食品中の多核芳香族炭化水素の定量 (第4報)

魚介類中の 3,4-ベンズピレン

(昭和 50 年 2 月 6 日受理)

白石慶子^{*1} 白鳥つや子^{*2} 高島英伍^{*1}

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods (IV)

3,4-Benzopyrene in Fish and Shellfish

Yoshiko SHIRAISHI^{*1}, Tsuyako SHIOTORI^{*2} and Eigo TAKABATAKE^{*1}(*¹The Institute of Public Health: 6-1, Shirokanedai 4-chome, Minato-ku, Tokyo;*²Tokyo College of Domestic Science: 18-1, Kaga 1-chome, Itabashi-ku, Tokyo)

An analytical method was investigated for 3,4-benzopyrene in fish and shellfish being consumed usually in our daily foods. It was found that the unknown substances extracted from the samples containing high amount of fat interfered the fluorescence of benzopyrene in the final fraction. In order to avoid this obstruction, the clean up step of chromatography on a silica gel column (1×30 cm) with petroleum ether: ether (9:1) was added to the method for vegetables previously published. The determination of 3,4-benzopyrene in the samples by the presented method was possible without any trouble.

The recovery of 3,4-benzopyrene added to 100 g of mackerel at a level of 2 ppb was 45.6% by the former method in which silica gel chromatography was not operated, but 91.0% by the improved method. No interference on the fluorescence of 3,4-benzopyrene was exerted by stearic acid, palmitic acid, behenic acid, lauric acid, myristic acid, cholesterol, or lecithin.

The analysis by the improved method for commercially available fish and shellfish showed no 3,4-benzopyrene in 11 out of 19 samples but the concentration between 0.08 and 9.85 ppb in other samples.

(Received February 6, 1975)

1. ま え が き

我が国における食品中の発がん性多核芳香族炭化水素 3,4-ベンズピレンの含有量の実態のは握、および定量法確立のため、現在までに国産茶¹⁾、日常食品²⁾、野菜³⁾、果実⁴⁾など50種、約100検体について分析し、その結果について報告してきた。我々はさらに、我が国の食生活上大きな比重を占める魚介類について分析を行ったので、その方法と結果について報告する。

2. 実験の部

2.1 試 薬

1) 溶媒: *n*-ヘキサン, エーテル, ジメチルスルホキシド (DMSO), メタノール, 石油エーテルなどはいず

れも特級品を蒸留して使用した。

2) リン酸: 特級品 (85%以上)

3) 硫酸ナトリウム (無水), 塩化ナトリウム (いずれも特級品)

4) 3,4-ベンズピレン標準液: 3,4-ベンズピレン 100 ppm *n*-ヘキサン溶液。

5) ステアリン酸, パルミチン酸, ベヘン酸, ラウリン酸, ミリスチン酸, イソステアリン酸, コレステロール, 大豆レシチンはパピリオ化粧品(株)提供による研究用精製品を使用した。

6) カラムクロマト用アルミナ: 前報に準じ、5および1%含水アルミナを調製した。

7) カラムクロマト用シリカゲル: キーゼルゲル (メルク社製 0.2~0.5 mm, 30~70 mesh ASTM) を電気乾燥器中に約110°で1~2時間乾燥したものを使用し

*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

た。

2.2 装置, 器具

1) ソクスレー抽出器: 抽出管部分約 5×26 cm, 受器容量 500 ml.

2) けい光分光光度計: 日立 MPF-4 型けい光分光光度計.

3) 紫外線灯: 365 nm.

4) ロータリーエバポレーター.

5) クロマト用カラム管: 1%含水アルミナ用, およびシリカゲル用はいずれも 1×40 cm, 外套冷却管付, 5%含水アルミナ用は 2×30 cm.

2.3 分析試料

a) アジ, b) サケ, c) ニジマス, d) ニシン, e) スルメイカ, f) サンマ, g) カレイ, h) キス, i) サバ, j) ワカサギ, k) クルマエビ, l) アサリ, m) ハマグリ, n) シジミ, o) イワシ, p) ホタテガイ, q) セイゴ, r) カニ, s) マダイ, などは昭和49年1月から12月までに, 東京都内で購入した市販品である.

魚は頭, 尾, 骨などを除いた可食部 100~500 g を秤り, 細切した後, 貝類は殻を除いたものを, 電気乾燥器

中で60~70°で乾燥した後, 以下の操作を行った.

2.4 操 作

魚介類を分析するに当たって, 従来我々が確立した前報の分析法をそのまま応用した場合, 油脂分の多い魚介類では, 最終のけい光測定用濃縮液に未知物質が存在し, これが3,4-ベンズピレンのけい光を妨害することを認めた. そこで, 未知の妨害性物質を最終測定用液から除くため, カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを検討し, シリカゲルカラム (展開溶媒: 石油エーテル・エーテル9:1) により, 3,4-ベンズピレンは展開溶媒の落下とともに最先端に溶離し, 未知物質はカラムに保持されたまま, 完全に分離することを確認した.

上記の結果, 魚介類の分析は, 前報の操作法のうち, カラムクロマトグラフィーの項に改良を加え, 以下のとおり行った.

1) アルカリ性メタノール抽出

乾燥した試料をソクスレー抽出器に入れ, 受器に固形水酸化カリウム 20 g を加え, メタノール抽出を行う. 抽出を終わったアルカリ性メタノール液は, 従来はただちに液一液分配抽出を行ったが, 魚介類の場合, 10%塩酸を加え, 試料液の pH を 3~4 にした後, *n*-ヘキサ

Table 1. Comparison of the Recoveries of 3,4-Benzopyrene between Original and Improved Method

Fish	Original method (%)	Improved method (%)
Mackerel (Saba)	46.8 44.4	91.0
Pacific saury (Sanma)	37.6	80.5
Bacon	trace, trace, trace	85.0, 81.6, 104.1

200 ng of 3,4-benzopyrene was added to each 100 g of sample (2 ppb).

Table 2. Effect of the Fatty Acids, Phosphatide and Cholesterol on Fluorescence Intensity of 3,4-Benzopyrene

	Fluorescence intensity
5 ppb 3,4-Benzopyrene <i>n</i> -hexane standard soln.	44.4
10 ppm Stearic acid-containing 3,4-bp. std. soln.	46.4
10 ppm Palmitic acid-	" 45.6
10 ppm Behenic acid-	" 44.5
10 ppm Lauric acid-	" 44.9
10 ppm Myristic acid-	" 44.2
10 ppm Iso-stearic acid-	" 46.0
10 ppm Cholesterol-	" 44.4
10 ppm Lecithin-	" 46.6

The wave length of excitation was 383 nm and that of fluorescence 403 nm.

Ex. slit 10 nm. Em. slit 2 nm. Sens. ×10 F6, HITACHI MPF-4 Fluorescence Spectrophotometer.

Table 3. The Amounts of 3,4-Benzopyrene in Fishes and Shellfishes

Fishes and Shellfishes	Wet weight (g)	Dry weight (g)	3,4-Benzopyrene found (ppb) by wet weight
a) Jack mackerel (aji)	100	—	N. D.
b) Salmon (sake)	180	60	0.10
c) Rainbow trout (nijimasu)	202	—	N. D.
d) Herring (nishin)	200	75	N. D.
e) Squid "surume"	505	125	1.04
f) Pacific saury (sanma)	340	137	0.12
g) Flatfish (karei)	230	67	N. D.
h) Sand borer (Kisu)	202	60	N. D.
i) Mackerel (saba)	332	209	0.08
j) Pond smelt (wakasagi)	200	48	N. D.
k) Prawn (ebi)	135	106	0.08
l) Short neck clam (asari)	1000	47	N. D.
m) Clam (hamaguri)	1000	45	N. D.
n) Corb shell (shijimi)	1000	47	N. D.
o) Sardine (iwashi)	203	65	0.21
p) Scallop (hotategai)	182	39	9.85
q) Seigo	68	22	N. D.
r) Crab	390	120	N. D.
s) Sea-bream (madai)	215	55	0.14

ン抽出などによる液一液分配抽出を行った。

2) 液一液分配抽出

前報に準じて行った。

3) カラムクロマトグラフィー

5%含水アルミナカラムによる *n*-ヘキサン溶出液 250 ml をとり、1~2 ml に濃縮した後、次のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行う。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー：シリカゲルカラム (1×30 cm) に上記濃縮液をのせ、石油エーテル・エーテル混液 (9:1) を流し、溶出液 50 ml をとる。溶出液は再び濃縮し、前報に準じ 1%含水アルミナカラムクロマトグラフィーを行う。

4) けい光測定による定量

けい光光度計を用い、れい起波長 383 nm において、400, 403, 406 nm の 3 点のけい光強度を測定し、同時に 3,4-ベンズピレン標準液を *n*-ヘキサンで薄めて調製した 100 ppb 液を同じ条件下で測定し、ベースライン法による標準液の値に対する比例計算で、検液中の濃度を算出した。

3. 実験結果

3.1 カラムクロマトグラフィー改良法による回収率の向上

サバ、サンマ、それぞれ 100 g の試料に、200 ng の 3,4-ベンズピレンを添加 (2 ppb) した後、前報に準じ分

析を行った場合、回収率は添加量の約 1/2 に過ぎなかった。しかしながら、5%含水アルミナおよび 1%含水アルミナを用いるクロマト操作の間に、キーゼルゲルを用いるクロマト操作を行った場合、平均 85.8% の回収率が得られ、キーゼルゲルカラムによるクリーンアップの有用性を確めた (Table 1)。

3.2 高級脂肪酸、コレステリン、レシチンなどの 3,4-ベンズピレンのけい光に及ぼす影響

魚介類の油脂分はアルカリ性メタノールにより加水分解し、高級脂肪酸を生成すると考えられ、また不ケン化物として、コレステリン、レシチンなどの存在も推定される。

そこで、3,4-ベンズピレンのけい光測定を妨害する物質が、これらの物質と関係あるかどうかをみるため、以下のような実験を行った。

ステアリン酸、パルミチン酸、ベヘン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、イソステアリン酸、コレステリン、および大豆レシチンをそれぞれ *n*-ヘキサンに溶かし、これらの 200 ppm 溶液を作る。別に 3,4-ベンズピレン標準液を *n*-ヘキサンで薄めて 10 ppb 溶液を作り、この溶液をそれぞれ上記の各脂肪酸、コレステリン、レシチン 20 ppm 溶液に 1:1 の割合で加えた液を作り、各溶液の 3,4-ベンズピレンのけい光を 403 nm (Excit. 383 nm) で測定した。その結果を Table 2 に示した。

Fig. 1. Fluorescence spectra of 3,4-benzopyrene isolated from bacon (2 ppb of the substance added)

—, std. 3,4-benzopyrene (50 ppb *n*-hexane soln.); ---, obtained from the former method; - · -, obtained from the improved method.

Table 2 によれば, 3,4-ベンズピレン 5 ppb *n*-ヘキサン溶液中に, 2000倍量の高級脂肪酸, コレステリン, レシチンを含有する場合でも, そのけい光測定値は, 標準の 5 ppb *n*-ヘキサン溶液と比べて, 有意差は認められず, 3,4-ベンズピレンのけい光妨害物質は上記以外のものと考えられた。

3.3 市販魚介類の分析結果

市販魚介類の分析結果は Table 3 に示すとおりであった。

19種の魚介類の分析の結果, 11種のものは3,4-ベンズピレンを検出せず, 残りの8種のものの含有量は 0.08~9.85 ppb の範囲であった。

4. 考 察

魚介類は油脂分が多いためアルカリ性メタノールにより抽出を行ったが, この抽出液を従来のように直接 *n*-ヘキサン抽出を行う際, アルカリ性メタノール抽出により生成するセッケン分のため, 両層の分離が困難になる傾向を認めた。そこで10%塩酸を用いてメタノール抽出液

の pH を 3~4 とした後, 従来の液-液分配抽出を行ったところ, 溶媒層の分離が比較的容易となった。

シリカゲルカラムにより魚介類中の3,4-ベンズピレンのけい光妨害物質の影響を除くことができたが, 油脂の多い食品として, 魚以外の食肉製品のベーコンを使用し, 同様の分析を行ったところ, 全く同一の結果が得られた。すなわち, ベーコン 100 g に 200 ng の3,4-ベンズピレン (2 ppb) を加え, 従来の方法で分析を行ったところ (A), 3,4-ベンズピレンはこん跡を検出したに過ぎなかった。そこで改良法として, シリカゲルカラムの操作を加えて分析したところ (B), 回収率90.2%となり, 良好な結果が得られた。

上記実験の (A) および (B) の場合, それぞれ最終測定液のけい光スペクトルを Fig. 1 に示した。

カラムクロマトグラフィーで, 5%含水アルミナ, シリカゲル, 1%含水アルミナカラムの組み合わせは, 油脂分の多い魚介類のみでなく, ベーコンのような食肉にも有用なクリーンアップ法であることは, 上記の結果から明らかなことである。

5. ま と め

1) 魚介類中の3,4-ベンズピレンの定量法につき検討を行った。前回報告した日常食品中の3,4-ベンズピレン定量法に従った場合, 最終けい光測定用溶液中に, 3,4-ベンズピレンのけい光を妨害する未知物質の存在を認めた。そこで, 従来の定量法のカラムクロマトグラフィーの項に, シリカゲルカラム操作 (カラム 1×30 cm, 展開液: 石油エーテル・エーテル9:1) を加えると, 妨害性物質を除くことができた。

2) 3,4-ベンズピレン (200 ng/100 g) を加えたサバ, サンマについて, 前報通りに分析した場合の回収率は 37.6~46.8%, 改良した方法の場合の回収率は 80.5~91.0%を示した。

3) 各種高級脂肪酸 (6種), コレステリン, レシチンなどの3,4-ベンズピレンのけい光に及ぼす影響は認められなかった。

4) 市販魚介類19種のうち, 8種に3,4-ベンズピレンを検出し, その量は 0.08~9.85 ppb の範囲であった。

5) 本分析法は油脂分の多い食肉製品の分析にも適用できることを示した。

文 献

- 1) 白石慶子, 白鳥つや子, 坂上米次: 食衛誌, **13**, 41 (1972).
- 2) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍: 同上, **14**, 173 (1973).
- 3) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍: 同上, **15**, 18 (1974).
- 4) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍: 同上, **16**, 187 (1975).