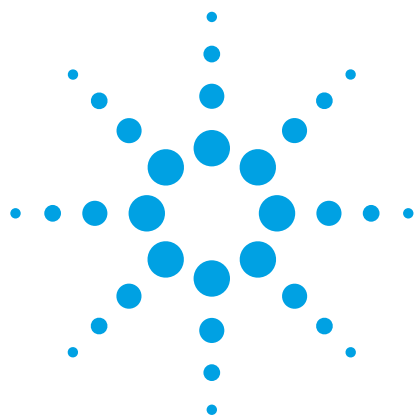




Agilent GC/Q-TOF MS および Mass Profiler Professional ソフトウェアによる オリーブオイルのキャラクタリゼーション

アプリケーションノート

食品テストおよび農業

著者

Stephan Baumann, Sofia Aronova
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA USA

概要

オリーブオイルがエキストラバージンオイルの官能検査に合格するかどうかを予測するためのモデルを構築しました。Agilent 7200 シリーズ Q-TOF MS と組み合わせられた Agilent 7890A GC システムを使用して電子イオン化 (EI) とポジティブ化学イオン化 (PCI)、両方のモードで精密質量分析を行い、オリーブオイル中の多くの化合物を検出しました。このデータについて Mass Profiler Professional ソフトウェアを使用して統計解析を実施し、5 つの特徴的な化合物の有無を使用して、オリーブオイルが官能検査に合格するかどうかを正確に予測する分類モデルを構築しました。



Agilent Technologies

はじめに

地中海料理の人気の高まりに加え、オリーブオイルがもたらす健康上のメリットによって、米国ではオリーブオイルの需要が迅速に伸びています。米国市場では 2013 年までに 18 億ドルを超えることが予想されています [1]。オリーブオイルは、南欧の人々の長寿と心臓病の低い発生率に貢献していると考えられています。実際に、食品医薬品局 (FDA) は、オリーブオイルに含まれるモノ不飽和脂肪酸の保健機能と冠動脈疾患のリスク軽減を認めています。最近の研究では、オリーブオイル、主にオイルの最初の圧搾で得られたエキストラバージンオイル (EV00) による抗炎症効果が認められています。これほど多くの抗酸化および抗炎症性化合物が含まれている食品はほとんどありません。

国際オリーブ協会 (IOC) と USDA は、食味検査パネルおよび化学試験により実施される官能検査を含む、EV00 の分類のための基準を確立しました。しかし最近の研究 [2] では、米国市場の EV00 の 99 % を占める輸入オリーブオイルにおいて、EV00 分類のための官能検査に合格しない事例が頻繁に発生することが示されています。さらに、この官能検査はコストが高く、主観的なものとなっています。

米国における EV00 の需要の高まりと EV00 市場の規模の拡大により、オリーブオイルがこの官能検査に合格するかどうかを予測する化学的なスクリーニングの開発が重要になっています。このスクリーニングによって、生産者は合格する確率が高いオリーブオイルだけを官能検査用に提出することができます。そのような化学的スクリーニングにより、認定コストの軽減と時間短縮が可能になると同時に、市場に出回る EV00 の品質も向上することができます。

このアプリケーションノートでは、オリーブオイルが官能検査に合格するかどうかを予測できるモデルの開発の実現可能性について説明します。ここでは、先ごろワインの分類に使用したものと類似した分析アプローチを使用します [3]。データは、Agilent 7200 シリーズ Q-TOF MS システムの電子イオン化 (EI) とポジティブ化学イオン化 (PCI) の両方の高分解能モードで取得しました。Agilent MassHunter ソフトウェアを使用してクロマトグラフィデコンボリューションを実行し、それと同時に、詳細な統計解析と分類モデルの構築を Mass Profiler Professional (MPP) で行いました。オリーブオイルサンプル中における特定の 5 種類の化合物の蓄積と、官能検査における不合格との相関関係が確認されました。

実験

試薬および標準品

シクロヘキサン、分光光度グレード、Sigma-Aldrich

サンプル

合計 10 種類のオリーブオイルサンプルを UC Davis Olive Center から入手しました。これらのすべてのサンプルについて、EV00 の基準への合否を判断するために、IOC により認められた官能検査を実施しました。これらのサンプルは室温で暗い場所に保管しました。また、サンプルをシクロヘキサンに 1:10 で希釈し、スプリット比 1:10 でランダムな順序で分析しました。

装置

この実験には、Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF (GC 部は Agilent 7890 GC) を使用しました。機器の条件を表 1 に示します。

表 1. GC および MS の条件

GC の条件	
カラム	DB-5 MS、30 m、内径 0.25 mm、0.25 µm フィルム (p/n 122-5532)
注入量	1 µL
MMI インジェクタ	50 °C で 0.01 分間 600 °C/min で 50~300 °C
スプリットベントへのパージ	60 mL/min 分析開始 1 分から
オープン温度プログラム	45 °C で 4.25 分間 5 °C/min で 45~75 °C、0 分間保持 10 °C/min で 75~320 °C、10 分間保持
キャリアガス	ヘリウム、1.3 mL/min、定流量
トランスファーライン温度	290 °C
MS の条件	
イオン化モード	EI、ポジティブ CI (20 % メタンフロー)
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C
m/z 範囲	40~800 m/z
スペクトル取り込みレート	5 Hz、セントロイドおよびプロファイルの両方のモードで取り込み

データ処理および統計解析

データ処理には MassHunter 定性分析 (バージョン B.05 SP1) を使用しました。ピークは、MassHunter のクロマトグラフィデコンボリューションツールにより検出し、100~300 種類の成分がソフトウェアによって識別されるように質量および化合物フィルタを調整しました。デコンボリューションされたデータを MPP にインポートするために、MassHunter エクスポートツールを使用して CEF ファイルを生成しました。

統計分析には Mass Profiler Professional (バージョン 2.1.5) を使用しました。データの処理は次の手順に従って行いました。

1. インポートフィルタとアラインメントパラメータの設定
2. 正規化基準の選択
3. サンプルグループの定義
4. データフィルタの設定
5. PCA プロットによるデータクラスタの評価

これらの手順が完了した後、倍数変化および有意性検定などの統計ツールを使用してデータを評価しました。そして最後の手

順は、分類モデルの構築とテストでした。さらに、データ処理には質量スペクトルライブラリ検索や分子式推定による、分類モデルで使用する化合物の同定が含まれています。

結果と考察

データ取り込みと処理

EV00 サンプルの分析を行い、GC/Q-TOF によって検出できる化合物を確認しました。一般に、クロマトグラフィデコンボリューションによって MassHunter で約 150 個のピークが検出されました (図 1)。注入口温度を 50 °C から 300 °C に上げるコールドスプリット注入を使用して、熱による分解を最小限に抑えました。初期のオープン温度上昇は、溶出が早いピークの分離能を向上させるため 5 °C/min にしました。

ピークの検出は、MassHunter のデコンボリューションを使用しました。次に MassHunter エクスポートツールを使用して、Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアでインポート可能な CEF ファイルを生成しました。

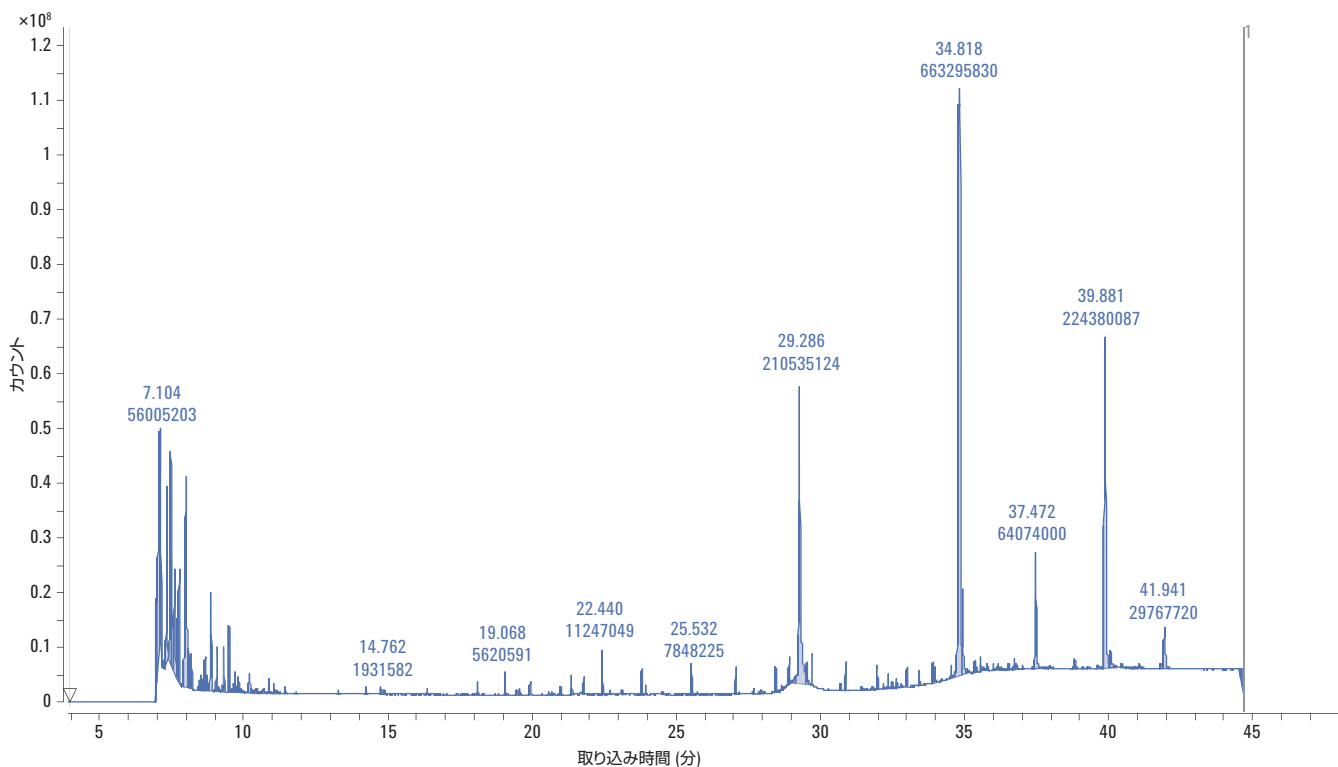


図 1. 相対面積フィルタを最大ピークの 0.1 % と設定すると、通常はクロマトグラフィデコンボリューションによって約 150 個のピークが検出されます。

抽出イオンクロマトグラム (EIC) を MPP でアラインメントしました。このアラインメントは、スペクトルパターンとリテンションタイムに基づいて行いました。同じ成分とみなされるには、抽出スペクトルの相互相関係数は 0.6 以上、リテンションタイムのずれは 0.05 分以内である必要があります。図 2 の質量対リテンションタイムのプロットは、オリーブオイルサンプル中で 442 個の同一でない成分が検出されたことを示しています。しかし、これらのほとんどのエンティティ (化合物) は 1 回または 2 回程度出現するにとどまるため、データフィルタリングの段階で排除されました。

MPP においてサンプルグループを定義し、データフィルタを設定します。フィルタリングによって高品質のデータセットが生成されるため、以降の多変量解析がより有意なものとなります。最初のフィルタでは、少なくとも 1 つのグループに 100 % の確率で出現するエンティティ (化合物) を確認しました (頻度分析)。この頻度フィルタによって、暫定的なマーカ化合物の数が 442 個のエンティティから 91 個に減少しました。

統計解析

マーカ検出のための統計解析は、多くの場合、ASCI またはテキストタイプの結果を処理するように作成された複雑な統計ソフトウェアを使用すると、手間と時間が掛かります。MPP は、複雑で「ノイズの多い」データを効率的に処理するために必要となる高度なデータ管理、フィルタリング、統計解析、解釈、モデル作成、および予測を簡単に行うことができます。MPP では、データの最適な評価方法を決定する際に役立つ、容易に実行できるガイド付きワークフローが提供されます。経験豊富なユーザーは使用するデータ処理に直接移動することもできます (詳細については、Mass Profiler Professional のカタログ、5990-4164JAJP を参照してください)。

主成分分析 (PCA) は、データの識別能力を維持しながら次元を減らすことのできる、よく使われる多変量解析技術です

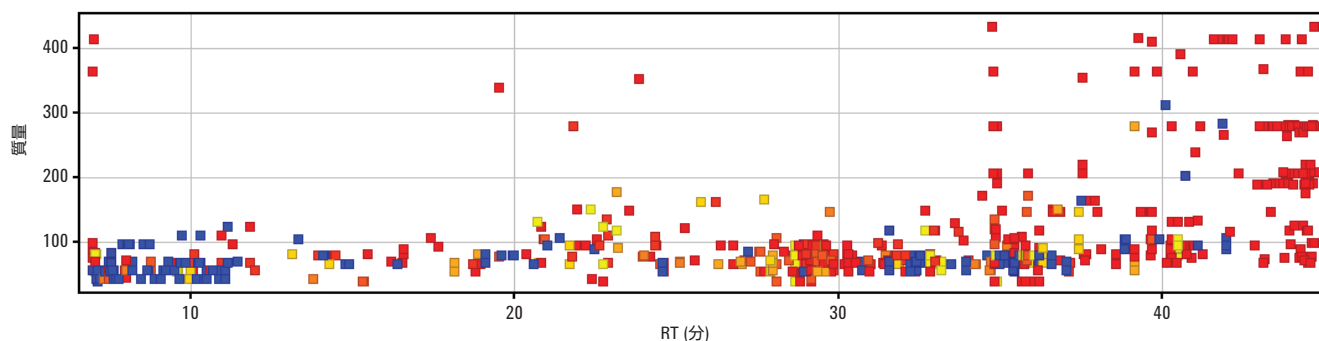


図 2. 質量対リテンションタイムのこのプロットは、442 個の個別の化合物がクロマトグラフィデコンボリューションによって検出されたことを示しています。そのほとんどの出現回数は 1 回または 2 回だけで、MPP により除去されます。低頻度の成分は赤で、高頻度の成分は青で示されています

主成分分析は、測定した変数を、それぞれの変数の一次結合である相関関係のない主成分に変換することで行います。これを品質管理ツールとして使用すると、データが適切な方法でまとめられ、サンプルの異常値を確認することができます。図3のように、官能検査の合格サンプルと不合格サンプルではPCAスコアが変わり、そのことによってそれぞれが明確にグループ分けされました。

倍数変化および有意性検定

官能検査に合格、または不合格だったオリーブオイルサンプルのデータであるかをクラス分けした後、統計分析を実行しました。化合物の濃度の倍数変化 (増加) 量を最初に確認しました。この分析によって、データクラス間で存在量に大きな差があるエンティティ、つまり、合格した EV00 サンプルと不合格のサンプルとの濃度差が2倍、3倍、4倍のように異なるものを特定しました。

次に、分散分析 (ANOVA) を使用して、倍数変化の基準を満たす化合物のクラス間の差が統計的に有意であるかどうかを確認しました。確率 p の値に 0.01 を使用することで、頻度フィルタで 91 個に減少していたエンティティをさらに 5 個の有意な化合物まで絞り込むことができました。倍数変化分析と ANOVA の結果を Volcano プロットとして示します (図4)。最も低い p の値を持ち、最大の倍数変化を持つ 5 種類の化合物を分類モデルの構築用に選択しました。

分類モデル

分類の目標は、複数の変数により記述され、どのクラスに属するかがわかっている例についての分類をいくつも試すことに基づいて一般的な仮説を作成することです。それは、前者から後者へのマッピングを学習することです。統計または人工知能に基づくいくつかの技術がこの目的で開発されています [4]。ここでの目標は、試験の不合格と関連することがわかった 5 個の化合物に基づいて、官能検査に合格しないオリーブオイルサンプルを予測することでした。

部分最小二乗 (PLS) 分析は、観察したもの数 (サンプル数) が測定した変数 (検出されたエンティティ、 m/z など) よりも少ない場合によく適用されます。この分析は、関連した変数とノイズの変数をうまく処理できることから、非常に広く使用されるようになっています。部分最小二乗法判別分析 (PLSDA) は、クラスの間で最大の分離が得られるように、観察したもののグループの間の区別を明確にするために使用され、メタボロミクスデータの分類のための強力なツールとなりつつあります [4]。そこで、オリーブオイルの分類モデルを構築するために PLSDA を使用しました。

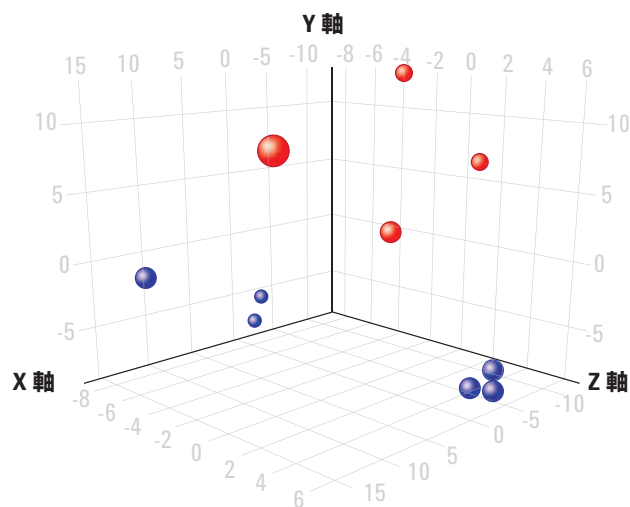


図3. 主成分分析 (PCA) のスコアプロット。官能検査に不合格だったサンプルには赤、合格したサンプルは青のマークで示しています

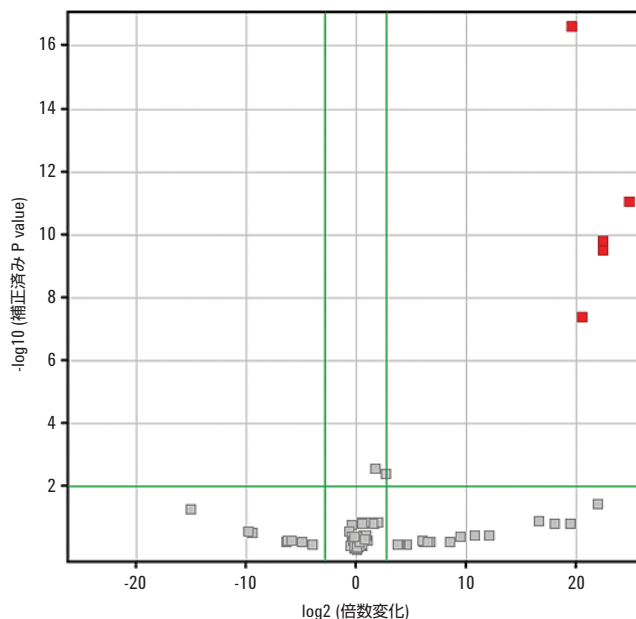


図4. Volcano プロットでは、x 軸は各エンティティの倍数変化を y 軸は有意性を示しています。赤で示した 5 種類の化合物は、官能検査に不合格だったサンプルに蓄積しています

MPP の処理によって選ばれた 5 種類の化合物により、2 つのデータクラスを確立した後のステップは、オリーブオイルサンプルが官能検査に合格するかどうかを予測できるモデルを作成することでした。分類モデルを構築するための最初の手順は、モデルをデータでトレーニングすることでした (図 5)。

モデルをテストするために、同じトレーニングデータに加えて、モデルの構築に含まれないサンプルを使用しました。冗長ですが、これは有効な統計的手順です。トレーニングしたモデルの検証に同じクラス予想モデルを使用しました。モデルの構築に使用しなかったものも含めて、この限られたサンプル数のモデルの確度は 100 % でした (図 6)。これらの結果は、EV00 が官能検査に合格するかどうかを正確に予測するモデルの開発が可能であることを示しています。

Identifier	Training	Predicted(Training)	Confidence
CSC1-EI-1: Ig2	[F, Training]	[F, Training]	1.000
FSW2-EI-1: Ig2	[F, Training]	[F, Training]	1.000
ESC1-EI-1: Ig2	[P, Training]	[P, Training]	1.000
ESC2-EI-1: Ig2	[P, Training]	[P, Training]	1.000
RSA1-EI-1: Ig2	[P, Training]	[P, Training]	1.000

図 5. PCA プロットで見つかった 3 つの各クラスタの代表値を含む PLSD トレーニングセット

Prediction Results					♀
Identifier	Grade	Training	Predicted(Class Pre...	Confidence	
PAC1-EI-1: Ig2	F	None	[F, Training]	1.000	
ESC2-EI-1: Ig2	P	Training	[P, Training]	1.000	
ESC1-EI-1: Ig2	P	Training	[P, Training]	1.000	
SAC1-EI-1: Ig2	F	None	[F, Training]	1.000	
RFC2-EI-1: Ig2	P	None	[P, Training]	1.000	
RSA2-EI-1: Ig2	P	None	[P, Training]	1.000	
CSC1-EI-1: Ig2	F	Training	[F, Training]	1.000	
RSA1-EI-1: Ig2	P	Training	[P, Training]	1.000	
EFC1-EI-1: Ig2	P	None	[P, Training]	1.000	
FSW2-EI-1: Ig2	F	Training	[F, Training]	1.000	

図 6. このモデルは、モデルの構築に使用しないものも含むすべてのサンプルの合格/不合格の状態を正しく予測しています。予測モデルの構築に使用しなかったサンプルは「None」として Training のところに示しています

化合物の同定

Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF などの機器の利点は、EI、CI、およびプロダクトイオンキャンモードでデータを収集できることです。このようないろいろな動作モードから得られるデータは化合物の確認に役立ちます。EI スペクトルではライブラリ検索が可能で、フラグメント情報が得られます。CI からは分子式に関する情報が得られ、プロダクトイオンキャン MS/MS からは、EI または CI で生成されたイオンに対して MS/MS を行った際の部分構造の精密質量を得ることができます。

分類モデルで使用する化合物の同定は必ずしも必要ではありませんが、これらを同定することは、これらの化学成分がオリーブオイルの官能品質に対して直接的または間接的にマイナスの影響を与えるメカニズムの理解に繋がります。Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF は、精密質量構造情報を提供することにより、化合物同定 (ID) のための大きなメリットを提供します。

Agilent MassHunter 定性ソフトウェアを使用して、精密質量クロマトグラフィデコンボリューションを実行し、干渉ピークからクリーンなスペクトルを抽出しました。これらの EI スペクトルを NIST データベースを基準に検索しました (図 7)。最後の化合物を除くすべての化合物の EI スペクトルに対して、対応する化合物が見つかりました。Q-TOF では、フラグメンテーションパターンは一致しますが、マッチ率は、四重極機器を使用して得られるものよりも低くなります。これは、NIST ライブラリのほとんどのデータが四重極質量分析計から得られているためです。

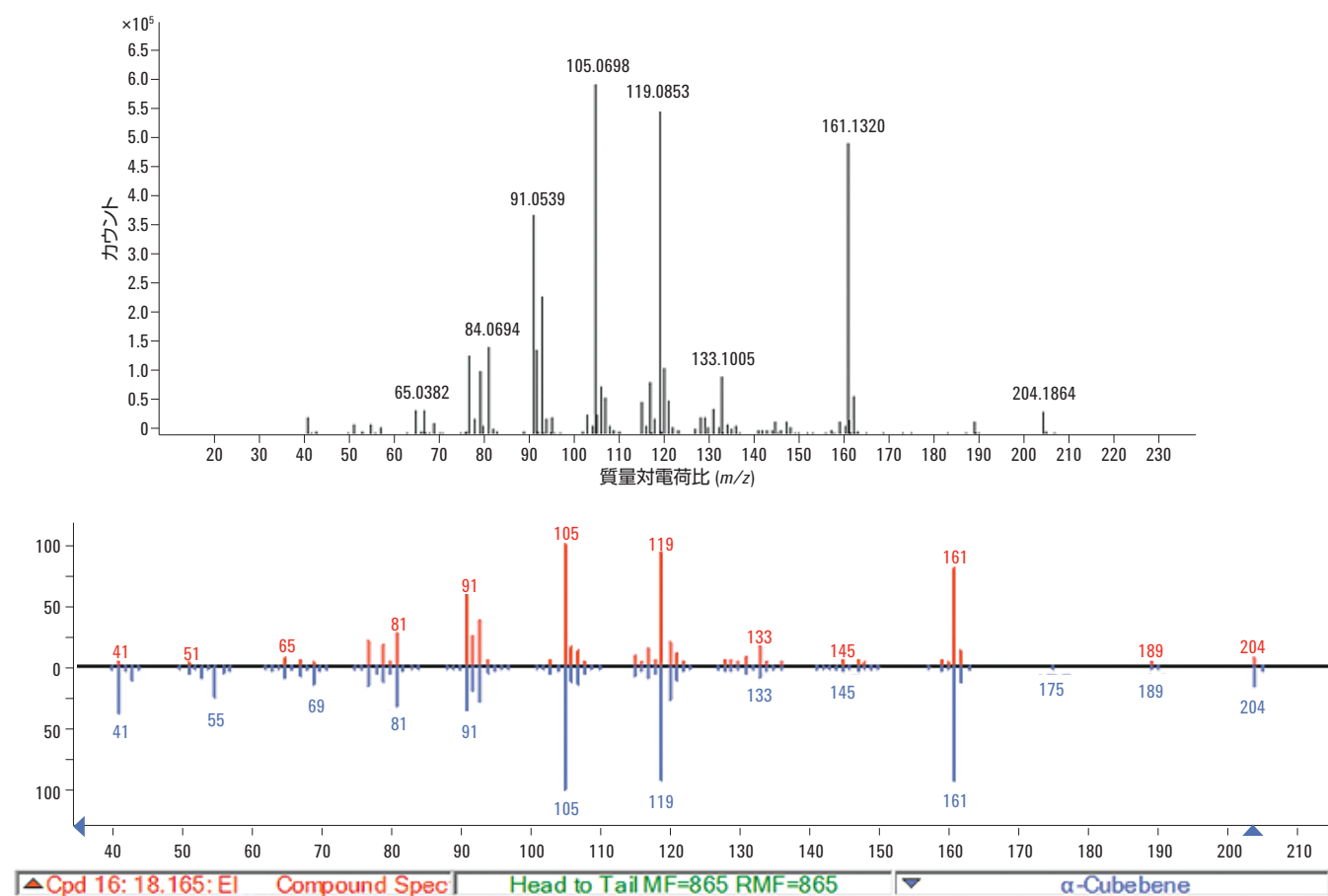


図 7. 精密質量 EI GC/Q-TOF データにおいても Wiley や NIST などの市販のユニットマス EI スペクトルライブラリを検索し、化合物を同定することができます

EI によって得られた精密質量情報は、官能検査に不合格だったサンプルに蓄積した化合物を暫定的に同定する上で有効でした。質量精度は、分子イオンが検出されなかった 1 つの化合物を除くすべての化合物で 5 ppm 以下となっています (図 8)。

ポジティブ CI による精密質量データを使用して、各マーカ化合物の分子式を推定しました (図 8)。このデータでは、観測されたフラグメンテーションパターンにより、5 番目の化合物 (最も下の行) の分子式が確認されました。予想された 227 m/z のピークとその PCI による付加イオン ($M+C_3H_5$)⁺に加えて、 H_2O の喪失と一致する 209 m/z のフラグメントが観察されました。また、191 m/z のフラグメントの存在は、第 2 の水分子が失われたことを示しています。このことから、この化合物がジオールであり、実験式が $C_{14}H_{26}O_2$ であると推定できます。この化合物に対する質量精度は 8 ppm をわずかに上回り、低い信号強度の場合と一致しています。NIST データベースによって同定された 4 種類の化合物の特性を調べると、そのすべてがオリーブオイルのフレーバの元となる香りを持ち、官能検査に不合格となる原因であることがわかりました (図 9)。

MPP ID	NIST 検索結果	NIST ライブラリ との マッチ率	化学式	CAS	EI, M ⁺			PCI, [M+H] ⁺		
					計算値	測定値	質量誤差 (ppm)	計算値	測定値	質量誤差 (ppm)
55.0@27.546	n-ヘキサデカン酸	789	$C_{16}H_{32}O_2$	57-10-3	256.2397	256.2385	4.7	257.2475	257.2470	1.9
73.0@29.750	オクタデカン酸、 エチルエステル	703	$C_{20}H_{40}O_2$	111-61-5	312.3023	312.3008	4.8	313.3101	313.3091	3.2
81.0@35.731	スクアレン	831	$C_{30}H_{50}$	111-02-4	410.3907	410.3904	0.7	411.3985	411.3987	0.5
105.0@20.906	α -クベベン	880	$C_{15}H_{24}$	17699-14-8	204.1873	204.1883	4.9	205.1951	205.1945	2.9
71.0@27.260	NIST データベースになし	N/A	$C_{14}H_{26}O_2$	N/A	226.1927	ND	ND	227.2006	227.1987	8.4

図 8. EI スペクトルで分子イオンが得られなかった場合 (最後の行) も含み、PCI スペクトルデータからは官能検査に不合格になったオリーブオイルに蓄積された化合物の分子イオンに関する精密質量情報が得られました

MPP ID	NIST 検索結果	NIST ライブラリ とのマッチ率	化学式	CAS	香りの 種類	入手元
55.0@27.546	n-ヘキサデカン酸	789	$C_{16}H_{32}O_2$	57-10-3	わずかな オイルの香り	Bedoukian Research
73.0@29.750	オクタデカン酸、エチルエステル	703	$C_{20}H_{40}O_2$	111-61-5	蠟の香り	The Good Scents Company
81.0@35.731	スクアレン	831	$C_{30}H_{50}$	111-02-4	花の香り	The Good Scents Company
105.0@20.906	α -クベベン	880	$C_{15}H_{24}$	17699-14-8	ハーブの香り	The Good Scents Company

図 9. 官能試験の不合格に関連する 4 種類の同定済み化合物の香り特性のリスト

Molecular Structure Correlator を使用した構造確認

Q-TOF プロダクトイオンスペクトルは、生成されたすべてのフラグメントイオンが提案された構造異性体に相関付けできるかどうかを確認するのに役立ちます。Molecular Structure Correlator は、ChemSpider データベースの部分構造検索を行い、その結果を可能なすべての構造異性体に関連付けます。個々のフラグメントイオンに対する構造は、質量誤差とその構造を生成するのにどれだけの結合を切る必要があるかというペナルティのパラメータによってランク付けされて表示されます。異性体の個々の Compatibility Score は、各フラグメントイオンの強度と質量を考慮して重み付けしたフラグメントイオンスコアの平均値です (図 10)。

このツールが EI ライブラリ検索の結果が明らかに 29.75 分のピークをエチルエステル同定していることと補完的な結果を示していることに注目してください。29.75 分の化合物が最もマッチしているのはオクタデカン酸エチルです。Molecular Structure Correlator は、312 m/z をプリカーサイオンとした時のプロダクトイオンとオクタデカン酸エチルとの良好な相関関係を示し、Compatibility Score は 98 を超えています (図 10)。さらに、フラグメントの精密質量には予想される質量との良好な相関関係があり、すべてのフラグメントの質量誤差は 5 ppm 未満です。このように化合物の同定をサポートする追加情報が提供されます。

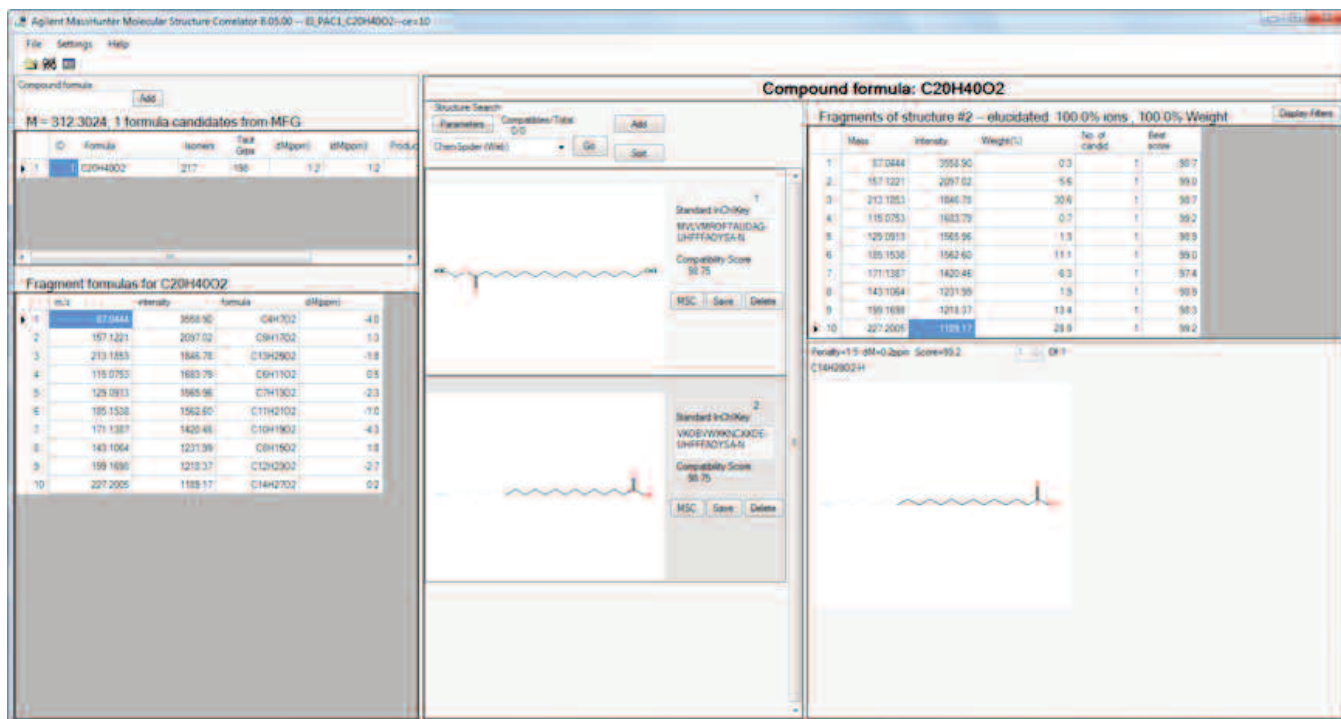


図 10. Molecular Structure Correlator は、Q-TOF のプロダクトイオンスペクトルを化学式の構造異性体と比較します。どのプロダクトイオンが異性体のフラグメントと一致しているかを決定し、Compatibility Score を生成します

結論

Agilent GC/Q-TOF システムにより生成される精密質量 EI およびポジティブ CI スキャンデータを使用して、オリーブオイルが官能検査に合格するかどうかを正確に予測するモデルを構築しました。非常に少量のサンプルセットを使用して構築したにもかかわらず、このモデルは、このアプローチの有効性を示しています。さらに大量のサンプルを使用して予測モデルを構築すれば、オリーブオイルの官能検査で合格を確認するための、低コストで迅速なテストを行うことが可能になり、品質の劣るオイルに対して時間の掛かる高コストな官能検査を実施することを回避できます。官能検査に不合格になる EV00 に蓄積された化合物を香りとして同定することで、それらの香りがオリーブオイルのフレーバに確実にマイナスの影響を与えることがわかります。このアプローチは、オリーブオイルが他の安価なオリーブオイルと混合されて品質が低下していないかどうかを予測できるモデルの構築にも使用できると考えられます。

参考文献

1. Olive Oil in the U.S., 3rd Edition, Apr 1, 2009, a marketing report from Packaged Facts (<http://www.packagedfacts.com/Olive-Oil-Edition-2071654/>)
2. E. N. Frankel, R. J. Mailer, C. F. Shoemaker, S. C. Wang, J. D. Flynn, "Tests indicate that imported "extra virgin" olive oil often fails international and USDA standards" UC Davis Olive Center, July 2010 (<http://olivecenter.ucdavis.edu/news-events/news/files/olive%20oil%20final%20071410%20.pdf>)
3. 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)
4. J. Boccard, J. L. Veuthey, S. Rudaz. "Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling." *J Sep Sci*. **33**, 290-304 (2010)

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

March 23, 2012

5991-0106JAJP



Agilent Technologies