

ウシ臓器中の多核芳香族炭化水素

根 岸 孝

(帯広畜産大学畜産環境学科)

中 野 益 男

(帯広畜産大学農産化学科)

1977年5月26日受理

Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Bovine Tissues

Takashi NEGISHI* and Masuo NAKANO**

緒 言

多核芳香族炭化水素 (PAH) は可燃物, とくに化石燃料の燃焼により生じ, その多くは強い発癌性をもっているため, 環境汚染物質として知られている。とくにベンゾ (a) ピレン (BaP) は代表的な PAH で, 大気^{1,2)}, タバコの煙³⁻⁵⁾, 水質⁶⁾, 食品^{7,8)} および土壌⁶⁾ 中における分布や生体での代謝⁹⁻¹¹⁾ についてよく調べられている。一方, 塩素系農薬 (農薬) も PAH と同様に代表的な環境汚染物質で, 多くの研究がなされている¹²⁻¹⁵⁾。しかし, われわれの生活環境では, 両汚染物質が共存していて, 分離, 測定を行うことは非常に困難であり, 今までに両汚染物質を対象とした研究はみられない。最近, われわれは溶媒分画, アルカリ処理, 薄層クロマトグラフィー, ガスクロマトグラフーマススペクトロメトリーを組み合わせてることにより共雑する農薬を除去し, PAH を精度よく分析する方法をみいだした¹⁶⁾。よって今回はウシの各種臓器中の PAH を本方法により分析したので報告する

実 験 方 法

1. 実験材料 本学に繋養中のウシ (3歳) および屠場で解体されたウシ (8歳) 各1頭の肺臓, 肝臓および腎周囲脂肪組織を用いた。

2. PAH 画分の抽出とアルカリ処理 各組織 50g をそれぞれ細片とし, 3倍量のアセトンを加えてホモジナイズした。ついで同量のヘキサンを加えて振盪抽出し濾過した。この操作を3回繰り返して行い抽出液を合し濃縮した。抽出物量を測定後, 60ml のヘキサンに再溶解

* Department of Agro-Environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan.

** Department of Agricultural Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan.

し、同量のヘキサン飽和アセトニトリルで5回抽出した。このアセトニトリル層を濃縮後、5 ml のエタノール性 1 N カセイカリを加えて 100° で 1 時間加熱した。ついで 10 ml の水およびヘキサンを加え攪拌した後、ヘキサン層を減圧濃縮して PAH 画分とした。

3. 薄層クロマトグラフィー 25 g のワコーゲル B-5 および 65 ml の水をまぜ、1 分間はげしく攪拌した後、ガラスプレート (20×20 cm 5 枚) に均一に塗布した。このプレートを 105°C で 2 時間加熱活性化したものを固定層とし、ヘキサン-ベンゼン (95:5) で展開した。スポットは PAH の場合はヨース蒸気または紫外線鑑別器 (マナスル製, 2536 Å) で、農薬の場合はヨース蒸気または 0.5% o-トリジンエタノール液を噴霧後、紫外線鑑別器で検出した。

4. ガスクロマトグラフーマススペクトロメトリー 装置としては日立 RMU-6 MG を用いた。条件として充填剤は 2% Dexsil-300, カラムはガラスカラム (0.4×200 cm), カラム温度は 160~290°C の昇温 (3°C/min), キャリアーガスはヘリウム, 放射電流は 80 μA, イオン加速電圧は 3.2 KV, イオン化電圧は 20 ev を用いた。計算は半値巾法によった。

5. 試薬 ヘキサン, ベンゼン, エタノールおよびアセトニトリルはすべて農薬分析用 (関東化学製) を用いた。標準物質として用いたアントラセンおよびクリセンは東京化成製, フルオランテンはイーストマン製, ピレン, フェナントレン, ベンゾ (a) ピレン, ジベンゾ (a, h) アントラセン, BHC (α, β および γ), ヘプタクロール, DDD, DDT, アルドリン, エンドリンおよびデイルドリンは和光純薬製を使用した。

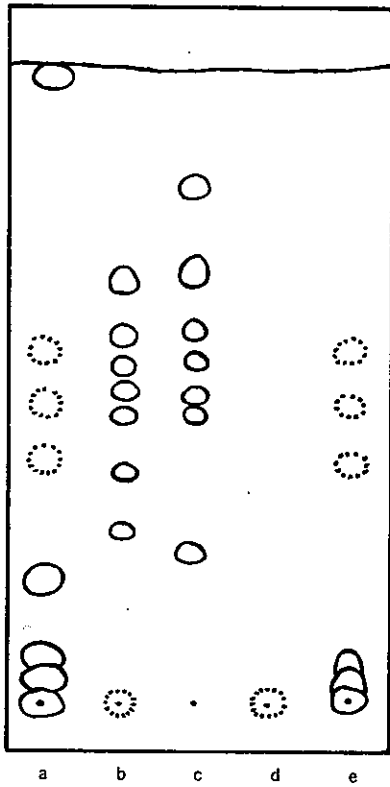
結 果

1. PAH 画分の収量 アルカリ処理後の PAH 画分の収量は組織 100 g 当たり, 肺臓で 6.2 mg, 肝臓で 9.1 mg, 腎周囲脂肪組織で 10.6 mg であった。

2. 薄層クロマトグラフィー 標準 PAH, 農薬および試料の薄層クロマトグラムを Fig. 1 に示す。アセトニトリル分配により混入してきたトリグリセリドならびに農薬はアルカリ処理により, まったく消失した。一方, PAH は安定で, アルカリ未処理のものと同じの挙動を示し, 分解物と思われるものも認められなかった。なお, アルカリ処理を 5 時間行ってもパターンの変化は認められなかった。

3. 回収率 標準 PAH のみの場合, およびそれを 50 g の脂肪組織に加えた場合の回収率を Table 1 に示す。PAH のみの場合は 85~98%, 脂肪組織の場合は 80~92% でいずれの場合もほぼ満足すべき値を示したが, とくにフルオランテンの回収率が良好であった。ただしこの操作ではアントラセンとフェナントレンの分離, 定量はできなかった。

4. 組織中の PAH の種類と含量 ガスクロマトグラフーマススペクトロメトリー分析で検出できたピークは肺臓が 14, 肝臓が 19, 脂肪組織が 10 であった。そのうち同定できた PAH の種類と含量を Table 2 (肺臓), Table 3 (肝臓) および Table 4 (脂肪組織) に示す。いずれ



Developing system: Hexane-Benzene (95:5).
 Detection: Iodine vapor.
 a=acetonitrile fraction
 b=mixture of standard PAH
 c=mixture of standard pesticides
 d=extracts after alkaline digestion of standard pesticides
 e=extracts after alkaline digestion of acetonitrile fraction

Fig. 1 Thin-layer chromatogram of PAH fractions

Table 1. Recoveries of polynuclear aromatic hydrocarbons

PAH	Recoveries*	
	Without tissue	With tissue**
Anthracene+Phenanthrene	88.5%	80.8%
Fluoranthene	97.6	92.0
Pyrene	86.4	90.5
Chrysene	89.5	87.4
Benzo (a) pyrene	85.8	80.0
Dibenzo (a, h) anthracene	86.8	83.4

* Calculated from peak area

** Fifty grams of bovine adipose tissue was used

も2頭の平均値である。各組織に共通して含まれていたのはトリメチルフルオレン、アントラセンとフェナントレン、ジヒドロトリメチルベンゾアントラセンの3つで、これらのうち3番目のものがもっとも多く含まれていた。また肺臓ではそのほかに他臓器にはみられなかったピレンおよびクリセンが検出された。

Table 2. Tentative identification of polynuclear aromatic hydrocarbons prepared from bovine lung

Relative retention time	Mass no.	Content	Possible compound
0.278	208	33.6 ppb	Trimethylfluorene
0.518	178	13.4	Anthracene + Phenanthrene
0.970	204	32.5	Dimethylantracene
1.000	202	-	Fluoranthene*
1.098	202	65.8	Pyrene
1.145	232	90.8	Dihydrodimethylpyrene
1.406	230	6.5	Dimethylpyrene
1.637	228	14.8	Chrysene
2.128	272	90.9	Dihydrotrimethylbenzoanthracene
2.361	254	11.8	Dihydrobenzopyrene

* Standard

Table 3. Tentative identification of polynuclear aromatic hydrocarbons prepared from bovine liver

Relative retention time	Mass no.	Content	Possible compound
0.278	208	54.7 ppb	Trimethylfluorene
0.518	178	7.5	Anthracene + Phenanthrene
0.684	192	28.1	Methylantracene
0.902	206	40.6	Tetrahydropyrene
1.000	202	-	Fluoranthene*
1.203	234	60.4	Hexahydrochrysene
2.128	272	135.2	Dihydrotrimethylbenzoanthracene
2.569	252	7.7	Isomer of benzopyrene

* Standard

Table 4. Tentative identification of polynuclear aromatic hydrocarbons prepared from bovine adipose tissue

Relative retention time	Mass no.	Content	Possible compound
0.278	208	10.1 ppb	Trimethylfluorene
0.518	178	21.3	Anthracene + Phenanthrene
0.970	204	11.5	Dihydrofluoranthene
1.000	202	-	Fluoranthene*
2.128	272	302.0	Dihydrotrimethylbenzoanthracene
2.361	256	17.2	Tetrahydrobenzopyrene
2.519	252	23.1	Isomer of benzopyrene
3.120	278	-	Dibenzo (a, h) anthracene*

* Standard

考 察

PAH の多くは、発癌性をもっているもので、環境汚染物質として知られている¹⁻⁶⁾。一方、

われわれの体内では PAH が水酸化、メチル化、水素化などの代謝をうけることも報告されている⁹⁻¹¹⁾。これらの測定は主としてケイ光光度法によっているが、多くの環境汚染物質が混在する場合、必ずしも適当な測定法とはいえない。われわれはすでに PAH に塩素系農薬が共雑している場合の有用な PAH 測定法を報告した¹⁵⁾。今回、この方法をウシの臓器に適用したのであるが (Table 2~4) 結果として、本来の PAH よりはむしろその代謝物と考えられるものが多く検出された。しかもこれらの含量は報告されている PAH 量 (代謝されていない) よりもはるかに高い値を示した。これらの物質は PAH と比較してその生理活性は低いので、とくに考慮する必要はないのかも知れないが、今後大いに究明されなければならない問題であると思われる。

要 約

1. ウシの肺臓、肝臓および腎周囲脂肪組織中の多核芳香族炭化水素を分析した。
2. 添加多核芳香族炭化水素の回収率は 80~97% の範囲でありほぼ満足すべき値であった。
3. トリメチルフルオレン、アントラセンとフェナントレンおよびジヒドロトリメチルベンゾアントラセンが用いたすべての臓器中にみいだされた。そのほかに肺臓ではピレンおよびクリセンが認められた。

文 献

- 1) R. C. LAO, R. S. THOMAS, H. OJA and L. DUBOIS: *Anal. Chem.*, **45**, 908 (1973).
- 2) R. J. GORDON: *Environ. Sci. Tech.*, **10**, 370 (1976).
- 3) G. E. MOORE, R. S. THOMAS and J. L. MONKMAN: *J. Chromatog.*, **26**, 456 (1967).
- 4) D. HOFFMANN and E. R. WYNDER: *Anal. Chem.*, **32**, 295 (1960).
- 5) M. E. SNOOK, W. J. CHAMBERLAIN, R. F. SEVERSON and T. CHORTYK: *Anal. Chem.*, **47**, 1155 (1975).
- 6) H. KUNTE: *Arch. Hyg.*, **151**, 193 (1967).
- 7) J. W. HOWARD, R. T. TEAGUE, R. H. WHITE and B. E. FRY: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **49**, 595 (1966).
- 8) K. SHIRAISHI, T. SHIRATORI and E. TAKAHATA: *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **16**, 183 (1975).
- 9) J. T. AHOKAS, O. PELKONEN and N. T. KARKI: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 635 (1975).
- 10) J.K. SELKIRK, R. G. CROY and H. V. GELBOIN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **168**, 322 (1975).
- 11) P. L. GROVER, A. HEWER and P. SIMS: *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 323 (1974).
- 12) M. H. BALBA and J. G. SAHA: *Environ. Letters*, **7**, 181 (1974).
- 13) R. G. HEATH and S. A. HILL: *Pestic. Monit. J.* **7**, 153 (1974).
- 14) R. M. COOK and K. A. WILSON: *J. Dairy Sci.*, **54**, 712 (1971).
- 15) D. S. SIYALI and P. STRICKER: *Aust. J. Dairy. Tech.*, **28**, 55 (1973).
- 16) T. NEGISHI: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, (1977) (投稿中).

Summary

Polynuclear aromatic hydrocarbons in bovine tissues were analyzed. The results were as follows :

1. The recoveries of representative polynuclear aromatic hydrocarbons added to the adipose tissue ranged from 80 to 97%.
2. Trimethylfluorene, anthracene and phenanthrene and dihydrotrimethylbenzoanthracene were detected in the all tissues used. Further pyrene and chrycene were detected in the lung.