

食品防腐剤のフリルフラマイドの 分解について

石原 忠・保田 正人

Degradation of Furylfuramide (2-(2-Furyl) -3-(5-nitro-2-furyl)- acrylamide) in Food Preservative

Tadashi ISHIHARA and Masato YASUDA

Abstract

A study was made on the products of degradation of Furylfuramide (FF) in food preservative and the following results were obtained.

1. Eight kinds of products were isolated by thin-layer chromatography (TLC) from FF which was dissolved in neutral or alkaline phosphate buffer and heated in water bath (90°C).

2. It was clarified by the TLC that FF added in food or phosphate buffer is degraded after becoming cis-FF during the process of heating (90°C). This cis-FF showed Rf 0.62 (WAKOGEL B-5, solvent: ethyl ether) and maximum absorption at 300m μ and 420m μ . Those products of degradation produced following the status of cis-FF which were constantly verified by the TLC were two yellow spots with Rf 0.16 and 0.18 both of which showed maximum absorption near 280m μ and 415m μ .

3. Most of the FF added to food remained as cis-FF.

4. Those degraded products of heated FF in phosphate buffer were two kinds of yellow materials in which nitro radical is believed to have been reduced to amino acid. Both of these materials showed maximum absorption at 345m μ and Rf 0.8 or more at the TLC.

食品防腐剤として従来使用されていたニトロフラン誘導体のニトロフラゾン、ニトロフリルアクリル酸アミドに代り 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, FF)が1965年に畜肉, 魚肉煉製品などの防腐剤として許可されている。この物質は西海枝, 田中ら¹⁾により合成され, 幾何異性的には側鎖二重結合に関し, ニトロフリル基とカルバモイルがトランス配位であることが明らかにされている。本剤の防腐効果に関しては多くの報告があるが, 使用時に分解によって生成する物質についてはあまり研究されていない。食品中でのFFの減少の大部分は分解によるもので, ハム, ソーセージなどの加熱食品中での失活については小島, 松田ら²⁾が報告している。著者ら^{3,4)}は鮮魚, 魚介類乾製品に対するFFの防腐効果試験を行なった際, 製品に付着するFFの残存量がハム, ソーセージなどと異なり多くの場合検出限界以下であった。このようなことより, FFの分解はその条件によ

つてはかなり速やかであることが想像され、その分解機構について興味を持たれる。

本実験では数種の方法により FF を分解しその生成物を TLC で分離し、2, 3 の新知見を得た。すなはち煉製品中に TLC で FF 以外に FF より R_f が高く N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液中で 300, 420 μ に吸収極大を持つ黄色物質の存在を認めた。この物質は有機溶媒中での FF の光分解や、水溶液中での加熱分解時にもみられるもので、西海枝ら⁵⁾の報告した FF のシス型に一致することおよび食品中の FF を定量する場合、従来の方法ではこの物質も含んだ値となっていることを確認した。その他 FF のリン酸緩衝溶液の加熱分解生成物中には、これまで報告されていない 345 μ に吸収の極大を持つ 2 種の黄色物質や、性質不明の数種の間中生成物を TLC で分解したので報告する。

実験方法

試薬および操作

1. FF: 純末 (針状結晶) 上野製薬製。
2. TLC: ワコーゲル B 5 を用い、エチルエーテルを用いて 40 分間展開した。
3. FF の定量: 松田ら^{6,7)} のポーラログラフ (柳本 PA 102 型) を用いニトロ基の還元波高による定量、および菅野⁸⁾ のメタノール溶液中で亜硝酸の呈色による方法によった。
4. 食品中からの FF の抽出: トルエン・酢酸ブチル (1:1) で抽出し、アルミナカラムを通し、メタノールで溶出する方法^{6,7,8)} によった。
5. 分解生成物の吸収曲線の測定: TLC で分離したスポット部をかき取り、有機溶媒で振とう抽出し、遠心分離後その上澄を分光光度計 (日立 EPU 2 型) で測定した。

以上の操作は光分解の影響を除くため、暗室またはそれに近い室内で行ない、溶媒は 40°C 以下の減圧下で溜去した。

実験結果

1. 煉製品中での FF の分解

市販の魚肉ソーセージ 300 g をトルエン・酢酸ブチルで抽出し、アルミナカラムを通し、メタノールで流出させた液を減圧乾固後、少量の DMF に溶かし TLC を行ない、FF と同 R_f (約 0.5) の位置に小さな黄色のスポットと、その上部 (R_f 0.62) に黄色の大きなスポットを得た。次にアジ肉すり身に 100 ppm, 300 ppm と高濃度に FF を添加し、ソーセージ加工行程を考慮して 90°C, 30 分熱処理したものの抽出液について TLC で分離を試みた。結果はいずれも根跡程度に原点に止まる物質と、市販品の場合と同様 FF および R_f 0.62 の黄色物質が得られた他、300 ppm 添加の場合には原点と FF の間に淡黄色の R_f 0.16, 0.18 の 2 スポットを認めた (Fig. 1)。

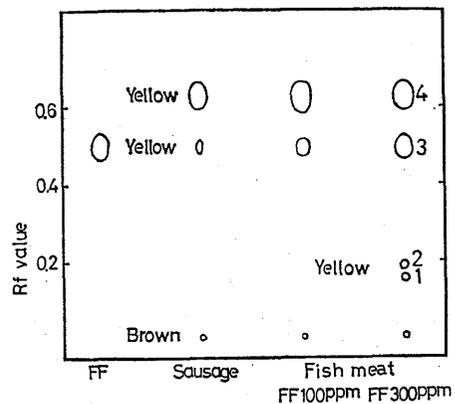


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of FF and the extracts from foods containing FF

以上のことより市販煉製品に添加されたFFは大部分がRf 0.62の物質に変化していると思われる。各スポットのDMF抽出液の吸収曲線を測定すると、Rf 0.62の物質は300, 420m μ に極大吸収があり、FFの302, 405m μ とは異なっていた。Rf 0.16, 0.18の物質は何れも280, 415m μ 付近に極大吸収がありよく類似していた(Fig. 2)。これまで多くの報告でFFを食品に添加すると405m μ の極大吸収が幾分長波長側に移動するといわれ、著者らも確認しているが、この現象はRf 0.62の物質によるものと考えられる。

2. 水溶液中のFFの加熱分解

あらかじめ少量のDMFに溶解したFF 60mgをpHをかえたM/15リン酸緩衝液(pH 5.0, 7.0, 7.1, 8.0) 200mlに溶解し、300ppmの溶液を作り、90 $^{\circ}$ CでpH 5.0, 7.0, 8.0の液は1時間、pH 7.1は3時間加熱した。冷却後、酢酸エチルで振とう抽出し減圧濃縮後TLCで分離しFig. 3の結果を得た。pH 5.0ではFFが大部分で、FF上部のRf 0.62の物質は小さいスポットであった。pH 7.0ではFFのスポットは小さくなり、pH 8.0では多くの分解生成物がみられた。

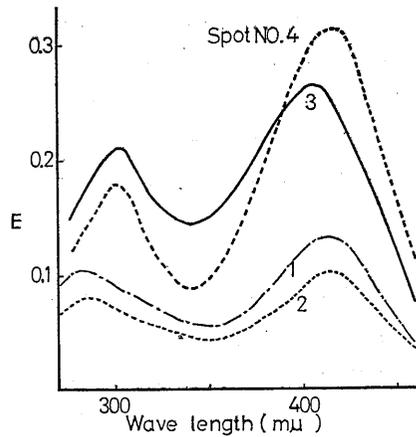


Fig. 2. Absorption spectra in DMF of each spot shown in Fig. 1

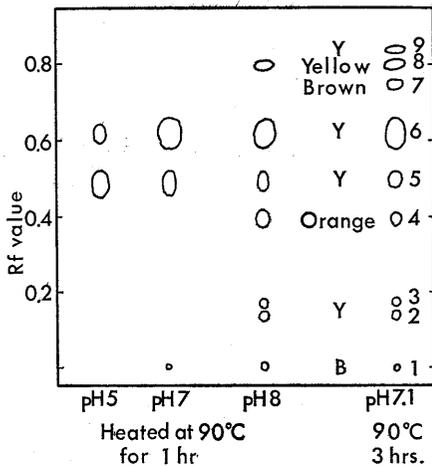


Fig. 3. Thin-layer chromatograms of M/15 phosphate buffer containing FF heated at 90 $^{\circ}$ C and extracted by ethyl acetate

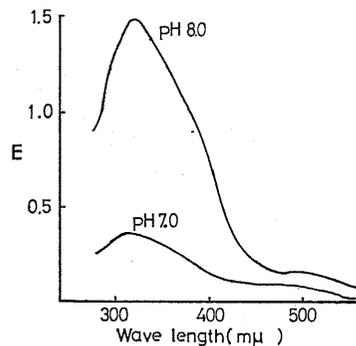


Fig. 4. Absorption spectrum of aqueous phase of M/15 phosphate buffer containing FF heated at 90 $^{\circ}$ C for 80 min. and then shaken with ethyl acetate

pH 7.1の3時間分解時は上記pH 8.0の場合とほぼ同様多くの分解物が確認された。またこれらの分解液中に残存するFF量をポーラログラフィーで定量すると、pH 5.0では98%が残存し、pH 7.0で82%、pH 8.0で62%となりアルカリ側では不安定とする松田⁹⁾の報告によく一致する。また分解生成物中には抽出溶媒の酢酸エチルに移行せず水溶液層に残るものがあ

ることがわかった。この水溶性分解物の吸収曲線を Fig. 4 に示す。また TLC で分離された分解物の吸収曲線は pH 7.1, 3 時間加熱分解のものについて示すと Fig. 5 の通りである。Fig. 5 中の曲線 6 の物質は 300, 420m μ に極大吸収を有し, Rf も前実験 (Fig. 1) 0.62 の物質と一致することより同一物質と断定した。また Fig. 3 に原点に止まる物質も含めて 9 種が分離された場合を例示したが, 展開槽中のエーテルの飽和が乱れると最上部にある 8, 9 の 2 つのスポットが 1 つになることもある。またスポット 7 は非常にうすく再現性のある吸収曲線が得られなかった。スポット 2, 3 は分離しにくく時により重なることがある。Fig. 5 に示すように吸収曲線より判定すると曲線 1 と 4, 2 と 3, 5 と 6, 8 と 9 が各々非常に類似していることから近似化合物ではないかと考える。

次に pH7.0, M/15リン酸緩衝液で FF の 50ppm, 100ppm 溶液を作り,

この 100ml にシステイン 50mg, 100mg を添加し, 80°C, 30分間の熱処理後, 酢酸エチルで抽出し常法により TLC で分離したところ, FF のスポット以外に原点と Rf 0.62 を示す物質が常

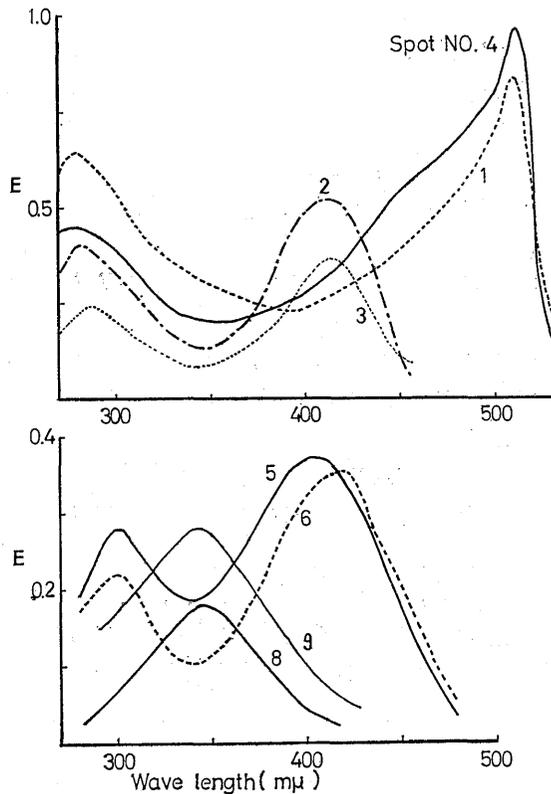


Fig. 5. Absorption spectra in DMF of each spot shown in Fig. 3

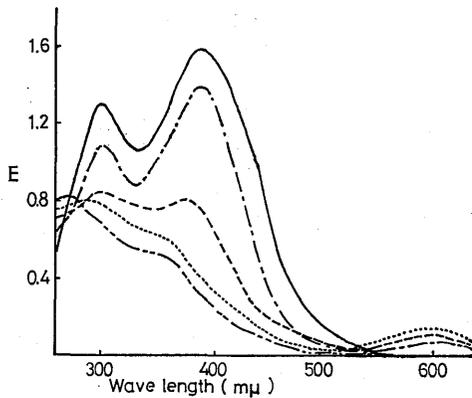


Fig. 6. Change of absorption spectrum of FF in ethyl acetate with influence of sunlight —,exposed to sunlight for 0 min. - - -,5 min. - · - · -,10min. ·····,20min. - · - · -,30min.

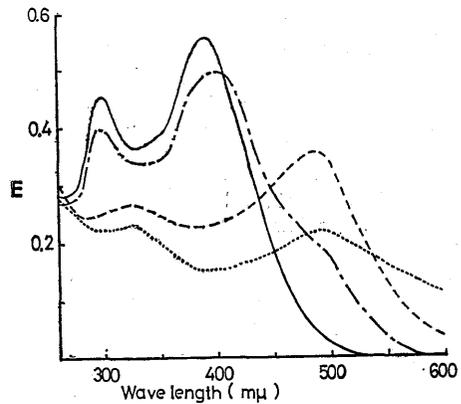


Fig. 7. Change of absorption spectrum of FF in methyl alcohol with influence of sunlight —,exposed to sunlight for 0min. - - -, 10min. - · - · -,20min. ·····,30min.

に現われ、さらに 100ppm の場合には Rf 0.16, 0.18 の2スポットを確認した。これらの吸収曲線は Fig. 3 の同 Rf の物質と比較するとよく一致した。Rf 0.62 の物質は常時検出されるので以下本物質を FFX と呼称する。

3. 有機溶媒中での FF の光分解

FF の化学的定量には抽出、分離の過程で数種の有機溶媒を用いる。FF は有機溶媒中で特に光によって分解されやすいので、数種の溶媒中で直射日光により分解を受けた場合の吸収曲線の変化を調べ Fig. 6, 7, 8 に示した。酢酸エチル中では照射時間と共に FF の極大吸収

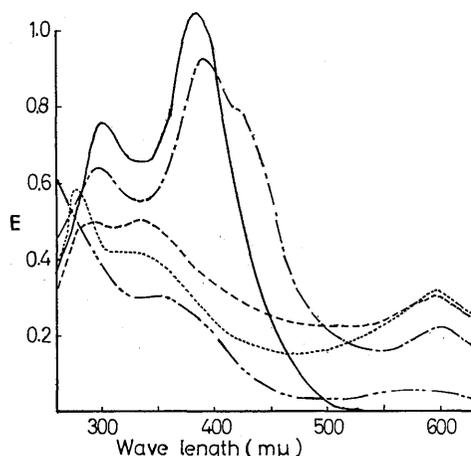


Fig. 8. Change of absorption spectrum of FF in ethyl alcohol with influence of sunlight

—, exposed to sunlight for 0 min. ---, 10 min. - - - -, 15 min. ·····, 20 min. - · - ·, 30 min.

は短波長側に移り、吸光度は急速に減少し分解前にみられなかった 600m μ 付近に新たなピークを生じるが、さらに分解が進むとこのピークも減少し最終的には消失する。この 600m μ 付近での吸収の出現はエチルアルコール、クロロホルムの場合にもみられる。メタノール中では分解と共に液は赤色を増し、500m μ 付近に新たなピークを生じるがこれも分解が進むと減少する。酢酸エチル中で光分解を受けた液を TLC で分離した結果、水溶液の時にはみられなかったブルーのスポットを原点のすぐ上部に認めたが、この物質は特に分解が早く TLC 展開終了後間もなく消失してしまう。スポットの色調よりみて、吸収曲線で 600m μ 付近に生じるピークはこの物質に

よるものと思えた。また光分解の初期には TLC で FF と FFX が分離されるのみであるが、分解が進むと FFX が増し、原点に止まる物質、ついで Rf 0.16, 0.18 の淡黄色の 2 物質、さらにブルーのスポットが現れる。ブルーのスポットを除き水溶液の場合の同 Rf のものと比較するとその吸収曲線はよく一致した。

4. FFX (TLC, Rf 0.62 の物質) の検討

以上の結果より FF は条件によって分解機作を幾分異にすることが推察されるが、共通して TLC で得られるスポットは、原点に止まる物質と Rf 0.62 で DMF 抽出液で 300, 423m μ に極大吸収を持つ FFX および Rf 0.16, 0.18 の 280, 415m μ 付近に極大吸収を有する 2 物質であった。FFX についてその単離したものをポーラログラフィー、および菅野の方法による呈色を行なったところ、前者では FF と同一電位でニトロ基の還元波を示し、後者では亜硝酸の呈色がみられた。したがって従来の FF 定量法ではこの FFX を FF に含めて定量していることになる。

また両定量法によって得られる定量値は FFX の問題とは別に一致しない場合が多い。例えば FF の 100ppm メタノール溶液を直射日光に照射して分解させると 80分照射時にはポーラログラフィーでは残存率が 0% となるが、呈色法では 60% がなお残存している結果を得た (Table 1)。また FF 100ppm の pH 7.0 の溶液にシステイン 25mg を加え、90°C, 120分

加熱分解させた場合にも前者では44%にすぎないが、後者では全く分解されていない (Table 2)。このような不一致な結果は後にも述べるが、FFの分解の主経路はニトロ基を遊離して進むと

Table 1. Percentage of FF remaining in methyl alcohol after exposure to sunlight assayed by polarography and colorimetry

Exposure time (min)	Percentage of remaining FF (%)			
	Polarographic method		Colorimetric method	
0	100		100	
20	58		80	
30	27		67	
80	0		60	

Table 2. Percentage of FF remaining in phosphate buffer with pH 7.0 containing 100 γ /ml of FF added with 0.025% cysteine after being heated at 90°C assayed by polarography and colorimetry

Heating time at 90° C (min)	Percentage of remaining FF			
	Polarographic method		Colorimetric method	
0	100		100	
60	68		98	
120	44		98	

いう松田¹⁰⁾の報告をうらずけるもので、FFの分解を伴うような条件下では呈色法によって実際より高い残存率が得られることになる。このような定量法の優劣はあるがいずれにせよアルミナカラムによってはFFとFFXは分離しないため、これまで加工食品に残存するとされたFF量はその大部分がFFXである。またピオアツセイによる定量もポーラログラフィーによる定量値と同程度の結果を示す⁹⁾こと、および後に示すFFXの防腐効果より考えてFFXを含めているといえる。またFFの50ppmメタノール溶液に短時間光を照射し、分解がFFXまでで止まっていることをTLCで確認したものについて、ポーラログラフィーで定量しても照射前のFF含量に等しい結果を得た。松田ら⁶⁾はFFの吸収極大が食品添加後長波長側に移動し、吸光度が高くなった場合にもポーラログラフィーによる還元波高および抗菌力に影響がないと報告しているが、著者らの結果とも良く一致する。以上のことからFFXのポーラログラフィーによる定量値はFFにそのまま換算出来ることが判明した。

次にFFXの防腐効果について検討した。TLCで分離したFFXを集め、その適当量を酢酸エチルで抽出後、溶剤を溜去して残査を少量のDMFに溶解しM/15リン酸緩衝液 (pH7.0) で50mlにした。この緩衝液中に含まれるFFXはFFに換算して0.18mg/mlであった。この

液を対照として同濃度の F F 溶液を作り、各々その4ml をアジすり身50g に添加し充分混和した (アジすり身中含量は 14.4ppm になる)。各5検体を3日間室温 (18~20°C) に放置し、その

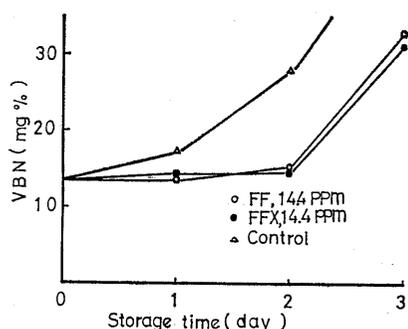


Fig. 9. Change of VBN quantity by storage time of fish meat containing FF and FFX. (storage temperature 20°C)

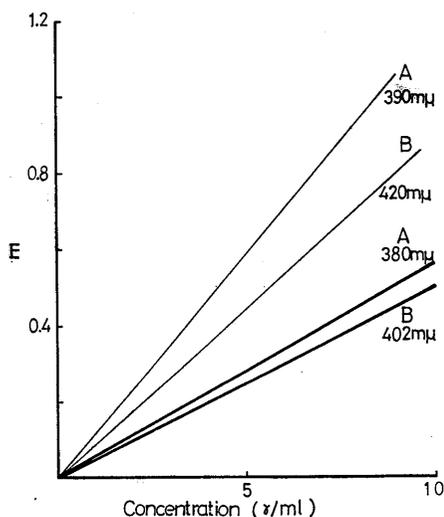


Fig. 10. Standard curves of FF and FFX.
—, FF—, FFX
A: absorbance in ethyl ether
B: absorbance in M/15 phosphate buffer (pH7.0)

間2g ずつを取り Conway の微量拡散分析法¹¹⁾で揮発性塩基態窒素を測定した結果、検体によるばらつきは幾分あったが平均値では両者はよく一致した (Fig. 9)。このことから F F X も F F と同程度の防腐効果を有することが想像される。

5. F F X の標準曲線

食品に添加した F F の大部分が F F X になっている場合、F F の極大吸収波長の吸光度測定による定量法では誤差が非常に大きくなる可能性がある。この欠点を除くためにはカラムクロマトなどによる F F と F F X の分離が必要であり、著者らは現在この方法について検討中であるが、同時に F F X の標準曲線の作製が必要となる。

T L C で分離した F F X をエーテルで抽出後、これを原液としてさらに3段階に希釈し F F X がエーテル中で示す 390 μ の極大吸収における吸光度を測定した。一方各希釈液の 10ml を取り、エーテルを溜去後 D M F 1ml に溶解し、M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 9ml を加え、420 μ の吸光度とポーラログラフイーによる定量値を求め、F F X のエーテルおよび M/15 リン酸緩衝液に溶解した液での標準曲線を作製した (Fig. 10)。図のごとく F F X の標準曲線は F F よりいずれも同濃度で吸光度が高く、リン酸緩衝液中での F F X 10ppm の吸光度は 0.90 となり、菅野ら¹²⁾の F F のシス型の吸光度 0.91 とよく一致する。またシス型がトランス型と同様の抗菌作用をもつこと⁵⁾およびシス型の吸収曲線¹²⁾との比較より、本報中の F F X は F F のシス型のものと断定できる。

考 察

F F の分解は溶剤、その他処理方法により幾分機構を異にするとと思われるが、食品中に添加された場合 F F は初めに T L C で R_f 0.62 を示すシス型に変わり、ついで原点に止まる物質、および R_f 0.16, 0.18 で、極大吸収を 280, 415 μ 付近にもつ2物質を生じた後さらに複雑に分解して行くものと考えられる。F F の食品中での分解は S H 基を主とした還元性物質に影響されるといわれ^{9, 13, 15)} これらの存在でニトロフラン誘導体のニトロ基が還元され、ヒドロキシアミドよりアミノ基になることを AUSTIN¹⁵⁾ BECKET¹⁷⁾ らは確認している。AUSTIN によるニトロ

フラゾーン (F) の還元過程を Fig 11 に示す。一方松田¹⁰⁾ はニトロフラン誘導体の分解過程

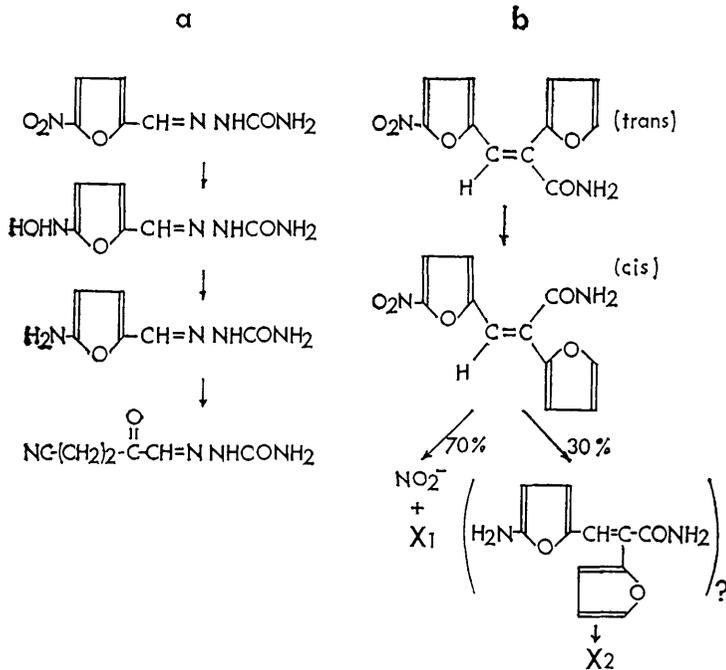


Fig 11 Degradation process of nitrofurans derivatives
 a : Nitrofurazone (F) reported by AUSTIN
 b : Furfurylfuramide (FF), reported by MATSUDA

ているか、松田¹⁰⁾は Fig 11 に示すことく F F の分解の 70% 以上はニトロ基を遊離して進むと述べ、ニトロ基が還元されアミノ基を経て分解する過程については、このような新しい極大吸収の出現などの点からも確認していない。本報ではリン酸緩衝液中での加熱分解物中に Rf が最も高く (Fig 3 のスポット 8, 9), 345m μ に極大吸収を持つ 2 つの黄色物質の生成を確認した。この物質が極大吸収波長よりみて BECKET の述べているニトロ基かアミノ基に変わったものとも考えられるか今後さらに追究する必要がある。また TLC で分離した多くのスポットかのような分解過程の物質であるか全く確認していないか、F F の主分解がニトロ基の遊離をへて進むことを考えると、Fig 11 に示す X₁ に相当するものからの分解生成物と考えられる。またトランスの F F が分解の第一段階としてシス型に転することと、多くの分離された分解物の吸収曲線を比較した場合、Fig 5 の 2 と 3, 1 と 4, 8 と 9 の類似性よりみて互いに幾何異性のような近縁な関係にあるものではないかと思われる。

要 約

- 1 F F を中性、アルカリ性溶液中で加熱分解し、TLC で 8 種の分解生成物を確認した。
- 2 食品中、水溶液中に添加された F F は加熱分解時に異性化しシス型を経て分解することが TLC でわかった。この物質は Rf 0.62, 極大吸収 300, 420m μ を示す。シス型以後の分解物として常に現れるものは Rf 0.16, 0.18 で 280, 415m μ 付近に極大吸収を持つ 2 種の黄色物質か

でシステインとともに加熱したときには、ニトロ基の一部は還元を受けずに、亜硝酸イオンの形で遊離する事実を報告しているかこのことは本研究における Table 1, 2 の結果からも裏書きされる。

また松田¹⁰⁾はニトロ基の遊離率はシステインによる分解され易さとは関係なく誘導体の種類によって異なることを報告している。ニトロ基かアミノ基に変化し分解が進むならば BECKET¹⁷⁾はアミノ基の生成により、530~380m μ に新しいピークが出現すると報告し

確認された。

3 食品中のFFの残存量として定量されているものは大部分かシス型である。

4 リン酸緩衝液 (pH 7.0以上) 中でのFFの加熱分解物中には、ニトロ基が還元されてアミノ基に変化したと思われる $345 \text{ m}\mu$ に極大吸収を持つ $R_f 0.8$ 以上の2種の黄色物質が生成されることを確認した。

本報告は昭和42年7月29日、日本水産学会九州支部第三回例会で発表した。

文 献

- 1) 西海枝, 田中: 菓誌, **83**, 147 (1963)
- 2) 小島, 松田: 日水誌, **31**, 214 (1965)
- 3) 石原, 保田, 長谷川: 日本水産学会昭和40年度秋季大会 (1965)
- 4) 石原, 保田: 昭和41年度日本農学大会水産部会 (1966)
- 5) 西海枝, 渡辺, 他: 第23回菓学大会 (1966年)
- 6) 松田, 小島, 稲嶺, 荒井: 日水誌, **31**, 146 (1965)
- 7) 荒井, 松田: 日水誌, **32**, 655 (1966)
- 8) 菅野, 詫摩: 食衛誌, **7**, 140 (1966)
- 9) 松田: 醸酵工誌, **43**, 936 (1965)
- 10) 松田: ニトロフラン誘導体の食品防腐剤としての研究, P 127,133,136 (1967)
- 11) 厚生省編, 食品衛生検査指針 (I), [I] IV 化学的検査法, P 13 (1959) 協同医書出版社
- 12) 菅野, 詫摩, 渡辺, 村井: 食衛誌, **8**, 253 (1967)
- 13) 松田: 醸酵工誌, **43**, 426 (1965)
- 14) 松田: 同上, **43**, 432 (1965)
- 15) 松田: 同上, **43**, 942 (1965)
- 16) AUSTIN, F L., : *Chem and Ind*, **4**, 523 (1957)
- 17) BECKET, A, ROKINSON A., : *J. Med Pharm. Chem.*, **1**, 135 (1959)