ApplicationNOTE

Waters

ACQUITY UPLC™/MSデータの多変量解析法を用いた茶葉の識別

Application Note No. 720001598J

概要

茶は水以外の飲料では最も多く消費される飲料です。Camellia sinensisは中国原産の常緑樹種であり、3000種類もの茶が世界中に広まっています。それらは、おおまかに白茶・緑茶・ウーロン茶・紅茶・プアール茶・フレーバー茶の6種類に分類されます。特に緑茶はアジア諸国で、紅茶は欧米諸国でより好まれています。茶葉は数百にもなる複雑な多数の成分を含んでおり、特有の芳香を持ち、抗酸化ポリフェノールなど体に良いとされる成分の含有量が茶葉によって異なることが知られています。それゆえ、茶葉の識別には多変量統計解析手法が有効であると考えられます。

このアプリケーションノートではWaters ACQUITY UPLC™システムと LCT Premier™ XE で分析したデータをMassLynx MarkerLynx™アプリケーションマネージャーで解析した結果についてご紹介します。

サンプルの準備

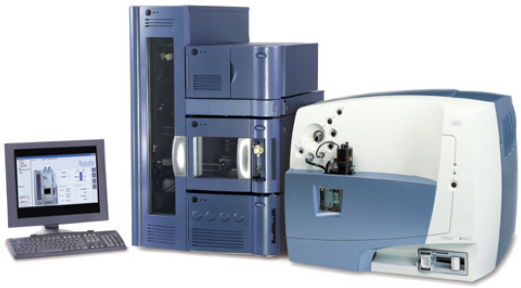
茶葉;

日本の緑茶、ハス茶、紅茶、アールグレイ、チャイ茶

フレーバー茶;

テンションタマー茶、クランベリー＆ラズベリー＆エルダーフラワー茶、レモン＆ジンジャー茶、ブラックカレント＆人参＆バニラ茶、カモミール茶

茶葉は各製品パッケージにある手順で湯にて煎じました。蒸留水で4倍量に希釈され、分析に用いました。



Acquity™ Ultra Performance LC

分析条件

装置

ACQUITY UPLC™ System

カラム: Waters Symmetry C_8 2.1×100 mm , 1.7 μm

移動相: A)0.1 % ギ酸 B)0.1 % ギ酸/アセトニトリル

流速 : 0.6 ml/min

注入量: 5 μl

サンプル温度: 10℃

カラム温度: 40℃

グラジエント条件:

Step	Time (min)	Flow Rate (mL/min)	%A	%B	Curve
1	Initial	0.770	100	0	Initial
2	0.36	0.770	100	0	6
3	0.60	0.770	88	12	6
4	2.10	0.770	79	21	6
5	2.40	0.770	75	25	6
6	3.0	0.770	5	95	6

※10分間の分析ではこのテーブルの時間を3.3倍したグラジエントを、30分間の分析ではこのテーブルの時間を10倍したグラジエントを用いて測定を行いました。

Mass Spectrometer

LCT Premier XE Mass Spectrometer

イオン化 : ESIポジティブ/ネガティブ

質量測定範囲: 50-850m/z

コーン電圧: 70V

キャピラリー電圧: 3200V(ポジティブ) 2800V(ネガティブ)

スキャンタイム: 0.3s

インタースキャンディレイ:0.1s

脱溶媒ガス: 700L/Hr

コーンガス: 50L/Hr

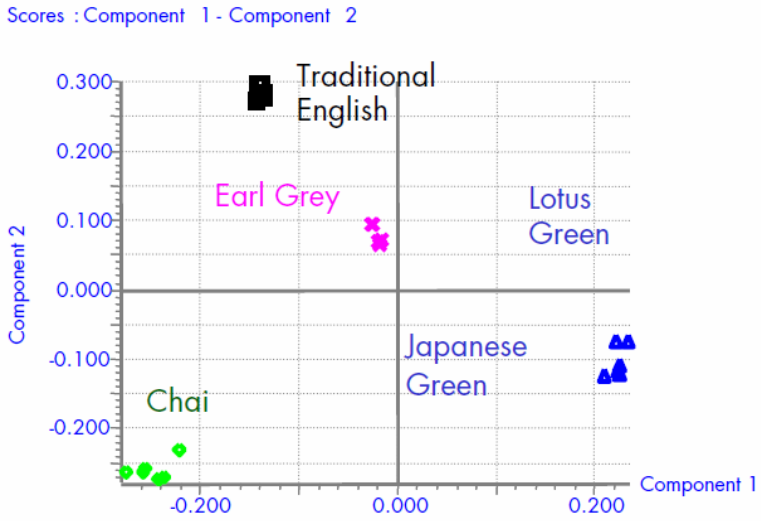
ソース温度: 350℃

LockSpray™: Leucine enkephalin 30μL/分

W-Optics™ Mode: Enabled

DRE: Enabled

図1. カフェイン含有茶を識別したスコアプロット



定性的に2つの茶サンプルを識別するには、クロマトグラムの視覚的な比較、リテンションタイムやマススペクトルが有効ですが、10種以上の茶葉の比較ではこのような検査をマニュアルで行うには多大な労働力を要します。
MarkerLynxはPCA(Principal Components Analysis；主成分分析)によるスペクトルデータに基づく茶葉の種類の自動的な分類(スコアプロット)と、統計学的有意性を見るための、リテンションタイムーm/zで構成されるグラフ(トレンドプロット)を作成するために用いられます。

図1はカフェインを含む茶5種を解析したMarkerLynx PCA結果です。3分間のグラジエント条件によるESI(ポジティブ)UPLC™/MSデータを用いています。各々の属性によって分類されていることがわかります。

図2にカモミール茶とチャイ茶のUPLC™/TOFクロマトグラムの比較を示します。30分のグラジエント条件を使用しています。茶サンプルは煎じてから時間が経つに連れて色が変わり各成分量も変化して行きます。UPLC™を用いた高速な分離分析は、このような副反応的要因を低減するためにも有効です。

図2. カモミール茶とチャイ茶のUPLC™/TOF クロマトグラムの比較 (ESIネガティブ; 30分分析)

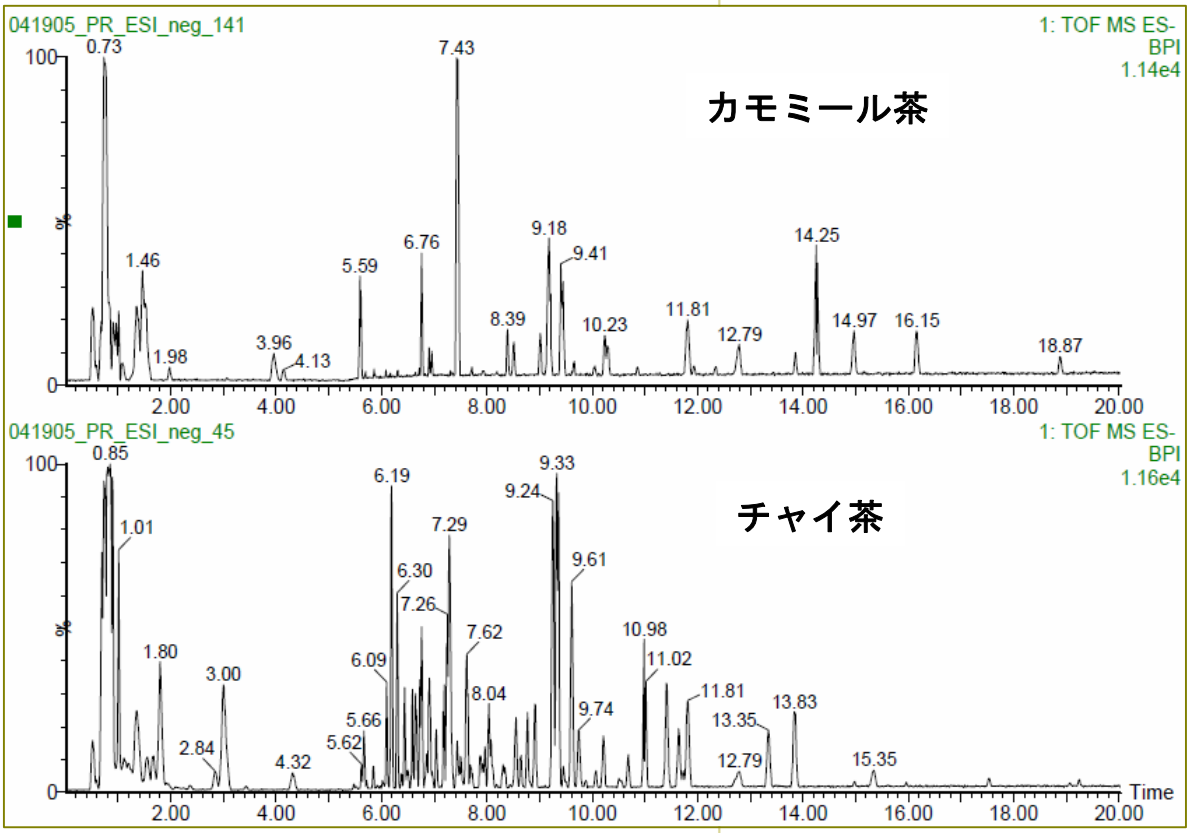


図3. トレンドプロット(サンプルvsイオン強度)

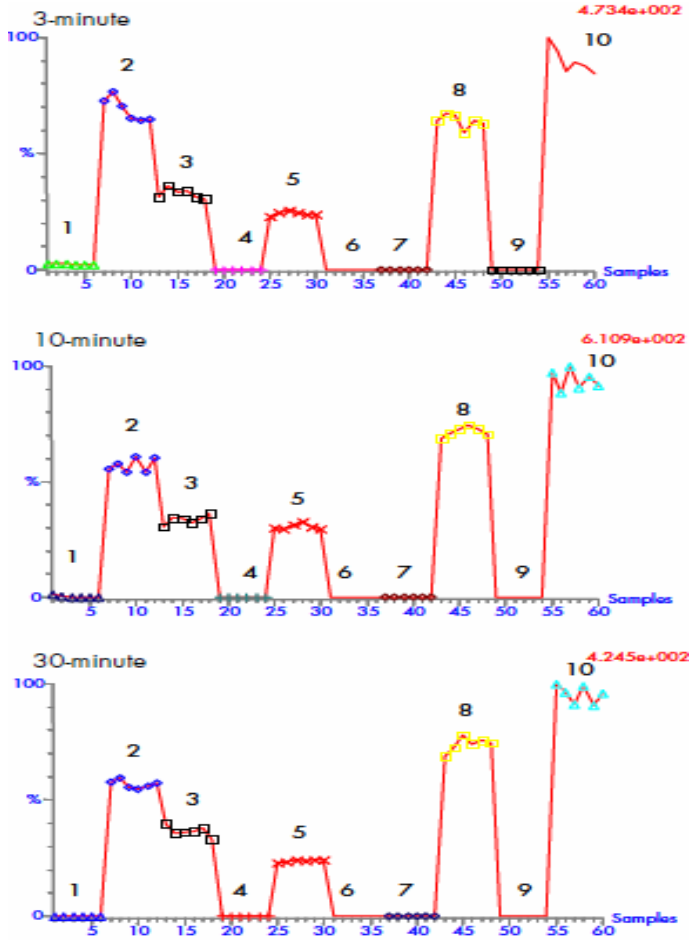


図3にサンプルNo.対イオン強度であるトレンドプロットを示します。カテキンガレートのピークのプロットです。これより茶葉によるカテキンガレートの含有量の差を見ることができます。各番号に対応する茶葉は以下の通りです。

1) テンション・タマー茶
2) 日本緑茶
3) チャイ茶
4) クランベリー＆ラズベリー＆エルダーフラワー茶
5) 紅茶
6) レモン＆ジンジャー茶
7) ブラックカレント＆人参＆バニラ茶
8) アールグレー茶
9) カモミール茶
10) ハス茶

上から3分グラジエント、10分グラジエント、30分グラジエントとなっています。3分間という高速分離条件を用いても、有意差を見るために十分な情報が得られます。

図.4 カフェイン含有茶とハーブ茶を識別した PCAスコアプロット

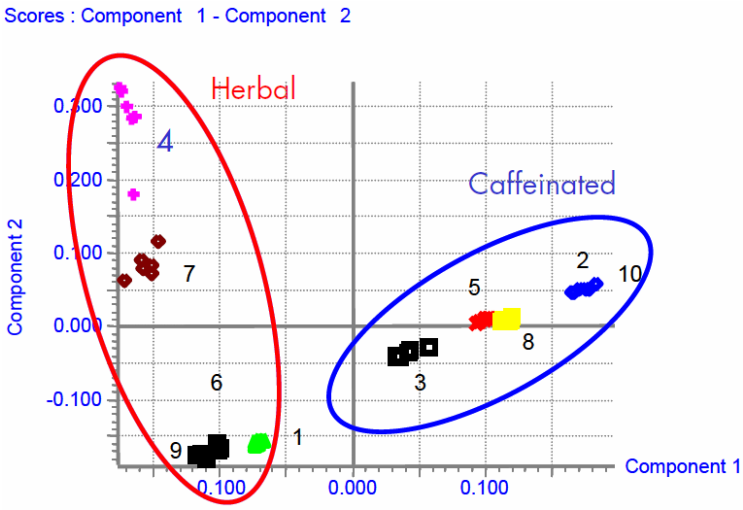


図4にカフェイン含有茶とハーブ茶のPCAスコアプロットを示します。カフェイン以外の成分による識別をするために、カフェインピークを取り除いて統計計算が行われました。カフェイン以外の成分からも、多変量統計解析によってグループ分けによる識別がなされています。
各番号は図3の説明中のものに対応しています。

図5. 精密質量測定によるカテキンガレートピークのトレンドプロット

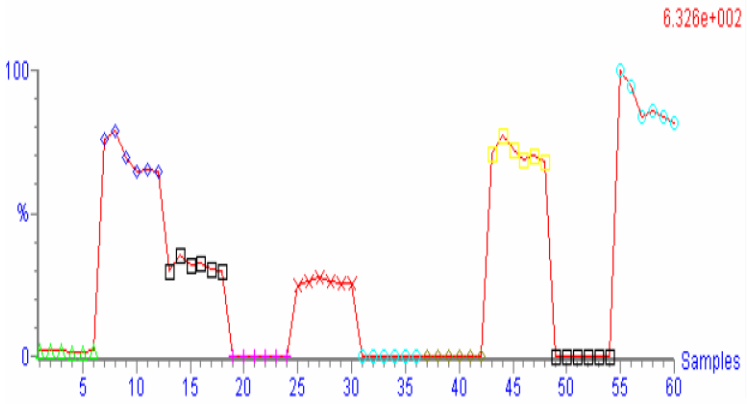
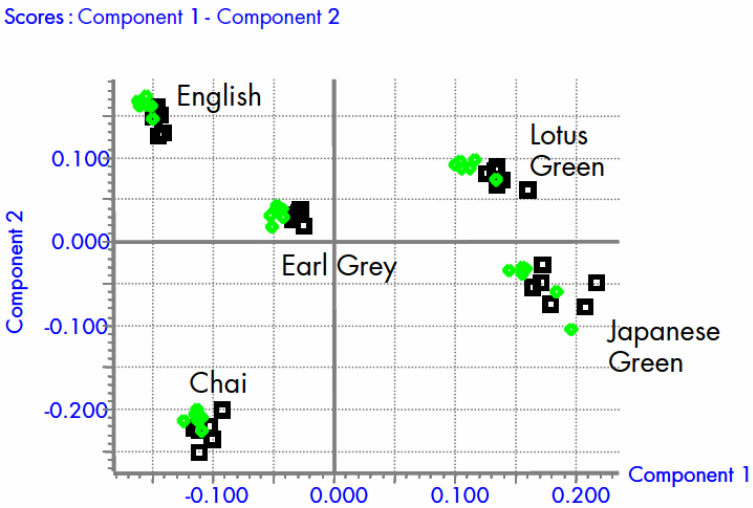


図6. 冷たい茶と温かい茶のスコアプロット

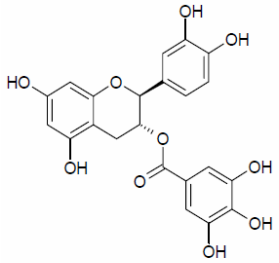


まとめ

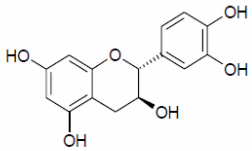
多変量統計解析手法を用いて各種茶葉を解析した結果、グループを識別し、カテキンガレート含有量の有意差を見ることができました。Waters ACQUITY UPLC™ /LCT Premier™ XE と MassLynx MarkerLynx™アプリケーションマネージャーの組み合わせは、多数の成分を含むサンプルのグループ分けや、種類を特徴付けるマーカーを探す手段として有効な手法です。

図5には精密質量測定によるデータを用いたカテキンガレートピークのトレンドプロットを示します。サンプルはカフェイン含有茶10種です。精密質量を用いることにより、多数の未同定ピークの中に存在するターゲット化合物の存在を確認することができます。この結果は文献1)2)3)にある、カテキンガレートに関する記述を裏付けています。

図6は冷たい茶と温かい茶のスコアプロットを示しています。どちらのサンプルにおいても、各茶葉の識別がはっきりなされていることがわかります。



Catechin Galate



Catechin

文献

1. Sakakibara, Hiroyuki; Honda, Yoshinori; Nakagawa, Satoshi; Ashida, Hitoshi; and Kanazawa, Kazuki Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51(3), 571-581.

2. Lin, Yung-Sheng; Wu, Sang-Shung; and Lin, Jen-Kun Determination of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Flowers (Camellia sinensis) and Their Hydroxyl Radical Scavenging and Nitric Oxide Suppressing Effects. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 975-980.

3. Zeeb, Daniel J.; Nelson, Bryant C.; Albert, Klaus; and Dalluge, Joseph J. Separation and Identification of Twelve Catechins in Tea Using Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, 72(20), 5020-5026.

Waters

日本ウォーターズ株式会社　www.waters.co.jp

東京本社　〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第 5 小池ビル
TEL 03-3471-7191　FAX 03-3471-7118

大阪支社　〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 カトキチ新大阪ビル 11F
TEL 06-6304-8888　FAX 06-6300-1734

ショールーム　東京　大阪

テクニカルセンター　東京　大阪　名古屋　福岡　静岡

LLOYD'S REGISTER QUALITY ASSURANCE ISO9001
UKAS QUALITY MANAGEMENT 001
VIT