

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索しました。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、化合物プロフィー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ィー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。保持指数（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 二次オープン +10 °C
モジュレーション	Quad jet thermal modulator, 2.5 s
トランスファーライン	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、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。

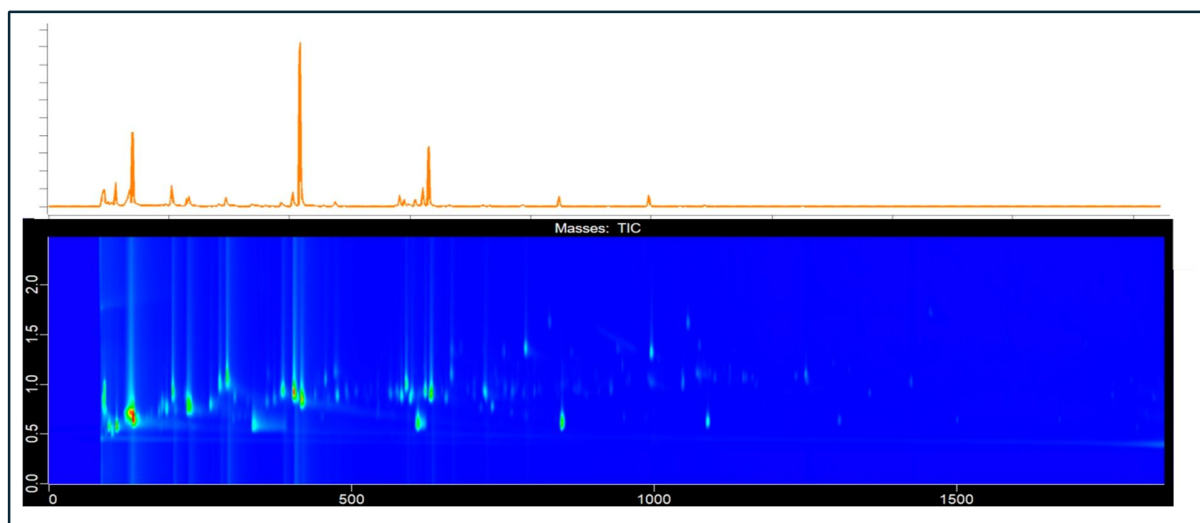


図 2. トマトサンプル（6 日目）の代表的 GC および GCxGC クロマトグラム.

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。

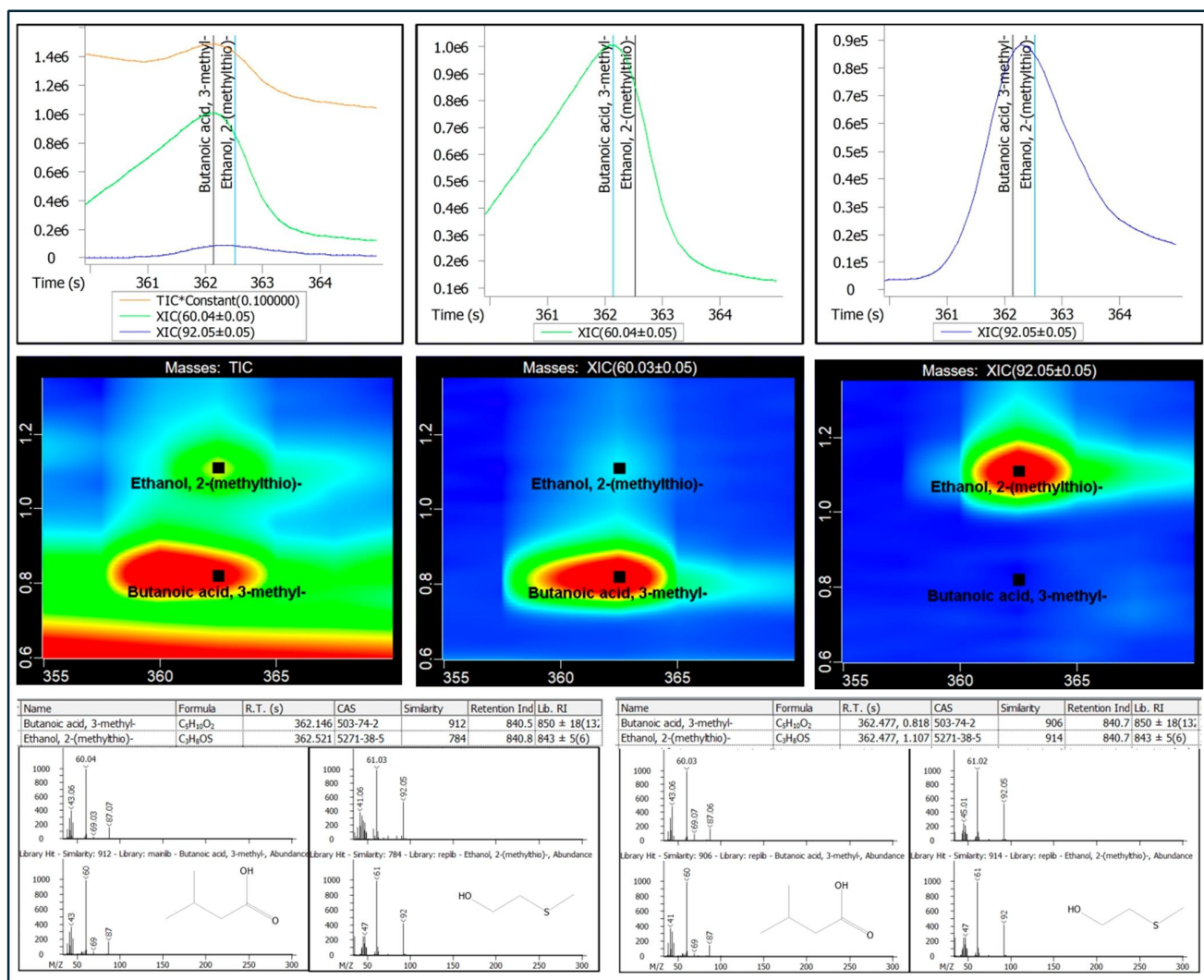


図 3. 共溶出ペアの GC でのデコンボリューション結果と、GCxGC によるクロマトグラフィー的分離結果を示す。GC データ (左下) および GCxGC データ (右下) のピークテーブルとスペクトル情報が比較可能。

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。

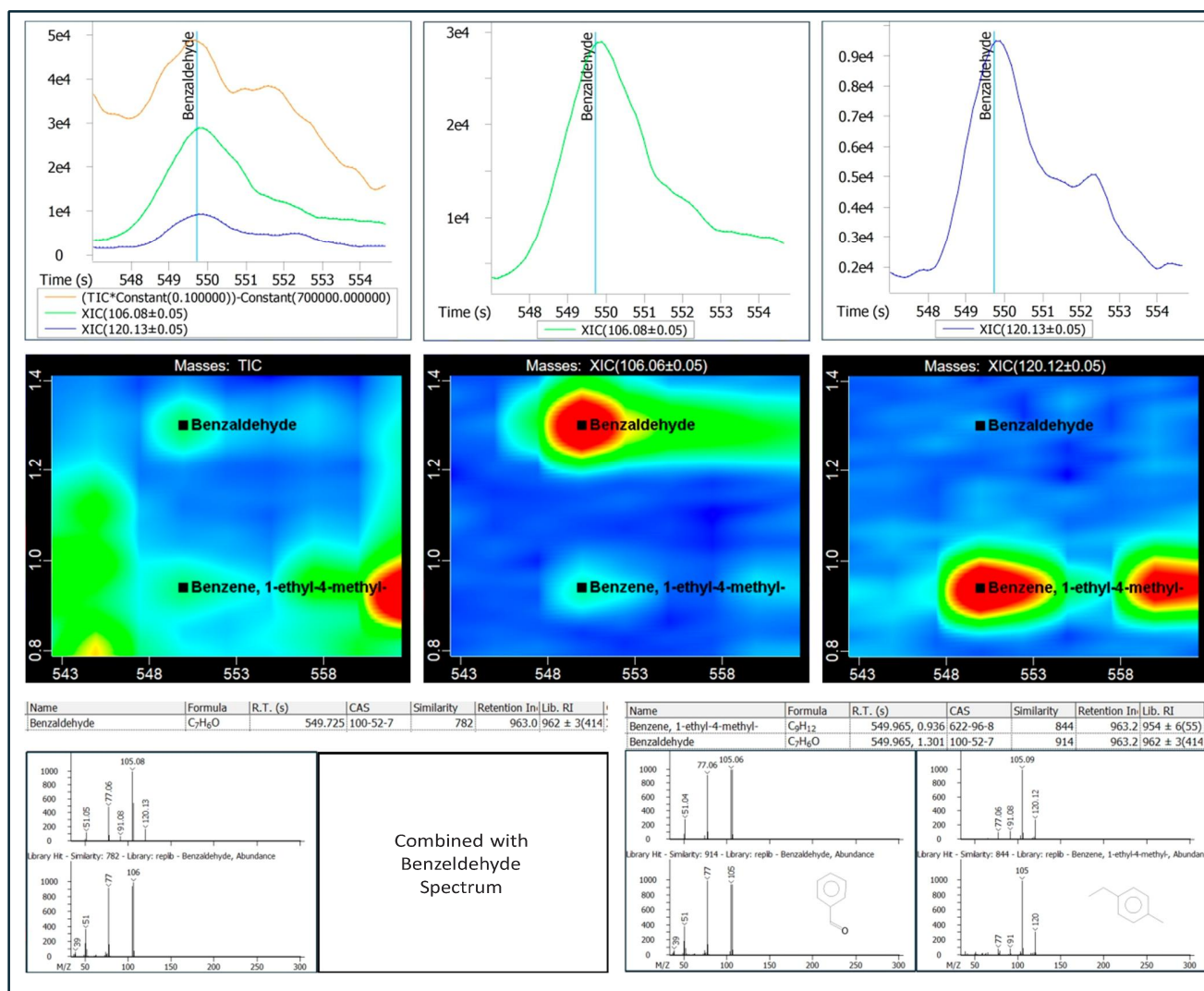


図 4. 共溶出ピークの GC でのデコンボリューション結果と、GCxGC によるクロマトグラフィー的分離結果を示す。GC データ（左下）および GCxGC データ（右下）のピークテーブルとスペクトル情報が比較可能。

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わかります。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。

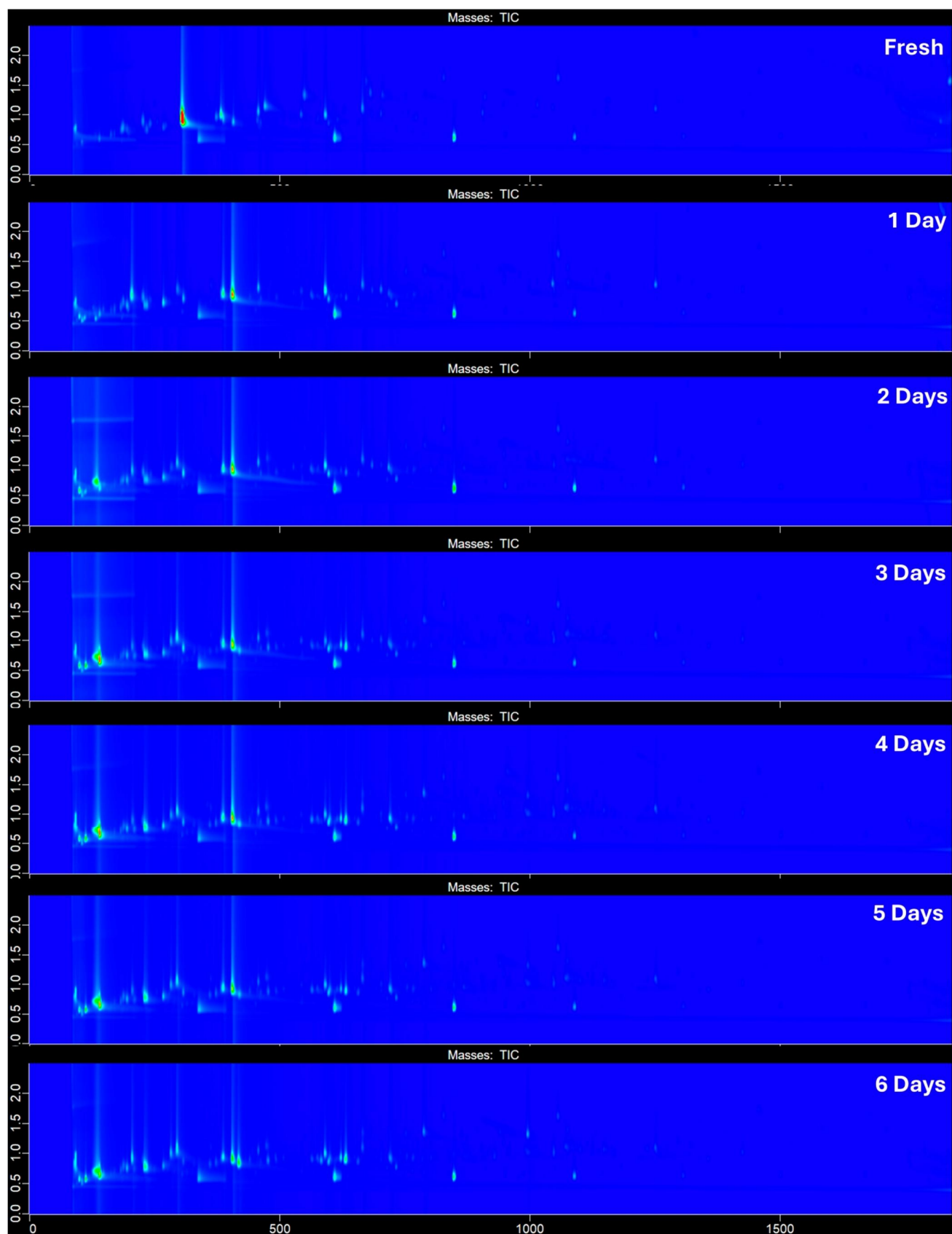


図 5. 腐敗過程における各時間点のトマトサンプルの代表的等高線プロット

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、色の变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

Name	Formula	M.W.	Similarity	CAS	Quant m	RI calc	RI lib	S/N	Aroma	Description	Med RI	Med RT2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	842	66-25-1	56.08	804	801	44394.69	green	fresh green fatty aldehydic grass leafy fruity sweaty	307.5	0.87																					
2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98	938	505-57-7	96.09	857	851	3678.56	green	sweet almond fruity green leafy apple plum vegetable	385.0	0.96																					
Methional	C ₆ H ₁₀ OS	104	810	3268-49-3	104.05	910	907	113.96	vegetable	musty potato tomato earthy vegetable creamy	465.0	1.28																					
Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114	935	111-71-7	96.12	904	901	808.98	green	fresh aldehydic fatty green herbal wine-lee ozone	455.0	0.91																					
Decanal	C ₁₀ H ₁₈ O	156	934	112-31-2	112.15	1209	1206	170.25	aldehydic	sweet aldehydic waxy orange peel citrus floral	922.4	0.99																					
Dimethyl trisulfide	C ₂ H ₆ S ₃	126	927	3658-80-8	125.99	972	971	783.98	alliacous	sulfurous cooked onion savory meaty	562.5	1.25																					
Butanoic acid	C ₄ H ₈ O ₂	88	808	107-92-6	60.03	785	802	415.03	cheesy	sharp acetic cheese butter fruit	285.0	0.82																					
2,3-Butanedione	C ₄ H ₆ O ₂	86	844	431-03-8	86.05	604	595	3413.94	buttery	strong butter sweet creamy pungent caramel	130.0	0.64																					
Octanoic acid, ethyl ester	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	172	727	109-32-1	88.07	1200	1196	417.30	waxy	fruity wine waxy sweet apricot banana brandy pear	909.9	0.94																					
Ethanol, 2-(methylthio)-	C ₃ H ₈ OS	92	780	5271-38-5	92.05	841	843	661.95	meaty	sulfurous meaty	362.5	1.10																					
2-Heptanone	C ₇ H ₁₄ O	114	876	110-43-0	114.13	894	891	381.24	cheesy	fruity spicy sweet herbal coconut woody	440.0	0.90																					
Ethanol	C ₂ H ₆ O	46	989	64-17-5	46.06	454	427	7259.30	alcoholic	strong alcoholic ethereal medicinal	100.0	0.58																					
1-Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	116	889	111-70-6	70.09	973	970	2069.08	green	musty leafy violet herbal green sweet woody peony	565.0	0.91																					
1-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	130	919	111-87-5	84.10	1072	1070	1653.21	waxy	waxy green orange aldehydic rose mushroom	720.0	0.92																					
Hexanoic acid, ethyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	733	123-66-0	88.07	1002	999	571.95	fruity	sweet fruity pineapple waxy green banana	610.0	0.88																					
Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	60	953	64-19-7	60.03	608	610	9025.01	acidic	sharp pungent sour vinegar	132.5	0.72																					
Pyrazine, 2-methyl-6-(1-propenyl)-	C ₈ H ₁₀ N ₂	134	748	18217-81-7	133.11	1103	1107	76.23			767.5	1.21																					
Pyrazine, 2,5-dimethyl-	C ₆ H ₈ N ₂	108	902	123-32-0	108.09	917	917	1323.17	chocolate	cocoa roasted nuts roast beef woody grass medical	475.0	1.12																					
Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	C ₈ H ₁₀ N ₂	136	902	13360-65-1	136.13	1084	1081	259.61	nutty	potato cocoa roasted nutty	737.5	1.11																					
Acetic acid, methyl ester	C ₄ H ₈ O ₂	74	818	79-20-9	74.05	537	526	14042.83	ethereal	ether sweet fruity	112.5	0.58																					
Acetic acid, pentyl ester	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	844	628-63-7	70.09	918	910	3468.17	fruity	ethereal fruity banana pear banana apple	477.5	0.88																					
Ethyl Acetate	C ₄ H ₈ O ₂	88	852	141-78-6	88.06	620	612	9864.33	ethereal	ethereal fruity sweet weed green	140.0	0.66																					
Phenylethyl Alcohol	C ₈ H ₁₀ O	122	958	60-12-8	91.08	1117	1116	4259.33	floral	floral rose dried rose flower rose water	787.4	1.36																					
Propanoic acid, ethyl ester	C ₅ H ₁₀ O ₂	102	909	105-37-3	102.09	716	710	1099.25	fruity	sweet fruity rum juicy fruit grape pineapple	207.5	0.74																					
Acetic acid, butyl ester	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	855	123-86-4	73.04	819	812	839.03	ethereal	ethereal solvent fruity banana	330.0	0.82																					
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	831	78-70-6	93.09	1101	1099	821.14	floral	citrus floral sweet bois de rose woody green blueberry	765.0	0.93																					
1-Butanol, 2-methyl-	C ₅ H ₁₂ O	88	960	137-32-6	57.09	740	739	3219.00	ethereal	ethereal fusel alcoholic fatty greasy winy whiskey leathery	235.0	0.77																					
1-Butanol, 3-methyl-	C ₅ H ₁₂ O	88	921	122-51-3	55.07	736	736	15667.28	fermented	fuel oil alcoholic whiskey fruity banana	230.0	0.78																					
1-Hexanol, 4-methyl-	C ₇ H ₁₄ O	116	755	818-49-5	70.09	948	953	270.04	sweaty		525.0	0.87																					
Benzeneoacetic acid, methyl ester	C ₉ H ₁₀ O ₂	150	760	101-41-7	150.11	1183	1178	60.50	honey	sweet floral honey spice waxy almond	884.9	1.37																					
Methyl valerate	C ₈ H ₁₆ O ₂	116	723	624-24-8	74.05	828	823	300.89	fruity	sweet green fruity apple pineapple nutty	342.5	0.83																					
Butanoic acid, 3-methyl-	C ₅ H ₁₀ O ₂	102	713	503-74-2	60.03	841	850	1462.90	cheesy	sour stinky feet sweaty cheese tropical	362.5	0.81																					
Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	938	142-62-1	73.04	980	990	939.25	fatty	sour fatty sweat cheese	575.0	0.93																					
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	936	103-45-7	104.09	1261	1258	7261.78	floral	floral rose sweet honey fruity tropical	994.9	1.32																					
Acetic acid, heptyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	887	112-06-1	96.13	1115	1112	854.61	green	fresh green rum ripe fruit pear apricot woody	784.9	0.91																					
Acetic acid, hexyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	766	142-92-7	101.08	981	1011	552.09	fruity	fruity green apple banana sweet	577.5	0.88																					
Acetic acid, phenylmethyl ester	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	150	897	140-11-4	106.08	1169	1164	524.06	floral	sweet floral fruity jasmine fresh	864.9	1.31																					
Acetic acid, octyl ester	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	172	821	112-14-1	112.15	1214	1210	445.18	floral	green earthy mushroom herbal waxy	929.9	0.94																					

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ルについて、図 6 に詳細情報を示します。ヘキサナール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。ヘキサナールの香気は「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。

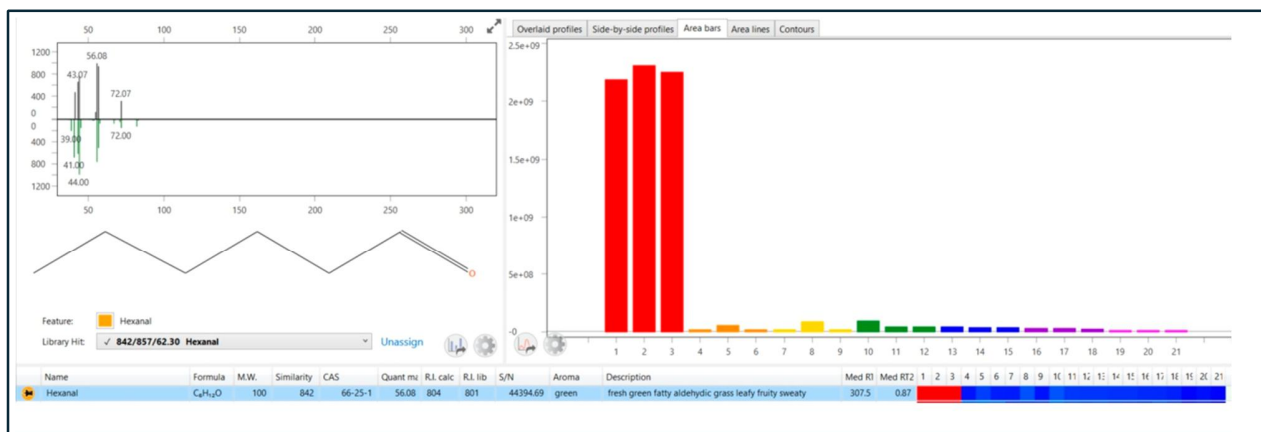


図 6 ヘキサナールは Pegasus BTX 4D および ChromaTOF Sync 2D で同定された。新鮮なサンプル中で高濃度に観察され、その後急速に減少。

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・体臭様香を呈し、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。

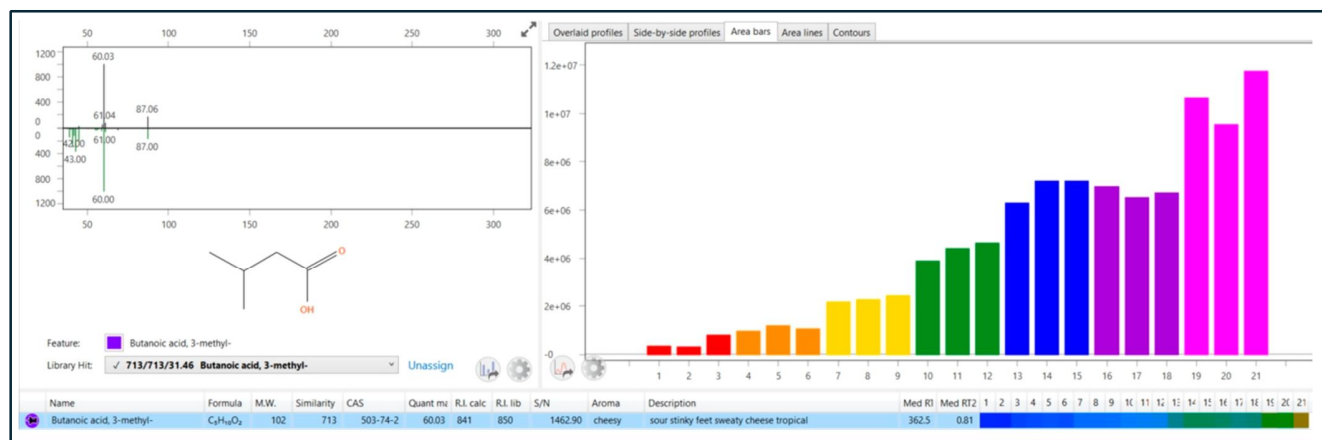


図8 3-メチルブタン酸は、Pegasus BTX 4D および ChromaTOF Sync 2D を用いて食品劣化サンプル中で同定された。

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。

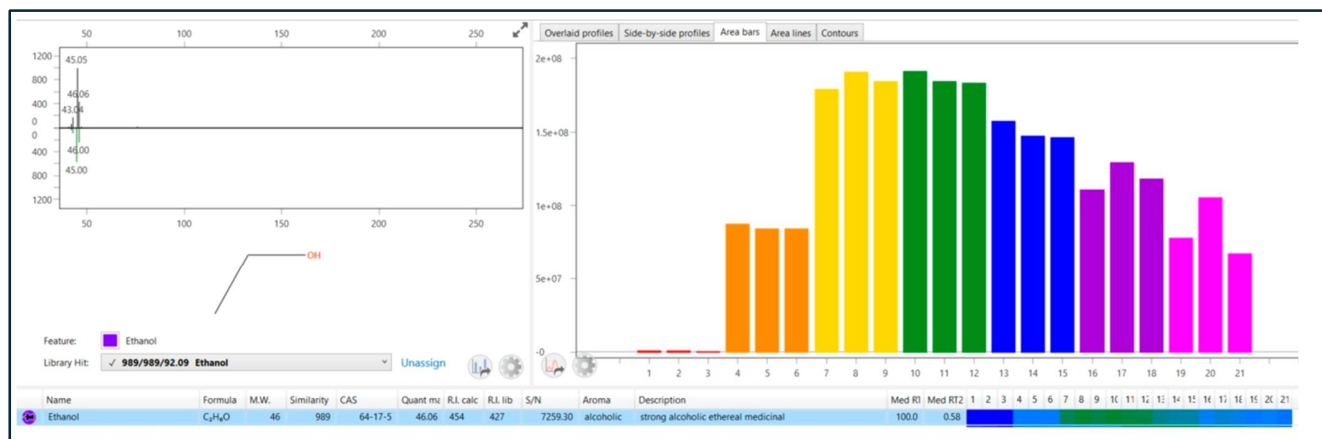


図9 エタノールは、Pegasus BTX 4D および ChromaTOF Sync 2D を用いて食品劣化サンプル中で同定されました。



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。

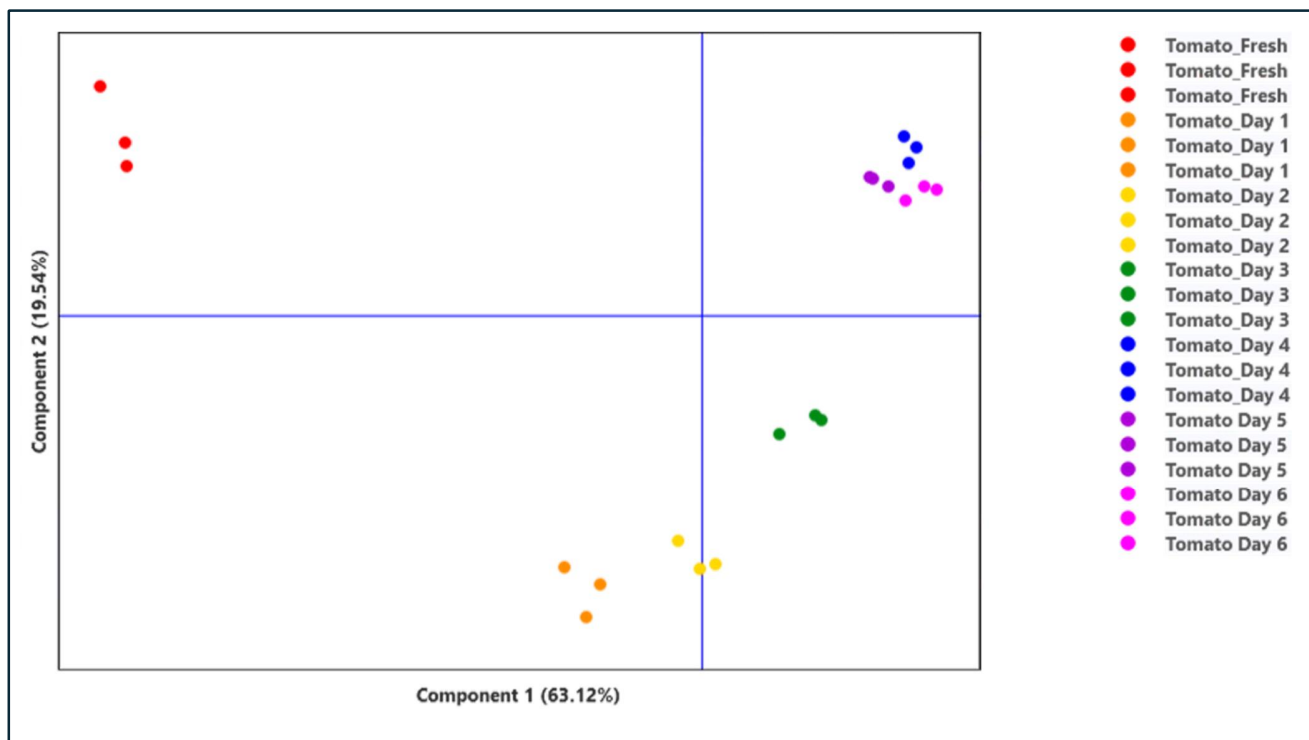


図 11. 腐敗過程を通したトマトサンプルの PCA スコア

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.thegoodscentscompany.com