

## 固相マイクロ抽出 (SPME) 法を用いた異臭物質のスクリーニング法の検討

林 貴寛\* 岩本 安未 石村 勝之 末田 義博

### はじめに

食品中への化学物質の混入による異味異臭の苦情は多く、最近ではマッシュルームからのクロロフェノール類検出事例(千葉県)、即席カップ麺からのパラジクロロベンゼン検出事例(神奈川県)等が挙げられる。これらの異臭物質の分析には、一般的に溶媒抽出が用いられているが、迅速性に欠け、少量の試料に対応することが難しい。

この問題点を解決するため、一部の地方衛生研究所において固相マイクロ抽出 (SPME) 法<sup>1)</sup>と呼ばれる抽出方法による分析が行われている。

SPME 法は、複雑な前処理が不要で短時間で分析でき、濃縮効果によって低濃度試料の測定が可能で、有機溶媒をほとんど使わない環境に優しい分析法である。当所においても、SPME 法を異臭物質等の検査手段の一つとするため、今回はクロロフェノール類とパラジクロロベンゼンについて検討を行ったので報告する。

### 方 法

#### 1 試料

牛乳, 100%オレンジジュース, 冷凍ロールキャベツ, キャベツ, 冷凍餃子

#### 2 試薬

標準液: 5種クロロフェノール混合標準液(2-クロロフェノール, 4-クロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノール, 2,6-ジクロロフェノール, 2,4,6-トリクロロフェノール各 1mg/ml アセトン溶液, 和光純薬工業), p-ジクロロベンゼン標準原液(1mg/ml メタノール溶液, 関東化学)をメタノールで適宜希釈して使用した。

その他の試薬: 残留農薬試験用メタノール, 特級塩化ナトリウム, 超純水(Milli-Q)を用いた。

#### 3 装置

(1) マニュアルインジェクション

GC/MS: 島津 GC-17A/GCMS-QP5000

(2) オートサンプラーインジェクション

GC/MS: 島津 GC-2010/GCMS-QP2010 Plus

オートサンプラー: 島津 AOC-5000

(1), (2)共に内径 0.75mm インレットライナーを使用し, ファイバーは 85  $\mu$ m Polyacrylate ファイバー (SUPELCO) を使用した。

#### 4 測定条件

(1) GC/MS 条件

カラム: (株)J&W 社製 DB-5MS (0.25mm i. d.  $\times$  30m, 0.25  $\mu$ m), キャリアーガス: ヘリウム (1.2ml/min), オープン昇温: 40°C (2min) - 10°C/min - 280°C (5min) (Total 31min), 注入口温度: 260°C, インターフェイス温度: 280°C, 測定モード: Scan or FASST, Splitless

(2) オートサンプラー条件

平衡化: 50°C, 5min, 500rpm, 抽出: ヘッドスペース/SPME 法, 50°C, 15min

#### 5 試験溶液の調製

(1) 液体試料

20ml バイアル管と塩化ナトリウムを 200°C で 2 時間以上加熱し, デシケーター内で室温まで冷却した。バイアル管内に塩化ナトリウム 3.7g, 液体試料 10ml を加えた。添加用混合標準液を液中加入し, 直ちにセプタム付きキャップをしてサンプルとした。

(2) 固体試料

液体試料と同様に, 20ml バイアル管と塩化ナトリウムを加熱, 冷却し, バイアル管内に塩化ナトリウム 3.7g を加えた後, 個体試料 1g を加えた。添加用混合標準液を加えた後, 超純水を加えて 10ml にメスアップし, 直ちにセプタム付きキャップをしてサンプルとした。

#### 6 検量線用混合標準液の作製

各標準液を混合し, メタノールで希釈して 100  $\mu$ g/ml 及び 10  $\mu$ g/ml 混合標準液を調製した。この混合標準液を, 試料の代わりに超純水を用いて作成したサンプルにマイクロシリンジで 0.5  $\mu$ l ~ 5  $\mu$ l 注入し, 溶媒標準液とした。これを試料と同様に抽出し, ピーク面積法により検量線を作成した。

マトリックス標準液は, 同一製品の対照品を用い, 同様にして作成した。

\*: 現 広島市環境局産業廃棄物指導課

## 結果と考察

### 1 塩効果と pH の影響

気液平衡によるヘッドスペース気相の分析において、塩類の添加<sup>2)</sup>や pH のコントロールによって測定感度が上昇することが知られている。そこで、塩効果と pH の影響をマニュアルインジェクション法により検討した。

添加剤には抽出に影響を与えない不揮発性の物質を選ぶ必要がある。今回は食塩とリン酸を添加剤に選び、無添加で抽出した時のピーク面積を 1 として比較した。どの化合物も食塩添加により 2 ~ 19 倍と感度が向上し、pH を酸性にした場合にも約 1.5 倍の感度の上昇がみられた。また、両方を添加した感度はそれぞれを単独で添加した場合の概ね乗算した値であった(表 1)。

### 2 定性分析の例

混合標準液を 0.1ppm になるよう添加した牛乳をマニュアルインジェクション法によって分析した(図 1)。

図 1 は通常の牛乳と測定物質を添加した牛乳を SCAN 分析し、そのクロマトグラムを重ねて表示したものである。重ねて見ることにより、本来含まれていない成分のピークがよく分かるが、正確に混入物質のピークを特定するためには、元来からの食品由来物質によるピークを排除する必要があるため、対照には同一製品の使用が望ましい。類似の製品、例えば他社が発売する同様の製品であっても微妙に成分は異なり、単純な比較は難しい。

### 3 再現性の検討

クロロフェノール類を 50ng/ml 含む超純水を 5 検体作成し、マニュアルインジェクション及びオ

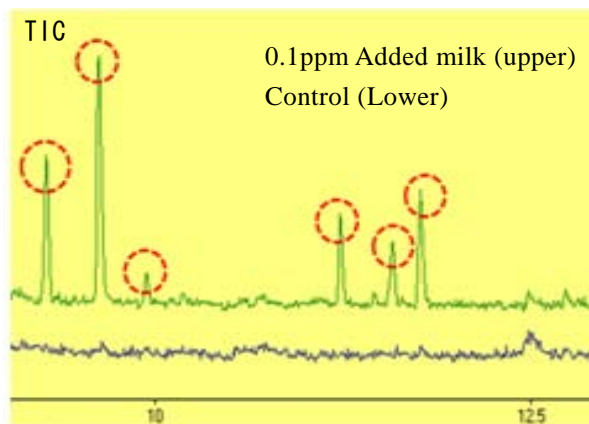


図 1 混合標準液添加牛乳のクロマトグラムの一部

ートサンプラーインジェクションにより繰り返し測定を行った。その結果、抽出等を全て手作業で行うマニュアルインジェクションでは RSD[%] が 9.0 ~ 16.2%, オートサンプラーインジェクションでは 2.8 ~ 4.9% となった(表 2)。この結果から、以後の検討は、抽出や GC/MS への導入を自動で行えるオートサンプラーインジェクションを用いて行った。

表 2 再現性試験の比較 (n=5)

| Target analyte        | RSD [%] |              |
|-----------------------|---------|--------------|
|                       | Manual  | Auto sampler |
| 2-chlorophenol        | 9.0     | 4.3          |
| 4-chlorophenol        | 14.7    | 3.1          |
| 2,4-dichlorophenol    | 13.6    | 2.8          |
| 2,6-dichlorophenol    | 12.6    | 3.0          |
| 2,4,6-trichlorophenol | 16.2    | 4.9          |

表 1 NaCl と H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH2) 添加による感度変化

| Analytes              | Additive |      |                                      |                                     |
|-----------------------|----------|------|--------------------------------------|-------------------------------------|
|                       | None     | NaCl | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH2) | NaCl+H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> |
| 2-chlorophenol        | 1        | 9.4  | 1.4                                  | 11.0                                |
| 4-chlorophenol        | 1        | 7.6  | 1.2                                  | 9.2                                 |
| 2,4-dichlorophenol    | 1        | 11.8 | 1.3                                  | 14.1                                |
| 2,6-dichlorophenol    | 1        | 14.9 | 1.6                                  | 18.3                                |
| 2,4,6-trichlorophenol | 1        | 18.5 | 2.0                                  | 31.7                                |
| p-dichlorobenzene     | 1        | 2.0  | 1.3                                  | 3.2                                 |

#### 4 液体試料の定量検討

定量試験への応用を検討した。100%オレンジジュースに標準溶液を20 ng/mlとなるように添加して測定試料を作成し、前述の方法により測定を行った。しかし、Milli-Q水を用いて作成した検量線では適切な回収率を得ることはできなかった。この様な試料では、標的となる化合物よりマトリックス成分の方が大過剰に存在するため、ファイバー間の平衡反応が早いと考えられる<sup>3)</sup>。岩佐らの報告<sup>4)</sup>では、食品中に含まれるVOCsのHS-GC/MSによる分析においてマトリックス標準液が効果的であると述べている。SPMEを用いたGC/MSでも同様にマトリックス効果が起こっていると考えられたことから、同Lot.のオレンジジュースを用いたマトリックス標準液により定量を行ったところ、良好な回収率が得られた(表3)。

なお、このマトリックス効果は成分の異なる水溶媒でも見られ、蒸留水、ミネラルウォーター、水道水などでも相互に定量することが困難であった。

#### 5 固体試料の定量検討

固体試料の定量では、まず固体試料からの抽出方法を検討した。一般に、固体試料の定性・定量分析は溶媒を加えず、固体のみで行っている報告が多い<sup>5)</sup>。しかし、今回は異臭物質をターゲットとしているが、それら以外の物質(例えば農薬等)も分析する場合、固体内部に含まれる化合物も標的とする必要がある。そこで、冷凍ロールキャベツに30 ng/gとなるように標準液を添加した試料を用い、固体表面に添加した場合(図2, entry1)と、固体内部に添加して混合した場合(図2, entry2)で測定した時、測定強度が含有形態によってどれほど違うか検討してみた。その結果、固体のみの測定では、表面に含まれる場合と内部に含まれ

表3 オレンジジュースの添加回収試験結果(n=5)

| Target analyte        | Recovery rates [%] |                 |
|-----------------------|--------------------|-----------------|
|                       | Solvent standard   | Matrix standard |
| 2-chlorophenol        | 28                 | 93              |
| 4-chlorophenol        | 32                 | 104             |
| 2,4-dichlorophenol    | 7                  | 96              |
| 2,6-dichlorophenol    | 26                 | 94              |
| 2,4,6-trichlorophenol | 10                 | 101             |
| p-dichlorobenzene     | 4                  | 93              |

る場合とで強度の差が大きかった。

一方、標準液を添加した固体試料に水を加えて10 mlにメスアップすることで試料を溶媒中に拡散させた場合、強度は低下したが表面添加(図3, entry3)、内部添加(図3, entry4)で、測定値間の差はみられなかった。さらに、食塩を飽和量加えた場合、測定値間の差は小さく、かつ強度が増加した。表面添加(図3, entry5)、内部添加(図3, entry6)。これらの結果から、固体の定量試験の検討には固体1gを水で10 mlにメスアップし、食塩を飽和量添加する方法を用いることとした。

今回、固体試料として比較的夾雑成分の少ないと考えられるキャベツと、様々な食材や油分を含み、夾雑成分が多い食品として冷凍餃子について、混合標準液を20 ng/mlとなるように添加し測定試料を作成し、マトリックス標準液を用いて添加回収試験を行った。固体内部に添加したものが全体的に感度は低くなったが、回収率は良好であった。なお、餃子については一部の物質の回収率が高くなった(表4)

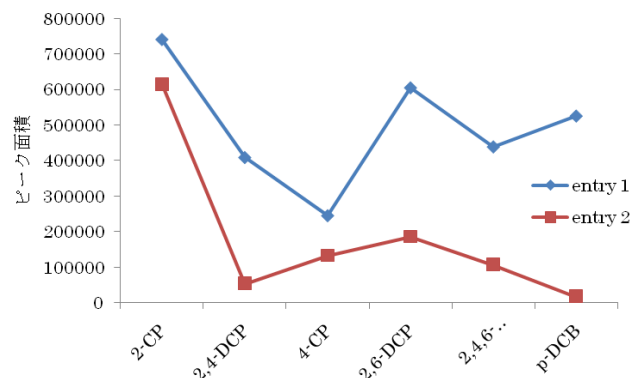


図2 固体試料測定における含有形態による強度差

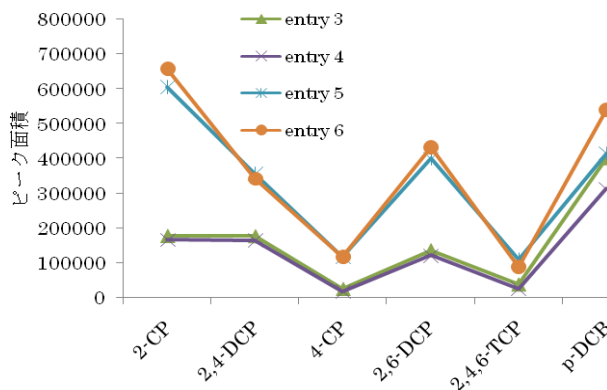


図3 固体試料測定における溶媒と塩添加の効果

**表 4 キャベツと餃子の添加回収試験結果 (n=5)**

| Target analyte        | Cabbage recovery rate [%] |          | Gyoza recovery rate [%] |          |
|-----------------------|---------------------------|----------|-------------------------|----------|
|                       | Matrix standard           |          | Matrix standard         |          |
|                       | Surface                   | Internal | Surface                 | Internal |
| 2-chlorophenol        | 98                        | 91       | 106                     | 97       |
| 4-chlorophenol        | 115                       | 96       | 111                     | 96       |
| 2,4-dichlorophenol    | 98                        | 87       | 133                     | 110      |
| 2,6-dichlorophenol    | 98                        | 90       | 128                     | 119      |
| 2,4,6-trichlorophenol | 91                        | 80       | 100                     | 98       |
| p-dichlorobenzene     | 99                        | 101      | 108                     | 88       |

**ま と め**

クロロフェノール類と p-ジクロロベンゼンについては、対照品との比較において異臭成分ピークを確認できた。他の異臭物質についても、SPME法を用いて試験品と対照品を同一条件で抽出・分析し、そのクロマトグラムを比較することで原因物質を迅速に特定できると考えられた。

試験品と同じ夾雑成分を含むマトリックス標準液を用いることで、オレンジジュースのような液体試料についても定量が可能であった。しかし、夾雑成分の多い固体試料の餃子では、今回一部の物質において回収率が高くなったり、ばらつきが大きくなったりすることがあり、抽出及び測定条件等についてはさらに検討が必要である。

**文 献**

- 1) Catherine L.Arthur et al:Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, Anal.Chem., 62(19), 2145~2148 (1990)
- 2) Xiaogen Yang et al:Solid-phase microextraction for flavor analysis, J.Agric.Food Chem., 42, 1925~1930(1994)
- 3) Agnes G. Oomen et al:Nonequilibrium solid-phase microextraction for determination of the freely dissolved concentration of hydrophobic organic compounds:matrix effects and limitations, Anal. Chem., 72, 2802~2808(2000)
- 4) 岩佐美紀子 他：食品中の揮発性有機化合物の分析技術の確立，宮崎県衛生環境研究所年報，20，97~101(2008)
- 5) 伊藤光男 他：SPME/GCMS法による食肉に移染した溶剤類の定量，神戸市環境保健研究所報，31，59~64(2003)