

Agilent 5977A GC/MSD を用いた ウィスキーの香気成分の ケモメトリクスプロファイリング

アプリケーションノート

食品試験・農業

著者

Takeshi Serino and Brian Hom
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA
USA

Sadao Nakamura
Agilent Technologies Japan Ltd.
Hachioji-Shi, Tokyo
Japan

概要

エクストラクタ EI イオン源を搭載した高感度の Agilent 5977A シリーズ GC/MSD に、ノンターゲット化合物分析と統計解析の手法を組み合わせ、化合物プロフィールを作成し、5 種類のブランドのウィスキーを識別しました。



Agilent Technologies

はじめに

ガスクロマトグラフィ/質量分析 (GC/MS) は、研究開発、品質管理、品質確認といった食品分析アプリケーションに広く使用されています。GC/MS 性能の進歩により、天然物に一般的に含まれる多くの微量化合物を確実に検出できるようになっています。香料の品質管理においては、いまでも人の感覚による試験 (嗅覚や味覚) が欠かせませんが、GC/MS を使えば、主要化合物や微量化合物の濃度プロファイルの変化や違いについて、人間の感覚の限界を超えて、より多くの貴重なデータを集めることができます。

ケモメトリクスは、記述的なアプリケーションと予測的なアプリケーションの両方に対応できます。記述的なアプリケーションでは、化学システムの特性をモデル化し、システムの基本的な関連性や構造を解明します。予測的なアプリケーションでは、化学システムの特性をモデル化して、調査対象となる新たな特性や挙動を予測します。記述的および予測的ケモメトリクスで用いられるデータの導出には、GC/MS がしばしば使用されます。予測的アプリケーションでは、オリーブ油におけるエクストラバージン感知試験の合否判定の予測^[1]、ワイン品種の識別^[2]、製造過程における焼酎の汚染の有無の確認^[3]などに GC/MS テクニックが用いられています。記述的アプリケーションでは、各種ブランドのウイスキーなどの識別に GC/MS が用いられています。

これらのケモメトリクス分析には、飛行時間型質量分析装置 (TOF MS) などが用いられることが多いですが、コストの安いシングル四重極質量分析計でも、有益な情報が得られます。このア

プリケーションノートでは、5977A GC/MSD により得られたデータに対して高度な統計解析を用いて、5 種類のブランドのウイスキーの違いを識別しました。Agilent 7890B GC を組み合わせた 5977A GC/MSD は、ウイスキーなどの食品の高感度分析および高度な統計プロファイリングに最適な分析装置です。また、PAL オートサンプラの自動固相マイクロ抽出 (SPME) により、ウイスキーの香り成分の高感度ヘッドスペースサンプリングが可能になります。Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアを使えば、幅広い統計ツールを用いて、ウイスキーなどの複雑なサンプルの組成を分類することができます。

このアプリケーションノートでは、ノンターゲット化合物分析と、一元配置分散分析 (ANOVA)、主成分分析 (PCA)、階層的クラスタ分析 (HCA) などの統計ツールを用いて、各ブランドのウイスキーの違いを識別しました。データ解析および統計解析には、NIST AMDIS (自動質量スペクトルデコンボリューション同定システム)、Agilent MassHunter ID Browser、Mass Profiler Professional ソフトウェアを使用しました。このアプローチにより、46 種類の化合物のピーク強度をもとに、ウイスキーを 4 つのグループに分類することが可能になります。

メソッド

サンプル

5 種類のウイスキーを米国の酒屋で購入しました。表 1 に各ウイスキーの説明をまとめています。

表 1. 研究に使用したウイスキーサンプル

サンプル	説明	主観的な香り
人気ブランド (PB)	市場でもっとも人気のあるウイスキー	やわらかで、ややオフドライ
他社製品 (A)	プレミアムウイスキーの記述	PB と類似
他社製品 (B)	人気のある安価なウイスキー	軽いキャラメルとバニラの甘い香り、PB より強い香り
他社製品 (C)	PB よりも高品質と主張	甘い香り、PB よりもやや強い
他社製品 (D)	深い香りのウイスキーと主張	ハチミツ、バター、かすかなダークフルーツ (プラム、レーズン)、PB より強い香り

装置

PAL オートサンブラの自動固相マイクロ抽出 (SPME) 機能を搭載した Agilent 7890B GC を、エクストラクタ EI イオン源を搭載したシングル四重極 Agilent 5977A GC/MSD と組み合わせておこないました。機器条件を表 2 および表 3 に示しています。

サンプル前処理

ヘッドスペース SPME を用いて、各サンプルに含まれる揮発性の香り成分を採取しました。ウイスキーサンプル各 5 mL を 10 mL ヘッドスペースバイアルに移しました。50 μm \times 2 cm DVB/CAR/PDMS を、攪拌して 60 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間、サンプルのヘッドスペースに曝露しました。SPME ファイバーに吸着した揮発性化合物を、240 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間、注入口へ熱脱着しました。

表 2. PAL オートサンブラ SPME 条件

サンプル量	ウイスキー 5 mL (10 mL バイアル)
シリンジ	2 cm ファイバー 50/30 μm DVB/CAR/PDMS
ブレインキュベーション時間	60 秒
インキュベーション温度	60 $^{\circ}\text{C}$
ブレインキュベーション 攪拌スピード	500 rpm
攪拌時間	0 秒でオン、2 秒でオフ
バイアルニードル深さ	11 mm
バイアルファイバー曝露	22 mm
抽出時間	600 秒
注入口	スプリット/スプリットレス注入口
注入ニードル深さ	32 mm
注入ファイバー曝露	22 mm
脱離時間	60 秒

表 3. GC および質量分析計条件

GC 分析条件

分析カラム	HP INNOWAX (25 m \times 0.20 mm、0.40 μm) (p/n 19091N-202)
注入メソッド	SPME (50/30 μm DVB/CAR/PDMS)
注入口温度	260 $^{\circ}\text{C}$ で等温
注入モード	スプリット、比率 50:1
オープン温度	40 $^{\circ}\text{C}$ で 1.5 分維持 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 40 $^{\circ}\text{C}$ ~240 $^{\circ}\text{C}$ 240 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分維持
カラム流量	1.1 mL/min 定流量
キャリアガス	ヘリウム
トランスファーライン温度	255 $^{\circ}\text{C}$
GC 分析時間	16 分

MS 条件

イオン化モード	EI、70 eV
イオン源温度	230 $^{\circ}\text{C}$
四重極温度	150 $^{\circ}\text{C}$
取り込みモード	スキャン (50–550 amu)、ノーマルモード
A/D サンプル	4
EM 設定ゲイン	1.0
閾値	150
微量イオン検出	オン
チューニング	etune.u および atune.u

データ処理と統計解析

GC/MS データからのエンティティ抽出には、Agilent MSD Productivity ChemStation (F.01.00) と AMDIS を使用しました。AMDIS の .ELU ファイルを Mass Profiler Professional (MPP) にインポートし、差分解析をおこないました。データフィルタリングおよび統計解析には、MPP 12.1 を使用しました。化合物同定には、NIST 11 MS ライブラリと Agilent MassHunter ID Browser を使用しました。各ソフトウェアパッケージで用いた設定を表 4 に示しています。

結果と考察

微量化合物の検出、Etune と Atune

5977A GC/MSD は、独自のエクストラクタ EI イオン源と Etune チューニングプロトコルを搭載しています。これにより、MSD 感度が向上し、より優れた検出下限が得られるとともに、微量化合物の同定性能が向上しています。旧バージョンの Agilent MSD に搭載されていた Atune アルゴリズムも、エクストラクタ EI イオン源で引き続き使用できます。この 2 つのチューニングプロトコルを用いてウィスキーサンプルの微量香り成分を検出し、このアプリケーションにおける両プロトコルの相対的な効率を比較しました。

表 4. データ処理および統計解析ソフトウェアの設定

デコンボリューション (AMDIS 2.67)	
Component width	12
Omit <i>m/z</i>	0 (TIC)、207、267
Adjacent peak subtraction	2
Resolution	中
Sensitivity	低
Shape requirement	中
エンティティ作成 (Mass Profiler Professional 12.1)	
Compound quality score	> 20
Minimum abundance	> 1,000
Ions	> 3
RT tolerance	< 0.10
Match factor	> 0.3
Normalization type	なし
化合物同定 (NIST MS ライブラリおよび Agilent MassHunter ID Browser)	
MS ライブラリ	NIST 11
マッチファクター	> 50、ベストヒット

Etune および Atune を用いたサンプル分析により、4 回の繰り返し注入から、合計 142 エンティティのリストを作成しました。図 1 のボルケーノプロットの赤い点で示しているように、相対強度を比較したところ、2 つのチューニングプロトコル間の倍率変化 ≥ 2 において、142 のエンティティのうち 48 エンティティが、 p -値 $< 5\%$ における t -検定の要件を満たしました。48 エンティティすべてで、Atune よりも Etune で強度が高くなりました。さらに、Etune で検出された 4 つのエンティティは、同じ AMDIS パラメータを用いた Atune では検出されませんでした (図 2)。

ウィスキーの香り成分のプロファイリング

5 種類のウィスキーサンプルの香り構成成分を完全に分析するために、5 種類すべてのウィスキーサンプルについて、3 回繰り返して GC/MS 分析をおこないました。その後、75% の変動係数 (CV) フィルタを用いて、検出されたエンティティをフィルタリングしたところ、5 種類のウィスキーサンプルに共通する 74 エンティティが得られました。これらを 2 つのグループに分けました (図 3)。1 つは相対ピーク強度が $< 1,000,000$ (低いピーク強度) のグループ、もう 1 つはピーク強度が $\geq 1,000,000$ (高いピーク強度) のグループです。

リテンションタイム	質量	化合物	Atune	Etune
6.522	401	401.0 at 6.52155	0	27,685
11.415	88	ペンタデカン酸、エチルエステル	0	25,542
7.86	475	475.0 at 7.86025	0	18,527
8.646	143	143.0 at 8.646299	0	19,100

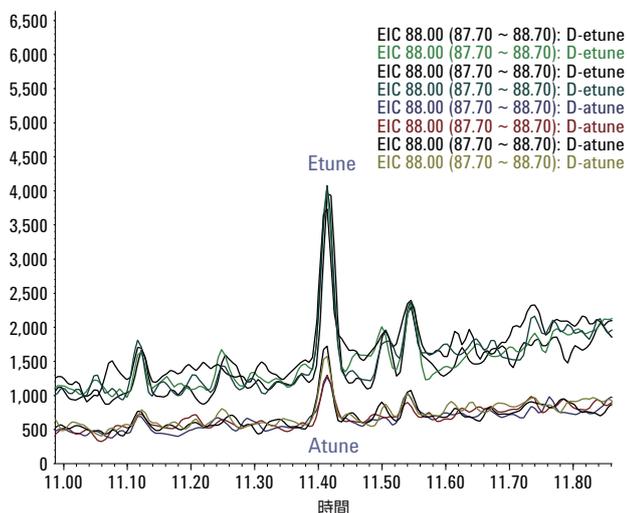


図 2. Etune (上の図) を用いたサンプル D の 4 回繰り返し分析では、同じ AMDIS 積分閾値を用いた Atune では検出されなかった 4 つの化合物が検出されました。下の抽出イオンクロマトグラム (EIC) は、Etune および Atune を用いた 4 回繰り返し分析における 88u ピーク (ペンタデカン酸、エチルエステル) を示しています。

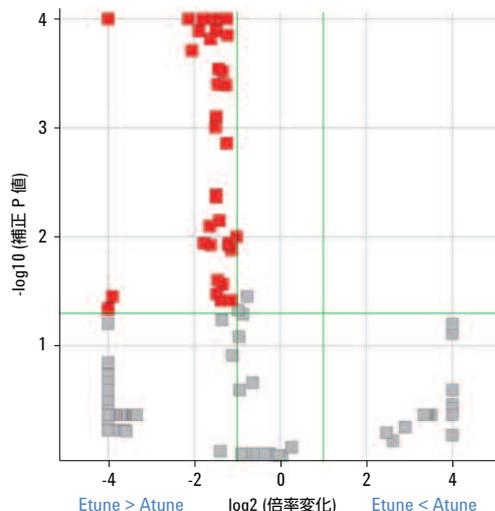


図 1. Atune および Etune で検出されたサンプル D の化合物における倍率変化を比較したボルケーノプロット。緑の線は倍率変化 (≥ 2) および確率 p 値 ($< 5\%$) のカットオフ値を示しています。基準を満たすエンティティを赤で示しています。基準を満たすすべての化合物の強度が、Etune では Atune と比較して 2 倍以上になっている点に注目してください。

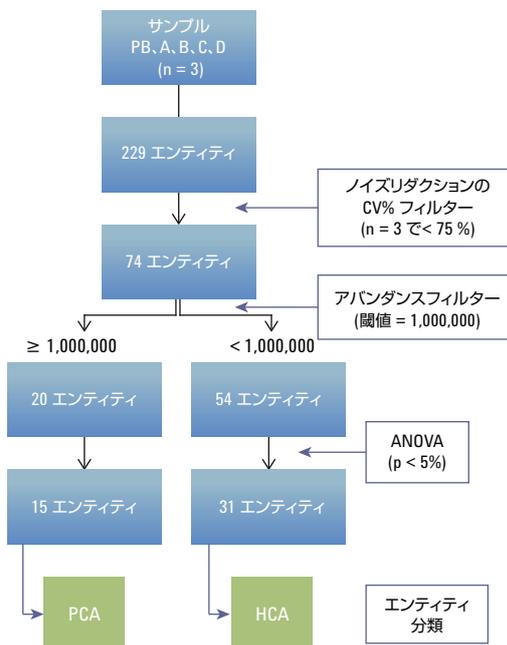


図 3. ウィスキーサンプルのケモメトリクスプロファイリングのワークフロー。主成分分析 (PCA) または階層的クラスター分析 (HCA) により、関連化合物の分類が完了します。

高濃度のエンティティ

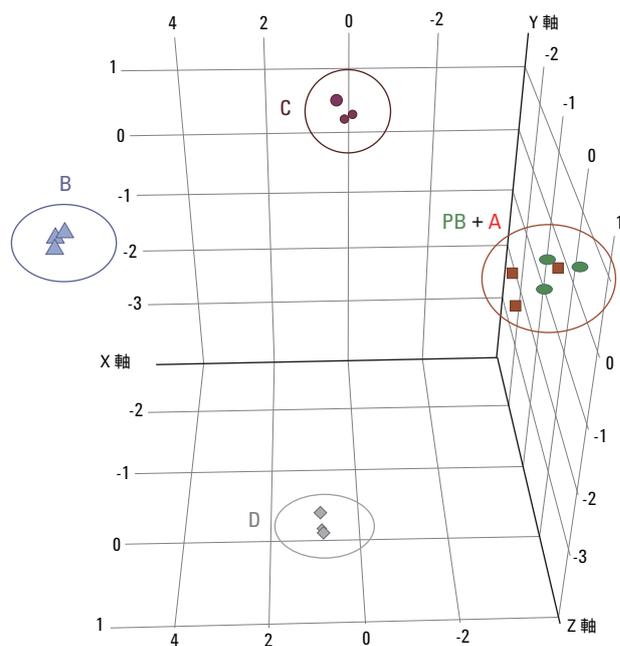
ピーク強度 $\geq 1,000,000$ の 20 の化合物を、Mass Profiler Professional (MPP) により同定しました。チューニングの違いを比較するために、ここでも Atune と Etune を使用しました。p-値 $< 5\%$ の一元

配置分散分析 (ANOVA) を用いてこれらのエンティティをフィルタリングしたところ、統計的に有意な 15 の化合物が得られました (図 4)。この 15 化合物の主成分分析 (PCA) により、4 つのサンプルグループ PB+A、B、C、D が識別されました (図 5)。

Retention Time	Mass	Compound	[PB]	[A]	[B]	[C]	[D]
2.590	61.0	Trimethylsilylmethanol	3759228	4107974	3257738	6529116	8362442
4.515	74.0	2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	3863118	3302027	1622565	2550368	1281017
4.772	70.0	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	3286931	3442918	1255734	584678	384032
5.724	88.0	Hexanoic acid, ethyl ester	855511	840595	2161864	991785	1130796
7.246	88.0	Octanoic acid, ethyl ester	6435439	7319735	35215980	7083341	16339178
7.590	96.0	3-Furaldehyde	3406372	3151482	1785684	1587822	3265564
7.937	88.0	Nonanoic acid, ethyl ester	619252	708628	1281332	674696	716060
8.593	88.0	Decanoic acid, ethyl ester	9160368	10945965	91484704	15420839	43557596
8.721	70.0	Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	99822	132939	1301459	366510	160848
8.767	110.0	Ethyl trans-4-decenoate	528019	555572	1170285	717243	240995
9.803	88.0	Dodecanoic acid, ethyl ester	1428005	1770075	31862326	3835626	14279053
9.912	70.0	(-)-1-Methylbutyl decanoate	35299	45598	1048773	303444	187453
10.348	91.0	Phenylethyl Alcohol	1451716	1323375	2749470	2825832	1035489
10.901	88.0	Tetradecanoic acid, ethyl ester	183026	188006	3107707	483733	1213085
11.906	88.0	Hexadecanoic acid, ethyl ester	343726	300003	2559052	741498	1686823

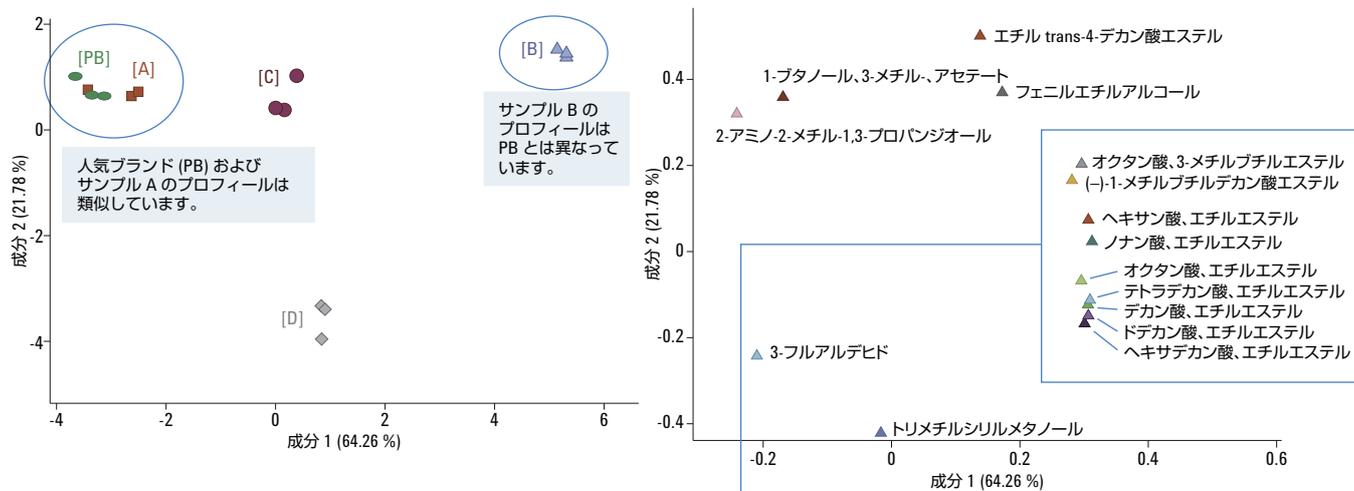
図 4. MPP および p 値 $< 5\%$ の ANOVA を用いたフィルタリングにより、統計的に有意と確認された 15 種類の高濃度化合物。

成分 1 では、PCA スコアプロットでサンプル B が大きくプラスとなり、サンプル A および PB がマイナススコアになりました (図 5)。成分 1 および 2 のローディングに従って、各エンティティが PCA ローディングプロット (図 6) に配置されています。PCA ローディングプロットでは、サンプル B に固有のエンティティが成分 1 のプラスエリアに配置されています。PCA スコアプロット (図 6A) とローディングプロット (図 6B) を比較すれば、各ウィスキーサンプルで違いのある固有のエンティティを特定することができます。図 6 の表は、サンプル B に固有のエンティティの例を示しています。PCA ローディングプロット (図 5) の X 軸である成分 1 について、サンプル B がハイスコアとなっているのは、これらのエンティティの影響です。また、各グループの化合物の相対ピーク強度も、グループの特徴を表しています (図 6)。



成分	中性 (ほぼゼロ)		
	マイナス (-)		プラス (+)
1 (64%) X 軸	A, PB	C, D	B
2 (22%) Y 軸	D	-	A, B, C, PB
3 (11%) Z 軸	C	-	A, B, D, PB

図 5. 高濃度グループの 15 種類の有意な化合物の PCA 分析により、化合物が 4 つの典型的なグループに分類され、A と B を除くすべてのサンプルが識別されています。



各サンプルタイプのエンティティの標準化強度

リテンションタイム	質量	化合物	[A]	[B]	[C]	[D]	[PB]
8.593	88	デカン酸、エチルエステル	10,945,965	91,484,704	15,420,839	43,557,596	9,160,368
7.246	88	オクタタン酸、エチルエステル	7,319,735	35,215,980	7,083,341	16,339,178	6,435,439
9.803	88	ドデカン酸、エチルエステル	1,770,075	31,862,326	3,835,627	14,279,053	1,428,005
10.901	88	テトラデカン酸、エチルエステル	188,006	3,107,707	483,733	1,213,085	183,026
11.906	88	ヘキサデカン酸、エチルエステル	300,003	2,559,052	741,498	1,686,823	343,726
5.724	88	ヘキサタン酸、エチルエステル	840,595	2,161,864	991,785	1,130,796	855,511
8.721	70	オクタタン酸、3-メチルブチルエステル	132,939	1,301,459	366,510	160,848	99,822
7.937	88	ノナン酸、エチルエステル	708,628	1,281,332	674,696	716,060	619,252
9.912	70	(-)-1-メチルブチルデカン酸エステル	45,598	1,048,773	303,444	187,453	35,299

図 6. PCA スコアにより、4 つのサンプルグループの違いが示されています (上のスコアプロット)。また、各グループの成分の標準化した相対強度が、グループの特性を表しています (下の表)。PCA ローディングプロットの一部の成分は、同様のプロフィールをもつことから、オーバーラップしています。赤: 非常に高い強度、オレンジ: 高い強度、黄色: 中程度の強度、緑: 低い強度。

低濃度および中濃度のエンティティ

ピーク強度 < 1,000,000 の 54 のエンティティを、Etune により検出し、Mass Profiler Professional (MPP) により同定しました。p 値 < 5 % の ANOVA でフィルタリングしたところ、統計的に有意な 31 の化合物が得られました。階層的クラスター分析 (HCA) によ

り、この 31 の化合物を 4 つのサンプルグループ PB+A、B、C、D に分類しました (図 7)。また、強度プロファイルの類似性をもとに、31 の化合物を HCA により 8 つのクラスターに分類しました。詳細を図 8 に示しています。

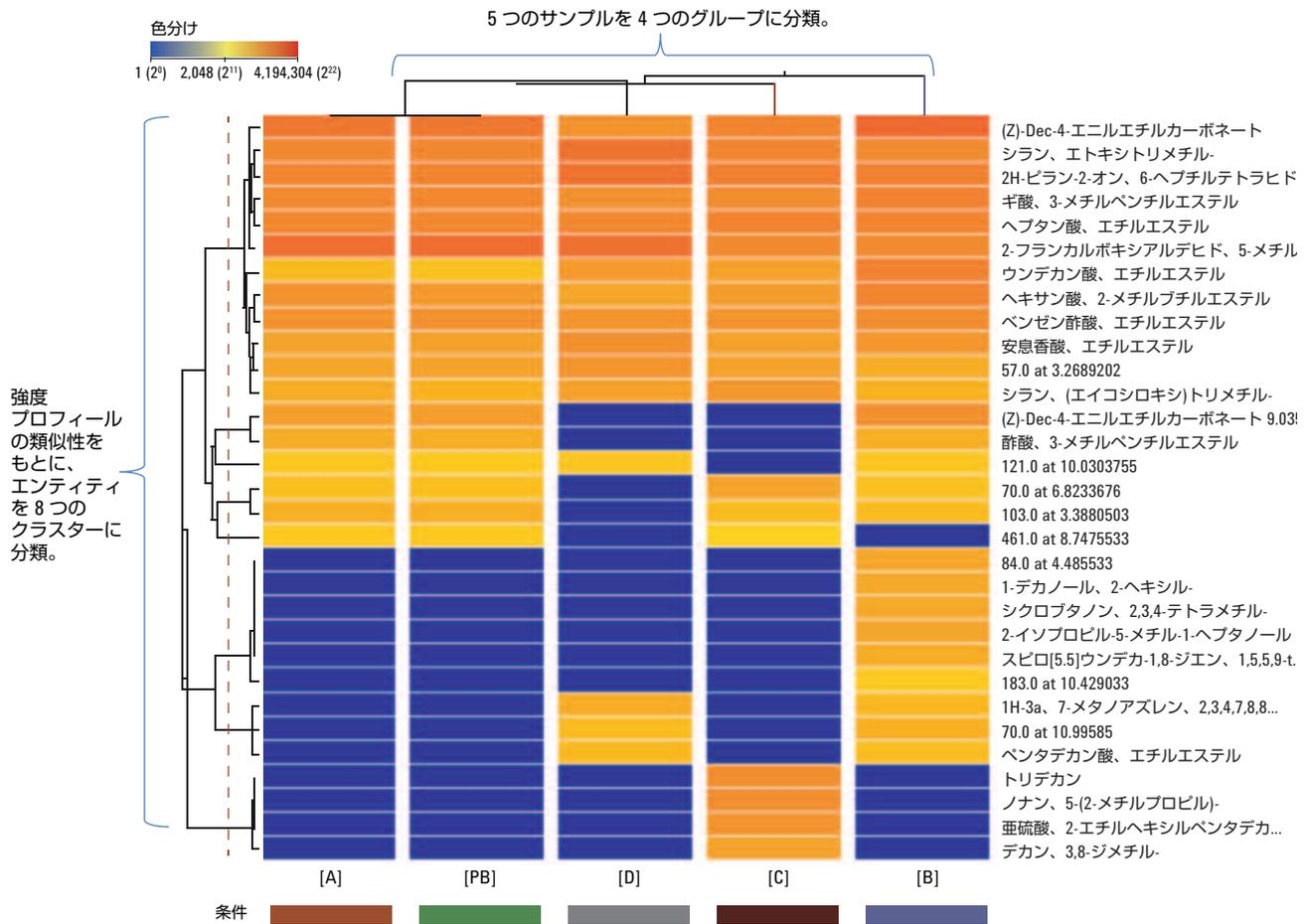


図 7. 標準化強度 < 1,000,000 の基準と HCA を用いたサンプルおよびエンティティの分類。プロフィールの類似性をもとに、サンプルを 4 つのグループに分類し、エンティティを 8 つのクラスターに分類しました。

5つのサンプルすべてに存在する12のエンティティ(クラスター0)のうち、1つは同定できず、他の2つはシステムブランクでした。残りの9つを、エンティティ強度に従って、PB+A、C+D、Bという3つのサンプルグループに分類しました(図9)。ピーク強度は、14,000~500,000の範囲内でした。

サンプルBおよびDには、いずれもクラスター6の3つのエンティティが含まれていました(図10)。そのうちの1つがペンタデカン酸エチルエステルでした。この化合物は、先におこなったAtuneおよびEtuneプロトコルの比較において、サンプルDで検出されています。この化合物は、Etuneを使用した場合にのみ検出されました。

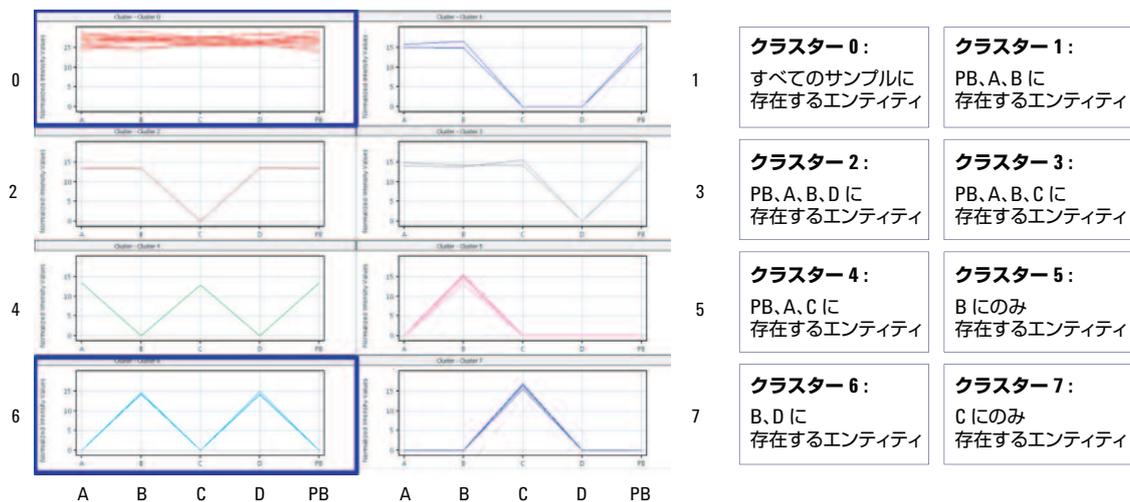


図8. 低濃度および中濃度のエンティティを8つのクラスターに分類し、各クラスターのエンティティの強度(y軸)を各サンプルグループ(x軸)に対してプロットしました。

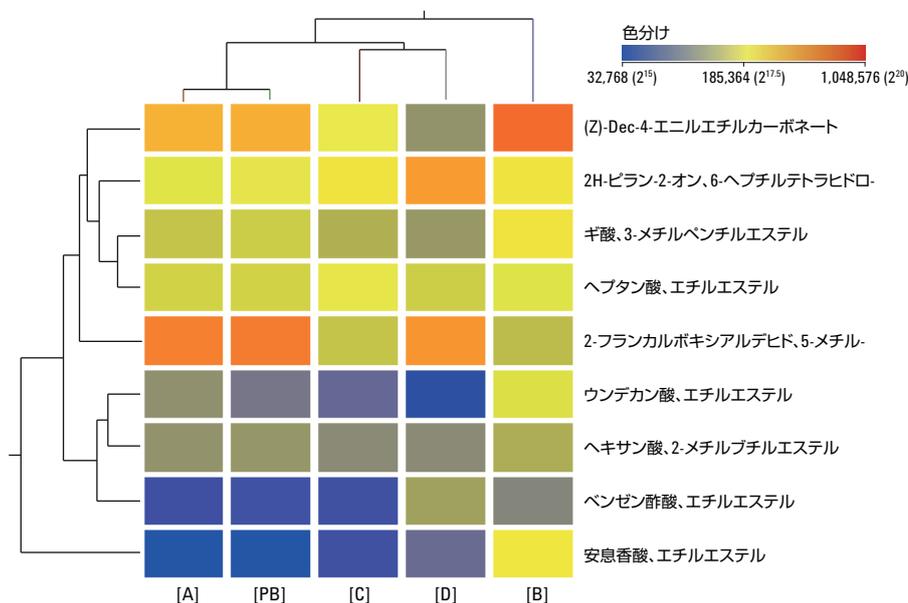
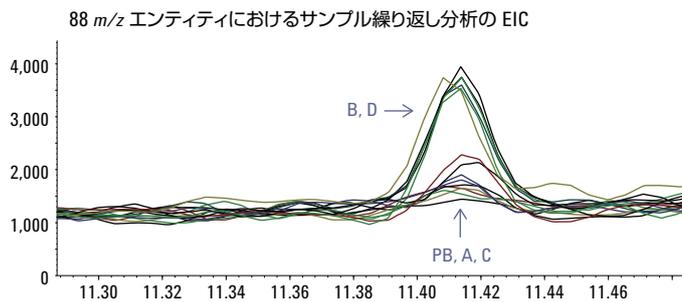


図9. 5つのサンプルすべてに存在すると確認された9つの化合物のHCA分析。クラスター0化合物の強度パターンをもとに、PB+A、C+D、Bという3つのサンプルグループに分類されています。



クラスター 6 のエンティティ

リテンションタイム	質量	化合物	[A]	[B]	[C]	[D]	[PB]
8.383	119	1H-3a、7-メタノアズレン、 2,3,4,7,8,8a-ヘキサヒドロ-3,6,8,8- テトラメチル、 [3R-(3.alpha.,3a.beta.,7.beta.,8a.alpha.)]-	0	20,890	0	33,060	0
10.996	70	10.99585 で 70.0	0	28,591	0	17,961	0
11.415	88	ペンタデカン酸、エチルエステル	0	18,581	0	21,067	0

図 10. クラスター 6 のエンティティの同定結果とピーク強度、および 88u エンティティ (ペンタデカン酸、エチルエステル) に関する 5 サンプルの繰り返し分析で得られた抽出イオンクロマトグラム (EIC)。この化合物がサンプル B および D にのみ存在することが示されています。

結論

このアプローチにより、5 種類のウィスキーサンプルのケモメトリクスプロフィールを作成し、サンプルを 4 つのグループに分類することができました。このアプローチは、未知汚染物質の分析^[3]、製品保管条件の最適化、サンプルの経時的劣化の測定などに用いることも可能です。

参考文献

1. S. Baumann and S. Aronova, "Olive Oil Characterization using Agilent GC/Q-TOF MS and Mass Profiler Professional Software" Agilent Technologies Application Note 5991-0106EN.
2. L. Vaclavik, , *O. Lacina, J. Hajslova, J. Zweigenbaum*, "The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety." , *Anal Chim Acta*.685, 45-51 (2011).
3. T. Serino, "Detecting Contamination in Shochu Using the Agilent GC/MSD, Mass Profiler Professional, and Sample Class Prediction Models" Agilent Technologies Application Note 5991-0975EN.

詳細情報

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

June 14, 2013

5991-2547JAJP



Agilent Technologies