

食品中の3,4-ベンツピレンの分離, 定量法 に関する検討

食品からの抽出条件について

白鳥つや子 白石 慶子

Studies on the extraction method of 3,4-benzopyrene in foods

Tsuyako SHIROTORI and Yoshiko SHIRAIISHI

The usual analytical procedure for the determination of 3,4-Benzopyrene involves saponification of material to be analyzed. In order to simplify the extraction procedure and to avoid losses of 3,4-Benzopyrene from emulsions formed after the saponification step in the usual method, direct extraction method by dimethyl sulfoxide without saponification (A) was studied.

The direct extraction procedure has been described. The recoveries of 3,4-Benzopyrene added to 100 g of foods at a level of 0.04 ppm by the method (A), were compared with those of n-hexane soxhlet extraction method without saponification (B) and of modified method of (B) including saponification (C).

The highest recoveries were obtained by method (B), while Method (C) was the lowest.

(1) ま え が き

一般に食品から3,4-ベンツピレンを抽出するにあたっては、まず食品中の油脂成分との分離が問題となる。公定法として記載されているA. O. A. C¹⁾の方法は、試料中の油脂分をアルコール性アルカリによって加水分解を行なったのち、加水分解されないfractionを有機溶媒で抽出したのち溶剤分配クロマトグラムとカラムクロマトグラムによりclean-upし、紫外吸光度で定量を行なっている。またC. Genest²⁾らは上記の加水分解操作を行わず、油脂分をほとんど溶解せず、しかも多核芳香族炭化水素のすぐれた抽出剤であるジメチルスルホキシド(D. M. S. O)を用いて抽出し、薄層クロマトグラムにより紫外線灯(360 m μ)下の蛍光から検出する方法をとっている。

白石らはさきに煩雑なA. O. A. C法を簡易化し、加水分解操作を行わず、D. M. S. Oを用いて抽出しカラムクロマトグラムによりclean-upしたのち、紫外吸収および蛍光度測定を行なう方法を報告した。著者らは今回、白石らの方法をさらに簡易化するため食品の有機溶媒ソクスレー抽出を省略し、直接D. M. S. Oで抽出する方法を検討し、またA. O. A. C法のごとくアルコール性アルカリによる加水分解操作を加える方法をあわせて行ない、食品中からの3,4-ベンツピレンの抽出条件としてどの方法が一番すぐれているかについて、回収率を求めて検討したのでその結果について報告する。

(2) 実 験 の 部

(2) — A 試料, 試薬および器具:

試料：

サラミソーセージ，くん製いか（市販品）

試薬：

① n-ヘキサン：特級市販品を濃硫酸，水，10%水酸化ナトリウムおよび水を用いて順次洗滌し，乾燥したのち蒸留した。

② エーテル：特級市販品を10%水酸化ナトリウム，2%過マンガン酸カリウム液および水を用いて順次洗滌し，乾燥したのち蒸留した。

③ ジメチルスルホキシド (D. M. S. O) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ：市販品を減圧蒸留し，D. M. S. Oの沸点留分を使用した。

④ 3,4-ベンツピレン：(L. Light & Co, Ltd Colnbrook England) ベンゼン，メタノールを用いて再結晶を行なった。mp. 176-177.5°C

⑤ ズダンイエロー：The British Drug Houses Ltd. クロマトグラフィー標準用

⑥ カラムクロマト用アルミナ：E. Merck の Aluminiumoxid standardisiert を電気炉中に約500°で1~2時間乾燥した。デシケーター中で放冷したのち，乾燥アルミナに対し1%の水を加え，共栓びんに入れよく振りまぜ1~2時間放置した。このように処理したアルミナ1gを内径4mmのガラス管につめた。0.4%ズダンイエローのn-ヘキサン溶液1mlをカラムにのせて流し，色素液がカラムの上端まで浸透し終ったところで，ベンゼン：n-ヘキサン（1：3）の液を注加する。この液約7.0~8.0mlを流し終ったとき，ズダンイエローの溶出 Bandの先端がカラムの最下端にあれば1%含水アルミナとして使用した。

器具：

ソックスレー大型抽出器，Waring Blendor

DU ベックマン分光光度計，クボタ遠心沈澱機

207型日立蛍光分光計，KM式万能シェーカー（イワキK. K.）

(2)-B 実験方法

Fig. 1. Determination Procedure of 3,4-Benzopyrene in Smoked Food

(1) 抽出

試料（くん製食品）100g 細切
 | — +Na₂SO₄(50g)
 | — ソックスレー抽出器で4~5時間，
 | n-ヘキサン抽出
 | n-ヘキサン抽出物
 | — 溶媒を減圧下で除く
 | 残留油脂
 | — +n-ヘキサン（10ml）
 | — D. M. S. Oで抽出（50ml×3）
 | — 遠心分離
 | D. M. S. O抽出物（150ml）
 | — +H₂O（150ml）
 | — n-ヘキサンで抽出（50ml×3）
 | — 遠心分離
 | n-ヘキサン抽出物
 | — +Na₂SO₄

| — 溶媒を減圧で除く
 | 残留油脂
 | — +n-ヘキサン・エーテル（1：1）2ml
 | (2) カラムクロマトグラフィー
 | — アルミナカラム（1%含水アルミナ）
 | 1.1×25cm 展開溶媒にn-ヘキサン・エー
 | テル（1：1）使用
 | — 展開溶媒を減圧下で除く
 | — +n-ヘキサン→4ml
 | 最終抽出物
 | (3) 分析定量（base-line technique）
 | — 紫外部吸収スペクトル法（375，385，
 | 395mμ）
 | — 蛍光スペクトル法（425，430，435mμ）

従来の白石らの方法の術式は Fig. 1 に示す通りであるが，(1)抽出の操作法から n-ヘキサンによるソクスレー抽出を省略して以下のようにして行なった。すなわちくん製食品 100 g をとり，Waring Blendor にかけて細切し，これに無水硫酸ナトリウム約 50g を加えて均一にする。これを 500 ml の共栓三角フラスコに入れ，D. M. S. O 150 ml を加えたのち 3 時間振とう機にかける。次に内容を大型ポリエチレン製遠心管に入れ，高速遠心機に 30 分間かける (7000 RPM)。D. M. S. O 層を分液ロートにとり，残りの試料は再び少量の D. M. S. O を加えてかきまぜたのち遠心分離を行ない，二度この操作をくり返す。D. M. S. O 層を合わせ水 200 ml を加えてふりまぜ，以下の操作は Fig 1 の通り行なった。

測定は紫外外部吸収を 375, 385, 395 m μ において，蛍光強度を 425, 430, 435 m μ において行ない，base line technique⁴⁾⁵⁾ により濃度を算出した。すなわち主ピーク 385 m μ の吸光度 I_A ，この両側の 375, 395 m μ の吸光度 I_B , I_C を測定し， $I = I_A - (I_B + I_C)/2$ を求めこの I と 3,4-ベンツピレン濃度との関係を用いて，濃度未知の 3,4-ベンツピレンを定量した。

(3) 実験結果

① 結果は Table 1 に示す通りに D. M. S. O で直接ふりまぜて抽出する方法よりも，n-ヘキサンによるソクスレー抽出法の方が良い結果が得られることがわかった。すなわち，いか，およびサラミソーセージからの回収率は D. M. S. O による直接抽出での紫外外部吸収測定による場合では，平均 32.6% であり，白石らの方法による n-ヘキサンソクスレー抽出では平均 68.9% であった。上記の二つの方法はいずれもアルカリによる加水分解を行っていない。

② D. M. S. O による直接抽出は食品が paste 状になり D. M. S. O との分離に難点がみとめられた。

そこでさらに白石の方法に次のようなアルカリによる加水分解操作を行ない，加水分解による回収率について検討を行なった。すなわち試料 100 g を細切したものに 50 g の無水硫酸ナトリウムをまぜ，ソクスレー円筒ろ紙に入れる。抽出器に水酸化カリウム 3 g を加え，エチルアルコールを

Table 1. Comparison of the Recoveries of 3,4-Benzopyrene by direct Extraction with D.M.S.O. Solvent and Soxhlet Extraction with n-Hexane

Smoked Foods	Recoveries of 3,4-Benzopyrene added to foods at a level of 0.04ppm *	
	D.M.S.O Extn	n-Hexane soxhlet extraction
Cuttle fish	50.1, 42.6 %	80.1 %
Salami Sausage	5.1	57.6
average	32.6	68.9

* Recoveries were obtained by Ultraviolet absorbance

用いて 4~5 時間抽出する。抽出液を 20~30 ml まで濃縮したのち，同量の水を加え，n-ヘキサン 50 ml を用いて 4 回抽出を行なう。n-ヘキサン抽出液を合し水 50 ml を用いて 4 回洗滌した。下部の水層はさらに n-ヘキサン 50 ml を用いて 2 回抽出したのち，さきの n-ヘキサン抽出液と合した。n-ヘキサン抽出液は D. M. S. O 50 ml を用いて 3 回抽出を行なう。以下は上記の白石らの術式通りに操作を行なった。

実験結果は Table 2 に示すごとくであった。

Table 2. Comparison of the Recoveries of 3,4-Benzopyrene between non-saponification and saponification method

Smoked Foods	Recoveries of 3,4-Benzopyrene added to foods at a level of 0.04ppm			
	non-saponification method		saponification method	
Cheese	63.3	I	98.3	II %
			62.5	I
			46.7	II %
			59.6	II %
			43.8	

I : determined by Ultraviolet absorbance

II : determined by Fluorescence intensity

すなわちチーズ 100 g に 4 μ g の 3,4-Benzopyrene を添加して行なった2つの方法による回収率は、明らかに、食品中の油脂分を加水分解することは抽出条件としてむしろ好ましくないことを示している。実際の操作にあたって、生じた乳濁はしばしば分離を困難にする。

以上の点から結論として、食品からの3,4-ベンツピレンの抽出法としては加水分解を行わず、n-ヘキサンソクスレー抽出による白石の方法が最も回収率がよく、手技としてもやり易いものであることを確認した。

文 献

- 1) J.W. Howard, R.H. White et al., : J. of A.O.A.C 49, No. 3, 611 (1966)
- 2) C. Genest, D.M. Smith., : J. of A.O.A.C 47, No. 5, 894 (1964)
- 3) 坂上, 白石., : 第86年会日本薬学会大会講演要旨集 132 (1966)
- 4) B.T. Commins, : Analyst, 83, 386 (1958)
- 5) R.L. Cooper : Analyst, 79, 573 (1954)