食品中の多核芳香族炭化水素の定量 (第6報)

植物性油, バターおよびマーガリン中の 3,4-ベンズピレン

(昭和 52 年 2 月 16 日受理)

白石 慶子^{*1} 白鳥 つや子^{*2}

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods (VI)

3,4-Benzopyrene in Vegetable Oils, Butter and Margarine

Yoshiko SHIRAISHI and Tsuyako SHIOTORI

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

*²Tokyo Kasei Daigaku: 18-1, Kaga 1-chome, Itabashi-ku, Tokyo)

The amount of 3,4-benzopyrene was determined in vegetable oils, butter, and margarine according to the method for the foods that had been already published.

3,4-Benzopyrene in vegetable oils was extracted with dimethylsulfoxide after dissolving in *n*-hexane using a separatory funnel, and one in butter and margarine was extracted using the wax extraction apparatus which had been contrived by Shiraishi, *et al.*⁹⁾

The clean up was proceeded through a silica gel column (1×30 cm, petroleum ether: ether (9:1)) and a 1% water containing alumina column (1×30 cm, *n*-hexane: ether (2:1)) in succession and then 3,4-benzopyrene was determined by fluorophotometry.

The recovery of 3,4-benzopyrene by the proposed method was 94.9% for vegetable oils and 95.2% for butter, when 3 ppb of 3,4-benzopyrene was added. In commercial samples, 3,4-benzopyrene was detected at levels of 0.08 to 1.24 ppb in 9 out of 12 samples of vegetable oils, 0.35 to 0.60 ppb in all the 3 samples of butter, and 0.46 to 0.83 ppb in all the 3 samples of margarine on the market.

(Received February 16, 1977)

1. ま え が き

我々は先に、種々の食品^{1),2)}, 野菜³⁾, 魚介類⁴⁾, および果実中⁵⁾の 3,4-ベンズピレンについて分析し、食品中に含有される 3,4-ベンズピレン量の実態をかなり知ることができた。今回ひき続いて、植物性油, バターおよびマーガリンについて分析を行ったので、その方法および分析結果について報告する。

2. 実験方法

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), 石油エーテル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-ベンズピレンの

10.0 ppm *n*-ヘキサン溶液を作り原液とする。用時 *n*-ヘキサンで希釈し、10~50 ppb の一定濃度液として使用する。

5) カラムクロマト用アルミナ 前報³⁾に準じ1%含水アルミナを調製した。

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

2.2 装置, 器具

1) 分液漏斗: 分液漏斗 500 ml

2) ワックス用抽出器⁶⁾: ワックス中の 3,4-ベンズピレンを抽出するために、先に著者らが考案作製した抽出器を、今回のバターおよびマーガリン中の 3,4-ベンズピレン抽出に使用した。

抽出器は Fig. 1 に示すとおり、抽出器のすり合わせ部分はグリースを用いず、必要なときは少量のジメチルスルホキシドを用いた。外とうのヒーターは加熱終了時には、ファスナーを開き、抽出器 (A) からとりはずす

*¹ 国立公衆衛生院: 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

ことができる。

3) けい光分光光度計: (株)日立製作所製 MPF-4 型
けい光分光光度計

4) 紫外線灯: マナスライト 365 nm

5) ロータリーエバポレータ

Fig. 1. Extraction apparatus for butter and margarine

6) クロマト用カラム管: アルミナおよびシリカゲル用カラム管はいずれも $1 \times 40 \sim 45$ cm で外とう冷却管付。

2.3 分析試料

植物性油は a) なたね油, b) 大豆油, c) 綿実油, d) 米油, e) ひまわり油, f) やし油, g) ごま油, h) 天ぷら油, i) サラダオイルで, a) ~ f) は某食品会社から提供されたもので, いずれも精製された食用油である。また, g) ~ i) は市販の食用油を購入した。

2.4 操 作

植物性油, バターおよびマーガリンの分析方法は, すでに前報に報告した方法^{1)~6)}に準ずるものであるが, 試料からの抽出方法およびカラム操作の組合せなど, 若干異なる点を含め, 全体の術式について Scheme 1 に示した。

1) 抽 出

植物性油の抽出: 試料 50 g をはかり, 500 ml の分液漏斗にとる。これに *n*-ヘキサン 50 ml を加えて溶かした後, ジメチルスルホキシド (DMSO) 50 ml を加え, 10 分間振り混ぜる。DMSO 50 ml による抽出を合計 5 回繰り返し, DMSO 抽出液を別の分液漏斗に合わせる。

バターおよびマーガリンの抽出: バターおよびマーガリンは 25 g をはかり, Fig. 1 のワックス用抽出器の

Scheme 1. The scheme of analytical procedure for 3,4-benzopyrene in vegetable oils, butter and margarine

Fig. 2. Excitation (a), and fluorescence (b) spectra of 3,4-benzopyrene: HITACHI MPF-4 Fluorescence Spectrophotometer
—, 3,4-benzopyrene isolated from commercial salad oil; ---, 40 ppb *n*-hexane solution of 3,4-benzopyrene.

Table 1. Recoveries of 3,4-Benzopyrene Added to Vegetable Oils and Butter

Sample	Sample weight (g)	Added		Found		
		(ng)	(ppb)	Total (ng)	Recovered (ng)	(%)
Cottonseed oil ^{a)}	1. 50	160	3.2	169	157	98.4
	2. 50	160	3.2	158	146	91.4
	3. 50	1000	20.0	1003	991	99.1
Butter ^{b)}	25	160	3.2	167	152	95.2

^{a)} Originally contained 0.24 ppb 3,4-benzopyrene
^{b)} Originally contained 0.60 ppb 3,4-benzopyrene

(A) に入れる。 *n*-ヘキサン 100 ml を加え、マントルヒーターで抽出器内の液を加温し、かき混ぜて試料を溶かした後、(B) から DMSO 50 ml を (A) 内に加え、冷却管 (C) に水を通し、かき混ぜながら約 80° で 30 分間加温する。次にマントルヒーターをはずし、約 10 分間放置した後、下層の DMSO 層を 1 L の分液漏斗にとる。(A) には再び DMSO 50 ml を加え、上記と同様の加温抽出の操作を合計 4 回行う。DMSO 抽出液を分液漏斗に合わせ、室温まで放冷する。

2) カラムクロマトグラフィー

液-液分配抽出を行い、濃縮した抽出液を、シリカゲルカラム (1×30 cm) にのせ、石油エーテル：エーテル (9：1) を用いて溶出させ、溶出液 50 ml をとる。この溶出液を 1～2 ml に濃縮し、1%含水アルミナカラム (1×30 cm) にのせ、*n*-ヘキサン：エーテル (2：1) を用い、必要ならばスプレーで加圧しながら溶出させる。最初の溶出液より 50 ml ずつ 3 フラクションをとり、各フラクションをそれぞれ濃縮して 4 ml とし、けい光を測

定する。

3) けい光測定による同定と定量

同定：けい光光度計を用い、励起波長 383 nm において、390～500 nm までのけい光スペクトルを測定する。3,4-ベンズピレンの標準液のそれと比べ、ピークパターンが一致した場合、あらためて、けい光波長 403 nm における 280～390 nm の励起スペクトルを測定する。励起スペクトルカーブは他のけい光物質の影響を受けやすいが、パターンが多少異なっても、296, 365, 383 nm のピークを認めた場合、3,4-ベンズピレンと同定した。標準液および市販サラダ油から得られた3,4-ベンズピレンのけい光および励起スペクトルを Fig. 2 に示した。

定量：励起波長 383 nm (365 nm でもよい) における 400, 403, 406 nm の 3 点のけい光を測定し、同時に、3,4-ベンズピレン稀釈標準液を、試料を測定したときと同じ条件下で測定し、次式からそれぞれ *I* を求め、標準液の値に対する比例計算で、検液中の濃度を求める。

Table 2. Amounts of 3,4-Benzopyrene in Vegetable Oils

Vegetable oils	Sample weight (g)	3,4-Benzopyrene found (ppb)
a) Rape-seed oil	50	0.08, 0.02
b) Soybean oil	50	0.48
c) Cottonseed oil	50	0.24
d) Rice oil	50	0.82
e) Sunflower-seed oil	50	0.56
f) Coconut oil	50	n. d. ^{a)}
g) Sesame oil	50	1.24, n. d.
h) Tempura oil	50	0.35, n. d., 0.90
i) Salad oil	50	1.18

^{a)} Not detected.

Table 3. Amounts of 3,4-Benzopyrene in Butter and Margarine

Sample	Sample weight (g)	3,4-Benzopyrene found (ppb)
Butter		
a)	25	0.60
b)	25	0.35
c)	25	0.51
Margarine		
a)	25	0.83
b)	25	0.46
c)	25	0.54

$$I = I_{403} - (I_{400} + I_{406})/2$$

3. 実験結果

3.1 回収率

綿実油, およびバター (それぞれ 0.24, および 0.60 ppb の3,4-ベンズピレン含有のもの) に, 一定量の3,4-ベンズピレン標準液を添加し, 上記の方法で分析を行った際の, それぞれの回収率は Table 1 に示したとおりである。

3.2 市販食用植物性油, バターおよびマーガリンの分析結果

市販の食用植物性油9種類について分析を行った結果については Table 2 に, バター3種, およびマーガリン3種についての結果は Table 3 に示すとおりであった。

9種の植物性油を分析した結果, 8種のものに3,4-ベンズピレンを検出し, 含有量は 0.02~1.24 ppb の範囲であった。また, バター3検体, マーガリン3検体のそれぞれ全部に3,4-ベンズピレンを検出し, バターは 0.35~0.60 ppb, マーガリンは 0.46~0.83 ppb の範囲であった。

4. 考 察

操作については分析方法については基本的には問題はないと考えられるが, 植物性油中「ごま油」の場合, カラムクロマトグラフィーを行う際にやや溶出しにくいいため, スプレーによる加圧を行った。

植物性油の抽出には, 当初, 液体抽出器によるメタノール抽出を8~10時間行ったが, 添加した3,4-ベンズピレン (1000 ng/100 g) の回収率は33%, 55%と悪かった。抽出方法を種々検討したが, 結局, 試料を *n*-ヘキサンに溶かした後, これを DMSO で分液漏斗を用いて抽出する方法が最も成績が良いことを認めた。バター, マーガリンの抽出には, 先にワックス中の3,4-ベンズピレン抽出のために考案した抽出器を使用したところ, 試料を加温溶解させた状態で溶媒抽出できる利点があり, 回収率も良く, バター類の分析にも有効であった。

各国分析者によるデータ: 植物性油中の多核芳香族炭化水素類, および3,4-ベンズピレンの分析に関しては Grimmer^{7),8)}, Howard⁹⁾, Jung¹⁰⁾, Biernoth^{11),12)}, Borneff¹³⁾ らの報告があり, バター, マーガリンについては Fabian¹⁴⁾, Fritz¹⁵⁾, Siegfried¹⁶⁾ らが行っている。

精製植物油中の3,4-ベンズピレンに関して Howard⁹⁾ らは大豆油, 綿実油, とうもろこし油, オリーブ油, 落花生油など31検体中15検体に 0.4~1.5 ppb を, Siegfried¹⁶⁾ はとうもろこし油およびひまわり油などに 0.2~5.2 ppb を検出している。また粗製植物性油については Grimmer^{7),8)} らは, 大豆油, 綿実油, ひまわり油, なたね油, やし油などに 1.2~21.0 ppb, 特にココナッツ油には 43.7 ppb という値を認め, Biernoth^{11),12)} もココナッツ油に 0.9~29 ppb という値を報告している。マーガリンについては 0.2~6.8 ppb (Fabian¹⁴⁾, Fritz¹⁵⁾, Siegfried¹⁶⁾ ら), バターについては 0.2~0.5 ppb (Siegfried¹⁶⁾) を検出している。

筆者らが分析した精製植物性油中の3,4-ベンズピレン量は 0.02~1.24 ppb の範囲で, Howard⁹⁾ らの報告した

値と同一レベルにあることが分かる。また、バター、マーガリンはそれぞれ 0.35~0.60 ppb, および 0.46~0.83 ppb で、マーガリンの場合上記の報告にみられる高い値は試料数が少ないため検出されなかった。

植物性油、バターおよびマーガリン中の3,4-ベンズピレンの由来について：植物性油およびバター、マーガリン中に3,4-ベンズピレンなどの多核芳香族炭化水素が検出されることは、1) 植物自体の内因的な生成によるもの、2) 農作物の大気および土壌などの環境汚染によるもの、3) 油脂の製造工程における発生および汚染、などが考えられる。このうち2)の環境汚染に対しては、3,4-ベンズピレンを添加した土壌に生育する植物が、明らかに土壌から3,4-ベンズピレンを吸収するという事実^{17),18)*8}が報告されており、注目されてよい。また3)の製造工程における問題は、植物性油の場合、その種類により製造工程に異なる点があるようだが、ココナツ油の場合はコブラの実の乾燥法により、明らかに差が認められている。すなわち Grimmer ら⁹⁾は、新鮮なココナツを乾燥せずに分析した際は3,4-ベンズピレンを全く検出しなかったが、天日またはくん煙乾燥したコブラから製油した場合は43.7 ppb (くん煙乾燥, 6 試料の中央値)を示したと報告している。

植物性油の抽出に使用するヘキサンについても汚染の可能性が考えられるが、Grimmerら⁹⁾多くの研究者により、ヘキサンが油脂の直接の汚染の原因とは認められないとしている。

5. ま と め

1) 植物性油、バターおよびマーガリン中の3,4-ベンズピレンの分析方法の検討を行った。方法は従来著者らが行ってきた方法に準じたが、植物性油の抽出は分液漏斗によるジメチルスルホキシド抽出、バターおよびマーガリンの抽出には著者らの考案したワックス用抽出器を用い、試料を温時溶解し抽出した。カラムクロマトグラフィーにはシリカゲルカラム (1×30 cm, 石油エーテル：エーテル (9:1), 1%含水アルミナカラム (1×30 cm, *n*-ヘキサン：エーテル (2:1) を順次行った。

2) 植物性油およびバターにそれぞれ 3 ppb の濃度に3,4-ベンズピレンを添加して回収実験を行ったところ、回収率は各々94.9および95.2%であった。

3) 本方法により米油、大豆油、綿実油など市販の精

製植物性油12検体を分析したところ、9検体に 0.08~1.24 ppb, バター3検体全部に 0.35~0.60 ppb, マーガリン3検体全部に 0.46~0.83 ppb の3,4-ベンズピレンを検出した。

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**, 178 (1975).
- 5) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍: 同上, **16**, 187 (1975).
- 6) 白石慶子, 高島英伍: 衛生化学, **21**, 60 (1975).
- 7) Grimmer, G., Hildbrandt, A.: Arch. Hyg., **152**, 255 (1968).
- 8) Grimmer, G., Hildbrandt, A.: Chem. and Ind., **40-52**, November 25, 2000 (1967).
- 9) Howard, J. W., Turicchi, E. W., White, R. H., Fazio, T.: J. Assoc. Offic. Agr. Chem., **49**, 1236 (1966).
- 10) Jung, L., Morand, P.: C.R. Acad. Sci. (Paris), **257**, 1638 (1963).
- 11) Biernoth, G., Rost, H. E.: Arch. Hyg. (Munche), **152**, 238 (1968).
- 12) Biernoth, G., Rost, H. E.: Chem. and Ind., **40-52**, November 25, 2002 (1967).
- 13) Borneff, J., Fabian, B.: Arch. Hyg (Munche), **150**, 485 (1966).
- 14) Fabian, B.: Arch. Hyg. (Munche), **152**, 231 (1968): *ibid.*, **153**, 21 (1969).
- 15) Fritz, W.: Nahrung, **12**, 495 (1968).
- 16) Siegfried, R.: Naturwissenschaften, **62**, 576 (1975).
- 17) Shabad, L. M., Cohan, Y. L., Ilnitsky A. P., et al.: J. National Cancer Institute, **47**, No. 6, December, 1179 (1971).
- 18) Muller, H.: Z. Pflanz B **1976**(6), 685 (1976).

*8 白石慶子, 白鳥つや子: 日本薬学会96年会講演要旨 第三分冊, 170 (1976)