸光度でオレンジジュース中のフラボノイドやアミノ酸等多様な物質の分離を試みている。しかしながら、この報文は単に分離できることを報告するにとどまり、食品の多様な品質成分を定量し品質や味覚等の評価への応用についてまで言及したキャピラリー電気泳動法に関する報告はなかった。そこで、本論文においては、キャピラリー電気泳動法を用いた、アミノ酸やカテキン類等茶中の重要な品質成分の同時分析を試みた。アミノ酸、アスコルビン酸とカフェインさらにポリフェノール類であるカテキン類という化学的性質の異なる成分を同時に分析・定量しようという最初の試みである。

キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) では通常は物質の電荷に基づき分離する。アルカリ性を示すホウ酸緩衝液を泳動液とした CZE を試み、pH 等の条件を最適化したところ、テアニンとカテキン類、アスコルビン酸の分離が可能であった。近年、HPLC によるカテキン類の分離に関する報告は多いが、キャピラリー電気泳動法により、より迅速に分離できることが初めて示された (HORIEら, 1997a)。

カフェインについては電荷を持たないために、CZE 法を用いる場合は十分な分離が得られなかった。MEKC 法においては、界面活性剤を加えミセルを形成させることにより、このような電荷を持たない分子の分離を可能にする。そこで、緩衝液に界面活性剤を加えて MEKC の分離モードを加え、手法を改良することにより、テアニン、アスコルビン酸、カテキン類とカフェインの分離が可能となった (HORIEら, 1998a)。さらにアスコルビン酸は茶葉中には 0.5% 程度しか存在しないため、270nm というアスコルビン酸の極大吸収波長付近での検出を、テアニン検出に適した 200nm と同時に行い、アスコルビン酸の検出感度を向上させた (堀江ら, 1999a)。

従来法においては、カテキン類の分析には 1 時間弱、アスコルビン酸の分析には 10 分程度、さらにテアニンの分析には誘導体化が必要なうえ、分析にも 1 時間程度必要であった。このような手法を開発することにより、1 試料 20 分以内にこれら全ての成分の分析が可能となった。本来なら 3 台の HPLC 装置を必要とする分析を、1 台のキャピラリー電気泳動装置を用いてより短時間でできる本手法は、分析の省力化や迅速化といった当初の目的を十分に果たすものといえる。さらにキャピラリー電気泳動法の利点のひとつは微量の試料にも対応できる点である。従って茶葉 1 枚あれば重要な品質成分を分析することが可能となり、試料採集や前処理の手間が省けるばかりでなく、1 本の茶新芽の葉毎の成分変動を調べるなどより詳細な研究への応用も期待できる。

一方、茶葉中の有機酸に関しては、存在することは知られていたものの、シュウ酸等一部を除き詳細な研究はなされてこなかった。茶中のシュウ酸については、カルシウムの吸収を妨げ、腎結石の原因物質とされることから、その量について関心がもたれ、比色法 (中原, 1974) や酵素法 (山中ら, 1983)、ガスクロマトグラフ法 (神谷ら, 1991) により定量されてきたが、操作が煩雑であるのみならず、他の成分との同時分析は困難であった。また、茶中にグルタミン酸、アスパラギン酸はそれぞれ 0.3% 程度存在し、これらのアミノ酸はうま味を呈する。テアニンもうま味物質とされるが、その味がおだやかであるため、茶の味を考察する上では、グルタミン酸の寄与が大きいものと推察され、品質評価の上でグルタミン酸の定量は重要である。イオンクロマトグラフ法により、茶中の有機酸と無機アニオンを同時に定量した報告もある (DINGら, 1997) が、グルタミン酸については定量されていない。またこの報文では、従来あまり多量に存在することが報告されたことがないコハク酸について、茶葉中に 5% 以上存在すると報告され、また存在が知られているシュウ酸について定量されていないなど手法そのものに疑問が残る。そこで、キャピラリー電気泳動法を用いて、シュウ酸及び既知の有機酸さらにグルタミン酸を同時に分析することを試みた。キャピラリー電気泳動法による有機酸分析に関しては、KENNEY (1991) によって開発された方法に基づき、様々な分野への応用がなされている。すなわち、多くの有機酸自身には紫外部における特異的な吸収がないため、電気泳動液側に紫外部に吸収のある成分を加えて間接的に有機酸を検出し、さらに電圧のかけ方を従来の逆に設定し、試料注入側を陰極とする。すでにこのような方法で、食品

を含めた多様な試料について有機酸の分析が試みられている (KLAMPFLら, 1997) が, シュウ酸からグルタミン酸まで, ひとつの食品の品質上重要と考えられる有機アニオンを同時分析した例はほとんどなかった。

開発された手法においては, シュウ酸, リンゴ酸, クエン酸, アスパラギン酸, グルタミン酸, キナ酸の同時分析を可能にし, キャピラリー管の洗浄を含めても分析に要する時間は1試料あたり12分以内であった (HORIEら, 1998b)。そして, 今まで茶の有機酸についてはあまり関心が持たれてこなかっただけに, 本手法の開発に伴い多様な研究成果が期待される。各種茶浸出液のシュウ酸濃度を測定した結果, その濃度は感覚的に感じられる濃度以上で存在し, 味に関与することが明らかとなり (堀江ら, 1999b, 2000a), クエン酸にシュウ酸の味を抑制する作用が認められつつある (堀江ら, 2000b)。さらに, 茶を硬水で入れると白濁するが, この白濁はタンニンとシュウ酸の複合体であると考えられてきた。茶浸出液中のシュウ酸濃度の分析及び白濁物質の¹³C-NMRスペクトルの解析の結果, これがシュウ酸カルシウムであることを明らかにできた (堀江ら, 1998a)。アルツハイマー病との関係から茶浸出液中のアルミニウムの存在形態に関心がもたれるが, ²⁷Al-NMRのスペクトルやシュウ酸濃度から, アルミニウムがシュウ酸との錯体を形成していることも示された (堀江ら, 1994)。さらに, 茶にグルタミン酸ナトリウム等で味付けする場面があるが, このような添加茶の判別にも, アスパラギン酸, グルタミン酸の同時分析が容易な本法は応用できるはずである (堀江ら, 2000c)。

キャピラリー電気泳動法を導入し分析が容易になったことにより研究がすすみ, 今まであまり注目されなかった有機酸類の品質上の重要性について明らかにされつつある。カテキン類やテアニンなどの分析の省力化についても, 今後多量の試料を扱う場合には非常に有効な手法となる。キャピラリー電気泳動法の食品分野への普及度はまだ高いとはいえない。しかしながら, 本研究にみられたように, キャピラリー電気泳動法を用いることにより従来法よりも大幅に省力化でき, このことが新たな発見につながる可能性を秘めている。

3 酵素反応を利用した簡易迅速分析法

キャピラリー電気泳動法は, HPLC法など従来法と比べて迅速な分析手法ではあるが, 装置が高価であり, 使用にあたっては多少の化学的知識が必要な点に難が残る。一方, 茶の製造や流通現場において簡易で客観的な

品質評価を目的とした場合には, 必ずしも多項目の同時分析でなくともよいが, より簡易・迅速な手法が望まれる。従来からの化学分析法にかわる比較的簡易な分析法として, 酵素の基質特異性を利用した酵素分析法が知られ, 食品成分分析への酵素利用はすでに実用化され (酵素法による食品分析研究会, 1989), 一部の成分では食品分析用にキット化されているものもある。酵素分析法は, 通常分光光度計以外には特殊な機械を必要としない点では優れた分析手法であるが, 茶の品質評価のために成分分析する場合, 次の点で問題が残る。①現在, 重要な茶成分でその分析法がキット化されているのはグルタミン酸及びアスコルビン酸のみである。②仮に他の重要な品質関連主要成分についての酵素キットが開発されたとしても, 茶にはカテキン類やアスコルビン酸が含まれているため, これらの影響を除去するには, 前処理法を工夫する必要がある。③前処理を含み酵素分析法が開発されたとしても, 分注等の操作を繰り返し行わねばならず, 高性能の実験ロボットを使用しない限り, 省力化は難しい。

上記②及び③を克服し分析を省力化する手法として, バイオセンサーの利用が考えられる。バイオセンサーの概念は, UPDIKE & HICKS (1967) によって最初に具体化されたもので, これは, 酵素など生物を構成する物質のもつ化学成分に対する選択性を, 物理化学デバイスと結びつけた高度の選択性を有するセンサーである。当初は酸化酵素と酸素電極を結合させ, 酵素反応の結果生じる酸素濃度の低下を酸素電極でモニターする方法が主流であった。現在では生物由来の物質として, 酵素以外にも, 抗体, レセプター, 動植物組織などを用い, 物理化学的な検出法も, 各種電極, 光計測デバイス, 熱計測デバイス等多様な組み合わせが報告されている (軽部, 1988; 堀江, 1991, 1995a)。バイオセンサーの利点は生物機能の利用による高選択性と定量操作の容易さにある。また, 廃液処理の困難な有機溶媒も一般に使用しない。このような性質に基づき, すでに各種のバイオセンサーを利用した分析装置が市販され利用が進んでいる (松本, 1991; NEWMANら, 1994; 田島, 1995; 大澤ら, 1995; BIO INDUSTRY 編集部, 1997; LUONGら, 1997)。特に糖尿病患者を対象に開発された, 尿や血液中のグルコースの定量用バイオセンサーの普及はめざましく, すでに一般の薬局等でも購入可能である。

このようにバイオセンサーの未来には期待が大きいものの, その開発研究は酵素等の入手が容易なものに限定され, 食品分野で重要とされる多くの化学成分について

は、グルコース等一部の糖類やグルタミン酸等の一部のアミノ酸を除けば、その開発・利用はほとんど試みられてはいない。そこで、本論文では茶の品質上重要な成分についてのバイオセンサー開発を試みた。

それぞれの茶成分に対応したバイオセンサーが開発されれば、分析の簡便・迅速化は進むものと期待されるが、試料の前処理や希釈の手間なども含めより省力化を図るには、フローインジェクション法との組み合わせは特に有望な手段である。フローインジェクション分析法はRUZICKA & HANSEN (1975) によって提唱された、連続する流れの中に試薬と試料を注入し、混合して化学反応させた反応液を検出器に導き検出する手法である。酵素を用いる場合には、酵素を試料とともに液中に流すことも可能ではあるが、一般に酵素自身が高価であるため、これを担体に固定化し利用する場合が多い。本論文では固定化酵素をフローインジェクション系に組み込み、酵素反応によって得た生成物を電気化学的あるいは光学的に検出する流れ分析を試みた。フローインジェクション分析法の利点は反応の平衡化を待つ必要がないため、多数の試料を分析するとき、試料あたりの分析時間は著しく短縮できるものと期待される。さらに、フローインジェクション法では、様々なデバイスが開発され、これらを組み込むことにより分析の自動化・省力化が実現されている。本論文では通常飲む状態の茶をそのまま分析できることを目標に、フローインジェクション分析法と組み合わせたバイオセンサーの開発を行った。

まず、一般的な茶の味に対するイメージは苦渋味であり、この苦渋味にはカテキン類の寄与が大きい。そこで、カテキン類について酵素を用いた分析法の開発を試みた。カテキン類はポリフェノール類の一種であることから、ポリフェノールオキシダーゼを利用した分析法が考えられる。ポリフェノールオキシダーゼを用いたポリフェノール類の分析例は少なくない (WANGら, 1988; UCHIYAMAら, 1988; HALLら, 1988; KULYSら, 1990; DESHPANDEら, 1990; BOTREら, 1991; COSNIERら, 1993; HORIEら, 1995; EGGINSら, 1997) が、その多くはカテコール類を分析対象としており、カテキン類を対象とした検討は今までなされていなかった。市販のマッシュルーム由来のポリフェノールオキシダーゼはカテキン類にも作用することが認められたため、本酵素を光架橋性樹脂内に固定化し、酸素電極と組み合わせた測定を試みた。その結果、応答はみられたものの、得られた応答は測定度に顕著に弱くなり、茶のカテキン類の安定した測定には用いることができなかった。カテキン類の測定後は、酵素

膜の褐変が見られ、カテキン類重合物が膜表面の透過を抑制するものと推定された。

酵素膜に代わる手法として、動植物組織をそのまま利用するセンサーも RECHNITZらを中心に研究開発されている (RIEDEL, 1994)。ポリフェノールオキシダーゼは各種植物に存在するため、組織センサーとして植物組織を利用することも考えられるので、各種植物組織を酸素電極表面に張り付け、(+)-カテキンや EGCg に対する応答に基づき、最適な植物体をスクリーニングした。その結果、年中入手が容易で、しかも EGCg に対する選択性の高さ、さらには担体としての丈夫さなどからセンサーに用いる植物組織として、ゴボウが有望であった。実際にゴボウ切片と酸素電極を組み合わせたセンサーは、各種茶カテキン類に応答し、茶浸出液を分析すると従来法での結果と高い相関関係が得られた。組織センサーの利点は、安価に入手でき酵素の固定化等の手間が省けることであると言われているが、酵素を保持する担体としても、最適な透過性を示すものと推察された (HORIEら, 1994)。また組織センサーにおいては多数の酵素が共存するため選択性が低いことが懸念されるが、茶のカテキン類を対象とする場合は、他に組織中のオキシダーゼの基質となるような成分は多く含まれないため、選択性の問題は無視しても差し支えないものと考えられる。

ゴボウを用いたカテキン類の分析法は、特殊な試薬を用いずにカテキン類の総量を簡易に求めるには適している。しかしながら、十分な強度を維持するためにはゴボウ組織自身の厚みを薄くするには限界があり、ゴボウを用いたセンサーをフローインジェクション化すると、再現性に問題が残された。また一方で、EGCg や ECg 等のエステル型カテキン類のみが渋味を示す (中川, 1973) ため、これら渋味カテキン類のみを迅速に測定できる分析法が望まれる。酵素タンナーゼはこのようなエステル型カテキン類から没食子酸を遊離し、クリームダウンを防止する作用が知られ (滝野ら, 1974; AOKIら; 1976, DESCHAMPSら, 1983), 工業的にも利用されてきた。本論文においては、タンナーゼの没食子酸遊離反応を利用して、エステル型カテキン類を測定することを試みた (HORIEら, 1997)。これはタンナーゼを利用したフロー分析法としては最初のものである。すなわち固定化タンナーゼを酵素リアクターとし、その下流においた pH 電極で、没食子酸に由来する pH 変化を測定することにより、エステル型カテキン類を定量するものである。このとき通常の pH 電極を用いると、センサー部が巨大なため、系が非常に大きなものとなる。そこで、pH 電

極の代わりに、感応部位が小さくしかも応答が迅速であることを特徴とする半導体、pH-ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) (伊藤, 1998) を検出に利用した。その結果、EGCgの濃度に応じてpHの低下に伴う電圧変化が検出された。ただし、実際の茶試料を分析する場合には、試料によってpHが幾分異なる。この試料自身のpHを補正するため、タンナーゼ固定化リアクター及びこの下流のpH-ISFETと並行して、牛血清アルブミンを固定化した疑似リアクターとpH-ISFETを配置し、二つの電極の電位差をモニターした。その結果1試料当たり3分でエステル型カテキン類の分析が可能になった。

カテキン類の示す苦渋味とアミノ酸類の示すうま味のバランスが、緑茶の味にとって重要である。次に、アミノ酸の分析法について述べる。

GABAは、通常の緑茶には微量に含まれるものの品質成分としては重視されてこなかった。しかしながら、近年開発された血圧上昇を抑制する茶「ギャバロン茶」では、GABAは血圧上昇抑制に関する有効成分と考えられている(戸張, 1992)。通常GABAの分析には、アミノ酸分析装置が用いられており、装置が高価なうえ分析に時間を要する(高柳ら, 1989; 後藤ら, 1993b)ため製造現場での分析は不可能であった。高品質のギャバロン茶を製造するには、その原葉の特性に応じて製造条件を変更する必要があると考えられ、製造されたギャバロン茶中のGABA含量を製造現場で定量し、その結果を製造法にフィードバックできることが望まれる。そのために、酵素分析法が考えられ、固定化GABAseを用いたフローインジェクション法を試みた。GABAは、ギャバロン茶中に存在してもその含量は0.5%以下しか含まれないので、比較的低濃度での検出が必要となる。そこで、酵素反応の結果生じるNADPH由来の蛍光を測定することとした。その結果GABA標準品に対しては、その濃度に応じて直線的に蛍光強度が増すことが判明した(Horieら, 1995b)。この方法はGABAのフローインジェクション分析法としては最初のものである。しかしながら、実際の茶を対象とする場合は、茶抽出液そのものの有する蛍光が妨害となった。そこで、HPLC用のC18担体を詰めたミニカラムを用いて、妨害する蛍光物質をオンラインで吸着除去することを試みた(堀江ら, 1999c)。この手法の利点は、測定時間は1試料あたりわずか4分とアミノ酸分析装置を用いた分析と比べて極めて短く、また試料調製も茶を緩衝液で抽出し濾過するだけで簡単であり、しかも有害物質は使用しない点である。このようなことから、ギャバロン茶を製造する

現場において製造された茶中のGABA含量を求め、製造へのフィードバックするのに有効な方法と考えられる。

茶の品質とアミノ酸の総量の間の相関が高いことは、先に述べた通りである。そこで、まずフローインジェクション法を用いたアミノ酸分析法の開発を試みた。この場合、茶のアミノ酸の大半を占めるものはテアニンであり、またテアニン含量と品質との相関が高いことも知られている(向井ら, 1992)。従って、テアニンに対して選択性の高い酵素反応系を利用する必要があるが、テアニンは茶に特有のアミノ酸であるため、既知の酵素についてもテアニンに対する選択性については全く評価されていなかった。センサー化を前提に、反応が利用しやすい酵素としてL-アミノ酸オキシダーゼが考えられ、市販の種々の蛇毒由来のL-アミノ酸オキシダーゼについて利用を試みたところ、安定性に難があるのみならず、テアニンに対する選択性も低いことが判明した(堀江ら, 1996)。一方、当時東洋醸造より市販されていたバイオセンサー用の酵素膜(微生物由来のL-アミノ酸オキシダーゼ使用)を用いれば、テアニンへの応答が大きくしかも安定であることが明らかとなった。そこで、この酵素膜を利用し、酸素電極と組み合わせバイオセンサーとした(堀江ら, 1992b)。オキシダーゼと酵素膜と組み合わせたバイオセンサーは最も古典的な手法ではあるが、酸素電極はガス透過性の膜に覆われているため、茶試料に含まれているアスコルビン酸やカテキン類の影響を受けにくいのが利点である。このようなアミノ酸センサーの応答と茶の品質との相関が高いことを確認した後に、フローインジェクション化を試みた。フローインジェクション分析においては、グルタミン酸オキシダーゼを利用したグルタミン酸センサーをこのセンサーと直列に配置し、二つのセンサーによる同時分析を行った(堀江ら, 1993)。このように装置化することにより、2分毎に1試料の迅速分析が可能となったのみならず、飲む状態の茶試料をそのまま分析できるようにもなった。アミノ酸センサーの出力はその茶の品質や価格を反映し、一方グルタミン酸センサーの出力は、グルタミン酸ナトリウムを添加して味付けした茶の判別にも利用できる可能性が示された。

いわゆるバイオセンサーの研究は酵素の入手が容易なグルコースオキシダーゼを中心に行われてきたため、現在に至っても実用的に測定できる成分数はごく限られたものでしかない。本論文では茶の品質成分に限定して酵素を利用した迅速分析法の研究を推進し、茶浸出液に含まれるテアニン等アミノ酸やカテキン類及びGABAに

についても、バイオセンサーが利用できることを示した。他の食品についても品質管理は今後益々重要となり、分析の簡便化法としてバイオセンサーやこれと結びついたフローインジェクション法の応用はさらに進むものと期待される。

Ⅱにおいてはキャピラリー電気泳動法、Ⅲにおいては酵素を用いた分析法を中心に、茶の品質成分分析の迅速化について述べる。前者は装置は高価であるが、多成分の同時分析に適した方法、後者は比較的簡単な装置でせいぜい2成分までを迅速に測定する方法として位置付けられる。両者は、利用目的や利用者によって選択され、高品質な茶の生産・流通に貢献していくものと期待している。

本論文のとりまとめに際し、懇切なご助言とご教示を賜った東北大学大学院農学研究科教授大類 洋博士に厚く感謝の意を表す。また、ご校閲の労を賜った東北大学大学院農学研究科教授大久保一良博士・宮澤陽夫博士に厚くお礼申し上げる。さらに、本研究の推進にあたり終始ご助言賜った東京農工大学教授松岡英明博士、神奈川工科大学教授松本邦男博士に感謝の意を表す。

本研究を遂行するにあたり終始、ご指導、激励賜った野菜・茶業試験場茶利用加工部品質化学研究室後藤哲久前室長、木幡勝則室長には深く感謝の意を表す。また、研修に当たりご指導を賜った産業技術総合研究所水谷文雄博士・矢吹聡一博士、ハワイ大学教授 G. A. RECHNITZ博士にお礼申し上げる。

さらに研究の遂行にあたり、適切なお助言、ご助力をいただいた野菜・茶業試験場袴田勝弘茶業研究官、安田環元野菜・茶業試験場茶利用加工部長をはじめ、野菜・茶業試験場の皆様には深く感謝する。また、官能試験に当たり積極的に協力いただいた臨時職員や農業技術研修生諸氏にもお礼申し上げる。

Ⅱ キャピラリー電気泳動法を利用した茶の品質成分分析法の開発

キャピラリー電気泳動法は HPLC 法を補完する魅力的で新しい分析手法である。1 においてはテアニンやカテキン類など主要成分の同時分析法、2 においては主要有機酸と酸性アミノ酸の同時分析法とそれらの方法の応用について述べる。

1 キャピラリー電気泳動法による茶の主要成分の同時分析

緑茶の品質と化学成分の関係についてすでに多くの報

告がなされ（古谷ら、1961；中川、1969、1970；加藤ら、1970；中川ら、1974、1977；前田ら、1977；中村ら、1983；高柳ら、1985；HORIEら、1991；向井ら、1992；後藤ら、1994a, b；GOTOら、1996a），なかでも遊離アミノ酸、カテキン類、アスコルビン酸、カフェインは重要な指標となる。特にテアニンは遊離アミノ酸のうちの最も主要な成分であり、高品質な茶に多く含まれるため重要な品質成分である。アスコルビン酸含量は茶の鮮度指標となり、またカフェインは覚醒作用を示す。カテキン類については、茶タンニンとも呼ばれ苦渋味を示すだけでなく、近年、その健康維持機能についても世界的に着目されており（村松、1991；山本、1996；良部ら、1998），近年 HPLC の発達とともにその個々のカテキン類に分離して定量することも普及しつつある（寺田ら、1987；GOTOら、1996b；後藤ら、1996；梅垣ら、1996；堀江ら、1997；山口ら、1997）。

このようなことから、テアニンに代表される遊離アミノ酸、カテキン類、アスコルビン酸およびカフェイン等の分析は茶の品質評価の上で重要であるが、それぞれの分析にはそれぞれ異なる前処理や分析法を必要とする。さらに遊離アミノ酸やカテキン類の HPLC による分析には、分析時間だけでそれぞれ1時間近く必要である。従来法に基づき、1つの茶試料について遊離アミノ酸、カテキン類、カフェイン、アスコルビン酸を同時に分析するとすれば、それぞれ異なった前処理をした後に最低3台の HPLC 装置を動かす必要があるため、非常に労力を要する。これらの成分を同時分析できれば、分析の迅速化・省力化に大きく貢献できるはずであるが、HPLC を用いる限り、アミノ酸とカテキン、アスコルビン酸といった性質の全く異なる物質を同時に分離する方法の開発は困難である。

そこで、別の原理に基づく迅速分離分析法としてキャピラリー電気泳動法の利用を試みた。この方法ではキャピラリー管の内径が細いため、HPLC では移動相に用いられる有機溶媒の吸収が強すぎて使えないような短波長での検出にも利用できる。実際に、ビールやオレンジジュース中の遊離アミノ酸を誘導体化せずに短波長で直接検出した報告もある（CANCALONら、1993）。従って、200nm 以上にはほとんど吸収を持たないアミノ酸も、カテキン類やカフェインなどとともに、検出できる可能性がある。そこで、キャピラリー電気泳動法により茶の品質評価に重要とされるテアニン、カフェイン、主要カテキン類、アスコルビン酸について、茶の浸出液を対象に同時に分析できる方法の開発を試みた (a)。さらに、

茶葉試料から分析試料を調製する際に有機溶媒を用いるが、その影響の除去とアスコルビン酸の検出感度向上を試みた (b). そして、こうして開発された方法で実際の茶葉を分析した結果についても示した (c).

a キャピラリーゾーン電気泳動法による茶浸出液中主要成分の同時分析

茶浸出液中の主要品質関与成分テアニン、カフェイン、カテキン類、アスコルビン酸の同時分析法の開発を試みた。分析は四ホウ酸緩衝液を電気泳動液として用いたキャピラリーゾーン電気泳動法とした。

1) 実験方法

(1) 試薬と試料

茶の主要カテキン類4種、すなわち EGCg, EGC, ECg, EC は三井農林 (東京) より譲渡いただいた。(+) -カテキン (C) 及びテアニンは東京化成より購入し、他の試薬は特級品を用いた。

煎茶 (一番茶) は野菜・茶業試験場 (静岡県金谷町, 以下当試験場と記載) で栽培、製造したものを窒素封入して -20°C で保存した。缶いりの茶ドリンクは市場で購入した。

(2) 分析機器

P/ACE5000 型 (ベックマン, カリフォルニア) に UV 検出器を装着したものを用い、未修飾のフェーズドシリカキャピラリー管 (内径 $50\mu\text{m}$, 長さ 77cm , 有効長 70cm) を分離に利用した。

(3) 分析条件

ミリ Q 水で調製し、塩酸で pH を合わせた 20mM の四ホウ酸緩衝液を電気泳動用の緩衝液として用いた。印加電圧は 30kV とし、 200nm での吸収を UV 検出器で検出した。キャピラリー管の温度は 23°C とした。5 種のカテキン類とテアニン、アスコルビン酸、カフェインを

0.1% のメタリン酸に溶かし、それぞれ濃度 50mg/l に調製した混合物を標準として用いた。

3g の茶葉を 180ml の沸騰水で 5 分間抽出したものを 2 号濾紙 (アドバンテック, 東京) で濾過した濾液を茶浸出液とした。この茶浸出液を 0.1% メタリン酸で 10 倍に希釈し、 $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを通したものを試料として分析に供した。試料はキャピラリー内に窒素のガス圧によって 5 秒間注入した。各分析の間にはキャピラリー管は蒸留水, 0.1M 塩酸, 蒸留水, 0.1M 水酸化ナトリウム, 水, 緩衝液の順で洗浄した。キャピラリーの洗浄時間は 1 試料につき約 7 分であった。塩酸による洗浄は通常のキャピラリー電気泳動法では行

われた例は少なく、水酸化ナトリウムでのみ洗浄するのが一般的である。しかしながら、茶中に多量に存在するポリフェノール類はアルカリ側で不安定である (ZHUら, 1997) ため、キャピラリー管に残存したポリフェノールをそのまま強アルカリ性にすれば酸化重合して、キャピラリー管の寿命を短縮する懸念があると考え、ここではアルカリ洗浄の前に酸洗浄とした。

2) 結果と考察

カフェイン、アスコルビン酸、カテキン類の極大吸収波長 (λ_{max}) はそれぞれ 272nm , 266nm , 280nm 付近である。一方テアニンについての λ_{max} は 200nm 以上の波長域では観察されなかった。そこで、他の成分と同時にテアニンも検出するため、検出波長として 200nm を選択した。

20mM の四ホウ酸緩衝液 pH7.6 から pH9.0 までの間で標準物質の分離を行った (図-2)。図では pH9.0 ではこれら 8 種の成分が 9 分以内にきわめてよく分離されているように見える。しかしながらカテキン類はアルカリ条件で不安定で、pH が高い場合、ピークのテーリングが顕著になった。一方、pH7.8 以下では、テアニンの分離が不十分であった。そこで、pH8.0 を選択した。このような条件下で、8 種類の茶成分は 10 分以内に分離できた。標準品のフェログラムを図-3 に示した。

本手法においては四ホウ酸緩衝液を電気泳動液として用いた。リン酸緩衝液等も、紫外吸収が少ないことから汎用されるが、リン酸緩衝液を用いた場合は十分な分離が得られなかった。McGHILE (1993) はホウ酸緩衝液の濃度増加とともにサトウキビフラボノイド類の分離が向上することを観察し、フラボノイド類とホウ酸の錯形成によるものと考察している。茶のカテキン類もホウ酸と錯形成することが分離に寄与しているものと考察される。

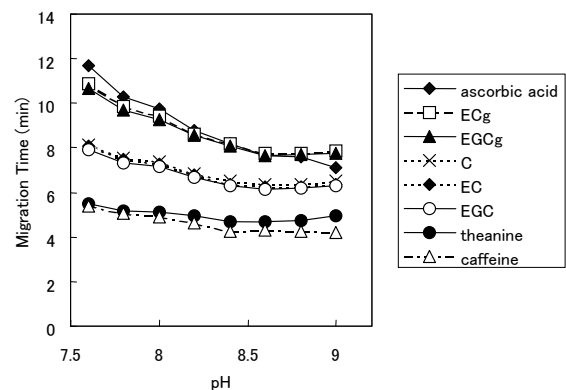


図-2 茶主要成分の泳動時間に対する泳動液 pH の影響

煎茶浸出液及び缶ドリンクをこのような条件で分析した（図-4）。ここで試料をメタリン酸溶液で希釈したのは、試料中のアスコルビン酸を安定化するためである。缶ドリンクの製造工程で、品質保持のために多量のアスコルビン酸ナトリウムが添加され、また、カテキン組成も滅菌処理によって変化する（末松ら, 1992）ことが知られている。図-4bにおいても、缶ドリンクには他の茶浸出液と比べて著しく多量のアスコルビン酸と（±）-カテキンが検出された。

本実験条件では、分析時間はわずか11分で洗浄は8分以内に完了する。カテキン類とカフェインをHPLCで同時定量するための種々分析条件が報告されているも

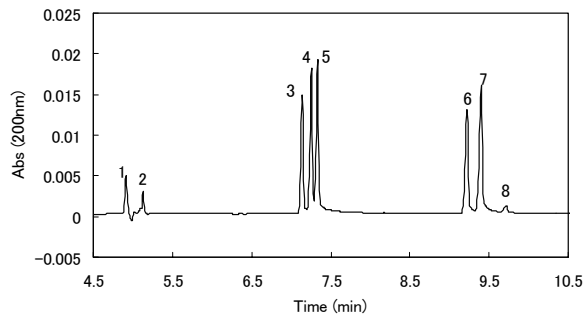


図-3 茶主要成分標準品のフェログラム

1：カフェイン，2：テアニン，3：EGC，4：EC，5：C；6：EGCg，7：ECg，8：アスコルビン酸。各成分の濃度は50mg/lとした。

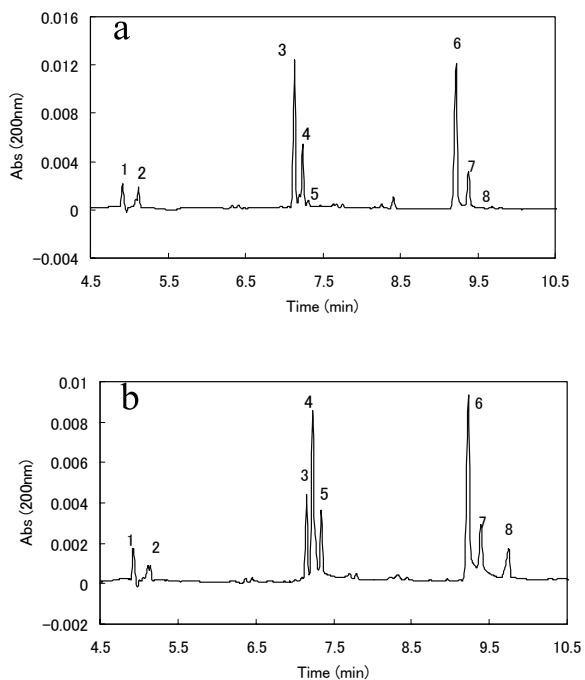


図-4 煎茶浸出液及び缶ドリンクの分析例

a：煎茶浸出液を10倍に希釈，b：市販缶ドリンクを5倍に希釈。各番号は図3と同じ。

の、HPLCを用いる場合には1試料あたりの分析時間は30分以上必要とされ（寺田ら, 1987；GoToら, 1996b；後藤ら, 1996；梅垣ら, 1996；堀江ら, 1997；山口ら, 1997），これらのうちの手法を用いてもカテキン類・カフェインとテアニン・アスコルビン酸を同時に定量することはできなかった。ここに示したキャピラリー電気泳動法は、分析時間が短く、1度の分析でより多くの成分の分析ができる点で、緑茶の品質や味を推定する上で、HPLC法よりも優れている。

キャピラリー電気泳動法の食品分析への応用例として、有機酸分析を中心に報告は少なくない（KENNEYら, 1991；CANCALONら, 1995；KLAMPFLら, 1998）。しかしながら、ポリフェノールとアミノ酸のように性質の異なる品質成分を同時分析した例は極めて少ない。CANCALON & BRYAN (1993) は柑橘ジュース中のアミノ酸、フラボノイド、アミン等の分離を試みてはいるが、定量できるほどの分離は得られておらず、唯一 WALKERら (1997) が飲料中のカフェイン、安息香酸、アスパルテムを同時分析し、品質管理への利用を提唱している程度である。本手法では、茶浸出液を希釈しメンブレンフィルターを通すだけという極めて簡単な前処理ですむため、茶の品質管理現場での導入が容易であるばかりでなく、重要な品質成分を同時に分析できる点でもキャピラリー電気泳動法の極めて新しい応用法といえる。

なお、本法はカテキン類分析にキャピラリー電気泳動法を応用した最初の研究例として BEECHERら (1999)、DALLUGEら (2000) の総説や他の報文からも評価され、この報文をもとに多くの改良法が報告されている。

b キャピラリー電気泳動法による茶葉中の主要品質成分の同時分析

前節においては、茶浸出液中の成分の同時分析においてキャピラリー電気泳動法が有効であることを示した。茶浸出液の成分分析は茶の味覚成分そのものの濃度を測定できる点で重要性は高い。しかしながらこの方法では、浸出法等によるバラツキが大きく、浸出法も多様であるため、他の分析データとの比較検討にはあまり適さない。その結果、茶葉から直接可溶性成分を全量抽出して分析した値がこれまで蓄積されてきた。茶葉からのカテキン類及びアミノ酸類の全量抽出に際しては、従来熱水が多く用いられてきた（池ヶ谷ら, 1990）が、近年、この方法ではカテキン類の抽出が十分でなく、またカテキン類が異性化する可能性が指摘され（末松ら, 1995）、熱水のかわりに50%アセトニトリル等の含水有機溶媒で室

温抽出する場合が多くなった (GOTOら, 1996b; 後藤ら, 1996; 梅垣ら, 1996; 堀江ら, 1997; 山口ら, 1997). このような含水有機溶媒で抽出した抽出液を試料とした場合, 前節の方法では, アセトニトリル等有機溶媒に依存するベースラインの乱れとカフェインのピークが重なる可能性がある. また, 前節では 200nm を検出波長として用いたが, この波長におけるアスコルビン酸の吸収は強くないため, 通常の茶浸出液に含まれる程度の濃度のアスコルビン酸を精度良く測定するには無理がある.

前者の問題を解決するためには, ミセル動電クロマトグラフィーの応用が考えられる. この方法では, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などの界面活性剤を緩衝液に加えて泳動させる. そして SDS ミセルに対する物質の分配の差によって, 中性物質を分離できる (寺部, 1995). この場合, SDS の添加によって中性物質であるカフェインとアセトニトリルの分離が向上できるものと期待される. また, 前節で用いた UV 検出器に代わり, ダイオードアレイ検出器を用いることにより, 複数波長での検出が可能となる. テアニンやカテキン類は前節と同じく短波長で検出し, それ以外にアスコルビン酸を極大吸収波長付近で検出することにより, アスコルビン酸の検出感度の向上をはかった.

1) 実験方法

(1) 試葉

標準物質として用いるテアニン, アスコルビン酸はそれぞれ東京化成, 和光純薬より購入した. 主要カテキン類である EGC, EC, EGCg, ECg およびカテキン類の粗抽出物であるポリフェノン 100 はフナコシより購入した. テアニン, アスコルビン酸, カフェインおよびあらかじめ各成分の濃度を分析したポリフェノン 100 水溶液を, 0.1%メタリン酸に溶解し, 標準液とした.

その他の試葉は, HPLC 用のエタノールを茶成分の抽出に用いた以外は, 特級品をそのまま用いた.

(2) キャピラリー電気泳動法による分析

フォトダイオードアレイ検出器を装着したキャピラリー電気泳動装置 (ベックマン, P/ACE 5500) を使用した. キャピラリー管としては, 未修飾のフューズドシリカキャピラリー管 (内径 75 μm) をジューエルサイエンスより購入して用いた. 長さは 57cm (有効長 50cm) とした.

電気泳動液としては, 50mM ホウ酸, 10mM リン酸水素二ナトリウム, 50mM ドデシル硫酸ナトリウム, 10%メタノールとし, 0.1M 水酸化ナトリウムを用いて pH を 8.2 に調製した. なお, 電気泳動液の調製に際しては, ミリ Q 水を用いた.

泳動条件は, キャピラリーカートリッジを 20°C に冷却し, 5 秒間試料を加圧注入後, 25kV 印加して分離した. 検出波長としては 200nm と 270nm を用い, カフェインとアスコルビン酸は 270nm でそれ以外の成分は 200nm で定量した.

各分析の間には, キャピラリー管の劣化を防ぐため, 洗浄操作を行った. 洗浄は 0.1M 塩酸を 1 分, 水を 0.5 分, 0.1M 水酸化ナトリウムを 2 分, 泳動液を 2 分流した.

(3) 分析試料の調製

当試験場で製造された一番茶及び二番茶の荒茶を試料として用いた.

浸出液成分を分析する場合には, 各茶葉 3g を 180ml の沸騰した蒸留水で 3 分間抽出後, 速やかに 2 号濾紙 (アドバンテック) で濾過し, 濾液を 0.1%メタリン酸水溶液で 10 倍に希釈した. 希釈した液は, 0.45 μm のメンブレンフィルターに通し試料とした.

茶葉からの成分を全量抽出する際には, 25ml 容メスフラスコに 250mg の粉末化した茶に対し, 2%メタリン酸とエタノールを 10ml ずつ加えた. これを超音波洗浄槽につけて, 茶粉末を分散した後, 室温で弱く振とうしながら 30 分間抽出した. 抽出溶媒で定容後, 抽出液を水で 10 倍に希釈し, これをメンブレンフィルターで濾過し試料とした.

(4) 従来法での分析条件

従来法でのテアニンの分析はオルトフタルアルデヒド誘導体化し, HPLC で定量した (後藤ら, 1993b). 内部標準としてはグリシルーグリシンを用いた. 茶浸出液中の濃度測定に際しては, 浸出濾液に内部標準を終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え, 水で 10 倍希釈したものを試料とした. 茶葉成分の測定に際して, 100mg の茶葉粉末を 80ml の熱水で抽出し, 終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように内部標準を添加し, 100ml に定容後, ポリビニルポリピロリドンの添加によりカテキン類を吸着除去し試料とした.

アスコルビン酸は, 1%メタリン酸を移動相とする逆相 HPLC 法により分析した (池ヶ谷ら, 1990). 茶浸出液中アスコルビン酸濃度は, 0.1%メタリン酸水溶液で 10 倍希釈したものを試料として定量した. 茶葉中の含量は, 茶粉末 1g に対し 2%メタリン酸 100ml で室温で抽出後, 濾過した濾液を試料として定量に用いた.

カテキン類及びカフェインの分析は既報 (堀江ら, 1997) に準じ, 移動相として水, メタノール, アセトニトリル, リン酸を 82.5 : 11 : 6 : 0.5 の体積比で混合したものを用いる逆相 HPLC によった. 茶浸出液は水で

10 倍に希釈し試料とした。茶葉からの抽出は水、アセトニトリルを等量混合したものを抽出液として用い 500mg の茶粉末を 50ml の抽出液で抽出し、水で 10 倍希釈したものを試料とした。

2) 結果と考察

(1) 分離条件の検討

ドデシル硫酸ナトリウムを泳動液に加えることにより、カフェインのピークが有機溶媒に由来するピークと分離できた。しかしながら、ホウ酸緩衝液を用いて pH8.4 以下にすると緩衝能が極めて低くなり、緩衝液の調製が困難で泳動時間の再現性が低下した。また pH を上げて緩衝能の高い pH9.0 付近にすると、カテキン類相互の分離はよくても、ピークのテーリングが著しくなった。そこで、緩衝液にリン酸を加えることにより pH8.0 付近での緩衝能を高めたが、この pH 以下ではテアニンの分離が得られなくなり、アスコルビン酸のピークもカテキン類に由来するピークと重なった。そこで、メタノールを泳動液に加えることにより、テアニンおよびアスコルビン酸の相対的な泳動時間を長くした。その結果、泳動液の組成を 50mM ホウ酸、10mM リン酸水素二ナトリウム、50mM ドデシル硫酸ナトリウム、10%メタノールとし、pH は 8.2 に調製した。

検出器としてフォトダイオードアレイ検出器を用いたので、最大 2 波長での同時モニタリングが可能である。検出の波長の選択に当たっては、茶の最も重要な品質成分であるテアニンが 200nm 以上の波長において吸収極大をもたないことから、200nm を第一波長として選択した。しかしながら、この波長単独では、緑茶に含まれる程度のアスコルビン酸の定量をするには、アスコルビン酸の吸収がやや不足する。最近開発した HPLC 法 (堀江ら, 1997) ではカテキン類やカフェインの検出に 270nm を用いており、またこの波長はアスコルビン酸やカフェインの吸収極大波長にも近いことから、第 2 の波長として、270nm を選択した。これら 2 波長を用いることにより、より低濃度のアスコルビン酸まで分析できるようになった。

本条件における標準物質 (a)、茶浸出液 (b)、茶葉からの抽出液 (c) のエレクトロフェログラムを図-5 に示す。カフェインに由来するピークは、ドデシル硫酸ナトリウムを使用したことにより、全く有機溶媒の影響を受けなかった。さらにカテキン類のピークのテーリングもなく、テアニンやアスコルビン酸の分離も十分である。このように、4 種の主要カテキン類、カフェインとともにテアニン、アスコルビン酸が 12 分以内に分離さ

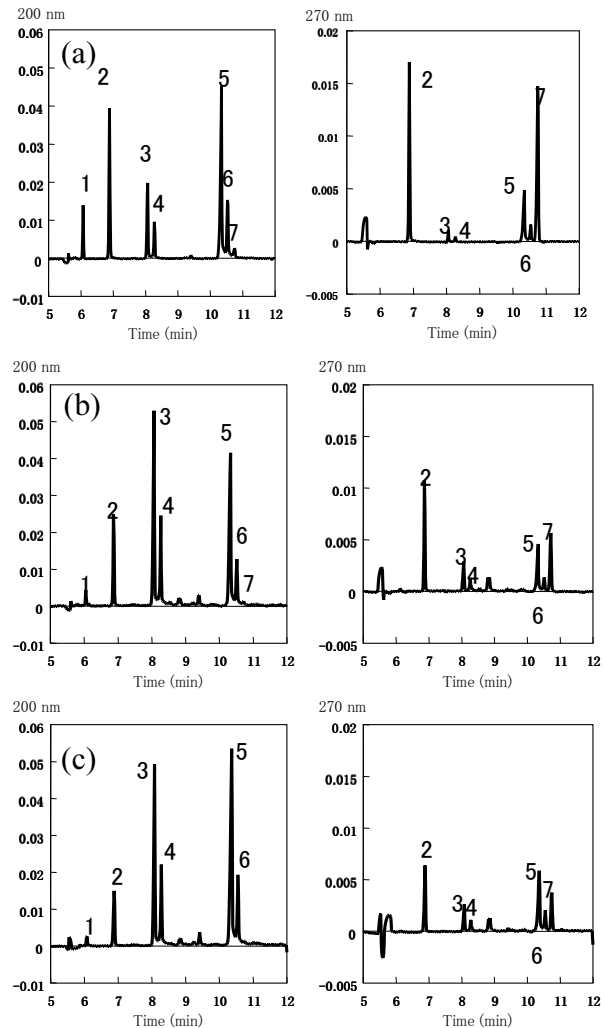


図-5 ミセル動電クロマトグラフ法による
茶主要成分分析

1: テアニン, 2: カフェイン, 3: EGC, 4: EC, 5: EGCg, 6: ECg, 7: アスコルビン酸. (a) 標準品: テアニン 50mg/l, カフェイン 50mg/l, アスコルビン酸 25mg/l, ポリフェノン 100 100mg/l. (b) 煎茶浸出液 (10 倍希釈). (c) 粉末化した茶葉からの抽出液.

れ、キャピラリーの洗浄等の時間を含めても、1 試料の分析に要する時間は前節の結果と変わらず 20 分以下である。本法を用いれば茶を熱水で浸出した試料液だけでなく、茶葉から有機溶媒を用いて全量抽出した液でも分析することが可能で、前節で述べた手法よりも応用範囲は広い。

(2) 茶試料について従来法での分析結果との比較

同一の茶浸出液について、本法と従来法で分析した結果の比較を試みた。ただ、キャピラリー電気泳動装置のオートサンプラーは 30°C 程度の温度になるため、試料

中のアスコルビン酸の安定化が必要である。そこで、試料中に前節同様メタリン酸の添加を試みたが、試料中の過剰なメタリン酸の存在は、各成分の泳動時間に影響し、またアスコルビン酸自身のピークをブロードにするため、好ましくない。そこで終濃度0.1%となるようにメタリン酸を加えたところ、茶浸出液中のアスコルビン酸のピークの面積は少なくとも2時間は変化しなかったため、アスコルビン酸の測定時には茶浸出液試料は終濃度0.1%のメタリン酸濃度となるよう調製した。また、このことにより他の成分のピークの形状や泳動時間には影響は見られなかった。

キャピラリー電気泳動法と従来法による茶浸出液中の各成分の分析結果を表-1に示した。その結果、各分析値ともほぼ一致した。キャピラリー電気泳動法はHPLC法に比べて、測定の再現性に劣るといわれてきたが、このようにコンピュータ制御された装置ではキャピラリー管の洗浄操作などを適切に行うことにより、HPLCに比べて遜色ない再現性を示すことが明かになった。

次に、本法及び従来法で茶葉成分の抽出・定量を行い比較した。本法の特徴のひとつは、テアニンとアスコルビン酸、カフェイン、カテキン類を同時分析できる点にある。茶葉成分を分析する際に、それぞれ別の方法で抽出するのは、あまり利点がない。そこで、1度の操作で、すべての成分の抽出ができる抽出条件を検討した。まず最も不安定な成分であるアスコルビン酸の抽出を考

える場合、安定化のためメタリン酸を加えることは必須である。そこで、2%のメタリン酸と有機溶媒を1:1の体積比で混合したものを抽出溶媒として用いた。有機溶媒としては、アセトニトリル、メタノール、エタノールのうちどれを用いても、茶抽出液のエレクトロフェログラムには差がなかったが、アセトニトリルを抽出に用いる場合、泡立つことが定容を困難にする。一方アルコール類を用いた場合にはこれが見られないので、より安全性の高いエタノールをメタリン酸と混合して抽出に用いた。さらに、既報によるカテキン類の抽出条件(堀江ら, 1997)に準じて超音波槽で30分間処理した場合、アスコルビン酸の定量値が著しく低くなった。超音波槽が熱を発生し、液温が40℃程度まで上昇することが、アスコルビン酸の分解を促進しているものと考え、超音波処理は、茶葉粉末が分散する程度の最短時間にとどめ、以後室温で30分間ゆっくり振とうしながら抽出することにした。

従来法で抽出しHPLCで分析した結果と、メタリン酸/エタノールで抽出しキャピラリー電気泳動法で分析した結果を表-2に示した。その結果、特にテアニンについては熱水で抽出する従来法の条件と著しく異なるため、抽出効率の低下が懸念されたが、テアニンを含むアスコルビン酸以外の成分について従来法とほぼ一致する結果が得られた。アスコルビン酸含量については、前述のように抽出において注意を払ったにもかかわらず、本

表-1 キャピラリー電気泳動法と従来法の比較
(茶浸出液成分の分析値)

	一番茶適期		一番茶晩期		二番茶	
	CE法*	従来法	CE法	従来法	CE法	従来法
テアニン	15.2	15.0	5.3	5.3	6.8	7.0
	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2
カフェイン	30.8	31.0	19.3	21.1	22.0	21.2
	2.8	0.5	0.2	0.2	0.3	0.5
EGC	49.0	46.7	31.9	29.7	30.1	29.4
	0.8	0.7	0.3	0.4	0.3	0.5
EC	13.7	14.2	11.4	9.3	8.1	8.1
	0.3	0.3	0.1	0.2	0.3	0.3
EGCg	54.3	51.3	29.4	31.4	42.1	40.6
	0.4	1.1	0.9	0.8	0.5	1.3
ECg	10.7	10.0	6.2	5.7	7.0	6.2
	0.3	0.4	0.2	0.6	0.2	0.3
アスコルビン酸	7.8	7.4	5.3	5.6	5.9	6.1
	<0.1	0.2	0.1	<0.1	0.1	<0.1

単位 mg/100ml

上段: 平均値, 下段: 標準偏差, 同一試料をそれぞれ4度測定。

*CE法: キャピラリー電気泳動法

表-2 キャピラリー電気泳動法と従来法の比較
(茶葉成分の分析値)

	一番茶		二番茶	
	CE法*	従来法	CE法	従来法
テアニン	1.32	1.33	0.63	0.60
	0.04	0.03	0.01	0.04
カフェイン	2.58	2.76	2.20	2.25
	0.01	0.18	0.01	0.13
EGC	5.01	4.96	3.71	3.64
	0.12	0.12	0.04	0.08
EC	1.60	1.54	1.24	1.19
	0.04	0.03	0.05	0.02
EGCg	8.36	8.39	8.17	7.66
	0.27	0.22	0.19	0.26
ECg	1.59	1.61	1.40	1.49
	0.05	0.06	0.03	0.10
アスコルビン酸	0.45	0.64	0.40	0.47
	0.01	<0.01	0.05	0.01

単位 %

上段: 平均値, 下段: 標準偏差, それぞ3反復で抽出・分析。

*CE法: キャピラリー電気泳動法

法の分析値が従来法より低めにでる傾向があった。この要因は従来法に比べて、メタリン酸濃度が低く、抽出条件がやや過激であったためにアスコルビン酸が一部分解されたものと推定される。これらのことから、本法によって得られた分析値はアスコルビン酸以外は従来法と一致するが、茶葉中のアスコルビン酸含量については、従来法で得られるよりも低い値を示す傾向があることに留意が必要である。

従来法で茶葉成分を分析する際には、アスコルビン酸は室温でメタリン酸抽出、テアニンは熱水抽出、カテキン類とカフェインは含水有機溶媒で室温抽出と3種類の抽出を行い、それぞれ別の条件でHPLC分析する必要があった(池ヶ谷ら, 1990; 後藤ら, 1993a; 堀江ら, 1997)。ここに示した方法ではアスコルビン酸の分析値には多少誤差を含むかもしれないが、1度の抽出操作で得た試料を1度の分析ですべての成分を定量できた。このことにより、分析に要する時間の短縮だけでなく、労力を必要とする抽出操作も大幅に省力化できる。本法が茶葉研究や品質評価の分野で多用されることが期待される。

c キャピラリー電気泳動法の茶品質成分研究への応用

前節で開発したキャピラリー電気泳動法を用いることにより、HPLCを用いた従来法に劣らぬ再現性をもち、さらに従来法をはるかに凌ぐ迅速性と前処理の簡便性を示すことが明らかとなった。そこで、この方法の実際の茶成分分析への応用を試みた。

まず、茶新芽の成熟に伴う成分変動を追跡した。一般に摘採が遅れると、新芽の成熟が進行し、緑茶としての品質は低下し価格も下がることが知られている。従って、緑茶の化学成分を分析することにより、葉の熟度あるいはこれと密接に関連する品質を推定できる(高柳ら, 1985)。そこで、摘採日の異なる煎茶(荒茶)の成分分析へのこの方法の応用を試みた。

また、キャピラリー電気泳動法の利点のひとつは、試料量が極めて少なくすむ点にある。しかも本方法では主要な成分を同時に分析できるため、葉1枚あれば重要な品質成分の分析に十分である。そこで、この手法を用いて、若い新芽の葉位毎の分析を試みた。

1) 実験方法

生産日の異なる煎茶間での成分の相違を求めるため、静岡県内のある一カ所の茶工場で異なる日に製造された荒茶を1996年の5月に収集した。これらの茶試料は粉碎後冷蔵庫に保存しておいた。250mgの粉碎茶を50mlの抽出液(アセトニトリルと2%メタリン酸水溶液の1:

1混合液)で30分間室温で抽出し、抽出液は水で10倍に希釈し、その後、0.45 μ mのメンブレンフィルターを通した後試料とした。

葉位間の成分を比較するため、1997年の4月25日に新芽を茶園から収集した。茎と葉は電子レンジで1分間殺青後80°Cで乾燥した。1枚の葉をガラス棒でつぶし、葉1mgにつき0.2mlの割合で抽出液を加えて抽出した。抽出後の試料調製は粉碎茶の場合と同じである。

分析にはキャピラリー電気泳動法を用い、条件は前節で設定した通りである。

2) 結果及び考察

摘採日が遅れると、茶の品質が低下し、価格も下落する。一カ所の茶工場で製造された茶について、経時的にその成分変化を調べたところ、摘採・製茶が遅くなるにつれテアニン、カフェイン、EGCgの含量は減少するが、EGCやECの含量が増加することが観察された(図-6)。この傾向は以前からの研究結果(高柳ら, 1985, 山本ら, 1996)と一致した。従来法では、このような分析をするには、少なくとも3種類の抽出法を用いた抽出液を、それぞれ別の方法で分析する必要があったが、本法では一度の抽出・分析で主要品質成分であるカテキン類、カフェイン、テアニン、アスコルビン酸のデータが得られる。しかも1度の分析に要する時間も短縮された。このような点が本法の大きな利点である。

用いた茶新芽の熟度の進んでいない部分の割合が多いほど、その茶は高品質とされる。しかしながら、従来法によりこのような分析を行うには、先述のように3通りの抽出法を行う必要があり、その分多くの試料を必要とした。このことから、これまでの方法では多くの新芽を採集し、その平均的な値を出せるに過ぎなかった。ところがこの方法を用いれば、葉1枚あれば十分分析可能なので、単一の茶新芽中の成分を直接分析できる。圃場で採取した新芽一本から得られたデータを図-7にまとめた。このように、葉位間で各成分含量に大きな差がある

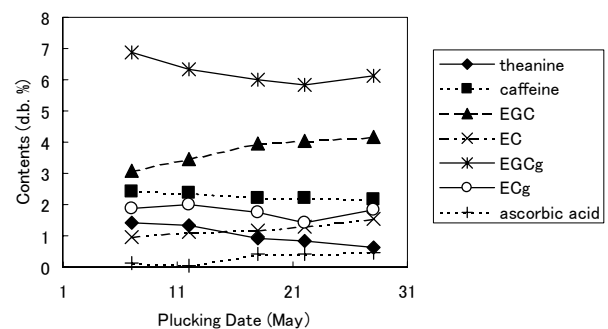


図-6 摘採時期による茶葉中の成分含量の変化

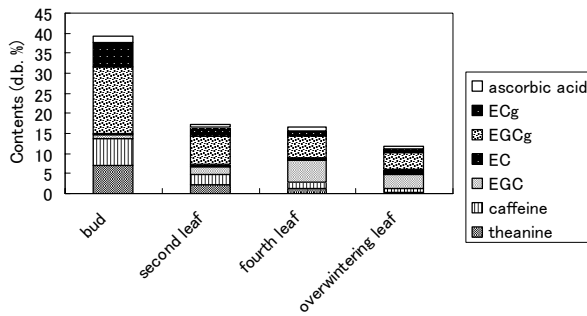


図-7 主要成分含量の葉位間比較

ことが判明した。心にはテアニン、EGCg、ECg、カフェインの含量が他の部位よりも多く、一方EGCやECの含量は低かった。三輪ら(1978)は、ペーパークロマトグラフィー、HPLC、セミマイクロゲル法などを駆使して、同様の結果を出している。彼らの分析には多くの試料が必要であったと推定されるが、本法では、茶新芽一本あれば十分であり、時間と労力、試薬類を大幅に節約できる。

以上のように、本法では最も重要な品質成分であるテアニンと主要カテキン類、カフェイン、さらにアスコルビン酸が同時に分析できた。しかも分析に要する時間は洗浄等の操作を含めても1試料あたり20分程度と、HPLC法で報告されているよりも短い時間しか必要でない。さらに、メタリン酸水溶液と有機溶媒の混合液を用いることにより、1度の抽出で試料の調製ができ、葉や心が1枚あれば分析には十分である。このように本手法は茶成分分析作業の効率化や高度化に大きく貢献し、今後の茶業研究への活用が期待される。

2 茶中の有機酸の分析とそれらの品質への寄与

シュウ酸を除き茶中の有機酸を分析した例は極めて少なく、シュウ酸以外には、クエン酸、リンゴ酸、キナ酸などの存在が知られている程度である。このことから、有機酸につて品質との関連での研究例はないものの、例えばクエン酸は調味料としても食品の風味改善に用いられ、さらに、最近ではクエン酸にグルタミン酸ナトリウムのうま味を強める作用があることが示唆される(原田ら, 2000)など、茶の味を考えるうえで有機酸が重要な役割を担っている可能性がある。一方、シュウ酸は腎結石の原因物質とされ、ホウレンソウを中心に研究が進んでいる(香川, 1993)。シュウ酸単独の分析であれば、酵素法(山中ら, 1983)やイオンクロマトグラフィー(安井ら, 1992)によっても比較的簡単に分析できるが、茶を対象とするときクエン酸やキナ酸などの主要有機酸

も同時分析できればさらに効率がよい。また、キャピラリー電気泳動法によりアニオン分析をした文献の中にも有機酸とともにアスパラギン酸まで分離を試みた文献(DEVREら, 1994)があることから、グルタミン酸など酸性アミノ酸も同時に分析できれば、なお効率的である。aにおいてはキャピラリー電気泳動法による有機酸及び酸性アミノ酸の分析法について、bにおいては、aの分析手法を用いて明らかにされた、シュウ酸の味への影響について述べる。

a キャピラリー電気泳動法による主要有機酸と酸性アミノ酸の同時分析

キャピラリー電気泳動法を用いて、シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、キナ酸などの有機酸及びアスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸の同時分析法の開発を試みた。方法としては、紫外外部吸収のある成分を電気泳動液に加えて電気泳動を行い、その結果紫外吸収を持たない各成分はマイナスのピークを示す。これを検出側で逆転表示させる間接吸光度検出法を採用した。

1) 実験方法

(1) 試薬と試料

クロム酸ナトリウム、臭化トリメチルシリルアンモニウム(TTAB)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(Na_2EDTA)については、それぞれ関東化学、和光純薬、同仁より購入した。他の試薬については特級品を用いた。キャピラリー管はJ&B製を用いた。

煎茶は当試験場で生産したものを、玉露は購入し、紅茶(ダーズリンとウバ)はリプトンより譲渡いただいた。

3gの茶を熱水180mlで3分間浸出し、2号濾紙で濾過した。濾液は終濃度0.25mMになるように Na_2EDTA を添加した後、5倍に希釈した。希釈液は0.45 μm のメンブレンフィルターを通して試料とした。

(2) 装置と分析条件

キャピラリー電気泳動装置は、ベックマンP/ACE 5000を用いた。キャピラリー管(57cm, 内径75 μm)は20 $^{\circ}\text{C}$ に設定し、間接吸光度法で254nmの吸光度を測定した。試料は5秒間高圧注入し、-20kVの電圧をかけて分離した。各分析後、0.1M塩酸、0.1M水酸化ナトリウム、電気泳動液の順に流してキャピラリー管を洗浄した。

電気泳動液の組成はクロム酸ナトリウム10mM, TTAB 0.5mM, Na_2EDTA 0.1mMとし、pHは調整しなかった。

2) 結果と考察

(1) エチレンジアミン四酢酸添加の影響

茶浸出液中には各種の金属イオンが溶解しているが、金属イオンが、キャピラリー電気泳動の泳動時間やピーク面積に影響することが知られている (CHIARIら, 1996; NELSONら, 1997). そこでNELSONら (1997) の報告に従い0.1mMの Na_2EDTA を泳動液に添加したが、それでもクエン酸のピークについては金属イオンの影響を受けることが認められた。そこで、茶浸出液中の主な2価及び3価カチオンであるカルシウム、マグネシウム、アルミニウム、マンガンの各イオンをそれぞれ1mg/lになるように、25mg/lのクエン酸液に加えたモデル試料液に、さらに Na_2EDTA を添加したときにクエン酸のピーク面積はいかに変化するかを図-8に示した。その結果、 Na_2EDTA を添加しない場合には、 Na_2EDTA を十分加えた時と比べてピーク面積が60%程度になり、金属イオンの影響を受けていることが示唆された。本条件では Na_2EDTA を0.1mM以上加えた場合にピーク面積が100%回復したので、0.25mMのEDTAを試料液

に添加することとした。

(2) 分析条件

アニオン分析において、フタル酸も泳動液として汎用される。フタル酸を用いた手法も試みたが、重要な分析対象であるシュウ酸のピークがややブロードに出るため、クロム酸を選択した。クロム酸自身にはほとんど緩衝能がないため、pHの微妙な調整は困難である。それ故pHは調整しなかったが、十分な分離と再現性が得られた (図-9, 表-3)。さらに、煎茶及び紅茶の浸出液に標準品を添加した場合も97~105%の回収率で回収され (表-4)、本法の有効性が示された。なお本法では洗浄操作まで含めても、12分程度で分析は完了した。

(3) 各種茶浸出液の分析

煎茶試料を分析したフェログラムを図-10に示す。シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、キナ酸が分離されたが、フッ化物イオンについては、検出されなかった。フッ化物イオンについては濃度が低すぎるものと推測された。なお、泳動時間4.5分付近の大きなピークはEDTAと金属の錯体ではない

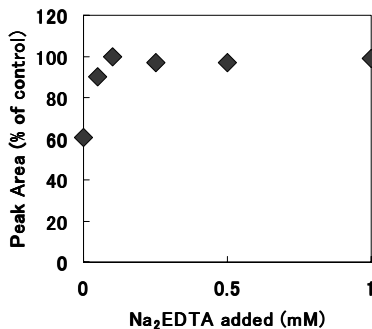


図-8 金属イオン共存下でのクエン酸のピーク面積に及ぼすEDTAの影響
クエン酸濃度は25mg/lとし、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、マンガンをそれぞれ1mg/lずつ添加した。対照(100%)は、金属を添加しない場合の25mg/lクエン酸のピーク面積。

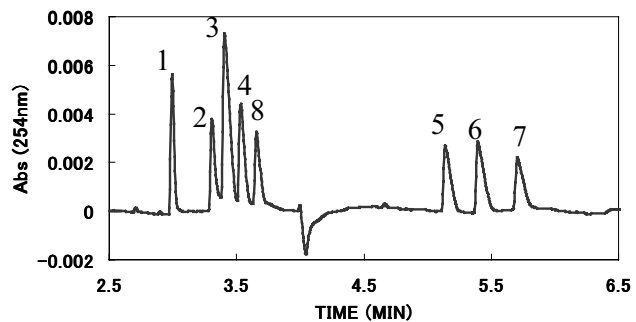


図-9 茶の主要有機酸、酸性アミノ酸のフェログラム
1:シュウ酸, 2:クエン酸, 3:フッ化物, 4:リンゴ酸, 5:アスパラギン酸, 6:グルタミン酸, 7:キナ酸, 8:EDTA. 各成分の濃度は20mg/l.

表-3 分析法に対する評価

成分	泳動時間 相対標準偏差 (%)*	ピーク面積		
		相対標準偏差 (%)*	直線性 (mg/l)	相関係数 (r ²)
シュウ酸	0.40	0.93	0.2-1000	0.999
クエン酸	0.43	1.38	0.5-1000	0.998
フッ化物	0.44	1.00	0.5- 250	0.998
リンゴ酸	0.40	1.04	0.5- 250	0.997
アスパラギン酸	0.75	2.20	0.5- 500	0.999
グルタミン酸	0.83	3.53	1.0- 500	0.999
キナ酸	0.65	3.11	1.0-1000	0.999

* 濃度 20mg/l. 4反復

かと推測される。

各種茶を同一条件で浸出した浸出液についての分析結果を表-5にまとめた。シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、キナ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸は4種の茶に検出され、再現性も良好であった。この表からうま味を重視する緑茶（煎茶・玉露）は紅茶に比べてグルタミン酸濃度が高く、中でもうま味が強いとされる玉露には煎茶の2倍近いグルタミン酸が含まれていた。一方、シュウ酸については分析した4種の茶いずれにおいても75mg/l以上含まれていた。別の研究において、茶浸出液中のアルミニウムの状態分析を行った際、²⁷Al-NMRスペクトルの化学シフトから、アルミニウム-シュウ酸錯体の存在が示唆された（堀江ら、1994）。今回のこの濃度はアルミニウム-シュウ酸錯体の存在を裏付けるものである。また、キナ酸はすべての茶種において100mg/l以上含まれ、さらに、クエン酸やリンゴ酸も茶中に無視できない濃度で存在することが明らかになった。

このように飲用状態での茶中の各種有機酸濃度が求め

表-4 有機酸・酸性アミノ酸を煎茶及び紅茶に添加した場合の回収率

	平均回収率 (% , n=3)	
	煎 茶	紅 茶
シュウ酸	99	97
クエン酸	105	100
フッ化物	105	102
リンゴ酸	97	97
アスパラギン酸	97	98
グルタミン酸	97	102
キナ酸	104	99

添加した濃度は20mg/l.

られたのは初めてであり、このデータは、各有機酸、酸性アミノ酸が味や品質に影響するか、あるいは品質指標となりうるかなど検討する際の基礎データになるものである。また、グルタミン酸ナトリウムを茶に添加することも行われ、流通の過程でこれを判別する必要がある。グルタミン酸とアスパラギン酸の比は通常の煎茶では2を越えることはめったになく（堀江ら、2000c）、これら2成分を誘導体化せずに測定できる本法は、グルタミン酸ナトリウム添加の判別にも利用できる。

b シュウ酸の茶の味への影響

前節で示した方法により茶中の有機酸、酸性アミノ酸が同時に分析できる。分析対象とした中でも、シュウ酸についてはハウレンソウのエグ味と関係があるとされ、特に注目に値する。そこで、前節に示したキャピラリー電気泳動法を用いて茶中のシュウ酸分析を行い、特に味との関連で考察をすすめた。

各種緑茶中のシュウ酸含量についてキャピラリー電気

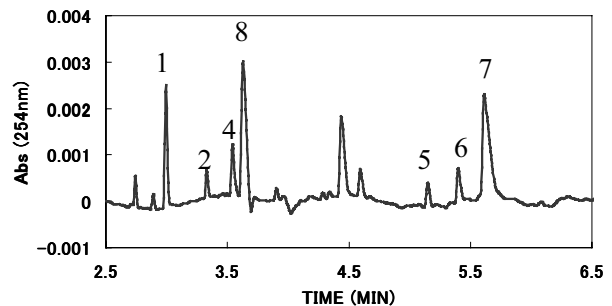


図-10 煎茶浸出液のフェログラム

各番号は図-9と同じ。

表-5 茶浸出液中の有機酸、酸性アミノ酸の濃度

	濃 度 (mg/l)					
	煎 茶	玉 露	ダーズリン紅茶	ウバ紅茶	プアール茶	碁石茶
シュウ酸	76.0 (1.9)	166.3 (3.2)	81.9 (3.3)	76.0 (3.2)	45.2 (1.5)	12.1 (0.9)
クエン酸	19.8 (0.5)	31.7 (0.6)	20.3 (0.7)	27.1 (1.3)	3.7 (0.2)	trace
リンゴ酸	40.9 (1.7)	32.3 (1.6)	23.1 (1.1)	18.3 (0.9)	trace	15.8 (1.9)
キナ酸	275.2 (8.9)	132.4 (7.1)	272.1 (4.3)	316.4 (19.0)	13.5 (1.4)	14.3 (1.3)
アスパラギン酸	12.7 (0.6)	64.5 (1.8)	5.5 (0.2)	6.7 (0.3)	trace	3.1 (0.2)
グルタミン酸	33.8 (1.2)	64.5 (1.3)	7.6 (0.3)	10.4 (2.8)	trace	2.6 (0.3)

() 内は標準偏差。3gの茶葉に対し180mlの沸騰蒸留水で3分間抽出を3反復し、その平均値と標準偏差。

泳動法により分析し、まとめた結果を表-6に示した。その結果、玉露において他の茶種よりも水溶性シュウ酸の含量が高いことが明らかになった。また、この原因として、被覆することにより葉中の水溶性シュウ酸含量が増加することも示されている（堀江ら，1998b）。

1) 実験方法

煎茶は当試験場で生産したもの、あるいは伊藤園より譲渡いただいたものを用い、玉露は中級品を購入した。浸出液中の有機酸の分析は前節の方法で行い、無機成分の分析は、茶抽出液を1M塩酸で5分の1に希釈後、ICP発光分析装置（島津ICPV-1014）を用いて分析した。

シュウ酸カルシウムの白濁生成に関しては、シュウ酸ナトリウム、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸二水素カリウム、及びクエン酸三ナトリウムの水溶液を混合に用いた。pHをMES緩衝液で6.5に調整しながら、37°Cに保温して混合1分後、シュウ酸カルシウムの生成にともなう白濁を肉眼で観察した。

2) 結果及び考察

シュウ酸はエグ味物質として知られる。シュウ酸ナトリウム水溶液はを口に含んだときその場では無味と感じられるものの、その後舌がざらざらするような感覚を覚える。シュウ酸濃度50mg/l以上でこのような感覚がみられるため、通常飲用する状態の茶にも、感覚的に認知される程度のシュウ酸が含まれていることになる。

このようなシュウ酸の舌に残る感覚をあと味とここでは呼ぶが、シュウ酸に由来するものと思われるあと味の異なる茶を3種類用意し、官能での評価と成分分析を並行して行った。その結果を表-7aに示した。あと味の強さは試料1>試料2>試料3の順であったが、シュウ酸濃度は試料1>試料3>試料2の順となり、必ずしもシュウ酸濃度が高いとあと味が強いとはいえなかった。舌にのこる味は、渋味物質であるカテキン類に由来する可能性もあるため、茶浸出液にポリビニルピロリドン（PVPP）を添加し、カテキン類の吸着したPVPPを濾別することにより、渋味物質であるカテキン類を除去した。このような方法でカテキン類の影響を除去した後も官能的なあと味の強さの順は、PVPP処理の前と変わらなかった。このことから、シュウ酸が茶のあと味に関与することが示唆された。しかし、シュウ酸濃度が高いほどあと味が強いというわけではなく、他の成分の関与が推測される。

そこで、シュウ酸の状態に影響を与えると考えられるクエン酸と無機成分の濃度を測定した（表-7b）。試料2と3の間でリン以外のこれらの成分の濃度は類似であ

表-6 各種市販緑茶中のシュウ酸含量

	測定点数	価格 (円)**	シュウ酸含量 (%)*	
			平均値	標準偏差
玉露上級	6	3000-5000	1.29	0.12
玉露下級	6	1000-1500	1.17	0.15
煎茶上級	6	1500-3000	0.82	0.03
煎茶下級	6	300-500	0.95	0.11
番茶	6	100-200	0.74	0.12
ほうじ茶	6	200-500	0.77	0.19

*乾物当たり，**100g当たりの市販価格。

表-7a 3種類の緑茶のシュウ酸味の強さとシュウ酸濃度

試料*	浸出液 シュウ酸味	PVPP処理液 シュウ酸味	浸出液中の シュウ酸濃度 (mg/l)
1	++	++	150.0
2	+	+	81.5
3	±	±	97.8

* 試料1：玉露（中級品），試料2：煎茶（上級品），試料3：煎茶（中級品）

+が多いほどあと味が強い。

表-7b 3種類の緑茶浸出液中の成分濃度

試料*	mg/l				
	クエン酸	P	Mg	Ca	Mn
1	50.6	23.5	15.3	1.5	4.6
2	26.6	22.1	11.3	2.0	0.4
3	24.0	15.1	11.8	1.7	0.1

* 各試料は表-7aと同じ。

る。リンの存在がシュウ酸のあと味に関連するのではないかと仮定し、試料3の茶にリン酸二水素カリウム1mM（Pとして31mg/l）添加したところ、シュウ酸のあと味は著しく増強された。この濃度のリン酸塩は無味であるから、リン酸イオンの存在がシュウ酸のあと味を増強させたものと推定される。

一方、茶中のシュウ酸とカルシウムが沈殿生成し、硬水で入れた茶の白濁原因になることは既に別の実験から明らかにしている（堀江ら，1998a）。また、唾液中にはカルシウムイオンやマグネシウムイオンが存在するが、唾液中のカルシウムイオン濃度は白濁を生成する硬水に含まれるカルシウムイオン濃度よりも高いため、シュウ酸を含む水や茶を飲むと唾液のカルシウムと反応し、シュウ酸カルシウムの沈殿を生成する可能性がある。そこで、モデル実験として、シュウ酸とカルシウムとの反応に対する、他のイオンの影響を調べた。

結果は表-8に示した。すなわち、シュウ酸とカルシウムイオンのみが存在する場合は白濁したが、マグネシ

ウムイオンはこれを抑制した。ところがこれにリン酸を加えると、白濁した。このことから、シュウ酸の示すあと味について次のようなメカニズムで仮説が立てられる。唾液中にはカルシウムイオンが存在し、茶中のシュウ酸と結合して、舌を物理的に刺激する。これがシュウ酸の示すあと味である。唾液中のマグネシウムなどの他のイオンはシュウ酸カルシウムの結晶生成を阻害し、あと味を緩和する作用がある。一方リン酸イオンはこのマグネシウムの作用を妨害し、シュウ酸カルシウム形成を促進する方向に作用するため、リン酸イオンを添加した茶やリン酸を多く含む茶ではあと味が強いのではないかと推測される。

玉露は表-7a に示したように3gの茶葉に対し180mlの熱水で抽出するような条件で薄くいれるとシュウ酸のあと味が強い。しかし、玉露は標準的には10gの茶葉を60mlの湯で抽出するというように非常に濃厚なエキスを飲用する。この条件で抽出した玉露の成分を表-9にまとめた。このような玉露浸出液では、シュウ酸濃度は860mg/lもあり非常に高いため、あと味も強いのではないかと推察されるが、実際にはシュウ酸が含まれていることを感覚的にはあまり感じない。玉露を濃厚に抽出すると当然他の有機酸も濃く溶出され、クエン酸、リンゴ酸とも100mg/lを越える。そこで、シュウ酸とカルシウムを混合したときに生成する白濁への有機酸の影響を調べた。表-10に示すように、シュウ酸カルシウムの生成はクエン酸の存在によって抑制されることが明らかになった。ただし、シュウ酸、クエン酸とも同じ組成比を保ったまま濃度を下げると、抑制作用が見られず白濁した。先のシュウ酸の示すあと味についてのメカニズムから、次のように考察される。玉露を濃くいれるとクエン酸濃度が十分高くなり、シュウ酸カルシウムの生成を阻害するため、あと味はしない。一方、薄く入れた場合にはクエン酸濃度が低くなるため、シュウ酸カルシウム生成が抑制されず、生成したシュウ酸カルシウムが舌を物理的に刺激し、これがあと味として認識されるのではないかと考えられる。実際にシュウ酸溶液にクエン酸を添加することにより、官能的にもシュウ酸のあと味は緩和された。

以上のことから、玉露を濃く出すことにより、シュウ酸カルシウム生成抑制作用のあるクエン酸のような成分を十分な濃度で抽出し、口腔内でのシュウ酸カルシウム生成に伴うあと味を緩和することに役立つと考えられる。

前節で開発された分析法により、各種茶中のシュウ酸含量(堀江ら, 2000a)や、茶葉の部位毎のシュウ酸含

表-8 シュウ酸カルシウム生成に対するマグネシウムイオン、リン酸イオンの影響

濃度 (mM)				結晶生成による白濁
カルシウム	シュウ酸	マグネシウム	リン酸	
5.0	1.0	1.0	2.5	+
5.0	1.0	1.0	0	-
5.0	1.0	0	2.5	+
5.0	1.0	0	0	+

10mMのMES緩衝液でpH6.5に調整し、37℃で1分間インキュベーション後の白濁を肉眼で観察した。

表-9 標準的な方法で浸出した場合の玉露中の味関連成分濃度

成分	濃度 (mg/l)	成分	濃度 (mg/l)
テアニン	2090	カテキン類	2130
グルタミン酸	320	カフェイン	1540
アデニル酸	4.4	シュウ酸	860
グアニル酸	0.5	クエン酸	180
水溶性多糖類	1500	リンゴ酸	130

10gの茶葉に対して60℃の蒸留水60ml注ぎ、2分間抽出した。

表-10 シュウ酸カルシウム生成へのクエン酸の影響

カルシウム mM	シュウ酸 mM	クエン酸 mM	結晶生成による白濁
1.0	5.0	0	+
1.0	5.0	2.0	-

10mMのMES緩衝液でpH6.5に調整し、37℃で1分間インキュベーション後の白濁を肉眼で観察した。

量や熱度と葉中シュウ酸含量の関係等の基礎データが集積されてきている。さらにここに示したようにシュウ酸の示すあと味についての研究に加えて、クエン酸の影響の解明等新たな展開もみられている。なお、クエン酸がグルタミン酸と相互作用し、うま味を強化するという報告(原田ら, 2000)もあるが、茶においてクエン酸のうま味への寄与についてはこれからの課題である。

3 要 約

本章1においてはキャピラリー電気泳動法を用いた茶の主要品質成分の同時分析法、主要有機酸と酸性アミノ酸の同時分析法を開発した。

1-aにおいては、キャピラリー電気泳動法においては200nmでの検出が可能であることを活かし、遊離アミノ酸であるテアニンと通常280nm付近で検出される場合が多いカテキン類・カフェインを同時分析することを試みた。pH8.0に調整した20mMの四ホウ酸緩衝液を用いるキャピラリーゾーン電気泳動法により、主要カテキン類、カフェイン、テアニン、さらに緑茶缶ドリン

クに多く含まれるアスコルビン酸や(±)ーカテキンまで同時に一試料 20 分以内で分析することが可能になった。この手法は、飲用状態の茶成分の同時分析に有効であった。

しかしながら 1-a の方法で、茶葉から有機溶媒で抽出した試料を分析する際には、カフェイン由来のピークと有機溶媒由来のベースラインの変動が重なる懸念があった。そこで、1-b においては、ドデシル硫酸ナトリウムを泳動液に加えミセル動電クロマトグラフィーの分離モードも取り入れることにより、問題を回避した。また、200nm の検出波長では、アスコルビン酸の感度が不十分であった。そこで、フォトダイオードアレイ検出器を用いて二波長検出し、270nm での検出も並行して行うことにより、アスコルビン酸の感度を向上させた。また、従来法による分析値と比較した結果も良好であった。

1-c においては開発した手法を、茶葉成分の経時変化や葉位別の成分分析に応用を試みた。本手法を用いることにより、HPLC によりカテキン類・カフェインを分析するよりも迅速にこれらの成分が分析でき、またテアニンやアスコルビン酸までも同時に定量できた。1 度の抽出で、必要項目を分析できる本手法は、省力化・迅速化を進めるだけでなく、今までは分析できなかった茶葉 1 枚のような微量試料にも対応でき、ルーチンの品質評価だけでなく、今後植物生理学的な研究場面での利用も期待される。

HORIE らの最初の報告 (1997a) 以来、キャピラリー電気泳動法を用いた茶のカテキン類分析に関して多くの報文が出されている (DALLUGE ら, 2000, HORIE ら, 2000)。しかしながら、他の報告においては、緑茶の最も重要な品質成分であるテアニンは分析の対象とされていない。本手法はテアニンをカテキン類やアスコルビン酸といった化学的性質の異なる品質成分と同時に分析できる点で、緑茶の品質成分分析という面では最も適している。

2 においては、キャピラリー電気泳動法による茶の有機酸及び酸性アミノ酸の同時分析法の開発と、その応用のひとつとして、シュウ酸が茶の味に及ぼす影響について述べた。

2-a においては、茶試料をキャピラリー電気泳動法により分析する場合は、試料中のカチオンの影響を防ぐためには、エチレンジアミン四酢酸を電気泳動液と試料の双方に添加することの必要性を認めた。開発した手法を用いれば、クロム酸を主体とするキャピラリー電気泳動法により、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、キナ酸、

アスパラギン酸、グルタミン酸の同時分析が洗浄時間も含めて 1 試料あたり 12 分以内で完了した。フッ化物イオンについては他の成分と分離できるものの、茶試料において検出するには感度は不十分であった。

2-b においては、a の方法の茶研究への応用を述べた。シュウ酸は茶浸出液にも感覚的に認識できる濃度で含まれ、舌に残るあと味を示すことが明らかになった。しかし、シュウ酸濃度が高いほどあと味が強いとは必ずしもいえず、茶浸出液中の他の成分があと味に影響するものと推測された。シュウ酸の示す味のメカニズムとして、茶浸出液中のシュウ酸と唾液のカルシウムが結晶化し、舌を物理的に刺激するものと考察した。また、通常玉露は非常に濃厚なエキスを飲用するが、この場合茶浸出液中のクエン酸濃度も高められ、結果的にクエン酸により口腔内でのシュウ酸カルシウムの生成が抑制され、シュウ酸カルシウムの物理的的刺激に由来するあと味が低減するのではないかと推論された。茶中の有機酸の研究はまだ緒についたところであり、今後クエン酸とグルタミン酸の間でのうま味の相互作用の研究にも、本分析法は有用であると考えられる。

キャピラリー電気泳動法の他の応用については、現在無機カチオン分析もすすめている。茶抽出液中のアンモニウムイオン (後藤ら, 1991) やナトリウムイオン (後藤ら, 1992) をそれぞれイオメータで分析したり、これら 2 成分をイオンクロマトグラフィーにより同時分析 (中川, 1995) できることから偽和物茶の判別等が試みられているが、キャピラリー電気泳動法を用いて、これら 2 成分を同時分析する手法も開発されている (堀江ら, 1999d)。なお、グルタミン酸ナトリウム添加の判別には、本章で示したグルタミン酸とアスパラギン酸の同時分析も有効である。

HPLC やイオンクロマトグラフィーにおいて、このように多種類の分析を行うにはそれぞれ、高価な分析カラムを準備する必要があるが、キャピラリー電気泳動法では、同じキャピラリー管を用い泳動液を換えるだけで、イオン分析にもカテキン類の分析にも使うことができる。従って、最近のキャピラリー電気泳動装置を用いれば、1 試料について、カテキン類など茶の主要成分、有機酸、無機カチオンを連続して分析することも可能である。このように、省力、省資源、さらに試料量も少なくすむキャピラリー電気泳動法は、今後、茶や食品の品質管理を目的とした分析装置の主役のひとつとして加えられるものと期待される。さらに、本章 1-a, b で示したように、キャピラリー電気泳動法を用いれば、従来の

HPLCでは分析できなかった成分の組み合わせで同時に分析できる。このことにより、従来は測定成分毎に何回かに分けて調製する必要があったが、性質の異なる成分群まで1度で試料調製でき、キャピラリー電気泳動法で必要とされる試料量が数十 μ lと微量なことから相まって、キャピラリー電気泳動法は微量試料中の多項目の同時分析にも適すると考えられる。このような利点は、今後茶業研究の多様な場面で十分活かされるものと期待される。

ただ、現在のところ分析装置自体が高価でしかも大型であるため農家や茶工場レベルへの普及が困難なのが問題点である。キャピラリー電気泳動法に関してはミニチュア化が最も期待され、現在、活発に研究されている分野(EFFENHAUSERら, 1997)なので、今後この分野での技術の発展が、キャピラリー電気泳動装置の小型軽量化、低価格化をもたらし、その結果、流通や生産の現場等茶業界での本手法の普及が進むものと考えられる。

III 酵素反応を利用した茶品質成分の簡易迅速分析法の開発

前章で述べたキャピラリー電気泳動法は、重要な品質関連成分の同時分析を迅速に行える点で優れており、装置の普及とともに急速に利用価値が高まるものと考えられる。しかしながら、本装置の農業分野への普及は未だ十分ではなく、しかも高価で大型の装置であるため、茶の流通や茶製造過程での品質評価への普及にはまだまだ時間を要する。そこで、たとえ多項目の分析はできなくとも、必要最低限の成分を迅速・簡便に分析でき、しかも導入の容易な手法の開発が望まれる。

近年、食品成分の酵素分析が一般化し(酵素法による食品分析研究会, 1989)、分析キット等も市販されているが、酵素を検出装置と組み合わせたバイオセンサーの方が使用に当たってはより簡便である。多くの場面でもより広く用いられる可能性はバイオセンサーの方が高いものと考えられる。そこで、茶の品質成分を対象としたバイオセンサーの開発を試みた。

茶の鮮度指標として重要なアスコルビン酸については、市販のバイオセンサーを用いた茶葉成分測定に関してすでに報告されている(大熊ら, 1996)が、感度が十分でないため試料の前処理にかなりの労力を必要とする。これに対して、既存のHPLC分析においても5分毎に試料の注入が可能(池ヶ谷ら, 1990)で、迅速性においてもバイオセンサー法と比べて遜色ない。従って、この成

分については既存のHPLCによる手法を利用する方が現実的であると考えられる。また、覚醒作用を示すカフェインに関しては、新たに開発されたPVPPP(ポリビニルポリピロリドン)プレカラムを用いる(NAKAKUKIら, 1999)ことによりHPLCの前処理が簡便化でき、またこの手法ではアスコルビン酸分析と同程度の迅速・簡便性を有する。また、これらの成分のHPLC分析においては、通常イソクラティック分析を行い、しかも高い感度は要求されないため、最近市販された携帯用の液体クロマトグラフィー装置(ハンディクロマトHC-2001, 旭テクネイオン)を茶工場に持ち込んでの測定も可能である。このようなことから、本研究においてはアスコルビン酸及びカフェインについてはバイオセンサーの開発は試みなかった。

アスコルビン酸あるいはカフェイン以外の重要な品質成分としては、苦渋味成分であるカテキン類、うま味成分である遊離アミノ酸が残り、これらは茶の品質上最も重要な成分である。そこで1においてカテキン類を対象とした2種類のバイオセンサーの開発について述べ、2において遊離アミノ酸を対象としたバイオセンサーについて述べる。

「ギャバロン茶」と呼ばれるGABA含量を高めた特殊な茶が高血圧症の人向けに市販されており(大森, 1991)、GABAの簡易迅速測定法の開発も求められているので、GABAセンサーについても2のなかで述べる。

1 バイオセンサー法による茶浸出液中カテキン類の迅速分析

茶のカテキン類は苦渋味物質として知られているだけでなく、近年ヒトの健康に及ぼす機能性物質としての評価も高まりつつある(村松, 1991, 山本, 1996, 良部ら, 1998)。そこで、カテキン類の迅速分析法として、バイオセンサーによる方法の開発を試みた。aにおいては、ゴボウのポリフェノールオキシダーゼの作用により、カテキン類が酸化されるのに伴い消費される酸素を酸素電極で測定した。bにおいては、酵素タンナーゼを用いて茶カテキン類のなかでも渋味に関係するガロイル基を有するカテキン類(EGCg, ECg等)の測定を試みた。

a ゴボウの根切片を利用した茶のカテキン類の迅速分析

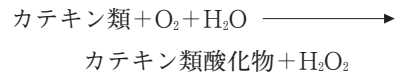
茶タンニンとも呼ばれるカテキン類は、複数の水酸基をもつフェノール性物質(ポリフェノール類)に属し、これらは茶葉中のポリフェノールオキシダーゼの作用に

より酸化重合し、紅茶のテアフラビン類などが生成される (西岡, 1991), 一方, 多くの植物にポリフェノールオキシダーゼが存在し (村田ら, 1998), これらのうちカテキン類を酸化する酵素もあるものと推測され, この酸化反応に伴う酸素の減少あるいは過酸化水素の生成, あるいは系に添加した酸化還元物質 (メディエーター) の酸化還元反応を測定すれば, カテキン類が定量できるはずである. カテキン類のセンサーの前例はないものの, カテコール等のポリフェノール類を対象とし, ポリフェノールオキシダーゼを利用したバイオセンサーの報告はいくつかあり, その中には精製された酵素を用いる場合 (HALLら, 1988; KULYSら, 1990; COSNIERら, 1993) とポリフェノールオキシダーゼを含む植物組織そのものを用いる場合 (WANGら, 1988; UCHIYAMAら, 1988; DESHPANDEら, 1990; BOTREら, 1991; RIEDEL, 1994; HORIEら, 1995a; EGGINSら, 1997) とがある. そこで, 本研究では, 市販のマッシュルーム由来のポリフェノールオキシダーゼを固定化した酵素膜と, ポリフェノールオキシダーゼ活性を示す植物組織の両方の利用を試みた.

また, ポリフェノールオキシダーゼを利用したバイオセンサーにはいくつかの検出手法が考えられる. まず, 酸化反応によって消費される酸素濃度を酸素電極によって測定する方法 (UCHIYAMAら 1988; BOTREら, 1991), および酵素反応によって生成した過酸化水素を電極によって測定する方法 (DESHPANDEら, 1990), あるいは酵素反応によって生成した酸化物を電極で再還元する際の電流を測定する方法 (HALLら, 1988; WANGら; 1988; KULYSら, 1990; COSNIERら, 1993; EGGINSら, 1997), 酵素反応生成物の色を検出に用いる方法 (HORIEら, 1995a) などが報告されている. 過酸化水素を検出する場合にはカテキン類自身や茶中に含まれるアスコルビン酸などが電極表面で酸化される危惧があり, 一方, 酵素生成物を電極で還元する場合も他の茶成分の影響が懸念される. また, カテキン酸化物も褐色を示すものの, 検出の際に茶自身に由来する色との識別が困難なため, 可視部の吸収により定量する方法も利用が困難である. これらに比べて, クラーク型酸素電極を利用した酸素電極では, 気体のみが透過できるテフロン膜で覆われているため, 他の茶成分による妨害を受ける懸念がない. そこで, 本研究では, 実用的に優れているという見地からクラーク型酸素電極と酵素膜あるいは植物組織の組み合わせを選択した. この場合, 酵素膜あるいは植物組織とポリフェノールオキシダーゼがカテキン類の酸化を触媒するなら, 酸素の消費はカテキン類の濃度と比例関係にあ

るはずで, この酸素濃度の変化は酸素電極により電流の低下として測定される (UCHIYAMAら, 1988; BOTREら, 1991).

ここで観察される酵素反応は以下のようである.



消費される酸素を酸素電極で検出することによりカテキン類の濃度が測定できる.

1) 実験方法

(1) 実験材料と装置

光架橋性樹脂 PVA-SbQ は東洋合成工業 (千葉) より譲渡いただいた. キノコ由来のポリフェノールオキシダーゼ (2000 units/mg, チロシナーゼ) はシグマから購入した. ゴボウ及び他の野菜や果実 (馬鈴薯, ナス, バナナ, リンゴ, モモ, ブドウ) は市場より購入した. 酸素電極は電気化学計器製のポーラログラフ式隔膜型電極を, 付属のフローセル (FLC-41) に装着して使用した. 酸素電極は, ポテンショスタットの代わりに, 電気化学計器製の電流電圧変換器 (IVC-200) 及びイオンメーター (IOL-30) と接続し, -700mV 印加し, 溶存酸素に由来する電流を計測した. (+)-カテキン及び EGCG はそれぞれ東京化成および和光より, 他のカテキン類はフナコシ (東京) より購入した.

(2) センサーの作製

バイオセンサーは酸素電極と酵素膜あるいはゴボウ (あるいは他の植物) の薄片から構成される. ポリフェノールオキシダーゼを固定化した酵素膜は, MIZUTANIら (1991) の方法を用いて, 光架橋性樹脂中に酵素を包括固定することにより作製した. すなわち, 1mg のチロシナーゼを 0.1ml の水に溶解し, これに 1g の PVA-SbQ を加えて攪拌後, テフロン板上にのぼし, これを冷蔵庫で 16 時間乾燥した. 乾燥した薄片の裏表をそれぞれ紫外線で 10 分処理し, これを 1 片 5mm 程度に切り取り酵素膜とした. ゴボウの薄片は, ゴボウの根をカミソリで厚さ約 0.2mm に切断することにより調製した. 他の植物組織片の作製もこれに準じた. 酵素膜あるいはゴボウの根薄片は, 酸素電極の官能部にポリプロピレン製樹脂ネットで固定してセンサー化した. 測定は, 図 11 に示すようなフロー系を 25°C の水槽中で保温しながら行った. すなわち一方から, $2\text{ml}/\text{min}$ の流量で緩衝液を流し, もう一方から空気を等速で流しこれらを混合後, センサーに到達させた. 酸素電極の電流値が一定になったところで, 緩衝液の代わりに, 試料を含む緩衝液を

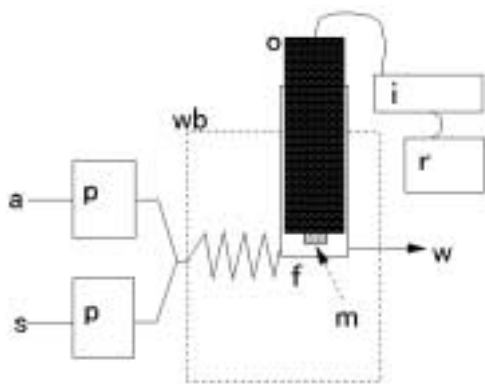


図-11 ゴボウ組織を用いたカテキン類センサーの構成
a: 空気, s: 緩衝液と試料溶液を交換, p: ペリスタポンプ,
f: フローセル, m: ゴボウ切片, o: 酸素電極, i: 電流測定器,
r: レコーダー, wb: 恒温水槽。

流し、酵素反応による酸素の消費にともなう電流の低下を、モニタした。本実験を通じて、酢酸緩衝液 (pH6.0, 0.1M) を使用した。

なお、本研究の推進にあたって茶カテキン類としては、EGCg 以外の茶の主要カテキン類が非常に高価なため、(+)-カテキンあるいは EGCg を主に用いた。

2) 結果と考察

(1) ポリフェノールオキシダーゼ固定化膜を用いたセンサー

ポリフェノールオキシダーゼを樹脂内に包括固定した膜を制作し、これを酸素電極を組み合わせたセンサーの利用を検討した。その結果、本センサーは (+)-カテキンに対して応答 (酸素の消費に伴う電流低下) は示すものの、その応答速度はきわめて低かった。さらに、(+)-カテキン添加後、電極で測定される電流値が定常状態になるまでに5分以上要し、しかもこの応答は数度の測定後徐々に小さくなった。そして、測定後には膜の褐色化が観察された。ポリフェノール類がポリフェノールオキシダーゼによって酸化重合し、高分子化することはよく知られており (秦, 1976)、酵素膜内あるいは酵素膜表面でポリフェノール重合物が生成されたものと推察される。

このようなことから、包括固定化膜の場合、(+)-カテキンの膜透過性が律速であり、酵素反応によって膜表面上に生成されたポリマー化したカテキンが (+)-カテキンの透過の障害となっているのではないかと推測される。このような酵素センサーでカテキン類を測定するには、カテキン類の酸化重合生成物に妨害されないような膜構造への改良が必要であり、今回の研究においてはこれ以上の解析は行わなかった。

(2) ゴボウ組織片を用いたセンサー

多様な植物にポリフェノールオキシダーゼが存在することが知られている (VAUGHNら, 1984)。そこで、植物組織片をポリフェノールオキシダーゼを固定化した膜の代わりに用いることを検討した。切り口が褐変することからポリフェノールオキシダーゼの存在が知られているか、あるいは存在が推定される多様な野菜や果実 (ゴボウ, 馬鈴薯 (CHENら, 1992), ナス (FUJITAら, 1988), バナナ (PALMER, 1963), リンゴ (JANOVITZ-KLAPP, 1989), モモ (LEEら, 1990), ブドウ (CHEYNIERら, 1989) をそれぞれ薄く切り、この切片を酸素電極の表面に固定してセンサーとした。これらのセンサーに (+)-カテキン及び EGCg 溶液を添加して応答を比較し、茶カテキン類のセンサーとして最適のものを選択した。その基準は、EGCg に対する応答が高いことは当然であるが、切片の作製が簡単でしかも切片が物理的に丈夫であることも重要である。さらに、センサーとして年間を通して使用する上では、その植物組織が四季を通じて入手が可能であることも重要な条件である。これらのことを踏まえて検討した結果、比較した植物のなかではゴボウ組織が EGCg に対して比較的高い応答を示し、しかも丈夫で取り扱いが簡単であった。さらに通年入手が容易なことから、ゴボウを選択した。ゴボウのポリフェノールオキシダーゼに関する生化学的な研究は少なく、組織に傷ができれば本酵素の作用で褐変するなどの観察にとどまる (吉富ら, 1994) が、茶ポリフェノールを基質として酸素を消費する性質から、本センサーの応答はポリフェノールオキシダーゼによるものと推測される。

ゴボウ組織を用いたセンサーは精製酵素を用いたセンサーに比べて高い性能を示した。すなわち、電流の定常状態は試料注入後3分以内に観察され、応答性は数十回の測定後も変化しなかった。植物組織の構造が、酵素膜に比べてカテキン類の透過に適しているためと考えられる。酵素膜よりも植物組織の方が物質の透過性に優れる点に関しては、オレンジの皮を利用したペクチンセンサーにおいても観察している (HORIEら, 1995c)。(+)-カテキンと EGCg に対する検量線を図-12 に示し、選択性については表-11 に示した。このセンサーは茶の他のカテキン類やカテコールにも応答した。カテコールに対する応答はカテキン類に比べれば著しく大きい。カテコールは茶には含まれないので測定の障害にはならないと考えられる。また、本センサーはアスコルビン酸にも応答するが、緑茶の種類や浸出法にかかわらず茶浸出液中のアスコルビン酸濃度は通常カテキン類の10%以

下（下徳ら，1982）なので，アスコルビン酸による影響はきわめてわずかと推測される．また，本センサーは茶中の主要アミノ酸や炭水化物には影響されなかった．このことから，本センサーで茶浸出液を測定する場合，主にカテキン類に応答するものと推定される．

価格の異なる3種の煎茶から茶浸出液を調製した．それぞれ3gの茶葉を40℃，70℃，95℃の湯180mlで4分間浸出した．これらの浸出液を緩衝液で5倍に希釈後フロー系に注入し，このときのセンサーの応答と，従来から行われているカテキン類の分析に用いられている比色法（池ヶ谷ら，1990）の結果と比較した（図-13）．その結果2つの方法の結果は高い相関を示した．

次に安定性について検討した．25℃に放置したセンサーの応答は，1週間毎日使用しても変化がみられず，ルーチン分析に必要な安定性を示した．また茶浸出液を5回測定した場合の相対標準偏差は3%以下であった．この方法の再現性は，比色による従来法の結果よりわずかに劣った．しかしながら，比色法では必須である発色剤との混合や定容などの煩雑な操作を必要とせず，また，緩衝液で希釈した茶浸出液を注入後3分で結果が得られる迅速さがこの方法の利点である．

緑茶は健康によい食品として欧州にも進出し，その品質評価は機能性成分であるカテキン類の含量に重きを置かれる（谷本，1998）．そこで生産地におけるカテキン類の分析評価が必要になる．しかしながら，特に諸外国における茶生産地は辺境の地域が多く，カテキン類含量を中心に品質管理を試みようとしても，分析に必要な試薬類の入手が困難な場合も考えられる．一方，本手法では特殊な試薬類を必要とせず，酸素電極と簡易なポンプ等の小型の機器だけでよい．その地域でゴボウの入手が困難であれば，ポリフェノールオキシダーゼは植物界にかなり普遍的に存在するので，ゴボウと同様の植物を探し利用すればよい．ここで示したゴボウを用いたカテキン類のセンサーは，このような辺境の茶生産地における茶の品質評価にも利用できると考えられる．

b タンナーゼリアクターを用いたエステル型カテキン類のフローインジェクション分析

前節では，茶のポリフェノールの主要部分をカテキン類が占めることを利用し，植物組織に存在するポリフェノールオキシダーゼを用いてカテキン類の濃度を測定する方法について述べた．通常の品質評価には，カテキン類の個別定量が煩雑であるため，多くの分析データはカテキン類の合計量の定量にとどまっている（中川ら，

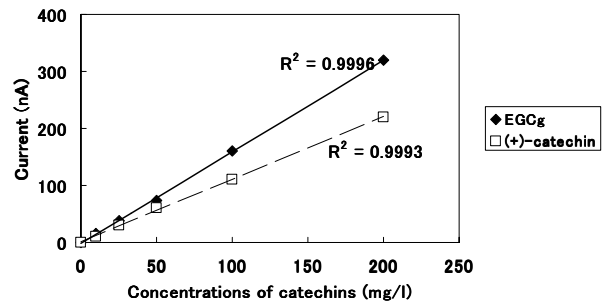


図-12 ゴボウ組織センサーのカテキン類に対する応答

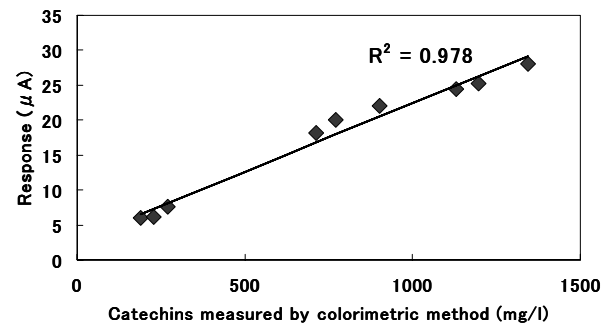


図-13 煎茶浸出液中のカテキン類濃度とセンサー出力の関係

カテキン類濃度は酒石酸鉄法により測定した．

表-11 ゴボウ切片を用いたセンサーの選択性

	応答 (%)
(+)-カテキン	100
EGCg	125
EGC	50
ECg	360
EC	380
没食子酸	33
カテコール	1050
アスコルビン酸	50
グルコース	0
テアニン	0
グルタミン酸	0
アルギニン	0

各成分の濃度は200mg/lとした．

1974；前田ら，1977；下徳ら，1982；宮崎ら，1992；後藤ら，1994a, b)．しかし，苦渋味物質とされるカテキン類のなかでも化学構造により味は異なり，より詳細な味の評価を行う上では，渋味物質の評価が重要になる．茶の4つの主要カテキン類として，EGCg，ECg，ECg，ECが知られており，これらのなかでもより渋味が強いのはEGCg，ECgの2種のカテキン類である（中川，1973）．このような，ガロイル基を有する茶カテキン類

をここではエステル型カテキン類と呼び、エステル型カテキン類の簡便迅速な定量法の開発が望まれる。

エステル型カテキン類の分析法としてタンナーゼ（滝野ら, 1974; AOKIら, 1976; DESCHAMPSら, 1983）の利用が考えられる。すでに本酵素は紅茶に作用させると没食子酸を遊離することが知られており（滝野ら, 1974）、緑茶のエステル型カテキン類からも没食子酸を遊離することが期待される。この反応を適切な検出系と組み合わせることにより EGCg や ECg に関する選択性の高い検出手法の開発が可能と考えられる。なお、EGCg, ECg の間では緑茶中には常に EGCg の方が数倍多く含まれる（西條ら, 1981; 後藤ら, 1996）、また、入手が容易であるため、本節においては EGCg を中心に研究を進めた。

EGCg に酵素タンナーゼを作用させたときの反応は次のように推定される。

(-)-Epigallocatechin gallate + H₂O

→ (-)-Epigallocatechin + Gallic acid

本反応で生成した没食子酸による pH の変動を測定することにより EGCg を定量できるはずである。操作の簡便性を考えて、ここでもフロー分析系を考えた。pH の測定に当たって通常のガラス電極型 pH メータを用いた場合には、応答が遅く、さらに電極自身が大きいためフローセルの容量を大きくせざるを得ず、感度の低くなることが問題となる。一方、半導体技術を利用し、小型で迅速に応答する pH 電極、pH-ISFET（イオン感応性電界効果型トランジスタ）電極が最近開発された（伊藤, 1998）。これを用いれば、フローセルの小型化も可能なため、酵素反応による pH 変化の検出に最適であると考えた。すなわち、タンナーゼ固定化リアクターで生じる pH の低下を下流に設置した pH-ISFET 電極で検出すればよい。ただし、茶浸出液自身の pH も試料間で多少は異なるため、試料自身の pH を別の pH-ISFET 電極でモニタし、タンナーゼの作用による pH 低下を 2 つの電極の電位差として検出した。

1) 実験方法

(1) 装置と試薬

pH-ISFET 電極及び ISFET mV/pH メータは新電元（東京）より購入した。比較電極（Ag/AgCl, RE-1B）と ISFET 及び比較電極用のフローセルは BAS（東京）より購入した。タンナーゼ（*Aspergillus oryzae*, 49units/mg）は和光純薬（大阪）より、アミノプロピル化した多孔質ガラスビーズ（CPG, 平均孔径 521Å, 粒子サイズ 120/200）は CPG Inc.（米国, NJ）より得

た。EGCg は和光純薬より、他の茶カテキン類は栗田工業（東京）より購入した。購入した試薬はそのまま使用した。

(2) 酵素リアクターの作製

タンナーゼは CPG に MURACHI & TABATA（1988）の方法に従い固定化した。すなわち 20mg のタンナーゼを含む 1ml のリン酸緩衝液（pH7.0, 50mM）を、あらかじめグルタルアルデヒドで処理した CPG に加え、4℃で一晩（約 16 時間）静置した。1M の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液で洗浄後、タンナーゼ固定化ガラスビーズは 4℃でリン酸緩衝液中で使用まで保存した。固定化されたガラスビーズはシリコンチューブ（内径 1mm）に詰めて、酵素リアクターとした。リアクターチューブの長さは約 20mm とした。

牛血清アルブミン（BSA）をタンナーゼと同様の方法でガラスビーズに固定化し、リアクターに詰めた。

(3) 固定化タンナーゼ活性の測定

固定化タンナーゼの活性は以下のように測定した。反応液（5mg のタンナーゼ固定化ガラスビーズと 0.5mM の EGCg あるいは他の基質を 100mM のリン酸緩衝液に加えたもの）を 20℃で 40 分間インキュベートした。酵素反応により EGCg より遊離する没食子酸を HPLC で分析した。HPLC の条件は後述する茶カテキン類の分析法と同じである。

(4) フローインジェクションシステムの構成

システムの構成を図-14 に示す。蒸留水と 500mM の塩化ナトリウムを含むフタル酸緩衝液（10mM, pH5.5）を多チャンネルのペリスタポンプ（Multipuls 3, Gilson, 米国）を用いて総流量 0.7ml/min で送液した。なお塩化ナトリウムはベースラインのノイズを削減するために添加した。脈流はパルスダンパーを用いて低下させた。試料液は 100 μl のサンプルループを装着したインジェクションバルブ（レオダイン 50 型）より注入した。注入した試料は緩衝液と混合され、この混合液を再度 2 流路に分けた。流速は背圧コイルを用いることにより、一流路あたり 0.35ml/min に調節した。一方の流路はタンナーゼを固定化したリアクターに、残りの一方を BSA を固定化したリアクターに接続した。タンナーゼの反応による pH 変化と試料自身による pH 変化を合わせたものがタンナーゼリアクターに接続された ISFET/pH 電極で検出される。試料自身に由来する pH 変化は BSA 固定化リアクターに接続されたもう一方の電極においても検出される。そこで、2 本の電極で測定される pH 差は、タンナーゼの反応のみによる pH 変化

と等しいと考えられ、この値を電圧差として記録した。

茶浸出液はこのシステムに注入する前に濾紙（アドバンテック東洋，2号）で濾過した後この系に注入した。測定は室温（約20℃）で行った。

(5) 茶カテキン類のHPLCによる分析

茶浸出液中のカテキン類の分析にはHPLC装置（LC-6A，島津，京都）を用い，UV検出器（280nm）で検出した。ODSカラム（Capcell Pak UG-120；粒子径5 μm ；250mm \times 4.6mm（内径），資生堂，東京）を用い，カラム温度は40℃に設定した。移動相は水（81.5%），メタノール（18%），リン酸（0.5%）とし流速1ml/minで流した。茶浸出液は蒸留水で10倍に希釈し，メンブレンフィルターを通し，これを10 μl オートサンプラーより注入した。

2) 結果と考察

(1) 固定化タンナーゼの特性

固定化タンナーゼの基質特異性を茶葉中の4種の主要カテキン類の間で比較した（表-12）。本固定化酵素はEGCやECから没食子酸を生成することはなかった。

EGCgとECgからは同程度の量の没食子酸を生成した。このことから，本固定化酵素は茶中のEGCgおよびECgより没食子酸を遊離し，pHを低下するものと考えられる。また，フロー分析においてもEGCgとECgは同程度のpH低下応答を示すと考えられるので，茶中により多く含まれるEGCgを本研究では主に用いた。

(2) 分析条件の決定

固定化タンナーゼのpH依存性をpH4.0からpH6.0の間で検討した（図-15）。最大の活性はpH5.5からpH6.0付近で得られた。EGCgは高pH条件では不安定なのでpH5.5を選択した。

タンナーゼカラムの長さもシステムの応答に影響する。様々なカラム長でのEGCgへの応答を比較した（図-16）。試験した範囲内では，カラム長を長くしても流速は変化しなかった。応答はリアクター長が20mmかそれ以上で最大となった。そこで20mmを選択した。このような条件下では試料は3分毎に注入できた。

EGCgに対する応答は50回以上の連続注入でも変化せず，このリアクターを冷蔵庫で保存した場合，1週間

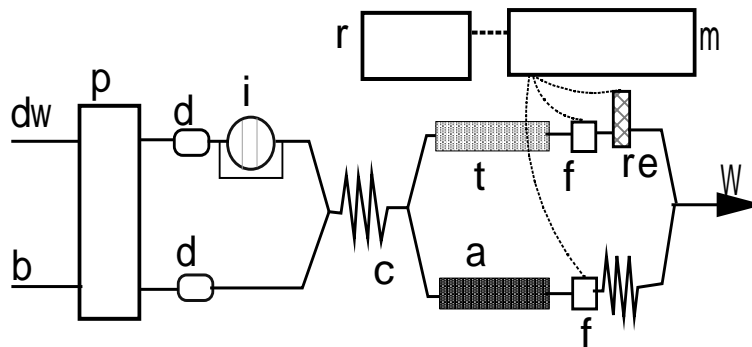


図-14 エステル型カテキン類分析用フローインジェクション装置の構成
dw：蒸留水，b：緩衝液，p：ペリスタポンプ，d：ダンパー，i：インジェクションバルブ，c：コイル，t：タンナーゼ固定化リアクター，a：BSA固定化リアクター，f：pH-ISFET電極，re：比較電極，m：pHメーター本体，r：レコーダー，w：廃液。

表-12 固定化タンナーゼの4種のカテキン類からの没食子酸遊離活性の比較

没食子酸遊離活性 (%)	
EGCg	100 ^{a)}
ECg	101
EGC	0
EC	0

酵素活性は20℃，pH5.5で測定した。
a) 0.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ glass beads/min.

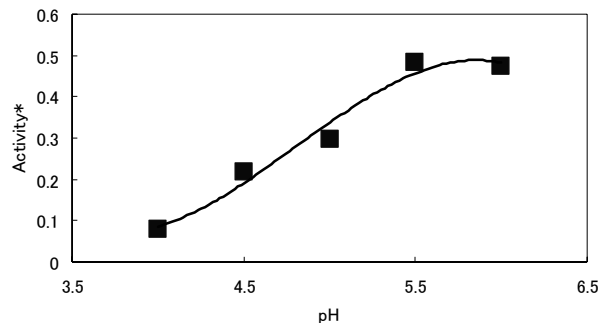


図-15 タンナーゼ固定化ガラスビーズの没食子酸遊離活性へのpHの影響

*1分間，1gのガラスビーズ当たりの没食子酸生成量 (μmol)。

後に再使用しても実用上問題がなかった。しかし、日中に使用し夜間は室温に放置することを1週間繰り返すと、80%程度の応答性を失った。一方、4°Cでリン酸緩衝液中に保存した固定化酵素自身は3カ月以上に渡って活性の低下は観察されなかった。固定化酵素を用いてリアクターを作製するのに5分程度しか必要としないので、フロー分析直前に新しいリアクターを作製することが最も望ましい。

EGCg に対する検量線を図-17 に記載した。高濃度の緩衝液を用いた場合にはシステムの応答を抑制した。比較したなかでは5mM のフタル酸緩衝液を使用したとき応答は最大になったが、600mg/l 以下でしか直線性が得られなかった。通常茶浸出液の EGCg の濃度は1000mg/l 以下と考えられるので、緩衝液濃度 10mM を選択した。この濃度では50mg/l から1000mg/l の間で ($r^2=0.99$) の直線関係が得られた。

(3) FIA システムの特性

EGCg を茶浸出液に添加した場合の回収率を表-13 に示した。上級茶及び下級茶に既知濃度の EGCg を添加したときの回収率はほぼ 100%であった。

本システムを選択性についても試験した。茶中の4種の主要カテキン類のうちで、EC と EGC に対する応答はみられなかった。このことは、表-12 に示したことと一

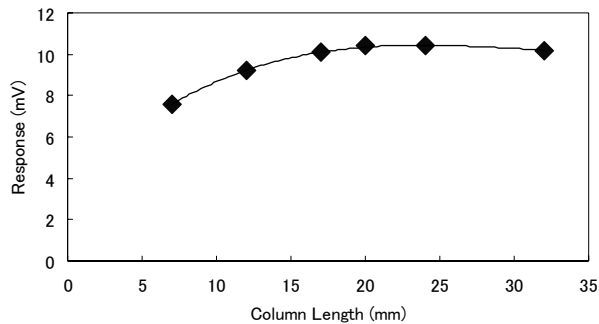


図-16 タンナーゼリアクターカラムの長さの応答への影響

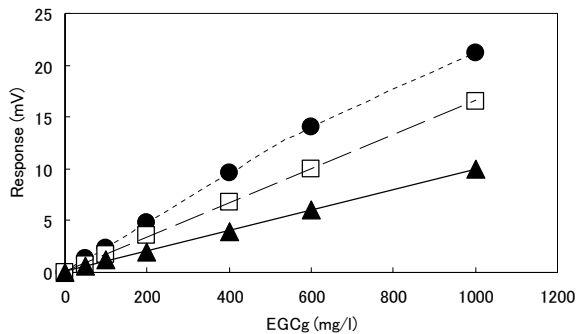


図-17 緩衝液濃度が EGCg の検量線に及ぼす影響

● : 5mM, □ : 10mM, △ : 20mM.

致する。さらに、茶の主要成分であるカフェインとテアニンに対する応答もみられなかった。一方、EGCg は等モル濃度の EGCg と同程度の応答を示した。従って、本フロー装置で茶浸出液を測定するとき得られる値は EGCg と ECG のモル濃度の和に近いものと推定される。

本法で得られた結果を HPLC を用いた分析結果と比較した (図-18)。すなわち、様々な条件で抽出した4種類の緑茶の浸出濾液を試料とし、HPLC で得られた EGCg と ECG の合計の濃度と、本装置で得られたエステル型カテキン類の濃度を比較した。得られたこれら2つの方法の間の相関 ($r^2=0.95$) はかなりよく、十分実用に値するものと考えられた。ただし、数値そのものは2つの方法の間で完全には一致しなかった。この不一致についてはいくつかの理由が考えられる。ひとつは、茶浸出液に微量ではあるが、ガロカテキンガレート、カテキンガレートなどが存在する (後藤ら, 1996) ことによるものである。これら微量のガロイル基をもつカテキン類もタンナーゼの基質となるものと推定され、このことにより、EGCg と ECG の濃度の合計値よりも高い値が得られることが推察される。もう一つの理由は、茶浸出液のもつ緩衝能である。茶の緩衝能については、辻・竹尾 (1983) の報告があり、本システムで用いた pH (5.5) では比較的小さいものとされる。しかしながら、

表-13 茶浸出液に添加した EGCg の回収率

	測定値* (mg/l)	回収率 (%)
茶浸出液 A	544±5	—
+125mg/l	668±8	99
+250mg/l	786±8	97
茶浸出液 B	360±8	—
+125mg/l	484±4	99
+250mg/l	602±5	97

* 平均値 ± 標準偏差 (n=3),

茶浸出液 A : 下級煎茶.

茶浸出液 B : 玉露

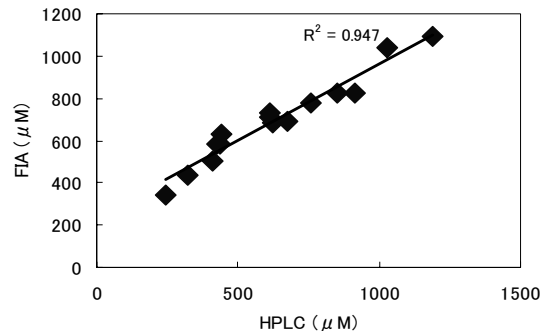


図-18 従来法 (HPLC)* による分析結果と FIA 分析値** の比較

* EGCg と ECG の和, ** EGCg を用いて作成した検量線から読みとった値.

それでも無視できない程度の緩衝能を茶浸出液自身が有しており、緩衝能の高い茶浸出液ほどこの効果が顕在化し、測定値がHPLCの測定値より低い値を示すことになる。

カテキン類を分析する際、HPLCでは1試料当たりの分析時間が30分以上かかり(寺田ら, 1987; 衣笠ら, 1992; Gotoら, 1996b; 後藤ら, 1996; 梅垣ら, 1996; 堀江ら, 1997; 山口ら, 1997), 前章において示したキャピラリー電気泳動法においても20分必要なのに対して、ここで開発したシステムでは、カテキン類の個別定量はできないものの、試料は3分毎に注入可能である。前節で述べたゴボウを用いたセンサーによる方法(HORIEら, 1994)では分析に1試料あたり5分以上必要で、EGCgに対する選択性は低かった。これらのことから本システムは緑茶中の渋味との関係の強いエステル型カテキン類の迅速測定には最適であり、後述のアミノ酸のフローインジェクション分析法と組み合わせることにより、茶の品質と浸出条件の相異による味成分濃度の相違を表現するのにも有用である(堀江ら, 1996)。

EGCgやECgは紅茶にも含まれるが、この開発したシステムは紅茶のエステル型カテキン類の定量には適当ではない。紅茶において、EGCgやECg等のエステル型カテキン類以外にテアフラビンガレート類も含まれている。そして、これらテアフラビンガレート類もタンナーゼの作用で没食子酸を遊離するものと推定される(滝野, 1974)ためである。一方、紅茶の渋味とEGCg, ECg及びテアフラビンガレート類の間に高い相関があることが報告されている(DINGら, 1992, OWUORら, 1995)ため、この方法は紅茶の渋味の評価に適する可能性も有しており、今後応用をはかる必要がある。

CHEN & MATSUMOTO (1995)は茶をタンナーゼで処理し、遊離した没食子酸をローダニンと反応させることによりエステル型カテキン類の分析を試みている。彼らの方法では、ローダニンが遊離の没食子酸と特異的に反応して可視部に吸収をもつ性質を利用しており、没食子酸に対する選択性の点では本章に示した方法より優れるかもしれない。しかし、彼らの方法では分析の際に非常に高濃度の水酸化カリウムを反応に使用する必要があり、危険を伴う。また、ローダニン試薬との反応はフローインジェクション法を用いているものの、酵素反応は60分間マニュアル操作で行わねばならない。このように、彼らの方法は操作が著しく煩雑で、しかも有害な試薬類の使用も必須になるなど問題点も多い。これらの点から考慮すると、茶工場等での使用を対象とすれば、本章の

方法がCHEN & MATSUMOTO (1995)の方法よりも、実用的な面で優れているものと考えられる。

pH-ISFETを酵素反応と組み合わせた分析法は、必ずしも新しいものとは言えず、すでに多くの報告がある。しかし、これらの報告の多くはグルコース(KIMURAら, 1989; BRANDら, 1991)や農薬(HENDJIら, 1993), 尿素(CHANDLERら, 1989)等限定された物質を対象としており、しかも標準物質の定量で終わっている場合が多い。このようなpH-ISFETと酵素反応を組み合わせた食品分析については、ごく最近飲料中のアスコルビン酸の分析への応用が報告されている(VOLOTOVSKら, 1998)だけである。しかもVOLOTOVSKらの方法では、飲料由来のpHの影響を防ぐために予め手作業での中和操作が必要であった。今回開発した方法はエステル型カテキン類の分析という新しい物質を対象とした点も含め、測定操作の簡便さの点からも食品分析の分野では極めて新しい試みといえる。

2 バイオセンサー法による茶浸出液中遊離アミノ酸の迅速分析

緑茶はうま味の強いものほど高品質であると評価され、うま味は主にグルタミン酸やテアニンなどアミノ酸によるところが大きく、従って遊離アミノ酸濃度と品質や価格との相関は非常に高く、茶浸出液中のアミノ酸の迅速分析への要望は強い。茶のアミノ酸分析は、かつては微生物定量法でなされていたが(長嶋ら, 1956), アミノ酸の自動分析装置(久保田ら, 1973), さらに逆相HPLC法(高柳ら, 1989)の導入により徐々に簡便迅速化されてきた。現在では、アミノ酸を自動的にo-フタルアルデヒド誘導体化し、HPLCで分離し蛍光検出することにより50分に1試料の主要アミノ酸分析が可能となった(後藤ら, 1993)。しかし、このような方法では、分析に時間がかかり、また前処理が煩雑で、さらに分析機械が高価でランニングコストがかかるため、誰でも手軽に分析するわけにはいかない。一方、ニンヒドリンで呈色させる比色法(池ヶ谷ら, 1986)も現在汎用されているが、操作が煩雑で再現性が悪いという難が残る。そこで、より迅速で簡便なアミノ酸の分析法の開発が要求される。

また一方で、ギャバロン茶と呼ばれるGABA含量を高めた茶が血圧上昇抑制を目的に生産されている。その有効成分GABAの分析への要望は高いものの、従来法ではHPLCを用いたアミノ酸分析法に依るしかなく、非常に煩雑で時間のかかるものであった。そこで

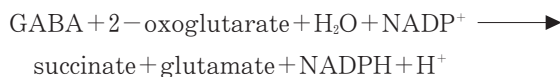
GABAについても生産現場でも使えるような簡便・迅速な分析手法の開発が望まれる。

そこで本章においては、酵素を用いた手法でこれらのアミノ酸類の分析の迅速化をはかった。aにおいてはGABAの分析法を開発し、bでは全アミノ酸の分析法を開発し、グルタミン酸との同時分析を試みた。

a 酵素を用いたγ-アミノ酪酸 (GABA) のフローインジェクション分析

ギャバロン茶と呼ばれるGABAを蓄積した茶に血圧上昇を抑制する作用のあることが報告され(大森ら, 1987; HAKAMATA, 1990),すでに臨床的にもその効果が確認されている(大森, 1991; 戸張, 1992)。茶のGABA含量は主として製造工程で生の葉を窒素ガス嫌気条件に置くことで高められ(HAKAMATA, 1990; 竹内ら, 1994a, b),ギャバロン茶が生産されている。市場ではより高GABA含量のギャバロン茶が求められており,原葉の特性に応じてGABA含量を高めるような製造法の改良が必要である。そのためには,製造されたギャバロン茶のGABA含量が製造現場において直ちに分析できれば理想的であるが,現在GABA含量は主にHPLCによって分析されており(高柳ら, 1989, 後藤ら, 1993b),分析操作が複雑で,測定に時間を要するため,現場での分析は非常に困難である。そこで,ギャバロン茶製造現場での簡便迅速なGABAのルーチン分析を目的に,酵素を用いたフローインジェクション分析法の開発を試みた。

ここで用いた酵素反応は次のようなものである。



酵素はGABAseと呼ばれる酵素を用いた。本酵素はGABAアミノトランスフェラーゼとコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼの2種類の酵素からなる(JACOBY, 1962)が,上記の反応に基づき,蛍光物質であるNADPHを生成するため,この蛍光をモニターすることにより,GABAの定量が可能である(GRAHAMら, 1966)。ここでは,分析を簡便迅速化するためGABAを固定化した酵素リアクターの下流に蛍光検出器をおくフロー分析とした。

1) 実験方法

(1) GABAse リアクターの作製

前節に準じて酵素の固定化を行った。まず,アミノプロピル化した多孔性ガラスビーズ(CPG, 孔径521A, 120/200メッシュ)200mgを2.5%グルタルアルデヒド

処理した。10mgのGABAse(Sigma, *Pseudomonas fluorescens*由来, 0.5U/mg)を1/15Mリン酸緩衝液(pH6.4)0.2mlに溶かした溶液に,グルタルアルデヒド処理したガラスビーズを加えて,冷蔵庫内で一晩放置し固定化した。GABAseを固定化したガラスビーズは洗浄後,同じリン酸緩衝液中で保存し使用した。GABAse固定化ガラスビーズは,片側にセルロースワイパー(旭化成, クリーンワイプ-P)を詰めた内径1mmのシリコンチューブに10cm充填し,これをGABAseリアクターとした。

(2) フローインジェクション分析

図-19に示すように蒸留水と緩衝液はプランジャーポンプ(サヌキ工業FI-710L)よりそれぞれ流速0.2ml/minで流した。緩衝液は,100mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0),400mM硫酸ナトリウム,1mM NADP⁺,5mM 2-ケトグルタル酸,2mMメルカプトエタノールとした。ここで,硫酸ナトリウムは試薬類の酵素リアクターへの吸着を防ぎ,シャープなピークを得るために添加した。蒸留水側のインジェクションバルブ(サンプルループ20μl)より試料を注入し,緩衝液と混合後,GABAseリアクターを通過し,酵素と反応した液は,ペリスタポンプを用いて0.2ml/minの流速で送液される1%酢酸と混合され,弱酸性化される。この液はODSミニカラムを通過するが,茶に由来する蛍光物質はここで吸着される。ODSミニカラムはHPLC用ガードカラム(野村化学, 内径4.6mm, 長さ10mm)に充填剤(野村化学, Develosil ODS 15/30)を乾式充填したものである。ODSミニカラムを通過した液中のNADPH濃度は,蛍光検出器(日本分光, FP-110, 励起波長360nm, 検出波長460nm)を用いて測定した。蛍光シグナルはインテグレーターで記録し,定量にはピークの高さを用いた。なお,GABAseリアクター部分は,HPLC用

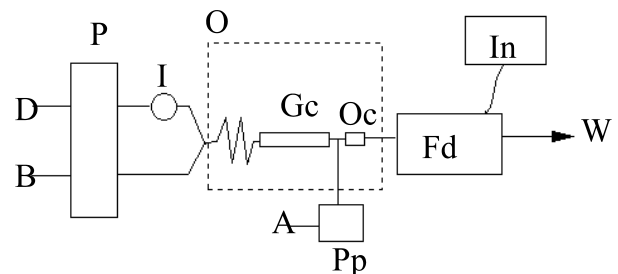


図-19 GABA 測定用フローインジェクション分析装置

D: 蒸留水, B: 緩衝液, P: ポンプ, I: インジェクションバルブ, Gc: GABAse 固定化リアクター, Oc: ODS ミニカラム, Pp: ペリスタポンプ, A: 酢酸, Fd: 蛍光検出器, In: インテグレーター, W: 廃液, O: HPLC 用カラムオープン。

カラム恒温槽内に取り付け 30°C に保温した。

2) 実験結果および考察

本フロー分析系においては、酵素反応の結果生成する NADPH に由来する蛍光を検出し、GABA の定量を行う。この方法を実際のギャバロン茶試料に適用する際、茶中に存在する蛍光物質が NADPH 由来のピークと重なり測定の影響となる。そこで、茶由来の蛍光物質のオンライン除去法を検討した結果、弱酸性条件下においてその大部分が ODS に吸着されることが判明した。フロー系に適用した結果、茶由来の蛍光物質のピークの高さは約 2% にまで低下し、一方 NADPH のピークは、pH の酸性化に伴い元の 30% の高さとなった。NADPH のピークに比べて茶成分由来のピークの低下が著しいことから、本法は茶由来の蛍光の影響除去に極めて有効と考えられた。さらにこの ODS ミニカラムに、茶抽出液を 200 点以上注入した後も、茶成分の脱着に由来するベースラインのドリフトが生じることもなく、本 ODS ミニカラムは連続分析にも耐えることが判明した。また、ODS ミニカラムは、メタノール、蒸留水の順で流し、洗浄することにより再生可能であった。

この装置では 2.5 分毎（実試料の場合は、わずかではあるが試料由来の蛍光の影響を受けるため 4 分毎）に 1 試料の注入が可能で、GABA 標準液濃度 1~100mg/l の間で濃度とピークの高さに直線関係 ($r^2=0.999$) が認められた。そこで、当試験場で生産された 6 種類のギャバロン茶中の GABA 含量を求めた。GABA の抽出は 1.0g のギャバロン茶を 100ml の蒸留水で 40 分間軽く攪拌し、この濾液を試料液とした。この方法で求めた GABA 含量を、HPLC で求めた値と比較した結果、高い相関が得られ（図-20）、この方法が実際のギャバロン茶の分析に応用できることが明らかになった。

固定化 GABAse 自身はそれほど安定ではなく、長時間茶成分にさらされることにより、活性は徐々に低下する傾向にあった。しかし、通常の測定間隔で試料を注入

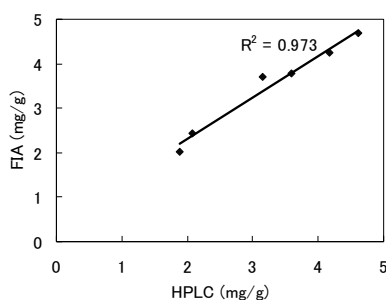


図-20 ギャバロン茶中の GABA 含量について HPLC 法と FIA 法の間での比較

する限りにおいては 4 時間程度では蛍光強度の低下は認められず、1 日の測定のなかでは数回標準物質で検量線を補正するだけで十分であると考えられた。なお、固定化 GABAse の活性は、保存中にも 10 日で 40% 程度は低下するので、製造現場での使用には、各茶期において使用する直前に GABAse リアクターを調製する必要がある。また、本酵素活性及び ODS カラムの吸着能の低下は誤差を拡大する要因になるので、使用にあたっては留意を必要とする。さらに、試薬類のキット化や装置の小型化もギャバロン茶生産現場への普及においては重要と考えている。

GABA を対象としたバイオセンサーの開発は HORIE & RECHNITZ (1995b) が最初であり、その後 MAZZEI ら (1996) も GABAse を用いたバイオセンサーを報告している。しかしながら、彼らは GABAse による反応で生成した NADPH をペルオキシダーゼで酸化することにより検出している。この場合、ペルオキシダーゼは基質特異性が低い酵素なので、センサーの選択性が問題となり、実試料への利用は困難と考えられる。従って、ここに述べた方法が実試料中の GABA を測定できる唯一の酵素センサー法といえる。

b バイオセンサーによる茶浸出液中の全アミノ酸及びグルタミン酸の迅速分析

茶の品質評価のためには、遊離アミノ酸を測定することが最も重要である。そこで、b-1 においては、酵素センサーを作製し、茶浸出液中の全アミノ酸濃度の測定を試みた。L-アミノ酸オキシダーゼ固定化膜と酸素電極を組み合わせたバッチ分析を行うことにより、全アミノ酸の分析は可能ではあるものの、実際に飲用する状態の茶浸出液を分析するには感度が若干不足した。

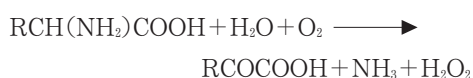
一方、グルタミン酸は他のアミノ酸と比べて著しくうま味に対する閾値が低く（小原，1966）、緑茶のうま味を評価するうえでは欠かせない成分である。そこで、バイオセンサーによる茶浸出液中のグルタミン酸測定を試みた。ところが、グルタミン酸は茶葉中に 0.3% 程度、通常の方法で茶を浸出した場合浸出液中に 50mg/l 以下しか含まれないため、b-1 で示したような酸素電極とグルタミン酸オキシダーゼ固定化膜を組み合わせたバッチ法による分析では、感度が不十分である。そこで b-2 においては、アミノ酸センサー、グルタミン酸センサーを組み合わせたフローインジェクション法を開発し、全アミノ酸とグルタミン酸の同時分析を試みた。この方法では、通常飲用する状態の茶浸出液をそのまま測定でき

ること、及びさらなる操作の簡便化・迅速化も目標とした。

なお本章においては、L-アミノ酸オキシダーゼを用いたアミノ酸センサーにおいてはテアニンを標準物質として用いて検量線を作成し、測定し得られた値を全アミノ酸として記載した。

b-1 全アミノ酸測定用バイオセンサーの開発

多種類のアミノ酸を酸化する酵素としてL-アミノ酸オキシダーゼが知られており、本酵素は次式の反応を触媒する (WELLNERら, 1971)。



このときアミノ酸濃度に対応した酸素の消費や過酸化水素の発生がみられるので、本酵素と適当な検出装置を組み合わせれば、アミノ酸の濃度が測定できるはずである。ここでは、L-アミノ酸オキシダーゼの反応を利用して測定されたアミノ酸の測定値を全アミノ酸として記載する。

このような原理に基づくバイオセンサーで市販された装置 (バイオテックアナライザー, PM-1000, 日本ゼネラル) もあるが、これをそのまま茶浸出液中のアミノ酸の分析に使用することは困難である。それは、茶葉中には数パーセント程度のアミノ酸しか含まれず、しかもその成分の測定にあたっては数倍存在するカテキン類が妨害する可能性があるためである。そこで、このような茶の特性を踏まえた測定法の開発が必要である。感度の向上だけを問題にすれば、過酸化水素電極を用いL-アミノ酸オキシダーゼの反応によって生成された過酸化水素を検出すれば優れたものが得られるはずであるが、茶中に共存するカテキン類やアスコルビン酸の影響を考慮して、ここでは酸素電極を用い酵素反応に伴う酸素消費量を検出した。

1) 実験方法

(1) 装置と材料

ポーラログラフ式隔膜型酸素電極 (電気化学計器, 東京) を電流電圧変換器 IVC-200 (電気化学計器) を介してイオンメータ IOL-30 (電気化学計器) と接続した。酸素電極には -700mV を印加し、溶存酸素濃度の変化に伴う電流変化をレコーダーで記録した。酸素電極の先端の酸素透過性テフロン膜の表面に、直径5mmの円形に整形したL-アミノ酸オキシダーゼ固定化膜 (Colletotricum sp. 由来, 東洋醸造, 静岡) を、電極

に付属のプロピレン樹脂製のネットで固定し、アミノ酸センサーとした。

粗カテキン類は茶より抽出したもの (個別のカテキン類には分離されていない) (堀田, 1989) を現食品総合研究所堀田博士より譲与いただいた。

茶試料としては同一地域の単価の異なる荒茶を収集して用いた。

(2) 測定法

図-21に示すように100mlのpH7.0の0.1Mリン酸緩衝液の入ったビーカーを30°Cに設定した恒温槽中で保温し、マグネチックスターラーを用いて攪拌し、緩衝液を空気中の酸素で飽和した。緩衝液中に酵素膜を装着した酸素電極を挿入し、電流値が安定した後、5mlの試料溶液を注入し、酸素の消費に伴う電流減少量を測定した。価格の異なる一番茶の荒茶5gを80°C、100mlの熱水で5分間抽出した濾液を茶浸出液として測定に用いた。この茶浸出液中の全遊離アミノ酸濃度は除タンニン後、ニンヒドリンで呈色させる方法 (池ヶ谷ら, 1990) で測定し、酵素センサー法による測定値と比較した。

2) 実験結果

L-アミノ酸オキシダーゼは多種のアミノ酸を基質としうるが、茶浸出液中に最も多く存在するアミノ酸はテアニン (中川, 1969; 加藤ら, 1970; 向井ら, 1992; GOTOら, 1996a) であるので、まずテアニンに対する応答について検討した。既知濃度のテアニン水溶液を、酵素センサーを挿入した緩衝液に添加したところ、電流の減少がみられ、添加後約2分で定常になった。電流値の低下量は添加したテアニンの濃度に依存していたので、電流値低下量とテアニンの濃度の関係をプロットしたのが図-22である。このセンサーを用いれば、テアニン

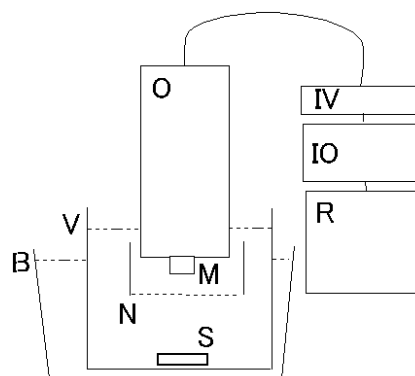


図-21 アミノ酸センサーの構成

O: 酸素電極, M: 酵素膜, N: ネット, S: スターラーバー, V: 測定容器, B: 恒温水槽, IV: 電流電圧変換器, IO: イオンメーター, R: レコーダー。

が10mg/lから100mg/lの範囲で測定可能なことが示された。

茶中に存在する遊離アミノ酸のなかで、テアニンについてアルギニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、セリン、スレオニン等の含量が比較的高い(中川, 1969; 加藤ら, 1970; 向井ら, 1992; GOTOら, 1996a)。そこでこれらのアミノ酸をそれぞれ25mg/lになるように添加した時のセンサーの応答を表-14に示した。その結果、本センサーはグルタミン酸、アスパラギン酸、スレオニンに対しては応答せず、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、セリンに対しては応答はみられるものの、テアニンに対する応答より小さかった。

茶浸出液中で最も多く含まれる成分はカテキン類で(中川, 1970)、カテキン類が酵素反応を阻害する例も知られている(原ら, 1987; HARAら, 1990; HONDAら, 1993)。そこでカテキン類の本酵素センサーの応答への影響を調べた。粗カテキンを1000mg/lの濃度に溶解した緩衝液に、テアニンを50mg/lになるように添加した場合と、テアニンだけの場合のセンサー電流変化を比較した。その結果電流応答の速度と強度に差は認められなかった。このことから、1000mg/l以下の濃度であれば、カテキン類の存在は本センサーの障害にはならないことが明らかになった。

本センサーを用いて実際の茶浸出液の全アミノ酸濃度を測定した結果を図-23に示す。全アミノ酸濃度は、5mlの茶浸出液を緩衝液に添加して電流の減少量をもとめ、あらかじめ既知濃度のテアニンを用いて作成した検量線から全アミノ酸濃度として読み取ることにより測定した。測定値を従来から行われているニンヒドリン呈色法による測定値と比較したところ、相関係数($r^2=0.99$)と非常に高い相関が得られた。さらに、価格の高い茶ほど、センサー応答は大きい傾向があった。

3) 考 察

テアニンは茶に特有のアミノ酸であるため、アミノ酸オキシダーゼの基質となりうるか否かが問題であった。蛇毒由来のL-アミノ酸オキシダーゼを用いた場合、テアニン酸化能は低かった(堀江ら, 1996)ため、ここでは微生物由来の酵素を用いた。その結果、微生物由来のL-アミノ酸オキシダーゼ膜は、テアニンを酸化することが判明した。

カテキン類は主要な茶成分のひとつで、多様な機能を有し、酵素活性を阻害する例も知られている。しかしながら粗カテキン類が測定液中に1000mg/l存在してい

ても、センサーの応答に影響はなく、茶浸出液中のカテキン類の濃度は多くとも3000mg/lと考えられる(下徳ら, 1982)ことから、これが緩衝液で20分の1以下に希釈される本法の条件にあてはめると、酵素反応へのカテキン類の影響は全く無視できるものと考えられた。

一方、カテキン類は還元作用も有し、カテキン類を含む水溶液の溶存酸素濃度は低くなる。従って、高濃度のカテキン類溶液を緩衝液中に多量に添加すると、緩衝液の溶存酸素濃度が非酵素的に低下し、本酵素センサーで

表-14 茶中に含まれる主要アミノ酸に対するアミノ酸センサーの応答比較

	%
テアニン	100
アルギニン	62
アスパラギン酸	ND
アスパラギン	87
グルタミン酸	ND
グルタミン	24
セリン	6
スレオニン	ND

すべてL体のアミノ酸を用い、各アミノ酸の濃度は25mg/lとした。

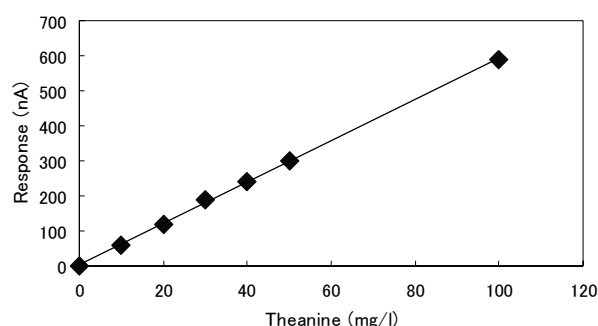


図-22 アミノ酸センサーのテアニンに対する応答

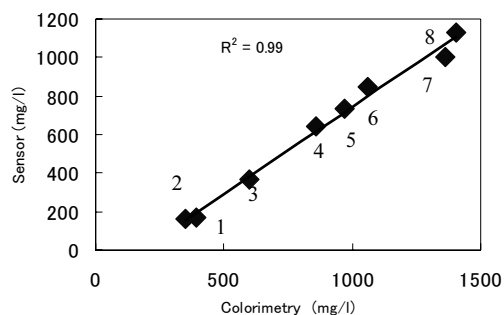


図-23 茶浸出液中の全アミノ酸分析値についてニンヒドリン比色法とセンサー法との比較

数字はkg当たりの荒茶価格を示す。

1: 300円, 2: 500円, 3: 800円, 4: 1,000円, 5: 1,500円, 6: 2,000円, 7: 3,000円, 8: 5,000円。

は見かけ上アミノ酸が存在するのと同じような電流値の減少が観察される。茶浸出液の測定にあたっては、含まれるカテキン類の濃度について注意が必要である。本法では、このような観点から、測定に際して添加する茶浸出液の量を、カテキン類に由来する電流値の減少のみられない程度(5ml)に定めた。

L-アミノ酸オキシダーゼ固定化膜を用いた茶葉抽出液中の全アミノ酸の測定は、すでに青木(1985)によって試みられている。この報告では、酵素反応によって生成する過酸化水素を過酸化水素電極で測定しているが、過酸化水素電極は電気化学活性を有するカテキン類に対しても応答するので、カテキン類の存在は測定の障害となった。従って、カテキン類を抽出液から除去することが必須で、そのために多量のカテキン類の吸着剤ポリビニルポリピロリドンを用いた前処理が必要であった。一方、酸素電極はカテキン類には直接応答しないので、カテキン類を多量に含む茶を測定対象にする場合、電極としては酸素電極を用いた方が過酸化水素電極を用いるよりも適しているものと考えられる。

上述の点に留意してL-アミノ酸オキシダーゼを固定化した膜を酸素電極に装着したセンサーを用いれば、前処理なしに茶浸出液中の全アミノ酸の濃度を測定できることが明かになった。本センサーを用いた全アミノ酸測定値は、従来法による測定値との相関は高いが、値は低めに傾向があった(図-23)。これは、表-14に示す通り、茶浸出液中のアミノ酸の中には本センサーに反応しないアミノ酸が含まれるためであると推察される。しかしながら、本センサーは上級煎茶や玉露に多く含まれるテアニンやアルギニンに対する応答が大きいため、図-23に示すように高級な茶に対しては高い値を示し、茶の品質評価への利用には好適であると考えられる。

本センサーに残された問題は、感度がやや低いため、茶の浸出液を濃い目にしなければ十分な測定精度が得られない点である。官能審査液や標準的な浸出法で得られた茶浸出液のアミノ酸測定が精度よくできるようさらに改良が必要である。この点に関してb-2において検討した。

b-2 茶浸出液中の全アミノ酸とグルタミン酸のフローインジェクション同時分析

L-アミノ酸オキシダーゼを用いた酵素センサーによって、茶浸出液中の全アミノ酸濃度の測定が可能であった(b-1)。さらにこれを省力化するためにゴボウを用いたカテキン類センサー(HORIEら, 1994)と同様のフロー

分析化することも可能で(HORIEら, 1993)、この場合には、通常の茶浸出液を試料として用いることができた。さらに茶のうま味にとって重要と考えられるグルタミン酸についても同様のフロー法で測定できる(堀江ら, 1992c)。この場合は、酸素電極とグルタミン酸オキシダーゼ固定化膜を組み合わせている。しかしながら、このような方法では、試料液と緩衝液との交換操作がまだ煩雑で1時間当たり10試料程度の測定が限度であった。しかも単一成分しか測定できないため、グルタミン酸と全アミノ酸の定量が必要な場合、装置および作業量が2倍必要となる。そこで、本節では、さらなる迅速簡便化をすすめるため、フローインジェクション分析法の導入を試み、グルタミン酸と全アミノ酸の同時定量ができるよう改良を加えた。

1) 実験方法

(1) 試薬と酵素膜

L-アミノ酸オキシダーゼを固定化した膜を旭化成から、グルタミン酸オキシダーゼを固定化した膜を電気化学計器から購入した。緩衝液はpH6.4, 1/15Mの粉末のリン酸緩衝液を和光純薬から購入し、蒸留水に溶かし用いた。他の試薬は特級品を、水は蒸留水を用いた。

(2) 酵素センサー

ガルバニ電池式溶存酸素電極BO-G型(エイブル)の先端に、直径5mmの円形に整形したL-アミノ酸オキシダーゼ固定化膜を装着し、ナイロンメッシュとOリングで固定したものをアミノ酸センサーとし、グルタミン酸オキシダーゼ固定化膜を同様に固定したものをグルタミン酸センサーとした。各々のセンサーは、専用のフローセル(エイブル, 東京)に装着した。

(3) 実験装置

実験装置の概略を図-24に示す。センサー部分の温度を一定に保つため、HPLC用カラムオーブン(556C

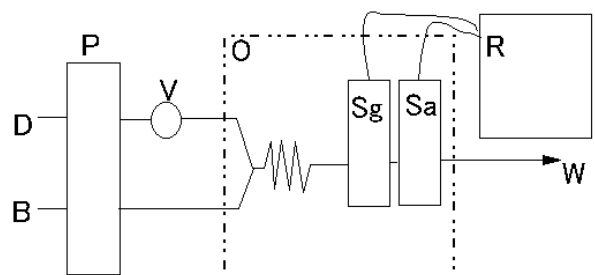


図-24 全アミノ酸、グルタミン酸のフローインジェクション分析装置

D: 蒸留水, B: 緩衝液, P: ポンプ, V: インジェクションバルブ, Sg: グルタミン酸センサー, Sa: アミノ酸センサー, O: カラムオーブン, R: レコーダー, W: 廃液。

型、ジーエルサイエンス)を恒温槽として用い、槽内に2種類の酵素センサーを設置した。温度は30℃に設定した。緩衝液と水は、それぞれマルチチャンネルのペリスタリックポンプ(MP-4, ギルソン)で送液した。100 μ lのサンプルループを装着したインジェクションバルブ(タイプ50, レオダイン)を恒温槽の外壁に取り付け、常時送液された水を通した。試料の注入は、1mlのディスプレイブルシリンジを用いてサンプルループを満たした試料を、バルブを切り替えることによって行った。2本のチューブを通過した液を恒温槽内で混合し、グルタミン酸センサー、アミノ酸センサーの順に通過後、廃液溜に送った。センサーで得られる電流信号は抵抗を用いて電圧信号に変換後、2ペンレコーダーでチャート紙に記録した。

(4) 試料の測定

本アミノ酸センサーは、多種類のアミノ酸に応答するが、茶中に多く含まれるアミノ酸の中では、テアニンに対する応答が最大であった(堀江ら1992b; HORIEら, 1993)ので、テアニンを標準物質として用いた。一方、グルタミン酸センサーではグルタミン酸ナトリウムを標準物質として用いた。3gの煎茶を審査茶碗に入れ、官能審査に用いる方法、すなわち180mlの熱水で5分間浸出後、2号濾紙(アドバンテック)で濾過したものを茶浸出液試料とした。サンプル注入後の電流変化をレコーダーのチャートから読みとり、あらかじめ標準品を用いて作成した検量線から茶浸出液中の全アミノ酸およびグルタミン酸の濃度を計算した。

また、本茶浸出液を20倍に希釈後、後藤ら(1993b)の方法によるHPLCにより主要なアミノ酸の濃度を測定し、センサーによって得られた値と比較した。

2) 結果

本測定装置で得られたテアニン及びグルタミン酸測定時のチャートを図-25に示す。各酵素の基質であるテアニンとグルタミン酸の溶液を注入すれば、1分以内に再現性のよいシグナルが得られた。さらに、グルタミン酸センサーはテアニンにはほとんど応答せず、逆にアミノ酸センサーもグルタミン酸にはほとんど応答しなかった。以後の測定においては、両センサーとも、ベースラインからの電流の低下を読みとった。

本装置では、マルチチャンネルのポンプを利用して、緩衝液と水を送液し、試料は水側のインジェクションバルブから注入するため、2本のチューブの内径の比率を変えることにより、測定する試料の希釈率を調節できる。そこで、試料注入側のチューブの内径を1mmに固定し、

緩衝液側の内径を1mmから3mmまで変化させて、種々の濃度の標準物質を注入し、電流応答を比較した(図-26)。緩衝液側のチューブの内径を太くすると、試料は希釈されて濃度が低下するため応答は小さくなったが、測定できる範囲は広がった。通常の茶の浸出法では、上級茶中のアミノ酸の濃度は1,000mg/l程度と考えられ

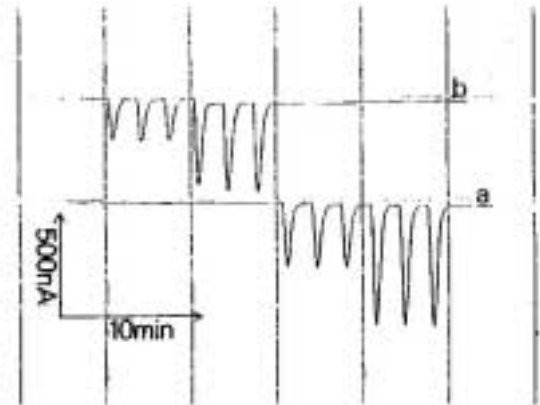


図-25 テアニンとグルタミン酸に対する応答

a: アミノ酸センサーの出力, b: グルタミン酸センサーの出力。グルタミン酸200mg/l, グルタミン酸400mg/l, テアニン500mg/l, テアニン1000mg/lの順に各々3回ずつ注入した。

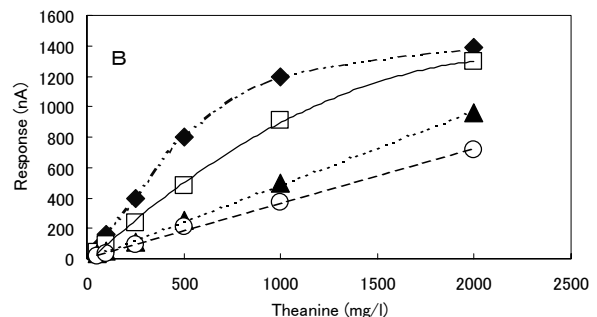
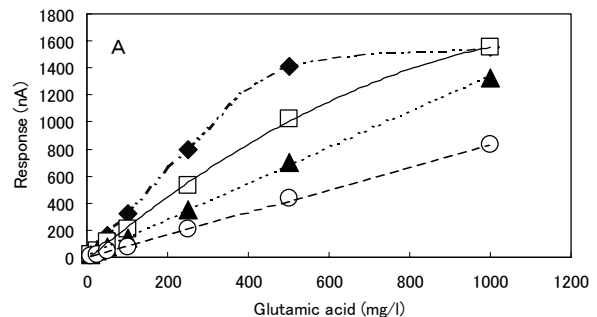


図-26 緩衝液と蒸留水の混合割合とセンサー応答の関係

A: グルタミン酸センサー, B: アミノ酸センサー。緩衝液を送るチューブの内径, ○: 3mm, ▲: 2mm, □: 1.5mm, ◆: 1mm。蒸留水(試料注入)側のチューブ内径は1mmに固定した。

る（下徳ら，1982）ため，本実験ではこの濃度まで十分測定できる内径 2mm のチューブを選択した．このことにより，希釈等の処理をせず，茶浸出液を直接注入することが可能になった．

次に，ポンプの回転数を変えることにより流速を変化させた時の，信号の強度および再現性について検討した（表-15）．流速を大きくすると，応答と再現性が低下するものの，シグナルが得られるまでの時間は短縮される傾向にあった．そこで，本装置では再現性のあまり低下しない程度の流速，3.4ml/min に設定した．本条件では 2 分毎に試料の注入が可能であった．

次に，茶浸出液に標準物質を一定濃度添加し，回収率を調べた（表-16）．その結果，テアニン，グルタミン酸とも 100% 近い回収率で回収できた．

実際の茶浸出液を測定した結果を図-27 に示す．各種荒茶から，官能審査の要領で抽出後，濾過したものを，そのまま注入し測定した．一方，同じ浸出液を希釈後，HPLC により個別アミノ酸濃度を定量し，テアニン，グルタミン酸，アルギニン等 7 種類の主要な遊離アミノ酸の合計量をもとめた．その結果，HPLC で定量した遊離アミノ酸濃度の合計値とアミノ酸センサーで得られた全アミノ酸濃度の間には，相関係数 ($r^2=0.99$) と極めて高い相関が得られたが，センサーで得られた測定値は HPLC で得られたものより常に低い値を示した．グ

ルタミン酸に関しても，2つの方法による測定値の間に相関係数 ($r^2=0.95$) とかなり高い相関が得られたものの，センサーで得られた測定値は HPLC で得られたものより常に高い値を示した．

生産地及び価格の異なる荒茶及び，アミノ酸添加の表示のある煎茶から浸出液を調製し，本装置を用いて測定し，あらかじめテアニン及びグルタミン酸を用いて作成した検量線を用いて濃度表示した（図-28）．各産地とも，高価な茶ほど全アミノ酸濃度及びグルタミン酸濃度が高い傾向を示した．D1 及び D2 はグルタミン酸ナトリウムの添加が表示から明らかな茶を示す．D2 は官能的にはグルタミン酸ナトリウム添加の判別が困難であったが，グルタミン酸の濃度は，他の荒茶と比べて著しく高かった．官能的に明らかにグルタミン酸ナトリウムの味がする茶 D1 では，さらに高いグルタミン酸濃度が認められた．

3) 考 察

前節では電気化学計器製のポーラログラフ式酸素電極を用いていたが，ここではエイブル製のガルバニ式酸素電極を用いた．この変更理由は，応答の迅速化，および 2つのセンサーを直列につなぐ際のデッドボリュームの縮減である．電気化学計器製の酸素電極では，隔膜が厚く応答が鈍いため分析の迅速化に限界があり，また電極の表面積が大きいためフローセルのデッドボリューム

表-15 流速と測定時間及び再現性との関係

流速* (ml/min)	測定時間** (s)	センサー応答 (nA)***	
		アミノ酸	グルタミン酸
1.7	80	317 ± 3	670 ± 5
3.4	45	289 ± 3	630 ± 5
5.1	30	280 ± 6	614 ± 8
6.8	25	286 ± 16	563 ± 19

* 廃液の流速を測定した値．

** アミノ酸センサーでシグナルのピークが得られるまでの時間．

*** テアニン，グルタミン酸各々 500mg/l の溶液に対する電流応答．5 回測定した値についての（平均値）±（標準偏差）．

表-16 各センサーにおけるテアニンとグルタミン酸の回収率

アミノ酸センサー			グルタミン酸センサー		
添加量* (mg/l)	測定値 (mg/l)	回収率 (%)	添加量 (mg/l)	測定値 (mg/l)	回収率 (%)
0	100	—	0	32	—
200	300	100	25	57	100
400	486	97	50	87	103

* テアニンを添加した．

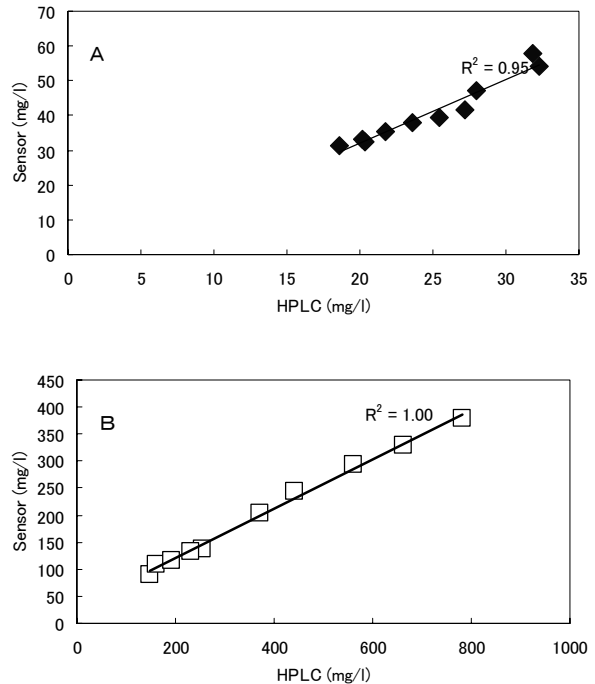


図-27 センサーと高速液体クロマトグラフィーによる茶浸出液測定値の比較

A: グルタミン酸, B: 全アミノ酸.

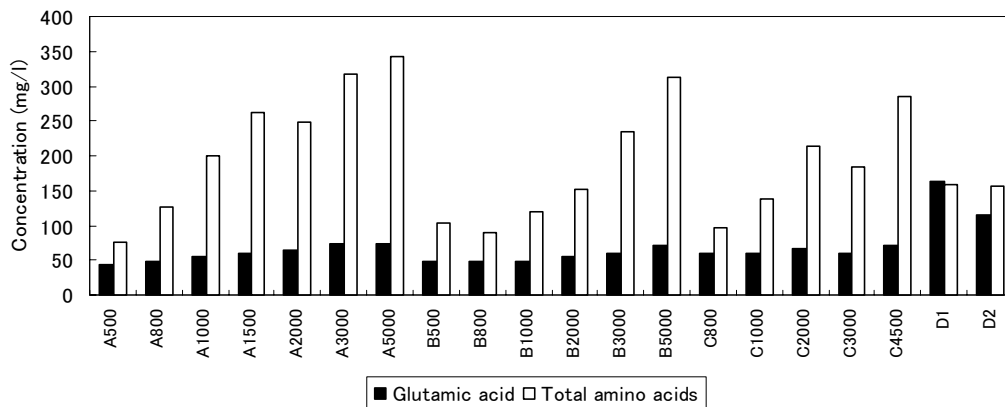


図-28 価格の異なる荒茶及びグルタミン酸添加茶の浸出液の分析

A, B, C は生産地, 500, 800 等は kg 当たりの価格 (円) を示す. D1, D2 はグルタミン酸ナトリウムの添加が表示されている茶.

が大きくなる。一方エイブル製の酸素電極は電極自体が細く、しかも隔膜は薄く応答が早い実験の目的にはより適するものと考え、酸素電極とフローセルをエイブル製へと変更した。その結果、フローインジェクション分析法を用いて、2分間隔で試料の連続注入が可能で、注入後1分以内に全アミノ酸及びグルタミン酸の定量が可能となった。本装置では、前節で述べた酵素センサーを用いた方法に比べ、測定時間を3分の1程度に短縮し、しかも2成分を同時に分析することを可能にした。また、HPLCによるアミノ酸分析と比べれば、本装置では測定時間が数十分の1で、試料の前処理も、茶浸出液をそのまま注入できるのではあるかに簡単である。このように、本装置を用いることによりアミノ酸の分析が著しく迅速・簡便化される。

本法で得られた測定値は既存の方法による定量値との間で非常に高い相関関係が得られた(図-27)。しかしながら、アミノ酸センサーで得られた値は、HPLCにより定量されたアミノ酸の合計値と比べて常に低い値を示した。このことについては、本センサーはテアニンには高い応答を示すが、グルタミン酸やアスパラギン酸には応答しないことを前節において示しており、このことが、アミノ酸センサーで求めた値がHPLCで求めたアミノ酸濃度の合計量よりも低いことの原因であると考えられる。一方、グルタミン酸センサーでは、HPLCによる定量値より常に高い値を示した。これは、通常茶浸出液中のグルタミン酸の濃度があまり高くないため、測定条件の下限に近いところでの分析となり、グルタミン酸以外の物質の影響を受けやすくなるためであろう。茶浸出液では、カテキン類やアスコルビン酸等還元性の物質を多く含むため、溶存酸素濃度は低い。酸素濃度の

低下を測定する本法では、このような茶浸出液を測定する場合には数値が高めにでる傾向がある。さらに、試料の粘性等の物理化学性も影響しているものと推定される。

ここでは、アミノ酸センサーで得られた値を全アミノ酸濃度、グルタミン酸センサーで得られた値をグルタミン酸濃度として記載したが、以上のことから、これらの値をそのまま既存の方法で得られた定量値と比較することはできない。そのためには、さらに多くの試料について分析を行い、適切な回帰式を求めるとも考えられる。

上記のような問題点も残されてはいるが、本装置の特徴である簡便・迅速性を生かせば、茶の品質評価にとって非常に有益な情報が得られるものと期待される。一般に高品質な緑茶にはアミノ酸が多く含まれるとされ、なかでも、中川ら(1973)は、茶浸出液中のテアニン及びアルギニン濃度と品質、味、小売り価格の間に高い正の相関関係を認めている。また、向井ら(1992)も、アミノ酸のなかでもテアニン及びアルギニンは価格との間で相関関係が非常に高いことを報告している。本装置に組み込んだアミノ酸センサーは、テアニンやアルギニンに対して高い応答がみられる(表-14)ことから、アミノ酸センサーの測定値と品質や価格の間には高い相関が認められることが期待される。実際に、フローインジェクション法に基づく本装置でも、価格の高い茶ほど高い測定値が得られた(図-28)。従って、本アミノ酸センサーによる測定値は、既存の方法によるアミノ酸濃度の合計値と数値は一致しないものの、相対的な品質を簡便に評価するには適するものと考えられる。

一方、通常茶試料ではグルタミン酸の含量は5mg/g以下(向井ら, 1992; 後藤ら, 1994b)であるが、添加茶と呼ばれるアミノ酸を添加した茶には10mg/g

を越えるものもみられる。後藤ら(1992)は、イオンメータを用いたナトリウムイオンの測定によるアミノ酸添加の簡易判別を提唱しているが、グルタミン酸を定量するのがより直接的な方法である。本装置での分析値によると(図-28)、グルタミン酸ナトリウム添加茶では、普通の煎茶に比べてグルタミン酸濃度及びグルタミン酸/全アミノ酸比の非常に高い値が認められた。本グルタミン酸センサーは、測定の精度にやや難はあるものの、グルタミン酸添加の判別には十分使えるものと考えられる。

最近LEEら(1996)も茶浸出液中の全アミノ酸とグルタミン酸を順次定量するバイオセンサーを開発した。彼らのシステムにおいても、L-アミノ酸オキシダーゼとグルタミン酸オキシダーゼを用いており、酵素反応の結果生じるアンモニアを蛍光検出する方法をとっている。しかしながら彼らの装置を用いた場合、70分間に標準物質以外には2~3試料しか分析できず、さらに蛍光検出器は酸素電極に比べれば著しく高価で、しかも複雑なフロー系を必要とするため装置自身が高価なものとなる。それに比べ本装置では、低価格な酸素電極を用いて簡単なフロー系を利用しており、全アミノ酸とグルタミン酸を1時間に20試料以上分析できる。また、緩衝液以外の試薬類は必要としない点でも、茶の流通現場での使用にはより適するものと考えられる。本装置ではフローインジェクション分析法を導入したことにより、カテキンセンサー等別のセンサーを新たに加えること、センサーからの出力をパソコン等で計測・処理する(堀江, 1995b)こと、あるいはオートサンプラーを付属させて自動計測に発展させることも比較的容易と思われる。

3 要 約

本章においてはバイオセンサーを利用した茶の主要品質成分の定量法について述べた。茶成分のなかでも苦渋味成分であるカテキン類とうま味成分であるアミノ酸については、迅速分析への期待が大きい。前者については1、後者については2において述べた。いずれの方法を用いても1試料あたり数分から10分以内で測定が完結できるのが特徴である。

1-aにおいては、ポリフェノールオキシダーゼを用いたカテキン類の迅速分析法について述べた。まず、市販酵素を光架橋性樹脂で包括固定した膜と酸素電極を組み合わせたセンサーを試作したが、測定するにつれ応答性が著しく低下するため実際に利用できるものにはならなかった。そこでポリフェノールオキシダーゼ活性を示す植物組織切片と酸素電極を組み合わせたセンサーを作

製した。茶に最も多く含まれるカテキン類であるEGCgに対する応答性や組織片の強固さ、入手しやすさなどを加味した結果、多種類の植物組織片のなかからゴボウが選択された。ゴボウ切片と酸素電極を組み合わせたセンサーでは安定な測定が可能で、茶浸出液を測定した結果、センサーでの電流応答と比色による定量値との間で高い相関が得られた。本法では、酵素などの特殊な試薬を必要としないため、発展途上国の茶生産現場においても品質管理に応用できる可能性がある。

カテキン類のなかでも渋味の強いものは、EGCgとECgを中心とするエステル型カテキン類である。そこで1-bにおいてはエステル型カテキン類の迅速分析法を検討した。ここでは酵素タンナーゼを利用し、酵素反応の結果生じる没食子酸に由来するpHの低下を、ISFET-pHメータで検出するフローインジェクション系とした。この方法では、3分間に1試料の注入が可能で、実際の茶浸出液について測定した結果は、HPLCで測定したEGCgとECgの濃度の和と高い相関を示した。試料自身に由来するpH変化は、別のpH-ISFET電極を用いてキャンセルしているのが本システムの特徴である。

2ではアミノ酸の迅速分析法について検討を行ったが、2-aにおいてはGABA、2-bにおいては全アミノ酸とグルタミン酸の分析法を開発した。

GABAはギャバロン茶の示す血圧上昇抑制作用の有効成分として重要であるため、2-aにおいてはGABAのフロー分析法を開発した。原理は酵素GABAseの作用により還元されるNADPHを蛍光検出するものである。GABAseはガラスビーズ上に固定化し、カラムにつめて酵素リアクター化し、下流に蛍光検出器を配置した。この方法では、ギャバロン茶に含まれる程度の濃度のGABAを4分間に1試料測定できた。茶試料由来の蛍光物質による分析への障害に対しては、HPLC用のカラム充填剤(C18)を詰めたミニカラムにおいてトラップすることにより解決した。

茶の味の評価や品質と最も相関の高い成分はテアニンなどの遊離アミノ酸である。そこで、2-bにおいては遊離アミノ酸のバイオセンサーについて検討した。b-1においては、L-アミノ酸オキシダーゼ固定化膜と酸素電極を組み合わせたアミノ酸センサーについて検討した。このセンサーは茶中の主要な遊離アミノ酸のなかではテアニンに対して最も高い応答を示し、その他アルギニンやグルタミンといった高品質の茶に多いアミノ酸への応答が比較的高かった。その結果、茶浸出液を分析した場

合得られた全アミノ酸の濃度は、高価格の茶ほど高い応答が得られた。

b-2においては、2種類のセンサーを直列に並べることにより全アミノ酸とグルタミン酸の同時分析を可能とし、フローインジェクション分析法化することにより迅速化し、1時間に20試料以上の分析を可能とした。実際の茶浸出液について分析した結果、同一地域では高価な茶の浸出液ほど全アミノ酸の濃度が高い傾向が認められた。また、グルタミン酸については、グルタミン酸添加茶の浸出液において、著しく高い濃度を示し、グルタミン酸添加茶の判別にも有効であることが示唆された。

ここに提示したバイオセンサー法は一度装置が組まれば、操作が簡単で茶浸出液を濾過後そのまま測定に用いることができる。また、緩衝液を少量使用するだけなので、廃液の問題もほとんどなく、有害物質も使用しない。このようなことから、メーカーから専用機として生産され、酵素膜や酵素リアクター等の供給がなされれば、誰にでも手軽に利用できるようになり、茶生産の各工程で分析結果をフィードバックして生産の改善に活かしたり、品質成分に基づく製品価格の設定や包装への成分表示が可能になるものと期待される。

しかし、問題点は装置や酵素膜・酵素リアクターの供給である。特に、酵素膜や酵素リアクターは永久に活性を維持するとは言いえないため、必要に応じて供給できるようなメーカーのサポート体制が重要となる。

IV 総括

茶は嗜好品であるが故に、収量以上に品質が重要視される。より高品質の茶を生産しようという生産者の意欲は他の作物より遥かにかに大きいものの、品質を評価するものは官能による以外はなく、たとえば何年か前に生産した茶と今年の茶の品質の相異を生産者が客観的に評価することは非常に困難である。一方、化学分析法を用いれば、化学成分値というかたちでの記録を残すことは可能であり、50年前の茶と現在の茶を比較することも可能である。品質上重要な化学成分として、テアニン、グルタミン酸などの遊離アミノ酸、EGCgなどのカテキン類、カフェイン、アスコルビン酸が挙げられるが、化学分析には分析機器類が必要で、しかもその扱いには熟練を要するため、生産者・加工者・流通業者自らが分析を行うことは非常に困難である。そこで、より簡便迅速に品質成分を定量できる手法の開発を試みた。

茶の迅速な主要品質成分分析法として、2つの立場か

ら開発にとりくんだ。ひとつは、1試料あたりの分析時間を20分以内とし、重要成分を同時に分析する方法であり、もうひとつは、分析時間を数分から10分以内とし、単一（あるいは2種類）の成分に絞って分析する方法である。前者としてはキャピラリー電気泳動法であり、後者としてバイオセンサー法を採用した。また、前者は大学や試験研究機関、茶の流通に関係する大企業等におけるより精密な分析を指向し、後者は一般の茶生産者団体や、流通・加工業者の品質評価のための使用を念頭においたものである。

II-1において、キャピラリー電気泳動法により、茶浸出液あるいは茶葉中のテアニン、カフェイン、主要カテキン類、アスコルビン酸といった主要な品質成分が同時に定量できることを述べた。さらに、茶葉からの成分抽出法として、メタリン酸水溶液とエタノールの混合溶液を用いればよいことを示した。従来法では、それぞれの成分を分析するには、抽出や分析をそれぞれ別々に行う必要があり、またHPLCなどを用いた分析もそれぞれ1時間くらいかけて、別々に行う必要があった。これに対して、本法では1度の試料調製の後、20分間の分析操作により、テアニン、カフェイン、カテキン類、アスコルビン酸の定量が可能となった。このことにより省力化や分析時間の短縮が大幅に進んだ。試料調製が1度ですむことと、さらにキャピラリー電気泳動法においては必要とされる試料量が少なくてすむことにより、従来法に比べて微量の試料にも対応可能となった。II-1-cにおいては、小さな新芽ひとつあれば、これらの成分を分析できることを示した。この方法は、茶業研究においては分析の効率化をもたらすだけでなく、精密化をもたらすことが期待される。もちろん、主要品質関連成分が一度に分析できる本法は、茶の理化学的品質評価法として多方面での利用が期待される。

茶の品質と最も関連の深い成分は、アミノ酸であり、茶のアミノ酸のうち最も多く含まれている成分がテアニンである。キャピラリー電気泳動法においてもテアニンの分析は可能であるが、装置が高価であることや、操作にやや熟練を要することなどが問題として残っている。そこで、バイオセンサー法の利用を試みた。L-アミノ酸オキシダーゼを固定化した膜と酸素電極とを組み合わせたアミノ酸センサーが、茶の全アミノ酸の分析に有効であることが示され（III-2-b-1）、さらに、フローインジェクション分析法との組み合わせの結果、2分毎に1試料のアミノ酸分析が可能になった。得られた結果は、高価な茶ほど高い応答を示したので、品質評価に使

用できることが示された(Ⅲ-2-b-2)。本法では、グルタミン酸も同時に定量できるため、グルタミン酸ナトリウムなどで味付けした茶の判別にも有効と考えられる。バイオセンサー法の特徴は、分析できる成分数は限定されているが、茶浸出液の濾液をシリンジで注入するだけという簡単な操作で、2分という短時間で結果を出せる点にある。品質がよいとされるものほど、アミノ酸センサーの応答が大きいことから、装置化されれば流通過程での品質評価への利用が期待される。

さらに、GABAはギャバロン茶として販売される特殊な茶の重要な品質成分である。酵素GABAseと蛍光検出器を組み合わせたフローインジェクション法を開発した(Ⅲ-2-a)。GABAはアミノ酸分析計を用いても測定できるものの、装置は高価で、また分析に時間がかかりすぎる。この方法なら1試料あたり4分しかかからないため、ギャバロン茶製造工場などで製品を管理し、製造法へフィードバックするのにも使えるのではないかと期待される。

カテキン類については、茶の味として重要な苦渋味に関わっているだけでなく、最近では抗酸化性等健康への寄与の面でも注目されている。これらを簡便に測定できるバイオセンサーとして2種類のセンサーを開発した。ひとつは、ゴボウ組織と酸素電極を組み合わせたもので、ゴボウ中のポリフェノールオキシダーゼのカテキン類を酸化する作用を用いている(Ⅲ-1-a)。この方法では、茶浸出液を緩衝液で薄めて注入するだけで、測定は1試料10分以内に完結する。特殊な試薬類を必要とせず、安価に定量できるのが特徴である。一方、タンナーゼを固定化したリアクターの下流にpH測定用の半導体電極を配置したフローインジェクション法も開発した(Ⅲ-1-b)。タンナーゼではガロイル基を遊離させ、pHを下げるため、渋味を有するEGCgやECgに反応する。測定時間は1試料あたり3分間であった。これらカテキン類のセンサーについては、キャピラリー電気泳動法のように個々のカテキン類まで分離して定量することは

できないものの、茶の苦渋味の強さやカテキン類のおおよその濃度などを把握するためには簡便に利用できる。

最近特にカテキン類については、HPLCによる新しい分析法の開発が盛んである。そこで、本論文で述べた方法と最新のHPLC法の結果を比較することにより、開発した手法の特徴を明らかにしたい(表-17)。HPLC法については、現在報告されている中で最も優れた結果を集めたものである。Ⅱにおいて述べたキャピラリー電気泳動法では、茶の品質評価にとって重要な主要カテキン類4種類を分離することを目的としたのに対して、HPLCを用いれば微量に含まれるカテキン類まで分離定量できる。また、HPLCでは多様な検出法が選択でき、電気化学検出法(梅垣, 1996)や化学発光検出法(NAKAGAWAら, 1997)などの高感度分析法を用いれば、キャピラリー電気泳動法に比べて検出感度を何桁も上げることは可能である。しかし、微量のカテキン類は茶の味や品質にとってあまり重要とは考えられておらず、また、生体内でのカテキン類の動態を追跡するような特殊な場合以外は微量分析の必要はない。むしろ、品質上重要であるテアニンやアスコルビン酸を同時に、しかもHPLCよりも迅速に分析できる点に、ここで開発したキャピラリー電気泳動法の特徴がある。一方タンナーゼを利用したフローインジェクション法については、検出感度は低いが、逆に茶浸出液を希釈することなく分析できるので実用上の利点と考えられる。この方法ではエステル型カテキン類の総量しか測定できないものの、3分間で簡単に渋味成分を分析できる点は、製造現場や流通過程での品質検査には理想的であるといえる。

このように従来からその重要性が指摘されていた成分については、キャピラリー電気泳動法による同時分析、バイオセンサー法による迅速分析の手法を開発できた。カテキン類やアミノ酸は茶の品質や味にとって重要な成分であり、特にテアニンなどのアミノ酸は官能的な味の評価との相関が高い。このような既知の成分の分析値から味についての官能評価の点数を説明する目的での重回

表-17 カテキン類の分析法についての比較

	分析成分	検出限界	分析時間	他成分との同時分析
HPLC* ¹	8以上	pmol/ml* ⁴	30分	カフェイン
HPCE* ²	4~5	nmol/ml	20分	カフェイン, テアニン, アスコルビン酸
FIA* ³	1	100nmol/l	3分	不可

*1 高速液体クロマトグラフ法 現在報告されている中で最も優れた結果から抜粋。

*2 キャピラリー電気泳動法(参照Ⅱ-1)。

*3 フローインジェクション分析法(参照Ⅲ-1-b)。

*4 電気化学検出法あるいは発光検出法を用いた場合。

帰分析が試みられたこともあるが、既知成分のみでは完全には説明できなかった（中川ら，1973）。今後は、既存の品質成分以外の成分寄与を考察していく必要がある。

一方、茶の有機酸については、腎結石の生成など健康との観点からシュウ酸の定量がなされた例があるものの、品質や味との関連で研究されたことはなかった。そこで、キャピラリー電気泳動法を用いた茶の有機酸分析法を開発した（II-2-a）。本法は主要有機酸だけではなく、アスパラギン酸、グルタミン酸といったうま味のあるアミノ酸まで定量できることを特徴とする。本法を応用した研究の結果、シュウ酸は茶葉中に1%程度含まれるだけでなく、味にも寄与することが明らかになった（II-2-b）。シュウ酸は舌に残るあと味に寄与するが、この味をクエン酸が抑制することなども明らかにされ、さらに、クエン酸自身の茶の味への寄与についても現在検討中である。このように、簡便に有機酸を定量できる手法が開発されたことにより、茶の品質や味についての新たな知見が得られつつある。今後は有機酸も含め、従来は品質や味との関連で調べられていなかった成分まで含めて茶の味について考察し、官能的な茶の味を化学成分によって解析することが必要である。

本研究においては茶成分分析のための様々な手法を開発した。しかしながら、単に手法を開発するだけでは片手落ちで、開発した手法が茶葉研究や茶業の発展に寄与しなければあまり意味がない。キャピラリー電気泳動法については、今後装置が普及するとともに、多様な場面で利用されていくものと確信する。一方、バイオセンサーについては、測定そのものは簡便であるが、酵素膜や酵素リアクターを調製するには技術を要する。また、小型でルーチン分析に適した装置を開発することも必要である。これらの問題を解決するには、今後メーカーとタイアップした研究開発も必要であり、需要に応じて酵素膜や酵素リアクターを供給できる体制の確立が待たれる。

茶の理化学的品質評価は従来より一部の試験研究機関によってのみ行われてきた。ここに示した手法は生産現場・流通現場での分析評価をも指向し、簡便さ・迅速さを特徴としている。今後、ここに述べた手法が研究現場のみならず、生産や流通の過程でそれぞれ手法の特徴を活かしながら有効に利用され、高品質緑茶の生産・供給に役立てられることを期待したい。

V 摘 要

緑茶の品質を客観的に、しかも迅速に評価するための

手法を開発した。一つの手法はキャピラリー電気泳動法により重要な品質成分を一斉に分析する方法であり、もう一つの手法は酵素反応を利用して、特定の1~2成分を迅速に測定する方法である。

キャピラリー電気泳動法のキャピラリーゾーン電気泳動のモードにより、茶の主要成分であるテアニン、カフェイン、5種類のカテキン類の分離が可能であった。これは茶カテキン類の分析にキャピラリー電気泳動法を用いた世界で最初の試みである。さらに、カフェインの分離の改善と、アスコルビン酸の感度向上のため、ミセル動電クロマトグラフィーのモード、及び、フォトダイオードアレイ検出器による2波長検出を適用し、茶浸出液及び茶葉試料中の主要成分の同時分析法を確立した。この方法は、茶葉1枚毎の成分分析にも適用できた。

茶葉中にシュウ酸や他の有機酸が含まれていることは知られているものの、それらの品質や味覚上の特性については知られていなかった。そこで、キャピラリー電気泳動法を用いて茶浸出液中の主要有機酸と、うま味を示すアミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸を同時に定量できる手法を開発した。この手法を用いて茶試料を分析した結果、茶浸出液中のシュウ酸が舌に残るあと味を示すことが明らかにされた。

キャピラリー電気泳動法では、多成分の同時分析が可能であるが、1試料の分析には12~20分要すること、機器そのものが高価であることなどのため、このままの形で生産や流通の現場での品質評価に利用することは困難である。そこで、特に重要な成分を現場で安価に分析できる方法の開発を目指し、酵素反応を利用した迅速分析法を開発した。

茶の苦渋味成分であるカテキン類の分析には、ポリフェノールオキシダーゼによる酸化反応に伴う酸素濃度の低下の計測が有効であった。ポリフェノールオキシダーゼを含むゴボウ切片を酸素電極と組み合わせることにより、カテキン類のバイオセンサーが開発された。特に渋味の強い成分であるEGCg, ECG等エステル型カテキン類については、酵素タンナーゼの作用によるpHの低下を半導体pH電極でモニターすることにより、定量可能であった。

血圧上昇抑制作用のあるギャバロン茶の主要成分GABAについては、酵素GABAseにより生成したNADPHの蛍光を計測することにより定量が可能であった。また、茶の品質と最も相関の高い成分であるアミノ酸については、L-アミノ酸オキシダーゼ膜を酸素電極と組み合わせたバイオセンサーにより測定可能であり、

フローインジェクション分析法と組み合わせ、茶浸出液中の全アミノ酸とグルタミン酸を同時定量できる装置を開発した。

多成分が同時に分析できるキャピラリー電気泳動法は、研究現場や流通業者の品質管理室で詳細なデータを収集するのに適し、1~4分間に1試料分析できる酵素を用いた方法は生産や流通の各過程で品質をチェックするのに適する。開発したこれらの手法が、多様な場面で利用され、高品質な茶の生産や、流通の適正化に寄与することが期待される。

引用文献

- 1) AOKI, K., R. SHINKE and H. NISHIRA (1976): Purification and some properties of yeast tannase. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 79-85.
- 2) 青木 智 (1985): 固定化酵素膜-過酸化水素電極による茶樹の炭水化物と遊離アミノ酸の定量. 日作紀, **54**, 235-240.
- 3) BEECHER, G.R., B. A. WARDON and H. MERKEN (1999): Analysis of tea polyphenols. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **220**, 267-270.
- 4) BOTRE, F., F. MAZZEI, M. LANZI, G. LORENTI and C. BOTRE (1991): Plant-tissue electrode for the determination of catechol. *Anal. Chim. Acta*, **255**, 59-62.
- 5) BRAND, U., L. BRANDES, V. KOCH, T. KULLIK, B. REINHARDT, F. RUTHER, T. SCHEPER, K. SCHUGERL, S. WANG, X. WU, R. FERRETTI, S. PRASAD and D. WILHELM (1991): Monitoring and control of biotechnological production process by Bio-FET-FIA-sensors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 167-172.
- 6) CANCELON, P. F. and C. R. BRYAN (1993): Use of capillary electrophoresis for monitoring citrus juice composition. *J. Chromatogr. A*, **652**, 555-561.
- 7) CANCELON, P.F. (1995): Capillary electrophoresis: A new tool in food analysis. *Journal of AOAC International*, **78**, 12-15.
- 8) CHANDLER, G. K., J. R. DODGSON and M. J. EDDOWES (1989): ISFET-based enzyme sensors for urea: enzyme-modified ISFETs and column-immobilized enzyme flow injection analysis. *Anal. Proc.*, **26**, 154-156.
- 9) CHEN, J. S., J. F. PRESTON, C. WEI, P. HOOSHAR, R. A. GLEESON and M. R. MARSHALL (1992): Structural comparison of crustacean, potato, and mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1326-1330.
- 10) CHEN, R. L. and K. MATSUMOTO (1995): Enzymatic determination of gallotannin in green-tea infusions by a photometric flow injection analytical method. *Analytical Sciences*, **11**, 777-780.
- 11) CHEYNIER, V., N. BASIRE and J. RIGAUD (1989): Mechanism of trans-caffeoyl tartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1069-1071.
- 12) CHIARI, M., N. DELL'ORTO and L. CASELLA (1996): Separation of organic acids by capillary electrophoresis in buffers containing divalent metal cations. *J. Chromatogr. A*, **745**, 93-101.
- 13) COSNIER, S. and C. INNOCENT (1993): A new strategy for the construction of tyrosinase-based amperometric phenol and o-diphenol sensor. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **31**, 147-160.
- 14) DALLUGE, J. J. and B. C. NELSON (2000): Determination of tea catechins. *J. Chromatogr. A*, **881**, 411-424.
- 15) DESCHAMPS, A. M., G. OTUK and J-M. LEBEAULT (1983): Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 55-59.
- 16) DESHPANDE, M.V. and E.A.H. HALL (1990): An electrochemically grown polymer as an immobilization matrix for whole cells: application in amperometric dopamine sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, **5**, 431-448.
- 17) DEVEVRE, O., D. P. PUTRA, D.P., B. BOTTON, J. GARBAYE (1994): Sensitive and selective method for the separation of organic acids by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **679**, 349-357.
- 18) DING, Z., S. KUHR and U. H. ENGELHARDT (1992): Influence of catechins and theaflavins on astringent taste of black tea brews. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **195**, 108-111.
- 19) DING M. Y., R. P. CHEN and G. A. LUO (1997): Simultaneous determination of organic acids and inorganic anions in tea by ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, **764**, 341-345.
- 20) EFFENHAUSER, C. S., G. J. BRUIN and A. PAULUS (1997): Integrated chip-based capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **18**, 2203-2213.
- 21) EGGINS, B. R., C. HICKEY, S. A. TOFT and D.M. ZHOU (1997): Determination of flavonols in beers with tissue biosensors. *Anal. Chim. Acta*, **347**, 281-288.
- 22) FUJITA, S. and T. TONO (1988): Purification and some properties of polyphenol oxidase in eggplant (*Solanum melongena*). *J. Sci. Food Agric.*, **46**, 115-123.
- 23) 古谷弘三・原 利男・久保田悦郎 (1961): 煎茶の貯蔵条件が品質に及ぼす影響について. 茶技研, **25**, 42-46.
- 24) 後藤 正 (1989): 近赤外法による茶の総繊維の定量分析. 茶研報, **70**, 67-80.
- 25) 後藤 正・柴田隆夫・山口吉克 (1990): 茶芽の全窒素および総繊維含有率の経時変化. 静岡茶試研報, **15**, 43-47.
- 26) GOTO, T., T. MUKAI, H. HORIE, T. ANAN, H. TAKAYANAGI and K. IKEGAYA (1991): Utilization of near infrared spectroscopy for the analysis of components in green tea. In: Proceedings of the International Symposium on Tea Sciences. pp 81-85. Organizing Committee of ISTS, Shizuoka.
- 27) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博・谷口正樹 (1991): イオンメーターによる茶葉中のアンモニウムの簡易分析法. 茶研報, **74**, 11-13.
- 28) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博 (1992): 添加茶の化学成分による判別法. 茶研報, **76**, 33-38.
- 29) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博 (1993a): 全国茶品評会入賞茶の化学成分 (第3報) 個別アミノ酸の含有量. 茶研報, **78**, 29-35.
- 30) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博. (1993b): 緑茶中の主要アミノ酸のOPAによるプレカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィーによる分析. 茶研報, **77**, 29-33.
- 31) 後藤哲久・堀江秀樹・向井俊博・千羽智子・増田英昭・

- 藁科二郎 (1994a) : 1993 年産品評会入賞茶の化学成分. 茶研報, **79**, 19-24.
- 32) 後藤哲久・堀江秀樹・大関由紀・増田英昭・藁科二郎 (1994b) : 化学成分からみた市販緑茶の品質. 茶研報, **80**, 23-28.
- 33) GOTO, T., Y. YOSHIDA, I. AMANO and H. HORIE (1996a) : Chemical composition of commercially available Japanese green tea. *Food & Food Ingredients Journal of Japan* **170**, 46-52.
- 34) GOTO, T., Y. YOSHIDA, M. KISO and H. NAGASHIMA. (1996b) : Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J. Chromatogr. A*, **749**, 295-299.
- 35) 後藤哲久・長嶋 等・吉田優子・木曾雅昭 (1996) : 市販緑茶の個別カテキン類とカフェインの分析. 茶研報, **83**, 21-28.
- 36) GRAHAM, L. T. and M. H. APRISON (1966) : Fluorometric determination of aspartate, glutamate, and γ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Anal. Biochem.*, **15**, 487-497.
- 37) HAKAMATA, K. (1990) : Anaerobically treated tea and its hypotensive effects. *JARQ*, **24**, 105-110.
- 38) HALL, G.F., D.J. BEST and A.P.F. TURNER (1988) : The determination of *p*-cresol in chloroform with an enzyme electrode used in organic phases. *Anal. Chim. Acta*, **213**, 113-119.
- 39) 原 征彦・松崎妙子・鈴木建夫 (1987) : 茶成分のアンジオテンシン I 阻害能について. 農化, **61**, 803-808.
- 40) HARA, Y. and M. HONDA (1990) : The inhibition of α -amylase by tea polyphenols. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1939-1945.
- 41) 原 利男・松村正弘 (1994) : 近赤外分光法による緑茶の成分特性調査. 茶研報, **79**, 25-30.
- 42) 原 利男 (1996) : 近赤外分光法の緑茶品質管理への利用. 茶研報, **82**, 67-80.
- 43) 原田秀逸・金丸憲一・笠原康夫 (2000) : クエン酸とうま味物質の味覚相互作用について. 日本味と匂学会誌, **7**, 621-622.
- 44) HARBOWY, M. E., D. A. BALENTINE (1997) : Tea chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **16**, 415-480.
- 45) 秦 忠夫 (1976) : 食品と酵素. 「食品化学」藤巻正生・金田尚志・秦 忠夫・柴崎一雄・不破英次・稲垣長典・坂村貞雄・門田 元・松本 博編. pp 138-151. 朝倉書店, 東京.
- 46) HENDJI, A.M.N., N. JAFFRESIC-RENAULT, C. MARTELET, P. CLECHET, A. A. SHUL'GA, V.I. STRIKHA, L.I. NETCHPORUK, A.P. SOLDATKIN and W.B. WLODARSKI (1993) : Sensitive detection of pesticides using a differential ISFET-based system with immobilized cholinesterases. *Anal. Chim. Acta*, **281**, 3-11.
- 47) HONDA, M. and Y. HARA (1993) : Inhibition of rat small intestinal sucrase and α -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 123-124.
- 48) HORIE, H., S. FUKATSU, T. MUKAI, A. TAKEUCHI and T. GOTO (1991) : Quality evaluation of medium class green tea. In: Proceedings of the International Symposium on Tea Sciences. pp 155-159. Organizing Committee of ISTS, Shizuoka.
- 49) 堀江秀樹 (1991) : バイオセンサー. 農機誌, **53**, 105-109.
- 50) 堀江秀樹・深津修一・向井俊博・後藤哲久 (1992a) : 官能審査と近赤外分光光度法による市販煎茶の品質評価. 茶研報, **76**, 39-44.
- 51) 堀江秀樹・向井俊博・後藤哲久・川中道夫・下原 融 (1992b) : 酵素センサーを用いた茶浸出液中の全アミノ酸濃度の定量. 茶研報, **75**, 33-37.
- 52) 堀江秀樹・向井俊博・後藤哲久・川中道夫・下原 融 (1992c) : センサーを利用した茶の品質評価 2. グルタミン酸とタンニンの測定. 茶研報, **76**別, 85-86.
- 53) HORIE, H., S. FUKATSU, T. MUKAI, T. GOTO, M. KAWANAKA and T. SHIMOHARA (1993) : Quality evaluation on green tea. *Sensors and Actuators B*, **13-14**, 451-454.
- 54) 堀江秀樹・向井俊博・後藤哲久・権田実敏・川中道夫 (1993) : 酵素センサーを用いた茶浸出液中のアミノ酸のフローインジェクション分析. 茶研報, **78**, 53-60.
- 55) HORIE, H., T. MUKAI, T. GOTO, M. KAWANAKA and T. SHIMOHARA (1994) : Measurement of tea catechins using biosensors. 食工誌, **41**, 433-435.
- 56) 堀江秀樹・向井俊博・後藤哲久・永田忠博 (1994) : ^{27}Al -NMR を用いた茶浸出液中のアルミニウムの存在状態の解析. 食科工, **41**, 120-122.
- 57) HORIE, H. and G.A. RECHNITZ (1995a) : Flow injection determination of malic acid and DOPA using an apple tissue reactor. *J. Flow Injection Anal.*, **12**, 91-97.
- 58) HORIE, H. and G.A. RECHNITZ, G.A. (1995b) : Enzymatic flow injection determination of gamma-aminobutyric acid. *Analytical Letters*, **28**, 259-266.
- 59) HORIE, H. and G.A. RECHNITZ (1995c) : Hybrid tissue/enzyme biosensor for pectin. *Anal. Chim. Acta*, **306**, 123-127.
- 60) 堀江秀樹 (1995a) : 化学センサーを用いた食品分析. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, **166**, 61-67.
- 61) 堀江秀樹 (1995b) : バイオセンサーを用いた茶の品質評価. 農及園, **70**, 705-708.
- 62) 堀江秀樹・向井俊博・木幡勝則. (1996) 茶呈味成分のフローインジェクション分析. 日本味と匂学会誌, **3**, 588-591.
- 63) HORIE, H., T. MUKAI and K. KOHATA (1997a) : Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **758**, 332-335.
- 64) HORIE, H., T. MUKAI, K. KOHATA and T. GOTO (1997b) : Flow injection analysis of (-)-epigallocatechin gallate in green tea infusions with an immobilized tannase reactor. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, 27-30.
- 65) 堀江秀樹・木幡勝則・双木良和 (1997) : 全国茶品評会入賞茶の化学成分 (第5報) 1994 年審査会入賞茶のカテキン組成. 茶研報, **85**, 9-12.
- 66) HORIE, H. and K. KOHATA (1998a) : Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation. *J. Chromatogr. A*, **802**, 219-223.
- 67) HORIE, H., Y. YAMAUCHI and K. KOHATA (1998b) : Analysis of organic anions in tea infusions using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **817**, 139-144.
- 68) 堀江秀樹・山内雄二・木幡勝則 (1998a) : 緑茶の硬水浸出液に生じる白色沈殿. 食科工, **45**, 364-367.
- 69) 堀江秀樹・山崎祐作・山内雄二・木幡勝則・森山弘信 (1998b) : 茶に含まれるシュウ酸について. 茶研報, **87**別, 118-119.

- 70) 堀江秀樹・山崎祐作・山内雄二・木幡勝則 (1999a) : キャピラリー電気泳動法による茶主要成分同時分析法の改良. 茶研報, **87**, 59-65.
- 71) 堀江秀樹・木幡勝則 (1999b) : 茶の味成分に関する新たな検討. 日本味と匂学会誌, **8**, 665-668.
- 72) 堀江秀樹・澤井祐典・木幡勝則 (1999c) : ギャバロン茶中の γ -アミノ酪酸のフローインジェクション分析. 食科工, **46**, 494-496.
- 73) 堀江秀樹・山内雄二・木幡勝則 (1999d) : キャピラリー電気泳動法による茶抽出液中のナトリウムイオン及びアンモニウムイオンの同時分析. 茶研報, **87**, 81-84.
- 74) HORIE, H., K. KOHATA (2000) Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **881**, 425-438.
- 75) 堀江秀樹・木幡勝則 (2000a) : 各種緑茶中のシュウ酸含量とその味への寄与. 茶研報, **89**, 23-27.
- 76) 堀江秀樹・氏原ともみ・木幡勝則 (2000b) 茶の味成分に関する新たな検討 2. 玉露の味についての考察. 日本味と匂学会誌, **7**, 611-614.
- 77) 堀江秀樹・山崎祐作・山下陽市・山内雄二・木幡勝則 (2000c) : 添加茶・発色茶判別のための分析データ. 茶研報, **88**, 79-85.
- 78) 堀田 博 (1989) : 茶カテキン類の抽出・精製法. 野茶試報 B, **3**, 65-74.
- 79) 池田奈実子・向井俊博・堀江秀樹 (1993) 一番茶芽及び秋芽の化学成分含量の品種間差違. 茶研報, **77**, 13-21.
- 80) 池ヶ谷賢次郎・増田道則 (1986) 茶の全遊離アミノ酸類の新簡易定量法. 茶研報, **63**, 35-36.
- 81) IKEGAYA, K., M. IWAMOTO, J. UOZUMI and K. NISHINARI (1987) : Near infrared spectra of caffeine and its related compounds and their application to determination of caffeine content in green tea. 食工誌, **34**, 254-258.
- 82) 池ヶ谷賢次郎・高柳博次・阿南豊正・岩元睦夫・魚住純・西成勝好・趙 来光 (1988) : 近赤外分光法による煎茶およびまっ茶の全窒素・カフェイン・全遊離アミノ酸類・テアニンおよびタンニンの定量. 野茶試報 B, **2**, 47-90.
- 83) 池ヶ谷賢次郎・高柳博次・阿南豊正 (1990) : 茶の分析法. 茶研報, **71**, 43-74.
- 84) IKEGAYA, K., K. SUZUKI, T. KATO, K. RACHI and M. SHINJI (1991) : Quality control of Sencha by NIR method. In: Proceedings of the International Symposium on Tea Sciences. pp 150-154. Organizing Committee of ISTS, Shizuoka.
- 85) 伊藤善孝 (1998) : ISFET による pH センサの開発と実用化. 化学センサ, **14**, 8-17.
- 86) JACOBY, W.B. (1962) : Enzymes of γ -amino butyrate metabolism. *Methods Enzymol.*, **5**, 765-778.
- 87) JANOVIKZ-KLAPP, A., F. RICHARD and J. NICOLAS (1989) : Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochem.*, **28**, 2903-2907.
- 88) JORGENSON, J.W. and K.D. LUCACS (1981) : Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.*, **53**, 1298-1302.
- 89) 香川 彰 (1993) : ホウレンソウのシュウ酸をめぐる諸問題 (2) 品質向上のための低シュウ酸化を中心に. 農及園, **68**, 906-912.
- 90) 神谷智恵子・小川美江子・大川博徳 (1991) : 茶に含まれるシュウ酸及びカルシウム量. 食衛誌, **32**, 291-300.
- 91) 軽部制夫 (1998) : バイオセンシング. 「バイオセンシング」軽部制夫編. pp 1-46. 啓学書店, 東京.
- 92) 加藤司郎・鈴木忠直 (1970) : 緑茶浸出液中のアミノ酸類と味評価との関係について. 食工誌, **18**, 388-393.
- 93) KENNEY B. Y. F. (1991) : Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **546**, 423-430.
- 94) KIMURA, J., N. ITO, N. and T. KURIYAMA (1989) : A novel blood glucose monitoring method an ISFET biosensor applied to transcutaneous effusion fluid. *J. Electrochem. Soc.*, **136**, 1744-1747.
- 95) 衣笠 仁・竹尾忠一・福元研治・石原正美 (1992) : 茶飲料の高圧処理による殺菌効果と成分変化. 農化, **66**, 707-712.
- 96) KLAMPFL C. W., W. BUCHBERGER (1997) : Determination of low-molecular-mass organic acids by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*, **19**, 221-229.
- 97) KLAMPFL, C.W., W. BUCHBERGER, M. TURNER, and J.S. FRITZ (1998) : Determination of underivatized amino acids in beverage samples by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **804**, 349-355.
- 98) 久保田悦郎・中川致之 (1973) : 茶のアミノ酸類の自動分析法. 茶技研, **45**, 51-57.
- 99) 久保田悦郎・原 利男・中川致之 (1975) : 茶の色の測定と品質評価への応用. 食工誌, **22**, 222-227.
- 100) KULYS, J. and R.D. SCHMID (1990) : A sensitive electrode for phenol monitoring. *Analytical Letters*, **23**, 589-597.
- 101) LEE, C.Y., V. KAGAN, A.W. JAWORSKI and S.K. BROWN (1990) : Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 99-101.
- 102) LEE, M-H, R.T.C. CHEN and K. MATSUMOTO (1996) : Fluorometric biosensing of the total amino acid content and glutamate content of green tea infusions using an automated multi-channel flow system. *Biosci. Biotech. Bioche.* **60**, 99-102.
- 103) LUONG, J.H., P. BOUVRETTE and K.B. MALE (1997) : Developments and applications of biosensors in food analysis. *TIBTECH*, **15**, 369-377.
- 104) 前田 茂・中川致之 (1977) : 各種緑茶の総合的理化学分析. 茶研報, **45**, 85-92.
- 105) 松本邦男 (1991) : 食品工業における酵素センサの利用. 食品工業, **34** (16), 20-30.
- 106) MAZZEI, F., F. BOTRE, G. LORENTI and F. PORCELLI (1996) : Peroxidase based amperometric biosensors for the determination of γ -aminobutyric acid. *Anal. Chim. Acta*, **328**, 41-46.
- 107) MCGHILE, T.K. (1993) : Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, **634**, 107-112.
- 108) 三輪悦夫・高柳博次・中川致之 (1978) : 葉位別にみた茶葉の化学成分含量. 茶研報, **47**, 48-52.
- 109) 宮地鉄治 (1941) : 全窒素量と茶の品質との関係並に全窒素量に依る日本緑茶の分類に関する研究. 埼玉茶研要報, **19**, 1-75.
- 110) 宮崎秀雄・田中信之 (1992) : 茶原葉の物性及び化学成分とかまもり茶品質との関係解析. 九農研, **54**, 37.

- 111) MIZUTANI, F., S. YABUKI and M. ASAI (1991): L-malate-sensing electrode based on malate dehydrogenase and NADH oxidase. *Anal. Chim. Acta*, **245**, 145-150.
- 112) 向井俊博・堀江秀樹・後藤哲久 (1992): 煎茶の遊離アミノ酸と全窒素の含量と価格の関係について. *茶研報*, **76**, 45-50.
- 113) MURACHI, T. and M. TABATA (1988): Use of immobilized enzyme column reactors in clinical analysis. *Methods Enzymol.*, **137**, 260-287.
- 114) 村松敬一郎 (1991): 茶の生理機能研究のまとめと展望. 「茶の科学」村松敬一郎編. pp 205-213. 朝倉書店, 東京.
- 115) 村田容常・本間清一 (1998): ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御-最新の研究動向-. *食土工*, **45**, 177-185.
- 116) 長嶋善次・中川致之 (1956): 茶葉中の遊離アミノ酸について (第3報) 微生物定量による theanine の定量法. *農化*, **10**, 637-640.
- 117) 中川致之・鳥井秀一 (1964): 茶のカテキンに関する研究 (第3報) 品種によるカテキンの差違. *茶研報*, **22**, 101-104.
- 118) 中川致之 (1969): 緑茶の滋味と化学成分の組成との相関. *食工誌*, **16**, 252-258.
- 119) 中川致之 (1970): 緑茶の味と成分の関係. *食工誌*, **17**, 154-163.
- 120) 中川致之 (1973): 渋み物質のいき値とたんぱく質に対する反応性. *食工誌*, **19**, 531-537.
- 121) 中川致之・石間紀男 (1973): 緑茶煎汁の化学成分と味の関係. *食工誌*, **20**, 119-125.
- 122) 中川致之・天野いね (1974): 窒素分析による煎茶の品質評価. *食工誌*, **21**, 57-63.
- 123) 中川致之・阿南豊正・岩浅 潔 (1977): 夏茶と春茶の香味特性と化学成分の相関. *茶技研*, **53**, 74-81.
- 124) 中川致之 (1995): イオンクロマトグラフ法による茶のナトリウム, アンモニウムイオンの分析. *茶研報*, **81**, 43-48.
- 125) NAKAGAWA, K. and T. MIYAZAWA (1997): Chemiluminescence-high-performance liquid chromatographic determination of tea catechin, (-)-epigallocatechin 3-gallate, at picomole levels in rat and human plasma. *Anal Biochem.*, **248**, 41-49.
- 126) 中原経子 (1974): 緑茶の有機酸含量ならびに緑茶浸出液中の有機酸. *栄養と食糧*, **27**, 36-38.
- 127) NAKAKUKI, H., H. HORIE, K. KOHATA (1999): Rapid analysis of methylated xanthines in teas by an improved high-performance liquid chromatographic method using a polyvinylpyrrolidone pre-column. *J. Chromatogr. A.*, **848**, 523-527.
- 128) 中村実久・大城邦保 (1983): 茶に関する研究 (第8報) 貯蔵によるビタミンCの変化. *琉球大農学部報*, **30**, 231-234.
- 129) NELSON, B.C., P.C. UDEN, G.F. ROCKWELL, K.M. GORSKI and B.Z. AGUILERA (1997): Determination of oxalate in parenteral nutrition solutions by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **771**, 285-299.
- 130) NEWMAN, J.D. and A.P.F. TURNER (1994): Biosensors: The analyst's dream? *Chemistry & Industry* (May), 374-378.
- 131) 西岡五夫 (1991): 茶のポリフェノール. 「茶の科学」村松敬一郎編. pp 115-123. 朝倉書店, 東京.
- 132) 小原正美 (1966): 味の種類. 「食品の味」. pp 15-37. 光琳全書, 東京.
- 133) 大石貞夫 (1989): 茶業の沿革. 「新茶業全書」静岡県茶業会議所編, pp 1-33. 静岡県茶業会議所, 静岡.
- 134) 大熊廣一・高橋仁志・谷沢誠一・堀池静子・赤星亮一 (1996): リアクター型バイオセンサシステムによるマイクロ波乾燥葉中のビタミンC計測. *食土工*, **43**, 668-673.
- 135) 大森 薫 (1983): 化学成分による煎茶と玉露の判別. *茶研報*, **58**, 28-35.
- 136) 大森正司・矢野とし子・岡本順子・津志田藤二郎・村井敏信・樋口 満 (1987): 嫌気処理茶 (ギャバロン茶) による高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制作用. *農化*, **61**, 1449-1451.
- 137) 大森正司 (1991): 茶の血圧上昇抑制効果. 「茶の科学」村松敬一郎編. pp 167-175. 朝倉書店, 東京.
- 138) 大澤好明・桜井令子・谷澤誠一・大熊廣一・安平仁美 (1995): リアクター型バイオセンサによる味噌の成分分析. *味噌と科学と技術*, **43**, 97-104.
- 139) OSBORNE, B.G. and T. FEARN, (1986) Near infrared spectroscopy in food analysis. pp 1-19. Longman Scientific & Technical, New York.
- 140) OWUOR, P.O. and M. OBANDA (1995): Changes of astringency of black tea due to the variations in individual theaflavins. In Proceedings of '95 international tea-quality-human health symposium. pp 201-205, Shanghai, China.
- 141) PALMER, J.K. (1963): Banana polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, **38**, 508-513.
- 142) RIEDEL K. (1994): Whole-cell and tissue sensors. In: Food biosensor analysis. ed. WAGNER G. and G.G. GUILBAULT, pp 123-150, MarcelDekker, New York.
- 143) RUZICKA, J. and H.H. HANSEN (1975): Flow injection analysis. Part 1. A new concept of fast continuous analysis. *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145-157.
- 144) 西條了康・大沢キミ子 (1981): しゃ光によるカテキン類ならびに窒素成分の生成制御. *茶技研*, **54**, 40-46.
- 145) 酒戸弥次郎 (1950): 茶の成分に関する研究 (第3報) 新amide "theanine" に就いて. *農化*, **23**, 262-267.
- 146) 芝 時孝・出村要三郎 (1925): 茶分析法. *茶試彙報*, **1**, 1-11.
- 147) 下徳敏夫・市川弘美・阿南豊正・高柳博次・池ヶ谷賢次郎 (1982): 茶の入れ方と化学成分の溶出量との関係. *茶研報*, **55**, 43-50.
- 148) St. CLAIR, III R L. (1996): Capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **68**, 569R-586R.
- 149) 末松伸一・久延義弘・西郷英昭・松田良子・原 京子・小松美博 (1992): 茶類飲料缶詰の成分変化に及ぼす pH の影響. *食工誌*, **39**, 178-282.
- 150) 末松伸一・久延義弘・西郷英昭・松田良子・小松美博 (1995): 緑茶中のカフェイン, カテキン類測定のための新しい抽出法. *食土工*, **42**, 419-424.
- 151) 田島 真 (1995): 食品産業におけるバイオセンサ利用の現状. *食品と開発*, **30**, 32-35.
- 152) 高橋 薫・石間 尚 (1938): 製茶の滋味と可溶性成分の関係に就て 第1報. *茶試彙報*, **14**, 31-43.
- 153) 高柳博次・阿南豊正・池ヶ谷賢次郎・中川致之 (1985): 茶芽の熟度と成分変動. *茶研報*, **61**, 20-25.
- 154) 高柳博次・阿南豊正・池ヶ谷賢次郎 (1989): 高速液体クロマトグラフィーによる茶のアミノ酸類の定量. *茶研報*, **69**, 29-34.
- 155) 竹内敦子・澤井祐典・深津修一 (1994a): 茶葉中のアミ

- ノ酸量に及ぼす嫌気処理の温度と時間の影響. 茶研報, 80, 13-16.
- 156) 竹内敦子・澤井祐典・深津修一・佐波哲次・山下正隆 (1994b): 嫌気処理による γ -アミノ酪酸増加はチャの組織の熟度に依存する. 茶研報, 80, 17-21.
- 157) 滝野慶則・今川 弘 (1974): 紅茶のクリーミングに対するタンナーゼ処理の影響. 食工誌, 22, 286-291.
- 158) 谷本宏太郎 (1998): 最近の輸出茶の評判をさぐる. 茶, 51, 40-44.
- 159) 寺部 茂 (1995): キャピラリー動電クロマトグラフィー. 「キャピラリー電気泳動 基礎と実際」 本田 進・寺部 茂編. pp 53-73. 講談社, 東京.
- 160) 寺田志保子・前田有美恵・増井俊夫・鈴木裕介・伊那和夫 (1987): 各種茶(緑茶, 半発酵茶, 紅茶) 浸出液およびティードリンクス中のカフェイン, カテキン組成. 食工誌, 34, 20-27.
- 161) 戸張正義 (1992): ギャバロン茶について. 食品加工技術, 12, 65-71.
- 162) 辻 啓一・竹尾忠一 (1983): 緑茶の緩衝能曲線. 農化, 57, 461-463.
- 163) UCHIYAMA, S., M. TAMATA, Y. TOFUKU and S. SUZUKI (1988): A catechol electrode based on spinach leaves. *Anal. Chim. Acta*, 208, 287-290.
- 164) 上野健二・古谷弘三・原 利男・久保田悦郎 (1960): 茶貯蔵における窒素ガス封入の効果について. 茶技研, 23, 65-69.
- 165) 梅垣敬三・江指隆年・手塚雅勝・小野明子・佐野満昭・富田 勲. (1996): 電気化学検出 HPLC による食品中の茶カテキン類分析法. 食衛誌, 37, 77-82.
- 166) UPDIKE, S. J. and G. P. HICKS (1967): The enzyme electrode. *Nature*, 214, 986-988.
- 167) VAUGHN, K.C. and S.O. DUKE (1984) Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.*, 60, 106-112.
- 168) BOLOTOVSKY, V. and N. KIM (1998): Ascorbic acid determination with an ion-sensitive field effect transistor-based peroxidase biosensor. *Anal. Chim. Acta*, 359, 143-148.
- 169) WALKER, J.C., S.E. ZAUGG and F.B. WALKER (1997): Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 781, 481-485.
- 170) WANG, J. and M.S. LIN, (1988): Mixed plant tissue-carbon paste bioelectrode. *Anal. Chem.*, 60, 1545-1548.
- 171) WELLNER, D. and L.A. LICHTENBERG (1971): Assay of amino acid oxidase. *Methods Enzymol.*, 17B, 593-597.
- 172) 山口優一・山本(前田)万里・辻 顕光. (1997): カテコールを内部標準としたカテキン類及びカフェインの HPLC 分析. 茶研報, 84, 32-34.
- 173) 山本(前田)万里 (1996): 茶の体調節機能. 食科工, 43, 653-662.
- 174) 山本(前田)万里・田原常史・山口優一・辻 顕光 (1996): 茶葉中食物繊維等品質成分の熟度および製茶法による変動. 食科工, 43, 1309-1313.
- 175) 山中英明・久能昌朗・塩見一雄・菊池武昭 (1983): 酵素法による食品中のシュウ酸の定量. 食衛誌, 24, 454-458.
- 176) 築瀬好充・田中静夫・青野英也・杉井四郎 (1974): シャ光の程度が茶の収量ならびに品質に及ぼす影響. 茶技研, 47, 48-53.
- 177) 安井明美・永井俊郎・小泉秀夫 (1992): ノンサプレッサイオンクロマトグラフィーによる野菜中の硝酸イオン, 硫酸イオン及びシュウ酸イオンの定量. 食科工, 39, 722-725.
- 178) 良部文久・海野知紀 (1998): カテキンの機能と食品への利用. *New Food Industry*, 40, 27-32.
- 179) 吉富 浩・仲川政一 (1994): ゴボウの鮮度保持技術. 鹿児島農試報, 23, 17-20.
- 180) ZHU, Q. Y., A. ZANG, D. TSANG, Y. HUANG and Z-Y. CHEN (1997): Stability of green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4624-4628.
- 181) BIO INDUSTRY 編集部 (1997): 食品分析用センサー. *BIO INDUSTRY*, 14, 53-54.
- 182) 化学研究室 (1970): 茶の公定分析法. 茶試報, 6, 167-172.
- 183) 酵素法による食品分析研究会編 (1989): 「酵素による食品分析法」 食品化学新聞社, 東京.

Development of New Analytical Methods to Evaluate the Quality of Green Tea

Hideki HORIE

Summary

Several analytical methods were developed to estimate the quality of green teas, objectively and rapidly. The two major approaches were; (1) simultaneous determinations of qualitatively important components using capillary electrophoresis, (2) rapid determination of one or two components applying enzyme reactions.

It was possible to separate the major quality components of tea, theanine, caffeine and five catechins, simultaneously applying the mode of capillary zone electrophoresis. This is the first report in the world to separate tea catechins using capillary electrophoresis. The analytical method for both tea infusions and tea leaves was established with applying the mode of micellar electrokinetic chromatography and the detection with two wavelengths, to improve the separation of caffeine and the sensitivity of ascorbic acid. This method could be applied to the analysis of the components of each tea leaf.

It has already been known that tea leaves contain oxalic acid and other organic acids, however there were no reports on their contributions to the quality or taste of tea. An analytical method was developed using capillary electrophoresis to determine the major organic acids and the amino acids that taste Umami in tea infusions. It was shown that oxalic acid in tea infusion produces an after-taste lingering on the tongue, based on the experiments using these methods.

It is not convenient enough to use these methods at the sites of production and marketing of tea, because it takes 12 to 20 min to analyze one sample and the instrument itself is very expensive. Quicker methods were developed, applying enzyme reactions, to establish cheaper analysis of the key components on site.

It was useful to measure the decrease in oxygen concentration caused by the oxidation of catechins by polyphenol oxidase, for the analysis of tea catechins. The biosensor for tea catechins was composed with the slice of burdock (*gobo*), which contains polyphenol oxidase, and an oxygen electrode. Ester-type catechins, (–)-epigallocatechin gallate and (–)-epicatechin gallate show astringency. The enzyme tannase hydrolyzes ester-type catechins and produces gallic acid. The concentrations of these catechins could be measured by monitoring the pH decrease, caused by the production of gallic acid, using a pH-ISFET (ion sensitive field effect transistor) electrode.

GABA (γ -amino butyric acid) enriched tea decreases the blood pressure. The active constituent GABA could be measured by monitoring the fluorescence of NADPH, which was produced by the enzyme reaction of GABAse. The content of amino acids shows a high correlation with tea quality.

Received: November 14, 2002

Kanaya Tea Research Station, 2769 Kanaya, Haibara, Shizuoka, 428-8501 Japan

Present Address:

Department of Physiology and Quality Science, 360 Kusawa, Ano, Mie, 514-2392 Japan

Amino acids in tea infusions could be measured by the biosensor, which combine L-amino acid oxidase and an oxygen electrode. Total amino acids and glutamic acid in tea infusion could be analyzed simultaneously with the instrument, which combined biosensors and a flow injection system.

Several important components can be analyzed simultaneously with the methods using capillary electrophoresis, which are good for data collection at laboratories. On the other hand, each sample can be measured within 1 or 4 min by the methods applying enzyme reactions, which are suitable to check the quality of teas at each stage of production and marketing. I hope these methods will be used in various situations and contribute to the production of teas of high quality and the elimination of unfair marketing.