

多変量解析を用いた食品の劣化評価

食品の開発時には、理化学検査・微生物検査・官能評価が実施され、客観的な指標に基づき賞味（消費）期限が設定されています。現在のような商品数が膨大で、かつ商品サイクルが短い市場においては、賞味（消費）期限内の安全性及び品質は十分に担保されていますが、個々の商品ごとの劣化の特徴を把握することは難しくなっています。加えて、商品開封後の消費者の賞味（消費）期限に関する認識も様々であることから、経時劣化を予測する方法が求められています。

食品の劣化は微生物、水、酸素、温度および光などによって引き起こされ、タンパク質、炭水化物や脂肪といった高分子は低分子へと分解します。例えば、タンパク質の場合にはペプチドやアミノ酸に分解した後、アミンや有機酸が生成することが知られております。

本稿では、開封後の牛乳の劣化の様子を追跡することを目的としました。アミノ酸や有機酸、糖などの親水性成分を Smart Metabolites Database™により同定し、それらの成分の経時的な変化を多変量解析ソフトウェア Traverse MS™により解析を行った結果を紹介します。

Y. Kawakita, Y. Sakamoto

■ 試料調製および分析条件

市販されている牛乳（紙パック）を測定試料として用意しました。時間経過による変化を捉えることを目的として、開封日を0日とし、3日、7日、14日、21日経過後にサンプリングを行いました。サンプリング時以外は冷蔵庫にて保管しました。

牛乳 100 μL を 1.5 mL マイクロチューブに測り、内部標準物質としてリビトール水溶液（0.2 mg/mL）を 10 μL 添加しました。親水性成分の抽出溶媒として、水：メタノール：クロロホルム=1：2.5：1 の混合溶媒を 500 μL 添加し、37℃にて30分間振とう後、遠心分離（4℃、3000 g、10 min）し、上相（水/メタノール相）を 450 μL 分取しました。そこに超純水 400 μL を添加し、再度 5 分間遠心分離し、上清を 500 μL 採取しました。その後遠心エバポレータにてメタノールを気化させた後、凍結乾燥にて十分に乾固させました。乾固後の残渣に、メトキシアミン-ピリジン溶液（20 mg/mL）を 200 μL 加え、30℃で 90 分振とうしました。続いて N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide（MSTFA）を 100 μL 加え、37℃で 30 分振とうし、分析用試料としました。GC-MS/MS の測定は、475 成分の MRM 一斉分析が可能な Smart Metabolites Database を使用しました。測定条件は表 1 に示します。

表 1 測定条件

GC-MS	: GCMS-TQ™8040 NX
オートインジェクタ	: AOC-20i + s
カラム	: BPX-5 (Length 30 m, 0.25 mm I.D., df=0.25 μm)
[GC]	
気化室温度	: 250℃
カラムオープン温度	: 60℃ (2分) ⇒ (15℃/分) ⇒ 330℃ (3分)
注入モード	: スプリット
スプリット比	: 30
キャリアガス	: He
キャリアガス制御	: 39.0 cm/秒 (線速度一定)
注入量	: 1 μL
[MS]	
イオン源温度	: 200℃
インターフェイス温度	: 280℃
データ採取モード	: MRM
ループタイム	: 0.25 秒

■ 結果

図 1 に開封直後の牛乳の TICC（トータルイオンカレントクロマトグラム）を示します。開封直後の牛乳からは、Lactose などの糖や、アミノ酸、Palmitic acid を始めとした飽和脂肪酸など、合計 106 成分（94 化合物）が検出されました。検出された化合物は表 2 に記載しております。

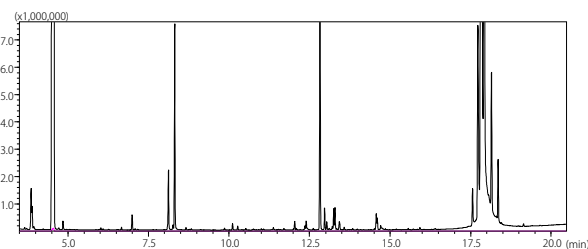


図 1 開封直後の牛乳の分析結果

表2 牛乳から検出された成分

糖／糖アルコール ／糖酸	2-Deoxy-glucose	Arabinose	Arabitol	Erythrose	Fructose	Fucose
	Galactose	Galacturonic acid	Gluconic acid	Glucose	Glucuronic acid	Glyceric acid
	Glycerol	Inositol	Lactitol	Lactose	Maltose	Mannose
	N-Acetylmannosamine	Ribitol (内部標準物質)	Ribonic acid	Ribose	Ribulose	Sucrose
	Threonic acid	Xylitol	Xylose	Xylulose		
糖リン酸	3-Phosphoglyceric acid	Dihydroxyacetone phosphate	Fructose 6-phosphate	Glucose 6-phosphate	Glycerol 2-phosphate	Glycerol 3-phosphate
	Mannose 6-phosphate	Ribose 5-phosphate	Ribulose 5-phosphate	Sedoheptulose 7-phosphate		
アミノ酸	2-Aminopimelic acid	3-Aminoglutaric acid (β-Glutamic acid)	3-Aminopropanoic acid (β-Alanine)	4-Aminobutyric acid (GABA)	4-Hydroxyproline	5-Oxoproline
	Alanine	Aspartic acid	Creatinine	Cysteine	Dimethylglycine	Glutamic acid
	Glycine	Hypotaurine	Isoleucine	Leucine	Lysine	Phenylalanine
	Proline	Serine	Threonine	Tyrosine	Ureidosuccinic acid	Valine
飽和脂肪酸	Caproic acid	Decanoic acid	Lauric acid	Myristic acid	Nonanoic acid	Octanoic acid
	Palmitic acid	Stearic acid				
有機酸	2-Ketoglutaric acid	2-Hydroxyglutaric acid	3-Hydroxybutyric acid	3-Hydroxyisovaleric acid	3-Hydroxypropionic acid	Aconitic acid
	Benzoic acid	Citric acid	Fumaric acid	Glycolic acid	Glyoxylic acid	Lactic acid
	Malic acid	Pyruvic acid	Succinic acid			
その他	2-Aminoethanol	Allantoin	Dopamine	O-Phosphoethanolamine	Orotic acid	Pantothenic acid
	Phosphoric acid	Uracil	Urea	Xanthosine monophosphate		

■ 時系列による多変量解析

多変量解析ソフトウェア Traverse MS™ (Reifycs 社) は、GC-MS/MS で取得した MRM データを用いた多変量解析を高速に実現するための統合解析ソフトウェアです。MRM 分析データに特化したピーク認識のアルゴリズムと操作性の高いグラフィカルユーザーインターフェースを採用することで、ピーク波形処理・同定処理をより「正確・迅速・簡単」に行うことができます。また、サンプル群間での変動をグラフにより表示させることが可能な他、階層クラスタリング、主成分分析 (PCA) や代謝パスウェイにも対応しており、様々な解析手法からデータ間の違いを視覚的に評価することができます。GCMSsolution™ で取得した qgd ファイル (MRM データ) は直接 Traverse MS™ に読み込むことができます。

牛乳から検出された上記 106 成分をターゲットとし、Traverse MS™ にて解析を行いました。分析は各経過日ごとに 3 検体実施し、各試料で検出された化合物の強度は Ribitol を内部標準物質として正規化しました。Traverse MS™ にて主成分分析 (PCA) の Score Plot を用いて各経過日の差異を調べた結果を図 2 に示します。第 1 主成分 (横軸、PC1) に注目すると、正から負に向かって 0 日、3 日、7 日、14 日、21 日と順に並んでおり、0 日と 3 日が正、14 日と 21 日が負に分布しておりました。このことから、第 1 主成分は経時的な変化を表していることが示唆されました。

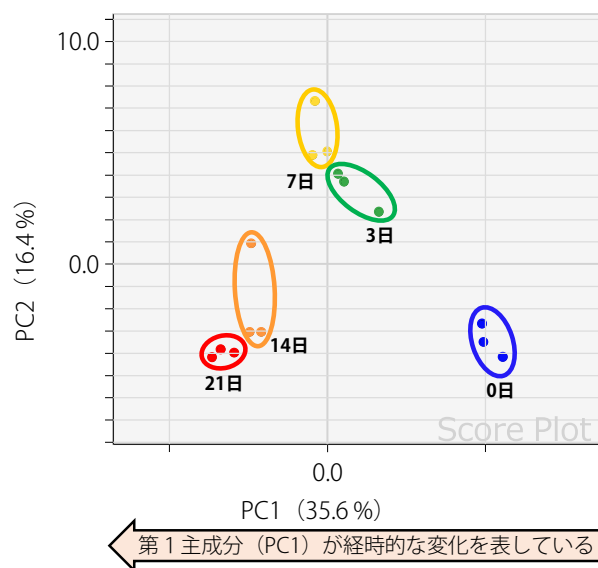


図2 主成分分析 (PCA) の Score Plot による各検体の分布

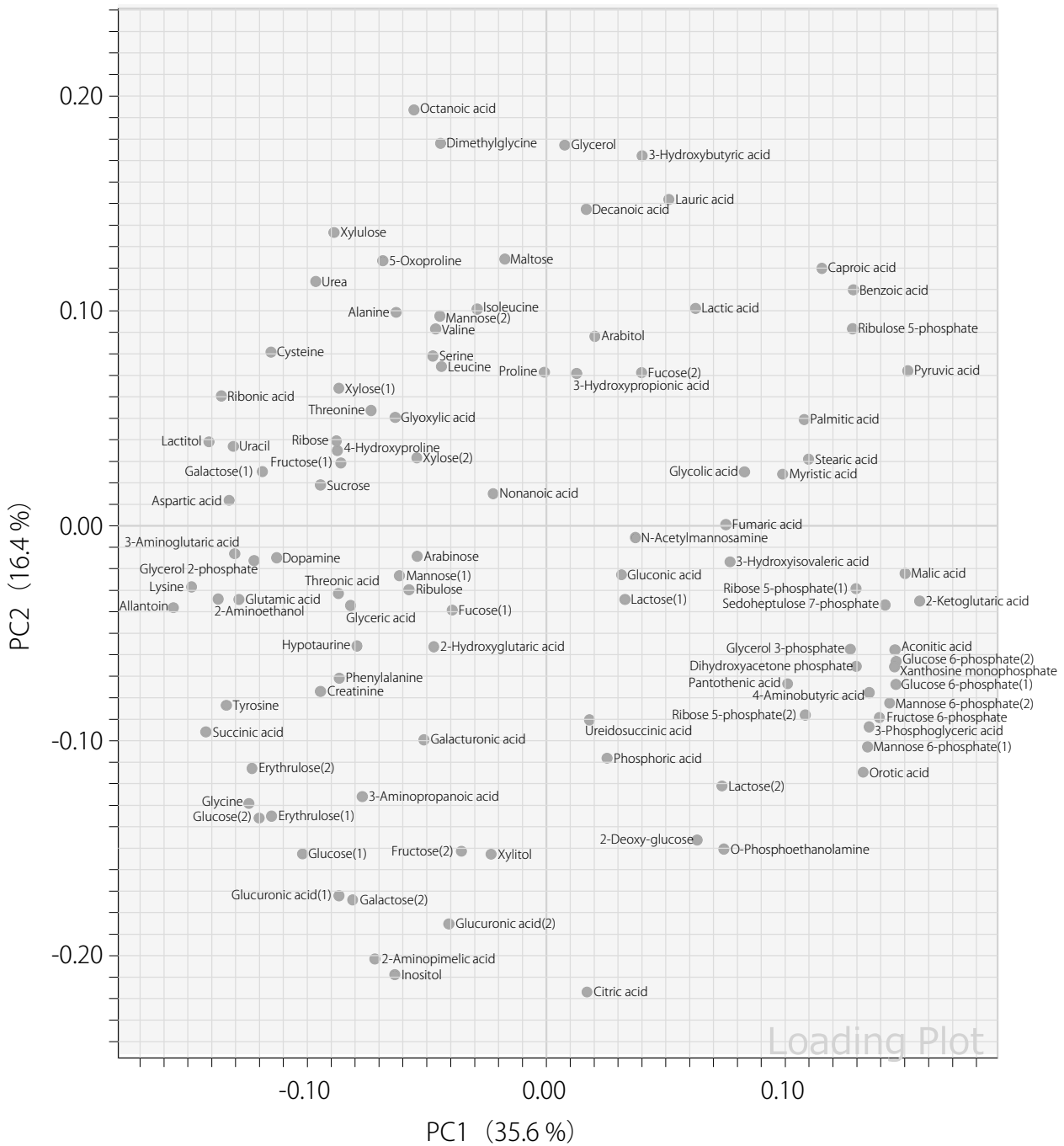


図3 主成分分析 (PCA) の Loading Plot による各成分の分布

また、主成分分析の Loading Plot を図3に示します。第1主成分(横軸、PC1)で正に分布している成分は、開封直後の新鮮な牛乳に多く含まれており、負に分布している成分は、日数が経過した牛乳に多く含まれる傾向にあります。第1主成分が正の成分は、Malic acid、2-Ketoglutaric acid、Pyruvic acidなどの有機酸や飽和脂肪酸、糖リン酸などが代表的でした。一方、第1主成分が負の成分では、Succinic acid、Allantoin や Glycine を始めとしたアミノ酸、Glucose、Erythuloseなどの糖が確認されました。

次に、各経過日でクラス分けをし、分散分析 (ANOVA) に基づいて p-value を算出しました。p-value<0.01 の成分のうち、増加あるいは減少傾向が確認される成分の一部について、その定量値のクラス内平均を棒グラフで表しました(図4)。2-Ketoglutaric acid、Malic acid、Glucose 6-phosphateなどは時間経過とともに減少しておりました。一方で、Succinic acid や、Glycine、Lysineなどのアミノ酸、Glucoseなどの糖は増加しておりました。このことから、日数の経過に伴ってタンパク質の一部が分解されアミノ酸が増加することや、糖リン酸の一部が糖へと分解していることが示唆されました。

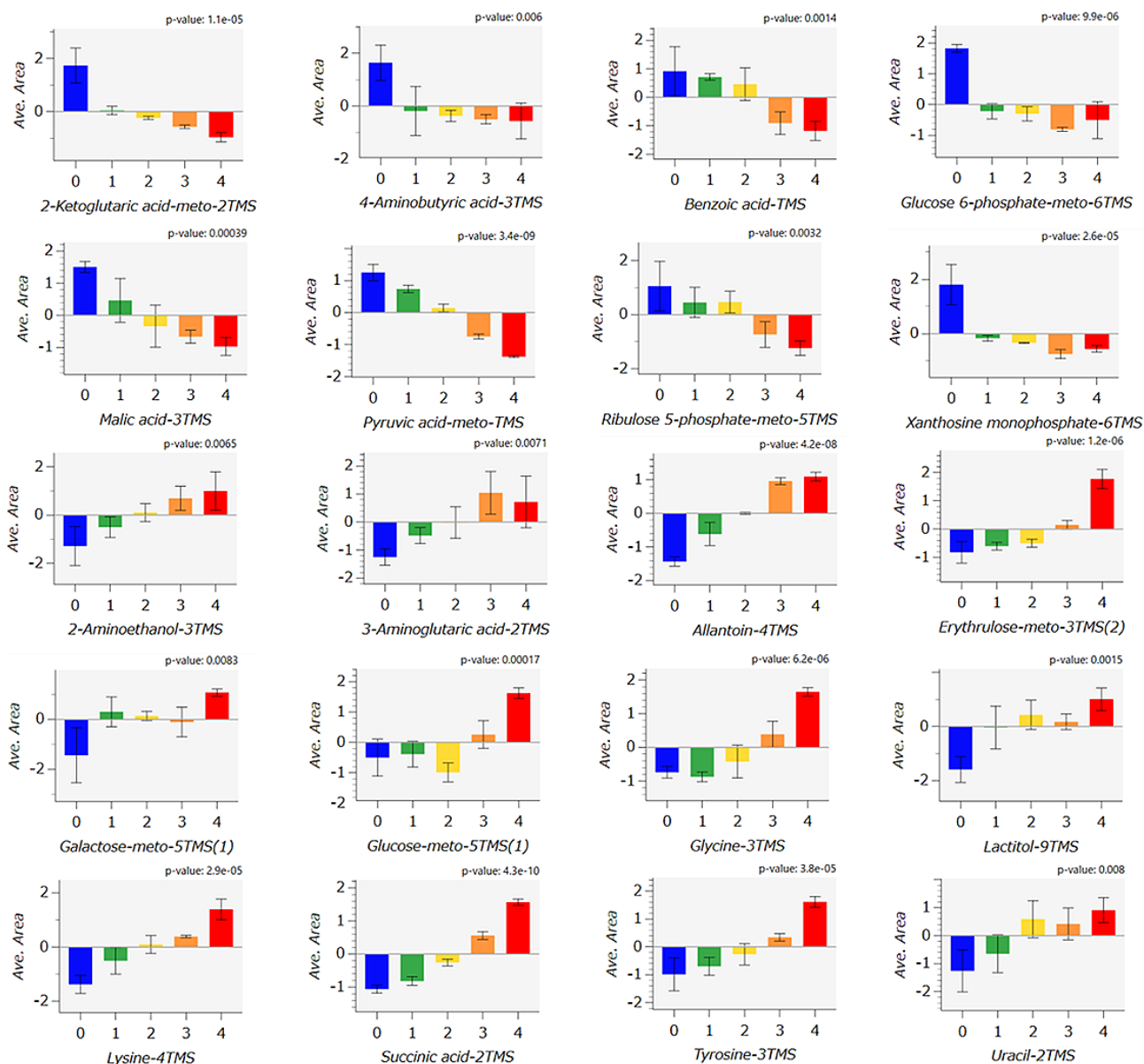


図4 分散分析 (ANOVA) による結果
0: 開封時、1: 開封後3日経過、2: 開封後7日経過、3: 開封後14日経過、4: 開封後21日経過
($p < 0.01$ の成分のうち一部のみを記載しております。棒グラフはクラス内平均、エラーバーはクラス内標準偏差)

■まとめ

Smart Metabolites Database を使用することにより、食品に含まれる親水性成分を一斉分析することが出来、その結果を用いたワイドターゲットな多変量解析を実施することで、劣化時に増加する成分と減少する成分を確認することが出来ました。

これにより、鮮度や劣化の指標として一部の有機酸やアミノ酸、糖をマーカーとして使用できる可能性が示唆されました。製品開発時の客観的評価と合わせて使用することで、製品の特徴をより詳細に把握することが可能となります。

Smart Metabolites Database、GCMS-TQ、および GCMSsolution 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。Traverse MS は、Reifycs 株式会社の商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年6月
島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

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。