

食品防腐剤フリルフラマイドの
カラムクロマトグラフィーによる
シス体、トランス体の分離定量

石原 忠・高本 健一*・保田 正人

Separation and Determination of *Cis*- and *Trans*-Furylfuramide
as Food Preservatives by Silicagel Column Chromatography

Tadashi ISHIHARA, Kenichi KOMOTO and Masato YASUDA

A study was made on separation and determination of *cis*- and *trans*-furylfuramide which was extracted from kamaboko (fish cake).

The procedures and the results can be summarized as follows. *Cis*- and *trans*-furylfuramide were separated by silicagel column chromatographic procedure using WAKOGEL C-200, which was soaked in 5 volumes of 20% acetic acid for 48 hours, then washed with boiling water 6 or 7 times, and after repeating the same treatment activated for 24 hours at 150°C, or which was refluxed with 5 volumes of 20% acetic acid on the free flame for 6 hours, then washed and activated.

The silicagel was packed in column with n-hexan and the elution was carried out with ethyl ether. (Fig. 1) *Cis*- and *trans*-furylfuramide, separated through the column, were determined by ultraviolet spectroscopy at 380 m μ (*trans*-furylfuramide) and 390 m μ (*cis*-furylfuramide) in ethyl ether. Recovery rates of *cis*- and *trans*-furylfuramide during the column chromatography were 95~97%. (Tables 1, 2). The extract of kamaboko did not prevent the determination of *cis*- and *trans*-furylfuramide. (Fig. 2, Table 2)

フリルフラマイド (FF) の定量法には吸光度法^{1), 2)}, ポーラログラフィー法^{3), 4)}, ニトロ基の発色による方法⁵⁾ および Bioassay による方法⁶⁾ がある。このうち吸光度法は操作が簡便であるが、食品などに FF を添加した場合測定に使用する長波長側の吸収極大の位置の移動とその吸光係数に変化が起る^{3), 7)} ためほとんど行なわれていない。この原因を知るために著者らは先に FF の 2, 3 の条件下における分解機序をシリカゲルによる TLC 法によって追究した⁸⁾。その結果数種の分解生成物を確認したが、食品中では *trans*

* 長崎市西山町 長崎県立東高等学校

体として添加された FF がまず *cis* 体へ異性化し次段階の分解へ進むことを認めた。したがって FF は食品中でそのかなりの部分が *cis* 体に変化しており、吸収曲線、吸光係数の変化はこの異性化に起因することが判明した。

先にあげた定量法はこれら *trans* 体と *cis* 体をまとめて定量しており、両者の分別定量法は現在までなされていない。ポーラログラフィー法は高価な特殊な機器を必要とするし、Bioassay はかなりの習熟を要する。これらのことを考慮し、*cis* 体と *trans* 体の分離ができれば吸光度法の利用が可能になると考え、著者らはシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより両者の分離を試みた結果、所期の目的を達することができ、各々の吸光度を測定することにより FF の定量が可能となったので報告する。

実 験 方 法

1 試 薬

- (1) カラム用シリカゲル：WAKOGEL C-200
- (2) FF (*trans* 体)：純末，針状結晶（上野製薬製）
- (3) FF (*cis* 体)：菅野の方法⁹⁾により *trans*-FF 0.5 g をメタノール 200 ml に溶解し，M/15 リン酸ナトリウム溶液 130 ml を加え，数時間直射日光に照射後減圧濃縮し，放冷して析出する結晶を濾別する。この結晶をメタノール・水（4：1）から再結晶して *cis* 体を得るが，微量に *trans* 体を含む場合もあるのでこれをさらに前報⁸⁾の TLC 法で分離し，*cis* 体の部分を集めエチルエーテルにて溶出し，実験に供した。濃度の決定は 390 $m\mu$ の吸光度で前報⁸⁾の標準曲線より求めた。

2 操 作

- (1) 食品中からの FF の抽出：松田らの方法⁴⁾に準じ，煉製品（FF を添加した自作かまぼこ）10 g に対し 5%メタリン酸 20 ml を加え，ブレンダーにて2分間ホモゲナイズする。これを分液ロートに移し 60 ml のトルエン，酢酸ブチル混液（1：1）を加え 10 分間振とう機にて振る。次に 4000 rpm で 2，3 分間遠心分離し上澄液を取る。この液の一定量（通常 30 ml）をトルエンで調製した 1×8 cm のアルミナカラムに通し，試料液が流下後 20 ml のエチルエーテルを流して溶出物質を除去し，ついでメタノール 20 ml で FF を溶出させる。メタノールを減圧下で溜去後エチルエーテルに溶解してシリカゲルカラムクロマトグラフィー用の試料液とした。
- (2) *cis* 体，*trans* 体のカラムクロマトグラフィーによる分離：約 3.5 g の WAKOGEL C-200 を 20 ml 程度の *n*-ヘキサンと混合し気泡を除き冷却用外套管のついた下コック付のカラム管（0.8×40 cm）に流し入れ，13~14 cm に調製する。上部管壁についたシリカゲルはなるべく除去する。*n*-ヘキサンを固定相すれすれまで流出後，エチルエーテルに溶解した試料液 1~2 ml をのせ，エチルエーテルにて毎分約 1 ml の流速で展開する。流出液を 2 ml ずつ分取し，エタノール 2.5 ml を加え分光光度計（日立 EPU-2 型）にて 390 $m\mu$ で吸光度を測定する。さきに流出する *cis* 体の最大吸収波長はエチルエーテル中で 390 $m\mu$ ，あとに流出する *trans* 体は 380 $m\mu$ 近くである。冷却用外套管は室温が高い場合カラムにひびが入り易いのでこれをさけるためのものである。

操作 1，2 は光分解をさけるため暗い室内で行なった。

実 験 結 果

1 *cis* 体, *trans* 体の分離におよぼすシリカゲルの前処理の影響

シリカゲルの前処理により分離能に優劣が生じるので以下の4種の方法を試験し比較した。

(I) WAKOGEL C-200 を 150°C 中に 24時間保ち活性化し，減圧デンケーター中に 1時間放冷後使用する。

(II) シリカゲルを5倍量の 20%酢酸に 48時間浸漬する。この間時々攪拌する。吸引濾過後さらに2, 3倍量の 20%酢酸で2度洗い，ついで沸騰蒸溜水で pH 5.0~5.5 になるまで洗浄をくり返す。これをエタノールで2回，エチルエーテルで2回洗い，エーテル臭がなくなつてから前記(I)と同様に活性化して使用する。

(III) 前記(II)の処理を2回くり返す。ただし1回目の処理後の活性化は行なわずに2回目の処理をする。

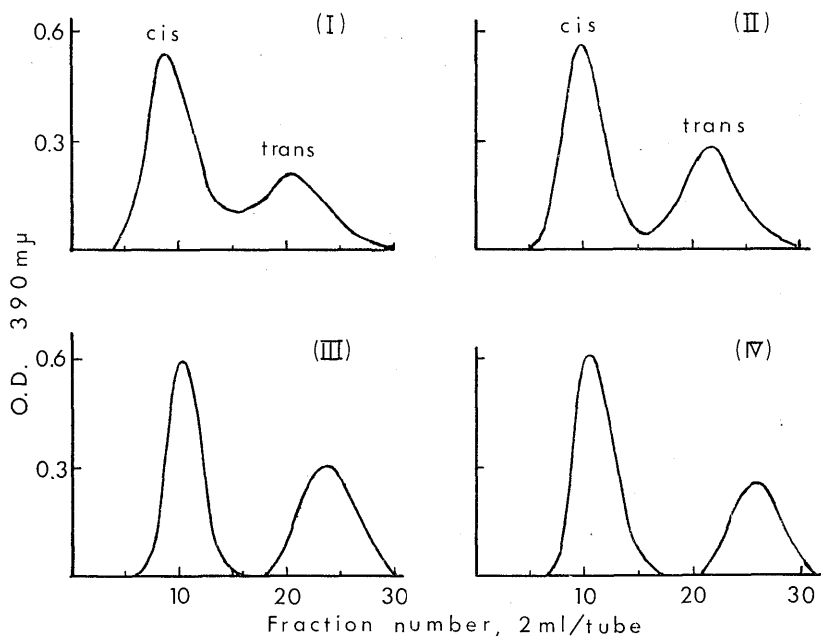


Fig. 1. Silicagel column chromatography of *cis*- and *trans*-furylfuramides.

Cis- and *trans*-furylfuramides were added either separately or in mixture to the silicagel column (0.8×13 cm) prepared with *n*-hexan.

Elution was carried out with ethyl ether at a flow rate of 2 ml/min.

(I): Silicagel (WAKOGEL C-200) was activated for 24 hrs. at 150°C

(II): Silicagel was soaked in 5 volumes of 20% acetic acid for 48 hrs. and then washed with boiling water 6 or 7 times.

Activation was carried out with the same method as described in (I)

(III): Silicagel was soaked twice with the same method as shown in (II) and then washed and activated

(IV): Silicagel was refluxed carefully with 5 volumes of 20% acetic acid on the free flame for 6 hrs. and then washed and activated

(Ⅳ) 5倍量の20%酢酸に浸漬し、これを還流冷却管に接続し直火で約6時間還流を続ける。この間一度酢酸溶液をとりかえる。突沸が著しいので沸騰石を充分入れておく必要がある。これを(Ⅱ)と同様な方法で洗浄し活性化する。

FFのcis体, trans体の適当濃度の混合液を作り、上記4処理法により調製したシリカゲルを用いてその分離能を試験した。溶出は初めにcis体がついでtrans体となる。溶出液量は、わずかのカラムの長さの差により異なってくるが、分離能には大差なく、その一例をFig. 1に示した。図中の(Ⅰ)~(Ⅳ)は前記(Ⅰ)~(Ⅳ)の処理方法によって調製したシリカゲルを用いて行なった結果である。その結果(Ⅰ)の処理方法ではcis体, trans体の分離は非常に不完全であり、(Ⅱ)の処理方法では処理法(Ⅰ)よりは分離状態はよくなっているがまだ両者が幾分重なっている。これにたいし(Ⅲ), (Ⅳ)の処理を行なったものは両者を完全に分離して溶出できることがわかった。したがって以下の実験ではWAKOGEL C-200を(Ⅲ)または(Ⅳ)の方法によって調製したものを用いた。

2 カラムクロマトグラフィーの回収率試験

cis体, trans体と両者を混合した3通りについてカラムクロマトグラフィーを行ない、その前後の吸光度をエチルエーテル中390 m μ で測定し、回収率を試験した。trans体は

Table 1. Recovery rates of furylfuramide (FF) during silicagel column chromatography.

Amount of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -FF added to column (μ g)	Recovery rate of FF (%)			
	<i>Cis</i> -FF	<i>Trans</i> -FF	Mixture	
			<i>Cis</i> -FF	<i>Trans</i> -FF
50	97.9	96.2	96.3	95.2
	98.6	98.8	98.2	94.4
	95.4	96.4	97.6	95.8
	98.1	97.9	96.7	96.8
	96.9	95.8	95.4	97.9
	(97.4 \pm 1.3)	(97.0 \pm 1.3)	(96.8 \pm 1.1)	(96.0 \pm 1.4)
100	98.5	97.7	98.9	94.5
	97.3	95.2	96.8	95.3
	96.1	98.1	97.4	95.1
	98.4	95.2	96.0	97.1
	98.2	98.0	95.4	97.8
	(97.7 \pm 1.0)	(96.8 \pm 1.5)	(96.9 \pm 1.4)	(96.0 \pm 1.4)
200	97.8	97.5	98.7	94.7
	97.2	98.4	96.2	97.7
	99.0	98.1	96.8	95.2
	97.6	97.3	98.0	96.4
	95.7	95.8	97.2	98.2
	(97.5 \pm 1.2)	(97.4 \pm 1.0)	(97.4 \pm 1.0)	(96.4 \pm 1.5)

Silicagel was prepared with the same method as shown Fig. 1 (Ⅲ), (Ⅳ)
1 or 2 ml of 50, 100, 200 ppm FF ethyl ether solution was added to column
(): Average and standard deviation

50, 100, 200 ppm の3段階の試料液を作り，その1 ml または 2 ml をカラムにのせた。*cis* 体は前報⁸⁾の標準曲線より求め前記3段階の濃さに分けて行なった。*cis* 体，*trans* 体の混合は同濃度の等量混合液を用いた。溶出位置は各回毎に幾分異なるので，呈色状態で両者の分離溶出状態を判断し，*cis* 体，*trans* 体に分取した。各5回の結果はTable 1 に示すごとく，50~200 μg の間ではカラムに添加した試料量の差による回収率の差はほとんどなく，また *cis* 体，*trans* 体ともに96~97%の回収率を示しその偏差も小さく満足のできる結果であった。

3 煉製品抽出液の分離におよぼす影響

ソーセイジ，かまぼこなどの煉製品からFFを抽出し，カラムクロマトグラフィーにかける場合，その分離におよぼす抽出液中の夾雑物の影響が考えられるのでこの点について検討した。マジ肉を摺りつぶしFF無添加のかまぼこを自作した。この60 gを用い前述のFFの抽出法に準じトルエン，酢酸ブチル混液で抽出しこの全量を3回に分けてアルミナカラムにかけメタノール溶出液を採った。これを減圧濃縮し，所定の濃度に調製した*cis* 体，*trans* 体のエチルエーテル溶液6 mlを添加し，濃縮乾固物を溶解しこの2 mlをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけて，溶出状態および回収率を試験した。Table 2 に回収率を示したが，*cis* 体，*trans* 体単独の場合は50~200 μg の各濃度とも96~97%の回収率が得られ，またそのばらつきも小さく，前実験結果(Table 1)と比較し差はなく夾雑物の影響はほとんど見られなかった。*cis* 体と*trans* 体の混合物の場合は*cis* 体の回収率はほとんど変らないが，*trans* 体の回収率が各濃度ともわずかに低くなった。しかし大きな影響は見られなかった。この場合の溶出状態の一例をFig. 2 に示したが*cis* 体，*trans* 体ともに溶出が少し遅くなったのみで，両者の分離および溶出液量には大差はなかった。またFF無添加の自作かまぼこの抽出液を同様の方法でカラムにかけ390 m μ の吸光を測定したが何らの影響も見られなかった。

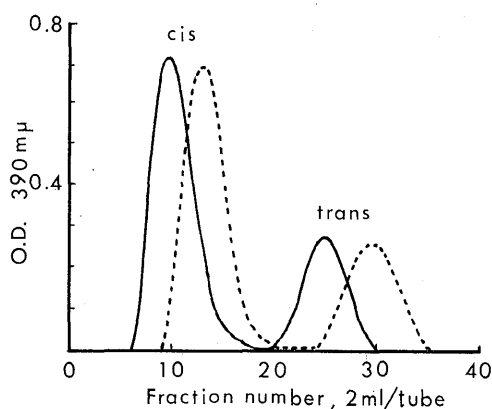


Fig. 2. Silicagel column chromatography of *cis*- and *trans*-furylfuramides.

Silicagel was prepared with the same method as shown in Fig. 1 (III), (IV).

Elution was the same as in Fig. 1.

— : Control

..... : Extract of kamaboko (fish cake) contained

Table 2. Recovery rates of furylfuramide (FF), added with extract of kamaboko, during silicagel column chromatography.

Amount of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -FF added to column (μ g)	Recovery rate of FF (%)			
	<i>Cis</i> -FF	<i>Trans</i> -FF	Mixture	
			<i>Cis</i> -FF	<i>Trans</i> -FF
50	98.5	96.4	96.2	94.7
	95.7	97.2	94.2	93.2
	96.2	98.1	95.8	96.4
	(96.8 \pm 1.5)	(97.2 \pm 0.9)	(95.4 \pm 1.1)	(94.8 \pm 1.6)
100	98.2	98.6	97.0	94.9
	96.0	95.9	95.4	96.3
	97.3	95.3	96.8	94.0
	(97.2 \pm 1.1)	(96.4 \pm 1.8)	(96.4 \pm 0.9)	(95.1 \pm 1.2)
200	97.1	97.0	97.4	94.2
	95.4	94.2	98.2	98.4
	98.7	96.8	96.3	95.0
	(97.1 \pm 1.7)	(96.0 \pm 1.6)	(97.3 \pm 1.0)	(95.9 \pm 2.2)

Silicagel was prepared with the same method as shown Fig. 1 (III), (IV)

1 or 2 ml of 50, 100, 200 ppm FF ethyl ether solution containing extract of kamaboko was added to column. Extract of kamaboko was obtained by the method of MATSUDA⁴⁾
(): Average and standard deviation

Table 3. Quantity of furylfuramide (FF) remaining in the same extract from kamaboko (fish cake) determined by silicagel column chromatographic procedure.

	<i>Cis</i> -FF (ppm)	<i>Trans</i> -FF (ppm)	Total FF (ppm)
Amount of FF	8.2	6.1	14.3
	7.6	6.2	13.8
	8.0	6.0	14.0
	7.7	5.7	13.4
	7.9	5.6	13.5
Average and standard deviation	7.8 \pm 0.2	5.9 \pm 0.3	13.8 \pm 0.4

Kamaboko: The fish meat containing FF (*trans*-FF) 100 ppm. was boiled for 30 min. at 90°C, and then exposed to room temperature (13~18°C) for about 30 days. Extract of kamaboko was obtained by the method of MATSUDA⁴⁾

4 煉製品から抽出した FF の *cis* 体, *trans* 体の分離

アジ肉を搗りつぶし、澱粉で 50倍散した FF を使用して、FF 100 ppm 含有のすり身を 90°C, 30分間の熱処理をしてかまぼこを自作した。実験には製造後約 1ヶ月間室温 (13~18°C) に放置しておいたものを用いた。この 60 g からトルエン・酢酸ブチル混液で抽

出し、その 30 ml をアルミナカラムに通し、メタノール溶出液を減圧濃縮後 3 ml のエチルエーテルに溶解し、この 2 ml をシリカゲルカラムによって *cis*体、*trans* 体の分離定量を試みた。なお定量にあたってカラムからの溶出液を両者共 15 ml に定容として吸光度を測定した。5回の実験結果は Table 3 に示すごとく比較的良好一致した。また分離状態は図示しなかったが、実験3の結果と比較し大差なくよく分離した。

考 察

食品中に残存しているフリルフラマイド (FF) は添加時の *trans* 体から一部が *cis* 体に変化しており、*cis* 体、*trans* 体の吸光係数および吸収極大波長がことなるため FF の吸光度法による定量法は使用できなかった。

著者らは先にシリカゲル薄層クロマトグラフィーでこの *cis* 体と *trans* 体をよく分離できることを知った⁸⁾。これを応用し本実験では WAKOGEL C-200 を用いたカラムクロマトグラフィーを行ない両者を完全に分離し、各々の吸光度より FF が定量できることをみいだした。

本法に使用する装置は簡単なものであるが問題点としては食品中の含有量が低濃度の場合、多量の抽出液が必要となる。そのためアルミナカラムでの処理量が多くなり、それに伴う回収率低下の恐れも考えられるので、抽出法および前処理に関してはさらに検討が必要と考える。また FF は有機溶媒中では光に対し非常に不安定であり¹⁰⁾、本実験のようにたえず有機溶剤にて実験を進める方法では実験室内の遮光をなるべく完全にすることが望ましい。

要 約

フリルフラマイドの *cis* 体と *trans* 体のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離定量法について検討し次の結果を得た。

1. 分離用シリカゲルは WAKOGEL C-200 を前処理として5倍量の20%酢酸で2日間の浸漬処理を2回行なうかまたは同量、同濃度の酢酸にて6時間還流する必要がある。
2. 上記のシリカゲルを 150°C で 24時間活性化し、*n*-ヘキサンでカラム (0.8×13 cm) を調製しエチルエーテルにて毎分 1 ml の流速でクロマトグラフィーを行なえば両者を完全に分離できその回収率も高かった。
3. 煉製品の抽出液中の夾雑物はカラムクロマトグラフィーの溶出位置を少し遅くさせるが分離および回収率にはほとんど影響を与えなかった。

文 献

- 1) 菅野三郎，屋宮妙子：食衛誌，4，205 (1963)
- 2) 竹下隆三，他：食衛誌，8，127 (1967)
- 3) 松田敏生，小島 渥，稲嶺成男，荒井伸一郎：日水誌，31，146 (1965)
- 4) 荒井伸一郎，松田敏生：日水誌，32，655 (1966)
- 5) 菅野三郎，詫摩真澄，渡辺重信，村井絢子：食衛誌，7，140 (1966)

- 6) 松田敏生, 小島 渥: 日水誌, 31, 208 (1965)
- 7) 小島 渥, 松田敏生: 日水誌, 31, 214 (1965)
- 8) 石原 忠, 保田正人: 本誌, 25, 79 (1968)
- 9) 菅野三郎, 詫摩真澄, 渡辺重信, 村井絢子: 食衛誌, 8, 253 (1967)
- 10) 石原 忠, 保田正人: 昭和41年4月日本水産学会講演 (1966)