

## HS-SPME 法を用いたカビ臭原因物質の分析法の検討 (第 2 報)

徳島県立保健製薬環境センター

小川 智子・中西 淳治\*・吉田 理恵・岩佐 智佳

Analysis of musty odorous compounds by HS-SPME (II)

Tomoko OGAWA, Junji NAKANISHI, Rie YOSHIDA and Chika IWASA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

### 要 旨

代表的なカビ臭原因物質である 2,4,6-トリブロモアニソール (以下「TBA」という。), 2,4,6-トリクロロアニソール (以下「TCA」という。), ジオスミン及び 2-メチルイソボルネオール (以下「MIB」という。) について, ヘッドスペース-固相マイクロ抽出 (以下「HS-SPME」という。) 法を用いた異臭苦情時の検査に適用できる迅速分析法を検討したところ, 良好な検量線及び再現性を得ることができ, すべてのカビ臭原因物質で検出閾値の定量が可能となった。さらに, カビ臭原因物質の移染による異臭苦情を想定したモデル実験において, 試料として用いた飲料への移染を確認し, 食品の異臭苦情時の検査として有効であることを確認した。

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

食品の広域流通化, 提供方法等の多様化に伴い, 消費者の「食の安全・安心」に対する関心は高まっている。そうした中で, 苦情・相談についても多く寄せられており, 迅速な原因究明及び再発防止対策を求められているところである。

寄せられる苦情のうち, 常に一定の割合を占めているものが食品の異臭である。異臭原因物質は, 極めて低濃度でも人が感知できるものが多く, また揮散の恐れがあるため, 原因究明のためには, 一般に異臭分析に用いられる溶媒抽出法や水蒸気蒸留法よりも迅速で高感度な分析が望まれる。

しかし, 異臭だけでは健康被害を伴うことが少ないため, 詳細な検討事例は多くなく, 異臭苦情時の迅速分析法として活用可能な検査法の確立には, 課題が多いのが現状である。

これまで当センターでは, 苦情頻度の最も高い消毒臭等に

ついて HS-SPME 法を用いた迅速分析法の検討を行い, 異臭苦情時の検査として有効であることを確認してきた<sup>1)2)</sup>。

また, 前報<sup>3)</sup>より, 分析対象を代表的なカビ臭原因物質である TBA, TCA, ジオスミン, MIB とし, HS-SPME 法を用いた迅速分析法の検討を行ってきた。カビ臭は, 人がおいを検出できる最小濃度 (検出閾値) が他の異臭物質と比べても非常に低いため, 異臭苦情時の検査においては, 検出閾値まで検出できる高感度な分析法が必須である。前報では, 蒸留水中における検出閾値の定量が可能であり, かつ良好な再現性が得られる分析法を確立することができた。

本報では, 飲料中におけるカビ臭の苦情を想定し, 喫食する機会が多い緑茶及び牛乳について, 検出閾値の定量の可否を検討した。

また, カビ臭原因物質の移染による異臭苦情を想定したモデル実験を各試料について行ったので, 併せて報告する。

\*現 薬務課

## II 方法

### 1 試料

水（関東化学製，高速液体クロマトグラフィー用蒸留水），ミネラルウォーター，緑茶及び牛乳

### 2 試薬

標準品は，2,4,6-トリプロモアニソール（Sigma-Aldrich 製，99.9 %），2,4,6-トリクロロアニソール（和光純薬工業製，水質試験用），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。

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。

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  $\mu$ m PDMS/DVB（SUPELCO 製）

バイアル：20 mL ヘッドスペース用スクリュウバイアル

（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  $\mu$ m, Agilent 製）

カラム温度：40  $^{\circ}$ C（3 min hold） $\rightarrow$ 10  $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 100  $^{\circ}$ C $\rightarrow$

5  $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 150  $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 25  $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$

300  $^{\circ}$ C（7 min hold）

注入口：230  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C

トランスファーライン温度：260  $^{\circ}$ C

測定モード：Scan（ $m/z$  40-350），SRM

#### (2) 自動注入装置

抽出：80  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C，10 分（熱脱離後）

#### (3) 測定条件

各カビ臭原因物質を測定する条件を，表1に示す。

表1 各種パラメータ

化合物名	分子量	RT (min)	定量イオン (m/z)	CE (eV)	確認イオン (m/z)	CE (eV)
TBA	342	20.81	143.2 > 62.2	16	344.4 > 329.6	6
TCA	210	15.68	212.3 > 169.3	24	212.3 > 197.4	14
ジオスミン	182	17.25	112.2 > 97.2	10	182.5 > 112.3	6
MIB	168	12.26	150.4 > 107.3	12	150.4 > 135.4	8

## 5 試験操作

試料2 mLを20 mLバイアルに量り取り，標準溶液を20  $\mu$ L 添加し分析用試料を作成した。作成した分析用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 異臭苦情検査に対する適応可否

#### (1) 緑茶及び牛乳中における検知閾値の定量の可否

異臭苦情検査においては，検知閾値を測定できる必要があるため，緑茶及び牛乳中における各カビ臭原因物質の定量下限値を求め，飲料の中で最も低いと考えられる水における検知閾値（以下「検知閾値（水）」という。）<sup>4) 5)</sup>と比較した。なお，定量下限値は，各カビ臭原因物質を0.1-50  $\mu$ g/mL 含む分析用試料を測定し，S/N 比が10以上となる最小濃度を選択した。

結果を表2に示す。なお，比較のために，これ以降，前報の水の結果も合わせて示す。緑茶における定量下限値はすべて検知閾値（水）未満であり，検知閾値の測定が可能であることが判明した。しかし，牛乳については，ジオスミン以外で，定量下限値が検知閾値（水）を上回る結果となった。

表2 定量下限値と検知閾値

化合物名	定量下限値 (ppt)			検知閾値 (水) (ppt)
	水	緑茶	牛乳	
TBA	0.2	0.5	50	1*
TCA	0.1	0.1	2	1*
ジオスミン	0.1	0.1	5	10 (飲料水中)
MIB	2	5	10	5 (飲料水中)

\*参考文献では，ppt オーダーとの記載であるため

最小濃度 (1 ppt) とした。

牛乳には検知閾値（水）が適用できなかったため，牛乳における検知閾値（以下「検知閾値（牛乳）」という。）を検討した。検討方法は，悪臭防止法に基づく臭気指数を測定する嗅覚測定法として採用されている「三点比較式フラスコ法<sup>9)</sup>」を用いた（図1）。嗅覚検査に合格したパネル6名に，カビ臭原因物質を添加した牛乳を3つのフラスコから選択させ，正解者が1名となるまで希釈倍数を増して繰り返し，検知閾値（牛乳）を導き出した。

その結果，検知閾値（牛乳）は定量下限値を大幅に上回り，牛乳においても検知閾値の定量が十分に可能であることが判明した（表3）。

これより，試料として用いた飲料すべてにおいて，各カビ臭原因物質の検知閾値の定量が可能であることが検証できた。

表3 牛乳の検知閾値

化合物名	定量下限値 (ppt)	閾値 (ppt)
TBA	50	5,495
TCA	2	733
ジオスミン	5	1,738
MIB	10	733

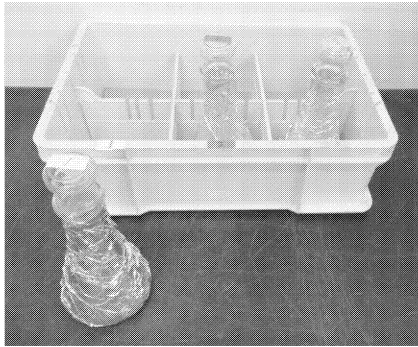


図1 三点比較式フラスコ法

(2) 検量線, 再現性の検討

検量線は定量下限値を最小濃度とした4濃度で作成した。その結果, 試料として用いた飲料すべてにおいて, 各カビ臭原因物質の検量線の決定係数 ( $R^2$ ) は $\geq 0.997$  となり, 良好な直線性を確認できた (表4)。

また, 再現性 (RSD) について, 水及び緑茶については検知閾値 (水) の濃度, 牛乳については定量下限値濃度を5回ずつ測定し求めたところ, 1.1-11.9 %と良好な結果を得ることができた (表4)。

2 カビ臭の移染による異臭苦情を想定したモデル実験

プラスチック製密閉容器内に, 試料及びn-ヘキサンに溶解したカビ臭原因物質混合標準液 (各 250  $\mu\text{g/mL}$ ) を密閉容器内の濃度が約 100  $\text{mg/m}^3$  となるよう配置した<sup>7)</sup> (図2)。試料として, ペットボトル入りのミネラルウォーター, 紙パック入りのお茶及び牛乳の3種を用いた。また, ミネラルウォーター及びお茶は常温, 牛乳は冷蔵で28日間保管し, 表5に示す測定日に試料を1本ずつ取り出し測定した。

その結果, ミネラルウォーター中のTBAを除く全てのカビ臭原因物質について, 試料中への移染を確認することができた (表6)。特に牛乳への移染が顕著であり, カビ臭原因物質が乳脂肪等に取り込まれたことが原因と考えられる。また, 容器包装の種類に着目して比較した場合, ペットボトル (ミネラルウォーター) よりも紙パック (緑茶, 牛乳) の方が移染しやすい傾向が見られた。これは容器包装の気密性に依存するものと推測される。

表4 検量線及び再現性

TBA						
試料	検量線範囲 (ppt)	決定係数 ( $R^2$ )	定量下限値 (ppt)	閾値 (ppt)	RSD (%)	
水	0.2 - 2	1.0000	0.2	1	6.2	
緑茶	0.5 - 5	0.9983	0.5	1	3.8	
牛乳	50 - 500	0.9978	50	5,495	11.8	

TCA						
試料	検量線範囲 (ppt)	決定係数 ( $R^2$ )	定量下限値 (ppt)	閾値 (ppt)	RSD (%)	
水	0.1 - 1	0.9982	0.1	1	7.2	
緑茶	0.1 - 1	0.9988	0.1	1	7.8	
牛乳	2 - 20	0.9992	2	733	6.2	

ジオスミン						
試料	検量線範囲 (ppt)	決定係数 ( $R^2$ )	定量下限値 (ppt)	閾値 (ppt)	RSD (%)	
水	0.1 - 1	0.9992	0.1	10	1.1	
緑茶	0.1 - 1	0.9990	0.1	10	3.4	
牛乳	5 - 50	0.9994	5	1,738	2.7	

MIB						
試料	検量線範囲 (ppt)	決定係数 ( $R^2$ )	定量下限値 (ppt)	閾値 (ppt)	RSD (%)	
水	2 - 20	0.9997	2	5	11.9	
緑茶	5 - 50	0.9987	5	5	11.7	
牛乳	10 - 100	0.9987	10	733	6.4	

表5 カビ臭の移染を想定したモデル実験の条件

試料 (容器の種類)	ミネラルウォーター (ペットボトル: 500mL)	緑茶 (紙パック: 250mL)	牛乳 (紙パック: 200mL)
実験容器 (プラスチック製密閉容器) の容量	H 332mm × W 545mm × D 379mm		H 259mm × W 443mm × D 295mm
保存温度	常温 (15°C-25°C)		冷蔵 (10°C以下)
測定日	1,3,7,15,28 日後		1,3,7,14,28 日後

表6 モデル実験におけるカビ臭の移染の推移

単位 : ppt						
化合物名	1日後	3日後	7日後	14or15日後	28日後	
ミネラルウォーター (ペットボトル: 500mL)	TBA	1未満	1未満	1未満	1未満	1未満
	TCA	1未満	3.3	4.3	6.4	1.1×10 <sup>2</sup>
	ジオスミン	1未満	4.2	5.4	1.1	1.0
	MIB	2未満	6.8	6.4	2未満	3.2
緑茶 (紙パック: 250mL)	TBA	1未満	1.0	2.9	5.5	6.0
	TCA	1未満	1.3×10	2.0×10	3.3×10	3.8×10
	ジオスミン	1未満	5.7×10	6.6×10	7.1×10	7.6×10
	MIB	5未満	1.2×10 <sup>2</sup>	2.8×10 <sup>2</sup>	6.7×10 <sup>2</sup>	4.6×10 <sup>2</sup>
牛乳 (紙パック: 200mL)	TBA	50未満	2.1×10 <sup>5</sup>	6.3×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	2.0×10 <sup>5</sup>
	TCA	6.2×10 <sup>2</sup>	1.7×10 <sup>5</sup>	8.2×10 <sup>5</sup>	1.9×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>
	ジオスミン	4.4×10 <sup>2</sup>	1.7×10 <sup>5</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>
	MIB	9.3×10 <sup>2</sup>	4.0×10 <sup>5</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>	2.1×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>6</sup>

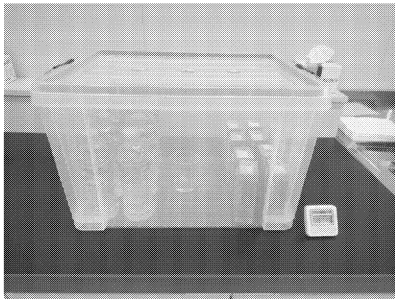


図2 モデル実験

#### IV まとめ

代表的なカビ臭原因物質である4化合物に対し、異臭苦情検査に対する適用可否、検量線及び再現性の検討、並びに移染による異臭苦情を想定したモデル実験について検討を行ったところ、以下に示す内容について有用な結果を得ることができた。

- 1 試料として使用したすべての食品において良好な検量線が得られた。また、定量下限値あるいは検知閾値の濃度における再現性も良好であった。
- 2 水及び緑茶について、各カビ臭原因物質の検知閾値(水)の定量が可能であることが検証できた。
- 3 牛乳については、検知閾値(水)の測定ができなかったため、検知閾値(牛乳)を「三点比較式フラスコ法(官能試験)」を用いて求めた。その結果、牛乳についても、すべてのカビ臭原因物質の検知閾値(牛乳)の定量が可能であることが検証できた。
- 4 モデル実験において、移染したカビ臭原因物質を測定することが可能であった。また、牛乳がカビ臭を取り込み

やすいことが判明し、ペットボトルより紙パックの方が移行しやすいことが推察された。

以上の結果より、カビ臭原因物質について、異臭苦情時の検査として有効であり迅速かつ高感度な一斉分析法を確立できた。今後は、実際に異臭苦情の検体を受け付け、原因究明の一助となるよう検査及び助言指導を行っていくほか、他の異臭物質に関する一斉分析法についても検討していく予定である。

#### 参考文献

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 中西淳治: 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年報, 7, 37-40 (2017)
- 4) 加藤寛之, 渡辺久夫: 食品の匂いと異臭, 株式会社 幸書房, 東京 (2011)
- 5) 石田裕, 佐藤邦裕, 加藤寛之: 食品の臭気対策 一第1集一, 株式会社サイエンスフォーラム, 千葉 (2010)
- 6) 三点比較式フラスコ法マニュアル, 環境省
- 7) 但馬良一, 馬場亜希, 峯孝則, 他: 食品へのカビ臭移行防止(第2報) 移行メカニズム解明とその対策, 日本包装学会誌, 3 (1), 45-55 (1994)