粉乳の遊離脂肪測定法の検討

柴田満穂[§], 浜 初美, 今井眞美, 豊田 活

明治乳業株式会社 技術開発研究所

An Investigation of Measuring Free Fat
in Milk PowderMitsuho Shibata[§], Hatsumi Hama,
Masami Imai and Ikuru Toyoda

Food Technology Research Institute, Meiji Dairies Corporation, 540, Naruda, Odawara, Kanagawa 250-0862

The optimal conditions for the measurement of free fat in milk powder were determined in samples and fat-free milk powder to which defined amounts of fat were added.

It was found that approximately 90% of free fat could be extracted within a short time and under moderate conditions using carbon tetrachloride as a solvent. Experimental conditions were also found to be adequate for the measurement of free fat from fat-free milk powder.

In addition, n-hexane was also found to be suitable for use as a solvent, which is preferable given that carbon tetrachloride is harmful to humans and the environment.

(Received Oct. 14, 2005 ; Accepted Jul. 25, 2006)

粉乳中に含まれる脂肪は、たん白質、リン脂質などの界面活性な成分から成る膜で覆われた微細な脂肪球として存在している。しかし、何らかの原因により膜が損傷を受けた脂肪は粉乳の粒子表面、割れ目もしくは一部の毛管部分に存在する¹⁾³⁾。これが粉乳の遊離脂肪であり、Holm ら⁴⁾によって「一定の条件下で有機溶媒により抽出される脂肪」と定義されている。遊離脂肪は脂肪の酸化に関与して風味を劣化させ、溶解性、保存性などにも影響を与える粉乳の重要な製品品質のひとつである¹⁾³⁾⁴⁾。一方、遊離脂肪の測定法は同じく Holm ら⁴⁾によって提唱されており、粉乳に関わる多くの研究者、技術者はこの方法を用いているが、溶媒の種類、振とう強度（振幅、時間当たりの振とう回数）、温度および時間などの粉乳からの抽出条件は研究者によって異なっており²⁾、Holm らの方法の妥当性に関する検証、考察は報告されていないのが現状である。また、抽出用の溶媒に関しては様々な種類が報告されているが²⁾、現在、最も一般的に用いられているものは四塩化炭素である⁴⁾⁵⁾。しかし、これは有機塩素系化合物であり、ヒトや環境に対して有害であることから、これに替わる溶媒への切り替えが望まれる。

そこで、本報では数種類の粉乳試料および既知量の脂肪

を物理的に吸着させた擬似遊離脂肪含有粉を用いて遊離脂肪の測定の操作法について検討し、また安全な抽出溶媒として取り上げた *n*-ヘキサンを使用して得られる測定値を従来から一般的な四塩化炭素を用いた場合の値と比較した。

1. 実験方法

(1) 試料および試薬

試料として明治乳業(株)製の全粉乳、脱脂粉乳、調製粉乳 A および調製粉乳 B を用いた。表 1 にそれぞれの組成および平均粒子径を示した。また、植物油は日清オイリオ(株)製、各種有機溶媒は和光純薬(株)製特級を使用した。

(2) 遊離脂肪の測定

試料約 5 g を共栓付き 200 mL 三角フラスコ（以後抽出用フラスコと記載する）内に秤りとった。これに 25 mL の四塩化炭素または *n*-ヘキサンを加え、温度 20℃ で時間当たりの振とう回数および時間を変化させて振とうした（以後抽出操作と記載する）。

抽出操作後、直ちに内容物をろ紙上に移してろ過し、ろ液を 100 mL 三角フラスコ（以後回収用フラスコと記載する）に回収した。続いて 15 mL の有機溶媒を抽出用フラスコ内にとって、共洗し、ろ過することにより試料およびろ紙を洗浄した（以後分離回収操作と記載する）。

回収用フラスコ内のろ液中の抽出溶媒を窒素気流下で蒸発させた後、ヤマト科学(株)製真空定温乾燥器中で 98℃、減圧下（-0.1013 MPa）に 2 時間保持して溶媒を留去した（以後溶媒留去操作と記載する）。試料採取量および回収用フラスコ内の残留物の重量から粉乳中の遊離脂肪の重量割合を算出した。

(3) 擬似遊離脂肪含有粉の調製

1 L ビーカーに植物油 4 g を正確に秤りとり、ジエチルエーテル 36 g を加えて溶解した。これに脱脂粉乳 196 g を加え、スパーテルでよく練り混ぜた後、50℃ のホットプレート上でジエチルエーテルを蒸発させた。次に、これをヤマト科学(株)製真空定温乾燥器を用いて室温、減圧下（-0.1013 MPa）で、12 時間乾固させることにより、脂肪 2% を含有した擬似遊離脂肪含有粉を得た。なお、ここで調製した擬似遊離脂肪含有粉中に吸着した脂肪の量と添加した脂肪の量とが一致していることをレーゼ・ゴットリーブ法⁶⁾により確認した。

(4) 残存溶媒の測定

溶媒留去操作後の回収用三角フラスコ内の四塩化炭素または *n*-ヘキサンの残留量をガスクロマトグラフィー（GC）法により測定した。GC 装置には島津製作所(株)製 GC-14A（水素炎イオン化検出器）を、カラムにはジーエルサイエンス(株)製 GC 用キャピラリーカラム TC-WAX 内径 0.25 mm、長さ 30 m、液相の膜厚 0.25 μm を用いた。測定はカラム温度 35℃、キャリアーガス（窒素）流量 1 mL/min、注入量 1 μL の条件で行った。

(5) 統計学的検定

測定結果の有意差検定は危険率 5% の水準で正規分布を仮定した一元配置の分散分析にて行った。

2. 実験結果および考察

(1) 四塩化炭素を用いた操作条件が遊離脂肪の測定値に及ぼす影響

操作条件のうち、試料採取量、抽出溶媒量および振幅は試料の抽出溶媒中への懸濁状態に影響する条件であり、これらについては目視により良好な懸濁状態を確認してそれぞれ 5 g, 25 mL, 40 mm とし、また操作温度は四塩化炭素が容易に揮発しない 20℃ とした。ここでは、これらの条件を固定し、振とう回数または時間を変化させて粉乳からの遊離脂肪の抽出性を調べた。まず、抽出時間を 3 分間とし、振とう回数 65, 130, 195, 260 回/min の条件で全粉乳の遊離脂肪を測定した。その結果を図 1 に示した。検討した振とう回数の範囲では遊離脂肪の測定値はほぼ同じレベルで統計的な差は見られなかった ($p>0.05$)。上記の結果として、振とう回数 130 回/min が適当と考えられた。次に、全粉乳、調製粉乳 A、調製粉乳 B を試料とし、振とう回数 130 回/min で 6 時間まで抽出を行った。その結果を表 2 に示した。測定値は 2 分以降、6 時間までほとんど差がないことが確認された ($p>0.05$) ので、振とう回数 130 回/min、抽出時間 3 分間の条件で十分に安定した抽出が可能であると考えられた。これより、粉乳からの遊離脂肪の抽出は、比較的緩和な振とう条件で、短時間に終了していることが確認された。このことは、粉乳粒子表面の脂肪が溶媒により数秒で抽出されるという過去の報告³⁾と一致している。

次に溶媒留去操作での溶媒の残留性を調べる目的で、溶媒留去操作後の試料中の四塩化炭素の重量を測定した。擬似遊離脂肪含有粉を試料とし、抽出、分離回収および窒素気流下での溶媒留去の操作を行った。その後、回収用三角フラスコを 98℃、減圧下 (-0.1013 MPa) に置き 0.5, 1.0,

2.0 時間経過時にそれぞれ取り出し、これらの四塩化炭素の残存重量を GC 法により測定した。その結果、回収用三角フラスコ内の四塩化炭素はいずれも 0.01 mg 以下の非常に小さい値であった。このことから、98℃、減圧下、2 時間の条件で四塩化炭素は実質的に残存していないことが確認された。

一方、抽出操作後の分離回収操作による脂肪の回収性について擬似遊離脂肪含有粉を試料として検討した。ろ過が終了した後の粉乳、抽出用フラスコの内壁面およびろ紙を四塩化炭素 15 mL で洗浄回数を変化させて回収率を測定し、その結果を図 2 に示した。ろ紙や粉乳の洗浄回数を増やすに従って回収率は上がり、洗浄回数 2 回で約 90% の回収率が得られた。粉乳の遊離脂肪は粉乳の風味や保存性などの品質評価の目安として用いられることが多く、ここで得られた回収率は実用的には十分な精度と考えられた。

なお、ここで用いた擬似遊離脂肪含有粉は脱脂粉乳の表面に脂肪を物理的に吸着させて作成した粉乳であり、その脂肪は脂肪球を形成することなく遊離脂肪の状態が存在している。この脂肪が上述した操作条件により高い回収率で測定されていることから、Holm らによって提案された方法とここで示した操作条件は遊離脂肪の測定法として妥当であることが確かめられた。

(2) 代替え抽出溶媒としての *n*-ヘキサンの検討

粉乳中の遊離脂肪の抽出溶媒としては、これまで用いられてきた四塩化炭素などの有機塩素化合物の他に飽和炭化水素、エーテル類、エステル類があげられる²⁾。操作性の観点から抽出および分離回収の際には揮発し難く、溶媒留去の際には蒸発し易い範囲の沸点の溶媒が望まれる。また、

図 1 遊離脂肪の測定値に及ぼす振とう回数の影響
(試料: 全粉乳, 抽出溶媒: 四塩化炭素, 抽出時間: 3 min)

表 1 実験に使用した試料の組成および平均粒子径

試料名		全粉乳	調製粉乳 A	調製粉乳 B	脱脂粉乳
水分	[%]	3.2	2.8	2.0	3.5
脂肪	[%]	26.0	25.0	23.5	1.0
たん白質	[%]	25.0	11.7	8.7	35.0
灰分	[%]	5.9	2.2	2.3	7.9
炭水化物	[%]	39.9	58.3	63.5	52.6
平均粒子径	[μ m]	100	220	193	100

表 2 遊離脂肪の測定値に及ぼす抽出時間の影響

抽出時間	1 min	2 min	3 min	15 min	30 min	1 h	2 h	6 h
全粉乳 [%]	0.70	0.70	0.69	0.65	0.67	0.70	0.70	0.68
調製粉乳 A [%]	0.58	0.58	0.56	0.57	0.58	0.57	0.56	0.55
調製粉乳 B [%]	7.44	8.79	8.63	8.82	8.94	8.97	9.90	10.45

(抽出溶媒: 四塩化炭素, 振とう回数: 130 回/min)

作業者および環境への影響の観点から毒物および劇物取締法や化学物質管理促進法（PRTR：Pollutant Release and Transfer Register）の規制対象となっていない溶媒が望まれる。これらの点から *n*-ヘキサンと石油エーテルが適当と考えられたが、石油エーテルは *n*-ペンタン、イソペンタン、*n*-ヘキサンなどの飽和炭化水素の混合物であり、組成が一定でないことから沸点や密度が変動し、抽出溶媒の性質としては好ましくない。以上より、*n*-ヘキサンが四塩化炭素の代替え溶媒の候補としてあげられた。ただし、*n*-

図 2 回収率に及ぼす洗浄回数の影響
(抽出溶媒：四塩化炭素)

ヘキサンは密度、粘度が四塩化炭素と異なることから、粉乳中の遊離脂肪の抽出性について実験的に検討した。

まず、*n*-ヘキサンについて、抽出条件 ① 振とう回数 130 回/min、振とう時間 3 分、② 振とう回数 260 回/min、振とう時間 30 分の異なる 2 つの抽出条件で、擬遊離脂肪含有粉および調製粉乳 A について調べた。なお、このときの粉乳およびろ紙の洗浄回数は前述した結果より 2 回とした。この測定結果を表 3 に示した。両試料ともに抽出条件の違いで遊離脂肪の平均値に有意差は認められなかった ($p>0.05$)。このことから *n*-ヘキサンにおいても四塩化炭素と同様、振とう回数 130 回/min、振とう時間 3 分で抽出が完了していることが確認された。

次に、溶媒留去操作での *n*-ヘキサンの残留性を調べた。その結果、*n*-ヘキサンの残留重量は 0.01 mg 以下の非常に小さい値であった。このことから、溶媒留去操作により四塩化炭素と同じく *n*-ヘキサンが実質的に残存していないことが確認された。

(3) 四塩化炭素と *n*-ヘキサンの比較

同一試料を *n*-ヘキサンと四塩化炭素とで測定し、両者の同等性を検討した。全粉乳、調製粉乳 A および調製粉乳 B を試料とし、両溶媒で比較した結果を表 4 に示した。い

表 3 *n*-ヘキサンでの抽出性

試料名	擬似遊離脂肪含有粉		調製粉乳 A	
振とう強度	130 回/min・3 分間	260 回/min・30 分間	130 回/min・3 分間	260 回/min・30 分間
測定値 [%]	1.79	1.79	0.66	0.69
	1.82	1.83	0.68	0.65
	1.77	1.78	0.64	0.69
	1.78	1.84	0.65	0.66
	1.78	1.84	0.65	0.67
	1.80	1.77	0.64	0.66
平均値 [%]	1.79	1.81	0.65	0.67
変動係数 [%]	1.00	1.76	2.30	2.50
回収率 [%]	89.5	90.4	—	—
有意差検定	P>0.05 (有意差なし)		P>0.05 (有意差なし)	

表 4 四塩化炭素と *n*-ヘキサンとの測定値の比較

試料名	全粉乳		調製粉乳 A		調製粉乳 B	
溶媒名	四塩化炭素	<i>n</i> -ヘキサン	四塩化炭素	<i>n</i> -ヘキサン	四塩化炭素	<i>n</i> -ヘキサン
測定値 [%]	0.89	0.79	0.57	0.55	11.92	11.56
	0.86	0.79	0.57	0.56	11.48	11.53
	0.79	0.80	0.56	0.54	11.15	11.76
	0.85	0.85	0.58	0.57	11.86	11.90
	0.84	0.77	0.56	0.53	11.56	11.53
	0.73	0.91	0.55	0.55	11.89	11.64
平均値 [%]	0.83	0.82	0.57	0.55	11.64	11.65
変動係数 [%]	7.0	6.4	1.9	2.6	2.6	1.3
有意差検定	P>0.05 (有意差なし)		P>0.05 (有意差なし)		P>0.05 (有意差なし)

図 3 四塩化炭素と n -ヘキサンとの測定値の比較

ずれの試料においても、両溶媒間に有意差は認められなかった ($p>0.05$)。次に、組成、粒子径などが異なる試料 100 個についての両溶媒での測定値の比較を図 3 に示した。いずれの試料においても四塩化炭素と n -ヘキサンとの測定値はよく一致しており、大差は認められなかった。粉乳の遊離脂肪の測定値は水分含量や粒子径の影響を受けることが知られている⁷⁾⁸⁾が、ここで用いた試料の水分含量は 2.0~4.0%、平均粒子径は 90~300 μm 程度と一般的な粉乳の範囲である。このことから、通常の粉乳の遊離脂肪測定において、四塩化炭素を n -ヘキサンに代替することは可能であると考えられた。

3. 要 約

粉乳の遊離脂肪の測定法における抽出、分離、回収および溶媒留去の操作について、数種類の粉乳試料および既知量の脂肪を吸着させた擬似遊離脂肪含有粉を用いて実験的に検討した。

その結果、四塩化炭素では粉乳の遊離脂肪は振とう回数 130 回/min、抽出時間 3 分、残留物洗浄回数 2 回の比較的緩和な条件で短時間に抽出され、約 90% の回収率が得られることを確認した。さらに擬似遊離脂肪含有粉を用いた検討から、本法は粉乳の遊離脂肪の測定法として妥当であることを確認した。

次に、四塩化炭素に替わる溶媒の検討を行い、環境や作業者に安全な n -ヘキサンが四塩化炭素と同等であることを確認した。

以上より、粉乳中の遊離脂肪測定について実用的な操作法の条件を設定し、また n -ヘキサンが代替の抽出溶媒として使用可能であるとの結論を得た。

文 献

- 1) Buma, T.J., Free fat in spray-dried whole milk. 1. General introduction and brief review of literature. *Neth. Milk Dairy J.*, **25**, 33-41 (1971).
- 2) Buma, T.J., Free fat in spray-dried whole milk. 2. An evaluation of methods for the determination of free-fat content. *Neth. Milk Dairy J.*, **25**, 42-52 (1971).
- 3) Buma, T.J., Free fat in spray-dried whole milk. 10. A final report with a physical model for free fat in spray-dried milk. *Neth. Milk Dairy J.*, **25**, 159-174 (1971).
- 4) Holm, G.E., Greenbank, G.R. and Deysher, E.F. The effect of homogenization, condensation and variations in the fat content of a milk upon the keeping quality of its milk powder. *J. Dairy Sci.*, **8**, 515-522 (1925).
- 5) "Analytical Methods for Dry Milk Products", 4th ed. (A/S NIRO ATOMIZER), pp. 46-47 (1978).
- 6) "Official Methods of Analysis of the AOAC", 13th ed. (AOAC International/USA), pp. 238-274 (1980).
- 7) Buma, T.J., A Correlation between free fat content and moisture content of whole milk spray powders. *Neth. Milk Dairy J.*, **22**, 22-28 (1968).
- 8) Buma, T.J., The true density of spray milk powders and of certain constituents. *Neth. Milk Dairy J.*, **19**, 249-265 (1965).

(平成 17 年 10 月 14 日受付, 平成 18 年 7 月 25 日受理)