市販牛肉中に検出されたクレゾール

(平成元年 1 月 30 日受理)

松本比佐志* 桑原克義* 村上保行*
西宗高弘* 末木賢二*

Cresol Isomers Contaminating Beef on the Market

Hisashi MATSUMOTO, Katsuyoshi KUWABARA, Yasuyuki MURAKAMI,
Takahiro NISHIMUNE and Kenji SUEKI

(Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69, Nakamichi,
Higashinari-ku, Osaka, Japan)

An analytical procedure for three cresol isomers (*o*-, *p*-, and *m*-isomers) contaminating beef was developed. Isolation of the compounds from the beef was efficiently carried out by steam distillation which was followed by liquid-liquid partition of the distillate with diethyl ether. The extracts were analyzed by gas chromatography (GC) in combination with capillary GC-mass spectrometry.

The three isomers were all detected in a sample of ground beef and in hamburger containing that beef. The concentrations of *o*-, *p*- and *m*-cresol in the beef were 1.7, 7.9 and 17.9 ppm, respectively. Though the concentration of each cresol isomer in the hamburger was slightly less than that in the ground beef, the ratio of each isomer in the hamburger was the same as that in the beef. The cresol isomers were not detected in five other beef samples on the market. The detection limit of each isomer was 0.2 ppm.

(Received January 30, 1989)

Key words: クレゾール異性体 cresol isomers; 牛肉 beef; ガスクロマトグラフィー (FID) gas chromatography (FID); ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー gas chromatography-mass spectrometry

はじめに

有毒な、若しくは有害な物質が含まれ、あるいは付着する食品の販売は、食品衛生法第 4 条において禁止されている¹⁾。牛肉中にクレゾールが混入することはまさにこの事例に該当する*¹。著者らは昭和 63 年 6 月末に試料の分析依頼を受け、緊急に牛肉中のクレゾール分析法を確立する必要にせまられた。

クレゾールの分析法にはガスクロマトグラフィー (GC)^{2), 3)}、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁴⁾ などがあるが食肉からのクレゾール抽出並びに分離法に関する報告はほとんど認められない。そこで、著者らはクレゾール化合物の物理化学的性状⁵⁾を考慮し、抽出分離の方法として衛生試験法注解記載の食品添加物・保存料の系統的

試験法⁶⁾の適用を検討した。その結果、良好な分析法が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

クレゾール混入の疑いのある牛ミンチ肉 1 検体及びその肉を用いたハンバーグ 1 検体と昭和 63 年 7~8 月に購入した市販の牛肉 5 検体を用いた。

2. 試薬

ジエチルエーテル、エタノール、アセトニトリル及び無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業(株)製、残留農薬分析用のものを用いた。*o*-, *p*- 及び *m*-クレゾールは東京化成工業(株)製、特級品のもの、塩化ナトリウム、酒石酸及び塩酸は和光純薬工業(株)製、特級品のものを使用した。

3. 装置

GC: 島津製作所(株)製 GC-7AG 及び GC-16A, Hew-

* 大阪府立公衆衛生研究所: 大阪市東成区中道 1-3-69

*¹ 朝日, 読売, 毎日, 日本経済の各新聞: 昭和 63 年 7 月 12 日朝刊。

Table 1. Recovery of Cresol Isomers from Beef

Added (μ g)	Recovery (%)		
	<i>o</i> -Cresol	<i>p</i> -Cresol	<i>m</i> -Cresol
20	85	95	98
100	83	87	91

Values were means of two determinations. The three cresol isomers (20 or 100 μ g portions) were mixed with fifty grams of beef purchased from the market.

lett Packard 社製, 5710A 型 (マススペクトロメトリー (MS) と連結)

MS: 日本電子(株)製 JMA DX-300

データ分析システム: 日本電子(株)製 JMA 3500 (MS と連結)

4. GC 条件

Gas chrom Q (80/100 mesh, Applied Science 社製) に変性ラノリン (10%) をコーティングしたものをガラスカラム (内径 3 mm, 長さ 2.0 m) につめ, これを分離用カラムとして使用した³⁾. カラム温度は 160°, 注入口及び検出器温度は 200° とした. キャリヤーガスは N₂ を用い, 流量を 40 ml/min とした. GC は FID モードで使用した.

5. キャピラリー GC/MS 条件

クレゾールの分離及び定性を行うため, キャピラリーカラム (CURABOND-WAX, 内径 0.32 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m, J & W 社製) を用い, 70° (2 分間定温) から 190° まで昇温 (16°/min) した. GC はスプリットレス方式で使用した. キャリヤーガスは He, 流速は 1 ml/min に調整した. MS は, イオン化電圧 70 eV, EI モードで測定した.

6. 試験溶液の調製

衛生試験法⁹⁾の食品添加物・保存料の系統的試験法⁹⁾に基づいて試験溶液を調製した. 試料 50 g を細切りにし, これに蒸留水 100 ml, 塩化ナトリウム 80 g 及び 15% 酒石酸溶液 5 ml を加え, 水蒸気蒸留を行った. 留液 200 ml (所要時間は約 20 分間) を取り, これに塩化ナトリウム 50 g, 10% 塩酸 5 ml 及びジエチルエーテル 50 ml を加え, 500 ml 容の褐色分液漏斗中で振とう抽出を行った. 1 時間放置した後, この水層を取り, これにジエチルエーテル 50 ml を加え, 更に振とう分離を行った. この操作を再度繰り返した (合計 3 回抽出) 後, ジエチルエーテル抽出液を合わせた. これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後, ガラス漏斗 11G1 を用いてろ過した. ろ液にエタノール 2 ml を加え, これを試験管付きポット (クーデルナ・ダニッシュ濃縮装置の一部) に入れた後, 湯浴 (80° 以下) 中に浸してエーテルを留去した. 溶媒が試験管に残った状態 (約 5 ml) で留去

Fig. 1. Gas chromatograms of cresol isomers and the ground beef extract

a: cresol isomers (each 0.3 μ g)

b: ground beef extract (adjusted to 10 ml)

1: *o*-cresol; 2: *p*-cresol; 3: *m*-cresol

GC conditions: column, 10% denatured lanoline/Gas chrom Q (3 mm i.d. $\times$ 2.0 m); column temp., 160°C; injection temp., 200°C; carrier gas, N₂ (40 ml/min)

を止め, 次に窒素気流を吹きつけて溶媒を除去し, 最終容量 2 ml に調製した. この溶液の 5 μ l (キャピラリー GC の場合は 2 μ l) を GC に注入した.

結果及び考察

GC による *o*-, *p*- 及び *m*-クレゾールの検量線は, 各々 50 から 500 ng まで直線となることが分かった. そこでまず, クレゾールの濃縮時における揮散の有無を調べるため, 各々 100 μ g のクレゾール化合物をジエチルエーテル 150 ml と混ぜた後, これを試験溶液の調製の項と同様の方法で濃縮したところ, 各種クレゾールの回収率は 100% に近いことが分かった. 次に, 水蒸気蒸留による最適留液量を決めるため, クレゾールが混入していないことをあらかじめ確かめた市販牛肉 50 g に各々 500 μ g のクレゾール化合物を添加した後, 試験溶液の調製の項に従って水蒸気蒸留を行い, 一定留液ごとにクレゾール量を測定した. *o*-, *p*- 及び *m*-体は留液 100 ml までに各々 81, 82 及び 85% の留出が認められた. 引き続き留液 50 ml ずつ 250 ml までの留出量を調べたところ, *o*-体: 6.5, 2.7, 1.6, *p*-体: 7.8, 3.4, 2.0 及び *m*-体: 8.3, 3.6, 2.2% の回収率となり, 順次その留出量は減少した. 各種クレゾールを 90% 以上回収するためには留液を 200

Table 2. Concentration of Cresol Isomers in the Ground Beef, Hamburger Containing that Beef, and Other Beef Samples on the Market

	Concentration (ppm)		
	<i>o</i> -Cresol	<i>p</i> -Cresol	<i>m</i> -Cresol
Ground beef	1.6, 1.8	7.3, 8.5	16.8, 18.9
Hamburger	1.2	6.4	14.0
Beef on the market ($n=5$)	all ND*	all ND*	all ND*

* ND: not detected (detection limit: 0.2 ppm).

Fig. 2. Reconstructed ion chromatogram of GC/MS analysis of the ground beef extract

1: *o*-cresol; 2: *p*-cresol; 3: *m*-cresol

GC conditions: column, DURABOND-WAX (0.32 mm i.d.×30 m, film thickness 0.25 μm); column temp., 70°C (2 min)→(16°C/min)→190°C; carrier gas, He (1 ml/min); splitless mode

MS conditions: ionization voltage, 70 eV; EI mode

Fig. 3. Mass spectra of cresol isomers in the ground beef extract

1: *o*-cresol; 2: *p*-cresol; 3: *m*-cresol

GC/MS conditions were the same as those in Fig. 2.

ml 採取すればよいことが分かった。

市販牛肉に各種クレゾールを添加したときの回収率を Table 1 に示す。各々 20 μg のクレゾール化合物を添加したときの回収率は 85~98% であり, 100 μg 添加群では 83~91% となりほぼ良好な結果を得た。なお, 検出限界は 0.2 ppm であった。

Fig. 1 に各種クレゾールの標準品及び牛ミンチ肉の抽出液のクロマトグラムを示す。標準品の保持時間と牛ミンチ肉試料のそれとの比較から, この試料中に各種クレゾールが確認できた。Table 2 には, 牛ミンチ肉, 食べさしのハンバーグ及び市販牛肉の分析結果を示す。牛ミンチ肉と同様にハンバーグにも各種クレゾールが検出された。各種クレゾールの混合比は牛ミンチ肉及びハンバーグにおいてほとんど変わらない値を示した (*o*-体:*p*-体:*m*-体=6:29:65 (牛ミンチ肉中); 6:30:65 (ハンバーグ中))。又, この牛ミンチ肉を冷凍庫 (-20°) に 3 か月間保存した後, 再度分析したところ, その値はほとんど変わらなかった。一方, 市販牛肉 5 検体はすべて検出限界 (0.2 ppm) 以下であった。

Fig. 2, 3 には, GC/MS による牛ミンチ肉試料中のク

レゾール分析結果を示す。試料の Reconstructed ion chromatogram (Fig. 2) から *p*- 及び *m*-体の分離は不十分であるが, この二つの化合物相互の保持時間がわずかに違うことが認められた。各種クレゾール標準品のマススペクトルは, Heller ら⁷⁾によるそれと同様のフラグメントパターンを示すことが分かった。*o*-, *m*-体では親イオン (m/z 108) の相対イオン強度が最も高いが, *p*-体では m/z 107 (M^+-1) のイオンが最大の強度を示した。更に, *o*-体では m/z 77 及び 79 の相対イオン強度と m/z 90 によるそれとはほぼ同程度の値を示したが, *p*- 及び *m*-体では m/z 77 及び 79 に比べ m/z 90 のイオン強度が低いことが分かった。このことは各種標準品と同一の保持時間に当たる牛ミンチ肉試料中のそれぞれの化合物

についても全く同様の結果となった (Fig. 3).

以上述べてきたことから、今回の実験結果は明らかに牛ミンチ肉に各種クレゾールが混入していたことを示している。と畜場においては病死牛肉を識別するためにクレゾールを散布することもあるといわれている。また、これらの牛肉は主にペットフードとして使用されることから、この牛肉が何らかの形で市場に出回った可能性が考えられる^{*2}。クレゾールは国の毒物及び劇物取締法に指定された劇物であり⁸⁾、ラットの経口投与による LD₅₀ 値は各異性体で異なっており、121~242 mg/kg と報告されている⁹⁾。又、ヒトに対する摂取致死量は大人で 1~10 g といわれている^{*1,5)}。今回のハンバーグ 1 個を子供が食べたとしても、クレゾールの総摂取量は 1 mg 以下に過ぎず、大きな影響はないと考えられる。

謝 辞

試料の採取に御尽力いただきました大阪府環境保健部食品衛生課、並びに大阪府吹田保健所の皆様方に、また分析手法などにおきまして種々御助言をたまわりました当所食品化学課及び環境衛生課諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課・乳肉衛生課・食品衛生課編：食品衛生小六法，昭和 60 年版，p. 2~3 (1985) 新日本法規出版。
- 2) Zweig, G., Sherma, J.: "Handbook of Chromatography" Vol. 1, p. 89~91, 93 (1972), CRC Press, Cleveland, Ohio.
- 3) 厚生省生活衛生局食品保健課・乳肉衛生課・食品化学課編：食品衛生小六法，昭和 60 年版，p. 709~711 (1985) 新日本法規出版。
- 4) 液体クロマトグラフ研究会データ集績委員会編：“高速液体クロマトグラフィーデータ集” 2, Data Sheet No. 277, 278, 280, 281 (1980) アイビーシー (株)。
- 5) Windholz, M., ed.: "The Merck Index ninth edition" p. 2,573 (1976) Merck & Co., Inc., Rahway, N. J.
- 6) 日本薬学会編：“衛生試験法注解” p. 298~304 (1980), 金原出版。
- 7) Heller, S. R., Milne, G. W. A.: "EPA/NIH Mass Spectral Data Base" Supplement I, p. 4,021 (1980), National Bureau of Standards, Washington, D. C.
- 8) 武田正三：“わかりやすい毒物・劇物取締法，毒物劇物関係法令集” p. 21 (1985), 薬業時報社。
- 9) Lewis, R. L., Sweet, D. V., ed.: "Registry of Toxic Effects of Chemical Substances 1983~84 Supplement" Vol. 1, p. 679~680 (1985), National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati, Ohio.

*2 朝日，読売新聞：昭和 63 年 9 月 13 日朝刊。