牛乳、人乳および飲用水中の硝酸、亜硝酸、ジメチルアミン含量について

祐川 金次郎, 有賀 秀子, 西村 勝美
龍 富美男, 林 友子
帯広畜産大学酪農学科

Nitrate, Nitrite and Dimethylamine Contents in Cow and Human Milk, and Water

Kinjiro SUKEGAWA, Hideko ARIGA,
Katsumi NISHIMURA, Fumio RYU,
Yuko HAYASHI

Department of Dairy Science, Obihiro Zootechnical
University, Obihiro, Hokkaido

Cow milk, human milk and water in several areas in Hokkaido were analyzed for nitrate-nitrogen ($\text{NO}_3\text{-N}$) by the cadmium column method, nitrite-nitrogen ($\text{NO}_2\text{-N}$) by the diazo-coupling reaction method and dimethylamine-nitrogen (DMA-N) by the Cu-dithiocarbamate method.

Average content of $\text{NO}_3\text{-N}$ in 380 samples of cow milk was 0.1 ppm and $\text{NO}_2\text{-N}$ was undetected (under the limit of 0.01 ppm), but high $\text{NO}_3\text{-N}$ levels (0.05–9.57 ppm) and $\text{NO}_2\text{-N}$ levels (0.01–0.47 ppm) were found in human milk especially in colostrum. The ground water contained higher amount of $\text{NO}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ than the city water.

The DMA-N contents in cow and human milk were of trace level.

(Received September 12, 1977)

著者らは、牛乳・乳製品および人乳中の硝酸・亜硝酸含量についてはすでに報告したが¹⁾、人乳には意外に硝酸 ($\text{NO}_3\text{-N}$) 含量が多く、牛乳の 20~30 倍以上、1~5 ppm であった。これはおそらく雑食動物であるヒトの食事、とくに硝酸塩含量の高い野菜類の摂取によるものであろうと推定した。さらに人乳でも初期の乳汁ほど $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が多い傾向を示したが、試料数も少なく、また試料量の関係から亜硝酸 ($\text{NO}_2\text{-N}$) については測定できなかった。今回は北海道各地域から採取した牛乳、人乳および水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、また硝酸、亜硝酸とともに、多くの動物に対して強いガン原性を示す N-ニトロソ化合物の前駆物質の一つであるジメチルアミン含量についても測定した。

実験方法

1. 試料

採取地および試料数を Table 1 に示した。牛乳は磯分内(釧路支庁管内)、大樹(十勝支庁管内)および遠浅(胆振支庁管内)地区の酪農家各 10 戸から毎月 2 回、昭和 51 年 5 月から 12 月までの 8 カ月間、そのほか、馬鈴薯でん粉工場の廃液を牧草地に散布している十勝管内浦幌地区より採取した。

人乳は、都市在住者については帯広および旭川、農村地帯は大樹、磯分内、浦幌地区の婦人より採取した。また、水は水道水および酪農地帯の地下水を試料とした。

2. $\text{NO}_3\text{-N}$ の定量²⁾

前報では¹⁾、除たん白剤としてチオシアン酸アンモニウム、塩化第二水銀および酢酸亜鉛を用いたが、廃液処理上の問題もあるので、今回は国際酪農連盟で採用している方法を用いた。

1) 試薬 除たん白剤: 12% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液。

水酸化ナトリウム溶液: 0.5 N NaOH 溶液。

塩化アンモニウム緩衝液 (AOAC 緩衝液): 濃塩酸 20 ml を蒸留水 500 ml で希釈し、これに濃アンモニア水 50 ml を加え、蒸留水で 1 l にした (pH 9.6~9.7)。

塩化ナトリウム溶液: 塩化ナトリウム 100 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、50 ml の AOAC 緩衝液を加え、蒸留水で 1 l にメスアップした。

スルファニルアミド溶液: 2 倍希釈の塩酸中に 0.5% スルファニルアミド溶液となるように調製した。

発色剤: 0.5% N-(1-ナフチル) エチレンジアミンジヒドロクロライド溶液 (NEDA)。この溶液は冷蔵保存し、3~4 週間ごとに更新した。

2) 還元カラムの調製 前報¹⁾と同様に調製した。

3) 方法 牛乳、人乳および水それぞれ 10 ml に除たん白剤 2 ml、0.5 N NaOH 2 ml、AOAC 緩衝液 2 ml をよく混合しながら順次加え、50°C の温浴中で 10~15 分間加温し、冷却後蒸留水 4 ml を加えて濾過した (東洋濾紙 No. 5 C)。

分液ロートに濾液および AOAC 緩衝液をそれぞれ 5 ml 採取、混合後還元カラムに流速 4.6 ml/分 で流下させ、ついで塩化ナトリウム溶液 15 ml でカラムを洗浄し、さらに蒸留水を流して全量約 90 ml を 100 ml のメスフラスコに採取した。流出液にスルファニルアミド溶液 5 ml を加えて 3 分間以上静置後、発色剤 2 ml を加えて発色させ、蒸留水で 100 ml にメスアップした。20 分後に 540 nm における吸光度を測定し、標準曲線から $\text{NO}_3\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N}$ 量を求めた。この値から $\text{NO}_2\text{-N}$ 量を引いて $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量とした。

4) 標準曲線 前報と同様に処理して作製した。

3. $\text{NO}_3\text{-N}$ の定量

$\text{NO}_3\text{-N}$ 測定の際除たん白剤では完全に透明にならない場合があるので、前報¹⁾と同様の除たん白剤を用いた。この点 $\text{NO}_3\text{-N}$ 定量では、還元カラムの通過によって透明化されるので問題はない。また発色剤は前報と異なり、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の定量の項で述べたものを用いた。

1) 方法 牛乳、人乳および水それぞれ 10 ml に除たん白剤 A 液、B 液をそれぞれ 2 ml、水 6 ml を加えて混合し、濾過（東洋濾紙 No. 5C）。濾液 5 ml に 0.5% スルファニルアミド溶液 2 ml を加え、3 分間以上静置したのち、0.5% NEDA 1 ml を加えて 20 分後、540 nm の吸光度を測定し、標準曲線から $\text{NO}_2\text{-N}$ 量を求めた。

2) 標準曲線 前報¹⁾と同様に処理して作製した。

4. ジメチルアミンの定量

河端ら³⁾の Cu-ジチオカルバメート法の改良法を用いた。試薬はすべて特級を用いた。

1) 試薬 二硫化炭素-クロロホルム混液：二硫化炭素を 5% の割合でクロロホルムに混合した。

アルカリ試薬：40% NaOH と濃アンモニア水の 1 : 1 混合液。

銅試薬：20% クエン酸溶液、濃アンモニア水の 3 : 2 混液 50 ml に 0.4 g の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を溶解。

2) 方法 試料 9 ml に 20% TCA 1 ml を加えて濾過（東洋濾紙 No. 5C）。濾液 5 ml を 50 ml の分液ロートにとり、5% 二硫化炭素-クロロホルム混液 10 ml、アルカリ試薬 0.2 ml をそれぞれ加え、2 分間激しく振とうする。さらに銅試薬 1 ml を加えて 1 分間振とう後、30% 酢酸溶液 1 ml を加えて数秒間振とうする。静置後、下層のクロロホルム層を試験管に採取し、無水硫酸ナトリウム 0.4 g を加えて脱水後、435 nm における吸光度を測定して、標準曲線からジメチルアミン (DMA-N) 含量を求めた。

なおこの場合、ジメチルアミン以外のアミン類も含まれている可能性はあるが、標準物質として DMA を用いているので、ここでの総第 2 級アミンの測定値は一応 DMA-N として表わした。また河端らは³⁾、この方法による第 1 級アミンおよび第 3 級アミンの存在による影響について検討したところ、第 1 級アミンについては 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では妨害するが、第 3 級アミンの影響はみられないと報告している。したがって、乳汁の場合には実際上無視してもよいと考えられる。

3) 標準曲線 特級ジメチルアミン塩酸塩 0.582 g を 1 N 塩酸溶液で 1 l にする (DMA-N 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。この溶液をさらに 1 N 塩酸で希釈し、試料と同様に処理して標準曲線を作製した。

Table 1. The number of sample from each area.

Area	Cow milk	Human milk	Water
Isobunnai	118	6	14
Taiki	104	7	10
Toasa	130		
Urahoro	28	2	15
Obihiro		120	3
Asahigawa		67	
Total	380	202	42

Fig. 1. Nitrate levels in cow milk.

□ Normal sample 352, May-Dec. 1976

■ Urahoro sample 28, June 1976

ND: Non detected

結果および考察

1. 牛乳中の $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$

各地域より採取した 352 試料と、馬鈴薯でん粉工場廃液を牧草地に散布し、比較的硝酸含量の高い牧草を摂取している浦幌地区の乳牛からの 28 試料中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量を Fig. 1 に示した。試料中 0.2 ppm 以下のものが約 96% を占め、検出されないものも約 37% あった（検出限界 0.05 ppm）。最高値は 0.85 ppm で、1 ppm を越えるものは見いだせなかった。

浦幌地区では、昭和 46 年度以降、馬鈴薯でん粉工場廃液を牧草地に肥培かんがいとして、50~160 t/10 a 散布し、その結果、牧草収量は増加したが、牧草中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量もかなり高い傾向を示した¹⁾。これは散布量の過剰によるものであり、47 年以降は牧草中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量をチェックしながら (0.2% 以下) 適正散布量を決定したため、現時点では異常に $\text{NO}_3\text{-N}$ の高い牧草は

Fig. 2. Seasonal variation of nitrate plus nitrite nitrogen in cow milk.

認められず¹⁾, 今回の牛乳試料中にも $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が 0.2 ppm を越えるものは認められず, 他の地区とはほぼ同様であった。また各地区間の差異も認められなかった。

5月から12月までの季節的変動を Fig. 2 に示したが, 7~9月の放牧期が比較的高い傾向を示したのは, 牧草を摂取すること起因するものと思われる。飼料作物中の硝酸含量は, 土壌, 気象条件によって差があり, さらに肥培管理によっても異なるが, 窒素の過剰施肥による非たん白態窒素, $\text{NO}_3\text{-N}$ の増加も認められている。イネ科牧草では, メドフエスクの硝酸蓄積がやや高く, オーチャードグラスが少ない傾向にあり, マメ科牧草ではラディノクロパー, アルファアルファが高く, アカクロパーがやや低い傾向にあるといわれている⁴⁾。試料採取酪農家の牧草種はチモシー, オーチャードが主体であった。

乳汁中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量の変動要因の一つと考えられる畜舎用水中(後述)の $\text{NO}_3\text{-N}$ と乳汁中の $\text{NO}_3\text{-N}$ との関連については, 高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ を含む畜舎用水を飲用している乳牛の乳汁には比較的高い値の $\text{NO}_3\text{-N}$ が検出されたが, 乳汁中に比較的高い $\text{NO}_3\text{-N}$ が検出された乳牛が, かならずしも $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の高い畜舎用水を摂取しているという事実は認められなかったが, 飼料中の $\text{NO}_3\text{-N}$ との累積効果は十分考えられる。

以上のように, 前報と同様, 現時点では牛乳中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は多くはなく, とくに問題はないものと考えられる。 $\text{NO}_3\text{-N}$ は土壌, 植物に広く存在している以上, 牛乳にまったく含まれないということはありえないが, 現在以上多くなることは好ましくない。なお, $\text{NO}_2\text{-N}$ についてはほとんど検出されなかった(検出限界 0.01 ppm)。

Table 2. Nitrate levels in human milk.

Day after parturition	$\text{NO}_3\text{-N}$ ppm		Number of sample
	Range	Mean	
2- 3	1.51-3.24	1.97	7
4- 5	1.03-9.57	2.78	75
6- 7	0.71-5.10	2.06	55
8-10	0.64-5.61	2.13	24
11-30	0.05-5.10	1.85	20
31-60	0.34-1.91	0.80	8
61-120	0.31-2.60	1.25	6
120-	0.24-1.60	0.67	7

Fig. 3. Nitrate levels in human milk (ppm).

■ Colostrum (N: 138), □ Normal (N: 64)

2. 人乳中の $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$

人乳中の $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量は Table 2, Fig. 3, 4 に示したが, $\text{NO}_3\text{-N}$ は牛乳の数十倍という高い値であった。これを分娩後日数でみてみると, 常乳(8日以降)では 1 ppm 以下のものが約 50%, 全体の約 70% が 2 ppm 以下であった。これに対して初期乳では, 1 ppm 以下のものが約 5%, 2~5 ppm のものが約 50%, 最高 10 ppm のものもあった。このように泌乳初期に高濃度のものが多く, 日数の経過にともなって減少する傾向にあり, 泌乳 5 日までのものと, 1 カ月以降の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量には有意差が認められた。初乳に $\text{NO}_3\text{-N}$ が多いのは, 泌乳量が少ないために濃縮された形で分泌されるからであろうと推定されるが, 牛乳の場合には, 含有量も少ないが, 初乳, 常乳とも同程度の含有量であった。したがって, ヒト初期乳に $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が多い理由については, いまのところ明らかでない。

6名の婦人から経時的に採取した人乳の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量

Fig. 4. Nitrite levels in human milk (ppm).

■ Colostrum (N: 123), □ Normal (N: 52)

の変動をみると、分娩後 10 日ぐらいまでは全般的に高く (2~8 ppm), しかも変動が激しい。以後はしだいに減少 (1~6 ppm) するが、この場合にも日々の変動が大きいのは、おそらく食事内容に原因するものと考えられる。

人乳中に牛乳の数十倍の $\text{NO}_3\text{-N}$ が検出されたのは、雑食動物であるヒトの食事、とくに硝酸、亜硝酸塩の多い野菜類の摂取によるものと考えられる⁵⁾。摂取された $\text{NO}_3\text{-N}$ は消化器内で一部 $\text{NO}_2\text{-N}$ に還元され、また尿

中にも排泄されるが、血中さらには一部乳汁へ分泌される可能性は否定できない。今回の調査でも、人乳中の $\text{NO}_2\text{-N}$ は 0.1 ppm 以下のものが多かったが、初期乳中には 0.2~0.5 ppm のものもあり、牛乳に比較してはかなり高い。このようなことがとくに初期乳児の $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ に敏感な時期に与える影響については、今後検討を要する問題と思われる。

3. 飲用水中の $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$

Fig. 5 に示したように、水道水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ は 0.5 ppm 以下で、0.1~0.2 ppm 程度のものが多かった。これに対して酪農村地帯で地下水を使用しているものは 2~6 ppm と高く、15~20 ppm のものも数例あった。 $\text{NO}_2\text{-N}$ は両者とも微量か、または検出されないものが多かったが、2, 3 例には高いものもあった。このように水道水と地下水との $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量の差は大きい。これは地質などの自然条件のほか、堆肥、家畜糞尿の施肥などの影響も考えられ、自家ポンプ揚水を飲用、家畜用水として使用している農家では、ヒト、とくに乳幼児に対する影響も考えられ、上水道施設の導入を早急に実施する必要がある。乳幼児の場合には、血中メトヘモグロビン濃度との関係から、飲用水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ は 5 ppm 以上あってはならないとされており、WHO およびわが国でも 10 ppm 以下と規定している⁶⁾。

4. ジメチルアミン含量

硝酸、亜硝酸塩は従来、発色剤、防腐剤などに用いられてきたが、動物に対する発ガン物質である N -ニトロソアミンの前駆物質であることが知られ、しかも相手物

Fig. 5. Nitrate and nitrite levels in water.

Table 3. Dimethylamine levels in human and cow milk.

Sample	DMA-N ppm			Number of sample
	Non detected (%)	Range	Mean	
Human milk	39.1	0.05-0.20	0.05	46
Cow milk	0	0.13-0.60	0.32	70

質である各種アミン類も幅広くわれわれの生活環境に存在し、生体内で各種の *N*-ニトロソアミンを形成する可能性があるため、食品に対する添加もきびしく制限されている。

Table 3 のように、乳汁中のジメチルアミン含量は、魚貝類にくらべてはきわめて少なく、人乳では 0.05~0.2 ppm、牛乳で 0.13~0.6 ppm の範囲であった（検出限界 0.05 ppm）。したがって、牛乳、人乳とも、硝酸、亜硝酸およびジメチルアミン含量からみて、ニトロソアミン形成の可能性はないものと考えられる。しかし、発ガン物質であるニトロソアミンを形成するその他のアミン前駆体として、ピロリジン、ピペリジン、モルホリン、ピペラジン、サルコシン、ジエタノールアミン、カーバメート系農薬などが生活環境中に広く存在するので、乳汁中のこれら物質についても検討する必要がある。

要 約

前報にひきつづいて、牛乳、人乳、水中の硝酸、亜硝酸およびジメチルアミン含量を測定した。

1) 牛乳 380 試料中、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量 0.15 ppm 以下が約 94% で、7~9 月に比較的高い濃度を示したが、異常に高いものはなかった。また $\text{NO}_2\text{-N}$ はほとんど検出されなかった。

2) 人乳 202 試料中、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は牛乳に比較して高濃度であり、大部分が 1~5 ppm、最高値は 9.57 ppm であった。とくに初乳に多く、常乳に移行するにともなって減少する傾向を示した。 $\text{NO}_2\text{-N}$ は初乳で 0.2~0.4 ppm のものも認められたが、ほとんど 0.1 ppm 以下であった。

3) 水道水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ は 0.5 ppm 以下であったが、自家ポンプ揚水中には、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ がそれぞれ 5~20 ppm、0.05~0.15 ppm と高いものも検出された。

4) DMA-N は、人乳および牛乳でそれぞれ 0.05~0.2 ppm、0.13~0.6 ppm であり、他の一般食品に比較しては低い含量であった。

文 献

- 1) 祐川金次郎, 松本多計治: 栄養と食糧, 28, 389 (1975)
- 2) International Dairy Federation: Group E 8, 5th Meeting (1974)
- 3) 河端俊治, 石橋 亨, 中村昌道: 食衛誌, 14, 31 (1973)
- 4) 北海道開発局農業水産部農業調査課: 畜産基地建設事業に関する調査報告書 (1974)
- 5) 原田基夫, 石綿 肇, 中村洋子, 谷村顕雄, 石館守三: 食衛誌, 16, 11, 19 (1975)
- 6) 医学のあゆみ, 昭和48年10月27日号, 11月24日号
(昭和52年9月12日受理)