

## 四重極飛行時間型質量分析計を用いた 食酢中代謝物のノンターゲット解析

森 あすか<sup>1</sup>、加藤 紀子<sup>2</sup>、飯田 哲生<sup>2</sup>、服部 考成<sup>2</sup>  
1 大阪大学大学院工学研究科、2 島津製作所

### ユーザーベネフィット

- ◆ 四重極飛行時間型LC-MSであるLCMS-9030でノンターゲット解析することで、食品に含まれる呈味成分や機能性成分の種類や含量の違いを明らかにできます。
- ◆ LCMS-9030で得られる高い質量精度のMS/MSデータは、データベース検索における高い確度の化合物同定に有用です。

### ■はじめに

食酢は糖を含む食材を原料として、アルコール発酵とそれに続く酢酸発酵を経て製造される液体調味料です。世界には原料や製造方法の異なる様々な種類の食酢が存在しています。食酢にはアミノ酸、糖、有機酸を含む多くの成分が含まれていることが知られています。これらの成分は食酢の風味を決定するだけでなく、生体調節機能にも関わっています。未知成分を含めて網羅的に代謝物を解析する手法であるノンターゲットメタボロミクスは、食品に含まれる呈味成分や機能性成分の種類や含量の違いを明らかにすることができます。

本アプリケーションニュースでは、四重極飛行時間(QTOF)型LC-MSであるLCMS-9030と、メタボロミクス・リピドミクス解析プログラムであるMS-DIALを用いた食酢中代謝物のノンターゲット解析事例をご紹介します。

### ■ サンプルおよび前処理

表1に示す14種類の食酢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。その際、内部標準物質として*p*-Chlorophenylalanine（終濃度2.5 nmol/mL）を添加しました。

表1 サンプル情報

No.	サンプル	原産国	酸度 (%)	分類
1	米酢	日本	4.5	米酢
2	米黒酢A	日本	4.2	米黒酢
3	米黒酢B	日本	4.5	
4	米黒酢C	日本	4.2	
5	モルトビネガー	イギリス	5.0	
6	穀物酢	日本	4.2	穀物酢
7	バルサミコ酢A	イタリア	6.0	ぶどう酢
8	バルサミコ酢B	イタリア	4.5	
9	バルサミコ酢C	イタリア	6.0	
10	赤ワインビネガー	フランス	7.0	
11	白ワインビネガー	フランス	7.0	りんご酢
12	りんご酢A	イタリア	5.0	
13	りんご酢B	日本	4.5	
14	りんご酢C	日本	5.0	

### ■ 分析条件

分析には、超高速液体クロマトグラフNexera™ X3とQTOF型質量分析計LCMS-9030（図1）を使用しました。表2に、HPLCおよびMSの分析条件を示します。主要な親水性

代謝物の保持時間情報を化合物同定に利用するために、“LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 Ver.3”のHPLC条件（非イオン対試薬メソッド）を使用しました。MSは、Data Dependent Acquisition (DDA)モードでデータ取得しました。DDAモードでは、MS分析で検出された全イオンのうち、強度の高いプリカーサーイオンを複数選択し、MS/MS分析します。MS分析による精密質量情報とMS/MSスペクトルを用いた化合物同定が可能です。



図1 Nexera™ X3およびLCMS™-9030

表2 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera X3)	
Column	: Discovery HS F5 (150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm)
Column temp.	: 40°C
Flow rate	: 0.25 mL/min
Mobile phases	: A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Injection volume	: 2 μL
[MS conditions] (LCMS-9030)	
Ionization	: ESI Positive or Negative
Mode	: Data Dependent Acquisition (DDA)
TOF-MS	: MS <i>m/z</i> 50-1000 MS/MS <i>m/z</i> 10-1000
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
Interface temp.	: 300°C
DL temp.	: 250°C

## ■ データ解析

データ解析にはMS-DIAL (ver. 5.1.230912)を使用しました。MS-DIALは、LC-MSやGC-MSで取得した生データに対して、ピーク検出やアライメント、化合物同定を行い、データ行列を作成します(図2)。さらに、得られたデータ行列をもとに、主成分分析(PCA)などの多変量解析を行うことも可能です。"LC/MS/MSメソッドパッケージ二次代謝物 Ver.3"の非イオン対試薬メソッドで分析可能な代謝物(141成分)については、保持時間情報とMS分析の精密質量情報で同定しました。それ以外の代謝物については、MS-DIALのMS/MSスペクトルスターターキットで同定しました。

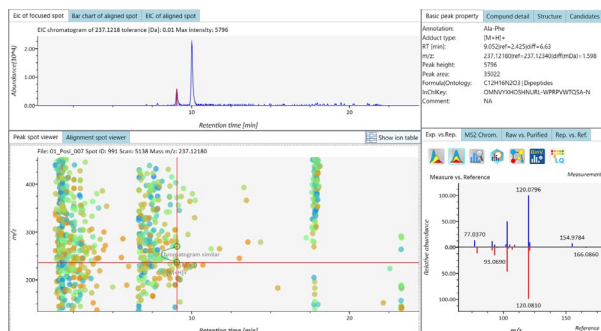


図2 MS-DIALの解析画面例

## ■ 分析結果

MS-DIALを用いて解析を行った結果、ポジティブモードでは5309ピーク、ネガティブモードでは10386ピークが抽出されました。内部標準物質による補正を行った後、PCAに供した結果を図3および図4に示します。スコアプロットにおいては、ポジティブモード、ネガティブモードともに、①米黒酢A、B、②バルサミコ酢A~C、③その他の食酢という3つのクラスター形成が確認されました。ローディングプロットにおいては、ポジティブモード、ネガティブモードともにプロットが右側に多く偏り、米黒酢A、Bに特徴的な成分が多数存在することがわかりました。

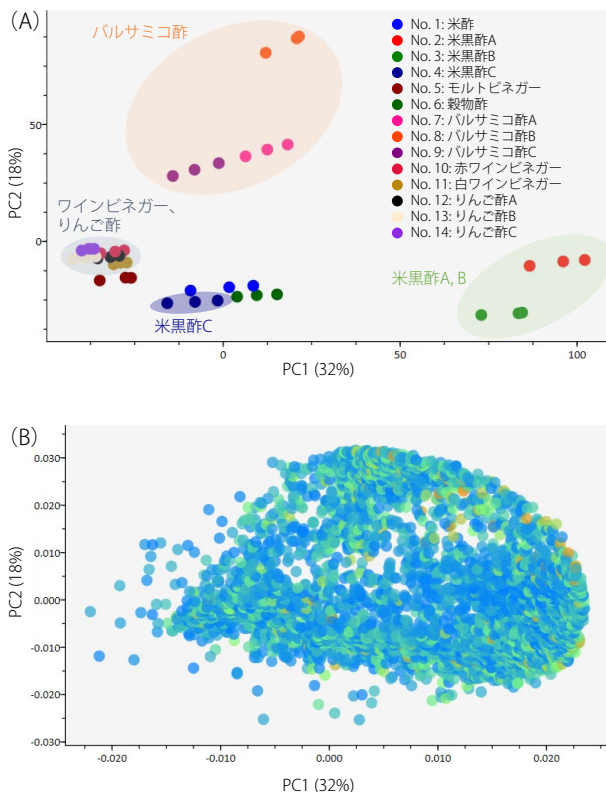


図3 PCAの結果(ポジティブモード)  
(A) スコアプロット、(B) ローディングプロット

バルサミコ酢においては、バルサミコ酢A、Cとバルサミコ酢Bのプロットは第二主成分(PC2)軸方向に互いに離れており(特にポジティブモード)、バルサミコ酢Bはバルサミコ酢A、Cと異なる傾向を示しました。ローディングプロットのプロットの偏りからも、バルサミコ酢Bには特徴的な成分がより多く存在することがわかりました。バルサミコ酢Bは6年熟成されたものであることから、この違いは発酵由来の代謝物によってもたらされた可能性が考えられます。

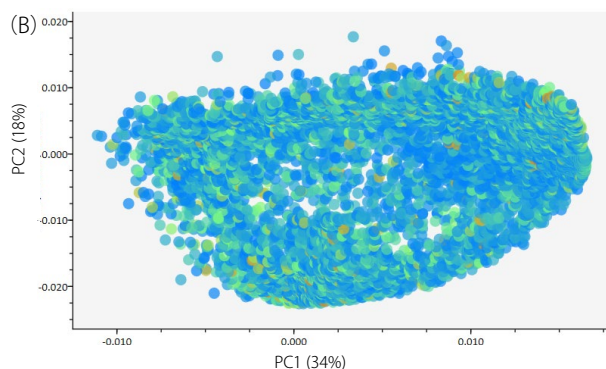
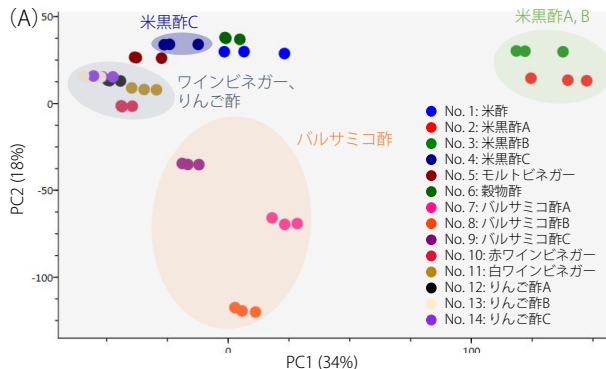


図4 PCAの結果(ネガティブモード)  
(A) スコアプロット、(B) ローディングプロット

MS/MSスペクトルを用いた化合物同定例を図5に示します。図5は、クエン酸の実測MS/MSスペクトルとMS-DIALのMS/MSスペクトルスターターキットに記載されているリファレンスMS/MSスペクトルを比較したものです。実測MS/MSスペクトルとリファレンスMS/MSスペクトルのパターンはほぼ一致し、またそれぞれのピークの質量誤差も1 mDa以下であり、高い確度で化合物同定が可能でした。

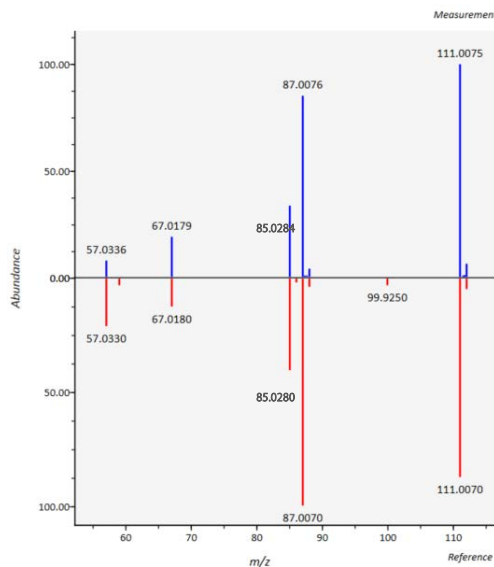


図5 クエン酸の実測MS/MSスペクトル(上)とリファレンスMS/MSスペクトル(下)の比較

米黒酢A, B (No. 2, 3) からは、アミノ酸やジペプチドが多く検出されました。バルサミコ酢 (No. 7~9) から多く検出されたHydroxytyrosolはポリフェノールの一種であり、抗酸化作用を持つことが知られています。また、りんご酢 (No. 12~14) からは同じく抗酸化作用を持つポリフェノールであるQuercetinが多く検出されました。サンプル間で特徴的であった代謝物に関して、内部標準物質に対する各代謝物のピーク高さ比の比較を図6に例示します。

## ■まとめ

本稿では、QTOF型LC-MSであるLCMS-9030とメタボロミクス・リポドミクス解析プログラムであるMS-DIALを用いて、様々な種類の食酢に含まれる代謝物のノンターゲット解析を行いました。その結果、アミノ酸やジペプチドといった呈味成分やポリフェノールなどの機能性成分を含む多くのピークが検出され、食酢の種類ごとの代謝物プロファイルの違いが明らかとなりました。

未知ピークをデータベース検索する際、高い質量精度のデータは候補化合物の数を大幅に絞り込むため有用です。LCMS-9030はMS分析だけでなく、MS/MS分析においても高い質量精度を実現します。本手法で得られる高い質量精度のMS/MSデータを用いることで、ノンターゲット解析における確度の高い化合物同定が可能となります。

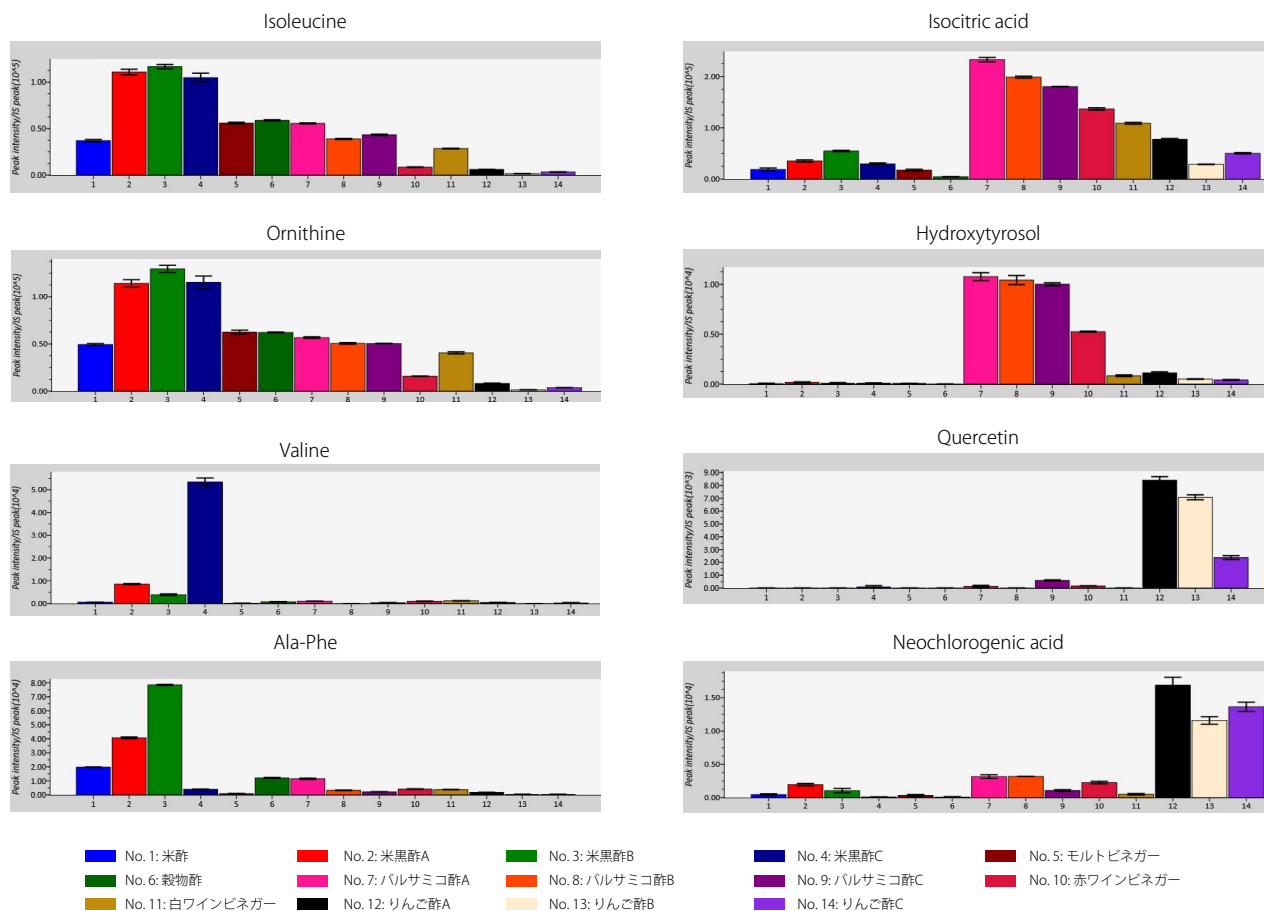


図6 サンプル間で特徴的であった代謝物例

LCMS、Nexeraは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

＞ アンケート

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ LCMS-9030

四重極飛行時間型質量分析計

## 関連分野

＞ 食品・飲料

＞ フードメタボロミクス

＞ 食品の栄養表示・機能性成分表示

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ