

# 食品中の3・4ベンツピレンの分析に関する検討

宮本 文夫\* 矢崎 廣久\* 安田 敏子\* 佐伯 政信\*

## I. 緒 言

多環芳香族炭化水素はその多くが強い発癌性を持っている<sup>1)</sup>ことから、タールを扱う人の職業病や自動車の排気ガスによる公害病などとの関連性において注目を集めている。

この中の代表的な化合物3・4-ベンツピレン(以下3・4-BPと略す)はその分析法が容易<sup>2)</sup>であること、大気中の多環芳香族炭化水素の全量と比例関係<sup>3)</sup>にあることなどから、大気中の濃度については多く分析されている。

また、3・4-BPは食品中にも微量存在することが明らかとなり、食品中の存在量<sup>4-6)</sup>についても調査がなされてきている。最近では、海洋における重油汚染に関連して魚介類について各種石油成分の影響<sup>7-9)</sup>等も調査研究されている。

我々は前報<sup>10-11)</sup>において、植物性食品、動物性食品、油脂類等について3・4-BPの含有量分析を試みたが比較的多く含有される食品(1ppb以上)以外は他のけい光物質の影響等で分析が困難であった。また、油脂分や着色成分の多い検体は同一検体でも妨害物質の分離状況によって分析が可能な場合と不可能な場合がみうけられた。今回上記の事項を検討改良した結果、3・4-BP 0.04ppbの微量濃度の検体についてまで分析可能となったので、この方法を用い、油脂及び食肉製品中の3・4-BPを、またベーコン、かつおぶし、大豆油について製造工程中の3・4-BPを分析したので報告する。

## II. 実験方法

### 1. 試 薬

#### (1) 有機溶媒及び試薬

アセトン、ベンゼンは市販の残留農薬用試薬を用いその他の有機溶媒類及び試薬類は市販の特級品を用いた。

#### (2) カラムクロマト用アルミナ

メルク社製アルミナ90 basicを140°C、5時間活性化したのち、2%V/Wの水を加えよく振とうし、2~3時間放置後使用した。

#### (3) カラムクロマト用シリカゲル

メルク社製シリカゲル70~230メッシュを110°C、5時間活性化したのち、6%V/Wの水を加えよく振とうし、2~3時間放置後使用した。

#### (4) 薄層用シリカゲル

キーゼルゲルG-HR(マシリーナーゲル社製)を使用した。

#### (5) 3・4-BP標準液

3・4-BP 100mgをベンゼンに溶解させ1ℓとする。この1mlをベンゼンで更に100mlとし1μg/mlの標準原液を作成する。この標準原液を用時希釈して使用する。

## 2. 装 置

#### (1) 紫外線灯

スーパーライト 2537 Å, 3650 Å  
(入江製作所製)

#### (2) けい光分光光度計

日立 204型けい光分光光度計

## 3. 分析資料

市販のベーコン、かつおぶし等8種類及び大豆油、かつおぶし、ベーコンの製造工程中のものを試料とした。

## 4. 実験操作

### (1) 前 処 理

細切粉碎した検体50~100grを正確に秤取し、n-ヘキサン300mlを加えホモジナイズした後、20分間振とう抽出する。これを3000rpmにて10分間遠心分離し、上層のn-ヘキサンの一定量を取り、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水する。この際、検体がゲル状になる場合は、5%酢酸メチル-n-ヘキサン溶液を使用し上記と同様の操作を行なう。脱水ろ過後、減圧下で50mlに濃縮する。

### (2) 液相分配

検体の種類により液相分配の適用部分が異なるの

\*千葉県衛生研究所

(1978年2月18日受理)

で図1の操作図中のA, B, C各ラインで操作する検体を次に示す。

A…油脂, 魚介類など n-ヘキサン可溶成分及び着色成分の多い検体。

B…野菜, 果実, 海藻類など n-ヘキサン可溶成分は少ないが着色成分の多い検体。

C…水, アミノ酸, 糖など n-ヘキサン可溶成分及び着色成分も少ない検体。

① DMSO抽出

n-ヘキサン抽出液を DMSO 50ml で 3 回, 振とう抽出する。得られた DMSO 層を分液ロートにとり 20~30 分間放置する。下層の大部分を別の容器にとり, 残りの DMSO に n-ヘキサンを両層が明瞭に分離するまで加える。DMSO 層をとり先の DMSO と合し, これに 1% 食塩水 150ml 及び n-ヘキサン 100ml を加えて振とう抽出し, n-ヘキサン層を分取する。下層は更に n-ヘキサン 50ml で再抽出する。

② 酸, アルカリ洗浄

n-ヘキサン抽出液に 3% 水酸化ナトリウム溶液 100ml を加え振とうした後, 更に 7% 塩酸溶液 50ml を加え振とうする。静置後, n-ヘキサン層を分取し, 水層はさらに n-ヘキサン 50ml で再抽出する。

得られた n-ヘキサン溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水後, 減圧下で 2ml 程度に濃縮する。

(3) カラムクロマトグラフィー

内径 1.5cm, 長さ 30cm のカラム管に n-ヘキサンを湿潤液として下から無水硫酸ナトリウム 5gr, 2% 含水アルミナ 10gr, 6% 含水シリカゲル 10gr, 無水硫酸ナトリウム 5gr を順次充てんし, 重層カラムを作成する。(2)①-②で得た濃縮液を次に示す溶液でカラムクロマトグラフィーを行ない, 各フラクションを分取する。

フラクション 1 … n-ヘキサン 100ml

フラクション 2 … n-ヘキサン-ベンゼン (4:1) 50ml

フラクション 3 … n-ヘキサン-ベンゼン (4:1) 50ml

フラクション 4 … n-ヘキサン-ベンゼン (2:1) 50ml

(4) 薄層クロマトグラフィー

5×20cm ガラス板に 0.25mm のキーゼルゲル層を塗布し 100°C, 2 時間活性化した後用いた。(3)で得た各フラクションを 0.3ml 程度に減圧濃縮し, それぞれ

ライン状に塗布し, 原点から 10cm まで n-ヘキサン-0-ジクロロベンゼン (9:1) で展開する。紫外線照射下で標準と一致するけい光部分を確認する。

(5) 溶出

けい光部分をかきとり, ガラスロートにのせ, アセトン 100ml で減圧吸引下で溶出する。使用したアセトンでさらに 2 回溶出をおこなう。このアセトン溶液を乾固直前まで減圧濃縮し, 最後に空気を吹き入れて乾固する。これにベンゼン 5ml を正確に加え検液とする。

(6) 定量

検液と標準溶液の励起波長 375nm におけるけい光スペクトルを 390~460nm の範囲でとる。ナローベースライン法<sup>10)</sup>による下記の計算式を用い, 検液と標準液の I<sub>1</sub> 値, I<sub>2</sub> 値を計算する。算出時に使用した溶媒量と回収溶媒量による濃度補正をおこない検体濃度を算出し定量値の小さい方の値を検体の定量値とする。

$$I_1 = I_{410} - \frac{I_{405} + I_{415}}{2} \quad I_a \cdots a_{nm} \text{ における}$$

$$I_2 = I_{435} - \frac{I_{430} + I_{440}}{2} \quad \text{けい光強度}$$

試料 50~100gr (細切する)

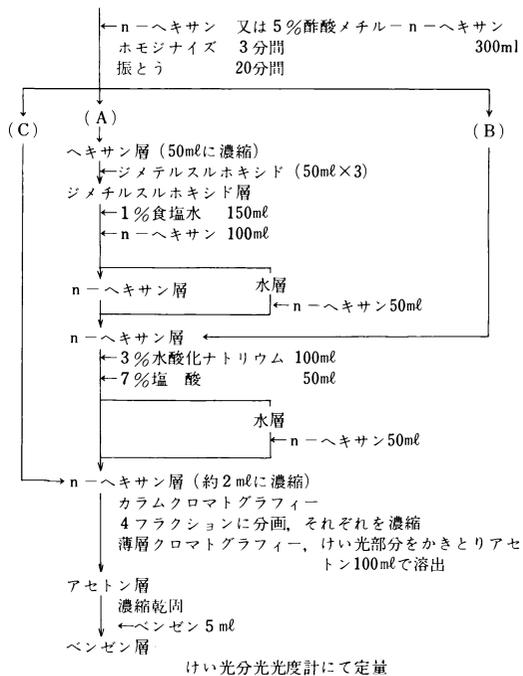


図1 操作行程

III. 試験結果及び考察

1. 抽出溶媒について

抽出溶媒としてn-ヘキサンのみを使用した場合、検体によってはゲル状を呈するものがみうけられたのでゲル状になりやすい食品4種(ソース, トマトケチャップ, わかめ, しょうゆ)に対し, 6種の溶媒(ベンゼン, クロロホルム, エーテル, 酢酸エチル, 酢酸メチル, アセトン)を各々n-ヘキサンに10%及び5%の混合比率で作成した抽出溶媒についてゲル生成状況をみた。10%ではエーテル, 酢酸エチル, 酢酸メチル, アセトンが良好であった。5%では酢酸エチル, 酢酸メチル, アセトンが良好であった。溶媒の分離状況, 溶媒の沸点, 夾雑物の混入等を考慮し5%酢酸メチル-n-ヘキサンを抽出溶媒として選定した。

2. 液相分配について

DMSO抽出は油脂分の多い検体では明瞭に分離できない場合がみうけられ, カラム部分での目づまりの原因となり, また3・4-BPの回収率を低下させていた。そこで抽出時に遠心分離を行ない分離させ, また脂肪の白濁が残存する検体では温湯での加熱直後に遠心分離を行なった。

酸・アルカリ洗浄部分でエマルジョンが生成する場合があったが, これは3%水酸化ナトリウムを加えて振とう後直ちに7%塩酸を加え酸性状態<sup>6)</sup>にて分離をおこなうことによって解消した。

この結果, カラムクロマトグラフィーが容易におこなえ, また回収率も上昇した。

3. カラムクロマトグラフィーについて

カラムクロマトグラフィーではアルミナ, シリカゲルそれぞれ単独<sup>6)</sup>で使用したり, 両者の重層カラム<sup>3)</sup>を使用する方法が報告されている。重層カラムは簡便であること, 条件を厳密に設定することにより単独カラムの2~3本使用と同様な効果が発揮されるものと考え, 重層カラムについてその条件の検討を行った。湿潤液及び洗浄液はn-ヘキサンを使用することとし, 洗浄効果が充分発揮できるよう溶出溶媒をn-ヘキサン-ベンゼン(4:1)に設定した。アルミナカラムの溶出状況は2%含水の場合, 溶出溶媒の15~40ml間に溶出し, 3%以上含水の場合, n-ヘキサン洗浄液にて溶出が始まった。シリカゲルカラムは5~6%含水で2%含水アルミナカラムとほぼ同様な活性が示された。そこで2%含水アルミナと6%含水シリカゲルを使って重層カラムを作成した。このカラムにおける3・4-BPの溶出状況を図2に示す。n-ヘキサン

100ml(フラクション1)には全く現われず, 溶出溶媒の50~100ml(フラクション3)に大部分が溶出し, 回収率は91~104%(100ng 3・4-BP添加), 98~100%(1000ng 3・4-BP添加)と良好であった。溶出を完全にさせるための実験方法ではn-ヘキサン-ベンゼン(2:1)をフラクション4とした。このカラムによって今までのアルミナカラムより溶出の間隔が長くなったが他の夾雑物はn-ヘキサン洗浄部分で溶出したり, カラム部分に保持されることにより薄層クロマトグラフィーへの影響が少なくなった。検体をカラムで溶出させた時アルミナカラムのみでは黄色油状物質, 茶褐色色素等が溶出したが, 今回の重層カラムではシリカゲル部分に保持され溶出しなかった。検体での3・4-BPの溶出状況は標準3・4-BPのみの場合より早く溶出する傾向がみられた。大豆抽出油, ベーコン, かつおぶしなどではフラクション2に3・4-BPが検出されたが, これらはカラムへの吸着物質が多いためカラム担体の活性度が低下したことが原因と思われる。また, 菜種油, マーガリン, ベーコン, かつおぶしはいづれも多量のけい光物質がみられるが, カラムでの4フラクション分取により他のけい光物質との分離が容易となった。

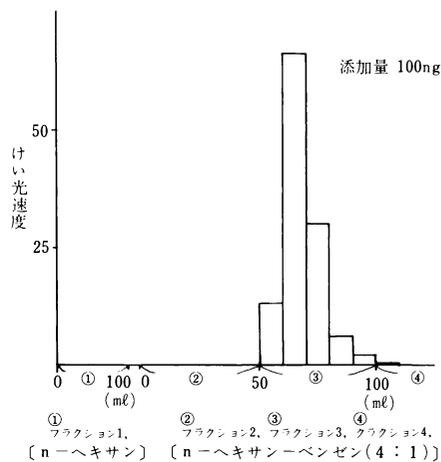


図2 重層カラムクロマト溶出パターン図  
溶出速度 1.3~1.5ml/min  
カラムにおける回収率

添加量	回収率
100ng	91, 104, 102, 104
1000hg	99, 100, 98, 100

4. 薄層担体からの溶出方法について

3・4-BPの薄層担体からの回収は今まではベンゼン20mlを使用していたが、微量(100ng)になると回収率が60~70%に低下していた。

そこで、溶出方法についての検討を行ないアセトン100mlを用い(1)急激に吸引溶出、(2)ゆっくり吸引溶出(3)瓶とう抽出の3法を試みた。1回溶出の結果(1)が最も標準スペクトルへの妨害が少なく、回収率も83~105%と良好であった。回収率の安定性を増すため実験操作では3回くり返し溶出する方法とした。急激な吸引のためか1回溶出も3回溶出もスペクトルにはあまり変化がみられなかった。

5. 市販食品の分析結果及び添加回収実験

この方法を用いての市販食品中の3・4-BP含有量分析の結果を表1に示す。410nmと435nmの検体濃度が非常に異なっているのがみうけられるが、これらの主原因は他のけい光物質の混入と考えられたのでかつおぶしとマーガリンにおける他のけい光物質の影響を調べた。3・4-BP以外のけい光部分をかきとり溶出させ、励起365nm, 375nm, 383nmの3波長別にけい光スペクトルをみた。この3波長のうち410nm, 435nmの定量波長部分に最も影響が小さかったのは励起375nmであった。しかしこの励起波長でもけい光波長405nm及び410nmに極大吸収を持つけい光物質が存在した。従って、この2検体については410nmにおける定量値は正の妨害をうけている可能性が大きいものと思われる。以上のことから3・4-BPの定量値は励起375nm, けい光410nmと435nmの波長で測定し、値の低い方を真の値とした。

表1 各食品における3・4-ベンツピレンの含有量(ppm)

食品名	分析波長	
	410nm	435nm
ソース	不検出	不検出
こんぶ	1.82	1.73
ハム	不検出	不検出
ベーコン	0.18	0.32
マーガリン	4.25	3.02
かつおぶし	8.60	7.50
菜種油	1.97	1.47
食パン	不検出	不検出
ベーコン(表面)	0.23	0.19
ベーコン(内部)	0.04	0.14

不検出<0.04ppb(試料50gr)

市販食品の油脂等5種から0.18~7.50ppb検出された。そのスペクトルを図3に示す。

また、ソース、こんぶ等7検体について2ppb添加回収実験を行ったが、それらの結果を表2に示す。410nmで測定したものは89~117%、435nmで測定したものは88~93%の回収率であった。

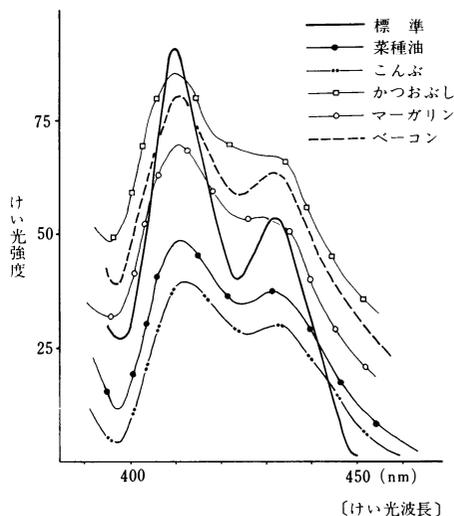


図3 各食品中の3・4ベンツピレンのけい光スペクトル(各検体の検出感度は各々異なる)

表2 各食品の3・4-ベンツピレン添加回収実験結果

食品名	分析波長 添加量	405nm, 410nm, 415n		430nm, 435nm, 440nm	
		検出値	回収率	検出値	回収率
ソース	2 ppb	1.92(ppb)	96%	1.75(ppb)	88%
こんぶ	2	2.33	116	1.79	89
ハム	2	1.80	90	1.81	90
ベーコン	2	1.98	99	1.82	91
かつおぶし	4	3.57	89	3.73	93
マーガリン	2	2.30	115	1.81	90
菜種油	2	2.34	117	1.85	92

6. 製造工程中の食品分析結果

植物油の精製工程において3・4-BPの増加<sup>10</sup>と減少<sup>19</sup>の二通りの意見がみうけられるが著者らがこの分析法を用いて得た結果は表3に示すように減少の傾向であった。くん煙による3・4-BPの増加についてはくん煙方法による違い<sup>16-17)</sup>が知られているが、著者らがベーコンを調査した結果も試料間に、0.06~1.04ppbと大きな違いがみうけられ、くん煙方法の違

いによるものと推察された。なまりぶしは2.98ppbとベーコンのいずれの値よりも高い値であったが、これは長時間くん煙室へ放置しておくためと思われる。

表3 食品の製造工程中における3・4-ベンツピレンの変動

大豆油		
抽出油	脱色油	精製油
1.06(ppb)	0.63	0.32

かつおぶし	
蒸煮したかつお	なまりぶし
不検出	2.98(ppb)

ベーコン		
製造業者	原料塩せき肉	くん煙後の肉
A	不検出	1.04(ppb)
B	不検出	0.13
C	不検出	0.43
D	不検出	0.06
E	不検出	0.53

食品の製造工程あるいは調理工程<sup>14, 18</sup>における3・4-BPの生成については最近よく研究がなされてきている。また、生成原因物質については糖質<sup>19</sup>、脂質<sup>20</sup>について研究報告されている。3・4-BPを含む多環芳香族炭化水素が食品構成成分のどのような物質からどのような条件で生成されていくのかを調査し、生成を減少させていく手段を考えていくことは今後の重要な課題と思われる。

#### IV. 結 論

食品中の3・4-BPの分析法について重層カラム等を中心に前報の方法に改良を加えた。さらに分析法を作成し、この方法で2ppb添加回収実験を行ない、88~92%の回収率を得た。検体による回収率のばらつきも少なくほぼ満足のいく結果であり、市販食品製造工程中の食品の分析に使用出来た。

- 市販食品8種を分析した結果、こんぶ、マーガリン、ベーコン、かつおぶし及び菜種油に0.18~7.50ppbの3・4-BPが検出された。
- 食品の製造工程中の3・4-BPの変動を調査した結果、大豆油の精製工程では3・4-BPは減少し、ベーコン及びかつおぶしのくん煙工程では3・4-BPが増加していた。

終りにあたり、この研究の企画及び検体採取に御協力いただいた千葉県衛生指導課食品衛生監視機動班職員各位に深く感謝いたします。

#### V. 文 献

- 堀口博：公害と毒危険物（有機編），467，三共出版1970
- 松下秀鶴他：大気汚染物中のベンゾ（a）ピレンの迅速分析法，分析化学，21巻，772~779，1972
- 藤井正美：ベンゾ（a）ピレンの存在(1)ー環境大気ー現代化学，10月号，56，1975
- 白石慶子他：食品中の多核芳香族炭化水素の定量(2報)，食衛誌，14巻，173~178，1973
- 白石慶子他：食品中の多核芳香族炭化水素の定量(3報)，食衛誌，15巻，18~21，1974
- 白石慶子他：食品中の多核芳香族炭化水素の定量(4報)，食衛誌，16巻，178~181，1975
- 緒方正名他：浮上原油成分の魚への移行に関する実験的研究，日本公衛誌，21巻，581~585，1970
- 堀伸二郎他：魚介類中の重油成分の研究，大阪府公衛研究報，6号，77~87，1975
- 内山充他：海洋の油汚染と海産食品の汚染の関連性に関する研究，国立機関公害防止等試験研究昭和51年度中間報告書，26-1~26-22，1976
- 宮本文夫他：3・4-ベンツピレンの分析法に関する検討，千衛研報，23号，96~100，1974
- 宮本文夫他：3・4-ベンツピレンの分析法に関する検討(2報)，千衛研報，24号，76~80，1975
- B. T. COMMINS：Modified Method for the Determination of polycyclic Hydrocarbons, Analyst, Vol. 83, 386 389, 1958
- 石田立夫他：重油に関する衛生化学的研究(1報)，岡山衛研報，22号，25~29，1975
- 藤井正美：ベンゾ（a）ピレンの存在，(2)ー日常食品ー現代化学，12月号，52~56，1975
- 太田静行：食用油脂の製造法の原理とその安全性，食品衛生研究，25巻，611~622，1975
- 橋本吉雄他：食肉，肉製品ハンドブック，373~374 朝倉書朝倉書店，1969
- A. J. MALANOSKI et al.：Survey of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Foods, J. AOAC, Vol. 51, 114~121, 1968
- 堀伸二郎他：食品中の多核芳香族炭化水素の定量，大阪府公衛研究報，7号，49~52，1976
- E. BARR HIGMANN et al.：Product from

the Thermal Degradation of Some Naturally  
Occuring Materials, J. AGR. Food Chem., Vol.  
18, 636~639, 1970

20) 山崎裕康他：魚肉中ならびにその調理時に生ずる多  
環芳香族炭化水素について，食衛誌，18巻，368~374  
1977

## Study on Analysis for 3,4-Benzopyrene in Foods

Fumio MIYAMOTO, Hirohisa YAZAKI,  
Toshiko YASUDA and Masanobu SAEKI

### Summary

Not only a simple and quick but a more accurate analytical method for 3,4-benzopyrene in food was devised. Further, a systematic analytical method for many Kinds of foods was prepared from the previous and present reports.

The recovery of 3,4-benzopyrene added to 7 Kinds of daily foods at a level of 2 ppb ranged from 88 to 92% by this method. 3,4-benzopyrene was determined at levels of 0.18 to 1.24 ppb in 5 samples out of 8 Kinds of daily foods on the market.

Seven variations of 3,4-benzopyrene were detected in the manufacturing process of 3 foods. The results were as follows.

- (1) Initial amounts of 3,4-benzopyrene at a level of 1.06 ppb decreased to 30% in the purifying process of soy oil.
- (2) Amount of 3,4-benzopyrene increased to a level of 2.98 ppb in the smoking process of *Katuo-bushi*(pieces of dried bonito).
- (3) Amounts of 3,4-benzopyrene increased to levels of 0.06~1.04 ppb in the smoking process of bacon.