

Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 61 (9), 418-426, 2014
Copyright © 2014, Japanese Society for Food Science and Technology
doi : 10.3136/nshkk.61.418



報 文

メタボローム解析手法を用いた PET ボトル詰め緑茶飲料中の
アスコルビン酸分解に関する研究

隅谷栄伸*, 大塚貴子, 笹井実佐

公益財団法人東洋食品研究所

Metabolomic Analysis of the Degradation of Ascorbic Acid in a Commercial
Green Tea Beverage Stored in PET Bottles

Hidenobu Sumitani*, Takako Ootsuka and Misa Sasai

Toyo Institute of Food Technology, 4-23-2, Minamihanayashiki, Kawanishi, Hyogo 666-0026

The purpose of this paper was to use metabolomics to investigate the chemical changes occurring in a green tea beverage packaged in polyethylene terephthalate (PET) bottles. The analysis methodology uses trimethylsilyl derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and multivariate analysis of principal component analysis (PCA). Bottled tea samples were stored at 4°C (control) or 55°C for 2 and 4 weeks. The samples were pretreated and then derivatized. The data set was analyzed using PCA. Two-dimensional PCA plots were constructed, then the stored tea samples were divided into three groups according to their storage temperature and duration. PCA showed a clear classification reflecting the deterioration of each tea sample and revealed two indicator compounds, identified by GC/MS and LC/MS analysis as xylonic acid and lyxonic acid (belonging to the aldonic acid family). These compounds, generated from ascorbic acid present in the green tea infusion, increased in concentration during storage at 55°C. Thus, the results indicated the presence of a degradation pathway involving ascorbic acid in green tea products.

(Received Feb. 5, 2014; Accepted May 23, 2014)

Keywords : metabolome analysis, green tea beverage, ascorbic acid, aldonic acid, mass spectrometry**キーワード :** メタボローム解析, 緑茶飲料, アスコルビン酸, アルドン酸, 質量分析

生鮮あるいは加工食品において、保存中に各種成分が変動し、味、匂い、色、テクスチャーなど様々な品質に影響が生じる。食品の品質を調べるにあたり、これまでは主要な成分や特徴的な成分を個別に分析評価することが一般的であったが、分析装置やコンピュータの技術進歩で、膨大な化学データから統計解析により情報を引き出すケモトリックス（計量化学）が発展し、全ての成分を対象にした評価がなされるようになった。すなわち全検出成分を対象に網羅的に評価することで、食品の品質や成分の挙動を把握しようとする研究が始まっている^{1)~7)}。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することで、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。食品においても様々な成分が複雑に変化しており、客観的な機器分析データを元にして多成分の挙動を総合的に評価で

きれば、食品の鮮度や、調理・加工による変化、機能性成分の探求など、様々な食品研究分野に利用でき、製品開発や、品質評価・管理等にも有効と考えられる。

本研究の目的は、各種食品の品質評価・向上のため、GC/MSを使った誘導体化分析と主成分分析による多変量解析を用いたメタボロミクス手法を応用し、PET ボトル詰め緑茶飲料中の成分挙動を解明することにある。本製品は冬場に加温販売され、品質変化が起り易い製品のひとつである。保存中の変化を GC/MS 分析で捉え、それをプロファイルとして多変量解析し、その解析結果から変動成分として選定されたアスコルビン酸およびアルドン酸の挙動に関して得られた知見を報告する。なお、アルドン酸はアルドースの 1 位のホルミル基がカルボキシル基に変わったカルボン酸の総称で、その内の炭素数 5 つのアルドン酸として、リボン酸、アラビノン酸、キシロン酸、リキソン酸があり、今回の対象としている。また本文中、アルドン酸と表現する場合は、上記 4 種類を指すものとする。

〒666-0026 兵庫県川西市南花屋敷 4-23-2

*連絡先 (Corresponding author), hidenobu_sumitani@shokuken.or.jp

実験方法

1. 試料と試薬

PET ボトル詰め緑茶製品の保存試験には、3社（以後、A社、B社、C社と称す）の単層PETボトル詰め製品（内容量500mL、アスコルビン酸添加品）を各社毎に同一製造ロット品を購入し、いずれかを使用した。その他の試験で用いた緑茶試料は、A社の同一製品をその都度購入した。緑茶モデル液の調製には茶葉として伊藤園ホームサイズ緑茶（国産茶葉100%）を使用した。

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20mg/mLに調製した。TMS誘導体化試薬であるMSTFA（N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド）と、その他のリビトール、D-リボン酸 γ -ラクトン、D-キシロン酸カルシウム、D-リボース、D-アラビノース、D-キシロース、D-リキソース、臭素、酸化銀（I）、アセトニトリル、ギ酸、L-アスコルビン酸、D-イソアスコルビン酸は和光純薬工業製を用いた。

2. PET ボトル詰め緑茶製品の保存試験と緑茶抽出成分の多変量解析

(1) 試料の調製

A社とB社の2種類の製品を用い、加温しないコントロール試料として各社製品5~6本を分析に供するまで4℃に保存した。劣化程度の異なるサンプルを調製するため、加温販売時に広く使われる55℃と設定した。55℃に2週間および4週間保存した試料を各社製品5~6本調製し、その後分析に供するまで4℃に保存した。

(2) 試料の前処理

各保存区の試料からの抽出は、Pongsuwanらの方法に準じた²⁾。すなわち、1本のボトル製品から採取した緑茶飲料5mLに0.2g/mLリビトール水溶液1mLを添加し、-80℃で凍結し、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1mLを添加、振とう後、遠心分離（2000×g, 3分）した。上澄液0.7mLに水2mLを添加し、振とう後、遠心分離（2000×g, 3分）した。その上澄液0.6mLを遠心エバポレーター（EYELA製CVE-1000）で50℃の加温下濃縮して、残留する有機溶媒を除いた後に-80℃で凍結して凍結乾燥した。

(3) TMS誘導体化とGC/MS分析

凍結乾燥した抽出試料に、20mg/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、MSTFA100 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GC/MS試料とした。

GC装置はAgilent6890Nを、質量分析計（MS）はAgilent5973（ともにアジレントテクノロジー製）を使用した。GCの条件は、以下の通りとした。

注入口温度：260℃、スプリットモード（スプリット比1：20）、注入量：1 μ L。カラム：AgilentDB-5（30m×0.25mm-i.d., 膜厚0.25 μ m, アジレントテクノロジー製）、キャリアガス：He（1.0mL/min）、温度プログラム：80℃（2min）-10℃/min-320℃（4min）。MSの条件は、イオン化法：EI（正イオンモード）、イオン化電圧：70eV、イオン源温度250℃で、走査範囲はm/z（質量電荷比）35-500。

(4) 多変量解析

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 Ver 4.0およびLineUp Ver 2.0（どちらもInfomatrix社製）を用いて、GC保持時間0.01秒毎のピーク強度値を変数として、平均化およびノーマライズ処理し、主成分分析を行った。

3. 変動成分（アルドン酸）の同定

(1) アルカリ加水分解によるリボン酸の調製

D-リボン酸 γ -ラクトンの0.05g/20mL水溶液1mLと0.1N-NaOH水溶液1mLを混合し、室温で1時間反応させ、リボン酸を調製した。

(2) 臭素酸化反応による各種アルドン酸および緑茶試料の調製

Overendらの糖化合物合成方法³⁾に準じて、4種類のアルドースから、リボン酸、アラビノン酸、キシロン酸、リキソン酸をそれぞれ調製した。

すなわち、0.01g/mL（10000ppm）の各アルドース水溶液1mLに臭素0.05mLを添加し、室温で2時間以上反応後、溶液が透明色になるまで窒素ガスを通気して残留する臭素を除いた。更に脱臭素のため極少量の酸化銀（I）を加え、不溶物を遠心分離によって除去した。各アルドン酸の標品試料として、水2mLに上澄液2 μ Lを添加した試料（アルドン酸10ppm相当）と、水で10倍希釈した緑茶2mLに上澄液2 μ Lを添加した緑茶試料（アルドン酸10ppm相当）をそれぞれ調製した。なお、反応収率100%としてアルドン酸濃度（ppm）を記した。

キシロースを臭素酸化して得られた反応物をLC/MSで分析し、市販のキシロン酸と保持時間および質量スペクトルが一致したことから、本臭素酸化反応により、各アルドン酸が得られることを確認した。

(3) GC/MS分析による同定

アルカリ加水分解により調製したリボン酸水溶液2mL、あるいは臭素酸化により調製した各種アルドン酸や緑茶試料0.5mLと、水で10倍希釈した緑茶試料0.5mLをそれぞれ-80℃で凍結後、凍結乾燥し、「実験方法2.(3)」と同じ条件でTMS誘導体化し、GC/MS分析に供した。

(4) LC/MS分析による同定

臭素酸化により調製した各種アルドン酸および緑茶試料と、水で10倍希釈した緑茶試料を0.45 μ mメンブランフィルターでろ過後、LC/MS分析に供した。

LC/MS装置はAgilent1100シリーズLC/MSD SL（アジ

レントテクノロジー製)を用いた。

カラムは順相の UK-Amino (250mm×3mm-i.d., 粒径3 μm , Imtakt社製), カラム温度: 30℃とし, A液 (0.3%ギ酸水溶液) 中 B液 (1.0%ギ酸アセトニトリル溶液) を15分間で40%から25%へ下げるグラジエント溶出 (流速0.3mL/min) で, 注入量は2 μL とした。イオン化はESI (Electrospray Ionization) 法で, 走査範囲は m/z 50–500, フラグメンター電圧を100V, 乾燥窒素ガス (350℃) を毎分12L, ネブライザー圧を60 psig (0.4138 MPa), キャピラリー電圧 (Negative) を3500Vとした。

得られた全イオン電流クロマトグラムから, アルドン酸 ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_6$) の脱プロトン化物である $[\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_6]^-$ イオン (m/z 165) を選択抽出し, アルドン酸を探索した。

4. PETボトル詰め緑茶製品保存中のアルドン酸生成量の測定

(1) 試料の調製

A社, B社, C社の市販製品を4℃に保存した試料と, 55℃に2, 5, 7, 9, 14, 21, 28日間保存後, 分析に供するまで4℃に保存したボトル製品を1本ずつ調製した。

(2) LC/MSによるアルドン酸の定量

各保存区試料のアルドン酸をLC/MSで定量した。

LC装置はProminence UFLCXR (島津製作所製) を, MS装置はmicrOTOF-Q II (ブルカーダルトニクス製) を用いた。LC条件およびカラム条件は「実験方法3.(4)」と同じである。MS条件はESI法で走査範囲は m/z 50–500とし, 乾燥窒素ガス (180℃) を毎分7L, ネブライザー圧を1.6bar (0.16 MPa), キャピラリー電圧 (Negative) を2800Vとした。全イオン電流クロマトグラムから, アルドン酸 ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_6$) の脱プロトン化物である $[\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_6]^-$ イオン (m/z 165) を選択抽出し, その面積値で定量計算を行った。

検量線は, 試料濃度に応じて, キシロン酸カルシウム水溶液1–100ppm (キシロン酸換算濃度0.826–82.6ppm) の範囲で3点作成し, キシロン酸含有量を定量した。毎回検量線を作成し, その相関係数 (R) は0.998以上であった。

その他のアルドン酸については, キシロン酸と同等の感度があると仮定し, キシロン酸の検量線を用いて定量した。試料濃度に応じて検量線範囲に入るように原液あるいは水で2倍希釈したものを0.45 μm メンブランフィルターでろ過後, 測定に供し, 定量値を求めた。

5. アルドン酸の生成経路の解明

(1) アスコルビン酸水溶液の加熱分解試験

10000ppmのアスコルビン酸と, その構造異性体であるイソアスコルビン酸の水溶液をそれぞれ調製し, 10mLずつを10mL容共栓付き試験管に入れ, ガラス製キャップで密栓した。各試験管を75℃のウォーターバス (EYELA製 WATER BATH SB-35) で3時間加温した後に氷冷した。得られた試験管試料からアルドン酸を検出するためにLC/

MS/MS分析に供した。

LC装置はAgilent1290を, MS/MS装置Agilent6430 (ともにアジレントテクノロジー製) を用いた。SRM (Selected Reaction Monitoring) モードで, フラグメンター電圧80V, コリジョンエネルギー18V, プリカーサーイオン m/z 165, プロダクトイオン m/z 75.1に設定した。その他のLC条件とカラム条件は「実験方法3.(4)」と同じである。

(2) アスコルビン酸および緑茶モデル液の保存試験

1000ppmアスコルビン酸水溶液と, アスコルビン酸を添加, あるいは無添加の緑茶をそれぞれモデル液として保存試験を行った。茶葉60gをメッシュバッグに入れ, 3Lの沸騰した湯に投入し, 1時間加熱後取り出し一旦冷却後, 浸出液を1Lと約2Lの2つに分けて, 1Lの浸出液には終濃度が1000ppmになるようにアスコルビン酸1gを添加し, もう一方の約2Lの浸出液はそのままアスコルビン酸を添加しないモデル液とした。アスコルビン酸水溶液および茶葉浸出液の各モデル液を95℃5分間加熱し, それぞれ9本のポリプロピレン製容器 (分解チューブDigi TUBE, 容量50mL, 耐熱温度110℃, SCP Science製) に満注充填し, ポリプロピレン製キャップ (Digi TUBE用) で密栓した。キャップ面を下にして1時間静置後, 流水で冷却した。

各モデル液は, それぞれ3本ずつを55℃暗所に2週間と4週間保存し, コントロールは4℃に4週間保存した。保存試験後はいずれも4℃に保管して, アスコルビン酸については次項のLC分析の条件で, アルドン酸については「実験方法4.(2)」と同じ条件でLC/MSによって分析して, 3本の平均値を分析結果とした。

(3) LCによるアスコルビン酸の定量

アスコルビン酸には, LC装置Agilent1100 (アジレントテクノロジー社製) を用いた。カラムはChemcosorb-ODS-H (4.6mm×250mm, 粒径3 μm , ケムコ社製) を40℃に設定し, 移動相は0.2%メタリン酸のイソクラティック (0.5 mL/min) とした。試料5mLに対し, 4%メタリン酸水溶液5mLを添加し, 0.45 μm メンブランフィルターでろ過後, 5 μL を注入し, 検出波長250nmで分析した。検量線は10–1000ppmの範囲で5点で毎回作成し, その相関係数 (R) は0.9999以上であった。

6. キシロン酸の加熱試験

(1) 試料調製および測定条件

100ppmキシロン酸カルシウム水溶液を, 0.1N塩酸を用いてpH2.5–6.4の範囲で6段階に調整した。各pHの水溶液1mLずつを10mL容試験管12本に分注し, プラスチックキャップで密栓した。各pHの試験管3本ずつをキシロン酸初期量測定用とし, 残りの試験管を75℃湯浴に漬けた。2時間毎に各pHの試験管3本ずつを湯浴中から取り出し, 氷水に漬ける処理を行い, 6時間で終了した。各試験区の試験管3本のキシロン酸を「実験方法4.(2)」と同じ条件でLC/MSにより定量し, その平均値から残存量

(19)

隅谷・他：PET ボトル詰め緑茶成分の挙動

421

(%) を算出した。

(2) 加熱処理成分の同定

上記と同様に 100 ppm キシロン酸カルシウム水溶液 (pH 3) 2 mL を 10 mL 容試験管 1 本に入れて密栓し、4 時間 75℃ で加熱処理後、遠心エバポレーター (Genevac 社製 miVac Duo HV) を用い 50℃ で濃縮乾固した。その濃縮物をピリジン 200 μ L に溶解し MSTFA 50 μ L を添加後、室温 3 時間反応させ、「実験方法 2. (3)」と同じ条件で GC/MS 分析した。

実験結果および考察

1. PET ボトル詰め緑茶製品の保存試験と緑茶抽出成分の多変量解析

各銘柄の PET ボトル詰め緑茶飲料を 4℃ に保存した試料 (コントロール試料) と、55℃ に 2 週間および 4 週間保存後、分析に供するまで 4℃ に保存した試料を比較することで、温度による変動成分の選定を試みた。2 社 (A 社および B 社) の各試料を分析して得られた GC/MS 全イオン電流クロマトグラムを用いて、それぞれ主成分分析を行った。2 社製品の結果が同様であったため、A 社製品の主成分分析結果を図 1 に示す。Scores (主成分スコアの散布図) に示す通り、Factor1 (第 1 主成分) に沿って、4℃ に保存したコントロール試料と 55℃ で 2 週間および 4 週間保存した試料がそれぞれ区別された。変数プロット図である Loadings 図中で、Factor1 の正の方向に寄与している変数は GC 保持時間が 16.8 分のピーク強度値で、その変数に関与する成分は、GC/MS で得られた質量スペクトルと保持時間からアスコルビン酸であることが分かった。市販製品では酸化防止剤としてアスコルビン酸が添加され、保存中に減少することが知られている⁹⁾。すなわち、4℃ に保存した試料は 55℃ に保存した試料よりもアスコルビン酸が多いことが解析結果から明らかになった。逆に Factor1 の負の方向に寄与している変数は、GC 保持時間が 15 分付近の複数の変数 (0.01 分間隔のピーク強度値) が影響しており、GC/MS クロマトグラムから 2 成分に絞られた。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 2 成分を変動成分として選定し、以下、それぞれを成分 A および B とした。

2. 変動成分 (アルドン酸) の同定

成分 A および B を同定するため、GC/MS で得られた質量スペクトルのライブラリ検索結果を参考に、候補化合物を選定した。候補化合物の中で市販物質を分析確認したが、保持時間が一致しなかったため、最後に候補として残ったリボン酸を軸に同定作業を進めた。

(1) GC/MS 分析による同定

アルカリ加水分解により調製したリボン酸を TMS 誘導体化 GC/MS 法で分析した結果、リボン酸 (TMS 誘導体化

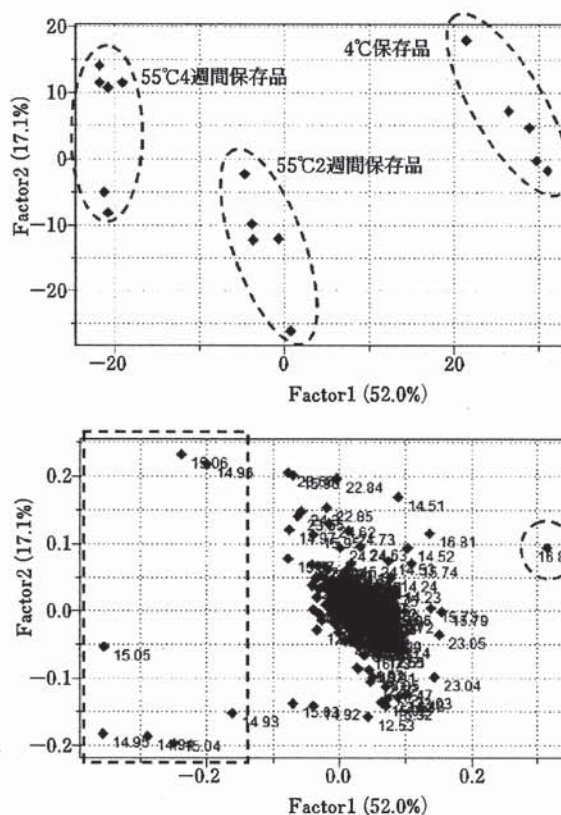


図 1 55℃ 保存試験した A 社製品の主成分分析結果：(上図) Scores (下図) Loadings

※ Scores の各点は測定試料を表す (各保存区の試料, $n=5\sim6$)
 ※ Loadings の各点は成分由来の変数 (=GC 保持時間 0.01 分間隔のピーク強度値) を表す。その添え字は GC 保持時間を示す。

物) は成分 A と質量スペクトルが一致し、GC 保持時間も近接していることが分かった。しかし、成分 B と一致するピークは検出できなかった。このことから、成分 B は誘導体化反応によって生じた構造異性体ではなく、A と B は互いに独立した成分であることが予想された。

リボン酸の構造異性体として、アラビノン酸、キシロン酸、リキソン酸がある。この内、キシロン酸 (市販品) を TMS 誘導体化 GC/MS 法で分析した結果、成分 A の GC 保持時間および質量スペクトルが一致した。

臭素酸化法で調製したリボン酸、アラビノン酸、キシロン酸、リキソン酸を GC/MS 分析した結果、リボン酸とキシロン酸が同じ GC 保持時間で、その後、リキソン酸、アラビノン酸の順で溶出した。緑茶試料および各アルドン酸をそれぞれ添加した緑茶試料を、TMS 誘導体化 GC/MS 分析した結果を図 2 に示す。各アルドン酸調製品を添加した試料と添加しない試料を比較し、リボン酸あるいはキシロン酸を添加した場合に成分 A (GC 保持時間 15.020 分) のピークが大きくなり、リキソン酸を添加した場合に成分 B (15.121 分) のピークが大きくなることから、成分 A は

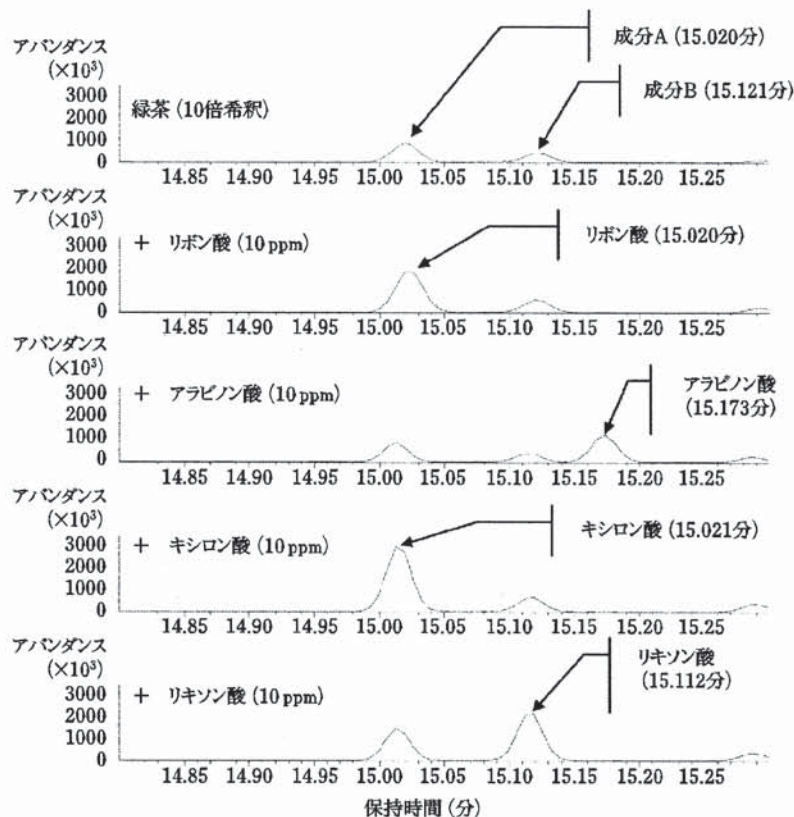


図2 緑茶試料 (A社製) および各アルドン酸添加試料のTMS誘導体化GC/MS全イオン電流クロマトグラム

リボン酸かキシロン酸で、成分Bはリキシロン酸であることが確認できた。アラビノン酸はどちらの成分にも該当しなかった。

(2) LC/MS分析による同定

4種のアルドン酸をそれぞれLC/MS分析したところ、いずれも同一の質量スペクトルを示し、リボン酸、アラビノン酸、キシロン酸、リキシロン酸の順で完全に分離されて溶出した。緑茶試料および各アルドン酸をそれぞれ添加した緑茶試料のLC/MS分析結果を図3に示す。緑茶の m/z 165の選択イオンクロマトグラムにおいて8.912分と9.418分にピークが検出された。4種類のアルドン酸の内、リボン酸とアラビノン酸は緑茶検出成分とLC保持時間が一致しなかったが、キシロン酸 (LC保持時間8.890分) が前方のピーク (8.912分) と、またリキシロン酸 (9.365分) が後方のピーク (9.418分) とLC保持時間が一致した。

以上のGC/MSおよびLC/MSの結果から、成分Aはキシロン酸、成分Bがリキシロン酸であることが判明した。

3. PETボトル詰め緑茶製品保存中のアルドン酸生成量の測定

3社のPETボトル詰め緑茶飲料のキシロン酸およびリキシロン酸の経時的変化を図4に示す。55℃保存によって、キシロン酸およびリキシロン酸が保存中に増加することが確

認された。またキシロン酸とリキシロン酸は製品毎に同期して増加していた。2つの成分は構造も類似しており、同様の反応経路で生成していると予想された。全ての製品において、保存開始前からキシロン酸とリキシロン酸を検出したが、これらは原料由来か、製造工程や流通過程で生成した可能性がある。

4. アルドン酸の生成経路の解明

キシロン酸およびリキシロン酸が緑茶飲料から検出されたとの報告はこれまでにない。それらの前駆体としてキシロースやリキシロースなどの糖類の可能性があるが、緑茶中の極微量の糖から、数10ppmのアルドン酸が生成するとは考えにくい。PETボトル詰め緑茶飲料中で大きく変動する成分として、アスコルビン酸があり、それが主成分分析結果 (図1) にも反映していることを先述した。またバイオインフォマティクス研究用に公開されているKEGGパスウェイデータベースには、アスコルビン酸からキシロン酸とリキシロン酸が代謝物として生成する経路¹⁾が示されている。

(1) アスコルビン酸水溶液の加熱分解試験

キシロン酸とリキシロン酸がアスコルビン酸由来であると予測されたため、アスコルビン酸水溶液の加熱分解試験を行った。更に、アスコルビン酸の構造異性体であるイソア

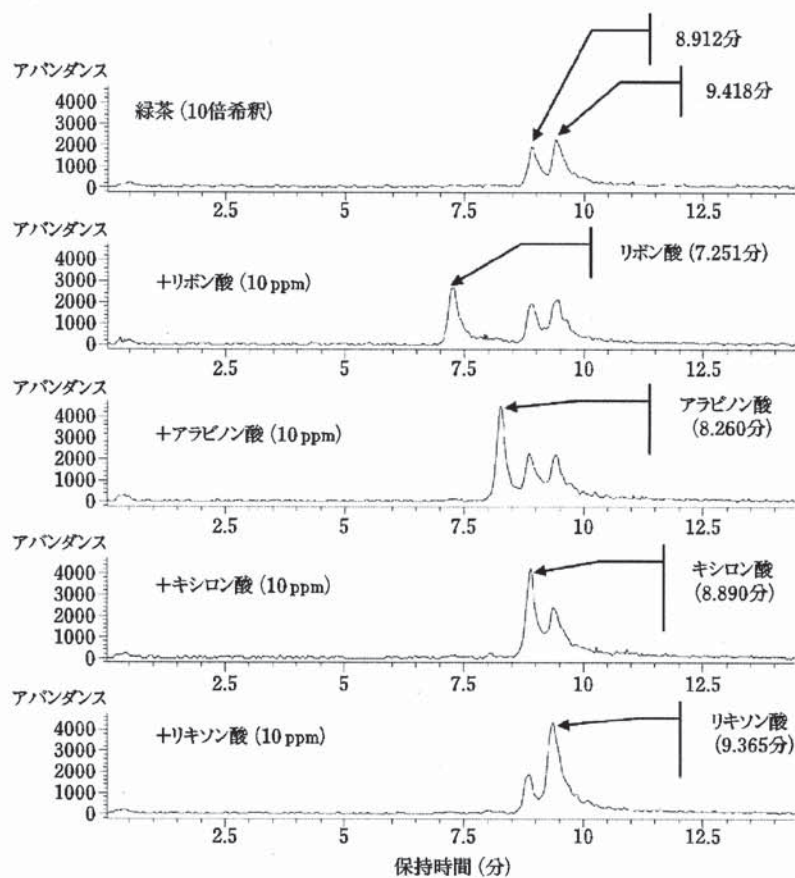


図 3 緑茶試料 (A 社製) および各アルドン酸添加試料の LC/MS 選択イオン (m/z 165) クロマトグラム

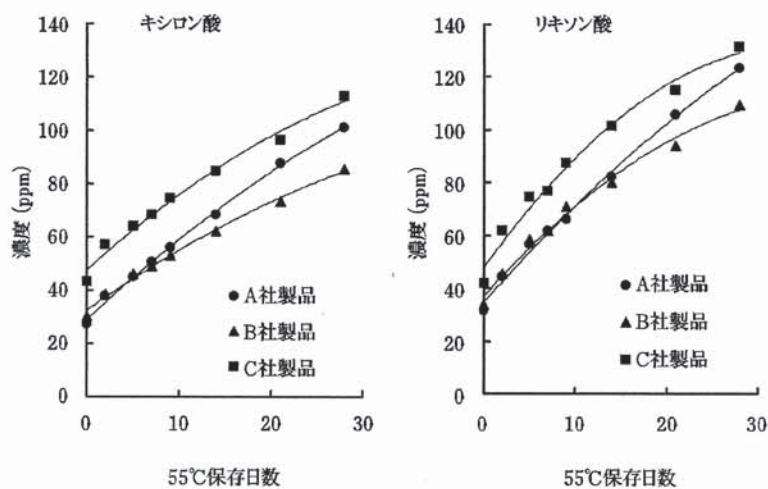


図 4 緑茶製品のキシロン酸およびリキソン酸の経時変化

スコルビン酸から同様の反応によってリボン酸とアラビノ酸が生成する可能性が予測されたため、アスコルビン酸およびイソアスコルビン酸の水溶液をそれぞれ 75°C で 3 時間加熱した後、LC/MS/MS 測定した。その結

果、アスコルビン酸からキシロン酸およびリキソン酸が、イソアスコルビン酸からリボン酸とアラビノ酸が生成することを確認した。図 5 に予想される分解経路図を示す。

リンゴ果汁飲料製品において、搾汁時の褐変防止にアス

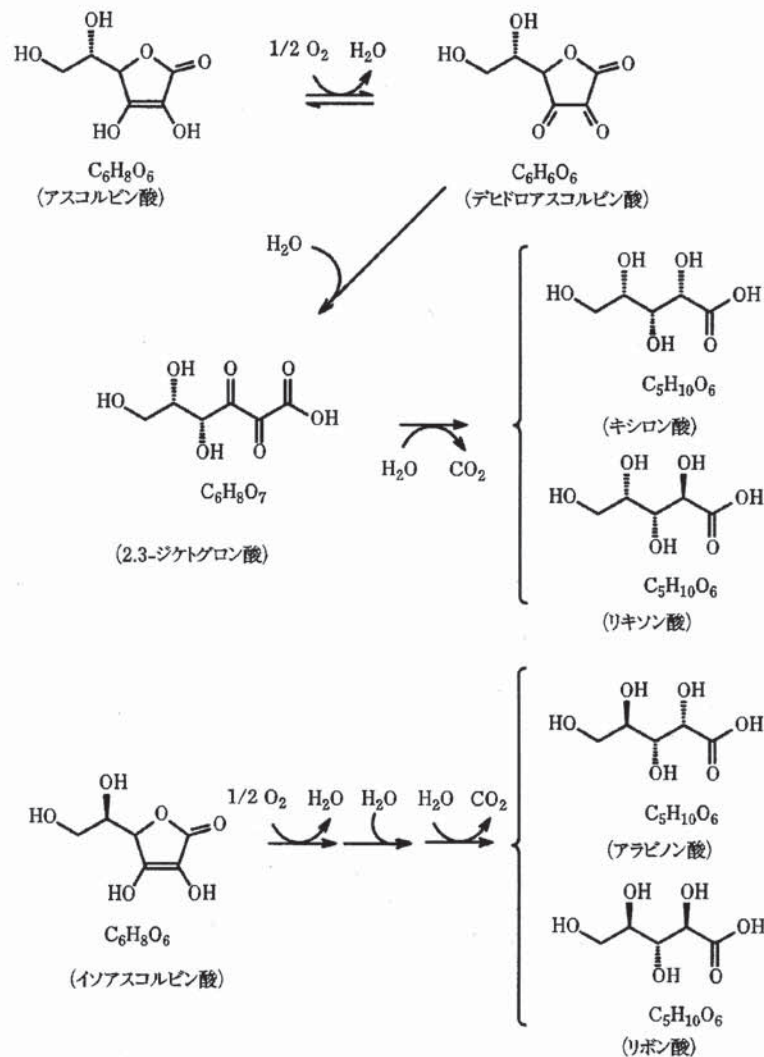


図5 アスコルビン酸 (上) およびイソアスコルビン酸 (下) の予想分解経路図

コルビン酸が添加され、アスコルビン酸からデヒドロアスコルビン酸が生成し、さらに加水分解して2,3-ジケトグルロン酸を生成することが報告されている⁹⁾。またPETボトル詰め緑茶飲料製品において、アスコルビン酸は著しく減少するが、デヒドロアスコルビン酸が検出されないことが報告されている¹⁰⁾。アスコルビン酸からデヒドロアスコルビン酸への変換は可逆的であるが、酸化生成したデヒドロアスコルビン酸が加水分解して2,3-ジケトグルロン酸へと進み、さらに2,3-ジケトグルロン酸が脱炭酸し、キシロン酸やリキソン酸へと不可逆的に変化していくものと推定される。

(2) アスコルビン酸および緑茶モデル液の保存試験

アスコルビン酸の水溶液と、アスコルビン酸を添加あるいは無添加の緑茶モデル液を、それぞれ55℃に2週間および4週間保存後、残存するアスコルビン酸と、キシロン酸

およびリキソン酸を定量した結果を表1に示す。

アスコルビン酸水溶液では、容器への加熱充填によって、保存前からアスコルビン酸が減少したと考えられ、そのコントロール品(4℃ 4週間)では、残存するアスコルビン酸濃度は726.8ppm (4.13mM)で、キシロン酸およびリキソン酸は検出されなかった。しかし、55℃保存によりアスコルビン酸は全て分解され、キシロン酸とリキソン酸を2週間の保存で合計207.4ppm (1.25mM)、4週間の保存で合計181.5ppm (1.09mM) 検出した。

アスコルビン酸を添加した緑茶モデル液の場合は、アスコルビン酸水溶液と同様に容器への加熱充填によって、保存前からアスコルビン酸が減少したと考えられ、そのコントロール品(4℃ 4週間保存試料)に残存するアスコルビン酸濃度は441.0ppm (2.50mM)であった。緑茶中では水溶液とは異なり、カテキン類などの抗酸化作用¹¹⁾¹²⁾でアスコ

表 1 アスコルビン酸水溶液およびアスコルビン酸添加緑茶試料の保存試験結果

① アスコルビン酸水溶液 (調製時アスコルビン酸添加量; 1000ppm)					
55℃ 保存期間	定量値		【ppm (mM)】		
[週]	アスコルビン酸	減少量	キシロン酸	リキソン酸	合計生成量
コントロール (4℃ 4 週間)	726.8 (4.13)	—	ND	ND	—
2	ND	726.8 (4.13)	130.0 (0.78)	77.4 (0.47)	207.4 (1.25)
4	ND	726.8 (4.13)	115.4 (0.69)	66.1 (0.40)	181.5 (1.09)

② アスコルビン酸添加緑茶試料 (調製時アスコルビン酸添加量; 1000ppm)					
55℃ 保存期間	定量値		【ppm (mM)】		
[週]	アスコルビン酸	減少量	キシロン酸	リキソン酸	合計生成量
コントロール (4℃ 4 週間)	441.0 (2.50)	—	ND	ND	—
2	318.7 (1.81)	122.3 (0.69)	63.6 (0.38)	49.2 (0.30)	112.8 (0.68)
4	152.0 (0.86)	289.0 (1.64)	98.3 (0.59)	83.0 (0.50)	181.3 (1.09)

※ ND: 不検出

ルビン酸は 55℃ 保存でも残存し、徐々に分解し、キシロン酸やリキソン酸が経時的に増加することが確認された。55℃ で 2 週間および 4 週間の保存によって、アスコルビン酸はそれぞれ 122.3ppm (0.69mM) および 289.0ppm (1.64mM) 減少しており、その時のキシロン酸とリキソン酸の合計生成量がそれぞれ 112.8ppm (0.68mM) および 181.3ppm (1.09mM) となり、アスコルビン酸の減少量に相当する生成量が認められた。一方、アスコルビン酸を添加しない緑茶モデル液を同様に保存試験した結果、アスコルビン酸やキシロン酸等が検出されなかった。このことから、キシロン酸およびリキソン酸がアスコルビン酸由来であると判断した。

なお、アスコルビン酸の分解には非酸化的分解と酸化的分解があり、非酸化的分解では最終的にフルフラールと二酸化炭素に分解することが知られている¹³⁾。アスコルビン酸の水溶液や緑茶試料のコントロール品 (4℃ 4 週間保存) において、キシロン酸等が検出されなかった理由は、加熱殺菌時に非酸化的分解が起こったためと推定される。

5. キシロン酸の加熱試験

これまでの実験データにおいて、アルドン酸が更に分解している可能性が示唆されている。例えば、市販製品のアルドン酸の経時変化図 (図 4) において、アルドン酸の生成が直線的でないことや、アスコルビン酸水溶液およびアスコルビン酸添加緑茶モデル液の保存試験結果 (表 1) において、保存期間が長くなるほどアスコルビン酸の減少量とアルドン酸の生成量に差が生じる事などから、アルドン酸が更に分解していると考えられた。その検証のため、キシロン酸水溶液の加熱試験を行った。緑茶製品の pH は約 6

で、アスコルビン酸水溶液の pH は約 3 であることから、pH 2.5~6.4 の範囲でキシロン酸水溶液を 75℃ で加温処理した結果を図 6 に示す。pH 6.4 においてアルドン酸が徐々に減少した。また pH が低いほど、キシロン酸が減少し、最大で約 50% まで下がった。

キシロン酸カルシウム水溶液を pH3 下で加熱処理した試料を TMS 誘導体化後、GC/MS 分析した結果、キシロン酸 (5TMS 体) 以外に未知成分を検出した。その未知成分の質量スペクトルから、キシロン酸のラクトン体と推定された。そこで構造が類似している市販の D-リボン酸 γ -ラクトンと同様に TMS 誘導体化分析したスペクトルデータと照合した結果、未知物質は D-リボン酸 γ -ラクTONの 3TMS 体 ($C_{14}H_{32}O_5Si_3$, 質量 364.16) と類似し、 m/z 364.1 の分子イオンも観測された。以上の結果から、未知成分をキシロン酸ラクTONと推定した。従って、緑茶飲料中において、アルドン酸は、その一部がラクTON化するために減少すると推測される。

6. ま と め

食品の品質評価や向上のため、各種成分がどのような変化をしているかを調べる必要がある。そこで、網羅的に成分挙動を調べる手法として、メタボロミクスで使用している分析や解析方法を利用した。市販の緑茶飲料をモデルとして経時変化に関連して変動する成分を調べたところ、経時的にアスコルビン酸が減少し、キシロン酸とリキソン酸が増加するという現象を知ることができた。さらにキシロン酸やリキソン酸は保存中に一部ラクTON化することも示唆された。このようにメタボロミクス手法を用いることで、PET ボトル詰め緑茶飲料中の変動成分を抽出でき、そ

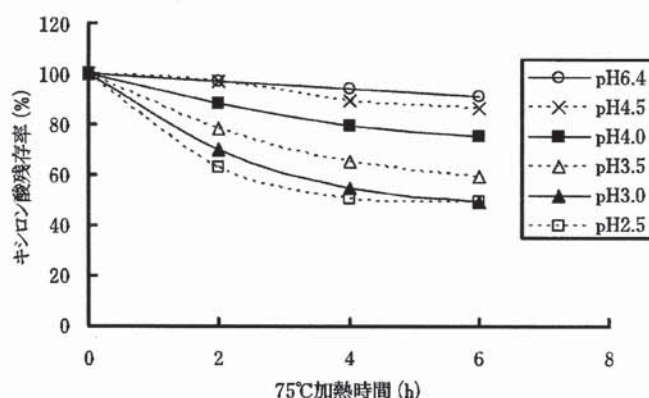


図6 キシロン酸水溶液 75°C加熱試験における pH の影響

これらの関連からその成分の挙動解明につながった。特にこれまで飲料製品中のアスコルビン酸の分解過程でデヒドロアスコルビン酸が検出されないなど、食品中のアスコルビン酸の挙動が不明瞭であったが、ノンターゲットに分析することによって、着眼していなかった成分の変化を見いだしたことは非常に意義深い。今後、本方法を使って様々な食品の成分挙動を解明することによって、品質評価や向上につながるものと期待する。

要 約

本論文の目的は、GC/MSを使ったトリメチルシリル誘導体化分析と主成分分析による多変量解析を用いるメタボロミクス手法を応用し、PET ボトル詰め緑茶飲料中成分の挙動を解明することである。

PET ボトル詰め緑茶飲料を 4°C と 55°C で 2 週間および 4 週間保存した。前処理後、誘導体化 GC/MS 分析結果の主成分分析によって、試料は保存温度と期間に応じて 3 つにグループに分離された。その変数プロット図から品質指標として 2 つの成分を選定し、GC/MS および LC/MS 分析によりそれぞれ 2 種類のアルドン酸（キシロン酸およびリキソン酸）と同定した。これらキシロン酸およびリキソン酸が緑茶飲料に添加されたアスコルビン酸の分解によって生成し、55°C 保存中に増加することを実験的に示すことで緑茶飲料製品におけるアスコルビン酸の分解経路を明らかにした。

物質同定の際のアルドン酸標品を調製するにあたり、ご指示ご指導戴きました大阪府立大学特認教授の切畑光統先生に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) 福崎英一郎, メタボロミクス (代謝物総体解析) の食品工学への応用, 生物工学, 85, 488-491 (2007).

- 2) 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).
- 3) 山本慎也, 馬場健史, 福崎英一郎, 佐野敦志, 小玉侑加子, 今村美穂, 小幡明雄, GC/TOFMS によるしょうゆ成分のプロファイリングおよび定量的記述分析法との相関性, 醤油の研究と技術, 39 (3), 131-139 (2013).
- 4) 越智 浩, 食のメタボロミクス解析応用の最新動向 3 GC/MS を用いたメタボローム解析のチーズ品質評価への応用, 食品と開発, 48 (11), 10-12 (2013).
- 5) 杉本昌弘, メタボローム解析を用いた日本酒の味と成分の関係の解明, *Bio Industry*, 29 (11), 52-58 (2012).
- 6) 及川 彰, 食のメタボロミクス解析応用の最新動向 食品のメタボローム解析動向, 食品と開発, 48 (11), 4-6 (2013).
- 7) 及川 彰, メタボロミクスの農業・食品分野への応用, 化学と生物, 51 (9), 615-621 (2013).
- 8) Overend, W.G., Stacey, M. and Wiggins, L.F., Deoxy-sugars. part IV. A synthesis of 2-deoxy-D-ribose from D-erythrose, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1358-1363 (1949).
- 9) 越野昭一, 本部康宏, 久保順一, 佐藤 恵, リンゴ混濁果汁の褐変に関する研究 (第 2 報) リンゴ搾汁時に添加した L-アスコルビン酸の分解について, 果汁協会報, 396, 30-35 (1990).
- 10) 米谷 力, 木村好成, ベットボトル入り煎茶飲料の貯蔵による成分変化について, 奈良県農業技術センター研究報告, 34, 66-67 (2003).
- 11) Chen C. - W. and Ho C. - T., Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas, *J. Food Lipids*, 2, 35-46 (1995).
- 12) 佐藤陽子, 巽佐智江, 市販ペットボトル茶系飲料中のカテキンおよびビタミン C と抗酸化効果, 共立女子短期大学生生活科学科紀要, 45, 67-72 (2002).
- 13) 石井謙二, 桜井英敏, L-アスコルビン酸とその酸化分解, 栄養学雑誌, 48, 149-156 (1990).

引用 URL

- 1) http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00053+C04575 (2012. 12. 15), KEGG-ASCORBATE AND ALDARATE METABOLISM- Reference pathway (KO). (平成 26 年 2 月 5 日受付, 平成 26 年 5 月 23 日受理)