

Application Note

島津アプリケーションノート No.1(食品)



Food

高機能性緑茶飲料を支える計測技術

小林まなみ
M.KOBAYASHI

1.はじめに

9世紀頃に中国から日本に伝わったお茶は、安土桃山時代より庶民に普及したと言われています。以来日本では、各家庭で茶葉に湯を注ぎ、お茶を淹れて飲むことができましたが、1981年にアルミ缶入りの烏龍茶、次いでアルミ缶入りの緑茶・紅茶が発売、その後、PETボトル入りのお茶が発売され、お茶飲料が広く流通するよ

うになりました。現在では、市販されているお茶飲料を購入することが広く普及しています。市販のお茶飲料は種類も豊富で、味・風味がとても良い、すなわち、プロの味を手軽に楽しめることが一般消費者の購入を促進しているとも言えます。

2.緑茶に豊富に含まれるカテキン

緑茶の健康への効果は早い段階から注目されてきました。緑茶には、カテキン、カフェイン、アミノ酸、ビタミンなどの成分が多く含まれています。ビタミンの中でもビタミンCが多く含まれること、抗菌作用があることで、昔から庶民の薬的な役割も果たしてきました。

特に、緑茶葉中約10から15%と多く含まれる渋味成分であるカテキン類については、血中コレステロールや体脂肪低下、ガン予防効果、抗酸化作用等々があることが報告され、数多くの研究がおこなわれています。

最新の研究では、カテキン類で認知症を予防できる可能性があるということも報告されており、ますます注目されています。最近では、カテキン類を強化した高機能性緑茶飲料も各メーカーが開発、発売しています。

緑茶の葉には化学構造の異なる4種類のカテキン類、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートが多く含まれています。また、お茶飲料を製造する過程の加熱処理で構造が変化し、

一部がそれぞれ、カテキン、ガロカテキン、カテキンガレート、ガロカテキンガレートとなります。カテキン類は植物に数千種類あるといわれているポリフェノールの一種です。水に溶けているカテキン類の分析には、通常、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が汎用されます(図1)。



図1 HPLC (Prominence UFLCXR)

3.高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるカテキン類の高速分析

図2に、緑茶飲料に含まれるカテキン類およびその分解物である没食子酸とカフェインの構造式を示しました。

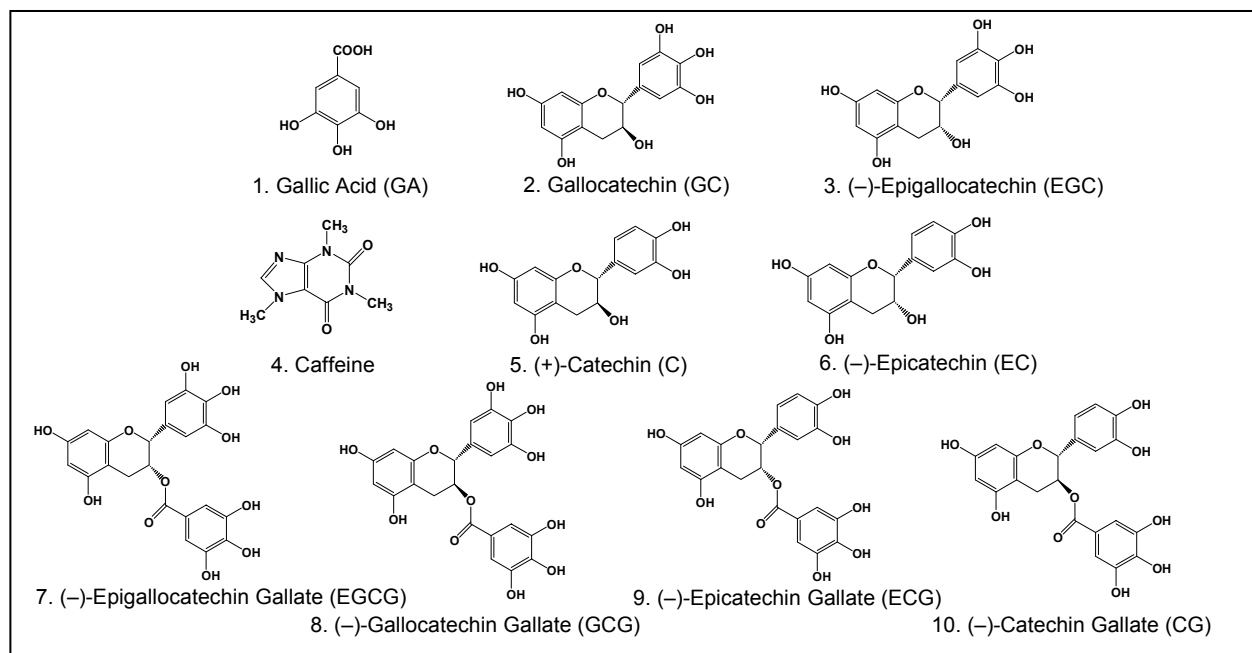


図2 カテキン類、没食子酸とカフェインの構造式

図3には、カテキン類、没食子酸、カフェイン10成分の標準混合溶液(各100 mg/L)を高速分離したクロマトグラムをご紹介します。装置は、Prominence UFLCXRを使用し、その分析条件を表1に示します。カテキン類にUV吸収があることを利用し、ダイオードアレイ検出器 SPD-M20A (230 nm)を使用しています。AMT 社製

の HALO[®] C18(粒子径 2.7 μm)を使用し、1 分析 2 分の高速分離が可能になりました。図4は市販の緑茶飲料のクロマトグラムです。緑茶飲料水は精製水で12倍に希釈後、メンブランフィルター(孔径 0.22 μm)でろ過しました。

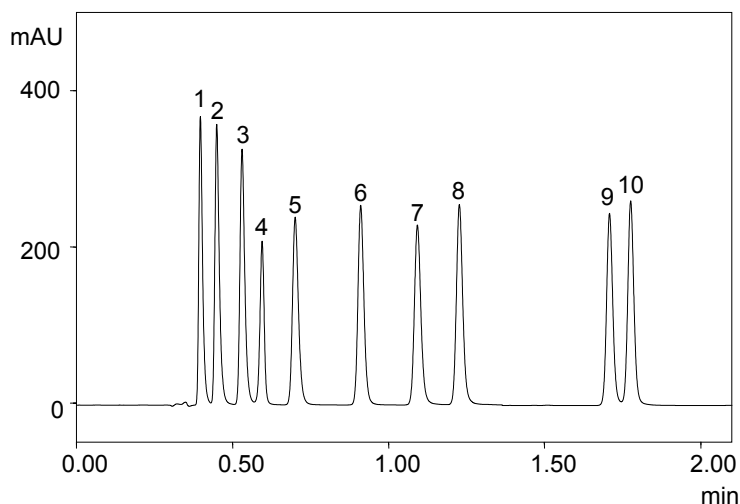


図3 カテキン類、没食子酸、カフェイン標準液のクロマトグラム(各100 mg/L, 2 μL 注入)

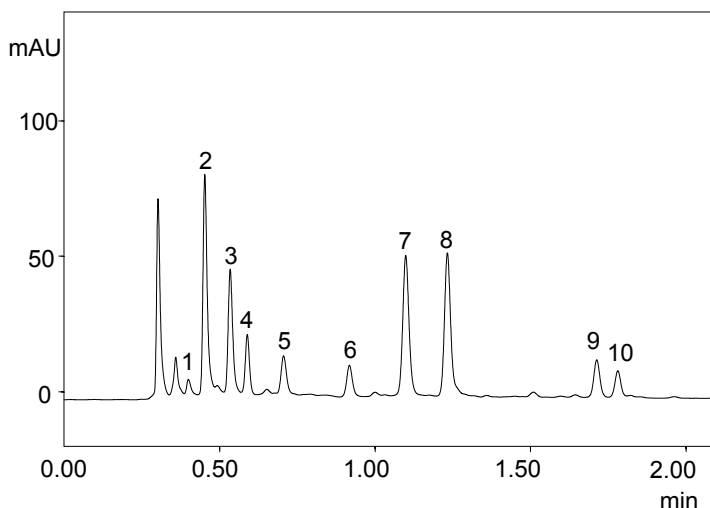


図4 市販緑茶飲料のクロマトグラム

■ Peaks

1. Gallic Acid (GA), 2. (-)-Gallocatechin (GC), 3. (-)-Epigallocatechin (EGC), 4. Caffeine,
5. (+)-Catechin (C), 6. (-)-Epicatechin (EC), 7. (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG),
8. (-)-Gallocatechin Gallate (GCG), 9. (-)-Epicatechin Gallate (ECG), 10. (-)-Catechin Gallate (CG)

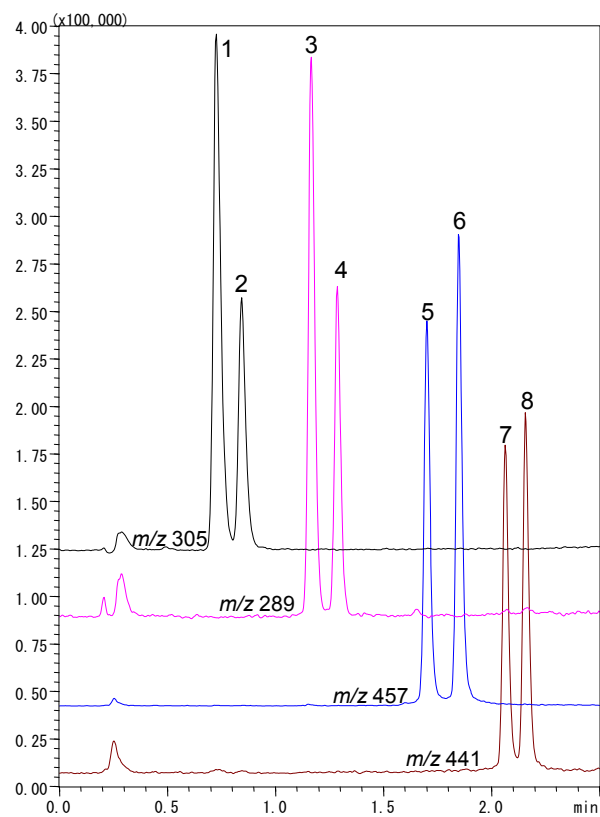
表1 HPLCの分析条件

Column	: HALO [®] C18 (75 mmL. × 3.0 mmI.D., 2.7 μm)
Mobile Phase A	: 0.2% Phosphoric acid in water / Tetrahydrofuran = 99/1 (v/v)
Mobile Phase B	: Acetonitrile / Tetrahydrofuran = 99/1 (v/v)
Time Program	: B conc. 12 % (0 min) → 25 % (2 min) → 50% (2.01-2.1 min)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temperature	: 40 °C
Injection Volume	: 2 μL
Detection	: SPD-M20A at 230 nm
UV Cell	: Semi-micro Cell

4.高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)によるカテキン類の高速分析

HPLCの検出器に質量分析計を使用すると、高い質量選択性が得られます。図5に緑茶飲料中カテキン類8成分の高速分析例を示します。図6は、LC-MSの外観写真です。

カテキン類は、エレクトロスプレーイオン化法のネガティブモードにおいて、プロトンが脱離した脱プロトン分子 $[M-H]^-$ を検出することができます。従来の分析では20~30 min程度の分析時間が必要でしたが、LC-MSに適した内径2 mmの高速分析用カラム Shim-pack XR-ODS (粒子径 2.2 μ m) セミマイクロカラムを使用し、Prominence UFLCを用いることにより分析時間を1分析2.5 minに短縮することができました。分析条件を表2に示します。



■Peaks

1. (-)-Gallocatechin, 2. (-)-Epigallocatechin, 3. (+)-Catechin,
4. (-)-Epicatechin, 5. (-)-Epigallocatechin Gallate, 6. (-)-Gallocatechin Gallate,
7. (-)-Epicatechin Gallate, 8. (-)-Catechin Gallate

図5 市販緑茶飲料中のカテキン類のSIMクロマトグラム



図6 LC-MS(LCMS-2020)の外観写真

表2 LC-MS分析条件

[LC Conditions]

Column	: Shim-pack XR-ODS (50 mmL. × 2.0 mmI.D., 2.2 μ m)
Mobile Phase A	: 0.1% Formic acid in water / Tetrahydrofuran = 95 / 5
Mobile Phase B	: Acetonitrile
Time Program	: B conc. 3 % (0 min) → 35 % (2.5 min)
Flow Rate	: 0.5 mL/min
Column Temperature	: 50 °C
Injection Volume	: 2 μ L

[MS Conditions]

Probe Voltage	: -3.5 kV (ESI-Negative mode)	Nebulizing Gas Flow	: 1.5 L/min
Drying Gas Pressure	: 0.2 MPa	CDL Temperature	: 250 °C
CDL, Q-array Voltages	: using default values	Block Heater Temperature	: 200 °C

Monitoring Ions :

- m/z 305 for (-)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin
- m/z 289 for (+)-Catechin, (-)-Epicatechin
- m/z 457 for (-)-Epigallocatechin Gallate, (-)-Gallocatechin Gallate
- m/z 441 for (-)-Epicatechin Gallate, (-)-Catechin Gallate

5.カテキン類の分取と高速分析

現在、緑茶中のカテキン類は様々な研究や加工食品に利用されています。緑茶中の各カテキン成分を分取し、その後、各分取画分を確認分析する。このような作業も、LC-MS を使用すれば、自動化分取、確実な分取画分の設定、高速確認分析をおこなうことができます。カテキン類分取のための LC-MS システム構成例を図7に示します。カテキン各成分について質量分析を行い、得られたマスクロマトグラムの強度や傾きを指標として分取をおこないます。LC の高い分離能力に加えて、MS の高い定性能によって、より確実に目的成分を分取することができます。

緑茶中のカテキン類を対象とした LC-MS 分取例を図8に示します。このときの分取条件は表3に示していま

す。フラクションコレクター直前のUV検出器 (SPD-20A) での分離状態も、MS 検出器と同様で良好な結果を得ていることから、分画分取が正確に行われていることを確認できます。

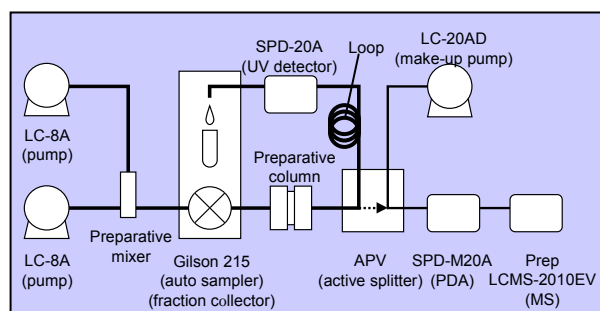


図7 分取LC-MSの流路図

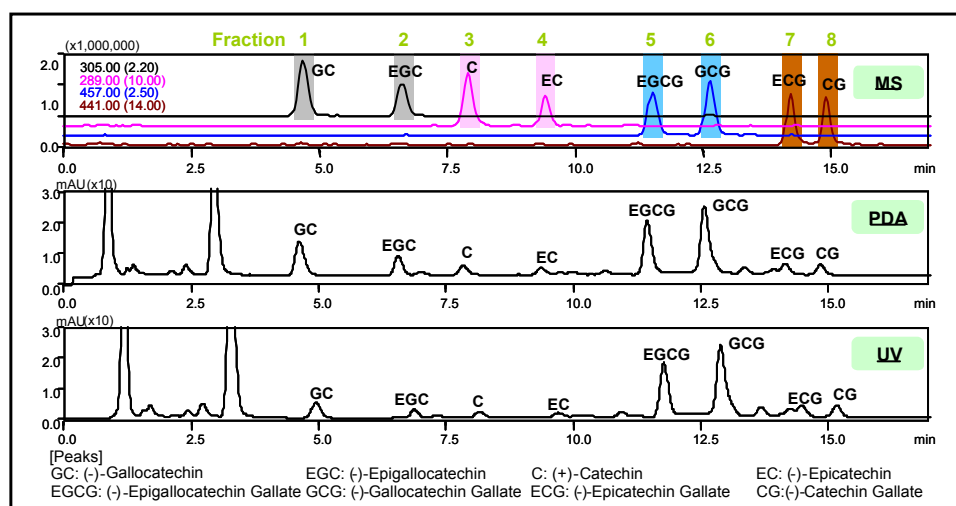


図8 緑茶中カテキン類の分取

表3 分取LC-MS条件

[LC Conditions]	
Column	: Gemini 5 μ m C18 Axia packed (50 mL. \times 21.2 mmI.D.)
Mobile Phase A	: Water containing 0.1 % formic acid / tetrahydrofuran = 95 / 5
Mobile Phase B	: Acetonitrile
Time Program	: B conc. 3 % (0.00-2.00 min) \rightarrow 30 % (15.00-17.00 min) \rightarrow 3 % (17.01 min) \rightarrow STOP(22.00 min)
Make-up Flow	: Water containing 0.1 % formic acid / Acetonitrile = 1/1 (0.2 mL/min)
Split Ratio	: 1/1000
Flow Rate	: 20 mL/min
Injection Volume	: 1000 μ L
Column Temperature	: Room Temperature
[MS Conditions]	
Probe Voltage	: -3.5 kV (ESI-negative mode)
Drying Gas Pressure	: 0.1 MPa
CDL, Q-array Voltages	: Using default values
Scan Range	: m/z 100-500 (1.0 sec)
Trigger Ions:	
	m/z 305 for (-)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin, m/z 289 for (+)-Catechin, (-)-Epicatechin
	m/z 457 for (-)-Epigallocatechin Gallate, (-)-Gallocatechin Gallate, m/z 441 for (-)-Epicatechin Gallate, (-)-Catechin Gallate
	Nebulizing Gas Flow : 1.5 L/min
	CDL Temperature : 250 $^{\circ}$ C
	Block Heater Temperature : 200 $^{\circ}$ C

Application Note No.1

さらに、分取した画分をそれぞれ LC-MS 分析に供することで精製確認を行うことができます。この場合、高速分析を行うことで多数の画分を分取した場合も速やかに確認作業を行うことができ、精製や分取条件検討

の作業効率を高めます。分取とは別システム (Prominence UFLC) を使用しての高速分析による精製確認の例を図 9 に示します。1 分析 5.5 min で終了する高速分析条件です (表 4)。

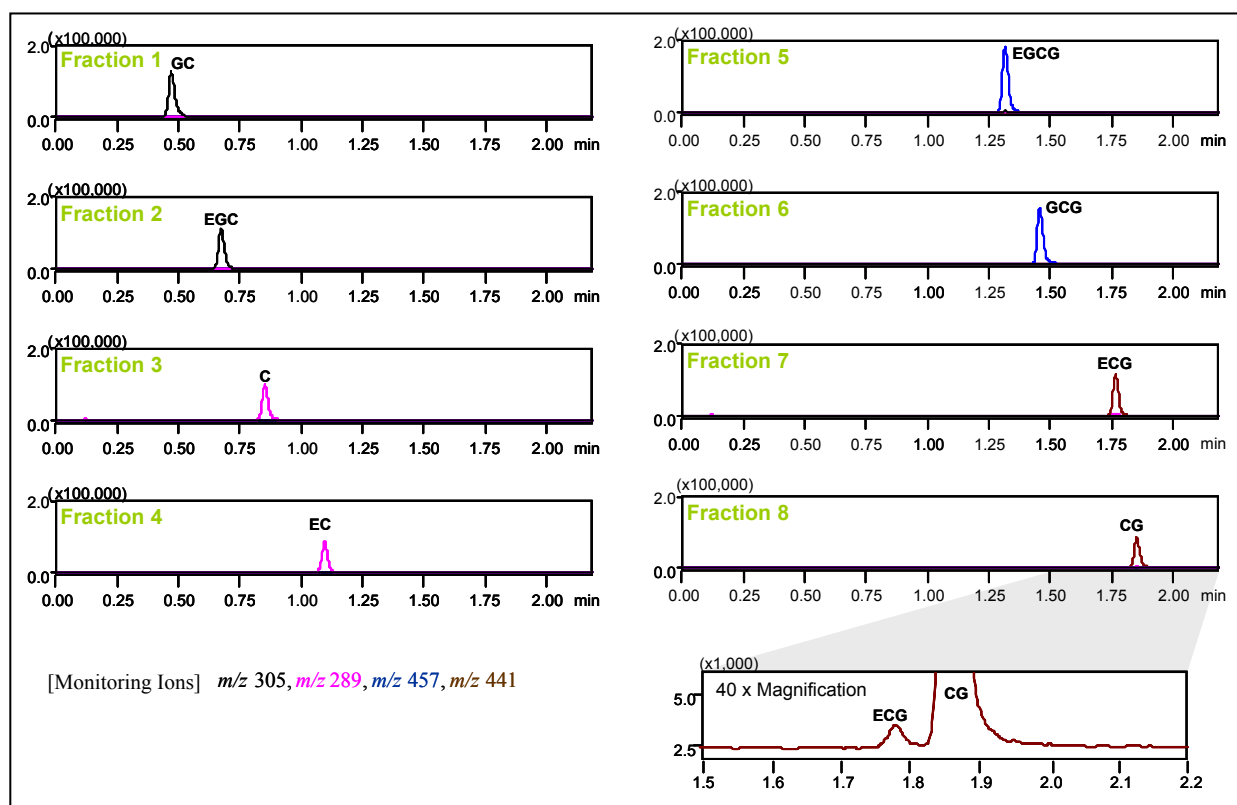


図9 高速LC-MS分析による各分画中カテキン類の確認

表4 高速LC-MS分析条件

[LC Conditions]

Column : Shim-pack XR-ODS (50mm.L × 2.0 mmI.D.)
 Mobile Phase A : Water containing 0.1 % formic acid / Tetrahydrofuran = 57 / 1
 Mobile Phase B : Acetonitrile
 Time Program : B conc. 5 % (0.00 min) → 25 % (2.00 min) → 60 % (2.01-4.00 min)
 → 5 % (4.01 min) → STOP (5.50 min)
 Flow Rate : 0.8 mL/min
 Injection Volume : 2 μL
 Column Temperature : 40 °C

[MS Conditions]

Probe Voltage : -3.5 kV (ESI-negative mode)
 Drying Gas Pressure : 0.1 MPa
 CDL, Q-array Voltages : Using default values
 Monitoring ions :
 m/z 305 for (-)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin
 m/z 289 for (+)-Catechin, (-)-Epicatechin
 m/z 457 for (-)-Epigallocatechin Gallate, (-)-Gallocatechin Gallate
 m/z 441 for (-)-Epicatechin Gallate, (-)-Catechin Gallate
 Nebulizing Gas Flow : 1.5 L/min
 CDL Temperature : 250 °C
 Block Heater Temperature : 200 °C

6.LC-MSによるメチル化カテキンの分析

最近、お茶葉の品種として注目されているものとして日本の紅茶種「べにふうき」があります。「べにふうき」は、発酵させず緑茶として製作することによって、メチル化カテキンを豊富に含みます。また、お茶の旨味成分であるアミノ酸成分テアニンも豊富です。メチル化カテキンは花粉症に効果があるといわれています。べにふうき茶葉から抽出したカテキン類のLC-MSによる分析例を図10に示します。「べにふうき」茶葉と一般の市販茶葉 5 g

をそれぞれ 100 mL の熱湯で抽出処理し(抽出時間 30 分)、精製水で 10 倍に希釈、メンブランフィルター(孔径 0.45 μm)でろ過しました。図 11(a)のべにふうき茶葉抽出液には図 10(b)の市販茶葉抽出液には検出されない、ピーク 8:エピガロカテキンガレートのメチル化体したカテキンとピーク 11:エピカテキンガレートがメチル化したカテキンが豊富に含まれていることがわかります。図 11 には、2 種類のメチル化カテキンの構造式を示します。

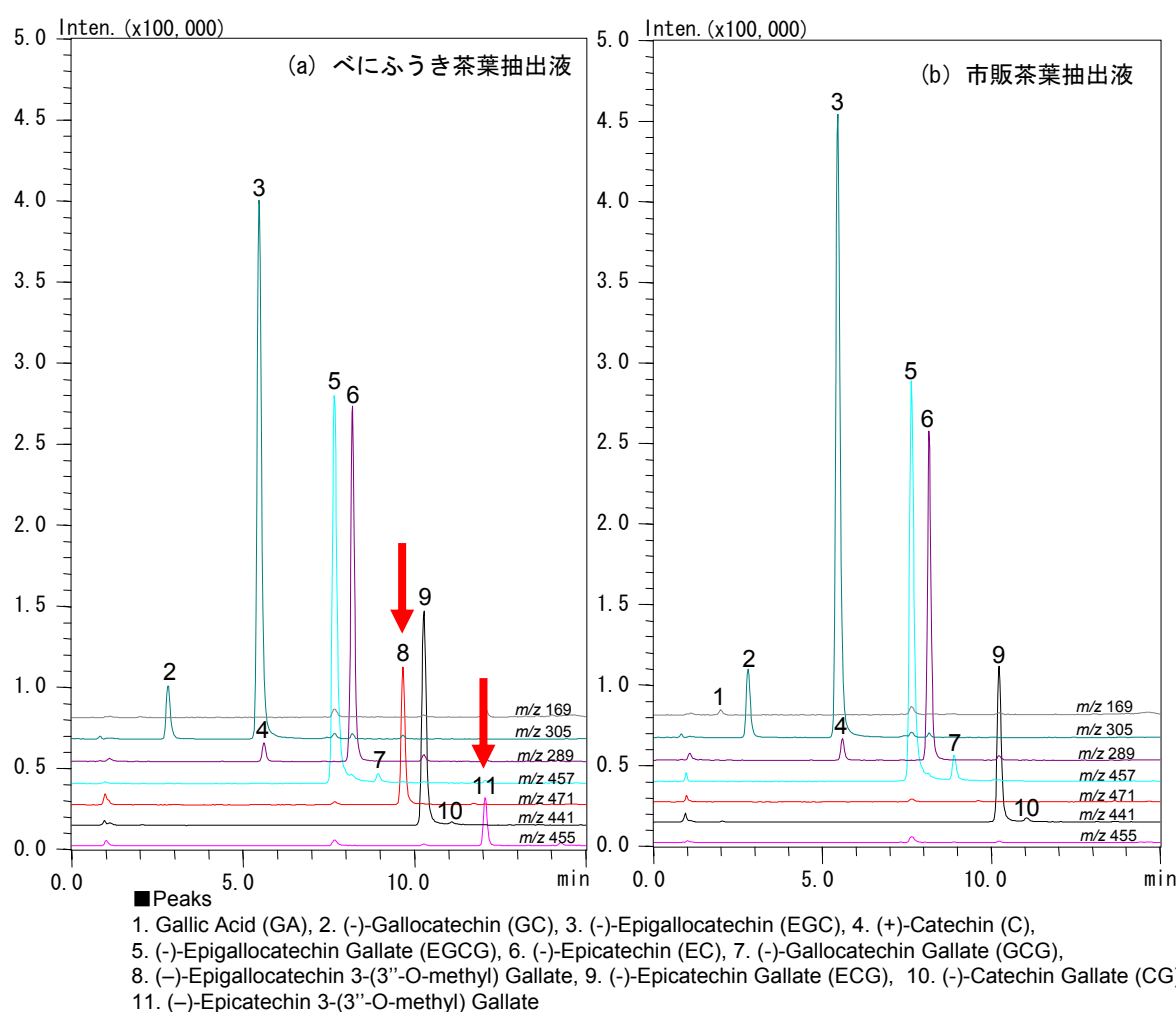


図10 茶葉抽出液中カテキン類のSIMクロマトグラム

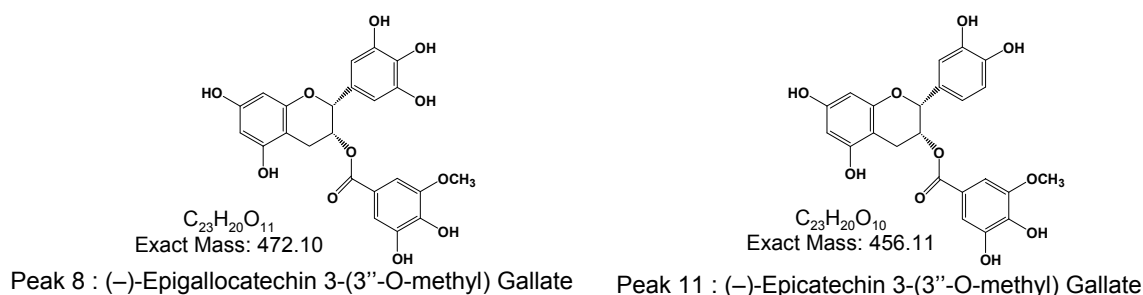


図11 ベにふうき茶葉に主に含まれるメチル化カテキンの構造式

図 10 の 2 つの抽出液のように、茶葉より湯で淹れたお茶には、各カテキン類のエピ体が主に含まれることがわかります(ピーク 3, 5, 6, 9)。

一方、市販緑茶飲料中カテキン類の LC-MS による分析例を図 12 に示します。緑茶飲料製造中の加熱処理により生成した非エピ体であるカテキン、ガロカテキン、カテキンガレート、ガロカテキンガレートが含まれていることがわかります(ピーク 2, 4, 7, 10)。市販緑茶飲料は精製水で 10 倍に希釈、メンブランフィルター (孔径 0.45 μ m) でろ過した後、分析しました。図 10, 図 12 の分析条件を表 5 に示します。

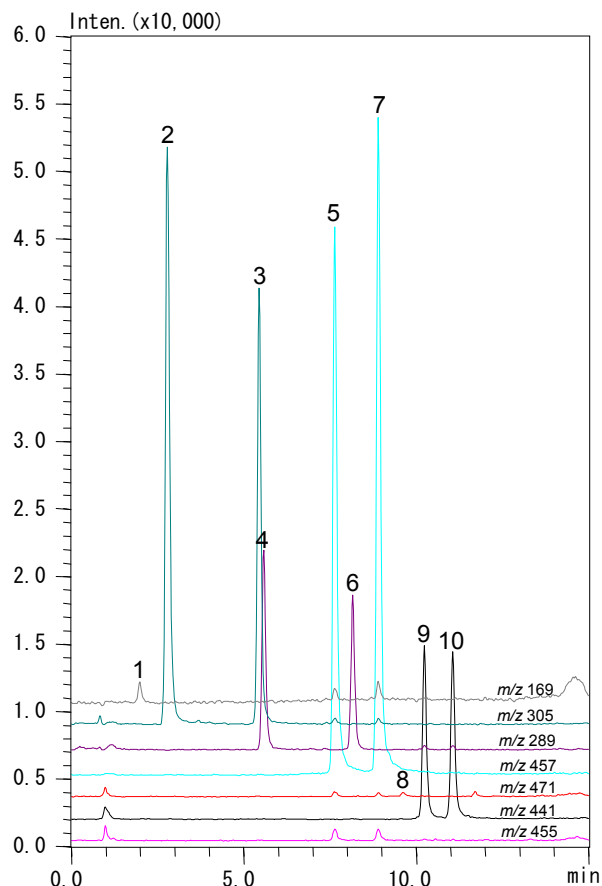


図12 市販緑茶飲料中カテキン類のSIMクロマトグラム

表5 LC-MSの分析条件

[LC Conditions]

Column : Shim-pack FC-ODS (75 mmL. \times 2.0 mmI.D., 3 μ m)
 Mobile Phase A : 0.1 % Formic acid in water
 Mobile Phase B : Methanol
 Time Program : B conc. 10 % (0 min) \rightarrow 35 % (10 min) \rightarrow 80 % (12.5 min)
 \rightarrow 10 % (12.51 min) \rightarrow STOP(20 min)
 Flow Rate : 0.2 mL/min
 Column Temperature : 40 $^{\circ}$ C
 Injection Volume : 1 μ L

[MS Conditions]

Probe Voltage : -3.5 kV (ESI-Negative mode)
 Drying Gas Pressure : 0.1 MPa
 CDL, Q-array Voltages : Using default values
 Nebulizing Gas Flow : 1.5 L/min
 CDL Temperature : 250 $^{\circ}$ C
 Block Heater Temperature : 200 $^{\circ}$ C

SIM Ions :

m/z 169 for Gallic acid
m/z 305 for (-)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin
m/z 289 for (+)-Catechin, (-)-Epicatechin
m/z 457 for (-)-Epigallocatechin Gallate, (-)-Gallocatechin Gallate
m/z 471 for (-)-Epigallocatechin 3-(3'-O-methyl) Gallate
m/z 441 for (-)-Epicatechin Gallate, (-)-Catechin Gallate
m/z 455 for (-)-Epicatechin 3-(3'-O-methyl) Gallate

7.HPLCによるべにふうき茶中のテアニン分析

テアニンは主に茶に豊富に含まれるアミノ酸のひとつです。茶の味を決定付ける旨み・甘み成分であることから重要な成分です。また、テアニンの効果についてはカテキンと同様にさまざまな研究がなされており、神経の興奮を抑えリラックスさせる、血圧降下作用などの効能が報告されています。アミノ酸であるテアニンの分析にはHPLCを用いることができます。OPA(ο-フタルアルデヒド)を反応試薬として用いるポストカラム蛍光誘導体化法で他の37成分アミノ酸類と同時に分析を行うことができますが、Li型陽イオン交換カラムで分離するこの方法は1分析に約160分が必要でした。

そこで、緑茶中に豊富に含まれるテアニンのみを短時間に分析する方法として、試料中に含まれるアミノ酸を逆相イオンペア法で分離後、ポストカラムでOPAと反応させて蛍光誘導体化し、分光蛍光検出器により検出す

る方法をご紹介します。この方法では、誘導体化することにより高い選択性でテアニンのみを1分析25分と短時間に高感度分析することができます。図13に、べにふうき抽出液中のテアニンの分析例を示します。

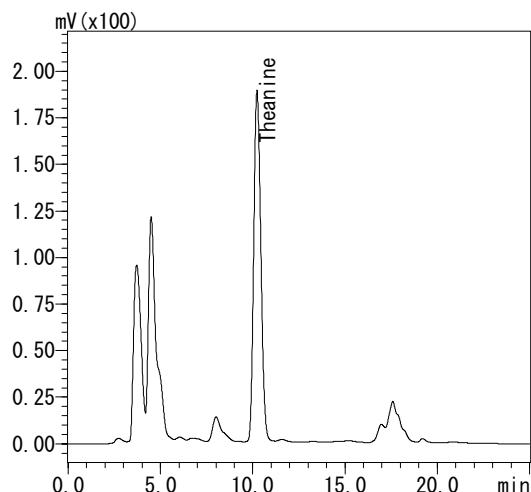


図13 べにふうき茶葉抽出液中のテアニンのクロマトグラム

表6 HPLCの分析条件

Column	: Synergi Hydro-RP (150 mmL. × 4.6 mmL.D.)
Mobile Phase A	: 20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.6) containing 10 mmol/L sodium 1-hexanesulfonate
Mobile Phase B	: Methanol
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Column Temperature	: 45 °C
Reaction Reagent	: Amino Acid Reagent Kit
Flow Rate of Reagent	: 0.2 mL/min
Reaction Temperature	: 45 °C
Detection	: RF-10AxL, Ex. at 350 nm, Em. at 450 nm
Injection Volume	: 10 μL

Time Program		
Time	Func	Value
0	B.Conc	5
11	B.Conc	5
11.01	B.Conc	50
16.00	B.Conc	50
16.01	B.Conc	5
25	STOP	

8.まとめ

機能性食品として緑茶が注目されており、様々な研究がなされています。その中でも緑茶中に豊富に含まれるカテキン類は、血中コレステロールや体脂肪低下、ガン予防、痴呆症予防など多様な効果が報告されています。ポリフェノールの一種であるカテキン類の分離・検出にはHPLCやLC-MSが有効です。緑茶中の8種のカテキン類と2種のメチル化カテキン、カフェイン、

アミノ酸のテアニンについて、HPLCやLC-MSの分析例をご紹介しました。Prominence UFLCとUFLCXRによる高速分析では分析時間の大幅短縮が可能となります。また、LC-MSを用いた質量選択による定性能強化は、確実なピーク同定を可能にし、分取分析や確認分析の作業効率化に大きく貢献します。

*本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行 2009年7月