食肉中のニコチン酸及びニコチン酸アミド分析法及び それらの保存中の変化

(昭和 62 年 9 月 2 日受理)

大石 充男* 天川 映子* 荻原 勉*
田口 信夫* 大西 和夫* 西島 基弘*

Determination of Nicotinic Acid and Nicotinamide in Meats by High Performance Liquid Chromatography and Conversion of Nicotinamide in Meats during Storage

Mitsuo OISHI, Eiko AMAKAWA, Tsutomu OGIWARA, Nobuo TAGUCHI,
Kazuo ONISHI and Motohiro NISHIJIMA

(Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
3-16-25, Shibazaki-cho, Tachikawa-shi, Tokyo, Japan)

A method for determination of nicotinic acid (NA) and nicotinamide (NAA) in meat by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed.

NA and NAA were extracted from meat with methanol and the extract was cleaned up with a Sep-pak alumina N cartridge. NAA was eluted with methanol and NA was eluted with 0.1 M sodium hydrogencarbonate from the cartridge. NA and NAA in each eluate were separated on a column packed with LiChrosorb RP-18 by using methanol-acetate buffer (pH 5) containing 0.1 M sodium acetate and 0.01 M tetrabutylammonium hydroxide (2:10 v/v%), as a mobile phase, with detection at 261 nm. Recoveries of NA and NAA from ground meats spiked at levels of 0.5 and 2.0 mg/100 g were more than 92%. NA was detected in 24 of 155 samples of commercial ground meat at the level of 1.1~45.7 mg/100 g and NAA was detected in all of the samples at the level of 1.1~5.9 mg/100 g.

The effect of storage time on content of NA and NAA in meat at -18, 4, 10 and 25°C was examined. At 10°C, NAA content began to decrease on the 2nd day and NAA was no longer detected on the 5th day, whereas NA began to be detected on the 2nd day and its content subsequently rapidly increased. The total amount of NA and NAA in one sample was approximately constant during storage.

Based on these results, NAA in meat appears to be converted to NA during storage.

(Received September 2, 1987)

Key words: ニコチン酸 nicotinic acid; ニコチン酸アミド nicotinamide; 食肉 meat; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; セップパックアルミナ Sep-pak alumina; ニコチン酸アミドの変化 conversion of nicotinamide

緒 言

ニコチン酸 (NA) 及びニコチン酸アミド (NAA) はビタミン B 複合体の 1 種でペラグラの治療薬¹⁾として知られている。食品添加物としては、強化剤として各種の食品に許可されている²⁾。しかし昭和 55 年から 56 年に日

本各地で NA を主成分とする混合製剤が肉の発色剤として使用され、顔面紅潮、発疹、体のかゆみ及び顔のはてりなどを主症状とする一過性の食中毒が発生した。このことから、NA 及び NAA は昭和 57 年に食肉並びに鮮魚介類 (鯨肉を含む) への使用が禁止された³⁾。

しかし、昭和 61 年東京都内において NA を添加したひき肉を食べ、前述の症状を示す食中毒が発生し食品衛生上問題となった。そこで著者らはひき肉を中心とした

* 東京都立衛生研究所多摩支所: 東京都立川市柴崎町 3-16-25

Table 1. Operating Conditions of HPLC

Instrument	Japan Spectroscopic TWINCLE
Column	LiChrosorb RP-18 (5 μ m) 4 mm i.d. $\times$ 300 mm
Guard column	Unisil C-18 (10 μ m) 4 mm i.d. $\times$ 10 mm
Mobile phase	methanol-acetate buffer (pH 5) containing 0.1M sodium acetate and 0.01M tetrabutyl ammonium hydroxide (2:10)
Flow rate	0.6 ml/min
Column temp.	Ambient
Detector	UVIDEC 100III, 261 nm
Sensitivity	AUFS 0.04
Sample size	10 μ l

多数の市販生肉中の NA 及び NAA を精度良く、迅速に分析する必要を生じた。食品中の NA 及び NAA の分析法としては、すでに高速液体クロマトグラフを用いた方法^{4)~9)}が報告されている。これらは妨害物質の影響がみられたり、試験溶液の調製操作が煩雑であるなどの難点を有する。著者らは簡便な前処理法として Sep-pak アルミナ N カートリッジを用いたクリーンアップ法について検討を行った。また、本法を用いて食肉中の NA 及び NAA の挙動について検討し、若干の知見を得たので併せて報告する。

実験方法

1. 試料

昭和 61 年 7 月から 9 月にかけて都内精肉店から入手した牛ひき肉 66 件、豚ひき肉 27 件、及び牛豚合ひき肉 62 件、計 155 件を用いた。

2. 試薬

1) アルミナカートリッジ: Sep-pak アルミナ N カートリッジ (Waters 社製) をあらかじめメタノール 10 ml で洗浄したものを用いた。

2) NA 及び NAA 混合標準溶液: NA 及び NAA それぞれ 100 mg を水に溶解して 100 ml としたものを標準原液とした。標準原液を水で希釈し 2~30 μ g/ml になるように調製したものを NA 及び NAA 混合標準溶液とした。

試薬はいずれも市販特級品を用いた。

3. 装置

1) ホモジナイザー: (株)日本精機製 DX-3

2) 高速液体クロマトグラフ: (株)日本分光工業製 TWINCLE

3) 検出器: (株)日本分光工業製 UVIDEC 100III 型

4) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件 Table 1 に示した条件¹⁰⁾により測定した。

5. 試験溶液の調製

細切した試料 10 g をブレンダーカップに秤取し、メタノール 50 ml を加えて 2 分間ホモジナイズした後、メタノールで 100 ml とした。よく振とう後静置し、上澄

Fig. 1. High performance liquid chromatogram of beef extract without Sep-pak alumina N cartridge treatment

液をろ紙でろ過した。ろ液 10 ml を分取し、アルミナカートリッジに毎分約 2 ml の速度で負荷した。流出液をナシ型フラスコにとり、さらにメタノール 10 ml を流し、先の溶出液と合わせて、減圧乾固した。残留物に水 5 ml を加え、溶解したものを NAA 用試験溶液とした。ついで、先のカートリッジに 0.1M 炭酸水素ナトリウム溶液を流し、初めの溶出液 1 ml をすて、次の 10 ml をとり NA 用試験溶液とした。各試験溶液はそれぞれ 0.45 μ m のマイクロフィルターでろ過し、ろ液を HPLC 用試験溶液とした。

6. 定量

各試験溶液を Table 1 の HPLC 測定条件に従って HPLC を行い、標準溶液 (2~30 μ g/ml) のピーク高法によってあらかじめ作成した検量線により定量した。

結果及び考察

1. アルミナカートリッジによるクリーンアップ

牛ひき肉及び豚ひき肉のメタノール抽出液をクリーンアップせず、そのまま本法の HPLC 条件で測定すると Fig. 1 に示したとおり、NA 及び NAA の定量を妨害するピークが出現するため定量が困難であった。そこで前処理用カートリッジとして市販されている Sep-pak ア

ルミナ N カートリッジを用いたクリーンアップ法を検討した。

1) NAA

NAA はアルミナカートリッジに流すと、吸着せずそのまま流出するため、メタノール 10 ml で完全に流出させることができた。この流出液では Fig. 2(A) に示したとおり妨害物が除去された良好なクロマトグラムが得られた。

2) NA

NA 0.2 mg をアルミナカートリッジに負荷させ水、0.1M 塩酸、0.1M 酢酸、0.1M 水酸化ナトリウム、0.1M 炭酸ナトリウム及び 0.1M 炭酸水素ナトリウムそれぞれ 10 ml で溶出させた結果、溶出率はそれぞれ 0, 31, 68, 98, 95 及び 98% であった。アルカリ溶液ではいずれも 95% 以上の高い回収率を示したが、0.1M 水酸化ナトリウム及び 0.1M 炭酸ナトリウムで溶出させた場合、クロマトグラム上に肉に由来する妨害ピークが出現した。

Fig. 2. High performance liquid chromatograms of fraction eluted by methanol (A) and fraction by 0.1M NaHCO₃ (B) from Sep-pak alumina N cartridge

0.1M 炭酸水素ナトリウムを用いた場合、妨害ピークの影響はほとんどなく良好なクロマトグラムが得られた。また、炭酸水素ナトリウムの濃度は 0.05M 以上で良好な回収率が得られたため、以後の実験は 0.1 M 炭酸水素ナトリウムを用いることとした。

牛ひき肉抽出物をアルミナカートリッジで処理した後のクロマトグラムを Fig. 2(B) に示した。特に妨害ピークもみられず良好な結果が得られた。そこで、0.1M 炭酸水素ナトリウムを用い、0.5 ml ずつ分取し、測定したときの溶出パターンを Fig. 3 に示した。NA は 1.5 ml から溶出され、7.5 ml で溶出が終了した。そこで、以後の実験は初めの溶出液 1 ml をすてた後、10 ml をとり NA 用試験溶液とすることとした。

2. 添加回収試験

あらかじめ NA が検出されないことを確認したひき

Fig. 3. Elution pattern of NA from Sep-pak alumina N cartridge with 0.1M NaHCO₃

Table 2. Recoveries of NA and NAA Added to Ground Meats

Sample	Added (mg)	NA			NAA		
		Found* ¹ (mg)	Recovery (%)	C.V.* ² (%)	Found* ¹ (mg)	Recovery (%)	C.V.* ² (%)
Ground beef	0	0			0.45		
	0.5	0.46	92	3.9	0.96	102	1.9
	2.0	1.90	95	1.2	2.51	103	0.8
Ground pork	0	0			0.51		
	0.5	0.49	98	3.3	1.01	100	1.1
	2.0	2.08	104	1.0	2.59	104	4.5

*¹: Mean of 5 trials

*²: Coefficient of variation

Table 3. Analytical Results of NA and NAA in Commercial Ground Meats

Sample	No. of sample	NA		NAA		
		No. of positive	Range (mg/100 g)	No. of positive	Range (mg/100 g)	Average (mg/100 g)
Ground beef	66	5	3.6~28.9	66	1.4~5.9	3.5
Ground pork	27	3	6.5~14.0	27	2.0~5.3	3.8
Beef and pork ground together	62	16	1.1~45.7	62	1.1~5.3	3.7

Fig. 4. Time course of NA and NAA content in ground beef at various temperature
NAA content at 25°C (○), 10°C (△), 4°C (□) and -18°C (◇)
NA content at 25°C (●), 10°C (▲), 4°C (■) and -18°C (◆)

Fig. 5. Time course of NA and NAA content in ground pork at various temperature
Temperature as in Fig. 3.

肉 10 g に、NA 及び NAA を 0.5, 2 mg 添加し、本法に従って測定し、回収率を求め Table 2 に示した。いずれも 92% 以上の高い回収率が得られ、変動係数も 4.5% 以下と良好であった。なお、定量限界は NA が 1 mg/100 g、NAA が 0.5 mg/100 g であった。

3. 市販ひき肉の実態調査

市販の牛ひき肉、豚ひき肉及び牛と豚の合ひき肉に本法を適用し、その結果を Table 3 に示した。NAA はいずれからも検出された。NA は牛ひき肉 5 検体から 3.6~28.9 mg/100 g、豚ひき肉 3 検体から 6.5~14 mg/100 g 及び牛豚合ひき肉 16 検体から 1.1~45.7 mg/100 g の範囲で検出された。NA が検出されたもので 2

mg/100 g 以上の値を示したものは人為的に添加されたことが東京都衛生局食品監視課の調査により確認された。しかし、2 mg/100 g 未満のものは添加したとの確認がなされず、検出された理由が不明であった。また、過去の報告^{4), 5), 7~10)}では、NAA はいずれの食肉からも検出されている。検出量は 2~6 mg/100 g の範囲のものが多く見られ、この値は NAA のバックグラウンド値であると言われている。今回の調査結果もほぼ同じ値を示しており、これらは肉由来のものと考えられる。一方、先に述べた NA が 2 mg/100 g 未満検出されたものは、肉を保存している間に何らかの原因により NAA が変化したことも考えられる。そこでひき肉を各種温度条件で保存し、NA 及び NAA の挙動を調査した。

4. 保存中における NA 及び NAA の挙動

あらかじめ NA が検出されないことを確認したひき

Fig. 6. Time course of NA and NAA content in ground beef and ground pork at 25°C
 NAA (○) and NA (●) in ground beef
 NAA (△) and NA (▲) in ground pork

肉を10gずつビーカーに入れ、パラフィルムで密封し、それぞれ25°(恒温実験室の温度)、10°(食品衛生法で規定されている食肉の保存温度の上限)、4°(冷蔵庫)及び-18°(冷凍庫)に放置したときのNAとNAAの経時変化をFig. 4~6に示した。牛ひき肉の場合、25°ではNAAは急激に減少し2日で検出されなくなった。それに対して、実験開始日には検出されないNAは経時的に増加し、2日後には実験開始日のNAAの測定値とほぼ同程度となった。10°、4°と保存温度が低くなるに伴い、NAAが減少してNAが増加する速度は低下したが、いずれも25°の場合と同様の傾向が見られた。なお、-18°では30日後でも変化は見られなかった。豚ひき肉の場合NAの増加及びNAAの減少のパターンは牛ひき肉の場合とほぼ同様の傾向を示した。25°で保存した場合は牛ひき肉及び豚ひき肉ともNA及びNAAの変化が急激なため、2時間ごとに調査したところNAAは牛ひき肉の場合、12時間後、豚ひき肉では18時間後から減少し始め、それに対応してNAの増加が見られた。いずれの場合もNAAが減少するに伴い、NAの増加が見られ、これらの合計値がほぼ一定であるところから、保存中にNAAがNAに変化するものと考えられる。また、保存試験の再現実験を行った結果、変化の現れる日時がその都度異なった。保存温度の上昇に伴い、NAAの減少とNAの増加速度が速まることを考え合わせると、NAAからNAへの変化は微生物が関与していることが考えられる。

以上のことから牛、豚ひき肉などからNAが6mg/100g以下検出された場合、肉に含有しているNAAが変化した可能性があるため添加の有無の判定には十分留意する必要があると考える。

要 約

食肉中のNA及びNAAの分析法を検討した。また、食肉中におけるそれらの挙動について併せて検討した。

1. 牛肉及び豚肉のメタノール抽出液をSep-pak A

ルミナNカートリッジを用いてクリーンアップを行うことにより、精度良く迅速にNA及びNAAを定量することができた。

2. 本法を用い、ひき肉にNA及びNAAを0.5, 2mg添加したときの回収率は92%以上であった。検出限界はNAが1mg/100gでNAAは0.5mg/100gであった。

3. 市販のひき肉155検体について調査したところ、NAは24検体から1.1~45.7mg/100g検出され、NAAはすべての検体から1.1~5.9mg/100g検出された。

4. ひき肉を-18, 4, 10及び25°に放置しNA及びNAAの経時変化を調べたところ、温度の上昇に従いNAAの減少及びNAの増加の速度が速まる傾向が見られた。また、このときのNAとNAAの合計値が常にほぼ一定であることから、ひき肉中のNAAが保存中にNAに変化することがわかった。このNAAがNAに変化する要因は微生物が関与していることも十分考えられるためこれらについて今後検討する予定である。

なお、本研究の要旨は日本食品衛生学会第52回学術講演会(1986年11月、高知)において発表した。

文 献

- 1) 日本公定書協会: “第十一改正日本薬局方解説書” p. C-1205~1211 (1986), 広川書店。
- 2) 石館守三, 谷村顕雄監修: “第五版食品添加物公定書解説書” p. D-677 (1987), 広川書店。
- 3) 昭和57年2月27日厚生省告示環食第52号。
- 4) 北田善三, 井上雅成, 玉瀬喜久男, 芋生真子, 蓮池秋一, 佐々木美智子: 栄養と食糧 35, 121~124 (1982)。
- 5) 吉田宏三, 山本行隆, 藤原光雄: 食衛誌, 23, 428~433 (1982)。
- 6) 厚生省環境衛生局食品化学課編: “食品中の食品添加物分析法” p. 330~335 (1982), 講談社。
- 7) 高槻圭悟, 鈴木 滋, 牛沢 勇, 堺 敬一: 宮城県保健環境センター年報, 2, 89~92 (1984)。

-
- 8) 吉田綾子, 尾花裕孝, 今井田雅志: 大阪府立公衛研所報.
食品衛生編 15, 29~32 (1984).
I.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70, 698~702 (1987).
- 9) Takatsuki, K., Suzuki, S., Sato, M., Sakai, K., Ushizawa,
10) 大石充男, 大西和夫, 中村 弘, 坂井千三: 東京都衛研年
報. 35, 252~255 (1984).