

ワインの判別： UHPLC ESI/Q-TOF MS を使用した 代謝物分析とプロファイリング

アプリケーションノート

著者

Shen Han, Jinhua Wang, Ying Liu, and
Qi Zhou
Beijing Entry-Exit Bureau of Inspection
and Quarantine
Beijing, China
Meiling Lu, Shan Zhou
Agilent Technologies China
Beijing, China

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6530 Q-TOF LC/MS を用いた代謝物分析および多変数統計解析をワインの代謝物プロファイリングに使用したときの利点について説明します。これらを使用することで、フランスや中国などの異なる地域で生産されたワインを判別し、ワインバイオマーカーを特定できるようになります。

はじめに

ワインの化学組成はさまざまな要因によって異なります。この違いは、主にブドウの種類、気候や土壌などの生育条件、ワインメーカーの栽培方法によって生じます。さらに、酵母株、発酵、熟成課程もワインの風味や品質に影響を与える可能性があります。現在では、クロマトグラフィーと真度および分離能の高い質量分析装置との組み合わせが、ワインの代謝物プロファイリングのためのメソッドとして広く受け入れられています。このメソッドはワインの化学的多様性の分析に日常的に使用されており [1~3]、ワインバイオマーカーの検出に有効です。このアプリケーションノートでは、ワインの品質管理および偽装表示を防止させる可能性について詳細に説明します。この実験では超高性能液体クロマトグラフィー (UHPLC) とエレクトロスプレーイオン化 Q-TOF (ESI-Q-TOF) 質量分析計に加えて、多変数統計解析をワインのプロファイリングに使用しました。この実験の目的は、中国とフランスのさまざまな地域から得られたワインを判別する特性を見つけることです。



Agilent Technologies

実験方法

サンプル前処理

0.22 µm メンブレンを使用して事前にもろ過したワインサンプルについて、UHPLC グラジエント溶出に続いて MS スキャンモードのエレクトロスプレー Q-TOF 質量分析を行いました。次に、MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの取り込みデータから化合物を抽出し、分子特性抽出 (MFE) アルゴリズムを使用して、ノンターゲット法で抽出しました。抽出した化合物を化合物交換ファイル (.cef) としてエクスポートし、次にデータアライメント、フィルタリング、統計およびクラスタ分析のための計量化学ソフトウェアである Mass Profiler Professional (MPP) V.12.5 にインポートしました。溶媒ブランク中の特性は MPP 分析からは除外しました。最初に、すべてのサンプルの 25 % 未満に見られた特性を削除することでデータをフィルタリングしました。さらにフィルタリング手順を使用し、少なくとも 1 つのグループ内のすべてのファイルの 60 % 未満で現れ、変動係数 (CV) が 50 % 以上の化合物を削除しました。ワインのグループ内の大きな違いについて、残った化合物を ANOVA で分析し、主成分分析 (PCA) によって視覚化しました。得られた特徴的なマーカーをターゲット MS/MS 分析の対象にし、詳細に同定しました。

フランスおよび中国からの入出検査時に約 200 個のワインサンプルを取得しました。ここには、フランスの 4 つの主要な醸造所から得られた、1985 年から現在までの幅広い収穫時期のサンプルが醸造所ごとに 6 つ以上含まれていました。中国産ワインについては、3 つのブランドからそれぞれ 30 個のサンプルを入手しました。すべての中国産ワインはメーカーから直接入手したものです。不明ワインサンプルは、フランスの 4 つの醸造所の 1 つから得られたさまざまな収穫時期のものということでしたが、詳細な確認が必要でした。

使用機器

機器条件

LC 条件

機器

デガッサが組み込まれた Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ、温度制御を備えた 1290 Infinity オートサンブラ、1290 Infinity カラムコンパートメント

カラム

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、
2.1 × 100 mm、1.8 µm

カラム温度

30 °C

移動相

溶媒 A) 0.1 % FA/5 mM CH₃COONH₄ 水溶液、
溶媒 B) 0.1 % FA/5 mM CH₃COONH₄ メタノール/
水溶液 (95:5)

流量

0.4 mL/min

注入量

2 µL

ポストタイム

3 分間

グラジエント溶出 プロファイル

0~1 分、% B を 1 % で保持
1~8 分、% B を 1 % から 15 % に上昇
8~15 分、% B を 15 % から 45 % に上昇
15~17 分、% B を 45 % から 90 % に上昇
17~20 分、% B を 90 % で維持

ESI-Q-TOF MS 条件

機器

Agilent Dual Jet Stream テクノロジー搭載
Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システム

乾燥ガス温度

325 °C

乾燥ガス流量

11 L/min

ネブライザ圧力

45 psi

シースガス温度

350 °C

シースガス流量

12 L/min

キャピラリ電圧

3,500 V (ポジティブ)/3,000 V (ネガティブ)

ノズル電圧

500 V (ポジティブ)/1,000 V (ネガティブ)

フラグメンタ電圧

130 V

スキマ電圧

65 V

m/z スキャン範囲

MS で 100~1,100
MS/MS で 50~1,000

取り込みレート

MS で 2 スペクトル/秒
MS/MS で 3 スペクトル/秒

参照イオン

121.0509 および 922.0098 (ポジティブ)
112.9856 および 1,033.9831 (ネガティブ)

結果と考察

データの再現性

ワインに含まれる多くの化合物を、UHPLC 逆相グラジエント溶出を使用した LC カラムから溶出し、フルスキャンモードの ESI-Q-TOF MS 分析できます。これらの化合物はリテンションタイム、高真度の m/z (精密質量)、またはその両方によって分離できます。同じサンプルの 2 つの個別の注入を重ね表示すると (図 1)、リテンションタイムの再現性が 0.5 % (RSD) 以内であっただけでなく、参照イオンを使用したオンラインキャリブレーションが 5 ppm 未満の質量真度を維持していたことがわかります。

データの抽出

分子特性抽出 (MFE) アルゴリズムを 4 グループのフランス産ワインの取り込みデータに適用しました。すべてのイオン種が対応する共溶出プロファイルによって関連付けられました。各データファイルを MPP ソフトウェアにインポートし、アライメントし、リテンションタイムおよび m/z 別に保存しました。データアライメントの後、ポジティブおよびネガティブイオン化でそれぞれ最大 32,116 および 43,236 の物質が得られました。これをその後のデータフィルタリングの対象としました。

データのフィルタリング

前述のように得られたデータを、少なくとも 1 つの条件の 60 % 発生頻度と、変動係数が 50 % 未満のサンプル変動によって各グループ内でフィルタリングしました。残った物質を分散分析 (ANOVA, $p < 0.01$) と倍率変化 ($FC > 2$) によりさらにフィルタリングしました。4 つのグループの中で大きな違いを持つ、ポジティブイオン化で得られた 55 個の物質が残りました。元の全イオンクロマトグラムからこれらの物質を抽出することで、この物質のほとんどがサンプルに含まれる化合物であり、そのレベルがグループ内で大きく異なることがわかりました。EIC の例を図 2 に示します。この結果は、これらの物質が産地の異なるワインを判別するためのマーカーとして使用できることを示しています。

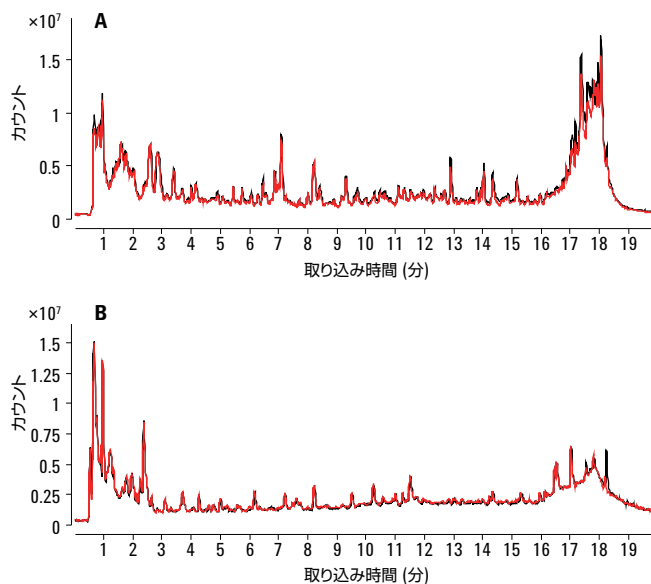


図 1. ポジティブ ESI とネガティブ ESI の両モードから得られた一般的な全イオンクロマトグラム。A. ポジティブ ESI。B. ネガティブ ESI

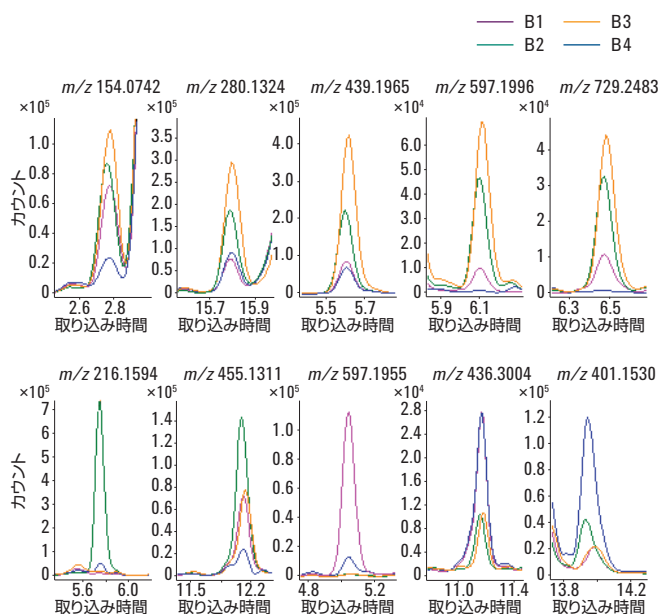


図 2. フランスの 4 つの醸造所のワインを判別するために使用できるマーカーの EIC。B2 および B3 は、上部の 5 つのマーカーにより B1 および B4 と判別でき、B2 は 216.1594 の m/z を使用して残りの 3 つとさらに判別することができます。B1 および B4 は 597.1955 および 401.1530 の m/z によって互いに判別できます。

主成分分析 (PCA)

前述の 55 個の物質の PCA 分析を行ったところ、4 つの異なるフランスの醸造所のワインは良好に分離されました (図 3)。この図から、成分 1 および 2 では B2 と B3 が近く (X、Y 平面)、成分 2 および 3 では分離できることがわかります (Y、Z 平面)。これは、B2 と B3 が他のグループと比べて比較的類似した化合物であることを示します。この結果は図 2 と一致しています。ここでは、ほとんどのマーカーが、B2 と B3 の違いが他の対と比べて比較的小さいことを示しています。

フランス産ワインと中国産ワインの判別

抽出した物質を使用して、フランスの醸造所から取得したワインを中国産ワインから分離できるかどうかを確認するために、中国の 2 つのブランドのワインで同じ分析を実施しました。主成分分析 (PCA) プロットから、中国産ワインがフランス産ワインと大きく異なることがわかりました (図 4)。産地不明のワイン群 (ピンク) は中国産ワインに類似していますが、調べた醸造所の 1 つからフランス産ワインとして販売されていました。

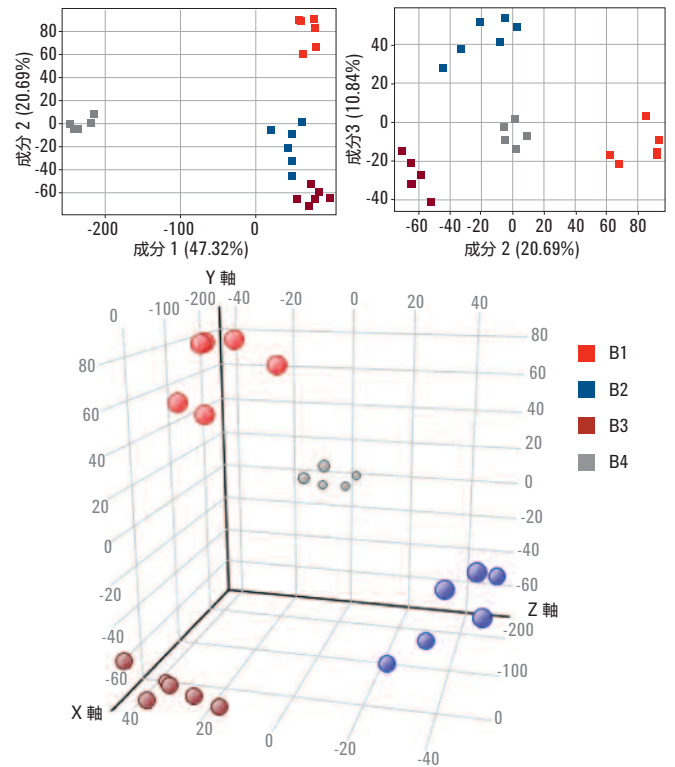


図 3. 4 つの醸造所 (フランス) の 2-D および 3-D 主成分分析 (PCA) プロット。ANOVA ($P < 0.01$) および倍率変化 ($FC > 2$) によってフィルタリングされた 55 個の物質に基づく 4 つのグループの明確な分離を示します。

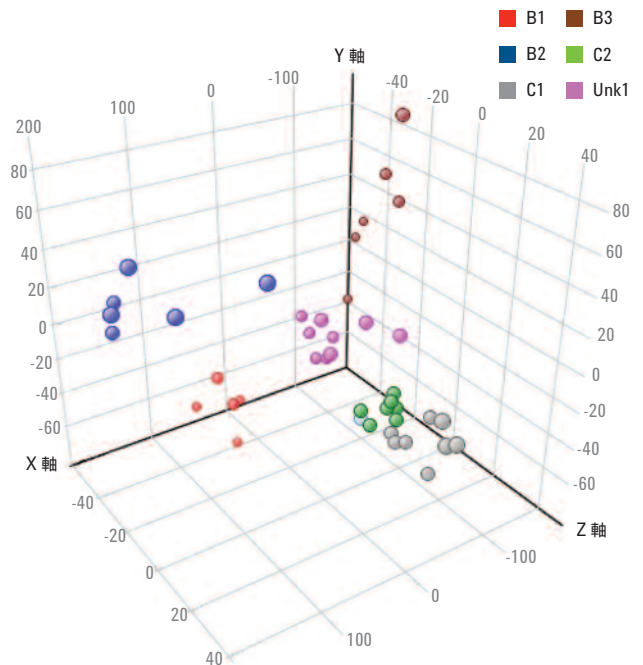


図 4. フランス産ワイン (B1~B3)、中国産ワイン (C1、C2)、および産地が不明な 1 つのサンプルワイン (Unk1) (4 つのフランス産ワインの MPP 分析後の 55 個の抽出物質からも不明) の PCA 分析

モデルの作成と予測

このメソッドによる産地不明のワインの同定能力を向上するために、フランス産ワインから抽出した物質を使用して部分最小二乗微分分析 (PLSDA) に基づくモデルを作成しました。図 5 に示すように、4つの醸造所のワインは互いに良好に分離できました。表 1 に示すマトリックスは、予測真度が 100% に達したことを示します。この実験は、平均予測信頼度が約 78% であり、優れたモデルを構築するためにより多くのサンプルが必要であることを示しています。

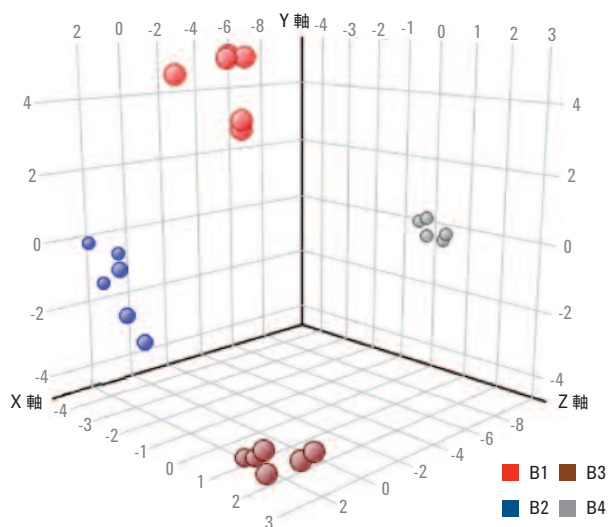


図 5. MPP 分析後の 55 個の抽出物質に基づく予測 PLSDA モデル

表 1. PLSDA モデルから得られたワインの予測真度は、平均予測信頼度が約 78% で優れた予測能力を示しました。

	B1	B2	B3	B4	真度
(真) B1	6	0	0	0	100.00
(真) B2	0	6	0	0	100.00
(真) B3	0	0	6	0	100.00
(真) B4	0	0	0	5	100.00
総合的な真度					100.00

マーカートの同定

得られた重要な物質でターゲット MS/MS 分析を行いました。ChemSpider データベースの化合物に一致した MS/MS フラグメントに基づいて候補化合物の仮の同定を行うために、取得した MS/MS スペクトルを MassHunter Molecular Structure Correlator にインポートしました。図 6 に示すように、1つのマーカートについて高い適合性スコア (> 90) で 2つの候補構造が得られました。

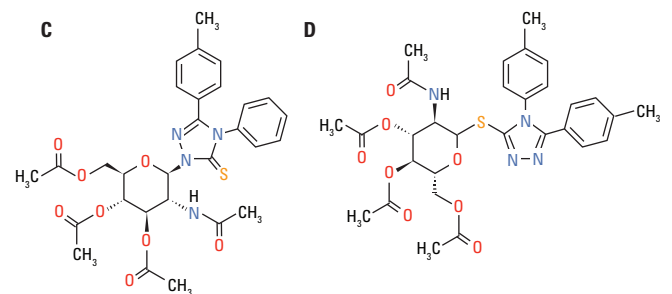
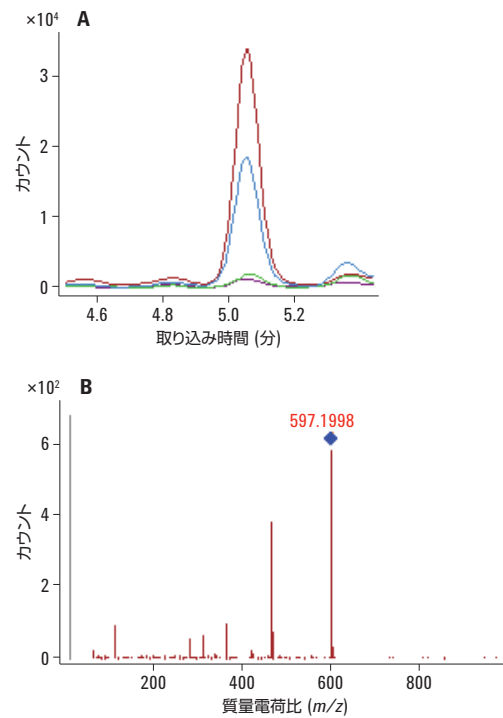


図 6. 1つの一般的なマーカートの仮の同定 (m/z 597.1955, t_R 5.045 分)。A) 1つのマーカートの EIC (m/z 597.1955, t_R 5.045 分)。B) マーカートのターゲット MS/MS 分析。C、D) 適合性スコア > 90 の 2つの候補構造を示す分子構造相関関係

結論

この実験では、精密質量 Q-TOF LC/MS が、さまざまな産地のワインで代謝物プロファイリングを行うためのパワフルな手法であることを示しました。分子特性抽出などのデータマイニング手法を MPP などの計量化学ソフトウェアと組み合わせることで、データの迅速なアライメントとフィルタリングに役立ちます。フランスの 4 つの主要な醸造所のワインから重要なマーカーが得られました。これらのマーカーを使用すると、この 4 つのワインのグループを判別するだけでなく、中国産の 2 種類のワインを判別することができます。不明なワインの割り当ても、他の手法で行った測定と一致しました。優れた真度と適切な信頼度を提供する PLSDA モデルを作成しました。モデルの構築にさらに多くの参照サンプルを組み込むと、構築したモデルを使用してサンプルを予測する際の信頼度がさらに向上します。ターゲット MS/MS を使用したマーカーの仮の同定後に、分子構造の相関関係を使用することで、いくつかの有力な候補化合物の絞り込みが可能で、さらに詳細に調べることができます。

参考文献

1. L. Vaclavik, O. Lacina, J. Hajslova, J. Zeigenbaum *Anal.Chim.Acta.*2011, **685**, 45.
2. A. Cuadros-Inostroza, P. Giavalisco, J. Hummel, *et al.Anal.Chem.*, 2010, **82**, 3573–3580.
3. F. Mandel, ASMS2011 Poster WP-222.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Printed in Japan

March 20, 2014

5991-3335JAJP



Agilent Technologies