

固相誘導体化法を用いた黒コショウの GC/MS プロファイリング分析

Profiling analysis of the components in Black pepper using in SPE derivatization method by GC/MS

恩田浩幸

Hiroyuki Onda

エスビー食品株式会社

開發生産グループ 中央研究所 分析センター

〒174-8651 東京都板橋区宮本町 38-8

TEL 03-6810-8621

E-mail: hiroyuki_onda@sbfoods.co.jp



図 1 固相誘導体化法

(in-SPE derivatization method)

近年、メタボローム解析手法を用いた食品の品質評価が盛んに行われ、特にアミノ酸などの不揮発性成分を誘導体化後に GC/MS 分析し、得られたデータを多変量解析して品質評価に適用した例は数多く報告されるようになってきた。この GC/MS メタボローム解析時の試料前処理手法として、Bligh & Dyer 法（クロロホルム、メタノール、水混合溶媒を使用して、生体材料から脂質成分を抽出する方法）が広く用いられている。しかしながらこの手法は抽出、およびその後の誘導体化の工程に長時間を有する上に操作が複雑である

ため、より短時間で簡易的に実施できる前処理法の開発が望まれていた。そのような中で近年、固相カラム上で短時間かつ容易に誘導体化を行う「固相誘導体化法」も提唱されるに至っている（図 1）。本講演では、固相誘導体化法を用いた黒コショウの代謝産物プロファイリング分析の事例を紹介する。

「固相誘導体化法」とは、株式会社アイスティサイエンスと大阪大学の共同研究によって開発された誘導体化法である¹⁾。本手法は、試料から得られた抽出物をイオン交換樹脂が充填された固相カラムに負荷し、固相カラムに吸着させ、その後、脱水・誘導体化（メトキシ化、トリメチルシリル化）までをカラム中で行い、そして、得られた誘導体化物質を GC/MS 分析に供するという手法である。本手法については、これまで、血清などの生体試料へ適用した事例はあったが、黒コショウのようにマトリックスの多い食品・農産物での検討事例はなかった。



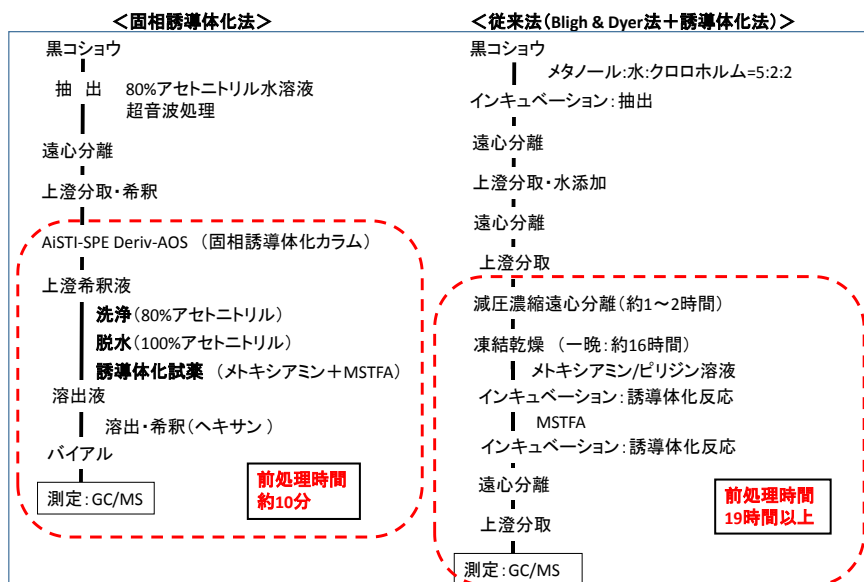


図2 固相誘導体化、および従来法における前処理方法

法の両手法で前処理を行った (図2 参照)。ターゲット物質は、黒コショウに多く含まれていた5種の有機酸、アミノ酸に絞り (Malic acid、Citric acid、L-Aspartic acid、GABA、Asparagine) GC/MS分析を実施した (図3 参照)。固相誘導体化法については、Bligh & Dyer法で採用されている抽出法に併せて、クロロホルムを使用しないアセトニトリル水溶液による抽出も行い、黒コショウ抽出条件の比較を行った。その結果、アセトニトリル水溶液抽出を行った後に固相誘導体化を行った場合であっても、安定的にアミノ酸および有機酸を検出することができ、Bligh & Dyer法と同等の結果となった (表1)。併せて、試料からの抽出において超音波処理を行うことで安定的な抽出が実施できるのと同時に、その後抽出液のpH調整を行ったのちに固相誘導体化操作を行うことで、安定的な半定量値が得られることも明らかになった。

これらの結果から、本手法は、短時間で簡易的かつ安定的なデータを得る上で有用な手段であることが示唆された。

現在、ターゲット物質としているアミノ酸、有機酸の固相誘導体化カラムへの最適負荷量についての検討を実施しており、複数産地の黒コショウ試料の産地識別モデルの構築を目指している。

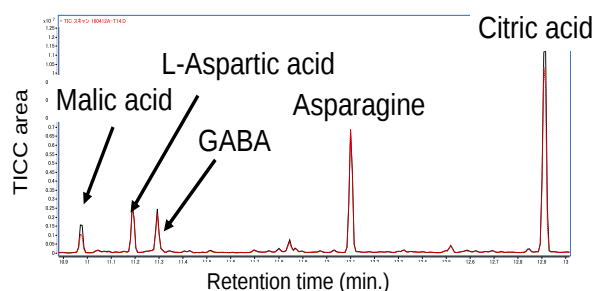


図3 黒コショウのGC/MS分析データ

そこで今回、固層誘導体化法を用いたプロファイリング分析がマトリックスの多い黒コショウにおいて適応できるか否かの評価に焦点を絞って解析を行った。

ところで、メタボローム解析が通常の微量成分分析と異なる点は、絶対的な定量値ではなく、安定的な半定量値が必要なことである。そこで、Bligh & Dyer法を用いた従来法と、固相誘導体化

表 1 従来法と固相誘導体化法にける再現性比較

前処理条件	ターゲット物質	m/z	RSD(%) n=3
従来法 (Bligh & Dyer法 + 誘導体化法)	Malic acid 3TMS	73	9.6
	L-Aspartic acid 3TMS	232	7.9
	GABA 3TMS	174	13.1
	Asparagine 3TMS	232	23.4
	Citric acid 4TMS	273	14.4
固相誘導体化法	Malic acid 3TMS	73	20.3
	L-Aspartic acid 3TMS	232	2.5
	GABA 3TMS	174	4.6
	Asparagine 3TMS	232	4.4
	Citric acid 4TMS	273	8.1

最後に、この固相誘導体化法を用いたプロファイリング分析検討と並行して行なっている、リアルタイム直接質量分析システム (Direct analysis in real time mass spectrometry analysis: DART-MS system) に昇温デバイスである ionRocket (バイオクロマト) を組み合わせて行う黒コショウのプロファイリング分析手法についても簡単に紹介する (図 4 参照)。

メタボロミクス解析を有効に活用してゆくために、様々なイオン化と質量分析計を組み合わせた分析手法の開発が必要であり、前処理や分析機器の発展がその実用性を高めてくれるものと考えている。



図 4 DART 写真

参考文献

- 1) Ryoichi SASANO, *et al.*, “Development of in-SPE derivatization method for GC-MS metabolome analysis”. 11th International Conference of the Metabolomics Society. San Francisco, USA. June 29th to July 2nd 2015.