

清涼飲料水中のベンゼンの分析

藤原卓士, 宮川弘之, 新藤哲也, 安井明子, 山嶋裕季子,
小川仁志, 大石充男, 田口信夫, 前潔, 伊藤弘一,
中里光男, 安田和男

Determination of Benzene in Beverage

Takushi FUJIWARA, Hiroyuki MIYAKAWA, Tetsuya SHINDO, Akiko YASUI, Yukiko YAMAJIMA,
Hitoshi OGAWA, Mitsuo OISHI, Nobuo TAGUCHI, Kiyoshi MAE, Kouichi ITO,
Mitsuo NAKAZATO and Kazuo YASUDA

清涼飲料水中のベンゼンの分析

藤原卓士*, 宮川弘之*, 新藤哲也*, 安井明子*, 山嶋裕季子*,
小川仁志*, 大石充男*, 田口信夫*, 前潔*, 伊藤弘一**,
中里光男*, 安田和男***

Determination of Benzene in Beverage

Takushi FUJIWARA*, Hiroyuki MIYAKAWA*, Tetsuya SHINDO*, Akiko YASUI*, Yukiko YAMAJIMA*,
Hitoshi OGAWA*, Mitsuo OISHI*, Nobuo TAGUCHI*, Kiyoshi MAE*, Kouichi ITO**,
Mitsuo NAKAZATO* and Kazuo YASUDA***

Keywords : ベンゼン benzene, 清涼飲料水 beverage, 安息香酸 benzoic acid, アスコルビン酸 ascorbic acid,
ヘッドスペース GC/MS headspace GC/MS

はじめに

有機化合物であるベンゼンは車の排ガスやタバコの煙などに含まれており、発がん性を持つことが知られている¹⁾。我が国では、食品中のベンゼンについての法定基準値はないが、水道法において水道水の基準値は10 ng/mL以下に定められている²⁾。

2006年春以来、イギリス、アメリカ、カナダ、韓国等の諸外国で安息香酸とアスコルビン酸を含む清涼飲料水から「WHO飲料水ガイドライン」の基準値である10 ng/mL³⁾あるいは各国の規制値を超えてベンゼンが検出され、イギリス、韓国等では製造メーカーに対し、自主回収が要請された。これを受け、我が国においても清涼飲料水中のベンゼンの実態調査が行われ、先に、厚生労働省の調査結果が発表されたが、水道法の水質基準値に基づき、10 ng/mLを清涼飲料水の指導にあたっての判断基準とした。

清涼飲料水中のベンゼンは保存料として添加される安息香酸と酸化防止剤あるいは強化剤として添加されるアスコルビン酸が反応して生成されるとされている。この生成にはさらにpH、金属イオン⁴⁾、温度、紫外線などの因子が関与しているといわれているが、生成機構はよく分かっていない。そこで東京都内で流通している清涼飲料水中のベンゼン含有量の実態調査と併せて、ベンゼン生成に関与する種々のファクターを検証すべく安息香酸、アスコルビン酸の他に、銅、鉄などの金属イオンの濃度およびpHを測定したので、その結果も合わせて報告する。

実験方法

1. 試料

都内のスーパー、コンビニエンスストア、酒屋などで清

涼飲料水88試料を購入し、分析を行った。

なお、試料の内訳は栄養ドリンク30検体、炭酸飲料12検体、茶飲料およびコーヒー17検体、ジュースおよびその他の飲料29検体であった。

2. 試薬

ベンゼン標準原液 (1 mg/mLメタノール溶液)、フルオロベンゼン標準原液 (1 mg/mLメタノール溶液) およびメタノールは関東化学の水質試験用を用いた。水は市販のミネラルウォーターを、塩化ナトリウムは市販特級品をベンゼンに汚染されていないことを確認して用いた。

安息香酸、アスコルビン酸、鉄および銅イオン標準溶液は和光純薬工業株式会社製を、その他の試薬は市販特級品を用いた。

3. 装置および測定条件

1) ベンゼン分析条件

GC/MS装置 : TRACE GC, DSQ II ThermoFisher Scientific 社製

GC測定条件 : カラム : AQUATIC-2 (0.25 mm i.d.×60 m 膜厚1.40 μm, GL Science社製); キャリアガス : ヘリウム 1.2 mL/min; 注入口温度 : 200°C; トランスファーライン温度 : 250°C; アジテーター温度 : 80°C; 昇温条件 : 40°C (1 min.) →30°C/min→250°C (3 min.)

MS測定条件 : 注入方法 : スプリットレス; イオン化法 : EI法; イオン化電圧 : 70 eV; 測定モード : Full Scan m/z=46-180, SIM m/z=52, 77, 78 (ベンゼン), 70, 96 (フルオロベンゼン); 注入量 : 2.5 μL

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科, *** 東京都健康安全研究センター食品化学部

2) 安息香酸分析条件

HPLC装置：日本分光（株）製ガリバーシリーズ；HPLCカラム：COSMOSIL 5C18-AR-II（4.6 mm i.d.×150 mm，粒子径5.0 μm）；移動相：メタノール・アセトニトリル・5 mmol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.0）（1:2:7）；カラム温度：40℃；測定波長：230 nm；注入量：10 μL

3) アスコルビン酸分析条件

HPLC装置：日本分光（株）製870-UVシリーズ；HPLCカラム：Inertsil-5NH2（4.6 mm i.d.×250 mm，粒子径5.0 μm）；移動相：アセトニトリル・0.01 mmol/Lリン酸一カリウム溶液（80:20）；カラム温度：40℃；測定波長：254 nm；注入量：10 μL

4) 鉄および銅イオン分析条件

誘導結合プラズマ（以下ICPと略す）発光分光分析装置：サーモジャーレルアッシュ（株）製IRIS Advantage；測定波長：Cu 324 nm，Fe 238 nm

4. 分析方法

1) ベンゼンの測定：清涼飲料水中のベンゼンの分析は，GCの昇温条件およびアジテーターの温度を除き厚生労働省告示食安基発第0728008号の方法に従った⁵⁾。

20 mLヘッドスペース用バイアルに試料10 mLと塩化ナトリウム3 gを入れ，さらに内部標準としてフルオロベンゼンを10 ng/mLとなるように加え，密栓してよく振り混ぜ試料液とした．次いで試料液のヘッドスペースガスをGC/MSに注入し，ベンゼンおよび内部標準のピーク面積と検量線からベンゼン濃度を算出した．ただし，炭酸飲料については，30%水酸化ナトリウム溶液1 mLを加えた50 mLメスフラスコ中に炭酸飲料を加えてメスアップしたものを試料とした．ベンゼンが検出された製品については，同一ロットで再度測定を行い，これらの測定で得られたベンゼンの平均値をその製品におけるベンゼン含有量とした．

検量線用標準原液はベンゼンの濃度が1, 2, 4, 10, 20, 40, 100 μg/mL，内部標準のフルオロベンゼン濃度が10 μg/mLとなるように，メタノールを用いて調製した．

検量線は20 mLヘッドスペース用バイアルに10 mLの水と塩化ナトリウム3 gを入れ，そこに検量線用標準原液をそれぞれ10 μLずつ加え，（バイアル中のベンゼンの濃度は1, 2, 4, 10, 20, 40, 100 ng/mL，フルオロベンゼンの濃度は10 ng/mLである）直ちに密栓し，振り混ぜた後，ヘッドスペース付きGC/MSによりベンゼンのピーク面積を測定して内部標準法により検量線を作成した．

図1にベンゼン10 ng/mLの標準溶液とベンゼンが検出された試料（栄養ドリンク-1）の FullScan での GC/MS クロマトグラムとマススペクトルを示した．

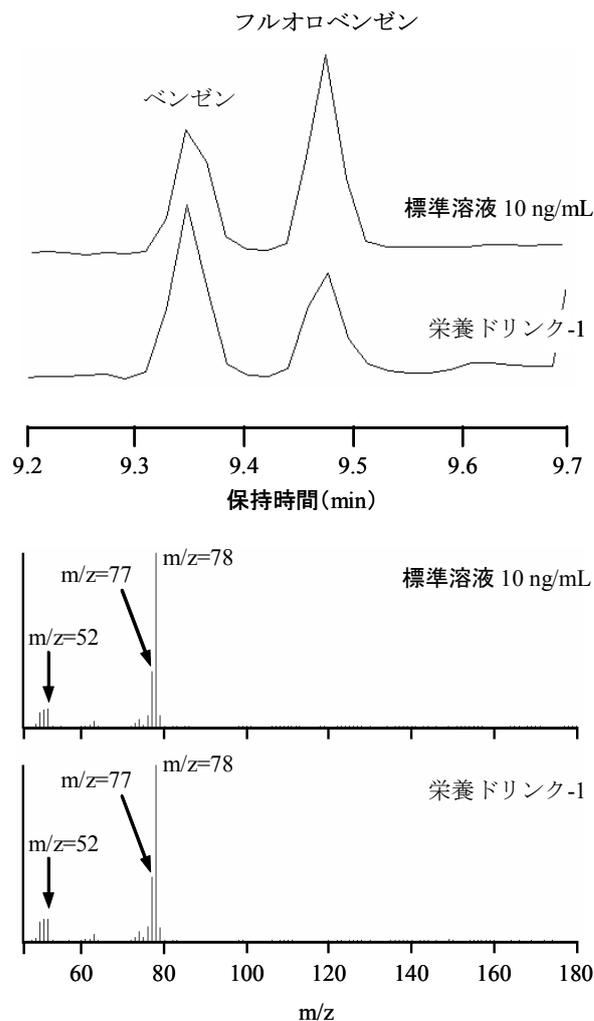


図1. ベンゼン標準溶液（10 ng/mL）とベンゼンが検出された試料（栄養ドリンク-1）のGC/MSクロマトグラム（上）とそれぞれのマススペクトル（下）

2) 安息香酸塩の測定：食品衛生検査指針 食品添加物編（2003）に準じた⁶⁾。試料10 gを100 mL容メスフラスコに量り取り，蒸留水で100 mLにした．さらにメタノールで二倍に希釈した後，0.45 μmのフィルターでろ過した溶液をHPLCに供し，絶対検量線法にて定量した．

3) アスコルビン酸の測定：食品衛生検査指針 食品添加物編（2003）に準じた⁷⁾。

4) 金属イオンの測定：試料を0.45 μmのフィルターでろ過し，ICPにより測定した．

5) モデル実験：ベンゼンの生成に関与する因子として安息香酸とアスコルビン酸の他に，金属イオンや温度等が促進因子とされることから，これらの影響を調べるためにモデル実験を行った．

(1) 温度条件に対するベンゼン生成量の変化

表1. 清涼飲料水中のベンゼン等の含有量

	ベンゼン (ng/mL)	安息香酸		アスコルビン酸		Cu (µg/mL)	Fe (µg/mL)	pH	
		表示	検出値(g/kg)	表示	検出値(g/kg)				
栄養ドリンク	1	14	+	0.45	+	0.47	0.12	4.2	
	2	5	+	0.46			0.25	3.9	
	3	3	+	0.40	+	5.9	0.03	3.0	
	4	3	+	0.55	+	5.5	0.03	4.5	
	5	3	+	0.56	+	4.8	0.07	4.6	
	6	2	+	0.55	+	5.1	0.04	4.6	
	7	2	+	0.39			0.03	2.9	
	8	2	+	0.44			0.04	2.9	
	9	1	+	0.39			0.02	2.6	
	10	1	+	0.53	+	9.6	0.08	4.6	
	11	1	+	0.42			0.04	2.8	
	12	1	+	0.48			0.07	3.8	
	13		+	0.47			0.02	2.6	
	14		+	0.52	+	10	0.03	4.6	
	15		+	0.39			0.05	3.0	
	16		+	0.42			0.03	2.7	
	17		+	0.41	+	17	0.36	4.5	
	18		+	0.36			0.02	2.8	
	19		+	0.43			0.02	2.7	
	20		+	0.43			0.02	3.4	
	21		+	0.43			0.06	3.1	
	22		+	0.37			0.03	3.1	
	23		+	0.41			0.07	3.2	
	24		+	0.37			0.02	2.8	
	25		+	0.27			0.04	4.1	
	26		+	0.34			0.03	3.4	
	27		+	0.46			0.04	3.3	
	28		+	0.48			0.04	4.9	
	29		+	0.48			0.16	4.9	
	30		+	0.42			0.34	2.5	
炭酸飲料	1	5	+	0.26	+	0.02	0.02	3.1	
	2	5	+	0.39			0.04	2.8	
	3		+	0.28			0.07	3.1	
	4		+	0.14	+	0.03	0.01	3.4	
	5		+	0.38			0.03	3.1	
	6		+	0.33			0.12	3.6	
	7		+	0.29			0.02	3.0	
	8		+	0.24			0.01	3.1	
	9		+	0.23			0.04	3.0	
	10		+	0.20	+	0.13	0.07	3.0	
	11		+	0.16				2.8	
	12		+	0.14	+	0.14		0.10	2.8
茶飲料およびコーヒー	1				+	0.92	0.02	4.0	
	2				+	0.65	0.06	6.2	
	3				+	0.47	0.03	6.2	
	4				+	0.38	0.03	5.6	
	5				+	0.36		6.3	
	6				+	0.34		6.6	
	7				+	0.33		6.2	
	8				+	0.27	0.03	4.0	
	9				+	0.25	0.05	6.6	
	10				+	0.14		5.5	
	11				+	0.10		5.8	
	12				+	0.10		6.0	
	13				+	0.10		6.1	
	14				+	0.06		6.3	
	15				+	0.03		3.9	
	16							0.11	6.6
	17							0.06	6.6

	ベンゼン (ng/mL)	安息香酸		アスコルビン酸		Cu ($\mu\text{g/mL}$)	Fe ($\mu\text{g/mL}$)	pH
		表示	検出値(g/kg)	表示	検出値(g/kg)			
	1	7	<0.01	+	0.19		0.17	2.7
	2	2	0.03	+	0.22		0.40	2.7
	3		0.41	+			0.52*	2.5
	4		0.37	+			0.22	3.2
	5		0.36	+	3.8		0.06	3.4
	6		0.33	+			0.26	3.6
	7			+	2.7		0.01	3.7
	8			+	1.8		0.02	3.0
ジュ ー ス お よ び そ の 他 の 飲 料	9			+	1.3		0.10	3.4
	10			+	0.66		0.17	3.7
	11			+	0.32		0.07	3.3
	12			+	0.32		0.05	3.4
	13			+	0.25		0.08	3.3
	14			+	0.21	0.04	0.21	3.6
	15			+	0.17		0.13	3.5
	16				0.12	0.04	0.69	4.9
	17				0.09		0.08	5.0
	18				0.07	0.46	2.3*	4.2
19				0.07		0.68	3.2	
20				+	0.07		0.21	3.7
21				+	0.04		0.24	2.8
22					0.01		1.5	4.2
23						0.24	2.2*	4.2
24				+		0.11	0.44	3.9
25						0.03	0.56	3.6
26							0.13*	5.0
27							1.4	3.3
28				+			0.94	3.4
29							0.10	6.7

注) ベンゼン, 安息香酸, アスコルビン酸, 鉄, 銅の定量限界値はそれぞれ 1 ng/mL, 0.01 g/kg, 0.01 g/kg, 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.03 $\mu\text{g/mL}$ であり, 定量限界値以下は空欄で表している. * ; $\mu\text{g/g}$

用いる基質は様々な要因を排除するため0.1 mol/Lクエン酸緩衝液を用いた. クエン酸緩衝液は0.1 mol/Lクエン酸と0.1 mol/Lクエン酸三ナトリウムを混合してpH 3.0となるように調製した.

クエン酸緩衝液8 mLに5,000 $\mu\text{g/mL}$ 安息香酸ナトリウム溶液(安息香酸として), 50 mg/mLアスコルビン酸ナトリウム溶液(アスコルビン酸として)をそれぞれ1 mLずつ加え, そこに100 $\mu\text{g/mL}$ となるように調製した銅および鉄イオン標準溶液を10 μL 加えて試験溶液を調製した.(溶液内の安息香酸, アスコルビン酸, 銅および鉄イオンの濃度はそれぞれ500 $\mu\text{g/mL}$, 5,000 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ である)また, この系にアスコルビン酸を添加せずに調製したものをブランク溶液とした. 試験溶液とブランク溶液を調整後, それぞれ4 $^{\circ}\text{C}$, 室温, 45 $^{\circ}\text{C}$ で24 時間保存し, 溶液中のベンゼン生成量の測定を行った. なお, 4 $^{\circ}\text{C}$ は冷蔵庫, 室温は蛍光灯下実験台上に, 45 $^{\circ}\text{C}$ は恒温器内にそれぞれ静置した.

(2) ベンゼン生成における遮光の影響

前項と同様に試験溶液を調製後, 25 $^{\circ}\text{C}$ で遮光した条件下で静置し, それぞれ調製直後, 4日後, 7日後, 14日後に各溶液中のベンゼンの生成量の測定を行った.

結果及び考察

1. 清涼飲料水中のベンゼン含有量

今回測定を行った88試料の調査結果を表1に示した. ベンゼンは16検体から検出された(検出限界1 ng/mL). 清涼飲料水を種類別にみると, 栄養ドリンク(計30検体)については, 12検体から1-14 ng/mLのベンゼンが検出され, そのうち1検体から水道法の基準値である10 ng/mLを超える値が検出された. 炭酸飲料(計12検体)では, 2検体から各5 ng/mLのベンゼンが検出され, お茶およびコーヒー(計17検体)からは検出されなかった. ジュースおよびその他の飲料(計29検体)についてはクランベリージュース2検体(ジュース-1, 2)から各々7および2 ng/mLのベンゼンが検出された.

安息香酸は栄養ドリンクと炭酸飲料のすべてジュースおよびその他の飲料の一部からそれぞれ0.27-0.56, 0.14-0.39 および<0.01-0.47 g/kg検出されたが, クランベリージュース2検体を除き, いずれも安息香酸の添加表示があった. クランベリージュース2検体から検出された安息香酸は, 天然由来と判断される⁸⁾. なお, ベンゼンが検出された検体からはすべて安息香酸が検出されたが, 両者の検出量の間に相関は見られなかった.

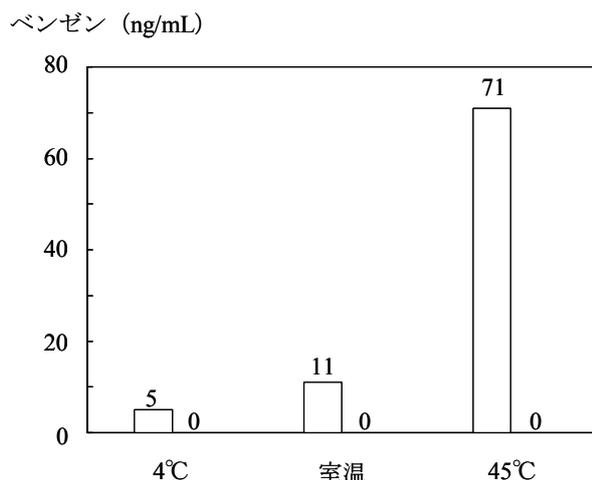


図2. 各種温度条件で24 時間保存した試験溶液のベンゼン生成量 (左 試験溶液 右 ブランク溶液)

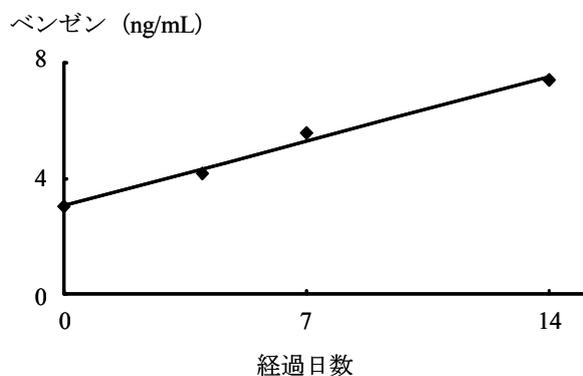


図3. 25°Cで遮光して保存した試験溶液のベンゼン生成量

アスコルビン酸は栄養ドリンク、炭酸飲料、茶飲料およびコーヒーの添加表示のある検体すべてからそれぞれ0.47-17, 0.02-0.14, 0.03-0.92 g/kg検出された。ジュースからは0.01-3.8 g/kg検出されたが、添加表示のないものからも検出された。これは原料に由来するものと思われる。

また、表示があってもアスコルビン酸が検出されないものもあり、これは製造過程あるいは流通段階で分解してしまったものと思われる。本調査ではアスコルビン酸が検出されないにもかかわらず、ベンゼンが検出された試料が7検体あった。

金属イオンについては、鉄イオンはほとんどすべての検体から検出されたが、銅イオンはベンゼンを検出した検体からは検出されなかった。

pHは栄養ドリンクでほぼ2.5-4.5、炭酸飲料では3.0前後、お茶およびコーヒーでは中性に近いものが多く、ジュースでは2.5-5.0付近のものが多かった。

2. 各種温度と遮光条件下におけるベンゼン生成

図2に温度条件の違い、図3に遮光条件下の影響についての結果を示した。

温度の影響については、図2のように温度が高くなるほどベンゼンの生成が促進されることがわかった。特に45°Cの場合は4°Cの約14倍、室温の6.5倍の生成量であった。また、水溶液中に安息香酸と金属イオンが共存してもアスコルビン酸が存在しなければベンゼンはほとんど生成しないことがわかった。また、実際の試料ではアスコルビン酸が存在しない試料からもベンゼンが検出されたが、おそらくこれらの試料中にはアスコルビン酸に代わる生成因子があるものと推察される。

また、遮光すると、図3に示したように、その反応は穏やかになったが、試験溶液中のベンゼンは、時間の経過とともに増加した。

これらのことから、本モデル系ではベンゼンは安息香酸、アスコルビン酸、金属イオンが共存すると生成するが、温度はそれを促進し、光を遮断するとその反応は穏やかになることがわかった。以上の結果、温度と光はベンゼン生成の促進因子であることは明らかである。したがって、清涼飲料水の保管をする場合、冷暗所に保存するとベンゼンの生成を抑制できるものと思われる。

ま と め

東京都内において購入した清涼飲料水88検体において、厚生労働省告示食安基発第0728008号の方法に従いベンゼンの濃度を測定したところ、16検体についてベンゼンが検出され、そのうち1検体について水道水の基準値である10 ng/mLを超える値が検出された。なお、当該品については、監視行政部署を通じて製造者に情報提供を行った。

一方、ベンゼンはアスコルビン酸が存在しない試料からも検出されたことから、アスコルビン酸が分解して試料から消失していた可能性も否定はできないが、アスコルビン酸以外の物質の関与によっても生成される可能性が高いと推察された。

また、ベンゼン生成の本体とされる安息香酸とベンゼンの間、生成条件に関わるとされる金属イオン、pHとベンゼンの間には特に量的な相関は認められなかったが、温度と光はその反応の促進因子であると考えられた。

文 献

- 1) <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthgr01.php> (2007年8月30日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H15/H15F19001000101.html> (2007年8月30日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 日本水道協会:WHO 飲料水水質ガイドライン(第2版), 2, 423-428, 1999, 日本水道協会, 東京.
- 4) Lalita K. Gardner, Glen D. Lawrence : *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 693-695, 1993.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全基準審査課長通知:清涼飲料水中のベンゼンについて,平成18年7月28日付

食安基発第 0728008 号, 2006.

- 6) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針食品添加物編 2003, 12-16, 2003, (社)日本食品衛生協会, 東京.
- 7) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針食品添加物編 2003,

32-37, 2003, (社)日本食品衛生協会, 東京.

- 8) 宮本美紀子, 森 茂, 宇野沢高春, 他: 千葉衛研報告, **8**, 60-63, 1984