

発ガン物質のけい光分析法による微量分析

Micro Analysis of Carcinogenic Substances by Fluorometric Method

The fluorometric method of analyzing polynuclear aromatic hydrocarbons contained in atmospheric particulate matter and the effects of this method are detailed in this article. The hydrocarbons are initially caught by the high volume sampler and extracted by the vacuum sublimation method. They are then separated by one-dimensional dual band thin layer chromatography and finally analyzed using a fluorescence spectrophotometer and a thin layer chromatography accessory. This fluorometric method is also applicable to analyzing aflatoxin contained in peanut mold. After extraction, the aflatoxin is also separated by one-dimensional dual band thin layer chromatography and then analyzed by the fluorometric method. In both cases, the method of operation is easy, requires only a small amount of sample, and analysis is faster than with conventional methods.

松下秀鶴* *Hidetsuru Matsushita*嶺岸久子** *Hisako Minegishi*

1 緒 言

近年我が国における死因別死亡状況をみると、昭和28年以来今日までガンは総合で死亡順位第2位を占めているばかりでなく、昭和45年度においては社会的にも家庭的にも重要な地位にある34～64歳の年齢階層において死因順位第1位となっている。ガン発生の原因に関しては種々の因子が考えられているが、その中の一つの重要因子として生活環境中の発ガン性物質、又はその関連物質の体内侵入があげられる。生活環境中に広く分布し、且つ強力な発ガン性物質としては、多環芳香族炭化水素系発ガン性物質、アフラトキシンなどのマイコトキシン、及びニトロサミン系化合物がある。これらの物質はすべてけい光分光法で感度良く分析可能である。本稿ではその一例として、大気浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素とピーナツ中のアフラトキシンの薄層けい光分光法などによる分析法につき述べる。

2 多環芳香族炭化水素

多環芳香族炭化水素系の発ガン性物質は、物質の燃焼、又は高温処理により発生する。我々は物を燃やすことなしには生活できない。従って、多環芳香族炭化水素系の発ガン性物質は必然的に環境に広く分布するようになり、また産業などにおいて大量に消費される燃料の処理方法（燃焼法及び排ガス処理）を誤ると多量の発ガン性炭化水素が大気中などに放散する危険性がある。このため、ベンゾ(a)ピレンを中心とした発ガン性炭化水素の微量迅速分析法を確立し、環境汚染の実態を把握することはガン対策の一環として重要である。

大気浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素分析に関する研究報告は、Waller⁽¹⁾がロンドンの大気中からベンゾ(a)ピレンを検出して以来、数多く提出され今日に至っている。しかし、その多くの分析方法是操作が複雑で、所要時間が長いなどの難点を有していた。これは大気浮遊粉塵中に含まれる有機化合物の種類が200～400種と多く、個々の化合物の含量は極めて少ないことに起因する。このため、空気を多量に吸引して浮遊粉塵を多量採取しなければならず、また捕集粉塵中の多環芳

香族炭化水素を単離するのに複雑な操作と長時間を要した。このような分析法上の難点を解決する一つの試みとして、最近松下⁽²⁾により二層薄層クロマトグラフィが提案された。この方法によると、捕集浮遊粉塵の真空昇華抽出物から目的の多環芳香族炭化水素を簡単に単離することができる。また感度の高い分析装置であるけい光分光光度計を併用することにより、極微量の多環芳香族炭化水素の分析が可能となり、浮遊粉塵捕集量も少量で足りるようになった。

大気浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素の分析は次の操作から成っている。

- (1) 浮遊粉塵の捕集
- (2) 捕集粉塵から有機物質の抽出
- (3) 抽出物から各物質の単離
- (4) 定量

2.1 浮遊粉塵の捕集

通常ハイボリューム サンプラを用いてガラス ファイバ フィルタ上に大気浮遊粉塵を捕集する。フィルタとしては、有機物をバインダとして使用していないものを用いる。大気粉塵の必要捕集量は採用する分析方法によって異なるが、ここで採用した真空昇華抽出→薄層クロマトグラフィ→けい光分析から成る方法では、10mgで十分である。従来用いられてきたソックスレー溶剤抽出→カラムクロマトグラフィ→吸光分析の方法によれば、200～400mgも必要とした。捕集時間は芳香族炭化水素の散逸を考慮して、できるだけ短いことが望ましい。捕集物は褐色デシケータ中で乾燥後、重量測定し抽出操作にかけられる。

2.2 抽 出

抽出は、図1に示す真空昇華装置を用いて行なわれる。フラスコに捕集粉塵の付着したガラス フィルタを入れ、真空昇華管(内径約2mm、長さ約20cm)をつなぎ、真空度0.01mmHg以下(通常0.007mmHg程度)に排気後、300℃に予熱した電気炉に挿入し、電気炉の出口近くの昇華管部分を水冷する。このまま約40分間放置すると、昇華管の冷却部位に多環芳香族

* 労働省労働衛生研究所 理学博士

** 日立製作所那珂工場

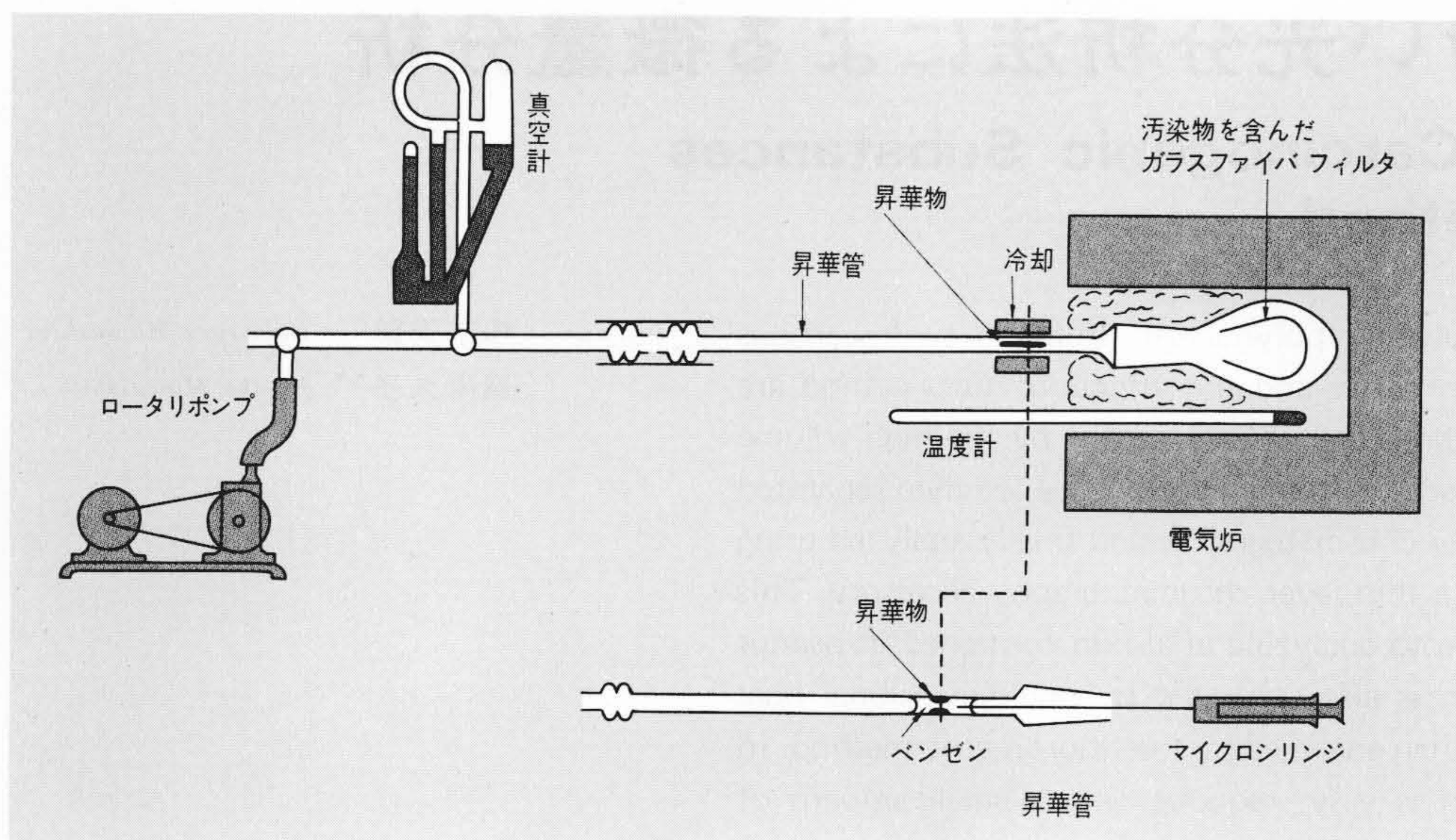


図1 真空昇華装置 昇華管の冷却部位にマイクロシリンジを用いてベンゼンを注入、析出物を溶解する。
Fig. 1 Vacuum Sublimation Apparatus

炭化水素類が析出する。マイクロシリンジを用いてその部分に少量のベンゼン（又はテトラヒドロフラン）を注入すると、析出物は容易に溶解する。別のマイクロシリンジでこの溶液を吸い上げ、薄層クロマトグラフィによる分離に供する。

2.3 分離

昇華抽出物溶液の一定量を二層一次元薄層クロマトグラフィにかけて分離する。二層一次元薄層クロマトグラフィでは、分離に用いる吸着媒と検体塗布に用いる吸着媒は異なったものを使用する。検体塗布用の吸着媒としては、検体に対して分離能力の全くないものを選ぶ。検体は展開剤とともに上昇して塗布用吸着媒と分離用吸着媒との境界で線状スポットとなった後、分離用吸着媒薄層上で各成分に分離する。二層一次元薄層クロマトグラフィでは、塗布が無雑作で塗布スポットが大きくなっても二層の境で細い線となり、そこから改めて展開されるため、分離の良いクロマトグラムが得られる。従って通常の一次元薄層クロマトグラフィと比較すると、

- (1) 試料塗布に熟練を要しない。
 - (2) 多量の試料液（50～200 μ l）がつけられるから試料塗布に伴う誤差が少ない。
 - (3) 常に良好な分離パターンが得られる。
- などの利点を有する。

ここでは検体塗布用にキーゼルグールG（メルク社）を、分離用に26%アセチル化セルロース（微結晶性薄層用セルロース、アビスルSFをアセチル化したもの）を用いた。なお二層薄層プレートは、図2に示すアプリケータを用いることによって作製することができる。薄層作製後、80℃で1時間加熱して活性化した後、室温に戻して使用した。

抽出液をキーゼルグール薄層上に塗布した後、メタノール-エーテル-水（4：4：1 V/V）で、アセチル化セルロース層上に10cm展開した。図3は展開後の薄層を紫外線ランプで照射したとき現われるスポットの様子を示したものである。

2.4 定量

芳香族炭化水素は紫外域から可視域にわたって強い特性吸収帯をもっているため、吸光分析によって同定及び定量分析することができる。しかし、けい光分析によれば10～100倍ほど感度が高い。薄層クロマトグラフィによって分離された微量の試料を定量するのに、けい光法はより適している。

薄層上のスポットをかき取り、溶媒で抽出して、溶液の状

態でけい光スペクトルを測定することによって同定及び定量することはよく行なわれているが、ここでは薄層から直接測定する方法について述べる。

スポットをかき取ることはせず、薄層板を薄層クロマト装置に装着し、目的のスポットのけい光スペクトルを測定することによって同定を行ない、またけい光強度を比較することによって定量することが可能である。

図3の薄層プレートをけい光検出用紫外線ランプ（主波長365 nm）で照射すると、青色から緑色までの様々な色調のけい光を発するスポットがみられる。およそその同定はけい光の色とRf値から可能であるが、更にスポットのけい光スペクトルと励起スペクトルを測定して標準物質と比較し、同定を完全なものにした。測定にはMPF-4形けい光分光光度計と薄層クロマト付属装置を用いた。図4は、装置の外観を示すものである。標準物質と同じRf値を有する試料のスポットのけい光スペクトルと励起スペクトルとを一組として示したの

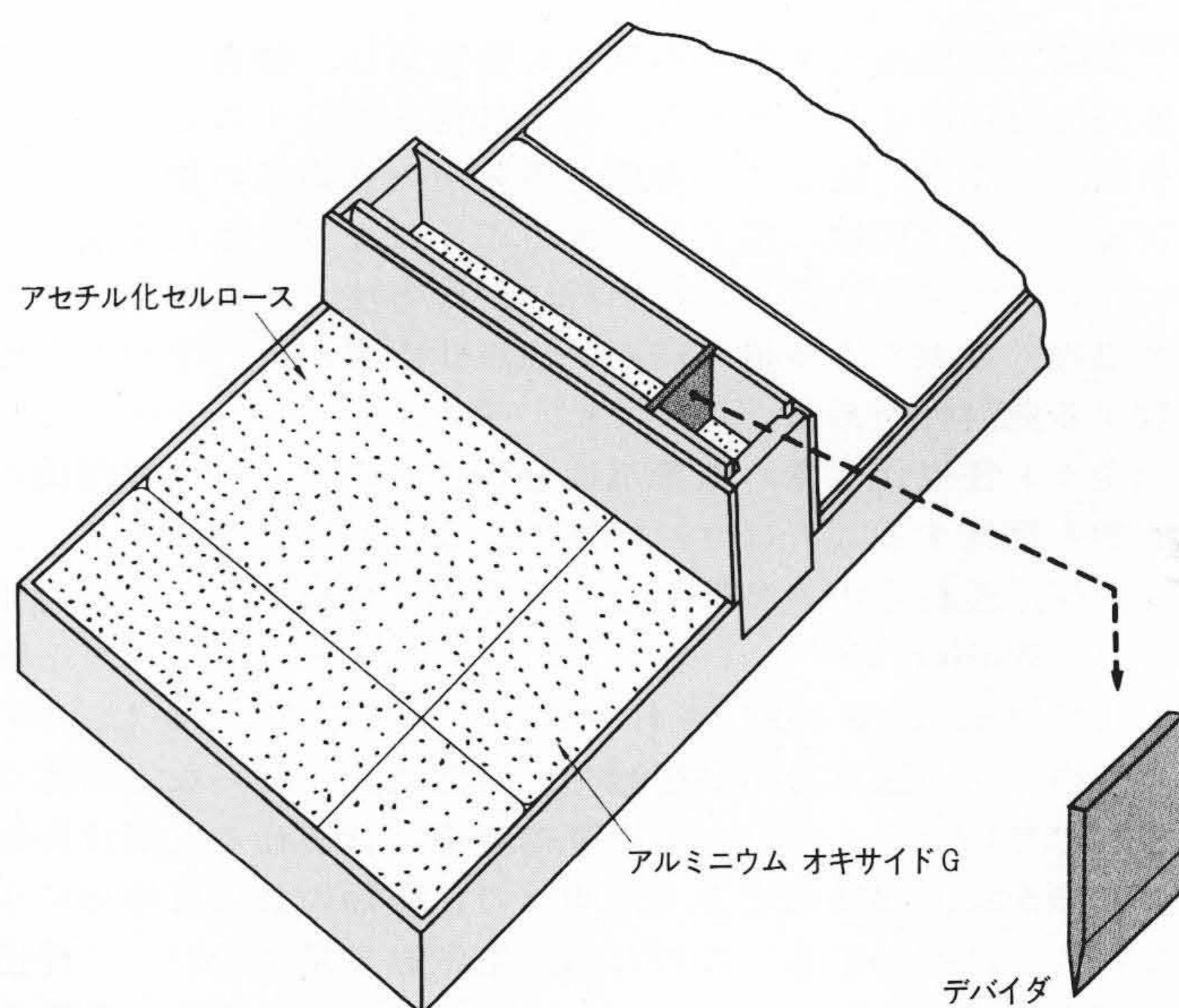
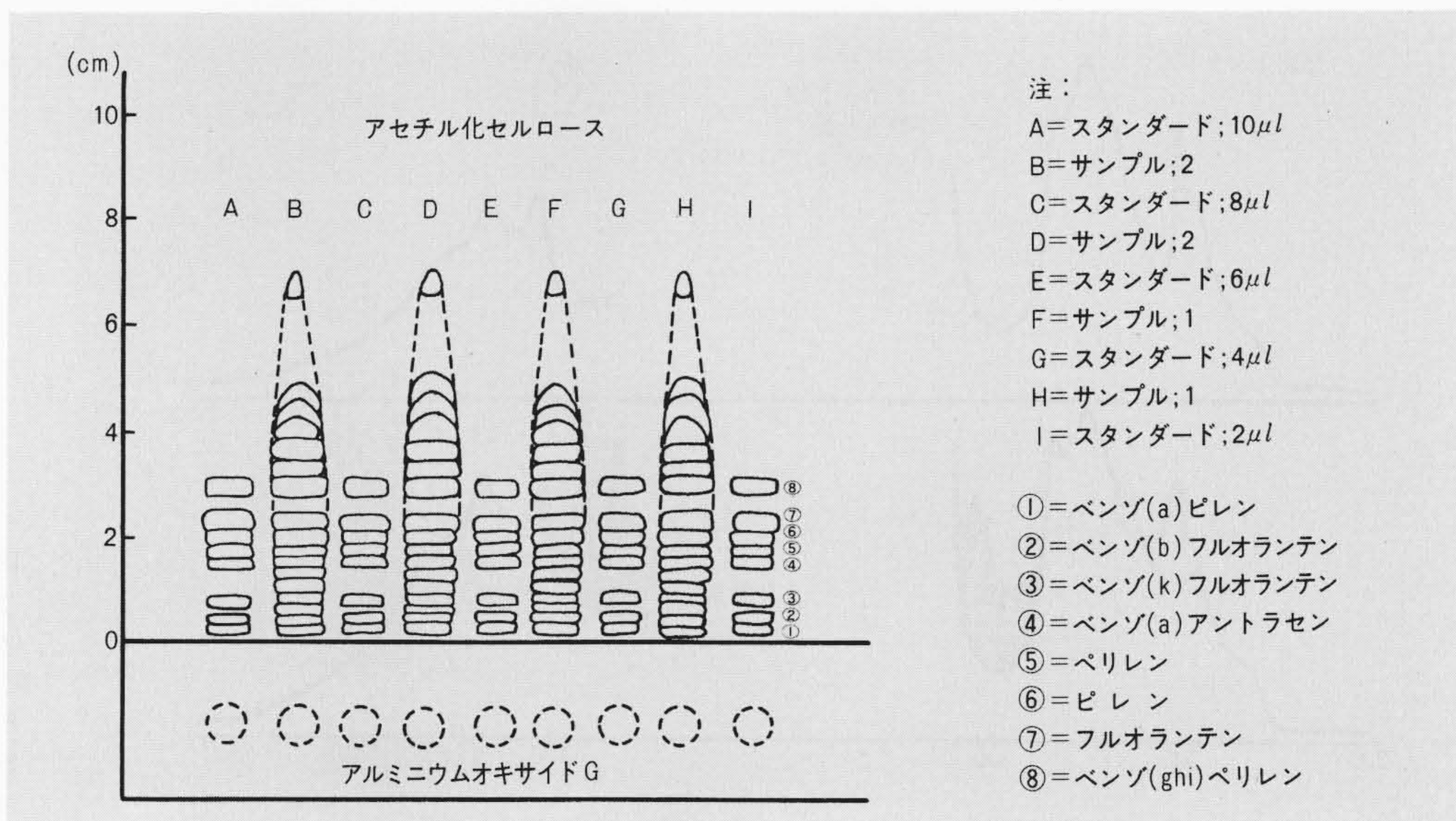


図2 二層薄層プレート用アプリケータ 通常のアプリケータにデバイダを入れ、2種類の吸着媒を同一プレート上に塗布する。
Fig. 2 Applicator for Dual Band Thin-layer

図3 真空昇華抽出物の二層一次元薄層クロマトグラム サンプルには多少テーリングが見られるが、かなり分離の良いクロマトグラムである。

Fig. 3 One Dimensional Dual Band Thin-layer Chromatogram of Vacuum Sublimation Extract



が図5～9である。なお、標準物質として用いた芳香族炭化水素の R_f 値とスペクトルをあらかじめ知っておく必要がある。スポット①、③、⑥のスペクトルは標準とよく一致していることから、それぞれベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(k)フルオランテン、ピレンであると同定された。⑦のけい光スペクトルはブロードで、これからは同定しにくいが、励起スペクトルからフルオランテンと同定された。一方、スポット②はベンゾ(b)フルオランテンとはかなり異なるスペクトルを示している。これは分離が不完全だったためで、図6の影を付けた部分は他の炭化水素(主にクリセン)によるものと思われる。図10は、図3のベンゾ(a)ピレンのスポットをデンシトメータでスキヤニングしたときに得られたパターンを示すものである。デンシトメトリィは、薄層クロマトグラムのスポットの高さがそろっていることを利用して、展開方向とは直角に物質ごとに行なった。図11はベンゾ(a)ピレンとベンゾ(k)フルオランテンに対する検量線を示したものである。ピーク面積と塗布量との

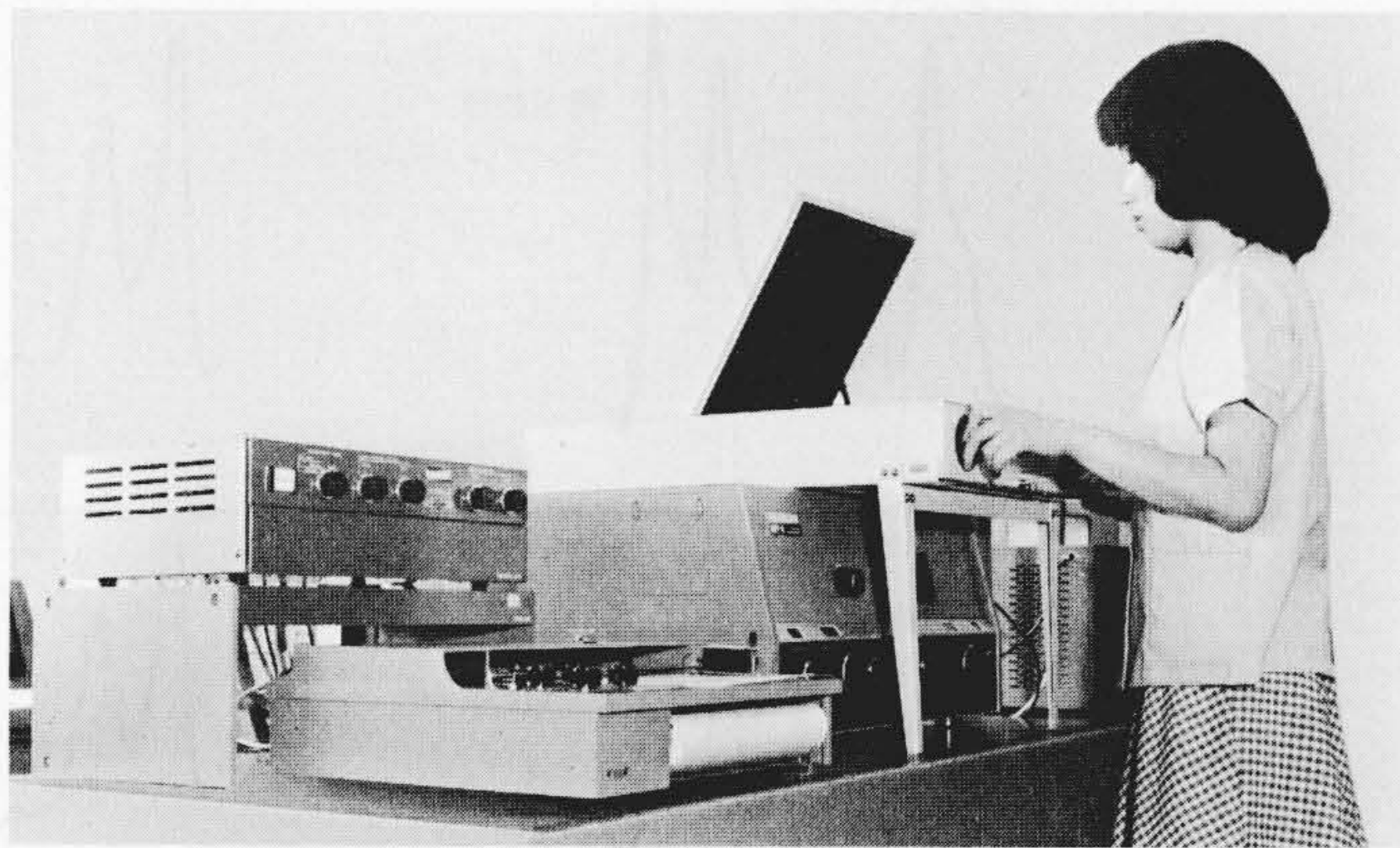


図4 MPF-4けい光分光光度計と薄層クロマト付属装置 けい光性薄層クロマトグラムにとって感度の高い分析装置である。

Fig. 4 MPF-4 Fluorescence Spectrophotometer and Thin-layer Chromatography Accessory

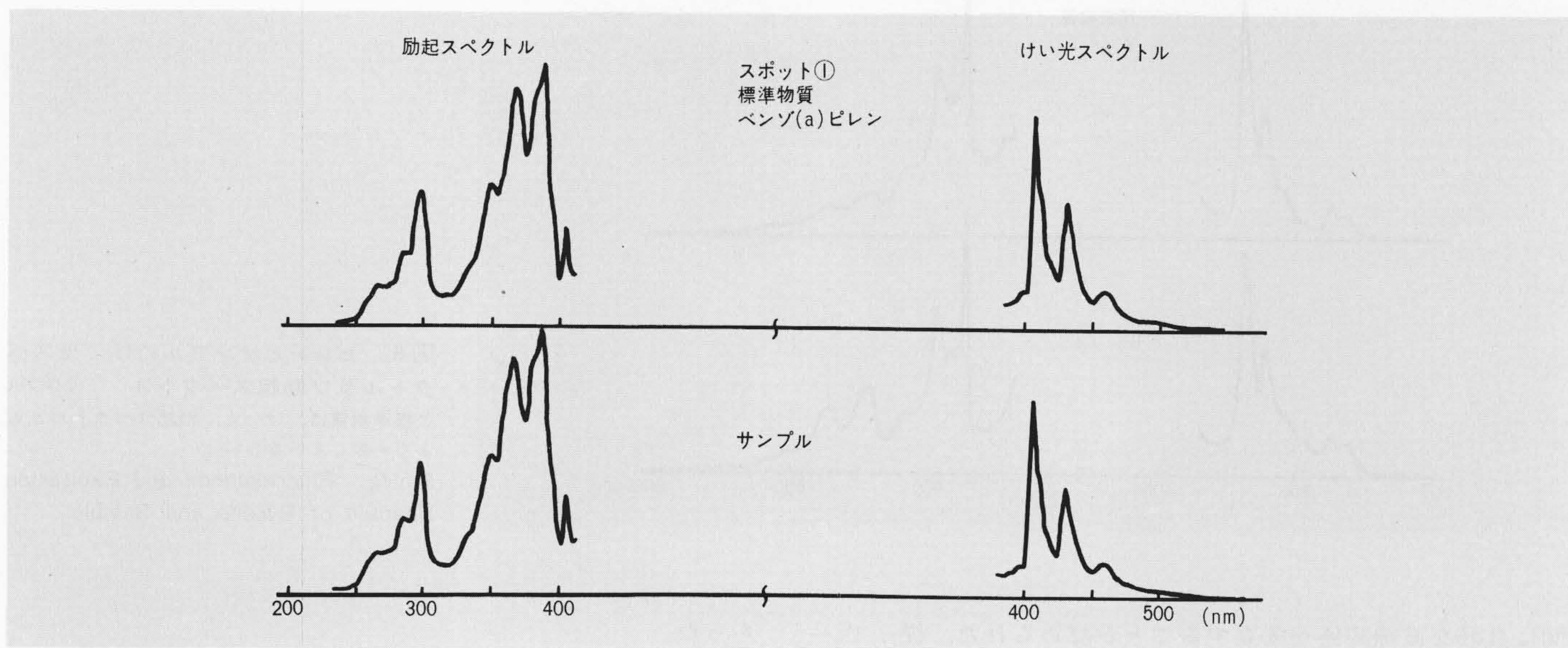


図5 ベンゾ(a)ピレンとサンプルのけい光スペクトルと励起スペクトル

サンプルと標準物質は、けい光及び励起スペクトルが全く一致している。

Fig. 5 Fluorescence and Excitation Spectra of Benzo(a)pyrene and Sample

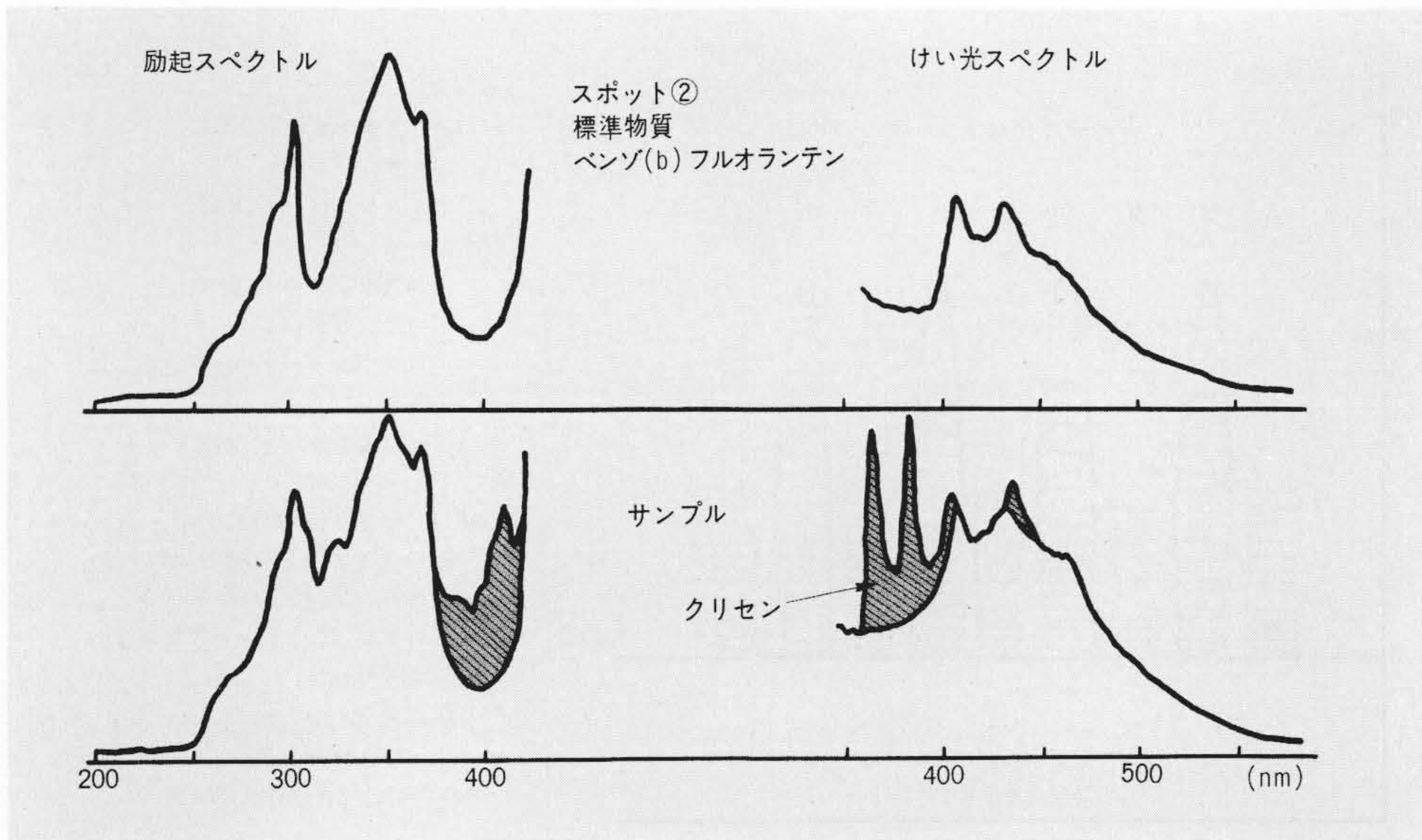


図6 ベンゾ(b)フルオランテンとサンプルのけい光スペクトル及び励起スペクトル 図の影の部分は、分離不十分で残ったクリセンによる。

Fig. 6 Fluorescence and Excitation Spectra of Benzo(b)fluoranthene and Sample

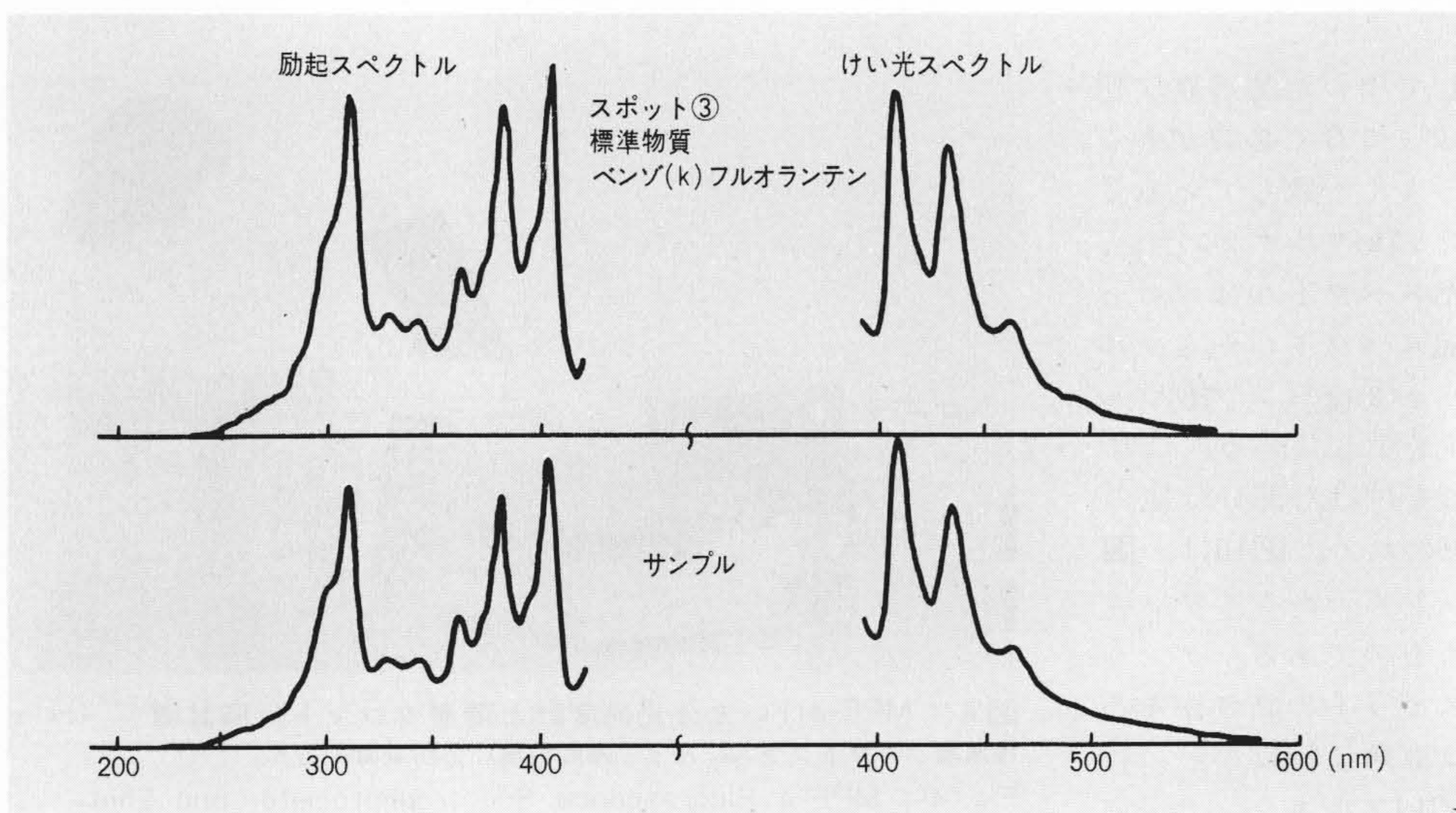


図7 ベンゾ(k)フルオランテンとサンプルのけい光スペクトル及び励起スペクトル サンプルと標準物質は、けい光、励起スペクトルともよく一致している。

Fig. 7 Fluorescence and Excitation Spectra of Benzo(k)fluoranthene and Sample

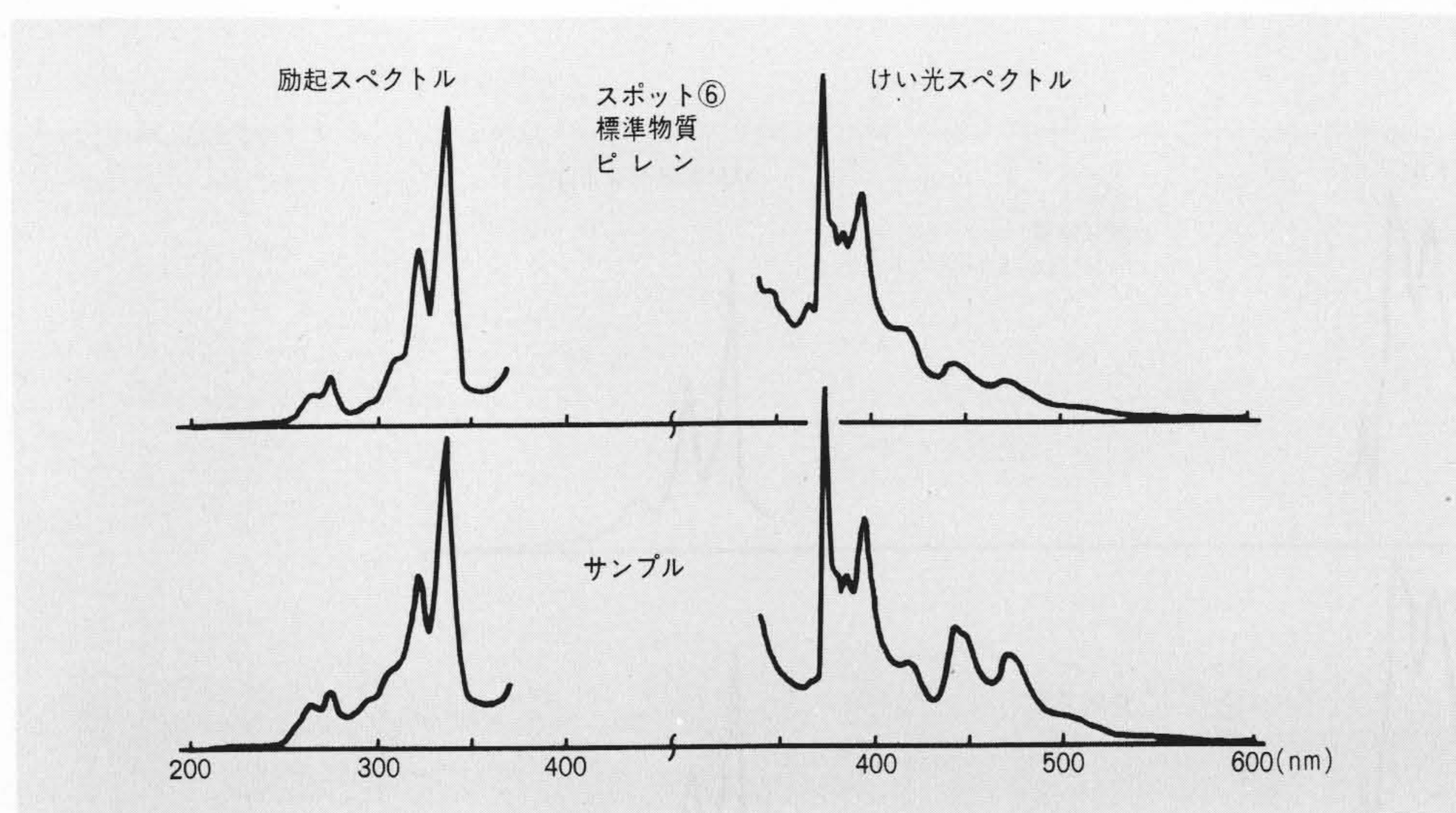


図8 ピレンとサンプルのけい光スペクトル及び励起スペクトル サンプルと標準物質は、けい光、励起スペクトルとも、よく一致している。

Fig. 8 Fluorescence and Excitation Spectra of Pyrene and Sample

間に良好な直線関係が成立することが認められた。従って、この関係を利用して試料中のベンゾ(a)ピレンなどの量を容易に定量できる。なお、二層一次元薄層クロマトグラフィ→直接けい光測定法によるベンゾ(a)ピレンの最小検出量は1 ngで

あった。

3 アフラトキシンの分析

数年前、我が国で輸入ピーナツのかびから強い毒性を有す

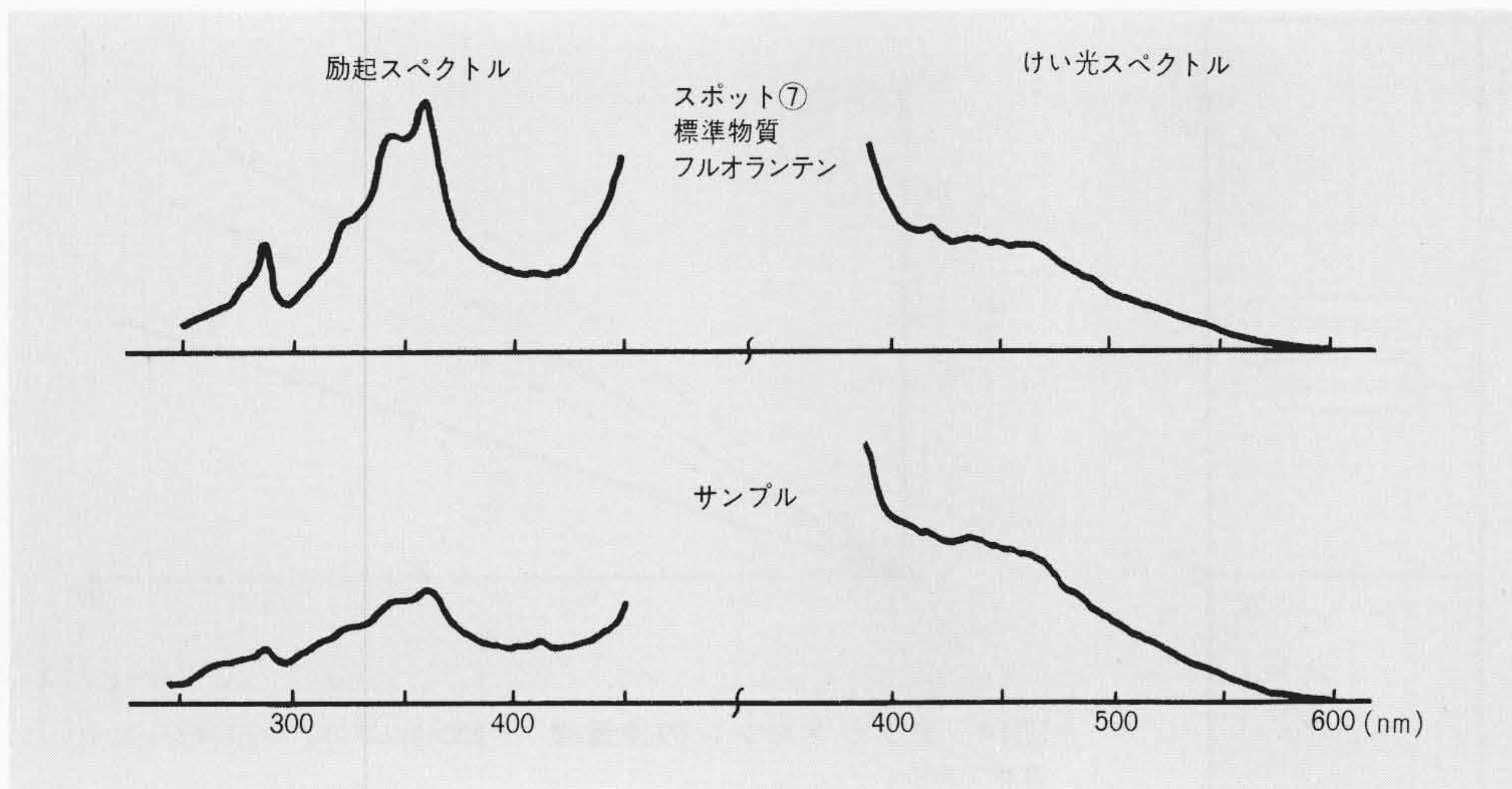


図9 フルオランテンとサンプルのけい光スペクトル及び励起スペクトル
けい光スペクトルは、ブロードで、同定に用いるには不足であるが、励起スペクトルの形は標準物質と一致しているので、同定に用いた。
Fig. 9 Fluorescence and Excitation Spectra of Fluoranthene and Sample

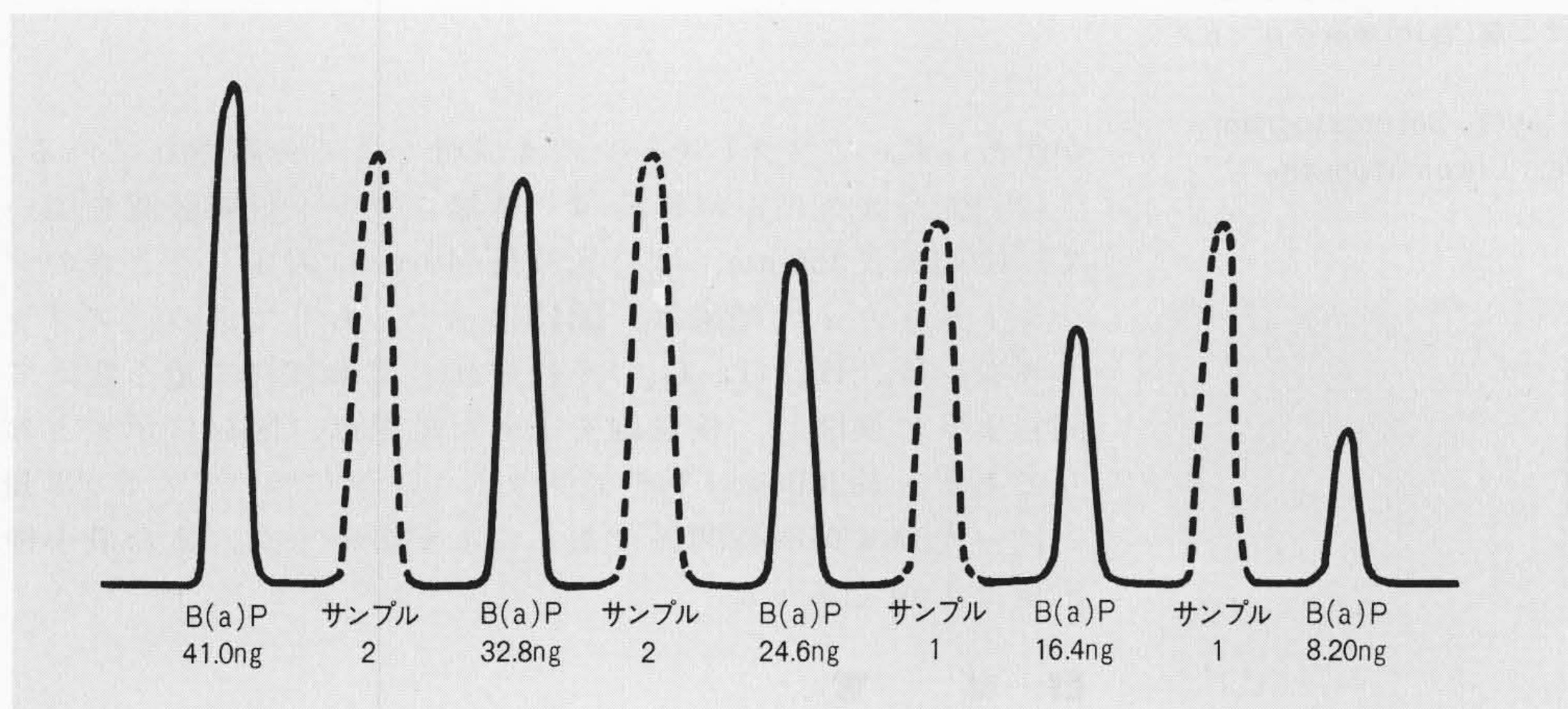


図10 ベンゾ(a)ピレン(B(a)P)とサンプルのデンシトメトリー 展開方向とは直角に行なった。
Fig. 10 Densitometry of Benzo(a)-pyrene and Sample

るかび毒、アフラトキシン(Aflatoxin)が発見され大きな問題になった。アフラトキシンはかびの一種であるアスペルギルスフラブス(Aspergillus Flavs)が生成するかび毒で、アヒル、七面鳥などの多くの種類の動物に対して急性の強い毒性を示すばかりでなく、ラットなどの動物に対しては発ガン性を示すことが発見されている。我が国では昔から数多くの発酵食品が供せられているが、使用しているかびがアスペルギルスフラブスと類似の種類であることから、アフラトキシンの存在が懸念されているが、幸いにもこれまで一件発見されたのみである。しかし、発酵食品や輸入穀物の監視は常時必要であり、現にそのための検査研究機関が設立されている。またアフラトキシンの迅速簡便な分析方法の確立が望まれている。

アフラトキシンは紫外線の照射によって青緑色のけい光を発し、ペーパークロマト又は薄層クロマトによって四つの成分に分けられる。青いけい光を発する成分はアフラトキシン B_1 、 B_2 、緑色のけい光を発するものはアフラトキシン G_1 、 G_2 と名付けられている⁽³⁾。

3.1 前処理

ピーナツ中のアフラトキシンは、以下に述べる手法で分析される⁽⁴⁾。

- (1) 粉碎したピーナツ50gにメタノールと1%NaClの混合液(11:9)を250ml加えて30分間かき混ぜる。
- (2) ノルマルヘキサン200mlを加えて30分間かき混ぜる。
- (3) 水層から50mlを分け取る。
- (4) クロロホルム50mlずつで2回、2分間振とうして抽出する。

- (5) クロロホルム溶液に無水硫酸ソーダを入れて水分を除く。
- (6) クロロホルム溶液を減圧下で50mlになるまで濃縮する。
- (7) カラムクロマトグラフィにかける。

吸着剤：シリカゲル10g+無水硫酸ソーダ15g

ノルマルヘキサン150mlとエーテル150mlでカラムを洗浄しておく。

メタノール-クロロホルム(3:9.7 V/V) 200mlで抽出する。

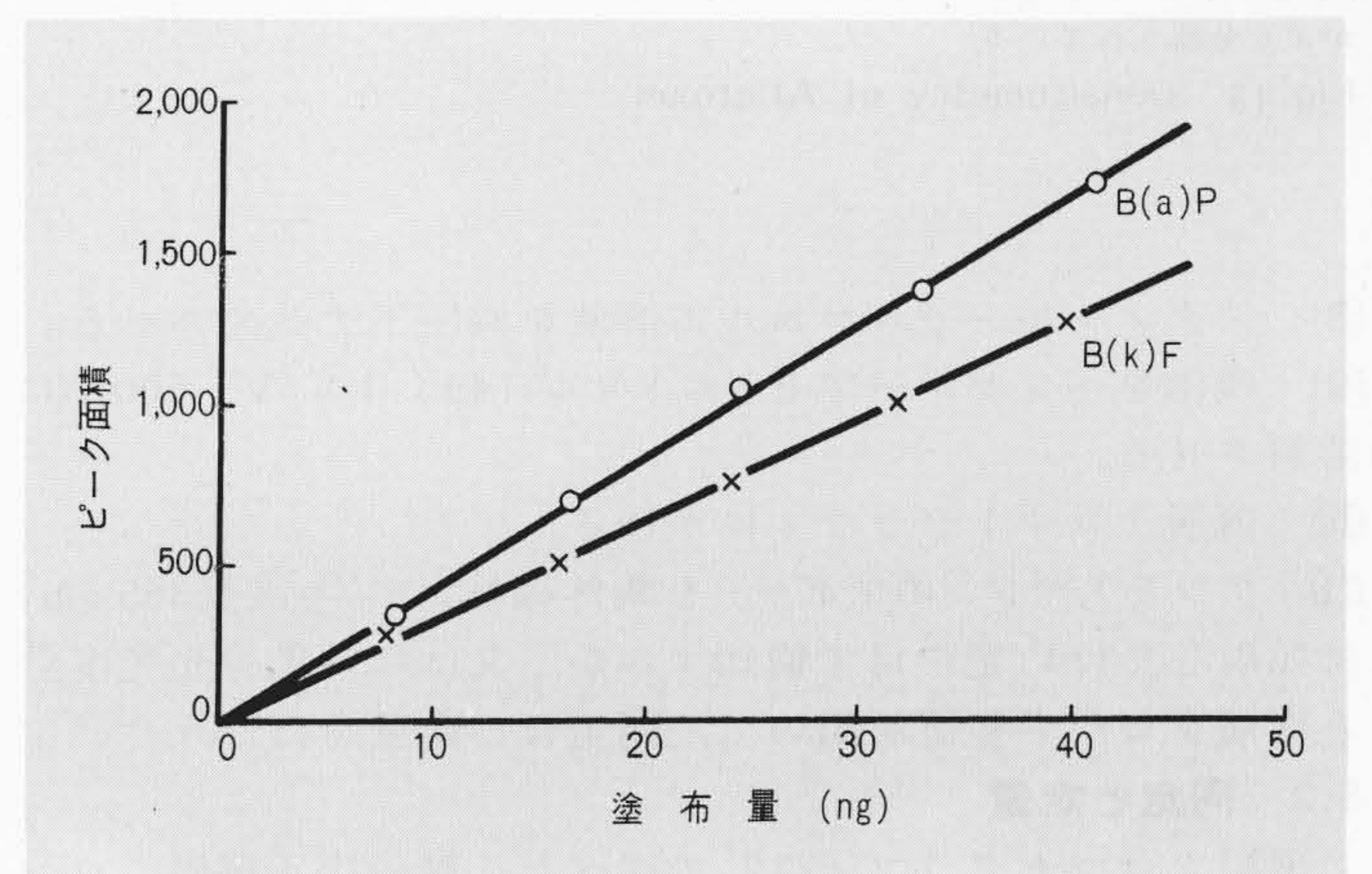


図11 ベンゾ(a)ピレン(B(a)P)とベンゾ(k)フルオランテン(B(k)F)の検量線 ピーク面積と塗布量との間に、直線関係が成立する。
Fig. 11 Calibration Curves for Benzo(a)pyrene and Benzo(k)fluoranthene

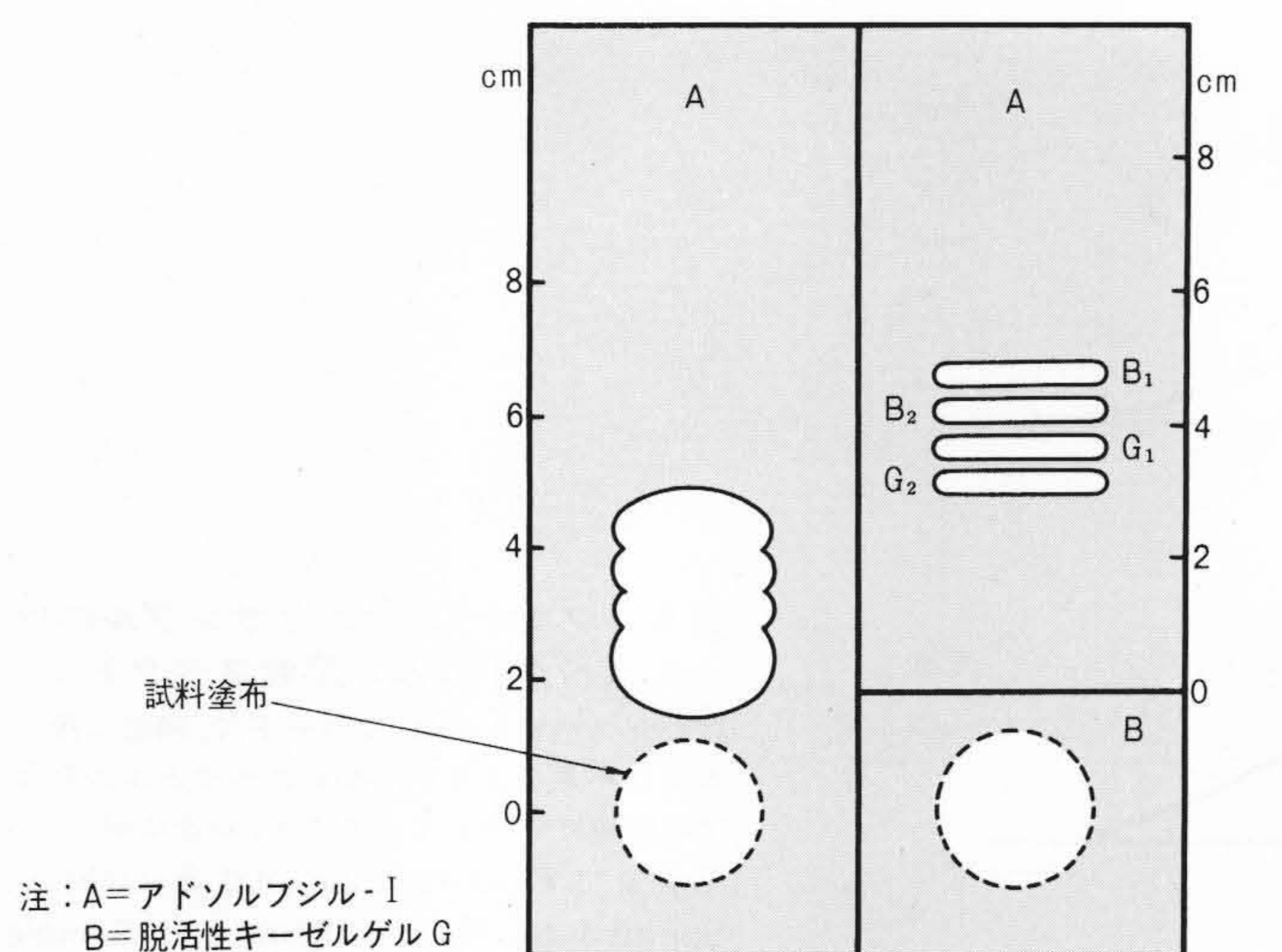


図12 アフラトキシンの一層一次元薄層クロマトグラム及び二層一次元薄層クロマトグラム 一層(左)と比べて二層(右)の薄層クロマトグラムは、分離が格段に良い。

Fig. 12 One Dimensional One Band Thin-layer Chromatogram and One Dimensional Dual Band Thin-layer Chromatogram of Aflatoxin

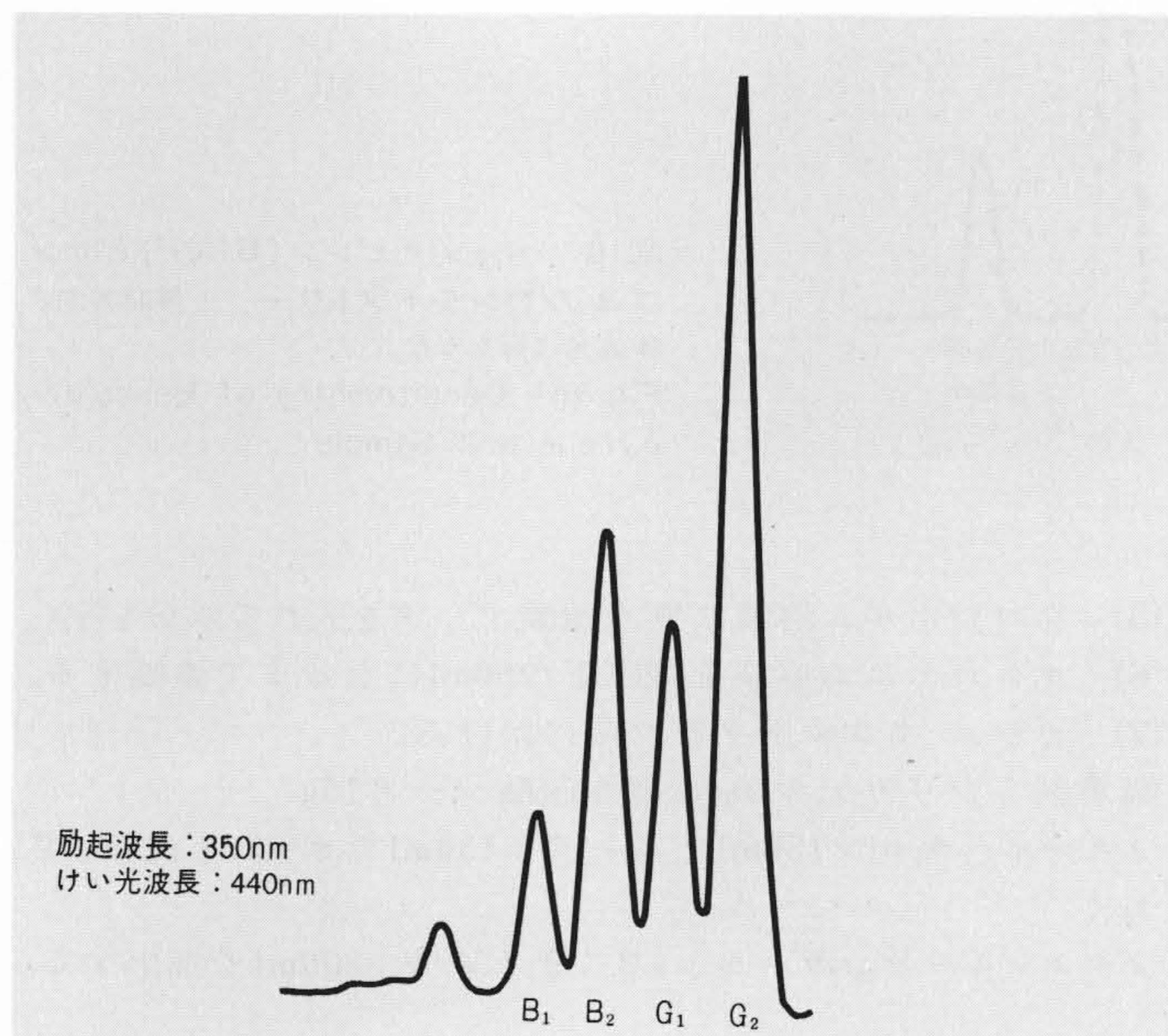


図13 アフラトキシンのデンストメトリー アフラトキシンの4成分がよく分離されている

Fig. 13 Densitometry of Aflatoxin

- (8) メタノール-クロロホルム溶液を減圧下で蒸発させる。
- (9) 残渣をベンゼン-アセトニトリル (49:1 V/V) 500 μ lに溶解させる。
- (10) 薄層クロマトグラフィにかける。
- (11) アフラトキシンのスポットを紫外線ランプ(主波長365 nm)で照射してけい光を目で検知するか、又はけい光分光光度計と薄層クロマト装置を用いて、同定及び定量を行なう。

3.2 同定と定量

薄層クロマトグラフィは2.で述べた二層一次元薄層クロマトグラフィの方法を用いた。図12の左側は一層のクロマトグラムで、吸着剤はアドソルブジル-1である。試料を比較的大まかにつけたこともあって分離は良くない。同図の右側は二層一次元薄層クロマトグラムである。塗布面積が大きいにも

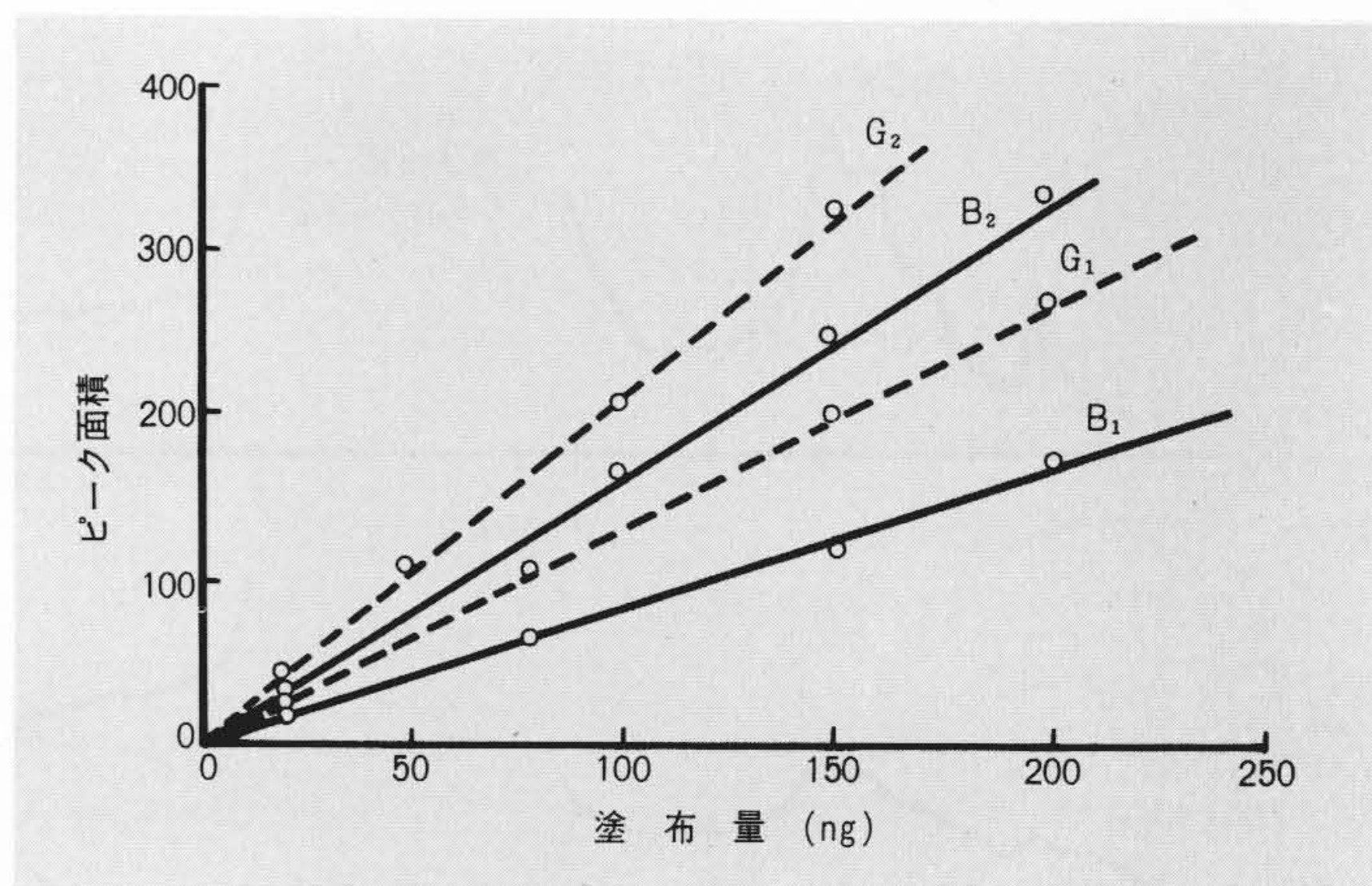


図14 アフラトキシンの検量線 200ng以下のアフラトキシンの場合、直線である。

Fig. 14 Calibration Curves for Aflatoxin

かわらず、アフラトキシンの4成分がよく分離されている。

けい光分光光度計MPF-4と薄層クロマト付属装置を用いて、励起波長350 nm、けい光波長440 nmに設定したときのデンストメトリーの結果は、図13に示すとおりである。アフラトキシンのB₁、B₂、G₁、G₂のそれぞれの標準試料の量を変えて同じように展開し、検量線を求めた結果は、図14に示すとおりである。約200ng以下のアフラトキシンの場合、スポット量とけい光強度は直線関係にあることが分かった。また最小検出量は1 ngであった。

4 結 言

大気浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素及びピーナツのかび毒アフラトキシンを抽出した後、二層一次元薄層クロマトグラフィで分離し、けい光分光光度計と薄層クロマトグラフィ装置を用いて同定及び定量を行なった。この方法は、試料量が少なく操作が簡単で、分析時間が短いことが確認された。

ここでは二例について述べたが、この方法は他にも応用できる。例えば食品だけでも、人工タンパク中のベンゾ(a)ピレン、茶や野菜に見いだされるベンゾ(a)ピレン、ソーセージ、ハムなど食肉加工品に添加される発色剤のニトロサミン、その他の防腐剤、着色剤など発ガン性の疑いのある物質が我々の生活に入りこんでいるが、けい光分析法は、それらの発見、分析に大いに役立つものと思われる。

参考文献

- (1) R.E.Waller: Brit. J. Cancer, 6, 8 (1952)
- (2) H.Matsushita, Y. Suzuki: Bull. Chem. Soc. Japan, 42, 460 (1969)
- (3) 解説「アフラトキシンの発酵食品」食糧 11, 20 (1968)
- (4) 松下, 小谷野, 嵐谷「二層一次元薄層クロマトグラフィによるアフラトキシンの分離」1973年日本化学会秋季大会にて発表