

Application News

No. C194

LC-MS

フードメタボロミクス LC/MS/MS を用いたカレーの分析

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の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あり、他のオミクスと比較して対象成分が少ないことから網羅的分析を行いやすいとされています。元々は臨床試料を用いた診断マーカー探索やモデル動物を用いた病因解析など、医療分野における成果を期待されて発展してきた技術ですが、同様の解析手法が工業分野や食品分野などでのメーカー間の製品比較や原材料の産地比較などにも応用されるようになり、ますます利用される機会が増えています。このようにメタボロミクスを生体以外に応用した中でも食品に応用したものについては「フードメタボロミクス」と言われています。

本稿ではフードメタボロミクスの一例として複数の家庭で作られたカレーの成分の違いや、カレーを一晩置いた場合にどのような変化がみられるのかについて、ソースに含まれる親水性成分を対象に、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) を用いてそれらを網羅的に解析し多変量解析により検証した事例を紹介いたします。

T. Hattori, Y. Inohana

■ サンプルおよび前処理

サンプルとして 2 つの家庭で作られたカレーを準備しました。家庭 A で作られたものをカレー A、家庭 B で作られたものをカレー B としました。また、カレー A を一晩寝かせたものをカレー A-2 としました。加えて食堂のカレーもサンプリングし、カレー C としました。表 1 にサンプルの詳細を示しました。

サンプルの前処理はメタボロミクス前処理ハンドブック (当社カタログ No. C146-2181) の手法に従い、カレーのソース部分 50 μ L に対し、水：メタノール：クロロホルム=1：2.5：1 の混合溶媒 900 μ L を加えよく混和させた後、遠心分離した上清 630 μ L を回収しました。そこに超純水 280 μ L を添加し、さらに混和、遠心分離して得られた水／メタノール層 300 μ L を限外ろ過したものを 150 μ L 採取し乾固しました。その後内部標準水溶液 150 μ L で溶解し、さらに内部標準水溶液で 10 倍希釈したものを LC/MS/MS 分析用サンプルとしました。

表 1 サンプルの詳細

サンプル	
カレー A	家庭 A の手作りカレー
カレー A-2	カレー A を一晩冷蔵庫で寝かせた後再加熱したもの
カレー B	家庭 B の手作りカレー
カレー C	食堂のカレー

■ 分析条件

一次代謝物 LC/MS/MS メソッドパッケージ Ver. 2 に含まれるイオンペアフリー LC/MS/MS 法を用い、LCMS™ -8060 (図 1) を使用して行いました。本分析法では、ライフサイエンス分野のメタボローム解析において重要となるアミノ酸、有機酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド等の親水性代謝物 97 成分の一斉分析が可能です。表 2 に HPLC および MS の分析条件を示しました。

表 2 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
Column	: Reversed-phase column
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
Injection volume	: 3 μ L
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Positive and negative mode)
Mode	: MRM
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



図 1 Nexera™ X2 および LCMS™-8060

■ メタボローム解析

各カレーサンプルを LC/MS/MS で測定し、内部標準物質に対する各成分の面積比を用いて、主成分分析 (Principal Component Analysis) および t 検定を Traverse MS™ソフトウェアによって行いました。図 2 にカレー A と A-2 を比較した場合のスコアプロットおよびローディングプロットを示しました。スコアプロットでは群間に若干の違いはありますが、明確な差異はないことが伺えます。また同じくカレー A と A-2 を比較した場合の t 検定結果を図 3 に示しました。有意差ありと判定される成分 (p 値 < 5 %) も限定的ですが、それらの成分においても両サンプル間において格段の量差は確認できませんでした。この結果から、一晩置くことによるソースへの具材中成分の溶け出しや変化はあまり生じていないものと考えられます。

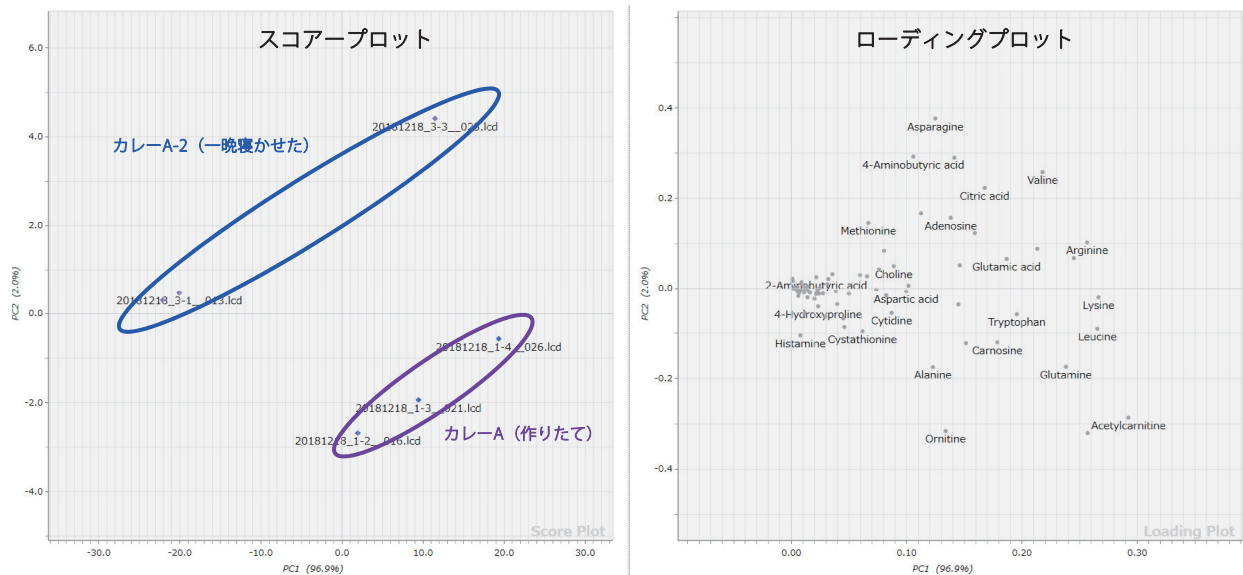


図2 カレーAおよびA-2の主成分分析結果



図3 カレーAおよびA-2のt検定結果

以上のようにカレーを一晩寝かせても、成分の量的変化はあまり確認できませんでした。インターネット上で検索される情報では、一晩寝かせたカレーがおいしくなる原因として、具材の持つうま味成分や甘み成分のソースへの溶け出し、具材へのソースのしみ込み、具材とスパイス、調味料の味や香りが混じりあいなじむことなどが挙げられています。一般に煮込み料理においては加熱時に具材の味・風味がスープに移り、冷却時にスープから具材に味・風味がしみ込むと言われています。これらの情報と今回の解析結果から考察すると、

カレーを一晩寝かせても、具材からソースへのうま味成分の溶け出しはあまり生じておらず、おいしく感じられる主な要因となっているのは、加熱と冷却が繰り返されることで具材に様々な味や風味が取り込まれ、「具材とルーがなじむ」とことではないか推測することができます。

次に出所の異なるカレーA、B、およびCについてどのような差異がみられるのか検討してみました。t検定の結果および主成分分析結果を図4および図5に示しました。



図4 カレーA、B、およびCのt検定結果

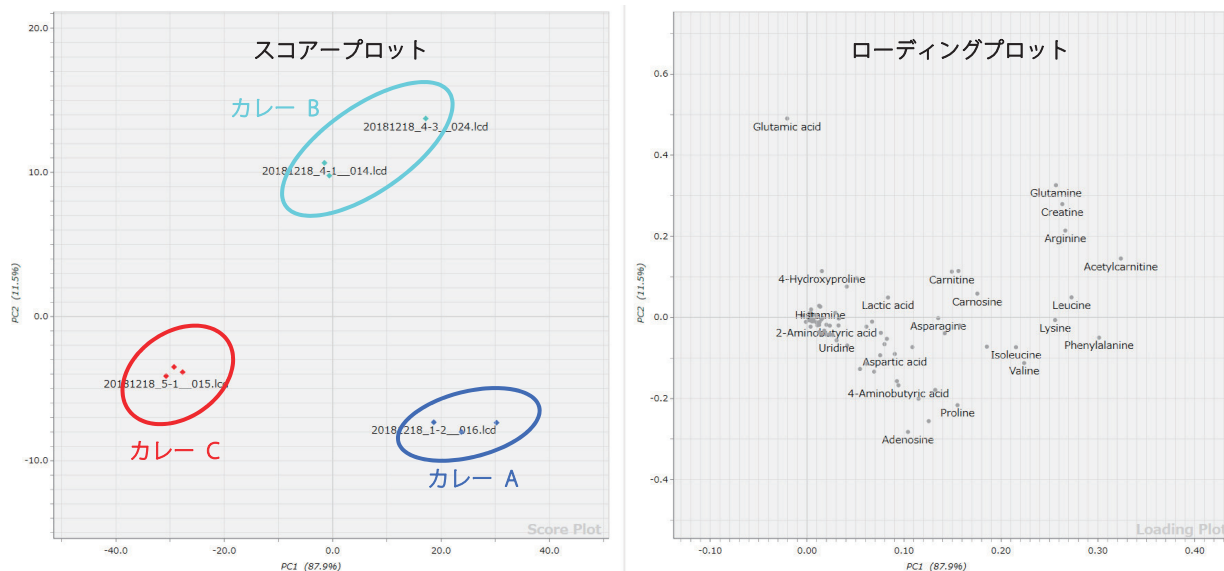


図5 カレーA、B、およびCの主成分分析結果

得られた結果を考察すると、カレーA>B>Cの順で含まれている成分が多い傾向がみられました。使用したカレーの違いもあると思われますが、その他の要因としてカレーAは具材にマッシュルームや他の野菜類などがたっぷりと使われていることから、具材からソースに溶け出した成分も多かったものと推測されます。また、カレーCについては一般家庭で作られた他の2種のカレーと比較して、多くの成分で格段に含有量が少ない傾向が確認されました。一方でグルタミン酸の量にあまり大きな違いは見られず（図6）、薄く調製したカレーにうま味調味料等を加えることで味を調えている可能性が示唆されました。

このようにメタボロミックスの食品分野への応用により、サンプル間の差異に対して科学的にアプローチすることが可能となり、官能試験と組み合わせることでより客観的な評価として認知されていくものと期待されています。

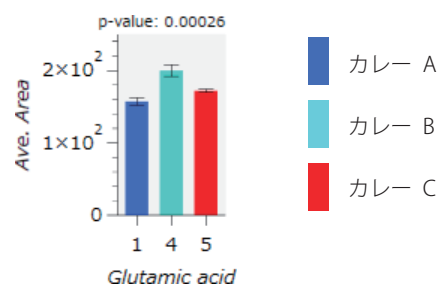


図6 カレーA、B、およびCのt検定結果（グルタミン酸の抜粋）

LCMS および 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。
Traverse MS は、ライフックス株式会社の商標です。

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

初版発行：2019年5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。