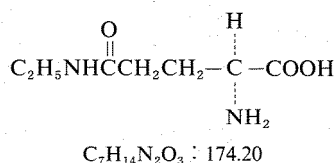


## 53 L-テアニン

L-Theanine



### 1. 試験法の概要

食品中のL-テアニンは、液体クロマトグラフィー（試験法A）又はトリメチルシリル体としてガスクロマトグラフィー（試験法B）により定量する。緑茶には、天然の遊離のL-テアニンが分布している。したがって、検体中にこれらの食品を素材として含有する場合には、定量値は素材由来の遊離のL-テアニンと添加されたものとの合計値である。

### 2. 試験法（液体クロマトグラフィー，ガスクロマトグラフィー）

#### 試験法A（液体クロマトグラフィー）

- (1) 検体の採取と試料の調製
- (2) 試料液の調製
- (3) 検量線用標準液の調製

上記の(1)~(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-テアニン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-テアニン 100mg」とする。

#### (4) 測定法

##### ① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する<sup>8)</sup>。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 5~6 $\mu\text{m}$ ，架橋度 10~12 %

カラム管：内径 2.6mm，長さ 250mm

カラム温度：初期 34℃，32 分間後 43℃ に設定

移動相：クエン酸緩衝液 (Li 0.155mol/l, pH3.00)，0.275ml/分

反応コイル：内径 0.25mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

## ② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸 (1 → 6) を加えて pH2.2 に調整した後，塩酸 (1 → 600) を加えて正確に 100ml とし，測定液とする<sup>13)</sup>。

## ③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 $\mu$ l ずつを正確に量り，液体クロマトグラフに注入し，570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比を例計算で定量する<sup>9)</sup>。

$$\text{L-テアニン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W A_s}^{10)}$$

S：標準液中の L-テアニン濃度 ( $\mu$ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

$A_s$ ：標準液で得られたクロマトグラムの L-テアニンピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムの L-テアニンピーク面積

## 試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし，「7. クエン酸緩衝液 (pH3.25)」の代わりに次の試薬・試液を用いる。

塩化リチウム：市販のアミノ酸自動分析用を用いる。

クエン酸リチウム・四水塩：市販のアミノ酸自動分析用を用いる。

クエン酸緩衝液 (Li 0.155mol/l, pH3.00)：クエン酸リチウム・四水塩 9.80g，塩化リチウム 2.12g，クエン酸・一水塩 34.00g，エタノール 40ml，チオジグリコール 5ml<sup>11)</sup>，BRIJ-35 溶液 (1 → 4) 4ml 及び *n*-カプリル酸 0.1ml を水に溶かして 1,000ml とする。

## [注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。ただし，13) は次のとおりとする。

13) ここで濁りを生じた場合は，ろ紙 No. 5B でろ過し，ろ液を測定液とする。

## 試験法 B (ガスクロマトグラフィー)

### (1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

### (2) 試料液の調製

試料約 5g を精密に量り、温湯 50ml を加えて 5 分間振り混ぜ、ろ紙 (No. 5C) でろ過する<sup>1)</sup>。残留物に温湯 20ml ずつを加え、先のろ紙を用いて同様の操作を 2 回繰り返す。全ろ液を合わせて水を加え、正確に 100ml とし、試料溶液とする。この液 8ml を正確に量り、イオン交換カラムを通過させ、次に水 10ml を通過させ、流出した液は捨てる。更に、1mol/l アンモニア水の溶液 2ml 及び水 1ml を順に通過させて両流出液を 25ml の共栓ナス型フラスコに合わせ、減圧下濃縮乾固する<sup>2)</sup>。残留物に TSIM 液 200 $\mu$ l を正確に量って加え、残留物が溶けるまで激しく振り混ぜた後、15 分間静置する<sup>3)</sup>。次に *n*-ヘキサン 1.8ml を正確に量って加え、よく振り混ぜ、試料液とする。

### (3) 検量線用標準液の調製

L-テアニン 20mg を正確に量り、0.5mol/l アンモニア水の溶液<sup>4)</sup>を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1ml は、L-テアニン 200 $\mu$ g を含む)。標準液 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、25ml の共栓ナス型フラスコにそれぞれ入れ、減圧下濃縮乾固する<sup>2)</sup>。以下(2)試料液の調製と同様に操作してトリメチルシリル化し、それぞれを検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれ L-テアニンとして 200, 300, 400 $\mu$ g 及び 500 $\mu$ g を含む)。

### (4) 測定法

#### ① 測定条件<sup>5)</sup>

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60~80 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフィー用ケイソウ土担体に、シリコーン OV-101 を 4% の割合にコーティングしたもの。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 2m

カラム温度：160 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：窒素

## ② 検量線

検量線用標準液  $2\mu\text{l}$  ずつを正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

## ③ 定量

試料液  $2\mu\text{l}$  を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試料液中の L-テアニン濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を求め、次式によって検体中の L-テアニン含量 ( $\text{g/kg}$ ) を計算する。

$$\text{L-テアニン含量 (g/kg)} = \frac{C}{40 \times W}$$

C : 試料液中の L-テアニン濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

W : 試料の採取量 (g)

## 試薬・試液等

1. イオン交換カラム：パスツールピペットにガラスウールを詰め、カラムとして使用する。強酸性陽イオン交換樹脂 1ml を水を用いて湿式法でカラム管に詰め、 $2\text{mol/l}$  アンモニア水の溶液 5ml、水 10ml、 $2\text{mol/l}$  塩酸 5ml を流し、更に、水 10ml でよく洗浄する。
2. 強酸性陽イオン交換樹脂：市販品を用いる。
3. トリメチルクロロシラン：市販のガスクロマトシリル化用。
4. *N*-（トリメチルシリル）イミダゾール：市販のガスクロマトシリル化用。
5. トリメチルシリルイミダゾール (TSIM) 液<sup>6)</sup>：*N*, *O*-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド、*N*-（トリメチルシリル）イミダゾール及びトリメチルクロロシランを 2:1:1 の割合で混合する。
6. *N*, *O*-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド：市販のガスクロマトシリル化用。
7. *n*-ヘキサン：[残留農薬分析用]

## [注]

- 1) 抹茶等の粉末状のものは、遠心分離操作（10分間、3,000回転/分）を行った後、又は No.5A のろ紙でろ過した後、No.5C のろ紙でろ過する。
- 2) 水分があると反応が妨害されるので、完全に水分を除去する。濃縮乾固後、微量の水分がナス型フラスコの壁面に付着しているときは、過塩素酸マグネシウムをトラップにして真空ポンプで2分間吸引する。
- 3) TSIM 液により L-テアニンがトリメチルシリル (TMS) 化されるが、この反応は室温 5~15 分で十分に進行する。
- 4) L-テアニンは水でもよく溶けるが、 $0.5\text{mol/l}$  アンモニア水の溶液を用いた方が濃縮乾固のときに水分が完全に除去できる。
- 5) ガスクロマトグラフィーの測定条件は次のように行ってもよい。  
カラム充てん剤：5% SE-30 (ケイソウ土)

カラム温度：240℃

キャリアガス：窒素

- 6) *N, O*-ビス (トリメチルシリル) アセトアミドの代わりに, *N, O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアミドを用いてもよい。