

【ワカメの産地判別】

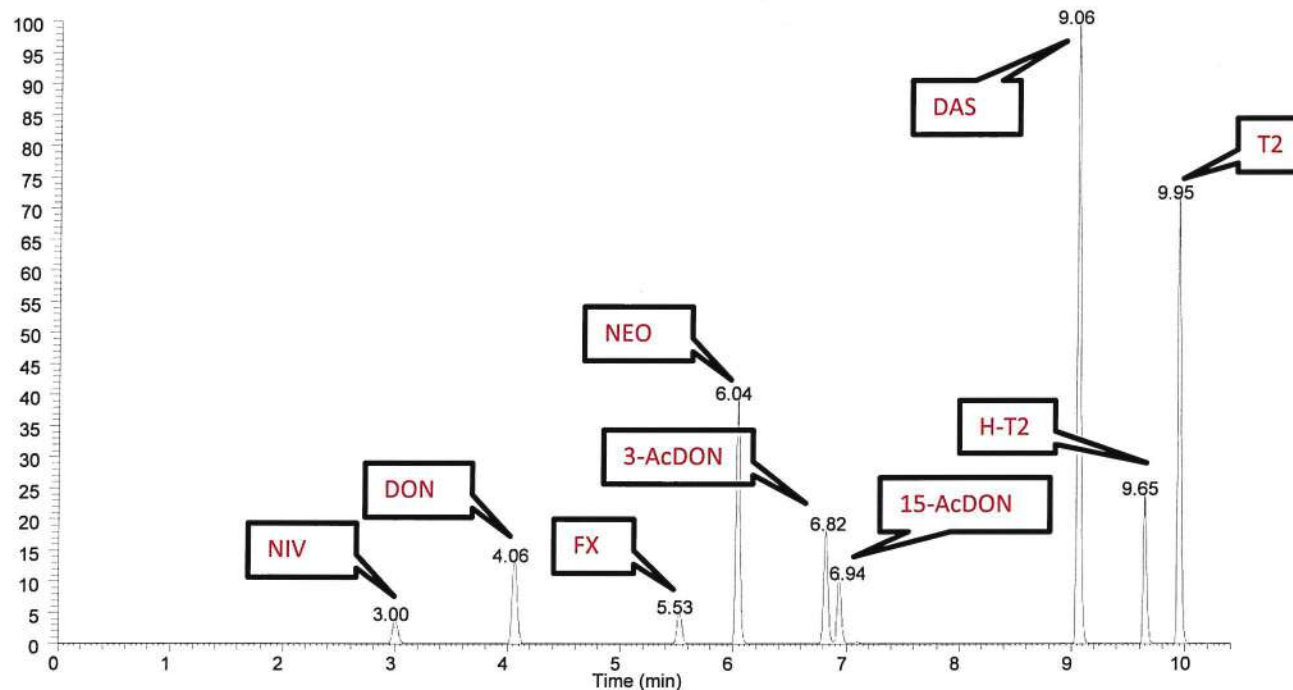
産地偽装の防止策として国産及び中国産ワカメの産地判別方法を構築した。Q Exactive Focusでは試料中の有機物を網羅的に測定する可能で、安定同位体比分析や元素分析といった既存の方法に比べて、モニターできる化合物数が圧倒的に多いのが特徴である。この中から各産地を代表する有効なマーカー化合物を探索し、それらを用いた統計解析の結果、判別率100%を達成する判別モデルが構築できた。



【トリコテセン系カビ毒一斉分析】

Q Exactive Focusは高い選択性と定性確度を有す一方で定量性にも優れている。定量分析は通常タンデム四重極で行うことが多いが、分析種数が増えると条件取りに膨大な労力を要するというデメリットがある。Q Exactive FocusはFull MS測定の後、数mDaのマストレランスでEICを描かせるだけで選択性の高いクロマトグラムが得られるため、MS条件取りが不要となりメソッド開発が容易であるという特徴がある。

当法人ではこの手法を用いてトリコテセン系カビ毒一斉分析法を開発した。本分析法は各種学会等で発表しており、多くのご質問を頂いている。



【市販緑茶飲料の主成分分析】

市販緑茶飲料を高分解能MSを用いて測定し、網羅的なデータを取得後に主成分分析を行うことで、特定保健用食品（トクホ）とそれ以外の商品の差を認めることができた。同様の手法により、様々な食品における差異解析への応用が可能であると思われる。

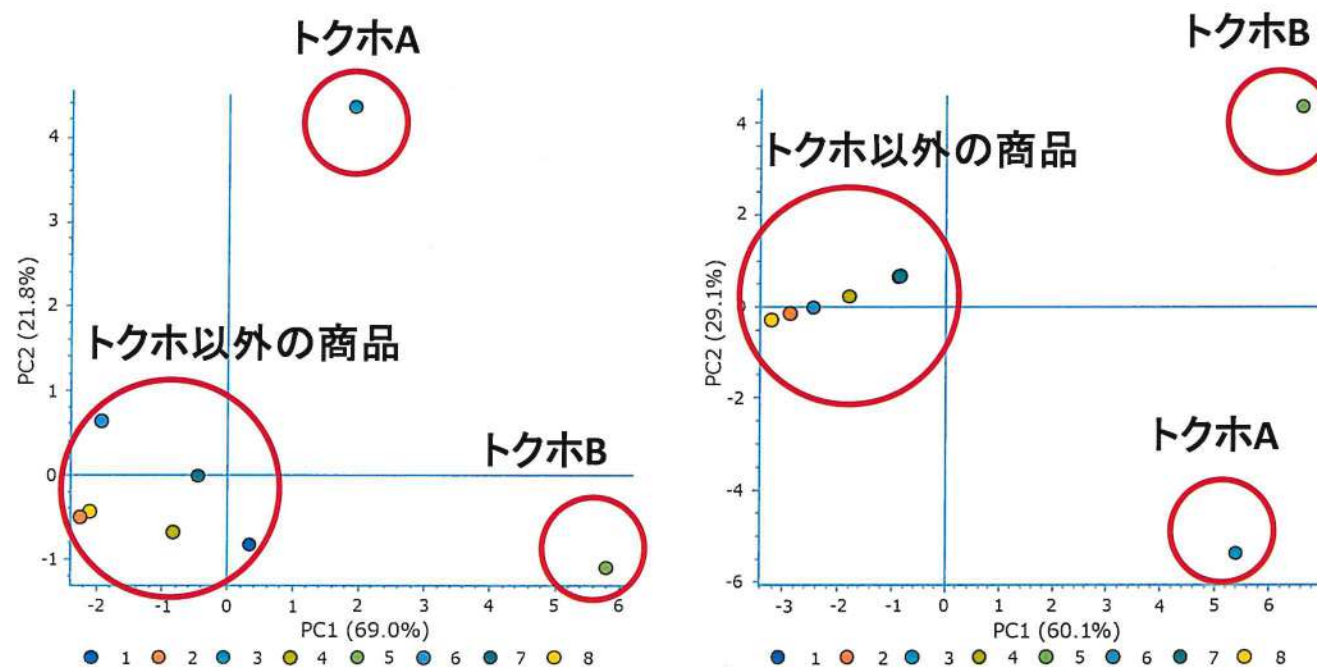


図 逆相モード(左)及びHILICモード(右)における主成分分析結果

【飲料中の苦味成分のスクリーニング及び構造推定】

飲料を摂取したときに感じられるわずかな苦味の原因を探るため、苦味の有無それぞれの試料の差異解析を行い、有意差のある成分の中から苦味の原因と推定される化合物をスクリーニングした。また、当該化合物のデータベース検索結果及びMS/MSスペクトル情報からその構造を推定した。

【飲料容器中の洗浄剤残存確認試験】

高分解能MSを用いて洗浄剤由来成分をスクリーニング分析してターゲットを探索し、飲料容器に洗浄剤が残存しているかどうか判定した。

【食品中に含まれる殺菌剤成分の定量分析】

標準品として入手困難な殺菌剤成分が食品中に含まれているか調査するために、殺菌剤を高分解能MSを用いて測定し、殺菌剤成分を検出する分析条件を構築した。

【化学繊維製品の洗浄水中の成分分析】

化学繊維製品を洗浄した排水中に含まれる成分を特定するために、高分解能MSを用いてスクリーニング測定を行った。検出した成分については、解析ソフトやデータベース等を使用して構造推定を行った。

【油の差異解析】

産地の異なる油製品を複数用意し、それぞれをグルーピングし、グループ間の主成分分析を行った。ローディングプロットから各グループの分離に寄与している化合物を選び、その組成式及び構造式を推定した。産地既知の試料が十分量サンプリング出来れば、産地判別も可能であると考えられる。

【河川中に含まれる界面活性剤のスクリーニング】

上流、中流、下流の3区分を対象にそれぞれ河川水をサンプリングし、LC-MS測定から得られたマススペクトル情報をデータベース検索に供すことで、各区分に含まれる界面活性剤のスクリーニングを行った。

LC-MSを用いた葉物野菜中の 主要な代謝物のスクリーニング

高橋洋武, 佐野勇気, 橘田 規, 照井善光
(一般財団法人日本食品検査)



一般財団法人 日本食品検査
Japan Food Inspection Corporation

目的

● 食物のエネルギー量や各種栄養素の含有量は、食品成分表等に詳細に掲載されているが、全ての成分が明らかになっているわけではない。そこで、未知の代謝物等をスクリーニングするために、Q Exactive Focusで網羅的に取得したデータを用いて、葉物野菜中の主要代謝物の化合物推定が可能を検討した。

対象サンプル

● 以下の12種類の葉物野菜を使用した。



前処理方法

【試料調製】

ドライアイスを用いた凍結粉砕法によって、サンプルを均一化した。



【測定溶液調製】

Bligh & Dyer Methodを用いた。メタノール/水混合層を測定溶液とした。



分析方法

【分析条件：LC条件】

装置：UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific製)
分析カラム：Discovery HS F5-3 (Merck製)
(2.1 mm I.D. × 150 mm, 3 μm)
移動相：強溶媒：0.1 vol% 硝酸含有アセトリル,
弱溶媒：0.1 vol% 硝酸

【解析ソフト】

・Compound Discoverer 2.1
(Thermo Fisher Scientific製)

【分析条件：MS条件】

装置：Q Exactive Focus
(Thermo Fisher Scientific製)
イオン化：ESI, pos及びneg
測定モード：Full MS及びddMS²
MS範囲：m/z 70~1050
分解能：70,000 (m/z 200)



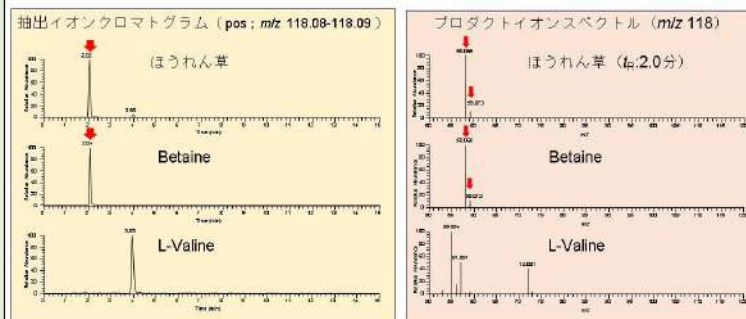
データ解析結果

● Compound Discoverer 2.1にて、葉物野菜12種類のデータをアライメントし、面積値の大きい2代謝物について化合物推定を行った。

名称	保持時間 (分)	推定精密質量	多く含まれる野菜
代謝物A	2.0	117.079	ほうれん草
代謝物B	1.8	129.042	小松菜、キャベツ

代謝物Aの化合物推定

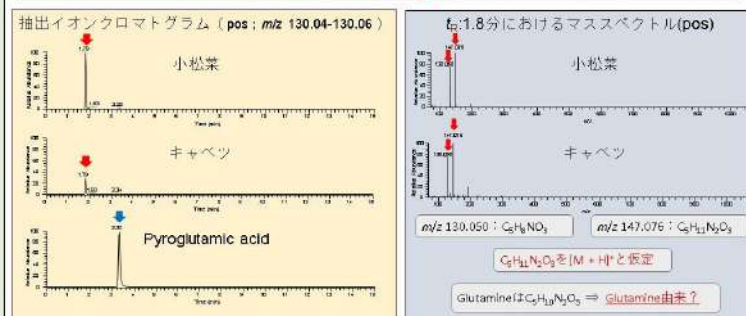
代謝物DatabaseでBetaineとL-Valineがヒット → BetaineとL-Valineの標準品を測定



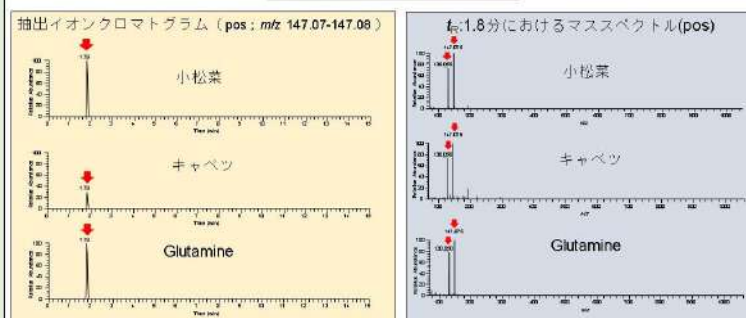
代謝物AはBetaineと推定された。

代謝物Bの化合物推定

代謝物DatabaseでPyroglutamic acidがヒット → Pyroglutamic acidの標準品を測定



Glutamineの標準品を測定



代謝物BはGlutamineと推定された。

まとめ

● 葉物野菜12種類を高分解能MSを用いて、網羅的にデータを取得し、ほうれん草、小松菜及びキャベツの主要な代謝物の化合物を推定することができた。
● 今回は葉物野菜を対象にしたが、対象サンプルを拡張して検討していきたい。また、主要な代謝物だけでなく、機能性成分等のサンプル特有の化合物等の探索に本手法を応用できるか検討していきたい。

LC-HRMS及びIC-HRMSを用いた 日本酒中の化学成分分析



一般財団法人 日本食品検査
Japan Food Inspection Corporation

高橋洋武, 佐野勇気, 橋田 規, 照井善光
(一般財団法人日本食品検査)

目的

●日本酒は冷やで飲む方法や、50℃程度に温める熱燗など、温度を変えて飲む方法が楽しまれており、その違いによって美味しさの感じ方も人それぞれである。そこで、日本酒中にどのような成分が含まれるか探索するとともに、日本酒を様々な条件下で前処理したときの成分変化について調査した。

試料及び前処理方法

●試料は以下の17種類の日本酒を用いた。

No.	メーカー	製品名	特定名称	精米歩合 (%)	火入れタイプ	醸造用アルコール	アルコール分 (%)
1	日駒	上撰白鶴なし粒生酒	不明	不明	生貯蔵	添加	13~14
2	月桂冠	香り豊やか純米大吟醸生酒	純米大吟醸酒	50	生酒	無添加	15~16
3	月桂冠	おしやべりクラ すっきりフルーティ	不明	不明	生酒	添加	14~15
4	月桂冠	大吟醸 (生詰)	大吟醸酒	50	生詰め	添加	15~16
5	宝酒造	松竹梅「源快」生酒	不明	不明	生酒	添加	13~14
6	宝酒造	松竹梅「源快」生酒 本醸造	本醸造酒	70	生酒	添加	15
7	大関	純米しほりたて	純米酒	73	生貯蔵	無添加	13~14
8	菊正宗	生もと大吟醸ひやあろし	大吟醸酒	50	生詰め	添加	15~16
9	菊正宗	生貯蔵酒300ml	不明	不明	生貯蔵	添加	14
10	旭酒造	泉路(だっさい) 雫外23	純米大吟醸酒	23	生酒	無添加	16
11	旭酒造	泉路(だっさい) 雫造早樽	純米大吟醸酒	45	生酒	無添加	16
12	興隆	山鹿仕込生貯蔵酒	本醸造酒	70	生貯蔵	添加	14
13	興隆	生もと山鹿仕込生貯蔵酒	本醸造酒	70	生詰め	添加	14
14	合同酒造	純米吟醸大雪乃蔵生貯蔵酒	純米吟醸酒	55	生貯蔵	無添加	13~16
15	朝日酒造	朝日山 特別本醸造	特別本醸造酒	60	生酒	添加	14
16	八海醸造	八海山 しほりたて 原酒 越後で候	不明	60	生酒	添加	19
17	興隆	生もと山鹿仕込生貯蔵酒	吟醸酒	55	生貯蔵	添加	15

●前処理方法は、2 mLガラスバイアルに試料を入れて次の処理を行った。

No.	前処理法	分取量
1	未処理	1.7 mL
2	加温 (50℃で30分)	1.7 mL
3	超音波 (10分)	1.7 mL
4	ボルテックス攪拌30分+振とう5分	0.5 mL



分析方法

[HPLC]

装置: UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific)
分析カラム: Discovery HS F5-3 (3 µm, 2.1×150 mm, Merck)
流速: 0.25 mL/min
カラム温度: 40 °C
移動相: A: 0.1 vol% 半酸含有アセトリル
B: 0.1 vol% 半酸

[HRMS]

装置: Q Exactive Focus (Thermo Fisher Scientific)
イオン化: ESI
測定モード: Full MS (pos/neg) 及び ddMS² (No.17)
MS範囲: m/z 70-1050
分解能: 70,000 (m/z 200)

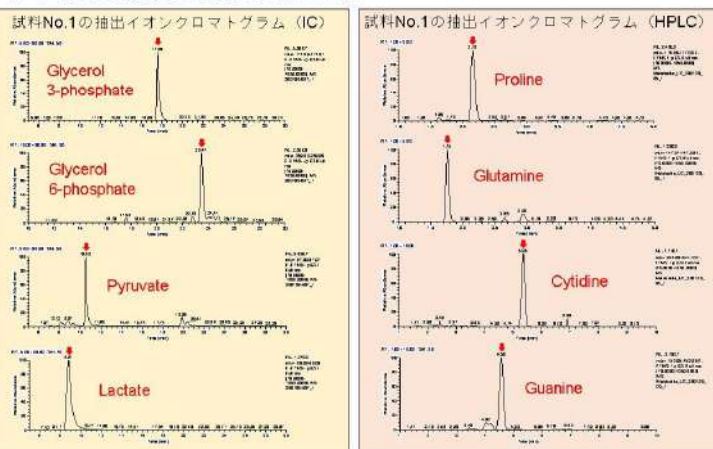


[IC]

装置: ICS-6000 (Thermo Fisher Scientific)
ガードカラム: IonPac AG11HC-4µm, 2×50 mm
分析カラム: IonPac AS11HC-4µm, 2×250 mm
溶離液ジェネレーター: KOH
流速: 0.25 mL/min
カラム温度: 30 °C
メークアップ溶液: メタノール
メークアップ溶液流速: 0.1 mL/min
サプレッサー: AERS500 2 mm
サプレッサー温度: 15 °C

①代謝物ターゲット分析結果

●代謝物標準品を用いてターゲット分析を行いNo.1~No.17すべての試料で検出した分析種について代表的なクロマトグラムを下記に示した。ただし、前処理の有無によって大きな濃度変化は見られなかった。

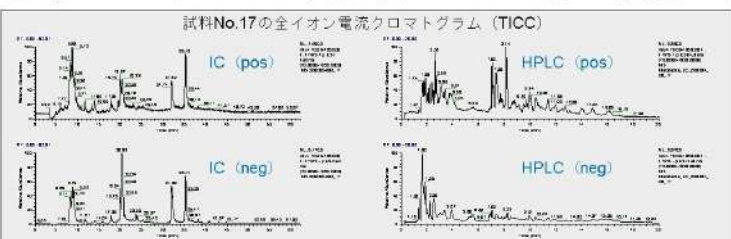


②ノンターゲット分析結果

●No.17の試料でノンターゲット分析を行った結果、次の化合物をm/zスコア^注 70以上で検出したが、前処理の有無によって大きなピーク面積変化は見られなかった。

IC	Name	Molecular Formula	HPLC	Name	Molecular Formula
	Diethyl phosphate	C ₄ H ₁₁ O ₅ P		L-Pyrogutamic acid/D-(+)-Pyrogutamic Acid	C ₅ H ₉ NO ₃
	L-Pyrogutamic acid/D-(+)-Pyrogutamic Acid	C ₅ H ₉ NO ₃		Acetylcholine	C ₇ H ₁₅ NO ₂
	Dimethyl phosphate	C ₄ H ₁₁ O ₅ P		N6-Methyladenine/1-Methyladenine/7-Methyladenine	C ₆ H ₉ N ₅
	Kynurenic acid	C ₁₀ H ₉ NO ₃		Pipecolic acid/D-(+)-Pipecolic acid/L-(+)-Pipecolic acid/Nipecolic acid	C ₈ H ₁₁ NO ₂
	5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde/Phloroglucinol/Malto/Pyrogalol (-)-Camphor/D-(+)-Camphor/D,L-Camphor/Citral/Pulegone	C ₁₀ H ₈ O ₃		Kynurenic acid/e-Cyano-3-hydroxycinnamic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₃
	cis,cis-Muconic acid	C ₆ H ₈ O ₄		α-Aspartylphenylalanine	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅
	1,5-Isosquinalindiol	C ₉ H ₉ NO ₂		Prolyleucine	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₃
	2-Methoxyresorcinol	C ₇ H ₈ O ₃		(15Z)-9,12,13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₅

注: Compound Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific) で解析した際に、mzCloudデータベースと照合した一致率を数値化したもの。

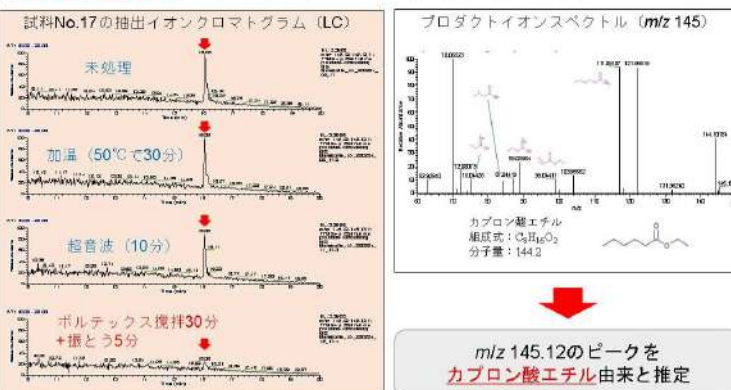


③香気成分ピークの前処理による変化

●No.17の試料で日本酒に含まれている可能性のある香気成分について抽出イオンクロマトグラム (EIC) で確認した。

化合物名	組成式	EICで確認	香り
カブロン酸エチル	C ₈ H ₁₆ O ₂	LC (pos) で検出	エステル
酢酸イソアミル	C ₈ H ₁₆ O ₂	IC (pos) で検出(複数ピーク)	エステル
イソアミルアルコール	C ₈ H ₁₈ O	不検出	アルコール
β-フェニルアルコール	C ₉ H ₁₀ O	IC (pos) で検出(複数ピーク)	花様
4-ビニルグアイアコール	C ₉ H ₁₆ O ₂	LC (pos) で検出	香辛料様
ントロン	C ₉ H ₁₀ O	IC (pos), LC (pos) で検出(複数ピーク)	カラメル様
2-エチル-4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フランロン	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	不検出	カラメル様
酪酸	C ₄ H ₈ O ₂	LC (neg), IC (pos) (複数ピーク) で検出	酸香、チーズ様

●香気成分であるカブロン酸エチルと推定された化合物はNo.2、No.4、No.8、No.10、No.11、No.16、No.17で検出し、いずれの試料においても「ボルテックス攪拌30分+振とう5分」の前処理を行うとピーク面積が大きく減少した。



まとめ

●日本酒中に含まれる成分をIC/HRMS とLC/HRMSを用いて分析し、加温、超音波処理、酸化処理することで、日本酒の成分がどのように変化するか検討した結果、酸化処理 (ボルテックス攪拌30分+振とう5分) によりカブロン酸エチルと推定されたピークの消失が認められた。

●今回得られたデータの解析をさらに進め、各日本酒の特徴を多変量解析によって明らかにしたい。また、今回は日本酒を対象にしたが、日本酒だけでなく様々な飲料でも検討を行ってきたい。

生鮮野菜中のβ-ニコチンアミドモノヌクレオチド 及び周辺代謝物分析



一般財団法人 日本食品検査
Japan Food Inspection Corporation

高橋洋武, 佐野勇気, 橘田 規, 照井善光
(一般財団法人日本食品検査)

はじめに

β-ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) は、リボースとニコチンアミドの構造を有するヌクレオチドであり、近年健康食品や化粧品等に配合され注目を集めている成分である。NMNは図1や図2に示すように、生体内や植物中の代謝において、重要な役割を果たしている。そこで、今回LC-HRMSを用いてNMNとその周辺代謝物の分析法を開発し、生鮮野菜中の含有量について調査した。

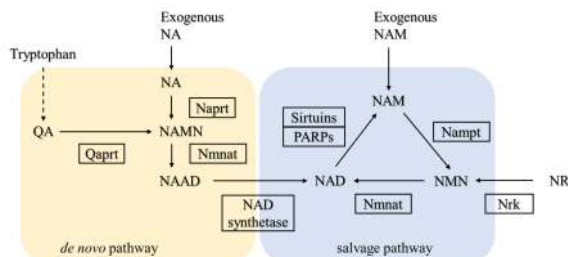


図1 哺乳類におけるNADの生合成経路¹⁾

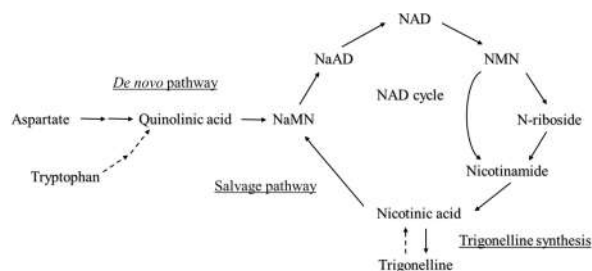
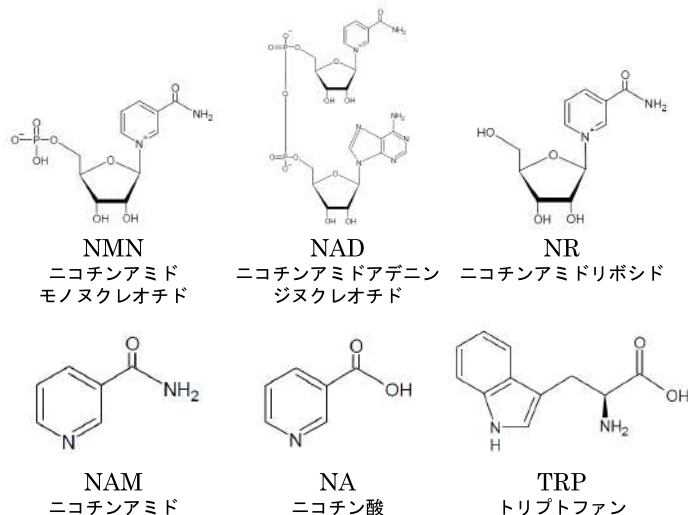


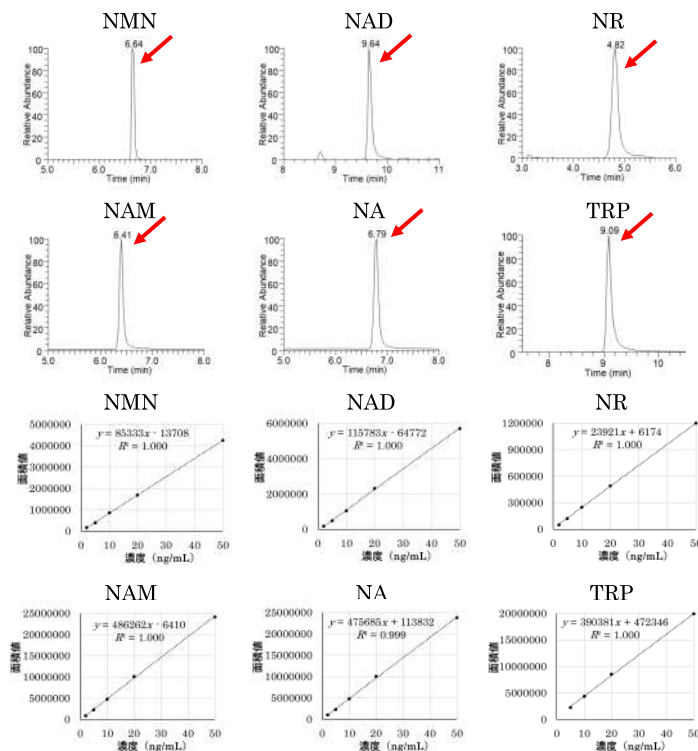
図2 コーヒーにおけるトリゴネリン合成経路²⁾

分析対象化合物



分析対象化合物	m/z	極性
NMN (Nicotinamide mononucleotide)	335.064	Positive
NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide)	664.116	Positive
NR (Nicotinamide riboside)	255.098	Positive
NAM (Nicotinamide)	123.055	Positive
NA (Nicotinic acid)	124.039	Positive
TRP (Tryptophan)	205.097	Positive

クロマトグラム及び検量線



生鮮野菜の測定

1 対象試料

トマト アボカド ブロccoli もやし さといも



2 含有量及び定量下限

化合物	トマト	アボカド 皮なし	アボカド 皮付き	ブロッコリー	もやし	さといも 皮なし	さといも 皮付き
NMN	0.82 (0.02)	<0.1	0.3 (0.1)	<0.1	0.05 (0.02)	0.2 (0.1)	0.2 (0.1)
NAD	0.7 (0.1)	<0.7	<0.5	<0.3	0.6 (0.1)	<0.7	<0.6
NR	<0.1	11 (0.1)	39 (0.1)	11 (0.1)	0.1~0.2 (0.1)	<0.1	<0.1
NAM	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
NA	<0.1	0.5 (0.1)	0.1~0.2 (0.1)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
TRP	0.80 (0.05)	0.8 (0.4)	0.7 (0.3)	15 (0.2)	10 (0.05)	14 (0.3)	11 (0.3)

単位: mg/100 g; 上段は含有量、下段の括弧内は定量下限
※上記結果は自主的な分析に基づく数値です。上記結果の第三者による無断利用は固くお断りいたします。

まとめ

生鮮野菜中のNMNとその周辺代謝物を測定した結果、5種類の野菜中でNMNが最も多く含まれているのは、トマトであった。また、アボカドやブロッコリーにはNRが多く含まれていることがわかった。今後の課題として、保存や調理等によって、含有量がどのように変化するかの検討を進めたい。

1) 夜久圭介, 中川 崇: 基礎老化研究, 41(1), 23-27 (2017).

2) H. ASHIHARA: Braz. J. Plant Physiol, 18(1), 1-8 (2006).