

LC-QTOFMSを用いた飲料中代謝物のノンターゲット解析

○飯田 哲生¹⁾、馬越 泰¹⁾、小林 まなみ¹⁾

1) 株式会社 島津製作所

◆背景・目的

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が注目を集めている。食品分野でも、味や品質、栄養的価値を客観的に評価する手法として利用されている。メタボロミクスには大きく分けて「ターゲット解析」と「ノンターゲット解析」という二つの手法がある。ターゲット解析は、あらかじめ決められた化合物群のみを測定する方法で解析は容易になるが、ターゲット以外の有効成分を見逃す恐れがある。一方、ノンターゲット解析では未知成分も含めて代謝物を網羅的に解析する。本研究では、精密質量データを取得可能な四重極飛行時間型質量分析計 (LC-QTOFMS) を用い、ビールを代表とする各種飲料中代謝物をノンターゲット解析した。原料や製造法に基づいた代謝物プロファイルを考察した。

◆前処理

表1に示す市販の6種類のビール、発泡酒、新ジャンル、ノンアルコールビールをサンプルとした。前処理では、各サンプルを脱気後、超純水で10倍希釈した。

表1 サンプルの詳細

No	サンプル	備考
1	ビール1	ラガービール (下面発酵)
2	ビール2	エールビール (上面発酵)
3	発泡酒	ブリン体ゼロ
4	新ジャンル	大豆たんぱくを原材料に使用
5	ノンアルコールビール1	国内製
6	ノンアルコールビール2	海外製

◆分析条件

測定機器は、液体クロマトグラフ Nexera™ X3と四重極飛行時間型質量分析計 LCMS™-9030を用い、6種類のビールおよび、ビールテイスト飲料を3回ずつ分析した。"LC/MS/MSメソッドパッケージ二次代謝物"に記載されているLCメソッドを用いた。検出にはプリカーサー m/z と MS/MS データを同時に取得できる Data Dependent Acquisition (DDA) モードを使用した。表2に分析条件を示す。

表2 分析条件

[HPLC conditions]	Nexera X3
Column :	Reversed-phase column
Mobile phase A :	0.1 % Formic acid - water
Mobile phase B :	0.1 % Formic acid - acetonitrile
Time program :	Gradient elution
Flow rate :	0.25 mL/min
Column temperature :	40℃
Injection volume :	3 μ L

[MS conditions]	LCMS-9030 (LC-QTOFMS)
Ionization :	ESI (Positive)
Mode :	Data Dependent Acquisition (DDA, 自動MS/MS)
MS event :	m/z 50-1000, 0.1 sec
MS/MS event :	m/z 10-1000, 0.1 sec x5
Collision Energy :	35 $\pm$ 17 V
Nebulizing gas flow :	3 L/min
Drying gas flow :	10 L/min
Heating gas flow :	10 L/min
DL temperature :	250℃
Block heater temperature :	400℃
Interface temperature :	300℃



◆データ解析

差異解析にはノンターゲット解析ソフトウェア LabSolutions Insight™ Profiler (図1)を用いた。取得したデータから検出されたイオン情報をピークとして抽出し、保持時間と m/z を基にアライメントを行った。アライメントされたピークを用いて多変量解析を行い、各サンプルに特徴的なピークを抽出した。ライブラリ検索には、約5万化合物が収載された NIST 23 Mass Spectral Libraryを使用した。MS/MSスペクトルのマッチングを基にスコアを算出した。

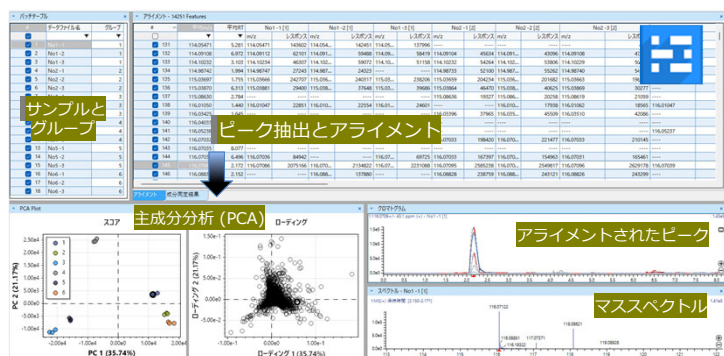


図1 多変量解析

◆6種類ビールの主成分分析 (PCA) 結果

LabSolutions Insight Profilerにより、4695個のピークが抽出された。抽出されたピーク面積値で主成分分析 (PCA : Principal Component Analysis) を行った結果を図2に示す。データのスケールにはPareto scalingを用いた。スコアプロット上ではビール1(No.1)、ビール2(No.2)、ノンアルコールビール2(No.6)が近くにプロットされた。発泡酒(No.3)、ノンアルコールビール1(No.5)も近くにプロットされた。新ジャンル(No.4)は、PC2軸方向で他のサンプルと異なる位置にプロットされた。

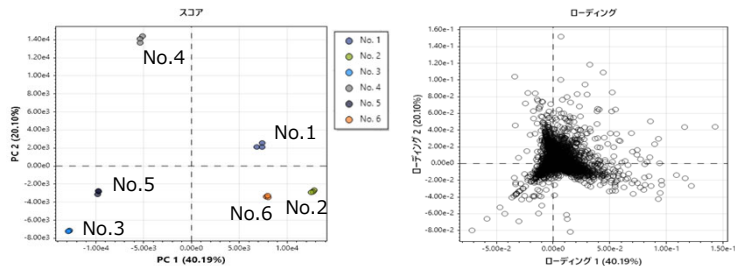


図2 主成分分析結果 (左) スコアプロット (右) ローディングプロット

◆ライブラリ検索の結果

検出されたピークのうち、MS/MSスペクトルが取得できているものに対して NIST 23 Mass Spectral Libraryを用いた検索を実施した結果、ライブラリ類似度が50以上の化合物が403個で、類似度が80以上の化合物が214個であった。図3に平均 m/z 156.077、保持時間1.9 minのピークに対するライブラリ検索の結果を示す。このMS/MSスペクトルは、ライブラリ類似度83でHistidineがトップでヒットされた。

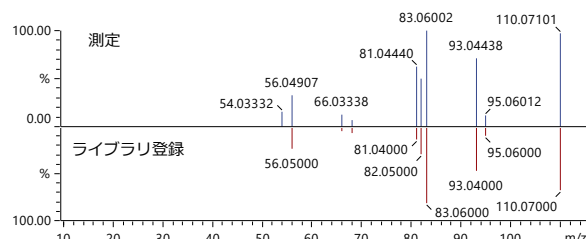


図3 MS/MSスペクトルに対するライブラリ検索結果例

サンプル間で特徴的な一部の化合物の面積値を、図4にまとめた。飲料No. 1、2、6からはアミノ酸 (Histidine、Phenylalanine、Tyrosine、Tryptophan) や核酸代謝物 (Cytidine、Guanosine) が多く検出された。また大麦由来と考えられるアルカロイド (Hordenine) も検出された。No. 6はノンアルコールビールであるが、ビールの原料を使用し、アルコール生成を抑えた発酵法で製造されているため、No. 1、2と類似した代謝プロファイルになったと考えられた。No. 3からは旨味成分 (Glutamic acid) や香料安定剤 (Triethyl citrate) が多く検出された。No. 3、5からは酸化防止剤 (Vitamin C) が検出された。No. 3、5は原料を混合して製造されているため、ビールとは異なる代謝プロファイルになったと考えられた。No. 4からはイソフラボン (Daidzin、Genistein) が検出された。No. 4は大豆を原料に製造されているため、大豆由来の化合物が検出されたと考えられた。

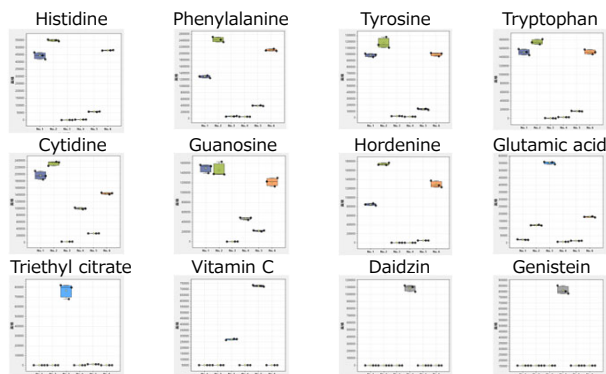


図4 サンプル間で特徴的な化合物の箱ひげ図 (縦軸: 面積値, n = 3)

◆まとめ

LC-QTOFMSを用いてビールを代表する各種飲料中化合物をノンターゲット解析した。サンプル間で特徴的な化合物を解析した所、原料や製造法に基づいた代謝物プロファイルになっていることが確認された。本解析法により、食品の味、品質および栄養的価値を客観的に評価できると考えられる。