

LC-MS/MS による食品成分の一斉測定と差異分析

Simultaneous Measurement and Difference Analysis of Food Components by LC-MS/MS

梅林 志浩

Yukihiro Umebayashi

食品開発研究所 バイオ技術科

平成 26 年 3 月に当施設に導入されたハイブリッド型高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、農産物中の多様な成分の一斉測定条件の最適化と構成成分の差異分析を試みたので報告する。

1. はじめに

高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) は、液体に溶けた多くの成分を一度に効率よく測定できる有用な装置である。厚生労働省が定める「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 (平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)」において、農産物の残留農薬の一斉分析法として LC-MS 又は LC-MS/MS の使用を規定しており、装置の性能向上や分析技術の進歩により近年は数十から百種類以上の農薬を一度に検出することも可能になってきている^{1~3)}。

LC-MS/MS の測定原理としては、まず液体クロマトグラフ(LC)で多成分の混合液からそれぞれの成分を分離し、続いて、質量分析計(MS)でイオン化された各成分の質量と電荷を検出する。各成分の質量と電荷の比は m/z で表され、 m/z の値から各成分の分子構造を推定することも可能である。

食品分野での LC-MS/MS の使用例としては、ワイン製造工程で排出されるブドウの絞り粕からの生理活性ポリフェノール類の検出⁴⁾、食物アレルギーの一斉測定 (ペプチドフラグメントフィンガープリンティング法)⁵⁾、緑茶葉由来の未知化合物の構造推定⁶⁾など、これまで多数の報告があり、既知成分の測定のみでなく未知成分の探索においても重要な装置となっている。

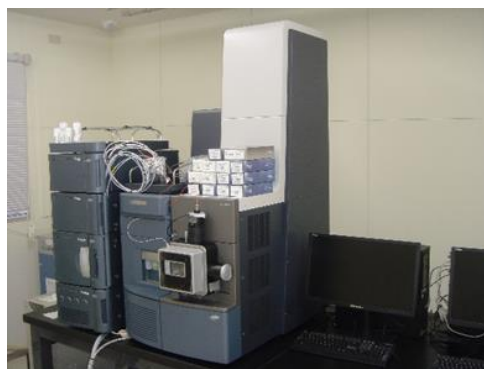


図 1 ハイブリッド型高速液体クロマトグラフ質量分析計

ここでは、本年当施設に導入されたハイブリッド型高速液体クロマトグラフ質量分析計 (図 1) を用いて、農産物中成分の一斉測定と構成成分の差異分析を試みたので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

農産物の部位による含有成分の違いを比較するため、試料として市販の白葱 (県内産) を用いた。白葱の白い部分 (葉鞘) と緑色の部分 (本葉) を切り分け、真空凍結乾燥後フードプロセッサーで粉碎し、乾燥物 1 g に対しメタノール 25 ml を加え 30 分間放置したものを 0.2 μm フィルターで濾過し、測定試料とした。一方、加工 (加熱) による農産物の成分変化を検証するため、試料として焙煎玄米 ((有) ビーエムステーションより提供) を用いた。フードプロセッサーで粉碎した焙煎玄米 0.5 g に対し熱水

10 ml を加え 30 分間放置し、遠心後の上澄みに等量のエタノールを加えたものを 0.2 μm フィルターで濾過し、測定試料とした。

2.2 装置及び測定条件

LC-MS/MS は Waters 社製の ACQUITY UPLC H-Class PDAe λ -Xevo G2-S QToF システムを使用した。

LC 部については、分析カラムは Waters 製の ACQUITY UPLC® BEH C18、2.1 \times 75 mm、粒子径 1.7 μm を用いた。移動相については、A 液として 0.1% ギ酸含有水を、B 液として 0.1% ギ酸含有アセトニトリルを用い、グラジエント条件は 0 min (A 液:100%)、20 min (A 液:0%)とした。また、カラム温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ 、流速は 0.35 ml/min、サンプル注入量は 10 μl とした。

MS 部については、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法によるポジティブイオンモードにて測定を行った。キャピラリー電圧は 1.0 kv、ソースブロック温度は 150 $^{\circ}\text{C}$ 、脱溶媒ヒーター温度は 500 $^{\circ}\text{C}$ 、質量範囲(m/z)は 100-3000 に設定した。

測定質量からの元素組成解析、OPLS-DA 解析 (2 グループ間の成分組成の比較・各グループに特有の成分を抽出) 及び主成分分析は付属の解析ソフトウェア (MarkerLynx XS) により行った。

3. 結果と考察

3.1 白葱抽出液の成分分析

図 2 に LC-MS/MS ポジティブイオンモード測定により得られたクロマトグラムを示す。クロマトグラムにおいて葉鞘、本葉それぞれ 20~30 本のピークを確認することができるが、さらに、僅かに検出されるピークを含めると葉鞘で約 200 成分、本葉で約 150 成分を検出することができた。

本実験では比較的明瞭なピークが複数得られたが、今後さらに分析精度を高めるためには、LC 条件を再検討し、移動相の種類やグラジエント条件などの最適化が必要と思われる。

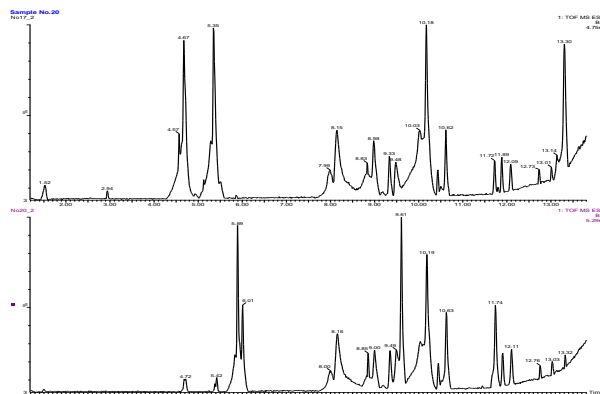


図 2 LC-MS/MS クロマトグラム
上: 葉鞘、下: 本葉

また、測定成分の精密質量から元素組成の推定やインターネット上のデータベース (ChemSpider™ 等) を利用した物質推定も可能であり、これらの解析により健康機能性を有する未知化合物を発見できる可能性がある。しかしながら、フラグメントパターンの確認や標準品との比較など、個々の成分についての詳細な検証は不可欠である。

図 3 に OPLS-DA 解析の結果 (S-Plot) を示す。葉鞘と本葉のそれぞれの成分 (保持時間-精密質量) を 1 つの点としてプロットしており、左に行くほど葉鞘に多い成分、右に行くほど本葉に多い成分を示している。これにより、葉鞘では約 40 成分、本葉で約 20 成分のサンプル特有の成分を抽出できた。S-Plot はサンプルの各成分の検出量の違いや繰り返し測定精度及び各サンプルに特有の成分を視覚化できるため、マーカー候補化合物の探索に有効なツールと言える。

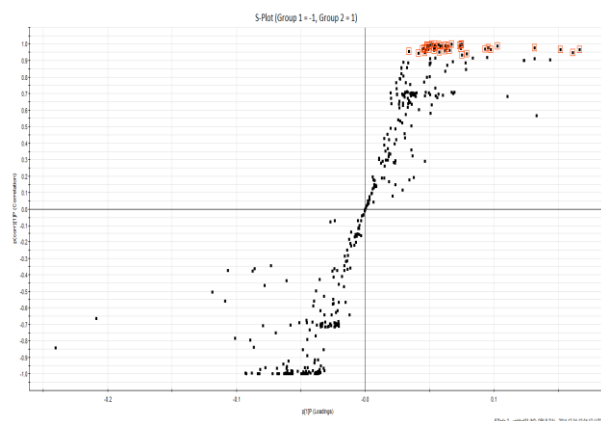


図 3 OPLS-DA 解析結果 (S-Plot)

3.2 焙煎玄米抽出物の比較

LC-MS/MS により農産物の成分を精密に測定し、化合物のデータベース検索や多変量解析を行うことで、上述のような部位間の成分比較や品種間での比較⁷⁾、さらには産地識別も可能になってきている⁸⁾。

次に、加工により生じる農産物中の成分変化を LC-MS/MS により検出可能であるかを検証するため、焙煎程度が異なる 3 種類の玄米 (図 4) を用いて、その溶出成分を測定し、差異解析を試みた。測定の結果、未焙煎の玄米で検出された成分は約 300 種類であったのに対して、焙煎玄米では 1000 以上の成分が検出された。また、焙煎時間と共に溶出量 (生成量) が増加する成分も認められた (表 1)。



図 4 玄米サンプル

左上：未焙煎、右上→左下→右下の順で焙煎時間が長い

表 1 質量測定結果

保持時間 (min)	質量 (m/z)	未焙煎 玄米 [※]	焙煎玄米 [※] 焙煎時間		
			短	→	長
5.21	255.16	148.4	0.0	0.0	0.0
6.27	369.20	186.5	0.0	0.0	0.0
7.00	271.18	563.2	0.0	0.0	0.0
3.31	195.11	0.0	4.8	16.5	36.2
3.73	197.12	0.0	0.0	26.8	63.2
4.28	211.14	0.0	2.6	53.4	81.8
4.55	245.12	0.0	0.0	65.3	147.1
5.52	261.16	0.0	0.0	79.3	115.7
7.22	326.18	0.0	0.0	6.2	33.6

(※数値は検出ピークの強度を示す)

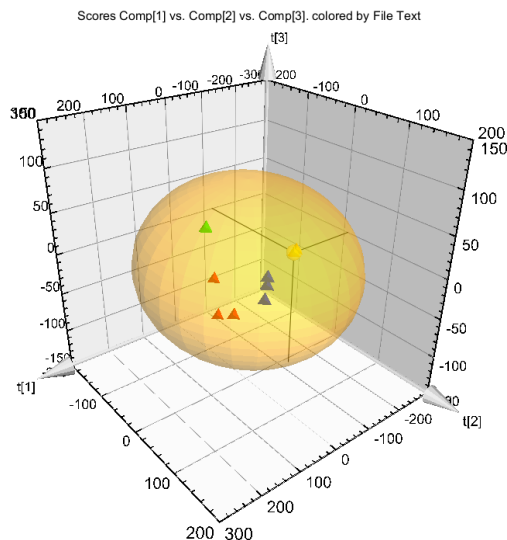


図 5 4 種類の玄米サンプルの主成分分析結果

黄色：未焙煎、黒→赤→緑色の順で焙煎時間が長い

図 5 に各玄米サンプルの精密質量データから主成分分析により作成したスコアプロット (3-D 表示) を示す。それぞれのサンプルを 1 つの点としてプロットしており、この結果からも焙煎程度が異なる 4 種類の玄米サンプルの成分組成が明瞭に異なることが明らかになった。

4. おわりに

今回、新たに導入したハイブリッド型高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いて、農産物の部位による含有成分の違い及び加工により生じる成分変化を検証した。結果、LC-MS/MS は食品成分を効率的に測定し、サンプル間の差異を検証し原因成分を特定できる有効なツールであることを再認識した。今後、さらに測定精度を高めるとともに、他の食品素材についても検証し、地域食材の高付加価値化や機能性を付与した新商品の開発に貢献していきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、焙煎玄米を御提供いただいた有限会社ビーエムステーション代表取締役社長松尾信一郎氏に、深く感謝いたします。

文献

- 1) 石川順子 他 ; 農産物中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価について, 香川県環境保健研究センター所報, 12, p.91-99(2013).
- 2) 西川 徹 他 ; LC/MS/MS を用いた農産物中残留農薬の一斉分析, 長崎県環境保健研究センター所報, 53, p.79-84(2007) .
- 3) 渡邊美奈恵 他 ; LC-MS/MS による農産物中残留農薬の一斉分析, 食品衛生学雑誌, 54(1), p.14-24 (2013).
- 4) Brazinha Carla et al. ; Optimization of Extraction of Bioactive Compounds from Different Types of Grape Pomace Produced at Wineries and Distilleries, J. Food Sci., 9 (4-6), p.E1142-E1149 (2014).
- 5) Monaci Linda ; LCMS as a reliable tool for monitoring food allergens contamination, New Food, 15(2), p.23-24,26,28 (2012).
- 6) 合田隆大 他 ; 食品分析の技術動向 LC/MS および GC/MS を用いたメタボローム解析手法の応用 -緑茶葉のプロファイリング解析, ジャパンフードサイエンス, 52(7), p.44-53 (2013).
- 7) Soininen Tuula H. et al. ; Quantitative metabolite profiling of edible onion species by NMR and HPLC-MS, Food Chem., 165, p.499-505 (2014).
- 8) Diaz Ramon et al. ; Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, Food Chem., 157, p.84-93 (2014).