

Technical Report

SPME Arrow-GC-MSを用いた酸を含む食品の香気成分プロファイリング

Analysis of aroma compounds in fatty acid containing foods using SPME Arrow-GC-MS

谷口 百優¹、河村 和広²、福崎 英一郎^{1,3}

Abstract:

食品フレーバーの品質を評価するための手法としてSPME-GC-MS（固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフィー質量分析計）を用いた香気成分分析は頻用されている。また近年では捕集キャパシティの大きいSPME Arrowが開発され用いられている。揮発性成分分析の際のGC用カラムとして第一選択はPEG（ポリエチレングリコール）を固定相としたカラムであるが、本カラムの場合、カルボキシル基を持つ酸は固定相の水酸基との相互作用によりピークがテーリングするという課題があった。そこで本稿では、脂肪酸を多量に含む清酒を例として、酸が抽出されない条件を検討し、さらにシェリー樽貯蔵前後の清酒の香気成分プロファイルと比較した。

Keywords: SPME Arrow、ガスクロマトグラフ質量分析計、Tris (hydroxymethyl) aminomethane、シェリー樽貯蔵清酒

1. はじめに

食品フレーバーの品質を解析するための手法として、ガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）による香気成分分析が頻用されている。固相マイクロ抽出（SPME）は、揮発性成分を簡便かつ省溶媒に抽出することができる。また多機能オートサンブラの使用によって温度や時間などの抽出条件を緻密に制御できるため高い再現性が得られやすく、複数サンプルを対象とした定量的な比較分析に適している。またSPME Arrowは従来のSPMEと比較してより大容量の捕集剤をコーティングされていることから、高感度に成分を分析することができる。さらに、径が大きく高い耐久性を有する。上記の理由からSPME Arrowは食品の香気成分分析において今後、頻用される成分抽出法の一つとして期待されている。

本稿では、シェリー樽貯蔵清酒のシェリー樽貯蔵由来の独特の風味を解析するために、貯蔵前後の清酒サンプルのSPME Arrow-GC-MS分析を実施した。樽貯蔵は独特のフレーバーを付与することを目的として、清酒、ウイスキー、ワインなどの様々なアルコール飲料で為されている。シェリー樽は、以前にシェリーワインを貯蔵したオーク樽である。シェリー樽貯蔵清酒は、樽貯蔵に由来する特徴的な色やフレーバーを呈する。清酒製造に従事する専門家パネリストが行った官能評価によると、ココナッツ様、バニラ様、オーク様、ウイスキー様の香りが強く感じられる。しかしながらシェリー樽貯蔵に起因する特徴についてメタボローム解析による調査は為されていなかった。

GC用カラムとして揮発性成分分析の際の第一選択であるPEG（ポリエチレングリコール）を固定相としたカラムを使用した。しかしながら本カラムの場合、カルボキシル基を持つ酸は固定相の水酸基との相互作用によりピークがテーリングする可能性がある。清酒サンプルの分析では脂肪酸のピークが大きくテーリング

し、共溶出する他成分の検出及び解析ができず清酒中の香気成分の網羅的解析が困難だった。そこで本研究では、酸が抽出されない条件を検討し、シェリー樽貯蔵清酒の特徴的な香気成分プロファイルを調査した。

Table 1 分析条件

システム構成	
GC-MS	: GCMS-TQ [®] 8050 NX
オートサンブラ	: AOC-6000
カラム	: Supelcowax 10 (長さ 30 m 内径 0.25 mm 膜厚 0.25 μm)
SPME Arrow 条件	
SPME Arrow	: PDMS (長さ 20 mm 外径 1.1 mm 膜厚 100 μm)
Conditioning temp.	: 250 °C
Pre Conditioning Time	: 15 min
Incubation Temp.	: 30 °C
Incubation Time	: 10 min
Stirrer Speed	: 1500 rpm
Sample Extract Time	: 60 min
Sample Desorb Time	: 2 min
GC 条件	
気化室温度	: 250 °C
注入モード	: スプリットレス
制御モード	: 線速度一定 (30 cm/sec)
カラムオープン温度	: 40 °C (5 min) → 3 °C/min → 240 °C (20 min)
MS 条件	
インターフェース温度	: 250 °C
イオン源温度	: 200 °C
イオン化法	: EI
測定モード	: Scan (35-350 m/z)
イベント時間	: 0.1 sec

1 大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻
2 株式会社島津製作所分析計測事業部
3 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所

2. 実験方法

水洗いしたシェリー樽に火入れした清酒(大吟醸、兵庫)を充填し、室温で2か月間貯蔵した。清酒サンプルは貯蔵前と貯蔵後に採集された。SPME-GC-MS分析のためにアルコール濃度が10%になるように超純水で希釈された。その時にpHを調整するためにトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)溶液(4 mol/L)をサンプルに添加した。サンプル15 mLは20 mLバイアルに移され、Sodium chloride 3 gが加えられた後ボルテックスされた。揮発性成分の抽出のためにSPME Arrow(PDMSファイバー、20 mm×o.d.1.1 mm、df=100 μm)が用いられた。サンプル抽出前にファイバーは250°Cで15分間プレコンディショニングが行われた。サンプルは振とうしながら10分間30°Cでインキュベートした。その後、30°C、1500 rpmで振とうされているサンプルにファイバーを直接浸漬することで60分間抽出が行われた。抽出後、ファイバーはGCの注入口に導入され、250°Cで2分間アナライトの加熱脱着が行われた。ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-TQ8050 NXと、キャピラリー GCカラムSupelcowax10(30 mm×i.d.0.25 mm、df=0.25 μm)が用いられた。SPMEファイバーから加熱脱着されたアナライトはスプリットレスモードで注入された。キャリアガスとしてヘリウムガスが用いられた。カラムオープン温度の条件は以下の通りだった。40°Cで5分間維持され、240°Cまで3°C/minで上げられ、その後240°Cで20分間維持された。MSはスキャン範囲をm/z 35-350をスキャンモードで操作された。イオン源温度、インターフェイス温度はそれぞれ200°C、250°Cに設定された。ピークピッキング、波形処理はGCMSsolutionTMを用いた。化合物アノテーションはNISTライブラリとFFNSC3ライブラリを用いて類似のマススペクトルパターンを検索することによって実施した。

3. 結果

シェリー樽貯蔵前後の清酒サンプルはSPME Arrow-GC-MSを用いて分析された。得られたトータルイオンクロマトグラム(TIC)をFig.1に示す。清酒に多量に含まれる脂肪酸(Hexanoate, Octanoate, Decanoate, Dodecanoate)が抽出されており、それらのピークテーリングが観察された。脂肪酸と共溶出する他の成分は、抽出、検出ができていてもピークピッキングが困難である。目的の数成分のみに焦点を当てるターゲット分析の場合、標準溶液のリテンションタイムとマススペクトルを取得して抽出イオンクロマトグラム(EIC)を使用することによって、クロマト分離ができない成分の解析でも原理的に可能である。しかしながら、この戦術は、ノンターゲット分析では使用できない。デコンボリューションは有効であるかもしれないが有効なソフトウェアが必要とされる。従って酸がSPMEによって抽出されない方法が期待された。SPMEのために使用されたPDMSファイバーは非極性であり、解離性酸よりも非解離性酸の方がより保持されやすい。検出された脂肪酸のpKaは4.8-5.3(PubChemを参照)である。清酒本来のpH=約4を上げて解離性脂肪酸を増加させることで、PDMSの脂肪酸の保持を抑制することを試みた。Trisは水への溶解度が非常に高く無臭である。本研究ではTrisを使用してサンプルのpHを調整した。Trisを添加した清酒サンプルのSPME Arrow-GC-MS分析によって得られたトータルイオンクロマトグラムをFig.2に示した。pH上昇に依存して脂肪酸由来のピークが低減され、脂肪酸と共溶出する成分のピークピッキングが可能となった。pHを調整することにより、清酒中の香気成分の網羅的プロファイリングが可能となり、シェリー樽貯蔵前後の成分プロファイルの差異をより詳細に解析できるようになった。

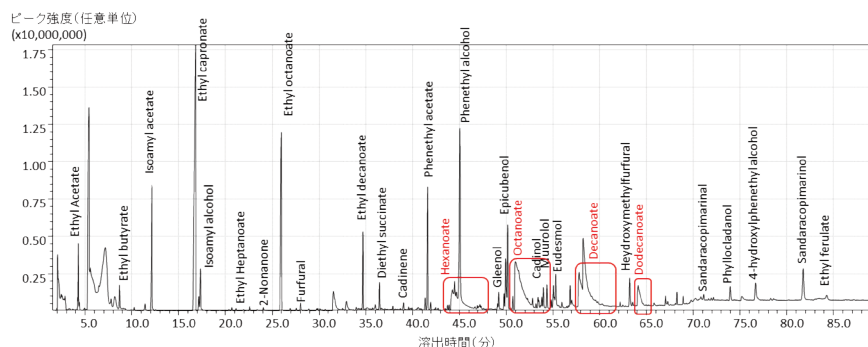


Fig. 1 SPME Arrow-GC-MS 分析によって得たシェリー樽貯蔵清酒の TIC

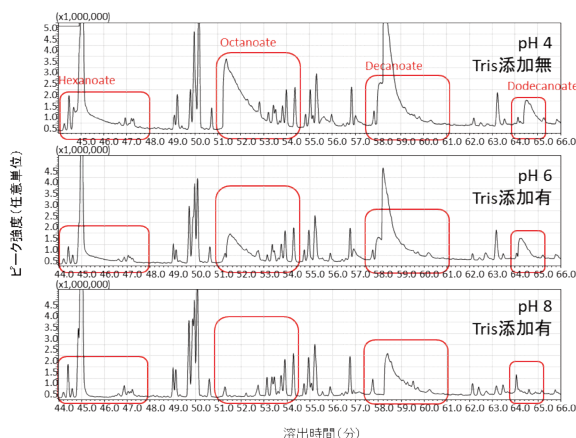


Fig. 2 SPME Arrow-GC-MS 分析によって得たシェリー樽貯蔵清酒の脂肪酸溶出時間付近のクロマトグラム

Fig.2に示されているように、pH8で脂肪酸由来のピークが観察されなかったことから、pH4 (Tris添加なし) とpH8に調整されたサンプルを用いてデータ解析を実施し、シェリー樽貯蔵前と後の清酒の揮発性成分プロファイルを比較した。脂肪酸と共溶出する成分はpH8に調整されたサンプルを用いてデータ解析を実施した。シェリー樽貯蔵によって有意に増加又は減少した成分はそれぞれTable 1又は2に示した (n=5, p<0.05)。脂肪族アルコール、有機酸エステル、脂肪酸エステル、テルペン、テルペンアルコールを含む種々の香気成分が有意に増加した。脂肪族アルコールである1-Hexanol、1-Decanolはシェリー樽貯蔵後有意に増加した。1-Hexanolは飲料をオーク樽に貯蔵することで増加することや、オークのおがくずから抽出されることが知られている^{[1][2]}。有機酸エステルであるDiethyl succinateは熟成された清酒に多く検出されることが知られている^[3]。またPhenylethyl acetateはワインをオーク樽で貯蔵することで増加することが知られている^[4]。Whisky lactoneは、オークチップに由来する成分であり、オーク樽で貯蔵されたウィスキーなどで検出される成分である^[5]。またCadinene、Calamenene、Gleenol、Epicubemol、Elemol、Eudesmol、Sandaracopimarinal、Phyllocladanol、Sandaracopimarinalなどのテルペンやテルペンアルコールは、樽酒に多く含まれ木の香りを構成することが知られており、樽の木材由来と考えられる^{[6][7][8]}。テルペンは清酒に木の香りを付与するだけでなく、抗菌作用もあることが明らかとなっている^[8]。これらの成分は清酒のシェリー樽貯蔵後で有意に増加しており、貯蔵由来の独特のフレーバーを構成している可能性が示唆された。

Table 2 シェリー樽貯蔵後に増加した香気成分

カテゴリー	化合物名	RI	ターゲットマス	シミリティ (%)	コメント
脂肪族アルコール	1-Hexanol	722	56	91	草的なグリーン香
	1-Decanol	1118	70	96	未熟な果実様
有機酸エステル	Diethyl-succinate	1035	101	98	貯蔵で増加 (熟成香成分) 果実様香、はちみつ香
	2-phenylethyl-acetate	1167	104	94	バラ、桃、はちみつ香
	Ethyl 3-methylbutyl-butanedioate	1255	101	96	脂肪酸と共溶出
	Diethyl azelate	1561	152	91	
	Ethyl ferulate	2569	222	91	
	Ethyl-nonanoate	888	88	92	オイリーなナッツ、ワイン 粕的な甘い匂い
その他	2-Nonanone/2-Decanone	740	43	96	貯蔵で増加 (熟成香成分) ケトン様、フルーティ
	(2,2-diethoxyethyl)-benzene	1071	103	95	
	1,15-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	1092	157	94	
	Whiskey lactone	1315	99	89	ココナッツ様香
	3-(octadecyloxy)-1-Propanol	1871	77	83	脂肪酸と共溶出
	Sesquirose furan	1626	69	79	
	delta-Cadinene	1104	161	93	樽酒に含まれる
	trans-Calamenene	1180	159	93	樽酒に含まれる
	cis-Calamenene	1335	159	93	樽酒に含まれる
	Gleenol	1386	121	93	樽酒に含まれる
	Epicubenol	1415	119	93	樽酒に含まれる
	alpha-Elemol	1430	93	94	樽酒に含まれる
	Muurolo-4,10(14)-dien-1-beta-ol	1500	159	86	
	gamma-Eudesmol/10-epi-gamma-Eudesmol	1519	161	92	樽酒に含まれる
	Cadin-4-en-10-ol/T-Muurolo	1533	95	92	
	alpha-Muurolo/delta-Cadinol	1544	161	92	
	alpha-Eudesmol	1570	161	91	樽酒に含まれる
beta-Eudesmol	1577	59	90	樽酒に含まれる	
Sandaracopimarinal	2153	271	91	樽酒に含まれる	
Phyllocladanol	2240	232	81	樽酒に含まれる	
Sandaracopimarinal	2493	257	92	樽酒に含まれる	
alfa/beta-Calacorene/alpha-dehydro-ar-Himachalene	1250	157	85	脂肪酸と共溶出	
Unknown	alpha/beta-Calacorene	1257	157	96	脂肪酸と共溶出
	RT:29.952	875	177		
	RT:40.827	1146	101		
	RT:53.257	1510	57		
	RT:53.493	1518	104		
	RT:53.883	1527	109		
	RT:62.442	1812	59		
RT:72.293	2194	103			

Table 3 シェリー樽貯蔵後に減少した香気成分

カテゴリー	化合物名	RI	ターゲットマス	シミリティ (%)	コメント
有機酸エステル	Ethyl butyrate	404	71	96	
	Ethyl hexanoate	583	88	97	果実様 (リンゴ)
	(iso)propyl hexanoate	651	43	93	
	Isopentyl hexanoate	805	70	97	

4. まとめ

本研究の結果をまとめると、不揮発性の水溶性一級アミンTrisをサンプルに添加することで、SPME Arrow-GC-MS分析法を用いた清酒の揮発性成分の網羅的解析が可能となった。従ってシェリー樽貯蔵が清酒の成分プロファイルに与える影響について調査することができた。Trisを添加しない場合では、清酒に多量に含まれる脂肪酸のピークテーリングによって、共溶出する成分のデータ解析が困難だった。Trisを添加してpHを上昇することによって、解離型脂肪酸はPDMSファイバーによって保持されなかった。また本手法の応用例としてFig.3にはリンゴ酢のSPME Arrow-GC-MS分析におけるTris添加の効果を示している。リンゴ酢中には多量の酢酸が含まれており、その巨大なテーリングしたピークによって共溶出する成分の解析が困難である。清酒の分析では直接浸漬によって成分は抽出されたが、リンゴ酢の分析ではヘッドスペースにおいて成分が抽出された。Trisを添加してpHを上昇したことにより酢酸のピークが低減され、共溶出する成分のピークピッキングが可能だった。

以上から、Trisを用いた本抽出方法は、多量の酸を含む様々な食品中の揮発性成分のSPME-GC-MS分析に適用可能であることが示唆された。

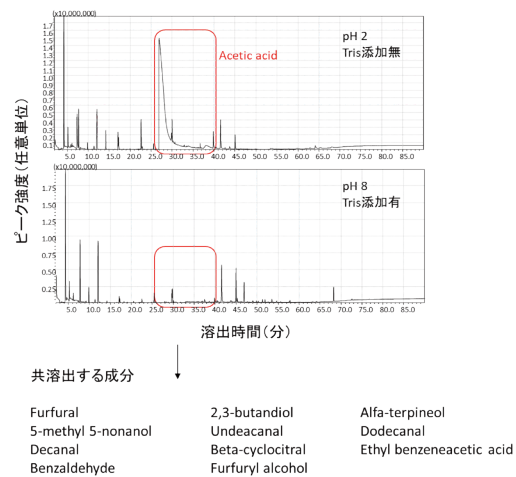


Fig. 3 SPME Arrow-GC-MSによって得たリンゴ酢のTIC

本アプリケーションの詳細は、下記論文をご参照ください。

Taniguchi, M., Furuno, M., Yamada, T., Kawamura, K., Fukusaki, E.: Profiling of volatile compounds in Japanese sake stored in sherry casks using solid phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry analysis, J. Biosci. Bioeng, (2021)(e-pub)

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.03.014>

参考文献

- Mangas, J., Rodríguez, R., Moreno, J. and Blanco, D.: Volatiles in distillates of cider aged in American oak wood, J. Agric. Food Chem., 44, 268–273 (1996).
- Chatonnet, P. and Dubourdieu D.: Identification of substances responsible for the 'sawdust' aroma in oak wood, J. Sci. Food. Agric., 76, 179–188 (1998).
- Isogai, A., Utsunomiya, H. and Iwata, H.: Changes in the concentrations of sotolon and furfural during the maturation of sake, J. Brew. Soc. Japan., 99, 374–380 (2004).
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N. and Ancin-Azpilicueta, C.: Concentration of volatile compounds in Chardonnay wine fermented in stainless steel tanks and oak barrels, Food Chem., 108, 213–219 (2008).
- Conner, J. M., Paterson, A. and Piggott, J. R.: Changes in wood extractives from oak cask staves through maturation of scotch malt whisky, J. Sci. Food. Agric., 62, 169–174 (1993).
- Matsunaga, K., Furukawa, K. and Hara, S.: Components of Taru-sake, J. Brew. Soc. Japan., 97, 529–534 (2002) (in Japanese).
- Orihara, Y., Wake, H., Utsunomiya, H. and Aoshima, H.: Components of Taru-sake and their physiological activity, J. Brew. Soc. Japan., 101, 349–356 (2006)(in Japanese).
- Takao, Y., Yamada, T., Furukawa, K. and Mizoguchi, H.: Components of Taru-sake and their inhibitory effects on *hiochi* bacterial growth, J. Brew. Soc. Japan., 107, 868–874 (2012)(in Japanese).

多機能オートサンプリングシステム

AOC-6000 Plus

GC/MS分析の生産性を飛躍させる多機能オートサンプリングシステム



1台で複数の試料導入に対応

液体試料注入法、ヘッドスペース注入法、固相マイクロ抽出 (SPME) 注入法など、1台でGC-MSへの様々な試料導入が可能です。さらに、自動ツール交換機能を利用することで、パークステーションに設置された各試料導入法ごとのシリンジツールを自動で交換できます。

データへの信頼性の追求

シリンジ及びファイバーの使用履歴の管理機能を有しており、採取したデータへの信頼性が向上します。さらに、これまで手動で行っていた試料調整の自動化により、作業者の負担を軽減し、分析精度の向上を実現します。

最新の濃縮テクノロジーによる高感度分析

従来のSPMEに比べ感度と耐久性が向上したSPME Arrow、従来のHSに比べ高感度に分析可能なITEX DHSによる最新の濃縮テクノロジーを用いた分析が可能です。

幅広いサンプル形態に対応

多機能注入口OPTIC-4の多彩な注入モードと組み合わせることで、固体サンプルの熱分解分析やガス成分の加熱脱着分析など、多様なサンプル形態の分析に対応します。

高感度・高耐久性を誇るSPME Arrow

SPMEの最新技術であるSPME Arrowは、従来のSPMEファイバーに比べ、大容量の吸着剤が塗布されており、高感度分析が可能です。さらに、太く頑丈な構造のため、高い耐久性を誇ります。

SPME Arrow



外径: 1.5 mm、液相容量: 12 µL

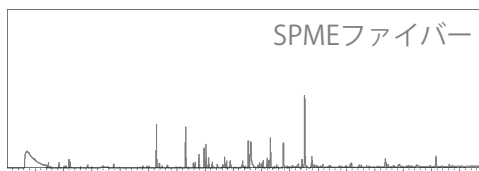
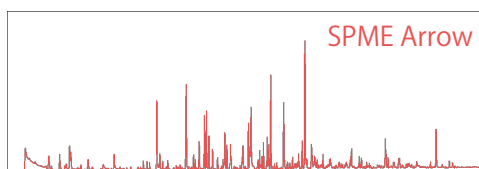


外径: 1.1 mm、液相容量: 3.8 µL

従来のSPMEファイバー



外径: 0.6 mm、液相容量: 0.6 µL



コーヒー香気成分分析
(SPME ArrowおよびSPMEファイバーはPDMS100µmタイプを使用)

GCMS-TQおよびGCMSsolutionは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2021年6月
© Shimadzu Corporation, 2021