食品の保存料, 人工甘味料等の衛生化学的研究 (第 9 報)

ニトロフラズーンおよびニトロフリルアクリル酸アミドの
共存下における食品中の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-
2-フリル) アクリル酸アミドの定量

(昭和 41 年 12 月 3 日受理)

竹下隆三^{*1} 坂上米次^{*1} 樋口隼男^{*2}

Studies on Food Additives (Food Preservatives, Artificial
Sweeteners, etc.) (IX)

Determination of 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide
in Foods in the presence of Nitrofurazone
and Nitrofurylacrylamide

Ryūzō TAKESHITA^{*1}, Yoneji SAKAGAMI^{*1} and Itsuo HIGUCHI^{*2}

(^{*1} The Institute of public Health: Shirogane-Daimachi, Minato-ku, Tokyo;

^{*2} Medical School, Self Defence Force: 1 Ikejiri-cho, Setagaya-ku, Tokyo)

The method described herein consists of (1) extraction of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (F-NFA) with benzene from food, (2) separation of F-NFA from nitrofurazone and nitrofurylacrylamide on a silica gel chromatographic column and (3) determination of the separated F-NFA by ultraviolet spectroscopy at 380 mμ.

The analysis can be applied to the determination of F-NFA in either fish meals or Soybean curd.

(Received December 3, 1966)

I. ま え が き

食品中の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリル酸アミド (F-NFA) の定量については、菅野、屋宮は食品中の F-NFA をトルエンで抽出しそのまま近紫外部の吸収極大波長において定量する方法¹⁾、トルエン抽出液をアルミナによるカラムクロマトグラフィーを行ない F-NFA をメタノールで溶出し、さらに水酸化ナトリウムで加熱分解し生成する亜硝酸をナフチルエチレンジアミンをカップリングして呈色させる比色定量法²⁾、アルミナによるカラムクロマトグラフィーを行ない分離した F-NFA をポーラログラフィーにより定量する方法³⁾ および Bioassay による方法⁴⁾ があるが、いずれもニトロフラズーン (NFS) および ニトロフリルアクリル酸アミドのごときニトロフラン誘導体が F-NFA と共存しているときには F-NFA のみを定量することができないと考えられる。

先に著者らは、ニトロフラン誘導体の薄層クロマトグ

ラフィーによる分離検出⁵⁾、および食品中の NFS および NFA 共存下における F-NFA の分離検出⁶⁾ について報告したが、これらの知見に基づいて NFS および NFA 共存下における食品中の F-NFA の定量を試みた。

食品より F-NFA をベンゼンにより抽出し、シリカゲルによるカラムクロマトグラフィーを行ないエーテルによる溶出で F-NFA を NFS および NFA と分離し、エーテル溶液をそのまま近紫外部において吸光度を測定して定量を行なった。

II. 実験方法

試 薬

1. シリカゲル: ワコーゲル C-200
2. F-NFA: 市販品 (上野製薬製) をジメチルホルムアミドで再結晶したもの
3. 標準溶液: F-NFA 10 mg を正確にはかり、ベンゼン 100 ml に溶かし、その 1 ml をとりエーテルを加えて 50 ml とする

装 置

1. Fig. 1 に示すように、かつ色ガラス管に冷却で

^{*1} 国立公衆衛生院: 東京都港区芝白金台町 1-39

^{*2} 陸上自衛隊衛生学校: 東京都世田谷区池尻町 1

きるように外套管を付けたもの

2. 分光光度計:

Beckmann DU

操 作

1. 試験溶液の調製

試料の一定量 (F-NFA として 200 μ g 以上含む量) をとり、固体試料はホモジナイザーまたは乳パチで必要に応じて水を加え十分すりつぶす。これを 50 ml の遠心分離管にとり、ホモジナイザーまたは乳パチは少量の水で洗い試料に合わせる。液体試料はそのまま遠心分離管にとり、これにベンゼン 15 ml を加えて振りまぜたのち遠心分離し、ベンゼン層をフラスコにとる。さらにベンゼン 10 ml で 4 回、同様の操作をくり返す。ベンゼン抽出液を合わせ、これに少量の無水硫酸ナトリウムを加え、30 分間放置して試験溶液とする。

2. カラムクロマトグラフィーによる F-NFA の分離

Fig. 1 の装置の外套管に水を流し、かつ色ガラス管内に少量の *n*-ヘキサンを入れ、これにシリカゲルを *n*-ヘキサンでよくまぜ合わせたものを気泡が入らないように静かに注入し、高さ 10 cm のカラムを調製し、カラム上部約 1 cm になるまで過量の *n*-ヘキサンを除く。ついで試験溶液をカラムにのせ、毎分 1~2 ml で流出させ、さらにベンゼン 10 ml で 2 回フラスコ内および無水硫酸ナトリウムを洗いこれをカラムにのせ同様に流出させる。ついで、ベンゼンがカラム上部より 2~3 mm になったとき、エーテルを静かに注入し流出を続ける。溶出液をエーテルに変えてからはじめの 5 ml を捨て、ついで 50 ml のかつ色メスフラスコで流出液を分取する。なお、F-NFA の含有量が 100 μ g 以下の試料の場合には 25 ml のかつ色メスフラスコで分取する。

3. 吸光度測定による F-NFA の定量

分取したエーテル溶液および F-NFA 標準溶液をそれぞれ対照としてエーテルを用いて波長 380 $m\mu$ において吸光度 (A) および (A_0) を測定し試料中の F-NFA の濃度 C (ppm) を求める。

$$C = K \times \frac{A}{A_0} \times 50^{**} \times \frac{1000}{\text{試料の採取量 (g)}}$$

* F-NFA 標準溶液 1 ml 中の F-NFA の mg 数

** 溶出液 25 ml を分取したときは 25 とする

III. 結果および考察

1. F-NFA の吸収曲線

市販品の F-NFA をジメチルホルムアミドで再結晶し

Fig. 1.
Apparatus for column
chromatography

Fig. 2. Absorption spectrum
of F-NFA in ethyl ether

て得たものは Fig. 2 に示すような吸収曲線が得られ、F-NFA のエーテル溶液では 382.5 $m\mu$ 、エタノール溶液でも同様 382.5 $m\mu$ に吸収極大をもっている。

2. カラムクロマトグラフィーによる F-NFA, NFS および NFA の分離

さきにシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにより NFS および NFA の分離を報告したが、これら二者が共存しているときの F-NFA の単離を前と同様にシリカゲルによるカラムクロマトグラフィーを行なった。前記実験の部と同様にシリカゲルのカラムを調製し、F-NFA (100, 200 および 400 μ g) と NFA (100 μ g) を含むベンゼン溶液をのせたのち、エーテルで溶出し、溶出液を 2 ml ずつ分取し、おのおのにエタノール 3 ml を加えて、波長 380 $m\mu$ において吸光度を測定したところ Fig. 3

Fig. 3. Elution curves of F-NFA
on column chromatography

に示すような溶出曲線を得た。F-NFA はエーテルで溶出すると約 10 ml で始め、F-NFA の 400 μg においても 40 ml までに溶出しおわり、NFA は 58 ml~60 ml より出始める。なお NFS は NFA より溶出がおそい。したがって、F-NFA 400 μg が NFS および NFA と共存しているときに、エーテルで溶出しはじめてから 50 ml を分取すれば NFS および NFA が混入せずに F-

NFA が単離できる。

3. F-NFA の安定性

a) 水溶液中での安定性

F-NFA の水溶液 (1 ml 中 F-NFA として 3 μg) を白色およびかっ色フラスコに入れ、栓をして直射日光を避けた室内で沸騰水浴中で加熱し、10 分、20 分および 30 分後においてそれぞれの吸収曲線を測定したところ、Fig. 4 および 5 に示すとき結果を得た。

水溶液を加熱すると λ_{max} は 385 $\text{m}\mu$ より次第に 395 $\text{m}\mu$ へと移行し、10~20 分の加熱でほとんど一定となることがわかった。

b) 有機溶媒中での安定性

抽出溶媒であるベンゼンとカラムクロマトグラフィーにおける溶出液のエーテルの二者の溶媒中で F-NFA の室内における変化を調べたところ、ベンゼン溶液はエーテル溶液に比べて安定であるので、エーテル溶液について安定性をみた。すなわちエーテル溶液 1 ml (F-NFA として 400 μg) を室内 12 時間放置後 *n*-ヘキサン 5 ml を加えて前項と同様カラムクロマトグラフィーを行なった。溶出曲線は Fig. 6 のとおりで、はじめに現われる小さいピークが分解物と考えられ、このもののエーテル溶液中での吸収曲線は λ_{max} 400 $\text{m}\mu$ である。したがって F-NFA の吸収曲線は光により 380 $\text{m}\mu$ から 400 $\text{m}\mu$ にシフトすることがわかる。

Fig. 4. Change of absorption spectrum of F-NFA without the influence of sunlight

Fig. 5. Change of absorption spectrum of F-NFA

Fig. 6. Elution curve of F-NFA exposed to sunlight

4. カラムクロマトグラフィーによる F-NFA の回収率

F-NFA 100 μ g, 200 μ g および 400 μ g を含むベンゼン溶液をおのおの上記カラムクロマトグラフィーを行ない 100 μ g についてはエーテル溶出液 25 ml, 200 μ g および 400 μ g についてはエーテル溶出液 50 ml を分取し、それぞれ波長 380 m μ において、エーテルを対照として、吸光度を測定し標準溶液の吸光度よりおのおのの回収率を求めたところ、100 μ g では 94.1~98.5% (97 $\pm$ 3%), 200 μ g では 97.6~101% (98 $\pm$ 2%), 400 μ g では 99.2~101% (99 $\pm$ 2%) であった。

5. 食品よりの回収率

食品として、魚肉ねり製品（はんぺん、およびかまぼこ）を選び、これら二者の盲検値を調べるため、おのおの 20 g (F-NFA 無添加) をひょう取し、実験法に従って行ない、エーテル溶出液 50 ml につき吸光度を測定したところ、かまぼこについては 0.003 以下、はんぺんについては 0.002 以下であった。

さらにこれら魚肉ねり製品および豆腐のおのおの一定量に F-NFA (100~400 μ g) をアセトン溶液として添加し、減圧下アセトンを除去したのち実験方法に従い操作し回収率を求めたところ、Table 1 に示すような結果を得た。魚肉ねり製品の種類により回収率の相違は Bioassay における場合に認められている。なお F-NFA の抽出時において、リン酸あるいは塩酸酸性で行なった場合も回収率になんら有意差を示さなかった。

IV. 結 論

1. F-NFA が NFS および NFA と共存している場合でもシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにより F-NFA のみ単離でき、同時に食品中の妨害物も除去できる。

2. カラムクロマトグラフィーにより単離された F-NFA は溶出液そのままを吸光度測定して定量することができる。

Table 1. Per cent Recovery of F-NFA from Foods

Sample	Exp. No.	ppmlevel added	Recovery
"Kamaboko"	1	10	61
	2	10	66
	3	10	63
	4	10	63
	5	20	64
	6	20	68
	7	20	68
"Hanpen"	1	10	71
	2	10	86
	3	20	72
	4	20	88
	5	20	80
"Tofu" (Soybean curd)	1	5	101
	2	5	78
	3	5	83
	4	5	91

3. 魚肉ねり製品に F-NFA を添加し回収率を求めたところ、比較的良好な結果を得た。

文 献

- 菅野三郎, 屋宮妙子: 食衛誌. 4, 198 (1963).
- 菅野三郎, 詫摩直澄, 他: 同上 7, 140 (1966).
- 荒井伸一郎, 小島 渥, 松田敏生: 日本食品衛生学会第 9 回学術講演会発表, 大阪 (1965).
- 小島 渥, 松田敏生: 日水産. 31, 146 (1965).
- 菰田太郎, 竹下隆三, 水嶋久雄: 第 17 回日本薬学大会発表, 金沢 (1963) 衛生化学投稿中.
- 坂上米次, 竹下隆三, 他: 食衛誌. 8, 124 (1967).