

HS-SPME とトリプル四重極 GC/MS による ワイン中ハロアニソールのハイスループット 分析

アプリケーションノート

食品

著者

Anna K. Hjelmeland, Thomas S. Collins,
Alyson E. Mitchell, and Susan E. Ebeler
Departments of Viticulture and Enology,
Food Science and Technology,
Agricultural and Environmental
Chemistry Graduate Group, and the Food
Safety and Measurement Facility
University of California
Davis, CA
USA

Joshua L. Miles
Treasury Wine Estates
600 Airpark Road
Napa, CA
USA

Philip L. Wylie
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE
USA

概要

ハロアニソールによる汚染は、ワインにおけるコルクのしみやかび臭さの原因になります。ワインおよび関連業界では、コルクのしみにより、毎年大きな経済的損失が生じています。ヘッドスペース固相マイクロ抽出 (HS-SPME) と Agilent 7890A GC および Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS を組み合わせた手法により、ワイン中の TCA について 0.5 ng/L という定量下限 (LOQ) が得られました。TeCA、TBA、PCA の LOQ は、1.0 ng/L 以下でした。これらの LOQ は、ワイン中のハロアニソールの閾値を下回っています。このメソッドは自動化されているため、必要な前処理操作は内標準の添加のみです。ハイスループットのメソッドで、抽出時間は 10 分です。



Agilent Technologies

はじめに

ハロアニソール (2,4,6-トリクロロアニソール (TCA)、2,3,4,6-テトラクロロアニソール (TeCA)、2,3,4,5,6-ペンタクロロアニソール (PCA)、2,4,6-トリブロモアニソール (TBA) など) は、微量レベルであっても、多くの食品や飲料でかび臭さの原因になります。ワインの場合、ハロアニソールによる汚染は、しばしばコルクのしみとして表れ、市場に出るおよそ 1~5 % のワインに影響を与え、大きな経済的損失の原因になっています。ワインにおけるハロアニソールのおもな汚染源は汚染されたコルクですが、オーク樽などのその他のワイン製造に起因することもあります [1]。

ハロアニソールの閾値は、低 ng/L 域 (ワイン中 TCA で 3 ng/L 以下) ときわめて低いため、ワイン中のハロアニソールを定量するためには、感度と選択性の高い分析手法が必要です。ほとんどのワイナリーやコルク供給業者は、確立された詳細な品質管理分析手順を持ち、加工や保管の全工程を通して、コルクロットやワインサンプルのハロアニソール濃度を日常的にモニタリングしています。そのためには、ハイスルーブットのメソッドが求められます。

多くのハロアニソール分析メソッドでは HS-SPME が用いられますが、抽出時間が 20 分を超えるため、生産現場における分析のスピードに制約が生じています。また、多くのメソッドでは、定量分析の正確性を確保するための安定同位体内標準が用いられません。ワイン成分のターゲット分析には、検出下限 (LOD) (感度) に優れ、分析対象物の選択性が高いタンデム MS (MS/MS) がしばしば用いられます。このアプリケーションノートでは、HS-SPME と安定同位体内標準を用いたハロアニソール分析メソッドを紹介します。Agilent 7890A GC と Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS により、再現性と精度の高い高速 MS/MS 分析が実現します。このメソッドにより、TCA、TeCA、PCA、TBA について、1 ng/L 以下という LOD および LOQ が得られました [1]。

実験手法

標準および試薬

ハロアニソール標準試料を購入し、過去の文献の記載にしたがって原液を調製しました [1]。モデルワインも過去の文献にしたがって調製し、初期評価およびキャリブレーション標準の作成に使用しました。

5 種類の市販ワイン (赤 2 種類、白 3 種類) を地元カリフォルニアで入手し、分析対象物の回収試験に使用しました。また、地元の試験所から、消費者から香りの劣化が報告された 5 本の汚染ワインを入手しました [1]。

装置

このメソッドは、注入口に SPME 注入ライナを備えた Agilent 7890A ガスクロマトグラフと Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS を用いて開発しました。Gerstel MPS2 オートサンブラを 7890A GC に取り付け、ヘッドスペースサンプル抽出をおこないました。GC/MS/MS の機器条件を表 1 に示しています。

表 1. ガスクロマトグラフおよび質量分析計条件

| GC 分析条件 | |
|--------------|---|
| 分析カラム | 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-5 (p/n 122-5032) |
| 注入口 | スプリットレス、SPME 注入ポートライナを設置 |
| 注入 | スプリットレス、スプリットフローを 1.2 分に開始、流量 50 mL/min で 3 分、流量を 20 mL/min に変更 |
| キャリアガス | ヘリウム、定流量、1.2 mL/min |
| オープンプログラム | 40 °C (0 分) 30 °C/min で 40~280 °C 3 分維持 |
| トランスファーライン温度 | 280 °C |
| MS 分析条件 | |
| 溶媒ディレイ | 5 分 |
| EMV ゲイン | 15 |
| 採取パラメータ | EI、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) |
| スキャン幅 | ±1.2 m/z |
| クエンチガス | ヘリウム、2.25 mL/min |
| コリジョンガス | 窒素、1.5 mL/min |

サンプル前処理

ワインサンプル (10 mL) を 20-mL アンバーガラスサンプルバイアルに移し、内標準原液 50 μL を加えました。内標準のサンプル中の最終濃度は、 $[^2\text{H}_5]$ TCA および $[^{13}\text{C}_6]$ PCA は 5.0 ng/L、 $[^2\text{H}_5]$ TBA は 10 ng/L としました。抽出に先立ち、40 °C、500 rpm で 5 分間、サンプルを攪拌しました。その後ただちに、あらかじめコンディショニングした 100 μm PDMS SPME ファイバーをバイアルのヘッドスペースに挿入し、250 rpm で攪拌しながら、10 分間でサンプルを抽出しました。その後、サンプル間の分析対象物のキャリーオーバーを防ぐために、オープンサイクル時間 (11 分) 全体にわたって、GC 注入口 280 °C でファイバーを加熱脱着しました。汚染とサンプルのロスを防ぐために、ファイバーは常に注入口に設置するか、サンプルを抽出している状態にしました。すべての分析を 3 回繰り返して実施しました。

分析パラメータ

4 種類のハロアニソールの分析に用いたパラメータを表 2 に示しています。

表 2. 分析パラメータ

| 分析対象物/内標準 | リテンション タイム (分) | トラン ジション (<i>m/z</i>) | コリジョン エネルギー (V) |
|--|----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| トリクロロアニソール (TCA) | 5.21 | 210 & 195* 212 & 197 † | 10 10 |
| [² H ₅] トリクロロアニソール | 5.20 | 215 & 197 217 & 199 | 10 10 |
| テトラクロロアニソール (TeCA) | 6.10 | 246 & 203 231 & 203 | 25 15 |
| トリプロモアニソール (TBA) | 6.50 | 344 & 329 346 & 331 | 10 10 |
| [² H ₅] トリプロモアニソール | 6.48 | 351 & 333 349 & 331 | 15 15 |
| ペンタクロロアニソール (PCA) | 6.91 | 265 & 237 280 & 237 | 10 25 |
| [¹³ C ₆] ペンタクロロアニソール | 6.91 | 286 & 242 286 & 271 | 25 10 |

* 記載したすべてのトランジションについて、最初の数字はクオンティファイアのトランジションを示します。

† 記載したすべてのトランジションについて、2 つ目の数字はクオリファイアのトランジションを示します。

データ入手先: Hjelmeland ほか [1]

結果と考察

直線性、LOD、LOQ

表 3 の結果は、モデルワインマトリクス中の各ハロアニソールの直線レスポンスを示しています。LOD と LOQ は、それぞれの閾値よりも大幅に低くなりました。この分析条件下では、もっとも揮発性の低い TBA の LOD と LOQ がもっとも高くなりました。このメソッドでは、抽出時間を短くすることで、最適な感度とスルーボットのバランスを調整することができます。得られた LOD と LOQ は、水、ワイン、コルク抽出液中のハロアニソールの HS-SPME 分析に関する過去の研究で報告されている一般的な値を下回りました [2,3]。過去の研究では、抽出時間 25 分以上の HS-SPME とシングル四重極選択イオンモニタリング (SIM) 検出が用いられています。

回収率と再現性

表 3. モデルワインにおけるハロアニソールのキャリブレーション、直線性、LOD、LOQ

| 化合物 | 標準検量線範囲 (ng/L) | 相関係数 (R) | LOQ (ng/L) | LOD (ng/L) | 閾値* (ng/L) |
|------|-------------------|----------|---------------|---------------|---------------|
| TCA | 0.10–50 | 0.9992 | 0.50 | 0.10 | 3.0 |
| TeCA | 0.10–50 | 0.9997 | 0.10 | < 0.10 † | 15 |
| PCA | 0.10–50 | 0.9996 | 0.25 | 0.10 | 3.0 |
| TBA | 0.50–50 | 0.9991 | 1.0 | 0.50 | 10,000 |

* ワインにおける閾値

† 0.10 ng/L 未満の標準は分析せず

データ入手先: Hjelmeland ほか [1]

このメソッドを用いた場合、各種の赤ワインおよび白ワインマトリクス中のハロアニソールの回収率は 90~110 % で、ほとんどのケースで相対標準偏差 (% RSD) は 10 % 未満でした (表 4)。過去の文献でも同様の値が報告されています [2,4]。マトリクス干渉によりサブ ng/L レベルの検出が制限されるケースも報告されていますが、ここで用いた HS-SPME と組み合わせたタンデム MS アプローチでは、分析対象のワインでマトリクス干渉は見られませんでした。バックグラウンドレベルが観察されたケースでは、イオン比にもとづき、ハロアニソールが原因であると特定されました。商業ワイナリー環境においては、水や空気、ガラス容器からすべてのハロアニソール汚染を取り除くことがきわめて困難であるため、低濃度のハロアニソールの検出は予想外の事例ではありません。分析システムの各コンポーネントの汚染もモニタリングする必要があります。たとえば、プラスチック製コンポーネントについては、高キャリブレーション標準の分析後に洗浄する必要があります。また、濃度 100 ng/L を超える分析後には、カラムのフロントエンド (~2.5 cm) を切断し、キャリーオーバーを防ぐ必要があります [1]。

表 4. ワイン中ハロアニソールの添加回収率と再現性

| 化合物 | ワイン | 測定値 | | | 添加回収率 (%) | RSD (%) |
|------|-------------|-------------|--------------|------------|-----------|---------|
| | | 添加濃度 (ng/L) | ブランク中 (ng/L) | 添加後 (ng/L) | | |
| TCA | プティシラー | 1.0 | nd* | 0.94 | 94 | 2.5 |
| | | 5.0 | | 4.7 | 94 | 4.7 |
| | ソーヴィニオンブラン | 1.0 | nd | 0.93 | 93 | 11 |
| | | 5.0 | | 4.8 | 97 | 2.2 |
| | ゲヴェルツトラミネール | 1.0 | < LOQ | 1.0 | 97 | 17 |
| | | 5.0 | | 5.0 | 99 | 4.8 |
| | リースリング | 1.0 | nd | 1.0 | 103 | 9.1 |
| | | 5.0 | | 4.9 | 98 | 5.5 |
| | カベルネソーヴィニオン | 1.0 | nd | 1.1 | 106 | 6.1 |
| | | 5.0 | | 5.1 | 102 | 1.3 |
| TeCA | プティシラー | 1.0 | 0.7 | 1.1 | 109 | 13 |
| | | 5.0 | | 5.5 | 110 | 4.2 |
| | ソーヴィニオンブラン | 1.0 | nd | 1.0 | 98 | 3.7 |
| | | 5.0 | | 4.6 | 91 | 2.8 |
| | ゲヴェルツトラミネール | 1.0 | nd | 1.0 | 103 | 5.5 |
| | | 5.0 | | 5.2 | 104 | 9.9 |
| | リースリング | 1.0 | nd | 1.0 | 100 | 4.1 |
| | | 5.0 | | 5.2 | 104 | 3.3 |
| | カベルネソーヴィニオン | 1.0 | nd | 1.0 | 102 | 2.0 |
| | | 5.0 | | 5.4 | 108 | 1.3 |
| PCA | プティシラー | 1.0 | nd | 1.0 | 96 | 9.0 |
| | | 5.0 | | 5.1 | 103 | 3.6 |
| | ソーヴィニオンブラン | 1.0 | nd | 1.0 | 105 | 8.9 |
| | | 5.0 | | 5.2 | 103 | 3.2 |
| | ゲヴェルツトラミネール | 1.0 | nd | 1.0 | 105 | 2.7 |
| | | 5.0 | | 5.3 | 106 | 2.6 |
| | リースリング | 1.0 | nd | 1.1 | 108 | 1.9 |
| | | 5.0 | | 4.8 | 97 | 2.2 |
| | カベルネソーヴィニオン | 1.0 | nd | 1.1 | 109 | 6.0 |
| | | 5.0 | | 5.3 | 107 | 4.7 |
| TBA | プティシラー | 1.0 | nd | 1.1 | 109 | 15 |
| | | 5.0 | | 5.3 | 107 | 9.7 |
| | ソーヴィニオンブラン | 1.0 | nd | 1.0 | 104 | 11 |
| | | 5.0 | | 5.1 | 102 | 4.1 |
| | ゲヴェルツトラミネール | 1.0 | nd | 1.0 | 103 | 3.2 |
| | | 5.0 | | 5.1 | 102 | 2.3 |
| | リースリング | 1.0 | nd | 1.0 | 104 | 9.7 |
| | | 5.0 | | 5.3 | 106 | 0.4 |
| | カベルネソーヴィニオン | 1.0 | nd | 1.1 | 106 | 7.7 |
| | | 5.0 | | 5.0 | 101 | 7.3 |

* 検出されず、LOD 未満
データ入手先: Hjelmeland ほか [1]

汚染ワインの分析

消費者から汚染が報告されたワインの分析では、TCA がおもなハロアニソールとして検出されました。検出濃度は、閾値とほぼ同程度かそれ以上でした (表 5、図 1)。その他のハロアニソールは検出されないか、TCA の濃度 10 分の 1 未満程度でした。

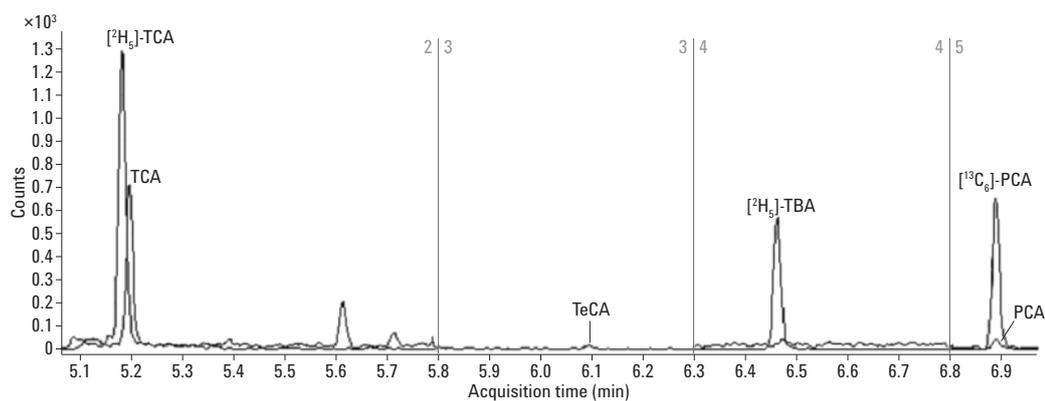


図 1. 消費者から苦情のあったワイン A のクロマトグラム例 (表 6)。算出された TCA レベルは 2.3 ng/L でした。
データ入手先: Hjelmeland ほか [1]

表 5.3 種類の汚染ワインのハロアニソール濃度†

| 化合物 | 測定濃度 (ng/L) と (%RSD) | | |
|------|----------------------|------------|------------|
| | ワイン A | ワイン B | ワイン C |
| TCA | 2.3 (4.5) | 9.9 (3.4) | 6.8 (5.6) |
| TeCA | 0.18 (6.9) | 0.16 (0.7) | 0.17 (3.5) |
| PCA | 0.41 (18) | nd* | 0.26 (9.0) |
| TBA | nd* | 0.65 (1.8) | 0.73 (1.8) |

† 商業ラボから入手

* 検出されず、LOD 未満

データ入手先: Hjelmeland ほか [1]

結論

HS-HPME と Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS による MS/MS 分析を用いて、再現性の高いワイン中 TCA、TeCA、PCA、TBA の高速分析メソッドを開発しました。TCA、TeCA、PCA の LOD と LOQ は 1 ng/L を大きく下回り、TBA については 1 ng/L 以下でした。これらの値は、報告されている閾値を下回ります。加工および保管過程におけるワインの汚染源が存在しないようにするためには、ワイン製造プロセスを経時的にモニタリングすることも重要です。最適化したメソッドの総 HS-SPME 抽出時間は、ブレ攪拌の 5 分を含めて 15 分でした。GC 分析時間は 11 分でした。

参考文献

1. A. K. Hjelmeland, T. S. Collins, J. L. Miles, P. L. Wylie, A. E. Mitchell, S. E. Ebeler. "Determination of 2,4,6-Trichloroanisole and 2,4,6-Tribromoanisole in Wine Using Microextraction in Packed Syringe and Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Am. J. Enol.Viticult.* **63**, 494-499 (2012).
2. T.J.Evans, C.E.Butzke, S.E.Ebeler. "Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry." *J. Chromatogr., A* **786**, 293-298 (1997).
3. C. Fischer and U. Fischer. "Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction." *J. Agric.Food Chem.* **45**, 1995-1997.(1997).
4. T.S.Collins, A. Hjelmeland, and S.E.Ebeler. "Analysis of haloanisoles in corks and wines." In *Recent Advances in Analysis of Food and Flavors*.S. Toth and C.J.Mussinán (eds.), pp. 1091-127.*Am. Chemical Society, Washington, DC.*(2012).

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 31, 2013

5991-3812JAJP



Agilent Technologies