

トリプル四重極型LC/MS/MSを用いたお茶中のカテキン類／テアフラビン類一斉分析

南元 彩花、小林 まなみ

ユーザーベネフィット

- ◆ お茶中のカテキン8種類とテアフラビン4種の一斉分析が可能です。
- ◆ 前処理はメンブランフィルターでろ過した後に希釈するのみで煩雑な作業は必要ありません。
- ◆ Traverse MS™を使用することで、簡便に多変量解析をすることが出来ます。

■はじめに

気軽に購入でき、ポリフェノールが多く含まれるお茶は、抗がん作用、認知症予防、抗ウイルス作用等の効果が期待される機能性食品として注目を浴びています。カテキン類は、特に緑茶葉中に含まれる成分で、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECG)、エピガロカテキンガレート (EGCG) が存在します。これらは加熱処理で、カテキン (C)、ガロカテキン (GC)、カテキンガレート (CG)、ガロカテキンガレート (GCG) となります。また、カテキン類は発酵過程で茶葉に含まれる酵素と反応し、カテキン類の組み合わせによって4種のテアフラビン類 (テアフラビン (TF1)、テアフラビン3-ガレート (TF2A)、テアフラビン3'-ガレート (TF2B)、テアフラビン3,3'-ジガレート (TF3)) になります。ここでは、トリプル四重極質量分析計LCMS-8050とShim-pack™ XR-ODS III カラムを用いて、簡易前処理による市販PET飲料水中のカテキン8種とテアフラビン4種を一斉分析し、緑茶について多変量解析を行った事例をご紹介します。

■カテキン類8種テアフラビン類4種一斉分析

表1に分析条件を、表2にMRMトランジションを示します。また、図1に12成分標準混合液を一斉分析したクロマトグラムを、図2にカテキン類およびテアフラビン類の構造式を示します。カテキン類はエピマー同士が連続的に溶出し、分離も良好でした。テアフラビン類においても構造異性体で質量が同じであるTF2AとTF2Bも同様に分離し、ピーク形状も良好でした。

表1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
Column	: Shim-pack XR-ODS III (150 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile phase	: A: Water containing 0.1% formic acid/ Tetrahydrofuran=95/5 (v/v) B: Acetonitrile
Time program	: B.CONC. 3% (0 min) → 35% (15-17 min) → 3% (17.01-20 min) フロントカットバルブを使用し、0.7-16 minのみ をMSへ導入
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 10 μL
Column temp.	: 50 °C
[MS conditions] (LCMS-8050)	
Ionization	: ESI (Positive mode)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.5 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C
Probe position	: +1 mm

表2 MRM条件

Compound	MRM Transition(m/z)	Collision energy(V)
GC	307.05>139.00	-13.0
	307.05>151.00	-10.0
	307.05>163.00	-21.0
EGC	307.05>139.00	-16.0
	307.05>151.00	-10.0
	307.05>163.05	-22.0
C	291.10>139.00	-14.0
	291.10>123.00	-15.0
	291.10>161.00	-18.0
EC	291.10>139.05	-14.0
	291.10>123.00	-14.0
	291.10>165.00	-12.0
EGCG	459.10>139.10	-21.0
	459.10>289.05	-10.0
	459.10>151.05	-14.0
GCG	459.10>139.10	-25.0
	459.10>289.05	-11.0
	459.10>151.10	-13.0
ECG	443.05>139.10	-25.0
	443.05>123.05	-19.0
	443.05>273.10	-9.0
CG	443.05>139.10	-27.0
	443.05>123.05	-23.0
	443.05>273.00	-10.0
TF1	565.10>139.05	-37.0
	565.10>427.00	-17.0
	565.10>276.95	-10.0
TF2A	717.10>139.15	-37.0
	717.10>277.05	-17.0
	717.10>150.95	-43.0
TF2B	717.10>579.05	-17.0
	717.10>139.10	-40.0
	717.10>276.95	-14.0
TF3	869.10>138.95	-48.0
	869.10>276.95	-17.0
	869.10>333.25	-18.0

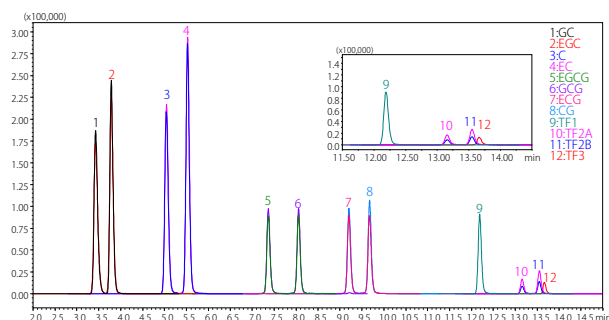


図1 12成分標準混合液のMRMクロマトグラム

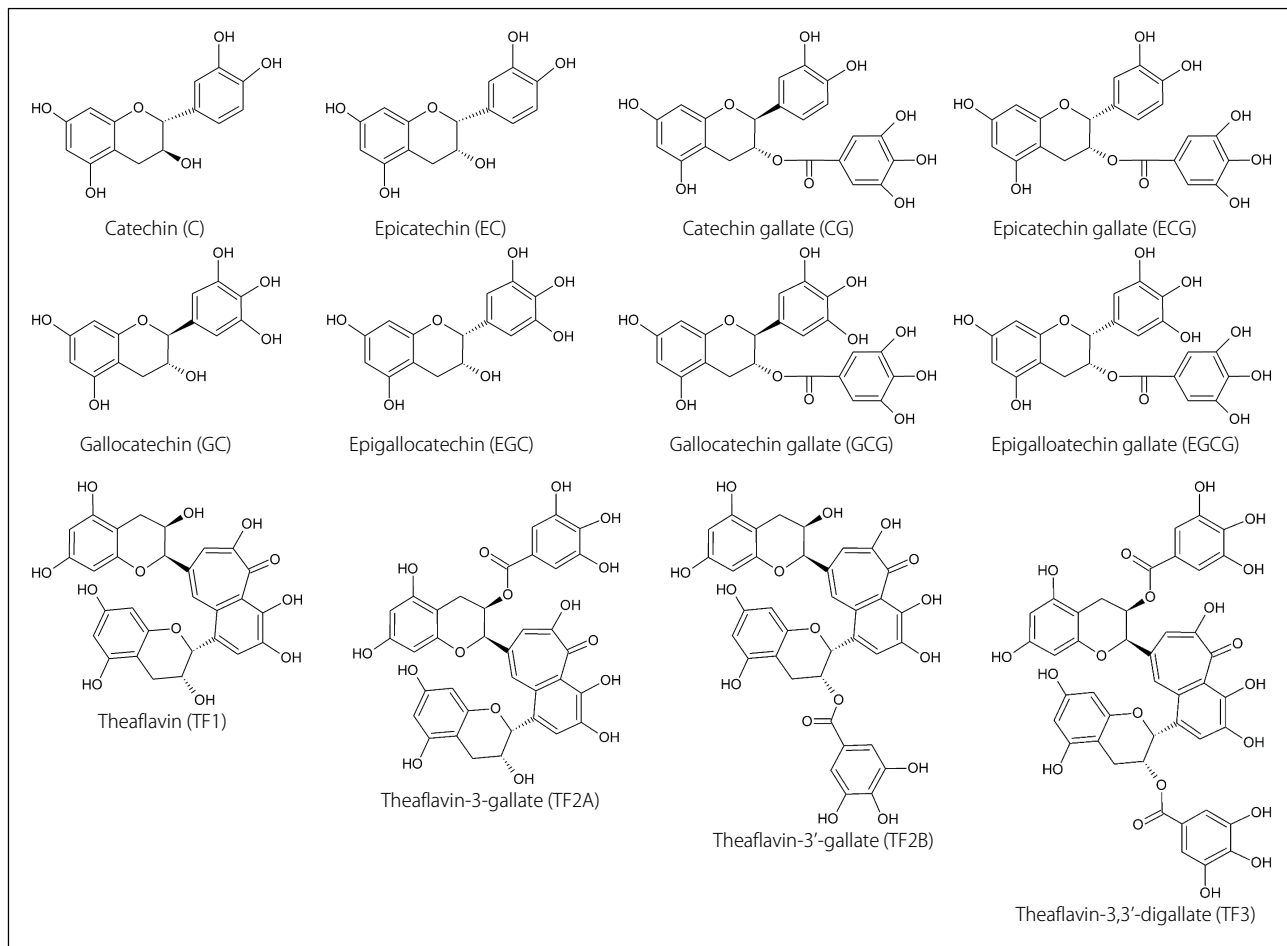


図2 カテキン8種およびテアフラビン4種の構造式

■ 各種お茶の定性分析

紅茶、ウーロン茶、緑茶9種をそれぞれ親水性混合セルロースエステルメンブレンフィルター（孔径：0.22 μm）でろ過し、カテキン類分析用に200倍希釈、テアフラビン類分析用に10倍希釈したものを使用しました。また、バイアルはTORAST™-H-Glass Vial（島津ジーエルシー）を使用しました。

図3—5に10倍希釈した紅茶、ウーロン茶および緑茶（代表して緑茶K）のMRMクロマトグラムを示します。緑茶には、テアフラビン類のピークはほとんど見られませんが、紅茶、ウーロン茶にはピークが確認できます。テアフラビン類のピーク有無により、緑茶と緑茶以外の判別が可能であることが示唆されました。

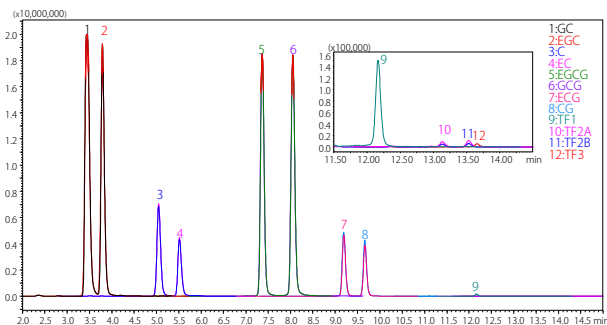


図4 10倍希釈ウーロン茶のMRMクロマトグラム

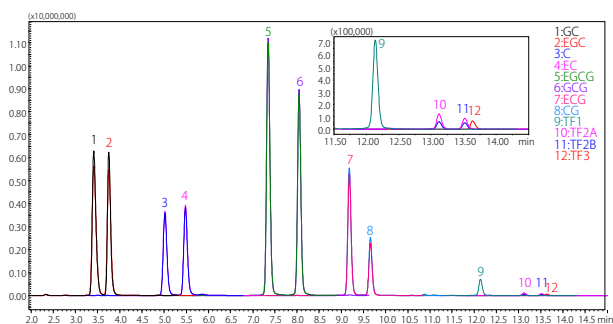


図3 10倍希釈紅茶のMRMクロマトグラム

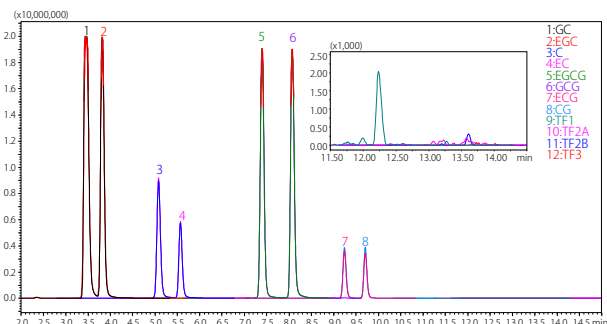


図5 10倍希釈緑茶KのMRMクロマトグラム

■ 各種お茶の定量分析

11種のお茶の定量結果を表3に示します。定量方法は、標準添加法を用いました。カテキン類分析には200倍希釈、テアフラビン類分析には10倍希釈したお茶を使用しました。図6に分析の流れを、表4および図7に代表して紅茶における各化合物の検量線と寄与率 (r²) を示します。

一般的に、市販の茶飲料中には非エピ体のガレート型カテキン (GCGおよびCG) が含まれることが知られており、製造加工工程における加熱処理によりEGCGやECGからエピ化して生成するものとされています。今回のお茶11種全てにおいて、非エピ体のカテキン類が含まれていることを確認しました。さらに、定性結果同様、緑茶中にはテアフラビン類がほとんど含まれておらず、紅茶およびウーロン茶には4種全てのテアフラビンが含まれていました。テアフラビン類は2種類のカテキンが茶葉中のポリフェノールオキシダーゼによって酸化された後に重合して生成するもので、発酵が進むほど増加します。今回の結果においても、半発酵茶のウーロン茶よりも発酵茶である紅茶の方が高濃度のテアフラビン類を含んでいました。

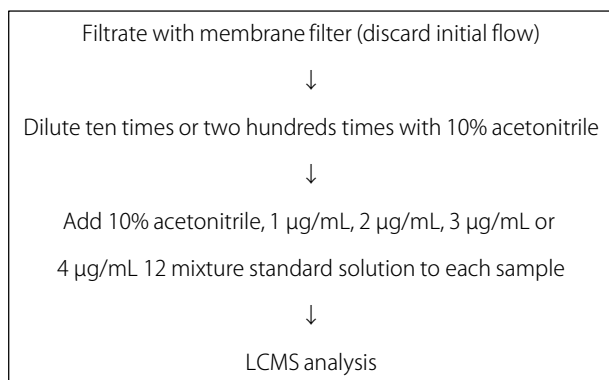


図6 分析ワークフロー

表4 紅茶に添加した各成分の検量線の寄与率 (カテキン類は200倍希釈、テアフラビン類は10倍希釈のお茶を使用)

化合物名	寄与率 (r ²)
GC	0.9995
EGC	0.9993
C	0.9990
EC	0.9995
EGCG	0.9978
GCG	0.9970
ECG	0.9994
CG	0.9984
TF1	0.9996
TF2A	0.9995
TF2B	0.9996
TF3	0.9999

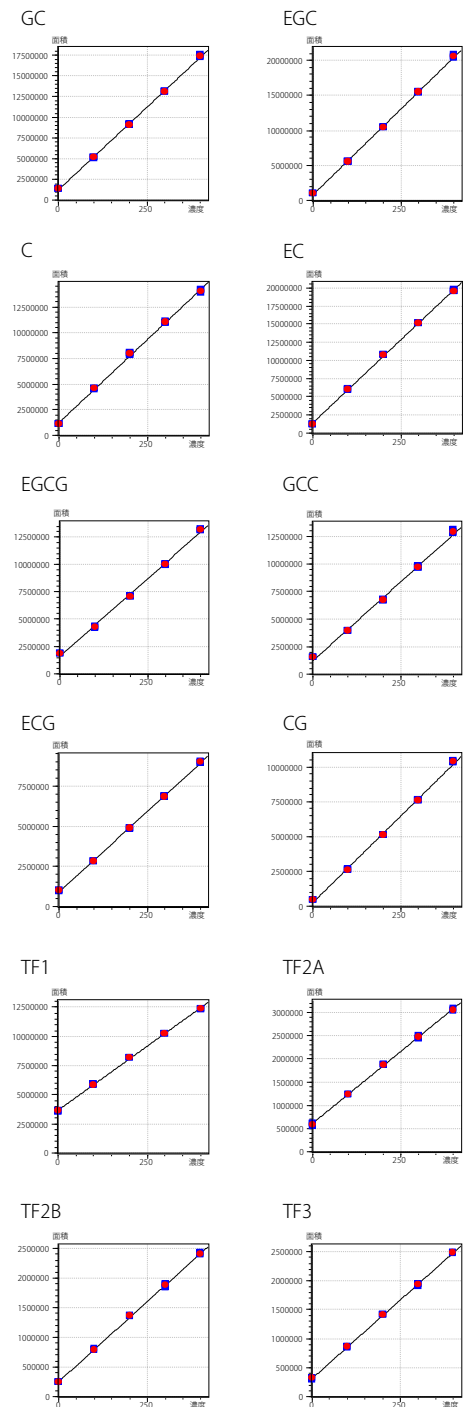


図7 紅茶に添加した各成分の検量線 (カテキン類は200倍希釈、テアフラビン類は10倍希釈のお茶を使用)

表3 お茶の定量結果 (単位: μg/mL)

	紅茶	ウーロン茶	緑茶C	緑茶D	緑茶E	緑茶F	緑茶G	緑茶H	緑茶I	緑茶J	緑茶K
GC	6.170	32.699	101.001	63.913	66.084	85.903	48.791	69.243	74.618	82.820	44.205
EGC	3.339	11.042	37.162	21.345	24.399	32.488	17.042	23.611	24.828	28.054	15.939
C	7.605	13.447	36.209	24.163	22.066	27.251	23.640	22.126	24.974	28.772	17.951
EC	6.115	7.072	14.645	8.663	9.607	12.943	9.306	8.552	9.969	10.778	8.378
EGCG	11.456	22.780	41.257	15.062	36.465	23.276	33.937	16.639	19.786	22.252	29.937
GCG	8.629	30.820	59.899	22.020	51.511	32.272	42.991	23.008	25.486	35.025	36.531
ECG	8.951	7.320	9.472	2.368	8.192	4.732	7.993	4.376	3.442	4.592	6.248
CG	2.151	3.828	9.123	2.227	7.492	3.334	6.659	4.114	2.759	4.512	4.788
TF1	1.679	0.342	0.071	N.D.	N.D.	0.041	0.076	N.D.	N.D.	0.060	N.D.
TF2A	0.989	0.045	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TF2B	0.468	0.022	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TF3	0.581	0.017	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: 0.012 μg/mL未満

■再現性

緑茶Kにて、分析サンプルを3点調製して分析を行い、日内差を確認しました。また、3日間同様の分析をし、日間差を確認しました(表5)。相対標準偏差は全成分で10%以内であり、日内および日間ともに再現性の良い分析方法であることが分かりました。

表5 再現性結果 (n=3)

	日内再現性 相対標準偏差RSD(%)	日間再現性 相対標準偏差RSD(%)
GC	1.56	2.21
EGC	1.11	1.52
C	1.65	2.09
EC	3.43	4.33
EGCG	1.37	1.93
GCG	0.30	1.73
ECG	3.95	2.35
CG	9.22	3.2
TF1	N.D.	N.D.
TF2A	N.D.	N.D.
TF2B	N.D.	N.D.
TF3	N.D.	N.D.

■緑茶の多変量解析

測定した緑茶9種に対し、カテキン類8種の面積値を用いて主成分分析(Principal Component Analysis: PCA)をTraverse MSソフトウェアにより行いました。データには、標準添加法の検量線下限点を用いました。

図8にScore plotおよびLoading plotの結果を示します。Score plotより、2種のクラスターが形成されました。Loading plotより、クラスターXでは、遊離型カテキン成分(C、EC、GC、EGC)が多く、ガレート型カテキン成分(CG、ECG、GCG、EGCG)が少ない傾向があり、クラスターYはその逆になっています。クラスターXは玉露や抹茶を含み、まろやかな口当たりを強調した製品でした。玉露や抹茶は、光を遮って茶葉を育てるため、一般的な煎茶と比較してアミノ酸含有量が多く、カテキン量が少なくなることで甘さやうまみが生まれると言われていています。お茶の渋みはECGやEGCGに依存し、後味の甘みはECやEGCに由来することから、渋みをおさえて甘みを多くするために被覆法を用いた茶葉を使用しているのではないかと考えられます。このように、官能試験だけでなく、多変量解析を組み合わせることで客観的かつ一目で評価することが可能になります。

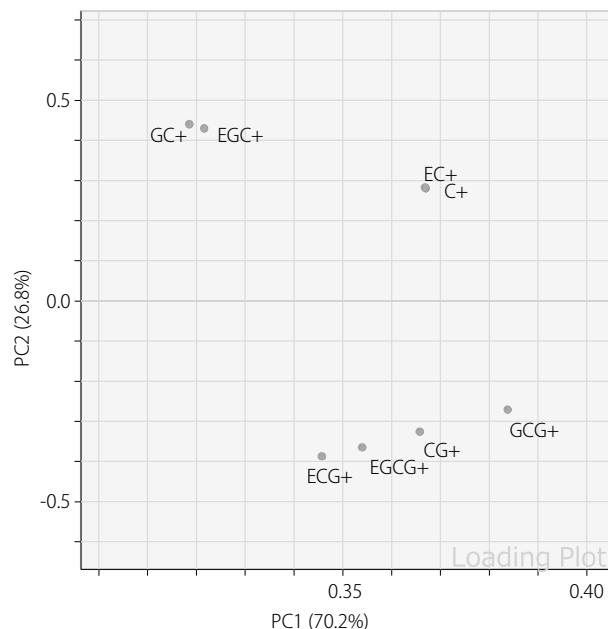
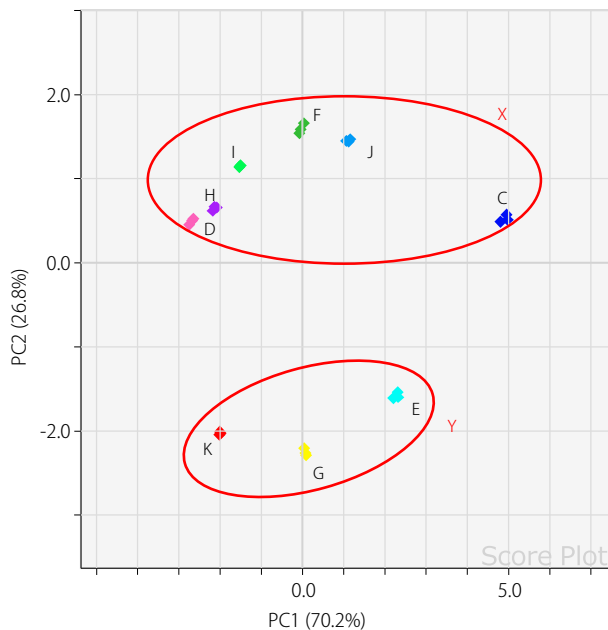


図8 PCA結果

■まとめ

トリプル四重極質量分析計LCMS-8050と一般的なODSカラムを用いて、カテキン類8成分とアフラビン類4成分を一斉に分析出来ることを確認しました。本分析法により、お茶中に含まれる12成分を簡単な前処理で定量をすることが可能です。また、Traverse MSを用いることで、簡便に多変量解析をすることが出来ます。

<謝辞>

データ採取にあたり、警察庁科学警察研究所法科学第三部化学第四研究室 柘様、吉川様にご協力頂きました。心より、謝意を表します。

LCMS、Nexera、およびShim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
Traverse MSは、ライフィクス株式会社の商標です。
TORASTは、株式会社島津ジーエルシーの商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00034-JP 初版発行：2021年 8月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。

改訂版は会員サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
閲覧には、会員情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021