

乳児用粉ミルク中の低沸点揮発性物質の測定法について

佐二木順子、ジョイ・カバカン*、高橋 勝弘、佐伯 政信

Method for the determination of volatiles with low boiling points in infant powdered milk

Junko SAJIKI, Joy CABACCANG, Katsuhiro TAKAHASHI
and Masanobu SAEKI

*National Food Authority Food Development Center, Philippines

はじめに

リノール酸などの不飽和脂肪酸の酸化により生成されるアルデヒド等の低沸点揮発性物質は、酸敗臭の原因となり変異原性^{1,2)}や細胞毒性^{3,4)}を示すため、食品衛生学的に重要である。なかでも、大豆ミルクやピーナツミルクなどの乳製品中ではリポキシゲナーゼ^{5,6)}などの酵素や熱、光等の物理的要因^{7,8)}によりこれら物質が多く生成されることが知られており、アルデヒド類の測定はミルクの品質管理上良い指標になりうるものと考えられている^{9,10)}。とくに、東南アジア等年間気温の高い国々ではしばしば乳製品の異臭等品質低下の問題が生じており、測定法の確立が急がれている。

しかしながら、これら物質は物理的、化学的に不安定であり、また食品中からの抽出が困難なため、確立された良い測定法がない。近年、食品や生体試料中のアルデヒド類をダイナミックヘッドスペース法^{11,12)}や微量固相抽出法 (solid-phase microextraction)¹³⁾を併用したGC-MSによる分析が精度の高い方法として紹介されているが、高価な装置ならびに高度な技術を要するため一般的ではない。そのため、食品中の低沸点揮発性物質の測定は、減圧水蒸気蒸留法によるGC分析により行われている^{14,15)}のが現状である。

このたび、フィリピン製乳児用粉ミルク中のヘキサナル底沸点揮発性物質の分析法を検討する機会に恵まれたので、測定コストが安く、東南アジア諸国において即導入可能な減圧水蒸気蒸留法によるGC測定を試みた。

実験材料ならびに方法

1. 実験材料

フィリピン製の乳児用粉ミルク (以下Phil-Mと略) は、缶入りをポリ袋に移したもの (異臭ありと異臭無し) であった。標準物質は和光純薬kkならびにSigma Co.製のものをを用いた。減圧水蒸気蒸留装置は図1に示したガラス製のものをを用いた。水蒸気発生フラスコは40℃、試料入り蒸留フラスコは30℃に加熱された。抽出液受けフラスコは水で冷却された。

2. 実験方法

1) 試料からの低沸点揮発性成分の抽出

粉ミルクからの低沸点揮発性成分の抽出は図2に示すフローシートに基づいた。すなわち、100gの粉ミルクをの40℃の温水300

mlに溶かしたものを、減圧水蒸気蒸留装置で蒸留し、留液500mlを集めた。低沸点揮発性成分はジエチルエーテル (500mlx1, 200mlx2) を用いて抽出された。ジエチルエーテルを10mlまで留去し、さらにN₂下で0.5mlに濃縮し、2 μlをGCに注入した。

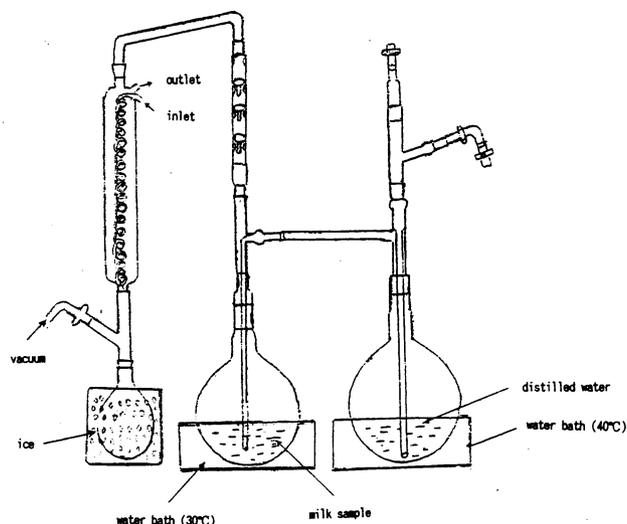


Fig.1. Reduced Pressure Distillation Set-up for Determining Volatile Components in Infant Powdered Milk Sample

2) GCならびにGC-MSの測定条件

通常の分析はFID (frame ionization detector) を備えたGC-14 (Shimadzu) により行った。使用カラムおよび分析条件は以下のとおりであった。

カラム: DB-5, およびDB-Wax (30m x 0.53mm i.d. fused silica capillary column, 1.5 μm)

流速: 19ml/min, 注入温度: 210℃, 検出器温度: 250℃,

測定モード: splitless, 分析プログラム: 40℃で4 min保持, 2℃/minで60℃まで昇温後1.0min保持, 30℃/minで210℃まで昇温後2.0min保持。

揮発性物質の同定はGC-MS: GC-17A (Shimadzu), QP-5000 (Shimadzu) によった。使用カラムおよび分析条件は以下のとおりであった。

カラム: DB-5 (31m x 0.25mm i.d. fused silica capillary column, 1.5 μm)

流速: 9.6ml/min, 注入温度: 210℃, インターフェース温度: 280℃, 測定モード: split, 分析プログラム: 40℃で4 min保持,

乳児用粉ミルク中の低沸点揮発性物質の測定法について

2°C/minで60°Cまで昇温後5.0min保持, 30°C/minで210°Cまで昇温後1.0min保持。

100 g of milk

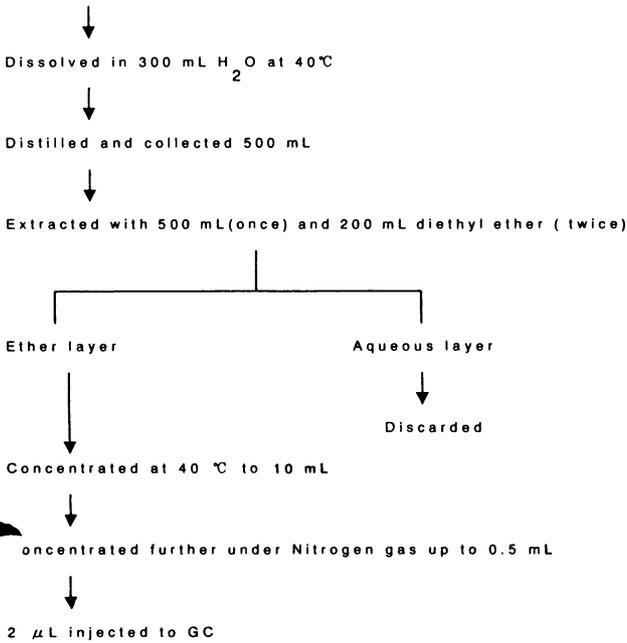


Fig.2. Flowsheet for the Determination of Hexanal in Powdered Milk Using Steam Distillation Under Reduced Pressure (SDRP) and Gas Chromatography

実験結果

標準ペンタナールならびにヘキサナールの保持時間 (R T) は, DB-5カラムではそれぞれ2.3+2.4分, 5.2分, DB-Waxカラムではそれぞれ3.1+3.2分, 6.2分であった。100ppm注入の場合, ヘキサナールのピーク面積はDB-5カラムでは 81.3×10^3 , DB-Waxカラムでは 48.7×10^3 であった。ヘキサナールの測定に関しては, どちらのカラムを用いても他の物質による妨害はなかったが, ペンタナールについては, 保持時間が短いため, 場合により溶媒の影響を受けることがあり, 粉ミルクの劣化の指標としては不適當と考えられた。ヘキサナールの検出限界は1 ppmであった。図3は, 水に添加したヘキサナールをジエチルエーテルで抽出したものであるが, ヘキサナールの他に大きなピークが出現した。このピークはエタンと同定された。表1は50ppmのヘキサナールを水に添加し, ジエチルエーテルで抽出した場合 (減圧水蒸気蒸留は行っていない) のヘキサナールとエタンのピーク面積値ならびにヘキサナールの回収率を示したものである。ヘキサナールの回収率が低いほどエタンが多く生成された。このエタンの高まりについて, ヘキサナールがエタンに分解されたのか, ジエチルエーテルに起因するのかわ不明である。なお, ミルクサンプル (粉ミルクを40°Cの温水に溶かしたもの) に500ppmのヘキサナールを添加し, 減圧水蒸気蒸留法によりヘキサナールを抽出した際の回収率は9.9%と著しく低かった。

Table 1 Behaviour of Ethane in Recovery Test of Hexanal in Water

Method	Hexanal Peak Area (X10 ³)	Ethane Peak Area (X10 ³)	% Recovery of Hexanal
Without Distillation	37.2	0	
With Distillation *			
# 1	20.9	154.6	56.2
# 2	33.9	45.8	91.1

* #1 Extracted with 3 x 500 ml diethylether
#2 Extracted with 1x 500 ml and 2 x 200 ml diethylether

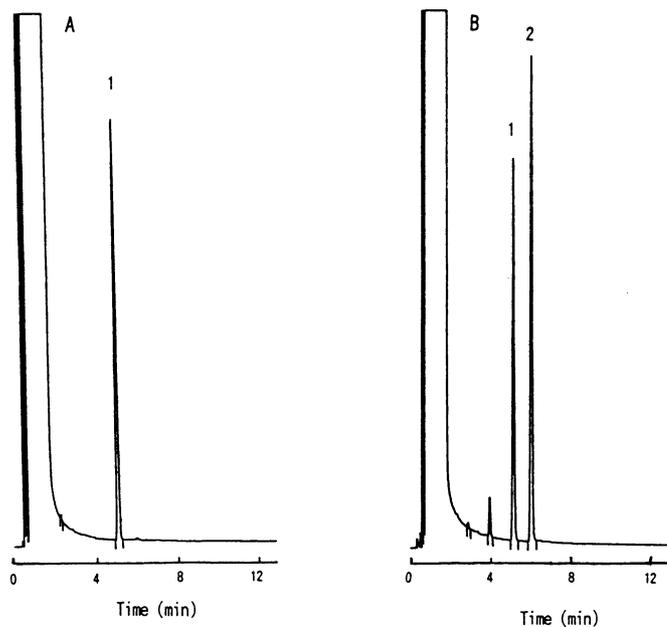


Fig.3. Chromatograms of 50 ppm Hexanal Without (A) and With (B) Distillation and Extraction With Diethylether. 1, Hexanal; 2, Ethane.

図4にPhil-M(A:無臭, B:強臭を有する)から得られた低沸点揮発性成分のGCクロマトグラムを示した。A, Bともに多くの物質が検出されたが, その中で12物質がGC-MSにより同定された(表2)。強臭を有するサンプルでは1-ペンタノール, ヘキサナール, エタン, 2-ヘプテナール, 1-ヘプタノールが増加した。一方, 4-ヒドロキシ-4-メチル-2-ペンタノン(4)は減少した。表2は同定された物質の相対面積値(%)を示したものである。分析条件によっては, 溶媒ピークが大きく, ペンタナールが出現しないことがあったので, ペンタナール(RT 2.3とRT 2.4分の2本のピーク)は除外してRT4分から16分までに検出されたピークの総面積に対する11物質のピーク面積比を求めた。強臭を有するサンプル中の1-ペンタノール, ヘキサナールは, 無臭サンプル中の値の約2倍であった。1-ヘキサノール, ヘプタナール, 1-ヘプタノール, 2-ヘキサナールは無臭サンプル中には認められないが, 臭いを有するサンプルでは検出された。逆に, 2-フランメタノール, 4-ヒドロキシ-4-メチル-2-ペンタノンは, 強臭を有するサンプルで著しく減少した。

考察

ミルクの品質を判定する上で, 臭いは重要な因子である。ミルクの異臭の原因は主として, メチオニンなど硫黄を含んだアミノ酸の分解過程で生成されるメチオナルやジメチルジサルファイドや, 不飽和脂肪酸の酸化により生じるアルデヒド類によるものと考えられている。これら物質は化学的, 物理的に不安定なため正確な定量は非常に困難である。とくにアミノ酸の分解物は不飽和脂肪酸の酸化物に比べGC分析による検出が困難であることが報告されている¹⁰⁾。今回の実験では, 不飽和脂肪酸の酸化物であるヘキサナール, ペンタナール, ヘプタナールなど多くのアルデヒドが検出された。なかでもリノール酸の酸化代謝物であるヘキサナールはミルクの品質低下の程度を知る上で良い指標になると考えられている物質である¹³⁾。ペンタナールもヘキサナール同様, ミルクの品質管理の良い指標になりうるものと考えられている^{9,13)}が, 減圧水蒸気蒸留法を用いた今回の結果からは, ヘキサナールがペンタナールより適当であると考えられた。その理由として, ペンタナールはGC分析で2本のピークを有するため確実な物質の同定が困難なこと, 保持時間が短かい場合によっては溶媒ピークの影響を受けることがあげられる。

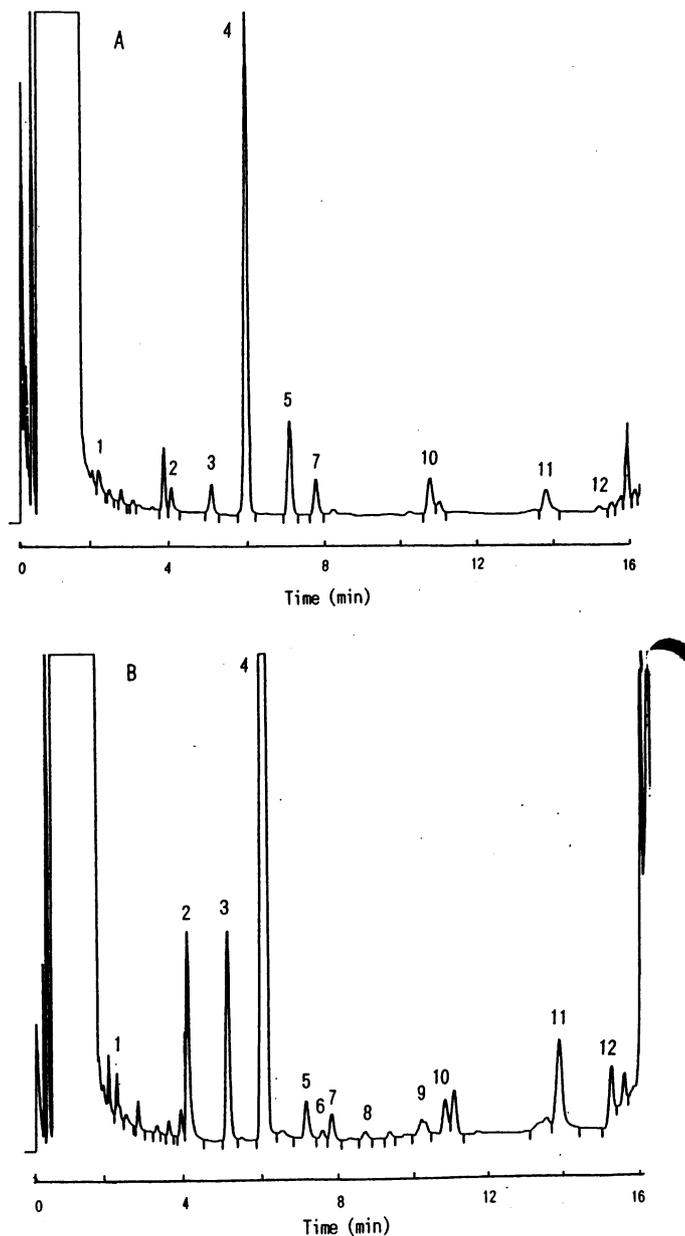


Fig. 4. Chromatograms of Philippine Infant Powder Milk Samples: No Off-odor (A) and Strong Off-odor (B). Peaks: 1, pentanal; 2, 1-pentanol; 3, hexanal; 4, ethane; 5, 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone; 6, 2-hexenal; 7, 2-furanmethanol; 8, 1-hexanol; 9, heptanal; 10, 2-butoxy-ethanol; 11, 2-heptenal; and 12, 1-heptanol.

Table 2 Relative % Composition of Volatiles identified in various kinds of infant milk

Peak No.	Component	Retention Time	Relative % Composition			
			Off-Odor			
			None ^{*1}	None ^{*2}	Slight ^{*2}	Strong ^{*2}
1	1-Pentanol	4.14	0.4	2.6	1.4	5.6
2	Hexanal	5.16	2.1	5.4	5.5	10.4
3	Ethane	6.34	81.7	63.5	82.6	71.5
4	4-hydroxy-4-methyl-2-Pentanone	7.23	0	12.67	0	1.2
5	2-Hexenal	7.62	0	0	0	0.3
6	2-Furanmethanol	7.86	9.3	4.8	3.2	0.8
7	1-Hexanol	8.72	0	0	0	0.3
8	Heptanal	10.34	0	0	0.8	1.3
9	2-butoxy-Ethanol	10.88	2.7	5.5	1.8	0.9
10	2-Heptenal	13.92	2.4	4.4	3.3	4
11	1-Heptanol	15.25	0	0	0	1.8
Others			1.4	1.13	1.4	1.9

Data represents % of sum total peaks area detected from 4 min to 16 min in GC.

*1 Japan milk

*2 Phillipine milk

減圧水蒸気蒸留法を用いた場合、ヘキサナールは容易に分解されることが明らかであった。蒸留条件により揮発性成分の分解率が異なることも十分考えられ、ミルク中におけるヘキサナールの絶対量の測定は困難であると思われた。そのため、今回はミルク中のヘキサナールの濃度指標として多くの研究者が用いている¹⁴⁾¹⁵⁾相対面積比(%)を用いた。無臭ミルクと強い臭いを有する粉ミルク中のヘキサナール値に有意な差が認められた事実はヘキサナールが粉ミルクの品質劣化の良い指標になりうることを示すものであった。今後さらに検体数を増し、品質劣化(臭いや風味)とヘキサナールの相対面積比(%)の関係を調べることは、粉ミルクの品質管理マニュアルを作成する上で不可欠である。ミルク中のヘキサナールは主としてリノール酸の酸化過程で生成されるものと考えられている。今回使用した乳児用粉ミルク中には乳脂肪以外に大豆油、パーム油などの植物油が添加されているため、脂質に対するリノール酸の割合が12%と普通牛乳(2%)に比べ高い。本法によるヘキサナールの定量検出限界は1ppmであり、ヘッドスペース法や微量固相抽出法を用いたGC-MS法(0.3-0.8ppb)¹³⁾に比べると著しく高いが、本法でヘキサナールの検出が可能であったのは、リノール酸が乳児用粉ミルク中に高濃度含まれているためと思われる。

フラン化合物は熟れた果実等の発する芳香物質の一つと考えられている¹⁶⁾。ミルク中の2-フランメタノール値の減少が臭いの強さに依存していた事実は、2-フランメタノールがミルクのもつ芳香に関係していることを示すものと考えられた。

近年、揮発性物質の抽出操作中の分解を最小限に抑えるため、煩雑な抽出操作を必要としない簡便なダイナミックヘッドスペースGC法が汎用されるようになってきている。しかし、高価な装置を必要とし、揮発性成分が多い検体ではカラムのクリーンアップが完全でなく、次のサンプルの分析値に影響を及ぼしたり、Tenaxなど充填物質の熱分解物質が不純物として検出されるなどの問題点が挙げられている¹⁰⁾。以上のような点を考慮すると、減圧水蒸気蒸留法を併用したGC法は東南アジア諸国でも即導入が可能であり、ミルク製品の品質管理に十分役立つものと思われる。

まとめ

乳児用粉ミルクの品質管理に広く用いられている低沸点揮発性物質の分析法の検討を行った。測定コストが安く、高価な機器を必要としない減圧水蒸気蒸留-GC法を用いた。その結果、異臭の原因であるアルデヒド類をはじめ多くの物質が粉ミルク中に検出され、そのうち12物質が同定された。強い臭いを有する粉ミルク中に多量検出されたヘキサナールは、RTが短い他の物質の妨害がないという点で、劣化の良い指標になりうるものと考えられた。ヘキサナールは本法では分解され易く、定量は不可能であった。しかし、相対面積比(%)の導入で品質の評価が可能になった。

参考文献

- 1) Cajelli, E., Ferraris, A., Brambilla, G., Mutagenicity of 4-hydroxy-nonenal in V79 chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 190 : 169-171 (1987)
- 2) Brambilla, G., Cajelli, E., Canonero R., Martelli A., Marinari, U.M., Mutagenicity in V79 chinese hamster cells of n-alkanals produced by lipid peroxidation. *Mutagenesis*, 4 : 277-279 (1989)
- 3) Brambilla, G., Sciaba L., Faggin P., Maura A., Marinari, U.M., Ferro M., Esterbauer H., Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister-chromatid exchange in chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutat. Res.*, 171 : 169-176 (1986)
- 4) Martelli A., Canonero R., Cavanna M., Ceradelli, M., Marinari, U.M., Cytotoxic and genotoxic effects of five n-alkanals in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutat. Res.*, 323 : 121-126 (1994)
- 5) Fischer KH, Grosch W, Co-oxidation of linoleic acid to volatile compounds by lipoxygenase isoenzymes from soya beans. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 165 : 137-139 (1977)
- 6) Angelo AJ, Legendre MG, Dupuy HP., Identification of lipoxygenase-linoleate decomposition products by direct gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids*, 15 : 45-49 (1980)
- 7) Barnard SE, Importance of shelf life for consumers of milk. *J. Dairy Sci.*, 55 : 134-139 (1973)
- 8) Norsten-Hoog C, Cronholm T, Analysis of aldehydic lipid peroxidation products in rat liver and hepatocytes by gas chromatography and mass spectrometry of the oxime-tert-butylidimethylsilyl derivatives. *Anal. Biochem.*, 189 : 131-137 (1990)
- 9) Marsili RT, Off-flavors and malodors in foods: mechanisms of formation and analytical techniques. *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Marsili RT, Ed. Marcel Dekker, New York, NY, pp237-264 (1997).
- 10) Cadwallader KR, Howard CL, Analysis of aroma-active components of light-activated milk. *Flavor Analysis: Development in isolation and characterization*, Morrello M and Mussinan C, Eds., ACS Symposium Series No. 705, American Chemical Society, Washington, DC, pp 343-358 (1998)
- 11) Frankel EN, Tappel AL, Head space gas chromatography of volatile lipid peroxidation products from human red blood cell membranes. *Lipids*, 26 : 479-84 (1991)
- 12) Frankel EN, Hu ML, Tappel AL, Rapid head space gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples. *Lipids*, 24 : 976-81 (1989)
- 13) Marsili RT, Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *J. Chromatogr., Sci.*, 37 : 17-23 (1999)

- 14) Sanceda N, Suzuki E, Kurata T, Formation of volatile acids during fermentation of fish sauce. Flavor Chemistry of Ethnic Foods, Shahidi and Ho, Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp41-53 (1999).
- 15) Macleod AJ, De Troconis NG, Volatile Flavour Components of some mango fruit. Phytochemistry, 21 : 2523-2526 (1982)
- 16) Wilson CW, Shaw EP, Knight RJJr, Importance of lactones and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone to Mango (*Mangifera indica* L) Aroma. J. Agric. Food Chem., 38 : 1556-1559 (1990)