

ChromaTOF® Tile™ を使用した通常および樽熟成メープルシロップの 差異分析

キーワード : GCxGC、TOFMS、差異分析、ChromaTOF Tile、Fisher 比、クラス比較、シロップ、樽熟成

はじめに

バーボン樽を使用した熟成は、多様な食品および飲料市場において1つのトレンドとして広まっています。こうした手順が広まったことで、かつてバーボンの熟成に使用された焦がしオーク樽が、食品や飲料製品の数か月にわたる熟成に再利用されています。この熟成過程では、オーク樽および樽に残留したバーボンのフレーバーが食品や飲料に吸収されます。また、食品や飲料にもともと含まれていたフレーバーが樽に染み込んだり、時間の経過とともに反応を起こしたりします。こうした過程が製品にフレーバーの複雑さを与え、製品価値を高めることができるため、ビール、蒸留酒、ワイン、ソース、シロップ、コーヒー、およびお茶などに利用されてきました。このアプリケーションノートでは、バーボン樽で熟成されたメープルシロップとそうでないメープルシロップのあいだの具体的な化学的差異について研究します。この分析目標を達成するため、2次元ガスクロマトグラフィー (GCxGC) を使用して試料中の成分を分離しました。GCxGC では、相補的な固定相を持つ 2 つのカラムを組み合わせることで、1次元分離でいずれかの固定相を使用した場合よりもピークキャパシティを向上させることができます。これにより、複雑な試料中に存在するより多くの成分をクロマトグラフィー分離できます。この強力な分離能を飛行時間型質量分析 (TOFMS) と組み合わせることにより、スペクトルデータベースとの照合に基づいた成分の同定を行うことができます。GCxGC-TOFMS では豊富なデータが生成されるため、データ分析ツールを使用してデータマイニングを行い、分析上の課題に対する有意義な情報や答えを見出すことが可能です。今回のケースでは、ChromaTOF Tile™ を使用することによりサンプルセット全体の生データを迅速に比較し、クラスを差別化する成分、すなわちバーボン樽熟成メープルシロップと通常のメープルシロップを区別する特定の化学成分の検出を目指しました。

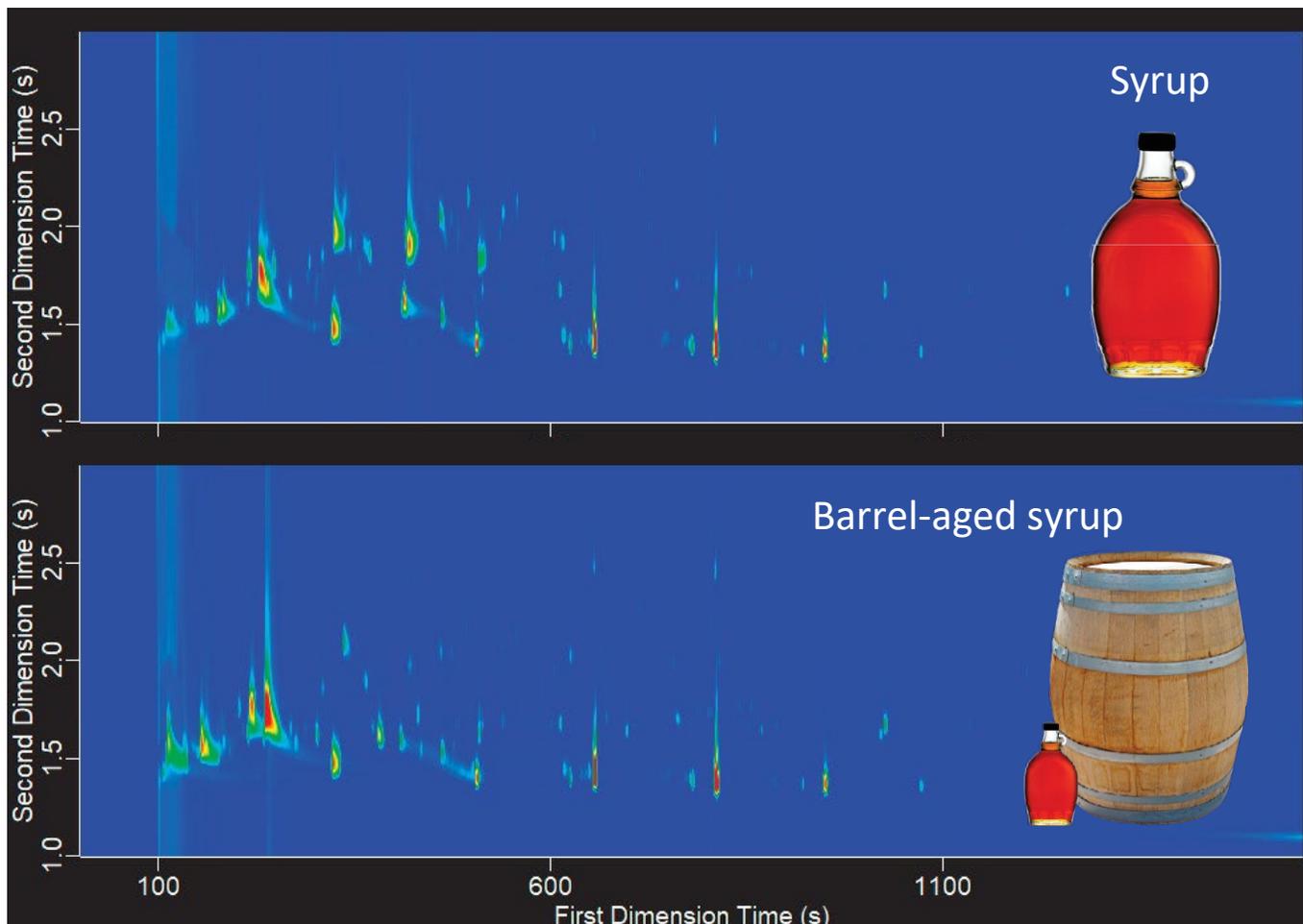


図1 : バーボン樽熟成メープルシロップおよび通常のメープルシロップの代表的なクロマトグラム。

実験概要

HS-SPME および GCxGC-TOFMS を使用して、通常のメイプルシロップ試料およびバーボン樽熟成メイプルシロップ試料の 2 種類を分析しました。試料は、蒸留水を使用して約 50% (水 1 mL あたりシロップ 1 g) に希釈しました。続いて、希釈したそれぞれのシロップ 2 mL を 20 mL の HS-SPME バイアルに移しました。各試料を 40°C で 5 分間インキュベートし、SPME ファイバー (PDMS/DVB/Carboxen、Supelco 製) を使用して同じ温度で 10 分間抽出しました。GCxGC-TOFMS の分析条件を表 1 に示します。データはシロップの種類ごとに $n=4$ で取得し、SPME ファイバーは各注入のあいだに 250°C で 5 分間コンディショニングしています。アルカン標準物質のデータも同じメソッドで取得し、リテンションインデックス (RI) の算出に使用しました。試料の分析は LECO 社の ChromaTOF ソフトウェアを使用しました。また、クラス差別化成分を決定および同定するデータ分析では ChromaTOF Tile を使用しました。

表 1 : GCxGC-TOFMS (Pegasus® BT 4D) 分析条件

Auto Sampler	LECO L-PAL 3 Autosampler
Injection	2 min desorption in GC inlet, splitless
Gas Chromatograph	LECO GCxGC QuadJet™ Thermal Modulator
Inlet	250°C
Carrier Gas	He @ 1.4 mL/min, corrected constant flow
Columns	HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm coating Rxi-17SilMS, 0.45 m x 0.25 mm x 0.25 µm coating
Temperature Program	Hold 2 min at 40°C, ramp 10°C/min to 280°C Secondary oven: +20°C relative to primary oven
Modulation	2 s with temperature maintained +15°C relative to 2nd oven
Transfer Line	300°C
Mass Spectrometer	LECO Pegasus BT
Ion Source Temperature	250°C
Mass Range	35-550 m/z
Acquisition Rate	200 spectra/s

結果および考察

通常のメイプルシロップおよびバーボン樽熟成メイプルシロップの代表的な等高線プロットを図 1 に示します。これらの試料のあいだには、いくつかの類似点と特徴的な差異が存在することが分かります。この分析の主要な目的は、樽熟成過程に関連する可能性のある化学的差異を決定および解明することにあります。いくつかの差異は TIC で明らかに示されるので、クロマトグラムを目視で比較して判断できるものと思われます。一方その他の差異については、比較用ソフトウェアツールを使用しない限り判断が難しい可能性があります。低濃度の成分は TIC で確認できない可能性があり、ほかの特徴的な成分も共溶出や試料の複雑さゆえに不明瞭になる可能性があるためです。LECO 社の ChromaTOF Tile では、クロマトグラム (保持時間および特定の m/z) のスポットを迅速に検出することにより、データからこれらの差異を描き出すことができます。これにより、統計的に有意な方法でサンプルグループを区別することができます。生データの各 m/z でこの比較を行うことで、目視では確認できないと思われる成分を明らかにすることができ、サンプルグループとその差異に関するより深い理解を得ることができます。

シロップの種類間における最も特徴的な成分の 1 つであるピラジンを図 2 に示します。ピラジンは通常のシロップでのみ確認できた成分で (試料 5 ~ 8、焦げ茶色のバー)、樽熟成シロップでは検出されませんでした (試料 1 ~ 4、薄茶色のバー)。ChromaTOF Tile によりデータ内でこの成分が現れた位置を特定し、スペクトル情報およびリテンションインデックスを使用して暫定的に同定しました。図 2 左枠の上側に実測のスペクトルデータ、下側に反転した形でライブラリのスペクトルを示します。シミュラリティスコアは 904 でした。この暫定的な同定では、ライブラリ RI 値 736 に対して実測 RI 値 745 となっており、リテンションインデックスによる裏付けも確認できます。ピラジンは「木の実のような」香り記述子で表現される成分で、これが重要な差異としてアロマプロファイルにも影響を与えていると思われます。

試料中のこの重要な差異を明らかにするうえで、ChromaTOF Tile が決定的な役割を果たしました。図 3 に示すこの保持時間エリアの TIC を確認すると、TIC の目視による比較だけではピラジンの確認が困難であった可能性が示唆されています。図 3 の左枠に、樽熟成シロップ試料の平均クロマトグラム (上側) と通常のシロップ試料の平均クロマトグラム (下側) を比較したものを示します。黒丸で囲んだ部分がピラジンの保持時間を示していますが、差異は必ずしも明確とは言えません。この TIC でははっきりと分かるのは、ある成分が樽熟成シロップでより高い濃度で示されているということです。TIC 内でピラジンを不明瞭にしているこの成分は、右枠に示す m/z 55 の XIC でも示されています。また、TIC ではピラジンが不明瞭ですが、中枠に示す m/z 80 の XIC では確認することができます。この 2 つ目の差異は TIC でも確認できたと思われますが、ChromaTOF Tile によりすべての m/z を調査することで、これらのサンプルクラスを区別する成分の両方を決定することができました。

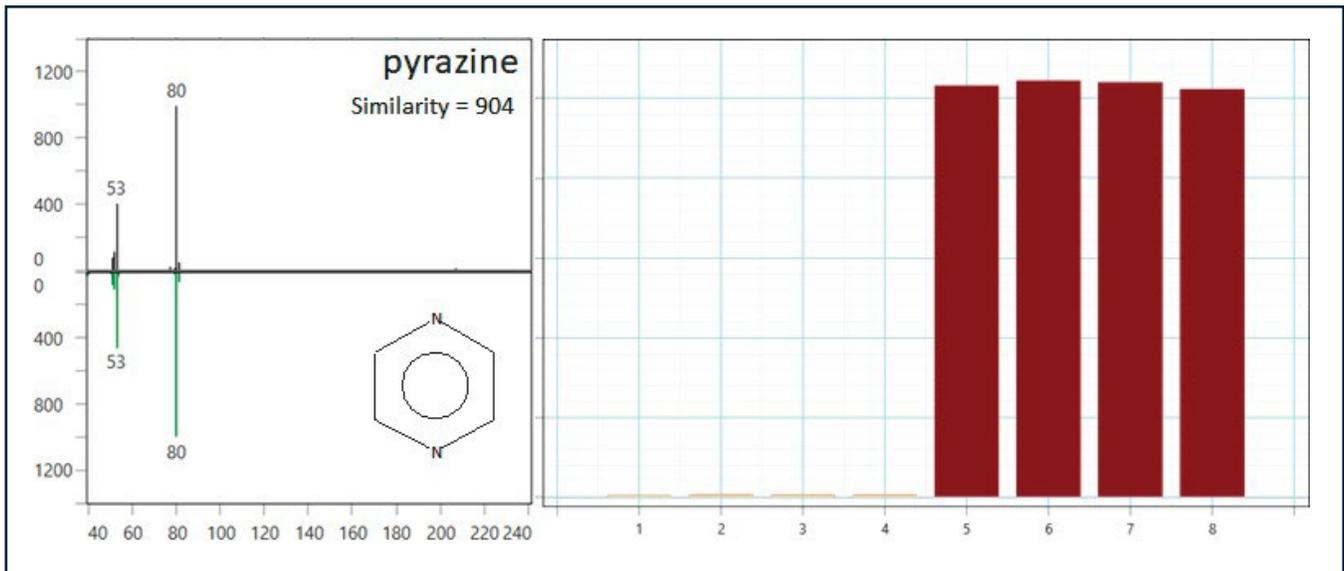


図2：ChromaTOF Tileを使用することで、ピラジンがサンプルクラスを区別する成分の1つであると決定できた。スペクトルマッチングおよびRI マッチングに基づいて同定を行った。また、通常のシロップでより高い濃度で観測された(試料5～8、焦げ茶色バー)。

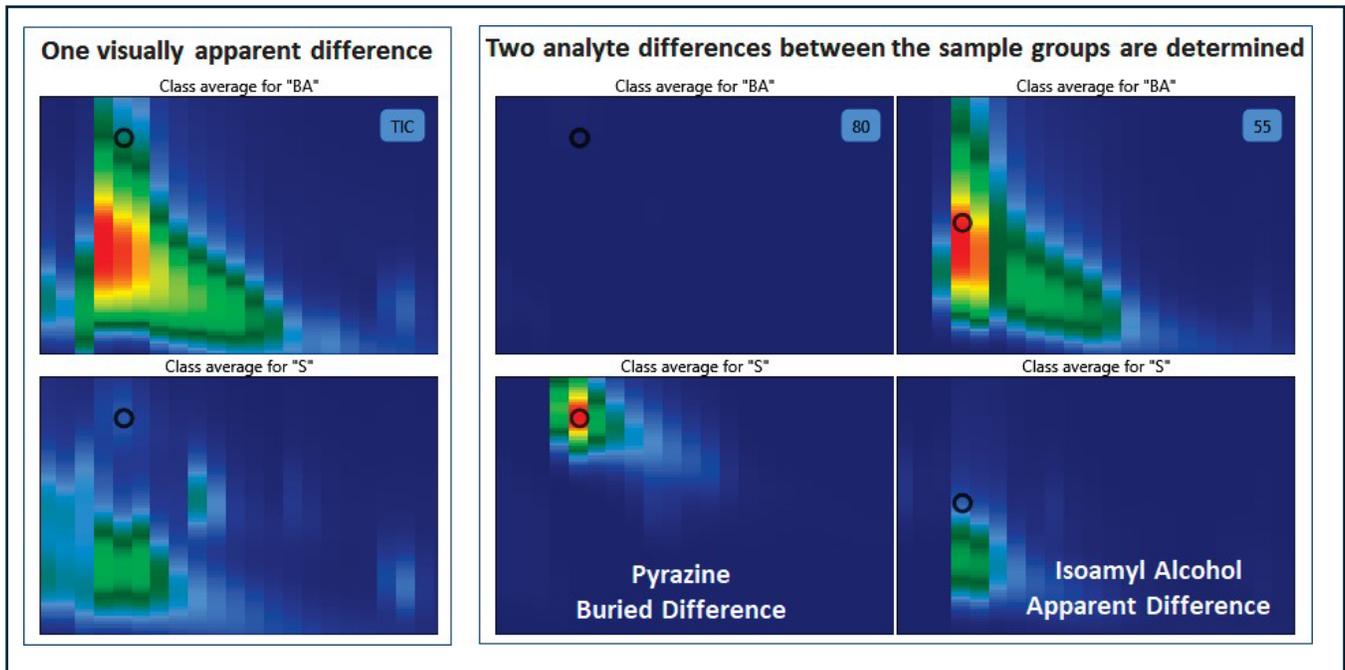


図3：ピラジン周辺のクロマトグラフィーウィンドウにおける樽熟成シロップ(上側)および通常のシロップ(下側)のTIC(左側)、m/z 80(中央)、およびm/z 55(右側)を示す。

図3に示した2つ目の差異に関する詳細を図4に示します。この成分はイソアミルアルコールであることが確定し、樽熟成シロップ(試料1～4、薄茶色バー)では通常のシロップ(試料5～8、焦げ茶色バー)よりも高い濃度で観測されています。ChromaTOF Tileによりこの差異を決定し、スペクトル情報およびリテンション情報に基づいて同定を行いました。上側に実測のスペクトルデータ、下側に反転した形でライブラリのスペクトルを示します。シミュリティスコアは917でした。この暫定的な同定では、ライブラリRI値736に対して実測RI値742となっており、リテンションインデックスによる裏付けも確認できます。イソアミルアルコールは、「発酵した」および「ウイスキー」といった香り記述子で表現されており、樽熟成試料中の濃度の高さがアロマプロファイルの差異にも影響を与えています。

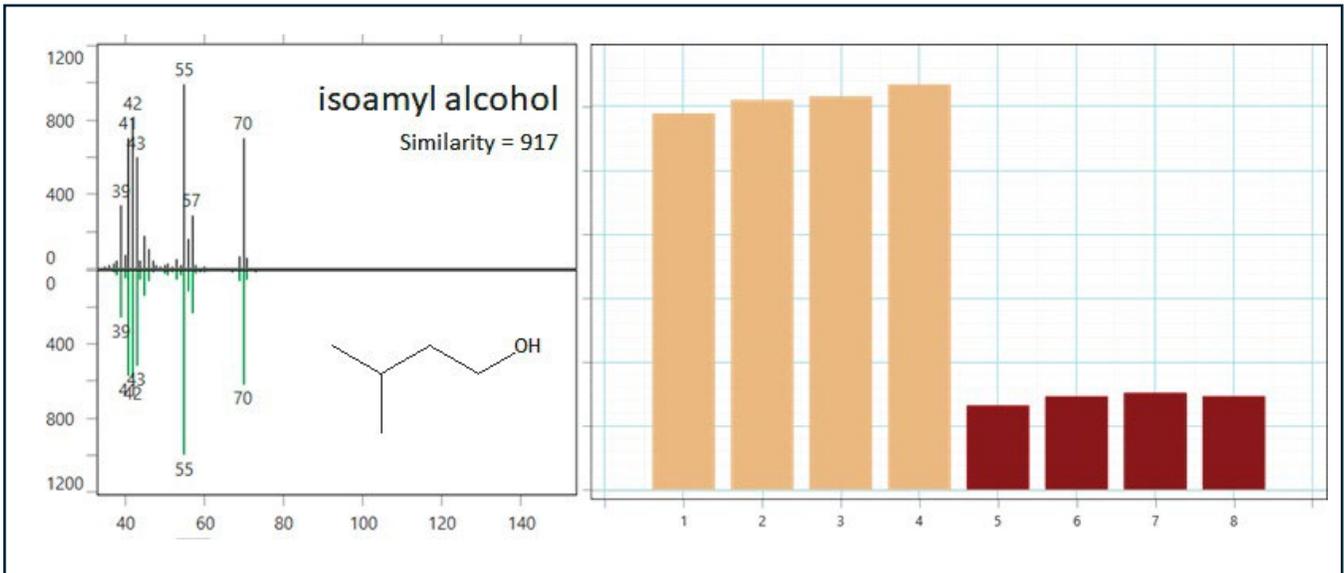


図4：ChromaTOF Tileを使用することで、イソミルアルコールがサンプルクラスを区別する成分の1つであると決定できた。スペクトルマッチングおよびRIマッチングに基づいて同定を行った。また、樽熟成シロップでより高い濃度で観測された。

図2～4で示した2つの成分に加え、試料の差異に影響を与えている成分がほかにもたくさんあることがChromaTOF Tileにより示されました。同ソフトウェアにより、これらの成分に関する試料間の相対的な傾向、および暫定的な同定も決定できました。ChromaTOF TileのPCAを使用して全体的な傾向をまとめ、キャラクターゼーションを行いました。PCAでは、資料を区別するために決定された139種類の成分を変数として使用されました。これらは、可能な場合にはシミュラリティスコアおよびRIマッチングにより暫定的に同定されました。各グループを特徴づける成分のみを変数としているため、図5に示すとおりスコアプロットでグループごとに明確なクラスターが表示されるようになっています。実際、ほぼすべての変数が第一主成分に取り込まれています(PC1)。

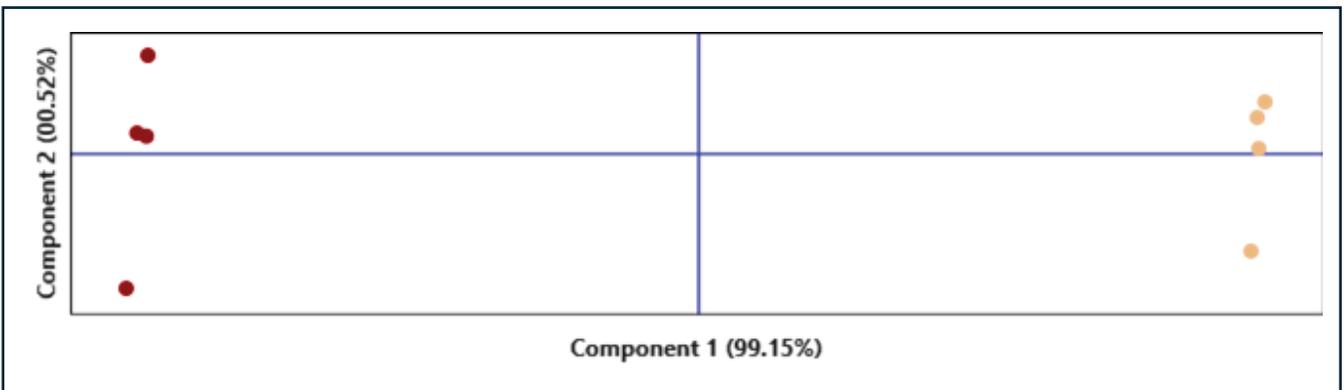


図5：樽熟成シロップ(焦げ茶色)および通常のシロップ(薄茶色)の明確なクラスターを示すPCAスコアプロット。

とはいえ、図6に示すとおり、化学的変化における傾向(樽熟成シロップと通常シロップのどちらで濃度が高いか)を明らかにするうえでローディングの調査が大いに役立ちました。樽熟成シロップはPC1で正のスコアを示しており、PC1で正の因子負荷量を持つ成分が高い濃度で存在することが分かります。一方で通常のシロップはPC1で負のスコアを示しており、PC1で負の因子負荷量を持つ成分が高い濃度で存在していることが分かります。化合物の種類ごとに色分けしてみると、官能基ごとに非常に一貫した傾向(樽熟成試料における濃度の高低)があることが分かります。アルコール、エステル、およびアルカンは、樽熟成シロップにおいて一貫して高い濃度で観測され、窒素含有環(ピラジンおよびピリジン)、硫黄含有化合物、アルデヒド、およびケトンは通常のシロップ中で一貫して高い濃度で観測されたことが分かります。酸素含有環(フランおよび置換フラン)については、樽熟成シロップ中の濃度の高低が成分ごとに異なることが示されています。

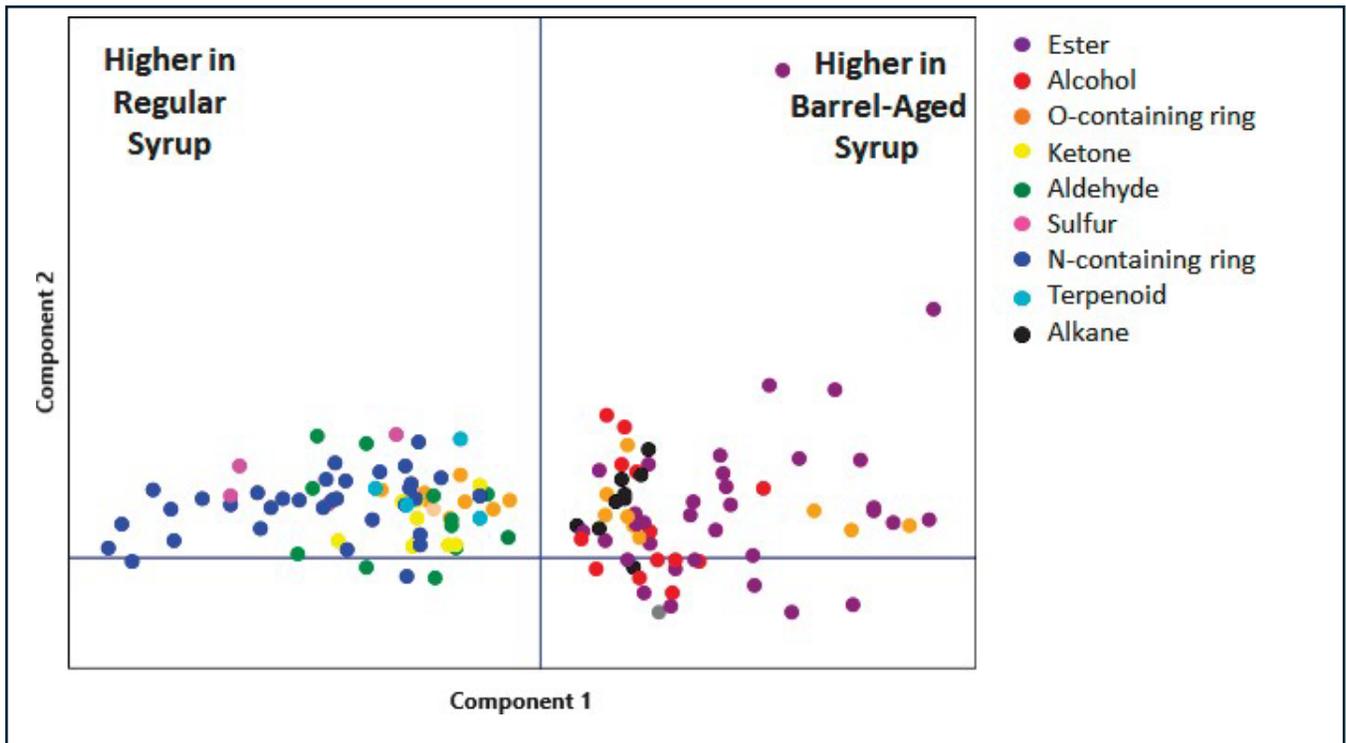


図6：PCA ローディングプロット。樽熟成シロップと通常のシロップの比較において、さまざまな化合物クラスがそれぞれに異なる傾向（濃度の高低）を持つことが示されている。

このように化合物クラスの傾向ごとに試料のキャラクタリゼーションを行うことで、シロップ間の差異を明らかにすることができました。これらの化合物に存在する個々の成分の情報も利用可能です。さまざまな化合物クラスから、代表的な成分の例を図7に示します。

	Name	Formula	Similarity	CAS	Quant mass	RI. calc	RI. lib	RI. Δ	Med RT1	Med RT2	1	2	3	4	5	6	7	8
●	Butanoic acid, ethyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₂	916	105-54-4	88	811	802	9	302.0	1.61	34	13	11	36	30	74	18	79
●	isobutyl acetate	C ₈ H ₁₆ O ₂	913	110-19-0	73	783	772	11	274.0	1.59	37	33	10	34	37	10	30	11
●	isoamyl alcohol	C ₇ H ₁₄ O	917	123-51-3	55	742	736	6	236.0	1.79	16	34	10	15	74	15	39	17
●	isobutyl alcohol	C ₄ H ₁₀ O	924	78-83-1	74	639	624	15	160.0	1.59	16	11	36	36	76	16	39	38
●	1-Butanol, 2-methyl-	C ₅ H ₁₂ O	932	137-32-6	57	747	739	8	240.0	1.79	31	33	15	32	25	17	33	13
●	2-Acetyl-5-methylfuran	C ₇ H ₁₀ O ₂	839	1193-79-9	109	1023	1039	-16	524.0	1.94	10	19	17	16	30	11	34	13
●	Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	919	98-01-1	96	843	833	10	338.0	0.10	11	74	73	79	11	33	11	13
●	2-Cyclopenten-1-one	C ₅ H ₈ O	845	930-30-3	82	845	832	13	340.0	0.16	37	31	17	16	21	34	36	15
●	Cyclopentanone	C ₅ H ₈ O	901	120-92-3	55	802	791	11	292.0	1.82	31	38	32	32	36	72	35	15
●	Butanal, 3-methyl-	C ₅ H ₁₀ O	917	590-86-3	44	666	652	14	176.0	1.58	15	34	13	38	34	15	16	37
●	Butanal, 2-methyl-	C ₅ H ₁₀ O	865	96-17-3	57	676	662	14	182.0	1.59	32	37	13	13	38	33	34	17
●	Disulfide, dimethyl	C ₂ H ₆ S ₂	923	624-92-0	94	753	746	7	246.0	1.80	15	10	36	13	32	11	31	19
●	Dimethyl trisulfide	C ₂ H ₆ S ₃	897	3658-80-8	126	981	971	10	482.0	1.95	38	32	17	38	32	38	32	14
●	Pyrazine	C ₄ H ₄ N ₂	904	290-37-9	80	745	736	9	238.0	1.93	13	14	14	12	74	35	38	18
●	Pyrazine, methyl-	C ₅ H ₆ N ₂	933	109-08-0	94	832	829	3	324.0	1.97	31	14	16	10	17	33	17	18

図7：さまざまな化合物クラスの代表的な成分について、ピーク同定マトリクス（シミュラリティスコア、RI 情報）および相対的な傾向（ヒートマップカースケール、樽熟成シロップは列1～4、通常のシロップは列5～8）を示したものの。

ChromaTOF Tileにより実現したこのワークフローでは、2つの異なるシロップ間の化学的差異を迅速に解明し、これらの差異に関連する特定の化学成分の同定および傾向を決定することができました。また、樽熟成に関係すると思われる特定の官能基の傾向も明らかにすることができました。

まとめ

このアプリケーションノートでは、GCxGC-TOFMSにより複雑なシロップ試料の分離および個々の成分の分離を行うことができました。**ChromaTOF Tile**によりサンプルクラスの比較を容易に行うことができ、通常のシロップと樽熟成シロップの差異を決定づける成分をデータから迅速に確認することもできました。各成分の同定と傾向のキャラクタリゼーションを行うことで、化合物クラスに関連する一貫した変化も解明できました。これらのツールにより、こうした種類のノンターゲット差異分析を容易に行うことができ、試料の詳細な情報を明らかにすることができます。



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、ChromaTOF、QUADJET、Tile は LECO 社の登録商標です。