SPME-GCxGC-TOFMSによる保存食品の香気成分分析

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、質量分析、食品、香気成分、統計解析、多変量解析

はじめに

食品中の香り成分は、多くの成分から構成されており、“美味しさ”を構成する大きな要素の一つとして非常に重要です。そのため、複雑な香りの特徴の探索及び成分の組成を把握する技術の開発は、重要な研究のテーマと考えられています。

今回使用した、チョコレートの香りは、多くの成分から構成されています。保存環境により香り成分が変化する事が知られているが、成分変化の詳細は解明されていません。

ここでは、この香り成分の変化に着目し、気体成分を濃縮できるSPMEと高速でマススペクトル取得が可能なGCxGC-TOFMS（飛行時間型質量分析装置)を用いて、保存環境による香気成分の変化をかいせきする手法を検討しました。多数の成分をトラップできるSPME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の組み合わせは、今回のアプローチに適した手法であると考えられます。

本アプリケーションノートではチョコレートを5種類の保存条件で保存したもの及び未保存品をSPME-GCxGC-TOFMS測定分析結果を通じて、食品分析の差異解析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。

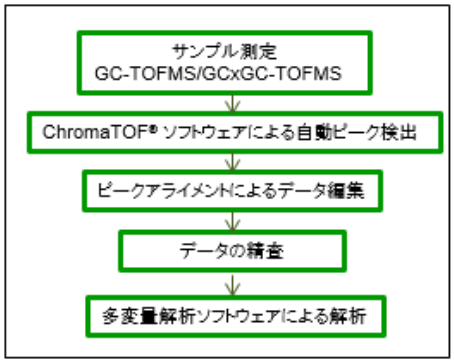

図1 分析ワークフロー

網羅的サンプル検出

Pegasus4Dは、二次元ガスクロマトグラフを備えており、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微小なピークも漏らすことなく検出が可能です。

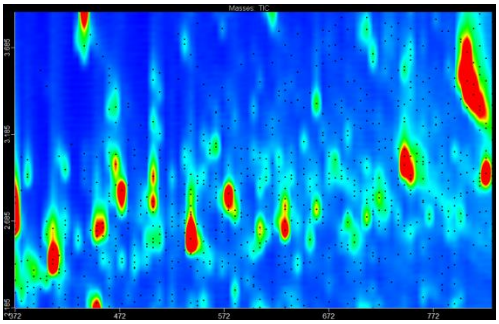

図2 二次元クロマトグラフによるピーク検出

Fisher Ratioについて

サンプル検出されたピーク面積値を使用し、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、小さいピーク間の変化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。

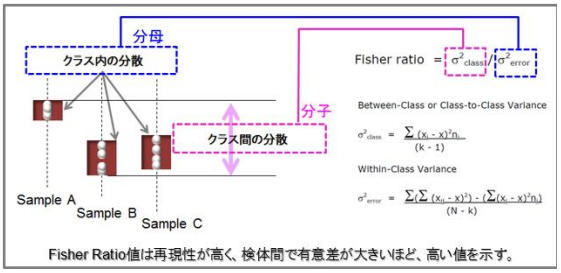

図3 Fisher Ratio

Delivering The Right Results

サンプル

サンプルは、市販されているチョコレートを5種の保存環境にて4日及び9日保存し用いました。保存は、チョコレートを細かく砕き、密閉容器に入れて行いました。

保存環境は、冷凍(-18℃)、冷蔵(4℃)、常温(18℃)、常温乾燥(18℃、湿度10%程度)、高温(30℃)です。

各保存サンプル
約1 gを秤量

SPMEで吸着、濃縮
約40℃、30 min

GCxGC-TOFMSで分析

分析条件

本分析では、保存したサンプルをヘッドスペース用ガラスバイアルに量り取り、恒温槽であたため、揮発成分をSPMEを用いて吸着しました。

一次カラムとして高極性の極性分離を有するエチレングリコール固定相のInertCap Pure-WAX(GLサイエンス社製)を、二次カラムには微極性の沸点分離を有するRtx-5カラム(Restek社製)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* 30-550 で行いました。

表1 分析条件

Injector
CTC Combi Pal
SPME, 50/30 µm, DVB/CAR/PDMS, 2 cm

GCxGC
Agilent technology, 7890A equipped with a LECO Thermal Modulator and Second Oven
Injector: Splitless, 230℃
Primary Column: Pure-WAX, 60 m x 0.25mm x 0.25 µm (GL Science)
Secondary Column: Rtx-5, 1.5 m x 0.18 mm x 0.18 µm (Restek)
Carrier Gas: He, 1.3 mL, Constant Flow
Primary Oven: 50℃ 5 min, 5℃/min to 230℃, hold 20 min
Secondary Oven: 60℃ 5 min, 5℃/min to 240℃, hold 20 min
Modulater Thermal Offset: 25℃ (above primary oven)
Modulation Time: 6 sec (Hot: 1 sec, Cold: 2 sec)
Transfar Line Temp: 240℃

TOFMS
LECO Pegasus 4D GCxGC-TOFMS
Souece Temp: 230℃
Stored Mass Range: 30 to 550 u
Acquisition Rate: 200 spectra/sec

分析結果

今回の分析で、各サンプルに2000を超えるピークが検出されました。オーブン温度として、200℃程度までに多くの成分が検出され、2次元分離により微小ピークの検出もできました。

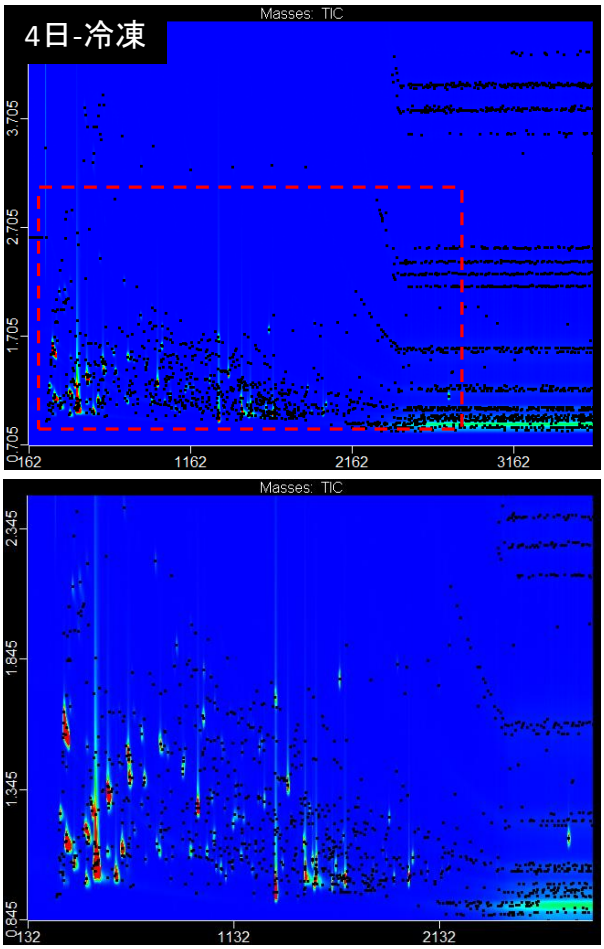

図5 上:4日冷凍保存の2次元クロマトグラム
下:主ピーク検出位置拡大クロマトグラム

解析結果

F.R.値10以上の538化合物を使用し多変量解析を行いました。

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、各化合物を変数とし、その存在比の類似性が高いものをクラスターとして繋ぐ解析方法です。主成分分析は、多数の次元をもつサンプルを少ない次元で十分に説明できる次元を新たにとり、サンプルの関係性を示しています。

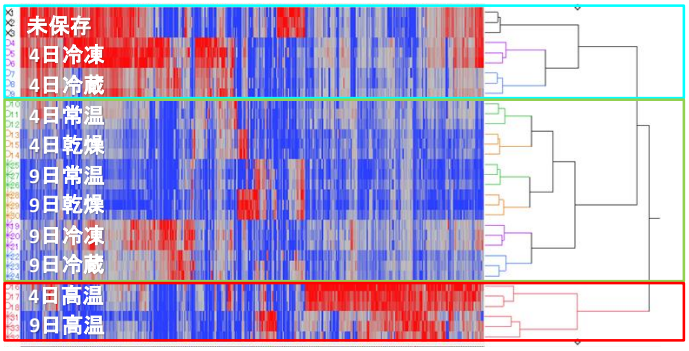

図6　クラスター解析結果

クラスター解析の結果(図6)では、青-灰-赤の色で各変数の存在比(縦方向)を示してあるヒートマップから、各サンプルの類似性及び特徴化合物の抽出ができます。解析結果では、サンプルを保存環境と日数で大きな3つのグループに分類されました。水色の未保存、4日冷凍保存、4日冷蔵保存のグループは、香気成分の減少が少なく、緑色の4，9日常温保存、4，9日乾燥保存、9日冷凍保存、9日冷蔵保存のグループは、香気成分が減少しています。赤色の4，9日高温保存のグループでは、香気成分の減少に加えて、特徴的な成分が検出されています。

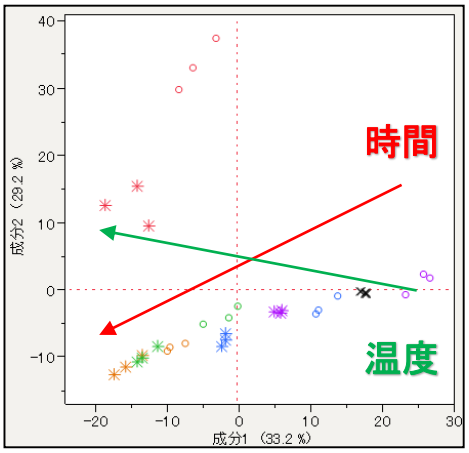

図7　主成分分析結果(全サンプル)

主成分分析の結果(図7)では、全サンプルの関係性を表しています。高温保存したサンプルは、特徴的な化合物が多く存在していることから、その他のサンプルから最も離れた位置で存在しています。高温保存のサンプルも含め、全体の傾向を見てみると、温度と時間の関係が主成分分析に出ています。赤の矢印の方向には、時間(保存日数)により変化をしています。また、緑の矢印の方向には温度の変化をしていることが分かりました。

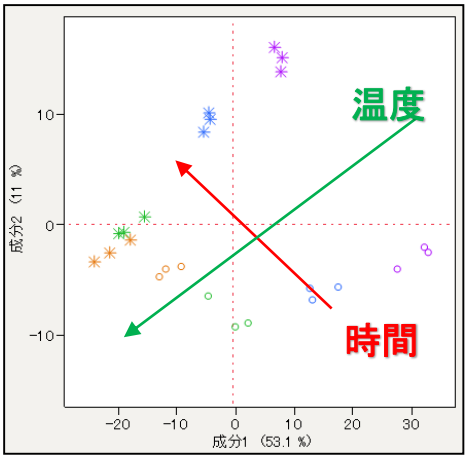

図8　主成分分析結果(高温保存以外)

詳細な解析を行うために、高温保存サンプル及び未保存サンプルを除き解析を行いました。(図8、解析に使用した化合物は、全サンプル時と同じ)

全サンプル使用時と同じで、赤い矢印方向に時間変化を、緑の矢印に温度の変化が表れています。

主成分分析では、サンプルに影響を与えている化合物を抽出をすることができるので、日数により変化する化合物の抽出を行いました。

対象のサンプルは、常温保存と高温保存のサンプルで、未保存サンプルから変化した化合物を抽出しました。

保存日数との相関を取り、保存環境ごとに相関値が高い化合物を取り出し、共通化合物を抽出しました。

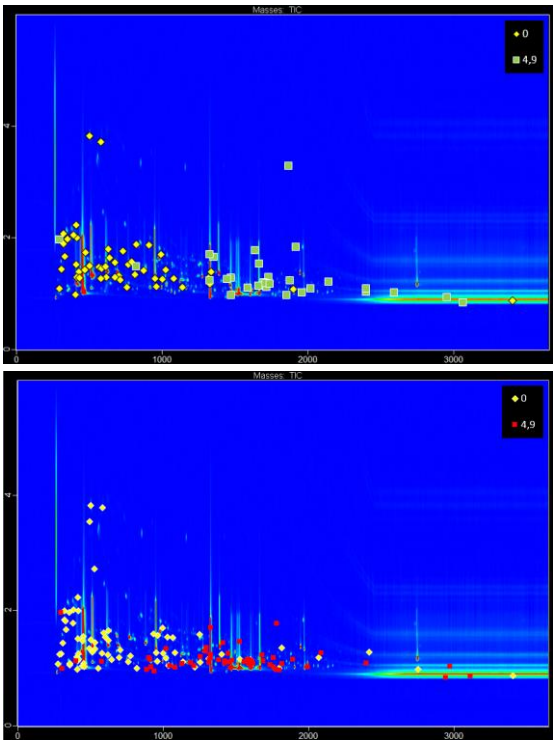

図9 常温特徴化合物抽出（上図）
高温特徴化合物抽出（下図）

各保存状態のサンプルで、日数により多く存在している化合物を抽出し、クロマトグラム上にプロットしています。（図9） 未保存品（黄色マーカー）は、早い時間帯に検出される化合物が多く、時間経過（4日、9日保存）とともに遅い時間に検出される化合物が多いです。これは、保存方法によらず共通の傾向として出ています。

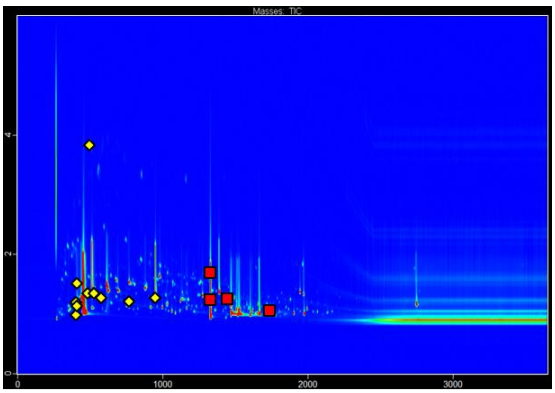

図10 共通変化化合物

表2 時間経過により変化する化合物一覧

特徴化合物
時間経過により減少した化合物

1st	2nd	化合物	香り
408	1.20	Acetic acid, ethyl ester (CAS)	フルーティ
410	1.00	1-Propanol, 2-amino-, (,+-,)- (CAS)	皮のにおい
414	1.15	Acetic acid ethenyl ester (CAS)	フルーティ
414	1.53	Ethane, 1,1-diethoxy- (CAS)	ジャスミン臭
492	1.36	PROPANOIC ACID, ETHYL ESTER	果実臭
504	3.83	Heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl- (CAS)	油由来
532	1.35	Butanoic acid, methyl ester	フルーティ
582	1.28	2,3-Pentanedione (CAS)	バタースコッティ
777	1.22	2-Pentenal, (E)- (CAS)	果実臭
954	1.28	1-Methoxy-2-propyl ester of acetic acid	バナナ様

時間経過により増加した化合物

1st	2nd	化合物	香り
1332	1.25	1,3-Dioxolane, 2-ethyl-2,4,5-trimethyl-	不明
1332	1.71	Octanoic acid, ethyl ester (CAS)	甘い香り
1452	1.26	Benzoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	植物油
1740	1.07	1H-Pyrrole, 2-ethyl-4-methyl-	薬系

保存状態によらず共通して時間により変化する化合物を抽出すると、計14化合物ありました。（図10及び表2） 内訳としては、減少していく化合物が10化合物で、増加していく化合物が4化合物です。

時間経過とともに、フルーティな香りなどチョコレートの甘い香りのものが多く減少していき、油や薬系とあまりいいとは言い難い香りが増加していくことが分かりました。

まとめ

チョコレートの香気成分分析では、サンプル間の差異解析、統計解析手法と組み合わせた時間経過による変化化合物の抽出まで細かく解析することができました。

網羅的分析と統計解析を使用した本手法は、今回のような保存環境や時間経過と組み合わせたものだけでなく、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、より多くの発見につながる可能性を秘めています。

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