

香気成分の分析と評価

—その2 匂い濃縮物の分画及びGC匂い嗅ぎ法—

下田 満哉* 箴島 豊**
(Shimoda Mitsuya) (Osajima Yutaka)

前回¹⁾の香気成分の分析と評価(その1)では、全揮発性成分を一括して分析することを前提として、匂い濃縮物の調製方法あるいはヘッドスペースガス分析法など香気成分の分離・濃縮法について述べた。しかしながら、匂い濃縮物を構成している成分の複雑さを軽減し化合物の同定を容易にするためにも匂い濃縮物の分画は非常に有効な手段である。さらに、特徴香成分の検索や異臭成分の検索などその匂いを追求しながら原因成分を明らかにしたい場合が多々あるが、このようなときは全揮発性成分の同定リストから原因物質を特定するよりも、匂い濃縮物を種々の方法で分画しながら目的の匂いを含んでいる画分を絞り込んでいく方法が有効である。本稿では、このような見地から匂い濃縮物の分画法ならびにGC-匂い嗅ぎ法について解説する。

1. 酸性、中性、塩基性画分に分画

匂い濃縮物中には、中性の揮発性成分のみならず酸性および塩基性の揮発性成分が含まれている。そこで液体試料のpHを酸性、中性およびアルカリ性に調整して溶媒抽出を行うことにより、匂い構成成分を酸性、中性、塩基性画分に分画することができる。本分画法は、特に発酵食品などに対して有効である。図1に、典型的な分画例を示す²⁾。

2. シリカゲルカラムによるテルペン化合物の分画

テルペン化合物は、各種精油及びスパイスなどの構成成分として極めて重要である。構成炭素数によりモノテルペン(炭素数10個)およびセスキテルペン(炭素数15個)に分類されるが、いずれも大部分は炭化水素であり、それぞれ $C_{10}H_{16}$ 及び $C_{15}H_{24}$ の分子式で書き表すことができる。しかしながら官能的には炭化水

素画分よりもはるかに重要な含酸素テルペン(分子中にアルコール、アルデヒド、エステルなどの酸素原子を有する)が精油ならびにスパイス中には少量ながら含まれており、特有の匂いを付与している。そこでテルペン化合物の分析においてはシリカゲルカラムを用いたテルペン炭化水素と含酸素テルペンの分画が有効な場合がある。すなわち、ペンタンあるいはヘキサンを溶媒として30~100メッシュのシリカゲルを充填した直径2cm長さ10cm程のカラムにテルペン混合物を負荷し、シリカゲルのほぼ10倍量のペンタン(ヘキサン)を流すことにより、炭化水素画分を溶出させる。次いでエーテルを流すことにより含酸素テルペンが回収される。なお、ペンタンとエーテルのステップワイズ溶離あるいはグラジエント溶離によると構成成分を数個のフラクションに分けることも可能である。本法では、溶離液として低沸点の溶媒を使用するので匂い成分の再濃縮も容易である。

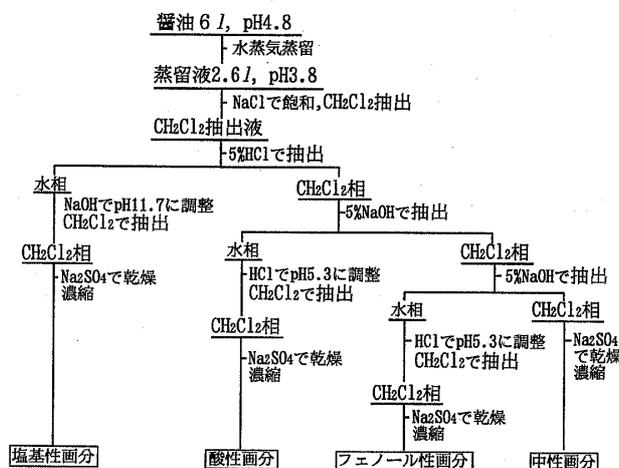


図1. 匂い成分のpHによる分別抽出

* 九州大学大学院農学研究院

** 広島県立大学生物資源学部

香気成分の分析と評価

3. 薄層クロマトグラフィー (TLC) による匂い濃縮物の分画

匂い濃縮物中の官能的に重要な成分を絞り込むために、GC 匂い嗅ぎ法及び GC 分取匂い嗅ぎ法を行うが、それに先立って薄層クロマトグラフィー (TLC) による匂い濃縮物の分画は非常に効果的である。すなわち、図2に示したように蛍光試薬が予め塗布されているシリカゲル TLC プレートに匂い濃縮物を線状にプロットし、エーテル：ペンタンの混合溶媒で展開することにより通常 10 個程度のフラクションに分画することができる。エーテル：ペンタンの混合比は試料により、2：8 から 4：6 程度を用いる。展開後、溶媒を揮散除去した後、紫外線ランプ下で分離状況を確認する。次いで、各フラクションの匂いを確認するとともに、フラクション毎に担体のシリカゲルをプレートから削り取り少量のエーテルで匂い成分を抽出回収することができる。このようなシリカゲル TLC (順相クロマト) によると、低沸点混合溶媒により匂い構成成分をほぼ官能基毎に分離できる。一般的に、揮発性成分の匂いはおおよそ官能基毎に特徴付けられることを考えると、本法は匂い特性毎に匂い濃縮物を分画できる貴重な方法といえることができる。これまでに著者らは、脱脂粉乳の匂い濃縮物³⁾、荒挽ソーセージの匂い濃縮物⁴⁾、ごま油の匂い濃縮物⁵⁾ の分画に本法を適用している。

4. HPLC による匂い濃縮物の分画

TLC による匂い分画と同様に考えることができる。分離モードとしては、シリカゲルカラムを使用する順相モードと ODS カラムを使用する逆相モードが利用可能であるが、ペンタン+エーテルなどの低沸点溶媒を移動相として使用できる逆相モードの方が溶出液の最濃縮の容易さ、並びに HPLC 分析中に溶出液をガラス棒につけて溶媒を気化させながら匂い嗅ぎができる

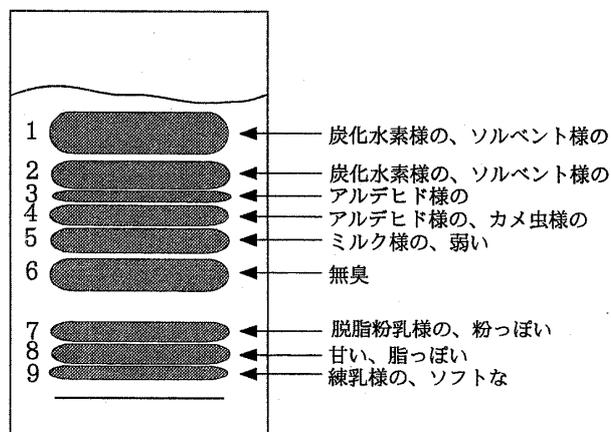


図2. 薄層クロマトグラフィーによる匂い濃縮物の分画

など利点が多い。逆相モードでは移動相としてメタノール+水系が普通に使用され、溶出液の匂いはそのままメタノール水溶液として匂い嗅ぎができる。しかしながら、目的フラクションの匂い濃縮物を得るためには前所述した直接カラム濃縮法等によりメタノール溶媒から香気成分を分離する必要がある。適用例としては、順相モードでのコーヒー香気濃縮物の分画などがある。

5. GC 分取匂い嗅ぎ法

匂い分析では、多くの場合 GC で分離、定量され、GC-MS により同定されたとしても、個々の成分の匂いの質と強度を知ることは、なお重要である。GC 分取匂い嗅ぎ法は、図3に示した構成により行われる³⁾。すなわち、本法では試料負荷量の大きな内径 0.32mm あるいはそれ以上の大口径キャピラリーカラムの使用が好ましい。分離された個々の成分あるいはフラクションを分取用キャピラリーカラムに導き捕集する。著者らは通常、先ず最初に 5~8min 間に溶出するフラクションを一括分取してその画分の匂い嗅ぎを行い、次いで 2min 程度のフラクション、最も重要な匂いを呈したフラクションについては最終的には個々の成分を分取して匂い嗅ぎを行っている (図4)。分取キャピラリーに捕集された成分 (画分) は微量のエーテルで紙上に溶出してその匂いを嗅ぐことができる。本法では、内面に化学結合した固定相フィルムをもつシリカキャピラリーカラム (内径 0.32mm×25cm, フィルム厚 1 μm) を分取成分の捕捉カラムとして使用することにより、冷却の必要なしに室温で分取することを可能としている。また、このキャピラリーはテーパーをつけた小さなガラス管に GC オープンの外部から差し込まれるだけなので、瞬時に交換可能であり隣接成分の混入が問題とならない。

6. Sniff-GC 法 (Aroma Extract Dilution Analysis への適用)

匂い濃縮物中には数百にも及ぶ匂い成分が存在する

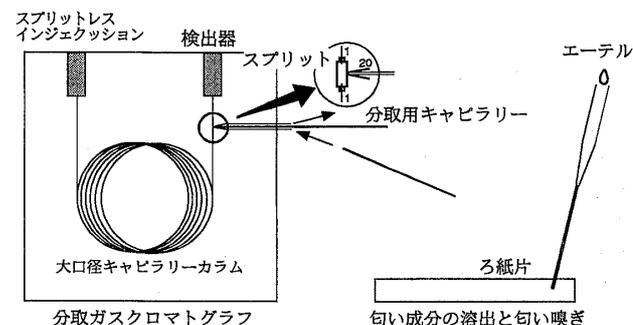


図3. 分取 GC-匂い嗅ぎ法

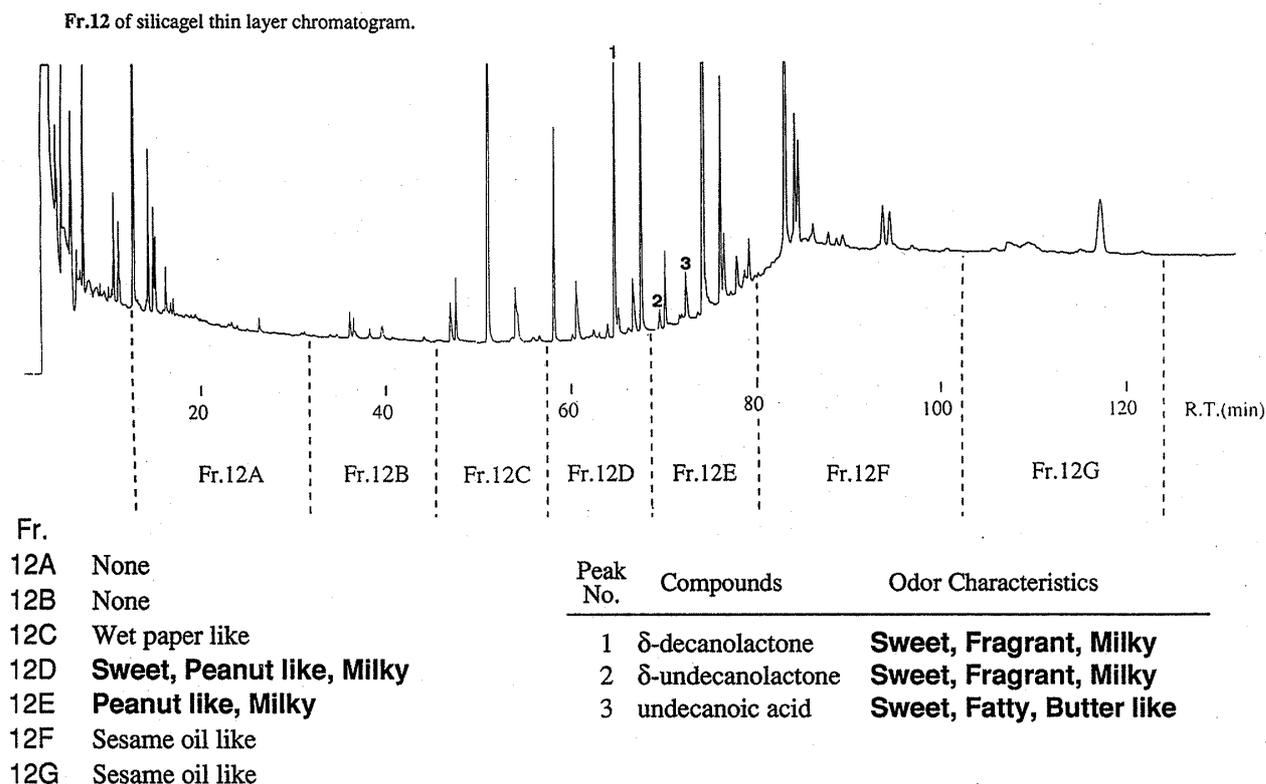


図4. 分取GC法による匂い評価

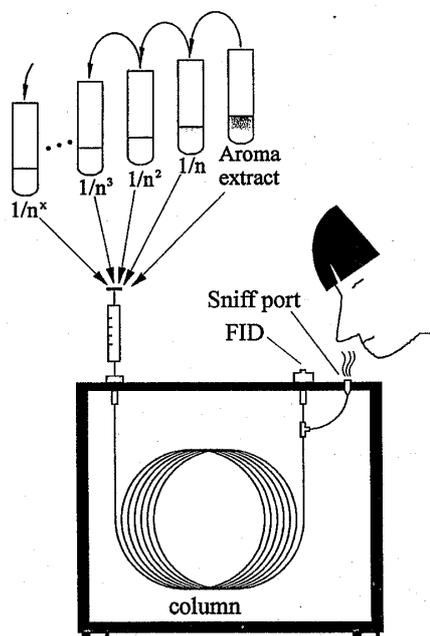


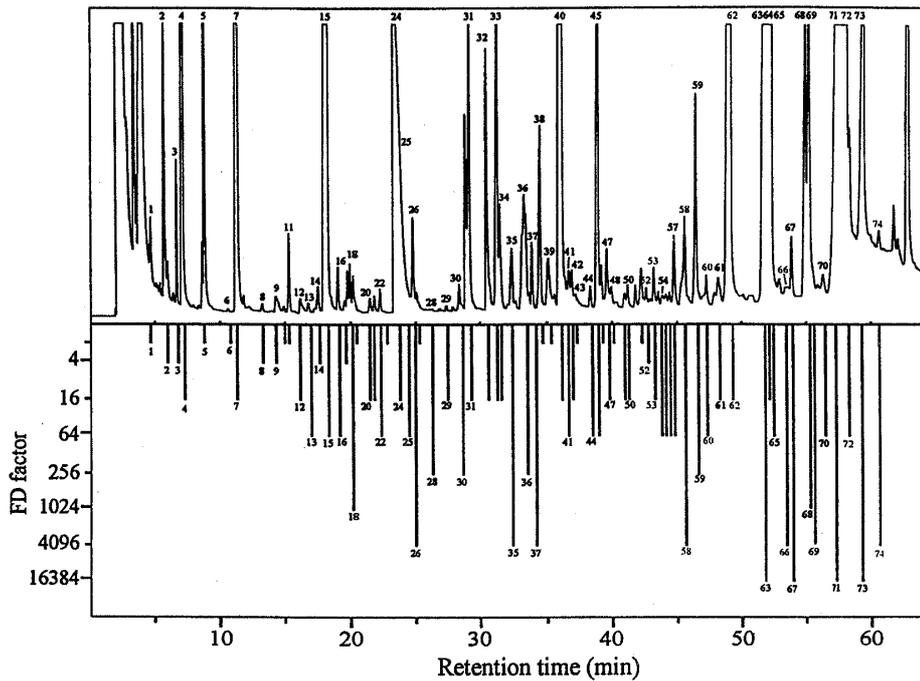
図5. Sniff-GCとAroma Extract Dilution Analysis

のが普通である。前項5の方法は、オフフレーバー成分あるいは特徴香成分を絞り込んでいくのに適した方法である。これに対して本項では述べる Sniff-GC 法は、すべての構成成分について匂いの質と強度を明らかに

していく方法である。すなわち、Sniff-GC法は図5に示すようにキャピラリーカラムの出口を二つに分岐し、一方を検出器に、他方を Sniffing Port へ導きガスクロマトグラムの取得と各成分の匂い嗅ぎを同時に行うことを特徴とする。このとき検出器側と Sniffing 側のスプリット比は1:10程度に設定することが一般的である。匂い成分の Sniffing Port での滞留を防ぎ、匂い嗅ぎを容易にするために Sniffing Port 出口へは、水蒸気で飽和させた空気を毎分100ml程度供給する方法が取られる場合が多い。

匂い濃縮物を順次希釈した一連の試料について希釈率が低い(濃度の高い)試料から順に Sniff-GC を行うと、ある成分(A)は1/16倍希釈試料で匂いが認められなくなり、成分(B)は1/128倍希釈試料で匂いが認められなくなった場合、その匂い濃縮物に関して成分(B)は(A)に比べて8倍匂い寄与率が高いことを意味する。このような分析方法を Aroma Extract Dilution Analysis(AEDA)と呼び、最終的にピークの匂いが認められたときの希釈率をその成分のFD Factorと呼んでいる。AEDA法によると、言うまでもなく、匂い寄与率のみならず匂いの質も明らかにすることができる。最も匂いが複雑な試料の一つである醤油の匂い濃縮物についてAEDAをおこなった著者らの結果

香気成分の分析と評価



No.	Aroma quality	FD factor	No.	Aroma quality	FD factor
52	Sharp, smoky, heavy, salty	4	62	Heavy, medical, salty	16
53	Sharp, smoky, heavy, salty	16	66	Heavy, medical, salty	4096
58	Smoky, light, tar, salty	4096	72	Sweet, heavy, burnt, salty	64
60	Burnt, salty	64	74	Heavy, burnt, salty	4096

図6. 醤油ニオイ濃縮物のアロマガラフ (下段), 上段は水素炎イオン化検出器の応答

を図6に示す(未公表データ)。本稿では、特徴的香気成分のスクリーニング手法について種々解説したが、AEDA法はこのための最も簡単な方法であろう。例えば、SchieberleとGroschはレモンフレーバーの酸性水溶液中での経時変化をAEDA法を用いて明らかにしている⁶⁾。また、西村はAEDA法により新ショウガの重要香気成分として linalool, geraniol, isborneol, borneol, geranial 及び neral を見出している⁷⁾。

文献

- 1) 下田満哉: 日本調理科学会誌, **33**, 510, (2000)
- 2) N. Nunomura, M. Sasaki and T. Yokotsuka:

Agric. Biol. Chem., **44**, 339 (1980)

- 3) H. Shiratsuchi, M. Shimoda, K. Imayoshi, K. Noda and Y. Osajima: *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1323 (1994)
- 4) M. Shimoda, H. Shiratsuchi, Y. Minegishi and Y. Osajima: *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 946~950 (1993)
- 5) M. Shimoda, H. Shiratsuchi, Y. Nakada, Y. Wu and Y. Osajima: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3909~3912 (1996)
- 6) P. Schieberle and W. Grosch: *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 797~802 (1988)
- 7) O. Nishimura: *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2941~2945 (1995)