

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：87402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18707

研究課題名(和文)食品成分の網羅的分析を可能とする分離界面の作製と分離・同定システムの構築

研究課題名(英文)Preparation of novel surface modification capillary fused silica for comprehensive analysis

研究代表者

佐藤 崇雄 (SATO, TAKAO)

熊本県産業技術センター(ものづくり室、材料・地域資源室、食品加工室)・その他部局等・研究主任

研究者番号：80467977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品成分の網羅的分析を指向したCE-MS用マルチモードキャピラリーカラムの開発を実施した。分子認識能を有す化合物(脂質)の分子設計・合成を行い、得られた化合物をキャピラリー電気泳動用のカラム内に化学結合により導入した。導入した化合物は温度によりその形態が変化する構造になっているため、分析途中で泳動バッファを変化することのできないキャピラリー電気泳動においても、カラム温度を変化させるだけで分離モードの変更が可能となる。カラム内界面の修飾後に、カラムの性能評価を行い、醸造発酵食品をモデルケースに網羅的一斉分析を実施し、代表的な化合物の分離を確認した。

研究成果の概要(英文)：We prepared novel surface modification capillary fused silica. A selectivity of the obtained surface modification capillary fused silica was estimated using capillary electrophoresis/mass spectrometry. As a result, we succeeded in identifying fermented food extracted compounds.

研究分野：食品科学

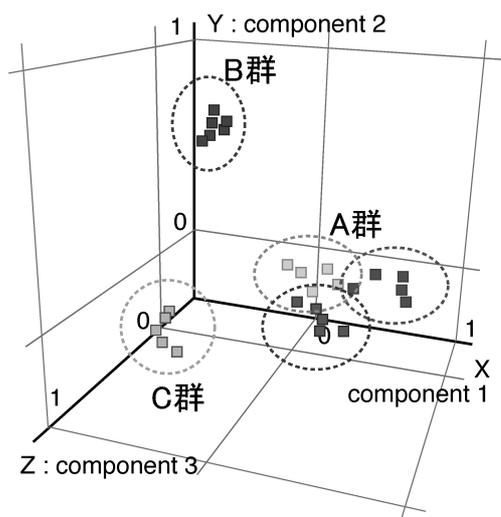
キーワード：食品成分分析

1. 研究開始当初の背景

現在、食品科学や農学をはじめ多岐にわたる分野において質量分析計 (MS) と各種クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動を連結して未知化合物の同定に関する研究が行われている。そのなかで我々は、キャピラリー電気泳動 (CE) に着目した。CE は高い分解能をもち、電荷物質の分離に威力を発揮するものの HPLC などと比べ分離カラムの種類は格段に少ない。従って、CE に最適、かつ MS に直接導入できる泳動バッファーで使用可能なマルチモードのカラムを開発できれば、その適用範囲は拡大し、これまで困難とされた系での多成分同時一斉分析も可能となる。そこで本研究では、食品成分の網羅的分析を指向した CE-MS 用マルチモードキャピラリーカラムの開発の必要性を感じた。

2. 研究の目的

代謝産物を網羅的に解析する、いわゆるメタボロミクスは、大規模な発現プロファイリングやプロテオーム研究を論理的に補完するものとして急速に浸透している手法で、生物における生化学を知るための貴重な手がかりを得ることができる。しかし、代謝産物は化学的にきわめて多様であることから、その解析には高度な分析化学的な知見が要求される。申請者らは、これまでに微生物代謝物について LC-QTOF (精密質量分析) と多変量解析の技術を駆使した主成分解析を行い下図に示すように複数の微生物を 3 つのカテゴリに分類することに成功した。



精密質量分析による微生物代謝物の主成分解析例 (代謝物の組成により 3 つのカテゴリに分類可能)

これらの分析の多くは LC/MS や GC/MS などのクロマトグラフィーや CE/MS (キャピラリー電気泳動) を利用する場合が多い。とり

わけ、CE は理論上 HPLC よりも分離能がよく、GC よりも広範囲の化合物を検出できるため今後代謝産物を網羅的に解析する研究には不可欠になると考えられ、さらに検出器に TOF-MS を使用することで CE の分解能とミリマス単位での検出が可能となり定性でも優れた威力を発揮すると考えられる。しかしながら、MS を検出器として利用する場合、CE の使用できる泳動バッファーなどが厳しく制限され、分析対象分子が限定される。従って、CE において幅広い分子が分析対象となれば、食品分析における成分の網羅的解析は飛躍的に向上すると予想される。

そこで本研究では、申請者らがこれまでの研究で得た、単一分子を規則的に並べる・ナノ構造体を構築する等、いわゆる機能性分子ゲルに関する知見を基に、電気泳動に利用するキャピラリーカラム内界面に分子ゲルレイヤーを集積させ、その分子配向を温度でのみ制御可能な形態で固定化し、分析時に温度勾配を持たせることにより、通常電気的な分子移動に加え、集積した分子との相互作用の発現をめざす。

3. 研究の方法

これまでに得た知見に基づき、分子認識能を有し分子ゲルを形成しうる化合物の分子設計・合成を行い、その構造やゲル形成能などについて詳細に調査する。得られた分子ゲルを内径 0.5 μm のキャピラリー電気泳動用のカラム内に化学結合により導入する。導入する分子ゲルは温度によりその形態が変化する構造になっているため、分析途中で泳動バッファーを変化することのできないキャピラリー電気泳動においても、カラム温度を変化させるだけで分離モードの変更が可能となる。カラム内界面の修飾後に、電荷や Log P 値が近傍のアミノ酸数種類や本来分析適用外の糖などの化合物をもちいてカラムの性能評価を行い、キャピラリーゾーン電気泳動以外の分離モードが発現したことを確認する。その後、食品成分分析の中でも難易度の高い醸造発酵食品をモデルケースに網羅的一斉分析を実施する。

4. 研究成果

(1) 分子認識素子の合成

分子認識素子は既存の方法に従い合成するが、ゲルネットワーク中の分子の配向構造、バンドル構造 (数本のファイバーの束)、クロスセクション構造 (架橋点) の精密な制御を行うため、脂質分子のアルキル鎖長、機能性部位の化学構造について検討した。アルキル鎖長が C16 以上では、溶解性の低下や配向性の増大にともない比較的大きな

ファイバー状会合体が形成される。一方 C6 以下では配向性の低下により断片的なファイバー状会合体が形成されることが確認された。加えて今回のケースでは、分子ゲル作成後にキャピラリー界面への導入を行う必要があるため分子ゲルの一端の運動性が低下することが確認された。したがってアルキル鎖長は C8 から C14 のものを合成した。

(2) 構造解析

アルキル鎖長、機能性部位の構造などを UV-vis スペクトル、円偏光二色性 (CD)、ケイ光スペクトルを用いた分光測定、ならびに TEM、SEM による微細構造観察により評価した。加えて、DSC を用いて親水性物質との親和性を評価し、温度や濃度による配向状態の詳細についても同様の手法を用いて評価した。化学修飾したものについては同様の評価に加えて、FT-IR や $^{13}\text{C-NMR}$ (現有設備) を用いて構造解析した。

(3) 固定化

キャピラリーカラムの内部 (無機界面) の活性水酸基にポリマーグラフト化に必要な不可欠な官能基を導入した。本研究では、重合反応をもちいて界面に修飾を採用しており、ラジカル連鎖を行う化学種を導入した。加えてグラフト化される分子鎖は分子認識機構に大きな影響を与える為、精密に制御する必要がある。以上の条件を満たす手法として、ここでは硫黄の連鎖移動を利用し重合度を制御するラジカルテロメリゼーション法とリビング的にラジカルを発生させ重合度を制御する ATRP 法を採用しポリマーグラフト化を実施した。グラフト後のポリマーの評価は、元素分析、拡散反射型赤外分光光度計 (FT-IR) 及び固体核磁気共鳴分光測定 (固体 $^{13}\text{C-NMR}$) により行い、加えて、ポリマーを切り出し後の溶液 NMR、TOF-MS 測定により正確な分子量、高分子主鎖の立体構造等も評価した。

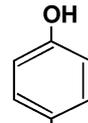
(4) 分離能評価

作製したキャピラリーカラムを利用して分離能の評価を行った。CE/MS に作成したカラムを接続し、次に示すような等電点や Log P 値 (疎水性の度合いを示す値) に近い物質をモデルケースにして分析を行った。カラム温度を変え分離係数の増減をプロットすることによって分子認識能を見いだした。加えて、泳動バッファーには 1M 程度のギ酸が用いられるため、耐酸性や再現性を詳細に調査し、高い耐久性を有することが確認できた。また、ヌクレオチドや塩基、中性物質である糖や糖アルコール及びそれらの

分離性能評価

アミノ酸を利用した性能評価

等電点や Log p が近い物質を選択 (通常モードでは分離不可能)

R:	-H	-CH ₃		
	グリシン	アラニン	フェニルアラニン	チロシン
等電点	5.97	6.00	5.48	5.66
Log p	-3.21	-2.85	-1.38	-1.30

核酸塩基や中性物質の糖・糖アルコールなども調査する

配糖体など既存の分離モードでは分析適用外とされたサンプルについても分離の検討を行った。

(5) 網羅的分析への応用

これまでの研究において、酢酸菌の 2 次代謝物を CE/MS で網羅的に分析し、その結果を多変量解析によりクラスター分類を行った。約 200 種類の化合物 (60-1,700 m/z) が検出され、そのうち 80 % 前後の化合物の組成式が精密質量より推定可能であった。分離や検出のパラメーターを最適化し同様の解析を行った結果、マーカーとなり得る化合物の同定に成功した。この、研究成果と本研

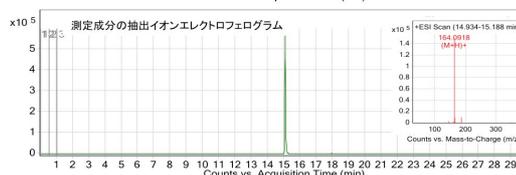
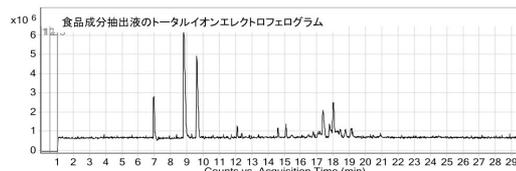
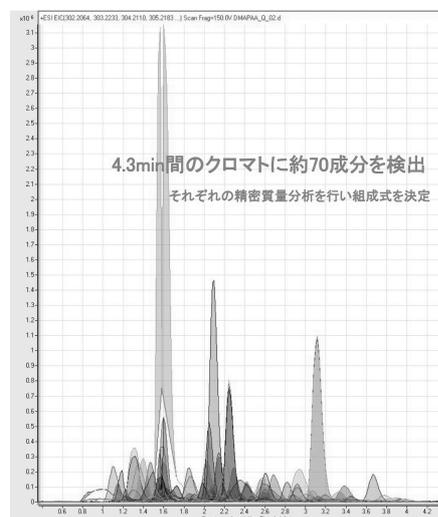


Fig. 1 食品抽出液のCE/MS分析結果とマスペクトル

究課題で作製するマルチモード CE/MS 用分離カラムを利用し、一斉分析の中でも難易度の高い発酵食品をモデルケースにし、分離界面の評価を実施した。分離例を上を示す。今後は、得られた結果をふまえ、分離界面の最適化を実施し、再度一斉分析を行い、作製した分離界面の優位性を確認する。また、チーズなどの乳製品や医薬品代謝評価等についての応用を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

1 日本分析化学会 第64年会 2015年
9月

キャピラリー電気泳動質量分析を利用した
迅速な食品成分分析法の探索

佐藤崇雄、藤野加奈子、大王龍一

[その他]

産業技術センター研究報告

[http://www.iri.pref.kumamoto.jp/library/
publication_list.html](http://www.iri.pref.kumamoto.jp/library/publication_list.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤崇雄 (SATOH Takao)

熊本県産業技術センター・食品加工室・

研究主任

研究者番号:80467977