

## SPME - GC/MS/MS と多変量解析による 接ぎ木した紅茶香氣成分の差異分析

### アプリケーションノート

#### 著者

Wei Chen, Chengying Ma, Aiqing Miao, Shi  
Pang, and Dandan Qi  
Tea Research Institute,  
Guangdong Academy of Agricultural Sciences,  
Guangdong, China

Wenwen Wang  
Agilent Technologies, Inc.  
Beijing, China

#### 概要

接ぎ木による紅茶サンプルの差異を分析するために、固相マイクロ抽出 (SPME) とガスクロマトグラフィー / トリプル四重極質量分析 (GC/MS/MS) を用いたメソッドを開発しました。データ抽出と統計解析には、Agilent MassHunter Profinder および Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアを使用しました。同定された、または暫定的に同定された特徴的な揮発性化合物については、主成分分析と階層的クラスター分析によって、茶サンプル中での差異を明らかにしました。



**Agilent Technologies**

## はじめに

茶 (カメリアシネンシス) は世界中で一般的な飲料であり、特に中国では広く好まれています。茶の香りは、官能的品質の主要な指標の1つとして揮発性成分を表すものです。接ぎ木は、茶の繁殖と栽培品種の変更に幅広く用いられている手法です。接ぎ木を行った後には、揮発性成分が変化する可能性があります。これは、根茎を交換すると接ぎ穂の二次代謝物に差異が生じることがあるためです [1、2]。ガスクロマトグラフィー / 質量分析 (GC/MS) を多変量解析と組み合わせる手法により、茶サンプル中の揮発性化合物と半揮発性化合物の複雑な混合物内での差異を効率的に分析することができます。

この研究では、接ぎ木によって発生する香りのプロファイルの差異を示すために、固相マイクロ抽出 (SPME) をスキャンモード動作の GC/MS/MS および多変量解析と組み合わせ、紅茶サンプルの揮発性成分の抽出および分析に適用しました。このサンプルは、中国の広東省では一般的な茶品種である YingHong No.9 の接ぎ木していないものと接ぎ木したものとから調製しました。化合物情報の抽出と化合物交換ファイル (cef ファイル) でのデータのエクスポートには、Agilent MassHunter Profinder ソフトウェアを使用しました。特徴的な揮発性化合物のデータマトリックスを良好な再現性で取得するために、バイオインフォマティクスデータマイニングと多変量解析用のソフトウェアである Agilent Mass Profiler Professional (MPP) を使用して、サンプルの調整とデータのフィルタリングを実施しました [3、4]。得られた化合物に対して、主成分分析 (PCA) および階層的クラスター分析 (HCA) を実施して、さまざまな茶サンプル間の差異を同定しました。

## 実験方法

### 茶サンプル

6つのバイオロジカルレプリケートを含む、5グループのローターバン (Cut-Tear-Curl 加工タイプ) 紅茶サンプルを、接ぎ木していない YingHong No.9 (CK) と、BaiMao No.2 (BM)、HeiYe ShuiXian (HY)、HuangZhiXiang DanCong (HZX)、および WuLingHong (WLH) という4種類の異なる茶品種の根茎で接ぎ木した YingHong No.9 から調製しました (図 1)。



図 1. 使用した茶の供給源

## 分析条件

表 1. GC/MS/MS 条件

パラメータ	設定値
GC システム	Agilent 7890B
カラム	DB-5MS, 60 m × 0.32 mm, 0.25 μm (p/n 123-5562)
オープンプログラム	50 °C で 3 分ホールド、 5 °C/min で 250 °C まで、5 分ホールド
キャリアガス流量	ヘリウム
流量	1.0 mL/min
注入モード	マニュアル、SPME ファイバー
注入口温度	270 °C
インタフェース温度	280 °C
MS システム	Agilent 7000D
イオン源	EI, 70 eV
イオン源温度	230 °C
四重極温度	Q1 および Q2 = 150 °C
スペクトル採取	フルスキャン、35~500 m/z

## SPME 条件

3.5 g の紅茶サンプルをガラスバイアルに計量し、10 mL の熱湯を添加してから、内部標準として 10.0 μL のデカン酸エチル (0.2 μg/μL、エチルエーテル溶液) を添加しました。バイアルを密封して 60 °C 水槽内に移し、5 分間そのまま置きました。抽出は、60 °C で 40 分間、DVB/CAR/PDMS-50/30 μm SPME ファイバーにより行いました。SPME ファイバーは、270 °C で 4.5 分間吸着させました。

## 結果と考察

### データの抽出

図 2A に、各紅茶サンプルのトータルイオンクロマトグラムを示します。MassHunter Profinder ソフトウェアは、プロファイリング分析で複数のサンプルを処理するための生産性向上ツールであ

り、多数のサンプル間の結果を化合物別に視覚化、確認、および編集することができます。サンプル間の処理に基づいて、高品質の結果を取得できます。クロマトグラフィーピークの抽出には、Profinder ソフトウェア (バージョン B. 08) のモレキュラーフィーチャー抽出 (MFE) を使用しました (図 2B)。各サンプルの cef ファイルを Profinder ソフトウェアで取得し、MPP ソフトウェアにインポートして分析しました。

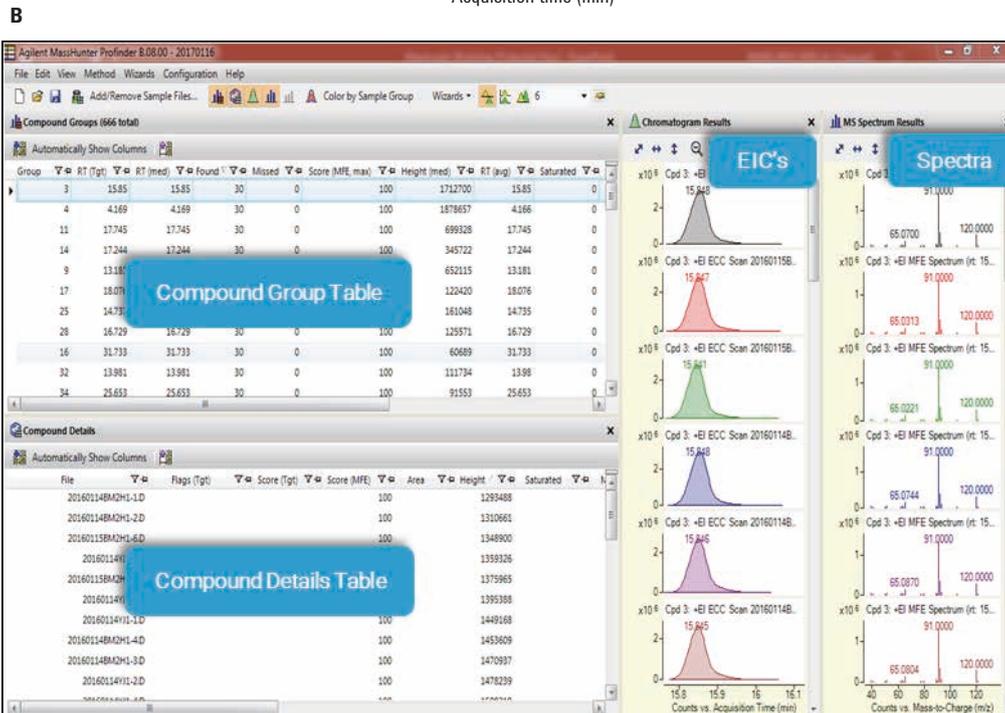
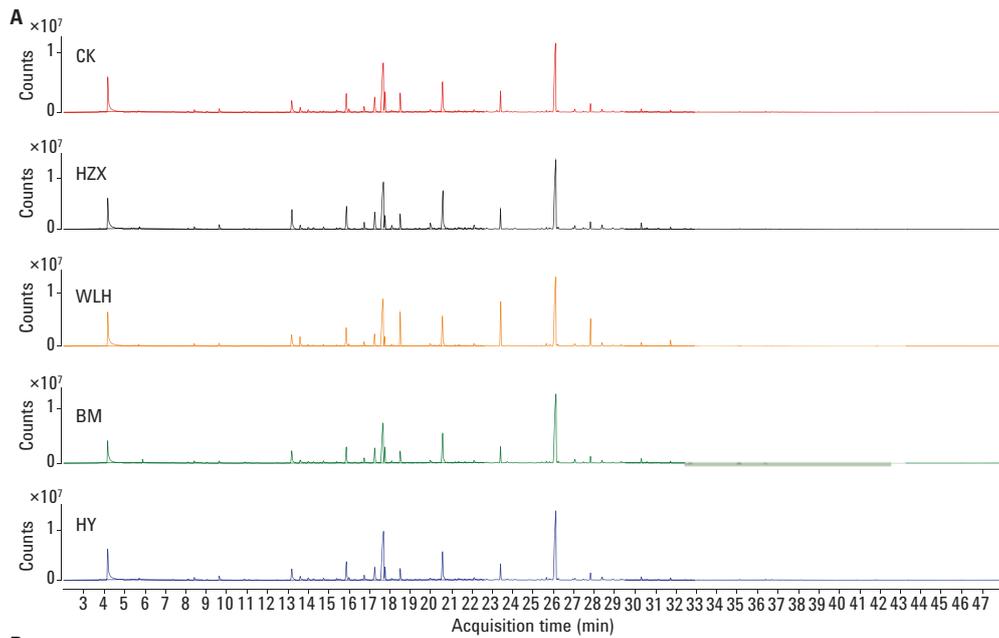


図 2. A) 5 つのグループの紅茶サンプルのトータルイオンクロマトグラム。B) Agilent MassHunter Profinder ソフトウェアのメイン画面

## データのフィルタリングと化合物の同定

MPPソフトウェア(バージョンB.14.5)を使用して、データのフィルタリングと多変量解析を実施しました。すべてのcefファイルに対してデータのフィルタリングを実施しました。5つのサンプルグループ間でデータを調整し、合計584のエンティティを取得しました。その後、発生頻度、サンプル変動、および一元配置分散分析(一元配置ANOVA)のフィルタに基づいて段階的なデータのフィルタリングを実行しました。102のエンティティは最低1つのサンプルグループ内に常に存在し(発生頻度フィルタ)、良好な再現性(変動係数 < 25%、サンプル変動フィルタ)を示しました。次に、

CK(接ぎ木していないグループ)に関して、p値カットオフ0.05および倍率変化閾値1.5( $FC \geq 1.5$ )の一元配置ANOVAにより44のエンティティを選択しました。最後に、NIST14データベースを基にしたライブラリ検索に従って、ID Browserにより34の化合物を暫定的に同定しました(図3)。標準試料を使用して確認した8つの揮発性化合物を、表2に示します。主にアルデヒド、アルコール、ケトン、およびエステルから構成されている34の化合物に対して、主成分分析および階層的クラスター分析を実施しました。

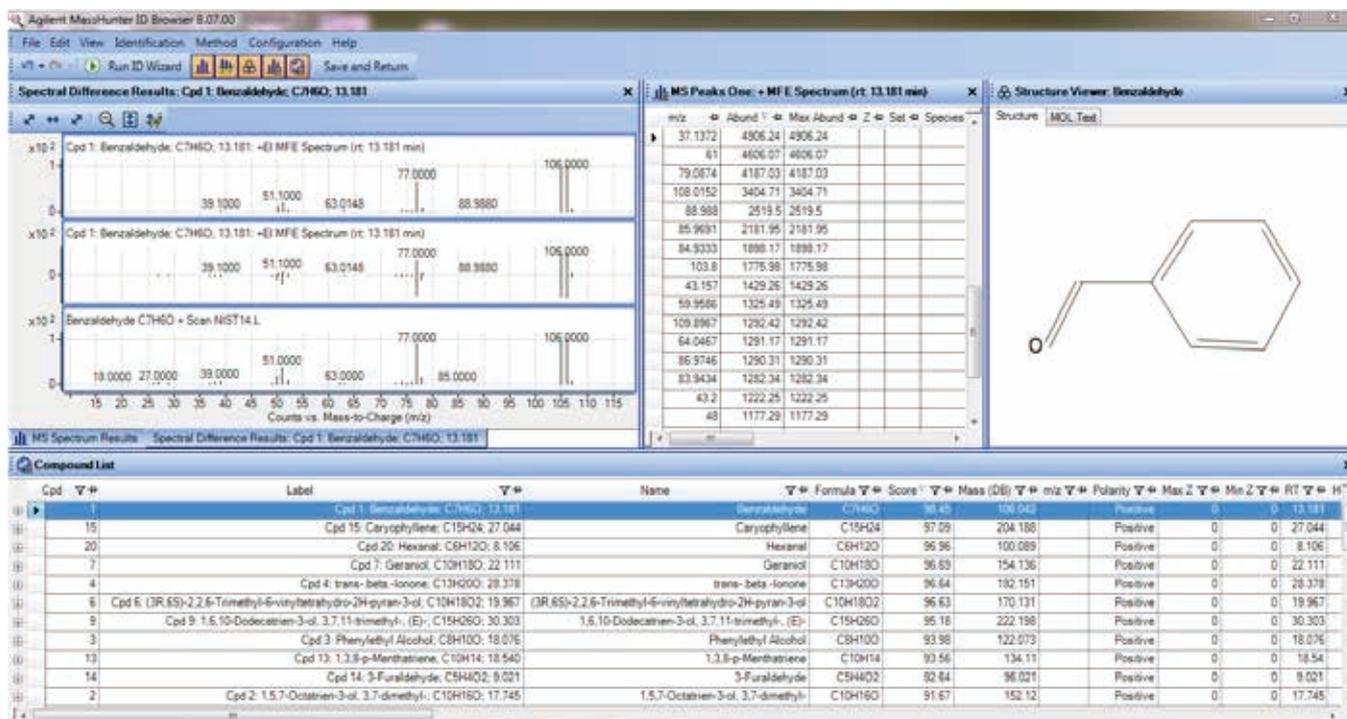


図3. 化合物の同定に使用した Agilent Mass Profiler Professional の ID Browser 機能

表2. 標準試料による化合物の同定

No.	RT (分)	化合物	CAS 番号
1	8.10	ヘキサナール	66-25-1
2	13.18	ベンズアルデヒド	100-52-7
3	14.74	(E,E)-2,4-ヘプタジエナール	4313-03-5
4	16.24	(E)-2-オクテナール	2548-87-0
5	19.44	(E)-2-ノネナール	18829-56-6
6	20.81	デカナール	112-31-2
7	22.11	ゲラニオール	106-24-1
8	28.38	(E)-β-イオノン	79-77-6

## 主成分分析 (PCA)

PCA は一般的に用いられている教師なし統計的手法の 1 つで、大規模なデータセットの次元性を縮小することにより、サンプル間の差異を明らかにします。選択した 34 の化合物に対して PCA を実施しました。最初の 3 つの主成分により、オリジナルデータのうち約 90 % の差異が説明されました。3D スコアプロットによると、CK と 接ぎ木した 4 つのサンプルグループが明確に分離されており、これは接ぎ木していないものと接ぎ木したもののサンプルディスクリミネーションに対して、選択した化合物が特徴的であることを示しています (図 4)。PC1 により 47.6 % の差異が説明されており、HZX、BM、およびグループの残りはこの座標に沿って分離されました。PC2 により 25.4 % の差異が説明されており、CK、HY、および WLH のサンプルはこの座標に沿ってお互いが分離されました。

## 階層的クラスタ分析 (HCA)

HCA はデータセット内のサブグループを発見する強力な手法で、類似したアバundanceプロファイルを持つ測定結果をクラスターに統合します。HCA は、選択した 34 の化合物に対して実施しました。その結果をデンドログラムとして表示しています (図 5)。茶サンプルは接ぎ木処理に従って 5 つのクラスターに分類されました。接ぎ木したグループ BM のサンプルは CK のサンプルと化合物アバundanceにおいて高い類似性を示している一方、HZX のアバundanceプロファイルは CK と接ぎ木したグループの残りに対して固有の特徴を示していました。

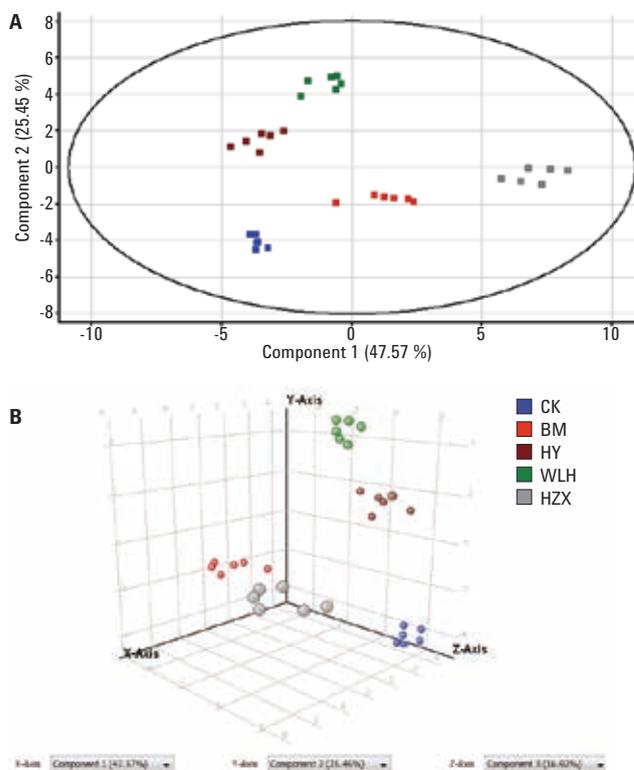


図 4. 5 つのグループの紅茶サンプルの 2D (A) および 3D (B) PCA

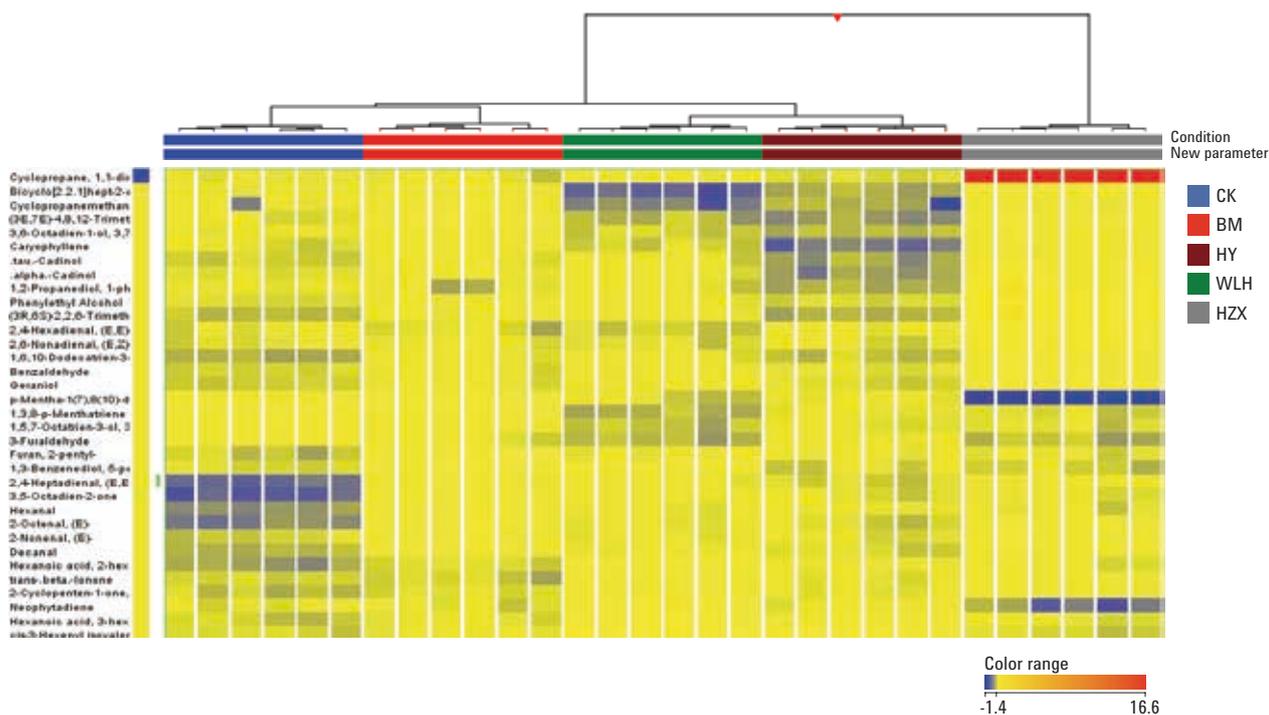


図 5. 紅茶サンプルで検出された化合物の関連を示す HCA ヒートマップ

## 結論

Agilent 7000D GC/MS/MS を使用したノンターゲット GC/MS 分析により、接ぎ木による紅茶の香気成分を分類して判別するために必要な情報豊富なデータが得られます。Agilent MSD Productivity MassHunter および Agilent Mass Profiler Professional ソフトウェアを用いてデータの自動マイニングと処理を実行することにより、特徴的な化合物を検出することができました。同定された化合物に基づいて PCA と HCA を使用することにより、5 つのグループが明確に分離されました。今回の研究結果により、接ぎ木は紅茶の揮発性有機化合物のプロファイルに影響を与え、茶の繁殖における根茎の選択において有益になる可能性が示されました。

## 参考文献

1. E. J. Warschefsky, *et al.* “Rootstocks: diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes” *Trends in Plant Science* **21(5)**, 418-437 (2016).
2. R. Joshi, *et al.* “Fractionation and identification of minor and aroma-active constituents in Kangra orthodox black tea” *Food Chemistry* **167**, 290-298 (2015).
3. M. Wang, *et al.* “An integrated approach utilising chemometrics and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products” *Food chemistry* **152**, 391–398 (2014).
4. S. Baumann, *et al.* Olive Oil Characterization using Agilent GC/Q-TOF MS and Mass Profiler Professional Software, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0106EN.

## 詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, August 15, 2017

5991-8330JAJP



**Agilent Technologies**