

Application Note



EMPOWERING RESULTS

Instrument: Pegasus[®] BTX 4D and ChromaTOF[®] Sync 2D

GC × GC および ChromaTOF Sync 2D を用いた食品の劣化プロセスにおける化合物プロファイルの追跡

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

Key Words: Tomato, Food Spoilage, Microbial Activity, Time Course, Process Monitoring, Solid Phase Microextraction, SPME, GC, GCxGC, MS, TOFMS, Retention Index, RI, Deconvolution, Peak Finding, Alignment, ChromaTOF Sync 2D, PCA



Introduction

サンプルの化学情報を理解し、そのプロセス中や時間経過による変化を把握することは、多くの状況で重要です。この情報はシステムの挙動を洞察するのに役立ち、化学反応やプロセスの速度論の把握、目標状態の達成確認、システムの逸脱検知、パラメータ変動がプロセスに与える影響の評価など、さまざまな分析目的に応用できます。こうした詳細な解析は、システムの最適化や理解に重要な役割を果たします。

本研究では、トマトの劣化を追跡することで食品の腐敗プロセスを探査しました。トマトを例に取っていますが、食品劣化の理解は、食品の品質・安全性への影響や経済的損失の観点から非常に重要です。このようなプロセスを十分に理解するまでは、化合物プロファイルの評価や変化の解析は一般的にノンターゲットの探索型タスクとして実施されます。食品腐敗では、多くの変化が揮発性および半揮発性成分に反映され、サンプルの香気プロファイルや微生物活動の化学マーカーの形成も観察されます。

揮発性および半揮発性成分のノンターゲット解析には、GC（ガスクロマトグラフィー）と TOFMS（飛行時間型質量分析）が確立された手法であり、この種の解析に適しています。GCにより個々の分析成分を分離し、TOFMSにより分離成分の同定を行います。さらに、分析分離を二次元に拡張した包括的二次元ガスクロマトグラフィー（GCxGC）を使用することで、ピーク容量が向上し、複雑なサンプル中のより多くの成分を明確に検出可能です。しかし、得られた豊富なデータを解釈する際には、複数サンプル間での分析成分情報をリンクさせ、傾向やパターンを把握することが課題となります。このため、複数の GCxGC サンプルを比較できるソフトウェアツールも有用です。

LECO 社の ChromaTOF Sync 2D は、こうしたデータセットを扱うための高度なデータ処理機能を提供します。本ソフトウェアは、複数の GCxGC サンプル情報を統合して単一のピークテーブルを作成し、ピーク検出とデコンボリューションを自動で行うことで、非ターゲット解析および比較を容易にします。これにより、サンプルセット全体で分析成分を比較し、類似点・相違点・傾向を効果的に把握できます。GCxGC-TOFMS と ChromaTOF Sync 2D の組み合わせにより、トマトサンプルに関する有用な情報が明らかになりました。本事例ではトマトの腐敗モニタリングに応用していますが、多くの他のプロセスにも広く応用可能です。



図 1. 腐敗プロセスにおけるトマトサンプルの比較に、Pegasus BTX と ChromaTOF Sync 2D が使用された

Experimental

新鮮なガーデントマトをピューレ状にし、室温で 1 週間放置して自然腐敗させました。トマトサンプルはピューレ直後から毎日分析しました。各日、3 g のトマトを 20 mL の SPME バイアルに分注して三重サンプルを準備しました。バイアルは HS-SPME により分析され、40 °C で 2 分間インキュベート後、三相ファイバー (PDMS、DVB、C-WR) で同温度下 5 分間抽出しました。

サンプルは、表 1 に示す条件で LECO Pegasus BTX 4D を用いた GCxGC-TOFMS で分析しました。保持指數 (RI) 算出のため、同条件下でアルカン標準も分析しました。

Table 1. Instrument (Pegasus BTX 4D) Conditions

Auto Sampler	LECO L-PAL 3 Autosampler
注入	GC 注入口にて 2 分間脱着、スプリット比 10:1
Gas Chromatograph	LECO QuadJet™ GCxGC
注入口	250 ° C
キャリアガス	He 1.4 mL/min
カラム	Rxi-5ms, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm coating Rxi-17Sil MS, 0.6 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm coating
温度プログラム	40 °C (2 分保持) → 6 °C/min で 200 °Cまで → 24 °C/min で 250 °Cまで 二次オーブン +10 °C
モジュレーション	Quad jet thermal modulator, 2.5 s
ransfer Line	250 ° C
Mass Spectrometer	LECO Pegasus BT
イオン源温度	250 ° C
質量範囲	35-500 m/z
取得速度	10 spectra/s (GC) and 100 spectra/s (GCxGC)

Results and Discussion

トマトの腐敗過程をカバーする時間経過サンプルは、Pegasus BTX 4D と ChromaTOF Sync 2D を用いて分析されました。この GCxGC-TOFMS と非ターゲットピーク検出・整列ソフトウェアの組み合わせにより、サンプルセットの探索を効率的に行うワークフローが実現しました。GCxGC-TOFMS は、二次元クロマトグラフィーによる分離能力と全質量範囲での MS 検出を組み合わせることで、複雑サンプルから豊富な化学情報を提供します。特に BTX TOFMS は高感度を有し、低濃度成分の検出も可能です。これにより、複雑なサンプル中でより多くの個別成分の分離・検出が可能となります。ChromaTOF Sync 2D は、非ターゲットピーク検出とデコンボリューションを組み合わせて、サンプルセット全体の化学情報を効率的に処理・整列・集約し、最も有用な情報へ迅速にアクセスできます。GCxGC はサンプルの複雑性を、ChromaTOF Sync 2D はデータの複雑性を扱う役割を果たします。代表的なトマトサンプルの GC および GCxGC クロマトグラムを図 2 に示します。

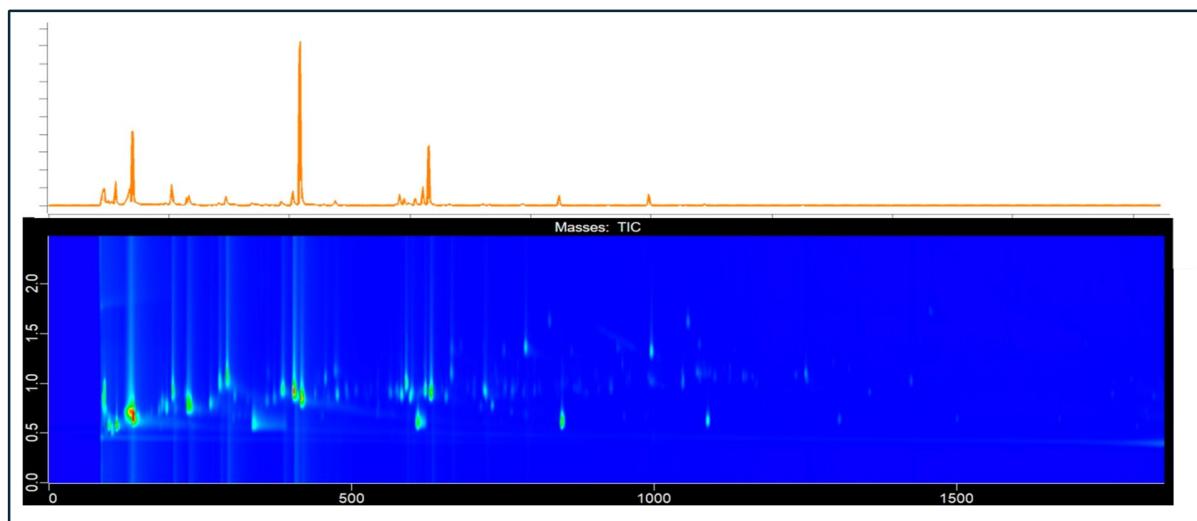


図 2. トマトサンプル (6 日目) の代表的 GC および GCxGC クロマトグラム。

このサンプルの複雑さは明らかであり、GCxGC-TOFMS の利用はピークキャパシティを増加させ、より多くの化学情報の取得に寄与しました。例えば、図 2 の等高線プロットで縦方向に揃ったピークは、従来 GC では共溶出する成分ペアの例であり、GCxGC の追加分離次元によって分離されます。

一部の共溶出ペアは GC データでデコンボリューションにより分離可能でした。例として、3-メチル酪酸と 2-メチルチオエタノールを図 3 に示します。このペアは GC データでデコンボリューションされ、GCxGC の二次元でクロマトグラフィー的に分離されました。ライブラリとのスペクトルおよび RI 一致により、両成分は GC または GCxGC のいずれでも信頼性高く同定されました。

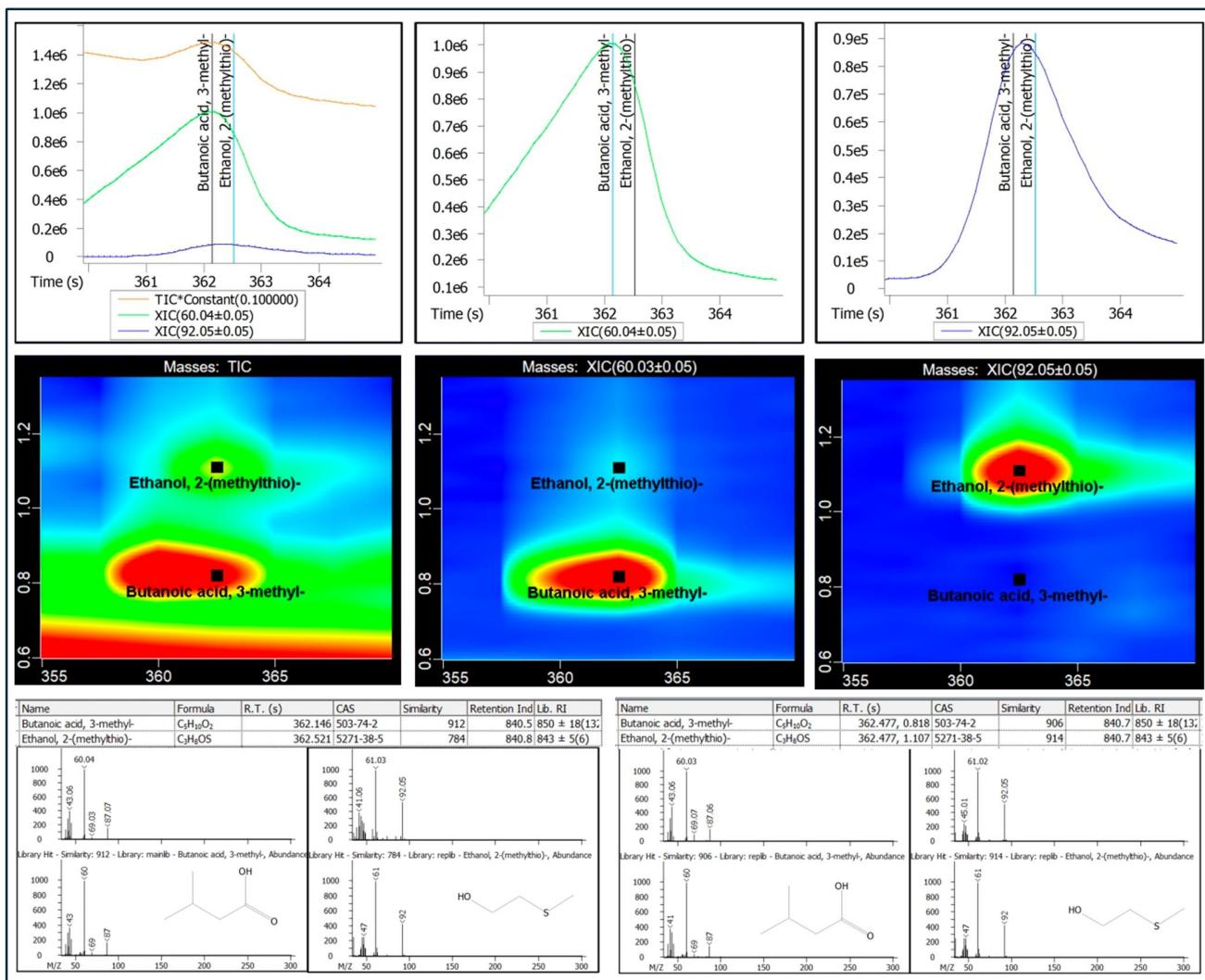


図 3. 共溶出ペアの GC でのデコンボリューション結果と、GCxGC によるクロマトグラフィー的分離結果を示す。GC データ（左下）および GCxGC データ（右下）のピークテーブルとスペクトル情報が比較可能。

しかし、他の共溶出ペアは GC データのデコンボリューション能力を超えており、GCxGC なしでは特定が困難でした。例えば、ベンズアルデヒドと 1-エチル-4-メチルベンゼン（図 4）では、GC では完全重なりにより単一ピークとして扱われましたが、GCxGC により二次元で分離され、それぞれ独立したピークマーカーとして認識されました。これにより、ベンズアルデヒドの類似度スコアが向上し、1-エチル-4-メチルベンゼンの情報も取得可能となり、サンプル中の成分検出範囲が向上しました。

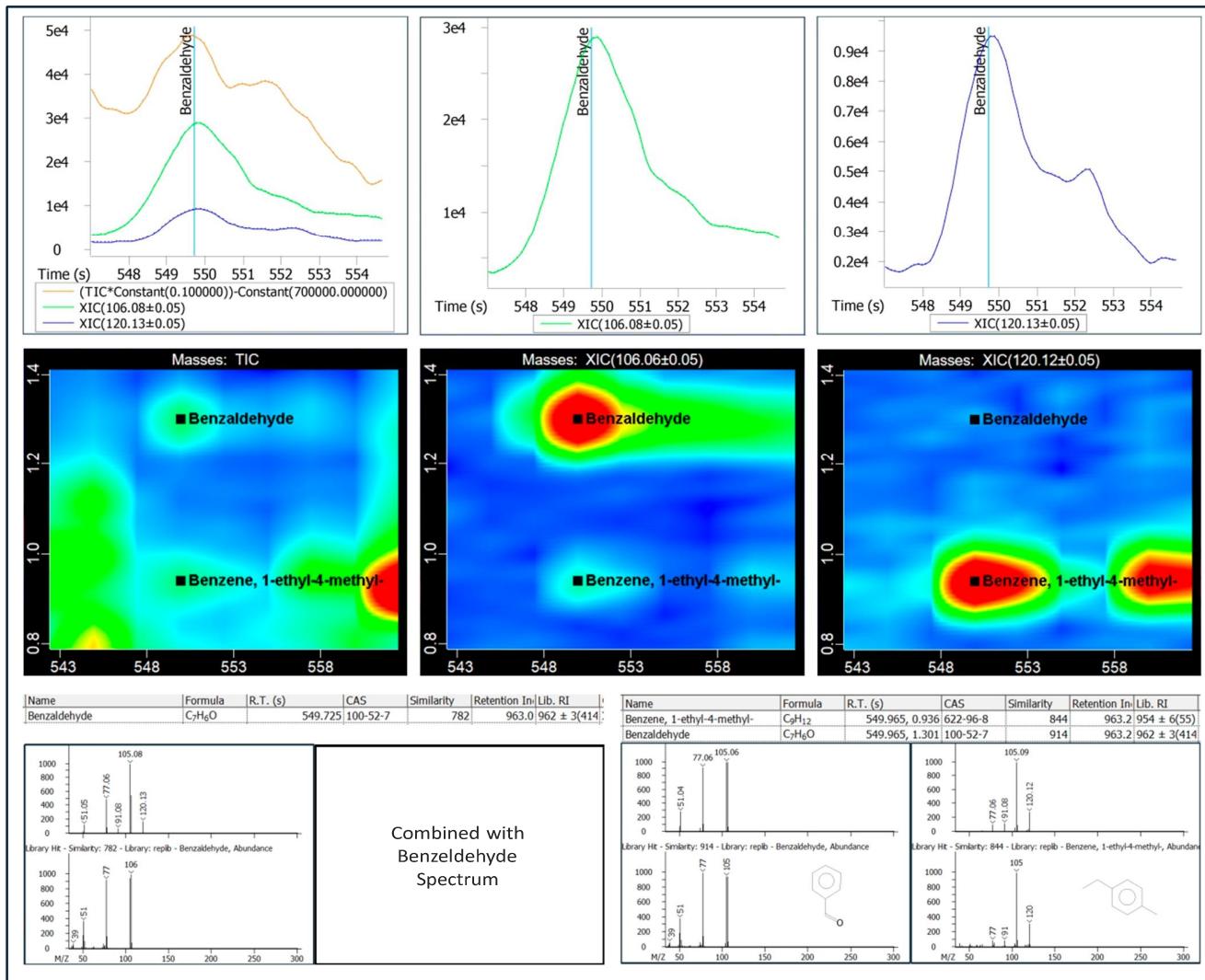


図 4. 共溶出ペアの GC でのデコンボリューション結果と、GCxGC によるクロマトグラフィー的分離結果を示す。GC データ（左下）および GCxGC データ（右下）のピークテーブルとスペクトル情報が比較可能。

本プロジェクトはノンターゲット探索型であるため、GCxGC による化学成分検出範囲の向上は理想的であり、重要成分の見落としリスクを低減します。

図 5 には腐敗過程における各時間点の代表的 GCxGC 等高線プロットを示しています。クロマトグラムを比較すると、サンプルが非常に複雑であり、腐敗過程で多くの変化が生じたことが分かります。各時点のサンプルは独立でも解析が難しく、全データをまとめて解析することはさらに挑戦的です。しかし、ChromaTOF Sync 2D を用いることで、全サンプルの個別成分情報を統合し、全サンプルを対象とした単一のピークテーブルを作成し、各ピークの面積を表形式で確認できます。

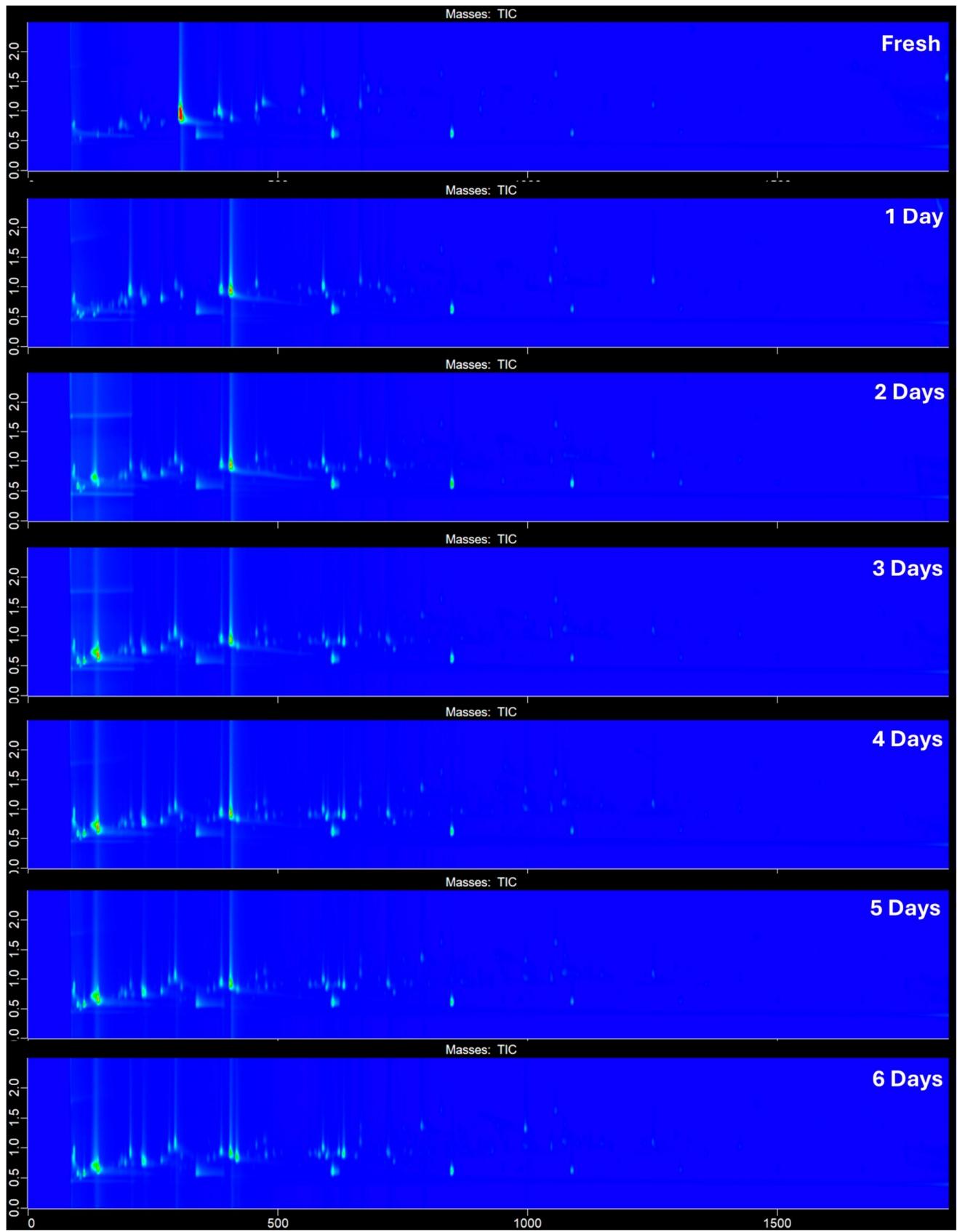


図 5. 腐敗過程における各時間点のトマトサンプルの代表的等高線プロット

表2は代表的成分を抜粋したピークテーブルの一部です。本ソフトウェアはデコンボリューションを組み込み、スペクトル情報およびRI情報を活用して成分同定を行います。表2の成分は全て、スペクトル類似度700以上およびRI一致により信頼性高く同定されており、300以上の成分がこの条件を満たしました。全サンプルのピーク面積は一定の定量質量で計算され、ヒートマップとして表示されています。最後の21列は7日間の各時間点で3回ずつ測定したサンプルを示しており、色の変化により成分の増減傾向を直感的に把握可能です。赤から青は減少、青から赤は増加を示します。各成分には香気の説明も追加され、変化の理解を補助します。^[1]

表2. 代表的成分とヒートマップ

ピークテーブルからは、個別の成分をさらに詳細に解析することが可能です。例えば、表 2 の 1 行目に示されるヘキサナーについて、図 6 に詳細情報を示します。ヘキサナーはスペクトル類似度 842 で同定され、デコンボリューション後のスペクトルとライブラリマッチも良好です。観測または計算 RI 値 804 は、ライブラリ値 801 と一致しています。ヒートマップおよびピーク面積の棒グラフでは、新鮮サンプルでは高濃度で存在し、1 日目以降に急速に減少していることが明確です。ヘキサナーの香気は「フレッシュ」「グリーン」であり、この減少はトマトの香り変化の理解に重要です。この傾向は図 5 のクロマトグラムでも確認できます。ChromaTOF Sync 2D により、データが効率的に集約・整理され、観測結果が明確に示されます。

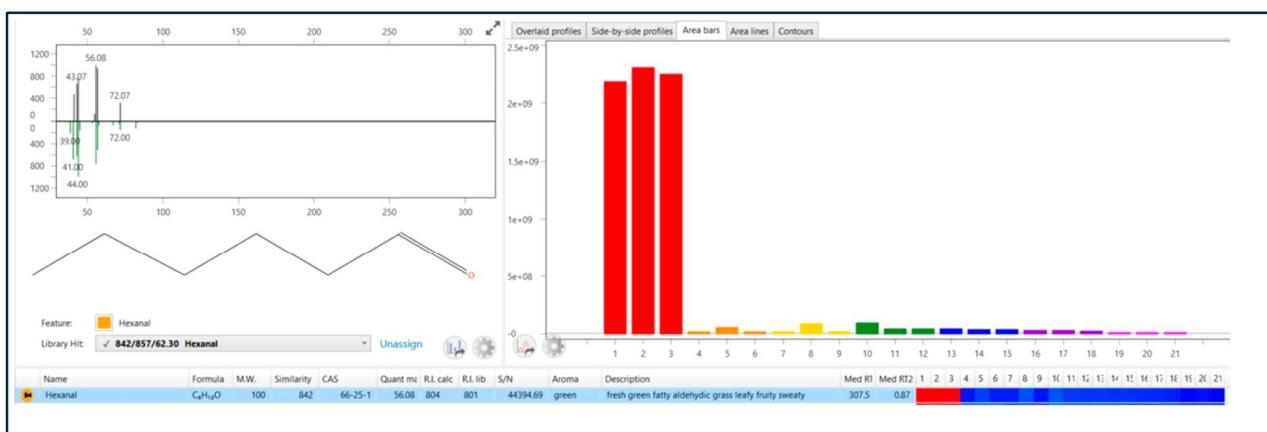


図 6 ヘキサナールは Pegasus BTX 4D および ChromaTOF Sync 2D で同定された。新鮮なサンプル中で高濃度に観察され、その後急速に減少。他の成分もピークテーブルから解析可能で、腐敗過程や香気変化の理解に役立ちます。例えば、図 3 で示された共溶出ペアの 2-(メチルチオ)-エタノール（図 7）および 3-メチル酪酸（図 8）は、1 日目以降に増加傾向を示しました。前者は硫黄系・肉様香、後者はチーズ様・酸味・休皇様香を呈し、腐敗による不快香気の増加に寄与したと考えられます。



図 7 2-(メチルチオ)-エタノールは、Pegasus BTX 4D および ChromaTOF Sync 2D を用いて食品劣化サンプル中で同定された。

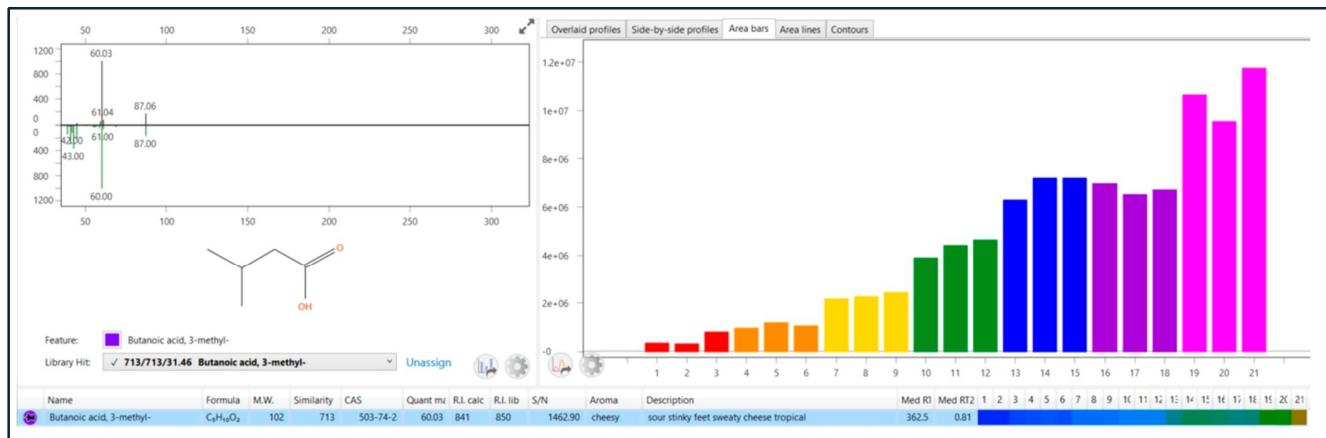


図 8 3-メチルブタン酸は、Pegasus BTX 4D および ChromaTOF Sync 2D を用いて食品劣化サンプル中で同定された。

さらに、微生物活動の指標となる成分も確認されました。エタノール（図 9）は 1 日目以降に、酢酸（図 10）は翌日に検出されています。これらの成分の発現タイミングを特定することで、腐敗過程全体の理解が深まります。



図 9 エタノールは、Pegasus BTX 4D および ChromaTOF Sync 2D を用いて食品劣化サンプル中で同定されました。



図 8 酢酸は、Pegasus BTX 4D および ChromaTOF Sync 2D を用いて食品劣化サンプル中で同定された。

図 5 の等高線プロット、表 2 のヒートマップ、図 6～図 10 の解析結果から、このプロセスは多くの化学的変化を伴う複雑なシステムであることが明らかです。成分によって増減のタイミングや傾向は大きく異なります。初日から急増する成分や、数日後に増加する成分、急激に増えるものや緩やかに増加するものもあり、増加後の動向も一定ではありません。ChromaTOF Sync 2D では、これらの全体的傾向を比較・集約することが可能です。

例えば、図 11 に示す主成分分析 (PCA) では、各サンプルをデータ点として表示し、近接度により化学的類似性が把握できます。新鮮サンプルは PC1 上で後期サンプルから離れており、初日で多くの化学変化が起こったことを示唆します。1～3 日目のサンプルは独立してクラスタリングされ、後半 3 日間は互いに近接しており、時間経過による化学的類似性の増加が示されています。この解析は、プロセスに目標到達点がある場合、変化の収束時期や到達タイミングの推定にも有用です。

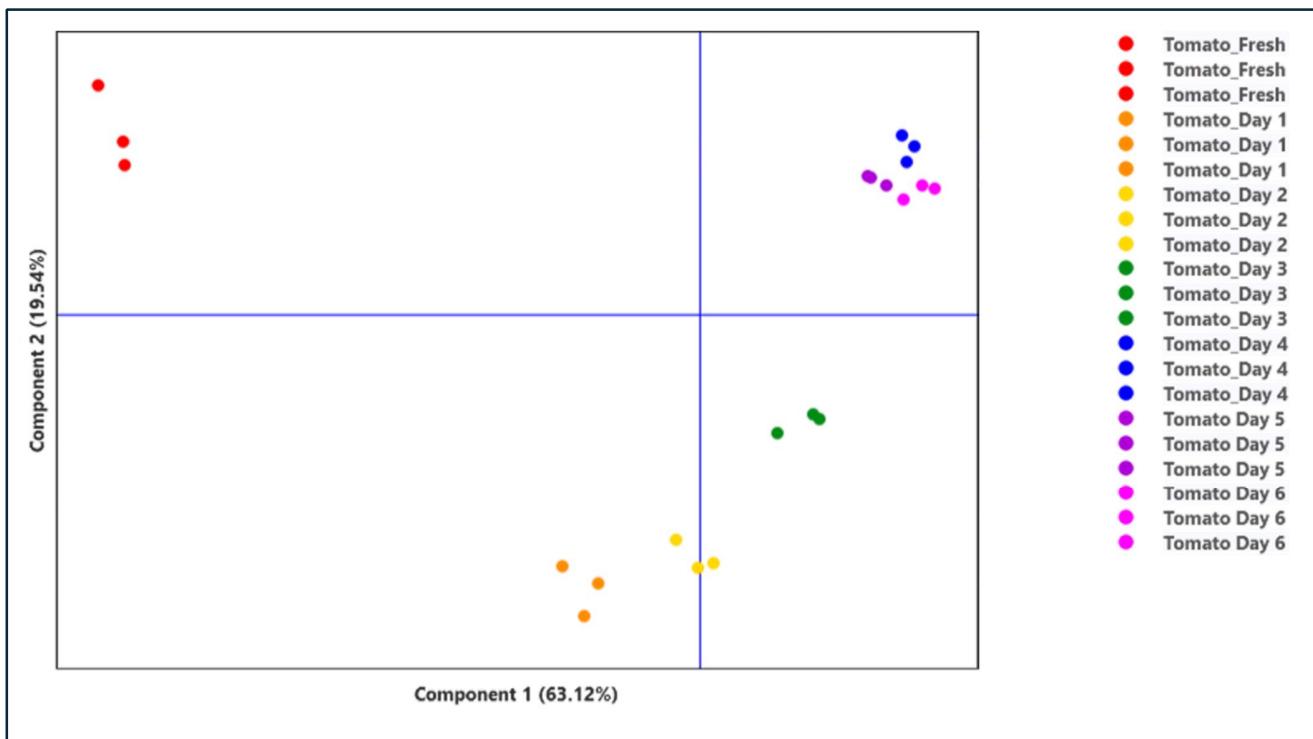


図 11. 腐敗過程を通じたトマトサンプルの PCA スコア

Conclusion

本研究では、LECO 社の GCxGC-TOFMS Pegasus BTX 4D と ChromaTOF Sync 2D を用いて、トマトサンプルの腐敗過程を解析しました。GCxGCにより複雑なサンプル中の成分を効率的に分離でき、Pegasus BTX TOFMSは全 m/z 範囲での高感度検出を提供しました。ChromaTOF Sync 2D により、ノンターゲット解析によるピーク検出・整列が効率化され、全データセットの情報が統合されました。時間経過に伴う多くの成分傾向や違いが明らかになり、これらの分析ツールは効率的なノンターゲット解析に不可欠であることが示されました。PCA などの追加解析により、データ全体の傾向把握も容易になり、ノンターゲット解析の理解と作業効率が向上します。本解析はトマトの腐敗に焦点を当てたものですが、他のプロセスやノンターゲット解析にも広く応用可能です。

References

- [1] Good Scents database, www.thegoodsentscompany.com