

食品の品質指標成分の探索法に関する研究

隅谷 栄伸, 大塚 貴子

Study on Search Method for Quality Indicators in Food

Hideobu Sumitani and Takako Ootsuka

This research is aimed at developing a reliable method to evaluate flavor quality of food. In order to search for quality indicators in food, it was used the metabolomic techniques of gas chromatograph - mass spectrometer (GC-MS) using TMS derivatization and multivariate analysis of principal component analysis (PCA).

Commercial green tea beverage in a PET bottle was used as a model for this study. Two brands of PET bottled samples were stored at 55°C for 3 weeks, respectively. The extract from each sample was derivatized by methoximation and N-methyl-N-trimethylsilyl fluoroacetamide (MSTFA). In 2 dimensional scores plotting on PCA, the control and stored tea samples were divided by two groups. The PCA resulted in clear classification reflecting the deterioration of each tea sample, and revealed the indicator. These results suggested that this method is useful to search for quality indicators of food.

Key words: quality indicator, metabolomic analysis, mass spectrometry, principal component analysis, green tea beverage

食品の風味等の品質評価は官能評価が基本となるが、客観性に欠ける。そこで様々な分析を行い、その風味に寄与する成分を明らかにしようとする研究がある。このような機器分析評価では、色調変化や主成分の変動等を元に行われてきた。例えば、市販緑茶飲料の品質評価においては、官能評価の他に、色調、遊離アミノ酸量、カテキン類およびカフェイン量、アスコルビン酸（還元型ビタミンC）量などを指標として評価されてきた^{1)~5)}。これらの成分が風味にどの程度関与しているかをそれぞれ数値化することは容易ではないが、品質変化があったことを間接的に説明していると考えられる。このように各種成分の変動を観測し、総合的に品質を論じることは、研究として王道であるが、日常の品質管理にとっては指標が多すぎて扱いつらい。風味に違いがあることは、内容成分に差があることを意味する。その違いが一つの成分によるものではなく、複数の成分の組み合わせに基づくものと考えられる。そこで多変量の機器分析データを統計解析することによって、変化の中心を明らかにする技術として、ケモメトリックス（計量化学）と称する学問領域があり、さらにポストゲノムの一分野としてメタボロミクス（代謝物の網羅的分析）がある。メタボロミクスは、細胞の活動によって生じる特異的な分子を網羅的に解析し、ある瞬間の細胞内の生理を明らかにすることに用いられている。生体内では各種の反応によって、様々な分子が増減を繰り返している。食品においても同様に様々な成分が複雑に変化していると考えられ、その技法は食品研究にも有効なはずである。

本研究はメタボローム解析の手法⁶⁾を利用し、各種食品

の品質評価指標成分を探索する技術の開発を目的として、冬場には加温販売され、品質劣化が起り易い製品の一つであるPETボトル詰緑茶飲料をモデルとして試験した結果を報告する。

実験方法

1. 試料と試薬

数銘柄の市販PETボトル詰緑茶飲料（内容量500 mL）を、4°Cの冷蔵庫と55°Cの恒温室に一定期間保存し、試験に用いた。なお、本緑茶飲料は55°Cで3週間保存すると、官能的に有意に風味に違いが生じることを確認している。

オキシム化試薬はメトキシアミン塩酸塩（シグマ・アルドリッチ・ジャパン製）を無水ピリジンに溶解して20 mg/mLに調製した。TMS誘導体化試薬であるMSTFA（N-メチル-N-トリメチルトリフルオロアセトアミド）は和光純薬工業(株)から購入した。その他の試薬として、リビトールは和光純薬工業(株)から購入した。

2. 抽出処理

緑茶飲料5 mLに0.2 g/mLリビトール水溶液1 mLを添加し、-80°Cのディープフリーザーで冷凍し、凍結乾燥（EYELA製FDU-2100）した。メタノール：水：クロロホルム（2.5：1：1, v/v/v）混液1 mLを添加、振とう後、遠心分離（2,000 × g, 3分）した。上澄液0.7 mLに水2 mLを添加し、振とう後、遠心分離（2,000 × g, 3分）した。その上澄液0.6 mLを遠心エバポレーター（EYELA

製 CVE-1000) で 50℃加温下, 濃縮し, ディープフリーザーで冷凍後, 凍結乾燥した。

3. TMS 誘導体化と GC-MS 分析

凍結乾燥した抽出試料に, 20 mg/mL メトキシアミン溶液 100 μ L を添加し, 室温で 90 分間反応させた後, MSTFA 100 μ L を添加し, 37℃のウォーターバスで 30 分間反応させたものをガスクロマトグラフ-質量分析 (GC-MS) 用試料とした。

GC 装置は Agilent 6890N (アジレントテクノロジー製), カラムは J&W DB-5 (30 m \times 0.25 mm-i.d., 膜厚 0.25 μ m, アジレントテクノロジー製), ヘリウムをキャリアガスとして毎分 1.0 mL, 注入口温度は 260℃, オープン昇温プログラムは 80℃で 2 分保持後, 毎分 10℃で 320℃まで昇温し, 4 分間保持した。MS 装置は Agilent 5972 (アジレントテクノロジー製) で, 走査範囲は m/z (質量電荷比) =35-500 で分析した。

4. 多変量解析ソフトウェア

緑茶飲料の GC-MS データを AIA フォーマットに変換後, 多変量解析ソフトウェア Pirouette Ver4.0 および LineUp Ver2.0 (どちらも Infomatrix 社製) を用いて, GC 保持時間 0.01 秒刻みのピーク強度値について主成分分析を行った。なお, データは平均化し, ノーマライズ処理を行っている。

5. アスコルビン酸の定量方法

アスコルビン酸は LC で定量した。LC-10A システム (島津製作所製) を用い, カラムは Asahipak NH2P-50 4E (250 mm \times 4.6 mm i.d., 粒径 5 μ m, Shodex 製), ガードカラムは Asahipak NH2P-50G 4A (10 mm \times 4.6 mm i.d., Shodex 製), カラムオープン温度は 35℃で, 移動相は 20mM リン酸 2 水素ナトリウムと 30 mM リン酸混合液 (pH2.2) を 20% と, アセトニトリルを 80% に設定し, 流速毎分 1 mL のイソクラテック分析を行い, 254 nm で検出した。

緑茶 0.5 mL に 4% メタリン酸 4.5 mL を添加し, 10 mL に定容後, 0.45 μ m のメンブランフィルターに濾過した試料を 10 μ L 注入した。検量線用試料も調製し, 0.5, 1.5, 2.5 mg% の標準アスコルビン酸試料 (2% メタリン酸濃度) を調製・分析し, 3 点検量線法で定量した。

結果および考察

1. 市販緑茶飲料の解析結果

PET ボトル詰緑茶飲料の GC-MS の全イオンクロマトグラムの一例を, 図 1 に示す。多数のピークを検出し, このクロマトグラムをプロファイルとして, 多変量解析の一つである主成分分析を行った。官能的に明らかに風味が異なる 3 種類の結果を図 2 に示す。3 種類は主成分分析によって分類できることがわかった。このことから, 本分析方法は風味や成分の違いを表現できる可能性を持つことが示唆

アバundance

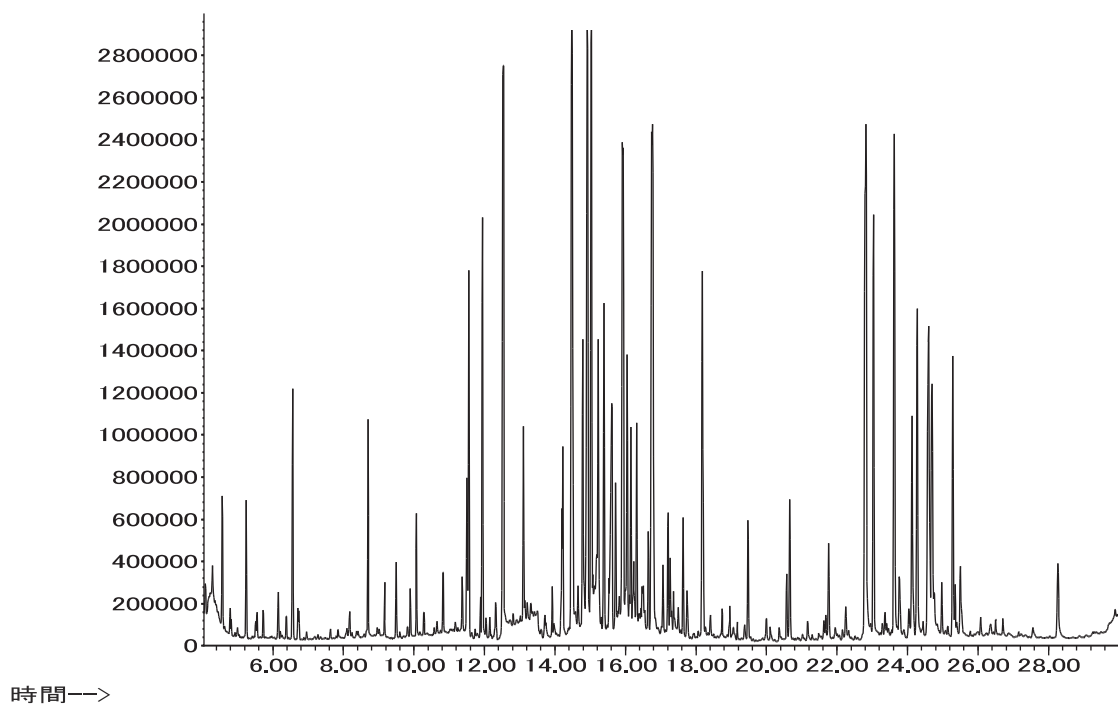


図 1 市販 PET ボトル詰緑茶飲料の GC-MS トータルイオンクロマトグラムの一例

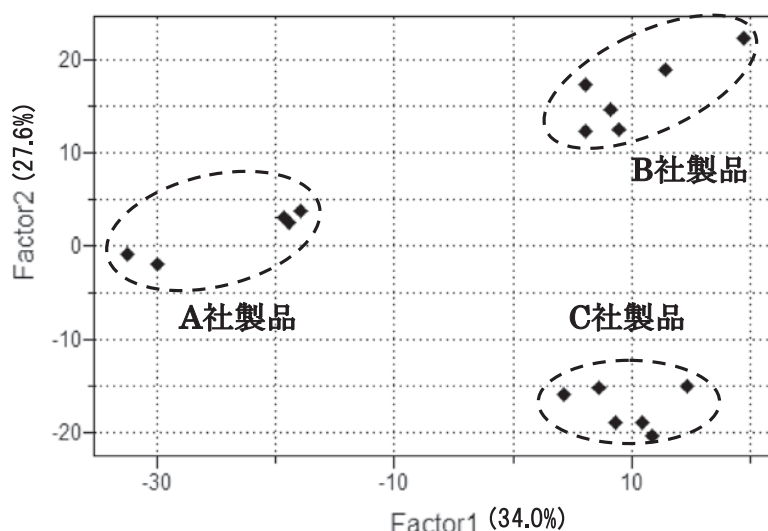


図2 主成分分析結果：市販PETボトル詰緑茶飲料（3種類）の比較（各試料 n=6）

された。

2. 緑茶加温保存品の主成分分析結果

4℃、55℃でそれぞれ3週間保存した3種類の市販緑茶飲料のGC-MS分析データを用いて主成分分析した結果を、図3に示す。Factor1（第1主成分）とFactor2（第2主成分）を軸とする2次元Scores図（各サンプルの散布図）から、Factor1に沿って、冷蔵品と55℃保存品が区別されている。Loadings図（各変数の散布図）から、3種類の緑茶に共通して、Factor1の正の方向に寄与している成分のGC保持時間は約16.8分で、その質量スペクトルからアスコルビン酸であることが分かった。逆にFactor1の負の方向に寄与している成分は、GC保持時間が14.9分から15.1分の2成分が関与していることが判明した。両成分の質量スペクトルは類似しており、それぞれが構造異性体の関係にあるか、誘導体化反応時に構造異性体が生成したものと予想された。このことから緑茶飲料の劣化に対して、正の相関を示したアスコルビン酸と、負の相関を示した未同定の2成分が劣化指標成分として利用出来る可能性が示唆された。

3. 指標成分の経時変化

2種類の市販品の冷蔵品と55℃2週間および4週間保存品について、主成分分析で正の相関があった冷蔵品に寄与しているアスコルビン酸をLCで定量した結果を図4に、主成分分析で負の相関があった保存劣化に寄与していると考えられるGC保持時間が14.9分および15.1分の2成分の定量結果を図5に示す。アスコルビン酸は緑茶飲料を製造する際に酸化防止剤として添加されるが、保存中に経時的に減少することはよく知られており、55℃保存によってリニアに減少することから、製品の劣化状態の確認に使用できると思われる。一方、GC保持時間が14.9分および15.1分の2成分は、本手法の抽出処理や誘導体化処理などの過程を経て測定された数値であり、正確な定量値とはい

えないが、経時的に増加していることが確認できた。

まとめ

各種加工食品製品に対して、網羅解析手法を用いた日常の品質管理に利用出来る品質指標成分の探索法を検討した。

市販のPETボトル詰緑茶飲料を試料として、4℃保存品と55℃劣化品を比較することで、劣化指標成分の抽出を試みた。緑茶飲料を凍結乾燥し、メタノール-クロロホルム混液で抽出後、TMS誘導体化しGC-MSで測定した。得られたクロマトグラムをプロファイルとして多変量解析（主成分分析法）した結果、4℃と55℃の各保存区試料でグループ化され、データ上に差異があることが確認された。その差異に寄与する成分として、アスコルビン酸とその他に2つの成分が選定された。アスコルビン酸は製造時に一定量が添加され、4℃保存品に多く、保存中に酸化劣化し減少することから、一つの品質指標成分であると言える。また未同定の2成分は55℃保存によって経時的に増加していることが確認できたことから、原料茶葉の選定や製造時の品質評価など、様々な品質指標としての利用が期待できる。今後、これらの成分の同定と官能との相関を明らかにし、品質指標成分としての利用を検討する。

以上の結果から、本手法は緑茶飲料などの食品の品質指標成分の探索に有効であると思われる。

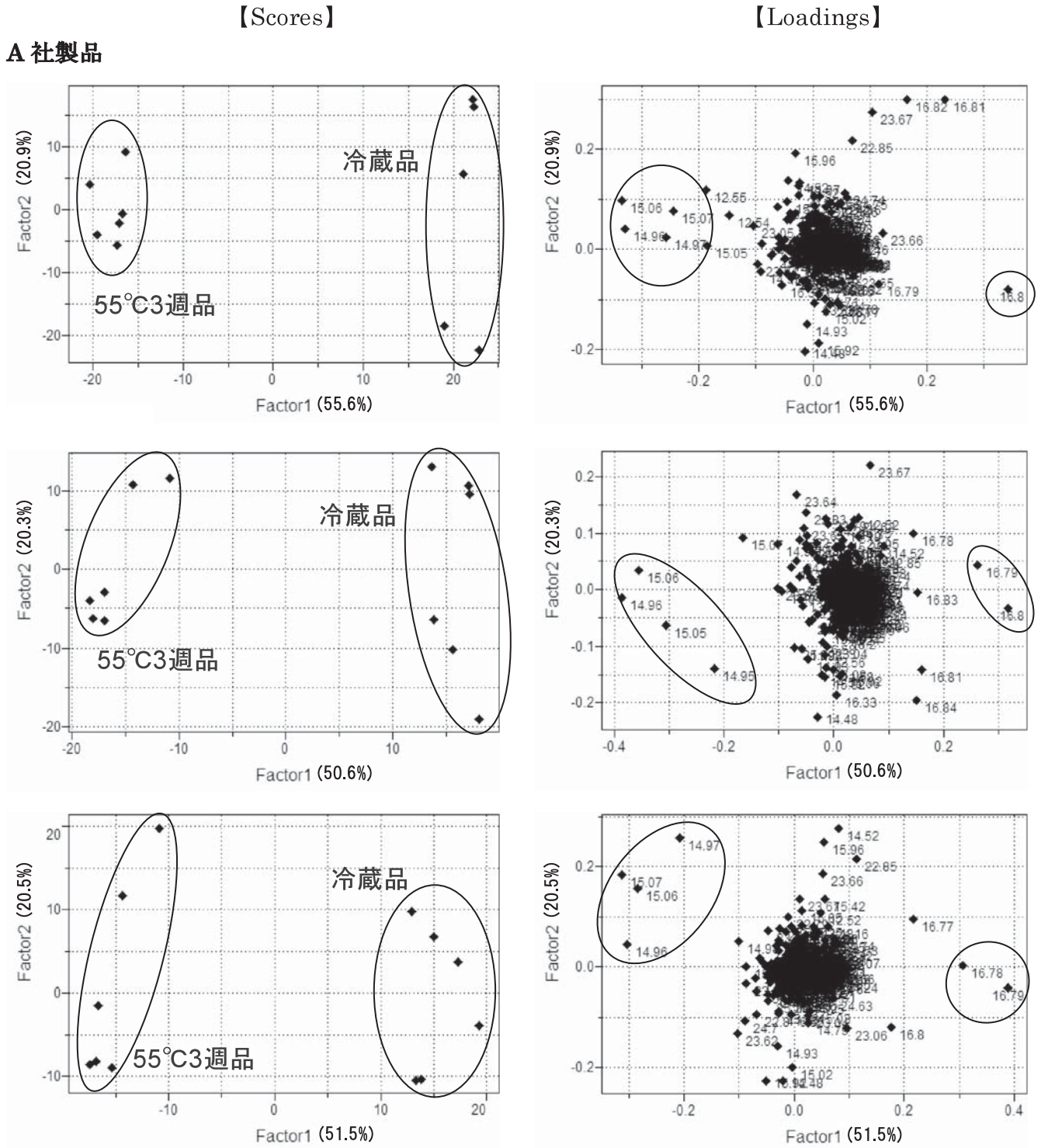


図3 主成分分析結果：冷蔵品と55°C 3週間保存品との比較（各試料 n=6）

注）Loadings 上の各プロットのラベルは0.01秒刻みのGC保持時間（分）を指す

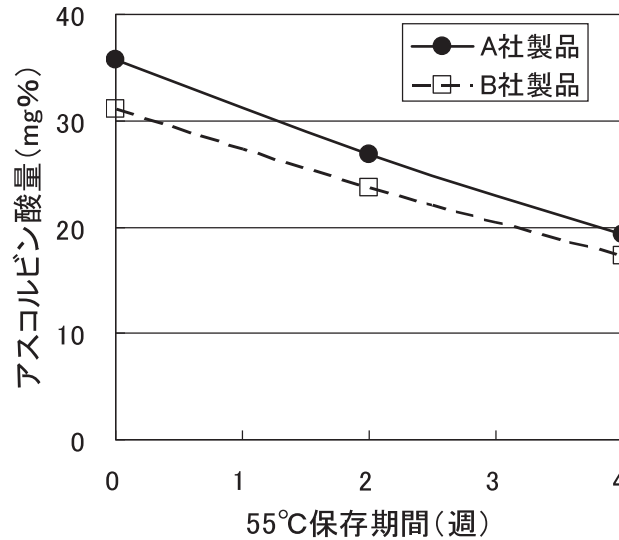


図4 55°C保存した緑茶飲料中のアスコルビン酸量の経時変化

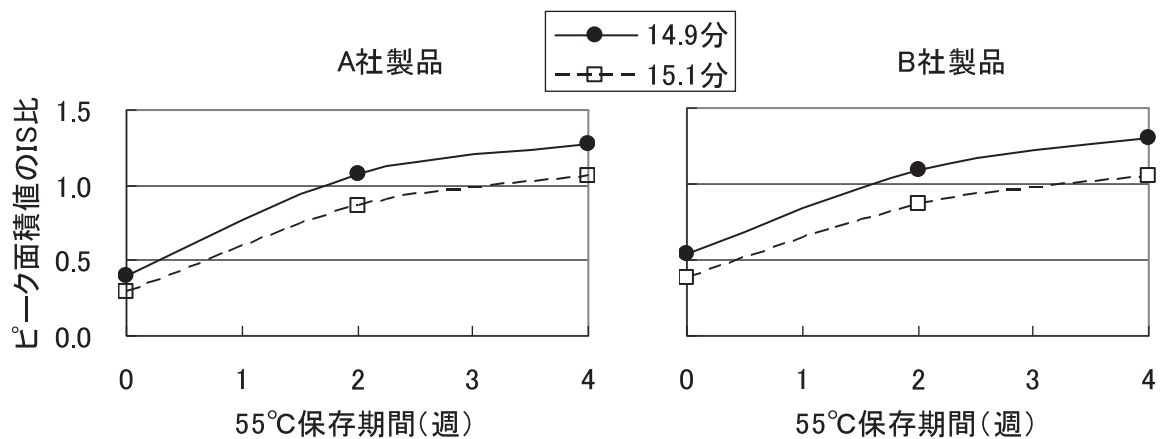


図5 指標成分 (14.9分と15.1分) の経時変化 (左図: A社製品, 右図: B社製品)

参考文献

- 1) 関根章智, 軽量化多層PETボトルを用いた緑茶の保存性評価, 包装技術, **47**, 233-235 (2009).
- 2) 菅野尚子, 影山知子, 渡辺武明, 浮島美之, PETボトル入緑茶飲料の有効成分及び品質保持に関する調査研究 煎茶浸出液との成分比較 その1, 静岡県環境衛生科学研究所報告, **44**, 57-61 (2002).
- 3) 奥崎政美, 鮮度保持容器 テトラ-ブリック-アセプティック容器の保存性能について, Packpia, **45**, 72-73 (2001).
- 4) 藤井正人, 茶類飲料の品質に及ぼす容器材質及び保存温度の影響について, 愛知県食品工業技術センター年報, **40**, 12-18 (2000).
- 5) 末松伸一, 久延義弘, 西郷英昭, 松田良子, 原京子, 小松美博, 緑茶飲料缶詰の嗜好性に及ぼす飲用温度と成分の影響, 東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書, **20**, 97-103 (1994).

- 6) Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T. and Kobayashi, A., Prediction of Japanese Green Tea Ranking by Gas Chromatography / Mass Spectrometry-Based Hydrophilic Metabolite Fingerprinting, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 231-236 (2007)