食品中のフリルフラマイドの薄層クロマトグラフィー による検出法について

(昭和 49 年 10 月 22 日受理)

酒井 綾子* 原田 基夫* 谷村 顕雄*

Detection of Furylfuramide from Foods by Thin-layer Chromatography

Ayako SAKAI, Motoo HARADA and Akio TANIMURA

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

Detection of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (furylfuramide, FF) in foods by thin-layer chromatography (TLC) was studied.

Two methods of the extraction of FF from foods in the "Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists" authorized by the Pharmaceutical Society of Japan were compared and we found the method described in the section of quantitative analysis was better.

There were *trans*- and *cis*-FF in the extracts from foods and they were separated to two spots on a thin-layer chromatoplate in the solvent system of benzene:acetone (7:3) or ether:acetone (7:3). Therefore, it was inappropriate that TLC was carried out using only *trans*-FF as the standard substance. Then, the preparation of standard solution for TLC was improved.

The extracts from ham and sausage gave fluorescent spots on a thin-layer chromatoplate by irradiation of UV light, and some of the fluorescent spots interfered the detection of FFs on the thin-layer chromatogram in the case of developing with benzene:acetone (7:3 or 1:1) and with ether:acetone (7:3 or 3:2). However, on the thin-layer chromatograms developed with the proposed solvents system, chloroform:ethyl alcohol (19:1) and with chloroform:acetone (9:1), the spot of FF was completely separated from the interfering spots.

It was found out that the main substances of the interfering spots were natural spices contained in ham and sausage.

(Received October 22, 1974)

まえがき

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリル酸 アミド (フリルフラマイド, 以下 FF と略す) は昭和49年9月1日より食品添加物としての指定が取り消され, 同年10月1日より FF を含む食品の販売も禁止された。これに伴い, 食品中の FF の精度の高い検出法が必要となった。

FF の定性についてはペーパークロマトグラフによる方法も報告されているが^{1)~3)}, より展開時間が短く, 分離能の優れた薄層クロマトグラフィー (TLC) について検討を行った。薬学会協定衛生試験法⁴⁾による方法で

は, 紫外線の下で青白色および黄緑色の強いけい光を有し, FF のスポットの検出を妨害する物質がある場合が少なくない。また, 食品添加物としての FF は *trans* 体であるが, 食品から抽出された FF は *cis* 体と *trans* 体の二つのスポットを有するなどの問題があった。著者らは, 従来の食品からの抽出法を比較検討するとともに, 新しく TLC 用展開溶媒を検討し, ハム,ソーセージ中の妨害物質と FF との分離, FF の回収率, FF の *cis* 体と *trans* 体のスポットの処理などの点で, 衛生試験法に若干の改良を加えた次の方法を考案した。また, ハム,ソーセージ中の妨害物質についても若干の知見を得たので報告する。

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Table 1. *R_f* Values of Unknown Fluorescent Spots from Various Foods under UV Light

	Chloroform : Ethanol 19 : 1	Chloroform : Acetone 9 : 1	Benzene : Acetone 7 : 3	Ethyl ether : Acetone 7 : 3	Chloroform (ethanol free)
<i>trans</i> -FF	0.26	0.17	0.30	0.47	0.00
<i>cis</i> -FF	0.25	0.17	0.35	0.53	0.00
Fish sausage A*	0.53, 0.64, 0.68	0.33, 0.46, 0.53	0.33, 0.47, 0.54, 0.67	0.37, 0.54, 0.58, 0.66	0.05
Fish sausage B	0.51, 0.56				
Fish sausage C	0.50, 0.55				
Fish ham A	0.39, 0.51				
Fish ham B	0.07, 0.31, 0.46, 0.51		0.19, 0.31, 0.42, 0.47, 0.53		0.05
Pressed ham A	0.53, 0.61, 0.65	0.29, 0.43, 0.48			
Pressed ham B		0.33, 0.48, 0.55	0.38, 0.44, 0.50, 0.56		
Roasted ham	0.33, 0.53, 0.59		0.41, 0.53, 0.61		
Wiener sausage A*		0.31, 0.40, 0.46	0.29, 0.43, 0.50, 0.66	0.32, 0.46, 0.50, 0.57	
Chikuwa (A kind of fish paste)	0.71		0.57, 0.71		
Kamaboko (Boiled fish paste)	0.71		0.57, 0.71		
Tofu (Bean curd)	0.71		0.72		

FF, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

* Spots of FF were detected in addition to these spots

実験方法

1. 試 薬

① アルミナ: Woelm 社製 neutral, activity grade 1 またはそれと同等の活性を有するもの。

② フリルフラマイド標準溶液: フリルフラマイド (*trans*-FF) 20 mg を水に溶かして 1000 ml とする。

③ TLC 用プレート: 1) TLC 用ガラス板 (5×20 cm または 20×20 cm) にシリカゲル (Kieselgel H, Merck 社製) を 250 μ の厚さに塗布した後, 110°で30分間乾燥する。2) スポットフィルム (シリカゲル, 東京化成(株)製)。3) ワコーゲルプレート (シリカゲル, 和光純薬(株)製)。

④ 展開溶媒

1) クロロホルム・エタノール (19:1)

2) クロロホルム・アセトン (9:1)

3) ベンゼン・アセトン (7:3)⁴⁾

以上いずれも試薬特級を用いた。

2. 試験溶液の調製

衛生試験法⁵⁾ に準じて得たメタノール溶液を減圧乾固し, アセトンに溶かして用いた。

すなわち, 試料の中心部分約 20 g を細切り, これに食塩 10 g, メタリン酸溶液 (1→20) 30 ml およびトルエン・酢酸ブチル混液 (1:1) 50 ml を加えホモジナイザーで4分間均一化する。内容物を遠心分離管に移し, 約 4000 rpm で5分間遠心分離する。トルエン・酢酸ブチル混液層をかつ色フラスコにとり, 無水硫酸ナトリウム少量を加え, 静かに振り混ぜて脱水した後, 別のかつ色フラスコに傾斜し, その全量をトルエンで湿潤したアルミナカラム (直径約 15 cm, 長さ 6 cm) にのせる。全カラム操作を通じて流速は 1 ml/min とする。また, カラムはかつ色のものを用いるか, アルミ箔で遮光したものを用いる。次に *n*-ヘキサン 20 ml を注加し, ヘキサンの流出が終わったならば, エーテル 10 ml を注加し, エーテルの流出が終わったならば, メタノール 5 ml ずつを数回にわたって静かに注加して溶出する。最初の流出液約 2 ml を捨て, 次の流出液約 25 ml をかつ色のナス型フラスコにとり, 減圧でメタノールを留去し, 残留物をアセトン 0.5 ml に溶かして TLC 用試験溶液とする。

別に, フリルフラマイド標準溶液 20 ml をとって同様に操作したものを TLC 用標準溶液とする。操作はすべて暗所で行う。

3. 定 性

TLC 用プレートの下端から 2 cm のところに試験溶液および TLC 用標準溶液を別々に塗布し, 展開溶媒を用いて約 15 cm 展開する。この際, ハム, ソーセージなどの脂肪の多い食品では, 試験溶液中に脂肪が多量に存在することがある。このときは, あらかじめ *n*-ヘキサンで約 15 cm 展開後, 風乾し, 展開溶媒 1) または

2) で再び展開する。展開終了後, 風乾し, 薄層クロマトグラムを自然光および紫外線 (3650 Å) のもとで観察し, 試験溶液および TLC 用標準溶液より得られたスポットの色および *R_f* 値より判定する。FF は自然光下で黄色, 紫外線下で橙黄色のけい光を有する特有のスポットを示す。操作はすべて直射日光を避け, 出来るだけ暗所で行う。

4. *trans*-FF から *cis*-FF への変換

FF (上野製薬製, *trans* 体) を菅野らの方法⁶⁾に従って処理し *cis* 体 (α 体) を得た。すなわち, *trans*-FF 3 g をメタノール 600 ml に溶解し, 1/15 M リン酸一水素ナトリウム溶液 400 ml を加え, 数時間日光照射した後, 減圧濃縮し, 放冷後, 析出した結晶を, メタノール・水 (3:1) から再結晶し, *cis*-FF を得た。このも

Fig. 1. Thin-layer chromatograms of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (FF) and extracts from foods

Silica gel; Kieselgel H, Solvent; Benzene: Acetone (7:3).

A; Fish sausage A, B; Roasted ham added 20 μ g of FF.

Detected by irradiation of UV light (3650 Å).

f; spots of FF.

Fig. 2-1

Fig. 2-2

Fig. 2-3

Fig. 2. Thin-layer chromatograms of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (FF) and extracts from foods

Fig. 2-1; Benzene : Acetone 7 : 3, Fig. 2-2; Ethyl ether : Acetone 7 : 3, Fig. 2-3; Chloroform : Ethanol 19 : 1.

Silica gel; Kieselgel H.

A; Tofu (Bean curd), B; Chikuwa (A kind of fish paste), C; Kamaboko (Boiled fish paste), D; Fish sausage A, E; Wiener sausage A, F; Wiener sausage C.

○; detected under visible light, ⊙; detected under UV light (3650 Å), ⊙; detected under visible and UV light.

f; spots of FF.

の濃度 10 ppm におけるリン酸緩衝液 (pH 6) について、最大波長および吸光度を測定し、文献値⁶⁾と一致することを確認した。

結果および考察

1. 抽出法の比較

衛生試験法の定性法によって作製した試験溶液と、上記のように衛生試験法の定量法の試験溶液の調製法を定性用に変更した方法で作製した試験溶液との両者について TLC を行い、FF の回収率と妨害物質の点から検討を行ったところ、定性法による抽出法では回収率が悪く、抽出されてくる妨害物質には両法とも差違がなかったため、以後、定量法の抽出法によることにした。

2. cis-FF のスポットについて

FF を含む食品から得た試験溶液を展開溶媒 3) またはエーテル・アセトン (7 : 3)^{4), 7)} で TLC を行くと、trans-FF の上方に自然光下黄色、紫外線下黄橙色の FF 様のスポットが現れる。展開溶媒 3) を用いた場合の 1 例を Fig. 1 に示す。このスポットは前述の方法に従って変換した cis-FF と R_f 値が一致し、FF の cis 体と考えられ、また、一般に、食品から抽出した FF は

cis 体の方が trans 体よりも多かった。このように食品抽出液中の FF の半量以上が cis 体になり、trans 体の R_f 値と差があることから、FF の trans 体のみを標準としてスポットし TLC を行くと、間違いを生じやすく、cis 体の標準溶液を同時にスポットすることが望ましいが、cis 体は市販品としては入手困難である。ところが、trans 体標準溶液のみについて試験溶液の調製操作を行うと、食品からの抽出液中の FF よりも変換率は低いが、やはり、cis-FF を生ずる。そこで前述のように、trans-FF 標準溶液について検体と同様に試験溶液の調製操作を行い、これを TLC 用標準溶液として使用することによって、trans 体と cis 体の両方を検出できるようにした。

さらに、trans 体と cis 体が分離しない溶媒系についても種々検討したところ、展開溶媒 1) または 2) を用いた場合、両者の R_f 値は近接し (Table 1)、円形から円形のスポットになった。

3. 妨害物質との分離について

ハム、ソーセージの場合、ベンゼン・アセトン (7 : 3 または 1 : 1) またはエーテル・アセトン (7 : 3 または

Fig. 3-1

Fig. 3-2

Fig. 3. Thin-layer chromatograms of extracts from foods and natural spices
Detected by irradiation of UV light (3650)Å.

Fig. 3-1; Benzene : Acetone 7 : 3, Fig. 3-2; Chloroform : Acetone 9 : 1.

Silica gel; Kieselgel H.

A; Pressed ham B, B; Pepper, C; Wiener sausage B, D; Mixed spice (the constituents are presented in Table 2).

Table 2. The Constituents of Mixed Spice
Used in Wiener Sausage

Pepper	70%
Onion powder	10
All spice	10
Garlic powder	10

3 : 2)⁶⁾で展開すると FF と近似の *R_f* 値を有し、紫外線下で青白色および黄緑色の強いけい光を有する妨害物質があることが多かった。この妨害物質はスポット量が多いと自然光下では弱い黄色のスポットを示すことがあったが、紫外線下のけい光は非常に強く、FF の存否の判定を困難にする場合がある。種々の展開溶媒を用いて、この妨害物質との分離を検討したところ、展開溶媒 1) または 2) が優れていた。主な展開溶媒と FF および妨害物質の薄層クロマトグラムと *R_f* 値をそれぞれ Fig. 2 および Table 1 に示す。

精製し、エタノールを全く含まないクロロホルムでは FF は *cis* 体、*trans* 体とも全く移動せず、この妨害物質は若干移動する。この差を利用してクロロホルムを含む展開溶媒を用いるとよい結果が得られた。

Fig. 2 に示したように試験したかまぼこ、ちくわ、豆腐については自然光下では全くスポットを検出せず、紫外線の下では 1 ~ 2 個のごく薄いスポットを FF よりも上方に検出したが、*R_f* 値も大きく離れており妨害と

Fig. 4-1

Fig. 4-2

Fig. 4-3

Fig. 4-4

Fig. 4. Thin-layer chromatograms of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (FF) and the extract from a fatty wiener sausage

Silica gel: Fig. 4-1, 4-2; Spotfilm (Tokyo Kasei).

Fig. 4-3, 4-4; Wakogel Plate.

Solvents: Fig. 4-1, 4-3; Chloroform : Ethanol 19 : 1.

Fig. 4-2, 4-4; Hexane and Chloroform : Ethanol 19 : 1.

S; Extract from a wiener sausage

Detected by irradiation of UV light (3650 Å).

f; spots of FF.

はならなかった。これらの食品については、衛生試験法による方法⁴⁾によっても妨害物質はなく、その点での問題は無いが、FFの抽出率の点で本法による方が優れていた。

4. ハム、ソーセージの妨害スポットについて

上記のように、強いけい光を有する妨害スポットは、ちくわ、かまぼこ、豆腐などには現れない。そこで、妨害スポットはハム、ソーセージ中の何に原因するかを検討した。コショウ 50 mg, 混合香辛料 (Table 2 参照) 50 mg, およびコショウ 0.1% を添加して製造したプレスハム B 20 g, 混合香辛料 0.3% を添加して製造したウインナーソーセージ B 20 g を用いて、それぞれ試験溶液の調製法に従って TLC 用試験溶液を作製し、10 μ l ずつスポットして展開溶媒 2), 3) を用いて TLC を行ったところ、Fig. 3 に示すように各試験溶液から全く同じクロマトグラムが得られた。

この結果から、ハム、ソーセージ中の妨害物質は、これらの天然添加物が主な原因であると思われる。

5. 脂肪を多く含む食品について

ハム、ソーセージなどの脂肪を多く含む食品については、カラム処理によって除去しきれなかった脂肪が試験溶液中に存在する場合があります、この脂肪のため、全体にスポットの移動距離が小さくなる傾向があった。Fig. 2-2 の E の FF のスポットが下方に見られるのはこのためである。

この現象は、既製のシリカゲルプレート (スポットフィルム, ワコーゲルプレート) を使用したとき特に顕著に現れ、これらの既製プレートでは、FF が極端に下方に検出され、スポットのまともにも悪く、FF のスポットの判定が困難であった。このような場合には、*n*-ヘキサンであらかじめ 15 cm 展開後 (このとき FF は原点にとどまる)、展開溶媒 1) または 2) で展開するとよい結果が得られた。Fig. 4 に脂肪の多いウインナーソーセージの抽出液から得た幾つかのクロマトグラムを示す。なお、キーゼルゲル H を用いて作製した薄層に比べてスポットフィルムでは *R_f* 値は小さく、ワコーゲルプレートでは大きかった。

本法による検出限界は、展開溶媒 3) を用いて展開した場合、FF として約 0.4 μ g, 展開溶媒 2) で FF として約 0.2 μ g である。展開溶媒 3) を用いて展開すると *cis* 体と *trans* 体にスポットが分かれるため、FF 全体としての検出感度が低下する。また、紫外線下では、感度は数倍増加する。

ま と め

1. 食品からの抽出法としては、衛生試験法の定性法の抽出法と、定量法の抽出法を比較したところ、定量法の抽出法が優れていることが分かった。

2. 食品抽出液中の FF は、*trans* 体よりも *cis* 体の方が多く、*cis* 体と *trans* 体はベンゼン・アセトン (7:3) やエーテル・アセトン (7:3) で展開を行うと 2 スポットに分かれる。そこで抽出操作のみによっても *trans* 体の一部が *cis* 体に変換することを利用して、*trans* FF に試料の場合と同様に抽出操作を適用して薄層クロマトグラフィー用試験溶液とした。

3. ハム、ソーセージ中に含まれ、紫外線下で強いけい光を有する妨害物質との分離の点で、従来から FF の分析に使用されているベンゼン・アセトン (7:3) やエーテル・アセトン (7:3 または 3:2) に代わってクロロホルム・エタノール (19:1) またはクロロホルム・アセトン (9:1) を使用すると、完全な分離が可能である。

4. ハム、ソーセージ中の妨害物質は、それに添加される天然香辛料に起因するが多い。

5. 脂肪を多く含む食品については、カラム処理によって除去できなかった脂肪が試験溶液中に存在する場合があります、この場合は、一度 *n*-ヘキサンで展開後、クロロホルム・アセトンまたはクロロホルム・エタノールなどの展開溶媒を用いて展開することによってよい結果を得た。

終わりに、試料を御提供いただいた日本ハム(株) 太治司郎氏ならびに重久保氏に深謝します。また、実験に御協力いただいた伊野晴美氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 菰田太郎, 竹下隆三, 白石慶子: 食衛誌. 3, 288 (1962).
- 2) 菅野三郎, 屋宮妙子: 同上, 4, 198 (1963).
- 3) 菅野三郎, 屋宮妙子: 同上, 4, 205 (1963).
- 4) 日本薬学会編 “衛生試験法注解” p. 218 (1973) 金原出版.
- 5) 同上, p. 219 (1973).
- 6) 菅野三郎, 詫摩真澄, 渡辺重信, 村井絢子: 食衛誌. 8, 253 (1967).
- 7) 菅野三郎, 詫摩真澄, 渡辺重信, 村井絢子: 衛生化学, 13, 74 (1967).
- 8) 菰田太郎, 竹下隆三: 同上, 13, 201 (1967).