

ノート

## くん煙肉の分析法に関する検討（第2報） - フェノール性成分の定量性に関する検討 -

佐藤 宗 衛 , 白 井 正 澄\*

### Examination on the Analytical Methods of Smoked Beefs (2)

### Some Considerations on the Quantitative Analysis of Phenolic Compounds in Smoked Beefs

Soei SATO and Masazumi SHIRAI\*

\*Tokyo Customs Laboratory

5-5-30 , Konan , Minato-ku , Tokyo , 108 Japan

For the discrimination between smoked beefs and non smoked beefs , analytical methods of the phenolic compounds were examined. Phenol , cresol isomers and guaiacol , which had been identified as main phenolic compounds in smoked beefs , were used as standard phenolic compounds in this experiment.

These phenolic compounds added to fresh beefs (500 ppm per 100 g of fresh beef) were distilled with 500 ml of distillation volume by steam distillation under phosphoric acid acidity. Quantitative analysis of these phenolic compounds were evaluated in terms of the sensitivity, interference from other components and practical applicability. Colorimetric methods of the colored derivatives formed by reaction with phenols and 4-aminoantipyrine or 3-methyl-2-benzothiazolinon hydrazone-HCl (MBTH) as color reagents were discussed. The relations between the concentrations of phenols and the absorbances of their colored derivatives formed by 4-aminoantipyrine method were shown to be rectilinear in the range of the concentrations from 20 to 80 ppm. On the other hand , in the case of the color reaction with MBTH method the relations were shown to be rectilinear in the range of the concentrations from 2 to 8 ppm.

These methods were applied to the quantitative analysis of the phenol contents in practical smoked beefs.

It was seemed that 4-aminoantipyrine-CHCl<sub>3</sub> extraction method was more convenient for the determination of the phenol contents in smoked beefs than MBTH method in terms of the practical applicability.

- Received June 11.1984 -

## 1 緒 言

食品加工におけるくん煙処理は食品の保存性とし、好的価値の向上にある。前者は、乾燥による水分の低下並びにくん煙成分の有する抗菌性、抗酸化性及び樹脂膜の形成による食品の保護であり、後者は、くん煙成分が食品に付与されることに伴う独特の風味性から生じる<sup>1)</sup>。

近年、比較的軽度にくん煙処理された牛肉塊が我が国に輸入されている。現行の関税制度において、くん煙肉と生鮮牛肉（冷凍牛肉）とは関税率のみでなく、輸入割当制度とも関連するため、両者の鑑別には特に慎重な判断が要求される。

くん煙肉と生鮮肉との鑑別には、くん煙処理によって生鮮肉に生ずる種々の組織的、生物的、物理化学的变化<sup>1)・2)</sup>に着目し、総合的に判断することになるが、この中で、高坂ら<sup>3)</sup>は、鑑別の指標として、水分、水分活性及びフェノール含有量を指摘している。

著者らも、前報<sup>4)</sup>で輸入くん煙肉の処理程度の一つの尺度として、くん煙フレーバーの母体であり、かつ比較的定量的取扱いが可能なフェノール成分に着目し、輸入くん煙肉中の主要フェノール成分を検索するとともに、それらの成分を高感度で一括して定量する種々の方法について検討した。

本報では、水蒸気蒸留によるフェノール性成分の回収率、発色化合物の安定性を含めてフェノール性成分の定量性を検討した。

## 2 実験方法

### 2・1 試 料

標準のフェノール性化合物に、くん煙肉の主要フェノール性成分として検出されたフェノール、クレゾール及びグアヤコールを用いた。応用例に実際のくん煙肉を数種用いた。

### 2・2 装置及び発色法

分光光度計：日立 124 型ダブルビーム分光光度計。フェノール性成分の発色法は前報<sup>4)</sup>にほぼ準じた。

## 3 結果及び考察

先に報告したように、輸入くん煙肉の主要フェノール性成分として、フェノール、クレゾール異性体、グアヤコール異性体及びメチルグアヤコール等が検出された。そこで、これらのフェノール性成分の幾つかを用いて水蒸気蒸留による回収率及び定量性を検討した。

### 3・1 水蒸気蒸留によるフェノール性成分の回収率

くん煙肉よりフェノール性成分を選択的に分取するため、一般的に水蒸気蒸留法が採用されている。そこで、蒸留の留出量によるフェノール成分の回収率を検討した。

一般的に、フェノール性成分のように極性基を有する化合物は筋肉組織中ではたん白質や糖質成分等の生体成分と相互作用していることが考えられるため、フェノール性成分をより容易に水蒸気蒸留するには水と共沸されない無機酸によりフェノール性成分を遊離状態にする必要があると考えられる。Fig.1 は、水蒸気蒸留の留出量と添加したフェノール性成分の回収率との関係を示したものである。すなわ

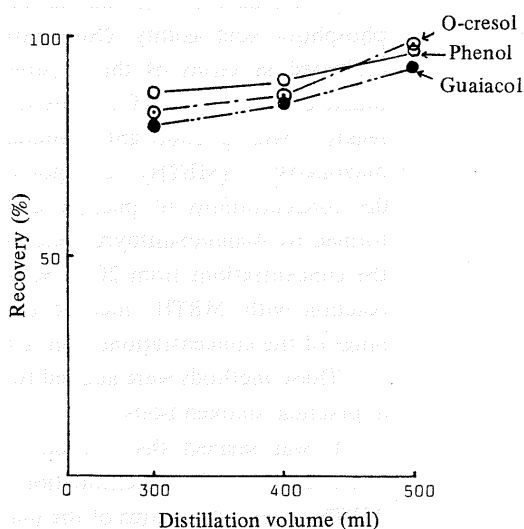


Fig.1 Correlation between the distillation volume and the recovery of phenols added to beef  
Added phenols amounts:500 ppm in 100g beef

ノート く煙肉の分析法に関する検討(第2報) - フェノール性成分の定量性に関する検討 -

ち、細断した生牛肉の一定量に、フェノール、クレゾール(オルトクレゾール)及びグアヤコールをそれぞれ個別に一定量添加混合してりん酸酸性下で水蒸気蒸留した。次に、各留出液中のフェノール性成分を4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法により定量した。

Fig.1 に示すように、筋肉組織中のフェノール性成分は、その種類によって多少回収率に差がある(フェノールに比較してオルトクレゾール、グアヤコールはわずかに回収率が低い)ものの、300mlの留出量で80~85%程度、400mlでは90~95%程度、500mlでは95~98%程度回収され、フェノールの種類による回収率に顕著な差はないように思われた。

したがって、この蒸留条件で500ml留出すれば、筋肉組織中のフェノール性成分は十分に分取できるものと思われる。

### 3・2 フェノール成分の定量性に関する考察

著者らは前報で、く煙肉より検出されるフェノール性成分を一括して定量する方法として、紫外吸光度法及び各種の発色剤を用いた比色法について感度及び実用性の点から検討した結果、4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法及び3-メチルベンゾチアゾリノンヒドラゾン法が有用と考えられた。そこで、本報では、これら二方法の定量性及び実用性の点から比較検討した。

#### 3・2・1 4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法

比色法において発色生成物の安定性は定量性に直接関連するため、この方法による発色生成物の経時変化を検討し、その結果をFig.2に示した。

Fig.2 に示されるように、この方法による発色生成物は、発色後10~50分間で、フェノール、グアヤコールは時間の経過とともにわずかに吸光度が増加する傾向があり、クレゾールではわずかに吸光度が減少する傾向がみられるが、いずれもその程度は無視しうるものと考えられた。したがって、発色後、この時間内で吸光度を測定すれば、ほぼ安定した吸光度が得られることが判明した。

次に、これらフェノール性成分の検量線について検討した。実際のく煙肉中のフェノール分は、石

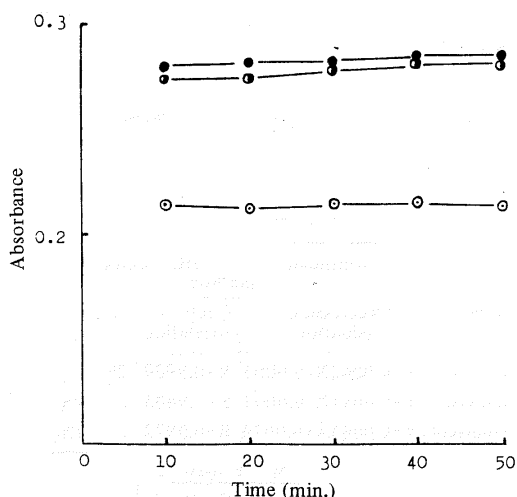


Fig.2 Stabilities of the colored derivatives of phenols with 4-aminoantipyrine method (CHCl<sub>3</sub> method)

●—● Phenol, ■—■ Guaiacol ○—○ O-Cresol,

炭酸(フェノール)を標準に用いて、これらフェノール性成分含有量の含量として定量するため、フェノール性成分の濃度と発色生成物の吸光度との直線関係を検討し、その結果をFig.3およびTable 1に示した。Fig.3に示すように、これらフェノール性成分の濃度と発色生成物の吸光度とはいずれも良好な直線関係を示した。また、この場合の回帰式及び相関係数をTable 1に示してあるが、Table 1から明らかなように、これらフェノール性成分の濃度と吸光度との相関係数は0.997~0.999で、いずれも高い相関性を示した。このことは、本発色法により、これらフェノール性成分が高い精度で定量しうることを示唆している。

#### 3・2・2 3-メチルベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸法の定量性

4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法は、水蒸気留出液を発色後、発色生成物をクロロホルムで抽出し、抽出液の吸光度を測定するため、操作上の難点がある。そこで、留出液の一定量を発色し、直接吸光度を測定する方法として、3-メチルベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸法(MBT

H法)について、発色生成物の安定性及び直線性を検討した。

Fig.4はフェノール、クレゾール及びグアヤコールをMBTH法により発色した生成物の安定性を

Table 1 Data for the regression lines of some phenols

Compound	4-Aminoantipyrine-CHCl <sub>3</sub> extraction method		
	Regression equation	Coeff. of correlation	Range of conc.
Phenol	$Y=0.0065X-0.0005$	$R=0.9989$	20- 80ppm
O-cresol	$Y=0.0041X-0.0003$	$R=0.9885$	20- 80ppm
Guaiacol	$Y=0.0045X+0.0074$	$R=0.9972$	20-100ppm
Compound	MBTH method		
	Regression equation	Coeff. of correlation	Range of conc.
Phenol	$Y=0.0164X+0.0121$	$R=0.9946$	2-10ppm
O-cresol	$Y=0.0174X-0.029$	$R=1.000$	2-10ppm
Guaiacol	$Y=0.0148X+0.0026$	$R=0.9998$	2-10ppm

MB.T.H: 3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazone-HCl

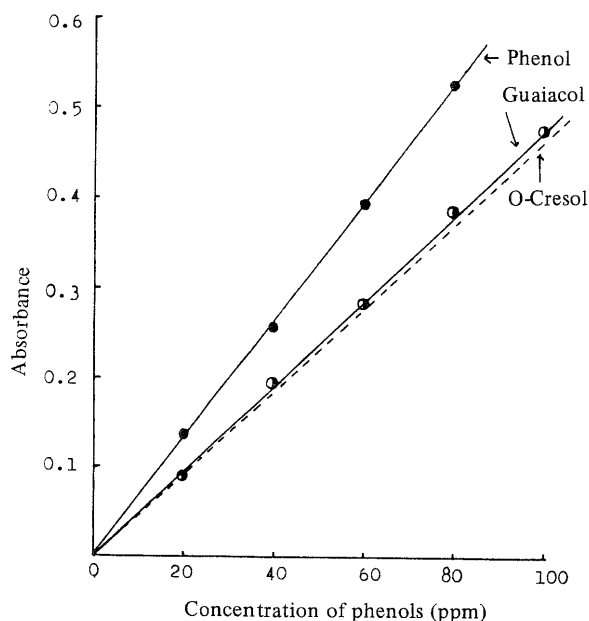


Fig.3 Calibration curves for the colored derivatives of phenols with 4-aminoantipyrine method

示したものである。

Fig.4に示すように、この方法による発色生成物はいずれも、発色後10~50分間ではほぼ一定の吸光度を示し、経時変化はほとんど見られなかった。このことは、これらの発色生成物がいずれも安定であることを示している。

次に、各フェノール性成分の濃度とこの発色法による生成物の吸光度との関係を検討し、Fig.5及び

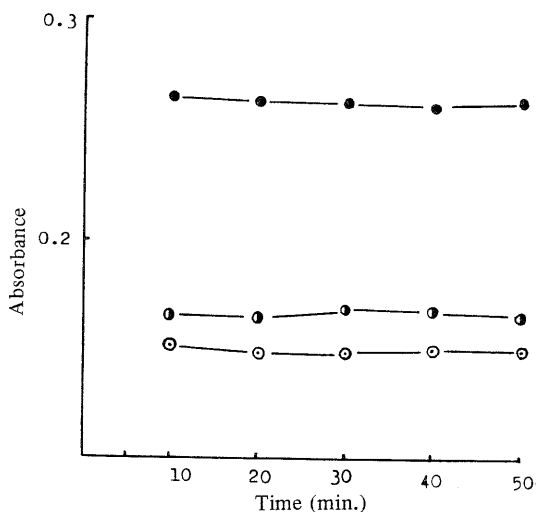


Fig.4 Stabilities of the colored derivatives of phenols with MBTH method

●—● Phenol, ■—■ Guaiacol ○—○ O-Cresol,

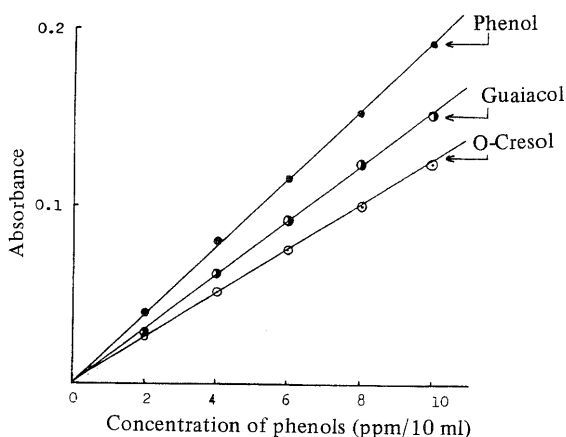


Fig.5 Calibration curves for the colored derivatives of phenols with MBTH method

ノート くん煙肉の分析法に関する検討（第2報） - フェノール性成分の定量性に関する検討 -

Table 1 に示した。Fig.5 に示すように、これら各フェノール性成分の濃度と吸光度の関係は各フェノール性成分の濃度が 2~10ppm の微量領域で、いずれも良好な直線関係を示した。この場合の各フェノール性成分の回帰式は Table 1 に示す通りで、また、相関係数も 0.995~0.999 の値を示し、濃度と吸光度との間には高い相関性を有することが判明した。

### 3・3 実際試料への応用と両法の比較

3・2 で検討した 4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法と MBTH 法を実際のくん煙肉中のフェノール性成分の定量に応用した。

輸入くん煙肉は冷凍の肉塊で輸入される場合が多いため、先ず粗く切断し、一定の部位を採取して解凍し、細断後、その一定量を分析試料として供する。

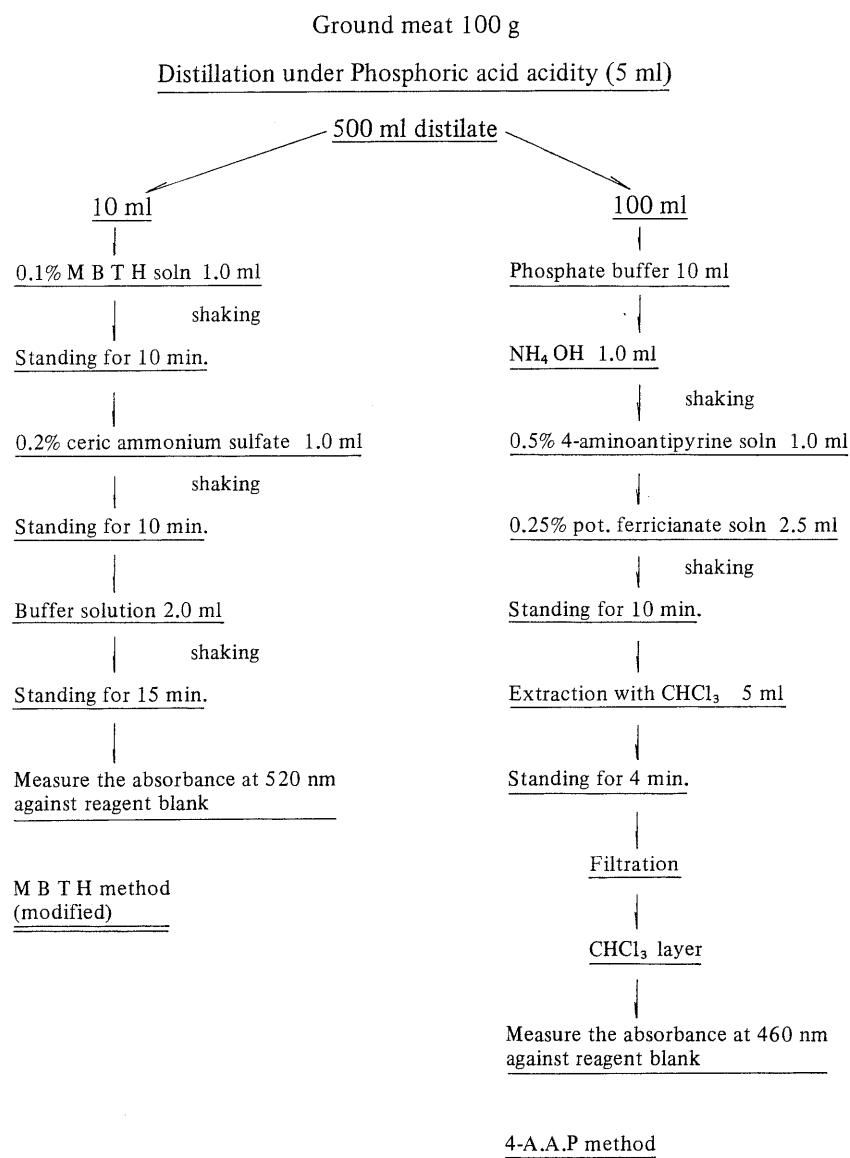


Fig.6 The scheme for the determination of total phenols in practical smoked beef

なお、この場合のサンプリングでは、解凍に伴う液汁の溶出によるフェノール性成分の減少を防止するため細断に支障のない程度に氷結した状態で行った。この採取した試料を Fig.6 の操作に従って処理し、フェノール分を求めた。

試料 A、試料 B 及び試料 C について、両者の方法によって定量したフェノール分を Table 2 に示した。Table 2 から明らかなように、4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法の定量値に比較して、MBTH 法の定量値はいずれも高い値を示した。これは、前者の方法が、発色生成物をクロロホルムで選択的に抽出するため、他の成分による影響が少ないと考えられるのに対し、後者の方法は、フェノール成分を発色後、直接吸光度を測定するため、フェノール成分とともに共沸留出される他の成分からの影響を受け、見掛け上高い吸光度を示すこしが一つの要因として考えられる。これは、この発色生成物の可視吸収スペクトル (Fig.7) がバックグラウンドによるブロードな吸収波形を示すため、弱い吸光度でもこれに重複することにより見掛け上高い吸光度を示すことから推定される。そこで、共存成分の影響を考慮し、また、低濃度のフェノール性成分を精度良く定量する方法として、MBTH 法の標準添加法を検討した。Table 3 は、試料 D 及び試料 E のフェノール性成分を 4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法と MBTH 法の標準添加法によって定量した結果を示したものである。Table 3 に示すように、MBTH 法の標準添加法による定量値も 4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法によって求めた値よりもいずれも高い値を示した。このことは MBTH 法の高い値を示す要因

が単なるフェノール成分以外の成分による発色に対する影響のみでなく、他の要因が大きく関与していることが考えられる。この主な要因として、MBTH 法は 4-アミノアンチピリン法で発色しにくいフェノール性成分にも高感度で発色しうること<sup>4)</sup>、MBTH 法はフェノール性成分以外の他成分によるバックグラウンドが大きいこと、更にこの方法は微量フェノール性成分を対象とするため、留出液量 (500ml) に対して少量の液量 (2~5ml) を発色することから、希釈倍率による誤差が大きいことなどが考えられる。

したがって、MBTH 法は、微量で共存成分の少ない試料中のフェノール性成分の定量法としては有用と考えられるが、くん煙肉のように、筋肉組織中の複雑な生体成分並びにくん煙成分が共存する試料中のフェノール性成分を定量するには問題があるものと考えられた。

Table 3 Analytical results of total phenols in practical smoked beefs(2)

Samples	Total phenols	
	4-A.A.P-CHCl <sub>3</sub> method	MBTH Add. method*
Sample D	0.5 mg %	0.91 mg %
Sample E	0.83 mg %	1.4 mg %

\*MBTH standard addition method

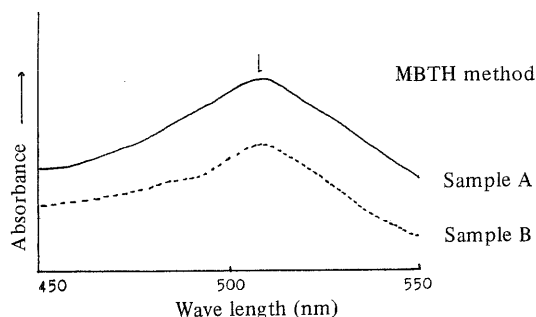


Fig.7 Visible spectra of the colored derivatives of phenolic compounds obtained from imported samples

Table 2 Analytical results of total phenols in practical smoked beefs(1)

Samples	Total phenols	
	4-A.A.P-CHCl <sub>3</sub> method	MBTH method
Sample A	0.28 mg %	0.42 mg %
Sample B	0.14 mg %	0.32 mg %
Sample C	trace	0.1 mg %

ノート くん煙肉の分析法に関する検討（第2報）- フェノール性成分の定量性に関する検討 -

#### 4 要 約

くん煙肉中の微量フェノール性成分を高感度で一括して定量するために、水蒸気蒸留の条件、4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法と MBTH 法の定量性、並びにこれらの方法を実際の試料に適用した場合の問題点について考察した。

くん煙肉（100g）中の主要フェノール性成分はりん酸酸性下で水蒸気蒸留すると、500ml の留出量ではほぼ回収された。標準フェノール性成分として、フェノール、オルトクレゾール及びグアヤコールを用い、4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法及び MBTH 法の定量性について検討した結果、これらの方法による発色化合物はいずれも安定

で、フェノール性成分の濃度と発色化合物の吸光度との間には良好な直線関係を示した。一方、両方法を実際のくん煙肉中のフェノール性成分の分析に応用したところ、MBTH 法は 4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法に比較して、高い定量値を与えることが示された。4-アミノアンチピリン-クロロホルム抽出法は、フェノール性成分の種類によっては発色しないものもみられるが、希薄溶液中のフェノール性成分を発色後、発色化合物を選択的に抽出するため、フェノール性成分が濃縮され、かつ他成分からの影響が少ないことなどから、くん煙肉のように複雑な生体成分からなる留出液中の微量フェノール性成分を一括して定量する分析法として有用と考えられた。

#### 文 献

- 1) グュエンバン・チュン, 加藤博:食品工誌, **30**, 661, 722(1984)
- 2) 橋本吉雄, 木塚静雄, 安藤則秀, 藤巻正生共著: “食肉, 肉製品ハンドブック” (1963)
- 3) 高坂和久, 山田順一, 新村裕: “食肉化工協会編, 試験成績書”, **13**, 29(1977)
- 4) 佐藤宗衛, 尾本薫, 印出進, 白井正澄:本誌, **24**, 59(1983)