大気圧イオン化 GC/Q TOF MS および多変量解析を用いた日本酒中の香味成分の比較

Comparison of Flavor Component in Sake (Rice Wine) with Atmospheric Pressure GC (APGC)/Q Tof MS and Multivariate Data Analysis

佐藤信武、江崎達哉（日本ウォーターズ株式会社）
Nobutake Sato, Tatsuya Ezaki (Nihon Waters K.K.,Tokyo, Japan)

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

INTRODUCTION

食品中の香味や香料に関連するフレーバー分析では EI（Electron Ionization）が GC/MS で広く用いられているイオン化法である。EI によるイオン化では機種間差に依存しない各化合物固有のフラグメントイオン情報が得られるため EI のライブラリーとして多くの化合物がデータベースに登録されライブラリー検索が可能である。一方、EI はハードイオン化法のためフラグメンテーションにより分子関連イオンの強度が低く、定量分析においては感度不足や選択性の低下、定性分析においては未知化合物の同定が困難な場合がある。

大気圧イオン化 GC（APGC）は EI とは異なり、LC/MS のイオン化法でも用いられる大気圧化学イオン化法(APCI)を原理とするソフトイオン化法のため GC 分析においても分子関連イオンの高感度検出が可能となる。APGC はフラグメンテーションが少なく、分子関連イオンが高感度で得られるため定量分析においては MS/MS による選択性・感度の向上、定性分析においては変動解析による有意成分の抽出や分子関連イオン由来のフラグメントによる同定が容易となる。

食品開発においては味や風味に関与する香料や香味成分は揮発性で低分子化合物が多く、多くの構造異性体が天然に存在するため分離モードとしては GC による測定が有利である。本実験では食品中の揮発性低分子化合物の変動解析を行うため、分離、イオン化、変動解析、構造推定の点で有利となる APGC Q Tof MS システムにて分析し、最新の多変量解析ソフトウェアにて変動成分の抽出・同定を行うとともに、APGC によるイオン化パターンの確認を行った。

Figure 1. APGC Q Tof MS システム

METHODS

サンプル抽出

日本酒 30mL に酢酸エチル 6mL を加え撹拌後、遠心分離を施し上澄み溶液を採取した。さらに酢酸エチル 2mL でを加えて同様に抽出を行い、上澄み溶液を混合し酢酸エチルで 6mL に定容した。これに無水硫酸ナトリウムを加え脱水した溶液をサンプル溶液とした。

APGC/Q Tof MS 条件

GC ：7890B(Agilent 社製)
Column ：RESTEK 社製 Stabilwax-MS (30m x 0.25ID, 0.25um df)
Injection Temp ：220℃
Mode ：Split
Gas Flow ：He constant flow 1 mL/min
Injection Vol. ：1 uL
Temp Ramps ：Initial Temp. : 50℃ Initial Time. : 4 min

Rate (℃/min)	Final Temp (℃)	Hold Time (min)	Total Time (min)
7	210	0	26.86
10	250	4	34.86

Transfer Temp ：250℃
Transfer Gas ：N2 30 psi(constant pressure)

MS ：Xevo G2-XS Q Tof(Waters 社製)
Ionization ：APGC positive
Corona ：8.0 uA(Current)
Cone Voltage ：20 V
Source Temp ：150℃
Cone Gas ：N2 20L/hr
Auxiliary Gas ：N2 300L/hr
Source mode ：Wet(Water)
Mode ：MS^E
Mass range ：*m/z* 50 to 450
Collision Energy ：Low:2 eV, High 10 to 45 eV

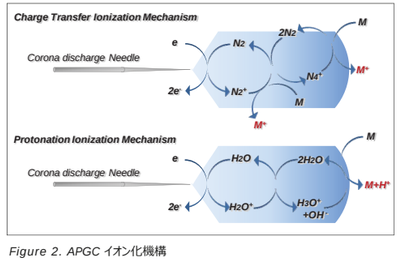

Figure 2. APGC イオン化機構

APGC のイオン化機構を Fig.2 に示す。APGC ではチャンバー内に窒素を満たした Dry 環境では$(M^+)^+$が生成しやすく、微量の水蒸気やアルコールを導入した Wet 環境では$(M+H)^+$が生成しやすくなる。香味成分では酸素を含有する成分が多いと予想されるため Wet 環境での測定とした。

Q Tof MS の測定モードは全プリカーサーイオンとフラグメントイオンを 1 回の分析で取得できる MS^E モードにて測定した（Fig.3）

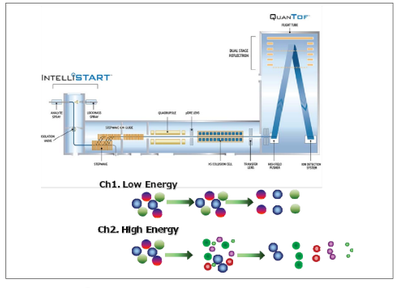

Figure 3. MS^E 測定モード

RESULTS

APGC のイオン化を確認するため香味成分の標準溶液の測定を行った結果を Fig.4 に示す。日本酒成分の Norfuraneol, Frufural においてはフラグメント化せずに$(M+H)^+$の分子関連イオンが観測されたが、脱水や二量体での検出も考慮し、多変量解析のデコンボリューションでは、$(M^-)^+$、$(M+H)^+$、$(M+H-H_2O)^+$、$(2M+H)^+$を対象として解析を行った。

各試料のベースラインインテンシティー（BPI）クロマトグラムを Fig.5 に示す。EI の GC/MS データで多変量解析を行う場合はピークトップでの分離が必須であるが、APGC では共溶出成分でも分子関連イオンでの質量分離が可能である。

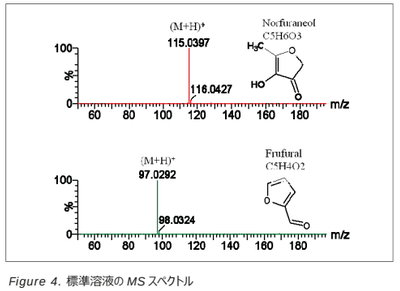

Figure 4. 標準溶液の MS スペクトル

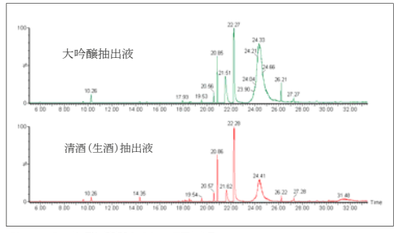

Figure 5. サンプル溶液の BPI クロマトグラム

清酒（生酒）および大吟醸酒を 3 回繰り返し測定した結果を用い、変動・差異解析用ソフトウェア ProgenesisQI（Waters 社製）にて解析した。Fig.6 に、2 群比較解析である OPLS-DA モデルにおける Score Plot を示しす。

Fig.7 に OPLS-DA モデルにおける S-Plot を示す。S-Plot では右上に位置するプロットが大吟醸に有意な差を示す成分、左下に位置するプロットが清酒（生酒）に有意な差を示す成分である。サンプル間で差異のある成分のマスクロマトグラム例を Fig.8 に示す。

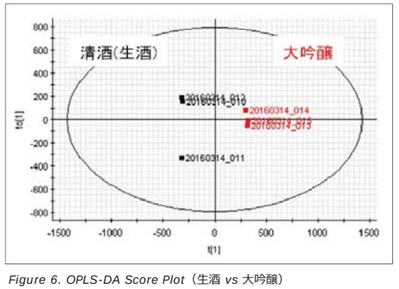

Figure 6. OPLS-DA Score Plot（生酒 vs 大吟醸）

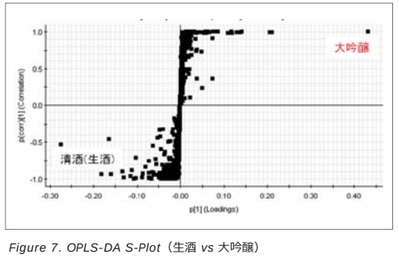

Figure 7. OPLS-DA S-Plot（生酒 vs 大吟醸）

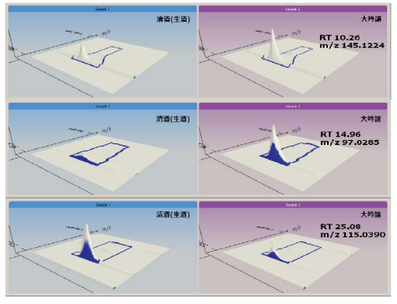

Figure 8. 差異成分のマスクロマトグラム例

DISCUSSION

標準溶液にて APGC のイオン化を確認した結果、EI のイオン化法とは異なり分子関連イオンが観測されたことにより、多変量解析においても分子関連イオンを成分の主スペクトルとして取り扱うことができるため、Fig.5 の保持時間 25 分付近のピークのような共溶出成分の存在が示唆されるブロードピーク中においても Fig.8 の下段に示す成分が質量分離により単利が可能である。

清酒（生酒）と大吟醸酒中の揮発成分の比較解析を行った結果、多くの差異成分が確認された。これら差異成分の同定のため組成演算、データベース検索、フラグメントでの確認を行った。フラグメントによる成分同定の結果を Fig.9 ～ 11 に示す。EI のイオン化法とは異なり、分子関連イオンが高い強度で検出されるため MS^E 測定でのフラグメントスペクトルより各成分由来のフラグメントスペクトルの帰属が可能となることから、EI のスペクトルライブラリーに存在しない未知成分の同定も従来の EI 法より容易に行うことが可能である。

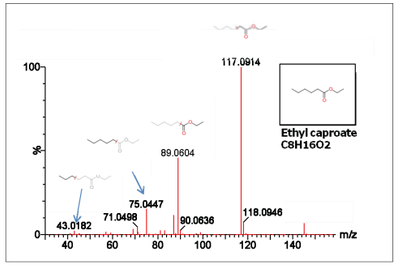

Figure 8. フラグメントイオンによる同定結果
（大吟醸中差異成分： Ethyl Caproate）

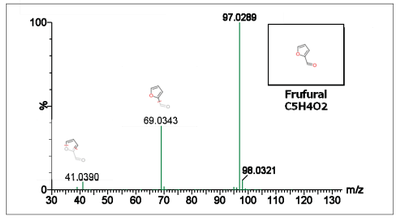

Figure 10. フラグメントイオンによる同定結果
(大吟醸中差異成分： Frufural)

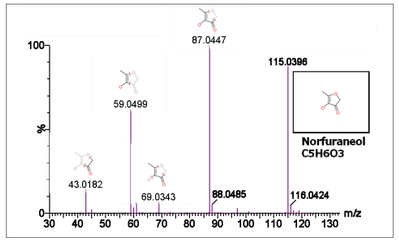

Figure 11. フラグメントイオンによる同定結果
(生酒中差異成分： Norfuraneol)

CONCLUSION

APGC イオン化法を活用することで、フラグメンテーションが少なく、分子関連イオンが高い強度で検出できることから、MS スペクトルをシンプルにでき質量分離による成分の単利が可能なため多変量解析におけるピークのマージが低減される。従来の GC/MS では同時溶出成分を多変量解析にてデコンボリューションや同定することは困難であったが、APGC では分子関連イオンに紐付けされたフラグメント情報により未知化合物の同定が容易に可能となるため、LC/MS と同様の多変量解析手法を用いることが可能であり GC 分析における有意成分の同定・構造推定の手法として有用と示唆される。

References

1. K.Yoshizawa *et al.*, Journal of the Brewing Society of Japan. Vol.89, No6, 481-488(1994)

TO DOWNLOAD A COPY OF THIS POSTER, VISIT WWW.WATERS.COM/POSTERS

©2016 Waters Corporation MKT16065