

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19089

研究課題名（和文）味と香りを同時分析できるワンストップ食品分析法の構築

研究課題名（英文）Establishment of simultaneous analysis of taste and aroma compounds

研究代表者

松井 利郎（Matsui, Toshiro）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20238942

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、LDI-MS装置を用いることで、誘導体化などの前処理を行うことなく、香りと味成分を「そのまま」ワンストップ分析しようとするものである。化合物吸着能を有するグラファイトカーボンブラック（GCB）がイオン化支援剤として有用であることを見出し、揮発性成分と不揮発性成分の同時検出を達成した。本法を活用することで、醤油中の代謝物情報を用いることで製品の識別が可能であることを見出した。したがって、本GCB-LDI-MS法が食品の風味・品質を評価可能な新規ワンストップ分析方であることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は1台のMALDI-MS装置で、誘導体化などの前処理を行うことなく、香りと味成分を「そのまま」ワンストップ分析しようとするものであり、世界初の風味成分の同時分析法の提案となる。構築しようとするSALDI-MS食品分析法は、香り成分をイオン化支援材に吸着保持させ、マトリックス剤を使用することなく定量できる画期性がある。実際に、本法により食品の製品識別が達成され、その識別には味と匂いに寄与する成分が関与していることを示されていることから、本法は従来にないマルチモーダルな化学分析法であるといえる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a new methodology to detect directly and simultaneously detect taste- and odor-active compounds. Graphite carbon black (GCB) nanoparticles, a chemical adsorbent for a variety of compounds, including gaseous molecules, which consists of sp²-conjugated atomic carbon with high specific surface area, possess the characteristics essential for a surface-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry (SALDI-MS) material. The proposed GCB-LDI-MS successfully detected volatile compounds (e.g. ethyl esters, alcohols, fatty acids, and aldehydes) and a series of taste-active compounds (e.g., amino acids and sugars) simultaneously. Then, GCB-LDI-MS allowed hundreds of MS peaks derived from soy sauces in both positive and negative modes without any tedious sample pretreatments. PCA using the obtained MS peaks clearly distinguished three soy sauce products.

研究分野：食品分析

キーワード：質量分析 食品分析 風味 グラファイトカーボンブラック

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

機器分析による風味評価では、物理化学的特性を利用した解析や各食品中における味や香りに関わる成分の定性・定量分析が行われており、機器分析は客観性・定量性・再現性の点で優れている。風味に関わる化学成分(呈味成分および香気成分)について評価する際には、それぞれ液体クロマトグラフィー(LC)またはガスクロマトグラフィー(GC)に質量分析計(MS)を接続したLC-MSやGC-MS等が用いられている¹⁻³⁾。MS法は低分子から高分子化合物まで含めて、高感度に分析可能である点、未知化合物に対してもその質量情報を獲得できる点を踏まえると、有用な手法の一つであると考えられる⁴⁾。一方、分析対象となる風味化合物の化学的特性に応じて、LC-MSでは脱塩、除タンパク⁵⁾、GC-MSでは液液抽出、誘導體化、固相マイクロ抽出、ヘッドスペースガス捕集など、精製や濃縮のための煩雑な試料調製を必要とする。そのため、試料調製の前処理過程で、食品本来の風味組成の損失の可能性を避けることは不可能である。したがって、機器分析により食品の風味を客観的に評価するためには、食品そのままの状態にて、味とにおいの両方を同時かつ網羅的に測定する技術が必要である。

他方、レーザー脱離イオン化質量分析(LDI-MS)法は対象化合物を一斉検出可能な分析方法として知られている。その中で、UVレーザーエネルギーの吸収と分析対象化合物へのH⁺の授受を仲介する有機化合物をイオン化支援剤として用いるマトリックス支援LDI-MS(MALDI-MS)法がもっとも汎用されている一方、本法はこれらの有機マトリックス由来のクラスター状の複雑シグナルが低分子領域(<500 m/z)に観測されるため、低分子化合物の検出は困難とされている。そこで、有機マトリックスを用いずに、イオン化支援基材を用いて、対象化合物をイオン化させる表面支援レーザー脱離イオン化質量分析(SALDI-MS)法に着目した。SALDI-MS法は、無機ナノ材料をイオン化支援材として用いてレーザーエネルギーを効率よく、熱エネルギーに変換し対象化合物を検出する手法である。そのため、多様な低分子化合物の一斉検出が可能なハイスループットな分析法であり、低分子代謝物の解析や判別分析にも用いられている⁸⁾。多くの風味成分は一般に低分子化合物であることを考慮すると、SALDI-MS法の食品中の風味成分の網羅解析への応用が期待される。

2. 研究の目的

SALDI-MS法における、イオン化支援基材ではナノ構造、低熱容量、高導電性を有する点が重要とされる^{9,10)}。グラファイトカーボンブラック(GCB)¹¹⁾は、sp²共役原子炭素の多層シートからなるナノ粒子から構成されており、高い導電率(～10² S/m)¹²⁾と低い熱容量(0.4924 J/K)¹³⁾を有しており、同様の基材特性を有するgraphene等が低分子量の合成ポリマー(ポリエチレングリコールなどを検出可能な基材として用いられており、GCBも同様にイオン化支援材として適用可能であることが期待される¹⁴⁾。また、GCBは様々な化合物に対して、分子間相互作用に起因する吸着能を有している¹⁵⁾。LDI-MS法は、高真空下でのイオン化法であるため、揮発性化合物の検出は困難とされており、MALDI-MS法は主としてタンパク質、SALDI-MS法は不揮発性の低分子化合物の検出に適用されている。そのため、GCBをイオン化支援材として用いることで、揮発性化合物と不揮発性化合物を一斉吸着させることで、両成分の同時検出が期待できる。そこで、本検討ではGCBイオン化支援材として用いた、食品風味化合物を一斉検出可能なレーザー脱離イオン化質量分析(LDI-MS)法の構築とその食品分析法としての応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料調製

各アミノ酸類については、10 mmol/LとなるようにMS grade water (Merck)に溶解し、ストック溶液を調製した。20種の標準アミノ酸のうち、LeuとIle、GlnとLysは同重体であり、Cys、Leu、Asp、Glu、Met、PheのNa付加体とSer、Pro、Val、Leu、Asp、MetのK付加体のm/zが重複するため、PositiveモードではGly、Ala、Pro、Val、Thr、Cys、Gln、Glu、His、Phe、Arg、Trpを、NegativeモードではGly、Ala、Ser、Pro、Val、Thr、Cys、Leu、Asn、Asp、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Trpを分析に用いた。

直鎖の脂肪酸類、エチルエステル類、アルコール類、アルデヒド類、各種香気成分は、それぞれ100 mmol/Lとなるようにethanol (Merck, Darmstadt, Germany)に溶解し、ストック溶液を調製した。

各しょうゆは水で10倍希釈したのちに内部標準化合物を添加し、さらに10倍希釈したものを、分析対象試料とした。(最終濃度:しょうゆ100倍希釈液、内部標準化合物終濃度:各1 mol/L、最終溶媒:50%EtOH)

MALDI-MSにおいては、CHCA (20 mg/mL in 70% acetonitrile, Positiveモード) およびIAA (20 mg/mL in 70% acetonitrile, Negativeモード)をマトリックス溶液として用いた。

(2) LDI-MS 分析

① GCB-LDI-MS

GCB懸濁液(5 mg/mL in 2-propanol)の2倍希釈液(in 50% 2-propanol)をITOコートガラス上に2 μL滴下、風乾後に、分析対象試料を2 μLをGCB上に滴下、風乾後にLDI-MS分析に供し

た。アミノ酸混合溶液、揮発性化合物混合溶液は添加量が 200 pmol/2 μ L-spot、風味化合物モデル溶液は添加量が 100 pmol/2 μ L-spot となるように分析対象試料を調製した。

② MALDI-MS

マトリックス溶液と分析対象試料を等量混合したのちに、indium-tin oxide (ITO)-coated glass slide (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)上に 2 μ L 滴下、風乾したのちに LDI-MS 分析に供した。

③ NALDI-MS

nanostructured laser desorption ionization (NALDI)-plate (Bruker Daltonics)をイオン化支援材として用いた LDI-MS 分析では、プレート上に分析対象試料を 2 μ L 滴下、風乾後に LDI-MS 分析に供した。

分析装置には smartbeamIII (Nd:YAG, 355 nm; Bruker Daltonics) を搭載した autoflexIII smartbeam (Bruker Daltonics) を使用した。なお、LDI-TOF-MS 条件は以下のように設定した。

Mode : Positive/Negative ; Ion Source 1 : 20.00 kV ; Ion Source 2 : 18.80 kV ; Lens : 7.50 kV ; Mass range : 0 - 2000 Da ; Laser Frequency : 200.0 Hz ; Number of Shots : 100 shots/spot ; Spatial Resolution (Spot Distance) : 200 μ m

スペクトル解析には FlexAnalysis software version 3.3 (Bruker Daltonics)、ピークアラインメント・抽出には Clinprotocols version 3.0 (Bruker Daltonics) ならびに多変量解析・統計処理には Metaboanalyst version 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>)¹⁶⁾を用いた。なお、ピーク抽出条件は以下の通りに設定した。

Resolution : 800, Peak detection threshold : $S/N \geq 3$; Data normalization : by intensity of internal standard ; Scaling : no scaling

4. 研究成果

(1) GCB-LDI-MS による揮発性化合物の検出

滴下した GCB ナノ粒子とマトリックス (正イオンモードでは CHCA、負イオンモードでは IAA) の LDI-MS 分析を行い、バックグラウンドスペクトルについて両者の比較を行った。GCB-LDI-MS 分析では、正イオンモードおよび負イオンモードにおいて、MALDI-MS 分析と比較して低分子領域での夾雑シグナルはほとんど認められなかった。このことから、GCB-LDI-MS 法は低分子化合物の検出に適用可能であると考えられた。

MALDI-MS では対象分子とマトリックスの共結晶へのレーザー照射により、分子の気相中への脱着 (昇華) を誘起しているため、LDI-MS 装置内のイオン源は、一般的には高真空状態である。したがって、LDI-MS においては、香氣成分をはじめとする蒸気圧 (v.p.) > イオン源真空圧 ($\sim 10^{-6}$ Torr) の揮発性化合物の検出は現状不可能である。

そこで、LDI-MS イオン源真空圧よりも蒸気圧の大きい揮発性化合物 (炭素数 16 のエチルエステル、アルコール、脂肪酸、アルデヒドについて、LDI-MS に供し、揮発性化合物の検出可否について評価を行った。その結果、MALDI-MS ならびに NALDI プレートでは検出に至らなかった一方、GCB-LDI-MS では Positive モードでは全ての揮発性化合物について、Negative モードではエチルエステルを除くすべての揮発性化合物の検出に成功した。

そこで、化合物の揮発性の違いが検出に与える影響について評価するために、エチルエステル類、脂肪酸類、アルコール類、アルデヒド類の各同族列化合物について、GCB-LDI-MS 分析に供した。その結果、炭素数の減少に伴い、検出強度が減少していく傾向が確認された。検出に至った各同族列化合物内ではいずれも、最も蒸気圧の小さいエチルエステル (C12) と同程度の揮発性を有する化合物まで検出可能であったことから、GCB 表面への揮発性化合物の吸着親和性は、官能基固有の静電的相互作用ではなく、ロンドン分散力、ファンデルワールス力^{17),18)}などの分子間相互作用であると推測された。

(2) GCB-LDI-MS の化合物イオン化特性

MALDI-MS や ESI のイオン化効率に影響する因子であるプロトン親和力と気相酸性度の異なる不揮発性アミノ酸を用いて、本 GCB-LDI-MS 法の化合物イオン化特性を評価した¹⁹⁾。アミノ酸混合溶液の分析結果では、MALDI-MS では、夾雑シグナルとのオーバーラップにより、Positive モードでは 6 種、Negative モードでは 4 種のアミノ酸しか検出に至らなかった。一方で、GCB-LDI-MS では、Positive モードでは 11/12 種、Negative モードでは全種の検出を達成した。したがって、GCB-LDI-MS は他のイオン化支援材と同様に低分子化合物の検出も可能な SALDI-MS 基材として有用であることが明らかになった。

各化合物のイオン化特性を評価したところ、Positive モードにおいて観測された各アミノ酸の $[M+Na]^+$ の検出強度は、Arg を除き、プロトン親和力に相関する傾向 ($R=0.723$) が認められた。Arg $[M+Na]^+$ の検出強度が直線上に乗らなかった理由としては、Arg のプロトン親和力が大きく、 $[M+H]^+$ (175.3 m/z) としてのシグナルの検出が大きかったためと考えられる。また、Negative モードにおいて観測された各アミノ酸の $[M-H]^-$ の検出強度は、気相酸性度に相関する傾向 ($R=0.717$) が認められた。

(3) GCB-LDI-MS による揮発性・不揮発性化合物の同時検出

次いで、GCB-LDI-MS 法による揮発性・不揮発性化合物の同時検出を試みた。呈味に寄与する化合物として hypoxanthine, glutamic acid, glucose および sucrose、香気を呈する化合物として HEMF, 2-methoxy-4-vinylphenol, 2,6-dimethoxyphenol, palmitic acid および ethyl palmitate を含む食品風味代表化合物モデル溶液を調製し、GCB-LDI-MS に供した。その結果、すべての化合物について、GCB-LDI-MS での検出を達成し、呈味ならびに香気に寄与する不揮発性・揮発性化合物を同時検出可能であることが示された (図 1)。

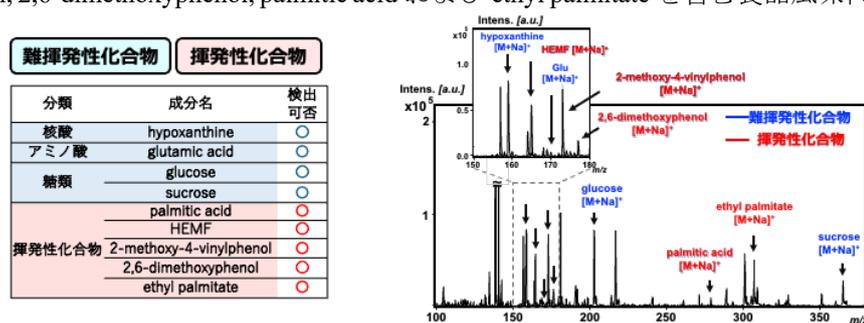


図 1. GCB-LDI-MS を用いた揮発・不揮発性化合物の一斉検出

(4) GCB-LDI-MS によるしょうゆの分析

続いて、食品品質評価法としての GCB-LDI-MS 法の適用性を明らかにするため、しょうゆ製品を用いた判別分析を試みた。生産国の異なる 3 種のしょうゆ A、B、C を分析対象とし、試料 (100 倍希釈液、内標準: [$^{13}\text{C}_6$] Glc, [$^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_1$] Glu) 0.5 μL を GCB 上に直接滴下・風乾後、GCB-LDI-MS 分析に供した。その結果、3 種の異なるしょうゆより正イオンモードでは総計 568 シグナル、負イオンモードでは 672 シグナル ($S/N \geq 3$) が集約された。観測された MS シグナル m/z 情報に基づき主成分分析を行った結果、生産国の違いを明瞭に識別することができた (図 2)。さらに、識別寄与因子として、単糖類 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$: 203.1 m/z)、二糖類 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$: 365.1 m/z)、lactic acid ($[\text{M}+\text{Na}]^+$: 112.9 m/z)、Glu ($[\text{M}-\text{H}]^-$: 146.0 m/z) および pyroglutamic acid ($[\text{M}-\text{H}]^-$: 128.0 m/z) (因子負荷量 ≥ 0.3) が抽出され、これら因子の MS 強度と含量との間に良好な相関関係にあることが判明し、しょうゆ品質への寄与が高い成分であることが示唆された。

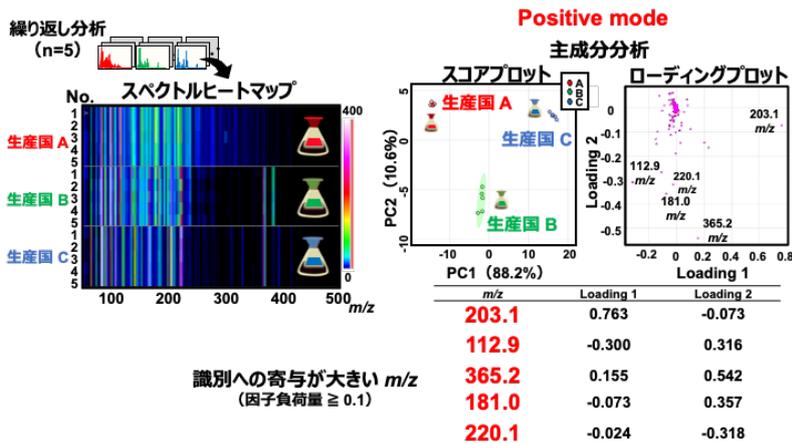


図 2. GCB-LDI-MS による異なる生産国しょうゆの識別 (positive mode)

以上の結果より、本 GCB-LDI-MS 法は、迅速・簡便に味とにおいに寄与する成分の同時検出を可能にするワンストップ食品分析法であり、新たな食品品質評価法として適応可能であることが実証された。

<引用文献>

- 1) Frank O. et al., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1945–1954 (2007).
- 2) Schuh C. et al., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 916–924 (2006).
- 3) 高橋亮 et al., *ぶんせき*, **8**, 388–394 (2010).
- 4) Cao G. et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **68**, 6956–6966 (2020).
- 5) Korte R. et al., *J. Proteomics*, **196**, 131–140 (2019).
- 6) Kataoka H. et al., *J. Chromatogr. A*, **880**, 35–62 (2000).
- 7) Soria A. C. et al., *Trends Analyt. Chem.*, **71**, 85–99 (2015).
- 8) Zhang H. et al., *Nature Communications*, **13**, 1–11 (2022).
- 9) Chiang C. K. et al., *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 1269–1281 (2011).
- 10) Lin Z. et al., *Mass Spectrom. Rev.*, **37**, 681–696 (2018).
- 11) Hennion M.-C., *J. Chromatogr. A*, **885**, 73–95 (2000).

- 12) Marinho B. et al., *Powder Technol.*, **221**, 351–358 (2012).
- 13) Snowdon M. R. et al., *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, **2**, 1257–1263 (2014).
- 14) Conway U. et al., *Polym. Chem.*, **12**, 439–448 (2021).
- 15) Leboda R. et al., *Mater. Chem. Phys.*, **51**, 216–232 (1997).
- 16) Pang Z. et al., *Nat. Protoc.*, **17**, 1735–1761 (2022).
- 17) Matisová E. et al., *J. Chromatogr. A*, **707**, 145–179 (1995).
- 18) Dettmer K. et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 490–500 (2002).
- 19) Nishikaze T. et al., *Int. J. Mass Spectrom.*, **268**, 47–59 (2007).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Mitsuru, Arima Keishiro, Takeshita Tomotaka, Kunitake Yuri, Ohno Naoto, Imamura Miho, Matsui Toshiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Laser Desorption Ionization/Mass Spectrometry with Graphite Carbon Black Nanoparticles for Simultaneous Detection of Taste- and Odor-Active Compounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 2187 ~ 2194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.1c03890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井手晴菜、有馬継士郎、松井利郎、田中 充
2. 発表標題 グラファイトカーボンブラック支援-レーザー脱離イオン化質量分析法を用いた低分子栄養成分の一斉検出
3. 学会等名 第69回日本食品科学工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村太陽、有馬継士郎、松井利郎、田中 充
2. 発表標題 グラファイトカーボンブラックの分子吸着特性を利用したレーザー脱離イオン化-質量分析法の揮発性成分検出への応用
3. 学会等名 令和4年度（2022年度）日本食品科学工学会および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruna Ide, Keishiro Arima, Toshiro Matsui, Mitsuru Tanaka
2. 発表標題 Simultaneous detection of food compounds by a graphite carbon black-aided laser desorption ionization-mass spectrometry
3. 学会等名 22nd ICN (Int. Congress of Nutrition) in Tokyo 2022 Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有馬継士郎、田中 充、國武友里、今村美穂、大野直士、松山 旭、松井利郎
2. 発表標題 風味成分一斉分析のためのカーボンブラックをイオン化支援材とする新たなLDI-MS法の構築
3. 学会等名 第68回日本食品科学工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有馬継士郎、松井利郎、田中 充
2. 発表標題 金ナノ粒子を用いたレーザー脱離イオン化質量分析法による食品風味成分の一斉分析法の構築
3. 学会等名 第6回日本食品分析学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 結晶性グラファイト基板及び該結晶性グラファイト基板を用いた測定用デバイス	発明者 西木直巳, 桑原涼, 鶴田崇, 松野行壮, 松井利郎, 田中充, 有馬継	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-104410	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 充 (Tanaka Mitsuru) (70584209)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------