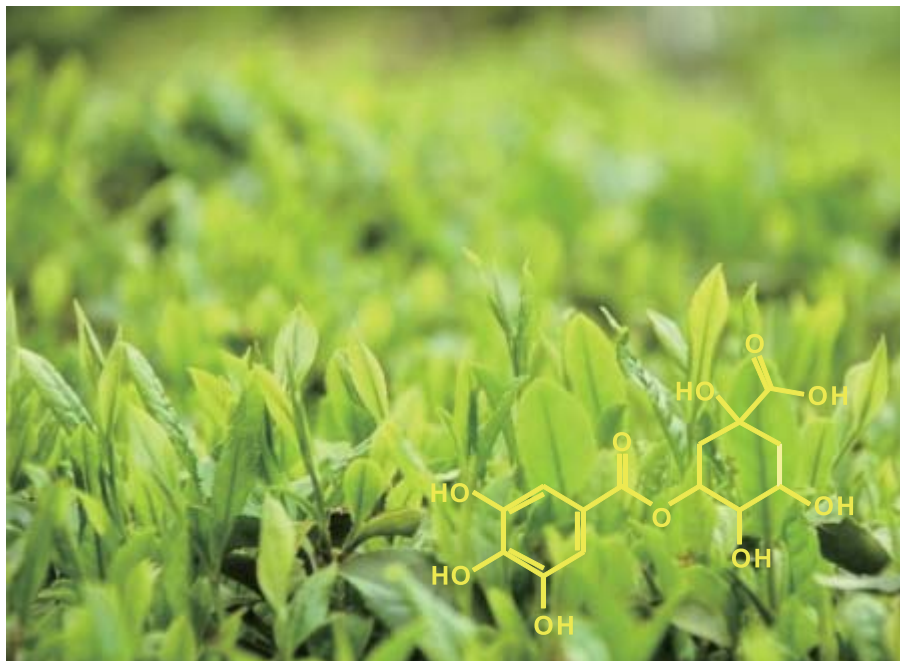


Application Note

島津アプリケーションノート No.10 (ライフサイエンス)



Lifescience

LC/MSおよびGC/MSを用いたメタボローム解析手法の応用 緑茶葉のプロファイリング解析

小倉泰郎
T. OGURA

坂本雄紀
Y. SAKAMOTO

1. はじめに

メタボローム解析 (メタボロミクス) とは、生体内における代謝物を網羅的に解析することで、近年医療分野における診断マーカー探索や病因解析、製薬分野における薬効や毒性を示すマーカー探索、食品分野における品質管理や品質予測など幅広い分野への応用がなされています¹⁾。

メタボローム解析で対象となる代謝物は膨大な数であり、かつ化学的性質は広範に渡ります。このため、これら物質の網羅的な分析には、一般に分離分析法を用いることが多く、ガス

クロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS)、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS)、キャピラリー電気泳動質量分析法などによる方法が報告されています。

本資料では、LC/MSおよびGC/MSを用いたメタボローム解析手法の応用として、緑茶葉のプロファイリング解析を行い、品質に寄与する成分の探索と品質予測モデルを構築した例をご紹介します。

2. メタボローム解析における代表的な研究の流れ

メタボローム解析は実験の計画にはじまり、サンプル調達や分析機器によるデータ測定、各種統計学的手法を用いた解析を行います¹⁾。

Fig.1に、メタボローム解析における代表的なスキーム例を示します。

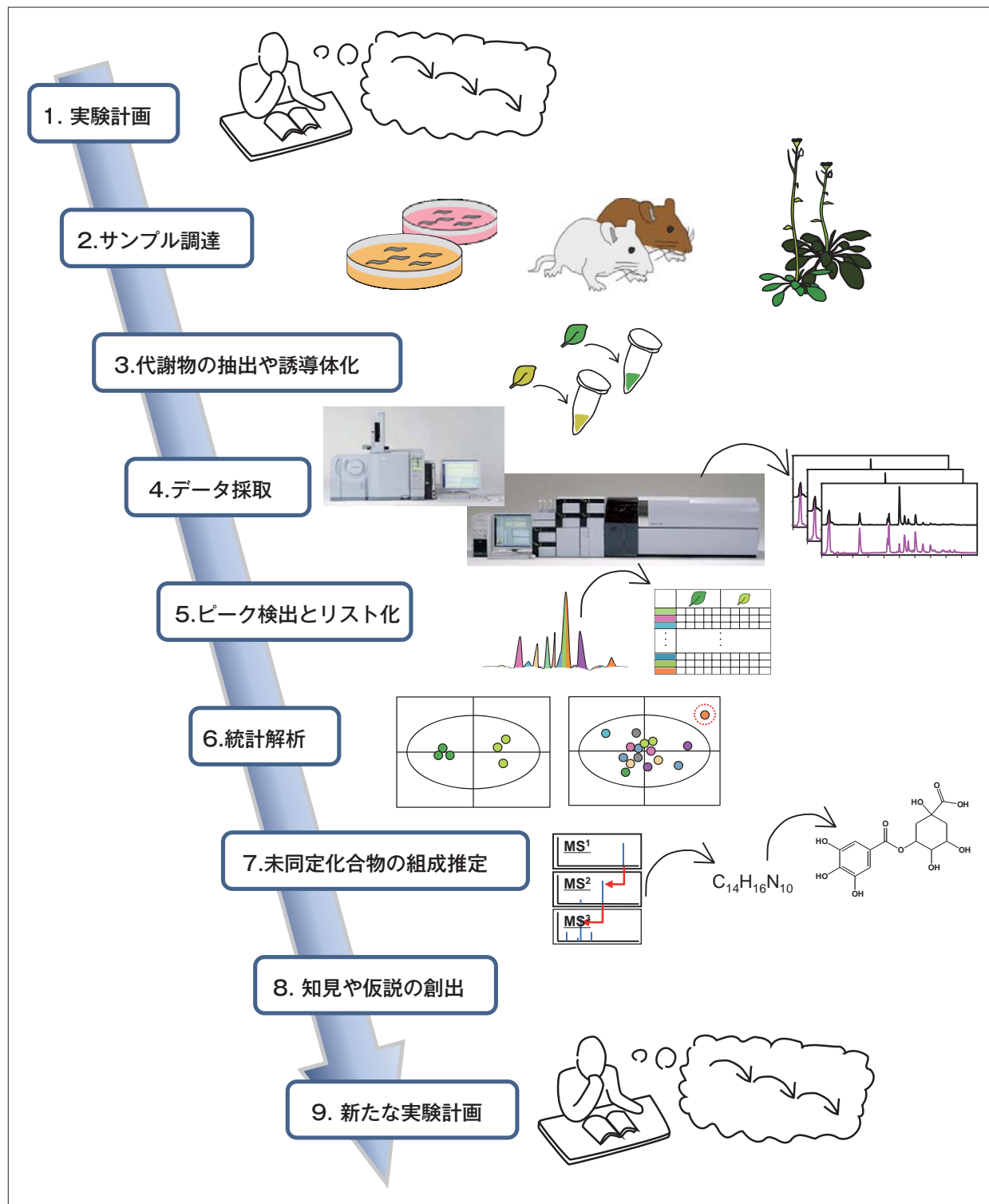


Fig.1 メタボローム解析におけるスキーム例

3. メタボローム解析と分析法

メタボローム解析で対象となる代謝物は膨大な数であり、かつ化学的性質も広範に渡ります。このため、これら代謝物の分析には、ガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーなどによる分離と質量分析による検出とを組み合わせたガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) や液体クロマトグラ

フィー質量分析法 (LC/MS) などが有力な手段として用いられます。GC/MSやLC/MSを駆使することにより、このような複雑な代謝物のプロファイリングや同定を効率的に行うことができます。

3.1 GC/MSによるメタボローム解析

GCは他のクロマトグラフィーに比べて分離能に優れており、構造の類似した揮発性代謝物や前処理により揮発性誘導体化物に変換できる代謝物を効率良く精密に分離することができます。GC/MSでは、GCによる高分離と、MSによる質量分離と高感度検出が可能であり、またMSのEI (Electron Ionization) 法で得られる化合物ごとに特異的なマススペクトルにより、化合物の同定が可能となります。

また、マススペクトルと保持時間を基準化した保持指標をデータベース化することにより、代謝物の同定が容易であり、島津GC/MS代謝成分データベースやマススペクトルライブラリを用いることで、多くの代謝物を同定することが可能です。

GC/MSは脂質やエステル類などの低極性揮発性代謝物や揮発性誘導体に変換させたアミノ酸や有機酸などの高極性代謝物を分析することができます。

GC/MSによるメタボローム解析

- ✓ 脂質、エステル類などの低極性代謝物や、誘導体に変換したアミノ酸、有機酸などの高極性代謝物が分析対象
- ✓ 高い分離能力と高速スキャンにより、多数のピークの検出と同定が可能
- ✓ 島津GC/MS代謝成分データベースやNISTマススペクトルライブラリによる、化合物検索が可能

ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010 Ultra

<特長>

- 高感度, 高速スキャン測定
- Easy-sTop機能による待ち時間の短縮
- エコロジーモードによる省エネ

島津GC/MS代謝成分データベース (アミノ酸・脂肪酸・有機酸)

<特長>

- 約300種の代謝物情報を収載
- 保持指標付きデータベース



3.2 LC/MSによるメタボローム解析

LCはGCでは分析できない不揮発性化合物や誘導体化が困難な代謝物も含め、低極性から高極性までの幅広い代謝物に適用できる特長があります。LCはGCの優れた分離能には及びませんが、近年充てん剤の微粒子化技術と装置性能の発展により、超高速・高分離分析が可能となってきました。この超高速LCと質量分析計を組み合わせたLC/MSは、大量の試料を扱うメタボローム解析のハイスループット化に大きく貢献します。また、分析のハイスループット化は、測定時間の短縮に加えて測定試料や質量分析結果の安定性を維持するなど二次的な効果も期待できます。

超高速LCでは著しくピークがシャープになるため、MSには高速データ取り込み性能が求められます。島津“LCMS-2020”および“LCMS-IT-TOF”は、高速スキャンと高速極性切替による分析が可能で、超高速LCに適したMSです。島津超高速LC“Prominence UFLC”とこれらMSとの組み合わせは、メタボローム解析に適したシステムとなります。さらに、LCMS-IT-TOFではMSⁿ分析を用いた精密質量測定により、高精度な組成推定および部分構造情報の取得が可能となるため、汎用スペクトライブラリがないLC/MSにおいて、未知化合物探索に有効な装置です。

LC/MSによるメタボローム解析

- ✓ アミノ酸、有機酸、糖など高極性代謝物やカテキン類などの二次代謝物が分析対象
- ✓ 超高速LCの使用により、従来に比べ大幅な高速・高分離が可能
- ✓ LCMS-2020では、プロファイリングやマーカー探索などが可能
- ✓ LCMS-IT-TOFでは、プロファイリングやマーカー探索に加え、未知代謝物の化合物情報を得ることが可能

超高速液体クロマトグラフ “Prominence UFLC” 四重極型質量分析計 “LCMS-2020”

<特長>

- 高速高分離によるハイスループット分析
- 優れたメンテナンス性
- 高いコストパフォーマンス



超高速液体クロマトグラフ “Prominence UFLC” イオントラップ-飛行時間型質量分析計 “LCMS-IT-TOF”

<特長>

- 高速高分離によるハイスループット分析
- 高いスキャン感度
- 高精度MSⁿ分析により未知代謝物の化合物情報を取得



4. LC/MSおよびGC/MSを用いたメタボローム解析手法の応用（緑茶葉）

4.1 概要

品評会で順位付けされた9種の高級緑茶葉から分析試料を調製し、Prominence UFLC/LCMS-IT-TOFおよびGCMS-2010 Plusを用いて測定しました。

測定結果を用い、多変量解析の一つである主成分分析を

実施し、順位への寄与が高い化合物を明らかにすることができました。その中で代表的な未知化合物に対してMSⁿ分析を行い、候補となる化合物を推定しました。

4.2 実験

4.2.1 機器

LC/MSには“Prominence UFLC/LCMS-IT-TOF”を、データ処理には“LCMSsolution”を用いました。GC/MSには“GCMS-QP2010 Plus”を、データ処理には“GCMSsolution”を用いました。また、マススペクトライブラリには、NIST2008年度版と島津GC/MS代謝成分データベースを、多変量解析ソフトウェアにはUmetrics社のSIMCA-Pソフトウェアを用いました。

4.2.2 試料および前処理

A県茶葉品評会で順位づけされた緑茶葉のうち、順位が5, 10, 15, …, 4550位の茶葉109点を用いました。緑茶葉は既報の前処理手順²³⁾に従い処理をおこないました。(Fig.2, Fig.3)

4.2.3 分析

緑茶に含まれていることが知られている化合物の標準試料を用いて分離の確認を行い、分析条件 (Tables 1-2) を検討しました。

4.2.4 データ解析

LC/MSではMS1分析の結果からピークを検出し、各ピークの面積値を用いてピークリストを作成しました。

GC/MSではTICクロマトグラムとマスクロマトグラムを用いてピークを検出し、GC/MS代謝成分データベースとNISTマススペクトライブラリを用いて同定しました。同定されたピーク面積と内標準物質（リビトール）との面積比を用いてピークリストを作成しました。

これらのピークリストを併せて多変量解析を行いました。

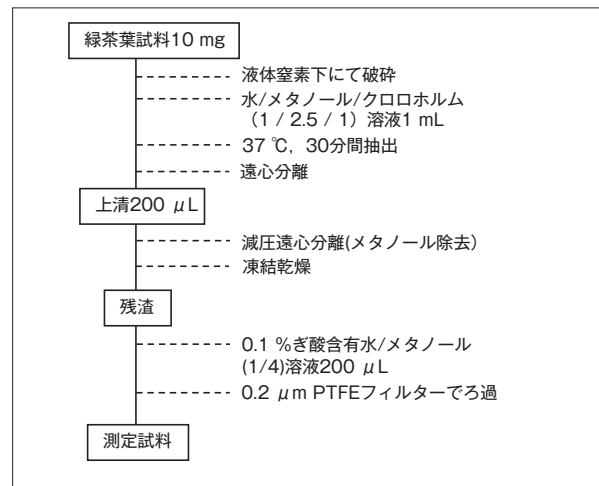


Fig.2 LC/MS分析用試料前処理手順

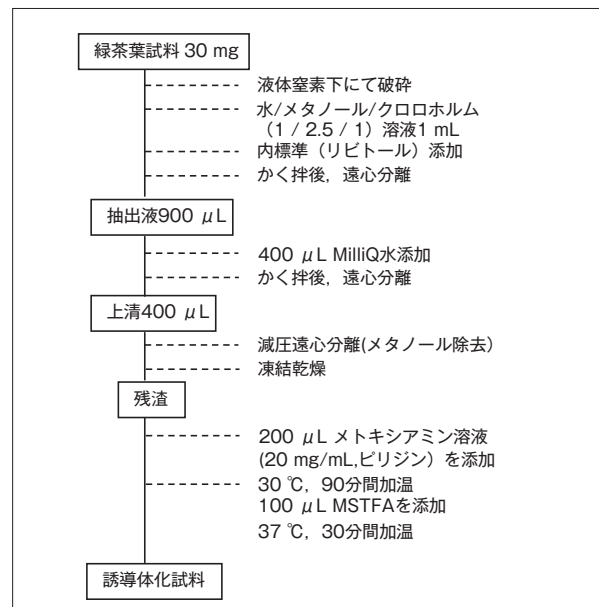


Fig.3 GC/MS分析用試料前処理手順

Table 1 LC/MS分析条件

装置	Prominence UFLC series, LCMS-IT-TOF
[LC条件]	
カラム	Shim-pack XR-ODS (50 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
移動相A	0.1% ぎ酸水溶液
移動相B	メタノール
グラジエントプログラム	B濃度 2% (0 min) – B 60% (10 min) – B 98% (10.01-14 min) – B 2% (14.01 min) – STOP (19 min)
流量	0.4 mL/min
カラム温度	40 °C
[MS条件]	
イオン化モード	ESI (+/- switching)
測定範囲	<i>m/z</i> 100 – 1000
CDL 温度	200 °C
BH 温度	200 °C

Table 2 GC/MS分析条件

装置	GCMS-QP2010 Plus, AOC-20i + s (オートインジェクタ)
[GC条件]	
カラム	Rtx [®] -5MS (30 m L. × 0.25 mm I.D. df=0.25 mm, Restek Corp.)
注入温度	250 °C
カラム温度	80 °C(2 min) – (15 °C/min) – 320 °C (20 min)
注入モード	スプリット
キャリアガス	He (Constant Linear Velocity)
線速度	36.8 cm/sec
スプリット比	25:1
注入量	1 μL
[MS条件]	
イオン源温度	200 °C
インターフェース温度	250 °C
測定範囲	<i>m/z</i> 50 – 1000
イベント時間	0.2 sec
スキャンスピード	5000 u/sec

4.2.5 LC/MSにおける未知化合物の分析

多変量解析により重要性の示された未知化合物の*m/z*をもとにMS³分析による精密質量測定および組成推定を行います。

した。Fig.4に、MSⁿ分析による候補の絞込みの様子を示します。

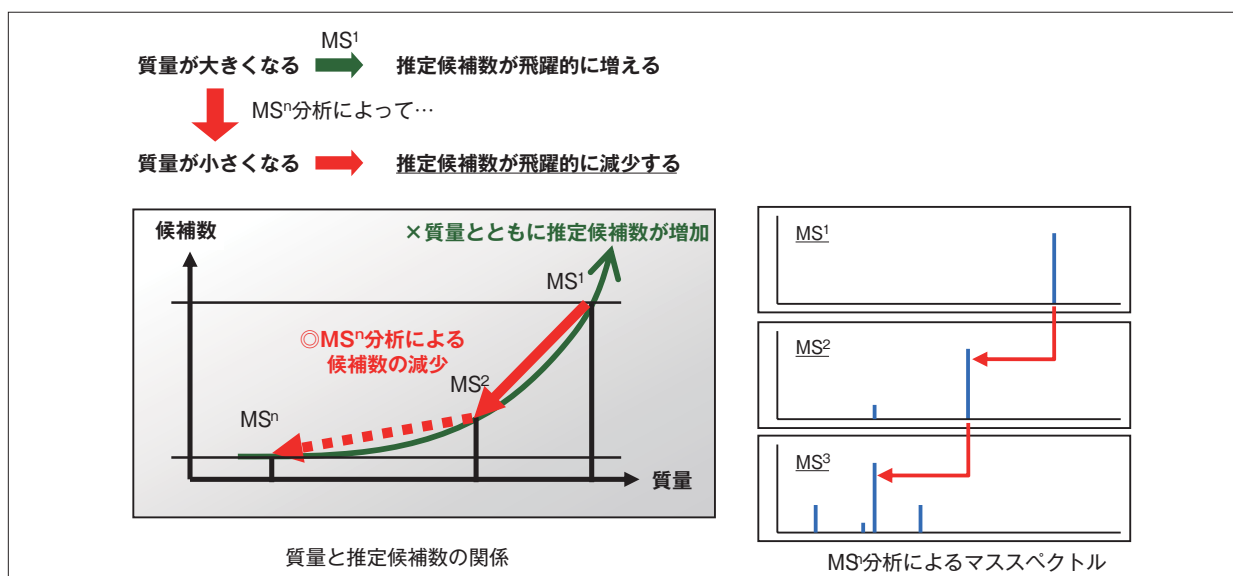


Fig.4 MSⁿ 分析による候補の絞込み

4.3 結果

4.3.1 LC/MSによる分析結果

緑茶に含まれる代表的な化合物の標準試料を市販緑茶飲料に添加し、それらの分離を確認しました。Fig.5に、その結果を示します。10分間のグラジエント溶離で10成分の分離が達成されました。

また、緑茶葉試料の分析において、最初に分析した試料を

連続分析の間に挟みこみ、繰り返し分析することで保持時間およびピーク面積再現性を算出し、分析途中の経時変化によるデータ変動を確認しました。Fig.6に、その結果を示します。強度の高い5成分において、高い保持時間再現性が得られたことがわかります。

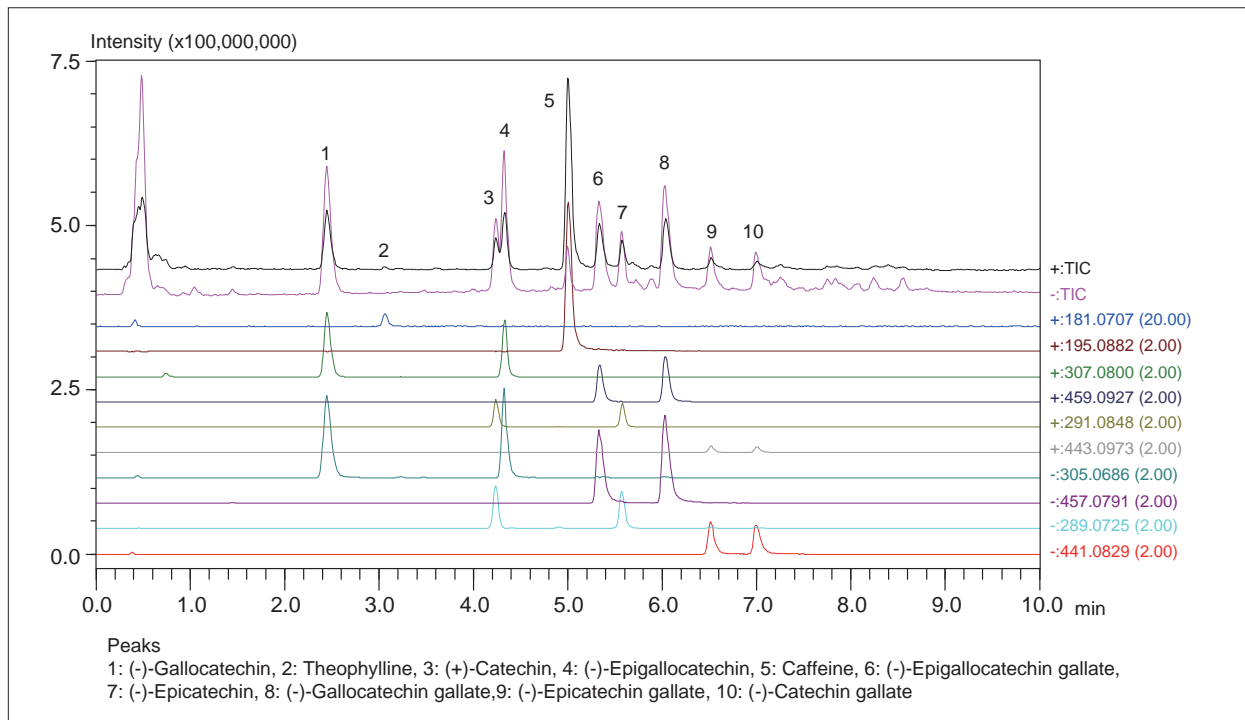


Fig.5 市販緑茶飲料水中カフェイン，テオフィリンおよびカテキン類のクロマトグラム

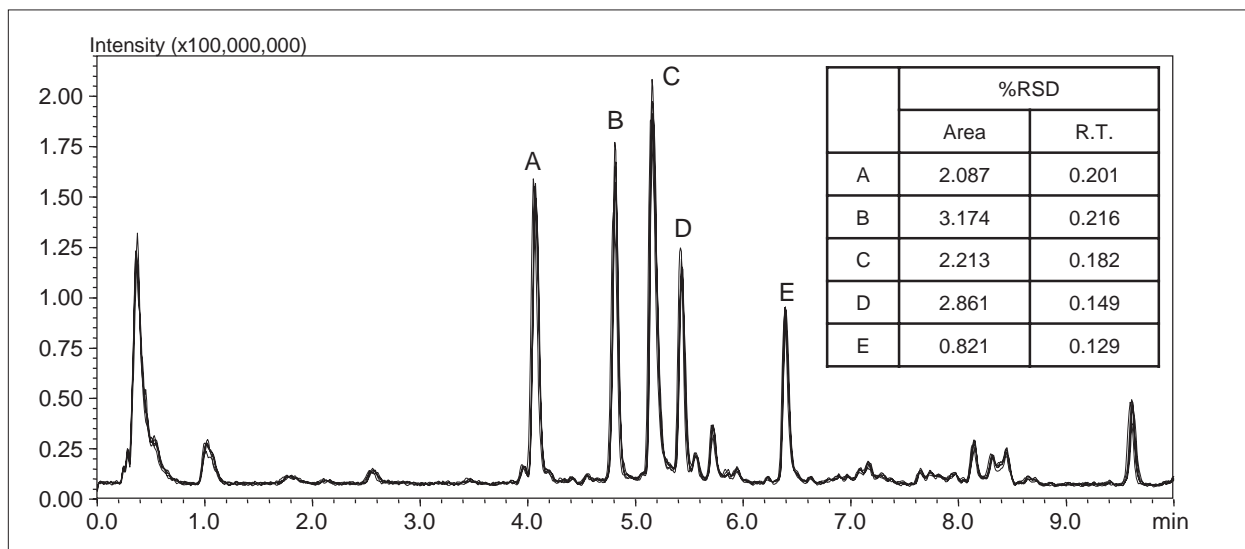


Fig.6 緑茶葉試料の重ね描きクロマトグラム (1, 20, 40, 60, 80回目の分析結果)

4.3.2 GC/MSによる分析結果

Fig.7に、緑茶葉試料のTICクロマトグラムを示します。Table 4に、検出された約100ピークについてGC/MS代謝成分データベースおよびNISTライブラリを用いて同定した結果を

示します。糖類、アミノ酸類および有機酸類など71化合物を同定することができました。

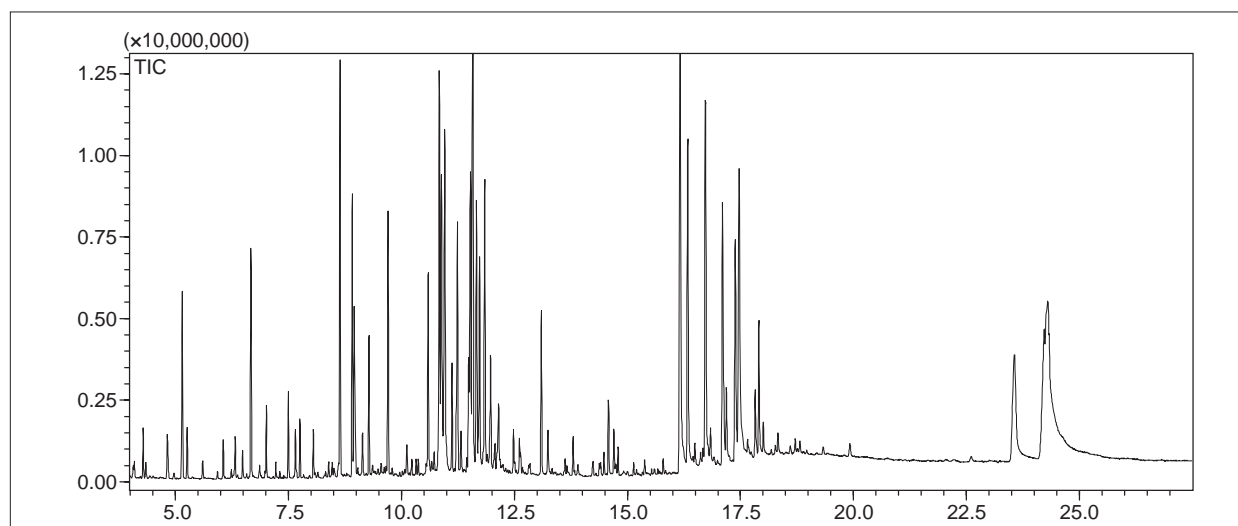


Fig.7 緑茶葉抽出試料のTICクロマトグラム

Table 4 同定された化合物と保持時間

ID	Compound Name	RT	ID	Compound Name	RT
1	L-Alanine-2TMS	4.82	37	Lyxose methyloxime-TMS 1	10.11
2	Oxalic acid-2TMS	5.15	38	Asparagine-3TMS	10.11
3	Malonic acid-2TMS	5.93	39	Lyxose methyloxime-TMS 2	10.22
4	Urea-2TMS	6.27	41	Ribitol-5TMS (IS)	10.58
5	Serine-2TMS	6.48	40	L-Glutamine-4TMS	10.58
6	Methyl 5-oxo-2-pyrrolidinecarboxylate	6.56	41	Xylonic acid-3TMS	10.66
7	Ethanolamine-3TMS	6.58	42	Theanine	10.83
8	L-Leucine-2TMS	6.63	43	L-Glutamine-3TMS	10.87
9	Phosphoric acid-3TMS	6.67	44	Shikimic acid-4TMS	11.11
10	L-Isolucine-2TMS	6.85	45	Citric acid-4TMS	11.23
11	L-Threonine-2TMS	6.86	46	Caffeine	11.51
12	L-Proline-2TMS	6.89	47	Quinic Acid- TMS	11.57
13	Glycine-3TMS	6.98	48	Fructose-Methyloxime-5TMS 1	11.65
14	Succinic acid-2TMS	7.01	49	Fructose-Methyloxime-5TMS 2	11.72
15	Glyceric acid-3TMS	7.22	50	Glucose-Methyloxime-5TMS	11.83
16	Fumaric acid-2TMS	7.31	51	L-Lysine-4TMS	11.89
17	L-Serine-3TMS	7.50	52	Mannose-Methyloxime-5TMS	11.96
18	3,4-Bis[(trimethylsilyloxy)dihydro-2(3H)-furanone-2TMS	7.65	53	L-Tyrosine-3TMS	12.02
19	L-threonine-3TMS	7.75	54	Benzoic acid-4TMS	12.14
20	L-Aspartic acid-2TMS	8.05	55	Gluconic acid-5TMS 1	12.47
21	4-Ketoglucose methyloxime-3TMS	8.50	56	Palmitic acid-TMS	12.60
22	2-Methylmaric acid-3TMS	8.52	57	Gluconic acid-5TMS 2	12.62
23	Arabino-Hexos-2-ulose-4TMS	8.61	58	Inositol-6TMS	13.08
24	Malic acid-3TMS	8.64	59	Galactose-Methyloxime-5TMS	13.32
25	L-Aspartic acid-3TMS	8.91	60	Phosphoric acid propylester-4TMS	13.65
26	Pyroglutamic acid-2TMS	8.95	61	Stearic acid-TMS	13.79
27	4-aminobutyric acid-3TMS	8.98	62	L-Tryptophan-3TMS	13.82
28	L-Norvaline-3TMS	9.13	63	Xylopyranose-4TMS	14.37
29	L-Threonic acid-4TMS	9.28	64	Glucose-6-phosphate-Methyloxime-5TMS 1	14.40
30	Isopropylmalic acid-3TMS	9.40	65	Glucose-6-phosphate-Methyloxime-5TMS 2	14.47
31	Glycerol-3TMS	9.54	66	Glucoheptulose-Methyloxime-TMS	14.74
32	Ornithine-3TMS	9.65	67	Di-n-octyl phthalate	15.53
33	L-Glutamic acid-3TMS	9.70	68	Maltose-8TMS	15.79
34	Phenylalanine-2TMS	9.79	69	Sucrose-8TMS	16.16
35	Asparagine-4TMS	9.81	70	Arabinopyranose-4TMS	16.33
36	2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid-1,4-lactone-3TMS	10.01	71	Raffinose-8TMS	19.92

4.3.3 主成分分析による品質に寄与する成分の探索

Fig.8に、LC/MSおよびGC/MSで検出された代謝物のピークリストを用いて、主成分分析 (PCA) を実施した結果を示します。

スコアプロット中の数字は品評会における順位を示していますが、順位の高い緑茶葉と低い緑茶葉がグラフの左右に分かれており、第一主成分軸により順位の差異が示されていることがわかります。また、第一主成分軸 (PC1) のローディングプロットから、各成分の品質への寄与がわかります。順位の高い

緑茶葉に多く含まれる化合物はプラス方向に、逆に順位の低い緑茶葉に多く含まれる化合物はマイナス方向にプロットされています。

これら結果からGC/MSにおける有機酸やLC/MSにおけるカテキン類など、それぞれの分析法で品質への寄与が高い成分が確認されました。

続いて品質への寄与の高い未知成分の代表として、ピークXの化合物候補の推定を行いました。

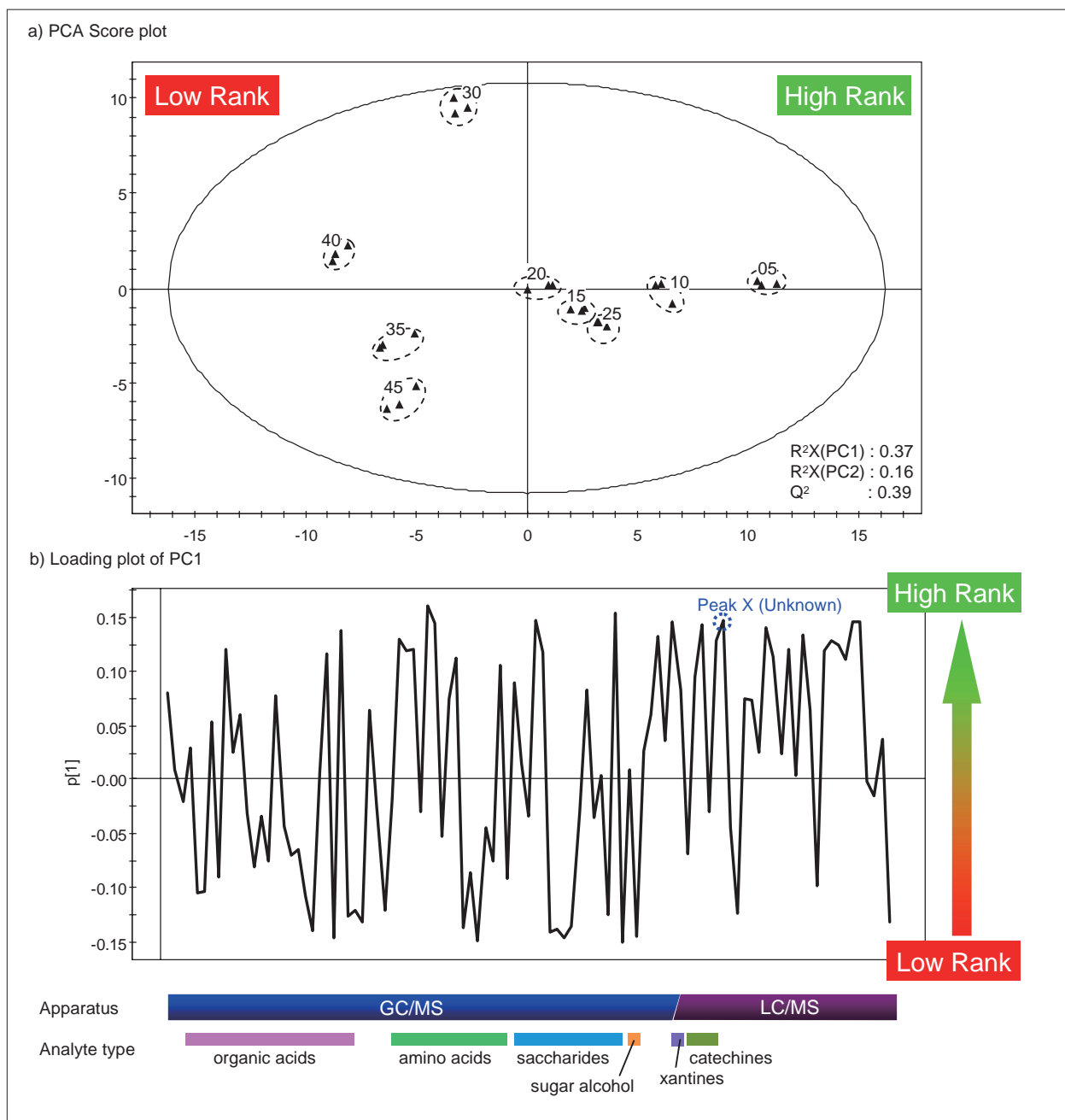


Fig.8 LC/MSおよびGC/MSによる緑茶葉試料の主成分分析 (PCA) 結果

4.3.4 未知化合物の組成推定

ピークXのMS³分析のデータを用いて、精密質量情報より組成を推定しました。Fig.9に、その結果を示します。

組成推定ソフトウェアより、ピークXの組成式はC₁₄H₁₆O₁₀であると示されました。

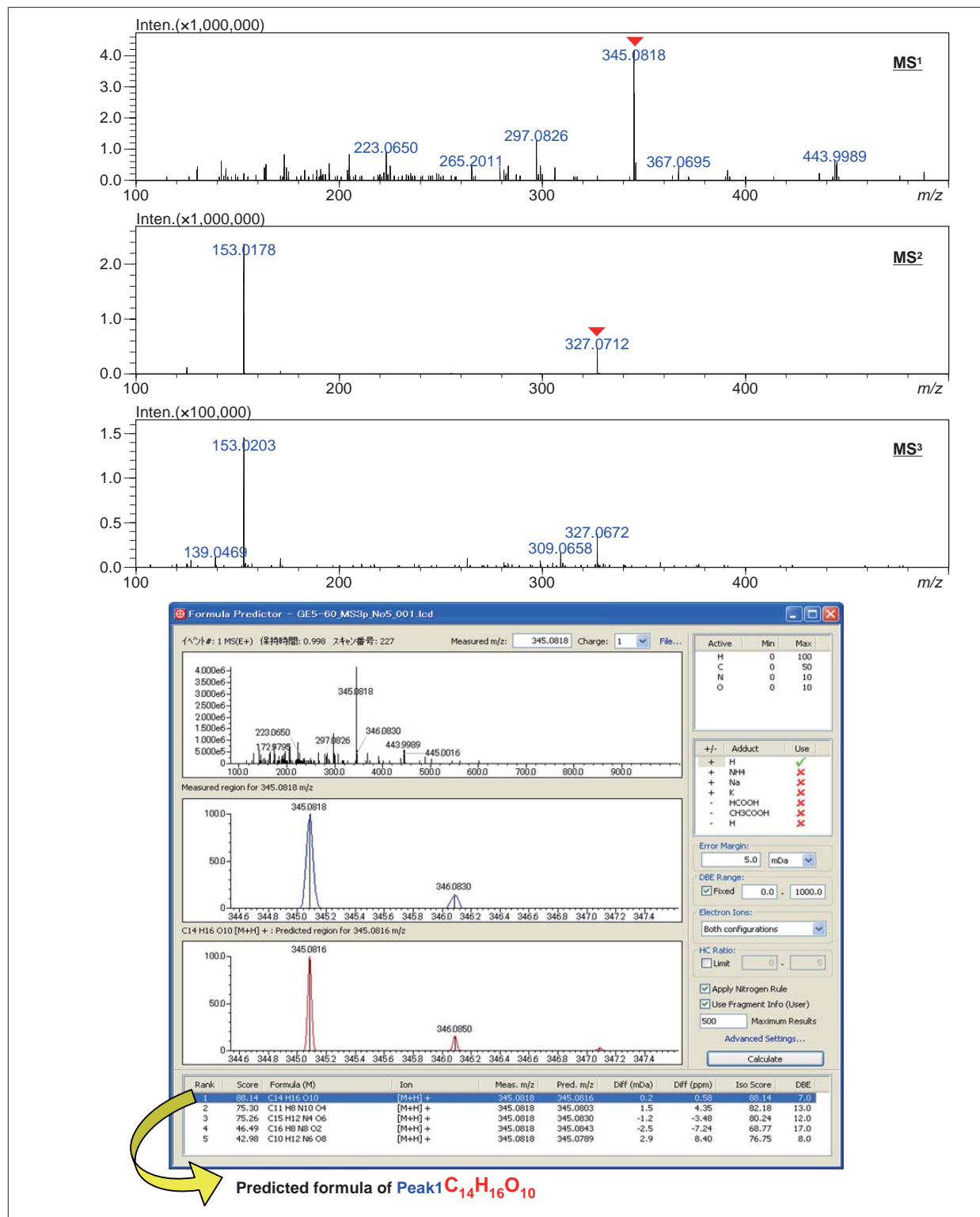


Fig.9 ピークXのマスペクトルと組成推定結果

4.3.5 未知化合物の化合物候補推定

4.3.4において組成推定ソフトウェアにより得られた組成式「 $C_{14}H_{16}O_{10}$ 」をWebで公開されているデータベースを用いて検索したところ、ポリフェノールの一種であるテオガリン (Theogallin) の可能性が示されました。

そこで、テオガリンの構造を元にマスペクトルの帰属を行ったところ、ピークXはテオガリンであると示唆される結果が得られました。(Fig.10)

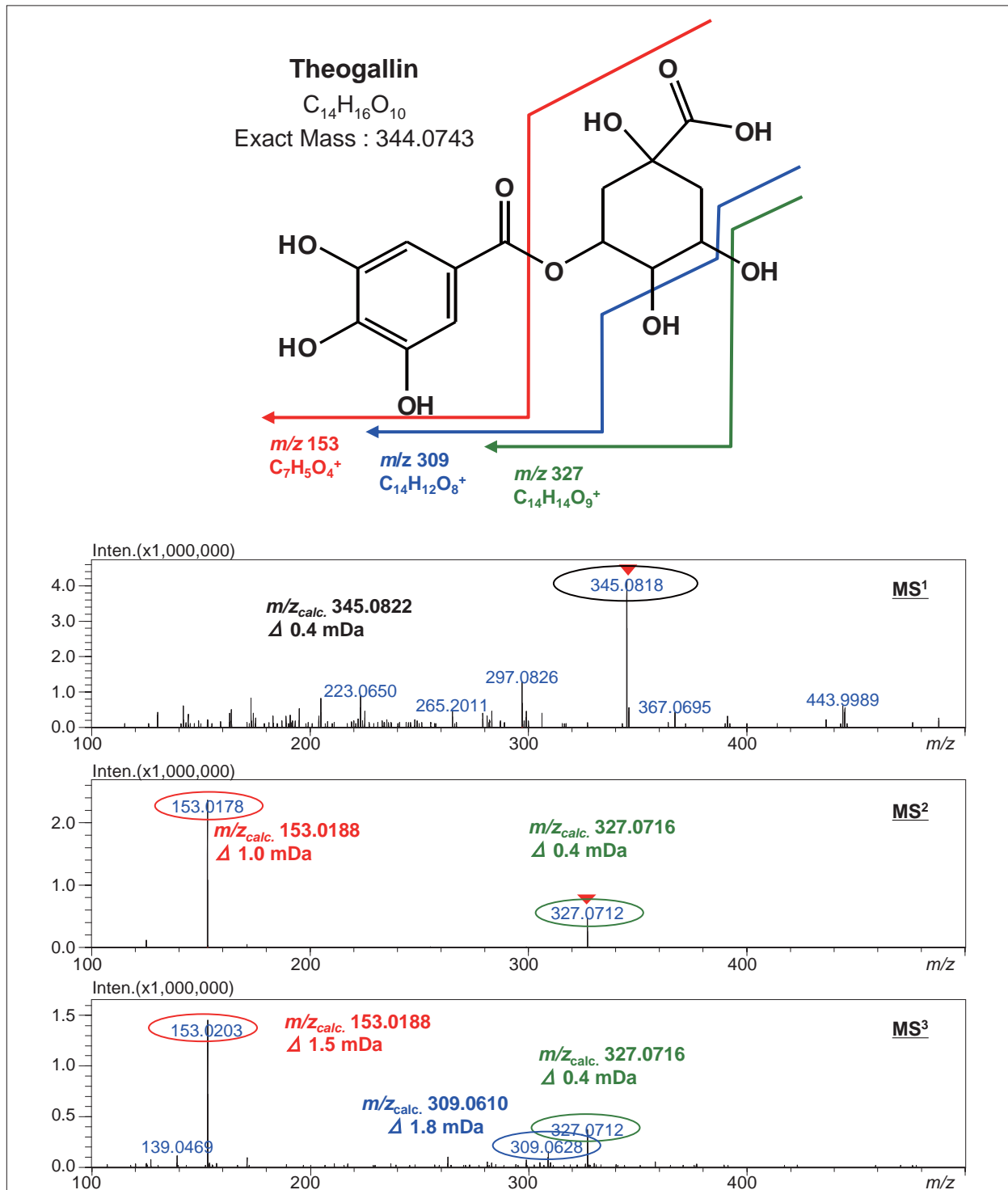


Fig.10 テオガリンの構造式とピークXのマスペクトルの帰属

5. まとめ

本資料では、メタボロミクスの概要説明と代表的な分析法であるLC/MS, GC/MS, およびこれらによる実際の分析例として緑茶葉の品質評価例についてご紹介しました。LC/MSやGC/MSは単独でも十分な分析能力を持っており、GC/MSのデータベース検索やLCMS-IT-TOFの組成推定能力など

各々の長所がメタボロミクスの分野で活用されています。また、これら分析法を組み合わせることにより、広範な特性をもつ代謝物を分析可能とし、メタボロミクスやその応用範囲においてより広範囲な網羅的解析が可能になります。

[謝辞]

本研究を行うにあたり、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 教授 福崎英一郎先生、准教授 馬場健史先生ならびに研究室の皆様にご多大なご指導とご協力を賜りました。

[参考文献]

- 1) Fukusaki, E.; メタボロミクスの可能性と技術的問題. 生物工学 2006, 84, 231-234
- 2) Pongsuwan, W.; Fukusaki, E.; Bamba, T.; Yonetani, T.; Yamahara, T.; Kobayashi, A.
Prediction of Japanese Green Tea Ranking by Gas Chromatography/Mass Spectrometry-Based Hydrophilic Metabolite Fingerprinting. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 231-236.

*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。

A改訂版発行 2010年6月
初版発行 2010年4月

 **島津製作所** 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

- ☎ 0120-131691 (携帯電話不可)
- 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。