

## 分析装置 : Pegasus® BT 4D

### FLUX™ GCxGC-TOFMS によるハチミツの のアロマプロファイルの差異分析

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

キーワード : ハチミツ、アロマプロファイル、試料差異分析、HS-SPME、GCxGC-TOFMS、フローモジュレーション

#### はじめに

アロマプロファイルとは、個々の試料に含まれる揮発性および半揮発性成分から構成されます。食品および飲料の分野では、揮発性および半揮発性成分の多くが全体的な香気やフレーバーに重要な影響を与えるため、アロマプロファイルはとりわけ興味深いものになります。これらの成分をモニタリングすることにより、試料の差異を分析し、追跡し、品質管理に必要な情報を得ることができます。また、製品に対するより優れた知見や理解を広く得ることができます。この研究では、個別の成分の差異を決定することにより、ハチミツの品種を識別し、全体的な香りの特徴の違いを理解することを目的としています。ガスクロマトグラフィー (GC) は、揮発性および半揮発性成分を簡単に分離することができるため、このような種類の化学分析に対して有用なツールとなります。しかしながら、複雑な試料の場合、アロマプロファイルに影響を与える成分が広範囲に及ぶため、GC のみで分離を行うことが難しい場合があります。このような場合に大いに役立つのが、包括的な 2 次元 GC (GCxGC) です。GCxGC では、相補的な固定相を持つ二次カラムを使用します。この二次カラムは、モジュレーターを使用して一次カラムに接続します。モジュレーターは、一次分離の実行中に一次カラムから溶出した成分を分割して二次カラムに順次注入することで、両次元での成分の分離を効率的に行う役割を果たします。多くの場合、1 次元側で共溶出した成分を 2 次元側で分離できるため、クロマトグラフィー分離能が向上します。この研究では、フローベースのモジュレーターを組み込んだ堅牢で使いやすい GCxGC システムに飛行時間型質量分析 (TOFMS) 装置を組み合わせ、ハチミツのアロマプロファイルに使用しました。ハチミツの品種の比較を行い、代表的な成分の差異を示します。そのなかには 1 次元での共溶出により不明瞭な成分もありました。

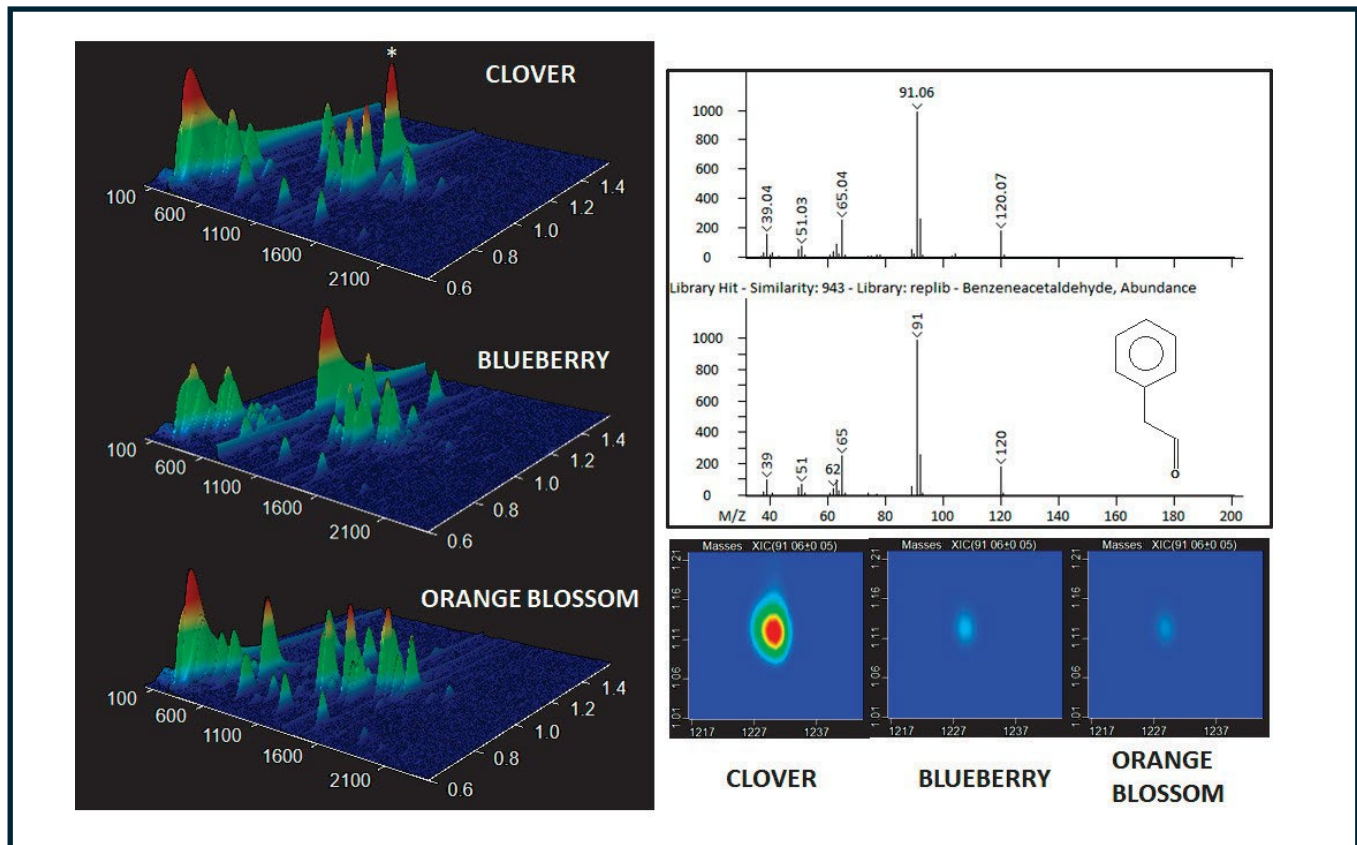


図1: 3つのハチミツ(クローバー、ブルーベリー、およびオレンジの花)に対して、GCxGC-TOFMSを使用した分析および比較を実施。試料間に多くの類似性および差異が存在することが観察された。たとえば、クローバーハチミツでは、ブルーベリーハチミツおよびオレンジの花のハチミツと比較してより高濃度のフェニルアセトアルデヒドが含まれていた。

## 実験概要

試料：HS-SPME と GCxGC-TOFMS を組み合わせ、さまざまなハチミツ試料の分析を行いました。約 3.5g の試料を 20mL バイアルに入れ、セプタムキャップで密閉しました。表 1 に示す装置分析条件のもと、GCxGC-TOFMS を使用して試料の分析を行いました。モジュレーターをオフにした同一の装置を使用して、代表的な GC データも取得しました。また、リテンションインデックスを計算するため、液体注入法によるアルカン標準試料の分析を行いました。

表 1：GC-TOFMS (Pegasus®BT) 分析条件

<b>Autosampler</b>	<b>LECO L-PAL 3</b>
SPME fiber	DVB/CAR/PDMS fiber (conditioned 5 min pre and post injection at 250°C)
Incubation	5 minutes at 40°C
Extraction	10 minutes at 40°C
<b>Gas Chromatograph</b>	<b>LECO FLUX GCxGC</b>
Injection	SPME, 3 min desorption in 250°C inlet, splitless
Carrier Gas	He @ 0.80mL/min, corrected constant flow
Column One	Rxi-5ms, 30m x 0.25mm i.d. x 0.25µm coating (Restek)
Column Two	Rxi-17MS, 0.91*M x 0.10mm i.d. x 0.25µm coating (Restek) *0.60m coiled in 2nd oven and 0.31m in transfer line
Temperature Program	3 min at 40°C, ramped 4.2°C/min to 250°C, hold 5 min
Secondary Oven	+20°C relative to primary oven
2nd Dimension Separation Time	1s, injection duration of 0.05s
Transfer Line	250°C
<b>Mass Spectrometer</b>	<b>LECO Pegasus BT</b>
Ion Source Temperature	250°C
Mass Range	33-500 m/z
Acquisition Rate	200 spectra/s

## 結果および考察

この研究では、さまざまなハチミツ試料の分析と比較を行いました。ハチミツは、それぞれの種類に応じて香気やフレーバーの特徴に若干の違いがあります。クローバーハチミツは、あっさり、マイルド、フローラルなどと表現されます。ブルーベリーハチミツは、濃厚、スパイシー、フルーティー、およびピリッとした味わいなどと表現されます。オレンジの花ハチミツは、マイルド、フルーティー、および柑橘系などと表現されます。各試料の代表的な TIC クロマトグラムを図 1 に示します。さきほどのような表現につながる可能性のある、アロマプロファイルの化学的な差異を調査しました。何百もの成分を検出し、広範におよぶ化合物の同定を行いました。多くの成分は各ハチミツ品種間で同じ濃度で存在していましたが、顕著な差異も多くありました。図 1 では、一例としてフェニルアセトアルデヒドを取り上げています。同定は、取得したスペクトルと NIST ライブラリデータベースとの照合 (シミラリティスコア 943)、およびリテンションインデックスの照合 (取得 RI=1049.3、ライブラリ RI=1045) に基づいて決定しました。同定することにより、この成分の香気特性を理解できます。フェニルアセトアルデヒドの香気は、グリーン、甘い、フローラル、ヒヤシンス、クローバー、およびハチミツのよう、などと表現されます。この成分は、クローバーハチミツ (あっさり、マイルド、およびフローラルと表現される) に最も高い濃度で確認され、ブルーベリーハチミツおよびオレンジの花ハチミツではより低い濃度で存在することが確認されました。

フェニルアセトアルデヒドおよび各試料間の差異は GC 分離により確認することができますが (ここでは簡略のため非表示)、ほかの試料の差異分析については、GCxGC を使用しない限り明瞭に確認することができません。GCxGC には、向上したクロマトグラフィー分離能により 1 次元で共溶出した成分を 2 次元で分離できるという大きな利点があります。今回のような複雑な試料では、1 次元での共溶出はよくあることです。デコンボリューションにより一部の共溶出を数学的に分離することはできますが、デコンボリューションアルゴリズムを正常に実行するには、ある程度クロマトグラフィー分離ができていする必要があります。各成分が同じような保持時間を示す完全な共溶出の場合、デコンボリューションでは不十分です。このような場合、ピークマーカはひとつだけ表示され、結果として取得できるスペクトルは共溶出した複数の成分を組み合わせたものになってしまいます。その一例を図 2 に示します。GC では、シングルピークが表示されています。スペクトルデータでは、オクタンに対するライブラリ照合の結果が低くなっています (シミラリティスコア 794)。シミラリティスコアが低いのは、ライブラリススペクトルと比較した際に、余分な質量が存在していること ( $m/z$  67、72、および 82)、およびスペクトル比が異なっていること ( $m/z$  56 および 44 が期待値より高い) によるものです。GCxGC 分離により、1 次元データにおいてライブラリススペクトルからの乖離の原因となった共溶出成分が判明しました。GCxGC を使用したことで、新たに確認されたヘキサナールが、1 次元ではオクタンと共溶出しているものの、2 次元ではクロマトグラフィー分離することができました。GCxGC データに基づいて、各成分の純粋なスペクトルを決定しました。これによりオクタンの同定結果を改善することができ、ヘキサナールの追加の同定も行うことができました。いずれの同定も、リテンションインデックスにより裏付けられています (実測 RI = 803 (ヘキサナール) および 803.4 (オクタン)、両成分のライブラリ RI = 800)。ヘキサナールは、ブルーベリーハチミツで最も高い濃度、クローバーハチミツでは最も低い濃度で存在しており、差異を決定付ける成分の 1 つであることが分かります。ブルーベリーハチミツおよびオレンジの花ハチミツはいずれもフルーティーと表現されており、ヘキサナールの香気はフルーティー、フレッシュ、グリーン、脂っこい、アルデヒド、草、葉、および汗のよう、と表現されます。この成分はアロマ特性において潜在的に重要な役割を果たしており、GCxGC がなければ検出は困難でした。

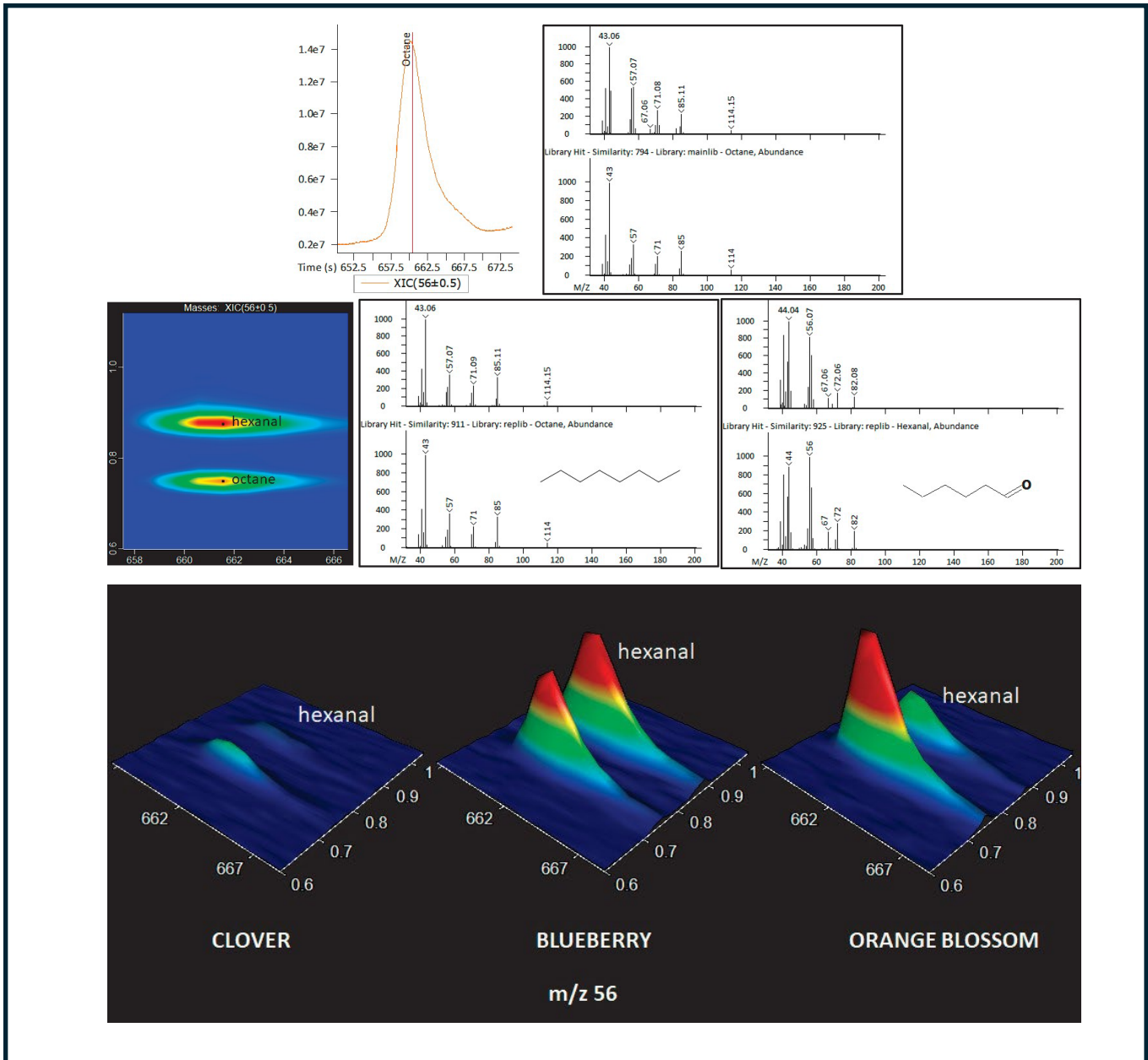
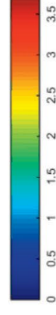


図2：デコンボリューションを超える共溶出を示す。GCxGCにより、共溶出した成分が2次元で分離されている。

興味深い香気特性を持つその他の成分をまとめたものを表2に示します。表2では、この代表的な成分の同定および相対定量に関する情報をまとめています。また、シミュリティスコアおよびリテンションインデックス情報（取得値およびライブラリRI値）も記載してあります。相対的なピークエリア（成分ごとに平均正規化）を、ヒートマップで表しています。各成分の香気およびフレーバーに関する説明も記載されています。各成分の香り記述子をハチミツ全般の香気表現と比較することにより、よい洞察を得ることができます。クローバーハチミツは、あっさり、マイルド、フローラルなどと表現されます。クローバーハチミツ中に高濃度で確認された一部の成分には、表2にまとめたとおり、ハチミツ、甘い、フローラル、ヒヤシンス、ローズ、ドライローズ、クローバー、グリーン、フルーティー、およびチェリー（その他）のような香気やフレーバーの表現が見られます。ブルーベリーハチミツは、濃厚、スパイシー、フルーティー、およびピリッとした味わいなどと表現されます。ブルーベリーハチミツ中に高濃度で確認された一部の成分には、表2にまとめたとおり、甘い、フルーティー、アップル、パイナップル、チェリー、トゥッティフルッティ、ココナッツ、シトラス、オレンジ、フレッシュ、グリーン、コニャック、スパイシー、酸っぱい、ストロング、シャープ、ハーブ、冷たい、ショウノウ、メントール、およびミント（その他）のような香気やフレーバーの表現が見られます。オレンジの花のハチミツは、マイルド、フルーティー、および柑橘系などと表現されます。オレンジの花のハチミツ中に高濃度で確認された一部の成分には、表2にまとめたとおり、シトラス、オレンジ、レモン、レモングラス、ドライオレンジピール、アップル、グリーン、甘い、フローラル、およびローズ（その他）のような香気やフレーバーの表現が見られます。加えて、いくつかの成分はブルーベリーハチミツおよびオレンジの花のハチミツ中に高濃度で確認されています。これらの成分のうちの一部には、フローラル、フレッシュ、花のような、ハチミツ、および甘いといった表現が見られます。このリストは包括的なものではありませんが、ここに挙げられた個々の成分の一部が、それぞれのハチミツの全体的なアロマやフレーバーの特徴に寄与していると考えられます。

表 2: ハチミツのアロマトプロファイルに差異をもたらす代表的な成分

Name	Formula	Sim	R.T. (s)	Obs. RI	Lib. RI	CAS	CLOVER	BLUE	ORANGE	ODOR and FLAVOR Descriptions
cocoa butenal	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O	886	1717.89,1.167	1280.9	1279	4411-89-6				sweet narcissus cortex beany honey cocoa nutty radish / green vegetative floral cocoa nutty / green sweet floral hyacinth clover honey cocoa / honey sweet floral chocolate and cocoa with a spicy nuance
benzeneacetaldehyde	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O	949	1229.92,1.119	1049.3	1045	122-78-1				floral rose phenolic balsamic / chemical fruity cherry almond balsamic bitter
benzyl alcohol	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	881	1202.92,1.101	1037.3	1036	100-51-6				floral rose dried rose flower rose water / floral sweet rosey and bready
phenylethyl alcohol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	920	1382.91,1.109	1118.3	1116	60-12-8				earthy floral sweet woody
Z-linalool oxide	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	926	1293.92,0.888	1077.8	1074	5989-33-3				citrus herbal terpene camphor
limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	904	1196.92,0.853	1034.7	1030	138-86-3				herbal sweet warm tobacco cocoa woody / sweet tonka coumarinic tobacco cocoa dark chocolate coconut
gamma-valerolactone	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	914	1014.94,1.242	955.5	958	108-29-2				floral honey
linalool oxide	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	826	1512.9,0.955	1179.3	1178	14049-11-7				flowery fresh
lilac aldehyde A	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	926	1445.91,0.959	1147.9	1145	53447-46-4				fresh flowery
lilac aldehyde B	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	925	1464.91,0.964	1156.8	1154	53447-45-3				sweet flowery
lilac aldehyde D	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	925	1496.9,0.972	1171.8	1169	53447-47-5				fresh green fatty aldehyde grass leafy fruity sweaty / green woody vegetative apple grassy citrus and orange with fresh/lingering aftertaste
hexanal	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	934	659.958,0.876	803	800	66-25-1				strong sharp sweet bitter almond cherry / sweet oily almond cherry nutty and woody
benzaldehyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	959	1036.93,1.106	964.9	962	100-52-7				fruity juicy fruit pineapple cognac / fruity sweet tutti frutti apple fresh and lifting ethereal
ethyl butyrate	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	879	662.958,0.845	804.3	802	105-54-4				fruity spicy sweet herbal coconut woody / cheese fruity coconut waxy green
2-heptanone	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	932	866.945,0.889	892.2	891	110-43-0				sharp acetic cheese butter fruit / acidic sour cheesy dairy creamy with a fruity nuance
butanoic acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	951	687.956,0.791	815.1	805	107-92-6				sweet woody almond fragrant baked bread / brown sweet woody bready nutty caramellic with burnt astringent nuance
furfural	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	958	737.953,1.064	836.6	833	98-01-1				cooling woody sweet green camphor fruity musty cedarwood tobacco leather / sweet green waxy woody cooling pulpy mouthfeel and citrus
isophorone	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	882	1402.91,1.047	1127.7	1124	78-59-1				camphor menthol phenol
cyclohexanol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	895	855.945,0.949	887.5	880	108-93-0				minty acetone
cyclohexanone	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O	881	878.944,1.060	897.4	894	108-94-1				citrus floral sweet bois de rose woody green blueberry / citrus orange lemon floral waxy aldehydic and woody
linalool	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	894	1347.91,0.870	1101.9	1099	78-70-6				citrus green musty lemongrass apple / green vegetative musty apple banana and green bean-like
methyl heptenone	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	877	1091.93,0.920	988.5	986	110-93-0				green lincolool terpineol fatty / sweet woody aromatic spicy cardamom green cumin like with dried orange peel and green waxy floral nuances
perilla alcohol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	851	1750.89,1.011	1297.5	1296	536-59-4				



## まとめ

今回の研究では、フローベースのモジュレーターを組み込んだ GCxGC-TOFMS 装置を使用して、3 つの異なるハチミツ品種のアロマプロファイルと比較しました。このモジュレーターは堅牢で使いやすく、流量計算をソフトウェアで行うため、ユーザーによる操作も簡単です。この装置により、アロマプロファイルの豊富なデータが得られ、試料に差異をもたらす成分の調査を行うことができました。いくつかの成分では、ハチミツの全般的な官能表現につながる差異を確認することができました。差異をもたらすこれらの成分のいくつかは、GCxGC による向上したクロマトグラフィー分離能がなければ確認することが困難でした。



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

info@leco.com • www.leco.com | ISO-9001:2015 Q-994 | LECO は、LECO 社の登録商標です。

PEGASUS、FLUX、StayClean は LECO 社の登録商標です。