注目 しています...
その技術!

食品の特性・挙動解析のためのリアルタイムもしくは 高時間分解能分析装置－PTR-MS

下 野 彰 夫

株式会社汀線科学研究所

PTR-MS, the Realtime or High Time Resolution Instrument for Analyzing the Characteristics and Behaviors of Foods

Akio SHIMONO

Shoreline Science Research, Inc. 3-12-7 Owadamachi, Hachioji, Tokyo 192-0045, Japan

The application examples of PTR-MS which measures volatile organics forming flavor or quality of foods in real-time were introduced focusing on breath-by-breath analysis of retronasal aroma. Time variations of multiple low concentration flavor compounds at each exhalation events after swallowing food or drink could be tracked simultaneously by using PTR-MS instruments. With this approach, the aroma perception was analyzed in view of mass transfer processes, especially remarking interfacial mass transfer which determined liquid-gas partitioning. Physicochemical properties related with retronasal aroma were complicated and could not be interpreted only by the differences of simple Henry's law constants.

1. は じ め に

食品を嚥下した後に咽頭部を経由して鼻腔内に達する香気（レトロネーザルアロマ）の分析が近年注目されている [1]。食品に関連する揮発性物質を簡便かつリアルタイムに分析することができれば、過渡的な現象の深い理解に繋がることが期待される。弊社では揮発性有機化合物をリアルタイムに分析する技術として、プロトン移動反応を用いた化学イオン化質量分析装置 PTR-MS (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometer, プロトン移動反応質量分析計もしくは陽子移動反応質量分析計) の適用を図ってきたが、数年前より飛行時間型質量分析計が搭載され、プレスバイプレス分析に代表される高時間分解能での多成分同時測定の実用性が飛躍的に拡大した。こうした背景を踏まえ、PTR-MS の適用技術を御紹介し、その食品工学分野における可能性について考察する。

2. PTR-MS の原理, 装置構成および特性

PTR-MS は、基本的にクロマトグラフによる分離機能をもたないオンラインの質量分析計であって、試料

気体を直接吸引して揮発性有機物質の濃度を測定する。装置構成は、Fig. 1 に示すようにイオン源、ドリフトチューブおよび質量分析計の 3 つの部分からなる。

イオン化は、イオン・分子反応である以下のプロトン移動反応によって行われる。

プロトン移動反応は、基本的にはプロトンが付加した分子イオンを生ずるソフトなイオン化である。反応部

Fig. 1 Structure of PTR-MS.

であるドリフトチューブの電場強度により、フラグメンテーションおよび相反するクラスターの生成が制御される。同じプロトン移動反応を利用する大気圧化学イオン化が、他の並行反応が複雑かつ反応の進行が試料中水分量に強く依存するのに対し、PTR-MSでは独立したイオン源に水蒸気を定量供給してイオン化し、高純度、大量かつ一定の H_3O^+ イオンを生成する。一次イオン H_3O^+ が大過剰、すなわち擬一次反応条件が成立するため、生成物イオン RH^+ の濃度と元の中性分子 R の濃度は単純な次式の関係となる。

$$[RH^+] \approx [H_3O^+]_0 [R]kt \approx [H_3O^+] [R]kt$$

すなわち中性分子 R の濃度 $[R]$ は、反応速度定数 k および反応時間 t を介して、生成物イオン濃度 $[RH^+]$ と一次イオン濃度 $[H_3O^+]$ の比と完全な比例関係にある。反応時間はドリフトチューブ中における一次イオンの流下時間から計算される。水よりもプロトン親和力が小さいアルカン、エチレン、アセチレンおよびハロアルカンを除き、プロトン移動反応が進行する有機物では、ほとんどが $2 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s} \pm 30\%$ の範囲の反応速度定数をもつため、例え未知物質であっても一義的には絶対濃度測定となる。以下の測定事例における濃度表示は、全て $2 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$ の速度定数を使用したベンゼン等価濃度 ($1.98 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$) で示している。

上記の原理により、PTR-MSは最低でも5桁半以上の広い直線定量範囲と0.998以上の R^2 値である優れた直線性を示し、高感度機種では4,500 cps/ppb (すなわち1秒の測定で0.2 pptの物質に対し感度がある)の感度が得られ、最小検出限界は1 ppt以下(1分積算, 3s)である。また100 ms以下の速い応答速度を得ている。

従来、四重極型質量分析計を搭載していたため異なる質量数の検出は逐次測定であったが、最近では直交加速リフレクトロン飛行時間型質量分析計の搭載が主流となり、完全な多成分同時リアルタイム測定が可能となった[2]。

3. PTR-MSの適用方法

当初、食品分野におけるPTR-MSの利用は、リアルタイム性よりもむしろ簡便性の長を生かして食品のヘッドスペースガスを測定し、香気成分の質量スペクトルを取得して主成分分析と合わせて食品の特性化を行う、あるいは線形判別分析により製品品質管理に用いる方法が主であった。Fig. 2に示すように、ヘッドスペース分析の適用方法は、①バッグ入りの試料のようにヘッドスペース体積の縮小を許容する静的分析法、②試料容器に導入配管を挿し、別途空気が入る開口部を設けることで、PTR-MSで吸引する流量分のヘッドスペースが置換する半動的分析法、および③試料容器

Fig. 2 Application methods of PTR-MS.

にVOCフリーの純窒素あるいは合成空気をパージガスとして定量供給し、完全な流通条件でヘッドスペースガスをPTR-MSに供給する動的分析法に分けられる。またリアルタイム性を活かした適用としては、揮発性物質の経時的なモニタリングやプロセスモニタリングが挙げられるが、最も端的な測定はレトロネーザルアロマを一呼吸ごとの挙動で観るブレスバイブレス分析である。

4. PTR-MSの適用事例

4.1 食品のヘッドスペース分析と特性化

放出される香気成分により食品の特性化を行うことにPTR-MSを利用している事例は、多数報告されている[3]。ソフトなイオン化を行うPTR-MSで測定する質量スペクトルは、基本的に各質量ピークが物質に直接対応している。そこで主成分分析を行うことで、官能試験による評価とも関連付けられ、かつ数値的に表現することが可能となる。ここで時間プロファイルも加味して特性化を行うと、より官能評価に密接な情報が得られる。

Fig. 3はティーバッグの緑茶を淹れたときの質量分解能6,000程度の直交加速リフレクトロン飛行時間型質量分析計を搭載した機種による半動的ヘッドスペース測定の例であり、湯を注いでからの香気物質濃度の変化を時系列で示している。これ以降、物質名は他の情報と合わせることで特定もしくは推定される物質を示し、分子式レベルの特定では正しいが、構造異性体その他の異性体を含む場合にはそれらの寄与があることに留意されたい。茶を淹れた直後の揮発物質濃度はカフェインを含めて非常に高く、カロチノイド由来のイオノンおよびテアスピラン類も比較的高いことがわかる。一方、リナロールは比較的低い。イソプレネン、硫化ジメチルおよびペンテナールなどを標準的挙動とすると、カフェインは遅れて最大となる。これはカフェインが茶葉中では固体として存在し、湯に溶解する過程が含まれるためと説明される。一方、ワッ

Fig. 3 Time evolution of released flavor compounds from brewed tea. The protonated masses are shown in the legend.

クス状であるドデセナールおよびドデカン酸は早期に最大となり、これらが茶葉表面に局在しているため早いものと考えられる。カロチノイド由来物質についても、物質により挙動が異なり、イオノンおよびテアスピロンは標準的もしくはやや早い挙動を示す。より定量性を重視して評価したい場合、種々の条件を管理した動的ヘッドスペース法が適する。

4.2 変化の追跡もしくはプロセスモニタリング

長い時間スケールでの連続測定により、肉類の熟成と腐敗、あるいは発生代謝物質により汚染細菌類の特定を行うといった品質管理に PTR-MS を用いた例も散見される [4]。

一方、プロセスモニタリングへの適用として、発酵槽オフガス中の揮発性物質による乳酸発酵のモニタリング例を Fig. 4 に示す。図中の複数のトレースは異なる 9 回のバッチの繰返しにおけるジアセチルの挙動を示す。バッチごとのばらつきの範囲内で発酵過程の再現性を示している。乳酸自体もオフガス中で検出され

Fig. 4 Reproducibility of time profile of diacetyl detected in fermenter off-gas. A total of 9 traces, each representing a different batch, are plotted together.

るが、揮発性が低くかつ見掛けのヘンリー定数は pH 変化に依存するため、副反応での代謝生成物であるジアセチルの方が管理指標として向く。このような通気式の培養槽オフガス中の揮発性物質濃度と液相濃度の関係は、通気ガス中の見掛けのヘンリー平衡を考慮することで比較的単純なモデル化が可能であり、有用物質生産量あるいは菌体量が予測可能である。また混在する放線菌の増殖は、トリメチルアニソールおよびジオスミンなどのカビ臭物質の生成などで検出できる。

4.3 レトロネーザルアロマのプレスバイプレス分析

食品を喫食したときの香りは、最終的にレトロネーザルアロマとして感じられる。そこで鼻腔内呼吸サンプルを用いて、食品喫食時の鼻腔内の香気成分変化を呼吸サイクルに合わせてリアルタイム分析するプレスバイプレス分析は興味もたれる。鼻腔内呼吸サンプルは鼻腔内への挿入管の片側を大気解放として呼吸を可能とするもので、直交方向から挿入管内にキャピラリーを差し込み、流速条件を最適化することにより、吸気時には室内空気、呼気時には鼻腔内の呼気のみを PTR-MS に導入する。このため吸気、呼気のサイクルにより、例えばアセトンのような呼気中の代謝物質は楕形の繰返し挙動が観測される。

プレスバイプレス分析の実例として、熱いコーヒーを飲んだ場合の鼻腔内呼吸の経時変化を Fig. 5 に、冷めたコーヒーを飲んだ場合の鼻腔内呼吸の経時変化を Fig. 6 に示す。前者は淹れて 5～10 分後、後者はポットに入れて 9 時間後に供試している。Semmelroch および Grosch [5] によるコーヒーを特徴付ける最重要香気物質は全て挙動が観測可能であった。両者の図は呼吸の周期がやや異なるが、時間よりもむしろ呼吸サイクル数の関数として眺める方が適切である。メチルブタナールに関しては、前者および後者共に速い減衰を示しており、嚥下後 1 呼吸目で最大で、2 呼吸目は 1/3

Fig. 5 Breath-by-breath analysis of retronasal aroma for specified compounds after a swallow of hot coffee. Each peak corresponds to an exhalation event. A total of 22 exhalation events were monitored.

以下に減少しているが、前者の方がピーク濃度はやや大きく初期の減衰がやや速い。このように2呼吸目で急激な減少をする典型的な物質は脂肪酸エステルである。ピリジンは両者共にやや緩やかな減衰を示すが、後者はピーク濃度が高く、かつ減衰が速い。一方、メチオナルおよびグアヤコールでは、後者がピーク濃度が高いが減衰曲線を呈し、前者は低濃度が持続している。なお両者の条件において、これらの物質における呼気由来の他の干渉の挙動の違いへの寄与は小さい。両者の条件は豆種、焙煎度、挽き方および淹れ方が異なるために単純な比較とはならないが、考察のための典型的な例として挙げたものである。前者はエスプレッソ式であり、疎水性物質を含めて多くの香気成分を抽出しているものと予想されたが、ドリップ式の後者の方が多くの香気成分のピーク濃度が高かった。しかも後者では淹れてから長時間が経ち、香気成分は大分散逸しているはずである。1呼吸目のピーク濃度は、口に含まれたコーヒー液の液相と分配するヘッドスペースガスの一部が周り込んでおり、見掛けのヘンリー定数を介して液相濃度と関係付けがなされ、濃度軸を対数表示とした場合の減衰曲線の傾きは口腔から鼻腔にかけての何れかの表面での気液分配における見掛けのヘンリー定数と相関していると考えられる。この液膜表面のpHあるいは界面における疎水性膜の存在の有無によ

Fig. 6 Breath-by-breath analysis of retronasal aroma for specified compounds after a swallow of cold coffee. Each peak corresponds to an exhalation event. A total of 20 exhalation events were monitored.

り、物質によっては見掛けのヘンリー定数は数倍程度変化するものと考えられる。他の例としてブラックコーヒーとミルク入りコーヒーのレトロネザルアロマの挙動は異なり、メチルプロパナール、ジアセチル、ピリジンおよびメチルフランなどの多くの香気物質で、嚥下後のピーク濃度はラテの方が大きいが減衰は速い傾向が観られ、ブラックコーヒーの方が持続性がある。こうした挙動の違いは、乳成分による見掛けのヘンリー定数の変化によると考えられる。先の熱いコーヒーと冷めたコーヒーの挙動の違いも、温度低下により口腔から鼻腔に親油性の被膜が形成され、上述の物質の界面物質移動を促進している可能性がある。

香りの持続性の観点は食品の香味の設計において重要である。例えばチューインガムに入れるミント系香料に関して、等量であってもカプセル化およびガム素材の違いによりL-メントールの香りの持続性が違うが、実際にプレスバイプレス測定で比較しても同様の挙動を可視化できる。

プレスバイプレス分析は簡易ではあるが、管理が比較的難しい手法である。同一の由来の試料を測定する場合においても、試料調整後の経過時間もしくは開封時間、温度、pH、口に含まれてから嚥下までの維持時間など多くのパラメータを制御しなければならない。また被験者の差は換気量、口腔体積、口腔、鼻腔および

上気道の湿度が関係すると考えられるが、多くの場合はそれらが決定的な差とはならないようである。注意しなければならないのはブランクである。プレスバイプレス測定では何も喫食しない場合の鼻腔内呼吸をブランクとして測定する。ブランク呼吸中に含まれる物質は非常に多く、純粋な代謝物質、吸気した室内空気中の存在物質、口内細菌産生物質、および過去に喫食した食物履歴に由来する残存物質の寄与を考慮する必要がある。また測定に供する試料の調製には注意が必要であり、香気の散逸による室内空気中あるいはオルソネーザルアロマの鼻腔への吸着・残留も無視できない。以上のような議論が可能になるのはPTR-MSという道具が得られたからにはほかならない。先の例で明らかのように、レトロネーザルアロマの追跡は嚥下後1呼吸目のピークを確実に捉える必要がある。重要な香気成分では1秒の測定時間で1ppb以下の感度は必須であり、同時多成分に対して1秒で0.1ppb以下の感度が望まれ、PTR-MSはその要求に応える独自の装置であり、絶対濃度測定であることが強みである。

4.4 ヘンリー定数の測定とレトロネーザルアロマ香気成分の鼻腔への移行率

香りを感じるのも、香気成分が食品から気相に移行するという過程が鍵となる。そこで気液分配を決定するヘンリー定数が問題となるが、香気物質では値が報じられていないものも多い。また液相での解離平衡あるいは液相反応がある物質では見掛けのヘンリー定数が問題となり、実際系での実測が望ましい。ヘンリー定数の測定法は幾つかあるが、動的ヘッドスペース法を利用してPTR-MSにより測定が可能である。十分な気液接触時間を有するストリップングセルに所定濃度の水溶液を入れて通気した時、気相中の香気物質濃度 C (ppb) の時間変化は次式で表される。

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -\frac{F}{VHRT}t$$

ここに C_0 はセル内水溶液の初期濃度に平衡な香気物質の気相濃度 (ppb)、 F はガス流量 (L/s)、 V は液量 (L)、 H はヘンリー定数 (M/atm)、 T は温度 (K)、 R は気体定数 0.0821 (atm L/mol/K) を表す。上式からヘンリー定数は、縦軸を対数表示の濃度、横軸を時間に採った近似直線の傾きから計算される。Fig. 7 は培養液マトリクス中の硫化水素の見掛けのヘンリー定数 H^* の測定事例である。

文献値の得られない香気物質についても、上記の手順で純物質を超純水中に溶解してヘンリー定数を求めた後、所定濃度の水溶液を嚥下してプレスバイプレス測定を行った。鼻腔内での最大ピークの呼吸濃度をヘンリー定数から計算される気相平衡濃度で除した割合を鼻腔への移行率と定義すると、鼻腔への移行率は物

Fig. 7 Determination of effective Henry's law constant for hydrogen sulfide in a culture medium by dynamic headspace analysis.

質により大きく異なった。酢酸エチルの鼻腔への移行率は47%と高く、予想に反して揮発性の高いモノテルペンの α -テルピネンでは0.18%と低かった。セスキテルペンの β -カリオフィレンでは0.04%であったが、よりヘンリー定数の大きいオイゲノールでは7.4%と高かった。これらの結果は口腔、鼻腔および上気道にかけての物理化学過程が複雑であることを示唆する。

5. PTR-MS で観えるものと今後の展開

純粋科学分野における過渡現象の追跡では、すでにPTR-MSはデファクトスタンダードとなっている。食品工学分野においても、香りを感じるという総体的な現象に対し、PTR-MSはプロセス工学的あるいは物理化学的アプローチを導入し、物質移動の各過程まで考察を進めることを可能とする。今後は文献値のない香気物質のヘンリー定数の測定・開示も進め、より詳細な定量的解析を行っていく。

引用文献

- 1) M. Onishi; "Wine aroma observed by instrumental analysis (Kiki bunseki kara mita wain no kaori)". Jpn. J. Food Eng., **15**, 199-202 (2014).
- 2) M. Graus, M. Müller, A. Hansel; High resolution PTR-TOF: Quantification and formula confirmation of VOC in real time. J. Am. Soc. Mass Spectrom., **21**, 1037-1044 (2010).
- 3) F. Biasioli, C. Yeretzian, F. Gasperi, T. D. Märk; PTR-MS monitoring of VOCs and BVOCs in food science and technology. TrAC Trends Anal. Chem., **30**, 698-977 (2011).
- 4) D. Mayr, R. Margesin, F. Schinner, T. D. Märk; Detection of the spoiling of meat using PTR-MS. Int. J. Mass Spectrom., **223-224**, 229-235 (2003).
- 5) P. Semmelroch, W. Grosch; Studies on character impact odorants of coffee brews. J. Agric. Food Chem. **44**, 537-543 (1996).