SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

液体クロマトグラフ質量分析計　LCMS™-9030

四重極飛行時間型質量分析計を用いた飲料中代謝物のノンターゲット解析

馬越 泰、飯田 哲生

ユーザーベネフィット

- ◆ LCMS-9030と多変量解析ソフトウェアを用いて、食品サンプルのノンターゲット解析が可能です。
- ◆ 精密質量を取得可能なLCMS-9030を用いることで、サンプル間で差異のあった未知化合物の推定が可能です。
- ◆ 本ワークフローにより、食品の味、品質および栄養的価値を客観的に比較、評価できます。

■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、品質および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。メタボロミクスには大きく分けて、“ターゲット解析”と”ノンターゲット解析“という二つの手法があります。ターゲット解析は、決められた化合物群のみを測定する方法で解析は容易になりますが、ターゲット以外の有効成分を見逃す恐れがあります。一方、ノンターゲット解析では未知成分も含めて網羅的に代謝物を解析します。精密質量を取得可能な四重極飛行時間型（QTOF）質量分析計はノンターゲット解析に適しており、サンプル間で差異のあった未知化合物の推定が可能です。

本稿では四重極飛行時間型質量分析計であるLCMS-9030（図1）を用いて、ビールを代表とする各種飲料中代謝物をノンターゲット解析した例を紹介します。多変量解析ソフトウェアを用いて、各サンプルに特徴的なピークを抽出しました。差異のあったピークの同定を行ったところ、原料や製造法に基づいた代謝物プロファイルであることが確認できました。

図1　Nexera™ X3 およびLCMS™-9030

■サンプルおよび前処理

表1に示す市販の6種類のビール、発泡酒、新ジャンル、ノンアルコールビールをサンプルとしました。前処理では、各サンプルを脱気後、超純水で10倍希釈しました。

表1　サンプルの詳細

No	サンプル	備考
1	ビール1	ラガービール（下面発酵）
2	ビール2	エールビール（上面発酵）
3	発泡酒	プリン体ゼロ
4	新ジャンル	大豆たんぱくを原材料に使用
5	ノンアルコールビール1	国内製
6	ノンアルコールビール2	海外製

■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2に分析条件を示します。

表2　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, Positive
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

■データ解析

差異解析にはReifycs社のSignpost MS（図2）を用いました。Signpost MSは、取得したデータから検出されたイオン情報をSpotとして抽出し、保持時間と*m/z*を基にアライメントを行います。アライメントされたピークを用いて多変量解析を行うことで、各サンプルに特徴的なピークを簡便に抽出可能です。化合物同定は、“代謝物精密質量データベース”を基に行いました。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。保持時間と精密質量情報により、確度の高い化合物同定が可能です。代謝物精密質量データベースに含まれていない化合物については、LabSolutions Insight Explore™のアサイン機能を用いて化合物推定を行いました。推定された化合物の標準品を用いて、保持時間とMS/MSスペクトルの確認を行い、同定しました。

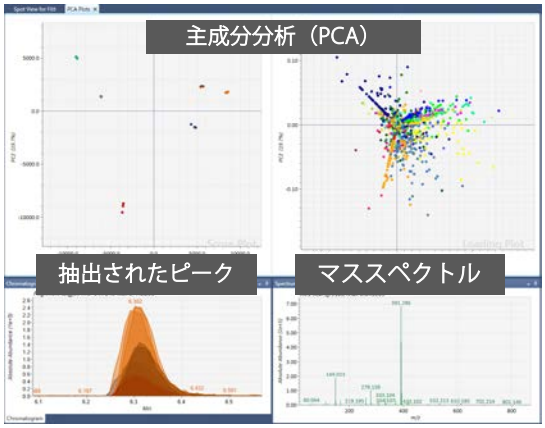

図2　Signpost MSの解析画面例

■LCMS-9030によるビール中代謝物の網羅的分析

LCMS-9030を用いて、6種類のビールおよび、ビールテイスト飲料を3回ずつ分析しました。Signpost MSにより、1698個のピークが抽出されました。抽出されたピーク高さ値で主成分分析を行った結果を図3に示します。データのスケーリングにはPareto scalingを用いました。ローディングプロットはPrincipal Component Variable Grouping (PCVG)により、色分けして表示されています。これにより、大量に得られたスポットが関連するもの同士でグルーピングされ、得られた主成分の解釈がしやすくなります。

スコアプロット上ではビール1、ビール2、ノンアルコールビール2が近くにプロットされました。発泡酒、ノンアルコールビール1も近くにプロットされました。新ジャンルは、PC2軸方向で他のサンプルと異なる位置にプロットされました。サンプル間で特徴的であった一部の代謝物のピーク高さを、図4で比較しました。

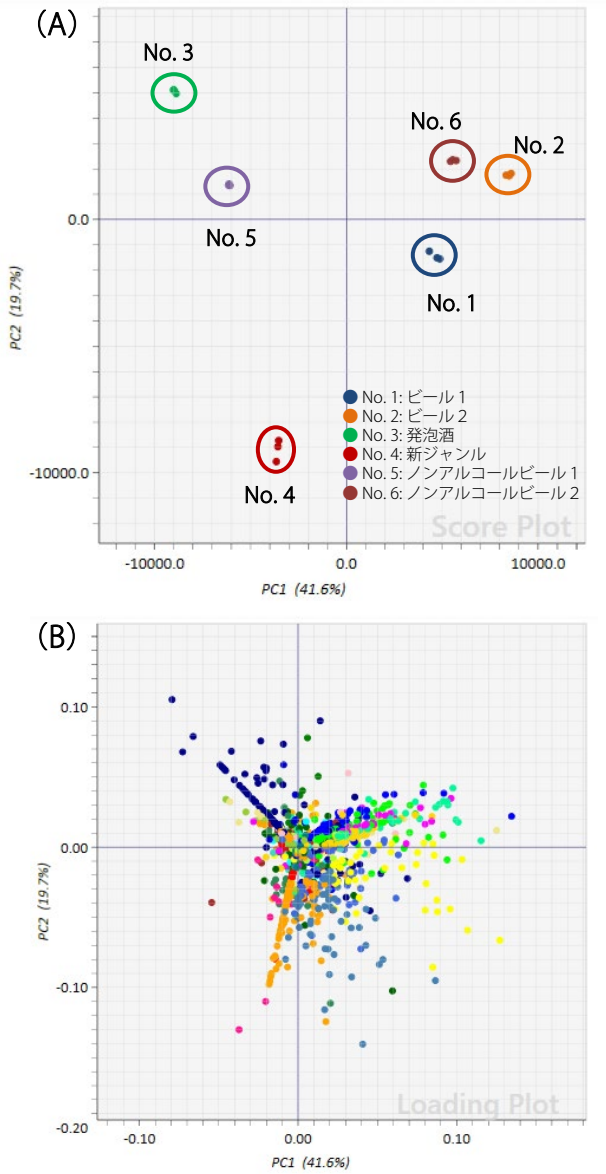

図3　Signpost MSでの主成分分析結果
（A）スコアプロット、（B）ローディングプロット

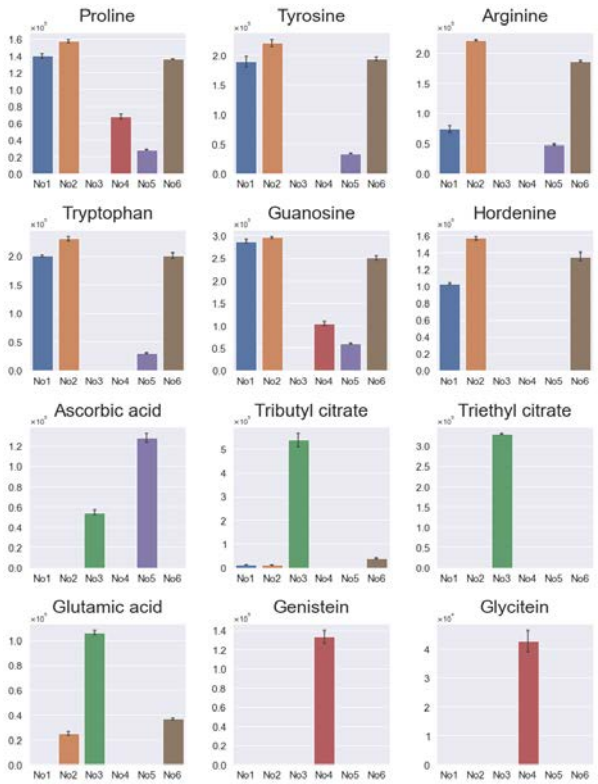

図4　サンプル間で特徴的であった代謝物
縦軸：高さ値（n＝3、平均±標準偏差）

No. 1、2、6からはアミノ酸（Proline、Tyrosine、Arginine、Tryptophan）や核酸代謝物（Guanosine）が多く検出されました。また大麦由来と考えられるアルカロイド（Hordenine）も検出されました。No. 1、2、6から同様の成分が特徴的に検出されたのは、これらの製法に共通する発酵工程が理由だと推測されます。No. 6はビールの原料を使用し、アルコール生成を抑えた発酵法で製造されているため、No. 1、2と類似した代謝プロファイルになったと考えられます。No. 3、5からは酸化防止剤（Ascorbic acid）が検出されました。No. 3からは乳化剤（Tributyl citrate、Triethyl citrate）や旨味成分（Glutamic acid）が多く検出されました。 No. 3、5は原料を混合して製造されているため、ビールとは異なる代謝プロファイルになったと考えられます。No. 4からはイソフラボン（Genistein、Glycitein）が検出されました。No. 4は大豆を原料に製造されているため、大豆由来の代謝物が検出されたと考えらえます。

■まとめ

本稿では、四重極飛行時間型質量分析計であるLCMS-9030を用いて、ビール中代謝物をノンターゲット解析しました。サンプル間で特徴的な化合物を同定したところ、原料や製造法に基づいた代謝物プロファイルになっていることが確認できました。

LCMS-9030とSignpost MSを用いることで、食品サンプルのノンターゲット解析が可能です。本ワークフローにより、食品の味、品質および栄養的価値を客観的に評価できると考えられます。

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

01-00390-JP　初版発行：2022年 6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