

缶詰鶏卵の異臭原因物質としてのクロロフェノール類の同定と定量

達家 清明・末兼 幸子・酒井 康江

Identification and Detection of Chlorophenols as Off-Flavor Components in Canned Eggs

Kiyooki TATSUKA, Sachiko SUEKANE and Yasue SAKAI

The canned eggs with slight disinfectant off-flavor were analyzed for the presence of chlorophenols. An acetylated extract of chlorophenols isolated from off-flavored egg-yolk was injected to capillary column GC-MS. Mass chromatographic method was employed to detect trace amount of chlorophenols. 2,4-Dichlorophenol, 2,6-dichlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol were detected with the concentrations of $1.8 \mu\text{g kg}^{-1}$, $1.7 \mu\text{g kg}^{-1}$, and $1.7 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. It was concluded that these compounds are responsible for the disinfectant off-flavored egg-yolk.

食品産業における消費者苦情の原因として異臭の占める割合は大きい。輸送、加工及び包装等について十分な注意が払われている現在においてもオフフレーバの原因を根絶することは難しいと言われている。食品のオフフレーバの原因、原因物質及び分析法等については従来数多くの報告がある¹⁻⁵⁾。鶏卵及びブロイラーではクロロアニソールによるかび臭についての報告はあるが^{6,7)}、缶詰鶏卵の卵黄から消毒臭様異臭が感じられたという報告は見あたらない。筆者らは今回GC-MSマスキロマトグラフ法によって卵黄の消毒臭様異臭の原因物質と推定されたハロゲン化フェノール類の同定と定量を行ったので報告する。

実験材料及び方法

1. 実験材料及び試薬

官能評価によって卵黄に消毒臭様異臭を僅かに感じる缶詰鶏卵及び正常な缶詰鶏卵。実験用には超純水製造装置 (ELGASTAT UHQ, Elga Ltd., U. K.) によって処理した水もちいた。2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP)、2,6-Dichlorophenol (2,6-DCP)、2,4,6-Trichlorophenol (2,4,6-TCP)、2,3,4,6-Tetrachlorophenol (2,3,4,6-TeCP)、及び Pentachlorophenol (PeCP) は和光純薬株式会社製1級試薬、2,4-Dichloro-6-methylphenol (2,4-DC6MP) は東京化成工業株式会社製試薬を、その他の試薬は市販の特級品を用いた。サンプル前処理用のSEP-PAK C₁₈ CARTRIDGEは Waters Associates (U. S. A.)製を用いた。

2. 異臭成分の捕集とアセチル化

(1) 水蒸気蒸留・抽出

卵黄20個(約250g)をホモジナイズ、水2.5ℓを加え2モル硫酸でpHを4とし、1時間室温に放置後蒸留し800mlまでの留出液をあらかじめ0.1規定水酸化ナトリウム20mlを入れた受器に、流出中pHを10以上に保ち捕集した。留出液をクロロホルム80mlおよびペンタン80mlでそれぞれ2回ずつ抽出後、水層をロータリエバポレータを用いて50℃以下で20mlまで濃縮し、2モル硫酸でpHを

2とする。メタノール4 mlと水20mlでもって予備洗浄したSEP-PAK C₁₈ CARTRIDGEを通し、20mlの水で2回洗浄後、4 mlのメタノールで溶離する。溶離液を0.1規定水酸化ナトリウムでもってpHを10とし、ロータリエボレータを用いて室温で殆ど乾燥状態とした後、酢酸・イソプロパノール(1:1) 200 μ lに溶解する。

(2) 濃縮物のアセチル化

酢酸・イソプロパノール(1:1)抽出物200 μ lをあらかじめ0.1M-炭酸ナトリウム3 mlの入った25ml容の分液漏斗に移し、ヘキサン・トルエン混液(10:1) 2 ml、無水酢酸200 μ lを加え1分間激しく振る。5分間放置後ヘキサン・トルエン混液層を無水硫酸ナトリウムで脱水後窒素気流中で20 μ lまで濃縮し、その3 μ lをGC-MSに注入した。

3. 分析条件

GC-MS: 島津製作所製GCMS-QP1000(四重極形)。カラム: 島津製作所製溶融シリカキャピラリーカラムHiCap-CBP1(OV-1相当)、内径0.2mm、長さ25mイオン源直結。キャリアガス: ヘリウム、線速度30cm/sec。スプリット比40:1。注入口温度: 250 $^{\circ}$ C。カラム温度プログラム: 4 $^{\circ}$ C/minで80~200 $^{\circ}$ C昇温。イオン源温度: 250 $^{\circ}$ C。イオン化: EI, 70eV。走査: 2秒間隔でm/e 20-350。

4. ピークの同定

標準物質とのマススペクトル及びマスクロマトグラム的一致によった。

5. フラグメントイオン強度を用いた内部標準法による定量精度

マスクロマトグラム法によって各々の化合物を定量するために、それぞれの化合物に特徴的でか

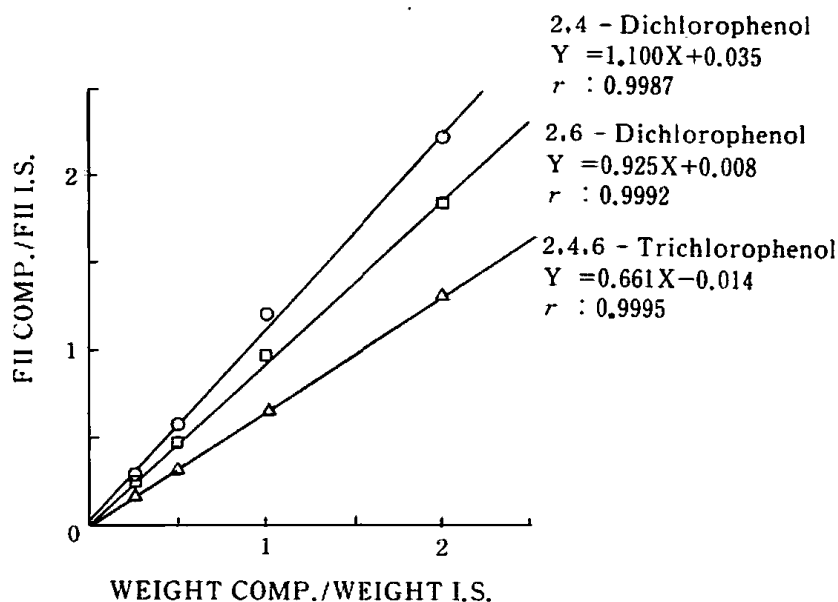


Fig. 1 Calibration curves for 2,4-Dichlorophenol, 2,6-Dichlorophenol and 2,4,6-Trichlorophenol obtained from fragment ion intensity of GC-MS by using 2,4-Dichloro-6-methylphenol as an internal standard. The fragment ions of acetylated derivatives are $m/e=162$ (2,6-DCPA and 2,4-DCPA), $m/e=196$ (2,4,6-TCPA) and $m/e=176$ (2,4-DC6MPA).

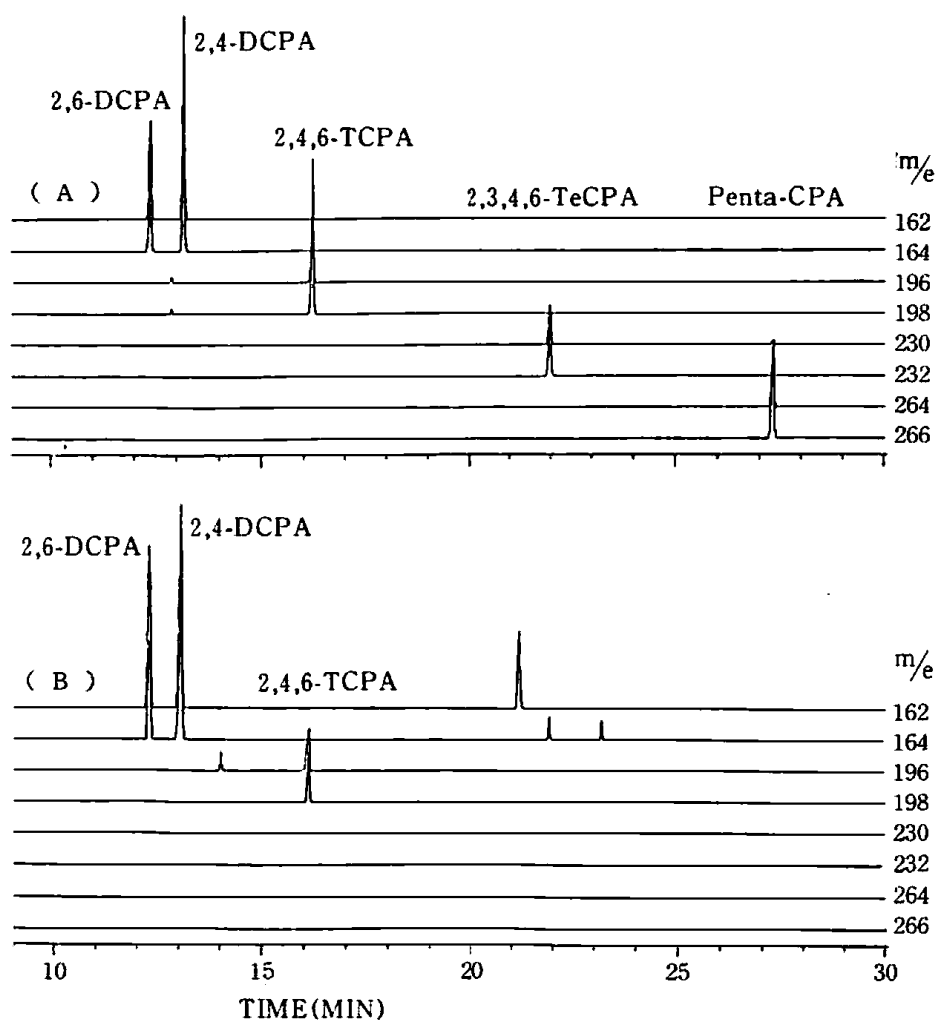


Fig. 2 Section of mass chromatogram of an acetylated standard chlorophenols (A) and an acetylated extract of chlorophenols (B) isolated from off-flavored yolk. In this chromatogram fragment ($M-42$) and ($M+2-42$) ions were monitored for 2,4-Dichlorophenol acetate, 2,6-Dichlorophenol acetate, 2,4,6-Trichlorophenol acetate, 2,3,4,6-Tetrachlorophenol acetate and Pentachlorophenol acetate.

つ強度の大きいフラグメントイオンピークの強度を用いて内部標準法によって定量する場合の精度について検討した。鶏卵中に検出された 2,4-DCP, 2,6-DCP 及び 2,4,6-TCP をそれぞれ 10ppm, 20ppm, 40ppm 及び 80ppm、内部標準の 2,4-DC6MP はいずれも 80ppm になるようにヘキサン・トルエン混液 (9 : 1) に溶解し、サンプル蒸留物のアセチル化の場合と同様にしてアセチル化し、 $0.5\mu\text{l}$ を GC-MS に注入した。検量線作成に用いたアセチル化誘導体のフラグメントイオンは 2,4-Dichlorophenyl acetate (2,4-DCPA) 及び 2,6-Dichlorophenyl acetate (2,6-DCPA) が $m/e = 162$ 、2,4,6-Trichlorophenyl acetate (2,4,6-TCPA) が $m/e = 196$ 、内部標準 (2,4-Dichloro-6-methylphenyl acetate (2,4-DC6MPA)) が $m/e = 176$ である。検量線を Fig. 1 に示す。相関係数はいずれも 0.998 以上で十分に定量に利用出来る。

6. 定量方法

定量は2,4-DC6MPを内部標準として1点検量法で行った。蒸留に先立ち異臭卵黄にはその重量に対して $200\mu\text{g kg}^{-1}$ になるように内部標準溶液(2,4-DC6MPの $1\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ 炭酸ナトリウム溶液)を加え、また検量線用の正常卵黄にはその重量にたいして内部標準は $200\mu\text{g kg}^{-1}$ 、2,4-DCP、2,6-DCP及び2,4,6-TCPは $20\mu\text{g kg}^{-1}$ になるように各々の溶液を加え、同定の場合と同様に蒸留後アセチル化しGC-MSに注入した。この二つの測定によって得られた結果から、内部標準(2,4-DC6MPA)の $m/e=176$ のフラグメントイオン強度に対する2,4-DCPA及び2,6-DCPAの $m/e=162$ のフラグメントイオン強度及び2,4,6-TCPAの $m/e=196$ のフラグメントイオン強度との比を求め各々のクロロフェノールの含有量を計算した。

結果と考察

フラグメントイオン $m/e=(M-42)$ 及び $m/e=(M+2-42)$ でもって書いたクロロフェノール類標準試薬のアセチル化物のマスキロマトグラムをFig. 2(A)に、異臭卵黄中のクロロフェノール類アセチル化物のマスキロマトグラムをFig. 2(B)に示した。図から明らかなように異臭卵黄からは三種のクロロフェノールのアセチル化物、2,4-DCPA、2,6-DCPA及び2,4,6-TCPAのフラグメントイオン、 $m/e=(M-42)$ 及び $m/e=(M+2-42)$ が標準品のアセチル化物と同じ保持時間のところに見られその存在が確認された。マススペクトルを検討した結果、標準試薬では2,4-DCPAと2,6-DCPAでは $M=204$ 及び $M+2=206$ が見られたが、異臭卵では $M+2=206$ は見られなかった。また、2,4,6-TCPAでも標準試薬で見られた $M=238$ 及び $M+2=240$ は異臭卵ではともに見られなかった。これはその存在量が微量なためと考えられる。

定量結果と水中閾値をTable 1に示す。2,4-DCPと2,6-DCPは閾値の数倍含まれており、これらの化合物が消毒臭様異臭の原因物質であると認められた。

極めて閾値の低いかび臭を発するクロロアニソール類はクロロフェノール類の微生物によるメチル化によって生成することが知られているので³⁾連続蒸留抽出物についてマスキロマトグラフィ

Table 1. Concentration of chlorophenols in disinfectant off-odored yolk and odor thresholds.

Compound	Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Threshold conc ($\mu\text{g kg}^{-1}$ in aqueous sol)
2, 4-Dichlorophenol	1.8	0.3
2, 6-Dichlorophenol	1.7	0.2
2, 4, 6-Trichlorophenol	1.7	2.0

ーで分析したが検出されなかった。

普通飲料水に含まれるハロゲン化フェノール類は ng kg^{-1} のオーダーであり³⁾、異臭を感じる程度にクロロフェノール類が卵黄に含まれることとなった混入経路についてはまったく推定の域を出ないが、使用水中に何らかの原因でフェノール類が混入し、それが水の塩素殺菌によってクロロフェノール類となり脂質の多い卵黄に移行したか、あるいは鶏の飼育環境(飼料、ケージ等)からクロロフェノール系化合物(木材防腐剤、塩素系農薬等)が混入し卵黄に濃集したのではない

かという推定は有りそうなことである。

要 約

鶏卵缶詰で卵黄に極めて微かではあるが消毒臭様異臭の感じられるものがあった。異臭の特徴からクロロフェノール類の存在が推定されたので、卵黄を酸性条件下で水蒸気蒸留、留出物を濃縮後アセチル化しGC-MS測定に供した。2,4-Dichlorophenol, 2,6-Dichlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol, 2,3,4,6-Tetrachlorophenol及びPentachlorophenolのアセチル化物のフラグメントイオン $m/e = (M - 42)$ 及び $m/e = (M + 2 - 42)$ でもって書いたマスクロマトグラムから2,4-DCP, 2,6-DCP及び2,4,6-TCPの存在が確認された。2,4-Dichloro-6-methylphenolを内部標準として、アセチル化物のフラグメント $m/e = (M - 42)$ でもって作成した検量線ではその重量比と強度比との間に良い直線関係が認められた。内部標準法による定量の結果、卵黄中の濃度は2,4-DCP、2,6-DCP及び2,4,6-TCPは各々 $1.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、 $1.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ 及び $1.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ で、これらの化合物が消毒臭様異臭の原因物質であることが確認された。

文 献

- 1) G. A. Reineccius : *J. Food Sci.*, **44**, 12 (1979).
- 2) F. B. Whitfield and K. J. Shaw : "Progress in Flavour Research" ed. by J. Adda, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1985, p. 221.
- 3) F. B. Whitfield and J. H. Last : "The Shelf Life of Foods and Beverages" ed. by G. Charalamvous, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1986, p. 483.
- 4) H. B. Heath and G. Reineccius : "Flavor Chemistry and Technology", Macmillan Publishers, England, 1986, p. 112.
- 5) F. B. Whitfield : "Developments in Food Flavours", ed. by G. G. Birch and M. G. Lindley : Elsevier Applied Science, London, 1986, p. 249.
- 6) J. M. H. Bemelmans and M. C. ten Noever de Brauw : *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 1138 (1974).
- 7) J. E. R. Frijters and J. M. H. Bemelmans, *J. Food Sci.*, **42**, 1122 (1977).
- 8) B. B. Sithole and D. T. Williams : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 807 (1986).