

超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた メタボリックプロファイリングの食品科学への応用

内方 崇人・松原 惇起・福崎英一郎・馬場 健史*

近年の研究で、脂質は単なる生体膜の構成成分やエネルギー源としてだけでなく、シグナル伝達などのメディエーターとして機能すること生理活性分子であることが明らかになってきている¹⁾。また、カロテノイドや脂溶性ビタミンなどの食品中の脂溶性機能性成分についても体内動態を含めた精密な解析が求められてきている²⁾。最近では質量分析計や超高速液体クロマトグラフをはじめとする各種分析装置のめざましい発展に伴い、代謝物の動態を包括的に理解しようとするメタボロミクスが各所で進められてきている^{3,4)}。親水性代謝物をターゲットにしたメタボロミクスについてはGC/MSやCE/MSなどを中心とした分析系が構築されているが^{5,6)}、脂溶性代謝物については、化学的性状が良く似た類縁体が多く存在することからメタボロミクスの目指す網羅的な分析系の開発は発展途上である。

超臨界流体は、臨界温度、臨界圧力を超えた物質の状態であり、低粘性、高拡散性といった特徴からクロマトグラフィーの移動相として好適な性質を有している。二酸化炭素は31.1°C、7.38 MPaで超臨界状態になり化学的安定性が高いことから取り扱いが簡便で、また低価格であることから最も良く利用されている。超臨界二酸化炭素は極性が低い(ヘキサン程度)ことから疎水性化合物の分離に利用されており、メタノールなどの極性溶媒をモディファイヤーとして加えることで移動相の極性を変化させることができるため、幅広い化合物への適用が可能である。この超臨界流体を利用したクロマトグラフィー (supercritical fluid chromatography, SFC) と検出方法として質量分析 (MS) を組み合わせた超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析 (SFC/MS) は、さまざまな疎水性化合物の網羅的かつ高感度の分析が可能である。また、超臨界流体は抽出媒体としても利用されており、マイルドな条件で効率良く抽出できることから、超臨界流体抽出 (supercritical fluid extraction, SFE) はさまざまな脂溶性代謝物に有用な抽出・精製手法である。

本稿では、脂溶性代謝物をターゲットとした新しいメタボリックプロファイリングの手法であるSFC/MSの食品分野への応用例を紹介するとともに、SFEを含めた超臨界流体利用技術の可能性についても言及する。

SFC/MSを用いたダイズ脂質プロファイリング

ダイズは食用油や醤油・味噌の原料として、また、煮豆、納豆、枝豆などに加工されて食品として広く利用されており、食品分野において重要な素材である。ダイズ中には、トリアシルグリセリド (TAG) をはじめ、リン脂質などの多くの脂質が含まれている。TAGやリン脂質は、極性基や脂肪酸の組み合わせから構造異性体まで含めると数千種以上の分子種が存在すると考えられる。そのプロファイルを精密にとらえるためには、高い分離能を有し幅広い性質の化合物に適用可能な分析系が必須となる。そこで、疎水性化合物の分析に有用であるSFC/MSを用いてダイズ脂質プロファイリングを行った。さらに、ダイズ中の脂質プロファイル情報と品種との関連を調べた。

これまでに筆者らが構築したSFC/MSを用いた分析系 (図1) では14種の脂質の一斉分析が可能であり、脂質プロファイリングの有用な分析手法である⁷⁾。当該分析系を用いて12品種のダイズを分析し、主成分分析 (PCA) に供した。主要成分としてTAGとホスファチジルコリン (PC) が確認され、PCAではダイズの用途による各品種のクラスター分離が認められた (図2)。また、そのローディングを見ることでTAGがクラスターの分離に寄与している重要成分であることがわかった (図3)。TAGは、グリセロール骨格に3つの脂肪酸を有することから、分子イオンピークの解析だけでは脂肪酸の結合様式を含めた分子種の同定はできない。そこで、TAGの分離条件の改善とイオン化電圧を高くすることによるフラグメント解析を行い、ダイズ中TAGのより詳細なプロファイル解析が可能な分析系の構築を試み

*著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 (准教授) E-mail: bamba@bio.eng.osaka-u.ac.jp

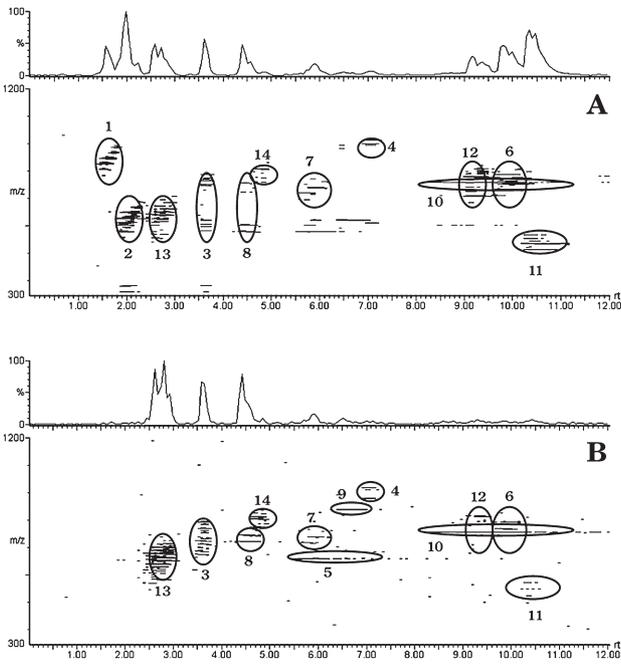


図1. シアノカラムを用いた脂質14種のSFC/MS分析⁷⁾. (A) ポジティブイオンモード, (B) ネガティブイオンモード. 1, TAG; 2, DAG diacylglycerol; 3, MGDG monogalactosyldiacylglycerol; 4, DGDG digalactosyldiacylglycerol; 5, PA phosphatidic acid; 6, PC; 7, PE phosphatidylethanolamine; 8, PG phosphatidylglycerol; 9, PI phosphatidylinositol; 10, PS phosphatidylserine; 11, LPC lysophosphatidylcholine; 12, SM sphingomyelin; 13, Cer ceramide; 14, CB cerebrosides.

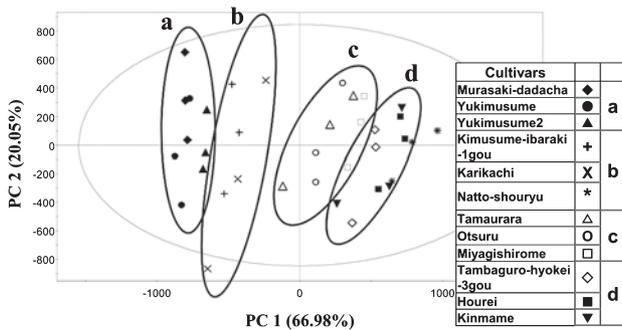


図2. ダイズ12品種のPCA (スコアプロット)⁸⁾. (a, edamame; b, natto; c, tofu and nimame; d, nimame and an unknown)

た. 各種標準品や実試料を用いて分析条件の検討, 各分子の保持時間やフラグメントの解析を行うことにより, 保持時間, m/z の情報からTAGの一斉プロファイルが可能なる分析系を構築した(図4)⁸⁾. 当該分析系は, 基準となるTAG標準品を1種類揃えることで他のTAGの一斉同定ができ, ダイズ以外のTAGの解析にも利用可能

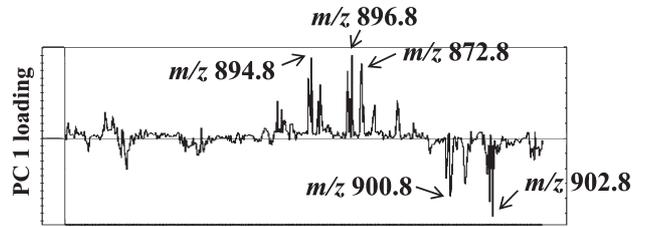


図3. 図2ファクター1におけるローディングプロット⁸⁾

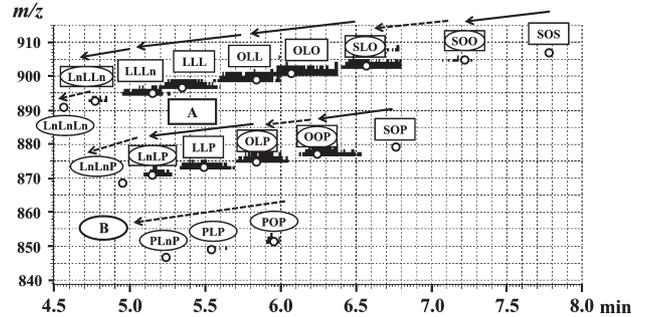


図4. TAGの同定 (karikachi)⁸⁾. (A) 実線: sn -1脂肪酸が異なるTAG, (B) 点線: sn -2脂肪酸が異なるTAG. P: palmitic acid, C16, S: stearic acid, C18, O: oleic acid, C18:1, L: linoleic acid, C18:2, Ln: linolenic acid, C18:3.

な汎用性のある分析系である.

当該研究においてSFC/MSを効果的に利用することで脂溶性代謝物情報に基づくダイズの用途ごとの品種の判別ができた. 今後, 豆腐, 納豆, 味噌などのさまざまなダイズ加工食品においてもSFC/MSを用いた脂質プロファイルを行うことにより最適なダイズ品種のより精密な選別が可能になると考えられる. また, 当該SFC/MS分析系は簡便に高解像度のTAGのプロファイリングが可能であることから, さまざまな食品中TAGの分析だけでなく, 体内動態解析への適用も可能な有用ツールとして期待できる.

SFC/MS/MSを用いたミカンβ-クリプトキサンチンおよびエステル体のプロファイリング

β-クリプトキサンチンは, カロテノイドの一種であり, 他のカロテノイドと同様に自身が持つ抗酸化作用によってがん予防や心疾患の抑制, 骨粗しょう症の抑制などの多様な生理作用を示すことが知られている⁹⁾. オレンジなどの柑橘類は, 世界中で広く消費されている果実であ

り、カロテノイドの食事供給源として重要な役割を担っている。柑橘類に主として含まれるカロテノイドは β -クリプトキサンチンであり¹⁰⁾、他のカロテノイドと比較して吸収性が高く、少ない摂取量で体内に大量に蓄積する特長を持つ¹¹⁾。また、 β -クリプトキサンチンは、分子内に酸素を一つ有することからキサントフィルに分類される。キサントフィルは、生体組織内ではフリー体としてだけでなく脂肪酸が付加したエステル体としても存在することがわかっている¹²⁾。これまでの研究で、キサントフィルはエステル体の方がフリー体よりも高い熱安定性や生体利用率を有することが報告されている¹³⁾。キサントフィル脂肪酸エステルは、非常に疎水性の高い化合物であり、脂肪酸側鎖が異なる構造類縁体が多数存在するという特徴を持つ。そこで、疎水性化合物の分離に好適なSFCに高選択性かつ高感度の分析が可能なタンデム型質量分析計 (MS/MS) を検出器として接続し、 β -クリプトキサンチンおよびそのエステル体のプロファイル解析を試みた。各種分析条件を検討したところ、 β -クリプトキサンチンおよび、炭素数、不飽和度の異なる9種の脂肪酸エステル化 β -クリプトキサンチンを20分以内に分離可能な分析系を構築できた (図5-A)。構築した分析系を用いて、温州ミカンの果皮乾燥物に含まれる β -クリプトキサンチン脂肪酸エステル類の分析を試みたところ β -クリプトキサンチンとそのエステル体 (C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1) が検出された (図5-B)。一方、温州ミカン果皮乾燥物中の全脂肪酸をGC/MSにより分析した結果、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、パルミチン酸 (C16:0)、リノレン酸 (C18:3) が主要な構成脂肪酸として検出された。このことから β -クリプトキサンチンには短鎖脂肪酸が優先的に付加することが示唆された¹⁴⁾。

当該研究により、SFC-MS/MSを用いた β -クリプトキサンチン脂肪酸エステル類のハイスループットで高感度な分析系が構築でき、キサントフィル脂肪酸エステル化機構解明の一助となる知見を取得することができた。今後、これまでほとんど明らかにされていなかったキサントフィル脂肪酸エステルの生体内における動態や生理作用の解析において、SFC-MS/MSを用いた分析系の貢献が期待される。

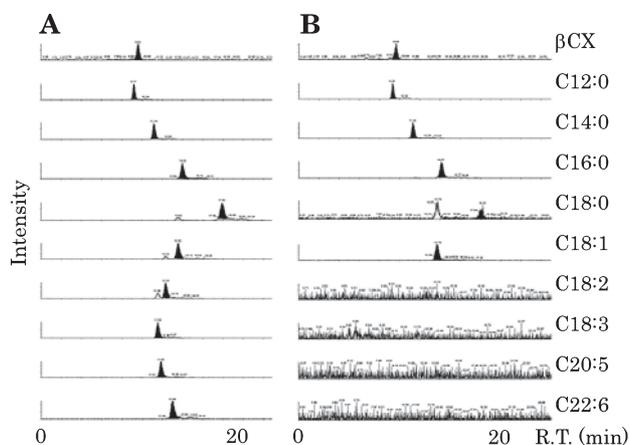


図5. SFC-MS/MSによる β -クリプトキサンチンおよびエステル体の分析¹⁴⁾。(A) Standard mixtures, (B) Citrus unshiu peel.

今後の展望

本稿ではSFC/MSの食品科学への応用例を紹介した。SFC/MSは、食品に含まれる各種疎水性化合物を高解像度かつハイスループットで分析可能な有用技術である。また、本稿では応用例を紹介しなかったが超臨界流体を抽出媒体として用いるSFEもデカフェコーヒーの製造をはじめ、カモミールからのオイル抽出¹⁵⁾や食用油として菜種やヒマワリの油の抽出など¹⁶⁾食品分野において効果的に利用されている。筆者らのグループでは、高い抽出効率を有し暗黒無酸素かつマイルドな条件での抽出が可能なSFEをSFC/MSとオンラインで接続し、抽出から分離分析まで連続して行うオンラインSFE-SFC/MS分析系の開発に取り組んでいる。たとえば当該システムを適用することにより、抽出時に酸化を受けやすいコエンザイムQ₁₀の還元体を変化させることなく分析できるため、生体内の酸化体/還元体比を高精度に解析できる¹⁷⁾。すなわち、オンラインSFE-SFC/MSは、食品科学においても食品中や摂取した生物中の抗酸化物質を精密に解析可能な技術として威力を発揮すると思われる。

さらに、今後疎水性化合物の分離分析に好適なSFC/MSを用いたマルチマーカープロファイリングを積極的に食品の機能解析や製造工程管理、品質評価などに適用することで、これまで親水性化合物を主としてきたメタボリックプロファイリングでは発見できなかった未知のマーカールや疎水性化合物の新たな機能の発見、品質向上などが期待される。また、食品の安全性に深く関連する

残留農薬分析は、日常的に多検体を処理する必要があることから、分析時間の短縮化が求められている。そこで、我々のグループではSFC-MS/MSの残留農薬分析への適用技術の開発に取り組んでおり、ハイスループット分析系の構築を試みている。

SFC/MSはまだ限られた分野でしか用いられていないマイナーな分析手法であるが、本稿で示したようにさまざまな疎水性化合物の解析に威力を発揮する代謝物分析において大きな可能性を秘めた有用技術である。今後、SFC/MSを利用したメタボロリックプロファイリングの技術開発と応用がさらに進み、食品分野のキーテクノロジーとして貢献することを期待する。

文 献

- 1) Mohib, U. *et al.*: *Prog. Lipid. Res.*, **50**, 75 (2011).
- 2) Delia, B. *et al.*: *J. Food Comp. Anal.*, **23**, 726 (2010).
- 3) Glauser, G. *et al.*: *Phytochem. Anal.*, **21**, 95 (2010).
- 4) Lu, X. *et al.*: *J. Chromatogr. B*, **866**, 64 (2008).
- 5) Pasikanti, K. K. *et al.*: *J. Chromatogr. B*, **871**, 202 (2008).
- 6) Monton, M. R. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1168**, 237 (2007).
- 7) Bamba, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 450 (2008).
- 8) Jae, W. L. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.* (in press)
- 9) Rao, A. *et al.*: *Pharmacol. Res.*, **55**, 207 (2007).
- 10) Dugo, P. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1189**, 196 (2008).
- 11) Yano, M. *et al.*: *Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci.*, **4**, 13 (2005).
- 12) Wingerath, T. *et al.*: *Biochem. Biophys.*, **324**, 385 (1995).
- 13) Fu, H. *et al.*: *Food Chem.*, **122**, 602 (2010).
- 14) Wada, Y. *et al.*: *J. Sep. Sci.* (in press)
- 15) E. Rahimi *et al.*: *J. of Supercritical Fluids*, **56**, 80 (2011).
- 16) Olivier, B. *et al.*: *chemical engineering research and design* (in press)
- 17) 松原惇起ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p. 98 (2008).