

Accurate-Mass Q-TOF LC/MS と MFE、データベース、データマイニング、多変量解析手法の主成分分析を用いた食品種識別のアプローチ

アプリケーションノート

食品

著者

Alyson E. Mitchell, Jihyun Lee,
Department of Food Science and
Technology, University of California,
Davis
One Shields Avenue
Davis, CA 95616

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808

概要

タマネギは、重要な食事由来フラボノイドのひとつであるケルセチンの主要な供給源です。Agilent MassHunter PCDL Manager ソフトウェア、公開されている文献、Phenol-Explorer^{*1} および ChemSpider^{*2} などのオンラインデータベースを用いて、タマネギ固有のフラボノイドの精密質量データベースを作成しました。Agilent MassHunter 定性解析ソフトウェアを用いて、7 品種のタマネギの抽出物の Q-TOF LC/MS データを検索し、フラボノイドデータベースと一致するものを調べました。19 のフラボノイドが暫定的にライブラリ同定されました。ライブラリ同定されたフラボノイドに、Agilent Mass Profiler Professional 多変量解析ソフトウェアの主成分分析 (PCA) を適用し、各タマネギ品種の品種と色の違いとの関連を調べました。PCA により、品種と色が分類されました。MFE から抽出された未知化合物についても PCA も適用し、比較検討しました。これらの未知化合物の PCA については、タマネギ品種における特異性をもとにフィルタリングしました。この PCA では類似した結果が得られ、新たに暫定的にライブラリ同定された非アントシアニンフラボノイドの上位 10 の化合物についても、色と品種の関連性が示されました。

*1 Phenol-Explorer : <http://phenol-explorer.eu/>

*2 ChemSpider : <http://www.chemspider.com/>



Agilent Technologies

はじめに

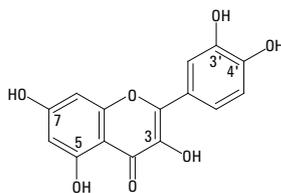
果実と野菜は、ビタミンやミネラル、食物繊維のほか、ポリフェノール性抗酸化物質、フラボノイド、カロテノイド、アルカロイド、グルコシノレートといった幅広い植物化学物質由来の非必須栄養素の主要な食物供給源です。これらの化合物の多くは、強い生物学的活性を示します。発現される生物活性植物性化学物質の範囲は、植物種や栽培品種によって異なります。生物活性植物性化学物質は、幅広い化学構造を有しています。植物由来のポリフェノール性生物活性化合物のうち、もっとも豊富なサブクラスであるフラボノイドは、アシル化、マロニル化、硫酸化、メチル化、グリコシル化といった多くの化学的修飾を経ることがあります。グリコシド形態については、単糖、二糖、三糖が置換されることがあります。果実や野菜の摂取に伴う健康上の利点は、おもにこうした生物活性植物性化学物質の相乗活性に起因するものと考えられています。

米国において、重要な食物由来フラボノイドであるケルセチンの供給源となっているのは、生重量で 210 mg/kg を含むタマネギと、生重量で 30 mg/kg を含むリンゴです。興味深いことに、ほとんどのヒトおよび細胞培養データは、食品中では見られないケルセチン形態から導き出されたものです (図 1)。

遺伝的特徴は、食品中フラボノイドの生合成に影響を与える主たる要因です。しかし、フラボノイドの量は、農業的および環境的な要因の影響も受けることがあります (たとえば、土壌改良、生育地域、紫外線照射など)。

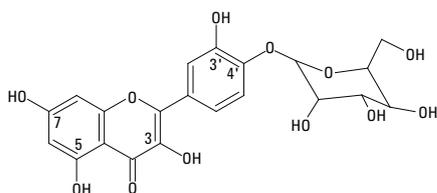
品種や生育時期および地域、加工、保存、包装などが生物活性化学物質の組成にどのような影響を与えるかについては、現時点ではほとんどわかっていません。同様に、そうした要因が食品の栄養価に及ぼす影響も、十分に理解されていません。そうした知識の欠如により、医療目的および個人に応じた栄養上の目的で食品を利用したり、一貫した量の生物活性物質を含む食品ベースの製品を製造したりすることが難しくなっています。

このアプリケーションノートでは、タマネギをモデルとして、Accurate-Mass Q-TOF LC/MS と Agilent MassHunter PDCL Manager ソフトウェア、MassHunter 定性解析ソフトウェア、MassHunter Mass Profiler Professional 多変量解析ソフトウェアを用いて品種の違いを識別する方法を検証しました。標準物質は使用せず、ノンターゲットおよびアンノウン・アプローチ解析しました。Accurate Mass Q-TOF LC/MS を用いたタマネギ品種識別アプローチに関するこの研究の補足レポートは、Physical Methods in Food Analysis, ACS Symposium Series で公開されています [1]。



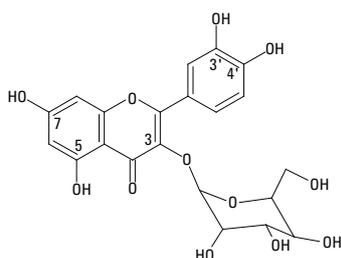
ケルセチンアグリコン (I)

細胞培養研究、臨床試験で使用され、成分として販売されているもの。



ケルセチン-4'-O-β-D-グルコシド (II)

タマネギ中でおもに見られる形態。



ケルセチン-3-O-β-D-ガラクトシド (III)

リンゴ中でおもに見られる形態。

図 1. ケルセチン形態の例

実験方法

実験手順の詳細な説明は、Physical Methods in Food Analysis, ACS Symposium Series の補足レポートに記載されています [1]。

サンプル前処理

黄タマネギ 4 品種 (カウボーイ、チーフ、バケーロ、サマセット) と赤タマネギ 3 品種 (レッドロック、サルサ、メレンゲ) を Gills Onion 社 (カリフォルニア州オックスフォード、米国) から入手し、分析しました。

一般的な抽出手順を用いて、ノンターゲット分析を実施しました。タマネギの果皮部を除去して果肉部を凍結乾燥させ、80 % MEOH で 20 分にわたって抽出しました。果肉部のアントシアニン(赤色)の量が限られているため、アントシアニンは解析対象から除外されました。抽出は 3 回繰り返して行いました。

使用機器

抽出したサンプルの分析は、Agilent 1290 Infinity LC システムと、Agilent Jet Stream テクノロジーを搭載した Agilent 6530 Accurate-Mass 四重極飛行時間型 (Q-TOF) LC/MS システムを使用しました。1290 Infinity LC システムは、一体型真空デガッサ搭載バイナリポンプ (G4220A)、オートサンブラ (G4226A) とサーモスタット (G1330B)、カラムコンパートメント (G1316C) を搭載しています。1290 Infinity LC システムのパラメータを表 1 に示しています。

表 1. Agilent 1290 Infinity LC システムパラメータ

機器	Agilent 1290 Infinity LC システム
移動相	(A) 0.1 % ギ酸を含む水、初期 5 % B (B) 0.1 % ギ酸を含むアセトニトリル
グラジエント	直線
時間 (分)	%B
	0-5 5-10
	5-8 10-12
	8-10 12-15
	10-15 15
	15-18 15-55
	18-20 55-90
流量	0.4 mL/min
カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、 2.7 μm (p/n 695775-902)
ポストランタイム	4 分、初期移動相
温度	30 °C
注入量	5 μL

サンプルの Q-TOF LC/MS 分析を実施しました。存在する可能性のあるすべてのフラボノイドを同定するために、機器メソッドをできるだけ広く設定しました。m/z 100~1,000 の質量範囲において、ネガティブモードとポジティブモードの両方でデータ採取しました。一般に、エレクトロスプレーイオン化では、比較的極性の低い化合物を除き、幅広い化合物がイオン化されます。フラボノイドでは良好な反応が得られると予想されますが、その相対レスポンスは、内在的化学構造 (抱合部位、糖の種類、アシル化など) の影響を強く受けます。

一部のフラボノイドはポジティブイオンモードでのみ、また別のフラボノイドはネガティブモードでのみ応答しました。両モードで応答したフラボノイドについては、どちらかのモードが高いイオン化効率を示していた可能性があります。Q-TOF MS パラメータを表 2 に示しています。

表 2. Q-TOF MS パラメータ

機器	Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS システム
イオン化モード	ポジティブおよびネガティブエレクトロスプレー、 Agilent Jet Stream テクノロジー
採取レート	1.0 スペクトル/秒
質量範囲	100-1,000 m/z
乾燥ガス温度	225 °C
乾燥ガス流量	8.0 L/min
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	10.0 L/min
ネプライザガス	45 psi
スキマー電圧	65 V
オクタポール RF	750 V
フラグメンタ	125 V
キャピラリ	2.5 kV

ネガティブイオンモードで、スペクトル補正により、概ね 2 ppm を上回る精密質量精度で測定を行いました。

データ解析

データ解析は、次の 4 ステップで実施しました。

1. フラボノイドデータベースを作成し、タマネギ分析に合わせてカスタマイズしました。
2. Q-TOF LC/MS シングル MS 分析で得られたデータを検索し、フラボノイドデータベースと一致するものを調べ、一致度にスコアをつけました。
3. 化合物の一致度 (ノンターゲット分析結果、標準物質を同定や確認に用いない分析結果) をもとに、各タマネギ品種の品種および色の違いに関する主成分分析 (PCA) を適用しました。
4. タマネギ品種で検出される可能性のあるすべての化合物 (未知、マッチングは使用せず) の PCA を適用し比較検討しました。

データベースの作成

Phenol-Explorer および ChemSpider などのデータベースを含む公開の文献を用いて、150 のフラボノイド候補を特定しました。これには、タマネギ中に存在する可能性のある抱合形態も含まれます。各フラボノイドの分子式を MassHunter PCDL Manager ソフトウェア (図 2) に入力し、PDCL データベースを作成しました。入力した分子式を用いて、MassHunter PCDL Manager ソフトウェアが自動的に精密な質量を計算します。この PDCL データベースを MassHunter 定性解析ソフトウェアで使用し、各サンプルから得られたデータファイルを検索し、これらの化合物と一致するフラボノイドを調べました。

MassHunter PCDL Manager ソフトウェアでは、化合物名、IUPAC 名、関連注記、リンク、化学構造、その他の有益な情報を入力することができます。化学構造を .mol フォーマットで利用できる場合は、インポートされた .mol ファイルを用いて、ソフトウェアが分子式と精密質量を計算します。MassHunter PCDL Manager ソフトウェアでは、データベース中の化合物について、精密質量 MS/MS スペクトルを追加することができます。MassHunter PCDL Manager ソフトウェアを使えば単純な検索を実行できますが、完全なデータファイル検索には、MassHunter 定性解析ソフトウェアを使う必要があります。

Compound Name	Formula	Mass	Anion	Cation	RT (min)	CAS	ChemSpider	IUPAC Name	Num Spectra
Kaempferol 3-O-(6'-malonyl)-glucoside	C24H22O14	534.10096	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	10.659				0
Kaempferol 3-O-rutinoside	C27H30O15	594.15847	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	10.886				0
Dihydroquercetin	C15H12O7	304.05930	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	11.250		458	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	0
Quercetin 3-O-glucoside	C21H20O12	464.09548	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	12.900		4444361	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl-O-beta-D-glucopyranoside	0
Quercetin 4-O-glucoside	C21H20O12	464.09548	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16.640		4478811	2-hydroxy-4-(3,5,7-trihydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-O-beta-D-glucopyranoside	0
Kaempferol 3-O-xyloxy-rutinoside	C32H38O19	726.20073	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16.720				0
Quercetin 3-O-rhamnoside	C21H20O11	448.10096	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16.787		4444112	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl-O-beta-D-rhamnopyranoside	0
6,8-Dihydroxykaempferol	C15H12O8	320.06322	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16.940				0
Isohammetin 4-O-glucoside	C22H22O12	478.11113	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16.980				0
Quercetin	C15H10O7	302.04265	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	17.580		4444051	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one	0
Kaempferol	C15H10O6	286.04774	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	18.110		4444395	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one	0
Isohammetin	C16H12O7	316.05930	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	18.183		4444973	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one	0

図 2. Agilent MassHunter PCDL Manager ソフトウェアを用いて、タマネギ分析の精密質量 PDCL データベースを作成しました。

データベース検索

MassHunter 定性分析ソフトウェア (図 3) を用いて、データ解析のステップ 1 で作成した PCDL データベースに照らして、Q-TOF LC/MS で得られたデータを検索しました。具体的には、ソフトウェアの Find-by-Formula 機能を用いて、精密質量の許容範囲を設定したのち、予想される同位体、付加物 (H⁺、Na⁺ など)、二量体、三量体などのイオンのデータファイル検索を適用しました。

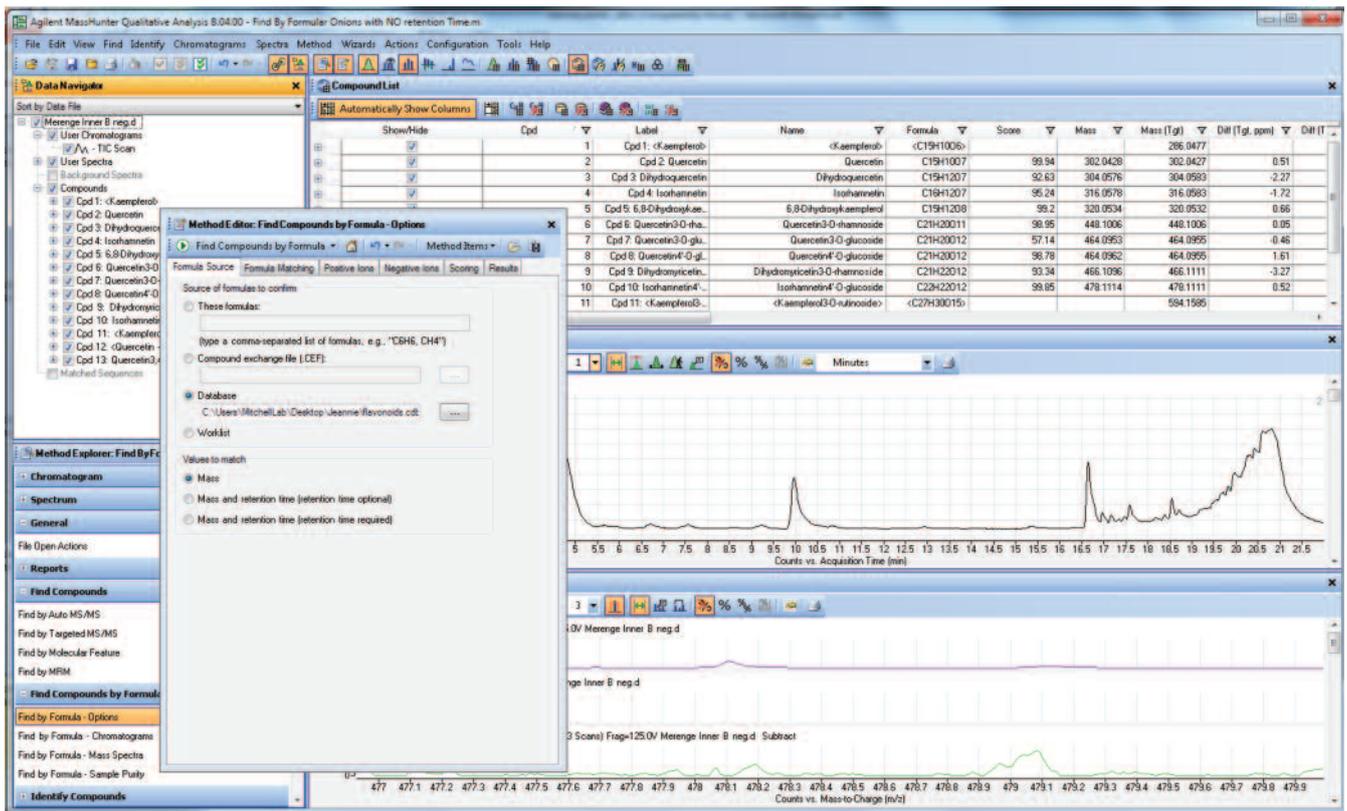


図 3. Agilent MassHunter 定性分析ソフトウェアを用いてデータを検索し、フラボノイドデータベース中の分子式との一致度を調べました。

分子式の精密質量およびその分子式に関して予想される同位体パターンをもとに、実験で測定した各イオンの質量を評価しました。このデータを用いて、イオンとデータベースの一致度にスコアをつけました (図 4)。このアプローチを用いて、標準物質を使用せずに、ソフトウェアにより各フラボノイドを暫定的にライブラリ同定しました。このアプローチのことを、「ノンターゲット化合物のターゲット検索」と呼んでいます。

質量、同位体質量、同位体存在比が正確に一致しても、確認されるのは分子式のみで、それが間違いなくデータベースにある化合物かどうかは確認できません。標準物質を使用しない場合、MS/MS により得た補足的な情報を使えば、より間違いのない同定を行うことが可能です。標準物質を利用できる場合は、リテンションタイムと MS/MS もデータベースに追加し、一致度のスコアづけに使用することができます。確認にあたっては、サンプルと同じ条件で分析した標準物質との比較が必要となります。

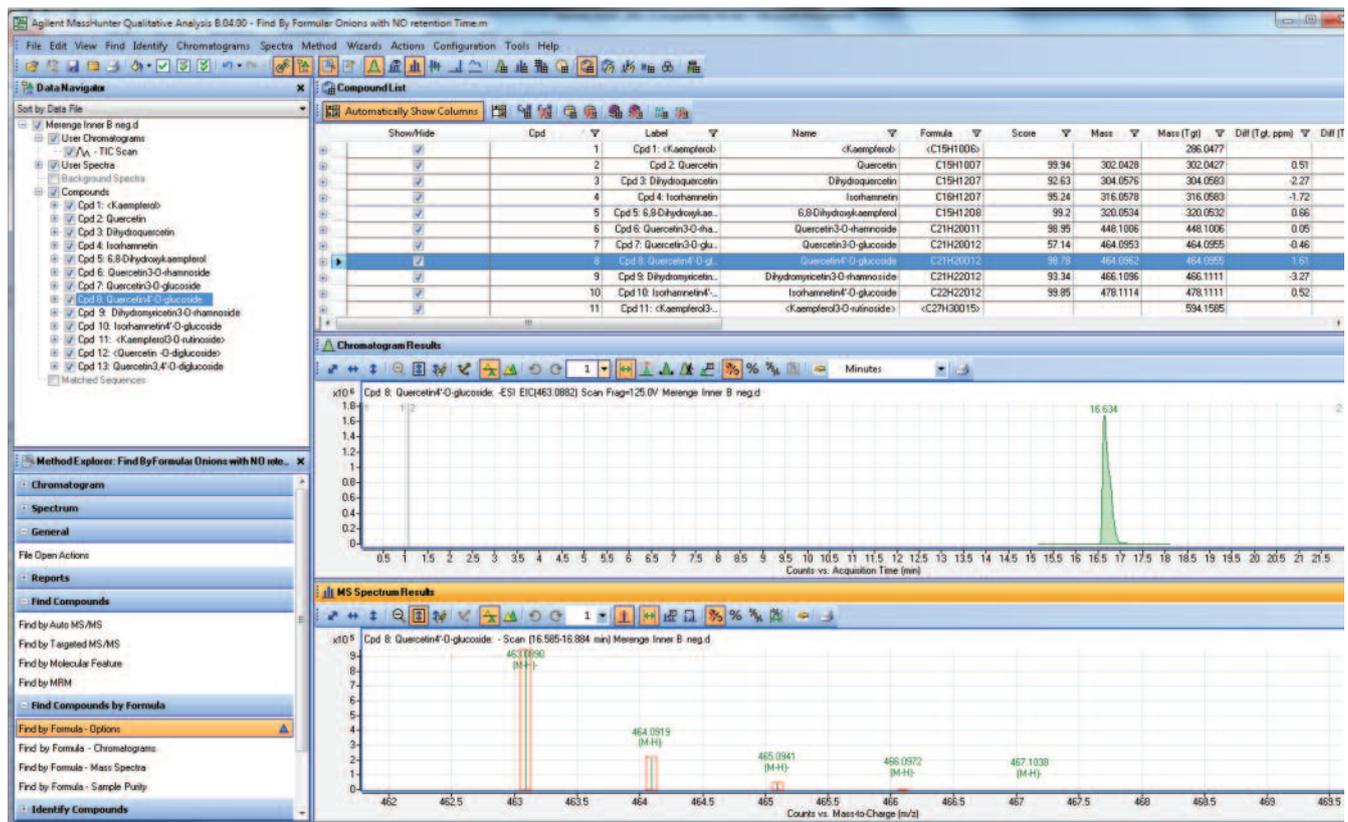


図 4. Agilent MassHunter 定性解析ソフトウェアを用いて、測定した質量、同位体存在比 (アバンダンスおよびスペーシング) を理論上の計算値と比較し、フラボノイドの一致度を調べ、スコアをつけました。

主成分分析

各タマネギ品種について、暫定的にライブラリ同定されたフラボノイドのリストを作成した後、MassHunter Mass Profiler Professional 多変量解析ソフトウェアの主成分分析 (PCA) 機能を用いてさらに検討を進め、品種と色の違いを調べました。PCA を 2 通りの方法で実施しました。どちらのアプローチも、化合物リストが得られるように設計されています。1 つはデータベース検索により暫定的にライブラリ同定された化合物のリスト、もう 1 つは未知化合物のリストです。

最初に実施した PCA は、データベースで検出された一致にもとづくものです。第 2 のアプローチでは、MFE を用いて、すべての品種の TIC で検出されたすべての化合物候補を抽出しました。その後、特定の品種と別の品種における存在の有無をもとに、検出された未知化合物をフィルタリングしました。MassHunter 定性分析ソフトウェアの MFE 機能では、クロマトグラフィー上のピークに該当するすべてのイオンをピックアップし (したがってバックグラウンドイオンを排除し)、付加物クラス、同位体候補、二量体、三量体などによりグループ分けします。それらすべての情報が、分子特性としてまとめられます。その後、各特性が計算され、分子質量が算出されます。化合物の同定は実行されません。このアンノウン・アプローチによるデータマイニングを用いれば、特徴的な化合物を同定しなくても、品種の違いを識別することが可能です。

結果と考察

Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 分析

抽出タマネギサンプルの TIC はあまり特徴的なものではありませんが、そこには多くの化合物に該当する多くのイオンが含まれています。メレンゲ品種の果肉の TIC を図 5 に示しています。

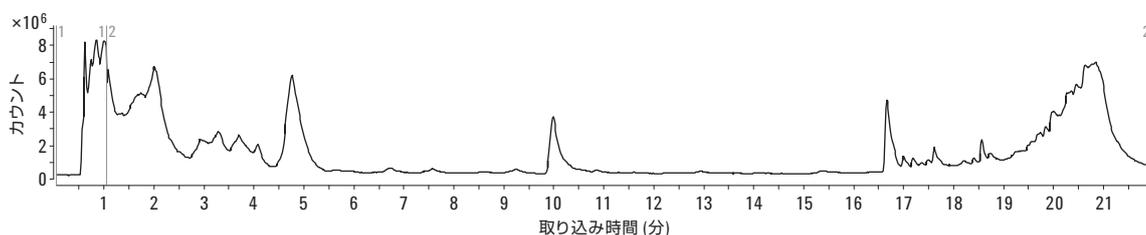


図 5. メレンゲ品種の TIC

データベース検索結果

MassHunter 定性分析ソフトウェアの Find-by-Formula 機能を用いて、作成されたフラボノイドデータベースを検索したところ、7 つのタマネギ品種で 19 のフラボノイドが暫定的にライブラリ同定されました (表 3)。

表 3. 作成したデータベースをもとに Agilent MassHunter 定性分析ソフトウェアの Find-By-Formula 機能により、暫定的に同定されたフラボノイド

デルフィニジン 3-O-(6"-マロニル-グルコシド)
ジヒドロケンペロール
ジヒドロミリセチン 3-O-ラムノシド
ジヒドロケルセチン
イソラムネチン
イソラムネチン 4'-O-グルコシド
ケンペロール
ケンペロール 3-O-(6"-マロニル-グルコシド)
ケンペロール 3,7-O-ジグルコシド
ケンペロール 3-O-アセチル-グルコシド
ケンペロール 3-O-ルチノシド
ケンペロール 3-O-キシロシル-ルチノシド
ケルセチン
ケルセチン 3,7,4'-トリグルコシド
ケルセチン-O-ジグルコシド
ケルセチン 3,4'-O-ジグルコシド
ケルセチン 3-O-グルコシド
ケルセチン 3-O-ラムノシド
ケルセチン 4'-O-グルコシド

主成分分析 (PCA) 結果

PCA スコアプロットにより、サンプル間のデータの違いが示されました。たとえば、PDCL データベース検索により暫定的にライブラリ同定された 19 のフラボノイドをもとにした 7 つのタマネギ品種の PCA スコアプロットでは、各品種が良好に区別されました (図 6)。タマネギの果肉で分析を行い (抽出溶媒によりアントシアニジンを除く)、各品種の区別は、色素に関連する化合物にもとづくものではありません。カウボーイ品種とサマセット品種は互いに近い位置にグループ分けされました (違いが小さい)。チーフ、バケーロ、サルサも同様でした。赤タマネギ品種のレッドロックとメレンゲは、ほかの品種とは明確に区別されました。

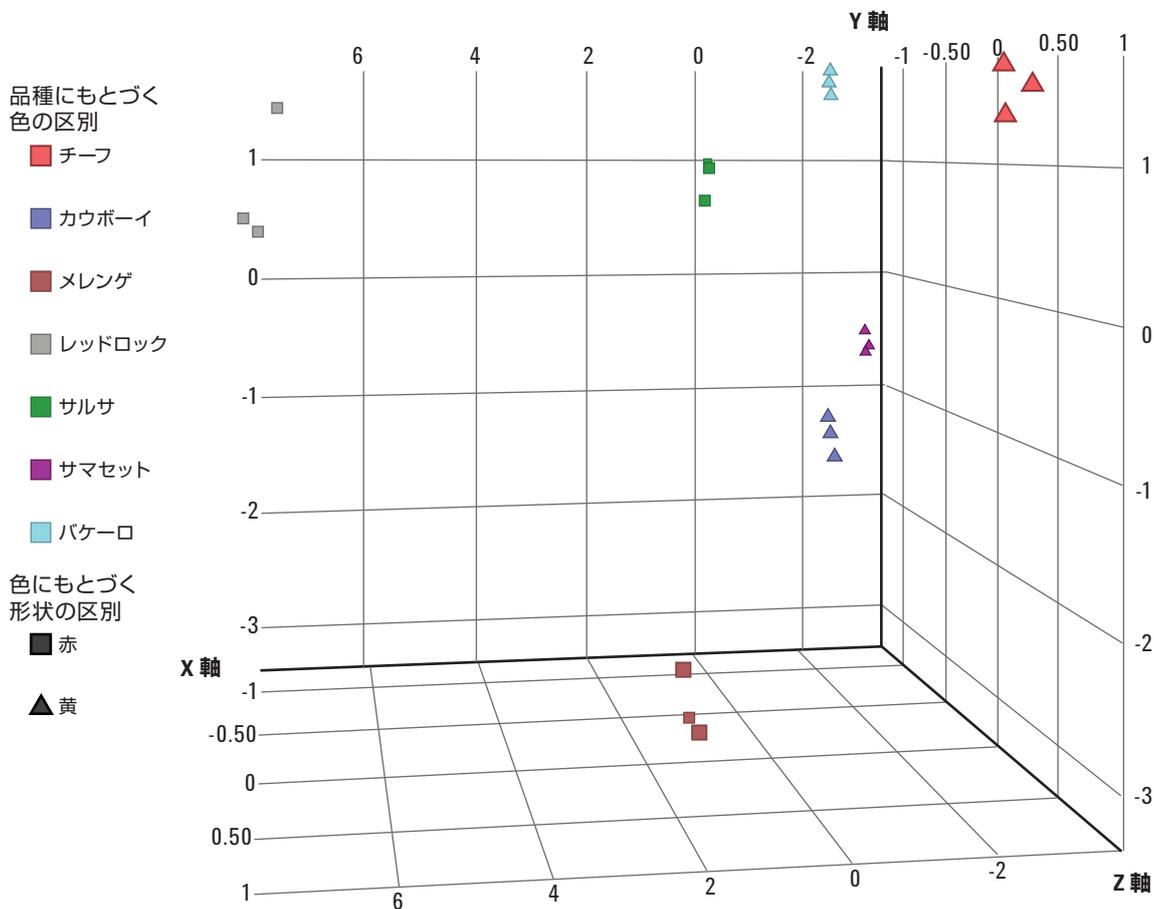


図 6. フラボノイド PDCL データベース検索で同定された化合物にもとづくタマネギ品種の区別に関する PCA

色の違いに関する PCA スコアプロット (図 7) では、品種間の区別はあまりありませんでした。ただし、x 軸に沿って若干の相関性が見られます。

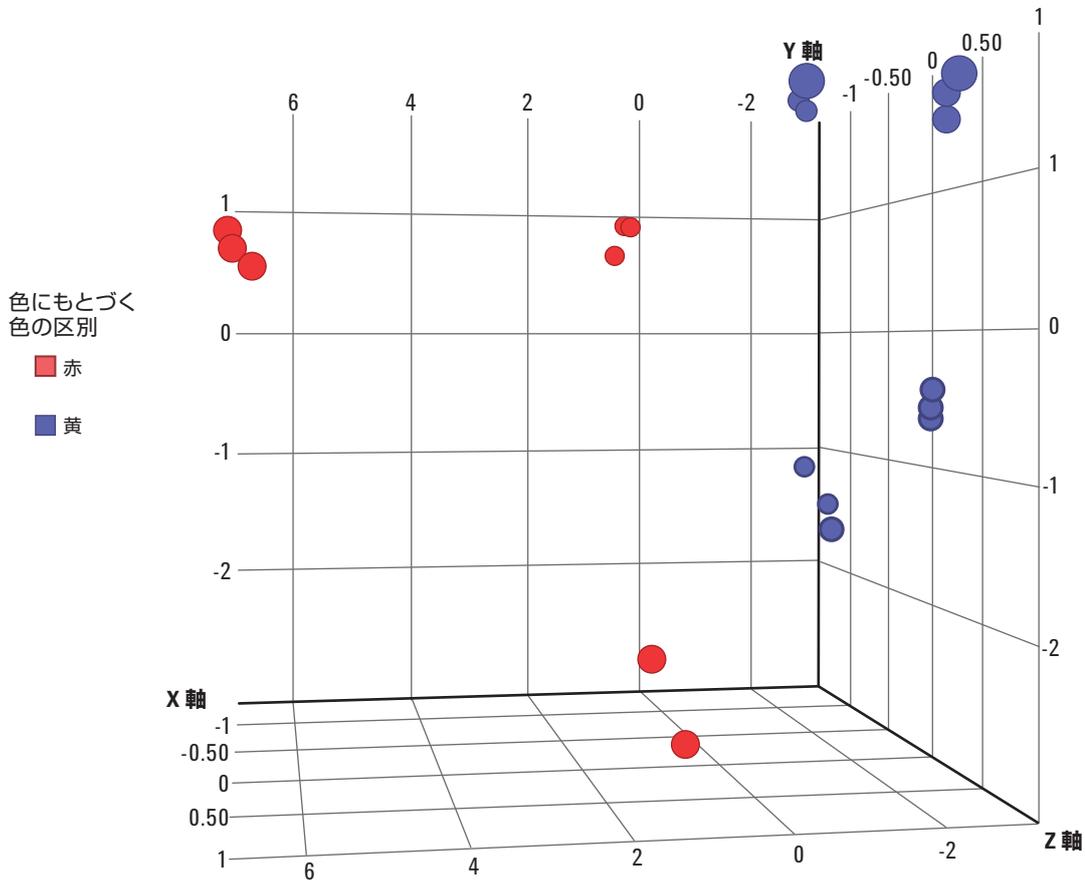


図 7. フラボノイド PDCL データベース検索で暫定的に同定された化合物にもとづく色の違いに関する PCA スコアプロット

データの MFE 後にすべての未知化合物を用いて作成したタマネギ 7 品種の PCA スコアプロット (図 8) では、このアプローチを各品種の一般的な組成や色の評価にも適用できる可能性が示されています。

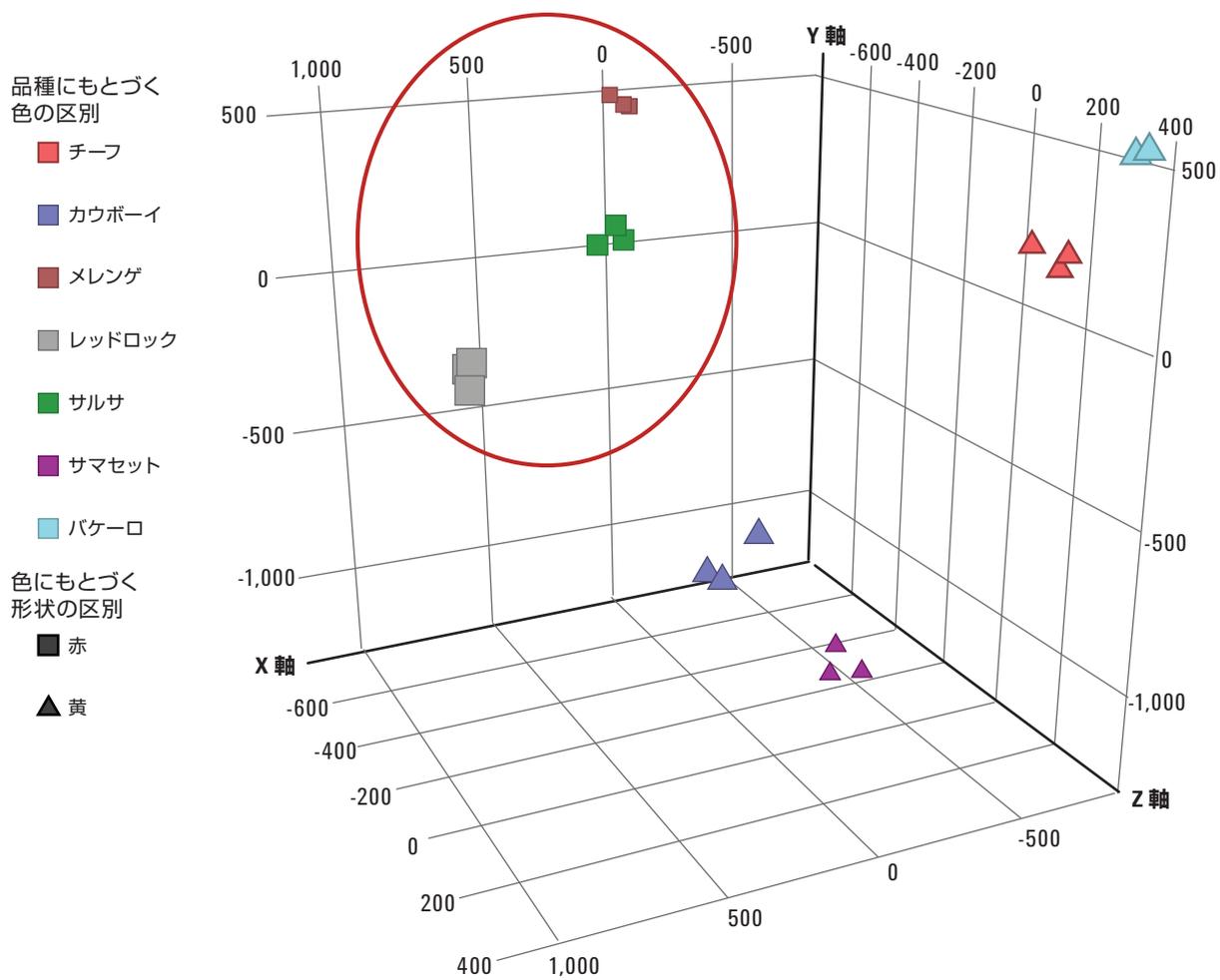


図 8. MFE 後にすべての未知化合物を用いて作成した PCA スコアプロット

PCA ローディングプロットでは、各サンプルのエンティティや化合物が、一つのポイントとして示されます。結果として得られるローディングは化合物リストになります。チーフおよびメレンゲは PCA でははっきりと区別されたため、これらを用いてローディングを評価し、2 品種間の判別に利用できる化合物リストを作成することが可能です。

色の判別に関して暫定的にライブラリ同定された上位 10 の化合物を表 4 に示しています。ソフトウェアで検出された各分子式には多くの化合物候補が存在するため、さらなる MS/MS 分析を実施すれば、実際に存在する化合物をより確実に同定することが可能です。これにより、判別がさらに明確化できます。

表 4. 暫定的にライブラリ同定された化合物のうち、色の違いに関連する上位 10 の非アントシアニン化合物

6,8-ジヒドロキシケンベロール
ケンベロール 3-0-(6J)-マロニル-グルコシド
ケンベロールジグルコシド-1
ケンベロールジグルコシド-2 (異性体、リテンションタイムが異なる)
ケンベロール 3-0-アセチル-グルコシドケルセチン
ケルセチン 3,4'-0-ジグルコシド
ケルセチンジグルコシド-1
ケルセチンジグルコシド-2 (異性体、リテンションタイムが異なる)
ケルセチン 3-0-ラムノシド
ジヒドロケルセチン

結論

公開されている文献および各種データベースと Agilent MassHunter PCDL Manager ソフトウェアを用いて、ターゲット検索に使用できるタマネギ固有のフラボノイドの精密質量 PDCL データベースを作成しました。この PDCL データベースを用いて、7 つのタマネギ品種の Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 分析により得られたデータでターゲット検索を実施し、19 のフラボノイド候補をライブラリ同定しました。フラボノイド候補をもとに PCA を適用し、品種および色の違いを判別しました。データの MFE 後にすべての未知化合物を用いて実施した第 2 の PCA でも、同様の結果が得られました。この第 2 の PCA アプローチを用いて、暫定的にライブラリ同定されたフラボノイドのうち、色と品種の違いにもっとも強い関連性がある上位 10 化合物をライブラリ同定しました。この結果は、Accurate-Mass Q-TOF LC/MS といずれかの PCA アプローチを組み合わせれば、タマネギ中に存在するフラボノイド化合物の品種間の違いを判別できることを示しています。ただし、異なる条件下で栽培されたさらに多くの品種を詳しく分析するためには、明確な相関性を立証する必要があります。

謝辞

この研究に用いたタマネギを提供いただいた Gills Onions 社 (オックスナード、カリフォルニア州) に感謝します。また、貴重な科学的情報を提供し、高度なデータ処理を支援していただいたカリフォルニア大学デービス校の Susan Ebeler 博士と Tom Collins 博士、およびアジレント・テクノロジーの Steven Fischer 氏に感謝します。

参考文献

1. J.S.E.Lee, J.A. Zweigenbaum, A.E. Mitchell “Nontargeted Unknown LC(ESI)-Q/TOF MS Approaches for Food Verification” *Physical Methods in Food Analysis*, M. Tunick, et al. ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington, DC, 2013.

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。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト 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. 2013

Published in Japan

November 13, 2013

5991-3419JAJP



Agilent Technologies