

6

香気成分

食味の構成要素として、「食感」「におい（香り）」「味」の3要素が主に挙げられる。その中における「におい（香り）」は、黒毛和種牛肉には日本人に好まれる特有の香気（和牛香）が存在し、和牛香は霜降り肉を空気中で熟成させて加熱することにより増加する（Matsuishi ら, 2001）、豚へのリノレイン酸量の多い飼料の給与は、酸化臭の指標であるアルデヒド類を増加させ、引いては、酸化臭による豚肉の劣化を招く（Larick ら, 1992）、ラクトン類は、roasted beef flavorと正の相関関係、gamey/stale off-flavorと負の相関関係があり、ジテルペノイド類は、roasted beef flavorと負の相関関係、gamey/stale off-flavorと正の相関関係がある（Maruri ら, 1992）、など他にも多くの報告がみられることから、食味性を考える上で重要な因子の一つと考えられる。

香気成分を測定する方法として、目的成分が揮発性または半揮発性成分の場合、サンプルから抽出した香気成分をGCMSまたはGCにて分析する方法が一般的に用いられている。本稿では、（独）東北農業研究センターの渡邊 彰氏が報告しているDynamic-Headspace SPME（固相マイクロ抽出：Solid Phase Micro Extraction）法により抽出した香気成分をGCMSにて分析する方法（Watanabe ら, 2008）をもとに家畜改良センターで実施している方法を紹介する。

香気成分の抽出法は、水蒸気蒸留および溶媒抽出を同時、かつ連続で行う連続蒸留抽出法、有機溶媒に香気成分を溶かして直接抽出する溶媒抽出法など、目的とする成分の抽出に応じた様々な手法が開発されている。本稿で用いるDynamic-Headspace SPME法は、容器に試料を入れた時の上部空間（Headspace）に生じる揮発性物質を、不活性ガスにてパージしながらSPMEファイバーに吸着させる手法である。

このHeadspace SPME法は、サンプルの状態（固体、液体、気体）にかかわらずに、簡便かつ迅速に揮発性物質および半揮発性物質の抽出を可能とする手法であり、他の手法に比べ比較的少ないサンプル量での分析が可能である。ただし、SPME法で使用されるSPMEファイバーは、コーティング相や膜厚の違いにより吸着可能な物質が異なるため、目的に応じたSPMEファイバーの選択が必要であることは注意されたい。

①器具準備

- (1)ガラス製パストゥールピペット（以下、パストゥールピペット）、ガラス製バイアル（以下、バイアル）等のガラス器具は、300℃で4時間加熱処理したものを使用する。



＜ガラス製品は加熱処理後、ガラス容器内にて保存する＞

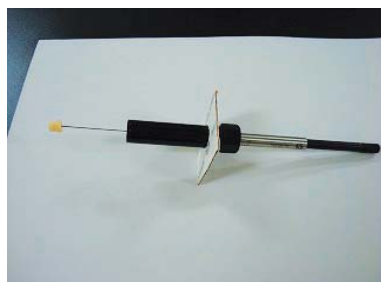
注）使用する器具について、プラスチック製品は、プラスチック由来成分のコンタミネーションを招くため使用を避ける。

- (2)10 μ lの1,2-dichlorobenzene と1240 μ lのインフィニティピュアメタノールを混和し、1,2-dichlorobenzene 濃度:0.0527 μ mol/mlの内部標準試薬(以下、I.S.)を作成する。(I.S.の保存は1週間程度を目安としている)

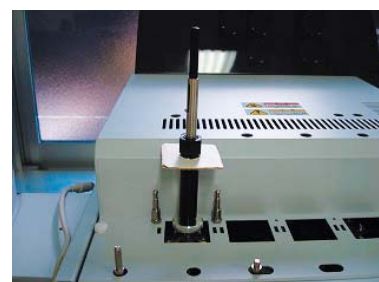
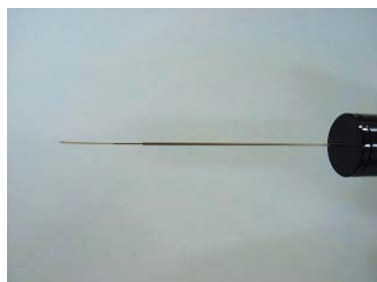


<内部標準液(I.S.)>

- (3)新品のSPMEファイバーアッセンブリー(以下、ファイバー)は加熱処理によるコンディショニングを行う。ファイバーの加熱処理は、別のGC装置を用いると便利である。ファイバーの種類によって加熱処理の温度および時間は変化するため、詳細はファイバーの説明書を参照されたい。本分析ではDVB/CAR/PDMSファイバー(gray)を使用するため270℃で1時間加熱処理を行う。



<SPMEファイバーアッセンブリー>



<ファイバーの加熱処理>

②GCMS起動・分析準備

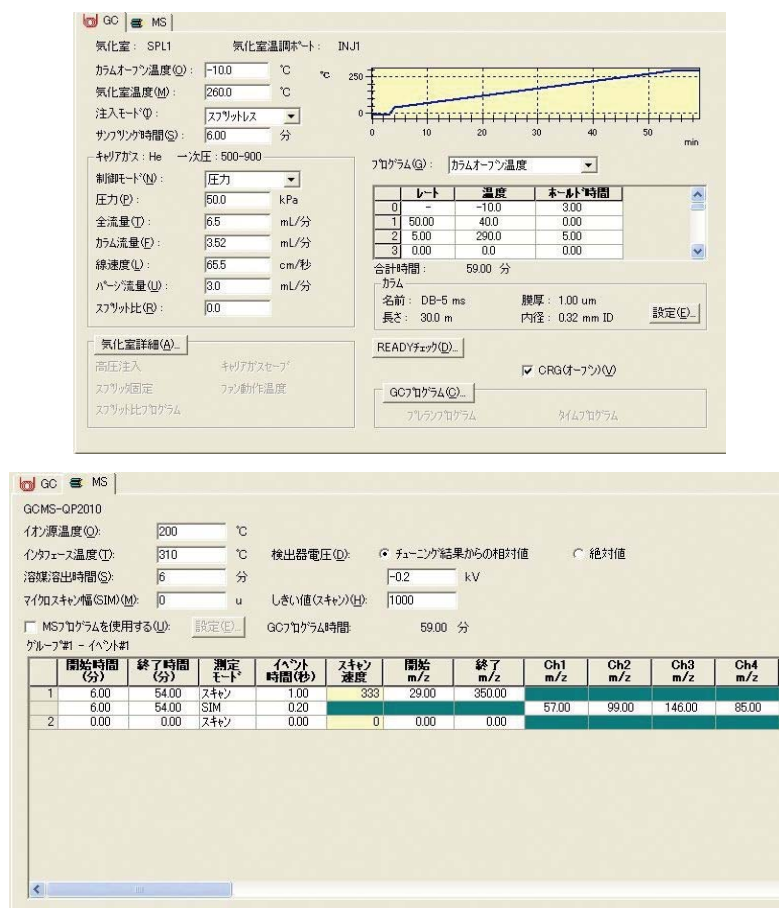
本分析では下記に示す分析カラム(DB-5ms)を取り付けた GCMS-QP2010Plus(島津製作所)を用い、DVB/CAR/PDMSファイバーによる抽出を行うので、これに合わせた装置の設定条件を示す。

- (1)真空度を最適な状態にするために、GCMSは分析の前日に起動し、MS部を真空にした状態で最低一晩待機状態にする。
- (2)GCMSの起動は、Heガスの元栓を開けてから、GC電源→MS電源→PC電源の順番でOnにする。
- (3)GC起動のため、「FLOW」 流量：On、「SYSTEM」 GC：起動を行う。
- (4)GCの状態を以下のとおりに設定する。「MONIT」の「流量」 圧力:50kPa、全流量:6.5mL/分、パーズ流量:3.0mL/分、「COL」 オープン温度:35℃、「INJ」 気化室温度:260℃、「DET」 インターフェイス温度:310℃。
- (5)PCのデスクトップ上の「GCMS分析アイコン」をダブルクリックして、GCMS分析画面を立ち上げる。(ユーザー ID:Admin、パスワード:空欄)
- (6)GCMS分析画面の「真空系の起動・停止」の「自動起動」からMSの真空系の起動を行う。

- (7)真空系の起動後、GCの状態を以下のとおり設定して一晩以上待機状態にする。「FLOW」圧力：10.9kpa、カラム流量：1.5ml/min、全流量：3.0ml/min、注入モード：SPLITLESS。

注) ガス節約のため、圧力を小さく、流量を少なくする。

- (8)分析前にGCの状態を②GCMS起動・分析準備の(4)GCのとおりに設定する。
 (9)カラムコンディショニングのため、カラムオープンを300℃で1時間カラムを空焼きする。
 (10)分析条件の確認を行う。



<MS分析条件>

- (11)チューニングの「ピークモニター」の「モニタグループ」から「水、空気」を選択し、H₂OとN₂のピークを確認する。N₂のピークがH₂Oのピークよりも2倍以上大きい時は真空漏れの可能性があるため、インジェクションのセプタムおよびガラスインサートのOリングの交換、またはカラムナットの増し締めを行う。ただし、GCMSを連日起動している場合は、H₂Oのピークがかなり小さくなるためこの限りではない。
- (12)オートチューニングを行い、チューニングレポートのチェックとチューニングファイルの保存を行う。チューニングレポートでは、検出器：1.5kV以下、m/z69, 219, 502の半値幅：0.6 ± 0.2以内、各m/zのマーカーズレ：± 0.2以内、m/z502の強度比：2以上であることを確認する。値が範囲外の場合は、GCおよびMSのメンテナンスを行う。
- (13)サンプル登録で日付、サンプル名、データファイル、データコメントおよびチューニングファイルを登録する。

(14)連日GCMSを稼働していても、分析当日に空分析を一度実施してから通常の分析を開始する。

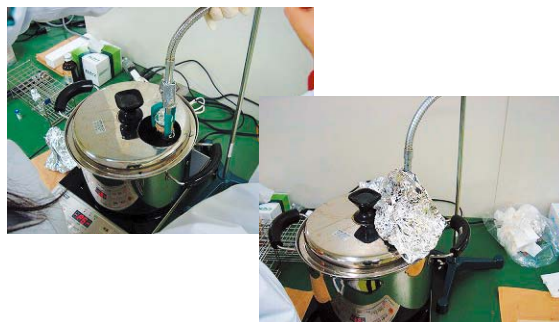
③脂肪抽出

(1)お湯を沸騰させる。(100℃近く)

(2)100ml三角フラスコにミンチした牛肉10g（粗脂肪含量が約25%以上の場合）と、牛肉と同分量の蒸留水を入れてアルミホイルで蓋をし、沸騰水中で10分間加熱する。



<試料の調整>



<試料の加熱>

(3)加熱後、水と脂肪の混合水を10ml試験管に分注・採取して、2分間遠心分離(3,000rpm)する。



<試料の分注>



<採取・遠心分離後の試料>

(4)分離した脂肪と水のうち、パスツールピペットを使用して脂肪のみを吸い取り、0.2g（0.1950～0.2050g）をバイアルに秤量・採取する。（重量は小数点第4位まで記録する）



<脂肪の採取・秤量>



(5)脂肪を秤量・採取したバイアルは、直ぐに分析を実施しないのであれば、バイアルにキャップをしないで、脱酸素剤とともにアルミパックして常温で放置する。

(6)分析前にI.S.を2μl加えたのちキャップをして、ボルテックスでよく混和する。（I.S.を加えるときは、バイアルの管壁に接面した脂肪付近に落とすようにする）



<I.S.の投与>



<抽出バイアル>

(7) ボルテックス後、バイアルにサンプル番号を記載する。(以下、抽出バイアル)

注) マーカーの揮発成分がバイアル内に入らないようにするため、キャップ後にサンプル番号を記載する。

(8) 1つのサンプルにつき抽出バイアルを2個作成する。(うち1個は予備)

④ SPMEファイバー吸着・GCMS分析

(1) ファイバー吸着を行う前に、ファーパーを270℃で15分間加熱処理する。

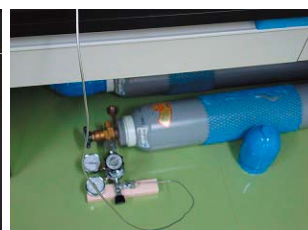
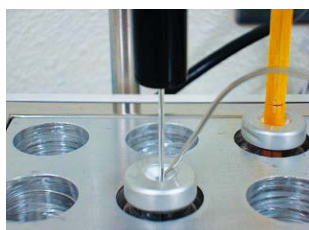
(2) 抽出バイアルのキャップに注射針で穴を2カ所開ける。

(3) 穴の一方に、毛細管を脂肪の5mm上まで差し込んだ後、毛細管にファイバーを挿入し、100℃に加熱したアルミブロックバスに抽出バイアルをセットする。



<毛細管は脂肪の5mm上まで差し込む>

(4) もう一方の穴に、純Heガス（純度：G1）の配管を突き刺して、Helium purifier（Heガス用フィルター）を通した純Heガスを5mm/minの流量で抽出バイアルに流しながら、ファイバー部を露出し、100℃で30分間ファイバー吸着させる。なお、配管は、純Heガスボンベ→流量コントローラー→Helium purifier→抽出バイアル（ドライブロックバス）の順番で設置する。



<Dynamic-Headspace SPME法>

注) 純Heガスを流すことで、バイアル内気圧の平衡状態が崩れるため、揮発成分の抽出がより可能となる。

- (5)ファイバー部を露出して25分経過後、GCMS分析画面上の「準備」を押し、さらに液化炭酸のバルブを開けてGCMSを分析準備の状態にする。「準備」を押すと、液化炭酸が流れてオープン温度が-10℃に下がり、3分後分析準備完了の状態になる)

注) 液化炭酸ガスにてオープン温度を-10℃に下げる理由は、気化室内での香気成分の拡散防止による分離能の向上(シグナルのシャープ化)のため。

- (6) 30分間のファイバー吸着後、ファイバー部の露出を戻して毛細管から抜き取り、他の香気成分が吸着しないようにファイバー先端部にセプタムをつける。
(7) GCMSの準備が終了後、GCMSにファイバーをセットしてからファイバー部を露出し、直ちにGCの「START」を押して分析を開始する。



<GC/MSへの投与>

- (8)分析を開始してから1分後にファイバー部の露出を戻し、GCMSから抜き取る。
(9)ファイバーに吸着した成分を完全に脱離させるため、念のため270℃で15分間加熱処理する。
(10)分析開始10分後に、「OPTION」から液化炭酸の使用をOn→Offにして、さらに液化炭酸のバルブを閉じる。

注) 分析終了後のオープン温度を下げる際に、液化炭酸が使用されるのを避けるためバルブを閉じる。

- (11)GCMSにおける分析時間は、1検体あたり54分のため、次のサンプルを分析するときには、分析開始30分後あたりからファイバーの加熱処理を開始する。

⑤GCMS待機

- (1)翌日も分析を行う場合は、GCMS画面を閉じてから、GCの状態を以下のとおり設定して待機状態にする。「COL」オープン温度:35℃、「FLOW」圧力:10.9kpa、カラム流量:1.5ml/min、全流量:3.0ml/min、注入モード:SPLITLESS。

注) オープン温度を35℃に設定してからでないと、流量の変更はエラーのため不可能である。

- (2)次に分析を行う際には、②GCMS起動・分析準備の(8)GCの設定から行う。

⑥GCMS停止

- (1)GCMS分析画面上の「真空系の起動・停止」の「自動停止」から真空系を停止する。
- (2)真空系の停止後、GCMS画面を閉じてから、MS電源→GC電源の順番でOffにし、Heガスのバルブを閉じる。

⑦データ解析

- (1)各種炭化水素（C7-C22）をスタンダードとして分析し、それらのRT（リテンションタイム）から各ピークのLRI（Linear Retention Index）を算出する。ピークの同定には、NIST chemistry WebBookホームページや論文などのLRIとマスパターンを参考にして行う。
- (2)量的解析には定性と定量に関するデータを同時に取得できるFASSTモード（島津製作所）で分析しておく。添加した内部標準物質（I.S.）のTIC（トータルイオンクロマト）面積または選択イオン（1,2-dichlorobenzeneをI.S.とした場合は $m/z=146$ ）面積に対する同定物質のTIC面積または選択イオンの m/z 値による面積の比率で表す。

【参考：GCMSおよびカラム詳細】

GCMS：GCMS-QP2010Plus（島津製作所）
電子イオン化法（EI法：Electro Ionization）

カラム：DB-5ms（Agilent Technologies）
Length 30m, I.D. 0.320mm, Film Thickness 1.00 μ m

【参考文献】

- Matsuishi, M., Fujimori, M., and Okitani, A. 2001. Wagyu Beef Aroma in Wagyu (Japanese Black Cattle) Beef Preferred by the Japanese over Imported Beef. *Animal Science Journal*, 72 : 498-504.
- Larick, D. K., Turner, B. E., Schoenherr, W. D., Coffey, M. T., and Pilkington, D. H. 1992. Volatile compound content and fatty acid composition of pork as influenced by linoleic acid content of the diet. *Journal of Animal Science*, 70 : 1397-1403.
- Maruri, J. L., and Larick, D. K. 1992. Volatile Concentration and Flavor of Beef as Influenced by Diet. *Journal of Food Science*, 57 : 1275-1281.
- Watanabe, A., Ueda, Y., Higuchi, M., and Shiba, N. 2008. Analysis of Volatile Compounds in Beef Fat by Dynamic-Headspace Solid-phase Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*, 73 : C420-C425.