

別 紙

論 文 の 内 容 の 要 旨

応用生命化学 専攻  
平成 21 年度博士課程 入学  
氏 名 甲田 政則  
指導教員名 田之倉 優

論文題目  $F_2$ -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

近年、生体中に含まれる低分子化合物を網羅的に解析する代謝物分析（メタボロミクス）の技術が食品科学の分野において幅広く応用されている。食品中に含まれる様々な低分子化合物は、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、代謝物分析は食品の真正評価や品質管理において特に有用なツールになると期待されており、代謝物分析を用いた様々な研究が報告されている。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) 簡単な前処理で非破壊的な測定が可能である 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利点を有している。また近年は HR-MAS (high-resolution magic angle spinning) NMR 法を用いる事で固形状の試料も非破壊的に測定することが可能になっている。代謝物分析による食品の真性評価、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が食品には糖類、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に由来する成分の除去が行われている。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か選択励起を用

いて主成分に由来する信号を除去する事である。これによりダイナミックレンジの問題が改善し微量成分を非破壊的に測定する事が可能になる。選択励起を用いる事で食品中の微量成分を非破壊的に測定できる事については 1 次元 NMR で既に報告がされているが、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り NMR を用いた非破壊的な代謝物分析においては必須の技術であると考えられる。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、 $F_1$  軸に沿った選択励起を行う事 ( $F_1$ -selective 2D NMR 法) で測定時間の短縮及び  $F_1$  軸のデジタル分解能の改善に非常に有用である事が報告されている。しかし、これらの研究は何れも分離・精製された単一成分の構造解析で用いられており、食品の様な複雑混合物では適用事例が報告されていない。

本研究では選択励起を用いた 2 次元 NMR スペクトルにより食品中の微量成分を非破壊的に測定し、代謝物分析への応用可能性を検討した。

### 1. $F_2$ -selective 2D NMR 法<sup>1)</sup>

最初に NMR を用いた非破壊的な微量成分分析を行う試料として、その成分の大部分が水と糖類 (ショ糖、果糖、ブドウ糖) であるマンゴー果汁を用いて低磁場領域 (6.0-10.5 ppm) の微量成分の測定を行った。

ハードパルスを用いた非選択的な測定では糖類の強い信号によるダイナミックレンジの問題のため (レシーバーゲイン 18 dB)  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの低磁場領域には殆ど信号が検出されなかったが、選択励起を用いて低磁場領域の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定することでダイナミックレンジの問題が解決し (レシーバーゲイン 60 dB)、多くの微量成分の信号を新たに検出する事ができた。次に従来法である  $F_1$ -selective 2D NMR 法をマンゴー果汁に適用し  $F_1$ -selective TOCSY による低磁場領域の微量成分測定を行った。その結果、選択励起の範囲外であり、本来なら励起が起きないはずの糖類 (約 3-5 ppm) の励起が起こり、糖類の信号に由来する  $t_1$  ノイズのために微量成分の綺麗な TOCSY スペクトルを得る事が出来なかった。また、レシーバーゲインが 52 dB に制限された。この糖類の予定外の励起は、選択励起の後に非選択的に全領域に照射されるスピロックパルスにより引き起こされたのではないかと考えられた。そこで、スピロックパルスによる糖類の予定外の励起及び  $t_1$  ノイズを避けるために、選択励起のパルスをパルスシークエンスの最後に配置し  $F_2$  軸に沿った形での選択励起を行った ( $F_2$ -selective 2D NMR 法)。その結果、糖類の  $t_1$  ノイズの影響を全く受けない微量成分の綺麗な TOCSY スペクトルが得られただけでなく、レシーバー

ゲインも最大値である 60 dB に回復した (図 1)。

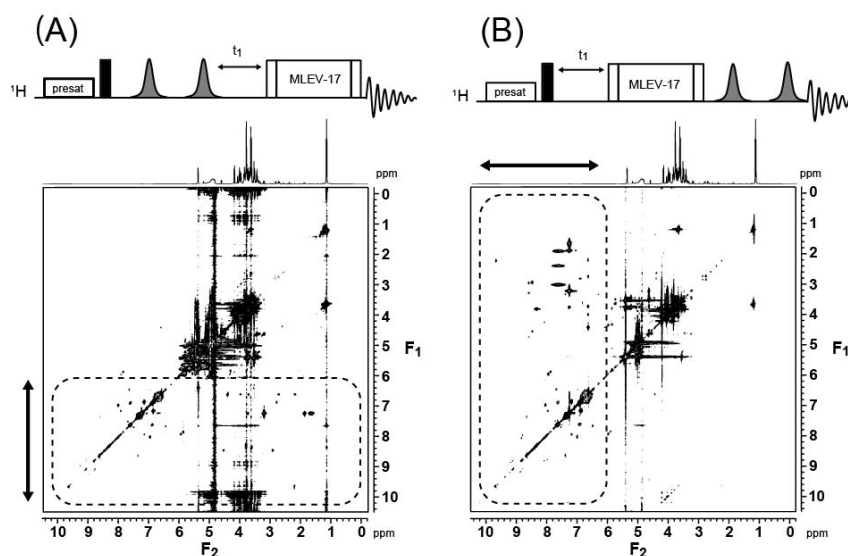


図 1 マンゴー果汁の (A)  $F_1$ -selective TOCSY, (B)  $F_2$ -selective TOCSY スペクトル

$F_2$ -selective 2D NMR 法を DQF-COSY 及び NOESY スペクトルにも適用し、マンゴー果汁を用いて  $F_1$ -selective 2D NMR との比較を行った。その結果、従来法である  $F_1$ -selective DQF-COSY 及び NOESY では TOCSY の時と同様に糖類の励起が起こり  $t_1$  ノイズとレシーバーゲインの制限により綺麗なスペクトルを得る事が出来なかった。これに対して  $F_2$ -selective DQF-COSY 及び NOESY では何れからも綺麗な 2次元 NMR スペクトルを得る事が出来た。この事は  $F_2$ -selective 2D NMR 法が様々な 2次元 NMR 法に対して適用可能である事を示唆している。

$F_2$ -selective TOCSY を日本酒、ハチミツ、グレープシードオイルに適用し低磁場領域の微量成分の測定を行った。その結果、全ての試料から綺麗な TOCSY スペクトルが得られた。この事は  $F_2$ -selective 2D NMR 法がアルコール飲料、水溶性物質、脂溶性物質等の幅広い食品に適用可能である事を示唆している。

## 2. 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

選択励起を用いた低磁場領域の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルと主成分分析を組み合わせる事で異なる 5 種類の品種のマンゴー果汁の識別を試みた。比較対象で行った、非選択励起による  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを用いた主成分分析では 5 種類の品種が互いに混じってしまい、識別モデルを構築する事は出来なかった。これに対し、選択励起により得られた  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを用いて行った主成分分析では 5 種類の品種が互いに分離し、綺麗な識別モデルを構築する事が出来た。さらに  $F_2$ -selective 2D NMR 法を用いる事で信号の帰属が効率的に

行われ、芳香族成分だけでなく交換性のアミノプロトンに由来する信号も数多く存在している事が明らかになった。これらの帰属情報と主成分分析におけるローディングプロットを組み合わせる事で品種識別に有用な成分を同定する事が出来た。

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殆ど注目されて来なかった領域であるが、選択励起を用いる事で微量成分の検出、帰属を効率的に行う事が可能であり、さらに品種識別などの真正評価において有用な情報が含まれている可能性がある事が示された。選択励起を用いた低磁場領域の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを用いる事で煩雑な前処理が不要な効率のよい食品の真正評価法を構築できる事が期待される。

### 3. $F_2$ -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

日本酒、米酢などの米発酵食品は選択励起を用いて低磁場領域の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定すると 8-9 ppm にブロードな山型のピークが検出される。この領域は  $F_2$ -selective TOCSY スペクトルにおいて  $F_1$  軸の 1-5 ppm の範囲との間に非常に多くの相関ピークが観測され、指紋の様な複雑なスペクトルパターンを示した。解析の結果これらのピークは主に低級ペプチドに由来する物である事が分かった。様々な製造会社の日本酒において、このペプチドに由来するスペクトルパターンは類似していた事から、これは日本酒を特徴付けるパターンではないかと考えられた。そこで同じライスインである紹興酒とマッコリの  $F_2$ -selective TOCSY スペクトルを測定したところ日本酒とは全く異なるパターンを示した。これらの 2次元 TOCSY スペクトルを主成分分析で処理したところ、日本酒、紹興酒、マッコリを識別するモデルを構築する事が出来た。さらに、マッコリは米麴を用いた物と小麦麴を用いた物の 2種類あったが、これらに関しても識別する事が出来た。米酢は銘柄ごとに異なるパターンを示す事が分かった。この結果より食品中のペプチドの組成には発酵食品の履歴情報が織り込まれている可能性が示唆された。この  $F_2$ -selective TOCSY スペクトルにより得られる複雑なペプチドのスペクトルは食品の指紋として真正評価や品質管理に利用できるかもしれない。

1) Koda, M.; Furihata, K.; Wei, 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