

Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, **63** (9), 415–419, 2016
Copyright © 2016, Japanese Society for Food Science and Technology
doi : 10.3136/nskkk.63.415



<http://www.jsfst.or.jp>

研究ノート

メタボリックプロファイリングによる柑橘果汁飲料製品の特徴的変動成分の探索

隅谷栄伸^{1*}, 大塚貴子², 大木伽耶子¹

¹ 公益財団法人東洋食品研究所

² 元公益財団法人東洋食品研究所

Identification of Characteristic Quality Determinants of Commercial Citrus Juice Beverages by Metabolic Profiling

Hideonobu Sumitani^{1*}, Takako Otsuka² and Kayako Ogi¹

¹ Toyo Institute of Food Technology, 23-2, 4-Chome, Minamihanayashiki, Kawanishi-shi, Hyogo 666-0026

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

The purpose of this study was to investigate the objective validation of the quality of citrus juice products using a metabolic profiling method. Citrus juice products stored at 55°C for 1–4 weeks were trimethylsilyl-derivatized and subjected to gas chromatography–mass spectrometry analysis. Principal component analysis showed that the amounts of fructose, glucose and sucrose changed according to the storage period. In addition, high performance liquid chromatography analysis of the citrus juice indicated that sucrose was hydrolyzed to equimolecular amounts of fructose and glucose. Thus, we propose that the method used in this study described product conditions objectively, and can be applied to the quality control of foods. (Received Mar. 17, 2016; Accepted May. 27, 2016)

Keywords : citrus juice beverage, metabolomic analysis, mass spectrometry, principal component analysis, carbohydrate
キーワード : 柑橘果汁飲料, メタボローム解析, 質量分析, 主成分分析, 糖

食品の品質評価法として、成分の化学分析により、客観的に評価しようとする試みがこれまでなされてきた。食品分析において、糖、アミノ酸、各種ビタミンなどを個別に分析評価するが、これらの成分を網羅的に解析するメタボリックプロファイリングの手法が注目されている¹⁾。福岡らはその手法を食品工学に応用し、GC/MS クロマトグラムの保持時間（独立変数）とピーク強度（従属変数）のデータ行列を用いた解析により、高級茶と低級茶を層別し、成分の違いや品質の予測を行っている¹⁾²⁾。このような手法を用いて、サンプルの機器分析と多変量解析から変化をみつけ、製品状態を客観的に示すことができれば、品質の管理や向上のための有益な情報になる。

質量分析データ用に開発された多変量解析ソフトウェアでは、ピークが重なった成分も区別して解析できる点において成分分解能が高く効率的という利点がある。その一方で、質量分析により得られたクロマトグラムの波形を変動箇所の探索に利用し、その箇所の質量スペクトルから成分の構造を推定するという手法も有効である。これらは非選択的かつ網羅的に解析することから、成分変動の探索や製

品評価への応用が期待できる。筆者らは PET ボトル詰め緑茶飲料製品を題材として、GC/MS により得られたクロマトグラムの波形データの解析により、変動成分を発見し、その質量分析データからアスコルビン酸の分解経路の解明につなげることができた³⁾。

本研究の目的は、メタボリックプロファイリング手法が各種製品の状態を客観的に評価できるかを調べることである。今回、市場性の高い柑橘果汁飲料製品を題材とし、保存劣化させた試料を調製し試験を行った結果を報告する。

1. 実験方法

(1) 試料の調製

350 mL 容 PET ボトル詰め 100% 柑橘果汁飲料製品（内容量 350 mL、オレンジ果汁と温州ミカン果汁のブレンド品）は、ロット単位で製造販売メーカーから直接購入し、保存試験開始まで 4°C に保管した。PET ボトル詰品は、30°C、40°C で 2 週間および 4 週間、55°C で 1, 2, 3, 4 週間保存後、各種測定に供するまで 4°C にて保存した。なお成分変化が明確に現れる 55°C 保存試料（保存区毎に試料 5 本）の分析データを元に主成分分析による解析を行った。

¹ 〒666-0026 兵庫県川西市南花屋敷 4-23-2, ² 〒666-0026 兵庫県川西市南花屋敷 4-23-2

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

(2) 測定項目

i) pH, Brix, 色の測定

pH の測定には, pH メーター (M-12, HORIBA 製) を, Brix の測定には, デジタル屈折計 (PR-1, アタゴ製) を用いた。

ii) GC/MS 分析および解析

(i) メトキシアミン溶液の調製

ベレット状の水酸化カリウムを入れ, 無水化したピリジン (和光純薬工業(株) 製, 特級) に, メトキシアミン塩酸塩 (Sigma-Aldrich Japan 製) を溶解し, 20 mg/mL に調製した。

(ii) 成分抽出および誘導体化

Pongsuwan らの方法に準じた²⁾ 試料 0.1 mL を凍結乾燥し, 得られた乾燥試料にメタノール: 水: クロロホルム = 2.5: 1: 1 (v/v/v) の混液を 1 mL 添加し, タッチミキサーで振とう後, 遠心分離 (12000 rpm, 3 分間) した。上澄液 0.7 mL に, 水を 0.2 mL 添加してタッチミキサーで振とう後, 遠心分離した。遠心エバポレーター (50℃, 30 分間) で上澄液 0.6 mL からメタノールおよびクロロホルムを除去し, 抽出液とした。

抽出液を凍結乾燥させ, メトキシアミン溶液 0.1 mL を添加し, 室温で 90 分以上反応させた。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, Pierce Biotechnology 製) を 0.1 mL 添加し, 37℃ のウォーターバスで 30 分反応させ, 4 時間以上室温で静置したものを GC/MS 試料とし, 24 時間以内に分析に供した。

(iii) 分析条件

GC 装置は 7890A GC System (Agilent Technology 製) を用い, カラムを Agilent DB-5 (30 m×0.25 mm-i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent Technology 製) とした。キャリアガスはヘリウムを流速 1.0 mL/分 で流した。注入口温度は 260℃ で, オープン温度は 80℃ で 2 分間保持後, 10℃/分 にて昇温し, 320℃ で 4 分間保持した。検出器は, JMS-T100GCV 型 GCTOF (日本電子製) を用いた。MS のイオン化モードは EI, 検出器電圧 2100 V, MS レンジ m/z 35-650 (0.4 スキャン/秒, データ集積間隔 0.5 [ns]), 溶媒待機時間を 4 分とした。

(iv) 解析条件

データ解析ソフト MassCenter システム (日本電子製) を用いて, ANDI フォーマット (米国分析機器工業会が定めたクロマトグラフィーデータの標準フォーマット) に変換後, GC 保持時間 4.06 分 (データ取り込み開始時間) 以降の 0.01 分刻みのピーク強度を PiroTran (ver 1.35, ジェールサイエンス製) によりデータ行列化し, 多変量解析用ソフトウエア Pirouette (Infometrix 製) を用いて解析を行った。多変量解析手法の中で, 探索的データ解析手法である主成分分析 (PCA) を行った。なお, 変数は平均化および, ノーマライズ処理した。

iii) 糖含量の定量

糖含量の測定には Agilent1100 Series HPLC (Agilent Technology 製) を用いた。試料は三層フィルタ (Whatman シリンジフィルター φ25 mm, 0.45 μm) でろ過した後, 分析に供した。測定条件は, 移動相に 85% (v/v) アセトニトリル水溶液を用い, 流速 0.45 mL/min のイソクラティックで流し, カラムは UK-Amino (250×3 mm, 3 μm, Imtakt 製), 温度 36℃, 注入量 10 μL とした。示差屈折率検出器 (RID) は Agilent1200 Infinity Series (Agilent Technology 製) を用い, 温度を 40℃ に設定した。糖の標準品は, フルクトース, グルコース, スクロース (和光純薬工業(株) 製) の各糖の濃度が 1.25~5% (w/v) の混合水溶液を調製し, それを検量線試料として検量線を求め, 各種糖の保持時間におけるクロマトグラムのピーク強度 (面積値) を算出し定量した。1 本の試料を 3 回ずつ測定し, モル濃度 (mM) で示した。

2. 実験結果および考察

(1) 試料特性

劣化促進のため保存温度は 30℃, 40℃, 55℃ の 3 通りで試料を調製した。保存した試料は, いずれも pH 3.8 を示し, 保存温度と期間によって変化は全く見られなかった。Brix は 10.7 で, 30℃ および 40℃ で 4 週間まで変化はなかったが, 55℃ 2 週間の保存で 10.9, 4 週間の保存で 11.0 を示した。高温保存により PET ボトルの水分透過および揮発性が影響し, 若干, 濃度が濃くなった可能性が考えられるが, 特に顕著な差ではなかった。

(2) 主成分分析

4℃ および 55℃ 保存した PET ボトル結果汁飲料製品を TMS (トリメチルシリル) 誘導体化後 GC/MS により測定した。例として 4℃ および 55℃ 4 週間保存試料から得られた全イオンカレントクロマトグラムを図 1 に示す。これらの分析データを用いて, 多変量解析の一つである主成分分析を行った。4℃ および変化が顕著な 55℃ 1, 2, 3, 4 週間保存試料のクロマトグラム波形データを用いて主成分分析した結果を図 2 に示す。Scores から, 各試料が第 1 主成分 (Factor1) で明確に分離していることがわかる。また, 55℃ 保存試料は, 保存期間毎に分類されており, 保存期間と共に, 第 1 主成分軸方向に移動した。本解析における変数は各成分ではなく, 保持時間 0.01 分刻みのピーク強度である。Loadings から, 第 1 主成分 (Factor1) に対して正方向に相関した変数は保持時間 15~17 分にあり, 全イオンカレントクロマトグラムで確認したところ, 保持時間 15.9 分と 16.4 分の 2 本のピークに該当した。同様に負の方向に相関した変数とクロマトグラムで確認したところ 22.7 分のピークに該当した。それらの保持時間とスペクトルから, 15.9 分がフルクトース, 16.4 分がグルコース, 22.7 分がスクロースと同定された。Loadings において, フルクトースとグルコースが第 1 主成分軸の正方向に大きい物質

(41)

隅谷・他：柑橘果汁飲料の特徴的変動成分

417

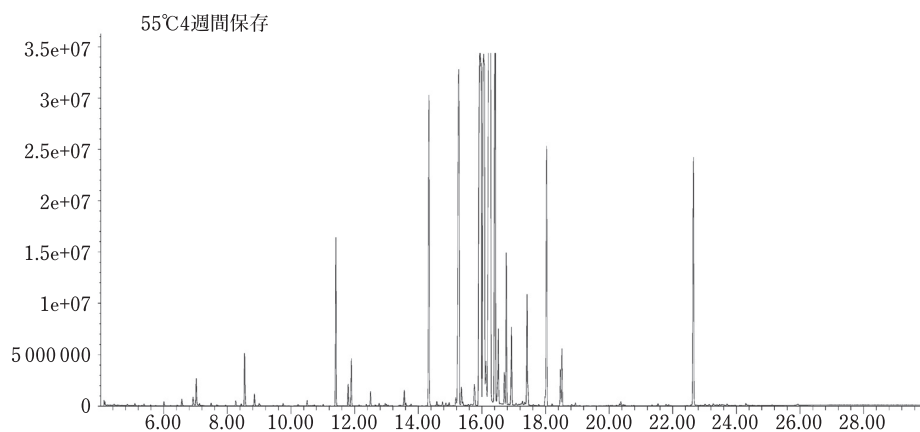
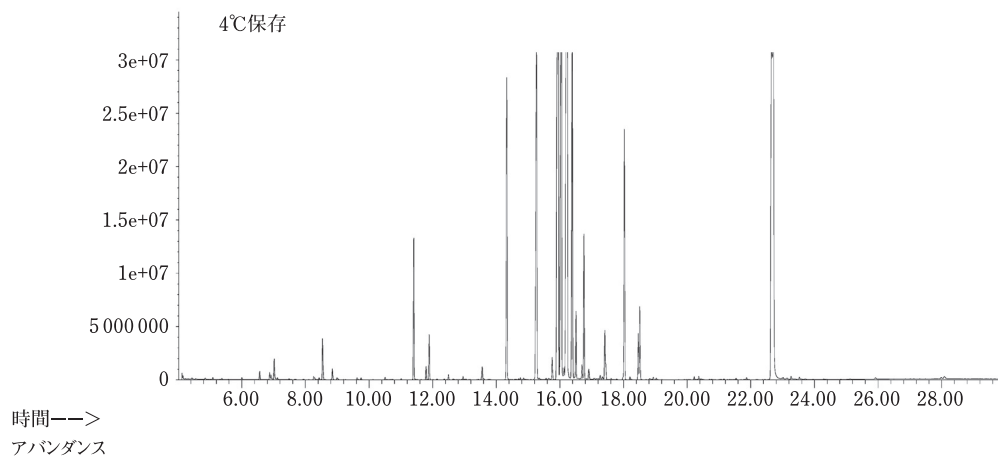


図 1 市販果汁飲料 4℃ および 55℃ 4 週間保存試料の全イオンカレントクロマトグラム

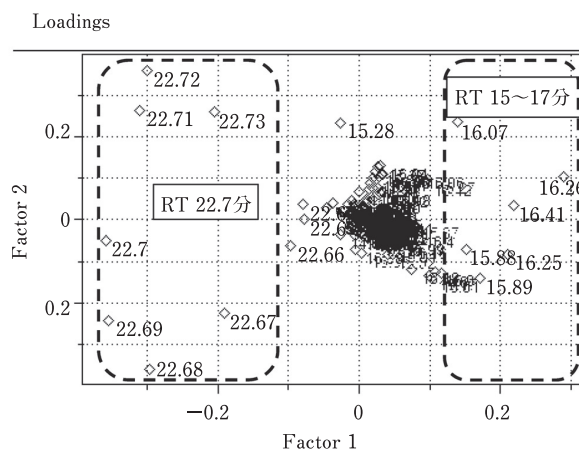
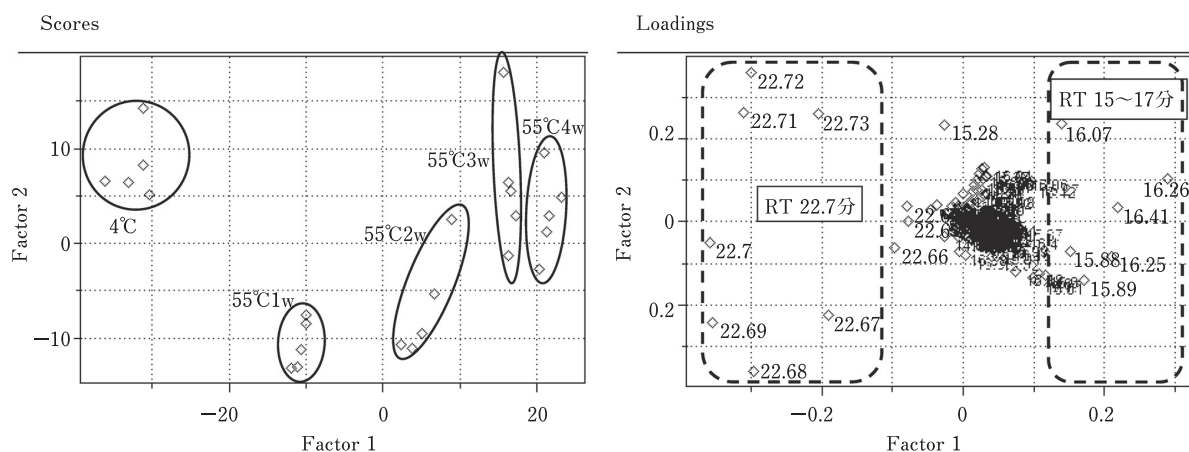


図 2 TMS 誘導体化 GC/MS 分析データの主成分分析結果

Scores の各点は測定試料を表す（各保存区の試料, $n=5$ ）

Loadings の各点は独立変数 (GC 保持時間 (分), 添え字) を表す

表 1 PET ボトル詰果汁の糖含量 [mM]

期間	30℃			保存温度 40℃			55℃		
	フルクトース	グルコース	スクロース	フルクトース	グルコース	スクロース	フルクトース	グルコース	スクロース
コントロール (4℃)	140	132	118	140	132	118	140	132	118
2 週間	142	135	109	165	155	87	228	219	32
4 週間	147	139	103	192	182	69	246	236	11 ^{※2}
Δ ^{※1}	7	7	-15	52	50	-49	106	104	-107

※ 1 各糖の差 (Δ) = (保存 4 週間品の糖含量) - (コントロールの糖含量)

※ 2 定量値が 100mM 以上の場合の変動係数は 5% 以下, 低濃度 (約 10mM 以下) では 20% 超

であり, スクロースが負方向に大きい物質であることから, 加温により, これらの含量が変化したと考えられる。なお, 図 1 のクロマトグラムの 4℃と 55℃保存試料を比べて見ると, スクロースと同定された 22.7 分のピークが大きく減少していることが分かる。同様にフルクトースとグルコースの各ピークも 55℃保存で増加していることが確認された。

このように, クロマトグラム波形のパターンから, 果汁飲料の加温保存期間ごとに分類できることが分かった。すなわち, クロマトグラム波形のパターンが製品状態のプロファイルであり, 原料管理, 製造管理, 品質管理等への様々な応用の可能性を示唆した。

(3) 糖含量の変化

実際の糖含量を確認するため, 市販果汁飲料の 4℃および 30℃, 40℃, 55℃の 2 週間, 4 週間保存試料を HPLC 分析に供し, フルクトース, グルコースおよびスクロースを定量した結果を表 1 に示す。4℃保存試料 (コントロール) を初期値と考え, その含量を比較すると, 保存期間が延びるとフルクトースとグルコースが増加し, スクロースが減少した。また, 保存温度の高い方が, フルクトースとグルコースの含量が多く, スクロース含量は少なかった。保存期間や, 保存温度によって, フルクトースとグルコースが増加し, スクロースが減少することから, これらは温度の影響を受けたと考えられる。スクロースはグルコースとフルクトースが脱水縮合した糖であり, 加水分解によりモル等量のフルクトースとグルコースを生成する。これらの糖の変化量を各保存温度 4 週間品とコントロール (4℃保存試料) との差 [Δ] を求め表 1 に加えた。55℃ではフルクトース, グルコース, スクロースの変化量がよく一致し, 30℃および 40℃保存では 55℃保存に比べて変化量が小さく明瞭ではないが, 同傾向の変化を示した。このことから, 果汁飲料の保存中に, スクロースが加水分解し, フルクトースとグルコースが生成したと推定される。柑橘果汁においてショ糖が加水分解する事例として, 缶詰グレープフルーツジュースを 30℃ 6 週間保存によりスクロースの 50% 以上が加水分解して還元糖が増加したとの報告⁴⁾がある。今回のオレンジと温州ミカンのブレンドジュースでは, 上記

ほど激しい変化は生じなかったものの, 類似した反応が生じたと考えている。

(4) おわりに

メタボリックプロファイリングの手法を用いて, 果汁飲料製品の状態を客観的に評価した。加温保存した市販果汁飲料の GC/MS データの主成分分析および成分同定と HPLC による定量から, 食品成分の変化としてスクロースの加水分解によりフルクトースとグルコースが生成することを確認した。このような変化は既に報告されているが, クロマトグラム波形の解析および質量分析による成分推定を行う本手法は食品中の成分変化の探索に有効であることが分かった。日常の製品管理では, 分析設備や維持の負担が MS に比べて少ない FID (水素炎イオン化検出器) でも対応可能で, 日本緑茶葉の品質格付け⁵⁾や, 高級コーヒーの品質判別・予測⁶⁾に GC/FID を利用した報告もある。

一つの分析方法で全ての食品成分の状態を把握することは難しいが, 成分別の個別分析よりも, 非選択的かつ網羅的に成分の変動を調べるプロファイリングにより, 全体像で状態を確認でき, 汚染成分や予期せぬ劣化進行の発見など, 製品リスク管理の精度を上げる意味において有効であろう。また原料管理, 品質管理, 加温殺菌時や流通時の熱履歴の判定など広く応用が期待される。

3. 要約

本研究の目的は, メタボリックプロファイリング手法が柑橘果汁飲料の製品状態を客観的に評価できるかを調べることである。

柑橘果汁飲料製品を 55℃で 1, 2, 3, 4 週間保存し, 凍結乾燥, 溶剤抽出等の前処理後, TMS 誘導体化処理して GC/MS 測定を行った。得られたクロマトグラムの波形データを主成分分析した結果, 保存期間毎に群分けされ, それに寄与する成分が保持時間と質量スペクトルからフルクトース, グルコース, スクロースと同定された。

その変動を確認するため, 市販果汁飲料の 4℃および 30℃, 40℃, 55℃の 2 週間, 4 週間保存試料を HPLC で測定し, 変動量をモル濃度で比較したところスクロースの加水分解によりモル等量のフルクトースとグルコースの生成

が推定された。

クロマトグラム波形の解析および質量分析による成分推定を行う本手法は食品中の成分変化の探索に有効で、得られた波形パターンを製品のプロファイルとして品質管理等への応用の可能性が確認された。

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, 生物工学会誌, **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) 隅谷栄伸, 大塚貴子, 笹井実佐, 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, 日本食品科学工学会誌, **61**, 418-426 (2014).
- 4) Lee, H.S. and Nagy, S., Quality changes and nonenzymic browning intermediates in grapefruit juice during storage. *J. Food Sci.*, **53**, 168-172,180 (1988).
- 5) Jumtee, K., Bamba, T. and Fukusaki, E., Fast GC-FID based metabolic fingerprinting of Japanese green tea leaf for its quality ranking prediction. *J. Sep. Sci.*, **32**, 2296-2304 (2009).
- 6) Jumhawan, U., Putri, S.P., Bamba, T. and Fukusaki, E., Yusianto, Application of gas chromatography/flame ionization detector-based metabolite fingerprinting for authentication of Asian palm civet coffee (Kopi Luwak). *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 555-561 (2015).

(平成 28 年 3 月 17 日受付, 平成 28 年 5 月 27 日受理)