

牛乳中の Polycyclic Aromatic Hydrocarbons の 分離定量法に関する検討

館 野 つや子

(平成5年9月30日受理)

Studies on the Extraction Method of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Milk

Tsuyako TATENO

(Received September 30, 1993)

緒 言

従来、多種類の食品について Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (以下 PAH と略す) の含有量を測定してきた。^{1)~9)}

今回は、牛乳及び加工乳等の PAH の含有量の検討を試みた。

Lechner ら¹⁰⁾による母乳中の Benzo(a)pyrene 及び PAH の調査研究が行なわれているが、牛乳中の分析についての報告はほとんど見られない。

館野らの従来からの食品中(野菜類^{1)~4)}、果実類⁵⁾、魚^{6)~8)}及び肉類、油脂類⁹⁾)の Benzo(a)pyrene を始め PAH 分析方法として用いた、ソックスレー抽出→液々抽出→カラムクロマトグラフィーを牛乳の分析方法にも応用したが、各分析段階において分離抽出が困難であった。

そこで、従来食品中の化学成分の分析に一般に应用されているトリクロロ酢酸を用いる方法を検討した。

その結果が得られたので報告する。

また、館野らの従来の分析方法^{1)~6)}と比較すると、液々抽出の段階を簡素化することができた。

その結果、分析時間が従来のものより、約5~7時間短縮された。

分析方法

1. 試 料

試料の牛乳、加工乳等は平成3年3月~平成5年7月都内で市販されているものを購入した。

2. 試 薬

・トリクロロ酢酸(特級): 和光純薬工業

・窒素(ナイトゲン)ガス: 太陽酸素・太陽ケミカル

上記以外の試薬は前報³⁾に従った。

3. 装置及び器具

前報³⁾に従った。

4. 実験操作

1) 試 料

市販の牛乳及び加工乳等はそのまま用いた。

2) 試料の液々抽出、カラムクロマトグラフィー及び測定

図1に示す通り、分液ロートに牛乳、ジメチルスルフォキシド(以下 DMSO と略す)、40%トリクロロ酢酸、塩化ナトリウム及びn-ヘキサンを入れ、5分間振とう機で抽出する。

n-ヘキサン層は別の丸底フラスコに取り、さらに下層をn-ヘキサンで抽出する。以下図1に示す通り、この操作を4回繰り返す、n-ヘキサン層をエバポレーターで1~2mlに濃縮し、N-ガスで脱水する。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーはカラム管(2×20cm)に溶出溶媒(石油エーテル:エーテル(9:1))で15cmの高さにシリカゲルを詰め300ml溶出し、1~2mlに濃縮する。

1%含水アルミナカラムクロマトグラフィー及び測定は、図1に示す通り前報³⁾に従った。

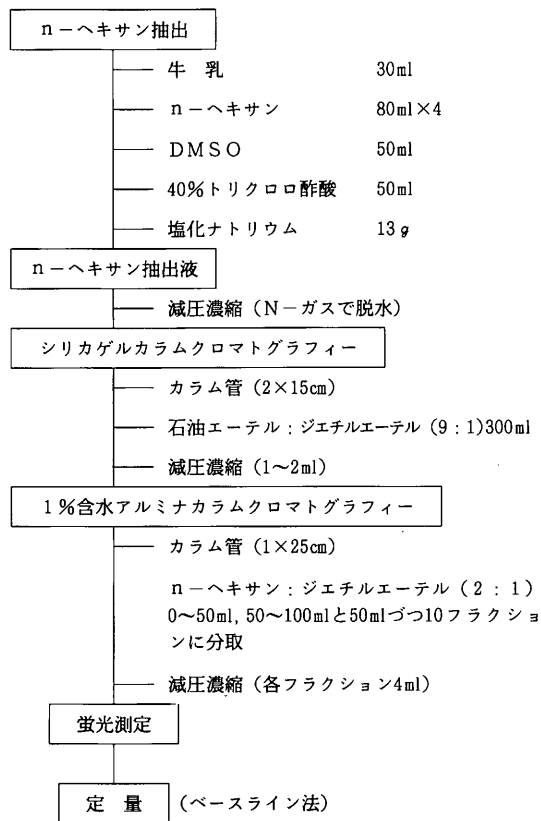


図1 牛乳の分析方法

結果及び考察

1. 牛乳中の PAH の分析方法の結果を図1に示した。
2. 試料の牛乳及び抽出溶媒の検討
1) 従来からの食品中の PAH 分析方法^{1)~6)}を用い、牛乳中の PAH 分析を行なったが牛乳を n-ヘキサン等の溶媒で抽出を行なうと、混濁し、全く分離せず、抽出不可能であった。
2) 次に、牛乳を凍結乾燥し、従来の PAH 分析方法^{1)~6)}により分析を行なった。しかし、凍結乾燥した牛乳についても上記同様 n-ヘキサン等の抽出時に混濁し、分離せず、分析が不可能であった。
3) 次に除タンパク剤として用いられているトリクロロ酢酸による検討を行なった。
① トリクロロ酢酸濃度の検討
表1に示す通り、分液ロートに牛乳、塩化ナトリウム、n-ヘキサンを入れ、トリクロロ酢酸10、20、30、40及び50%の各濃度についての分離状況の検討を行なった。
表1に示す通り、10~30%トリクロロ酢酸濃度では、凝固物(上下層の接触部)が浮遊し、抽出が思わしくなかった。
しかし、40及び50%トリクロロ酢酸濃度では、凝固浮遊物が微細になり、しかも量が少なく、この濃度の方が抽出が良行であった。
しかし、凝固浮遊物の存在は充分抽出が出来ていないものと思われ、さらに次の検討を行なった。

表1 トリクロロ酢酸濃度の検討

№	牛 乳 (ml)	トリクロロ酢酸* (%)	塩化ナトリウム (g)	N-ヘキサン (ml)	分 離 状 況	結 果
1	30	10	13	80	上層部、下層部共透明、下層部に1つにか たまった、大きな凝固浮遊物	×
2	30	20	13	80	上層部透明、下層部透明で上部に微細な凝 固浮遊物	×
3	30	30	13	80		×
4	30	40	13	80		△ [○]
5	30	50	13	80	上層部透明、下層部透明で上部に多少の微 細な凝固浮遊物 (N・4が分離良行)	△

※トリクロロ酢酸それぞれ50ml使用

牛乳中のPolycyclic Aromatic Hydrocarbonsの分離定量法に関する検討

- ② 凝固浮遊物をより溶解させるために、上記条件に DMSO を加え抽出することを検討した。
- 表 2 に示す通り、上記条件の40%及び50%トリクロロ酢酸に DMSO を加え抽出を行なうと、上層の n-ヘキサン層は透明で分離よく、下層は上層との接触部がわずかに白濁したが分離が良好であった。

表 2 濃度の異なるトリクロロ酢酸に DMSO を加えた際の分離状況

No.	牛乳 (ml)	トリクロロ 酢酸* (%)	塩化ナトリ ウム (g)	N-ヘキサン (ml)	DMSO (ml)	分離状況	結果
1	30	10	13	80	50	上層部約 1/2 透明であと白濁、下層部透明で淡黄色	×
2	30	20	13	80	50		×
3	30	30	13	80	50	上層部透明、下層部透明で上部多少凝固浮遊物	△
4	30	40	13	80	50	上層部、下層部共透明、上下層接触部わずかに白濁 (N・4 が白濁部最も少ない)	○°
5	30	50	13	80	50		○

※トリクロロ酢酸それぞれ50ml使用

- ③ DMSO 使用量の検討
- 表 3 に示す通り、上記条件で DMSO20~60ml 使用における n-ヘキサン抽出の分離状況では、DMSO 50ml 使用が最も分離良好であった。

表 3 DMSO 使用量の検討

No.	牛乳 (ml)	40%トリクロ ロ酢酸(ml)	DMSO (ml)	塩化ナトリ ウム (g)	N-ヘキサン (ml)	分離状況	結果
1	30	50	20	13	80	ほとんど分離しない	×
2	30	50	30	13	80	上層部かなり透明 下層部白濁	×
3	30	50	40	13	80	上層部、下層部共透明、上下層接触部多少白濁 (N・4 が白濁部最も少ない)	△
4	30	50	50	13	80		○
5	30	50	60	13	80		△°

④ n-ヘキサン使用量の検討

使用における分離状況は、80ml 使用が最も分離良行であった。

表 4 に示す通り、上記条件で n-ヘキサン40~80ml

表 4 n-ヘキサン使用量の検討

№	牛 乳 (ml)	40%トリクロ ロ酢酸(ml)	DMSO (ml)	塩化ナトリ ウム (g)	N-ヘキサン (ml)	分 離 状 況	結 果
1	30	50	50	13	40	上層部分離悪い 下層部白濁	×
2	30	50	50	13	50		×
3	30	50	50	13	60	上層部透明、下層部淡い白濁、上下層接触 部白濁	△
4	30	50	50	13	70		△°
5	30	50	50	13	80	上層部下層部共透明、上下層接触部少し白 濁 (N・5 が白濁が少ない)	○
6	30	50	50	13	90		△°

⑤ 塩化ナトリウム使用量の検討

における分離状況は13~14g 使用が分離良行であった。

表 5 に示す通り、上記条件で塩化ナトリウム10~15g

表 5 塩化ナトリウム使用量の検討

№	牛 乳 (ml)	40%トリクロ ロ酢酸(ml)	DMSO (ml)	塩化ナトリ ウム (g)	N-ヘキサン (ml)	分 離 状 況	結 果
1	30	50	50	10	40	上層部少し透明 下層部白濁で分離悪い N・3 は N・1 N・2 より上層部透明	×
2	30	50	50	11	50		×
3	30	50	50	12	60		△
4	30	50	50	13	70	上層部透明 下層部白色、上下層接触部多少白濁 (N・4 が白濁部最も少ない)	○°
5	30	50	50	14	80		○
6	30	50	50	15	90		△

3. 上記分析方法（図1）により検出された牛乳中のBenzo(a)pyrene及びAnthraceneの蛍光波長を図2及び図3に示した。

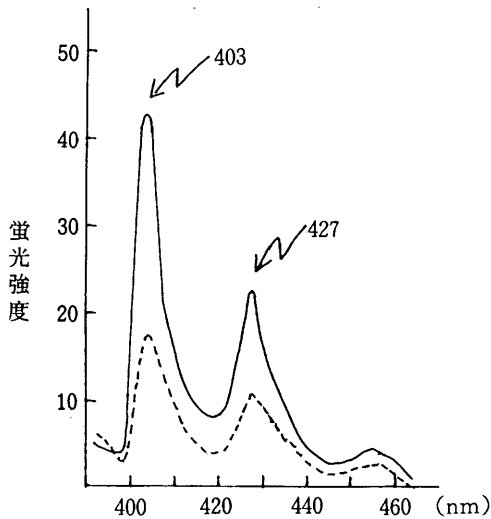


図2. 牛乳から検出されたBenzo(a)pyreneの蛍光波長
 — 標準Benzo(a)pyrene (濃度29ppb)
 牛乳から検出されたBenzo(a)pyrene

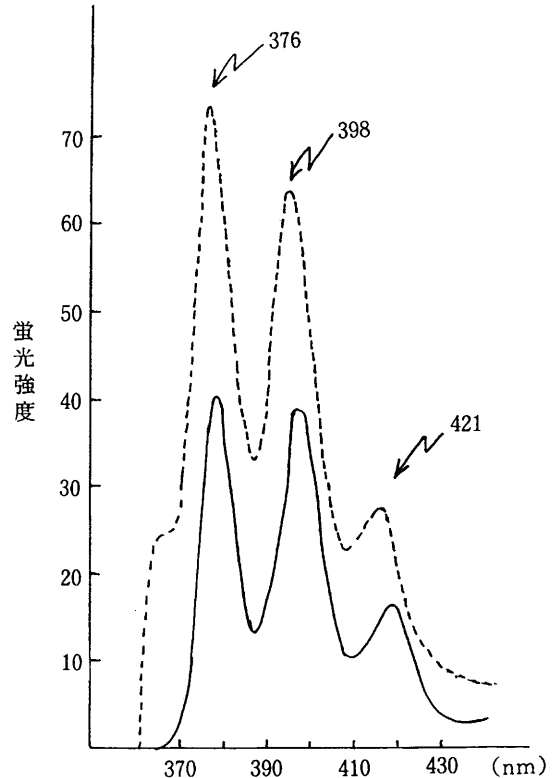


図3. 牛乳から検出されたAnthraceneの蛍光波長
 — 標準Anthracene (濃度29ppb)
 牛乳から検出されたAnthracene

Benzo(a)pyrene及びAnthraceneの顕著な蛍光波長が得られ、分離が良好であった。

4. 牛乳のBenzo(a)pyrene添加回収率を表6に示した。

表6に示す通り、添加回収率84～89％、平均86.9％と良い結果が得られた。

表6 簡素化した方法によるBenzo(a)pyrene添加回収率

No	牛乳 (ml)	B(a)P 添加量 (ppb)	検出量 (ppb)	回収率 (%)
1	30	50.0	42.2	84.4
2	30	50.0	44.7	89.4
3	30	50.0	42.5	85.0
4	30	50.0	43.5	87.0
5	30	50.0	44.3	88.6
平均				86.9

5. 市販牛乳中の PAH 分析結果を表 7 に示した。た。
数例の試料ではあるが、発がん性のある Benzo(a) また、検出された PAH の種類は 6 ～ 7 及び検出量は
pyrene が全試料から 0.04 ～ 0.05ppb の範囲で検出され 0.01 ～ 2.94ppb で野菜、魚等とほぼ同程度であった。

表 7 牛乳中の Polycyclic Aromatic Hydrocarbons の含有量

PAH		牛 乳 類 (ppb)			
		牛 乳 (1)	牛 乳 (2)	牛 乳 (3) (ロングラン)	加工乳 (低脂肪)
C a r c i n o g e n i c	Benzo (a) anthracene	0.01	0.17	ND	ND
	Benzo (a) pyrene	0.04	0.04	0.04	0.05
	Dibenz (ah) anthracene	ND*	ND	ND	ND
	3 - Methylcholanthrene	ND	ND	ND	ND
	Benzo (a) pyrene	ND	ND	ND	ND
n o t C a r c i n o g e n i c	Pyrene	ND	0.05	ND	0.07
	Fluoranthene	1.59	2.13	2.02	1.91
	Anthracene	0.38	0.39	0.23	0.10
	Phenanthrene	2.94	ND	1.86	ND
	Coronene	0.06	0.11	0.12	0.57
	Fluorene	ND	ND	ND	ND
	2, 3 - Benzofluorene	0.15	0.20	0.16	ND
	1 - Methylphenanthrene	ND	ND	ND	0.02
	Perylene	ND	ND	ND	ND
	Dibenz (ac) anthracene	ND	ND	ND	ND
	9, 10 - Dimethylbenz (a) - anthracene	ND	ND	ND	ND
	9 - Mehtylantracene	ND	ND	ND	ND
	5, 12 - Dihydronaphthacene	ND	ND	ND	0.26
	Benzo (k) fluoranthene	ND	ND	ND	ND
	Acenaphthene	ND	ND	ND	ND
Total		5.17	3.09	4.43	2.98

*ND : Not detected (ND<0.01ppb)

まとめ

1) 牛乳中のPAH分析において、
n-ヘキサンによる液々抽出時に40~50%トリクロロ酢酸を用いると分離が良好であることがわかった。

2) 従来の舘野らの食品中のPAH分析方法では、n-ヘキサン抽出→DMSO抽出→n-ヘキサン抽出の3段階の液々抽出を行なうが、牛乳に関しては、牛乳に直接DMSO、40%トリクロロ酢酸及び塩化ナトリウムを加え、n-ヘキサン抽出を行なう簡素化した方法の方が分離、抽出が良好であった。

3) 簡素化した分析方法は、従来のものより、分析時間が5~7時間短縮された。

4) 試料数が少ないが、市販の牛乳のPAH含有量は0.01~2.94ppbで野菜、魚類とほぼ同程度であった。

文 献

1. 白石慶子, 白鳥つや子, 高畠英伍: 食衛誌, 15, 18 (1974)
2. 舘野つや子, 南雲葉子, 末永泉二: 食衛誌, 31, 271 (1990)
3. 舘野つや子, 南雲葉子: 東京家政大学紀要, 30, 21 (1990)
4. T.Tateno and Y.nagumo: 東京家政大学紀要, 31, 27 (1991)
5. 白石慶子, 白鳥つや子, 高畠英伍: 食衛誌, 16, 187 (1975)
6. 白石慶子, 白鳥つや子, 高畠英伍: 食衛誌, 16, 178 (1975)
7. 舘野つや子: 東京家政大学紀要, 26, 85 (1986)
8. 舘野つや子: 東京家政大学紀要, 28, 103 (1988)
9. 白石慶子, 白鳥つや子: 食衛誌, 18, 426 (1977)
10. W. Lechner, M.Huber, G. K. Bonn and G. Daxenbichler: Wien Kiin Wochnschr 103/3 88 (1991)