

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4505598号  
(P4505598)

(45) 発行日 平成22年7月21日(2010.7.21)

(24) 登録日 平成22年5月14日(2010.5.14)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 21/35 (2006.01)

GO 1 N 21/35

Z

GO 1 N 21/27 (2006.01)

GO 1 N 21/27

F

GO 1 N 33/14 (2006.01)

GO 1 N 33/14

請求項の数 6 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2005-10131 (P2005-10131)  
 (22) 出願日 平成17年1月18日 (2005.1.18)  
 (65) 公開番号 特開2005-257676 (P2005-257676A)  
 (43) 公開日 平成17年9月22日 (2005.9.22)  
 審査請求日 平成20年1月8日 (2008.1.8)  
 (31) 優先権主張番号 特願2004-31814 (P2004-31814)  
 (32) 優先日 平成16年2月9日 (2004.2.9)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 501203344  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究  
 機構  
 茨城県つくば市観音台3-1-1  
 (73) 特許権者 596126465  
 アサヒ飲料株式会社  
 東京都墨田区吾妻橋一丁目23番1号  
 (74) 代理人 100106002  
 弁理士 正林 真之  
 (72) 発明者 山本 万里  
 静岡県掛川市旭台3-16  
 (72) 発明者 永井 寛  
 茨城県守谷市緑1丁目1番21号 アサヒ  
 飲料株式会社 飲料研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】茶葉中に含まれる化学成分の定量方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法であって、1000nmから2500nmの近赤外領域の波長を用いて前記茶葉の吸光度を測定し、この吸光度と前記茶葉中のメチル化カテキン量との相関に関する情報に基づいて、メチル化カテキン濃度未知の茶葉の吸光度からメチル化カテキン濃度を算出することを特徴とする茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法。

## 【請求項2】

前記情報は、定期的又は常時更新するものであることを特徴とする請求項1に記載の茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法。 10

## 【請求項3】

茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法であって、  
 前記メチル化カテキン濃度が既知の複数の標準試料を、略1000nmから略2500nmの波長を有する近赤外光を照射する近赤外分光光度計を用いて、前記標準試料の吸光度を測定する吸光度測定工程と、

この吸光度測定工程で測定したそれぞれの吸光度と、前記標準試料のメチル化カテキン濃度に基づいて単回帰法又は直線重回帰法の少なくともいずれか1つにより検量線を算出する検量線算出工程と、

メチル化カテキン濃度が未知の対象試料を前記標準試料と同じ波長における吸光度を測定し、この吸光度の値から前記検量線に基づいて前記対象試料のメチル化カテキン濃度を

算出する濃度算出工程と、を有することを特徴とする請求項1又は2記載の茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法。

【請求項4】

前記近赤外光の波長は、略1100nmから略2400nmである請求項3に記載の茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法。

【請求項5】

前記検量線算出工程における前記検量線の精度(SEP)が、0.4以下のものである請求項3又は4記載の茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法。

【請求項6】

茶葉中に含まれるメチル化カテキンを定量するプログラムであって、

10

このメチル化カテキン濃度が既知の複数の標準試料を、所定の波長を有する近赤外光を照射する近赤外分光光度計を用いて測定したそれぞれの吸光度と、前記標準試料のメチル化カテキン濃度に基づいて単回帰法又は直線重回帰法の少なくともいずれか1つにより検量線を算出するように指令する検量線算出工程と、

メチル化カテキン濃度が未知の対象試料を前記標準試料と同じ波長における吸光度の値から前記検量線に基づいて前記対象試料のメチル化カテキン濃度を算出するように指令する濃度算出工程と、

を有することを特徴とする茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法をコンピュータに実行させるためのプログラム。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、茶葉中に含まれる化学成分の定量方法に関する。さらに詳しくは、メチル化カテキン、カフェイン及びビタミン類の含有量を近赤外分光光度計により簡易迅速に測定する方法を開発する。

【背景技術】

【0002】

「べにふうき」、「べにふじ」、「べにほまれ」等の茶葉は、花粉症状を抑制するメチル化カテキンを多く含有しており、アレルギー抑制効果を有する飲料や食品として幅広く使用することができる。従って、これらの茶葉(生葉、荒茶、仕上げ茶等)に含まれている化学成分の含有量は、製造工程における品質管理のため迅速に測定する必要がある。例えば、茶葉中に含まれているメチル化カテキンの含有量は、5%未満である。このため、従来では測定方法として高速液体クロマトグラフ法(以下HPLC法とする)を用いていた(非特許文献1参照)。

30

【0003】

HPLC法は、各種の固体または液体を固定相とし、固定相を含むカラムに液体移動相の加圧した流れを用いて試料を通過させ、その一端に置いた試料混合物を適当な展開剤(移動相mobile phase)で移動させて、各成分の吸着性や分配係数の差異に基づく移動速度の差を利用してこれを相互分離する方法であり、これによって、マイクログラム量からグラム量の混合物を分離することが可能となる(非特許文献2参照)。

40

【0004】

【非特許文献1】村松敬一郎編「茶の化学」朝倉書店 1997年9月1日 p.119

【非特許文献2】古谷圭一監訳「分析化学」丸善株式会社 平成10年2月28日 p.103-130

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、HPLC法による化学成分の測定は、精度は高いが測定装置が高価であるという点と測定操作や試料作成が煩雑であるという点が難点となり、迅速さや簡便さが要求される製造工程における品質管理のための測定には適していない。また、茶葉中に含まれて

50

いるメチル化カテキンは数種類あるが、その総含有量は茶葉全体の数%程度である。従つてこれらのメチル化カテキンを同時に検出する場合、高い分解能を有する測定装置でなければ正確に検出することは困難である。

#### 【0006】

本発明は、以上の課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、生葉、荒茶、仕上げ茶等を含む茶葉中の化学成分の含有量を簡易迅速に測定する測定方法を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

以上のような目的を達成するために、本発明は、近赤外分光光度計を用いて化学成分濃度既知の茶葉の吸光度を測定し、この吸光度と前記茶葉中の化学成分量との相関に関する情報に基づいて、化学成分濃度未知の茶葉の吸光度から化学成分濃度を算出することを特徴とするものである。10

#### 【0008】

本発明は具体的に以下のようなものを提供する。

#### 【0009】

(1) 茶葉中に含まれる化学成分の定量方法であって、1000 nmから2500 nmの近赤外領域の波長を用いて前記茶葉の吸光度を測定し、この吸光度と前記茶葉中の化学成分量との相関に関する情報に基づいて、化学成分濃度未知の茶葉の吸光度から化学成分濃度を算出することを特徴とする茶葉中に含まれる化学成分の定量方法。20

#### 【0010】

(1)の発明によれば、近赤外領域の波長を用いることによって、試料を非破壊で迅速、かつ、簡便に多成分同時分析を行うことが可能となる。また、多くの化学成分が有するC - H、O - HもしくはN - H基が帰属する官能基は、近赤外線領域に特有の吸収領域があるため、この吸収領域の吸光度を測定することによって、茶葉中の化学成分量との相関に関する情報を得ることが可能となる。

#### 【0011】

(2) 前記情報は、定期的又は常時更新するものであることを特徴とする(1)に記載の茶葉中に含まれる化学成分の定量方法。

#### 【0012】

(2)の発明によれば、茶量と吸光度に関する情報を、定期的あるいは常時更新することで化学成分濃度未知の試料の濃度を最適化することが可能となっている。更新方法としては、年次毎にデータを取り直し、傾き等を適宜補正する方法が挙げられる。30

#### 【0013】

(3) 前記化学成分は、カテキン類、プリン塩基、及びビタミン類からなる群から選ばれる1種以上の成分である(1)又は(2)に記載の茶葉中に含まれる化学成分の定量方法。

#### 【0014】

(3)の発明によれば、化学成分をカテキン類、プリン塩基、及びビタミン類からなる群から選ばれる1種以上の成分としたことによって、本発明に係る定量方法の精度を上げることが可能となる。ここで「カテキン類」とは、エピカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、エピガロカテキンガレート、カテキン、ガロカテキン、メチル化カテキン及びこれらの光学異性体をいい、「プリン塩基」とは、主としてカフェインをいい、「ビタミン類」とは、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンB<sub>1</sub>及びビタミンB<sub>2</sub>をいう。

#### 【0015】

(4) 前記化学成分は、メチル化カテキンである(1)から(3)いずれかに記載の茶葉中に含まれる化学成分の定量方法。

#### 【0016】

(4)の発明によれば、化学成分をメチル化カテキンとしたことによって、本発明に係40

50

る定量方法の精度をより向上させることが可能となる。

**【0017】**

(5) 茶葉中に含まれる化学成分の定量方法であって、前記化学成分濃度が既知の複数の標準試料を、所定の波長を有する近赤外光を照射する近赤外分光光度計を用いて、前記標準試料の吸光度を測定する吸光度測定工程と、この吸光度測定工程で測定したそれらの吸光度と、前記標準試料の化学成分濃度に基づいて単回帰法又は直線重回帰法の少なくともいずれか1つにより検量線を算出する検量線算出工程と、化学成分濃度が未知の対象試料を前記標準試料と同じ波長における吸光度を測定し、この吸光度の値から前記検量線に基づいて前記対象試料の化学成分濃度を算出する濃度算出工程と、を有することを特徴とする茶葉中に含まれる(1)から(4)いずれかに記載の茶葉中に含まれる化学成分の定量方法。10

**【0018】**

(5) の発明によれば、吸光度検出工程において、メチル化カテキン濃度が既知の試料に所定の波長を有する近赤外光を照射することによってこの試料中のメチル化カテキンの吸光度を測定することが可能となる。また、検量線算出工程及び濃度算出工程において、単回帰法又は直線重回帰法を使用することによってメチル化カテキン濃度が未知の試料の濃度を正確、かつ、迅速に算出することが可能となる。

**【0019】**

ここで、「単回帰法又は直線重回帰法」とは、複数の変数間の関係を一次方程式( $y = ax + b$ )で表現する分析方法をいう。単回帰法を使用する場合は、試料に照射する近赤外光の波長は1種類であるが、直線重回帰法(MLRコンビネーションサーチ法、ステップサーチ法)を使用する場合は、複数種の試料を用いることが可能となる。そのため、同じ試料に異なる波長の近赤外光を照射し、直線重回帰法を用いることによって、より正確にメチル化カテキンの濃度を算出することが可能となる。20

**【0020】**

(6) 前記近赤外光の波長は、略1000nmから略2500nmである(5)に記載の茶葉中に含まれる化学成分の定量方法。

**【0021】**

(6) の発明によれば、近赤外光の波長を略1000nmから略2500nmとしたことによって、各化学成分の吸収領域を効率よく検出することが可能となる。30

**【0022】**

(7) 前記近赤外光の波長は、略1100nmから略2400nmである(5)又は(6)に記載の茶葉中に含まれる化学成分の定量方法。

**【0023】**

(7) の発明によれば、近赤外光の波長を略1100nmから略2400nmとしたことによって、各化学成分のうち特に、カテキン類の吸収領域を効率よく検出することが可能となる。スキャンタイプのNIRにおいてカテキン類は、下記の波長を用いて検出することが好ましい。

**【0024】**

例えば波長を、略1220nm、略1400nm、略1650nm、略1770nm、略1900nm、略2070nm、からなる群より選ばれる2以上としたことによってカテキン類特有の吸収領域をより効率良く検出することが可能となる。ここで「略1220nm」とは、1210nm~1230nmをいい、「略1400nm」とは、1390nm~1410nmをいい、「略1650nm」とは、1640nm~1670nmをいい、「略1770nm」とは、1760nm~1790nmをいい、「略1900nm」とは、1890nm~1920nmをいい、「略2070nm」とは、2050nm~2080nmをいう。40

**【0025】**

また波長を、略1100nmから略2400nmの任意の波長としたことによって、カテキン類の中でも、特にエピガロカテキンガレート及びエピカテキンの吸収領域をより効50

率良く検出することが可能となる。この場合において、測定波長は1波長であってもよいが、2以上の波長を組み合わせて用いることが好ましく、4以上の波長を組み合わせて用いることがより好ましい。例えば、1110～1140 nm、1650～1670 nm、1620～1650 nm、及び2090～2120 nmの任意の波長を組み合わせて測定することが挙げられる。

#### 【0026】

また波長を、略1500 nmから略2400 nmの任意の波長としたことによって、カテキン類の中でも、特にエピガロカテキンの吸収領域をより効率良く検出することが可能となる。この場合においても上記と同様、測定波長は1波長であってもよいが、2以上の波長を組み合わせて用いることが好ましく、4以上の波長を組み合わせて用いることがより好ましい。例えば、1520～1550 nm、1660～1680 nm、1990～2010 nm及び、2260～2280 nmの任意の波長を組み合わせて測定することが挙げられる。

#### 【0027】

(8) 前記検量線算出工程における前記検量線の精度(ＳＥＰ)が、0.4以下のものである(5)から(7)いずれかに記載の茶葉中に含まれる化学成分の定量方法。

#### 【0028】

(8)の発明によれば、検量線算出工程で算出した検量線の精度(検量線評価時(予測値)の標準誤差:ＳＥＰ)を0.4以下とすることによって、メチル化カテキンの濃度をより正確に算出することが可能となる。

#### 【0029】

(9) 茶葉中に含まれる化学成分を定量するプログラムであって、この化学成分濃度が既知の複数の標準試料を、所定の波長を有する近赤外光を照射する近赤外分光光度計を用いて測定したそれぞれの吸光度と、前記標準試料の化学成分濃度に基づいて単回帰法又は直線重回帰法の少なくともいずれか1つにより検量線を算出するように指令する検量線算出工程と、化学成分濃度が未知の対象試料を前記標準試料と同じ波長における吸光度の値から前記検量線に基づいて前記対象試料の化学成分濃度を算出するように指令する濃度算出工程と、を有することを特徴とする茶葉中に含まれる化学成分の定量方法をコンピュータに実行させるためのプログラム。

#### 【0030】

(10) 茶葉中に含まれるメチル化カテキンを定量するプログラムであって、このメチル化カテキン濃度が既知の複数の標準試料を、所定の波長を有する近赤外光を照射する近赤外分光光度計を用いて測定したそれぞれの吸光度と、前記標準試料のメチル化カテキン濃度に基づいて単回帰法又は直線重回帰法の少なくともいずれか1つにより検量線を算出するように指令する検量線算出工程と、メチル化カテキン濃度が未知の対象試料を前記標準試料と同じ波長における吸光度の値から前記検量線に基づいて前記対象試料のメチル化カテキン濃度を算出するように指令する濃度算出工程と、を有することを特徴とする茶葉中に含まれるメチル化カテキンの定量方法をコンピュータに実行させるためのプログラム。

#### 【発明の効果】

#### 【0031】

以上説明したように本発明は、茶葉中の化学成分の近赤外領域における特有の吸収領域と試料中の各化学成分濃度との相関に基づいて化学成分濃度未知の試料の濃度を粉碎のみで迅速、かつ、簡便に算出することが可能となる。これによって、製造工程において製品や茶葉の十分な品質管理を行うことができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0032】

以下、本発明について詳しく説明する。

#### 【0033】

<測定試料>

10

20

30

40

50

本発明は、測定試料に茶葉を用いる。「茶葉」とは、茶葉の一枚一枚を意味するのではなく、茶や食品の原料となる茶葉の集合体のことを意味する。使用する茶葉には「べにふうき」、「べにふじ」、「べにほまれ」、「やえほ」、「するがわせ」、「ゆたかみどり」、「くりたわせ」、「かなやみどり」、「おくむさし」、「大葉烏龍」、「青心大パン」、「青心烏龍」、「鳳凰単叢」、「鳳凰水仙」、「白葉単叢水仙」、「黄枝香」、「武夷水仙」、「紅花」、「べにひかり」、「やまかい」、「やまとみどり」、「ひめみどり」、「香駿」、及び「おくみどり」、等が挙げられ、これら数種を混合したものを用いてもよい。

## 【0034】

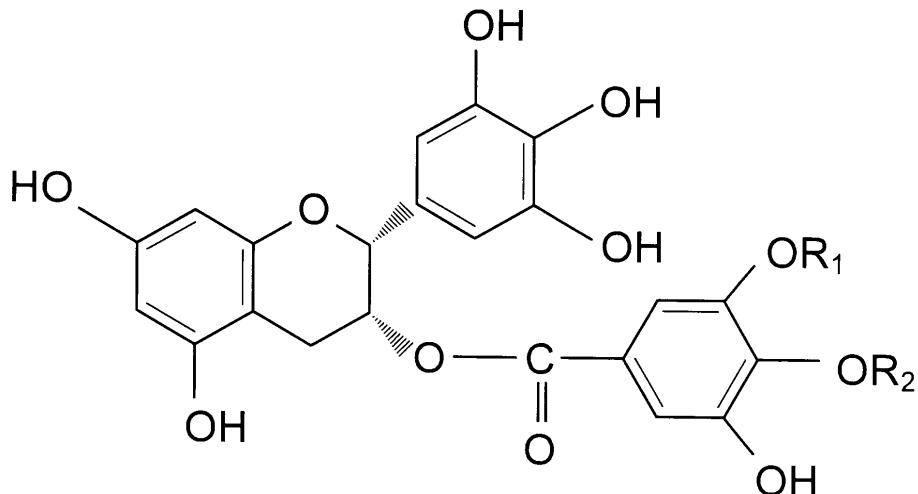
測定対象物質は、カテキン類、プリン塩基（カフェイン）、ビタミン類である。カテキン類の一種であるメチル化カテキンとは、メチル化されたカテキンをいい、エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート（以下、EGCG3"Meという）、エピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート（以下、EGCG4"Meという）、ガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート（以下、GCG3"Meという）、又は、ガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート（以下、GCG4"Meという）を含む。

## 【0035】

EGCG3"Me、EGCG4"Meは、以下の化学構造式で示される。

## 【0036】

## 【化1】



## 【0037】

R<sub>1</sub>がメチル基(-CH<sub>3</sub>)であり、かつ、R<sub>2</sub>が水素原子(-H)である場合には、EGCG3"Meを示す。また、R<sub>1</sub>が水素原子(-H)であり、R<sub>2</sub>がメチル基(-CH<sub>3</sub>)である場合には、GCG4"Meを示す。

## 【0038】

GCG3"Me、GCG4"Meは、以下の化学構造式で示される。

## 【0039】

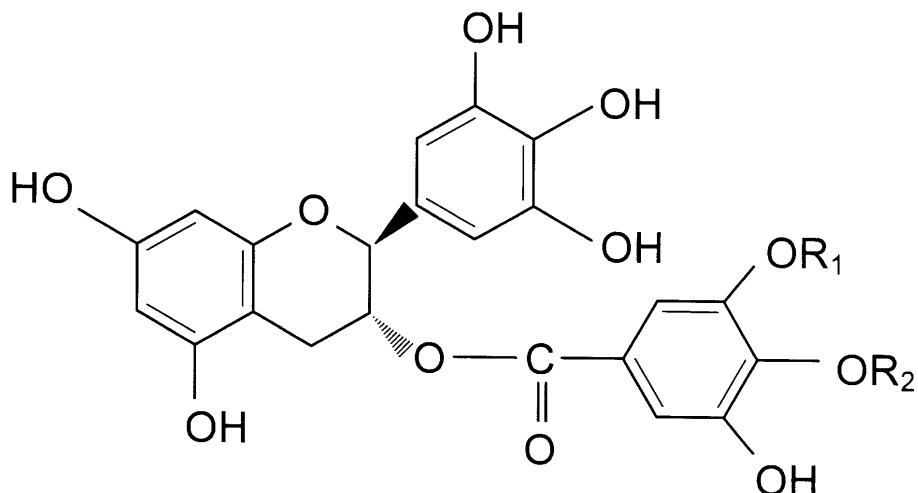
10

20

30

40

## 【化2】



## 【0040】

$R_1$  がメチル基 ( -CH<sub>3</sub> ) であり、かつ、 $R_2$  が水素原子 ( -H ) である場合には、  
GCG3"Me を示す。また、 $R_1$  が水素原子 ( -H ) であり、 $R_2$  がメチル基 ( -CH<sub>3</sub> ) である場合には、 GCG4"Me を示す。なお、 EGCG3"Me 及び EGCG4"Me は互いに構造異性体であり、 GCG3"Me 及び GCG4"Me は互いに構造異性体である。 EGCG3"Me 及び GCG3"Me は互いに立体異性体であり、 EGCG4"Me 及び GCG4"Me は互いに立体異性体である。

## 【0041】

<測定及びメチル化カテキン濃度の算出>

本発明では、吸光度測定工程において近赤外分光高度計を用いている。「近赤外分光光度計（以下、NIRとする）」とは、試薬不要、前処理不要、多成分同時分析、定性及び定量分析可能であることを特徴とする近赤外線（700～2500nm）を用いる分光光度計をいう。従来の赤外分光光度計（2500～10000nm）と比べ、短波長であるため、赤外分光光度計の測定における分子の基本振動による吸収特性の、倍音、結合音での測定が可能である。使用するNIRには、スキャンタイプとフィルタータイプのものが挙げられる。

## 【0042】

また検量線算出工程における「検量線」とは、このNIRで測定した茶葉の吸光度（y）とメチル化カテキン濃度（x）の相関関係を単回帰法又は直線重回帰法を用いて一次方程式（ $y = ax + b$ ）に表したものである。 $x$ 軸のメチル化カテキンの濃度は、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCとする）を用いて予め測定し、算出した値を用いている。「単回帰法又は直線重回帰法」とは一般に、幾つかの変数（独立変数又は説明変数）に基づいて、別の変数（従属変数又は目的変数）を予測することである。独立変数をx、従属変数をy、yの予測値をy'としたとき、x、yの各点の近くを通るような直線（検量線） $y' = ax + b$ が考えられる。なお、この直線式の定数は最小自乗法により求めることができる。この検量線の精度は、検量線上に乗らない点の数によって決定される。なお本発明では、測定の便宜上、独立変数をyに従属変数をxに設定している。更に検量線の精度は、検量線評価時（予測値）の標準誤差（SEP）を用いて評価している。

## 【0043】

以下、検量線算出工程及び濃度算出工程の具体的な方法を説明する。

## 【0044】

メチル化カテキン濃度既知の標準試料を、少なくとも4点、好ましくは10点以上についてNIRにて吸光度を測定する。照射波長の範囲としては、NIRにより通常測定され

10

20

30

40

50

る700～2500nm波長の範囲を含んでいればよい。なお、このスキャンタイプのNIRで測定した場合、得られたスペクトルは、ピークの最大吸光度を示す波長が含まれている。ここで、最大吸光度とはスペクトルのピークの山の部分を指し、このピークの位置は、得られるスペクトルデータを目視又はコンピュータ等の情報処理装置などにより確認することができる。そして、この最大吸光度を示す波長が上記範囲の波長の中に入っているればよい。

#### 【0045】

そして、フィルタータイプのNIRにおいてはまず、各波長における試料の吸光度を説明変数とし、メチル化カテキン濃度を目的変数として、まず単回帰分析及び重回帰分析を行い、精度の良い回帰線の波長を少なくとも2本以上採用し、アウトライヤー（外れ値）をチェックし、その原因が明確であれば切り捨てていく。次に上記の作業で採用した検量線について他の試料での検証を行い、最も精度の良い検量線を決定する。10

#### 【0046】

スキャンタイプのNIRにおいては、得られたNIRスペクトルのピークの最大吸光度を示す波長を2以上、好ましくは3以上選択し、それらの波数における吸光度を用いる。得られたスペクトルのピークの最大吸光度の波長を選択し、それらの吸光度を用いる。各波長における試料の吸光度を説明変数とし、メチル化カテキン濃度を目的変数として、重回帰分析を行う。

#### 【0047】

また、重回帰分析計算や主成分回帰分析計算は市販の計算ソフトもしくは自作のものでも特に限定されるものではない。更にこれら一連の作業をNIRの測定プログラムに組込んでメチル化カテキン濃度検出用プログラムとしてもよい。20

#### 【0048】

濃度算出工程では、メチル化カテキン濃度未知の試料の吸光度を測定し、その値を上記の検量線算出工程で得られた検量線に代入してメチル化カテキンの濃度を算出することが可能となる。

#### 【0049】

本発明に係る定量方法をプログラムとする場合は、NIRで測定した吸光度を、ケモメトリックス手法による主成分分析、クラスター分析、判別分析、重回帰分析、主成分回帰分析、PLS (partial least squares) 回帰分析、SIMCA (soft independent modeling of class analogy)、KNN (K-nearest neighbor method)、ニューラルネットワーク分析等、及びこれらを組み合わせて使用することが好ましい。30

#### 【実施例】

#### 【0050】

##### [フィルタータイプのNIRを用いた場合]

###### <試料>

平成15年産べにふうき ( $n = 50$  1茶期18点、2茶期18点、3茶期8点、秋冬期6点) 及びメチル化カテキンを含有する品種茶 ( $n = 100$  1茶期50点、2茶期50点) をUDYサイクロンミル(スクリーン 1.0mm)で粉碎した試料をNIR (GT-8基準機 (Dickey john社製) IL610S/N11138) ; Model 1.0, DJセル, 2回測定(詰め替えあり)で測定した。また同じサンプルをHPLC(島津製作所製 LC-10AVP、LC-M10AVP)にて測定し、Dickey john回帰プログラムv2.0(直線重回帰法)を用いて2つの測定値について解析した。方法としては、試料を3群にわけ、Cross Validation方式で作成及び検証を行なった。なお、NIRのフィルタ番号と照射波長の帰属は表1の通りである。40

#### 【0051】

【表1】

波長の帰属(nm)	
L0 (2310)	Fiber
L1 (2230)	Oil, Fat
L2 (2180)	Protein
L3 (2100)	
L4 (1940)	Moisture
L5 (1680)	General Ref.
L6 (2208)	Urea
L7 (2139)	Ref. Protein
L8 (2270)	Oil, Fat
L9 (2345)	Fiber

## 【0052】

フィルタ7(L7)(2139nm)は、タンニンの吸収領域に由来し、フィルタ2(L2)(2180nm)は蛋白質に、フィルタ9(L9)(2345nm)は纖維に由来し、フィルタ4(L4)(1940nm)は水分に、フィルタ6(L6)(2208nm)は蛋白質に由来していることが判っている。 20

## 【0053】

<検量線作成手順>

(1) 単回帰、2波長及び3波長でラフに検量線を作成し、選択波長の構成をみる。(2) 傾き(t-value)をチェックし、2.0以下の検量線を切り捨てる(オミット)。(3) 波長の帰属、係数の符号(+,-)、CAL定数(2.0以下)、及び多重共線性(40nm以下)等で組合せをチェックし、検量線を絞り込んでいく。(4) 数本の検量線のなかから、統計値のよい検量線2~3本を選び採用候補とする。統計値の評価は、SEP: 小さいほど良い、傾き(SLOPE): 0.9~1.1、寄与率( $R^2$ ): 0.85以上、変動率(CV%): 10以下、K係数の総和(Sum K): 0.1~1.0以下、K係数の自乗和の平方根(RSSK): 1.0以下、及びF比: 80以上等を基準にして行った。(5) アウトライヤーをチェックし、原因が明確であれば切り捨てた。上記(1)~(5)を繰り返し、採用候補を決定した(Calibration)。(6) 他の試料群で、採用候補の検量線を検証した(Validation)。このようにして一番よい結果の検量線を決定した。 30

## 【0054】

<メチル化カテキン検量線の作成と検証>

表2は、上記の検量線作成手順によって算出した検量線の検証結果を示したものである。

## 【0055】

10

30

40

## 【表2】

CAL サンプル群	全サンプルCAL オミット 9点	べにふうきCAL オミット 4点
全サンプル n=100	SEC 0.302	----
べにふうき n=50	SEP 0.333 (オミット 7点)	SEC 0.210

10

## 【0056】

これより、PLS解析（PLSとは、Partial Least Squares解析（部分最小自乗法））をベースにしたMLR CAL作成作業（Multiple Linear Pregrression Cakewalk Application Language）で、全サンプルの採用候補は2、5、7のフィルタの組合せであり、メチル化カテキン群の採用候補は2、7、9の組合せであった。本発明では2、5、7のフィルタの組合せと2、7、9のフィルタの組合せを中心に解析をすすめた。

## 【0057】

また、全試料を3分割し、2グループでCAL作成し、他の1グループで検証を行ったが、特別な傾向は認められなかった。3分割Cross Validation方式でサンプル群としての差異は認められなかつたことから、全試料でCAL作成（アウトライヤー9点をオミット）を行つた結果、2、5、7のフィルタの組合せで、SEC：0.302、R<sup>2</sup>：0.814、CV%：33.83、F Ratio：259.4の精度が得られた。

20

## 【0058】

試料が「べにふうき」のみである場合におけるCAL作成（4点オミット）の結果は、2、7、9のフィルタの組合せで、SEC：0.210、R<sup>2</sup>：0.594、CV%：13.19、F Ratio：43.0の精度が得られたため、これをCAL採用候補とし、図1、2に示す。なお、このときのサンプル数は46、平均吸光度は1.59（最大値（log値）：2.33、最小値（log値）：0.65）であり、標準誤差は0.160、変動係数は10.1%である。また、CALの検証のため、上記で作成した検量線「べにふうきCAL」で乾物したべにふうきを用いてその精度を検証した結果は、SEP：0.207、R<sup>2</sup>：0.594、CV%：13.0%、slope：1.683、F ratio：42.96であった。

30

## 【0059】

なお参考として、カテキン類の検量線を作成してメチル化カテキンと比較を行つた。その結果、含量の多いエピガロカテキンガレートやカテキン総量の変動係数の方が、含量の少ないエピガロカテキン、エピカテキン及びエピカテキンガレートよりも優れていた。また、カテキン類で選択された検量線の波長構成は、3、7、8（第一候補）、2、7、9（第二候補）のフィルタの組合せであり、べにふうきCALの波長構成の妥当性が確認された。

40

## 【0060】

更に、普通煎茶群と乾燥生葉群とに層別してCAL作成を行つたが、普通煎茶群はべにふうきと、乾燥生葉群は全サンプルとほぼ対応しているので、CALの精度に変化はないことが確認された。

## 【0061】

## [スキャンタイプのNIRを用いた場合]

## &lt;試料&gt;

平成16年産べにふうき（荒茶、n=106、一番茶～秋冬番茶）を用い、上述と同様

50

の方法で粉体を測定用試料とした。試料をNIR(Bran+Luebbe社製 InfraAlyzer 500)の試料用セルにセットし、1100nmから2500nmの近赤外域において2nm間隔で反射光を測定した。

#### 【0062】

得られたスペクトルは解析プログラムSE SAMI(Bran+Luebbe社製)を用いて前処理(2次微分)と多変量解析した。

#### 【0063】

得られたスペクトルを正規化、二次微分または平準化して、HPLC法で測定した個別カテキン量との相関を調べたところ、二次微分により高い相関が得られた。なお、検量線の作成にはMLRコンビネーションサーチ法とステップサーチ法を組み合わせて行った。

10

#### 【0064】

MLRコンビネーションサーチ法とは、直線重回帰法の1種であり、すべての波長の組み合わせを試行して、最適な波長を求め、各波長の重相関係数Rをそれぞれ算出して、最も高い値の組み合わせを検出する方法をいう。

#### 【0065】

ステップアップサーチとは、MLRコンビネーションサーチ法と同様、直線重回帰法の1種である。まず、第1波長だけはコンビネーションサーチ法により求め、次の新しい波長を決めるのに、コンビネーションサーチで決定した波長は固定しておき、重相関係数Rが最高値を示すような波長を検索する。第3波長までRが最高となる波長を検索し、その後、第2、第3波長を固定するまで第1波長を再度変動させる。新しい波長を使ってもそれ以上相関が向上しなくなるまで、同様の操作を繰り返す(MLR変数増加法)。

20

#### 【0066】

なお、検量線を作成する際、目的変数を増加させることによりSEC(検量線作成時の標準誤差)を小さくすることができます。しかし、SEP(予測値の標準誤差)は一度小さくなるが目的変数をさらに増加させると増加する。これは、オーバーフィッティングとよばれており、多変量解析において目的変数の決定に用いられている。その結果、メチル化カテキンで4波長、EGCG、ECGで3波長、EGCで4波長を選択することが妥当であることがわかった。メチル化カテキンには、ヒドロキシ基および、メチル基が含まれており、この波長選択は妥当であることがわかる。

#### 【0067】

30

##### 〔一番茶を用いた茶葉中のメチル化カテキン定量法〕

NIRの波長として1220nm±50nm、2068nm±50nm、2364nm±50nm、2468nm±50nmの波長を選択し、MLR変数増加法を適用して検量線を作成すると、キャリブレーションのR=0.983、SEC=0.103、SEP=0.17の精度で測定できるようになった(図3)。

#### 【0068】

##### <EGCG定量法>

NIRの波長として1660±50nm、1632±50nm、1128±50nmを選択してMLR変数増加法を適用して検量線を作成すると、キャリブレーションのR(重相関係数)=0.97、SEC=0.549、SEP=0.63の精度で測定できるようになる(図4)。

40

#### 【0069】

##### <ECG定量法>

NIRの波長として2186±50nm、2062±50nm、1546±50nmを選択してMLR変数増加法を適用して検量線を作成すると、キャリブレーションのR=0.963、SEC=0.17、SEP=0.24の精度で測定できるようになる(図5)。

。

#### 【0070】

##### <EGC定量法>

NIRの波長として1534±50nm、2000±50nm、2270±50nm、

50

2356 ± 50 nm を選択して M L R 変数増加法を適用して検量線を作成すると、キャリブレーションの  $R = 0.978$ 、SEC = 0.215、SEP = 0.328 の精度で測定できるようになる(図6)。

【0071】

<EC定量法>

NIRの波長として  $1124 \pm 50 \text{ nm}$ 、 $1470 \pm 50 \text{ nm}$ 、 $2208 \pm 50 \text{ nm}$  を選択して M L R 変数増加法を適用して検量線を作成すると、キャリブレーションの  $R = 0.884$ 、SEC = 0.112、SEP = 0.128 の精度で測定できるようになる(図7)。

【0072】

以上より、本発明は製造工程における茶葉の品質管理、育種選抜システムの目的の下では十分な精度を有していることがわかった。また、本発明による検量線を組み込んだプログラム、オプションキットとしてそれぞれの波長フィルタを従来からある茶葉分析計等の測定装置に搭載することにより、機能性に関わるカテキン類を高精度、簡易に測定することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】本発明の分析方法により算出したカテキン類の検量線を示した図である。

【図2】本発明の分析方法により算出したカテキン類の検量線を示した図である。

【図3】本発明の分析方法により算出したカテキン類の検量線を示した図である。

【図4】本発明の分析方法により算出したエピガロカテキンガレートの検量線を示した図である。

【図5】本発明の分析方法により算出したエピカテキンガレートの検量線を示した図である。

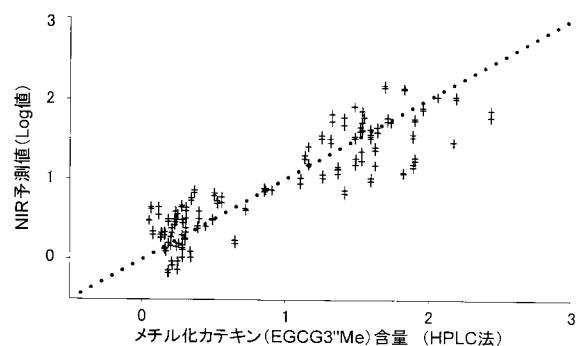
【図6】本発明の分析方法により算出したエピガロカテキンの検量線を示した図である。

【図7】本発明の分析方法により算出したエピカテキンの検量線を示した図である。

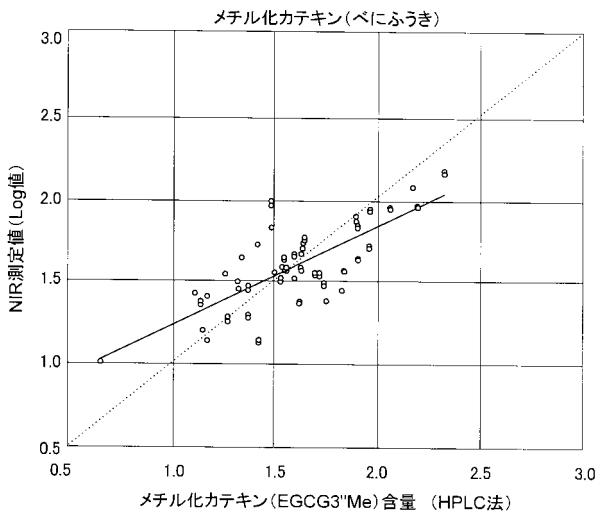
10

20

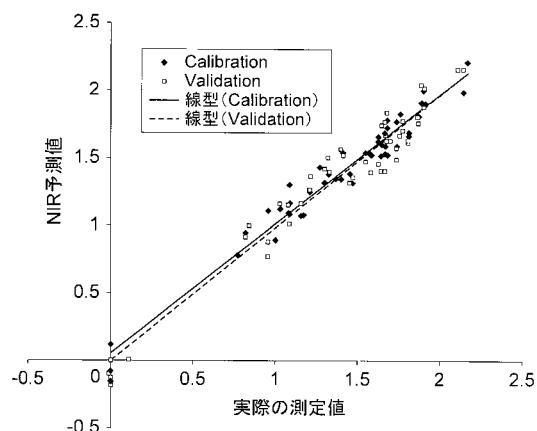
【図1】



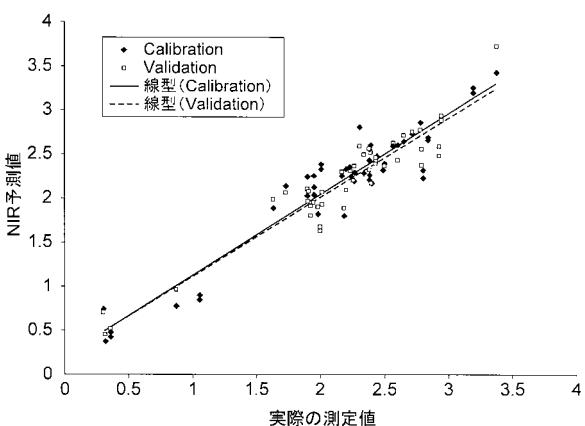
【図2】



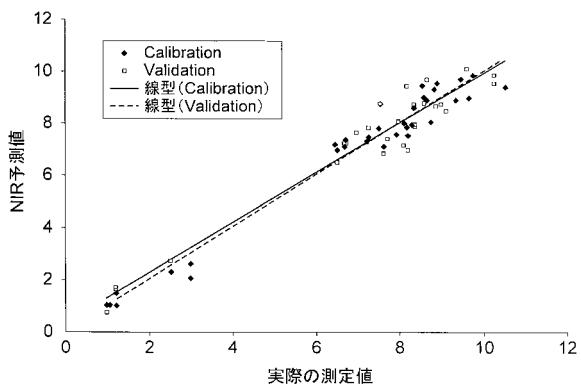
【図3】



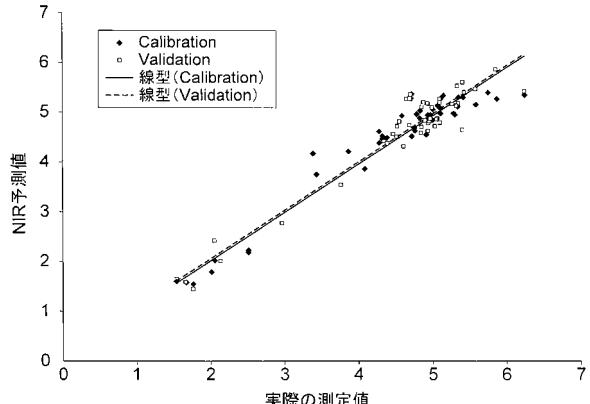
【図5】



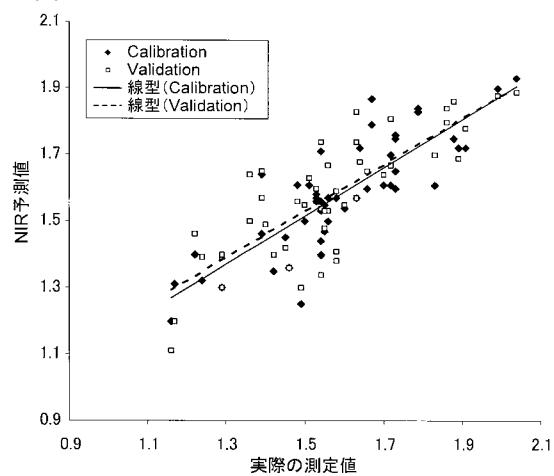
【図4】



【図6】



【図7】



---

フロントページの続き

審査官 島田 英昭

(56)参考文献 特開平08-114543(JP,A)

特開平11-346702(JP,A)

特開平08-027142(JP,A)

特開平08-027226(JP,A)

特開平09-015146(JP,A)

特開平03-179239(JP,A)

特開2003-075339(JP,A)

特開平08-094522(JP,A)

特開2003-023890(JP,A)

特開2001-343325(JP,A)

特開2000-121578(JP,A)

Christina S.Robb,et al., "ANALYSIS OF GREEN TEA CONSTITUENTS BY HPLC-FTIR", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2002年, Vol.25, No.5, p.787-801

J.Luypaert,et al., "Feasibility study for the use of near infrared spectroscopy in the qualitative and quantitative analysis of green tea, Camellia sinensis(L.)", ANALYTICA CHIMICA ACTA, 2003年, Vol.478, No.2, p.303-312

Ghazi Hussein,et al., "Phenolics from Maytenus senegalensis", PHYTOCHEMISTRY, 1999年, Vol.50, No.4, p.689-694

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 21 / 17 - 21 / 6 1

G 01 N 33 / 1 4

J S T P l u s ( J D r e a m I I )