

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>Title</b>       | 食品のフレバー及び酸化変敗の測定に用いられる 2-TBA 法の問題点と, $\gamma$ -線照射した生揚げへの適用 |
| <b>Author</b>      | 浦上, 智子 / 青木, 田鶴 / 高松, 元子                                    |
| <b>Citation</b>    | 大阪市立大学家政学部紀要. 12 巻, p.17-27.                                |
| <b>Issue Date</b>  | 1965-02   |
| <b>ISSN</b>        | 0473-4742   |
| <b>Type</b>        | Departmental Bulletin Paper                                 |
| <b>Textversion</b> | Publisher   |
| <b>Publisher</b>   | 大阪市立大学家政学部  |
| <b>Description</b> |   |

Placed on: 大阪市立大学学術機関リポジトリ

Placed on: Osaka City University Repository

# 食品のフレーバー及び酸化変敗の測定に用いられる 2-TBA 法の問題点と、 $\gamma$ -線照射した生揚げへの適用

浦上智子・青木田鶴・高松元子

## Problems concerning the 2-Thiobarbituric Acid Method used for Measurement of Flavor or Oxidative Rancidity of Foodstuffs and Its Application to $\gamma$ -Ray Irradiated Fried Tofu

BY CHIEKO URAKAMI, TAZU AOKI, AND MOTOKO TAKAMATSU

### 緒 言

油脂，加工食品或は生鮮食品のフレーバー及び変敗の測定に 2-Thiobarbituric acid (TBA) テストが試みられている。これは低分子量の飽和或は不飽和アルデヒドが TBA と反応して色素を作り，これを比色定量する方法であるが，反応そのものは古く，Doxら<sup>(1)</sup>が 1916 年にフルフラルと TBA を塩酸の存在下で反応させ，オレンジ色の色素を得ている。其後，Bernheim ら<sup>(2)</sup>がこの反応を食品の酸化による変敗の測定に適用して以来，注目されるようになった。然し，信頼出来る方法として用いるには余りにも多くの問題が残されている。

照射した生揚げの異臭及び貯蔵期間の限界を知ろうとする目的で，昨年来この反応を試みたが，数多くの文献に見られるような問題がある事がわかり，再現性のある結果を得る事は困難であった。そこで，この反応を食品に適用する場合，考慮すべき点を考察し，信頼度のより高い結果を得るよう努力すべきであると考え，以下これらの点について述べる。

### 方法と問題点

I. 方法 今迄に用いられた方法を簡単に分類すると次のようになる。(A) 酸化分解或は変敗した油脂或は抽出油を95%アルコールに溶解し，TCA を触媒として TBA と反応させる。<sup>(3)</sup> (B) 食品の油脂成分を抽出する事なく，検体をそのままアルコール，ベンゼン或は四塩化炭素に溶解又はケンドクさせ，TCA を触媒(除蛋白の目的も含まれる)とし TBA と反応させ，発色した水層部を

比色する<sup>(4)</sup>。

乳脂肪、ラード、バター等に適用されている。魚肉加工品の場合、TCAのかわりに HCl 又はピリジンを用いている。<sup>(5)</sup> この方法では変敗と末変敗との差は明らかで、再現性のある結果が得られると報告されている。然し、油脂を抽出しないので、水層にニゴリが生じるという欠点がある。(C) TBA と検体とを反応させた後、色素をイソアミルアルコールとピリジンの混合溶媒で抽出する。これは冷凍豚肉<sup>(6)</sup>、手乳<sup>(7)</sup>、及びバター<sup>(8)</sup>に適用されている。(D) 炭水化物を多く含有する食品の場合、TBA と反応後、反応液をセルローズカラムを通し、ピリジン水溶液で展開し、黄色色素(第3表を参照)を除去し、流出液を比色する。セリアル<sup>(9)</sup>に適用されている。(E) 酸化油脂を減圧蒸溜に附し、その抽出液に TBA 反応を行う方法で、粉末ミルク<sup>(10)</sup>に用いられている。

II. 溶媒及び触媒の影響 普通これらの方法では、TBA を水、アルコール、氷酢酸、希塩酸に溶解して試薬とし、塩酸、TCA 或は  $H_3PO_4$  を酸触媒として用いているが、最近これら酸性化合物は種々副反応を起す事が明らかにされ(くわしくは副反応の項で述べる)、注意を要する点である。Tarladgis ら<sup>(11)</sup>によれば、マロンアルデヒドと TBA の反応生成物の  $530m\mu$  における吸光値は酢酸、12%塩酸、20% TCA により、それぞれ90%、80%、75%減少する。勿論、盲検を行えば差支えないかも知れないが、検体から得られる色素の量が少ない時には問題がある。

III. 其他の反応条件の影響 Täufer-Zimmermann<sup>(12)</sup>は TBA とカルボニル化合物の反応をくわしく調べ、活性水素の存在下では、コンプレックスは無色になり、酸素を導入すると着色する事を観察している。そこで最近 Jacobson ら<sup>(13)</sup>もこの事に注意し、検体と TBA (結晶を用いている)との混合物を加温する前によく振とうし、反応液中の酸素量を均一にする必要を指摘している。

この反応は光に敏感で、普通暗所で行うが、不便である。Jacobson ら<sup>(13)</sup>は日光と蛍光灯との影響を比較し、日光は吸光値を増大させるが、蛍光灯の影響が小さい事から、後者の使用は可能であると述べている。

反応は $60^{\circ}\sim 70^{\circ}C$ で、30分~60分加温して行うが、Jacobson ら<sup>(13)</sup>は、油脂の種類によって、反応時間は必ずしも均一でないと報告している。例えば、牛脂は $60^{\circ}$ でゆっくりと黄色の色素 ( $452m\mu$ ) を生成するが、大豆油は同じ温度で、30分後に同波長で最大の吸光値を示し、其後ゆっくりと $532m\mu$ の弱い吸収を示すようになる。従って、反応時間は検体の種類によって今後更に吟味されなければならない。

IV. 前駆体と色素の吸収波長との関係 通常 TBA テストで用いられる極大吸収波長は $530m\mu$  附近であるが、前駆体の種類によって、 $450m\mu$  或はそれ以下の波長、及び $480m\mu$  附近の吸収を示す。

Sinnhuber ら<sup>(14)</sup>は油脂の酸化による変敗ではマロンアルデヒドが生成され、これが TBA と反応し、 $534m\mu$  (赤色)の吸収を示す色素の前駆体である事を証明し、以来変敗とマロンアルデヒドの生成量との関係について多くの研究が行われるようになった。Tarladgis-Watts<sup>(15)</sup>は不飽和脂肪酸の混合物の変敗臭とマロンアルデヒド生成量との関係を TBA 反応を用いて調べ相関関係を見出していない。その理由として後者の量は酸素吸収量より遥かに少なく、又マロンアルデヒドは自動酸化中或は貯蔵中に分解され、蓄積されないだろうと述べている。又この場合、 $538m\mu$  の吸収以

外に450m $\mu$ の吸収を示す色素が出来る事も観察している。従って最近 Jacobson ら<sup>(13)</sup>は油脂の種類によって異った波長を用いている。くわしくは TBA 値と変敗臭との関係の項で述べる。

TBA とコンプックスを作る主な前駆体のうち低分子量のもので、反応生成物が可成り明らかにされているもの及び油脂の酸化生成物で TBA とコンプレックスを作るものを第1表に、又マロンアルデヒドの前駆体

第1表 TBA とコンプックスを作る低分子量の化合物

| Compound                           | $\lambda_i$  | Absorption maxima<br>m $\mu$  | $\lambda_r$ | Ref.   |
|------------------------------------|--------------|-------------------------------|-------------|--------|
| Formaldehyde                       | 452          | (Pigment B)                   |             | 16     |
| Formic acid                        | 452          | —————→                        | 530         | 16, 17 |
| Glyoxal                            | 454          | 525                           | 552         | 18     |
| Glyoxamide                         |              | light pink to red (Pigment C) |             | 19     |
| Malonic dialdehyde                 |              | (Pigment A) 532~535           |             | 14, 18 |
| Epihydrin aldehyde                 | 456          | 460                           | —————→      | 20     |
|                                    |              |                               |             | 485    |
| Glyceraldehyde                     | 456          | —————→                        | 485         | 17, 20 |
| Acrolein, Citral                   |              | orange                        |             | 12, 21 |
| Crotonaldehyde                     | 452          | (major) orange                | 532 (minor) | 21     |
|                                    |              |                               |             | 13     |
| Saturated aldehydes <sup>a</sup>   |              | 452                           |             | 12, 13 |
| Unsaturated aldehydes <sup>b</sup> |              | 450~480                       |             | 22     |
| {Alk- 2, 4 -dienals <sup>b</sup>   |              |                               | 532         | 13     |
| {trans- 2-hexenal <sup>b</sup>     | 452 (major)  |                               | 532 (minor) | 13     |
| {10-undecenal <sup>b</sup>         | 452 (strong) |                               |             | 13     |

になり得るものを第2表に、そして他のもので TB A テストで呈色反応を与えるものを第3表に示す。ここでは反応が明らかにされているか、或は文献に反応機構が提案されているもののみについて述べる事にする。

- a) C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, 等油脂の自動酸化により生成される。
- b) 油脂の自動酸化或は加熱分解により生成される。
- $\lambda_i$  は矢印のある場合の反応初期の吸収波長で、 $\lambda_r$  は放置後に見られる波長。

1. マロンアルデヒド

(マロニルデアルデヒド) 1 モルが 2 モルの TBA と反応し、第1図の色素Aを与える事が明らかにされている<sup>(14)</sup>。

2. アフォルムルデヒド及び

ギ酸 について、Schmidt

<sup>(16)</sup> は第1図の B 色素を与える反応を示し、又エタノールも日光にあたるとフリーラジカル反応を起しギ酸を生成し B 色素を与えるの

ではないかと報告している。第4表に示す如く、暗所で96時間放置すると 532m $\mu$  の吸収を示す化合物になり、これを日光にあてると、又もとの 452m $\mu$  の吸収を示す化合物になる。このような事から

第2表 マロンアルデヒドの前駆体

| Compound                              | Ref. |
|---------------------------------------|------|
| 2-Deoxysugars and galactal            | 23   |
| 2-Aminopyrimidine and sulfadiazine    | 24   |
| $\beta$ -Formylpyruvic acid           | 25   |
| 2-keto-3-deoxyheptanoic acid          | 26   |
| 2-keto-3-deoxygluconic acid           | 27   |
| Sialic acids                          | 28   |
| Highly unsaturated acids <sup>a</sup> | 29   |
| Linolenic acid <sup>a</sup>           | 30   |
| Rancid foods                          | 31   |

a Täufer-Zimmermann<sup>(12)</sup> は必ずしも非共役の不飽和脂肪酸でなくてはならないことはなく、共役二重結合を有するもの及び飽和脂肪酸も自動酸化中にマロンアルデヒドを生成すると述べている。

第3表 TBA と反応し、オレンジの色素を作る化合物<sup>(21)</sup>

| Arylaldehydes                 |       | Sugars <sup>a</sup>           |       | N-Arylidenes <sup>b</sup> |       |
|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|---------------------------|-------|
| Benzaldehyde                  | (5)   | Xylose                        | (5)   | Benzaldazine              | (5)   |
| o-Hydroxybenzaldehyde         | (2.5) | Arabinose                     | (10)  | Benzaniline               | (10)  |
| m-Hydroxybenzaldehyde         | (5)   | Glucose                       | (5)   | Resorcyldaldoxime         | (2.5) |
| p-Hydroxybenzaldehyde         | (0.5) | Levulose                      | (0.5) | Salicyldaldazine          | (2.5) |
| Anisaldehyde                  | (0.1) | Mannose                       | (1)   | 4-Hydroxybenz-aldoxime    | (2.5) |
| Cinnamaldehyde                | (0.5) | Saccharose                    | (0.5) | m-Nitrobenz-aldazine      | (10)  |
| Pyridine (2, 3, 4-) aldehydes | (500) | Cellulose                     |       | etc.                      |       |
| P-Dimethylamino-benzaldehyde  | (2.5) | Nitrocellulose                |       |                           |       |
| o-Nitrobenzaldehyde           | (5)   | Cellulose esters and ethers   |       |                           |       |
| P-Chlorobenzaldehyde          | (25)  | Furfural <sup>(1)</sup>       |       |                           |       |
| Benzaldehyde sulfonic acid    | (10)  | Methylfurfural <sup>(1)</sup> |       |                           |       |
|                               |       | Sorbic acid <sup>c</sup>      |       |                           |       |

グリセリンのみ或はグリセリンとアミノ酸の混合物は TBA と反応し蛍光を呈す<sup>(32)</sup>。カッコ内の数字はスポットテストにおける感度を  $\mu\text{g}$  で表わしたものの。

- a, シロップ状  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を添加して行うので、糖類は脱水反応を起し、フルフラルになり、これが、TBA と反応すると考えられている。
- b,  $\text{Ar-CH=NR} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ArCHO} + \text{NH}_2\text{R}$  の反応により生成されるアリルアルデヒドが TBA と反応するのであろうと述べられている。
- c,  $535\text{m}\mu$  の極大吸収を示す<sup>(33)</sup>。

Schmidt<sup>(16)</sup> は  $\text{TBA} = \text{CH-TBA}$  (B色素) は  $\text{TBA} = \text{CH-CH=C-TBA}$  (A色素) と交換反応を行うのではないかと提案している。

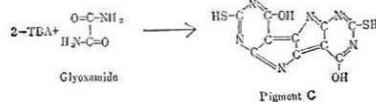
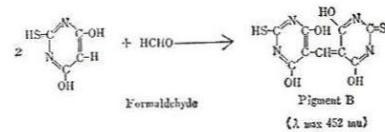
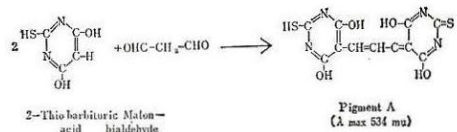
3. グリオキサマイド と TBA との反応はスポットテスト<sup>(19)</sup> に用いられ、 $\lambda_{\text{max}}$  は明らかでないが、エタノール溶液中でピンク～赤色を示す事から  $530\text{m}\mu$  附近の吸収を示す色素 (第1図, C色素) であると考えられている。

4. 油脂の自動酸化で生成するカルボニル化合物 と TBA 反応について, Täufer-

Zimmermann<sup>(12)</sup> は33の化合物を検討している。

原著を見る事が出来ないののでくわしい事はわからないが、次の事を報告している。即ちケトン

TBA と反応しないのでアルデヒドと識別出来る； pentanal 及び heptanal からそれぞれ  $208\sim 10^\circ$  と  $187\sim 9^\circ\text{C}$  (分解) の融点を示す無色の結晶を得、これを極性溶媒に溶解すると着色 (黄色) する；この結晶は TBA : アルデヒド 1 : 1 の組成のもので、活性水素を溶液に通じると無色になり、酸素



第 1 図

ガスを通じると着色する；又コンプレックスはアルカリで滴定出来る。

以上の事から、TBA 1分子の水素原子がアルデヒドのC=Oに移動し、アルドールに相当する化合物を作るのではないかと報告している。

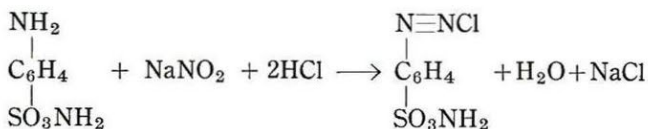
5. 其他の化合物 (第3表)について、Feigl-Libergott<sup>(21)</sup>はくわしく調べ、次のように結論している。即ち放香族系のアルデヒド例えばC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHOはTBAと反応しないが、脂肪族系のアルデヒド及び=C-C<<sub>H</sub><sup>O</sup>の構造を有するアルデヒド(ベンズアルデヒド等)はTBAとコンプレックスを生成する。其他の事については第3表の注を参照されたい。

V. TBAテストにおける副反応及び干渉物質 第4表に示す如く、溶媒として、エタノールや酢酸は好ましくないようで、水又はメタノール(IV 2参照)が好ましい。然し、検体の種類によっては後者を用いる事が出来ない場合もあるので、盲検を注意して行う必要がある。最近油脂試料に対して均一層を作る為、n-プロパノールを混合した溶媒を用いている例もあるが、補遺で指摘する如く、アルコール類の使用はさけた方がよい。

塩酸、酢酸、TCA等はニゴリを与えたり、呈色する事があるがくわしく調べられていない(補遺参照)。更に再結晶したTBAをセルローズカラムにかけ、10%酢酸でエルトすると452m $\mu$ と490m $\mu$ で吸収を示す色素が得られ、空気にふれると前者はオレンジに、後者はピンクになり、又過酸化水素でTBAを処理し、カラムクロマトにかけると3コの色素(黄色、オレンジ、及び赤色)が分離されている<sup>(11)</sup>。これらの現象はTBAの加水分解によるのではなく、酸化反応によりアロキサン或はバルビツル酸が生成する為ではないかといわれている<sup>(11)</sup>。過酸化水素との反応は油脂の自動酸化で生成されるROOHとTBAとの反応に関連して重要な反応である。即ち過酸化水素の濃度が高いと無色になる事から、ROOHの濃度と、発色の程度との関係が調べられなければならない。

Jacobsonら<sup>(13)</sup>及びWills<sup>(24)</sup>はFe<sup>3+</sup>がTBAテストに障害を与えると報告し、生肉のようにヘムが存在する場合特に注意する必要がある。然し、これとは反対にFe<sup>3+</sup>がTBA反応を促進するので、これを触媒的に用いている場合もある<sup>(12)</sup>。いづれにしても、食品に適用する場合は鉄イオンのみならず他のカチオンの影響も検討されなければならない。

次に陰イオンについて、Zipper-Wattsら<sup>(25)</sup>はソーセージにTBA反応を行う前に亜硝酸塩を除去する為に次の反応で示される処理を行っている。其他EDTAは吸光値を低下させるという報告もある<sup>(24)</sup>。



VI. 色素のクロマト法による分離 Sinnhuberら<sup>(14)</sup>はTBA-マロンアルデヒド色素をフェノール：ギ酸：イソプロパノール：水(80:10:10:100)の溶媒で展開すると(Whatman No. 1) Rf 0.22のものが得られ、又同じRf値のものがサケ油及びスルファダイアゼンから得られると報告している。最近Anderson-Waraudeker<sup>(22)</sup>はオレイン酸、アラキドン酸メチルエステルを紫外線照射し

て、その酸化生成物の薄層クロマトを行い（展開溶媒は n-ブタノール：デクロルメタノール：水（20：4：1）TBA 試薬で発色させ、黄色の色素でRf 0.8のものと、ピンクの色素0.6及び0.9のものを得ている。他方マロンアルデヒドから得られる色素は Rf 0.25（ティリングの傾向あり）を示すので、酸化脂肪から得られる TBA 色素の前駆体は他のカルボニル化合物であろうと報告している。尚これら前駆体は油層部には存在しないが、水抽出液のみに存在しているから低分子量のものであると推定している。

Ⅶ. TBA値と変敗及びフレバーとの関係 含脂食品の変敗と TBA 値との相関関係については相反する報告がなされており、この事について Jacobson ら<sup>(13)</sup>が再検討している。それによれば、変敗した大豆油（主成分は、2-hexenal, dienals）及び加熱した豚脂（Alkanals, mono- 及び di-enals）の場合は 532m $\mu$ での測定値が臭と相関関係を示し、牛脂、綿実油の変敗及び鶏肉フライ油のフレバー（2, 4-decadienal を主成分とす）の場合は 452m $\mu$ での測定値が相関関係を示すと報告している。従って今迄のように530m $\mu$ 附近のみの測定値では変敗臭との関係が得られない事がわかる。然しこれらの結果は未だ充分とは云えないので、今後更に異った食品について検討されなければならない。

### TBA 法の生揚げへの適用

I. 試料の調製と試料の分析値 市販の生揚げを製造直後 0.07m 厚さのイラックス（住友電気工業）に真空密封し、氷冷下Co<sup>60</sup>  $\gamma$ -線照射を行った。総照射線量は $2.4 \times 10^5$ 及び $4.8 \times 10^5$ rであった。照射後、中実の油脂成分を前報で述べた方法<sup>(38)</sup>に従って抽出し、溶媒を除去した後、常法に従いヨーソ価、其他の分析を行い、更に TBA 反応を試みた。分析の結果は次の通りである。照射しない生揚げ中実抽出油の場合ヨーソ価104、ケン化価247、屈折率（22℃）1.4720、パーオキサイド価0.51/100gであった。リン量は抽出油脂 1g 当り0.8~1mg程度で、リン脂体としてはレシチン、セファリン及びイノシタイドではないかと思われる3種類のものが検出された。照射によるパーオキサイド価への影響は余り著しいものではなく、 $2.4 \times 10^5$ r で0.98、 $4.8 \times 10^5$ r で1.80程度であった。このような現象は前にも観察された。従っ

第4表 TBA テストにおける副反応

| Reagents used in TBA test                                    | $\lambda$ max, m $\mu$ or color | Ref.   |
|--|---------------------------------|--------|
| Water or Methanol  | no color                        | 17     |
| Conc. HCl  | 452 — 48 hrs —> 532             | 17     |
| HCl, 12%   | Cloudy solution                 | 11     |
| TCA (20%)  | Cloudy solution                 | 11     |
| Ethanol under Sunlight <sup>a</sup>                          | 452 in the dark —> 532          | 16, 17 |
|  | 452 sunlight —> 532             |        |
| Acetic acid, heated  | 450 —> 490 —> 530               | 11     |
| Acetic acid + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                  | Discolored                      | 11     |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , dilute solution <sup>a</sup> | 530                             | 11     |
| TBA crystal in water, heated                                 | 452 — air —> orange to Pink     | 11     |
|  | 490 — air —> Pink               |        |

a 本文参照

II. TBAテスト A法 生揚げ中実抽出油及び天ぶら油の場合は油をベンゼン溶液とした。TBA 0.67g を加温しながら蒸溜水にとかし、冷却後メスフラスコで 100ml にし、これを等量の氷酢酸と混合し、TBA 試薬とした。油脂 1.5~3g を含むベンゼン溶液に TBA 試薬 10ml を加え、4 分間振とうした後、水層部を分離し、これを 30 分ウワターバス中で加温し、冷却後、比色を行った。水層部の場合は定性的に試みたのであるが、TCA で除蛋白した溶液 5 ml に 10ml の TBA 試薬を加え、上と同様に反応させ、吸収曲線を得た。従ってこの場合の吸光値は任意のもので、430m $\mu$  と 530m $\mu$  ではいづれが強い吸収を示すかを検討した。定量については目下検討中で、今迄の結果は第 5 表に示す通りである。

第 5 表 生揚げ及び天ぶら油への TBA テストの応用

| 試料                  | 重量, g | 色    | 吸光値 430m $\mu$ | 530m $\mu$ |
|---------------------|-------|------|----------------|------------|
| 天ぶら油 新              | 3.0   | ピンク  | —              | 0.083      |
| 古                   | 3.0   | ピンク  | 0.062          | 0.093      |
| 加熱                  | 3.0   | 濃ピンク | —              | 0.945      |
| 中実抽出油               |       |      |                |            |
| 非照時                 | 1.5   | オレンジ | 0.220          | 0.140      |
| 2.4 $\times 10^5$ r | 2.97  | オレンジ | 0.442          | 0.475      |
| 中実の水層部              |       |      |                |            |
| 2.4 $\times 10^5$ r |       | オレンジ | 0.127          | 0.053      |
| 4.8 $\times 10^5$ r |       | オレンジ | 0.135          | 0.072      |

天ぶら油では加熱したもの及び新らしいものでは 530m $\mu$  の吸光値は余り高くないが、古い油ではやや増加した値を示している。又加熱した油では 530m $\mu$  の吸光値の 0.26 に対して 450m $\mu$  の吸光値は 0.1 程度で、530m $\mu$  の方がやや高いようであるが、著しい差ではない。これは不安定なマロンアルデヒドや他のカ

ルボニル化合物が加熱により分解されるものと考えられる。

中実抽出油は試料が少ないので油脂量を少なくし、それに依じて試薬の量を調節して行ったが、定量的な結果を得る事は困難であった。唯非照射試料では 430m $\mu$  の方が高い値であるが、照射試料では 430 及び 530m $\mu$  で同程度の値を示すか、或は後者の波長でやや増加の傾向を示すようである。

次に水層部では明らかに 430m $\mu$  の吸光値の方が高く、照射線量の増加と共に吸光値が大きくなる傾向を示している。然しアルデヒドは不安定な化合物であるから、照射線量を更に増加した場合どのようなか更に検討する必要がある。以上の結果から油層部を用いて定量を試みる事は操作が繁親で試料を多量に得る事が出来ないばかりでなく、溶媒を除去する時揮発成分が失われ<sup>(36)</sup> 再現性のある結果を得る事は困難である。従って水層部を用い 430m $\mu$  附近で測定するのがよいのではないかと考えられる。これについては TBA 色素の前駆体が水層部に移行するという報告<sup>(32)</sup> から考えても妥当である。そこで水層部について種々な方法を試みた。

TBA テスト B法 : Jacobson ら<sup>(13)</sup> は酸触媒を用いないで、TBA 結晶をそのまま用いている。これは前にも述べたように TBA が酸性溶液中では不安定であると考えられるからである (但し補遺参照)。

中実 20g に水を加え、ろ過し、ろ液を 50ml とし、その 10ml に 10% TCA 5 ml を加え 15 分遠心分離し、上清 10ml をとり、これに TBA 結晶 10mg を加え、60°C 40 分加温し、15 分後に比色する。蒸溜水をろ



液のかわりに用い 400~550 $\mu$ m の吸光値を測定したところ、値は非常に低く、430で 0.027, 450で 0.031, 530で 0.018で、無色透明であった。

新鮮な生揚げを真空密封し、15日間冷蔵庫で貯蔵し、やや腐敗臭のあるものについて、この方法を検討した結果、450 $\mu$ m で新しいものは 0.100~0.116の吸光値で、15日経過のものは 0.131~0.153であり；540 $\mu$ m では新しいもの 0.084~0.088に対して古いものは 0.101~0.109の値を示した。色は淡いピンクであった。これら予備的な結果では 450 $\mu$ m での測定が腐敗に関係するのではないかと考えられる。然し  $1 \times 10^5$ r 照射し、1カ月冷蔵庫に保存し、未だ腐敗臭のない試料を検査したところ、450 $\mu$ m で 0.136~0.157を示し、15日経過し腐敗したものの価に近似している。又 540 $\mu$ m では 0.125~0.142で腐敗したものより可成り高い価を示した。従って照射した生揚げの腐敗現象を検討するにはこの2つの吸収極大について検討しなければならない事がわかる。

## 補 遺

この稿を終えた頃 Sinnhuber ら<sup>(87)</sup> の報告に接し、TBA の副反応について吟味されている事を知った。それによれば、TCA 及び希塩酸は色素を生成しない。又酢酸も TBA 又は 2,4-DNP を用いて精製すれば非常に低い吸光値を示すので、使用可能である。然しアミルアルコールは 2,4-DNP で精製しても黄色を呈するので、使用しない方がよい。この事について、当研究室でも 2,4-DNP で精製したプロパノールを試みたが、非常に濃い黄色を呈し、使用出来なかった。従ってアルコールを使用した今迄の方法 (I の (A), (B), (C) 法及びプロパノールを使用する Jacobson らの方法<sup>(13)</sup>) については再検討されなければならない。但し Jacobson らは亜鉛と KOH を用いて溶媒を精製しているので、2,4-DNP 精製法より効果的であったものと考えられる。

以上の事から、溶媒を厳密に精製すれば、TBA の結晶を用いなくても、酸性溶液として使用出来る。然し保存期間については明らかでないから、新しい試薬を用いるのが安全である。

## 今 後 の 課 題

C<sub>10</sub> 以下の飽和及び不飽和カルボニル化合物が、食品の酸化による変敗又は加熱により生じるフレーバーの主な成分として考えられ、従来この定量法としては TBA 反応以外に、アニリン系、2,4-ジニトロフェニルヒドラゼン (2,4-DNP) 或は Girard-T 試薬等が試みられているが、いずれも長所短所がある。Sawicki<sup>(89)</sup> によればアニリン系化合物より TBA 試薬の方が敏感で特にマロンアルデヒドに特異的であると報告しているが、第 3 表に示した如く、後者は他の多くの種類の化合物とも反応するので、食品の組成によっては必ずしも適当でない場合もある。若し TBA テストに干渉する物質がある場合はカラムクロマト或は色素の溶媒抽出等の操作を加える必要があり、可成り繁雑になる。又この反応で、発色させる為加温する事も問題点の一つである。即ち加温により揮発性のカルボニル化合物が失われる恐れがあり又カルボニル化合物の前駆体が分解し、操作中にカルボ化合物が新らしく生成される可能性もある。この事は 2,4-DNP とアルデヒド類の場合観察されている。そこで

最近 Gaddis ら<sup>(38)</sup>は油脂酸化物の定量に室温で反応を行う方法を報告している。即ち Girard-T 試薬でカルボニル化合物を水溶性のヒドラゾンとし、これを更に室温で 2,4-DNP と反応させる方法である。この反応は炭素数の小さいものは定量的に反応するようであるが、炭素数の多い化合物では必ずしも定量的ではない。従って全カルボニル量を定量する事も又マロンアルデヒド或は其他特定のものと異臭或はフレーバーに關係するカルボニルを定量する事も困難で、更に基礎的に検討されるべき多くの問題を残している。

TBA 試薬の不安定な事及び前述の問題点などに対して、Watts ら<sup>(40)</sup>は最近新らしいマロンアルデヒドの定量を試みている。即ち、Anthrone を濃硫酸の存在下で縮合させ $510m\mu$ で吸収を示す *di-benzanthrone* を生成する反応である。勿論この反応も複雑な組成である食品に適用する場合には TBA 或は 2,4-DNP の場合と同様、反応の限界、適用範囲等について検討されなければならない。然し既にある方法に対して一つの新しい方向を生み出そうとするとところに大きな意義があると考えられる。

従って現在では TBA が最も簡便な方法のようで、食品の組成によって、色素の吸収波長を吟味して、異臭或はフレーバーとの關係が更に検討されるべきであろう。

## 要 約

1. 2-TBA法は食品のフレーバーや変敗の測定に広く使用されているが、多くの未解決の問題があるので、これらを指適した。即ち、溶媒、酸触媒、障害物質及び  $530m\mu$  以外の吸収波長等注意を払わなければならない点がある。

2. これらの問題点を考慮し、この方法を  $\gamma$ -線照射揚げに適用し、最も簡便であると思われる方法を考えた。即ち検体としては生揚げ中実の抽出油より水層部を用い、TCA を除蛋白の為及び触媒として添加し、TBA 反応を行い、 $450\mu$ 及び $540m\mu$ の波長で吸光値を測定する。

3. TBA 反応に類似するカルボニル定量法を比較検討したが、TBA 法が現在では最も簡単な方法ではないかと考えられる。

## 文 献

- (1) A.W. Dox and G.P. Plaisance : J. Am. Chem. Soc., 38 2156, 2164 (1916) .
- (2) F. Bernheim, M. L. C. Berheim and K. M. Wilbur : J. Biol. Chem. 174, 257 (1948) .
- (3) K. M. Wilbur and F. Bernheim and O. W. Shapiro : Arch. Biochem. 24, 305 (1949) .
- (4) T. C. Yu and R. O. Sinnhuber : Food Technol. 11, 104 (1957)
- (5) R. O. Sinnhuber and T. C. Yu : *Ibid.*, 12, 9 (1958)
- (6) E. W. Turner, W. D. Paynter, J. Montie, M. W. Bessert, G. M. Struck and F. C. Olson : *Ibid.*, 8, 326 (1954)
- (7) W. L. Dunkely and W. G. Jennings : J. Dairy Sci., 34, 1064 (1951)

- (8) D. A. Briggs and L. R. Bryant : *Can. J. Techhol.* **31**, 138 (1953)
- (9) E. F. Caldwell and B. Grogg : *Food Technol.* **9**, 185 (1955)
- (10) C. W. Sidwell, H. Salwin and J. H. Mitchell Jr.,: *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **32**, 13 (1955)
- (11) B. G. Tarladgis, A. M. Pearson, and L. R. Dugan, Jr. : *Ibid.* **39**, 34 (1962)
- (12) K. Täufer and R. Zimmermann : *Fette Seifen Anstrichmittel* **63**, 226 (1961) ; *CA* **55**, 15964c.
- (13) G. A. Jacobson, J. A. Kirkpatrick and H. E. Goff, Jr. : *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **41**, 124 (1964)
- (14) R. O. Sinnhuber, T. C. Yu and Te C. Yu : *Food Research* **23** 626 (1958)
- (15) B. G. Tarladgis and B. M. Watts : *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **37**, 403 (1960)
- (16) H. Schmidt, *Fette Seifen Anstrichmittel* : **61**, 127 (1959)
- (17) A. J. de Koning and M. H. Silk: *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **40**, 165 (1963)
- (18) N. L. Smith, I. J. Tinsley, and E. C. Bubl : *Food Technol.* **14**, 317 (1960)
- (19) F. Feigl "Spot tests in organic analysis" Elsevier Publishing Co., 1960, 432
- (20) S. Patton : *Food Research* **25**, 554 (1960)
- (21) F. Feigl and E. Libergott : *Anal. Chem.* **36**, 132 (1964)
- (22) H. J. Anderson and V. S. Waraudekar : *Nature* **200**, 1098 (1962)
- (23) V. S. Waraudekar and L. D. Saslaw: *J. Biol. Chem.* **234**, 1945 (1959)
- (24) R. G. Shepherd : *Anal. Chem.* **21**, 1150 (1948)
- (25) A. Weissbach and J. Hurwitz : *J. Biol. Chem.* **234**, 705 (1959)
- (26) J. Hurwitz and A. Weissbach., *Ibid.*, **234**, 710 (1959)
- (27) G. Ashwell, A. J. Wahba, and J. Hickman : *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 186 (1958)
- (28) L. Warren : *J. Biol. Chem.* **234**, 1971 (1959)
- (29) W. G. Jennings, W. L. Dunkley and H. G. Reiber : *Food, Research* **20**, 1 (1955)
- (30) M. Fujimaki and S. Odagiri, *Nihon Nogei Kagaku Kaishi* : **28**, 963 (1954)
- (31) B. G. Tarladgis, B. M. Watts, M. J. Younathan and L. R. Dugan, Jr. : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37** 441 (1960)
- (32) H. W. Schultz : *PB Rept.*, 131, 948 ; *CA* **54**, 12415D (1960)
- (33) B. I. Khomutov and G. A. Garkusha : *Voprosy Med. Khim.* **6** 431 (1960) ; *CA* **55**, 9532i
- (34) E. D. Wills : *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 475 (1964)
- (35) M. W. Zipper and B. M. Watts : *Food Technol.* **16** (7) , 102 (1962)
- (36) 浦上・西島・山西 : *本紀要* **11**, 15 (1963)
- (37) T. C. Yu and R. O. Sinnhuber : *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **41**, 540 (1964)
- (38) E. Sawacki : *Anal. Chem.* **35**, 199 (1963)
- (39) A. M. Gaddis, R. Ellis, and G. T. Currie : *J. Food Sci.* **29**, 6 (1964)
- (40) T. W. Kwon and B. M. Watts : *Anal. Chem.* **35**, 733 (1963)

### Summary

Although the 2-thiobarbituric acid (TBA) method has been employed widely for the determination of flavors and oxidative rancidity of foodstuffs, there remain many problems to be solved such as effects of solvents, acid catalysts, interfering substances, reaction conditions, and absorption maxima other than 530m $\mu$ , which is generally used for the measurement of malonaldehyde.

In application of the method to the determination of offflavors induced by  $\gamma$ -ray irradiation and rancidity of fried Tofu, these problems were taken into consideration in developing a method that appears to be satisfactory; an aliquot of the aqueous pressed juice of the meat, instead of the oil extract, was treated with a 10% solution of TCA, the mixture centrifuged, the clear solution treated with 10mg. of TBA crystals at 60°C for 40min., and the optical density of a pink colored solution was measured at both 450 and 540 m $\mu$ .

Other methods of determination of carbonyl compounds which have been used or newly introduced were considered but the TBA method appears to be the most convenient one at the present time.