報 文

GC/MS による異臭牛肉中のスカトールの分析

(平成 10 年 4 月 6 日受理)

田中康夫*¹ 笹尾忠由*¹ 桐ヶ谷忠司*¹
細井志郎*¹ 水野惇雄*¹ 河村太郎*²
中澤裕之*³

Analysis of Skatole in Off-Flavor Beef by GC/MS

Yasuo TANAKA*¹, Tadayoshi SASAO*¹, Tadashi KIRIGAYA*¹, Shiro Hosoi*¹, Atsuo MIZUNO*¹,
Taro KAWAMURA*² and Hiroyuki NAKAZAWA*³

(*¹Yokohama City Institute of Health: 1-2-17, Takigashira, Isogo-ku, Yokohama 235-0012, Japan; *²Kamakura Woman's College: 1420, Iwase, Kamakura 247-0051, Japan; *³Hoshi University: 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan)

An extract from beef with a "medicinal" smell in sensory analysis was analyzed by using GC/MS, and skatole was identified as the cause of the off-flavor. A GC/MS method with selected ion monitoring (SIM) was established for quantitative and sensitive analysis of skatole in beef with a detection limit of 0.1 $\mu\text{g/g}$. The recoveries of skatole from beef fortified at the levels of 0.5 $\mu\text{g/g}$ and 5.0 $\mu\text{g/g}$ were more than 95%.

Skatole was detected in smelly beef in the range of 1.6~5.6 $\mu\text{g/g}$. One sample among 30 commercial beef samples analyzed showed a level of 0.1 $\mu\text{g/g}$.

The threshold level of skatole for the off-flavor was evaluated as 0.2~0.3 $\mu\text{g/g}$ by sensory analysis.

Based on the concentration of skatole in off-flavor beef, the origin of the off-flavor was concluded to be skatole.

(Received April 6, 1998)

Key words: 牛肉 beef; 異臭 off-flavor; スカトール skatole; ガスクロマトグラフィー質量分析法 GC/MS; 臭いの閾値 smelly threshold

ま え が き

消費者から牛肉の異臭について検査依頼があり、その原因物質の究明を行った。官能検査によっても薬品臭が確認され、異臭牛肉の薬品臭抽出液を GC/MS で測定したところ、スカトールと推定されるマススペクトルが得られた。スカトールは、主にテンサイ糖の根、ジャコウ及びヒトの糞中に存在する物質である^{1)~4)}。食肉のスカトール臭は豚肉について報告例が多く、HPLC による方法が繁用されている^{5)~11)}。しかし、牛肉については

報告例がないため、牛肉中のスカトールを測定するために、分析精度及び定性能に優れた GC/MS-Selected ion monitoring (以下: GC/MS-SIM と略す) で定量する方法を検討し、異臭牛肉及び市販牛肉中のスカトール量を調べた。併せて牛肉中スカトールの官能試験における閾値を検討した。

実 験 方 法

1. 試 料

1995 年 1 月 18 日、1996 年 11 月 11 日及び 1997 年 2 月 27 日に、別々の消費者から持ち込まれた異臭の牛肉各 1 検体及び 1996 年と 1997 年に横浜市内のスーパーマーケットや小売店で販売されていた牛肉 30 検体を試料とした。

*¹ 横浜市衛生研究所: 〒235-0012 横浜市磯子区滝頭 1-2-17

*² 鎌倉女子大学: 〒247-0051 神奈川県鎌倉市岩瀬 1420

*³ 星薬科大学: 〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

2. 試薬及び標準品

標準品: スカトールは和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

アセトニトリル, アセトン, *n*-ヘキサン, ジエチルエーテル, 酢酸エチル, 塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム: 和光純薬工業(株)製残留農薬試験用を用いた。

標準溶液 I, II, III: スカトールを *n*-ヘキサン (標準溶液 I), アセトニトリル (標準溶液 II) 及びアセトン (標準溶液 III) で, それぞれ 100.0 µg/mL の濃度に調製し, 用時希釈して用いた。

3. 装置及び測定条件

ガスクロマトグラフ-質量分析計: ガスクロマトグラフは, Hewlett Packard 社製 5890 SERIES II, 質量分析計は, Hewlett Packard 社製 5989A 型を用いた。GC/MS の測定条件は下記のとおりである。

カラム; DB-1 (J&W Scientific 社製), 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 µm; カラム温度 60°C (2 min)-20°C/min-250°C-40°C/min-290°C (6 min); 注入口温度: 250°C; セパレータ温度: 250°C; イオン源温度: 250°C; イオン化電圧: 70 eV; イオン化モード: EI; 注入量: 2 µL (スプリットレス)

4. 試験溶液の調製法

試験溶液の調製法の概要を Scheme 1 に示す。

フードプロセッサーで細切均一化した試料 2 g にアセトニトリル 20 mL を加えて, 10 分間振とう抽出した。一夜放置した後, 三角フラスコにろ紙ろ過した。残さにアセトニトリル 20 mL を加えて 10 分間振とうした後, 同様にろ過し, 先のろ液と合わせた。これを, あらかじめ 10% 塩化ナトリウム水溶液 300 mL を入れた 500 mL の分液漏斗に移し, 三角フラスコを *n*-ヘキサン 50 mL で洗い, 分液漏斗に合わせ, 10 分間振とう

して静置後, *n*-ヘキサン層を三角フラスコに分取した。更に水層に *n*-ヘキサン 50 mL を加えて同様の操作を行い, *n*-ヘキサン層を合わせた。これに無水硫酸ナトリウム 20 g を加えて脱水した後, 200 mL ナス型フラスコに移し, 約 2 mL まで減圧濃縮して 10 mL の試験管に移した。ナス型フラスコの残留物を 8 mL の *n*-ヘキサンで洗い, 先の試験管に合わせ, 窒素気流下で濃縮し, 正確に 2 mL にして試験溶液とした。

5. 定性及び定量

GC/MS-SIM (*m/z*: 130, 131, 77) で得られたピークの保持時間及びピーク面積 (*m/z*: 130) により, スカトールの定性と定量を行った。更に, 同定は試験溶液を濃縮した後, GC/MS-SCAN で行った。

Scheme 1. Analytical procedure for determination of skatole in beef

Fig. 1. Total ion chromatograms of (a) authentic skatole and (b) beef extract by GC/MS-SCAN

Fig. 2. Mass spectra of (a) authentic skatole and (b) beef extract by GC/MS-SCAN

結果及び考察

1. 各標準溶液の用途

標準溶液 I, II, III を下記の用途で使用了。試験溶液は *n*-ヘキサンで調製したので、定性、定量及び同定は標準溶液 I を 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 及び 10.0 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製し、検量線作成及び確認試験に用いた。また、抽出溶媒はアセトニトリルを使用したので、転用溶媒検討時の添加は標準溶液 II を 1.0 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製し用いた。更に添加回収試験及び閾値の検討時の牛肉への添加は *n*-ヘキサン及びアセトニトリルよりアセトンが親和性がよいと考えられたので、標準溶液 III を 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ~100.0 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した。そしてアセトン臭を少なくするため、また、溶媒による回収率の影響を少なくするため、各 10 μL を使用した。

2. GC/MS による異臭牛肉中のスカトールの確認

異臭牛肉試験溶液中のスカトールの確認を試みた。標準溶液 I のスカトールのピークと異臭牛肉試験溶液のピーク A の保持時間が一致し、更に、標準溶液 I のマススペクトルの分子イオンピーク m/z 131 及び水素が脱離した m/z 130 が一致しており、異臭牛肉試験溶液のピーク A をスカトールと同定した (Fig. 1, 2)。更に異臭牛肉の異臭はスカトール標準品の臭いと同様でありスカトールであると確認した。

3. スカトールの抽出溶媒及び転用溶媒の検討

牛肉からスカトールを抽出する溶媒及び転用溶媒を検討した。スカトールは *n*-ヘキサン、アセトン、アセトニトリル、ジエチルエーテル及び酢酸エチルのいずれの溶媒にもよく溶解することから²⁾、これらのどの溶媒でも抽出可能と思われた。そこで残留農薬分析では脂肪含量の多い試料の抽出に繁用される¹²⁾ アセトニトリルを抽出溶媒として検討した。すなわち、スカトールの残留

Table 1. Recoveries of Skatole from Spiked Beef

Sample	Spiked ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
		Skatole
Beef	0.5	97 $\pm$ 3.6
	5.0	95 $\pm$ 1.6

Values are mean $\pm$ S.D. ($n=5$)

が認められない牛肉 2 g に 1.0 μg 相当量の標準溶液 III を添加し、アセトニトリルの抽出回数を 1 回、2 回及び 3 回に変化させ、以下 4. 試験溶液の調製法に従った。その結果、いずれも回収率 95% 以上であったので、抽出回数は 2 回とした。次に、10% 塩化ナトリウム水溶液からスカトールを再抽出する転用溶媒について検討した。転用溶媒としてはアセトニトリル-*n*-ヘキサン分配¹³⁾ 法による脱脂を目的として *n*-ヘキサンを検討した。抽出回数について 10% 塩化ナトリウム水溶液 300 mL にアセトニトリル 40 mL 及び 1.0 μg 相当量の標準溶液 II を添加し、抽出溶媒と同様に検討した。いずれも回収率約 100% であったので、転用溶媒も抽出溶媒同様抽出回数を 2 回とした。

4. 検量線の作成

GC/MS-SIM でスカトール (m/z 130) のピーク面積法で検量線を作成したところ、0.1~10.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性が得られ、検出限界は 0.1 $\mu\text{g/g}$ であった。

5. 添加回収試験

スカトールが検出されなかった牛肉を細切均一化し、その 2 g に 1.0 及び 10.0 μg 相当量の標準溶液 III をそれぞれ添加して 4. 試験溶液の調製法に従い、添加回収試験を行った。その結果 (Table 1)、回収率はいずれも

95%以上と良好であり、本法は牛肉中のスカトール残留分析法として日常分析に適用できるものと考えられる。

6. 苦情のあった牛肉及び市販牛肉の分析

異臭牛肉3検体及び市販牛肉30検体について、4. 試験溶液の調製法に従って、試験溶液を調製し、5. 定性及び定量により分析した結果、市販牛肉30検体中1検体から0.1 $\mu\text{g/g}$ のスカトールが検出された。この濃度ではスカトール臭は感じられなかった。一方、異臭牛肉3検体からは1.6~5.6 $\mu\text{g/g}$ 検出され (Table 2), 検出された市販牛肉の約15~55倍高い値であり、牛肉異臭 (スカトール臭) の原因になったものと考えられた。Fig. 3 にスカトールが検出された異臭牛肉 (1997年2月27日搬入) の試験溶液のマスキロマトグラムを示す。

7. スカトール濃度と臭い閾値の関係

ヒトがスカトール臭を感じる濃度について25名を被験者として官能検査により、その閾値を検討した。すなわち、スカトールが残留していない厚さ約5 mmの牛

肉を重さが1 g になるように縦約15 mm, 横約10 mm に切り取り、ふた付きシャーレに入れた。この牛肉にスカトール無添加及び10.0~100.0 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液IIIを10 μL ずつ添加し、0~1.0 $\mu\text{g/g}$ の濃度になるよう調製した。その結果 (Fig. 4), 0.9 及び1.0 $\mu\text{g/g}$ の濃度ですべての被験者 (25/25 名) が、0.6~0.8 $\mu\text{g/g}$ のレベルで約85% (21/25 名) の被験者が異臭を感じた。更に0.3 $\mu\text{g/g}$ の濃度で約70% (17/25 名) の被験者が、0.2 $\mu\text{g/g}$ のレベルで約45% (11/25 名) の被験者が牛肉以外の臭いを感じたことから、スカトール臭の閾値は0.2~0.3 $\mu\text{g/g}$ であると考えられた。異臭牛

Table 2. Contents of Skatole in Beef

Sample No.	Sampling date	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
		Skatole
1	January 18, 1995	5.6
2	November 11, 1996	1.6
3	February 27, 1997	2.6

Fig. 3. Mass chromatograms of (a) authentic skatole and (b) beef extract by GC/MS-SIM

Fig. 4. The correlation between concentration of skatole and the number of people who felt skatole's smell

肉のスカトール濃度はいずれも $1\mu\text{g/g}$ 以上であったため、スカトールがこのような異臭の苦情原因になったものと考えられた。牛肉中にスカトールが多く残留した原因については、スカトールが次のような要因で生成されることと関係するものと考えられる。すなわち、①食肉（主に豚肉）のスカトールは、トリプトファンから腸内細菌によって分解生成され^{14), 15)}、これが腸管から一部吸収された後、代謝されて尿中に排泄される³⁾が、排泄が阻害された場合、食肉中に蓄積される。また、②トリプトファンを多量に含有する飼料でウシを飼育すると、スカトールが体内で過剰に産生され、排出することが不可能となり、新鮮肉のスカトール汚染となると考えられている¹⁶⁾。更に、③肉が腐敗したときにもスカトールが発生すると考えられるが、今回の異臭牛肉の外観は対象品として持ち込まれた牛肉（腐敗臭なし）と同様であり、聞き取り調査によってもスカトール検出の原因を特定するには至らなかった。

ま と め

異臭のする苦情牛肉について原因物質の究明を行った。官能検査で薬品臭を呈したので、GC/MS で異臭牛肉の試験溶液を測定しスカトールと同定した。更に異臭牛肉の異臭はスカトール標準品の臭いと同様でありスカトールであると確認した。そこで、異臭牛肉のスカトールを定量するために GC/MS-SIM を用いた分析法を開発した。本法は検出限界 $0.1\mu\text{g/g}$ であり、添加回収率は 0.5 及び $5.0\mu\text{g/g}$ の標準溶液添加で 95%以上と良好であった。本法で、異臭牛肉 3 検体及び市販牛肉 30 検体の分析を行った結果、異臭牛肉すべてから $1.6\sim 5.6\mu\text{g/g}$ 、市販牛肉 1 検体から $0.1\mu\text{g/g}$ のスカトールを検出した。市販牛肉から検出された濃度レベルではスカトール臭は認められなかったため、ヒトが異臭と感じるスカトール濃度の閾値について検討したところ、約 $0.2\sim 0.3\mu\text{g/g}$ であった。異臭牛肉はスカトール臭閾値の

約 5~20 倍と高濃度だったため、異臭（スカトール臭）の苦情原因になったものと考えられた。

文 献

- 1) 久保亮五, 長倉三郎, 井口洋夫, 江沢 洋: “岩波理化学事典第 4 版” p. 649 (1987) 岩波書店.
- 2) 大木道則, 大沢利昭, 田中元治, 千原秀昭: “化学大辞典” p. 2,330 (1989) 東京化学同人.
- 3) 今堀和友, 山川民夫: “生化学辞典 (第 2 版)” p. 683 (1990) 東京化学同人.
- 4) 化学用語辞典編集委員会編: “化学用語辞典” p. 625 (1980) 技報堂出版.
- 5) Wilkins, C. K.: Int. J. Food Sci. Technol. **25**, 313~317 (1990).
- 6) Gibis, M., Dehnhard, M., Fischer, A.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **193**, 220~223 (1991).
- 7) Moller, J. H.: J. Chromatogr. **624**, 479~490 (1992).
- 8) Dehnhard, M., Claus, R., Hillenbrand, M., Herzog, A.: *ibid.* **616**, 205~209 (1993).
- 9) Gibis, M., Dehnhard, M., Fischer, A.: Deutsch. Lebensm. Rundsch. **89**, 313~344 (1993).
- 10) Moller, J. H.: J. Chromatogr. **661**, 219~230 (1994).
- 11) Tuomola, M., Vahva, M., Kallio, H.: J. Agric. Food Chem. **44**(5), 1,265~1,270 (1996).
- 12) 後藤真康, 加藤誠哉編著: “残留農薬分析法” p. 19 (1980) ソフトサイエンス社.
- 13) 厚生省生活衛生局監修: “食品衛生検査指針追補 I, 食品中の添加物分析法, 理化学編” p. 43~52 (1993) 日本食品衛生協会.
- 14) Yokoyama, M. T., Carlson, J. R.: Am. J. Clin. Nutr. **32**, 173 (1979).
- 15) 日高秀昌, 柴田利章: 食品工業 **31** (15), 52~57 (1988).
- 16) 森田茂広, 内田和夫翻訳: “肉の科学” p. 152 (1978) 学窓社.