DYER 法によるトリメチルアミン測定値 に対するジメチルアミンの影響*

戸沢晴巳・榎原和子・天野慶之

(1970 年 2 月 10 日受理)

Effect of Dimethylamine on the Value of Trimethylamine Determined by the DYER's Method

Harumi TOZAWA, Kazuko ENOKIBARA,
and Keishi AMANO**

It has been known that the picrate colour reaction is not specific for trimethylamine (TMA) because the reaction occurs also with many types of amines formed during the spoilage of fish. Thus, the TMA level in the muscle of gadoid fishes are considered to be overestimated by the DYER's picrate method, since the muscle often contains a considerable amount of dimethylamine (DMA) even in a good grade of quality.

By chance the authors observed that the picrate value of cod muscle, obtained by HASHIMOTO's method using KOH instead of K_2CO_3 , was too low for the expected level from the amount of DMA contained, and therefore, examined the colour development of DMA picrate in relation to the reagents employed in the picrate method.

Optical density of DMA picrate was much smaller with the combined use of KOH and 1 ml of 10% formaldehyde (FA), than the O.D. obtained with K_2CO_3 and FA. The ratio of the O.D. of DMA picrate to the O.D. of the equivalent TMA picrate (ratio of colour development) was approximately 4% for the KOH method, while the ratio was about 50% in the case of using K_2CO_3 as the reagent.

The amount of FA showed markedly different effects in the two methods: with K_2CO_3 , the colour intensified in proportion to the increase of FA, while with KOH, a maximum value occurred in the absence of FA and abruptly dropped with the addition of 0.5 to 1.0 ml of FA, followed by a gradual intensification in colours as FA increased.

The use of KOH as well as K_2CO_3 was examined to determine their effect on the picrate values of fish samples. Cod and Alaska pollock fillets, including irradiated or salted, were analyzed after chilled or frozen storage. The picrate values with the use of KOH were found close to the "real" TMA values measured by gas-liquid chromatography (GLC), except one sample which contained a larger amount of DMA. However, the picrate values obtained with K_2CO_3 were much higher than the GLC values.

With regard to the results mentioned above, the authors propose that KOH be used instead of K_2CO_3 as the alkali reagent, and the amount of 10% FA added be kept to 1 ml, when gadoid fishes are subjected to TMA analysis by the picrate method.

DYER¹⁾ のピクレート法はトリメチルアミン (TMA) の特異反応ではなく、腐敗によつて生ずる多くのアミンも、同様に発色することはよく知られている^{2~4)}。ただ通常の魚類では初期腐敗に至るまでは、TMA 以外のアミンの生成は少量であり、従つてピクレート法の定量値と“真の” TMA 値は、ほぼ一致するとされている。このことは最近野中ら⁴⁾ のガスクロマトグラフ法を用いる研究によつて一層明確にされている。

* 東海区水産研究所業績 B 第 529 号

** 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo)

しかし、タラ類の場合は事情が異ってくる。なぜならすでに天野⁵⁾、徳永⁶⁾によつて、マダラ、スケトウの臓器や肉では、特有の酵素作用によつてジメチルアミン (DMA) が生成し、その結果 TMA が微量であつても、相当量の DMA が含有されている場合があることが明らかにされているからである。この DMA は当然ピクレートとして発色する。DYER¹⁾ は、DMA の発色は等モルの TMA の約 20% としているが、DMA 量が多ければ当然鮮度判定に誤りを来すことになる。最近 CASTELL ら⁷⁾ が、冷凍中のタラ肉に TMA が増加して来ると報告しているが、この測定値の相当部分は DMA によるものではないかと思われる。

ところがわれわれが、マダラ肉をガンマ線で照射 (0.05~0.4 Mrad) し、1°~4°C に 3~4 週間保存した場合の TMA 増加量を、橋本⁸⁾の改良ピクレート法 (25% KOH 使用) で測定し、別に DMA を銅-ジチオカーバメート法²⁾で定量したところ、DMA-N が 10~12 mg% もある試料でも、ピクレート値は意外に小さく、1.5 mg%-N 程度しかないという事例がいくつか出現した⁹⁾。そこでピクレート法による DMA の測定値が、測定条件によつてどう変化するかにつき、やや詳しく検討することとした。

実験方法

ピクレート法 DYER¹⁾の原法及び橋本⁸⁾の改良法に準じた。試料及び 10% ホルムアルデヒド (FA) 溶液をあわせて 5 ml、アルカリ溶液 (50% K₂CO₃ または 25% KOH) 3 ml、トルオール 10 ml で、アルカリ添加後 30°C に 5 分間加熱し、60 回はげしく振とう後、静置 10 分、トルオール層を Na₂SO₄ で脱水し、この 2 ml をとつて 0.02% ピクリン酸トルオール溶液 2 ml と混合する。比色は日立-139 型分光光度計を用い、セルは 1 cm×1 cm、波長は 410 mμ とした。

銅-ジチオカーバメート法 (DMA の測定) DYER²⁾の改良法に従つた。比色には上と同じ計器とセルを用いた。

ガスクロマトグラフ法 (TMA の測定) 野中⁴⁾の方法に準じた。この方法は現在もつとも信頼のおける“真の”TMA 測定法として、比較のため採用した。

なお試薬として用いた TMA·HCl 及び DMA·HCl は市販 1 級 (E. P.) のものを、エタノールから 3 回再結晶したもので、前者は銅-ジチオカーバメート法を用いて DMA の、後者はガスクロマトグラフ法により TMA の混在が、それぞれほとんどないことを確めた。

結 果

ピクレート法による DMA の測定値 さきにのべたように、KOH を使用したことによつて、DMA のピクレート値が低下したと思われるので、この点を検討した。いろいろな濃度の DMA·HCl を、K₂CO₃、KOH を用いるピクレート法 (10% FA=1 ml) でそれぞれ測定したときの O. D. を Fig. 1 に示す。どちらのアルカリの場合でも、DMA-N 濃度 (KOH では 140 μg まで、K₂CO₃ では 56 μg まで) と、O. D. の関係には直線性があつた。DMA ピクレートの O. D. は KOH を用いた方がはるかに小さく、同一濃度の DMA-N で K₂CO₃ 使用の場合の 6% 弱であつた。

同一条件で TMA·HCl を測定したときの値 (標準曲線) も Fig. 1 に示したが、DMA と等モルの TMA との O. D. 比 (以下この比を**発色率**と呼び、% であらわす) は、KOH 使用のときは約 4%, K₂CO₃ では約 50% の値を示した。前述したように DYER¹⁾ は、K₂CO₃ を使用したときこの値を 20% としているが、今回えられた値がこれよりはるかに高いことは注目される。なお DMA, TMA が混在するときの O. D. は、両者それぞれの O. D. の和と合致することが認められた (Table 1) から、上にのべた DMA, TMA の O. D. 比の関係は、両アミンが混在するときも成立すると考えられる。

FA 量の影響 以上の結果は、すべて 10% FA を 1 ml 添加して得られたものだが、FA 量を 0 から 4 ml にまで変えたときの、DMA-ピクレート値の変化を Fig. 2 に示した。この場合 2 つのアルカリでは結果はきわめて対照的で、K₂CO₃ では FA 量の増加とともに DMA 値は増加するが、KOH では FA が 1 ml の場合は 0 のときの 1/5 以下となり、これより FA が増加すれば DMA 値もわずかず増加することが

Fig. 1. Optical density of TMA- and DMA picrate using KOH or K_2CO_3 .

ば満足できるほど小さいが、更に低くできるような条件を求めるテストを行なつてみた。

Fig. 2 から KOH 使用の場合は、適宜な FA 量るとき DMA-ピクレートの最小値が得られるものと考え、やや詳細に FA 量の影響を調べた。この結果、10% FA の 0.5 ml 付近が最小であることがわかったが、

Fig. 2. Effect of FA concentration on the colour development of DMA picrate as determined by picrate method using KOH or K_2CO_3 .

Ratio of colour development refers to per cent of colour given by an equivalent concentration of TMA.

Table 1. Optical density given by the picrates of TMA, DMA and their mixtures.

Alkali reagents	Optical density		
	TMA*	DMA**	TMA+DMA
KOH (25%)	0.136	0.051	0.188
K_2CO_3 (50%)	0.190	0.176	0.380

* TMA: 10.0 μg as N in samples using KOH or K_2CO_3 .

** DMA: 100 μg as N in the sample using KOH, and 20.0 μg as N in the sample with K_2CO_3 .

認められた。

DMA 測定値をより小さくする試み ピクレート法の測定値がより正しく TMA 値を与えるようにするには、DMA 値がより小さく、無視できる程度であることが望ましい。前述の条件 (25% KOH の使用、FA は 10% のもの 1 ml) でも、その DMA 値はほ

ぼ満足できるほど小さいが、更に低くできるような条件を求めるテストを行なつてみた。

次にピクレート法の反応 (抽出) 温度の影響と、KOH を NaOH に置きかえた場合について検討した。反応温度を 30°C 以下にすることは実用上も困難であるし、TMA の測定精度もおちる⁹⁾ので、50°C につきテストを行なつた。また水酸化物試薬についても、NaOH 以外は非実用的と考えて対象

Fig. 3. FA concentration required to minimize colour development of DMA picrate when using KOH.

Table 2. Effect of reaction temperature and of NaOH on the ratio of colour development.

Alkali reagents (25%)	Reaction temperature (°C)	Optical density		Ratio of colour development
		DMA (N: 100 µg)	TMA (N: 10 µg)	
KOH	50	0.124	0.163	7.6
	30	0.050	0.131	3.8
NaOH	30	0.062	0.172	3.6

としなかった。なおこのテストでは TMA 値も当然影響をうけることを考え、DMA の発色率が小さい場合をより良い条件として判定した。この結果を Table 2 に示したが、反応温度が 50°C では 30°C に比し明らかに発色率が大となり、NaOH の使用では KOH の場合とほとんど差がなかった。

以上からはじめに行なつた KOH を使用する実験条件は、ほぼ妥当であつたと考えられ、これ以上 DMA 値を小とすることは、本報告で検討した範囲ではできなかった*。

タラ類魚肉についての測定 KOH と K_2CO_3 の使用が、実際に魚肉試料についてピクレート値を求め、どのような差となつてあらわれるかを検討した。

Table 3. TMA and DMA determinations for TCA extracts of cod and Alaska pollock meat by DYER's and the modified method, gas-liquid chromatography, and the copper-dithiocarbamate method.*

Sample extracts**	Picrate method		Gas-liquid chromatography (TMA)	Cu-dithiocarbamate method (DMA)	Ratio of colour development calculated (%)	
	K_2CO_3	KOH			K_2CO_3	KOH
1	7.0	4.3	4.3	8.3	33	0
2	4.8	2.6	2.1	6.6	41	7.5
3	8.2	1.9	1.2	18.0	35	3.9
4	4.7	1.0	0.9	9.8	39	1.0
5	5.0	1.2	1.0	7.6	52	2.8
6	4.4	2.0	1.7	7.4	35	4.1

* Unit: As µg N per ml except for the last two columns.

** Sample extract was prepared from one part fish meat and two parts of 10% TCA solution.

Sample 1: Cod fillets stored 1 week at 5°C after irradiation at 50 Krad.

Sample 2: Alaska pollock fillet stored 10 days at 1°C after irradiation at 50 Krad.

Sample 3: Alaska pollock fillet stored 6 months at -18°C.

Sample 4: A different Alaska pollock from the above lot.

Sample 5: Alaska pollock stored 1 week at 0°C after frozen storage at -5°C to -10°C for 8 days.

Sample 6: Salted cod fillet stored for 10 months at -18°C.

* 実験条件の検討は、予備的にはあるが他にも KOH の濃度をかえること、反応時の水溶液-トルオールの量比をかえることなどを試みたが、いずれも発色率を低下させることができなかった。

用いた試料はマダラ *Gadus macrocephalus* およびスケトウ *Theragra chalcogramma* の肉をガンマ線照射 (0.5 Mrad) し、 $1^{\circ}\sim 5^{\circ}\text{C}$ に1週間保存したもの (各魚種1試料)、スケトウ肉を -18°C に6か月以上保存したもの (2試料)、スケトウ肉 (漁獲直後) を $-5^{\circ}\sim -10^{\circ}\text{C}$ に8日間保存し、その後 0°C に7日間おいたもの (1試料)、ならびに塩蔵マダラ肉を -18°C に10か月間保存したもの (1試料) の計6試料である。これらの魚肉の精肉部 10 g に 10% TCA 20 ml を加え、乳鉢でよく磨砕した後濾過した濾液を抽出液試料とした。ピクレート法で測定する場合は、いずれもこの試料 2 ml を用いた。なおあらかじめ漁獲直後から約1か月間 -40°C に保存した新鮮なマダラから、同一条件で抽出液をつくり、これに TMA-HCl 溶液 1 ml (N として $10\text{ }\mu\text{g}$) を添加した場合の O. D. を両アルカリについてとり、抽出液が O. D. に影響を及ぼさないことを確かめた。

Table 3 に示すように、KOH 使用と K_2CO_3 使用とでは明らかにピクレート値が異なり、 K_2CO_3 の方が大きい。特に試料3のように DMA の多いものでは、その差は相当に著しいものとなる。KOH を用いた測定値は、ガスクロマトグラフ法による“真の”TMA 値とほぼ一致し、DMA の影響をあまり受けないことを示している。しかし試料3のような場合は、KOH を用いても、ピクレート値はやはり“真の”TMA 値より高くなる。これらのピクレート値と“真の”TMA 値との差を DMA に起因するものと考え、この差の値を、別に銅-ジチオカーバメート法で求めた DMA 値でわつて、DMA の発色率を求めてみると、Table 3 の右端の欄に示すようになる。この発色率の値は、KOH で $0\sim 7.5\%$ 、 K_2CO_3 では $33\sim 52\%$ とかなりのバラツキがみられるが、DMA 量そのものが少ないから、特に KOH の場合のバラツキはやむを得ないであろう。DMA 量の多い試料3の場合は、KOH での発色率はさきに実験的に求めた 4% とよく一致している。 K_2CO_3 の場合、この平均値は 40% となり、さきに求めた約 50% よりやや低くなる傾向がみられた。

考 察

Table 3 に示した各試料中で、もつとも DMA の多いものでも魚肉中の含有濃度 (N) として計算すると、約 $5.5\text{ mg}\%$ (このとき TMA-N は約 $0.4\text{ mg}\%$) である。しかし徳永^{6,10)}は、スケトウを凍結貯蔵した際の DMA 増加について、 $-2^{\circ}\sim -3^{\circ}\text{C}$ では 30 日、 $-13^{\circ}\sim -15^{\circ}\text{C}$ でも 60 日後に DMA-N が $10\text{ mg}\%$ をこえた例をみており、また別の例では $-17^{\circ}\sim -19^{\circ}\text{C}$ においてすら 75 日後に $10\text{ mg}\%$ をこえる程度となつたことを報告している。またこの試料について同時に微量拡散法によつて TMA を測定し、DMA-N が $10.6\text{ mg}\%$ のときでも、TMA-N は $1.8\text{ mg}\%$ (補正值) にすぎなかつたことをみている。その他天野¹¹⁾は、冷凍及び塩蔵のマダラ肉中に、FA をそれぞれ $15, 10\text{ mg}\%$ 検出しているが、この FA の大部分は TMAO が酵素分解を受けた際、DMA とともに生成すると考えられ、他の報告中の FA/DMA の数値比率 (例えば天野⁵⁾) からみても、このとき同時に存在した DMA は、N として $10\text{ mg}\%$ 内外と推定される。本報告の緒言にのべた照射マダラ肉の例をも考えるなら、タラ類の肉では DMA-N が $10\text{ mg}\%$ 程度となることはさほど珍しくなく、しかもこのときの“真の”TMA-N は $1\sim 2\text{ mg}\%$ であることも、またしばしばである。

結局タラ類の肉では、細菌の繁殖を抑えつつ保存がやや長期にわたるような場合には、DMA が相対的に卓越することになり、冷凍、塩蔵ならびに照射保存などがこの典型的な例となる。従つてこのような処理品については、DMA によるピクレート法の誤差に十分留意する必要がある。今回の結果では、タラ類の肉抽出液試料での DMA の発色率は平均 40% であつたから、DMA-N が $10\text{ mg}\%$ の場合、 K_2CO_3 を使用したピクレート値は約 $4\text{ mg}\%-\text{N}$ となる。この値は、例えばカナダの水産物検査で、タラ類魚肉の品質限界値として採用されている TMA-N 値 ($5\text{ mg}\%$) に近い。これらの点を考慮すれば、少なくともタラ類の鮮度判定にピクレート法を用いる場合は、アルカリとして KOH を使用すること、また 10% FA は 1 ml 以上加えないことを定法化する必要があると思われる。また DYER の原法ではピクレート法の反応温度は特に規定されていないが、橋本⁸⁾の指摘する反応温度の TMA 測定値への影響のみでなく、DMA 測定値への影響

も明らかに認められるので、今後はピクレート法の反応温度を適宜に規定することが望ましい。

DMA のピクレート法による発色を低下させる要因は、明らかに FA および水酸化アルカリの存在である。これは FA が OH イオンの存在下で DMA と反応し、もはやピクレートをつくらない形となることを示唆している。事実 FA は OH イオン存在下、室温で 1, 2 級アミンと反応して methylolamine をつくり、これは更に 1 分子のアミンと縮合して、bis-(alkylamino)-methane をつくることは、かなり古くから知られている¹²⁾。

おそらくピクレート法で KOH (または NaOH) を使用した場合もこのような反応がおこり、 K_2CO_3 の場合はこれがおきないか、乃至はごく僅かしかおきないのではないかと推定される。しかし一方、FA 量が増加すると DMA の測定値が上昇する (特に K_2CO_3 の場合) のは、どのような理由によるかは明でない。

要 約

タラ類魚肉は保存中に DMA を生成するため、DYER 法による TMA 値が過大となるおそれがあるので、これにつき検討した。

DMA のピクレート値は、使用するアルカリによつて著しく影響され、等モルの TMA のピクレート値との比 (発色率) は、50% K_2CO_3 使用では約 50% なのに対し、25% KOH では約 4% にすぎなかつた。

FA 量の影響は 2 つのアルカリ試薬に対しきわめて対照的で、 K_2CO_3 では FA の増加とともに DMA の発色率は増大し、KOH では 10% FA 0.5~1 ml のときが最小であつた。NaOH の使用、反応温度などについても検討したが、DMA の発色率を上記の 4% 以下とすることはできなかつた。

タラ類魚肉の抽出液について、 K_2CO_3 , KOH を用いるピクレート値を比較し、KOH 使用のときは、ガスクロマトグラフ法による“真の” TMA 値とほぼ一致し、 K_2CO_3 では明らかに過大値となることを認めた。

以上の結果から、少なくともタラ類魚肉試料について DYER 法により TMA 値を求める場合は、KOH を使用し、FA は 10% のもの 1 ml 以下とするよう提案した。

文 献

- 1) W. J. DYER: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **6**, 351~358 (1945).
- 2) W. J. DYER and Y. A. MOUNSEY: *ibid.*, **6**, 359~367 (1945).
- 3) S. BETHEA and F. HILLIG: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.*, **48**, 731~735 (1965).
- 4) 野中順三・三谷仁巳・小泉千秋: 本誌, **33**, 753~757 (1967).
- 5) K. AMANO and K. YAMADA: *This bull.*, **29**, 695~701 (1963).
- 6) 徳永俊夫: 北水研報告, No. 30, 90~97 (1965).
- 7) C. H. CASTELL, D. M. BISHOP, and W. E. NEAL: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **25**, 921~933 (1968).
- 8) 橋本芳郎・岡市友利: 本誌, **23**, 269~272 (1957).
- 9) 戸沢晴巳・榎原和子: 未発表.
- 10) 徳永俊夫: 北水研報告, No. 29, 108~132 (1964).
- 11) 天野慶之・山田金次郎・尾藤方通: 東海水研報告, **29**, 695~701 (1963).
- 12) M. M. SPRUNG: *Chem. Revs.*, **26**, 297~338 (1940).