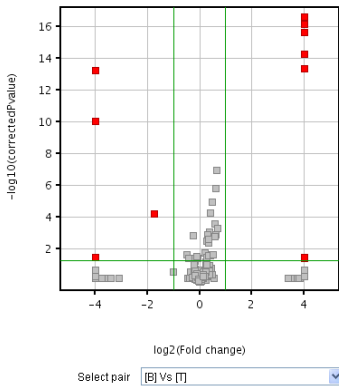




# GC/MS 分析における多変量解析の活用 — 日本酒保管試験をモデルとした Volcano Plot による解析手法 —



<要旨> ブラックライトを照射して保管した日本酒について、褐色バイアルと透明バイアルを用いたサンプルの2グループ間の違いを多変量解析ソフトウェア Mass Profiler Professional (MPP) の Volcano Plot を用いて調べました。p-value<0.05, Fold Change>2.0 として解析を行った結果、2グループで有意差があり、かつ強度差のある化合物を効率的に探すことが可能でした。Volcano Plot で違いの見つかった化合物をクロマトグラムからも検証を行ったところ、TIC では見つけられなかった差を、マスクロマトグラムで確認することができました。

**Key Words:** 多変量解析, MPP, Mass Profiler Professional, 2群比較, t-検定, Fold Change, GC/MS, メタボロミクス, 食品分析, 品質管理

\* \* \* \* \*

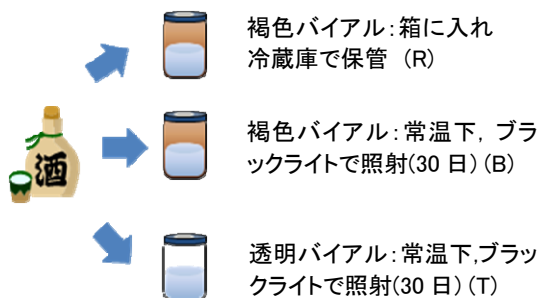
## 1. はじめに

Volcano Plot は2つのグループの間で「差」がある Entity (化合物) を効率的に抽出するツールです。正常品とクレーム品、あるいは劣化試験を行ったときの正常品との違い (どんな成分が増え、どんな成分が減少しているか) といった、2つのグループ間の違いを見つけ出すことができます。GC/MS のクロマトグラム (TIC: トータルイオンクロマトグラム) から差を探し出すのが困難なピークの変動も探し出すのに有効なツールです。

また、統計的な処理によって2つのグループ間の違いを視覚化しますので、客観性のある結果を示すことができます。

## 2. 実験方法

清酒を不活性処理済みバイアルビンに入れて保管



### <前処理方法>

保管条件の異なる清酒を各 10 $\mu$ l ずつ分取し、オキシム化、トリメチルシリル化を行い試験溶液としま

した。また、試験は試行回数 n=5 で行いました。GC/MS 測定条件は 3. に示しました。

### <ピーク抽出>

NIST の AMDIS を用いてデコンボリューションを行いました。

## 3. 測定条件

装置: 7890 GC/5975C TAD MSD

カラム: DB-5ms 30m, 0.25mm, 0.25 $\mu$ m, 10m デュラガード

注入量: 1 $\mu$ l

注入法: スプリット, 10:1

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C

オープン : 60 $^{\circ}$ C (1min) -10 $^{\circ}$ C/min-325 $^{\circ}$ C (10min)

カラム流量: 1.1ml/min (定流量モード)

インターフェース温度 : 290 $^{\circ}$ C

イオン源温度 : 250 $^{\circ}$ C

質量範囲: m/z 50-600

## 4. Volcano Plot による2群の比較

Volcano Plot では、2つのグループの平均値の比率 (Fold Change) と、統計的有意差 (p-value) の両方を可視化した図となります。

Volcano Plot を用いる前に、まず「Filter by Frequency」を使い、最低1グループで100%出現する (Frequency が100%) ピークを対象としました。このフィルターにより、ピーク抽出時に得られた388化合物を、270化合物に絞り込みました。

t-検定は p-value < 0.05 にて、平均値の強度の差は Fold Change > 2.0 (差が2倍以上) としました。t-検定のみを使った場合には、ばらつきが非常に小さい化合物の場合、強度差がわずかでも有意差



があるとされてしまいます。そこで、強度の平均値の差のフィルターを併用することで、対象成分の絞り込みが効率よく行うことができます。

Fig. 1 に Volcano Plot の結果を示します。

横軸は  $\log_2(\text{Fold Change})$  で中心から外側に行くほど平均値の差が大きい化合物になります。

縦軸は  $-\log_{10}(\text{p-value})$  で、上に行くほど有意差が大きい化合物になります。また、この図では左半分が透明バイアルにより多く存在する化合物(B<T)、右半分が褐色バイアルにより多く存在する化合物(B>T)となります。Table 1,2 には、それぞれのグループに特徴的な化合物の強度を示しています。

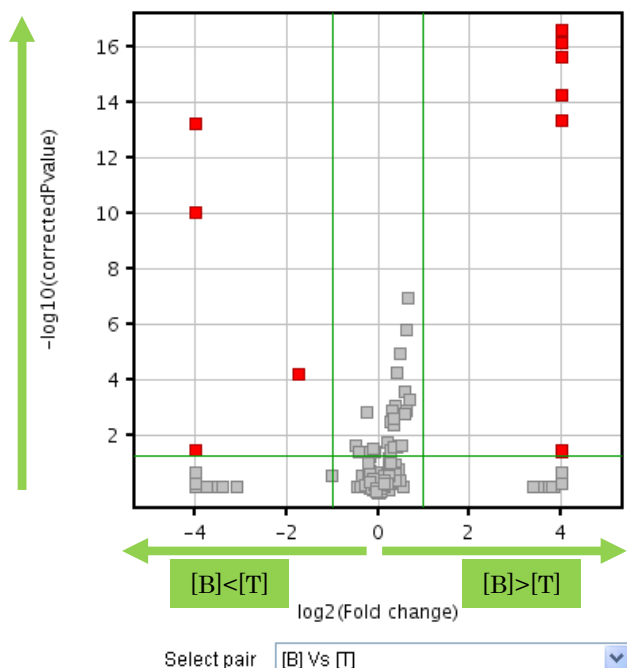


Fig.1 Volcano Plot (褐色バイアルと透明バイアルで保管したときの違い)

Table 1 透明バイアルに多く存在する化合物

Compound	褐色[B]	透明[T]	Mass	Retention Time
154.0@8.709	166419	557951	154	8.709
205.0@10.968	45	1.85E+08	205	10.968
103.0@17.926	0	492805	103	17.926
205.0@18.587	0	304561	205	18.587

Table 2 褐色バイアルに多く存在する化合物

Compound	褐色[B]	透明[T]	Mass	Retention Time
174.0@7.674	1726229	0	174	7.674
281.0@8.646	119747	0	281	8.646
176.0@14.292	330101	0	176	14.292
117.0@15.547	295786	0	117	15.547
147.0@18.323	1.53E+08	46	147	18.323
319.0@18.525	626111	14	319	18.525
202.0@18.552	548354	0	202	18.552
329.0@23.612	416955	0	329	23.612

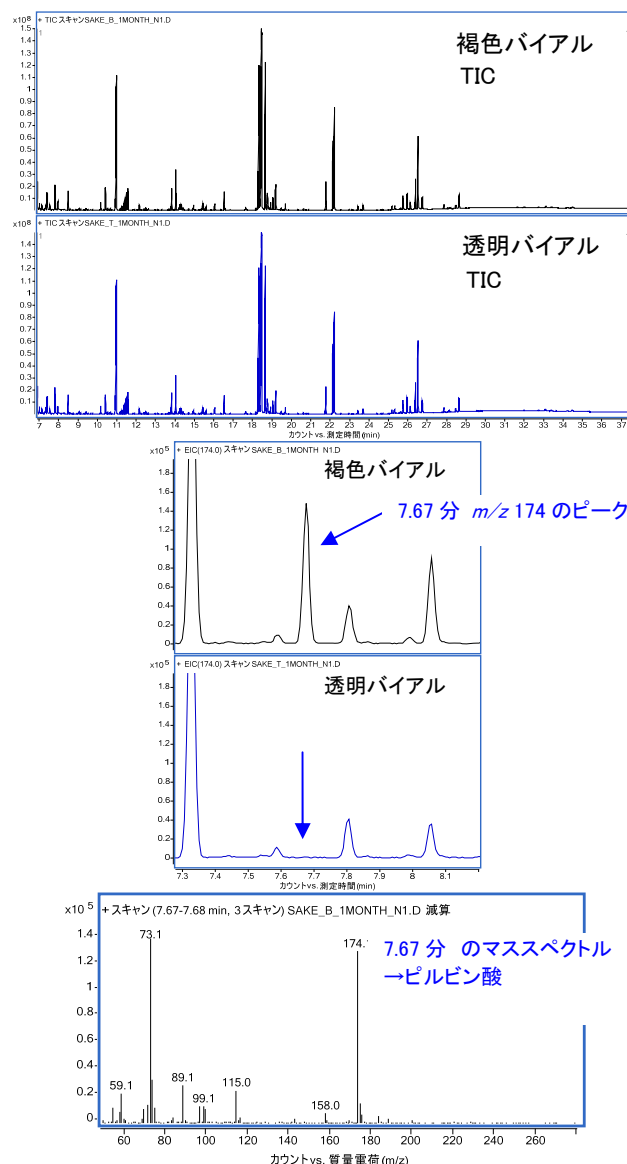


Fig. 2 一番上：褐色バイアルと透明バイアルの TIC, 中段：m/z 174 のマスクロマトグラム, 下段：7.67 分のマススペクトル

## 5. まとめ

MPP の Volcano Plot を用いることで、TIC では見つけられなかった、褐色バイアルと透明バイアルの差を見つけることができました。t-検定の結果により有意差があり、かつ Fold Change により強度差のある化合物を抽出することができました。さらに、マスクロマトグラムによって Volcano Plot の結果を確認することができました。

Volcano Plot は 2 グループの差のある化合物を見つけない場合に有効なことが分かりました。

### 【GCMS-201010SG-001】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies