

Smart Metabolites Databaseを用いた食品中糖類の分析

坂本 雄紀 川北 祥人

ユーザーベネフィット

- ◆ 食品中の24種類の糖類を誘導体化による幾何異性体をつくらずに1つのピークで検出できます。
- ◆ 内部標準を添加して前処理するだけで、食品中の24成分の糖類のおおよその濃度が算出できます。
- ◆ メタボロミクス解析用の代謝物一斉分析と同一の抽出方法および分析システムが利用できます。

■はじめに

糖類はグルコースなどの単糖類とスクロースなどの二糖類であって、糖アルコールでないものの総称です。動植物のエネルギー源として様々な糖類が生体内に含まれています。

GC-MSを用いたメタボロミクス解析でよく利用されるメトキシム-TMS誘導体化法は、代謝物一斉分析法として一般的に使用されています。しかし、還元性を持つ糖類は、メトキシム誘導体化による鎖状構造化することにより、2種類の幾何異性体が検出されます。そのため、ソルボースとフルクトース、マンノースとグルコースといった糖類の異性体同士はクロマトグラム分離が不十分で定量するのが困難です。

また、動植物の生体内には多数の糖類が数百 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の高濃度から0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 以下の低濃度まで非常に幅広い濃度範囲で含有されています。検出された糖類の定量を行う場合、対象化合物によって濃度範囲を変えた検量線を準備する必要がありますが、前処理の回収率などを考慮すると非常に手間がかかることから、おおよその濃度を知りたいというニーズがありました。

これらのニーズに応えるため、「Smart Metabolites Database Ver.2」に新たに糖類を半定量できる分析メソッドを搭載しました。

本稿では、食品試料として牛肉およびトマトを用いて糖類分析メソッドから得られる半定量値と標準添加法から得られる定量値を比較した結果を紹介します。

■ Smart Metabolites Database Ver.2

Smart Metabolites Database Ver.2は、メタボロミクス解析に必要な代謝成分の分析条件、SIMおよびMRMトランジションがあらかじめ最適化されたデータベースです。多変量解析でのマーカー探索用途の代謝成分一斉分析では、SIMにおいて627成分、MRMにおいて540成分に登録成分を増強しました。化合物別の定量用メソッドとして、脂肪酸メチルエステル(FAMES)、アミノ酸の他に糖類のメソッドも新たに追加しました(表1)。

表1 Smart Metabolites Database Ver.2の概要

	誘導体化方法	分析方法	登録成分数
代謝成分一斉分析	TMS	SIM	627
		MRM	540
脂肪酸メチルエステル	メチル化	SIM MRM	50
糖類	アセチル化	SIM MRM	24
アミノ酸	EZ:faast	Scan	33

■糖類定量用メソッド

糖類定量用メソッドでは、幾何異性体をつくらず、また他の代謝成分が誘導体化しにくいアセチル誘導体化を採用し、誘導体化方法を最適化しました。

また、前処理方法を最適化して固定化することにより、希釈倍率と回収率を補正した検量線情報を登録しています。内部標準としてリビトールを規定量添加するだけで試料中に含有している24種類の糖類のおおよその定量値を算出することができます。

前処理方法は、データベースの代謝物一斉分析で利用するBligh & Dyerの方法をベースとした前処理プロトコルで、抽出した一部を採取して糖類用の誘導体化をすることにより測定することができます。

■実験

牛肉およびトマトは市販されているものを使用しました。ホモジナイズして凍結乾燥した各試料を10 mg採取して、Bligh & Dyerの方法をベースに前処理を行い、100 μL の抽出溶液を採取してアセチル誘導体化を行いました。データベースを用いた半定量の評価は、1種類の試料につき、3回繰り返して行いました。標準添加法は、あらかじめ各試料を測定して検出された糖類を把握し、リボース、キシロース、フルクトース、マンノース、グルコース、*myo*-イノシトールの検量線を作成しました。リボース、キシロース、*myo*-イノシトールは試料中濃度(乾燥重量)で0.1~5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、フルクトース、マンノース、グルコースは高濃度で検出されたため、5~500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の範囲で標準添加法での検量線を作成しました。分析条件は表2に示します。

表2 装置構成および分析条件

GC-MS	: GCMS-TQ8040 NX
オートインジェクタ	: AOC-30i / 20s U
データベース	: Smart Metabolites Database Ver.2
カラム	: BPX-5 (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm) [GC]
気化室温度	: 280 $^{\circ}\text{C}$
カラムオープン温度	: 150 $^{\circ}\text{C}$ (5 min) \rightarrow (3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) \rightarrow 220 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow (10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) \rightarrow 320 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)
注入モード	: スプリット
スプリット比	: 15
キャリアガス	: He
キャリアガス制御	: 34.0 cm/sec
注入量	: 1 μL
[MS]	
イオン源温度	: 230 $^{\circ}\text{C}$
インターフェイス温度	: 280 $^{\circ}\text{C}$
データ採取モード	: MRM

■ 分析結果

図1に牛肉試料から検出された代表的なMRMクロマトグラムを示します。また表3に牛肉およびトマト試料のデータベースから得られた半定量値と標準添加法の定量値を比較した結果を示します。

牛肉で検出された糖類の濃度は1 μg/mg以下で検出されるものが多く、トマトではフルクトース、グルコース、スクロースが約100 μg/mg以上の濃度で検出され、他の糖類よりも数百～数千倍異なります。

データベースから得られた半定量値は、3回繰り返しの定量値の平均を用いて標準添加法との定量値の比較を行いました。測定結果は、48~191%の範囲に収まりました。1 μg/mg以下の濃度において低めに算出される傾向がありますが、幅広い濃度範囲の検量線情報を登録していることが原因として挙げられます。

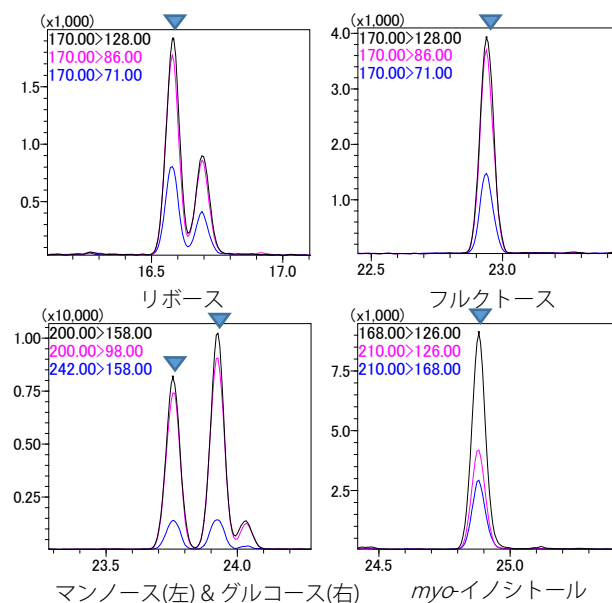


図1 牛肉から検出された代表的な糖類のMRMクロマトグラム

表3 牛肉およびトマトを測定して得られた半定量値と標準添加法での定量の比較結果

牛肉

検出化合物	DBで算出した定量値				
	牛肉1	牛肉2	牛肉3	Ave	%RSD
リボース	0.14	0.14	0.14	0.14	2.9
フルクトース	1.26	0.95	0.82	1.01	22.5
マンノース	1.00	0.84	0.69	0.84	18.6
グルコース	1.24	1.00	0.81	1.01	21.1
myo-イノシトール	0.12	0.10	0.08	0.10	21.1

単位: μg/mg

標準添加法の定量値	比率 (%) (半定量/標準添加)
0.29	48.5
0.53	191.0
0.60	139.6
1.01	100.3
0.10	101.8

トマト

	DBで算出した定量値			Ave	%RSD
	トマト1	トマト2	トマト3		
キシロース	0.14	0.13	0.15	0.14	9.0
リボース	0.07	0.06	0.07	0.07	8.9
フルクトース	563	438	577	526	14.6
マンノース	104	91	113	103	11.0
グルコース	131	116	142	130	10.4
myo-イノシトール	0.92	0.76	1.01	0.90	14.0

標準添加法の定量値	比率 (%) [DB半定量/標準添加]
0.31	45.2
0.11	62.9
304	172.9
91	112.5
99	131.7
0.99	90.5

■ まとめ

食品試料中の糖類の定量を正確に行う場合、前処理の回収率などを考慮すると、標準添加法が一番妥当な方法ですが、これだけ幅広い検量線範囲の検量点を採用すると、前処理と分析を行うのに非常に手間がかかります。糖類定量メソッドを用いた半定量は、試料中の糖類のおおよその濃度を知ることができるためメリットがあると考えられます。また、正確な定量値を出力する場合には、その半定量値から標準添加法を行うための検量点を絞り込むのに役立ちます。

*半定量結果は、試料の種類や前処理法により真値から大きくずれる可能性があります。正確な定量結果を必要とする場合には標準試料を用いた定量試験を実施してください。

GCMS-TQおよびSmart Metabolites Database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。

株式会社 島津製作所

01-00337-JP 初版発行：2022年5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」、「®」を明記していません。

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。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022