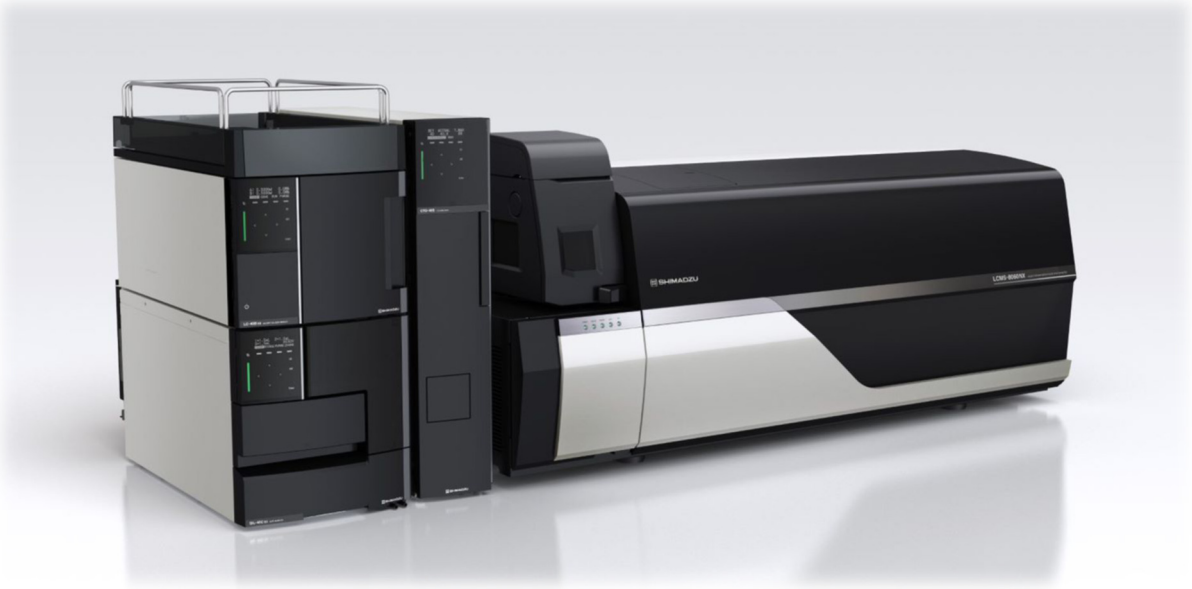
SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. C226

LC-MS

フードメタボロミクス トリプル四重極質量分析計LCMS™-8060NX を用いたワインの分析



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「フードメタボロミクス」と言われています。

本報告ではフードメタボロミクスの一例として産地、ブドウ品種が異なるワインの事例を紹介いたします。ワイン中の親水性成分を網羅的に分析するために、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）を使用し 2 つのメソッドで測定しました。

T. Hattori, Y. Yamada

サンプル

産地やブドウ品種が異なる 6 種類の赤ワインをサンプルとしました。表 1 にサンプルの詳細を示しました。

表 1　サンプルの詳細

	Producing regions	Grape varieties
Wine A	France	Cabernet Sauvignon
Wine B	France	Merlot
Wine C	France	98 % Pinot Noir, 2 % Pinot Beurot
Wine D	U.S.A	Cabernet Sauvignon
Wine E	Chile	Cabernet Sauvignon
Wine F	Australia	Cabernet Sauvignon

前処理

短鎖脂肪酸・有機酸分析のための前処理では、ODS カラムへの保持と MS 検出における感度向上を目的にサンプルを 3-ニトロフェニルヒドラジン（3-NPH）により誘導体化させました。ワインをメンブレンフィルターでろ過後、3-NPH（誘導体化試薬）、ピリジン（触媒）、カルボジイミド（縮合剤）、2-Ethylbutyric acid（内部標準物質）を添加し、室温で 30 分間反応させました。反応後、ギ酸を含むメタノール溶液で 5 倍希釈しました。

親水性代謝物の一斉分析のための前処理では、ワインをメンブレンフィルターでろ過後、超純水で 100 倍希釈しました。希釈の際、内部標準物質として 1 µmol/L になるよう 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES)を添加しました。

■分析条件

短鎖脂肪酸・有機酸分析は、LC/MS/MS メソッドパッケージ 短鎖脂肪酸を用い、LCMS-8060NX を使用して行いました。本分析法では、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸 6 成分と中心代謝経路に関連した有機酸 16 成分を分析可能です。ワイン中には酒石酸が多く含まれるため、酒石酸もメソッドに追加しました。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（短鎖脂肪酸・有機酸分析）

[HPLC conditions] (Nexera™ X3)		
Column	:	Mastro™ C18 (150 mm×2.0 mm I.D., 3.0 µm)
Mobile phases	:	A) 0.1 % Formic acid in water
		B) Acetonitrile
Mode	:	Gradient elution
Flow rate	:	0.35 mL/min
Injection volume	:	3 µL
[MS conditions] (LCMS-8060NX)		
Ionization	:	ESI (Positive and negative mode)
Mode	:	MRM
Nebulizing gas flow	:	2.0 L/min
Drying gas flow	:	10.0 L/min
Heating gas flow	:	10.0 L/min
DL temp.	:	250 ℃
Block heater temp.	:	400 ℃
Interface temp.	:	300 ℃

親水性代謝物の一斉分析は、LC/MS/MS メソッドパッケージ一次代謝物 ver. 2 に含まれるイオンペアフリーLC/MS/MS 法を用い、LCMS-8060NX 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 3 に HPLC および MS の分析条件を示しました。

表 3　分析条件（親水性代謝物一斉分析）

[HPLC conditions] (Nexera X3)		
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 µL
[MS conditions] (LCMS-8060NX)		
Ionization	:	ESI (Positive and negative mode)
Mode	:	MRM
IonFocus voltage	:	±2 kV
Nebulizing gas flow	:	3.0 L/min
Drying gas flow	:	10.0 L/min
Heating gas flow	:	10.0 L/min
DL temp.	:	250 ℃
Block heater temp.	:	400 ℃
Interface temp.	:	300 ℃

■IonFocus™ユニットによる感度向上

LCMS-8060NX の IonFocus ユニット（図 1）は、イオン輸送用のフォーカス電極によりイオンのみを効率的に質量分析計に取り込み、不要な中性粒子を除去します。そのため、生体・食品サンプルのようなマトリックスが多いサンプルでも、高感度分析と高い装置頑健性を両立することができます。ワインから検出された親水性代謝物に対して、IonFocus ユニットの効果を確認したところ、約 90 %の化合物において平均約 1.5 倍の感度向上が確認できました。図 2 に IonFocus ユニットによる感度向上例を示しました。

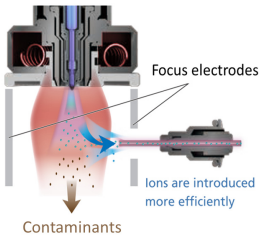


図 1　IonFocus ユニットのコンセプト

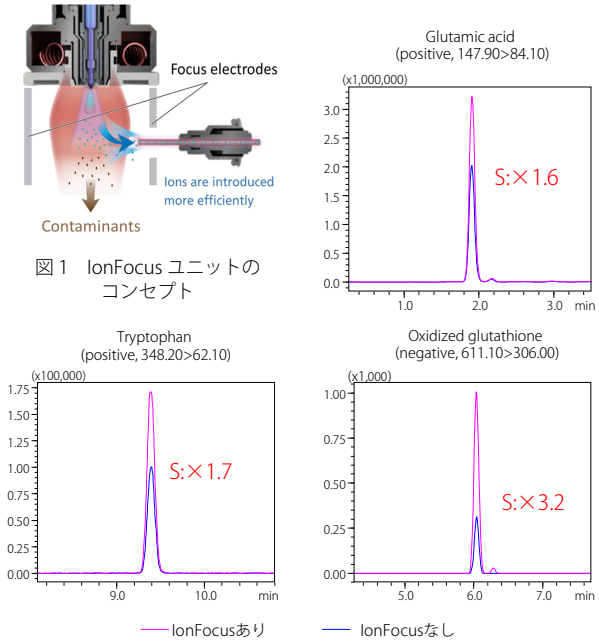


図 2　IonFocus ユニットによる感度向上

■Peakintelligence™による波形処理

検出されたピークの波形処理は、LabSolutions Insight™のオプションソフトウェアである Peakintelligence により行いました。Peakintelligence では、熟練作業者が行った波形処理を AI に学習させており、熟練者と同等レベルの解析を実現できます。図 3 のような SN 比が低く、別成分由来のピークが近くにある場合でも、Peakintelligence では正しく検出・波形処理が可能です。これにより、誤検出・未検出ピーク数を低減し、波形処理結果の確認と修正にかかる時間を短縮できます。

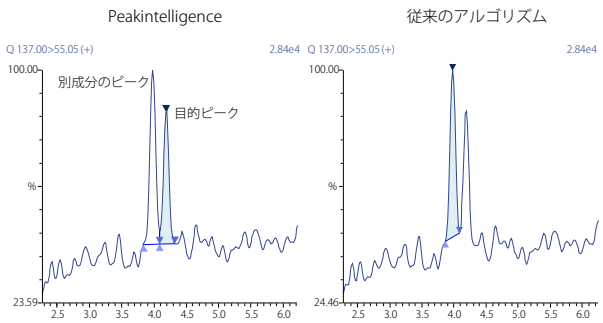


図 3　Peakintelligence による波形処理

■メタボローム解析

短鎖脂肪酸・有機酸分析の結果、短鎖脂肪酸 5 成分、有機酸 13 成分が検出されました。内部標準物質に対する各成分のピーク高さ比を用いて、主成分分析を SIMCA®16 ソフトウェアによって行いました。図 4 にスコアープロットおよびローディングプロットを示しました。第 1 主成分軸で、フランスワインと非フランスワインを区別できました。フランスワインには、酒石酸やコハク酸が多く含まれており、アメリカワインはリンゴ酸が多く含まれていることがわかりました。チリワインとオーストラリアワインは、短鎖脂肪酸・有機酸のパターンが似ているとわかりました。

親水性代謝物一斉分析の結果、アミノ酸、有機酸、核酸系代謝物を中心に 60 成分検出されました。内部標準物質に対する各成分の面積比を用いて、主成分分析を行いました。図 5 にスコアープロットおよびローディングプロットを示しました。ブドウ品種ごとに、3 つのクラスターにわかれました。カベルネ・ソーヴィニヨンのワインには、プロリンや 4-ヒドロキシプロリンが多く含まれていました。ワイン中のプロリンは、苦味や甘味を呈すると言われています。メルローのワインには、フェニルアラニン、ロイシン、リシンが多く含まれていました。ピノノワールのワインには、アラニンが多く含まれていました。ワイン中のアラニンは、甘味や旨味を呈すると言われています。

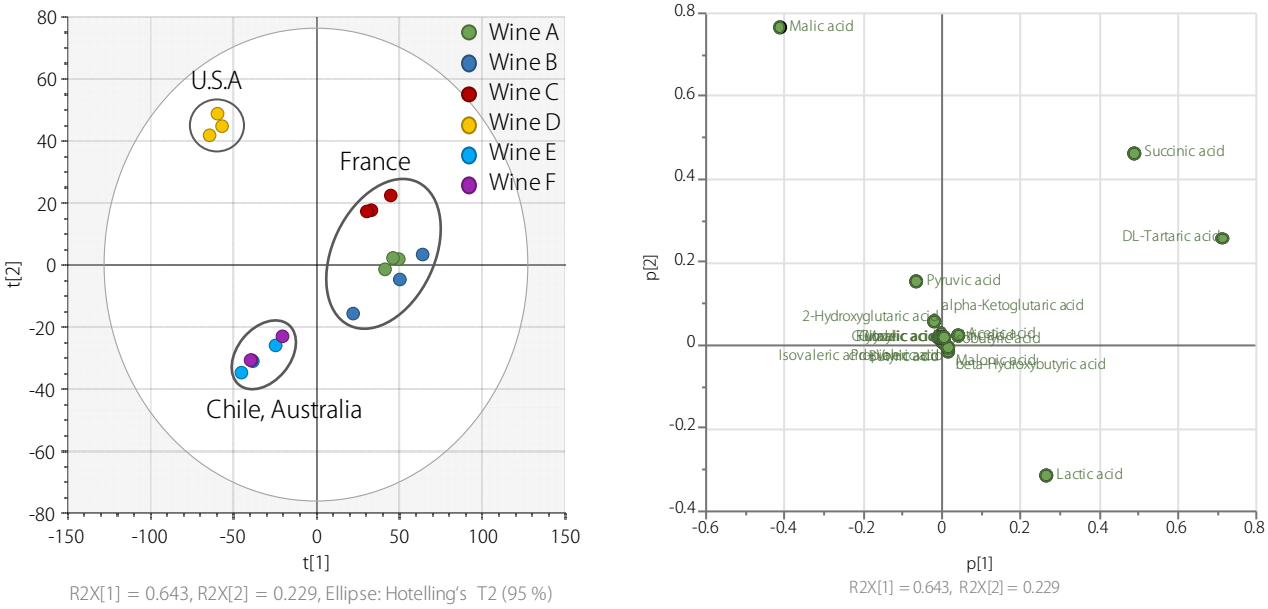


図 4　短鎖脂肪酸・有機酸分析における主成分分析結果

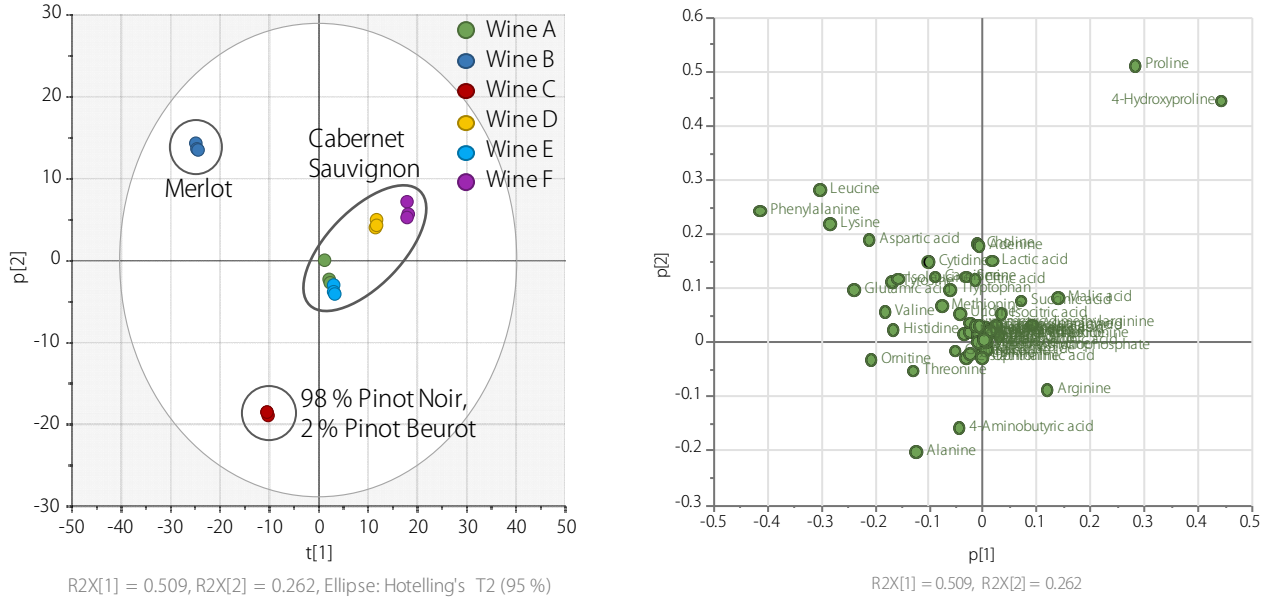


図 5　親水性代謝物一斉分析における主成分分析結果

このように、ワイン中の親水性代謝物（特に、アミノ酸）はブドウ品種によって影響することが示唆されました。一方、短鎖脂肪酸や有機酸は、ブドウ品種ではなくワインの産地（ブドウを栽培した土壌、気候、ワインの醸造プロセス等）が影響することが示唆されました。ワインの醸造プロセスが、ワイン中の短鎖脂肪酸や有機酸に影響することは知られています。通常、ワインの発酵工程では、アルコール発酵後にマロラティック発酵が起こります。マロラティック発酵では、乳酸菌によって果汁やワインの中に含まれるリンゴ酸が乳酸と二酸化炭素に分解されます。マロラティック発酵によって、ワインの酸味がまろやかになると言われています。図 6 にそれぞれのワインに含まれる短鎖脂肪酸・有機酸の割合を示しました。フランスワイン A, B, C、チリワイン E、オーストラリアワイン F は乳酸の割合がリンゴ酸の割合よりも高く、マロラティック発酵が進んでいることが示唆されました。アメリカワイン D はリンゴ酸の割合が乳酸の割合よりも高く、マロラティック発酵があまり進んでないと示唆されました。

■まとめ

以上のように、ワイン中の短鎖脂肪酸・有機酸、親水性代謝物を網羅的に分析することによって、ワインの発酵プロセス評価や、味との関係性評価に応用できます。より美味しく品質のよいワインの生産のために、本分析手法は有用と考えられます。

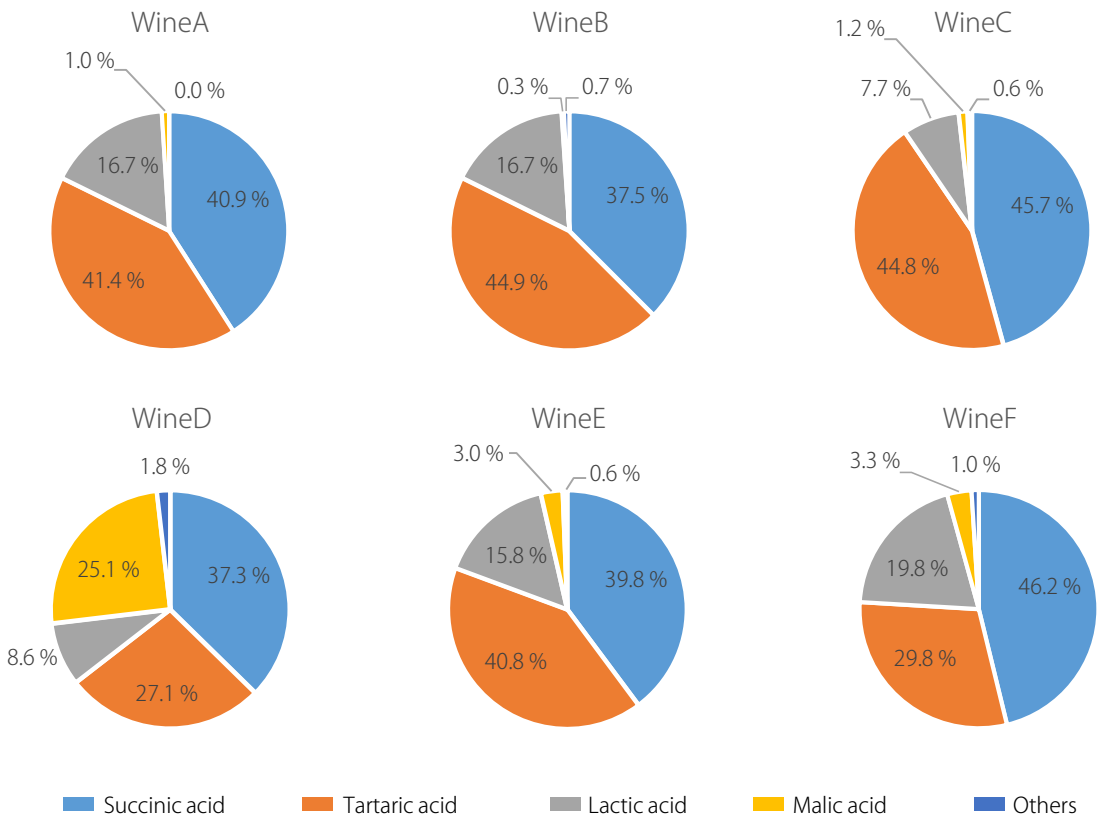


図 6　ワイン中短鎖脂肪酸・有機酸のプロファイル

LCMS、Nexera、IonFocus、Peakintelligence、および LabSolutions Insight 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。
SIMCA は、Sartorius Stedim Data Analytics AB の登録商標です。

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
島津コールセンター 0120-131691 (075) 813-1691

初版発行：2020 年 8 月

※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。