ニトロフラン誘導体の分析に関する研究 (第5報)

食肉製品および魚肉ねり製品中のニトロフラン誘導体
(AF-2を含む)の分析法

(昭和38年5月20日受理)

菅野 三郎* 屋宮 妙子*

Studies on Analysis of Nitrofuran Derivatives (V)
Differential Colorimetric Determination of Nitrofurylacryl-
amide, α -Furyl- β -(5-nitro-2-furyl)-acrylic Acid Amide
and Nitrofurazone in Meat Products and Fish-Paste Products

Saburo KANNO and Taeko OKUMIYA

(Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory :
3-185, Nakamura-cho, Minami-ku, Yokohama)

α -Furyl- β -(5-nitro-2-furyl)-acrylic acid amide (AF-2) and nitrofurazone (NFS) in meat products were analysed separately. Nitrofurylacrylamide (NFA) combines with protein. AF-2, after washing the sample with petroleum ether, was extracted with toluene and determined at 395 m μ . NFS, after extracting AF-2 with toluene from the sample, was reacted with phenylhydrazine and determined at 440 m μ . Each of the photometric methods were not interfered by other components. The recoveries of each components were above 70~85%.

(Received May 20, 1963)

合成殺菌料として AF-2 が開発されつつあるので肉製品中の AF-2, ニトロフラゾン(NFS)およびニトロフリルアクリル酸アミド(NFA)の分離分析法を検討した。

Table 1. Structures and Limit Concentration of NFA, AF-2 and NFS in Meat Products

Preservative	Structures	Limit concn. in meat Products
NFA		20 ppm
AF-2		20 ppm
NFS		5 ppm

* 神奈川県衛生研究所：神奈川県横浜市南区中村町 3-185

このうち NFA は第2報において述べたごとく、タンパクと親和性があり、肉製品からの分離抽出はきわめて困難である。したがって、本報においては、主として AF-2 および NFS の定性試験ならびに定量試験を記載する。

本報記載の方法の要旨はつぎのごとくである。

- (1) 定性は肉製品を酢酸エチルで抽出し、ペーパークロマトグラフィーによって行なう。
- (2) 肉製品から抽出するのにトルエンを抽出剤として選ぶことによって、AF-2 のみが単離できる。
前処理を適当に施すことによって空試験値をほとんど0にすることができる。
- (3) トルエンで AF-2 を抽出した残りの検体をキシレンで数回処理したのち、酢酸エチルで振とうすることによって NFS を溶出する。この際キシレンによる処理を充分に行なわないと、酢酸エチルによる NFS の抽出の際、検体中の種々の添加物質が溶出し、つぎの呈色操作を行なうとき空試験値が大となり、NFS の定

量を妨害する。NFS はキシレンに全く不溶であるのでキシレン処理を充分行なっても NFS の損失をきたすことはない。

- (4) DMF 抽出液を第 1 報²⁾ 記載の方法に従ってフェニルヒドラジンと反応させ、ここに生じた呈色をトルエンで抽出して可視部吸収を測定し、NFS を定量する。

トルエンへの転溶によってソーセージ等にかならず使用されている食用色素、たとえば、食用赤色 101 号、102 号、4 号、食用だいたい色 1 号等は除くことができる。

- (5) 以上に記した AF-2 および NFS の定量法の概要を表示すれば Table 2 のようになる。

Table 2. Separation and Determination of AF-2 and NFS in Meat Products

なお、本試験法の検討にあたっては、かまぼこ、すじ、はんぺん、魚肉ソーセージおよびソーセージの 5 種について防腐剤を含まないだけで、内容は市販品そのままのものを作り、空試験用検体とし、このものについて以下の定量操作条件で操作して、空試験による妨害のないことを確認した。

以上の原理に基づいた試験法の詳細はつぎのとおりである。

〔定性試験〕

1. 試験溶液の調製

検体 10 g をとり、乳鉢中でよくすりつぶし、無水硫酸ナトリウム 20 g を加え均等に混合する。つぎにこの混合物を送風しながら、ときどきかきまぜ、すみやかに乾燥

したのち、ガラスフィルターに入れ、石油エーテル 50 ml ずつで 7～8 回洗い、ふたたび送風して乾燥する。これを共栓ビンに入れ、酢酸エチル 40 ml を加えて振とう機で 30 分間振とうしたのち、ろ過し、ろ液をふたたび無水硫酸ナトリウムで脱水してろ過し、ろ液を試験溶液とする。

2. 操 作

試験溶液約 10 ml を減圧で濃縮し、約 1 ml 以下とする。その 0.01 ml をあらかじめ McIlvaine 緩衝液 (pH 3.0) を噴霧したのち乾燥しておいたロ紙につけ、ペーパクロマトグラフィーを行なう。展開溶媒としては、同緩衝液と振りまぜたブタノールを用いる。展開距離は約 25 cm とする。展開後、室温で乾燥し、直視下、

Table 3. Paper Chromatography on AF-2, NFS and NFA

	Under day-light	Under ultra-violet light	10% NaOH soln.	Rf value
AF-2	yellow	orange	yellow	0.74～0.76
NFS	yellow	pink	orange	0.53～0.60
NFA			yellow	0.67～0.70

紫外線下および10%水酸化ナトリウム溶液噴霧時の各条件下で観察する。同時に AF-2, NFS および NFA の濃度各 100 ppm のアルコール溶液を作り、その 0.01 ml をロ紙につけ、対照試験を行なう。AF-2, NFS および NFA が存在すれば、対照試験と同一の Rf の位置にそれぞれスポットが現われる。

〔定量試験〕

1. AF-2

(1) 試 薬

AF-2 標準溶液：AF-2 20 mg をジメチルホルムアミド (DMF) に溶かして 100 ml として、その 2.5 ml をとり、トルエンを加えて 100 ml とする。

AF-2 標準溶液 1 ml = 5 μ g AF-2

(2) 試験溶液の調製

検体 10 g を正確に量りとり、乳鉢中でよくすりつぶし、無水硫酸ナトリウム 20 g を加え、均等に混合する。つぎにこの混合物を送風しながら、ときどきかきまぜ、すみやかに乾燥したのち、ガラスフィルターに入れ石油エーテル 50 ml ずつで 7~8 回洗い、ふたたび送風して乾燥する。これを共栓ビンに入れトルエン 40 ml を加えて振とう機で 1 時間振とうしたのち、ろ過し、ろ液を試験溶液とする。

(3) 操 作

試験溶液および AF-2 標準溶液について、波長 395 m μ において、それぞれの吸光度 A および A₀ を測定する。対照溶液はトルエンを用いる。

検体中の AF-2 の濃度 C (ppm) は、次式によって求められる。

$$C(\text{ppm}) = 200 \times \frac{A}{A_0} \times \frac{1}{\text{検体秤取量 (g)}}$$

2. ニトロフラゾン

(1) 試 薬

① フェニルヒドラジン溶液：塩酸フェニルヒドラジン 0.5 g を水 75 ml に溶かし、さらに 5 N 塩酸 75 ml を加える (用時調製)。

② NFS 標準溶液：NFS 20 mg をとり、DMF に溶かして 100 ml とし、その 2.5 ml をとり、75% DMF 溶液を加えて 100 ml とする。

ニトロフラゾン標準溶液 1 ml = 5 μ g NFS

(2) 試験溶液の調製

AF-2 の試験溶液の調製の項でトルエンによる抽出操作の終わった残りの検体全部をフラスコ内に移し、キシレン 50 ml を加えて全体を 60° に加温してよく振りまぜたのち吸引ろ過し、この操作をさらに 3 回繰り返す。これをシャーレ上に拡げ、キシレンを完全に揮散させる。これを共栓ビンに入れ、酢酸エチル 40 ml を加えて振とう機で 30 分間振とうする。この抽出液を遠心分離後傾斜し、無水硫酸ナトリウム少量で振りまぜたのちろ過し、ろ液 20 ml を 100 ml の共セン三角コルベンにとり、水浴

上ですみやかに酢酸エチルをとばし、これに 75% DMF 溶液 10 ml を加えて試験溶液とする。

(3) 操 作

試験溶液および NFS 標準溶液各 10 ml をとり、これにフェニルヒドラジン溶液 10 ml を加え、約 70° の水浴中で 25 分間加温したのち、急冷する。つぎにトルエン 10 ml を加えて、よく振とうしてからトルエン層を分離ろ過し、440 m μ における吸光度を測定し、それぞれ A および A₀ とする。対照溶液は 75% DMF 溶液 10 ml について同様に操作したものをを用いる。

検体中のニトロフラゾンの濃度 C (ppm) は、次式によって求められる。

$$C(\text{ppm}) = 100 \times \frac{A}{A_0} \times \frac{1}{\text{検体秤取量 (g)}}$$

実験の部

1. AF-2 の定量時の空試験

本試験の検討にあたっては、かまぼこ、すじ、はんぺん、魚肉ソーセージおよびソーセージの 5 種について防腐剤を含まないだけで、内容は市販品そのままの生のすり身を作り、これを空試験用検体とした。

空試験用検体につき生のものと、加熱したものにつき、それぞれ本文記載の AF-2 の定量条件に従って試験溶液を作り、波長 395 m μ における吸光度を測定したところ、ほとんど 0 であり、AF-2 の定量を妨害しないことが判明した。また空試験用検体に NFS を濃度 20 ppm の割合に添加し、同様に空試験溶液の吸光度を測定したところ、ほとんど 0 であり、NFS は妨害しないことが判明した。この理由は、NFS が Table 4 に見られるようにトルエンおよびキシレンに不溶であるためである。

Table 4. Solubility of NFS

Saturated with NFS	Absorbance	
	Toluene	Xylene
	0.02	0.01

2. AF-2 の回収試験

空試験用検体に 20 ppm の割合に AF-2 を添加し、生のものと加熱したものについて本文記載の定量条件に従って AF-2 の回収試験を行なったところ、Table 5 に示すように回収率は 70~85% であった。

Table 5. Recovery Test of AF-2 in Meat Products

	Recovery (%)				
	1	2	3	4	5
Not boiled	71	85	78	80	82
Boiled	70	75	78	76	80

3. 妨害物除去のためのキシレン洗浄の効果

AF-2 の定量の終了した検体について NFS を定量しようとするとき、その前処理としてキシレンで洗浄する操作を行わないと NFS の定量が妨害される。すなわち空試験用検体について本文記載の NFS の定量条件に従って空試験溶液を作り、呈色操作を行なうとき、キシレンによる洗浄を行わないと波長 400~460 m μ の範囲にわたり、空試験吸光度が 0.25~0.40 のような大きな値を示す。しかし、キシレンで数回洗浄することにより空試験吸光度は 0.03 以下に低下する。このことは検体中の香料、香辛料等のようなフェニルヒドラジンと反応して呈色する物質がキシレン洗浄により除去されるためであろうと推定される。

4. NFS の回収試験

空試験用検体に濃度 20 ppm の割合に NFS を添加し生のもものと加熱したものについて、本文記載の定量条件に従い、NFS の回収試験を行なったところ Table 6 に

示すように 70~85% であった。

Table 6. Recovery Test of NFS in Meat Products

	Recovery (%)				
	1	2	3	4	5
Not boiled	72	84	79	81	82
Boiled	72	75	70	77	81

5. ソーセージ中の AF-2 および NFS の経日変化

AF-2 および NFS 各 20 ppm を添加したソーセージにつきその濃度の経日変化を追跡したところ Table 7 のような結果を得た。ただし、検出%は添加 1 時間後の検出量を 100% として算出した。

これをグラフにすると Fig. 1 および Fig. 2 のようになる。

Table 7. Variation of AF-2 Conc. and NFS Conc. in Meat Products

			1 (Oct. 30)	2 (Nov. 1)	3 (Nov. 5)	4 (Nov. 24)	5 (Dec. 6)
			After 1 hr	After 24 hr	After 6 days	After 25 days	After 36 days
			ppm(%)	ppm(%)	ppm(%)	ppm(%)	ppm(%)
AF-2	Freezer	Not boil	14.0 (100)	13.8 (98.5)	13.8 (98.5)	13.4 (95.7)	13.2 (94.5)
		Boil	14.0 (100)	13.8 (98.5)	12.6 (85.1)	12.0 (85.7)	12.0 (85.7)
	20°	Not boil	14.0 (100)	13.8 (98.5)	11.2 (80.0)	2.2 (15.7)	2.4 (17.1)
		Boil	14.0 (100)	13.8 (98.5)	11.2 (80.0)	13.2 (94.5)	10.0 (71.4)
NFS	Freezer	Not boil	17.0 (100)	16.7 (98.0)	16.7 (98.0)	16.2 (95.3)	16.0 (94.1)
		Boil	17.0 (100)	17.0 (100)	16.7 (98.2)	17.2 (101.0)	16.7 (98.2)
	20°	Not boil	17.0 (100)	16.7 (98.0)	15.0 (88.2)	1.4 (8.2)	1.4 (8.2)
		Boil	17.0 (100)	16.7 (98.0)	16.0 (94.1)	14.6 (85.9)	14.6 (85.9)

Fig. 1. Variation of AF-2 concn.

Fig. 2. Variation of NFS concn.

各条件で36日間にわたって AF-2 および NFS の濃度変化を追跡した結果によれば、氷室中に保存したものについては、製品をボイルしたもの、しないもの、ともに著しい濃度低下が見られなかった。20° で保存したものについてはボイルしたものは70~85%に低下し、ボイルしないものは約1週間後から急速に低下しはじめ、25日目には15%以下となった。しかしボイルしないものについて20°に長期間放置するということは、実際問題として考えなくてもよいから、この場合のデータは単なる参考資料である。

終りにのぞみ、試料の提供等、種々の御便宜を得た東大薬学部水野教授ならびに上野製薬株式会社に対し厚く感謝します。

報文の要旨は、日本食品衛生学会 第5回学術講演会 (昭和38年5月10日、東京) で発表。

文 献

- 1) 菅野三郎, 池田陽男: 食衛誌. 3, 266 (1962).
- 2) 菅野三郎, 池田陽男: 食衛誌. 2, No. 4, 76 (1961).

クン蒸剤「酸化エチレン」に関する研究 (第2報)

殺菌・殺虫効果について

(昭和38年6月1日受理)

鶴田 理*¹ 太田 輝夫*¹
戸部 敬哉*² 原田 豊秋*¹

Studies on Fumigant "Ethylene Oxide" (II) Studies on the Effect of Fungicides and Insecticides

Osamu TSURUTA*¹, Teruo OHTA*¹, Yukiya TOBE*², and Toyoaki HARADA*¹

(*¹Food Research Institute Ministry of Agriculture and Forestry
: 2, Hamazono-cho, Hukagawa, Koto-ku, Tokyo; *² Sanko Chem.
Co.: Samukawa-cho, Ichinomiya Koza-gun, Kanagawa-ken)

Optimal dosage of fumigant, ethylene oxide, was studied, under fundamental experiment and actual environmental conditions. The effect was found to vary according to the amount and the quality of the subject, while the reason of the results being assumed to be due to the difference of gas penetration. It was also concluded that two hundred grams per one and a half cubic meters of the fumigant amount was practically effective against even *Bacilli* having rather high tolerance, and also against Eumycetes and insect.

(Received June 1, 1963)

結 言

酸化エチレンの性状については既報¹⁾のごとく、これを安全かつ有効にクン蒸剤として扱うには臭化メチルとの混用が望ましい。しかしながら、混用以前の基礎的な

研究として酸化エチレンそのものの殺菌・殺虫効果を把握して置く必要があるため、単体での研究を進めた。

酸化エチレンのクン蒸が長期保存性を必要とする殺類のみならず、広範囲の一般食品類・香辛料などの、変敗要因となる微生物あるいは害虫を駆除するのに有効な手段であることは、幾つかの報告^{2)~14)}によって指摘されている。しかし、これらの研究には定量的な方法によっ

*¹ 農林省食糧研究所: 東京都江東区深川浜園町2

*² 三光化学工業株式会社:
神奈川県高座郡寒川町一之宮