

Agilent PAL3 - 5977C GC/MSD による ビール中のアルデヒドの分析



著者

Yufeng Zhang and
Lay Peng Tan
Agilent Technologies Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 8890/5977C GC/MSD と Agilent PAL3 (SPME) オートサンプラを使用した、ビールの異臭の原因となる 4 種類のアルデヒド (ヘキサナール、フルフラール、フェニルアセトアルデヒド、*trans*-2-ノネナール) の定量分析について説明します。この分析では、溶媒を使用せず自動化された抽出とオンファイバ誘導体化を使用しました。アルデヒド化合物は、オンファイバ誘導体化を使用して、誘導体化試薬 O-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン塩酸塩 (PFBHA) で誘導体化しました。まず、誘導体化試薬を Agilent 65 μ m PDMS/DVB ファイバに吸着させました。次に、2 mL のビールサンプルを入れた 20 mL のヘッドスペースバイアルにファイバを挿入し、60 °C で 30 分間攪拌しました。抽出と誘導体化の両方の手順は、PAL3 オートサンプラを使用して自動的に実行しました。このメソッドは優れた感度を示しており、検出限界はヘキサナールが 0.0009 μ g/L、フルフラールが 0.52 μ g/L、フェニルアセトアルデヒドが 0.015 μ g/L、*trans*-2-ノネナールが 0.003 μ g/L でした。4 種類の化合物の定量下限は、それぞれ 0.003、1.72、0.05、0.01 μ g/L でした。4 種類のアルデヒドは、スーパーマーケットで購入した 4 種類のビールサンプルにおいて正常に定量できました。また、4 種類のアルデヒドすべてについて、4 種類のビールサンプルを 3 回繰り返し注入した結果、RSD < 4.9 % と良好な再現性を示しました。

はじめに

アルデヒドは、ビールの香料および香りのプロファイルに大きな影響を与える重要な化合物群です。このような揮発性有機化合物は、低濃度であっても、段ボールや青臭いにおいなど、好ましくない官能特性の影響を与え、製品の全体的な品質と消費者の受け入れに悪影響を及ぼす可能性があります。アルデヒドの存在は、醸造時、梱包時、保管時の酸化プロセスと関連することが多く、ビールの鮮度と安定性の重要な指標となります。¹ヘキサナール、フルフラール、フェニルアセトアルデヒド、*trans*-2-ノネナールは、異臭の原因として最も認識されているアルデヒドであり、香料の閾値はそれぞれ、350 µg/L、15.157 mg/L、105 µg/L、0.1 µg/Lです。²

ビール中のアルデヒドの濃度をモニタリングして管理することは、製品の一貫性を維持して、上質な飲み心地を保証するために不可欠です。醸造者は、アルデヒドを正確に定量することにより、酸素曝露や成分の分解など、製造工程における潜在的な問題を特定して、異臭を最小限に抑えるための是正措置を実施することができます。さらに、ビール中のアルデヒドのプロファイルを理解することは、風味の安定性と保存期間を向上させる新しい醸造技術や配合の開発に役に立ちます。

固相マイクロ抽出 (SPME) は、吸着と脱着の原理に基づいた溶媒を使用しないサンプル前処理技術で、広く使用されています。コーティングされたファイバ (抽出相) を使用して、サンプルから分析対象物を濃縮します。PDMS、アクリレート、カーボン WR、DVB、およびこれらの充填剤の組み合わせを含む、さまざまな種類のファイバを使用することができ、分析対象物の極性の違いによって使い分けられます。SPME は、環境特性解析、食品および香気分析、医薬品研究、法医学的調査など、さまざまな分析で広く使用されています。また、SPME は自動化されたサンプル前処理に非常に適しており、サンプルあたりの前処理時間を短縮し、ヒューマンエラーの可能性を最小限に抑え、ラボの作業者を反復作業から解放します。

このアプリケーションノートでは、SPME ツールを備えた PAL3 RTC サンプラと 8890/5977C GC/MSD を使用して、ビール中の 4 種類のアルデヒド化合物を分析した例を紹介します。SPME サンプルングツール (シリーズ 2) には、固定相や使用状況の追跡などの事前設定パラメータを備えた独自の読み取りおよび書き込みチップが搭載されています。サンプルの抽出と誘導体化は、両方とも、PAL3 RTC サンプラで自動化しました。

実験手法

試薬およびサンプル

アルデヒド標準 (ヘキサナール、フルフラール、フェニルアセトアルデヒド、*trans*-2-ノネナール) と誘導体化試薬 PFBHA は、Sigma-Aldrich から購入しました。HPLC グレードメタノールは、Merck から入手しました。水は Milli-Q 超純水を使用しました。4 種類のブランドのビールは、地元のスーパーマーケットで購入しました。

標準溶液の前処理

10 µg/mL のヘキサナール、10 µg/mL のフェニルアセトアルデヒド、1,000 µg/mL のフルフラール、1 µg/mL の *trans*-2-ノネナールで構成される混合原液をメタノールで調製しました。

100 µg/L のヘキサナール、100 µg/L のフェニルアセトアルデヒド、10 µg/mL のフルフラール、10 µg/L の *trans*-2-ノネナールの二次混合標準液は超純水中で調製しました。

この二次混合標準液を使用して、ヘキサナールは 0.05 ~ 10 µg/L、フルフラールは 5 ~ 1,000 µg/L、フェニルアセトアルデヒドは 0.1 ~ 50 µg/L、*trans*-2-ノネナールは 0.025 ~ 5 µg/L の濃度範囲で検量線の標準溶液を調製しました。

各標準溶液 2 mL を 20 mL のヘッドスペースバイアルに添加し、即座にキャップをして分析に使用しました。

濃度 60 mg/L の PFBHA 誘導体化試薬は、30.1 mg の粉末 PFBHA を 500 mL の計量フラスコに計量して、500 mL の目盛まで超純水に溶解することにより調製しました。調製した 60 mg/L の PFBHA 溶液 10 mL を、サンプルの誘導体化に使用するヘッドスペースバイアルに準備しました。

サンプル前処理

ビールサンプルは、分析前に 4 ~ 6 °C の冷蔵庫に保管しました。250 mL のビールを清潔なプラスチック製ボトルに注入して、キャップをしました。キャップをしたボトルを手で 5 回振とうした後、キャップを開けて二酸化炭素 (CO₂) を放出することにより、脱気しました。サンプルの脱気は、合計 3 回実施しました。脱気した 2 mL のビールサンプルを 20 mL のヘッドスペースバイアルに移し、即座にキャップをして分析に供しました。

PAL3 RTC および GC/MSD パラメータ

PAL3 RTC サンプラの分析条件を表 1 に示します。

表 1. ピールの分析で使用した Agilent PAL3 オートサンプラおよび GC/MSD パラメータ

Agilent PAL3 (SPME)	
ファイバの種類	Agilent 65 µm PDMS/DVB (p/n 5610-5873)
ファイバコンディショニング温度	250 °C
プレコンディショニング時間	5 分
インキュベーション時間	20 分
インキュベーション温度	60 °C
誘導体化時間	10 分
アジテータ速度	250 rpm
サンプル抽出時間	30 分
サンプル脱着時間	1 分
ポストコンディショニング時間	5 分
ガスクロマトグラフ	
モデル	Agilent 8890 GC
GC カラム	Agilent J&W DB-5ms UI, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm (部品番号 122-5532UI)
コントロールモード	定流量 (コンスタントフロー)
キャリアガス	ヘリウム
注入法	スプリットレス
スプリットベントへのパージ流量	50 mL/min, 2 分
注入口温度	250 °C
注入口ライナ	Agilent ウルトライナートスプリットレスライナ (p/n 5190-4047)
カラム流量	1.2 mL/min
オープン温度プログラム	60 °C で 2 分間
	10 °C /min で 140 °C まで
	7 °C /min で 250 °C まで、3 分間保持
平衡化時間	3 分
質量分析計	
モデル	Agilent 5977C GC/MSD
イオン化モード	EI, 70 eV
取り込みモード	スキャン
スキャンスピード	N = 2
スキャン範囲	50 ~ 520 amu
GC トランスファライン温度	250 °C
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C

結果と考察

化合物の同定とリテンションタイムの確認

10 µg/L の標準溶液をフルスキャンモードで分析したトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図 1 に示します。

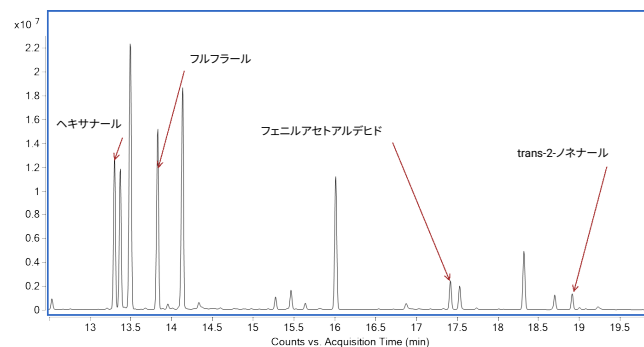


図 1. Agilent SPME オンファイバ PFBHA 誘導体化による 10 µg/L アルデヒドの TIC

10 µg/L サンプルのデータファイルを、MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアを使用して処理しました。Unknowns Analysis を使用してデータの自動デコンボリューションを実行し、サンプル中にのみ存在する成分を同定しました。得られた成分のリストから、NIST 23 スペクトルライブラリに対するライブラリ照合を実施して 4 種類のターゲットアルデヒドを同定しましたが、この際の一貫スコアは 80 を超えていません。4 種類のアルデヒド誘導体の保持時間 (RT) は、それぞれ 13.299、13.830、17.419、18.914 分でした (図 2 ~ 5)。

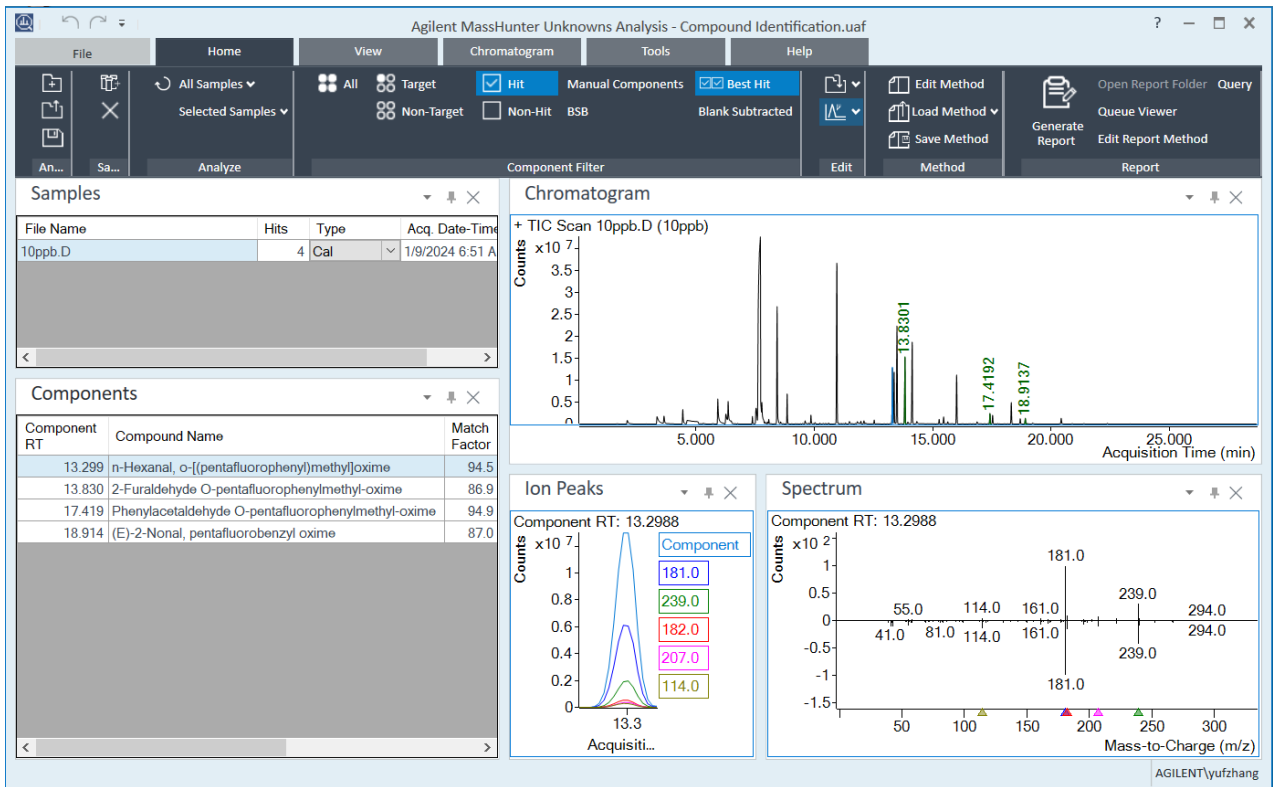


図 2. RT 13.299 分で同定されたヘキサナル誘導体

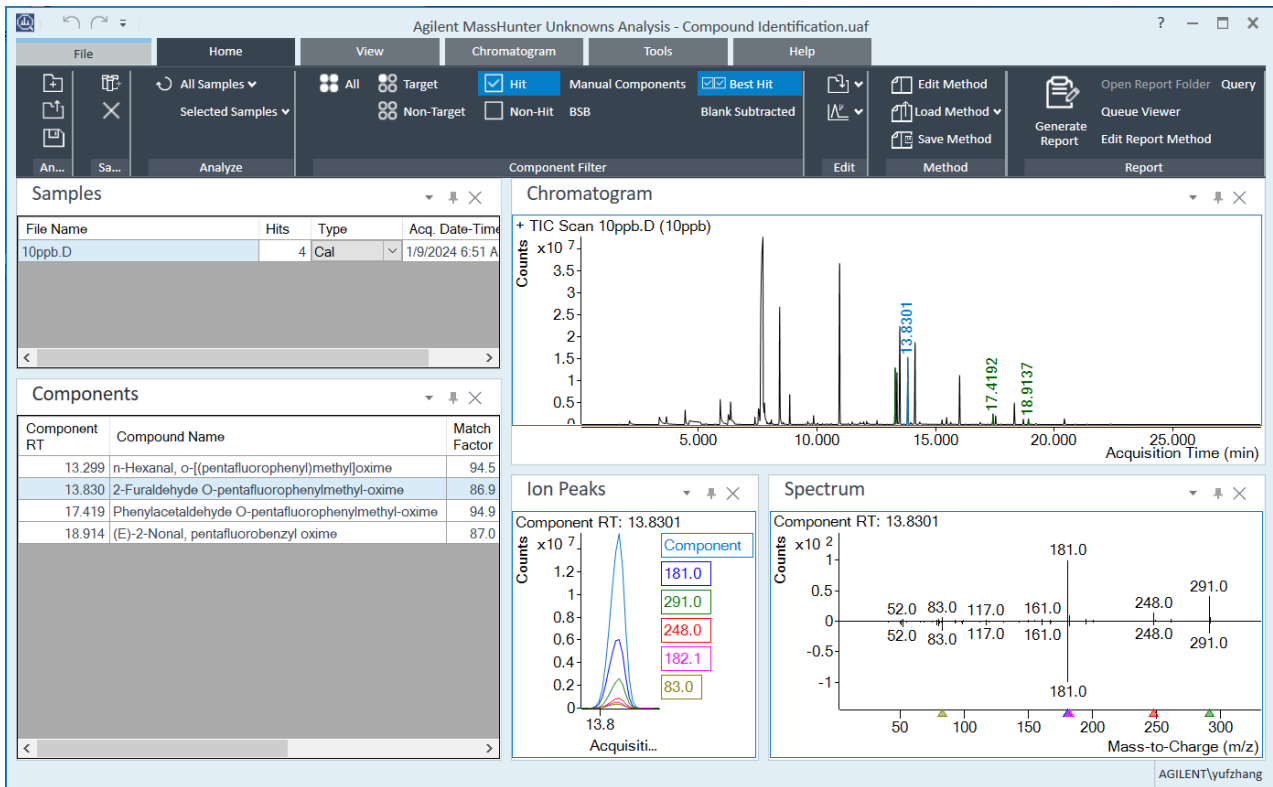


図 3. RT 13.830 分で同定されたフルフラール誘導体

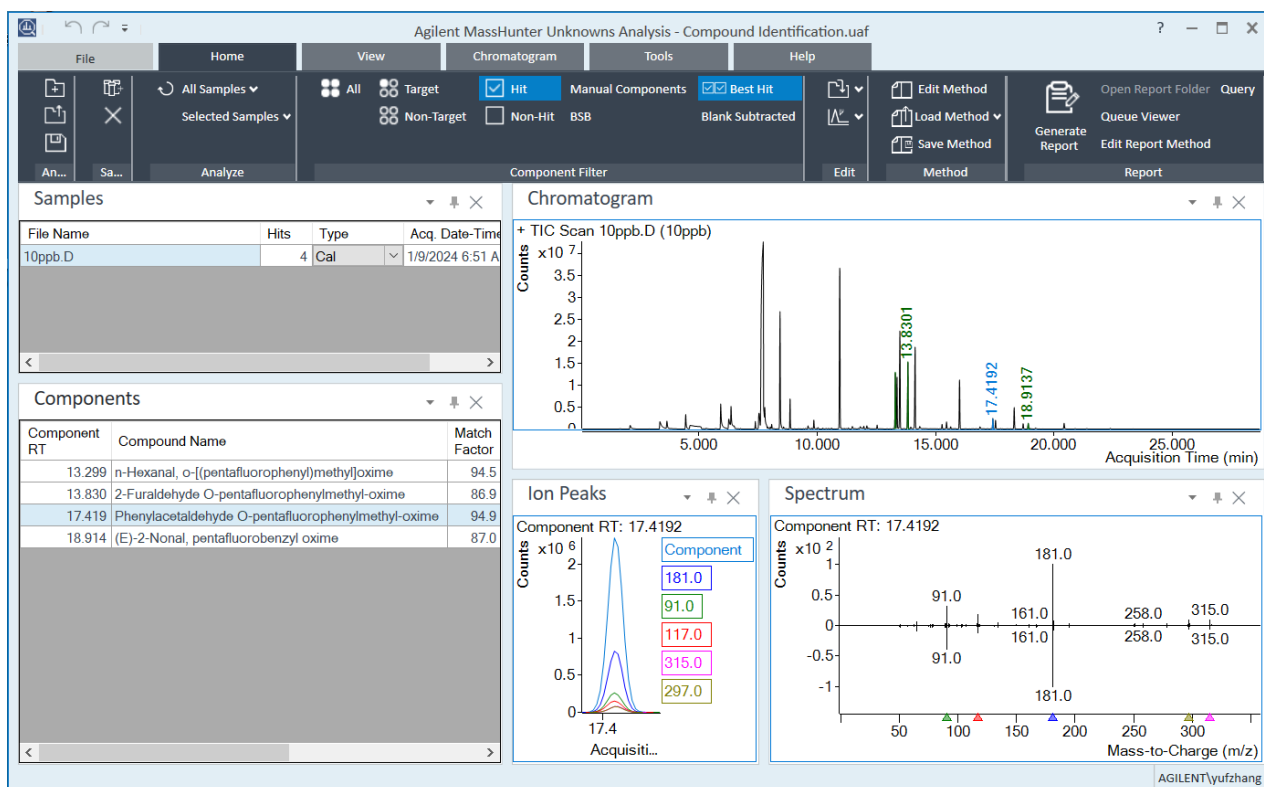


図 4. RT 17.419 分で同定されたフェニルアセトアルデヒド誘導体

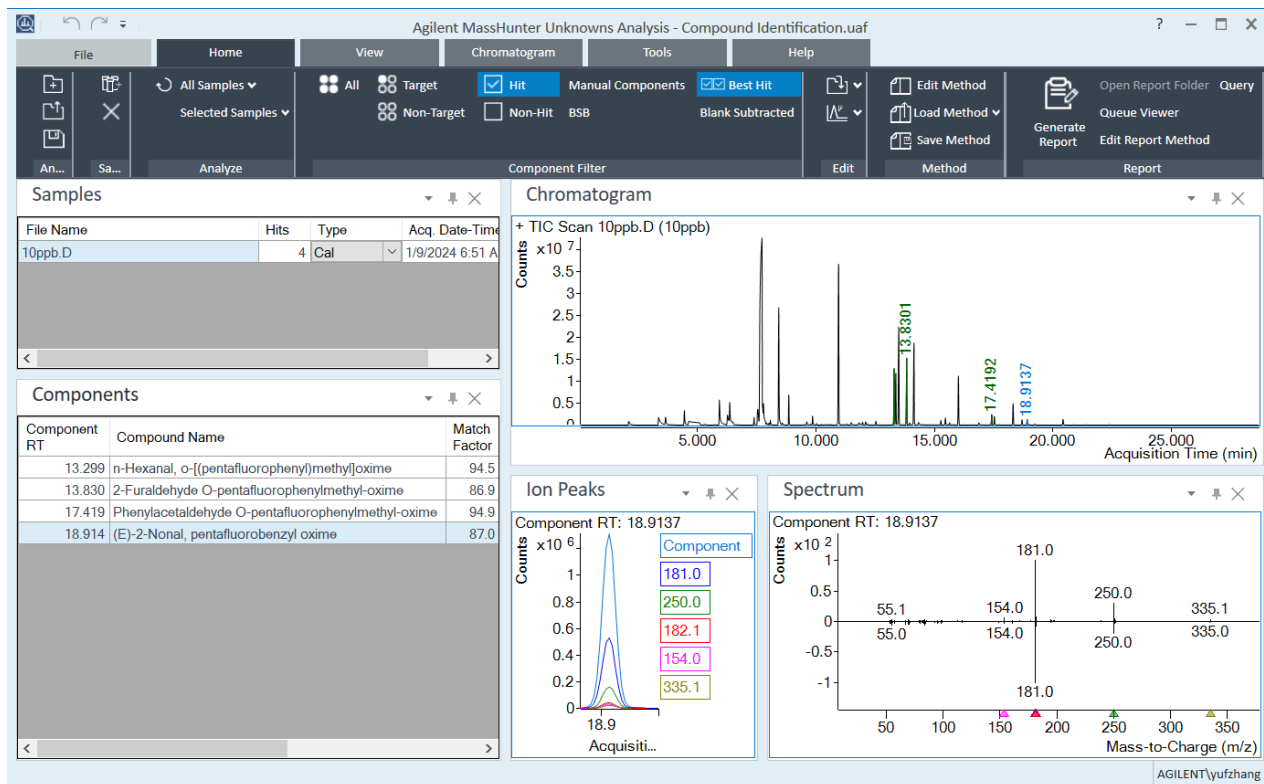


図 5. RT 18.914 分で同定された trans-2-ノネナル誘導体

検量線

標準液のレスポンスに基づいて、4種類のアルデヒド誘導体の検量線をプロットしました。この結果を、表2および図6～9に示します。

表2. 4種類のアルデヒドの検量線範囲とR²、および定量・定性イオン

No.	化合物名	検量線範囲 (μg/L)	R ²	定量イオン	定性イオン
1	ヘキサナール	0.05～10	0.999	181	239, 114
2	フルフラール	5～1,000	0.998	181	291, 195
3	フェニルアセトアルデヒド	0.1～50	0.996	181	297, 91
4	<i>trans</i> -2-ノネナール	0.025～5	0.998	250	181

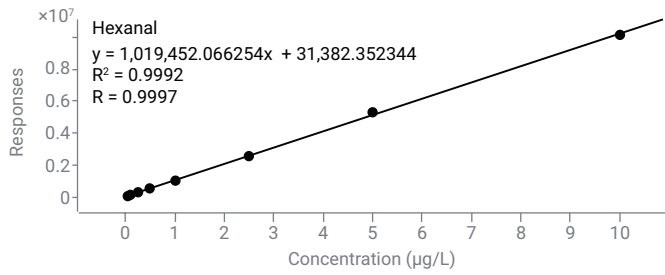


図6. ヘキサナール 0.05～10 μg/L の検量線

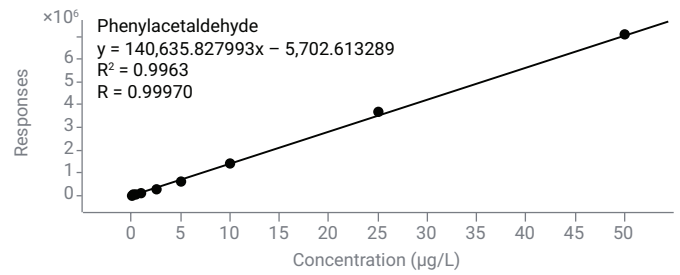


図8. フェニルアセトアルデヒド 0.1～50 μg/L の検量線

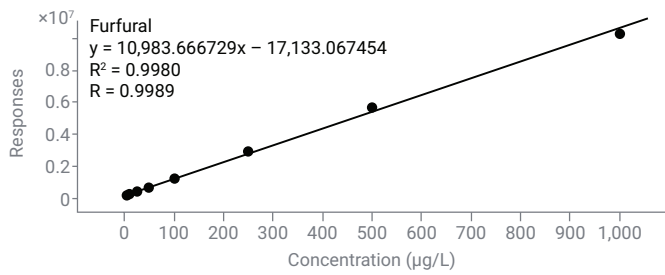


図7. フルフラール 5～1,000 μg/L の検量線

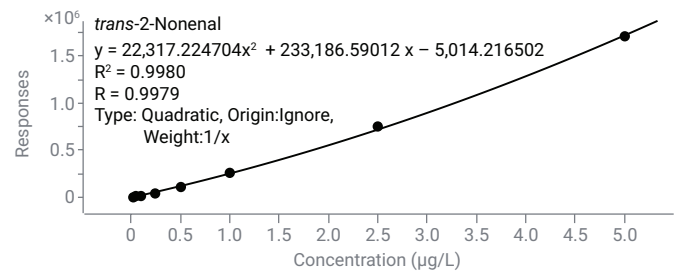


図9. *trans*-2-ノネナール 0.025～5 μg/L の検量線

ビールサンプルの定量結果

検量線の設定に基づいて、試験した 4 種類のブランドのビールサンプル中の 4 種類のアルデヒドを定量しました。定量結果を表 3～6 に示します。4 種類のブランドのビールサンプル中のアルデヒドはすべて、それぞれの閾値を下回っていました。試験した 4 種類のブランドのビールサンプルの中で、アルデヒドの含有濃度が最も低かったのはブランド 4 であり、ヘキサナールが 0.45 µg/L、フルフラールが 6.26 µg/L、フェニルアセトアルデヒドが 6.64 µg/L、*trans*-2-ノネナールが 0.031 µg/L でした。

表 3. 4 種類のビールサンプル中のヘキサナールの定量結果

No.	ビール	ヘキサナール濃度 (µg/L)			平均濃度 (µg/L)	濃度 %RSD (n = 3)
1	ブランド 1	0.67	0.67	0.69	0.68	1.7
2	ブランド 2	1.53	1.54	1.61	1.56	2.8
3	ブランド 3	0.99	1.03	1.04	1.02	2.6
4	ブランド 4	0.45	0.46	0.45	0.45	1.3

表 4. 4 種類のビールサンプル中のフルフラールの定量結果

No.	ビール	フルフラール濃度 (µg/L)			平均濃度 (µg/L)	濃度 %RSD (n = 3)
1	ブランド 1	18.45	18.75	18.45	18.55	0.9
2	ブランド 2	49.46	49.39	52.27	50.37	3.3
3	ブランド 3	24.81	26.53	25.04	25.46	3.7
4	ブランド 4	6.10	6.37	6.30	6.26	2.2

表 5. 4 種類のビールサンプル中のフェニルアセトアルデヒドの定量結果

No.	ビール	フェニルアセトアルデヒド濃度 (µg/L)			平均濃度 (µg/L)	濃度 %RSD (n = 3)
1	ブランド 1	11.07	10.41	10.05	10.51	4.9
2	ブランド 2	8.36	8.26	8.07	8.23	1.8
3	ブランド 3	8.72	8.63	8.92	8.76	1.7
4	ブランド 4	6.84	6.59	6.48	6.64	2.8

表 6. 4 種類のビールサンプル中の *trans*-2-ノネナールの定量結果

No.	ビール	<i>trans</i> -2-ノネナール濃度 (µg/L)			平均濃度 (µg/L)	濃度 %RSD (n = 3)
1	ブランド 1	0.034	0.035	0.034	0.034	1.7
2	ブランド 2	0.061	0.063	0.063	0.062	2.8
3	ブランド 3	0.034	0.034	0.035	0.034	1.7
4	ブランド 4	0.030	0.031	0.031	0.031	1.3

各ビールサンプルについて3回の繰り返し注入を実施し、計算された濃度 %RSD は 4.9 % 未満でした。3回の繰り返し注入の EIC を重ねて表示したものを図 10 ~ 13 に示します。

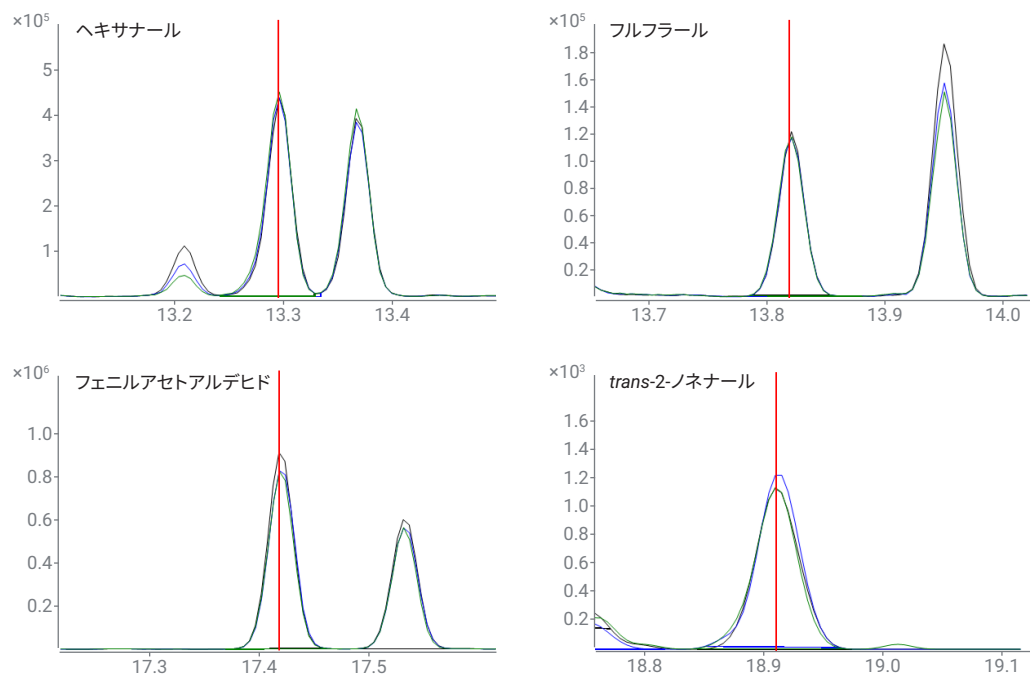


図 10. ブランド 1 ビールサンプル中の 4 種類のアルデヒドの EIC 重ね表示

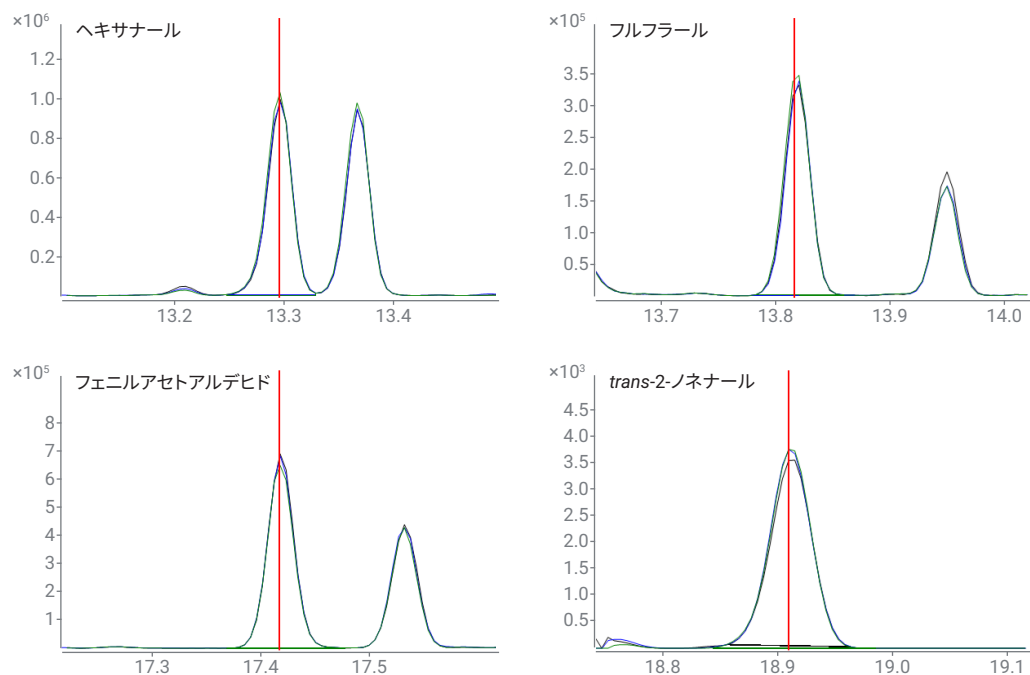


図 11. ブランド 2 ビールサンプル中の 4 種類のアルデヒドの EIC 重ね表示

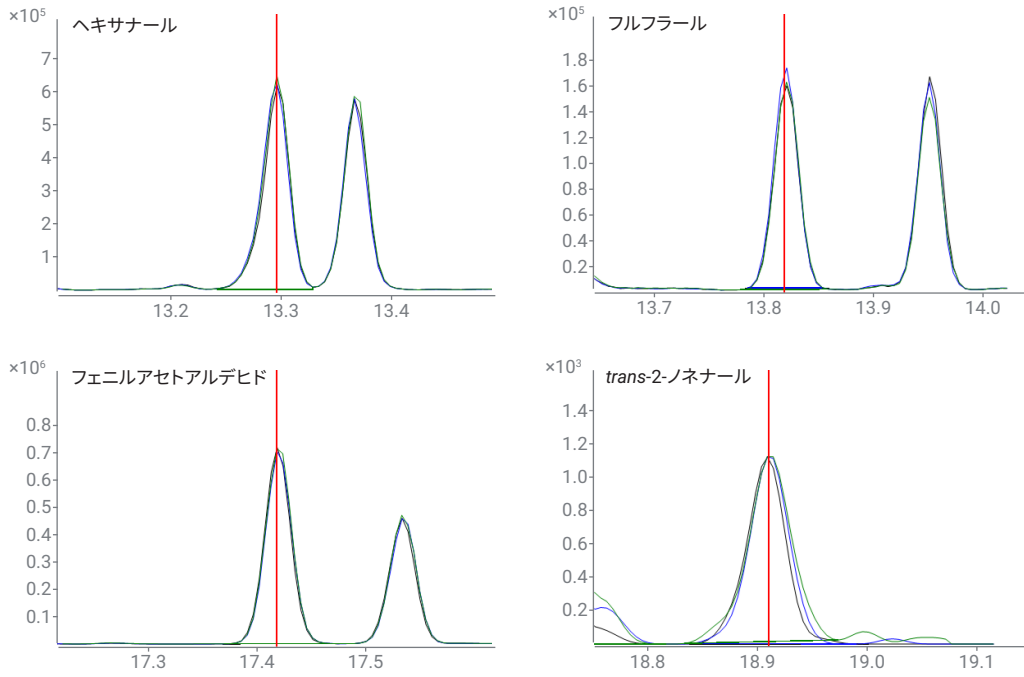


図 12. ブランド 3 ビールサンプル中の 4 種類のアルデヒドの EIC 重ね表示

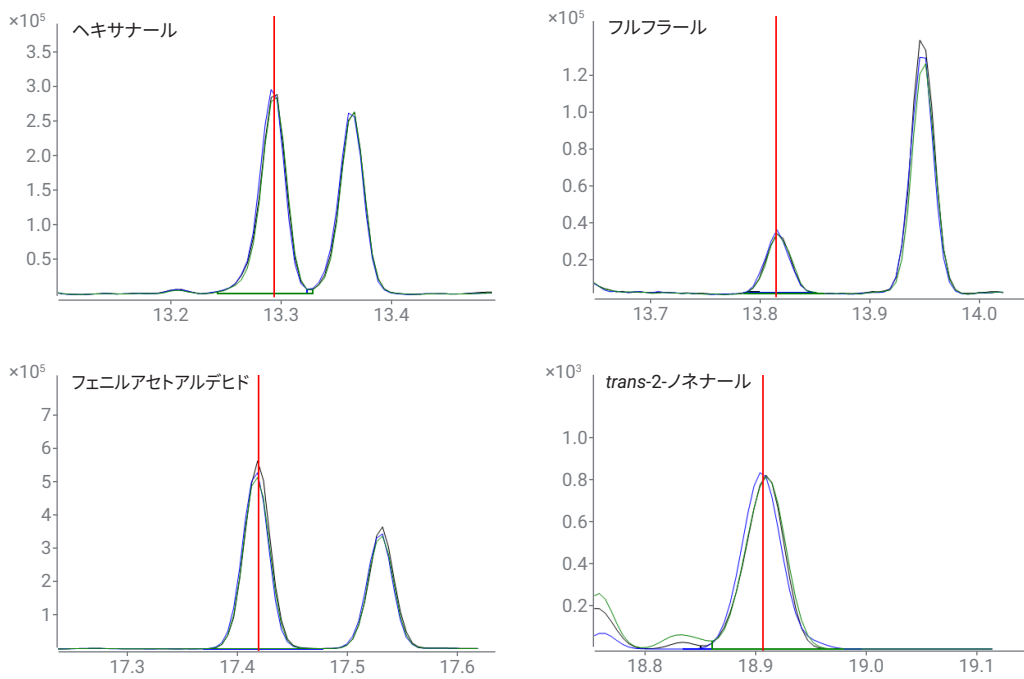


図 13. ブランド 4 ビールサンプル中の 4 種類のアルデヒドの EIC 重ね表示

検出限界の決定

各化合物の最も低い濃度の標準液を使用して、フルスキャンモードでのS/N比を計算しました。定量下限 (LOQ) は S/N 10 で、検出限界 (LOD) は S/N 3 で決定しました。LOQ と LOD の結果を表 7 に示します。

表 7. アルデヒドの LOQ と LOD

アルデヒド	S/N	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)
ヘキサナール (0.05 µg/L)	161	0.003	0.0009
フルフラール (5 µg/L)	29	1.72	0.52
フェニルアセトアルデヒド (0.1 µg/L)	20	0.05	0.015
trans-2-ノネナール (0.025 µg/L)	24	0.01	0.003

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 8890/5977C GC/MSD と PAL3 (SPME) オートサンプラを使用した、ビールの異臭の原因となる 4 種類のアルデヒド (ヘキサナール、フルフラール、フェニルアセトアルデヒド、trans-2-ノネナール) の定量分析について紹介しました。このメソッドには、完全自動化、高速分析、溶媒を使用しない抽出、オンファイバ誘導体化という利点があります。この自動化ソリューションでは、ヘキサナール (0.0009 µg/L)、フルフラール (0.52 µg/L)、フェニルアセトアルデヒド (0.015 µg/L)、trans-2-ノネナール (0.003 µg/L) の検出において、優れた感度を示しました。4 種類のビールを分析しましたが、ヘキサナールは 0.45 ~ 1.56 µg/L、フルフラールは 6.62 ~ 50.37 µg/L、フェニルアセトアルデヒドは 6.64 ~ 10.51 µg/L、trans-2-ノネナールは 0.031 ~ 0.062 µg/L の範囲で検出されました。また、4 種類のアルデヒドすべてについて、4 種類のビールサンプルを 3 回繰り返し注入した結果、RSD < 4.9 % と良好な再現性を示しました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

DE58984949

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, July 18, 2024
5994-7633JAJP

参考文献

1. Aguiar, D.; *et al.* Assessment of Staling Aldehydes in Lager Beer under Maritime Transport and Storage Conditions. *Molecules* **2022**, *27*(3), 600.
2. Moreira, M. T. G.; *et al.* Aldehyde Accumulation in Aged Alcoholic Beer: Addressing Acetaldehyde Impacts on Upper Aerodigestive Tract Cancer Risks. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*(22), 14147.