γ線照射によるトリメチルアミンオキシドからの 揮発性アミン生成について (第2報)

共存金属イオンおよびタンパク質の影響

(昭和 50 年 10 月 7 日受理)

内山 貞夫* 近藤 竜雄* 内山 充*

Studies on the Formation of Volatile Amines from Trimethylamine Oxide by γ-Irradiation (II)

Influence of Co-existing Metal Ions and Protein

Sadao UCHIYAMA, Tatsuo KONDO and Mitsuru UCHIYAMA

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

The fundamental investigation concerning the formation of volatile amines from trimethylamine oxide (TMAO) by γ-irradiation was carried out as a model of the irradiation of fish-meat products like Kamaboko.

By the irradiation of 5.8 Mrad, 5×10^{-6} mol of dimethylamine (DMA) was produced from 1×10^{-4} mol of TMAO in a phosphate buffer (pH 6.5). Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} and Al^{3+} promoted the formation of amines but Ca^{2+} , Mg^{2+} and Na^{+} scarcely affected it. On the other hand, cysteine, which is known as a protecting agent against γ-ray, promoted the formation of DMA. However, protein worked repressibly for amine formation even when Fe^{3+} was contained.

(Received October 7, 1975)

前報¹⁾においてアンモニアおよび揮発性アミンの簡便な分離定量法を報告した。今回はこの分析法を用い、γ線照射による魚肉成分の変質を検討する基礎実験の一つとしてトリメチルアミンオキシド (TMAO) の水溶液を照射した場合に生ずるアミン類のより詳しい知見と照射効果に大きな変動をもたらすと考えられる金属イオンおよびタンパク質の影響について調べた。

実験方法

1. 試薬

TMAO: 東京化成(株)製, 試薬1級品を使用。

塩化アンモニウムおよびアミン塩酸塩: 塩化アンモニウム, トリメチルアミン (TMA), ジメチルアミン (DMA) およびモノメチルアミン (MMA) 各塩酸塩は市販試薬特級品。各標準溶液は塩化アンモニウムおよびアミン塩酸塩の水溶液を使用。

ダンシルクロライド溶液 (DNSCl: 1-dimethylamino-

naphthalene-5-sulphonyl chloride): 生化学工業(株)製試薬をアセトン (特級品を蒸留精製する) に溶かし 1% 溶液とする。密せんして -20° の冷凍庫に保存すれば 1 か月以上使用可能。

リン酸塩緩衝液: 1/15M リン酸一カリウム水溶液と 1/15M リン酸二ナトリウム水溶液より pH 6.5 に調整。

トリクロル酢酸 (TCA): 市販試薬特級品。

カゼイン: 市販試薬, 大豆製。

有機溶媒: 市販試薬を蒸留精製して使用。

なお TMAO, 塩化アンモニウムおよびアミン塩酸塩は塩化カルシウム入りデシケーターで乾燥したものを使用。

2. 装置

コバルト 60 γ線照射装置: (株)日立製作所製コバルト 60照射装置, 線源 166 Ci, 実験に際しての線量率は 12.09 krad/hour であり, その測定は硫酸第一鉄を用いる Weiss らの方法²⁾に従った。

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

けい光デンストメータ: 明日香工業(株)製, 自記濃度計, OZUMA, SD-92 型 (けい光測定付属品付)。

ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製ガスクロマトグラフ, GC-6A型 (水素炎イオン化検出器付)。Conway 微量拡散装置: 柴田化学(株)製, 微量拡散分析器, 標準ユニットを使用。

3. γ 線照射

せん付き試験管 (内径 10 mm, 長さ 85 mm, 5 ml 用) に各実験に応じた試料液を入れ密せんし, ^{60}Co 線源直下放射状に横倒しに設置し, 毎分 2 回のスピードで回転させながら必要線量を照射した。試料液の pH は一般的な食品の pH を考慮してリン酸塩緩衝液 pH 6.5 にした。

なお試験管はガラスによる影響を少なくするために, あらかじめ γ 線で空照射しかつ色化したものを使用した。

4. アンモニアおよび揮発性アミンの分析

試験溶液の調製はタンパク質を含まない試料溶液をそのまま試験溶液とし, 照射効果に対するタンパク質の影響を調べる場合は γ 線照射されたカゼイン水溶液 (0.3~6.3%濃度) 3 ml に 10% TCA 溶液 2 ml を加え TCA の最終濃度 4% として 30 分放置後ろ過し, ろ液 1 ml を試験溶液とした。

アンモニアおよび揮発性アミンの定量は前報に記述されたとおりに行い, 試料溶液中の含量を求めた。なおタンパク質の影響を調べる場合の試料溶液 3 ml 中の含量は試験溶液 1 ml 中の含量を 5 倍して求めた。

実験結果

1. TMAO 水溶液の照射によるアミン生成

TMAO はリン酸塩緩衝液 pH 6.5 に溶解したものを使用し, γ 線の線量は 5.8 Mrad まで照射した結果, アンモニア, MMA, DMA および TMA が生成され, いずれも線量に比例して生成量が増す傾向にあった。なかでも DMA は他の 3 者よりも大きい値を示し, 線量 5.8 Mrad で 1×10^{-4} mol の TMAO から 5×10^{-6} mol の DMA が生成された (Fig. 1)。

2. 金属イオンの影響

2.1. 金属イオン濃度とアミン生成量

TMAO 水溶液の照射に対する共存金属イオンの影響を調べるために, まず食品中に比較的多く含まれる Fe^{2+} , Fe^{3+} および Ca^{2+} イオンについて金属イオン濃度とアミン生成量の関係を調べた。その結果, いずれも 5.8 Mrad で照射したところ, 低濃度では明らかな影響は観察されないが, 金属イオンが増加するに従い Fe^{2+} では DMA および TMA が増加し, Fe^{3+} では DMA のみが増加した。一方 Ca^{2+} はほとんどアミン生成量に影響を与えなかった (Fig. 2)。

2.2. 金属イオンの種類とアミン生成

共存金属イオンの種類によってアミン生成量がどのように変わるかを調べるために, 金属イオンの 5×10^{-5} mol を添加し, 5.8 Mrad 照射する際に生ずるアンモニアおよびアミンの生成量を調べた。

まず Table 1 は金属イオン無添加の TMAO 水溶液の照射に対して各種金属イオンを添加した場合に生成するアンモニアおよび揮発性アミン量の違いを表した。また Table 2 はこれら金属イオンを含む TMAO 水溶液

Fig. 1. Formation of ammonia and amines from an aqueous solution of trimethylamine oxide (TMAO) by γ -irradiation

○, ammonia; ×, monomethylamine (MMA); ●, dimethylamine (DMA); △, trimethylamine (TMA).

Three ml of the solution containing 1×10^{-4} mol of TMAO in a phosphate buffer, pH 6.5, was irradiated.

Fig. 2. Effect of metal ions on the formation of ammonia and amines from TMAO by γ -irradiation

○, ammonia, ×, MMA; ●, DMA; △, TMA.

Three ml of the test solution containing 1×10^{-4} mol of TMAO and various amount of metal ion in a phosphate buffer, pH 6.5, was irradiated by 5.8 Mrad of γ -ray.

Table 1. Effect of Metal Ions on the Formation of Ammonia and Amines from TMAO by γ -Irradiation

Addition	Amount of product (10^{-6} mol)			
	TMA	DMA	MMA	Ammonia
Control	1.96	5.00	1.50	2.30
Fe ²⁺	6.40	11.88	1.04	0.31
"	6.36	10.86	1.00	0.41
Fe ³⁺	2.56	16.76	1.48	0.24
"	2.40	16.70	1.28	0.36
Zn ²⁺	6.04	12.95	3.20	1.80
Al ³⁺	5.04	13.47	1.65	0.61
Ca ²⁺	0.77	4.92	1.60	1.33
Mg ²⁺	0.17	2.51	0.80	1.04
Na ⁺	0.26	3.26	1.56	1.31

Three ml of the solution containing 1×10^{-4} mol of TMAO and 5×10^{-5} mol of metal ion (metal chloride) in a phosphate buffer, pH 6.5, was irradiated by 5.8 Mrad of γ -ray. Control does not contain a metal ion in the solution.

Table 2. Formation of Ammonia and Amines from TMAO without γ -Irradiation by Co-Existing Metal Ion

Addition	Amount of product (10^{-6} mol)			
	TMA	DMA	MMA	Ammonia
Control	0	0	0	0
Fe ²⁺	9.30	3.52	0	0
"	8.99	4.00	0	0
Fe ³⁺	0	0	0	0
"	0	0	0	0
Zn ²⁺	0	0	0	0
Al ³⁺	0	0	0	0
Ca ²⁺	0	0	0	0
Mg ²⁺	0	0	0	0
Na ⁺	0	0	0	0

Three ml of the solution containing 1×10^{-4} mol of TMAO and 5×10^{-5} mol of metal ion (metal chloride) in a phosphate buffer, pH 6.5, was allowed to stand without γ -irradiation for the same period as in Table 1. Control does not contain a metal ion in the solution.

を照射することなしに Table 1 と同条件で照射に要した時間だけ放置した結果である。

以上のことから金属イオンを添加しないものと比較して照射によって DMA などアミン生成量の多いものは Fe²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ および Al³⁺ を添加した場合であり, Ca²⁺, Mg²⁺ および Na⁺ はほとんど同じ値または少ない値を示した。ただし Fe²⁺ は未照射のものでもその還元作用のためか DMA および TMA が生成した。

3. システインの影響

還元作用を示す Fe²⁺ がアミン生成を促進することから, 同様に還元作用を示すアミノ酸, システインを添加し TMAO 水溶液の照射によるアミン生成にどのような影響を与えるかを調べた。

その結果 Table 3 に示すようにシステインは DMA 生成を促すことが分った。また未照射のものは若干ながら DMA を生成するが, Fe²⁺ に比べて低い値を示した。

Table 3. Effect of Cysteine on the Formation of Ammonia and Amines from TMAO by γ -Irradiation

Addition	Amount of product (10^{-6} mol)			
	TMA	DMA	MMA	Ammonia
Irradiation				
Control	1.96	5.00	1.50	2.30
Cysteine	1.17	10.20	1.77	8.57
"	0.73	11.18	1.37	9.33
Non-irradiation				
Control	0	0	0	0
Cysteine	0	0.41	0	0
"	0	0.46	0	0

Three ml of the solution containing 1×10^{-4} mol of TMAO and 5×10^{-5} mol of cysteine in a phosphate buffer, pH 6.5, was irradiated by 5.8 Mrad of γ -ray. Control does not contain cysteine in the solution.

4. タンパク質の影響

TMAO 水溶液の γ 線照射に際しシステインが DMA 生成を促進することから、タンパク質が共存した場合のアミン生成に対する影響を調べた。

1×10^{-4} mol の TMAO を含む溶液 3 ml にタンパク質として大豆製カゼインを0.3~6.3%の濃度で添加し検討したが、タンパク質の濃度が増加するに伴って DMA の生成量は減少した。しかし TMA 量はこの濃度範囲ではほとんど変動がなかった。

一方、Fe イオンとして食品中に比較的多く存在する Fe^{3+} (5×10^{-5} mol) がタンパク質とともに共存するとき、タンパク質は DMA の生成を促す Fe^{3+} の存在にもかかわらずタンパク質の濃度が増すに従い DMA の生成

量を減少させた。しかし TMA の生成量は低濃度のタンパク質の存在で増加してカゼインの濃度 1% 前後でピークに達し、その後は漸次減少した (Fig. 3)。

MMA およびアンモニアの生成はタンパク質のみ添加の場合とタンパク質および Fe^{3+} 添加の場合とを比べてほとんど差がなく同様な結果を示した。すなわち MMA はタンパク質の濃度が増加するとともに減少し、アンモニアはタンパク質が γ 線照射によって分解し生ずるためタンパク質の濃度が増加するに従い増大した。

なおカゼイン水溶液を照射したものからは MMA, DMA および TMA は検出しなかった。

考 察

TMAO 水溶液の γ 線照射によって生ずるアミンについての基礎実験として金属イオンおよびタンパク質の影響を調べた結果、種々の知見を得た。

TMAO 水溶液の照射によるアミン生成について、添加した TMAO のモル数に対して約10%モル数の揮発性塩基窒素化合物を得るのに照射線量 5.8 Mrad を必要としたが、このことは TMAO が水溶液中で照射によって容易にアミンを生成しないことを示唆している。

さらに DMA の生成量が他のものより大きい値を示したが、この事実からただちに TMAO の照射分解が酵素³⁾ および非酵素触媒⁴⁾ による分解と同様に主に脱ホルミルによって行われ DMA 生成がなされているとは言い切れず、今後 TMAO の照射によるラジカル反応について検討を加えねばならないと考える。

金属イオンの影響について、アミン生成に明らかな影響を与える金属イオン濃度は一般に高いものと考えられる。例えば食品中に比較的多量に存在する Fe^{3+} は 900 ppm 以上存在するときに影響が見られた (Fig. 2)。

しかしながら、本実験において興味ある事実は、第一に金属イオンの種類によって DMA などのアミン生成に

Fig. 3. Effect of protein on the formation of amines from TMAO by γ -irradiation —, with Fe^{3+} ; ----, without Fe^{3+} .

Three ml of the solution containing casein and 1×10^{-4} mol of TMAO was irradiated by γ -ray of 5.8 Mrad. Amount of Fe^{3+} was 5×10^{-5} mol.

対する影響がかなり異なること、第二に一般にラジカル吸収剤として照射効果を減少させる Fe^{2+} やシステインが TMAO から DMA を生成させる場合に逆に増加させるという現象であり、今後とも検討すべき点であると考え (Table 1, 3).

タンパク質の影響は濃度が増すに従って γ 線照射による TMAO からの DMA 生成が減少し、実際の魚肉ねり製品 (カマボコなど) のようにタンパク質濃度が非常に高い場合は、さらに DMA 生成は抑制されるものと推定される。またタンパク質は DMA 生成を促す Fe^{3+} が存在しても同様に DMA 生成を抑制する傾向を示したが、それに反して TMA 量は増加しタンパク質 1% 濃度の前後でピークを示した。これはタンパク質の低い濃度で若干加水分解が促され、その分解物が還元的作用をして TMAO から TMA を生成させたものと考えられる。しかも TMA は他のアミンよりも生成量は大きく品質的な意味で臭気の劣化の原因になる可能性を含んでいた (Fig. 3).

以上金属イオンおよびタンパク質の影響について述べたが、本実験はモデル実験であることから高い線量で照射効果を観察したり、金属イオンも多量に加えて影響を調べたために実際の照射食品への直接比較は不可能かもしれない。またカマボコなどのタンパク質濃度の高いものは DMA 生成が少ないように推定されるが、他の因子が存在しないことは言い切れず、今後は実際のカマボコなど魚肉ねり製品について γ 線照射を行った際の DMA および他のアミンの生成を検討する予定である。また本実験に用いた γ 線は線源が小さいのでさらに大きな線源で短時間照射することも必要と考えられる。

ま と め

1. トリメチルアミノオキシド (TMAO) 水溶液の γ 線照射によるアミン生成に関して金属イオンおよびタンパク質の影響を調べた。

2. γ 線照射による TMAO 水溶液 (リン酸塩緩衝液, pH 6.5) からのアミン生成は照射量に比例して増加し、なかでもジメチルアミン (DMA) がもっとも高い値を示した。ただし 1×10^{-4} mol の TMAO から 5×10^{-6} mol の DMA を得るのに 5.8 Mrad の γ 線照射を必要とした。

3. 金属イオンの影響について、DMA などアミン生成を促進するものは Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} および Al^{3+} があり、影響の少ないものは Ca^{2+} , Mg^{2+} および Na^{+} があつた。ただし Fe^{2+} はその還元作用のためか未照射のものでも TMA および DMA を生成させた。

4. 一般にラジカル吸収剤として照射効果を減少させるシステインは TMAO から DMA を生成する際には逆に増加の現象を示した。

5. タンパク質は DMA 生成を抑制し、 Fe^{3+} が共存する場合でも抑制する傾向にあつた。

本研究の費用は国立機関原子力試験研究費によつた。

文 献

- 1) 内山貞夫, 近藤竜雄, 内山 充: 食衛誌. **17**, 345 (1976).
- 2) 日本分析化学会編: “新分析化学講座 4, 放射化学分析法” p. 235, (1959) 共立出版.
- 3) 原田勝彦: 水産大学校研究報告, **23**, 163 (1975).
- 4) Craig, C.J., Dwyer, F.P., Horning, E.C.: J. Am. Chem. Soc., **83**, 1871 (1961).