

Instrument: Pegasus® BT 4D

パンパーニッケルパンの主要香気成分評価に向けたワークフロー

GCxGC-TOFMS と自動化された統計的データ処理を組み合わせた分析ワークフロー

Key Words: GCxGC, TOFMS, VOCs, Flavor and Food, Aroma, Bread, Pumpernickel, Statistical Data Analysis, ChromaTOF® Tile

Introduction

パンパーニッケルは、ライ麦を主原料とし伝統的に作られる特別なサワードウブレッドです。ドイツ西部のヴェストファーレン地域に起源をもち、その製法により非常に濃い色調と、密度が高く粗い独特の組織を呈します。パンパーニッケルの焼成はゆっくりと進められ、比較的穏やかな条件下で長時間の蒸し焼きが行われることが特徴です。

この工程では、メイラード反応に由来する数多くの反応生成物が形成され、主要な香気化合物も生成されます [1]。消費者は、甘みのある味わいと強い香ばしさー典型的には「ブラウン」「カラメル」「モルティ」と表現される香りーを楽しみますが、比較的低い血糖指数 (GI) をはじめとする栄養上の利点も評価されています。

レシピの変更はパンの最終的な味と香りのプロファイルに影響します。こうした調整が製品に及ぼす影響を深く理解することは、製造者が消費者の嗜好に合わせて効率的に味と香りを設計するうえで重要です。

本アプリケーションノートでは、パンパーニッケルの種類間比較のための分析ワークフロー全体を紹介します。本研究では、溶剤支援フレーバー蒸発装置 (SAFE)、包括的二次元ガスクロマトグラフィー (GC×GC)、および飛行時間型質量分析 (TOFMS) を組み合わせ、さらに統計解析ソフトウェアを用いてデータ処理を実施しました。

LECO Pegasus BT4D GC×GC-TOFMS は、優れた分離能、ダイナミックレンジ、感度を提供し、多数の香気関連化合物を検出することができました。広い質量範囲で高速データ取得が可能なおかげで、デコンボリューションを用いたピークファインディングと、質量スペクトル (MS) および保持指標 (RI) ライブラリー検索を迅速に実行できました。

サンプルセットの解釈は *ChromaTOF Tile* ソフトウェアを用いて実施し、複合サンプルセット特徴テーブルを作成することで、効率的な教師あり統計解析を可能にしました。このテーブルにより、サンプル中の注目すべき特徴について、その傾向、パターン、そして有意な差異を明確に観察することができました。

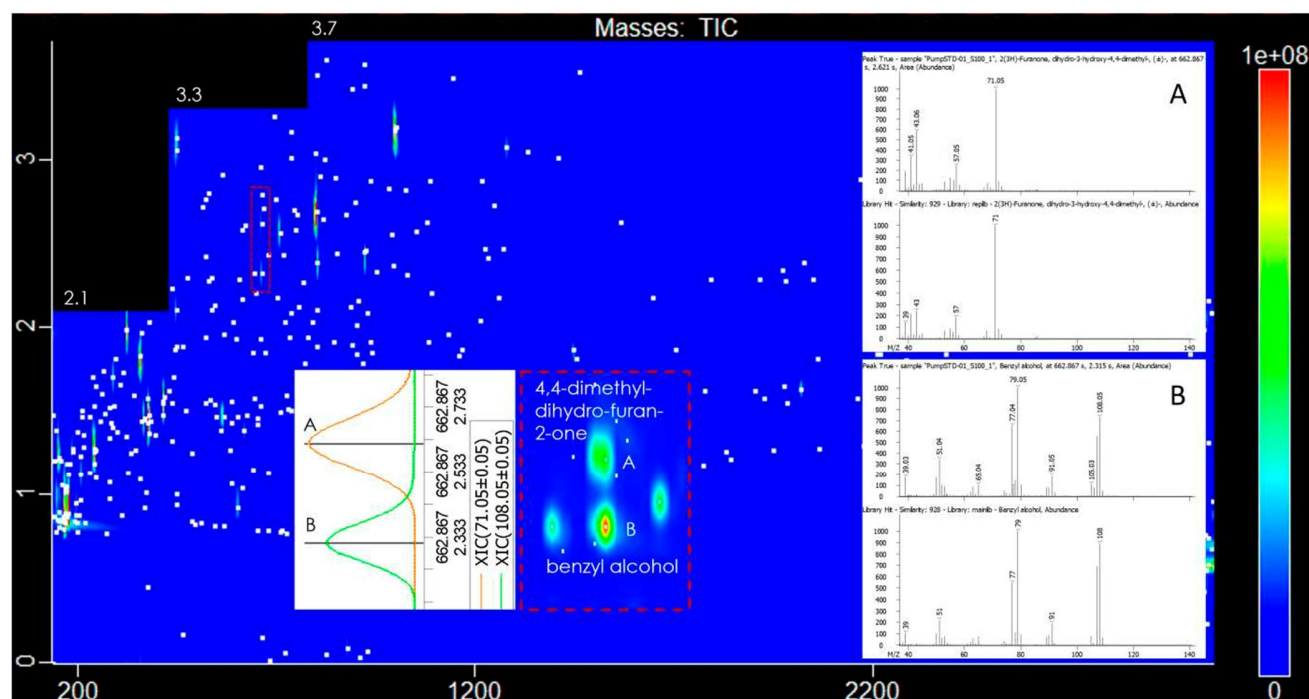


図 1. パンパーニッケル抽出物の全イオンクロマトグラム(TIC)等高線図。

Experimental

3 種類のパンパーニッケルをメチレン塩化物で抽出し、SAFE (solvent-assisted flavor evaporation) [1] を適用した後、表 1 に示す条件で 3 反復分析を行いました。線形保持指標 (RI) 算出のため、n-アルカン標準 (C7-C30) も分析しました。

表 1. サンプルングおよび分析条件

GC	Agilent 7890
注入口	1 μ L スプリット注入, 250 ° C
キャリアガス	He 1.4 mL/min, (定流量)
カラム	D ₁ : Rxi-5MS 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m coating D ₂ : Rxi-17MS 0.9 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m coating
オープン温度	40 ° C (1 分保持), 5 ° C/min で 280 ° C まで; 20 ° C/min で 300 ° C まで (1 分保持)
二次オープン	主オープン温度に対して+11 ° C
モジュレーター	二次オープン温度に対して+15 ° C
モジュレーション時間	2.1 s (start - 431 s); 3.3 (432 s - 778 s); 3.7 s (779 s - end)
トランスファーライン	330 ° C
MS	LECO Pegasus BT4D
イオン源温度	250 ° C
質量範囲	40-400 m/z
取得速度	200 spectra/s

Results and Discussion

図 1 は、パンパーニッケル抽出物のクロマトグラムを示しています。全イオンクロマトグラム (TIC) には多数のピークが確認され、この種のサンプルが非常に複雑であることが分かります。GC×GC と TOFMS を組み合わせる利点の 1 つは、二段階の分離と広い質量範囲での高速データ取得によって、極めて包括的なノンターゲットデータが取得できる点です。また、一次元 GC と比較して感度が向上するのは、熱モジュレーションによるバンドフォーカシング効果によるものです。本解析では、可変モジュレーション周期 (VMP) を適用しており、クロマトグラム左上に段階的に示される各区間のモジュレーション周期 (P_M) がそれを示しています。VMP を用いることで、一次元目 (D₁) の分離能を保持しつつ、重要な成分対に対して分離条件を最適化・微調整できます。

ハイライトされた保持時間ウィンドウでは、一次元保持時間 (RT1) が同じ 2 つの成分が溶出していますが、二次元目 (D₂) で明確に分離されていることが確認できます。これらの 2 次元分離された化合物 (A および B で示す) の同定には、質量スペクトル情報と保持指標 (RI) が用いられました。NIST MS ライブラリによるスペクトル比較の結果、A は 4,4-ジメチルジヒドロ-フラン-2-オンで類似度 929/1000、B はベンジルアルコールで類似度 928/1000 と一致しました。

通常、複数の GC×GC-MS クロマトグラムのアライメントおよび比較は大きな課題となります。しかし、本研究では **ChromaTOF Tile** を用いることで、パンパーニッケル抽出物間の類似点と相違点を容易に見出すことができました。この処理プラットフォームはタイルベースの Fisher 比アプローチに基づき、複数の GC×GC-TOFMS データセットを高速かつユーザーフレンドリーに比較できます。有意差を持つ特徴を統計的にハイライトできるため、サンプルセット間のクロマトグラム差異を探索するための作業時間が大幅に短縮されます。さらに、RI 計算も容易に実装でき、図 2 にその例を示します。

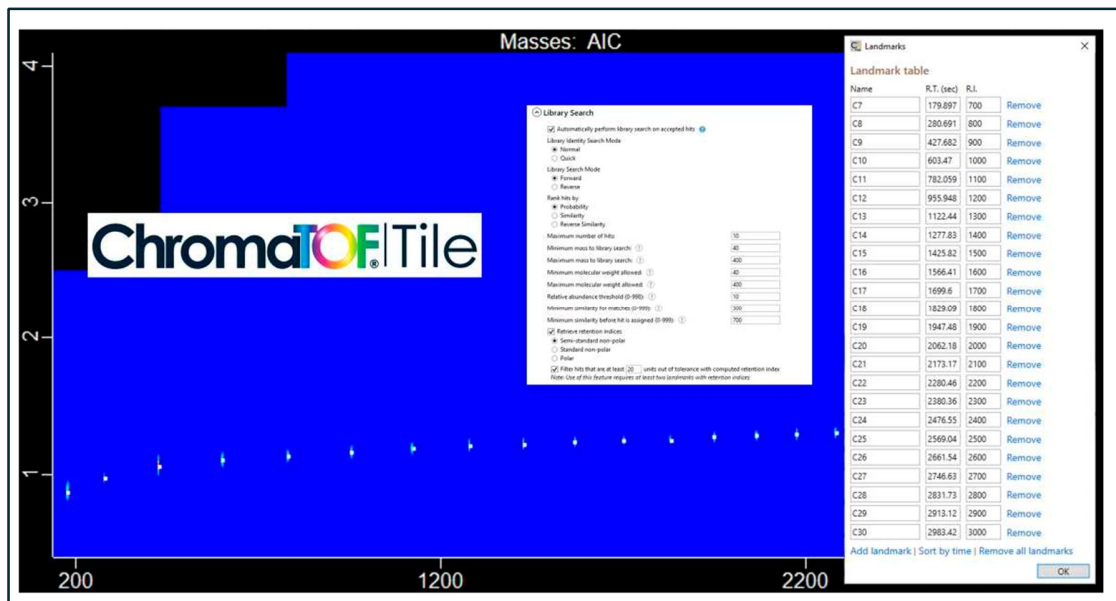


図 2. ChromaTOF Tile における RI 実装例

主成分分析（PCA）は、サンプル間の全体的な類似性と傾向に基づくクラスタリングを視覚化するために用いられました。図 3 は、レシピの違いに関連した香気プロファイルに基づき、3 つのクラスターに分かれた PCA スコアプロットを示しています。

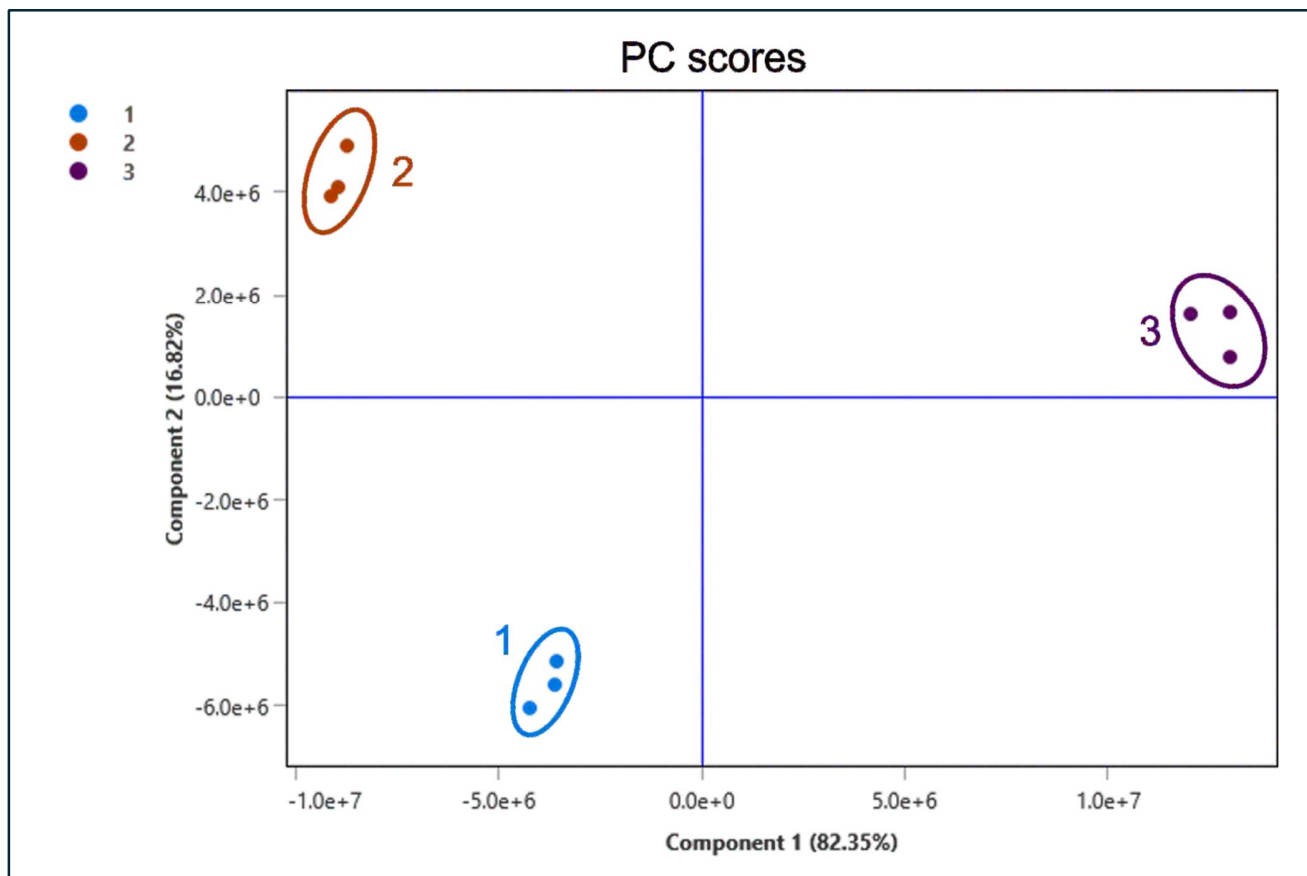


図 3. 異なる香気タイプおよびレシピに基づくブンパーニッケル抽出物の PCA スコアプロット。

サンプルセットにおける個々の特徴量の分布は、棒グラフ表示、等高線プロット（クラス平均または個別サンプル）、あるいは化学特徴テーブル内のヒートマップなど、複数の可視化ツールを用いて確認できます。

図 4 は、Fisher 比が高く、サンプルクラス間で有意な差異を示した特徴の 1 つのトレンドを示しています。観測スペクトルは NIST ライブラリでメチオナル（CAS: 3268-49-3）と一致し、類似度は 925 でした。同定は RI でも支持され、計算 RI は 907、ライブラリ値も 907 で完全一致しました。メチオナルは 3 つのサンプルすべてに検出されましたが、サンプル 2 および 3 で高い存在量が観察されました。メチオナルは茹でたジャガイモのような匂いで知られる香気活性化合物です。

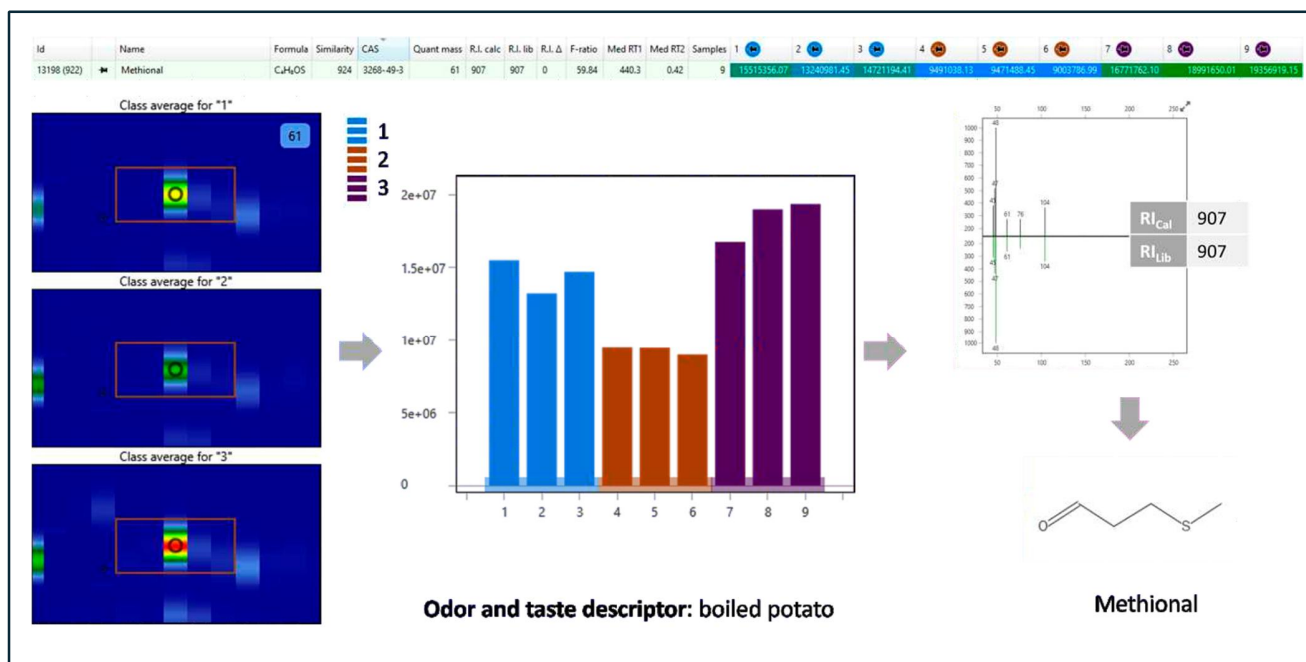


図 4. メチオナル（CAS: 3268-49-3, RIΔ=0）の平均等高線図（ $m/z = 61$ ）、スペクトル比較、棒グラフ。

別の統計的に有意な化合物とそのサンプル間変動を図 5 に示します。観測スペクトルは 2-ペンチルフラン（CAS: 3777-69-3）と一致し、類似度は 946/1000 でした。同定は RI によりさらに支持され、計算 RI 991 はライブラリ値 993 と良好に一致しました。棒グラフが示すように、サンプル 2 で高い存在量が確認されました。2-ペンチルフランの香味特性には、バター、インゲン豆、フローラル、フルーティ、マッシュルーム、ナッツなどが含まれます。



図 5: 2-ペンチルフラン（CAS: 3777-69-3, RIΔ=2）の平均等高線図（ $m/z = 81$ ）、スペクトル比較、棒グラフ。

図 6 は、2,3-ジヒドロ-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-4H-ピラン-4-オン (CAS: 28564-83-2)、別名ジヒドロマルトール (DHM) と同定された化合物のトレンドを示しています。NIST ライブラリでの類似度は 914/1000、計算 RI とライブラリ RI の差 (RIΔ) は 8 でした。カラメル様の香りをもつこの化合物は、サンプル 2 および 3 では比較的低かったものの、サンプル 1 では非常に高い濃度で検出されました。

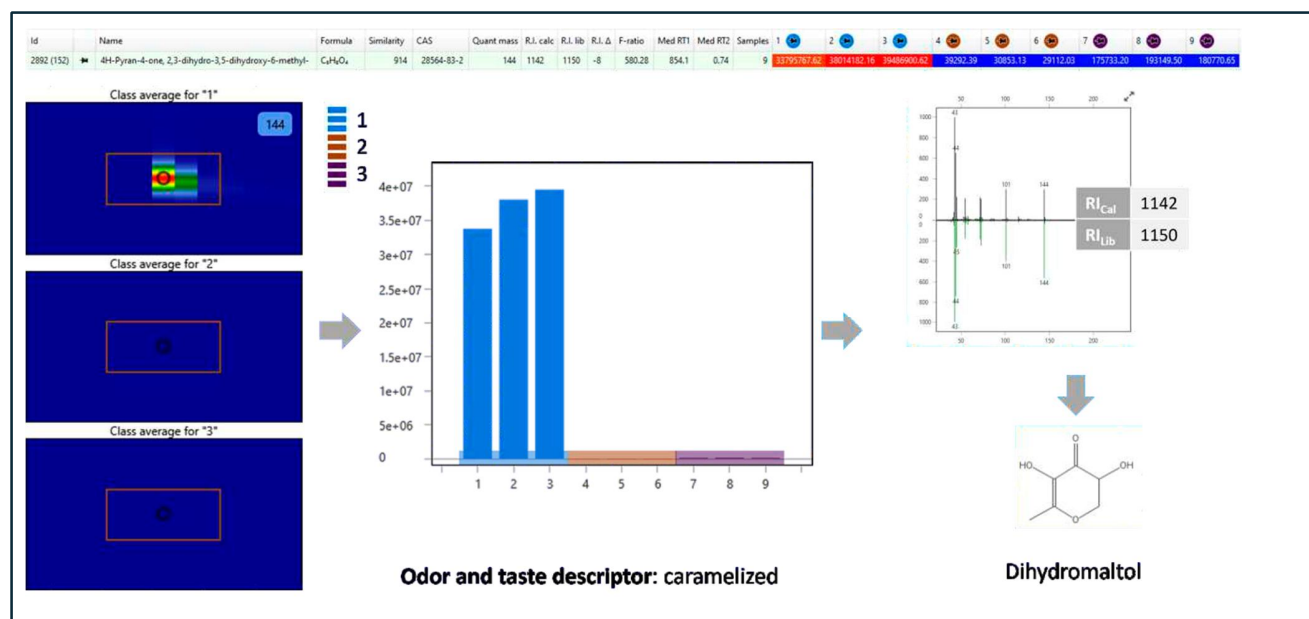


Figure 6: ジヒドロマルトール (CAS: 28564-83-2, RIΔ=8) の平均等高線図 (m/z = 144)、スペクトル比較、棒グラフ。

ブンパーニッケルパンの化学組成と香気プロファイルの類似点と差異を理解することは、消費者により好まれる官能特性をもった食品の製造に役立つことでしょう。

Conclusion

本研究では、GC×GC-TOFMS と *ChromaTOF Tile* を組み合わせ、異なるレシピのブンパーニッケルパンの香気プロファイル解析しました。LECO Pegasus BT4D GC×GC-TOFMS を中心としたワークフローにより、非常に豊富で高品質なデータが得られました。

ChromaTOF Tile は、異なるサンプル群を比較するノンターゲット解析に特に有用であり、質量スペクトルマッチングおよび RI 計算を組み合わせることで化合物の同定を強力に支援します。メチオナル、2-ペンチルフラン、ジヒドロマルトールといった差異化合物の分布は、棒グラフなどの可視化を用いて容易に確認できます。

このワークフローにより、香気プロファイルの把握や個々の化合物トレンド、さらにはサンプルセット全体の傾向を効率的に評価することが可能になりました。特に、メイラード反応で生成する揮発性化合物について理解を深めることは、特定の香気特性を持つ食品の創出や改良に大きく貢献すると期待されます。

Authors

This application was developed in collaboration by LECO Europe EATC, Germany and The Faculty of Food Science & Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland (Prof. M. A. Majcher).

References

^[1] M. A. Majcher et al., Formation of Key Aroma Compounds during Preparation of Pumpernickel Bread. J. Agric. Food Chem. 2020, 68, 38, 10352–10360.

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 Certified | LECO is a registered trademark of LECO Corporation.
Pegasus, ChromaTOF, Quadlet, Tile are trademarks of LECO Corporation.

