

LC-MSを用いたワカメの産地判別



佐野勇気、高橋洋武、橋田規、照井善光
(一財) 日本食品検査

一般財団法人
日本食品検査

【背景・目的】

わが国の市場には産地偽装食品が紛れ込んで流通しており、中でもワカメは国産と外国産の価格差が大きいため偽装の対象になりやすい。機器を用いた産地判別技術には様々なアプローチがあり、これまでの主要なものとしては、炭素、酸素、窒素等の安定同位体比を指標にするものや微量元素の組成を指標にするものが挙げられる。しかし、いずれも完全に判別可能というわけではなく、季節による微妙な環境変動により判別が困難となるケースもあった。

我々は今回、新たなアプローチとして、試料中の有機物をLC-MSで網羅的に測定し、その分布傾向から産地判別するという方法を検討した。試料に含まれる数千種の内因性/外因性物質を m/z としてモニターでき、他の方法に比べ膨大なデータが得られるのがこの方法の特徴である。今回は、国産ワカメ及び中国産ワカメを対象とした産地判別方法を検討し、分析法の妥当性評価を行ったので、その結果について報告する。

【方法】

国産ワカメ及び中国産ワカメを複数種類用意し、産地毎にグルーピングを行い、下記の条件に従って前処理した試料をLC-MS測定に供した。MSは高分解能質量分析計であるQ Exactive™ Focus (Thermo Fisher Scientific) を使用し、定性確度の高い精密質量情報を網羅的に取得した。得られたクロマトグラムから、各化合物のピーク面積値を基にグループ間の差異解析を行い、国産及び中国産に特異的なマーカー化合物を数十成分選出した。これらを説明変数とし、統計解析ソフトRを用いて線形判別分析により判別係数を算出した。各説明変数に付与された判別係数にピーク面積値を乗じ、その合計を各試料の判別得点とした。全試料の判別得点を算出し、グループ間の判別率が最も高くなるようにマーカー化合物を取捨選択する作業を繰り返し、最終的に判別モデルを構築した。この判別モデルを用いて、国産37試料及び中国産20試料を対象に本分析法の妥当性を評価した。評価方法は、Leave-one-out cross validation (LOOCV) ※を採用した。

また、同時に説明変数として使用したマーカー化合物の精密質量情報から組成式あるいは構造式を推定し、データベース検索から化合物名を同定した。同定できた化合物については、その試料に含まれている蓋然性の有無を確認した。

※LOOCV：全サンプルから1つのサンプルを除き、残りのサンプルでモデルを作製したときに、あらかじめ抜いていたサンプルを正確に予測することができるかを検定する方法

前処理条件

試料
↓
乾燥ワカメ：水で膨潤
塩蔵ワカメ：水で洗浄
↓
秤量
↓
+アセトニトリル
ホモジナイズ
↓
+飽和食塩水
液液分配
↓
有機層分取 (水層廃棄)
↓
フィルター処理
↓
LC-MS分析

LC/MS 条件

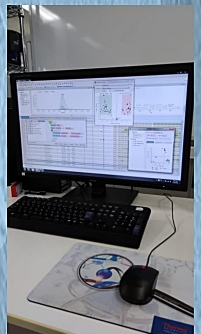
- Column : L-Column2 ODS 2.1 mm×150 mm, 3 μ m (CER1)
- Column temperature : 40 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.2 mL/min
- Mobile phase
 - A : Water containing 2 mmol/L ammonium acetate
 - B : MeOH containing 2 mmol/L ammonium acetate
- Ionization : ESI pos/neg switching
- Measurement mode : Full MS/ddMS2
- Resolution : 70,000 / 17,500 (m/z 200)



HPLC : UltiMate 3000
(Thermo Fisher Scientific)

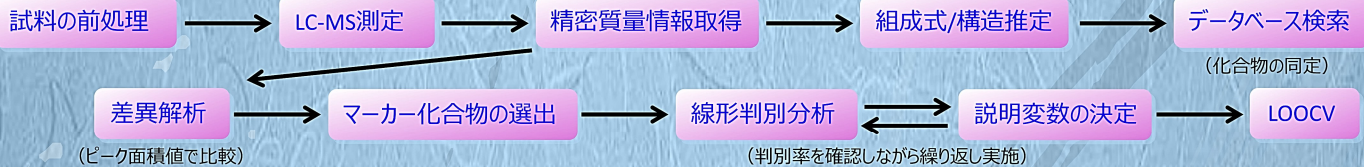


MS : Q Exactive Focus
(Thermo Fisher Scientific)



Analysis : Compound Discoverer
(Thermo Fisher Scientific)

☆試料前処理から解析までの流れ



【結果・考察】

LC-MS分析により網羅的な情報を取得すると図1に示したTICが得られた。このクロマトグラムから取得したマススペクトルからは数千種の化合物が得られ、その強度比から図2に示すようなボルケーノ・プロットを作成した。この図はプロットが両端に来る化合物ほど強度比が大きいことを示し、これを基にマーカー化合物を数十成分選出した。マーカー化合物のみを抽出すると図3に示すようなEICの一例が得られた。これらのピーク面積値に線形判別分析から得られた判別係数を乗じて判別得点を算出し、グループ間の判別率が最も高くなるように調整した結果、判別率100 %となる判別モデルを構築した。この判別モデルを用いてLOOCVを行った結果、図4に示すヒストグラムが得られた。判別得点1.6～3.6を境界とすることで判別率100 %が達成できた。

また、データベース検索の結果、数種類のマーカー化合物で化合物名候補が挙げられた。そのうち2種類は中国での生育過程で付着した外因性物質であることが分かり、その蓋然性が示された。

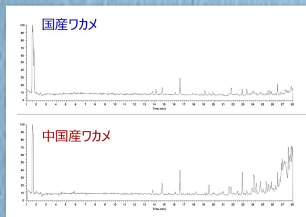
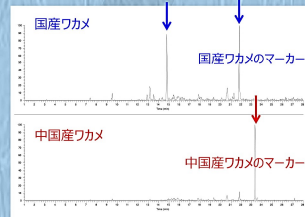


図1：国産ワカメ及び中国産ワカメの測定から得られたTICの一例

上段の国産ワカメに比べ、下段の中国産ワカメはクロマトグラムの後半に顕著なピーク群が観測される。このことから、疎水性化合物が中国産のマーカーとして有効であると推定される。

マーカー選出



各マーカー化合物のみを抽出したクロマトグラム (EIC) を作成した。最終的に19ピークを説明変数として、線形判別分析に供した。

中国産ワカメの判別得点は-4.1～1.5となり、国産ワカメの判別得点は3.7～26となった。よって判別得点1.6～3.6を境界とすることで判別率100 %が達成できた。

中国産に特異的な化合物

図3：選出したマーカーから得られたEICの一例

ボルケーノ・プロットの縦軸は p 値の負の対数を示し、横軸は強度比の対数を示す。図2に示したプロットを観察すると、中国産ワカメは国産ワカメに対し、 p 値が小さく、強度比が大きい化合物、すなわち中国産に特異的な化合物が多く見られる。

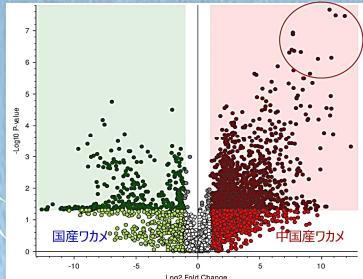


図2：国産ワカメ及び中国産ワカメの統計解析から得られたボルケーノ・プロット



図4：構築した判別モデルのLOOCVから得られたヒストグラム

【まとめ】

- 国産ワカメ及び中国産ワカメのLC-MS分析により得られた情報から判別モデルを構築した。本モデルでLOOCVを行った結果、判別率は100 %となり、本分析法の妥当性が確認された。
- 説明変数として使用したマーカー化合物をデータベース検索した結果、数種類は同定され、そのうち2種類は中国での生育過程で付着した外因性物質であることが分かり、その蓋然性が示された。