

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, 橘田 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	白鶴	上撰白鶴ねじ生貯蔵酒	不明	不明	生貯蔵	添加	13~14
2	月桂冠	香しきやう純米大吟醸生酒	純米大吟醸酒	50	生酒	無添加	15~16
3	月桂冠	おしゃべりクラ 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「豪快」生酒	不明	不明	生酒	添加	13~14
6	宝酒造	松竹梅「豪快」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	生もと大吟醸ひやおろし	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	獺祭(だっさい)等外23	純米大吟醸酒	23	生酒	無添加	16
11	旭酒造	獺祭(だっさい) 寒造早稲	純米大吟醸酒	45	生酒	無添加	16
12	黄桜	山鹿仕込 生貯蔵酒	本醸造酒	70	生貯蔵	添加	14
13	黄桜	生もと山鹿 本醸造ひやおろし	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	13~14
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後継	不明	60	生酒	添加	19
17	黄桜	生もと山鹿 本醸造ひやおろし	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)



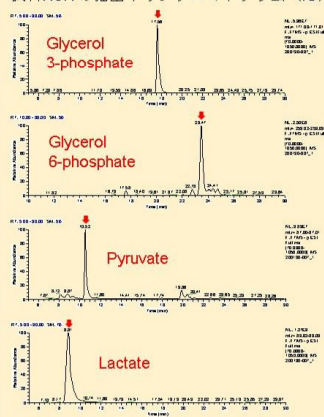
[IC]

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

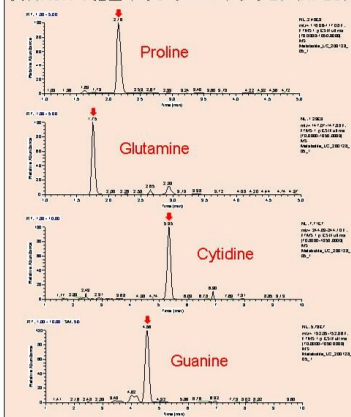
①代謝物ターゲット分析結果

●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。

試料No.1の抽出イオンクロマトグラム (IC)



試料No.1の抽出イオンクロマトグラム (HPLC)

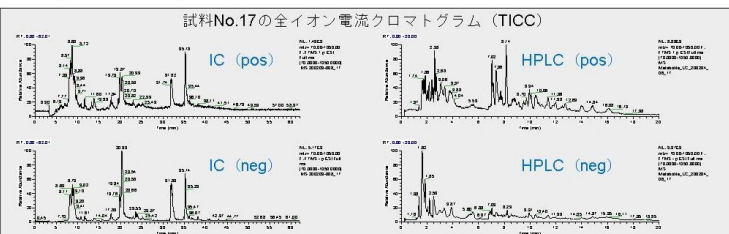


②ノンターゲット分析結果

●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 ₄ P	L-Pyrogutamic acid/D-(+)-Pyrogutamic Acid		C ₅ H ₇ NO ₃
L-Pyrogutamic acid/D-(+)-Pyrogutamic Acid		C ₅ H ₇ NO ₃	Acetylcholine		C ₇ H ₁₅ NO ₂
Dimethyl phosphate		C ₂ H ₇ O ₄ P	N6-Methyladenine/1-Methyladenine/7-Methyladenine		C ₆ H ₇ N ₅
Kynurenic acid		C ₁₀ H ₇ NO ₃	Pipecolic acid/D-(+)-Pipecolic acid/L-(+)-Pipecolic acid/Nipecolic acid		C ₈ H ₁₁ NO ₂
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde/Phloroglucinol/Maltol/Pyrogallol (-)-Camphor/D-(+)-Camphor/D,L-Camphor/Citral/Pulegone		C ₆ H ₆ O ₃	Kynurenic acid/α-Cyano-3-hydroxycinnamic acid		C ₁₀ H ₇ NO ₃
cis,cis-Muconic acid		C ₆ H ₆ O ₄	α-Aspartylphenylalanine		C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₅
1,5-Isoquinolinediol		C ₉ H ₇ NO ₂	Prolyleucine		C ₁₁ H ₂₀ 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 Discoverer2.1 (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。

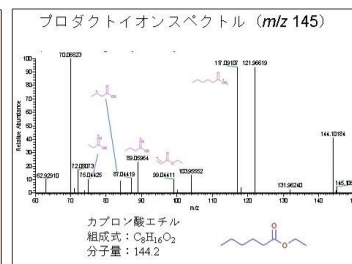
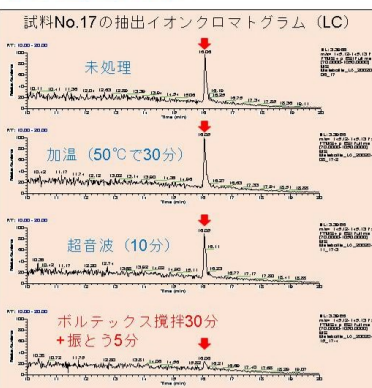


③香気成分ピークの前処理による変化

●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 ₇ H ₁₄ 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 ₆ H ₁₂ O	不検出	アルコール
β-フェニルアルコール	C ₈ H ₁₀ O	IC (pos) で検出(複数ピーク)	花様
4-ビニルグアイコール	C ₈ H ₁₀ O ₂	LC (pos) で検出	香辛料様
ソトロノ	C ₆ H ₈ O ₃	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	C ₉ H ₁₂ O ₃	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	銀杏、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。



m/z 145.12のピークを
カブロン酸エチル由来と推定

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。