

資 料

食品における異臭検査プロセスの構築
及び大豆ミートに残存するヘキサン分析について

林 典子 浦本雄大 遠藤利加

要 旨

異臭苦情原因となり得る代表的な物質について、GC-MSによる分析データの収集・解析を行い、データベース化すると共に、検査時のフロー、マニュアル等の整備を行い、異臭苦情事案発生時に迅速正確に対応可能な検査体制を構築した。また、「第2版 食品中の食品添加物分析法」による植物油脂中のヘキサン分析法を基に、大豆ミート中に残存するヘキサンをより効率的に抽出するための抽出条件を検討したところ、試料量の半減、水の添加、スタンダード添加後の静置時間、及び加温抽出時間の延長により抽出効率が上がることを確認した。

キーワード：食品異臭事案、GC-MS、データベース、大豆ミート、ヘキサン、抽出条件

1 はじめに

当所では食品の異物混入等、不良食品発生時の検査を実施しており、異物については先行研究「食品中の異物検査法の確立」にて検査プロセスを構築した。一方、異臭については具体的な検査法についての検討が充分なされていなかったため、異臭苦情原因となり得る代表的な化学物質（以下、異臭苦情原因物質）について、前処理法及びGC-MSにおける分析条件の検討、GC-MSの分析データの収集・解析を行い、データベース化することで異臭苦情事案に迅速正確に対応可能な検査体制を構築した。

加えて、異臭苦情事案への対応をきっかけとし、大豆ミートに残存するヘキサンの分析における抽出条件の検討を実施した。大豆ミートとは、大豆油製造時の副産物である脱脂大豆を肉のような食感になるよう加工した食品を指す。大豆油の中にはヘキサンを用いた抽出法で製造されるものがあり、製造用剤であるヘキサンは、食品添加物の使用基準¹⁾により「最終食品の完成前に除去する」ことが規定されている。一方、「第2版 食品中の食品添加物分析法」²⁾（以下、通知法）によるヘキサンの分析法は、植物油脂中のヘキサンを対象としており、その他の食品について言及していない。本資料では、異臭苦情事案における検査体制の整備内容と、大豆ミートに残存するヘキサンを対象とした抽出条件の検討結果について報告する。

2 異臭検査プロセスの構築

2.1 異臭事案関連情報の収集及びデータベース化

過去に発生した食品異臭事案における主訴及び主訴から推定される異臭原因物質に関する情報を整理し、データベース化を行った。更に、当所が保有する異臭苦情原因物質について、分子量、構造式、沸点、臭気閾値³⁾、臭いの表現等の属性情報を整理し、これまでに72物質（オフフレーバーキットに含まれる物質については一部重複）をリスト化することにより、異臭事案発生時に当該データベースを検索し、迅速に照合、確認可能な体制を確立した（図1）。

物質名	分子量	構造式	沸点	臭気閾値	臭いの表現
ヘキサン	86.17	<chem>CCCCC</chem>	68.7	0.001	石油臭
ヘプタン	98.19	<chem>CCCCCC</chem>	98.4	0.001	石油臭
オクタン	114.23	<chem>CCCCCCC</chem>	125.6	0.001	石油臭
ノナン	128.17	<chem>CCCCCCCC</chem>	151.0	0.001	石油臭
デカン	142.28	<chem>CCCCCCCCC</chem>	174.1	0.001	石油臭

図1 データベース（一部）

2.2 異臭苦情原因物質の同定可否の確認

2.2.1 装置、試料

装置：GC-MS QP2010（株式会社島津製作所）

試料：食品異臭苦情事案の原因物質として報告の多い

化学物質 58 物質

・グアヤコール・ジメチルジスルフィド・ナフタレン・2-MIB・トリメチルアミン・2,4-デカジエナール・トルエン・2,4,6-トリクロロアニソール・n-吉草酸・2,6-ジクロロフェノール・4-メチル3-ヘキセン酸・メチルエチルケトン・2,4,6-トリブロモアニソール・2-トリデカノン・1-オクテン3-オン・n-ヘキサナール・n-ヘプタナール・n-酪酸・酢酸エチル・プロピレングリコール (オフフレーバーキット1, 2, 林純薬工業株式会社)

・ノナン・デカン・ジェオスミン・フェノール・ヘキサナール・オクタナール・ヘプタナール・ベンズアルデヒド・アセトフェノン・2,6-ジクロロフェノール・n-酪酸・イソ吉草酸・2-MIB・ヘキサン・グアヤコール・ジフェニル・p-ジクロロベンゼン・メタノール・エタノール・酢酸エチル・イソプロパノール (富士フィルム和光純薬株式会社)

・ジメチルトリスルフィド・2,4,6-トリクロロアニソール・2,4,6-トリブロモアニソール・イソブタノール・2-トリデカノン・パラクレゾール・トリメチルベンゼン・ガラクソリド・ジアセチル・2,4-デカジエナール・β-イオノン・2-エチルヘキサノール・2,6-ジブロモフェノール・クレゾール・2,4-ジクロロフェノール・2,4,6-トリクロロフェノール・バニリン・トリメチルアミン, メチルエチルケトン・1-オクテン-3-オン・5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒド・サリチル酸メチル・2,4-ジブロモフェノール・インドール・スカトール・エチルベンゼン・1,2,4-トリメチルベンゼン・プロピオン酸 (東京化成工業株式会社)

・ナフタレン・アセトン (関東化学株式会社)

・ジメチルジスルフィド (ナカライテスク株式会社)

2.2.2 方法

各物質をメタノールを用いて $10 \mu\text{g/mL}$ に調製し (オフフレーバーキットを除く, 一部 $\sim 100 \mu\text{g/mL}$), 試料液とした。天城らの報告⁴⁾を参考に, これまで当所で異臭分析に使用してきた分析条件の一部を変更し, GC-MS 分析条件を決定した。

2.2.3 GC-MS 分析条件

表1のとおり

2.2.4 結果

表1の条件により, 41物質の同定が可能であった。検出可能な物質について当所の分析条件における分析結果をGC-MSに登録し, 異臭ライブラリを作成した。

2.3 異臭検査プロセスの構築

事案探知から官能検査^{5, 6)}, 分析, 判定までの異臭苦情対応フローを作成し, 検査プロセスを構築した (図

2)。

表1 GC-MS 分析条件 (異臭苦情対応)

前処理法	HS (必要に応じてSPME)
カラム	DB-5MS-DG (膜厚 $0.25 \mu\text{m}$ 、長さ 30.0m 、内径 0.25mm)
カラム温度	40°C (3min) $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ -300°C (2min)
キャリアガス	He ($0.94\text{mL}/\text{min}$)
注入方式	スプリット
注入量	$500 \mu\text{L}$
注入口温度	200°C
イオン化法	EI
イオン源温度	250°C
測定モード	SCAN

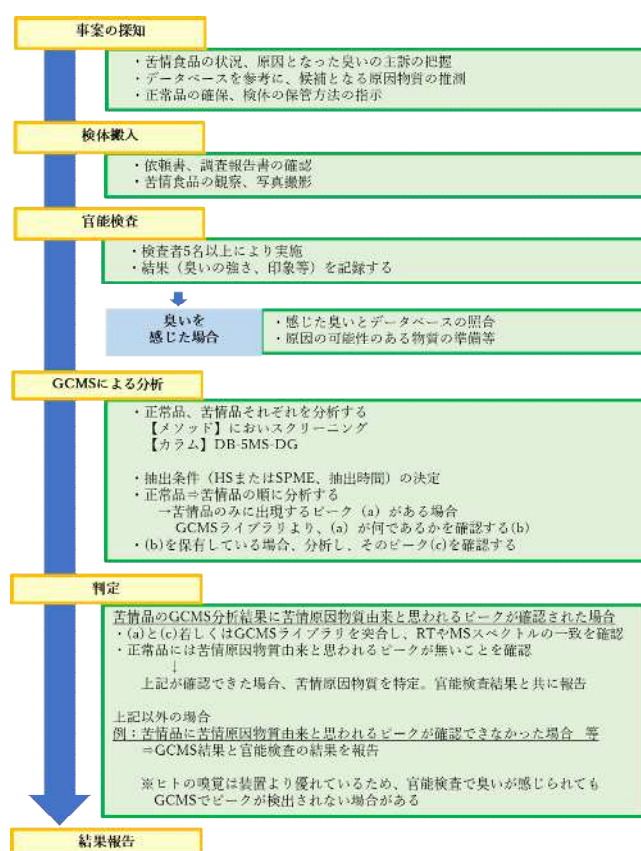


図2 異臭検査フロー

3 大豆ミート中のヘキサン抽出条件の検討

食品に吸着した異臭苦情原因物質がヘッドスペース (以下, HS) に移行する割合は, 食品の種類や抽出条件により異なり, 一定の割合において平衡状態となる。そこで, 試料の表面積, 静置時間, 試料量, 加温抽出時間, また, 抽出時に水を添加して実施したヘキサン分析に関する資料⁷⁾, 及び塩 (食塩, 硫酸ナトリウム) の添加やpHの変化が香気成分の揮発状態に影響を与えることについて書かれた報告^{8, 9)}を参考に, これらの条件を変更した際の抽出効率を確認した。

3.1 装置, 試料

装置: GC-MS QP-2010 (島津製作所)

オートインジェクタ AOC-5000 (COMBI-PAL)

試料: 市販大豆ミート

- ・苦情時に当所で実施した検査においてヘキサンが検出された大豆ミート (以下, ヘキサン含有大豆ミート)
- ・ヘキサンを含まないことを確認した大豆ミート (以下, ヘキサン非含有大豆ミート)

3.2 分析条件

3.2.1 前処理法, カラムの検討

前処理法の検討として, ヘキサンをエタノールに溶解し $10 \mu\text{g/mL}$ に調製した試料を 60°C 30 分加温したものを, HS 法と, 固相マイクロ抽出 (以下, SPME) 法で測定し, クロマトグラムを比較したところ, 確認イオンである 57m/z において, SPME 法ではヘキサンとエタノールのピークの一部が重なっていたのに対し, HS 法ではヘキサン単独のピークが得られた. 次に, カラムを決定するため, DB-5MS, DB-1MS, DB-WAX-UI の 3 種類のカラムで測定した際のクロマトグラムを比較し, 保持時間, ピーク形状から, DB-1MS が最適と判断した (図 3). これらの結果を基に, 以降の検討は, 前処理法は HS 法, カラムは DB-1MS を用いることとした.

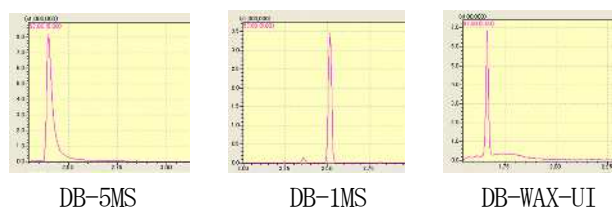


図 3 カラムによるピーク形状の違い

3.2.2 GC-MS 分析条件

表 2 のとおり.

表 2 GC-MS 分析条件 (大豆ミートヘキサン)

前処理法	HS
カラム	DB-1MS (膜厚 $0.25 \mu\text{m}$ 、長さ 30.0m 、内径 0.25mm)
カラム温度	35°C (3.5min) $-25^\circ\text{C}/\text{min}$ -250°C (3min)
キャリアガス	He ($0.95\text{mL}/\text{min}$)
注入方式	スプリット
注入量	$500 \mu\text{L}$
注入口温度	250°C
イオン化法	EI
イオン源温度	200°C
モード	SCAN
確認イオン	57m/z

3.3 抽出条件の検討

3.3.1 方法

項目ごとに, 通知法から変更した条件で抽出した場合のヘキサンピーク面積と, 各項目で通知法が定める条件で抽出した場合のヘキサンピーク面積を比較した. 全ての検討は $n=3$ で実施し, 条件を変更した際のヘキサンピーク面積の平均値が, 各項目で通知法が定める条件で分析した際の平均値から 10% 以上大きくなった場合に抽出効率が上がったと判断した. また, 有効と判断された条件は次の検討に採用した上で, 新たな項目の検討を実施した. 尚, 今回の検討において通知法と異なる装置を使用したものは, 以下※に示す.

《通知法》 植物油脂中のヘキサン試験法

○標準溶液の調製

n -ヘキサン 0.5g を精密に量り, エタノールを加えて正確に 50mL とする. その 1mL を正確にとり, エタノールを加えて正確に 25mL とし, 標準原液とする. これを 1mL ずつ正確にとり, エタノールで正確に 10mL 及び 20mL とし, STD. 20, STD. 40 とする (それぞれのスタンダード 1mL は, n -ヘキサン $40, 20 \mu\text{g}$ を含む). STD. 20 を正確に 2mL ずつ採り, エタノールを加えて $5, 10, 20\text{mL}$ とし, それぞれ STD. 8, STD. 4, STD. 2 とする (それぞれのスタンダード 1mL は, n -ヘキサン $8, 4 \mu\text{g}$ 及び $2 \mu\text{g}$ を含む).

○試料気相の調製

HS 用バイアル 7 本に試料 1g ずつを量り, 試料を採取したバイアルのうち 2 本にはエタノール $250 \mu\text{L}$ を, 残りのバイアルには STD. 2~STD. 40 を各 $250 \mu\text{L}$ 添加する. 撹拌子で撹拌しながら 5 分静置後, 50°C の水浴中にて 10 分加温する. (※水浴に代わりオートインジェクタに付属するアジテータの加温機能を使用)

○検量線の作成

HS を水素炎イオン化型検出器付きガスクロマトグラフ (FID-GC) にて測定する. STD. 0, 2, 4, 8, 20, 40 について同様に測定し (STD. 0 のみ 2 本), 標準添加法にて作製した検量線の x 切片の値 (絶対値) を定量値とする. (※FID-GC に代わり GC-MS を使用)

3.3.2 検討項目

試料の表面積

バイアル内の試料に STD. 0, STD. 40 をそれぞれ $250 \mu\text{L}$ 添加後, そのまま静置した場合と, バイアルを軽くたたいて試料をほぐし, 試料表面がより気相に触れる状態にした場合のピーク面積を通知法の場合と比較した.

スタンダード添加後の静置時間

通知法では, スタンダード添加後 5 分間撹拌子で撹

拌すると記されているが、大豆ミートは水分量が少なく攪拌子による攪拌が出来ないため、試料を入れたバイアルに STD. 40 を添加後、静置時間を 10 分間にした場合と、通知法に従い 5 分間とした場合のヘキサンピーク面積を比較した。

試料量

試料とスタンダード (STD. 0, 40) の量を、通知法の半量である 0.5 g, 125 μ L に変更して抽出した場合のヘキサンピーク面積を、通知法の場合と比較した。

水の添加

試料 0.5 g に STD. 0, 125 μ L を加えたものに、試料量の 10~100% に相当する蒸留水をそれぞれ添加した場合と、通知法のとおり蒸留水を添加しない場合の面積を比較した。

水の pH

添加する蒸留水の pH を、pH2 (リン酸溶液), pH9 (水酸化ナトリウム溶液) とした場合と、pH7 (蒸留水) の場合を比較した。

塩の添加

試料 0.5 g に対し、NaCl, Na₂SO₄ をそれぞれ 10%, 20%, 40% 添加し、塩を添加しない場合と比較した。加えた塩が十分に溶解せず残っている試料が確認されたため、添加量 20% の条件において静置時間を 20 分に延長した場合と、飽和 NaCl 水, 飽和 Na₂SO₄ 水をそれぞれ試料の 20% 添加した場合を併せて確認した。

抽出温度

抽出時の温度をヘキサンの沸点 (69°C) に近い 70°C とした場合のヘキサンピーク面積を、通知法 (50°C) の場合と比較した。

加温抽出時間

加温抽出時間を 30 分, 60 分, 90 分に延長し、通知法が定める 10 分の場合と比較した。

3.3.3 結果

「試料の表面積」, 「水の pH」, 「塩の添加」, 「抽出温度」の検討では、通知法に比べ 10% 以上のヘキサンピーク面積の増加は認められず、条件の変更により抽出効率を上げる効果は確認できなかった。

一方、「スタンダード添加後の静置時間の延長」, 「試料量の半減」, 「水の添加」, 「加温抽出時間の延長」においては抽出効率を上げる効果が確認された (表 3)。水の添加では、添加量に関わらずヘキサンピーク面積が増大し、試料量の 20% (100 μ L) を添加した場合に最も抽出効率が高くなった。加温抽出時間の延長においては、ヘキサンピーク面積が 1.2~1.4 倍程度に増大した。今回は作業効率を考慮し、30 分を採用した。抽出の効率化に有効であったこれらの条件を合わせた抽出条件を「変法」とした (図 4)。

表 3 抽出の効率化が確認された条件

静置時間を延長した場合と通知法とを比較					
静置時間	静置時間		ヘキサンピーク 面積平均	5 分に対する 面積比率	
	5分		1060439	1	
	10分		1151071	1.1	
試料、スタンダードを通知法と通知法の半量にした場合を比較					
試料量	濃度	試料	ヘキサン ピーク 面積平均	1.0g あたり 換算値	1gに対する 面積比率
	STD.0	1.0 g	172756	172756	1
		0.5 g	214822	429644	2.5
	STD.40	1.0 g	1151071	1151071	1
		0.5 g	806243	1612486	1.4
試料(0.5 g)+STD.0(125 μL)+下記量の水を添加					
水の添加	水の添加		ヘキサンピーク 面積平均		水を添加しない場 合に対する面積比 率
	なし（通知法）		214822		1
	50 μL（試料の10％）		1766386		8.22
	100 μL（試料の20％）		2844754		13.24
	250 μL（試料の50％）		2255031		10.50
	500 μL（試料と同量）		1122353		5.22
（検体0.5 g+STD.0:125 μL+水100 μL）→静置→加温→測定					
加温抽出 時間	濃度	加温時間	ヘキサンピーク 面積平均		10分（通知法） に対する面積比率
	STD.0	10分	2753943		1
		30分	3388640		1.23
		60分	3371704		1.22
		90分	3974350		1.44
	STD.40	10分	4634736		1.00
		30分	5441579		1.18
		60分	5646602		1.23
90分		5662940		1.23	

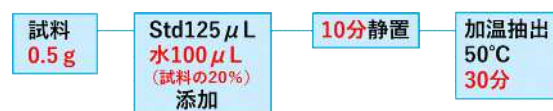


図 4 変法抽出条件

3.4 変法による定量値の正確性の確認

3.4.1 定量値の比較

ヘキサ含有大豆ミートを変法と通知法で抽出し、定量結果を比較したところ、変法は 19.4 μ g/mL, 通知法は 2.0 μ g/mL であり、結果に約 10 倍の差が認められた。変法の検量線は、通知法の検量線を y 軸方向に平行移動したように位置し、これにより定量値に差が生じていた (図 5)。

一方で、変法の結果は通知法の結果と乖離していたものの、抽出効率の良い条件を合わせたものであり、実際の試料中のヘキサ濃度により近い可能性が考えられた。また、大豆ミート中に元々残存していたヘキサ (以下、残存ヘキサ) と、測定の際にスタンダードとして添加されたヘキサ (以下、標準添加ヘキサ) では、大豆ミートとの結合の強さや大豆ミートか

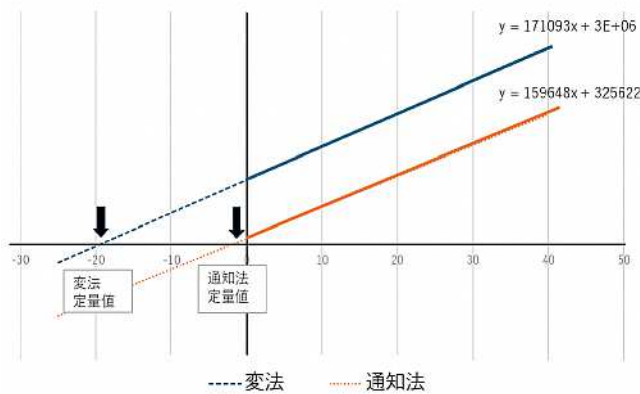


図5 定量値の比較

らの揮発のしやすさが大きく異なる¹⁰⁾ことから、抽出条件の変更が抽出効率の変化に反映される程度が、残存ヘキサンと標準添加ヘキサンで異なることも十分考えられた。これを確認するため、変法と通知法でそれぞれ定量及び添加回収を行い、結果のばらつき、回収率を比較した。

3.4.2 ヘキサン含有大豆ミートによる確認

3.4.2.1 方法

変法と通知法による定量、添加回収（ヘキサンを4 $\mu\text{g/g}$ になるよう添加）をそれぞれ5回実施し、定量値、回収率を比較した。

3.4.2.2 結果

変法で測定した定量値の平均値が19.5 $\mu\text{g/g}$ であったのに対し、通知法で測定した場合は1.7 $\mu\text{g/g}$ であり、変法による定量値は通知法の11.5倍となった。回収率は、変法108.8%、通知法85.5%であった（表4）。

3.5.3 ヘキサン非含有大豆ミートによる確認

変法による抽出の効率化が、残存ヘキサンに対してのみ作用していることを確認するため、ヘキサン非含有大豆ミートにおける、変法と通知法の添加回収の結果を比較した。

3.4.3.1 方法

ヘキサン非含有大豆ミートに4 $\mu\text{g/g}$ になるようヘキサンを添加した試料を、変法と通知法で抽出し、標準添加法による定量により回収率を比較した（ $n=3$ ）。

3.4.3.2 結果

変法による定量値の平均値は3.7 $\mu\text{g/g}$ 通知法による定量値の平均値は3.9 $\mu\text{g/g}$ であり、ヘキサン非含有大豆ミートでは、変法と通知法の結果は同程度であった（表4）。

3.5 考察

表7のヘキサン含有大豆ミートの結果を検量線に示す（図6、7）。定量においては、変法と通知法で、抽出効率の良さを反映する検量線の傾きに違いが見られなかった。添加回収においては、変法の傾きが通知法に比べ僅かに大きくなっていったものの、その差から変法の抽出効率が通知法に比べ高いと判断するのは困難であった。一方で、定量、添加回収共に残存ヘキサンのみが存在するSTD.0において、変法のヘキサンピーク面積が通知法に比べ大きな値を示したことから、残存ヘキサンに対して、変法による抽出の効率化が作用していることが示唆された。

ヘキサン非含有大豆ミートを用いた添加回収、すなわち添加ヘキサンしか存在しない試料においては、変法と通知法の結果に差が見られなかった（図8）。このことにより、変法による効果は残存ヘキサンに対し有効であることが裏付けられ、ヘキサン含有大豆ミートにおいて変法の定量値が通知法に比べ高くなったのも、このためと考えられた。

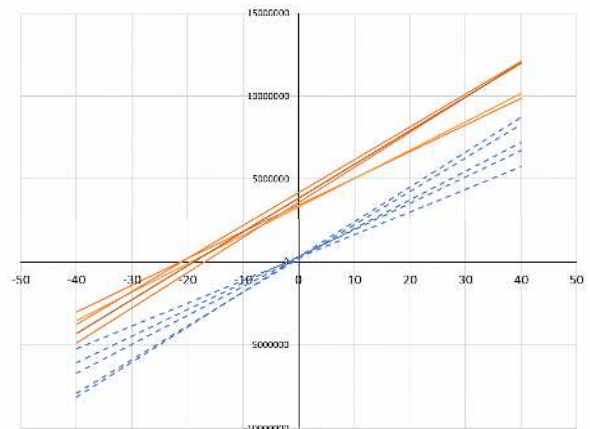
図6 ヘキサン含有大豆ミートにおける定量
(直線：変法・点線：通知法)

表4 ヘキサン含有大豆ミート・非含有大豆ミート 定量・添加回収結果

検体	抽出方法	定量/添加回収	定量①	定量②	定量③	定量④	定量⑤	平均 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)
ヘキサン 含有 大豆ミート	変法	定量	19.4	21.0	17.0	21.4	18.9	19.5	-
		添加回収(4 $\mu\text{g/g}$)	24.5	26.0	23.1	23.2	22.7	23.9	108.8
	通知法	定量	2.0	1.5	1.9	1.5	1.4	1.7	-
		添加回収(4 $\mu\text{g/g}$)	5.6	4.6	4.9	5.6	4.7	5.1	85.5
ヘキサン 非含有 大豆ミート	変法	添加回収(4 $\mu\text{g/g}$)	3.8	3.4	3.8	-	-	3.7	92.5
	通知法		3.9	4.0	3.7	-	-	3.9	97.5

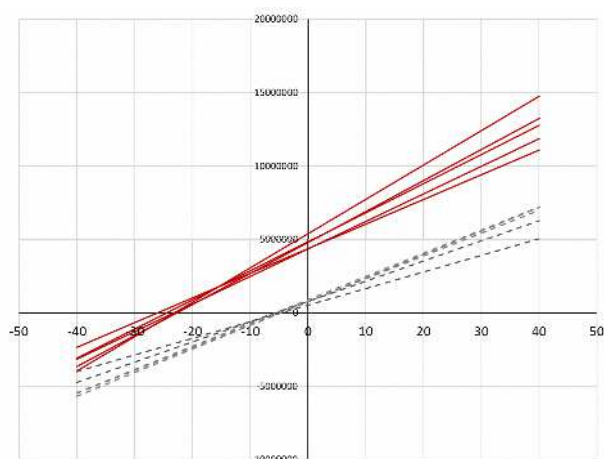


図7 ヘキサン含有大豆ミートにおける添加回収
(直線：変法・点線：通知法)

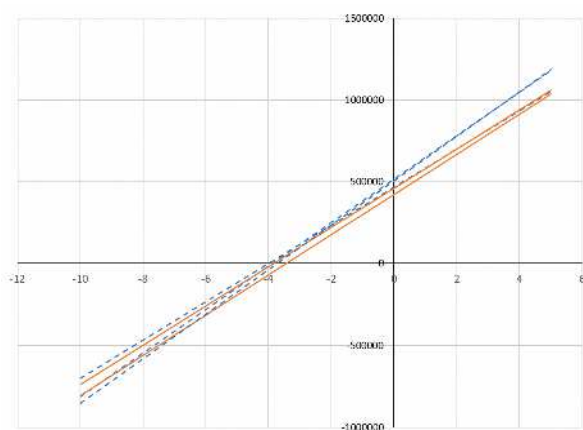


図8 ヘキサン非含有大豆ミートにおける添加回収
(直線：変法、点線：通知法)

4 まとめ

異臭検査体制の整備を目的とし、異臭苦情の原因になり得る代表的な物質について、過去の異臭苦情事案の情報を纏めると共に、当所における同定の可否を確認し、データベースを作成した。また、異臭検査は異物検査に比べ依頼件数が少なく、日常の業務の中で検査手技を伝達していくことが困難な現状を踏まえ、異臭事案発生時の対応フロー、官能検査結果記録用紙の作成、機器の操作マニュアル等の整備を行い、異臭原因物質の検査に対応可能な体制を整えた。ジェオスミン、2-MIB、4-メチル-3-ヘキセン酸、1-オクテン-3-オン、5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒド等、今回当所の分析条件で検出が困難であった物質については、今後SPME法やカラム条件等の検討を行う予定である。

検査体制の整備を進める中で、大豆ミートの異臭苦情事案への対応を経験した。通知法が植物油を対象とした検査法であったことから、固形食品である大豆ミートのヘキサン抽出法について検討を実施したところ、

試料量を通知法の半量にすること、試料に水を添加すること、スタンダード添加後の静置時間及び加温抽出時間を延長することが効果的であることが明らかとなった。抽出効率を上げるのに効果的な条件を合わせたものを変法と位置づけ、大豆ミート中のヘキサンの定量及び添加回収を、変法と通知法で実施した結果、変法は「測定時にスタンダードとして添加されたヘキサン」に対する抽出効率が通知法と変わらない一方で、「製造時に使用され大豆ミートに残存していたヘキサン」に対し抽出効率を上げる効果があることが明らかとなった。

異臭苦情事案の検査の際には、変法は人の嗅覚で探知しない濃度の食品中ヘキサンまで抽出する可能性があるため、検査目的により通知法との使い分けが必要であるが、食品添加物使用基準の判定において固形食品である大豆ミートに残存するヘキサンを測定する場合には、通知法に比べ正確な定量が可能である。

今後も、様々な事案での異臭分析を求められる可能性がある。分析法が定められていない物質の分析が必要となる場合もあることから、引き続き、前処理法・分析条件等について検討し、幅広く対応可能な体制を整備していきたい。

文 献

- 1) 厚生省告示「食品、添加物等の規格基準」S34.12.28 第370号
- 2) 社団法人日本食品衛生協会、第2版食品中の食品添加物分析法 2000
- 3) 永田好男、嗅覚閾値、日本環境センター所報、1990 他
- 4) 天城裕子、渋谷恵太、山下亮、GC-MSによるオフフレーバー分析、新潟県工業技術研究報告書 No.48, 2018
- 5) 川崎通昭、堀内哲嗣郎、嗅覚とにおい物質、におい・かおり環境協会 p 104, 2011
- 6) 高谷智之、加藤宏明、氏田勝三、食品の苦情対応における異臭検査について、J Japan Association on Odor Environment Vol.45 No.5, 2014
- 7) 日本電子株式会社、HS-GC-MS 法による粒状大豆蛋白中の残留ヘキサン分析
- 8) 林貴寛、岩本安未、石村勝之、末田義博、固相マイクロ抽出 (SPME) 法を用いた異臭物質のスクリーニング法の検討、広島市衛研年報 29, 91-94, 2010
- 9) Ali Ammari, Karin Schroen, Flavor Retention and Release from Beverages: A Kinetic and Thermodynamic Perspective, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66, 9869-9881

- 10) H. P. Dupuy, S.P. Fore, Determination of Residual Solvent in oilseed Meals and Flours II. Volatilization Procedure, AOCS Meeting, Minneapolis, 1969

Establishing an Off-Flavor Inspection Process in Food
and Analyzing Residual Hexane in Soy Meat

Noriko HAYASHI, Yuta URAMOTO, Rika ENDO

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan*