SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No.C132

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

UHPLC メソッド自動切換システムとトリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた柑橘類の一次・二次代謝物の網羅的分析

Comprehensive Analysis of Primary & Secondary Metabolites in Citrus Using an Automated Method Changeover UHPLC System and LC/MS/MS【LCMS-8050】

健康志向が高まる中，農産物や食品はおいしさとともに機能性も重要視されるようになっており，より付加価値の高い食品の生産・開発が重要となっています。生体内に存在する全代謝産物を網羅的に解析する「メタボローム解析」は，生物の代謝産物を解析する以外にも様々な分野で応用されており，近年食品分野でも食品加工・植物育種などにおける重要なツールとなりつつあります。

食品分析では，食品の色や香り・味・機能性に関わる一次代謝物や二次代謝物を網羅的に分析することが非常に重要ですが，これまでにこれらを同時に測定した例はあまりありません。

本アプリケーションニュースでは，LC/MS/MS を用いた食品中の一次代謝物と二次代謝物（有機酸，アミノ酸，糖，カロテノイド，フラボノイドの主要化合物）を網羅的に測定する分析手法と，柑橘類を実試料として用いた解析の応用例をご紹介します。

Y. Fujito

■サンプルの前処理

Sample Preparation

7 種の柑橘類（ミカン，ポンカン，シラヌイ，アマクサ，ハッサク，ブンタン，ヒュウガナツ）を使用しました（Fig. 1）。各代謝物は，Fig. 2 に示した通り，2 種の溶媒によって分画・抽出しました。

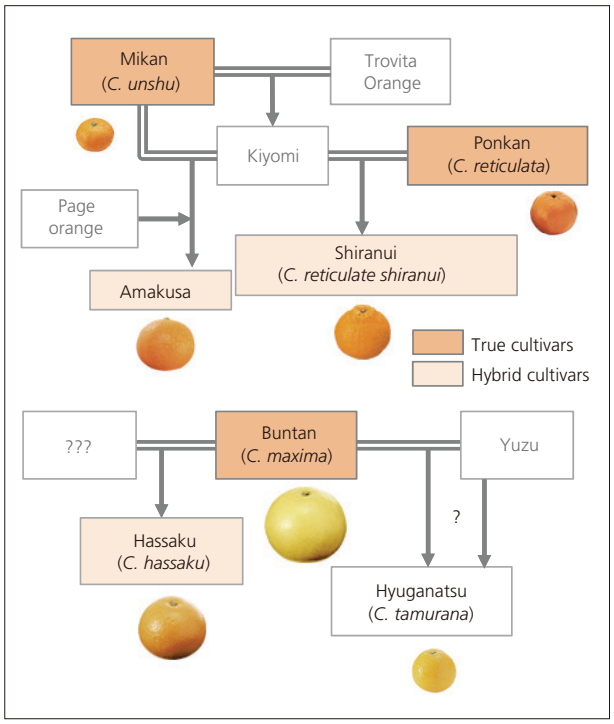

Fig. 1　7 種の柑橘類の系統図
The Breed Trees of Tested Citrus Fruits

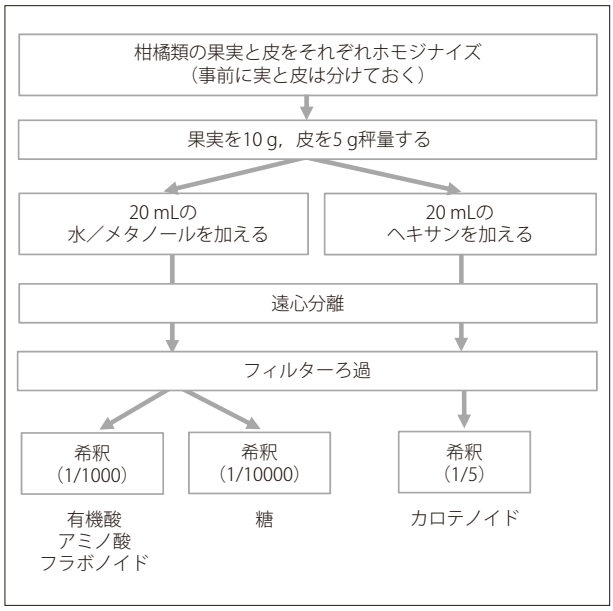

Fig. 2　前処理プロトコル
Procedure of Sample Preparation

■ LC/MS/MS 分析

LC/MS/MS Analysis

一次代謝物と二次代謝物は，化合物の化学的性質上，同じクロマトグラフィー条件で測定するのは困難なため，移動相およびカラムが異なる 3 通りの分析条件を設定しました。本アプリケーションでは，Nexera メソッドスカウティングシステム（網羅的メソッド探索システム）を応用し，これら 3 通りの分析条件を自動で切り替えて測定できるようにしました（Fig. 3）。今回は，4 種類の移動相と 3 本のカラムを使用しましたが，本システムでは，最大 8 種類の移動相と 6 本のカラムを使用することが可能です。各々の分析条件を Table 1 に示しました。

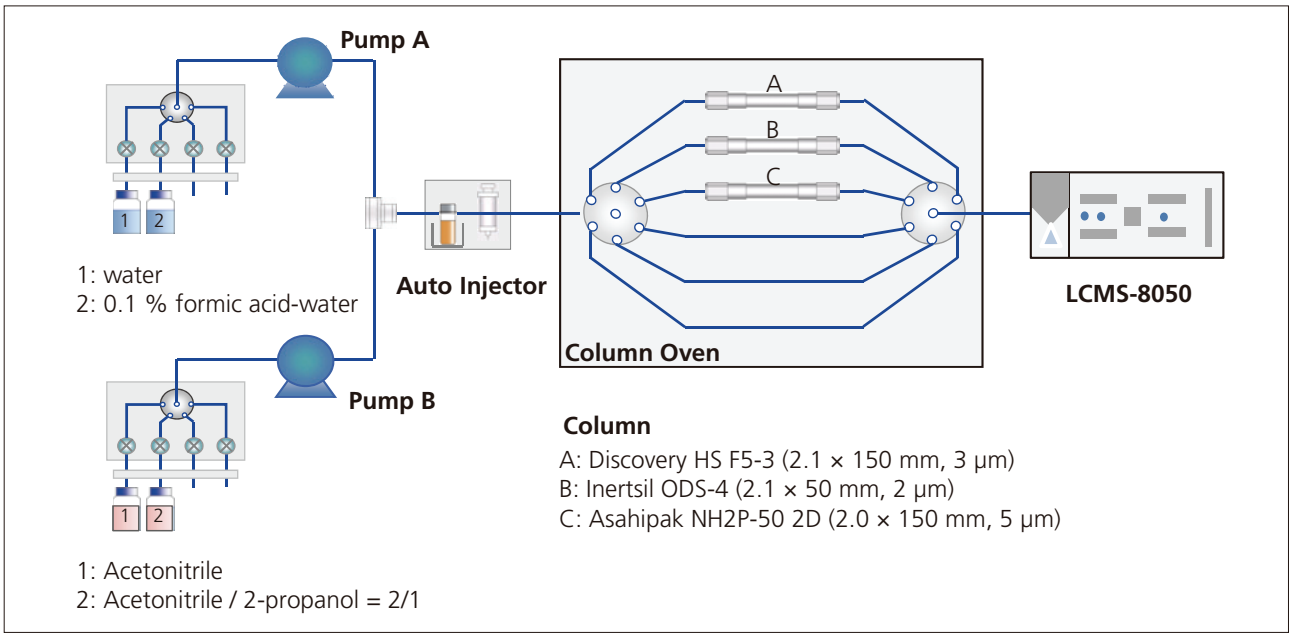

Fig. 3　システム構成
System Configuration

Table 1　分析条件
Analytical Conditions

Conditions		Condition 1	Condition 2	Condition 3
HPLC	Instrument	UHPLC Nexera system (Shimadzu)		
	Target Compounds	Organic acids Amino acids Flavonoids	Carotenoids	Sugars
	Column	A: Discovery HS F5-3 (150 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 μm) Sigma-aldrich	B: Inertsil ODS-4 (50 mm L. × 2.1 mm I.D., 2 μm) GL-science	C: Asahipak NH2P-50 2D (150 mm L. × 2.0 mm I.D., 5 μm) Shodex
	Column Oven Temp.	40 °C		
	Mobile Phase A	2: 0.1 % Formic acid-Water	1: Water	1: Water
	Mobile Phase B	1: Acetonitrile	2: Acetonitrile / 2-Propanol = 2/1	1: Acetonitrile
	Flow Rate	0.25 mL/min	0.4 mL/min	0.4 mL/min
	Time Program	0 %B (0-2 min.) → 95 % (10-13 min.) → 0 % (13.01-16 min.)	60 %B (0 min.) → 100 % (5-8 min.) → 60 % (8.01-10 min.)	65 %B (0-8 min.) → 30 % (8-11 min.) → 65 % (11.01-15 min.)
	Measurement Time	16 min	10 min	15 min
	Total Run Time	41 min		
	Injection Volume	2 μL		
MS	Instrument	LCMS-8050		
	Ionization	ESI (+ / –)		
	Mode	MRM		

■一次代謝物，二次代謝物の MRM 測定

Standards of Primary & Secondary Metabolites

各分析条件における測定化合物の MRM クロマトグラムを Fig. 4 に示します。また，Table 2 に，全成分の検量線範囲を示しました。

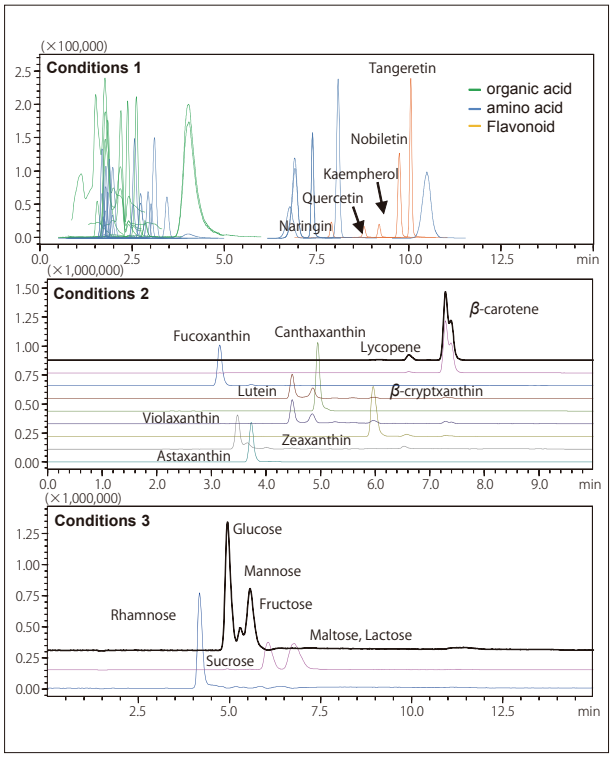

Fig. 4　各分析条件におけるクロマトグラム例
MRM Chromatograms in Each Analytical Conditions

Table 2　目的成分の検量線範囲
Calibration Range of Tested Compounds

Amino acids	Range	Organic acids	Range
Cystine	1-100	Tartaric acid	50-10000
Aspartic acid	5-100	2-Ketoglutaric acid	10-1000
Asparagine	5-100	Isocitric acid	50-10000
Serine	5-100	Malic acid	10-5000
4-Hydroxyproline	1-100	Lactic acid	50-10000
Glycine	5-100	Citric acid	50-10000
Lysine	1-100	Pyroglutamic acid	10-10000
Cysteine	50-100	Succinic acid	10-1000
Threonine	5-100	Fumaric acid	500-1000
Glutamic acid	1-100	Maleic acid	50-10000
Alanine	5-100		
Proline	1-100		
Ornitine	5-1000		
Glutamine	5-100		
Histidine	5-100		
Arginine	5-100		
GABA	5-100		
Valine	1-100		
Methionine	5-100		
Tyrosine	5-100		
Isoleucine	5-100		
Leucine	10-100		
Phenylalanine	1-100		
Tryptophan	5-500		
Sugars	**Range**		
Rhamnose	50-1000		
Fluctose	50-5000		
Glucose	50-5000		
Sucrose	100-5000		
Maltose, Lactose	200-2000		
Carotenoids	**Range**	**Flavonoids**	**Range**
Fucoxanthin	0.1-100	Naringin	10-1000
Violaxanthin	1-100	Quercetin	5-1000
Astaxanthin	0.5-100	Kaempferol	5-1000
Lutein	0.1-100	Nobiletin	0.1-1000
Zeaxanthin	0.5-100	Tangeretin	0.1-1000
Canthaxanthin	0.05-100		
β-Cryptxanthin	0.05-100		
Lycopene	50-100		
β-carotene	0.1-100		(μg/L)

■実と皮の成分比較

Comparison between Fruit and Peel

柑橘 7 種類について実と皮の成分比較を行うため，主成分分析を行いました。実と皮では，スコアプロットで 2 グループに分かれる傾向が見られました。ローディングプロットの結果から，カロテノイド・フラボノイド・糖が 2 者間の違いに寄与していることが示唆されました。

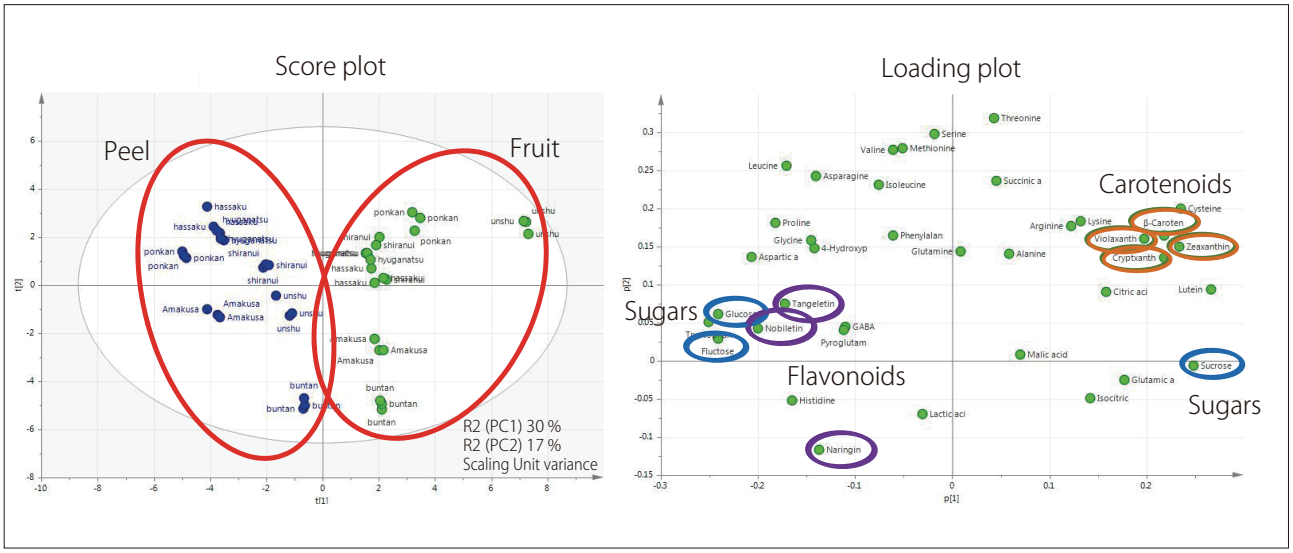

Fig. 5　実と皮の主成分分析（PCA）
Result of PCA in Both Fruit and Peel Samples (SIMCA-P)

■糖の比較（実と皮）

Comparison of Sugars (Fruit and Peel)

糖について，果実と皮で定量値を比較した結果を Fig. 6 に示しました。果実と皮で糖の総量では違いがないものの，糖組成では大きく異なることが解りました。

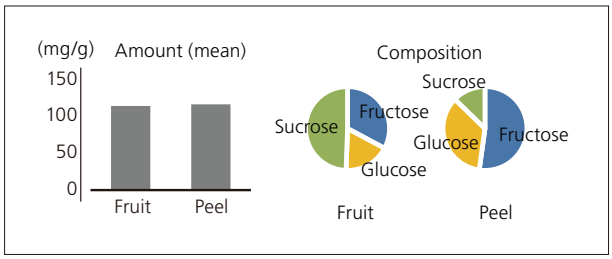

Fig. 6　果実と皮に含まれる糖の量と組成の比較
Comparison of Amount (mean) and Composition between Fruit and Peel

■二次代謝物の比較（実と皮）

Comparison of Secondary Metabolites (Fruit and Peel)

二次代謝物について，実と皮で定量値を比較した結果を Fig. 7 に示しました。カロテノイドは実に多く，皮と比較して 30 倍以上含まれていることが分かりました。一方で，フラボノイドは，皮に多く実に含まれる量は皮の 5 分の 1 程度でした。このように，二次代謝物は実と皮で含有量が大きく異なることが分かりました。

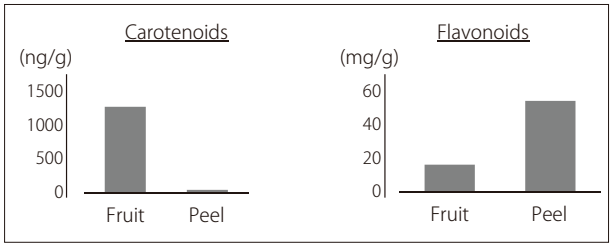

Fig. 7　二次代謝物の平均量比較
Comparison of Amount (mean) in Secondary Metabolites

■品種間比較（果実）

Comparison between Cultivars (Fruit)

スコアプロットで，みかんとその交雑品種が右上にプロットされる傾向がみられました。また，ローディングプロットでは，カロテノイド類が右上にプロットされていることが確認された（Fig. 8）ことから，カロテノイド類について定量を行いました。その結果，みかんとその交雑品種は，カロテノイドの含有量が高く，特にβ - クリプトキサンチン，β - カロテンを多く含むことが確認されました（Fig. 9）。

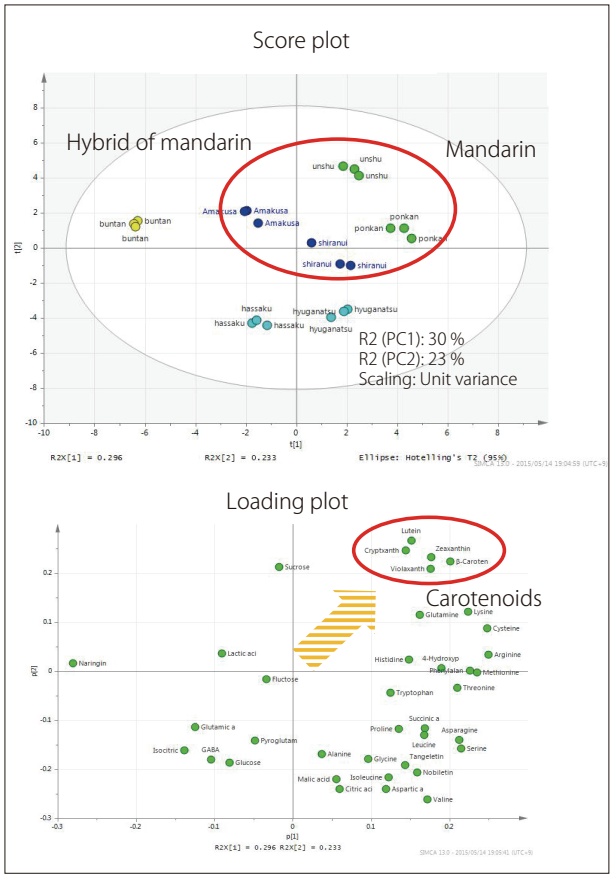

Fig. 8　実の主成分分析（PCA）
Result of PCA in Fruit Peel Samples (SIMCA-P)

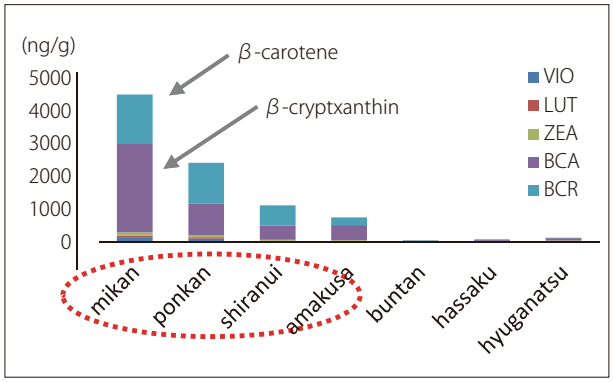

Fig. 9　柑橘類 7 品種のカロテノイド量比較
Comparison of Amount of Carotenoids between 7 Citrus

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
初版発行：2016年4月
島津コールセンター 0120-131691
(075) 813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm
会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。