ねり製品の保藏の研究—Ⅰ

ねり製品の腐敗に伴う揮発酸のペーパークロマト グラフによる検出について

内 山 均・横 山 和 吉

(東海区水産研究所)

A Study on the Preservation of Fish Cake—II.

Detection of Volatile Acid in Fish Cake by Paper Chromatograph

Hitoshi UCHIYAMA and Wakichi YOKOYAMA

Paper chromatograph by hydroxamate method was applied to the qualitative analysis of the volatile acid which was produced by the decomposition of fish cake made of dog-fish with sugar and starch used as submaterials.

Before putrefaction takes place, acetic acid alone is detected. When the decomposition proceeds, higher fatty acids such as propionic acid, butyric acid and valeric acid are also detected along with acetic acid, the acetic acid being predominant throughout the course of decomposition. On the other hand, in case of the fish cake, which is made of meat in slightly lower freshness, propionic acid, butyric acid, valeric acid and acetic acid are detected even at the stage when there is no sign of putrefaction. Such being the case, it may be not admitted that detection of volatile acid composition furnishes proper judgment of the degree of deterioration of fish cake.

前報で¹⁾ 著者らは、ねり製品の腐敗に伴い生成される揮発酸について報告した。今回は、ねり製品の腐敗中に生成する揮発酸組成を検討するために、ペーパークロマトグラフによる検出を行い、二、三の結果をえたのでここに報告する。

従来、揮発酸の検出法としては DUCLAUX 氏²⁾の蒸溜法があり、また天野、富谷両氏³⁾は塩蔵鯨肉の変質判定に揮発酸を検出し、Bhrens の偏光顕微鏡分析法を用いている。東、岡田両氏⁴⁾は、腐敗魚肉を水蒸気蒸溜後溜出物を苛性ソーダで中和、乾燥し、その平均分子量より揮発酸組成を推察した。

ペーパークロマトグラフ法として、佐竹氏⁵⁾は揮発酸を常法に従いエステル化し、反応液に数倍量のヒドラゼンヒドラートを加えて加温し、揮発酸ヒドラゼン誘導体として、ピリジン含有アミルアルコールで展開アンモニア性硝酸銀で発色させて検出している。井上、野田両氏⁶⁾は揮発酸エステルに、塩酸ヒドロキシルアミン及び過剰の苛性カリを加えて、ヒドロオキザム酸となし、水飽和ブタノールで展開、塩化鉄飽和ブタノール溶液をスプレーして発色させ、検出できることを実証した。天野、富谷両氏⁷⁾も当方法を用いて、塩蔵鯨肉中の揮発酸の検出を行つている。LUGG, CVERELL 両氏⁸⁾は不揮発酸の検出に、溶媒、ブタノール、蟻酸、水 (4:1:1) を用いて展開、発色試薬に、B. P. R. 指示薬のアルコール溶液をスプレーして検出して

1953 年 2 月 23 日受理 東海区水産研究所業績 B 第 103 号 (印刷費負担)

いる。この方法は、味の素研究室の小原氏⁹⁾が、澱粉廃液中の不揮発酸の検出に応用したことを報告している。

著者らは、上述の方法中塩酸ヒドロキシルアミンによる方法が比較的簡単であるため、当方法を用いて検出することにした。

II 実験方法

(1) 試料の調製及び蒸溜方法

前報¹⁾の揮発酸測定と全く同様に行つた。ねり製品の腐敗前の総揮発酸量は、原魚の鮮度、添加澱粉の品質等によつて左右されるが、5~30 mg% である。これをエステル化して、ヒドロオキザム酸に導く訳であるが、エステル化の反応が可逆的反應であることに留意して、試料は常に 300 g とした。水蒸気蒸溜するさいの水、硫酸、タングステン酸ソーダ^{*}、硫酸マグネシウムは、試料の増加におうじて増加した。

(2) 揮発酸の抽出及びエステル化

蒸溜液より揮発酸を抽出するには、一般にエーテルを用い、約 20 時間前後液体抽出する。著者らは蒸溜液を苛性ソーダで中和、揮発酸を塩として固定、水分を沸騰蒸発させた。(蒸溜液を 500 cc 容ケルダールフラスコにいれ、中和後沸騰すれば約 90 分で大部分の水分は蒸発し、残部を小型ケルダールフラスコに移し、再び振盪しつつ沸騰蒸発させた後、乾燥器中で完全に水分を除き、以後、そのまゝエステル化に用いた。当方法で行えば、一時に多数の試料を簡単に処理できる)。Na 塩は充分に水分を除き、冷後無水アルコール 10 cc を加え中和に要した苛性ソーダ量を濃硫酸を加えて、 Na_2SO_4 とし揮発酸を遊離さす。さらに 10 滴の濃硫酸を加え、直ちに逆流冷却器を接続して 85~90° の湯煎中で約 30 分加温して、エステル化を行つた。油煎を用いないで充分である。

(3) エスターの蒸溜

エステル化した硫酸、アルコール、エスターの混液を小型枝付フラスコにいれて、過剰のアルコールと共に蒸溜する。このさい溜液受器も冷却する。この蒸溜液をそのまま、つぎの合成の試料とした。

(4) ヒドロオキザム酸の合成

井上氏はエステルに塩酸ヒドロキシルアミンの 5% アルコール溶液又は結晶を添加して、ヒドロオキザム酸を合成しているが、著者らも上述の溜液に 0.5 g の塩酸ヒドロキシルアミンと 0.5 g の苛性カリを加え、逆流冷却器を接続し 85~90°、10 分加温した。加温後吸引漏斗に移し過剰の苛性カリを濾別、濾液を小型蒸発皿に移し、湯煎上でアルコールを蒸発、冷後残留物に塩酸：アルコール (2:1) 混液を滴下、コンゴレッド試験紙で反応を驗しつつ酸性とする。酸性でないと R_f に影響し、また酸性後加温すると発色試薬塩化鉄ブタノールとの反応を示さない。即ち酸性に於て、ヒドロオキザム酸は不安定である。かくしてえたヒドロオキザム酸を毛細管にとり、塩化鉄飽和ブタノールをスプレーした濾紙に附着させ、暗黒色の反応を検して展開の試料とした。

(5) 濾紙及び溶媒

東洋濾紙 No. 52.2 cm×40 cm を用いた。多数の試料を同時に展開する場合は、大型濾紙に約 2 cm の線を引き、二次元法に於ける如くクリップにて上部をとめ、大型標本ピンで展開した。試料は下部より 5 cm のところに 5 mm 以内の直径で毛細管にて附着し、一次元上昇法で行つた。溶媒は水飽和ブタノールを用いた。一度展開に使用した溶媒を再び水飽和にして用いても、 R_f に影響はない。

(6) R_f の測定

展開後 20 時間前後 (温度 15~20°C) で約 25 cm 上昇、これを風乾し、塩化鉄 (FeCl_3) 飽和ブタノール

* タングステン酸ソーダーは高価であり、できれば加えたくない。当問題について浅川氏¹⁰⁾が二、三の報告をのべている。

ル溶液をスプレーして発色し Rf を測定した。

II 実 験 結 果

第1表は純粋の各有機酸とエチルエステルを試料とした場合の Rf である。井上氏の結果と比較してやや低い Rf 値を示し、また著者らの実験内に於ても同一の揮発数で多少変動している。だがアミノ酸の場合と比較して常にスペシメンと平行して展開すれば、遙にその判定は容易である。

Table 1. Rf of standard hydroxamate from various fatty acids and their ethyl esters.

	Samples from acids or ester	Formate	Acetate	Propio- nate	Buty- rate	valerate
1	Na-salt from pure A.P.B.V. acids	—	0.44	0.67	0.80	0.86
2	Na-salt from pure F.A.P.B.V. acids	—	0.48	0.66	0.80	0.89
3	Pure ethyl ester of F.A.P.B. acids	0.38	0.50	0.65	0.78	—
4	Pure ethyl ester of F.A.P.B.V. acids	0.44	0.48	0.72	0.80	0.88
5	Pure ethyl ester of F.A.P.B. acid solvent used twice	0.33	0.52	0.64	0.76	—
6	By Y. INOUE and M. NODA	0.45	0.53	0.69	0.84	0.89
7	Pure ethyl ester of F.V. acids	0.44	—	—	—	0.90
8	Pure ethyl ester of F.V. acids	0.44	—	—	—	0.89

F=Formic acid, A=Acetic acid, P=propionic acid, B=Butyric acid, V=Valerianic acid

III ねり製品の腐敗と揮発酸組成

使用原料魚はメジロ鰯及びヨシキリ鰯を用い、澱粉、砂糖を添加し、ゆで竹輪とした。製造直後のインドール量は 100 g 中 2.1 r であった。市販小田原カマボコの極く上質の腐敗前のインドール量は 2.4 r であったところから、当試料の原料魚は鮮度良好であると推察されよう。

総揮発酸、揮発性塩基、pH 及び官能検査の結果を第2表に示す。また、ペーパークロマトグラフの結果を第1, 2図に示す。第1図より腐敗前にすでに醋酸が検出され、醋酸は腐敗が進行しても、各酸中最も顕著に検出される。48時間目に総揮発酸量 75.6 mg%(醋酸として)、官能検査に於ても明らかに腐敗し、プロピオン酸の生成がみられる。さらに腐敗が進んだ 72時間目には、醋酸、プロピオン酸、酪酸、樟草酸の如き揮発酸が生成されてくる傾向を示している。このように、種々の揮発性酸が現れる中でも、醋酸が最も顕著

Table 2. Organoleptic test: pH-value, volatile acid and volatile basic nitrogen of fish cake made of dog-fish, sugar and starch. (Storage temp. 30°C)

	Volatile acid mg%	pH value	Volatile basic N mg%	Slime	Stench		Fit for food or not
					Basic	Acidic	
0 hr.	15.3	7.2(P.R.) 7.0(M.R.)	49.3	—	—	—	fit
24 hrs.	25.2	7.0(B.T.B.) 7.0(M.R.)	97.2	—	—	—	fit
48 hrs.	75.6	6.0(C.P.R.) 6.0(M.R.)	88.1	+	+	+	not
72 hrs.	93.2	6.6(M.R.) 6.6(B.T.B.)	144.1	+	+	+	not
96 hrs.	95.3	6.6(M.R.)	253.0	+	+	+	nct

Fig. 1. One dimensional paper-chromatograph of hydroxamate in the degradation of fish cake made of dog-fish, sugar and starch. (Storage temp. 30°C.)

Fig. 2. Total volatile acid and its composition in the degradation of fish cake made of dog-fish, sugar and starch. (Storage temp. 30°C.)

であることは上述の如くである。

IV 考 察

HILLIG, CLARK両氏¹⁰⁾は鯖を用いた腐敗の実験で、蟻酸、醋酸に打勝つて、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸が腐敗の進行と共に検出されてくることを報告しており、その母体を蛋白質の分解の結果としている。また、日笠、浅川両氏¹¹⁾は、ねり製品の腐敗判定として、DUGLAUX 氏の揮発酸蒸溜法を応用して判定する試みを提案している。それは、腐敗が進行してくると、比較的高級の揮発酸が増加してくるので、蒸溜速度が大となる。従つて、その蒸溜速度より判定できようという想定に基づいている。これらの事実は上述の著者らの結果を裏書するものといえよう。また、全体を通じて醋酸が顕著に検出されやすいことは、比較的多量に肉中に含有されている乳酸を母体としているためか、或は醋酸が魚肉と結合して流出しにくいことによるためか、著者らの考察は充分でないで、その事実を記載するに止める。尚、原料の水晒肉（チョッパーにかけた白グチを十分に水晒したもの）に於ても、同様に醋酸が顕著に検出された。

ところで、ねり製品の揮発酸組成及びその母体を検討するさい、問題を二つに分けて考察する必要がある。第一は腐敗前にすでに含有している揮発酸、第二には腐敗に伴つて生成してくる揮発酸とである。原料魚から製品に揮発酸が移行することは明らかであり、* 鮮度不良の原料魚を用いたねり製品中には、腐敗前にすでに蟻酸や、酪酸、またプロピオン酸、酪酸、樟草酸の如きC数の多い脂肪酸も検出されることを、著者らは上述のヒドロキザム酸法で確認している。このことは、揮発酸組成の検出のみからして、ねり製品の腐敗判定を行えないことを示すものであろう。（その組成と各揮発性酸量から、腐敗判定を行うことは別である。）

一方、著者らは、当初ねり製品には砂糖、澱粉等の炭水化物を添加する関係上、腐敗に伴つて生成する揮発酸は魚肉を母体とするよりも、添加炭水化物を主たる母体として生成されるだろうと推察した。だが、魚肉中にすでに上述の如きC数の多い揮発酸が含有していること、また魚肉の腐敗の場合にも、それらの揮発酸が検出されるということは、ねり製品の腐敗にさいしても、魚肉を母体として生成される点に重きをおく必要がある。また、砂糖を添加した場合としない場合で pH が、前者は酸性に、後者が塩基性に斜く傾向

* 小田原カマボコの如く徹底した水晒を行う場合に於ても、水晒によつて易溶性の揮発酸が、原料魚肉から流出しつくすことはない。これらについては、別に報告する予定である。

がみられるが、脱炭酸あるいは脱アミノ作用下の腐敗と、揮発酸組成との関係についても、明かにすべき問題と考える。高橋氏¹²⁾は微生物の有機酸代謝の綜述で C_3 化合物を中心としての、合成あるいは分解による有機酸生成について論じているが、上述の問題と共にねり製品の腐敗に伴う揮発酸の生成母体の検討にさいしても、考慮すべき問題と考える。

要 約

(1) ヒドロキシザム酸によるペーパークロマトグラフ法によつて、ねり製品の腐敗に伴う揮発酸組成を検出した。検出にさいし揮発酸は、蒸溜液をエーテル抽出しないで、Na 塩として固定し乾燥後、常法に従つてエステル化し、ヒドロキシザム酸に合成できる。

(2) 鰯肉を原料とし、砂糖、澱粉を添加した製品に於て、腐敗前には醋酸が検出されるが、腐敗の進行と共にプロピオン酸、酪酸、癩草酸の如き C 数の多い脂肪酸が検出される。全体を通じて、常に醋酸が顕著に検出される。だが、鮮度不良な魚肉を原料とした場合、製造直後すでに醋酸、プロピオン酸、酪酸、癩草酸が検出される。このことは揮発酸の組成のみからみて、ねり製品の腐敗を判定することはできないと考える。

実験を進めるに当りいろいろ助言を載いた天野慶之博士に厚く御礼申し上げ尙、常に著者らの実験に試料の製造をして載く、紀文カマボコ工場技術部長黒柳繁氏に併せて御礼申上げる次第である。

文 献

- 1) 内山均, 横山和吉: 日本水産学会誌, **18**, (12) (1953)
- 2) 化学実験学第二部, 第 10 卷, p. 223. 34
- 3) 天野慶之, 富谷章子: 日本水産学会誌, **16**, (12) (1951).
- 4) 東秀雄, 岡田稔: 日本水産学会誌, **16**, (10) (1951).
- 5) 佐竹一夫: 化学の領域, **4**, 8 (1951).
- 6) 井上吉之, 野田万次郎: 日本農芸化学会誌, **23**, (8) 368 (1950).
- 7) 天野慶之, 富谷章子: 日本水産学会誌, **16**, (12) (1951).
- 8) J. M. H. LUGG, B. T. OVERLL: Nature, **160**, 87 (1951).
- 9) 小原正美: 科 学, **21**, 7 (1951).
- 10) F. HILLIG, E. P. CLARER: Advance in food research, Vol. 2, p. 370 (1949).
- 11) 日笠七郎, 浅川末三: 水産研究所鮮度保持研究班連絡情報 第 4 号, (1953)
- 12) 高橋 甫: 科 学, **21**, 7 (1951).