

食品分析におけるガスクロマトグラフ質量分析装置の利用

Application of Gas-Chromatograph mass spectrometer to food characterization

土屋文彦

Fumihiko TSUCHIYA

LECO ジャパン合同会社質量分析営業部

〒105-0014 東京都港区芝2-13-4

TEL 03-6891-5800

E-mail : fumihiko_tsuchiya@leco.co.jp

1 はじめに

価値観の多様化が進む現代の日本においては、食品に求められる要素が単なる安全性にとどまらず、嗜好性の高さ、栄養面における付加価値の高さなど複雑化してきたのは当然と言えます。こうした様々な消費者のニーズに答えるためには“美味しさ”、“健康性”を客観的な数値データとして表現し、その性質をコントロールする必要があります。つまり味のデザインや成分の機能性を明らかにする事を目的とするのであれば、その食品の機能や特性の本体を明確にするために、その性質に寄与する化合物を多種多様な共存成分の中から探し出す必要があります。このような成分の探索には、分析の網羅性の高さと”カギとなる化合物を膨大なデータから抽出し決定するための情報科学的なテクニックが必要となります。本発表では、ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いた食品分析への応用例を紹介し、今後の食品化学の様々な課題を克服するための方法論としての可能性について述べたいと思います。

2 背景

ガスクロマトグラフ質量分析装置(以下、GC-MS)は1980年代より質量分析の中心的役割を担ってきました。現在においても揮発性化合物の分析において依然としてGC-MSは定量性と分離能に優れた装置として一定の評価をされているものの、ESI法の実用化による2000年頃からの液体クロマトグラフ質量分析装置(以下、LC-MS)の急速な普及によって、生体試料、食品成分分析などといった極性化合物の分析における主役の座をLC-MSに明け渡しているのが現状です。この理由として、GC-MS分析では難揮発性化合物の誘導体化が必要であること、LC-MS法におけるMS/MS技術を利用した定性分析が普及したこと、また、当時のGC-MSでは四重極ベースの装置が基本であった事で、そのスキャン速度の制約から、複雑な組成のサンプルにおける分析の網羅性に限界があった事などが考えられます。このような技術的な限界を克服するために登場したのが飛行時間型質量分析装置(TOFMS)です。GC-TOFMS最大の利点は、マススペクトルの取得において高速性に大変優れている点が挙げられます(毎秒500スペクトル)⁻¹。この特性は、通常のGCのピーク幅(1~2秒)に十分なデータポイントを与える事はもちろん、重複したピークのわずかな保持時間の違いを識別する事に大きな要素となります。さらに、GC×GC(包括的

二次元ガスクロマトグラフ)において得られる非常にシャープなピーク幅(0.1秒)に対しても、定量、定性に十分なデータポイント数(20ポイント以上)を与える事が可能です。このように GC-TOFMS では一回の測定で膨大な情報の取得が可能となります。ここで分析操作上問題として挙げられる2点は、データサイズの肥大化とピーク検出への負担になりますが、この問題を解決しない限りこのタイプの装置を用いても実用化は困難であると言えます。この問題点を解決するために、まずピークの肥大化については、整数質量での記録形式を採用し大幅なデータの軽量化が実現されました。この背景には GC-MS 分析で一般に用いられる電子イオン化法では主に一価イオンが検出される事、GC-MS 用ライブラリーが整数質量に対応している事ありました。また、ピーク検出における分析者の負担については、解析の自動化実現のためピーク検出アルゴリズムであるデコンボリューションを開発した上で解決しました。このアルゴリズムにより解析時間の短縮、ピーク分離の正確性が大幅に向上しました。デコンボリューションは、時間軸(クロマトグラム)、 m/z 軸(マススペクトル)及びピーク強度(量的情報)の三次元で構成される質量分析原データから、ノイズリダクション、ピーク形状のコンピューティングを経て得られた個々のフラグメントイオン(電子イオン化法で得られる開裂イオン)情報を膨大なマスクロマトグラムとして記録します。これらの中からピークの違い、保持時間の違いに関する情報を集計し、同一の分子から派生したフラグメントイオン群をクラスタリングしていくアルゴリズムです。このアルゴリズムにより重なり合ったピークから、そのわずかな保持時間の違いでピークとスペクトルを分離する事ができる事から解析の自動化が可能となります。

以上述べたとおり GC-TOFMS は、古典的な技術的背景に、近代的な技術を重ねた、新しい分析技術であると言えます。この GC-TOFMS は複雑な成分から構成されるサンプル、例えば食品栄養成分、香気成分の一斉分析に対して高い同定能力を示します。演者らはこの GC-TOFMS を用いて、数々の食品サンプルのキャラクタライゼーションを行ってきましたが、本法で可能となるノンターゲット分析と多変量解析を組み合わせることにより、サンプル間の特徴の差異を調べる事が可能となる事、さらに、官能試験結果との結果の総合評価によりサンプルの特徴に寄与する化合物を探索する事が可能である事がわかりました。本発表で紹介する分析例では、異なる種のホップでそれぞれ製造された5種類のビールを用いて、ホップ由来の香気成分の探索を行い、それぞれのビールサンプルのキャラクタライゼーションを行った例、及び定量的官能試験データを評価基準として用い、主成分分析を通じて特徴に寄与する化合物の絞り込みを行った例を示します。

3 実験

サンプル

5品種のホップ(Hallertauer Mfr., Saazer, Cascade, Tradition, Perle)からそれぞれ醸造した5種のホップドビールに加え、ホップを使用せず醸造したビール(アンホップドビール)の計6種ビールを調製しました。ホップドビールはホップ香の強さを同

程度にするため、この香に関連する香気成分である Linalool を基準とし、これを一定濃度(30ppb)となるようにホップ添加量を調整しました。

官能試験

官能試験は、一定のトレーニングを積んだ 5 名により 5 種のホップのビールについて実施しました。この中で ① Floral, ② Herbal, ③ Citrussy, ④ Spicy, ⑤ Ester 及び ⑥ Sylvan (Woody) の 6 つの各特徴について、0 から 3 のスコア付けを行いました。

GC-TOFMS 分析

本試験ではサンプルの組成が複雑であることから、二次元クロマト法である GC×GC による分離を行いました。分析用試料については、上記 6 種のビールに、ジクロロメタンを加え、液液分配により香気成分をジクロロメタン層に抽出し回収したものを、遠心エバポレーターによって濃縮し、これを試液としました。この際、内部標準物質として Methyl octanoate を加えました。

サンプルの導入は試液 1 uL に対してスプリット 50:1 で行い、Pegasus® 4D GC×GC-TOFMS system によりデータを記録しました。この際、一次及び二次カラムにはそれぞれ、Rtx-1(30 m, 0.25 mm, 0.25 um) 及び InartCap-17(1.6 m, 0.100 mm, 0.1 um) を用いて昇温分析(40°C -2min → $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ → 250°C)により成分を分離しました。データ取得速度及び質量レンジは毎分 200 スペクトル及び m/z 30-400 u で行いました。

データ解析のため ChrmaTOF® ソフトウェア ver 4.33 を用いたデコンボリューション (TSD: True Signal Deconvolution) によるピーク分離を行いました。香気成分同定は WILEY08 及び標準試料で作成したユーザーライブラリーを併用した検索で、スペクトルの一一致率 75%以上のピークを次の解析に供しました。さらにこれらのピーカリストについて、分散分析である ANOVA を行い、ホップ由来の香気性化合物をリストから抽出しました。

最後に、官能試験結果と GC×GC-TOFMS 同定結果について主成分分析を多変量解析ソフトウェア (JMP08) により行い、相互の結果の一致性(寄与率)からそれぞれの香りの特徴に関する化合物を選別しました(図-1 参照)。

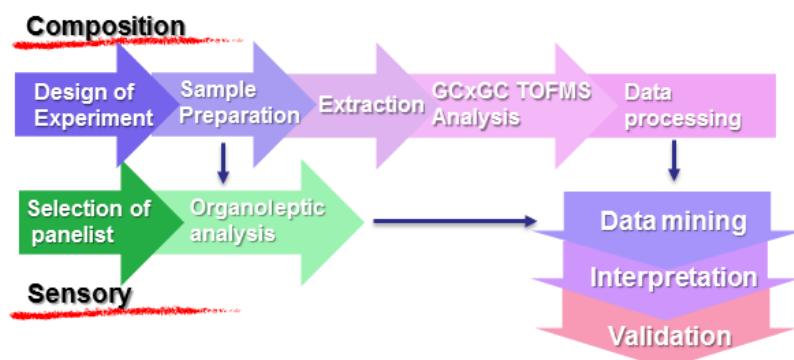


図-1 本実験のワークフロー

GC×GC-TOFMS を用いた成分分析と官能試験を並行して行い最後に総合的な評価を行い香りの特徴に寄与する成分を探索しました。

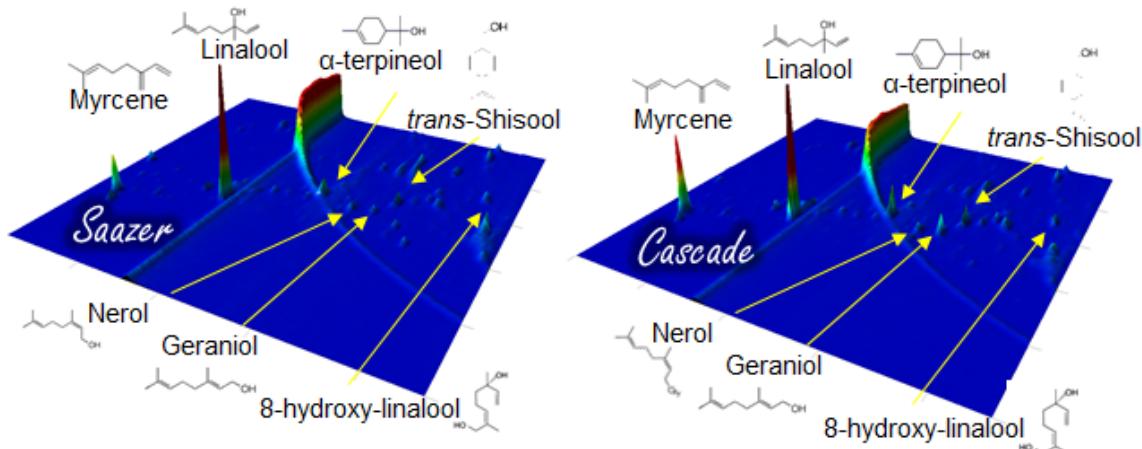


図-2 GC×GC-TOFMS によるホップドビール中のテルペノイドの検出例(m/z 93)
(左がザーツ種、右がカスケード種)

4 実験結果

GC×GC-TOFMS によるノンターゲット分析の結果 2000 を超えるピークが検出されました。その中からはテルペノイドをはじめとする非常に多数の香気化合物が検出されました(図-2 参照)。各化合物は、一次カラム(無極性)と二次カラム(極性)により極性の違いで二次元分離され、同定情報と面積値を含むピークリストに記録されました。このように膨大な化合物の存在下であっても、GC×GC-TOFMS のピーク分離能力は十分な許容量を有している事が明らかとなりました。

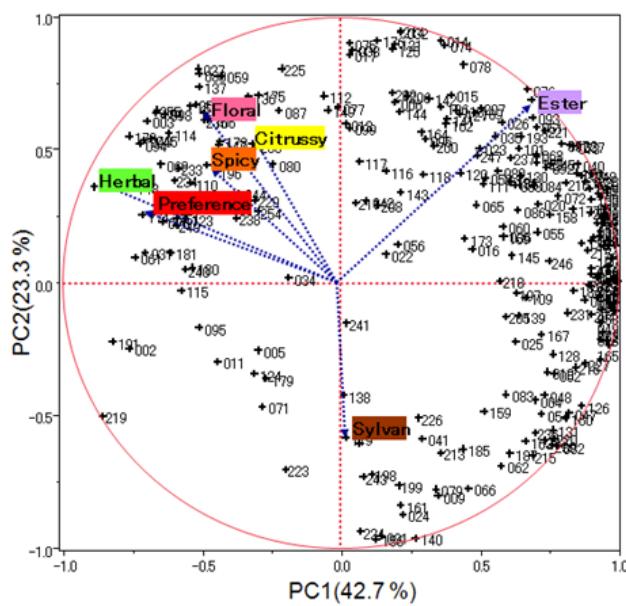


図-3 6 種類の香りの特徴(官能試験)と成分分析結果(GC×GC-TOFMS)のフィッティング
(主成分分析ローディングプロット)

GC×GC-TOFMS で得られた化合物のリスト及び面積値情報は、ピークアライメントの後スプレッドシートとして編集しました。これに官能試験で得られたそれぞれ 6 種類の香りの特徴(① Floral, ② Herbal, ③ Citrussy, ④ Spicy, ⑤ Ester 及び ⑥ Sylvan)に対する 3 段階評価のスコア値情報を、主成分分析で重ね合わせ、香りの特徴に寄与する化合物を主成分軸における距離情報から寄与率の高い化合物を選別し、それぞれの特徴に対して、合計 60 以上の関連成分が得られました(図-3 参照)。

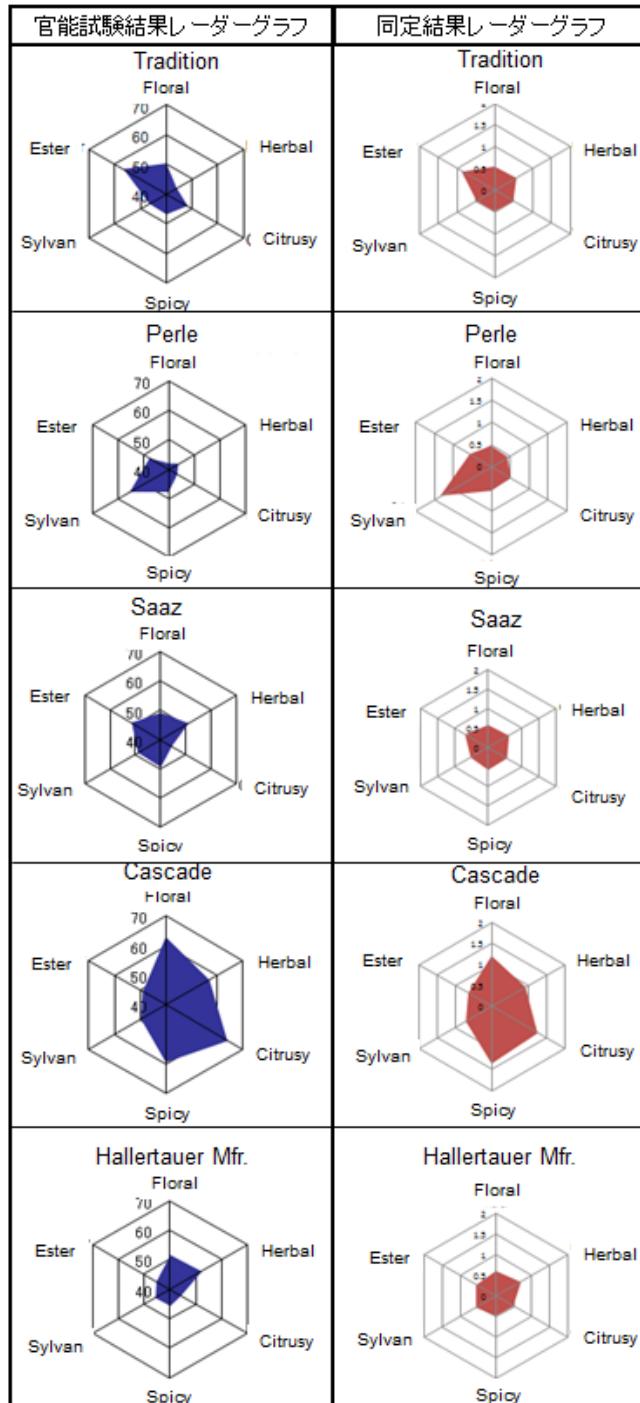


図-4 各種ホップドビールの官能試験(香りの特徴に対するスコア値)と GC×GC-TOFMS で得られた香りの特徴に寄与率の高い化合物の積算値を表したレーダーグラフの比較

図-4は、それぞれの香の特徴に対する官能試験のスコア値を表したレーダーグラフと主成分分析により選別された香りの特徴に寄与する化合物の存在量を表したレーダーグラフを示しました。今回の5種類のホップを用いた各ビールは、レーダーグラフの結果から定量的官能試験により明確な特徴の違いが示されましたが、この官能試験の結果と、2000を超えるピーク数からデータの精査、主成分分析を経て抽出された化合物の存在量を示したレーダーグラフのパターンとの間に高い相関性がある事が確認されました。官能試験のような主観的分析結果とGC-MSで得られる客観的数値結果が一致する場合、双方の分析結果の信頼性が非常に高い事に起因すると考えられ、食品の品質評価において本ワークフローの応用性が高い事を示唆すると考えられました。

網羅性の高いGC-TOFMS法を用いたノンターゲット分析は、事前設定が求められる四重極型質量分析装置(GC-QMS)によるターゲット分析と比較しても、先入観の排除という点においてデータの正確性の確保や、予期しない発見が期待できるという利点を有します。このため本研究のような、サンプルのキャラクタライゼーション、寄与率の高い化合物の探索には非常に有効な手法であると考えられます。さらに、多変量解析を通じ官能試験や他の化学分析結果と総合的に評価することにより、応用範囲はさらに高まる期待されます。

5 謝辞

本研究の実施にあたり、サントリー酒類株式会社の乾 隆子様、石丸茉莉子様ならびに岡 賀根雄様より実験全般において多大なるご支援を賜りました。この場で厚く御礼申し上げます。

6 参考文献

- 1 土屋文彦、矢島敏行:月刊フードケミカル1月号, 2009