

## 分析装置 : Pegasus® BT 4D

## SPME-GCxGC-TOFMS および ChromaTOF® Tile による

## ペースト製品の統計的差異分析

## アロマキャラクタリゼーションの向上

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

キーワード : ノンターゲット、食品、GCxGC、TOFMS、ペースト、フードミクス、差異分析、Fisher 比

## はじめに

ペーストとその起源は古代にまで遡ります。主な原料はよく知られていますが (一般的にはオリーブオイル、バジル、および松の実)、市販されている膨大な数のペースト製品のレシピはそれぞれ大きく異なっています。ペーストのアロマプロファイルは、消費者の知覚や嗜好に大きな影響を与えます。そのため、「正しい」レシピを定義し、製品の安定性および製品品質を決定するうえで、そのアロマプロファイルの研究は重要な役割を果たします。多様なペーストのレシピを包括的に分析し、その特性を明らかにすることができれば、より最適な製品開発が可能になり、結果としてブランドの知名度や顧客満足度を高めることができます。

GCxGC では、各試料で検出される膨大な成分のピークテーブルを取り扱わなければならない、データの複雑性はあつという間に手に負えない規模になることがあります。データセット間で統計的に有意な差異を見出すには、多くの場合エキスパートレベルでの集中的なデータマイニングが必要となり、時間も奪われることになります。

ChromaTOF Tile は、Synovec 教授のタイルベース Fisher 比アプローチを使用して開発されたデータ処理ソフトウェアで、複数の GCxGC-TOFMS データの比較を迅速かつ容易に行える革新的なアルゴリズムが採用されており、面積計算には整数質量のトレースが使用されます。統計的に有意な差異を簡単に見つけることができ、試料セット間の差異がどこにあるかを確認するためにかける時間を減らすことができます。

ここでは、3 つの異なる生産者から提供された 11 種類のペースト試料からなるデータセットを使用して、簡単で使いやすい差異分析の手法を実証します。試料は SPME-GCxGC-TOFMS を使用して取得しました。

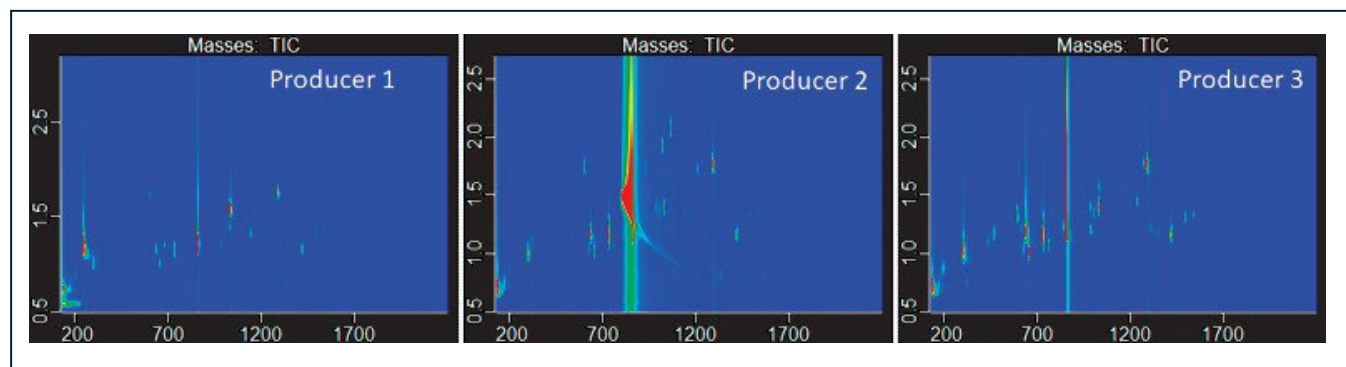


図 1 : 3 つの異なる生産者から提供された 11 種類のペースト試料の代表的な TIC 等高線プロット。

## 実験概要

### 材料

ペーストのアロマプロフィールの統計的較を確実なものにするため、3つの異なる生産者から提供された11種類の市販されているペースト製品をn=3で分析しました。

n-アルカン標準物質 (C7-C30) (Merck #49451-U) を 10 µg/mL に希釈し、リテンションインデックスの計算に必要な分析を行いました。

### 試料抽出および分析条件

セプタムキャップで密閉した 10 mL のバイアルにペースト (1 g ± 0.1 g) を秤量し、HS-SPME 用試料を調製しました。試料をインキュベートし (60°C で 15 分)、その後抽出を行いました (同じ温度で 15 分)。抽出は 1cm の DVB/CAR/PDMS ファイバー (Merck #57329-U) を使用して行い、その後直ちに GC 注入口で脱着し、表 1 に示す条件で分析を行いました。ライブラリ検索結果の精度を向上させるため、アルカン標準試料のデータも取得してリテンションインデックスの計算を行いました。

表 1 : Pegasus® BT 4D GCxGC-TOFMS 分析条件

GC	LECO GCxGC QuadJet™ Thermal Modulator
Injection	2 min fiber desorption with inlet temp. 220°C, split 20:1
Columns	1D: Rxi-5SilMS, 30m x 0.25mm i.d. x 0.25µm coating (Restek) 2D: Rxi-17SilMS, 0.6m x 0.18mm ID x 0.18µm coating (Restek)
Carrier Gas	He @ 1.2ml/min
Oven Program	40°C (2min), ramp 5°C/min to 210°C, 20°C/min to 280°C
Secondary Oven	+ 5°C (relative to the primary oven temperature)
Modulator	+15 °C (relative to the secondary oven temperature)
Modulation Period	2.7 sec
Transfer line	300 °C
MS	LECO Pegasus BT 4D
Ion Source Temperature	250 °C
Mass Range	40-550 m/z
Extraction Frequency	32KHz
Acquisition Rate	200 spectra/s

## 結果および考察

異なる生産者から提供された3つのペースト試料の代表的な GCxGC-TOFMS 等高線プロットを図 1 に示します。このケーススタディの目的は、簡単かつ迅速な差異分析ソフトウェアツールを活用して、3つの生産者から提供された製品間の差異を検出することです。

差異分析における複雑性の度合は、採用する手法によって異なります。ベーシックなものとしては、TIC や選択した質量 (例: テルペノイド *m/z* 93) を使用して等高線プロットを目視で比較することにより差異を確認する方法があります。

より高度なアプローチとしては、統計比較ソフトウェアを活用する方法があります。後者のワークフローを用いれば (完全に自動化されていることが理想的ですが)、膨大な試料にわたって見られる、目視による確認が難しいピーク (ピーク強度の低さ、サンプルの複雑さなどのため)、または同定に時間を要する差異を検出することが可能です。LECO ChromaTOF Tile では、GCxGC プロットをタイル状 (1次元および2次元の保持時間ウィンドウ) にモザイク化することにより、重要なスポットを特定することができます。試料クラスの比較に Fisher 比 (F-ratio) を適用することで、複雑な GCxGC-TOFMS データセットをアルゴリズム的に縮小することにより、クラスを区別する化学成分を見出すことができます。<sup>2</sup>各タイルの面積は、個々の整数質量で計算されます。その積分は Synovec 氏が説明するように統計的に有意な差異を見出すための Fisher 比 (F-ratio) の算出に使用されます。<sup>1,2</sup>

差異分析の結果を表す方法は複数ありますが、最も多く採用されているのは主成分分析 (PCA) プロットです。これにより、類似性に基づいた試料のクラスターリングが可能になります。図 2 に今回のケーススタディで取得した PCA を示します。

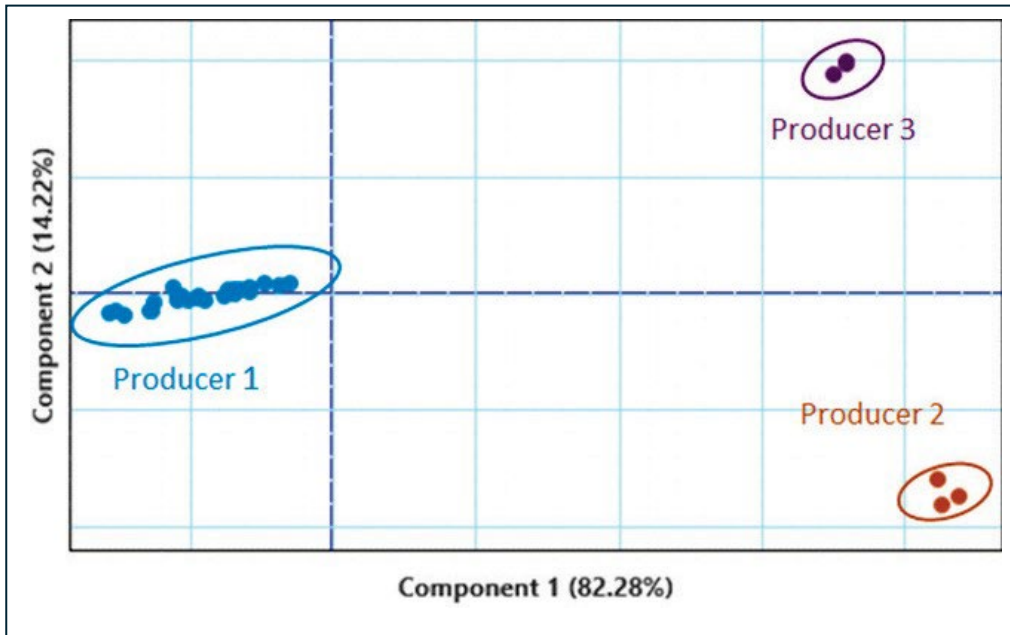


図2：試料クラスをPCAプロットで表したものの。

試料のクラスターリングに各成分が与える影響は、図3に示すとおりローディングプロットによって表されます。ここでは、最も特徴的な成分が強調表示され、同定は、NIST MS ライブラリおよびリテンションインデックスの計算を使用して ChromaTOF Tile 内でバックグラウンド減算されたマススペクトルの比較によって行われます。最も特徴的な成分として、以下の化合物が確認されています。

- (i) 1,2-プロパンジオール。この成分の詳細を 図4 に示しています。この化合物はおもに試料クラス Producer 1 で確認されており、Producer 2 および 3 には存在していませんでした。
- (ii) 図5 では、Producer 3 の試料セットにおける統計的に有意な差異として酪酸が突出していることが示されています。同様に、7-ヒドロキシオクタ-2,4-ジエン酸が Producer 2 の製品でのみ確認されました。(図6) これら2つの成分に加え、その他の短鎖有機酸(カブロン酸およびマロン酸など)もマーカーとして認識されています。
- (iii) エストラゴールは、図7に示すとおり Producer 1 の試料でもっとも多く確認されており、Producer 3 の試料でも若干確認されていますが、Producer 2 の試料ではまったく検出されませんでした。

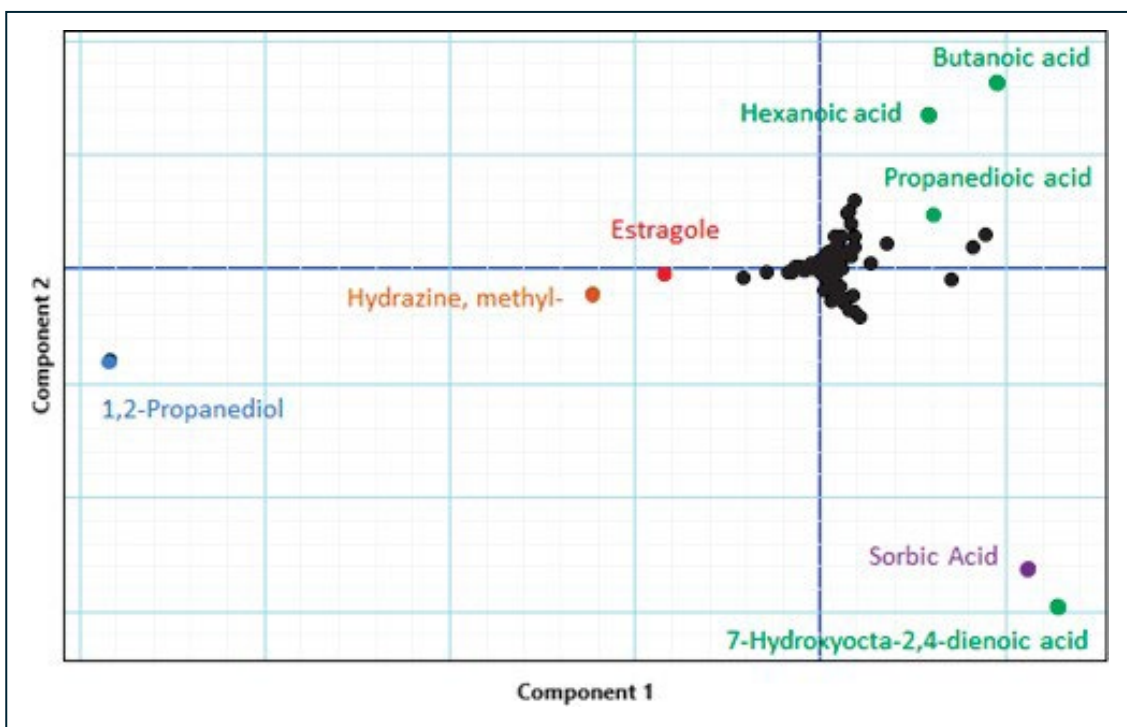


図3：前述のPCAプロットのローディングプロットでは、最も際立った特徴的な成分として、1,2-プロパンジオール、酪酸、7-ヒドロキシオクタ-2,4-ジエン酸、カブロン酸、マロン酸、エストラゴール、メチルヒドラジン、およびソルビン酸が同定されている。

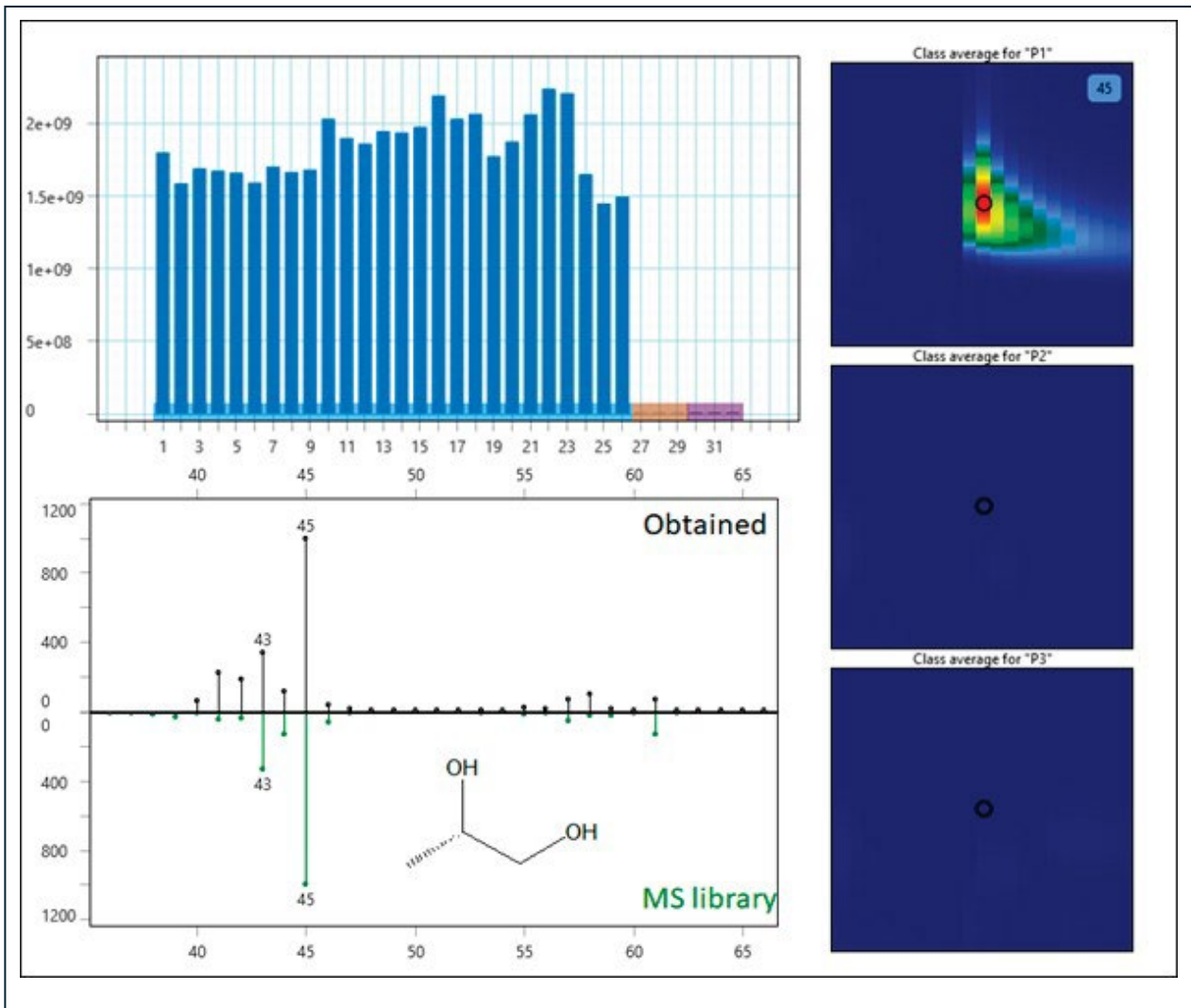


図4：1,2-プロパンジオールの面積値グラフと平均等高線プロットの概要の比較。バックグラウンドを除去したスペクトルのシミュリティスコアは799/1000の高い数値を示している。RI 計算値(732)とNIST ライブラリのRI(732)を比較した。

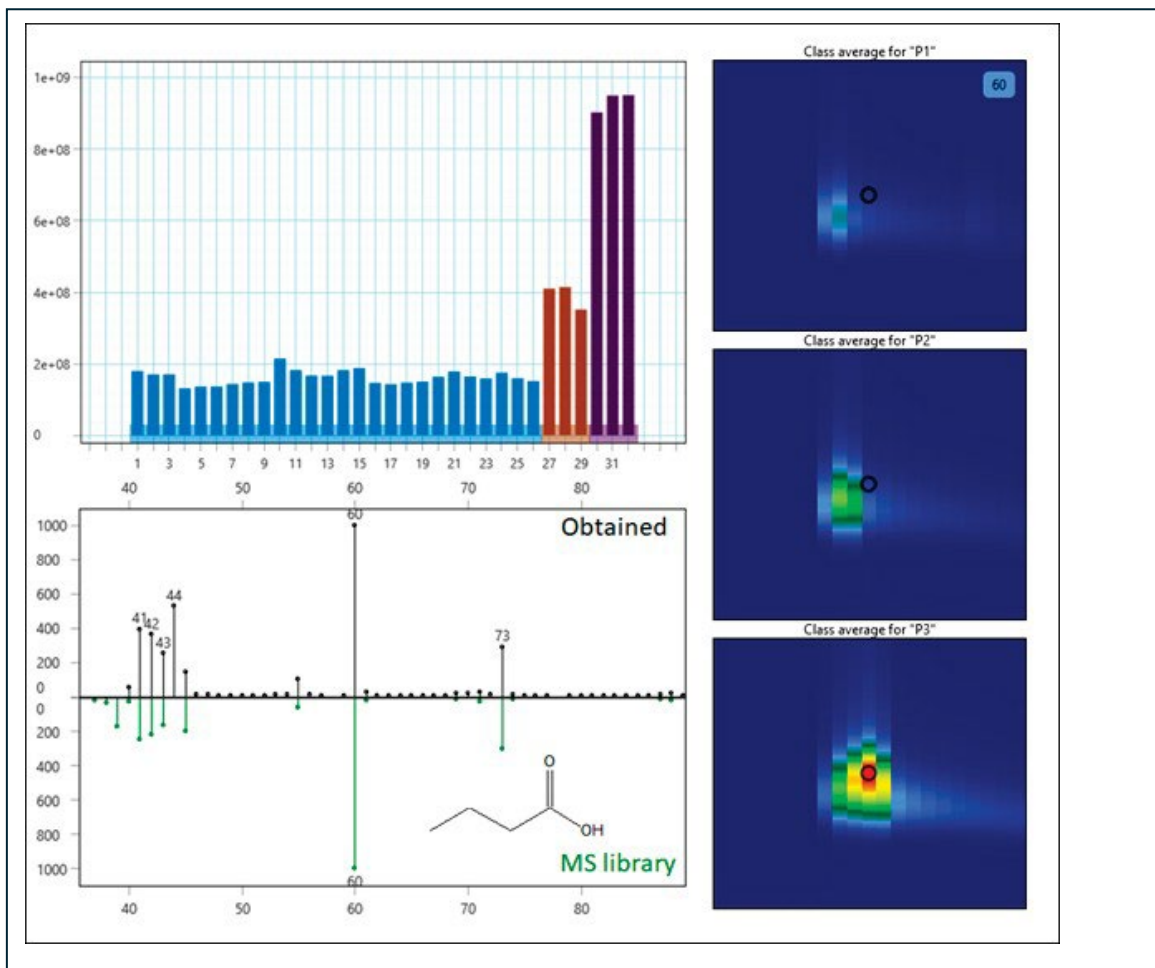


図5：ライブラリ照合で960/1000で酪酸と同定され、RI値は789(NISTでは802)であった成分の詳細。この成分のm/z 60のプロファイルと試料の面積値グラフを比較した。

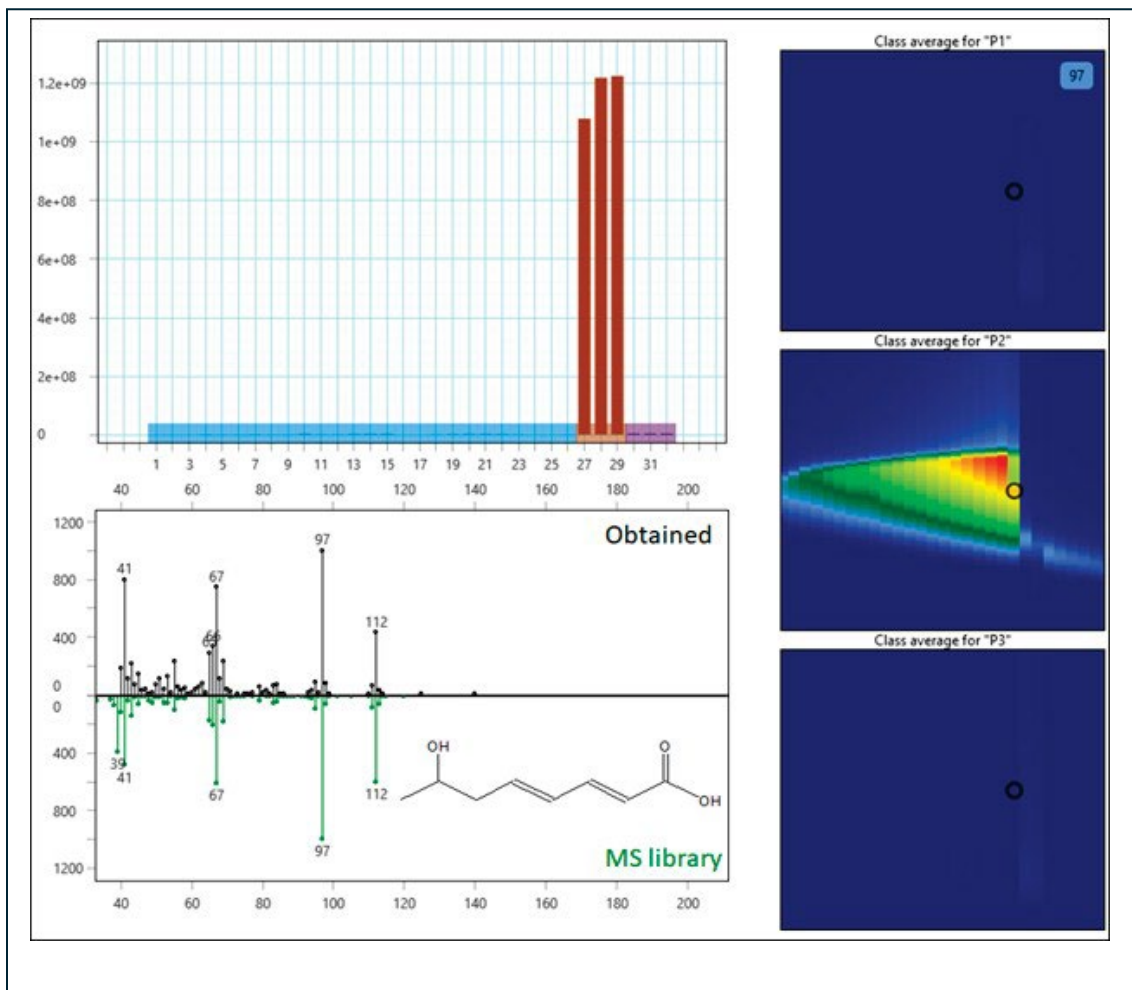


図6：7-ヒドロキシオクタ-2,4-ジエン酸の平均等高線プロット（シミュラリティスコア 854/1000）。棒グラフが示すとおり、この成分は Producer 2 のセットでのみ観察された。

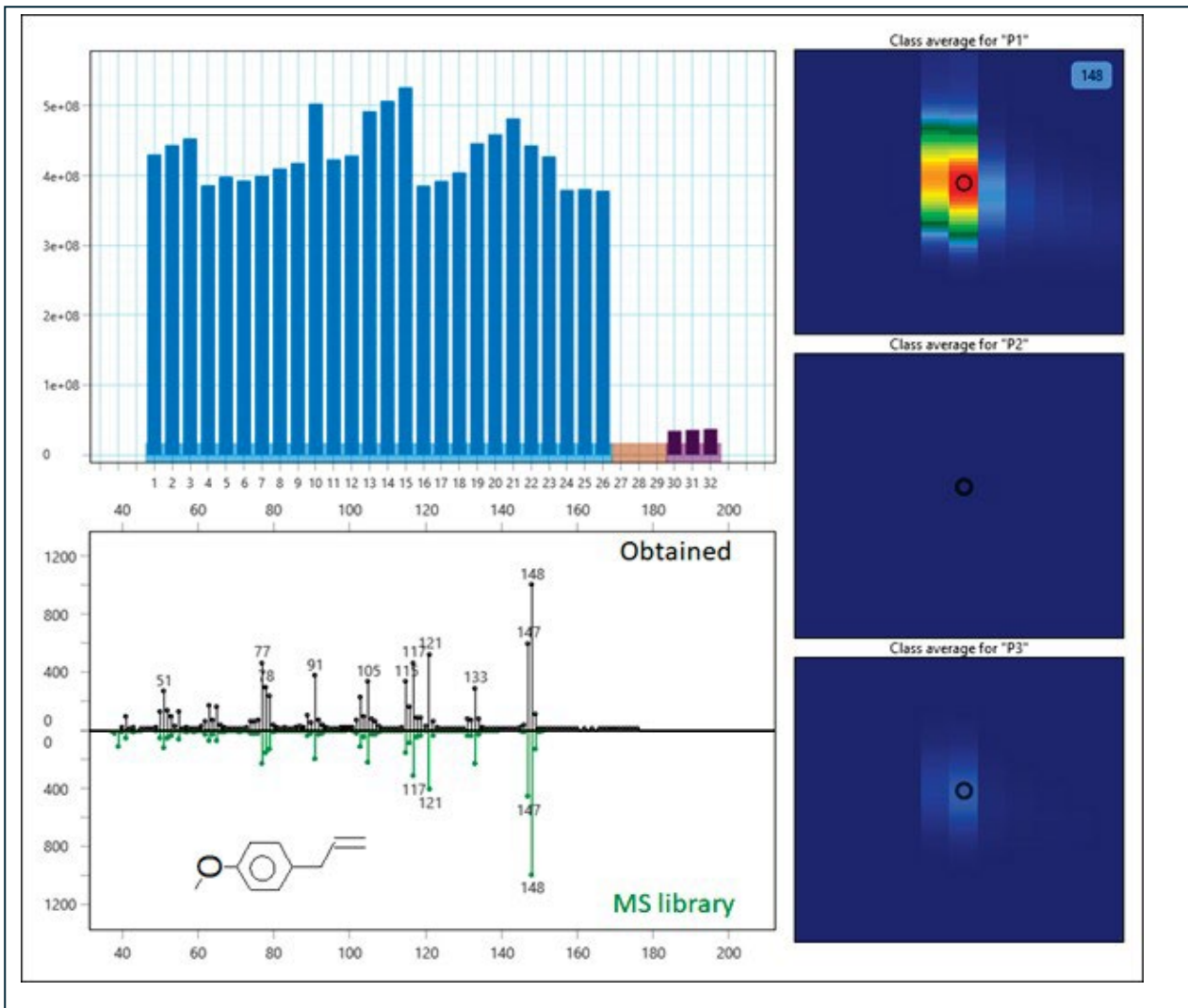


図7：面積値グラフと等高線プロットの比較では、Producer 1 の試料でエストラゴール(シミュラリティスコア 923/1000、実測 RI 値 1199/NIST RI 値1196)が高い強度で確認された。Producer 3 では低いレベルで確認され、Producer 2 ではまったく確認されなかった。

## まとめ

このアプリケーションノートでは、**ChromaTOF Tile** ソフトウェアが複数の試料を対象としたノンターゲット手法において迅速な差異分析を実施できることを示しました。試料のクラスタリングの原因となる統計的に有意な差のある成分を簡単に確認、同定することが可能なため、キーとなる成分の差異を浮き彫りにすることができます。これにより、たとえば官能検査データや消費者試験データと連動した開発プロセスの支援などが可能になります。全体として、この差異分析ツールを使用することで、GCxGC-TOFMSにより取得した複雑な試料セットの豊富な情報、傾向、およびパターンを迅速に活用することが可能になります。これにより、骨の折れるデータマイニングから解放され、有意な結果の研究により多くの時間を費やすことができます。

## 参考文献

<sup>1</sup>L.C. Marney, W.C. Siegler, B. A.Parsons, J. C.Hoggard, B.W. Wright, R.E. Synovec, **Talanta**, 115 (2013) 887-895, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.038>

<sup>2</sup>B. A. Parsons,L.C. Marney, W.C. Siegler, J.C. Hoggard, B.W. Wright, R.E. Synovec, *Anal. Chem* 87 (2015) 3812-3819, DOI: 10.1021/ac504472s

## 執筆者

Sebastiano Panto<sup>\*</sup>, Michele Suman<sup>\*\*</sup>, Tomas Kovalczuk<sup>\*</sup>, Nick Jones<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>LECO European Application & Technology Center, Berlin (Germany)

<sup>\*\*</sup>Advanced Research Laboratory, Barilla G. e R. Fratelli S.p.A., Via Mantova 166-43122 Parma (Italy)

<sup>††</sup>Department for Sustainable Food Process, Catholic University of the Sacred Heart, 29121 Piacenza (Italy)

## 追加参照資料

アプリケーションノート [203-821-641](#) では、包括的な 2 次元 GCxGC-TOFMS の使用に関する評価を行いました。分離、検出、およびそれによるペースト製品中の種の同定作業を大幅な改善、ならびにキャラクター化性能の品質や情報量の大幅な向上が可能であることが示されています。



**LECO Corporation** | 3000 Lakeview Avenue | St. Joseph, MI 49085 | Phone: 800-292-6141 | 269-985-5496

[info@leco.com](mailto:info@leco.com) • [www.leco.com](http://www.leco.com) | ISO-9001:2015 Q-994 | LECO は、LECO 社の登録商標です。

PEGASUS、ChromaTOF は、LECO 社の登録商標です。