

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 (第2報)

中嶋 昌徳・西田 政司

Determination of Volatile Basic Nitrogen in Fish by Capillary Electrophoresis(Part 2)

Masanori NAKASHIMA, Seiji NISHIDA

Summary

Determination of volatile basic nitrogen (VBN) in fish by capillary electrophoresis (CE) were studied in former report, but peak of trimethylamine (TMA) was influenced by sample matrix. The method was improved using N_2 gas through distillation-CE. Sample fish were extracted by 3% trichloroacetate. Extract was measured 10ml in a distillation flask. After addition of 50ml water, 35g potassium carbonate, the flask was incubated under 37°C water for 40 min., and through N_2 gas 800ml/min.. VBN was collected with 0.02mol/L hydrochloric acid solution. Recoveries of ammonia (NH_4), TMA, dimethylamine (DMA) were beyond 90%. VBN by Conway's micro diffusion method and total volatile nitrogen (NH_4 and TMA) detected distillation-CE method in fish showed a good correlation ($r=0.9978$, $n=25$).

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, 通気蒸留 distillation

I はじめに

著者らは前報¹⁾で、魚介類中の揮発性塩基性窒素 (VBN) の分析をキャピラリー電気泳動 (CE) を用いて検討した。

VBN の主成分であるアンモニア (NH_4)、トリメチルアミン (TMA)、ジメチルアミン (DMA) などの揮発性アミンを分別定量することにより VBN を測定した。

しかしながら、前法²⁾では TMA のピーク近くに妨害ピークがあり、前法の検出は間接吸光法を用いていたため吸収スペクトルによる同定ができず、妨害を除いたチャートが求められた。そこで今回、更に改良を加え、VBN の揮発性に着目し、前法のトリクロロ酢酸 (TCA) 抽出液を通気蒸留を行うことで精製したところ、妨害ピークが除去でき良好な結果が得られたので報告する。

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イワシ、カツオ、マダイ、ハマチ、スズキ等

2. 試薬および試液

(1) 標準原液 (各 1000ppm)

NH_4 標準溶液: 塩化アンモニウム (特級) を 89.15mg 量り、0.02mol/L HCL で 30mL に定容した。

TMA 標準溶液: 塩酸トリメチルアミン (和光特級) を 47.7mg 量り、0.02mol/L HCL で 30mL に定容した。

DMA 標準溶液: 塩酸ジメチルアミン (和光 1 級) を 53.1mg 量り、0.02mol/L HCL で 30mL に定容した。

MMA 標準溶液: 塩酸モノメチルアミン (和光特級) を 65.3mg 量り、0.02mol/L HCL で 30mL に定容した。

(2) 抽出および通気蒸留用

トリクロロ酢酸 (和光特級)、炭酸カリウム (和光特級)

(3) CE 泳動液

イミダゾール (和光特級)、18-Crown-6 (1,4,7,10,13,16-

1. 福岡市保健環境研究所 理化学課

(現所属 福岡市教育委員会学校給食センター)

2. 福岡市保健環境研究所 理化学課 (現所属 衛生化学部門)

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²⁾に従った。その他試薬は市販の特級試薬を用いた。

3. 装置

コンウェイ装置は柴田科学製の微量拡散装置を, CE 装置はヒューレット・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り, 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) を用いてろ過した。

このろ液 10ml 採り, 水 50ml に炭酸カリ 35g 加えたアルカリ溶液を加え, 37℃の水浴上で 40 分間窒素ガスで通気蒸留を行い, 0.02mol/LHCl 溶液 9ml に捕集し, 水で 10ml に定容後 CE 用試験溶液とした。

5. 測定方法

(1) VBN

コンウェイ装置を用いた微量拡散法により測定した。なお, 拡散条件は 37℃ 80 分間とした。

(2) CE 法(前報と同じ条件)

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
 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. 通気蒸留法の検討

カツオを 3 日間放置して本法に従い TCA 抽出し, 抽出液を通気蒸留後, CE で NH₄ 等を測定したところ, Fig. 1 に示すとおり良好なチャートが得られ, NH₄ と TMA が検出された。

また, ハマチを 20℃で 2 日間放置したときの前報告のチャートを Fig. 2 (1)に, また今回の本法で分析した

ハマチのチャートを Fig. 2 (2)に示す。TMA の近くの妨害は除去されているのが確認された。

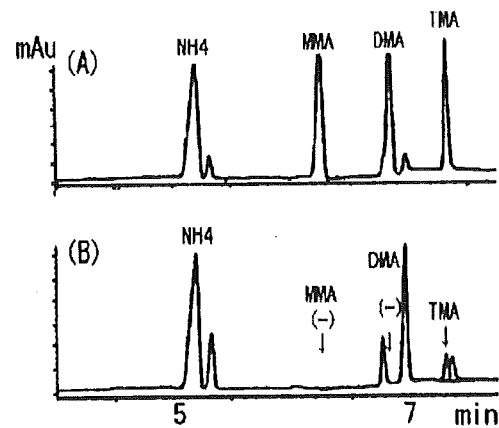


Fig.1 Electrofelogram of (A) 10ppm standard solution of NH₄, monomethylamin (MMA), DMA, TMA and (B) volatill amine of Skipjack tuna preserved for 3 days at 20 °C

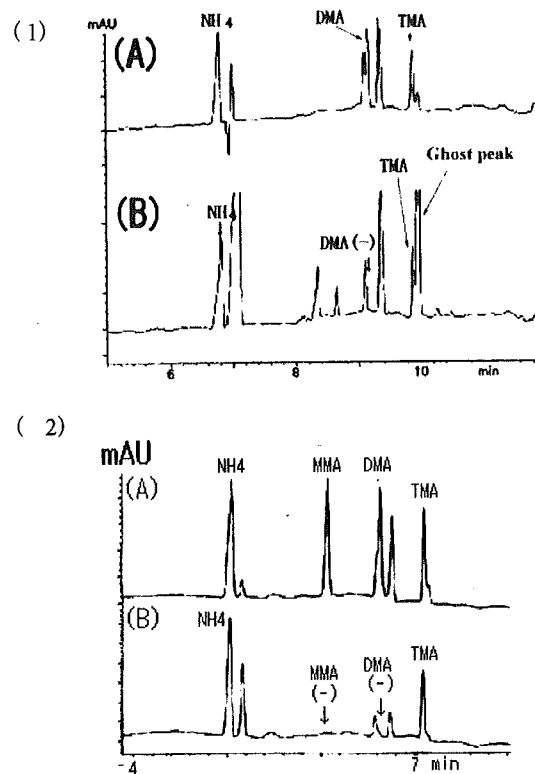


Fig.2 Electrofelogram of (1) not using N₂ gas through distillation and (2) using N₂ gas through distillation (A) 2.5ppm standard solution of NH₄, MMA, DMA and TMA (B) volatill amine of Yellowtail preserved for 3 days at 20 °C

2. 通気蒸留の条件

次に通気蒸留の最適条件を検討した。

(1) 水浴の温度

微量拡散法の拡散条件に合わせ、温度を37℃にした。

(2) 通気時間

通気時間を20minから100minの間で検討した。結果をFig.3に示す。

通気時間は40min以上あればMMAをのぞき90%以上の回収率であった。MMAは回収率がいずれの条件でも低く、100分間通気しても回収率は60%程度であった。

外海らの³⁾報告によれば、MMAは鮮魚ではほとんど生成しないので、鮮魚のVBNの定量から無視できると考えられたのでNH₄、TMA、DMAの回収率が全て90%以上となる40minを本法の通気時間にした。

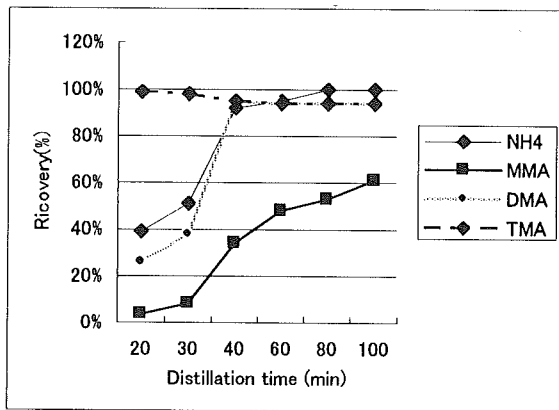


Fig.3 Effect of distillation time on recovery of NH₄, MMA, DMA and TMA at there level of 1mg

(3) 窒素通気量および炭酸カリウム添加量

窒素通気量を600～1000mL/minの間で検討したが大きな差はみられなかったため、捕集液が吹きこぼれない800mL/minとした。また、アルカリ添加量を30g～50gで検討したが、NH₄、TMA、DMAの回収率に大きな違いはみられなかったため、添加量を35gにした。

(4) 定量下限

濃度範囲0.5ppmから50ppmで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、試料濃度としてNH₄-Nは3.9ppm、TMA-Nは1.2ppm、DMA-Nは0.86ppm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。

3. 本法と微量拡散法との相関および経日変化

新鮮な魚介類(イワシ、カツオ、マダイ、スズキ、ハマチ)を20℃で0日、1日、2日、3日、6日間放置して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、本法でNH₄・TMA・DMAを分別定量した。結果をTable 1に示す。

(1) 本法微量拡散法との相関

本法と微量拡散法との測定値の相関を求めた。結果はFig. 4に示すとおり相関係数r = 0.9978という良好な相関が得られ、前法と同様に微量拡散法と同等の分析法であることが確認できた。

Table 1 Analytical results of NH₄, MMA, DMA and TMA by N₂ gas through distillation-CE method and VBN by Conway's micro diffusion method in fish

Sample (Days)	distillation-CE method				micro diffusion method
	ammonia	TMA	DMA	Total-N	VBN
Sardine (0)	15	ND	ND	15	14
(1)	20	ND	ND	20	19
(2)	27	7	ND	34	31
(3)	38	6	ND	44	40
(6)	264	11	ND	275	275
Skipjack (0)	23	ND	ND	23	22
(1)	23	ND	ND	23	22
(2)	23	ND	ND	27	26
(3)	37	2	ND	39	46
(6)	90	5	ND	95	89
Red sea bream(0)	15	ND	ND	15	14
(1)	16	9	ND	25	22
(2)	21	43	ND	63	59
(3)	40	45	ND	84	80
(6)	257	31	ND	289	316
Sea bass (0)	13	ND	ND	13	15
(1)	14	ND	ND	14	13
(2)	21	1	ND	23	24
(3)	85	17	ND	103	98
(6)	310	31	ND	340	331
Yellow tail (0)	15	ND	ND	15	17
(1)	19	ND	ND	19	20
(2)	33	8	ND	41	48
(3)	87	14	ND	102	105
(4)	375	18	ND	392	370

ND : NH₄<3.9 TMA< 1.2 DMA<0.86 (N-mg%)

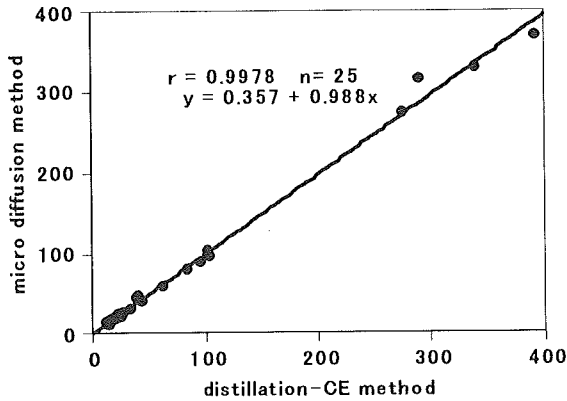


Fig.4 The correlation of VBN in fish that was analysed by Conway's micro diffusion method and N₂ gas through distillation-CE method (n=25)

(2) VBN と NH₄・TMA の経日変化

Fig. 5 に魚種別の揮発性塩基窒素発生状況を 3 日目まで折れ線グラフで示す。TMA は 0 日は全ての試料で ND で、マダイは 1 日目から、イワシ・スズキ・ハマチは 2 日目から、カツオは 3 日目から TMA が生成した。

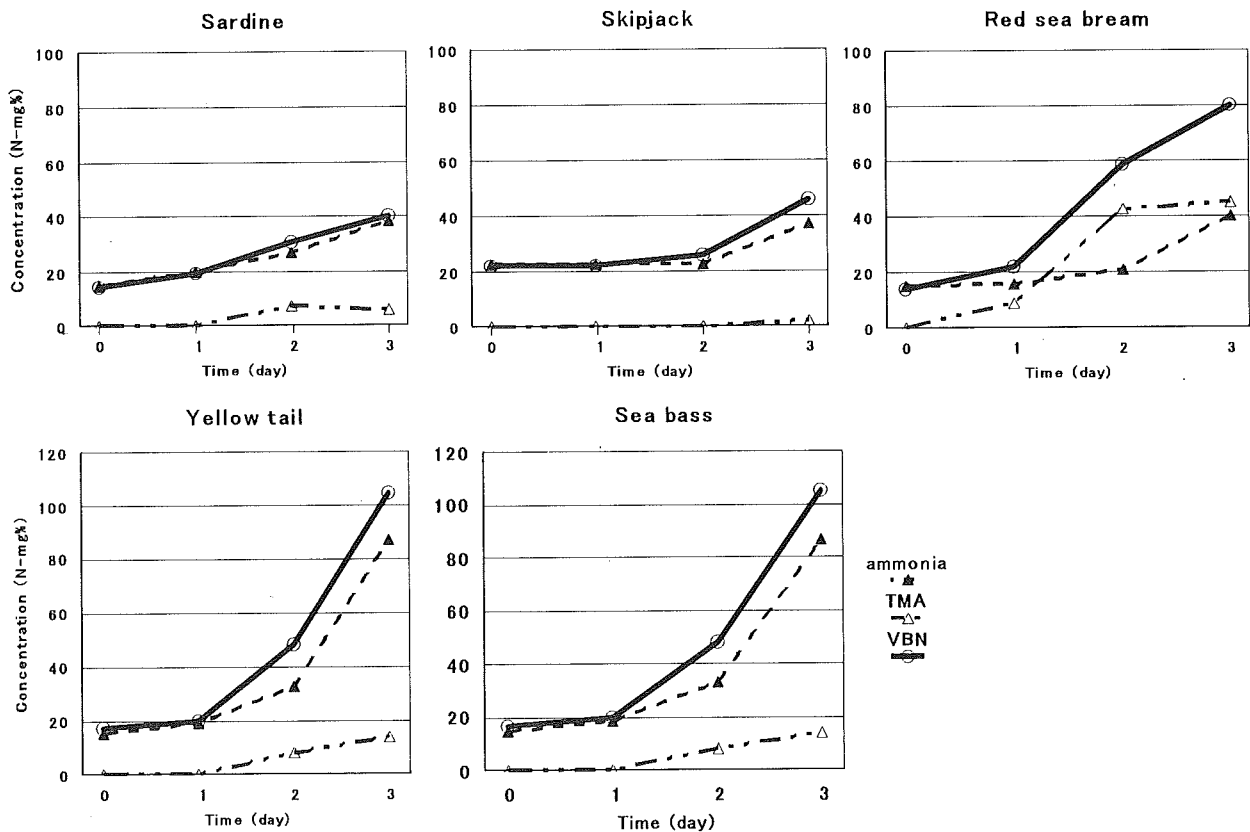


Fig.5 Variatin of NH₄, DMA, TMA and VBN in fish for 3 days at 20 °C
NH₄, DMA, TMA were analysed by N₂ gas through distillation-CE method.
VBN was analysed by Conway's micro diffusion method.

マダイの 1 日目は VBN は 22mg 鮮魚の鮮度指標から言えば初期腐敗の目安⁴⁾より小さい値であったが強い腐敗臭を呈していた。TMA はトリメチルアミンオキシド (TMAO) が分解して生成するが、魚肉中の TMAO は魚種により異なっており⁵⁾、マダイのように TMAO が多い魚種については VBN より、むしろ TMA を鮮度の指標にしたほうが良いと思われた。

IV ま と め

今回、前法の TCA 抽出 - CE 法に通気蒸留による精製操作を加えて、TMA ピーク近くの妨害の除去に成功した。本法は前法と同様に微量拡散法との整合性もあり、分析精度も同等であった。また分析時間は一検体あたり 60 分程度で従前の微量拡散法より迅速に行えた。

本法は NH₄ TMA の分別定量が簡便に行えるので、今後、鮮度指標として VBN の他に NH₄ および TMA も加え、魚種による違いのほか、精肉や納豆などのデータを加えていきたい。

文 献

- 1) 中嶋昌徳, 江頭 勝, 柳沼瑞江: 福岡市保健環境研究所報, 25, 55 ~ 59 (2000).
- 2) 厚生省生活衛生局監修: 食品衛生検査指針理化学編, 269 ~ 271, (1991).
- 3) 外海泰秀, 伊藤誉志男, 原田基夫: 食衛誌 25, 149 ~ 157, (1984).
- 4) 厚生省生活衛生局監修: 食品衛生検査指針理化学編: 275 ~ 276, (1991).
- 5) 日本水産学会編: 白身の魚と赤身の魚, 肉の特性, 水産学会シリーズ 13, 恒星社厚生閣, 68 ~ 77, (1976).