

キャピラリー電気泳動による魚介類の揮発性塩基性窒素分析法の検討

中嶋 昌徳・西田 政司

Determination of Volatile Basic Nitrogen in Raw Fish by Capillary Electrophoresis

Masanori NAKASHIMA, Seiji NISHIDA

要 旨

鮮魚介類の鮮度指標として用いられている揮発性塩基性窒素(VBN)の分析法を検討した。VBNは古くからコンウェイユニットを使用する微量拡散法で行われているが、今回、VBNの主な成分であるアンモニア(NH₃)、トリメチルアミン(TMA)、ジメチルアミン(DMA)の分別定量をキャピラリー電気泳動を用いて行った。試料を3%TCAで抽出し、希釈してろ過するだけの簡単な前処理で精度よく迅速に分析することができた。鮮魚を20℃で数日間放置してNH₃、TMA、DMAを測定したところ、微量拡散法のVBNの値とCE法によるNH₃-N + TMA-Nの値の相関はR²=0.997と良好であった。なお、本法の定量下限はNH₃-Nは3.9N-mg%、TMA-Nは1.2N-mg%、DMA-Nは0.86N-mg%であり鮮度指標として十分であった。

Key Words : キャピラリー電気泳動 Capillary Electrophoresis, 揮発性塩基性窒素 volatile basic nitrogen, アンモニア ammonia, トリメチルアミン trimethylamine, ジメチルアミン dimethylamine, 鮮魚 raw fish

I はじめに

一般に魚介類の鮮度指標として揮発性塩基性窒素(VBN)が用いられる。これは魚介類の腐敗の進行に伴いタンパク質やアミノ酸が分解しアンモニア(NH₃)やトリメチルアミン(TMA)などの揮発性アミンが生成するため、これらのVBN量を一括して定量することにより、腐敗の進行状況が判断できるからである。特に初期腐敗の判定に有効で、通常、VBNが30～40N-mg%のときに初期腐敗と判断される¹⁾。

またTMAは魚臭の中心的化合物として知られており、魚肉中に多く含まれるトリメチルアミンオキシドが鮮度低下に伴い細菌の働きによりTMAに分解されるため、TMAも魚介類の鮮度判定に利用されている^{2,3)}。VBNの測定は古くからコンウェイユニットを用いた微量拡散法¹⁾で行われているが、拡散操作に時間を要し、迅速な検査ができない。また微妙な滴定操作が必要なため機械による自動化ができない等の欠点もある。

著者らは前報³⁾で、VBNとアンモニア性窒素量(NH₃-N)との相関について報告した。また、外海ら³⁾はヘッドスペース-ガスクロマトグラフィー(GC)法によるNH₃およびTMA、ジメチルアミン(DMA)、モノメチルアミン(MMA)の定量法とこれらの揮発性窒素の総量と微量拡散法によるVBN量がほぼ一致していることを報告している。VBNの測定法は食品衛生検査指針ではNH₃は微量拡散-比色法、TMAは比色法、DMAは蛍光誘導体化-HPLC法が示されているが、その操作は煩雑である。また、外海らのGC法は測定レンジが狭く、また、NH₃とTMA、DMAの一斉分析ができない。

著者らは今回、魚介類の鮮度を迅速に測定することを目的としてキャピラリー電気泳動(CE)を用いたNH₃およびTMA、DMAの一斉分析法を検討したので報告する。

II 材料および方法

1. 試料

福岡市食品衛生検査所から入手した新鮮なスズキ、マ

1.福岡市保健環境研究所 理化学課

ダイ, ハマチを用いた.

2. 試薬および試液

(1) 標準溶液

NH₄ 標準溶液: アンモニウム標準液 (1000ppm 和光) を 0.3%トリクロロ酢酸 (TCA) で適宜希釈した.

TMA 標準溶液: トリメチルアミン標準液 (1000ppm 悪臭物質試験用 和光) を 0.3%TCA で適宜希釈した.

DMA 標準溶液: 塩酸ジメチルアミン (和光特級) を 53.1mg 正確に量り 0.1MHCl で 30ml に定容し 1000ppm 標準原液とし, 0.3%TCA で適宜希釈した.

(2) 泳動液

イミダゾール (和光特級), 18-Crown-6 (1,4,7,10,13,16-ヘキサオキシクロオクタデカン 和光特級) を使用した.

20mM イミダゾール, 0.5mM18-crown-6 溶液を調製し, 1M 酢酸で pH4.5 になるように調整した.

純水は Barnstead 社製 EASYpure で導電率 17.8M Ω・cm に調製したものをを用いた.

(3) VBN 測定用試薬

食品衛生検査指針理化学編に従った.
その他試薬は市販の特級試薬を用いた.

3. 装置

コンウェイ装置: 柴田科学製の微量拡散装置を使用した.

CE 装置: ヒューレット・パッカード (HP) 社製 HP3DCE システム G1600 を使用した.

4. 試験溶液の調製

魚介類の可食部を細切し, その 5g に 3%TCA20ml を加え, ホモジナイザーで均一化し 3%TCA で 50ml に定容した. よく混和して 10 分間放置後ろ紙 (TOYO No.5A) を用いてろ過し, ろ液を VBN 用試験溶液とした.

また, 更に試験溶液を蒸留水で 10 倍希釈しメンブランフィルター (孔径 0.20 μm) でろ過して CE 用試験溶液とした.

5. 測定方法

(1) VBN

理化学検査指針に準拠した. なお, 拡散条件は 37℃ 80 分間とした.

(2) CE 法による NH₄, TMA, DMA

キャピラリー: フューズドシリカ 内径 75 μm 有効長 72cm 全長 80.5cm

泳動液: 20mM イミダゾール, 0.5mM18-crown-6, pH4.5

電圧: 20KV (Positive)

キャピラリー温度: 15.0℃

試料注入量 (加圧量): 500mbar・s

分離モード: キャピラリーゾーン電気泳動

検出波長: Sig 280/40nm, Ref 210/10nm

プレコンデショニング: 4 分間

III 結果および考察

1. CE 法の条件

(1) 泳動液の検討

NH₄, TMA, DMA は UV 吸収を持たないので泳動液に強い UV 吸収があるものを使用しマイナスピークを検出する間接吸光法を用いた. 泳動液として HP 社のカチオン分析用バッファーで検討したが, 抽出液の TCA の影響を強く受けるためベースラインが安定しなかった.

次に HP 社のアルキルアミン分析法 (No476) に従い, 20mM イミダゾール, 0.5mM18-crown-6, pH4.5 を泳動液として検討したところ NH₄, TMA, DMA は Fig.1. (A) に示すとおり分離した. また, Fig.1. (B) に 20℃ で 2 日間放置したハマチの TCA 抽出物のエレクトロフェログラムを示す.

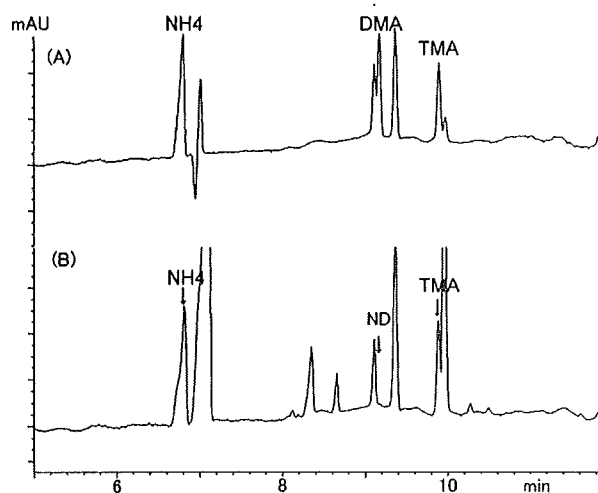


Fig.1. Electropherograms of volatile amines standard and hamachi extracted with 3%TCA

(A) NH₄, TMA and DMA mix standard solution in 0.3%TCA (each 2.5ppm)

(B) Hamachi kept at 20℃ for two days

(2) 再現性

各標準溶液 (2.5ppm) の移動時間及びピーク面積の相対標準偏差 (RSD, n=5) は Table1 に示すとおり移動時間は 0.04%以下, ピーク面積は 3.59%以下とともに良好であった.

Table1. Repeatability for NH₄, TMA and DMA of Migration Time and Peak Area.

	RSD (n=5)		
	NH ₄	TMA	DMA
Migration time (%)	0.03	0.04	0.04
Peak area (%)	1.79	1.78	3.59

(3) 定量下限, 直線性, 範囲

濃度範囲を 0.5ppm から 50ppm で検量線を作成したところ Fig.2 に示すとおり R² = 0.999 の良好な直線が得られた. 検量線の下限 0.5ppm を窒素量に換算すると NH₄-N は 0.39ppm, TMA-N は 0.12ppm, DMA-N は 0.086ppm となる.

鮮度の指標として試料濃度 40ppm (4mg%) あれば十分なので, 定量下限値は, NH₄-N は 39ppm (3.9N-mg%), TMA-N は 12ppm (1.2N-mg%), DMA-N は 8.6ppm (0.86Nmg%) とした.

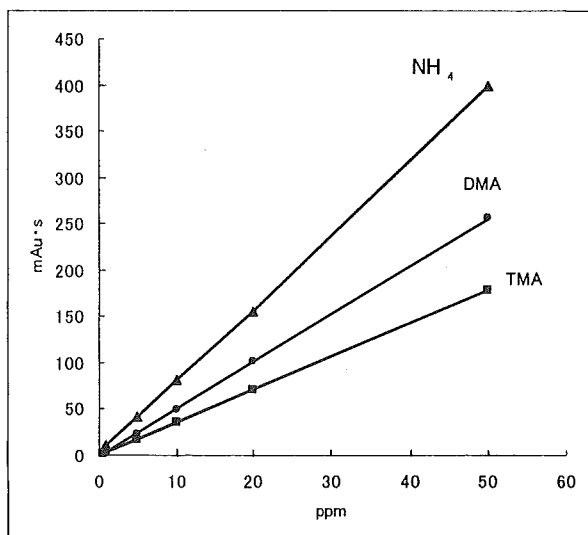


Fig.2. Calibration curve for NH₄, TMA, DMA (each 0.5 ~ 50ppm)

NH₄ : $y=7.911x-1.77$ R²=0.9997

TMA : $y=3.565x-0.223$ R²=0.9999

DMA : $y=5.147x-1.747$ R²=0.9999

2. VBN と NH₄・TMA の経時変化

新鮮な魚介類 (スズキ, マダイ, ハマチ) を 20℃ で 0 日, 1 日, 2 日, 3 日, 6 日間放置して VBN と NH₄, TMA, DMA を生成させたものを試料とし, TCA 抽出を行い微量拡散法で VBN を, CE 法で NH₄・TMA・DMA を測定

した. スズキ, マダイ, ハマチの 0 日目は TMA はいずれからも検出されず, NH₄ は 15 ~ 16.3N-mg% であった.

放置 1 日目はスズキ, ハマチからは TMA が検出されなかったが, マダイから 14.9N-mg% の TMA が検出された. マダイの NH₄ は 11.8N-mg% と高くはなかったが, VBN は 25mg% と初期腐敗に近い値だった.

放置 2 日目はスズキ, ハマチからも TMA が検出された. TMA が検出される段階ではいずれの検体も悪臭が強かったが, スズキ, マダイの VBN は 30N-mg% 以下であった. このことから TMA の生成と腐敗の関連が示唆された. なお, DMA はいずれの検体からも検出されなかった.

Table2. Contents of NH₄, TMA, DMA in Raw Fishes determined by CE and by Conway's method

Sample (days)	CE method			Conway's method	
	NH ₄	TMA	DMA	Total-N	VBN
	(unit: N-mg%)				
suzuki (0)	15.0	ND	ND	15	15
suzuki (1)	13.4	ND	ND	13	13
suzuki (2)	20.7	1.8	ND	22	24
suzuki (3)	88.6	19.0	ND	108	98
suzuki (6)	308.3	33.2	ND	341	331
madai (0)	15.2	ND	ND	15	13
madai (1)	11.8	14.9	ND	27	25
madai (2)	11.3	40.4	ND	52	49
madai (3)	133.9	48.0	ND	182	166
madai (6)	451.0	54.2	ND	505	525
hamachi (0)	16.3	ND	ND	16	17
hamachi (1)	17.2	ND	ND	17	20
hamachi (2)	35.3	11.0	ND	46	48
hamachi (3)	80.2	15.6	ND	96	105
hamachi (6)	350.3	16.5	ND	367	370

ND; NH₄ : <3.9 TMA: <1.2 DMA: <0.86

3. VBN と NH₄・TMA の相関

VBN と NH₄-N+TMA-N の相関は Fig.3 に示すとおり (NH₄-N+TMA-N) = 1.014 (VBN) - 2.0195, 相関係数 0.997 とほぼ一致しており, VBN の代わりに NH₄-N, TMA-N を測定することで代用ができることが裏付けられた.

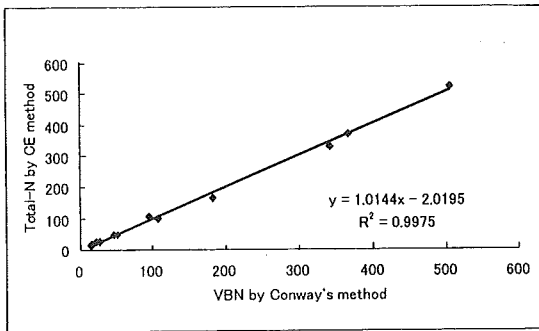


Fig.3. Correlation of Volatile Nitrogen in fishes between CE method and Conway's method

IV ま と め

今回検討した CE による NH_4 ・TMA・DMA の定量法は、試料を TCA 抽出後、希釈し更にろ過する簡単な前

処理だけで迅速に行えた。分析時間は一検体あたり 30 ~ 40 分程度で従前の微量拡散法の半分以下であり、また、分析精度も良好であった。魚介類の鮮度の指標として用いられる VBN に代わる指標として、 NH_4 -N と TMA-N の和が有用であることが裏付けられ、鮮魚介類の苦情等の検査に充分活用できると思われた。

また、魚肉中の TMA の生成と腐敗の関係については今後、魚種を増やしてデータを積み重ねたい。

文 献

- 1) 食品衛生検査指針理化学編：p. 269 ~ 271 (1991).
- 2) 林 誠：食衛誌 11 p.432 ~ 433 (1970).
- 3) 食品衛生検査指針理化学編：p. 275 (1991).
- 4) 中嶋昌徳ら：福岡市保健環境研究所報 第 25 号：p. 55 ~ 59 (2000).
- 5) 外海泰秀ら：食衛誌 25 p.149 ~ 157 (1984).