

Instrument: Pegasus® BT 4D

ChromaTOF® Tile™を用いた通常シロップと樽熟成メープルシロップの差異解析

Key Words: GCxGC, TOFMS, Differential Analysis, ChromaTOF Tile, Fisher Ratio, Class Comparison, Syrup, Barrel-Aging

Introduction

バーボン樽熟成は、幅広い食品・飲料市場で広がっているトレンドです。このプロセスでは、かつてバーボンの熟成に使用された焦がしオーク樽を、通常数か月間かけて別の食品や飲料の熟成に再利用します。この過程で、食品や飲料はオーク樽や樽内に残存するバーボンの風味を吸収し、また食品や飲料本来の成分が樽に移行したり、時間とともに化学反応を起こしたりすることがあります。このプロセスは、風味の複雑性や製品価値の向上に寄与し、ビール、リキュール、ワイン、ソース、シロップ、コーヒー、紅茶などで活用されています。本応用ノートでは、バーボン樽熟成を施したメープルシロップと、そうでないメープルシロップの間ににおける特定の化学的差異を解析します。

この分析目的を達成するため、試料中の化学成分は二次元ガスクロマトグラフィー (GCxGC) によって分離されました。GCxGCは、相補的な固定相を持つ2本のカラムを組み合わせることで、単一の固定相による一次元分離と比較してピーク容量を増加させ、複雑な試料中の個々の分析対象物をより多くクロマトグラフィー的に分離できます。さらに、この強力な分離手法と飛行時間型質量分析計 (TOFMS) を組み合わせることで、分離された化合物をスペクトルデータベースとの照合により同定できます。GCxGC-TOFMSは豊富なデータを生成し、データ解析ソフトウェアで処理することで有用な情報を抽出し、分析上の課題に答えることが可能です。本例では、ChromaTOF Tile を用いて試料セット間の生データを迅速に比較し、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化学成分（クラス差異特徴量）を特定しました。

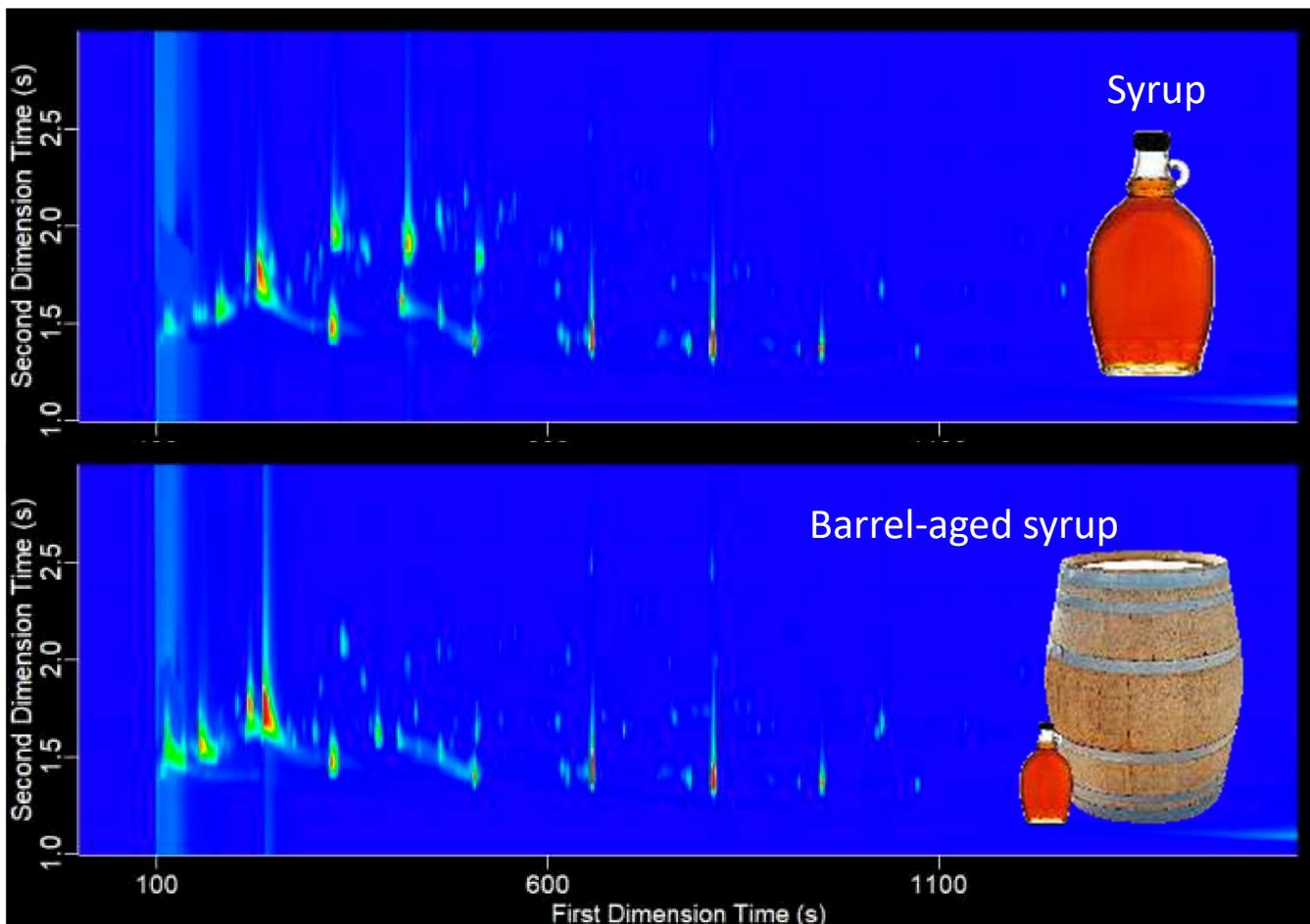


図 1. バーボン樽熟成メープルシロップと通常メープルシロップの代表的クロマトグラム

Experimental

通常およびバーボン樽熟成の2種類のシロップ試料を、HS-SPME および GCxGC-TOFMS で分析しました。試料は蒸留水で約 50%（シロップ 1 g / 水 1 mL）に希釈しました。希釈シロップ 2 mL を 20 mL HS-SPME バイアルに添加し、40 °C で 5 分間インキュベートした後、同温度で三相 SPME ファイバー（PDMS/DVB/Carboxen, Supelco）を用いて 10 分間抽出しました。GCxGC-TOFMS の条件は表 1 に示します。各シロップ試料は 4 回反復でデータ取得を行い、SPME ファイバーは注入間に 250 °C で 5 分間コンディショニングしました。また、保持指数（RI）計算のため、アルカン標準品のデータも同条件で取得しました。試料の取得は LECO 社 ChromaTOF ソフトウェアで自動制御し、クラス差異特徴量の同定・解析は ChromaTOF Tile で実施しました。

表 1. GCxGC-TOFMS (Pegasus® BT 4D) 条件

Auto Sampler	LECO L-PAL 3 Autosampler
注入	GC 入口で 2 分間脱着、スプリットレス
Gas Chromatograph	LECO GCxGC QuadJet™ Thermal Modulator
注入口温度	250 °C
キャリアガス	He @ 1.4 mL/min (補正済み定流量)
カラム	HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm coating Rx-17SiIMS, 0.45 m x 0.25 mm x 0.25 μm coating
温度プログラム	初期保持 2 分 40 °C, 10 °C/min で 280 °C まで上昇 二次オーブン: 一次オーブン+20 °C
モジュレーション	2 s (二次オーブン+15 °C で温度維持)
ransfer Line	300 °C
Mass Spectrometer	LECO Pegasus BT
イオン源温度	250 °C
質量範囲	35-550 m/z
取得速度	200 spectra/s

Results and Discussion

代表的な等高線図として、通常シロップとバーボン樽熟成シロップのものを図 1 に示します。両サンプルには類似点もあれば明確な相違点も存在します。本分析の主目的は、樽熟成プロセスに関連する可能性のある化学的差異を特定し理解することです。これらの差異の一部は全イオンクロマトグラム (TIC) 上でも確認可能であり、クロマトグラムを目視比較することで把握できる場合があります。しかし、他の差異は比較ソフトウェアを用いなければ把握が困難な場合があります。低濃度の成分は TIC 上では視認できず、共溶出やサンプルの複雑性により他の特徴が隠れてしまうこともあります。LECO の ChromaTOF Tile は、クロマトグラム上の保持時間領域や特定の m/z を迅速に抽出し、統計的に有意なサンプル間差異を特定することで、これらの差異を明らかにする支援を行います。この比較は生データの各 m/z に対して行われるため、目視では把握しにくい特徴も明らかになり、サンプル群の理解と差異解析の精度が向上します。

シロップ間の最も顕著な差異の一つはピラジンであり、図 2 に示しています。ピラジンは通常シロップ（サンプル 5-8、濃い茶色のバー）のみで観察され、樽熟成シロップ（サンプル 1-4、薄茶色のバー）では検出されませんでした。ChromaTOF Tile は、この特徴が現れるデータ上の位置を特定し、スペクトル情報と保持時間情報に基づく仮同定を行いました。観測されたスペクトルデータは上部に、ライプラリマッチ（類似度スコア 904）は図 2 左パネル下部に逆向きで示されています。また、保持指数 (RI) 情報でも支持されており、観測 RI 値 745 はライプラリ RI 値 736 と一致しています。ピラジンは「ナツツ様」香気として表現され、この差異は香りプロファイル上でも重要であると考えられます。

ChromaTOF Tile は、サンプル間のこの重要な差異を明らかにする上で不可欠でした。図 3 に示す TIC の確認では、目視による比較のみではピラジンの特定が困難であった可能性が示唆されます。図 3 左パネルでは、樽熟成シロップの平均 TIC (上) と通常シロップの平均 TIC (下) を比較しています。黒丸マーカーはピラジンの保持時間を示していますが、TIC 上では明確な差は必ずしも認識できません。TIC で際立つのは、実際には樽熟成シロップで高濃度の別の特徴です。この特徴は TIC 上でピラジンを隠しており、m/z 55 の抽出イオンクロマトグラム (XIC、右パネル) でも確認できます。一方、ピラジンは TIC 上では明瞭ではないものの、m/z 80 の XIC (中パネル) で観察可能です。この 2 つ目の差異は TIC 上でも認識できる可能性がありますが、ChromaTOF Tile による全 m/z の探索により、両方のクラス識別特徴が特定されました。

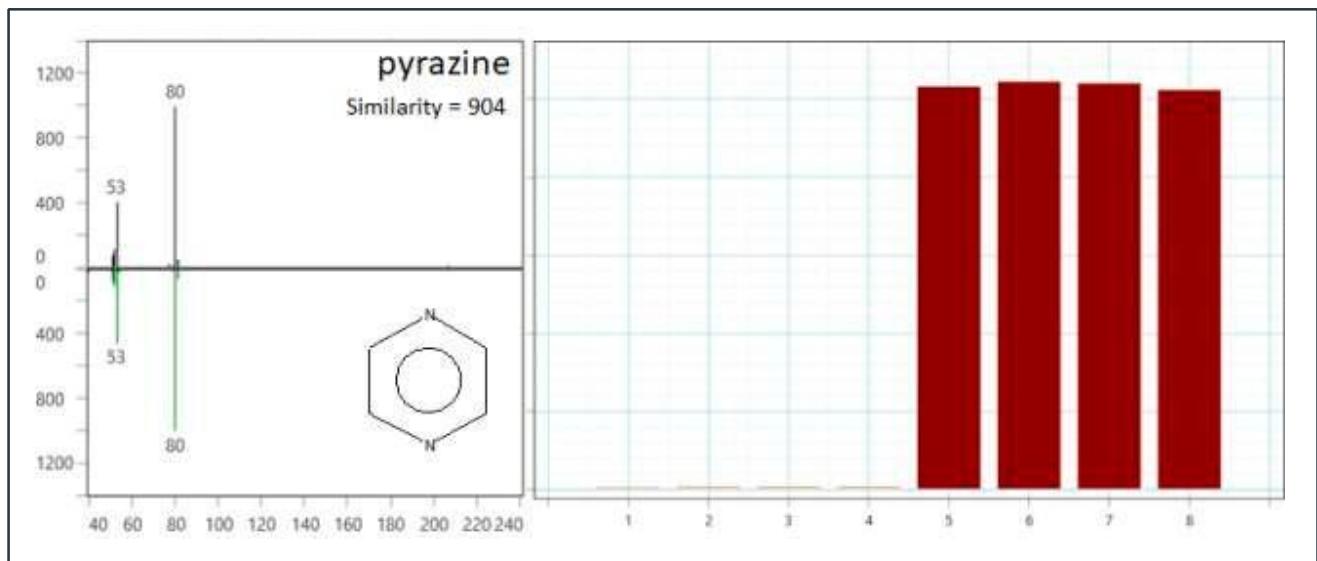


図 2. ChromaTOF Tile によりクラス識別特徴としてピラジンを特定。スペクトルおよび RI マッチングにより同定され、通常シロップ（サンプル 5-8、濃茶色）で高濃度で観測される。

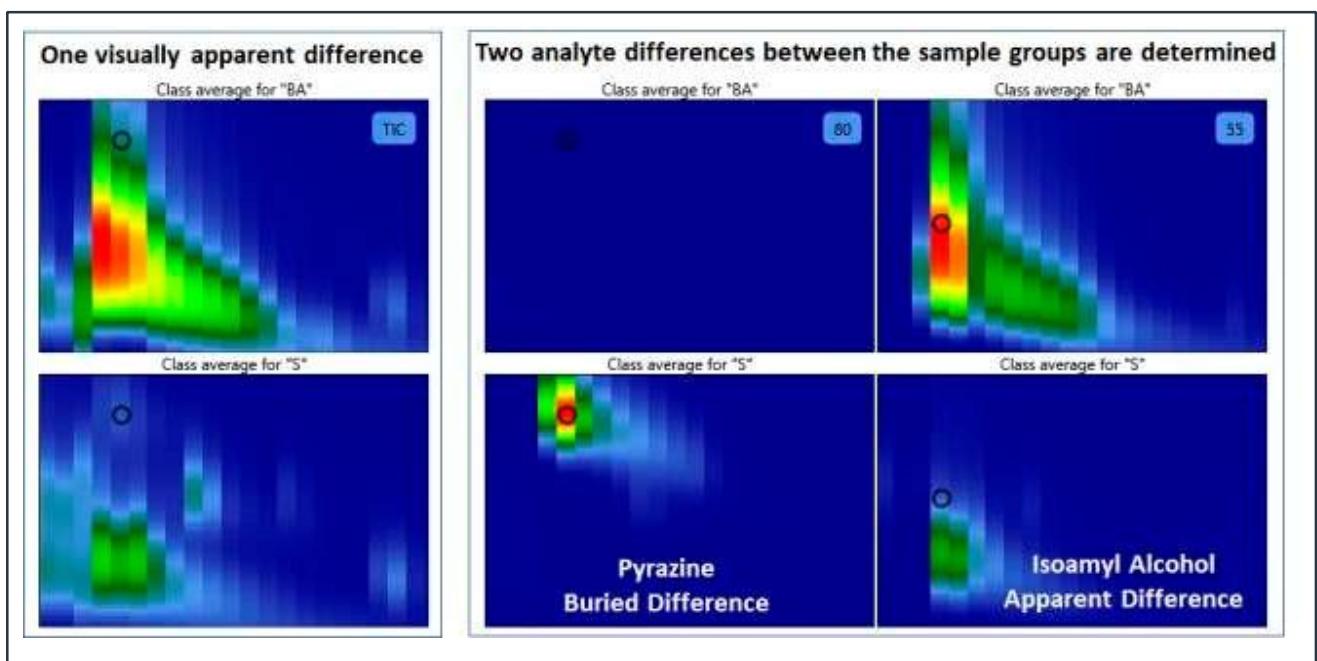


図 3. ピラジン周辺のクロマトグラム。樽熟成シロップ（上）と通常シロップ（下）の TIC（左）、m/z 80（中）、m/z 55（右）を示す。

図 3 に示す 2 つ目の特徴は図 4 に示されたイソアミルアルコールであり、樽熟成シロップ（サンプル 1-4、薄茶色）で通常シロップ（サンプル 5-8、濃茶色）より高濃度で観察されました。ChromaTOF Tile により、この差異はスペクトルおよび保持時間情報に基づき同定されました。観測スペクトルは上部に、ライブラリマッチ（類似度スコア 917）は下部に逆向きで示されています。保持指標も観測 RI 値 742 とライブラリ RI 値 736 の比較で支持されます。イソアミルアルコールは「発酵」および「ウイスキー様」の香気として表現され、樽熟成サンプルでの高濃度は香りプロファイル上の差異に関連します。

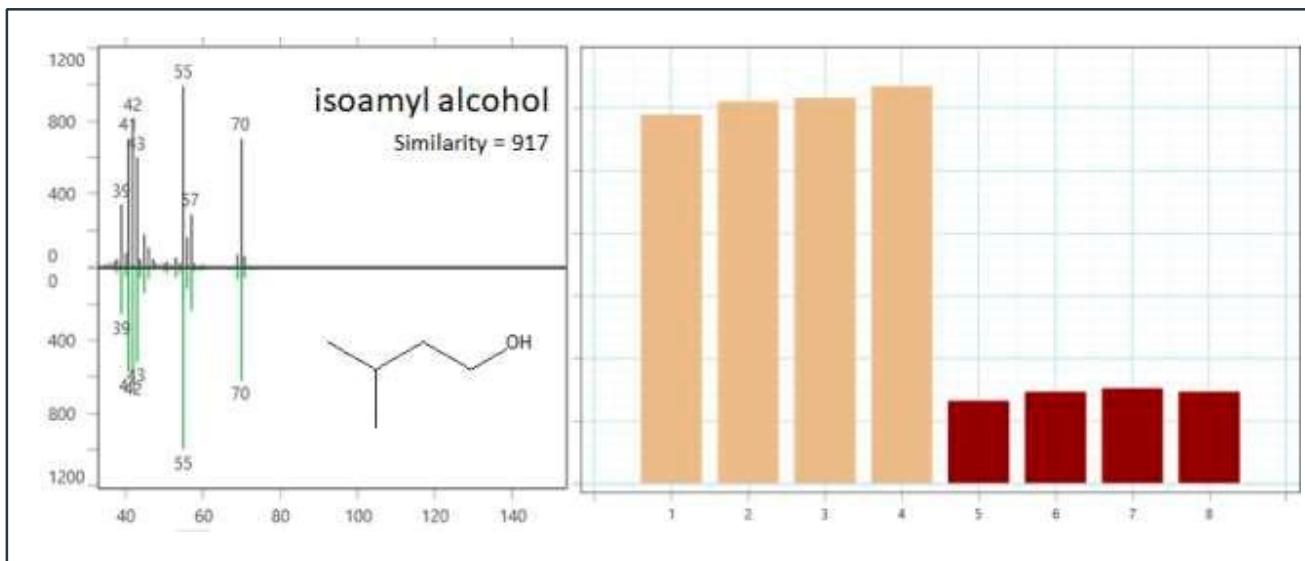


図 4. ChromaTOF Tile によりクラス識別特徴としてイソアミルアルコールを特定。スペクトルおよび RI マッチングにより同定され、樽熟成シロップで高濃度で観察される。

図 2-4 に示した 2 つの特徴に加え、ChromaTOF Tile はクロマトグラム上の多数のその他の特徴に関する情報も提供し、サンプル間の違いを明らかにしました。これらの特徴のサンプル間相対傾向および仮同定はソフトウェアにより解析され、最終的に PCA（主成分分析）でまとめられました。サンプル間差異を示す 139 の特徴が、類似度スコアと RI マッチング（利用可能な場合）に基づき変数として PCA に入力されました。グループ間を識別する化学的特徴のみを選定したため、スコアプロットは図 5 に示すように明確なクラスターを示します。実際、ほぼ全ての変動は第 1 主成分 (PC1) で説明されています。

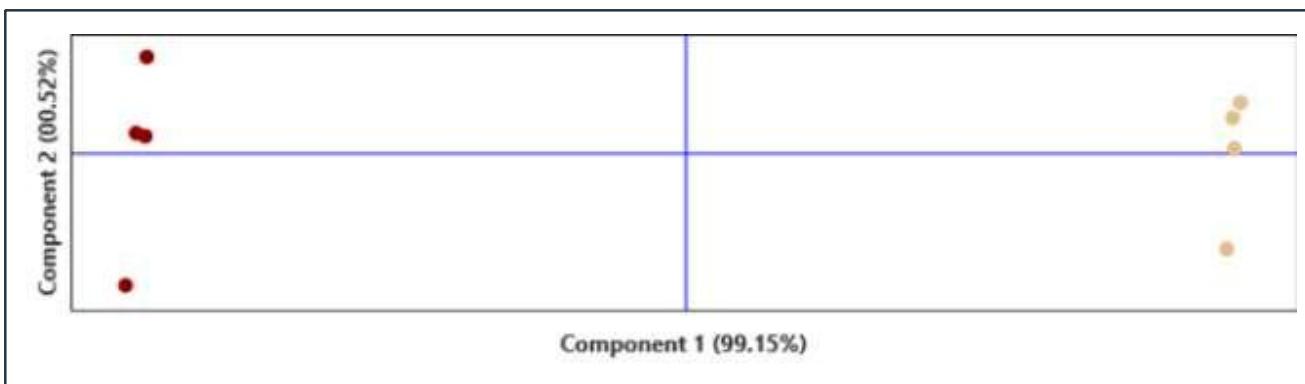


図 5. PCA スコアプロット。樽熟成シロップ（薄茶色）と通常シロップ（濃茶色）の明確なクラスターを示す。

一方、ローディング解析（図 6）は化学変化の傾向（樽熟成で高い、通常シロップで高い）を理解する上で有用です。樽熟成シロップは PC1 で正のスコアを示し、PC1 で正のローディングを持つ特徴は樽熟成シロップで高濃度です。通常シロップは PC1 で負のスコアを示し、負のローディングを持つ特徴は通常シロップで高濃度です。化合物クラス別に色分けすると、傾向（増加または減少）は機能基ごとに一貫しており、アルコール、エステル、アルカンは樽熟成シロップで高濃度、窒素含有環（ピラジン、ピリジン）、硫黄化合物、アルデヒド、ケトンは通常シロップで高濃度です。酸素含有環（フラン、置換フラン）は各分析対象ごとに樽熟成シロップで高低が異なります。

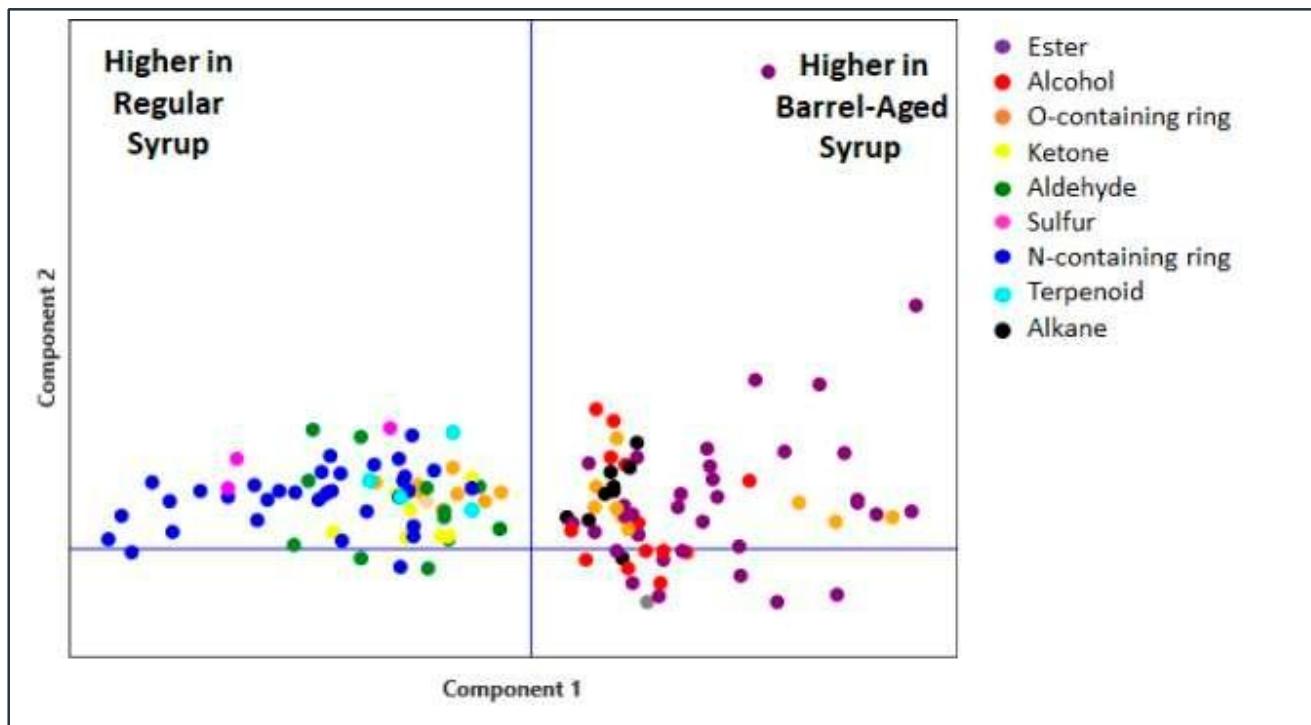


図 6. PCA ローディング。化合物クラスごとに、樽熟成シロップと通常シロップで傾向（増減）が異なる。

この化合物クラスごとの傾向によるサンプル特性化は、シロップ間の差異を理解する上で有用です。各化合物クラス内の個別分析対象に関する情報も入手可能であり、代表的な例を図 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 ₆ H ₁₂ O ₂	916	105-54-4	88	811	802	9	302.0	1.61	4	13	21	26	10	14	38	19
Isobutyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₂	913	110-19-0	73	783	772	11	274.0	1.59	7	13	10	24	17	10	10	11
Isoamyl alcohol	C ₆ H ₁₂ O	917	123-51-3	55	742	736	6	236.0	1.79	16	34	10	15	4	15	19	17
Isobutyl alcohol	C ₆ H ₁₂ O	924	78-83-1	74	639	624	15	160.0	1.59	16	31	36	26	76	16	19	36
1-Butanol, 2-methyl-	C ₆ H ₁₂ O	932	137-32-6	57	747	739	8	240.0	1.79	31	33	25	32	15	17	13	13
2-Acetyl-5-methylfuran	C ₆ H ₈ O ₂	839	1193-79-9	109	1023	1039	-16	524.0	1.94	10	19	37	36	30	11	34	13
Furfural	C ₅ H ₈ O ₂	919	98-01-1	96	843	833	10	338.0	0.10	21	24	13	19	31	13	31	13
2-Cyclopenten-1-one	C ₅ H ₈ O	845	930-30-3	82	845	832	13	340.0	0.16	17	11	17	36	31	14	36	15
Cyclopentanone	C ₅ H ₈ O	901	120-92-3	55	802	791	11	292.0	1.82	11	16	32	32	36	12	15	15
Butanal, 3-methyl-	C ₆ H ₁₂ O	917	590-86-3	44	666	652	14	176.0	1.58	15	34	23	36	34	15	36	37
Butanal, 2-methyl-	C ₆ H ₁₂ O	865	96-17-3	57	676	662	14	182.0	1.59	12	17	13	13	36	13	34	17
Disulfide, dimethyl	C ₆ H ₈ S ₂	923	624-92-0	94	753	746	7	246.0	1.80	15	10	36	13	42	11	21	29
Dimethyl trisulfide	C ₆ H ₈ S ₃	897	3658-80-8	126	981	971	10	482.0	1.95	10	32	27	36	32	16		
Pyrazine	C ₆ H ₅ N ₂	904	290-37-9	80	745	736	9	238.0	1.93	13	34	34	32	14	15	36	16
Pyrazine, methyl-	C ₆ H ₆ N ₂	933	109-08-0	94	832	829	3	324.0	1.97	11	34	16	30	37	13	27	16

図 7. 代表的化合物クラスの分析対象に関するピーク同定指標（類似度スコア、RI 情報）および相対傾向（ヒートマップ、樽熟成シロップ：列 1-4、通常シロップ：列 5-8）。

ChromaTOF Tile により促進されたこのワークフローは、両タイプのシロップ間の化学的差異を迅速に明らかにし、特定化学成分の同定と傾向解析を行い、樽熟成に関連する可能性のある機能基ごとの傾向も明らかにしました。

Conclusion

本アプリケーションノートでは、GCxGC-TOFMS が複雑なシロップ試料を分離し、個々の分析対象化合物を分離する上で有効であることを示しました。ChromaTOF Tileはサンプルクラス比較を容易にし、通常シロップと樽熟成シロップを区別する特徴を迅速に特定しました。特徴の同定と傾向解析により、化合物クラスに関連する一貫した変化が明らかになりました。これらのツールの組み合わせにより、ノンターゲットの差異解析を効率的に実施し、サンプルに関する理解を深めることができます。



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* is a registered trademark of LECO Corporation.
Pegasus, ChromaTOF, QuadJet, Tile are trademarks of LECO Corporation.