

高速液体クロマトグラフィーによる食品中の多環芳香族炭化水素の分析

館野 つや子

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods by High-Performance Liquid Chromatography

Tsuyako TATENO

(Received September 25, 1991)

1 緒 言

食品中の多環芳香族炭化水素(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons以下PAHと略す)の定量に、今までは蛍光々度計を用いてきたが、近年、試料溶液が微量で定量できる高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography 以下HPLCと略す)を用いることが一般的になってきた。

食品中のBenzo(a)pyrene(以下B(a)Pと略す)及びPAHのHPLC測定はC. Hischenhuberら¹⁾、辻ら²⁾、玉川ら³⁾及び衛生試験法注解⁴⁾等数多く行なわれている。

従来からの食品中のB(a)Pを始めとする館野ら^{5)~11)}のPAHの分析方法は、試料をソックスレー抽出→液々抽出→カラムクロマトグラフィー(シリカゲル→1%含水アルミナカラム→7%含水アルミナカラム)により分離後蛍光々度計による蛍光測定法であって一試料の分析時間に3~4日間必要である。そこで、まず同一試験溶液について、従来法(蛍光々度計法)とHPLC法との比較実験を行い、ついでHPLC法を用いることによる分析時間の短縮を目的とし、上記3種類のカラムクロマトグラフィーの分離操作をどの程度省略できるものか、検討を行なった。その結果を報告する。

2 分析 方 法

試 料

試料のサツマイモ、タマネギ及びナスは、平成2年10月都内で購入した市販品を用いた。

試 薬

食品衛生学第1研究室

○アセトニトリル：高速液体クロマト用

○水：高速液体クロマト用

上記以外の試薬は前報¹⁰⁾に準じて行なった。

装置・器具

○HPLC：日立L-6000型

○検出器：日立F-1050型(蛍光々度計)

○カラム：Lichrosorb R P-18(5 μ l)

ドイツMERK社製(250mm \times 4.0mm)

上記以外の装置・器具は前報¹⁰⁾に準じて行なった。

実験操作

① 試料溶液の調整

試料のサツマイモ、タマネギ及びナスは、皮、へた等を取り除き可食部をそれぞれ200g取り、細切したもの、また、サツマイモは輪切りにし、フライパン焼きにしたものを、乾燥器中(60~70 $^{\circ}$ C)で5~6時間乾燥し分析用試料とした。以下ソックスレー抽出、液々抽出及びカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、7%含水アルミナ及び1%含水アルミナ)は前報¹⁰⁾に準じて行なった。

○従来の蛍光々度計法とHPLC法との比較のための試験溶液

試料にサツマイモ(フライパン焼)を用い、シリカゲル、7%含水アルミナ及び1%含水アルミナを行なう3段階のカラムクロマトグラフィーを従来の操作^{5)~11)}によって行ない、0~50ml、50~100ml……と50mlづつ13フラクションに分取したそれぞれの濃縮液をn-ヘキサンで4mlとし、蛍光々度計法によるPAH測定用溶液とし、測定後この溶液を完全に濃縮し、それぞれアセトニトリル：水(9：1, V/V)で1mlとし、HPLCによるPAH測定用溶液とした。測定後各フラクションを一つにまとめ濃縮し、アセトニトリル：水(9：1, V

／V)で1mlとし、HPLCによるPAH測定溶液とした。

○シリカゲル及びアルミナカラムクロマトグラフィー処理の比較のための試験溶液

試料にサツマイモ(生)、タマネギ(生)及びナス(生)を用い、シリカゲル、7%含水アルミナ及び1%含水アルミナの3段階のカラムクロマトグラフィーでのHPLC測定値を比較するため次のように試料溶液を分取した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ない濃縮液をn-ヘキサンで9mlとし、その3mlをHPLC用とし、残り6mlについて前報¹⁰⁾に準じて7%含水アルミナカラムクロマトグラフィーを行い濃縮液を6mlとし、その3mlをHPLC用とする。さらに残り3mlについて前報¹⁰⁾に準じて1%含水アルミナカラムクロマトグラフィーを行ない、0~50ml、50~100ml……と50mlづつ分取した13フラクションをそれぞれ濃縮し、濃縮液をHPLC測定用溶液とする。

各3段階のカラムクロマトグラフィーの完全に濃縮したHPLC用溶出液にマイクロペットを用いてアセトニトリル：水(9：1，V/V)で1mlにし、HPLC測定用溶液とした。

② HPLCによる分離及び定量

充填剤：Lichrosorb RP-18，移動相：アセトニトリル：水(9：1，V/V)超音波発生装置内に約10分間放置後使用した。流量：1.0ml/min。

表1に示す通り、それぞれの測定時のPAH励起波長及び蛍光波長でまず標準PAHの保持時間を調べ、さらに蛍光強度を測定した。

次に試料中のPAHの保持時間を同様にそれぞれのPAHの励起波長及び蛍光波長で調べ、標準のPAHと比較し、同じ保持時間に検出したものについて蛍光強度を測定した。

PAHの定量は、HPLCに付属の日立P-2500型クロマトデータ処理装置を用い、ピーク面積法(n法)^{12) 13)}により行なった。

表1. 液体クロマトグラフィーに於ける標準Polycyclic Aromatic HydrocarbonsのRetention Timeと測定蛍光波長

PAH	Retention Time (min)	Excitation (nm)	Fluorescence (nm)
Pyrene	5.84	319	392
Benzo(a)anthracene	6.72	287	386
Fluoranthene	5.07	286	443
1,12-Benzoperylene	14.55	382	418
Benzo(a)pyrene	10.31	384	405
Anthracene	4.94	376	400
Dibenz(a,h)anthracene	11.58	297	395
Phenanthrene	4.77	291	345
Benzo(e)pyrene	9.67	330	388
Fluorene	4.36	278	302
2,3-Benzofluorene	6.20	315	340
1-Methylphenanthrene	5.67	256	368
Perylene	9.80	407	438
Dibenz(a,c)anthracene	10.28	285	376
9,10-Dimethylbenzo(a)anthracene	9.18	296	409
9-Methylanthracene	5.68	347	389
5,12-Dihydronaphthacene	5.38	231	327
Benzo(k)fluoranthene	9.12	306	409
Acenaphthene	4.55	306	321

- ・カラム：Lichrosorb RP-18 (25mm × 4.0 mm)
- ・溶媒：アセトニトリル：水 (9：1，V/V)
- ・流速：1.0 ml/min.

3. 結果及び考察

1) 標準PAH溶液についてのHPLC測定

表1には、それぞれ19種類の標準PAHの保持時間とその励起及び蛍光のピークを示した。

表1に示す通り、19種類の標準PAHは全部保持時間が異なっている。

しかし、保持時間が近すぎ、測定に影響する可能性も考えられるので、今後の検討が必要と思われる。

2) 注入容量と定量性

HPLCにB(a)P標準液 (20 μl /ml)アセトニトリル:水 (9:1, V/V) 溶液を注入した場合の注入量 (7~50 μl) とピーク面積との間に直線性が得られた (図1)。

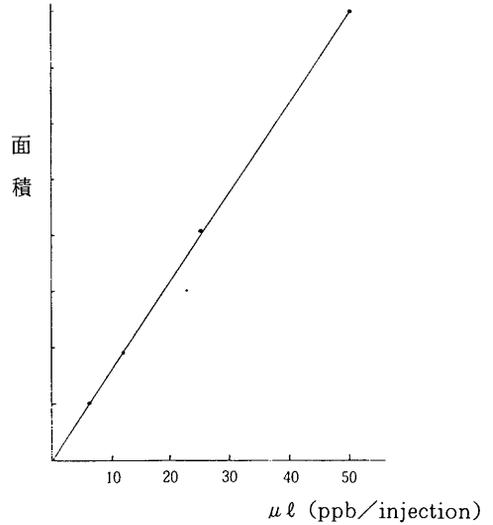


図1. Benzo(a)pyrene の注入容量と定量

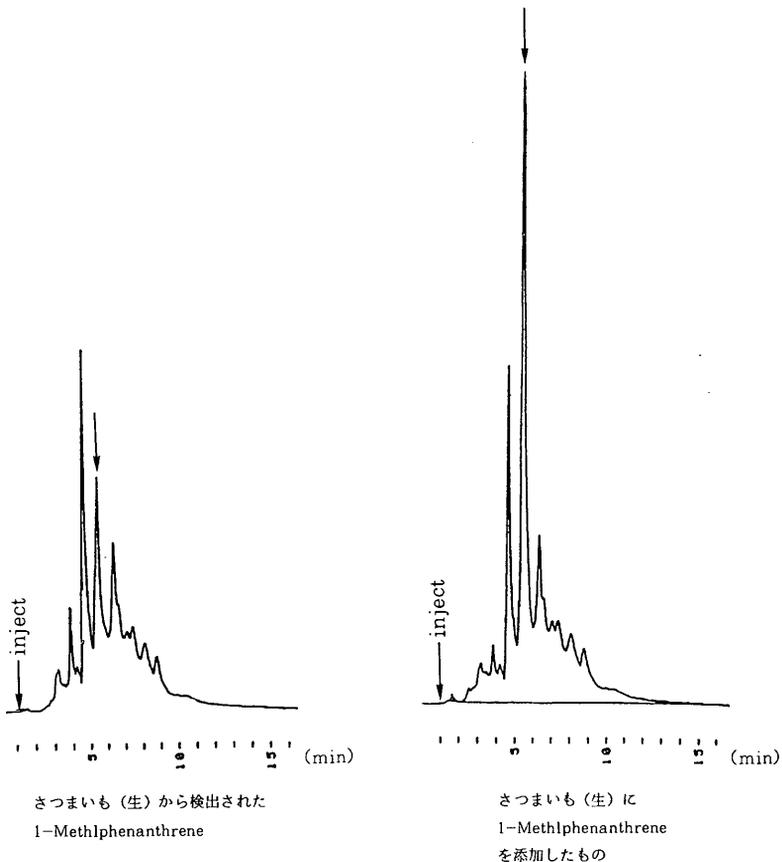


図2. さつまいも(生)における1-Methylphenanthreneの無添加及び添加の High Performance Liquid Chromatography

また、図2に、サツマイモ(生)から検出された、1-Methylphenanthreneと、これに標準1-Methylphenanthreneを添加した際のHPLCによる検出状況を示した。

3) 従来用いた蛍光光度計測定法^{5)~11)}とHPLC測定法との比較

表2は、サツマイモ(フライパン焼)¹⁴⁾を試料とし、得られた同一の0~50ml, 50~100ml……と50mlづつの各フラクションについての蛍光光度計の測定値とHPLC測定値及び各フラクション全部を混合したHPLC測定値の3種の測定結果を示した。

検出されたPAHの値はAcenaphthene以外はほぼ一致した結果が得られた。

すなわち、従来の蛍光光度計による測定値とHPLCによる測定値には、ほとんど差がないといえよう。

4) HPLCにおける3種のカラムクロマトによるク

リンアップ状況

図3は、タマネギのシリカゲルカラムクロマトグラフィー、7%含水アルミナカラムクロマトグラフィー及び1%含水アルミナカラムクロマトグラフィーの3段階におけるHPLCによる5, 12-Dihydronaphthaceneの蛍光ピークを例として示した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーのみで測定したものは、ピークも高く、不純物の影響が見られる。さらに7%含水アルミナカラムクロマトグラフィーを加えてHPLC測定を行なったものは、ピークも小さく、5, 12-Dihydronaphthacene 前後の他の蛍光物質の影響が少なくなってきている。さらに3番めの1%含水アルミナカラムクロマトグラフィーを加えてHPLC測定を行なったものは、5, 12-Dihydronaphthaceneのピークはより一層はっきりしている。

このように、カラムクロマトグラフィー3種によるク

表2. サツマイモ(フライパン焼)の蛍光光度計及びHigh Performance Liquid Chromatography測定によるPolycyclic Aromatic Hydrocarbons 定量値の比較

P A H	蛍 光 光 度 計		
	1%含水アルミナカラムクロマトグラフィー各フラクション別 (ppb)	1%含水アルミナカラムクロマトグラフィー各フラクション別 (ppb)	1%含水アルミナカラムクロマトグラフィー各フラクションをまとめた物 (ppb)
Pyrene	ND *	ND	ND
Benzo(a)anthracene	0.03	0.02	0.02
Fluoranthene	0.32	0.30	0.36
1,12-Benzoperylene	ND	ND	ND
Benzo(a)pyrene	0.03	0.01	0.01
Anthracene	ND	ND	ND
Dibenz(a,h)anthracene	ND	ND	ND
Phenanthrene	ND	ND	ND
Benzo(e)pyrene	0.27	0.22	0.22
Fluorene	ND	ND	ND
2,3-Benzofluorene	0.07	0.10	0.04
1-Methylphenanthrene	ND	ND	ND
Perylene	0.01	ND	0.02
Dibenz(a,c)anthracene	ND	ND	ND
9,10-Dimethylbenzo(a)anthracene	ND	ND	ND
9-Methylanthracene	ND	ND	ND
5,12-Dihydronaphthacene	ND	ND	ND
Benzo(k)fluoranthene	0.07	0.06	0.05
Acenaphthene	1.58	0.04	0.94
P A H 総 量	2.60	0.75	1.66

* ND : Not detected < 0.01 ppb

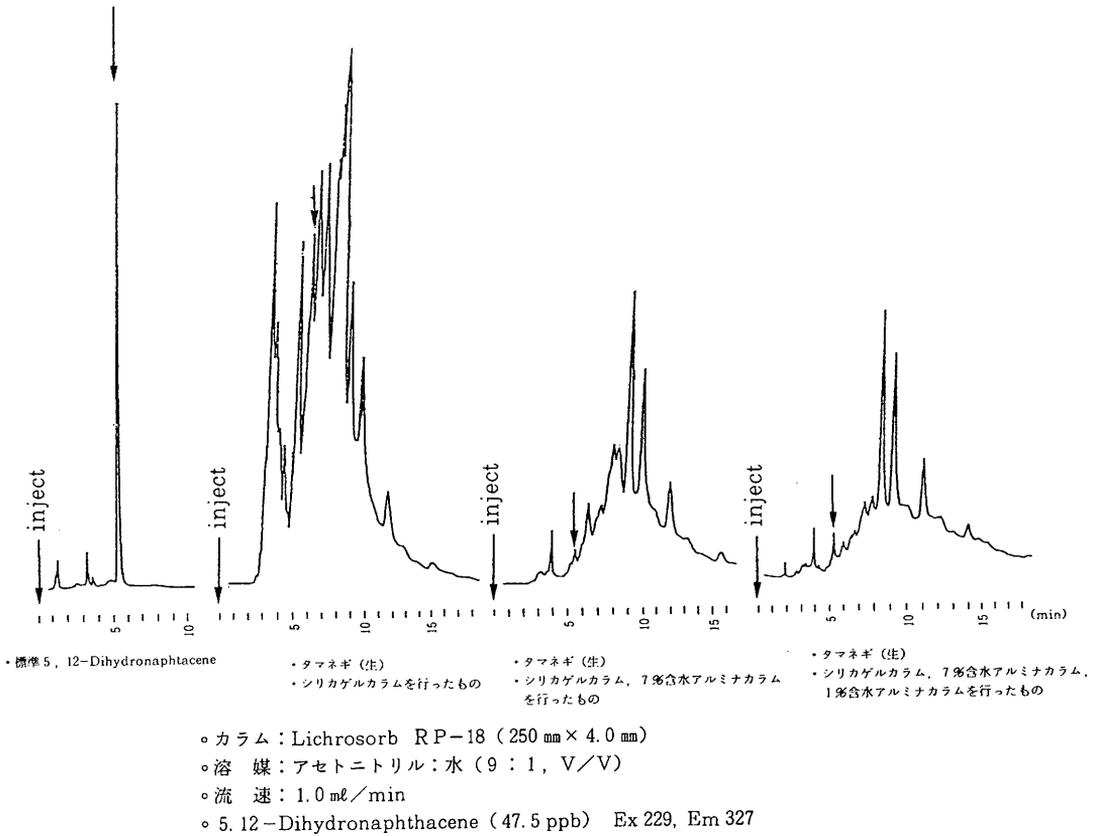


図3. タマネギ(生)における5, 12-Dihydronaphthaceneの3種類のカラムクロマトグラフィーによるClean-up

リンアップを比較すると、図3に示す通り顕著であった。

5) 表3は、従来のPAH分析に用いた3種のカラムクロマトのクリーンアップ法によるHPLC測定値の比較である。

試料には、サツマイモ、タマネギ及びナスを用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー、7%含水アルミナカラムクロマトグラフィー及び1%含水アルミナカラムクロマトグラフィーそれぞれの段階におけるHPLCの測定結果である。

クリーンアップがシリカゲルカラムクロマトグラフィーのみの場合、Phenanthrene, Fluorene, 1-Methylphenanthrene及び5, 12-Dihydronaphthaceneの4種類

は図2に示した通り、精製不十分のために測定値が高い。測定値を最終カラムの1%含水アルミナカラムクロマトグラフィー測定値と比較すると、約27~1400倍と極端に高くなっている。このことは、それぞれのPAH個有の蛍光ピークだけでなく、保持時間が非常に近い蛍光物質をもだきこんでしまったものと思われる。

また、7%含水アルミナカラムクロマトグラフィーと1%含水アルミナカラムクロマトグラフィーの測定値を比較すると、タマネギのPyrene, Fluoranthene及びPhenanthrene以外は、ほとんど両者とも差異が見られなかった。

以上のことから、HPLC測定では、食品の種類によ

表3. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons のカラムクロマトグラフィー各段階に於ける High Performance Liquid Chromatography 測定の比較

P A H	サツマイモ (生)			タマネギ (生)			ナス (生)		
	※ 1 (ppb)	※ 2 (ppb)	※ 3 (ppb)	※ 1 (ppb)	※ 2 (ppb)	※ 3 (ppb)	※ 1 (ppb)	※ 2 (ppb)	※ 3 (ppb)
Pyrene	0.24	0.11	0.14	0.77	1.52	0.18	1.16	0.21	0.23
Benzo(a)anthracene	0.08	0.03	0.01	0.03	0.04	0.01	0.10	Trace	0.01
Fluoranthene	1.47	0.32	0.30	1.87	2.68	0.68	0.91	0.60	0.51
1,12- Benzoperylene	0.02	0.01	ND *4	0.03	0.02	0.01	0.02	0.01	ND
Benzo(a)pyrene	0.01	0.01	ND	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03	0.01
Anthracene	20.71	0.03	Trace	0.05	0.01	0.01	8.89	0.05	Trace
Dibenz(a,h)anthracene	Trace*5	Trace	Trace	Trace	0.01	Trace	Trace	Trace	Trace
Phenanthrene	56.49	0.02	0.04	2.44	0.38	0.07	1.94	0.05	0.03
Benzo(e)pyrene	0.09	0.10	0.07	0.15	0.16	0.11	3.30	0.12	0.12
Fluorene	27.91	ND	ND	6.23	0.05	Trace	6.45	ND	Trace
2,3-Benzofluorene	1.04	0.10	0.02	0.08	0.07	0.05	0.01	0.02	0.04
1-Methylphenanthrene	4.37	0.25	0.16	6.08	0.72	0.65	2.01	0.36	0.21
Perylene	Trace	Trace	Trace	0.02	0.02	0.01	Trace	Trace	Trace
Dibenz(a,c)anthracene	0.04	0.02	Trace	0.04	0.03	Trace	0.02	0.03	0.02
9-10-Dimethyl benzo(a)anthracene	0.10	0.04	Trace	0.07	0.11	0.01	0.03	0.05	0.01
9-Methylanthracene	1.04	0.02	Trace	0.15	0.02	0.01	0.52	0.01	Trace
5,12-Dihydronaphthacene	5.72	0.03	0.02	0.88	0.03	0.05	1.17	0.06	0.04
Benzo(k)fluoranthene	0.03	0.01	Trace	0.03	0.03	Trace	0.04	0.03	Trace
Acenaphthene	39.45	0.03	0.01	0.16	0.23	0.01	0.40	0.08	0.01
P A H 総量	158.83	1.13	0.77	19.14	6.18	1.90	27.01	1.71	1.24

※ 1. シリカゲルカラムクロマトグラフィー

※ 2. シリカゲルカラムクロマトグラフィー、7%含水アルミナカラムクロマトグラフィー

※ 3. シリカゲルカラムクロマトグラフィー、7%含水アルミナカラムクロマトグラフィー、1%含水アルミナカラムクロマトグラフィー

※ 4. ND: Not detected

※ 5. Trace: <0.01 ppb

っては測定値に多少の違いは見られるが、1%含水アルミナカラムクロマトグラフィーは、実用上省略できることがわかった。

すなわち、これによって分析時間は6時間前後短縮される結果となる。

ま と め

① 館野ら^{5)~11)}の従来からの野菜類を試料とした

P A H分析方法を用いて野菜類のH P L C測定を行なう場合、1%含水アルミナカラムクロマトグラフィーを行なう必要のないことを認めた。その結果、分析時間がH P L C測定の方が6時間前後短縮できることがわかった。

② H P L Cを行なう際、保持時間が測定時に多少異なるP A Hがある。そのため、測定時に常に標準P A Hを測定し、保持時間を確認する必要があった。

文 献

- 1) C. Hischenhuber, T. Stijve : Deutsche Lebensmittel - Rundschau 83, 1. (1987)
- 2) 辻功, 小出圭子, 森山秀樹, 田辺潔, 松下秀鶴 : 食衛誌, 26, 50(1985)
- 3) 玉川勝美, 加藤由美, 大金由夫, 三島靖子, 関敏彦, 角田行 : 衛生化学, 32, 6, (1986)
- 4) 日本薬学会 : 衛生試験法・注解, 金原出版 (東京), 1990, P 106 ~ 108
- 5) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍 : 食衛誌, 14, 173 (1973)
- 6) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍 : 食衛誌., 15, 18 (1974)
- 7) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍 : 食衛誌., 16, 178 (1975)
- 8) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍 : 食衛誌., 16, 187 (1975)
- 9) 白石慶子, 白鳥つや子 : 食衛誌., 18, 426 (1977)
- 10) 館野つや子 : 東京家政大紀要., 26, 85 (1986)
- 11) 館野つや子 : 東京家政大紀要., 28, 103 (1988)
- 12) 日立製作所 : INSTRUCTION MANUAL, D - 2500 型クロマトデータ処理装置 I, 取扱説明書, 日立製作所 (東京), 1988, P 3 - 14 ~ 3 - 17
- 13) 日立製作所 : INSTRUCTION MANUAL, D - 2500 型クロマトデータ処理装置 II 取扱説明書, 日立製作所 (東京), P 4 の12
- 14) 館野つや子, 南雲葉子, 末永泉二 : 食衛誌., 31, 271 (1990)