

学位論文 博士（理学）

液体クロマトグラフィー大気圧化学イオン化
質量分析装置による
たばこの低極性不揮発性成分の解析と応用

2016年3月

慶應義塾大学大学院理工学研究科

石田直之

目次

1章 序論	1
1-1 葉たばこ	2
1-2 葉たばこの種類	3
1-3 葉たばこの内容成分	4
1-4 計量化学	7
1-5 計量化学と多変量解析	8
1-6 計量化学と成分分析装置	9
1-7 本研究の目的と構成	10
2章 SOLANESOL とその誘導体の分析	12
2-1 序論	13
2-2 実験方法	14
2-2-1 サンプルおよび試薬類	14
2-2-2 サンプルの調整	15
2-2-3 水分測定	15
2-2-4 分離カラムと分析装置条件	15
2-2-5 SOLANESYL ESTER 標品の合成	16
2-2-6 定量分析結果の統計解析	17
2-3 結果と考察	18
2-3-1 分離方法の検討	18
2-3-2 SOLANESYL ESTER の構造推定	20
2-3-3 定量に向けた分析方法の妥当性確認	22
2-3-4 定量分析結果と葉たばこ間における量的差異	25
2-4 小括	29
3章 葉緑素とその誘導体の分析	30
3-1 序論	31
3-2 実験方法	34

3-2-1 サンプルおよび試薬類	34
3-2-2 サンプルの調製	34
3-2-3 分離カラムと分析装置条件	34
3-2-3-1 CHLOROPHYLL 代謝物構造推定に向けた水系逆相クロマトグラフィー	34
3-2-3-2 CHLOROPHYLL 代謝物構造推定に向けた非水系逆相クロマトグラフィー	35
3-2-4 CHLOROPHYLL 代謝物標品の合成	35
3-2-4-1 SOLANESYL PHEOPHORBIDE A の合成	35
3-2-4-2 HYDROXPHEOPHYTIN A と SOLANESYL HYDROXPHEOPHORBIDE A の合成	36
3-3 結果と考察	37
3-3-1 CHLOROPHYLL 代謝物の分離検討	37
3-3-2 CHLOROPHYLL 代謝物の構造推定	39
3-4 小括	50
4章 TRIACYLGLYCEROL の分析	51
4-1 序論	52
4-2 実験方法	54
4-2-1 略号について	54
4-2-2 サンプルおよび試薬類	54
4-2-3 サンプルの調整	54
4-2-4 水分測定	54
4-2-5 分離カラムと分析装置条件	55
4-2-6 定量分析結果の統計解析	55
4-3 結果と考察	56
4-3-1 葉たばこ中の TRIACYLGLYCEROL の構造推定	56
4-3-2 標準 TRIACYLGLYCEROL による分析の妥当性検証	59
4-3-3 添加回収試験	60
4-3-4 葉たばこ中の TRIACYLGLYCEROL の定量分析	61
4-4 小括	67
5章 PHYTOSTEROL と PHYTOSTEROL ESTER 分析	68
5-1 序論	69

5-2 実験方法	71
5-2-1 サンプルおよび試薬類.....	71
5-2-2 サンプルの調製.....	72
5-2-3 水分測定.....	72
5-2-4 分離カラムと分析装置条件.....	72
5-2-4-1 SITOSTEROL と CAMPESTEROL の精製.....	72
5-2-4-2 PHYTOSTEROL と PHYTOSTEROL ESTER に向けた NARPC.....	73
5-2-5 PHYTOSTEROL ESTER 標品の合成.....	73
5-2-6 定量分析結果の統計解析.....	74
5-3 結果と考察	75
5-3-1 PHYTOSTEROL と PHYTOSTEROL ESTER の分離と構造推定.....	75
5-3-2 定量分析について.....	80
5-3-3 定量に向けた分析方法の妥当性確認.....	80
5-3-4 葉たばこ中の PHYTOSTEROL と PHYTOSTEROL ESTER の定量分析と結果の概観.....	85
5-4 小括	90
6章 低極性不揮発成分による網羅的分析	91
6-1 序論	92
6-2 実験方法	94
6-2-1 サンプルおよび試薬類.....	94
6-2-2 サンプルの調整.....	94
6-2-3 水分測定.....	94
6-2-4 分離カラムと分析装置条件.....	95
6-2-5 分析データからのスポット抽出と多変量解析.....	95
6-3 結果と考察	96
6-3-1 網羅的分析に向けた LC/APCI-MSD を利用したメソッド検討.....	96
6-3-2 網羅的分析に向けたデータ解析方法の検討.....	98
6-3-3 網羅的分析に向けた分析方法の妥当性検証.....	100
6-3-4 葉たばこの低極性不揮発性成分の網羅的分析結果の検証.....	102
6-4 小括	117

7章 総括	118
8章 謝辞	122
9章 参考文献	123
10章 試料一覧	134

1 章 序論

1-1 葉たばこ

たばこの喫煙の記録は、最古のものでは7世紀のマヤ文明のレリーフにみられる。それ以前より喫煙の習慣は原住民に普及していたようだが、文字を持たない文明であったので、喫煙が習慣化した正確な時期は分かっていない。ともかく古来、南北米大陸だけの習慣であったが、15世紀にスペインのコロンブスが北米大陸に到達し、16世紀初頭にヨーロッパ大陸に持ち込まれてから、僅か100年足らずの間に、世界中に広まった。当初は葉巻たばこやパイプたばこが一般的であったが、産業革命以降の大量生産化を受けて、19世紀には紙巻きたばこ、所謂シガレットが登場し、その手軽さが人気となり、現在の嗜好品としての地位を確立した。このたばこの原料は、植物の一種である“葉たばこ”である。現在のアルゼンチンとボリビア国境に跨る、アンデス山脈周辺が発祥と考えられている。16世紀初頭には、既に数種の葉たばこが栽培されており、その後たばこの普及とともに、葉たばこの栽培地域も拡大した。現在では世界中で栽培されており、世界の年間生産量は約600万トンに上る。栽培には水はけのよい土壌が適しており、温帯気候の丘陵地で栽培されることが多い。葉たばこの種子は、春先に苗床に播種され、およそ3週間で発芽する。その後、別の苗床に仮植され、およそ3週間で成長した苗が舗地に移植される。およそ2か月を経た初夏には、丈が50 cm から 250 cm に達し、茎に対して30枚程度の葉が着生する (Figure 1-1)。発蕾時期を迎えると、葉に成分を充実させるための摘心 (心止め) が行われ、それから1週間から1月の間で収穫される。着位が下の葉 (中葉系) から退色が始まり収穫に適した時期を迎え、着位が上の葉 (本葉系) は後から収穫される。収穫後は乾燥 (curing) されるが、方法により特有の味、香りが与えられる。乾燥後の葉たばこには、葉脈と葉肉部があるため、製造段階で分離されるが、葉脈部は中骨 (Stem) と呼ばれ、葉肉部はラミナ (Lamina) と呼ばれ、着位同様、異なるたばこ用原料として扱われる。これらが裁刻され、巻き上げを経て、たばこは完成する。ところで、たばこ特有の味や香りは、特にラミナに多く含まれる葉面樹脂が関係する。葉面には毛茸という樹脂を分泌する微小器官があり、降雨などから内部を保護するクチクラ層を形成するが、この葉面樹脂が、葉たばこ特有であり、喫煙燃焼時にたばこ特有の味や香りが発現するのである。このように葉たばこは長い歴史を経て、たばことして世界中に普及したため、植物の中では最も盛んに研究されてきたと言っても良い。



Figure 1-1 国産黄色種葉たばこ「つくば1号」

1-2 葉たばこの種類

植物分類上、葉たばこはナス科 (family) のタバコ属 (genus) であり、タバコ属は遺伝的に異なる約 70 種 (Species) で構成される。このなかで栽培されるのは、*Nicotiana tabacum* と *Nicotiana rustica* の 2 種であるが、*tabacum* が世界の生産量の大半を占める。これら 2 種が栽培種と呼ばれるが、本論文における“葉たばこ”としたい。一方で観賞用に栽培されることもあるが、現在のたばこには使用されていないタバコ属のことを野生種と呼ぶ。なかには *Nicotiana tabacum* の両親とされる *Nicotiana sylvestris* と *Nicotiana tomentosiformis* も含まれるが、現在では試験用としての栽培にとどまる。かつては栽培されていた野生種もあり、また *N. rustica* の方が、生産量が多い時代もあった。しかしながら安定的な収量、病害抵抗性などの観点から、次第に *N. tabacum* に集約されていったものと考えられている。葉たばこは収穫後の乾燥方法により、さらにバラエティーに富んだたばこ原料となる (Figure 1-2)。*Nicotiana tabacum* に限っても、大別すると黄色種、バーレー種、オリエント種、在来種の 4 品種 (Cultivar) が知られる。これらは遺伝的には近いが、収穫後の乾燥方法が異なるため、別の品種として扱われる。例えば収穫後に葉緑素の代謝を経て、カロテノイドの黄色が発現した段階から、火力乾燥を加え、葉内に黄色を固定させた、糖を多く含むたばこを黄色種 (バルク乾燥葉) という。19 世紀に米国で開発された乾燥方法であるが、燃焼時に糖に由来する特有の焦甘臭があり、シガレットの味や香りの中心的な役割を果たしている。また葉色が褐色になるまで、屋内で空気乾燥させるたばこをバーレー種 (明色気干葉) という。糖はほ

ば完全に代謝されるものの、葉面の樹脂成分はある程度残っており、燃焼性も高いため、特有の味や香りがある。ほかに中近東地域で主に栽培され、収穫後に天日乾燥し、堆積発酵させるたばこをオリエント種（明色日干葉）という。発酵させたことによる独特の香りと、製品の味や香り全体を調和させる効果があると考えられている。他にも乾燥法は空気乾燥であり、バーレー種に近いものの、地域特有である品種を総称して在来種（暗色気干葉、暗色日干葉）という。在来種を総括できる味や香りの特徴はなく、地域的な違いを含んでいる。これら4品種のなかには、病害やウイルス抵抗性向上を目指して開発された葉たばこがあり、さらに1章1項で述べたように産地、栽培方法、乾燥方法、着位、部位が異なった葉たばこがあるため、たばこの原料としての葉たばこの種類は極めて豊富である(Figure 1-2)。そのためシガレット製造者は、これらを適切にブレンド（葉組）することで、商品特徴を維持している。しかし葉たばこは農作物であるために、品質や需給の変動があり、様々な葉たばこの特徴を適切に定義し、品質判断と在庫管理しなければならない。これまで経験を積んだ専門家の官能により品質を判断してきたが、技能の安定化と高度化に、非常に多くの労力を割いており、品質管理の客観化、効率化が喫緊の課題となっている。

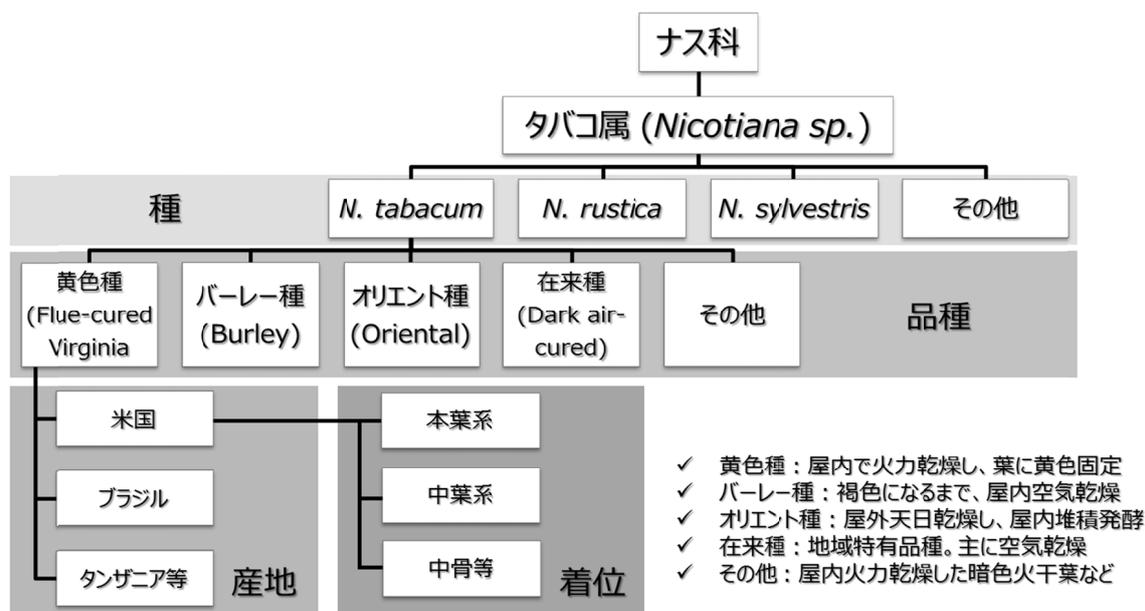


Figure 1-2 たばこの種と品種

1-3 葉たばこの内容成分

植物のなかで葉たばこほど成分について調べられた植物はない。1950年代から多くの種類の成分が、単離、同定され、現在のところ約4000種類が知られており、取りまとめた総説も数多い (J. C. Leffingwell, 1999) (A. Rodman, 2008) (D. Davis, 1999) [E. Voges, 1984] (R. L. Stedman, 1968)。代表的な成分を Figure 1-3 に記した。同様に、喫煙燃焼時に生成する成分も、盛んに調査されており、多くの報告や総説がある (A. Rodman, 2008)。本研究では喫煙燃焼時の成分と区別するため、

燃焼前の葉たばこに含まれる成分を“葉たばこ内容成分”とする。この、葉たばこ内容成分の中で代表的な成分は、ナス科植物に含まれるアルカロイドとして有名なニコチンであり、生合成経路、生成関与遺伝子、植物中の生成部位、根からの転流機構、喫煙燃焼時の煙中移行メカニズム、血中代謝機構など数多くの研究が進められてきており、単一の成分としては稀有な存在である。1960年代以降は、分析機器の進歩もあり、ニコチン以外の成分の単離、同定が一举に進められ、多くの葉たばこ内容成分の同定が行われた。一般的に量が多く、高等植物には共通して含まれる高分子成分のタンパク質、リグニン、セルロース、スターチ、ペクチンや、高極性成分のポリフェノール類、アミノ酸、糖、有機酸などを除くと、葉面上の毛茸から分泌される、脂肪酸類やテルペノイド類を多く含む、樹脂成分の単離、同定が盛んに研究された。特にテルペノイド類は、葉たばこ特有の成分が多く、喫煙燃焼時の味や香りに大きく関係するものと考えられてきた。 α -CBT を代表とするジテルペンのセンプラノイド、葉たばこの乾燥中にカロテノイドから生成してくるカロテノイド分解物、オリエント種葉たばこに含まれるラブダノイド、環境ストレスを受けた葉たばこが誘導抵抗性物質として放出するファイトアレキシン、植物特有のステロイドである **Phytosterol**、たばこ特有のトリセスキテルペンである **Solaneseol** は、代表的なテルペノイドとして多くの報告がみられる。一方、脂肪酸類は、低級から高級までの脂肪酸、**Triacylglycerol**、リン脂質、炭化水素があり、テルペノイド類ほど解明が進んでいないものの、味や香りに関係していると考えられてきた。このように、多くの葉たばこ内容成分の同定が進められたあと、1980年代以降、成分の単離、同定に言及した研究は一旦終息する。この時期までの研究は、葉たばこの品種間、産地間、着位間で量的差異を見せる成分の解明であり、新規成分の発見が難しくなったことも一因であろう。しかし、1990年以降、機器の成分に対する網羅性が向上したことにより、非常に多くの成分を一度に分析し、統計解析により包括的にサンプル間の差異を、説明する成分を明らかにする計量化学という学問領域が登場した。2000年代に入った現在では、葉たばこに関しても、新たな成分の分離、同定よりも、計量化学的な研究報告が増加傾向にある (Figure 1-4)。

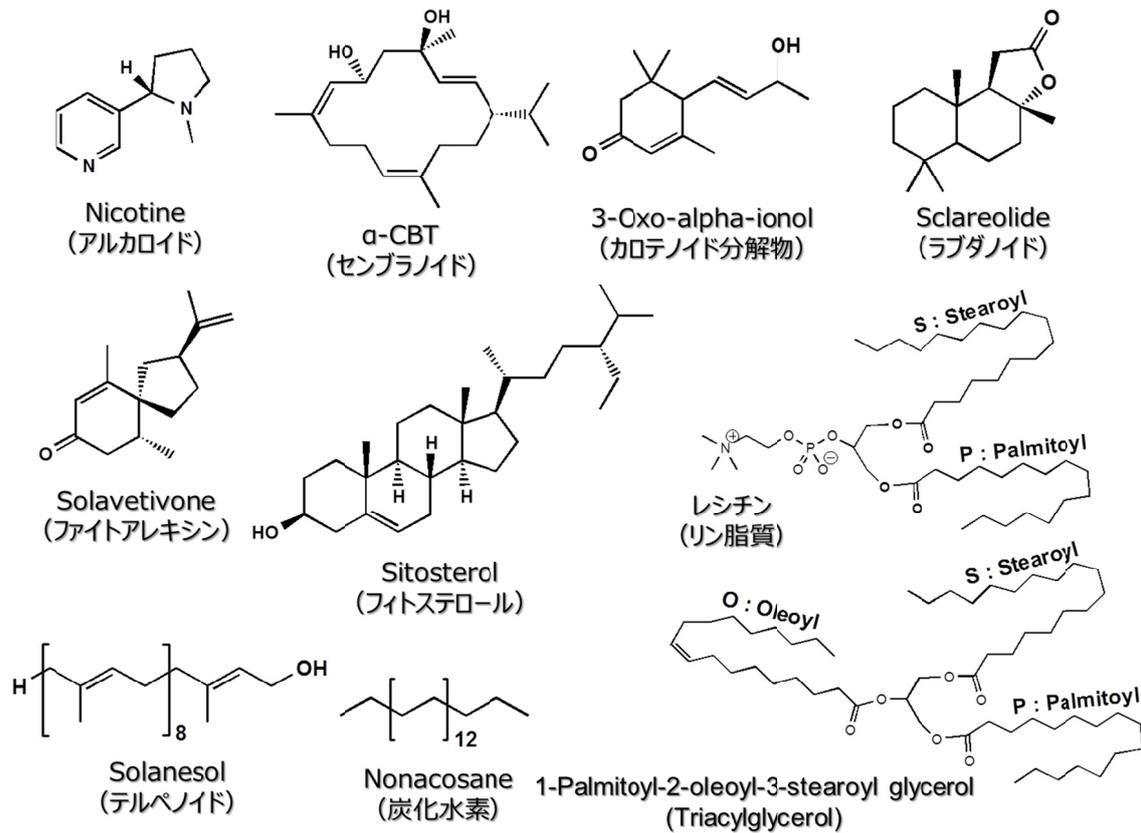


Figure 1-3 葉たばこ内容成分

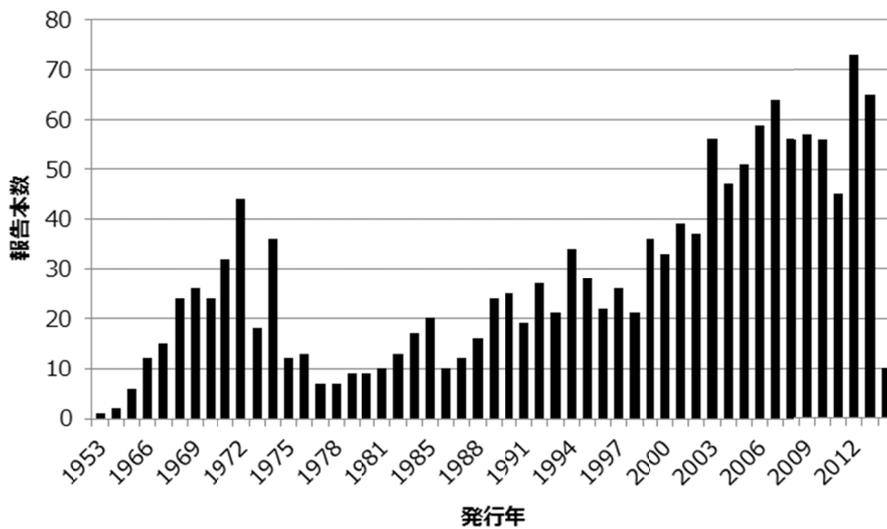


Figure 1-4 葉たばこ内容成分の分析に関する公開論文数の推移

公開論文数の推移は、Pubmed に以下の検索式を入力することで求めた。pubmed - (((tobacco) OR nicotiana) AND analysis) AND chromatography) NOT smoke) NOT smoking。1970 年前後に増加し、80、90 年代は増減を繰り返し、2000 年から増加傾向にある。

1-4 計量化学

自然科学は、「自然に属する諸対象を取扱い、その法則性を明らかにする学問」とされる [自然科学, 1998]。端的に言えば、初めに自然現象を選定し、要素を絞り込み、分析を行ってから、結果の傾向を読み取ることで法則性を見出すのである。例えば植物の病気という現象であれば、特定の成分が原因ではないかと仮定し、分析により罹病した個体と、罹病していない個体間における成分量階差を把握することで、仮定した成分が原因であるという、法則性を見出すのである。一方で近年では、分析技術、情報技術、解析技術の進歩により、事前の成分の仮定が必要とされない方法が登場してきた。その方法は、Figure 1-5 で比較しているように、網羅的分析により、非常に多くの成分を同時に分析し、個体間の差異に寄与する成分を統計解析により特定し、必要に応じて同定し、原因成分を明らかにするものである。前項末でも触れた、この進め方について研究する学問分野を、計量化学(chemometrics)と呼び、近年では化学、生物学、医薬学など、広範な分野で活用されており、新しいアプローチの自然科学と言える。1970年前後の、アメリカの B. R. Kowalski やスウェーデンの S. Wold らの研究により、学問領域として認識されるようになった。またこの計量化学は、自然科学のみならず応用科学への活用も進められており、たとえば健常者と患者間の差を説明するモデル式を作成し、血中成分の分析を迅速に行うだけで、疾病の有無を判別するといった研究もある。また網羅的分析の対象成分群が、異なるアプローチも数多く報告されるようになってきており、代謝物を活用した計量化学を metabolomics、遺伝子を活用した場合を genomics、タンパク質の場合は proteomics、脂質の場合は lipidomics といったように方法自体が多様化しつつある。このように計量化学は、自然科学と応用科学の2領域に跨る、新しい学問分野であり、近年の進歩は著しい。

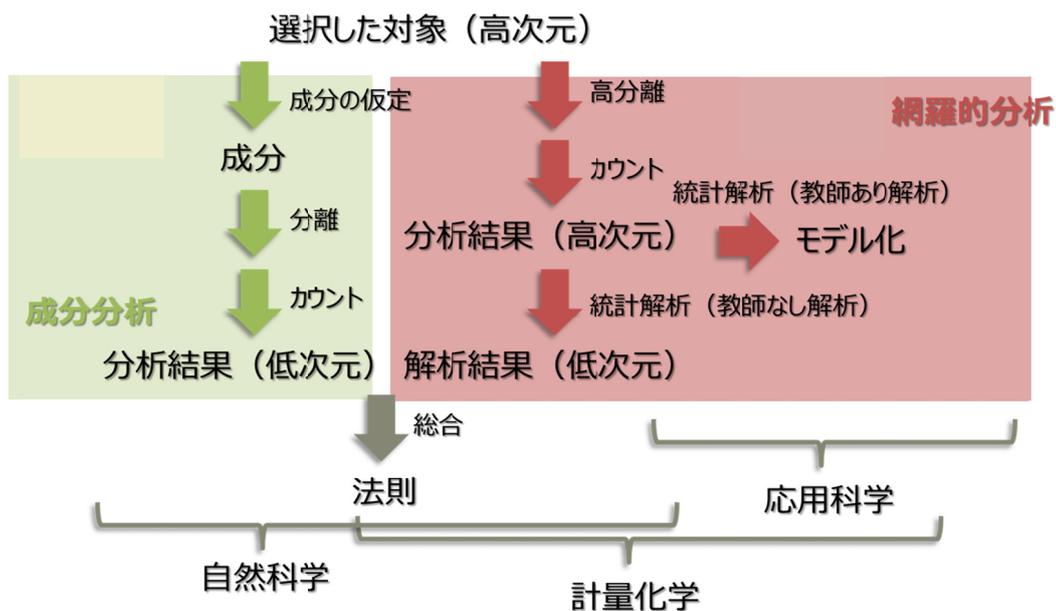


Figure 1-5 計量化学における網羅的分析とモデル化

1・5 計量化学と多変量解析

計量化学は、対象に関わる全化学成分の網羅的分析の結果に対し、統計を駆使することで、高次元データの圧縮・回帰・判別・視覚化・分類などを行う。網羅的分析により得た高次元データを、連続的数値（量的変数）に変換する場合は、主成分分析(Principal Component Analysis : PCA)、多次元尺度構成法(Multi dimensional Scaling : MDS)などがある。PCA の場合は、分析したサンプル間の分散が最大化された主成分得点により 2 次元プロット等の形で視覚化され、主成分に寄与する因子負荷量も併せて提示される。これらを俯瞰することで、サンプル間の距離感やカテゴリーが観測され、法則性が得られる。また非連続的数値（質的変数）に変換する場合は、階層的クラスタ分析(Hierarchical Clustering Analysis)、自己組織化写像(Self-organizing Map : SOM)などがあり、次元の圧縮後、分析したサンプルの類似度が、樹形図などの形で表現される。PCA と同様に、サンプル間の類似度とカテゴリーが観測され、法則性が得られる。注意しなければならないのは、妥当な手法の選択、すなわちデータの形式、距離の尺度の選択は、解析者本人行方が根拠を示す必要がある。このように対象の網羅的分析により、法則性を明らかにしようとする自然科学的な解析を“教師なし解析”と呼ぶ。一方で対象に、何らかの観察結果が付与されている場合（対象が農作物の場合は品種、産地、品質など）、この事前に付与されている観察情報と、対象の網羅的分析結果を関連付ける応用化学的な解析のことを、計量化学では“教師あり解析”と呼ぶ。教師あり解析の単純な事例としては、たとえば甘さの異なる果物があり（事前の観察結果）、糖量の分析結果（事後の観察結果）を関連づける単相関解析がある。甘さと糖量の相関関係を数式化することで、甘さが未知の果物の糖量を分析することで、ヒトが感じる甘さを量的に示すことになる。このとき統計的に導き出された数式を“モデル”という。なお計量化学を含めた統計学では、事前の観察情報である甘さのことを、“目的変数”と呼び、事後の観察情報である糖量のことを“説明変数”という。また産地、品種のような非連続的な変数を“質的変数”、糖量のような連続的な変数を“量的変数”という。こうしたモデルは目的変数や説明変数の数や種類により、様々なモデル化方法がある。例えば“教師あり解析”では、回帰分析と判別分析が代表的である。上記のように甘さが目的変数、糖量が説明変数、両変数が量的変数の場合、両者の相関関係を線形モデル化する解析を、単回帰分析という。一方で糖量以外の量的変数、たとえばアミノ酸やでんぷんなど他の成分（説明変数）も含めて線形でモデル化する解析を、重回帰分析という。他にもモデルの適合性向上を目的として、非線形のロジスティック回帰など数多くの方法がある。一方で産地を目的変数とし、複数の量的変数が説明変数である場合を判別分析という。回帰分析と同様に判別分析も数多くの方法が提唱されており、判別空間の距離定義だけでも、ユークリッド距離、平方距離、マハラノビス距離などがあり、解析者により妥当と思われる方法が選択される。こうしたモデル化は、近年頻繁に利用されるようになってきており、例えば多くの成分の網羅的分析結果を活用して、茶、酒類、穀物、果物、野菜

などの品質、産地、品種などを目的変数とした回帰モデルや判別モデルが検討・報告されてきている。世界中で栽培され、非常に多くの種類に富む葉たばこも同様に、このモデル化の対象になる。

1-6 計量化学と成分分析装置

1章3項において、葉たばこ内容成分を解明することを目的とした、計量化学に関係する研究が増加していることに触れたが、対象成分群の化学的性質に応じて、使用される機器は使い分けられる。当初は再現性の高さから、核磁気共鳴分光法（Neuclear Magnetic Resonance : NMR）や近赤外線分光法（Near-Infrared Spectroscopy : NIR）などの波長吸収型の分析装置が使用されていたが、近年では化合物の特定が容易なクロマトグラフィーが多用されるようになった。特に分離された成分の同定が可能な質量分析装置（Mass Spectrometry Detector : MSD）との組み合わせは盛んに研究されている。しかし、どのような組み合わせの装置であっても、あらゆる成分を検出することは難しいため、ある程度対象中の成分群の化学的特徴に応じた選択が必要となる。Figure 1-6に、成分群の特性と、網羅的分析に適した装置を示した。例えばガスクロマトグラフィー（GC）を組み合わせた GC/MSD の場合は、質量分析装置へのイオン導入部に電子ビームイオン化（EI）（Figure 1-7）というイオン導入部を備えているが、この装置により得られる質量スペクトルのライブラリーから化合物の同定が容易という特徴がある。ただ分離機構が GC であるため対象中の成分群は、揮発性が高い必要がある。また液体クロマトグラフィー（LC）を組み合わせた LC/ESI-MSD の場合は、電子スプレーイオン化（ESI）という極性の高い化合物を効率的にイオン化する導入部を有している。イオン化の機構上、クロマトグラフィーの溶離液は水を含み、中～高極性成分群向けとなるが、計量化学で頻繁に扱われるサンプルは、生体試料であることが多く、これらに含まれる成分群は、中～高極性であるため、非常に多くの報告例がある。またキャピラリー電気泳動（CE）を組み合わせた CE/ESI-MSD は、水溶性分子群の分析向けであり、保持時間の変動といった問題を抱えているものの、CE 自体が極めて高い分離度を有していることから、近年では使用例が増加している。他にも LC/APCI-MSD のように、大気圧化学イオン化法（APCI-MSD）の導入部を備えた組み合わせもある。この導入部は、クロマトグラフィーの溶離液からプロトンを発生させ、溶質を強制的にイオン化するもので、低中極性成分群の分析向けであり、他の装置に比べると対象成分の化学的特性が特異的である。このように対象に含まれる成分群の化学的特性に応じて機器を選択することが、網羅的分析を行う上では必要となる。

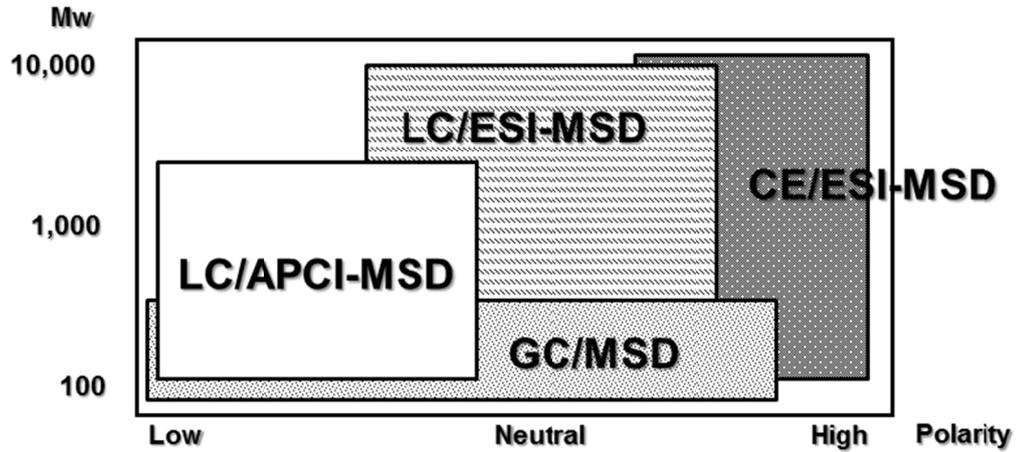


Figure 1-6 網羅的分析の対象成分群と装置の組み合わせ

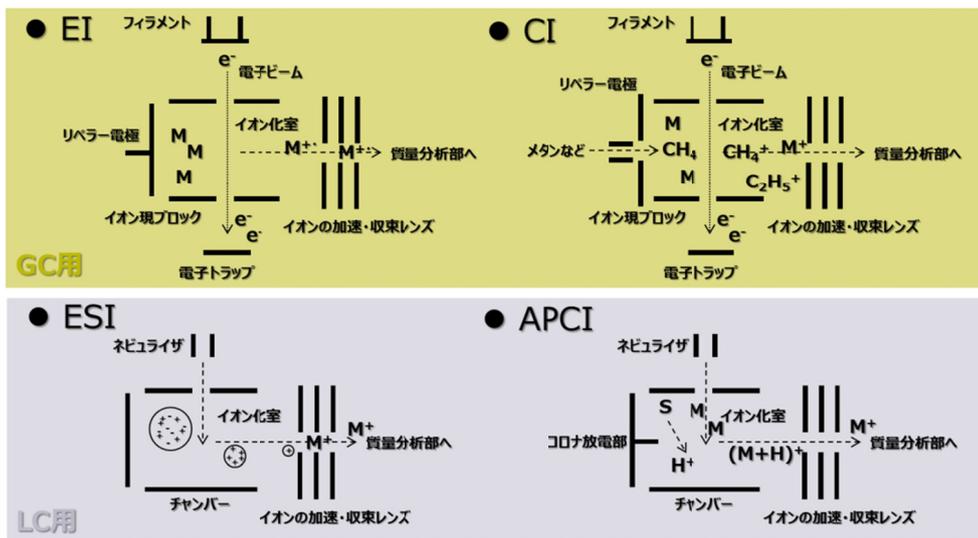


Figure 1-7 質量分析装置の導入部

1-7 本研究の目的と構成

本項では、これまで述べた背景を総括し、本研究の目的と構成について述べたい。1章2項において、葉たばこは非常に多くの種類があり、品質は安定させ難い農作物であるため、製造者は専門家の経験と官能により品質を定義、判断し、在庫管理を行ってきたことを述べた。一方で、1章3項において述べたように、葉たばこは、およそ4000種の成分で構成されており、なかでも葉面樹脂成分は、喫煙燃焼時の味や香りに関係していると考えられる。例えば葉面樹脂のセンプラノイドであれば、たばこらしい香りを与え、ラブダノイドであれば、抹香臭を与えるなど、発現する味や香りの傾向も部分的には分かっている。これは、葉たばこの樹脂成分を中心とした分析により、ヒトに頼らない品質判断が行える可能性を示している。ところがこれら既往の研究では、様々な葉たばこの差異、すなわち品質に関係する成分を明らかにしてきているものの、個別の成分によ

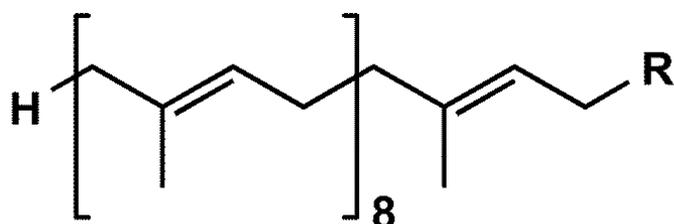
る各論であり、品質判断まで行う仕組みづくりには至っていないのである。一方で、1章4項で述べた計量化学は、網羅的分析を用いることで、葉たばこを多面的に把握することができ、さらには応用科学的な活用を進めることで、ヒトの経験や官能に依存してきた品質判断を、成分情報に置き換える可能性を有している。こうした背景を踏まえ、著者はLC/APCI-MSDを利用して、初めに葉たばこに含まれる低極性不揮発性成分の解明に取り組むこととした。さらに明らかにされた低極性不揮発性成分の分析方法を、網羅的分析方法へと高度化することで、品質の差異を判断するモデル化の検討を行うこととした。低極性不揮発性成分を対象としたのは、樹脂成分が味や香りに関係すると考えられていること、なかでも不揮発性の成分は、適当な分析装置がなく未解明だったことが理由である。一方で樹脂成分の中で揮発性成分を対象としなかったのは、分析する場合はGC/EI-MSDが適当であるが、バックグラウンドノイズが大きく、測定後の解析が難しいためである。また本研究ではタンパク質や遺伝子を網羅的分析の対象とする proteomics や genomics も採用しなかった。これは葉たばこが種類に富む要因として収穫後の乾燥方法、産地、着位などが挙げられ、葉たばこの差異を把握するための表現型としては、適当ではないと考えたためである。

本研究は、製品を製造していくにあたり、シガレット製造者が抱えてきた問題点を解決し、開発、製造の効率化、安定化を狙いとして、著者が2010年より取り組んできた研究である。本論は序論を含めた6章で構成される。2章では、葉たばこ内容成分の低極性不揮発性成分として、既知の Solanesol と、未知の Solanesol 誘導体に焦点を当て、それらの分離、構造推定、定量分析方法の構築、種々の葉たばこ間における差異について論じる。3章では、植物一般に含まれる葉緑素の、葉たばこ特有の代謝物に関わる成分の分離、構造推定を論じる。4章では、葉たばこ中の中性脂肪として知られる Triacylglycerol の分離、構造推定、定量分析方法の構築、種々の葉たばこ間における差異について論じる。5章では、葉たばこを含む植物に普遍的に含まれる Phytosterol とその誘導体に焦点を当て、それらの分離、構造推定、定量分析方法の構築、種々の葉たばこ間における差異について論じる。2章から5章は、低極性不揮発性成分が、種々の葉たばこ間における量的差異をどの程度説明可能か調べることとしたが、6章では、構築した分析方法を発展させることで、網羅的に分析する方法を開発した。そして網羅的分析によって得られた成分情報に基づき、モデル化を行い、葉たばこの品質に関係すると考えられてきた葉面樹脂成分のうち、低極性不揮発性成分により様々な葉たばこの品質を判断可能か検証した。

2 章 Solanesol とその誘導体の分析

2-1 序論

Solanesolは葉たばこに含まれる炭素数45のトリセスキテルペノイドアルコールの一つであり、長鎖のテルペン骨格と、末端に一つの水酸基を含む(Figure 2-1)。この化合物は、黄色種から単離・同定され (R. L. Rowland P. H., 1956)、コエンザイム Q10 との構造上の類似から、ある時期には合成開始化合物として有名になった (B. H. Lipshutz, 2002)。またこの化合物は、喫煙燃焼時のたばこの味や香りとの関係性や (Davis, 1976)、環境中たばこ煙濃度のマーカーとしての有用性が報告されたこともあり (M. W. Ogden, 1989) (R. Zhou, 2000)、葉たばこ内容成分としてはよく知られる。過去にも、液体クロマトグラフィー (Y. Zhao Q. D., 2007) (H. Zhou C. L., 2006) (R. N. Rao, 2008) (C. Zhao, 2007) (J. Chen, 2007)や、ガスクロマトグラフィー (R.F. Severson, 1977) (W. J. Chaberlain, 1990)を分離部とし、様々な検出器と組み合わせた、分析方法が報告されてきている。



1: Solanesol : R = OH

2: Solanesyl ester : R = O₂CR'

Figure 2-1 Solanesol とその誘導体の化学構造

Solanesol の水酸基にエステル結合する脂肪酸の R' 部は、飽和、あるいは不飽和の長鎖脂肪酸とされる。

一方で Solanesol の水酸基が脂肪酸によりエステル化された、Solanesyl ester 類(Figure 2-1)も、葉たばこに含まれていることが、報告されており (R. L. Rowland P. H., 1959) (C. E. Cook, 1969)、それらが、たばこの喫煙燃焼時の味と香りに関係する可能性が示唆されている (Davis, 1976)。しかしながら、Solanesyl ester は、適当な分析方法がなかったことから、エステル結合を加水分解したのちに、遊離になった Solanesol と、脂肪酸を同定、定量するという方法が採られてきた。加水分解を実験手順に含めているため、再現性の低下、他の化合物由来の脂肪酸によるコンタミネーション、操作上の煩雑さが避けられない。そのため著者は、葉たばこ中の Solanesyl ester の構造推定と定量を、加水分解を経ることなく、直接実行する方法構築を目標とし、様々な葉たばこで定量的な観察を行うこととした。

加水分解を含まない分析方法には、低極性成分の分離に有効とされる、非水系逆相クロマトグラフィー (Non-Aqueous Reversed Phase Chromatography : NARPC) (N. A. Parris, 1978)を用いることとした。NARPC を使用した最近の研究では、Steroid ester (D. J. Chitwood, 1991) (P.

Jandera, 1991)、Triacylglycerol (V. M. Kapoulas, 1986) (E. Salivaras, 1992) (J. S. Amaral S. C., 2004)や Ceramide (K. Gaudina, 2000)など、低極性で類似した構造を有する化合物群の、分離が盛んに報告されてきている。そこで同じように低極性の類似構造を有する Solanesyl ester 類の分離にも、この方法が有効ではないかと考えた。

検出器としては、質量分析装置 (MSD)は、未知化合物の同定に必要な情報を与え、クロマトグラムの分離が不十分でも、MSD のマスフィルターで独立したピークを得ることが出来ると考え、NARPC と組み合わせることとした。一般的には、LC と組み合わせる MSD は、汎用性の観点から、導入部をエレクトロスプレーイオン化法 (ESI)とすることが多い。しかし、ESI によるイオン化機構は、溶離液にイオンが多く含まれていることが望ましく、非水系の溶離液は、組み合わせとして適当ではない。そのため、低極性かつ不揮発性の化合物を、溶離液からコロナ放電により生じさせたプロトンの付加により、強制的にイオン化させられる、大気圧化学イオン化法 (APCI)を MSD の導入部とした。APCI-MSD を使用した、Triacylglycerol (A. Jakab, 2002) (M. Lísá M. H., 2008)のような低極性不揮発性成分の分析が報告されているので、効率的な分離と、未知の Solanesyl ester の検出が出来るものと期待した。

初めに、NARPC と APCI-MSD の組み合わせによる、Solanesyl ester の分離と検出の検討について述べる。次に、分析方法の妥当性検証のために、標準化合物の濃度線形性 (Linearity)、検出・定量限界 (Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ)、添加回収率 (Recovery rates) の結果を示し、最後に、定量結果ならびに各種葉たばこにおける量的差異をまとめる。

2-2 実験方法

2-2-1 サンプルおよび試薬類

葉たばこは、Japan Tobacco Inc. (Yokohama, Japan)の所有する、各国ならびに各産地の *Nicotiana tabacum* (黄色種 : Flue-cured Virginia (FCV), バーレー種 : Burley (BLY), オリエン特種 : Oriental (ORI), 在来種暗色気干葉 : Dark-air cured (DAC), 暗色火干葉 : Dark-fire cured (DFC), 在来種暗色日干葉 : Sun-air cured (SAC)、中骨 : stem)および、暗色日干の *Nicotiana rustica* を Solanesyl ester 分析に供した (Table 10-1)。抽出ならびに液体クロマトグラフィーによる分析に向けて使用した溶媒は、全て HPLC グレードとし、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan)製を使用した。構造推定と単離に向けた、標品の Solanesol と Solanesyl ester は、以下の試薬を使用、あるいは合成、精製して調製された。Solanesol、Heptadecanoyl chloride (C17)、Linolenoyl chloride (C18:2)、Arachidic anhydride (C20)、Behenic anhydride (C22)、N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)製を使用した。Palmitoyl chloride (C16)、Myristoyl chloride (C14)、Oleoyl chloride (C18:1)、Acetic

anhydride (C2)、Dehydrated pyridine、4-Dimehtyl amino pyridine は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo Japan)製を使用した。 α - Linolenic acid (C18:3)、Stearoyl chloride (C18)、Pentadecanoyl chloride (C15)は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)製を使用した。合成時の溶媒として使用した、Dehydrated tetrahydrofuran (THF) は、Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)製を使用した。

2-2-2 サンプルの調整

約 100 g の葉たばこをサイズ 1 mm のメッシュを備えた粉砕機 (Nara Machinery Co., Ltd., Tokyo, Japan)により粉砕した。粉砕された葉たばこ 2.5 g を精秤し、金属製の 22 mL 耐圧セル (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA)に入れ、続けて空隙を埋めるために海砂を充填した。このセルを確実に密閉し、高速溶媒抽出器 ASE200 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) に装着した。すべての葉たばこの抽出は、この ASE200 で自動的に実行され、抽出溶媒は HPLC グレードの *n*-hexane を用いた。*n*-hexane による抽出は、溶媒のセルへの充填、セルの静置 (70°C、2000 psi)、抽出液の回収を 1 サイクルとして、3 回行った。一つのセルからの抽出では、おおむね 40 mL の *n*-hexane を要した。合計 4 セル (葉たばこ換算で 10 g) からの抽出液を、250 mL のメスフラスコに定容した。その後、A グレードの 10 mL ホールピペットで、抽出液を量りとり、ナスフラスコに移し、真空エバポレーターで溶媒を留去した。乾固した抽出物に、ホールピペットで測り取った 10 mL の HPLC グレードの Acetone を加え、超音波洗浄機で確実に懸濁させた。この懸濁溶液は、0.20 μ m ポアサイズの Millex-LG (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) シリンジフィルターによって不溶成分をろ過により除き、これを分析用のサンプル溶液とした。ろ過後のサンプル溶液は、密閉性の遮光性瓶に入れて保存した。

2-2-3 水分測定

粉砕した葉たばこ 2.0 g を耐熱性の恒量缶に量りとり、80°C にて 3 時間乾燥した。乾燥後の葉たばこは、デシケーター内にて 1 時間放冷し、重量測定を行った。重量の差分を、水分量とし、定量分析を行う際の、乾物定量値 (Dry base : D.B.) の計算根拠とした。

2-2-4 分離カラムと分析装置条件

分析には、液体クロマトグラフィー質量分析装置として、DAD G1315C、G1379B degasser、G1312B Binary pump SL、G1367C Hip-ALS SL、G1330B FC/ALS therm、6130 APCI-MSD を備えた、Agilent 1200 HPLC system (Agilent Tech., CA, USA) を使用した。分析用のカラムは、Excelpak SIL-C18/5C (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m, Yokogawa Analytical Systems, Japan

(Agilent Tech.から入手))を用い、以下の溶離液条件を適用した。溶離液 A : Acetonitrile、溶離液 B : Acetone ; 流速 : 1.0 mL/min ; グラジエント条件 : 溶離液 A 100% (0 min)、溶離液 A 30% (10 min)、溶離液 A 20% (30 min)、溶離液 A 0% (40 min)、溶離液 A 0% (B 100%) (55 min まで維持)。またカラムの温度は 25°Cとした。PDAD を LC に接続しているとき、あるいは MSD をスキャンモードで使用する際には、カラムへのサンプル溶液注入量を、50 μ L とし、定量分析を行う際には 3 μ L とした。PDAD による波長吸収の測定は、測定波長を 205 nm とし、リファレンス波長を 360 nm とした。APCI-MSD の測定条件は、以下の通りとした。イオン化モード : ポジティブ ; キャピラリー電圧 (Capillary Voltage) : 4000 V ; コロナ電流 (Corona Current) : 10 μ A ; 乾燥ガス流量 (drying gas flow) : 5 mL/min ; 乾燥ガス温度 (drying gas temperature) : 350°C ; フラグメンター電圧 (fragmentor voltage) : 200 V ; ネビュライザー圧力 (nebulizer pressure) : 60 psi ; ベーポライザー温度 (vaporizer temperature) : 500°C。APCI-MSD のデータ取り込み条件は、以下の通りとした。Threshold : 150 ; Gain : 1.0 ; Stepsize : 0.10 ; Peak width : 0.30 min。葉タバコのサンプル溶液中に含まれる Solanesyl ester の構造推定は、あらかじめ合成した標品と、クロマトグラム上の保持時間ならびに質量スペクトルを比較した。定量分析を行う際には、APCI-MSD を Selected ion monitoring mode (SIM mode)に切り替え、613.6 m/z の Solanesol および Solanesyl ester の特徴的なフラグメントを検出する設定とした。測定した全てのデータは、装置付属のソフトウェア、Chemstation (Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA)で解析した。

2-2-5 Solanesyl ester 標品の合成

Solanesol のエステル化は、基本的に塩基存在下にて、酸無水物または酸ハライドによりアシル化する方法を採った。Solanesyl linolenate (C18:3)のみ、遊離の Linolenic acid と N, N'-dicyclohexyl- carbodiimide (DCC)を使用した。酸無水物を使用する Solanesol のエステル化は、高純度アルゴンを置換した、100 mL ニロナスフラスコ内において、無水 THF およそ 50 mL に純度 95%以上の Solanesol を 5 g 溶解させることから開始した。そこに Dehydrated pyridine(3 eq)を、シリンジにより滴下した後に、触媒量の 4-dimethylaminopyridine (DMAP)を加えて、さらに 10 min 以上攪拌した。その後、対応する上記記載の酸無水物(3 eq)を、反応物にシリンジにて滴下した。反応は室温で、少なくとも 6 時間以上攪拌を続けた。0.05 M の塩酸水溶液(10 mL)にて反応を停止し、さらに 20 min 以上の間、氷浴中にて攪拌を続けた。その後、混合物を、200 mL の分液漏斗に移し、30 mL 程度の n-hexane により、3 回抽出を行った。集めた有機層は、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した後に、無水硫酸ナトリウムを加えることで、水分を取り除いた。酸ハライドを使用する Solanesol のエステル化では、DMAP を使用せず、全ての反応過程において、反応

温度は 0℃で行った。ほかの反応条件は、酸無水物を使用するエステル化と同一とした。また Solanesyl linolenate の場合は、Dehydrated pyridine を加える代わりに、DCC(4 eq)を反応物に加え、Linolenic acid を加える前に、十分に DCC を Solanesol と反応させるために、2時間ほど室温にて攪拌を行った。Solanesol が DCC と十分に反応した場合、THF の白濁化が見られた。以後の生成物を抽出するまでの操作は、酸無水物と同一の手順をとった。

エステル化された Solanesol は、n-hexane/Ethyl acetate = 90/10 を溶離液、担体を関東化学製のシリカゲル 60 (Tokyo, Japan) とした順相カラムクロマトグラフィーによる分離、続けて、Acetonitrile/Acetone = 30/70 を溶離液、担体を Waters 製の RP18 とした逆相カラムクロマトグラフィー(Millifred, MA, USA)により精製した。精製後の Solanesyl ester は、飽和脂肪酸が結合している場合は、n-hexane と Ethanol の混合溶媒からの再析出、ろ過することで精製した。また不飽和脂肪酸が結合している場合は、室温で液体状になるため、カラムクロマトグラフィーによる精製物を、標品とした。エステル化の収率は、70%から 90%であった。Solanesol (市販品) と Solanesyl ester (合成品) は、葉たばこ中の成分の構造推定ならびに定量に使用したが、分析に供するまでは、大気中のオゾンによる分解を防ぐために、高純度アルゴンを封入した遮光性のガラス瓶にて保存した (S. P. Tucker, 2005)。

2-2-6 定量分析結果の統計解析

全ての定量結果は、事前に葉たばこから抽出し、サンプル溶液を、3回繰り返し分析を行い、その結果に標準偏差を付した平均値とした。Solanesol と Solanesyl ester の分析結果を総合的に解釈するために、主成分分析(Principal Component Analysis : PCA)に供したが、その解析には、市販の統計解析ソフトウェア JUSE-statworks/V4.0 sw4 (Union of Japanese Scientists and Engineers, Tokyo, Japan)を使用した。

2-3 結果と考察

2-3-1 分離方法の検討

葉たばこに含まれる Solanesyl ester の化学構造が似通っていることから、順相系のクロマトグラフィーでは分離が難しいと予想されたため、初めに PDAD を検出器とし、逆相系のクロマトグラフィーによる検討から開始した。Figure 2-2 は黄色種の抽出液を、波長 205 nm で検出したクロマトグラムである。最も大きなピークは、標品との保持時間による比較から Solanesol と分かった。一方で Solanesyl ester がエステル構造であること、逆相系の液体クロマトグラフィーでは低極性の成分が、より強くカラムに保持されることを考慮すると、クロマトグラムの後半部に、目的化合物が溶出している可能性がある。実際、ピークがまとまっている部分がクロマトグラム上においても確認された。しかしながら、通常の逆相系のクロマトグラフィーでは、十分な分離が得られていないため、分離系を改善することとした。

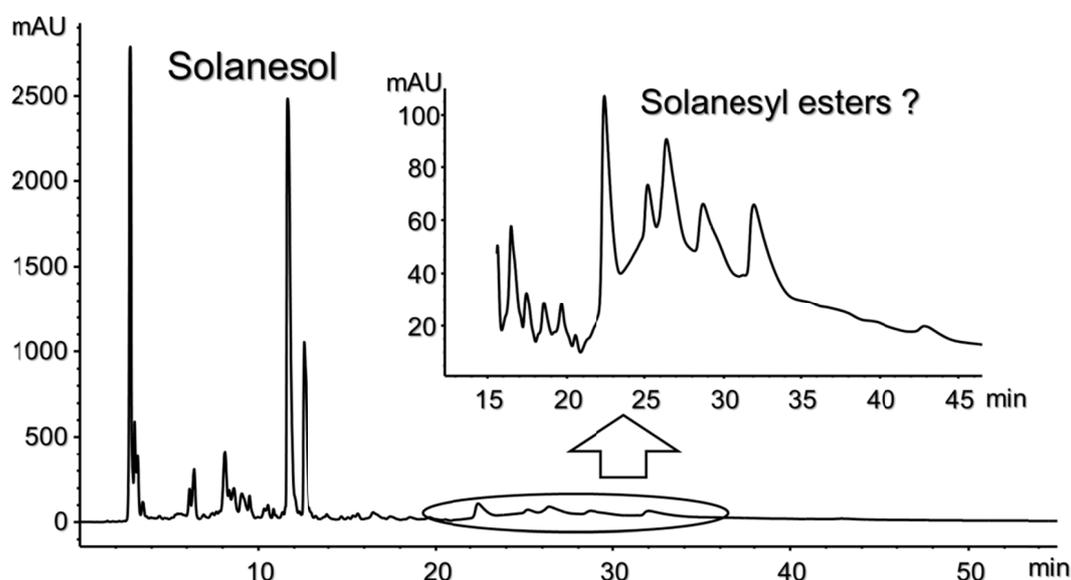


Figure 2-2

水系逆相クロマトグラフィーと PDAD (205 nm)による葉たばこ抽出液のクロマトグラム

PDAD の吸収波長を 205 nm とし、水系の逆相クロマトグラフィーを組み合わせた RPLC による、1997 年産の米国産黄色種葉たばこ(252)のクロマトグラム。溶離液の組成は水を 10%、Acetonitrile を 90%の開始条件とし、線形的なグラジエントで 10 分後に Acetonitrile を 100%まで増加させ、その後 45 分間条件を維持した。流量は 1 mL/min とし、サンプル注入量は 50 μ L とした。その他の分析条件については、実験の部 2-2-4 に記載。

逆相系の溶離液として、水を使用することなく、Acetonitrile と Acetone のみを使用した非水系逆相クロマトグラフィー (NARPC)を適用した際の、クロマトグラムを Figure 2-3 に示す。この分離系により、非水系の逆相クロマトグラフィーでは、分離が不十分であったピーク群が分離できた。しかしながら、吸収波長を 205 nm とした場合、溶離液の Acetone が 240 nm 程度で最大吸収を有しているため、ベースラインがクロマトグラム上側にドリフトしており、50 μ L という注

入量の大きさの割には不十分なピーク強度であった。

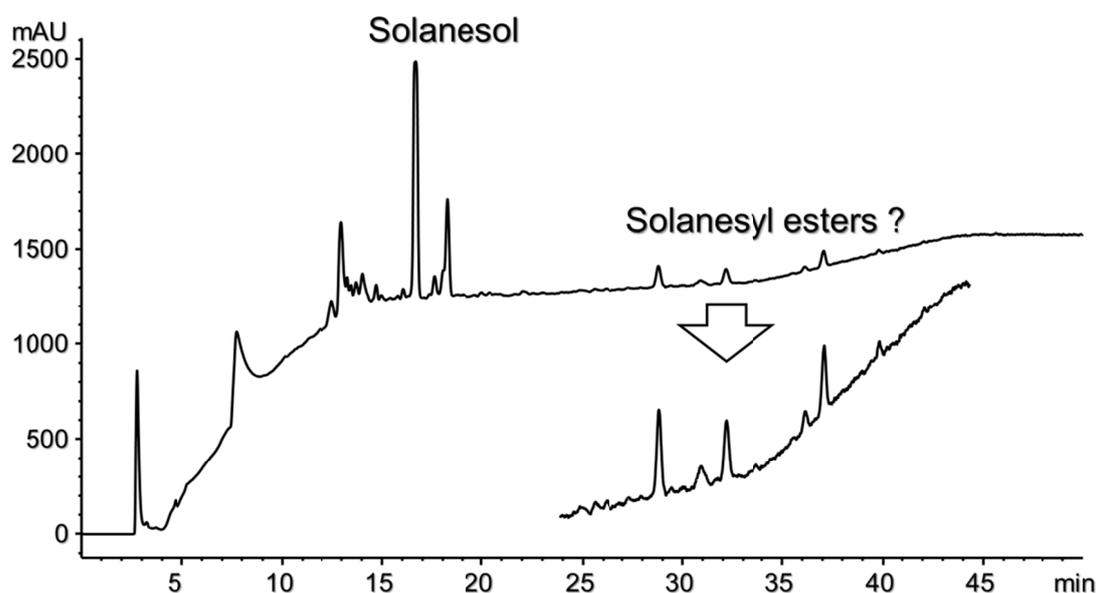


Figure 2-3

非水系逆相クロマトグラフィーと PDAD (205 nm)による葉たばこ抽出液のクロマトグラム

PDADの吸収波長を205 nmとし、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせたRPLCによる、1997年産の米国産黄色種葉たばこ(252)のクロマトグラム。サンプル注入量は50 μ Lとした。その他の分析条件については、実験の部2-2-4に記載。

このためPDADに代わって、APCI-MSDを検出器として、非水系の逆相クロマトグラフィーに組み合わせることとした(Figure 2-4)。クロマトグラム中で最大のピークは、PDADを検出器とした場合と同様にSolanesolであった。質量スペクトルを確認すると、プロトンが付加したプリカーサーイオン ($M+H^+$)はほとんど確認できず、水分子が脱離したと考えられるプロダクトイオン (613.6 m/z)が、最大の強度を示していた。この結果は、Solanesolの質量分析装置のイオン化における、フラグメンテーションパターンに関する既報と一致していた (E. Salivaras, 1992)。また非水系の逆相クロマトグラフィーを適用することで確認されたエステル体と予想されるピークも、Solanesolと同じ m/z のプロダクトイオン (613.6 m/z)が観測された。これらの質量スペクトル上には、Solanesyl esterのプリカーサーイオン ($M+H^+$)もわずかに観測されていることから、Solanesyl esterであることが分かり、Figure 2-5に示されているようなフラグメンテーションから、Solanesolと同じ m/z のプロダクトイオンが観測されたものと考えられた。

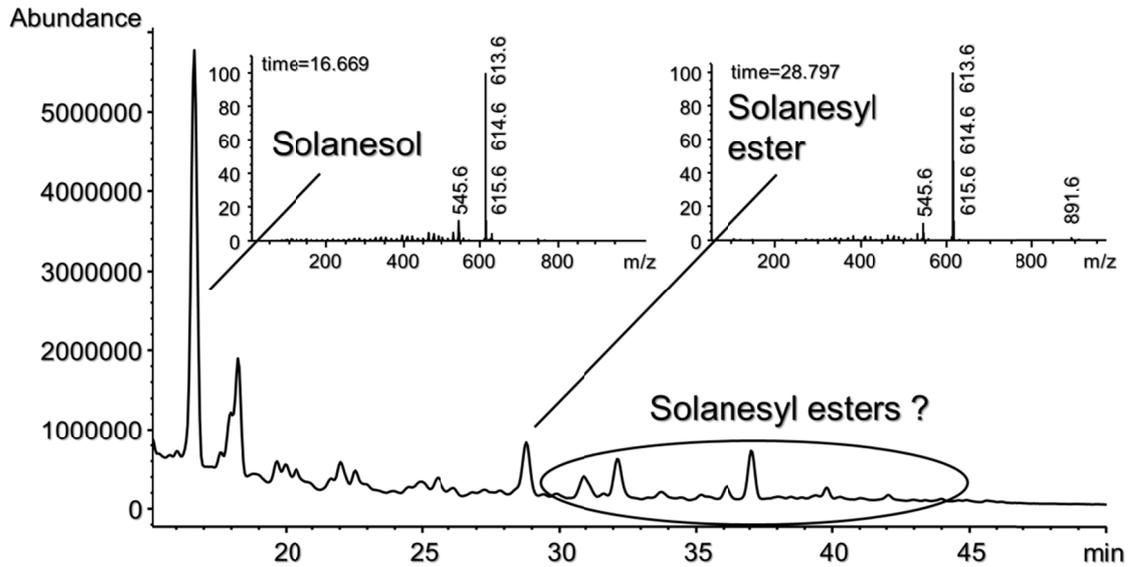


Figure 2-4

非水系逆相クロマトグラフィーと LC/APCI-MSD による葉たばこ抽出液のクロマトグラム

APCI-MSD をスキャンモードに設定し、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を組み合わせた RPLC による、1997 年産の米国産黄色種葉たばこ(252)のクロマトグラム。サンプル注入量は 50 μ L とした。その他の分析条件については、実験の部 2-2-4 に記載。

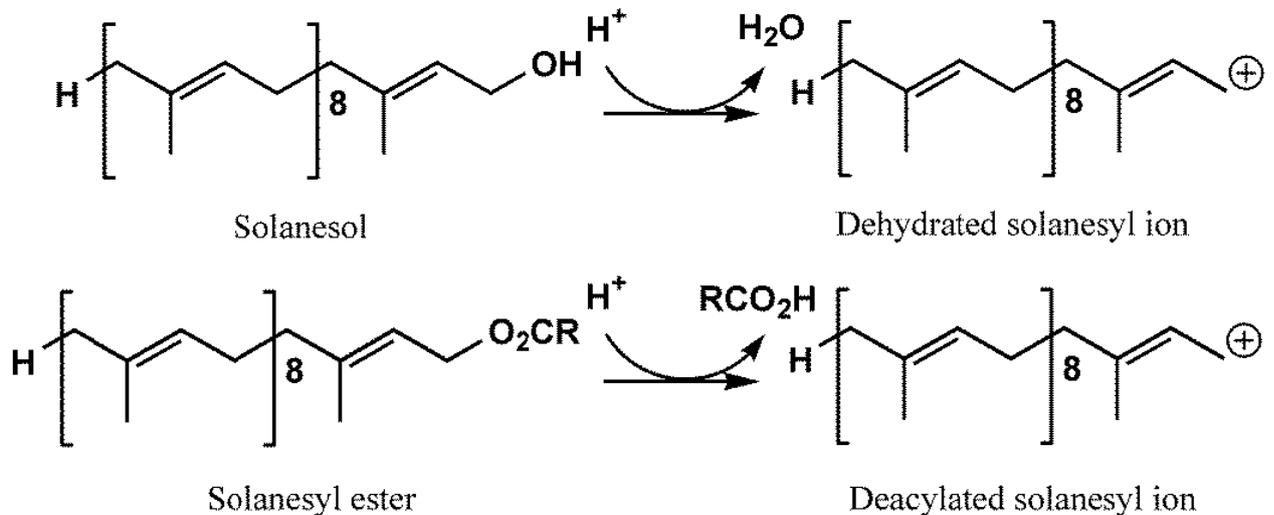


Figure 2-5

Solanesol と Solanesyl ester のフラグメンテーション機構

2-3-2 Solanesyl ester の構造推定

実験の部 2-2-2 記載の合成 Solanesyl ester を、未知ピークの構造推定のために、同一の分析系に供した。葉たばこ中の Solanesyl ester と比較したクロマトグラムを Figure 2-6 に示す。保持時間と質量スペクトルを確認することで、11 種類の Solanesyl ester を葉たばこ中に見出した (Table 2-1)。併せてカラムからの Solanesyl ester の溶出は、エステル部分の脂肪酸の炭素数が高いと遅く

なり、脂肪酸の不飽和度が高いと早くなることが分かった。また全ての Solanesyl ester は、フラグメンテーション時に、ほとんど脱アシルを経たプロダクトイオン (613.6 m/z)として観測されるものの、エステル部の脂肪酸の不飽和度が高いと、質量スペクトルにおいて、プロトンが付加したプリカーサーイオン (M+H+)が強くなる傾向が観測された。

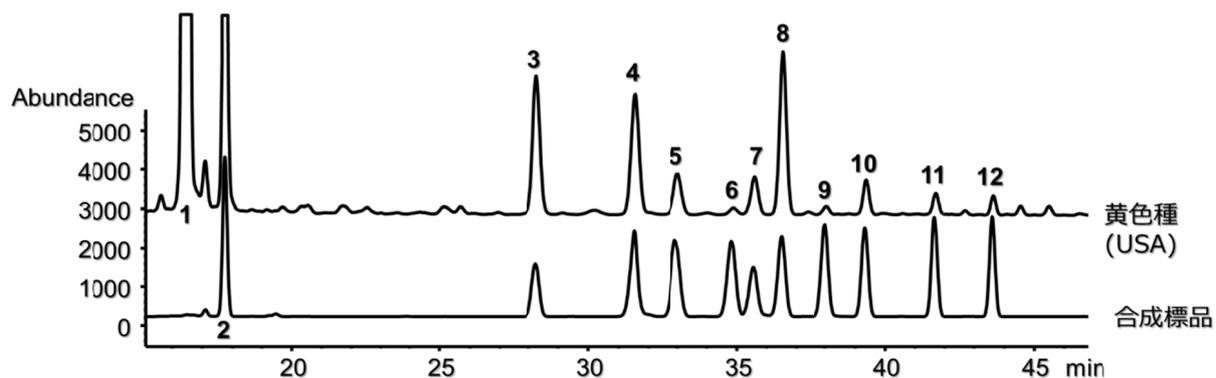


Figure 2-6

葉たばこ中および合成 Solanesyl ester の SIM モード設定した LC/APCI-MSD によるクロマトグラム

選択したイオンのみを取り込む SIM モードを設定した APCI-MSD と、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた RPLC による、1997 年産の米国産黄色種葉たばこ(252)と、合成した Solanesyl ester の Acetone 溶解液のクロマトグラム。クロマトグラム上の番号は、Table 2-1 に記載の化合物と対応。サンプル注入量は 50 μ L とした。その他の分析条件については、実験の部 2-2-4 に記載。

Table 2-1 葉たばこに含まれる Solanesol と Solanesyl ester の構造推定

Figure 2-6 のクロマトグラムにおいて標品との比較により構造推定された Solanesol と Solanesyl ester の一覧。

peak	Assignment	Abbreviation	Retention time (min)
1	Solanesol	Sol-OH	16.5
2	Solanesyl acetate	Sol-C2	17.8
3	Solanesyl α -linolenate	Sol-C18:3	28.4
4	Solanesyl linoleate	Sol-C18:2	31.7
5	Solanesyl myristeate	Sol-C14	33.2
6	Solanesyl pentadecanoate	Sol-C15	35.0
7	Solanesyl oleate	Sol-C18:1	35.7
8	Solanesyl palmitate	Sol-C16	36.7
9	Solanesyl margrate	Sol-C17	38.1
10	Solanesyl stearate	Sol-C18	39.5
11	Solanesyl arachidinate	Sol-C20	41.8
12	Solanesyl behenate	Sol-C22	43.7

2-3-3 定量に向けた分析方法の妥当性確認

葉たばこの Solanesyl ester の定量分析方法を構築する上で、これまでのところ APCI-MSD にて質量スペクトルを測定するためにスキャンモードに設定していたが、定量イオンに限定する Selected ion monitoring mode (SIM mode) に切り替えることで、ピーク強度の増大を図った。前項で触れたように、Solanesyl ester と Solanesol はいずれもフラグメンテーション時に、脱水や脱アシルを経て同一のプロダクトイオン (613.6 m/z) を与えたので、このイオンのみを質量分析装置に取り込むように設定することにした。定量の際には、市販の Solanesol と合成された Solanesyl ester を標品とし、後述の濃度水準の混合溶液をあらかじめ調製した。検量線は絶対検量線法を採用し、APCI-MSD のコロナニードルの劣化を加味するために、サンプル溶液を 10 個分析するごとに、検量線用の標準溶液を分析し、サンプルの両側の標準溶液で作成した検量線にてサンプルを定量する手順をとった。なお 1 つの葉たばこから、1 回抽出したサンプル溶液に対して 3 回定量分析を行った。

0.15 ~ 40 μ g/mL の各 Solanesyl ester と、3~800 μ g/mL の Solanesol が、それぞれ 6 種の濃度水準に調製した Acetone 溶液を、LC/APCI-MSD に供した。検量線は、標準溶液の分析から得られたクロマトグラム上の、ピーク面積により作成した。これらの化合物の検量線は、決定係数が 0.999 を超える良好な線形性を示した。葉たばこには、Solanesyl ester よりも、遊離の Solanesol のほうが量的に遥かに大きいため、検量線用の標準溶液も、800 μ g/mL のような高濃度であることが望ましかった。

検量線の線形性を確認した後に、定量分析としての妥当性を、示すために必要な、検出限界

(limit of detection (LOD))と、定量限界 (limit of quantification (LOQ))を測定した。上記の標準溶液において、最も薄い濃度に近い標準溶液、およそ 0.15 μ g/mL の各 Solanesyl ester、0.1~0.5 μ g/mL の Solanesol を含む溶液を、あらかじめ調製した。これらのサンプルを 10 回分析し、検量線から定量値ならびに定量値の標準偏差 (SD)を算出した。LOD は SD に 3 を乗じ、LOQ は SD に 10 を乗じた値とした。また定量値の再現性を示す RSD (%)を、併せて算出し、これらの結果を Table 2-2 にまとめた。各 Solanesyl ester と Solanesol の RSD (%)は、3 から 12%程度となり、定量する上では、十分な値を示した。

Table 2-2 Solanesol および Solanesyl ester の LOD,LOQ,RSD

LOD と LOQ は、検量線の最低の濃度水準に近い、別途調整した標準溶液を 10 回分析して求めた。分析条件については、実験の部 2-2-4 に記載。

	Actual conc. (μ g/mL)	Detected conc. (μ g/mL)	\pm SD (μ g/mL)	LOD (μ g/mL)	LOQ (μ g/mL)	RSD (%)
Sol-OH	0.109	0.112	\pm 0.008	0.024	0.080	7.10
Sol-C2	0.146	0.147	\pm 0.017	0.051	0.169	11.45
Sol-C18:3	0.121	0.129	\pm 0.013	0.040	0.133	10.33
Sol-C18:2	0.123	0.125	\pm 0.006	0.018	0.060	4.78
Sol-C14	0.140	0.147	\pm 0.010	0.030	0.098	6.71
Sol-C15	0.119	0.139	\pm 0.006	0.019	0.064	4.61
Sol-C18:1	0.146	0.118	\pm 0.004	0.012	0.039	3.32
Sol-C16	0.154	0.158	\pm 0.009	0.028	0.094	5.94
Sol-C17	0.142	0.143	\pm 0.004	0.013	0.044	3.07
Sol-C18	0.139	0.141	\pm 0.010	0.029	0.098	6.93
Sol-C20	0.135	0.131	\pm 0.006	0.017	0.057	4.36
Sol-C22	0.143	0.141	\pm 0.009	0.026	0.086	6.09

続けて添加回収試験を行った。添加回収率は、葉たばこ抽出液に含まれる分析対象の濃度に近い、複数の濃度水準の標準溶液を、その葉たばこ抽出液に加え、求められた定量値から、回収率を算出した。測定は 3 回繰り返し、以下の計算式により回収率 (%)を求めた。

$$\text{添加回収率 (\%)} = (A-B)/C$$

A = 標準溶液を添加した、葉たばこ抽出液の分析対象化合物の濃度

B = 葉たばこ抽出液の分析対象化合物の濃度

C = 標準溶液の分析対象化合物の濃度

算出された Solanesol と Solanesyl ester の添加回収率を、Table 2-3 にまとめた。ほぼすべての化合物で、80 から 120%の回収率となり、RSD も 10%を下回ったため、定量分析に向けて、十分な検証データが得られたと判断した。

Table 2-3 添加回収試験結果

添加回収試験は、2008 年産のトルコ産オリエント種のサンプル溶液に、標準溶液を添加し、定量分析した結果から、無添加時の結果を減じることで回収率を算出した。全ての定量結果は、事前調製したサンプル溶液を3回分析して求めた。分析条件については、実験の部 2-2-4 に記載。

Compound	Added (μ g/mL)	Detected (μ g/mL)	SD (μ g/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Compound	Added (μ g/mL)	Detected (μ g/mL)	SD (μ g/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Sol-OH	0.0	339.8	± 24.9		7.3	Sol-C18:1	0.0	3.2	± 0.3		8.7
	200.8	578.8	± 60.6	119.0	10.5		1.3	4.3	± 0.4	83.0	9.7
	401.5	786.4	± 52.4	111.2	6.7		2.6	5.3	± 0.4	81.0	7.1
							11.8	13.5	± 0.9	87.6	6.3
Sol-C2	0.0	15.5	± 1.1		7.2	Sol-C16	0.0	12.3	± 1.8		14.7
	5.9	20.8	± 1.5	89.8	7.2		6.2	17.2	± 1.5	78.3	9.0
	11.8	28.3	± 1.9	108.1	6.7		12.4	24.6	± 1.8	99.2	7.3
	23.7	39.6	± 3.1	101.7	7.8		24.9	36.5	± 2.0	97.2	5.4
Sol-C18:3	0.0	11.6	± 1.3		11.5	Sol-C17	0.0	0.5	± 0.1		11.2
	4.9	16.2	± 1.4	93.3	8.4		0.3	0.8	± 0.0	113.2	6.0
	9.8	22.3	± 2.1	109.3	9.5		0.6	1.1	± 0.0	108.8	3.3
	19.6	30.8	± 1.8	98.2	5.8		1.3	1.8	± 0.2	105.4	10.9
Sol-C18:2	0.0	8.2	± 0.4		4.7	Sol-C18	0.0	1.9	± 0.2		9.0
	5.0	12.8	± 0.8	92.1	6.2		0.6	2.6	± 0.0	109.8	1.6
	9.9	18.7	± 1.5	105.1	8.3		1.3	3.3	± 0.3	106.1	8.6
	19.9	27.5	± 2.6	97.0	9.4		2.5	4.6	± 0.2	106.6	5.3
Sol-C14	0.0	2.8	± 0.3		10.4	Sol-C20	0.0	1.2	± 0.1		7.6
	1.3	4.2	± 0.3	113.7	8.1		0.6	1.8	± 0.1	97.4	6.2
	2.5	5.5	± 0.4	107.8	6.9		1.2	2.5	± 0.2	105.7	8.2
	5.7	8.4	± 0.9	99.6	10.1		2.4	3.7	± 0.2	102.3	6.3
Sol-C15	0.0	0.4	± 0.0		5.4	Sol-C22	0.0	1.1	± 0.1		6.7
	0.2	0.7	± 0.0	134.1	6.6		0.6	1.8	± 0.1	110.3	4.3
	0.5	1.0	± 0.0	122.0	2.3		1.3	2.5	± 0.2	107.2	9.0
	1.1	1.7	± 0.2	121.0	10.6		2.6	3.8	± 0.3	106.4	7.3

2-3-4 定量分析結果と葉たばこ間における量的差異

種々の葉たばこの定量結果は Table 2-4 に示した。葉たばこには Solanesol が非常に多く、Solanesyl ester は相対的に少ないことが分かる。既往の Solanesyl ester の加水分解後の脂肪酸を分析した報告によれば、Sol-C18:3 (80 μ g/g), Sol-C18:2 (40 μ g/g), Sol-C18:1 (10 μ g/g), Sol-C14 (1.5 μ g/g) and Sol-C16 (110 μ g/g)としており (R. L. Rowland P. H., 1959)、定量値のスケールは近い。一般的に植物中には含まれない炭素数が奇数の脂肪酸が含まれており過去の報告と一致していた (A. Rodman, 2008)。また Solanesol 誘導体の総量のみを分析した、既往の研究 (R.F. Severson, 1977) (W. J. Chaberlain, 1990) (J. C. Leffingwell, 1999) (S. J. Sheen, 1978)によれば、Solanesol 誘導体の Solanesol に対する割合は、葉たばこの種類にもよるが、例えば 14~19% (R.F. Severson, 1977)、1~30% (W. J. Chaberlain, 1990)であったと報告とされており、概ね本研究の結果と一致した。逆に言えば、Solanesol 誘導体の大半はエステル体であり、本分析方法で葉たばこに含まれる Solanesol 類を全て検出できることになる。Solanesol 類は環境煙マーカー (M. W. Ogden, 1989) (R. Zhou, 2000)とし分析方法が盛んに研究されており、煩雑さを除いた本研究はその一助になる。サンプル数を増やした定量結果を、主成分分析(Principal Component Analysis:PCA)に供した (Figure 2-7)。遊離の Solanesol 量が Solanesyl ester 量よりも著しく大きいため、分散共分散行列 (Variance-covariance matrix:VCM) を PCA の開始行列とすると、Solanesol の影響が強くなる。そのため各成分の定量値を標準化した相関係数行列 (correlation coefficient matrix : CCM) を採用した。第一第二主成分の累積寄与率は 72%となり、散布図に定量値の分散が十分反映されていることが分かった。そのうえで、主成分散布図と負荷量散布図を観察すると、第一主成分 (58%) 方向左側に Solanesol が少ない中骨があり、右側にラミナが集中していることから、Solanesol 類全体の量に関係すると解釈された。一方で、寄与率は低いものの第二主成分(13%)方向では、バルク乾燥葉 (黄色種) が散布図下方にあり、空気乾燥葉 (パーレー種、在来種) が上方にある。負荷量散布図では、第二主成分の正方向には、飽和度の高い脂肪酸が結合した Solanesyl ester が付置しており、負方向には、不飽和度の高い脂肪酸が結合した、Solanesyl ester が寄与付置しているため、乾燥 (キュアリング) 過程と、結合脂肪酸の飽和度に関係性が推定された。散布図を俯瞰した限りでは、品種の異なる葉たばこが、離れて付置されなかったため、葉たばこの差異を説明するには、Solanesol とその誘導体は不十分に見えた。

Table 2-4 葉たばこの Solanesol と Solanesyl ester の定量分析結果

1つの葉たばこに対し、1回抽出したサンプル溶液に対して、定量分析を3回繰り返した。分析条件については、実験の部 2-2-4に記載。表内の定量結果は、全て葉たばこの乾物重量に対する $\mu\text{g/g}$ (D.B.)としている。葉たばこの種類につけられた略名は以下の通り；FCV：黄色種；BLY：パーレー種；ORI：オリエント種；DAC：在来種暗色気干葉。産地記載の国名3文字表記はISO表示に準拠した。

Unit = ppm (D.B.)

黄色種 (USA)				黄色種 (BRA)					
Compound	Ave.	SD	RSD (%)	Ratio (%)	Compound	Ave.	SD	RSD (%)	Ratio (%)
Ester total	2670.0			15.5	Ester total	2546.0			22.2
Sol-C2	638.0	±18.9	3.0		Sol-C2	475.4	±33.1	7.0	
Sol-C18:3	466.5	±17.6	3.8		Sol-C18:3	633.2	±34.4	5.4	
Sol-C18:2	398.9	±11.8	3.0		Sol-C18:2	465.0	±26.7	5.7	
Sol-C14	144.2	±7.1	4.9		Sol-C14	71.7	±3.5	4.8	
Sol-C15	22.9	±1.4	6.2		Sol-C15	21.8	±1.8	8.4	
Sol-C18:1	155.3	±4.9	3.2		Sol-C18:1	177.0	±10.2	5.8	
Sol-C16	580.8	±16.7	2.9		Sol-C16	532.5	±31.6	5.9	
Sol-C17	28.5	±1.9	6.8		Sol-C17	21.3	±0.6	2.7	
Sol-C18	111.4	±0.6	0.5		Sol-C18	89.7	±2.8	3.2	
Sol-C20	66.9	±1.4	2.1		Sol-C20	33.0	±1.9	5.7	
Sol-C22	56.7	±0.7	1.3		Sol-C22	25.3	±1.7	6.7	
Sol-OH	17195.4	±319.5	1.9		Sol-OH	11488.8	±481.5	4.2	

パーレー種 (BRA)				パーレー種 (USA)					
Compound	Ave.	SD	RSD (%)	Ratio (%)	Compound	Ave.	SD	RSD (%)	Ratio (%)
Ester total	1538.5			12.0	Ester total	2378.4			14.7
Sol-C2	354.8	±15.4	4.3		Sol-C2	455.6	±28.0	6.1	
Sol-C18:3	227.7	±13.3	5.9		Sol-C18:3	376.4	±13.0	3.5	
Sol-C18:2	252.3	±16.4	6.5		Sol-C18:2	443.7	±18.5	4.2	
Sol-C14	91.4	±4.3	4.7		Sol-C14	130.4	±2.5	1.9	
Sol-C15	41.7	±2.1	5.1		Sol-C15	72.6	±1.4	1.9	
Sol-C18:1	98.9	±4.4	4.5		Sol-C18:1	203.2	±3.2	1.6	
Sol-C16	324.2	±24.5	7.5		Sol-C16	472.1	±7.6	1.6	
Sol-C17	20.7	±1.3	6.4		Sol-C17	35.7	±1.2	3.3	
Sol-C18	61.9	±6.5	10.5		Sol-C18	93.1	±1.6	1.8	
Sol-C20	32.3	±2.3	7.2		Sol-C20	45.2	±0.3	0.7	
Sol-C22	32.6	±1.8	5.5		Sol-C22	50.2	±1.3	2.6	
Sol-OH	12836.0	±500.9	3.9		Sol-OH	16230.8	±641.7	4.0	

Unit = ppm (D.B.)

Compound	オリエント種 (GRC)				Compound	オリエント種 (TUR)			
	Ave.	SD	RSD (%)	Ratio (%)		Ave.	SD	RSD (%)	Ratio (%)
Ester total	2252.6			28.9	Ester total	2546.7			34.7
Sol-C2	171.0	±3.8	2.2		Sol-C2	107.0	±2.6	2.5	
Sol-C18:3	789.1	±10.4	1.3		Sol-C18:3	1107.6	±27.9	2.5	
Sol-C18:2	306.7	±5.0	1.6		Sol-C18:2	299.2	±7.6	2.5	
Sol-C14	52.7	±8.4	15.9		Sol-C14	57.7	±3.8	6.5	
Sol-C15	43.5	±4.1	9.4		Sol-C15	12.3	±1.0	8.3	
Sol-C18:1	197.9	±11.1	5.6		Sol-C18:1	171.5	±4.7	2.7	
Sol-C16	516.4	±6.8	1.3		Sol-C16	579.2	±19.9	3.4	
Sol-C17	16.2	±0.1	0.8		Sol-C17	16.3	±0.7	4.4	
Sol-C18	98.4	±4.5	4.6		Sol-C18	118.5	±2.5	2.1	
Sol-C20	33.1	±0.6	1.7		Sol-C20	45.0	±1.0	2.3	
Sol-C22	27.5	±1.0	3.8		Sol-C22	32.4	±1.2	3.6	
Sol-OH	7792.3	±320.2	4.1		Sol-OH	7342.2	±193.9	2.6	

Compound	在来種暗色気干葉 (PHL)				Compound	在来種暗色気干葉 (BRA)			
	Ave.	SD	RSD (%)	Ratio (%)		Ave.	SD	RSD (%)	Ratio (%)
Ester total	2686.1			65.9	Ester total	1763.7			25.1
Sol-C2	75.6	±4.6	6.1		Sol-C2	110.3	±10.3	9.4	
Sol-C18:3	554.9	±16.7	3.0		Sol-C18:3	420.5	±7.4	1.8	
Sol-C18:2	334.2	±30.5	9.1		Sol-C18:2	304.7	±21.7	7.1	
Sol-C14	94.6	±9.3	9.8		Sol-C14	93.5	±3.7	4.0	
Sol-C15	48.2	±3.3	6.9		Sol-C15	53.6	±4.4	8.2	
Sol-C18:1	406.2	±36.9	9.1		Sol-C18:1	146.1	±11.2	7.7	
Sol-C16	813.7	±51.4	6.3		Sol-C16	426.4	±32.3	7.6	
Sol-C17	32.4	±4.3	13.3		Sol-C17	25.2	±2.7	10.8	
Sol-C18	186.2	±14.7	7.9		Sol-C18	95.1	±8.1	8.5	
Sol-C20	70.9	±4.5	6.3		Sol-C20	45.3	±4.6	10.2	
Sol-C22	69.2	±5.1	7.4		Sol-C22	43.0	±3.3	7.6	
Sol-OH	4073.2	±314.1	7.7		Sol-OH	7030.0	±323.5	4.6	

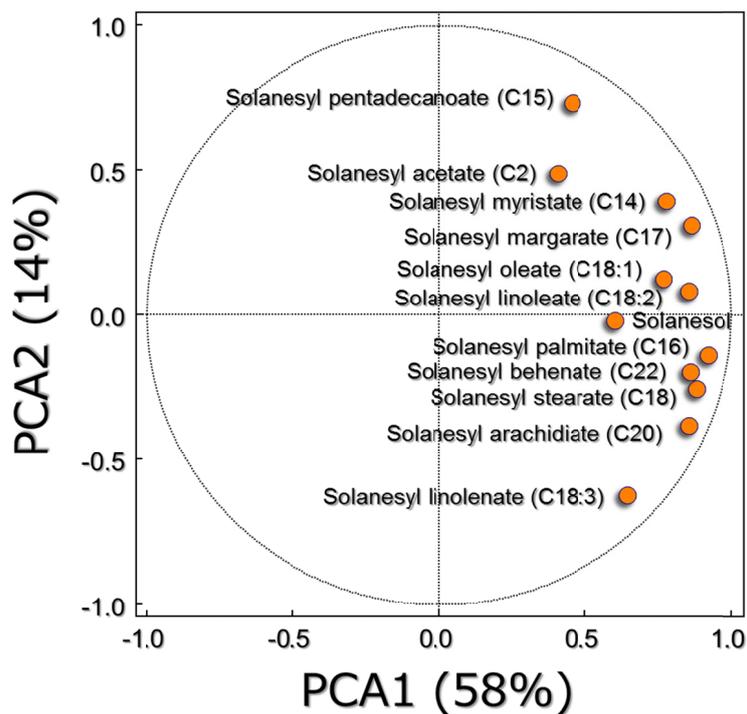
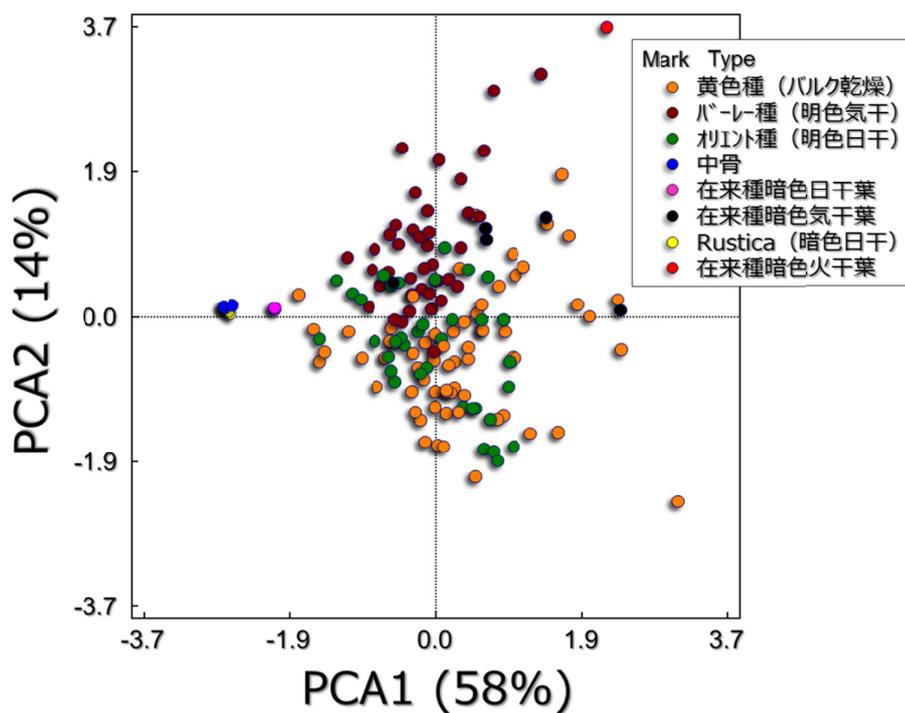


Figure 2-7 葉たばこ Solanesol と Solanesyl ester の定量データに基づく主成分得点散布図

上図は主成分得点散布図であり、葉たばこの乾燥（キュアリング）方法ごとにプロットを色分けした。プロットに付与された文字列は、“品種”を表す。下図は主成分負荷量散布図。なお1つの葉たばこに対し、1回抽出したサンプル溶液に対して3回定量分析を行った。分析条件については、実験の部 2-2-4 に記載。

2-4 小括

本研究で、非水系の逆相クロマトグラフィーと LC/APCI-MSD を組み合わせることで、加水分解過程を省き、葉たばこに含まれる Solanesyl ester の構造を推定し、定量分析する方法を構築した。Solanesyl arachidate (C20)、Solanesyl behenate (C22)、Solanesyl pentadecanate (C15) は、葉たばこで初めて報告された化合物であった。質量分析装置に導入された Solanesyl ester は、フラグメンテーションを起こし、プロトンが付加したプリカーサーイオンから、脂肪酸が脱離していくことが、質量スペクトルから推測された。そのため 613.6 m/z のプロダクトイオンを検出することで、イオン選択性が極めて高い定量分析方法を開発することが出来た。Solanesol 誘導体を包括的に測定する場合は、一般的に煩雑な加水分解を経る必要があるが、本方法は、その問題を解決する可能性を示した。また定量結果から、葉たばこに含まれる遊離の Solanesol を除く Solanesol 誘導体は、過去の報告と同様に、大半が Solanesyl ester であることが確認できた。Solanesyl ester のエステル部に結合した脂肪酸は、軽度な乾燥を受けた品種（黄色種）には不飽和型が多く、乾燥が進んだ品種（バーレー種）には飽和型が多い傾向が、主成分得点散布図から読み取られた、しかし、本研究で対象とした Solanesol とその誘導体は、葉たばこの差異を十分に説明する成分では無いものと考えられた。

3 章 葉緑素とその誘導体の分析

3-1 序論

葉緑素は植物の成長において、極めて重要な役割を果たす。これは植物細胞の葉緑体に含まれるチラコイドルーメンに葉緑素が存在し、そこで外部から吸収した光エネルギーにより、二酸化炭素と水を、酸素と糖へ最終的に変換する光合成反応と密接に関係しているためである (J. M. Berg, 1995)。このダイナミックな光合成機構への科学的な興味のみならず、将来的な応用展開を期待し、多くの研究者によって研究されてきた。

葉緑体において、葉緑素が果たす様々な機能は、代表成分である Chlorophyll 自体の、化学構造と関係があると考えられている (D. Dolphin, 1978)。Chlorophyll は、ポルフィリン骨格、中心のマグネシウムイオン、そして Phytol と呼ばれるジテルペンの長鎖アルコール構造を含む。そして最も特徴的な構造は、ポルフィリン骨格を構成する四つのピロール環上のパイ電子共役系である (Figure 3-1)。この特徴的な共役系は、可視光の波長帯に二つの吸収を持ち、この吸収により Chlorophyll に特徴的で鮮やかな緑色を与え、吸収されたエネルギーは、呼吸鎖電子伝達系を經由して、酸素と糖を形成するためのエネルギーへと変換される。Chlorophyll は上記基本骨格以外に様々な修飾を受けた化合物が知られており、現在までに Chlorophyll *a*, *b*, *c1*, *c2*, *d* (W. M. Manning, 1943)、(M. Chen, 2010)が報告されている。

Chlorophyll *a* と *b* (Figure 3-1)では、可視光の吸収波長帯は、異なっており、Figure 3-1 に示されているポルフィリン骨格の末端 R₁ 基の違いに起因する (J. M. Berg, 1995) (L. P. Vernon, 1966)。Chlorophyll *b* の R₁ 位にあるアルデヒド基は、ポルフィリンのパイ電子と共役できる位置にあり、R₁ 位にメチル基を有する Chlorophyll *a* とは、共役構造に起因した可視光の波長吸収帯が異なる。そのために Chlorophyll *a* は 430 nm と 662 nm に極大吸収があり、Chlorophyll *b* は 453 nm と 643 nm に極大吸収があり、吸収波長の違いから呈する色には差異がある (L. Almela, 2000)。

また Figure 3-1 にある Chlorophyllide *a*、Pheophytin *a*、Pheophorbide *a* は、Chlorophyll の代謝物として知られる (本論文では、これらを Chlorophyll 代謝物と呼ぶ) (K. Takamiya, 2000) (J.W. Heaton, 1996) (H. Thomas, 2001) (B. Kräutler, 1999) (S. Hörtensteiner, 1999)。Chlorophyllide *a* の極大吸収は 428 nm と 662 nm であるが (L. Almela, 2000)、これは Chlorophyll *a* とほぼ等しく、R₂ 位にある末端のフィチル基が無いものの、可視光の吸収波長への影響が乏しいためか、鮮やかな緑色を呈している (L. P. Vernon, 1966)。一方で R₂ 位の末端フィトールは含むものの、ポルフィリン骨格の中心にマグネシウムイオンを含まない Pheophytin *a* は、化学構造的には、Chlorophyllide *a* のような波長吸収は示しておらず、実際、過去の報告による Pheophytin *a* の吸収波長の極大値は、408 nm と 667 nm (L. Almela, 2000)である。このことから、末端の共役系に含まれないフィトールよりも、中心のマグネシウムイオンによる、吸収波長帯への影響が大きいことが窺える。それでも、ポルフィリン骨格中のパイ電子共役系は、可視光の波長吸収を保つ

ており、やや暗い暗緑色を Pheophytin に与えている。同様に、マグネシウムイオンもフィトールも構造には含まない、Pheophorbide a (極大吸収は 408 nm と 665 nm (L. Almela, 2000)) も暗緑色を呈することが知られている。

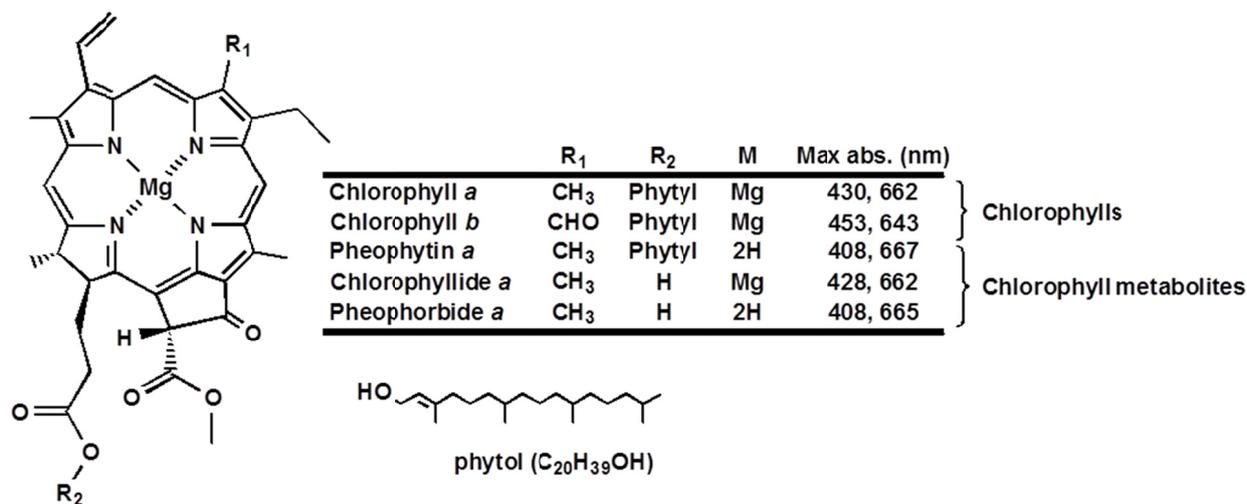


Figure 3-1 Chlorophyll と Chlorophyll 代謝物の構造と極大吸収波長

ところで植物の呈する緑色は、Chlorophyll の減少とともに、著しく低下する。Chlorophyll の減少は、収穫や落葉直後に発生する植物細胞の死と併せて、極めて急速に進行する。一方強い赤橙色を呈するカロテノイドは Chlorophyll と比較して緩やかに代謝される。落葉に赤橙色を確認できるのはこのためである。植物の一つである葉たばこも、シガレット製造に向けて収穫・乾燥・熟成過程 (R. N. Jeffrey, 1947) (H. R. Burton, 1985) (J. C. Leffingwell, 1999) を経るが、この過程において、葉たばこは他の植物と同様に Chlorophyll が減少し緑色を失う。黄色種の場合は、乾燥途中で一時的に 5 日～7 日間高温乾燥を行うが、葉たばこの Chlorophyll が消失し、葉の黄色が鮮明になった状態で葉の代謝を人為的に停止するため、黄色を強く呈する。一方で、バーレー種の場合は、室温で長期間乾燥することで生産されるが、茶色を呈するまで乾燥が進められる (明色気干)。ところが、葉たばこの品種の一つであり、トルコやギリシャにおいて栽培されるオリエント種は、黄色種やバーレー種と異なり、日光にさらされた状態で乾燥される。そして、乾燥が進んだのちに納屋で堆積発酵を経て生産されるが (明色日干)、乾燥過程を経た後においても、やや緑色を呈することが知られる。化学成分の組成としては、バーレー種と比較すると、黄色種とオリエント種に、還元糖が多く、たんぱく質が少ないことが知られており、成分組成の違いは、遺伝子の差異に加えて、主に収穫後の乾燥過程に起因することが、過去の報告で述べられている (J. C. Leffingwell, 1999)。加えて、遮光条件で乾燥されるバーレー種には、通常は Chlorophyll が含まれない。しかし光に晒された条件で乾燥されたバーレー種には、90 日間の乾燥を経た後においても、0.021 mg/g の Chlorophyll が含まれていたとする報告がある (H. R. Burton, 1985)。こうした報告を踏まえると、乾燥方法が、オリエント種に緑色の原因である Chlorophyll を、多く残留させている可能性が

あるものの、これまで緑色成分の組成に関しては報告が無い。

このオリエント種には、残留している Chlorophyll 以外に、Pheophytin *a*、Chlorophyllide *a*、Pheophorbide *a* のような Chlorophyll 代謝物が含まれると考えられた。これは Chlorophyll 代謝物が乾燥過程で発生している可能性があるためだけでなく、葉たばこと同様に乾燥された緑茶に、これら Chlorophyll 代謝物が含まれることが分かっているからである (Y. Suzuki, 2003)。本研究では、初めに葉たばこのオリエント種に、上記の Chlorophyll 代謝物が含まれているか確認し、必要に応じて未知の代謝物の存在も確かめることとした。本研究の目的は、オリエント種の葉たばこに含まれる Chlorophyll 代謝物を分析する方法を構築し、それら代謝物を明らかにすることである。

葉たばこに含まれる Chlorophyll 代謝物の検出と構造推定に向けた分析装置は、三つの構造的特徴 (800 以上の分子量、低極性、可視光吸収) を考慮し、緑色を検出するための PDAD と、低極性かつ不揮発性の化合物をイオン化させ、質量スペクトルから構造を推定できる APCI-MSD を、LC に組み合わせた LC/APCI-MSD を選択した。本章の初めに、Chlorophyll 代謝物を分離するための、クロマトグラフィー条件の検討について述べる。続いてオリエント種に含まれていた、未知の Chlorophyll 代謝物の構造推定を、市販化合物あるいは合成された推定化合物と、吸収スペクトル、質量スペクトル、クロマトグラム上の保持時間比較により進めたので以下に詳細を記述する。

3-2 実験方法

3-2-1 サンプルおよび試薬類

葉たばこは、Table 10-1 記載のサンプルを、Chlorophyll 代謝物分析に供した。抽出ならびに液体クロマトグラフィーによる分析に向けて使用した溶媒は、全て HPLC グレードとし、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan)製を使用した。構造推定の際の標品の Chlorophyll *a*、Chlorophyll *b*、Pheophytin *a*、Pheophytin *b* は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan)製を使用した。Pheophytin *a* のみは、Hydroxypheophytin *a* 合成に向けての、開始化合物とした。Chlorophyll 代謝物の合成に使用した試薬を以下に記載する。Solanesol、1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-en (DBU)、(1*R*)-(+)-(10-camphorsulfonyl)oxaziridine ((+)-CSOAI)、di-*tert*-butyl dicarbonate ((Boc)₂O)は、Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)製を使用した。Pheophorbide *a*、Dehydrated pyridine (Py)、4-dimethylaminopyridine (DMAP)は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan)製を使用した。合成時には、Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)製の Dehydrated tetrahydrofuran (THF)を使用した。

3-2-2 サンプルの調製

約 100 g の葉たばこをサイズ 1 mm のメッシュを備えた粉砕機 (CYCLOTEC 1093 Sample mill (FOSS TECATOR Inc., Höganäs, Sweden))により粉砕した。粉砕した 10 g の葉たばこを精秤し、300 mL の三角フラスコに入れ、そこに約 100 mL のアセトンを加え、超音波洗浄器 UT206 (Sharp Manufacturing Systems Corporation, Osaka, Japan)にかけた。10 min 後に抽出液を、ろ紙#16 μ m (Tokyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)にて、ろ過し、ろ液を 250 mL のメスフラスコで定容した。定容した抽出液を、シリンジフィルター Millex-LG with a pore size of 0.20 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)にてろ過し、Acetone 抽出液中の不溶物を除去し、これを分析用のサンプル溶液とした。ろ過後のサンプル溶液は、密閉性の遮光性瓶に入れて保存した。

3-2-3 分離カラムと分析装置条件

3-2-3-1 Chlorophyll 代謝物構造推定に向けた水系逆相クロマトグラフィー

分析には、液体クロマトグラフィー質量分析装置として、6 mm flow cell G1315-60015 (Agilent Tech., CA, USA) を含む DAD G1315C を備え、G1379B degasser、G1312B Binary pump SL、G1367C Hip-ALS SL、G1330B FC/ALS therm をシステムに含む Agilent 1200 HPLC system (Agilent Tech., CA, USA)を使用した。分析用のカラムは、LiChrospher RP18 (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m, Supelco Inc., PA, USA)を用い、以下の溶離液条件を適用した。溶離液 A : aqueous 1M ammonium acetate/MeOH = 1/4、溶離液 B : Acetone/MeOH = 1/4 ; 流速 : 1.0 mL/min ; グラジ

エント条件：溶離液 A 100% (0 min)、溶離液 A 0% (15 min)、溶離液 A 0% (B 100%) (60 min まで維持)。またカラムの温度は 25°C とし、サンプル溶液注入量は、50 μ L とした。PDAD による波長吸収の測定は、190-800 nm とした。測定した全てのデータは、装置付属のソフトウェア、Chemstation (Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA) で解析した。

3-2-3-2 Chlorophyll 代謝物構造推定に向けた非水系逆相クロマトグラフィー

分析では、液体クロマトグラフィー質量分析装置として、6 mm flow cell G1315-60015 (Agilent Tech., CA, USA) を含む DAD G1315C と 6130 APCI-MSD を備えた、Agilent 1200 HPLC system (Agilent Tech., CA, USA) を使用した。分析用のカラムと溶離液の条件は、2-2-4 記載の条件と同一とした。PDAD を LC に接続しているとき、あるいは MSD をスキャンモードで使用する際には、カラムへのサンプル溶液注入量を、50 μ L とした。PDAD による波長吸収の測定は、190-800 nm とした。APCI-MSD の測定条件並びにデータ取り込み条件は、2-2-4 記載の条件と同一とした。ただし APCI-MSD により、未知の Chlorophyll 代謝物の構造を検討している際には、スキャンモードを適用し、100-1850 m/z (Condensed) に設定した。特徴的な質量スペクトルの強度比を求める際には、Selected ion monitoring mode (SIM mode) に切り替え (Table 3-2 参照)、各 Chlorophyll 代謝物を測定した。その際に、APCI インターフェースにあるコロナニードルの劣化を防ぎ、質量スペクトルの再現性を向上させるために、カラムからの溶離液を、APCI インターフェースの直前で 3/13 (約 0.23 mL/min) へとスプリットした。測定した全てのデータは、装置付属のソフトウェア、Chemstation (Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA) で解析した。

3-2-4 Chlorophyll 代謝物標品の合成

3-2-4-1 Solanesyl pheophorbide *a* の合成

Solanesyl pheophorbide *a* の合成は、以下の手順を採った。-42°C の Acetonitrile を冷媒とするドライアイスバスに、50 mL のアルゴンを置換した二口ナスフラスコを備え付け、そこにシリンジを使用し、Dehydrated THF に溶解させた Pheophorbide *a* (*a/a'* = 85.5/14.5) 100 mg を加えた。次いで、THF の溶液に、Dehydrated pyridine (1 eq) を、シリンジで静かに加え、触媒量の DMAP を加えた。反応液を 10 分間以上攪拌した後に、Dehydrated THF に溶解させた (Boc)₂O (1 eq) を滴下した。さらに 10 分間攪拌した後に、Dehydrated THF に溶解させた Solanesol (7 eq) を滴下した。反応液をさらに 4 時間攪拌した後に、0.05 M の塩酸水溶液 10 mL を、加えて反応を停止させた。分液漏斗に反応液を移しこみ *n*-hexane で 3 回抽出した。集めた有機層は、飽和塩化ナトリウム水溶液にて、洗浄した後に、無水硫酸ナトリウムを加えることで、水分を取り除いた。減圧濃縮後の残渣を PLC 1.138959 (MERCK KGaA Inc., Darmstadt, Germany) に展開し、hexane/AcOEt

= 5/5 を展開系としたプレパラティブスケールの薄層クロマトグラフィーにより濃緑色の Solanesyl pheophorbide *a* ($a/a' = 95.3/4.7$ determined by HPLC)を得た。すべての作業は、反応物と生成物の分解を防ぐために、過去の報告を参考に遮光条件化で速やかに行った (P. Wongsinkongman, 2002)。

3-2-4-2 Hydroxypheophytin *a* と Solanesyl hydroxypheophorbide *a* の合成

Hydroxypheophytin *a* の合成は、 -42°C の Acetonitrile を冷媒とするドライアイスバスに、50 mL のアルゴンを置換した二口ナスフラスコを備え付け、そこにシリンジを使用し、Dehydrated THF に溶解させた pheophytin *a* ($a/a' = 84.5/15.5$) 5 mg を加えた。次いで THF に溶解させた DBU (100 eq) を滴下し、混合物を 10 分間攪拌した。Dehydrated THF に溶解させた (+)-CSOAI (1.1 eq) を反応液に滴下し、そのまま 4 時間攪拌を続けた。反応の停止、分液漏斗による分離は、3-2-4-1 に記載した手順と同一とした。濃縮後の残渣を PTLC 1.138959 (MERCK KGaA Inc., Darmstadt, Germany) に展開し、hexane/AcOEt = 7/3 を展開系としたプレパラティブスケールの薄層クロマトグラフィーにより濃緑色の hydroxypheophytin *a* ($a/a' = 38.4/61.6$ by HPLC) を得た。すべての作業は、反応物と生成物の分解を防ぐために、過去の報告を参考に遮光条件化で速やかに行った (L. Ma, 1996)。上記 Hydroxypheophytin *a* の合成と同様に、前項の 3-2-4-1 の実験で得た Solanesyl pheophorbide *a* を酸化することで、濃緑色の Solanesyl hydroxypheophorbide *a* ($a/a' = 32.7/67.3$ by HPLC) を得た。

3-3 結果と考察

3-3-1 Chlorophyll 代謝物の分離検討

水系の逆相クロマトグラフィーによる Chlorophyll と Chlorophyll 代謝物の分離は、既に報告されているので (K. Takamiya, 2000) (A. Gauthier-Jacques, 2001) (S. C. Huang, 2008) (R. L. Airs, 2001)、これを利用したオリエント種と黄色種の比較を行うことで、オリエント種の葉たばこに含まれる Chlorophyll 代謝物を明らかにすることとした。Figure 3-2 は測定波長を 660 nm に設定した LC/PDAD によるクロマトグラムである。Chlorophyll *a*、Pheophytin *a*、Pheophorbide *a* のピークを標品との比較により確認し、オリエント種に多く含まれていることが確認できた。しかし、Phytol を含まない Chlorophyllide *a* は確認されなかったため、緑色は Chlorophyll、Pheophytin、Pheophorbide が主要因と思われた。ただし、ピークの大きさから代謝物のほうが緑色への寄与は大きいと思われた。本研究は、オリエント種の Chlorophyll 代謝物を確認することが、一つの目標であるため、上記の検討でも十分ではあるが、一方で Figure 3-2 のクロマトグラムで確認できるように、Pheophytin *a* 周辺には、他の葉緑素と考えられるピークが見られた。このような未知の代謝物は、過去に報告されていないため、続けて未知ピークの構造推定に取り組むこととした。

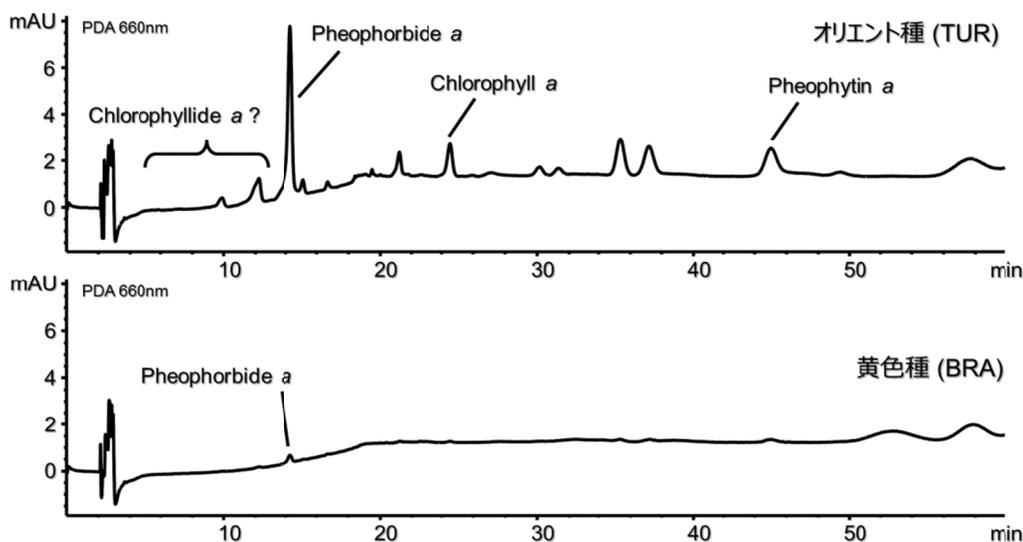


Figure 3-2

水系の逆相クロマトグラフィーと PDAD によるオリエント種と黄色種のクロマトグラム

PDAD の吸収波長を 660 nm とし、水系の逆相クロマトグラフィーを組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種(304)と 2008 年産のブラジル産黄色種葉たばこ(311)のクロマトグラム。分析条件については、実験の部 3-2-3-1 に記載。BRA はブラジル、TUR はトルコを指す。

未知の Chlorophyll 代謝物を構造推定するためには、構造決定を支援する質量スペクトルを与える質量分析装置と組み合わせることが望ましいが、Figure 3-2 は、1 M という高濃度の酢酸アンモニウムを含んだ溶離液による逆相クロマトグラフィーによるクロマトグラムであったため、質量分析装置との接続は難しい。また、未知のピークは比較的低極性である Pheophytin *a* の周辺に

存在したので、低極性成分をイオン化可能な質量分析装置との組み合わせが必要となった。そのため非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を利用することとした (N. A. Parris, 1978)。NARPCは、Triacylglycerol や Steroid のような低極性化合物の分離に効果的であることが知られており、前章の Solanesol の分離にも使用したクロマトグラフ方法の一つである (D. J. Chitwood, 1991) (P. Jandera, 1991) (V. M. Kapoulas, 1986) (E. Salivaras, 1992) (J. S. Amaral S. C., 2004)。質量スペクトルを得るためには、イオン化室で溶離液中の各成分をイオン化しなければならないが、非水系の NARPC の場合は、イオン性化合物をイオン化するエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) は不向きであった。そこでコロナ放電により、溶離液から強制的にプロトンが発生させ、各成分のイオン化を促す大気圧化学イオン化法 (APCI) を選択した。NARPC を分離に適用した LC/PDAD のクロマトグラムを Figure 3-3 に示した。未知の Chlorophyll 代謝物ピークが、Figure 3-2 と異なり短時間で分離溶出した結果が得られた。各ピークは 660 nm の PDAD 波長吸収によるが、さらに波長スペクトルを見ることで、ポルフィリン骨格上に存在するパイ電子共役系に由来する 2 種の極大吸収帯があり、Chlorophyll 代謝物であることが分かる。以後は、こうした未知ピークを中心に、直結した APCI-MSD の質量スペクトルより、構造を推定することとした。

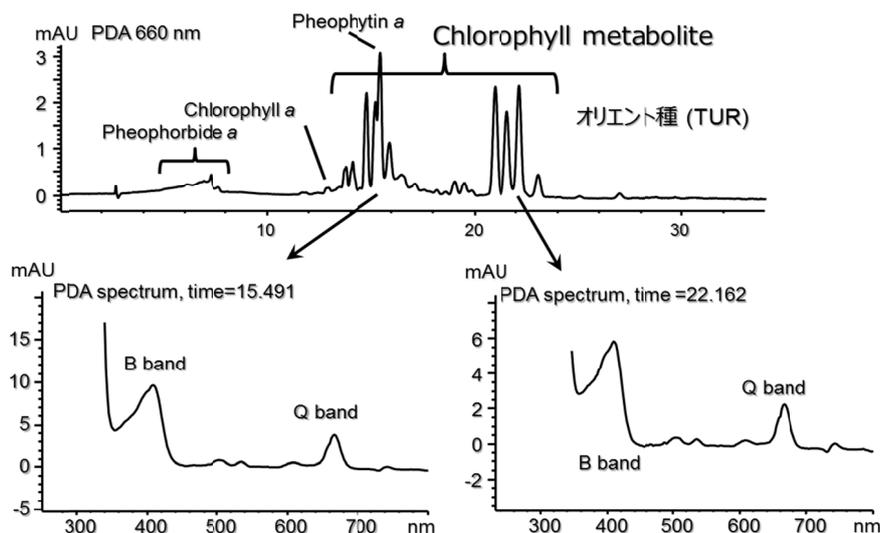


Figure 3-3

非水系の逆相クロマトグラフィーと PDAD によるオリエント種のクロマトグラム

PDAD の吸収波長を 660 nm とし、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種(304)のクロマトグラムと波長吸収スペクトル。その他の分析条件については、実験の部 3-2-3-1 に記載。

3-3-2 Chlorophyll 代謝物の構造推定

未知の Chlorophyll 代謝物の構造推定にあたり、質量スペクトルは分子量と化学構造を決定するうえで重要である。この研究では、質量スペクトルから予想された化合物を別途合成し、それをオリエント種に含まれるピークと、保持時間や吸収スペクトル、質量スペクトルを比較することで構造推定を行った。なお合成の困難な化合物については、確からしさが劣るものの、観察された波長スペクトルと質量スペクトルから、化合物の構造推定を試みた。Figure 3-4 と Figure 3-5 に、クロマトグラム上で構造推定された成分をナンバリングしており、Figure 3-6 に構造推定された成分の成分名と成分の化学構造を一覧表にまとめた。すべての化合物の波長スペクトルと質量スペクトルは、Table 3-1 と Table 3-2 にまとめた。Chlorophyll *a* (3)、Chlorophyll *a* (4)、Chlorophyll *b* (1)、Chlorophyll *b* (2)、Pheophytin *a* (11)、Pheophytin *a* (12)、Pheophytin *b* (7)、Pheophytin *b* (8)は、市販の標品との保持時間の比較から、容易に構造推定できた。なお化合物名に付されたアルファベットの右肩に示された、プライムはジアステレオマーを表しているが(例えば Chlorophyll *a* 例など)、過去の報告によれば、逆相クロマトグラフィーでは、プライムの無い異性体のほうが、先に溶出するので、本報告においても、保持時間が短いピークを、プライム無しの異性体とした。他の未知の Chlorophyll 代謝物を構造推定する場合にも、この傾向を同様に適用した。

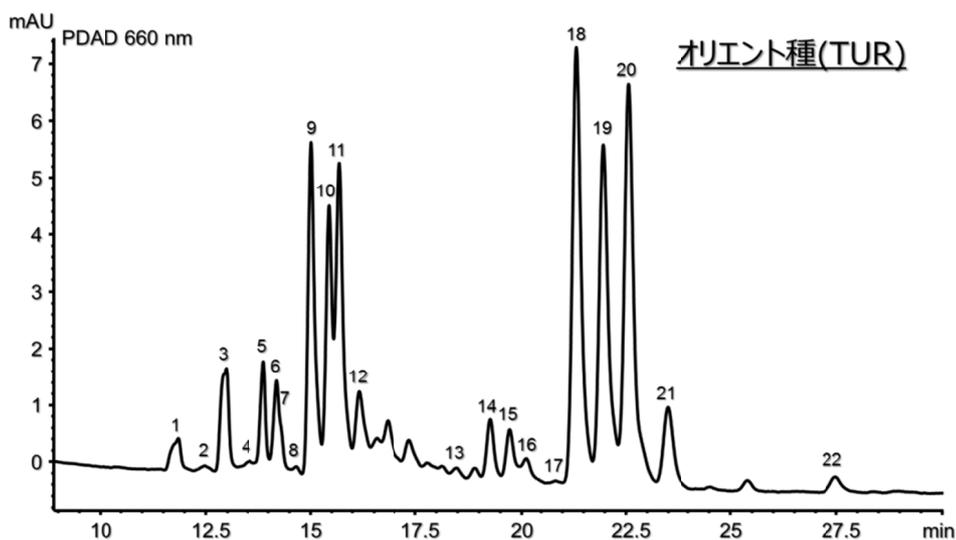


Figure 3-4 PDAD を検出器としたトルコ産オリエン種のクロマトグラム左部の拡大

PDAD の吸収波長を 660 nm とし、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエン種(304)のクロマトグラム。クロマトグラム上の番号は、Figure 3-6 に記載の化合物と対応。その他の分析条件については、実験の部 3-2-3-2 に記載。TUR はトルコを指す。

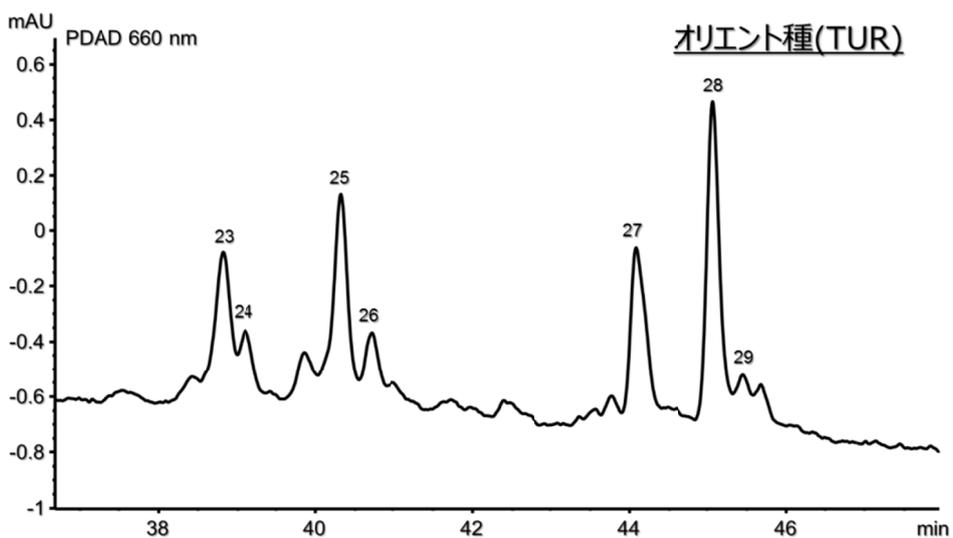
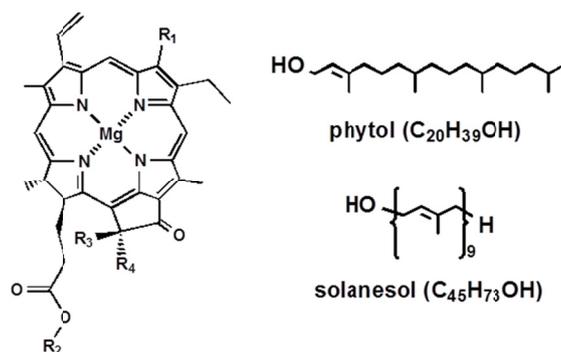


Figure 3-5 PDAD を検出器としたトルコ産オリエン種のクロマトグラム右部の拡大

PDAD の吸収波長を 660 nm とし、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエン種(304)のクロマトグラム。クロマトグラム上の番号は、Figure 3-6 に記載の化合物と対応。その他の分析条件については、実験の部 3-2-3-2 に記載。TUR はトルコを指す。



number	retention (min)	assignment	M	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	12.03	Chlorophyll <i>b</i>	Mg	CHO	Phytyl	H	COOCH ₃
2	12.60	Chlorophyll <i>b'</i>	Mg	CHO	Phytyl	COOCH ₃	H
3	13.14	Chlorophyll <i>a</i>	Mg	CH ₃	Phytyl	H	COOCH ₃
4	13.65	Chlorophyll <i>a'</i>	Mg	CH ₃	Phytyl	COOCH ₃	H
5	13.84	Hydroxypheophytin <i>b</i>	2H	CHO	Phytyl	OH	COOCH ₃
6	14.15	Hydroxypheophytin <i>b'</i>	2H	CHO	Phytyl	COOCH ₃	OH
7	14.30	Pheophytin <i>b</i>	2H	CHO	Phytyl	H	COOCH ₃
8	14.57	Pheophytin <i>b'</i>	2H	CHO	Phytyl	COOCH ₃	H
9	14.93	Hydroxypheophytin <i>a</i>	2H	CH ₃	Phytyl	OH	COOCH ₃
10	15.36	Hydroxypheophytin <i>a'</i>	2H	CH ₃	Phytyl	COOCH ₃	OH
11	15.58	Pheophytin <i>a</i>	2H	CH ₃	Phytyl	H	COOCH ₃
12	16.04	Pheophytin <i>a'</i>	2H	CH ₃	Phytyl	COOCH ₃	H
13	18.31	Pyropheophytin <i>a</i>	2H	CH ₃	Phytyl	H	H
14	19.18	Solanesyl hydroxypheophorbide <i>b</i>	2H	CHO	Solanesyl	OH	COOCH ₃
15	19.63	Solanesyl hydroxypheophorbide <i>b'</i>	2H	CHO	Solanesyl	COOCH ₃	OH
16	20.01	Solanesyl pheophorbide <i>b</i>	2H	CHO	Solanesyl	H	COOCH ₃
17	20.75	Solanesyl pheophorbide <i>b'</i>	2H	CHO	Solanesyl	COOCH ₃	H
18	21.19	Solanesyl hydroxypheophorbide <i>a</i>	2H	CH ₃	Solanesyl	OH	COOCH ₃
19	21.82	Solanesyl hydroxypheophorbide <i>a'</i>	2H	CH ₃	Solanesyl	COOCH ₃	OH
20	22.40	Solanesyl pheophorbide <i>a</i>	2H	CH ₃	Solanesyl	H	COOCH ₃
21	23.31	Solanesyl pheophorbide <i>a'</i>	2H	CH ₃	Solanesyl	COOCH ₃	H
22	27.26	Solanesyl pyropheophorbide <i>a</i>	2H	CH ₃	Solanesyl	H	H
23	38.63	Solanesyl hydroxypheophytin <i>a</i>	2H	CH ₃	Phytyl	OH	COOC ₄₅ H ₇₃
24	38.93	Solanesyl hydroxypheophytin <i>a'</i>	2H	CH ₃	Phytyl	COOC ₄₅ H ₇₃	OH
25	40.16	Solanesyl pheophytin <i>a</i>	2H	CH ₃	Phytyl	H	COOC ₄₅ H ₇₃
26	40.54	Solanesyl pheophytin <i>a'</i>	2H	CH ₃	Phytyl	COOC ₄₅ H ₇₃	H
27	43.96	Disolanesyl hydroxypheophorbide <i>a/a'</i>	2H	CH ₃	Solanesyl	OH	COOC ₄₅ H ₇₃
28	44.92	Disolanesyl pheophorbide <i>a</i>	2H	CH ₃	Solanesyl	H	COOC ₄₅ H ₇₃
29	45.30	Disolanesyl pheophorbide <i>a'</i>	2H	CH ₃	Solanesyl	COOC ₄₅ H ₇₃	H

Figure 3-6 オリエン特種に含まれる構造推定された Chlorophyll 代謝物一覧

一覧表に記載の Chlorophyll 代謝物の保持時間は、PDAD によるクロマトグラムに含まれるピーク頂上の時間とした。分析条件については、実験の部 3-2-3-2 に記載。

他の Chlorophyll 代謝物は、前述のとおり、予想構造の Chlorophyll 代謝物を合成し、波長スペクトル、質量スペクトル、保持時間を、オリエン特種に含まれるピークと比較することで構造推定を進めた。Figure 3-7 は、標品から構造推定された Pheophytin *a* と、Figure 3-3 にも示された類似の波長・質量スペクトルを示す未知の代謝物である。この比較からは、Pheophytin *a* の Phytol 基の代わりに、Solanesyl 基が結合した、Solanesyl pheophorbide *a* (20) であると予想した。なぜならオリエン特種に含まれる、Solanesyl pheophorbide *a* と思われるピークは、Pheophytin *a* 同様に、二つの大きな波長吸収と、三つの小さい波長吸収を示しており、パイ電子共役系を含む可能性が高いこと、また質量スペクトルを確認すると、Methanol (CH₃OH)、Solaniadiene (C₄₅H₇₂)、Solanesyl acetate 基(CH₃COOC₂₀H₃₉)の脱離が、イオン化後のフラグメンテーション時に生じており、合成物も同様のフラグメンテーションを示していた(Figure 3-8)。Pheophytin *a* のフラグメン

テーションに言及している過去の報告を見ると、methanol (CH₃OH)、phytadien (C₂₀H₃₈)、phytyl acetate (CH₃COOC₂₀H₃₉)の脱離が確認されているので (A. Gauthier-Jacques, 2001) (R. B. V. Breeman, 1991)、Phytol の代わりに Solanesol が脱離しているものと考えられる。Solanesol は長鎖のテルペノイドアルコールであり、葉たばこから初めて単離された成分である (R. L. Rowland P. H., 1956)。葉たばこには非常に多く含まれていることが知られており、分子量の差分から Phytol の代わりに結合したものと推定された。Figure 3-9 は、合成した標品との保持時間の比較結果を、PDAD を検出器としたクロマトグラムで示したものである。この保持時間の比較から Solanesyl pheophorbide *a* (20)、Solanesyl pheophorbide (*a*=21)と構造推定した。また、同様の手順により Hydroxypheophytin *a* (9)、Hydroxypheophytin *a* (10)、Solanesyl hydroxypheophorbide *a* (18)、Solanesyl hydroxypheophorbide *a* (19)と、構造推定した。Hydroxypheophytin *a* は、Pheophytin *a* のメトキシカルボニル基が結合した炭素に、水酸基が一つ結合した構造をとっており、葉たばこ以外の植物ではすでに報告されている。また Hydroxypheophytin *a* と Pheophytin *a* の構造的な関係と同様に、Solanesyl pheophorbide *a* のメトキシカルボニル基が結合した炭素に、水酸基が一つ結合しているのが、Solanesyl hydroxypheophorbide *a* であり、本研究で初めて確認した化合物である。

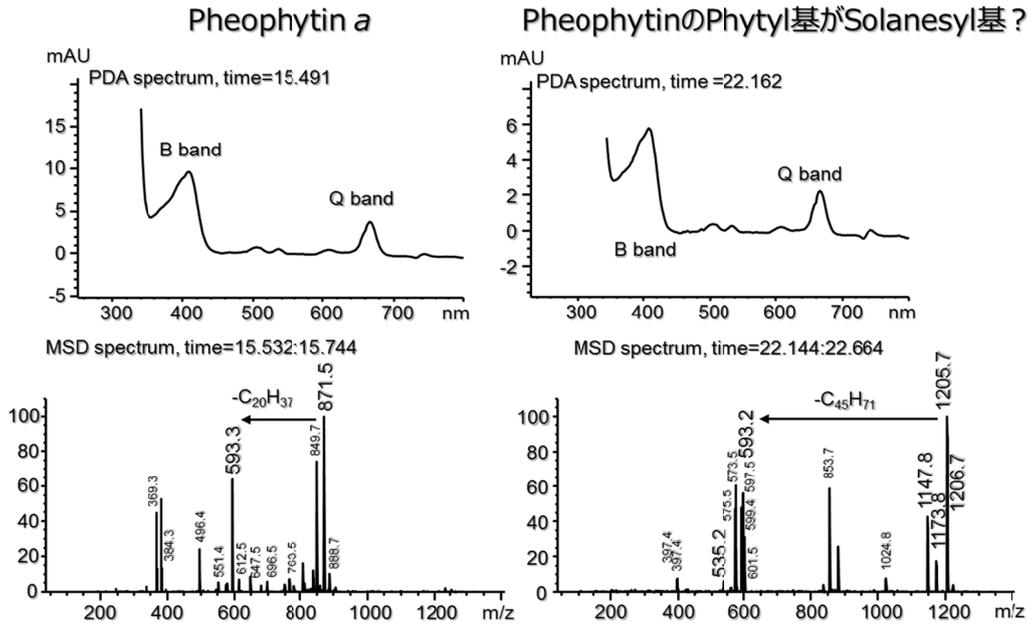


Figure 3-7 葉たばこに含まれる Chlorophyll 代謝物と未知の代謝物との比較

PDAD と APCI-MSD を検出器とし、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種(304)と合成した標準物質とを比較したスペクトル。分析条件については、実験の部 3-2-3-2 に記載。

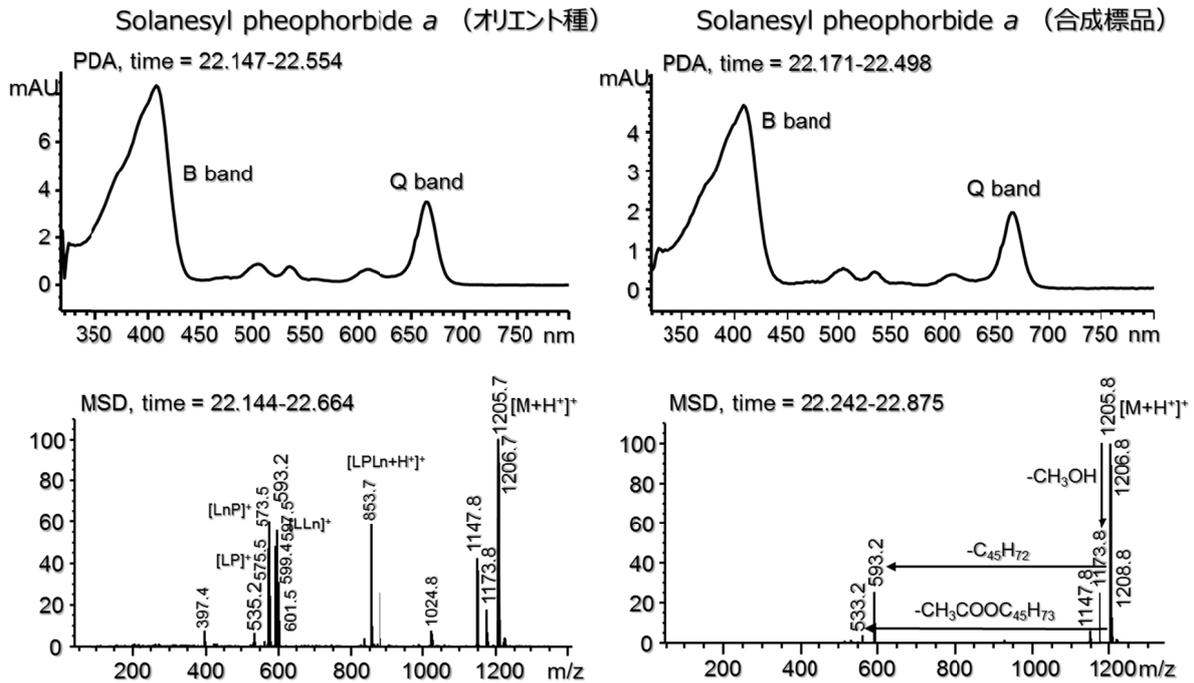


Figure 3-8 葉たばこに含まれる Chlorophyll 代謝物と合成標品との比較

PDAD と APCI-MSD を検出器とし、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種(304)と合成した標準物質とを比較したスペクトル。分析条件については、実験の部 3-2-3-2 に記載。

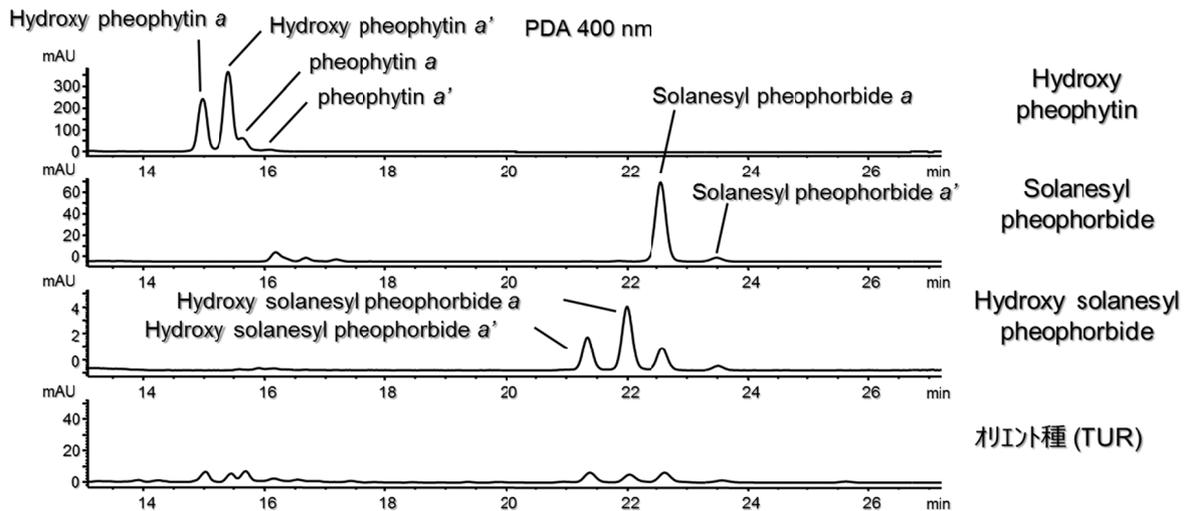


Figure 3-9 葉たばこに含まれる Chlorophyll 代謝物と合成した標準物質との比較

PDAD の吸収波長を 660 nm とし、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリント種(304)と合成した標準物質とを比較したクロマトグラム。分析条件については、実験の部 3-2-3-2 に記載。TUR はトルコを指す。

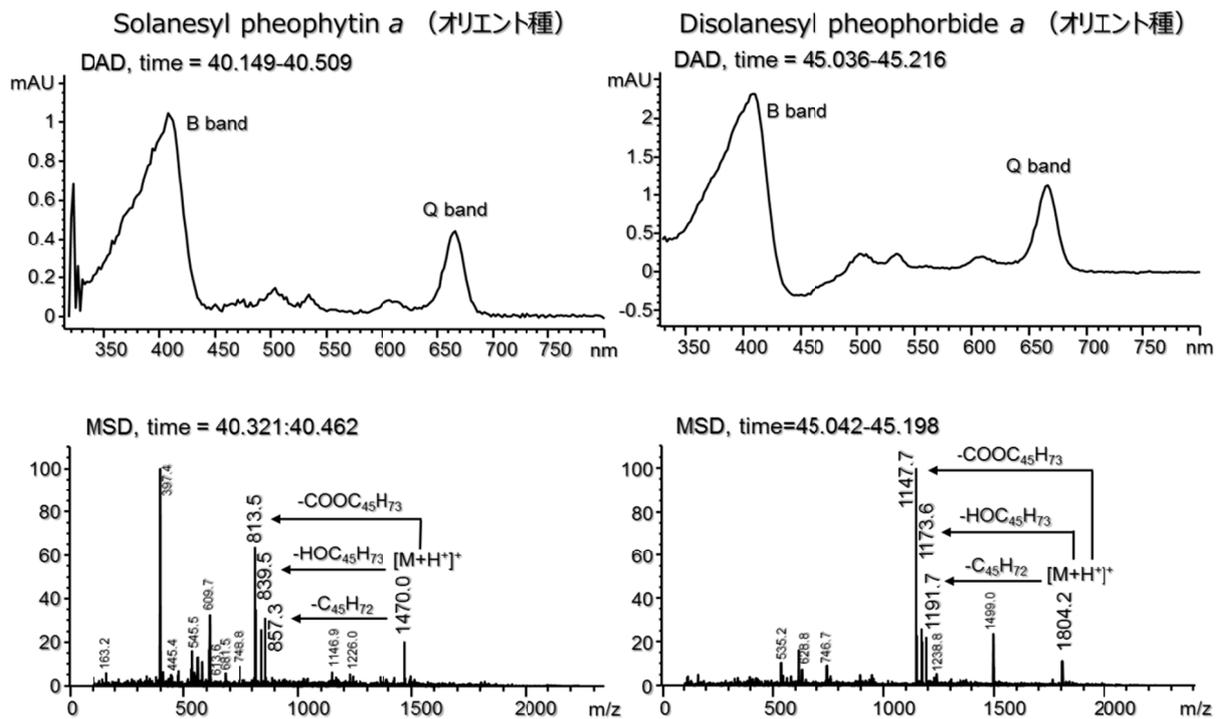


Figure 3-10 葉たばこに含まれる未知の Chlorophyll 代謝物のスペクトル

PDAD と APCI-MSD を検出器とし、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリント種(304)と合成した標準物質とを比較したスペクトル。分析条件については、実験の部 3-2-3-2 に記載。

ほかの Chlorophyll 代謝物である Hydroxypheophytin *b* (5)、Hydroxypheophytin *b* (6)、Solanesyl pheophorbide *b* (16)、Solanesyl pheophorbide *b'* (17)、Solanesyl hydroxypheophorbide *b* (14)、Solanesyl hydroxypheophorbide *b'* (15)、Pyropheophytin *a* (13)、Solanesyl pyropheophorbide *a* (22)は、波長スペクトル、質量スペクトル、既報に記載の Chlorophyll 代謝物の溶出序列 (L. Almela, 2000) (A. Gauthier-Jacques, 2001) (S. C. Huang, 2008) (R. L. Airs, 2001) などを活用して構造推定を行った。また未知の Chlorophyll 代謝物のうち、Pheophytin *b* のような *b* タイプの化合物の場合、*a* タイプとの共通した差異を考慮して構造推定を行った。*b* タイプの場合は、ポルフィリン骨格の末端部に、アルデヒド基が結合しているため、逆相カラムに対する保持力は、*a* タイプの Chlorophyll 代謝物より低い。これにより *a* タイプを構造推定した後に、*b* タイプの成分の保持時間を、ある程度予測することが可能であった。加えて *b* タイプの場合は、*a* タイプの極大吸収波長とは異なる、430 nm と 650 nm の極大吸収を示したので、吸収波長の差異からも、タイプを判別することが可能であったすでに記したとおり、*b* タイプの場合は、メチル基の代わりにアルデヒド基を含んでいる。したがってイオン質量が *a* タイプより 14 m/z 大きくなるので、この情報もタイプの判別には質量スペクトルが有効であった。

Figure 3-5 に示されたクロマトグラムの後半部分に現れた、未知の Chlorophyll 代謝物のピークは、波長スペクトルと質量スペクトルから構造推定を行った。Figure 3-10 には、solanesyl pheophytin *a* (25) と、disolanesyl pheophorbide *a* (28)のスペクトルを示す。これらの化合物は、いずれもパイ電子共役系に由来する、二つの極大波長吸収を示していることから、容易に Chlorophyll 代謝物に関連する化合物であることがうかがえた。さらに質量スペクトルを確認すると、Pyropheophytin *a* (813.5 m/z) (13)と、Solanesyl pyropheophorbide *a* (1147.7 m/z) (22)のプリカーサーイオンと m/z が同一のイオンが、それぞれの質量スペクトルに確認された。Solanesyl pheophorbide *a* (20)は、メトキシカルボニル基 (COOCH₃)の脱離を伴って、solanesyl pyropheophorbide *a* (1147.8 m/z)(22)へとフラグメンテーションする。そこで、Solanesyl formate (COOC₄₅H₇₃)のフラグメント時の脱離が、Solanesyl pheophytin *a* (25) と、Disolanesyl pheophorbide *a* (28)にも生じる可能性は高いと思われる。加えて、Solanadiene (C₄₅H₇₂)と、Solanesol (C₄₅H₇₃OH)の脱離が、質量スペクトルに確認されているので、Solanesol 基が、メトキシカルボニル基のメトキシ基の代わりに結合している可能性は高いと判断し、未知のピークは Solanesyl pheophytin *a* (25) と、Disolanesyl pheophorbide *a* (28)と構造推定した。同様に水酸化された Solanesyl hydroxypheophytin *a* (23)と、Disolanesyl hydroxypheophorbide *a/a'* (27)も、構造推定できた。これらの分子量が 1000 を超える Chlorophyll 代謝物は、量的には少ないために、オリエント種の緑色に大きく関係しているとは考えにくいだが、本研究の進め方が、低極性

Chlorophyll 代謝物構造推定には、有効であることが示された。

各 Chlorophyll 代謝物は、Table 3-1 に示したとおり、必ず二種の極大吸収を有しており、一部の化合物の極大吸収波長は、市販の標品との比較でも、良好な一致と再現性を示していた。一方で、Table 3-2 に示したような質量スペクトルは、当初の分析方法 3-2-3 に記載の条件では、市販の標品との比較でも、イオン強度を一致させることが困難であった。これは、APCI-MSD のインターフェースになるコロナニードルの劣化を引き起こすような、高濃度サンプルの注入を、分析条件として採用していたためである。安定したフラグメンテーションを確立するために、MSD のスキャンモードを Selected Ion Monitoring に切り替え、一部の特徴的なイオンのみを取り込み、同時に溶離液ラインを APCI インターフェースの直前で分離することで、サンプルの大量導入を防ぐ条件に変更した。この結果得られた各 Chlorophyll 代謝物のイオン強度比をまとめたのが、Table 3-2 である。結果的に、良好な質量スペクトルパターン的一致を観測することが出来た。

Table 3-1

オリエント種に含まれる Chlorophyll 代謝物と標品の PDAD による極大吸収波長

分析条件については、実験の部 3-2-3-1 に記載。表中の Identification のカラムに記載の“Standard” は市販の標品か、合成された Chlorophyll 代謝物によって、構造推定されたことを示す。“DAD, MSD” は分析した際のスペクトルデータから構造推定されたことを示している。同じカラムに含まれるアスタリスク(*)は合成された化合物であることを表す。報告された極大吸収波長は、既報のデータを転載した (S. C. Huang, 2008)。

number	λ_{\max} (葉たばこ抽出物)	λ_{\max} (標品)	λ_{\max} (既報)	Identification
1	<u>456</u> , 594, <u>644</u>	<u>454</u> , 596, <u>644</u>	<u>462</u> , 600, <u>648</u>	standard
2	<u>456</u> , <u>648</u>	<u>454</u> , 596, <u>644</u>	<u>462</u> , 600, <u>648</u>	standard
3	<u>430</u> , 618, <u>662</u>	<u>430</u> , 616, <u>660</u>	<u>430</u> , 618, <u>664</u>	standard
4	<u>664</u>	430, 618, <u>662</u>	<u>430</u> , 618, <u>664</u>	standard
5	<u>432</u> , 526, 554, 596, <u>652</u>		<u>434</u> , 522, 598, <u>652</u>	DAD, MSD
6	<u>434</u> , 526, 554, 596, <u>652</u>		<u>436</u> , 528, 600, <u>652</u>	DAD, MSD
7	<u>434</u> , 526, 550, 596, <u>652</u>	<u>434</u> , 524, 598, <u>652</u>	<u>436</u> , 528, 598, <u>652</u>	standard
8	<u>434</u> , <u>652</u>	<u>434</u> , 526, 552, 596, <u>652</u>	<u>436</u> , 524, 600, <u>656</u>	standard
9	<u>406</u> , 502, 530, 608, <u>664</u>	<u>408</u> , 502, 530, 608, <u>664</u>	<u>406</u> , 502, 532, 610, <u>666</u>	standard
10	<u>410</u> , 502, 532, 608, <u>666</u>	<u>410</u> , 502, 532, 608, <u>666</u>	<u>408</u> , 504, 534, 610, <u>666</u>	standard
11	<u>408</u> , 504, 534, 608, <u>664</u>	<u>408</u> , 504, 534, 608, <u>664</u>	<u>408</u> , 506, 536, 608, <u>666</u>	standard
12	<u>408</u> , 502, 534, 608, <u>666</u>	<u>408</u> , 504, 536, 608, <u>666</u>	<u>408</u> , 506, 536, 610, <u>666</u>	standard
13	<u>410</u> , <u>664</u>		<u>410</u> , 508, 538, 610, <u>666</u>	DAD, MSD
14	<u>432</u> , 522, 600, <u>652</u>			DAD, MSD
15	<u>434</u> , 522, 600, <u>652</u>			DAD, MSD
16	<u>434</u> , 520, 596, <u>652</u>			DAD, MSD
17	<u>436</u> , <u>652</u>			DAD, MSD
18	<u>406</u> , 502, 530, 610, <u>666</u>	<u>404</u> , 502, 530, 608, <u>666</u>		standard
19	<u>410</u> , 502, 532, 610, <u>666</u>	<u>410</u> , 502, 532, 610, <u>666</u>		standard
20	<u>408</u> , 504, 534, 606, <u>664</u>	<u>408</u> , 504, 534, 610, <u>664</u>		standard
21	<u>410</u> , 504, 536, 606, <u>666</u>	<u>408</u> , 504, 534, 610, <u>666</u>		standard
22	<u>410</u> , <u>664</u>			DAD, MSD
23	<u>410</u> , 506, 534, 612, <u>666</u>			DAD, MSD
24	<u>408</u> , 610, <u>666</u>			DAD, MSD
25	<u>410</u> , 504, 534, 604, <u>666</u>			DAD, MSD
26	<u>402</u> , <u>668</u>			DAD, MSD
27	<u>408</u> , 500, 532, 610, <u>666</u>			DAD, MSD
28	<u>408</u> , 504, 536, 608, <u>666</u>			DAD, MSD
29	<u>406</u> , <u>668</u>	—		DAD, MSD

Table 3-2 オリエント種に含まれる Chlorophyll 代謝物と標品の、MSD により観測されたフラグメントイオンと強度比

分析条件については、実験の部 3-2-3-1 に記載。フラグメントイオンの m/z の後に示されている括弧内の数値は、質量スペクトル上のベースピークに対する相対強度をパーセント表示している。表中記載の保持時間は、Figure 3-6 の記載値とは異なるが、PDAD と MSD へ分析成分が達するまでの時間差が原因。

number	retention (min)	[M+H ⁺] (葉たばこ抽出物)
1	12.04	907.6(100), 629.2(44.5)
2	-	907.6(100), 629.2(N.D.)
3	13.24	893.5(100), 615.2(59.6)
4	-	893.5(100), 615.2(N.D.)
5	13.96	901.5(85.6), 883.5(65.9), 623.4(45.2), 605.3(100)
6	14.27	901.5(100), 883.5(13.4), 623.4(53.6), 605.3(51.8)
7	14.37	885.5(100), 607.4(87.7)
8	14.74	885.5(100), 607.4(N.D.)
9	15.06	887.5(86.2), 869.5(100), 609.4(13.6), 591.2(42.8)
10	15.48	887.5(100), 869.5(34.3), 609.4(52.9), 591.2(41.3)
11	15.71	871.5(100), 593.3(82.9)
12	16.15	871.5(100), 593.3(48.3)
13	18.46	813.8(100), 535.6(6.0)
14	19.33	1235.7(100), 1217.7(40.9), 623.3(53.3), 605.3(49.5)
15	19.75	1235.7(100), 1217.7(6.9), 623.3(94.0), 605.3(37.7)
16	20.14	1219.7(100), 607.4(53.6)
17	20.88	1219.7(100), 607.4(78.6)
18	21.33	1221.7(100), 1203.7(67.7), 609.3(24.5), 591.2(28.7)
19	21.95	1221.7(100), 1203.7(26.8), 609.3(43.3), 591.2(29.3)
20	22.54	1205.7(100), 1173.7(13.4), 593.3(47.9)
21	23.43	1205.7(100), 1173.7(6.4), 593.3(48.4)
22	27.40	1147.8(100), 535.6(7.1)
23	38.79	1486.1(100), 1468.0(98.0), 1207.6(24.5)
24	39.05	1486.1(100), 1468.0(21.5), 1207.6(18.0)
25	40.29	1470.1(53.7), 857.4(42.4), 839.6(34.1), 813.6(100)
26	40.68	1470.1(66.0), 857.4(55.0), 839.6(23.0), 813.6(100)
27	44.10	1820.3(81.3), 1207.8(100), 1187.8(0.52), 1163.8(35.3)
28	45.06	1804.4(14.7), 1191.8(19.9), 1173.8(25.6), 1147.8(100)
29	45.42	1804.4(31.3), 1191.8(34.5), 1173.8(20.5), 1147.8(100)

number	[M+H ⁺] (標品)	[M+H ⁺] (既報)
1	907.6(100), 629.2(65.3)	907.4(100), 629.1(35)
2	907.6(100), 629.2(48.2)	907.4(100), 629.1(35)
3	893.5(100), 615.2(51.9)	893.5(100), 615.1(15)
4	893.5(86.8), 615.2(100)	893.5(100), 615.1(15)
5		
6		
7	885.5(100), 607.4(86.7)	885.4(100), 607.2(25)
8	885.5(100), 607.4(94.6)	
9	887.5(96.3), 869.5(100), 609.4(23.8), 591.2(45.5)	887.4(100), 869.5(55), 609.2(10), 591.1(15)
10	887.5(100), 869.5(37.2), 609.4(41.0), 591.2(41.8)	
11	871.5(100), 593.3(81.0)	871.5(100), 593.2(10)
12	871.5(100), 593.3(59.4)	
13		813.8(100), 535.6(5)
14		
15		
16		
17		
18	1221.7(100), 1203.7(50.4), 609.3(21.8), 591.2(20.7)	
19	1221.7(100), 1203.7(24.9), 609.3(46.0), 591.2(27.6)	
20	1205.7(100), 1173.7(8.5), 593.3(46.2)	
21	1205.7(100), 1173.7(3.7), 593.3(45.9)	
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		

3-4 小括

本研究で、オリエント種の葉たばこに含まれる Chlorophyll 代謝物を分離、構造推定するための方法を構築した。検出器として PDAD と APCI-MSD を用い、各化合物の波長スペクトル、質量スペクトル、保持時間を測定することで、未知の Chlorophyll 代謝物を構造推定することが出来た。Hydroxypheophytin は、葉たばこにおいて初めて確認された化合物である。また Solanesol が結合した Chlorophyll 代謝物である Solanesyl pheophorbide と Solanesyl hydroxypheophorbide については、推定構造ではあるものの、新規物質である可能性が高い。これらは葉たばこが Solanesol を多量に含むことに由来する、葉たばこ特有の成分と推測された。新規の Chlorophyll 代謝物の分離、検出を可能にした本研究における分析方法は、葉たばこのなかでオリエント種と他の品種を区別する方法となるだけでなく、葉たばこのみならず他の植物における Chlorophyll 代謝物の解明が広がる可能性を示した。

4 章 Triacylglycerol の分析

4-1 序論

Triacylglycerol は植物の種子、樹脂、花卉、花粉に含まれる主要な脂肪成分であり、無数の植物生理反応に関わる、エネルギーを貯蔵するための化学物質である。その普遍性と機能性は、飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸に至る様々な脂肪酸を含む、Triacylglycerol の構造的多様性に由来する (Berg, 1995)。その結果、定量分析方法の開発、サンプル間の Triacylglycerol 組成の差異の解明、各 Triacylglycerol の代謝系における機能の解明など、非常に多くの研究が進められてきた。

本研究で扱う葉たばこは、非常に多くの成分で構成される植物の一種であり、1章で述べたように、様々な種類の葉たばこの、葉の着位、産地、乾燥過程 (キュアリング)、老化過程などにおける成分組成の変化や差異が調査されてきた (J. C. Leffingwell, 1999) (R. L. Stedman, 1968) (I. Schmeltz, 1977)。しかしながら、成熟中か発芽中の種子に含まれる、グリセロールに結合した脂肪酸成分組成の分析報告 (A. Koiwai F. S., 1982) (A. Koiwai F. S., 1983)を除くと、葉たばこに含まれる Triacylglycerol の研究は見当たらない。そのため、広義では葉たばこの喫煙燃焼時の味や香りに関係する葉面樹脂である Triacylglycerol の成分組成を明らかにすることは、葉たばこの差異を説明するために必要となる。このような背景を踏まえ、Triacylglycerol の包括的な分析方法を開発し、組成を明らかにし、種々の葉たばこ間における Triacylglycerol 成分組成の差異を明らかにすることを本研究の目的とした。

初期の Triacylglycerol 分析は、エステル結合を加水分解し、遊離した脂肪酸をメチルエステル化した後に、エステル体を定量分析する方法が一般的である。しかし、Triacylglycerol の化学構造を明らかに出来ない方法であった (A. Koiwai F. S., 1982) (A. Koiwai F. S., 1983) (A. Koiwai T. M., 1990)。近年では、構造を含めて成分組成を決定するために、高温耐性を有する GC のキャピラリーカラムと、FID や MSD を検出器とした分析方法が報告されている (R. P. Evershed, 1996) (S. C. Moldoveanu, 2011) (M. Lísa K. N., 2011)。さらに逆相クロマトグラフィー用の C18 カラムを様々な検出器と組み合わせた分析方法も、Triacylglycerol の分離と構造推定に向けて、GC より一般化しつつある。LC が頻繁に使用されるのは、非水系の逆相クロマトグラフィーの NARPC が、低極性成分の分離に有効であることも一因であろう (N. A. Parris, 1978)。Triacylglycerol の分析に向けて、NARPC に組み合わされる検出器としては、視差屈折率検出器 (RID) (M. Kadam, 2006)、散乱光検出器 (ELSD) (S. C. Cunha, 2005) (J. S. Amaral S. C., 2006) (J. S. Amaral S. C., 2004)、大気圧化学イオン化質量分析装置 (APCI-MSD) (M. Lísa K. N., 2011) (A. Türkan, 2006) (M. Holcapek, 2003) (A. Jakab, 2002) (M. Lísa M. H., 2007) (P. Dugo O. F., 2004) (M. Lísa M. H., 2008) (M. J. Lerma-García, 2011)、大気圧光イオン化質量分析装置 (APPI-MSD) (S. Cai, 2007) などが挙げられる。なかでも APCI-MSD は Triacylglycerol の構造推定にはきわめて有効な装置とさ

れる。なぜなら、Triacylglycerol 分子が MSD への導入部でイオン化される際に、溶媒からのプロトン供与を経て、グリセロールに結合している三つの脂肪酸のうち一つが脱離し、三種類の Diacylglycerol イオンへと壊変し、このプロダクトイオンから構造を容易に決定できるためである (M. Holcapek, 2003) (A. Jakab, 2002) (W. W. Christie, 1987)。より最近の分離技術によれば、銀イオンを担持したカラムにより、Triacylglycerol の位置異性体 (*sn-1, 3* と *sn-2*) の分離も可能である (M. LÍsa K. N., 2011) (R. Adlof, 2004) (G. Dobson, 1995)。また銀イオンを担持したカラムを、二次元クロマトグラフィーと組み合わせることで、位置異性体も含めた Triacylglycerol の包括的な分析が可能になりつつある (L. Modello, 2005) (P. Dugo T. K., 2006)。他にも、NARPC の溶離液を超臨界二酸化炭素とした方法も報告されており枚挙に暇がない (P. Sandra, 2002)。

以上のいずれも、葉たばこに含まれる Triacylglycerol の分析に適用可能と考えられるが、本研究では Triacylglycerol の構造決定が容易に進められる特徴と、将来的には網羅的分析に転用する可能性を踏まえ、NARPC を APCI-MSD に組み合わせた分析方法を採用することとした。定量分析に向けては、容易に入手可能な市販の Triacylglycerol を用い、既報にもあるレスポンスファクターの概念を取り入れた簡易定量を行うことにした。本報告では初めに、葉たばこに含まれる Triacylglycerol が LC/APCI-MSD により分離されるかどうか適用性の確認を行い、次いで葉たばこ中の Triacylglycerol を定量分析する方法の妥当性検証を行い、最後に種々の葉たばこを分析対象とした定量分析と分析結果についてまとめる。

4・2 実験方法

4・2-1 略号について

本論文において Triacylglycerol は、以下の通り脂肪酸の頭文字を用い、簡略化した形式で表示した。P : Palmitic acid ; S : Stearic acid ; O : Oleic acid ; L : Linoleic acid ; Ln : Linolenic acid など。Palmitic acid、Stearic acid、Oleic acid によりグリセロールがエステル化された Triacylglycerol の場合は、OPS と略した。*sn-2* と *sn-1* あるいは *sn-3* のような脂肪酸の位置異性体の場合は、本論文で開発した分析方法では分離することは出来なかったため、頭文字はアルファベット順に並べることにした。ただし、本論文において位置異性体に言及する必要がある場合のみ、文字列後方の肩部にアスタリスク (*) を付した。例えば POS* の場合は、1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-sn-glycerol であり、脂肪酸の Oleic acid が *sn-1* と *sn-3* に結合していない Triacylglycerol を指す。

4・2-2 サンプルおよび試薬類

葉たばこは、Table 10-1 記載のサンプルを Triacylglycerol 分析に供した。抽出ならびに液体クロマトグラフィーに向けて使用した溶媒は、全て HPLC グレードとし、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan) 製を使用した。Triacylglycerol の構造推定と定量分析に使用した試薬は下記の通り。Tripalmitin (PPP)、tristearin (SSS) は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo Japan) を使用した。Triolein (OOO)、trilinolein (LLL)、trilinolenin (LnLnLn) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 製を使用した。1(±)-1,2-dipalmitoyl-3-oleoylglycerol (PPO*)、(±)-1,2-distearoyl-3-oleoylglycerol (SSO*)、(±)-1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoylglycerol (POS*)、(±)-1-stearoyl-2-palmitoyl-3-oleoylglycerol (SPO*) は、Indofine Chemical Co., Inc. (NJ, USA) 製を使用した。

4・2-3 サンプルの調整

葉たばこから、分析に供するサンプル溶液を調製する手順は、前述の実験項 2・2・2 記載の方法と同一とした。

4・2-4 水分測定

葉たばこの水分測定は、前述の実験項 2・2・3 水分測定と同一とした。

4-2-5 分離カラムと分析装置条件

分析では、液体クロマトグラフィー質量分析装置として、G1379B degasser、G1312B Binary pump SL、G1367C Hip-ALS SL、G1330B FC/ALS therm と 6130 APCI-MSD を備えた、Agilent 1200 HPLC system (Agilent Tech., CA, USA)を使用した。分析用のカラムと溶離液の条件は、2-2-4 記載の条件と同一とした。APCI-MSD の測定条件とデータ取り込み条件は、下記のイオン取り込み時間と、Selected Ion Monitoring (SIM)の選択イオンを除いて 2-2-4 記載の条件と同一とした。イオンの取り込みは、分析開始から 15 min 後に開始し、一回の分析が完了する 55 min まで継続した。選択イオンの m/z は 551.7、573.7、575.7、577.7、579.7、595.7、597.7、599.7、601.7、603.7、605.7、607.7 とした。測定した全てのデータは、装置付属のソフトウェア、Chemstation (Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA)で解析した。

4-2-6 定量分析結果の統計解析

全ての定量結果は、事前に葉たばこから抽出し、サンプル溶液の 6 回繰り返し分析を行い、その結果を標準偏差を付した平均値で提示した。Triacylglycerol の分析結果を総合的に解釈するために、主成分分析(Principal Component Analysis : PCA)に供したが、その解析には、市販の統計解析ソフトウェア JUSE-statworks/V4.0 sw4 (Union of Japanese Scientists and Engineers, Tokyo, Japan)を使用した。

4-3 結果と考察

4-3-1 葉たばこ中の Triacylglycerol の構造推定

本章の検討は、低極性の化合物分離に NARPC が有効であることから、既往の方法 (Ishida, 2010) (N. Ishida, 2011) の適用検討から開始された。また別の既報にあるように、グリセロールに結合した脂肪酸を推測できるため、APCI-MSD を検出器とすることで、葉たばこに含まれる Triacylglycerol の構造推定を進めた (M. Holcapek, 2003) (A. Jakab, 2002) (W. W. Christie, 1987)。なお葉たばこの Triacylglycerol の脂肪酸は、Linolenic acid (Ln)、Linoleic acid (L)、Oleic acid (O)、Palmitic acid (P)、Stearic acid (S) であることが既に知られている (A. Koiwai T. K., 1979) (T. Matsuzaki, 1981)。そこで、これらの脂肪酸の組み合わせである Triacylglycerol に対象を絞り、12 種類の想定される Diacylglycerol イオンの m/z を、Selected Ion Monitoring (SIM) モードに設定することにした。構造推定は Figure 4-1 に示されているように、各 Triacylglycerol の構造推定は、脂肪酸の炭素数や二重結合の数に依存するカラムからの溶出順序と、同一の保持時間で検出される Diacylglycerol イオンから推測が可能であった。Figure 4-2 は、Triacylglycerol を分析した際の、各 m/z における抽出イオンクロマトグラム (Extracted Ion Chromatogram: EIC) である。 m/z が 601.7 の EIC において保持時間 30 min に現れる LnOS と LOP などは十分な分離が得られていない。しかし他のピークは構造推定と定量分析に十分な分離を示した。この検討から、脂肪酸の結合位置が異なる位置異性体は、構造推定できないものの、葉たばこ中に 35 種類の Triacylglycerol が存在することを明らかにした。

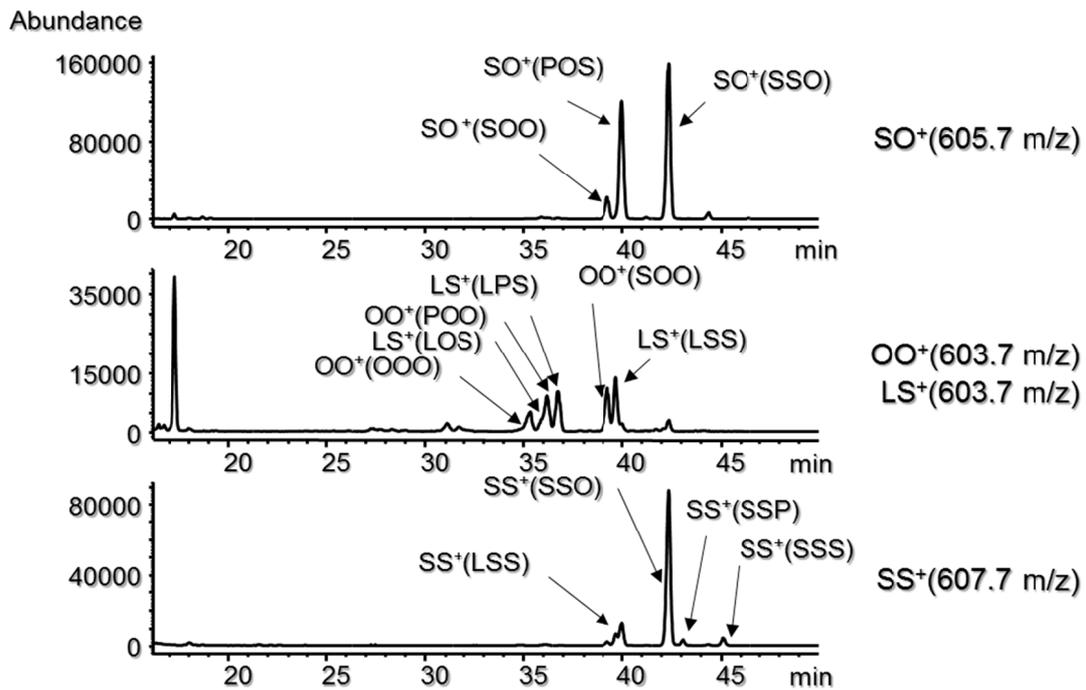


Figure 4-1 葉たばこ中の Triacylglycerol の LC/APCI-MSD によるイオン抽出クロマトグラム

SIM モードを設定した APCI-MSD と、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC) を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種(304)葉たばこのサンプル溶液の抽出イオンクロマトグラム。クロマトグラム上の Triacylglycerol の略号については、4-2-1 を参照。分析条件については、実験の部 4-2-5 に記載。

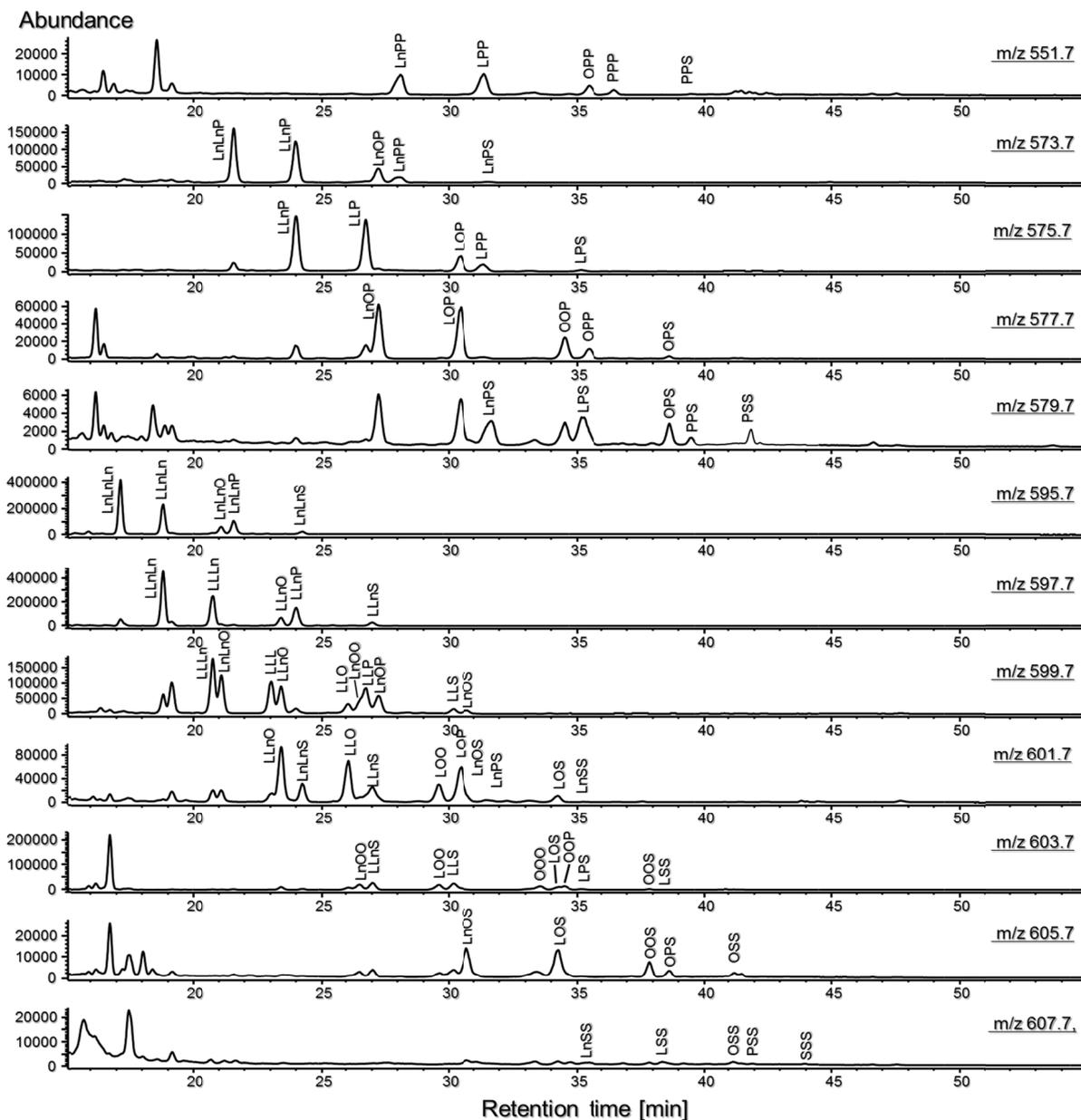


Figure 4-2 葉たばこ中の Triacylglycerol の LC/APCI-MSD によるイオン抽出クロマトグラム

SIM モードを設定した APCI-MSD と、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC) を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種(304)葉たばこのサンプル溶液の抽出イオンクロマトグラム。クロマトグラム上の Triacylglycerol の略号については、4-2-1 を参照。分析条件については、実験の部 4-2-5 に記載。

4-3-2 標準 Triacylglycerol による分析の妥当性検証

市販の標準 Triacylglycerol (LnLnLn、LLL、OOO、PPP、SSS) を、4-2-5 で記載した条件で分析した際の、検量線の傾きと決定係数を Table 4-1 に示した。Triacylglycerol からイオン化時に発生した Diacylglycerol イオン (LnLn⁺、LL⁺、OO⁺、PP⁺、SS⁺) のピーク面積により作製した検量線は、10~6,000 nm/mL の領域で、定量分析には十分な決定係数 0.999 を超える線形性を示した。しかしながら、各 Triacylglycerol の検量線の傾きには、やや差異がみられ、例えば LnLnLn などの傾きは小さい。これはイオン化時の脂肪酸脱離の度合が、脂肪酸の種類により異なり、Diacylglycerol イオンの発生量が異なるためと考えられる。つまり定量対象である Triacylglycerol の分析は、種類が異なる Triacylglycerol の検量線では難しいことになる。しかし葉たばこに含まれるあらゆる種類の Triacylglycerol 標品を揃えることは現実的ではないことから、正確な定量値を得るために、レスポンスファクター (M. Lísá M. H., 2008) を採用することとした。例えば、同一の脂肪酸のみで構成される、標準の Triacylglycerol のピーク強度をあらかじめ測定し、定量分析したい Triacylglycerol が LLnO であった場合は、LLL、LnLnLn、OOO (LnLn⁺、LL⁺、OO⁺) のピーク強度を相加平均し、その傾きから LLnO の定量値を求めることとした。定量分析としての妥当性を示すために必要な検出限界 (Limit Of Detection (LOD)) と定量限界 (Limit Of Quantification (LOQ)) を、2-3-3 に記載した方法と同様に測定したので Table 4-1 に記す。LOD と LOQ はいずれも葉たばこに含まれる Triacylglycerol を定量分析するために十分な値であり、理論値と実測値には著しい乖離は見られなかった。

Table 4-1

標準 Triacylglycerol の検量線、LOD、LOQ 測定結果

LOD と LOQ は 2-3-3 に記載した方法に則り測定された。分析条件については、実験の部 4-2-5 に記載。

	Actual conc. (ng/mL)	Detected conc. (ng/mL)	±SD (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	RSD (%)
LnLnLn	12.6	13.2	1.1	3.4	11.3	8.6
LLL	12.5	13.1	1.3	3.8	12.7	9.7
OOO	12.0	13.0	1.4	4.2	14.0	10.8
PPP	12.0	13.5	1.0	3.0	10.2	7.5
SSS	14.1	14.4	1.6	4.9	16.3	11.3

4-3-3 添加回収試験

添加回収試験は、トルコ産オリエント種のサンプル溶液に、分析対象に近い濃度水準で調製した、標準 Triacylglycerol を添加して測定した (Table 4-2)。なお本添加回収試験と、次項の定量分析において、検量線は絶対検量線法を採用し、APCI-MSD のコロナニードルの劣化を加味するために、サンプルを 10 個分析するごとに、検量線用の標準溶液を分析し、サンプルの両側の標準溶液で作成した検量線にてサンプルを定量する手順をとった。この添加回収試験では、ほぼすべての濃度領域で、回収率が 80% から 120% の範囲に収まり、実際に定量分析を行う上で、良好な値を示した。最も低濃度の SSS のみ標準偏差が大きく、ばらつきが観測されたが、LOQ に近い濃度となっていることが原因であり、他の Triacylglycerol は十分な再現性を示した。

Table 4-2 Triacylglycerol の添加回収試験結果

添加回収試験は、2008年産のトルコ産オリエント種(304)のサンプル溶液に、同一の脂肪酸が結合した Triacylglycerol の標準溶液を添加し、定量分析した結果から、無添加時の結果を減じることで、回収率を算出した。測定は一つのサンプル溶液に対して繰り返し5回行った。分析条件については、実験の部 4-2-5 に記載。

Compound	Added (ng/mL)	Detected (ng/mL)	±SD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
LnLnLn	0.0	2655.6	77.9		2.9
	1603.7	4297.2	148.3	102.4	3.5
	3207.4	6072.6	506.4	106.5	8.3
	5078.4	7644.6	213.1	98.2	2.8
LLL	0.0	159.7	5.7		3.6
	46.8	215.1	11.5	118.3	5.3
	140.5	325.9	12.7	118.3	3.9
	333.7	531.5	20.5	111.4	3.8
OOO	0.0	53.2	3.0		5.6
	28.4	84.8	3.6	111.0	4.2
	45.0	104.5	5.5	113.9	5.3
	135.0	203.7	8.2	111.5	4.0
PPP	0.0	23.6	0.7		3.1
	9.5	35.2	4.2	121.1	11.8
	28.5	55.4	1.1	111.1	2.0
	45.2	72.0	4.3	107.1	5.9
SSS	0.0	2.5	1.4		57.3
	2.4	3.9	0.4	62.2	9.7
	7.1	9.0	0.9	92.4	10.5
	11.2	13.2	1.6	95.9	12.5

4-3-4 葉たばこ中の Triacylglycerol の定量分析

一部の葉たばこに含まれる Triacylglycerol の定量分析した結果を、Table 4-3 と Figure 4-3 にまとめた。定量結果の中では、黄色種とバーレー種間における量的な差異が著しく、黄色種に Triacylglycerol が多い。また黄色種は、不飽和脂肪酸からなる Triacylglycerol (LLLn、LnLnL、LnLnLn など) を多く含み、反対にバーレー種は、やや飽和度の高い脂肪酸からなる Triacylglycerol (OPP、OPS、OOS など) が多い傾向がみられた。過去の報告では、不飽和脂肪酸を含むグリコ脂質やリン脂質は、飽和脂肪酸を含むそれらより、乾燥（キュアリング）過程における代謝が、早いことを報告している (A. Koiwai T. K., 1979) (T. Matsuzaki, 1981)。グリコ脂質やリン脂質は Triacylglycerol とは、代謝経路上で近傍の化合物同士であり、同様の傾向を示していると思われる。

加えて、黄色種は短時間の乾燥過程において、乾燥温度が 70°C に達するが、バーレー種は、常温での長時間乾燥であり、黄色種に Triacylglycerol が多いのは、加熱により代謝が途中で止められた可能性がある。オリエント種は通常太陽光下で乾燥（明色気干）後に、堆積発酵を経ることで作出されるが、Triacylglycerol の成分組成は、総量は同じであるものの、黄色種よりも Linolenic acid (Ln) を含む Triacylglycerol がやや多い傾向を示した。暗色火干葉の DFC は、Oleic acid を含む Triacylglycerol が多い傾向があり、総量としてはバーレー種と同等であった。これらの傾向をまとめると、異なる産地で作出された、あるいは品種も異なる葉たばこでも、類似の乾燥（キュアリング）過程を経た場合は、Triacylglycerol が類似の組成を示すものと考えられる。そのため Triacylglycerol の成分組成という切り口では、葉たばこは黄色種系統（黄色種とオリエント種）とバーレー種系統（バーレー種、在来種）に区分されるといえる。

Table 4-3 葉たばこ中の Triacylglycerol 定量分析結果

定量分析は、あらかじめ調製されたサンプル溶液を6回繰り返した。分析条件については、実験の部 4-2-5に記載。表内の定量結果は、全て葉たばこの乾物重量に対する $\mu\text{g/g}$ (D.B.)としている。葉たばこの種類につけられた略名は以下の通り；FCV：黄色種；BLY：パーレー種；ORI：オリエント種；DAC：在来種。産地記載の国名3文字表記はISO表示に準拠した。

ppm(D.B.)	黄色種 (BRA)			黄色種 (TZA)			パーレー種 (USA)			パーレー種 (BRA)		
	Average	SD	RSD (%)	Average	SD	RSD (%)	Average	SD	RSD (%)	Average	SD	RSD (%)
LnLnLn	70.1	±4.5	6.4	82.4	±21.2	25.7	28.4	±6.4	22.5	14.9	±4.4	29.1
LLnLn	121.1	±32.4	26.7	87.5	±5.2	5.9	29.1	±10.4	35.8	13.3	±3.0	22.6
LLLn	85.2	±4.4	5.2	55.8	±7.0	12.6	16.8	±7.5	44.5	8.5	±2.0	23.9
LnLnO	29.2	±2.3	7.9	12.1	±1.0	8.4	6.1	±3.0	48.4	2.8	±0.8	27.6
LnLnP	50.9	±3.4	6.7	58.8	±3.9	6.7	24.9	±9.2	37.1	15.0	±3.5	23.5
LLL	18.0	±1.4	7.5	9.1	±0.8	8.8	5.7	±2.0	35.0	6.4	±0.6	9.0
LLnO	43.7	±3.3	7.6	15.1	±0.9	5.9	9.1	±2.1	22.8	5.1	±0.9	17.0
LLnP	52.6	±5.7	10.8	42.8	±2.6	6.2	21.0	±5.2	24.8	9.9	±2.6	26.6
LnLnS	9.6	±1.1	11.2	11.0	±0.9	8.0	4.0	±0.5	12.3	1.9	±0.5	25.2
LLO	16.5	±1.5	9.1	6.0	±0.7	12.0	7.8	±3.6	46.6	8.7	±2.9	33.4
LnOO	13.3	±1.9	14.0	4.0	±0.8	20.4	2.9	±1.1	38.5	4.9	±3.2	65.2
LLP	45.2	±12.3	27.2	26.4	±3.3	12.6	13.5	±5.1	37.7	10.1	±2.1	20.5
LLnS	20.2	±2.7	13.3	17.7	±1.9	11.0	4.8	±1.6	32.5	3.3	±0.6	19.3
LnOP	34.5	±1.8	5.3	18.3	±4.0	22.1	8.3	±2.9	34.9	4.6	±1.1	24.0
LnPP	8.7	±0.7	8.3	10.6	±1.6	15.4	3.2	±1.1	33.5	2.0	±0.5	23.9
LOO	10.2	±0.7	6.6	3.3	±0.3	9.1	8.7	±4.1	46.4	6.6	±0.8	12.7
LLS	8.2	±0.6	7.3	5.3	±0.4	7.4	3.2	±1.2	36.5	2.4	±1.0	39.2
LOP	56.3	±3.4	6.0	39.2	±2.0	5.2	22.9	±6.3	27.5	12.2	±3.7	30.6
LnOS	6.2	±0.3	5.6	3.2	±0.3	10.4	1.2	±0.4	33.1	0.9	±0.3	32.5
LPP	7.2	±0.6	8.2	8.5	±1.1	12.6	11.7	±4.3	36.6	3.9	±1.0	25.1
LnPS	2.7	±0.2	8.0	3.1	±0.2	7.7	1.0	±0.4	35.8	0.7	±0.2	27.5
OOO	3.1	±0.3	9.3	2.0	±0.4	19.1	6.3	±2.9	47.0	4.5	±1.1	25.3
LOS	15.6	±0.6	3.8	7.4	±0.6	7.7	11.6	±3.6	31.4	5.7	±2.0	35.4
OOP	7.0	±1.0	13.7	5.2	±0.9	16.4	15.8	±6.4	40.6	6.5	±1.9	29.7
LPS	2.2	±0.3	12.1	3.1	±0.6	17.8	8.2	±3.1	38.3	2.0	±0.5	24.5
LnSS	0.6	±0.1	9.6	1.0	±0.2	16.8	0.4	±0.3	67.3	0.2	±0.1	32.8
OPP	2.8	±0.3	12.1	6.4	±0.9	14.2	19.8	±8.1	40.7	4.1	±1.1	27.4
PPP	0.5	±0.1	21.0	0.6	±0.1	17.2	0.4	±0.1	36.1	0.2	±0.1	42.9
OOS	1.3	±0.1	8.9	1.2	±0.2	15.8	6.2	±2.3	37.7	2.0	±0.5	26.6
LSS	0.5	±0.0	7.6	0.6	±0.2	28.4	1.8	±0.7	39.8	0.5	±0.2	29.2
OPS	1.2	±0.1	11.2	3.0	±0.4	11.8	15.6	±6.2	39.9	2.9	±1.2	39.7
PPS	0.2	±0.0	20.0	0.3	±0.0	15.1	0.3	±0.1	38.6	0.2	±0.1	40.0
OSS	0.4	±0.1	24.5	0.9	±0.1	11.9	2.8	±1.9	66.4	0.5	±0.3	57.2
PSS	0.2	±0.0	26.9	0.2	±0.1	25.4	0.1	±0.1	79.5	0.5	±0.7	144.1
SSS	0.0	±0.0	164.1	0.1	±0.1	116.8	0.1	±0.1	119.1	0.2	±0.3	123.7
Total	745.4			552.2			323.8			168.0		

ppm(D.B.)	オリエント種 (TUR)			オリエント種 (GRC)			DFC (TZA)			DAC (PHL)		
	Average	SD	RSD (%)	Average	SD	RSD (%)	Average	SD	RSD (%)	Average	SD	RSD (%)
LnLnLn	121.7	±7.5	6.2	64.2	±5.0	7.9	7.5	±2.2	28.5	1.5	±0.2	13.0
LlnLn	93.5	±5.8	6.2	50.4	±2.5	4.9	10.5	±0.9	8.8	1.8	±0.2	9.6
LLLn	36.9	±4.2	11.4	21.9	±2.0	9.0	11.3	±2.3	20.8	1.5	±0.3	22.5
LnLnO	35.0	±2.3	6.5	15.9	±1.0	6.0	1.6	±0.4	25.7	0.9	±0.2	19.7
LnLnP	109.3	±10.8	9.9	57.5	±3.9	6.8	9.7	±0.8	8.4	2.6	±0.3	13.4
LLL	9.3	±1.4	15.5	22.5	±4.4	19.4	6.6	±0.5	8.2	0.8	±0.1	15.5
LlnO	29.5	±2.5	8.6	16.4	±1.4	8.3	5.0	±0.5	9.3	1.6	±0.2	11.5
LlnP	48.9	±5.8	11.9	28.2	±2.0	7.3	21.6	±3.7	17.3	2.3	±0.2	10.1
LnLnS	24.6	±3.1	12.4	11.8	±1.2	10.0	1.4	±0.4	27.7	0.3	±0.1	15.7
LLO	8.6	±0.5	6.0	12.8	±1.4	10.9	16.4	±2.2	13.5	2.4	±0.2	9.0
LnOO	10.1	±1.2	11.5	6.1	±0.4	6.3	3.9	±0.7	16.7	2.3	±1.0	43.5
LLP	21.6	±4.0	18.7	21.8	±1.6	7.4	21.9	±1.5	6.9	2.7	±0.7	24.9
LlnS	19.5	±2.9	14.9	10.4	±0.8	7.8	3.9	±0.3	8.4	0.9	±0.1	14.1
LnOP	43.4	±5.7	13.1	21.1	±1.2	5.9	6.3	±0.4	6.6	2.2	±0.3	13.0
LnPP	17.9	±2.1	12.0	9.4	±0.6	6.1	2.7	±0.9	34.7	0.7	±0.2	24.6
LOO	5.8	±0.5	9.4	6.1	±0.4	6.5	34.3	±2.3	6.7	2.3	±0.2	6.7
LLS	5.4	±0.5	8.8	5.4	±0.5	10.0	8.6	±0.4	4.8	0.8	±0.1	7.3
LOP	48.5	±5.1	10.6	28.8	±1.7	6.0	48.9	±4.8	9.9	4.0	±0.4	10.6
LnOS	8.5	±0.7	8.2	3.5	±0.2	5.8	1.7	±0.2	9.3	0.6	±0.0	3.6
LPP	7.8	±0.7	8.9	5.6	±0.8	14.1	40.3	±3.4	8.4	3.0	±0.2	7.1
LnPS	7.3	±0.7	9.5	3.2	±0.6	17.4	1.3	±0.3	22.5	0.3	±0.1	38.9
OOO	2.3	±0.3	14.5	2.0	±0.1	2.9	27.9	±3.2	11.4	1.1	±0.0	1.7
LOS	10.3	±1.0	10.1	7.6	±0.4	5.6	45.2	±2.8	6.3	2.8	±0.2	5.5
OOP	5.1	±0.6	11.1	3.7	±0.5	13.1	91.1	±13.4	14.7	3.8	±0.5	12.2
LPS	3.0	±0.2	6.3	2.1	±0.3	14.0	23.5	±2.6	11.2	1.4	±0.3	20.0
LnSS	1.6	±0.3	17.4	0.8	±0.1	17.9	0.4	±0.1	33.1	0.3	±0.1	51.7
OPP	3.8	±0.5	13.9	2.6	±0.3	12.4	91.0	±10.0	11.0	4.8	±0.9	18.8
PPP	0.9	±0.1	12.8	0.6	±0.1	10.3	0.7	±0.1	15.2	0.1	±0.1	107.0
OOS	1.1	±0.2	13.8	0.7	±0.1	14.1	30.6	±3.1	10.3	1.0	±0.4	38.7
LSS	0.7	±0.0	6.2	0.6	±0.1	22.4	5.0	±0.8	16.7	0.4	±0.1	34.1
OPS	1.7	±0.2	11.7	1.1	±0.1	12.2	61.8	±6.9	11.1	2.7	±0.3	10.2
PPS	0.5	±0.0	7.2	0.4	±0.1	17.3	0.6	±0.1	14.2	0.4	±0.7	158.6
OSS	0.6	±0.1	16.3	0.5	±0.1	15.6	12.4	±1.0	8.2	0.6	±0.2	38.3
PSS	0.7	±0.1	9.3	0.3	±0.1	19.4	0.3	±0.0	12.1	0.1	±0.0	26.6
SSS	0.1	±0.0	37.3	0.1	±0.0	36.5	0.1	±0.0	44.6	0.1	±0.0	13.2
	745.6			446.2			655.9			55.0		

全体的な傾向を把握するために、結果を主成分分析(Principal Component Analysis : PCA)に供した。PCA に供する定量分析結果の行列は、Solanesol とその誘導体の分析を示した 2-3-4 で述べたように、分散共分散行列と相関係数行列がある。分散共分散行列は、PCA の結果に量的な概念を含むことができ、相関係数行列の場合は、成分間の定量値のスケールが大きく異なる場合や、単位が異なるデータの場合に使用される。2-3-4 では相関係数行列を使用しており、本来的には同じ形式の出発行列を使用すべきである。ただ相関係数行列で解析を実行すると、成分組成の影響が強くなったためか、サンプル間の距離が近く、距離感が見えにくくなったため、分散共分散行列を開始行列とした。60 種の葉たばこの定量結果を、PCA に供し、主成分得点散布図と、主成分負荷量散布図として Figure 4-3 に示した。主成分得点散布図における累積寄与率は、90%を超えており、定量結果の分散を損なうことなく、低次元化することに成功した。主成分得点散布図を俯瞰すると、第一主成分方向の左側に、バーレー種と在来種が付置され、右側に黄色種とオリエント種が付置されていた。負荷量散布図を見ると、比較的飽和度の高い脂肪酸を含む Triacylglycerol が右側に付置され、飽和度の高い脂肪酸を含む Triacylglycerol が左側に付置しているため、結合脂肪酸の飽和度と葉たばこの乾燥過程には関係性があることが推測された。また第二主成分方向では、黄色種とオリエント種が離れて付置されていた。負荷量散布図の右下に Linolenic acid を含む Triacylglycerol が多く付置されているため、Linolenic acid を含む Triacylglycerol がオリエント種に多いといえる。また暗色日干葉の DFC は他の葉たばことは大きく隔てられた位置にあるが、これは Oleic acid を含む Triacylglycerol が多いためと考えられる。全体的に得点散布図を俯瞰すると、品種同士が離れて付置されており、一方で品種内はサンプル数が少ないこともあり、産地や着位を分けるほどではなかった。出発行列が異なるため明確ではないものの、Triacylglycerol は Solanesol とその誘導体よりも、葉たばこ間の差異に対する説明力が強い成分群と考えられた。

4・4 小括

本章では、分離のための NARPC と、検出に向けた APCI-MSD を組み合わせることで、葉たばこに含まれる Triacylglycerol の分析方法を構築した。そして、Linolenic acid、Linoleic acid、Oleic acid、Palmitic acid、Stearic acid を含む 35 種の Triacylglycerol を葉たばこに見出した。市販の標準 Triacylglycerol を用いることで、レスポンスファクターを見積もり、標準品とは種類の異なる葉たばこに含まれる Triacylglycerol も、近似的な定量値を求める分析方法を確立した。方法の妥当性検証を行ったところ、検量線の線形性、LOD、LOQ などは良好な値を示した。分析結果より Triacylglycerol の成分組成という切り口では、葉たばこは黄色種系統と気干（バーレー種など）系統に二分されることが分かった。全体としては、乾燥（キュアリング）過程が、Triacylglycerol の成分組成を決定しており、過去の報告によるリン脂質やグリコ脂質と同様の傾向を示すことが分かった。分析サンプル数を増やし、結果を主成分分析に供したところ、黄色種とオリエント種に不飽和脂肪酸が結合した Triacylglycerol が多く、バーレー種と在来種に飽和脂肪酸が結合した Triacylglycerol が多いことが分かった。また主成分得点散布図を俯瞰したところ、葉たばこの品種同士が離れて付置しており、同一品種内の差異（産地や着位）への関係は明らかにはならなかった。しかし、Solanisol とその誘導体より、Triacylglycerol の方が、葉たばこの差異を説明できる可能性があると考えられた。

5 章 Phytosterol と Phytosterol ester 分析

5-1 序論

Phytosterol (Figure 5-1) は植物に含まれるステロイド成分であり、特に細胞膜や種子に多く存在し、広範な植物生理機能に関係することが知られる (I. Schuler, 1991)。この化合物の基本構造は、2,3-epoxy squalene から生成したテトラサイクル構造であり、炭素数 28 や 29 の中心構造には二重結合が内包されることもある。また、化合物によっては、二重結合を含むアルキル鎖(R₂)が末端に存在する (G.A. Bean, 1973)。Phytosterol は、この構造的多様性により、様々な生理機能を発揮する。各 Phytosterol の構造は、生体により厳密に認識・利用されており (R.A. Moreau, 2002)、代表的な例として、食用油、マヨネーズ、マーガリンといった Phytosterol 添加食品が挙げられる。これはコレステロールと構造が異なる Phytosterol により、コレステロール吸収を抑制し、血中コレステロール量を低下させるためと考えられている (A. Bernsteiner, 2011)。構造的多様性に加え、Phytosterol の成分組成は、植物の種類により相異がある。そのために品質判別などに向けた、重要な指標成分であり、重要な分析対象とされる (I. Schuler, 1991) (M. J. Lerma-Garcia, 2009)。マーカーとしての必要性に端を発した、Phytosterol の分析は、Phytosterol ester (L. Cercaci, 2003) (S. S. Cunha, 2006) (G. Iafelice, 2009)、Phytosterol glycoside (B. Pieber, 2010)、Phytosterol oxide (S. Azadmard-Damirchi, 2009) といった誘導体まで、対象が拡大している。

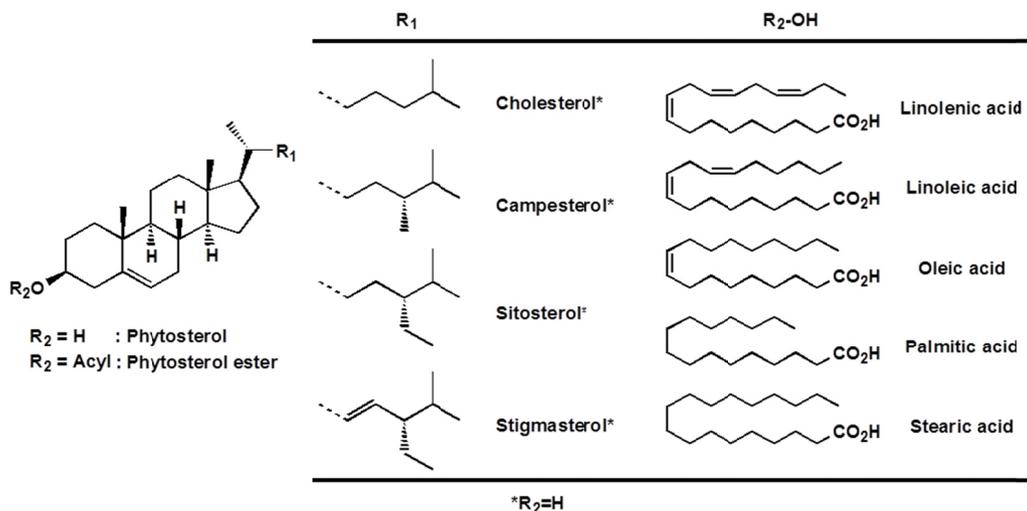


Figure 5-1 Phytosterol と Phytosterol ester の化学構造

葉たばこは、センプラノイド、ラブダノイド、テルペノイド、カロテノイド、炭化水素、脂肪酸、配糖体、アルカロイド、ポリフェノール、アミノ酸、糖、有機酸といった、多種多様な化合物を含む、植物の一種である (R. L. Stedman, 1968)。そして産地、着位、乾燥 (キュアリング) 条件など、葉たばこの品質に大きく関わる差異を説明するために、これらの化合物を対象とした、多くの分析結果が報告されてきた (J. C. Leffingwell, 1999)。とりわけ、葉たばこ表面にあるセンプラノイドやテルペノイドのような樹脂成分が、葉たばこの喫煙燃焼時における、味と香りに関わっている可能性が高いとされ、注力されてきた (R. L. Rowland P. H., 1956) (D. L. Roberts, 1962)

(R. L. Rowland P. H., 1959)。しかしながら、葉たばこの樹脂の一部と考えられる Phytosterol と Phytosterol ester の組成は、解明の重要性について言及されたものの、妥当な分析方法が見当たらないことから、その組成は、ほとんど明らかにされていない (W. Liu, 2007) (J. Ai, 1997)。こうした状況を踏まえ、本章では、Phytosterol と Phytosterol ester の、簡便な分析方法の開発を進めることとした。そして、様々な葉たばこにおける成分組成差異の明確化し、葉たばこの中でこれらの成分が、どの程度量的差異を示すのか明らかにすることとした。

遊離の Phytosterol 分析方法は数多く報告されている。例えば GC で分離した場合には、検出器を水素炎イオン検出器(FID)や質量分析装置(MSD)とした分析方法が知られている。ほかにも LC で分析する場合には、ダイオードアレイ検出器 (PDAD)、視差屈折率検出器 (RID) エレクトロスプレーイオン化法質量分析装置 (ESI-MSD)、大気圧化学イオン化法質量分析装置 (APCI-MSD) を検出器とした方法が知られており、これらの組み合わせは既往の総説に詳しい (S. L. Abidi, 2001)。一方で Phytosterol ester の分析方法は乏しく、ester 体同士の類似構造による分離の困難さと、分子の大きさにより、適用できる検出器が制限されるためである。それゆえ過去の方法も、以下の通り、粗い分離か事前の精製を含んでいる。1) 薄層クロマトグラフィーによる、Steryl ester マトリックスの精製を経た、GC による分析 (R. P. Evershed V. L., 1987)、2) フラッシュクロマトグラフィーによる Phytosterol と Phytosterol ester の事前分離を経た、GC による Phytosterol ester 分析 (P. Kalo, 2001)、3) 固層抽出による Phytosterol、Phytosterol ester 分離を経た、抽出画分を GC 分析 (A. Barnsteiner, 2012) (R. Esche A. B., 2012)、4) Phytosterol ester の成分組成を明らかにするために GC/CI-MSD を利用した定性分析 (E. Jover, 2002)、5) 飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の結合した Phytosterol ester の共溶出があるものの、事前のクロマトグラフィーを含まない LC や GC-LC による Phytosterol ester の分析 (I. Mezine, 2003) (W. Kamm, 2001)、などが挙げられる。既往の分離方法は、優れた再現性があることから、GC が加水分解後の遊離 Phytosterol 分析に多用されてきた。しかしながら無極性カラムを利用した GC の場合は、二重結合を一つ含む脂肪酸のエステルと、飽和脂肪酸のエステルを分離することができず、極性カラムを活用しても同様に分離は難しい (A. Bernsteiner, 2011)。LC 分離の場合は、順相カラムにより極性の異なる化合物マトリックスを粗く事前に分画する方法が多用されており、分画後に、別の分析装置で Phytosterol ester を分析する方法が一般的であった (A. Bernsteiner, 2011)。逆相カラムの利用例もあり、炭素数の異なる脂肪酸が結合した Phytosterol ester 同士の分離に有効とされるが、十分な分離達成には至っていない (P. Kalo, 2001)。Phytosterol ester のような大きな分子に向けた検出器としては、Phytosterol と同様に、GC と連結した水素炎イオン検出器(FID)、質量分析装置(MSD)、LC と連結した大気圧化学イオン化法質量分析装置 (APCI-MSD)、キャピラリー電気泳動クロマトグラフィー (Capillary Electrophoresis Chromatography : CEC) と連結したダイオードアレイ検

出器 (Photo Diode Array Detector : PDAD) が知られているが (S. L. Abidi, *Capillary electrochromatography of sterols and related sterol esters derived from vegetable oils.*, 2004)、いずれも検出器で分離は難しい。このように、高級脂肪酸である Palmitic acid (C16)、Stearic acid (C18)、Oleic acid (C18:1)、Linoleic acid (C18:2)、Linolenic acid (C18:3) が結合した Phytosterol ester を事前の分離を必要とせず完全に分離できる簡便な分析方法は見当たらない状況である。

本章における検討は、上記背景を踏まえ、分離には非水系の逆相クロマトグラフィーである non-aqueous reversed-phase chromatography (NARPC) を採用した。これは既に葉たばこに含まれる低極性不揮発性の成分である Solanesol ester (Ishida, 2010)、Chlorophyll 代謝物 (N. Ishida, 2011)、Triacylglycerol (N. Ishida, 2013) などの分離に効果的だったことによる。検出は前章までと同様に、APCI-MSD を採用した。水系の逆相クロマトグラフィーと APCI-MSD を組み合わせた Phytosterol ester 分析方法は、既に報告されているが、ester 体が分離出来なかったため、改善が期待できる。本章の冒頭部分で、葉たばこに含まれる Phytosterol と Phytosterol ester の分離と構造推定について述べる。次いで、方法の妥当性検証に向けて、検量線の線形性、検出限界 (Limit Of Detection : LOD)、定量限界 (Limit Of Quantification : LOQ)、添加回収試験を行った。最後に、様々な葉たばこに含まれる Phytosterol と Phytosterol ester の定量分析結果を紹介し、さらに全体的な傾向を把握するために、主成分分析 (Principal Component Analysis : PCA) と階層的クラスター分析 (Hierarchical Clustering Analysis) した結果を示す。

5-2 実験方法

5-2-1 サンプルおよび試薬類

葉たばこは、Table 10-1 記載のサンプルを Phytosterol ester 分析に供した。抽出ならびに液体クロマトグラフィーによる分析に向けて使用した溶媒は、全て HPLC グレードとし、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan) 製を使用した。構造推定と定量に向けた、標準 Phytosterol は下記の市販品を利用し、場合によっては純度を向上させるために分取液体クロマトグラフィー(LC)で精製し、それらを Phytosterol ester 合成に供した。エステル化に使用した試薬も併せて下記の通り記載する。Sitosterol (Sitosterol (40%)、Campesterol (27%)、Stigmasterol (20%)、2,3-Dehydrocapmesterol (6%)を含む大豆油からの抽物。GC/FID 分析によるエリア面積から決定)、Linolenic acid (C18:2)、*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)は、Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) 製を使用した。Cholesterol、Palmitoyl chloride (C16)、4-Dimethylaminopyridine (DMAP)は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan) 製を使用した。 α -Linolenic acid (C18:3)、Stearoyl chloride (C18)は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 製とし、エステル合成時の反応溶媒である Dehydrated pyridine と Dehydrated

tetrahydrofuran (THF)は、Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)製とし、Stigmasterol は、TAMA Biochemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)製を使用した。構造推定と定量に向けて、またエステル化の開始化合物としての標準 Campesterol と Sitosterol は、市販の上記 Sitosterol を精製することで調製した (方法は後述)。

5-2-2 サンプルの調製

乾燥 (キュアリング) 後の葉たばこから、分析に供するサンプル溶液を調整する手順は、前述の実験項 2-2-2 サンプルの調整方法と同一とした。

5-2-3 水分測定

乾燥 (キュアリング) 後の葉たばこの水分測定は、前述の実験項 2-2-3 水分測定と同一とした。

5-2-4 分離カラムと分析装置条件

5-2-4-1 Sitosterol と Campesterol の精製

Sitosterol と Campesterol の精製は、DAD G1315B, fraction collector G1364C、10 mm flow cell G1315-60012 を備えた Agilent 1100 HPLC (Agilent Tech., CA, USA)による分取液体クロマトグラフィーにより進められた。逆相カラムである、Capcell PAK C18 (250 mm × 10.0 mm I.D., 5 μm, SHISEIDO CO., Ltd. Tokyo, Japan) 3本を、PEEK チューブにより直列に接続し、以下の溶離液条件を適用した。溶離液 A : Acetonitrile、溶離液 B : Acetone ; 流速 : 4.0 mL/min ; アイソクラティック条件 : 溶離液 A 25% (20 min まで維持)。またカラム温度は 25°Cとし、サンプル溶液注入量は、50 μLとした。市販の Sitosterol に含まれる 4種の Phytosterol を検出するために、PDAD の吸収波長を 205 nm に設定した。市販の Sitosterol (5-2-1 記載) を、HPLC グレードの Acetone に溶解させ(20 mg/mL)、これを、標準品精製に向けたサンプル溶液とした。十分な分離と、繰り返し数増加を達成するために、サンプル溶液の注入 20 min 後に、注入した Phytosterol がカラムから溶出してくる前に、次のサンプル溶液を注入した。PDAD によるクロマトグラム上に現れた Campesterol (8.7 min (注入後 28.7 min)) と Sitosterol (10.6 min (注入後 30.6 min)) のピークを回収した。回収した画分は、GC/MSD により分析し、備え付けの解析ソフトウェア Chemstation と、質量スペクトルライブラリーの Wiley7(Agilent Tech., CA, USA)により、成分を確認した。純度は、LC/APCI-MSD のスキャン分析により得られた、クロマトグラムのピーク面積から決定した (装置条件については後述)。この精製作業は、定量と構造推定、エステル化に向けた Campesterol と Sitosterol の必要量が得られるまで繰り返し行った。

5・2・4・2 Phytosterol と Phytosterol ester に向けた NARPC

分析では、液体クロマトグラフィー質量分析装置として、G1379B degasser、G1312B Binary pump SL、G1367C Hip-ALS SL、G1330B FC/ALS therm と 6130 APCI-MSD を備えた、Agilent 1200 HPLC system (Agilent Tech., CA, USA)を使用した。分析用のカラムと溶離液の条件は、2-2-4 記載の条件と同一とした。APCI-MSD の測定条件とデータ取り込み条件は、精製した Phytosterol の純度決定の場合には、100 から 1850 m/z (Centroid)に設定したスキャンモードを用い、定量分析の際には、下記のイオン取り込み時間と、Selected Ion Monitoring (SIM)の選択イオンを適用し、それ以外の設定については、2-2-4 記載の条件と同一とした。イオンの取り込みは、分析開始から 10 min 後に開始し、選択イオンの m/z は 369.4、383.4、397.4、409.4 とし、20 min から 55 min までは、369.4、383.4、395.4、397.4 とした。すべての取得データは、分析装置に組み込まれた Chemstation (Agilent Tech., CA, USA)により処理した。なお定量分析時に、カラムからの溶出液は、APCI インターフェースのスプレー部に達する手前で、1/4 へと分流した。測定した全てのデータは、装置付属のソフトウェア、Chemstation (Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA)で解析した。

5・2・5 Phytosterol ester 標品の合成

Phytosterol ester は脂肪酸か、酸ハライドを用いて Phytosterol のエステル化により合成した。酸ハライド (oleoyl chloride, palmitoyl chloride and stearoyl chloride)を利用する Phytosterol ester の合成は、以下の手順に従った。高純度アルゴンを充填し、攪拌子を入れた、100 mL 二ロナスフラスコ内において、無水 THF およそ 50 mL に Phytosterol (Cholesterol、Campesterol、Stigmasterol、Sitosterol)100 mg を初めに溶解させた。続けて Dehydrated pyridine(5 eq)を、シリンジにより反応溶液に滴下した後に、触媒量の 4-dimethylaminopyridine (DMAP)を加えて、さらに 60 min 以上攪拌した。その後、対応する上記記載の酸ハライドの THF 溶解液を、反応物にシリンジにて滴下した。反応は室温で、少なくとも 6 時間から 24 時間攪拌を続けた。0.05 M の塩酸水溶液(10 mL)にて反応物を中和し、さらに 20 min 以上の間、氷浴中にて攪拌を続けた。その後、混合物を、200 mL の分液漏斗に移し、30 mL 程度の n-hexane により、三回抽出した。集めた有機層は、飽和塩化ナトリウム水溶液にて、再度分液漏斗にて洗浄された後に、無水硫酸ナトリウムを加えることで、乾燥した。遊離の脂肪酸 (Linoleic acid (C18:2)、Linolenic acid (C18:3)) でエステル化する場合は、Dehydrated pyridine を加える代わりに、DCC(4 eq)を反応物に加え、Linolenic acid を加える前に、十分に DCC を Phytosterol と反応させるために、2 時間ほど室温にて攪拌を行った。Phytosterol が DCC と十分に反応した場合、THF の白濁化が見られた。以後の有機層を分離するまでの操作は、酸ハライドを使用する場合と同一の手順をとった。

合成された Phytosterol ester は、n-hexane を溶離液、担体を関東科学製のシリカゲル 60

(Tokyo, Japan) とした順相カラムクロマトグラフィーによる分離、続けて、Acetonitrile/Acetone = 30/70 を溶離液、担体を Waters 製の RP18 とした逆相カラムクロマトグラフィー(Millifred, MA, USA)により精製した。精製後の Phytosterol ester は、飽和脂肪酸が結合している場合は、-30°C にて n-hexane と Ethanol の混合溶媒からの再析出、ろ過することで精製した。また不飽和脂肪酸が結合している場合は、室温で液体状になるため、カラムクロマトグラフィーによる精製物を、標品とした。エステル化の収率は、70%から 90%であった。合成された Phytosterol ester の構造推定と純度の決定は、葉たばこから抽出されたサンプル溶液と、5-2-4-2 記載の分析条件において、保持時間と質量スペクトルの比較、並びに LC/APCI-MSD のスキャン分析により得られた、クロマトグラムのピーク面積からそれぞれ行った。

5-2-6 定量分析結果の統計解析

全ての定量結果は、事前に葉たばこから抽出したサンプル溶液を、3 回繰り返し分析を行い、その結果を標準偏差を付した平均値で提示した。Phytosterol と Phytosterol ester の分析結果から、様々な葉たばこにおける成分組成の差異と、差異の程度を把握するために、主成分分析(Principal Component Analysis : PCA)と階層的クラスター分析 (Hierarchical Clustering Analysis) に供したが、その解析には、市販の統計解析ソフトウェア JUSE-statworks/V4.0 sw4 (Union of Japanese Scientists and Engineers, Tokyo, Japan)を使用した。

5-3 結果と考察

5-3-1 Phytosterol と Phytosterol ester の分離と構造推定

初めに、非水系の逆相クロマトグラフィーである NARPC を分析系に組み込み、水系の逆相クロマトグラフィー (I. Mezine, 2003) と比較して良好な分離を示すか検討した。Figure 5-2 の a) は、二重結合を有する化合物検出に向けて、PDAD を検出器としたクロマトグラムである。既に著者が報告している通り (Ishida, 2010)、葉たばこに多くふくまれる Solanesol や Solanesyl ester が大きなピークとして現れた。Phytosterol や Phytosterol ester は量が少ないためか、PDAD で検出可能な二重結合を有しているものの、クロマトグラム上では夾雑化合物に妨害され、確認できなかった。そこで選択的な検出が期待できる APCI-MSD を分析系に組み込んだ。Figure 5-2 の b) は、スキャンレンジを 100-1850 m/z に設定した質量分析装置によるクロマトグラムであり、Triacylglycerol や Solanesol が確認された (N. Ishida, 2013) (Ishida, 2010)。Phytosterol や phytosterol ester は、Total Ion Chromatogram (TIC) 上には、現れなかったものの、Selected Ion Monitoring (SIM) モードを適用すれば、検出できるものと期待された。Figure 5-3 は、phytosterol である、Cholesterol、Campesterol、Stigmasterol、Sitosterol の質量スペクトルであり、それぞれの化合物が、水分子の脱離を経て、最大の強度を与えるイオン $[M+H^+-H_2O]^+$ へフラグメンテーションを起こしていることが確認できる。質量スペクトルは示していないものの、Phytosterol ester の場合も同様に、酸の脱離を経て、 $[M+H^+-Acid]^+$ を与えた。これを踏まえ、葉たばこに含まれる Phytosterol と Phytosterol ester は、標品と、保持時間と質量スペクトルを比較した。

Figure 5-2 の c) は、葉たばこに含まれる Phytosterol と Phytosterol ester から生成した、プロダクトイオンである $[M+H^+-H_2O]^+$ と $[M+H^+-Acid]^+$ を、選択的に検出する SIM モードによるクロマトグラムである。また Figure 5-4 は、各プロダクトイオンの m/z 別に、SIM モードのクロマトグラムであり、水系逆相クロマトグラフィーでは分離出来なかった Phytosterol ester を、完全に分離できた。ただし、遊離の Stigmasterol のみ、SIM モードを 409.4 m/z に設定したが、これは 395.4 m/z で検出した場合は、Figure 5-5 にあるように、Stigmasterol 近傍の Campesterol に由来するピークが重複し、定量分析の正確性に影響があると、考えられたからである。Stigmasterol から 409.4 m/z のプロダクトイオンが与えられる機構については、まだ分かっていないが、既報も同様のプロダクトイオンの生成に触れていることから (M. Bedner, 2008)、409.4 m/z を遊離 Stigmasterol の検出に用いることとした。検討の結果、24 種類の Phytosterol と Phytosterol ester が葉たばこに含まれていることを確認した (Table 5-1)。なお Phytosterol より飽和度の高い、テトラサイクル構造部に二重結合を含まない Phytostanol は、一般的に植物由来のコーン、麦、ナッツ、Phytostanol 添加ヨーグルトなどに、多量に含まれているが (A. Bernsteiner, 2011) (R. Esche B. S., 2013) (R. Esche L. M., 2013)、葉たばこに関する既報 (J. Heyer, 2004) と同様に、本研究の分析方法では確認

されなかった。加えて、Figure 5-4 の 395.4 m/z のクロマトグラムにおいて、化合物番号 6 のピーク前後に、構造推定が難しい未知ピークがあった。分子量と、APCI-MSD による質量スペクトルを考慮すると、Avenasterol と推定されたが、標品の入手が難しいため定量対象から除外した。

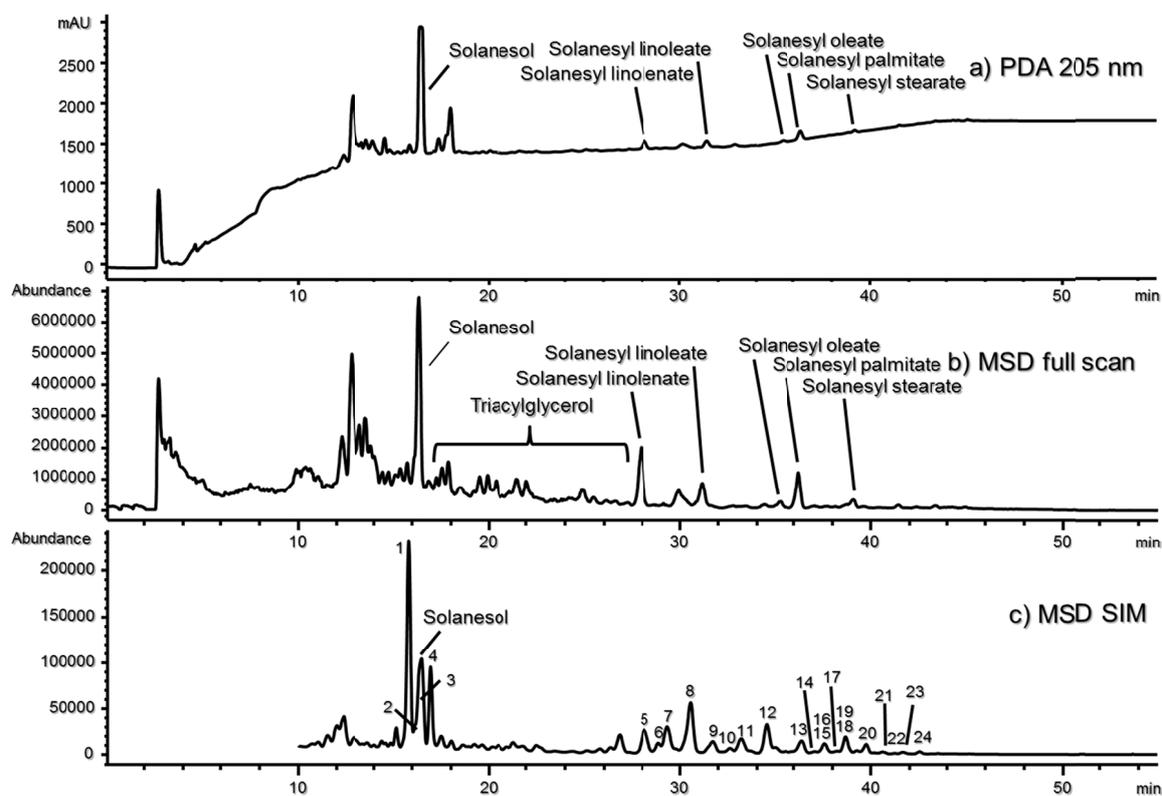


Figure 5-2 非水系逆相クロマトグラフィーによる葉たばこ抽出液のクロマトグラム

a) PDAD の吸収波長を 205 nm とし、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC) を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこのクロマトグラム。b) スキャンモードに設定した APCI-MSD と、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC) を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこのクロマトグラム。c) SIM モードに設定した APCI-MSD と、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC) を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこのクロマトグラム。クロマトグラム上の番号は、Table 5-1 に記載の化合物と対応。分析条件については、実験の部 5-2-4-2 に記載。

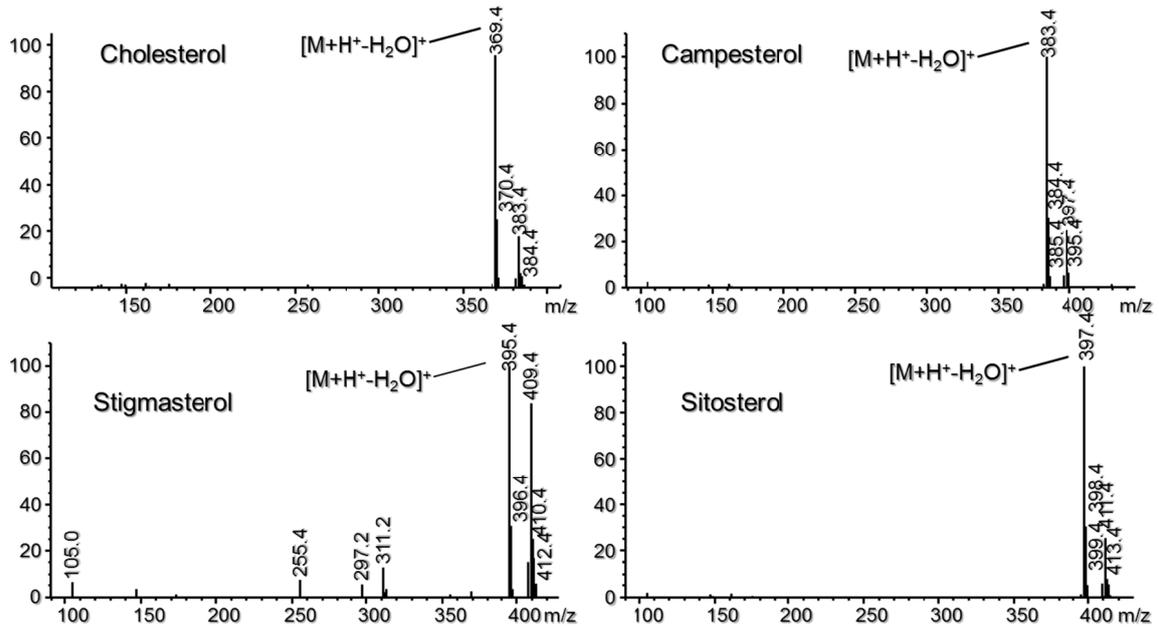


Figure 5-3 標準 Phytosterol の APCI-MSD による質量スペクトル

分析条件については、実験の部 5-2-4 に記載。

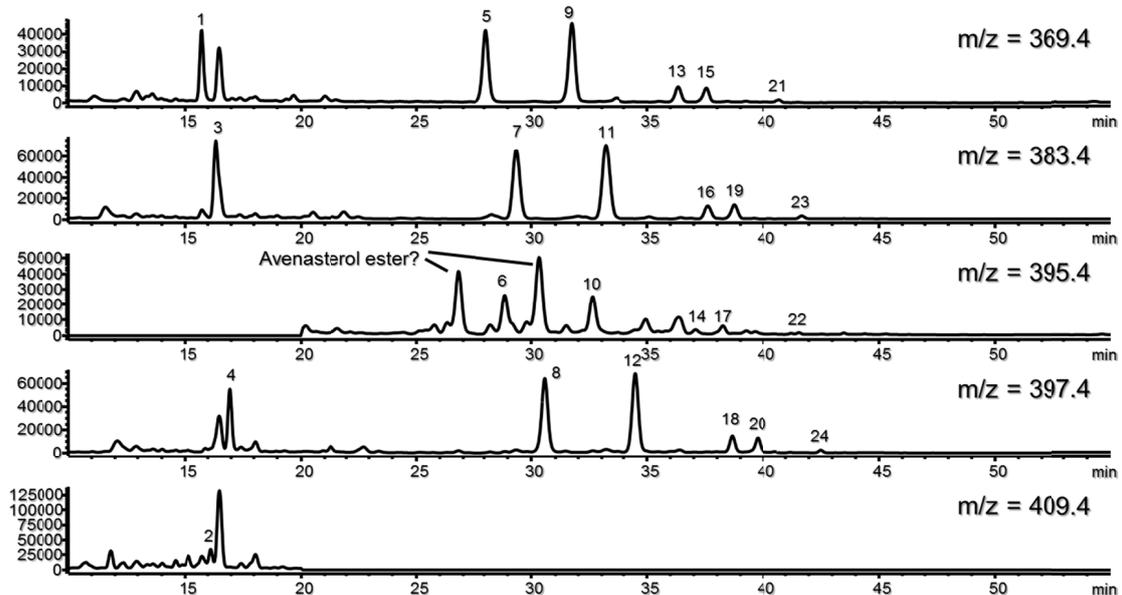


Figure 5-4 非水系の逆相クロマトグラフィーと SIM モード設定の APCI-MSD による抽出イオンクロマトグラム

SIM モードを設定した APCI-MSD と、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC) を組み合わせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉タバコのサンプル溶液の抽出イオン (369.4, 383.4, 397.4, 395.4, 409.4 m/z) のクロマトグラム。クロマトグラム上の番号は、Table 5-1 に記載の化合物と対応。分析条件については、実験の部 5-2-4-2 に記載。

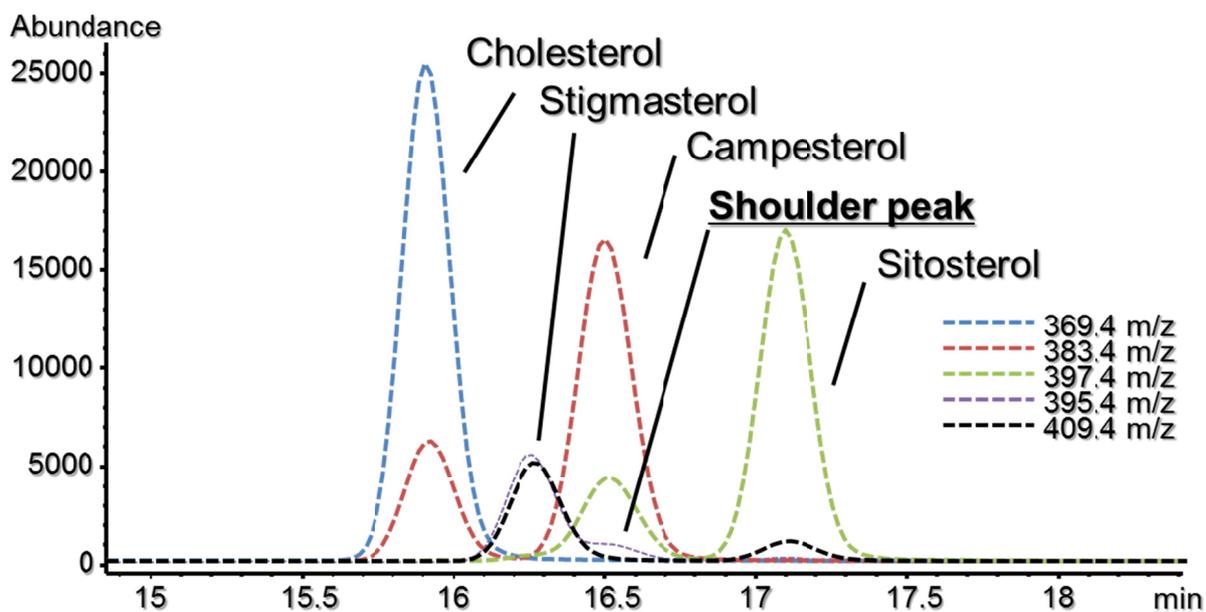


Figure 5-5 標準 Phytosterol の SIM モード APCI-MSD によるイオン抽出クロマトグラム

市販あるいは、あらかじめ分取クロマトグラフィーにより分取された標準 Phytosterol の SIM モードに設定された APCI-MSD によるイオン抽出クロマトグラム。紫点線が水の脱離後の Stigmasterol プロダクトイオンを検出する m/z に設定した場合で、黒点線が、Campesterol の影響を排除した m/z に設定した場合のイオン抽出クロマトグラム。分析条件については、実験の部 5-2-4 に記載。

Table 5-1 トルコ産オリエント種葉たばこに含まれる Phytosterols と Phytosterol esters

一覧表に記載の Chlorophyll 代謝物の保持時間は、APCI-MSD によるクロマトグラムに含まれるピーク頂上の時間とした。分析条件については、実験の部 5-2-4-2 に記載。SIM モードの選択イオンの m/z は、上記記載の理由に従い 5-2-4-2 に記載。すべての Phytosterol と Phytosterol ester は実験の部 5-2 に記載した通りあらかじめ市販品を入手、あるいは市販品を分離し、また合成して事前に調製された。表中の Phytosterol 名の前部に付された略号は、結合した脂肪酸の炭素数と二重結合の数を表す。Palmitic acid (C16)、Stearic acid (C18)、Oleic acid (C18:1)、Linoleic acid (C18:2)、Linolenic acid (C18:3)となる。

Number	Name	Selected ion	Retention time
		(m/z)	(min)
1	Cholesterol	369.4	15.6
2	Stigmasterol	409.4	16.0
3	Campesterol	383.4	16.2
4	Sitosterol	397.4	16.8
5	C18:3 Cholesterol	369.4	28.0
6	C18:3 Stigmasterol	395.4	28.8
7	C18:3 Campesterol	383.4	29.3
8	C18:3 Sitosterol	397.4	30.5
9	C18:2 Cholesterol	369.4	31.7
10	C18:2 Stigmasterol	395.4	32.6
11	C18:2 Campesterol	383.4	33.2
12	C18:2 Sitosterol	397.4	34.5
13	C18:1 Cholesterol	369.4	36.3
14	C18:1 Stigmasterol	395.4	37.1
15	C16 Cholesterol	397.4	37.6
16	C18:1 Campesterol	383.4	37.6
17	C16 Stigmasterol	395.4	38.3
18	C18:1 Sitosterol	397.4	38.7
19	C16 Campesterol	383.4	38.7
20	C16 Sitosterol	397.4	39.7
21	C18 Cholesterol	369.4	40.7
22	C18 Stigmasterol	395.4	41.3
23	C18 Campesterol	383.4	41.7
24	C18 Sitosterol	397.4	42.5

5-3-2 定量分析について

定量分析では、LCの溶離液をAPCI-MSDに導入する手前で、1/4にスプリットした。これはコロナ電流放出用のコロナコーンが、大量の化合物に暴露されることによる劣化を防ぐためであり、またAPCIインターフェース部で、溶離液を効率よく乾燥するためである。著者は注入量や溶離液流量を低下させるために、内径の小さい種々の逆相カラムを検討したものの、シリカ担体の粒径か、担体内の細孔が分離に最適なサイズだったためか、採用したSIL C-18カラムが最も良好な分離を示した。葉たばこに含まれるPhytosterolとPhytosterol esterは、7水準の標準溶液から作製された検量線により定量した。既往のPhytosterolとPhytosterol esterの定量分析は、標品を混合物のまま扱うか (I. Mezzine, 2003)、レスポンスを化合物間で同一として (W. Kamm, 2001)、定量を進めていたが、本研究では、全て標品により定量した。なお検量線の各水準溶液は、約20個のサンプルを間に挟み、前後に配された2回測定結果を平均した。これはAPCIインターフェースの、経時的な劣化を相殺するためである。定量データは、実験の部5-2-1に従って調製されたサンプル溶液1種に対して3回分析することで求めた。サンプル溶液の調製再現性については、一つの葉たばこに対して、繰り返し3回抽出を行い、3ロットのサンプル溶液それぞれを3回繰り返し分析し、合計9回の分析を行ったところ、抽出段階での有意差が見られなかったため（一元配置分散分析より）、抽出は一つの葉たばこに対して1回実施することとした。

5-3-3 定量に向けた分析方法の妥当性確認

Table 5-2に記載の通り、合計7種の濃度水準の標準溶液を作製し、LC/APCI-MSDで分析した。検量線は、ピークのエリア面積を均等に寄与させることで作成した。PhytosterolとPhytosterol esterの検量線の線形性は、表中記載の濃度領域において、決定係数が0.999を超えており、定量分析に十分耐えうることを確認した。Table 5-2には、各化合物の検量線傾きより求められたレスポンスファクター（面積を理論濃度で除し、Cholesterolを1とした場合の比）を付記した。これらを概観すると、遊離のPhytosterolは、Stigmasterolのみ、水分子が脱離した強度の強いプロダクトイオンを検出しなかったにも関わらず、他の遊離Phytosterolとほぼ近い値となった。一方で、Stigmasterol esterは、低めのイオン強度になることが分かった。これは、不飽和度の高い脂肪酸を含むTriacylglycerolやSolanesol esterが、親イオンとして検出される傾向にあることが、過去の報告から知られており、Stigmasterol esterの場合も、同様であったと考えられる (Ishida, 2010) (N. Ishida, 2013)。

Table 5-2 標準物質により測定された検量線の線形性、LOD、LOQ、SD

2-3-3に記載した方法と同様に、LODとLOQは、検量線の最低の濃度水準に近い、別途調整した標準溶液を10回分析して求めた。分析条件については、実験の部5-2-4-2に記載。

Number	calibration curve (ng/mL)	Actual conc. (ng/mL)	Detected conc. (ng/mL)	±SD (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	RSD (%)	Response factor
1	9-35875	17.5	16.1	0.4	1.3	4.3	2.6	1.00
2	7-27000	13.2	14.2	0.6	1.8	5.9	4.1	1.08
3	6-26000	12.7	11.8	0.4	1.1	3.8	3.2	0.97
4	6-25750	12.6	11.6	0.3	0.9	3.0	2.6	1.01
5	5-20625	10.1	10.3	0.4	1.2	3.8	3.7	1.71
6	5-21125	10.3	10.2	0.7	2.1	6.9	6.7	0.50
7	5-21237	10.4	10.4	0.4	1.1	3.6	3.5	1.70
8	6-25500	12.5	12.2	0.5	1.4	4.6	3.8	1.92
9	6-23010	11.2	11.0	0.4	1.2	3.9	3.5	1.79
10	5-21121	10.3	10.1	0.7	2.2	7.4	7.4	0.53
11	7-29063	14.2	13.8	0.4	1.3	4.4	3.2	1.29
12	5-21259	10.4	9.9	0.3	0.9	3.1	3.1	1.94
13	3-13677	6.7	6.8	0.4	1.3	4.4	6.5	1.94
14	4-16645	8.1	7.9	0.4	1.3	4.2	5.3	0.55
15	8-32314	15.8	15.5	0.7	2.0	6.6	4.3	1.73
16	4-15463	7.6	7.7	0.3	0.9	3.1	4.0	1.94
17	7-28905	14.1	13.6	1.0	3.1	10.5	7.7	0.40
18	5-22004	10.7	10.4	0.4	1.2	3.9	3.7	1.99
19	5-20803	10.2	9.9	0.3	0.9	3.0	3.1	1.70
20	6-25074	12.2	11.8	0.5	1.4	4.8	4.0	2.06
21	5-21009	10.3	10.3	0.4	1.1	3.6	3.5	1.33
22	6-23525	11.5	10.7	0.9	2.6	8.6	8.1	0.50
23	5-20412	10.0	9.9	0.4	1.1	3.8	3.8	1.64
24	5-19946	9.7	9.5	0.3	1.0	3.3	3.5	2.02

検量線の線形性を確認した後に、定量分析としての妥当性を、示すために必要な、検出限界 (Limit Of Detection (LOD))と、定量限界 (Limit Of Quantification (LOQ))を測定した。上記の標準溶液において、最も薄い濃度に近い標準溶液を 10 回分析し、平均値と標準偏差を求めた。以後の計算方法は、前記 2-3-3 と同一の手順を採った。LOD と LOQ 測定にあたり測定した標準溶液では、RSD(%)が、3 から 8%となり、葉たばこに含まれる Phytosterol と Phytosterol ester を定量分析するには十分な値を示した (Table 5-2)。添加回収率は、葉たばこ抽出液に含まれる分析対象の濃度に近い、複数の濃度水準の標準溶液を、葉たばこ抽出液に加え、求めた定量値から、回収率を算出した。計算方法は、上記 2-3-3 に記載の方法に準じ、得られた添加回収率は、Table 5-3 に示した。ほぼすべての化合物で、80 から 120%の回収率となり、RSD も 10%を下回ったため、定量分析を実施するためには、十分な検証データを得た。

Table 5-3 添加回収試験結果

添加回収試験は、2008 年産のトルコ産オリエント種のサンプル溶液に、標準溶液を添加し、定量分析した結果から、無添加時の結果を減じることで、回収率を算出した。全ての定量結果は、3 回分析することで求めた。分析方法については、実験の部 2-2-4 に記載。

Number	Added (ng/mL)	Detected (ng/mL)	±SD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Number	Added (ng/mL)	Detected (ng/mL)	±SD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
1	0.0	1579.0	70.3		4.5	13	0.0	196.7	6.7		3.4
	1121.1	2665.2	34.9	96.9	1.3		106.9	300.3	10.9	96.9	3.6
	2242.2	3862.6	110.4	101.8	2.9		213.7	403.7	11.4	96.8	2.8
	4484.4	6134.2	178.4	101.6	2.9		427.4	618.3	31.3	98.6	5.1
2	0.0	2353.2	69.2		2.9	14	0.0	218.5	13.2		6.0
	843.8	2968.3	54.9	72.9	1.8		130.0	348.2	13.8	99.7	4.0
	1687.5	3675.4	70.3	78.4	1.9		260.1	475.7	21.6	98.9	4.5
	3375.0	5019.6	86.6	79.0	1.7		520.2	755.5	39.9	103.2	5.3
3	0.0	2361.3	126.1		5.3	15	0.0	170.5	4.3		2.5
	812.5	3199.3	162.7	103.1	5.1		126.2	295.1	15.5	98.7	5.3
	1625.0	4169.3	234.3	111.3	5.6		252.5	411.5	13.1	95.5	3.2
	3250.0	6116.4	337.4	115.5	5.5		504.9	647.2	18.2	94.4	2.8
4	0.0	2970.8	89.3		3.0	16	0.0	248.2	8.5		3.4
	804.7	3821.9	59.7	105.8	1.6		120.8	366.5	11.3	97.9	3.1
	1609.4	4752.2	113.9	110.7	2.4		241.6	476.7	15.8	94.5	3.3
	3218.8	6497.1	117.7	109.6	1.8		483.2	733.5	32.0	100.4	4.4
5	0.0	844.1	18.9		2.2	17	0.0	376.0	9.5		2.5
	322.3	1165.8	37.5	99.8	3.2		225.8	593.7	21.6	96.4	3.6
	644.5	1504.9	65.1	102.5	4.3		451.6	808.8	55.4	95.8	6.9
	1289.1	2139.1	99.0	100.5	4.6		903.3	1212.8	45.8	92.6	3.8
6	0.0	1115.2	34.5		3.1	18	0.0	397.5	13.2		3.3
	660.2	1818.8	179.0	106.6	9.8		171.9	563.4	26.9	96.5	4.8
	1320.3	2438.4	216.6	100.2	8.9		343.8	726.2	19.8	95.6	2.7
	2640.6	4052.5	380.4	111.2	9.4		687.7	1100.9	56.5	102.3	5.1

Number	Added (ng/mL)	Detected (ng/mL)	±SD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Number	Added (ng/mL)	Detected (ng/mL)	±SD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
7	0.0	1232.7	29.8		2.4	19	0.0	234.9	4.5		1.9
	663.7	1926.8	91.7	104.6	4.8		162.5	392.2	13.7	96.8	3.5
	1327.3	2557.4	109.0	99.8	4.3		325.1	553.6	19.8	98.0	3.6
	2654.7	3960.6	129.0	102.8	3.3		650.1	886.0	39.7	100.2	4.5
8	0.0	1963.1	69.6		3.5	20	0.0	305.0	10.6		3.5
	796.9	2755.6	61.8	99.5	2.2		195.9	514.9	16.2	107.2	3.1
	1593.8	3621.8	141.7	104.1	3.9		391.8	697.4	29.0	100.1	4.2
	3187.5	5245.2	186.4	103.0	3.6		783.6	1101.8	34.9	101.7	3.2
9	0.0	506.9	12.2		2.4	21	0.0	58.3	2.9		5.1
	359.5	860.5	30.6	98.3	3.6		41.0	94.0	2.7	86.9	2.8
	719.1	1255.7	58.3	104.1	4.6		82.1	133.4	8.9	91.5	6.7
	1438.2	1998.8	75.4	103.7	3.8		164.1	210.2	8.4	92.5	4.0
10	0.0	639.6	52.4		8.2	22	0.0	54.7	3.2		5.9
	330.0	977.2	66.4	102.3	6.8		45.9	94.2	6.1	86.0	6.4
	660.1	1332.8	106.0	105.0	8.0		91.9	136.9	5.2	89.4	3.8
	1320.1	2001.6	121.0	103.2	6.0		183.8	233.8	7.5	97.4	3.2
11	0.0	996.4	26.1		2.6	23	0.0	54.3	2.4		4.4
	454.1	1424.0	53.4	94.2	3.8		19.9	73.9	2.4	98.2	3.3
	908.2	1931.0	67.0	102.9	3.5		39.9	95.8	3.0	104.1	3.1
	1816.4	2828.1	130.0	100.8	4.6		79.7	134.4	8.2	100.4	6.1
12	0.0	1118.3	25.8		2.3	24	0.0	78.2	2.9		3.7
	664.4	1800.8	64.9	102.7	3.6		19.5	97.6	2.0	99.9	2.0
	1328.7	2453.6	124.5	100.5	5.1		39.0	118.4	2.6	103.2	2.2
	2657.5	3752.2	203.3	99.1	5.4		77.9	155.9	5.7	99.8	3.7

5-3-4 葉たばこ中の Phytosterol と Phytosterol ester の定量分析と結果の概観

Phytosterol と Phytosterol ester の定量分析した結果を、Table 5-4 にまとめた。Linoleic acid と Linolenic acid を含む Phytosterol ester は、Table 記載の葉たばこ品種のなかでは、黄色種で最大の値を示しており、既報の結果と一致していた (W. Liu, 2007)。一方で黄色種の遊離の Phytosterol は、中骨と同レベルで低い値となり、既報 (W. Liu, 2007) とは、一致しなかった。しかし別の報告 (J. Ai, 1997) では、黄色種よりもバーレー種に Phytosterol が多く含まれるとされているので、結果の不一致については、サンプル数を増やし、確認する必要がある (後述)。オリエント種は、Phytosterol と Phytosterol ester が、葉たばこの品種の中では、中程度の値となり、唯一 Sitosterol だけが、高めの値を示した。バーレー種と在来種は、互いに類似の成分組成となったが、遊離の Phytosterol が多く、Phytosterol ester が黄色種やオリエント種よりも低い傾向を示しており、過去の報告とも一致した (W. Liu, 2007) (J. Ai, 1997)。中骨については、中程度の遊離 Phytosterol が含まれるのみで、Phytosterol ester については、ほとんど含まれないが、黄色種の中骨に、遊離の Phytosterol が多いとする過去の報告と一致しなかった (J. J. Ellington, 1978)。これは既往の結果が、葉たばこ抽出物を加水分解した後の Phytosterol 定量値だったためであり、本報告の結果が妥当とみてよい。Table 5-4 には示していないが、*Nicotiana rustica* には、ほとんど Phytosterol も Phytosterol ester も含まれていなかった。全体として Phytosterol と Phytosterol ester の成分組成の差異は、品種間で著しく、産地間では乏しかった。

より多くのサンプルを分析し、一般性の高い法則性を見出すために、品種や産地の異なるおよそ 100 種の葉たばこの定量分析を行い、その結果を主成分分析 (Principal Component Analysis : PCA) に供した。データ行列は、成分ごとの定量値のスケール違いによる分析結果への影響を軽減するために、相関係数行列で処理することとした。Figure 5-6 は、PCA から得られた散布図であり、上側の図が主成分得点散布図、下側の図が負荷量散布図である。主成分得点散布図は、第一主成分と第二主成分で構成され、葉たばこ品種に応じてプロットを色分けた。なお散布図上の点線は、標準化したデータ行列のウォード法とユークリッド距離による階層的クラスター解析を示す。主成分負荷量散布図は、第一、第二主成分への Phytosterol と Phytosterol ester の寄与係数をプロットしている。累積寄与率は、第一主成分と第二主成分で 80% を超えており、十分な分散を包含した主成分得点散布図となった。また PCA と階層的クラスター分析の結果 (Figure 5-6 上図) より、葉たばこには三つのカテゴリーが観測された ; 黄色種 + 暗色火干葉 (DFC)、オリエント種 + 明色気干葉 (SAC) + 中骨 + *N. rustica*、バーレー種 + 暗色気干葉 (DAC)。散布図を解釈すると、Figure 5-6 上図の右側に付置された黄色種は、Phytosterol ester の主成分得点への寄与 (Figure 5-6 下図の右側参照)、カテゴリーを形成したと考えられた。一方で Figure 5-6 上図の左上側に付置されたバーレー種については、遊離の Phytosterol の寄与により (Figure 5-6 下図の左上側参照)、カテゴリーを形

成していると考えられた。在来種はバーレー種と同様の成分組成であったためか、バーレー種に包含されるように付置されていた。中骨と *N. rustica* は、オリエント種の近傍に付置されたが、これは Phytosterol ester が少ないためと考えられる。同様に明色気干葉(SAC)もまた、オリエント種と混じって付置されたが、類似の乾燥（キュアリング）が原因と考えられる。このように Phytosterol や Phytosterol ester の組成は、乾燥（キュアリング）による影響が反映されており、Solanesol 類、Triacylglycerol と同様の結果であった。ただ主成分得点散布図において、葉たばこの分布をみると、Solanesol 類や Triacylglycerol による主成分得点散布図よりも、品種内での分布が広がっており、本章の分析結果だけからは明らかにされなかったが、品種内での差異、例えば産地や着位の差異も、説明できる可能性を示した。

Table 5-4 葉たばこ中の Phytosterol と Phytosterol ester の定量分析結果

定量分析は、あらかじめ調製されたサンプル溶液に対して3回繰り返した。分析条件については、実験の部 5-2-4-2 に記載。表内の定量結果は、全て葉たばこの乾物重量に対する $\mu\text{g/g}$ (D.B.)としている。葉たばこの種類につけられた略名は以下の通り；FCV：黄色種；BLY：バーレー種；ORI：オリエント種；DAC：在来種。カッコ内の産地の略名は以下の通り；JPN: Japan, USA: The United States of America, TUR: Turkey, GRC: Greece, PHL: Philippines.

Compound	黄色種 (USA)			黄色種 (JPN)			バーレー種 (USA)			バーレー種 (JPN)		
	Average	SD	RSD	Average	SD	RSD	Average	SD	RSD	Average	SD	RSD
	ppm(D.B.)			ppm(D.B.)			ppm(D.B.)			ppm(D.B.)		
	%			%			%			%		
Cholesterol	56.9	±3.5	6.1	39.7	±1.4	3.4	108.6	±5.1	4.7	144.8	±6.9	4.8
Stigmasterol	64.2	±7.8	12.2	75.1	±6.5	8.6	104.1	±8.1	7.8	192.4	±19.3	10.0
Campesterol	136.3	±12.2	8.9	87.8	±3.9	4.5	182.4	±13.6	7.4	187.1	±10.7	5.7
Sitosterol	68.3	±4.3	6.3	79.3	±3.6	4.5	153.6	±8.3	5.4	125.2	±5.0	4.0
C18:3 Cholesterol	61.9	±3.8	6.2	37.6	±2.6	6.9	33.6	±2.2	6.5	48.3	±2.8	5.8
C18:3 Stigmasterol	131.6	±7.2	5.4	93.0	±7.3	7.9	42.1	±3.9	9.4	78.6	±5.0	6.3
C18:3 Campesterol	115.7	±6.6	5.7	68.5	±4.4	6.4	47.1	±3.2	6.7	60.7	±3.1	5.1
C18:3 Sitosterol	93.7	±4.5	4.8	83.7	±4.9	5.8	61.3	±3.3	5.3	66.2	±3.1	4.7
C18:2 Cholesterol	67.7	±3.9	5.8	34.4	±2.2	6.5	28.9	±1.8	6.1	32.5	±1.7	5.2
C18:2 Stigmasterol	138.2	±9.6	6.9	78.4	±7.2	9.1	39.3	±3.1	7.9	54.3	±1.8	3.2
C18:2 Campesterol	174.3	±9.4	5.4	87.1	±5.8	6.6	55.1	±3.3	6.1	56.3	±2.4	4.2
C18:2 Sitosterol	97.3	±5.7	5.9	75.5	±6.1	8.1	46.3	±3.1	6.8	40.4	±1.8	4.5
C18:1 Cholesterol	11.6	±0.6	5.3	9.2	±0.7	7.3	6.0	±0.4	6.2	3.4	±0.2	5.1
C18:1 Stigmasterol	13.9	±1.0	7.2	12.2	±1.3	10.8	5.7	±0.5	9.4	3.8	±0.4	10.5
C16 Cholesterol	11.3	±0.5	4.4	8.3	±0.6	7.2	6.3	±0.3	5.5	6.9	±0.3	4.8
C18:1 Campesterol	19.7	±0.9	4.7	15.3	±1.1	7.4	7.8	±0.5	6.0	4.0	±0.3	7.2
C16 Stigmasterol	33.2	±2.1	6.4	27.0	±2.7	9.8	14.0	±0.9	6.8	17.2	±1.1	6.5
C18:1 Sitosterol	17.2	±0.8	4.9	20.8	±1.4	6.6	9.6	±0.6	5.8	4.4	±0.2	5.1
C16 Campesterol	21.6	±1.0	4.6	16.0	±1.0	6.5	8.9	±0.5	5.6	8.7	±0.4	4.3
C16 Sitosterol	14.9	±0.7	4.6	18.4	±1.0	5.4	9.2	±0.5	5.9	7.9	±0.3	4.4
C18 Cholesterol	2.7	±0.1	3.0	1.9	±0.1	7.2	1.5	±0.1	4.2	1.7	±0.1	3.5
C18 Stigmasterol	3.1	±0.2	6.8	2.7	±0.3	10.4	1.3	±0.2	13.0	1.9	±0.2	8.5
C18 Campesterol	4.0	±0.1	3.7	2.8	±0.2	6.2	1.8	±0.1	4.8	1.7	±0.1	4.3
C18 Sitosterol	2.5	±0.1	4.2	2.9	±0.2	5.2	1.6	±0.1	4.3	1.5	±0.1	4.5

Compound	オリエント種 (GRC)			オリエント種 (TUR)			中骨 (JPN)			在来種暗色気干葉 (PHL)		
	Average	SD	RSD	Average	SD	RSD	Average	SD	RSD	Average	SD	RSD
Compound	ppm(D.B.)		(%)	ppm(D.B.)		(%)	ppm(D.B.)		(%)	ppm(D.B.)		(%)
Cholesterol	73.3	±5.8	7.9	70.2	±2.7	3.8	57.2	±1.2	2.0	129.3	±12.5	9.7
Stigmasterol	91.2	±10.8	11.9	57.0	±9.2	16.2	185.6	±21.0	11.3	204.4	±27.3	13.4
Campesterol	129.8	±9.9	7.6	110.5	±4.4	3.9	66.3	±1.9	2.9	153.0	±16.8	11.0
Sitosterol	125.2	±9.5	7.6	124.7	±6.8	5.4	71.0	±2.2	3.2	134.6	±13.9	10.4
C18:3 Cholesterol	23.5	±0.4	1.7	34.8	±1.9	5.5	7.2	±0.3	3.5	13.0	±1.4	10.4
C18:3 Stigmasterol	39.0	±2.5	6.5	51.8	±1.8	3.5	20.6	±1.1	5.1	23.0	±2.8	12.2
C18:3 Campesterol	37.3	±0.4	1.0	52.4	±3.5	6.8	8.4	±0.1	1.6	14.7	±1.4	9.9
C18:3 Sitosterol	57.2	±0.7	1.3	82.9	±5.1	6.1	12.3	±0.4	2.9	17.6	±1.7	9.7
C18:2 Cholesterol	14.8	±0.2	1.4	20.6	±1.0	4.7	10.3	±0.3	3.1	15.8	±1.4	8.6
C18:2 Stigmasterol	26.3	±0.9	3.5	31.6	±0.3	1.0	22.4	±1.6	7.2	27.8	±4.0	14.3
C18:2 Campesterol	32.1	±0.2	0.7	42.3	±2.0	4.8	16.9	±0.3	1.6	24.1	±2.1	8.9
C18:2 Sitosterol	34.8	±0.6	1.8	48.9	±1.9	3.9	16.5	±0.6	3.8	20.0	±1.5	7.5
C18:1 Cholesterol	5.0	±0.1	1.3	7.8	±0.3	4.2	2.2	±0.1	4.1	8.9	±0.9	10.0
C18:1 Stigmasterol	5.9	±0.3	4.8	9.2	±0.1	1.0	3.1	±0.2	5.8	13.6	±1.4	10.3
C16 Cholesterol	4.4	±0.0	0.8	6.5	±0.4	6.0	2.1	±0.1	2.5	9.1	±0.7	7.7
C18:1 Campesterol	6.7	±0.1	1.1	11.0	±0.6	5.5	2.5	±0.0	1.3	10.0	±1.0	9.5
C16 Stigmasterol	12.6	±0.3	2.2	14.4	±0.1	0.5	7.1	±0.2	3.1	28.7	±2.6	9.1
C18:1 Sitosterol	10.9	±0.1	1.0	17.6	±0.7	3.9	3.7	±0.1	3.4	12.5	±1.0	8.2
C16 Campesterol	7.1	±0.0	0.7	9.6	±0.6	6.3	2.6	±0.0	1.7	10.8	±0.7	6.9
C16 Sitosterol	9.0	±0.3	2.8	12.4	±0.5	4.0	3.1	±0.1	2.9	10.1	±0.9	8.5
C18 Cholesterol	1.2	±0.0	2.2	1.9	±0.1	6.1	0.8	±0.0	0.9	2.9	±0.2	6.7
C18 Stigmasterol	1.3	±0.1	4.6	1.5	±0.1	3.5	1.1	±0.0	3.9	5.2	±0.3	6.0
C18 Campesterol	1.5	±0.0	2.2	2.2	±0.1	5.8	0.7	±0.0	2.4	2.7	±0.3	9.6
C18 Sitosterol	1.7	±0.0	1.4	2.9	±0.2	6.6	0.8	±0.0	2.4	2.5	±0.2	7.9

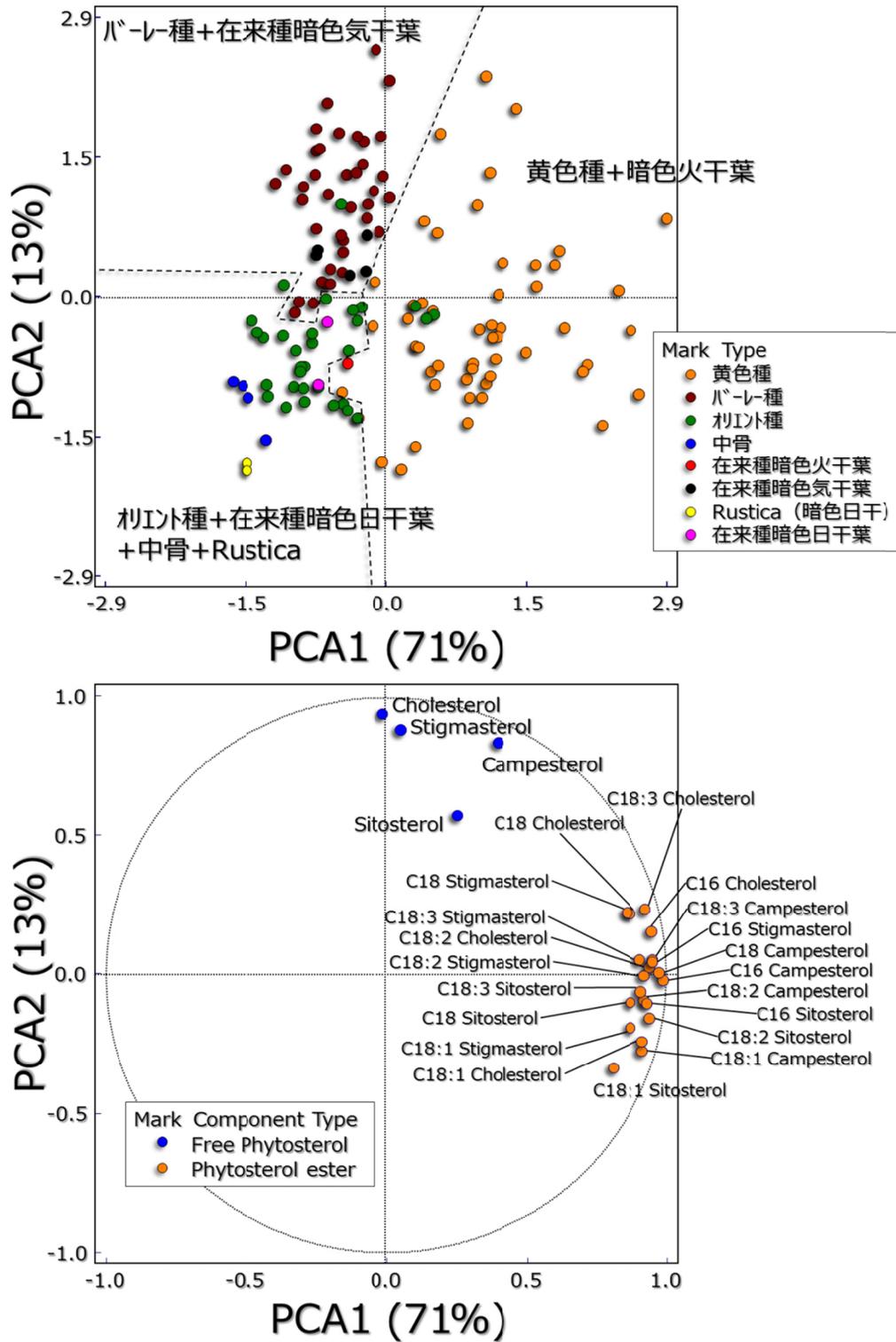


Figure 5-6 定量分析結果の主成分分析

上図は分析結果の相関係数行列を主成分分析することで得られた、第一主成分と第二主成分による主成分得点散布図。図上の点線は、標準化データに基づいた階層的クラスター分析（ユークリッド距離、ウォード法）から得られた三つの葉タバコカテゴリーを表す。下図は、主成分に寄与する主成分荷量散布図。分析結果の統計解析に使用されたソフトウェアについては、実験の部 5-2-6 に記載。

5・4 小括

本章の検討で、水系の逆相クロマトグラフィーの代わりに、非水系の逆相クロマトグラフィーである NARPC と APCI-MSD を組み合わせることで、高級脂肪酸である Palmitic acid (C16)、Stearic acid (C18)、Oleic acid (C18:1)、Linoleic acid (C18:2)、Linolenic acid (C18:3)を含む Phytosterol と Phytosterol ester の事前の分離を必要としない完全な分離を達成し、簡便な定量分析方法を構築した。定量分析を進めるにあたり、入手できない標準物質の場合は、事前に市販品から分離し、場合により合成された標準物質を利用することで、検量線を作成し、定量を進めた。定量結果より、黄色種は Phytosterol ester 量が最大でありバーレー種、在来種、明色気干葉(SAC)は遊離の Phytosterol 量が多かった。また定量結果を、主成分分析と非階層的クラスター分析に供したところ、主成分得点散布図からは、乾燥（キュアリング）過程の異なる葉たばこ間には、成分組成の差異が確認された。乾燥過程が、Phytosterol と Phytosterol ester の組成に対して影響が強いと考えられる結果となった。また同一品種内においても、葉たばこが広く分布しており、品種以外の葉たばこ間の差異にも関わる可能性が観測された。

6 章 低極性不揮発成分による網羅的分析

6-1 序論

1章2項で述べたように、葉たばこは、世界中の至る地域で、様々な栽培方法と乾燥方法に由来した、実に多くの種と品種がある。そして、喫煙燃焼時には、それぞれが特有の香りと味を与えることで知られる (D. Davis, 1999)。こうした多様性ゆえに、種、品種、乾燥、産地などに関係する葉たばこ内容成分が、大いに研究されてきた (A. Rodman, 2008) (D. Davis, 1999) (A. Rodman, 2008) (J. C. Leffingwell, 1999) (R. L. Stedman, 1968) (I. Schmeltz, 1977)。一方で、これまでの研究は、少数の成分による葉たばこの差異を説明しようとする各論的な取り組みであり、葉たばこの特徴を包括的にとらえようとする、計量化学的な研究例は乏しい。葉たばこでの実施例は、中国において栽培された黄色種の産地判別のモデル化や (L. Zhang, 2013) (Y. Zhao C. Z., 2013)、ストレスへの応答反応の探索 (J. Zhang, 2011) (K. Cho Y. K., 2012)に留まる。加えて、これらの研究は揮発性成分を分析するための GC/MSD (L. Zhang, 2013) (Y. Zhao C. Z., 2013)や、中高極性の成分を分析するための LC/ESI-MSD によって遂行されており (K. Cho Y. K., 2012)、2章から5章までで明らかにしてきた Solanesol (Ishida, 2010)、Triacylglycerol (N. Ishida, 2013)、Chlorophyll 代謝物 (N. Ishida, 2011)、Phytosterol (N. Ishida, 2014)などの、低極性不揮発性の葉面樹脂成分(Figure 6-1)は網羅出来ていない。そこで本章では、これまで実施例の無い葉たばこの樹脂に含まれる低極性不揮発性成分の網羅的分析により、種々の葉たばこに認められる法則性を明らかにし、併せてモデル化を進め、方法の有用性を考察する。なお本研究では樹脂成分のうち揮発性の成分は網羅的分析の対象とはしなかった。これは既報 (L. Zhang, 2013)があることに加えて、使用する装置が GC/MSD になる可能性が高く、キャピラリーカラムからのシロキサンのブリードが多く、葉たばこ内容成分との切り分けが煩雑になるためである。またタンパク質や遺伝子を対象とする計量化学である proteomics や genomics も手段として選択しなかったが、1章7項で記したように、葉たばこの豊富な種類は、遺伝子による差異に加えて、収穫後の乾燥方法や着位も要因となっており、網羅的分析の対象としては、不十分と判断したからである。そのため本検討を通じて、ヒトの経験と官能に頼ってきた、葉たばこの品質 (品種、産地、栽培、乾燥など) を、上記成分によって判別する仕組み作りが進むことを期待した。

ところで網羅的分析は様々な方法で行われるが、基本的に“分離”と“検出”で構成される。網羅性を高めるために、それらが適切に組み合わせられることが必要である。近年では総説も多くなり、方法論が体系化されつつある (E. J. Want, 2007) (W. Lu, 2008) (N. L. Kuehnbaum, 2013)。例えば分離については、揮発性成分の GC (L. Zhang, 2013) (Y. Zhao C. Z., 2013)、中高極性成分の LC (K. Cho Y. K., 2012) (K. Cho Y. K., 2013)、親水性成分の CE (M. R. N. Moton, 2007)があり、網羅的分析において、それぞれ一定の地位を確立している。一方、検出については、NMR や MSD が使用されることが多い。しかし、NMR は、少量の成分の検出や、成分組成が明らかにできず、“分

離 “との組み合わせも、十分な技術になっておらず、単独で使用されることが多い。再現性と信頼度の点において優れた能力があるため、網羅的分析では多用される (J. Zhang, 2011) (S. Chatterjee, 2010)が、近年では MSD にとって代わられることが多いと思われる。MSD は化合物の特定が可能なことに加えて、機種によっては精密質量での分離も可能なため、一般的な Q-MSD に加えて時間飛行型質量分析装置 (TOF-MSD) (K. Cho Y. K., 2012) (K. Cho Y. K., 2013) (E. Gaquerel, 2010) (I. M. Abu-Reidah, 2013) (F. L. Chu, 2011) (N. E. Madala, 2013)、orbitrap 型質量分析装置 (orbitrap-MSD) (A. Roux, 2012)、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析装置 (FT-ICR-MSD) (S. Forcisi, 2013)などが使用される。また MSD の場合のみ “イオン化” という、“分離” と “検出” をつなぐ重要な接続部である EI、CI、ESI、APCI、APPI などがあり、それぞれに適した成分種がある。EI は GC/MSD に組み込まれ、揮発性成分に限定されるものの、膨大なライブラリーによる化合物特定が比較的容易である。LC/MSD では ESI がよく用いられるが、中高極性の代謝成分に適しており、生体サンプルはそのような成分が多く、ペプチド、脂質 (P. Dugo O. M., 2012) (T. Bamba, 2012)、ホルモン、ポリフェノール (U. Vrhovsek, 2012)など数多い実施例がある。一方で、EI や ESI と比較すると、実施例は乏しいが、APCI がある (M. R. N. Moton, 2007) (H. Gan, 2014)。これは低極性成分のイオン化に強みがあるため、葉タバコを含む植物が、クチクラ層という低極性成分で覆われた組織構造を有することを踏まえると、検討の余地がある。このように、1章6項でも述べたが、あらゆる成分を網羅した装置はなく、装置の能力内で網羅性を高めた分析を行っている状況にある。なかでも2章から5章において、Solanescapin 類 (Ishida, 2010)、クロロフィル類 (N. Ishida, 2011)、Triacylglycerol (N. Ishida, 2013)、Phytosterol 類 (N. Ishida, 2014)の分析を進めてきたが、これらは全て LC/APCI-MSD で検出できる。そのため本機器による網羅的分析を行うことで、これまでと異なる特有の成分を対象とする計量化学が実施できるのである。

本章における検討は、網羅的分析方法を構築するため、2章から5章までで検討した定量分析方法を、網羅的分析にアレンジした。新たに開発した網羅的分析方法の妥当性検証は、検出化合物数、検出化合物種、ピーク面積の再現性、ピーク面積の線形性の観点で検証した。得られた解析結果は、法則性の解明に向けて主成分解析(PCA)や階層的クラスター解析に供した。明らかにされた法則性が、2章から5章までの成分分析の結果と一致しているかを検証し、さらにモデル化を進めることで、様々な葉タバコの差異 (品種、産地、着位など) が判別可能か検証し、本章で構築した網羅的分析の有効性を確認する。

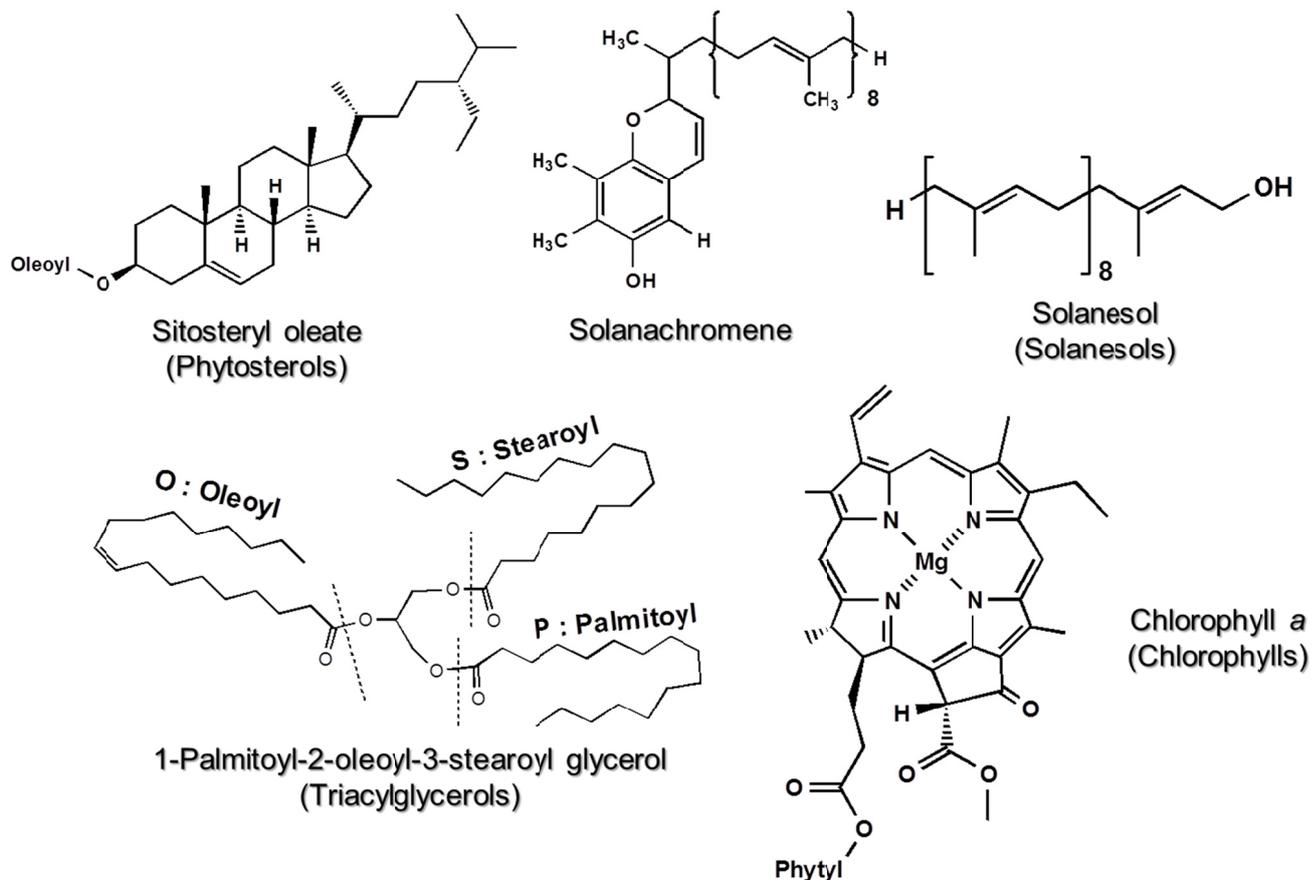


Figure 6-1 葉たばこに含まれる種々の低極性不揮発性成分

6-2 実験方法

6-2-1 サンプルおよび試薬類

葉たばこは、Table 10-1 記載のサンプルを網羅的分析に供した。抽出ならびに液体クロマトグラフィーによる分析に向けて使用した溶媒は、全て HPLC グレードとし、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan) 製を使用した。

6-2-2 サンプルの調整

乾燥（キュアリング）後の葉たばこから、分析に供するサンプル溶液を調整する手順は、前述の実験項 2-2-2 サンプルの調製方法と同一とした。

6-2-3 水分測定

乾燥（キュアリング）後の葉たばこの水分測定は、前述の実験項 2-2-3 水分測定と同一とした。

6-2-4 分離カラムと分析装置条件

分析では、液体クロマトグラフィー質量分析装置として、DAD G1315C、G1379B degasser、G1312B Binary pump SL、G1367C Hip-ALS SL、G1330B FC/ALS therm、6130 APCI-MSD を備えた、Agilent 1200 HPLC system (Agilent Tech., CA, USA)を使用した。サンプル注入量、分析用のカラム、カラム条件、溶離液、溶離液条件は、2-2-4 記載の条件と同一とした。APCI-MSD の測定条件は、スキャンモードの 100-1050 m/z (Centroid)とし、それ以外は 2-2-4 記載の条件と同一とした。ただし、必要に応じて測定条件を変更したので付記した。APCI/MSD のデータ取り込み条件は、以下の通りとした。Threshold : 0 ; Gain : 1.0 ; Stepsize : 0.10 ; Peak width : 0.20 min。すべての測定データは、装置付属のソフトウェア、Chemstation (Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA)で解析され、共通した分析データフォーマットである AIA 形式に変換して、その後の解析に供した。

6-2-5 分析データからのスポット抽出と多変量解析

事前に葉たばこから抽出し、調製されたサンプル溶液を、3回繰り返した平均値を分析データとした。通常の分析データはクロマトグラムで描かれ、ピークの保持時間は、ピーク頂点とすることが一般的であるが、AIA 形式に変換された分析データは、イオン強度、保持時間、m/z の三次元行列のままである。そのため、保持時間が一定の範囲内にある同一の m/z を有するイオン群から、一定の基準で自動的にピークの位置を決定し (本章では、これを”スポット”と呼ぶ)、サンプル間でスポットの位置を揃えるために (本章では、これを”アライメント”と呼ぶ)、市販のソフトウェアである Reifycs Signpost™ (Reifycs Inc., Tokyo, Japan)に分析データを供した。なお全サンプルの分析データは、最終的に一部の保持時間(8 to 54 min)や m/z(>300)を選択して、スポット抽出とアライメントに供された。イオン群の集約は以下の条件をソフトウェアに入力することで実行した。Intensity cutoff mode : Absolute ; Intensity cutoff value : 100 ; RT Tolerance (+/-) : 0.300 min ; m/z tolerance : -0.200 to 0.700 m/z ; Relative intensity cutoff : 0.3% ; Retention time tolerance : 2.000 min ; m/z tolerance : -0.200 to 1.100 m/z。スポットの位置は、同位体イオンを含めずに、集約されたイオン群の中から最大強度を示すイオンの保持時間とした。スポット位置をアライメントするには、以下の条件をソフトウェアに入力した。Retention time separation tolerance : 0.500 min ; m/z separation tolerance : 0.300。スポットのエリア面積などを含むデータ行列は標準化され、主成分解析や、ワード距離に基づく階層的クラスター分析へと供されたが、市販の統計解析ソフトウェア JMP 11.0.0 (SAS institute inc., Tokyo, Japan)を使用した。また主成分得点は、引き続き正準判別分析に供されたが、市販のソフトウェアである JUSE-statworks/V4.0 sw4 (Union of Japanese Scientists and Engineers, Tokyo, Japan)を使用した。

6・3 結果と考察

6・3-1 網羅的分析に向けた LC/APCI-MSD を利用したメソッド検討

本章の検討は、2章から5章で記してきた NARPC と APCI-MSD の組み合わせが、葉たばこに含まれる多くの低極性不揮発性成分の網羅的分析へ、転用できるか検証するところから開始した。可否判断で重視すべきは、同時に検出可能な成分数を確保しつつ、ピークの安定性を保つことである。LC へ葉たばこからの抽出液を大容量注入すれば、検出成分数は増えるが、分離度の低下や、3章や5章で触れてきたように APCI コロナコーンの劣化が予想されたので、注入量は最低限に抑え、MSD の感度に関わるパラメータを調整することにした。Figure 6-2 は、4章の SIM モードによる Triacylglycerol 類のクロマトグラム (a) と、すべてのイオン質量を検出するスキャンモードを適用した際のクロマトグラム (b) である。Triacylglycerol は量が少ないことから、定量分析に向けて大容量注入(50 μ L)していたが、これ以上の増加は分離を損ねる上に、前述のようにコロナコーン劣化の問題があり、逆に注入量を 5 μ L に低下させた。さらに MSD の感度をスキャンモードに切り替えることで、さらにピーク強度のさらなる低下が予想された。そこでイオン取り込み時のノイズを減らすための Threshold を2章から5章の定量分析では 150 に設定したが、本章の検討では 0 に緩和した。その結果、クロマトグラム(Figure 6-2)で確認できるように、十分な大きさの Triacylglycerol のピークを確認できた。通常 Threshold を低下させると、クロマトグラム上のノイズが増加し、相対的なピーク強度は上がりにくいだが、本研究ではイオン質量が大きい不揮発性成分を対象としていたため、感度の低下を抑制できたものと考えられる。

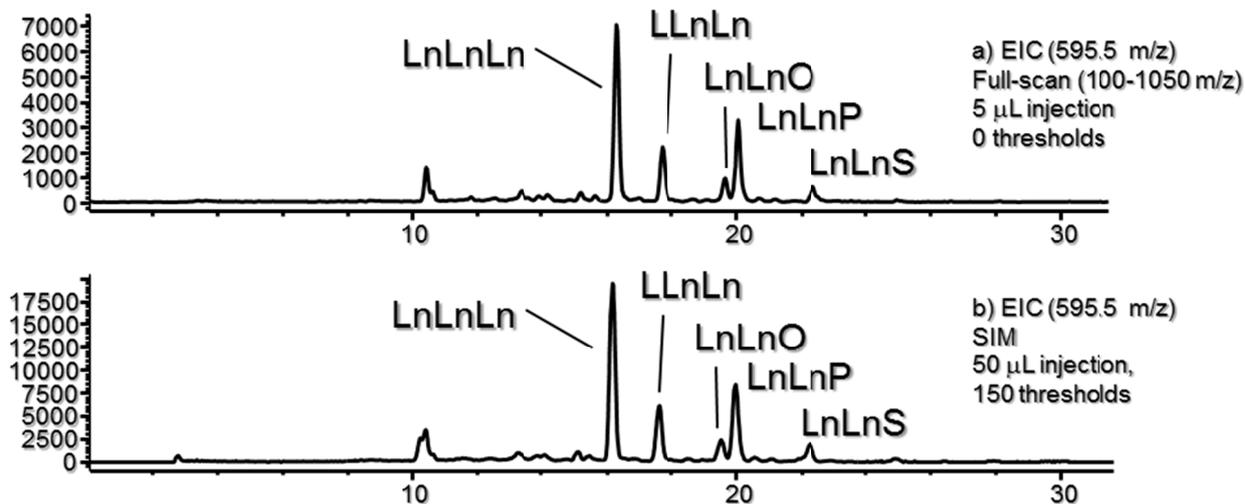


Figure 6-2 APCI-MSD のスキャンモードと SIM モードによる葉たばこ抽出液のクロマトグラム

a)はスキャンモードを設定した APCI-MSD と、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこ(304)のサンプル溶液の抽出イオンクロマトグラム。c)は SIM モードを設定した APCI-MSD と、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせせた RPLC による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこのサンプル溶液の抽出イオンクロマトグラム。クロマトグラム上の Triacylglycerol の略号については、4-2-1 を参照。分析条件は、フルスキャンモードについては、実験の部 6-2-4 に記載、SIM モードについては、実験の部 4-2-5 に記載。

続けて MSD の fragmentor voltage、drying gas flow、nebulizer pressure、vaporizer temperature、corona current の設定値検討を進めた。Figure 6-3 は、種々の設定値で観測された、スポット数、全スポット面積、スポット面積の標準偏差を、グラフ化したものである。スポット面積の標準偏差は、あるサンプルのクロマトグラム上で、各スポット面積同士のばらつきが大きく、微量成分が検出出来なくなるのを防ぐために、本検討で考慮に入れた。最終的に採用した設定値による観測データは、Figure 6-3 の左端に示した。vaporizer temperature は、溶離液が APCI-MSD のイオン化室に向けて噴霧された際に、液の気化を促すために設定されるが、定量分析時に採用した 500°C から 300°C に下げることによって、Solanesol 類のスポット面積が増加した。しかしスポット面積の標準偏差が大きく、微量成分が検出しにくくなったため、気化温度は 500°C のままとした。corona current は、気化室のコロナニードルからコロナ放電を行い、溶離液からプロトンを生成させるために使用されるが、設定電流を 10 μ A から 4 μ A に変更することで、スポット数と面積は低下したので、このパラメータも元の設定値である 10 μ A を採用した。またイオン化室に向けて溶離液を噴霧する際の圧力である nebulizer pressure を 60 psig から 30 psig に変更した場合と、イオンが四重極まで輸送される際に通過するキャピラリー管に印加される電圧である capillary voltage を 4000 V から 6000 V に変更した場合は、スポット数と面積が増加したが、クロマトグラム上にノイズが多く発生した。そして APCI-MSD のキャピラリー管と、四重極の間に印加される fragmentor voltage を 200 V から 100 V に低下させた場合と、その場所に通気されている溶媒乾燥用の乾燥ガス流量を 5.0 mL から 3.0 mL に低下させた場合も、スポット数、スポット面積、スポット面積の標準偏差に著しい差異が認められなかった。こうした結果を受けて、2 章から 5 章で述べた分析方法に採用された APCI-MSD のパラメータが網羅的分析においても有効であることが分かった。

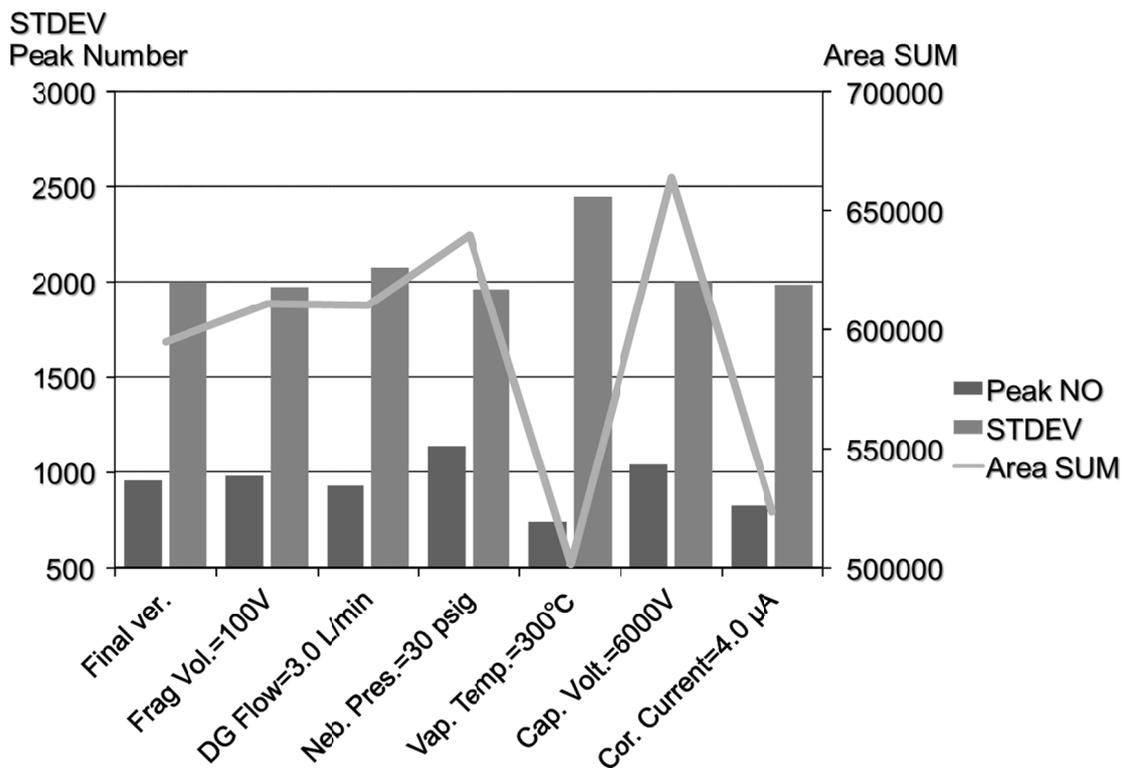


Figure 6-3 APCI-MSD の装置パラメータ変更時の変化

全てのスポット数、全スポット面積、スポット面積の標準偏差は、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこ(304)のサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析条件は、APCI-MSD のパラメータ変更部を除き、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。

6-3-2 網羅的分析に向けたデータ解析方法の検討

LC/APCI-MSD の網羅的分析から得られた分析データからスポット抽出を行い、スポット位置をアライメントするために、市販のソフトウェアを使用した。設定値について以下の通り検討した。Reifycs Signpost™はスポットの抽出と、アライメントに向けて以下の機能を有する。①保持時間と m/z によるフィルタリング、②相対あるいは絶対強度によるイオンのフィルタリング、③保持時間が近傍で、同一の m/z を有するイオン群の統合、④イオン群のなかで最大強度を与えるスポットの保持時間と m/z を決定、⑤抽出されたスポットをサンプル間でアライメント。Figure 6-4 は、②によるフィルタリング強度を 50 から 1000 にまで変化させた際の、スポット有無の変化をグレースケールで併記した、保持時間と m/z の散布図である。散布図からは、アライメントされたスポットの一部は、カラムに保持されていないことがわかる。加えて m/z が 300 以下のスポットは、不揮発性成分のフラグメントか、もともと分子量の低い成分と予想された。そこで、①の機能により、保持時間 0 min から 8 min と、 m/z が 300 以下のスポットは解析に不要と判断し除外した。また、②のイオン強度によるフィルタリングでは、閾値を 50 とした場合は、全スポット数が 1988 に達していたが、閾値を 1000 とした場合は、全スポット数が 169 にまで低下した。スポット数が多い

いほど、網羅性は期待できるものの、ノイズも含まれるため、閾値を最終的に 100 とした。なお相対強度によるイオンのフィルタリングは、本研究では採用せず、絶対強度によるフィルタリングとした。これは含まれる成分が少ないサンプルは、データにノイズが多くなるためである。③のイオン群を集約する機能では、各イオンの保持時間の許容幅を、クロマトグラム上のピーク半値幅を踏まえて 0.3 min とし、統合する m/z の許容幅を -0.2 m/z から 0.7 m/z とした。m/z の許容幅の設定根拠は、異なる成分に由来するイオン同士の重複を避けられるレベルとした。④のスポット位置の決定では、同位体イオンを除外したイオン群の中から、最大強度を示すイオンの保持時間を採用した。⑤のスポットのアライメントに関する設定値は、保持時間のサンプル間許容幅を 0.5 min 以下とし、イオン質量の許容幅を 0.3 m/z 以下とした。これらは、多サンプルの分析において、観測された保持時間の変動を踏まえて決定した。以上①から⑤の設定では、異なる成分に由来するスポットの重複を避け、一つの成分だけに由来するスポット面積、スポット保持時間、スポット m/z の再現性を特に重視した設定を採用した。

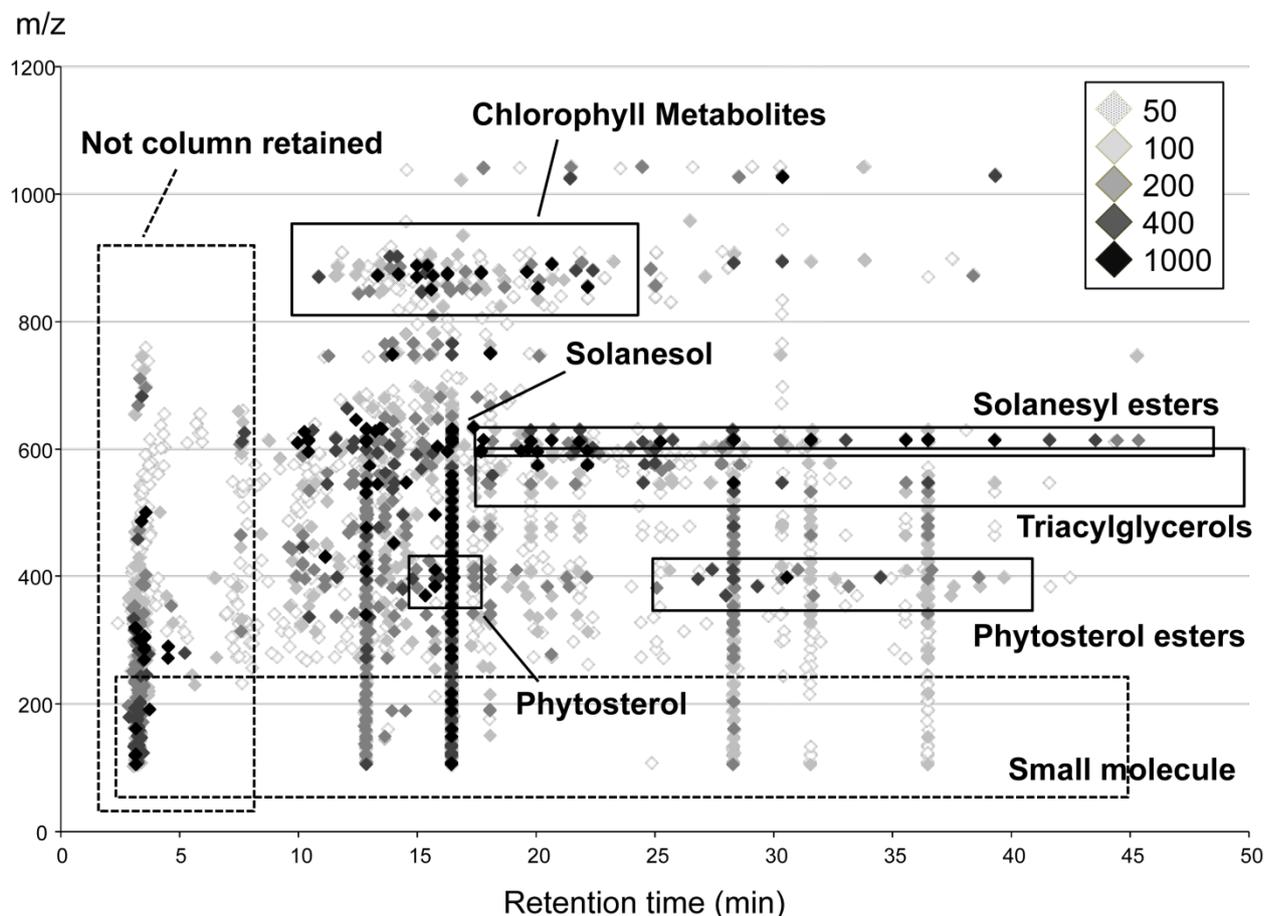


Figure 6-4 イオンフィルタリングの閾値を変化させた際のスポット数変化

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉タバコ(304)のサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉タバコから抽出、調整されたサンプル溶液の分析を 10 回繰り返した。分析条件は、APCI-MSD のパラメータ変更部を除き、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載しているものに加え、イオンフィルタリング機能の閾値を 50 から 1000 にまで変化させ、10 回の繰り返しが観測さ

れたスポットのみを Figure 上に表示した。

6-3-3 網羅的分析に向けた分析方法の妥当性検証

スポットの再現性と、スポット面積の濃度線形性の観点で、網羅的分析方法の妥当性を検証した。APCI-MSD のコロナニードルは、大容量のサンプル注入に曝され続けると、劣化し感度が低下する傾向にある。そこで同一のサンプルを分析する間隔を、連続的あるいは断続的（間隔を 2、20、60、100 とする）に変化させた場合の、それぞれのスポット面積の RSD(%)から、許容できる繰り返し間隔を明らかにすることとした。Figure 6-5 は、同一のサンプル間に、他のサンプルの分析を挿入し、3 回繰り返した際の各スポットの RSD(%)を、順番に並べたグラフである。全体として繰り返し間隔が小さいほど、RSD(%)は小さくなる傾向があり (consecutive と every 100 を比較)、間隔が大きくなるにつれて RSD(%)は大きい。本項の検討では分析間隔を 100 まで増加させたが、RSD(%)が安定することは無く、GC/EI-MSD (Y. Zhao C. Z., 2013)や LC/ESI-MSD (U. Vrhovsek, 2012) (S. Yang, 2010)を使用した場合と比べて、全体的に再現性は劣った。しかし 100 サンプルの分析を挟んだ繰り返し分析でも、RSD が 20%以下のスポット数は 400 程度に達していた。そこで上記の再現性が期待できるよう、サンプル種類数を 100 程度とした分析を行うこととした。次にスポット面積の濃度に対する線形性の検証を行った。32 倍まで希釈を進めたサンプル溶液の分析から、スポット面積の線形性を求めた (Figure 6-6)。棒グラフの縦軸は、相関が高いとされる決定係数(R^2)が 0.9 を超えているピーク数であり、横軸は希釈倍率ごとの、決定係数である。希釈倍率が高いほど、線形性を示すスポット数は減少したが、8 倍までサンプル溶液を希釈しても、決定係数が 0.99 を超えているスポットの数は、100 を超えていたため、網羅的分析には十分と判断した。

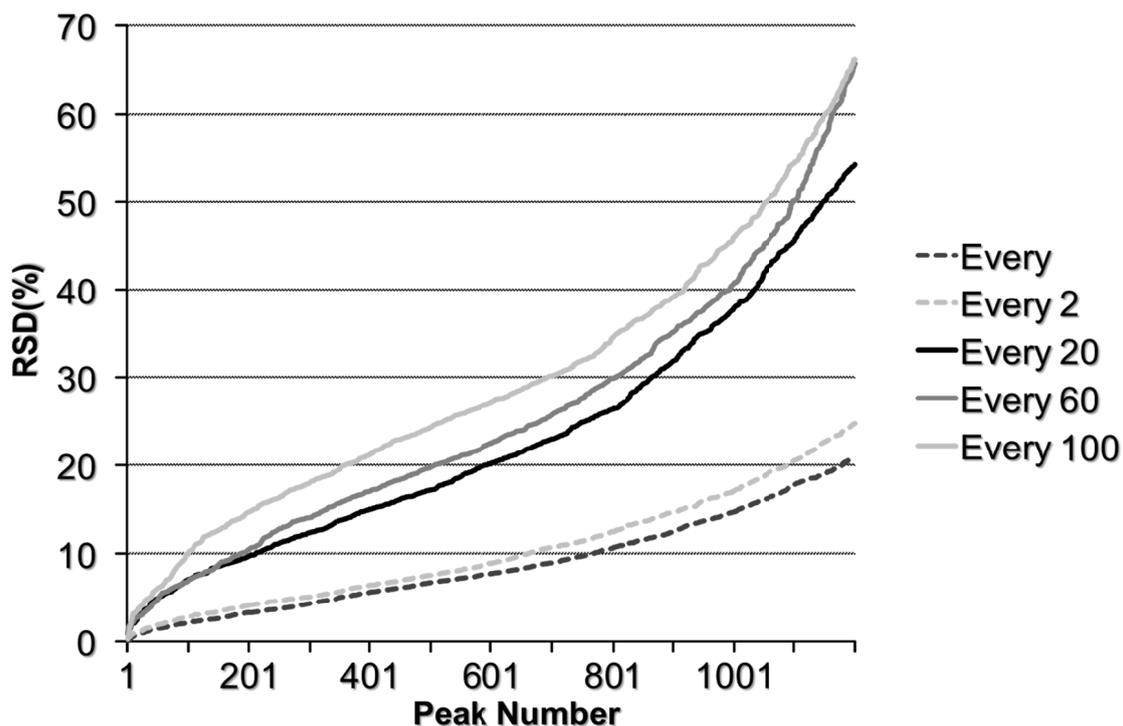


Figure 6-5 連続的・断続的繰り返し分析時のスポット面積再現性

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこ(304)のサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液の分析を 3 回繰り返した。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。

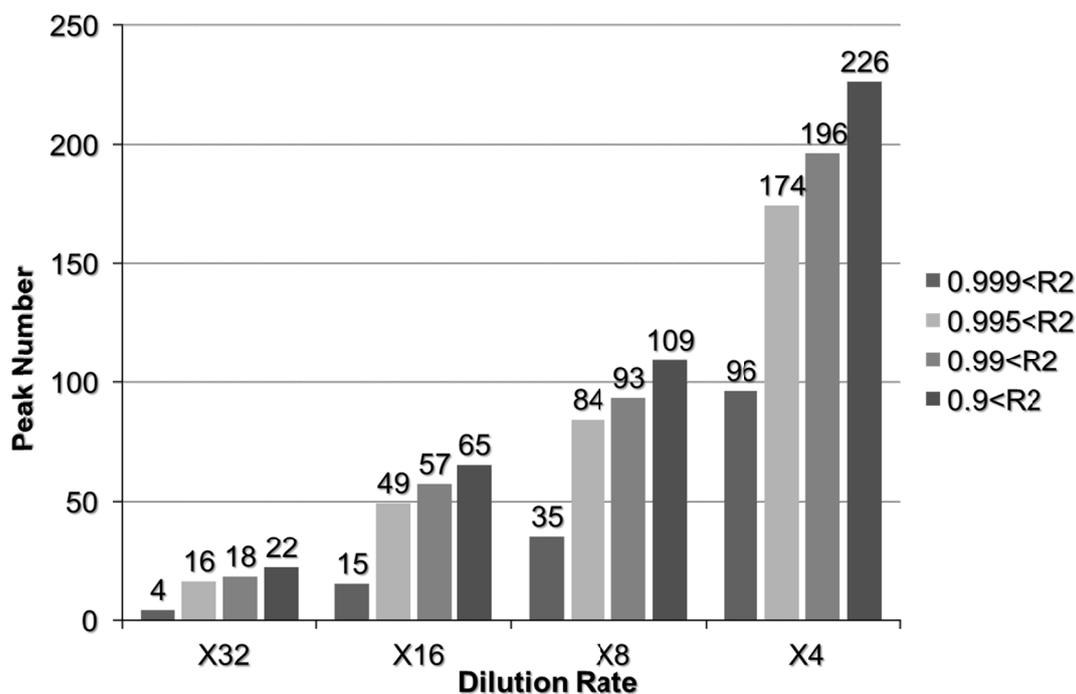


Figure 6-6 イオンフィルタリングの閾値を変化させた際のスポット数変化

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこ(304)のサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液

を適宜希釈し、各溶液の分析を3回繰り返した。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。

6-3-4 葉たばこの低極性不揮発性成分の網羅的分析結果の検証

分析データからスポットを抽出し、サンプル間でアライメントした後に、データ行列を主成分分析(PCA)と、階層的クラスター分析に供した。この統計解析は、高次元の分析データから読み取りにくい法則性を、可視化することが目的であり、序論で述べた教師なし解析である。初めにすべてのサンプル間で各スポットの標準偏差を求め、標準偏差の値が高い、言い換えればサンプル間の差異に関係する可能性が相対的に高い、スポットのみを統計解析に供した。これは種々の葉たばこに含まれるスポット総数が5000に達しており、結果の解釈が難しくなるのを避けるためである。本来分析データの絞り込みは、研究の主旨を踏まえると避けるべきであるが、Table 6-1 に示されているように、データの絞り込み後の全スポット面積の90%以上がデータ行列に残存していたので、サンプル間の差異に関わる分散は十分残ると考えて、実施することとした。

次にスポットの構造推定を進めた。Figure 6-7 のクロマトグラム上のピークに構造推定番号を付与しているように、合計63種の低極性不揮発性成分を構造推定することができた(Table 6-1)。成分の構造推定は、既報 (Ishida, 2010) (N. Ishida, 2011) (N. Ishida, 2013) (N. Ishida, 2014)を踏まえ、波長スペクトル、質量スペクトル、市販標品、分離・合成標品を使用して進めた。既報にある成分は概ね検出することが出来、不飽和脂肪酸 (Linolenic acid, Linoleic acid) を含んだエステル化合物を中心とした、大半の低極性不揮発性成分が検出された。さらに、2章から5章の検討からは、検出できていなかった Solanachromene や、Hydroxysolanol などが、スペクトルデータや既報 (Ishida, 2010) (R. L. Rowland, 1958)を参考にすることで、確認することが出来た。構造推定されたスポットの総面積は、Table 6-1 下部に示されているように、3種の葉たばこのいずれにおいても60%を超えており、2章から5章で構築した分析方法よりも、成分数とエリア面積両方の観点で、網羅性が高い分析方法を構築することが出来た。

Table 6-1 LC/APCI-MSD による網羅的分析データにおいて構造推定されたスポット一覧

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、2008 年産のブラジル産黄色種(311)、2009 年産のブラジル産バーレー種(341)、2005 年産のトルコ産オリエン特種(304)葉たばこのサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液を適宜希釈し、各溶液の分析を 3 回繰り返すことで、エリア面積、保持時間、m/z をアライメントした。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。表中の Assignment Source は、スポットの構造推定に使用した情報であり、それぞれの情報は以下の略号とした。PDA : wavelength spectrum ; MS : mass spectrum ; standard : actual component。Standard の右肩に付与した"*"と"**"は、それぞれ、市販の標品、合成した標品を表す。産地の略号については、ISO の 3 文字表記に準じた。表中のスポット面積に記載された"n.d."は、分析した葉たばこでは検出されなかったことを表す。表中の化合物番号 1、2、43 については、波長か質量スペクトルのみで構造推定されており、文献情報もないことから、化合物名の後方に"?"を付与した。

NO.	Aligned	Assigned component	Detected fragment	Assignment
	Retention		(Ratio on base peak)	Source
	Time (min)			
1	12.84	Hydroxysolanesol1?	611.6 (100), 629.7 (36.9)	PDA, MS
2	13.64	Hydroxysolanesol2?	629.7	PDA, MS
3	13.74	Hydroxypheophytin <i>b</i>	623.4	PDA, MS
4	13.95	Hydroxysolanachromene	747.7 (100), 765.7 (10.3)	PDA, MS
5	14.16	Pheophytin <i>b</i>	607.4	standard
6	15.08	Hydroxypheophytin <i>a</i>	869.5	standard**
7	15.29	Cholesterol	369.4	standard
8	15.29	Hydroxypheophytin <i>a'</i>	887.5 (100), 609.4 (67.9), 591.2 (69.5)	standard**
9	15.70	Stigmasterol	395.4, 409.4, 410.4	standard
10	15.87	Campesterol	383.4	standard*
11	15.87	Pheophytin <i>a</i>	871.5 (85.5), 593.3 (100)	standard
12	16.24	LnLnLn	595.5 (99.7), 873.7 (100)	MS
13	16.25	Pheophytin <i>a'</i>	593.3	standard
14	16.42	Solanesol	613.6 (100), 545.6 (15.8)	standard
15	16.49	Sitosterol	397.4 (100), 411.4 (19.4)	standard*
16	17.66	LLnLn	595.5 (48.8), 597.5 (97.0), 875.8 (100)	MS
17	18.05	Solanachromene	749.7 (100)	PDA, MS
18	19.37	LLLn	597.5 (63.9), 599.5 (99.0), 877.8 (100)	MS
19	19.76	Hydroxysolanesyl linolenate(C18:3)	611.6	PDA, MS
20	20.01	LnLnP	573.5 (100), 595.5 (77.1), 851.8 (82.6)	MS
21	21.38	LLL	599.5 (100), 879.8 (79.5)	MS
22	21.43	Solanesyl hydroxypheophorbide <i>a</i>	609.3	standard**
23	21.79	Hydroxysolanesyl linoleate(C18:2)	629.6	PDA, MS
24	21.83	Solanesyl hydroxypheophorbide <i>a'</i>	591.2	standard**
25	22.10	LLnP	573.5 (63.5), 575.4 (73.2), 597.5 (100), 853.8 (73.0)	MS
26	22.61	Solanesyl pheophorbide <i>a</i>	593.3	standard**
27	23.52	Hydroxysolanesyl pentadecanoate(C15)	611.6	PDA, MS
28	23.92	LLO	601.5 (100), 881.7 (6.4)	MS
29	24.65	LLP(LnOP)	575.4 (40.9), 599.5 (100), 855.8 (34.3)	MS
30	24.65	LnOP(LLP)	573.5 (69.2), 577.5 (50.5), 599.5 (100), 855.8 (34.3)	MS

NO.	Aligned	Assigned component	Detected fragment	Assignment
	Retention		(Ratio on base peak)	Source
	Time (min)			
31	24.67	LLnS	597.5 (63.6), 601.5 (92.7), 603.5 (100), 881.8 (100)	MS
32	25.04	LnPP(LnOP)	551.5 (21.8), 573.5 (100)	MS
33	25.09	Hydroxysolanesyl palmitate(C16)	629.6	PDA, MS
34	25.15	Hydroxysolanesyl oleate(C18:1)	611.6	PDA, MS
35	27.29	LLS	599.5 (90.3), 603.5 (100)	MS
36	27.52	LOO(LOP)	599.5 (38.4), 601.5 (100)	MS
37	27.52	LOP	575.4 (65.7), 577.5 (65.2), 601.5 (100)	MS
38	27.91	Cholesteryl linolenate(C18:3)	369.4	standard**
39	28.12	LPP(LOP)	551.5 (18.5), 575.4 (100)	MS
40	28.25	Solanesyl linolenate(C18:3)	613.6 (100), 891.8 (2.3)	standard**
41	28.71	Stigmasteryl linolenate(C18:3)	395.4	standard**
42	29.24	Campesteryl linolenate(C18:3)	383.4	standard**
43	30.25	Hydroxysolanesyl sitosteryl ether?	1025.9 (100), 611.6 (21.1), 545.5 (47.5)	PDA, MS
44	30.47	Sitosteryl linolenate(C18:3)	397.4	standard**
45	30.52	OOO	603.5	MS
46	31.07	LOS(OOP)	603.5 (100), 605.6 (59.7)	MS
47	31.34	Solanesyl linoleate(C18:2)	613.6 (100), 545.6 (7.6)	standard**
48	31.57	Cholesteryl linoleate(C18:2)	369.4	standard**
49	31.75	OOP	577.5 (100), 603.5 (61.8)	MS
50	32.48	Stigmasteryl linoleate(C18:2)	395.4	standard**
51	32.96	Solanesyl myristeate(C15)	613.6 (100), 545.6 (10.5), 841.8 (1.3)	standard**
52	33.05	Campesteryl linoleate(C18:2)	383.4	standard**
53	34.40	Sitosteryl linoleate(C18:2)	397.4	standard**
54	35.24	Solanesyl oleate(C18:1)	613.6 (100), 895.7 (0.9), 545.6 (7.3)	standard**
55	36.00	Solanesyl palmitate(C16)	613.6 (100), 545.6 (7.1)	standard**
56	36.19	Cholesteryl oleate(C18:1)	369.4	standard**
57	36.55	Solanesyl margrate(C17)	613.6 (100)	standard**
58	38.54	Sitosteryl oleate(C18:1)	397.4	standard**
59	38.58	Campesteryl palmitate(C16)	383.4	standard**
60	39.26	Solanesyl stearate(C18)	613.6 (100), 897.8 (0.4), 545.6 (7.3)	standard**
61	39.60	Sitosteryl palmitate(C16)	397.4	standard**
62	42.14	Solanesyl arachidinate(C20)	613.6 (100), 925.8 (1.7), 545.6 (8.8)	standard**
63	43.51	Solanesyl behenate(C22)	613.6 (100), 545.5 (6.8)	standard**

NO.	Aligned	Assigned component	黄色種		ハ ^o -レ種		リ ^o ト種	
	Retention		(BRA)		(BRA)		(TUR)	
	Time (min)		Ave area	SD	Ave area	SD	Ave area	SD
1	12.84	Hydroxysolanesol1?	358333	±87694	473700	±85483	413833	±48800
2	13.64	Hydroxysolanesol2?	n.d.		n.d.		n.d.	
3	13.74	Hydroxypheophytin <i>b</i>	1137	±424	659	±647	9316	±3935
4	13.95	Hydroxysolanachromene	131630	±54969	16377	±2932	18537	±2487
5	14.16	Pheophytin <i>b</i>	1823	±403	1537	±1238	5542	±4852
6	15.08	Hydroxypheophytin <i>a</i>	n.d.		n.d.		9898	±2700
7	15.29	Cholesterol	8420	±1919	17240	±8610	11914	±6977
8	15.29	Hydroxypheophytin <i>a'</i>	1510	±1020	1479	±334	15470	±3300
9	15.70	Stigmasterol	6486	±2379	8132	±3470	5597	±2353
10	15.87	Campesterol	23533	±5331	38447	±4297	53893	±4139
11	15.87	Pheophytin <i>a</i>	2939	±1281	467	±516	19083	±3693
12	16.24	LnLnLn	26947	±7049	4700	±454	43173	±1891
13	16.25	Pheophytin <i>a'</i>	n.d.		n.d.		n.d.	
14	16.42	Solanesol	469500	±74729	664133	±247168	406167	±53653
15	16.49	Sitosterol	30297	±7245	46190	±3863	31467	±4056
16	17.66	LLnLn	39437	±9501	4453	±345	27780	±1535
17	18.05	Solanachromene	150433	±26014	18587	±3001	22240	±1300
18	19.37	LLLn	29497	±7865	2888	±396	18110	±942
19	19.76	Hydroxysolanesyl linolenate(C18:3)	n.d.		n.d.		n.d.	
20	20.01	LnLnP	12777	±2515	3227	±516	28970	±5012
21	21.38	LLL	17760	±3689	3430	±683	11256	±1865
22	21.43	Solanesyl hydroxypheophorbide <i>a</i>	2597	±1779	3652	±208	13443	±3715
23	21.79	Hydroxysolanesyl linoleate(C18:2)	12742	±3483	11207	±1641	10493	±147
24	21.83	Solanesyl hydroxypheophorbide <i>a'</i>	n.d.		n.d.		5206	±4543
25	22.10	LLnP	19250	±3466	2077	±456	18527	±2715
26	22.61	Solanesyl pheophorbide <i>a</i>	n.d.		n.d.		10176	±3212
27	23.52	Hydroxysolanesyl pentadecanoate(C15)	n.d.		n.d.		n.d.	
28	23.92	LLO	n.d.		n.d.		7356	±5408
29	24.65	LLP(LnOP)	17380	±4959	3352	±950	18627	±4549
30	24.65	LnOP(LLP)	17380	±4959	3352	±950	18627	±4549

NO.	Aligned	Assigned component	黄色種		ハート種		サント種	
	Retention		(BRA)		(BRA)		(TUR)	
	Time (min)		Ave area	SD	Ave area	SD	Ave area	SD
31	24.67	LLnS	4682	±1662	n.d.		5214	±1320
32	25.04	LnPP(LnOP)	5463	±1687	n.d.		12893	±3380
33	25.09	Hydroxysolanesyl palmitate(C16)	6611	±4365	9648	±4044	10698	±5997
34	25.15	Hydroxysolanesyl oleate(C18:1)	n.d.		n.d.		n.d.	
35	27.29	LLS	4120	±1120	560	±350	2997	±1108
36	27.52	LOO(LOP)	8622	±1787	2516	±1031	7033	±798
37	27.52	LOP	8622	±1787	2516	±1031	7033	±798
38	27.91	Cholesteryl linolenate(C18:3)	12877	±3576	4208	±1798	9188	±2899
39	28.12	LPP(LOP)	5282	±1621	1053	±984	4619	±774
40	28.25	Solanesyl linolenate(C18:3)	92807	±33807	23367	±20862	128840	±56447
41	28.71	Stigmasteryl linolenate(C18:3)	11280	±1315	3702	±2870	7060	±1027
42	29.24	Campesteryl linolenate(C18:3)	23367	±7378	7216	±2727	12386	±3718
43	30.25	Hydroxysolanesyl sitosteryl ether?	42820	±13052	48353	±22610	26213	±9419
44	30.47	Sitosteryl linolenate(C18:3)	31347	±9576	11281	±3521	20447	±7582
45	30.52	OOO	n.d.		n.d.		999	±663
46	31.07	LOS(OOP)	2508	±604	2589	±996	1649	±1009
47	31.34	Solanesyl linoleate(C18:2)	84653	±39561	46350	±7043	32500	±5770
48	31.57	Cholesteryl linoleate(C18:2)	11934	±3563	3674	±1218	5086	±1839
49	31.75	OOP	2290	±1038	2440	±1013	2669	±128
50	32.48	Stigmasteryl linoleate(C18:2)	7735	±3048	1749	±1225	1790	±956
51	32.96	Solanesyl myristeate(C15)	n.d.		n.d.		8952	±4665
52	33.05	Campesteryl linoleate(C18:2)	22913	±5988	5984	±2303	7321	±2205
53	34.40	Sitosteryl linoleate(C18:2)	26320	±10370	7204	±3351	11644	±3742
54	35.24	Solanesyl oleate(C18:1)	8689	±11160	3311	±3306	5699	±5854
55	36.00	Solanesyl palmitate(C16)	105987	±30638	50417	±44185	68960	±15316
56	36.19	Cholesteryl oleate(C18:1)	1890	±895	n.d.		1844	±820
57	36.55	Solanesyl margrate(C17)	n.d.		n.d.		75959	±102730
58	38.54	Sitosteryl oleate(C18:1)	4161	±2085	1022	±847	4483	±1821
59	38.58	Campesteryl palmitate(C16)	3048	±1478	863	±936	1985	±1313
60	39.26	Solanesyl stearate(C18)	n.d.		n.d.		n.d.	
61	39.60	Sitosteryl palmitate(C16)	3990	±1680	1316	±1031	3206	±1425
62	42.14	Solanesyl arachidinate(C20)	14075	±11212	6182	±1758	5896	±3179
63	43.51	Solanesyl behenate(C22)	n.d.		n.d.		2965	±896
		Total identified peak areas	5383227		4995442		4103674	
		Total peak areas (SD>1000)	8155115		7618597		7237255	
		Total raw peak areas	8661262		8102758		7896941	

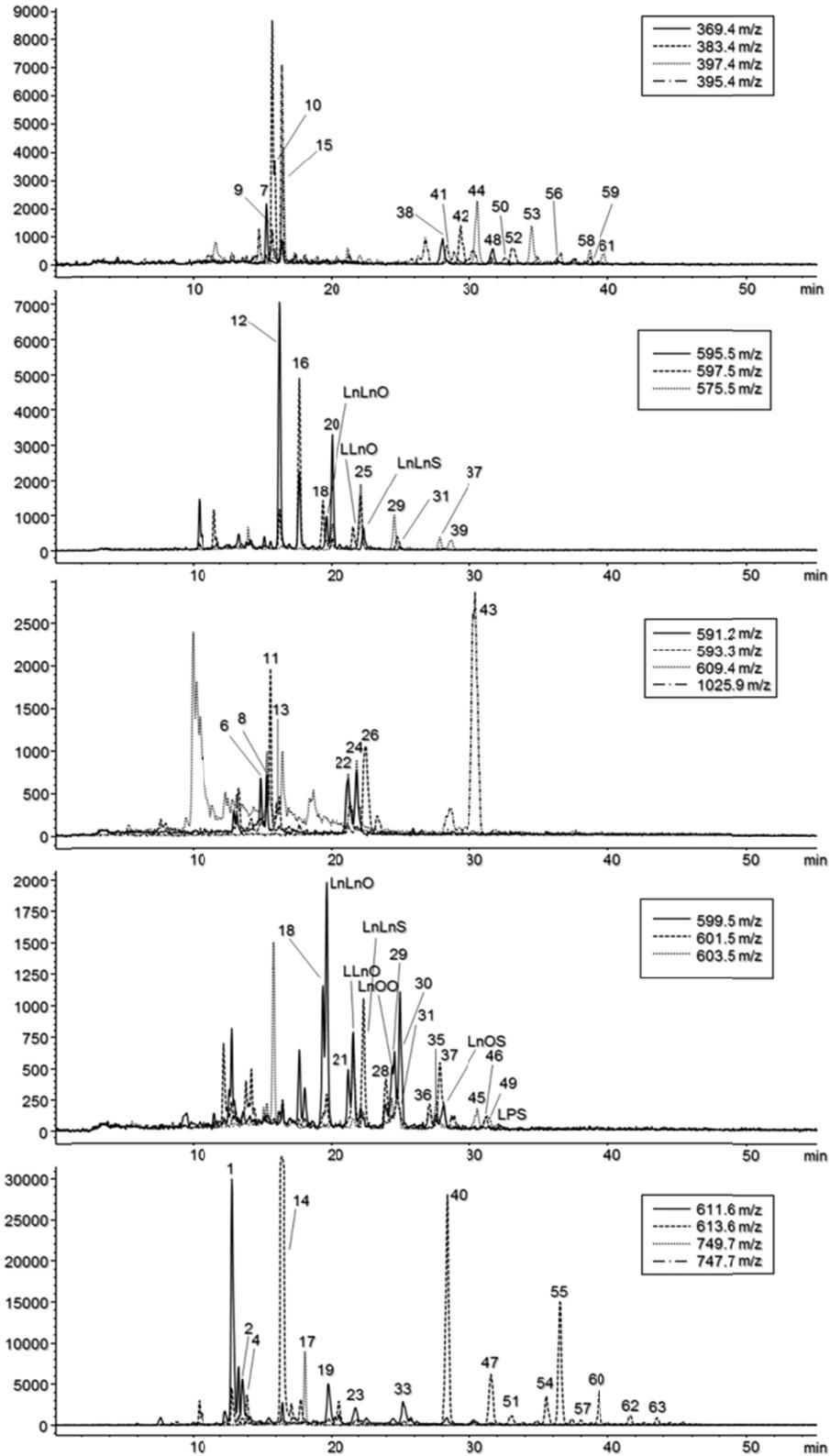


Figure 6-7 抽出イオンクロマトグラム上におけるスポットの構造推定

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、2008 年産のトルコ産オリエント種葉たばこ(304)のサンプル溶液の分析である。すべてのクロマトグラムは、ある m/z でイオン抽出されており、Figure スペース確保のために、重ね書き表示した。クロマトグラム上の番号は、Table 6-1 記載の番号を参照。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。

Figure 6-8 はデータ行列を相関係数行列に変換し、主成分分析(PCA)に供した主成分得点散布図である。散布図内の点線は、標準化したデータ行列と、ウォード法、ユークリッド距離に基づく階層的クラスター分析の結果である。比較のために、2章から5章までの定量分析結果を、統計処理に供することで得られた主成分得点散布図を Figure 6-9 に示す。Figure 6-8 を俯瞰すると、葉たばこは主に三つの品種(黄色種、バーレー種、オリエント種)に分類されており、黄色種はさらに複数分類されている様子が見える。クラスター分析により分類された黄色種5とオリエント種1が、散布図上で混在しているものの、オリエント種は全体的に黄色種と、バーレー種の間には配置していた。黄色種1と黄色種4は、それぞれブラジル産、日本産を中心としたグループであった。バーレー種は、黄色種と異なり散布図上では、広がりのある分布を示さなかった。これは黄色種同士のほうが、低極性不揮発性成分の量的差異が大きいためと考えられる。在来種暗色気干葉はバーレー種の分布中央に配置していたが、これは乾燥過程がバーレー種と類似しているためと考えられる。同様に在来種明色気干葉はバーレー種とオリエント種の間付近領域に配置していたが、オリエント種と在来種明色気干葉が類似した乾燥方法によるものと考えられる。一方で2章から5章までの結果を解析した Figure 6-9 を俯瞰すると、網羅的分析による結果と同様に、品種の分類は可能であった。サンプル数が少ないため、品種内でグループが存在しているようには見えないが、網羅的分析結果による主成分得点散布図と、全体的な傾向は類似していた。そのため網羅的分析が、定量分析による情報を漏らさずに包含しているものと考えられる。全体的に、乾燥過程において葉内に糖が残留するような、軽度の乾燥を経た葉たばこは、Figure 6-8 の散布図の右上に配置し、逆に十分な乾燥を経て、代謝が進んでいる葉たばこは、散布図においては左下に配置していた。このことから、低極性不揮発性成分は、葉たばこの品種間と、軽度の乾燥を経た品種(黄色種など)間で、組成が大きく異なると考えられた。

次に Figure 6-10 の因子負荷量散布図から、主成分分析散布図の葉たばこの各グループに寄与する成分を読み取ることとした。比較のために、2章から5章までの定量分析結果を、統計処理に供することで得られた因子負荷量散布図を Figure 6-11 に示す。網羅的分析による負荷量散布図からは、Triacylglycerol、Phytosterol ester、Solanachromene、遊離の Solanesol など多くの成分が黄色種に多いことが分かる。4章において黄色種には、Triacylglycerol が多く、5章において、Phytosterol ester が多いことが、明らかにされており、同じ傾向が観測されたことになる。加えて、黄色種2と黄色種3のグループは、主成分得点散布図では、右上に配置されており、グループに共通する要素(産地や着位など)ははっきりしないが、特に Phytosterol ester、Triacylglycerol、Solanachromene の寄与が大きい。一方で Pheophytin a や Solanesyl pheophytin a のような Chlorophyll 類については、オリエント種を特徴づけており、3章と同じ傾向が観測されている。他にも5章では、バーレー種に遊離の Phytosterol が多いと記したが、Figure 6-10 の負荷量散布図

においても、同じ傾向が観測された。Figure 6-11 の散布図でもほぼ同様の傾向が認められる。以上負荷量散布図の観察より、品種間や品種内間の産地などの葉たばこ間同士の差異は、低極性揮発性成分により、ある程度特徴づけられることが分かった。網羅的分析により、種々の葉たばこにおける法則性を明らかにしてきたが、定量分析結果と同様の傾向を与えられるだけの、網羅性が本章で構築した分析方法には備わっているものと考えられる。

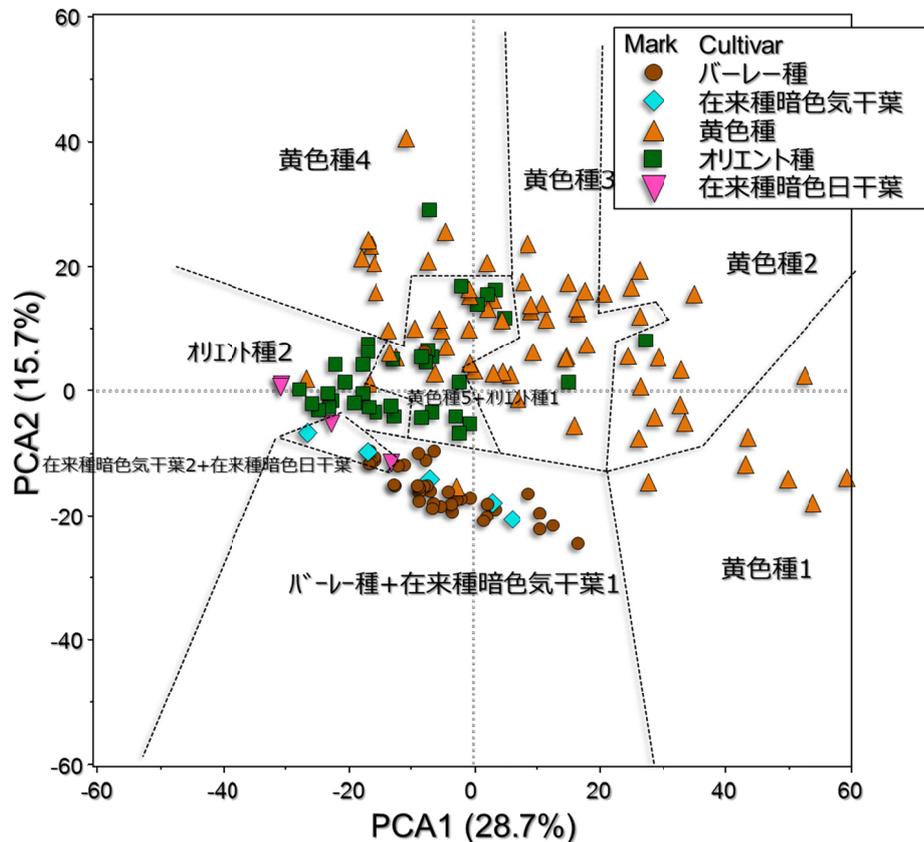


Figure 6-8 網羅的分析結果の主成分分析と階層的クラスター分析

分析結果の相関係数行列を主成分分析することで得られた、第一主成分と第二主成分による主成分得点散布図。図上の点線は、標準化されたデータに基づいた階層的クラスター分析（ユークリッド距離、ワード法）から得られた葉たばこカテゴリーを表す。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液を適宜希釈し、各溶液の分析を3回繰り返すことで、エリア面積、保持時間、 m/z をアライメントした。分析条件は、実験の部 6-2-4に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5に記載。

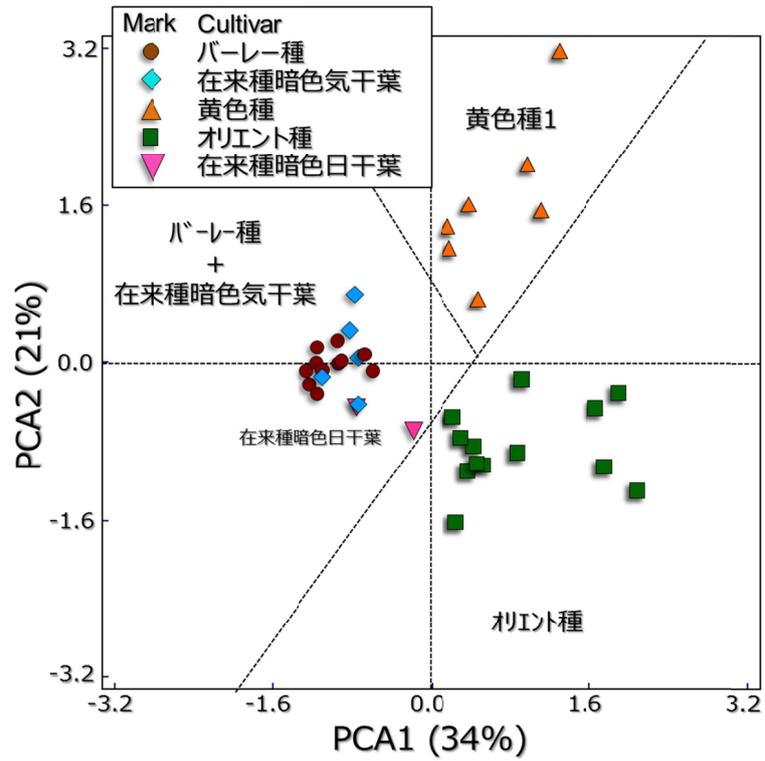


Figure 6-9 定量分析結果の主成分分析と階層的クラスター分析

2章から5章までの定量分析結果の相関係数行列を主成分分析することで得られた、第一主成分と第二主成分による主成分得点散布図。図上の点線は、標準化されたデータに基づいた階層的クラスター分析（ユークリッド距離、ウォード法）から得られた三つの葉たばこカテゴリーを表す。分析条件は、各章の実験項に記載。

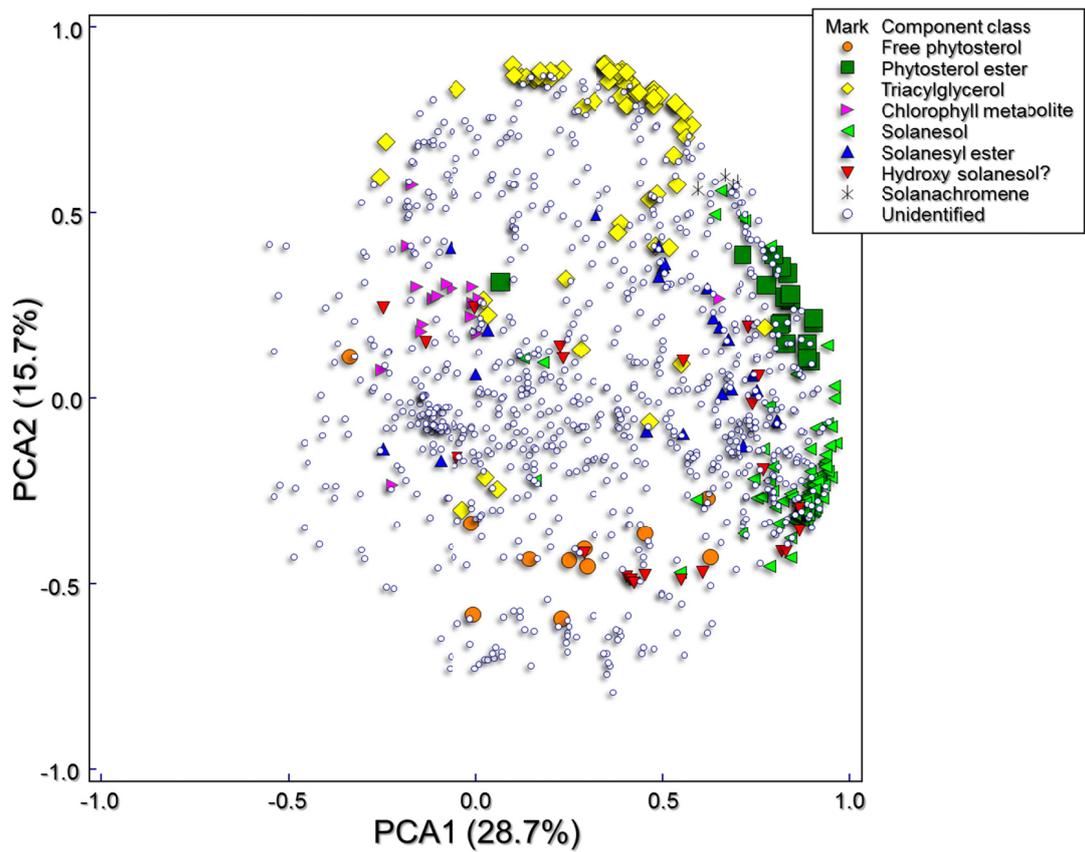


Figure 6-10 羅的分析結果の主成分分析による負荷量散布図

Figure 6-8 の主成分得点散布図における主成分に寄与する主成分負荷量散布図。分析自体は事前に葉タバコから抽出、調整されたサンプル溶液を適宜希釈し、各溶液の分析を3回繰り返すことで、エリア面積、保持時間、 m/z をアライメントした。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。分析結果の統計解析に使用されたソフトウェアについては、実験の部 5-2-6 に記載。化合物の種類は、プロットの形状により表示。

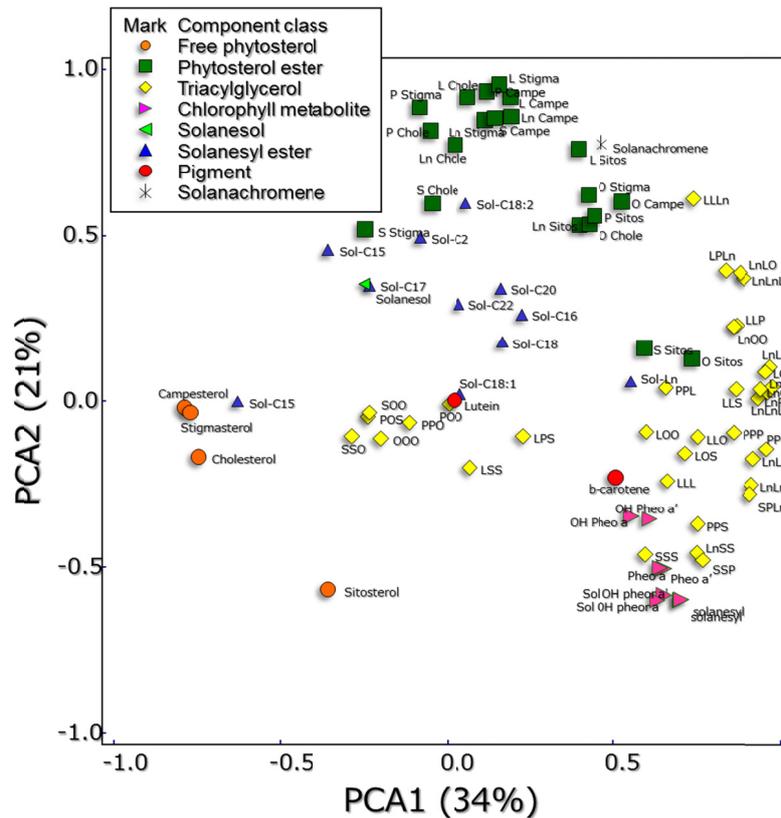


Figure 6-11 定量分析結果の主成分分析による負荷量散布図

2章から5章までの定量分析結果の相関係数行列を主成分分析することで得られた、主成分に寄与する負荷量散布図。分析条件は、各章の実験項に記載。

次いで網羅的分析からの“モデル化”を実施することとした。この“教師あり解析”では、葉たばこの産地、品種、着位といった質的変数を目的変数とし、モデル化を行い、そのモデルの機能検証を行うこととした。検証を通じて、本研究の目的である網羅的分析の有用性を示すことが目標となる。モデル化の方法は序論で述べたように、変数のタイプにより使い分けられるが、本章の検討では目的変数が質的変数となるため、判別分析を選択した。ただし説明変数の数が、サンプル数に比べて多く、目的変数ごとの説明変数による判別空間が求められない。そのため主成分分析後の主成分得点を、説明変数とし、累積寄与率が90%を超える、第60主成分までを、判別分析に供することとした (Figure 6-12)。ところで、判別分析にも、実際には多くの方法があり、解析者が都度妥当な方法を選択する必要がある。例えば説明変数は、分析データを直接用いて判別空間を構築することもあるが、判別精度を上げるために、群内分散に対して、群間分散を最大化するように、説明変数 (本章の検討では主成分得点になる) の正準変量化を実施してから、判別分析に供することもある。また距離尺度にはユークリッド距離や、標準偏差によるマハラノビス距離などがあり、群間の判別関数も線形、非線形とさまざまである。本項では、判別精度を上げるために主成分得点を正準変量化し、一般的なマハラノビス距離による線形判別空間を用いたモデル化を実行する

こととした。

Figure 6-13 は、黄色種、バーレー種、オリエント種といった品種を目的変数とした、分析データの正準変量散布図である。この正準変量に基づいた判別分析の結果は、Table 6-2 に、モデルの判定率とともに示した。Figure 6-8 の主成分得点散布図において、葉たばこの品種は離れて付置されていたが、正準変量散布図においては、さらに葉たばこの品種は離れて付置された。散布図上には、マハラノビス距離に基づく、線形の判別関数が示されているが、品種間を明確に判別する関数となった。判別精度は、One leave out cross-validation (ジャックナイフ判定) を使用し、サンプル一つを除いた分析データで、判別関数を作り、全てのサンプルに繰り返すモデル検証方法を採用したが、予測判別の正解率は、いずれも 95%を超えており、品種判別のモデルとしては十分に機能していることがわかる。

次に黄色種内のモデル化を検討することとし、目的変数として着位と産地を選択した。Table 6-3 は、黄色種の着位判別を、ジャックナイフ判定で検証した結果である。95%以上の予測判別の正解率で、黄色種の着位判別が可能であった。1章1項で触れたように、葉たばこは着位が下方の葉から退色が進み、収穫時期をずらして区別される。しかし収穫方法を厳密に管理することは難しく、混合することもあり得るため、有効なモデルとなった。着位の異なる葉たばこは、喫煙燃焼時の味、香りが異なるため、本項で扱った低極性不揮発性成分も差異がある可能性が高く、結果としてモデル構築が可能であったと思われる。Figure 6-14 は、黄色種の栽培地域を目的変数とした、正準変量の散布図である。Table 6-4 に、モデルの予測判別の正解率を示した。正準変量散布図においては、黄色種の各生産地域(Asia, South Asia, South America, Africa)が、明確に離れて付置されている。正解率も良好であることから、モデルとしては十分機能していると考えられた。着位とは異なり、栽培収穫情報により産地の判断は可能であるが、本章の検討により、同一産国内で様々なサンプルを分析すれば、詳細な地域判断モデルが構築出来る可能性が示されたといえる。以上の結果を踏まえ、本章で進めてきた網羅的分析方法に一定の有用性が認められた。

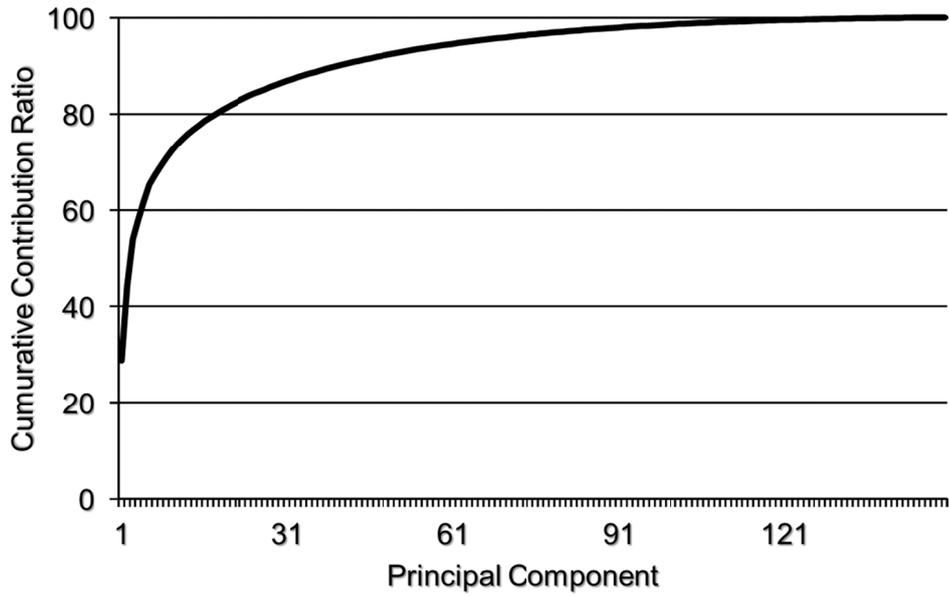


Figure 6-12 主成分分析の累積寄与率

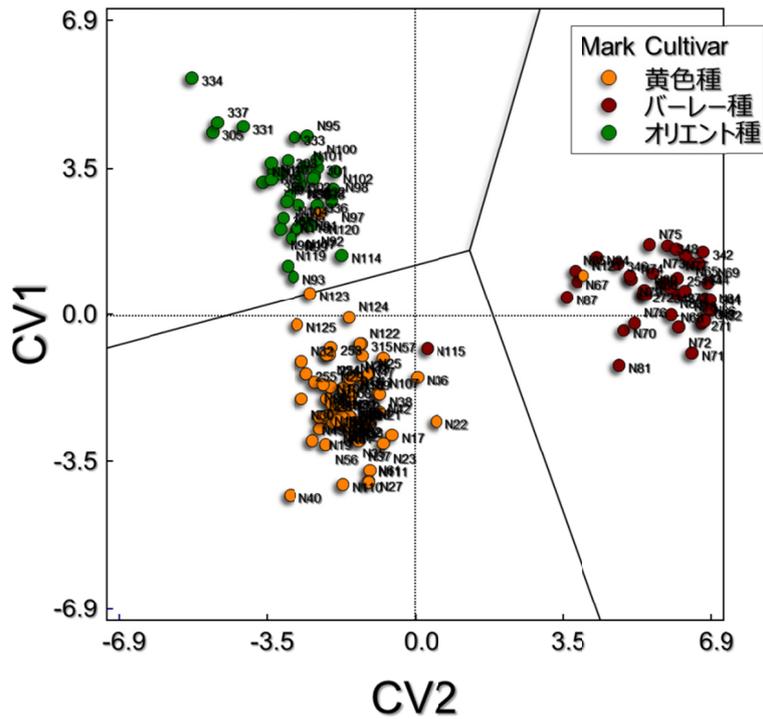


Figure 6-13 葉たばこの品種を目的変数とした主成分得点からの正準変量散布図

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー（NARPC）を組み合わせた LC/APCI-MSD による、葉たばこのサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液を適宜希釈し、各溶液の分析を 3 回繰り返すことで、エリア面積、保持時間、 m/z をアライメントした。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。散布図に付された番号は Table 10-1 を参照。

Table 6-2 主成分による品種の正準判別分析

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、葉たばこのサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液を適宜希釈し、各溶液の分析を 3 回繰り返すことで、エリア面積、保持時間、 m/z をアライメントした。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。表中の観測値は目的変数であり、推測値はモデルから導かれた予測カテゴリーである。

		推測値			合計
		ハロー種	黄色種	オリエント種	
観測値	ハロー種	38	1	0	39
	黄色種	1	64	2	67
	オリエント種	0	0	36	36
合計		39	65	38	142
正答率		97%	98%	95%	

Table 6-3 主成分による黄色種着位の判別分析

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、葉たばこのサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液を適宜希釈し、各溶液の分析を 3 回繰り返すことで、エリア面積、保持時間、 m/z をアライメントした。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。表中の Observed Value は目的変数であり、Predicted Value はモデルから導かれた予測カテゴリーである。着位が上の葉の場合を L とし、下の葉の場合を C とした。

		推測値		合計
		本葉系	中葉系	
観測値	本葉系	37	1	38
	中葉系	1	25	26
Sum		38	26	64
Accuracy		97%	96%	

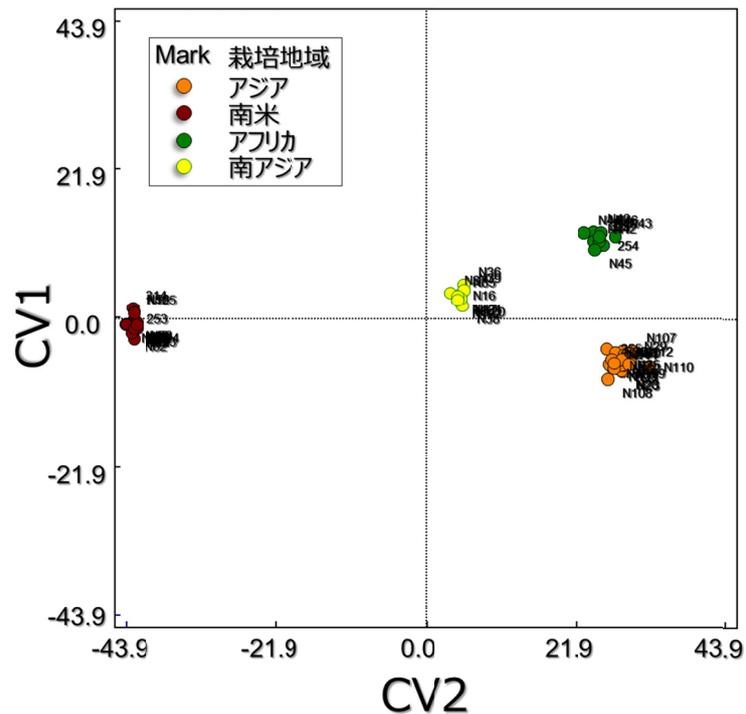


Figure 6-14 葉たばこの産地を目的変数とした主成分得点からの正準変量散布図

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、葉たばこのサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液を適宜希釈し、各溶液の分析を3回繰り返すことで、エリア面積、保持時間、m/z をアライメントした。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。散布図に付された番号は Table 10-1 を参照。

Table 6-4 主成分による黄色種産地の判別分析

全てのデータは、非水系の逆相クロマトグラフィー (NARPC)を組み合わせた LC/APCI-MSD による、葉たばこのサンプル溶液の分析と解析から求めた。分析自体は事前に葉たばこから抽出、調整されたサンプル溶液を適宜希釈し、各溶液の分析を3回繰り返すことで、エリア面積、保持時間、m/z をアライメントした。分析条件は、実験の部 6-2-4 に記載。解析条件は、実験の部 6-2-5 に記載。表中の Observed Value は目的変数であり、Predicted Value はモデルから導かれた予測カテゴリーである。

		推測値				合計
		南米	アジア	アフリカ	南アジア	
観測値	南米	21	0	0	0	21
	アジア	0	21	0	0	21
	アフリカ	0	0	10	0	10
	南アジア	0	0	0	10	10
	合計	21	21	10	10	62
	正答率	100%	100%	100%	100%	

6・4 小括

本章は、2章から5章で進めてきた低極性不揮発性成分の分析を踏まえて、網羅的分析方法を構築し、その有用性を示すことを目的とした。定量分析に向けたSIMモードからスキャンモードへ変更する際には、注入量の削減と、イオン取り込み時の閾値を低下させることで、成分数を極力損ねないように調整した。スポットの再現性と、面積の線形性については、繰り返し間隔を変更した分析と、継代希釈した溶液の分析により、それぞれ網羅的分析に十分であることを確認した。網羅的分析から得られたデータ行列は、PCAと階層的クラスター分析に供され、散布図に基づき、2章から5章で認められた傾向との比較を行った。結果的に、種々の低極性不揮発性成分が、品種と品種内の差異に関与しており、網羅的分析が十分な網羅性を有していることを示した。また網羅的分析結果を活用して、モデル化を行ったところ、品種、産地、着位を良好な正解率で判別可能な、モデルを構築できた。以上の結果より、葉たばこの低極性不揮発性成分の網羅的分析により、これまでヒトの経験と官能に頼ってきた、品質判断が成分情報で客観的かつ再現性良く実行できる可能性を示すことが出来た。本研究により提示された方法は、他の植物のクチクラ層分析にも適用できるので、さらに多くの対象を分析することで、方法自体の汎用性と、結果に基づく植物への理解が進むものと考えている。

7章 総括

たばこは 4000 年以上の歴史を持つ嗜好品であるが、その時間の流れとともに淘汰、進化、多様化した。そのなかで本研究では *Nicotiana tabacum* のなかで、最も一般的な品種である、黄色種、バーレー種、オリエント種、在来種のみを対象とした。これは知られていないか、入手出来ないような地域特有の種、品種等があり、そうした広い裾野まで対象とするのは困難であったからである。それでも現場では、様々な葉たばこの品質が、職人的なヒトの経験と官能によって、品質判断が進められてきておりいる。したがって科学の力で品質を説明できるよう、少しでも進歩させようとするには大きな意義がある。こうした背景に基づき著者は、葉たばこの品質を成分で説明する研究に取り組むこととした。

1 章の序論で述べたように、喫煙燃焼時の味や香りに大きく関わると考えられる葉たばこ内容成分、特に葉面の樹脂成分は、非常に研究が進んでおり同定や定量情報が既に世の中にある。ところが、味や香りに関係する葉面樹脂の低極性不揮発性成分は、適した分析装置が無いことから、解明が進んでいなかった。加えて網羅的分析を行い、サンプルの包括的な特徴把握と、サンプル間の判別モデル構築に取り組む研究は、近年盛んになっているものの、葉たばこに対しては実施例が乏しかった。そのため著者は、LC/APCI-MSD を利用して、葉たばこに含まれる低極性不揮発性成分を明らかにし、定量分析方法と網羅的分析方法を構築し、モデル化を検討することとした。この研究により、ヒトの経験と官能により判断されてきた、葉たばこの品質（品種、産地、栽培、乾燥）を機械的に判断出来るようになることは、たばこ製造の大きな進歩となる。本論文は、このような背景を踏まえて、著者が取り組んだ結果をまとめたものであり、以下の結果を提示することが出来た。

2 章では、Solanosol とその誘導体を解明し分析するために、これまで時間を要していた加水分解過程を分析過程から省き、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)と LC/APCI-MSD を組み合わせた方法を構築した。その結果、葉たばこに含まれる Solanesyl ester を完全に分離することが出来た。また構造が推定された化合物をを事前に合成し、クロマトグラム上で、葉たばこに含まれるピークと比較した。そして、構造推定を進めることで、Solanosyl arachidiate (C20)、Solanosyl behenate (C22)、Solanosyl pentadecanate(C15) を本研究において新たに見出した。質量分析装置に導入された Solanesol とその誘導体は、フラグメンテーション中に水や脂肪酸が脱離していたため、脱離後の 613.6 m/z のプロダクトイオンを検出すれば、定量分析方法を構築できることが分かった。定量結果より、Solanosyl ester の組成は、葉たばこ間で量的差異が観測され、ある程度乾燥方法に影響され、不飽和型の脂肪酸が黄色種とオリエント種に多く、飽和型の脂肪酸がバーレー種に多い傾向がみられた。ただし本章の定量結果からは、様々な葉たばこ間の差異を十分には表現できていないので、さらに成分種を拡張していくこととした。

3 章では、葉たばこの品種の一つであるオリエント種に含まれる Chlorophyll 代謝物を分

離、構造推定するための方法を構築した。分離は2章と同様に非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)を適用し、検出器はPDADとAPCI-MSDを用いて、各化合物の波長スペクトル、質量スペクトル、保持時間、合成標品などとの比較検討により、これまで明らかにされてこなかったChlorophyll代謝物の構造推定を進めた。結果的にHydroxypheophytin、Solanesyl pheophorbideとSolanesyl hydroxypheophorbideを新たに見出し、約30種のChlorophyll代謝物が、オリエント種の緑色に関わる成分として、提示することが出来た。本章で検討した分析は、オリエント種とその他の品種を、明確に判別するための方法となった。

4章では、中性脂肪であるTriacylglycerolを分離定量するために、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)とLC/APCI-MSDを組み合わせた分析方法を構築した。特徴的なジアシルグリセロールイオンがプロダクトイオンとして生成するため、Triacylglycerolの構造推定は容易であり、Linolenic acid、Linoleic acid、Oleic acid、Palmitic acid、Stearic acidを含む35種のTriacylglycerolを葉たばこに見出した。定量分析は、同一の脂肪酸が結合した市販の標準Triacylglycerolから、レスポンスファクターを算出した検量線を活用した。分析結果を主成分分析に供することにより、Triacylglycerolは、黄色種、オリエント種のような乾燥が軽度な品種と、バーレー種や在来種のような乾燥が十分に進んだ品種で、組成が大きく異なっており、Solanesolとその誘導体の結果と同様に、不飽和型の脂肪酸が、乾燥が軽度な品種に多く、飽和型の脂肪酸は乾燥が進んだ品種に多い傾向を明らかにした。

5章では、葉たばこに含まれるPhytosterolと、Palmitic acid (C16)、Stearic acid (C18)、Oleic acid (C18:1)、Linoleic acid (C18:2)、Linolenic acid (C18:3)のPhytosterol esterを完全に分離し、定量分析するために、非水系の逆相クロマトグラフィー(NARPC)とLC/APCI-MSDを組み合わせた分析方法を構築した。事前に調製した標品を利用することで、未知ピークの構造推定と定量を行った。定量結果からは、黄色種にPhytosterol esterが多く、バーレー種、在来種暗色気干葉、在来種明色気干葉に遊離のPhytosterol量が多いことが分かり、品種により著しい差異が見られた。また主成分分析により、PhytosterolとPhytosterol esterの組成差異は、乾燥過程の違いによると考えられた。またこれまでの成分群よりも品種間のみならず、品種内でも葉たばこ間の差異を説明できる可能性を示していた。

6章は、2章から5章で進めてきた低極性不揮発性成分の定量分析方法を、網羅的分析に最適化した。そして、同様の傾向が捉えられること、またモデル化とその検証を行うことで、本研究の目的であるヒトの経験や官能による品質判断から、成分情報による機械的な判断が可能か検証した。定量分析時に検出した成分を、網羅的分析時にも検出するために、イオン取り込み時の閾値を減少させることで、SIMモードをScanモードに切り替えた分の取り込みイオン量の減少を補填した。また検出されたスポットの状況を確認することで、定量分析時に検出された成分が概ね検出

されていることに加えて、新たな成分も追加されたことで、方法の網羅性を確認した。網羅的分析方法の妥当性は、スポットの再現性ならびにスポット面積の線形性を、繰り返し間隔の検討ならびに継代希釈した溶液の分析により示した。最終的にスポット面積と保持時間から成るデータ行列を、PCAと階層的クラスター分析に供し、種々の低極性不揮発性成分が、品種間と品種内の差異に関わることを明らかにした。種々の葉たばこ間に認められる低極性不揮発性成分の量的階差は、2章から5章の成分分析による傾向と、本網羅的分析により観測された傾向と良好な一致を示していた。分析結果の主成分得点を正準変量化し、判別モデルを構築した。モデルの妥当性検証は、ジャックナイフ判定法を用いたが、品種、地域、着位が良好な正答率で判別されることで確認した。世界中の農家で葉たばこの栽培は行われ、収穫された葉たばこを製造者は買い入れている。しかし、農家における葉たばこの種、栽培、収穫、乾燥方法を完全に追跡できるわけではないため、本研究で提示した判別モデルは有効と考えられる。

最後に今後の展望を述べ、本論文を締めくくりたい。本研究では、葉たばこの低極性不揮発性成分を対象とし、計量化学の観点を活用することで、ヒトの経験と官能に頼ってきた葉たばこ品質の判断を、機械的かつ再現性良く実施しようとした。これは当該成分が未解明だったこともあり、種や品種間の違いに関わる新たな成分知見を与え、これまで報告されてきた方法と比較しても成分が特異的であり、モデル自体も十分有効なレベルとなった。一方で本研究を遂行したことで、今後の課題が浮かび上がった。葉たばこの判別モデルとしては、サンプルの数と種類を増やし高度化することが、課題となることは明らかである。しかし本研究で提示した分析方法の網羅性は、葉たばこのみならず植物一般の葉面樹脂に対しても、有効なレベルなのかは未知数である。1章序論で触れたように、世の中に存在する成分全てを最大漏らさず分析できる装置は存在しない。しかし自然対象の特徴を完全に捉えるためには、分離の向上、分離における成分網羅性の拡張、検出感度の向上、分析結果の組み合わせなど様々なアプローチを検討する必要がある。こうした研究をさらに継続・拡大していくことで、さらに多くの知見と、有用性の向上、方法の汎用化が望めるのである。たばこ製造にかかわる問題解決に端を発した本研究は、非常に多くの種類に富む葉たばこを科学的に判別するという産業上の利点だけでなく、計量化学への貢献による学術的な貢献の一助になるものと信ずる。

8章 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇篤のご指導、ご鞭撻を賜りました、慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻の宮本憲二准教授に深甚の謝意を表します。また本論文のご校閲とご指導を賜りました、同大学院の佐藤智典教授、同大学院の末永聖武教授、同大学院の舟橋啓准教授に深謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、格別のご配慮と激励を賜りました元日本たばこ産業たばこ中央研究所所長の原秀実博士ならびに前同社たばこ中央研究所長、現同社執行役員米田靖之氏、現同社製品技術開発センター所長の北尾智博士に深謝申し上げます。

本研究を開始する契機を与えてくださり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました、前同社たばこ中央研究所主任研究員北見博子氏、現同社たばこ中央研究所主席研究員横井道德氏に心より御礼申し上げます。また終始本研究にご尽力賜りました、現同社製品技術開発センター主任の合原義人氏、同主任の香島貴純氏ならびに現同社たばこ中央研究所研究員の中山秀謹博士、同研究員の吉崎誠人氏、現研究補助の麻生克子氏、前補助の菅野路子氏に深甚の謝意を表します。

最後に研究遂行にあたり困難な時も変わらずに支え続けてくれた家族に感謝します。

9 章 参考文献

- A. Barnsteiner, R. E. (2012). Capillary gas chromatographic analysis of complex phytosteryl/-stanyl ester mixtures in enriched skimmed milk-drinking yoghurts. *Food Control*, 27, 275.
- A. Bernsteiner, T. L. (2011). GC-based analysis of plant stanyl fatty acid esters in enriched foods. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 5204.
- A. Gauthier-Jacques, K. B. (2001). Improved method to track chlorophyll degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1117.
- A. Jakab, K. H. (2002). Comparative analysis of different plant oils by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 976, 255.
- A. Koiwai, F. S. (1982). Changes in glycerolipids and their fatty acid composition during maturation of tobacco seeds. *Phytochemistry*, 21, 305.
- A. Koiwai, F. S. (1983). The fatty acid composition of seeds and leaves of Nicotiana species. *Phytochemistry*, 22, 1409.
- A. Koiwai, T. K. (1979). Changes in Glycolipids and Phospholipids of Tobacco Leaves during Flue-curing. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 597.
- A. Koiwai, T. M. (1990). Changes in glycerolipid content and fatty acid composition during tobacco seed germination. *Phytochemistry*, 29, 73.
- A. Rodman, T. A. (2008). *The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke*. Florida, United States: CRC Press.
- A. Roux, Y. X. (2012). Annotation of the human adult urinary metabolome and metabolite identification using ultra high performance liquid chromatography coupled to a linear quadrupole ion trap-Orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 84, 6429.
- A. Türkan, Ş. K. (2006). Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. *J. Chromatogr. A*, 1127, 34.
- B. H. Lipshutz, P. M. (2002). A Short, Highly Efficient Synthesis of Coenzyme Q10. *J. Am. Chem. Soc.*, 48, 14282.
- B. Kräutler, P. M. (1999). Solving the riddle of chlorophyll breakdown. *Acc. Chem. Res.*, 32, 35.
- B. Pieber, S. S. (2010). Novel sensitive determination of steryl glycosides in biodiesel by gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, 1217, 6555.

- Berg, J. M. (1995). Fatty acid metabolism. In L. Stryer (Ed.), *Biochemistry* (p. 603). N.Y.;; W.H. Freeman & Company.
- C. E. Cook, M. E. (1969). An examination of the hexane extract of flue-cured tobacco involving gel permeation chromatography. *Phytochemistry*, *8*, 1025.
- C. Zhao, C. L. (2007). Rapid and quantitative determination of solanesol in *Nicotiana tabacum* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *44*, 35.
- D. Davis, M. T. (1999). *Tobacco: Production, Chemistry, and Technology*, (1st ed.). New York: Blackwell Science.
- D. Dolphin. (1978). The Porphyrins Volume III. In *Physical Chemistry PART A*. New York: Academic Press.
- D. J. Chitwood, G. W. (1991). Separation of Epimeric Pairs of C-24 Alkylsterols by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of the Free Sterols at Subambient Temperature. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, *14*, 151.
- D. L. Roberts, R. L. (1962). Macrocyclic diterpenes. 0t- and B-4,8,13-duvatriene-1,3-diols from tobacco;. *J. Org. Chem.*, *27*, 3989.
- Davis, D. L. (1976). Waxes and lipids in leaf and their relationship to smoking quality and aroma,. *Rec. Adv. Tob. Sci.*, *2*, 80.
- E. Gaquerel, S. H. (2010). Development and validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry method for induced changes in *Nicotiana attenuata* leaves during simulated herbivory. *J. Agric. Food Chem.*, *58*, 9418.
- E. J. Want, A. N. (2007). From exogenous to endogenous: the inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics. *J. Proteome. Res.*, *6*, 459.
- E. Jover, Z. M. (2002). Complete characterisation of lanolin steryl esters by sub-ambient pressure gas chromatography-mass spectrometry in the electron impact and chemical ionisation modes. *J. Chromatogr. A*, *970*, 249.
- E. Salivaras, A. M. (1992). Detection of olive oil adulteration with canola oil from triacylglycerol analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, *69*, 935.
- E. Voges. (1984). Tobacco Encyclopedia. Virginia: Tobacco Journal International.
- F. L. Chu, L. P. (2011). Carotenogenesis up-regulation in *Scenedesmus* sp. using a targeted metabolomics approach by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, *59*, 3004.

- G. Dobson, W. W.-D. (1995). Silver ion chromatography of lipids and fatty acids. *J. Chromatogr. B*, 671, 197.
- G. Iafelice, V. V. (2009). Characterization of total, free and esterified phytosterols in tetraploid and hexaploid wheats. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2267.
- G.A. Bean. (1973). Phytosterols. *Adv. Lipid Res.*, 11, 193.
- H. Gan, C. S. (2014). Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry analysis linked with chemometrics for food classification - a case study: geographical provenance and cultivar classification of monovarietal clarified apple juices. *Food Chem.*, 146, 149.
- H. R. Burton, M. J. (1985). Changes in chemical composition of tobacco lamina during senescence and curing. 1. Plastid pigments. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 879.
- H. Thomas, H. O. (2001). Recent advances in the cell biology of chlorophyll catabolism. *Adv. Bot. Res.*, 35, 1.
- H. Zhou, C. L. (2006). Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *J. Chromatogr. A*, 1129, 135.
- H. Zhou, C. L. (2006). Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *J. Chromatogr. A*, 1129, 135.
- I. M. Abu-Reidah, M. M.-R.-C.-G. (2013). Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *J. Chromatogr. A*, 1313, 212.
- I. Mezzine, H. Z. (2003). Analysis of plant sterol and stanol esters in cholesterol-lowering spreads and beverages using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5639.
- I. Schmeltz, D. H. (1977). Nitrogen-containing compounds in tobacco and tobacco smoke. *Chem. Rev.*, 77, 295.
- I. Schuler, A. M. (1991). Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 6926.
- Ishida, N. (2010). A novel method for analyzing solanesyl esters in tobacco leaves using atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometer. *J. Chromatogr.*, 1217, 5794.
- J. Ai. (1997). Rapid Measurement of Free Phytosterols in Tobacco by Short-Column GC/MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3932.

- J. C. Leffingwell. (1999). Basic Chemical Constituents of Tobacco Leaf and Differences among Tobacco Types. In M. T. D. Davis (Ed.), *Tobacco: Production Chemistry and Technology* (p. 265). Oxford: Blackwell Science.
- J. Chen, X. L. (2007). Rapid determination of total solanesol in tobacco leaf by ultrasound-assisted extraction with RP-HPLC and ESI-TOF/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *43*, 879.
- J. Heyer, B. P. (2004). Steroid profiles of transgenic tobacco expressing an *Actinomyces* 3-hydroxysteroid oxidase gene. *Phytochemistry*, *65*, 2967.
- J. J. Ellington, P. F. (1978). Lipid distribution in flue-cured tobacco plants. *J. Agric. Food Chem.*, *26*, 407.
- J. M. Berg, J. L. (1995). Photosynthesis. In *Biochemistry 4th edition* (4th edition ed., p. 653). New York: W.H. Freeman & Company.
- J. S. Amaral, S. C. (2004). Triacylglycerol composition of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars: Characterization by HPLC-ELSD and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*, *26*, 7964.
- J. S. Amaral, S. C. (2006). Influence of Cultivar and Environmental Conditions on the Triacylglycerol Profile of Hazelnut (*Corylus avellana* L.). *J. Agric. Food Chem.*, *54*, 449.
- J. Zhang, Y. Z. (2011). Dynamic metabonomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants to salt stress. *J. Proteome. Res.*, *10*, 1904.
- J.W. Heaton, A. M. (1996). Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends Food Sci. Technol.*, *7*, 8.
- K. Cho, Y. K. (2012). Nontargeted metabolite profiling in compatible pathogen-inoculated tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38) using UPLC-Q-TOF/MS. *J. Agric. Food Chem.*, *60*, 11015.
- K. Cho, Y. K. (2013). Metabolic survey of defense responses to a compatible hemibiotroph, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, in ethylene signaling-impaired tobacco. *J. Agric. Food Chem.*, *61*, 8477.
- K. Gaudina, E. L. (2000). Retention behaviour of ceramides in sub-critical fluid chromatography in comparison with non-aqueous reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, *883*, 211.
- K. Takamiya, T. T. (2000). Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci.*, *5*, 426.
- L. Almela, J. A.-L. (2000). High-performance liquid chromatographic screening of chlorophyll

- derivatives produced during fruit storage. *J. Chromatogr. A*, *870*, 483.
- L. Cercaci, M. T.-E. (2003). Solid-phase extraction-thin-layer chromatography-gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. *J. Chromatogr. A*, *985*, 211.
- L. Ma, D. D. (1996). Stereoselective Synthesis of New Chlorophyll a Related Antioxidants Isolated from Marine Metabolites. *J. Org. Chem.*, *61*, 2501.
- L. Modello, P. Q. (2005). Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis. *J. Chromatogr. A*, *1086*, 91.
- L. P. Vernon. (1966). The Structure and Chemistry of Functional Groups. In G. R. Seely (Ed.), *The Chlorophylls* (p. 67). New York, London: Academic press.
- L. Zhang, X. W. (2013). Metabolic profiling of Chinese tobacco leaf of different geographical origins by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, *61*, 2597.
- M. Bedner, M. M. (2008). Development of liquid chromatographic methods for the determination of phytosterols in Standard Reference Materials containing saw palmetto. *J. Chromatogr. A*, *1192*, 74.
- M. Chen, M. S. (2010). A red-shifted chlorophyll. *Science*, *329*, 1318.
- M. Holčapek, H. V.-R. (1999). Trace determination of glycols by HPLC with UV and electrospray ionization mass spectrometric detections. *Anal. Chem.*, *71*, 2288.
- M. Holcapek, P. J. (2003). Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, *1010*, 195.
- M. J. Lerma-García, R. L.-R.-A. (2011). Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils. *J. Chromatogr. A*, *1218*, 7521.
- M. J. Lerma-Garcia, V. C.-H.-M.-A. (2009). Classification of extra virgin olive oils produced at La Comunitat Valenciana according to their genetic variety using sterol profiles established by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. *J. Agric. Food Chem.*, *57*, 10512.
- M. Kadam, D. N. (2006). Hplc analysis of rice bran oil. *J. Food Lipids*, *13*, 354.
- M. Lía, K. N. (2011). Characterization of fatty acid and triacylglycerol composition in animal fats using silver-ion and non-aqueous reversed-phase high-performance liquid

- chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/flame ionization detection. *J. Chromatogr. A*, 1218, 7499.
- M. LÍsa, M. H. (2007). High-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detection characterization of Delta5-polyenoic fatty acids in triacylglycerols from conifer seed oils. *J. Chromatogr. A*, 1146, 67.
- M. LÍsa, M. H. (2008). Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1198, 115.
- M. R. N. Moton, T. S. (2007). Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1168, 237.
- M. W. Ogden, K. C. (1989). Collection and determination of solanesol as a tracer of environmental tobacco smoke in indoor air. *Environ. Sci. Technol.*, 9, 1148.
- N. A. Parris. (1978). Non-aqueous reversed-phase liquid chromatography : A neglected approach to the analysis of low polarity samples. *J. Chromatogr. A*, 157, 161.
- N. E. Madala, P. A. (2013). Metabolomic analysis of isonitrosoacetophenone-induced perturbations in phenolic metabolism of *Nicotiana tabacum* cells. *Phytochem.*, 94, 82.
- N. Ishida. (2011). Expanded separation technique for chlorophyll metabolites in Oriental tobacco leaf using non aqueous reversed phase chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1218, 5810.
- N. Ishida. (2013). A comprehensive study on triacylglycerols in tobacco leaves using liquid chromatography and atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry. *Beitr. Tabakforsch. Int.*, 25, 360.
- N. Ishida. (2014). A method for simultaneous analysis of phytosterols and phytosterol esters in tobacco leaves using non aqueous reversed phase chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry detector. *J. Chromatogr. A*, 1340, 99.
- N. L. Kuehnbaum, P. B.-M. (2013). New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. *Chem. Rev.*, 113, 2437.
- P. Dugo, O. F. (2004). Off-line coupling of non-aqueous reversed-phase and silver ion high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the characterization of rice oil triacylglycerol positional isomers. *J. Chromatogr. A*, 1041, 135.
- P. Dugo, O. M. (2012). Mass spectrometric elucidation of triacylglycerol content of *Brevoortia*

- tyrannus (menhaden) oil using non-aqueous reversed-phase liquid chromatography under ultra high pressure conditions. *J. Chromatogr. A*, 1259, 227.
- P. Dugo, T. K. (2006). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrixes. *J. Chromatogr. A*, 1112, 269.
- P. Jandera, G. G. (1991). Effect of the sample solvent on band profiles in preparative liquid chromatography using non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 588, 1.
- P. Kalo, T. K. (2001). Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 935, 237.
- P. Sandra, A. M. (2002). Characterization of triglycerides in vegetable oils by silver-ion packed-column supercritical fluid chromatography coupled to mass spectroscopy with atmospheric pressure chemical ionization and coordination ion spray. *J. Chromatogr. A*, 974, 231.
- P. Wongsinkongman, A. B. (2002). Antitumor agents. Part 209: Pheophorbide-a derivatives as photo-Independent cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 583.
- R. Adlof, G. L. (2004). Analysis of triglyceride isomers by silver-ion high-performance liquid chromatography. Effect of column temperature on retention times. *J. Chromatogr.*, 1046, 109.
- R. B. V. Breeman, F. L. (1991). Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1452.
- R. Esche, A. B. (2012). Simultaneous analysis of free phytosterols/phytostanols and intact phytosteryl/phytostanyl fatty acid and phenolic acid esters in cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 5330.
- R. Esche, B. S. (2013). Online LC-GC analysis of free sterols/stanols and intact steryl/stanyl esters in cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 10932.
- R. Esche, L. M. (2013). Online LC-GC-based analysis of minor lipids in various tree nuts and peanuts. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 11636.
- R. L. Airs, J. E. (2001). Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *J. Chromatogr. A*, 917, 167.

- R. L. Rowland. (1958). Flue-cured Tobacco. III. Solanachromene and α -Tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.*, *22*, 6130.
- R. L. Rowland, P. H. (1956). Flue-cured Tobacco. I. Isolation of Solanesol, an Unsaturated Alcohol. *J. Am. Chem. Soc.*, *18*, 4680.
- R. L. Rowland, P. H. (1959). Flue-cured tobacco. IV. Isolation of solanesyl esters. *Tob. Sci.*, *3*, 1.
- R. L. Stedman. (1968). The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem. Rev.*, *68*, 153.
- R. N. Jeffrey, R. B. (1947). Changes in the Chlorophyll and Carotene Contents of Curing Burley Tobacco Cut at Different Stages of Maturity. *Plant Physiol.*, *22(1)*, 34.
- R. N. Rao, M. V. (2008). Continuous counter current extraction, isolation and determination of solanesol in *Nicotiana tabacum* L. by non-aqueous reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *46*, 310.
- R. P. Evershed. (1996). High-resolution triacylglycerol mixture analysis using high-temperature gas chromatography / mass spectrometry with a polarizable stationary phase, negative ion chemical ionization, and mass-resolved chromatography. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, *7*, 350.
- R. P. Evershed, V. L. (1987). Strategy for the analysis of steryl esters from plant and animal tissues. *J. Chromatogr.*, *400*, 187.
- R. Zhou, S. L. (2000). Comparison of environmental tobacco smoke concentrations and mutagenicity for several indoor environments. *Mutat. Res.*, 191.
- R.A. Moreau, B. W. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.*, *41*, 457.
- R.F. Severson, J. E. (1977). Gas chromatographic method for the determination of free and total solanesol in tobacco. *J. Chromatogr.*, *139*, 269.
- S. Azadmard-Damirchi, P. C. (2009). A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids. *J. Chromatogr. A*, *1216*, 36.
- S. C. Cunha, S. C. (2005). Triacylglycerol profile by HPLC/ELSD as a discriminant parameter of varietal olive oils from Portugal. *Ital. J. Food Sci.*, *17*, 447.
- S. C. Huang, C. F. (2008). Determination of chlorophylls and their derivatives in *Gynostemma pentaphyllum* Makino by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *48*, 105.
- S. C. Moldoveanu, Y. C. (2011). Dual analysis of triglycerides from certain common lipids and

- seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, *59*, 2137.
- S. Cai, L. C. (2007). Liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry analysis of triacylglycerol lipids--effects of mobile phases on sensitivity. *J. Chromatogr. A*, *1173*, 88.
- S. Chatterjee, S. S. (2010). Comprehensive metabolic fingerprinting of *Withania somnifera* leaf and root extracts. *Phytochem.*, *71*, 1085.
- S. Forcisi, F. M.-K. (2013). Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A*, *1292*, 51.
- S. Hörtensteiner. (1999). Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cell. Mol. Life Sci.*, *56*, 330.
- S. J. Sheen, D. L. (1978). Gas-liquid chromatographic quantification of solanesol in chlorophyll mutants of tobacco. *J. Agric. Food Chem.*, *1*, 259.
- S. L. Abidi. (2001). Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J. Chromatogr. A*, *935*, 173.
- S. L. Abidi. (2004). Capillary electrochromatography of sterols and related steryl esters derived from vegetable oils. *J. Chromatogr. A*, *1059*, 199.
- S. P. Tucker, J. R. (2005). Identification of oxidation products of solanesol produced during air sampling for tobacco smoke by electrospray mass spectrometry and HPLC. *Analyst*, *130*, 1414.
- S. S. Cunha, J. O. (2006). Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, *1128*, 220.
- S. Yang, M. S. (2010). Streamlined pentafluorophenylpropyl column liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry and global (¹³C)-labeled internal standards improve performance for quantitative metabolomics in bacteria. *J. Chromatogr. A*, *1217*, 7401.
- T. Bamba, J. W. (2012). Metabolic profiling of lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, *1250*, 212.
- T. Matsuzaki, A. K. (1981). Changes in Fatty Acids and Glycerolipids of Tobacco Leaves during Air-curing. *Agric. Biol. Chem.*, *45*, 2317.
- Tswett, M. S. (1905). On a new category of adsorption phenomena and on its application to

- biochemical analysis. *Trudy Varshavskogo Obshchestva Estestvoispytatelei Otdelenie*, 14(6), 20.
- U. Vrhovsek, D. M. (2012). A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 8831.
- V. M. Kapoulas, N. K. (1986). Detection of olive oil adulteration with linoleic acid-rich oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 366, 311.
- W. J. Chaberlain, R. F. (1990). Determination of solanesol in tobacco by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 513, 55.
- W. Kamm, F. D. (2001). Analysis of steryl esters in cocoa butter by on-line liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 918, 341.
- W. Liu, B. D. (2007). Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography-flame ionization detection. *J. Chromatogr. A*, 1163, 304.
- W. Lu, B. D. (2008). Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J. Chromatogr. B*, 871, 236.
- W. M. Manning, H. H. (1943). Chlorophyll d, a green pigment of red algae. *J. Biol. Chem.*, 151, 1.
- W. W. Christie. (1987). In *High Performance Liquid Chromatography and Lipids* (p. 188). New York: Pergamon Press.
- Y. Suzuki, Y. S. (2003). Identification of chlorophylls and carotenoids in major teas by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5307.
- Y. Zhao, C. Z. (2013). Investigation of the relationship between the metabolic profile of tobacco leaves in different planting regions and climate factors using a pseudotargeted method based on gas chromatography/mass spectrometry. *J. Proteome. Res.*, 12, 5072.
- Y. Zhao, Q. D. (2007). Separation of solanesol in tobacco leaves extract by slow rotary counter-current chromatography using a novel non-aqueous two-phase solvent system. *J. Chromatogr. A*, 1151, 193.
- Y. Zhao, Q. D. (2007). Separation of solanesol in tobacco leaves extract by slow rotary counter-current chromatography using a novel non-aqueous two-phase solvent system. *J. Chromatogr. A*, 1151, 193.

(1998). 自然科学. 著: 新村出 (編), 広辞苑 (第 5 版, ページ: 1174). 岩波書店.

(1998). 分析. 著: 新井出 (編), 広辞苑 (第 5 版, ページ: 2385). 岩波書店.

Table 10-1 本論文で使用した葉たばこ一覧

表中の“種”は Species、“品種”は Cultivar を表す。品種の命名は慣用的でもあり、日本語表記では乾燥（キュアリング）方法と品種が必ずしも一致はしない。例えば、黄色種（バルク乾燥葉）:Flue cured Virginia (FCV), バーレー種（明色気干葉）:Burley (BLY), オリエン特種（明色日干葉）:Oriental (ORI), 在来種（暗色気干葉）:Dark air-cured (DAC), 在来種（暗色日干葉）:Sun air-cured(SAC)、その他（暗色火干葉）:Dark fire-cured (DFC)となり、日本語表記の品種では同じ在来種でも、英語表記では異なる品種となるため注意が必要である。産地記載の国名3文字表記は ISO 表示に準拠した。Leaf Position は葉たばこの部位を意味しており、Lは葉たばこにおける上側の葉、Cは下側の葉を指す。Stem は葉たばこの中骨部を指しており、茎(Stalk)ではない。なお Leaf は L と C が混合して収穫された葉たばこである。

番号	種	品種	乾燥方法	産地	地域	年産	着位
251	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2004	L
252	tabacum	黄色種	バルク乾燥	USA		2005	L
253	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2006	L
254	tabacum	黄色種	バルク乾燥	MWI	アフリカ	2006	L
255	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2005	L
271	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2004	L
272	tabacum	バーレー種	明色気干	USA		2005	L
273	tabacum	バーレー種	明色気干	JPN		2005	L
291	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN		2008	Stem
292	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN		2008	Stem
301	tabacum	オリエン特種	明色日干	GRC		2005	Leaf
302	tabacum	オリエン特種	明色日干	GRC		2005	Leaf
303	tabacum	オリエン特種	明色日干	TUR		2005	Leaf
304	tabacum	オリエン特種	明色日干	TUR		2005	Leaf
305	tabacum	オリエン特種	明色日干	CHN		2005	Leaf
311	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2008	L
314	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2008	C
315	tabacum	黄色種	バルク乾燥	TZA	アフリカ	2007	C
316	tabacum	在来種暗色火干葉	暗色火干	TZA		2007	L
317	tabacum	在来種暗色気干葉	暗色気干	PHL		2006	Leaf
331	tabacum	オリエン特種	明色日干	GRC		2005	Leaf
332	tabacum	オリエン特種	明色日干	GRC		2007	Leaf
333	tabacum	オリエン特種	明色日干	TUR		2008	Leaf
334	tabacum	オリエン特種	明色日干	GRC		2008	Leaf
335	tabacum	オリエン特種	明色日干	TUR		2007	Leaf
336	tabacum	オリエン特種	明色日干	MKD		2008	Leaf
337	tabacum	オリエン特種	明色日干	BGR		2008	Leaf
338	tabacum	オリエン特種	明色日干	MKD		2008	Leaf
341	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2009	L
342	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2009	L
343	tabacum	バーレー種	明色気干	USA		2010	L

番号	種	品種	乾燥方法	産地	地域	年産	着位
344	tabacum	バーレー種	明色気干	USA		2010	C
345	tabacum	バーレー種	明色気干	MWI		2009	L
346	tabacum	バーレー種	明色気干	ITA		2008	L
347	tabacum	バーレー種	明色気干	JPN		2009	L
348	tabacum	バーレー種	明色気干	JPN		2009	C
S51	tabacum	在来種暗色気干葉	暗色気干	PHL		2005	Leaf
S52	tabacum	在来種暗色気干葉	暗色気干	PHL		2005	Leaf
S53	tabacum	在来種暗色気干葉	暗色気干	PHL		2005	Leaf
S54	tabacum	在来種暗色気干葉	暗色気干	BRA		2005	Leaf
S55	rustica		暗色日干	IND		2006	Leaf
S56	tabacum	在来種暗色日干葉	暗色日干	IND		2004	Leaf
S57	rustica		暗色日干	IND		2006	Leaf
S58	tabacum	在来種暗色日干葉	暗色日干	IND		2006	Leaf
S61	tabacum	中骨	バルク乾燥	BRA		2005	Stem
S62	tabacum	中骨	暗色気干	PHL		2005	Stem
N16	tabacum	黄色種	バルク乾燥	IND	南アジア	2012	L
N17	tabacum	黄色種	バルク乾燥	IND	南アジア	2012	L
N18	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ESP		2012	C
N19	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ESP		2012	C
N20	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ESP		2012	L
N21	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ESP		2012	L
N22	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	C
N23	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	L
N24	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	L
N25	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	C
N26	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	C
N27	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	C
N28	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	C
N29	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	L
N30	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	L
N31	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	L
N32	tabacum	黄色種	バルク乾燥	CHN	アジア	2012	L
N33	tabacum	バーレー種	明色気干	USA		2012	C
N34	tabacum	バーレー種	明色気干	USA		2012	L
N35	tabacum	黄色種	バルク乾燥	THA	南アジア	2012	L
N36	tabacum	黄色種	バルク乾燥	THA	南アジア	2012	C
N37	tabacum	黄色種	バルク乾燥	THA	南アジア	2012	C
N38	tabacum	黄色種	バルク乾燥	THA	南アジア	2012	C
N39	tabacum	黄色種	バルク乾燥	THA	南アジア	2012	L
N40	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ZWE	アフリカ	2012	L
N41	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ZWE	アフリカ	2012	L
N42	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ZWE	アフリカ	2012	C

番号	種	品種	乾燥方法	産地	地域	年産	着位
N43	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ZWE	アフリカ	2012	C
N44	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ZWE	アフリカ	2012	C
N45	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ZWE	アフリカ	2012	L
N46	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ZWE	アフリカ	2012	L
N47	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ZWE	アフリカ	2012	L
N48	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ARG	南米	2012	L
N49	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	L
N50	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ARG	南米	2012	L
N51	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	L
N52	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ARG	南米	2012	L
N53	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	L
N54	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	L
N55	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	L
N56	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	L
N57	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ARG	南米	2012	C
N58	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	C
N59	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	C
N60	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	C
N61	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	L
N62	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	C
N63	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	L
N64	tabacum	バーレー種	明色気干	PHL		2012	L
N65	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2012	L
N66	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2012	L
N67	tabacum	バーレー種	明色気干	MWI		2012	L
N68	tabacum	バーレー種	明色気干	ZWE		2012	L
N69	tabacum	バーレー種	明色気干	PHL		2012	L
N70	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2012	C
N71	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2012	C
N72	tabacum	バーレー種	明色気干	MWI		2012	C
N73	tabacum	バーレー種	明色気干	ZWE		2012	C
N74	tabacum	バーレー種	明色気干	PHL		2012	C
N75	tabacum	バーレー種	明色気干	BRA		2012	L
N76	tabacum	バーレー種	明色気干	PHL		2012	C
N77	tabacum	バーレー種	明色気干	ITA		2012	L
N78	tabacum	バーレー種	明色気干	SRB		2012	C
N79	tabacum	バーレー種	明色気干	SRB		2012	L
N80	tabacum	バーレー種	明色気干	ITA		2012	C
N81	tabacum	バーレー種	明色気干	PHL		2012	L
N82	tabacum	バーレー種	明色気干	SRB		2012	C
N83	tabacum	バーレー種	明色気干	SRB		2012	L
N84	tabacum	バーレー種	明色気干	IND		2012	C

番号	種	品種	乾燥方法	産地	地域	年産	着位
N85	tabacum	バーレー種	明色気干	THA		2012	L
N86	tabacum	バーレー種	明色気干	IND		2012	L
N87	tabacum	バーレー種	明色気干	THA		2012	C
N88	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N89	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N90	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N91	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N92	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N93	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N94	tabacum	オリエント種	明色日干	GRC		2012	Leaf
N95	tabacum	オリエント種	明色日干	GRC		2012	Leaf
N96	tabacum	オリエント種	明色日干	GRC		2012	Leaf
N97	tabacum	オリエント種	明色日干	MKD		2012	Leaf
N98	tabacum	オリエント種	明色日干	GRC		2012	Leaf
N99	tabacum	オリエント種	明色日干	LBN		2012	Leaf
N100	tabacum	オリエント種	明色日干	THA		2012	Leaf
N101	tabacum	オリエント種	明色日干	CHN		2012	Leaf
N102	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N103	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N104	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N105	tabacum	オリエント種	明色日干	MKD		2012	Leaf
N106	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	L
N107	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	L
N108	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	C
N109	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	C
N110	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	L
N111	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	C
N112	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	C
N113	tabacum	黄色種	バルク乾燥	JPN	アジア	2012	L
N114	tabacum	オリエント種	明色日干	CHN		2012	Leaf
N115	tabacum	バーレー種	明色気干	IND		2012	C
N116	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N117	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N118	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N119	tabacum	オリエント種	明色日干	TUR		2012	Leaf
N120	tabacum	黄色種	バルク乾燥	IND	南アジア	2012	Leaf
N121	tabacum	黄色種	バルク乾燥	IND	南アジア	2012	Leaf
N122	tabacum	黄色種	バルク乾燥	PHL	南アジア	2012	Leaf
N123	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ARG	南米	2012	C
N124	tabacum	黄色種	バルク乾燥	ARG	南米	2012	L
N125	tabacum	黄色種	バルク乾燥	BRA	南米	2012	C