HS-SPME と Agilent 5975 GC/MSD によるワインの揮発性化合物プロファイリング：化学的プロフィールと官能特性の関連性

アプリケーションノート

食品

著者

Anna K. Hjelmeland, Ellena S. King, Susan E. Ebeler, and Hildegarde Heymann
Department of Viticulture & Enology
University of California
Davis, CA
USA

概要

同時選択イオンモニタリング (SIM)/スキャン検出を用いた Agilent 5975 シリーズ GC/MSD システムで、61 種類のワイン中揮発性化合物を測定する半定量自動ヘッドスペース固相抽出 (HS-SPME) ガスクロマトフラフィー/質量分析 (GC/MS) メソッドを開発しました。このメソッドを用いて、市販されている 24 種類の米国産カベルネ・ソーヴィニョン単一種のワインおよびブレンドワインを分析しました。この分析結果をワインの記述的官能特性分析と比較し、多くの香り決定因子を予測できる高速ターゲットプロファイリングメソッドを開発しました。この研究は、ワイン業界が現在のカベルネ・ソーヴィニョンワインの特性を定義し、さらなる市場開発が求められる分野を特定するのに役立ちます。

Agilent Technologies

はじめに

ワインの官能試験によるプロフィールの分析では、化学的プロファイリング手法に対する関心が高まっています。飛行時間型 (TOF) 質量分析と包括的なガスクロマトグラフィーを組み合わせれば、何千もの化合物を分離することが可能です。しかし、すべての化合物がワインにおいて官能特性上の影響を与えているわけではありません。そうした複雑な化学組成の情報と官能試験結果を関連付けるためには、統計的手法が必要です。

特定の化合物に関するターゲットプロファイリングは、官能特性に関係するさまざまなワイン中揮発性化合物を評価するための代替的な高速分析手法となりえます。シングル四重極質量選択検出器 (MSD) の SIM/スキャン同時取り込みを利用すれば、フルスキャンスペクトルを迅速に採取し、分析対象物を確認することができます。また、高感度かつ選択性の高い定量分析や、ターゲット化合物の検出も可能です。

このアプリケーションノートで紹介する研究では、HS-SPME および 5975 シリーズ GC/MSD システムを用いて、米国産カベルネ・ソーヴィニョンワインおよびブレンドワインのプロファイリングメソッドを開発しています。このメソッドを使えば、ワインの官能特性を決定する複数の重要な成分を予測することができます [1]。SIM/スキャン同時取り込みは、これまでもワイン中揮発性化合物のプロファイリングに用いられていますが [2,3]、SIM/スキャン同時取り込みによりワインの香りに関連する可能性のある揮発性化合物を同定する手法は、この研究が初めてです。全部で 55 の揮発性化合物が同定されました。同定された化合物は、ワインの種類によって大きく異なりました。統計解析により、それらの化合物を 7 つの香り特性、12 の 味覚および口あたり特性へ関連付けました。いずれもワインの種類によって大きく異なりました。

実験手法

ワイン

研究に用いたワインは、すべて米国で製造および市販されているものです。全部で 24 種類のカベルネ・ソーヴィニョンだけを用いたワインおよびブレンドワイン (カベルネ・ソーヴィニョン 56 % 以上) を使用しました。うち 19 種類はカリフォルニア州、5 種類はワシントン州のものです。

標準試料

過去の報告をもとに、この研究では 61 種類の化合物をターゲットとしました [4,5]。そのうちの 58 種類を、過去に発表されている手順に従い、リファレンス化合物の測定により確認しました [1]。純性標準試料のリテンションタイムとスペクトルを、測定した化合物と照合させました。

装置

このプロファイリングメソッドの開発には、5975 シリーズ GC/MSD システムと、Gerstel MPS2 オートサンプラを搭載した Agilent 6890 GC を使用しました。GC と MS の設定条件を表 1 に示しています。SIM パラメータで用いたイオンと各化合物のリテンションタイムは、過去の文献で記載されているものを採用しました [1]。2-イソブチル-3-メトキシピラジン (MIBP) についても、過去の文献の記載に従って、同じ GC、カラムおよびオートサンプラ、Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS を用いて測定しました [1]。

サンプル前処理

ワインサンプル (10 mL、未希釈) をピペットで 20-mL 丸底褐色ガラスヘッドスペースバイアルに入れました。各バイアルには NaCl 3 g (± 0.02) が入っています。バイアルをすぐに MPS2 のトレイに置いて、測定しました。SPME のサンプリングには、2-cm ジビニルベンゼン/カルボキシン/ポリジメチルシロキサン (DVB/CAR/PDMS) (Supelco)、23-ゲージ SPME ファイバーを使用しました。サンプルを 30 °C に保温し、500 rpm で 5 分間撹拌した後、250 rpm で撹拌しながら 30 °C で 30 分間ファイバーを曝露しました。MPS2 トレイへバイアルを置いてから 18 時間以内に、ランダムにすべてのサンプルを 3 回分析しました。

表 1. 機器条件

GC 分析条件	
分析カラム	Agilent J&W DB-Wax、30 m × 0.25 mm、0.25 µm (p/n 122-7032)
注入モード	SPME ファイバーをスプリットモードで脱着、スプリット比 20:1
注入口温度	240 °C
キャリアガス	ヘリウム、定流量モード、1 mL/min
オーブン温度	40 °C で 5 分維持、3 °C/min で 40～180 °C、30 °C/min で 180～240 °C、10 分維持
トランスファーライン温度	240 °C
MS 分析条件	
採取モード	同時 SIM/スキャン、電子イオン化、*m/z* 40～300
スキャンレート	5.8 スキャン/s (各ピークで 15 スキャン)
HS-SPME 条件	
ファイバー	2 cm × 23 ゲージジビニルベンゼン/カルボキシン/ポリジメチルシロキサン (DVB/CAR/PDMS、Supelco)
サンプリング	サンプルを 30 °C で温め、500 rpm で 5 分間撹拌してから、250 rpm で撹拌しながら 30 °C で 30 分間ファイバーを曝露
脱着	240 °C で10 分

官能特性分析

ランダムかつバランスのとれた順序で、各ワインを 3 回評価しました。評価にあたっては、過去の文献に記載されている 11 の官能特性評価因子を選択しました [1]。20 の香り特性と 14 の味覚および口あたり特性を評価しました。「低」および「高」を主体とする非構造化 15 cm ラインスケールを用いて、各特性の強度を格付けしました。ただし、一部の特性については、別の対義語を使用しました。

データ解析

半定量ターゲットプロファイリングメソッドでは、抽出したイオンのピーク面積を用いて、内部標準 (2-ウンデカノン) と比較してピークを定量しました。GC/MS/MS を用いて測定した MIBP については、検量線を用いて、内部標準 ($^{2}H_{3}$MIBP) に対する MIBP の相対レスポンスから絶対濃度を測定しました。

分散分析 (ANOVA) により GC/MS の測定データを解析し、偽混合モデルテストを用いて、(ワイン*レプリケートの) 平均二乗をエラーとして、ワインとレプリケートの影響を測定しました。記述的官能特性解析では、ANOVA により、ワイン、レプリケート、評価因子の影響を測定しました。すべて双方向で解析し、偽混合モデルテストを用いて、ワインを含む相互作用項の平均二乗をエラーとしました。多重対相関と部分最小二乗回帰 (PLSR) を用いて、化学および官能特性データを互いに関連付けました。GC/MS データを x-変数 (予測変数)、官能記述データを y-変数として、PLS2 により関連付けました [1]。各官能特性 (y-変数) を官能データ (x-変数) に関連付け、さらなる PLS1 モデルを作成しました。

結果と考察

GC/MS データと官能特性データの関連付け

本研究で用いた 24 種類のカベルネ・ソーヴィニョンだけを用いたワインおよびブレンドワインについて、標準化した有意な GC/MS データおよび官能特性データの部分最小二乗回帰 (PLSR) 解析を実施した結果を図 1 に示しています。2 つの主成分 (PC) により、GC/MS データ (x-変数) の相違の 38 %、官能特性データ (y-変数) の相違の 46 % が説明されました。第 3 主成分により、GC/MS データと官能特性データの相違のさらに 7 % および 10 % が説明されました (データは示していません)。

このモデルでは、開発した GC メソッドを用いて測定したカベルネ・ソーヴィニョンワインおよびブレンドワイン中の 56 の化合物のうち、36 の化合物が官能特性の予測 (PLS2) に大きく ($p < 0.05$) 寄与しました。そうした化合物がローディングプロットの外側に位置することからも見てとれます (図 1A)。官能特性に関係する化合物をより詳細に探るために、各官能特性について、PLS1 回帰解析を実施しました。

化学組成と香り

検出された揮発性化合物は、官能特性決定因子の多くに関連している可能性があります。たとえば、ジアセチルとアセトインは、バタースコッチ香に関係していました (図 1A)。どちらの化合物も、食品やワインにおいてバター香に関係することで知られています。4-エチルフェノールと 4-エチルグアヤコールは、ワインにおいて革や鞍のような香りに関係することが知られています。この研究では、α-セドレンとともに、粗野な香りに関係していることがわかりました (図 1A)。野菜の香りは、ピーマンの香りを持つ 2-イソブチル-3-メトキシピラジン (MIBP) に関連付けられました。複数のエステル (酢酸エキシル、酢酸 2-フェニルエチルなど)、テルペン (リナロール、β-シトロネロールなど)、ノルイソプレノイド (β-ダマセノン、α-イオノンなど) は、PLS2 解析において、ベリーやフレッシュフルーツの香りに関連付けられました (図 1A)。

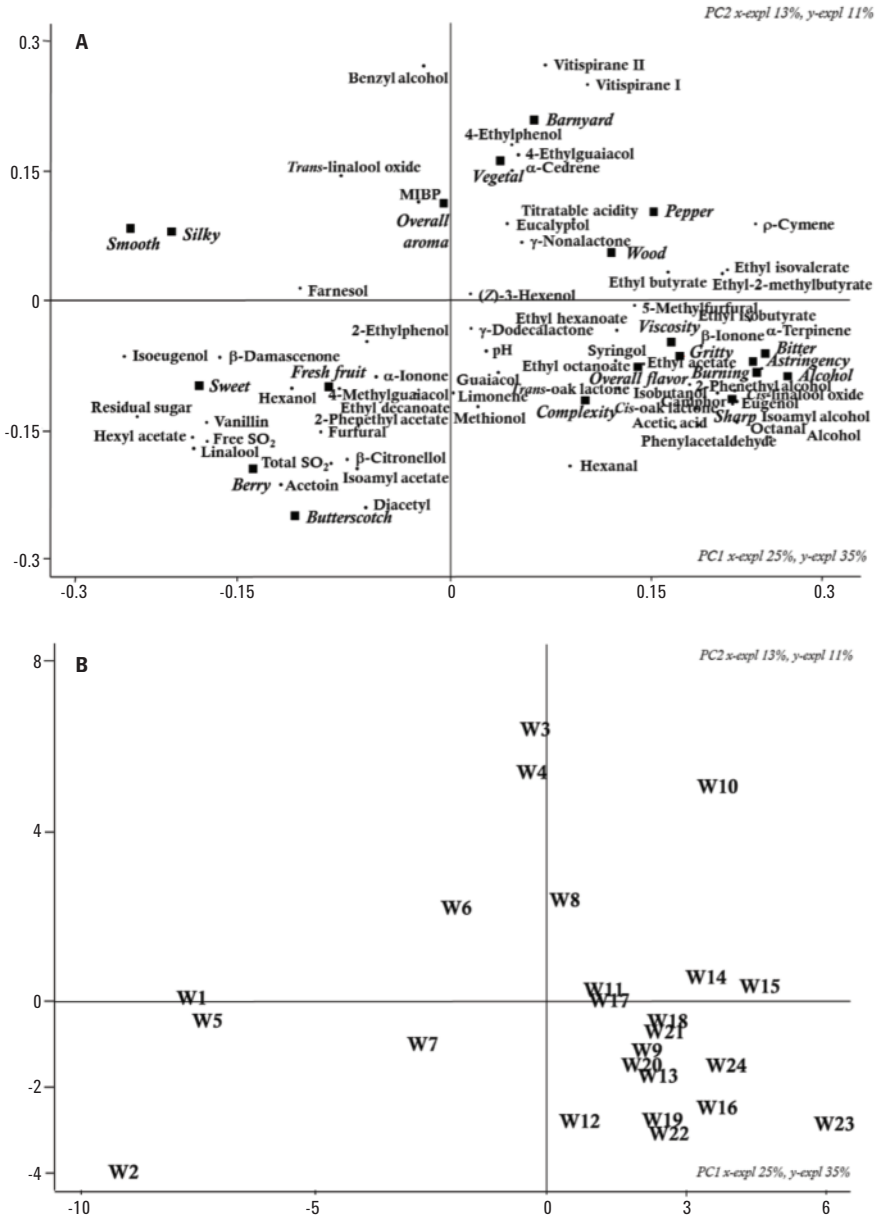


図 1. A) 標準化した化合物の GC/MS データを x-変数 (予測変数) (小さい黒丸)、標準化した有意な ($p < 0.07$) 官能特性を y-変数 (黒い四角) とした PLSR。B) 24 種類の市販米国産カベルネ・ソーヴィニョンだけを用いたワインおよびブレンドワインの PLSR。コードはアルコール濃度の増加を示しています (W1 = 12.4 % v/v～W24 = 15.9 % v/v)。情報元 : Hjelmeland ほか [1]。

表 2 および 3 にまとめたように、GC/MS のデータにより、多くの官能決定因子を予測できることがわかりました。相関性の多くは理論的なものですが、すでに述べたように、正相関が必ずしも因果関係を反映しているとは限りません。ほとんどのワインの官能特性は、複数の化合物の混合物を感知した結果として生じるものです。

表 2. PLS1 にもとづく米国産カベルネ・ソーヴィニョンワインおよびブレンドワインの各香り特性と揮発性化合物の有意な関連性

	香り							
化合物	**ベリー**	**バタースコッチ**	**フレッシュフルーツ**	**甘い香り**	**コショウ**	**野菜**	**木**	**粗野な香り**
酢酸								
アセトイン	+	+			–			
樟脳							+	
α-セドレン	–	–						+
p-シメン					+		+	
ジアアセチル		+						
酪酸エチル					+			
4-エチルグアヤコール								+
イソ酪酸エチル						–		
イソ吉草酸エチル	–	–			+			
エチル-2-メチルブタレート	–	–			+			
4-エチルフェノール								+
ユーカリプトル						+		
オイゲノール †					+		+	
ファルネソール		+					–	
グアヤコール †							+	
酢酸ヘキシル	+		+		–			
β-イオノン					+		+	
イソブタノール						–		
イソオイゲノール					–	–	–	
リナロール	+	+			–			–
cis-リナロールオキシド					+			
4-メチルグアヤコール †							–	
MIBP (2-イソブチル-3-メトキシピラジン)						+		
trans-オークラクトン †							+	
オクタナール					+			
2-フェネチルアルコール						–		
残留糖	+	+	+	+	–	–	–	
SO_2 (遊離)	+	+			–			
α-テルピネン			–		+		+	
バニリン †		+				–	–	
ビチスピラン I		–						+
ビチスピラン II								+

+ 正相関

– 負相関

† オーク由来化合物

黄色で示す化合物は、記載の香りに関係しているが、統計的に有意ではないもの。

表 3. PLS1 にもとづく米国産カベルネ・ソーヴィニョンワインおよびブレンドワインの味覚および口あたり特性と化学組成の関連性

	味覚または口あたり								
化合物	**甘味**	**苦味**	**渋味**	**アルコールの風味**	**粘度**	**なめらかさ**	**鋭さ**	**ざらつき**	**灼熱感**
酢酸		+	+	+		–			+
アセトイン			–						
アルコール (エタノール)		+	+	+	+	–	+	+	+
樟脳		+		+	+	–			+
p-シメン		+		+	+	–		+	+
ジアセチル			–						
酢酸エチル		+	+	+	+	–	+	+	+
4-エチルグアヤコール									
酪酸エチル		+		+					+
イソ酪酸エチル		+		+		–		+	+
イソ吉草酸エチル		+		+		–			+
エチル-2-メチルブタレート		+		+		–			+
オクタン酸エチル		+		+					+
オイゲノール†		+		+	+	–		+	+
酢酸ヘキシル									
β-イオノン		+		+	+	–		+	+
イソアミルアルコール		+		+		–		+	+
イソブタノール		+		+		–		+	+
イソオイゲノール		–		–	-	+		–	–
リナロール				–					
cis-リナロールオキシド		+		+	+	–		+	+
5-メチルフルフラール		+		+		–		+	+
cis-オークラクトン		+		+	+			+	+
trans-オークラクトン†				+	+	–			+
オクタナール		+		+	+	–		+	+
フェニルアセトアルデヒド		+		+	+	–			+
2-フェネチルアルコール		+	+	+		–		+	+
残留糖	+	–		–	–	+		–	–
SO_2 (遊離)		–		–	–	+		–	–
SO_2 (合計)			–				–		
pH			+						
シリンゴール		+	+	+		–	+		+
a-テルピネン		+	+	+	+	–		+	+
バニリン†									
ビチスピラン I									
ビチスピラン II									

+ 正相関
– 負相関
† オーク由来化合物

味覚および口あたりと化合物の関連性

このモデルでは、多くの揮発性化合物が、味覚および口あたり特性と関連付けられました (図 1、表 3)。ただし、これは相関性を示すもので、因果関係を示すものではありません。スコアプロット (図 1B) で示すカベルネ・ソーヴィニョンのみのワインおよびブレンドワインについては、アルコール濃度の測定値が最低のもの (W1 = 12.4 % v/v) から最高のもの (W24 = 15.9 % v/v) までをコードで表示しています。このモデルでは、おもにアルコール濃度に従ってワインが区別されています (図 1B)。このモデルからは、ローディングプロット (図 1A) における化合物および官能特性が、アルコール濃度に間接的に左右されている可能性が見てとれます。したがって、このモデルで味覚および口あたり特性に関係するとされた化合物の多く (エステル、高アルコール、モノテルペン、ノルイソプレノイド、ラクトン、フェノールなど) は、アルコール濃度の高いワインにおいて高濃度で検出されると同時に、高アルコール濃度ワインで数値が高くなった官能特性 (苦味、渋味、粘度、鋭さ、ざらつき、灼熱感など) でも相関性が見られています。

アルコール濃度の重要性

アルコール濃度の低いワイン (若いコード番号で表示) は、図 1B の左側にありますが、アルコール濃度の高いワインは、プロットの右側に位置しています。PC1 では、おもにフルーティ特性および甘味のあるサンプルがプロットの左側に分類され、アルコールの風味、苦味、渋味のあるサンプルが右側に分類されています (図 1A)。アルコール濃度の低い W1～7 (12.4～13.8 % v/v) は、全体的に甘く、フルーツおよびバタースコッチの香りが強く、なめらかな口あたりでした。それに対して、プロット (図 2) の左側にあるアルコール濃度の高い W8～24 (13.9～15.9 % v/v) は、苦味と渋味、木の香りが強く、全体的な香りの強度、アルコールの風味、複雑さが目立ち、鋭くざらざらした、灼熱感のある口あたりでした。W9、W12～13、W16～22、W24 といった右下に位置するワインのグループは、きわめて狭い範囲に固まっています。このことは、これらのワインではアルコール濃度が 14.3～15.9 % v/v と幅広いものの、化学プロフィールと官能特性プロフィールがよく似ていることを示しています。

その他の官能特性

多くの官能特性は、PLSR では十分にモデル化できませんでした。これはおそらく、特性に関連する化合物が、開発した GC メソッドで測定できなかったためと考えられます。そうした化合物の 1 つである含硫黄有揮発性化合物も測定されませんでした。含硫黄有揮発性化合物は揮発性が高いため、分析には特別な GC カラムや選択検出器が必要となります [1]。これらの化合物は、カベルネ・ソーヴィニョンワインの品種特性に関係していることが報告されています。さらなる研究では、ワインの官能特性プロフィールに影響を与えることで知られるその他の重要な揮発性化合物に対応できるように、HS-SPME/GC/MS メソッドを拡張および適合させる必要があります。

反対に、今回の研究で測定した化合物の多くは、いずれの官能特性についても、重要な関連性がありませんでした。これはおそらく、そうした化合物が官能閾値を下回っていたか、明確な決定因子のないワインの官能特性プロフィールに関係していることが原因と考えられます。また、さまざまな影響が組み合わさったためとも考えられます。複数の揮発性化合物の相互作用や相殺作用により、個別の官能特性への関与を測定できなかった可能性があります。

結論

赤ワインに含まれる幅広い揮発性化合物を測定する高速ターゲットプロファイリングメソッドを開発しました。このメソッドを使えば、重要な官能特性因子の多くを予測することができます。複雑なサンプル前処理をおこなったり、より高価な機器 (多次元 GC や TOF MS) を使用したりする必要はありません。このメソッドでは、HS-SPME と同時 SIM/スキャン検出を用いた GC/MS を組み合わせ、ターゲット化合物の感度と選択性を最適化しました。このメソッドを用いた分析により、各種の市販米国産カベルネ・ソーヴィニョンのみのワインおよびブレンドワインでは、化学プロフィールおよび官能特性プロフィールがそれぞれに異なることがわかりました。そうした違いの一部は、アルコール濃度の直接的および間接的な影響から生じていることも明らかになりました。

参考文献

1. A.K.Hjelmeland, *et al.* “Characterizing the Chemical and Sensory Profiles of U.S. Cabernet Sauvignon Wines and Blends” *Am. J. Enol.Vitic.***64**, 169-179 (2013).

2. L. Cai, *et al.* “Rapid determination of trans-resveratrol in red wine by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry” *J. Chromatogr., A* **1216**, 281-287 (2009).

3. M. Del Carlo, *et al.* “Determination of phthalate esters in wine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry” *Food Chem.***111**, 771-777 (2008).

4. I.L.Francis and J.L.Newton ” Determining wine aroma from compositional data” *Aust.J. Grape Wine Res.***11**, 114-126 (2005).

5. P. Polášková, J. Herszage, S.E.Ebeler “Wine flavor:Chemistry in a glass. “ *Chem.Soc.Rev.* **37**, 2478-2489 (2008).

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web 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
December 6, 2013
5991-3682JAJP

Agilent Technologies