

茶ポリフェノール及びカフェインの組成を利用した茶種の識別

樋野 千寿*, 三浦 徹*, 梅田 寛*, 竹元 賢治*, 辻 恵美*, 笹川 邦雄*

Differentiation of Tea categories by the Composition of Tea polyphenols and Caffeine

Chitoshi HINO*, Toru MIURA*, Hiroshi UMEDA*, Kenji TAKEMOTO*, Emi TUJI*, and Kunio SASAKAWA

*Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

Polyphenols contained in tea plants largely consist of catechins. In green tea, which is unfermented tea, most catechins are maintained, but in partially fermented Oolong tea and fully fermented black tea, a part of the catechins is converted into theaflavins by enzymatic oxidization. Thus there is a relationship between the composition of tea polyphenols and the category of tea. In this paper nine kinds of tea polyphenols [(-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin gallate, gallic acid, theaflavin, theaflavin-3-manogallate, theaflavin-3'-monogallate and theaflavin-3,3'-digallate] and caffeine were simultaneously determined by HPLC. For discriminating four tea categories – green tea, Oolong tea, black tea and dark tea – pattern recognition techniques were applied to the resultant data. The results of principal component analysis and cluster analysis suggested possible splitting of the data into several clusters corresponding to tea categories or origins. By canonical discriminant analysis and K-nearest neighbors, tea samples were differentiated into the four categories.

1. 緒 言

実行関税率表第0902項に分類される茶は、ツバキ科・ツバキ属の一種である *Camellia sinensis* L の葉を加工したものを指し、これは「緑茶（発酵していないもの）」（第0902.10号又は第0902.20号）と「紅茶及び部分的に発酵した茶」（第0902.30号又は第0902.40号）に分類され、さらに「紅茶及び部分的に発酵した茶」は、統計細分により「紅茶」と「その他のもの」に分類される。

「その他のもの」に分類されるものは、主として烏龍茶などの半発酵茶と呼ばれる種類の茶である。関税率の点からみた場合、紅茶と紅茶以外の茶（緑茶、烏龍茶等）の間に税率格差があるため、特に紅茶か紅茶以外の茶かを明確に識別する必要がある。

緑茶、烏龍茶、紅茶は、それぞれ不発酵茶、半発酵茶、完全発酵茶とも表現される。これは、製法の違いに基づく名称であって、必ずしもすべての緑茶、烏龍茶及び紅茶に対して緑茶、烏龍茶、紅茶の順に発酵程度が高くなるという関係が成り立つわけではない。しかし、茶葉の発酵は、酸化酵素によるカテキン類の代謝が伴うものであること¹⁾、またカテキン類の代謝によって生じるテアフラビン類の含有量は、紅茶で多く、烏龍茶で少ない傾向があり、緑茶では検出されないことが報告されて

いる²⁾。このことから、カテキン類、テアフラビン類などの茶ポリフェノール類の組成は、茶の発酵程度、種類と密接な関係があると考えられる。また、これらの茶とは別に黒茶あるいは、後発酵茶と呼ばれるものがあり、この種の茶は、酸化酵素による酵素発酵ではなく、微生物の作用による発酵を利用している。このため、微生物発酵により、カテキン類の減少が認められるが、テアフラビン類は検出されない^{1) 2)} という特徴がある。

以上のことから、茶種を識別するために、カテキン類、テアフラビン類等の茶ポリフェノールに着目することは有効な手段と考えられる。類似の観点からなされた研究の例としては、茶に含有されるカテキン類及びプリンアルカロイド類の定量を行い、各定量値を基に多変量解析法におけるパターン認識の手法を用いて茶種を識別しているものがある^{3) 4)}。しかし、テアフラビン類を含めた茶ポリフェノールの組成から緑茶、烏龍茶、紅茶及び黒茶の4種を同時に識別している例は見当たらない。そこで本研究では、茶の浸出液に対し、高速液体クロマトグラフィーによるカテキン類、テアフラビン類、さらにカフェイン、没食子酸までを含めた一斉分析を行い、得られた定量結果を基に多変量解析法におけるパターン認識の手法を用いて、緑茶、烏龍茶、紅茶及び黒茶の4種の茶を識別することが可能か検討した。

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海2-56

2. 実 験

2. 1 標準試料（すべて和光純薬工業社製）

没食子酸(GA)「一級」

(一) -エピカテキン (EC)「生化学用」

(一) -エピカテキンガレート (ECg)「生化学用」

(一) -エピガロカテキン(EGC)「生化学用」

(一) -エピガロカテキンガレート (EGCg)「生化学用」

カフェイン「特級」

テアフラビン(TF1)「生化学用」

テアフラビン-3-ガレート(TF2)「生化学用」

テアフラビン-3'-ガレート(TF3)「生化学用」

テアフラビン-3,3'-ジガレート(TF4)「生化学用」

2. 2 試料

試料は、国内で市販品として流通している茶種及び産地の明確なものを購入した。一覧を Table1に示す。

2. 3 分析装置及び分析条件

文献^{1) 5)}を参考に以下の条件に設定した。

装置：高速液体クロマトグラフ HP1100(Agilent 社製)

カラム：NUCLEOSIL C18 4.6×250mm

カラム温度：40℃

検出器および検出波長：ダイオードアレイ検出器 (DAD)
210nm

サンプル注入量：10 μ l

流速：1.0ml/min

移動相：A液 水：リン酸=200：1

B液 アセトニトリル：水：リン酸=100：100：1

グラディエント設定：A：B=85：15 (0～1分)

85：15～67：33 (1～24分)

67：33～50：50 (24～35分)

50：50～60：40 (35～55分)

次の分析までの平衡化時間を5分間とした。

2. 4 試料の調製

茶葉約1 gを精秤し、アセトン10ml及び蒸留水30mlを加え、24時間室温で浸出させ、蒸留水で抽出液を50mlに定容した。この浸出液を蒸留水で5倍に希釈後、0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、HPLC用検液とした。

2. 5 カテキン類、テアフラビン類、没食子酸、カフェインの定量

各成分の定量は、標準試薬を用いて絶対検量線法により算出した。

Table1 Tea samples

| Class | Sample | Origin | Notes |
|------------|--------|----------------------------|--|
| Green tea | G1 | CHINA(CN) | JASMIN TEA(TEA BAG) |
| | G2 | CHINA(CN) | JASMIN CHUNG FENG |
| | G3 | CHINA(CN) | LONG JING |
| | G4 | CHINA(CN) | PILUOCHUN |
| | G5 | CHINA(CN) | HUANG SHAN MAO FENG |
| | G6 | CHINA(CN) | |
| | G7 | CHINA(CN) | |
| | G8 | CHINA(CN) | |
| | G9 | CHINA(CN) | JASMIN TEA |
| | G10 | CHINA(CN) | JASMIN TEA |
| | G11 | JAPAN(JP) | SEN CHA |
| | G12 | JAPAN(JP) | SEN CHA |
| Oolong tea | O1 | TAIWAN(TW) | FOUR SEASONS OOLONG TEA |
| | O2 | TAIWAN(TW) | FORMOSA OOLONG TEA |
| | O3 | TAIWAN(TW) | FORMOSA OOLONG TEA |
| | O4 | TAIWAN(TW) | DONG DING OOLONG TEA |
| | O5 | TAIWAN(TW) | WEN SHAN BAO ZHONG |
| | O6 | TAIWAN(TW) | (FLAVORED TEA) |
| | O7 | TAIWAN(TW) | |
| | O8 | CHINA(CN) | (TEA BAG) |
| | O9 | CHINA(CN) | TIE GUAN YIN CHA |
| | O10 | CHINA(CN) | HUANG JING YUI |
| | O11 | CHINA(CN) | DA HONG PAO |
| | O12 | CHINA(CN) | (FLAVORED TEA) |
| | O13 | CHINA(CN) | |
| | O14 | CHINA(CN) | |
| | O15 | CHINA(CN) | (BLENDED TEA) |
| Black tea | B1 | ASSAM INDIA(A IN) | DIKSAM FTGFOP |
| | B2 | ASSAM INDIA(A IN) | DIKSAM TGFOP |
| | B3 | ASSAM INDIA(A IN) | MORNING TEA (ASSAM BASE FLAVORED TEA) |
| | B4 | ASSAM INDIA(A IN) | CALCUTTA AUCTION |
| | B5 | ASSAM INDIA(A IN) | SILONIBARI BPSTC |
| | B6 | KENYA(KE) | IMENTI |
| | B7 | KENYA(KE) | MASINGI BPCTC |
| | B8 | KENYA(KE) | KAPRORET GFOP |
| | B9 | SRI LANKA(LK) | PURE CEYLON ELDORADO |
| | B10 | SRI LANKA(LK) | UVA HIGHLANDS BOP |
| | B11 | DARJEELING INDIA (D IN) | DARJEELING FIRST FLUSH 2004 |
| | B12 | DARJEELING INDIA (D IN) | DARJEELING SECOND FLUSH 2004 |
| | B13 | DARJEELING INDIA (D IN) | (DARJEELING BASE FLAVORED TEA) |
| | B14 | DARJEELING INDIA (D IN) | EARL GREY DARJEELING (FLAVORED TEA) |
| | B15 | DARJEELING INDIA (D IN) | DARJEELING BPS |
| | B16 | CHINA(CN) | KEEMUM 1ST GRADE |
| | B17 | CHINA(CN) | KEEMUM SPECIAL GRADE |
| | B18 | CHINA(CN) | KEEMUN GONGFU |
| | B19 | CHINA(CN) | DIANHONG GONGFU |
| | B20 | CHINA(CN) | LAPSANG SOUCHONG |
| | B21 | CHINA(CN) | (FLAVORED TEA) |
| | B22 | CHINA(CN) | (FLAVORED TEA) |
| | B23 | CHINA(CN) | (KEEMUN BASE FLAVORED TEA)) |
| | B24 | SRI LANKA(LK) | BOGAWANA BOP |
| | B25 | MAURITIUS(MU) | ILE MAURICE VANILLE(FLAVORED TEA) |
| | B26 | SRI LANKA(LK) | POTHOTUWA FBOPF |
| | B27 | DARJEELING INDIA (D IN) | VICTORIA'S PEAK |
| | B28 | DARJEELING INDIA (D IN) | RISHEEHAT |
| Dark tea | D1 | CHINA(CN) | PU-ERH TEA(TEA BAG) |
| | D2 | CHINA(CN) | PU-ERH TEA |
| | D3 | CHINA(CN) | PU-ERH TEA |
| | D4 | CHINA(CN) | YUNNAN PU-ERH TEA |

2. 6 多変量解析によるパターン認識

定量値に対して、教師なしパターン認識の手法である主成分分析とクラスター分析を適用して探索的データ解析を行い、ついで教師付きパターン認識の手法である正準判別分析とK最近隣法を適用して茶種ごとの識別を試みた。クラスター分析、主成分分析及びK最近隣法には、多変量解析ソフトウェア「Pirouette 3.02」(Infometrix 社製)を使用した。正準判別分析には、Microsoft Excel 2003及びMicrosoft Excel 2003用アドインソフト「エクセル統計2004」(社会情報サービス社製)を使用した。

3. 結果及び考察

3. 1 クロマトグラム及び紫外可視吸収スペクトル

茶葉に含有されるポリフェノール及びカフェインのピークは、各標準試薬のリテンションタイム及びDADによる紫外可視吸収スペクトルにより同定した。標準試薬混合物のHPLCクロマトグラムをFig.1に、DADによる紫外可視吸収スペクトルをFig.2～Fig.4に示す。Fig.1クロマトグラムにおいて、TF3とTF4の分離が不完全であったが、他の成分については良好な分離を示し、Bee-Lan.Leeら⁵⁾が行った結果とほぼ同じであった。本実験では、一斉分析を行う都合からすべての成分について高感度に検出できる波長として210nmでの検出を選択したが、カテキン類、テアフラビン類ともに長波長側に吸収極大を有することから個別に定量する場合には、例えばカテキン類で270nmなどの検出波長も有効と考えられる。またFig.4の図では確認しづらいが、テアフラビン類は、460nmに微弱な可視部吸収極大を有する。この特異的な吸収波長は、テアフラビン類を選択的に検出するため、高濃度で浸出させた茶葉浸出液を460nmで検出することで、テアフラビン類のピークとその近辺に現れる他成分のピークを的確に区別することができた。

Fig.5に緑茶、烏龍茶及び黒茶の浸出液の典型的なクロマトグラムを示す。緑茶、烏龍茶では、カテキン類のピークが強く、テアフラビン類のピークは微弱か、または検出されなかった。黒茶ではカテキン類のピークが弱く、テアフラビン類については使用した黒茶4試料についてすべて検出されなかった。

Fig.6に典型的な紅茶浸出液のクロマトグラムを示す。紅茶のクロマトグラムは、大きく分けて(a)のパターンと(b)のパターンが認められた。(a)のパターンは、ダーズリン産の紅茶に共通のパターンで、(b)に比べてカテキン類のピークが強く、テアフラビン類は微かに検出される程度で、緑茶、烏龍茶のクロマトグラムのパターンに類似している。ダーズリン産以外の紅茶については、(b)のパターンか、または(a)と(b)の中間的なパターンを示し、(a)に比べてカテキン類のピークが弱く、テアフラビン類のピークが強いという顕著な違いが認められた。

カフェインのピークについては、茶種間で極端な差はなく、いずれの試料でも強いピークが認められた。

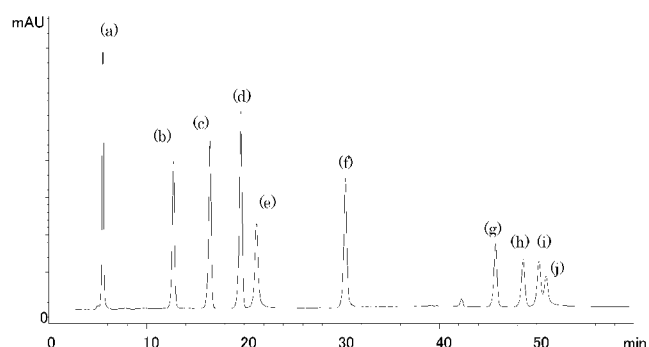


Fig.1 Chromatogram of standard samples (a)gallic acid [GA], (b) (-)epigallocatechin [EGC], (c)caffeine, (d) (-)epicatechin [EC], (e) (-)epigallocatechin-3-gallate [EGCg], (f) (-)epicatechin-3-gallate [ECg], (g)theaflavin [TF1], (h)theaflavin-3-gallate[TF2], (i)theaflavin-3'-gallate[TF3], (j)theaflavin-3,3'-digallate[TF4]

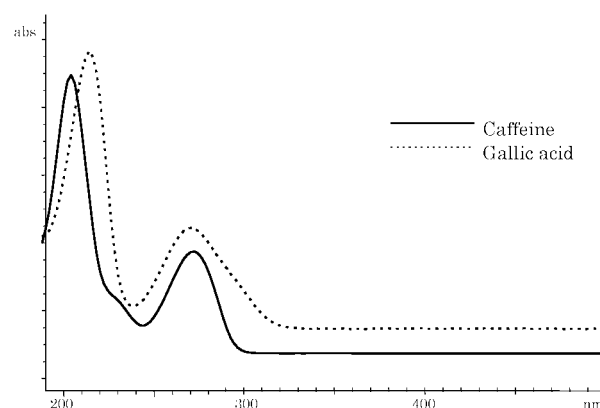


Fig.2 Photodiode-array UV-VIS spectrum of caffeine and gallic acid

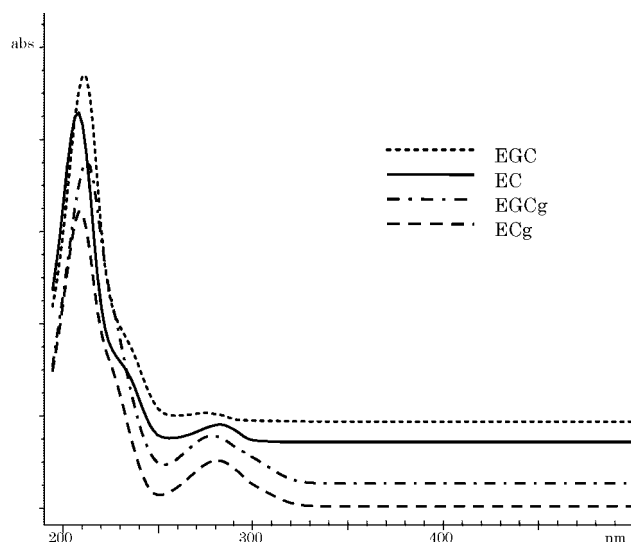


Fig.3 Photodiode-array UV-VIS spectrum of catechins

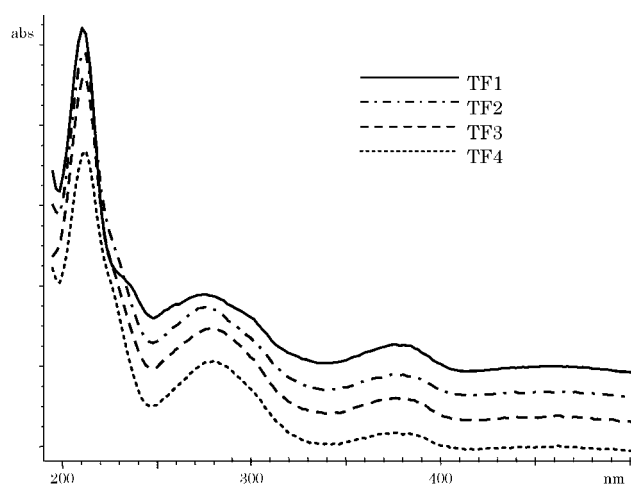


Fig.4 Photodiode-array UV-VIS spectrum of theaflavins

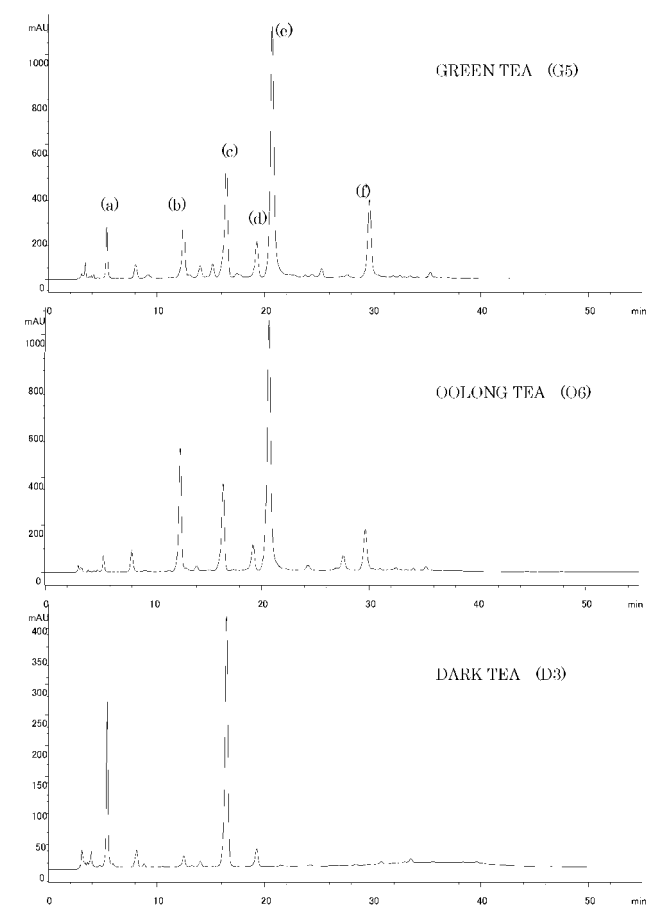


Fig.5 Chromatograms of (a) a green tea sample, (b) an Oolong tea sample, (c) a dark tea sample

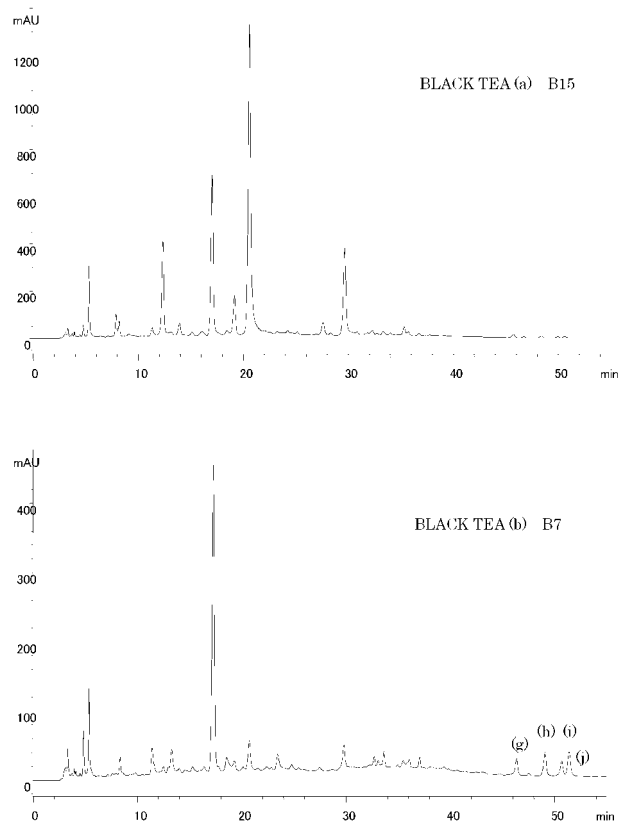


Fig.6 Chromatograms of black tea samples

3. 2 定量結果

定量結果を Table2に, また茶種ごとの定量値の範囲及び平均値を Table3に示す。Table2においてクロマトグラム上, ピークが確認されたが, 含有量0.01%以下となるものは, (+)と表記し, ピークが確認されなかったものを(−)と表記している(検出限界 およそ $0.1 \mu\text{g/ml}$)。なお, この定量値は3.3以降, 多変量解析の説明変数として使用しているが, (+)と(−)の違いは区別せず, どちらもゼロ値として扱った。カテキン類は, 緑茶で最も多く, 烏龍茶, 紅茶, 黒茶の順に少ない傾向を示しているが, 含有量の範囲は, 茶種間で重なっており, 茶種に特有な含有量の範囲は認められなかった。テアフラビン類についても, 紅茶と烏龍茶の間及び烏龍茶と緑茶の間で含有量の範囲が重なっている。没食子酸については, 烏龍茶, 日本産緑茶で少ない傾向がみられ, カフェインについては, 烏龍茶, 黒茶でやや少ない傾向がみられた。

Table2 Contents(%) of caffeine and polyphenols in tea samples

| Sample(Origin) | CLASS | GA | EGC | Caffeine | EC | EGCg | ECg | TF1 | TF2 | TF3 | TF4 |
|----------------|------------|------|------|----------|------|------|------|------|------|------|------|
| G1 (CN) | Green tea | 0.56 | 1.87 | 3.34 | 0.55 | 4.35 | 1.49 | 0.01 | + | + | 0.03 |
| G2 (CN) | Green tea | 0.77 | 1.54 | 3.86 | 0.50 | 4.33 | 1.36 | - | - | - | - |
| G3 (CN) | Green tea | 0.93 | 1.06 | 3.67 | 0.40 | 5.66 | 1.58 | - | - | - | - |
| G4 (CN) | Green tea | 1.33 | 0.34 | 4.30 | 0.26 | 4.50 | 1.62 | - | - | - | - |
| G5 (CN) | Green tea | 0.93 | 0.85 | 3.84 | 0.45 | 4.30 | 1.41 | - | - | - | - |
| G6 (CN) | Green tea | 0.55 | 1.52 | 3.56 | 0.41 | 4.49 | 1.03 | - | - | - | - |
| G7 (CN) | Green tea | 0.95 | 0.76 | 4.01 | 0.40 | 5.06 | 1.32 | - | - | - | - |
| G8 (CN) | Green tea | 2.13 | 0.58 | 4.66 | 0.39 | 5.22 | 3.02 | - | - | - | 0.01 |
| G9 (CN) | Green tea | 0.78 | 1.50 | 3.75 | 0.50 | 4.27 | 1.44 | - | - | - | - |
| G10 (CN) | Green tea | 1.20 | 1.21 | 3.98 | 0.44 | 3.88 | 1.21 | + | + | + | 0.01 |
| G11 (JP) | Green tea | 0.13 | 3.35 | 2.55 | 0.54 | 3.97 | 0.61 | - | - | - | - |
| G12 (JP) | Green tea | 0.14 | 2.99 | 2.52 | 0.49 | 4.04 | 0.69 | + | - | - | - |
| O1 (TW) | Oolong tea | 0.23 | 1.94 | 2.26 | 0.37 | 4.49 | 0.69 | 0.01 | 0.03 | + | + |
| O2 (TW) | Oolong tea | 0.29 | 3.35 | 2.73 | 0.49 | 3.49 | 0.51 | 0.01 | + | + | + |
| O3 (TW) | Oolong tea | 0.36 | 2.84 | 2.07 | 0.42 | 3.51 | 0.48 | 0.01 | + | + | + |
| O4 (TW) | Oolong tea | 0.18 | 2.79 | 2.37 | 0.40 | 3.10 | 0.50 | 0.01 | 0.02 | - | - |
| O5 (TW) | Oolong tea | 0.19 | 2.25 | 2.59 | 0.36 | 4.32 | 0.74 | 0.01 | 0.02 | + | + |
| O6 (TW) | Oolong tea | 0.28 | 1.56 | 2.72 | 0.33 | 4.30 | 0.67 | 0.01 | 0.03 | + | 0.01 |
| O7 (TW) | Oolong tea | 0.14 | 3.21 | 1.96 | 0.36 | 3.31 | 0.40 | + | 0.01 | 0.01 | - |
| O8 (CN) | Oolong tea | 0.48 | 0.92 | 2.70 | 0.22 | 2.00 | 0.61 | 0.01 | + | 0.01 | 0.02 |
| O9 (CN) | Oolong tea | 0.12 | 2.26 | 1.69 | 0.32 | 3.48 | 0.55 | 0.01 | 0.02 | + | + |
| O10 (CN) | Oolong tea | 0.11 | 2.67 | 3.42 | 0.55 | 3.43 | 0.66 | 0.02 | 0.01 | + | + |
| O11 (CN) | Oolong tea | 0.28 | 1.74 | 3.12 | 0.34 | 2.74 | 0.53 | 0.05 | 0.05 | 0.03 | 0.06 |
| O12 (CN) | Oolong tea | 0.58 | 0.84 | 3.24 | 0.15 | 6.34 | 0.84 | 0.02 | 0.02 | + | 0.04 |
| O13 (CN) | Oolong tea | 0.67 | 0.80 | 4.10 | 0.13 | 6.46 | 0.86 | 0.01 | 0.02 | + | 0.03 |
| O14 (CN) | Oolong tea | 0.49 | 1.26 | 2.77 | 0.29 | 4.79 | 1.03 | 0.05 | 0.03 | 0.03 | 0.12 |
| O15 (CN) | Oolong tea | 0.35 | 0.92 | 2.75 | 0.23 | 2.31 | 0.54 | 0.01 | + | 0.00 | 0.01 |
| B1(A IN) | Black tea | 0.73 | 0.09 | 3.16 | 0.07 | 0.34 | 0.40 | 0.06 | 0.12 | 0.09 | 0.25 |
| B2(A IN) | Black tea | 0.40 | 0.04 | 2.48 | 0.04 | 0.15 | 0.19 | 0.05 | 0.09 | 0.06 | 0.15 |
| B3(A IN) | Black tea | 0.73 | 0.11 | 3.84 | 0.10 | 0.54 | 0.49 | 0.09 | 0.16 | 0.11 | 0.29 |
| B4(A IN) | Black tea | 0.76 | 0.09 | 3.48 | 0.07 | 0.49 | 0.32 | 0.10 | 0.18 | 0.13 | 0.32 |
| B5(A IN) | Black tea | 0.52 | 0.07 | 3.29 | 0.06 | 0.38 | 0.22 | 0.11 | 0.17 | 0.10 | 0.24 |
| B6 (KE) | Black tea | 0.93 | 0.21 | 2.92 | 0.26 | 0.67 | 0.52 | 0.24 | 0.25 | 0.17 | 0.17 |
| B7 (KE) | Black tea | 0.41 | 0.03 | 2.53 | 0.04 | 0.12 | 0.11 | 0.14 | 0.22 | 0.15 | 0.25 |
| B8 (KE) | Black tea | 0.98 | 0.39 | 3.23 | 0.28 | 1.36 | 0.87 | 0.09 | 0.12 | 0.08 | 0.13 |
| B9 (LK) | Black tea | 0.65 | 0.88 | 3.48 | 0.43 | 1.47 | 0.72 | 0.11 | 0.12 | 0.08 | 0.14 |
| B10 (LK) | Black tea | 0.94 | 0.23 | 3.78 | 0.23 | 1.02 | 0.82 | 0.15 | 0.19 | 0.12 | 0.21 |
| B11 (D IN) | Black tea | 1.29 | 1.09 | 4.58 | 0.47 | 4.35 | 1.17 | 0.07 | 0.04 | 0.02 | 0.02 |
| B12 (D IN) | Black tea | 0.91 | 0.54 | 3.91 | 0.31 | 3.24 | 1.24 | 0.11 | 0.08 | 0.05 | 0.08 |
| B13 (D IN) | Black tea | 0.89 | 0.61 | 3.52 | 0.26 | 2.31 | 0.80 | 0.07 | 0.06 | 0.04 | 0.07 |
| B14 (D IN) | Black tea | 0.99 | 0.81 | 3.75 | 0.35 | 3.38 | 0.98 | 0.06 | 0.03 | 0.02 | 0.04 |
| B15 (D IN) | Black tea | 1.07 | 0.95 | 4.17 | 0.42 | 4.32 | 1.25 | 0.05 | 0.02 | 0.01 | 0.03 |
| B16 (CN) | Black tea | 0.62 | 0.06 | 3.75 | 0.05 | 0.25 | 0.23 | 0.05 | 0.11 | 0.05 | 0.19 |
| B17 (CN) | Black tea | 0.70 | 0.07 | 3.43 | 0.06 | 0.27 | 0.25 | 0.03 | 0.08 | 0.04 | 0.14 |
| B18 (CN) | Black tea | 0.83 | 0.05 | 3.94 | 0.04 | 0.21 | 0.23 | 0.02 | 0.07 | 0.03 | 0.18 |
| B19 (CN) | Black tea | 2.25 | 0.06 | 5.06 | 0.14 | 0.23 | 1.33 | 0.03 | 0.07 | 0.06 | 0.30 |
| B20 (CN) | Black tea | 0.46 | 0.02 | 2.83 | 0.02 | 0.12 | 0.09 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0.07 |
| B21 (CN) | Black tea | 0.65 | 0.07 | 3.14 | 0.09 | 0.38 | 0.33 | 0.03 | 0.06 | 0.03 | 0.10 |
| B22 (CN) | Black tea | 0.74 | 0.09 | 3.42 | 0.10 | 0.47 | 0.40 | 0.04 | 0.07 | 0.03 | 0.11 |
| B23 (CN) | Black tea | 0.29 | 0.02 | 2.36 | 0.02 | 0.09 | 0.13 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0.07 |
| B24 (LK) | Black tea | 0.39 | 0.04 | 2.41 | 0.06 | 0.15 | 0.25 | 0.11 | 0.18 | 0.09 | 0.22 |
| B25 (MU) | Black tea | 0.51 | 0.11 | 2.31 | 0.08 | 0.29 | 0.34 | 0.15 | 0.19 | 0.12 | 0.18 |
| B26 (LK) | Black tea | 0.88 | 0.11 | 3.62 | 0.14 | 0.75 | 0.75 | 0.06 | 0.15 | 0.08 | 0.23 |
| B27 (D IN) | Black tea | 0.87 | 0.10 | 3.59 | 0.31 | 3.36 | 1.69 | 0.07 | 0.07 | 0.03 | 0.10 |
| B28 (D IN) | Black tea | 1.26 | 0.10 | 4.33 | 0.46 | 4.15 | 1.59 | 0.04 | 0.05 | 0.03 | 0.06 |
| D1 (CN) | Dark tea | 0.74 | 0.05 | 3.05 | 0.06 | + | 0.04 | - | - | - | - |
| D2 (CN) | Dark tea | 0.47 | 0.03 | 3.55 | 0.04 | + | 0.02 | - | - | - | - |
| D3 (CN) | Dark tea | 1.04 | 0.05 | 2.57 | 0.06 | 0.01 | 0.01 | - | - | - | - |
| D4 (CN) | Dark tea | 1.71 | 0.12 | 2.61 | 0.06 | + | 0.06 | - | - | - | - |

Table3 A range of content of caffeine and each polyphenols(%)

| | | GA | EGC | Caffeine | EC | EGCg | ECg | TF1 | TF2 | TF3 | TF4 |
|------------|------|------|------|----------|------|------|------|------|------|------|------|
| Green tea | Mean | 0.87 | 1.46 | 3.67 | 0.44 | 4.51 | 1.40 | + | + | + | + |
| | Max. | 2.13 | 3.35 | 4.66 | 0.55 | 5.66 | 3.02 | 0.01 | + | + | 0.03 |
| | Min. | 0.13 | 0.34 | 2.55 | 0.26 | 3.88 | 0.61 | - | - | - | - |
| Oolong tea | Mean | 0.32 | 1.96 | 2.70 | 0.33 | 3.87 | 0.64 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 |
| | Max. | 0.67 | 3.35 | 4.10 | 0.55 | 6.46 | 1.03 | 0.05 | 0.05 | 0.03 | 0.12 |
| | Min. | 0.11 | 0.80 | 1.69 | 0.13 | 2.00 | 0.40 | + | + | - | - |
| Black tea | Mean | 0.81 | 0.25 | 3.44 | 0.18 | 1.25 | 0.63 | 0.08 | 0.11 | 0.07 | 0.16 |
| | Max. | 2.25 | 1.09 | 5.06 | 0.47 | 4.35 | 1.33 | 0.24 | 0.25 | 0.17 | 0.32 |
| | Min. | 0.29 | 0.02 | 2.31 | 0.02 | 0.09 | 0.09 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 |
| Dark tea | Mean | 0.99 | 0.06 | 2.94 | 0.05 | + | 0.03 | - | - | - | - |
| | Max. | 1.71 | 0.12 | 3.55 | 0.06 | 0.01 | 0.06 | - | - | - | - |
| | Min. | 0.47 | 0.03 | 2.57 | 0.04 | + | 0.01 | - | - | - | - |

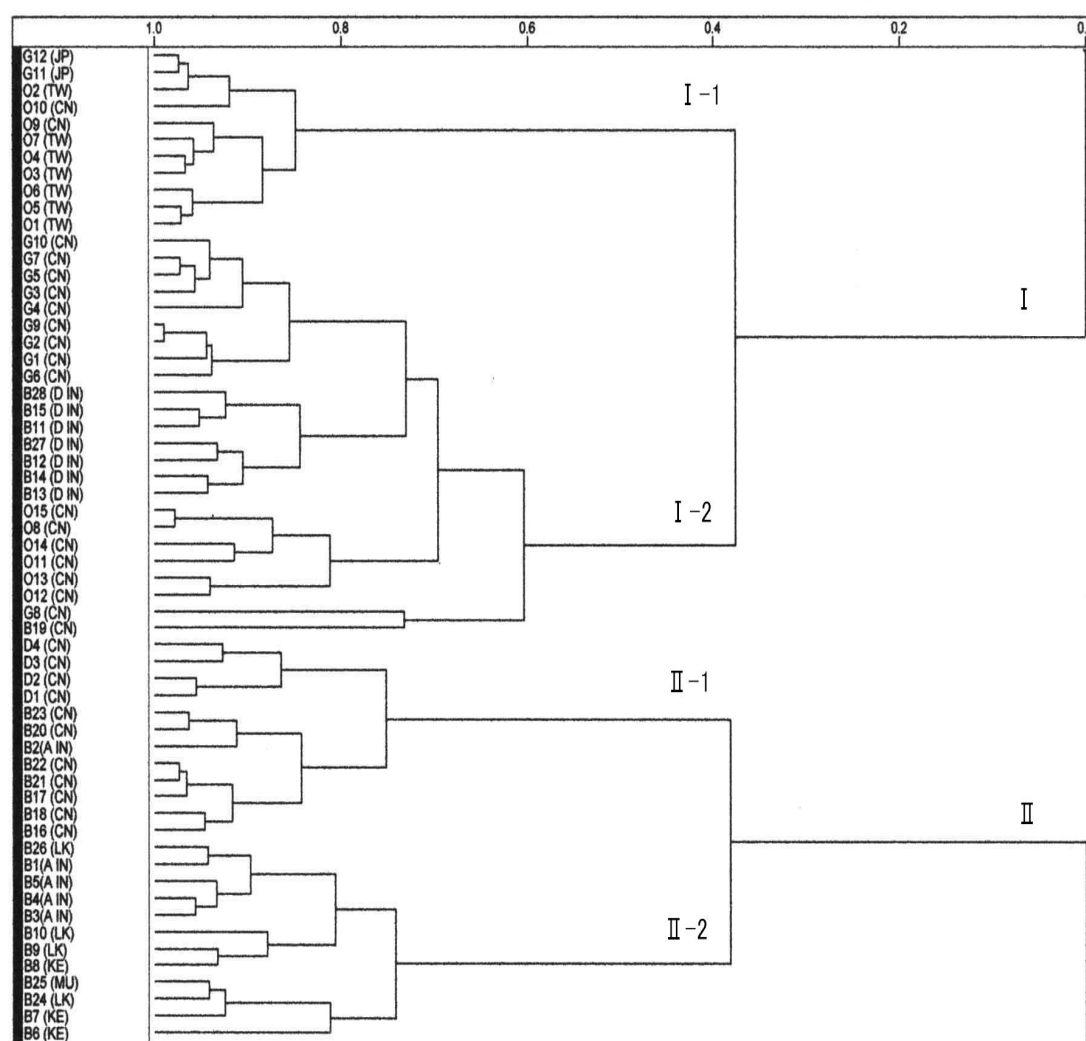


Fig.7 Dendrogram of cluster analysis

3. 3 多変量解析

3. 3. 1 クラスター分析

各成分の定量値を用いたクラスター分析の結果をデンドログラムの形式で Fig.7に示す。各定量値はオートスケール処理をし、

測定間隔にユークリッド平方距離、クラスター形成法にインクリメンタル法を用いた。デンドログラムは、大きく I と II の2つのグループに分かれており、ダーズリン産の紅茶が、他の紅茶群と分かれて緑茶、烏龍茶と同じ I のグループに含まれたのが特徴的である。デンドログラムを類似度0.4で切断することで

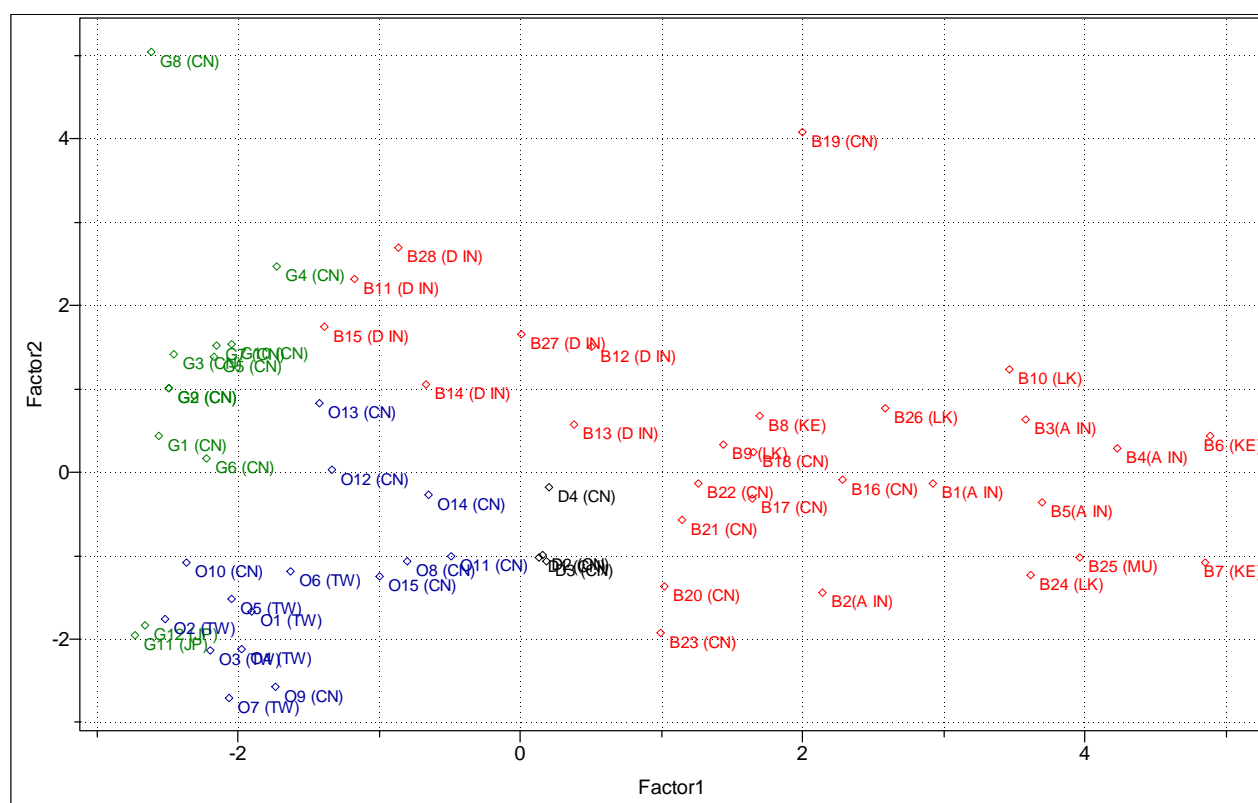


Fig.8 Scatter plot of tea samples based on the first and second principal component scores

I-1～II-2の4つのグループに分類された。I-1のグループは、台湾産の烏龍茶を主体としたクラスターを形成しており、日本産の緑茶と一部の中国産の烏龍茶が含まれた。I-2のグループは、中国産の緑茶、ダージリン産の紅茶及び中国産の烏龍茶のクラスターからなり、G8（中国産緑茶）とB19（中国産紅茶）の2試料が、他のクラスターから外れて孤立した形になった。II-1のグループは黒茶のクラスターと中国産紅茶を主体とするクラスターからなり、B2（アッサム産紅茶）の1試料のみが例外的に中国産紅茶のクラスターの中に含まれた。II-2のグループは、中国産、ダージリン産以外の紅茶からなるクラスターを形成した。クラスター分析の結果、茶種ごとにクラスターを形成する傾向と、原産地ごとにクラスターを形成する傾向の2つの傾向が認められた。

3. 3. 2 主成分分析

各成分の定量値を用いた主成分分析の結果をFig.8に示す。各成分の定量値は、オートスケール処理をした。第1主成分の寄与率は、50.7%、第2成分の寄与率は、25.0%であり、第2主成分まで累積寄与率は、75.7%であった。紅茶、烏龍茶、緑茶及び黒茶の分布には、茶種ごとの傾向が認められ、各種ポリフェノール及びカフェインの組成から茶種を区別できる可能性を示唆している。また紅茶の主成分得点が、広い範囲に分布を示しているのに対し、烏龍茶、緑茶の順に主成分得点が狭い範囲に集中している。黒茶については、試料数が少ないため分布についての考察は困難である。

主成分分析の因子負荷量をFig.9に示す。因子負荷量は、各主成分に対し、どの変数が寄与しているかを示したものである。テアフラビン類4種の因子負荷量は、第1主成分に対しても第2主成分に対しても各テアフラビン類の間に差があまりなく、どのテアフラビン類も主として第2主成分に対して正の寄与を示し、第1主成分に対する寄与は僅かであった。カテキン類4種は、いずれも第1主成分に負の寄与を示しており、第2主成分に対しては、ECgが正の寄与を、EGCg及びECは、僅かに正の寄与を示し、EGCが負の寄与を示した。一方、カフェイン及び没食子酸は、主として、第2主成分に対する寄与が大きく、第1主成分に対しては、ほとんど寄与していなかった。カテキン類は、茶葉の酵素発酵によって代謝され減少する成分であるのに対し、テアフラビン類は、酵素発酵によって生成、増加する成分であること、またカフェインは、酵素発酵によって変化しない成分であることを考慮すると、第1主成分は、主として酵素発酵の程度を表していると推測される。第2主成分は、第1主成分と独立した変数であることから酵素発酵によって変化しない情報を反映したものと考えられ、これは原料の生茶葉に含まれる成分組成の違いを反映している可能性がある。また、黒茶における発酵は、微生物発酵によるもので酵素発酵とは異なることから、黒茶の4試料については、発酵程度の違いが反映されず、第1主成分得点が同程度になっているものと推測される。

Fig.8において、B11～B15、B27～B28のダージリン産の紅茶試料が、緑茶、烏龍茶試料が分布している領域に近い位置に分布しており、クラスター分析の結果との整合性が認められた。

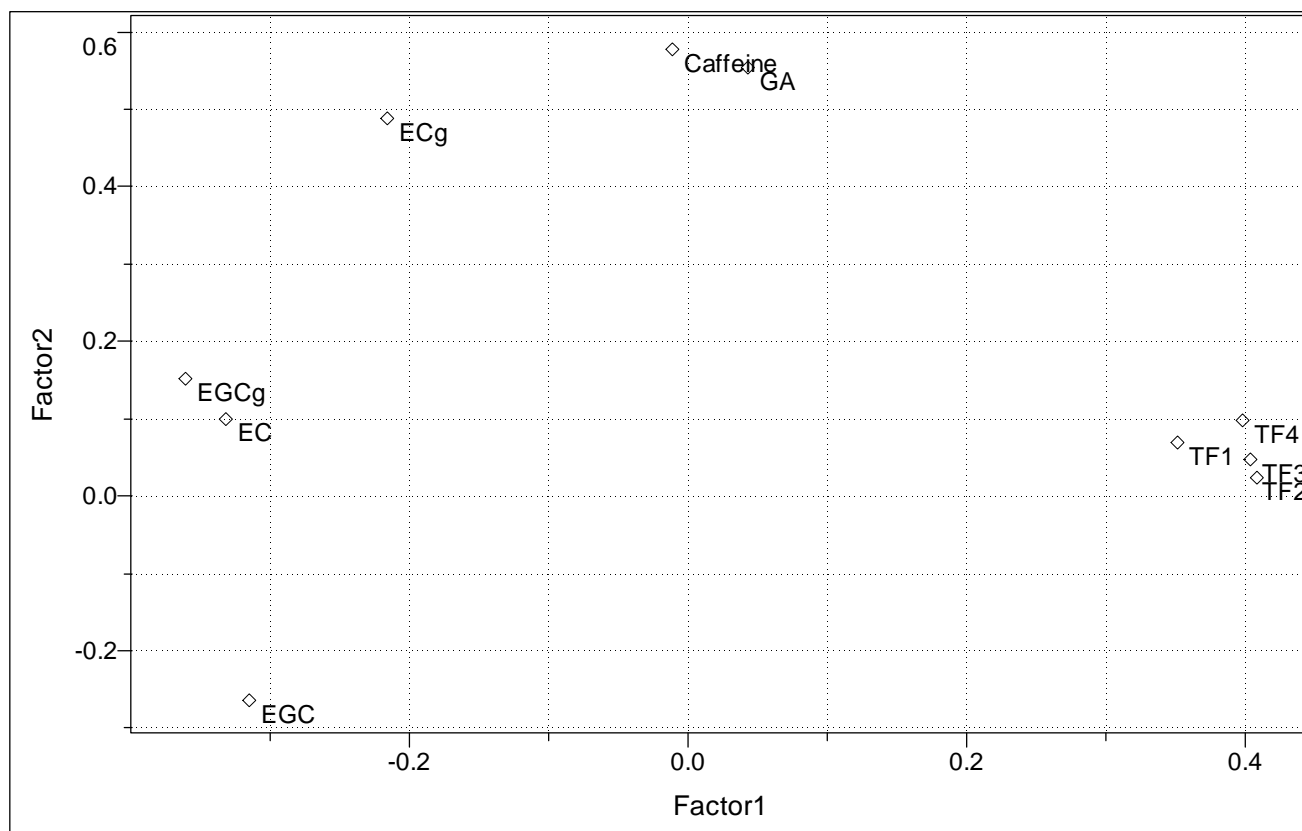


Fig.9 Factor loadings of the first and second principal component

Table4 Canonical coefficients and standardized canonical coefficients (all samples)

| Component | 1st vector | | 2nd vector | | 3rd vector | |
|-----------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
| | Coefficients | Standardized coefficients | Coefficients | Standardized coefficients | Coefficients | Standardized coefficients |
| GA | -1.376 | -0.537 | -2.078 | -0.811 | -0.499 | -0.195 |
| EGC | 1.158 | 0.750 | 0.183 | 0.118 | -1.238 | -0.802 |
| Caffeine | -0.137 | -0.088 | 0.128 | 0.082 | 0.623 | 0.399 |
| EC | -4.226 | -0.527 | 1.587 | 0.198 | 7.904 | 0.986 |
| EGCg | 0.613 | 0.757 | 0.100 | 0.124 | -0.379 | -0.468 |
| ECg | 1.904 | 0.831 | 1.817 | 0.793 | 1.145 | 0.500 |
| TF1 | -44.426 | -1.604 | 17.152 | 0.619 | -51.331 | -1.854 |
| TF2 | -4.688 | -0.211 | 18.275 | 0.822 | 4.079 | 0.184 |
| TF3 | 65.776 | 2.064 | -50.437 | -1.583 | 71.826 | 2.254 |
| TF4 | -11.218 | -0.703 | 20.572 | 1.289 | -15.734 | -0.986 |
| Constants | -0.701 | | -2.826 | | -1.792 | |

ダージリン産の紅茶の中には、発酵程度が未熟で緑色の茶葉が散見されるものがあるが、茶葉の緑色が強い試料ほど、緑茶の領域の近くに位置し、第1主成分得点が低い傾向が認められた。

3. 3. 3 正準判別分析

各成分の定量値を説明変数として用い、緑茶、烏龍茶、紅茶及び黒茶の4群からなる試料を3つの正準判別関数で分類した。正準判別係数及び標準化された正準判別係数を Table4に、判別結果を Table5に示す。Table5より、烏龍茶、黒茶の試料についてはすべて正しい判別結果となったが、緑茶の2試料について、誤って烏龍茶の群に分類され、紅茶の1試料については、誤って緑茶の群に分類された。誤って烏龍茶の群に分類された緑茶2

試料は、いずれも日本産のものであった。この結果は、クラスター分析で日本産緑茶2種が台湾産烏龍茶と同一のクラスターに組み込まれた結果と整合している。誤って緑茶の群に判別された紅茶試料はダージリン産のもので、クラスター分析及び主成分分析の結果と同様にダージリン産の紅茶については緑茶、烏龍茶に類似した成分組成であるために判別結果に誤りが生じやすいと考えられる。

正準変量の3次元散布図を Fig.10に示す。Fig.10より黒茶の群は、他の群と充分に分離していることが確認されたので、黒茶を除いた緑茶、烏龍茶及び紅茶の3群について、新たに2つの判別関数で判別した正準変量の2次元散布図を Fig.11に、Table6に正準判別係数及び標準化された正準判別係数を示す。正準変量1

は、紅茶の群と紅茶以外の群（緑茶、烏龍茶）を明瞭に分離した。全体的に紅茶の群は良いまとまりを示したが、B28の試料が、孤立した。正準変量2は、緑茶と烏龍茶を判別しているが、緑茶と烏龍茶の群の分離はやや不十分であった。

Table5 The results of classification with canonical discriminant analysis

| | | Predicted class | | | | Misclassified samples |
|-------|------------|-----------------|------------|-----------|----------|-----------------------|
| | | Green tea | Oolong tea | Black tea | Dark tea | |
| Class | Green tea | 10 | 2 | 0 | 0 | G11,G12 |
| | Oolong tea | 0 | 15 | 0 | 0 | |
| | Black tea | 1 | 0 | 27 | 0 | B28 |
| | Dark tea | 0 | 0 | 0 | 4 | |

Table6 Canonical coefficients and standardized canonical coefficients (excluding dark tea samples)

| Component | 1st vector | | 2nd vector | |
|-----------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
| | Coefficients | Standardized coefficients | Coefficients | Standardized coefficients |
| GA | -1.831 | -0.696 | -1.260 | -0.479 |
| EGC | 1.185 | 0.789 | -1.097 | -0.731 |
| Caffeine | 0.197 | 0.128 | 0.956 | 0.622 |
| EC | -5.359 | -0.688 | 6.497 | 0.834 |
| EGCg | 0.495 | 0.629 | -0.454 | -0.577 |
| ECg | 2.070 | 0.929 | 1.559 | 0.700 |
| TF1 | -45.700 | -1.697 | -48.717 | -1.809 |
| TF2 | -10.096 | -0.467 | 0.986 | 0.046 |
| TF3 | 77.848 | 2.513 | 74.912 | 2.418 |
| TF4 | -15.342 | -0.989 | -16.536 | -1.066 |
| Constants | -0.904 | | -2.219 | |

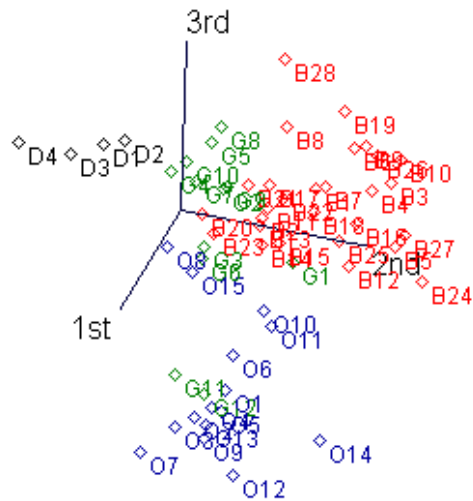


Fig.10 Canonical plot of all tea samples

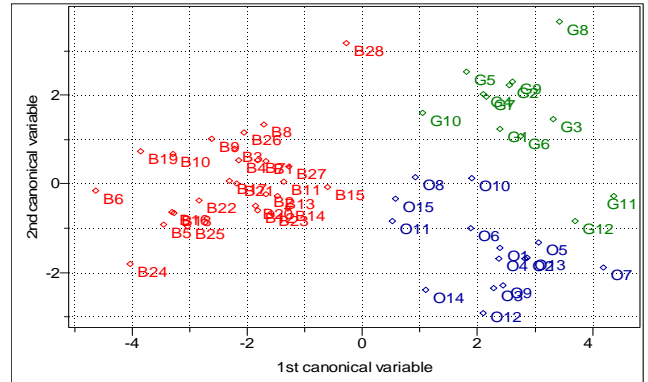


Fig.11 Canonical plot of tea samples excluding dark tea samples

3. 3. 4 K 最近隣法 (KNN 法)

緑茶、烏龍茶、紅茶及び黒茶の4群からなる試料を K 最近隣法により、分類した結果を Table7に示す。各成分の定量値はオートスケール処理をした。K 値は、3〜7までの設定で分類を試みたが、すべて同様の結果となった。誤って分類されたのは烏龍茶の1試料のみで、誤分類された試料が、正準判別分析の結果と異なるが、Fig.7のクラスター分析、Fig.8の主成分分析の結果から台湾産烏龍茶 O2の試料は、正準判別分析で誤分類された日本産緑茶 G11,G12と近い関係にあることがわかる。このことから、正準判別分析と K 最近隣法での分類結果は、おおむね整合しているものと推測される。

最後に、この分類結果が、未知試料に対して正確な予測を行うかどうか評価するために K 最近隣法によるクロスバリデーションを行った。今回用いた茶試料は、全茶種含めて59個であるが、この59個の試料を、ランダムに49個と10個に分割し、49個の試料を既知試料として、K 最近隣法による分類モデルを構築し、10個の試料を未知試料としてこの分類モデルにより茶種を予測した。このような分割を10回行い、のべ100個の試料についての予測結果を Table8に示す。Table8では、59個の既知試料について K 最近隣法を適用した結果と比較しているが、大きな違いはなく、烏龍茶以外は、すべて正確に予測した。誤った予測がなされた烏龍茶試料は、すべて緑茶と予測されたものであった。全体の予測的中率は、97.0%と良好であった。

Table7 The results of classification with KNN method (K=3〜7)

| | | Predicted class | | | | Misclassified samples |
|-------|------------|-----------------|------------|-----------|----------|-----------------------|
| | | Green tea | Oolong tea | Black tea | Dark tea | |
| Class | Green tea | 12 | 0 | 0 | 0 | O2 |
| | Oolong tea | 1 | 14 | 0 | 0 | |
| | Black tea | 0 | 0 | 28 | 0 | |
| | Dark tea | 0 | 0 | 0 | 4 | |

Table8 The results of cross validation (KNN K=5)

| | Percentage recognition ability | | Percentage prediction ability | |
|------------|--------------------------------|--------|-------------------------------|--------|
| Green tea | 12/12 | 100.0% | 22/22 | 100.0% |
| Oolong tea | 14/15 | 93.3% | 21/24 | 87.5% |
| Black tea | 28/28 | 100.0% | 47/47 | 100.0% |
| Dark tea | 4/4 | 100.0% | 7/7 | 100.0% |
| Total | 58/59 | 98.3% | 97/100 | 97.0% |

4 要 約

高速液体クロマトグラフィーにより、茶葉中のカテキン類、テアフラビン類等の数種のポリフェノール及びカフェインを一斉分析により定量することができた。この定量値のセットに対し、多変量解析におけるパターン認識の手法として、クラスター分析、主成分分析、正準判別分析、及びK最近隣法を適用した結果、緑茶、烏龍茶、紅茶及び黒茶の4種の茶を識別することが可能であった。しかし、ダージリン産の紅茶の中には、他の紅茶に比べて、緑茶、烏龍茶に近いパターンを有しているものがあり、このようなものについては誤って緑茶、あるいは烏龍茶と識別される可能性が高いと考えられる。また、緑茶と烏龍茶の間でのパターンの差は小さく、緑茶と烏龍茶の間での誤識別についても起こりやすいと考えられる。

文 献

- 1) 村松敬一郎編: “茶の科学”, P.60, P.119 (1991), (朝倉書店).
- 2) 中林敏郎, 伊奈和夫, 坂田完三: “緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能”, P.78 (1991), (弘学出版).
- 3) Pedro L.Fernandez, Antonio Lopez, Fernando Pablos, Antonio G.Gonzalez, Maria J.Martin : *Microchim Acta*, **142**, 79 (2003).
- 4) P.L.Fernandez, M.J.Martin, A.G.Gonzalez, F.Pablos : *Analyst*, **125**, 421 (2000).
- 5) Bee-Lan.Lee, Choon-Nam.Ong : *Journal of Chromatography A*, **881**, 439 (2000).