

Application News

No. C203

LC-MS

フードメタボロミクス LC/MS/MSを用いた酒類の劣化解析

近年、生体中の代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスという技術に注目が集まっています。この手法を食品に応用したものが「フードメタボロミクス」です。これまで食品を評価する際は、人による官能試験により味、香り、おいしさ、等級などが評価されてきました。フードメタボロミクスは、食品中の代謝物を網羅的に分析し、その結果と人による官能試験等の結果の関係を解析することで、より科学的に食品の「品質の評価・予測」や「機能性成分の探索」を行うというものです。

本報告ではフードメタボロミクスを用いた食品の劣化解析の一例として、市販の日本酒および白ワインを苛酷な条件下にて保管し、アミノ酸、有機酸、ヌクレオシド、ヌクレオチドといった親水性代謝物にどのような変化がみられるのかについて、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）を用いて網羅的に分析し、多変量解析により検証した事例を紹介いたします。

N. Kato Y. Inohana

■ サンプルおよび劣化実験

サンプルとして市販の日本酒2種類（冷蔵で販売されているもの）と白ワイン1種類を使用しました。各試料の内訳を表1に示しました。また、各サンプルについては強制的に劣化させる目的で、表2に示した処理を加えました。酒類の流通は国内に留まらず、輸出入も活発に行われるようになっており、品質を損なわない輸送は商品価値を維持する上で非常に重要な要素です。今回の実験では、日光への暴露、高温、揺れといった輸送時の品質に影響を及ぼしかねない状況を再現し、評価しました。

各条件下で保管したサンプルは、12,000 rpmで5分間遠心分離し、その上清を超純水で100倍希釈したものをLC/MS/MS分析用サンプルとしました。

表1 サンプルの詳細

サンプル	
日本酒-1	純米大吟醸, 精米歩合=50%, アルコール分=15度
日本酒-2	吟醸酒, 醸造アルコール添加, 精米歩合=50%, アルコール分=15度
白ワイン	オーストラリア産, 酸化防止剤（亜硫酸塩）含有, アルコール分=13度

表2 サンプル劣化処理の内容

保管条件	
A	冷蔵・遮光下にて2週間保管
B	室温・日光暴露下にて2週間保管
C	冷蔵・遮光下にて2週間保管 → 遮光下で24h 50℃に加熱
D	冷蔵・遮光下にて2週間保管 → 室温・遮光下で24h振とう

■ 分析条件

一次代謝物LC/MS/MSメソッドパッケージ Ver. 2に含まれるイオンペアフリーLC/MS/MS法を用い、LCMS™-8060（図1）を使用して行いました。本パッケージに含まれる分析メソッドを使用することで、ライフサイエンス分野のメタボローム解析において重要となる親水性代謝物97成分の一斉分析が可能になります。表3にHPLCおよびMSの分析条件を示しました。

表3 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
Column	: Reversed-phase column
Mobile phases	: A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 3 μL
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Positive and negative mode)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250°C
Block heater temp.	: 400°C
Interface temp.	: 300°C



図1 Nexera™ X2およびLCMS™-8060

■ メタボローム解析

各サンプルをLC/MS/MSで測定し、各成分の面積値を用いて、主成分分析（Principal Component Analysis: PCA）および一元配置分散分析（one-way analysis of variance: one-way ANOVA）をTraverse-MS™ ソフトウェアにより行いました。

その結果、主成分分析ではいずれの酒類においても、サンプルの処理による明確な差異は確認されませんでした。一方でANOVAの結果を詳しく確認すると、酒類あるいは保管条件によって特異的に増減する成分がいくつか確認されました。一例として日本酒-1の各保管条件におけるANOVA検定結果を図2に示しました。有意差有りとして判定される成分（ p 値<0.05）については、緑枠で囲い明示しました。



図2 日本酒-1における各保管条件間のANOVA検定結果

日本酒-1を各保管条件下にて処理した結果、特に条件Bの室温・日常光暴露下にて2週間保管したサンプルに関して、他の条件とは測定値が大きく異なる成分がいくつか確認されました。この傾向は日本酒-2や白ワインでも同様であり、50℃加温や振とうを24時間程度行っただけでは、アミノ酸や有機酸を中心とした親水性化合物群には大きな影響が確認されませんでした。今回の検証ですべてが判断できる訳ではありませんが、商品の輸送時や商品購入後の保管に関して、揺れや高温に曝された場合であっても、短時間であれば品質にあまり大きく影響しないと見てとることもできます。

なお、日本酒-1に関してp値が0.05未満でかつ条件Bが他と大きく違った成分としては、システイン、メチオニンスルホキシド、尿酸が挙げられます。他にも白ワインのみで特徴的に変化した成分などが観測されており、図3~6においてそうした特徴的な成分を抽出し酒類間で比較した結果を示しました。

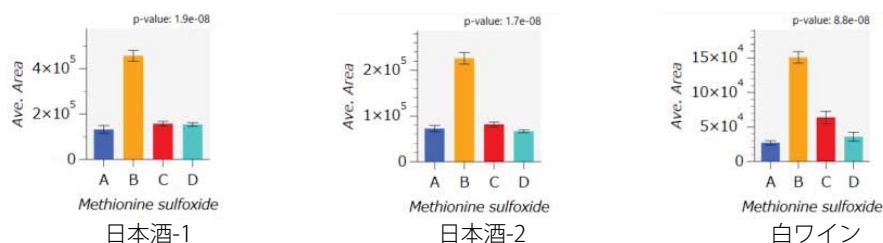


図3 メチオニンスルホキシドのANOVA検定結果

図3にメチオニンスルホキシドの各酒類における検定結果を示しました。この成分については、いずれの酒類においても同様の結果が得られており、室温・日常光暴露下にて2週間保管したサンプル (B) で顕著に増加する傾向がみられました。メチオニンは老化に伴う生体内でのタンパク質の酸化部位として最も影響を受けやすいアミノ酸残基と言われており、細胞内での酸化ストレスに迅速に反応してスルホキシド型になることが知られています。今回得られた結果からはメチオニンスルホキシドを酒類における酸化のマーカーとして使用できる可能性が示唆されました。

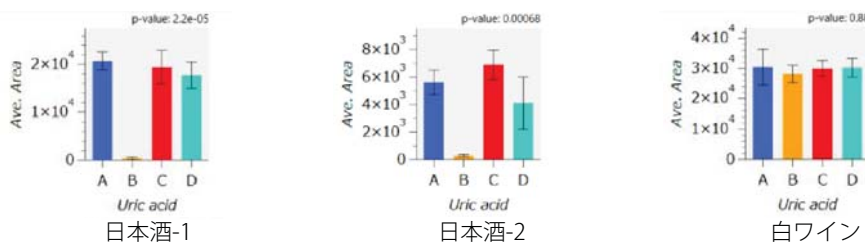


図4 尿酸のANOVA検定結果

図4に尿酸の各酒類における検定結果を示しました。この成分については、日本酒においてのみ室温・日常光暴露下にて2週間保管したサンプル (B) で顕著に減少する傾向がみられました。尿酸は生理学的役割としてアスコルビン酸に並ぶ強い抗酸化作用を持ち、自身は容易に酸化されやすい性質があります。白ワインについては酸化防止剤として亜硫酸塩が添加されているため、尿酸自身が酸化されることがほとんどなかったものとみられます。

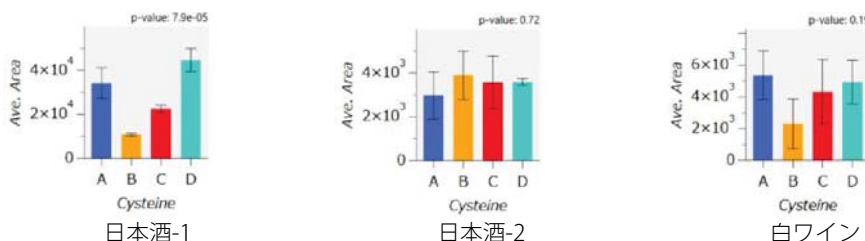


図5 システインのANOVA検定結果

図5にシステインの各酒類における検定結果を示しました。この成分については、日本酒-1においてのみ室温・日常光暴露下にて2週間保管したサンプル (B) で有意差をもって顕著に減少する傾向がみられました。システインはメチオニンとならんで日本酒の劣化臭の主要成分とされるジメチルトリスルフィド (DMTS) の前駆物質の一つとして知られています。システインの減少がDMTSの生成につながっているとすると、日本酒-1と日本酒-2の主な違いである醸造アルコール添加の有無が劣化の受けやすさに影響している可能性が考えられます。

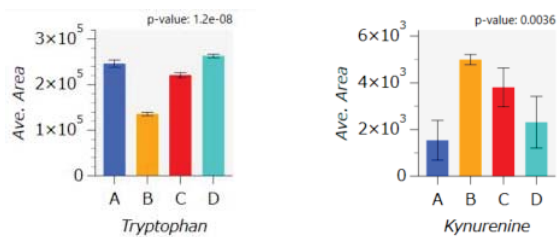


図6 白ワインにおけるトリプトファンおよびキヌレニンのANOVA検定結果

図6に白ワインにおけるトリプトファンおよびキヌレニンの検定結果を示しました。室温・日光暴露下にて2週間保管したサンプル (B) においてトリプトファンの低下とキヌレニンの上昇を確認することができ、高温下に24時間さらした検体 (C) もわずかに同じ傾向が見られました。トリプトファンはその代謝経路の一つであるキヌレニン経路 (図7) により、キヌレニンに代謝されることが知られており、その経路に沿った変動を示しています。

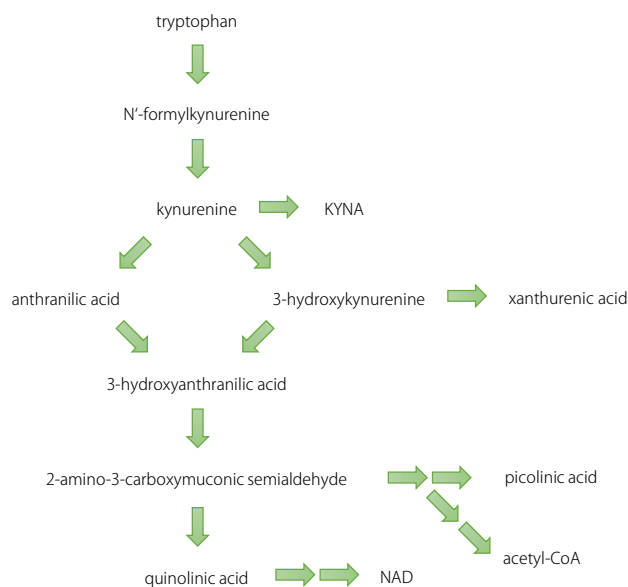


図7 キヌレニン経路

まとめ

このようにLC/MS/MSを用いたフードメタボロミクスを行うことで、酒類の劣化を特徴づける成分の網羅的探索が可能となります。

LCMSおよびNexera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 MSIは、ライフイクス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：2019年10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。