乳脂肪のヒドロキサム酸指数について

慶田 雅 洋* 海老根 涼子*

(昭和44年6月13日受理)

On the Hydroxamic Acid Index (HAI) of Milk Fat

Masahiro IWAIDA and Ryoko EBINE

(National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1,
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo)

Application of a hydroxamate method was suggested by Bassette and Keeney for the detection of foreign fat in milk fat.

This method does not require the saponification of milk fat as is the case with the determination of Reichert-Meissl-Wollny and Polenske values and butyric acid number (Buttersäurezahl).

Application of this method for the detection of the adulteration of milk fat was undertaken, by use of butterfats extracted from butter, butter oil, ghee, cream, ice cream mix and ice cream produced in Japan as the test sample, comparing the results with those obtained by the gas chromatography of sterols, RMW, Pol and butyric acid number. HAI of pure milk fat was defined within the range of 9.8–12.5.

It was demonstrated that the results of discrimination carried out by HAI were not always coincident with those obtained by gas chromatography of sterols. This indicates that commercial milk fats are available in Japan to which regulation of butyric (and caproic) acid has been carried out, and that results obtained by sterol test are not absolute. The correlation coefficient between HAI and butyric acid number was calculated to be 0.92. Distillation as well as saponification are necessary for the determination of RMW, Pol and butyric acid number. These tedious procedures are excluded in the determination of HAI, eliminating the error of determination. German National Committee of IDF expressed that HAI method is being adopted as the tentative method for the discrimination of adulteration of milk fat. It is recommended, therefore, to carry out both HAI and sterol tests for the detection of foreign fat in milk fat.

(Received June 13, 1969)

まえがき

有機酸エステル、塩化物、無水縮合物にアルカリ性でヒドロキシルアミンを反応させるとヒドロキサム酸が形成されることは従来から知られている¹⁾。したがって乳脂肪のトリグリセリドよりヒドロキサム酸を調製して、その性質を調べることも可能である。本法の特徴はけん化および蒸留を行わないことにある。ヒドロキサム酸自体は1800年代に発見されたものであるが、Feigl²⁾の“はん点分析 (Spot Test)”で簡易検出法が紹介されて以来、種々の報告が現われるようになった。その中でも鉄とキレート物質を形成する方法が非常に鋭敏である。共

有結合と配位結合の存在するキレート環の形成によるものであり、乳脂肪では520~530 mμに極大吸収を有する特有の赤紫色を呈する。本報告においては乳脂肪のすべてをヒドロキサム酸化したものと、その中から水溶性ヒドロキサム酸のみを抽出したものと2種類についてキレート化合物の吸光度を測定し、その比を求めて異種

* 国立衛生試験所食品添加物部：東京都世田谷区上用賀 1-18-1

脂肪の検出に応用することの可能性について、わが国の市販乳製品などより抽出した脂肪を試料としてステリンのガスクロマトグラフィー、水溶性・不溶性揮発性脂肪酸価および酪酸価による試験法を行なった結果と比較検討した。

試料および実験方法

1. 試料

試料としては市販バター、バターオイル、アイスクリーム類、アイスクリームミックス、クリームおよび輸出用ギー (ghee; 一種の融解バター、熱帯諸国では一般に水牛乳より調製する) を使用した。バターオイルおよびギーはそのまま試料として使用した。その他の製品よりの脂肪分の抽出は津郷ら³⁾の方法に従って行なった。

2. 試薬

a. 塩酸ヒドロキシルアミン溶液: 塩酸ヒドロキシルアミンと水を等重量混合する。かきまぜながら電気水浴上でとけるまで温めた後、室温まで冷却する。加熱は溶解に必要な最低限度とする。使用のたびごとに調製する。

b. 水酸化カリウム・イソプロパノール溶液: 水酸化カリウム 6.25 g にイソプロパノール 100 ml を添加し、電気水浴上で水酸化カリウムを溶解した後、室温まで冷却する。密せんにして冷蔵庫に保存する。数日間は保存可能である。黄色に着色したものは使用できない。使用の際にはあらかじめ 25~30° に温める。

c. イソプロパノール・水・アセトン混液: 等容量の水とイソプロパノールを混合した後、混合物に対して容量で 1% のアセトンを添加する。

d. 酢酸・クロロホルム混液: 水酢酸 6 ml をクロロホルムで 1 L に希釈する。

e. アセトン・クロロホルム混液: 等容量のアセトンとクロロホルムを混合する。

f. 鉄溶液

(1) 液: 無水塩化第二鉄 0.9 g を濃塩酸 5 ml に湯浴上でとかす。水で 100 ml に薄め、定性ろ紙でろ過する。密せんにして冷蔵すれば 2 か月間保存可能である。

(2) 液: (1) 液と 1.8% 塩酸 (濃塩酸 5 ml を 100 ml に薄める) を等容量混合する。混合操作は使用の際に行なう。

3. 実験方法

(1) ヒドロキサム酸指数

ヒドロキサム酸の形成は温度が高いほどすみやかに進行するが、あまりに高温では形成したヒドロキサム酸の破壊する恐れがあるので、30°で30分間 incubate する方法を採用した。水酸化カリウムのイソプロパノール溶液の添加は、溶液の pH をアルカリ性にしてヒドロキサム酸の形成に好適な条件を与えるためであって、けん化を行なうものではない。アルコール製水酸化カリウム (エタノール溶液) よりもイソプロパノール溶液を使用した

方が分離もよいので後者を採用した。操作法は Bassette および Keeney⁴⁾ の記載に従って行なった。すなわち下記の通りである。

(測定法) 約 0.1 g の融解脂肪を 50 ml の比色管 (ネスラー管)⁵⁾ にとり、塩酸ヒドロキシルアミン溶液 0.5 ml を加える。まだ脂肪がとけているうちに水酸化カリウムイソプロパノール溶液 5 ml を加える。添加は比色管を振り混ぜながら行なう。30° の水浴に 30 分間浸漬した後、酢酸・クロロホルム混液で 50 ml までメスアップする。密せんにして 5 秒間に 10 回反転する (内容物は混濁する)。管の直径と同じ大きさのガラスウールの塊を管の中に液面の高さまでそう入した後、1 ml のホールピペットで管の底までゆっくり押込む (ピペットの上端を押えながら行なう)。このピペットで溶液を 1 ml ずつ、50 ml の比色管 2 本に分注する。45 ml の目盛までイソプロパノール・水・アセトン混液で希釈する。しばらく放置してヒドロキサム酸を形成させる (総酸測定用)。

酢酸・クロロホルム混液でメスアップし、1 ml ずつ 2 回抜取った残りの溶液から 10 ml を 50 ml の比色管に移し、アセトン・クロロホルム混液 20 ml および蒸留水 20 ml を加える。比色管を 30 回 (10 秒間) 上下に激しく振り混ぜた後静置して分離させる。器壁を軽くたたいて上層に付着しているクロロホルム粒を落してやる。澄明な上層 10 ml ずつを 25 ml の目盛つき共せん試験管 2 本に移し約 22 ml までイソプロパノールで希釈する (水抽出酸測定用)。

総酸測定用比色管に鉄溶液の (1) 液を 1 ml 添加し、イソプロパノール・水・アセトン混液で 50 ml に希釈する。(2) 液 0.5 ml を水抽出酸測定用試験管に添加し、イソプロパノールで 25 ml の定容とする。各比色管および試験管の内容物をゆっくり 3 回反転して混合する (全く乳脂肪の存在しない場合は試験管の方は赤く呈色しない)。15 分以内に蒸留水を対照として 525 m μ で吸光度を測定する (日立 EPU-2A 使用)。

次式によりヒドロキサム酸指数を計算する。

$$\text{ヒドロキサム酸指数 (HAI)} = \frac{100 \times \text{水抽出酸の吸光度}}{10 \times \text{総酸の吸光度}}$$

本法では水溶性ヒドロキサム酸の抽出に当たって、アセトン・クロロホルム混液と水に対する分配性を利用していることが特徴の一つである。ただし、この場合の水層には約 9% のアセトンが含まれてくる。キレート形成に適当な鉄イオン濃度は 2 mM である。比色に当たっては溶媒による試薬ブランクは徐々に黄色に着色し不安定なため対照として蒸留水を使用した。水と溶媒ブランクの差は約 0.002 であり、ほとんど無視することができる。

(2) ステリンのガスクロマトグラフィー

衛生試験法注解⁶⁾に従って脂肪よりジギトニン沈殿法によって抽出したステリンの酢酸エステルを調製し、ガ

Table 1. Comparison of the Hydroxamic Acid Index with Results Obtained by Gas Chromatography of Sterols

No.	Kinds	HAI* ¹	Foreign vegetable fat* ²	Foreign fat* ²
1	Ghee	13.80	±	+
2	"	13.39	—	—
3	Butter	12.50	—	+
4	Butter oil	12.45	—	+
5	Cream	11.86	—	—
6	Butter oil	11.86	—	—
7	Butter	11.72	—	—
8	Ghee	11.23	+	+
9	Butter oil	10.90	—	—
10	"	10.84	—	+
11	"	10.72	—	+
12	"	10.44	—	+
13	"	10.18	—	+
14	Butter	10.15	—	—
15	Butter oil	10.07	—	—
16	"	9.93	—	—
17	"	9.92	—	±
18	"	9.59	—	—
19	"	9.56	—	+
20	"	9.39	—	+
21	Butter	9.33	—	—
22	Ice cream mix (soft)	9.06	—	+
23	Ghee	6.89	—	+
24	Butter oil	5.80	—	—
25	Ice cream mix (hard)	5.54	+	+

*¹ Hydroxamic Acid Index*² Examined by gas chromatography of sterols

Note +: Positive

—: Negative

±: Half positive

スクロマトグラフィーを行なった。

ガスクロマトグラフは島津製作所製 GC-1C 型、水素炎イオン化型検出器を使用した。分離管は 3 mm×1.2 m のガラスカラムにガスクロム Q (60~80 メッシュ) を担体として SE-30 を 3% コーティングして使用した。ステリン酢酸エステルはアセトンに溶解して注入した。分離管温度: 250°, キャリヤーガス: N₂ (25 ml/min), Press: 1.4 kg/cm², 感度はコレステリンの酢酸エステルを recorder response にほぼ full scale の 4 倍に現われる程度に調節する。

(3) 脂肪の酪酸価: 常法⁷⁾によって測定した。

(4) 水溶性揮発性脂肪酸価 (ライヘルト・マイスル・ウォルニー価; RMW) および不溶性揮発性脂肪酸価 (ポレンスケ価; Pol): 国際酪農連盟標準法⁸⁾によって測定した。

実験結果ならびに考察

25種の市販乳製品、輸出用ギーおよびアイスクリーム原料について HAI を測定し、ステリンのガスクロマトグラフィーによる検査成績と比較した結果は Table 1 に示す通りである。試料は HAI の大きい順に並べてある。異種植物油脂の存在はガスクロマトグラム上でプラシカステリン、カンベステリンまた β-シトステリンの酢酸エステルを検出することにより確認した。異種植物油脂の存在が認められる場合には当然異種脂肪も + となるが、なおこのほかにガスクロマトグラム上で β-コレスタノールの酢酸エステルが検出された場合には、海産動物体脂肪などによる偽和の行なわれたことを示すものであって、異種脂肪の存在が認められると判定される。本表より供試試料の HAI は 5.54~13.80 の間にあることが認められる。Bassette および Keeney⁴⁾ は純乳脂肪の HAI の範囲は 9.8~12.5 と定めているのでこれを準用すると本表の結果より試料 No. 1, 19, 20, 22, 23 および 25 は HAI およびステリンのガスクロマトグラフィーとともに純乳脂肪ではないと判定され、また No. 5, 6, 7, 9, 14, 15 および 16 は両法とともに異種脂肪陰性と判定されるので、これら13試料についてはなんら問題はないが、残り12試料のうち、偽陽性と判定された No. 17を除いた残りの11試料については判定成績が相異なるので問題となる。すなわち HAI 法ではステリン試験により陽性と判定される試料 No. 3, 4, 8, 10, 11, 12 および13の7個を見落してしまうという欠点がある。これは、HAI の測定は原理的には脂肪酸組成の差によるものであって、微量成分であるステリンの差によって鑑別する方法とは原理的に異なるものであり、脂肪酸組成を調整した脂肪には無効であることを示すものである。しかしながら、ここで注目すべきことはステリンの試験により異種脂肪が検出されなかった試料でも No. 2, 18, 21 および 24 のように HAI が乳脂肪の範囲からはずれていると判定されるものが存在するということである。HAI は大体において酪酸のモル比 (%) に相当するものであることが示されており⁴⁾ 9.8~12.5 の範囲に入らないものは、酪酸含量が少ないかまたは比較的低分子の脂肪酸の存在比が高いこと、あるいは酪酸が多すぎるか比較的高分子の脂肪酸の存在比の高いことのいずれかによるものと考えられ、純乳脂肪ではないものとするのが妥当である。したがって、本表の成績より、ステリンの試験成績は必ずしも異種脂肪の存在を示す完全な指標ではないことが推定される。

乳脂肪の脂肪酸組成を示す特数としては RMW, Pol

Table 2. Comparisons between Hydroxamic Acid Index, RMW- and Pol-Values, and Butyric Acid Numbers of Fat in Ice Cream

No.	HAI* ¹	RMW* ²	Pol* ²	BAN* ³
1	9.50	12.9	1.5	14.0
2	9.17	24.2	1.2	18.0
3	8.52	17.1	1.6	10.6
4	7.06	19.5	6.4	10.7
5	6.54	18.3	2.3	13.8
6	6.19	16.7	3.2	11.0
7	5.82	14.0	4.3	11.0
8	5.39	14.7	7.4	8.3
9	5.23	14.4	6.5	7.8
10	2.60	10.7	6.9	6.2
11	1.61	10.0	8.0	3.5
12	0.00	3.6	1.4	1.1

Note *¹ HAI: Hydroxamic Acid Index (Range of milk fat: 9.8~12.5)

*² RMW-value: Reichert-Meissl-Wollny value (Lower limit of milk fat: 24.8)
Pol-value: Polenske value (Range of milk fat: See Literature No. 10)

*³ BAN: Butyric Acid Number (Range of milk fat: 20±2)

および酪酸価が一般に実用化されていることはよく知られていることである。したがってこれらの特数と、同じく脂肪酸の特数である HAI を比較することは有意義なことであると考えられる。よってこれらの特数の間の関係について試験を行なった。ただし、実験試料としては RMW, Pol および酪酸価の範囲の広いことが知られているアイスクリーム⁹⁾を使用した。

実験結果は Table 2 に示す通りである (HAI の高い順に配列してある)。本表より市販アイスクリームの脂肪の HAI は 9.50 以下であり、すべて乳脂肪の範囲よりも低いことが認められる。一方、乳脂肪の RMW は 24.8以上¹⁰⁾、酪酸価は20±2¹¹⁾であることが示されており、これらについてもやはり乳脂肪の範囲よりも低いことが示されている。また、大体において HAI の高いものほど、RMW および酪酸価も高い値を示すことが知られるが、その順序は必ずしも一致していない。HAI と酪酸価の関係について図示すると Fig. 1 に示す通りであって、両者の相関係数は0.92、回帰からの標準偏差は1.92であって相関係数は Bassette および Keeney⁴⁾ が乳脂肪についてカラムクロマトグラフィーにより求めた酪酸のモル比と HAI との間について計算した値(0.88)とほぼ同じ程度でありきわめて高い相関を有することが認められる。また、Bassette および Keeney⁴⁾ によると乳脂肪に約20%までの範囲でコーンオイルおよびココヤシ油を添加した場合には、HAI は添加量に比例して同様の傾きでほぼ直線的に減少することが確かめられており、これは9%アセトン水溶液で抽出した水溶性ヒドロ

Fig. 1. Correlation of the hydroxamic acid index with the butyric acid number of fat in ice cream

キサム酸区分には酪酸 (およびカプロン酸) 以外の低級脂肪酸はほとんど含まれて来ないことを示すものである。

結 論

HAI の測定法の特徴を要約するとつぎの通りである。

1. HAI は総ヒドロキサム酸および水溶性ヒドロキサム酸の吸光度の比によって求められる相対値であるので試料を精秤する必要がない。
2. けん化および蒸留を行なわないので RMW, Pol および酪酸価の測定に比較してきわめて迅速に操作でき、しかも、測定誤差が少なく再現性が高い。
3. 水溶性酸の抽出には9%アセトン水溶液を使用するのでやし油の混入も他の植物油脂と同様の感度で検出する (酪酸価法ではやし油の混入の場合には、総価も測定する必要があり、揮発性脂肪酸価では RMW および Pol の両方を測定する必要がある)。
4. 短所としては、酪酸を組込んだ合成脂肪には効力が薄いことがあげられる。

1968年に国際酪農連盟は加盟各国に対して乳脂肪中の

異種脂肪の検出法に関する質問状 (IDF Questionnaire 1268/V) を発送した。これに対してドイツ国内委員会は当国ではヒドロキシサム酸指数を実用化していることを回答の中で明らかにしている。

本報告の結果より、わが国の乳製品および関連製品についての HAI の測定成績はステリンのガスクロマトグラフィーの成績と必ずしも一致しないことが示された。これは脂肪酸と微量成分という原理的な相異によるものと考えられ、異種脂肪の資材物質としては脂肪酸組成を調整した脂肪が使用されているほかに、ステリン成分では識別できないが HAI でその存在が検出されるものも存在することを認めた。したがって、異種脂肪の検出法としては両法を併用することが望ましい。

なお、以上のほかにも乳脂肪中の異種脂肪の鑑別にヒドロキシサム酸法を応用した例としては Nelson¹²⁾ の報告および Shipe¹³⁾ の報告があるが、前者は石油エーテル層より水溶性ヒドロキシサム酸を水抽出するものであって、RMW および Pol と同様な結果が得られることが期待しうるにすぎない。これに対して Shipe の方法は水抽出区分よりブタノール・エタノール混液により、カプリルおよびカプリン酸に由来するヒドロキシサム酸を除去する点に特徴がある。

稿を終えるに当たり、種々ご指導を賜った国立衛生試験所食品添加物部長谷村顕雄博士に感謝致します。

本研究の概要は昭和44年4月21日第23回日本栄養・食糧学会総会において講演した。

文 献

- 1) R. F. Goddu, N. F. Le Blanc, C. M. Wright: Anal. Chem. **27**, 1251 (1955).
- 2) F. Feigl: "Spot Tests in Organic Analysis" 5th Ed. p. 225 (1956) Elsevier Publish. Co., Amsterdam.
- 3) 津郷友吉, 慶田雅洋, 他 2 名: 食衛誌. **7**, 279 (1966).
- 4) R. Bassette, M. Keeney: J. Assoc. Offic. Agr. Chem. **39**, 469 (1956).
- 5) 日本薬学会編: "衛生試験法注解" p. 1105 (1965) 金原出版.
- 6) 衛生化学: **13**, 88 (1967).
- 7) 東京大学農学部農芸化学教室編: "実験農芸化学", 別巻, p. 262 (1961) 朝倉書店.
- 8) International Standard FIL-IDF 37 (1966); 慶田雅洋, 中島美千代, 他 2 名: 食衛誌. **7**, 455 (1966).
- 9) 慶田雅洋, 白鳥つや子, 他 2 名: 同上. **9**, 409 (1968).
- 10) 慶田雅洋, 津郷友吉: 食衛誌. **10**, 投稿中.
- 11) 日本薬学会編: "衛生試験法注解" p. 444 (1965) 金原出版.
- 12) W. L. Nelson: Food Technol. **8**, 385 (1954).
- 13) W. F. Shipe: J. Dairy Sci. **38**, 599 (1955).