

Technical Report

シリカモノリス捕集剤MonoTrapとGC-MSを用いたシークワシャー加工品香気成分の簡易分析

Simplified analysis of flavor in Shiikuwasha products using monolithic silica adsorbents "MonoTrap" and GC-MS

広瀬 直人¹、前田 剛希¹、宮城 一菜²、和田 浩二²、太田 英明³

Abstract:

シリカモノリス捕集剤MonoTrapと多機能注入口OPTIC-4を組み合わせ、簡易な手順によって柑橘加工品の香気成分濃縮とGC-MS分析を行った。MonoTrapを用いたヘッドスペース法でシークワシャー抽出酢の香気成分を捕集してGC-MSで分析したところ、シークワシャー由来の香気成分が検出された。香気成分を捕集したMonoTrapは冷凍保存が可能であり、分析の効率化に寄与すると考えられた。

Keywords: シークワシャー、香気成分、MonoTrap、OPTIC-4、GC-MS

1. はじめに

シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) は、沖縄に自生している果実重が20～50g程度の小型在来柑橘で、特有の強い香りと酸味が特徴である。多様な機能が報告されているノビレチンなどポリメトキシフラボン類を含有することが明らかになり、沖縄ブームの追い風も相まって生産量は急増している。シークワシャー果実の主な用途は果汁原料であるが、搾汁効率は50%程度であるため、大量に排出される加工副産物(搾汁残渣)の処理が問題となりつつある。筆者らは搾汁残渣の用途開発に取り組み、これまでにシークワシャーの香りを生かしたヨーグルトや抽出酢を開発している。

香気成分の分析方法には、溶媒抽出法や蒸留抽出法、固相抽出法などがあるが、いずれも煩雑な抽出操作が必要である。ヘッドスペースガス分析法は、ヒトが実際に嗅ぐのに最も近い条件で分析できることや、操作が簡便であることから簡易分析に適した方法であるが、高感度で分析するためには捕集剤による濃縮が必要である。本レポートでは、シリカモノリス捕集剤MonoTrapを用いてシークワシャー抽出酢の香気成分をヘッドスペース法で捕集し、GC-MSで分析した結果を報告する。

捕集剤を用いた加熱脱着分析では、クロマトグラムのピークが広がらないように、カラムの入り口で導入された試料を一旦冷却捕集し、急速加熱脱着させるクライオトラップが用いられる。しかし、クライオトラップの冷却には液体窒素を用いるため、液体窒素を随時利用できる環境下でない場合は、捕集した試料を保存し、まとめて分析できることが必要となる。そこで、香気成分を捕集したMonoTrapの冷凍保存性についても、併せて検討した。

2. 方法

2-1. 測定試料の調製

沖縄総合農産加工株式会社東工場(沖縄県東村)で搾汁されたシークワシャーの搾汁残渣より種子とじょうのう膜を除去し、搾汁果皮を得た。搾汁果皮に醸造酢(ホワイトビネガー、ハインツ)を加えて粉碎処理を行い、遠心分離とろ過で不溶性成分を除去したものを抽出酢とした。

2-2. 分析条件

香気成分の捕集には、PDMS (Polydimethyl Siloxane) 相をコーティング・エンドキャップ処理し、吸着剤にグラファイトカーボンを含有させた加熱脱着用シリカモノリス捕集剤(MonoTrap RGPS TD、ジーエルサイエンス)を用いた。

果皮の分析では0.10gの粉碎試料を40mL容のガラスバイアルに入れ、内部標準として0.1%のn-Hexanol(特級、和光純薬)を8μL噴霧した。抽出酢の分析では1.0mLの試料を入れ、内部標準として0.1%のCyclohexanol(特級、関東化学)を20μL添加した。MTホルダー(ジーエルサイエンス)にMonoTrapをセットして(Fig. 1)バイアルを密封し(Fig. 2)、50°Cで1時間保温して香気成分を捕集した。香気成分を捕集したMonoTrapは加熱脱着装置専用ガラスチューブ(MonoTrap TD Liner for OPTIC/LINEX、ジーエルサイエンス)に入れてCDCライナーキャップ(ジーエルサイエンス)を装着し、分析時まで15mL容のサンプルチューブに入れて-20°Cで冷凍保存した(Fig. 3)。

連続自動分析には、LINEXとCDC Stationを備えた多機能オートサンブラAOC-5000 Plus(島津製作所)を用いた。捕集剤に吸着した香気成分は、多機能注入口OPTIC-4(島津製作所)を用いた熱脱離モードによりGC-MSへ導入した。GC-MS分析で得られたクロマトグラムより質量スペクトルをNIST 11マススペクトルライブラリおよびFFNSC 2香料ライブラリ(いずれも島津製作所)により類似度90%以上で検索し、香気成分を同定した。GC-MS分析条件をTable 1に示す。

1 沖縄県農業研究センター
2 琉球大学
3 中村学園大学

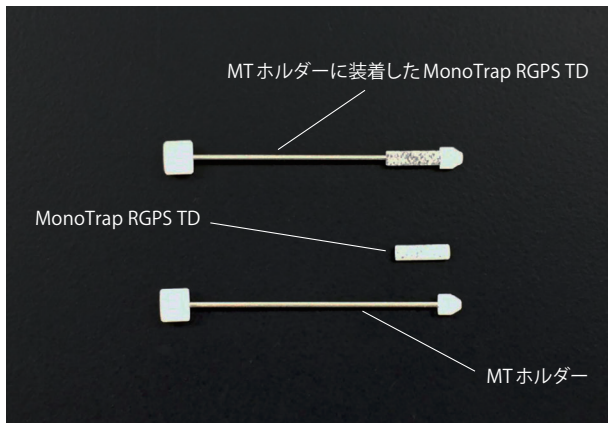


Fig. 1 MTホルダーに装着したMonoTrap



Fig. 2 捕集用バイアルにセットしたMTホルダー
MTホルダーにMonoTrapをセットし、試料と接触させずに香氣成分を捕集した。

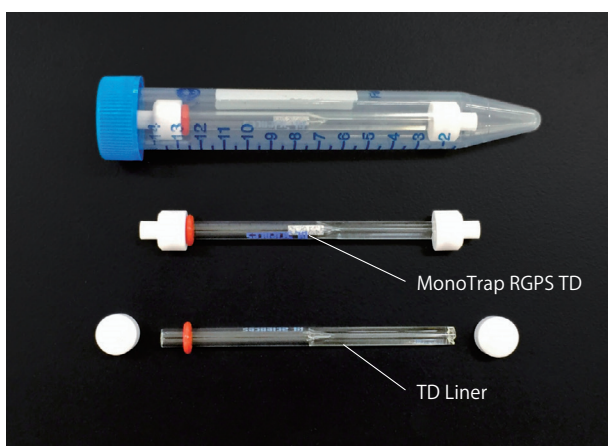


Fig. 3 MonoTrapの冷凍保存
香氣成分を捕集したMonoTrapをTD Linerにセットしてライナーキャップを装着し、サンプルチューブに入れて -20°C で冷凍保存した。

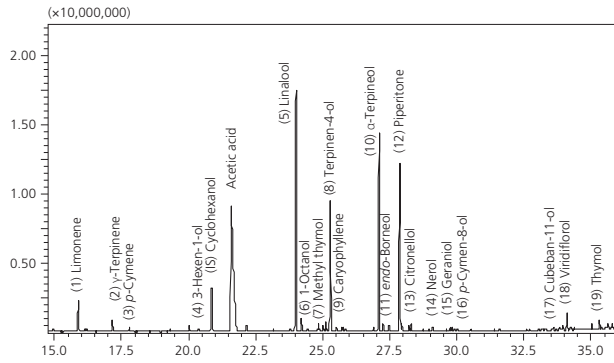
Table 1 GC-MS分析条件

装置構成	
多機能注入口	: OPTIC-4 (Cryotrap付)
オートインジェクタ	: AOC-5000 Plus LINEX+CDC Station
GC-MS	: GCMS-QP2010 Ultra
ソフトウェア	: GCMSsolution Ver. 4.20 Cycle Composer Ver. 1.6.0 Evolution Workstation Ver. 4.6.3
ライブラリ	: NIST 11 マススペクトルライブラリ FFNSC 2 香料ライブラリ
GC	
カラム	: InertCap Pure WAX ProG 2M, 0.25 mm \times 60 m, df = 0.25 μm (ジーエルサイエンス)
加熱脱着温度	: $40^{\circ}\text{C} - (6.0^{\circ}\text{C}/\text{sec}) - 200^{\circ}\text{C}$ (300 sec)
注入モード	: スプリット (果皮分析では1:50、抽出酢分析では1:20)
クライオフォーカス温度	: -150°C (400 sec) $- (5.0^{\circ}\text{C}/\text{sec}) - 250^{\circ}\text{C}$
キャリアガス	: ヘリウム
カラム流量	: 1.0 mL/min
カラムオープン温度	: 40°C (5 min) $- (6.0^{\circ}\text{C}/\text{min}) - 250^{\circ}\text{C}$
MS	
イオン源温度	: 200°C
インターフェース温度	: 250°C
イオン化法	: EI
イオン化電圧	: 70 eV
測定モード	: スキャン
イベント時間	: 0.30 sec
スキャン速度	: 2000
スキャン質量範囲	: m/z 30-600

3. 分析結果

3-1. シークワシャー抽出酢中の香氣成分

シークワシャー抽出酢をGC-MS分析した結果、ライブラリ検索によりシークワシャー由来の香氣成分19種を同定できた (Fig. 4)。シークワシャーの香氣成分は他の柑橘類と同様に、炭化水素化合物ではLimonene (43 ~ 45%) が最も大きな組成比を示すが、スイートオレンジ (86%) やユズ (63 ~ 68%) に比べると低いこと、 γ -Terpinene (28 ~ 29%) や *p*-Cymene (8 ~ 11%) は他の柑橘類よりも高いことが報告されている。また、含酸素化合物ではLinaloolやTerpinen-4-olなどのモノテルペンアルコール類を多く含有することも特徴である。シークワシャー抽出酢ではLimoneneや γ -Terpinene、*p*-Cymeneなどのモノテルペン類は文献値よりも大幅に低くなったが、 γ -Terpineneの相対面積値はLimoneneの63%であり、組成比は文献値とほぼ一致した。果皮の香氣成分ではモノテルペン類が主要なピークとして現れることから (Fig. 5)、酢を溶媒とした水系の抽出では、脂溶性であるモノテルペン類の抽出効率が低いことが推察された。一方、LinaloolやTerpinen-4-ol、 α -Terpineolなどのモノテルペンアルコール類は、効率良く抽出されていることが示された。



No.	Compounds	R.T.	相対面積値
1	Limone	15.91	24.35
2	γ -Terpinene	17.17	15.39
3	<i>p</i> -Cymene	17.80	8.05
4	3-Hexen-1-ol	20.38	6.12
5	Linalool	24.01	206.69
6	1-Octanol	24.21	12.31
7	Methyl thymol	25.13	18.79
8	Terpinen-4-ol	25.29	140.28
9	Caryophyllene	25.51	3.13
10	α -Terpineol	27.11	193.84
11	<i>endo</i> -Borneol	27.24	18.20
12	Piperitone	27.88	260.01
13	Citronellol	28.29	6.53
14	Nerol	28.96	2.99
15	Geraniol	29.76	6.09
16	<i>p</i> -Cymen-8-ol	29.82	9.83
17	Cubeban-11-ol	33.61	1.79
18	Viridiflorol	34.11	7.79
19	Thymol	35.32	18.28

※内部標準物質Cyclohexanolに対する相対面積値(%)で表示した。

Fig. 4 シークワシャー抽出液のTIC

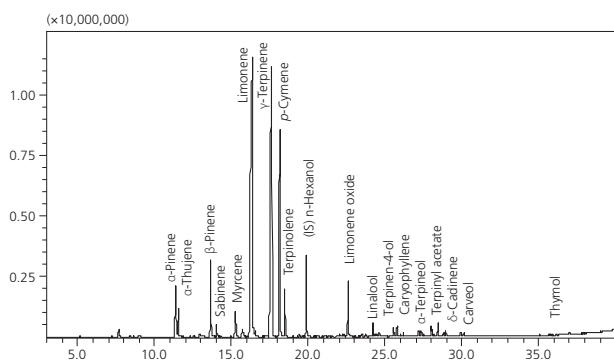


Fig. 5 シークワシャー果皮のTIC

3-2. 香気成分を捕集した捕集剤の冷凍保存

香気成分を捕集したMonoTrapを捕集後直ちにGC-MS分析した結果と、1日~4週間冷凍保存後に分析した結果を比較した。Fig. 6に示すように、TICには保存による差異は認められなかった。また、検出された19成分について相対面積値を比較したところ、各成分の変動係数はCV=0.01~0.11と小さく (Table 2)、冷凍保存の有無や保存期間による分析値に有意な差は認められなかった (Tukey-Kramerの検定による)。

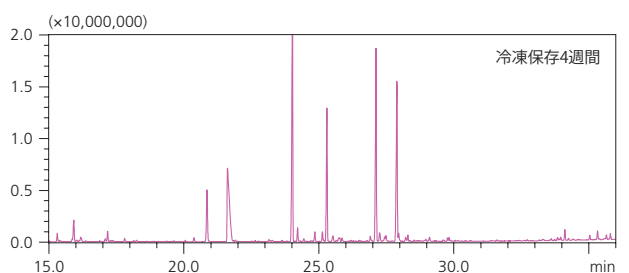
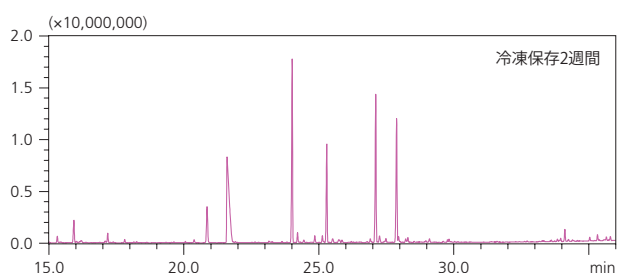
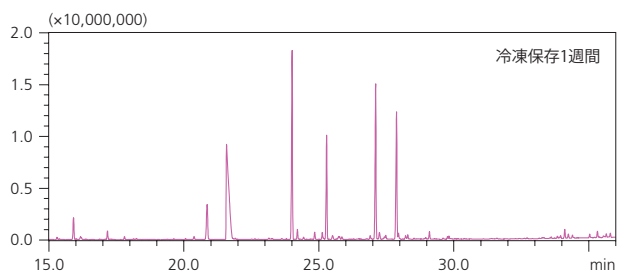
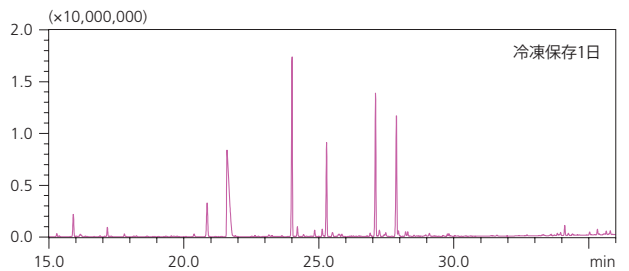
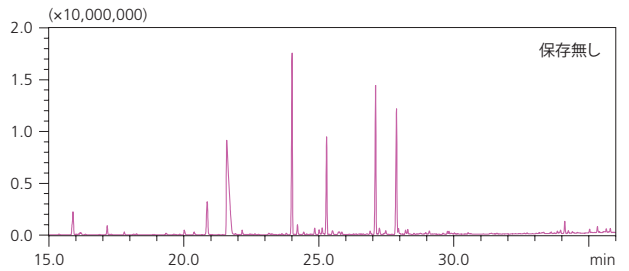


Fig. 6 冷凍保存したMonoTrap RGPS TDのGC-MS分析によるTIC比較

Table 2 香気成分を捕集したMonoTrap RGPS TDの冷凍保存による影響

No.	Compounds	R.T.	冷凍保存無し	冷凍保存した試料				平均値	標準偏差	変動係数
				1日間	1週間	2週間	4週間			
1	Limonene	15.91	24.35	23.63	22.24	23.10	21.01	22.87	1.15	0.05
2	γ -Terpinene	17.17	15.39	14.93	12.56	15.00	14.73	14.52	1.00	0.07
3	<i>p</i> -Cymene	17.80	8.05	7.61	8.65	8.65	7.74	8.14	0.44	0.05
4	3-Hexen-1-ol	20.38	6.12	5.89	6.10	5.81	6.07	6.00	0.12	0.02
5	Linalool	24.01	206.69	213.90	208.99	208.89	220.80	211.85	5.06	0.02
6	1-Octanol	24.21	12.31	12.34	11.08	11.47	11.91	11.82	0.49	0.04
7	Methyl thymol	25.13	18.79	22.83	18.40	20.97	22.67	20.73	1.87	0.09
8	Terpinen-4-ol	25.29	140.28	143.59	143.34	141.76	147.73	143.34	2.50	0.02
9	Caryophyllene	25.51	3.13	3.51	2.87	3.36	3.60	3.29	0.26	0.08
10	α -Terpineol	27.11	193.84	197.91	196.60	191.63	201.83	196.36	3.50	0.02
11	<i>endo</i> -Borneol	27.24	18.20	18.35	18.08	17.87	18.67	18.23	0.27	0.01
12	Piperitone	27.88	260.01	266.20	261.30	252.87	259.59	259.99	4.27	0.02
13	Citronellol	28.29	6.53	6.48	6.07	6.14	6.16	6.28	0.19	0.03
14	Nerol	28.96	2.99	2.66	2.97	2.79	2.88	2.86	0.12	0.04
15	Geraniol	29.76	6.09	5.58	5.69	5.59	5.57	5.70	0.20	0.03
16	<i>p</i> -Cymen-8-ol	29.82	9.83	9.51	10.04	10.37	9.58	9.87	0.31	0.03
17	Cubeban-11-ol	33.61	1.79	1.68	1.65	1.72	1.59	1.69	0.07	0.04
18	Viridiflorol	34.11	7.79	6.97	6.28	7.29	5.73	6.81	0.73	0.11
19	Thymol	35.32	18.28	18.62	19.72	18.62	20.55	19.16	0.85	0.04

※内部標準物質Cyclohexanolに対する相対面積値(%)で表示した。

4. まとめ

シリカモノリス捕集剤MonoTrapでシークワシャー加工品である抽出酢の香気成分を捕集してGC-MSで分析したところ、シークワシャー由来の香気成分が検出され、簡易な手順での分析が可能であった。香気成分を捕集したMonoTrapをTD Linerに入れてCDCライナーキャップを装着すると、 -20°C で4週間の冷凍保存が可能であった。

謝辞

この成果は、沖縄振興特別推進交付金事業（気候変動対応型果樹農業技術開発事業）に係る業務の結果得られたものです。

参考文献

- 和田浩二：沖縄在来柑橘シークワシャーの香り、味と機能性、香料、260、47-59 (2013)
- 広瀬直人, 前田剛希, 恩田聡, 正田守幸, 宮城一菜, 和田浩二, 太田英明：シークワシャー搾汁残渣を原料とした抽出酢の開発, 日本食品科学工学会誌, 64(2), 81-89 (2017)