

# Application News

## No. M274

ガスクロマトグラフ質量分析計

### 代謝物の網羅分析による コーヒー官能試験評価の回帰モデル作成

食品の呈味評価は食品開発や品質評価においてきわめて重要なファクターです。呈味と含有成分にはある程度関連がある一方、単純な一対一対応であるケースは少なく、多くの場合、複数の含有成分が呈味に複雑に関与しています。このことが、含有成分の測定を機軸とした食品の品質改善や品質評価を難しいものに行っている場合もあります。

そのような背景から、近年食品業界を中心に、代謝物の網羅分析による官能評価試験の回帰分析が注目を集めています。特に網羅分析の中でも、ピークの同定性がよいワイドターゲットメタボロミクスは、官能評価試験のモデルを作成した後、呈味に寄与する成分の考察が可能となることから、このような解析に非常に有用なツールとなることが期待されます。

8種類のコーヒー豆に関して、同じ条件でグラインド・焙煎・抽出し、官能試験を行いました。その後、各コーヒー豆から代謝物を抽出し、GC-MS/MSを用いて代謝物の測定を行いました。官能試験の結果を目的変数、検出された代謝物のピーク面積値を加工して説明変数とし、これらの中でPLS回帰モデルを作成しました。またその結果から、呈味に影響する成分の考察を行いました。

T. Sakai

#### 官能試験評価

同じ条件でグラインド・焙煎・抽出したA-Hの8種類のコーヒーにおける「苦味」について、8名のパネラーによる5段階評価を行い、そのスコアを合計しました。結果を表1に示します。

表1 官能試験結果

	A	B	C	D	E	F	G	H
苦味スコア	34	28	25	19	20	22	25	22

#### コーヒー豆中の代謝物の分析

同条件でグラインドおよび焙煎したコーヒー豆を、図1の内容で前処理し、各サンプル3回ずつGC-MS/MS分析を行いました。分析条件はSmart Metabolites Databaseに準拠しました(表2)。

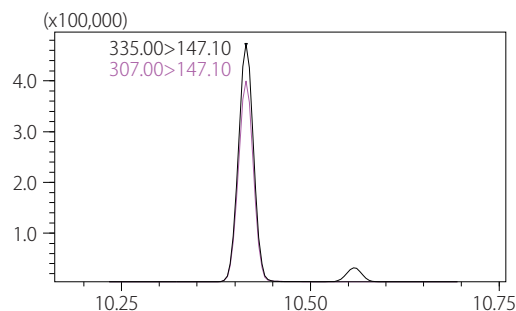
表2 分析条件 (Smart Metabolites Databaseに準拠)

Column	: BPX-5 (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm)
Injection mode	: Split
Split ratio	: 30:1
Injection port temperature	: 250 °C
Oven temperature program	: 60 °C → (15 °C/min) → 330 °C (3min)
Flow control	: Linear velocity (39.0 cm/sec)
Purge flow rate	: 5 mL/sec
Interface temperature	: 200 °C
Ion source temperature	: 280 °C
Event time	: 0.25 sec

1. 1.5 mLチューブにコーヒー豆約20 mgを量り取る。
2. 2-Isopropylmalic acidの水溶液 (20 mg/mL) を10 μL加える。
3. メタノールを500 μL加える。
4. 超純水を250 μL加え、よく混合する。
5. 懸濁液を600 μLを、新しい1.5 mLチューブへ移す。
6. クロロホルムを400 μL加え、よく混合する。
7. 16000 Gで3分間遠心し、上清を200 μL取る。
8. 濃縮遠心機にひと晩かけ、完全に乾燥させる。
9. メトキシアミン塩酸塩をピリジンに溶解し、20 mg/mLの溶液を調製する。
10. 乾燥後のチューブに9で調製した溶液を80 μL加える。
11. ソニケータで残滓を完全に溶液中に分散・溶解させた後、30 °C環境で90分振盪する。
12. MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) を40 μL加え、37 °Cで30分振盪する。
13. GC-MS/バイアルに導入し、分析する。

図1 コーヒー豆からの代謝物抽出

Smart Metabolites Databaseで測定した475成分のうち、192成分が各サンプルで共通に検出されました。この192成分の面積値に関して、内部標準のピーク面積値で除算し、平均0・分散1に標準化したものを説明変数のデータセットとしました。



ID	Compound / Sample	A_01	B_01	C_01	D_01	E_01
	Bitterness	34	28	25	19	2
52	2-Propyl-5-hydroxy-pentanoic acid-2TMS	0.030737	0.023885	0.024535	0.015942	0.0238
53	Threitol-4TMS	0.574396	0.556411	0.654507	0.478847	0.1364
54	Dihydrouracil-TMS	0.055576	0.056699	0.04577	0.037841	0.04076
55	Malic acid-3TMS	11.62529	11.05202	9.711597	8.162754	8.58277
56	meso-Erythritol-4TMS	1.433843	1.326945	1.185678	1.0577	1.06618
57	Niacinamide-TMS	0.020438	0.017427	0.022618	0.036423	0.03219
58	N-Acetylserine-2TMS	0.12085	0.127045	0.109326	0.126517	0.10657
59	Aspartic acid-3TMS	0.066144	0.134722	0.052077	0.125087	0.14311
60	3-Aminoglutaric acid-2TMS	0.075891	0.144157	0.066347	0.134849	0.05790
61	4-Hydroxyproline-3TMS	0.024839	0.018295	0.030287	0.021463	2.71109
62	4-Aminobutyric acid-3TMS	0.202442	0.115015	0.048878	0.143864	0.22620
63	5-Oxoproline-2TMS	79.23318	83.43766	73.40937	78.22139	90.1037
64	Cytosine-2TMS	0.165294	0.186654	0.133193	0.179156	0.12290
65	Threonic acid-4TMS	0.600645	0.404187	0.538817	0.423448	0.50393

図2 解析の一例

(Malic acid-3TMSのクロマトグラムと、データセットの一部)

## ■ PLS 回帰モデルの作成

官能評価試験の結果得られたデータを目的変数、GC-MS/MS 測定の結果得られたデータを説明変数とし、部分的最小自乗法 (Partial Least Squares; PLS) を用いて、説明変数から目的変数を回帰するモデルを作成しました。回帰された目的変数と、実際の目的変数の関係を示したグラフを図3に示します。PLS 回帰には、多変量解析ソフトウェアである SIMCA 14 を使用しました。

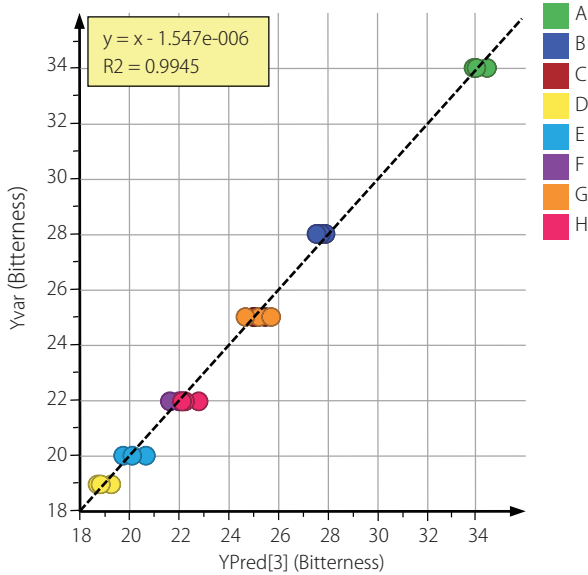


図3 苦味スコアの予測プロット

縦軸が実際の苦味スコアの値、横軸がモデル式に基づいて代謝物面積値の挙動から予測された苦味スコアの値を示します。予測モデル式からのずれの大きさの平均を表す Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) の値は 0.346、相関係数は 0.9945 でした。

表 3、4 に、このモデルにおける回帰係数および VIP 値を示します。

表 3 回帰係数の大きい化合物 (正方向) と、その VIP 値

化合物名	回帰係数	VIP
Glycine-3TMS	0.047	1.648
Arabitol-5TMS	0.043	1.682
Mannitol-6TMS	0.042	1.783
Glucose-meto-5TMS (2)	0.041	1.772
3-Phenyllactic acid-2TMS	0.037	1.591
Lauric acid-TMS	0.036	1.245
Glucuronic acid-meto-5TMS (2)	0.035	1.555
Octanoic acid-TMS	0.034	1.047
2-Aminoethanol-3TMS	0.034	1.417

表 4 回帰係数の大きい化合物 (負方向) と、その VIP 値

化合物名	回帰係数	VIP
4-Hydroxybenzoic acid-2TMS	-0.037	1.574
Glyceraldehyde-meto-2TMS (2)	-0.037	1.578
Erythulose-meto-3TMS (2)	-0.034	1.383
Gluconic acid-6TMS	-0.033	1.342
Coniferyl aldehyde-meto-TMS (2)	-0.033	1.332
5-Oxoproline-2TMS	-0.032	1.068
Niacinamide-TMS	-0.031	1.505
Dihydroxyacetone-meto-2TMS	-0.031	1.215
Tryptamine-2TMS	-0.031	1.275

回帰係数の絶対値が大きい成分に関しては、いずれも VIP 値が 1 より大きく、回帰に重要な成分であることがわかります。また回帰係数の絶対値の値から、Glycine-3TMS、Arabitol-5TMS、Mannitol-6TMS などのピークが大きいサンプルでは苦味スコアが高く、4-Hydroxybenzoic acid-2TMS、Glyceraldehyde-meto-2TMS (2)、Erythulose-meto-3TMS (2) などのピークが大きいサンプルでは、苦味スコアが低く出ていることがわかりました。

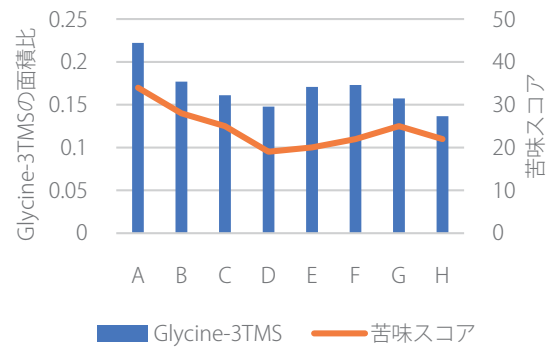


図4 Glycine-3TMS の面積比

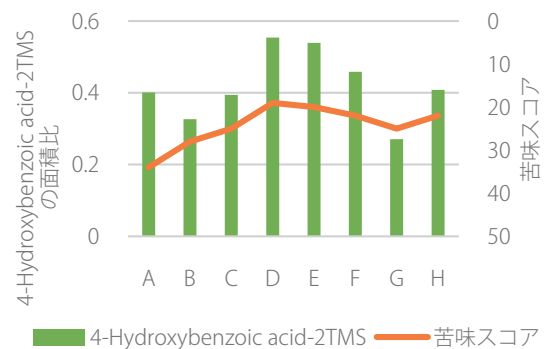


図5 4-Hydroxybenzoic acid-2TMS の面積比

\* なお本アプリケーションニュースにおける官能試験評価は、訓練されたパネラーによるものではありません。