

## 市販ぶどうジュース香気成分の 多変量解析ワークフローの紹介

### 著者

姉川 彩<sup>1</sup>  
大塚 剛史<sup>1</sup>  
笹本 喜久男<sup>2</sup>  
落合 伸夫<sup>2</sup>  
神田 広興<sup>2</sup>  
中村 貞夫<sup>1</sup>

1. アジレント・テクノロジー株式会社
2. ゲステル株式会社

### 要旨

ヘッドスペース固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフィー / 質量分析法 (HS SPME-GC/MS) で取得したスキャンデータから Unknowns Analysis ならびに AromaOffice<sup>2</sup>D、Mass Profiler Professional (MPP) の解析ソフトウェアを用いて、簡便に定性解析や差異解析を行う手法を紹介します。

Unknowns Analysis ならびに Aroma Search を併用することによって、解析対象のピークを総ピーク数の 10 分の 1 程度に減らすことができ、「におい・香気成分のみ」に絞った解析が可能となりました。さらに、MPP を用いた多変量解析により、におい・香気成分かつ統計学的有意差のある化合物のみに絞ることが可能となります。最終的に、検出された総ピーク数のうち、におい・香気成分で差異が確認された対象化合物は 30 成分以下となり、Unknowns Analysis、Aroma Search、MPP を組み合わせた解析が差異の確認に有効であることが明らかとなりました。

## はじめに

食品のおいしさに関わるフレーバー（風味・香味）は、食品の香りづけに広く使用されています。また、食品や飲料以外にも子ども向けの医薬品や歯磨き粉、大人向けのタバコやドリンク剤にも使われています。これら食品や日用品の中に含まれる香気成分を抽出するための前処理方法は多岐に渡り、香気成分分析ならびに解析は、それぞれ個別の手法で行われています。各種ソフトウェアで得られる解析結果の中から、におい・香気成分を絞り込む作業には膨大な時間がかかります。本報では、市販のぶどうジュースの香気成分を HS-SPME によって抽出し、GC/MS で取得したスキャンデータから解析ソフトウェアを用いて、簡便に定性解析や差異解析を行う手法を紹介します。

## 分析条件

固相マイクロ抽出（SPME、SPME Arrow）ファイバーは、270 °C で 30 分間コンディショニングを行い、市販のぶどうジュース（N=5）をそれぞれ 20 mL バイアルに 5 g ずつ秤量しました。GERSTEL 社製多機能オートサンブラ（MPS Robotic Pro）を用いて、SPME および SPME Arrow による抽出を行い、7890 GC / 5977B MSD を用いてスキャン分析を行いました。詳細な分析条件を下に記載します。

### GERSTEL MPS Robotic Pro（多機能オートサンブラ）

- 注入方法 : SPME および SPME Arrow
- SPME ファイバー : PDMS/DVB (65 μm)  
SPELCO 社製 (p/n 57327-U)
- SPME Arrow ファイバー : PDMS/DVB (120 μm)  
Agilent 社製 (p/n 5191-5860)
- サンプル平衡化条件 : 60 °C /10 min (攪拌 250 rpm)
- サンプル抽出時間 : 20 min
- サンプル脱着時間 : 2 min
- 塩析 : 1.5 g

### Agilent 7890 GC

- 注入口 : スプリット/スプリットレス
- 注入モード : スプリット (10 : 1)
- 注入口温度 : 250 °C
- ガスセーバー : 15 mL/min, 3 min
- 注入口ライナー : ①SPME 用、②SPME Arrow 用
  - ① ウルトライナート、ストレート、SPME 用、i.d. 0.75 mm (p/n 5190-4048)
  - ② 不活性処理済、ストレート、石英製、i.d. 2 mm (p/n 5181-8818)

- キャリアガス : ヘリウム 0.8 mL/min  
コンスタントフローモード
- カラム : HP-INNOWAX 20 m, 0.18 mm I.D.,  
0.18 μm (p/n 19091N-5771)
- オープン : 45 °C (3 min) - 20 °C /min - 230 °C  
(8 min) (GC ランタイム : 約 20 min)

### Agilent 5977B MSD Inert Plus

- トランスファーライン温度 : 250 °C
- イオン源温度 : 250 °C
- 四重極温度 : 150 °C
- 測定モード : スキャン (m/z = 29 - 350)

データ解析には、マススペクトルライブラリに NIST2017 および異臭ライブラリ<sup>(1)</sup>を用い、Unknowns Analysis と GERSTEL 社の AromaOffice<sup>2D</sup> を使用しました。AromaOffice<sup>2D</sup> には、文献情報に基づく化合物情報（香気成分）が約 11 万件登録されており、その中の Aroma Search 機能が Unknowns Analysis にパッケージ化されています<sup>(2,3)</sup>。スキャン分析で得られたトータルイオンカレントクロマトグラム（TICC）に対し、Unknowns Analysis および Aroma Search で解析し、香気・におい成分の絞りこみを行いました。その後、多変量解析ソフトである Mass Profiler Professional（MPP）を使用し、ファイバーの種類や塩析有無による検出成分の差異を確認しました。図 1 に本アプリケーションで行った香気成分の差異解析ワークフローを示しました。

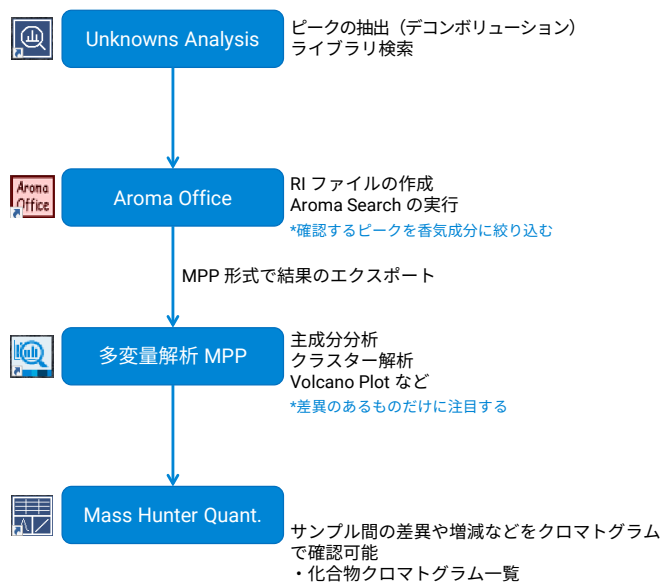


図 1. 香気成分の差異解析ワークフロー

## 分析結果

SPME, SPME Arrow-GC/MS スキャン分析で得られた TICC を図 2 に示します。SPME、SPME Arrow いずれの結果においても塩析によって、

全体的にレスポンスが上昇することが TICC レベルで確認できました。次に、サンプル中にどのような化合物が含まれるのか、TICC に対して Unknowns Analysis を用いて複数ライブラリ検索 (NIST、異臭ライブラリ) を行った結果の一例を図 3 に示します。

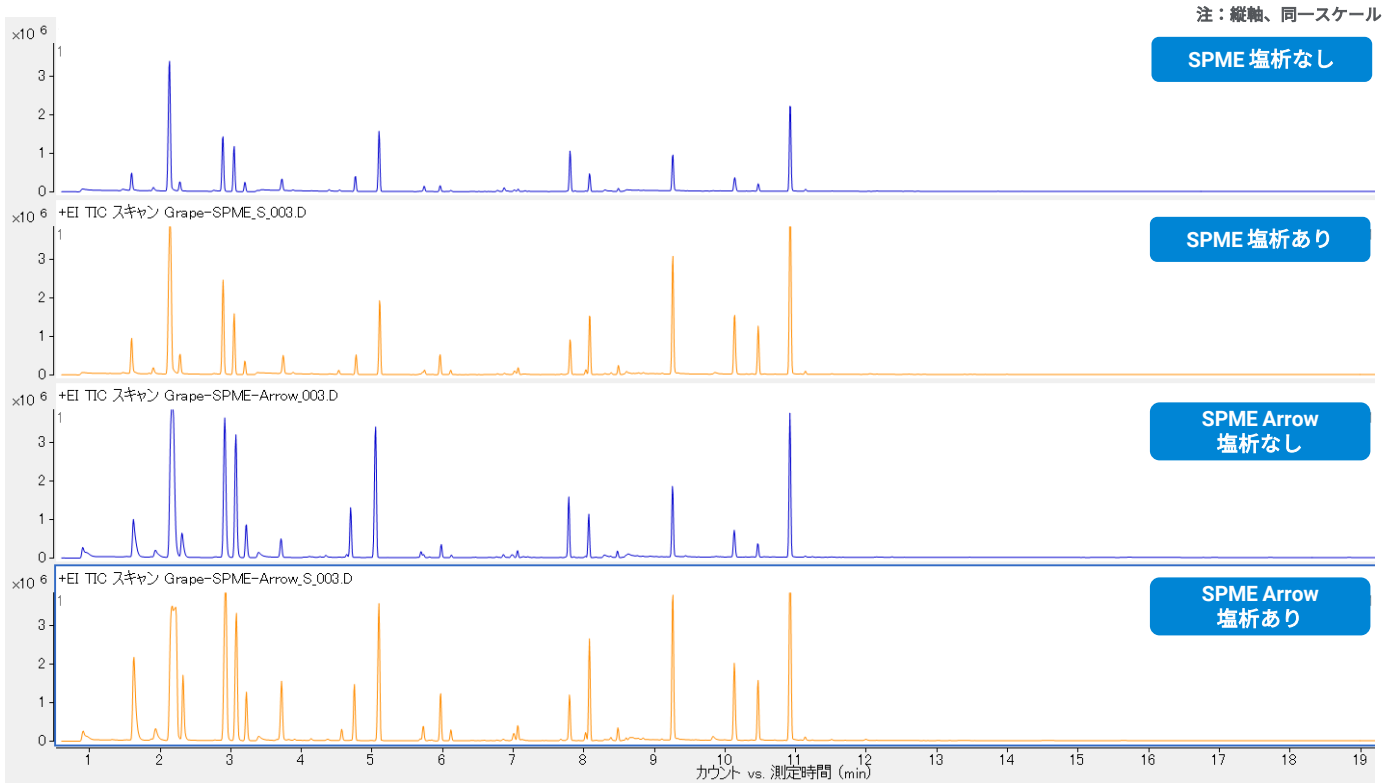


図 2. 市販ぶどうジュースの SPME-GC/MS 測定 (Split 10:1) によって得られた TICC

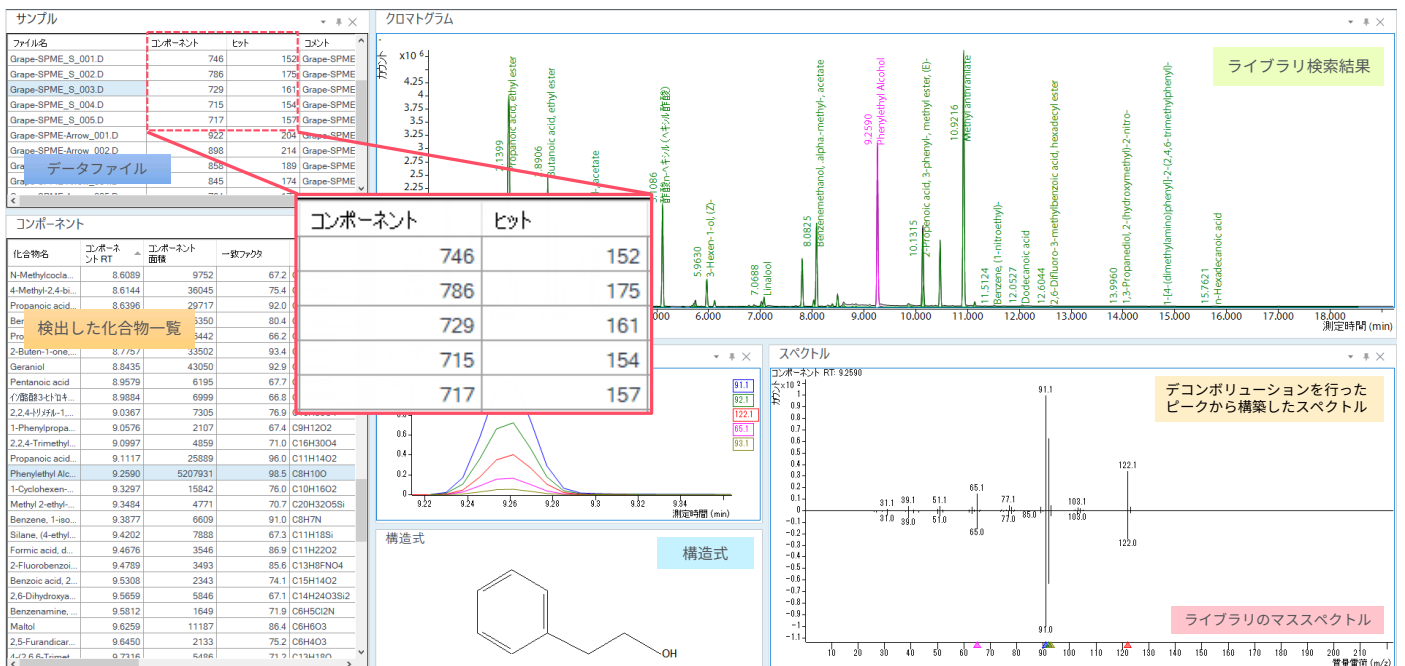


図 3. 複数ライブラリ検索を用いた Unknowns Analysis 解析結果の一例

図 3 で示したとおり、ライブラリ検索にヒットした候補化合物は緑色のピークで表示されます。抽出されたピーク数はコンポーネントで確認でき、そのうちライブラリにヒットした数はヒットで確認できます (図 3 拡大部分)。しかしながら、これらの候補化合物の中には、香気・におい成分ではないものも多く含まれるため、図 1 に示したワークフローに従い、複数ライブラリ検索でヒットした結果に対して Aroma Search を実行し、香気・におい成分への絞りこみを行いました。Unknowns Analysis ソフトウェア上でデコンボリューションを行い、各条件で得られたサンプルの抽出ピーク数 (コンポーネント、N=5 の平均値) は、表 1 のとおり 630 ~ 1000 ピーク程で、25 % 程度がライブラリにヒットする結果 (一致率 65 % 以上の条件) となりました。さらに、Aroma Search による絞りこみを行うと、ヒットした化合物の約 30 % が香気・におい成分であることが分かりました。

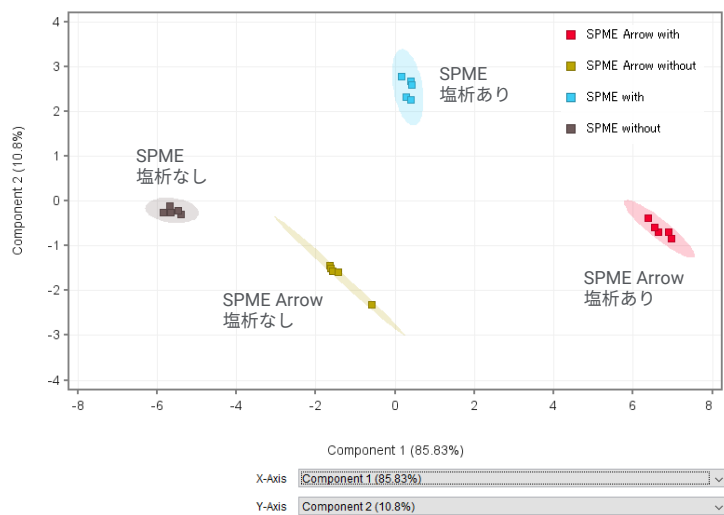
表 1. Aroma Search による香気成分の絞りこみ

	コンポーネント	ヒット	香気成分
Grape-SPME_塩析なし	625	157	43
Grape-SPME_塩析あり	739	186	56
Grape-SPME-Arrow_塩析なし	857	226	54
Grape-SPME-Arrow_塩析あり	954	242	70

次に、Aroma Search で絞りこみを行った結果を多変量解析ソフトウェア (MPP) に読み込み、差異検索を試みた結果を図 4 に示します。SPME 塩析有無ならびに SPME Arrow 塩析有無の計 4 条件すべてで検出され、統計学的な差 ( $p < 0.05$ ,  $FC > 2$ ) が確認できた香気成分のリストを得ることができました。図 4 a) に示す主成分分析の結果から、主成分 1 の寄与率が 85.8 % と高い結果となり、主成分 1 で差が明確に説明できることが示唆されました。図 4 b) に示すクラスター解析の結果から、SPME 塩析ありと SPME Arrow 塩析無しで検出された香気成分は類似しており、SPME Arrow 塩析ありのデータ群では、他の 3 群に比べて量の多い成分があることが推察されました。

多変量解析で得られた各サンプル間での統計学的な差について各成分のクロマトグラム確認を行うため、MPP から “Export for Identification” の機能を使用し、化合物リストを .cef ファイル形式でエクスポートしました。この .cef ファイルを定量用 MassHunter Quant ソフトウェアで読み込み、クロマトグラムの一覧表示機能により比較した結果を図 5 に示します。各サンプル中の化合物の RT やレスポンスの違いをクロマトグラム上で確認することが可能です。この一覧表示を使用することで SPME Arrow 塩析なしのデータでは、D-Limonene の RT にズレがあったことが容易に確認できます。

### a) 主成分分析



### b) クラスター解析

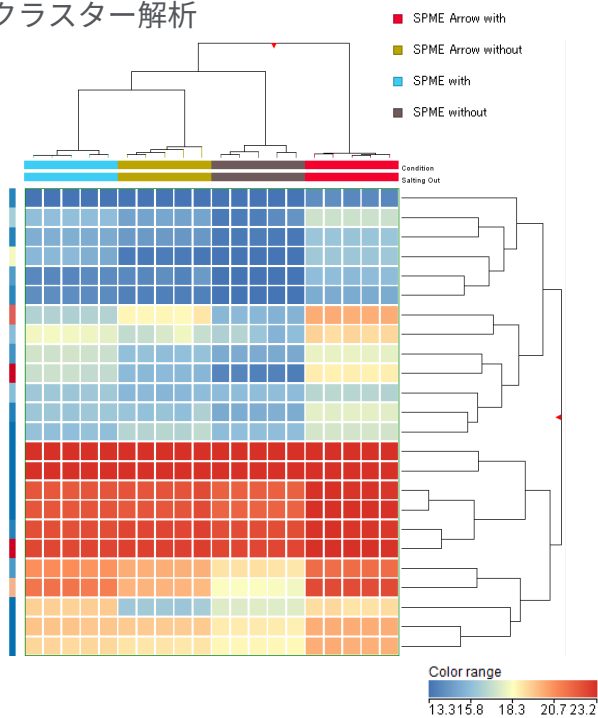


図 4. 4 条件で検出され、統計学的な差が見いだされた香気成分 ( $p < 0.05$ ,  $FC > 2$ )

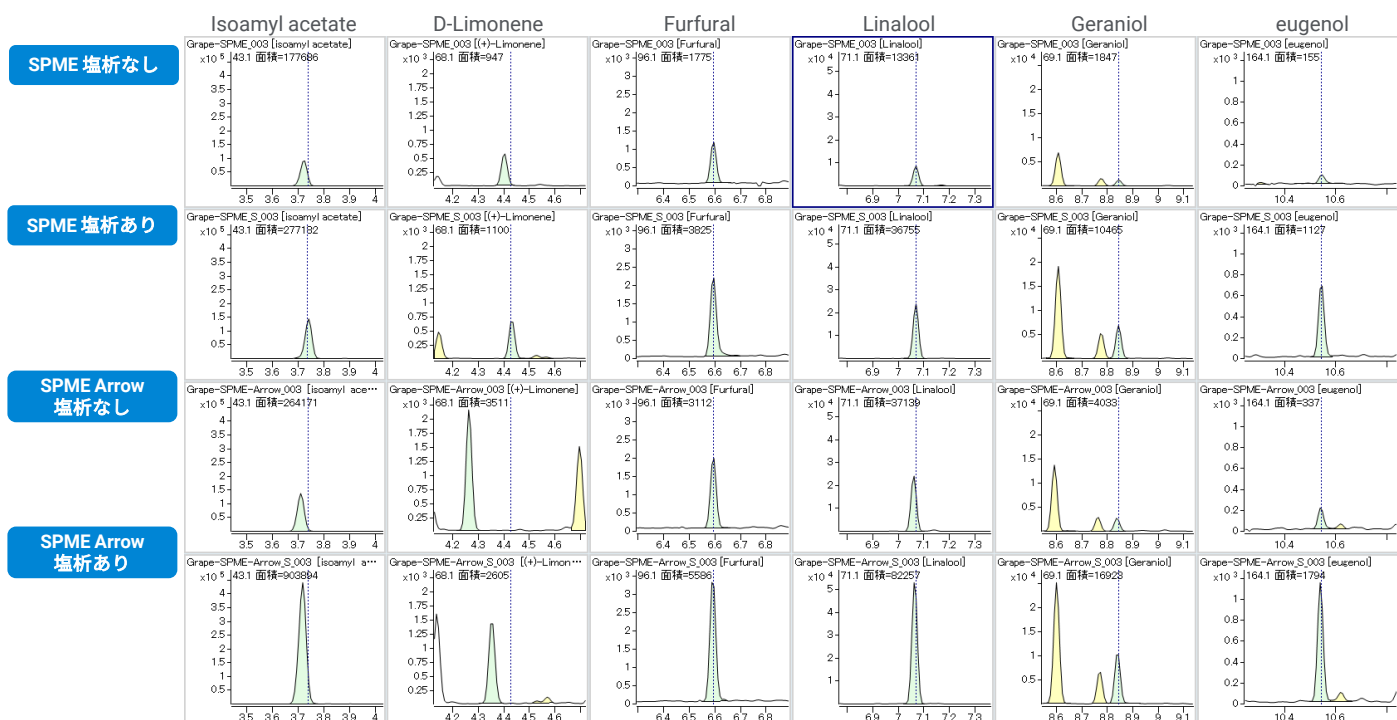


図 5. Mass Hunter Quant. のクロマトグラム一覧表示

香気・におい成分への絞り込み、さらに統計学的な差が確認された結果のみをクロマトグラムでレビューすることで、レスポンスが小さく目視では見つけにくい D-Limonene や Furfural の差を視覚的に確認することができます。また、従来のスペクトルのみの解析方法では同定結果の判断に迷うことの多い β-pinene と 2-carene についても、保持時間の情報を組み合わせた解析により標準試料を測定しなくても判断に迷うことなく解析が可能となります。

## まとめ

Unknowns Analysis、Aroma Search を併用することによって対象成分である「におい・香気成分のみ」に絞ることが可能となり、解析対象のピーク数を 10 分の 1 程度に減らすことができました。さらに、MPP を用いた多変量解析により各条件で差のある化合物のみに絞ることが可能となり、その数は 30 成分以下となりました。目視で確認するピーク数を減らすことによって、解析時間を大幅に短縮することができ、図 1 に示した Unknowns Analysis、Aroma Search、MPP を組み合わせた解析が差異の確認に有効であることが明らかとなりました。

## 参考文献

- 1) 異臭ライブラリダウンロードサイト  
<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1004696>
- 2) GERSTEL Application Note No. AN-J02/2021
- 3) GERSTEL Application Note No. AN-J01/2020

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
変更されることがあります。

DE66888381

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, October 12, 2023

5994-6899JAJP