トリメチルアミン及びトリメチルアミンオキシド の定量法について—DYER 法の検討

橋本 芳郎・岡市 友利
(東京大学農学部)

On the Determination of Trimethylamine and Trimethylamine Oxide.

A Modification of the DYER Method

Yoshiro HASHIMOTO and Tomotoshi OKAICHI
(Faculty of Agriculture, Tokyo University)

The extraction of trimethylamine (TMA) with toluene was found to be affected by temperature, sorts of alkali and number of shaking times, as shown in Fig. 1 and Table 1, whereas the color development of TMA with picric acid was not influenced by temperature. From these observations, the extraction procedure was modified to be carried out at a definite temperature (30°C). In an incubator, test solutions, reagents and funnels were previously warmed before extraction and the funnels shaken 60 times were again left for 5 minutes in it before the separation of toluene layer.

In the second place, the same volume of 25 % potassium hydroxide solution was adopted instead of the original 50 % potassium carbonate solution, which was confirmed to be not suitable for the TMA solution resulting from the reduction of trimethylamine oxide (TMO) with Devarda's alloy and hydrochloric acid. Figures in Table 2 indicate that some constituents of the alloy may disturb the extraction of TMA in the case of potassium carbonate, but not in the case of the hydroxide. This agrees well with the fact that the carbonate forms white colloidal precipitates, perhaps carbonates of Al and Zn, in the aliquot of the heated reducing mixture, and the precipitates were suspected to adsorb or occlude TMA. The hydroxide does not give such precipitates.

The modification above-mentioned facilitated the determination of the smaller amount of TMO and the modified method gave over 97 % recovery down to 0.025 mg N which is far lower than 0.4 mg N in the DYER method (Fig. 2). The recovery of TMO added to carp muscle extracts was also satisfactory (Table 3).

従来からトリメチルアミン (以下 TMA と略記) 定量法¹⁾²⁾³⁾ が種々検討されて来たが、このうち DYER のピクリン酸法⁴⁾ が比較的多く用いられている。この方法は TMA 以外のアミン類も呈色すること、腐敗魚肉ではカタベリンが妨害すること⁵⁾ 等、二、三欠点も指摘されているが、新鮮魚肉では簡易且つ正確な点で最も優れた方法と考えられている。

然し著者等は、この方法が時にかなりの誤差を伴うことを経験し、その原因を追求したところ、試料をアルカリ性にして TMA をトルオールに移行させる操作に問題があることが判つた。即ち、DYER⁶⁾ は TMA のトルオールへの移行は完全に行われると述べているが、従来注意されていなかった温度、振盪回数等が相当影響することが認められた。

一方、トリメチルアミンオキシド (以下 TMO と略記) の定量法としては、これを還元して生ずる TMA を測定する方法⁷⁾⁸⁾ が従来用いられており、DYER 等⁹⁾ は Devarda 合金を還元剤として使用する NORRIS & BENOIT 法⁷⁾ を修正し、生じた TMA を上記ピクリン酸法で測定して、従来定量限界が TMO-N 2 mg であつたのを 0.4 mg 迄引下げ、約 95 % の精度で測定しよう改良したが、その濃度以下では不明の原因により急激に精度が低下することを観察した。若し試料より 1:3 抽出液を作るとすれば、これは魚肉 100 g

当り TMO として約 86 mg の濃度に相当し、かなり TMO 含量の高い試料しか正確には測定しえないことになる。又、少量の試料での測定は困難である。

我々がこれから実施しようとしている水産物に於る TMO の代謝の研究には、上記の理由でこの DYER の方法は未だ不十分である。従つてこの改良を志したが、先ず TMO-N 0.4 mg 以下で急に回収率が低下する現象に注目し、色々吟味を行つたところ、やはり還元後アルカリ性で TMA をトルオールに移す操作に問題があることが判つた。そこで、原法の使用アルカリである炭酸カリを苛性カリに代え、上記 TMA の定量条件の検討結果を織込むことにより、TMO-N 0.025 mg 迄 100 % 近い回収率で定量しうるように DYER 法を修正することが出来た。以下その結果を報告する。

実験並びに結果

I. トルオールによる TMA 抽出操作の検討

定量条件を吟味する為とつた個々の操作は、DYER の原法を僅か修正した佐々木・藤巻¹⁰⁾の方法に準じた。TMA ピクレートの呈色はベツクマン光電比色計を用い、410 m μ で測定した。

a) 温度の影響 著者等は TMA の発色が試薬に殆ど変りがないのに、夏期に比し冬期著しく低いことに気がついた。これが時に経験する誤差の原因ではないかと考えられたので、TMA のトルオールへの移行あるいは TMA のピクリン酸による発色に対する温度の影響を調べてみた。

TMA 溶液、試薬及び分液漏斗を予め 30°C の孵卵器中で加温し、各試薬を合せ振盪した後、更に 5 分、30°C に放置して得た TMA トルオール溶液と約 10°C (室温) で常法通り操作して得たものを双方室温で脱水、発色させた。Fig. 1 に示すように、10°C で抽出した場合は TMA ピクレートの吸光値は 30°C のその約 80 % に過ぎず、抽出温度が著しく影響することがわかつた。又 30°C で得た TMA トルオール溶液を 10°C 及び 30°C で夫々発色させたが、吸光値に殆ど変りなく、発色自体には温度の影響のないことが示された。

以上、TMA のトルオールへの移行は、温度の影響を蒙り正值をうる為には、この操作を一定温度で行う必要があることが判つた。

b) 振盪回数の影響 アルカリ添加後、トルオールと振盪する回数を DYER は約 40 回、佐々木・藤巻は一分間 (約 150 回に相当する) に規定しているが、上述の如く TMA のトルオールへの移行が簡単でないことから、更に振盪回数の影響について検討を行つた。結果は Table 1 に示す如く、炭酸カリの場合 10°C では振盪回数とともに吸光値が僅かであるが増加し、30°C では 60 回で一定値に達した。一方 25 % 苛性カリでは、10°C、30°C 何れに於ても 40 回で略々一定値に達している。尚、この表でみられるように、使用アルカリ、温度により一定量の TMA より得られる吸光値が異なることは注意を要する。著者等は 50 % 炭酸カリを後記の理由により 25 % 苛性カリに代えたが、発色液の吸光値の高いこと、及び少い振盪回数で一定値に達することも、苛性カリの有利な点といえよう。勿論 25 % 苛性カリを使用した場合、TMA 濃度と吸光値の間には Fig. 1 に示すように BEER の法則が成立する。

Table 1. Effect of shaking on the extraction of TMA with toluene

Alkali used	Temperature °C	No. of shaking times			
		40	60	100	150
50 % K ₂ CO ₃	10	0.137*	0.138	0.143	0.146
	30	0.179	0.186	0.186	0.185
25 % KOH	10	0.170	0.176	0.176	0.174
	30	0.193	0.193	0.195	0.193

* Figures denote the optical density of TMA picrate.

c) 無水芒硝の使用量 佐々木・藤巻は 0.5 g 使用するよう規定しているが、使用芒硝の脱水力不足から時に誤差の生ずることが認められたので、使用量を 1 g としたが、増量しても TMA の抽出、発色に何等の悪影響のないことを予め確めた。

Fig. 1. Standard curve for TMA picrate.
(30°C) に予め加温しておき、各試薬をあわせた後約 60 回振盪する。その後 5 分同温に放置し、分離したトルオール層を分け、室温にて 1 g の無水芒硝で脱水する。その他は佐々木・藤巻が記載した方法通りで差支えない。

II. TMO 定量法の検討

DYER は Fig. 2 に示すように TMO-N 0.4 mg 以下では急激に回収率が低下することをみたが、彼はこの原因として Devarda 合金への吸着、或いは TMO の TMA 以外への還元によるのではないかとしている。事実、著者等も DYER の方法を追試してみたが、略々同じ曲線を得た。ところで、TMO を Devarda 合金と塩酸で還元した溶液について TMA 測定を行う場合は、TMA 標準液の場合と異なり、炭酸カリでアルカリ性にした時、白色コロイド状の沈澱がかなり生じ、トルオールと水の分離が悪くなる。恐らく、この沈澱は Devarda 合金より塩酸に溶出した Al 又は Zn の塩類が炭酸カリの添加によつて炭酸塩の膠状沈澱になるものと思われるが、これが TMA を吸着、或いは吸蔵して値を低くするのではないかと考えられた。従つて、これら金属塩と沈澱を生じない苛性カリをアルカリとして使用してみた。

TMO を加えないで DYER 法通り、水 5 ml Devarda 合金 1 g 及び 6 N 塩酸 2 ml の混合物を 100°C、15 分加熱して濾過洗滌し、この濾液と洗液を合し、50, 100, 200 ml に夫々定容した。

これに Table 2 に示す TMA 量となるように TMA 標準液 1 ml を添加して、以下炭酸カリの場合は

Table 2. Recovery (%) of TMA added to the filtrate of the mixture*, in which Devarda's alloy was heated with hydrochloric acid.

a) The DYER method.

b) The modified method by the present authors, using 25 % KOH as alkali.

TMA added N-μg/6 ml	Dilution of the filtrate (ml.)			TMA added N-μg/6 ml	Dilution of the filtrate (ml.)		
	50	100	200		50	100	200
5	79.0%	83.0%	90.2%	5	103.4%	105.8%	97.7%
10	86.9 "	89.1 "	94.9 "	10	97.8 "	99.4 "	98.9 "
20	79.6 "	90.3 "	94.2 "	20	97.5 "	98.9 "	97.5 "

* The mixture of distilled water 5 ml, 6 N HCl 2 ml and Devarda's alloy 1 g. was heated for 15 mins. as described by DYER and the filtrate was made up to 50, 100 and 200 ml. respectively. To 5 ml. of the filtrate, 1 ml. of standard TMA soln. was added.

Fig. 2. Recovery of TMO.
Curve A : The modified method.
Curve B : The curve reported by DYER.

II. DYER の TMA 定量法の修正

以上の実験結果から次のように原法を修正した。
第一に使用アルカリ 50 %炭酸カリを同量の 25 %

苛性カリに代える。次に試料及び各試薬は一定温度

DYER の TMA 定量法の原法通り、苛性カリの場合は前記著者の修正法通り操作して TMA の回収率をみた。アルカリとして炭酸カリを使用した場合、稀釈度の低いもの程回収率が低下したが、一方苛性カリの場合は白色沈澱を殆ど生ぜず、且つ Devarda 合金よりの溶出物による妨害は認められなかつた。以上の結果から、DYER 法による TMO 定量に於ける回収率低下は DYER が考えた合金への吸着、或いは TMO の TMA 以外の物質への変化によるのではなく、Devarda 合金よりの溶出物が炭酸カリと反応して定量を妨害することが明らかになった。

然し、その後繰返し行つた実験に於て抽出温度を 30°C として振盪回数を多くする処置を施せば、炭酸カリでも殆ど回収率低下をみないこともあつた。然し、苛性カリを使用した方が白色沈澱を生ぜず、抽出操作は容易且つ安全である。

次に、DYER の方法通り TMO 標準液の還元を行い、先述の修正法で測定、回収率を見た結果は Fig. 2 に示す通りで、TMO-N として 0.025 mg 迄 97 %以上の回収率で定量することが出来た。尚、これ以下の濃度ではベックマン光電比色計の精度が問題となり、ピクレート法では略々これが限界値と考えられる。

更に本修正法の信頼度を見るため、鯉肉抽出液に添加した TMO の回収率を測定してみた。即ち、生きた鯉から採つた背肉磨砕物 100g に 10 %三塩化酢酸 200 ml を加え、時々攪拌しながら 2 時間放置後、濾過して TMA 及び TMO を含まない抽出液を得た。この抽出液 20 ml に Table 3 に示す如く、各濃度の標準 TMO 溶液 10 ml を加え、その 5 ml をとり還元、上述の如く定量した。回収率は 97~101 %の値が得られた。

Table 3. Recovery of TMO added to the carp muscle extracts*

TMO added N mg/5 ml.*	0.049	0.202	0.404	0.802
TMO found N mg/5 ml.	0.049	0.197	0.404	0.811
Recovery %	100.0	97.8	100.0	101.1

* To 20 ml of the trichloroacetic acid extracts of carp muscle (1:2), 10 ml of the standard TMO soln. was added and 5 ml of this mixture was used for the recovery test.

以上、1:3 抽出液を作るとして魚肉 100 g 当り DYER 法では TMO として 86 mg 迄しか定量しえないのに対して、本修正法を用いれば 5.4 mg 迄正確に測定し得ることが判つた。

要 約

DYER 法によるトリメチルアミン (TMA) 及び同オキシド (TMO) の定量法を検討し、原法に二、三欠陥のあることを認めた。即ち、炭酸カリでアルカリ性とした試料より TMA をトルオールに移す際、温度及び振盪回数が影響し、これが誤差の原因となることを確め、使用アルカリを苛性カリに変更し、定量操作を一定温度 (30°C) に於いて行うことにより良好な結果を得た。

又、DYER の TMO 定量法に於て定量限界が 5 ml 又は 10 ml 中 0.4 mg-N であつたものを、上記 TMA 定量法の修正の結果、0.025 mg-N 迄引下げ 97 %以下の回収率を得ることが出来た。

終りに臨み、終始御指導を賜つた森高次郎教授に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) W. LINTZEL : Biochem. Z., **273**, 243 (1934).
- 2) E. J. CONWAY : Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, p. 176 (1950)., Determination of Volatile Amines.
- 3) B. T. CROMWELL : Biochem. J., **46**, 578 (1950).
- 4) W. J. DYER : J. Fish. Res. Bd. Can., **6**, 351 (1945).
- 5) 斎藤・鯨島 : 日農化, **30**, 531 (1956).
- 6) W. J. DYER : J. Fish. Res. Bd. Can., **7**, 576 (1950).
- 7) E. R. NORRIS and G. T. BENOIT : J. Biol. Chem., **158**, 433 (1945).
- 8) O. A. RONALD and F. JAKOBSEN : J. Sci. Chem. Ind., **66**, 160 (1947).
- 9) W. J. DYER, F. E. DYER and J. M. SNOW : J. Fish. Res. Bd. Can., **8**, 309 (1952).
- 10) 佐々木・藤巻 : 日農化, **27**, 420 (1953).