

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 ーオリゴ糖・多糖類プロファイリングー

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を用いることで、オリゴ糖をサブngで高感度分析できます。
- ◆ LCMS-2050の広い質量範囲により、アルコール飲料中のオリゴ糖・多糖類の網羅的プロファイリングが可能です。
- ◆ 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

メタボロミクスの技術を食品に応用した「フードメタボロミクス」は、近年、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始めています。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。アプリケーションニュース01-00334-JPでは、アミノ酸・有機酸・核酸系代謝物を主な対象成分とし、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す。

本報告では、シングル四重極LC-MSでオリゴ糖・多糖類を網羅的に分析・プロファイリングしたフードメタボロミクスの応用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。



図1 Nexera™ XRおよびLCMS™-2050

■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（第3のビール）、ノンアルコールビールを分析しました。各サンプルを超純水で10倍希釈したものを試料としました。

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	糖質・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	糖質・プリン体ゼロ（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。

表2にHPLCおよびMSの分析条件を示します。対象成分は、ビールに含まれると考えられるマルトオリゴ糖および多糖類とし、40量体までのSIMの一斉分析系を構築しました。分子量1500以上の成分は、測定可能な質量範囲と感度の観点から、多価イオンで分析しました。

表2 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera XR)	
Column	: Shodex Asahipak NH2P-40 3E (250 mm × 3.0 mm I.D., 4.0 μm)
Flow rate	: 0.3 mL/min
Mobile phases	: A) 2.5 mmol/L Ammonium bicarbonate aq. B) 25 mmol/L Ammonium bicarbonate aq. / Acetonitrile=10:90
Time program	: 70%B (0 min)→40%B (25 min) →70%B (25.01-30 min)
Mixer	: 20 μL
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 5 μL
[MS conditions] (LCMS-2050)	
Ionization	: ESI/APCI (DUIS), Negative mode
Mode	: SIM (40 events)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 7.0 L/min
Desolvation temp.	: 400 °C
DL temp.	: 150 °C

■ 混合標準溶液の分析

図2に10 mg/Lのマルトオリゴ糖混合試料（株式会社センシュー科学製 G1~G10のmix、オリゴ糖分析標準試料、型番 BC-GM）のマスクロマトグラムを示します。DP1~DP10のオリゴ糖以外にも、最大で24量体の多糖類が検出されました。高感度であるLCMS-2050を検出器として用いることで、LCでは検出できない微量のオリゴ糖・多糖類が検出できました。

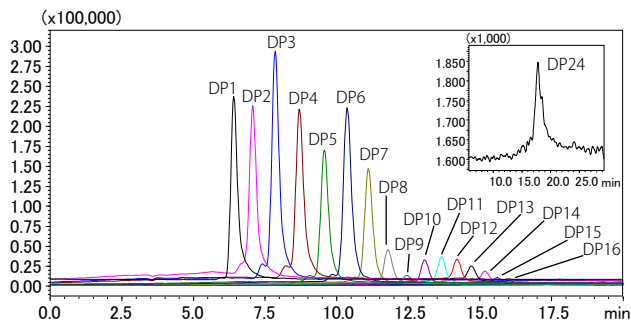


図2 マルトオリゴ糖混合試料のマスクロマトグラム

グルコースおよびマルトオリゴ糖DP2~DP7の混合標準品を一斉分析し検量線を作成したところ、いずれも寄与率 $r^2=0.995$ 以上と良好な直線性が得られました。代表してマルトトリオースとマルトペンタオースの検量線と最下点でのマスクロマトグラムを図3, 4にそれぞれ示します。表3に、全成分の検量線濃度範囲と寄与率、最下点での再現性（% RSD, $n=6$ ）を示します。シングル四重極LC-MSを検出器として用いることで、示差屈折率検出器（RID）や蒸発光散乱検出器（ELSD）、荷電化粒子検出器（CAD）では難しいサブngの高感度分析が可能です。

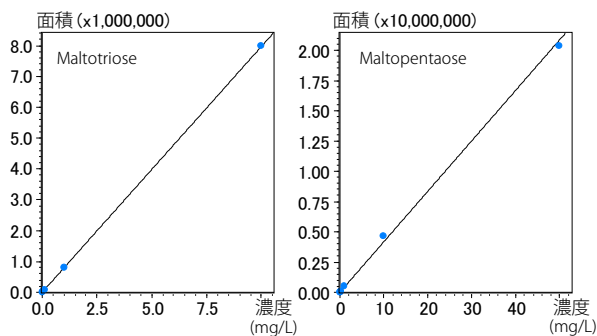


図3 検量線

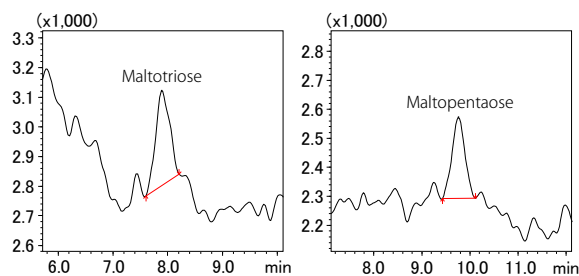


図4 検量線最下点でのマスクロマトグラム

表3 検量線濃度範囲、寄与率 (r^2)、再現性

Compound	Conc. Range (mg/L)	r^2	%RSD (R.T.)	%RSD (Peak area)
Glucose	0.05-100	0.998	0.25	4.49
Maltose	0.05-10	0.999	0.20	5.09
Maltotriose	0.01-10	0.999	0.40	8.33
Maltotetraose	0.01-50	0.995	0.36	6.46
Maltopentaose	0.01-50	0.997	0.52	5.66
Maltohexaose	0.05-50	0.997	0.23	4.35
Maltoheptaose	0.05-100	0.997	0.37	6.65

■ ビールの分析

各試料から検出されたオリゴ糖・多糖類の成分数を表4に示します。糖質ゼロと表記されている発泡酒、ノンアルコールビール1からは、オリゴ糖・多糖類はほとんど検出されませんでした。一方、ビール1、ビール2、ノンアルコールビール2からは、マルトース等の各種マルトオリゴ糖とともに、グルコースの重合体と思われる多糖類が多数検出されました。図5にビール2のマスクロマトグラムを示します。最大で36量体の多糖類（平均分子量 5855.09）が3価のイオン (m/z 1949.63) で検出されました。小型のシングル四重極LC-MSでも質量範囲が広いLCMS-2050を用いることで、このような分子量が大きい多糖類も分析できます。

表4 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
36	36	4	36	15	36

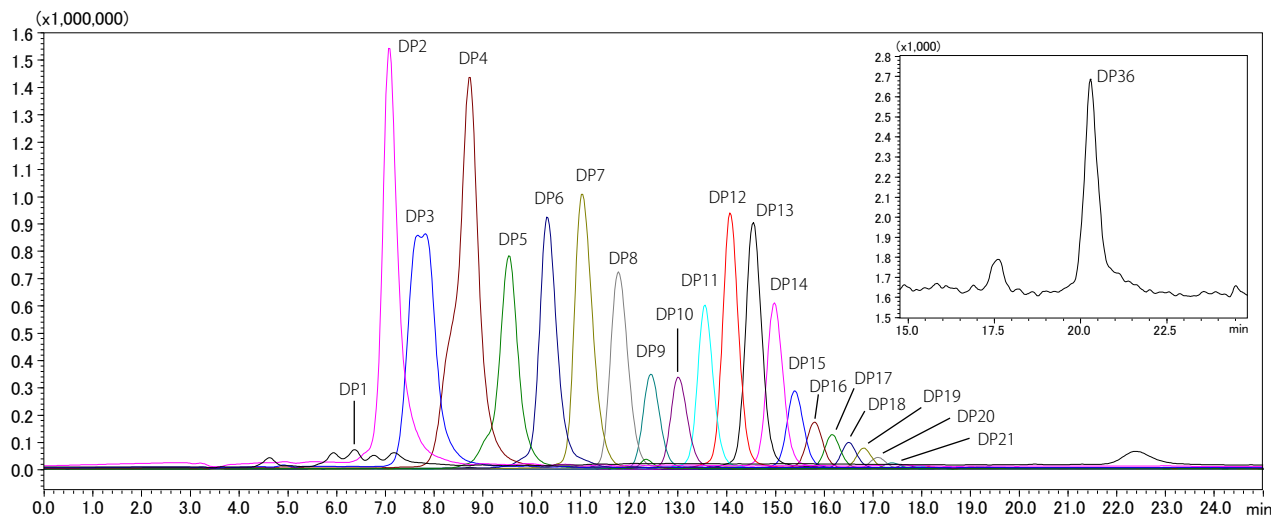


図5 ビール2のマスクロマトグラム

各成分のピーク面積を用いて、主成分分析をマルチオミクス解析パッケージ（図6）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搭載されており、あたかも1つのソフトウェアである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7に示します。図7 (a) のスコアプロットを見ると、「ビール1とビール2」、「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す。ノンアルコールビール2のプロットは、その他の試料のプロットから離れており、特徴が異なることがわかります。また、図7 (b) のローディングプロットを見ると、第1主成分（PC 1）の左側にオリゴ糖・多糖類が多数プロットされていることがわかります。このことから、第1主成分軸は原材料中の麦芽比率を表していると示唆されました。このように主成分分析をすることで、試料の分類分けが簡単にでき、試料の特徴を理解するのに役立ちます。



図6 マルチオミクス解析パッケージ

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>

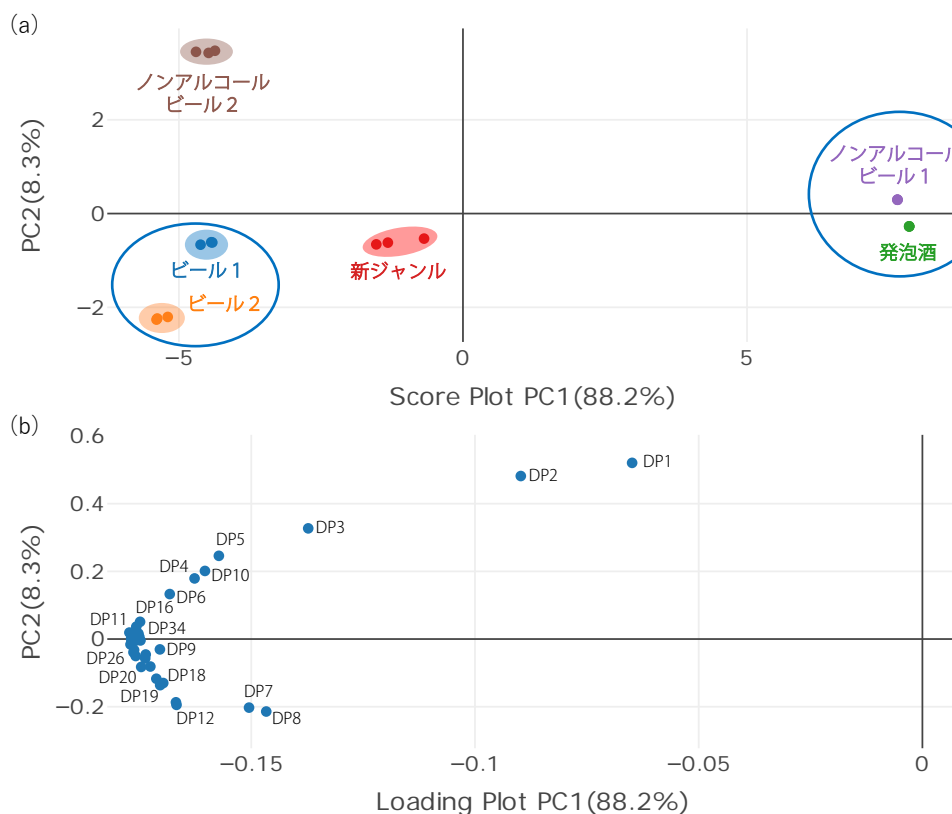


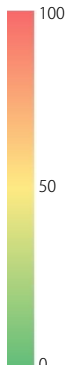
図7 主成分分析の結果
 (a) スコアプロット (b) ローディングプロット

各オリゴ糖・多糖類ごとに、最大のピーク面積を100とした相対ピーク面積をヒートマップにしました（表5）。ビール1、ビール2には、麦芽由来と思われるオリゴ糖・多糖類が多く含まれることがわかります。ノンアルコールビール1、2は同じジャンルですが、傾向が大きく異なります。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させて作られます。そのため、ノンアルコールビール2には、麦芽由来と思われるオリゴ糖・多糖類が多く含まれていたと考えられます。DP1（グルコース）やDP2（マルトース）はノンアルコールビール2に多く含まれますが、これもアルコール発酵を抑えた製法により、グルコースやマルトースが分解されずに残っているためと考えられます。

表5 ビールに含まれるオリゴ糖・多糖類の相対比較（相対ピーク面積）

	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
DP1	4.0	2.6	1.5	3.9	3.9	100
DP2	25.2	22.2	0.2	31.9	24.3	100
DP3	75.8	31.1	0.3	51.8	15.1	100
DP4	95.2	56.4	0.2	57.3	3.8	100
DP5	79.5	47.5	N.D.	47.1	2.2	100
DP6	82.0	69.0	N.D.	77.6	2.5	100
DP7	73.0	94.3	N.D.	100	1.9	49.6
DP8	70.8	90.6	N.D.	100	1.6	45.1
DP9	72.7	100	N.D.	87.2	1.8	86.7
DP10	53.2	64.3	N.D.	64.6	1.3	100
DP11	94.6	100	N.D.	68.1	1.0	98.2
DP12	80.3	100	N.D.	55.3	0.6	51.6
DP13	71.8	100	N.D.	55.9	0.5	52.6
DP14	68.0	100	N.D.	61.3	0.4	65.6
DP15	73.1	100	N.D.	60.2	0.3	90.1
DP16	83.9	99.1	N.D.	52.5	N.D.	100
DP17	95.0	100	N.D.	46.2	N.D.	80.5
DP18	88.0	100	N.D.	44.1	N.D.	62.4
DP19	80.4	100	N.D.	46.8	N.D.	61.2
DP20	80.3	100	N.D.	54.2	N.D.	72.6
DP21	83.8	100	N.D.	57.9	N.D.	91.4
DP22	91.4	100	N.D.	54.3	N.D.	99.3
DP23	95.0	100	N.D.	48.5	N.D.	89.8
DP24	95.8	100	N.D.	48.7	N.D.	78.6
DP25	95.2	100	N.D.	47.9	N.D.	73.5
DP26	98.5	100	N.D.	72.8	N.D.	92.1
DP27	88.1	100	N.D.	68.5	N.D.	95.5
DP28	93.0	100	N.D.	61.6	N.D.	92.8
DP29	95.8	100	N.D.	57.9	N.D.	81.7
DP30	92.6	100	N.D.	58.0	N.D.	83.5
DP31	95.7	100	N.D.	60.1	N.D.	85.8
DP32	100	98.7	N.D.	70.5	N.D.	92.2
DP33	100	94.9	N.D.	77.8	N.D.	92.5
DP34	100	90.4	N.D.	78.9	N.D.	94.5
DP35	100	98.0	N.D.	80.1	N.D.	95.7
DP36	98.7	100	N.D.	79.1	N.D.	97.3



■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応用例として、アルコール飲料中のオリゴ糖・多糖類プロファイリングをご紹介しました。シングル四重極LC-MSを用いることで、高感度にオリゴ糖・多糖類を分析できます。アミノ酸・有機酸・核酸系代謝物を主な対象成分としたメタボロミクス（アプリケーションニュース 01-00334-JP）と本報告のオリゴ糖・多糖類プロファイリングを組み合わせることで、網羅的なフードメタボロミクスが可能となります。

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、シングル四重極LC-MSでもターゲットメタボロミクスができます。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・製品開発のさらなる発展が期待されます。

LCMS、NexeraおよびDUIS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

01-00420-JP 初版発行：2022年 7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 にご登録いただけますと、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