

UPLC/TOFMSによる緑茶熱水抽出物中のカテキン類とカフェインの分析法

加藤 彰*・二宮由佳*・中西喜徳*・米谷 力

Analysis Method of Catechins and Caffeine in Hot Water Extraction of Green Tea (Sen-Cha) with UPLC/TOFMS

Akira KATO, Yuka NINOMIYA, Yoshinori NAKANISHI and Tsutomu YONETANI

Key Words : epicatechin, catechin, epigallocatechin, gallic catechin, LC/MS, 'Yabukita', 'Okumidori', 'Yamatomidori', 'Benifuki'

緒 言

緑茶の渋みと苦みの呈味成分は、主要熱水抽出成分であるカテキン類であり¹⁾、このカテキン類には様々な機能が報告されている。特に、近年、メチル化カテキン類による抗アレルギー性が注目されており²⁾、緑茶熱水抽出物中のカテキン類を簡便、正確に同定、定量することが求められている。茶葉に含まれるカテキン類の同定、定量法には、二次元ペーパークロマトグラフィー展開による方法³⁾や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分離による方法^{4,5)}が報告されているが、前者の方法は様々な処理が必要であり、解析に時間がかかり、後者の方法は、一般的で、かつ、便利な方法であるとは言え、各カテキン類の紫外線吸収ピークを完全に分離し、同定する操作手順が必要である。一方、液体クロマトグラフィー質量分析装置(LC/MS)は、複雑な前処理なしに、検出質量数を用いた親水性成分の同定と定量が可能な便利な分析ツールであるので、近年、茶成分の解析に用いられるようになっており、Murakamiらは烏龍茶ペットボトル中の8種類のカテキン類を定量分析し⁶⁾、また、米久保らは茶試料のLC/MSによるメタボローム解析例を示している¹⁰⁾。

緑茶の品質を評価する方法の1つとして、緑茶熱水抽出分中のカテキン類を定量分析する方法があるが、いままでの報告には、緑茶熱水抽出分中のメチル化カテキン類を含めた多種のカテキン類を、定量分析したものが無かった。そこで、本報告ではLC/MSを用いて、緑茶熱水抽出物中に含まれるメチル化カテキン類を含めた12種類のカテキン類とカフェインの同時定量を行った。更に、この技術が奈良県内で生産されている緑茶の品質評価に利用されることを想定して、奈良県内で栽培面積が1番広い'やぶきた'と2番目の'おくみどり'、奈良県登録品種である'やまとみどり'とメチル化カテキン類を含み抗アレルギーの機能が明らかにされている'べにふうき'⁶⁾の合わせて4品種のカテキン類とカフェインの含量の測定法を検討し

たので報告する。

試験方法

奈良県農業総合センター茶業振興センター内圃場で2007年5月に採取した'やぶきた'、'おくみどり'、'やまとみどり'と野菜茶業研究所の山本万里博士より譲渡された2007年採取の'べにふうき'を試料として用いた。煎茶に加工した4品種の茶葉について、凍結乾燥後、100(±0.2)mgを秤量し、50ml、80℃の熱水で30分間抽出し、その10μL熱水抽出物をLC/MSを用いて分析した。また、同時に、同じ試料を酒石酸鉄比色法²⁾によるタンニンの定量に供した。LC/MSは、ACQUITY UPLC™システム(UPLC, Waters, MA, USA)にMicromass LCT Premier™のTOF型質量分析器(TOFMS, Waters, Manchester, UK)を接続して行った。質量検出器の調整はWaters社のインストラクト・マニュアルに従い、ロイシン-エンケファリン由来の[M+H]⁺イオン(m/z 557.2805)を質量数ロックに設定した。測定は電氣的スプレー式イオン化(ESI)モードのポジティブとネガティブ、両方のWモードで行ったが、この報告では比較的検出強度が高いポジティブWモードの値のみを示した。キャピラリー電圧は1200V、サンプル・コーン電圧は30V、脱溶媒化温度は350℃、ソース温度は120℃、コーン・ガス流量は120L/h、脱溶媒化ガス流量は600L/h、TOF飛行管電圧は7200V、リフレクトロンとマイクロチャンネルプレート(MCP)検出器電圧は2600Vに設定した。UPLCの分析カラムは内径2.1mm ×長さ100mm ACQUITY UPLC™ HSS T3 1.8 μm column (Waters)を用いた。UPLC/TOFMSデータの解析は、MassLynx ver.4.1(Waters)で行った。移動相はA液に0.1%蟻酸、B液にアセトニトリルを用い、A/B = 60/40で送液した。流速は0.25 μL/minとし、カラム温度は40℃にした。

総タンニンの定量には、公定分析法である酒石酸鉄による比色定量法を用い²⁾、UV-1200(島津)により発色程度を測定した。

(-)カテキン(C),(-)カテキン・ガレート(CG)は,Sigma-Aldrich社製,(-)エピカテキン(EC),(-)エピカテキン・ガレート(ECG),(-)エピガロカテキン(EGC),(-)エピガロカテキン・ガレート(EGCG),(-)ガロカテキン(GC),(-)ガロカテキン・ガレート(GCG),カフェインは,和光純薬社製,(-)エピカテキン 3-(3"-O-メチル)ガレート(ECG3Me),(-)エピカテキン 3-(4"-O-メチル)ガレート(ECG4Me),(-)エピガロカテキン 3-(3"-O-メチル)ガレート(EGCG3Me),(-)エピガロカテキン 3-(4"-O-メチル)ガレート(EGCG4Me)は,長良サイエンス社製を標準試薬として用いた。その他の試薬は,特級またはHPLC用を用いた。

結果と考察

1. カテキン類とカフェインの溜出時間の再現性と検出質量数の精度

検出されたカテキン類とカフェインの溜出時間(RT)の平均値,並びにそれらの標準偏差,変動係数(CV), [M+H]⁺ イオンの理論的正確質量と検出質量数の平均値と二乗平均平方根値(RMS)を第1表に示した。RTが遅くなるほど標準偏差が大きくなる傾向にあるが,最大でも0.17分であり,CV値も1試料

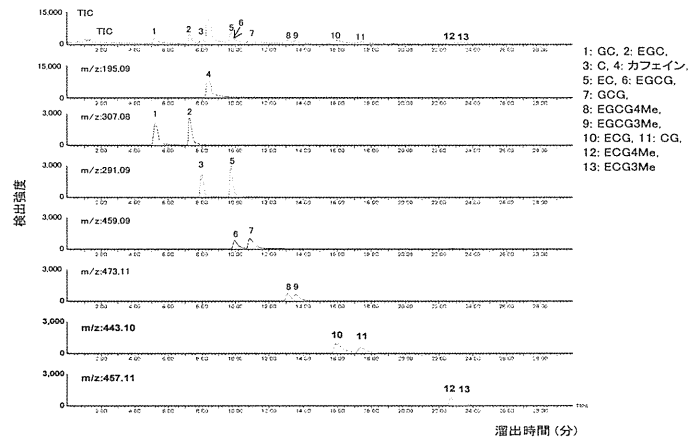
第1表 カテキン類とカフェインの溜出時間と検出質量

Table 1. Retention time and detected mass of catechins and caffeine

成分	溜出時間 平均値 (分)	標準偏差	変動係数 (%)	[M+H] ⁺ イオン 理論的 正確質量	検出質量数 平均値	二乗平均 平方根 (ppm)
GC	5.10	0.06	1.2	307.0818	307.0816	3.5
EGC	7.29	0.04	0.5	307.0818	307.0816	3.5
C	8.01	0.05	0.6	291.0869	291.087	2.8
Caffeine	8.39	0.03	0.4	195.0882	195.0886	2.3
EC	10.01	0.04	0.4	291.0869	291.0875	3.0
EGCG	10.24	0.05	0.5	459.0927	459.0926	0.8
GCG	11.47	0.08	0.7	459.0927	459.0917	2.0
EGCG4Me	13.99	0.08	0.6	473.1084	473.1078	1.6
EGCG3Me	14.79	0.09	0.6	473.1084	473.1094	1.6
ECG	17.44	0.13	0.7	443.0978	443.0977	2.4
CG	19.44	0.17	0.9	443.0978	443.097	2.5
ECG4Me	23.77	0.07	0.3	457.1135	457.1124	2.3
ECG3Me	24.59	0.10	0.4	457.1135	457.1147	1.5

を除き, 1%以下を示し,再現性の高いことが判った。これらの値は,Waters社のインストラク・マニュアルで求められた再現性を満足させるものである。検出質量数の精度の指標はRMS値であるが,本実験では, 2試料が最大の3.5 ppmを示した。マニュアルで求められた精度はラフィノースの[M+Na]⁺ イオン(m/z 527.1588)において3 ppm以下であるので, 2試料は,それを逸脱している。逸脱の原因として, 質量数ロックのロイシン-エンケファリン由来の[M+H]⁺ イオン(m/z 557.2805)から遠い質量数は精度が劣る傾向にあること,測定をESIポジティブとネガティブの両モードで行うと, シングルモードで行った場合より精度が劣る傾向にあることなどが考えられる。第1図に, カテキン類とカフェインを100 μg/mlの濃度で含む標準サンプルを分析した場合の総イオン数(TIC)によるUPLC/MSクロマトグラ

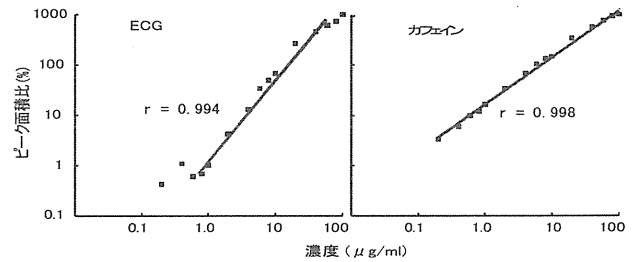
ムを示す。



第1図 カテキン類とカフェインのUPLC/MSクロマトグラム
Fig.1. UPLC/MS chromatogram of catechins and caffeine

2. カテキン類とカフェインの検量線の直線性

13種類の標準サンプルより, ECGとカフェインの検量線を代表して,第2図に示す。ピーク面積値は質量検出器の調整

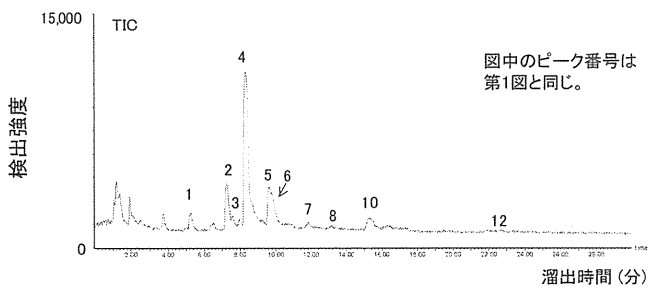


第2図 ECGとカフェインの検量線
Fig.2. Calibration curve of ECG and caffeine

毎に変化するため,10 μg/mlを基準として検量線を作成したものを図示した。数値を対数化して検量線の直線性を調べたところ,GCGとカフェインは0.2 - 100 μg/ml(GCGはr = 0.992, カフェインはr = 0.998,以下,物質名とrを略), Cは0.4 - 100 μg/ml (0.990),ECG3Meは1 - 100 μg/ml (0.993), ECとGC,EGCは2 - 100 μg/ml (0.991, 0.992, 0.990), CGは4 - 100 μg/ml (0.921), EGCGは0.4 - 60 μg/ml (0.992), EGCG3Meは0.6 - 60 μg/ml(0.995),ECGとEGCG4Meは0.8 - 60 μg/ml (0.994, 0.996), ECG4Meは2 - 60 μg/ml (0.992)に直線性が認められた。本実験では,検出値が検量線の直線域の下限以下の場合を,定量限界とした。

3. 緑茶熱水抽出物中のカテキン類、カフェインの含量と本定量化法の信頼性

第3図に, ‘おくみどり’の熱水抽出物を分析した場合の総イオン数(TIC)によるUPLC/MSクロマトグラムを示す。第2表に,茶葉の粉末重量当たりのカテキン類とカフェインの含量を茶葉



第3図 おくみどり緑茶熱水抽出物のUPLC/MSクロマトグラム
Fig. 3. UPLC/MS chromatogram of hot water extraction from green tea, "Okumidori"

の乾燥重量当たりの重量(%)で示した。検出成分の同定は溜出時間と質量数から行った。茶葉2 mg/ml, 抽出溶媒80°C, 10分以上の抽出条件から, カテキン類は80%以上, カフェインは約100%が抽出されていることが予測される³⁾。カテキン類の公的測定法が定められていないので, 茶のカテキン量の公的分析法⁸⁾として用いられている総タンニン量の値とUPLC/TOFMSにより測定されたカテキン類の総量の値(総カテキン)を比較した。その結果, 4品種間の比較なので試験数が少ないが,

第2表 緑茶熱水抽出物中のカテキン類とカフェイン、総タンニン含量(茶葉乾重量%)
Table 2. Contents of catechins, caffeine and tannin in hot water extraction of green tea (dry leaf weight %)

成分	やぶきた	おくみどり	やまとみどり	べにふうき
EGCG	3.8	3.6	3.4	3.9
EGC	2	1.8	1.7	2.2
EC	1.1	1.1	1.1	1.2
ECG	1.1	0.9	1.3	1.1
GC	0.4	0.5	0.3	0.4
C	0.4	0.5	0.4	0.4
GCG	0.3	0.4	0.3	0.4
CG	nd.	nd.	nd.	nd.
EGCG4Me	nd.	0.7	0.4	2.6
EGCG3Me	nd.	nd.	nd.	0.3
ECG3Me	nd.	0.2	0.2	0.8
ECG4Me	nd.	nd.	nd.	0.1
総カテキン(合計)	9.1	9.8	9.2	15.4
カフェイン	1.8	2.3	2.1	2.4
総タンニン	9	9.5	8.4	11

総タンニン量と総カテキン量の高低の傾向が一致していた。更に, 中川の二次元ペーパークロマトグラフィー展開⁹⁾と西條らのHPLC分離⁸⁾による定量の報告と比較すると, 今回の定量値が, EGCGが3.4 - 3.9%, EGCが1.7 - 2.2%, ECGが0.9 - 1.3%であり, 彼らの報告と同様であった。カフェインの定量値は1.8 - 2.4%で, 中川の報告⁹⁾と同様であった。これらのことから, 本定量法の信頼性を確認することができた。

抗アレルギー性の機能が報告されているメチル化カテキン類²⁾について特に考察する。メチル化カテキン類は, 'べにふうき'に多く, 次いで, 'おくみどり', 'やまとみどり'と続き, 'やぶきた'にはほとんど含まれていなかった。'べにふうき'と'おくみどり', 'やぶきた'に関する傾向は山本の報告⁹⁾と一致している。'べにふうき'の熱水抽出物については抗アレルギー性の機能が報告されているが⁹⁾, 'おくみどり'にはメチル化カテキン類が比

較的多く含まれているものの, その量は'べにふうき'の0.2倍程度で, 顕著な抗アレルギー性は期待できないと考えられる。

本実験において, UPLC/TOFMSを用いて, 緑茶熱水抽出物中のカテキン類を簡便, 正確に同定, 定量できることが確認できた。

謝 辞

タンニンの酒石酸鉄による比色定量法を教えて頂いた奈良県農業総合センター 山原俊昭主任研究員, UV-1200による測定をして頂いた平 浩一郎主任研究員, 研究の全般に付きご指導と励ましを頂いた奈良県中小企業支援センター・コア研究室 野本享資室長に深く感謝いたします。本研究は, JST, 奈良県地域結集型研究開発プログラムの一環として実施しました。

引用文献

- 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.
- 岩浅 潔・鳥井秀一. 1962. 酒石酸鉄による茶タンニンの比色定量法. 茶技研. 26: 87-91.
- 氏原ともみ. 日本茶の入れ方と味成分の溶出特性. 国立茶試成果100選編集委員会編. 国立茶試成果100選. 2004. pp 213-214.
- 中川致之. 1970. 茶の品質とカテキンに関する研究. 茶研報. 6: 65-166.
- . 各種日本茶の化学成分の相違. 国立茶試成果100選編集委員会編. 国立茶試成果100選. 2004. pp 220-222.
- Maeda-Yamamoto, M., N.Inagaki, J.Kitaura, T.Chikumoto, H.Kawahara, Y.Kawakami, M.Sano, T.Miyase, H.Tachibana, H.Nagai and T.Kawakami. 2004. O-Methylated Catechins from Tea Leaves Inhibit Multiple Protein Kinases in Mast Cells. J.Immunology. 172: 4486-4492.
- Murakami, I., T.Nakamura, Y.Ishibashi, R.Shibuya, E.Ayano, Y.Morita-Murase, Y.Nagata and H.Kanazawa. 2006. Simultaneous determination of catechins and procyanidines in bottled tea drinks by LC/MS. Chromatography 27(1): 27-33.
- 西條了康・武田善行. 1999. HPLCによる各種緑茶に含まれるカテキン類の分析. 日食工試. 46(3): 138-147.
- 山本(前田)万里. 2006. 抗アレルギー効果のある茶葉成分. 日本補完代替医療学会誌. 3(2): 53-60.
- 米久保淳・井上知佳・佐々木秀輝. 2006. 最新の飛行時間型質量分析計LCT PremierTMの特徴と食品メタボロームへの応用. Chromatography 27(2): 85-89.