

食品中の3,4-ベンツォピレン含有量について

白鳥 つや子

Studies on the Contents of 3,4-Benzopyrene in common Japanese Foods

Tsuyako SHIROTORI

The carcinogenic polycyclic hydrocarbon, 3,4-Benzopyrene in some Japanese common foods were analyzed by a method reported by Shiraiishi and Shirotori which involves extraction, solvent partition, column chromatography and spectrophotofluorometric measurement.

3,4-Benzopyrene were found in Japanese green teas ranging from 0.5 to 16.0 ppb, in Nori ranging from 7.4 to 31.3 ppb, in Katsuobushi (smoked and dried fish) from 8.7 to 27.2 ppb respectively.

These analytical results were compared with another reporters, and it seemed that values were higher than that reported of foreign foods.

① ま え が き

CookおよびHewett¹⁾らがマウスの皮膚に対する3,4-ベンツォピレンの発がん性を報告して以来、多核芳香族炭化水素の発がん性については大きな注目を呼んで、今日におよんでいる。

3,4-ベンツォピレンは発がん性をもつ多核芳香族炭化水素の中で、最も発がん性が強いと言われているものの一つである。

食品中に存在する3,4-ベンツォピレンが、人間の発がんに対してどのような関係を有するかについてはまだ定説がないのが現状である。しかしながら数多くの研究者らによって、食品中の3,4-ベンツォピレンの分離、定量法が検討され、種々の食品中の含有量もしだいに判明して来ている。

食品中の3,4-ベンツォピレンの分離、ならびに定量に関する主な報告としては、ドイツのG. Grimmer²⁾⁻⁸⁾およびアメリカのJ. W. Horward⁹⁾らによって数十種類におよぶ食品を分析したものがあげられる。

我国においても増田ら^{11) 12)}はかつおぶし、焼魚、麦茶などについて分析し、白石ら^{13) 14)}も日本茶、のりなどについて報告を行なっている。

3,4-ベンツォピレンの定量法には、特定波長における紫外外部吸収を測定する吸光法、およびけい光を測定するけい光法がある。

3,4-ベンツォピレンのけい光は、他の多核芳香族炭化水素のけい光に比べると非常に強く、20-メチルコランスレン、1,2-ベンツアントラセンおよびアントラセンのけい光の15~30倍、1,2,5,6-ジベンツアントラセンの200倍、クリセン、3,4-ベンツォフェナンスレンおよびビレンの2000~6000倍に達するものである¹⁵⁾。そのため、けい光法による3,4-ベンツォピレン測定の感

度は、使用する装置によっても異なるが、吸光法の場合の10~100倍位感度が高くなる。食品に含まれる3,4-ベンツォピレンの量はいずれも微量であり、その点からも定量法にはけい光による方が良いと思われる。

筆者はけい光法による白石らの方法に準じて、数種の食品について3,4-ベンツォピレンの定量を行なったのでその結果について報告し、あわせて外国の文献に報告された方法による結果と比較した。

② 実験の部

2-A 試料, 試薬および器具:

試料:

煎茶, ほうじ茶, 玉ろ, 麦茶, のり, かつおぶし, ハム

試薬:

1 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。

2 エーテル: 特級品を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浄し, 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 メタノール: 特級品を蒸留した。

5 リン酸: 特級品 (85%以上)

6 硫酸ナトリウム (無水): 特級品

7 塩化ナトリウム: 特級品

8 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, ヘキサンに溶かして10.0mlとし, 必要におおじてヘキサンでうすめて使用する。標準液1.0ml=100 μg 3,4-ベンツォピレン

9 0-ジクロロベンゼン: 特級品を濃硫酸, 水, 10%水酸化ナトリウム液および水を用いて順次洗浄し, 塩化カルシウムを加えて乾燥したのち, 減圧分留した。

10 ピリジン: 特級品を2%過マンガン酸カリウム液を用いて, いちじるしく液が脱色しなくなるまで洗浄し, 固形水酸化ナトリウムを加えて分離する液層を除いたのち, 塩化カルシウムを加えて脱水後, 蒸留した。

11 バターイエロー液: 特級品0.5gをn-ヘキサン100mlに溶かした。

12 カラムクロマト用アルミナ: E. Merck社のAluminiumoxid standardisiertを約5倍量のN-塩酸を用いてふりまぜて洗い, pH試験紙でpHが5~6位になるまで水洗したのち, 約110°Cで2時間乾燥器中で乾燥する。次に電気炉に入れ, 約500°Cで2~3時間加熱後, デシケーターに放冷する。乾燥アルミナに1% (V/W)の水を加え, よくふりまぜ2~3時間置いてから使用する。

13 薄層用展開溶媒: n-ヘキサン, 0-ジクロロベンゼンおよびピリジンを10:1:0.5の割合に混和する。

器具:

白鳥：食品中の3, 4ペンツォビレン含有量について

- 1 ソクスレー大型抽出器：抽出管部約6×30cm 受器500ml
- 2 ブレンダー：佐久間製作所
- 3 日立203型けい光光度計
- 4 紫外線灯：マナスライト365m μ
- 5 ローターエバポレーター：矢沢製作所
- 6 カラムクロマト装置：Fig 1 参照
- 7 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, ハンギング式展開槽 (東洋科学産業)

2-B. 操作法

抽出：茶の場合：試料100gを大型ソクスレー抽出管に入れる。抽出管の底部のサイホン管の開口部には、あらかじめガラス綿を軽くつめておく。受器にはメタノール400ml, 水酸化カリウム 20g およびテフロン被覆の小攪拌子を入れ、抽出受器中の液を軽くかきまぜながら、加熱し、5～6時間抽出する。

のり、かつおぶし、ハムの場合：のりはそのまま、かつおぶしはけずったものをそれぞれ100gを抽出管に入れる。ハムは100gを秤りブレンダーに入れ、50gの無水硫酸ナトリウムを加えたのち、細切したものを抽出管にとる。ハムの場合のみ、抽出管の底部にはガラス綿の上にさらに小ガラス玉数個を入れてから試料を入れる。受器にはn-ヘキサン400mlを入れ、加熱し、5～6時間抽出する。

液分配抽出：茶の場合：アルカリ性メタノール抽出液を1lの分液ロートにうつし、n-ヘキサン100mlを用いて3回抽出する。乳濁して分離がわるい時は、乳濁層を3000rpmで5分間遠心分離を行なう。n-ヘキサン抽出液を合せ水50mlを用いて3回洗浄する。水で洗ったn-ヘキサン抽出液についての以後の操作は、のり、かつおぶし、ハムの場合の操作法と全く同じに行う。

のり、かつおぶし、ハムの場合：n-ヘキサン抽出液を1lの分液ロートにうつし、リン酸50mlずつを用いてふりまぜ、下層のリン酸層が紫外外部線によっていちぢるしいけい光を認めなくなるまでリン酸洗浄をくり返す。リン酸は別の500ml分液ロートに合せ、n-ヘキサン50mlを用いて1度ふりまぜて洗い、分離したn-ヘキサンをもとのn-ヘキサン抽出液に合せる。n-ヘキサン抽出液には水50mlずつ用いて2～3回洗浄する。

次にn-ヘキサン抽出液をD.M.S.O 100mlずつを用いて3回抽出を行なう。D.M.S.O層を合せ、300mlの水および塩化ナトリウム 50gを加えてふりまぜたのち、この液の温度が室温になるまで放置する。

上記の液に再びn-ヘキサン100mlずつ加えて3回抽出を行う。n-ヘキサン抽出液を合せ、水浴上でエバポレーターにより液を濃縮し約10～20mlとする。無水硫酸ナトリウム適量を加えて乾燥したのち、濃縮液を30mlナスコルペンにうつし、硫酸ナトリウムには少量のn-ヘキサンを加えて数回洗い、濃縮液と合せ、さらに1～2mlまで濃縮する。

カラムクロマトグラフィー：Fig 1に示すカラムを用いて、1%含水アルミナカムラの上に濃縮液をのせ、n-ヘキサン：エーテル(2：1)を用いて展開させる。溶出液は50mlから90mlまでをとる。

各フラクションはそれぞれ約1ml位まで濃縮したのち、n-ヘキサンを用いて10mlの共栓目盛付小試験管にうつし、さらにn-ヘキサンを加えて全量を4mlとする。この液につきけい光を測定する。

けい光測定による定量：けい光分光計を用い、励起波長366m μ において、400, 405, 410m μ および425, 430, 435m μ のそれぞれ3点のけい光強度を測定し、Baseline techniqueにより、次式から

I を求め、3,4-ベンツオピレンの標準液から作った検量線から濃度を算出する。

$$I = I_{405(430)} - (I_{400(425)} + I_{410(435)}) / 2$$

検量線：3,4-ベンツオピレンの0.01~0.1ppmの各濃度のn-ヘキサン溶液につき、上記の通り、けい光を測定し、このIと3,4-ベンツオピレンの濃度との関係を、横軸に濃度を、縦軸にIをPlotして検量線を作る。

薄層クロマトグラフィーによる同定：けい光測定を行なった液を再びもとの10ml小試験管にうつし、0.5ml位まで濃縮する。薄層板の下端から2cmの位置に、標準の3,4-ベンツオピレン液、展開の指標とするバターイエロー液を

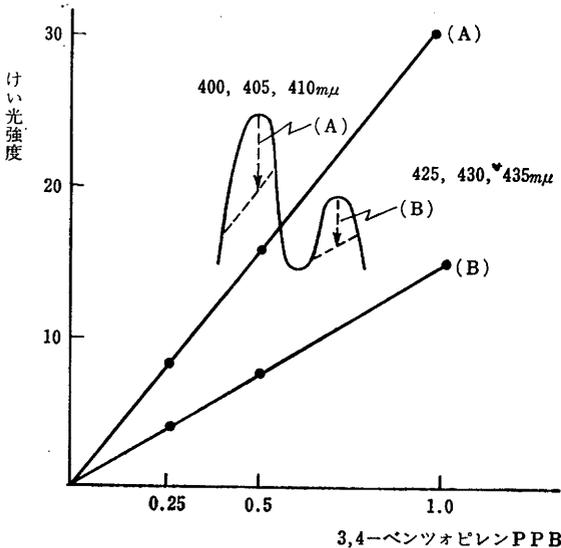


Fig 2

Baseline法による3,4-ベンツオピレンの検量線

(A) 400, 405, 410mμからえられる線

(B) 425, 430, 435mμからえられる線

励起波長366mμ SENS 5×1日立203型けい光分光光度計

いて別の小試験管にろ過する。抽出をくり返し、全量を4mlとする。この液につき、350~500mμまでのけい光スペクトルを測定し、標準3,4-ベンツオピレンのn-ヘキサン溶液のけい光スペクトルと全く同一の型を示すことを確認する。

③ 実験結果

上記方法にしたがって食品より分離し、さらに定量したけい光のピークが、確かに3,4-ベンツオピレンのものであることを確認した結果得られた、食品中の3,4-ベンツオピレンの含量、および諸外国の文献の値もあわせて示すとTable 1の通りである。

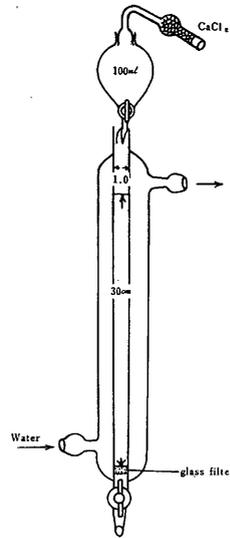


Fig 1

カラムクロマト装置

それぞれ両端に2点ずつスポットし、スポットからそれぞれ1cmずつ離して中央部に、上記の濃縮液を約5mm巾の帯状に塗布する。薄層板を軽く乾燥後、ハンギング式展開槽に約30分つるした後、展開溶媒の先端が原点より約13cm上昇するまで展開する。薄層板は軽く乾燥したのち、紫外線をあて、標準の3,4-ベンツオピレンのけい光スポットと全く同じR_Bを示すけい光帯を、金属ヘラを用いてけずり取る。けずり取ったシリカゲルを小試験管にうつし、少量のn-ヘキサンを加えて抽出し、小ガラスフィルターを用

白鳥：食品中の3, 4ベンツォピレン含有量について

Table I 各種食品中の3,4-ベンツォピレン含有量 (PPb)

分 析 食 品		白石らの方法 による分析値	増 田 の 方 法 による分析値	Grimmer の 方 法による分析値	Howardの方法 による分析値	その他の報告者 による分析値
日 本 茶	煎 茶	14.0				
		16.0				
		4.7				
	玉 露	1.6				
		0.5				
ほ う じ 茶		6.4				
		4.0				
麦 茶	検出せず	検出せず ¹¹⁾				
の り		7.4				
		12.0				
		31.3				
さ ば ぶ し	8.7	7 ¹²⁾				
本 かつ おぶし	27.2	9 ¹²⁾				
し ょ う 油		検出せず ¹¹⁾				
ほたるいかくんせい	11.4					
焼 魚		0.9 ¹¹⁾				
ス テ ー キ						8 ¹⁸⁾
ハ ム	0.0				1.0 3.2	
ソ ー セ ー ジ				0.06 ⁹⁾ 0.3	0.8	0.5 ¹⁶⁾
にしんくんせい					1.0 ¹⁰⁾	
ハ ム くんせい				0.06 ⁹⁾	3.2 ¹⁰⁾	<0.5 ¹⁶⁾ <0.5 <0.5
ベ ー コ ン						検出せず ¹⁶⁾ // 18)
にわとりくんせい						<0.5 ¹⁶⁾ 0.7 <0.5
チ ー ズ						検出せず ¹⁶⁾
コ ー ヒ ー				0.3 ⁵⁾ 1.3 0.4 0.3		検出せず ¹⁶⁾ //

紅	茶		3.9 ⁶⁾ 3.9 21.3		
スコッチウイスキー		検出せず ¹⁷⁾			検出せず ¹⁶⁾
大豆油			1.5~1.9 ⁷⁾		
落花生油			1.5~2.7		
野菜	チサ		12.8 ⁴⁾ 4.1 5.3		
		トマト	0.2 ⁴⁾		
		キャベツ	24.5 ⁴⁾ 20.4		

④ ま と め

食品中に含まれる発がん性多核芳香族炭化水素の3,4-ベンツォピレンの定量法として、白石らの方法に準じ、主として日本個有の食品について分析を行ない、あわせて諸外国の文献に報告された各種食品中の3,4-ベンツォピレン量と比較した。

日本茶(最高値16ppb)、かつおぶし(最高値27.2ppb)、のり(最高値31.3ppb)、ほたるいかくんせい(最高値11.4pdb)などの分析値は、他の文献による値に比べ、その含量が高いという事がわかったが、いずれもppbの単位であり、この分析値をもって、ただちに発がん性との相関について論ずるのは早急にすぎると考えられる。上記食品以外の市販食品については現在検討中である。

終りに臨み、本研究に御指導を賜った公衆衛生院の白石慶子医博に深く感謝致します。

文 献

- ① Cook, J. W., Hewett, C. L. and Hieger, I., J. Chem. Soc. 395 (1933)
- ② G. Grimmer, A. Hilbrandt : J. Chromatog., 20, 89 (1965)
- ③ G. Grimmer, A. Hilbrandt : Z. Krebsforsch., 67, 272 (1965)
- ④ G. Grimmer, A. Hildbrandt : Dtsch. Lebensmittel Rdsch., 61, 237 (1965)
- ⑤ G. Grimmer, A. Hildbrandt : ibid., 62, 19 (1966)
- ⑥ G. Grimmer, A. Hildbrandt : Z. Krebsforsch., 69, 223 (1967)
- ⑦ G. Grimmer, A. Hildbrandt : Arch. Hyg., 152, 255 (1968)
- ⑧ G. Grimmer, A. Hildbrandt : Dtsch. Lebensmittel Rdsch., 65, 229 (1969)
- ⑨ J. W. Horward, T. Fazio : Agricult. Food chem., 17, 527 (1967)
- ⑩ Howard, J. W., Teague, R. T., White, R. H., and Fry, B. E., J. of the A. O. A. C 49, 595—611 (1966) 49, 611—617 (1966)
- ⑪ Y. Masuda, K. Mori, M. Kuratsune : GANN, 57, 133—142 : April, 1966
- ⑫ Y. Masuda, M. Kuratsune : GANN, 62, 27—30 : Feb. 1971
- ⑬ 白石, 白鳥, 坂上 : 食衛誌投稿中
- ⑭ 白石, 白鳥, 坂上 : 食衛誌投稿中
- ⑮ I. Berenblum, R. Schoental : J. Chem. Soc. 1017 (1946)

白鳥：食品中の 3, 4 ベンツォピレン含有量について

- ⑯ A. J. Malanoski, E. L. Greenfield et. al., J. of the A. O. A. C 51, 114 (1968)
- ⑰ Y. Masuda, K. Mori, T. Hirohata, M. Kuratsune : GANN, 57, 549—557 : October 1966
- ⑱ W. Lijinsky, B. Shubik : Science 145, (3627), 53—5 (1964)