

第Ⅱ章 タマネギの香気成分の分析

第1節 生タマネギのヘッドスペースガス(HSV)分析

1 緒言

タマネギの香気の研究を開始するにあたり、その香気成分の抽出、分析法について検討することとした。主として1950年代から始まったタマネギの香気に関する研究は、ガスクロマトグラフ(GC)の発達により1970年代になってより盛んになり、多くの生タマネギの香気に関する研究が報告されている。そのなかでもBoelensらによる報告¹⁷⁾はタマネギの揮発性成分の分析に関してかなりまとまったものである。この場合のタマネギ香気の方法は生タマネギの蒸留物(オニオンオイル)をGC分析したものである。新鮮な生タマネギ香気抽出法にはこの水蒸気蒸留による方法³⁷⁾の他に、減圧蒸留法⁶⁾、溶媒抽出法³⁸⁾や最近では超臨界二酸化炭素抽出法³⁹⁾⁴⁰⁾が試みられている。

最近広く用いられるようになったhead space vapor (HSV) 分析は食品香気の研究手段として重要な方法である。なぜなら我々が実際に食物の香気をかいたり、口中で食物を咀嚼することで嗅細胞が受容する香気は、食物のHSV中に含まれる香気成分にほかならないからである。よってHSV成分は我々はその食物として認識する香気組成と最も類似したものと考えられる。また、この方法はHSVを直接GC等の機器に注入するため、抽出操作や溶媒由来の不純物の混入がない。

これらの理由によりHSV成分の分析が従来行われてきたが、いままで汎用されてきたGCへのHSVの直接導入法では低沸点成分の分析が主となり、食品香気への寄与が高い中・高沸点成分の検出が難しいという欠点がある。

タマネギのHSV分析についてはタマネギ香気GC分析が開始された当初

から報告があるが¹⁷⁾⁴¹⁾⁴²⁾、いずれも低沸点成分の検出に限定されていた。最近ではKallioら⁴³⁾によるタマネギHSVの品種間比較についての報告があるが、その方法はシリンジに吸引したHSVをGCカラム先端で凍結濃縮させてから注入するものであった。この場合は分子量180のトリスルフィドが検出されている。

この例にみられるように近年、GCへのHSV試料導入装置の開発が進み、HSVを濃縮して注入することにより中・高沸点成分の検出が可能となった。そのひとつにthermal desorption cold trap injectorを用いてGCにHSVを注入する方法(TCT-GC法)がある。この方法はKallioら⁴³⁾の方法と異なり、あらかじめポーラスポリマー樹脂に吸着させたHSV成分を加熱脱着させ、シリカゲルを充填したキャピラリーに凍結濃縮させた後、これを瞬間的に加熱してGCに導入する方法である。樹脂吸着を行わずHSVを同様な原理で凍結濃縮するGC導入装置を設置したPTI (purge and trap injector) 分析法が、水や乳製品の揮発性成分⁴⁴⁾、石炭中の揮発性炭化水素⁴⁵⁾、環境中のmethyl chlorideの検出⁴⁶⁾、ダイコンの香気成分⁴⁷⁾などに試験・応用されている。そこで、本研究ではまずこのGC導入装置を利用し、TCT-GC法による生タマネギのHSV分析について検討した。

2 実験方法

1) 試料と分析試料調製法

試料としたタマネギは東京都内の食品店にて購入した黄タマネギである。室温に保存して用いた。

HSV分析に供したタマネギ試料はフードスライサー（東芝CQM-60）にて0.6~0.7 mmにスライスしたもの（スライスタマネギと略記。以後のタマネギのスライスは上記条件で調製）と、おろし金でおろしたもの（おろしたマ

ネギと略記) の2種類である。

2) HSVの捕集とGCへの注入方法 (TCT-GC法)

捕集したHSVのGCへの注入方法はthermal desorption cold trap injector (TCT装置) を用いる方法 (TCT-GC法) とし、予備実験を繰り返した後、以下のような条件で捕集、分析を行った。

タマネギのHSV捕集にはFig. II-1 に示すようなガラス製捕集装置を用いた。HSVの吸着剤にはBuchem社製の2,6-diphenyl-*p*-phenylene oxide をベースとした弱極性のポラスポリマービーズであるTenax TA (60~80 mesh) が適当であった。これをガラス管 (3 mm i.d.×150 mm) に45 mg 充填し、窒素気流下、210 °Cで15分間空焼きして不純物を除き、Fig. II-1 の捕集装置にセットした。タマネギカット後10分以内にHSVの捕集を開始することとし、スライスタマネギとおろしたマネギそれぞれ10 gを図の50 mlフラスコ中に入れ、バス温40 °Cにて窒素ガスを20 ml/minで一定時間 (6~20分間) 流し、HSV成分をTenax TAに吸着させた。さらに試料フラスコを除いて窒素ガスを30分間流しTenax TAから水分を除いた。

このガラス管をFig. II-2に示すGCのインジェクションブロック上に設置したTCT装置のオープンブロックに収め、150 °Cに加熱して揮発性成分を脱着させ、さらに-130 °Cに冷却したキャピラリーチューブにコールドトラップした後、GCに注入した。

3) HSVのGCおよびGC-MS分析および香気成分の同定

上記の方法で樹脂に吸着させたHSV成分はTable II-1に示す条件でGCおよびGC分析と同様にTCT装置を設置したガスクロマトグラフ直結質量分析計 (GC-MS) にて分析した。化合物の同定はGCにおける保持時間とKI値 (Kováts Index) およびGC-MS分析により得られたマススペクトルの、標準物質およびマススペクトルデータ集⁴⁸⁾・文献値との一致によった。GCにお

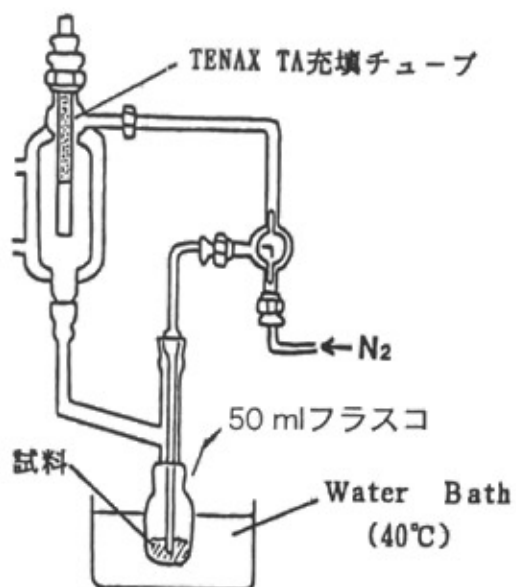


Fig. II-1 ヘッドスペースガス捕集装置

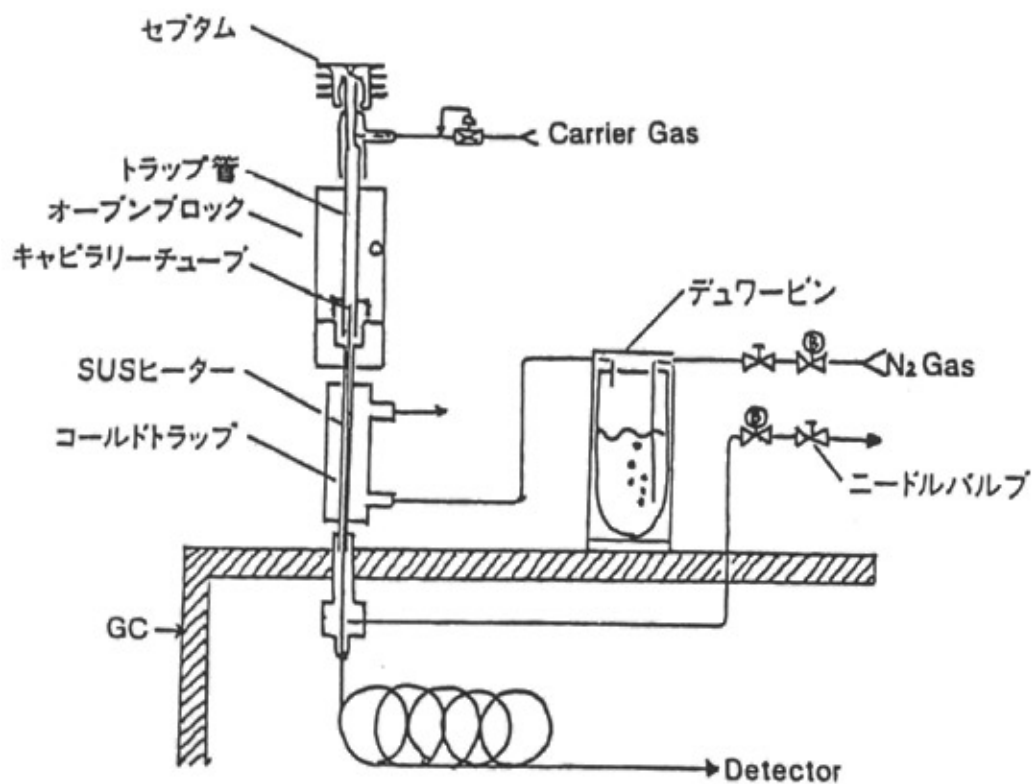


Fig. II-2 TCT インジェクターの概略図

Table II-1 TCT法によるGCおよびGC-MS分析条件

GC条件

装置 : Hitachi G-3000 ガスクロマトグラフ

カラム : Fused silica WCOT カラム, 0.25 mm i.d. × 50 m

液相 : CP-Wax 52CB (Chrompak)

オープン温度 : 40 °C (10 min hold) → 180 °C (5 °C/min)

キャリアーガス : He, 1.0 ml/min スプリットレスシステム

検出器 : FID (200 °C)

ヒーティングブロック温度 : 150 °C

コールドトラップ温度 : -130 °C (トラップ時間 10 min)

トラップ部加熱温度 : 170 °C (トラップ部加熱時間 10 min)

TCT インジェクションシステム : Chrompak 製

GC-MS条件

GC部 装置 : Hewlett Packard 5790A series ガスクロマトグラフ

カラム : Fused silica WCOT カラム, 0.25 mm i.d. × 50 m

液相 : CP-Wax 52CB (Chrompak)

オープン温度 : 40 °C (10 min hold) → 180 °C (5 °C/min)

キャリアーガス : He, 1.0 ml/min スプリットレスシステム

TCT インジェクション条件はGC分析と同様である

MS部 装置 : 日本電子 JMS-DX300 マススペクトロメータ

イオン化電圧 : 70 eV

データ処理装置 : 日本電子JMA-DX5000システム

ける保持時間とピーク面積に関するデータは島津クロマトパックC-R3Aにより得た。

3 結果と考察

1) TCT-GC法によるタマネギHSV成分の捕集，分析条件に関する検討

TCT-GC法による分析は当初は新しい技術であったため，おなじGC導入装置（PTI）を用いた分析の再現性に関する研究⁴⁹⁾を参考として，捕集・分析に関して数種の条件を試行し，最適と考えられる実験条件を設定した。また，以下に示す検討も行った。

a. 生タマネギHSV捕集とGC分析における再現性について

得られたGCパターンの再現性の検討のため，同条件で2回HSV捕集とGC分析を行った場合のGCパターン類似率を算出することとした。試料はスライスタマネギのHSVを20分間捕集したものをを用いた。その2試料A, BのガスクロマトグラムをFig. II-3に示した。このクロマトグラム中の65ピークのピーク面積%を変数としてGCパターン類似率⁵⁰⁾を算出した。試料Aと試料BのGCパターン類似率Sは以下の式で表される。

$$S(A, B) = \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n a_i^2 \sum_{i=1}^n b_i^2}}$$

a: 試料Aのピークaのピーク面積%

b: 試料Bのピークbのピーク面積%

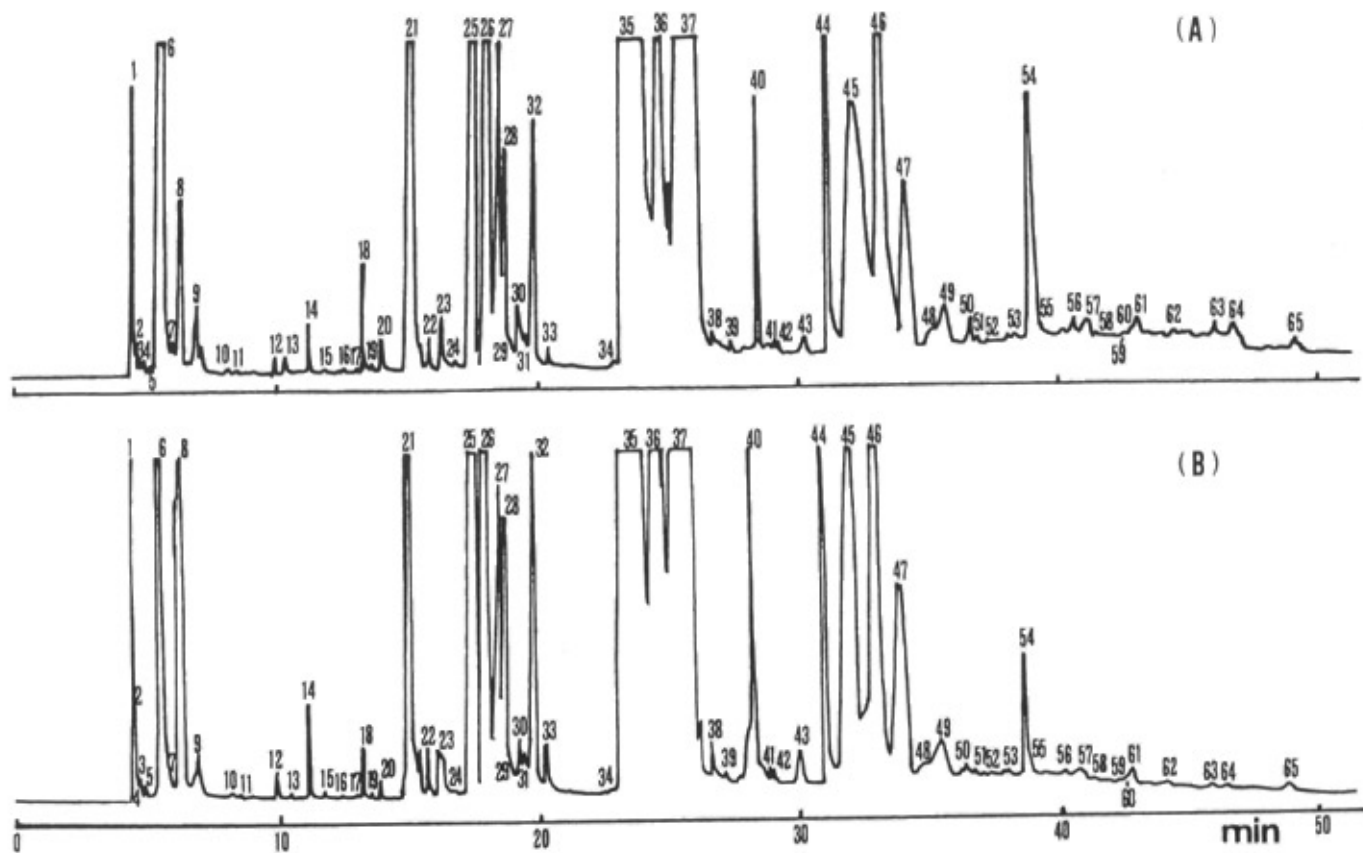


Fig. II-3 TCT-GC法により得た生タマネギHSV成分の2つのガスクロマトグラム
(再現性の検討)

その結果、試料A, B間の類似率は0.9706で、この方法は複雑なタマネギ香氣GCパターンにおいて再現性があると考えられた。なお、後日杉沢ら⁵¹⁾はPTC法(Purge and trap concentrator; 本論文におけるPTI装置と同様)を用いて各種標準物質のGC保持指標と定量値を検討し、直接導入法と同様の再現性が得られたと報告している。

b. 標準物質の導入法

化合物の同定のために保持指標であるKI値⁵²⁾を算出することにし、各標準物質をTCT装置を用いて注入する方法を検討した。この場合はFig. II-2のヒーティングブロックにTenax TAを充填していない空のガラス管をセットし、ヒーティングブロックの加熱を開始した後(同時にトラップ部を冷却開始)、3分後に上部の注入口よりマイクロシリンジを用いて標準物質を注入した。その後は通常の条件を進めることで分析が可能であることがわかった。KI値算出のために用意した直鎖飽和炭化水素はC₇からC₂₄で、それぞれ10 mgを秤量して混合し、ヘキサンで溶解して0.5 mlとしたものである。本実験ではGCカラムへの注入方法にスプリットレスシステムを用いているので、注入する炭化水素混合物量は0.02 μ lが適当量であった。なお、炭化水素混合物のガスクロマトグラムをFig. II-4に示した。他の標準物質も同様の方法で注入し、その後の操作は杉沢ら⁵²⁾の方法を用いKI値を求めることができた。

c. HSV捕集時間と香氣分量の変化

各香氣成分がHSV捕集操作中に吸着剤Tenax TAに保持されているか確認するため、捕集時間を変えてスライスタマネギのHSV成分を分析した。捕集時間を6分、10分、20分とし、他の条件は前述通りとした。この3試料のガスクロマトグラムをFig. II-5に示す。また、同定、推定した各ピークのピーク面積値とピーク面積%をTable II-2に示す。

11-403(3)=**44,
4/90
START

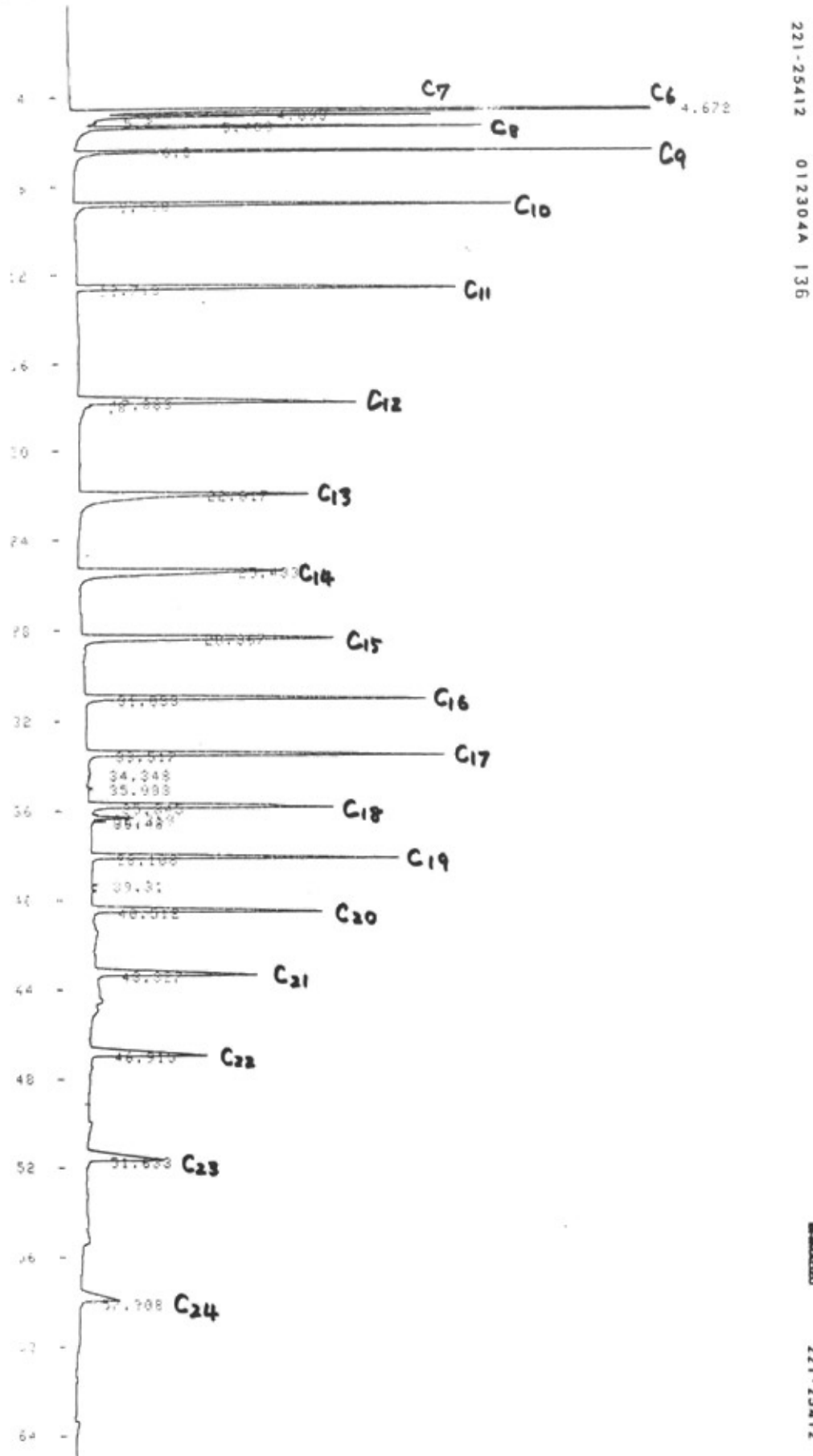


Fig. II-4 TCTインジェクション法により注入した直鎖炭化水素標準物質のガスクロマトグラム

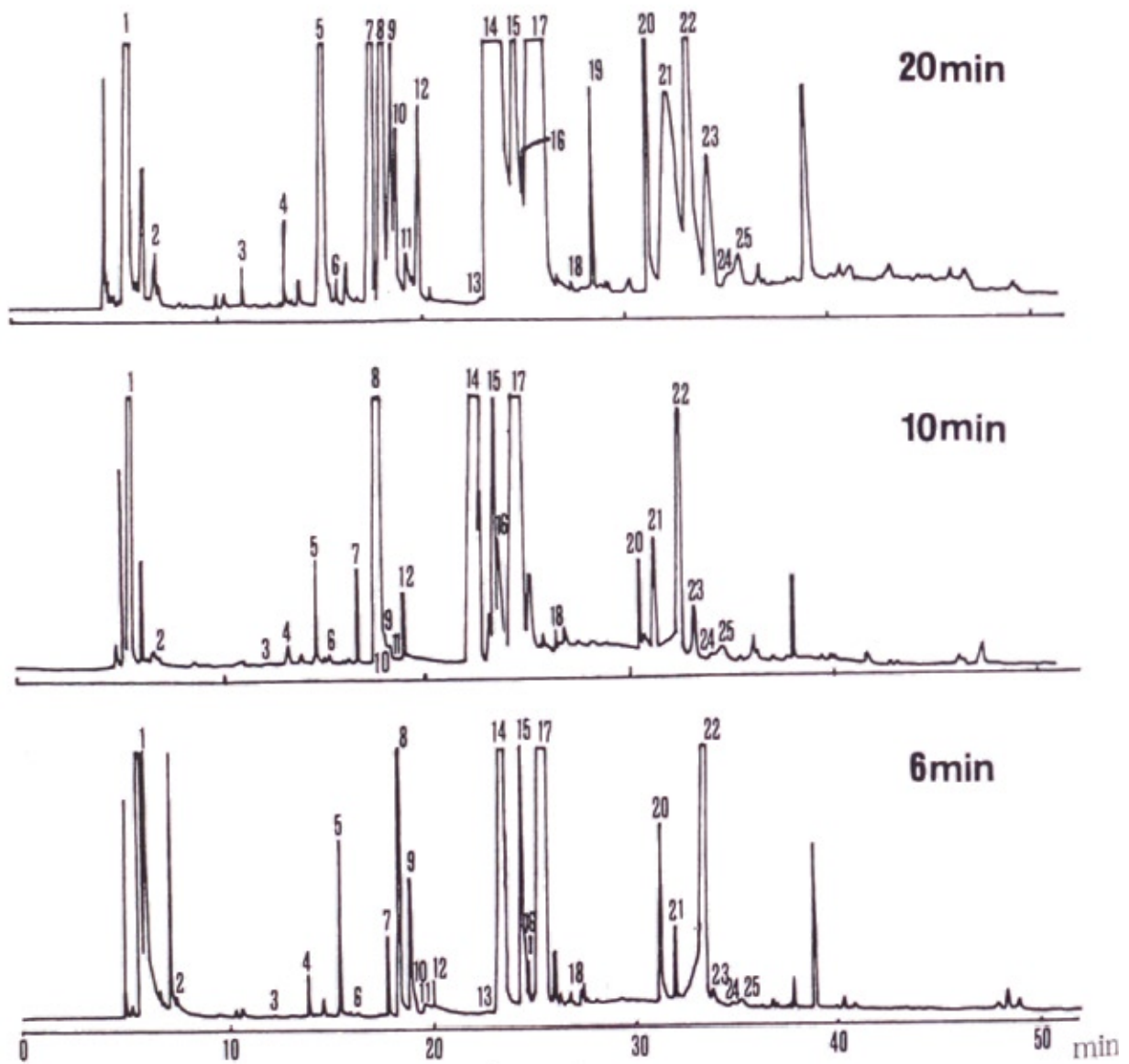


Fig. II-5 TCT-GC法により得た生タマネギのガスクロマトグラム
(捕集時間の違いによる比較)

Table II-2 タマネギのHSV成分組成の経時変化の比較

Peak NO.	Retention data*		Compound	6分間捕集		10分間捕集		20分間捕集	
	rT (min)	Kováts Index		Peak area	Peak area %	Peak area	Peak area %	Peak area	Peak area %
1	5.73	814	propanethiol	47136	16.19	23522	9.42	121268	1.29
2	7.2	921	1-propene-1-thiol	559	0.19	148	0.06	1985	0.2
3	11.55	1077	dimethyl disulfide	36	0.01	+	+	641	0.05
4	13.62	1114	allyl propyl sulfide	596	0.21	268	0.11	1304	0.11
5	15.58	1145	2-methyl-2-pentenal	3032	1.04	1482	0.59	38976	3.97
6	16.17	1158	2,4-dimethylthiophene	45	0.02	104	0.04	648	0.08
7	18.07	1187	methyl propyl disulfide	1307	0.45	1131	0.45	21127	2.92
8	18.52	1207	thiopropional S-oxide	10877	3.74	28167	11.27	37870	3.95
9	18.92	1219	3,4-dimethylthiophene	3049	1.05	125	0.05	9534	1.13
10	19.12	1226	methyl (Z)-propenyl disulfide	664	0.23	17	0.01	7687	0.91
11	19.62		allyl methyl disulfide	278	0.1	+	+	2667	0.32
12	20.32	1237	methyl (E)-propenyl disulfide	362	0.12	449	0.18	6438	0.9
13	23.26		dimethyl trisulfide	18	0.01	+	+	218	0.02
14	24.43	1320	dipropyl disulfide	41171	14.14	{ 40286	{ 16.13	197003	20.93
15	25.3	1352	(Z)-propenyl propyl disulfide	9246	3.18	+ +	+ +	{ 44491	{ 6.67
16	25.35		allyl propyl disulfide	976	0.34	16002	6.41	+ +	+ +
17	26.56	1383	(E)-propenyl propyl disulfide	67751	23.27	100991	40.13	205318	25.78
18	27.69		diallyl disulfide	1079	0.37	950	0.38	387	0.04
19	29	1473	methyl propyl trisulfide	+	+	752	0.3	11707	1.47
20	31.73		unknown compound A	4258	1.46	1200	0.48	14177	1.58
21	32.64	1613	dipropyl trisulfide	1601	0.55	3168	0.27	30894	3.78
22	33.76		unknown compound B	28364	9.74	10658	4.27	44159	4.95
23	34.6	1690	allyl propyl trisulfide	480	0.16	3327	1.35	13715	1.73
24	35.4	1725	(Z)-propenyl propyl trisulfide	318	0.11	359	0.14	2080	0.23
25	36.17	1746	(E)-propenyl propyl trisulfide	685	0.24	1303	0.52	8002	0.85

+ : < 0.01

*保持時間に関するデータは20分間捕集のGCデータを記した

その結果、多くのピークは捕集時間を長くすればピーク面積値は大となり、香気成分は吸着剤に保持されていると考えられた。特にピーク8はタマネギの催涙性成分であるthiopropenal S-oxideであり、この物質が時間の経過とともに生成が進み、吸着剤に保持されていることが明らかとなった。

2) スライスとおろしたマネギの香気成分の比較⁵³⁾

HSV捕集方法とTCTインジェクションシステムが生タマネギのHSV分析に採用できることが明らかとなったため、生タマネギのカット処理方法の違いによる香気成分組成について検討した。HSV捕集条件は実験方法に示した通りで、捕集時間は20分とした。Fig. II-6とTable II-3にスライスタマネギとおろしたマネギのガスクロマトグラムと各ピークの化合物名およびピーク面積%を示した。

今回、23化合物を同定、推定したが、多くは含硫化合物であった。ピークは保持時間50分まで検出されており、中・高沸点成分の分析も可能であることが示された。各ピークの中で、前述のようにピーク8はthiopropenal S-oxideであった。そのマススペクトルパターンをFig. II-7に示す。この催涙性成分はHSVの直接導入法では検出されていない⁴³⁾。GC注入部の加熱条件によって分解されたものと考えられる。この一連の実験により熱に不安定な物質に対するTCT-GC法の有効性が立証された。そしてthiopropenal S-oxideが検出可能ということが明らかになり、タマネギ香気の研究にも有効であることが示唆された。

GC分析結果を比較すると、thiopropenal S-oxideはおろしたマネギにおいて、約33%のピーク面積%を占めており、これはスライスタマネギにおける値4%と比較してかなり大であった。また、ピーク5の2-methyl-2-pentenalもおろしたマネギで多く、約49%を占めていることが注目された。反対にスライスタマネギに多く存在しているスルフィド類はおろしたマネギ

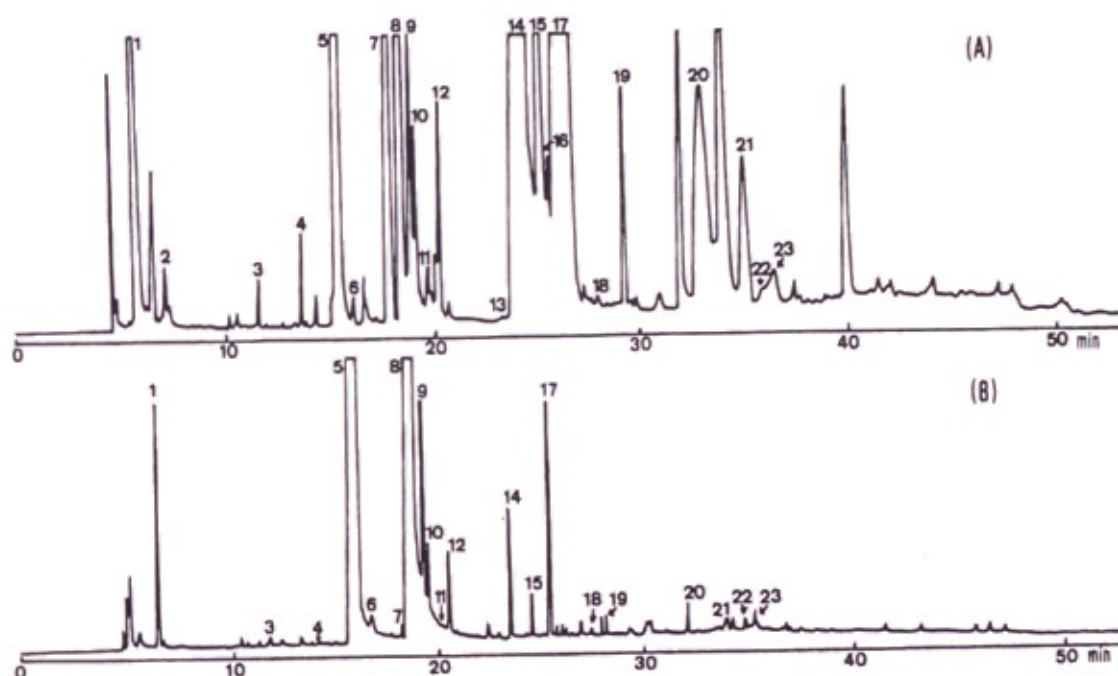


Fig. II-6 TCT-GC法により得た生タマネギHSV成分のガスクロマトグラム
 (A) スライスしたタマネギ, (B) おろしたタマネギ

Table II-3 スライスとおろしタマネギのHSV成分組成の比較

Peak No.	Retention data*		Compound	Peak area %	
	rT (min)	Kováts Index		スライス タマネギ	おろし タマネギ
1	5.73	814	propanethiol	10.86	1.29
2	7.2	921	1-propene-1-thiol	0.20	-
3	11.55	1077	dimethyl disulfide	0.11	0.07
4	13.62	1114	allyl propyl sulfide	0.11	0.03
5	15.58	1145	2-methyl-2-pentenal	3.97	48.87
6	16.17	1158	2,4-dimethylthiophene	0.08	0.14
7	18.07	1187	methyl propyl disulfide	2.92	0.15
8	18.52	1207	thiopropenal S-oxide	3.95	32.89
9	18.92	1219	3,4-dimethylthiophene	1.13	3.44
10	19.12	1226	methyl (<i>Z</i>)-propenyl disulfide	0.91	1.35
11	19.62		allyl methyl disulfide	0.32	+
12	20.32	1237	methyl (<i>E</i>)-propenyl disulfide	0.90	1.49
13	23.26		dimethyl trisulfide	0.02	-
14	24.43	1320	dipropyl disulfide	20.93	1.31
15	25.3	1352	(<i>Z</i>)-propenyl propyl disulfide	6.67	0.34
16	25.35		allyl propyl disulfide	+	-
17	26.56	1383	(<i>E</i>)-propenyl propyl disulfide	25.78	3.05
18	27.69		diallyl disulfide	+	0.1
19	29	1473	methyl propyl trisulfide	1.47	0.13
20	32.64	1613	dipropyl trisulfide	3.78	0.07
21	34.6	1690	allyl propyl trisulfide	1.73	0.40
22	35.4	1725	(<i>Z</i>)-propenyl propyl trisulfide	+	0.11
23	36.17	1746	(<i>E</i>)-propenyl propyl trisulfide	0.85	0.61

- : not found, + : < 0.01

*保持時間に関するデータはスライスタマネギのGCデータを記した

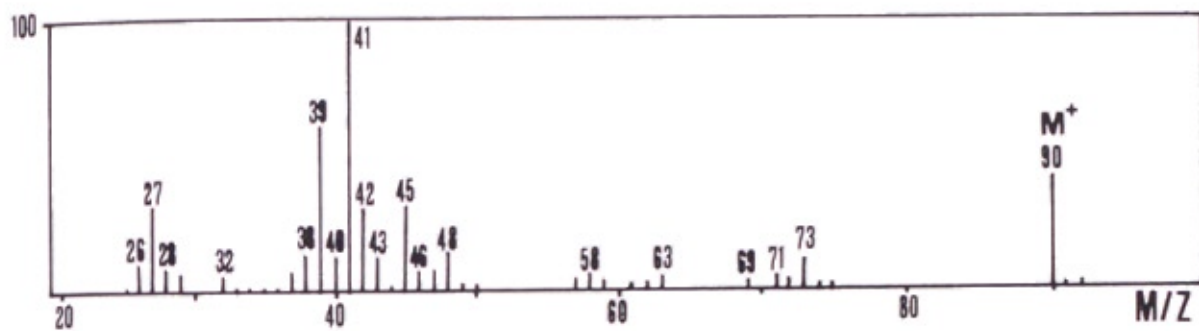


Fig. II-7 ピーク8 (Table II-3 とFig. II-6参照) :
thiopropanal *S*-oxide のマススペクトル

では顕著なものではなく、よってthiopropenal S-oxide量が相対的に多くなったと考えられる。以上から、次のような香気組成変化の機構を推定した。

Fig. II-8 にthiopropenal S-oxideと2-methyl-2-pentenalが生成される経路を示した¹⁷⁾。これによるとおろしタマネギの場合はthiopropenal S-oxideが多く生成して蓄積する一方、分解する経路にも進むと考えられる。その結果生成したpropanalは2分子アルドール縮合、脱水し、2-methyl-2-pentenalが生成するが、これは比較的安定で蓄積するものと考えられる。おろしタマネギがスライスタマネギに比較してthiopropenal S-oxideと2-methyl-2-pentenalが顕著なのは多くの水分中に溶解して安定な状態におかれていることが原因として考えられる。この点についてはすでにYagamiら⁵⁴⁾がタマネギのホモジネート中のthiopropenal S-oxide, propanalの存在を示唆していることと一致する。

反対にスライスタマネギの場合はFig. I-2に示すような経路でスルフェン酸やthiopropenal S-oxideが分解し、スルフィド類を生成する方向に反応が進行しやすいと考えられる。

以上のように同じタマネギという食品を分析した場合でも、その処理方法によって香気組成が異なることが明らかとなった。よって特に新鮮な素材の香気成分分析にこのようなHSV分析は有効な手段と考えられる。

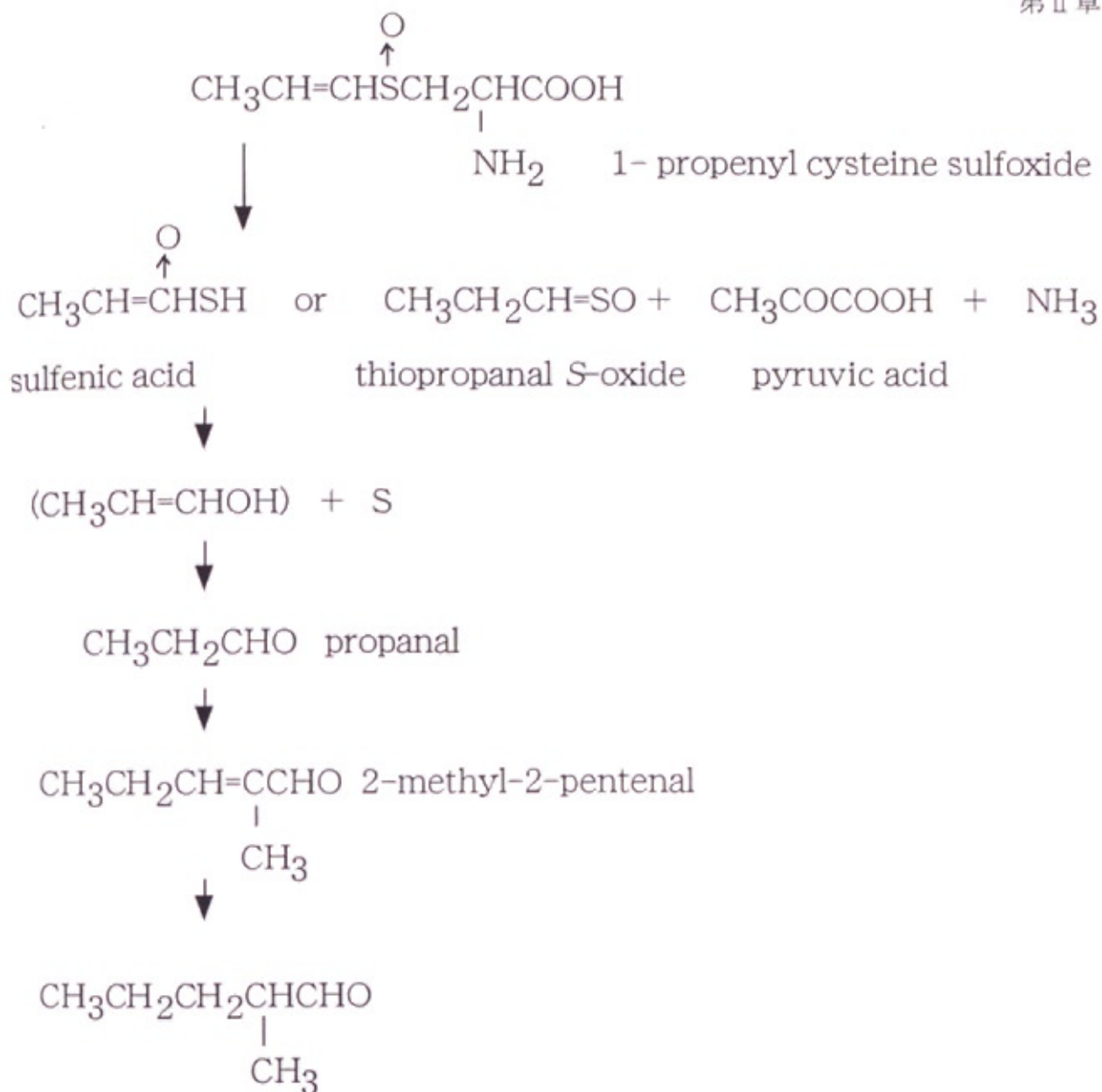


Fig. II-8 thiopropenal S-oxideと 2-methyl-2-pentenalの生成経路

第2節 ポーラスポリマーカラム濃縮法による タマネギ香気成分の捕集と分析

1 緒言

前節において、タマネギの催涙性成分の検出にTCT-GC法を用いたHSV分析が有効であり、生タマネギ香気の分析に応用できることが明らかとなった。本研究の目的のひとつであるタマネギの加熱香気の分析にもこのTCT-GC法によるHSV分析が適用できると考えられるが、他の方法も検討した。

加熱には大量の水を用いる場合があるため、水溶液中の香気成分分析の手段であるポーラスポリマーを充填したカラムによる香気成分を捕集する方法⁵⁵⁾を検討した。以下カラム濃縮法と記す。この方法は水蒸気蒸留のような香気試料調製の際の加熱変化を考慮する必要がない。また、試料の水抽出物を用いるため、水とともに加熱調理した食品の香気分析には好都合である。そこで、ポーラスポリマー樹脂Porapak Qを充填したカラムを用い、別途調製した加熱タマネギの水抽出物を展開して、そのGC分析結果を検討した。また、比較のために生タマネギのおろし汁を試料とし、同様に分析を行った。

2 実験方法

1) 試料

試料としたタマネギは山梨大学農場（山梨県甲府市）にて6月に収穫したもの（栽培品種タキイOP）である。これを7月まで吊り玉の状態乾燥した後、冷蔵し、随時実験に用いた。

2) 生タマネギと加熱タマネギ試料の調製法

a. 生タマネギ香気の水抽出液の調製

タマネギ116 gをすりおろし、ガーゼにて濾過後、さらに濾紙で濾過して得たおろし汁62 gをそのままただちに試料として用いた。

b. 焼きタマネギ香気の水抽出液の調製

タマネギをスライスし、100 gずつ3回計300 gを電気なべ（東芝HGP-108F）で約30分間加熱して計48.76 gの焼きタマネギを得た。これに380 mlの蒸留水を加え、15分間加熱還流した後、濾過して水抽出液を得、これを試料とした。

c. 煮熟タマネギ香気の水抽出液の調製

タマネギ250 gをスライスし、蒸留水400 mlを加えて1時間加熱した。急冷後、濾過して水抽出液500 mlを得、これを試料とした。

3) ポーラスポリマーカラムの調製

ポーラスポリマー樹脂はWaters製のPorapak Q, 50~80 mesh を用いた。樹脂はソックスレー抽出器を用いて精製エーテルを15時間還流させることにより精製してから使用した。精製メタノールで懸濁し、カラム（12 mm i.d. × 100 mm）に充填し、メタノールを蒸留水に置換した後、各タマネギ試料を展開した。

4) タマネギ香気濃縮物の調製

上記カラムに各タマネギ試料を流速1 ml/minで流し、試料中の香気成分を樹脂に吸着させ、無臭のカラム流出液を得た。これは脱臭水溶液としてそれぞれ回収した。なお、この脱臭水溶液は後述する第三章第1節の加熱タマネギの遊離アミノ酸分析に用いた。カラムは窒素ガス圧にて水分を流出させた後、香気成分を樹脂よりエーテル(100 ml)で脱着させ、さらに窒素ガス圧にてほぼ完全にエーテルをカラムより流出させた。エーテル溶液は無水硫酸ナトリウムにて脱水後、40℃にて常圧濃縮し、香気濃縮物を得た。

5) 香気成分の分析と同定

香気濃縮物はGCおよびGC-MSにて分析し、化合物の同定を行った。GC分析の検出器にはFIDの他にFPD検出器も用いてFID-FPD同時分析を行い、加熱による含硫化合物量の変化について比較を行った。分析条件をTable II-4に示す。化合物の同定は前節と同様の方法でGCにおける保持時間とGC-MS分析により得られたマススペクトルデータにより行った。

3 結果と考察

1) 生タマネギと加熱タマネギの香気成分

得られた各香気濃縮物の収量と香気の特徴をTable II-5に示した。試料調製に用いたタマネギ量が加熱方法によって違ったため、収率は香気濃縮物量/用いたタマネギ量で求めた。各香気濃縮物の香気は調製したタマネギのにおいをよく再現していたが、焼きタマネギと煮熟タマネギには若干の酸臭が感じられた。

Fig. II-9に各香気濃縮物のガスクロマトグラムを示した。さらに、同定および推定された化合物の一覧をTable II-6に示した。

GC-FID, GC-FPD同時分析を行い、Fig. II-9のガスクロマトグラムにおいて含硫化合物と確認されたピークにSマークを付けた。このように多くの含硫化合物のピークが検出された。特に生タマネギにはそのマススペクトルデータにより、既知物質ではなく、構造推定が未解決のままの含硫化合物ピークが多く存在していた。含硫化合物のピーク数およびピーク面積%の和とも、生タマネギ>焼きタマネギ>煮熟タマネギ、であった。また、香気濃縮物の収率 (Table II-5) も、生タマネギ>焼きタマネギ>煮熟タマネギ、の順であり、総含硫化合物量は加熱により減少することが明らかとなった。

Fig. II-9にみられるように、3種類の試料においてそれぞれ違った特徴的なGCパターンが得られた。生タマネギの主要ピークは含硫化合物であった

Table II-4 ポーラスポリマーカラム濃縮法により得た香気濃縮物のGCおよび
GC-MS分析条件

GC条件

GC-FID

装置：Hitachi 263-30 ガスクロマトグラフ
 カラム：Fused silica WCOT カラム, 0.25 mm i.d. × 50 m
 液相：PEG-20M (ジーエルサイエンス)
 オープン温度：60 °C (4 min hold) → 190 °C (2 °C/min)
 キャリアーガス：N₂, 1.0 ml/min スプリット比：20 : 1
 検出器：FID (200 °C)
 インジェクション温度：200 °C

GC-FID-FPD

装置：Shimadzu GC-7Aガスクロマトグラフ
 カラム：Fused silica WCOT カラム, 0.25 mm i.d. × 50 m
 液相：PEG-20M (ジーエルサイエンス)
 オープン温度：60 °C → 190 °C (2 °C/min)
 キャリアーガス：N₂, 1.0 ml/min スプリット比：40 : 1
 検出器：FID, FPD (230 °C)
 インジェクション温度：230 °C

GC-MS条件

GC部 装置：Hewlett Packard 5790A series ガスクロマトグラフ
 カラム：Fused silica WCOT カラム, 0.25 mm i.d. × 60 m
 液相：DB-WAX (J & W)
 オープン温度：60 °C (4 min hold) → 180 °C (2 °C/min)
 キャリアーガス：He, 1.0 ml/min スプリット比：30 : 1
 MS部 装置：日本電子 JMS-DX300 マススペクトロメータ
 イオン化電圧：70 eV
 データ処理装置：日本電子JMA-DX5000システム

Table II-5 ポーラスポリマーカラム濃縮法により得た
タマネギ香气濃縮物の収量と香气の特徴

香气濃縮物	香气濃縮物の収量 (用いたタマネギ量)	収率 (mg/100 g)	香气の特徴
生タマネギ	6.0 mg (116 g)	5.17	生タマネギ様の 刺激的なにおい
焼きタマネギ	2.9 mg (300 g)	0.96	タマネギを焼いた 香ばしい甘いにおい やや酸臭がある
煮熟タマネギ	1.3 mg (250 g)	0.52	タマネギを煮たときの 甘いにおい 酸臭がある

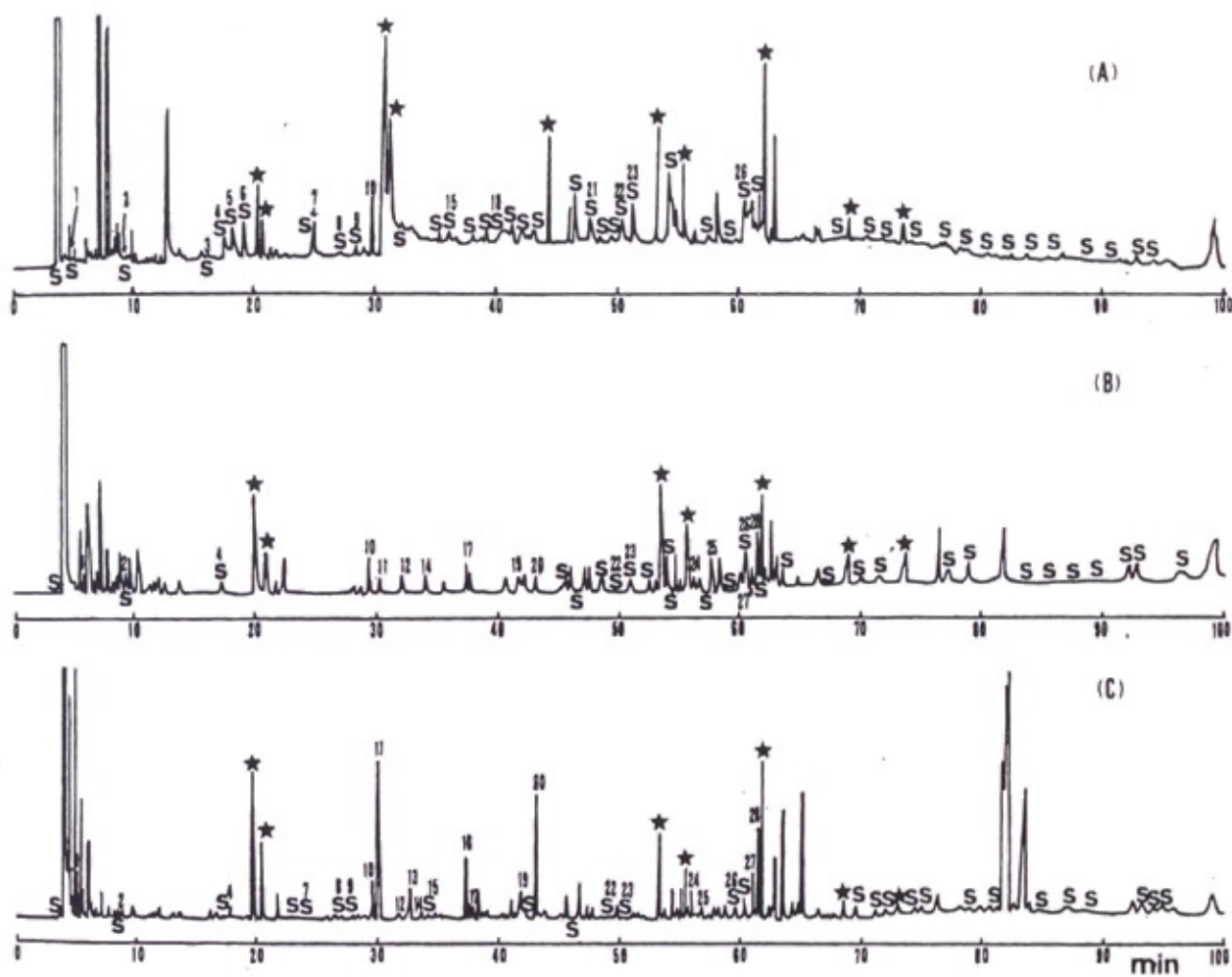


Fig. II-9 ポーラスポリマーカラム濃縮法により得たタマネギ香气濃縮物の
 ガスクロマトグラム (A) 生タマネギ, (B) 煮熟タマネギ, (C) 焼きタマネギ

Table II-6 ポーラスポリマーカラム濃縮法による各加熱タマネギの香気成分

Peak No	rT min	Compound	Peak area %		
			生	煮熟	焼き
1	5.09	propanethiol	0.051	+	+
2	9.63	dimethyl disulfide	0.042	+	0.119
3	16.50	methyl propyl disulfide	0.078		
4	17.68	3,4-dimethylthiophene	0.808	0.266	0.214
5	18.26	methyl (<i>Z</i>)-propenyl disulfide	0.767	+	
6	19.65	methyl (<i>E</i>)-propenyl disulfide	0.919	+	
7	25.25	dimethyl trisulfide	1.26	+	0.056
8	27.28	(<i>Z</i>)-propenyl propyl disulfide	0.036	+	+
9	28.73	(<i>E</i>)-propenyl propyl disulfide	0.165	+	+
10	29.80	acetic acid	1.03	1.56	1.19
11	30.07	furfural		0.333	3.92
12	31.94	2-ethylhexanol		0.272	0.072
13	32.76	2-ethyl-5-methylfuran			0.615
14	33.89	benzaldehyde		0.233	0.116
15	34.78	methyl propenyl trisulfide	0.083		0.073
16	37.15	5-methylfurfural			1.21
17	37.68	ethyl furyl ketone		0.789	0.167
18	40.25	methyl propenyl trisulfide	1.87		
19	41.59	phenylacetaldehyde		0.362	0.877
20	42.97	furfuryl alcohol		1.562	3.03
21	47.89	allyl propyl trisulfide	0.543		
22	50.15	(<i>Z</i>)-propenyl propyl trisulfide	0.965	+	0.045
23	51.42	(<i>E</i>)-propenyl propyl trisulfide	1.84	+	0.043
24	56.41	benzyl alcohol		0.227	0.149
25	57.93	2-phenylethanol		1.20	0.235
26	59.8	benzothiazole	0.727	0.769	0.267
27	61.01	maltol		0.332	0.850
28	61.44	2-acetylpyrrole		3.52	3.59

が、煮熟タマネギ、焼きタマネギには含酸素化合物が多く存在していた。特に糖を加熱した際生成するフラン化合物やmaltolが見いだされ、また芳香族化合物も存在していた。

以上の点から、加熱により刺激臭を有する含硫化合物量が減少し、さらに二次生成物が加わることにより、加熱タマネギはおだやかなフレーバーになることが推測された。

2) ポーラスポリマーカラム濃縮法による香気成分の抽出と分析

カラム濃縮法は試料を加熱することなく、水溶液中の香気成分の分析に有効であるが、揮発性物質以外のエーテル可溶成分も混入してくるため、GC分析の際のインジェクション部における高温加熱により不揮発性物質が熱分解し、クロマトグラフ上に出現する可能性がある。特に加熱処理していない生タマネギ成分の分析法としてはこの点で疑問がある。実際、HSV分析や後述するSDE法に比べて、保持時間の大きい成分が多く出現していた。

また、抽出操作の後、カラムに通す時間があるため、その間の香気成分の変化が考えられた。タマネギをはじめとするネギ属植物の場合は、植物体の細胞の破壊後に香気成分は経時変化することが知られている¹⁷⁾。その点で生タマネギの分析方法としては再現性のある結果を得ることが難しいと考えられる。生タマネギの新鮮な香気の方法としてはやはりHSV分析法が適切と考えられた。

加熱した2試料については酸臭が感じられた一方、加熱タマネギ中に存在するmaltolや2-acetyl pyrroleのような高沸点の加熱香気成分も検出されており、これらはHSV分析やSDE法では捕集されにくい物質であるため、難揮発性の香気成分の分析を目的とする場合は有効な手段であると考えられた。加熱処理してあるため抽出中も比較的安定で、タマネギを用いた加熱調理食品の香気分析に応用できると考えられた。

Fig. II-9においてポーラスポリマー樹脂Porapak Q(ethylvinylbenzene-divinylbenzene重合体)由来と考えられるピークに★マークを付した。これらはそのマススペクトルデータよりベンゼン環を有した化合物と推定され、このような揮発性化合物は現在までにタマネギ香気成分としての報告がないことから、樹脂由来の不純物の混入と考えられた。樹脂は使用前にエーテルを用いて精製を行ったが、香気成分分析のような微量分析の場合には不純物ピークがクロマトグラム上に出現し、香気成分ピークと重なる欠点があることが明らかとなった。

第3節 連続水蒸気蒸留抽出法(SDE法)により得た加熱タマネギ香気濃縮物の分析

1 緒言

前節において、加熱タマネギ香気をカラム濃縮法にて抽出・分析した結果、高沸点の香気成分の分析を目的とする場合は有効な手段と考えられた。本節では加熱タマネギの香気成分分析の場合には香気成分の抽出・濃縮に加熱条件が妨げとならないことを考慮し、連続水蒸気蒸留抽出法(simultaneous distillation and extraction : SDE法)により加熱香気成分を抽出する方法を検討した。

SDE法はLikens-Nickersonによって報告された装置⁵⁶⁾の改良型を用い、水蒸気蒸留の留出液の抽出と留出液と混合しない抽出溶媒の濃縮とを同時に行う方法である。最小量の溶媒の使用のため、溶媒由来の不純物の混入が避けられ、揮発性成分は溶媒中に効率的に濃縮できるという利点がある。よってこの方法は多くの食品香気抽出に応用されており、タマネギの加熱香気

捕集にも有効と考え、検討を試みた。

2 実験方法

1) 試料

用いたタマネギは10月収穫の北海道北見産の北もみじである。

2) SDE法による香気濃縮物の調製と分析

スライスタマネギ200 gは蒸留水750 mlとともに容量2000 mlのSDE試料フラスコ内に入れ、内部標準物質として1% 1-decanol ジクロロメタン溶液 8 μ lを試料フラスコに加え、マントルヒーターにて加熱を開始した。なお、この加熱開始はタマネギをカットしてから正確に30分後におこなうように統一した。フラスコ内温度を98~99 $^{\circ}$ Cに保ち、加熱抽出を2時間行った。用いた抽出溶媒はジクロロメタン60 mlで、湯浴温度は60 $^{\circ}$ Cとした。得られた蒸留液は無水硫酸ナトリウムで一昼夜脱水後、42~43 $^{\circ}$ Cで蒸留濃縮することによりジクロロメタンを留去して、香気濃縮物を得た。

3) 香気濃縮物のGCおよびGC-MS分析と香気成分の同定

SDE法により得た香気濃縮物はTable II-7 に示す条件でGCおよびGC-MS分析した。化合物の同定はGCにおける保持時間とマススペクトルデータにより行った。GCにおける保持時間とピーク面積に関するデータは島津クロマトパックC-R7Aにより得た。

3 結果と考察

SDE法における煮熟タマネギの香気成分の抽出についてその再現性を検討する目的で、第II章第1節と同様に同試料を同じ条件で抽出分析して、そのGCパターン類似率を算出することとした。Fig. II-10に得られた2試料のガスクロマトグラムと類似率算出に用いた54ピークを示した。

Table II-7 SDE法により得た香気濃縮物のGCおよびGC-MS条件
GC条件

装置：Hitachi 263-30 ガスクロマトグラフ

カラム：Fused silica WCOT カラム, 0.25 mm i.d. × 60 m

液相：DB-WAX (J & W)

オープン温度：60 °C → 180 °C (2 °C/min)

キャリアーガス：N₂, 1.0 ml/min スプリット比：50 : 1

検出器：FID (200 °C)

インジェクション温度：200 °C

GC-MS条件

GC部 装置：Hewlett Packard 5790A series ガスクロマトグラフ

カラム：Fused silica WCOT カラム, 0.25 mm i.d. × 60 m

液相：DB-WAX (J & W)

オープン温度：60 °C (4 min hold) → 180 °C (2 °C/min)

キャリアーガス：He, 1.0 ml/min スプリット比：30 : 1

インジェクション温度：200 °C

MS部 装置：日本電子 JMS-DX300 マススペクトロメータ

イオン化電圧：70 eV

データ処理装置：日本電子JMA-DX5000システム

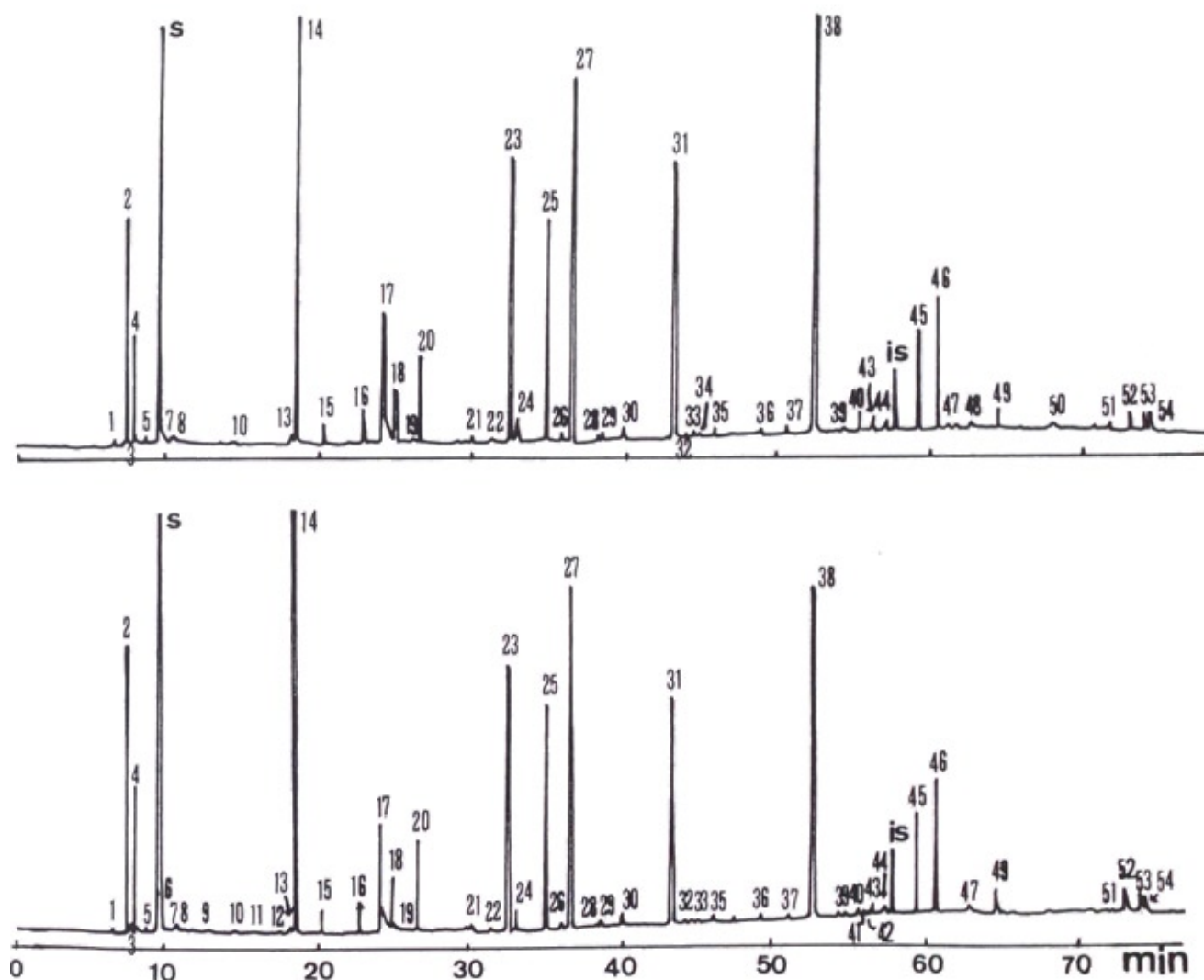


Fig. II-10 SDE法により得られた加熱タマネギ香气濃縮物のガスクロマトグラム

Peak S, solvent (dichloromethane); peak is, internal standard (1-decanol).

Table II-8 加熱タマネギの主な香気成分

Peak No.	rT	Compound
2	7.54	propanal
4	8.1	propanethiol
10	14.52	hexanal
14	18.6	2-methyl-2-pentenal
15	20.38	2,4-dimethylthiophene
16	22.9	2-pentylfuran
17	24.2	3,4-dimethylthiophene
18	24.96	methyl (<i>Z</i>)-propenyl disulfide
20	26.53	methyl (<i>E</i>)-propenyl disulfide
23	32.54	dipropyl disulfide
24	32.97	dimethyl trisulfide
25	34.96	(<i>Z</i>)-propenyl propyl disulfide
27	36.56	(<i>E</i>)-propenyl propyl disulfide
28	38.22	furfural
29	38.50	diallyl disulfide
31	43.2	methyl propyl trisulfide
35	46.01	ethyl furyl ketone
38	50.97	dipropyl trisulfide
44	57.14	(<i>Z</i>)-propenyl propyl trisulfide
46	59.39	(<i>E</i>)-propenyl propyl trisulfide

また、Table II-8に主な加熱香氣成分を示した。類似率算出には内部標準物質のピーク面積に対する各ピークの面積割合を変数として用いた。その結果、両者間のGCパターン類似率は0.9904と高い値を示し、この方法の再現性が確かめられた。また、内部標準物質を添加しての定量分析として容易な方法であると考えられる。

得られたSDE法による煮熟タマネギ香氣濃縮物の収率は生タマネギ100 g に対し平均で7.9 mgであった。香氣濃縮物は刺激的なタマネギのにおいが強く、それに加熱タマネギ特有の香ばしさが混合されたにおいを有していた。刺激的なにおいが強く感じられたのは生タマネギの状態から抽出を開始したためと考えられる。実際に食する状態の香氣に近い香氣成分組成を得るためにはすでに加熱しておいた状態のタマネギをSDE法の試料とすることが適切と考えられる。

得られた香氣成分はすでにタマネギ中から同定された成分であったが、このSDE法を用いると、簡便な方法で高い再現性が得られるため、加熱したタマネギの香氣分析には有効な手段である。

なお、本実験では常圧下における蒸留を行った。そのためタマネギ試料フラスコ内の温度は98~99℃であるが、加熱香氣の抽出を目的とするため、SDE法による加熱操作は香氣変化には大きな影響はないと考えられる。

第4節 HPLC法による生タマネギ香氣成分の分析

1 緒言

生鮮食品の香氣成分の分離法としては、加熱による変化を避け常温以下で調製することが望ましいので、先に検討したHSV分析法の他に、溶媒抽出

法，減圧水蒸気蒸留法，超臨界二酸化炭素抽出法などが用いられている．最近，GC分析時における高温環境を避けるために，香気濃縮物の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析が行われるようになった．Blockら⁵⁷⁾はネギ属植物の香気成分をHPLCにて分析し，不安定なチオスルフィネート類の同定に成功した．そこで本研究においても，タマネギの香気成分研究にHPLC分析を採用することとした．

新鮮なタマネギ香気に寄与するというチオスルフィネートは非常に不安定で反応性に富み，容易に分解する(Fig. I-2参照)．しかし，この物質は水の存在下ではその水素結合が安定化するらしく⁵⁷⁾，水溶液中で比較的安定である．よって蒸気として存在するHSV成分中では不安定であるが，水蒸気蒸留による蒸留液中には残存する．

そこで，HPLC分析のための香気濃縮物はロータリーエバポレータによる減圧水蒸気蒸留にて調製した．HPLC分析には試料量や移動相溶媒が少なくすむセミマイクロカラム（内径2.1 mm）にシリカゲルを充填したものを用い，分離条件の検討を行った．

2 実験方法

1) 試料

試料として第V章で後述する γ 線照射タマネギを用いた．用いたタマネギは1996年10月収穫の北海道北見産北もみじである．照射量は0.2 および5 kGyのもので非照射とともに保存し，照射直後と保存7週のタマネギを試料とした．

2) 減圧水蒸気蒸留による生タマネギの香気濃縮物の調製

タマネギは5～7℃の冷蔵庫で一昼夜冷蔵後，スライスし，150 gをはかりとり，1000 mlのナスフラスコ内に入れ蒸留水400 mlを加えた．タマネギを

カットしてから正確に30分後にロータリーエバポレータによる減圧水蒸気蒸留を開始した。バス温38℃、18～20 mm Hgにて2時間蒸留を行った。その間、氷-食塩の寒剤にてトラップすることにより蒸留液400 mlを得た。蒸留液は食塩飽和後ジクロロメタンにて振とう抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、42～43℃のバス温にて蒸留濃縮し、約800 mgとなるまでジクロロメタンを留去した。サンプルビンに移しかえた香気濃縮物は分析まで冷凍保存した。

3) HPLC分析

得られた香気濃縮物は分析直前に窒素ガスでサンプル量が360～370 mg量になるまで濃縮して、HPLCに注入した。

用いたHPLC条件をTable II-9に示す。

3 結果と考察

今回はHPLC分析の香気パターンが試料によって変化するか検証するために、第V章におけるGC分析で違いが明らかとなった非照射タマネギ・0.2 kGy照射タマネギと5 kGy照射タマネギを試料として用いた。

得られた香気濃縮物は、非照射と0.2 kGy照射のものは照射直後および保存7週後においても生タマネギ様の香気を再現しており、新鮮でくどさのない香気であった。また、若干催涙性が感じられ、thiopropenal S-oxideが残存していることが推測された。5 kGy照射の照射直後の香気濃縮物は生タマネギ様の香気を有しているが、7週保存のものはかなり香気が弱かった。

Fig. II-11とFig. II-12に分析した6試料のHPLCクロマトグラムを示した。

分析条件はBlockら⁵⁷⁾の報告を参考に決定した。

Table II-9 減圧水蒸気蒸留により得た生タマネギ香気濃縮物の
HPLC条件

装置：島津 LC-10ADvp

カラム：Inertsil SIL 2.1 mm i.d. × 250 mm

(ジーエルサイエンス)

移動相：A液 ヘキサン, B液 2-プロパノール を用い

以下のようなグラジエントとした。

0 min → 10 min 溶媒Aのみ

10 min → 15 min A : B = 100 : 0 → 98 : 2

15 min → 25 min A : B = 98 : 2

25 min → 35 min A : B = 98 : 2 → 90 : 10

35 min → 50 min A : B = 90 : 10

50 min → 55 min A : B = 90 : 10 → 98 : 2

流速：0.4 ml/min

カラム温度：40 °C

検出器：SPD-10Avp (UV : 254 nm)

試料注入量：2 μl

データ処理：島津クロマトパックC-R7A

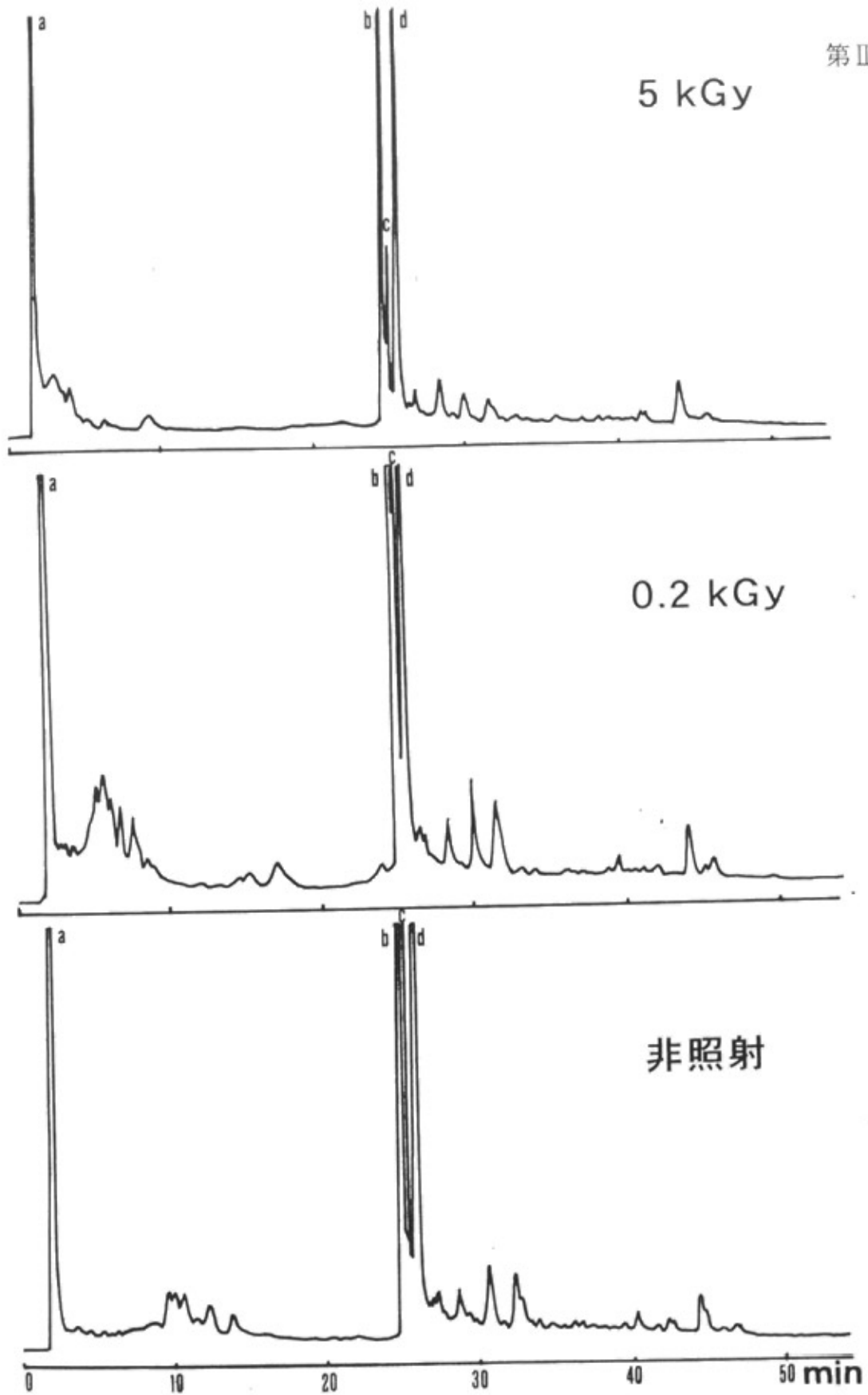


Fig. II-11 減圧水蒸気蒸留により得た香気濃縮物のHPLC分析
クロマトグラム (照射直後の γ 線照射タマネギ)

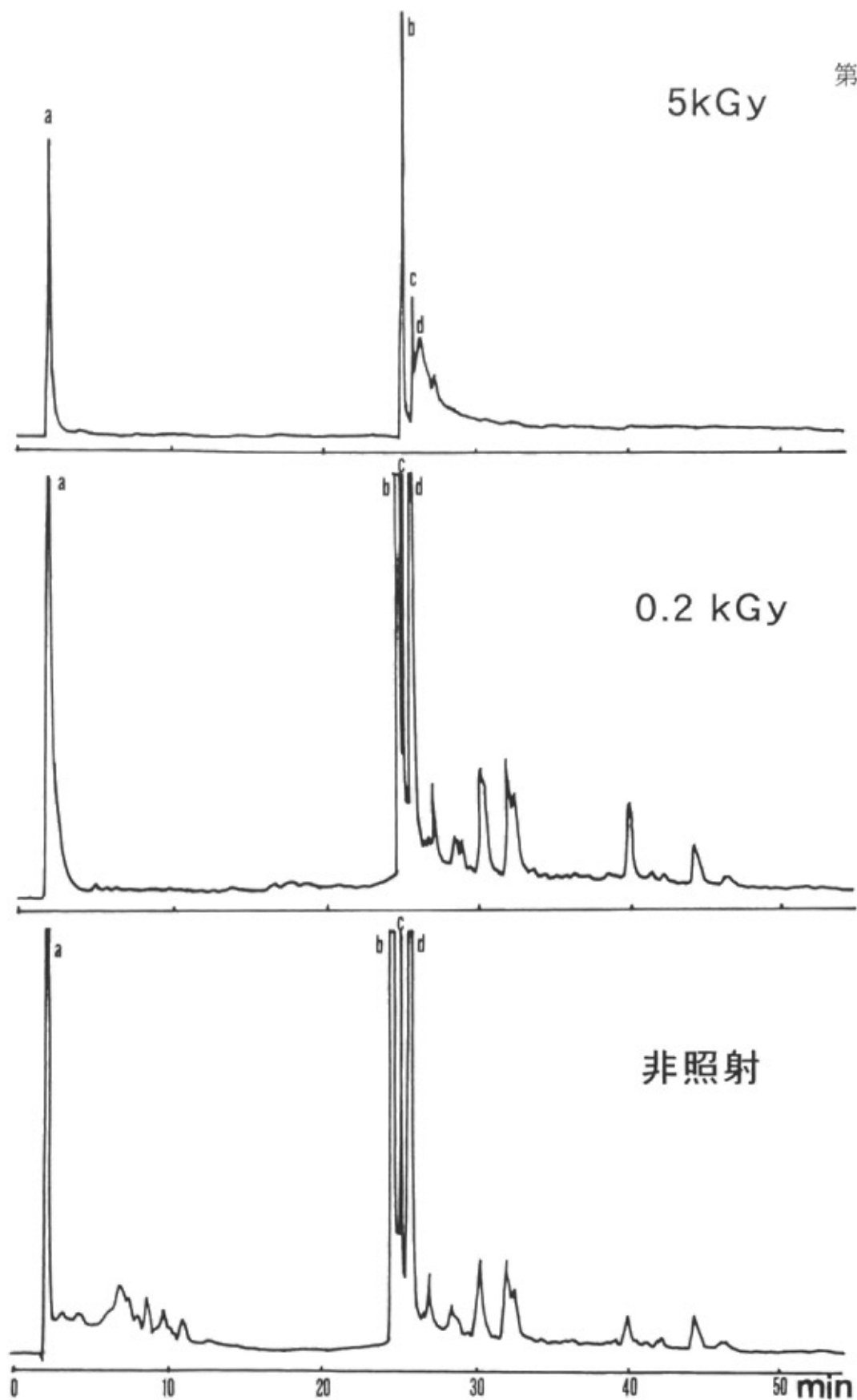


Fig. II-12 減圧水蒸気蒸留により得た香気濃縮物のHPLC分析
 クロマトグラム (照射タマネギ: 7週保存のもの)

カラムはシリカゲルカラムで内径2.1 mmのものを使用した。香氣成分は微量分析条件が求められるため、Blockらが用いている、あるいは現在のHPLC分析において汎用されている内径4.6 mmのカラムではなく、セミミクロの2.1 mmのカラムを使用した。この場合は流速やデッドボリュームなどの管理が難しいとされているが、今回のHPLC分析では特に問題はなかった。移動相溶媒の使用量が少ない点は長所であった。そしてFig. II-11とFig. II-12にあるように、多くのピークの存在が確認でき比較的分離のよいクロマトグラムが得られた。

移動相溶媒にはヘキサンと2-プロパノールを用い、グラジエントシステムで行ったが、Blockらの方法（分析開始の移動相の組成がヘキサン：2-プロパノール=98：2）ではピークaの分離が悪く、また、ピークaとピークb間のピークが出現せず、ピークb, c, dの3ピークが重複していたため、グラジエントの条件を変更した。分析開始から10分間、ヘキサンのみを流し、Table II-9の条件で分析したところ、ピークaとb間の小さなピークが分離し、また1本のピークであったb, c, dが図のように分離した。

香氣濃縮物の注入量は2 μ lで、これはジクロロメタンの希薄溶液である。HPLCの場合はGC分析の場合と比較してかなり希薄な溶液を多量に注入した方が分離が良いため、本論文でキャピラリーカラムを使用したGC分析の注入条件に比べ、香氣成分の濃度は1/5程度である。そのため、少ない香氣成分量であっても分析が可能であった。

ピークa, b, c, dは文献より1-プロペニル基を含んだチオスルフィネート類と推定された。各ピークについては今後LC-MS分析を行って、化合物の同定をする予定である。

Fig. II-11とFig. II-12において各クロマトグラムを比較すると、照射直後においては3試料とも類似したパターンを示しているが、保存7週後では5

kGy照射のピークが明らかに小さくなっていた。これは生成した香気成分量が非照射と0.2 kGy照射タマネギに比べ少量であることを示している。また、香気成分の組成比も5 kGy照射は他の2試料と違いがみられた。これらの特徴は第V章で詳細に検討した結果と一致していた。

以上のように比較的少ない香気濃縮物量で生タマネギの香気成分がHPLCにて分離できることが判明した。今後は溶媒の組成・グラジエントの検討や他の充填カラムの使用等によって、より分離のよい条件を模索する予定である。以上の実験により、タマネギ以外の加熱によって変化しやすい生鮮食品香気分析にもHPLCが応用できると考えられる。

第5節 要約

タマネギ香気成分の抽出・分析方法について検討を試みた。

(1) 生タマネギの新鮮な香気の方法として、thermal desorption cold trap injectorを用いたGC注入法(TCT-GC法)によるHSV分析の検討を行った。HSVの捕集条件として、ポーラスポリマー樹脂Tenax TAを充填したガラス管にタマネギのHSVを含んだ窒素ガスを20 ml/minで一定時間(6~20分間)流してHSV成分をTenax TAに吸着させる条件が適当であった。その後、TCT装置を用いて加熱脱着させ、シリカゲルを充填したキャピラリーに凍結濃縮させた後、瞬間的に加熱してGCに導入し、GCおよびGC-MS分析を行った。

この方法の再現性を確認し、またKI値を求めるための標準物質の導入法を決定した。また、HSVの捕集時間を変えて分析したところ、捕集時間を長くすればGCピーク面積値は大となり、香気成分は吸着剤に保持されていると

考えられた。特に、HSVの直接導入法では検出されていないタマネギの催涙性成分thiopropenal S-oxideのピークを確認することができ、この物質は時間の経過とともに生成が進み、吸着剤に保持されていることが明らかとなった。

生タマネギのカット処理方法の違いによる香気成分組成について、スライスタマネギとおろしたマネギのHSV成分を比較検討した。その結果、thiopropenal S-oxideはおろしたマネギにおいて、約33%のピーク面積%を占めており、これはスライスタマネギにおける値4%と比較して大であった。また、2-methyl-2-pentenalも同様の傾向であった。反対にスライスタマネギに多く存在しているスルフィド類はおろしたマネギでは顕著ではなかった。

おろしたマネギにおいてthiopropenal S-oxideと2-methyl-2-pentenalが顕著なのは多くの水分中に溶解して安定な状態におかれていることが原因として考えられ、スライスタマネギの場合はスルフェン酸やthiopropenal S-oxideが分解しスルフィド類を生成する反応が進行しやすいと推察した。

TCT-GC法により新鮮なタマネギ香気成分を分離同定することができ、直接導入法では捉えられない中・高沸点成分の検出も可能となった。よって、新鮮な素材のHSV分析にTCT-GC法は有効な手段である。

(2) 加熱香気成分の抽出法について、水溶液中の香気成分分析に有効なポーラスポリマーカラム濃縮法を検討した。生・煮熟・焼きタマネギの水抽出物を試料とし、ポリマー樹脂Porapak Qを充填したカラムで展開し、香気成分をエーテル抽出物として得てGC (FID, FPD)分析した。

生タマネギの主要ピークは含硫化合物であったが、煮熟・焼きタマネギには糖を加熱した際生成するフラン化合物やmaltol、芳香族化合物が存在していた。加熱により刺激臭を有する含硫化合物量が減少し、さらに二次生成物

が加わることにより、加熱タマネギはおだやかなフレーバーになることが推測された。加熱タマネギにはHSV分析やSDE法では捕集されにくい高沸点成分が検出されており、カラム濃縮法は難揮発性香気成分の分析には有効な手段であると考えられた。しかし、GC分析における不揮発性物質の熱分解とカラム濃縮時の成分変化を考慮すると、生タマネギ香気の分析方法としては適当でないと考えられた。

(3) 加熱タマネギの香気成分の分析方法として連続水蒸気蒸留抽出法(SDE法)を検討した結果、煮熟タマネギ香気成分の抽出・GC分析において高い再現性が得られ、加熱香気分析に有効な手段であることが明らかとなった。

(4) タマネギの新鮮な香気成分分析にHPLCを用いその条件を検討した。減圧水蒸気蒸留にて生タマネギ香気濃縮物を調製し、これをシリカゲルを充填したセミマイクロカラム、移動相溶媒ヘキサンと2-プロパノール、グラジエントシステム、にて分析した。その結果、少ない香気濃縮物量で生タマネギの香気成分がHPLCにて分離できることが判明し、加熱によって変化しやすい生鮮食品香気分析にHPLCが応用できると考えられた。