

ガスクロマトグラフィー質量スペクトル法 (GC/MS) を利用した卵黄におい成分分析 (第2報)

笠原 猛・澤 則之

要 約

前報¹⁾に引き続き、ガスクロマトグラフ+質量スペクトル計 (GC/MS) を用い、卵黄ヘッドスペースガス中のトリメチルアミン (TMA) 分析を試みた。

TMA 塩酸塩 (TMA-HCl) は、アルカリ性試薬を添加することにより、TMA と考えられるピーク (以降、TMA ピーク) のイオン強度が向上した。

また、TMA 濃度 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度となるよう調整した卵黄は、同濃度 TMA-HCl と比較して、同様なオーダー・リテンションタイムの TMA ピークが認められた。

しかし、濃度の異なる試料の連続分析、及び TMA 濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の試料における再現性が課題として残された。

目 的

前報¹⁾では、ガスクロマトグラフ+質量スペクトル計 (GC/MS) を用い、卵黄ヘッドスペースガス中のトリメチルアミン (TMA) 分析を試みた。

TMA 塩酸塩 (TMA-HCl) と TMA30% 標準液を供試した結果、TMA と考えられる分子量 58, 59 が強いピークを確認できた。また、同ピークは、イオン強度が低いものの卵黄ヘッドスペースガス中においても確認できた。

一方、TMA-HCl で得られるピークのイオン強度は、同濃度の TMA30% 標準液と比較すると非常に低い (TMA-HCl は酸性であるため TMA の揮発が少ない) もの、TMA-HCl をアルカリ性にすることで上昇する傾向が認められた。そこで、今回の、このことの再現性を確認すると共に、卵黄についても同様の処理を試みた。また同時に、カラムや分析条件 (特に装置の温度設定) についても検討した。

材料及び方法

(1) 試料の調整

まず、TMA-HCl は、TMA-HCl (170.5 mg) + 濃塩酸 (1ml) を 100ml にメスアップし (この液の

TMA 濃度は 1 mg/ml), これを希釈して濃度調整した。そして、今回の試料は、各濃度の TMA-HCl, 水、及びロードアイランドレッド:RIR 卵黄とし、各々をヘッドスペース用試験管 (20ml) に 2ml (卵黄は 2g) 採取した。更に、これに 1mol の水酸化ナトリウム:NaOH を 1ml 添加し、直ちに攪拌混合した。

(2) 分析装置

分析装置は、ヘッドスペースサンプラー (Tekmar 700/7050: Tekmar 社), 液体窒素による試料濃縮機 (Cryo), GC (HP5890 シリーズ II: Packard 社), MS (Trio-1000 VG Masslab: Limited 社) から成る。

カラムは、① J & WCAM キャピラリー (品番: 112-2132, 長さ: 30 m, 径: 0.25 mm, フィルム: 0.25 μm , 60 ~ 220°C), 及び② VARIAN 製キャピラリーカラム CP-Volamin (品番: CP7448, 長さ: 60 m, 内径: 0.32 mm, 外径: 0.45 mm) の 2 種類を用いた。

(3) 装置の温度・時間設定

装置は、まず、前報と同様に温度・時間を設定した。即ち、ヘッドスペースサンプラー (sampl Equil: 10 分間・50°C → mixing: 2 分間 → stabilize: 2 分間 → <cryo cooldown: 5 分間・-150°C> →

pressurise : 0.5 分間 → press Equil : 0.2 分間 → Loopfill : 0.5 分間 → LoopEquil : 0.5 分間 → Inject : 2.5 分間 → cryo インジェクション : 5 分間・150°C, < union Htr : 170°C >, < サンプルループとライン : 150°C >, GC/MS (6 分間・60°C → 14 分間 × 10°C/分 で上昇 → 5 分間・200°C) とした。

更に、ヘッドスペースサンプラーの温度設定は、サンプルループとライン、及び試料濃縮機への注入 : cryo インジェクションについて、幾つかの条件 (150・200・240 °C) を試した。

結果と考察

結果は、表 1・2 に、温度設定を併記し、実際に分析した試料順で示した。表 1 はカラム①、表 2 はカラム②を用いた結果である。なお、カラム②は、①よりも 2 倍程度長い。

まず、水 (No. 1) は、TMA と考えられる分子量 58, 59 が強いピーク (以降、TMA ピーク) を確認できなかった。

一方、アルカリ性試薬を加えずに TMA 濃度 100 µg/ml 濃度単位省略) を分析した前報結果は、TMA ピークイオン強度 (以降、イオン強度) が 3.0e4 程度であった。しかし、今回の TMA 濃度 125 のイオン強度は、No. 2 : 1.26e6・No. 13 : 1.22e6・No. 14 : 1.33e6 であった。この値は前報の TMA30% 標準液 (9.57e5) と同等以上であり、TMA-Hcl はアルカリ性試薬を添加することで大きくイオン強度が向上した。同時に、TMA 濃度 125 では、分析結果の再現性も高いことが確認できた。

ところが、この TMA 濃度 125 分析直後に測定した水のイオン強度は、No. 15・16 とともに高かった。即ち、本方法は、濃度の異なる試料を連続して分析した場合の信頼性が問題であると考えられた。このことは、No. 3 ~ 12 (TMA 濃度 12.5 ~ 0.0625) の分析結果からも推測できる。そこで、No. 17 ~ 53 では、サンプルループとライン、及び cryo インジェクションの温度上昇による改善を検討した。

cryo インジェクション 200°C (union Htr:220°C)

時の TMA 濃度は 125 は、No. 17 のとおり、温度 150°C の時と同等のイオン強度であった。しかし、その直後の水は No. 18 のとおり高く、cryo インジェクションの温度変更では、直後試料への影響について改善できなかった。

更に、サンプルループとラインの温度設定については、200°C と 240°C を試みた。TMA 濃度 125 のイオン強度は、150°C 時と比較して、200°C では同等であったが (No. 22), 240°C では若干低下した (No. 24・35・36)。また、TMA 濃度 12.5 のイオン強度も、150°C 時 (No. 50) と比較して、200°C では同等であったが (No. 43), 240°C では若干低下した (No. 32・33・39・40)。そして、直後試料への影響は 150°C 時と同様に認められ、TMA 濃度 1.25 以下のイオン強度も信頼性が低かった。

次に、カラムの違いによる改善を検討した。カラム②使用時の TMA 濃度 125 のイオン強度は 1.07e6 (No. 57), TMA 濃度 12.5 のイオン強度は 3.80e4 (No. 61) であり、両値はカラム①使用時と比較して同等なオーダーであった。また、カラム②は、カラム①と比べて TMA ピークのリテンションタイムが長かった。しかし、直後試料への影響は改善できなかった (No. 58 ~ 60, No. 62 ~ 64)。

ところで、卵黄の TMA ピークは、両カラムで認められた。まず、官能的に TMA 臭の強い卵黄をカラム①で分析したイオン強度 (No. 54) は、6.61e4 であった。また、カラム②では、TMA の弱い卵黄 (No. 64), 及びこの卵黄に TMA が 12.5 µg/ml となるよう TMA-Hcl を添加した試料 (No. 66) について分析した。そして、No. 64 は 1.61e3, No. 66 は 7.67e4 の TMA ピークが認められ、両 TMA ピークのリテンションタイムは同等であった。No. 66 のイオン強度は No. 61 と同等なオーダーであり、このことから、卵黄中の TMA は、この程度の濃度であれば現在の設定で定量可能と考えられた。

以上の結果から本研究では次のことが示唆された。まず、試料にアルカリ性試薬を添加する作業

表1 試料(各濃度のTMA標準液, 及び水, 卵黄)の分析結果①

No.	試料	サンプルループ・ ライン温度 (°C)	インジェクション 温度 (°C)	質量58から59の ピークイオン強度	リテンション タイム
1	水	150	150	81	2.3
2	TMA (125)	150	150	1.26E+06	2.3
3	TMA (12.5)	150	150	2.25E+05	2.3
4	TMA (1.25)	150	150	3.19E+04	2.4
5	TMA (0.125)	150	150	6.54E+03	2.4
6	TMA (0.0625)	150	150	3.95E+03	2.4
7	TMA (0.125)	150	150	129	2.4
8	TMA (0.125)	150	150	2.07E+03	2.4
9	TMA (0.3125)	150	150	3.86E+03	2.4
10	TMA (0.625)	150	150	3.02E+03	2.4
11	TMA (1.25)	150	150	9.01E+03	2.4
12	TMA (0.3125)	150	150	1.19E+04	2.4
13	TMA (125)	150	150	1.22E+06	2.3
14	TMA (125)	150	150	1.33E+06	2.3
15	水	150	150	6.92E+04	2.4
16	水	150	150	4.02E+03	2.4
17	TMA (125)	150	200	1.24E+06	2.3
18	水	150	200	5.51E+04	2.4
19	水	200	200	3.98E+03	2.4
20	水	200	200	4.39E+03	2.4
21	水	200	200	207	2.4
22	TMA (125)	200	200	1.05E+06	2.3
23	水	200	200	3.14E+03	2.4
24	TMA (125)	240	200	9.85E+05	2.3
25	水	240	200	5.27E+03	2.4
26	水	240	200	840	2.6
27	TMA (0.0625)	240	200	603	2.4
28	TMA (0.125)	240	200	2.00E+03	2.4
29	TMA (0.3125)	240	200	1.05E+03	2.4
30	TMA (0.625)	240	200	347	2.5
31	TMA (1.25)	240	200	579	2.4
32	TMA (12.5)	240	200	1.92E+03	2.4
33	TMA (12.5)	240	200	4.75E+03	2.4
34	水	240	200	509	2.4
35	TMA (12.5)	240	200	1.40E+05	2.3
36	TMA (12.5)	240	200	2.16E+05	2.3
37	水	240	200	4.75E+03	2.4
38	水	240	200	731	2.4
39	TMA (12.5)	240	200	2.61E+03	2.4
40	TMA (12.5)	240	200	3.43E+03	2.4
41	水	240	200	1.01E+03	2.2
42	水	240	200	351	2.5
43	TMA (12.5)	200	200	6.60E+04	2.4
44	水	200	200	3.91E+04	2.4
45	水	200	200	2.09E+03	2.4
46	水	240	200	590	2.4
47	TMA (1.25)	200	200	214	2.5
48	水	240	200	2.74E+03	2.4
49	TMA (1.25)	150	150	64	2.4
50	TMA (12.5)	150	150	8.04E+04	2.3
51	水	240	200	1.29E+04	2.4
52	水	240	200	931	2.5
53	水	240	200	415	2.4
54	卵黄 (TMA臭強 ^い)	150	150	6.61E+04	2.3

表2 試料(各濃度のTMA標準液, 及び水, 卵黄)の分析結果②

No.	試料	サンプルループ・ ライン温度 (°C)	インジェクション 温度 (°C)	質量58から59の ピークイオン強度	リテンション タイム
55	水	150	150	75	6.3
56	TMA (125)	150	150	1.07E+06	6.3
57	水	150	150	1.25E+04	6.4
58	水	150	150	1.31E+03	6.4
59	水	150	150	366	6.7
60	TMA (12.5)	150	150	3.80E+04	6.4
61	水	150	150	4.50E+03	6.4
62	水	150	150	1.58E+03	6.4
63	水	150	150	112	6.6
64	卵黄 (TMA臭強 ^い)	150	150	1.61E+03	6.5
65	水	150	150	112	6.6
66	卵黄+TMA (12.5)	150	150	7.67E+04	6.4
67	水	150	150	2.08E+03	6.4
68	水	150	150	676	6.4
69	TMA (12.5)	150	150	4.30E+04	6.3

は、本方法でTMA-HCl及び卵黄中のTMAを定性・定量する場合に有効である。そして、装置のサンプルループとライン、及びcryoインジェクションの温度設定は、150～200°C程度で良く、特にサンプルループとラインを240°Cとするとイオン強度が低下する。また、TMAピークのリテンションタイムはカラムにより異なる。更に、現在の条件では、定量可能なTMA濃度が10 µg/ml程度までと考えられる。但し、濃度の異なる試料の連続分析は困難であろう(TMAピークは、直後から水を2～4回分流しないと消えない)。

今後は、まず、連続分析を可能とする条件を検討する必要がある。同時に、10 µg/ml以下の濃度における再現性を高め、更に、官能検査など他の分析結果との相関についても調査する必要がある。

謝 辞

本試験を遂行するにあたり、協力していただいた徳島県立工業技術センターの諸氏に陳謝いたします。

文 献

- 1) 篠原啓子・富久章子・笠原猛・白田英樹・澤則之、徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告、1:71-78、2001。