SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

液体クロマトグラフ質量分析計　LCMS™-9030

赤ワイン中代謝物のスクリーニング解析

馬越 泰、飯田 哲生

ユーザーベネフィット

- ◆ LCMS-9030を用いて、食品中代謝物のスクリーニング解析が可能です。
- ◆ 解析ソフトウェアLabSolutions Insight Explore™のスクリーニング機能により、迅速に代謝物を推定できます。
- ◆ 化合物名と組成式情報があれば、任意の化合物を簡便にスクリーニング対象に設定できます。

■はじめに

近年、生体中の代謝物（メタボローム）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。食品分野でも味や品質、栄養的価値を客観的に評価する手法として利用されています。メタボロームのスクリーニング手法として、高分解能の質量分析計が頻用されますが、データ量が膨大になるため、解析部分が研究のボトルネックになります。

本稿では四重極飛行時間型（Q-TOF）質量分析計であるLCMS-9030（図1）を用いて、赤ワイン中代謝物をスクリーニング解析した例を紹介します。LabSolutions Insight Exploreのスクリーニング機能を用いて、サンプル中の代謝物推定を行いました。プリカーサーイオンの候補化合物リストを用意し、照合することで、迅速に代謝物のスクリーニングを行うことが出来ます。

図1　Nexera™ X3 およびLCMS™-9030

■分析条件

測定機器はNexera™ X3とLCMS-9030を使用しました。【LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物】に収載されているLCメソッドを用いました。検出にはプリカーサー*m/z*とMS/MSデータを同時に取得できるData Dependent Acquisition（DDA）モードを使用しました。表1に分析条件を示します。

表1　分析条件

[HPLC conditions]　(Nexera X3)		
Column	:	Reversed-phase column
Column oven	:	40° C
Solvent A	:	0.1% Formic acid in water
Solvent B	:	0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	:	Gradient elution
Flow rate	:	0.25 mL/min
Injection volume	:	3 μL
[MS conditions]　(LCMS-9030)		
Ionization	:	ESI, Negative
Mode	:	Data Dependent Acquisition（DDA）
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
CID Gas Pressure	:	230 kPa

■代謝物スクリーニングのワークフロー

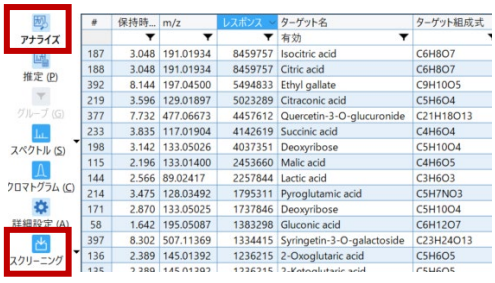
代謝物スクリーニングのワークフローを図2に示します。まず、プリカーサーイオンの候補化合物リストを用意します。ここでは【代謝物精密質量データベース】に含まれる一次代謝物の情報を基に、リスト作成しました。本データベースにはLC/MS/MSメソッドパッケージシリーズで実績のある代謝物の保持時間，精密質量情報が含まれます。それに加え、いくつかの代謝物をリストに追加しています。化合物名と組成式情報があれば、任意の化合物を簡便にスクリーニング対象に設定できます。次にLCMS-9030でデータを取得し、LabSolutions Insight Exploreのアナライズ機能でピーク抽出を行います。最後にスクリーニング機能で、用意したリストを読み込み、代謝物スクリーニングを行います。

プリカーサーイオンの候補化合物リストを用意

Name	m/z	Formula	RT	m/z tolerance (ppm)	m/z tolerance (mDa)	RT tolerance (min)
2-Ketoglutaric acid	145.0142	C5H6O5	2.317		1	1
2-Morpholinoethanesulfonic acid	194.0492	C6H13NO4S	2.021		1	1
Aconitic acid	173.0092	C6H6O6	3.536		1	1
Mucic acid	209.0303	C6H10O8			1	
Coumaric acid	163.0399	C9H8O3			1	
Gallic acid	169.0143	C7H6O5			1	
⋮	⋮	⋮			⋮	

□ 代謝物精密質量データベースに含まれる代謝物
□ 新たに追加した代謝物

LabSolutions Insight Exploreの
アナライズ機能でピーク抽出



用意したリストを用いて代謝物スクリーニング

図2　代謝物スクリーニングのワークフロー

■サンプル・前処理

由来や産地の異なる赤ワイン5種類を当量混合して、サンプルとしました。前処理は、混合ワインを遠心分離（12,000 rpm、5 min、4℃）し、その上清を超純水で10倍に希釈しました。

■LCMS-9030によるワイン中代謝物の網羅的分析

前処理した赤ワインを測定したところ、ネガティブモードでは図3に示すようなベースピーククロマトグラムが得られました。

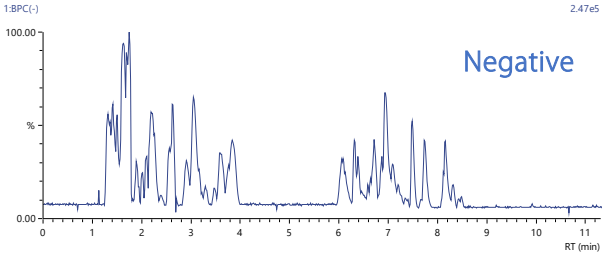


図3　赤ワイン混合サンプルのベースピーククロマトグラム

得られたデータに対してLabSolutions Insight Exploreのアナライズ機能を用いたところ、455個のピークが抽出されました。事前に用意した約500化合物の*m/z*のリストを用い、抽出ピークに対して質量誤差 1 mDaでスクリーニングを行ったところ、455ピーク中90個の化合物がヒットしました。ネガティブモードではCitric acid、Succinic acid、Gallic acid等の有機酸が多く検出され、Quercetin 3-O-glucuronide等のフラボノイドもいくつか検出されました。

■スクリーニングした化合物の確認

ここではGallic acid（保持時間6.385 min、*m/z* 169.01390）のフラグメント帰属結果と、標準品を用いた確認結果を示します。 図4に示すようにGallic acidは高い質量確度（誤差 -0.35 mDa）で推定されました。

#	保持時間	m/z	レスポンス	ターゲット名	ターゲット組成式	ターゲットm/z	質量誤差 (mDa)
				有効			
119	2.225	191.01936	1159690	Citric acid	C6H8O7	191.01970	-0.34
43	1.600	209.02996	1120974	Mucic acid	C6H10O8	209.03029	-0.33
269	6.385	169.01390	936758	Gallic acid	C7H6O5	169.01425	-0.35
374	7.669	189.07634	900018	Hydroxysuberic acid	C8H14O5	189.07660	-0.26
175	2.901	129.01896	881913	Citraconic acid	C5H6O4	129.01933	-0.37

図4　ワインのスクリーニング結果

組成式$C_7H_6O_5$について、ChemSpiderデータベースを用いたオンライン検索（アサイン機能）を行ったところ、最上位の候補化合物としてGallic acidがヒットしました。MS/MSスペクトル中のフラグメントの自動帰属結果を図5に、推定フラグメントを図6に示します。

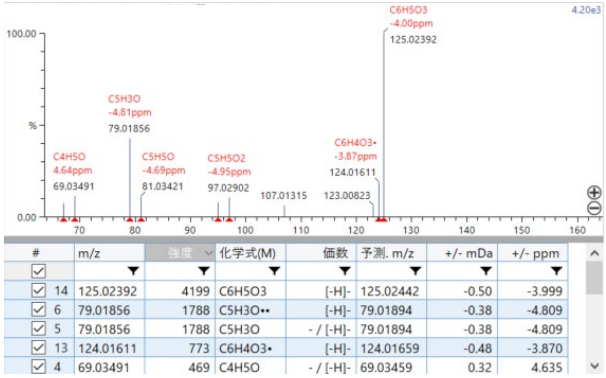


図5　Gallic acidのフラグメント自動帰属結果

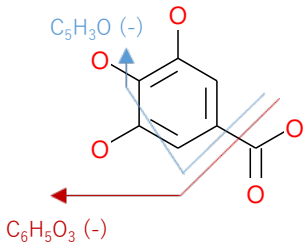


図6　Gallic acidの推定フラグメント

最後にGallic acidの標準品を分析した結果を示します。赤ワイン中でGallic acidと推定された化合物と、標準品の抽出イオンクロマトグラム上の保持時間は一致しました（図7）。またMS/MSスペクトルパターンも標準品と一致しました（図8）。

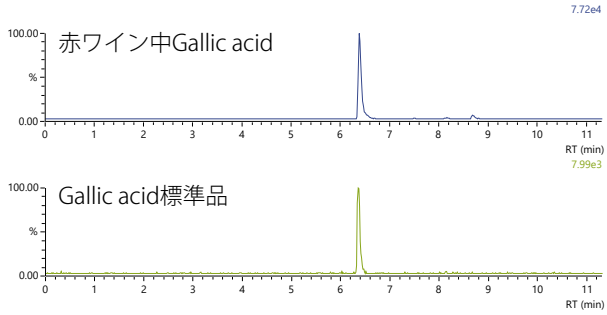


図7　抽出イオンクロマトグラム

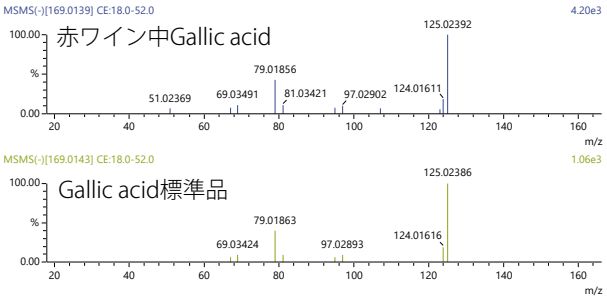


図8　MS/MSスペクトル

このように標準品の分析を行うことで、スクリーニングした化合物の確認を行うことが出来ました。

■まとめ

本稿では、赤ワインを四重極飛行時間型質量分析計であるLCMS-9030で測定し、機能性や呈味に関わる代謝物をスクリーニングしました。代謝物名と*m/z*のリストを用意・照合することで、ネガティブモードのデータから90個の化合物が推定されました。またGallic acidについて、標準品を用いてスクリーニング結果を検証しました。Gallic acidはフェノール系の抗酸化物質で、抗がん作用などの効果もあると言われています。また今回の分析で多く検出された有機酸は、ワインの呈味に大きく関わります。

本ワークフローにより、迅速な代謝物のスクリーニングが可能です。化合物名と組成式情報があれば、任意の化合物を簡便にスクリーニング対象に設定できます。

LCMS、LabSolutions Insight Explore、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。

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
01-00329-JP　初版発行：2022年 2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」、「®」を明記していない場合があります。

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 にご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