

【短報】

HS-SPME 法を用いたカビ臭原因物質の分析法の検討

徳島県立保健製薬環境センター

中西 淳治

Analysis of musty odorous compounds by HS-SPME

Junji NAKANISHI

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

カビ臭の原因物質の閾値は、異臭物質の中でも小さく、測定には ppt オーダー (pg/g) の非常に高感度な分析法が必要になる。一方、ヘッドスペース-固相マイクロ抽出 (以下「HS-SPME」という。) 法は、SPME ファイバーの濃縮効果によって低濃度の試料に対しても測定が可能である。そこで、今回、カビ臭の原因物質のうち代表的な 4 化合物 (2,4,6-トリクロロアニソール, 2,4,6-トリブロモアニソール, ジオスミン, 2-メチルイソボルネオール) について HS-SPME 法を用いて分析法の検討を行ったところ、すべての化合物で閾値が定量可能であり、また、良好な再現性を得ることができた。

Key words : ヘッドスペース-固相マイクロ抽出 HS-SPME(headspace solid-phase microextraction),
2,4,6-トリクロロアニソール 2,4,6-trichloroanisole, 2,4,6-トリブロモアニソール 2,4,6-tribromoanisole,
ジオスミン geosmin, 2-メチルイソボルネオール 2-methylisoborneol

I はじめに

近年、消費者の食の安全・安心への関心がますます高まる中、食品の苦情・相談は多く寄せられている。寄せられた苦情のうち異臭苦情は一定の割合を占めているが、異臭という性質上、健康被害を伴うことが少ないため、詳細に検討されない事例が多い。また、原因物質の揮散による消失や、試料が少量などの理由により、分析自体が困難なこともある。しかし、異臭苦情の原因究明及び再発防止対策には科学的かつ客観的な根拠に基づいた対応が必要である。

異臭の種類には、消毒臭、カビ臭、腐敗臭、溶剤臭、農薬臭などがあるが、この中でもカビ臭の原因物質は、微量でも臭いを放つものが多い^{1),2)}。代表的なカビ臭原因物質には川や湖沼で発生する藍藻類や放線菌により産出されるジオスミンや2-メチルイソボルネオール、木材用防霉剤として使用され

ている化合物をカビがメチル化することによって生成する2,4,6-トリクロロアニソールや2,4,6-トリブロモアニソールなどがある^{1),2)}。

食品中の異臭分析には一般に溶媒抽出法、水蒸気蒸留法などが用いられている³⁾が、カビ臭原因物質の場合、閾値が ppt オーダー (pg/g) と非常に低濃度であり、測定するためには高感度な分析法が必要になる。

当センターでは過去から異臭苦情時の迅速スクリーニングとして HS-SPME 法を用いた灯油、家庭用防虫剤、農薬や消毒臭の分析条件の検討を行ってきた^{4),5)}。HS-SPME 法は、SPME ファイバーの濃縮効果によって低濃度での測定が可能であり、また、必要な試料は少量で前処理もほとんどなく、迅速に測定できる分析法である。

今回、カビ臭原因物質として 2,4,6-トリクロロアニソール、2,4,6-トリプロモアニソール、ジオスミン、2-メチルイソボルネオール の 4 化合物について、HS-SPME 法を用いて閾値を定量することができるか検討を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

II 方法

ジオスミン、2-メチルイソボルネオールについてはウォーターサーバー中の水での苦情事例が報告されている¹⁾。また、2,4,6-トリクロロアニソールについては飲料水での苦情事例が報告されている²⁾ ことから試料には水(蒸留水)を選択した。

1 試料

蒸留水(関東化学製、高速液体クロマトグラフィー用)

2 試薬

標準品は、2,4,6-トリクロロアニソール標準品(和光純薬工業製、水質試験用)、2,4,6-トリプロモアニソール

(Sigma-Aldrich 製、99.9%)、ジオスミン標準品(和光純薬工業製、水質試験用)、2-メチルイソボルネオール標準品(和光純薬工業製、水質試験用)を用いた。

各標準品 5 mg をエタノール 5 mL に溶解し、標準原液とした(1 mg/mL)。

標準溶液は、各標準原液を混合し、エタノールで希釈して調製した(10 pg/mL, 20 pg/mL, 50 pg/mL, 100 pg/mL, 200 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 2000 pg/mL, 5000 pg/mL)。

エタノールは、関東化学製(残留農薬試験・PCB 試験用)を用いた。

3 装置

GC/MS/MS : TSQ Quantum GC (Thermo Fisher Scientific 製)

自動注入装置 : COMBI PAL (CTC Analytics 製)

SPME ファイバー : 65 μ m PDMS/DVB (SUPLECO 製)

バイアル : 20 mL ヘッドスペース用スクリーンバイアル

(GL Sciences 製)

4 分析条件

(1) GC/MS/MS

カラム : HP-5MS (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m, Agilent 製)

カラム温度 : 40°C (3 min) \rightarrow 10°C/min \rightarrow 100°C \rightarrow 5°C/min \rightarrow

150°C \rightarrow 25°C/min \rightarrow 300°C (7 min),

注入口 : 230°C, スプリットレス注入

キャリアーガス : He, 1 mL/min

イオン源温度 : 200°C

トランスファーライン温度 : 260°C

測定モード : Scan (m/z 40-350), SRM

(2) 自動注入装置

抽出 : 80°C, 20 min

GC 導入 : 注入口で 3 min 熱脱離

ファイバークリーニング : 250°C, 10 分(熱脱離後)

5 試験操作

(1) Scan 測定

各標準原液を 10 倍希釈した液 20 μ L を蒸留水 2 mL に添加し、20 mL バイアルに封入して、試料とした(試料中濃度 : 1 μ g/mL)。

(2) SRM 測定

各標準溶液 20 μ L を蒸留水 2 mL に添加し、20 mL バイアルに封入して、試料とした(試料中濃度 : 0.1 pg/mL, 0.2 pg/mL, 0.5 pg/mL, 1 pg/mL, 2 pg/mL, 5 pg/mL, 10 pg/mL, 20 pg/mL, 50 pg/mL)。

(1) 及び(2)で作成した試料は、自動注入装置 COMBI PAL を用いて、HS-SPME 法で抽出し、GC/MS/MS で測定を行った。

III 結果

1 測定条件の検討

試料(1 μ g/mL)を用いて Scan 測定を行い、ピーク形状とリテンションタイム(以下「RT」という。)の確認を行った。次に、各ピークのマススペクトルから強度の高いイオンを選択し、プロダクトイオンスキャン測定を行い、トランジションを決定した。最後にトランジションのコリジョンエネルギー(以下「CE」という。)を変化させて SRM 測定で CE の最適化を行った。

決定した各種パラメータを表 1 に示す。

表 1 各種パラメータ

分析対象化合物	RT(min)	トランジション	CE(eV)
2,4,6-トリクロロアニソール	15.68	97.1 > 62.1	16
		212.3 > 197.4	14
		212.3 > 169.3	24
		167.2 > 83.0	22
		109.1 > 74.1	16
2,4,6-トリプロモアニソール	20.81	143.2 > 62.2	16
		344.4 > 329.6	6
		250.3 > 143.3	14
		250.3 > 141.1	18
		155.2 > 74.2	16
ジオスミン	17.25	112.2 > 97.2	10
		182.5 > 112.3	6
		182.5 > 97.3	16
		112.2 > 83.2	10
		97.2 > 79.1	8
2-メチルイソボルネオール	12.26	150.4 > 107.3	12
		150.4 > 135.4	8
		135.3 > 107.3	10
		108.2 > 93.2	8
		95.2 > 55.2	16

2 検量線と定量下限値

定量下限値は、試料(0.1-50 pg/mL)を測定し、SN 比が 10 以上となる最小濃度を選択した。検量線は、定量下限値を最

小とした4濃度で作成した。検量線を図1に示す(範囲:2,4,6-トリクロロアニソール0.1-1 pg/mL, 2,4,6-トリブロモアニソール0.2-2 pg/mL, ジオスミン0.1-1 pg/mL, 2-メチルイソボルネオール2-20 pg/mL)。各化合物の濃度とピーク面積の決定係数(R^2)は検量線の範囲において0.9982-1.0000と高い値を示し、濃度応答性が極めて良好であった。

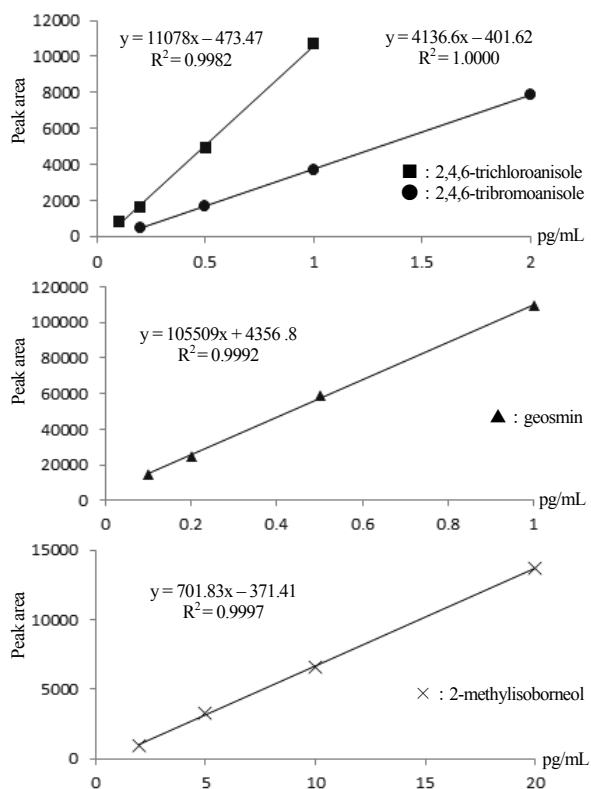


図1 各化合物の検量線

3 再現性

各化合物の閾値での試料を5回繰り返し測定を行った。なお、各化合物の水中での閾値は、ジオスミンが10 pg/mL、2-メチルイソボルネオールが5 pg/mLと言われている¹⁾のでそれぞれの濃度で測定を行った。一方、2,4,6-トリクロロアニソール、2,4,6-トリブロモアニソールの閾値は、pptオーダーと言われている³⁾ので測定は、最小濃度の1 ppt (pg/mL)で行った。各化合物の閾値でのクロマトグラムを図2、各化合物の検量線パラメータと再現性をまとめたものを表2に示す。

表2 各化合物の検量線パラメータと再現性

分析対象化合物	検量線範囲 (pg/mL)	決定係数 (R^2)	定量下限値 (pg/mL)	閾値 (pg/mL)	RSD (%)
2,4,6-トリクロロアニソール	0.2-2	1.0000	0.2	pptオーダー	6.2
2,4,6-トリブロモアニソール	0.1-1	0.9982	0.2	pptオーダー	7.2
ジオスミン	0.2-1	0.9992	0.1	10	1.1
2-メチルイソボルネオール	2-20	0.9997	2	5	11.9

各化合物のRSD(%)は1.1-11.9%となり、この値は、妥当性評価の併行精度の目標値⁹⁾(濃度 \leq 0.001 ppmのとき、 <30)を満たしており、良好であった。

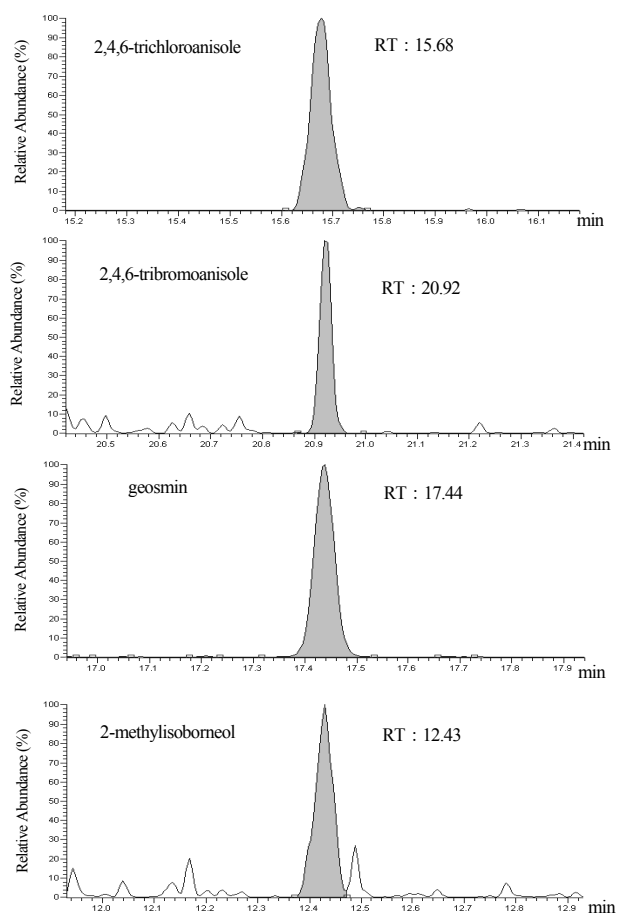


図2 各化合物の閾値でのクロマトグラム

測定濃度: 2,4,6-トリクロロアニソール、2,4,6-トリブロモアニソールは1 pg/mL、ジオスミンは10 pg/mL、2-メチルイソボルネオールは5 pg/mL

IV まとめ

代表的なカビ臭原因物質4化合物について、閾値で定量を目的とし、HS-SPME法を用いて分析法の検討を行ったところ以下のことが分かった。

- すべての化合物で良好な形状のピークが確認できた。
- すべての化合物で閾値の定量が可能だった。また、各化合物の定量下限値について2,4,6-トリブロモアニソールは0.2 pg/mL、2,4,6-トリクロロアニソールは0.1 pg/mL、ジオスミンは0.2 pg/mL、2-メチルイソボルネオールは2 pg/mLであった。
- 閾値での各化合物の変動係数は1.1-11.9%となり良好な再現性が得られた。

以上の結果から、本法は、カビ臭原因物質4化合物の測定に適用できる分析法であると考えられた。今後は、水以外の食品も対象とし、分析法の検討を行っていく予定である。

参考文献

- 1) 石田裕, 佐藤邦裕, 加藤寛之: 食品の臭気対策 ー第1集ー, 株式会社サイエンスフォーラム, (2010)
- 2) 石田裕, 佐藤邦裕, 加藤寛之: 食品の臭気対策 第2集 異臭問題の予防・解決の実務手順と実際, 株式会社サイエンスフォーラム, (2011)
- 3) 加藤寛之, 渡辺久夫: 食品の匂いと異臭, 株式会社幸書房, (2011)
- 4) 湯浅智子, 吉田理恵, 岩佐智佳: 食品の異臭苦情におけるSPMEを用いた分析法の検討, 徳島県立保健製薬環境センター年報, 3, 21-23 (2013)
- 5) 堀見朋代, 坂本充司, 堤泰造: ヘッドスペース/固相マイクロ抽出 (HS/SPME) 法による食品の異臭分析, 徳島県保健環境センター年報, 20, 17-20 (2002)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて, 食安発第1115001号, 平成19年11月15日