ベンゾ(a)ピレン分析時のベンゾ(k)フルオランテン との分離について^{*1}

(昭和 54 年 3 月 26 日受理)

白 石 慶 子^{*1} 白 鳥 つ や 子^{*2}

Separation and Determination of Benzo(a)pyrene and Benzo(k)fluoranthene

(Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
in Foods. VII)

Yoshiko SHIRAISHI^{*2} and Tsuyako SHIROTORI^{*3}

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

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

Benzo(a)pyrene (BaP), a carcinogenic polycyclic hydrocarbon, and benzo(k)fluoranthene (BkF), a non-carcinogenic hydrocarbon, have quite similar fluorescence emission spectra. According to the determination method for BaP in foods previously reported by the author, the two hydrocarbons are usually determined separately.

On some occasions, however, BkF may be included in the BaP fraction in column chromatography, depending on the type of food used as starting material or the water content of the alumina or the solvent used.

It is necessary to ensure that measurement of BaP is not affected by the presence of BkF. Unless the amount of co-existing BkF is separately determined and used to correct the value obtained for BaP, the value obtained may amount to two or more times the actual value.

Three separation techniques, sulfuric acid extraction, selection of excitation wavelength as reported by Dubois, and thin layer chromatography were applied to food samples. The technique of Dubois gave the best result. Extraction with sulfuric acid was not satisfactory with food samples.

(Received March 26, 1979)

ま え が き

発ガン性多核芳香族炭化水素ベンゾ(a)ピレン (BaP) と、非発ガン性のベンゾ(k)フルオランテン (BkF) は、けい光スペクトルが酷似し、れい起スペクトルも BkF の 308 nm のピークを別にすれば、両者のパターンは類似している (Fig. 1)。

白石らの食品中の BaP 分析法に関する検討によれば、BaP と BkF は 1%含水アルミナカラム (n-ヘキサン-エーテル, 2:1 溶出) により分離され、同一フラクシ

ョンに溶出し、しかしながら実際に多くの食品を分析した結果、BkF が BaP と同一フラクションに溶出することがあることを認めた。この原因はおそらく、食品中のある種の成分によるカラムクロマトグラムへの影響、カラムクロマト系の水分含有量 (1%含水アルミナ、展開溶媒、抽出濃縮液の脱水不完全) が増加していた場合などが考えられる。このような場合にけい光スペクトルパターンが BaP のそれと同一であると認め、安易にベースライン値より BaP を算出すると、BaP は見掛け上増加し、実際よりはるかに多い含有量を示すことになる。

BaP 含有量を食品中の発ガン性多核芳香族炭化水素類

^{*1} 食品中の多核芳香族炭化水素の定量 (第 7 報)

^{*2} 国立公衆衛生院: 東京都港区白金台 4-6-1

^{*3} 東京家政大学: 東京都板橋区加賀 1-18-1

Fig. 1. Fluorescence and excitation spectra of benzo(a)pyrene, benzo(k)fluoranthene and the mixed *n*-hexane solution

の含有量の指標として評価している現在、BaPの測定に際しては BkF が混在しないことを確かめ、混在しているときは BkF によるみせかけの BaP 増加量を差し引いて補正し、定量値を算出することが必要である。

BaP と BkF の分離に関しては、すでに両者の固有の励起およびけい光波長を選択し使い分ける Dubois ら¹⁾ および松下²⁾ の方法、両者の混合液に濃硫酸を加え抽出するといけい光スペクトルが全く異なることを応用する Sawicki³⁾ らの方法、薄層クロマトグラフィーの応用などの報告があるが、食品分析に適用したものはない。筆者らは食品を対象とした際の上記の分離法につき基礎的な検討を加えたので、その結果について報告する。

実験方法

1. 試薬類

1) 多核芳香族炭化水素 (PNAH) 標準品

a. ベンゾ(a)ピレン標準液: 43.2 ppb *n*-ヘキサン溶液を使用した。

b. ベンゾ(k)フルオランテン標準液: (K & K) 薄層クロマトにより展開スポットが単一であり、けい光および励起スペクトルピークが文献と一致した 41.8 ppb *n*-ヘキサン溶液を使用した。

c. その他のPNAH: いずれも特級試薬を用い、薄層クロマトにより展開スポットが単一であることを確かめた後標準品とし、*n*-ヘキサン、ベンゼンなど溶液として使用した。

なお、PNAH標準品は便宜上 Std. No. を付し、この Std. No. で標準品名に代えた (Table 5 参照)。

2) 薄層クロマト担体: アセチルセルロース (和光薄層用, アセチル化 26%) を 0.25 mm の薄層板とした。展開剤: エタノール-トルエン-水 (17:4:4 v/v/v)

3) 硫酸: 和光純薬工業 (株) 製特級

2. 装置, 器具

- 1) けい光分光光度計: MPF-4 型 (株) 日立製作所製
- 2) 紫外線灯: 365 nm
- 3) 展開槽: ハンギング式, (株) 東洋科学産業製, 25×12×25 cm

3. 実験操作

3.1 硫酸抽出法による BaP と BkF の分離

Sawicki ら³⁾ の濃硫酸抽出による BaP と BkF の分離法について、以下の項目について検討を行った。

3.1.1 同一フラクションに他の PNAH が存在する場合の影響

食品からの BaP 分析操作の最終測定用溶液中に、溶出される可能性のある PNAH のうち、次の 9 種の PNAH につき、硫酸抽出を行い、各 PNAH の硫酸溶液が示すけい光スペクトルが、BaP, BkF のけい光スペクトルに対し影響があるかをみた。

方法: 10^{-6} M/L 濃度のベンゾ (g, h, i) ペリレン (Std. No. 5), クリセレン (No. 8), 3-メチルコランスレン (No. 10), ベンゾ(e)ピレン (No. 12), 11-ベンゾ (b)フルオレン (No. 16), ペリレン (No. 18), 5,12-ジヒドロナフタセン (No. 25), トリフェニレン (No. 26), ベンゾ(b)フルオランテン (No. 29) 溶液を, BaP (No. 6), および BkF (No. 28) 溶液と同様に, それぞれ 3 ml を 10 ml の共栓小試験管にとり, 濃硫酸 4 ml を加えてよく振り混ぜ, 下層の硫酸層をとり各 PNAH のけい光および励起スペクトルを測定した。

3.1.2 硫酸抽出法による BaP けい光強度の再現性, 安定性および検量線

本方法は濃硫酸を有機性物質に加えるため、一部炭化などによるけい光強度の再現性, 安定性が問題になると考え、この点につき検討し、さらに検量線を作製した。

方法: 10 ml 共栓小試験管に BaP 標準液 2 ml をとり, 濃硫酸 4 ml を加え 2 分間振り混ぜた後下層をとり, けい光波長 539 nm (Ex. 468 nm), およびれい起波長 468 nm (Em. 539 nm) におけるけい光強度を測定する。

3.1.3 BaP 硫酸抽出法における共存 BkF の濃度の影響

BaP と共存する BkF の量が BaP の定量値に及ぼす影響をみるため次の実験を行った。

方法: BaP 一定量に対し, BkF の添加量を BaP の 1/2, 同量, 2, 3, 5 倍量とした液をつくり, 最終のヘキサン量を 6 ml とし, これに濃硫酸 4 ml を加え 2 分間振り混ぜた後, 硫酸層の BaP のけい光強度を測定した。

3.2 励起波長選択によるけい光値補正法による BaP と BkF の分離定量

Dubois ら¹⁾ は BaP と BkF の混合シクロヘキサン溶液から BaP を分離測定する方法として、a) 励起波長

308 nm における 401 nm のけい光強度を測定すると BkF のみが定量され、b) 励起波長 383 nm における 403 nm のけい光強度を測定すると両炭化水素の和が求められ、c) b)-a) から BaP の濃度が求められると報告している。この方法を食品に応用するため、以下の検討を行った。

3.2.1 BaP, BkF 各種濃度比混合液のけい光スペクトルピーク

BaP のけい光ピーク (403, 408, 427, 454 nm) と BkF のけい光ピーク (401, 410, 427, 455 nm) のうち、それぞれの主ピーク 403 および 401 nm の位置が、両者の混在比の変化に従ってどのように変化するかをみた。

方法: BaP 一定量に対し、BkF の添加量を 10^{-3} ~ 10 倍量とした各種濃度液をつくり、最終のヘキサン量を 6 ml とし、それぞれの液につき励起波長 383 nm におけるけい光スペクトルを測定し、主ピークの位置を測定した。

3.2.2 BaP 定量値に及ぼす BkF 量の影響

混在する BkF の量が増加するにつれて、BaP の定量値に与える影響をみるため以下の実験を行った。

方法: BaP 一定量に対し、BkF の添加量を 0.5 ~ 10 倍量とした各種濃度液をつくり、最終のヘキサン量を 6 ml とし、それぞれの液について 1) 403 ± 3 nm (Ex. 383 nm), 2) 402 ± 3 nm (Ex. 383 nm), 3) 401 ± 3 nm (Ex. 308 nm) のけい光を測定し、ベースライン値を求める。別に標準 BaP および BkF 溶液を用いて各種濃度希釈液をつくる。BaP は 1) および 2) の条件で、BkF は 2) および 3) の条件で測定し、それぞれの条件下の検量線をつくり、上記混液の各ベースライン値の BaP および BkF 濃度を求めた。すなわち、混液の示すピークにより 1) または 2) で総 BaP 量を測定し、次に 3) により混液中の BkF 量を測定し、この BkF 量は標準 BkF を BaP の測定条件 2) または 3) で測定した検量線より、BaP 量として算出し、この値を総 BaP 量から差し引いて補正し、真の BaP 量とした。

3.3 薄層クロマトグラフィーによる分離

BaP と BkF の分離には 1 nm という分解能の精度の高いけい光光度計を必要とするが、薄層クロマトグラフィーにより両者の分離同定および定量も可能である。PNAH の薄層クロマトグラフィーによる分離についてはすでに多くの報告があるが^{4)~7)}、BaP と BkF の両者の分離に関しては、アセチルセルロース担体 (エタノール: トルエン = 1: 4) が最も良かった⁷⁾。今回アセチル化約 26% の製品が得られたので、従来の 20% のものとの比較を行った。

実験結果および考察

1. 硫酸抽出法による分離

1.1 同一フラクションに他の PNAH が存在する場合の影響

Fig. 2-A, 2-B. Fluorescence spectra of polynuclear aromatic hydrocarbons in concentrated sulfuric acid

2-A. 16: 11-benzo(b)fluorene, 12: benzo(e)pyrene, 28: benzo(k)fluoranthene, 29: benzo(b)fluoranthene, 6: benzo(a)pyrene

2-B. 5: benzo(g,h,i)perylene, 8: chrysene, 18: perylene, 25: 5,12-dihydronaphthacene

合の影響

PNAH の有機溶媒溶液を濃硫酸抽出した際のけい光スペクトルは Fig. 2-A および B に示すとおりであった。

Fig. 2 にみるとおり、BaP は 545 nm (Ex. 468 nm), BkF は 456 nm (Ex. 316 nm) と大きくピークが離れ、また他の PNAH 9 種も両者の分離に影響しないことがわかる。なお、励起スペクトルはけい光スペクトルの場合に比べ、全 PNAH のピークが一团となり顕著に両者が分離せず、分離に応用するには不適であった。

1.2 BaP けい光強度の再現性、安定性、検量線

3.1.2 の方法の同一操作を 5 回繰り返した結果は Table 1 に示した。

Table 1. Reproducibility of the Sulfuric Acid Extraction Procedure

Fluorescence intensity	Sample No.						
	1	2	3	4	5	$\bar{x}$	σ
Emission 539 nm (Ex. 468 nm)	7.5	7.6	6.5	5.9	5.8	6.7	0.86
Excitation 468 nm (Em. 539 nm)	11.5	11.6	9.3	8.6	8.6	9.9	1.52

BaP 硫酸抽出液のけい光および励起光ピークの強度はかなりばらつきがあり、けい光の場合は標準偏差率12.8%，励起光の場合は15.4%で、けい光ピーク測定の方が再現性は良かった。

BaP 硫酸抽出液のけい光値は比較的安定した値を示し、5時間後も標準偏差内の変動であった。(Fig. 3 参照)

また BaP は 20~430 ppb の間で直線性を示した。

Fig. 3. Stability of benzo(a)pyrene in concentrated sulfuric acid

1.3 共存 BkF の濃度の影響

BaP 硫酸溶液のけい光スペクトルにおいて、539 nm のピークに対し BkF の影響は少ないと思われたが、各種濃度比の液について BaP を測定した際に Table 2 に

Table 2. Influence of Benzo(k)fluoranthene on the Determination of Benzo(a)pyrene in Concentrated Sulfuric Acid

BaP, BkF mix soln. (n-hexane)			Determined BaP	
Ratio	BaP	BkF	ng	recov. %
	ng/6 ml			
1 : 0.5	43.2	20.9	42.0	97
1 : 1	43.2	41.8	50.4	117
1 : 2	43.2	83.6	53.4	124
1 : 3	43.2	125	52.2	121
1 : 5	43.2	209	60.6	140
1 : 0	43.2		43.2	100

Ex, 468 nm; Em, 539 nm

示すように、1 : 1 位までの混在では、実際の BaP 量の約 20% 増となり、BkF の増大につれ影響も大きくなった。すなわち、1 : 5 と BkF 量が增大したときは約 40% 増となり、全体を通じての回収率の平均値は 120%、標準偏差 25% であった。

2. れい起波長選択法による分離

2.1 BaP, BkF 混合液のけい光スペクトルピーク

BaP と BkF の各種濃度比のヘキサン混液について測定した主ピークの位置は Table 3 に示したとおりである。

Table 3. Shift of the Main Fluorescence Peak of Benzo(a)pyrene with the Concentration of Co-existing Benzo(k)fluoranthene

BaP : BkF	BaP : BkF ng/6 ml n-hexane	Fluor. main peak (Ex. 383 nm) nm
1 : 0	130	403
1 : 10 ⁻³	130 : 0.13	403
1 : 10 ⁻²	130 : 1.3	403
1 : 10 ⁻¹	130 : 13.0	403
1 : 0.2	130 : 26.0	402
1 : 1	130 : 130	402
1 : 3	130 : 390	402
1 : 10	39 : 390	401
0 : 1	130	401

BaP に対し 10% 程度まで BkF が混入しても、混液は BaP 自体のピークを示すが、20% 以上 300% に達すると主ピーク 403 nm は 402 nm に移り、さらに 10 倍量になると BkF 自体の主ピーク 401 nm を示すことがわかる。すなわち、従来から BaP の定量、定性に当たって、BaP のピークを確認したのち行ったが、主ピークが 403, 402, 401 nm のいずれを示しても BaP と BkF の混在の可能性があることがわかり、いかなる場合にもれい起スペクトルを同時に測定し、両炭化水素が顕著な差を示す BkF のピーク 308 nm をチェックする必要があることを示している。

2.2 BaP 定量値に及ぼす BkF 量の影響

結果は Table 4 に示したとおりで、BaP に対し BkF 量が 20% 以上になるとピークは 402 nm に移るが、BaP 本来のピーク 403 nm によるベースライン値は BkF 量が 300% 存在しても測定できる。しかし、500% に達すれば不能となり、402 nm のピークにより可能となる。

いずれのピークによるにしても BkF によるみせかけの BaP 量を算出し補正しない場合、表中の c, e 項の値を示し、両者の比が 1 : 1 の場合 BaP は 100% 増量となり、その量比に比例して増大していることがわかる。しかしながら波長選択により補正すれば、BaP は 10 倍量

Table 4. Influence of Benzo(k)fluoranthene on the Determination of Benzo(a)pyrene and Correction of Determined Value by Means of Selecting Their Proper Wavelength

BaP, BkF mix soln. (n-hexane)			Total amount as BaP calculated with baseline method				BkF amount calculated with baseline method		Increased amount as BaP by coexist BkF ng	Accurate BaP	
Ratio	BaP	BkF	403±3 nm (Ex. 383 nm)	c/a %	402±3 nm (Ex. 383 nm)	e/a %	401±3 nm (Ex. 308 nm)	g/b %		e-i ng	j/a %
	ng/6 ml										
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
			ng		ng		ng		ng		
1 : 0.5	43.2	20.9	71.2	165	80.3	186	21.0	100	32.5	47.8	110
1 : 1	43.2	41.8	85.4	197	115	266	41.6	100	68.2	46.7	108
1 : 2	43.2	83.6	124	286	180	416	82.8	99	136	43.2	100
1 : 3	43.2	125	164	381	250	580	124	99	205	45.1	105
1 : 5	43.2	209	*	*	373	863	205	98	342	31.2	72
1 : 10	43.2	418	*	*	517	1196	397	95	474	43.0	100

* Impossible to make baseline value

Fig. 4. Calibration curve of benzo(k)fluoranthene with baseline technique

のBkFが混在しても、ほとんどその影響を無視して正確な定量値が得られる。また逆に、BkFの定量の際BaPが混在しても、ほとんど影響はみられないことを示し、Duboisらの方法が最も簡単で有効なことを認めた。

なお、BkFの検量線およびBaPの測定条件402±3 nm (Ex. 383 nm)による検量線をFig. 4に示した。

3. 薄層クロマトグラフィーによる分離

アセチル化率20および26%のアセチルセルロースによるPNAHの分離パターンはFig. 5およびTable 5に示すとおりで、アセチル化率26%の担体の方が20%のものより、両者の分離は更に良く、PNAH全体としても分離幅が広くなり好ましいことを認めた。

食品からの最終抽出測定用溶液のうち、BaPとBkF

Fig. 5. Distribution patterns of R_f of polynuclear aromatic hydrocarbons with acetylated cellulose thin-layer chromatography

Table 5. Thin-layer Chromatographic Separation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons

No.	Standard compound	$R_B^{a)}$		No.	Standard compound	$R_B^{a)}$	
		Acetylated (I) ^{b)}	Cellulose (II) ^{c)}			Acetylated (I) ^{b)}	Cellulose (II) ^{c)}
1.	Pyrene	1.80	2.07	16.	11-Benzo(b)fluorene	2.18	2.57
2.	Benzo(a)anthracene	1.57	2.06	17.	1-Methylphenanthrene	2.44	3.00
3.	Fluoranthene	1.79	2.25	18.	Perylene	1.90	2.26
4.	Naphthacene	2.10	—	19.	Dibenz(a, c)anthracene	1.94	2.27
5.	Benzo(g, h, i)perylene	1.62	1.67	20.	7, 12-Dimethylbenz-(a)anthracene	2.03	2.35
6.	Benzo(a)pyrene	1.00	1.00	21.	9-Methylanthracene	2.22	3.20
7.	Anthracene	2.04	3.00	22.	Pentacene	—	—
8.	Chrysene	1.42	—	23.	Picene	1.88	2.24
9.	Dibenz(a, h)anthracene	1.59	1.51	24.	2-Methylphenanthrene	2.23	3.46
10.	3-Methylcholanthrene	1.86	2.67	25.	5, 12-Dihydronaphthacene	2.36	—
11.	Phenanthrene	1.90	4.39	26.	Triphenylene	2.14	—
12.	Benzo(e)pyrene	1.72	1.91	27.	Anthanthrene	2.53	2.22
13.	Coronene	1.61	2.27	28.	Benzo(k)fluoranthene	1.66	2.43
14.	Fluorene	1.95	2.63				
15.	11-Benzo(a)fluorene	2.18	2.37				

^{a)} R_B : the ratio of the distance traveled by a polynuclear aromatic hydrocarbon to the distance traveled by benzo(a)pyrene

^{b)} 20% acetylated cellulose

^{c)} 26% acetylated cellulose

Solvent system: ethanol—toluene—water (17 : 4 : 4)

が同一フラクションに混在しているものにつき、これをあらためて濃縮し、上記のシステムで展開し、BaP標準液の展開けい光スポットと同じ位置の帯状部をかきおとし、熱メタノール抽出した際の BaP 含量は、波長選択法による場合の含量に対し平均 96%を示した。

4. 実際の応用例

BaP について分析した試料のうち、BaP フラクションに BkF を含むことの判明した測定用溶液につき、正確に等分し、一方につき上記 3.1 の硫酸抽出法、一方に

つき 3.2 の波長選択法を応用し、それぞれの方法で BaP 量を測定し、その有効性を比較した結果を Table 6 に示した。

表からわかるとおり硫酸抽出法による場合、波長選択法に比べてすべて多い値を示したが、これは従来から種々のステロイドが濃硫酸中で発けい光性物質に変わることが報告されている⁸⁾などの事実から考えて、濃硫酸処理により何らかの反応により新しいけい光物質を生ずる可能性が考えられる。これらの結果から食品試料につい

Table 6. Analytical Result with the Separation Technique Applied to the Solution Containing Both Benzo(a)pyrene and Benzo(k)fluoranthene

Sample spinach	Total amt. as BaP calcd. from Em. 403±3 nm (Ex. 383 nm) ng	BkF calcd. from Em. 401±3 nm (Ex. 398 nm) ng	Increased amt. as BaP by coexisting BkF ng	Accurate BaP amt.		BaP amt. separated from BkF by the H ₂ SO ₄ extrn. technique ^{a)}	
				ng	Total BaP/accurate ×100 %	ng	Determined amt./accurate ×100 %
1	5.38	2.08	3.38	2.45	238	28.2	1153
2	19.3	0.54	0.87	18.5	105	19.8	107
3	11.1	0.64	1.03	10.1	110	14.1	140

^{a)} Em, 539 nm; Ex, 468 nm

では硫酸抽出法はむしろ避けた方が良く、波長選択による補正法が有効であることを確認した。

ま と め

1) BaP フラクションに BkF が混入すると、BkF が BaP として定量されるため、真の BaP 量より増大した量に算出される。このため、硫酸抽出法、波長選択法、TLC 法による両者の分離について基礎的な検討を行った。

2) 硫酸抽出法は濃硫酸処理によりけい光量が増大し、食品試料については好ましくない結果を与えた。

3) BaP と BkF の固有の励起波長、けい光波長を選んで使い分ける。波長選択法によれば、BkF 量が BaP の10倍量混在しても、ほとんどその影響を無視した正確な定量値が得られ、逆に BkF の定量の際に BaP が混在しても影響が無く、本方法が最も簡単で有効であった。

4) TLC による両者の分離には26%アセチル化セルロース(エタノール-トルエン-水, 17:4:4)が最も良い分離を示し、BaP の回収率も96%を示した。

文 献

- 1) Dubois, L., Monkman, J. L.: Int. J. Air. Wat. Poll., 9, 131 (1965).
- 2) 松下秀鶴, 江角凱夫, 半田 隆: 分析化学, 21, 772 (1965).
- 3) Sawicki, E., Stanley, T. W., Elbert, W. C., Pfaff, J. D.: Analyt. Chem., 36, 497 (1964).
- 4) Sawicki, E., Stanley, T. W., Pfaff, J. D., Elbert, W. C.: Chemist-Analyst, 53, 6 (1964).
- 5) Kucharczyk, N., Fohl, J., Vymetal, J.: J. Chromatogr., 11, 55 (1963).
- 6) Howard, J. W., Teague, R. T., White, R. H., Fry, Jr. B. E.: J. Assoc. Office. Agr. Chemists, 49, 595 (1966); *ibid.*, 49, 611 (1966); *ibid.*, 49, 1236 (1966).
- 7) 白石慶子, 山下多恵子, 白鳥つや子: 衛生化学, 23, 310 (1977).
- 8) Udenfriend, S.: "Fluorescence Assay in Biology and Medicine" Vol. II, p. 455, (1969), Academic Press.