魚肉腐敗中の揮発性脂肪酸のガスクロマト グラフィーによる分離・定量

宮 原 昭 二 郎

(1960 年 8 月 31 日受理)

GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND DETERMINATION OF VOLATILE FATTY ACIDS IN FISH MEAT DURING SPOILAGE

Shojiro MIYAHARA*

In the process of spoilage of fish meat or its food products, it is known that the volatile fatty acids increase in amount with the progress of spoilage, and it is supposed that the composition of the acids may also be altered.

The author devised a easy method of separating and estimating esters of the acids by converting the acids into methyl esters first, and then by using gas-liquid chromatography with PEG-600 as stationary liquid phase and hydrogen as carrier gas at the temperature of 60°C.

With this method, the presence of volatile acids such as formic, acetic, propionic, n-butyric and iso-butyric acid was confirmed in the samples of different grade of quality, including mackerel, tuna and fish sausage.

During esterification process, it was disclosed that comparatively little loss observed in the amount of methylmercaptan, which existed with volatile acids in the distillate from spoiled fish sample. In addition, no ethylmercaptan was found in these samples.

緒 言

魚肉あるいは魚肉製品はその鮮度が低下するにつれて揮発性脂肪酸の発生が多くなり、またその組成も変化する¹⁾⁻⁵⁾ことが知られている。

筆者はポリエチレングリコール-600 を固定相液体とする気相-液相クロマトグラフ法(ガスクロマトグラフィー)によつて、揮発性脂肪酸メチルエステルを比較的容易に定性・定量できることがわかつたので、二、三の魚肉および魚肉製品の腐敗過程に生成する揮発性脂肪酸をメチルエステル化してその量変化をしらべた。その結果、腐敗によるこれら脂肪酸の増加組成の変化には一定の関係はなく、したがつてこの現象からは一つの鮮度判定を行うことは今のところ困難である。

脂肪酸や脂肪酸エステルのガスクロマトグラフィーによる分離については多くの研究があるが、中でも揮発性脂肪酸のエステルの分離については、用いられた固定相液体は今までにパラフィン⁶⁾、アピエゾン M⁷⁾、シリコン DC 550⁸⁾、ベンジルジフェニル⁷⁾、ジオクチルフタレート^{7),9)}、ジノニルフタレート¹⁰⁾などが報告されており**、またジエチレングリコールアジペートポリエステル¹¹⁾が水分を含む揮発性脂肪酸の分離・精製に用いられている。ポリエチレングリコール (P. E. G.) を揮発性脂肪酸やそのエステルの分離に用いた例は見当たらないが、筆者は P. E. G.-600 が低級脂肪酸メチルエステルの分離にきわめて有効であることを見出した。またメルカプタン類や硫化物類の分離にはトリクレジルホスフェート^{12),13)}、トリアコンタン¹⁴⁾、オルトおよびパラベンジルジフェニル¹⁴⁾、5% のジフェニルアミンを含むジオクチルフタレート¹⁵⁾を用いた例があるが、P. E. G.-600 によつても同じように硫化水素、メチルメルカプタン、エチルメルカプタンは脂肪

* 長崎大学水産学部 (Fac. Fish., Nagasaki Univ., Sasebo, Japan).

** 他に T. Johns: Beckman Gas Chromatography Manual (1959) によればベルジルエーテル、ジブチルメレアートが推奨されている。

酸メチルエステル類から分離しうることがわかった。

装 置 ・ 試 薬

ガスクロマトグラフ装置は柳本製 GCG-200 型を用いた。カラムは 4mm×2m のもの、固定相液体 (充填剤) は P.E.G.-600*, キャリヤーガスは水素を用いた。実験の際の測定条件は特記しないかぎり、ブリッジ電流 85mA, 感度 64mV (フルスケール), カラム温度 60°C, キャリヤーガス流速 48ml/分 であった。標準物質としてのメチルエステル類については、市販特級の脂肪酸類から常法によつておのおのメチルエステルを合成し、蒸溜によつて精製したものを用いた。

メチルメルカプタンは市販 *s*-メチルイソチオ尿素硫酸塩から苛性ソーダによつて発生させ¹⁶⁾, ガスクロマトグラフ用気体試料採取管 (内容 1ml) に採取したものを用いた。エチルメルカプタンは KLASON の法¹⁷⁾によつて合成したものを用いた。

実験方法・結果および考察

1. 揮発性脂肪酸のメチルエステル類およびメルカプタン類のガスクロマトグラフ分離曲線・検量線

辛酸メチル, 醋酸メチル, プロピオン酸メチル, 正酪酸メチル, イソ酪酸メチル各 10 μ l およびメタノール 20 μ l をとり, 前記条件でガスクロマトグラフィーにより分離を行つた結果 Fig. 1 に示すような分離曲線が得られた。なおこれらメチルエステル 1~10 μ l をメタノールとともにとり, 分離したクロマトグラムの波高を測定した結果, 波高**と採取量はメタノール量に関係なく非常によく比例し, Fig. 2 のような原点を通る検量線を得た。

Fig. 1. Separation of methyl esters of volatile fatty acids from C₁ to C₄ in methanol on a 2m column of PEG-600 at 60°C. Carrier gas: H₂ gas.

Flow rate: 48ml/min. Peak identification and sample: (F) methyl formate 10 μ l, (A) methyl acetate 10 μ l, (P) methyl propionate 10 μ l, (iB) methyl iso-butyrate 10 μ l, (nB) methyl *n*-butyrate 10 μ l, (M) methanol 20 μ l.

* 市販の P. E. G.-600 (カラム充填剤としてつくつてあるもの) を水素ガス気流下に 80°C で 1 時間乾燥させたもの。

** ピークの形が左右対称であり, ピーク高によく比例するので面積法によらずピーク高法によつた。

Fig. 2. Calibration curve for the estimation of methyl esters of volatile fatty acids C_1 to C_4 . Conditions and identification as in Fig. 1.

また、硫化水素ガス 1ml およびメチルメルカプタンガス 1ml (ともに室温で 1 気圧, 少量の空気を含む), エチルメルカプタン 5 μ l およびギ酸メチル 5 μ l の混合物について*の分離曲線は Fig. 3 のとおりであった。純メチルメルカプタンガスの一定量の採取が困難なため, その検量線の作成は行わなかったが, 相対的な定量は波高の測定により可能である。絶対的定量法については現在検討中である。

2. 魚肉よりの揮発性脂肪酸の採取およびメチルエステル化 (試料液の調整)

供試材料はサバ肉, マグロ肉, 市販魚肉ソーセージ 2 種の計 4 種類であつて, これらの新鮮材料を 1 塊 100g 宛に切つておき, 室温 (最高 28°C, 最低 16°C) に放置 (魚肉ソーセージはケーシングを取除いて放置) した。20~240 時間後にその 1 塊をとり出し, 約 100 ml の水を加えながらすりつぶして蒸

溜フラスコに入れ, 硫酸マグネシウム結晶 50g を加え, 次に濃硫酸を加えて混液の pH を 1 以下となし, 水蒸気蒸溜を 10 分間行う。溜出液は 0.1N 苛性ソーダ約 10ml にとり, アルカリ性のまま湯浴上で濃縮

Fig. 3. Separation of mixture of hydrogen sulfide, methyl mercaptan, ethyl mercaptan and methyl formate. Conditions as in Fig. 1.

Sample: hydrogen sulfide and methyl mercaptan, each 1ml (but including small amount of air) at 1 atm.; ethyl mercaptan and methyl formate, each 5 μ l.

* 気体試料注入口と液体試料注入口を同時に開いて試料を注入する。

乾固し、無水メタノール約 5ml を加え、濃硫酸・無水メタノール混合液 (1:50) で酸性となし、更に濃硫酸 0.5ml を加えて加熱しメチルエステル化を行う。のち 100°C 以下で蒸溜される部分を取り、メタノールで 10ml に定容しガスクロマトグラフ用試料液とした。

この操作によって魚肉中のメルカプタンは脂肪酸と同様にアルカリによつて一度メルカプチドとなり、濃縮され、酸によつて再びメルカプタンとなる。メチルメルカプタンを含むメタノール溶液 10ml と、同液を上記と同様に水蒸気蒸溜、アルカリ添加、濃縮、メタノールおよび濃硫酸添加、加熱、蒸溜し 10ml に定容したメタノール液とについて 1 のようにメルカプタンを分離し、その波高を測定した結果 Table 1 に示すように、揮発酸の採取およびメチルエステル化の際メルカプタンは逸散しないことがわかった。

Table 1. Recovery of methyl mercaptan by sampling and esterification. Conditions of gas chromatography are same as in Fig. 1.

Gas chromatographic peak height of methyl mercaptan		recovery
in original methanol solution	in treated solution	
3.5 cm	3.4 cm	97.1%
7.0 "	6.9 "	98.5 "

3. 試料液のガスクロマトグラフィー

2 の試料液 0.1ml をとり前記条件でガスクロマトグラフィーを行つた結果、例えばサバ肉 (放置時間 24 時間、腐敗) については Fig. 4 の分離曲線が得られた。その他のものについては Table 2 のような結果を得た。

Fig. 4. Separation of methyl esters of volatile acids and methyl mercaptan obtained from spoiled mackerel meat by gas chromatography. Sensitivity is multiplied by 8 into Fig. 1. Other conditions and peak identification as in Fig. 1. Sample 0.1ml is obtained from 1g spoiled mackerel meat.

Table 2 の値について、赤松氏の実験⁵⁾の試料中にはプロピオン酸は存在しなかったが、この場合は明らかに存在している。また他の酸についてはやや大きい値を示している。放置時間の区切り方が大きすぎたが一般にギ酸、醋酸、プロピオン酸、イソ酪酸、正酪酸およびメチルメルカプタンは魚肉の放置時間とともに増加し (エチルメルカプタンは存在しない)、その増加量は各試料によつて異つており、増加量または増加の割合から魚肉または魚肉ソーセージの鮮度を規定することは今のところ困難と思われる。硫化水素については、さきに Fig. 3 に示したように空気とは分離しないが、各試料液の第一の波高 (いわゆるエアピーク)

Table 2. The amount of methyl esters of volatile fatty acids and mercaptans in the fish meat and the fish sausage.

mercaptans: the relative amount
esters: upper....methyl ester μl in 100g, middle....converted
amount to acid mg, lower....% in the whole acid.

Sample	Tuna meat			Fish sausage A			Fish sausage B			Mackerel meat	
time in hours	0	20 ^{a)}	44 ^{b)}	0	72 ^{a)}	240 ^{b)}	0	72 ^{a)}	240 ^{b)}	0	24 ^{b, c)}
methyl mercaptan	0	1.0	2.6	1.0	2.2	3.8	1.0	2.2	4.1	trace	1.0
ethyl mercaptan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
methyl formate	3.4 2.5 40	6.4 4.7 24	26.8 20.0 33	4.7 3.5 12	8.8 6.5 13	24.4 18.3 22	5.3 4.0 36	9.2 6.8 26	48.6 36.3 45	4.0 3.0 29	48.0 36.0 34
methyl acetate	2.7 2.0 32	16.0 12.0 61	23.5 18.0 30	14.9 11.2 37	26.6 20.1 41	52.4 40.0 48	8.2 6.2 55	17.4 13.1 50	34.5 26.4 33	6.1 4.9 48	40.0 30.4 29
methyl propionate	0	1.0 0.8 4	2.3 1.7 2	trace	1.3 1.0 2	1.8 1.3 2	trace	1.1 0.8 3	1.8 1.3 2	trace	2.6 2.0 2
methyl iso-butyrate	0.7 0.5 8	1.0 0.8 4	2.1 1.6 2	0.7 0.5 2	1.7 1.3 3	2.0 1.6 2	0.7 0.5 5	1.6 1.2 5	2.1 1.6 2	1.1 0.9 9	14.0 10.7 10
methyl n-butyrate	1.5 1.2 19	1.9 1.5 7	26.0 20.0 33	18.2 14.0 49	25.3 19.5 40	29.1 22.4 27	0.6 0.4 4	5.3 4.1 16	19.0 14.7 19	1.8 1.4 14	35.0 26.8 26

a) half spoiled, b) spoiled, c) from Fig. 4.

は皆同じであつたので、これは一応硫化水素ではないとしておく。しかし腐敗肉からは当然硫化水素は発生されるものと思われるから、硫化水素の分離・定量についても今後検討を行い度い。

要 約

1. $C_1 \sim C_4$ の脂肪酸（飽和）のメチルエステル類およびメチル、エチルメルカプタンの混合物の分離・定量法について研究し、そのメタノール溶液を P. E. G.-600 を固定相液体とするガスクロマトグラフィーにより分離し、メチルエステル類についてはそれを定量することができた。なお硫化水素ガスは P. E. G.-600 では空気と分離されなかつた。

2. 1. の方法を魚肉および魚肉ソーセージに応用し、供試材料中の揮発性脂肪酸をメチルエステルに変えて定量した。その結果腐敗の進行につれて脂肪酸、(ギ酸、醋酸、プロピオン酸、正酪酸、イソ酪酸)が増加すること、その増加の割合や組成の変化に一定の関係はないことがわかつた。

3. 供試材料中のメルカプタンは揮発性脂肪酸とともに採取され、脂肪酸のメチルエステル化の際にも逸散することなく試料液中に存在すること、腐敗の進行につれてメチルメルカプタンは増加すること、魚肉やその腐敗生産物中にはエチルメルカプタンは存在しないことがわかつた。

文 献

- 1) HILLIG, F. and CLARK, E. P.: "Advance in Food Research II", p. 370, Acad. Press Inc., New York (1949).
- 2) 浅川末三: 本誌, **19**, 118 (1953).
- 3) ———: ———, **20**, 158 (1954).

- 4) 清水 亘他: 京大食研報告 **No. 19**, 44 (1957).
- 5) 赤松幹夫: 本誌, **26**, 588 (1960).
- 6) KEPLER, J. G., SCHOLS, J. A. and DIJKSTRA, G.: *Recueil. Trav. Chim.*, **75**, 965 (1956).
- 7) JAMES, A. T. and MARTIN, A. J. P.: *Biochem. J.*, **63**, 144 (1956).
- 8) ———: ———, **50**, 679 (1952).
- 9) LITTLEWOOD, A. B., PHILLIPS, C. S. G. and PRICE, D. T.: "Gas Chromatography", C. S. G. PHILLIPS ed., p. 76, Butterworths Scientific Public., London (1956).
- 10) 日本分析化学会編: 機器ガス分析法, p. 133, 共立出版, 東京 (1960).
- 11) HUNTER, I. R., ORTEGREN, V. H. and PENCE, J. W.: *Anal. Chem.*, **32**, 682 (1960).
- 12) RYCE, S. A. and BRYCE, W. A.: ———, **29**, 925 (1957).
- 13) AMBERG, C. H.: *Can. J. Chem.*, **36**, 590 (1958).
- 14) DESTY, D. H. and WHYMAN, B. H. F.: *Anal. Chem.*, **29**, 320 (1957).
- 15) SUNNER, S., KARRMAN, K. J. and SUNDÉN, V.: *Microchem. Acta*, **1956**, 1144 (1956).
- 16) 山田桂輔: 改訂有機合成化学, p. 393, 修教社, 東京 (1948).
- 17) ———: ———, p. 276.