

魚介類における揮発性アミンの 分離定量に関する研究—I

ニンヒドリンによる揮発性アミンの発色*

原田勝彦・阿南忠明・城井 堅・山田金次郎

Studies on the Separation and Quantitative Determination of
Volatile Amines in Fish and Shellfish—I.
Color Development of Volatile Amines with Ninhydrin

By

Katsuhiko HARADA, Tadaaki ANAN, Katashi KII and Kinjiro YAMADA

In order to determine the volatile amines in fish and shellfish separately, the color development of mono-, di- and trimethylamine with ninhydrin has been, first of all, examined intending to apply it to colorimetric estimation.

The analyses were made on reaction mixtures with or without ascorbic acid as a reducing agent, in the condition varying pH values and durations of heating.

In these investigations, it has been revealed that only monomethylamine reacts with ninhydrin so intensively at a definite condition as to be able to apply its color development to colorimetric estimation.

1. 緒 言

生鮮タラ、イカおよびカニ類からホルムアルデヒドが検出され、生成機構が問題とされている^{1)~11)}。生鮮魚介類の筋肉またはその他の組織中でホルムアルデヒドが生成する場合、それに伴って多くの場合にジメチルアミンの生成が認められる^{2)~10)}。これら両物質の生成母体はトリメチルアミンオキシドであり、生成には酵素が関与すると考えられている^{3)~5), 7)}。しかし、生成機構について詳細な報告は見あたらない。

一方、トリメチルアミンオキシドは容易に還元されてトリメチルアミンとなり¹²⁾、またトリメチルアミンは酸化されてホルムアルデヒドとジメチルアミンを生成し、ジメチルアミンもまた酸化されてホルムアルデヒドとモノメチルアミンを生じるといわれている¹³⁾。このことは、魚介類におけるホルムアルデヒド

* 水産大学校研究業績 第513号, 1967年7月17日 受理
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 513
Received Jul. 17, 1967

の生成機構を調べるのに、これら揮発性アミン（以下トリメチルアミンを TMA, ジメチルアミンを DMA, モノメチルアミンを MMA と略称する）のそれぞれの消長をきわめる必要がある。

魚介類における揮発性アミンの分離検出または分離定量については、いくつかの報告がある^{14)~16)}。このうち、ホルムアルデヒドの生成に関連し必要なのは各アミンの分離検出ではなく分離定量である。分離検出については薄層クロマトグラフィーによって十分その目的が達成できるが¹⁶⁾、分離定量についてはなお検討の余地がある。

林ら¹⁵⁾はガスクロマトグラフィーによる揮発性アミンの分離検出を行なっているが、その方法について詳細な記述がなく、したがって直接分離定量に利用しにくい。一方、宮原¹⁴⁾はイオン交換樹脂によるカラムクロマトグラフィーで揮発性アミンの分離を行なっているが、MMA とアンモニアとの分離が十分でなく、さらに分離したアミンを中和滴定のみで定量し、比色定量を行っていないので方法が煩雑である。

一方、同じ報告で宮原は TMA, DMA, MMA がすべてニンヒドリン反応陽性であると述べている。このため、著者らは揮発性アミンを適当な方法で分離したのち、分離した各アミンをニンヒドリンで発色させ比色定量を行えば、魚介類におけるこれらアミンの分離定量ができると考えた。よってまずニンヒドリンによる MMA, DMA および TMA の発色について検討を行なった。その結果について報告する。

2. 実験方法および結果

2-1 試薬 使用したアミンおよび試薬はつぎのとおりである。MMA：特級 MMA 水溶液（和光純薬 K. K.）に 3 N 塩酸を当量加え、沸騰浴中で蒸発乾固し、塩酸塩を作り、エチルアルコールで再結晶を行なった。DMA：特級 DMA 塩酸塩（和光純薬 K. K.）をエチルアルコールで再結晶した。ニンヒドリン溶液：98%メチルアルコールに特級ニンヒドリン（和光純薬 K. K.）を溶解し、0.2% ニンヒドリン溶液をつくり、これを使用した。アスコルビン酸溶液：MC ILVAINE 磷酸緩衝液に特級 L-アスコルビン酸（片山 K. K.）を溶解した。イソプロピルアルコール溶液：イソプロピルアルコールと水を 1 : 1 の体積比で混合した溶液を使用した。

2-2 ニンヒドリンによる発色 宮原の報告¹⁴⁾の追試を行ない、原著と同一条件下で TMA, DMA および MMA の 1 μ M/ml 溶液についてニンヒドリンによる発色を調べた。その結果によると、MMA のみがわずかに発色し他は全く発色しなかった。よって、発色と反応液の pH との関係を検討した。すなわち、原著の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) のかわりに MC ILVAINE 緩衝液 (pH 4~9) を用いて反応液の pH が発色に及ぼす影響を調べた。その結果、pH 7.5 で MMA が最高の発色を示し、またこの pH で DMA も発色した。しかし、TMA は 5 μ M/ml の溶液を用いても全く発色しなかった。なお、MMA と DMA の吸収極大の波長はともに 400 m μ と 500 m μ 近くにあった。原著では反応液の加熱時間を 5 分ないし 20 分と規定しているが、発色に及ぼす加熱時間の影響を検討するため、加熱時間を 5 分から 75 分までかえて発色を調べた。その結果、20 分以上の加熱で吸光度が一応一定になる傾向が認められた。しかし再現性が悪かった。よって、つぎにニンヒドリンによるアミン定量の場合と同様に還元剤としてアスコルビン酸を使用し¹⁷⁾、発色に及ぼす pH, アスコルビン酸の濃度および加熱時間の影響を調べた。この際の実験方法はつぎのとおりである。

アミン塩酸塩水溶液 1 ml を容量約 30 ml の試験管にとり、これにニンヒドリン溶液 0.5 ml およびアスコルビン酸溶液 0.5 ml を順次加え、十分混和した後、直ちに沸騰浴中で加熱する¹⁸⁾。加熱中、蒸発による液量の減少を防ぐため、試験管口を水を入れたガラス球でおおった。加熱終了後、流水中で 5 分間冷却する。つぎの約 2 分間激しく振りまぜて空気と十分接触させ、indanone-enedial に起因する赤色を消失させる。のち、イソプロピルアルコール溶液 5 ml を加え、混和し、日立分光光度計 (EPU 2 型) で吸光度を測定する。対照としてはアミン水溶液のかわりに再蒸留水を用いたものについて上述と同様の操作を行なっ

た。

2-3 吸収スペクトル MMA (0.5 $\mu\text{M}/\text{ml}$), DMA (5 $\mu\text{M}/\text{ml}$) および TMA (50 $\mu\text{M}/\text{ml}$), を前記の方法にしたがって発色させた。反応条件は 25mg % アスコルビン酸溶液 (pH 7.5) を使用し, 加熱時間は 30 分であった。その結果は図 1 に示すとおりである。これによれば, MMA と DMA はそれぞれ 400 $\text{m}\mu$ と 405 $\text{m}\mu$ で最大吸収を示した。以後, これらの波長をもって吸光度を測定し, 発色の度合を調べることにした。しかし, TMA は全く発色しなかった。

2-4 発色に及ぼす pH の影響 pH 3~8.5 までの各種の MC ILVAINE 緩衝液に L-アスコルビン酸を加え, その濃度が 25 mg % になるよう調整した。これを 0.5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ のアミン水溶液とニンヒドリン溶液の混合液に加えて 30 分間加熱し, 発色に及ぼす pH の影響を検討した。その結果は図 2 に示すとおりである。これから吸光度が最大となるのは MMA, DMA とともに pH 7.5 であることがわかる。TMA は被検 pH 範囲で全く発色しなかった。

2-5 発色に及ぼすアスコルビン酸濃度の影響 0.5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ のアミン水溶液にニンヒドリン溶液, 0~100 mg % のアスコルビン酸溶液 (pH 7.5) を加え, 30 分間加熱し, 発色に及ぼすアスコルビン酸濃度の影響を検討した。その結果は図 3 のとおりである。この図から MMA, DMA とともに使用したアスコルビン酸溶液の濃度が 20~30 mg % で吸光度が最大となることがわかる。なお, この濃度のアスコルビン酸溶液の使用により再現性のある測定値が得られた。TMA はアスコルビン酸の濃度をかえても全く発色しなかった。

MC ILVAINE 緩衝溶液 (pH 7.5) に溶解したアスコルビン酸の安定性は室温 8 時間で約 5 % 力価が落ちた。よって本試薬は使用に臨み作製した。

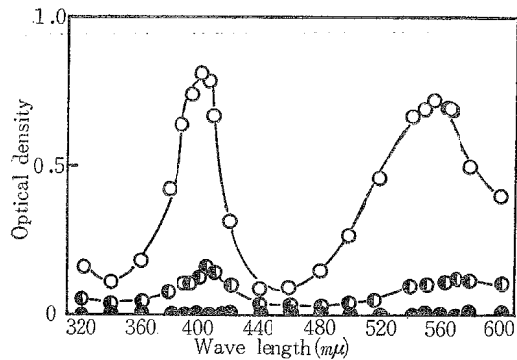


Fig. 1 Absorption spectrum obtained by the reaction of MMA, DMA and TMA with ninhydrin.
—○—○— MMA —●—●— DMA
—●—●— TMA

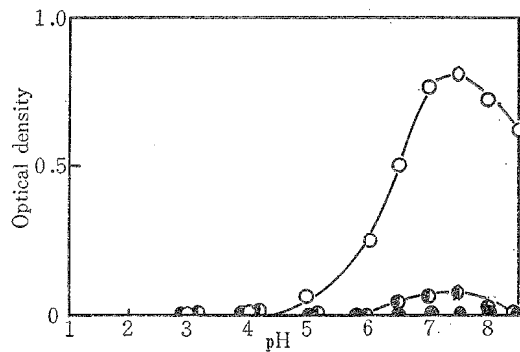


Fig. 2 Effect of pH on the color development of MMA, DMA and TMA with ninhydrin measured at each maximum absorption wave length.
—○—○— MMA —●—●— DMA
—●—●— TMA

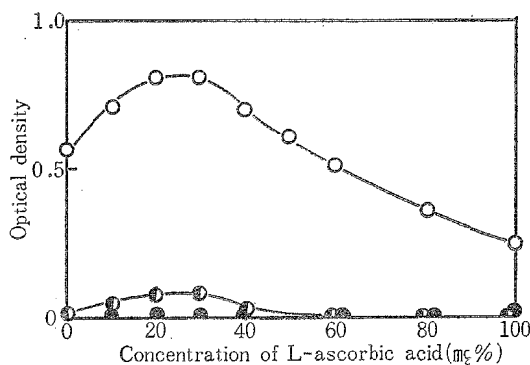


Fig. 3 Effect of L-ascorbic acid on the color development of MMA, DMA and TMA with ninhydrin measured at each maximum absorption wave length.
—○—○— MMA —●—●— DMA
—●—●— TMA

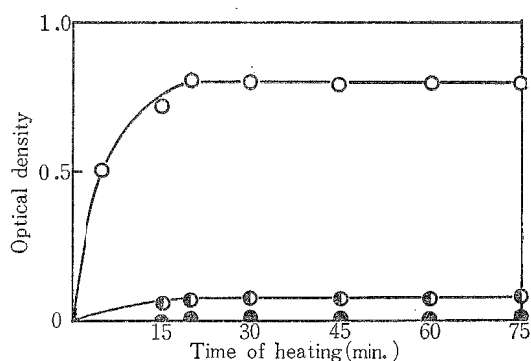


Fig. 4 Effect of heating on the color development of MMA, DMA and TMA with ninhydrin measured at each maximum absorption wave length.

—○—○— MMA —●—●— DMA
—●—●— TMA

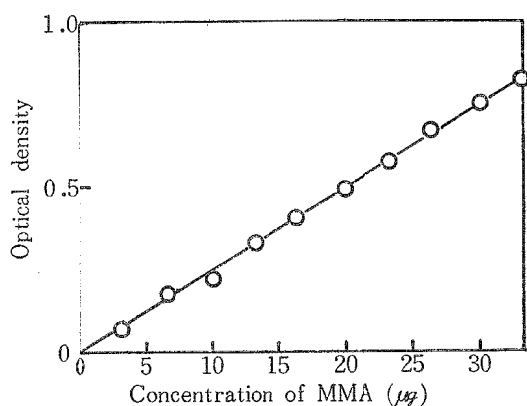


Fig. 5 Relationship between the color development of monomethylamine with ninhydrin and the concentration of the amine.

2-6 発色に及ぼす加熱時間の影響

0.5μ M/ml のアミン水溶液にニンヒドリン溶液, 25 mg % のアスコルビン酸溶液 (pH 7.5) を順次加え, 加熱時間をかえて発色に及ぼす加熱時間の影響を調べた。その結果は図4のとおりである。この図から MMA, DMA とともに20分以上加熱することが必要であり, 加熱時間が75分に及んでも発色に影響がないことがわかった。TMA はこの場合でも全く発色しなかった。

2-7 濃度吸光度曲線

以上の結果, 魚介類における揮発性アミンを定量する場合, ニンヒドリンによる DMA の発色は鋭敏でなく, MMA の発色のみが定量に用いることが可能であるとわかった。よって, 0.05~0.5 μM/ml の MMA 水溶液について濃度・吸光度曲線を求め, 図5のような結果を得た。これからニンヒドリンによる MMA の発色は全く LAMBERT-BEER の法則に従うことがわかる。

3. 考 察

MMA がニンヒドリン反応陽性であることは古くから知られているが¹⁹⁾, DMA は陰性とされている¹⁷⁾。これに対し, 宮原¹⁴⁾は DMA, TMA がともに MMA と同様ニンヒドリン反応陽性であり, 吸収極大が MMA の場合, 360 mμ と 560 mμ, DMA で 350 mμ, TMA で 360 mμ であることを報告している。しかし著者らが得た結果ではこれらアミンのニンヒドリンによる発色の度合はアミンの種類によって異なり, TMA は反応液の pH, 加熱時間およびアスコルビン酸の添加量をかえても全く発色しなかった。一方, 発色の認められた MMA, DMA の場合, その吸収極大はそれぞれ, 400 mμ と 560 mμ, 405 mμ と 565 mμ にあり, この吸収極大はアミノ酸とニンヒドリンとの最終生成色素である RUHEMANN Purple の吸収極大 (400 mμ 附近と 570 mμ 附近^{20), 21)} と一致する。

ニンヒドリンによる MMA と DMA の発色の吸収極大は, pH 7.5 の反応液において求めたものである。反応液の水素イオン濃度は発色に大きな影響を与える (図2)。このことは山岸²⁰⁾によっても認められ, 第二級アミンであるエフェドリンは pH 5 で発色しないが pH 8 で発色する。

ニンヒドリンによる発色において、還元剤としてアスコルビン酸の使用については、二つの相異なった知見がある。MOOREら¹⁹⁾はアスコルビン酸がニンヒドリンによるアミノ酸の比色定量に適當でないを報告し、一方山岸¹⁷⁾はアスコルビン酸を使用して好結果を得ている。著者らがニンヒドリンによるアミンの発色にアスコルビン酸を使用した場合の結果では、使用量が適當であれば発色が高まり、得られる吸光度の再現性が高いことがわかった(図3)。

ニンヒドリンによる MMA の発色は反応液の pH, 加熱時間およびアスコルビン酸の添加量などを適宜に選ぶことにより高まるが、DMA では発色が MMA に比べてかなり劣り、TMA は全く発色しなかった。したがって、魚介類に含まれる揮発性アミンを適當な方法で分離できても各アミンをニンヒドリンによる反応だけで定量することができないといえる。

4. 要 約

魚介類における揮発性アミン類を分離定量する目的で、ニンヒドリンによる MMA, DMA および TMA の発色について検討した。その結果、MMA はニンヒドリンによって強い発色を示すが、DMA の発色は弱く、TMA は全く発色しないことがわかった。

文 献

- 1) 天野慶之・山田金次郎・尾藤方通, 1963: 日水産, **29**, 659.
- 2) 天野慶之・山田金次郎・尾藤方通, 1963: 同誌, **29**, 860.
- 3) AMANO, K. and K. YAMADA, 1964: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **30**, 430.
- 4) AMANO, K. and K. YAMADA, 1964: *ibid.*, **30**, 639.
- 5) YAMADA, K. and K. AMANO, 1965: *ibid.*, **31**, 60.
- 6) YAMADA, K. and K. AMANO, 1965: *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **41**, 89.
- 7) YAMADA, K. and K. AMANO, 1965: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **31**, 1030.
- 8) 徳永俊夫, 1964: 北海道区水産研究所報告, **29**, 108.
- 9) 徳永俊夫, 1965: 同誌, **30**, 90.
- 10) 徳永俊夫, 1966: 同誌, **31**, 95.
- 11) 藤巻昌子・武見和子・天野立爾・川田公平・川城 峻, 1965: 食衛誌, **6**, 510.
- 12) VAISEY, E. B., 1956: *Canadian J. Biochem. & Physiol.*, **34**, 1085.
- 13) REAY, G. A., 1936: *Analyst*, **61**, 78.
- 14) 宮原昭二郎, 1960: 日化, **81**, 172.
- 15) 林 誠・畝本 力・内田礼子・宮木高明, 1963: 千葉大学農学部研究報, **15**, 39.
- 16) 天野慶之・山田金次郎・原田勝彦・神本保次, 1967: 日本水産学会誌投稿中
- 17) 山岸正治, 1954: 薬誌, **74**, 1042.
- 18) 須止三千三・鴻巣章二, 1958: 日水誌, **23**, 555.
- 19) MOORE, S. and W. H. STEIN, 1948: *J. Biol. Chem.*, **176**, 367.
- 20) 山岸正治, 1955: 分析化学, **4**, 584.
- 21) 久保山 昭, 1958: 宮崎大学農学部研究時報, **3**, 114.