

電子冷却トラップを利用した微量揮発成分分析法の確立

バイオ系チーム 廣岡 青央

要 旨

清酒中の微量揮発成分の定量を目的として、電子冷却トラップを利用した分析法を検討した。その結果、清酒に微量に含まれると推測された成分に対して、従来の静的ヘッドスペースガス分析法では分析できなかった濃度(0.1mg/L)の微量成分を検出でき、定量することが可能となる分析法を確立した。

1. はじめに

清酒中の揮発成分はアルコールやエステル、カルボニル化合物等が含まれる。これらの成分は清酒の香味に影響を及ぼすことから、これまでに様々な手法による定量分析法が研究されてきた。揮発成分の分離分析にはガスクロマトグラフィーが用いられるが、分析に供する試料の調製法としては、静的ヘッドスペース法¹⁾や有機溶媒による抽出法²⁾、ポラパックQカラムによる濃縮法³⁾、ヘッドスペース固相マイクロ抽出法⁴⁾等の手法が報告されている。ヘッドスペース法は比較的簡便な手法で、揮発性のエステル(酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル等)やアルコール(イソアミルアルコール、イソブチルアルコール等)の分析に適しており、国税庁所定分析法にも採用されている官能的に重要な清酒の香りの成分を定量することのできる一般的な手法である。ポラパックQカラムによる濃縮法は清酒に多量に含まれるエタノールの影響を抑えて分析することにより、広い沸点範囲にわたった揮発成分の分析が可能である。また、固相マイクロ抽出法はヘッドスペース法で分析可能なエステルやアルコールに加えて、沸点の比較的高いフェネチルアルコールや遊離の低級脂肪酸等の分析が可能であると報告されている。それぞれの手法はその簡便さや分析できる成分の範囲が異なり、分析の目的に沿って採用されている。

我々は、(株)島津製作所のガスクロマトグラフ用ヘッドスペースサンプラ(HS-20)に搭載された、電子冷却トラップによるヘッドスペースガス濃縮システムを清酒に応用することを目的として、清酒に含まれる微量な揮発成分について分析を行った。この手法は電子冷却トラップに疎水性のTenaxを使用し、ヘッドスペースガスを濃縮することにより、水分を含む試料の

低沸点化合物から高沸点化合物までの高感度分析が可能である。本稿では、この手法を用いて清酒に含まれる成分の分離定量分析法を検討したので報告する。

2. 実験方法

2. 1 標準試料の調製

20mL容ヘッドスペースバイアルに試料1mL、内部標準物質(4-メチル-1-ペンタノール)及び塩化ナトリウム0.2gを加えてセプタムにてシールし、分析に供した。

2. 2 ガスクロマトグラフ分析条件

ガスクロマトグラフ及び電子冷却トラップの分析条件を表1にまとめた。

表1 ガスクロマトグラフ分析条件

ヘッドスペースサンプラ：島津 HS-20 (冷却トラップモデル)	
オープン温度	70°C
バイアル保持時間	30分
サンプルライン温度	180°C
トラップ冷却温度	-10°C
ドライバージ時間	3分
トラップ加熱温度	280°C
インジェクション回数	3回
ガスクロマトグラフ：島津 GC-2010Plus	
カラム	DB-WAX 30m×0.32mm 膜厚 0.5μm
キャリアガス	ヘリウムガス (圧力 80kPa)
昇温プログラム	60°C (0分保持) から 220°C (15分保持) まで (3°C/分の昇温)
注入条件	スプリット
検出器	FID 250°C

3. 結果と考察

3. 1 ガスクロマトグラフによる分離条件の検討

今回、文献3で清酒に含まれていると報告されている成分のうち、清酒酵母の代謝生成機構が明らかでな

く、清酒に含まれる量が少ないと考えられるアルコール類(表2)を選択した。これらの全成分を分離することができる分析条件を検討し、表1の分析条件を選択した。この条件での各成分の保持時間を表2に示す。

表2 標準物質の沸点、濃度と保持時間

化合物	沸点 (°C)	保持時間 (分)
1-ペンタノール	138	6.7
2-メチル-1-ペンタノール	149	7.9
2-ヘプタノール	159	8.5
3-メチル-1-ペンタノール	153	8.7
1-ヘキサノール	157	9.5
1-ヘプタノール	176	12.9
2-エチル-1-ヘキサノール	183	14.1
1-オクタノール	195	16.6

表2の成分は、イソアミルアルコールのような清酒酵母による代謝経路が明らかな成分(清酒中濃度で数100mg/L程度)と比べ、1000分の1程度の0.1mg/L程度であると推測した。そこで、選択した成分の濃度を0.1mg/Lにして静的なヘッドスペース法(電子冷却トラップを使用すること以外の条件は表1と同じ)にて分析したところ、各成分のピークを特定することは困難であったことから、0.1mg/L程度の濃度で分析するためには何らかの濃縮が必要であると判断された。今回採用した電子冷却トラップによる濃縮により0.1mg/Lの試料を分析した結果、各成分の検出が可能であることが分かった(図)。

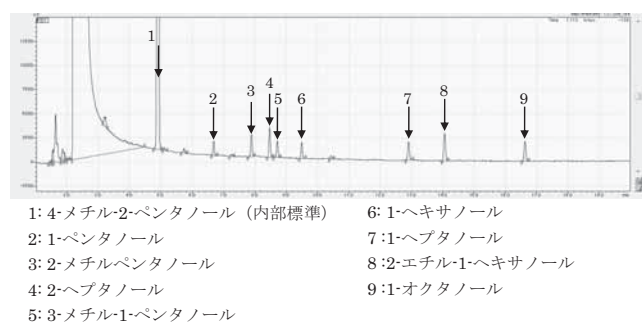


図 各標準物質(0.1mg/L)のクロマトグラム

3.2 再現性と定量性

各成分の濃度が1mg/Lになる標準液を作製し、5回分析を行い、内部標準に対するピーク面積比の平均値及び変動係数を求めた(表3)。変動係数は5%以下と

なり定量に十分な再現性が得られた。

表3 各成分の分析再現性

(内部標準のピーク面積=1)の標準偏差/平均(%)

化合物	標準偏差/平均 (%)
1-ペンタノール	4.28
2-メチル-1-ペンタノール	1.24
2-ヘプタノール	0.83
3-メチル-1-ペンタノール	1.59
1-ヘキサノール	1.29
1-ヘプタノール	1.73
2-エチル-1-ヘキサノール	0.71
1-オクタノール	1.32

次に、各成分の濃度が0.1mg/L、0.5mg/L及び1mg/L(溶液のエタノールの最終濃度は15%になるように調製)になるように標準液を作成し、分析を行った。その結果、得られたピーク面積比と各成分の濃度を1次直線で近似したところ決定係数(R²)の値は0.9975~1と良好な結果が得られた。

3.3 アルコール濃度の影響

アルコール飲料のような試料の香気成分のヘッドスペース分析では、各成分の定量に対してエタノール濃度の影響が考えられる。そこで、エタノール濃度を10%、15%及び20%と変化させた香気成分溶液(各成分の濃度は1mg/L)を作成し分析を行った。結果は、内部標準に対するピーク面積比をエタノール濃度15%の場合を1.0とした相対比として表した(表4)。

表4 エタノール濃度の影響

化合物	相対比(エタノール濃度15%=1)		
	エタノール濃度		
	10%	15%	20%
1-ペンタノール	1.00	1.00	0.95
2-メチル-1-ペンタノール	1.14	1.00	0.98
2-ヘプタノール	1.13	1.00	0.93
3-メチル-1-ペンタノール	1.16	1.00	1.02
1-ヘキサノール	1.20	1.00	0.98
1-ヘプタノール	1.22	1.00	0.90
2-エチル-1-ヘキサノール	1.20	1.00	0.87
1-オクタノール	1.35	1.00	0.89

今回選択した成分のうち比較沸点の低いもの(保持時間が短いもの)はアルコール濃度の影響を受けにくいと判断されたが、沸点が高くなるにつれて、エタノー

ル濃度の影響が大きくなると考えられた。測定対象の試料のエタノール濃度が15%から5%以上変化する試料を分析する場合、特に沸点の高いアルコール類の定量には試料のエタノール濃度を調整する必要があることが示唆された。

4. まとめ

今回、電子冷却トラップにより、ヘッドスペースガスを濃縮しガスクロマトグラフにて分析を行ったところ、酵母の代謝経路は明らかではないが、清酒に含まれるとされている微量成分の一部を分離、定量することが可能であった。また、従来揮発成分の簡便な測定法として比較的沸点の低いエステルやアルコールの定量分析に利用されてきた静的ヘッドスペース法では分析が困難な濃度(0.1mg/L程度)でも、電子冷却トラップの濃縮により定量することが可能であることが分かった。これらの結果から、溶媒などによる濃縮を必要としない電子冷却トラップによるヘッドスペース分析は、簡便な揮発成分の定量分析が可能であると考えられ、清酒中の微量揮発成分の分析に威力を発揮すると思われる。

本研究は平成26年度補正予算農林水産業の革新的技術緊急展開事業「メタボロミックプロファイリングを活用した清酒の品質向上と原料米のブランド力強化」において実施した研究開発の一部である。

文 献

- 1) 吉沢淑:日本醸造協会誌,68,59(1973).
- 2) 秋田修他:日本醸造協会誌,82,369(1987).
- 3) 坂本宏司他:日本農芸化学会誌,67,685(1993).
- 4) 宇都宮仁:日本醸造協会誌,94,252,(1999).