食品中の多核芳香族炭化水素の定量

(I) 国産茶類中の 3, 4-ベンズピレン

(昭和 46 年 8 月 3 日受理)

白石 慶子^{*1} 白鳥つや子^{*2} 坂上 米次^{*1}

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods

(I) 3, 4-Benzopyrene in Japanese Teas

Yoshiko SHIRAISHI, Tsuyako SHIROTORI, Yoneji SAKAGAMI

(*¹The Institute of Public Health: 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo;

*²Tokyo College of Domestic Science: 1-18-1, Kaga Itabashi-ku, Tokyo)

A method for the determination of 3, 4-benzopyrene in Japanese teas has been developed. Japanese teas were extracted and saponified with alkaline methanol in Soxhlet extraction apparatus. The extracts were partitioned with *n*-hexane, dimethyl-sulfoxide, and *n*-hexane successively, and these partitions were condensed. After 3, 4-benzopyrene was isolated by alumina column chromatography, measured by spectrophotofluorometry and calculated from the wave length of 405 m μ by the "baseline" method. Identification of the hydrocarbon was made by thin layer chromatography.

The recoveries of 3, 4-benzopyrene added to each 100 g of Japanese teas at a level of 20 ppb were ranged from 65 to 86%. However, when Japanese teas were extracted with hot water instead of alkaline methanol, the results were reduced to 0 to 3%. This fact seems to indicate that infusing tea in hot water is safe relating to carcinogen 3, 4-benzopyrene.

3, 4-benzopyrene was found from Japanese teas at levels varying from 0.0 to 16.0 ppb.

(Received August 3, 1971)

I. ま え が き

食品中の発癌性多核芳香族炭化水素である 3, 4-ベンズピレンの含量については、すでに穀類¹⁾、野菜²⁾、コーヒー、紅茶³⁾、肉、くん製品^{4)~10)}、植物油¹¹⁾、酵母¹²⁾などを対象として行なった分析の報告がある。また、日本個有の日常食品を対象としては、増田ら¹³⁾が焼魚、麦茶、しょう油、カラメル等について分析を行なった報告があげられる。

食品中に含有される多核芳香族炭化水素の量はいずれも微量であるため、分析に使用する試料および溶媒量は当然大きくなっている。われわれは分析試料の量を 100 g 程度とし、有機溶媒その他の試薬を日常分析に妥当な量に縮少し、けい光による定量および薄層による同定を

併せて行ない、食品中の 3, 4-ベンズピレンの分析を行なった。今回日本茶について分析を行なったので、その方法ならびに定量結果について報告する。

II. 実験の部

II-1. 試薬:

(1) *n*-ヘキサン: 市販特級品を濃硫酸、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蒸留した。

(2) エーテル: 市販特級品を10%水酸化ナトリウム液、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、塩化カルシウムを加えて乾燥したのち蒸留した。

(3) ジメチルスルホキシド (DMSO): 市販品をウィドマー精留管を用いて減圧蒸留し、DMSO の沸点留分を使用した。

(4) メタノール: 特級品を蒸留した。

*¹ 国立公衆衛生院衛生薬学部: 東京都港区白金台 4-6-1

*² 東京家政大学: 東京都板橋区加賀 1-18-1

- (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-ベンズピレン標準液: 3, 4-ベンズピレン (L. Light & Co., Ltd. Colnbrook, England) をベンゼン, メタノールを用いて再結晶を行なった. (mp. 176~177.5°) この結晶 0.001 g を正確に秤り, *n*-ヘキサンにとかし 10.0 ml とした. 標準液 1 ml = 100 μ g 3, 4-ベンズピレン.
- (9) *o*-ジクロロベンゼン: 市販品を濃硫酸, 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) ビリジン: 市販特級品を2%過マンガン酸カリウム液を用いて, 著しく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乾燥し, 蒸留した.
- (11) バターイエロー液: 試薬バターイエロー 0.5 g を秤り, *n*-ヘキサンにとかし 100 ml とした.
- (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1N塩酸に浸して洗い, 十分水洗したのち, 電気乾燥器中に約110°で2~3時間乾燥する. つぎに電気炉中に入れ, 約500°で2~3時間加熱したのち, デンケーターに放冷する. 乾燥アルミナに対し1% (v/w) の水を加え, 共センビンに入れ, よくふりまぜ2~3時間放置した.
- (13) 薄層展開溶媒: *n*-ヘキサン, *o*-ジクロロベンゼンおよびビリジンを10:1:0.5の割合に混和した.

II-2. 装置, 器具:

- (1) ソクスレー大型抽出器: 抽出管部分約6×30 cm, 受器容量 500 ml.
- (2) 日立 203 型けい光分光計:
- (3) 紫外線灯: マナスル化学工業製マナスルライト 365 m μ
- (4) ローター・エバポレーター: 矢沢製作所製
- (5) カラムクロマト装置: Fig. 1 参照
- (6) 薄層クロマト装置: 薄層板・DC-キーゼルゲル 20×20 cm (E. Merck 社製). 展開槽・ハンギング式展開槽 (東洋科学産業製)

II-3. 分析用試料:

市販の玉露, せん茶, ほうじ茶, 麦茶を使用した.

II-4. 操作法:

- (1) アルカリ性メタノール抽出: 試料 100 g を秤り, 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. 抽出受器にはメタノール 400 ml, 水酸化ナトリウム 20 g およびテフロン被覆の小かく拌子を入れ, 電気水浴中で, 抽出受器内の液をかき混ぜながら, 5~6時間抽出する. 抽出液を1Lの分液ロートにうつし,

抽出受器は少量のメタノールを用いて数回洗い洗液は分液ロートに合わせる.

- (2) 熱湯抽出: 茶は日常飲用するには熱湯を使用することを考え, 有機溶媒を使用せず, 熱湯を用いて以下の抽出操作を行ない, 抽出条件の差による分析結果について検討を行なった.

試料 100 g を丸底 1 L フラスコに入れ, 水 700 ml を加えたのち, 冷却管を付し, マントル型電気ヒーターを用い, 約 100° で 5~6 時間加熱した. 熱時, 大型目皿ガラスロートを用いて熱湯抽出液をできるだけ過したのち, メタノール約 100 ml を用いて丸底フラスコを洗い, さらにその洗液をロート上の茶に注いで洗い, さきの熱湯抽出液とともに 1 L の分液ロートにうつし, 以下の分配抽出を行なった.

- (3) 分配抽出: アルカリ性メタノール抽出液および熱湯抽出液にはそれぞれ *n*-ヘキサン 100 ml を加えて振り混ぜた. 上下両層の間に乳濁状の層を生じた場合は, 下層の分離した部分のみを別の 1 L 分液ロートにうつす. 乳濁層は約 5 分間 3000 rpm で遠心分離を行ない, 分離した上下の液をそれぞれの分液ロートにうつす. さらに 2 回, *n*-ヘキサン 100 ml で抽出をくり返し, *n*-ヘキサン抽出液を合わせる.

つぎに水 50 ml ずつを用いて 3 回, *n*-ヘキサン抽出液を洗う. 水層は別の 200 ml 分液ロートに集め, 塩化ナトリウム 15 g を加えて溶かしたのち, *n*-ヘキサン 30 ml ずつを用いて 2 回振り混ぜて洗い, *n*-ヘキサン層をさきの *n*-ヘキサン抽出液に合わせる.

n-ヘキサン抽出液にリン酸 50 ml を加えて振り混ぜ, リン酸層を別の分液ロートにとる. 同様の操作を, 下層のリン酸層が紫外線灯 (365 m μ) 下に著しいけい光を認めなくなるまでくり返す.

リン酸層を集め, *n*-ヘキサン 50 ml ずつを用いて 1~2 回洗い, ヘキサン層を再び *n*-ヘキサン抽出液に合わせる.

n-ヘキサン抽出液は水 50 ml ずつで洗い, 水層が紫外線灯下に著しいけい光を認めなくなるまでくり返す.

つぎに *n*-ヘキサン抽出液を DMSO 100 ml ずつを用いて 3 回抽出する. DMSO 抽出液を合わせ, DMSO と同量の水を加えて振り混ぜ, 液の温度が室温になるまで放置する.

水でうすめた DMSO 抽出液に塩化ナトリウム 50 g を加えて溶かしたのち, *n*-ヘキサン 100 ml ずつを用いて 3 回抽出を行なう. *n*-ヘキサン抽出液を合わせ, 水浴上でエバポレーターを用い, 約 10 ml になるまで減圧濃縮し, 無水硫酸ナトリウム少量を加え放置する. 乾燥した濃縮 *n*-ヘキサン抽出液は 30 ml のナス形フラスコにうつし, 硫酸ナトリウムは *n*-ヘキサン少量を加えて, 数回洗い, 洗液を同じナス形フラスコに合わせ, エバポレーターで 1~2 ml になるまで濃縮し, つぎのカラム

クロマトグラフィーを行なう。

(4) カラムクロマトグラフィー:

Fig. 1 に示すカラム管に 1% 含水アルミナをつめ、濃縮抽出液をのせ、*n*-ヘキサン・エーテル (1:1) を用いて展開させる。溶出液は 20 ml から 40 ml までのものをとり、水浴上で約 1 ml になるまで減圧濃縮し、10 ml の目盛付共セン小試験管にうつし、さらに *n*-ヘキサンを加え、全量を 4 ml とする。この液についてけい光強度を測定し、定量を行なう。

Fig. 1. Apparatus of Column Chromatography

(5) けい光測定による定量:

けい光分光計を用い、励起波長 366 mμ において、400, 405, 410 mμ および 425, 430, 435 mμ のそれぞれ 3 点のけい光強度を測定し、ベースライン法⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾により、次式から *I* を求め、3, 4-ベンズピレンの標準液から得た検量線より濃度を算出する。

$$I = I_{405}(480) - (I_{400}(425) + I_{410}(435))/2$$

検量線: 3, 4-ベンズピレンの 0.01~0.1 ppm の各濃度の *n*-ヘキサン溶液について、上記の通りけい光を測定し、この *I* と 3, 4-ベンズピレンの濃度との関係を plot して検量線を作る。(Fig. 2)

(6) 薄層クロマトグラフィーによる同定:

3, 4-ベンズピレンはそのけい光スペクトル (Fig. 3) において特徴あるピーク、405 および 430 mμ により同定しうるが、より確実に断定するため、松下ら⁽¹⁶⁾の方法に準じ、以下のような薄層クロマトグラフィーを行なった。

けい光測定の終わった液をふたたびもとの 10 ml 共セン小試験管にうつし、水浴上で約 0.5 ml になるまで濃縮

Fig. 2. Calibration curves of 3, 4-benzopyrene for baseline-technique

(A) obtained from the wave length of 400, 405, 410 mμ

(B) obtained from the wave length of 425, 430, 435 mμ

at excitation 366 mμ. Sensitivity 6×10 HITACHI 203 Fluorescence Spectrophotometer

する。

薄層板の下端から 2 cm のところに、3, 4-ベンズピレン標準液、展開の指標としてバタイエロー液をそれぞれ両側端に 2 点ずつスポットし、スポットからそれぞれ 1 cm ずつ離して、中央部分に薄層用の試料濃縮液を約 5 mm 幅の带状に塗布する。薄層板を軽く乾燥し、展開槽に約 30 分つるしたのち、溶媒の先端が原点より約 13 cm 上昇するまで展開する。

薄層板は軽く乾燥したのち、紫外線を照射し、標準の 3, 4-ベンズピレンのけい光スポットとまったく同じけい光色および R_B を示すけい光帯を、金属へらを用いて印をつけ、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*-ヘキサンを加えて振り混ぜ抽出し、上澄液を小ガラスフィルターでろ過し、別の小試験管に入れる。この抽出操作をくり返し、全量を 4 ml とする。この液につき、励起波長 366 mμ において、350 mμ から 500 mμ までのけい光スペクトルを測定し、標準の 3, 4-ベンズピレン *n*-ヘキサン溶液のけい光スペクトルとまったく同一の形を示すことを確認する。

なお、上記の条件で、3, 4-ベンズピレンならびに類縁の多核芳香族炭化水素を展開させた際の R_B ならび

Table 1. R_B Values of the Polycyclic Hydrocarbons by the Thin Layer Chromatography

Hydrocarbons	R_B^*	Fluorescence colour
Pyrene	1.70	yellow green
1, 2-benzanthracene	1.56	purple
Fluoranthene	1.66	light blue
Naphthacene	1.50	yellow green
1, 12-benzopyrene	1.22	purple
3, 4-benzopyrene	1.37	purple
Anthracene	1.85	purple
Chrysene	1.46	pink
1, 2, 5, 6-dibenzanthracene	1.19	purple
3-methylcholanthrene	1.48	purple

* R_B : Movement of hydrocarbons relative to that of butter yellow

に各々のけい光色を Table 1 に示した。

III. 実験結果および考察

市販のせん茶、玉露、ほうじ茶、麦茶について、20 ppb の 3, 4-ベンズピレンを添加したのち、上記の分析法に従って定量を行なった場合、その回収率は Table 2 に示すとおり、アルカリ性メタノール抽出による場合は 65~86%，熱湯抽出による場合は 0~3% であった。そこで、熱湯抽出法を行なう試料に対し、はじめに添加せず、ソクスレー抽出の終った熱湯ろ液を室温にまで放置したのち、あらためて 3, 4-ベンズピレン 16 ppb を添加して操作し、回収率をみたところ 88% であった。この事実は、日常茶を飲用する場合に、茶から熱湯による 3, 4-ベンズピレンの抽出はほとんど問題ないことを示すものであろう。

Table 2. Recoveries of 3, 4-Benzopyrene added to 100 g of Japanese Teas at a Level of 20 ppb

Japanese teas	Sample weight (g)	Recovery (%)
Sencha	70	86
	100	3*
	100	0*
Mugicha	60	70
Hojicha	65	65

* This recovery was obtained by hot-water extraction procedure

また、市販の日本茶について、アルカリ性メタノール抽出法により分析を行なった結果を Table 3 に示した。

Table 3. 3, 4-Benzopyrene Found in Japanese Teas

Japanese tea	No. of runs	3, 4-benzopyrene (ppb)
Sencha	4	14.0 N. D
		16.0 4.7
Gyokuro	3	1.6 N. D
		0.5
Hojicha	3	N. D 6.4
		4.0
Mugicha	2	N. D N. D

N. D: not detected

すなわち、日本茶の中にはまったく検出しないものから、最高 16.0 ppb までの 3, 4-ベンズピレンを検出した。また実際の茶葉とは関係ない麦茶からは検出しなかった。

ベースライン法でけい光を測定した 3, 4-ベンズピレン溶出フラクションをさらに同定のため薄層クロマトグラフィーを行なった場合、3, 4-ベンズピレン以外の他の 2, 3 の炭化水素のけい光帯を認めたが、ベースライン法によればそれらの影響は認められなかった。

薄層上で R_B を確認し、これをかきおとし、 n -ヘキサンに溶出させた液のけい光スペクトルは Fig. 3 に示

Fig. 3. Fluorescence spectra of 3, 4-benzopyrene isolated from Japanese tea

solid line, obtained from the proposed method; broken line, reference. emission spectra at excitation 366 m μ . sensitivity 5×1 , HITACHI 203 Fluorescence Spectrophotometer.

すとおりで、標準 3, 4-ベンズピレンのスペクトルとまったく同じ形を示した。

上記のカラムクロマトグラフィーによる 3, 4-ベンズピレンの溶出フラクションは 20 ml から 40 ml の間であるが、アルミナのロットによる差、使用する溶剤の脱水状態、その他の原因により、しばしば溶出範囲に多少の変動を認めた。このため、アルミナの活性化、溶剤の乾燥など、一定条件を守った上、さらに溶出フラクションの前後をそれぞれ 20 ml ずつとり、各フラクションも同様にけい光測定を行なうことにより、溶出状態の多少の変動に関係なく、3, 4-ベンズピレンをいずれかのフラクションに捕え、定量することができた。

3, 4-ベンズピレンの定量はそれぞれ 405 および 430 m μ におけるピークをとりあげているが、類縁の多核芳香族炭化水素のけい光スペクトルは Fig. 4 に示すとおり、405 および 430 m μ 付近にピークを有するものもあるが、405 および 430 m μ の 2 個所にピークを示すものは認められない。

しかしながら、食品に由来する未知のけい光物質の存在を考える場合、3, 4-ベンズピレンの定量は、薄層ク

ロマトグラフィーによる同定を併せて行なわなければ正確を期しがたい。すなわち、薄層による R_F 、けい光色、およびけい光スペクトルの 3 つを併せて確認することにより、より完全な定量を行なうことができる。

なお、カラムクロマトグラフィーで得られる 3, 4-ベンズピレン溶出フラクション以外の 20 ml ずつの溶出各フラクションの濃縮液を、(6) の薄層クロマトグラフィーにしたがって操作し、その R_F 、けい光色およびけい光スペクトルから、3, 4-ベンズピレン以外の多核炭化水素としてフェナンスレン、ピレンおよびフルオランセンの存在を認めた。

IV. ま と め

せん茶、玉露、ほうじ茶、麦茶中の発癌性多核芳香族炭化水素 3, 4-ベンズピレンの定量を行なった。定量法は試料のアルカリ性メタノール抽出、液分配抽出、カラムクロマトグラフィーを行ない、ベースライン法によるけい光測定を行ない、さらに薄層クロマトグラフィーによる判定を併せて行なった。

この方法による 20 ppb 添加に対する回収率は 65~86 %であった。

市販品の分析結果は、せん茶 0.0—16.0 ppb、玉露 0.0—1.6 ppb、ほうじ茶 0.0—6.4 ppb、麦茶 0.0 ppb、を示した。

なお、3, 4-ベンズピレン添加後、熱湯抽出により分析した結果は、回収率 0.0—3.0 %を示し、日常飲用する場合の茶の熱湯浸出条件では、3, 4-ベンズピレンの抽出はほとんど問題がないことを認めた。

文 献

- 1) Grimmer, G., Hildbrandt, A.: Z. Krebsforsch. **67**, 272 (1965).
- 2) Grimmer, G., Hildbrandt, A.: Dtsch. Lebensmittel Rdsch. **61**, 237 (1965).
- 3) Grimmer, G., Hildbrandt, A.: ibid. **62**, 19 (1966).
- 4) Grimmer, G., Hildbrandt, A.: Z. Krebsforsch. **69**, 223 (1967).
- 5) Bailey, E. J., Dungal, N.: Brit. J. Cancer **12**, 348 (1958).
- 6) Lijinsky, W., Schubik, B.: Science **145** (3627), 53 (1964).
- 7) Howard, J. W., Teague, R. T., JR., et al.: J. Assoc. Offic. Anal. Chemists **49**, 595 (1966).
- 8) Howard, J. W., White, R. H., et al.: ibid **49**, 611 (1966).
- 9) Lijinsky, W., Schubik, P.: Toxicology and Applied Pharmacology **7**, 337 (1965).
- 10) Malanoski, A. J., Greenfield, E. L., Barnes, C. J., Worthington, J. M.: J. Assoc. Offic. Anal. Chemists **51**, 114 (1968).

Fig. 4. Fluorescence spectra of polycyclic-hydrocarbons (2 ppm *n*-hexane solutions): emission spectra at excitation 366 m μ . sensitivity 5×1 , HITACHI 203 Fluorescence Spectrophotometer

- · — · — · — anthracene
- 3-methylcholanthrene
- 1, 12-benzoperyrene
- - - - - fluoranthene
- - - - - 1, 2-benzanthracene
- · - · - · - naphthacene
- × — × — × — × pyrene, chrysene, 1, 2, 5, 6-dibenzanthracene

-
- 11) Grimmer, G., Hildbrandt, A.: Arch. Hyg. **152**, 255 (1968).
 - 12) Grimmer, G., Hildbrandt, A.: Dtsch. Lebensmittel Rdsch. **65**, 229 (1969).
 - 13) Masuda, Y., Mori, K., Kuratsune, M.: GANN **57**, 133 (1966).
 - 14) Commins, B. T.: Analyst **83**, 386 (1958).
 - 15) Cooper, R. L.: ibid. **79**, 573 (1954).
 - 16) Matsushita, H., Suzuki, Y., Sakabe, H.: Bull. Chem. Soc. Japan **36** (10), 1371 (1963).