ジアミノベンジジンを使用したカテージチーズ中の ジアセチルの比色定量法について

慶 田 雅 洋*・渋 屋 千 征*・津 郷 友 吉*

乳酸菌の生産する芳香性物質のうち、ジアセチルおよびアセトインの定量法としては、従来はヒドロキシルアミンを使用する PRILL-HAMMER 法¹⁾ が広く用いられて来たが、この方法は操作がきわめて複雑で、多数の試料について迅速に調べるのには不適當である。したがってジアミノベンジジン (化学名 3, 4, 3', 4'-テトラアミノ

使用してジアセチルを定量する方法が PIEN, BAISSE および MARTIN²⁾ によって考案され、のちに BRANDL³⁾⁴⁾ によってバター中のジアセチルの定量に実用化された。この PIEN-BRANDL 法はバター中のジアセチル含量の測定のみを目的としたものであって実験条件もこの目的のために PRILL-HAMMER 法を基準として定められた便宜的なものであり、測定条件についての細かい検討は行なわれていない。したがって本研究ではこの PIEN-BRANDL 法を検討してこれを改良、簡易化し、カテージチーズについて回収試験を行なった結果、良好な結果を得たのでここに報告する。

実験方法

BRANDL のバター中のジアセチルの蒸留装置は第1図に示すとおりである。本研究においては蒸留装置は BRANDL と同一のものを使用した。なお PIEN-BRANDL 法の原文は入手しにくいと思われるので、その概略をつぎに示す。

1. 定量試薬の調製

- (1) 塩酸 (比重 1.19)
- (2) 2% ジアミノベンジジン溶液: ジアミノベンジジン四塩酸塩 $[\text{C}_6\text{H}_3(\text{NH}_2)_2]_2 \cdot 4\text{HCl}$ を使用し、水溶液は必ず使用の直前に調製する。

第1図 BRANDL のジアセチル蒸留装置

2. 定量法

フラスコ A に試料またはその希釈液を 50 ml 入れ、右下のコックを開き炭酸ガスを 5 分間 フラスコ A 中に送り、フラスコ内の空気を置換せしめる。(炭酸ガス発生には KIPP の装置を使うとよい。) 留出液の受け口には 25 ~ 30 ml 容の目盛付き試験管をとりつけ、あらかじめ蒸留水を 5 ml 入れ、留出口が蒸留水に浸るようにしてから蒸留を開始する。原法ではフラスコ B (蒸留水を入れる) の加熱には 250 W のフラスコヒーターを使用しているが、これは油浴またはグリセリン浴加熱により代用することができる。留出速度は最初はゆるく次第に速くなるように調整し、約 20 分間で正確に 15 ml 留出させる。なお蒸留終了間近になると試験管を下げて液面を下降させて留出口の壁にたまった留液を完全に落下させるようにするとよい。留液 (全体で 20 ml になっている) は密栓し、すぐに発色させない場合には冷暗所に保存する。

* 東京大学農学部農芸化学科 (東京都文京区向ヶ丘弥生町)

Colorimetric Determination of Diacetyl in Cottage Cheese by Diaminobenzidine. By MASAHIRO IWAIDA, CHISEI SHIBUYA and TOMOKICHI TSUGO.

なお蒸留装置は使用のたびごとに必ず温水で洗浄するものとする。

比色の際にはジアミノベンジジン溶液を 0.5 ml 添加し、充分混和したのち塩酸を 2.25 ml 加え 366 m μ で比色定量する。また蒸留水 20 ml に塩酸 2.25 ml を混合しジアミノベンジジンを添加したものの吸光値を空試験値とする。

実験の部

1. 試料の pH とジアセチルの留出度

佐々木および田辺⁹⁾は PRILL-HAMMER 法における試料の pH とジアセチルの留出度の関係について検討した結果、ジアセチル水溶液を試料とした場合には、pH 6.5 ~ 6.7 では 98.5% 以上留出され、もっとも回収率が高いが、pH を酸性側あるいはアルカリ性側にずらすと留出度は急激に低下し、pH 5.5 では 80.5%、pH 8.0 では 89.7% になることを認めた。

BRANDL の蒸留装置によりジアセチル水溶液を蒸留し、ジアミノベンジジン法によって定量する際の試料の pH と留出度の関係について調べた結果は第 1 表に示すとおりである。カテージチーズを蒸留水に懸濁したホモゲネートの pH は 4.0 前後であり、またカテージチーズのアセトインを塩化第二鉄でジアセチルに酸化したのちに定量する場合にはその pH は 1.0 付近に下るので、pH 1.0、4.0 および 6.7 のジアセチル溶液を使用してそれらの留出度を比較した。第 1 表の結果から pH を 6.7 に調整した際には、ほぼ 100% のジアセチルが留出されること、および pH を低くしても留出度はほとんど低下せず、pH 1.0 で留出した場合にも 96% 以上の留出度を得られることが確かめられる。

2. 留出区分によるジアセチル含量の変化

PIEN-BRANDL の原法では留出量を 15 ml に定めているが、ジアセチルは留出液を初留、中留、末留の 3 区分に大別した場合にどの区分にもっとも多く含まれるであろうか。この点について調べるために蒸留速度を調節し

第 2 表 留出液の留出区分によるジアセチル含量の変化

留出区分	留出時間蒸留開始後 (分)	試料の pH	ジアセチルの分布* (%)
初 留	0~10	6.7	98.1
中 留	10~16	6.7	1.0
末 留	16~20	6.7	0.9

注: * 3 回の測定の平均値を示す。

て最初の 10 分間、つぎの 6 分間および最後の 4 分間にそれぞれ 5 ml ずつ留出させ、各区分を蒸留水 5 ml に受けて全量を 10 ml にし、ジアミノベンジジン溶液 0.25 ml および塩酸 1.125 ml を加えて比色した結果は第 2 表に示すとおりである。本表より試料のジアセチルの約 98% は最初の 5 ml に含まれることが認められる。

なお別に留出時間を延長して留出量を 25 ml に増加した場合について、留出液中のジアセチル含量を比較した結果、15 ml の場合とまったく異ならないことから、留出量は 15 ml で十分であることも確かめた。

3. 炭酸ガス通気の影響

PRILL-HAMMER 法ではジアセチルを蒸留する前に 5 分間通気するように規定している。BRANDL もこれにならってバターのジアセチルの定量的場合には炭酸ガスを通気するように定めている。しかし炭酸ガス通気がどの程度効果があるかは疑わしい。この点について確めるためにジアセチルを 50 μ g 含む試料について炭酸ガスを 5 分間通気したもの、2 分間通気したものおよび通気しないものについて留出度を比較した。また試料中にアセトインが存在する場合には、フラスコ中の空気が炭酸ガスにより置換されていないときには、空気中の酸素によってアセトインが蒸留中に酸化されてジアセチルに変化して留出することも考えられる。この点についても確かめるためにアセトイン 50 μ g を含む試料について炭酸ガスを通気せずにジアセチルの場合と同じ条件で蒸留した場合について試験した。これらの結果は第 3 表に示すとおりである。第 3 表より炭酸ガスの通気はジアセチルの留出度に全く影響しないことが明らかになった。また空気中の酸素によって試料中のアセトインがジアセチルに酸化されて留出して来る危険性も全く認められない。したがって BRANDL の装置を使用する際には炭酸ガスの通気は、全く無意味であり不必要であると結論される。

4. 色調の安定性

PRILL-HAMMER 法ではジアセチルとヒドロキシルアミンより生成したジメチルグリオキシムが、鉄塩と反応す

第 1 表 試料の pH と留出度の関係

試料のジアセチル含量 (μ g)	試料の pH	留出液の吸光値*	標準液の吸光値*	留出度 (%)
50	1.0	0.239	0.247	96.8
50	4.0	0.236	0.247	95.6
50	6.7	0.248	0.247	100.5

注: * 空試験値との差を示す。いずれも 3 回の測定の前平均値。

第3表 炭酸ガス通気のアセチル留出度に対する影響

通気時間 (分)	試料のアセチル含量 (μg)	試料のアセトイン含量 (μg)	試料の pH	留出液の 吸光度*	標準液の 吸光度*	アセチルの 留出度 (%)
5	50	—	6.7	0.246	0.247	99.6
2	50	—	6.7	0.247	0.247	100.0
0	50	—	6.7	0.246	0.247	99.6
0	—	50	6.7	0.000	0.247	0.0

注：* 空試験値との差を示す。いずれも3回の測定の平均値。

ることによって生じた錯化合物の色調は時間とともに退色する。すなわち佐々木および田辺⁵⁾によると発色後20分間は吸光度は漸減し、20～30分の間はほとんど一定の状態を保ち、30分を過ぎると再び減少し始めるので、発色後20～30分の間は比色すべきであるとしている。

ジアミノベンジジンとジアセチルの反応生成物の吸光度の安定性を調べた結果は第2図のとおりである。吸光度は発色直後より増加して最大に達してのちやや減少し、発色後10～20分で安定し、発色後180分まで調べた結果吸光度はほとんど変化しないことが認められる。したがって比色操作は発色後20～180分の間に行なえばよいことが結論される。

5. ジアセチルの標準曲線および留出曲線の作成

20 ml 中に種々の量のジアセチルを含む水溶液についてジアミノベンジジン法により標準曲線を作成した。また同一量のジアセチルを含む水溶液を pH を 6.7 に調整して蒸留した留出液について、同様にしてジアセチル

第2図 ジアミノベンジジン法における発色後の放置時間の吸光度に与える影響

第3図 ジアミノベンジジン法によるジアセチルの標準曲線および留出曲線

含量を測定して留出曲線を作成した。これらの結果は第3図に示すとおりである。これらの2曲線を比較すると吸光度が0.4以下の場合には、換言すれば試料中のジアセチル含量が75 μg 以下の場合にはジアセチル水溶液の蒸留による誤差はほとんどないことが確かめられた。

6. カテージチーズ中のジアセチルの回収試験

発酵乳製品中のジアセチルの回収試験についてはバター（発酵バター）についてはすでに BRANDL⁴⁾が行っており、BRANDLの装置を使用してジアミノベンジジン法により定量した場合には95.7%、PRILL-HAMMER法の場合には95.8%の値を得ており、バターのジアセチルの回収率は両法とも全く差がないと結論している。したがって本研究においてはカテージチーズを使用してPRILL-HAMMER法およびジアミノベンジジン法によるジアセチルの回収試験を行なった。試験に使用したカテージチーズの製造法の概略を示すと第4図のとおりである。製品をカルトンに包装して2～4℃の冷蔵庫に1週間以上貯蔵したものを試料として使用した。

ジアミノベンジジン法により回収率を測定する場合に

注: 食用に供する目的で製造する場合と異なり加塩およびクリーム添加の操作を省略した。

第 4 図 カテージチーズの製造工程

は、カテージチーズを 25 g 秤量しワーリングブレンダーを使用して蒸留水に懸濁させ、全体が 50 ml になるようにしたものにジアセチル 50 μ g を加えて、BRANDL の装置により水蒸気蒸留したものについてジアミノベンジジン法により吸光度を測定した。また別にカテージチーズのみについて水蒸気蒸留を行なった場合の留液、および水蒸気蒸留を行わないジアセチル水溶液 (ジアセチル 50 μ g を含む) の吸光度も測定し次式により回収率を算定した。

$$\frac{\left(\text{ジアセチル添加カテージチーズ留液の吸光度} \right) - \left(\text{ジアセチル無添加カテージチーズ留液の吸光度} \right)}{\text{ジアセチル水溶液の吸光度}} \times 100 = \text{回収率}(\%)$$

その結果は第 4 表のとおりで回収率の平均は 98.4% であった。なお回収率の標準偏差は $\pm 1.0\%$ であって、これをジアセチル量になおすと $\pm 0.43 \mu$ g になる。なお同

第 4 表 カテージチーズのジアセチルの回収試験

試料番号	ジアミノベンジジン法		PRILL-HAMMER 法	
	吸光度*	回収率(%)	吸光度*	回収率(%)
1	0.242	98.0	0.140	83.8
2	0.246	99.6	0.185	110.8
3	0.246	99.6	0.181	108.4
4	0.243	98.4	0.137	82.0
5	0.244	98.8	0.188	112.6
6	0.244	98.8	0.146	87.4
7	0.242	98.0	0.161	96.4
8	0.238	96.4	0.166	99.4
平均値	0.243	98.4	0.163	97.6
標準偏差	± 0.002	± 1.0	± 0.020	± 11.5

注: * $\left(\text{ジアセチル添加カテージチーズ留液の吸光度} \right) - \left(\text{ジアセチル無添加カテージチーズ留液の吸光度} \right)$

一試料 5 g をとり、ジアセチル 30 μ g を添加して PRILL-HAMMER 法によって回収試験を行なった場合の結果も比較対照のために第 4 表に示した。第 4 表より両定量法によるジアセチルの回収率の平均値は、ともに 97% 以上でよい成績が得られたが、PRILL-HAMMER 法における回収率の標準偏差は $\pm 11.5\%$ でジアミノベンジジン法に比較して 10 倍以上の値となっており測定誤差がきわめて大であることが認められる。試料によっては回収率が 110% の値を示すものもあることより、PRILL-HAMMER 法による比色定量の際には、カテージチーズ中のジアセチル以外のジケトンあるいはケトンなどの呈色に対する影響も考えられるのでこれらの点についてさらに検討してみる必要があるものと考ええる。

7. 市販カテージチーズのジアセチル含量の測定

現在 (1962 年) 国内において製造・販売されているカテージチーズとしては K 社の製品がある。本製品は第 4 図で示した工程によって製造したカテージチーズに約 20% 脂肪のクリームを添加して混和し、脂肪含量が 4% となるように調整したクリーム添加カテージチーズである。本実験では K 社において製造したカテージチーズからクリーム添加直前に試料を採取し、カルトンに詰め 3 日間冷蔵したものを使用して、ジアミノベンジジン法によりジアセチルを定量した。その結果 4.2 ppm の値をえた。これは MATHER および BABEL⁶⁾ が 4 日間冷蔵したカテージチーズについて定量した値 (1.4 ppm) にくらべて高い値を示している。

第5表 ジアミノベンジジン法および PRILL-HAMMER 法の比較 (総括)

項 目	ジアミノベンジジン法	PRILL-HAMMER 法
試 料 の pH	調整不要(強酸性でもよい)	6.5~6.7 に調整
炭 酸 ガ ス 通 気	不 必 要	必 要
蒸 留 時 間(分)	約 20	19~25
留 出 液 量(ml)	15	5
留 出 速 度	関 係 な し	19~25分の間に行なう。速すぎても遅すぎてもいけない。
発 色 操 作	簡単 (ジアミノベンジジン および塩酸を加えるだけで よい)	きわめて複雑, 手間がかかる(85°C に 1 時間放置後, リン 酸二カリウム・アセトン水溶液を添加し, 5 分後に急冷, さらにアンモニヤ水溶液, ロッセル塩水溶液, 硫酸第一 鉄溶液を加え蒸留水で定容とする。)
比 色 の 時 期	発色後 15~120 分	発色後 20~25 分
測 定 波 長 (m μ)	366 (近紫外部)	530 (可視部)
バターのジアセチル 回 収 率 (%)	95.7	95.8
カテージチーズのジ アセチル回収率 (%)	98.4 $\pm$ 1.0	97.6 $\pm$ 11.5

考察および結論

以上実験したジアミノベンジジン法の結果を PRILL-HAMMER 法と比較して見ると第5表のとおりである。ジアミノベンジジン法は試料の pH に影響されないこと, 炭酸ガス通気をする必要のないこと, 留出速度によって結果が影響されないこと, 発色操作が簡単で時間と手間が省けることおよび呈色が長時間安定なことなどの点において PRILL-HAMMER 法よりもすぐれている。ただししいていえばジアミノベンジジンが比較的高価な試薬であること (1963年現在 1g 約 5,500 円) および紫外部の測定可能な光电比色計を必要とすることに難点がある。なお両法の測定精度の点に関しては, バターのジアセチルの回収試験では全く差がないことが報告されているが, カテージチーズの場合は PRILL-HAMMER 法はきわめてバラツキが多く, 測定精度の点においてはるかに劣る。

なお BRANDL の蒸留装置を PRILL-HAMMER の比色法と組み合わせること, あるいは PRILL-HAMMER の蒸留装置とジアミノベンジジン法による比色法を組み合わせることによりジアセチルを定量することも可能である。

要 約

本研究はジアミノベンジジンを使用してジアセチルを定量する PIEN-BRANDL 法について検討し, カテージチーズのジアセチルの定量に応用したものである。ジアセチルの定量法の検討として試料の pH とジアセチルの留出度, 留出区分と留出度, 炭酸ガス通気の影響および色

調の安定性について実験を行なった結果, つぎの方法を確定した。

(1) カテージチーズ 25 g を秤量しワーリングブレンダーを使用して蒸留水に懸濁させ全量を約 50ml とする。

(2) この懸濁液を BRANDL の蒸留装置のフラスコに流し込み, 留出液の受け口には 25~30ml 容の目盛り試験管をとりつけ, あらかじめ蒸留水を 5ml 入れ, 留出口が蒸留水に浸るようにしてから蒸留を開始する。約 20 分間で正確に 15 ml 留出させる。終了間近になると試験管を下げて液面を下降させ, 留出口の壁にたまった留液を完全に落下させる。留液は密セシ, すぐに発色させない場合は冷暗所に保存する。

(3) 留液に 2% ジアミノベンジジン溶液を 0.5ml 添加し, 十分混和したのち塩酸 (比重 1.19) を 2.25ml 加え 15~120 分後に 366 m μ で比色定量する。また蒸留水 20ml に塩酸 2.25 ml を混合しジアミノベンジジンを添加したものの値を空試験値とする。

本法によるカテージチーズのジアセチルの回収率は 98.4 $\pm$ 1.0% であった。なお PRILL-HAMMER 法はカテージチーズのジアセチルの定量には不適当である。

終りに分析用カテージチーズを提供して戴いた協同乳業株式会社東京工場に感謝致します。

文 献

- 1) PRILL, E. and HAMMER, B.W.: *Iowa State Coll. J. Sci.*, **12**, 385 (1938).
- 2) PIEN, J., BAISSE, J. and MARTIN, R.: *Le Lait*, **17**, 673 (1937).

- 3) BRANDL, E.: *Milchwiss. Ber.*, **7**, 85 (1957).
 4) BRANDL, E.: *Neth. Milk Dairy J.*, **13**, 206 (1959).
 5) 佐々木林治郎・田辺幾之助: 未発表.
 6) MATHER, D.W. and BABEL, F.J.: *J. Dairy Sci.*, **42**, 1045 (1959).
 (1963年5月29日受理)

Somogyi 変法による混合糖液 (シヨ糖・ブドウ糖 およびシヨ糖・果糖) 中のシヨ糖の定量について

江 島 信 昭*・平 田 洋 子*

著者らは食品とくに菓子類の糖の分析を迅速にしかも正確に行なうために、Schaffer-Somogyi 法¹⁾を半微量化した Somogyi 変法²⁾³⁾をシヨ糖の定量に応用し、これを検討した。

菓子類中にはシヨ糖が単独で存在することは考えられず、多少ともブドウ糖・果糖などが混在していると考えられる。Schaffer-Somogyi 法では還元糖と還元された亜酸化銅との間に直線関係の存することに着目し、これをシヨ糖の定量に応用した。またこの結果から混合糖液 (シヨ糖・ブドウ糖およびシヨ糖・果糖) について定量を行なったところ、シヨ糖を基準として求めた各単一糖類の値は、採取量よりも4~6%の低下が認められた。この原因としてシヨ糖の加水分解により生成した単糖がさらに分解したものと推定し、加水分解によりさらに2次的に各糖類が分解するか否かをペーパークロマトグラフィーにて検索した。果糖の分解については、すでに麻生・渡辺⁴⁾、小曾戸ら⁵⁾により検討され、果糖の分解物の主たる物質が5-hydroxy-methylfurfuralであり、その一部がさらにレブリン酸になることを報告している。この報告中、総転化糖定量の条件、すなわち0.1%塩酸、30分間沸騰水浴中での加熱では、ペーパークロマトグラフィーで果糖の分解物は認められなかったとしている。著者らは、混合糖液の定量を検討したところ、分析値が減少することから、0.729%(N/5)塩酸、30分間沸騰水浴中加熱の条件においても、糖の分解が起こるものと想定し、シヨ糖・ブドウ糖およびシヨ糖・果糖混合液の

0.729%(N/5)塩酸、30分間沸騰水浴中加熱 (以下この条件を総転化糖定量の条件とした) の試料について、ペーパークロマトグラフィーを行ない、それぞれ R_f 0.75~0.80, および R_f 0.12 に2つのスポットが認められたので、以上の結果を取りまとめて報告する。

実 験

1. シヨ糖の定量

(1) シヨ糖を定量するための係数 (Si) (シヨ糖が0.05 N チオ硫酸ナトリウム溶液 1 ml に相当する量) の決定。

各種糖類 (グルコース、マルトース、キシロース、フラクトース) の係数 S についての検討は、すでに行なわれているが³⁾、確認のためグルコース、フラクトースについて再検討した。使用した係数は、グルコース 1.449, フラクトース 1.49 で、定量値の変動は、それぞれ2%以内であった。したがって、この係数は十分信頼できるものであった。つぎにシヨ糖について検討した結果は以下のようであった。

i) シヨ糖の精製: 明治製糖製グラニ ュ 糖 (商品名 MZ) を2回再結したものを用いた。この結晶の直接還元糖を Ofner 法⁶⁾にて求めたところ3mg%であったので、この結晶は純粋なものとして分析に供した。

ii) シヨ糖の加水分解および定量

i) の試料約1gを精秤し、蒸留水70gに溶解させ、沸騰水浴中に10分間放置後、0.729%(N/5)塩酸、

* 栄太楼食品工業株式会社 (東京都調布市仙川町2-6)

On the Determination of Sucrose in Sugar Solution Including Sucrose and Glucose or Fructose by Modified Somogyi Method. By NOBUAKI EJIMA and YOKO HIRATA.