

匂いかぎ付きGC/MSを用いたブドウ‘シャインマスカット’及び‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の香りの数値化

石井 恵・鷲尾 建紀

Numerical Quantification of Aromas of 'Shine Muscat' and 'Muscat of Alexandria' Grape using GC/MS with Olfactometry

Megumi Ishii and Tatsuki Washio

緒言

食品の香気研究の歴史は長く、以前から多くの食品について香気成分の同定、定量が報告されており、その手法としては、ジエチルエーテルなどの有機溶媒で抽出した成分を、ガスクロマトグラフ（以下、GC）で分析する方法が主流であった（飯島、2018）。しかし近年、香気成分の分析方法や測定機器の発展により、抽出方法については、気相部分に揮発した香気成分をファイバーに吸着させてGC注入口に導入する固相マイクロ抽出法（以下、SPME法）等の溶媒を使用しない方法や、サンプルの匂いの再現性が高いとされる低温・真空下で香気成分を抽出するSolvent-Assisted Flavor Evaporator（以下、SAFE）法が、測定機器については、GCに匂いかぎポート装置を組み込んだ匂いかぎ付きクロマトグラフ質量分析計（以下、匂いかぎ付きGC/MS）が開発され、様々な食品の香気分析に利用され始めている（時友、2017）。匂いかぎ付きGC/MSで分離した香気成分を質量分析計（以下、MS）と匂いかぎポートに分岐することにより、MSでの検出と同時に、人が匂いをかぎ、その性質及び強度と検出された香気成分との関係性を知ることが期待できる。

そこで、本県の重要農産物であるブドウについて、香りの特徴を分かりやすく示して有利販売に繋げるため、本報告では匂いかぎ付きGC/MSを用いて、‘シャインマスカット’及び‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’に含まれ、かつ、特徴となる香気成分を明らか

にするとともに、香気成分を効率的に抽出し、定量するため、SPME法及びSAFE法による抽出方法及び測定手法を検討した。また、香気成分と官能評価値との関係性を解析し、人が食べて感じるブドウの香りを数値化する手法を検討した。

材料及び方法

1. 匂いかぎ付きGC/MSを用いた主要香気成分の同定

2017年に岡山県農林水産総合センター農業研究所果樹研究室（岡山県赤磐市、以下、果樹研究室）及び高冷地研究室（岡山県真庭市、以下、高冷地研究室）で簡易被覆栽培された‘シャインマスカット’2点を供試した。いずれも適期に収穫した果実で、収穫後室温25℃の条件下で4日又は8日静置した後、匂いかぎ調査を実施した。‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’については、2019年に果樹研究室で適期に収穫した果実を用いて、収穫当日に調査を実施した。

香気成分の捕集は、SPMEヘッドスペースサンプラー（PAL RSI, エーエムアール）を用いたSPME法により行った。まず、果粒の赤道部付近を厚さ5mmに切り出して放射状に細断し、0.5g, 2g, 5g, 8gになるよう試料片を20mLのガラス製バイアル瓶に入れ、スクリーキャップで密封した。その後、バイアル瓶を40℃又は50℃で10分間加熱し、シリンジ先端のファイバー（Carbon WR Fiber/PDMS 95 μ m, PAL SYSTEM）をバイアル瓶の気相部分に挿入して20分間香気成分を吸着させた後、シリンジを匂いかぎ付きGC/MS（JMS-Q1500,

日本電子) に導入して測定した。GCのカラムはInertCap Pure-WAX(カラム長60m, 内径0.25mm, 膜厚0.25 μm , GLサイエンス)を用い, 注入口温度250°C, スプリットレス条件でシリンジを注入した。GC内のオーブンは40°Cで1分間保持し, 5°C/minで100°Cまで昇温させた後, 10°C/minで250°Cまで昇温させ, 20分間保持した。その後, GCで分離した香気成分のピークをMSで同定し, ライブラリー(NIST Mass Spectrometry Data Center)で照合した。同時に, スニッフングポート(OP275, GLサイエンス)を介して感じた香りについて, 香りからイメージする言葉や強度を記録し, 強度は3段階(1. わずかに感じる, 2. 感じる, 3. 強く感じる)で評価した。

2. 測定手法の検討

(1)SPME法による香気成分の定量

1)検量線法による香気成分量の算出(手法1)

2021年に果樹研究室及び岡山県高梁市で収穫した‘シャインマスカット’27点と, 同年に岡山県赤磐市及び岡山市で収穫した‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’5点を供試した。‘シャインマスカット’のうち25点は, 収穫後0°Cで2か月又は4か月冷蔵したものを, 出庫翌日に供試した。まず, 供試試料から9粒採取し, 赤道部付近を厚さ5mmに切り出し, 放射状に細断し, 試料片8gを20mlのガラス製バイアル瓶に密閉した。その後, バイアル瓶を50°Cで10分間加温し, シリンジ先端のファイバーをバイアル瓶の気相部分に挿入し20分間香気成分を吸着させた後, シリンジを匂いかぎ付きGC/MSに導入し, リナロールとゲラニオールを測定した。検量線試料は, リナロールとゲラニオール(一級, 富士フィルム和光純薬)をエタノール(HPLC用, 富士フィルム和光純薬)で希釈して作成した。検量線試料10 μL をブドウ試料とは別のバイアル瓶に封入し, 気相部分に揮発したリナロールとゲラニオールを測定し, ピーク面積値を基に両成分を定量した。

2)標準物質による香気成分面積比の算出(手法2)

2019年及び2021年に果樹研究室, 高冷地研究室及び岡山県高梁市で収穫した‘シャインマスカット’45点と, 2019年及び2021年に赤磐市及び岡山市で収穫した‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’7点を供試した。‘シャインマスカット’のうち40点は, 収穫後0°Cで最長5か月冷蔵したものを供試した。匂いかぎ付きGC/MSに導入するまでの方法は手法1と同様とした。通常, GCによる香気分析ではシクロヘキサノール等の内部標準物質を供試試料及び標準試料(検量線試料)に添加し, 感度補正する(和歌山県, 2009年)。しかし, 予

備調査で細断したブドウ試料を封入したバイアル瓶にシクロヘキサノールを添加したところ, バイアル毎にシクロヘキサノールのピーク面積値(以下, 面積値)のばらつきが大きく, 内部標準として使用することができなかった。これは, 付着した場所や試料の水分量の違いにより揮発に差が生じることが要因とされている(野呂ら, 2023)。そこで, 揮発の影響による測定値のばらつきを回避するため, 測定日毎にエタノールで200ppmに調整したシクロヘキサノール(特級, 富士フィルム和光純薬)10 μL のみを供試試料とは別のバイアル瓶に封入した。その後, 匂いかぎ付きGC/MSで供試試料から揮発するリナロールとゲラニオール, 及び標準物質としてシクロヘキサノールの面積値を測定した。シクロヘキサノールの面積値を100として, シクロヘキサノールに対するリナロールとゲラニオールの面積比(リナロール及びゲラニオールの面積値*100/シクロヘキサノールの面積値)を求めた。

(2)SAFE法による香気成分の定量(手法3)

2018年及び2019年に果樹研究室, 高冷地研究室及び岡山県高梁市で収穫した‘シャインマスカット’19点と, 2021年に岡山県赤磐市及び岡山市で収穫した‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’7点を供試した。まず, 収穫後-30°Cで冷凍した果実250gに, 飽和塩化カリウム溶液250g, 塩化ナトリウム(特級, 富士フィルム和光純薬)90g, アスコルビン酸(特級, 富士フィルム和光純薬)5gを添加し, ミキサーで30秒間粉碎した。その後, 活性アルミナ(カラムクロマトグラフ用, 富士フィルム和光純薬)を通過させ, 水分や不純成分を吸着除去したジエチルエーテルを加え, 分液ロートで100回攪拌しジエチルエーテル層を回収した。この操作を3回繰り返し約500mLのジエチルエーテル層を得た。水層及び残渣は5°Cの条件下で3,000rpm, 15分間遠心分離し, ジエチルエーテル層を回収し, 前述のジエチルエーテル層に加えて抽出液とした。得られた抽出液は葉さじ1杯分の無水硫酸ナトリウム(残留農薬・PCB試験用, 富士フィルム和光純薬)で脱水し, ガラス繊維濾紙で濾過した後, エバポレーターで減圧濃縮し, SAFE装置(桐山製作所)で蒸留, 精製した後, 窒素ガスを使用して最終的に0.5mLまで濃縮し, 匂いかぎ付きGC/MSでリナロールとゲラニオールを定量した。定量のための検量線試料は, リナロールとゲラニオール(一級, 富士フィルム和光純薬)をジエチルエーテル(残留農薬・PCB試験用, 富士フィルム和光純薬)で希釈して作成した。

3. 官能評価

供試したすべての果実について、6～8名のパネルによって、甘い香りの強度を6段階（1. 感じない, 2. わずかに感じる, 3. 弱く感じる, 4. 感じる, 5. 強く感じる, 6. 非常に強く感じる）の評点法で評価した。パネルは、農業研究所に在籍する職員のうち、ブドウの育種や栽培、品質評価に関係する研究に携わり、ブドウの食味評価に精通する人材を選定した。

4. 統計解析及び官能評価値の推定方法

統計ソフトPASW Statistics18 (SPSS) を用いて、機器分析値（手法1～3で求めたリナロール及びゲラニオール量又は面積比）と甘い香りの官能評価値との間の相関関係の有意性を検定した。嗅覚刺激の強さは香気成分濃度の対数に比例することを示すウェーバー・フェヒナーの法則が知られており（山野, 2013）、機器分析値は全て対数変換（自然対数）して用いた。また、官能評価結果を従属変数とし、機器分析値を説明変数とした重回帰分析を行い、機器分析値から官能評価値を推定する回帰式を作成した。説明変数は、投入した説明変数の中で目的変数と関係する変数を自動で選択するステップワイズ法によって従属変数と関連性の強いものを選択した。また、得られた回帰式による官能評価値の推定精度を評価した。

結果

1. 匂いかぎ付きGC/MSを用いた主要香気成分の同定

‘シャインマスカット’ 及び ‘マスカット・オブ・ア

レキサンドリア’ のクロマトグラムを図1に、匂いかぎ調査の結果を表1に示した。マスカット香を呈する品種（以下、マスカット香品種）に含まれる主要な香気成分とされるリナロールのピークが最も大きく、すべての試料で感知された。同じく、マスカット香品種に含まれる主要な香気成分とされるゲラニオールは、リナロールのピークより小さいが、香りの強度はリナロールと同程度であった。他にもβ-ミルセン等のテルペン炭化水素類、(Z)-3-ヘキセン-1-オール等のアルコール類、ヘキサナール等のアルデヒド類の香りを感知した。

異なる封入量及び抽出温度でSPME法により測定した‘シャインマスカット’のリナロール及びゲラニオールの面積値を図2に示した。封入量の違いによる面積値に一定の傾向はみられず、また、匂いかぎによる香りの強度にも明らかな傾向はみられなかった。抽出温度の違いを比較した赤磐市の試料については、40℃よりも50℃で面積値が大きく、より香りが感じられる傾向であった。

2. 測定手法の検討

3つの測定手法により求められたリナロール及びゲラニオールのGC/MSによる検出率を表2に示した。その結果、リナロールの検出率は、両品種ともすべての手法で100%であった。一方、ゲラニオールの検出率は、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’ では100%であったが、‘シャインマスカット’ では、手法により検出率が異なり、手法1で41%、手法2で62%、手法3で19%で

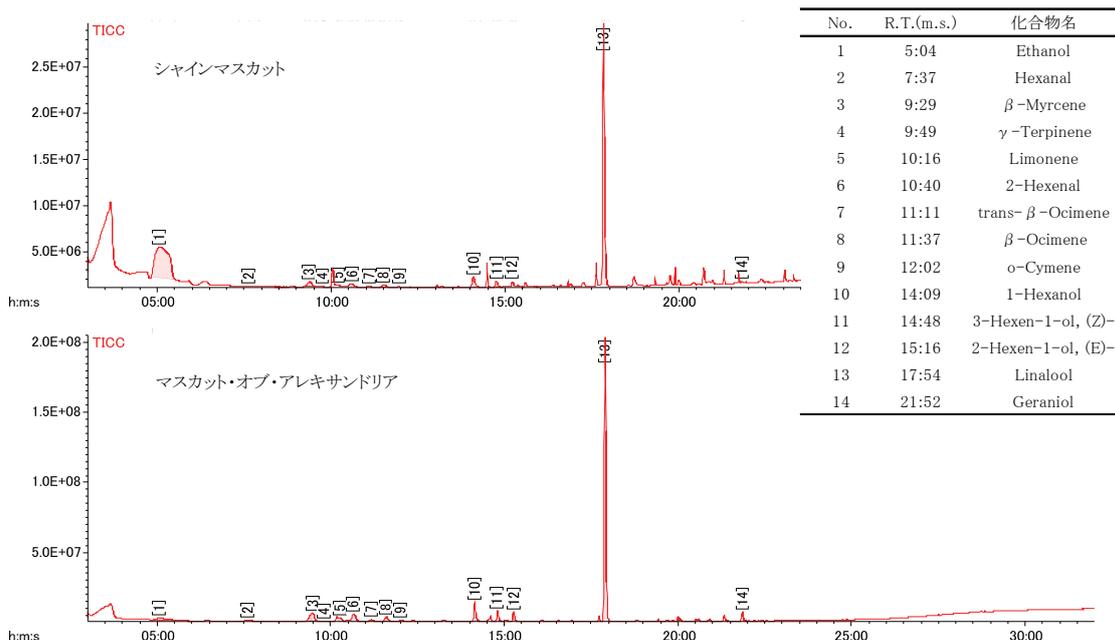


図1 SPME法で測定した ‘シャインマスカット’ と ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’ のクロマトグラムの例

あった(表2)。また、すべての手法において、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’は、‘シャインマスカット’と比べてリナロール及びゲラニオールの方が大きい傾向を示し、甘い香りの官能評価値も高かった(表3)。

リナロール及びゲラニオールの量又は面積比の対数変換値と甘い香りの官能評価値との関係は、手法3のゲ

ラニオールを除いて、手法1～3で両者に正の相関関係が認められた(図3)。

3. 機器分析値を用いた甘い香りの数値化

重回帰分析結果を表4に示した。甘い香りを推定する回帰式の説明変数に、手法1ではゲラニオール量が、手法2ではリナロール及びゲラニオールの面積比の値が

表1 SPME法による匂いかぎ調査で確認された‘シャインマスカット’及び‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の香気成分

No. 成分名	シャインマスカット (赤磐市)						シャインマスカット (真庭市)			マスカット・オブ・アレキサンドリア (赤磐市)	匂いの性質
	抽出温度(°C)			抽出温度(°C)			抽出温度(°C)			抽出温度(°C)	
	封入量(g)			封入量(g)			封入量(g)			封入量(g)	
1 Ethanol	1	1	1	1	1	1	0.5	2	8	8	アルコール
2 Hexanal			1	2		1					グリーン
3 β-Myrcene	1	1	1	2	1	1			1		ハーブ
4 α-Terpinene			1	1		1					ハーブ
5 Limonene	1	1	1		2		1				柑橘
6 2-Hexenal, (E)-				1		1					グリーン
7 trans-β-Ocimene	1			1	1	2		1			甘い
8 β-Ocimene	2	1	1		1	2			1		ハーブ
9 o-Cymene	1			2					1		果実
10 1-Hexanol					1		1	1	1	1	グリーン、果実
11 3-Hexen-1-ol, (Z)-		1	1	1	1	1	2	2	2		グリーン
12 2-Hexen-1-ol, (E)-	1			1	1						グリーン、果実
13 Linalool	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	スズラン
14 Geraniol	1				1	2	2	2	2	2	バラ

注)表中の数値は感知した香りの強度を示す
1:感じる、2:やや強く感じる、3:強く感じる

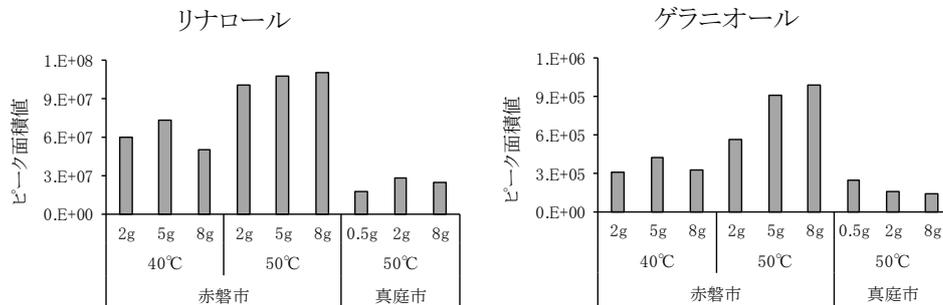


図2 異なる抽出温度及び封入量でSPME法により測定した‘シャインマスカット’のリナロール及びゲラニオールのピーク面積値

表2 異なる測定手法で求められたリナロール及びゲラニオールのGC/MSによる検出率 (%)

測定方法	品種	リナロール	ゲラニオール
手法1 (SPME法)	シャインマスカット	100 (27/27)	41 (11/27)
	マスカット・オブ・アレキサンドリア	100 (5/5)	100 (5/5)
手法2 (SPME法)	シャインマスカット	100 (45/45)	62 (28/45)
	マスカット・オブ・アレキサンドリア	100 (7/7)	100 (7/7)
手法3 (SAFE法)	シャインマスカット	100 (16/16)	19 (3/16)
	マスカット・オブ・アレキサンドリア	100 (7/7)	100 (7/7)

注)表中の()内は、検出試料数/供試試料数を示す

選択された。手法3では説明変数が選択されなかったため、強制投入法による重回帰分析を行った。得られた回帰式を用いて甘い香りの官能評価値を推定すると、実測値との推定誤差RMSEは、手法1で0.357 (R²=0.749, p<0.001), 手法2で0.353 (R²=0.718, p<0.001), 手法3で0.350 (R²=0.391, p=0.176) であった (図4)。

表3 異なる測定手法で求められた香り成分量と官能評価値

品種	手法1 (SPME法)		手法2 (SPME法)		手法3 (SAFE法)		官能評価値 ^z
	リナロール (mg/100g)	ゲラニオール (mg/100g)	リナロール (面積比)	ゲラニオール (面積比)	リナロール (μg/100g)	ゲラニオール (μg/100g)	
シャインマスカット	23.9	0.7	13.6	0.2	26.4	3.6	3.2
マスカット・オブ・アレキサンドリア	459.8	9.8	84.7	3.9	39.0	9.5	4.3
t検定	n.s.	*	*	**	n.s.	*	**

注) 表中の**及び*は、それぞれ1%及び5%水準で有意であることを示す
z 1: 感じない~6: 非常に強く感じる

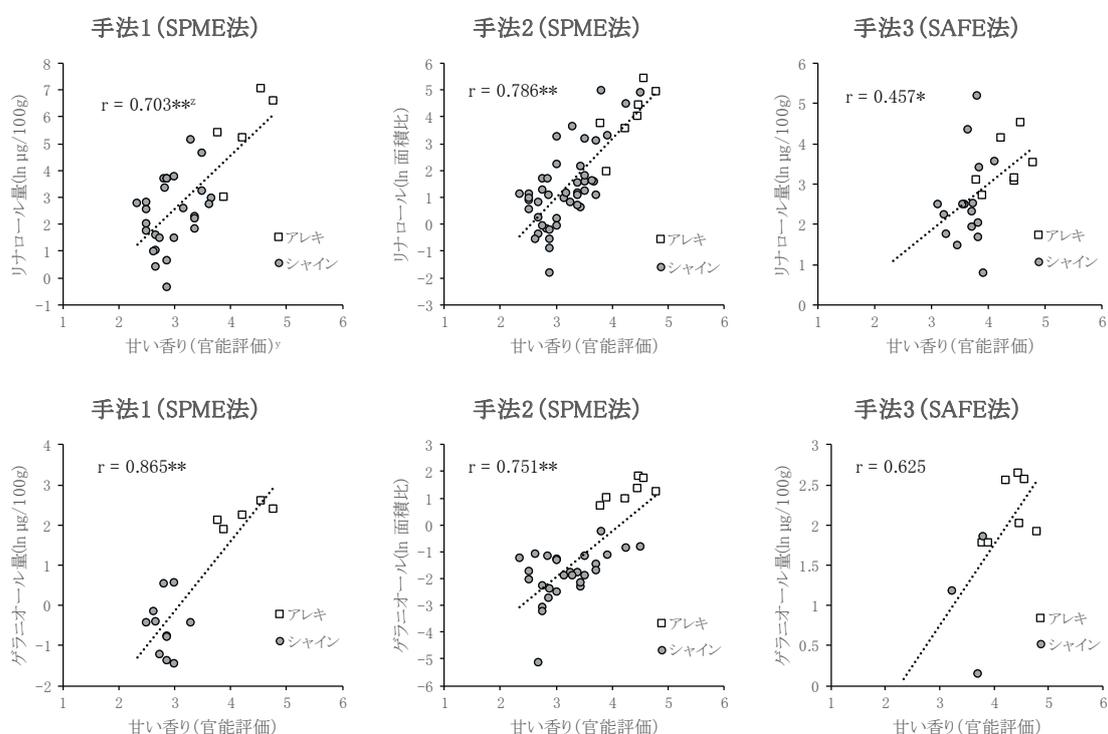


図3 対数変換した香り成分 (リナロール及びゲラニオール) と官能評価値との関係

注) 図中の□は ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’,

●は ‘シャインマスカット’ を示す

^z **及び*は、それぞれ1%及び5%水準で有意であることを示す

^y 1: 感じない~6: 非常に強く感じる

表4 重回帰分析結果

手法	変数	非標準化係数	標準化係数	R ²	RMSE
手法1 (SPME法)	ゲラニオール量	0.43	0.865	0.749	0.357
	定数	3.14			
手法2 (SPME法)	リナロール面積比	0.21	0.537	0.718	0.353
	ゲラニオール面積比	0.17	0.385		
手法3 (SAFE法)	リナロール量	0.00	0.002	0.391	0.350
	ゲラニオール量	0.39	0.624		
	定数	3.36			

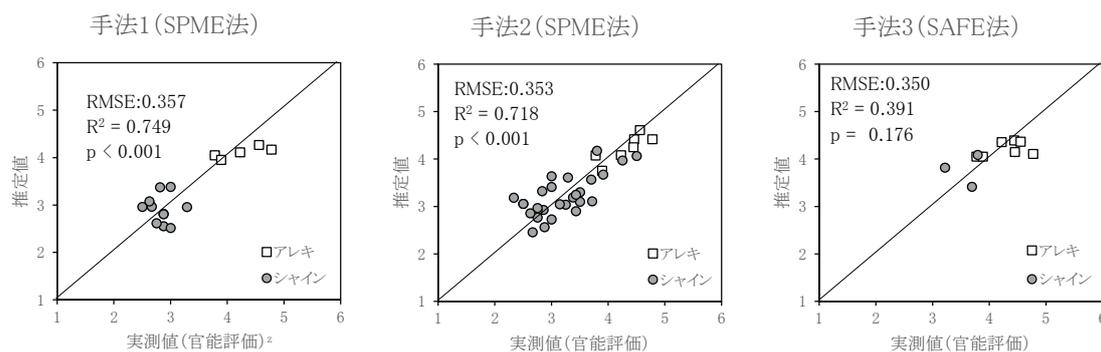


図4 香気成分量及び面積比から推定した官能評価値と実測値の関係

注) 図中の□は‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’,

●は‘シャインマスカット’を示す

※ 1: 感じない~6: 非常に強く感じる

考 察

本報告は、果実の粉碎や溶媒抽出を行わず、果実を細断した喫食に近い形状で揮発した香気成分を捕集し、匂いかぎ調査とSPME法による測定を組み合わせた結果である。‘シャインマスカット’や‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’に含まれる香りについては、Stevens et al. (1966), Park et al. (1991), 平野ら (1998), Okamoto et al. (2001), Matsumoto and Ikoma (2015) の報告において、主要な香気成分はリナロール及びゲラニオールであるとしているが、人が実際に感知する主要な香気成分を特定するための匂いかぎ調査を行った記述は見られない。

そこで本報では、匂いかぎ付きGC/MSを用いた主要香気成分の同定と匂いかぎ調査の結果、感知した回数が多く、香りの強度が強いリナロールとゲラニオールが、マスカット香の主要な香気成分であることを確認した(表1)。試料を0.5~8gと段階的に封入したが、封入量の影響は判然とせず、少量でも強く香りを感じる傾向にあったリナロールとゲラニオールが、人が感知する香りへの寄与度が特に高いものと考えられた。また、香気成分は揮発性であるため、温度上昇によって揮発性が高まり、より多くの香気成分が放出される(大久保, 2019)。ブドウについても、香気成分をSPME法で測定する際の抽出温度は40℃よりも50℃でより強く香りを感じる傾向であり、抽出効率が高いことが推測された(図2)。

また、上述の既報は、GC測定の前処理として果実の粉碎や溶媒抽出を行っており、本研究とは異なるGCカラムや香気成分の吸着剤等を使用したものである。‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’には、リナロー

ルやゲラニオールの他にもネロールやシトロネロールが含まれているとの報告があるが(平野ら, 1998; Okamoto et al.2001), 本研究では先行研究と調査手法が異なることから、ネロールやシトロネロールが感知されなかったと考えられ、この点については、今後、ネロールやシトロネロールを検出する手法及び甘い香りに対する寄与率を検討する余地があるものと考えられた。

測定手法の検討では、SPME法で2つの方法(手法1及び2)を検討した結果、いずれの手法も官能評価値との高い相関が見られ、甘い香りの数値化に活用できると考えられた。これらのことから、人が食べて感じる香りを数値化するには、SPME法(手法1及び2)が簡便で有用な手法であると考えられた。一方、SAFE法(手法3)は、SPME法(手法1及び2)と比べて官能評価値との関係性が低く、また、供試した‘シャインマスカット’の約8割でゲラニオールが検出されなかった。また、甘い香りを推定する回帰式を作成したが、推定値と官能評価値との相関関係は認められなかった。このことについて、SAFE法では、実際の喫食とは異なる形状での試料を分析することや、分析操作が複雑で香気成分の回収ロスが生じたのではないかと考えられた。

供試したブドウのうち、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’は、‘シャインマスカット’よりも香気成分を多く含んでおり、甘い香りの評価値も高かった(表3)。これは、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の特長のひとつとして挙げられる「香りの良さ」を示すものであると考えられた。そこで、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の香りを客観的に表現する図を盛り込んだPR資料を作成し(石井ら, 2021), ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の生産や販売に携わる

関係者に提供している。

摘 要

匂いかぎ付きGC/MSを用いて、ブドウ ‘シャインマスカット’ 及び ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’ に含まれる甘い香りを呈する香気成分の特定と客観的な評価手法を検討したところ、以下の結果を得た。

1. 匂いかぎ付きGC/MSを用いて両品種に含まれる香気成分について匂いかぎ調査を行ったところ、リナロールとゲラニオールをブドウ特有の甘い香りの成分として同定した。

2. 匂いかぎ付きGC/MSを用いたりナロールとゲラニオールの抽出及び測定手法を検討した。その結果、ブドウの甘い香りを評価する手法として、粉碎や溶媒抽出等の前処理を行わず、細断した果実から揮発する香気成分を捕集するSPME法が適するものと考えられた。

3. 甘い香りの官能評価値は、SPME法で求めたりナロールとゲラニオール量又は面積値の対数変換値を用いることで推定できる可能性が示唆された。

引用文献

- Hikaru Matsumoto and Yoshinori Ikoma. (2015) Effect of postharvest temperature on the muscat flavor and aroma volatile content in the berries of ‘Shine Muscat’ (*Vitis labruscana* Baily × *V. vinifera* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 112 : 256-265.
- 平野健・芝原律雄・朝岡克拓・岡本五郎 (1998) ブドウ ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’ 果汁の成熟中におけるモノテルペンの変化. *園学雑*, 67 : 907-911.
- 飯島陽子 (2018) 食品の香気分析技術についての最近の話題. *日調科誌*, 51 : 197-204.
- 石井恵・鷺尾建紀・中島譲 (2021) ブドウ「マスカット・オブ・アレキサンドリア」のおいしさのPR資料. 令和3年度試験研究主要成果, 岡山県農林水産総合センター農業研究所, pp.39-40.
- Okamoto, G. , Liao, K. , Fushimi, T. and Hirano, K. (2001) Aromatic Substances Evolved from the Whole Berry, Skin, and Flesh of Muscat of Alexandria Grapes. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University*, 90:21-25.
- 大久保直美 (2019) 農業技術大系花卉編 (5), 農文教. pp.57-66.
- Park, K.S. , Morrison, C. , Adamsand, D. O. and Noble, A.

C. (1991) Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *J. Agric. Food Chem*, 39:514-518.

Stevens, K., Bomben, J. , Lee, A. and McFadden, W. H. (1966) Volatiles from Grapes. Muscat of Alexandria. *J. Agric. Food Chem*, 14:249-25.

時友裕紀子 (2017) 果実の香気分析GCにおいしさ分析と官能評価. *化学と生物*, 55 (11) :743-749

和歌山県工業技術センター (2009) 香気成分分析. 中小企業のための分析機器利用マニュアル, p.10.

山野善正 (2013) おいしさの科学事典 (普及版). p.92.