

# 食品中の 3, 4-ベンツォピレンの分離定量法に関する検討 (第 2 報)

薄層クロマトかきおとしによる定量法の精度

白鳥つや子・原田 幸子・白石 慶子

Studies on the extraction method of 3, 4-benzopyrene in foods (Part II)  
Tsuyako SHIROTORI, Sachiko HARADA and Yoshiko SHIRAIISHI

In our previous report was described a method of separation and determination of 3, 4-benzopyrene (I) in Japanese foods, one of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons.

In the method, (I) was isolated by alumina column and measured by spectrofluorometry using baseline method.

Confirmation of (I) was made by thin-layer chromatography. When the thin-layer chromatographic technique was applied, two or three other spots in addition to (I) were separatory observed on the plate the determination of the fluorescence intensity of (I) extracted from the (I) spot on the thin-layer plate seems to be more accurate than direct determination of (I) fraction eluted from alumina column.

An attempt was made to know the recoveries of (I) contents extracted from the thin-layer adsorbent with n-hexane, hot methanol and benzene, respectively. Little differences were observed among the extraction solvents, that is recoveries ranged from 70 to 100%. Benzene seems to increase the fluorescence intensity of (I), compared with the other solvents. From the results of the experiment, it is suggested that there are the other solvents which can increase the intensity of fluorescence, compared with benzene.

## 1 ま え が き

食品中に含まれる微量成分の同定ならびに定量に際し薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いることが非常に多い。すなわち、定量の場合は、TLC でえられた微量成分のスポットをかきおとし、これを適当な溶媒で抽出し、その抽出液について定量<sup>1)</sup>を行なうわけであるが、かきおとし抽出操作による微量成分の損失はかなりあるものと考えなくてはならない。

我々は従来から各種食品中の 3, 4-ベンツォピレンの定量を行なっているが<sup>2)3)</sup>、いずれも定量は、最終抽出物のカラムクロマトグラフィーによる 3, 4-ベンツォピレンの溶出フラクションをとり、直接けい光測定を行う。次に測定した液を再び濃縮して TLC につけ、 $R_f$  の同定を行なったのち、このスポット部分をかきおとし、n-ヘキサンで抽出した液のけい光スペクトルを測定して確認する方法を行っている。すなわち、クリーンアップの方法として、最後に 1% 含水アルミナカラムクロマト (1×30cm) につけ、n-ヘキサン：エーテル (2：1) により展開し、3, 4-べ

ンツォピレンの溶出フラクションとして50ml~100mlをとり、測定しているがこのフラクションには、3,4-ベンツォピレン以外の多核芳香族炭化水素として、Chrysene, 3-Methylcholanthrene および1,12-Benzoperyleneなどが溶出することを認めた。これら3,4-ベンツォピレン以外の多核芳香族炭化水素の存在は、3,4-ベンツォピレンのけい光強度に比べて弱少であること、3,4-ベンツォピレンのスペクトルカーブの最大吸収である405, 430m $\mu$ の両方にピークを有するものがないこと又ベースライン法によれば、その影響が少ないことなどから、このフラクションの直接測定をもって定量値として大差ないわけである。

種々の食品を分析した際、3,4-ベンツォピレン溶出フラクションのTLCにおいて、上記の炭化水素以外のUnknownな物質によるいくつかのスポットをしばしば認めている。つまりTLCという方法によりさらに一段とクリーンアップされることは事実である。そこで我々はTLC上のバンドかきおとしの操作を3,4-ベンツォピレンの同定のみを用いず、これを定量法とする場合は、どの程度の損失をみるものかについて検討を行ったのでその結果について報告する。

## 2 実験の部

### 2-A 試薬および器具

試薬：

1 3,4-ベンツォピレン：3,4-ベンツォピレン (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。この結晶 0.001gを秤り、n-ヘキサンに溶かして10.0mlとし、必要に応じてn-ヘキサンでうすめて使用する。標準液 1.0ml = 100 $\mu$ g 3,4-ベンツォピレン

2 n-ヘキサン：特級品を濃硫酸、水、10%水酸化ナトリウムおよび水を用いて順次洗浄し、乾燥したのち蒸留した。

3 メタノール：特級品を蒸留した。

4 ベンゼン：特級品を蒸留した。

5 薄層用展開溶媒<sup>4)</sup>：n-ヘキサン、o-ジクロロベンゼンおよびピリジンを10:1:0.5の割合に混合した。

器具：

1 日立 203 型けい光光度計

2 紫外線灯 マナスライト 365m $\mu$

3 ロータリーエボレーター：矢沢製作所

4 薄層クロマト装置：薄層板、DC-キーゼルゲル20×20cm (E. Merck 社)  
展開槽、ハンキング式展開槽 (東洋科学産業)

5 薄層用ピペット

6 ろ過装置：グラスフィルター (20×30mm, 3G)

### 2-B 操作法

DC-キーゼルゲル (メルク社) 20×20cmの薄層板を105°Cの乾燥器中で1時間乾燥する。薄層板の下端から2cm、横端から2cmはいった所より巾0.5cm長さ4cmの帯を2cmかんかくで3ヶ所鉛筆でしるしをつける。

3,4-ベンツォピレン標準液を薄層用ピペットを用いて0.1mlずつ巾0.5cm長さ4cmの帯状に塗布する。薄層板をかるく乾燥後、ハンキング式展開槽に約30分間つるした後、展開溶媒の先端が

原点より約13cm上昇するまで展開する。薄層板をかるく乾燥したのち、紫外線(365m $\mu$ )をあて3,4-ベンツォピレンのけい光帯を鉛筆で囲む。これを金属ヘラを用いてけずりとる。

けずりとしたシリカゲルは重量を計ったのち、それぞれ共栓10mlの小試験管にうつし、抽出溶媒として、n-ヘキサン、ベンゼンおよび40~50°Cに加熱したメタノールを用いて、それぞれシリカゲルに1~2mlずつ加えて、小ガラス棒でシリカゲルをつぶすようにして抽出する。小ガラスフィルターを用いて、小試験管にろ過する。この操作を何回かくり返し、抽出液に紫外線灯をあてた際けい光をみとめなくなるまでくり返す。液量は濃縮して4mlとする。

けい光光度計により、n-ヘキサン、メタノール抽出液は波長400, 405, 410m $\mu$ および425, 430, 435m $\mu$ (励起365m $\mu$ )におけるけい光を測定し、ベースライン法により濃度を算出した。なお3,4-ベンツォピレンのベンゼン溶液は、n-ヘキサン、メタノール溶液の場合と異り、スペクトルの最大吸収は、405が410m $\mu$ に430が435m $\mu$ に移動すると共にピークはややブロードになることを認めたので、ベンゼン溶液の場合には、波長400, 410, 415m $\mu$ および425, 435, 440m $\mu$ におけるけい光を測定した。

### 3 実験結果及び考察

3-A 各種溶媒中の3,4-ベンツォピレンのベースライン法による検量線はFig. 1, 2, 3,に示した。

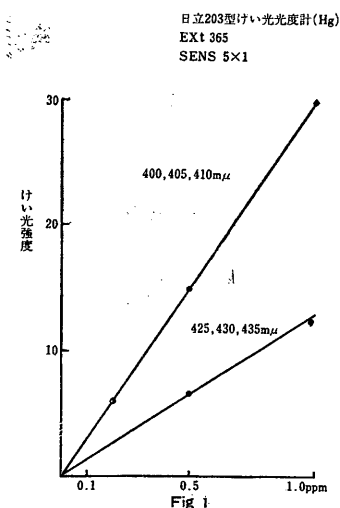


Fig. 1 3,4-ベンツォピレン n-ヘキサン溶液の検量線

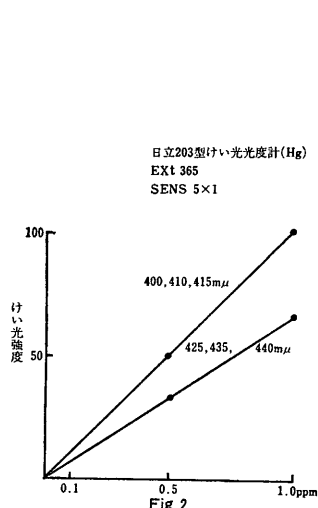


Fig. 2 3,4-ベンツォピレンベンゼン溶液の検量線

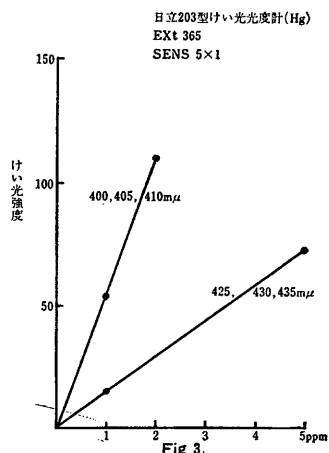


Fig. 3 3,4-ベンツォピレンメタノール溶液の検量線

3-B 各種溶媒による3,4-ベンツォピレンの回収率

1 3,4-ベンツォピレン塗布のTLCかきおとしを、各種溶媒で抽出した結果は、Table 1に示す通りであった。

Table 1 TLC シリカゲルかきおとしからの 3, 4-ベンツォピレンの各溶媒による回収率 (2 $\mu$ g 塗布)

	405m $\mu$ をピークとする ベースライン法による値			430m $\mu$ をピークとする ベースライン法による値			かきとりシリカゲル量(g)		
	n-ヘキサン	ベンゼン	熱メタノール	n-ヘキサン	ベンゼン	熱メタノール	n-ヘキサン	ベンゼン	熱メタノール
1	13.0	54.0	24.4	4.4	28.0	8.2	0.050	0.043	0.044
2	11.8	43.0	20.6	5.4	21.0	5.0	0.052	0.045	0.043
3	10.5	26.8	22.6	4.1	25.0	8.2	0.041	0.034	0.044
スペクトル強度平均	11.8	41.3	22.6	4.6	24.7	7.1			
3,4-ベンツォピレンの 濃度 ( $\mu$ g)	1.60	1.48	1.60	1.48	1.52	2.00			
回 収 率(%)	80	74	80	74	76	100			

\*ベンゼンの場合は410, 435m $\mu$ をピークとするベースライン法による値である。

なお溶媒及びプレート, TLC 展開溶媒によるけい光に対する影響をみるために 3, 4-ベンツォピレンを塗布しないプレートを薄層溶媒で展開したのち軽く乾燥しこれを 1 × 4 cm 巾にかきおとし, それぞれの溶媒で抽出した時のブランクの値を Table 2 に示した。

Table 2 TLC シリカゲルのかきおとしにおける各溶媒抽出のブランクのけい光値

溶 媒 波 長	n-ヘキサン	ベンゼン	熱メタノール
400	0.03	0.04	0.07
405	0.03		0.08
410	0.03	0.04	0.08
415		0.04	
425	0.01	0.03	0.07
430	0.01		0.06
435	0.01	0.03	0.06
440		0.03	

すなわちTLC上の3, 4-ベンツォピレンスポットを各種溶媒抽出した際, 405m $\mu$  (但しベンゼンの場合 410m $\mu$ ) のピークでは74~80%, 430m $\mu$  (但しベンゼンの場合 435m $\mu$ ) のピークでは74~100%の回収率を示した。各溶媒3回の平均では熱メタノールが回収率がやや高いように見えるが, 実際に行った場合, 担体シリカゲルの微粒子がガラスフィルターを通過したごとくわずかに不透明な感じを与える場合が多く, その点では n-ヘキサンかベンゼンを使用する方が無難と思われ

た。

3,4-ベンツォピレンのベンゼン溶液の場合は他の二つの溶媒にくらべて、同一濃度でもそのけい光強度はn-ヘキサン溶液の場合の約2倍、メタノール溶液の場合の約1.3倍を示し、又けい光のピークもやや移動するのを認めた。このことは3,4-ベンツォピレンのけい光が溶媒により可成の影響をうけることを示し、ng程度の微量の定量に際しては、今回使用した以外の適当な溶媒を用いることにより、さらに相対的感度を上げることが可能であることを示唆するものであろう。

n-ヘキサンとベンゼンでは両者の回収率に特に差があるとは言えなかった。

以上の実験から、実際の食品の分析にTLC上のスポットを溶出し、直接定量する方法をとる場合、標準3,4-ベンツォピレン以外の種々のけい光物質による影響等を合せると60~70%の回収率になるものと推定される。TLC上のスポットを直接デンストメーターにかけた際の分析精度との比較についてはさらに検討中である。

#### 4 ま と め

① TLCによる3,4-ベンツォピレン定量の精度を検討した。即ちDC-キーゼルゲル上に一定量の3,4-ベンツォピレンを塗布し松下らの方法による展開ののち、3,4-ベンツォピレンのスポット部分をかきおとし、このものを熱メタノール、ベンゼン、n-ヘキサンを用いて抽出した際の3,4-ベンツォピレンの回収率を求めた。

② 溶媒による回収率の差はあまり認められなかった。熱メタノールはシリカゲルを一部浮遊させることがあり好ましくないと思われた。

③ 3,4-ベンツォピレンベンゼン溶液は、他の二つの溶媒に比べ、けい光強度が強まり、またピークも長波長の方にやや移動するのをみとめた。このことは今回の実験に使用した以外の溶媒の選択により、3,4-ベンツォピレンのけい光強度を更に高めることが可能であることを示した。

④ TLC上のスポットをデンストメーターで測定する場合の精度との比較については検討されなければならない。

#### 文 献

- 1) Egon Stahl: Thin-Layer Chromatography, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, New York p 145, (1969)
- 2) 白石慶子, 白鳥つや子, 坂上米次: 食衛試 13 (No. 1) 41 (1972)
- 3) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍: 食衛試投稿中
- 4) Matsushita, H., Suzuki, Y., Sakabe, H.: Bull. Chem. Soc. Japan 36 (10),1371 (1963)