

一般論文

食品へのカビ臭移行防止 (第1報) カビ臭関連物質 (TCA、TCP) の同時定量法確立と 物流使用材中の含有量実態調査

馬場亜希* 西端綾子* 但馬良一* 峯孝則*
天知輝夫* 増田正裕** 泉哲男***

Prevention of Musty Odor (TCA) Migration into Foodstuffs (1)
Development of a Quantitative Determination Method of the Substances
Related to Musty Odor (TCA, TCP) and a Survey of the Contents of
the Two Compounds in Wooden Pallets and Corrugated Cardboard Boxes

Aki BANBA*, Ayako NISHIHATA*, Ryoichi TAJIMA*, Takanori MINE*,
Teruo AMACHI*, Masahiro MASUDA**, Tetsuo IZUMI***

An analytical method was developed for a simultaneous determination of the two substances related to musty odor, 2,4,6-trichloroanisole (TCA) which causes musty odor in wood and paper used for packaging materials, and 2,4,6-trichlorophenol (TCP) which is the precursor of TCA. Detection limits of TCA and TCP were 3.3 and 4.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively, and the standard deviation percentages for repetition analysis were 3.5% in both cases.

Then, this method is applied for the detection of the TCA and TCP in wooden pallets and corrugated cardboard boxes. The frequency of TCA detection from both wooden pallets and corrugated cardboard boxes has become higher recently than about 10 years ago. On the other hand, the frequency of TCP detection has become lower than the past from wooden pallets and has remained almost the same from corrugated cardboard boxes.

Keywords : TCA, TCP, Musty odor, GC - MS, Simultaneous determination, Pallet, Cardboard box

木材および紙製包装材中のカビ臭原因物質 (2,4,6-Trichloroanisole : TCA) およびその前駆体 (2,4,6-Trichlorophenol : TCP) の同時定量法を質量分析装置を用い確立した。定量限界はそれぞれ3.3、4.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、繰り返しの標準偏差率は共に3.5%であった。

また本法を用いて、10数年前に行われた木製パレットおよび段ボール中のTCA、TCP定量結果と近年の定量結果を比較検討した。近年の傾向としては、TCAの検出率はパレット段ボール共に増加しており、TCPの検出率はパレットについては減少してきているが、段ボールについてはほぼ横ばいである。

キーワード : TCA、TCP、カビ臭、GC - MS、同時定量法、パレット、段ボール

* サントリー(株)基礎研究所 分析科学センター (〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1) : Laboratory of Quality Control, Institute for Fundamental Research, Suntory Ltd., 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka, 618 ** サントリー(株)洋酒研究所 (〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1) : Research Laboratories of Distilled Spirits and Liqueurs, Suntory Ltd., 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka, 618 *** サントリー(株)生産企画部 (〒107 東京都港区元赤坂1-2-3) : Production Planning department, Suntory Ltd., 1-2-3, Moto Akasaka, Minato-ku, Tokyo, 107

1. 緒言

食品における異味異臭の発生や着臭は、その商品価値を大きく低下させるため、食品企業にとって極めて重要な管理項目である。

2,4,6-Trichloroanisole (以下TCA) を始めとする塩素化アニソールに起因するカビ臭は、1966年に Engelら¹⁾が報告して以来、食品、包装材などにおいてしばしば検出例が報告されている^{2) 3)}。

TCAは、その類縁物質の中でも極めて官能閾値が低く、水中ではppt~ppqレベルであるとする報告がある^{4) 5)}。

また、2,4,6-Trichlorophenol (以下TCP) を始めとする塩素化フェノールのカビによる代謝については、多くの研究者により報告^{6) 7) 8)}されている。そこでは、TCPをある種のカビがメチル化することによりTCAを生成するとされている (Fig. 1)。

TCPは、主に木材用の防黴剤として使用されてきた歴史があり⁹⁾、このためパレットや段ボール中に存在することがある。TCPがTCAの前駆体であることから、高濃度なTCPの存在は、カビ臭発生の高い危険性を有していることを意味する。このため、カビ臭およ

びその発生の可能性を含めて議論する場合、TCAとTCPの2物質を同時に定量することが必要である。TCAとTCPをそれぞれ分別抽出し、定量する方法についての報告例はあるが^{1) 10)}、同時定量法についての報告はない。

本研究はパレットや段ボールを対象として、カビ臭原因物質であるTCAおよびその前駆体TCPの同時定量法について検討したものである。

一般的に、微量のハロゲン化有機化合物の分析には電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ (以下ECD-GC) が使用される。

しかし、そのダイナミックレンジが 10^2 と狭いことから、しばしば分析試料液の希釈・濃縮が必要となり、再分析が必要になることも多い。そのためこれらの影響が少ない、ガスクロマトグラフ-質量分析装置 (以下GC-MS) を用い、内部標準法によるTCA、TCPの同時定量法を確立した。

また、本法を用いてTCA発生源としてしばしば問題になることの多い^{2) 3)}、木製パレットおよび段ボールのTCA、TCP含有量実態調査を行った。近年の調査結果と10数年前の調査結果について比較・検討を行った。

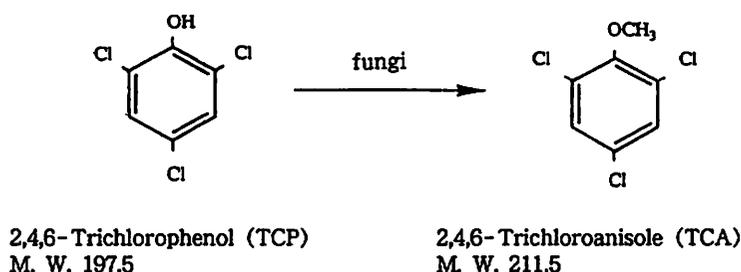


Fig. 1 Conversion of TCP to TCA by fungi

2. 実験方法

2.1 GC-MS条件の検討

(1) キャピラリーカラムの選定

TCPが弱酸性のフェノール化合物であることから、ピークのテーリング防止を目的に酸性のFFAPカラム (DB-FFAP、30m×0.32mm、0.25 μ m; J&W社製) および一般によく用いられる中性の強極性カラム (DB-WAX、30m×0.33mm、0.50 μ m; J&W社製) とを用いて、TCA、TCPおよびその異性体である2,4,5-TCPの分離特性を検討した。

一方、2.2で述べる抽出方法に従って、パレット材および段ボール試料から調製した試料液についても、TCA、TCPとの分離について調べた。検出は、MSのトータルイオンモニターで行った。

(2) TCA、TCP定量のためのGC-MS条件の検討

GC条件：それぞれのカラムで最適分離が得られる条件を設定した。

MS条件：2.2で調製されたパレット木材や段ボール試料からの試験液について、TCA、TCPの検出に適したフラグメントイオン (m/z) を選択した。

(3) 内部標準物質 (以下IS) の選定

(a) ISの選定

TCAおよびTCPと沸点、構造 (極性) の類似性といった点に着目し、候補物質を選別し、その中でTCA、TCPに対し妨害の影響を受けない (かつ与えない) 物質を選定した。

(b) IS添加量の検討

後述した方法により試料液2gから調製した試験溶液 (1~5ml) の場合、木、およ

び紙製試料から検出されることの多いTCA、TCPの濃度と同程度のピーク高さになるISの添加量を検討した。

2.2 パレット木材および段ボール試料からの試験溶液調製法

(1) 水蒸気蒸留条件の検討

試料からのカビ臭関連物質および、妨害物質からの分離を目的に水蒸気蒸留した。蒸留量決定のための方法は、次の通りである。約5mm角に切断した段ボールに、2g当たり0.25 μ gのTCA、TCPを塗布した (TCA、TCPの10mg/L、n-Hexane (和光純薬工業製残留農薬分析用300; 以下ヘキサン) 溶液を25 μ l添加)。次に、Fig. 2に示した装置を用いて磷酸酸性条件下 (5%磷酸50ml、pH=2.0以下) で水蒸気蒸留を行った。その際留液は、TCAの揮散を防ぐためにヘキサンを予め50ml入れたメスシリンダーに、50ml

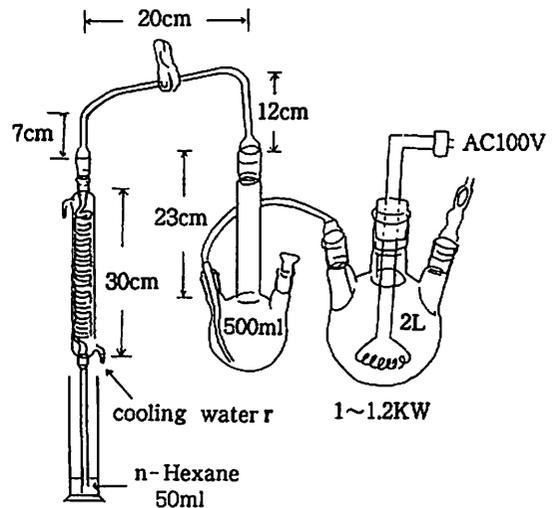


Fig. 2 Steam distillation apparatus for the isolation of TCA and TCP from wood and paper samples

ずつ4フラクション合計200ml採取した。

(2) 抽出条件の検討

抽出溶媒にはヘキサンを用い、抽出回数の検討を行った。方法は、2.2 (1) の留液をヘキサン100mlずつで計4回抽出し、各抽出液中のTCA、TCP量を定量した。

(3) 濃縮方法の検討

TCA、TCP、TCA用ISの25 μ gおよび、TCP用IS50 μ gを含む、ヘキサン溶液100mlをロータリーバキュームエバポレーター(35 $^{\circ}$ C、 2×10^3 Pa)により濃縮し、回収率をn=5で検討した。

(4) 添加回収実験

約5mm角大の段ボール2gに、TCA、TCP、TCP用ISの各5mg/LおよびTCA用IS10mg/Lヘキサン溶液を20 μ l添加し、Fig. 6に従い試料を調製した。定量は、Table 1に示す方法によりおこなった。

2.3 パレット木材および段ボール中のTCA、TCP含有実態調査

(1) 試料の選定

空調のない一般的な食品物流倉庫から、無作為に抽出した木製パレット(材質は松)および、段ボール箱、紙製化粧箱を17~30点を採取した。サンプリングの年代は'78年および'89~'92年の2期であり、サンプリング後アルミホイルに包み、冷蔵庫に保管しながら、1カ月以内にTCAおよびTCPを定量した。

(2) 分析方法

'92年採取試料の分析は、Table 1、Fig. 6に示す方法によった。'78年および'89~'91年採取試料は以下の方法により分析した。

抽出方法: 試料2gを精秤し、3.2 (1) に準拠して水蒸気蒸留後、ペンタン(和光純薬工業製試薬特級n-Pentaneを精製)100mlで2回抽出した。抽出液をクデルナダニッシュ

Table 1 Conditions for GC-MS analysis of TCA and TCP

Model	: Shimazu GC-14A + QP2000GF		
Column	: HP-1 (1.5m \times 0.53mm \times 2.65 μ m) + DB-FFAP (30m \times 0.32mm \times 0.25 μ m)		
Temperature	Column	: 50 $^{\circ}$ C \rightarrow 15/min \rightarrow 200 $^{\circ}$ C (7min) \rightarrow 15 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (5min)	
	Injection	: 60 $^{\circ}$ C (0.1min) \rightarrow 30 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (18min)	
	Ion source	: 250 $^{\circ}$ C	
Cooling air	: 0.1sec. off, 24min. on	GAIN	: 3.5
Inject. press	: 0.5kg/cm ²	Sampling rate	: 5 points/sec
Sample volume	: 1 μ l (on column injection)		
Solvent cut	: 5 min		
Aquisition time	: 8~11 min (ionset 1), 11~13 min (ionset 2)		
m/z	: (ionset 1) 197 (for TCA), 188 (for TCA-IS)		
	: (ionset 2) 196 (for TCP), 208 (for TCP-IS)		

濃縮器 (4連球) を用い45℃で濃縮後、1mlとし、以下の条件でGC分析した。

機種：柳本製作所製G3800 (ECD付き)

カラム：TCA用 2%OV-17 on Gaschrom Q、80~100mesh、1.5m×3mm i.d. glass column

TCP用 5% DEGS + 1% H₃PO₄ on Gaschrom Q、80~100mesh、1.5m×3mm i.d. glass column

カラム温度：TCA分析時 170℃恒温

TCP分析時 175℃恒温

注入口および検出器温度：250℃

注入量：5 μl

キャリアガス流量：50ml/min (窒素ガス)

3. 結果および考察

3.1 GC-MS条件の検討

(1) キャピラリーカラムの選定

TCA、TCPおよびTCP異性体の相互分離に関しては、テストしたDB-WAXとDB-FFAPは共に良好な分離能を示した (Fig. 3)。しかし、段ボールの中には妨害成分を多く含むものもあり、Fig. 4に示すとおりDB-WAXでは、TCPとの分離が困難であった。この結果からDB-FFAPを分離カラムとして選定した。

(2) TCA、TCP定量のためのGC-MS条件の決定

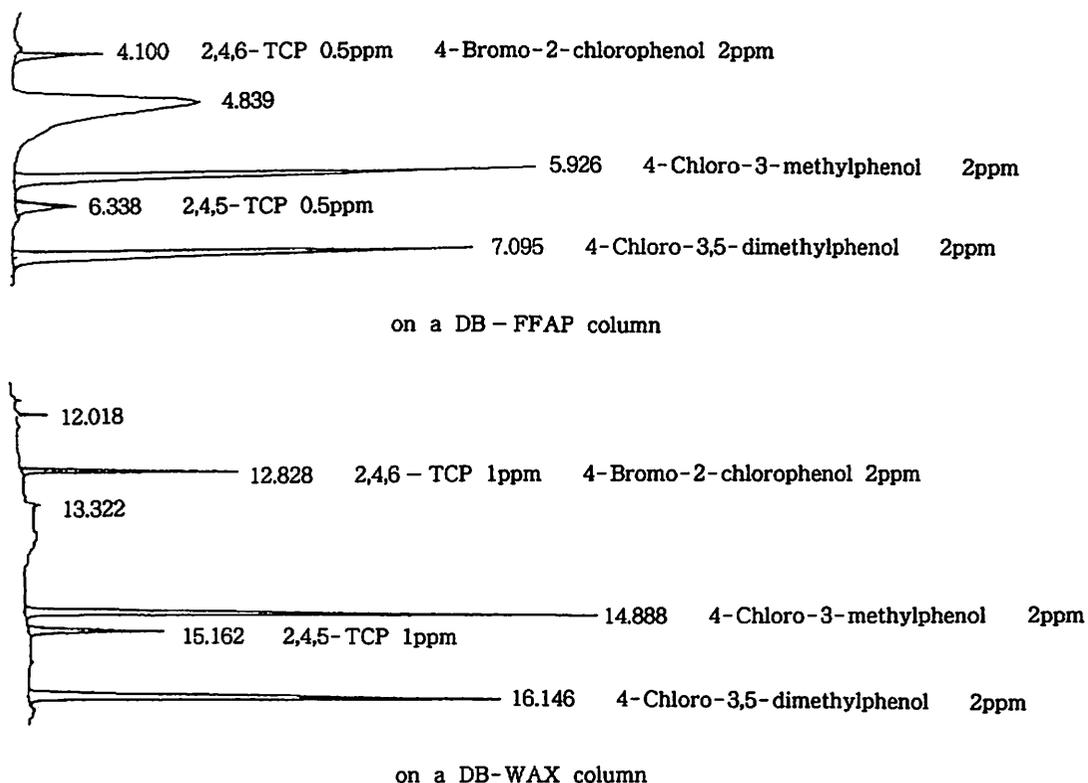


Fig. 3 Comparison for the separation of TCP isomers on DB-WAX and DB-FFAP capillary columns

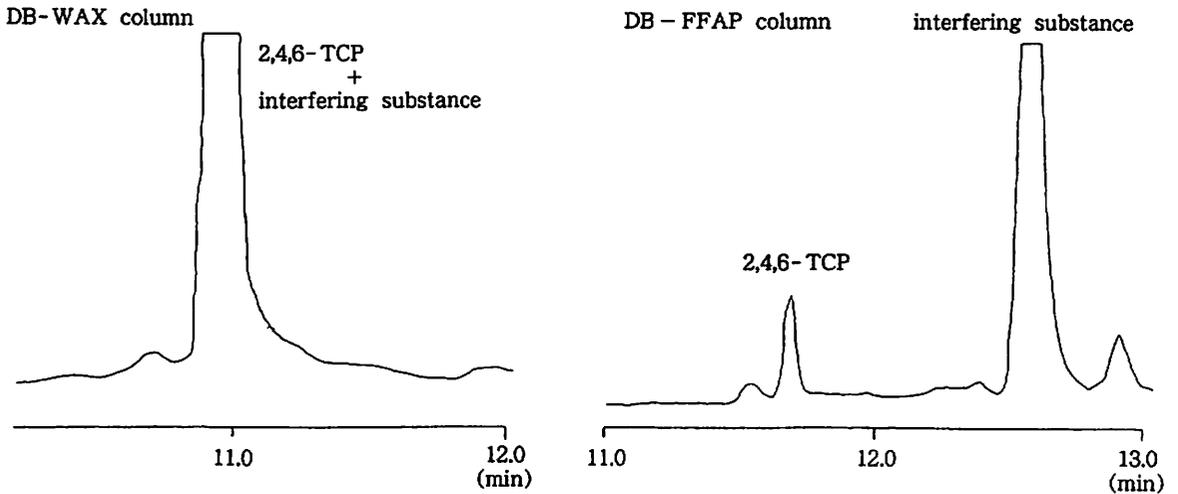


Fig. 4 Separation between TCP and the interfering substance on DB-WAX and DB-FFAP capillary columns

(a) m/z の選定

Fig. 5に各イオンにおける妨害ピークを示す。TCAについては m/z 195、197、210、212の4イオンについて検討したが、 m/z 195、210の両イオンは、妨害ピークの影響を受けたことから、 m/z 197、212の2イオンが適当と考えられた。また、2イオンを用いた内部標準法による検量線は、

ともに $r = 0.99$ と良好であった。

一方、TCPについては m/z 196、198の2イオンについて検討したが、妨害ピークの影響を受けない、 m/z 196が適当であった。

(b) GC条件

検討の結果確立した分析条件をTable 1に示す。

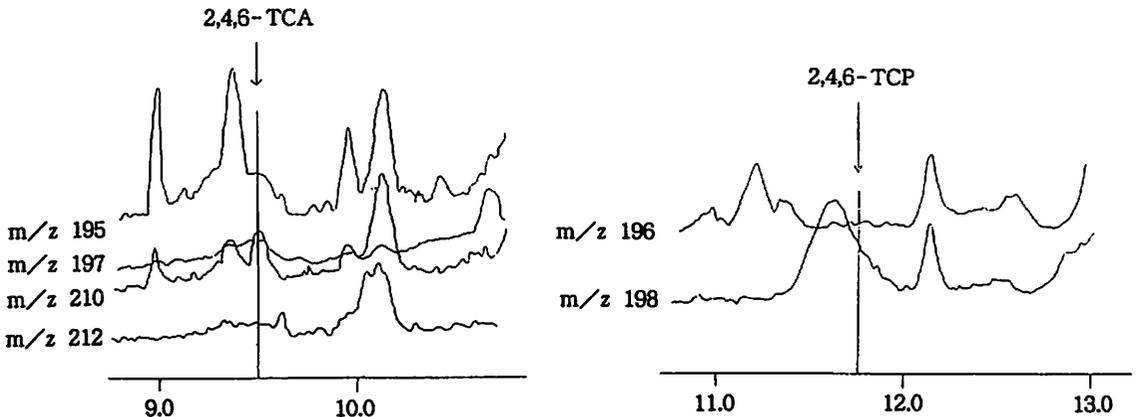


Fig. 5 Mass chromatogram of the extracts from a cardboard box for the TCA and TCP determination

(3) ISの選定

(a) IS候補の選定

候補物質の特徴を Table 2 に示す。

ISとして、最適な物質を選定するための手段として、分析対象であるパレット木材や段ボール抽出液中の、各IS候補の各m/zにおける妨害物質量を比較した (Table 3)。TCA用ISとしては2-Bromoanisoleのm/z 188での使用が、妨害物質量が少なく最適であった。

一方、TCP用ISとしては、4-Bromo-2-chlorophenolのm/z 208での使用が最適であった。

(b) IS添加量の検討

検討の結果、TCA用ISは125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 試料、TCP用ISは250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 試料を添加量とした。

3.2 パレット木材および段ボール試料からの試験溶液調製

(1) 水蒸気蒸留条件

TCA、TCP各125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加試料においては、留液採取量100mlでほぼ定量的に回収できた。しかし、さらに高濃度な試料にも対応できるように、安全を見て150mlまで留液を採取することとした。

Table 2 Internal standard candidates for TCA and TCP analysis

Materials	M.W.	b.p (°C)	R.T.(min)*	m/z
2-Bromoanisole	186	223	7.55	188, 186, 143
4-Bromophenetole	200	233	7.75	200, 172
4-Chloro-3-methylphenol	142.6	235	13.06	142, 107
4-Chloro-3,5-dimethylphenol	156.6	245	14.50	156, 121
4-Bromo-2-chlorophenol	207.5	232~235	10.80	208, 206

*On a DB - WAX column.

Table 3 Interfering concentration of the constituents of the corrugated cardboard paper to the internal standard candidates on GC - MS chromatogram

Internal standard candidates	Interfering concentration
2-Bromoanisole	1.0 (ng/g. m/z : 188)
4-Bromophenetole	1.0 (ng/g. m/z : 200)
4-Chloro-3-methylphenol	36.0 (ng/g. m/z : 142)
4-Chloro-3,5-dimethylphenol	30.0 (ng/g. m/z : 156)
4-Bromo-2-chlorophenol	3.0 (ng/g. m/z : 208)

(2) 抽出条件

抽出回数2回までで、4物質ともに定量的に回収できた。

(3) 濃縮方法

内部標準法を用いた定量結果から平均回収率は、TCAにおいて104.4%、TCPにおいて101.2%であった。

(4) 添加回収実験

n = 4で検討の結果、TCAについては平均回収率93.8%、cv = 3.5%であり、ノイズ対

信号比で3倍を定量限界とすれば、3.3 μg/kgであった。同様にTCPについては平均回収率103.0%、cv = 3.5%、定量限界は4.6 μg/kgであった。ここで、実際に食品に対しTCAが移行した場合の、包材中のTCAおよびTCP検出濃度は、文献^{2) 3)}ではジュート袋や紙袋などの一次包材で0.1~30 μg/kg以上含有しており、TCPも同様である。したがって、段ボールやカートンケースなどの二次包材およびパレットなどの物流使用材からのカビ臭移行を議論する上では、TCA、TCPの同時分析法として、満足できる定量限界を有するといえる。

つぎに食品の場合、TCAの水中における官能閾値がppt~ppqのレベルであるとする文献^{4) 5)}もあり、そのような食品に対して本法は不十分である。しかし、香気成分を多く含む多くの食品の場合は、その官能閾値が0.001~0.01ppbとする報告¹¹⁾もあり、実用的には一応満足できると考える。

以上の結果から確立した調製方法をFig. 6に示した。

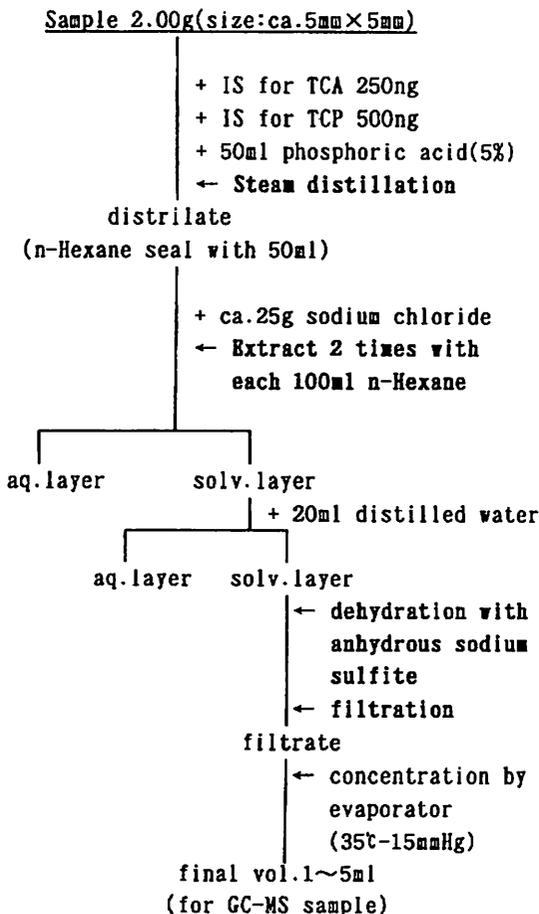


Fig. 6 Procedure for the preparation of GC-MS samples from wood and papers samples

3.3 含有量実態調査

(1) ECD-GC法とGC-MS法の定量値の比較

十数年前のデータとの関係を議論するに当たり、同一の段ボール試料について、TCPに関する同時定量(8回繰り返し)を実施することにより比較した。

TCPに関するデータ (単位: mg/kg)

ECD-GC分析値: 222.5~262.5

平均値: 234.7、標準偏差: 13.7

GC-MS分析値: 222.9~267.3

平均値: 247.9、標準偏差: 14.6

検定の結果、両者の母分散の比および平均値に差があるとはいえなかった。従って、以下に示す両者の定量値の比較は可能と考えられる。

一方、TCAに関しては、比較したデータはないが、試料調製法がほぼ同様である事から、両者には差がないと考える。

(2) 定量結果

結果をFig. 7、8に示した。

製品への移行を認めた際のTCA濃度は、段ボールにおいては0.1mg/kg、木製パレットにおいては1mg/kgであった。また、その際の最低TCP濃度は、段ボールにおいては1mg/kg、木製パレットにおいては10mg/kg

kgであった。以下、これを超える濃度を有する包装材を「高濃度品」と呼ぶ。

(3) TCA、TCPの濃度変化

パレット、段ボールに関し、過去のTCA濃度と近年のそれを比較した場合、高濃度品検出率が近年増加してきている。特に段ボールにあつては、十数年前は高濃度品を認めなかったのに対し、近年顕著に検出率が増加してきていると考えられる。

一方、TCPに関してはパレット中の濃度および高濃度品の検出率は近年減少しており、十数年前に比べ木製パレットへのTCP使用量、もしくは使用率が減少していると推測される。一方、段ボールにおいては、現在のと

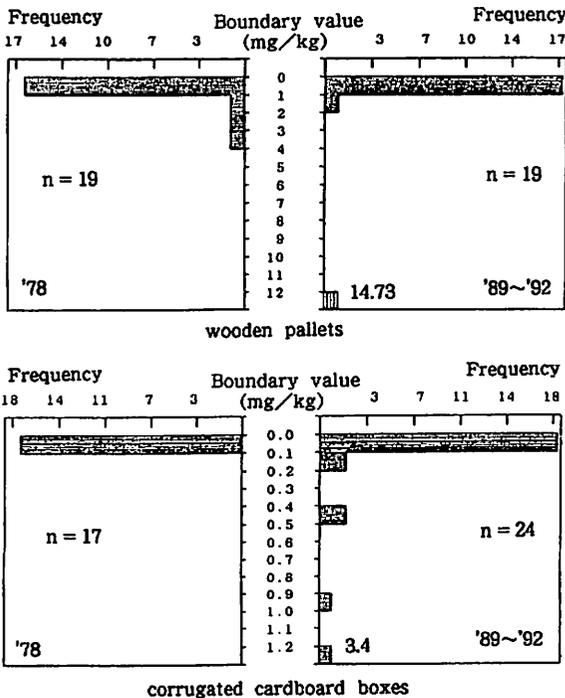


Fig. 7 Comparison of the amount of TCA detected from wooden pallets and corrugated cardboard boxes between 1978 and in the period 1989 to 1992

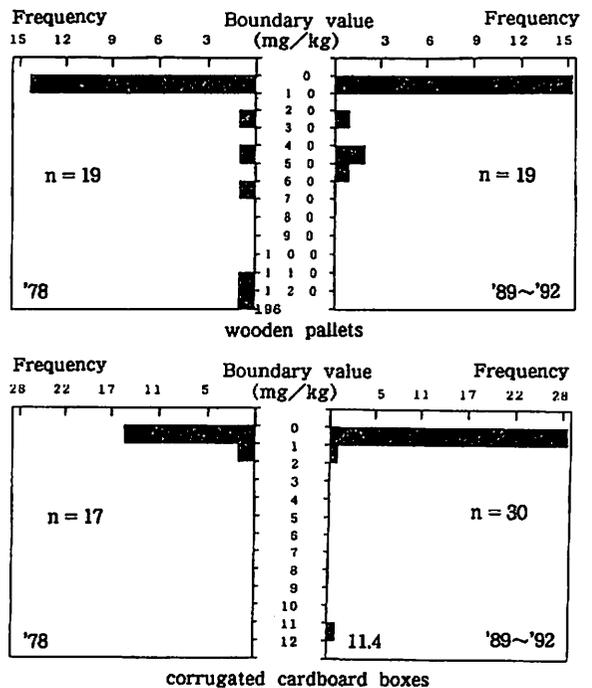


Fig. 8 Comparison of the amount of TCP detected from wooden pallets and corrugated cardboard boxes between 1978 and in the period 1989 to 1992

ころ原因不明であるが、TCAと同様高濃度品を検出している。またその中には極めて高濃度なものも含まれていることが判った。

4. 結 論

(1) GC-MSによるTCA、TCPの同時分析法を確立した。定量限界はそれぞれ木材、紙試料で3.3、4.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、繰り返しの標準偏差%は共に3.5%であった。

これにより、従来法では不可能であったTCAとTCPの同時定量が可能となり、操作の簡便化が図れた。

(2) 1978年と1989~92年に行った、木製パレット、段ボール中のTCA、TCP含有量実態調査の結果、TCAはパレット・段ボール共に高濃度品の検出率が増加してきている。この傾向は特に段ボールにおいて顕著である。

また、TCPについては、パレットについては高濃度品の検出率が減少しており、段ボールについては高濃度品を検出した。この原因は現在のところ不明である。

<引用文献>

- 1) C. Engel, A. P. Engel, C. Weurman, Science, 154, 270~271 (1966)
- 2) F. Whitfield, C. Tindale, K. Shaw, G. Stanley, Chemistry and Industry, 5 Nov., 772~774 (1984)
- 3) F. Whitfield, T. Nguyen, K. Shaw, J. Last, C. Tindale, G. Stanley, Chemistry and Industry, 10 (19), 661~663 (1985)
- 4) N. M. Griffiths, Chem. Senses Flavor, 1, 187 (1974)
- 5) D. G. Guadagni, R. G. Buttery, J. Food Sci., 43, 1346 (1978)
- 6) H. R. Buser, C. Zanier, H. Tanner, J. Agric. Food Chem., 30, 359 (1982)
- 7) F. B. Whitfield, C. R. Tindale, K. J. Shaw, G. Stanley, Chemistry and Industry, 5 Nov., 772 (1984)
- 8) F. B. Whitfield, T. L. Nguyen, J. H. Last, C. R. Tindale, G. Stanley, Chemistry and Industry, 7 Oct., 661 (1985)
- 9) 中村嘉明、木材工業、41 (1), 13~17 (1986)
- 10) Hans-Rudolf Buser, Carla Zanier, Hans Tanner, J. Agric. Food Chem., 30 (2), 352~362 (1982)
- 11) 朝倉幹男、吉田直子、林敏彦、日本缶詰協会第42回技術大会研究発表論文要旨

(原稿受付 1993年10月29日)

(審査受理 1994年1月12日)