

## SPME による煙の影響を受けた ワイン中の遊離揮発性フェノールの分析

### 著者

Jessica Westland and  
Vanessa Abercrombie  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

2003 年のオーストラリアおよびブリティッシュコロンビアにおける山火事の発生以来、ワイン生産にとって煙の影響は世界的な懸念事項となっています。<sup>1</sup> 世界中のさまざまな地域で山火事が増加しているため、ブドウ栽培者やワイナリーの多くがブドウや製品のワインへの煙の影響を懸念しています。アジレントは、煙の影響による遊離型の揮発性フェノールを分析するために、固相マイクロ抽出 (SPME) ガスクロマトグラフィー / 質量分析 (GC/MS) メソッドを開発しました。煙の影響に関連する遊離型の揮発性フェノールを分析するために、Agilent SPME-GC/MS/MS メソッドを用いれば、確実な同定と信頼性の高い定量が可能になります。

## はじめに

研究によると、煙由来の化合物はブドウのつるや実に吸収され、ワインの異臭の原因となる可能性があります。これらの化合物は主にブドウの実や果汁に揮発性物質の形で存在するという強力な証拠があります。それらの遊離画分の分析が、ブドウの実のスクリーニング、ワインへの影響評価を行うためのツールとして使用されています。<sup>2</sup> ワインの製造工程において、ブドウの育成と成熟は間違いなく最も重要なステップです。ヴェレゾン（着色）の期間、酸の濃度が下がり糖度が上がるのと同時に、芳香族化合物と香り化合物が生じ始めます。さまざまな外部要因がありますが、ブドウの成熟および収穫時期の決定に最も影響を与えるのは気候条件です。近隣の火事による煙など、気温と関係しない他の環境条件がワインの官能的品質に大きな悪影響を与える場合もあります。<sup>3</sup>

グアヤコールと 4-メチルグアヤコールが、煙による望ましくない影響特性に寄与する主要な揮発性芳香族化合物として特定されています。オーク樽の中で熟成させたワインもグアヤコールや 4-メチルグアヤコールの濃縮を引き起こしますが、この 2 つの化合物の比が異なります。煙の影響を受けた果実には、4-メチルグアヤコールのほぼ 4 倍のグアヤコールが含まれています。<sup>2</sup> オーク樽から移る香りは、煙およびトースト香として認知されます。一方、この 2 つの化合物の存在が煙の影響による場合、キャンプファイヤーや灰皿のような臭いとなり、ワインには望ましくありません。

煙の影響による化合物の分析の検出限界は、1 ppb 未満の検出感度が必要です。そのため、GC/MS 分析では選択イオンモニタリング (SIM) またはマルチプルリアクションモニタリング (MRM) が一般的に使用されます。ワインの直接分析は簡単ではありません。糖類、有機酸、その他の芳香族化合物は保持力が高

いためです。これらの揮発性物質の抽出と分析を簡素化するには、SPME が最適な抽出法とされています。この方法が広く使われるようになったのは、操作が簡単であること、自動化しやすいこと、有機溶媒の使用が減らせること、およびガスクロマトグラフへの直接熱脱着ができることが理由です。

## 実験方法

### 対象揮発性物質

煙に含まれる主な揮発性フェノールであるグアヤコールと 4-メチルグアヤコールは、ワインへの煙の影響のマーカーとして用いることができます。これらの物質の濃度はそれぞれ、特に焼いたオークにさらされていないワイン中で、知覚される煙の影響の程度と相関があります。ただし、煙の影響を受けたワインで検出および分析される化合物は、これら 2 つだけではありません。表 1 に、この実験で分析対象とした遊離型の揮発性フェノールを示します。

表 1. 遊離型の対象揮発性フェノール

CAS 番号	化合物
74495-69-5	グアヤコール-d3
90-05-1	グアヤコール
93-51-6	4-メチルグアヤコール
95-48-7	o-クレゾール
13127-88-3	フェノール-d6
108-95-2	フェノール
95-87-4	2,5-キシレン
2785-89-9	4-エチルグアヤコール
90-00-6	2-エチルフェノール
108-68-9	3,5-キシレン
106-44-5	p-クレゾール
108-39-4	m-クレゾール
123-07-9	4-エチルフェノール
91-10-1	2,6-ジメトキシフェノール

## メソッド

### サンプル前処理法：

- 20 mL ヘッドスペースバイアルおよびキャップ（部品番号 5188-6537 および 5188-2759）
- 4 g NaCl 入り 10 mL サンプル（図 1）
  - NaCl を飽和状態になるまで添加すると、煙の影響を受けたブドウやワインの対象化合物の応答が平均 95 % 増加します<sup>4</sup>。



水

ワイン

図 1. 水とワインのサンプルが入った 20 mL の茶色ヘッドスペースバイアル。

- キャリブレータまたは内部標準 (ISTD: Internal Standard) をスパイクしたサンプル
  - 10 ppb の ISTD スパイク
- Agilent SPME Arrow DVB/carbon WR/PDMS, 1.10 mm, 120  $\mu$ m (部品番号 5191-5861)
  - 匂いおよび香り化合物の選択的抽出のために、DVB/carbon WR/PDMS SPME 相を選択しました。
  - SPME Arrow を使用した理由は、従来の SPME ファイバと比較して吸着相の容量が大きいため、抽出効率を大幅に向上させることができるためです<sup>5</sup>。

Robotic Tool Change (RTC) 付き Agilent PAL3 オートサンプラを、Agilent 7000D トリプル四重極 GC/MS を備えた Agilent 8890 GC システムにインストールしました。SPME ヘッドスペースパラメータ、GC メソッド設定、および MS 条件を、それぞれ表 2、3、および 4 に示します。表 5 に、GC/MS/MS 分析に使用する MRM トランジションを示します。

表 2. SPME ヘッドスペースパラメータ

パラメータ	設定値
脱着前時間	3 分
脱着前温度	250 °C
インキュベーション時間	5 分
Heatex Stirrer 速度	1,000 rpm
Heatex Stirrer 温度	40 °C
サンプル抽出時間	10 分
サンプル脱着時間	3 分

表 3. Agilent 8890 GC の設定

パラメータ	設定値
注入口ライナ	インレットライナ、ウルトラライナート、スプリットレス、ストレート、内径 2 mm (部品番号 5190-6168)
注入口モード、温度	スプリットレス、250 °C
コントロールモード	定流量 (1.2 mL/分)
カラム	Agilent J & W DB-HeavyWAX GC カラム、30 m x 0.25 mm、0.25 μm (部品番号 122-7132)
オープンプログラム	120 °C (1 分間保持)、10 °C /分 で 250 °C まで (0 分間保持)、60 °C /分 で 280 °C まで (0 分間保持)

表 4. Agilent 7000D トリプル四重極 GC/MS の条件

パラメータ	設定値
トランスファーライン	280 °C
取り込みモード	dMRM
溶媒ディレイ	3.0 分
チューニングファイル	Atune.eiex
ゲイン	10
MS イオン源温度	280 °C
MS 四重極温度	150 °C

表 5. 遊離型揮発性フェノールの MRM トランジション

CAS 番号	化合物	プリカーサ イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	CE (V)
74495-69-5	グアヤコール-d3	127	109	15
		126.9	109	15
90-05-1	グアヤコール	124.1	109	15
		124.1	81	15
93-51-6	4-メチルグアヤコール	138.1	95	15
		138	123	15
95-48-7	o-クレゾール	108.1	107.1	15
		107.1	77	15
13127-88-3	フェノール-d6	99.1	71	10
		71	69	10
108-95-2	フェノール	94	66	10
		66	65	10
95-87-4	2,5-キシレン	122	107	15
		122	94	15

CAS 番号	化合物	プリカーサ イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	CE (V)
2785-89-9	4-エチルグアヤコール	152	137	15
		137.1	122	15
90-00-6	2-エチルフェノール	122.1	107.1	15
		107.1	77	15
108-68-9	3,5-キシレン	121.1	107.1	15
		121.1	77	15
106-44-5	p-クレゾール	108.1	107.1	15
		107.1	77	15
108-39-4	m-クレゾール	108.1	107.1	15
		107.1	77	15
123-07-9	4-エチルフェノール	122.1	107	15
		108.1	78	15
91-10-1	2,6-ジメトキシフェノール	154	139	15
		139.1	83	15

## 結果と考察

### キャリブレーション

ブランクは、品質管理と堅牢な定量分析メソッドにとって重要です。この実験では、Milli-Q 水 (18.2 Ω) をブランクとして使用して、干渉のない清浄なマトリックスをシミュレートしました。ただし、ワインにはターゲット化合物の測定に影響を与える可能性のある多くの成分が含まれているため、白ワインをマトリックスブランクとして使用しました。

表 6 に、Milli-Q 水中でキャリブレーションした場合の遊離型の対象揮発性物質のキャリブレーション範囲と直線性の値を示します。図 2 は、グアヤコールと 4-メチルグアヤコールの Milli-Q 水キャリブレーション曲線を示したものです。

グアヤコールと4-メチルグアヤコールの定量におけるマトリックス効果を説明するために、バッグインボックス（紙パック）の白ワインを選択しました。このマトリックスを選択した理由は次のとおりです。

- 煙の影響を受けた化合物が存在する皮は、発酵プロセスの前に果汁から分離されます。
- これは不特定のブレンドであり、より広範囲のマトリックスを代表します。
- パッケージにより、ワインがオークとコルクにさらされるのを防ぎます。

表 6. Agilent 7000D トリプル四重極 GC/MS の Milli-Q 水中のキャリブレーション範囲と R<sup>2</sup>

化合物	検量線範囲 (ppb)	R <sup>2</sup>
グアヤコール	0.2 ~ 50.3	0.999
4-メチルグアヤコール	0.1 ~ 25	0.999
o-クレゾール	0.2 ~ 50	0.996
フェノール	0.5 ~ 125.5	0.997
2,5-キシレン	0.1 ~ 25	0.998
4-エチルグアヤコール	0.1 ~ 25	0.998
2-エチルフェノール	0.03 ~ 7.5	0.995
3,5-キシレン	0.1 ~ 5	0.998
p-クレゾール	0.1 ~ 25	0.997
m-クレゾール	0.1 ~ 25	0.998
4-エチルフェノール	0.1 ~ 25	0.998
2,6-ジメトキシフェノール	0.1 ~ 25	0.998*

\*タイプ = 二次、原点 = 強制、重み = 1/x

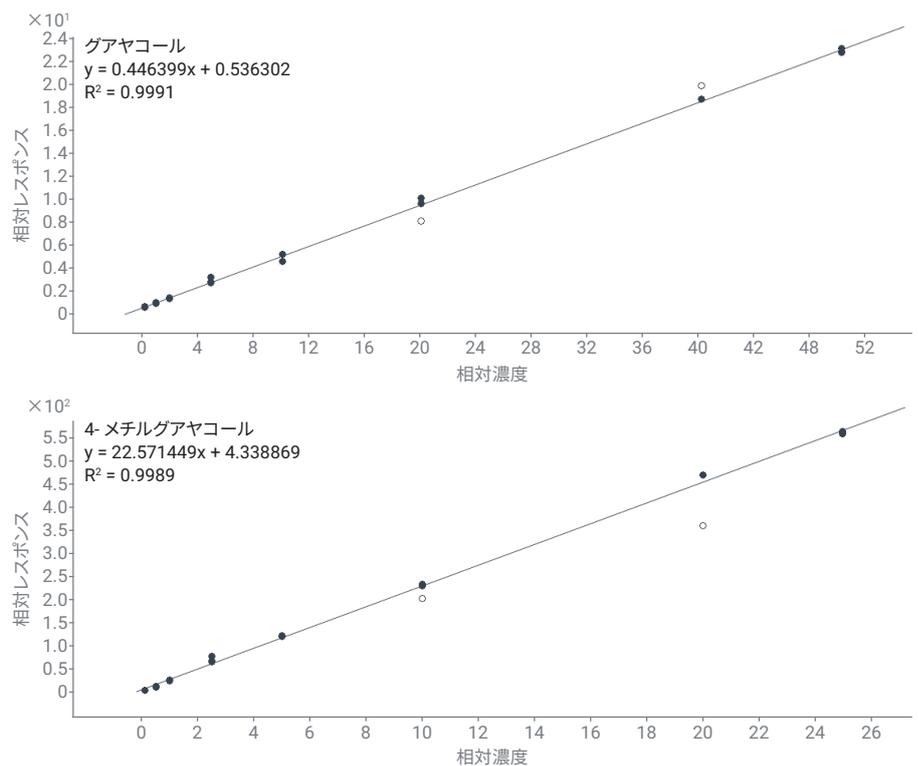


図 2. Milli-Q 水中のグアヤコールと 4-メチルグアヤコールの検量線

表 7 に、バッグインボックスの白ワインでキャリブレーションした場合の遊離型の対象揮発性物質のキャリブレーション範囲と直線性の値を示します。図 3 は、グアヤコールと 4-メチルグアヤコールの白ワイン中でのキャリブレーション曲線を示したものです。

表 7. Agilent 7000D トリプル四重極 GC/MS の白ワイン中のキャリブレーション範囲と R<sup>2</sup>

化合物	検量線範囲 (ppb)	R <sup>2</sup>
グアヤコール	0.2 ~ 50.3	0.993
4-メチルグアヤコール	0.1 ~ 25	0.996
o-クレゾール	0.2 ~ 50	0.996
フェノール	0.5 ~ 125.5	0.997
2,5-キシレン	0.1 ~ 25	0.996
4-エチルグアヤコール	0.1 ~ 25	0.996
2-エチルフェノール	0.03 ~ 7.5	0.995
3,5-キシレン	0.1 ~ 5	0.998
p-クレゾール	0.1 ~ 25	0.995
m-クレゾール	0.1 ~ 25	0.995
4-エチルフェノール	0.1 ~ 25	0.996
2,6-ジメトキシフェノール	0.1 ~ 25	0.995

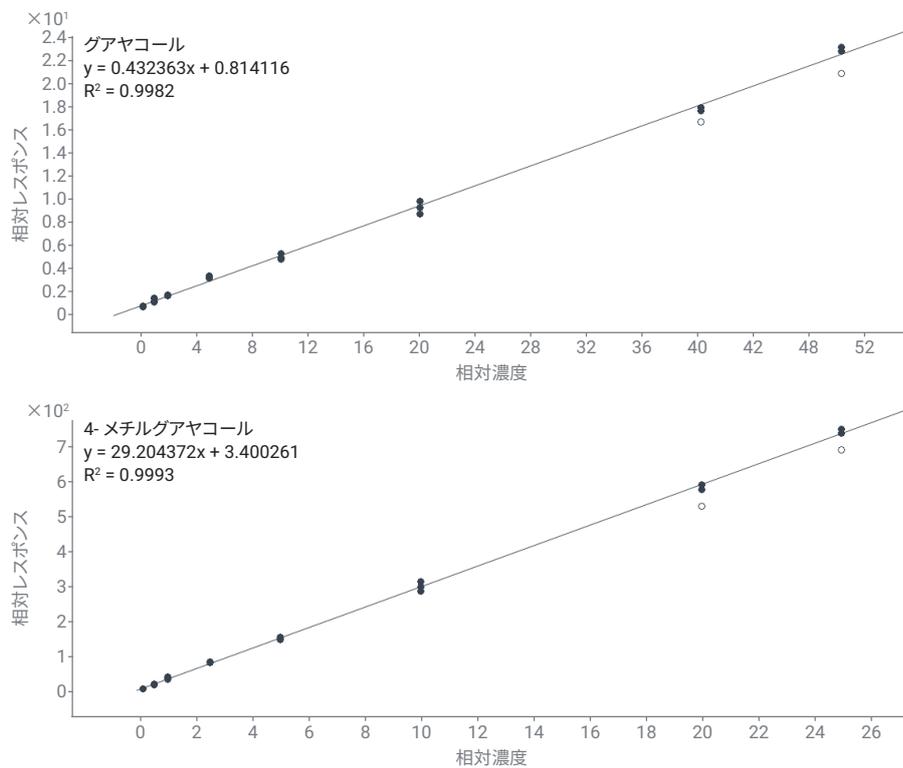


図 3. 白ワイン中のグアヤコールと 4-メチルグアヤコールの検量線

## 煙の影響マーカーの定量化

煙にさらされていないブドウでは、グアヤコールと 4-メチルグアヤコールとも 0.1 ~ 0.3 ppb のレベルで計測されます。1 ppb を超えるグアヤコールレベルは煙への曝露を示唆している可能性があります。煙にさらされたブドウのグアヤコールのレベルは 55 ppb にも達することがあります。煙の影響を受けた望ましくないブドウとワインで観察されるグアヤコール /4-メチルグアヤコールの比率は、平均で 3.7/1 です。<sup>2</sup>

すべてのワインサンプルと白ワインブランクのグアヤコールと 4-メチルグアヤコールのレベルは、Milli-Q 水キャリブレーション曲線に基づいて定量されたものです (表 8)。定量レベルの 4-メチルグアヤコールを含むサンプルはありませんでした。

遊離型の対象揮発性フェノールは、各赤ワインサンプル (n=3) から白ワインキャリブレーションによって定量しました (表 9)。4-メチルグアヤコールと 3,5-キシレンは、すべてのサンプルで定量下限 (LOQ) を下回っていたため、表には含まれていないことに注意してください。グアヤコール濃度が Milli-Q 水キャリブレーションと比べて白ワインキャリブレーションでわずかに減少するのは (標準偏差 = 0.82 および RSD = 9.35%)、定量に及ぼすワインのマトリックス効果を示しています。

表 8. ワインマトリックスで特定されたグアヤコールのレベル

グアヤコール	Franzia 白ワイン	Franzia 赤ワイン	CA ピノワール	OR ピノワール	赤ワインサンプル
平均濃度、n = 3 (ppb)	0.64	6.74	10.27	5.16	9.15
標準偏差	0.33	0.65	1.17	0.42	0.80
% RSD	51.80	9.57	11.40	8.13	8.72

表 9. 赤ワインのサンプルで同定されたターゲットの平均濃度 (ppb)

サンプル	グアヤコール	o-クレゾール	フェノール	2,5-キシレン	4-エチルグアヤコール	2-エチルフェノール	p-クレゾール	m-クレゾール	4-エチルフェノール	2,6-ジメトキシフェノール
Franzia 赤ワイン	6.32	0.41	2.73	<LOQ	0.09	<LOQ	1.61	0.38	<LOQ	0.77
CA ピノワール	9.97	1.90	5.58	0.23	0.22	0.01	0.75	0.68	0.08	1.05
OR ピノワール	4.68	2.05	6.20	16.23	10.81	<LOQ	1.73	1.44	24.81	0.60
赤ワインサンプル	8.81	5.70	16.35	<LOQ	<LOQ	0.03	4.61	2.30	0.16	0.57

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。

DE44288.3933217593

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021, 2023

Printed in Japan, April 27, 2023

5994-3161JAJP

## 結論

消費者は、煙の影響を受けたワインに否定的な反応を示しがちです。ブドウやワインから煙による化合物を除去する効果的な方法がないため、煙の影響はブドウ園にとって大きな問題になることがあります。収穫がないということは収入がないということになるので、この汚染はブドウ栽培者にとって重大な経済的影響を与える恐れがあります。ブドウ栽培者だけでなく、地域に対する風評被害のおそれもあります。<sup>6</sup> 煙の影響に関連する遊離型の揮発性フェノールを分析するために Agilent SPME-GC/MS/MS メソッドを開発したことで、確実な同定と信頼性の高い定量が可能となりました。

## 参考文献

1. Smoke Impact in Grapes and Wine. ETS Laboratories, 2020.
2. Herve, E.; Price, S.; Burns, G. Free Guaiacol and 4-Methylguaiacol as Markers of Smoke Taint in Grapes and Wines: Observations from the 2008 Vintage in California. ETS Laboratories, 2011.

3. Abercrombie, V. Agilent J&W DB-HeavyWax GC カラムによるワイン中の煙による汚染化合物の高速分析. Agilent Technologies application note, publication 5994-0081JAJP, 2018.
4. Westland, J. SPME ヘッドスペースアプリケーションによる塩を用いた成分濃度の増加の評価. Agilent Technologies application note, publication 5994-3159JAJP, 2021.
5. Westland, J. Agilent SPME Arrow および Agilent SPME ファイバ DVB/カーボン WR/PDMS の遊離型揮発性フェノールに対するレスポンスの比較. Agilent Technologies application note, publication 5994-3160JAJP, 2021.
6. Stubble burning – a Possible Source of Smoke Taint in Grapes – Fact Sheet. The Australian Wine Research Institute, 2021.