

Technical Report

ヘッドスペースSPME-GC×GC-quadMSを用いたマルサラワインのキャラクタリゼーション Using Headspace SPME-GC×GC-quadMS for the Characterization of Marsala Wine

Flavio A. Franchina¹, Peter Q. Tranchida¹, Paola Dugo^{1,2}, Luigi Mondello^{1,2}

Abstract:

本レポートでは、マルサラワインのヘッドスペース成分を明らかにするための研究について報告する。試料の分析はヘッドスペース固相マイクロ抽出-包括的2D GCで行った。GCの2次元目出口で溶出分析物を分け、一方は水素炎イオン化検出器（相対定量用）へ、もう一方は高速スキャン四重極型質量分析計（化合物同定用）へ導いた。その結果、非常に複雑な成分をもつマルサラのヘッドスペース分析への道を開いた。

Keywords: 包括的2D GC、四重極型質量分析、SPME、マルサラワイン

1. はじめに

マルサラワイン、または単に「マルサラ」は、イタリアのシチリア地方でのみ生産されている有名なデザートワインで、評価も高く経済的にも重要な位置を占めている。マルサラは世界中に輸出され、マデイラ、シェリー、ポートとともに、4大デザートワインの一つに数えられている。マルサラワインは熟成度や糖度により分類されている。熟成度の点から言えば、“fine”（1年超）、“superiore”（2年超）、“superiore riserva”（4年超）、“vergine”（5年超）、“stravecchio”（10年以上）となる。残留糖度については、以下のようなグループ分けになる。“secco”（40 g/L未満）、“semi-secco”（40と100 g/Lの間）、そして“dolce”（100 g/L以上）である。

現在、食品や飲料の香りのプロファイルを評価するためのノンターゲット分析方法としては、1次元ガスクロマトグラフィに質量分析計を結合させた装置が使用される。このGC-MSを利用する手法を用いると、定性情報（定量情報についても）は得られるが、ある特定成分が作り出す匂いの感覚についてはわからない。1D GCによる匂い分析の問題点は、1本のカラムで分離するには、匂いの試料が、あまりにも複雑すぎることである。分離能が不足し、その結果カラムの出口で化合物が共溶出してしまうことがしばしばある。このレポートでは、ヘッドスペース（HS）SPME-GC×GC-FID/MSを用いたマルサラワインの分析法を開発したので報告する（Fig. 1）。FIDデータは定量目的で、MSデータは同定のために使用した。

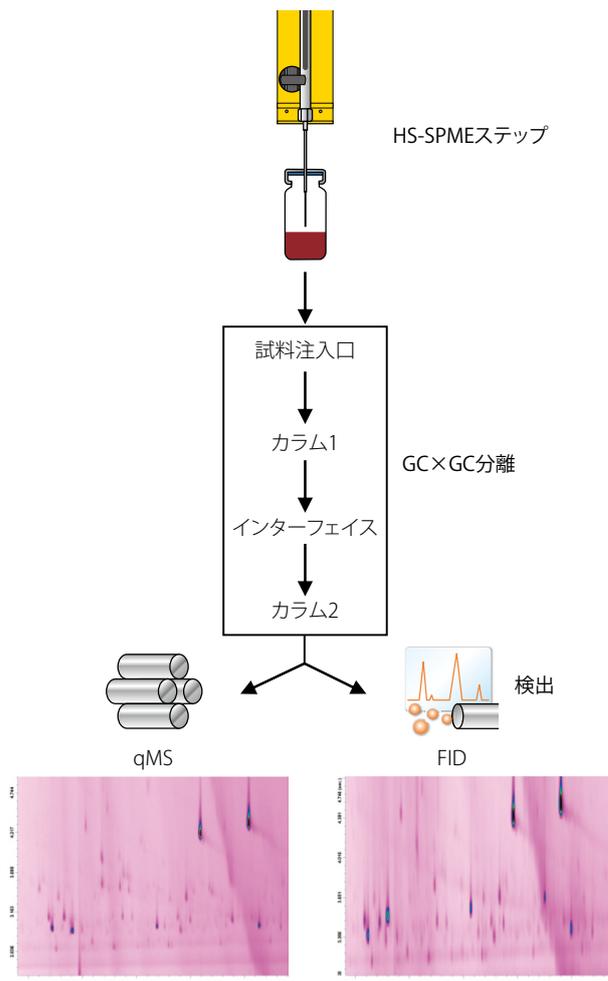


Fig. 1 マルサラワインの分析フローチャート

2. 実験

「fine」、「superiore secco」、「superiore riserva dolce」、および「vergine」の4タイプのマルサラワインは、シシリーのマルサラ生産者から提供してもらった。ワインは、分析前、ボトルで常温、暗所で保存されていた。

線形保持指標 (LRI) の計算に用いるC₇ ~ C₃₀アルカン混合物は、Supelco (ミラノ、イタリア) の厚意により提供してもらった。

ヘッドスペースSPMEの実施には、3相ジビニルベンゼン (DVB) /カルボキセン (CAR) /ポリジメチルシロキサン (PDMS) (50/30 μm)、PDMS (100 μm)、CAR/PDMS (75 μm) の各種SPMEファイバー (Supelco) を用いた。HS-SPME分析は、島津AOC-5000オートサンブラを用いた。

マルサラワイン4 mLを20 mLバイアルに入れた。実験室の室温 (25~26 °C) で、ファイバーをマルサラのヘッドスペース部に、30分間曝露させた。抽出中、バイアルを500 rpmで、(時計方向交互に) 振とうさせた。この処理後、ファイバーはGCの注入口で、270 °C、1分間、スプリットレスモード (1分後、10:1のスプリットモード) で、熱的に脱着させた。

島津GC×GCシステムの構成は次のとおりである。

- GC-2010ガスクロマトグラフ 2台
- GCMS-QP2010 Ultra 四重極型質量分析計
- AOC-5000オートインジェクタ
- ループ型クライオモジュレータ

使用ソフトウェア:

- GCMSsolution version 2.71
- GCSolution version 2.71
- ChromSquare version 2.0
- アドバンスドフローテクノロジー (AFT) 専用ソフトウェア

1Dカラム: SLB-5ms (Supelco) 30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm *d_f* [Silphenylene Polymer、極性的にはpoly (5 % diphenyl / 95 % methylsiloxane)と同等] を空カラム (1 m × 0.25 mm I.D.、クライオモジュールダブルループ用) に接続

2Dカラム: Supelcowax-10 (Supelco)、1 m × 0.1 mm I.D. × 0.1 μm *d_f* および 1.5 m × 0.1 mm I.D. × 0.1 μm *d_f* (100 % ポリエチレングリコール) を、それぞれFIDおよび質量分析計に接続

注入温度: 270 °C、注入圧力: 150 kPa

GCオープン温度: 3 °C/minにて50 °C (1分間保持) から270 °C (両オープン)、モジュレーション時間: 5秒間

MSパラメータ: フルスキャンモード (サンプリング周波数 25 Hz) をスキャン速度 10,000 u/sにて実施 (質量範囲は *m/z* 40 ~ 360) インターフェイスおよびイオン源の温度はそれぞれ250および200 °C、MSイオン化モード: 電子イオン化 (70 eV)

FIDパラメータ: 温度 280 °C、サンプリング周波数: 125 Hz、ガス: メイクアップ (He): 40 mL/min、H₂: 40 mL/min、空気: 400 mL/min

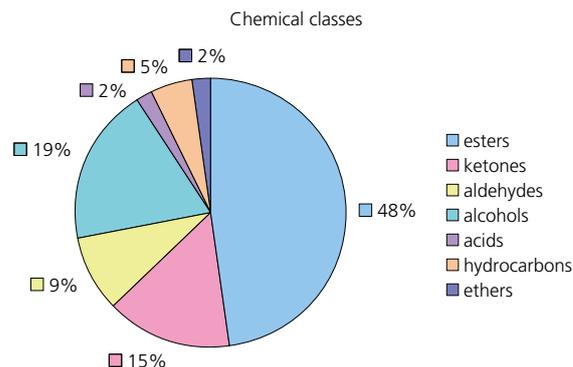


Fig. 2 マルサラで検出された主要成分のピーク面積の相対的割合

3. 結果および考察

まず、SPMEのファイバー固定相、抽出時間、および脱着時間を検討し、SPME動作の最適化を行った。抽出温度については、加熱は行わなかった。これは、マルサラワイン揮発成分のプロファイルを採取するという研究目的からすると、室温で行うのが最良だからである。加熱を行えば抽出時間を短縮できる可能性はあったが、(マルサラは室温にて賞味されるものなのに) マルサラのヘッドスペースの「標準」組成を変えてしまい、その結果、HS SPME-GC×GCフィンガープリントにマルサラの揮発性成分が忠実に反映されなくなってしまう。

ファイバーの選択にあたっては、マルサラのヘッドスペースには、さまざまな極性成分が含まれていることを考慮しておく必要がある。実際、マルサラの揮発性成分には、酸から始まり、アルコール、エステル、アルデヒド、およびケトンを経て、炭化水素にまでわたっている。PDMS液体ポリマーは、極性の高い揮発性物質(アルコール、酸、アルデヒド)に対してうまく適用できなかったのに対し、多孔質体と液体ポリマーからなるDVB/CAR/PDMSやCAR/PDMSの混合ファイバーでは、高極性、低極性の両方の成分を同じように検出できた。ただし、CARはDVBに比べ細孔が小さいため、CAR/PDMSファイバーは低分子量揮発性物質に対しては良好な特性を示したものの、高分子量揮発性物質 (>200 u) に対しては選択性が低下した。総じて言えば、極性および分析物の分子量の観点で一番広い範囲をカバーできたのはDVB/CAR/PDMS相であった。分析したマルサラワインの化学的分類に関する相対的割合をFig. 2に示す。

最適なファイバーを決定した後、抽出時間として、15、30、45、60、および75分を評価したが、全体的に良好であった30分を採用した。

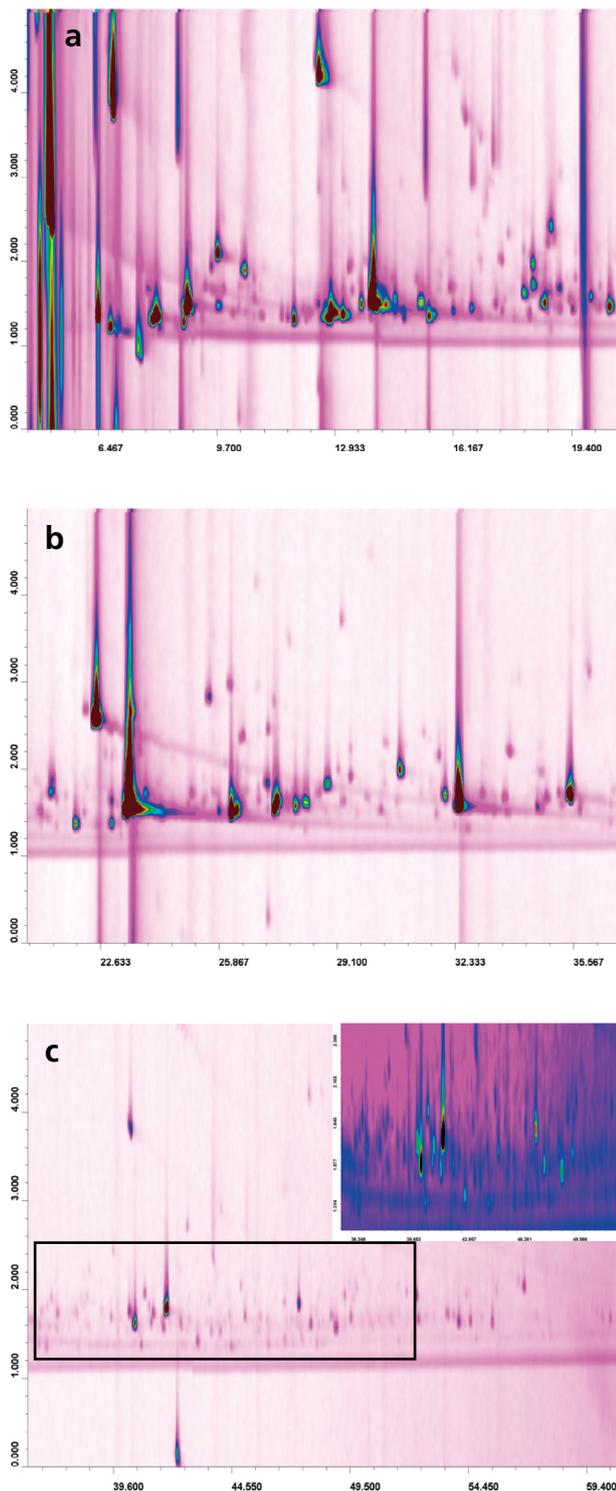


Fig. 3 a～c マルサラ「superiore secco」におけるフルスキャンHS SPME-GC×GC-MSクロマトグラムの拡大図（先頭、中央、最終部）
ピーク同定については参考文献1を参照のこと

GC×GC-MS/FID法については、よく用いられる無極性/極性カラムの組み合わせを採用した。各分岐カラム（実験の項を参照）はそれぞれの検出器に接続され、50:50にスプリットされた。MSシステムは25 Hzで動作させることで、定量を行うのに十分なデータポイント数/ピークが得られた（10以上）。MSでは応答因子が化合物に大きく依存するが、普通、このような計測装置はピーク面積の相対%情報の取得には用いられない。これに対し、FIDの応答因子の化合物依存性は非常に小さいので、FIDを半定量データの取得に用いた。

Fig. 3a～cに「superiore secco」試料のクロマトグラムの3つの領域の拡大図を示す。4つの試料について調べた結果、暫定的な値として異なる128成分が同定された。これらのクロマトグラムには、（水以外でマルサラにもっとも多く存在する）エタノールが含まれていないが、これはMS溶媒のカットオフ時間に溶出しているためである。他の3つの試料については、87成分が「fine」、91成分が「superiore riserva」、89成分が「verginе」で各々同定された。クロマトグラムの最初の部分には、低分子量の成分（プロピオン酸エチル）が強く検出されているが、これはクライオモジュレータでのトラップが不十分なためである（Fig. 3a参照）。

マルサラのヘッドスペースの組成が複雑であることは、検出化合物数が500を超えることからわかる。紙面の制約もあるため、同定された分析物の一覧については参考文献1を参照していただきたい。同定はMSデータベース検索を利用したが、この際、スペクトル類似度の最小値（75%）、実験/データベースの線形保持指標を基にした2つのフィルタリングを適用している^[1]。

定量値の考察にあたって、HS SPMEにより抽出された成分は、実際のヘッドスペース成分にちがいが、全体を完全に忠実に再現できていないことに留意しておく必要がある。つまり、FIDの%面積はSPMEファイバーの取込み量に関係している。しかし、ここで報告するデータは、実際、ヘッドスペース組成についての有用な知見を与えてくれる。

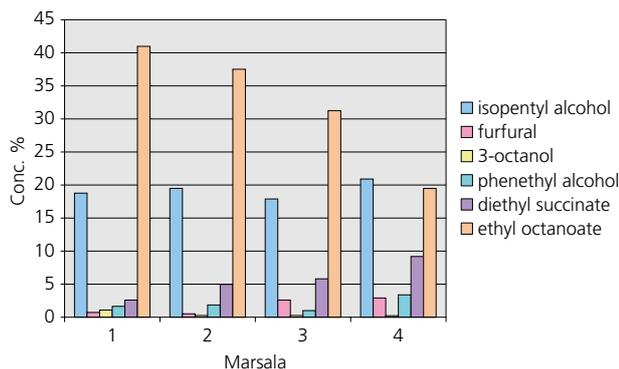


Fig. 4 マルサラで検出された主要成分のピーク面積の相対的割合 (1= Fine、2= Superiore Secco、3= Superiore Riserva、4= Vergine)

マルサラを構成する一連の成分を Fig. 4 に示す。これらの成分はいずれかの試料で FID の面積率が 1% を超えたものである。ここでは、同定された成分のピーク面積の合計 (たとえば、マルサラの fine では 87 成分) を 100% としている。同定された化合物および 4 種類の試料についての日内精度 (n=3) は、相対標準偏差値 20% 以内と良好であった。

最も多く含まれるエステル (一般的な化合物) はオクタン酸エチルであり、マルサラの熟成年が低いものから高いものにかけて次のように減少している。40.9%、37.5%、31.2%、および 19.4%。

同じエステルであってもコハク酸ジエチルは、これと反対の挙動を示しており、その濃度はマルサラの熟成年が低いものから高いものにかけて次のように増加している。2.7%、4.9%、5.7%、および 9.2%。アルデヒドフルフラールは、「superiore riserva」および「vergine」試料において、高い量が検出された。

最も豊富なアルコール (エタノールを除く) はイソペンチルアルコールで、すべての試料でほぼ同じ量であった (17.9 ~ 21.0% の範囲)。

検出化合物数についていえば、1D GC の手法でこのようなノンターゲット分析を行った場合、普通、これほどの数の化合物を検出することはできないと考えられる。このことは、Fig. 3c の挿入図でも裏付けられる。この図はクロマトグラムの矩形部分を、最大信号表示レベルを下げて表示したものである。この挿入図と矩形領域を目視で比べると、挿入図の成分数の方が多く確認でき、試料の揮発性成分の複雑さを忠実に反映している。

4. まとめ

結論として、開発した HS SPME GC×GC-MS/FID 法により、マルサラワインの香気分析への道が開かれた。一般には、デザートワイン (およびワイン全般) の揮発成分のノンターゲット分析に GC-MS を使用するのには困難を伴うと考えられている。原理的には TOF MS は GC の出口の所で、スペクトル的に、共出成分を「デコンボリュート」できる。しかし、重なりが増えてくると、MS データベース同定の精度が低下してしまう。結論として、このような実験では、GC×GC は最適なプリセパレーション手法になると思われる。

参考文献

- [1] Dugo *et al.*, *Food Chem.* 142 (2014) 262–268.