

## 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、任意の化合物を簡単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、任意の化合物を簡単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	C8H6O5	2.317		1	1
2-Morpholinoethanesulfonic acid	194.0482	C8H13NO4S	2.021		1	1
Acetic acid	173.0092	C2H4O2	3.536		1	1
Mucic acid	209.0303	C6H10O8			1	
Coumaric acid	163.0399	C9H8O3			1	
Galic 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

#	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
187	3.048	191.01934	8459757	Isocitric acid	C6H8O7
188	3.048	191.01934	8459757	Citric acid	C6H8O7
392	8.144	197.04500	5494833	Ethyl gallate	C9H10O5
219	3.596	129.01897	5023289	Citraconic acid	C5H6O4
377	7.732	477.06673	4457612	Quercetin-3-O-glucuronide	C21H18O13
233	3.835	117.01904	4142619	Succinic acid	C4H6O4
198	3.142	133.05026	4037351	Deoxyribose	C5H10O4
115	2.196	133.01400	2453660	Malic acid	C4H6O5
144	2.566	89.02417	2257844	Lactic acid	C3H6O3
214	3.475	128.03492	1795311	Pyroglutamic acid	C5H7NO3
171	2.870	133.05025	1737846	Deoxyribose	C5H10O4
58	1.642	195.05087	1383298	Gluconic acid	C6H12O7
397	8.302	507.11369	1334415	Syringetin-3-O-galactoside	C23H24O13
136	2.389	145.01392	1236215	2-Oxoglutaric acid	C5H6O5

#### 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°C）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。

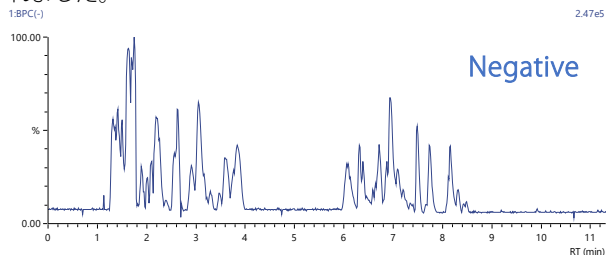


図3 赤ワイン混合サンプルのベースピーククロマトグラム

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は高い質量精度 (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)
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
203	6.385	169.01390	936758	Gallic acid	C7H6O5	169.01425	-0.35
374	7.669	189.07634	900018	Hydroxysuberic acid	C6H14O5	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。

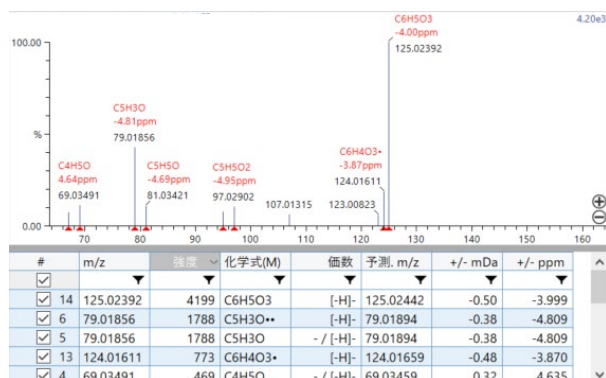


図5 Gallic acidのフラグメント自動帰属結果

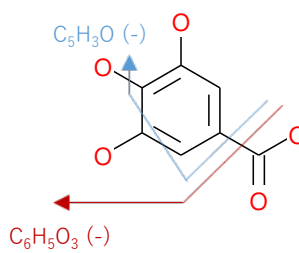


図6 Gallic acidの推定フラグメント

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)。

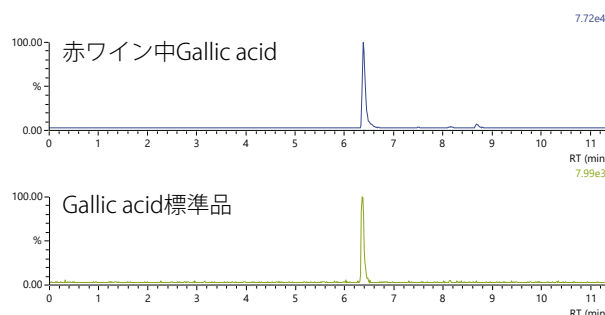


図7 抽出イオンクロマトグラム

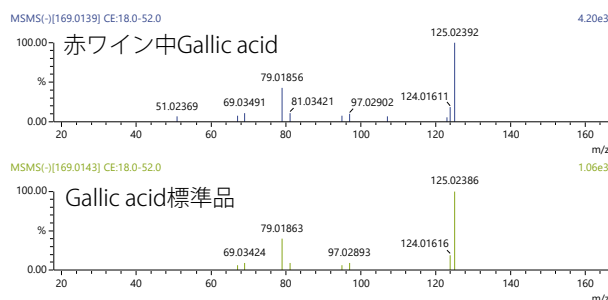


図8 MS/MSスペクトル

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、任意の化合物を簡単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