SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計　LCMS™-2050

シングル四重極質量分析計を用いた アルコール飲料のフードメタボロミクス

服部考成、岩田奈津紀

ユーザーベネフィット

- ◆ シングル四重極LC-MSで簡便にフードメタボロミクスが可能です。
- ◆ アミノ酸、有機酸、核酸系代謝物、機能性成分等を対象にした143成分の一斉分析が可能です。
- ◆ マルチオミクス解析パッケージを用いることで、初心者の方でも容易に多変量解析まで行うことができます。

■はじめに

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。メタボロミクスとは、細胞の活動によって生じるアミノ酸や有機酸などの低分子代謝物を網羅的に解析し複数の試料群における差異を明らかにする学術分野です。このメタボロミクスの技術を食品に応用したものを「フードメタボロミクス」と言い、食品の品質鑑定や品質予測、製造・保管工程の改善、機能性の評価など様々な目的に利用されています。食品には非常に多くの代謝物が含まれますが、これまでの研究から、風味や品質、機能性にかかわる代謝物の多くが明らかになっています。そのため、フードメタボロミクスでは対象成分を決めたターゲット分析が一般的です。重要な成分に絞り網羅的に解析することで、有益な結果を効率的に得ることができます。

本報告では、シングル四重極LC-MSを用いたフードメタボロミクスの事例を紹介いたします。トリプル四重極LC-MSと比べ、シングル四重極LC-MSは安価で、条件設定もシンプルなため、質量分析が初めての方でも簡単にメタボロミクスをはじめることができます。

■サンプル、前処理

表1に示す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、各サンプルを超純水で10倍希釈しました。希釈の際、内部標準物質として、Morpholinoethanesulfonic acid (MES) を1 µmol/Lになるように添加しました。

表1　サンプルの詳細

サンプル	備考
ビール1	ラガービール（下面発酵）
ビール2	エールビール（上面発酵）
発泡酒	プリン体ゼロ
新ジャンル	大豆たんぱくを原材料に使用
ノンアルコールビール1	国内製
ノンアルコールビール2	海外製

■分析条件

超高速液体クロマトグラフ Nexera™ XRとシングル四重極質量分析計 LCMS-2050を用いました（図1）。LCMS-2050は、コンパクトでありながら、使いやすさや性能面にも秀でたシングル四重極質量分析計です。ESI法とAPCI法、両方の特長を有するイオン化である加熱型DUIS™を搭載し、質量範囲は*m/z* 2-2000まで対応しています。幅広い物性の代謝物を分析対象とするメタボロミクスでは特に有用です。

図1　Nexera™ XRおよびLCMS™ -2050

表2にHPLCおよびMSの分析条件を示します。LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 ver.3に含まれるイオン対フリーLC/MS/MS法の分析条件を参考に、シングル四重極LC-MS用の一斉分析系を構築しました。食品分析において重要であるアミノ酸、有機酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド等の親水性代謝物143成分の一斉分析が可能です。

表2　分析条件

[HPLC conditions] (Nexera XR)		
Column	:	Shim-pack™ GIST PFPP*1 (2.1 mmI.D. x 150 mmL., 3.0 µm)
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 (17-19 min, 0.5 mL/min)
Injection volume	:	3 µL
[MS conditions] (LCMS-2050)		
Ionization	:	ESI/APCI (DUIS), Positive and Negative mode
Mode	:	SIM (143 events)
Nebulizing gas flow	:	3.0 L/min
Drying gas flow	:	5.0 L/min
Heating gas flow	:	7.0 L/min
Desolvation temp.	:	500℃
DL temp.	:	250℃

*1 P/N: 227-30858-07

■多変量解析

親水性代謝物を一斉分析した結果、アミノ酸、有機酸、核酸系代謝物を中心に82成分が検出されました。各サンプルから検出された代謝物数を表3に示します。ビール1、ビール2、ノンアルコールビール2からは70成分以上が検出されましたが、発泡酒からは22成分で、傾向が異なることがわかりました。

表 3　検出成分数

ビール1	ビール2	発泡酒	新ジャンル	ノンアルコールビール1	ノンアルコールビール2
76	78	22	57	44	77

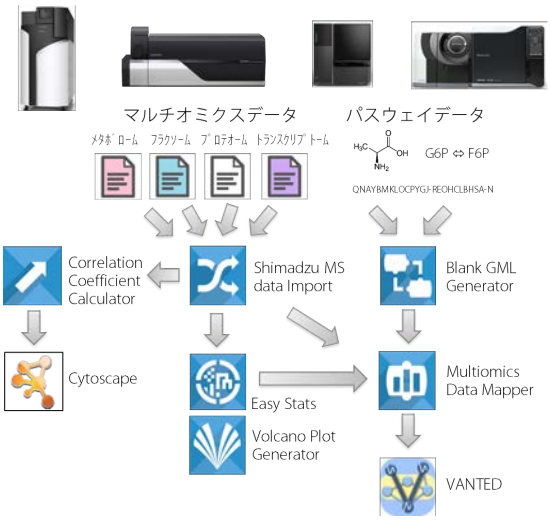

図2　マルチオミクス解析パッケージ

内部標準物質に対する各成分のピーク面積比を用いて、主成分分析と階層クラスタリング解析をマルチオミクス解析パッケージ（図2）で行いました。マルチオミクス解析パッケージは、メタボロミクス、プロテオミクス、フラックス解析などの膨大なデータを自動で代謝マップに表示したり、さまざまな多変量解析を行える代謝工学向けソフトウェアです。作業の効率化と直感的に捉えられる可視化されたデータが、創薬や診断、バイオ工学などライフサイエンス研究を強力にサポートします。解析用の各ガジェットと接続するデータ加工用のガジェットが収載されており、あたかも1つのソフトウェアかのような感覚で簡単にご使用いただけます。

主成分分析の結果を図3に示します。図3上のスコアプロットを見ると、発泡酒とノンアルコールビール1は近い位置にプロットされており、傾向が似ていることがわかりました。その他サンプルは十分に分離しており、それぞれ異なる特長があることがわかります。第1主成分（PC1）軸の観点から、左右に発泡酒、ノンアルコールビール1、新ジャンルのグループAと、ノンアルコールビール2、ビール1、ビール2のグループBに大きく分類できます。グループAは非ビール系の原材料が、グループBはビール系の原材料が使用されていることから、第一主成分軸は主に原材料の違いを表している可能性が示唆されました。

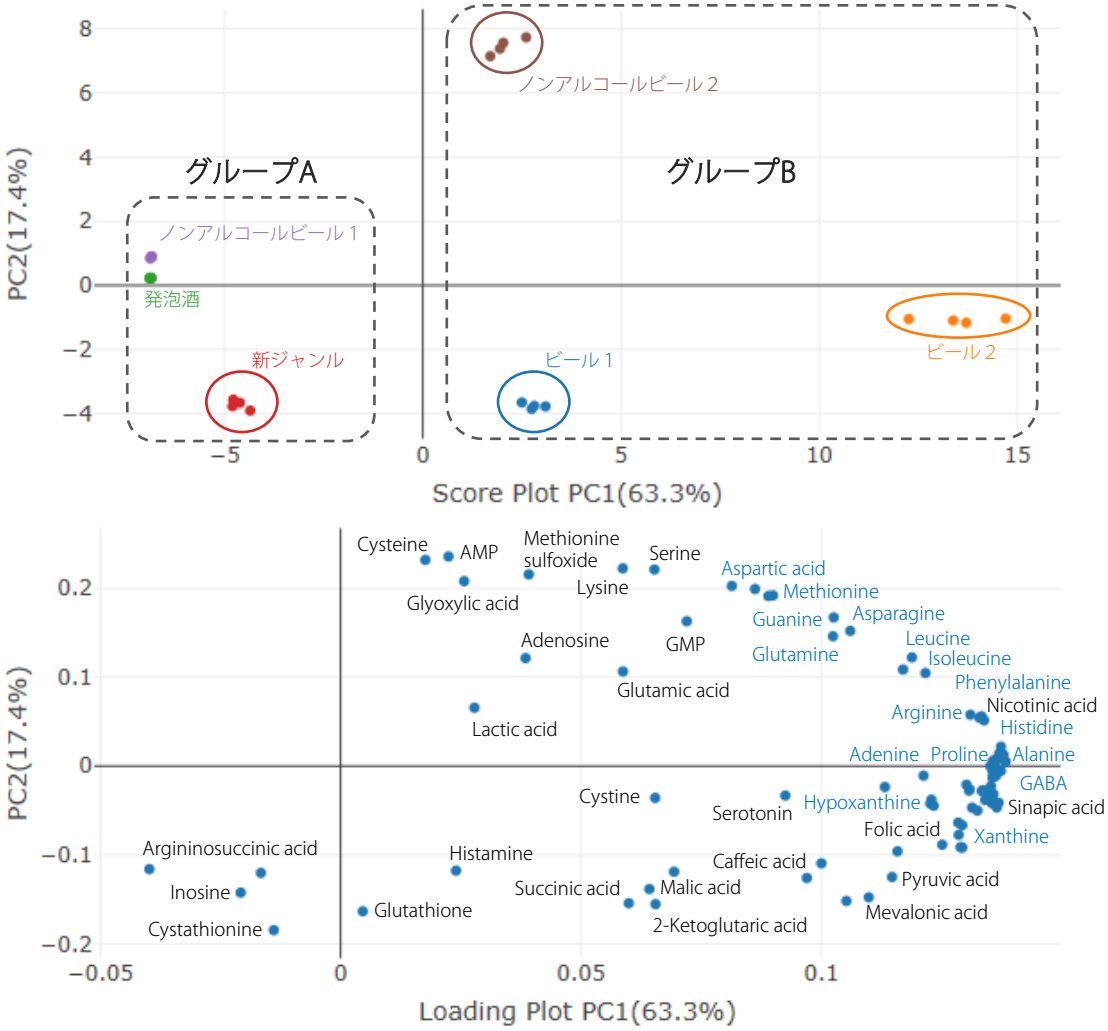

図 3　主成分分析の結果

マルチオミクス解析パッケージのご紹介と操作説明動画はこちら
https://www.shimadzu.co.jp/labcamp/multiomics5.html

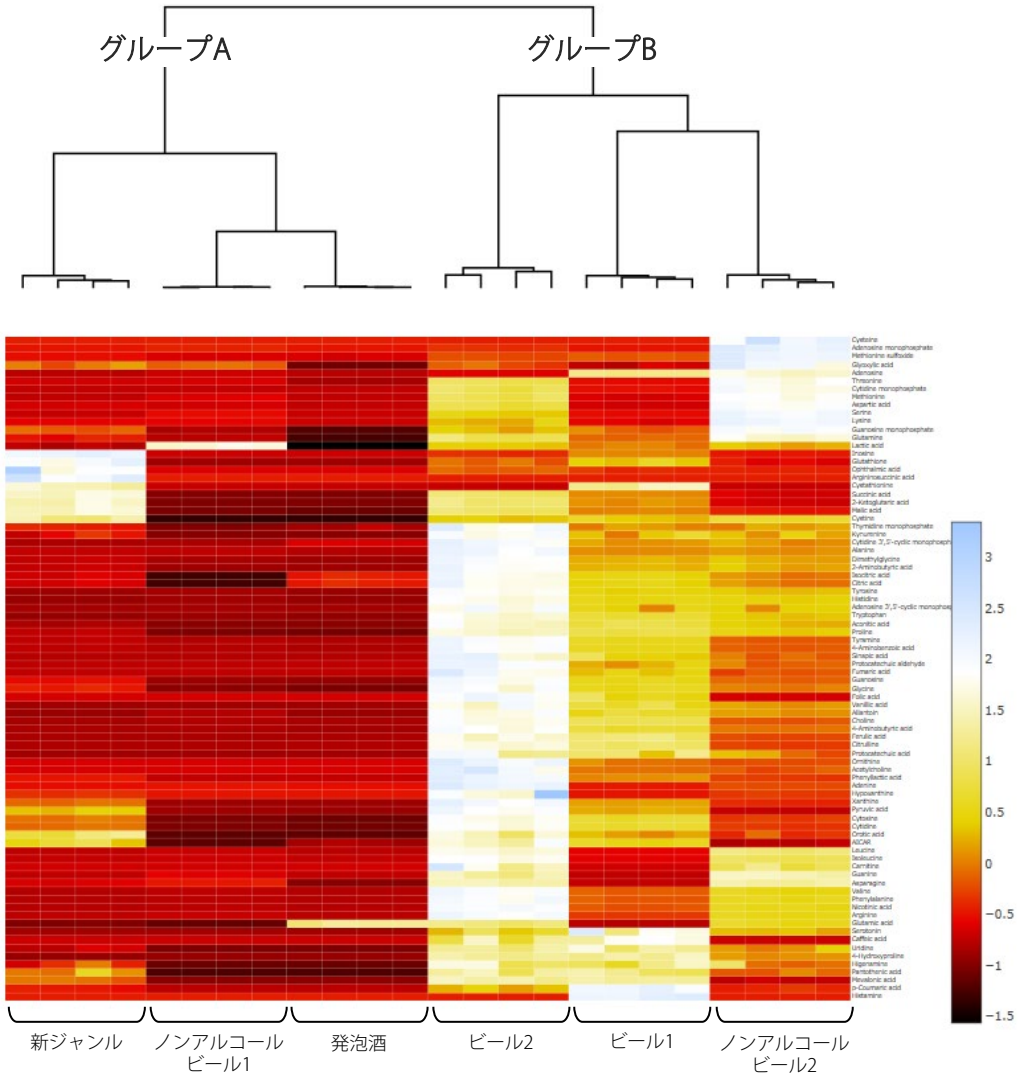

図 4 階層クラスタリング解析の結果

また、図3下のローディングプロットからは、それぞれのサンプルに含まれる特徴的な成分を特定することができました。特に、ビール2には青字で示したようにアミノ酸や核酸系の代謝物が多く含まれることがわかりました。このように、主成分分析をすることで、各サンプルを特徴毎に分類したり、違いの要因となる成分を見つけることが容易にできます。

階層クラスタリング解析の結果を図4に示します。主成分分析の結果と同様に、新ジャンル、ノンアルコールビール1、発泡酒のグループAと、ビール2、ビール1、ノンアルコールビール2のグループBに大きく分類されました。ノンアルコールビール1とノンアルコールビール2は同じノンアルコールビールですが、異なるカテゴリーとして分類されています。ノンアルコールビール1は国内製のノンアルコールビールで、麦汁に味付けをする方法で発酵させずに作られます。一方、ノンアルコールビール2は海外製のノンアルコールビールで、ビールを作る際に用いられる原材料を使い、アルコール生成を抑えた方法で発酵して作られます。この原材料と製法の違いが2つのノンアルコールビールの違いに影響していると考えられます。ビール1とノンアルコールビール2は近いカテゴリーとして分類されていますが、これは原材料がともにビール系であるのと、同じ下面発酵で作られていることが影響しているのかもしれません。このように階層クラスタリング解析を行うことで、各サンプルに含まれる成分による類似の程度を視覚的に理解することができます。

■プリン体関連成分

主成分分析や階層クラスタリング解析の結果、核酸系の代謝物に大きな違いあるとわかったため、各サンプルにおいてプリン体関連成分を比較しました。アデニル酸系のアデニン、アデノシン、環状アデノシン一リン酸、アデノシン一リン酸、イノシン酸系のイノシン、ヒポキサンチン、キサンチル酸系のキサンチン、グアニル酸系のグアニン、グアノシン、グアノシン一リン酸のプリン体関連成分が検出されました。各成分のピーク面積比を合算した結果を図5に示します。プリン体関連成分はビール2に最も多く含まれており、発泡酒、新ジャンル、ノンアルコールビール1には少ないことがわかりました。特に、プリン体ゼロ表記の発泡酒からは、ほとんど検出されませんでした。

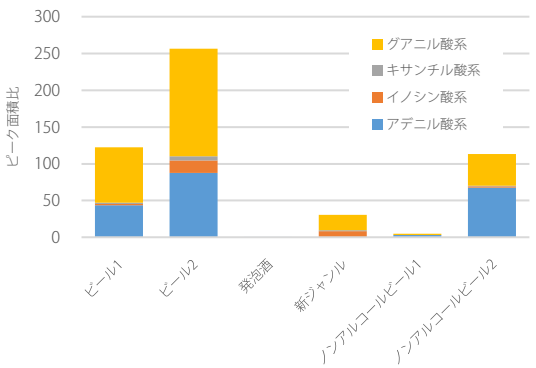

図 5 プリン体関連成分の比較

次に、サンプル間で差が見られたキサンチンを定量しました。キサンチンの標準サンプルを用いて検量線を作成したところ、図6に示すように、検量範囲0.1-50 μmol/Lにおいて、寄与率 0.999と良好な直線性が得られました。この検量線から求めた各サンプル中のキサンチン濃度を表4に示します。ビール2には、102 μmol/Lと最も多くキサンチンが含まれていました。

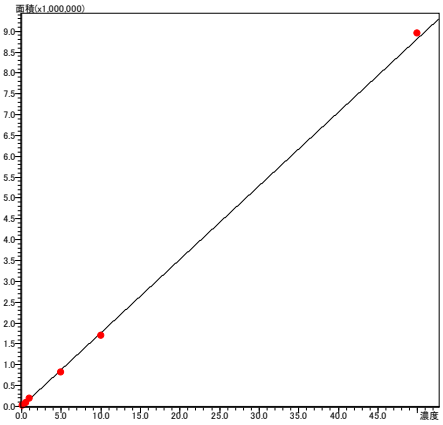

図 6　キサンチンの検量線

表 4　各サンプル中のキサンチン濃度（μmol/L）

ビール1	ビール2	発泡酒	新ジャンル	ノンアルコールビール1	ノンアルコールビール2
47	102	N.D.	33	N.D.	27

■機能性成分

各サンプルからは、主要なアミノ酸や有機酸、核酸系代謝物以外にも機能性成分も検出されました。例えば、血圧改善、ストレス緩和、疲労感の軽減などの効果があると知られているGABA（γ-アミノ酪酸）や、抗酸化作用を持つフェルラ酸、バニリン酸、シナピン酸、カフェイン酸が検出されました。各サンプルに含まれるこれら機能性成分について、ピーク面積比を比較しました。図7に示すように、ビール1、ビール2、ノンアルコールビール2には、これら機能性成分が多く含まれることがわかりました。フェルラ酸、バニリン酸はビール中の主要な抗酸化物質であり、麦芽に含有していることが知られています。ビール1、ビール2、ノンアルコールビール2は原材料中の麦芽比率が高いことから、これら機能性成分が多く検出されたと考えられます。

■まとめ

シングル四重極LC-MSを用いたフードメタボロミクスの事例をご紹介しました。ターゲットメタボロミクスでは、トリプル四重極LC-MSが使われることが多いですが、本報告で示した通り、シングル四重極LC-MSでも十分にターゲットメタボロミクスができることがわかりました。トリプル四重極LC-MSと比べ、シングル四重極LC-MSは安価で扱いやすいため、質量分析の経験がない方をはじめ、より多くの方に使っていただきやすい装置です。シングル四重極LC-MSによるフードメタボロミクスが広まることで、食品分野における技術・製品開発のますますの発展が期待されます。

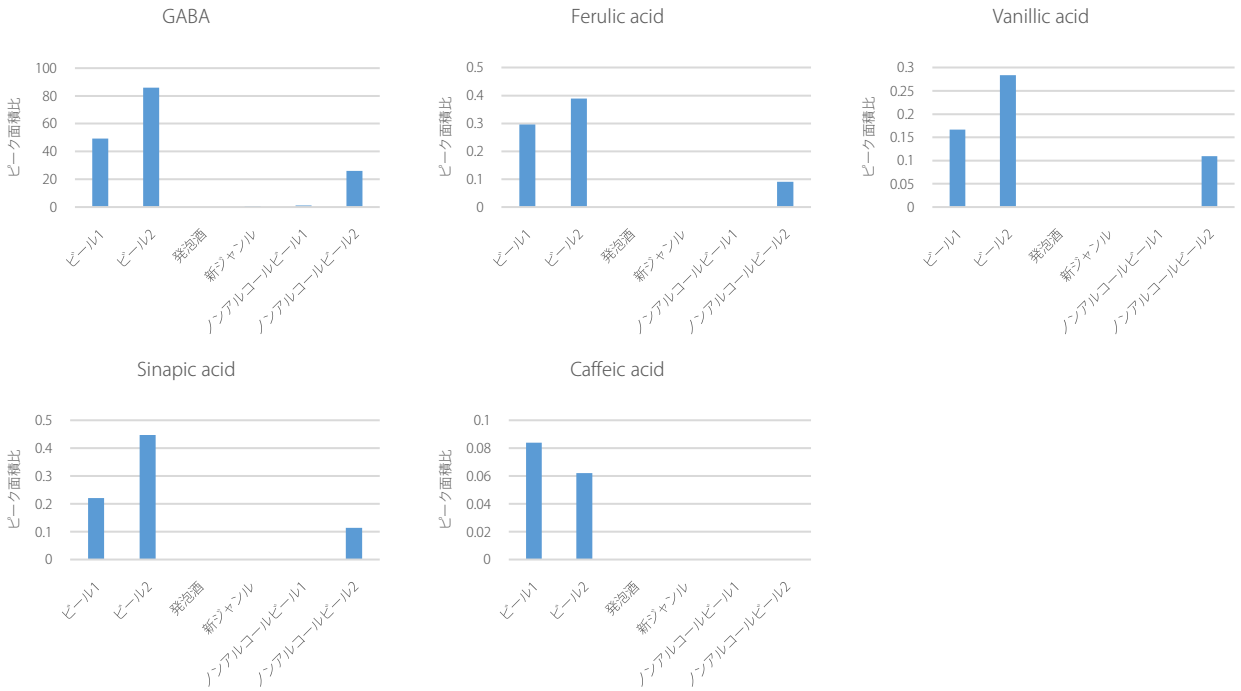

図 7　機能性成分の比較

LCMS、Nexera、DUISおよびShim-pack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
01-00334-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