

熱分解GCxGC-TOFMSによる食品のノンターゲット分析

LECOジャパン合同会社 質量分析営業部

キーワード: GCxGC、TOF、飛行時間型、食品、質量分析、統計解析、多変量解析

はじめに

近年、食品偽装や産地偽装など食品に関する問題が発生しており、食品の安全性への関心が非常に高まっております。

コーヒー豆では、原産地の明記が行われていますが、産地を判断する手法は特に無く、明記されている産地の真偽も定かではありません。これを受けて、産地特定方法として含まれている無機成分に着目した手法が報告されています。今回は、熱分解法と高速でフルスキャンが可能なGCxGC-TOFMS（飛行時間型質量分析装置）を用いた産地特定方法を検討しました。高分子分析で使用される熱分解法と、多数ピークを十分に分離・検出が可能な二次元GCxGC-TOFMSであるPegasus4D®を用いたノンターゲット分析により、複雑な前処理をせずとも、産地特定など商品開発へ活かせる手法が可能になります。

LECOのPegasus4D GCxGC-TOFMSは、最大で500スペクトル/秒と最高レベルのデータ取込速度、TSD (True Signal Deconvolution)というLECO独自のピーク分離アルゴリズムを有する特徴から、複雑なサンプル分析を行うための最高峰の装置と位置付けられています。

本アプリケーションノートではコーヒー豆5種(ストレート豆:標準試料3種、ブレンド豆:未知試料2種)を熱分解GCxGC-TOFMS測定分析結果を通じて、食品分析の産地特定のワークフローをご紹介します。

ノンターゲット分析のワークフロー

サンプルを網羅的なピーク検出を行い、各ピークリストを統合、有意差の指標となるFisher Ratio値(F.R.値)を用いて化合物精査を行いました。精査した化合物を使用して、多変量解析によりサンプル間の関係性を評価しています。

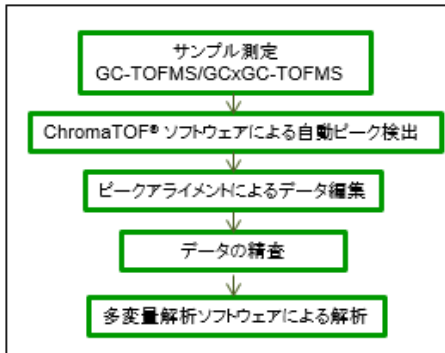


図1 分析ワークフロー

網羅的サンプル検出

Pegasus4Dは、二次元クロマトグラフであり一次元クロマトグラフでは重なってしまうピークの分離が可能です。加えて、独自のモジュレーション機能によりピークを約10倍シャープにできるため小さなピークも漏らすことなく検出が可能です。

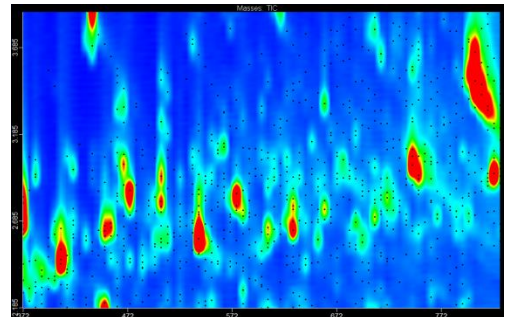


図2 二次元クロマトグラフによるピーク検出

Fisher Ratioについて

サンプル検出された面積値を使用し、分母にクラス内分散(再現性情報)を入れ、分子にクラス間分散(有意差情報)を入れて計算をします。(図3参照)そのため、小さいピーク間の情報も十分に拾う事ができ、微小差異解析でも十分に効果を発揮する指標です。

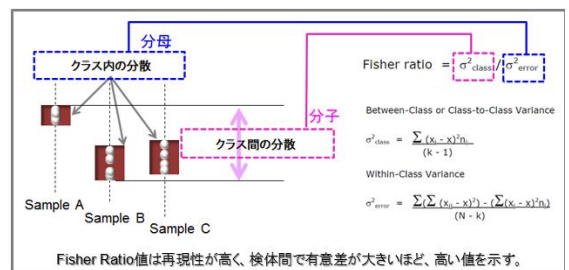


図3 Fisher Ratio



サンプル

サンプルは、ストレート豆3種(アフリカ産、東南アジア産、南アメリカ産)をスタンダードとし、未知品としてブレンド豆2種(ブレンド1:東南アジア、南アメリカ。ブレンド2:アフリカ、南アメリカ)を使用しました。コーヒー豆は、コーヒーミルで中挽きにし、ブレンド豆が均一になるように約0.5 mgを使用しました。産地情報を以下図4に示します。

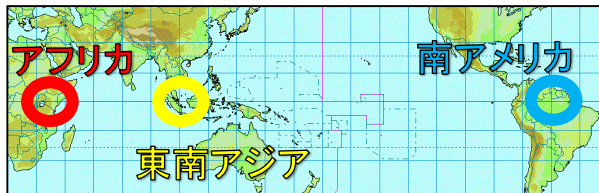


図4 コーヒー豆の産地情報

分析条件

本分析では、試料の導入に瞬間熱分解法を用い、試料を直接導入しました。瞬間熱分解の条件は、600°C 0.2 minで行いました。

一次カラムとして無極性の沸点分離を有するポリジメチルシロキサン固定相の金属キャピラリーカラムUltra Arroy-1を、二次カラムには中極性の極性分離を有するRtx-50カラムを用いて二次元分離を行いました。モジュレーションにより得られるピーク幅が0.1秒ときわめてシャープな形状のため、毎秒200スペクトルでデータ取得し、1ピークあたり20データポイントを確保しました。スペクトルの取得レンジは、m/z:45-600 uで行いました。

表1 分析条件

GCxGC-TOFMS conditions for the sample analysis	
Detector	LECO Pegasus 4D
Acquisition Rate	200 spectra/s
Acquisition Delay	0 minutes
Stored Mass Range	45 to 600 u
Transfer Line Temp.	250°C
Source Temperature	250°C
Column 1	Ultra Alloy-1, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm
Column 2	Rtx-50, 1.4 m x 0.18 mm I.D., 0.20 µm
Column 1 Oven	40°C(2min) → 10°C/min → 280°C(4min)
Column 2 Oven	50°C(2min) → 10°C/min → 290°C(4min)
Modulation Period	6 s
Modulator offset	15°C from second oven temperature
Inlet	split 1/20
Injection	pylolyzer: pyrolysis temperature 550°C
Carrier Gas	He, 1.0 ml/min (constant flow)

分析結果

今回の分析で、各サンプルに約2000のピークが検出されました。クロマトグラム上では、極性が低い脂肪酸類が2次側1.0秒付近に検出され、ヘテロ化合物類が1次側300~1000秒間で2次側1.0から3.0秒にかけて検出されました。

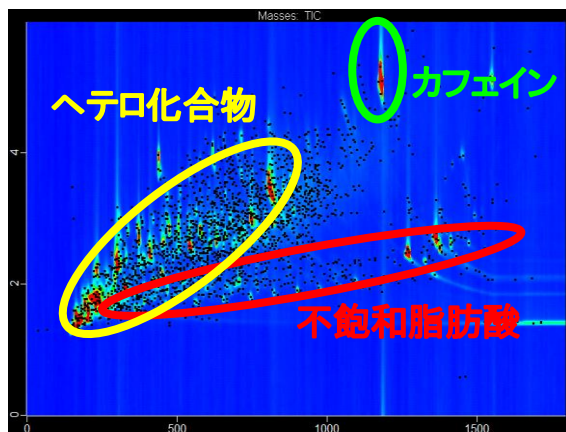
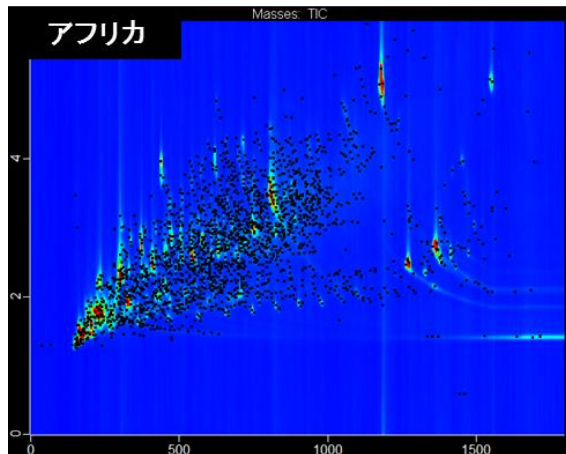


図5 上:アフリカ産の2次元クロマトグラム
下:クロマトグラフ上検出化合物分類

解析結果

F.R.値10以上の179化合物を使用し多変量解析を行いました。F.R.値の計算は、ストレート豆のみを使用して計算を行いました。

多変量解析では、クラスター解析と主成分分析の2種類を使用しました。クラスター解析は、各化合物の存在比を計算し、その存在比の類似性が高いものをクラスターとして繋いでいく解析方法です。主成分分析は、サンプルが多変数(各化合物が変数となります)を持つ場合に説明変数を新たにとることで解釈をしやすくする手法で、サンプル情報がプロットされるスコアプロットとプロットされたサンプルへの変数の影響をプロットしたローディングプロットで主に構成されます。

F.R.値上位化合物でストレート豆に特徴的な化合物を各20ピークをクロマトグラム上にプロットすると特徴が見いだせます。(図6)アフリカに関しては、全体的に広く存在していますが、2次側中位に出ているので極性を持った化合物に特徴があります。東南アジアは、1次側500から1000秒で2次側が1.5秒以上と比較的高い沸点を持つヘテロ化合物に特徴的なものが多く存在しています。南アメリカでは、1次側700秒以内の低沸点側の脂肪酸やヘテロ化合物類に特徴的なものが多く存在しています。

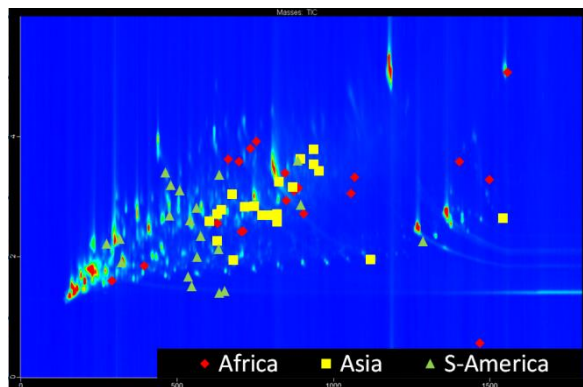


図6 有意差化合物の存在位置

クラスター解析の結果(図7)では、青-灰-赤の色でサンプルの存在量を示してあるヒートマップから、各サンプルの特徴化合物が抽出できます。また、ヒートマップの類似性から各サンプルの相関としてクラスターが作成されており、繋ぐ距離で相関を見ることが出来ます。ブレンド1はアジアと最も距離が近いのでアジアを含んでいるものと解釈ができ、同様にブレンド2は、アフリカを含んでいるものと解釈できます。

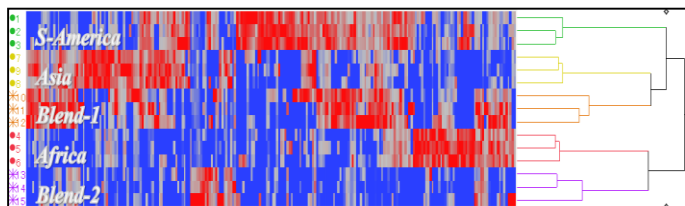


図7 クラスター解析結果

主成分分析の結果(図8)では、今回の産地情報解釈を行うのに適した主成分1と2で解釈を行いました。今回は、ストレート豆が最も分散する軸を選択しています。スコアプロットでは、主成分1を南アメリカが負にあり、その他が正にあることから南アメリカとその他を分ける指標として使用でき、主成分2はアフリカが負でその他が正にあることから、アフリカとその他を分ける指標として使用ができます。ブレンド豆1は、主成分1では南アメリカとその他の中間に位置しており、また主成分2では南アメリカとアジアと同じ値の位置に存在していることから、東南アジアと南アメリカの混合品であると言えます。ブレンド2は、主成分1では南アメリカに近い位置にあり、主成分2ではアフリカに近い位置に存在していることから、アフリカと南アメリカのブレンドと言えます。クラスター解析の結果と相違ない結果です。

実際のサンプルの配合は、ブレンド品1が東南アジアと南アメリカ、ブレンド品2がアジアと南アメリカです。今回の分析および解析で、一致する結果が得られました。

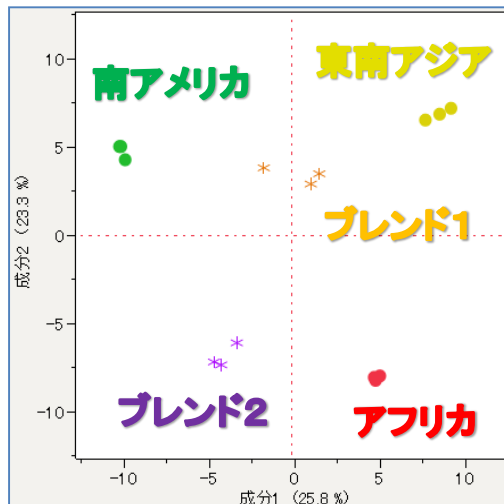


図8 主成分分析結果

まとめ

熱分解GC×GC-TOFMSIによる微小差異解析のワークフローは、高分子材料のみならず食品でも応用が可能であることが分かりました。

統計解析を使用した本手法の結果では、今回のような産地情報を組み合わせただけでなく、官能試験や鮮度情報といった他の情報と合わせることでより多くの可能性がある事が示唆されます。

お問い合わせ

LECOジャパン合同会社 質量分析営業部
東京都港区芝2-13-4 住友不動産芝ビル4号館
電話: 03-6891-5800 FAX: 03-6891-5801