

Dean-Stark 蒸留装置および炎光光度型ガスクロマトグラフィーを用いた揮発性硫黄化合物によるニンニク製品の同定

山本 敬男 望月 恵美子

Identification of Garlic Products with Volatile Sulfur Compounds using Dean-Stark Distillation Apparatus and FPD-GC

Takao YAMAMOTO and Emiko MOCHIZUKI

ニンニクを素材としたニンニク製品は、健康食品を中心として現在多種多様の製品が販売され健康食品を代表するものとなっている。また、県内にはニンニクよりも稀少価値のあるギョウジャニンニクを栽培し、その葉茎製品を販売して地域おこしをはかろうとしている自治体もある。しかし、これら製品に、実際にニンニクあるいはギョウジャニンニクが使用されているかどうかを判別・評価する方法は確立されておらず、食品表示の視点からも簡便で精度の高い分析法の開発が要求されている。そこでわれわれは、ニンニク使用有無の判別・評価方法を確立する目的で、これまでニンニクに特有の成分であるアリシン¹⁻³⁾、およびその前駆物質で含硫アミノ酸であるアリイン^{4,5)}、またタンパク質等を指標成分とする分析方法の検索を行ってきた⁶⁻⁹⁾。アリインは酵素アリナーゼによりアリシンに変換されるが、アリシンは不安定な揮発性物質で、さらに分解されてアリルスルフィドとなる。ニンニク中の揮発性化合物としては、アリシンを主とするチオスルフィネート、チオスルフィネートが分解して生成するスルフィド、ジチンなどが知られている¹⁰⁾。チオスルフィネートは熱に不安定であるため常温で徐々に分解してスルフィドを生成する。そこで今回、これらアリルスルフィドを主とする揮発性硫黄化合物を指標物質として、FPD-GC (炎光光度型ガスクロマトグラフィー) 及び GC-MS (ガスクロマトグラフ質量分析計) を用いてニンニクおよびギョウジャニンニク製品中の揮発性硫黄化合物の分析同定を行い、そのクロマトグラムパターンを比較解析することにより、ニンニク使用の判別が可能かどうか検討を試みたので報告する。

実験方法

1. 試料

ニンニク、ギョウジャニンニク、タマネギ、ラッキョウは農家より入手した。ニンニク製品はスーパーマーケットおよび薬店より、ギョウジャニンニク製品は製造元よ

り購入した。

2. 試薬

ジエチルエーテル、n-ヘキサンは和光純薬工業(株)製 残留農業試験用を用いた。フロリジル PR はフロリジン社製、ジアリルジスルフィド、ジメチルジスルフィドは東京化成(株)製試薬を、その他の試薬はすべて和光純薬工業(株)製試薬特級品を用いた。消泡剤は東レ・ダウコーニング・シリコン(株)製シリコングリース、液相分離用紙はワットマン社製 1 PS を用いた。

3. 器具および装置

マントルヒーター：400W, 10A, 1L マントルフラスコ用大科電気(株)製。

Dean-Stark 蒸留装置：(株)前田製作所製
FPD 検出器付きガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製 GC-14A

データ処理装置：(株)島津製作所製 C-R7A

ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)：(株)島津製作所製 GC-17A に(株)島津製作所製 MS 装置 QP-5000 を接続して用いた。

4. GC 及び GC-MS 分析条件

4. 1 GC 分析条件

カラム：Fused Silica Capillary Column Supelco SPB-1 Sulfur (膜厚 4.0 μ m, 30m \times 0.32mm i. d., Supelco 社製)
カラム昇温条件：試料注入後、カラムオープンで 40°C で 10 分間保持し、2°C/min で 180°C まで昇温、その後 25°C/min で 250°C まで昇温、同温で 5 分間保持した。

検出器温度：250°C

キャリアーガス：N₂ 1 kg/cm²

4. 2 GC-MS 分析条件

カラムおよびカラム昇温は、GC-FPD と同様の操作条件で行った。

キャリアーガス：He

イオン化電圧：70 eV

イオン源温度：250°C

5. 試験溶液の調製

試験溶液の調製法については、結果と考察で後述するように各種条件を検討した結果、次に述べる方法で各試料を処理した。

試料 1~30 g (ニンニク製品は 0.5~5 g) を 1 L の Dean-Stark 装置用丸底フラスコにとり、水 200 ml、消泡用シリコン液 2 滴、沸騰棒を加え、フラスコを蒸留装置に装着し、30 分間静置した。つぎに捕集溶剤としてジエチルエーテルを用い、還流速度を 2 ml/min に設定して、フラスコをマントルヒーターにより、1 時間加熱した。蒸留後放冷し、ジエチルエーテル層をろ紙(Whatman 1 PS)を用いて、10 ml 共栓試験管内にろ過した。ジエチルエーテルを加えて定容 (4 ml) とし、無水硫酸ナトリウムで脱水後、試験溶液とした。

6. 揮発性硫黄化合物の分析と同定

C-R7A データ処理装置を接続した FPD-GC に試験溶液 1 μ l をスプリットレスで注入し分析を行った。揮発性硫黄化合物の同定は FPD-GC のクロマトグラム上の保持時間および GC-MS 分析により得られたスペクトルの標準物質、Browser-Wiley Library, NIST62 Library および文献値²¹⁻²⁴⁾との一致により行った。

7. パターン分析

試験に用いた 4 種のねぎ属植物中の代表的な揮発性硫黄化合物 21 種類を選択し、官能基別に 10 群に分類した (表 1)。試料は 2 回分析し、それぞれの分析値のピーク高さの平均をとり、全ピーク高さで除して基準化した。パターン分析の手法としては、相関 (ピアソンの積率相関係数を適用) を用いた。

結果及び考察

1. 前処理条件の検討

揮発性化合物の単離・捕集方法としては、ヘッドスペースガス分析が知られている。ガス組成をそのまま分析でき、複雑な分離操作が不要である。容器にニンニク粉末、水を入れ、ゴムキャップで密閉し、一定時間後、上部空間の気体をシリンジで吸引し、直接ガスクロマトグラフに導入したところほとんどピークは見られなかった。

次に、少量の水を加えたニンニク粉末のエキストレルートカラム負荷-エーテル抽出、および液-液分配抽出を試みたが、いずれの場合もクロマトグラム上には数本のピークしか認められなかった。

そこで、水蒸気蒸留により水難溶性の揮発性成分を低

表 1 ねぎ属植物製品の同定に用いた揮発性硫黄化合物

群	ピーク番号	化合物	分子量	略号
1	3	diallyl sulfide	114	DAS
	9	diallyl disulfide	146	DAD
	18	diallyl trisulfide	178	DAT
2	1	allyl methyl sulfide	88	MAS
	4	allyl methyl disulfide	120	MAD
	14	allyl methyl trisulfide	152	MAT
3	2	dimethyl disulfide	94	DMD
	8	dimethyl trisulfide	126	DMT
	17	dimethyl tetrasulfide	158	DMTe
4	6	methy (Z) propenyl disulfide	120	(Z)MPeD
	7	methy (E) propenyl disulfide	120	(E)MPeD
5	5	methy propyl disulfide	122	MPD
	15	methy propyl trisulfide	154	MPT
6	10	ally (Z) propenyl disulfide	146	(Z)APeD
	11	ally (E) propenyl disulfide	146	(E)APeD
7	13	1-propenyl propyl disulfide	148	PePD
	12	dipropyl disulfide	150	DPD
8	20	dipropyl trisulfide	182	DPT
	16	3-vinyl 4H-1, 2-dithiin	144	3-VD
9	19	2-vinyl 4H-1, 3-dithiin	144	2-VD
	21	3, 5-diethyl-1, 2, 4-trithiolane	180	DT

* 図 5 参照

沸点有機溶媒中に抽出する方法を試みることにした。

1. 1 抽出装置と捕集溶媒

水蒸気蒸留に連続して気相下での溶媒抽出を行い、かつ連続して循環する連続蒸留抽出法 (Simultaneous distillation and extraction) に Dean-Stark 装置と Lickens-Nickerson 型 SDE 装置を用いる方法が知られている^{25,26)}。両者とも、熱に不安定な試料には応用され難い欠点があるが、少量の溶媒で効率良く抽出が行える点が長所である。そこで、連続蒸留抽出法を用いてニンニク中のチオスルフィネートを主とする易分解性硫黄化合物をスルフィドを主とする揮発性硫黄化合物に変換し、これら揮発性硫黄化合物を指標物質としてニンニク製品の定性分析法を検討することとした。乾燥ニンニクを試料として、連続蒸留抽出装置を用いた前処理条件を検討した。

Dean-Stark 装置は、溶媒の比重が水より小さいジエチルエーテルや n-ヘキサンのみしか使用できないが、操作は簡便である。一方、Lickens-Nickerson 型装置は、溶媒の比重が水より小さくても大きくても使用できるが、操作性は Dean-Stark 装置より劣る。そこで、水より比重の小さい溶媒の検討には Dean-Stark 装置、水より比重の大きい溶媒の検討には Lickens-Nickerson 型装置を使用することとした。10 種類の揮発性硫黄化合物 (アリルメルカプタン, MAS, DMD, DAS, MAD,

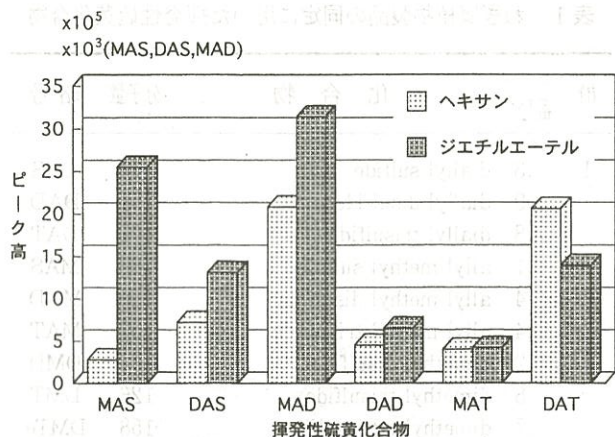


図1 捕集溶媒の違いによる主な揮発性硫黄化合物の捕集量 (Dean-Stark)

DMT, DAD, MAT, 3 VD, DAT)を指標として、n-ヘキサン、ジエチルエーテル、ジクロロメタンの3種の溶媒を捕集溶媒として検討した。図1に捕集溶媒として、n-ヘキサン、ジエチルエーテルを用いた時の主な揮発性硫黄化合物の捕集量を示した。MAS, DAS, MADなどガスクロマトグラム上保持時間の短い、つまり沸点の低い揮発性硫黄化合物は、ジエチルエーテルを用いた場合の捕集率を100%とすると、n-ヘキサンをを用いた場合では11%から66%と低い捕集率であった。しかし、前記化合物より沸点の高いMAT, DATの捕集率はn-ヘキサンの方が優れていた。ジクロロメタンを用いた場合はn-ヘキサン同様、沸点の低い揮発性硫黄化合物は捕集困難であった。そこで、溶媒としては全般的に捕集量の多かったジエチルエーテルを選択し、装置としては簡便でルーチン分析に向いているDean-Stark装置を用いることとした。

1.2 試料採取量

試料量が揮発性硫黄化合物の捕集量に与える影響を検討した。試料(乾燥ニンニク粉末)量を0.5, 1, 5, 10gと変化させて採取し、水200mlを添加後連続蒸留抽出し、揮発性硫黄化合物の捕集量を比較検討した。その結果、5g以上では各揮発性硫黄化合物の捕集量が多すぎて、数十倍の希釈が必要となったため、乾燥ニンニク試料の試料採取量は0.5gとすることとした。生ニンニク試料は、水分含量を考慮して1gとした。しかし、統計解析に十分な量の揮発性硫黄化合物を捕集するためには、ギョウジャニンニク試料の場合は5~10g、ラッキョウ、タマネギ試料の場合は20~30gを必要とした。

1.3 蒸留時間

蒸留時間の捕集量に及ぼす影響をみるため、試料(ニンニク乾燥粉末)0.5gに水200mlを添加し、時間を15,

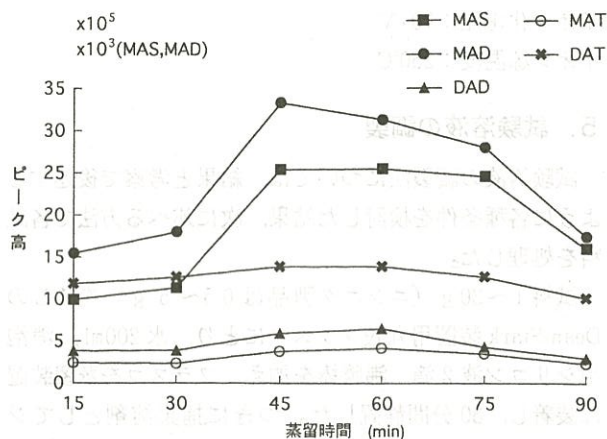


図2 蒸留時間の違いによる主な揮発性硫黄化合物の捕集量

30, 45, 60, 75および90分と変化させて試験した。図2に主な揮発性硫黄化合物の捕集量を示した。揮発性硫黄化合物の各5回の平均捕集率は蒸留時間45分を100%とすると、15分では58%(10種類の揮発性硫黄化合物の平均)と低かったが、30分では61%に上昇した。また60分以上の蒸留時間では100%, 98%, 63%と減少した。捕集率が減少した原因としては、蒸留時間が長すぎると冷却管からの揮散によるロスが生じるためと考えられた。蒸留時間45分と60分の間に差はあまり認められなかったため、蒸留時間は45分とした。

1.4 還流速度

試料(ニンニク乾燥粉末)0.5gに水200mlを加え、45分間還流した場合の還流速度の捕集量に及ぼす影響をみるため、還流速度を0.8, 2, 3ml/minに設定して試験した(図3)。各揮発性硫黄化合物の平均捕集率(各5回)は2ml/minを100%とすると、0.8ml/minでは、56%から89%(平均73%)の捕集率でいずれの化合物も2ml/minの捕集率より少なかった。3ml/minの還流速

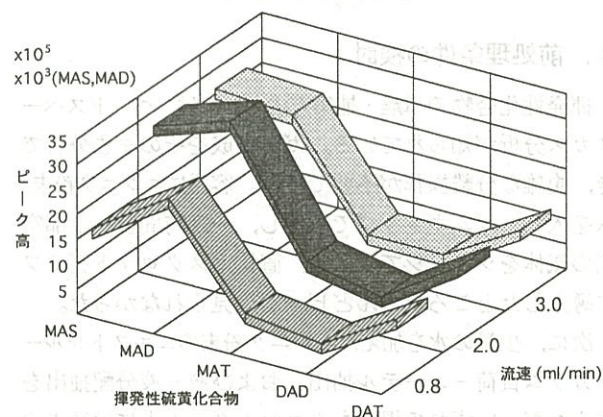


図3 還流速度の違いによる主な揮発性硫黄化合物の捕集量

表2 検討に用いたカラム

カラム名	液相	カラム長×内径	膜厚
DB-1	100% methyl polysiloxane	30m×0.25mm	0.25 μm
DB-5	5% phenyl 95% methyl polysiloxane	30m×0.25mm	0.25 μm
DB-17	50% phenyl 50% methyl polysiloxane	30m×0.25mm	0.25 μm
DB-WAX	polyethylene glycol	30m×0.25mm	0.25 μm
CP-WAX52CB	equivalent to DB-WAX	50m×0.25mm	0.20 μm
HP-1	100% methyl polysiloxane	50m×0.32mm	1.05 μm
SPB-1S	poly (dimethyl polysiloxane)	30m×0.32mm	4.00 μm

度では148%から63%（平均96%）と捕集率はばらついた。そこで捕集率が最も良好な2 ml/minを還流速度とした。

なお、還流速度の測定はあらかじめDean-Stark装置の下方のコックを開いた状態で蒸留水のみの蒸留で行い、単位時間当りに流出する留液の量をメスシリンダーにより測定して行った。また、その際のスライダックの目盛りを記録しておき、以後はスライダックの目盛りをその値に固定して実験を行った。

2. GC カラム

GCカラムは、表2に示した7種類について検討した。揮発性硫黄化合物の保持時間は、カラムの極性が増すにつれて、長くなる傾向がみられた（図4）。揮発性硫黄化合物はHP-1およびSPB-1S両カラムを用いた時、最も良好な分離度を示した。SPB-1Sのカラム長さはHP-1に比較して短い、膜厚が4.0 μmと厚いため、SPB-1SはHP-1より短時間で良好な分離度が得られたと考えられた。分析時間、保持時間、ピーク形状、共存物質等の影響を考慮して、SPB-1Sを選択した。

3. 試料への応用

ニンニク、タマネギ、ラッキョウ、ギョウジャニンニクのクロマトグラムを図5に示した。4種のねぎ属植物の特徴は、ニンニクは主としてアリル基と1-プロペニル基、タマネギはプロピル基と1-プロペニル基、ラッキョウはメチル基とプロピル基、ギョウジャニンニクはメチル基、1-プロペニル基とアリル基といった官能基で構成される揮発性硫黄化合物を有する点であった。そこで、4種のねぎ属植物中の代表的な揮発性硫黄化合物21種類を選び、官能基による群別を行い10群に分類した。つぎに、ニンニク、タマネギ、ラッキョウ、ギョウジャニンニクに対する製品の揮発性硫黄化合物のクロマトグラムパターンの相関（ピアソンの積率相関係数を適用）を求め比較した。無臭ニンニク製品では、クロマトグラム上にほとんどピークが認められず、クロマトグラムパターンによる解析は不可能であった。

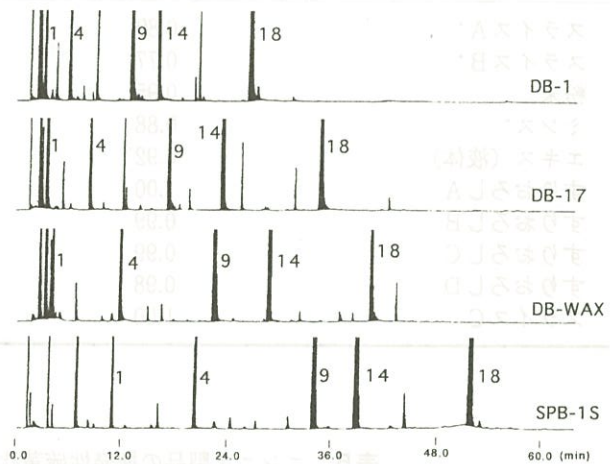


図4 各種カラムによる揮発性硫黄化合物の FPD-GC クロマトグラム
（ピークナンバーは表1を参照）

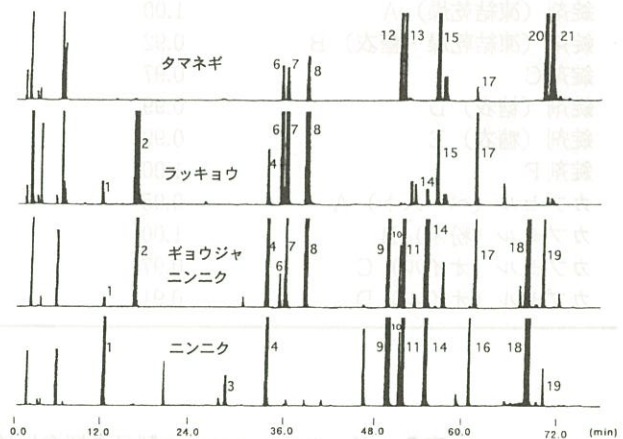


図5 ねぎ属植物中の揮発性硫黄化合物の FPD-GC クロマトグラム
（ピークナンバーは表1を参照）

ニンニクの産地による揮発性硫黄化合物のクロマトグラムパターンの相関は0.95~1.00で地域差はほとんどないと判断された。試験に供したタマネギ、ラッキョウ、ギョウジャニンニクも同様に個体差はほとんどみられなかった。ニンニク、タマネギ、ラッキョウ、ギョウジャ

表3 ねぎ属植物の揮発性硫黄化合物パターンの相関

	ニンニク	タマネギ	ラッキョウ	ギョウジャニンニク
ニンニク	1.00			
タマネギ	-0.39	1.00		
ラッキョウ	-0.20	-0.05	1.00	
ギョウジャニンニク	0.63	-0.46	0.40	1.00

表4 ニンニク香辛料の揮発性硫黄化合物パターンのねぎ属植物に対する相関

香辛料	ニンニク	タマネギ	ラッキョウ	ギョウジャニンニク
スライスA*	0.89	-0.37	-0.18	0.27
スライスB*	0.77	-0.41	-0.17	0.37
粉末*	0.95	-0.35	-0.17	0.20
ミンス*	0.88	-0.38	-0.16	0.30
エキス(液体)	0.92	-0.35	-0.17	0.24
すりおろしA	1.00	-0.29	-0.14	0.02
すりおろしB	0.99	-0.27	-0.13	-0.03
すりおろしC	0.99	-0.26	-0.12	-0.03
すりおろしD	0.98	-0.30	-0.15	-0.05
スライスC	1.00	-0.31	-0.14	0.06

*乾燥品

表5 ニンニク製品の揮発性硫黄化合物パターンのねぎ属植物に対する相関

ニンニク製品	ニンニク	タマネギ	ラッキョウ	ギョウジャニンニク
粉末(凍結乾燥)A	0.95	-0.35	-0.15	0.20
粉末(凍結乾燥)B	1.00	-0.29	-0.14	0.05
錠剤(凍結乾燥)A	1.00	-0.29	-0.14	0.05
錠剤(凍結乾燥・糖衣)B	0.92	-0.36	-0.15	0.25
錠剤C	0.97	-0.34	-0.15	0.17
錠剤(糖衣)D	0.99	-0.25	-0.12	-0.04
錠剤(糖衣)E	0.99	-0.25	-0.12	-0.03
錠剤F	1.00	-0.27	-0.13	-0.01
カプセル(ペースト)A	0.95	-0.35	-0.15	0.21
カプセル(粉末)B	1.00	-0.30	-0.15	0.07
カプセル(オイル)C	0.97	-0.34	-0.14	0.19
カプセル(オイル)D	0.91	-0.36	-0.15	0.27

表6 ギョウジャニンニク製品の揮発性硫黄化合物パターンのねぎ属植物に対する相関

ギョウジャニンニク製品	ニンニク	タマネギ	ラッキョウ	ギョウジャニンニク
しょうゆ漬け	0.07	-0.38	0.74	1.00
みそ漬け	0.27	-0.42	0.58	0.69
清涼飲料水A	-0.12	-0.29	0.93	0.94
清涼飲料水B	-0.13	-0.24	0.99	0.84

ニンニク各植物相互の相関は、ラッキョウとギョウジャニンニクの相関が0.63と他の植物に比べて高いほかは低い値であった(表3)。

ニンニク香辛料の相関はニンニクに対する相関が最も高かった(表4)。ニンニク製品の解析結果はニンニクに高い相関が得られ、ニンニクに最も類似している製品が多いことが認められた(表5)。

ギョウジャニンニク製品(しょうゆ漬, みそ漬)の相関はギョウジャニンニクに最も近い値が得られた(表6)。しかし、ギョウジャニンニク製品(清涼飲料水)は、ラッキョウにも高い相関が認められ、ラッキョウあるいはギョウジャニンニクどちらの植物に由来しているのか揮発性硫黄化合物のクロマトグラムパターンの相関のみによる判別は困難で、他の解析法あるいは同定法を併用する必要があると考えられた。

以上の結果から、揮発性硫黄化合物を指標とし、そのガスクロマトグラムパターン解析を適用した本分析法は、ニンニク使用の有無を判別評価できる方法として有用であると考えられた。

ま と め

香辛料を含むニンニクおよびギョウジャニンニク製品中の、チオスルフィネートを主とする易分解性硫黄化合物を、連続蒸留抽出法によりスルフィドを主とする揮発性硫黄化合物に変換し、これら揮発性硫黄化合物を指標物質として、FPD-GC及びGC-MSを用いてガスクロマトグラムパターンを比較解析することにより、ニンニク使用の判別が可能かどうか検討した。その結果、ニンニク、タマネギ、ラッキョウ、ギョウジャニンニク各植物には、それぞれに特徴のあるクロマトグラムパターンが認められた。ニンニク製品の揮発性硫黄化合物のガスクロマトグラムパターンの解析結果は、ニンニクに高い相関を示した。したがって、本法はニンニク製品を判別・評価する方法として適用できるものと考えられた。

文 献

- 1) Saito, K. et al. : J. Assoc. Off. Anal. Chem. **72**, 917~920 (1989)
- 2) 山本敬男ら : 山梨衛公研年報 **39**, 11~14 (1995)
- 3) Mochizuki, E. et al. : AOAC International **80**, 1502~1506 (1997)
- 4) 齊藤貢一ら : 衛生化学, **34** 536~541 (1988)
- 5) Mochizuki, E. et al. : J. Chromatogr. **455**, 271~277 (1988)
- 6) 望月恵美子ら : 山梨衛公研年報 **38**, 12~19 (1994)
- 7) 望月恵美子, 山本敬男, 小宮山美弘 : 山梨衛公研年報 **39**, 15~20 (1995)
- 8) Mochizuki, E. et al. : AOAC International **79**, 1466~1470 (1996)
- 9) 山本敬男, 望月恵美子 : 山梨衛公研年報 **40**, 6~7 (1996)
- 10) Block, E. : Sci. Am. **252**, 114~119 (1985)
- 11) Kim, S. M. et al. : J. Agric. Food Chem. **43**, 449~452 (1995)
- 12) Yu, T.-H., Lin, L.-Y. and Ho, C.-T. : J. Agric. Food Chem. **42**, 1342~1347 (1994)
- 13) Yu, T.-H., Wu, C.-M. and Ho, C.-T. : J. Agric. Food Chem. **41**, 800~805 (1993)
- 14) Yu, T.-H., Wu, C.-M. and Liou, Y.-C. : J. Agric. Food Chem. **37**, 725~730 (1989)
- 15) Yu, T.-H. and Wu, C.-M. : J. Food Science **54**, 977~981 (1989)
- 16) Mazza, G. et al. : Flavour and fragrance journal **7**, 111~116 (1992)
- 17) Vernin, G. et al. : Planta Med. **52**, 96~101 (1986)
- 18) Kallio, H. and Salorinne, L. : J. Agric. Food Chem. **38**, 1560~1564 (1990)
- 19) Boelens, M. et al. : J. Agric. Food Chem. **19**, 984~991 (1971)
- 20) Brodnitz, M. H., Pollock, C. L. and Vallon, P. P. : J. Agric. Food Chem. **17**, 760~763 (1969)
- 21) Sinha, N. K. et al. : J. Agric. Food Chem. **40**, 842~845 (1992)
- 22) Kuo, M.-C. and Ho, C.-T. : J. Agric. Food Chem. **40**, 111~117 (1992)
- 23) Kuo, M.-C. and Ho, C.-T. : J. Agric. Food Chem. **40**, 1906~1910 (1992)
- 24) Block, E., Putman, D. and Zhao, S. -H. : J. Agric. Food Chem. **40**, 2431~2438 (1992)
- 25) 後藤真康, 加藤誠哉 : 残留農薬分析法, 229~301 ソフトサイエンス社 (1980)
- 26) 時友裕紀子 : 日本食品科学工学会誌, **42**, (12) 1003~1011 (1995)