



GC/MSによる日本酒の代謝物分析 その1 (アミノ酸、糖、有機酸)



<要旨> Fiehn メタボロミクスライブラリを用いた GC/MS により、分類の異なる日本酒 4 種の代謝物 (アミノ酸、糖、有機酸) の分析を行いました。主成分分析により、普通酒、吟醸酒、大吟醸酒、純米吟醸酒の分類ができ、クラスター分析により、各サンプルに特徴ある化合物を捉えることができました。

Key Words: 日本酒 (清酒)、代謝物、多変量解析、GC/MS、Fiehn メタボロミクスライブラリ、Mass Profiler Professional

* * * * *

1. はじめに

日本酒 (清酒) は、米、米こうじ、水を主な原料として、製造されます。精米歩合、醸造アルコールの添加の有無、製造方法によって、清酒の分類 (吟醸酒、純米酒、本醸造酒など) がされています。米の胚芽や表層部には、たんぱく質、脂質、灰分、ビタミンなどが多く含まれ、多過ぎると逆に清酒の風味を悪くするので、日本酒の原料には精米した白米が使用されています。醸造アルコールを適量添加すると「スッキリした味」になり、さらに日本酒の風味を劣化させる乳酸菌の増殖を防止する効果もあります。吟醸造りは、より高い精白率で精米した白米を低温でゆっくり発酵させ、特有な芳香を有するように製造されています。

本アプリケーションノートでは、分類の異なる普通酒、吟醸酒、大吟醸酒、純米吟醸酒を選択し、Agilent Fiehn メタボロミクスライブラリにより代謝物の測定を行い、多変量解析ソフトウェア Mass Profiler Professional (MPP) により、それらの差異を分析しました。

2. 測定条件

装置: Gerstel 社 MPS2 多機能オートサンブラ+
Agilent 社 7890B GC/5977A Extractor MSD
ライブラリ: Agilent Fiehn メタボロミクスライブラリ
多変量解析: Agilent Mass Profiler Professional

(誘導体化)

日本酒 20 μ L に、内部標準物質としてミリスチン酸 d-27 (500ppm、5 μ L) を添加し、乾固しました。メトキシアミン塩酸塩 40mg/mL のピリジン溶液を 20 μ L を加え、30°C で 90 分のメトキシ化処理を行い、次に、1%トリメチルクロロシランを含む 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 (MSTFA + 1% TMCS) の混合溶液を 90 μ L を加え、37°C で 30 分かけて誘導体化しました。

(ALS)

注入量: 1 μ L

(GC)

注入法 : スプリット 10:1

注入口温度: 250°C

カラム : DB-5ms Duraguard 30 m, 250 μ m, 0.25 μ m

オープン温度: 60°C (1min) - 10°C/min - 325°C (10min)

カラム流量 : 1.2ml/min (コンスタントフローモード、リテンションタイムロッキング: ミリスチン酸 d-27 を 16.727min にロック)

(MS)

トランスファーライン温度: 290°C

イオン化モード: EI (電子エネルギー: 70eV)

チューニング: Etune

溶媒待ち時間: 6min

ゲイン係数: 1

イオン源温度 : 300°C

測定モード : スキャン (m/z 50-600、サンプリング 2°)

3. 結果

同一メーカーの市販の日本酒 (普通酒、吟醸酒、大吟醸酒、純米吟醸酒) を n=4 で測定を行いました。Fig. 1 に本手法で分析した普通酒のトータルイオンカレントクロマトグラム (TICC) を示しました (主要ピークには化合物名をラベルしました)。日本酒では、米のタンパク質やデンプンが微生物の代謝によりアミノ酸、糖、有機酸などの低分子に分解・変換されます。Fig. 1 では、それらの代謝物が確認できました。Fig. 2 に、各サンプルの TICC を示しました。TICC 上では、各サンプル間でほとんど差は認められませんでした。

各データをデコンボリューションし、複合データ (Identified+Unidentified) として MPP で読み込み、統計解析・多変量解析を行いました。Fig. 3 に、主成分分析 (各サンプルのバラツキが最大になるよう



に表示)の2Dスコアプロットを示しました。第1主成分のスコアの土で、普通酒と吟醸造りの酒が分類され、第2主成分のスコアの土で、醸造アルコールの添加の有無が分類されました。

Fig. 4 に階層型クラスター分析(似たものを集める:化合物を変動の類似度で配置)の結果を示しました。結果のヒートマップは各サンプル(図の縦方向)における各化合物(図の横方向)の存在量の大小を色別(赤色:多い、青色:少ない)で確認できるため、一目瞭然で、各サンプルに多く存在する化合物などを確認することができます。変動が類似している化合物をクラスターに分類し、Fig. 5 に大吟醸酒には存在が少ない化合物のクラスターを示しました。Fig. 6 にその一例として、シトシンのマスクロマトグラムを示しました。

このように清酒の分類によって、多変量解析で分類が可能でした。

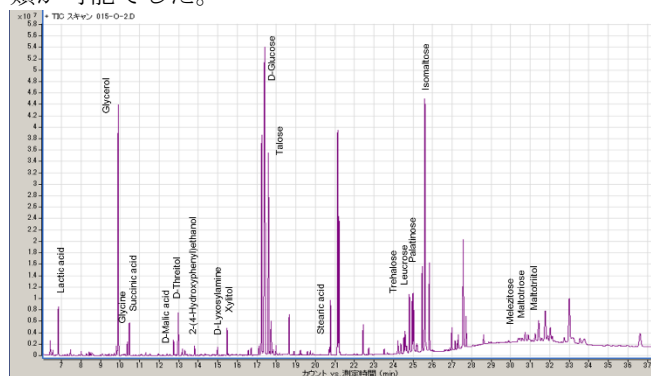


Fig. 1 普通酒のTIC

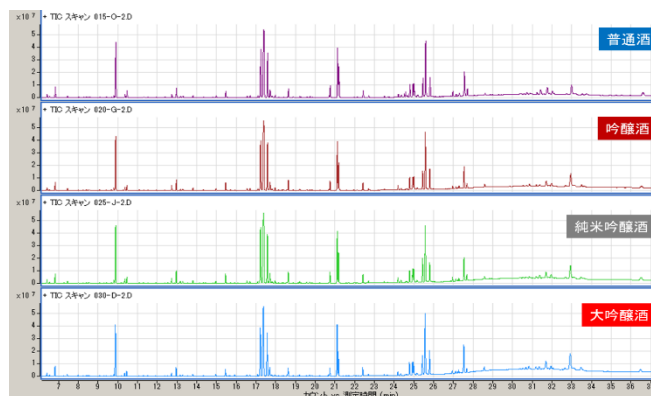


Fig. 2 各サンプルのTIC

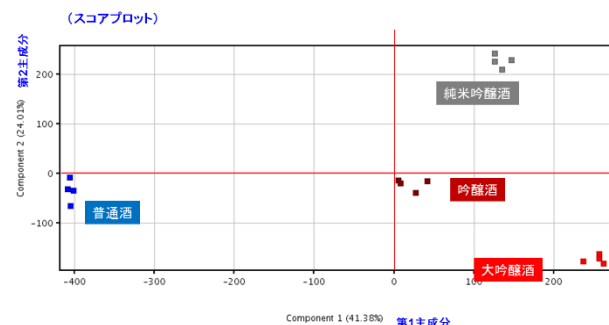


Fig. 3 2Dスコアプロット

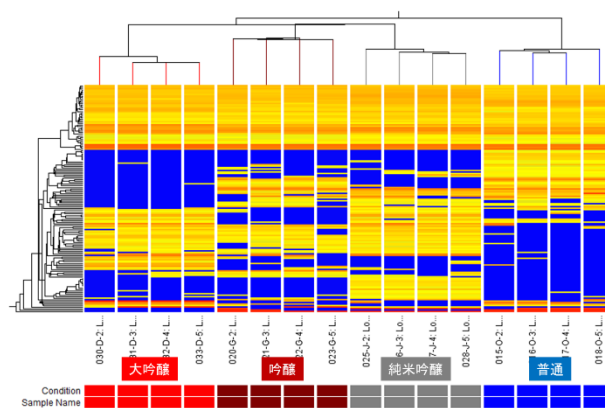


Fig. 4 階層型クラスターツリー

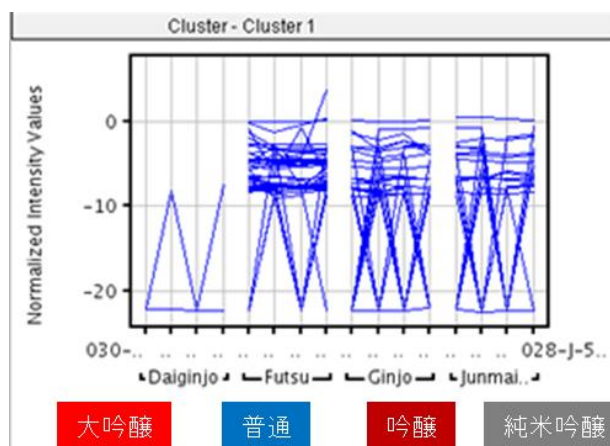


Fig. 5 大吟醸酒には存在が少ない化合物のクラスター

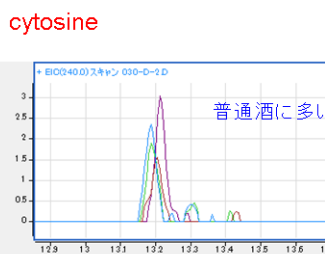


Fig. 6 シトシンのマスクロマトグラム

4. 参考文献

[1] 国税庁「清酒の製法品質表示基準」の概要
<http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/hyoji/seishu/gaiyo/02.htm>

【GC-MS-201408NK-002】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
 〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp