

乳製品中の多環芳香族炭化水素の分析法の検討及び残留実態調査

館野 つや子

(平成 15 年 10 月 2 日受理)

Improvement of the Determination Method of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Dairy Products

TATENO, Tsuyako

(Received on October 2, 2003)

キーワード：多環芳香族炭化水素，ヨーグルト，アイスクリーム，チーズ

Key words : polycyclic aromatic hydrocarbons, yogurt, ice cream, cheese

はじめに

我々は、日本における野菜類^{1)~5)}、魚介類^{6)~9)}、牛乳^{10), 11)}及び油脂類¹²⁾等に含まれる多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons, 以下 PAH と略す) の分析方法の検討及び含有量について報告を行ってきた。

乳製品の PAH の調査研究は、DE Vos^ら¹³⁾、Lodovici^ら¹⁴⁾及び Dennis^ら¹⁵⁾により行われているが、日本では、乳製品中の PAH の報告はほとんど見られない。

著者らがこれまで用いてきた PAH 分析方法^{1)~12)}を乳製品に適用したが、あまり満足できる結果が得られなかったため、若干の改良を加えた。この改良法により、市販ヨーグルト 14 試料、アイスクリーム 6 試料及びチーズ 8 試料の PAH の残留実態を調査した。

実験方法

1. 試料

国産ヨーグルト、アイスクリーム及びチーズ (ナチュラル) 試料は、平成 8 年 1 月~13 年 3 月都内で購入した。

2. 試薬

・ PAH 標準溶液 : pyrene, benzo(a)anthracene, fluranthene, benzo(a)pyrene, dibenz(a,h)anthracene, 3-methylcholanthrene 及び coronene は (特級品) 和光純薬工業 (株), また, benzo(e)pyrene, perylene 及び dibenz(a,c)anthracene は, Aldrich chemical company を

用いた。以上各 PAH 標準溶液 : 0.00220g~0.00872g を精秤し, n-ヘキサンに溶し, 100ml とした (各標準溶液は 22~87.2 μ g/ml)。使用時にこの液 1ml を n-ヘキサンで 200ml とした。

・ n-ヘキサン : (HPLC 用) 和光純薬工業 (株), エーテル : (残留農薬, PCB 試験用) 和光純薬工業 (株), メタノール : (高速液体クロマト用) 和光純薬工業 (株), 石油エーテル : (残留農薬, PCB 試験用) 和光純薬工業 (株), ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略す) : (アミノ酸自動分析用) 和光純薬工業 (株), 水酸化カリウム : (試薬特級) 和光純薬工業 (株), シリカゲル (0.2~0.5mm) : Merck Silica gel 60, 1% 含水アルミナ : Merck Aluminium oxide 90 standardisiert を電気炉約 500°C で 2 時間乾燥したものをデジケーター中で放冷した後, 乾燥アルミナに対して 1%v/w の水を加え, 共栓びんに入れよく振りまぜ 1 昼夜放置後使用, 硫酸ナトリウム (無水) : (試薬特級) 和光純薬工業 (株) 製をガスバーナーを用い磁製皿上で焼いたものを使用した。

3. 装置及び器具

液体抽出器¹⁶⁾ : 抽出管部分約 4 × 25cm, 受器容量 200ml 及びソックスレー抽出器^{2), 7)} : 抽出管部分約 4 × 20cm, 受器容量 200ml, シリカゲルクロマト用カラム管 : 2 × 30cm, 及び 1% 含水アルミナカラムクロマト用カラム管 : 1 × 40cm, 蛍光分光光度計 : 日立 MPF-4 型 蛍光分光光度計。

4. 試料の採取量

ヨーグルト及びアイスクリームは 25g, チーズは 15~20g を採取し分析に用いた。

5. 試料からの抽出

ヨーグルト及びアイスクリームの液体抽出器による抽出：液体抽出器¹⁶⁾の受器にn-ヘキサン50mlを入れ、一方、ヨーグルトまたはアイスクリーム25gにDMSO25mlを加えよく混合して、それぞれの抽出管に移し、さらにn-ヘキサン50mlを加え、80~85°Cの湯浴で6~7時間抽出を行った。

チーズのソックスレー抽出器による抽出：ソックスレー抽出器の受器に水酸化カリウム3gを入れ、少量の水で溶かした後、メタノール50mlを加えた。抽出管には、円筒ろ紙にチーズ15~20gと無水硫酸ナトリウム約30gを乳鉢でよく混合したものを入れた。さらに、メタノール50mlで乳鉢を洗いながら加え、80~85°Cの湯浴で6~7時間抽出を行った。

抽出液の処理^{2), 7)}：抽出を終えた受器の抽出液を分液ロートに移し、以下n-ヘキサン抽出(n-ヘキサン80ml×4回)を行い、その抽出液をDMSOで抽出(80ml×4回)を行い、DMSO抽出液に約300mlの水を加え、さらにn-ヘキサン抽出(80ml×4回)を行った。

6. カラムクロマトグラフィー及び測定

ヨーグルト、アイスクリーム及びチーズの上記抽出液を減圧下で濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー：溶出液、石油エーテル：エーテル(9:1)、1%含水アルミナカラムクロマトグラフィー：溶出液、n-ヘキサン：エーテル(2:1)を前方^{2), 7)}に従って行った。

測定は各溶出液を濃縮し、n-ヘキサンで4mlとし、蛍光分光光度計を用い、PAH10種類(pyrene, benzo(a)-

anthracene, fluranthene, benzo(a)pyrene, dibenz(a, h)anthracene, 3-methylcholanthrene, benzo(e)pyrene, coronene, perylene及びdibenz(a, c)anthracene)の各PAHの波長⁷⁾により測定を行った。

7. 添加回収実験

ヨーグルト、アイスクリーム及びチーズは、PAH10種類を添加し、各PAHにつき3回ずつ添加回収実験を行った。

すなわち、液体抽出器には、ヨーグルト及びアイスクリームをそれぞれ25g(DMSO25mlと混合したもの)ずつ入れ、また、ソックスレー抽出器には、チーズ15~20g(無水硫酸ナトリウム約30gとよく乳鉢で混合したもの)を入れ、各PAH標準溶液を各PAHごとに各試料に添加した。上記の標準添加試料及び標準無添加試料について分析を行った。標準無添加試料の検出量を差し引いて回収率を算出した。

結果及び考察

1. 添加回収実験

ヨーグルト及びアイスクリームの添加回収実験結果をTable 1及びTable 2に示した。

従来の牛乳¹¹⁾の分析法では、回収率34~64%で満足な結果が得られなかったので、液体抽出器による抽出の際、ヨーグルトにDMSOを加えるように改良したところ、標準品添加による各PAHの回収率(標準品添加試料の検出量から、標準品無添加試料の検出量を差し引いたもの)は、88~113%、標準偏差は2.6~8.2%であった。アイ

Table 1. Recoveries of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Yogurt

	Added(ng)	Recoveries(%)			Average±S.D.(%)
		1	2	3	
Pyrene	60.00	114	116	108	113±3.4
Benzo(a)anthracene	70.50	106	87	102	98±8.2
Fluoranthene	55.00	110	117	98	108±7.9
Benzo(a)pyrene	50.00	92	103	107	101±6.3
Dibenz(a, h)anthracene	43.60	90	99	99	96±4.2
3-Methylcholanthrene	48.00	101	93	94	96±3.6
Benzo(e)pyrene	53.00	95	105	96	99±4.4
Coronene	55.00	119	116	102	112±7.4
Perylene	50.00	86	87	92	88±2.6
Dibenz(a, c)anthracene	110.00	89	87	103	93±7.1

n = 3

Table 2. Recoveries of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Ice cream

P A H	Added(ng)	Recoveries(%)			Average±S.D.(%)
		1	2	3	
Pyrene	60.00	95	88	91	91±2.9
Benzo(a)anthracene	70.50	90	89	92	90±1.3
Fluoranthene	55.00	76	78	81	78±2.1
Benzo(a)pyrene	50.00	86	102	83	90±2.8
Dibenz(a, h)anthracene	43.60	87	83	89	86±2.5
3-Methylcholanthrene	48.00	84	81	95	87±6.0
Benzo(e)pyrene	53.00	91	115	108	105±10.1
Coronene	55.00	94	87	92	91±2.9
Perylene	50.00	70	77	76	74±3.1
Dibenz(a, c)anthracene	110.00	83	81	107	90±11.8

n = 3

Table 3. Recoveries of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Cheese

	Added(ng)	Recoveries(%)			Average±S.D.(%)
		1	2	3	
Pyrene	60.00	88	92	85	88±8.3
Benzo(a)anthracene	70.50	97	114	93	101±9.1
Fluoranthene	55.00	98	91	88	92±4.2
Benzo(a)pyrene	50.00	103	95	92	97±4.7
Dibenz(a, h)anthracene	43.60	116	111	96	108±8.5
3-Methylcholanthrene	48.00	77	85	84	82±3.6
Benzo(e)pyrene	53.00	110	92	97	100±7.6
Coronene	55.00	101	106	95	101±3.7
Perylene	50.00	85	93	80	86±5.3
Dibenz(a, c)anthracene	110.00	82	85	79	82±2.5

n = 3

スクリームで74~105%, 標準偏差は1.3~11.8%であった。

チーズの添加回収実験結果をTable 3に示した。

ソックスレー抽出後、メタノール抽出をn-ヘキサンによって液々抽出を行ったが分離が悪く、チーズに無水硫酸ナトリウムを加えるように改良したところ、標準品添加による各PAH回収率は平均82~108%, その標準偏差は、2.5~9.1%となった。

2. 乳製品中のPAHの残留実態

市販のヨーグルト14試料, 市販アイスクリーム6試料及び市販チーズ8試料を改良法を用いて2回ずつ分析し, その平均値をTable 4, Table 5及びTable 6に示した。

ヨーグルトのPAH検出範囲はND~1.28ppbであった。高濃度で検出されたPAHはfluoranthene平均0.21ppb

(最高値1.28ppb)であった。また, 検出頻度の高いPAHはfluoranthene(93%), coronene(79%), 及びbenzo(a)-pyrene(64%)などであった。

アイスクリームの検出範囲は, ND~1.01ppbであった。高濃度で検出されたPAHは, pyrene平均0.53ppb(最高値1.01ppb)及びfluoranthene平均0.15ppb(最高値0.44ppb)であった。また, 検出頻度の高いPAHは, pyrene(100%), benzo(a)pyrene(100%)及びcoronene(100%)などであった。

チーズの検出範囲は, ND~3.10ppbであった。高濃度で検出されたPAHは, fluoranthene平均1.26ppb(最高値2.82ppb)及び, coronene平均1.06ppb(最高値3.10ppb), また, benzo(a)pyreneは平均0.09ppbであった。

Table 4. Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Yogurt (ppb)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	average
Pyrene	ND*	ND	ND	ND	0.08	0.31	ND	0.03							
Benzo(a)anthracene	ND	0.04	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	0.01	0.01	0.01	ND	ND	ND	0.01
Fluoranthene	0.24	1.28	0.22	0.23	0.03	ND	0.21	0.20	0.11	0.16	0.04	0.13	0.06	0.07	0.21
Benzo(a)pyrene	0.04	0.05	ND	ND	ND	0.02	0.02	ND	ND	ND	0.03	0.01	0.01	0.05	0.02
Dibenz(a, h)anthracene	ND														
3-Methylcholanthrene	ND														
Benzo(e)pyrene	ND														
Coronene	ND	ND	0.04	0.03	0.02	0.24	0.02	0.04	0.07	0.14	0.07	0.01	0.12	ND	0.06
Perylene	ND														
Dibenz(a, c)anthracene	ND														

※ND : Not detected < 0.01

Table 5. Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ice cream (ppb)

	1	2	3	4	5	6	average
Pyrene	0.08	0.37	0.12	0.84	0.76	1.01	0.53
Benzo(a)anthracene	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	
Fluoranthene	0.27	0.14	0.44	0.02	0.02	ND	0.15
Benzo(a)pyrene	0.02	0.04	0.07	0.05	0.05	0.06	0.05
Dibenz(a, h)anthracene	ND	ND	0.02	ND	ND	ND	
3-Methylcholanthrene	0.02	ND	ND	ND	ND	ND	
Benzo(e)pyrene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Coronene	0.12	0.10	0.15	0.12	0.01	0.14	0.11
Perylene	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	
Dibenz(a, c)anthracene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

※ND : Not detected < 0.01

Table 6. Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cheese (ppb)

	1	2	3	4	5	6	7	8	average
Pyrene	1.83	ND*	1.33	1.06	0.57	ND	ND	0.14	0.62
Benzo(a)anthracene	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	ND	ND	0.01
Fluoranthene	1.17	0.71	0.55	1.24	1.82	0.63	2.82	1.15	1.26
Benzo(a)pyrene	0.15	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.12	0.12	0.09
Dibenz(a, h)anthracene	ND								
3-Methylcholanthrene	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	ND	ND	0.01
Benzo(e)pyrene	ND	ND	0.62	ND	0.58	ND	ND	ND	0.15
Coronene	1.03	2.76	ND	0.62	0.97	ND	ND	3.10	1.06
Perylene	0.02	ND	0.01	ND	0.01	0.01	ND	1.21	0.16
Dibenz(a, c)anthracene	ND	ND	ND	ND	0.28	ND	ND	ND	0.04

※ND : Not detected < 0.01

イタリアのLodoviciら¹⁴⁾の、牛乳及びヨーグルト中のbenzo(a)pyreneの分析結果では、平均0.336 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と報告している。また、イギリスのDennisら¹⁵⁾はエバミルク、アイスクリーム及びヨーグルト中のbenzo(a)-pyrene分析結果では、平均0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と報告している。分析に用いた試料が異なるが、今回分析を行ったアイスクリーム平均0.05ppb及びヨーグルト0.02ppbと検出量がほぼ同程度であった。

なお、チーズのbenzo(a)pyreneについては、Lodoviciら¹⁴⁾の検出量0.014 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、また、Dennisら¹⁵⁾は検出量0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と報告している。今回分析を行ったチーズの平均値0.09ppbはDennisら¹⁵⁾の検出量とほぼ同程度であった。

ヨーグルト、アイスクリーム及びチーズ3者について、PAHの検出量を平均値と比較すると、1ppb以上検出したものは、チーズのfluoranthene及びcoroneneであった。

文 献

- 1) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍: 食衛誌. **15**, 18~21 (1974).
- 2) 館野つや子, 南雲葉子: 東京家政大紀要. **30**, 21~25 (1990).
- 3) 館野つや子, 南雲葉子, 末永泉二: 食衛誌. **31**, 271~276 (1990).
- 4) Tsuyako TATENO and Yoko NAGUMO : Reprinted from the Bulletin of Tokyo Kasei University. **31**, 27~30 (1991).
- 5) 館野つや子, 末永泉二: 食衛誌. **35**, 206~209 (1994).
- 6) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍: 食衛誌. **16**, 178~181 (1975).
- 7) 館野つや子: 東京家政大紀要. **26**, 85~89 (1986).
- 8) 館野つや子: 東京家政大紀要. **28**, 103~107 (1988).
- 9) 館野つや子: 食衛誌. **39**, 159~164 (1998).
- 10) 館野つや子: 東京家政大紀要. **34**, 55~61 (1994).
- 11) 館野つや子, 影山百合子: 食衛誌. **40**, 90~97 (1999).
- 12) 白石慶子, 白鳥つや子: 食衛誌. **18**, 426~430 (1977).
- 13) DE Vos, R. H., van Dokkam, W., Schouten, A., DE Jong-Berkhout, P., Fd Chem. Toxicol. **28**, 263~268 (1990)
- 14) Lodovici, M., Dolara, P., Casalini, C., Ciappellano, S., Testolin, G., : Food Additives and Contaminants. **12**, 703~713 (1995).
- 15) Dennis, M. J., : Massey, R. C., Cripps, G., Venn, L., Howarth, N., Lee, G., : Food Additives and Contaminants. **8**, 517~530 (1991).
- 16) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解” p.192 (2000) 金原出版.

Summary

Determination method of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contained in domestic dairy foods were improved. Extraction of PAHs from yogurt and ice cream was carried out as the following method. Dimethyl sulfoxide was added to each sample in liquid extractor and was thoroughly agitated and next, N-hexane was added and incubated at 80~85°C.

On the other hand, regarding as extraction of PAHs from cheese, methylalcohol was added instead of dimethyl sulfoxide and processed with using soxhlet extractor. In these methods, the rate of added and recovered PAHs on yogurt is 88~113% and 74~105% on cheese.

Furthermore, dairy foods on the market, were analyzed by these methods, and range of PAHs detection in amount was ND~1.28ppb/g on the item of yogurt, specially pyrene and coronene were detected in high amount. In case of cheese, the range was wider at ND~3.10ppb/g and fluoranthene and coronene were detected in high amount.