

県産食品資源の市場流通を促進するための評価技術の確立

食品工業部

吉村臣史 鶴田裕美 澤田和敬

柘植圭介

本研究では、新たな農産物加工食品の一つとして開発された玉ねぎ茶葉に関して、高付加価値化を目的として機能性成分の評価を試みた。通常、玉ねぎには Quercetin 及びその配糖体が含まれていることが知られており、玉ねぎ茶葉における Quercetin 及びその配糖体の含有量等を各種機器を用いて調査した。その結果、玉ねぎ茶葉中に Quercetin は検出されず、Quercetin 3,4'-Glucoside 及び Quercetin 3-Glucoside が検出された。また、エレクトロスプレーイオン化による質量分析の結果より、Quercetin を基本骨格とした複数の配糖体と推察される成分が確認された。それらピークについて、四重極飛行時間型質量分析装置により得られた精密質量及び各種データに基づくオープンデータベース検索の結果から Quercetin 配糖体である可能性が示唆された。

1. はじめに

佐賀県では、食品関連の産業は極めて重要な位置付けとなっている。農林水産業等の一次産業は主要産業の一つであるとともに（1,267 億円（平成 24 年農業産出額¹⁾）、1,243 億円（平成 23 年農業産出額²⁾）、本県における全産業分野のうち、一次産業や食料品製造業、小売業、飲食店等の食品に関わる事業所数は、県内全事業所数の約 22%、従業員数は全従業員数の約 20%を占めている³⁾。

全国的な取組として、各地域の特色を表に出し、独自ブランドを形成することによって付加価値を付与した食品や、食品素材の機能性を活かした加工食品の開発など、農林水産物や加工食品の安全・安心、健康への配慮を強調した開発に重点が置かれている。

独自ブランド化への取組については、産地ごとに行政を交えた様々なブランドが立ち上がっている。本県では農業団体と連携し、厳しい基準で厳選した佐賀を代表する“最高級な”商品を創り出すことを目的に、「Premier-SJ」（プルミエ）というブランドを付して、積極的に首都圏や関西圏等への販路拡大に取り組んでいる。

食品の機能性に関する研究開発については、これまでも民間企業や大学、公設試等において積極的に取り組まれており、将来的に商品化されるものも増えてくると予測される。

そのような中、食品製造業者や農林水産業者からは、「素材や商品の特徴・特性を客観的に把握し、消費者への PR 活動において示すことはできないか。」というニーズが出されている。それは、風味等の客

観的な評価といった消費者など第三者にわかりやすいデータの取得や、高付加価値化に寄するための機能性成分等ヒトの恒常性維持に関与すると言われる成分の含有量調査等多岐に渡る。

食品の風味評価については、食品全体の風味を総合的に評価するための分析機器の開発がセンサー工学の観点から取り組まれており^{4), 5)}、現時点において数機種発売されている。一昨年度より、著者らは本県特産品の一つである「茶」に対して、味覚認識装置やおい識別センサー、ビジュアルアナライザーを用いて、風味や茶葉外観に関する測定から得られた結果の活用方法について種々検討を行うとともに、緑茶の水色と機器分析の相関性に関する検討を行ってきた。これらのデータは個々の成分の含有量等を測定するのではなく、複数存在する成分から得られる総括的なデータを採取し、それを味覚や嗅覚等にかかる数値として表示している。ヒトであれば主観的な判断となり得る部分を、客観的に測定できる機器として、非常に有用である。このような味覚に関する報告は、食品^{6)~8)}ばかりでなく医薬品^{9), 10)}に対しても行われるようになっており、風味の評価技術を導入する必要性が高まっている。

一方、国や県等では、農林水産業従事者が生産ばかりでなく、加工や流通等にも関与してもらい、従事者の収入改善や販路拡大を促す 6 次産業化に積極的に取り組んでいる。これらに係る取組の中では、加工した製品の付加価値向上が重要であり、その方策の一つとしてヒトの健康機能性に寄与する成分の含有量調査を行うことが多い。このような分析は、

高価な分析機器が必要になるなど、農林水産業従事者が取り組むことは非常に困難である。また、測定対象とする成分や機能性を評価しようとする成分が既に報告された成分であり、標準試薬としても市販されている成分であれば評価も容易となるものの、新規の成分である場合や、市販されていない成分である場合、その成分の構造把握や特徴の把握から行う必要があり、その実施は簡単ではない。このような場合については、大学や公的研究機関と連携した取り組みが非常に重要となってくる。

以上の背景から、本研究では加工食品の付加価値向上に寄与する取組の一環として、玉ねぎの葉を加工した茶に含まれる機能性成分の調査について、既知の機能性成分である Quercetin (図 1) の測定を基本に分析を行い、他に検出された成分の構造解析等を併用しながら得られた結果について検討を行った。

2. 方法

2.1 被験試料

本県内で販売されている玉ねぎ葉茶を、製造メーカーより提供いただいた。

2.2 標準試薬

Quercetin (Que) は和光純薬工業株式会社製の試薬(二水和物)を、Que 3-Glucoside (Glc), Que 4'-Glc 及び Que 3,4'-Glc は、株式会社常磐植物化学研究所製の試薬を使用した。

2.3 茶浸出液の調製

沸騰した蒸留水 200 g にティーパック 1 袋を浸漬後、アルミ箔で蓋をし 80°C に設定した恒温槽にて 30 分間静置した。所定時間経過後、ティーパックを取り出し浸出液(以後、玉ねぎ葉茶と略)を水冷し、

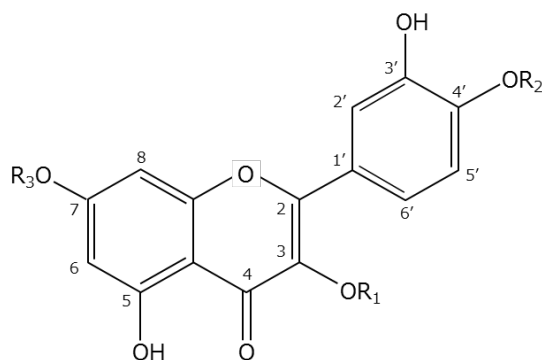


図 1 Quercetin 及びその配糖体の化学構造

Que, $R_1 = R_2 = R_3 = H$; Que 3-Glucoside (Glc); $R_1 = Glc$ & $R_2 = R_3 = H$; Que 4'-Glc, $R_2 = Glc$ & $R_1 = R_3 = H$; Que 3,4'-Glc, $R_1 = R_2 = Glc$ & $R_3 = H$

分析を行うまで冷蔵(約 4~5°C) 保存した。

保存した玉ねぎ葉茶に終濃度 80%となるように Methanol を加え、-20°C 以下の状況下、30 分間静置した。その後、遠心分離(20,000 x g, 4°C, 15 分間)し上清を回収した。回収した上清を精密フィルター(孔径 0.2 μm)でろ過し、ろ液を ESI イオントラップ型高速液体クロマトグラフ/質量分析装置にて分析を行った。

上述の茶浸出条件は測定成分の抽出を促すための条件にて行っている。一方、通常の飲用における茶の浸出条件(ティーパック 1 袋に対して水 500 g)を用いて熱水浸出した茶浸出液を調製した。後述の茶浸出液については、浸出液調製後 Methanol に代えて Acetonitrile を用いて同様の処理を行い、高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置にて分析を行った。

2.4 ESI イオントラップ型高速液体クロマトグラフ/質量分析装置を用いた分析

ESI イオントラップ型高速液体クロマトグラフ/質量分析装置(Liquid Chromatograph-ESI Ion Trap Mass Spectrometer; LC-IT/MS)による分析は、Agilent 1100 (Agilent Technologies 製)をフロント LC とし、IT/MS である HCT ultra (Bruker Daltonics 製)に接続したシステムで行った。LC 条件及び IT/MS 条件は以下のとおりである: 分離カラム, Cadenza CD-C18 (2 mm i.d. x 250 mm, Imtakt 製); カラムオープン温度, 40°C; カラム送液流量, 0.2 mL/min; 溶離液, Acetonitrile/超純水/Formic acid = 10/89.9/0.1 (溶離液 A) 及び Acetonitrile/超純水/Formic acid = 50/49.9/0.1 (溶離液 B); グラジエント条件, 溶離液 B 濃度にて 0% (0 min) から 80% (20 min), 100% (21 min) までリニアグラジエントを行い, 100%にて 5 分間保持; 紫外吸収測定波長, 368 nm; 測定イオン極性, Negative; 測定質量範囲, 200 m/z - 800 m/z ; スキャン速度, 8,100 (m/z)/sec; ネブライザー圧力, 45 psi; N_2 ドライガス温度, 350°C; MS/MS 及び MS/MS/MS 条件, MS 及び MS/MS 測定時に最も強度の高かったイオンを捕捉し分子内解離を誘発。

2.5 高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置を用いた分析

高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置(Liquid Chromatograph-quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer; LC-qTOF/MS)を用いた分析は、Nexera X2 (島津製作所製)をフロント LC とし, qTOF/MS である impact II (Bruker Daltonics 製)に接続したシステムにて行った。LC 条件はカラム

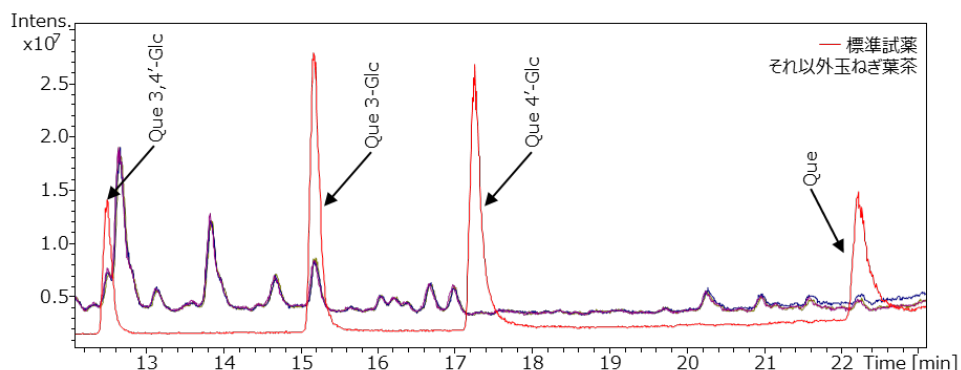


図 2 玉ねぎ葉茶及び Que 関連成分の LC-IT/MS による TIC

オープン温度を 50°C と設定した以外は 2.4 における LC 条件と同様である。qTOF/MS 条件は以下のとおりである：イオン化法，ESI；測定イオン極性，Negative；測定質量範囲，100 m/z - 1,500 m/z ；ネブライザー圧力，23.2 psi；N₂ ドライガス温度，180°C；MS/MS 条件，462.00 から 464.00 及び 624.00 から 626.00 の質量範囲において検出されたイオンを捕捉し分子内解離を誘発。

測定された精密質量（モノアイソトピック質量）を使った化学組成式の推定は qTOF/MS に付属している DataAnalysis ソフトウェア（ver. 4.3）の SmartFormula を用いて行った。同様に MS 及び MS/MS 測定の結果を用いて，インターネット上の化合物データベースと照合した。検索エンジンとして MetFrag¹¹）を用い，オープンデータベースとして Royal Society of Chemistry が提供する ChemSpider¹²）を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 玉ねぎ葉茶に含まれる Que 及び Que 配糖体の分析

図 2 に玉ねぎ葉茶から浸出した成分及び市販されている Que，Que 3-Glc，Que 4'-Glc 並びに Que 3,4'-Glc の LC-IT/MS におけるトータルイオンクロマトグラム（Total Ion Chromatogram; TIC）を示した。この結果から，玉ねぎ葉茶浸出液中には主に Que 3-Glc 及び Que 3,4'-Glc が含まれている可能性が示された。

図 2 を基に，Que の一配糖体の脱プロトン化した $[M-H]^-$ 463 m/z 及び二配糖体の $[M-H]^-$ 625 m/z について作成したエクストラクテッドイオンクロマトグラム（Extracted Ion Chromatogram; EIC）を図 3 に示した。この結果から，標準試薬を用いた LC 保持時間及び EIC の結果から Que 3-Glc は含まれている可能性が高いことが推察された。Que 3,4'-Glc も Que 3-Glc と同様の傾向であったが，625 m/z の EIC から同分子量を有すると推察される他の 2 つの成分の存在が示された。

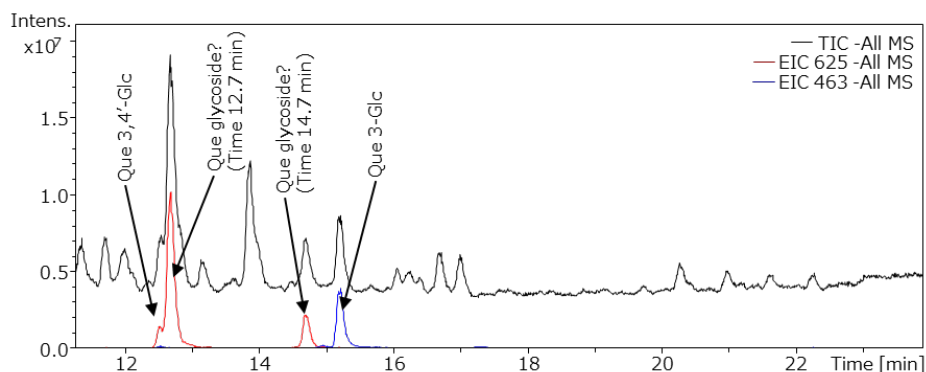


図 3 玉ねぎ葉茶浸出液の TIC 及び 463 m/z ，625 m/z の EIC

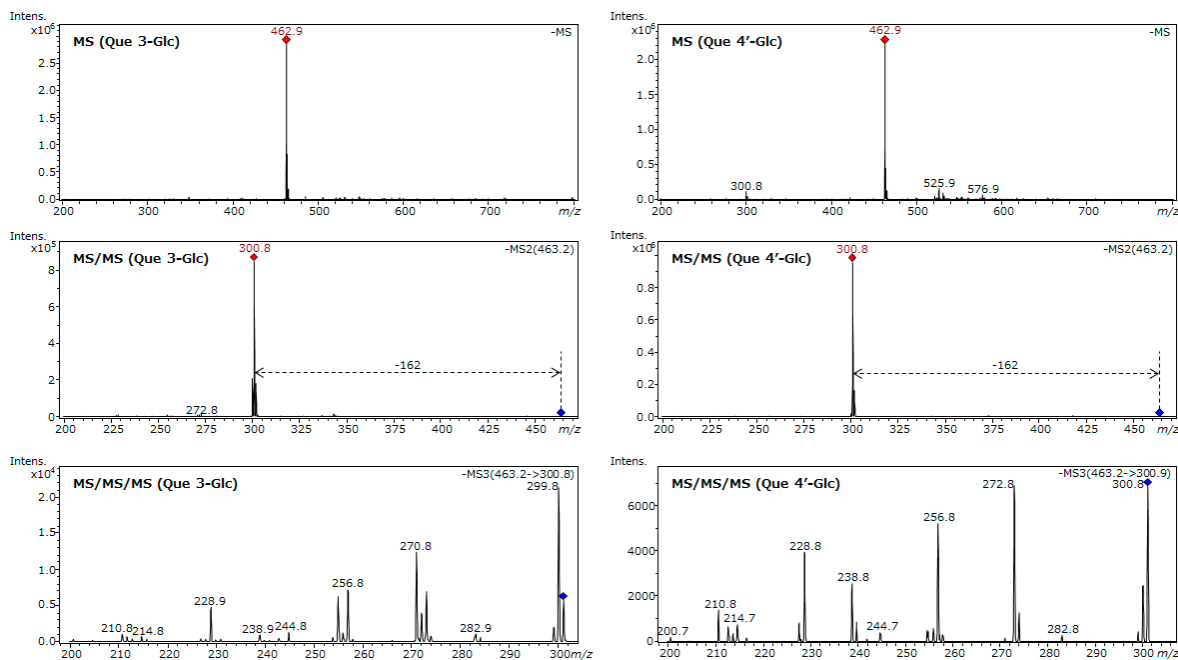


図 4 Que 3-Glc 及び Que 4'-Glc の MSⁿ スペクトル

3.2 IT/MS を用いた MS/MS 及び MS/MS/MS 分析による構造推定

図 4 に標準試薬である Que 3-Glc 及び Que 4'-Glc の MS 及び MS/MS, MS/MS/MS スペクトル (MSⁿ スペクトル) を示した。これらスペクトルは、最も強度の大きい m/z イオンをプリカーサーイオンとして選択し、当該イオンを衝突誘起解離 (Collision-Induced Dissociation; CID) している。この結果より、一配糖体は $[M-H]^-$ である $463 m/z$ が MS スペクトルにおいて確認された。また、 $[M-H]^-$ をプリカーサーイオンとした MS/MS スペクトルでは $m/z 301$ という Que の $[M-H]^-$ に相当すると思われるピークが確認され、このピークは Glc の脱離により生成したものと推察された。

図 5 に Glc の二配糖体である Que 3,4'-Glc の MSⁿ スペクトルを示した (左上)。このデータより、Que 3,4'-Glc の $[M-H]^-$ である $625 m/z$ のピークが確認された。このイオンをプリカーサーイオンとして CID を行うと、MS/MS スペクトルにおいて Glc の 1 分子が脱離したと推定されるピーク ($463 m/z$) が認められると同時に Glc 2 分子が脱離したと思われるピーク ($301 m/z$) も確認された。MS/MS スペクトル検出された $463 m/z$ を基に MS/MS/MS スペクトルを測定した結果、Glc 1 分子が脱離したとみられるピーク ($301 m/z$) が確認された。図 4 における MS/MS ス

ペクトルの結果を考慮すると、MS/MS 及び MS/MS/MS スペクトルにおいて測定された $301 m/z$ のピークは、Que 基本骨格に由来するピークと推察された。

図 5 右上には、玉ねぎ葉茶浸出液の TIC において同じ保持時間 (12.5 min) を示したピークの MSⁿ スペクトルを示した。各スペクトルの解離パターンが Que 3,4'-Glc と非常に類似しており、保持時間もほぼ同様であることから 12.5 min のピークは Que 3,4'-Glc の可能性が高いと判断された。

図 3 から、 $625 m/z$ のイオンが生成していることが認められた保持時間 12.7 min 及び 14.8 min の 2 つのピークについて、図 5 に MSⁿ スペクトルを示した (12.7 min; 図 5 左下: 14.8 min; 図 5 右下)。Que 3,4'-Glc の解離パターンと比較して、両者とも異なる MS/MS スペクトルを示した。MS/MS/MS スペクトルから Que の基本骨格と推察される構造を有している可能性が高い。MS/MS スペクトルの結果を考慮すると、これら 2 種の成分は Que を基本骨格とし、糖が 2 つ結合した配糖体である可能性が高いと推察された。

3.3 qTOF/MS を用いた MS 及び MS/MS 分析による構造推定

図 6 に LC-qTOF/MS を用いて測定した TIC を基に抽出した EIC ($463.0000 m/z$ 及び $625.1426 m/z$, 抽出

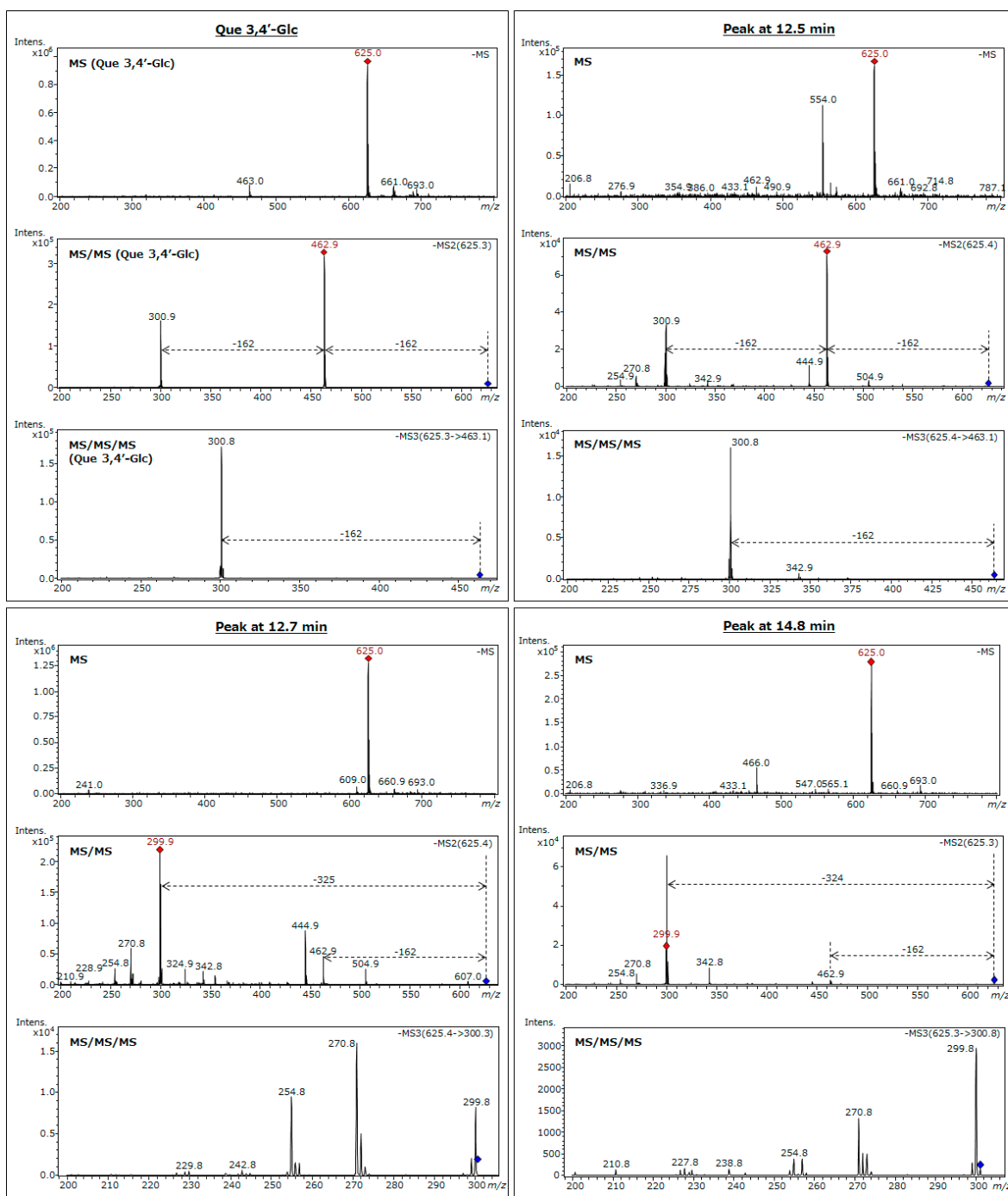


図 5 Que 3,4'-Glc 及び玉ねぎ葉茶浸出液の TIC 12.5 min, 12.7 min 並びに 14.8 min に検出したピークの MSⁿ スペクトル

誤差範囲±0.5 m/z) を示した. カラムオープン温度が異なるため, 図 3 と比較して成分の溶出プロファイルは異なるが 463.0000 m/z のピークが 1 つ, 及び 625.1426 m/z のピークが 4 つ確認された (保持時間

9.7 min, 10.9 min, 12.3 min, 12.7 min). ピークの保持時間が異なったことから, これら 4 つのピークは別々の成分であることが示された.

625.1426 m/z に対してデータを抽出した EIC におい

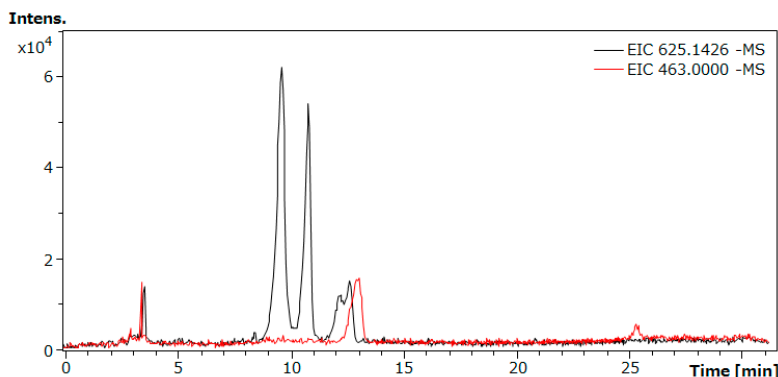


図 6 玉ねぎ葉茶浸出液の LC-qTOF/MS による TIC から抽出した 625.1426 m/z 及び 463.0000 m/z に関する EIC

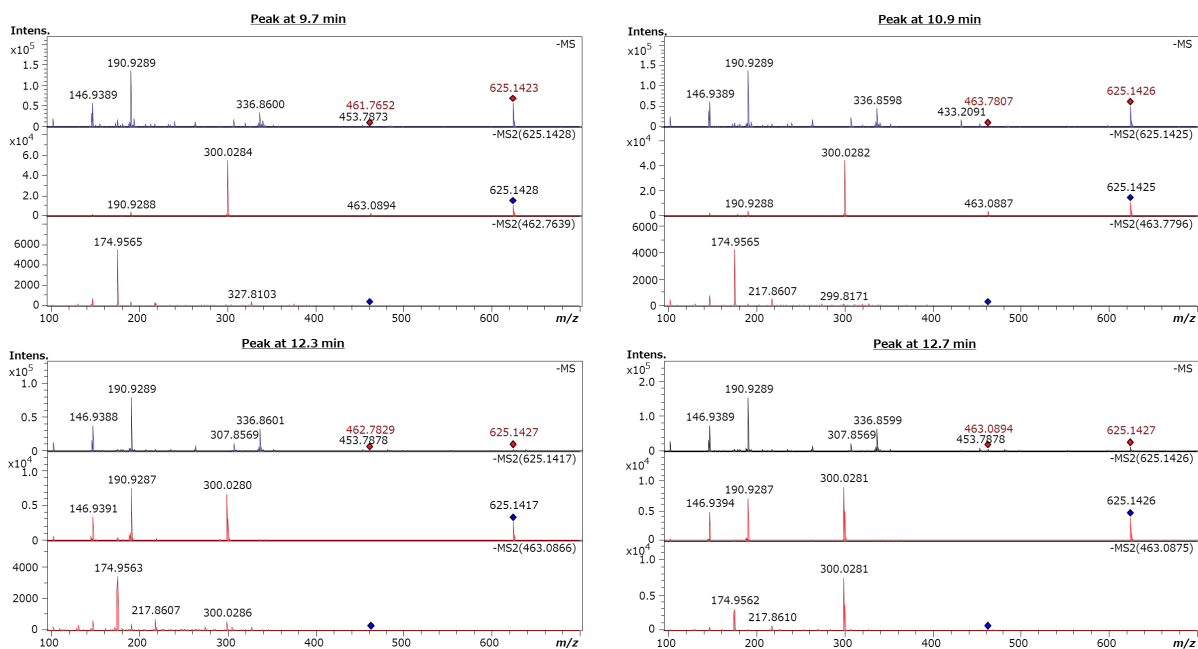


図 7 図 6 における EIC (625.1426 m/z) における保持時間 9.7 min, 10.9 min, 12.3 min 及び 12.7 min に測定されたピークの MS 及び MS/MS スペクトル

で認められたピーク 4 つの MS 及び MS/MS スペクトルを図 7 に示した。この結果から、4 つのピークのモノアイソトピック質量は全て 625.1425 (誤差範囲 ± 0.0003) であった。また、解離パターンも 9.7 min 及び 10.9 min のピークは類似しているものの、12.3 min 並びに 12.7 min のピークとは $[M-H]^-$ の解離パターン及び第 2 の捕捉イオン (462.7639 - 463.7796 m/z) の解離パターンが異なっていた。 $[M-H]^-$ の解離パターンについて、全ての 4 つのピークにおいて 300.0280 - 300.0284 m/z のピークが認められた。

保持時間が 9.7 min のピークに対して測定された MS スペクトルを用いて化学組成式の推定を行ったところ、 $C_{27}H_{29}O_{17}$ と推定された。また、保持時間が 10.9 min のピークに対して同様に MS スペクトルからの組成式推定を行ったところ、測定された 625.1426 m/z に対して 2 種類の組成式が提示されたものの、MS/MS スペクトルの結果をあわせて組成式の再推定を行うことにより、当該ピークの化学組成式は $C_{27}H_{29}O_{17}$ と推定された。

推定された化学組成式及び MS, MS/MS スペクトル

ルのデータを用いて、オープンデータベースである ChemSpider で成分検索を行ったところ、85 種の成分と類似性が高いと判断された。その示されたリストを確認したところ、ポリフェノール系の成分がリストアップされており、類似度の上位に Que 配糖体がリストアップされていた。

以上の結果を総括すると、試薬として市販されている Que 3,4'-Glc 以外に Que 3-Glc や他の Que 配糖体が含まれている可能性が示唆された。

IT/MS の結果から、162 m/z のニュートラルロスに糖の脱離を示していること、注目した個々のピークに基本骨格である Que の情報と推察されるピークが示されたこと、qTOF/MS の結果から、モノアイソトピック質量及び MS, MS/MS スペクトルの結果を基にしたデータベース検索において Que 配糖体の可能性が示されたことが根拠となっている。

今回の解析では、主に質量分析のデータをベースとして、解離パターンの把握からの構造推定、モノアイソトピック質量を基にした化学組成式の推定及びデータベースとの照合による一連の評価を行ったものであるが、詳細な構造式の推定については、核磁気共鳴装置等の別の機器を応用した解析が必要となる。

4. おわりに

農林水産物や加工食品の高付加価値化に対しては、どのような成分が含まれているかを把握することは非常に重要である。一方で、その評価は非常に困難であり、各種論文等でこれまで報告された既知の成分であればその分析方法や評価方法（生理活性等）を参考に分析、評価を行っていけばいいが、未知の成分に対しては一つ一つの特徴、特性を把握しながらデータを積み上げていく必要がある。

今回は、既知の成分のデータをベースに質量数やモノアイソトピック質量、CID による解離パターンの予測等を駆使しながら、検討を行ったが、最終的な可能性の提示まではできたものの構造を特定するまでには至らなかった。このような構造解析には、高度な知見と経験が重要となってくるため、必要に応じて専門家や大学との連携等を図っていくことが重要であると推察された。

本研究を実施するにあたり、使用した ESI イオントラップ型高速液体クロマトグラフ/質量分析装置は、電源立地地域対策交付金により導入した。

参考文献

- 1) 農林水産省「平成24年生産農業所得統計」（平成25年12月25日公表）；www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/nougyou_sansyutu/
- 2) 農林水産省「平成23年生産農業所得統計」（平成25年2月28日公表）；www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001104918
- 3) 佐賀県「平成24年版佐賀県統計年鑑」；www.pref.saga.lg.jp/web/kensei/_1366/toukei/t-sougo-u/t-nenpou/_72049.html
- 4) K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko, and K. Yamafuji, Multichannel taste sensor using lipid membranes; *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2(3), 205-213, 1990.
- 5) A. Legin, A. Rudnitskaya, Yu Vlasov, C. Di Natale, E. Mazzone, and A. D'Amico, Application of electric tongue for qualitative and quantitative analysis of complex liquid media; *Sensors and Actuators B: Chemical*, 65(1-3), 232- 234, 2000.
- 6) 中原徳昭, 古田幸, 境田博至, 甲斐孝憲, 榊原陽一, 西山和夫, 水光正仁, 本格焼酎の基本味を識別する脂質膜センサ；日本食品科学工学会誌, 52(8), 355-365, 2005.
- 7) 福井裕, 石田丈博, 西村敏英, 松田秀喜, 本みりんの塩味・酸味抑制効果における官能評価と味覚センサーの分析結果との相関性；日本調理科学会誌, 39(1), 49-56, 2006.
- 8) K. Chikuni, M. Oe, K. Sasaki, M. Shibata, I. Nakajima, K. Ojima, and S. Muroya, Effects of muscle type on beef taste-traits assessed by an electric sensing system; *Animal Science Journal.*, 81(5), 600-605, 2010.
- 9) V. Anand, M. Kataria, V. Kukkar, V. Saharan, and P.K. Choudhury, The latest trends in the taste assessment of pharmaceuticals; *Drug Discovery Today*, 12(5-6), 257- 265, 2007.
- 10) K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, and J. Breitkreutz, Taste sensing systems (electric tongues) for pharmaceutical applications; *International Journal of Pharmaceutics*, 417(1-2), 256-271, 2011.
- 11) MetFrag; In silico fragmentation for computer

assisted identification of metabolite mass spectra;
<http://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>.

12) ChemSpider; Search and share chemistry; Royal
society of chemistry; <http://www.chemspider.com>.