ノ ー ト

GC/MS による高脂肪食品中ラクトン類の簡易定量

松浦 弘明¹, 塩田 誠^{*1}

1 緒 言

ラクトン類は、フルーティーで甘い風味を特徴とする香気成分である。バターやチーズ、発酵乳などの乳製品に広く存在する、乳の風味を形成する重要な香気成分であり、その含有量や組成比の違いにより食品の風味を特徴付けている。ラクトン類は乳脂肪感を与える主要成分であることから、バター様の乳風味を有するマーガリン類への添加が行われている¹⁾。乳中のラクトン類としては、主に5員環の γ -ラクトンと6員環の δ -ラクトン類が存在し、その中では δ -ドデカラクトンや δ -デカラクトンが代表的である。そのほかにも鎖長構造が異なる多様なラクトン類が存在し、その組成の違いが各乳製品の風味の個性に関連している^{2)~4)}。また、ラクトンは乳製品のみならず、果物やワインなどの発酵食品の重要な風味成分でもあり、幅広い食品の風味を決定する重要な因子とされている^{5)~7)}。

食品中の香気成分は、ヘッドスペース法 (HS 法)、水蒸気蒸留法などにより、香気成分を抽出/濃縮したのち、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) で測定することができる⁸⁾⁹⁾。最近では、試料を保持した容器中のヘッドスペース中の香気成分を直接 GC に導入する方法や固相マイクロ抽出 (SPME) 法やテナックス法など、ヘッドスペース中の香気成分を樹脂に吸着させたのち、GC に導入する方法など、多様な方法が利用される。しかし、いずれの方法も食品のマトリクスから気相中に移行したものを濃縮し測定に供するため、香気成分と試料中のマトリクスとの相互作用や気液分配などの様々な要因により、食品中の濃度や組成が分析結果に直接反映されないという問題がある¹⁰⁾。溶剤抽出法としては、Solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) 装置を用いた測定が広く行われるが、油脂含量の高い試料からの香気成分の抽出では、親油性の高い揮発性物質を油脂から溶剤へ十分に移行させる必要があるため、長時間の抽出時間を要し、再現性にも課題がある¹¹⁾¹²⁾。加えて、抽出作業時の溶出や転溶に用いるジエチルエーテルやジクロロメタンなどの溶剤を減圧濃縮により留去する

際に、測定対象とする揮発性物質も逸散される可能性もある。水蒸気蒸留法では、抽出工程中に試料に加えられる加熱により生成するラクトン類の存在が無視できないため、定量性に問題がある¹³⁾。ラクトン類の定量については、下田ら¹⁴⁾は低密度ポリエチレン膜を使用したパウチ法を用いた方法を報告しているが、添加回収率が 10 % と低く課題があると考えられる。このように既報のラクトン類の定量値には、個々の化合物の回収率に起因する信頼性に問題があると考えられる。一方で、品質管理及び工程管理の観点から、乳製品の香気として重要なラクトン類をより精度高く、簡便に定量する分析技術が必要とされている¹⁵⁾¹⁶⁾。

本研究の目的は、高脂肪食品中のラクトン類を簡便かつ高精度に定量する方法を開発することである。ヘキサン溶解物を直接 GC にて測定する (直接導入法) ことで、従来のヘッドスペース法での課題である気相への移行度や溶剤抽出法における分配率の問題がなく、試料を溶剤に希釈溶解するだけの簡便な前処理で測定が可能である。直接導入法では、トリグリセリド (TG) 等の高沸点成分が GC 測定の妨害成分となるが、本法では、無極性で膜厚が薄い (0.1 μm) 高温分析用のキャピラリーカラムを用い、ラクトン類の分離定量後の昇温により TG をカラムから排出することで問題を解決した。本報告では、ラクトン類の定量性に関する検討結果と市販の油脂製品の分析への応用結果を報告する。

2 実 験

2.1 分析装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) は島津製作所製 QP-2010 を使用し、オートサンプラーは同社の AOC-20i 型を用いた。

2.2 ラクトン標準混合ヘキサン溶液、試薬及び市販油脂製品

標準溶液に用いたラクトン類としては、 γ -octalactone (γ -C8) (シグマ・アルドリッチ製)、 γ -nonalactone (γ -C9) (東京化成工業製)、 γ -decalactone (γ -C10) (和光純薬工業製)、 γ -undecalactone (γ -C11) (和光純薬工業製)、 γ -dodecalactone (γ -C12) (日本香料薬品製)、 δ -hexalactone

* E-mail: m-shiota@mtf.biglobe.ne.jp

¹ 雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所: 350-1165
埼玉県川越市南台 1-1-2

Table 1 Operation conditions for GC/MS

Instrument	Shimadzu GCMS-QP2010
Column	DB-1 (J&W), 15 m × 0.25 (i.d.) 0.1 μm (f.t.)
Column temp.	40 °C (3 min), 4 °C min ⁻¹ to 170 °C, 25 °C min ⁻¹ to 370 °C (7 min)
linear velocity	72.1 cm min ⁻¹
Carrier gas	Helium 49.1 kpa
Split	20 : 1
Ion source	EI 1.3 kV
Inlet temp.	370 °C
Detector temp.	345 °C
Ionization voltage	70 eV
Monitor ion	Qualitative analysis: lactones total ion <i>m/z</i> 42-500 Quantitative analysis: γ -lactone <i>m/z</i> 85, δ -lactone <i>m/z</i> 99, diphenyl <i>m/z</i> 154

(δ -C6) (シグマ・アルドリッチ製), δ -octalactone (δ -C8) (和光純薬工業製), δ -nonalactone (δ -C9) (和光純薬工業製), δ -decalactone (δ -C10) (東京化成工業製), δ -undecalactone (δ -C11) (和光純薬工業製), δ -dodecalactone (δ -C12) (東京化成工業製), δ -tetradecalactone (δ -C14) (和光純薬工業製), δ -hexadecalactone (δ -C16) (和光純薬工業製)を使用した。それぞれ 100 mg をエタノールで希釈し 10 mL に定容した。このエタノール溶液を適時ヘキサンで希釈混合し、ラクトン標準混合ヘキサン溶液とした。内標準溶液として、5000 μg mL⁻¹ のジフェニル (Ph₂) (和光純薬工業製) のヘキサン溶液を使用した。使用溶剤には、試薬特級ヘキサン (和光純薬工業製)、試薬特級エタノール (和光純薬工業製) を用いた。測定対象として、市販油脂食品であるバター (食塩不使用タイプ)、マーガリン類 (マーガリン及びファットスプレッド)、生クリーム (種類別クリーム) は、2016 年に埼玉県及び東京都の小売店で購入したものを試料として用いた。

2・3 試料の前処理

本研究の測定対象試料の油脂食品として、バター、クリーム及びマーガリン類を選定した。バターは 3.0 g を使用し、マーガリン類では香料由来のラクトン類を数 10 μg g⁻¹ 程度と、バターと比較して多量に含むため 1.0 g を使用した。試料を 10 mL 容量の目盛付きガラス製遠沈管 (ひょう) に秤取りし、ヘキサンを加え 10 mL に定容した。50 °C で加温溶解し、振とう処理及び超音波処理後に冷却し 2000 rpm で 5 分間遠心分離した。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後 1.5 mL のバイアルに 1.0 mL 分取し、内標準溶液 0.1 mL (500 μg mL⁻¹ に調製した Ph₂ のヘキサン溶液) を添加混合し GC 測定用試験溶液とした。油中水型 (W/O) 乳化食品であるバターやマーガリン類とは異なる、連続相が水である水中油型 (O/W) 乳化食品であるクリームについては、3.0 g の試料に 1 g の NaCl を添加したのちにヘキサンを加えて定容した。また、製品中の香料の定量には必要に応じてエタノールを用いて適時希釈し GC 測定用試験溶液とした。

2・4 GC/MS 測定

ラクトン標準混合ヘキサン溶液をヘキサンで希釈し、1, 5, 10, 50, 100 μg mL⁻¹ に調製した。その 1.0 mL を試料の前処理と同様に 1.5 mL バイアルに分取し、内標準溶液を 0.1 mL 添加し検量線作成用とした。GC/MS の分析条件を Table 1 に示す。測定はスキャンモード *m/z* 42 ~ 500 で実施し、定量イオンとして、 γ -ラクトンは *m/z* 85, δ -ラクトンは *m/z* 99 を用いて面積値を求めた。市販製品分析時のラクトン類は、標準試薬のリテンションタイム、物質のリテンションインデックス情報、MS スペクトルのライブラリ (NIST) との一致により同定した。

3 結果と考察

3・1 GC/MS による分析条件の検討

GC カラム選定と測定条件の最適化を目的として、ラクトン混合標準溶液を用いてスキャン検出による分析を実施した。GC カラムについては Agilent J & W 製 DB-1HT, DB-1 及びジーエルサイエンス製 InertCap pure-WAX の 3 製品を用いて比較したところ、いずれのカラムも良好な分離を示した。しかし、今回の分析では、GC への試料導入時の前処置による TG などの夾雑油脂分の除去を実施しないため、TG が溶出可能な最高使用温度 400 °C の高温分析用カラム Agilent J & W 製 DB-1HT を用い、ラクトン類の分離後、カラム中から昇温により TG を溶出させることとした。温度条件は 40 °C から昇温を開始し、各ラクトン類を順次溶出させ、 δ -C16 の溶出後にオープン温度を 370 °C まで急速に昇温し、TG を溶出した。今回設定した条件で市販バターを分析したところ、最も溶出が遅い δ -C16 は 33 分付近に溶出した。また、50 分までに TG の溶出を完了した (Fig. 1)。

3・2 前処理条件の検討

従来技術による前処理法としては、溶剤抽出法やヘッドスペース法、蒸留法などが存在するが、気液相や吸着樹脂への成分の分配が行われるため、香氣成分の回収率が常に課題となっていた。そこで、今回、分配を考慮する必要が

Fig. 1 GC/MS chromatogram of butter sample

a, Elution pattern of triglycerides by total ion chromatogram; b, Elution pattern of γ -lactones (m/z 85), δ -lactones (m/z 99), and biphenyl (m/z 154).

ない, 溶剤による直接希釈法を検討した. 使用溶剤としては, ジクロロメタンやクロロホルムなど塩素系溶剤は用いず, 毒性が低く油脂の溶解性が高いヘキサンを用いた. 本前処理ではラクトン類は親油性が高いため (δ -C10 の分配係数 $\log P_{ow}=2.4$), 少量含有する水層部への分配は起こらないものと考えられるため, 回収率等を考慮することなく定量可能と考えた. バターと比較して水分含量が高いクリーム類については, ①バターと同条件での調製, ②クリームにラクトン類のヘキサン層への移行を促すことを目的として, 1.0 g の NaCl を添加後にヘキサンを用いて定容して調製した2方法を用い, NaCl の添加の有無の影響を添加回収試験により調べた.

3.3 検量線と標準溶液の繰り返し精度

Table 1 に示した GC/MS 条件を用いた標準試料のクロマトグラムを Fig. 2 に示す. 近接する δ -C9 と Ph2 のピークの分離度は 1.03 であり, 他のピークは完全分離していた. ここでは, γ -ラクトンは m/z 85, δ -ラクトンは m/z 99

を用いて定量を行った. $1 \sim 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ の範囲で濃度を変化させたラクトン標準溶液を用いて, GC/MS 測定で得られた被検物質のピークの面積を, 内標準のピーク面積での補正を行った値を用いて検量線を作成した. 乳製品中に比較的多く存在する δ -C10 の回帰式は, $y = 45.254x - 73825$ ($R^2 = 0.9976$) であった. また, δ -C12 の回帰式は, $y = 44.807x - 115044$ ($R^2 = 0.9952$) であった. 両ラクトン類ともに, 決定係数が 0.99 以上の良好な直線性が得られた. 標準溶液 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ の 3 回の繰り返し測定を実施した結果, 繰り返し精度は, γ -C9 は 3.2 %, γ -C10 は 2.0 %, δ -C14 は 3.0 % と良好であった. これらの成分の定量値は内標準物質と被検物質の面積比から内標準法により算出した.

3.4 添加回収試験

基材試料として, W/O 型乳化物である油分 80 % のバター, 油分 70 % 及び 40 % のマーガリン類, O/W 型乳化物である油分 30 % のクリームを用いて, 添加回収試験を行った. 各試料を 45°C 設定インキュベータに 30 分間静置

Fig. 2 Chromatogram of a standard lactones mixture

Table 2 Recoveries of lactone from spiked sample ($n = 3$)

Samples	Fat %	Lactones	Added/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Recovery %	RSD ^{a)} %
Margarine	40	γ -C9	100	121	4.6
		γ -C10	100	121	2.6
		δ -C14	100	116	13.6
Margarine	70	γ -C9	100	121	1.9
		γ -C10	100	116	5.9
		δ -C14	100	94	10.1
Butter	83	γ -C9	33.3	90	2.9
		γ -C10	33.3	103	6.3
		δ -C14	33.3	120	4.0
Cream (Without NaCl)	30	γ -C9	33.3	95	10.3
		γ -C10	33.3	91	12.2
		δ -C14	33.3	32	18.1
Cream (Added 1 % NaCl)	30	γ -C9	33.3	97	3.9
		γ -C10	33.3	90	4.7
		δ -C14	33.3	87	7.2

a) relative standard deviation

し、油水分離が生起しない程度に軟化させた後、 γ -C9、 γ -C10 及び δ -C14 標準品を添加し、各試料 3 回の前処理及び測定を実施した。ラクトン標準品は、バターとクリームには $33.3 \mu\text{g g}^{-1}$ 、マーガリン類には $100.0 \mu\text{g g}^{-1}$ となる様に添加した。結果を Table 2 に示す。バターでは、平均回収率が 90～120 %、相対標準偏差（繰り返し精度 %）2.9～6.3 % であった。マーガリン類では、平均回収率が 94～121 %、相対標準偏差（繰り返し精度 %）1.9～13.6 % であった。クリームでは、NaCl を添加しない方法では、長鎖構造のラクトン（ δ -C14）の回収率が低かったが、試料調製時に NaCl を添加することで、平均回収率が 87～97 %、相対標準偏差（繰り返し精度 %）3.9～7.2 % と簡易法としては十分な精度にまで改善できた。W/O 型乳化食品であるバターとマーガリン類では、ヘキサンへの溶解のみにより試料調製が可能であったが、O/W 型乳化食品であるクリームでは、NaCl の添加により、ラクトン類のヘキサンへ

の移行を促すことが必要であることが分かった。NaCl の添加により、長鎖ラクトン類がヘキサン層へ濃縮される機構は不明であり、解明には分配を考慮した詳細な検討が必要である。

3.5 実試料の繰り返し精度

実試料として市販バターを用いて、3 回の繰り返し測定を行った。結果を Table 3 に示す。検出された $8.1 \sim 53 \mu\text{g g}^{-1}$ の γ -ラクトン（ γ -C m , $m=12$ ）と δ -ラクトン（ δ -C n , $n=10, 12, 14, 16$ ）の繰り返し精度は 2.7～5.4 % であり、良好であった。クリーム（油分 42 %）を用いた試験では、 $0.8 \sim 3.8 \mu\text{g g}^{-1}$ の上記ラクトン類の繰り返し精度は 4.0～17.3 % であり、バターの結果よりは若干悪い結果であった。

Table 3 Repeatability of GC/MS measurements of butter ($n = 3$)

Lactones	n	Butter			Cream (Fat 42 %)		
		Concentration $\mu\text{g g}^{-1}$	Repeatability CV %	Composition %	Concentration $\mu\text{g g}^{-1}$	Repeatability CV %	Composition %
δ -C10	3	22	3.1	13.9	1.8	7.6	14.0
γ -C12	3	8.1	3.2	5.2	0.8	17.3	6.2
δ -C12	3	41	5.4	26.2	3.5	4.0	27.1
δ -C14	3	53	3.8	33.9	3.8	4.4	29.5
δ -C16	3	32	2.7	20.8	3.0	13.8	23.3
total	3	155	-	100.0	13	-	100.0

Table 4 γ -lactone and δ -lactone concentration in fat samples

Samples ^{a)}		Fat (%)	Concentration (µg g ⁻¹) ^{b)}								Total
			γ -lactone (γ -C <i>m</i>)			δ -lactone (δ -C <i>n</i>)					
			<i>m</i>	<i>n</i>							
			9	11	12	10	11	12	14	16	
Butter	B-(A)	83	< 1.0	< 1.0	8.1	22	< 1.0	41	53	32	156
	B-(B)	83	< 1.0	< 1.0	7.6	12	< 1.0	25	32	24	101
	B-(C)	83	< 1.0	< 1.0	4.4	13	< 1.0	29	34	26	106
Margarine	M-(A)	83	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	-
	M-(B)	82	< 1.0	< 1.0	< 1.0	83	< 1.0	13	< 1.0	< 1.0	96
	M-(C)	23	4.7	4.8	< 1.0	19	9.1	19	< 1.0	< 1.0	57
	M-(D)	66	< 1.0	< 1.0	< 1.0	5.3	< 1.0	3.6	< 1.0	< 1.0	8.9
	M-(E)	64	3.2	2.3	< 1.0	15	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	20
	M-(F)	64	20	< 1.0	< 1.0	220	< 1.0	102	< 1.0	< 1.0	340
	M-(G)	82	< 1.0	< 1.0	< 1.0	13	< 1.0	13	< 1.0	< 1.0	27
Cream	C-(A)	30	< 1.0	< 1.0	0.4	1.0	< 1.0	1.3	1.2	1.1	4.8
	C-(B)	42	< 1.0	< 1.0	1.0	1.8	< 1.0	3.5	3.8	3.0	13

a) Food samples were purchased at the market in 2016. b) γ -C6, 8, 10, and δ -C6, 8, 9 in all samples were not detected.

3・6 市販商品の測定結果

本法の応用例として, 2016 年時点で市販されていたバター (3 品), 生クリーム (2 品), マーガリン類 (7 品) のラクトン含量を測定した. 本実験は今回の測定対象物質であるラクトン類の濃度範囲を明確にすることも目的とする. 結果を Table 4 に示す. 本分析条件により, γ -ラクトン (γ -Cm) と δ -ラクトン (δ -Cn) について, $m, n=6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16$ までが分離できた. 本分析では, 試料中に存在する TG 成分はラクトン類のピークとは重複せず, ラクトン溶出後のカラムオープンの昇温により溶出された. なお, 検量線は $1 \sim 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ の濃度の標準物質を用いて作成し, 決定係数が 0.99 以上の直線性を得ることを確認している. そのため, Table 4 では $1 \mu\text{g g}^{-1}$ 以上のデータのみを示した.

バターのラクトン類としては 5 種類の成分が検出され, 8.1 から $53 \mu\text{g g}^{-1}$ の範囲で分布し, δ -体が主成分であった. B-(A), B-(B) は国内産の食塩不使用バターであり, B-(C) は欧州産の発酵食塩不使用バターであるが, γ -C12, δ -C10, δ -C12, δ -C14, δ -C16 が主要成分であることは共通し, 構

成ラクトン類に大きな差がなかった. 油分 42 % と 30 % の油脂としては乳脂肪のみを含む 2 種類のクリームの分析では, バターと同じ成分のラクトン類がほぼ近い比率で存在することが確認できた. 多くの市販のマーガリン類では, δ -C10, δ -C12 ラクTONの含量が主成分として検出されたが, ラクTON類が検出されないマーガリンも存在したことから, マーガリン類のラクTON組成は多様であった.

4 ま と め

バターやマーガリン類の風味にはラクトン類や脂肪酸が大きく関与しているとされる. ラクTON類の濃度や組成を精度高く, 簡便に測定できる本技術は, 乳製品のおいしさの評価やマーガリン類の配合設計に利用することができる. 今回構築した分析法は, 食品の「おいしさ」に重要な成分であるラクTON類の簡易定量法として有効な手法であり利用価値の高い分析法と考える.

文 献

- 1) 中澤君敏: “マーガリン ショートニング ラード”,

- p. 250 (1979), (光琳).
- 2) 菅原康文, 大崎和彦, 岩淵久克: 香料, **235**, 87 (2007).
 - 3) 野口洋介: “牛乳・乳製品の知識”, p. 134, (2000), (幸書房).
 - 4) D. A. Forss: *J. Dairy Sci.*, **52**, 832 (1969).
 - 5) 中島基貴: “香りの技術動向と研究開発”, p. 117 (2004), (フレグランスジャーナル).
 - 6) 大西正展: 日本食品工学会誌, **15**, 199 (2014).
 - 7) 角田 一: 日本調理科学会誌, **308**, 46 (2013).
 - 8) J. Ruiz, J. Ventanas, R. Cava: *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5115 (2001).
 - 9) R. Bassette R: *J. Milk Food Technol.*, **39**, 10 (1976).
 - 10) 川崎通昭, 中島基貴, 外池光雄: “におい物質の特性と分析・評価”, p. 122 (2003), (フレグランスジャーナル).
 - 11) W. Engel, W. Bahr, P. Schieberle: *Euro. Food Res. Technol.*, **209**, 237 (1999).
 - 12) P. Landy, J.-L. Courthaudon, C. Dubois, A. Voilley: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 526 (1996).
 - 13) 薄木理一郎, 金田尚志: 油化学, **28**, 717 (1979).
 - 14) B. Chongcharoenyanon, N. Yamashita, N. Igura, S. Noma, M. Shimoda: *Flavour Fragrance J.*, **27**, 367 (2012).
 - 15) A. J. Taylor: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **36**, 765 (1996).
 - 16) 松浦弘明, 藤山勝二, 池内義弘: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **54**, 1075 (2005).

Simple Determination of Lactones in High-fat Food Products by GC/MS

Hiroaki MATSUURA¹ and Makoto SHIOTA^{*1}

^{*} E-mail: m-shiota@mtf.biglobe.ne.jp

¹ Megmilk Snow Brand Co., Ltd., Milk Science Research Institute, 1-1-1, Minamidai, Kawagoe-shi, Saitama 350-1165

(Received February 20, 2017; Accepted June 2, 2017)

In high-fat products, such as butter, cream, and margarine, simple a determination of lactones that have a sweet aroma was developed using a novel direct-injection GC/MS method. The sample was dissolved in hexane; subsequently, the hexane phase was transferred into an injection port of the GC mounted on a high-temperature-type capillary column with 0.1 μm film thickness. After the elution of lactones, the coexistent triacylglycerols in the hexane phase were eliminated from the column by the increasing oven temperature. This method does not consider the distribution ratio between the solvent phase and the water phase, or the vapor phase and adsorbed resin, as is done in conventional methods, such as SPME, because all of the components in the hexane phase are directly transferred into the GC/MS method. The quantity of γ -lactones and δ -lactones is determined using the selected ion peak area of m/z 85 and m/z 99, respectively. The calibration curve displays good linearity in the range of 1.0–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The recovery of the compounds varied from 87 % to 121 %, and the reproducibility has been 1.9–13.6 % (R.S.D.). This method was successfully applied to determining the composition of lactones in commercially available butter, cream, and margarines.

Keywords: GC/MS; lactone; butter; cream; margarine; fat; oil.