ガスクロマトグラフィーによる鮮魚介類並びにその加工品の揮発性アミン及びアンモニアの定量^{*1}

(昭和 58 年 10 月 26 日受理)

外海 泰秀^{*2} 伊藤 誉志男^{*2} 原田 基夫^{*2}

Determination of Volatile Amines and Ammonia in Raw Fish and Fish Products by Gas Chromatography

Yasuhide TONOGAI, Yoshio ITO and Motoo HARADA

(National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch: 1-1-43, Hoenzaka, Higashi-ku, Osaka, Japan)

A separative determination method for monomethylamine, dimethylamine, trimethylamine and ammonia in raw fish and fish products was developed by head space gas chromatography. The three amines in potassium hydroxide solution (50%) were volatilized by heating. Ammonia in acetate buffer (pH 3.5) was reacted with chloramine T and then heated for volatilization. The amounts of the three amines and ammonia in raw fish after various storage periods were determined, and a rapid increase of trimethylamine and ammonia was observed after 24 hrs at room temperature. Ammonia as a percentage of total volatile compounds was in the range of 86.4~98.8% in raw fish and 48.3~93.9% in dried fish products. Total volatile compounds (A) determined by head space gas chromatography and (B) determined by Conway's method were compared. The ratios A/B ranged between 1.0 and 1.2 in raw fish and between 1.2 and 1.7 in dried fish products, i.e., the amounts found by gas chromatography were rather higher than those by Conway's method.

(Received October 26, 1983)

Key words: モノメチルアミン monomethylamine; ジメチルアミン dimethylamine; トリメチルアミン trimethylamine; アンモニア ammonia; ヘッドスペース-ガスクロマトグラフィー head space gas chromatography; コンウェイ法 Conway's method; 鮮魚 raw fish

緒 言

魚介類の鮮度、腐敗度を調べる理化学的方法には、揮発性塩基窒素、トリメチルアミン (TMA)、アンモニアなどを測定する方法がある。揮発性塩基窒素の定量にはコンウェイの装置を用いる微量拡散法¹⁾があり、TMAの定量には、微量拡散後又は水蒸気蒸留後溶媒抽出しガスクロマトグラフィー (GC) で定量する方法^{2), 3)}などが報告されている。

しかし微量拡散法では拡散操作に長時間を要すると共に個々のアミン類を分別できず、水蒸気蒸留法では操作中の損失もあり、通常の GC ではアミンのテーリング及び溶媒の妨害⁴⁾を防止する工夫が必要である。

またアンモニアの定量にはピリジン・ピラゾロン法⁵⁾、インドフェノール法⁶⁾などの比色法や熱伝導度形検出器 TCD、高周波誘導加熱方式 FTD による GC* がある。しかし比色法では共存成分の影響があり、GC では測定感度が不十分である。

著者らは魚介類の鮮度を調べるための指標として揮発性のモノメチルアミン (MMA)、ジメチルアミン (DMA) 及び TMA を選び、さらにアンモニアを含めて

*1 食品の腐敗に関する研究 (第2報)

*2 国立衛生試験所大阪支所: 大阪市東区法円坂 1-1-43

* 島津アプリケーションニュース No. 18

これらを簡単・迅速に、しかも同時に定量して総合的に鮮度の判定をする方法について検討した。

実験方法

1. 試料

鮮魚介類としてサバ、イワシ、アサリ、小エビ、加工品として煮干し、ひらごちりめん、さきいか、干たら、干にしん、干かわはぎ、たらこを市場より購入し用いた。

2. 試薬

MMA, DMA, TMA の塩酸塩及び塩化アンモニウムは、和光純薬工業(株)製、クロラミンTは半井化学薬品(株)製のそれぞれ試薬特級を用いた。

MMA 標準溶液: MMA 塩酸塩 0.676 g を 0.1 N 塩酸に溶かして 1,000 ml とした。この液 1 ml は 10μ モルの MMA を含む。

DMA 標準溶液: DMA 塩酸塩 0.816 g を 0.1 N 塩酸に溶かして 1,000 ml とした。この液 1 ml は 10μ モルの DMA を含む。

TMA 標準溶液: TMA 塩酸塩 0.956 g を 0.1 N 塩酸に溶かして 1,000 ml とした。この液 1 ml は 10μ モルの TMA を含む。

アンモニア標準溶液: 塩化アンモニウム 0.535 g をとり、水で 1,000 ml とした。この液 1 ml は 10μ モルのアンモニアを含む。

クロラミンT溶液: クロラミンT三水合物 112.7 g を水に溶かして 1,000 ml とした。この液 1 ml はクロラミンT 400μ モルを含む。

酢酸緩衝液: 3 M 酢酸と 3 M 酢酸ナトリウム溶液で pH 3.5 に調整した。

ホウ酸吸収剤: ホウ酸 10 g を 1 L の共栓メスシリンダーにとり、これにアルコール 200 ml を加えて溶かし、さらに 0.066% メチルレッド・ブロムクレゾールグリーン混合指示薬 10 ml を加えて定容とした。

3. 装置

ヘッドスペース用試験管: 内径 1.5 cm, 長さ 10 cm, 容量約 15 ml の試験管にシリコン製のゴムキャップを装着した。

ガスクロマトグラフ: 島津製作所(株)製, GC-7AG 型, 水素炎イオン化検出器及びフレームサーミオニックディテクタ付。

カラム: Chromosorb 103 (60~80 mesh), 3.2 mm ϕ $\times$ 2.6 m。

コンヴェー装置: 柴田化学(株)製, 微量拡散分析器, 標準ユニットを使用した。

冷却遠心機: (株)日立製作所製, 18PR-3 型

4. 分析操作

4-1 試験溶液の調製

試料の可食部を細切し、その 10 g と 10% トリクロル酢酸溶液 40 ml をブレンダーカップにとり、氷冷しながら

ら 1 分間ホモジナイズし、除タンパクと抽出を行う。氷冷しながら 30 分間放置後、 10° に設定した遠心機を用い、8,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上澄液を分取する。残渣に 10% トリクロル酢酸溶液 40 ml を加え、再び同様に操作し上澄液を合わせ、5 N 水酸化カリウム溶液で pH 5 に調整後水で 100 ml の定容とし試験溶液とした。

4-2 MMA, DMA, TMA の定量法

あらかじめ 50% 水酸化カリウム溶液 3 ml を入れ 60° に保持したヘッドスペース用試験管に、シリコン栓を通して試験溶液 1 ml を注射器で入れる。試験管を 60° の水浴中で 5 分間加熱した後激しく振り混ぜ、そのヘッドスペース部の気体 1 ml をシリコン栓を通してマイクロシリンジで取り、ガスクロマトグラフに注入した。

4-3 アンモニアの定量法

あらかじめ試験溶液 1 ml と酢酸緩衝液 3 ml を入れ 60° に保持したヘッドスペース用試験管に、シリコン栓を通してクロラミンT溶液 1 ml を注射器で入れる。試

Fig. 1. Gas chromatogram of volatile amines and ammonia by head space method

GC conditions, column: Chromosorb 103 (3.2 mm ϕ $\times$ 2.6 m)

temperature: C.T. 120°C , I.T. 220°C

flow rate: nitrogen 25 ml/min

(), μ mole/tube

Fig. 2. Effects of alkaline media and their concentration on volatilization of TMA, DMA, MMA and NH₃.

—○— KOH TMA, DMA, MMA, 10 μ mole/tube GC sensitivity, $10^{-3} \times 1/4$

—●— K₂CO₃ NH₃, 1,000 μ mole/tube Sens. $10^{-2} \times 1/4$

Three ml of alkaline solution and 1 ml of sample solution were heated at 60°C, 5 min. One ml of the head space was injected into GC.

験管を 60° の水浴中で 15 分間加温した後激しく振り混ぜ、そのヘッドスペース部の気体 1 ml をシリコン栓を通してマイクロシリンジで取り、ガスクロマトグラフに注入した。

4-4 微量拡散法による揮発性塩基窒素の定量

コンヴェーユユニットの内室にホウ酸吸収剤 1 ml を入れ、外室に試験溶液 1 ml 及び 50% 水酸化カリウム溶液 1 ml を入れ、ただちにフタをして 25° で 2 時間放置した。その後内室の吸収液を 0.02 N 硫酸で滴定した。

実験結果及び考察

1. MMA, DMA, TMA 及びアンモニアの GC 条件の検討

試料から抽出した揮発性アミン及びアンモニアを、簡易な操作でしかも妨害成分の影響の少ないヘッドスペース・GC 法で分別定量する至適条件について検討した。各揮発性アミン及びアンモニアの標準溶液をアルカリ性で少時加温した後、ヘッドスペース法で測定した GC チャートを Fig. 1 に示した。

アンモニアは空気ピークのすぐ後に出て感度が非常に低い、揮発性アミンは MMA, DMA, TMA の順に現われ、その感度は TMA > DMA > MMA の順に大きかった。その他の揮発性アミンではジエチルアミンが R_f

20 分に出る程度で、*n*-プロピルアミン、*n*-ブチルアミンなどはいずれも R_f が大きくピークもテーリングした。

食品の腐敗過程においては上記 3 種以外のアミンが生成される可能性は少ない⁷⁾ ので、本報では MMA, DMA, TMA さらにアンモニアを定量することにし、これらの定量条件について検討した。

2. MMA, DMA, TMA 及びアンモニアの気化条件の検討

2-1 アルカリ溶液の検討

従来コンヴェーユ法を用いる揮発性塩基窒素の気化には 25% 水酸化カリウム溶液⁵⁾、50% 炭酸カリウム溶液¹⁾、飽和炭酸カリウム溶液⁸⁾ などが使用されている。

著者らは各種濃度の炭酸カリウム溶液又は水酸化カリウム溶液に 3 種の揮発性アミン及びアンモニアを別々に加え、少時加温後ヘッドスペース法でガスクロマトグラフに注入した時のそれぞれの気化効率を比較した。

TMA では両アルカリ溶液に大差は見られないが、DMA, MMA 及びアンモニアでは水酸化カリウム溶液の方がこれらの気化効率のよいことがわかった。従ってアルカリとしては 50% 水酸化カリウム溶液を用いることにした。なおヘッドスペース用試験管に入れるアルカ

Fig. 3. Effect of temperature on volatilization of TMA, DMA, MMA and NH₃

Note: Three ml of 50% potassium hydroxide solution and 1 ml of prepared solution were heated in a water bath for 10 min.

Fig. 4. Calibration curves of TMA, DMA, MMA and NH₃ determined by head space method

り量は、試験溶液 1 ml に対して 3 ml が適当であった。

2-2 加温条件の検討

3種の揮発性アミン及びアンモニアの気化効率に及ぼす水浴の加温条件を検討した。水浴温度と各化合物のGC上ピーク高との関係を求め、Fig. 3に示した。

水浴温度が高まるほど各アミン及びアンモニアのピークは高くなったが、60°以上では内圧のため栓が飛ぶので加温は60°と定めた。また加温時間は5分で各ピークは一定となったので、反応液は60°、5分間加温することにした。

3. ヘッドスペース法による検量線

今までに定めた条件での検量線をFig. 4に示した。

各アミンの検量線は0.05~0.25 μmole/tubeの範囲で良好な直線性を示し、測定の繰返し精度は8.5%以下であり、検出限界は0.1 μmole/sample (g)であった。またアンモニアについての検量線範囲は200~1,000 μmole/tubeとなり、感度は上記のアミン類に比し極めて低いことがわかった。

一方、窒素に特異的な感度を示すFTD-GCを使用し、3種のアミンを測定すると感度は約100~200倍高くなった。しかしFTD-GCでもアンモニアの感度は依然として低く、試料から定量するには何らかの方法で測定感度を上げる必要があった。

Fig. 5. Effect of pH of acetate buffer on formation of the compound from ammonia treated with chloramine T

Note: Three ml of acetate buffer, 1 ml of ammonia solution (10 μmole/tube) and 1 ml of 1% chloramine T solution were mixed and heated at 60°C, 10 min.

4. アンモニア誘導体の生成

アンモニアの比色定量法において敝本らは⁵⁾、アンモ

Fig. 6. Effect of conc. of chloramine T on formation of the compound from ammonia
Note: Concentration of ammonia is 10 μ mole/tube.

ニアとクロラミンTの反応物を四塩化炭素で抽出し、ビスピラゾロンと反応させ比色定量している。また田中*はシアンをクロラミンTと反応させ、ヘッドスペース法でクロルシアンを感度よく測定している。

著者らは敝本らの原理に従ってアンモニアにクロラミンTを加熱下で反応させ、その反応物を直接ヘッドスペース法で定量することを試み、その測定至適条件を検討した。

アンモニアを各種 pH (2.5~6.0) の酢酸緩衝液と混和し、さらにクロラミンTを作用させ試験管内のヘッドスペースをガスクロマトグラフに注入し、ピーク高とpHとの関係を調べたところ、Fig. 5に示したように反応液のpHが3.0~3.5でピークは最高となった。また試験溶液1mlに対して酢酸緩衝液の濃度は3M、その容量は3mlが適当であった。なお酢酸以外の緩衝液を用いても、アンモニア誘導体のピークはガスクロマトグラムに現われなかった。

次にアンモニアとクロラミンTの反応における両者の量的関係を調べた。アンモニア10 μ mole/tubeに対してクロラミンT量を変化させた時のガスクロマトグラムのピーク高を比較し、Fig. 6に示した。

クロラミンT濃度が30 μ mole/tube以上でピーク高は一定となった。すなわちアンモニア1moleに対してクロラミンTは3mole反応するものと考えられ、従って生成する化合物はアンモニアのトリクロル置換体であろうと推察された。なお生成物の気化効率に及ぼす水浴の加温条件は、温度を高めるほどGC上のピークは高く

Fig. 7. Gas chromatogram of ammonia treated with chloramine T by head space method
GC condition, column: Chromosorb 103 (3.2mm ϕ ×2.6m) temperature: C.T. 120°C, I.T. 220°C, flow rate: nitrogen 25 ml/min (), μ mole/tube

* 田中康夫, 木川寛, 河村太郎: 日本食品衛生学会第34回学術講演会要旨集, p. 32

Table 1. Recoveries of TMA, DMA, MMA and NH_3 from Raw Marine Foods

Compound	Added $\mu\text{mole}/$ sample (g)	Found: $\mu\text{mole}/\text{sample (g)}$ (Recovery*%)		
		Mackerel	"Asari"	Shrimp
TMA	0	0.15	0.18	0.10
	1.0	1.13 (98.0)	1.15 (97.4)	1.08 (98.5)
DMA	0	0	0	0
	1.0	0.92 (92.0)	0.93 (93.0)	0.93 (93.0)
MMA	0	0	0	0
	2.5	2.35 (94.0)	2.32 (92.8)	2.34 (93.6)
NH_3^{**}	0	8.9	5.0	6.5
	10.0	18.1 (92.0)	14.4 (94.0)	16.8 (93.0)
	100.0	104.9 (96.0)	100.6 (95.6)	101.8 (95.3)

* average of three trials

** Ammonia treated with chloramine T

Fig. 8. Time course for the formation of TMA, DMA and MMA in raw marine foods
—○—, TMA ---○---, MMA

なった。しかし 60° 以上では試験管内圧のためシリコン栓が飛ぶので、加温は 60° とした。加温時間は15分で十分であった。

5. アンモニア誘導体の GC

クロラミンT処理したアンモニアの GC チャートを図 7 に示した。

ピークは再現性よく単一のピークとして現われ、この

ピーク高はアンモニア濃度に比例した。また他の揮発性アミンを同様にクロラミンT処理してもこのピークは現われず、アンモニアに特異的なピークであった。

FID-GC によるアンモニア誘導体の検量線は $0.25 \sim 1.00 \mu\text{mole}/\text{tube}$ の範囲で良好な直線性を示し、繰返し測定精度は 7.6% 以下であり、検出限界は $0.05 \mu\text{mole}/\text{sample (g)}$ であった。

Fig. 9. Time course for the formation of ammonia in raw marine foods

Table 2. Contents of MMA, DMA, TMA and NH₃ in Raw Marine Foods Determined by Head Space GC Method and Conway's Method

Raw marine food	hr	Head space GC method					Conway's method (B)	Ratio (A/B)
		MMA	DMA	TMA	NH ₃	Total		
Mackerel "saba"	0	ND (0)	ND (0)	0.38 (1.9)	19.68 (98.1)	20.26 (100.0)	16.8	1.19
	50	1.75 (0.8)	ND (0)	10.89 (5.3)	194.34 (93.9)	206.98 (100.0)	181.6	1.14
Sardine "iwashi"	0	ND (0)	ND (0)	0.18 (1.2)	14.64 (98.8)	14.82 (100.0)	14.5	1.02
	50	0.44 (0.2)	ND (0)	6.69 (3.4)	186.96 (96.4)	194.09 (100.0)	153.2	1.27
Shellfish "asari"	0	ND (0)	ND (0)	1.83 (12.8)	12.42 (87.2)	14.25 (100.0)	14.0	1.02
	50	1.19 (1.3)	ND (0)	11.50 (12.3)	80.69 (86.4)	93.38 (100.0)	75.6	1.23
Shrimp "koebi"	0	ND (0)	ND (0)	0.22 (3.5)	6.15 (96.5)	6.37 (100.0)	5.8	1.10
	50	0.18 (0.2)	ND (0)	3.49 (3.1)	108.61 (96.7)	112.28 (100.0)	101.4	1.11

ND: less than 0.01 N-mg%/sample(g) unit: N-mg% (): percentage

6. 添加回収

3種類の鮮魚分類に TMA, DMA, MMA 及びアンモニアを添加した時の回収率を Table 1 に示した。

サバ, アサリ, エビにおいて, 四者の回収率はいずれも 92.0% 以上と良好であった。

Table 3. Contents of MMA, DMA, TMA and NH_3 in Dried Marine Foods Determined by Head Space GC Method and Conway's Method

Dried marine food	Head space GC method					Conway's method (B)	Ratio (A/B)
	MMA	DMA	TMA	NH_3	Total (A)		
Dried small sardine "niboshi"	1.08 (2.3)	0.56 (1.2)	1.21 (2.6)	44.05 (93.9)	46.90 (100.0)	36.7	1.23
Dried laval fish "hirago"	1.97 (3.7)	1.06 (2.0)	1.49 (2.8)	48.02 (91.5)	52.54 (100.0)	38.4	1.37
Dried cuttlefish "sakiika"	7.02 (9.4)	13.53 (18.2)	1.63 (2.2)	52.22 (70.2)	74.40 (100.0)	50.8	1.46
Dried codfish "hidara"	24.60 (27.1)	6.40 (7.1)	15.89 (17.5)	43.81 (48.3)	90.70 (100.0)	64.4	1.41
Dried herring "Hoshi-nishin"	5.26 (6.5)	3.94 (4.9)	8.49 (10.5)	63.18 (78.1)	80.87 (100.0)	47.6	1.70
Dried file fish "Hoshi-kawahagi"	12.30 (13.1)	25.34 (27.0)	7.40 (7.9)	48.87 (52.0)	93.91 (100.0)	61.6	1.52
Cod roes "tarako"	5.90 (11.6)	4.02 (7.9)	1.32 (2.6)	39.59 (77.9)	50.83 (100.0)	39.2	1.30

unit, N-mg% (), percentage

7. 試料分析

7-1 鮮魚介類中の揮発性アミン及びアンモニア量の経時変化

サバ、イワシ、アサリ、エビを 25° で56時間放置し、経時的な MMA, DMA, TMA 及びアンモニアの含有量を調べ、それぞれ Fig. 8 及び 9 に示した。

TMA の生成量は 24 時間経過したあたりから急激に増加し、56 時間後の生成量は特にアサリに多く見られ $13.40 \mu\text{mole/g}$ すなわち 790 ppm, ついでサバ 680 ppm, イワシ 383 ppm, エビ 206 ppm の順であった。MMA はいずれも少なくサバで $1.64 \mu\text{mole/g}$ (52 ppm) 程度であった。DMA は本条件下でいずれも検出されなかった。

一方、アンモニアの生成量は24時間経過したあたりから急激に増加し、56 時間でサバ $203.7 \mu\text{mole/g}$ (3,463 ppm), イワシ 3,068 ppm, エビ 1,955 ppm, アサリ 1,535 ppm となった。これらの値は先の揮発性アミン量に比べると極めて多いことがわかる。

7-2 本法とコンウエー法の比較

試料中の MMA, DMA, TMA 及びアンモニアの本法による測定値を N-mg% に換算し、同一試料についてコンウエー法で測定した値と比較した。生魚介類及びその加工品についての結果をそれぞれ Table 2 と 3 に示した。

鮮魚介類を 25° で 0 及び 50 時間放置した試料について、GC で 4 種のものを分別定量したときアンモニアの全体に占める割合は非常に高く、アサリでは 86~87% であるが他のものでは 93~98% を占めた。また GC の total 量とコンウエー法の揮発性塩基窒素量の比をとる

と、いずれも 1.0~1.2 でやや GC が高い傾向を示したことが両者はほぼ一致した値を示すことがわかった。

一方、魚加工品を両法で測定した結果、いずれも揮発性アミンの生成量が多く見られ、従ってアンモニアの全体に占める割合は低いものが多かった。特に干たらでは MMA 27.1%, DMA 7.1%, TMA 17.5%, アンモニア 48.3% であった。

また GC の total 量とコンウエー法の値の比は 1.2~1.7 と Table 2 の鮮魚類の場合よりも高い値を示した。もっとも GC では反応液を 60° で 5 分間加温するのに対し、コンウエー法では室温で 2 時間放置という反応条件の相違もあるが、Table 2 と比較すると揮発性アミンを多く含む試料ではコンウエー法の値の低く出る傾向が認められた。

なお今後は本法と細菌試験を比較して総合的に鮮度を判定する方法を検討すると共に、腐敗現象の解明も行いたいと考えている。

総 括

1. MMA, DMA 及び TMA を 50% 水酸化カリウム溶液中で気化し、ヘッドスペース・GC で定量する測定条件を設定した。

2. アンモニアを酢酸緩衝液 (pH 3.5) 中でクロロミン T と反応させ、生成物を加熱しヘッドスペース・GC で定量する方法を開発した。本法はアンモニアを直接定量する方法に比し、感度を約 1,000 倍高めることができた。

3. 鮮魚介類中の 3 種の揮発性アミン及びアンモニアの 25° における経時的な生成量を分別定量した結果、24 時間目あたりからアンモニア及び TMA の生成量は

急激に増加し、アンモニア量は全体の 86.4~98.8% を占めることがわかった。

4. 本法で定量した鮮魚介類及び魚加工品中の3種の揮発性アミン及びアンモニアの総量をコンウェイ法の値と比較した結果、鮮魚介類では両測定値はほぼ一致したが、揮発性アミンの比較的多く検出された魚加工品ではコンウェイ法の方が低く出る傾向が見られた。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局監修：“食品衛生検査指針 (II)” p. 204~213 (1978) 日本食品衛生協会。
- 2) 内山貞夫, 近藤竜雄, 内山 充: 食衛誌. 17, 345~351 (1976).
- 3) Gruger, E. H. Jr.: J. Agric. Food Chem., 20, 781~785 (1972).
- 4) 馬場二夫, 斉藤 穰, 福井弥生, 谷口 繁, 大和田国夫, 水谷泰久: 食衛誌. 19, 530~535 (1978).
- 5) 畝本 力, 津田 穰, 林 誠: 薬誌. 80, 1, 089~1, 092 (1960).
- 6) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解” p. 1, 083~1, 084 (1980) 金原出版。
- 7) 林 誠: 食衛誌. 11, 429~438 (1970).
- 8) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解” p. 163~164 (1980) 金原出版。