薄層クロマトグラフィーによる魚介類中のホルムアルデヒドの検出*

原田勝彦・三浦茂司・篠田義夫・山田金次郎

(1969 年 12 月 11 日受理)

Thin-layer Chromatographic Identification of Formaldehyde in Aquatic Animals

Katsuhiko HARADA, Shigetsugu MIURA, Yoshio SHINODA,
and Kinjiro YAMADA**

A convenient method, based on thin-layer chromatographic procedures, was developed to identify formaldehyde which circumstantially occurs in aquatic animals.

In the experiments described, the formaldehyde in muscle was extracted with petroleum ether after converting it into 2,4-dinitrophenylhydrazone. The extract was then evaporated to dryness and the residue was re-extracted with a small volume of toluene. The final extract was then applied on activated silica gel G plates, and developed with a solvent consisting of hexane-ethanol-acetic acid (90:10:3). The confirmatory evidence of formaldehyde in muscle was obtained from parallel experiments conducted with authentic 2,4-dinitrophenylhydrazones of C₁- and C₂-alkanals.

The presence of formaldehyde in muscle of fish and other aquatic animals was successfully confirmed by the adapted method, and it was found that the aldehyde exists in all of the muscles so far as examined except in the cyprinid, *Carassius auratus*.

魚介類に含まれる揮発性カルボニルの分離検出については、太田¹⁾、谷川²⁾、MANGAN³⁾、豊水^{4,5)}、GRONINGER⁶⁾、YU ら⁷⁾、HUGHES^{8,9)}、WYATT ら¹⁰⁾、YURKOWSKI ら^{11,12)}、山西ら¹³⁾、松任ら¹⁴⁾および野中ら¹⁵⁾の研究がある。

これらの研究は、主として生鮮魚およびその加工品の臭気または香気成分^{1-3,6,8,9,11-13,15)}、あるいは魚油の酸化生成物^{7,10)}として揮発性カルボニルの検索を行なったものである。このほか、豊水^{4,5)}は酸化魚油の抗菌成分として、また松任ら¹⁴⁾は冷凍オヒョウの褐変原因物質として揮発性カルボニルの分離検出を行なっている。分離検出法としては、ペーパークロマトグラフィー^{1,6)}、カラムクロマトグラフィー¹⁰⁾、薄層クロマトグラフィー^{11,12,14)}、ガスクロマトグラフィー^{5,13,15)}、およびこれらの方法の併用^{4,7-9)}とその他の方法^{2,3)}が使用され、いく種類かの生鮮魚、加工品、魚油でホルムアルデヒドが分離確認された^{2,6,9,10,12,14,15)}。

魚介類にホルムアルデヒドが天然に存在することについては、以上のほかになお多くの報告がある¹⁶⁾。しかし、ホルムアルデヒドを含む食品の販売等の行為は“食品、添加物等の規格基準”(厚生省告示第 370 号、昭和 34 年)によつて禁止されている。同告示におけるホルムアルデヒドの検出法は、磷酸または硫酸酸性下で検体を直接加熱蒸溜し、その初留液についてホルムアルデヒドの呈色反応を調べる方法である。この方法では、酸性下の加熱による検体成分の分解でホルムアルデヒドを生じる恐れと、ホルムアルデヒド以外の物質によつても類似の呈色を示す懸念がある^{17,19)}。

このため、著者らは温和な条件でホルムアルデヒドを抽出し、これを 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン

* 水産大学校研究業績第 599 号

** 水産大学校 (The Shimonoseki University of Fisheries, Shimonoseki, Japan)

(2,4-DNP-ヒドラゾン)として薄層クロマトグラフィーにより分離検出する簡易検出法について検討し、この方法を用いて魚介類におけるホルムアルデヒドの存在を調べた。

実験方法

検液の調製 組織 25 g に冷水 25 ml を加え、氷冷しつつブレンダーでホモジエナイズする。得られたホモジエネート 40 g に 20% トリクロル酢酸 10 ml を加えて除たんばくする。滲液 5 ml を分液ロートにとり、これに *n*-ヘキサン 10 ml を加えて振とうし、静置後水溶液層を試験管に移す。これに 1/10 飽和 2,4-DNP-ヒドラジン溶液 1 ml を加えて沸とう水中で 6 分間加熱する。その後、別の分液ロートに移し、石油エーテル 5 ml を加えて振とうし、2,4-DNP-ヒドラゾンを石油エーテルに移行させる。この石油エーテルによる抽出を 3 回繰返す。石油エーテルを蒸発乾固し、これをトルエン 20 μ l に溶かし検液とした。

薄層クロマトグラフィー 活性シリカゲル G のクロマト・プレート (厚さ 0.25 mm) を加温しつつ、その上に検液 20 μ l をスポットし、展開を行なつた。なお同定を確実にするため、検液と同時に精製ホルムアルデヒドとアセトアルデヒドの 2,4-DNP-ヒドラゾンの溶液をスポットした。

実験結果

抽出回数の検討 前述の検液の調整と同じ方法でフナ筋肉 25 g にホルムアルデヒドを添加し、2,4-DNP-ヒドラゾンとして石油エーテルで 1~5 回抽出した。この抽出液を 356 m μ の波長で測定し、回収率を求めた。その結果は Fig. 1 のとおりである。これから 3 回の抽出で約 90% のホルムアルデヒドが回収されることがわかる。ここで使用したフナ筋肉について、前もつてホルムアルデヒドの検出を行なつたが、その存在は認められなかつた。なお、フナ筋肉にホルムアルデヒドを加えた場合の最小検出量を求めた結果、1 スポット 0.3 μ g、すなわち筋肉 1 g 当り 0.1 μ g の値が得られた。

展開剤の検討 魚介類中にはときとしてアセトアルデヒドが存在する^{1,3,6-10,12,14,15)}。この物質とホルムアルデヒドを分離検出するのに適する二成分系の展開剤をまず選択するため、精製ホルムアルデヒドとアセトアルデヒドの 2,4-DNP-ヒドラゾンを検体として、8 種の展開剤につき検討を行なつた。ヘキサン-エタノール、ヘプタン-エタノール、シクロヘキサン-エタノール、カーボンテトラクロライド-エタノール、ベンゼン-エタノール、クロロホルム-エタノール、ヘキサン-イソプロパノールおよびヘキサン-ブタノールの展開剤につき両物質の分離能を調べた結果から、ヘキサン-エタノール混液 (90:10) がかなりよいことがわかつた (R_f 値の差, 0.07)。

次に、ヘキサン-エタノール混液 100 に対し、ヘプタン、シクロヘキサン、カーボンテトラクロライド、ベンゼン、クロロホルム、エチルエーテル、石油エーテル、酢酸エチル、酢酸、ピリジン、アセトン、メタノール、イソプロパノール、キシレンおよびトルエンをそれぞれ 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 および 40 の割に加えた三成分系の展開剤について分離能の検討を行なつた。その結果、ヘキサン-エタノール-酢酸混液 (90:10:3) が最もよい分離能を示した (R_f 値の差, 0.09)。

魚介類におけるホルムアルデヒドの検出 ヘキ

Fig. 1. Extraction of formaldehyde added to "Funa" *Carassius auratus* by petroleum ether in the form of 2,4-dinitro-phenylhydrazine.

Lines of I, II and III indicate the recovery curves when 0.65, 0.41 and 0.14 μ g of formaldehyde, respectively, were added to 1 g of the muscle.

Table 1. Identification of formaldehyde in the muscle of fish and other aquatic animals by thin-layer chromatography.

Species	Freshness score*	Formaldehyde
Elasmobranchii		
"Hoshizame" (<i>Mustelus manazo</i>)	2	+
"Akai" (<i>Dasyatis akajei</i>)	2	+
Teleostomi		
"Masaba" (<i>Scomber japonicus</i>)	2	+
"Maaji" (<i>Trachurus japonicus</i>)	2	+
"Hirame" (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	2	+
"Mahata" (<i>Epinephelus septemfasciatus</i>)	2	+
"Maiwashi" (<i>Sardinops melanosticta</i>)	2	+
"Funa" (<i>Carassius auratus</i>)	1	-
Cephalopoda		
"Madako" (<i>Octopus vulgaris</i>)	1	+
"Surumeika" (<i>Todarodes pacificus</i>)	1	+
"Sodeika" (<i>Thysanoteuthis rhombus</i>)	1	+
Crustacea		
"Gazami" (<i>Portunus trituberculatus</i>)	2	+
"Janomegazami" (<i>Portunus sanguinolentus</i>)	1	+
Gastropoda and Bivalvia		
"Sazae" (<i>Batillus cornutus</i>)	1	+
"Asari" (<i>Tapes philippinarum</i>)	1	+
"Hamaguri" (<i>Meretrix lusoria</i>)	1	+

* 1, Still alive; 2, Pre-rigor or during rigor.

Fig. 2. Thin-layer chromatogram of 2,4-dinitrophenylhydrazone of carbonyls in the muscle of several marine animals.

A=authentic specimen (a, formaldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone; b, acetaldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone).

B, C, D, E and F=2,4-dinitrophenylhydrazones from "Hoshizame", "Maaji", "Madako", "Gazami" and "Sazae" respectively.

サン-エタノール-酢酸混液 (90:10:3) を展開剤として用い、魚介類 (16 種) 筋肉についてホルムアルデヒドの検出を行なった。Table 1 に示すように、フナ筋肉を除きすべてにホルムアルデヒドが存在することがわかった。Fig. 2 はいくつかの魚介類筋肉についての薄層クロマトグラムを示したものである。

考 察

魚介類に含まれる揮発性カルボニルの捕集法としておもに蒸溜法が利用され^{1-10,12-15)}、"食品、添加物等の規格基準"のホルムアルデヒド検出の公定法においても蒸溜法が採用されている。この方法では、蒸溜の初留液についてホルムアルデヒドの検出を行なうが、山田がかつてマダラ肉について調べた結果では、初留区分に捕集されるホルムアルデヒド量は蒸溜原液の 17% であった²⁰⁾。このため、本法では、まず検体を *n*-ヘキサンで処理し、脂質成分を除いたのち、2,4-DNP-ヒドラジンを加えてホルムアルデヒドを 2,4-DNP-ヒドラゾンとし、これを石油エーテルで抽出する方法を採用した²¹⁾。この方法により、フナ筋肉に一定量のホルムアルデヒドを加えて、検討した結果、3 回の抽出でホルムアルデ

ヒドの約 90% が石油エーテルへ移行することがわかった。

菰田²¹⁾は食品中のホルムアルデヒド検出に固定相としてシリカゲル G を、展開剤としてベンゼンを用いて薄層クロマトグラフィーを行なっている。しかし、この方法ではホルムアルデヒドとアセトアルデヒドとの分離が十分でない。YURKOWSKI ら¹²⁾は塩蔵タラ (*Gadus morhua*) の揮発性カルボニルを薄層クロマトグラフィーで検索し、ホルムアルデヒドの存在を確認している。この方法は煩雑なため、ホルムアルデヒドのみの検出を目的とする簡易法としては適当でない。しかしプロピレン・グリコールで impregnation を行なったシリカゲル G で、低分子の *n*-アルカナールの分離に好結果を得ている¹¹⁾。また、松任ら¹⁴⁾は同様に impregnation を行つたクロマトシートを用い *n*-アルカナールの分離を行なっているが、ホルムアルデヒドとアセトアルデヒドの分離能では、ジオキサン-水系のクロマトグラフィーが 2-フェノキシエタノール-*n*-ヘキサン系のそれよりすぐれているようである。これらの impregnation を行なつた方法と著者らの方法との優劣については、比較研究を行なっていないため明らかでない。しかし、ヘキサン-エタノール-酢酸による本方法では、ホルムアルデヒドとアセトアルデヒドが明瞭に分離でき、展開時間がわずか 30 分程度であるため、魚介類中のホルムアルデヒドの簡易検出法として十分利用できよう。

要 約

1. 魚介類に含まれるホルムアルデヒドの簡易検出法として薄層クロマトグラフィーにつき検討を行ない、展開剤としてヘキサン-エタノール-酢酸 (90:10:3) が最もすぐれていることを確かめた。展開時間は約 30 分であつた。

2. 本法によるフナ筋肉に加えたホルムアルデヒドの石油エーテルへの移行率は約 90% であり、最小検出量は 0.3 μg /スポットであつた。

3. 本法により魚介類 (16 種) 筋肉におけるホルムアルデヒドの存在を調べ、フナ筋肉を除き調べた筋肉にすべてホルムアルデヒドが存在することを明らかにした。

本研究における軟体類および硬骨魚類の同定はそれぞれ本校網尾 勝助教授および尼岡邦夫博士の援助によるものである。ここに記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 太田冬雄: 本誌, **24**, 334~337 (1958).
- 2) E. TANIKAWA: *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **6** (2), 67~138 (1958).
- 3) G. F. MANGAN: *Comm. Fish. Rev.*, **21** (6), 21~27 (1959).
- 4) 豊水正道: 本誌, **26**, 726~732 (1960).
- 5) 豊水正道: 本誌, **26**, 733~738 (1960).
- 6) H. S. GRONINGER: *Food Technol.*, **15**, 10~12 (1961).
- 7) T. C. YU, E. A. DAY and R. O. SINNHUBER: *J. Food Sci.*, **26**, 192~197 (1961).
- 8) R. B. HUGHES: *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 822~826 (1961).
- 9) R. B. HUGHES: *ibid.*, **14**, 893~903 (1963).
- 10) C. J. WYATT and E. A. DAY: *J. Food Sci.*, **28**, 305~312 (1963).
- 11) M. YURKOWSKI: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **22**, 17~25 (1965).
- 12) M. YURKOWSKI and M. A. BORDELEAU: *ibid.*, **22**, 27~32 (1965).
- 13) 山西 貞・小林彰夫・中山典子・仲宗根洋子: 農化, **40**, 311~314 (1966).
- 14) 松任茂樹・永山文男・小野豊樹: 本誌, **33**, 586~590 (1967).
- 15) 野中順三九・川上晴雄・小泉千秋: 本誌, **34**, 712~715 (1968).
- 16) 山田金次郎: 本誌, **34**, 541~551 (1968).
- 17) A. R. TANKARD and D. J. T. BAGNALL: *Analyst*, **51**, 561~567 (1926).
- 18) G. A. REAY: *ibid.*, **61**, 78~85 (1936).
- 19) 三堀三郎・小管貞良: 日本衛生化学会誌, **6**, 155~157 (1934).
- 20) 山田金次郎: 未発表.
- 21) 菰田太郎・竹下隆三・藤田昌彦: 日本食品衛生学会昭和 37 年 5 月 18 日発表.