

学位論文

F₂-selective 2D NMR 法による非破壊的な食品中の微量成分分析に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 平成 21 年度入学

甲田 政則

指導教員 田之倉 優

目次

序論	1
第一章 F ₂ -selective 2D NMR 法	3
1-1. 序	4
1-2. 実験材料と方法	
1-2-1.NMR 測定用試料の調製	5
1-2-2.NMR スペクトルの測定	5
1-2-3.マンゴー果汁における NMR 信号の帰属	7
1-3. 結果と考察	
1-3-1 マンゴー果汁の選択励起を用いた ¹ H NMR スペクトル	8
1-3-2.選択励起を用いた TOCSY スペクトル	8
1-3-3.選択励起を用いた DQF-COSY 及び NOESY スペクトル	10
1-3-4.F ₂ -selective 2D NMR 法を用いた果汁中の微量成分の同定	11
1-3-5.F ₂ -selective TOCSY の様々な食品への適用	12
1-3-6.まとめ	13
表・図	14
第二章 選択励起を用いた NMR スペクトルによるマンゴーの品種識別	21
2-1. 序	22
2-2. 実験材料と方法	
2-2-1.NMR 測定用試料の調製	24
2-2-2.NMR スペクトルの測定	24
2-2-3.NMR スペクトルの前処理及び多変量解析	25
2-2-4.マンゴー果汁の NMR スペクトルにおける信号の帰属	26
2-3. 結果と考察	
2-3-1.マンゴー果汁の ¹ H NMR スペクトル及び信号の帰属	27
2-3-2.F ₂ -selective 2D NMR 法を用いた微量成分の同定	28
2-3-3.選択励起を用いた ¹ H NMR スペクトルによる多変量解析	30

2-3-4.まとめ	33
表・図 34	
第三章 F ₂ -selective TOCSY スペクトルを用いた米発酵食品のメタボリック プロファイリング	47
3-1. 序	48
3-2. 実験材料と方法	
3-2-1. NMR 測定用試料の調製	49
3-2-2. NMR スペクトルの測定	49
3-2-3. NMR スペクトルの前処理及び多変量解析	50
3-2-4. 日本酒の NMR スペクトルにおける信号の帰属	50
3-3. 結果と考察	
3-3-1. 日本酒の ¹ H NMR スペクトル	51
3-3-2. F ₂ -selective 2D NMR 法による日本酒の信号の帰属	51
3-3-3. F ₂ -selective TOCSY スペクトルを用いた多変量解析	53
3-3-4. 米酢の F ₂ -selective TOCSY スペクトルの比較	55
3-3-6. まとめ	55
表・図 56	
第四章 総括	69
参考文献	72
謝辞	78

序論

代謝物分析（メタボロミクス）は目的とする系に含まれる低分子化合物を網羅的に測定、解析する手法であり[1]、ゲノミクス、プロテオミクスに続く第3のオミクス法として生物学、医学をはじめとする幅広い生命科学の分野において活発に研究、応用が行われている。近年、この代謝物分析を食品科学に応用する試みが活発に行われている[1, 2]。食品中に含まれる様々な低分子化合物は、作物の生育環境、保存状態、加工操作等の様々な要因によって変化するため、代謝物分析により食品から様々な有益な情報を得る事が出来るのではないかと考えられている。具体的な応用例としては(1) 品質管理(保存状態、味など品質に関わるパラメーターの評価、発酵におけるコンタミネーションの検出) (2) 安全管理(病原性大腸菌、遺伝子組換え作物、放射線処理の有無の検出) (3) 真正評価(食品偽装、偽和などの検出) (4) 食品の物理的、化学処理に伴う成分変化の分析、などが挙げられる。

食品中の低分子化合物を分析する手法としては、GC, HPLC, GC-MS, LC-MS, NMR など様々な機器が用いられているが、その中でも NMR は 1) 簡単な前処理、穏やかな環境下で測定が可能であり成分の変質、損失を最小限に抑える事ができる 2) 糖類、脂質、有機酸、アミノ酸等、化学的性質の異なる幅広い成分を 1 回の実験で測定可能である、3) NOESY, ROESY などの手法により分子間の相互作用が解析可能である等、他の機器には無い特徴を有している。そのため食品科学においても NMR は様々な代謝物分析に応用されている。具体的な研究例としては、1次元、2次元 NMR スペクトルを用いたハチミツの水あめによる偽和の検出[3], ^1H NMR スペクトルを用いた日本茶の品質評価の為のメタボリックプロファイリング[4], ^1H NMR スペクトルを用いたオリーブオイルの原産地識別[5]などが挙げられる。代謝物分析において食品中の微量成分は情報源として非常に重要であるが食品には糖類、脂質等の圧倒的な主成分が含まれる事が多く、これらの成分に由来する強い信号は NMR 測定においてしばしばダイナミックレンジの問題を引き起こし、微量成分に由来する信号の検出を阻害する。そのため、NMR を用いた食品の代謝物分析では、前処理として主成分の除去が行われる事が多い。しかし、前処理は時間がかかるだけで無く、重要な情報源である微量成分の変質、損失を引き起こす可能性もある。この問題を解決する有効な手段の一つが選択励起を用いて主成分に由来す

る信号を除去する事である。これにより微量成分を主成分の除去無しに感度良く測定出来るのではないかと考えられた。また ^1H NMR スペクトルの低磁場領域(6-10 ppm)はその信号の弱さから食品の代謝物分析において殆ど注目されて来なかった領域であるが選択励起の手法により代謝物分析における有用な情報源になるのではないかと考えられた。

この研究では選択励起の手法を用いる事で食品の代謝物分析において重要な情報源である微量成分を分離、精製を行わずに測定する為の手法の検討を行った。特に低磁場領域(6-10 ppm)の測定に重点をおいた。本研究により食品中の微量成分の2次元 NMR スペクトルを分離、精製する事無く測定するための新規手法として F_2 -selective 2D NMR 法を新規に開発した。また、その応用として ^1H NMR スペクトルの低磁場領域を用いたマンゴー果汁の品種識別及び低磁場領域の F_2 -selective TOCSY スペクトルを用いた米発酵食品のプロファイル分析を行い NMR に基づいた食品の代謝物分析における選択励起法の有用性を実証する事が出来た。

第一章

F₂-selective 2D NMR 法

1-1. 序

近年、代謝物分析（メタボロミクス）は食品科学の分野において幅広く応用されている[1,2]。食品中に含まれる様々な低分子化合物は、作物の生育環境、保存状態、加工操作等の様々な要因によって変化する為、代謝物分析によって得られた情報は食品の真正評価や品質管理に有用であると考えられており、代謝物分析に関する様々な研究が報告されている[6-10]。代謝物分析には GC-MS、LC-MS、NMR 等の様々な機器が用いられているが、その中でも NMR は 1) 簡単な前処理で測定が可能であり 2) 糖類、脂質、有機酸、アミノ酸等の幅広い成分を一度に測定可能である、等の他の機器には無い特徴を有している。代謝物分析による真性評価、品質管理では食品に含まれる微量成分の組成が重要な鍵となる事が多い。しかし、食品には糖類、脂質、エタノール等の圧倒的な主成分が含まれている事が多く、これらの成分に由来する強い信号は NMR 測定においてしばしばダイナミックレンジの問題を引き起こし微量成分に由来する信号の検出を阻害する。そのため、NMR を用いた食品の代謝物分析では多くの場合、前処理として主成分の除去が必要となる。しかし、前処理は時間がかかるだけで無く、重要な情報源である微量成分の変質、損失を引き起こす可能性もある。この問題を解決する有効な手段の一つが選択励起を用いて主成分に由来する信号を除去する事である。これにより微量成分を非破壊的に測定する事が可能になる。選択励起を用いた食品中の微量成分の非破壊的な測定については 1 次元 NMR に関しては既に報告がされているが[11, 12]、2 次元 NMR に関しては報告がされていない。2 次元 NMR スペクトルは複雑に重なった食品の 1 次元スペクトルの解析、帰属において非常に重要である。選択励起を用いた 2 次元 NMR 法、それ自体については既に研究されており、測定時間の短縮及び間接的な次元である F_1 軸のデジタル分解能の改善において非常に有用である事が報告されている[13-17]。しかしこれらの研究は何れも、精製された物質で行われており食品の様な複雑混合物中の微量成分測定に関する研究は報告されていない。また近年は HR-MAS(high-resolution magic angle spinning) NMR 法による固形状試料の非破壊的な測定も数多く報告されており[18-20]、NMR における非破壊的な微量成分測定法の重要性はますます高まっている。本章ではマンゴー果汁、日本酒、ハチミツ、グレープシードオイルを用いて選択励起を用いた 2 次元 NMR 法による微量成分の非破壊的な測定法について検討を行った。

1-2. 実験材料と方法

1-2-1. NMR 測定用試料の調製

マンゴー果汁は神奈川県内のスーパーマーケットで購入した米国、カリフォルニア産のキーツ種の果実を用いて作成した。購入時は果実が熟していなかったため室温で放置し、果実が柔らかくなるまで約 1 週間追熟させた。熟したマンゴー果実は、皮をむき、種子を取り除いた後パルプ状にすりおろした。これを 4 °C、26,000×g で 10 分間遠心分離し、上清をマンゴー果汁として用いた。マンゴー果汁は測定に用いるまで冷凍庫内で -20 °C で保存した。マンゴー果汁 540 μL に重水 (99.9%, Shoko Co., Ltd., Tokyo, Japan) 60 μL と化学シフトの基準物質としてごく少量の DSS (2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate sodium salt, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を加え、混合した後に 5 mm の NMR チューブに移し測定用試料とした。

日本酒は神奈川県内のスーパーマーケットで購入した純米酒を用いた。日本酒は測定に用いるまで冷蔵庫内で 4 °C で保存した。日本酒 540μL に重水 60μL 及びごく少量の DSS を加え、混合した後に 5mm の NMR チューブに移し測定用試料とした。

ハチミツは神奈川県内のスーパーマーケットで購入した国産のりんご由来の物を用いた。ハチミツは測定に用いるまで室温で遮光した状態で保存した。ハチミツ 270 μL に milliQ 水 270 μL、重水 60 μL 及びごく少量の DSS を加え、混合した後に 5 mm の NMR チューブに移し測定用試料とした。

グレープシードオイルは神奈川県内のスーパーマーケットで購入した英国産の物を用いた。グレープシードオイルは測定まで室温で遮光した状態で保存した。グレープシードオイル 300μL に重クロロホルム (99.9%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 300 μL と化学シフトの基準物質としてごく少量の TMS(tetramethylsilane, 99.9%, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を加え、混合した後に 5 mm の NMR チューブに移し測定用試料とした。

1-2-2. NMR スペクトルの測定

全ての NMR スペクトル (^1H NMR, TOCSY (total correlation spectroscopy), DQF-COSY (double-quantum filtered correlation spectroscopy), NOESY (nuclear Overhauser effect

spectroscopy)) は Varian Unity INOVA-500 spectrometer を用いて 20 °C 測定した。軽水のシグナルは presaturation 法を用いて消去した。また化学シフトは DSS 又は TMS のメチル基に由来する信号を 0.00 ppm に設定した。

選択励起は DPFGE (double pulse field gradient spin echo) 法[21]を用いて行った。180° の shaped pulse には Re-Burp (refocusing band-selective 180° pulse with uniform response and phase)[22] を用いた。励起範囲 6.0-10.5 ppm 及び 6.5-10.5 ppm における Re-Burp パルスの power ($\gamma H1/2\pi$)及びパルス長はそれぞれ、3.2, 3.0 kHz 及び 2.0, 2.2 ms である。

¹H NMR 及び F₁-selective 2D NMR (F₁ 軸に沿って選択励起を行う手法) では DPFGE を最初の 90°パルスの直後に組み込んだ。F₂-selective 2D NMR (F₂ 軸に沿って選択励起を行う手法)法では DPFGE を最後の FID (free induction decay)の直後に組み込んだ。TOCSY, F₁-selective TOCSY, F₂-selective TOCSY, F₂-selective DQF-COSY 及び F₂-selective NOESY のパルスシーケンスを図 1-1 に示す。また、各測定における NMR スペクトルのパラメーターは以下のとおりである。

¹H NMR : スペクトル幅 8,000 Hz; データポイント, 32 k; 積算回数, 1024 回; 取り込み時間, 2.048 秒; 待ち時間, 2.0 秒。

マンゴー果汁における各種 2 次元 NMR のパラメーターは以下のとおりである。

TOCSY : スペクトル幅 6,000 Hz ; F₂ 軸のデータポイント 2048 ; F₁ 軸のデータポイント 512 ; 積算回数 16 回 ; 取り込み時間 0.341 s ; 待ち時間 2.0 s ; MLEV-17 スピンロックパルスの強さ 7.1 kHz ; トリムパルス長さ 2 ms ; 混合時間 80 ms。

DQF-COSY : スペクトル幅 6,000 Hz ; F₂ 軸のデータポイント 2048 ; F₁ 軸のデータポイント 512 ; 積算回数 16 回 ; 取り込み時間 0.341 s ; 待ち時間 2.0 s。

NOESY : スペクトル幅 6,000 Hz ; F₂ 軸のデータポイント 2048 ; F₁ 軸のデータポイント 512 ; 積算回数 16 回 ; 取り込み時間 0.341 s ; 待ち時間 2.0 s ; 混合時間 800 ms。

日本酒、ハチミツ、グレープシードオイルにおける TOCSY のパラメーターは以下のとおりである。

スペクトル幅 6,000 Hz ; F₂ 軸のデータポイント 2048 ; F₁ 軸のデータポイント 512 ; 積算回数 64 回 ; 取り込み時間 0.341 s ; 待ち時間 2.0 s ; トリムパルス長さ 2 ms ; 混合時間 80 ms 秒 ; MLEV-17 スピンロックパルスの強さはそれぞれ 7.8 kHz, 7.6 kHz 及び 7.6 kHz である。

1-2-3. マンゴー果汁における NMR 信号の帰属

NMR スペクトルから得られた信号は BMRB (Biological Magnetic Resonance data Bank), HMDB (Human Metabolome Database), MMCD (Madison Metabolomics Consortium Database) 等の代謝物に関するオンライン上のデータベース[23-25]及びマンゴー果汁に関する論文[26-28]と比較し候補となる成分を探索した。最終的には試薬をマンゴー果汁に添加し、その NMR スペクトルとマンゴー果汁のスペクトルを比較することで信号の帰属を行った。

1-3. 結果と考察

1-3-1. マンゴー果汁の選択励起を用いた ^1H NMR スペクトル

図 1-2a にマンゴー果汁の 1 次元 ^1H NMR スペクトルを示す。スペクトルは主要な信号として 1.2 ppm 付近にエタノールのメチル基の信号、3.0-4.5 ppm の範囲にショ糖、果糖及びブドウ糖に由来する信号が観測された。6.0-10.5 ppm の低磁場領域は信号が殆ど検出されなかった。糖類、エタノールの強い信号を除去するために DPFGESE 法を用いて 6.0-10.5 ppm の範囲で選択励起を行った。その結果、レシーバーゲインが 18 dB から最大値である 60 dB に増加し、非選択励起では検出されなかった多くの信号が低磁場領域において新たに検出された (図 1-2b)。このスペクトルの改善はレシーバーゲインの増加によるダイナミックレンジの有効活用によるものと考えられた。しかしながら、1 次元スペクトルは信号が複雑に重なっていた上に、pH や分子間相互作用に伴う化学シフトのデータベースからのずれ等の可能性もあったため、1 次元 NMR スペクトルのみでは信号の帰属は困難であった。また、選択励起の設定範囲は 6.0-10.5 ppm の範囲であったが 3.6 ppm 付近まで、強度は弱いながらも信号が検出された (図 1-2b)。これは選択励起の際に用いたシェードパルスの漏えい磁場によるものと考えられた。シェードパルスは漏えい磁場が技術的に避けられないために励起範囲外においてもごく僅かな励起が起きてしまう。今回用いたマンゴー果汁の場合、低磁場領域の微量成分の信号に比べてショ糖、果糖、ブドウ糖等の糖類の信号があまりにも強いため、漏えい磁場によるごく僅かな励起でも、微量成分と同等の強さの強度の信号が観測されたと考えられた。

1-3-2. 選択励起を用いた TOCSY スペクトル

選択励起により得られたマンゴー果汁の低磁場側の 1 次元の ^1H NMR スペクトルの信号の帰属を行うために 2 次元 TOCSY の測定を行った。TOCSY は同じスピン系に属する水素原子との間で相関ピークが得られるため、混合物分析において信号帰属を行う際に多くの相関ピークに関する情報を得るのに適した測定法である。特に、データベースを用いて候補成分を絞り込む際に効果的な測定法である。選択励起を行わない通常の TOCSY スペクトルでは低磁場側の微量成分に関する信号は殆ど得られなかった (図 1-3a)。さらに、 t_1 ノイズをはじめとする様々なノイズもスペクトルの解析を阻害した。

低磁場領域の微量成分に関する相関ピークを得るために、まず従来型の F_1 軸に沿って選択励起を行う 2 次元 TOCSY (F_1 -selective TOCSY) の測定を行った。その結果、レシーバーゲインが 18 dB から 52 dB に増加し通常の TOCSY で検出されなかった微量成分に関する多くの相関ピークが新たに検出された (図 1-3b)。しかし、糖類や水は選択励起の範囲外であったにも関わらず、糖類及び水に由来する強い t_1 ノイズのために微量成分のスペクトル解析が阻害された。図 1-2b で示したように、選択励起を用いた ^1H NMR スペクトルにおいても糖類や水に由来する信号を完全に消去することは出来なかったが、 F_1 -selective TOCSY において観察された糖類や水の信号強度は 1 次元の ^1H NMR のそれよりも明らかに強かった。このことから、この糖類や水の予定外の励起はパルスシーケンスにおいて選択励起の後に配置されている非選択的なスピロックパルスによって引き起こされたものと推定された。 F_1 -selective TOCSY スペクトルの t_1 ノイズを消去するために DPGSE のグラジエントレベルを何度か変えて測定を試みた。グラジエントレベルを変えることによって t_1 ノイズの強度は変化したが無完全に消去する事は出来なかった。また、z-filter も試してみたが t_1 ノイズを消去する事は出来なかった。このように t_1 ノイズを完全に消去する事は困難であったため、 F_2 軸に沿って選択励起を行う事で、すなわち F_2 -selective TOCSY を行う事で、これらの t_1 ノイズを避ける事が出来るのではないかと考えた。また F_2 -selective TOCSY の場合は選択励起のシェードパルスがスピロックパルスよりも後方に配置されているため F_1 -selective TOCSY に比べて t_1 ノイズの強度が弱くなり、レシーバーゲインがさらに増加する事も期待された。実験の結果 F_2 -selective TOCSY スペクトルでは非選択領域からの t_1 ノイズの無い高品質な selective TOCSY スペクトルを得ることが出来た (図 1-3c)。さらに、糖類と水に由来する信号の強度も下がりレシーバーゲインが最大値である 60 dB まで増加した。これによりスペクトルの S/N (signal-to-noise) 比も F_1 -selective TOCSY に比べて改善した。

これらの結果は F_2 -selective 法が食品中の微量成分の綺麗なスペクトルを非破壊的に得るために有効な測定法であることを示している。また F_1 -selective TOCSY ではグラジエントのレベルに依存して t_1 ノイズのレベルが大きく変化するが (図 1-4)、 F_2 -selective TOCSY では DPGSE のグラジエントレベルの値の影響が小さく、常に高品質の selective TOCSY スペクトルを得る事が出来た。 F_1 -selective TOCSY において最適なグラジエントレベルの値はサンプルごとに異なった。このことから F_2 -selective 法は DPGSE のグラジエントレベルに対してロバスト性を有していると考えられる。多くの食品は低磁場領域に

強い信号が現れる事が少ないので F_2 -selective 法は芳香族、アミン、アルデヒド等の信号が観測される低磁場領域の分析において非常に効果的であると考えられる。主成分の強い信号に挟まれた狭い領域を選択励起する際は、漏えい磁場による主成分の励起のためにレシーバーゲインが制限され微量成分を上手く検出できない場合が考えられる。その場合は adiabatic hyperbolic secant pulse[29] 又は constant-adiabaticity Lorentzian pulse[30] 等の、より”top-hat”な形状のパルスを用いる事で目的外の励起を抑え、レシーバーゲインの制限を改善できるかもしれない。さらに F_2 -selective 法は食品だけでなく血液や尿などのバイオフィード、飼料、エッセンシャルオイル等の様々な複雑混合物に対しても有効な測定法であると考えられる。

1-3-3. 選択励起を用いた DQF-COSY 及び NOESY スペクトル

F_2 -selective 2D NMR 法の他の 2 次元 NMR 法における適用可能性を検討する為、 F_2 -selective 2D NMR 法を DQF-COSY 及び NOESY に適用し実験を行った。DQF-COSY は主に 2-3 結合離れた水素原子間で相関ピークを示す。TOCSY から得られた情報と DQF-COSY から得られた情報を組み合わせる事で信号を帰属する為のさらなる情報が得られるだけでなく、帰属の精度をより確実なものにする事が出来る。NOESY は空間的に距離が近い水素原子間で相関ピークを示し、分子間の相互作用を解析する際に必須の測定法である。さらに NOESY はシングレットなピークからも相関ピークが得られる可能性があり、 ^{13}C に関する情報を得ることが困難な微量成分の信号の帰属においても有益な測定法である。図 1-5 に F_1 -及び F_2 -selective 2D NMR 法を適用した DQF-COSY と NOESY のスペクトルを示す。 F_2 -selective 2D NMR 法を適用した DQF-COSY 及び NOESY からは t_1 ノイズの影響が無い、マンゴー果汁の微量成分に関する高品質なスペクトルが得られた (図 1-5b, d)。さらにレシーバーゲインも最大値である 60 dB で測定できた。これに対し F_1 -selective 2D NMR 法を用いた測定では、非常に強い t_1 ノイズが現れスペクトル解析を阻害しただけでなくレシーバーゲインも 22 dB, 20 dB と非選択励起の時と殆ど変わらない制限を受けてしまった (図 1-5a, c)。 F_1 -selective TOCSY の時と同様に考えると、この t_1 ノイズはパルスシーケンスにおいて選択励起よりも後方に位置する非選択的なハードパルスにより引き起こされたと推定された。また、ハードパルスは TOCSY のスピロックパルスに比べてパワーが強いため DQF-COSY 及び NOESY では糖類がより強く励起されてしまい、そのため t_1 ノイズの強度が TOCSY よりも強くなったと考えられた。

これらの結果は F₂-selective 法は様々な ¹H-¹H 2 次元 NMR 法に対して幅広く適用可能な手法である事を示している。さらに選択励起の後のハードパルスによる予定外の励起は、そのパルスシーケンスの仕組み上 1 次元の NOESY 又は TOCSY でも起こりうる。それゆえ F₂-selective 法は、これら 1 次元法を含む従来法が適用困難な試料の測定において良い代替手段となるだろう。

1-3-4. F₂-selective 2D NMR 法を用いた果汁中の微量成分の同定

図 1-6 にマンゴー果汁の F₂-selective TOCSY スペクトルの拡大図と主要な信号の帰属を示す。選択励起を用いた 1 次元及び 2 次元 NMR スペクトルを用いる事でマンゴー果汁中の様々な微量成分を非破壊的に検出、同定する事が出来た。ヒスチジン、チロシン、フェニルアラニン等のいくつかの成分は 1 次元 NMR の情報と試薬の添加試験のみで帰属をする事が出来たが、他の多くの信号は 1 次元 NMR スペクトルからの情報のみではデータベースから推定される候補物質が多すぎるため信号の効率的な帰属は困難であった。しかし F₂-selective TOCSY, DQF-COSY 及び NOESY スペクトルからの情報を用いる事で候補となる化合物は大きく減少し効率的な信号の帰属、成分の同定が行えた。さらに F₂-selective 2D NMR 法はアミン、アミドに由来する信号の帰属を行うのに効果的であることが分かった。データベースや論文ではアミン、アミドプロトンに関する情報はあまり載っていないため 1 次元 NMR スペクトルのみで 8.47 ppm のダブレットな信号を還元型グルタチオンのグルタミン酸残基とシステイン残基間のペプチド結合のアミドプロトンに由来するものであると帰属するのは非常に困難である。しかし F₂-selective TOCSY によって得られた 2.93 ppm (システイン残基のメチレン) 及び 4.36 ppm (システイン残基のメチン) の相関ピークの情報を用いるとデータベースから還元型グルタチオンが候補として挙げられ、その情報を元に信号の帰属を行う事が出来た。7.62 ppm と 7.63 ppm には 2 種類のアミンプロトンに由来する信号、すなわち γ-アミノ酪酸(GABA)の NH₂-CH₂- 及びグルタミンの NH₂-CO-、が重なっていたが、これらを 1 次元 NMR スペクトルのみで認識することは困難であった。しかし F₂-selective TOCSY スペクトルでは、これらの信号に由来する相関ピークがはっきりと検出され 2 種類の成分を同定する事が出来た。これらの結果は F₂-selective 2D NMR 法が食品中の微量成分を検出、同定するのに有用な手法である事を証明している。

1-3-5. F₂-selective TOCSY 法の様々な食品への適用

F₂-selective 2D NMR 法の代謝物分析への有効性を検証するため日本酒、ハチミツ、グレープシードオイルを用いて低磁場領域の F₂-selective TOCSY を測定し微量成分検出を試みた。その結果、全ての試料において分離、濃縮等の前処理を行わずに微量成分の高品質な F₂-selective TOCSY スペクトルを得る事が出来た (図 1-7)。これらの結果は F₂-selective 2D NMR 法は水溶性、脂溶性を問わず様々なタイプの食品に対して適用可能であることを示している。これにより得られた微量成分のスペクトルは食品の品質管理や真正評価において有用な情報源となるだろう。

日本酒の F₂-selective TOCSY スペクトルにおいては F₁ 軸の 1-5 ppm の範囲に非常に多くの、そして複雑な相関ピークが現れた (図 1-7a)。さらにアルギニン、プロリン等のアミノ酸に由来する信号が検出された。興味深い事に (F₁/F₂) = (1.46/7.74 ppm) 及び (3.79/7.74 ppm) にアラニンに由来する相関ピークが検出された。マンゴー果汁も比較的多くのアラニンを含んでいるが F₂-selective TOCSY スペクトルでは信号が検出されなかった。マンゴー果汁と日本酒では pH やアルコール度数などの環境が異なるため、交換性のアミノプロトンの検出の、し易さが異なったのかもしれない。また、日本酒の F₂-selective TOCSY スペクトルに現れた複雑なスペクトルパターンは食品の指紋として利用可能かもしれないと考えられた。

ハチミツの F₂-selective TOCSY スペクトルからは非常に多くの微量成分に由来する相関ピークが得られた (図 1-7b)。これらのピーク情報はハチミツの原産地や花の由来等を評価する際に有用な情報を与えてくれるかもしれない。また (F₁/F₂) = (2.01, 2.34, 3.35, 4.12/7.88 ppm) 及び (2.01, 2.34, 3.35, 4.12/8.57 ppm) の相関ピークはプロリンに由来するものであると帰属された。この事から試料中で遊離のプロリンアミノプロトンは NH₂⁺ の状態で存在しており、そのため 2 種類のアミノプロトンに由来する信号が検出されたと考えられた。

グレープシードオイルの F₂-selective TOCSY スペクトルからも非常に多くの微量成分に由来する相関ピークが得られた (図 1-7c)。F₂ 軸の 9-10 ppm 付近にはアルデヒドに由来する相関ピークが検出された。油脂においてアルデヒドは酸化的劣化の指標として用いられている重要な成分である。F₂-selective 2D NMR 法は油脂の酸化的劣化の解析及び品質管理を非破壊的に行う際に有用なツールとなることが期待される。

1-3-6. まとめ

この章では食品中の微量成分の 2 次元 NMR スペクトルを測定するための新規手法として F₂-selective 2D NMR 法について述べた。この手法により従来法である F₁-selective 2D NMR 法で生じる t₁ ノイズによるスペクトルの障害を解決出来るだけでなく、S/N 比が良い高品質な 2 次元 NMR スペクトルを非破壊的に得ることが出来る。マンゴー果汁の F₂-selective TOCSY, DQF-COSY 及び NOESY スペクトルの測定を通して F₂-selective 2D NMR 法が様々な 2 次元 NMR 法に適用可能である事が分かった。さらに日本酒、ハチミツ、グレープシードオイルの F₂-selective TOCSY の測定を通して F₂-selective 2D NMR 法が様々な食品の測定に適用可能である事が分かった。これらの結果は F₂-selective 2D NMR 法が食品の代謝物分析において有用な汎用性の高い分析法である事を示している。

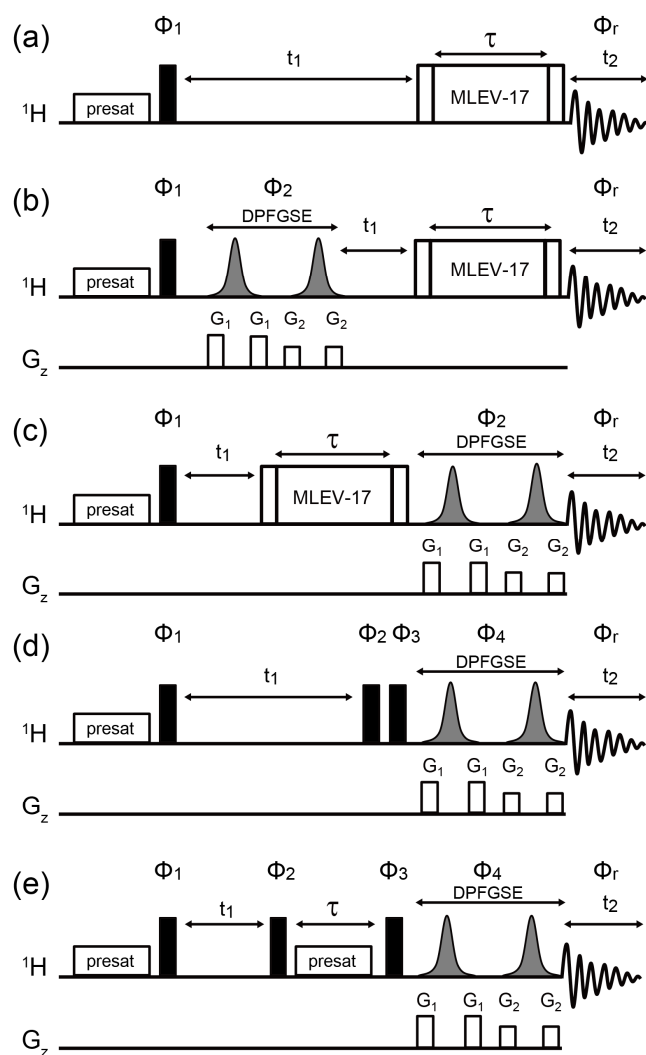


図 1-1. 本実験で用いたパルスシーケンス

(a) non-selective TOCSY, (b) F_1 -selective TOCSY, (c) F_2 -selective TOCSY, (d) F_2 -selective DQF-COSY, (e) F_2 -selective NOESY.

黒の長方形は非選択的な 90° パルスを示し、灰色の釣り鐘型は選択的な 180° パルスを示している。“ τ ” は TOCSY 及び NOESY の混合時間を示している。グラジエントパルスの強さを示す G_1 及び G_2 の値はそれぞれ 9 and 8 G/cm であり、その長さは共に 1 ms である。また、各測定における位相回しは以下の通りである。

- non-selective TOCSY: $\Phi_1 = \Phi_r = y, -y, -x, x$.
- F_1 -selective TOCSY: $\Phi_1 = \Phi_2 = \Phi_r = y, -y, -x, x$.
- F_2 -selective TOCSY: $\Phi_1 = y, -y, -x, x$; $\Phi_2 = 2(y), 2(-x)$; $\Phi_r = y, -y, -x, x, -y, y, x, -x$.
- F_2 -selective DQF-COSY: $\Phi_1 = 4(x), 4(y)$; $\Phi_2 = 4(x), 4(-y), 4(-x), 4(y)$; $\Phi_3 = \Phi_4 = x, y, -x, -y, -x, -y, x, -x, -y, x, y, -y, x, y, -x$; $\Phi_r = x, -y, -x, y, -y, -x, y, x$.
- F_2 -selective NOESY: $\Phi_1 = 4(x, -x), 4(y, -y)$; $\Phi_2 = 8(x), 8(y)$; $\Phi_3 = \Phi_4 = 2(x), 2(y), 2(-x), 2(-y), 2(y), 2(-x), 2(-y), 2(x)$; $\Phi_r = x, -x, y, -y, -x, x, -y, y, y, -y, -x, x, -y, y, x, -x$.

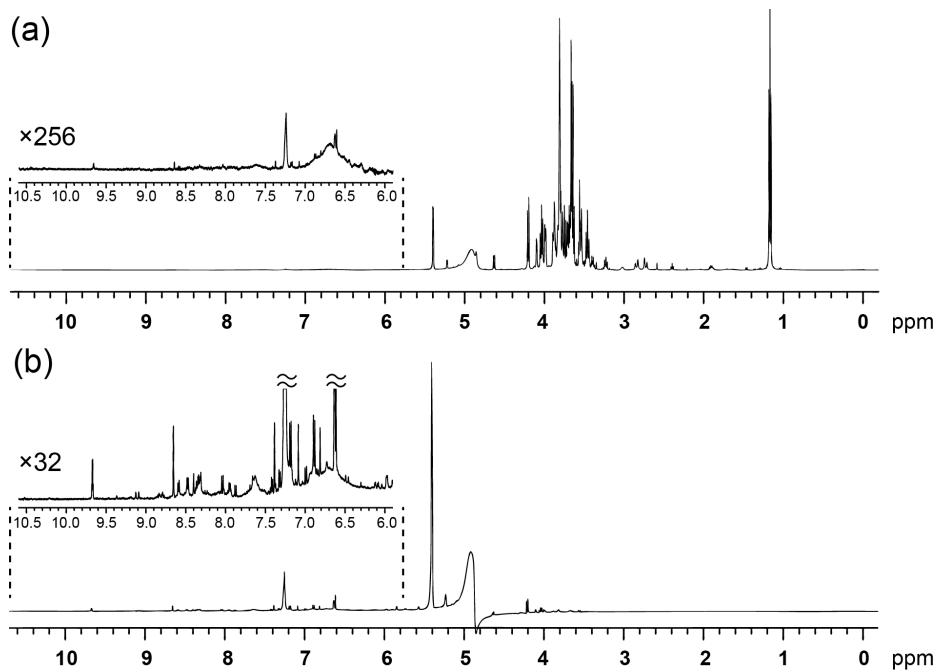


図 1-2. マンゴー果汁の 1 次元 ^1H NMR スペクトル

(a) 非選択励起を用いて測定。積算回数 256 回、レシーバーゲイン 18 dB

(b) 選択励起を用いて測定。励起範囲 6.0-10.5 ppm、積算回数 256 回、レシーバーゲイン 60 dB

両スペクトルにおいて水の信号は presaturation 法により消去している

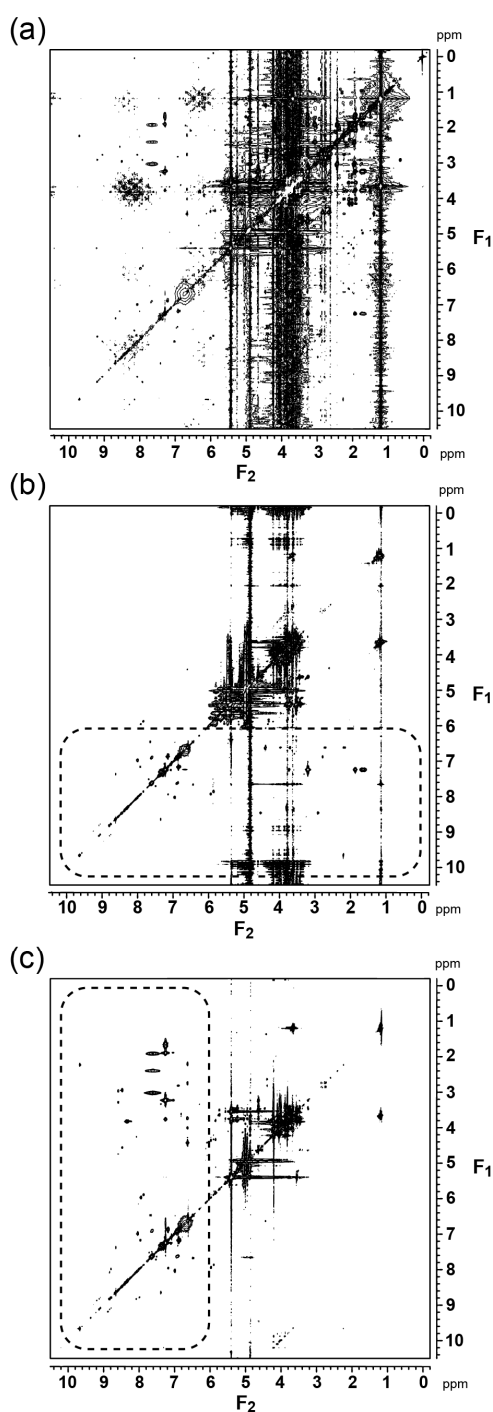


図 1-3. 非選択励起による TOCSY と選択励起による TOCSY の比較
 (a) 非選択励起による TOCSY スペクトル (積算回数 16 回、レシーバーゲイン 18 dB)
 (b) F₁-selective TOCSY スペクトル (積算回数 16 回、レシーバーゲイン 52 dB)
 (c) F₂-selective TOCSY スペクトル (積算回数 16 回、レシーバーゲイン 60 dB)

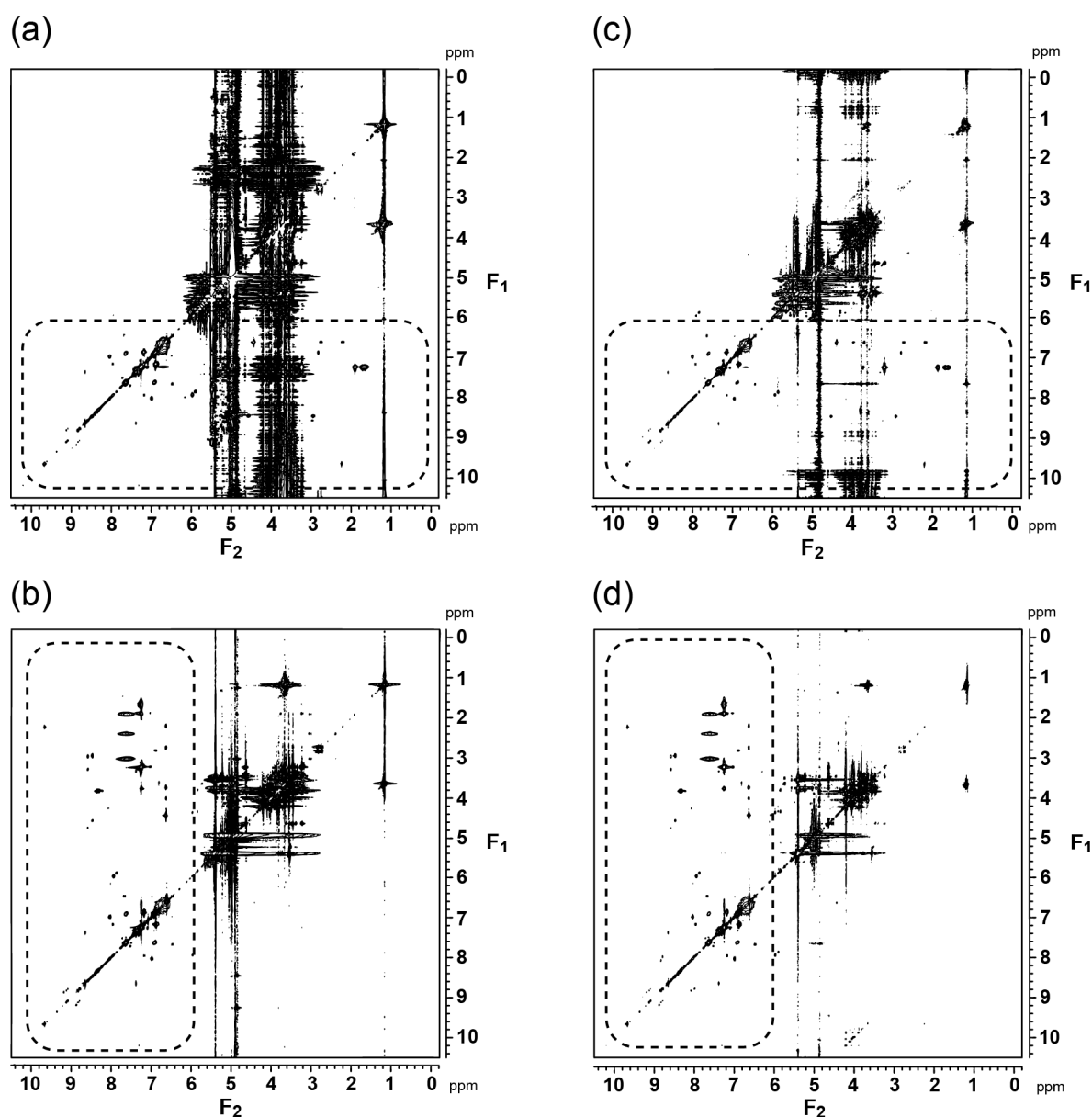


図 1-4. F_1 -selective 法と F_2 -selective 法における DPGSE のグラジエントレベルの違いによるスペクトルへの影響の比較

(a) F_1 -selective TOCSY スペクトル(G_1 :8.09 G/cm, G_2 :8.00 G/cm)

(b) F_2 -selective TOCSY スペクトル(G_1 :8.09 G/cm, G_2 :8.00 G/cm)

(c) F_1 -selective TOCSY スペクトル(G_1 :9.00 G/cm, G_2 :8.00 G/cm)

(d) F_2 -selective TOCSY スペクトル(G_1 :9.00 G/cm, G_2 :8.00 G/cm)

何れのスペクトルも積算回数は 16 回、励起範囲は 6.0-10.5 ppm である

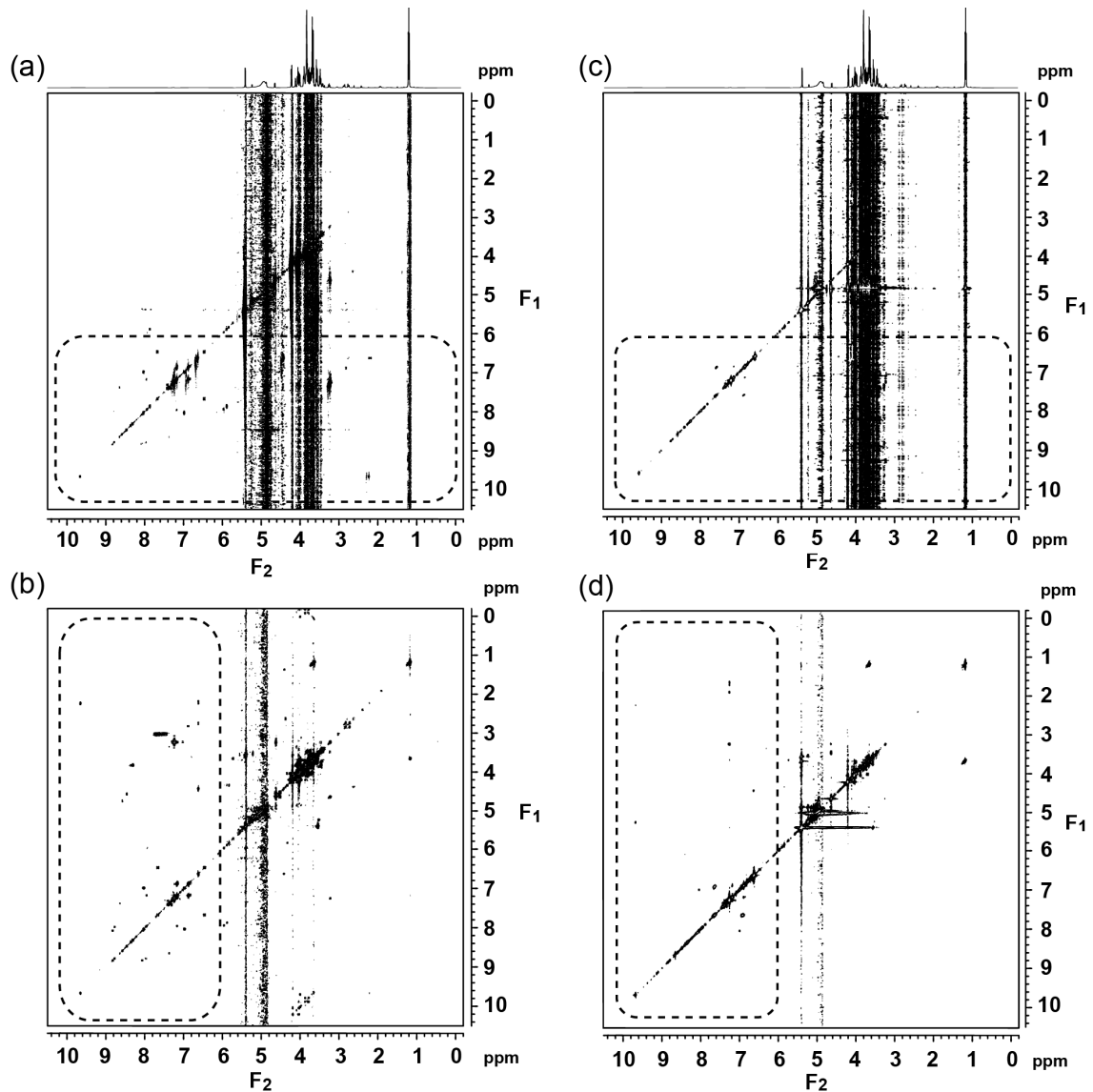


図 1-5. マンゴー果汁を用いた DQF-COSY 及び NOESY における F_1 -selective 法と F_2 -selective 法の比較

(a) F_1 -selective DQF-COSY スペクトル (レシーバーゲイン 28 dB)

(b) F_2 -selective DQF-COSY スペクトル (レシーバーゲイン 60 dB)

(c) F_1 -selective NOESY スペクトル (レシーバーゲイン 20 dB)

(d) F_2 -selective NOESY スペクトル (レシーバーゲイン 60 dB)

何れのスペクトルも積算回数は 16 回、励起範囲は 6.0-10.5 ppm である

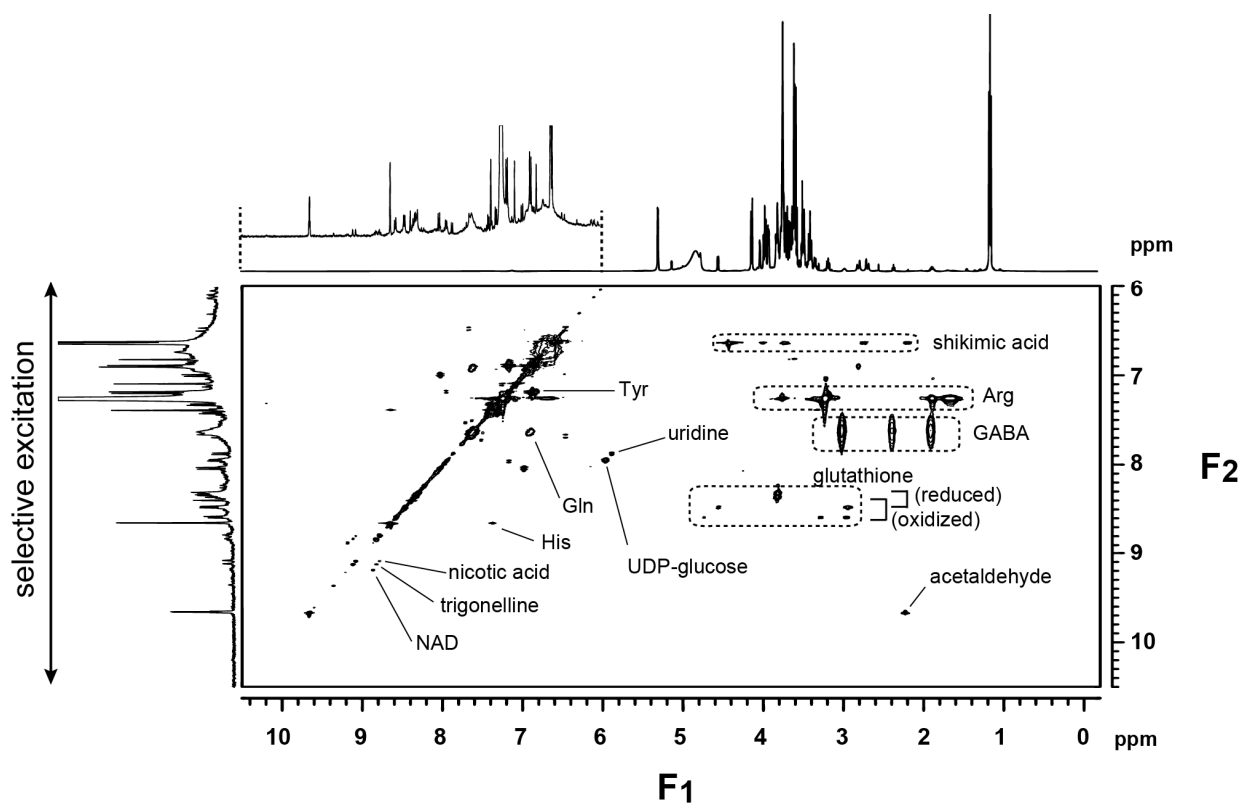


図 1-6. マンゴー果汁の F₂-selective TOCSY スペクトルの拡大図

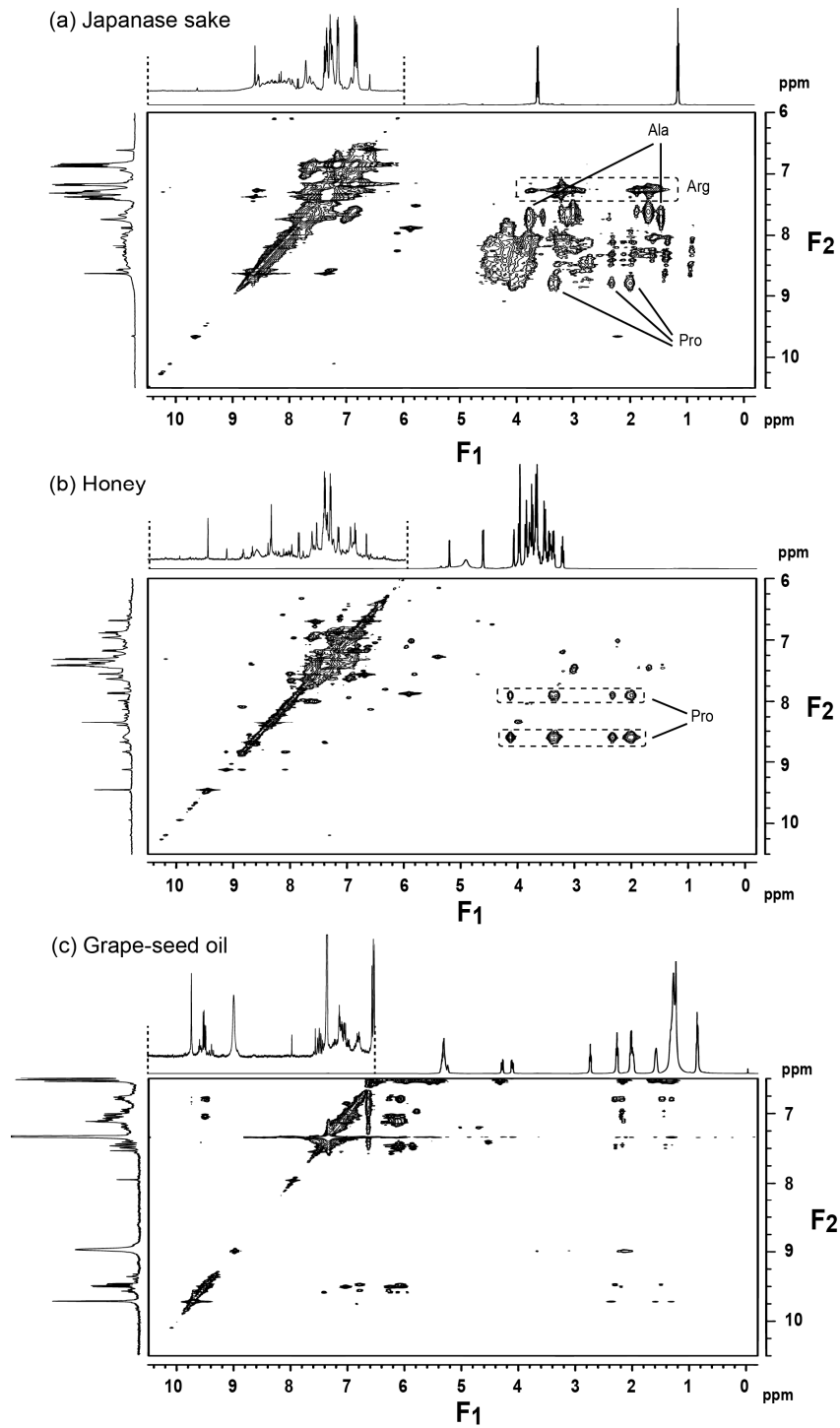


図 1-7. (a)日本酒、(b)ハチミツ、(c)グレープシードオイルの低磁場領域の F₂-selective TOCSY スペクトル
 励起範囲は日本酒及びハチミツが 6.0-10.5 ppm、グレープシードオイルが 6.5-10.5 ppm。積算回数は何れも 64 回である。

第二章

選択励起を用いた **NMR** スペクトルによる マンゴアの品種識別

2-1. 序

食品の原産地、由来となる生物種、偽和の有無など、いわゆる食品の真正評価に関する分析法は食品の安全性確保において非常に重要であり、食のグローバルズムに伴いその重要性が今まで以上に増してきている。それゆえ、様々な食品の真正評価法が研究され提案されてきた。代表的な分析法としては DNA 分析[31]、微量元素分析[32]、安定同位体分析[33]、代謝物分析[34,35]が挙げられる。これらの分析法の中で代謝物分析は加工食品を含む様々な食品に適用可能なだけでなく、食品工学や食品微生物学などの食品科学の広い分野においても有用な分析手法である事が報告されている[1-2]。NMR による代謝物分析を用いた食品の真正評価としてはオリーブオイルの原産地識別[36]、ハチミツの花の由来の評価[37, 38]、転化糖を用いたハチミツの偽和の検出[39]など、数多くの研究成果が報告がされている。

マンゴーは日本において人気のある果物の一つであり、多くのマンゴー果実及び果汁が海外から輸入されている。果物や野菜の品種識別は食品の真正評価において重要な分野の一つである。なぜなら品種が異なると多くの場合、価格が異なるからである。今回扱った 5 種類の品種の中でカラバオ種は 1 個当たりの単価が約¥150-200 であり、1 個当たりの単価が¥400-500 である他の品種に比べて安価に入手可能である。このような価格差は偽装表示、偽和などの原因となる。また今回の研究対象であるマンゴーには当てはまらないが、品種は登録することにより独占的な栽培が認められる知的財産でもある。そのため品種の識別技術は食品の真正評価の側面だけでなく、知的財産の保護の観点からも重要な技術である。品種の識別は果実の状態のものであれば比較的容易であるが、果汁の状態になると識別が急に難しくなる。また果汁の場合は偽和が行われている可能性もあり、この様な「場合分けの多さ」がさらに識別を困難にする。品種が異なっても生物種としては同じであるため、品種間の主要な成分は類似している場合が多い。その為、代謝物分析による品種識別では微量成分の組成が特に重要であると考えられる。NMR を用いた代謝物分析において低磁場領域は、その信号の弱さからこれまで、あまり利用されて来なかった。しかし前章で述べたように選択励起を用いる事で微量成分の信号を感度良く検出する事が可能であり、品種識別の有力な情報源になりうるかもしれないと考えられた。

この章では選択励起により非破壊的に得られた低磁場領域 (6-10 ppm) の ^1H NMR スペクトルと主成分分析を組み合わせる事によりアーウィン種、カラバオ種、キーツ種、ケント種及びナムドクマイ種の5種類のマンゴー果汁の品種識別モデルの構築を試みた。短時間で測定可能な1次元スペクトルを用いる事で1検体の分析にかかる時間を大幅に短縮し、大量の商業貨物に対処しうる効率的なスクリーニング法の構築を目指した。さらに F_2 -selective 2D NMR 法[40]を用い微量成分の帰属を行い、その情報を用いてローディングプロットの解釈を行う事で品種識別のためのマーカー成分の同定も試みた。

2-2. 実験材料と方法

2-2-1. NMR 測定用試料の調製

本研究では 5 品種、各 11 個、計 55 個のマンゴー果実を用いて品種識別を試みた。使用した 5 種類の品種はアーウィン種（台湾産）、カラバオ種（フィリピン産）、キーツ種（米国、カリフォルニア産）、ケント種（メキシコ産）及びナムドクマイ種（タイ産）である。これらの果実は何れも神奈川県内のスーパーマーケットで購入した。

果実は購入した時点では身が硬く、熟していなかったので十分に熟すまで室温で放置した。外観及び匂いから判断し、十分に熟した後にマンゴーの皮と種子を除去し、果肉をパルプ状にすりおろした。これを 4 °C、26,000×g で 10 分間遠心分離し、上清をマンゴー果汁として用いた。マンゴー果汁は測定に用いるまで冷凍庫内で-20 °C で保存した。

信号の帰属用の試料としては、マンゴー果汁 630 μL に重水 70 μL 及びごく少量の DSS を加え、混合した後に 5mm の NMR チューブに移したものを使用した。

多変量解析用の試料は pH による信号の化学シフトの変化を最小限に抑えるために pH を 4.2 に統一する前処理を行った。5mL のマンゴー果汁を 15mL のプラスチック製遠心管に移し 6 M の HCl 又は 4 N の NaOH を使用して pH を約 4.2 に調整した。このマンゴー果汁 420 μL に 300 mM シュウ酸緩衝液 (pH4.20) 210 μL 及び重水 70 μL (化学シフトの基準物質として 0.25 mM の DSS 及びヒスチジンを含む) を混合した後に 5mm の NMR チューブに移したものを使用した。

多変量解析用で用いる多くの試料の pH 調整を効率的に行う際に、緩衝液のみで pH の調整を行う事が出来れば非常に効率的であるが、今回用いたマンゴー果汁では pH を統一するために果汁の 7 倍容量の緩衝液が必要になり微量成分の検出が困難になった。これに対し 6 M の HCl 又は 4 N の NaOH を用いた pH の調整は時間がかかり非効率的であった。結果的に最も効率が良い方法は、6 M の HCl 又は 4 N の NaOH を用いて pH を大雑把に調整し、そこに緩衝液を加える事で正確な pH の調整を行う事であった。

2-2-2. NMR スペクトルの測定

全ての NMR スペクトルは Varian Unity INOVA-500 spectrometer を用いて 20 °C 測定した。選択励起は DPGSE 法[21]を用いて行った。180°の shaped pulse には Re-Burp[22]を用

いた。励起範囲 6.0-10.5 ppm、 6.3-10.5 ppm 及び 0.2-3.1 ppm における Re-Burp パルスの power ($\gamma H_1/2\pi$) 及びパルス長はそれぞれ、3.2, 3.1, 2.4 kHz 及び 2.0, 2.1, 2.9 ms である。

各測定における NMR スペクトルのパラメーターは以下のとおりである。

^1H NMR: スペクトル幅 8,000 Hz; データポイント 32 k; 取り込み時間 2.048 秒; 待ち時間 2.0 秒。なお、多変量解析に用いるスペクトルの測定では、非選択励起の場合は、レシーバーゲインを 16 dB、積算回数は 128 回とした。選択励起の場合はレシーバーゲインを 52 dB、積算回数は 256 回とした。

^{13}C NMR: スペクトル幅 30,018.76 Hz; データポイント 64 k; 取り込み時間 1.092 秒; 待ち時間 4.0 秒; 積算回数 15,000 回

TOCSY: スペクトル幅 6,000 Hz; F_2 軸のデータポイント 2048; F_1 軸のデータポイント 512; 積算回数 16 回; 取り込み時間 0.341 s; 待ち時間 2.0 s; MLEV-17 スピンロックパルスの強さ 7.1 kHz; トリムパルス長さ 2 ms; 混合時間 80 ms

DQF-COSY: スペクトル幅 6,000 Hz; F_2 軸のデータポイント 2048; F_1 軸のデータポイント 512; 積算回数 16 回; 取り込み時間 0.341 s; 待ち時間 2.0 s

NOESY: スペクトル幅 6,000 Hz; F_2 軸のデータポイント 2048; F_1 軸のデータポイント 512; 積算回数 16 回; 取り込み時間 0.341 s; 待ち時間 2.0 s; 混合時間 800 ms

HSQC (heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy): ^1H のスペクトル幅 6,000 Hz; ^{13}C のスペクトル幅 20,742 Hz; F_2 軸のデータポイント 2048; F_1 軸のデータポイント 512; 積算回数 256 回; 取り込み時間 0.341 s; 待ち時間 2.0 s

CT-HMBC (constant-time heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)[41]: ^1H のスペクトル幅 6,000 Hz; ^{13}C のスペクトル幅 28,902 Hz; F_2 軸のデータポイント 2048; F_1 軸のデータポイント 256; 積算回数 416 回; 取り込み時間 0.341 s; 待ち時間 2.0 s

2-2-3. NMR スペクトルの前処理及び多変量解析

多変量解析には 5 品種、各 11 個、合計 55 個の試料を用いて行った。全ての ^1H NMR スペクトルに対して手動での位相合わせ及びベースラインコレクションを行った。非選択励起により得られた ^1H NMR スペクトルは DSS のメチル基の信号を 0.00 ppm に、選択励起により得られた ^1H NMR スペクトルはヒスチジンの C2H の信号を 8.64 ppm に合わせた。

非選択励起により得られた ^1H NMR スペクトルは 0.0-10.0 ppm の範囲 (軽水周辺の

4.5-6.0 ppm の範囲を除く) を 0.01 ppm 幅のサイズに区切って積分を行った。選択励起により得られた ^1H NMR スペクトルは 6.3-10.0 ppm の範囲を 0.01 ppm の幅で区切って積分を行った。

上記処理により得られたデータを SIMCA-P+ version 11.0 にインポートし、教師無しの主成分分析を行った。これにより選択励起により得られた低磁場領域の ^1H NMR スペクトルを用いたマンゴー果汁の品種識別の有効性の検証を行った。

2-2-4. マンゴー果汁の NMR スペクトルにおける信号の帰属

1次元、2次元 NMR スペクトルから得られた信号は BMRB, HMDB, MMCD 等のオンラインデータベース[23-25]及びマンゴー果汁に関する論文[26-28]のデータと比較し候補成分を選び出した。最終的には、これら候補成分の試薬 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan 及び Nacalai Tesque, Inc. Tokyo Japan) をマンゴー果汁に添加し、得られたスペクトルと試薬を添加していないマンゴー果汁のスペクトルを比較する事で成分の帰属を行った。

2-3. 結果と考察

2-3-1. マンゴー果汁の ^1H NMR スペクトル及び信号の帰属

図 2-1a に非選択励起な測定により得られたマンゴー果汁(ナムドクマイ種)の ^1H NMR スペクトルを示す。そのスペクトルは 3.0-5.5 ppm の範囲で観察されるショ糖、果糖、ブドウ糖の信号が主体であった。高磁場領域 (0.5-3.0 ppm) ではアミノ酸、有機酸に由来すると推定される多くのピークが観察された。これに対して低磁場領域 (6.0-10.0 ppm) ではピークが殆ど検出されなかった。ピークの帰属を行う為、ナムドクマイ種の果汁を用いて各種 2 次元 NMR (DQF-COSY, TOCSY, NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C CT-HMBC) の測定を行った (図 2-2, 2-3)。これにより高磁場領域でアミノ酸 (イソロイシン、ロイシン、バリン、アラニン、アルギニン、グルタミン、GABA (γ -aminobutyric acid))、有機酸 (キナ酸、シキミ酸、リンゴ酸、クエン酸)、フコース、エタノール、コリン等の様々な微量成分を同定する事が出来た (図 2-1b、表 2-1)。

非選択励起な測定により得られた ^1H NMR スペクトルと同様に、非選択励起により得られた 2 次元 NMR スペクトルにおいても低磁場領域では殆どピークが検出されなかった。このように低磁場領域において殆どピークが検出されなかった理由の一つとして主成分である糖類の強い信号によるダイナミックレンジの問題が考えられた。すなわち、主成分の強い信号をデジタル化するためにダイナミックレンジの大部分を使用してしまうと微量成分の弱い信号を検出する事が出来なくなる。そこで主成分の信号を除去してダイナミックレンジの問題を解決するために選択励起の手法を用いて低磁場領域 (6.0-10.0 ppm) の測定を行った。その結果、レシーバーゲインは 18 dB から最大値である 60 dB まで増加し、非選択励起な測定では検出されなかった多くのピークが新たに検出された (図 2-1c)。この結果は、選択励起の手法を用いて主成分の強い信号を除去する事で溶媒抽出などの手間のかかる前処理を行うことなく非破壊的に微量成分を測定可能である事を示している。

NOESY の技術を応用した信号の消去 (suppression 法) もまた、食品中の微量成分を非破壊的に測定する際に効果的である。軽水の信号を消去する NOESY presat の手法は以前から NMR を用いた食品分析で用いられているが、最近、消去法により 8 個の周波数成分を同時に消去できる新手法も報告されている[42]。選択励起と消去法による巨大信号の

消去には互いに異なる長所があると考えられる。消去法の利点は、複数の領域の微量成分の測定が一度の実験で測定可能な事である。アルコール飲料を例にとると、消去法ではエタノールの信号を消去する事で高磁場側と低磁場側の微量成分の測定を一度の実験で行う事が出来る。しかし選択励起では 2 回以上の測定が必要となる。また、選択励起は漏えい磁場による目的外の励起のために強い信号に挟まれた領域の測定を苦手とする。一方、選択励起法の利点は「低磁場領域」などの特定の 1 領域を測定する場合は装置の設定を含む測定が容易である点が挙げられる。また選択励起は 2 次元 NMR スペクトルの測定において大きな利点がある。再びアルコール飲料を例にとると、消去法ではエタノールと重なっている微量成分の信号もエタノールと一緒に消去されてしまう可能性がある。さらに NOESY スペクトルにおいてエタノールと微量成分間の相互作用を解析することも困難であるが、選択励起、特に F_2 -selective 2D NMR 法を用いる事によって、上記の問題を克服する事ができる。この様な事から、測定する試料、スペクトルの種類に応じて、これらの手法を適切に使い分ける事が重要と考えられる。

2-3-2. F_2 -selective 2D NMR 法を用いた微量成分の同定

図 2-4a にマンゴー果汁（ナムドクマイ種）の低磁場領域の F_2 -selective TOCSY スペクトルを示す。非選択励起な測定で得られた 2 次元 NMR スペクトルよりも多くの信号が検出され、さらに 1 次元 ^1H NMR スペクトルでは複雑に重なっていた信号を分離する事が出来た。 F_2 -selective TOCSY, DQF-COSY, NOESY スペクトルを用いる事で低磁場領域の微量成分を効率的に帰属する事が出来た（表 2-1）。例えば、 $F_1/F_2 = (8.08/8.83 \text{ ppm})$ と $(9.12/8.83 \text{ ppm})$ の相関ピークが示すスピン系 $(8.08-8.83-9.12 \text{ ppm})$ はその化学シフトよりニコチン酸の誘導体である事が推定された。また、 $F_1/F_2 = (8.29/8.99 \text{ ppm}), (9.28/8.99 \text{ ppm}),$ 及び $(9.46/9.28 \text{ ppm})$ の相関ピークが示すスピン系 $(8.29-8.99-9.28-9.46 \text{ ppm})$ はその化学シフトよりニコチンアミドの誘導体であると推定された（図 2-4b）。最終的にこれらの相関ピークは添加試験により、前者がニコチン酸の誘導体であるトリゴネリン、後者がニコチンアミドの誘導体であるニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN) であると帰属された。また、7.07 及び 7.25 ppm には比較的強度の強い 2 本のシングレットピークが検出されたが、これらのピークは上記の F_2 -selective 2D NMR 法を用いても帰属をする事が出来なかった。しかし CT-HMBC スペクトルにおいて相関ピークが検出され、そのパターンより、これらのピークはガロイル基に由来する物であると推定された（図 2-5）。

最終的にピークの正確な帰属は出来なかったが、文献を検索した結果、これらのピークは *p*-digallic acid に由来する可能性が高いと推定された[43, 44]。

F₂-selective TOCSY スペクトルではアミノプロトンに由来する信号を感度良く検出する事が出来た。アミノプロトンは交換性の性質を示す為、試料を重水に溶かした場合、重水素との化学交換によりアミノプロトンを検出するのは通常困難である。しかし今回の実験のように軽水が十分にある環境下(NMR 装置のフィールドロックの為に 10% (v/v) の重水を添加する) では約 7-9 ppm の範囲でアミノプロトンの信号が検出される可能性が十分にある。例えば、6.89 及び 7.61 ppm のややブロードな 2 本のシングレットはグルタミンの側鎖のアミノプロトン (NH₂-CO-) に由来するものであると帰属された。これらのピークは、その形状がシングレットピークであったため F₂-selective TOCSY 及び DQF-COSY では相関ピークに関する情報が得られなかったが、F₂-selective NOESY スペクトルにおいて 2.45 ppm に相関ピークが検出された事から、これらのピークはグルタミンに由来するものではないかと推定された。最終的には添加試験により、これら 2 本のピークがグルタミンに由来する物である事が確認された。アスパラギンとグルタミンの側鎖のアミノプロトン (NH₂-CO-) は ¹H NMR スペクトルにおいて互いに類似の化学シフトを示し TOCSY, DQF-COSY では互いの識別は困難だったが NOESY スペクトルを用いる事で明確に識別が可能であった。7.25 ppm にはアルギニンの δNH に由来する信号が確認された。F₂-selective TOCSY スペクトルにおいて、F₁/F₂ = 1.69/7.25, 1.90/7.25, 3.23/7.25 ppm の位置に一連のスピンの系による相関ピークが観察され、これらはアルギニンに由来するものであると推定された。添加試験により、これら一連の相関ピークはアルギニンに由来するものである事が確認され、さらに F₂-selective DQF-COSY スペクトルにおいて F₁/F₂ = 3.23/7.25 ppm に相関ピークが検出された事から、最終的にこの 7.25 ppm の信号はアルギニンの δNH に由来する物であると帰属された。7.60 ppm と 7.72 ppm には、それぞれアラニンの αNH 及び GABA の NH₂ に由来する信号の存在が確認できた。これらのピークは強度が弱だけでなく、形状もブロードであったため信号が複雑に重なっていた 1 次元 NMR スペクトルでは存在に気づくことが出来なかったが F₂-selective TOCSY スペクトルにより検出、同定する事が出来た。ペプチドである酸化型及び還元型のグルタチオンに由来するアミノプロトンの信号も検出された。還元型グルタチオンの 8.47 ppm のピーク及び酸化型グルタチオンの 8.59 ppm のピークは 1 次元スペクトルにおいて共に重なっておらず、かつ形状がシャープであったので (図 2-1c)、マンゴー果汁中のグルタチオ

ンの量及び酸化型/還元型の存在比を測定するのに利用できるかもしれないと考えられた。Gómez らによるとトマト果実においては熟し具合の進行又は低温保存により果実中のグルタチオンの量が増加する事が報告されている[45]。この選択励起を用いた非破壊的なグルタチオンの測定法は品質管理の分野においてグルタチオンの迅速かつ正確な測定法として利用できるかもしれない。現在の所、低分子化合物のアミンプロトンの化学シフトに関する情報はデータベースや論文にほとんど記載されていない。さらにシグナルにはブロードな物も多く存在し、信号が複雑に重なっている食品の 1 次元スペクトルでは検出が難しい場合が多いが F₂-selective 2D NMR 法を用いる事でマンゴー果汁中の低磁場領域に存在するアミンプロトンのシグナルを効率よく検出、帰属する事が出来た。

図 2-6 に 100 mM のアルギニンと GABA を含む水溶液の F₁ 及び F₂-selective TOCSY スペクトルの比較図を示す。これらのスペクトルは同一の試料を、同一のレシーバーゲインの値で測定したものであり、違いは F₁ 軸、F₂ のどちらの軸に沿って選択励起をしているかの違いのみである。アルギニンの δNH 及び ωNH に由来する信号については F₁ 及び F₂-selective TOCSY スペクトルの両方で検出されたが F₂-selective 型の方が感度良く検出された。これに対して GABA のアミンプロトンに由来するシグナルは F₂-selective TOCSY でのみ検出された。この結果は、混合物中の弱いアミンプロトンに由来する信号を検出する為には、従来型の F₁-selective TOCSY よりも F₂-selective TOCSY の方が優れている事を示している。

高磁場側 (0.5-3.1 ppm) において、選択励起を用いる事でレシーバーゲインが 18 dB から 42 dB まで増加した。1 次元 NMR スペクトルにおいては、非選択励起で測定した物とスペクトルの質は大きく変わらなかった (図 2-7)。さらに選択励起を用いたスペクトルでは 2.7 ppm 付近にアンチフェイズのシグナルが強く表れスペクトルの形状が乱れてしまった。z-filter を適用しスペクトルの改善を試みたが、スペクトルの改善は見られなかった。一方 F₂-selective TOCSY の測定では選択励起を用いる事で S/N 比が大きく改善しスペクトルの質が大きく改善した (図 2-8)。高磁場側の F₂-selective TOCSY スペクトルを用いる事で新たにトレオニンを同定する事が出来た。

2-3-3. 選択励起を用いた ¹H NMR スペクトルによる多変量解析

アーウイン種、カラバオ種、キーツ種、ケント種、ナムドクマイ種の 5 種類のマンゴー果汁の異なる 4 種類の領域の ¹H NMR スペクトル((1) 非選択励起による全領域

(0.0-10.0 ppm)、(2) 非選択励起による高磁場領域 (0.0-3.1 ppm)、(3) 非選択励起による低磁場領域 (6.3-10.0 ppm)、(4) 選択励起を用いた低磁場領域 (6.3-10.0 ppm)) を用いて教師無し (unsupervised) の主成分分析を行い品種の識別モデルの構築を試みた。高磁場領域のスペクトルは選択励起を用いた物と非選択励起を用いた物の間で殆ど違いが見られなかったため、非選択励起を用いたスペクトルを使って主成分分析を行った。

図 2-10 に本研究で使用した 5 品種のマンゴー果汁の選択励起により得られた低磁場領域の ^1H NMR スペクトルを示す。非選択励起により得られたスペクトルの低磁場領域では何れの品種からもほとんどピークが検出されなかったが (図 2-9)、選択励起を用いたスペクトルからは多くのピークが検出され、そのスペクトルパターンは 5 品種で明らかに異なっていた (図 2-10)。この事より、選択励起により得られた低磁場領域の ^1H NMR スペクトルはマンゴー果汁の品種識別に利用できるかもしれないと考えられた。選択励起により得られた低磁場領域の ^1H NMR スペクトルの品種識別への有用性を評価する為、教師無し (unsupervised) の主成分分析を行い、非選択励起により得られたスペクトルを用いて行った主成分分析とスコアプロットの比較を行った。図 2-10 に 4 種類の異なる領域を用いて行った主成分分析のスコアプロットを示す。通常非選択励起で得たスペクトルを用いた主成分分析では何れも、キーツ種を除き品種が互いに重なってしまい、品種ごとに分離することは出来なかった (図 2-10a~10c)。これに対して選択励起による低磁場領域のスペクトルをもちいて行った主成分分析のスコアプロットでは 5 種類の品種の良い識別モデルが得られた (図 2-10d)。PC1 と PC2 を用いたスコアプロットではカラバオ種とナムドクマイ種は分離しなかったが PC3 を用いることで、これらの 2 品種が分離し綺麗な識別モデルを構築する事が出来た (図 2-11a)。PC1 のローディングプロットはキーツ種においてはアルギニン、ヒスチジン及びアセトアルデヒドの含有量が多く、シキミ酸の含有量が他の品種に比べて低いことを示した (図 2-11b)。PC2 のローディングプロットはアーウィン種においてフェニルアラニンの含有量が多く、カラバオ種とナムドクマイ種でグルタミンとシキミ酸の含有量が多い事を示した (図 2-11c)。カラバオ種とナムドクマイ種は PC3 に沿って分離したが、PC3 のローディングプロットによるとカラバオ種ではトリゴネリンの含有量が多い事が示された (図 2-11d)。これらの結果は、選択励起により得られた低磁場領域の ^1H NMR スペクトルは、従来型の非選択励起により得られたスペクトルよりもマンゴー果汁の品種識別において優れた情報を有している事を示している。選択励起により得られた低磁場領域の微量成分のスペクトルと非選択

励起で得られた高磁場領域の微量成分のスペクトルを合わせて主成分分析を行う事で、カラバオ種とナムドクマイ種を、より明確に分離するスコアプロットが得られるかもしれないと考えられたので、組み合わせたスペクトルを用いて主成分分析を試みたがスコアプロットは改善せず、選択励起で得られた低磁場領域のスペクトルのみで行った場合と類似のスコアプロットが得られた。

非選択励起により得られたスペクトルを用いた主成分分析ではキーツ種を除いて品種が互いに重なってしまい、品種ごとに分類する事が出来なかった(図 2-10a~10c)。全領域のスペクトルは全ての品種においてショ糖、果糖、ブドウ糖が主体的であった。そのため、これら糖類の濃度の個体差が主成分分析の結果に影響を与え、スコアプロットが複雑に混じってしまったのではないかと推定された。スコアプロットを改善する為に糖類のピークがある 3.2-4.4 ppm の範囲のデータに対して、重み付けを行ったがスコアプロットは改善せず、非選択励起により得られた高磁場側のスペクトルを用いたスコアプロットと同様の物が得られた。高磁場領域にはアミノ酸、有機酸等、様々な微量成分の信号が現れるため、NMR スペクトルを用いたメタボリックプロファイリングにおいては、多くの情報を含んでいる領域として、様々な研究で利用されている領域である。しかし、今回の研究においては当該領域を用いた主成分分析では品種の分類を行う事が出来なかった。マンゴー果実においては、熟す過程において有機酸、アミノ酸の含有量が増加する事が報告されている[26, 27]。高磁場領域のスコアプロットが複雑に混ざってしまったのは、実験に用いた果実の熟し具合の不均一さが原因なのかもしれない。また、ローディングプロットによるとキーツ種ではエタノールの含有量が他の品種よりも多い事が示された。しかし、エタノールは追熟中に天然酵母によるエタノール発酵で生じる事もある。従って、キーツ種でエタノール含有量が多いという結果は、品種の違いだけでなく、追熟条件の違いも反映しているのかもしれない。これらの結果は、選択励起を用いた低磁場領域の ^1H NMR スペクトルはマンゴー果実の個体差や熟し度合いの影響をあまり受けず、品種の違いを強く反映していた事を示唆している。また、このような特徴は、複数の果実の混合物である、実際に商取引される果汁を用いた品種識別において非常に有益であると考えられた。

2-3-4. まとめ

本章では選択励起を用いた 1 次元 NMR スペクトルと多変量解析を用いてマンゴー果汁の品種識別を試みた。選択励起の手法を用いる事でマンゴー果汁の様々な微量成分を非破壊的に同定する事が出来、さらに F₂-selective 2D NMR 法を用いる事で、低磁場領域のアミンプロトンを含む微量成分を効率的に帰属する事が出来た。F₂-selective 2D NMR 法により得られたピークの帰属情報は主成分分析のローディングプロットの解釈に非常に有用であり、アルギニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、グルタミン、シキミ酸及びトリゴネリンの含有量が、この5種類の品種識別に重要な成分であることが分かった。食品中の微量成分を非破壊的に測定可能にする選択励起の手法は NMR を用いた代謝物分析においてますます重要になっていくと考えられる。

Compounds	Chemical shifts (ppm)
Isoleucine	0.93 (δCH_3), 1.00 ($\gamma'\text{CH}_3$), 1.24 (γCH_2), 1.46 (γCH_2), 1.97 (βCH), 3.67 (αCH)
Leucine	0.95 (δCH_3), 1.70 (γCH , βCH_2)
Valine	0.98 ($\gamma'\text{CH}_3$), 1.03 (γCH_3), 2.26 (βCH_2), 3.60 (αCH)
Ethanol	1.17 (CH_3), 3.65 (CH_2)
Fucose	1.19 (αC6H_3), 4.19 (αC5H); 1.23 (βC6H_3), 3.79 (βC5H)
Threonine	1.32 (γCH_3), 3.58 (αCH), 4.26 (βCH)
Alanine	1.47 (βCH_3), 3.78 (αCH), 7.72 (αNH_2)
Arginine	1.69 (γCH_3), 1.90 (βCH_2), 3.23(δCH_2), 3.75 (αCH), 7.25 (δNH)
Quinic acid	1.87 (C2H_2), 1.97 (C6H_2), 2.06 (C6H_2), 2.07 (C2H_2), 3.55 (C4H), 4.01 (C3H), 4.14 (C5H)
γ -aminobutyric acid (GABA)	1.91 (βCH_2), 2.37(αCH_2), 3.02 (γCH_2), 7.60(γNH_2)
Glutamine	2.13 (βCH_2), 2.45(γCH_2), 3.77 (αCH), 6.89 ($\text{NH}_2\text{-CO-}$), 7.61 ($\text{NH}_2\text{-CO-}$)
Shikimic acid	2.20 (C6H_2), 2.76 (C6H_2), 3.74 (C4H), 4.00 (C5H), 4.42 (C3H), 6.59 (C2H)
Malic acid	2.62 (CH_2), 2.81 (CH_2), 4.38 (CH)
Citric acid	2.74 (CH_2), 2.85 (CH_2)
Choline	3.18 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$)
β -Glucose	3.23 (C2H), 3.39 (C4H), 3.45 (C5H), 3.48 (C3H), 3.71 (C6H_2), 3.89 (C6H_2), 4.63 (C1H)
<i>myo</i> -inositol	3.26 (C5H), 3.52 (C1H , C3H), 3.61 (C4H , C6H), 4.06 (C2H)
Methanol	3.35 (CH_3)
α -Glucose	3.40 (C4H), 3.52 (C2H), 3.70 (C3H), 3.75 (C6H_2), 3.82 (C5H), 3.83 (C6H_2), 5.22 (C1H)
Sucrose	3.46 (Glu C4H), 3.54 (Glu C2H), 3.67 (Fru C1H_2), 3.75 (Glu C3H), 3.81 (Glu C6H_2), 3.81 (Fru C6H_2), 3.83 (Glu C5H), 3.87 (Fru C5H), 4.04 (Fru C4H), 4.20 (Fru C3H), 5.39 (Glu C1H), 3.54 (C1H_2), 3.58 (C1H_2), 3.66 (C6H_2), 3.78 (C6H_2), 3.81 (C5H), 4.10 (C3H), 4.10 (C4H)
β -fructofuranose	3.54 (C1H_2), 3.58 (C1H_2), 3.66 (C6H_2), 3.78 (C6H_2), 3.81 (C5H), 4.10 (C3H), 4.10 (C4H)
β -fructopyranose	3.55 (C1H_2), 3.69 (C6H_2), 3.70(C1H_2), 3.78 (C3H), 3.89 (C4H), 3.99 (C5H), 4.01 (C6H_2)
Adenosine	6.08 (C1'H), 4.29 (C4'H), 4.43 (C3'H), 4.78 (C2'H), 8.29 (C8H), 8.38 (C2H)
Tyrosine	6.89 (C3H , C5H , ring), 7.18 (C2H , C6H , ring)
Phenylalanine	7.31 (C2H , C6H , ring), 7.36 (C4H , ring), 7.40 (C3H , C5H , ring)
Histidine	7.38 (C4H ring), 8.64 (C2H, ring)
Uridine	7.86 (C6H, ring), 5.90 (C5H, ring)
UDP-glucose	7.93 (C6H, ring), 5.94 (C5H, ring)
Uridine mono phosphate (UMP)	7.94 (C6H, ring), 5.93 (C5H, ring)
Trigonelline	8.08 (C5H), 8.83 (C4H, C6H), 9.12 (C2H)
Glutathione (reduced)	8.30 (Gly, NH), 3.82 (Gly, CH_2); 8.47 (Cys, NH), 2.95 (Cys, CH_2), 4.57 (Cys, CH)
Glutathione (oxidized)	8.35 (Gly, NH), 3.81 (Gly, CH_2); 8.59 (Cys, NH), 2.97 (Cys, CH_2), 3.30 (Cys, CH_2), 4.75 (Cys, CH)
Nicotineamide mononucleotide (NMN)	8.99 (C6H), 9.28(C4H), 9.46 (C2H), 8.29 (C5H)
acetaldehyde	9.66 (CHO), 2.24 (CH_3)

表 2-1. 検出、同定されたマンゴー果汁中の代謝物の化学シフト
(ナムドクマイ種、pH 4.3)

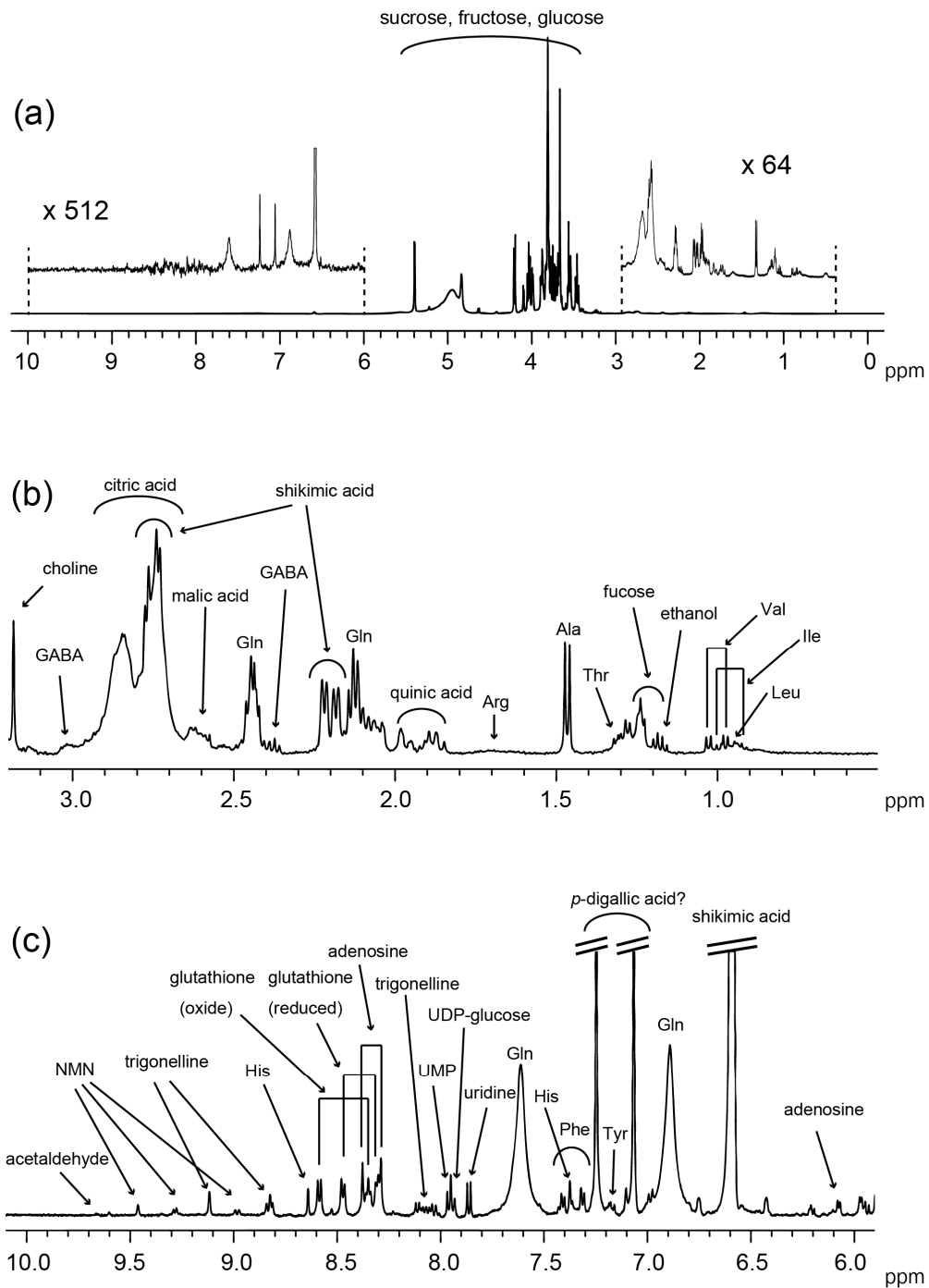


図 2-1. マンゴー果汁（ナムドクマイ種）の¹H NMR スペクトル及び信号の帰属
 (a) 非選択励起により測定したスペクトルの全体図、積算回数 128 回
 (b) 非選択励起により測定したスペクトルの高磁場領域の拡大図(0.5-3.2 ppm)
 (c) 選択励起により測定した低磁場領域のスペクトル(5.9-10.1 ppm)、積算回数 256 回

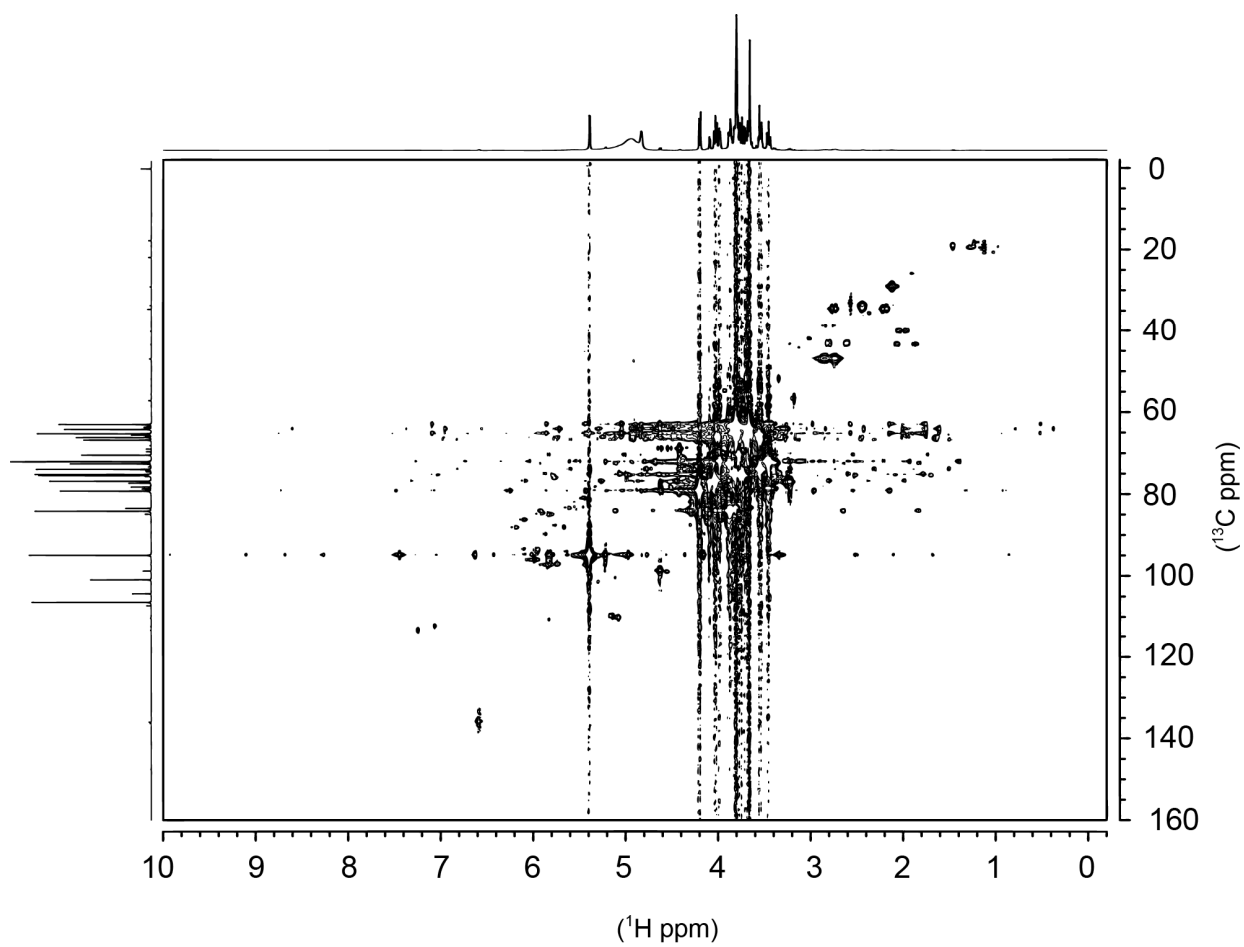


図 2-2. マンゴー果汁（ナムドクマイ種）の HSQC スペクトル

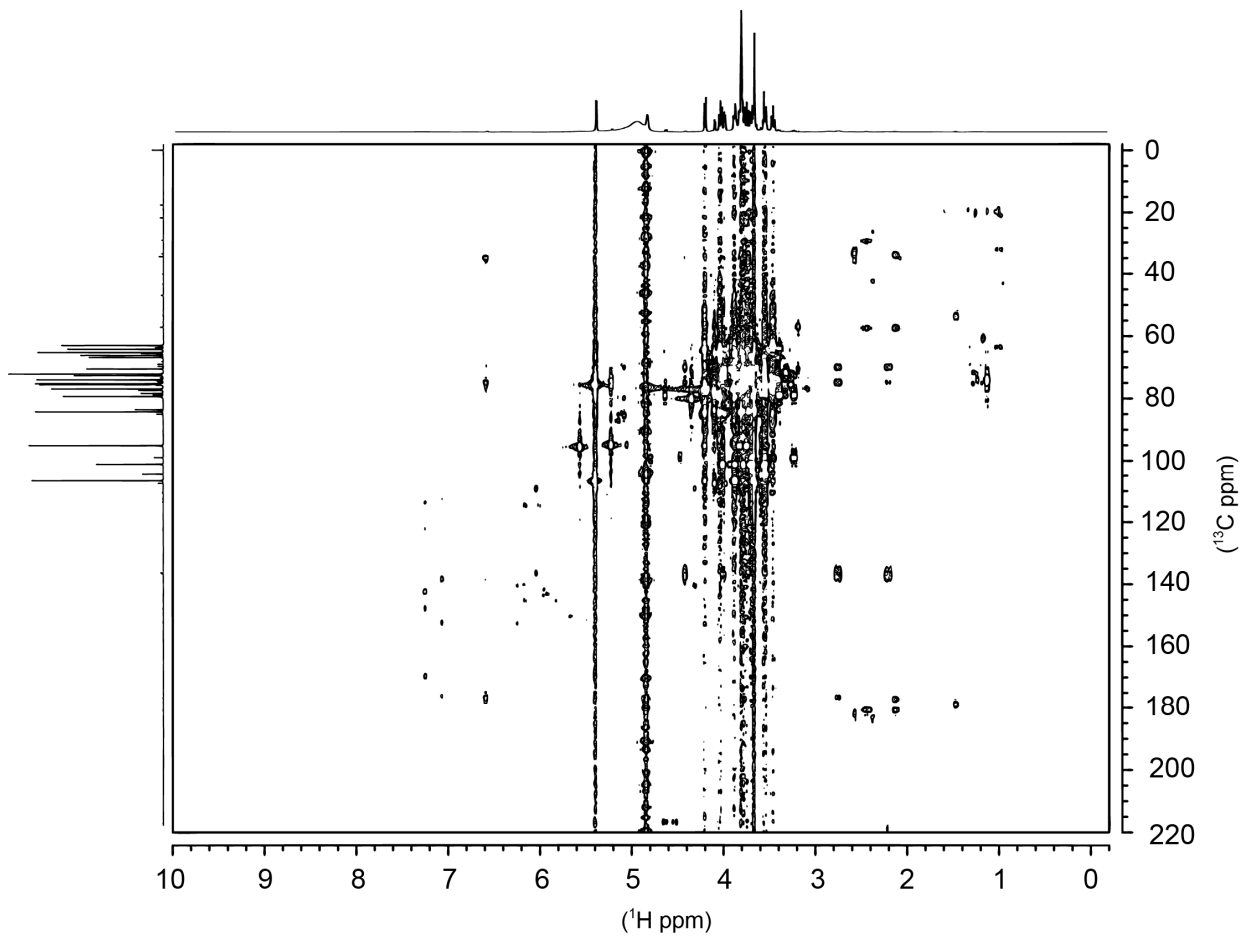


図 2-3. マンゴー果汁 (ナムドクマイ種) の CT-HMBC スペクトル

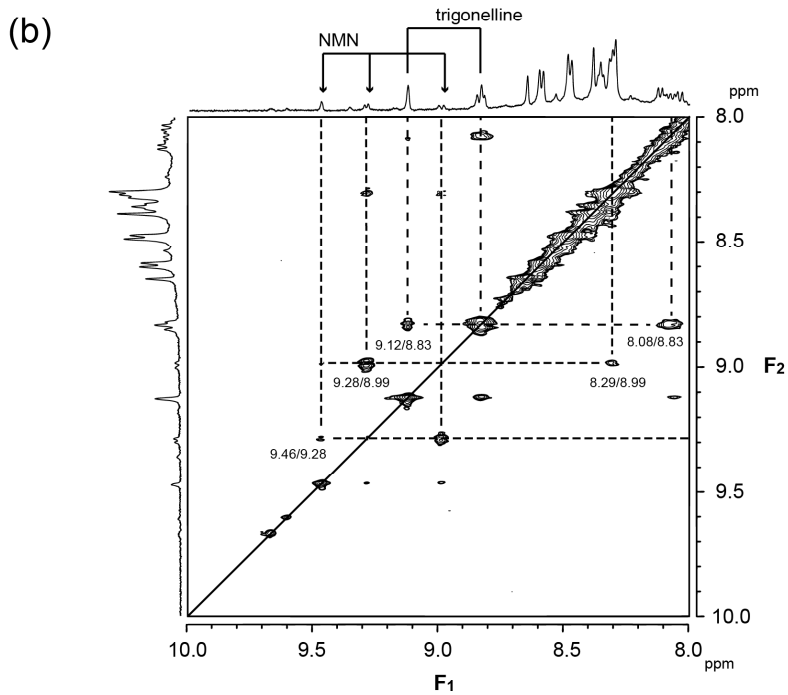
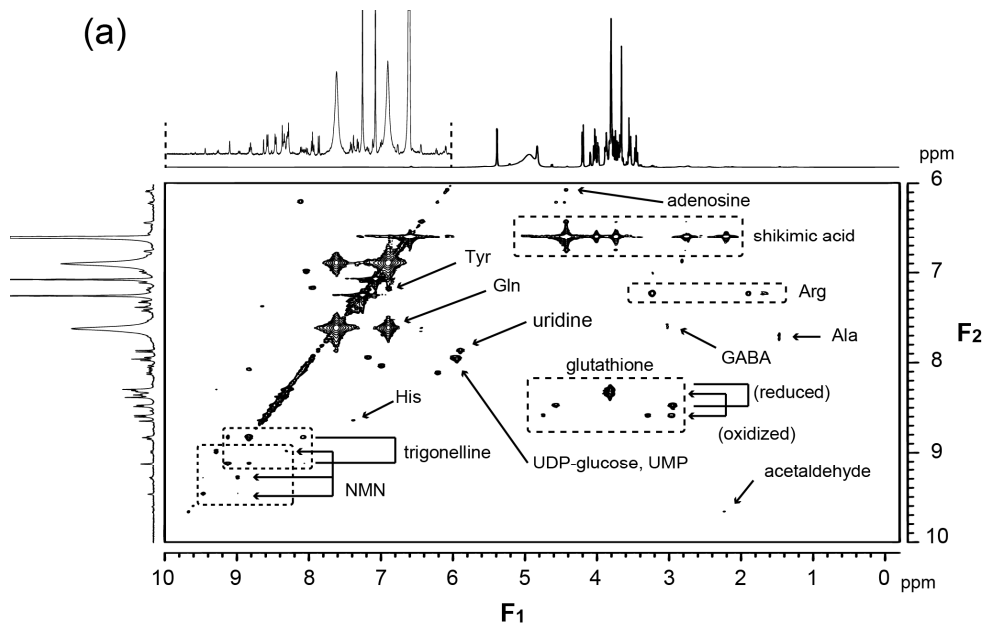


図 2-4. マンゴー果汁 (ナムドクマイ種) の F₂-selective TOCSY スペクトルの拡大図
 (a) F₁ 軸 : -0.2-10.0 ppm、F₂ 軸 : 6.0-10.0 ppm (b) F₁ 軸、F₂ 軸 : 8.0-10.0 ppm
 励起範囲 : 6.0-10.5 ppm、積算回数 16 回

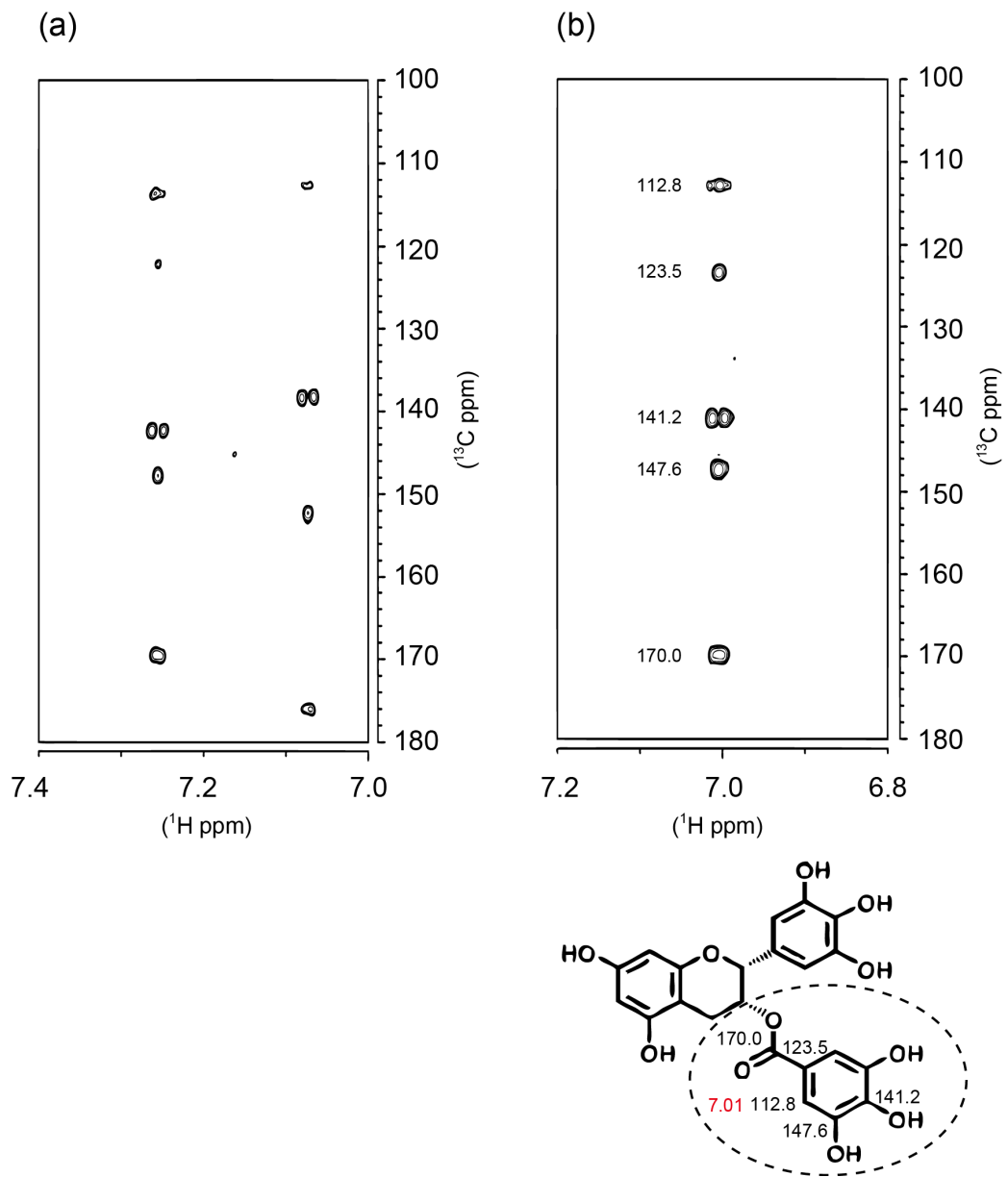


図 2-5. マンゴー果汁 (ナムドクマイ種) 及びエピガロカテキンガレートの CT-HMBC スペクトルの拡大図

- (a) ガロイル基に由来すると推定されるスペクトル
 (b) エピガロカテキンガレートのガロイル基のスペクトル

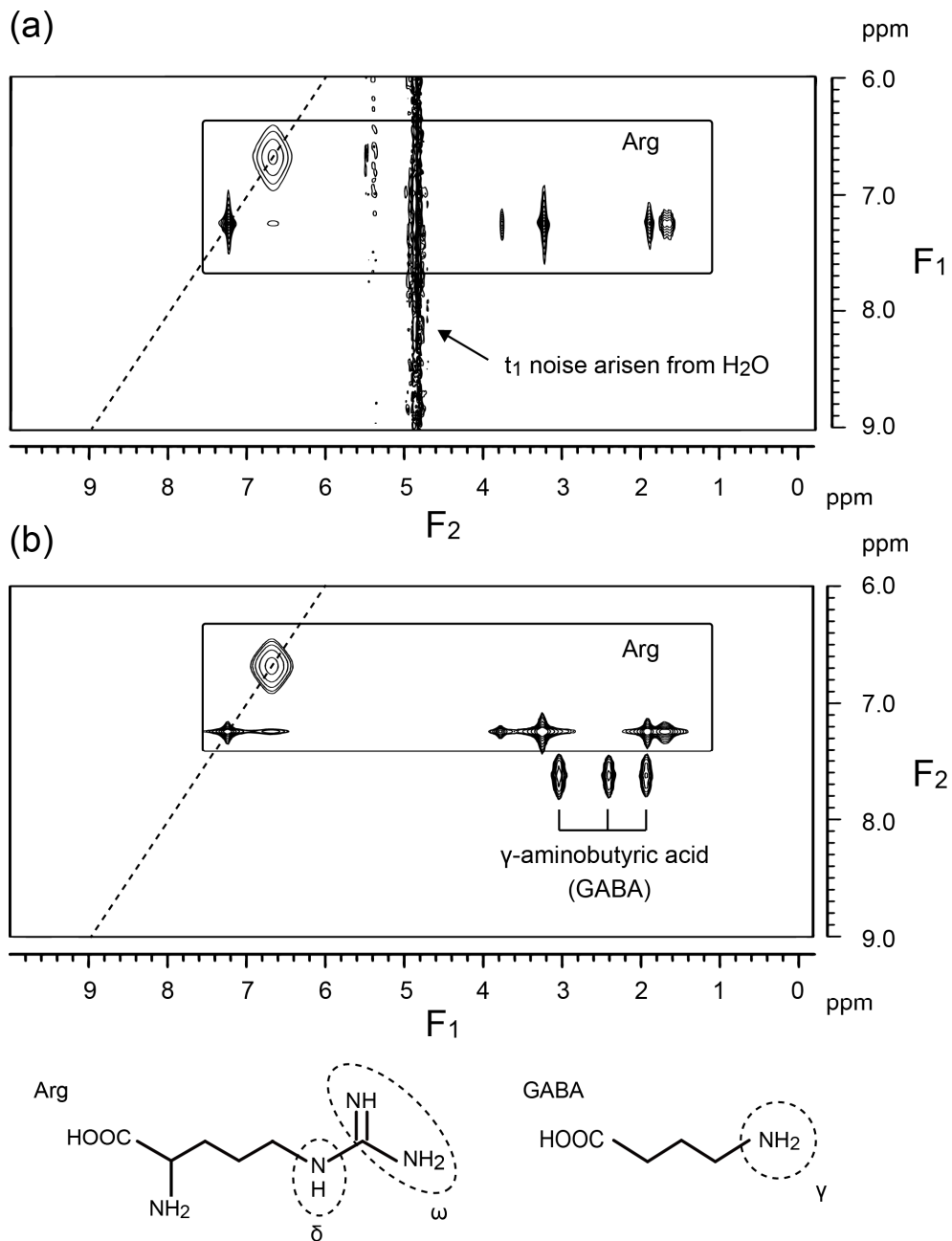


図 2-6. アルギニン(100 mM)及び GABA(100 mM)の混合水溶液における F_1 及び F_2 -selective TOCSY スペクトルの比較

(a) F_1 -selective TOCSY スペクトル (b) F_2 -selective TOCSY スペクトル

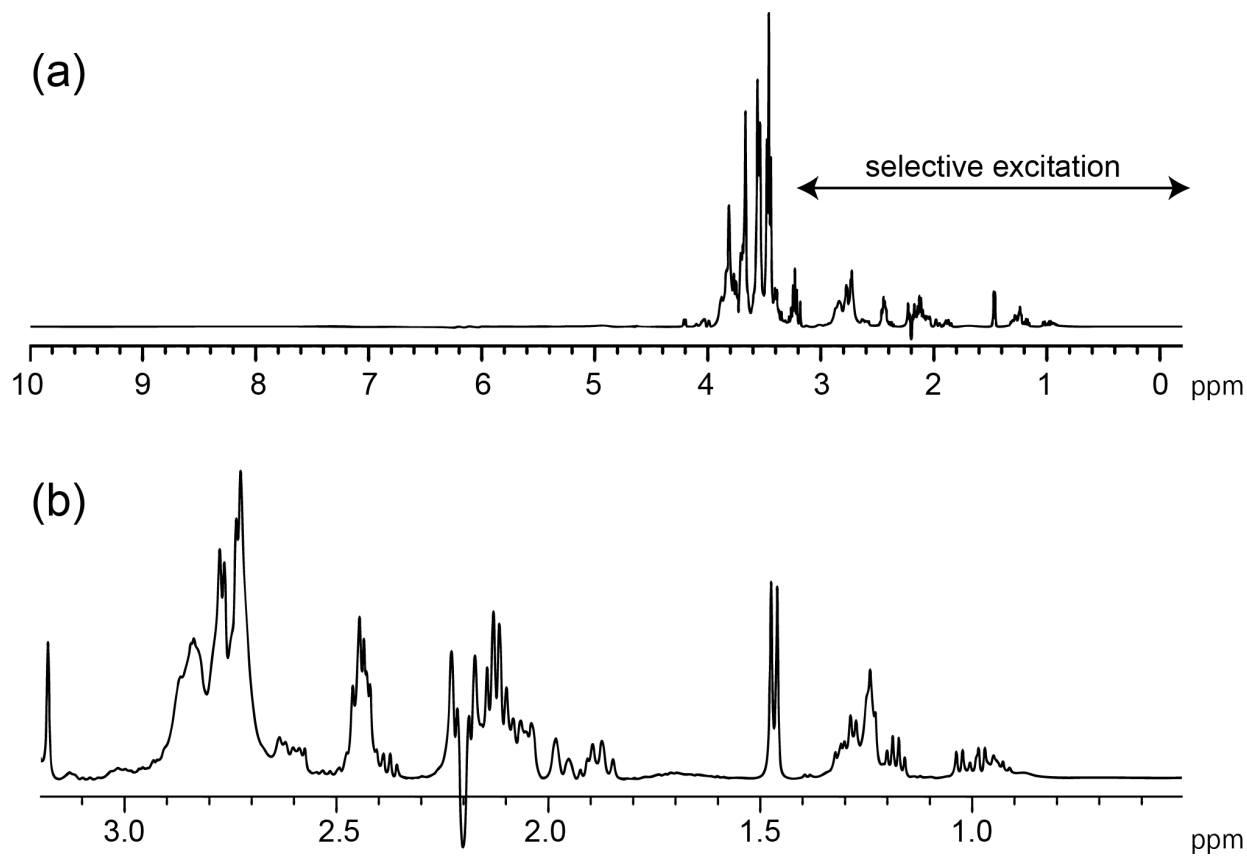


図 2-7. 選択励起を用いたマンゴー果汁（ナムドクマイ種）の高磁場領域の¹H NMR スペクトル

(a) スペクトルの全体図。積算回数 128 回、レシーバーゲイン 42 dB

(b) 0.5-3.2 ppm の拡大図

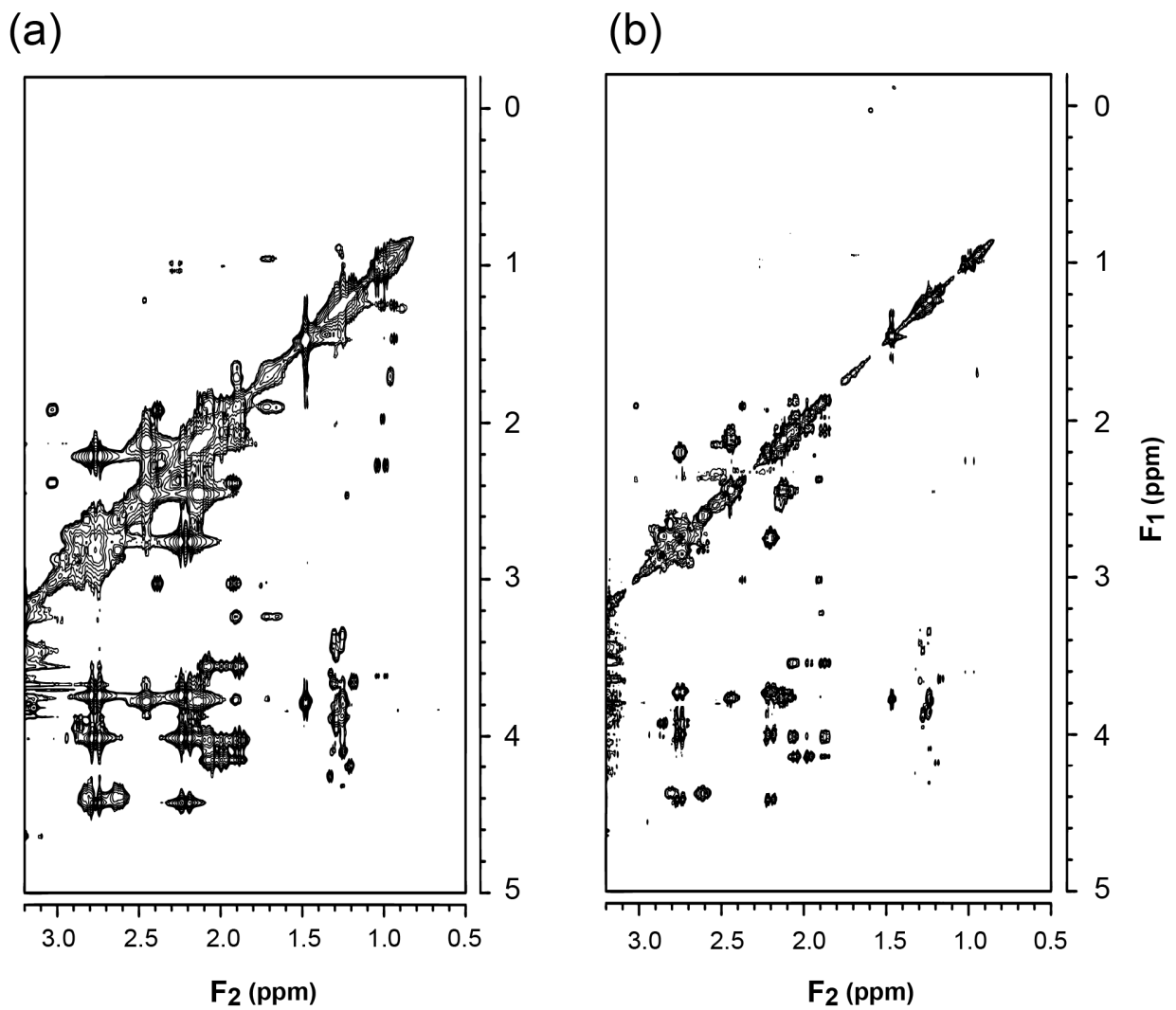


図 2-8. マンゴー果汁（ナムドクマイ種）の高磁場側の TOCSY スペクトルの比較

(a) F_2 -selective TOCSY スペクトル、積算回数 16 回、レシーバーゲイン 42 dB
励起範囲 -0.2-3.1 ppm

(b) 非選択励起による TOCSY スペクトル、積算回数 16 回、レシーバーゲイン 18dB

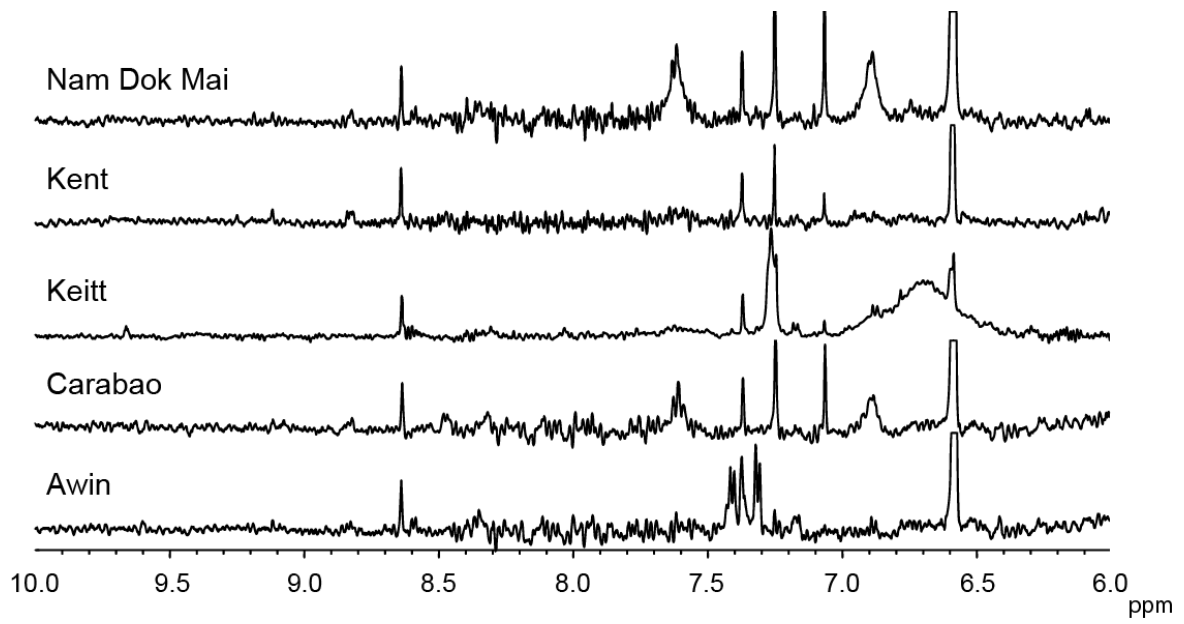


図 2-9. 非選択励起により得られたマンゴー果汁 5 品種の低磁場領域の ^1H NMR スペクトル

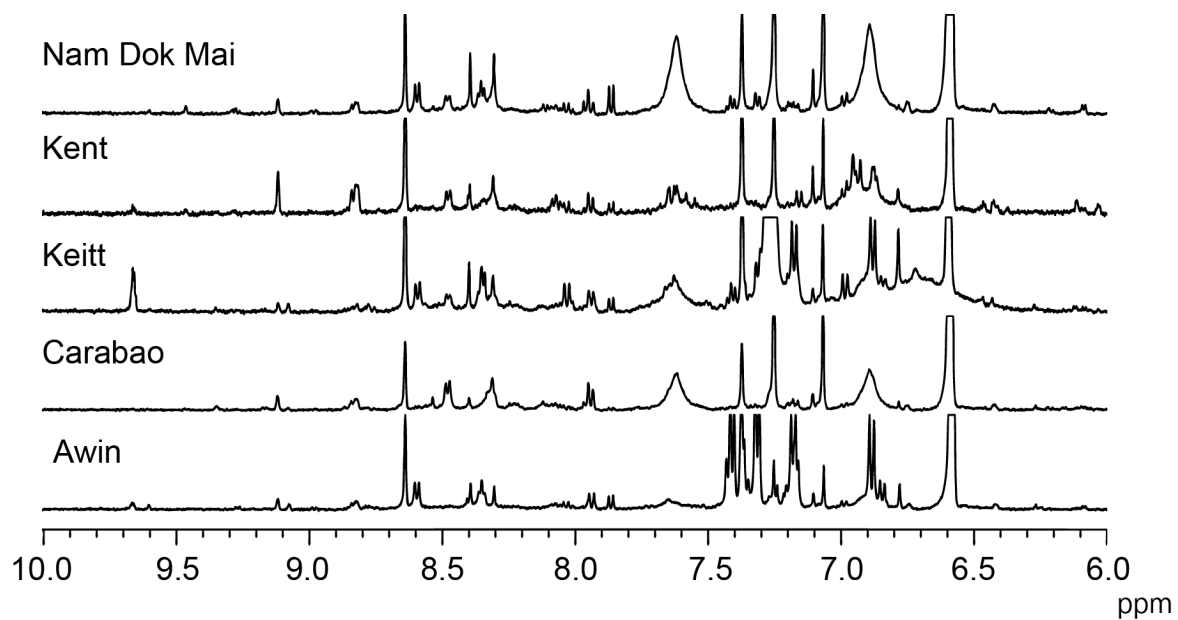


図 2-10. 選択励起により得られたマンゴー果汁 5 品種の低磁場領域の ^1H NMR スペクトル

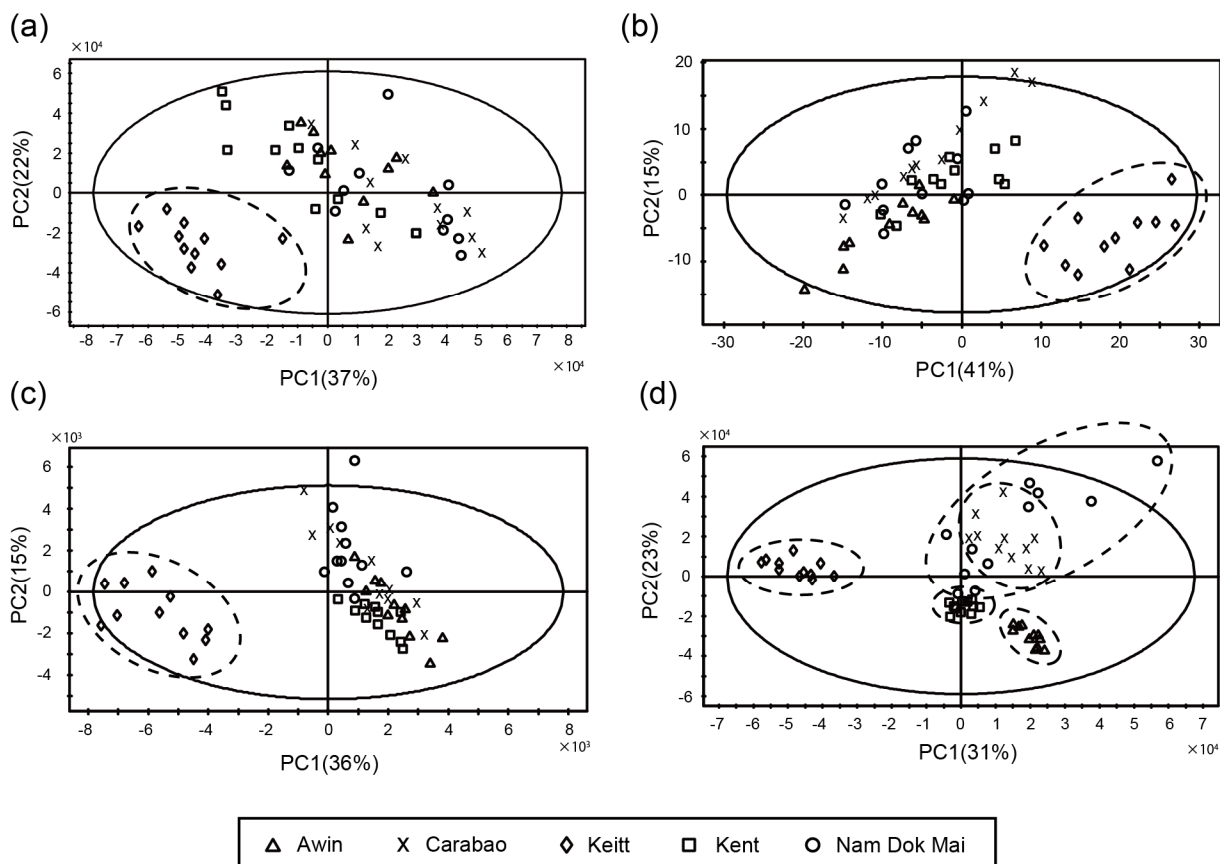


図 2-11. マンゴー果汁の ¹H NMR スペクトルを用いた PCA スコアプロット
 (a) 非選択励起、全範囲 (0.0-10.0 ppm), (b) 非選択励起、高磁場領域(0.0-3.1 ppm),
 (c) 非選択励起、低磁場領域(6.3-10.0 ppm), (d) 選択励起、低磁場領域(6.3-10.0 ppm)

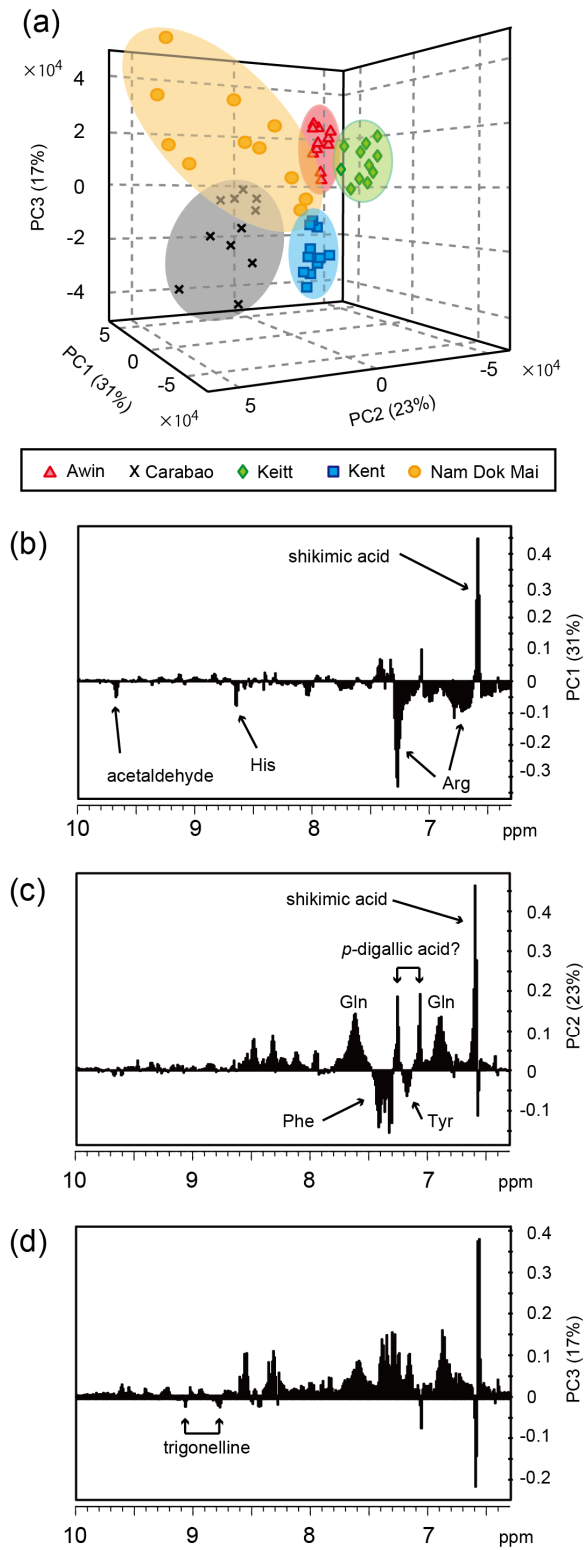


図 2-12. 選択励起により得られたマンゴー果汁の低磁場領域の¹H NMR スペクトルを用いた (a) 3次元PCAスコアプロット及び (b)PC1, (c)PC2, (d)PC3 のローディングプロット

第三章

F₂-selective TOCSY スペクトルを用いた米発酵食品 のメタボリックプロファイリング

3-1. 序

発酵は食品工業において重要な加工法の一つであり、アルコール飲料、酢等の様々な種類の発酵食品が世界中で生産されている。これまでにワイン[46, 47]、ビール[48, 49]、酢[50, 51]、チーズ[52, 53]等様々な発酵食品の NMR に基づいた代謝物分析が報告され、製品の特徴付け、発酵過程における成分変化の追跡、原産地、グレード等の真性評価等に応用されてきた。しかしアルコール飲料はエタノール、酢は酢酸という圧倒的な主成分を含む為、通常の高感度励起を用いて非破壊的に測定してもダイナミックレンジの問題により微量成分の綺麗なスペクトルを得るのは困難である。そのため多くの研究では微量成分を測定する為に分離、濃縮等が行われており、高感度励起を用いた非破壊的な微量成分の測定に関しては十分な研究が行われていない。さらに高感度励起を用いた非破壊的な測定は発酵過程における微量成分の変化をダイレクトに、かつ連続的にモニターできる可能性を持っており発酵食品の研究だけでなく、品質管理においても重要な測定法であると考えられる。

本章では F_2 -selective 2D NMR 法[37]を用いて日本酒及び米酢の低磁場領域 (6-10.5ppm) の NMR スペクトルを測定し非破壊的な代謝物分析を行った。また、第一章において述べたように、日本酒の F_2 -selective TOCSY スペクトルでは F_2 軸の約 8-9 ppm と F_1 軸の約 1-5 ppm に囲まれた領域で、非常に複雑なパターンを示すスペクトルが観測される事が判明している (図 1-7a)。このような複雑なパターンを示す 2次元 NMR スペクトルを食品における新たな「指紋」と考え、多変量解析と組み合わせたプロファイル分析により食品の真正評価や品質管理に応用出来るか検討を行った。

3-2. 実験材料と方法

3-2-1. NMR 測定用試料の調製

日本酒、紹興酒（中国産）、マッコリ（韓国産）、米酢（日本産）は神奈川県内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。これらの試料は測定に用いるまで冷蔵庫内で 4 °C で保存した。

日本酒、紹興酒、マッコリは、試料 50 mL を採取し 6 M の HCl 又は 4 N の NaOH を使用して pH を 4.5 に調整した。pH を調整した試料 630 μ L に重水 70 μ L と基準物質として DSS を加えた後に混合し 5mm の NMR チューブに移し測定用試料とした。濁酒であるマッコリは、pH を調整した試料 1.5 mL をエッペンドルフチューブに採取し、4 °C , 12000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 630 μ L に重水 70 μ L と基準物質として DSS を加えた後に混合し 5mm の NMR チューブに移し測定用試料とした。

米酢は試料 50 mL を採取し 6 M の HCl 又は 4 N の NaOH を使用して pH を 3.0 に調整した。その試料 630 μ L に重水 70 μ L と基準物質として DSS を加えた後に混合し 5mm の NMR チューブに移し測定用試料とした。

遊離のアミノ酸は 100 mM の濃度になるように 15% (v/v) エタノール (99.5%) と 10%(v/v)重水を含む水溶液に溶解し、6 M の HCl 又は 4 N の NaOH を使用して pH を 4.5 に調整した。基準物質として DSS を加えた後に混合し 5mm の NMR チューブに移し測定用試料とした。チロシン、トリプトファン、グルタミン酸、アスパラギン酸は溶解度が低く、100 mM の溶液が作成できなかったため、不溶分を除去した飽和溶液を用いて測定した。

3-2-2. NMR スペクトルの測定

全ての NMR スペクトルは Varian Unity INOVA-500 spectrometer を用いて 20 °C 測定した。

選択励起は DPGSE 法[21]を用いて行った。180°の shaped pulse には Re-Burp[22]を用いた。励起範囲 6.0-10.5 ppm における Re-Burp パルスの power ($\gamma H_1/2\pi$)及びパルス長はそれぞれ、3.2 及び 2.0 ms である。

各測定における NMR スペクトルのパラメーターは以下のとおりである。

^1H NMR : スペクトル幅 8,000 Hz; データポイント 32 k; 積算回数 256 回 ; 取り込み時

間 2.048 秒; 待ち時間 2.0 秒

TOCSY : スペクトル幅 6,000 Hz ; F₂ 軸のデータポイント 2048 ; F₁ 軸のデータポイント 256 ; 積算回数 64 回 ; 取り込み時間 0.341 s ; 待ち時間 2.0 s ; MLEV-17 スピンロックパルスの強さ 7.1 kHz ; トリムパルス長さ 2 ms ; 混合時間 80 ms

DQF-COSY : スペクトル幅 6,000 Hz ; F₂ 軸のデータポイント 2048 ; F₁ 軸のデータポイント 512 ; 積算回数 16 回 ; 取り込み時間 0.341 s ; 待ち時間 2.0 s

NOESY : スペクトル幅 6,000 Hz ; F₂ 軸のデータポイント 2048 ; F₁ 軸のデータポイント 256 ; 積算回数 96 回 ; 取り込み時間 0.341 s ; 待ち時間 2.0 s ; 混合時間 800 ms

3-2-3. NMR スペクトルの前処理及び多変量解析

多変量解析は日本酒 7 検体 (何れも純米酒)、紹興酒 3 検体、マッコリ 6 検体、合計 16 検体の試料を用いて行った。全ての ¹H NMR 及び F₂-selective TOCSY スペクトルは手動で位相合わせ及びベースラインコレクションを行った。

¹H NMR スペクトルは 6.5-10.5 ppm の範囲を 0.04 ppm 幅のサイズに区切って積分を行い、積分値の最大値を 100 とする基準化処理を行った。F₂-selective TOCSY スペクトルは F₂ 軸を 7.89 ppm から 9.01 ppm の範囲を 0.08 ppm 幅に 14 分割し F₁ 軸を 0.50 ppm から 4.49 ppm まで 0.07 ppm 幅に 57 分割した。この計 798 個の領域を積分し、積分値の最大値を 100 とする基準化処理を行った。そしてこの 2 次元データを 1 列に並べて 1 次元化データにした。

上記処理により得られたデータを SIMCA-P+ version 11.0 にインポートし、教師無し (unsupervised) の主成分分析を行った。

3-2-4. 日本酒の NMR スペクトルにおける信号の帰属

1 次元、2 次元 NMR スペクトルから得られた信号は BMRB, HMDB, MMCD 等のオンラインデータベース[23-25]及び日本酒の成分に関する論文[54]のデータと比較し候補成分を選び出した。最終的には、これら候補成分の試薬 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan 及び Nacalai Tesque, Inc. Tokyo Japan) を日本酒に添加し、得られたスペクトルと試薬を添加していない日本酒のスペクトルを比較する事で成分の帰属を行った。

3-3. 結果と考察

3-3-1. 日本酒の ^1H NMR スペクトル

図 3-1a に日本酒の ^1H NMR スペクトルを示す。選択励起を用いない通常の測定では、1.17 ppm と 3.64 ppm のエタノールが支配的であった。 ^1H NMR スペクトルの低磁場領域では主に芳香族類やアミン類の信号が観測されるが、非選択励起を用いた測定では低磁場領域 (6.0~10.5ppm) の綺麗なスペクトルを得る事は出来なかった。低磁場領域で綺麗なスペクトルが得られなかった理由の一つとして、強いエタノールのシグナルによるダイナミックレンジの問題が考えられた。そこでエタノールの信号を除去する為に選択励起を用いて低磁場側を測定したところレシーバーゲインが最大値に到達し、さらに t_1 ノイズによる妨害の無い高品質な微量成分の ^1H NMR スペクトルが得られた (図 3-1b)。7-8 ppm 付近にはチロシン、フェニルアラニン等の芳香環に由来すると考えられる信号が検出された。8-9 ppm の範囲で観察された山型のブロードなピークは主にペプチド類の背骨のアミドプロトンに由来するものと考えられたが、1 次元 NMR スペクトルではこれ以上の解析は困難であった。

3-3-2. F_2 -selective 2D NMR 法を用いた日本酒の低磁場領域の信号の帰属

図 3-2a に日本酒の低磁場領域の F_2 -selective TOCSY スペクトルを示す。選択励起を用いる事で t_1 ノイズにスペクトルが阻害されず、また信号の S/N 比が高い高品質な低磁場領域の微量成分の TOCSY スペクトルが得られ様々な成分を同定する事が出来た (表 3-1)。

6.0-7.5 ppm の範囲では、チロシン、チロソール、フェニルアラニン、2-フェニルエタノールの芳香環に由来する信号が主体であった。これらの芳香環は F_2 -selective NOESY スペクトルにおいて 1.17ppm のエタノールのメチル基との間に正の相関ピークが観察された (図 3-3)。またエタノールのメチレン残基も 7.2, 7.4 ppm 付近に相関ピークが観察された。これらの結果は疎水性の芳香族化合物は日本酒中でエタノールと複合体を形成している可能性を示唆している。

7.5~8.0 ppm の範囲にはブロードなクロスピークが多く観測され、これらはアミノ酸 (アルギニン、アラニン、グリシン)、ポリアミン (アグマチン)、ピログルタミン酸の

アミノプロトンに由来するものであると帰属された (図 3-2a)。これらの信号は何れもブロードで、かつ重なっていたので ^1H NMR のみでは帰属が困難であったが F_2 -selective TOCSY スペクトルを用いる事で各成分に由来する信号が分離し、検出、帰属する事が出来た。このような軽水が十分にある環境下では交換性のアミノプロトンに由来する信号が検出される可能性があるが、現在の所、アミノ酸を含むアミノプロトンに関する情報はデータベースや論文において、我々の知る限り乏しい。そこで日本酒と類似の環境下 (15% (v/v) エタノール水溶液 pH4.5、10%重水をロック用に添加) で主要な 23 個のアミノ酸の F_2 -selective TOCSY を測定し、アミノプロトンの検出を試みた (表 3-2)。グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、グルタミン、リジン、アルギニン、メチオニン、プロリン、オルニチン、シトルリンの αNH は側鎖との間にブロードな相関ピークが検出された。これに対してアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、システインは αNH と側鎖の相関ピークは検出できなかった。プロリンの αNH は 7.95 ppm と 8.8 0ppm に 2 種類の信号が検出された。この事はプロリンが 2 種類のタイプの αNH プロトンを有している、すなわち NH_2^+ の状態で存在していることを示唆している。側鎖のアミノプロトンも検出された。アスパラギン(6.93, 7.67 ppm) とグルタミン(6.89, 7.65 ppm) からは共に $\text{NH}_2\text{-CO}$ に由来する 2 本のシングレットピークが観察された。しかし、シトルリンの $\text{NH}_2\text{-CO}$ の信号は検出されなかった。リジン(ϵNH :7.59 ppm)、GABA (γNH : 7.66 ppm)、オルニチン (γNH : 7.66 ppm) の側鎖の NH_2 からは何れもブロードなピークが観察された。アルギニンの δNH (7.27 ppm) 及びシトルリンの δNH (6.38 ppm) のピークはシャープな形状であった。トリプトファンのインドール環の NH (10.23 ppm)も線幅がシャープであり、 F_2 -selective TOCSY スペクトルにおいて 7.30 ppm の C_2H (ring) との間に相関ピークが観察された。このようにアミノプロトンによってピークの形状が異なるのはアミノプロトンの交換速度に違いがあるためであると考えられる。清酒の DQF-COSY スペクトルにおいてアルギニンの δNH (7.27 ppm) と δCH_2 (3.24 ppm) の間に相関ピークが検出された。この事もアルギニンの δNH の交換速度が遅い事を示唆している[52]。

ブロードな山型を示した (図 3-1b) 8~9 ppm の範囲は F_2 -selective TOCSY スペクトルにおいて F_1 軸の 1.0-4.5 ppm の範囲との間に非常に多くの相関ピークが観察され複雑なパターンを示した。トリプトン及び酵母抽出物水溶液の F_2 -selective TOCSY において同様の複雑なパターンを示すスペクトルが得られたことから (図 3-4)、日本酒において測定さ

れた、この複雑なスペクトルも主にペプチド類に由来するものと考えられた。F₁ 軸が 4 ppm 付近の信号は主にペプチド結合の背骨の αCH との相関ピーク、F₁ 軸が 1.0~3.5 ppm の範囲は側鎖との相関ピークと考えられた。個々のピークの正確な帰属は困難であったが、いくつかのクロスピークは、その化学シフトよりグルタミン酸又はグルタミン、アスパラギン酸又はアスパラギン、アルギニン等に由来するものと推定された (図 3-2b) [55]。様々なメーカー、様々なグレード (普通酒、本醸造酒、純米酒、吟醸酒、料理酒) の日本酒の F₂-selective TOCSY スペクトルを測定したがこのペプチド領域のスペクトルは何れも類似のパターンを示した。この結果より、この F₂-selective TOCSY スペクトルのパターンは日本酒を特徴付けるものかもしれないと考えられた。そこで同じライスワインである中国の紹興酒と韓国のマッコリの F₂-selective TOCSY を測定したがペプチド領域のスペクトルは日本酒とは全く異なるパターンを示した (図 3-5)。これより F₂-selective TOCSY のペプチド領域のスペクトルは、これらのライスワインの識別に利用できるかもしれないと考えられた。また、日本酒のペプチド領域のスペクトルが一定のパターンを示していた理由の一つとして、今回検出されたペプチドはタンパク質のランダムな切断によって生じたのでは無く、アミラーゼ等、発酵において大量に生産された酵素がプロテアーゼにより特定部位で切断されて生じた一定の配列を持つペプチド及びその分解物が主体であるためと考えられた。紹興酒やマッコリと異なるパターンを示したのは、使用しているコウジカビ、酵母の種類及び製法の違いを反映しているものと考えられた。また、今回の結果は日本酒に含まれる低級ペプチドには Glu (or Gln), Asp (or Asn), Ser, Ala, Gly 残基が多く含まれているという研究報告とも概ね一致している[56-58]。

3-3-3. F₂-selective TOCSY スペクトルを用いた多変量解析

日本酒、紹興酒、マッコリの F₂-selective TOCSY スペクトルを用いて教師無し (unsupervised) である主成分分析を行った。スペクトルは F₂ 軸 7.9~9.0 ppm、F₁ 軸が 0.5~4.5 ppm の範囲を使用した。PC1 と PC2 を用いた 2 次元スコアプロット (図 3-6a) では 3 つのグループが形成された。グループ 1 は日本酒、グループ 2 は韓国のマッコリ、グループ 3 は中国の紹興酒と韓国のマッコリが混ざった。PC3 を用いる事でグループ 3 の紹興酒とマッコリが分離し、これら 3 種類のライスワインを識別するモデルを構築する事ができた (図 3-6b)。PC1 と PC2 を用いたスコアプロットにおいてマッコリがグループ 2 と 3 に分かれた理由は使用した麴の種類が違う為と考えられた。グループ 2 のマッコリ

はラベルに記載されている原材料に「米麴」と表示されており、グループ 3 のマッコリは「小麦麴」と表示されていた。図 3-6 においてアスタリスクを付けたマッコリは麴の種類は表示されておらずラベルには単に「麴」としか記載されていなかったが、主成分分析の結果及び F_2 -selective TOCSY スペクトルのパターンから判断すると、このアスタリスクを付けたマッコリは小麦麴を用いて製造されたと推定された。日本酒及び紹興酒はラベルの原材料欄にそれぞれ「米麴」、「小麦麴」と表示されていた。図 3-7 に PC1-PC3 のローディングプロットに F_2 -selective TOCSY スペクトルを重ねた物を示す。PC1 のローディングプロットは日本酒にはアルギニン、セリン、グリシン残基が相対的に多く含まれている事を示した(図 3-7a)。また、遊離のプロリンも多く含まれていることも示した。PC2 のローディングプロットは小麦麴を用いて製造した紹興酒及びマッコリには $(F_1/F_2) = (1.8-2.4/8.2-8.6 \text{ ppm})$ の範囲のピークが相対的に強い事を示している。このピークは、その化学シフトよりグルタミン又はグルタミン酸残基に由来するものと考えられた(図 3-6b)。PC3 のローディングプロットによるとマッコリには、 $(F_1/F_2) = (2.7/8.1 \text{ ppm})$ に位置する信号が相対的に多く含まれており、このピークは化学シフトよりアスパラギン又はアスパラギン酸残基に由来するものと考えられた(図 3-6c)。また $(F_1/F_2) = (3.07/8.80 \text{ ppm})$ 及び $(3.24/8.80 \text{ ppm})$ の信号もまたグループ 3 のマッコリと紹興酒の分離に重要である事が示されたが、これは合成甘味料であるアスパルテームに由来するものであると帰属された。実際、今回測定した 6 種類のマッコリのうち 5 種類から検出されたが、日本酒及び紹興酒からは全く検出されなかった。これらの結果は、ペプチドを主体とするこの複雑なスペクトルと多変量解析を用いる事でこれらライスワインの識別が可能であるだけでなく、米の糖化に用いる麴の種類についても識別できる可能性を持っている事を示した。

低磁場領域 (6.5~10.5 ppm) の選択励起により得られた ^1H NMR スペクトル (図 3-8) を用いて主成分分析を用いた結果、PC1 と PC2 だけで F_2 -selective TOCSY スペクトルを用いた時と同様に 4 つのグループに分ける事が出来た (図 3-9)。しかし、8-9 ppm 付近はペプチドに由来する信号が複雑に重なっており、ローディングプロットの詳細な解析は困難であった。高効率な ^1H NMR スペクトルを用いたスクリーニングと F_2 -selective TOCSY スペクトルを用いた詳細な解析を用いる事で効率のよいライスワインの識別法を構築する事が出来るかもしれない。

3-3-4. 米酢の F₂-selective TOCSY スペクトルの比較

図 3-10 に米酢のペプチド領域の F₂-selective TOCSY スペクトルを示す。日本酒と異なり、銘柄毎に明確に異なるパターンを示した。同じ銘柄で異なるロット番号の物においても異なるスペクトルパターンを示した。また、¹H NMR スペクトルにおいても、そのスペクトルパターンは異なっていた (図 3-11)。これらの違いは、原材料、発酵方法 (伝統的な手法か、工業的に大量生産された物か)、熟成期間等の様々な製法の違いを反映していると考えられた。このスペクトルパターンを指紋の様に用いる事で米酢の銘柄、製法、偽和の有無など真正評価、又は味や保存状態等の品質評価に応用できるかもしれない。

3-3-5. まとめ

F₂-selective 2D NMR 法を用いる事で日本酒に含まれる低磁場側の交換性アミンを含む微量成分の信号を非破壊的に感度良く検出、帰属する事が出来た。さらに F₂-selective NOESY スペクトルにより日本酒中のエタノールはチロシン、フェニルアラニン等の芳香環と相互作用している可能性がある事が示唆された。この様な主成分と微量成分間の相互作用は従来法の F₁-selective NOESY 及び 1D NOESY では t₁ ノイズ及びレシーバーゲインの制限のため極めて困難であり、非破壊的な微量成分分析における F₂-selective 2D NMR 法のさらなる優位性を証明する事が出来た。8-9 ppm のペプチド結合のアミドプロトンに F₂-selective TOCSY においてアミノ酸残基と多くの相関ピークが現れ、複雑で特徴的なパターンを示した。この複雑なスペクトルを主成分分析と組み合わせる事で日本酒、紹興酒、マッコリの 3 種類のライスワインを識別する事ができた。さらに、使用した原材料である麴の種類も識別出来た。米酢のペプチド領域のスペクトルは上記ライスワインとは異なり銘柄毎に異なるパターンを示した。F₂-selective TOCSY によって得られるペプチド領域のスペクトルは新しい観点からの指紋として食品分析における有用なツールになると考えられる。

Compound	Chemical shift (ppm)
Acetaldehyde	2.24 (CH ₃), 9.66 (CHO)
Agmatine (1-amino-4-guanidinobutane)	1.70 (C2H ₂ , C3H ₂), 3.03 (C1H ₂), 3.23 (C4H ₂), 7.26 (4NH), 7.59 (1NH ₂)
Alanine	1.47 (βCH ₃), 3.78 (αCH), 7.72 (αNH ₂)
Arginine	1.67 (γCH ₃), 1.90 (βCH ₂), 3.23(δCH ₂), 3.75 (αCH), 7.27 (δNH)
Asparagine	6.94 (NH ₂ -CO-), 7.67 (NH ₂ -CO-)
fumaric acid	6.60 (-CH=)
Glycine	3.54 (CH ₂), 7.69 (αNH)
Histidine	7.38 (C4H ring), 8.64 (C2H, ring)
Hypoxantine	8.18 (C2H), 8.21 (C8H)
Tyrosine	3.04 (βCH ₂), 3.19 (βCH ₂), 3.91 (αCH), 6.87 (C3H, C5H, ring), 7.17 (C2H, C6H, ring)
Tyrosol (2-(4-hydroxyphenyl) ethanol)	2.76 (C2H ₂), 3.75 (C1H ₂), 6.83 (C3H', C5H', ring), 7.16 (C2H', C6H', ring)
Phenylalanine	3.10 (βCH ₂), 3.27 (βCH ₂), 3.97 (αCH), 7.30 (C2H, C6H, ring), 7.36 (C4H, ring), 7.40 (C3H, C5H, ring)
2-phenylethanol	2.85 (C2H ₂), 3.83 (C1H ₂), 7.29 (C2H', C6H', ring), 7.35 (C4H', ring)
Prorine	2.01 (βCH ₂ , γCH ₂), 2.32 (βCH ₂), 3.35(δCH ₂), 8.80 (αNH)
Pyroglutamic acid	2.06 (βCH ₂), 2.39 (γCH ₂), 2.49 (βCH ₂), 4.18 (αCH), 7.74 (αNH)
Uridine	4.19 (C3H, ribose), 4.31 (C2H, ribose), 5.88 (C5H, uracil), 5.89 (C1H, ribose), 7.88 (C6H, uracil),

表 3-1. 日本酒の低磁場領域で検出、同定された代謝物

	α NH	side chain NH	C α H	C β H	C γ H	C δ H	others
Gly	7.69		3.53	-	-	-	
Ala	7.74		3.75	1.46	-	-	
Val	7.65		3.58	3.37	0.98	-	
Leu	7.73		3.70	1.70	1.70	0.95	
Ile	7.65		3.64	1.96	1.00(met), 1.25, 1.46	0.92	
Ser	7.85		3.81	3.95	-	-	
Thr	7.80		3.56	4.24	1.31	-	
Asp	n.d.		3.91	2.71, 2.84	-	-	
Glu	n.d.		3.75	2.09	2.42	-	
Asn	n.d.	6.94, 7.67 (-CO-NH ₂)	3.98	2.83, 2.94	-	-	
Gln	7.89	6.90, 7.64 (-CO-NH ₂)	3.75	2.12, 2.44	-	-	
Lys	7.77	7.60(ϵ NH)	3.73	1.89	1.46	1.71	3.01(C ϵ H)
Arg	7.85	6.72(ω NH), 7.27(δ NH)	3.75	1.90	1.69	3.24	
His	n.d.		4.01	3.53	-	-	ring: 7.39(C5H), 8.65(C2H)
Phe	n.d.		3.96	3.10, 3.28	-	-	ring: 7.31(C2H, C6H), 7.36(C4H), 7.40(C3H, C5H)
Tyr	n.d.		3.91	3.03, 3.19	-	-	ring: 6.87(C3H, C5H), 7.18(C2H, C6H)
Met	7.85		3.83	2.63	2.14	-	2.12(thio-met)
Cys	n.d.		3.96	3.06	-	-	
Trp	n.d.	10.23(ring NH)	4.02	3.28, 3.47	-	-	ring: 7.18(C6H), 7.26(C5H), 7.30(C2H), 7.52(C7H), 7.72(C
Pro	7.95, 8.81		4.09	2.06, 2.33	1.99	3.32, 3.39	
GABA	-	7.67(γ NH)	2.34	1.90	3.01	-	
ornithine	7.74	7.71(γ NH)	3.76	1.77	1.92	3.04	
citrulline	7.8	6.39(δ NH)	3.72	1.86	1.56	3.12	

表 3-2. 遊離アミノ酸の化学シフト
15%(v/v)エタノール、10%(v/v)重水水溶液、pH4.5

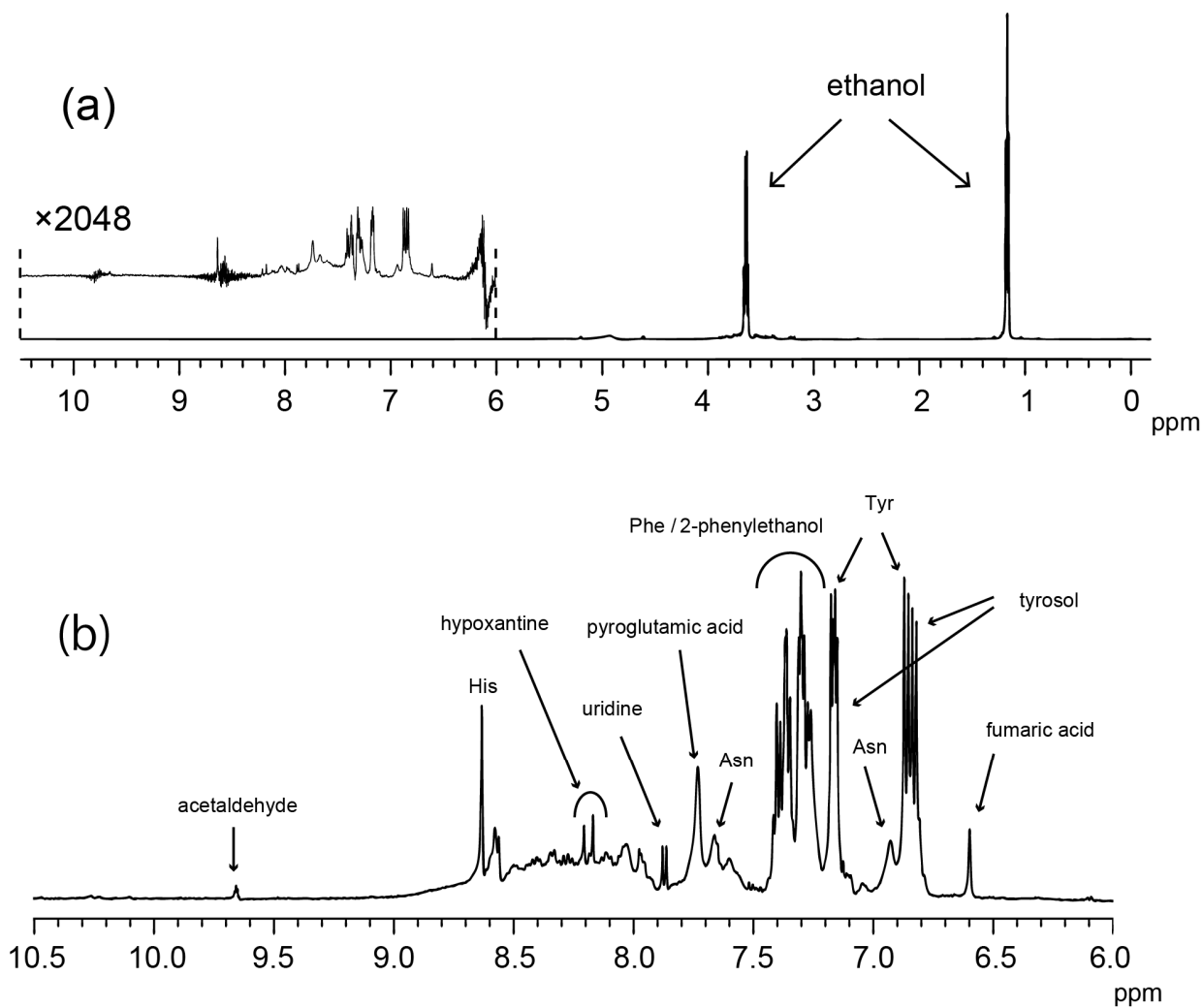


図 3-1. 日本酒の ^1H NMR スペクトル

(a) 非選択励起により測定した全領域 (-0.2-10.5 ppm) のスペクトル

(b) 選択励起により測定した低磁場領域 (6.0-10.5 ppm) のスペクトル

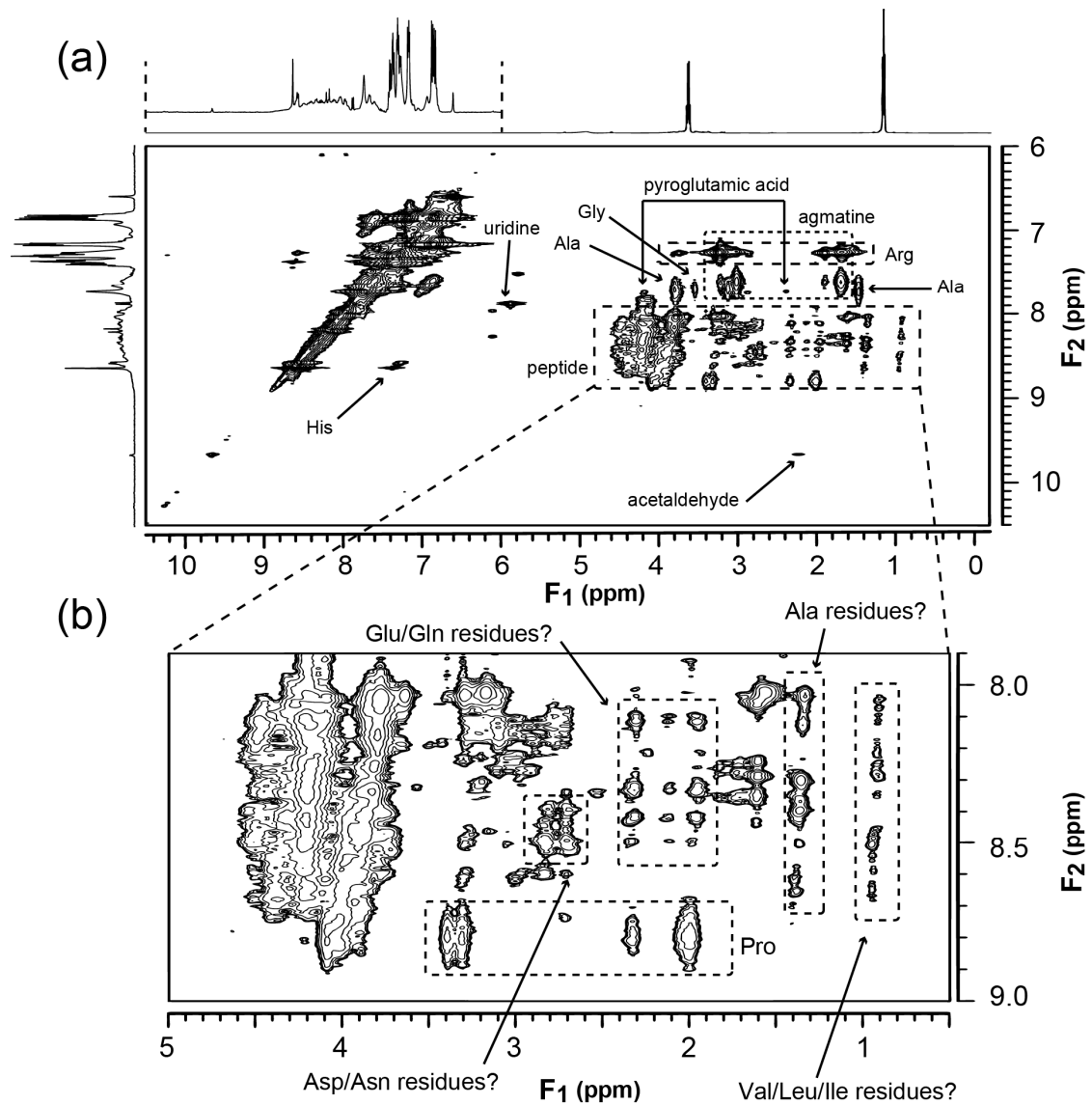


図 3-2. 日本酒の低磁場領域 (6.0-10.5 ppm) の F_2 -selective TOCSY スペクトル

(a) F_1 軸 : -0.2-10.5 ppm、 F_2 軸 : 6.0-10.5 ppm

(b) ペプチド領域 (F_1 軸 : 0.5-5.0 ppm、 F_2 軸 : 7.9-9.0 ppm) の拡大図

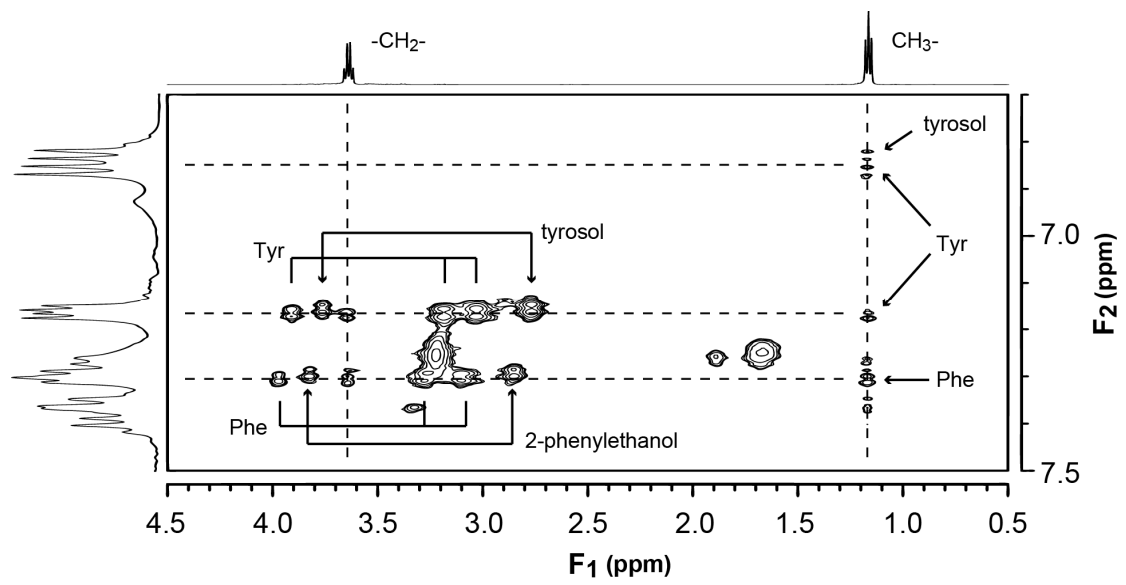


図 3-3. 日本酒の F_2 -selective NOESY スペクトルの拡大図

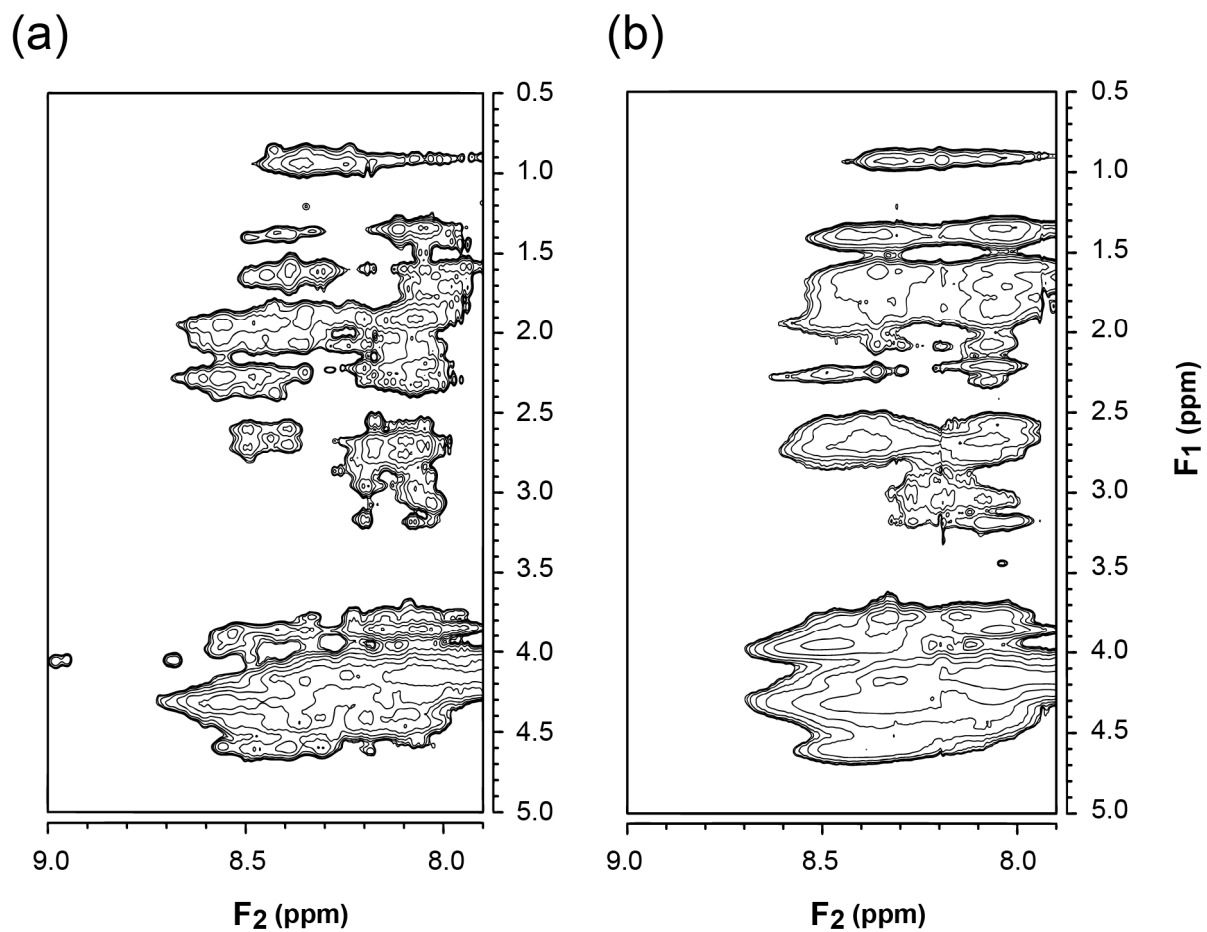


図 3-4. ペプチド領域の F₂-selective TOCSY スペクトル(10%D₂O)
(a)トリプトン水溶液、 (b)Yeast extract 水溶液

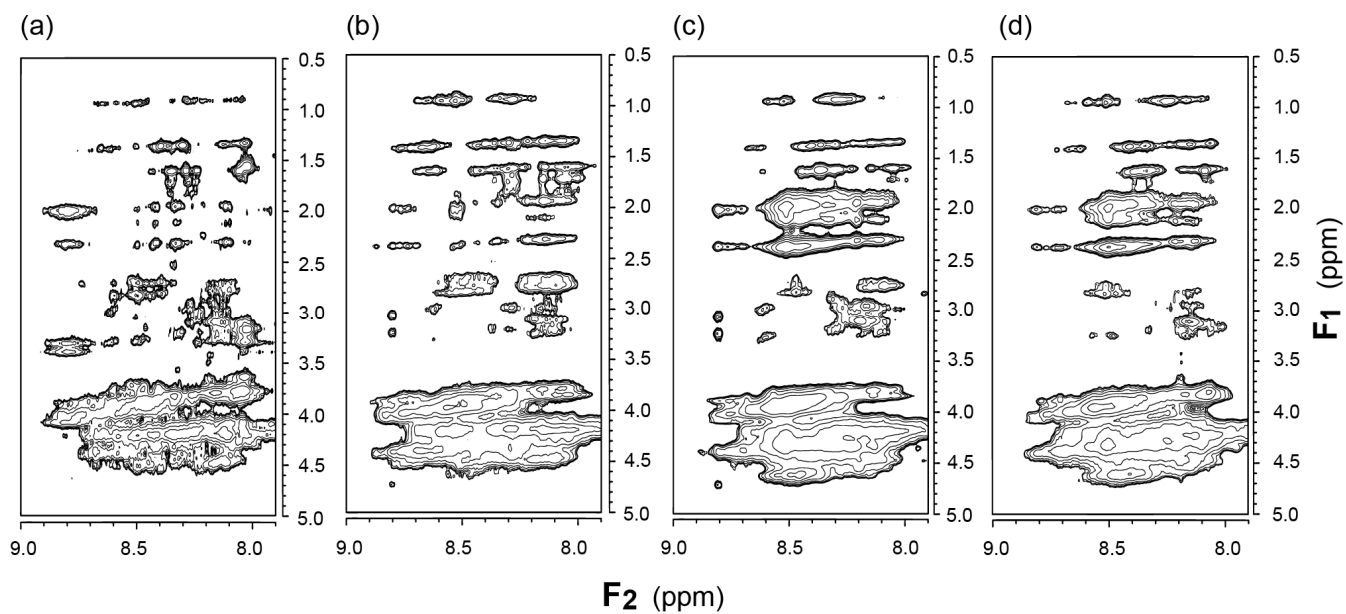


図 3-5. ペプチド領域の F_2 -selective TOCSY スペクトル (10% D_2O , pH4.5)

(a)日本酒 (米麴) (b)マッコリ (米麴) (c)マッコリ (小麦麴) (d)紹興酒 (小麦麴)

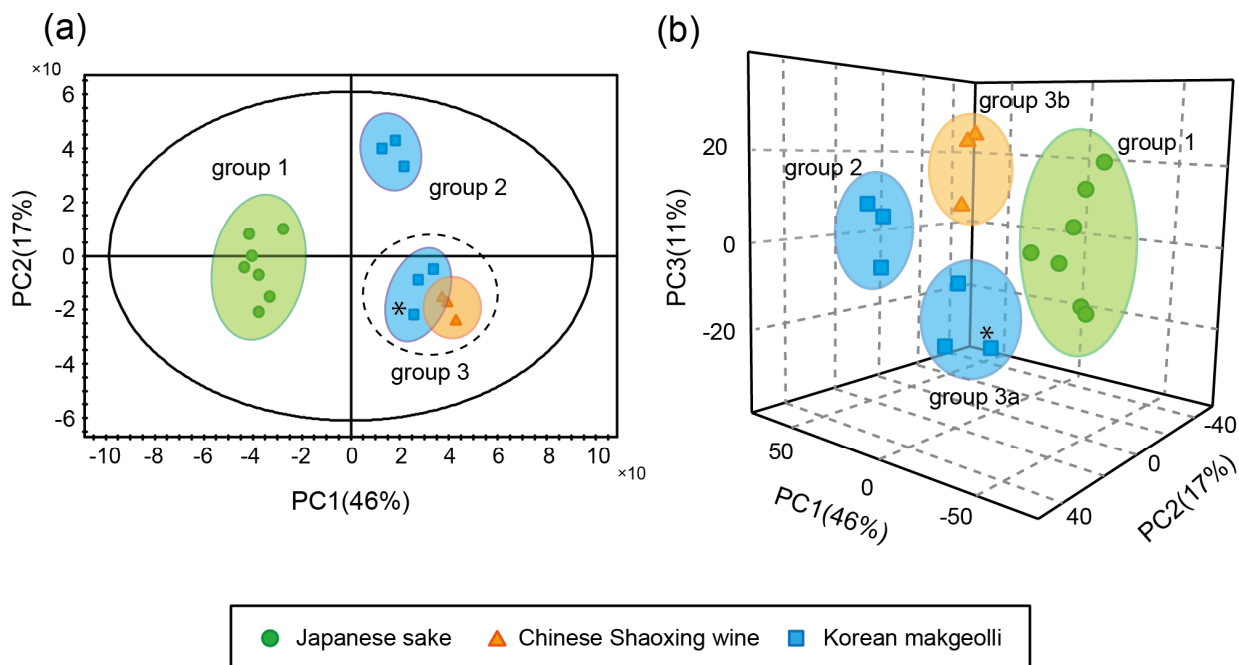


図 3-6. 日本酒、紹興酒、マッコリのペプチド領域の F₂-selective TOCSY スペクトルを用いた主成分分析のスコアプロット

(a) PC1 と PC2 を用いた 2 次元プロット (b) PC1-PC3 を用いた 3 次元プロット

スコアプロット内でアスタリスクが付いているマッコリはラベルに「麴」としか記載されておらず、麴の種類については表示されていなかった

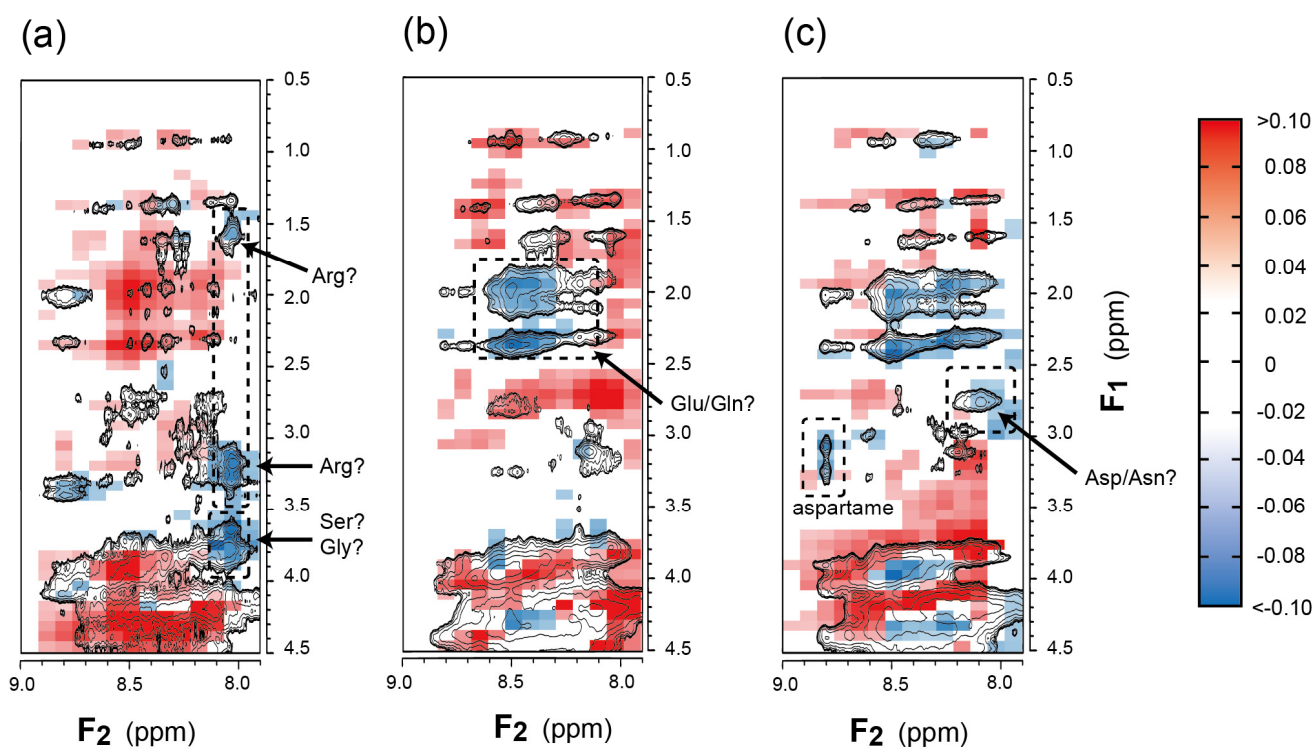


図 3-7. 日本酒、紹興酒、マッコリのペプチド領域の F_2 -selective TOCSY スペクトルを用いた主成分分析のローディングプロットに F_2 -selective TOCSY スペクトルを重ねた物
 (a)PC1、日本酒 (米麴) (b)PC2、紹興酒 (小麦麴) (c)PC3、マッコリ (小麦麴)

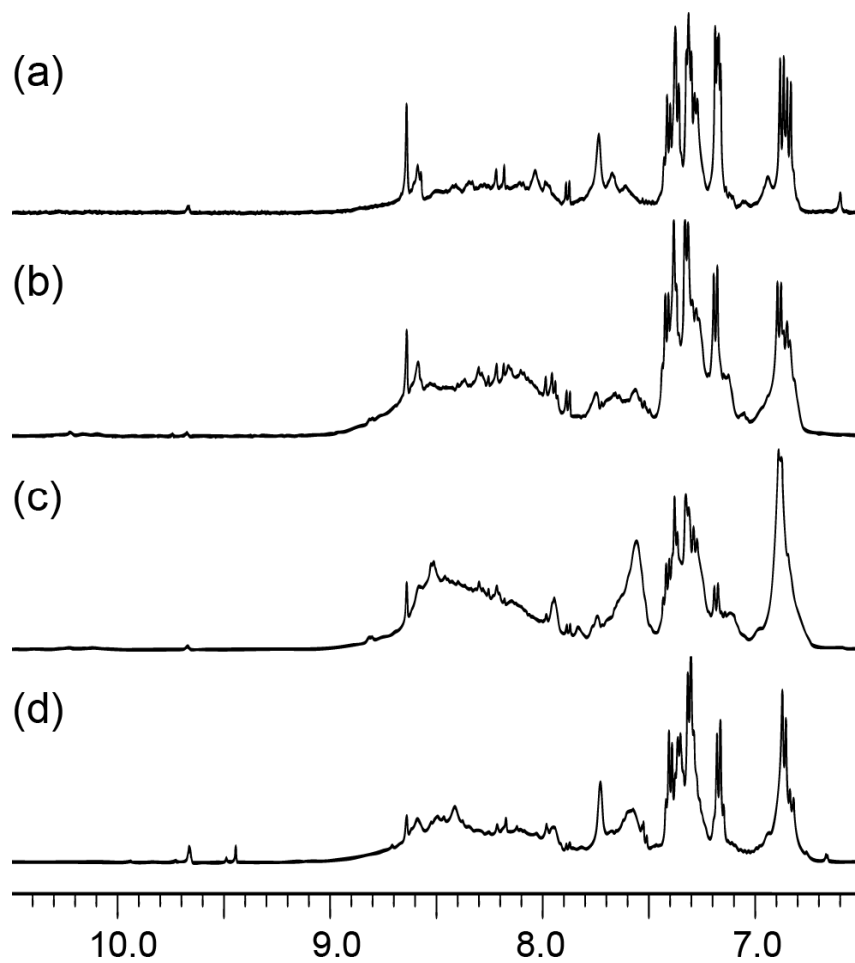


図 3-8. 選択励起を用いた低磁場領域の ^1H NMR スペクトル
(a)日本酒、(b)マッコリ (米麴)、(c)マッコリ (小麦麴)、(d)紹興酒

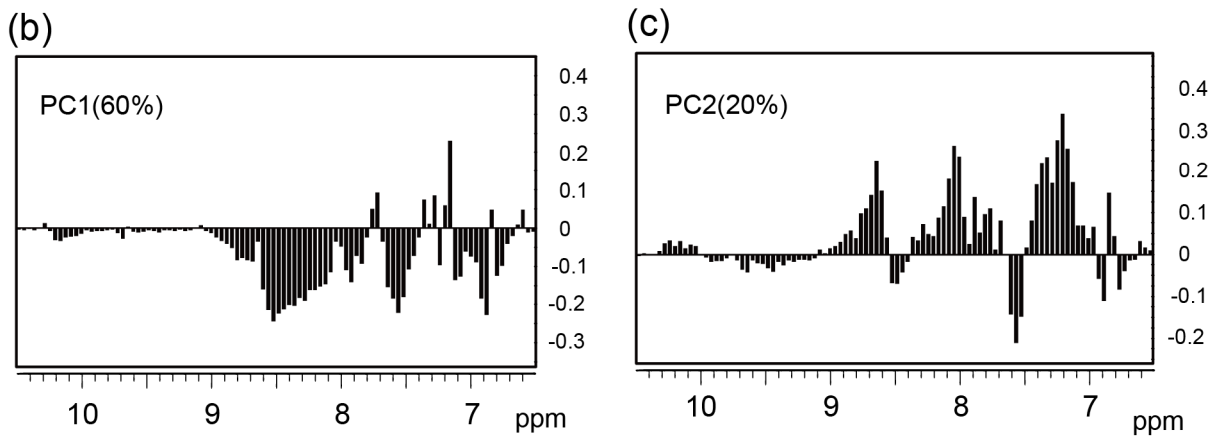
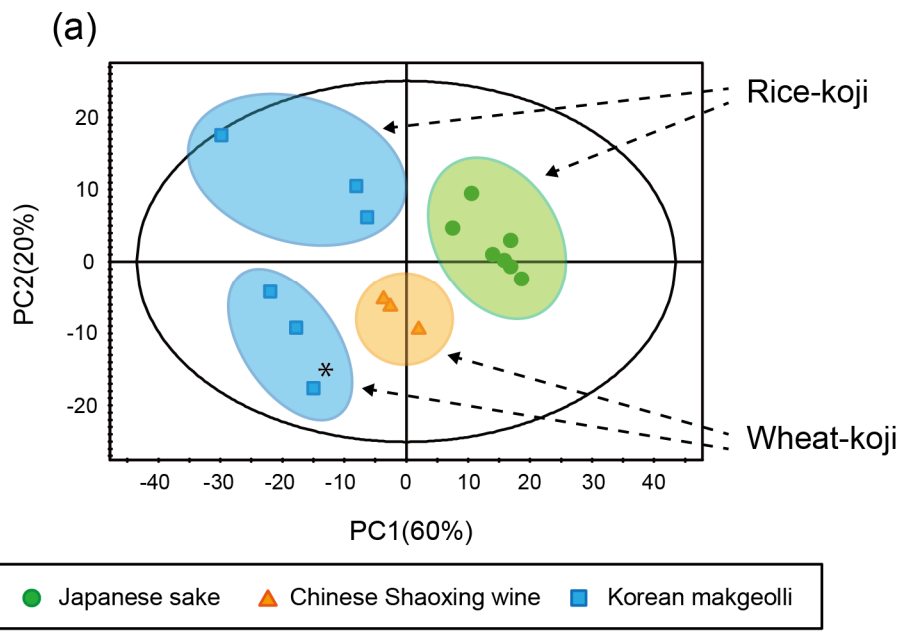


図 3-9. 日本酒、紹興酒、マッコリの低磁場領域の ^1H NMR スペクトルを用いた主成分分析の(a)スコアプロット及びローディングプロット((b) PC1, (c) PC2)

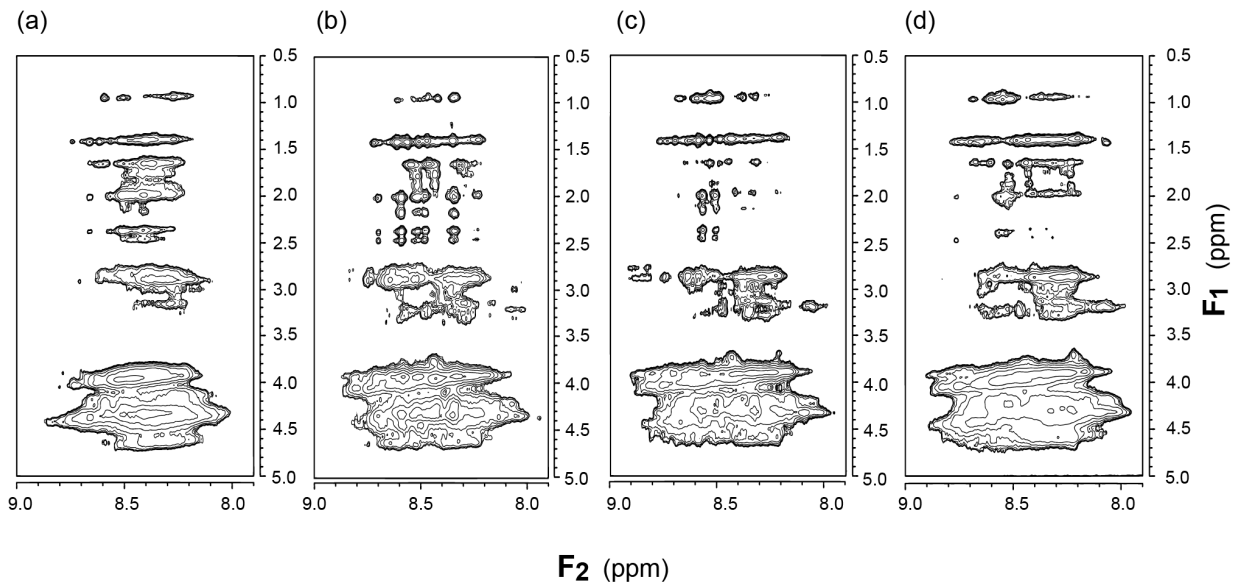


図 3-10. 米酢のペプチド領域の F₂-selective TOCSY スペクトル (10% D₂O, pH3.0)
 (a), (b), (c)は互いに異なる製造会社のもの。(c)と(d)は同じ銘柄だが購入した店が異なる。

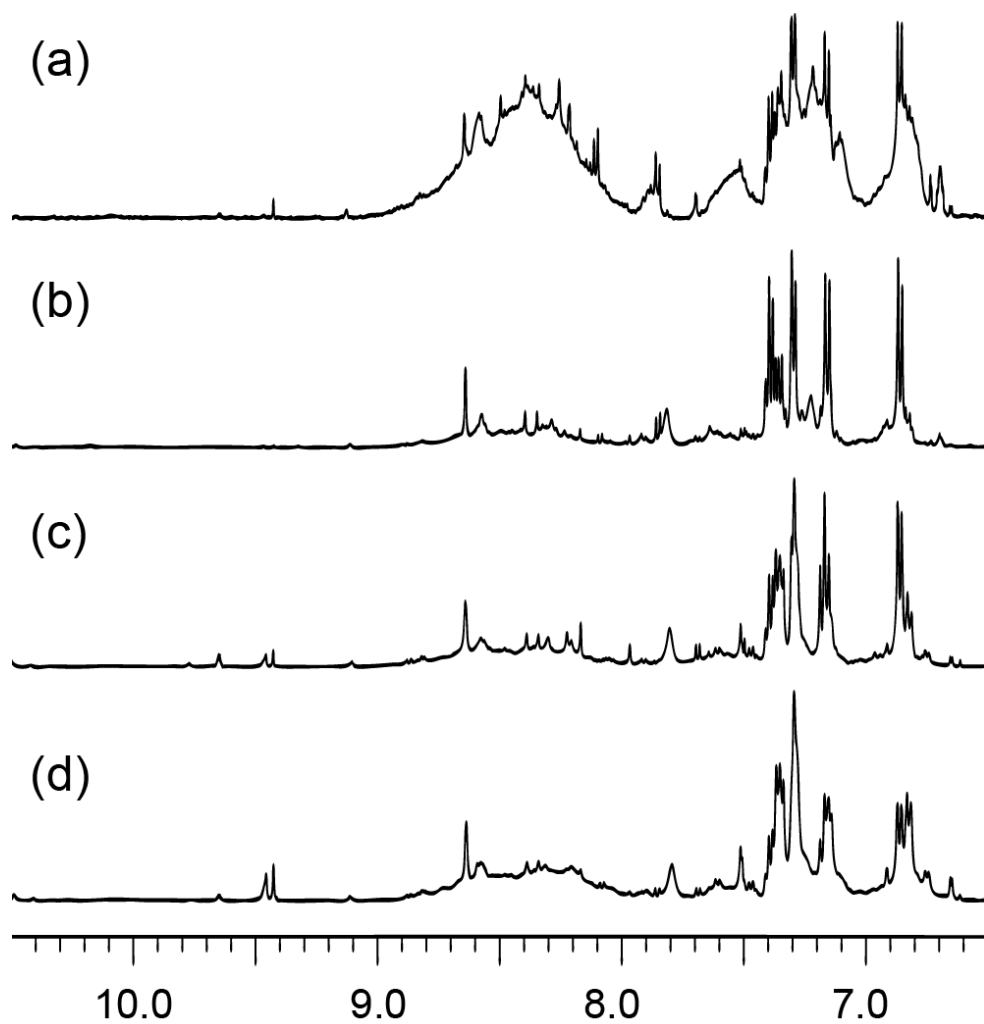


図 3-11. 米酢の低磁場領域の選択励起を用いた ^1H NMR スペクトル (10% D_2O , pH3.0)
(a), (b), (c)は互いに異なる製造会社のもの。(c)と(d)は同じ銘柄だが購入した店が異なる。

第四章

総括

NMR を用いた食品中の微量成分の新たな測定法として F₂-selective 2D NMR 法を開発した。この手法を用いる事で、従来法である F₁-selective 2D NMR 法では困難であった食品中の微量成分の非破壊的な 2 次元 NMR スペクトルの測定が可能になった。従来法である F₁-selective 2D NMR 法を用いて食品中の微量成分の非破壊的な測定を行うと、主成分の予定外の励起が発生しレシーバーゲインが制限されダイナミックレンジの問題により微量成分の検出が困難になるだけでなく、主成分に由来する t₁ ノイズによりスペクトルの解析も阻害される。これらの問題は、選択励起の後に続くハードパルスやスピロックパルス等の非選択的なパルスにより引き起こされる事が分かった。そこで、選択励起をパルスシーケンスの最後に持つてくることで、すなわち F₂ 軸に沿った選択励起を行う事で、主成分の予定外の励起が抑えられ微量成分の 2 次元 NMR スペクトルを非破壊的に得ることが出来た。この手法は TOCSY, DQF-COSY, NOESY 等の様々な 2 次元 NMR 法に適用可能であるだけでなく、果汁、アルコール飲料、食用油脂、食酢等様々な食品にも適用可能であり何れの試料からも微量成分の綺麗な 2 次元 NMR スペクトルを非破壊的に得る事が出来た。また、F₂-selective 2D NMR 法 HR-MAS による固形状の試料の測定、生きた細胞を直接測定する in vivo NMR 法等にも幅広く適用可能な手法であると考えられる。

また選択励起により得られた低磁場領域 (6.3-10.0 ppm) の微量成分の ¹H NMR スペクトルと主成分分析を組み合わせることで 5 種類のマンゴー果汁の品種を識別するモデルを構築する事が出来た。F₂-selective 2D NMR 法を用いる事で ¹H NMR スペクトルの帰属を効率的に行う事ができ、その知見は主成分分析のローディングプロットの解析において非常に有用であった。この事は、選択励起を用いて非破壊的に得られた ¹H NMR スペクトルと多変量解析を組み合わせることで、高効率な品種識別法を構築できる可能性がある事を示している。実際の商業貨物は非常に量が多いため食品の真正評価においては高効率なスクリーニング手法が求められている。選択励起を用いた微量成分の非破壊的な測定法は食品の真正評価において有用なツールとなる事が期待される。

日本酒、米酢等の発酵食品の F₂-selective TOCSY スペクトルにおいて、主にペプチドに由来する複雑なパターンを示すスペクトルが観察された。このスペクトルを主成分分析で処理する事で日本酒、紹興酒、マッコリの 3 種類のライスワインを識別するモデルを構築する事が出来た。さらにマッコリにおいては使用した麴の種類、すなわち米麴を用いたものか、小麦麴を用いたものかについても判定する事が可能であった。米酢では興

味深い事に銘柄ごとに異なっていただけで無く、同じ銘柄の製品であっても購入した店の違いによってスペクトルパターンが異なっていた。これら主にペプチドに由来するスペクトルのパターンの違いは使用した原材料、製造法、保存状態などの様々な食品の履歴を反映していると考えられた。この F₂-selective TOCSY 法スペクトルは新しい「食品の指紋」として食品の真正評価や味、保存状態などの品質管理に応用できるのではないかと考えられる。

参考文献

1. Cevallos-Cevallos, J. M.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E. Metabolic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci. Tech.* **2009**, *20*, 557-566.
2. Wishart, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends Food Sci. Tech.* **2008**, *19*, 482-493.
3. Bertelli, D.; Lolli, M.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Serra, G.; Plessi, M. Detection of Honey Adulteration by Sugar Syrups Using One-Dimensional and Two-Dimensional High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8495-8501.
4. Tarachiwin, L.; Ute, K.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E. ¹H NMR Based Metabolic Profiling in the Evaluation of Japanese Green Tea Quality. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9330-9336.
5. Longobardi, F.; Ventrella, A.; Napoli, C.; Humpfer, E.; Schutz, H.; Kontominas, M. G.; Sacco, A.; Classification of Olive Oils According to Geographical Origin by Using ¹H NMR Fingerprinting Combined with Multivariate Analysis. *Food Chem.* **2012**, *130*, 177-183.
6. Sobolev, A. P.; Segre, A.; Lamanna, R. Proton high-field NMR study of tomato juice. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 237-245.
7. Mannina, L. ; Cristinzio, M. ; Sobolev, A. P. ; Ragni, P.; Segre, A. High-Field Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Study of Truffles (*Tuber aestivum vittadini*). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7988-7996.
8. Hu, F.; Furihata, K.; Kato, Y.; Tanokura, M. Nondestructive Quantification of Organic Compounds in Whole Milk without Pretreatment by Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4307-4311.
9. Wei, F.; Furihata, K.; Hu, F.; Miyakawa, T.; Tanokura, M. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 857-865.
10. Sundekilde, U. K.; Frederiksen, P. D.; Clausen, M. R.; Larsen, L. B.; Bertram, H. C. Relationship between the metabolite profile and technological properties of bovine milk from two dairy breeds elucidated by NMR-based Metabolomics. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7360-7367.

11. Rastrelli, F.; Schievano, E.; Bagno, A.; Mammi, S. NMR quantification of trace components in complex matrices by band-selective excitation with adiabatic pulses. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 868-872.
12. Sandusky, P.; Raftery, D.; Use of Selective TOCSY NMR Experiments for Quantifying Minor Components in Complex Mixtures: Application to the Metabonomics of Amino Acids in Honey. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2455-2463.
13. Kessler, H.; Mronka, S.; Gemmecker, G. Multi-Dimensional NMR Experiments Using Selective Pulses. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 527-557.
14. Brüschweiler, R.; Madsen, J. C.; Griesinger, C.; Sørensen, O.W.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* Two-dimensional NMR spectroscopy with soft pulses **1987**, *73*, 380-385.
15. Cavanagh, J.; Waltho, J. P.; Keeler, J. Semiselective two-dimensional NMR experiments. *J. Magn. Reson.* **1987**, *74*, 386-393.
16. Krishnamurthy, V.V. Application of Semi-Selective Excitation Sculpting for Homonuclear Decoupling During Evolution in Multi-Dimensional NMR. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 9-12.
17. Bradley, S. A.; Hu, H.; Krishnamurthy, K. A band-selective composite gradient: Application to DQF-COSY. *J. Magn. Reson.* **2005**, *174*, 110-115.
18. Shintu, L.; Caldarelli, S. Toward the Determination of the Geographical Origin of Emmental(er) Cheese via High Resolution MAS NMR: A Preliminary Investigation. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4148-4154.
19. Castejon, D.; Villa, P.; Calvo, M. M.; Santa-Maria, G.; Herraiz, M.; Herrera, A. ¹H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 693-703.
20. Perez, E. M. S.; Iglesias, M. J.; Ortiz, F. L.; Perez, I. S.; Galera, M. M. Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chem.* **2010**, *122*, 877-887.
21. Hwang, T.; Shaka, A. J. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Field Gradients. *J. Magn. Reson. Series A*, **1995**, *112*, 275-279.
22. Geen, H.; Freeman, R. Band-Selective Radiofrequency Pulses. *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 93-141.
23. Ulrich, E. L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J. F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y. E.; Lin, J.; Livny, M.;

- Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; Nakatani, E.; Schulte, C. F.; Tolmie, D. E.; Kent Wenger, R.; Yao, H.; Markley, J. L. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D402–408.
24. Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Eisner, R.; Young, N.; Gautam, B.; Hau, D. D.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bouatra, S.; Mandal, R.; Sinelnikov, I.; Xia, J.; Jia, L.; Cruz, J. A.; Lim, E.; Sobsey, C. A.; Shrivastava, S.; Huang, P.; Liu, P.; Fang, L.; Peng, J.; Fradette, R.; Cheng, D.; Tzur, D.; Clements, M.; Lewis, A.; Souza, A. D.; Zuniga, A.; Dawe, M.; Xiong, Y.; Clive, D.; Greiner, R.; Nazyrova, A.; Shaykhtudinov, R.; Li, L.; Vogel, H. J.; Forsythe, I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D603–D610.
25. Cui, Q.; Lewis, I. A.; Hegeman, A. D.; Anderson, M. E.; Li, J.; Schulte, C. F.; Westler, W. M.; Eghbalnia, H. R.; Sussman, M. R.; Markley, J. L. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 162–164.
26. Gil, A. M.; Duarte, I. F.; Delgadillo, I.; Colquhoun, I. J.; Casuscelli, F.; Humpfer, E.; Spraul, M. Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1524-1536.
27. Duaret, I. F.; Goodfellow, B. J.; Gil, A.M. Characterization of mango juice by high-resolution NMR, hyphenated NMR, and diffusion-ordered spectroscopy. *Spectrosc. Lett.* **2005**, *38*, 319-342.
28. Duarte, I. F.; Delgadillo, I.; Gil, A.M. Study of natural mango juice spoilage and microbial contamination with *Penicillium expansum* by high resolution ¹H NMR spectroscopy. *Food Chem.* **2006**, *96*, 313-324.
29. Silver, M. S.; Joseph, R. I.; Hoult, D. I. Highly Selective $\pi/2$ and π Pulse Generation. *J. Magn. Reson.* **1984**, *59*, 347-351.
30. Tannus, A.; Garwood, M. Improved Performance of Frequency-Swept Pulses Using Offset-Independent Adiabaticity. *J. Magn. Reson. Series A*, **1996**, *120*, 133-137.
31. Mafra, I.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Oliveira, M. B.P. P. Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 649-665.
32. Benincasa, C.; Lewis, J.; Sindona, G.; Tagarelli, A. The use of multi element profiling to differentiate between cow and buffalo milk. *Food Chem.* **2008**, *110*, 257-262.
33. Jamin, E.; Gonzalez, J.; Remaud, G.; Naulet, N.; Martin G. G. Detection of exogenous sugars

- or organic acids addition in Pineapple juices and concentrates by ^{13}C IRMS Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3961-3967.
34. Defernez, M.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. Use of Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Authentication of Fruit Purees. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 109-113.
35. Reid, L. M.; O'Donnell, C. P.; Downey, G. Potential of SPME-GC and Chemometrics to detect adulteration of soft fruit purees. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 421-427.
36. Sacchi, R.; Mannina, L.; Fiordiponti, P.; Paolillo, L.; Patumi, M.; Segre, A. Characterization of Italian extra virgin olive oils using ^1H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3947-3951.
37. Beretta, G.; Caneva, E.; Regazzoni, L.; Bakhtyari, N. G.; Facino, R. M. A solid-phase extraction procedure coupled to ^1H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *620*, 176-182.
38. Schievano, E.; Peggion, E.; Mammi, S. ^1H nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometrics determination of its botanical origin. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 57-65.
39. Bertelli, D.; Lolli, M.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Serra, G.; Plessi, M. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8495-8501.
40. Koda, M.; Furihata, K.; Wei, F. F.; Miyakawa, T.; Tanokura, M. F_2 -selective two-dimensional NMR spectroscopy for the analysis of minor components in foods. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 710-716.
41. Furihata, K.; Seto, H. Constant time HMBC (CT-HMBC), a new HMBC technique useful for improving separation of cross peaks. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7337-7340.
42. Monakhova, Y. B.; Schäfer, H.; Humpfer, E.; Spraul, M.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D. W. Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in ^1H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 734-739.
43. Masibo, M.; He, Q. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2008**, *7*, 309-319.
44. Verzele, M.; Delahaye, P.; Dijck, J. V. Digallic acid. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1983**, *92*, 181-186.

45. Gómez, P.; Ferrer, M. Á., Fernández-Trujillo, J. P.; Calderón, A.; Artés, F.; Egea-Cortines, M.; Weiss, Structural changes, chemical composition and antioxidant activity of cherry tomato fruits (cv. Micro-Tom) stored under optimal and chilling conditions. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 1543–1551.
46. Rochfort, S.; Ezernieks, V.; Bastian, S. E. P.; Downey, M. O. Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chem.* **2010**, *121*, 1296-1304.
47. Viggiani, L.; Morelli, M. A. C. Characterization of Wines by Nuclear Magnetic Resonance: A Work Study on Wines from the Basilicata Region in Italy. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8273-8279.
48. Khatib A.; Wilson E. G.; Kim H. K.; Lefeber, A. W. M.; Erkelens, C.; Choi, Y. A.; Verpoorte, R. Application of two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiation of beer. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *559*, 264-270.
49. Almeida, C.; Duarte, I. F.; Barros, A.; Rodrigues, J.; Spraul, M.; Gil, A. M. Composition of Beer by ¹H NMR Spectroscopy: Effects of Brewing Site and Date of Production. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 700-706.
50. Consonni, R.; Gatti, A. ¹H NMR Studies on Italian Balsamic and Traditional Balsamic Vinegars. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3446-3450.
51. Caligiani, A.; Acquotti, D.; Palla, G.; Bocchi, V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ¹H NMR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *585*, 110-119.
52. Schievano, E.; Guardini, K.; Mammi, S. Fast Determination of Histamine in Cheese by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2647-2652.
53. Shintu, L.; Caldarelli, S. High-Resolution MAS NMR and Chemometrics: Characterization of the Ripening of Parmigiano Reggiano Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4026-4031.
54. Okamoto, A; Sugi, E.; Koizumi, Y.; Yanagida, F.; Utake, S. Polyamine Content of Ordinary Foodstuffs and Various Fermented Foods. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*, 1582-1584.
55. Pardi, A.; Wagner, G.; Wüthrich, K. Protein conformation and protein nuclear-magnetic-resonance chemical shifts. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *137*, 445-454.
56. 田中淑子、中村美枝子、松崎和代、野田耕作、清酒中のペプチドの単離とアミノ酸組

- 成、福岡女子大学家政学部紀要、**1989**, 20, 5-9.
57. 高橋暲、能勢惟一、清酒ペプチド類の型態に就いて (No1) 発酵工学雑誌、**1957**, 35, 404-406.
58. 高橋暲、能勢惟一、清酒中の低級ペプチドの型態について : 清酒のペプチドに関する研究 第5報、発酵工学雑誌、**1960**, 38, 319-321.

謝辞

本研究を行うにあたり、田之倉優教授には NMR 装置をはじめとする充実した研究環境を与えて頂きました。また、研究全般にわたりご指導賜り、深謝の意を表します。また、降旗一夫助教には NMR 測定全般にわたりご指導、ご教示頂きました。心より御礼申し上げます。日々の研究にあたり、永田宏次准教授、宮川拓也助教からは多くの貴重なご意見を頂きました。心より感謝申し上げます。魏 菲菲さんには多変量解析において大変お世話になりました。その他の研究室の方々にも大変お世話になりました。皆様に心から感謝いたします。