

キャピラリー・フロー・テクノロジー (Capillary Flow Technology; CFT) を用いた 飲料サンプル中の香気成分探索

著者

姉川 彩
大塚 剛史
中村 貞夫

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

アジレント独自のキャピラリー・フロー・テクノロジー (Capillary Flow Technology; CFT) を使用し、GC 選択型検出器である窒素リン検出器、炎光光度検出器および質量分析計との 3 分岐スプリット検出により、含窒素、含硫黄、さらにマスペクトル情報を同時に得ることができます¹⁾。未知サンプルの解析ソフトウェア (MassHunter Unknowns Analysis) によりデコンボリューションされたピークをライブラリ検索にかけ、GC 選択型検出器で得られた元素情報ならびに AromaOffice (香気成分データベース^{3,4)}) の保持時間情報と照らし合わせた結果、ライブラリ検索結果の整合性を確認することが可能となり、TICC レベルでは見つけることの難しい微量の含硫黄化合物や窒素・硫黄両方を含む化合物の存在が明らかとなり、探索漏れを防ぐことができます。

はじめに

コーヒーは、世界で最も親しまれている嗜好品の1つで、その品種は200種類を超えるといわれています。豆の焙煎方法や挽き方、保存期間や保存方法によって味や香りが変わることも多いため、コーヒー中の香気成分や異臭成分は関心の高い分析対象であるといえます。

コーヒーに含まれる揮発性硫黄化合物は香りや風味に重要な役割を果たしますが、微量で存在するため、複雑な食品マトリックス中の硫黄化合物の同定や定量には、サンプル前処理や高い分離能力を持つ機器分析などの手法が必要になります。食品から感じられる香りや異臭に関しては、におい嗅ぎを使用した官能情報から同定を試みる手法も取り入れられていますが、本アプリケーションでは、におい嗅ぎは使用せず、CFTを用いて選択型検出器である窒素リン検出器 (Nitrogen Phosphorus Detector; NPD)、炎光光度検出器 (Flame Photometric Detector; FPD) および質量分析計 (Mass Spectrometry; MS) に3分岐し、ライブラリ検索結果と元素情報ならびに AromaOffice に登録されている保持時間情報から缶コーヒー中の香気・異臭成分を探索する手法を試みました。

分析条件

固相マイクロ抽出 (SPME) ファイバーは、270 °Cで30分間コンディショニングを行い、市販缶コーヒーを20 mLバイアルに10 mLずつ分注しました。GERSTEL 社製多機能オートサンプラ (MPS Robotic Pro) を用いて、SPMEによる抽出を行い、シングル四重極 GC/MS システム (8890 GC/ 5977B MSD) を用いてスキャン分析を行いました。詳細な分析条件を下記に記載します。

表 1. 分析条件

GERSTEL MPS Robotic Pro (多機能オートサンプラ)	
注入方法	SPME
SPME ファイバー	SPELCO 社製 DVB/CAR/PDMS (30 µm CAR/PDMS, 50 µm DVB)
サンプル平衡化条件	40 °C /15 min (攪拌 250 rpm)
サンプル抽出条件	40 °C /30 min
サンプル脱着時間	3 min
塩析	3 g
Agilent 8890 GC	
注入口	スプリット/スプリットレス
注入モード	スプリットレス
注入口温度	250 °C
注入口ライナー	SPME 用ウルトラライナーライナー、i.d. 0.75 mm (p/n 5190-4048)
キャリアガス	ヘリウム 1 mL/min コンスタントプレッシャー
カラム	DB-WAX UI 40 m, 0.18 mm I.D., 0.18 µm (p/n 121-7042UI)
オープン	40 °C (3 min) -5 °C /min -250 °C (10 min)

Agilent 5977B MSD Inert Plus	
トランスファーライン温度	250 °C
イオン源温度	250 °C
四重極温度	150 °C
測定モード	スキャン (m/z = 30 - 400)
NPD	
温度	300 °C
水素流量	3 mL/min
Air 流量	60 mL/min
メークアップガス流量	3 mL/min ブロスビード
FPD*	
温度	300 °C
水素流量	60 mL/min
Air 流量	60 mL/min
メークアップガス流量	60 mL/min
フィルター	硫黄 (S) フィルター

データ解析にはスキャン分析で得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) に対し、マススペクトルライブラリに NIST2023 を用い、MassHunter Unknowns Analysis を使用した定性解析を行いました。GC 選択型検出器のクロマトグラムを併用した解析では、Mass Hunter Qualitative および MassHunter Unknowns Analysis の並列表記を使用し、同定結果とクロマトグラムを併用した解析を行いました。

図 1 に本アプリケーションの装置構成を示します。

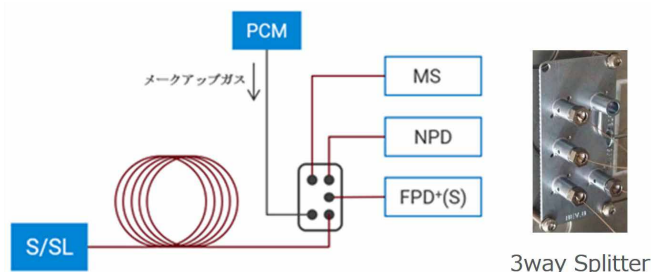


図 1. 装置構成

分析結果

SPME-GC/MS スキャン分析で得られた TICC ならびに GC 選択型検出器で得られたクロマトグラムを図 2 に示します。

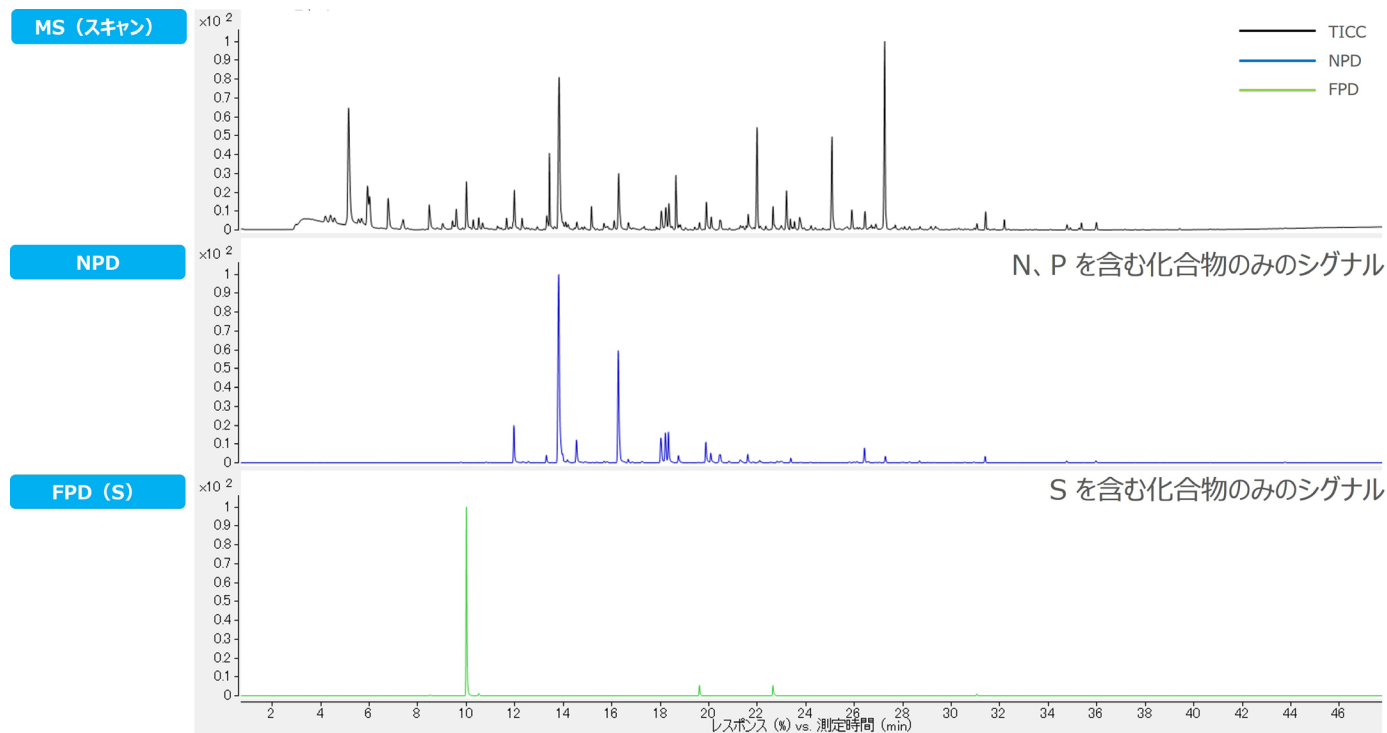


図 2. SPME-GC/MS, NPD, FPD 同時検出によって得られた市販缶コーヒーのクロマトグラム

サンプル中にどのような化合物が含まれるのか、Mass Hunter Qualitative を使用し、TICC からデコンボリューションの機能を使わず、各保持時間から抽出したマススペクトルからバックグラウンドのスペクトルを減算した後、ライブラリ検索を行った結果を図3に示します。ここで抜粋した1から5の

1. Prenol (C₅H₁₀O)
2. Pyrazine, 2,5-dimethyl (C₆H₈N₂)
3. Pyrazine, 2,6-dimethyl (C₆H₈N₂)
4. Pyrazine, ethyl (C₆H₈N₂)
5. Aziridine, 1-ethyl-2-methyl-3-(1-methylethyl)-, trans- (C₈H₁₇N)

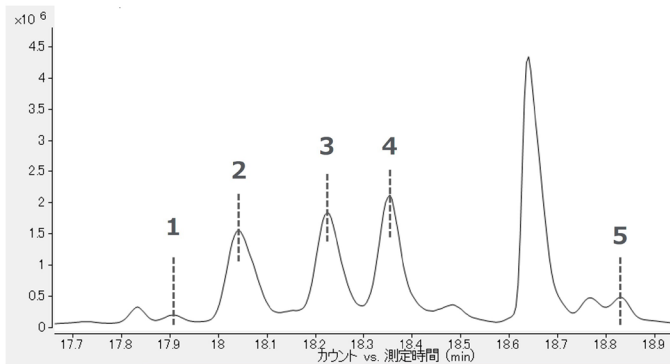
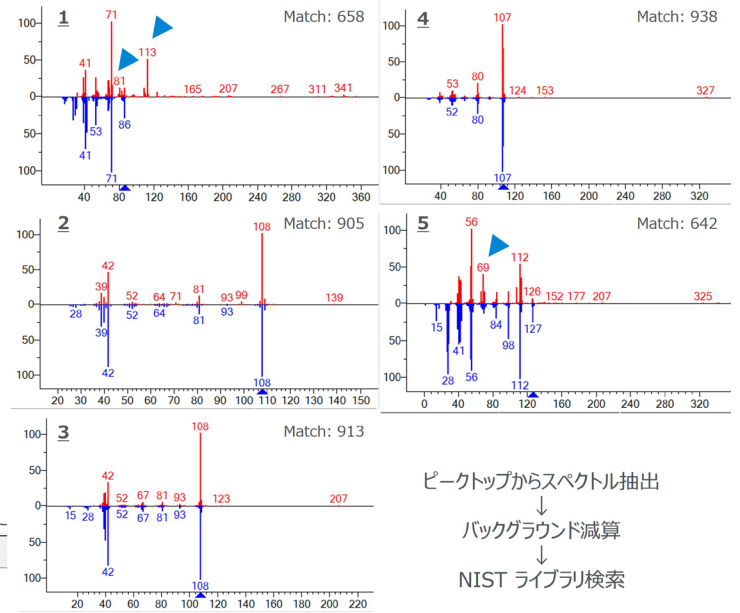


図3. MassHunter Qualitative ソフトウェアで TICC からスペクトルを抽出し、NIST ライブラリ検索を行った結果

ピークのうち、ピーク 2, 3, 4 は NIST ライブラリとのマススペクトルパターンの一致率が高いことが確認できます。しかしながら、ピーク 1, 5 についてはライブラリにはないイオン (▼) が検出されていることが確認できます。



ピークトップからスペクトル抽出
↓
バックグラウンド減算
↓
NIST ライブラリ検索

図4に MassHunter Unknowns Analysis を使用した定性解析の結果表示例を示します。

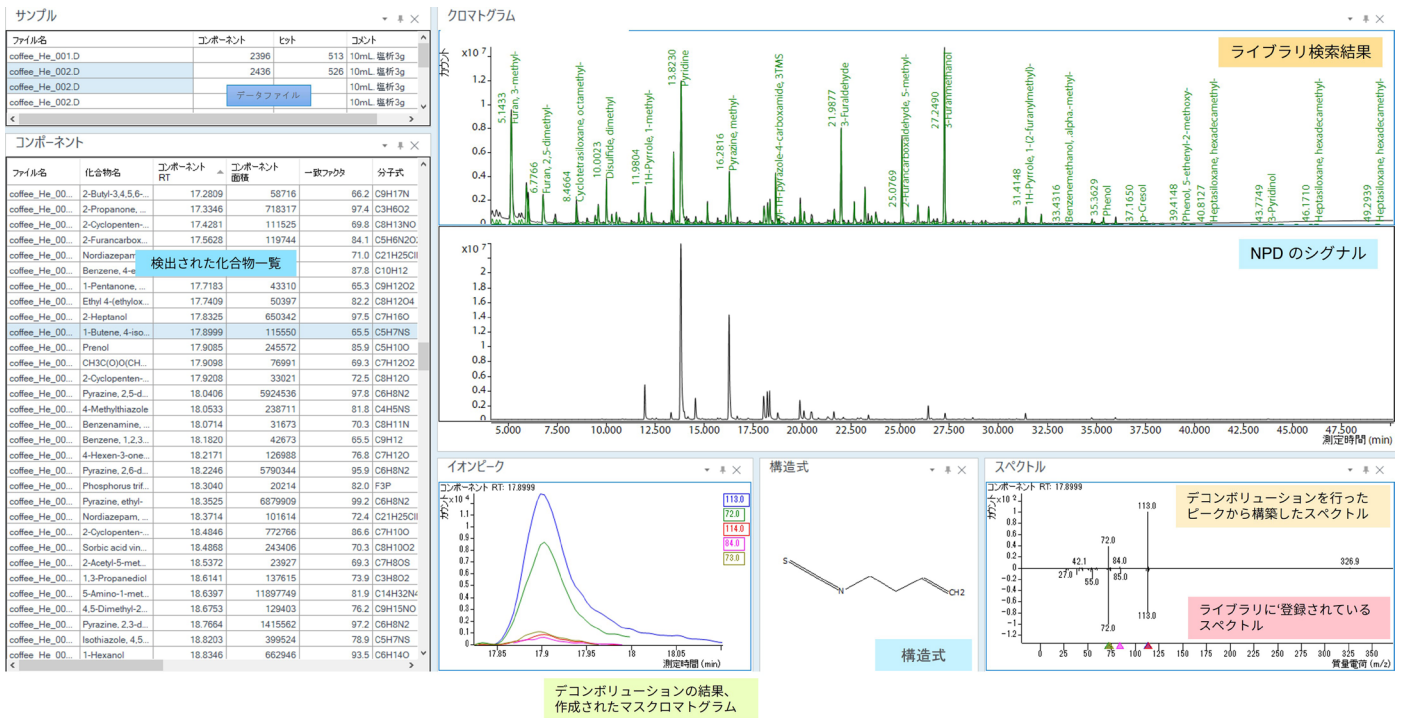


図4. Unknowns Analysis を使用した定性解析表示例

ライブラリ検索でヒットした候補化合物は緑色のピークで表示され、候補化合物の構造式やイオンピークのパネルでピークの抽出状況を確認することが可能です。図3で示したNISTライブラリにはないイオンが検出

されたピーク1と5について、MassHunter Unknowns Analysisで解析した結果を図5に示します。

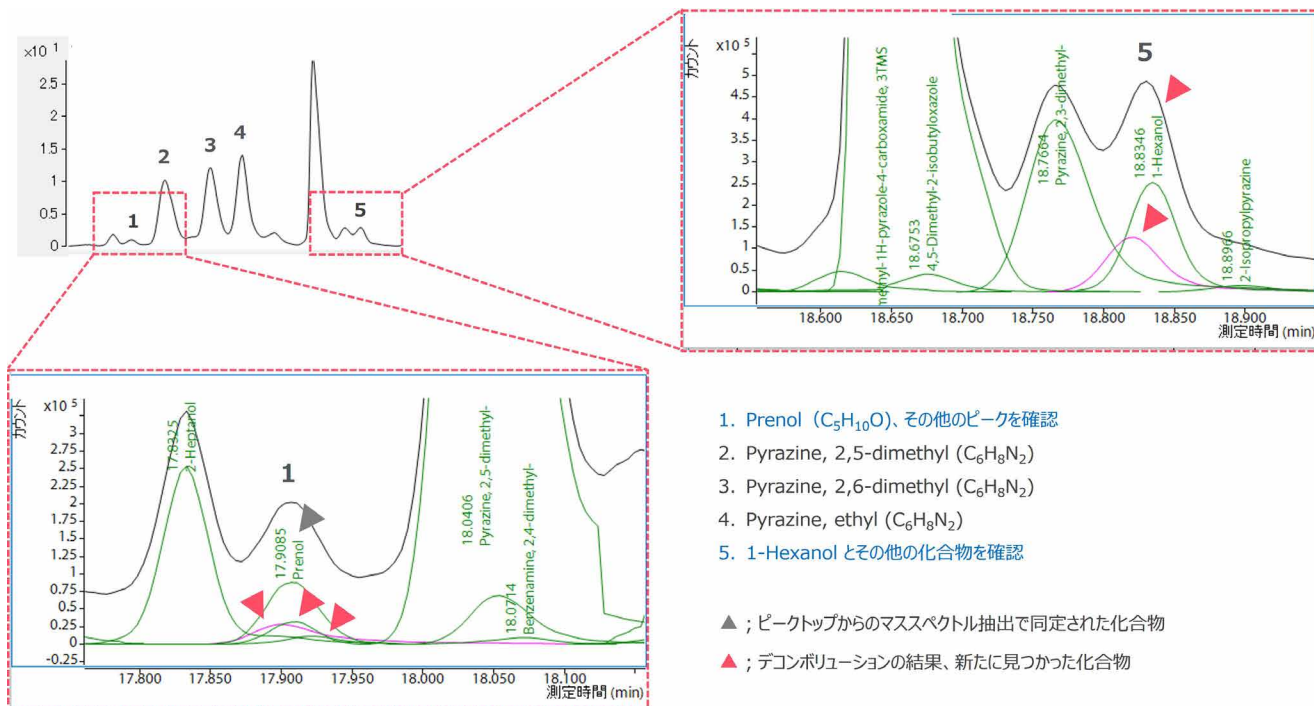


図5. Unknowns Analysisでデコンボリューション後のピークで同定されたピーク1、5の候補化合物（該当する保持時間部分を拡大表示）

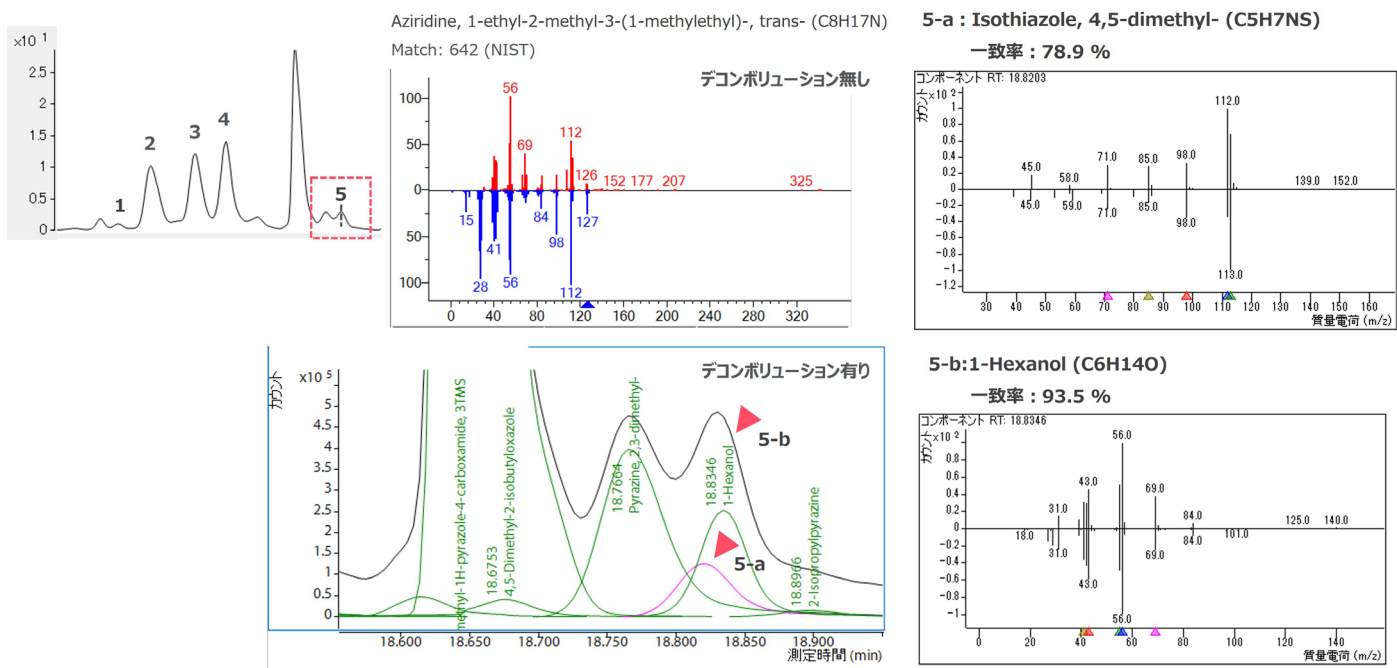


図6. ピーク5のデコンボリューション有無のライブラリ検索結果の比較

ピーク 1 の保持時間付近には、Prenol (▼) の他に 3 つの化合物候補 (▼) が存在することが示唆されました。一方、ピーク 5 は図 3 で示したピークトップから抽出したスペクトル検索結果；Aziridine, 1-ethyl-2-methyl-3-(1-methylethyl)-, trans- (C8H17N) とは異なる結果となり、5-a；Isothiazole, 4,5-dimethyl- と 5-b；1-Hexanol、2 つの化合物候補 (▼) が存在することが示唆されました (図 6)。図 3、5、6 で示した事例のように、従来のピークトップのみを使用したライブラリ検索結果に比べ、デコンボリューションの機能を使用すると共溶出の化合物を見つけることができ、候補化合物の同定結果の確かさが改善されることが明らかになりました。さらに、この 2 つの化合物に関して、GC 選択型検出器のシグナルと保持時間情報 (Retention Index; RI) を使用し香り成分への絞り込みが可能な Aroma Search で解析を行いました。図 6 で示したとおり、5-b；1-Hexanol (C6H14O) はライブラリー一致率が 93.5 % と高いため、この化合物である可能性が高いことが示唆されます。一方、ライブラリー一致率が 78.9 % だった 5-a；Isothiazole, 4,5-dimethyl-(C5H7NS) に

ついて、スキャンデータに各検出器のクロマトグラムを重ね合わせて確認すると (▼▼)、図 7 の左図に示すとおり、ピーク 5 の保持時間には NPD と FPD のシグナルが両方あることが確認できるため、窒素もしくはリン、硫黄を含む化合物であることが確認できます。化合物候補の同定確度を上げるため、AromaOffice に登録されている RI を使用して、候補化合物の整合性を確認しました。5-a, b それぞれの化合物の Aroma Search の結果 (表 2) を確認すると、5-b；1-Hexanol (C6H14O) の平均 RI は 1354 となっており、実測 RI と合致しているため、マススペクトルならびに RI 両方で確度の高い結果を得ることができました。一方、5-a；Isothiazole, 4,5-dimethyl-(C5H7NS) の平均 RI は 1407 であることが確認でき、図 7 に示した各化合物が検出される時間帯よりも 2 分以上後方に溶出することが示唆され、Aroma Search の結果 (表 2) では該当化合物を確認することは困難でした。このことから、5-a は、窒素および硫黄を含み、Isothiazole, 4,5-dimethyl- と類似したマススペクトルを持つ、その他の化合物の可能性であることが示唆されました。

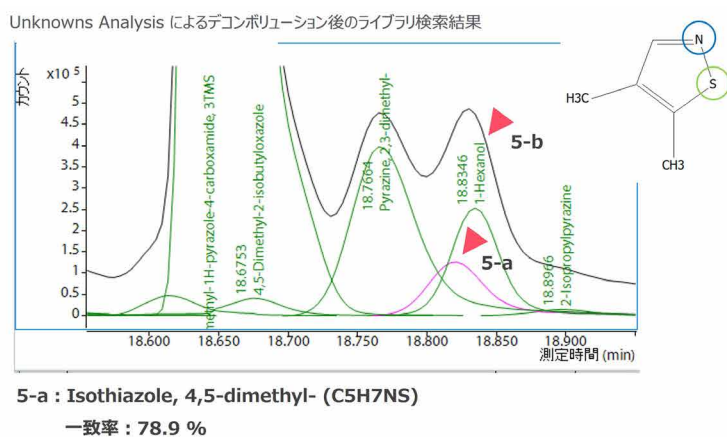
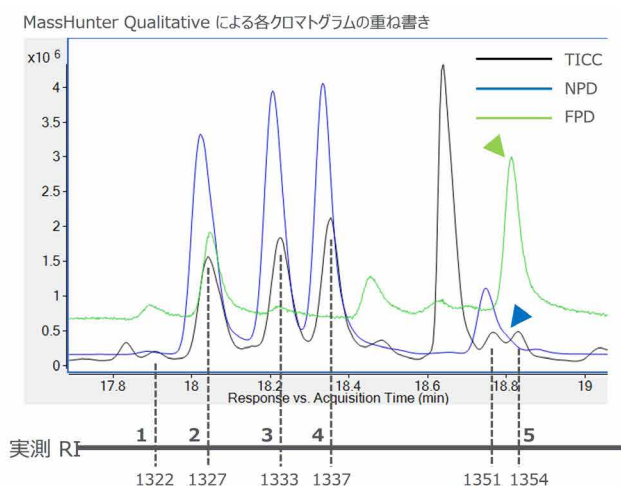


図 7. 選択型検出器のクロマトグラム重ね書きと各化合物の保持時間情報

表 2. 候補化合物が検出される 17.9 ~ 19.5 min 辺りの AromaSearch の結果 (抜粋)

コンポーネント			アロマサーチ			一致率	化合物名 (Unknowns Analysis)	化合物名 (AromaOffice)	Charactor	CAS No	分子式
RT	RI	面積	Cnt	RI-Ave	RI-Diff						
17.909	1322	245572	35	1323	1	86	Prenol	Prenol	gassy fruity	556-82-1	C5H10O
17.909	1322	245572	8	1318	4	85	2-Buten-1-ol, 2-methyl-	2-methyl-2-butenol	malty	4675-87-0	C5H10O
18.041	1327	5924536	62	1324	3	98	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	2,5-Dimethylpyrazine	beef stew	123-32-0	C6H8N2
18.225	1333	5790344	66	1329	4	97	2,6-Dimethyl pyrazine	2,6-dimethylpyrazine	baked	108-50-9	C6H8N2
18.352	1337	6879909	62	1340	3	99	Pyrazine, ethyl-	ethylpyrazine	earthy pyrazine potato	13925-00-3	C6H8N2
18.766	1351	1389625	53	1348	3	97	Pyrazine, 2,3-dimethyl-	2,3-Dimethylpyrazine	almond	5910-89-4	C6H8N2
18.835	1354	662946	304	1354	0	93	1-Hexanol	hexanol	alcoholic	111-27-3	C6H14O
19.045	1361	288066	8	1363	2	93	2-Cyclopenten-1-one	2-cyclopentenone	red	930-30-3	C5H6O
19.076	1362	134665	11	1366	4	83	2-Hydroxy-3-pentanone	3-pentanon-2-ol	buttery	5704-20-1	C5H10O2
19.417	1373	784307	16	1372	1	96	2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	2-methyl-2-cyclopentenone	cooked potato	1120-73-6	C6H8O
19.585	1379	253917	6	1382	3	73	Thiazole, 4,5-dimethyl-	4,5-dimethylthiazole	earthy	3581-91-7	C5H7NS

図 7、表 2 で示したように、ライブラリ検索で探索した候補化合物の同定結果の確度を上げるため、GC 選択型検出器の情報と RI 情報を使って、候補化合物の整合性を確認することが可能です。

次に、食品中で微量で香気に影響を与えやすい含硫黄化合物として知られるチアゾール類について、解析を試みました。食品中のチアゾール類は含まれる量が少なく、検出されていたとしても小さなピークで確認されることが多いため、TICC からこれらの化合物を探索することが難しい場合があります。図 8 に示すように、Aroma Search のフィルター機能 (▼) を使用すれば、比較的、簡単に含硫黄化合物を探索することが可能です。Aroma Search で含硫黄化合物に絞り込み、FPD のシグナルの有無を確認することで確度の高い結果を得ることが可能です。

本アプリケーションで示したように、香気・においの分析では、保持時間が近接し、類似したマススペクトルを持つピークが多く確認され、候補化合物の判断に迷うことも少なくありません。また、硫黄や窒素を含む化合物は比較的吸着しやすく、TICC レベルでは見つけることが難しい場合もあるため、GC 選択型検出器のクロマトグラムや MassHunter Unknowns Analysis で得られるノイズの少ないマススペクトル、Aroma Search を組み合わせた保持時間情報を併用解析することで比較的簡単に見つめやすくなり、候補化合物の整合性を確認することが可能です。

Aroma Search の解析結果表示例

コンポーネント		アロマサーチ		一致率	化合物名(Unknown Analysis)	化合物名(AromaOffice)	Charactor	CAS No	分子式	基準ピーク	
RI	面積	[Cnt]	RI-Ave	RI-Diff						m/z	面積
734	14987	20	742	8	73 Dimethyl sulfide	Thiobismethane	boiled cabbage	75-18-3	C2H6S	62.00	4454
1015	1818873	18	1020	5	89 Thiophene	thiophene	garlic	110-02-1	C4H4S	83.98	794538
1041	88720	13	1052	11	75 Methyl thioacetate	Methylthioacetate	cheesy	1534-08-3	C3H6OS	90.01	37195
1066	12486871	71	1073	7	86 Disulfide, dimethyl	DMS	cabbage	624-92-0	C2H6S2	93.99	5448737
1083	3021080	3	1094	11	97 Thiophene, 3-methyl-	3-methylthiophene	green	616-44-4	C5H6S	97.01	1441208
1083	3003046	20	1095	12	96 Thiophene, 2-methyl-	2-methylthiophene	french fries	554-14-3	C5H6S	97.01	1441208
1180	281037	1	1156	24	88 Thiophene, 2,3-dimethyl-	2,3-dimethylthiophene	earthy	632-16-6	C6H8S	111.01	96805
1241	159985	9	1246	5	73 Thiazole, 2-methyl-	2-methylthiazole	cabbage	3581-87-1	C4H5NS	98.98	53365
1250	185369	17	1252	2	79 Thiazole	Thiazole	burnt	288-47-1	C3H3NS	85.03	104400
1282	1016921	8	1291	9	92 4-Methylthiazole	4-methylthiazole	cooked meat	693-95-8	C4H5NS	98.98	390325
1287	254895	4	1283	4	85 Thiazole, 2,4-dimethyl-	2,4-Dimethylthiazole	rubbery	541-58-2	C5H7NS	112.98	93912
1379	253917	6	1382	3	73 Thiazole, 4,5-dimethyl-	4,5-dimethylthiazole	earthy	3581-91-7	C5H7NS	112.98	116461
1380	1713105	115	1377	3	96 Dimethyl trisulfide	DMTS	alliaceous	3658-80-8	C2H6S3	125.92	641162

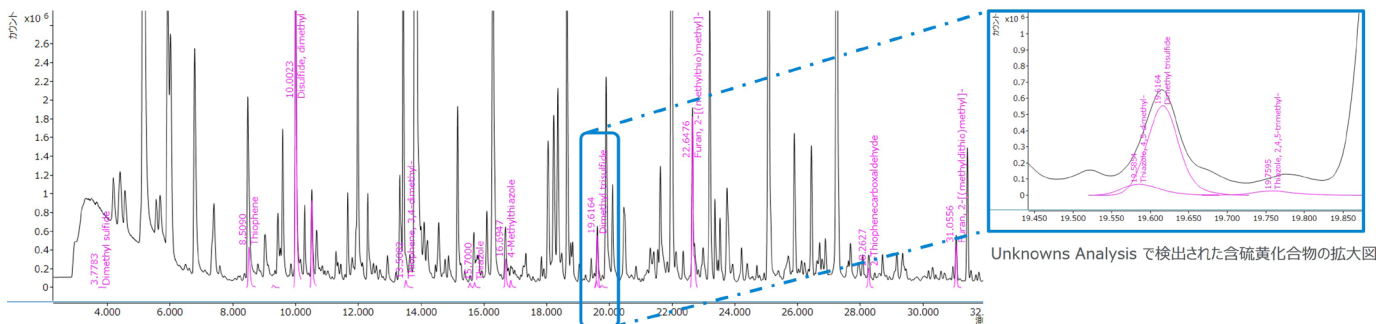


図 8. 微量の含硫黄化合物を探索する事例

まとめ

MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアを使用し、デコンボリューション後のスペクトルでライブラリ検索を行うことによって、より一致率の高い結果を得ることが再確認できました^{1,2)}。MassHunter Unknowns Analysis のデコンボリューションを行うことによって、共溶出したピークの中から香気成分を探し出すことも可能です。NPD・FPDなどの GC 選択型検出器で得られる元素情報や AromaOffice に登録されている RI 情報を併用した解析を行うことによって、ライブラリ検索結果の整合性を確認することが可能となり、微量で香気に影響を与えやすく、TICC レベルでは見つけることの難しい含硫黄化合物でも簡単に見つけることができ、探索漏れを防ぐことが期待できます。

本手法はキャピラリー・フロー・テクノロジー (CFT) による 3 分岐同時検出が可能であり、保持時間の一致したクロマトグラムを得ることができるため、微量で影響する含窒素、含硫黄の香気成分分析に有効な手法です。

参考文献

- 1) 姉川 彩, キャピラリー・フロー・テクノロジー (Capillary Flow Technology; CFT) を用いた塗料サンプルの成分差異解析, Agilent Technologies Application Note, publication number GC-MS-202102AA-001
- 2) Anastasia A. Andrianova, Bruce D. Quimby, and Jessica L. Westland, デコンボリュートしたスペクトルのライブラリ検索によるイチゴ中の農薬の許容レベルでの GC/MSD スクリーニング, Agilent Technologies Application Note, publication number 5994-0915JAJP.
- 3) AromaOffice データベースについて —<https://www.nskw.co.jp/solution/analytical/product/chemplus/aromaoffice/>
- 4) AromaOffice データベースについて —<https://gerstel.co.jp/products/aromaoffice2d/>
- 5) 異臭ライブラリダウンロードサイト
<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1004696>
- 6) GERSTEL Application Note No. AN-J02/2021
- 7) GERSTEL Application Note No. AN-J01/2023.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

DE002593

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, November 14, 2024

5994-7957JAJP