ビール香気成分の分析

醸造物の揮発性香気成分は、従来トリクロロフルオロメタンを抽出溶媒として使用し、液-液抽出後は通常のフレーバー分析法に従い濃縮し、GC 分析を行っているが、新しい分析法を使用してビールの中・高沸点香気成分分析の事例を解説していただいた。本法は抽出溶媒であるトリクロロフルオロメタン中の揮発性成分を多孔質ポリマー樹脂に吸着・濃縮させた後にヘッドスペースガス分析を行い、その問題点などを指摘していただいた。

原 山 耕 一

1. はじめに

通常、食品中の中・高沸点揮発性成分の分析には液-液抽出や蒸留法が用いられているが、ビール中には多量のエタノールが存在するため、これらの手法を用いた場合、抽出溶媒の濃縮が困難であった。また、抽出溶媒の減圧濃縮を行うと、中沸点揮発性成分が飛散してしまう欠点があった。食品のフレーバー分析では香気成分のパターン解析が重要であり、ビールなどのエタノールを多く含む飲料において、各香気成分の存在量比を変えることなく、測定可能な分析手法の開発が望まれていた。近年、Merck Extrelut QE tubes¹⁾や XAD-2 resin²⁾ などエタノールを吸着させない樹脂を用い、エタノールを除く試みが報告されている。しかし、これらの報告は少量のサンプルでの分析例しか紹介しておらず、溶出溶媒濃縮のステップを含む欠点が依然残されている。

本稿では、ビール中の中・高沸点揮発性成分の存在量比を可能な限り変えずに分析することを目的として、沸点が 24℃ と比較的低いトリクロロフルオロメタン (CCl₃F) を抽出溶媒とし、エタノールを吸着しづらい性質を有する多孔質ポリマー樹脂の Tenax TA を香気成分トラップ剤として用い、直接ガスクロマトグラフィー (GC) 分析に供する分析手法を開発した。

2. トラップ剤の選択

1986年に MURAKAMI³⁾が Tenax GC(2,6-Dihenyl-*p*-Phenylene Oxide をベースとした微極性のポーラスポリマービーズ, specific surface area : 19-30 m²/g, mean pore diameter : 720 (Å)) や Porapak Q (EVB-DVB をベースとしたポーラスポリマービーズ, specific surface area : 500-600 m²/g, mean pore dia-meter :

75(Å)) などの多孔質ポリマーを用いた “purge and trap” 手法にてビールフレーバーの分析を報告している。Tenax や Porapak などの捕集剤は疎水性を有するため、水やエタノールなどが吸着しにくく、ビールなどエタノールを含む飲料の香気分析に適した捕集剤といえる。本実験では Tenax GC や Porapak Q のかわりに Tenax TA (2,6-Diphenyl-*p*-Phenylene Oxide をベースとした微極性のポーラスポリマービーズ, specific surface area : 42 m²/g, mean pore diameter : 2000 (Å)) を用いている。これは Tenax TA の方が先の 2 つの捕集剤に比べ、加熱時の揮発性成分の脱着がしやすいこと、また、加熱時に捕集剤成分の分解により生成するアーティファクトが少ないことの 2 点から Tenax TA を用いた。

3. 分析手法

(1) 中・高沸点揮発性成分の抽出法

薄膜式フラッシュエバポレーター (MF-10 型, 東京理化(株), 第 1 図) に、大瓶 1 本分 (633 ml) のビールを入れ、消泡剤としてシリコン樹脂 (TSA 737 K, 東芝シリコン(株)) を少量添加した。ジャケットに 40℃ の温水を流し、ビールを加熱しながらファンを回転させ、ビールの表面積を大きくし、ポンプ (160 VP-D, 日立製作所(株)) で、5 mmHg まで減圧し、⁴⁾気化した揮発性成分を冷媒 (エタノール+ドライアイス+投げ込み式クーラー (ネオクール BD-26 型, ヤマト (株), -30℃)) でトラップした。パッチ式でビール 1 本につき 1 時間捕集を行い約 400 ml の香気抽出液が得られた。香気抽出液を室温に戻し、食塩飽和後、蒸留精製トリクロロフルオロメタン (三井・デュポンクロロケミカル(株)) 50 ml を用い、振盪機 (シェイカー SA-31 型, ヤマト (株))

Analytical Method of Beer Flavor

Koichi HARAYAMA (Alcoholic Beverage Research & Development Laboratories, Asahi Breweries, Ltd.)

第1図 ビール香気成分捕集に用いたフラッシュエバポレーター装置

第2図 抽出溶媒よりビール香気成分をTenax TAに捕集する装置

で20分間、液-液抽出を行った。

(2) トラップ剤への吸着法

第2図に示したように抽出溶媒をサンプル瓶に入れ、ガラスアダプターをセットし、ウォーターバス(40℃)恒温条件下、窒素ガス 100 ml/min の流速で1時間流入させ、スターラー攪拌下、溶媒(沸点 24℃)と同時に気化する揮発性成分を Tenax 管(熱電対とニクロム線を巻き付けた長さ 10 cm、内径 5 mm のガラス管)中の Tenax TA(多孔質ポリマー、メッシュ 60/80、200 mg)に導入し、ビール香気成分を吸着させた。

(3) GC への注入法

第3図に示した MACLEOD ら⁴⁾の用いたヘッドスペースガス分析法に従った。まず、Tenax 管をガラスアダプターから取り外し、抽出溶媒を導入したのと逆方向から窒素ガスを 100 ml/min の流速で 30 分間流し、

第3図 Tenax TAに吸着されたビール香気成分を脱着し、GCに注入する装置

1. Tenax TA 管, 2. テフロンソケット, 3. ステンレスナット, 4. シリコンプラグ, 5. ステンレスパイプ (3mm i.d.), 6. ステンレス針, 7. 三方弁, 8. GC 注入部

⇨: 通常分析時のキャリアガス流路

→: サンプル注入時のキャリアガス流路

Tenax 管中の水とエタノールのバージを行った。次に、ヘッドスペースガス導入口側に、サイドポートニードルをステンレスナットと GC 注入口用セプタムで取り付けた。GC のキャリアの1次圧弁の先に、三方コックを用いキャリアガスのバイパスを作り、そのバイパス管の先を Tenax 管に接続し、逆側のサイドポートニードルを GC 注入口に差し込んだ。Tenax 管に巻き付けたニクロム線に電流を流し、Tenax 管を加熱、200℃まで昇温(約 30 秒で昇温)した時点で、キャリアガスをバイパス側に切り替え、Tenax TA より脱着した揮発性成分を 20 秒間 GC 内に直接注入した。この間 Tenax 管の温度を 200℃に保った。注入後、GC 注入口より Tenax 管を抜き、キャリアガスを元の状態に戻した。

4. 分析結果と考察

第4図に典型的なビールの GC チャートを示した。

*印のピークはエタノールのピークである。エタノールはビール中に約 5% 程度含まれ、ビールに含まれる揮発性成分としては最も含量が多い成分であるが、Tenax TA はエタノールを吸着しやすい性質を有する樹脂であるため、このような比較的小さいピークとして検出されている。

抽出溶媒のトリクロロフルオロメタンはあらかじめ蒸留精製後用いているが、溶媒中にトリクロロフルオロメタンと沸点の近い成分が含まれているために精製が十分になされず、GC チャートの低沸点部分にそれら抽出溶

第4図 フラッシュエボレーター装置及び Tenax TA 捕集法によって得られた
ビール香気成分のガスクロマトグラム

* : エタノール, ○ : 抽出溶媒由来の不純物

ガスクロマトグラフィー (GC) 条件

装置 : Shimadzu GC-8 A (島津製作所(株))

カラム : PEG-20 M を充填した溶融シリカキャピラリーカラム (0.25 mm×50 m,
GL サイエンス社製)

キャリアガス : 窒素 (1.56 ml/min) ; スプリット比 46.6 : 1

昇温条件 : 50°C で5分保持後, 190°C まで 2°C/min で昇温し, その後 190°C で保持
注入部及び検出部温度 : 200°C ; 検出器 : FID

第1表 同定されたビール香気成分と GC によって得られたピーク面積の再現性

Peak No.	香気成分	CV ^a	Peak No.	香気成分	CV
1	Isoamyl alcohol	8.19	47	Hyptanol	14.95
4	Pentanol	9.28	53	2-Acetyl furan	3.87
6	2-Methyltetra hydrofuran-3-one	6.13	55	2-Ethyl-1-hexanol	10.46
8	Hexyl acetate	6.57	57	Benzaldehyde	9.25
9	2-Furfuryl ethyl ether	7.98	59	(E)-2-Nonenal	9.89
10	Octanol	9.41	60	Furfuryl acetate	8.71
15	Unknown	10.72	63	Linallol	5.48
16	3-Methyl-2-buten-1-ol	8.08	64	5-Methylfurfural	2.70
19	Methyl lactate	9.23	66	Octanol	5.08
22	Methylheptenone	11.97	67	(E, Z)-2, 6-Nonadienal	5.40
24	2-Methyl-2-hepten-6-one	7.21	70	4-Terpineol	2.59
26	Ethyl lactate	6.56	78	Butyric acid	8.62
27	Hexanol	7.32	79	Ethyl decanoate	9.71
28	Ethyl heptanoate	2.23	80	Furfuryl alcohol	6.59
29	Heptyl acetate	14.73	81	Isovaleric acid	3.24
32	2-Nonanone	10.63	100	2-Phenylethyl acetate	9.46
34	Unknown	3.36	103	Caproic acid	8.97
35	3-Methylhexanol	9.58	105	2-Phenylethyl alcohol	5.57
38	(E)-2-Octenal	6.14	110	Dodecanol	10.94
42	Ethyl caproate	14.53	118	Octanoic acid	19.54
44	Furfural	7.04	126	2-Phenylethyl hexanoate	12.91
46	Isoamyl caproate	3.77			

^a : 変動係数 (CV), (n=5) $CV = (\text{std. dev.}/X) \times 100$

媒由来の不純物質のピーク (○印) が多数検出された。従って、これらのピークと重なる低沸点揮発性成分の分析には当分析手法は適さないが、保持時間 16 分のイソアミルアルコール (No.1 のピーク) 以降では、抽出溶媒由来の夾雑ピークは No.58 の $\text{Cl}_2\text{CHClF}_2$ が小さいピークとして検出されたのみで、イソアミルアルコール以降の中・高沸点揮発性成分の分析には当抽出溶媒の使用は問題ない。

第1表に GC-MS で同定した成分と各ピーク面積の $n=5$ での変動係数を示した。エタノール以外にアルコール 13 成分、エステル 11 成分、アルデヒド 3 成分、ケトン 4 成分、酸 4 成分と 2-furfurylethyl ether, 2-acetylfuran を同定した。その他 GC 分析の保持時間より (E)-2-octenal, (E)-2-nonenal, (E,Z)-2,6-nonadienal をそれぞれ推定した。また、これらピークのほとんどは変動係数 10% 前後であり、再現性の高い結果となった。また、ピーク No.9, 16, 44, 53, 60, 63 の成分につきモデル系にて検量線の作成を試みた結果、良好な検量線が作成でき、回収率も 90% を超えた。

5. 今後の問題点

抽出溶媒のトリクロロフルオロメタンは、揮発性が高く大気圏のオゾン層を破壊し、環境破壊を引き起こす物質として悪名が高い。本分析では極力トリクロロフルオロメタンの大気中への拡散を防ぐため、Tenax TA を素通りする溶媒を冷却し、回収に勤めたが回収率は 100% とはならなかった。環境問題から抽出溶媒として今後トリクロロフルオロメタンの代用品を探す必要がある。また、今回の分析では内部標品を使用していない。これは他のピークと重ならない成分を検索したが、適当な物質を見い出せなかったためである。更に分析精度を上げるには目的に応じた内部標品を使用する必要があると考え

られる。

6. おわりに

CCl_3F を抽出溶媒として用いた報告としてはワイン⁵⁾、ウイスキー⁶⁾等のフレーバー分析があり、ビールフレーバーについても報告⁶⁾があるが、それらはいずれも CCl_3F を抽出溶媒として使用し、液-液抽出後は通常のフレーバー分析手法に従い濃縮し、GC 分析等に供している報告である。本分析手法は抽出溶媒である CCl_3F を、含まれる揮発性成分共々同時に昇華させ、多孔質ポリマー樹脂中に通し、 CCl_3F に含まれる揮発性成分を多孔質ポリマー樹脂中に吸着・濃縮させ、その後ヘッドスペースガス分析手法に準じて多孔質ポリマー樹脂に吸着された成分の分析を行う手法であり、本分析手法を用いての食品中の揮発性成分の報告は未だなされておらず、本分析手法は新しい分析手法と考えられる。また、本分析手法はエタノールを吸着しづらい性質を有するため、特にエタノールを多く含む食品中の揮発性成分の分析に適した手法であると考えられる。

＜アサヒビール（株）酒類研究所＞

文 献

- 1) A. J. IRWIN and D. J. THOMPSON: *J. Inst. Brew.*, 93, 113 (1987)
- 2) D. B. HAWTHORNE, T. E. KAVANAGH, and B. J. CLARKE: *J. Am. Soc. Chem.*, 45, 23 (1987)
- 3) A. MURAKAMI, H. GOLDSTEIN, and E. CHICOYE: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 44, 33 (1986)
- 4) G. MACLEOD and J. M. AMES: *J. Chromatogr.*, 355, 393 (1986)
- 5) P. J. HARDY: *J. Sci. Food Agr.*, 21, 39 (1970)
- 6) R. S. WILLIAMS and H. WAGNER: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 36, 27 (1978)

●執筆者紹介（順不同、敬称略）

原山 耕一＜Koichi HARAYAMA＞

昭和35年10月5日生れ＜勤務先とその所在地＞アサヒビール（株）酒類開発研究所、〒143 東京都大田区大森北2-13-1＜略歴＞昭和61年北海道大学大学院農学研究科農芸化学修士過程修了、同年アサヒビール（株）研究所入社、現在に至る（平成4年農学博士）＜趣味＞ゴルフ。

藤井 敏雄＜Toshio FUJII＞

昭和35年2月27日生れ＜勤務先とその所在地＞キリンビール（株）基盤技術研究所、〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5＜略歴＞昭和60年東京大学農学部農芸化学科修士課程修了、同年キリンビール（株）入社、現在に至る＜抱負＞脂質関連の遺伝子に興味がある＜趣味＞少人数スポーツ（テニス、ジョギング等）。