乳児用成型ミルクの ESR による分析

鶴飼光子[§], 亀谷宏美*

北海道教育大学大学院

* 農研機構食品総合研究所

ESR Analysis of Cubed Infant Milk

Mitsuko Ukai[§] and Hiromi Kameya*

Department of Environmental Science, Hokkaido University of Education,
1-2 Hachiman-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 040-8567

* National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8642

Cubed infant milk was analyzed by ESR. The shape of milk is cube and easily soluble in hot water. This cubed milk was compared with infant cubed/powdered milk, nonfat dry milk, powdered milk for coffee and dried whole egg. In ESR spectrum in each specimen, a singlet at $g=2.0$ due to organic free radicals was observed. In some specimens, hyperfine signals of Mn^{2+} and a singlet at $g=4.0$ from Fe^{3+} were also detected. The intensity of the ESR signal of the each specimen increased linearly with microwave intensity, became saturated and reached at the threshold amount at the 10 mW or 20 mW range. After showing the threshold amount, the signal intensity decreased. The ESR signal intensity of infant milk was larger than that of other powdered milk; powdered milk for coffee and nonfat dry milk. Regarding electron spin-lattice relaxation times T_1 and spin-spin-relaxation time T_2 of infant milk were 10 μs and 60 ns respectively. We concluded that the radicals analyzed in infant milk were the same radical species both in cubed milk and powdered milk.

(Received Nov. 11, 2009; Accepted Mar. 6, 2010)

Keywords: electron spin resonance (ESR), cubed infant milk, powdered milk

キーワード: 電子スピン共鳴法, 乳児用成型ミルク, 粉末ミルク

乳児用ミルクは保存性が高く広く利用されている。近年乳児用成型ミルク¹⁾が発売され、利便性が増している。乳児用成型ミルクは非常に新しい製造技術である¹⁾。粉乳を成型する方法は多く開発されている^{2)~7)}が、実用的な品質を保証できないばかりか、工業的に製造するのに適した方法ではないと報告¹⁾されている。乳児用成型ミルクは、表面近傍は加湿により粉乳粒子同士が結合して架橋を形成し間隙が少ないが、内部は間隙が十分確保されているので表面のみが硬く、内部はほぼ粉乳と同様の状態を保っている¹⁾⁸⁾⁹⁾。表面のみを硬くすることでくずれにくい、調製時に哺乳瓶中でよく溶ける。

電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance; ESR) 法は生薬や香辛料中のラジカル成分を高感度で容易に計測することが可能である。著者らはアガリクス¹⁰⁾、黒こしょう¹¹⁾¹²⁾、朝鮮人参^{13)~15)}、小麦¹⁶⁾、ナツメグ¹⁷⁾について、ESR で計測したラジカル成分を報告している。これまでミルクについては ESR で計測した報告はみられない。

一般に市販粉末ミルクは包装が工夫されているので酸化によるラジカル成分を ESR 検知すること¹⁸⁾は難しい。乳児用調製粉乳は種々の栄養素が添加されており、例えばミネラル成分のうち遷移金属イオン¹⁹⁾は ESR 信号として観測される。ESR 計測では加熱処理による変化を信号として捉えることが可能である²⁰⁾。成型処理は粉乳に加熱や加圧のような大きな衝撃を加えていない。しかしながら、加湿による粉乳粒子同士の結合を形成⁸⁾⁹⁾している。

本研究では成型ミルクの ESR 計測を行い加工処理による変化が ESR 信号としてとらえられるか否かについて検討した。成分組成の異なるタンパク質性粉末食品を数種、比較として用いた。得られた ESR 信号やラジカルの緩和挙動を比較し、加工処理や構成成分の違いに起因する変化をラジカル生成の相違として評価した。

実験方法

1. 測定試料

実験試料 (Table 1) は、函館市内の量販店で購入した成型と粉末の乳児用ミルク 2 種と、脱脂粉乳とコーヒー用粉

〒040-8567 北海道函館市八幡町 1-2

[§] 連絡先 (Corresponding author), mitsuko@hak.hokkyodai.ac.jp

Table 1 Samples

	商品名	種類別	製造会社
Sample 1	明治ほほえみらくらくキューブ	調製粉乳	明治乳業株式会社
Sample 2	明治ミルフィー	母乳代替食品	明治乳業株式会社
Sample 3	スキムミルク	脱脂粉乳	雪印乳業株式会社
Sample 4	クリープ	乳等を主要原料とする食品	森永乳業株式会社
Sample 5	—	乾燥全卵	キューピー株式会社

Fig. 1 The method of sealing ESR tube with Ar gas

末ミルクの粉末ミルク 2 種である。また、比較としてキューピー株式会社より提供された乾燥全卵²¹⁾を用いた。

2. 試料調製

試料は購入後すぐに冷蔵庫に保管し ESR 計測時は室温にもどした後、開封し速やかに実験に供した。試料管（ラジカルリサーチ株式会社, RST-5MSTD）は石英とパイレックスがつながれ、石英部位を封じた 320 mm のものを用いた。測定に使用する ESR 装置の測定保証範囲が 42 mm であるため、試料管の底から 30 mm のところに印をつけ、この部分まで試料管に試料を詰めた。

酸素脱気を行うと ESR スペクトルをより明確に確認できると報告¹⁰⁾されている。本研究は、多様な ESR スペクトルを比較検討するため、信号を確実に観測することが必要となる。そこで、試料管内の酸素を脱気し、アルゴン置換する処理を試料管に試料を詰めた直後に行った（Fig. 1）。真空ポンプにより試料管から酸素を脱気し、その後試料管内にアルゴンガスを 1 分間流入した。脱気の際、試料管内の圧力は 1 mmHg であった。脱気とガスの流入操作を 10 回繰り返した。試料管開放部分のパイレックス上部から約 30 mm のところをバーナーにて焼き切った。焼き切った部分は試料上部から約 250 mm 離れているため、バーナーの熱は試料に影響しない。

Fig. 2 Peak intensity of ESR signal

3. ESR 測定方法

ESR 分光器は X-band の JES-FA100（日本電子株式会社）を用いた。磁場を安定に保つため、電磁石の冷却水は冷却水循環装置（東京理化学株式会社）により 20℃ にコントロールした。ESR を起動させ、磁場を安定化させるために 30 分間放置してから測定を開始した。

試料を測定範囲内にセットするためにスケール（日本電子株式会社製）で試料管を挿入する深さを決定し、シリコンキャップを取り付けた。共振器に試料管をシリコンキャップの部分まで挿入し、コレットナットで固定した。

ESR の測定は次のパラメータ設定で行った。Center Field ; 250 mT, Sweep Width ; 250 mT, Frequency ; 9429~9434 MHz, Modulation frequency ; 100 kHz, Modulation width ; 1.0 mT, Time constant ; 0.03 s, Sweep time ; 4.0 min である。

マイクロ波強度は 0.1~100 mW まで変化させた。各マイクロ波強度で計測し、得られたスペクトルの信号強度を求めた（Fig. 2）。

JES-FA100 で測定したスペクトルは WIN-RAD（ラジカルリサーチ株式会社）を用いて解析した。g 値は Mn

Fig. 3 ESR spectra of infant milk (cube), infant milk (powder), fat-free milk (powder), coffee milk (powder) and whole egg (powder)

Horizontal scale is shown in mT ; the arrow is in the direction of increasing magnetic field.

マーカー（日本電子株式会社）を用い，補正して求めた。

実験結果

1. ESR スペクトル

Fig. 3 に測定した各試料のスペクトルを示した。ESR 信号強度を比較するため，いずれも計測感度（Amp. Gain）で補正して示した。Fig. 3 で示すようにいずれの試料でも一本線の P_1 信号が $g=2.0$ の位置に観測された。乳児用ミルク（乳児用成型ミルク，乳児用粉末ミルク）は強く鋭い信号を示した。粉末ミルク（脱脂粉乳，コーヒー用粉末ミルク）および乾燥全卵の信号強度は極めて弱かった。この 1 本線の信号はいずれも有機フリーラジカル由来の信号と考える。Fig. 4 に示すように測定感度（Amp. Gain）を上げて ESR 計測したところ，乳児用ミルクのスペクトルから g 値が約 4 の位置に Fe^{3+} 由来の信号が観測された。 g 値が約 2 の 1 本線の近傍に Mn^{2+} 由来と考えられる弱い信号も観測された。粉末ミルクでは遷移金属イオン由来と考えられる信号は検出されなかった。乾燥全卵では Fig. 3 に示した P_2 の信号が明瞭に観測された。 g 値が約 4 であったことから遷移金属イオンである Fe^{3+} 由来の信号であると考えた。

2. 緩和挙動

有機フリーラジカルの緩和挙動を検討した。Fig. 5 に示したように ESR 信号強度はマイクロ波強度が増すに従って増加し，ESR 信号強度が飽和する閾値⁽¹⁾⁽¹²⁾を得た。閾値を示した後は信号強度は減少した。閾値を Table 2 に示した。乳児用ミルクは他の試料よりも高い信号強度を示し

た。閾値を示すマイクロ波強度は，乳児用ミルクでは約 10 mW，粉末ミルクでは約 20 mW となった。

3. 緩和時間

Table 3 に Lund の解析ソフト⁽²²⁾を用い ESR 信号の飽和挙動から算出した電子スピンの緩和時間（ T_1 ， T_2 ）を示した。乳児用ミルクでは T_1 が約 10 μs ， T_2 が約 60 ns であった。粉末ミルクおよび乾燥全卵では T_1 が約 5 μs ， T_2 が約 100 ns となり，差異がみられた。

考 察

1. ESR 信号の同定

乳児用ミルクの成分には鉄とマンガンが黒コショウ⁽¹⁾⁽¹²⁾や朝鮮人参^{(13)~(15)}のように含まれているので ESR 計測により Mn^{2+} と Fe^{3+} の信号観測が可能であったようである。

乾燥全卵を計測すると，非常に強い Fe^{3+} 由来の信号（Fig. 3, P_2 ）が観測された。100 g 当たり 3.0 mg⁽²¹⁾ の高い鉄含有量なので非常に明瞭な ESR 信号として観測されたようである。

Fig. 3 で示したように粉末ミルクの P_1 信号強度は乳児用ミルクと比較して非常に微弱であった。ESR 信号強度は Table 2 で示すように乳児用ミルクで 60 と 30 であり，粉末ミルクは 3.0 を示した。乳児用ミルクは約 6 mg の脂質を含み⁽²¹⁾，コーヒー用粉末ミルクや乾燥全卵は乳児用ミルクの脂質含有量の 5 倍～7 倍である約 30～40 mg の脂質を含む⁽²¹⁾。そこで，ESR 信号強度と脂質含有量との関連は少ないと考えられる。試料はいずれも不活性ガス充填で包装されているため，食品中に含まれている油脂の酸化によ

Fig. 4 ESR spectra of infant milk (cube) and infant milk (powder)

Horizontal scale is shown in mT ; the arrow is in the direction of increasing magnetic field.

Fig. 5 Progressive saturation behaviors of P_1 signal

る P_1 信号強度への影響は少ない。

乳児用ミルクの P_1 信号強度が粉末ミルクおよび乾燥全卵と比較して非常に強くなったのは含有成分の一つであるアスコルビン酸の関与が予想される。乳児用ミルクではア

スコルビン酸が約 60 mg、脱脂粉乳には 5 mg 添加されている。コーヒー用粉末ミルクおよび乾燥全卵にはアスコルビン酸が含まれていない²¹⁾。アスコルビン酸は少量でも有機フリーラジカル由来の強く鋭い信号を観測する²³⁾。その

Table 2 Threshold power and peak height

	Power (mW)	Peak height /Amp. Gain
Infant milk (cube)	10	60
Infant milk (powder)	10	30
Fat-free milk (powder)	20	3.0
Coffee milk (powder)	20	3.0
Whole egg (powder)	10	6.0

ため、乳児用ミルクの P_1 信号は添加されたアスコルビン酸に由来すると考えた。

2. 緩和挙動と緩和時間

乳児用ミルクと粉末ミルクおよび乾燥全卵では緩和挙動に大きな差異がみられた。閾値を示すマイクロ波強度を比較すると、Table 2 で示すように乳児用ミルクはマイクロ波強度が 10 mW で飽和し、粉末ミルクは 20 mW で飽和しており、乳児用ミルクは弱いマイクロ波強度で早く飽和することが示された。

緩和時間でも差異が生じた。乳児用ミルクでは T_1 が約 10 μ s, T_2 が約 60 ns であった。一方、粉末ミルクと乾燥全卵では T_1 が約 5 μ s, T_2 が約 100 ns となった。弱いマイクロ波強度で飽和することから、乳児用ミルクの T_1 は長いと考えられる。

緩和挙動および緩和時間が異なることは含有されるラジカル種が違うことを示している。乳児用ミルクと、粉末ミルクおよび乾燥全卵では含有する栄養成分が大きく異なる¹⁰⁾。そのため、緩和挙動、緩和時間に差異が生じたと考えられる。しかし、2 種の乳児用ミルクでは同じ緩和挙動、同じ緩和時間を示したことからラジカル種が同じであると考えた。

3. 成型処理による成分への影響

乳児用ミルクは、表示をみると構成成分がほとんど同じであった。乳児用成型ミルクは豊田らの報告¹⁾の中にある顕微鏡写真からも明瞭であるが、外側が架橋して内部の粉状のミルクを覆っている構造⁸⁾⁹⁾である。成型すると粉状よりも酸素に暴露されにくいので酸化由来のラジカルは少ないと予想した。加熱、加圧処理はラジカルを生成するため P_1 信号強度を強くする²⁰⁾と報告されている。乳児用成型ミルクは加湿による成型処理を用いるため、成型処理によって検出されるラジカルは少ないと予想した。しかしながら、乳児用成型ミルクの P_1 信号強度はすべての試料の中で最も大きく、乳児用粉末ミルクの信号強度より、約 2 倍大きい値が得られた。

乳児用ミルクは数多くの成分で調製されている。乳児用成型ミルクは 43 種、乳児用粉末ミルクは 34 種の成分である。乳児用成型ミルクには、乳児用粉末ミルクには配合されていない 9 種の成分が添加されている。添加成分は表示から、アラキドン酸、リン脂質、コレステロール、アルファ・

Table 3 Relaxation times (T_1 and T_2)

	T_1 (μ s)	T_2 (ns)
Infant milk (cube)	10	60
Infant milk (powder)	10	60
Fat-free milk (powder)	4	100
Coffee milk (powder)	5	100
Whole egg (powder)	5	100

ラクトアルブミン、シスチン、ヌクレオチド、ラクトアドヘリン、セレン、カルニチンである。これらの構成成分が乳児用成型ミルクの P_1 信号の要因になる可能性がある。包装は不活性ガス充填であることから酸化は抑えられており、酸化由来のラジカルが P_1 信号の要因¹⁸⁾になるとは考えられない。乳児用ミルクでは成型でも粉末でも緩和挙動や緩和時間に差異は見られなかったので、成型処理により誘導されるラジカル種は粉末のものと同じであろう。すなわち、乳児用ミルクは、製法の違いによる新たなラジカル生成はないと考えた。

要 約

乳児用成型ミルクを成分組成の異なるタンパク質性粉末食品数種と比較して ESR 測定を行った。乳児用ミルクは脱脂粉乳、コーヒー用粉末ミルク、乾燥全卵より強い ESR 信号強度を観測した。乳児用ミルクの緩和挙動から種類の異なるラジカル種の寄与が示唆された。構成成分の違いから考察すると、強い有機ラジカル種である、アスコルビン酸の含有量が乳児用ミルクにおいて突出しており、その寄与が推察された。乳児用ミルクでは成型でも粉末でも緩和挙動や緩和時間に差異は見られなかったので、成型処理により誘導されるラジカル種は粉末のものと同じであると考えた。すなわち、乳児用ミルクは、製法の違いによる新たなラジカル生成はないと考えた。

本研究を行うにあたり、乾燥全卵試料を提供していただいたキューピー株式会社に深謝する。

文 献

- 1) 豊田 活, 柴田満穂, 粉ミルクの圧縮成型体製造技術の開発, 化学と生物, **47**, 506-510 (2009).
- 2) 森永乳業株式会社, 易溶性粉乳錠剤の製造法, 特公昭 45-007949 (1970).
- 3) 森永乳業株式会社, 易溶性粉乳錠剤の製造法, 特公昭 45-039018 (1970).
- 4) 雪印乳業株式会社, 易溶性固形状ミルクの製造法, 実開昭 49-130189 (1974).
- 5) 和光堂株式会社, 固形成型物およびその製造法, 特公昭 01-054015 (1989).
- 6) 石原公一郎, 乳児用固形ミルク, 実公昭 49-130189 (1974).
- 7) 野田佳子, 固形ミルク, 実開昭 61-118280 (1986).
- 8) 明治乳業株式会社, 固形乳, 及びその製造方法, WO2006/

- 004190 (2006).
- 9) 明治乳業株式会社, 固形乳, 及びその製造方法, 特許第 4062357 (2008).
- 10) 亀谷宏美, 鵜飼光子, 酸素フリー雰囲気での ESR による γ 線照射で衛生化したアガリクスの分析, *RADIOISOTOPES*, **56**, 437-441 (2007).
- 11) Ukai, M. and Shimoyama, Y., Free radicals in irradiated pepper : An electron spin resonance study. *Appl. Magn. Reson.*, **24**, 1-11 (2003).
- 12) Shimoyama, Y., Ukai, M. and Nakamura, H., Advanced protocol of Detection for Irradiated Food by ESR. *Radiat. Phys. Chem.*, **76**, 1837-1839 (2007).
- 13) 中村秀夫, 鵜飼光子, 下山雄平, γ 線照射した朝鮮人参の電子スピン共鳴法による解析, *RADIOISOTOPES*, **53**, 501-506 (2004).
- 14) Nakamura, H., Ukai, M. and Shimoyama, Y., An Electron Spin resonance Study of ginseng irradiated by gamma ray. *Spectrochimica Acta*, **63** (4), 883-887 (2006).
- 15) 亀谷宏美, 鵜飼光子, ESR による照射殺菌朝鮮人参の検知, *RADIOISOTOPES*, **55**, 451-455 (2006).
- 16) Shimoyama, Y. and Ukai, M., Free radicals in Irradiated Wheat flour detected by Electron Spin Resonance spectroscopy. *Spectrochimica Acta*, **63**, 888-890 (2006).
- 17) 亀谷宏美, 小川英之, 中村秀夫, 鵜飼光子, 下山雄平, 照射ナツメグ (*Myristica fragrans*) の ESR による検知, *RADIOISOTOPES*, **58**, 179-185 (2009).
- 18) 石津和彦, 実用 ESR 入門, 第 7 版 (講談社サイエンティフィック, 東京), pp. 270-273 (1981).
- 19) Swartz, M.H., Bolton, R.J. and Borg, C.D., Biological Applications of Electron Spin Resonance, John Wiley & Sons, Inc., pp. 23-25 (1972).
- 20) 安部あいか, 小寺直子, 高橋 望, 鈴木沙恵, 鵜飼光子, 加熱調理によるセルロースを多く含んだ照射食品中のラジカル減衰挙動, 食品照射, **39**, 1-4 (2004).
- 21) 五訂日本食品成分表, 医歯薬出版株式会社
- 22) Lund, A., Relaxation time determination from continuous-wave microwave saturation of EPR spectra. *Rad. Res.*, **172**, 753-760 (2009).
- 23) 山内 淳, 磁気共鳴—ESR—, 第 1 版 (株式会社サイエンス社, 東京), pp. 230-236 (2006).

(平成 21 年 11 月 11 日受付, 平成 22 年 3 月 6 日受理)