

Paper Chromatography による罐詰魚肉の 鮮度判定法

Freshness-Test of Canned Fish Meats by Paper Chromatography¹⁾

山西貞・花井精子・福原恵子・稲垣長典
(Tei Yamanishi, Seiko Hanai, Keiko Fukuhara and Chôten Inagaki)
Laboratory of Food-Chemistry, Faculty of Home Economics,
Ochanomizu University, Tokyo

Summary

We found a comparatively accurate and simple method to test the freshness of canned fish meat (reddish flesh fishes).

According to this method histamine contained in water extract of fish meat is determined by paper chromatography. The amount of histamine is calculated by the area of histamine spot.

緒 言

現在、わが国における輸出罐詰魚肉の鮮度の検査は専ら官能試験によって行われているので、その判定はいつに検査官の嗅覚にかかっている状態である。水産庁輸出罐詰検査所では、ここ数年来、罐詰魚肉の科学的な鮮度測定法の確立を急いでいるので、我々もその一端を荷い、この研究を行った。

生鮮魚肉の鮮度の化学的判定法については従来も数多くの研究^{(1)~(13)}があり、これらは総べて魚肉の鮮度低下に伴う種々の化学的変化を測定して鮮度の指標とするもので、原理的に大別すると次のようなものが挙げられる。

- (1) 揮発性総塩基窒素(主としてアンモニア態窒素)量の測定。
- (2) Trimethylamine 量の測定。
- (3) 揮発性酸の定量。
- (4) Histamine の定量。
- (5) pH の測定。
- (6) -SH の還元力の測定。
- (7) 昇汞沈澱反応。

以上の中、主として現在試みられているのは(1)または(2)である。しかし、罐詰魚肉の場合は、加圧加熱した魚肉であるから、揮発性塩基は罐詰製造工程中に逸散する可能性があり、また逆に加熱によりアンモニア量⁽¹⁴⁾や Trimethylamine 量⁽¹⁵⁾が増加することが認められているから、揮発性塩基量、あるいは Trimethylamine 量によって鮮度を判定することは困難である。

魚肉蛋白が細菌によって分解される場合、脱アミノによってアンモニアを生ずるが、同時に脱炭酸も行われてアミンを生ずることは周知の事実である。この場合、細菌の脱アミノ作用と脱炭酸作用とは全く別種の反応で、前者はアルカリ性側で行われ、後者は

¹⁾ Contribution from Department of Food & Nutrition, Faculty of Home Economics, Ochanomizu University, No. 6

酸性側で行われることが Gale⁽¹⁶⁾ 及び木俣河合等⁽¹⁷⁾によって認められている。

鮮度低下した赤肉魚肉による最も一般的な軽い中毒は蕁麻疹であるが、これは Histamine による中毒とされている。Histamine とアンモニア態窒素の増加の割合は、また温度によっても異なる⁽¹⁸⁾ことが認められている。

以上のような事実から、罐詰魚肉の鮮度判定法としては、直接、有毒アミンである Histamine を定量することが最も適切であると考えられる。

Histamine の定量法については、Koessler,⁽¹⁹⁾ 秋山,⁽²⁰⁾ 横山,⁽²¹⁾ 瀬良,⁽²²⁾ 木俣,⁽²³⁾ Rose Lubschez,⁽²⁴⁾ F. C. McIntre,⁽²⁵⁾ 門田,⁽²⁶⁾ 宮木,⁽²⁷⁾ Urbach⁽²⁸⁾ 等の報告があるが、この中、後三者は Paper Chromatography を試みている。

著者等は、輸出罐詰魚肉の検査にはその操作がある程度簡便であることを要するので、Paper Chromatography による Histamine の定量を煮熟魚肉あるいは、罐詰魚肉について試み、定量の各段階における諸条件を検討し定量法を決めた。この方法で Histamine を定量することにより、少くとも、青皮赤肉種の罐詰魚肉の鮮度判定は可能と考えられる。

実 験

(I) 煮熟魚肉より Paper Chromatography 用試料の調製。

築地魚市場で5月中旬求めた新鮮なサバ(体重約300g)を3枚におろし、骨を除き、片身を新鮮のまま、他方を30°Cの恒温器に20hrs保ち、官能的に軽い腐敗の認められる程度に鮮度を低下させたものとの2種につき、罐詰魚肉と同条件にするため、加圧釜で10~12 lbs. 60 min. 煮熟し、皮及び血合肉を除き中央部を材料とし、次の如く種々条件を変えて抽出液を調製、比較検討した。

(a) 煮熟肉 3g, 蒸溜水 5 cc, 及び 10% NaOH 0.2 cc を乳鉢中で磨碎後、6n-HCl でリトマスに対し酸性とし、n-BuOH 5 cc 加え、よく振盪抽出して遠心分離し、BuOH 層を分離して試料とする。

(b) (a) と同一方法で割合を次の如く変える。魚肉 2g, 蒸溜水 5 cc, 10% NaOH 0.2 cc n-BuOH 10 cc.

(c) 魚肉 3g に蒸溜水 5 cc 加えよく磨碎後、20% CCl_3COOH 2 cc 加え除蛋白後、n-BuOH 5 cc で抽出。

(d) 魚肉 30g, 蒸溜水 40 cc, 及び 10% NaOH 2 cc を乳鉢中で磨碎、糊状とし 30 min. 放置後、6n-HCl 30 cc 加えてよく混合、5 min. 放置後、遠心分離して上澄液をとり、残渣を 10 cc の蒸溜水で洗滌、洗滌液合したものを蒸発皿上で 5 cc に濃縮して試料とする。

(e) 魚肉 20g, 蒸溜水 40 cc 及び海砂 5g を乳鉢中で磨碎すると容易に均質な糊状となる。30 min. 放置後、6n-HCl 5 cc 加えよく攪拌後、遠心分離して上澄液 25 cc を 10 cc に濃縮、試料とする。

以上の5種の試料につき、次項に述べる条件により Paper Chromatography を実施し、発現する Spot の状態を比較した。

結果は Table 1 の如くで、(e) 法が最もよいことがわかった。

Table 1

Method of extraction	Freshness of fish meats	Number of spots	Appéarence of spot which Rf is corresponding that of Histamine (0.53)
(a)	Fresh	2	invisible
	Spoilaged	3	very faint colour
(b)	Fresh	4	invisible
	Spoilaged	5	very faint colour
(c)	Fresh	3	invisible
	Spoilaged	4	very faint colour
(d)	Fresh	3	invisible
	Spoilaged	4	very big but some what tailing
(e)	Fresh	5	invisible
	Spoilaged	6	clear

よって、(e) 法が果して定量法に適用できるかどうかを見るため、その抽出試料中の Histamine の回収率を測定した。定量は Rose Lubuschez 法⁽²⁴⁾を適用した。この方法の原理は Amberlite IRC-50 に Histamine を選択的に吸着させ、これを適当な溶媒で溶出し、Diazo 試薬により発色させ比色定量するのである。

先づ、検体 10 cc に 20% NaOH を 2,3 滴加えて pH 7.7 とし、等容の n-BuOH 加え、30 min. 振盪後、遠心分離 (1500 廻転で 10 分間) し、n-BuOH 層を分取、Amberlite IRC-50 を 4 g 加えて 1 hr. 振盪し、n-BuOH 層中の Histamine を吸着させる。この Amberlite を上端の太いビュレット型 tube に移し、95% EtOH 20 cc で洗う (この時、Histamine の溶出は見られない)。次に、3.8% HCl を 10 cc 加え、15 min. 静置後、HCl 溶液を Pyrex tube に移す。次いで、Amberlite は 1.6% NaNO₂ aqu. 10 cc で洗う。これら 2 つの溶出液を 100°C で 30 min. 加熱後、氷浴中で冷却し、冷後、Diazo 試薬 (後記) 2 cc を加えてよく攪拌し氷浴中に 3 min. 静置後、Methyl-isobutylketone を 4 cc 加え、30 回振盪後、遠心分離し、Ketone 層を分取、この Ketone 層に Vernal Buffer を 1 cc 加え、30 回振盪後、氷浴中で 30 min. 冷却、これを光電比色計で 530 m μ . にて測定する。

この方法で、先づ、純粋な Histamine-di HCl の結晶を用い、種々の濃度に調製した標準液につき比色値を求め、濃度と比色値の関係の Standard Curve を作成する。

次に、回収率を測るための試料の調製を行った。即ち、比較的鮮度の低下したサバ肉を加圧加熱したもの 20 g に、結晶 Histamine-di HCl の 0.5% 水溶液を 2 cc 加え、乳鉢中で魚肉によく浸透させたものを (e) 法に従い処理。(ただし最後の濃縮は行わず、Na₂CO₃ で中性となす)。これにつき、上記 Rose Lubuschez 法を適用して、比色値を求め Standard Curve より Histamine-di HCl 量を求めた。魚肉中の mg % の算出は魚肉水分 75% として換算した。

その結果は、Table 2 に示す如く、魚肉中 Histamine 量の回収率は 98% で、十分

定量に適用できることがわかった。

Table 2. Recovery of Added Histamine(-di HCl) to Fish Meat

	Histamine(-di HCl) mg % in Meat	
	Test 1	Test 2
Boiled fish meat	93	106
Added Histamine-di HCl (0.5% aqu. 2 cc.)	50	50
Histamine added meat	142	155
Rate of recovery %	98	98

(II) Paper Chromatography による Histamine の定量。

一般に, Paper chromatography を用いての定量法には大別して次の 3 種がある。

(1) 比色法 (i, 再抽出比色法。 ii, 濾紙上比色法)。 (2) 稀釈法。 (3) Spot 面積測定法。

著者等は, (1)-(i) 及び (3) を試みたが, (3) による方が簡単で良好な結果が得られたので, 専ら (3) によった。

(A) Paper Chromatography の実施条件。

Spot の面積により量を求めるには, Spot が鮮明に出ることが第一の必要条件であるから, Paper Chromatography 実施の各条件を種々検討した結果, 次の如き各条件で行うのが最良であることを認めた。

試料の点滴: ミクロピペット (最小目盛 5/1000 cc) を用い, 0.0025 cc を 2 cm × 40 cm 大の東洋濾紙 No. 50 の下端から 5 cm の原線中央に直径 5 mm になるように注意して完全に添附する (熟練によりかなり手早く正確にできるようになる)。

展開溶媒: 10% NH₄OH 飽和の n-BuOH。

展開温度: 20±1°C

展開距離及び展開時間: 正確に 23 cm 上昇させる。これに要する時間は約 17 hrs。

乾燥: 40°C 内外の流風により, 可及的短時間 (約 15 min) で乾燥する (Fan 付きの恒温器中がよい)。

発色: a) Ninhydrine の 0.25% Acetone 溶液を噴霧後, 90~95°C で 10 min. 加熱すると, Histamine spot は Rf=0.53 に青色を表す。 b), Diazo 試薬, 即ち Sulfanilic Acid の 10% HCl 飽和溶液と 5% NaNO₂ aqu. を, 使用直前に氷浴中で等容混合し, 5 分放置後に噴霧し, 3 分後, n-NaOH を再び噴霧すると橙赤色を表す。

(B) Standard Curve の作成。

Histamine-di HCl の結晶を用い, 種々の濃度の標準溶液を作り, これにつき, (A) の条件で Paper Chromatography を行い, 得られた Histamine の Spot の長径及び短径を測り, 楕円形として面積を算出すると, Table 3 の如くである。

この面積と濃度との関係を Semi-logarithmic Graph で示すと, Fig. 1 の如く, Histamine-di HCl 濃度が 250 γ/cc から 5000 γ/cc の範囲では, ほぼ直線の関係となる。Spot の識別限界濃度は 250 γ/cc で, 極めて淡く辛うじて判別し得る程度である。

(註): I-(e) 法により試料を調製する時は、もし試料中、Histamine-di HCl の濃度が 300 γ /cc であるとする、魚肉 100 g 中の Histamine の mg 数は、魚肉水分含量 75% とみなして、次のように算出、21.8 mg となる

$$0.3 \text{ mg} \times 10 \times \frac{20 \times 0.75 + 40 + 5}{25} \times \frac{100}{20} \times \frac{111}{183} = 21.8 \text{ mg}$$

Table 3. Relation between the Content of Histamine (di HCl) in Original Spot and Area of Spot developed.

Histamine-di HCl Content (γ)		Spot area (cm ²)
In 1 cc	In original spot	
250	0.625	0.50
300	0.75	0.66
500	1.25	1.13
1000	2.5	1.73
3000	7.5	3.10
5000	12.5	3.85
6000	15.0	4.50
8000	20.0	5.49
10000	25.0	6.14

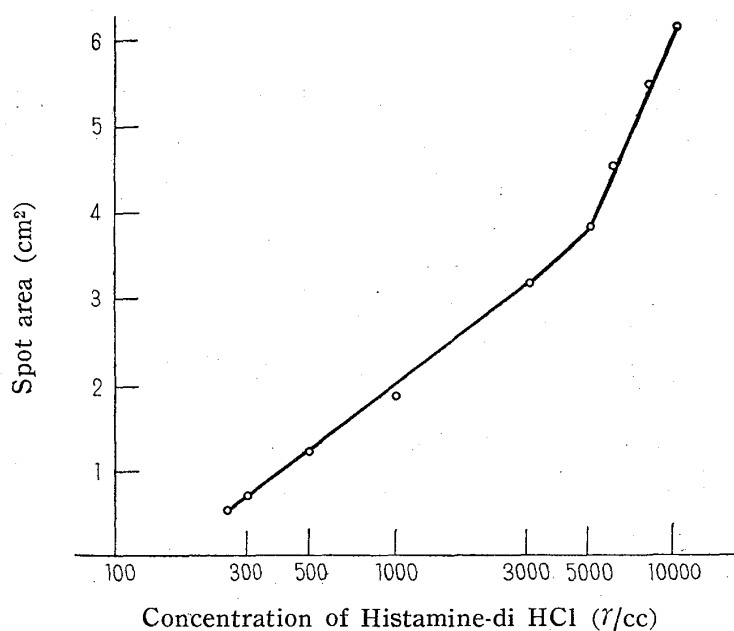


Fig. 1

(C) 実際への適用

実験 1. 築地魚市場 (1953 年 10 月 5 日) で求めた新鮮なサバ肉を 30°C の恒温器中に、それぞれ 16 hrs, 24 hrs, 40 hrs, 48 hrs 放置した後、加圧釜で 10±1 lbs で 30 min. 加熱したものにつき、(I)-(e) 法により Paper Chromatography 用の試料を調製し、(II) 法により Paper Chromatography を行い、得られた Histamine の Spot の面積から、前記 Standard Curve により Histamine 量を求めた。これと同時に、同一試料につき Rose Lubuschez 法により定量、両定量値を比較した。

結果は、Table 3 の如く、だいたい両者が実用範囲で近い値を得ている。

Table 3. Comparison of Amount of Histamine Determined by Paper Chromatography and Rose Lubuschez's Method (in meat of *Scomber Japonicus*).

Hours of Incubation at 30°C	Amount of Histamine in Fish meat (mg%)	
	by Paper Chromatography	by Rose Lubuschez's Method
0	non spot	—
16	non spot	—
24	non spot	25.8
40	185.7	193.5
48	207.9	309.6

実験 2. 1953 年 12 月 6 日、静岡県沖合で漁獲されたサンマを室内に保存し、1 日、2 日、3 日及び 6 日経過後、水煮罐詰に製造したものにつき同様の実験を行い、これでも両方法による Histamine 定量値がほぼ近い値となった。

Table 4. Determination of Histamine by Paper Chromatography and Rose Lubuschez's Method (in Meat of *Cololabis saira*).

Days of Stored	Amount of Histamine in Fish meat (mg%)	
	by Paper Chromatography	by Rose Lubuschez's Method
1	non spot	—
2	non spot	11.6
3	25.8	32.2
6	154.8	168.5

実験 3. 実験 2 における試料と同様に製造された罐詰の数組について Paper Chromatography による Histamine の定量を行い、他の鮮度判定の結果と比較した。

結果は Table 5 の通りである。Trimethylamine 及び Volatile-N の定量値は東大農芸化学藤巻講師によるものである。

Table 5. Amount of Histamine Determined by Paper Chromatography, Trimethylamine and Volatile Nitrogen in Canned Meat of *Cololabis saira*.

Series of Sample	Days of Stored	Organoleptic test	Amount of Histamine in Meat (mg%)	Amount of Trimethylamine (mg%)	Amount of volatile-N (mg%)
A	1	fresh	non spot	11.7	(NH ₃ -N) 46.0
	2	fresh	non spot	11.8	48.1
	3	some degree of fishy odour	25.8	12.3	50.5
	6	spoiled odour	154.8	15.0	135.1

B	1	fresh	non spot	12.2	50.9
	2	fresh	non spot	13.4	53.7
	3	fresh	non spot	10.6	52.8
	6	somewhat spoiled odour and slight yellowish colour	21.5*	13.6	51.6
C	1	fresh	non spot	10.3	42.8
	2	fresh	non spot	8.1	40.1
	3	fresh	non spot	7.3	36.1
	6	fresh	non spot	5.5	37.5

Note that * is determined about twice-concentrated sample.

考 察

(I)–(e) の方法で魚肉より試料を調製し、これにつき (II) の条件で Paper Chromatography を行い、Histamine 含量を求めると、ca. 22 mg % から、ca. 200 mg % の範囲では相当正しい値が得られることがわかったが、この際、試料調製の時の濃縮程度を増せば更に少量の Histamine 含量でも測定できる。(点滴を二度すると、定量値は 2 倍とはならず、4 倍近い値となることを認めたので、濃度を増すには試料を濃縮するより他はない)。Histamine の想定中毒量は、魚肉中 100 mg % とされているから、鮮度判定のための Histamine の定量には、上記程度の精度で十分であると考え。

本実験は、青皮赤身の魚について行ったもので、Histidine 含量の多いこの種の魚の罐詰肉の検査には本法は十分適用し得るし、また方法も試薬も簡単であるから実用価値ありと信ずる。

要 約

我々は、比較的精度がよくて簡単な罐詰魚肉(赤身魚肉)の鮮度判定法を見出した。

この方法は、魚肉の水抽出液中の Histamine を Paper Chromatography により定量し、判定の目やすとするものである。この場合、Histamine の量は Histamine-Spot の面積から算出する。

実際に、この方法をサンマ水煮罐詰魚肉の検査に適用し、従来の揮発性塩基や Trimethylamine の定量による方法より優れていることを認めた。

終りに、この研究において有益なご助言を頂いた当研究室の辻村みちよ教授、ならびに研究の進行に種々の面でご援助頂いた東大農芸化学藤巻正生 講師に深甚の謝意を表す。

なお、本研究に用いた費用は、すべて農林省漁業試験研究費によったことを附記し感謝する。

文 献

- (1) 富山, 井出, 秋山; 日水誌 **17**, 191 (1952)
- (2) 富山; 日水誌 **17**, 405 (1952)
- (3) 天野; 日水誌 **14**, 165 (1949)

- (4) 小幡, 座間; 日水誌 **16**, 10 (1950)
- (5) 小幡, 石田; 日水誌 **16**, 147 (1950)
- (6) 富山, 米, 井出; 日水誌 **16**, 17 (1951)
- (7) 同上; 同上, **16**, 22 (1951)
- (8) 天野, 内山, 富谷; 同上 **15**, 262 (1949)
- (9) 森, 秦; 同上, **15**, 407 (1949)
- (10) 天野, 富本; 同上, **15**, 753 (1950)
- (11) 山本, 曾根, 同上, **19**, 761 (1953)
- (12) 富山, 原田; 同上 **18**, 112 (1952)
- (13) 富山, 米; 同上 **18**, 521 (1953)
- (14) 太田, 中村; 同上 **18**, 15 (1952)
- (15) 藤巻; 農化 **27**, 424 (1953)
- (16) Gale; Biochem. J. **34** (1940)
- (17) 木俣, 河合; 京大食研報告 **5**, 21 (1951)
- (18) 同上 **10**, 83 (1952)
- (19) Koessler & Hanke; J. B. C. **39**, 497 (1919)
- (20) 秋山; 福岡医科 **30**, (1937)
- (21) 横山; 東京医事新誌 2990 1918 (1936)
- (22) 瀬良; 大阪医学 **38** (1939)
- (23) 木俣; 京大食研報告 **6**, 23 (1951)
- (24) Rose Lubschez; J. B. C. **183**, 731 (1950)
- (25) F. C. McIntre; J. B. C. **170**, 537 (1947)
- (26) 門田, 林; 京大食研報告 **6**, 30, (1951)
- (27) 宮木; Rep. Inst. Putrefac. Res. **2**, 31 (1949)
- (28) Urbach; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **68**, 438 (1949)

(Received June 15, 1954)