

表 4 CS3 および CS4 の不純物の検定結果

化合物	検量線用st			CS3			CS4		
	HRGC/HRMS	保持時間	検出限界	HRGC/HRMS	面積	定量値*	HRGC/HRMS	面積	定量値*
	注入量 (pg)	(min)	(S/N=3, pg)	注入量 (pg)		(pg)	注入量 (pg)		(pg)
2,3,7,8-tetraCDD	2	18.42	0.0049	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,7,8-pentaCDD	2	22.48	0.0071	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,4,7,8-hexaCDD	2	26.37	0.0071	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,6,7,8-hexaCDD	2	26.50	0.0069	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,7,8,9-hexaCDD	2	26.85	0.012	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD	2	30.60	0.012	-	0	ND	-	0	ND
octaCDD	4	34.52	0.010	-	0	ND	-	0	ND
2,3,7,8-tetraCDF	2	18.00	0.0091	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,7,8-pentaCDF	2	21.31	0.0093	-	0	ND	-	0	ND
2,3,4,7,8-pentaCDF	2	22.27	0.0056	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,4,7,8-hexaCDF	2	25.39	0.0042	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,6,7,8-hexaCDF	2	25.55	0.0038	-	0	ND	-	0	ND
2,3,4,6,7,8-hexaCDF	2	26.27	0.012	-	406	0.030	-	0	ND
1,2,3,7,8,9-hexaCDF	2	27.42	0.0090	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,4,6,7,8-heptaCDF	2	29.15	0.010	-	0	ND	-	0	ND
1,2,3,4,7,8,9-heptaCDF	2	31.43	0.0076	-	0	ND	-	0	ND
octaCDF	4	34.86	0.0074	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,7,8-tetraCDD	2	18.41	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,7,8-pentaCDD	2	22.47	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,7,8-hexaCDD	2	26.35	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,6,7,8-hexaCDD	2	26.47	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,7,8,9-hexaCDD	2	26.84	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD	2	30.58	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -octaCDD	4	34.51	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,7,8-tetraCDF	2	17.99	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,7,8-pentaCDF	2	21.30	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,4,7,8-pentaCDF	2	22.26	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,7,8-hexaCDF	2	25.38	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,6,7,8-hexaCDF	2	25.53	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,4,6,7,8-hexaCDF	2	26.24	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,7,8,9-hexaCDF	2	27.41	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,6,7,8-heptaCDF	2	29.14	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,7,8,9-heptaCDF	2	31.42	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -octaCDF	4	34.84	-	-	0	ND	-	0	ND
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2-monoCB(#1)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -4-monoCB(#3)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2'-diCB(#4)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -4,4'-diCB(#15)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',6-triCB(#19)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -3,4,4'-triCB(#37)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',6,6'-tetraCB(#54)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -3,3',4,4'-tetraCB(#77)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -3,4,4',5-tetraCB(#81)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',4,6,6'-pentaCB(#104)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,3',4,4'-pentaCB(#105)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,4,4',5-pentaCB(#114)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3',4,4',5-pentaCB(#118)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2',3,4,4',5-pentaCB(#123)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -3,3',4,4',5-pentaCB(#126)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',4,4',6,6'-hexaCB(#155)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,3',4,4',5-hexaCB(#156)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,3',4,4',5'-hexaCB(#157)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3',4,4',5,5'-hexaCB(#167)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -3,3',4,4',5,5'-hexaCB(#169)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB(#188)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB(#189)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,3',5,5',6,6'-octaCB(#202)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,3',4,4',5,5',6-octaCB(#205)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaCB(#206)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonaCB(#208)	-	-	-	500	-	-	500	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decaCB(#209)	-	-	-	500	-	-	500	-	-

\*ND: 検出せず

## Ⅱ. 分担研究報告書

### 2. 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定 法の開発

#### 2-4. 食品中ベンゾトリアゾール類の迅速測定法の開発

分担研究者 堤 智昭

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究

(2) 食品中ダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発

(2-4) 食品中ベンゾトリアゾール類の迅速測定法の開発

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

プラスチック用の紫外線吸収剤であるベンゾトリアゾール類は、難分解性、蓄積性を有し毒性が懸念されている。最近、ベンゾトリアゾール類の1種が化審法の第1種指定化学物質に指定され、その類縁化合物も含め食品汚染の把握が急務である。そこで本研究では、食品中のベンゾトリアゾール類の迅速測定法を開発することを目的とし、平成18年度には、測定対象とするベンゾトリアゾール類の測定のための基本物性を明らかにするとともに、HPLC分析とLC/MS/MS分析での当面の条件を決定し、高感度分析の可能性を示した。また、脂肪分の大きく異なる3種類の魚を用いて、5種類の方法で脂肪のアルカリ分解条件を検討し、従来法の問題点を明らかにし、新しい抽出液分解法を提案した。

研究協力者

横浜国立大学環境情報研究院  
浦野絃平、清水優子

ゾール類の迅速測定法を開発し、食品汚染の実態調査に役立てることを目的とした。

A. 研究目的

プラスチック用の紫外線吸収剤として長年にわたって使用されてきたベンゾトリアゾール類の1種である 2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール:(DBHP)BT:[CAS 3846-71-7]が、環境中での残留性と生物への濃縮性および毒性があることが判明し、平成19年11月に、化学物質の審査および規制に関する法律(化審法)で第1種指定化学物質に指定され、日本での製造・使用が禁止された<sup>1),2)</sup>。

しかし、ベンゾトリアゾール類には指定された化合物と類似な物質もあり、また、世界的には使用が続いており、これらによる地球レベルの食品汚染が懸念されている。

そこで、本研究では食品中のベンゾトリア

B. 研究方法

1. 試料

1.1 測定対象化合物の選定

ベンゾトリアゾール類には、化審法で第1種指定化学物質に指定された(DBHP)BT以外にも、ベンゼン環の置換基の炭素数や側鎖の形が異なるだけの 2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-アミルフェノール:(DAHP)BT:[CAS 25973-55-1]、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-メチルフェノール:(MHP)BT:[CAS 2440-22-4]、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-オクチルフェノール:(OHP)BT:[CAS 3147-75-9]、およびトリアゾール環に塩素が付加した 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール:(DBHP)CBT:[CAS 3864-99-1]や 2-tert-

ブチル-4-メチル-6-(5クロロ 2H-1,2,3 ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール：(BMHP)CBT:[CAS 3896-11-5]など、類似の化合物が利用されている。これら(DBHP)BT以外のベンゾトリアゾール類のうち(DAHP)BT、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT は難分解性であり、とくに(DBHP)CBT は生物濃縮性も高いため、化審法の第1種監視化学物質に指定されているほか、(DAHP)BTや(BMHP)CBTも濃縮性がやや高いことが分かっている。また、(MHP)BTと(OHP)BTは、分解性が比較的高いことが分かっているが、生産量が多いことから、食品汚染が懸念されている。そこで本研究では、これら6種類のベンゾトリアゾール類を研究対象とした。

### 1.2 試薬

ベンゾトリアゾール類の試薬は、(DBHP)BT、(DAHP)BT、(OHP)BTは東京化成社製、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT、(MHP)BTは和光純薬社製を用いた。また、メタノールはLC/MS用、アセトン、ヘキサンは残留農薬試験用、水酸化カリウム(KOH)や食塩(NaCl)などは特級の和光純薬製試薬を用いた。

### 1.3 魚試料

魚試料は、神奈川県内で購入した脂肪分の異なるマサバ2種類と脂肪分が非常に多いクロマグロの大トロ部分1種類をフードプロセッサで細かく砕いて均一化して使用した。ただし、食品中ダイオキシン類(DXN)分析法とその改良法では、KOHエタノール溶液を添加後、ホモジナイザーでさらに混合、破碎した。

## 2.装置と方法

### 2.1 分析機器と分析条件

各ベンゾトリアゾール類の紫外線吸収スペクトルの測定には、島津製作所社製の分光光度計UV-1200型を用いた。また、高速液体クロマトグラフ(HPLC)は、Waters 2695 Separation

ModuleのHPLCに、UV検出器Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detectorを接続したものを利用した。また、LC/MS/MSには、上記のHPLCとMicromass Quattro Microを用いた。これらの分析条件を表1、表2に示す。

表1 HPLCの分析条件

カラム	3.5 $\mu$ mのSunFireC18(2.1 $\times$ 150mm)
温度	40 $^{\circ}$ C
移動相組成	メタノール/水=99/1~97/3
移動相流量	0.3mL/min
試料注入量	5~50 $\mu$ L
検出波長	305nmと340nm

表2 LC/MS/MSの分析条件

カラム	3.5 $\mu$ mのSunFireC18(2.1 $\times$ 150mm)
温度	40 $^{\circ}$ C
移動相組成	メタノール/水=99/1
移動相流量	0.3mL/min
試料注入量	5~50 $\mu$ L
ネブライザーガス	N <sub>2</sub>
コリジョンガス	Ar
イオン化法	APCI(+)
モニタリング方法	MRM
イオン源温度	120 $^{\circ}$ C

### 2.2 アルカリ分解・抽出方法

一般的に魚介類中の有機汚染物質分析での脂肪等のアルカリ分解は、KOHエタノール溶液で行われている。これは、KOHが水やエタノールには溶けるが、ヘキサンやアセトンには溶けないため、およびエタノールが分解生成物も溶かしやすいためと考えられる。また、NaOHでなくKOHが使用されているのは、KOHの方がアルカリ強度が大きく、エタノールにも溶けやすいために反応速度が速くなり、反応生成物の溶解度も大きくなるためと考えられている。このため、本研究でもKOHエタノール溶液を用いた各種のアルカリ分解法を検討し、できるだけ容易に、か

つ、十分に分解と抽出ができる方法の開発を試みた。すなわち、魚を KOH エタノール溶液で分解後、分液ロートでヘキサン抽出する方法として、①環境省報告<sup>3)</sup>に記載されている方法(A法)と②その改良法、③「食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCB の測定方法

暫定ガイドライン<sup>4)</sup>に一例として記載されている方法(B法)と④その改良法、および⑤エタノール・ヘキサンで抽出後、KOH を加えて分解・精製する”抽出分解法”の5つの方法を比較検討した。これらの方法の基本フローを図1に示す。

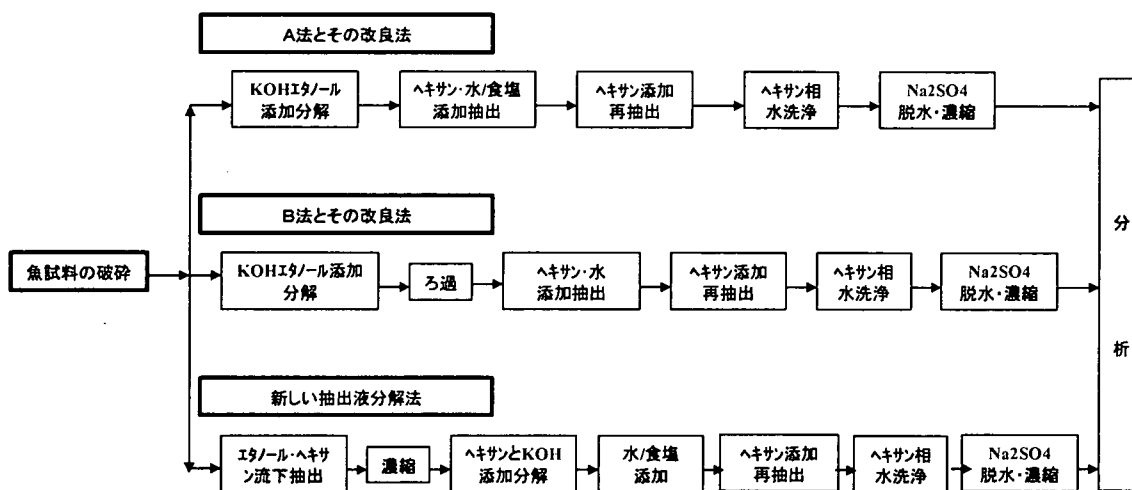


図1 アルカリ分解・抽出法を検討した基本操作フロー

直接分解法のうち A 法とその改良法では、フードプロセッサで細かく砕いて均一化した魚試料に、1mol/L の KOH エタノール溶液を単位試料重量あたり 5mL/g-wet を加えた。その後、90℃で還流しながら2時間分解したのち、A 法については KOH エタノール液量の 8/5 倍量のヘキサンと 10 倍量の 10%食塩水を、A 法改良法については KOH エタノール液量の 2/5 倍量のヘキサンと等倍量の水を加えて、振とう抽出後にヘキサン相の分離状態を観察、評価した。ヘキサンが分離できた場合には水・エタノール相にヘキサンを再度添加して抽出後、A 法改良法については合わせたヘキサンを同量の精製水で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)で脱水後にヘキサンを蒸発させ、残さの状態を観察し、重量を測定した。

B 法とその改良法では、フードプロセッサで細かく砕いて均一化した魚試料に、1mol/L の KOH エタノール溶液を単位試料重量あたり 3mL/g-wet または 5mL/g-wet 加えて、さらに

ホモジナイザーで混合した(ただし、クロマグロは、ホモジナイザーに組織が挟まり操作不能であった)。20℃または 40℃で 2 時間攪拌、あるいは 20℃で 15 時間静置して分解後、ろ過した液について、ヘキサン(KOH エタノール液量の 2/5 倍量)と水(KOH エタノール液量と同量)を加えて振とう抽出した。その後、ヘキサン相の分離状態を観察し、ヘキサン相が分離できた場合は、水・エタノール相にヘキサンを再度添加して抽出後、合わせたヘキサンを 2/3 倍量の精製水で 2 回洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で脱水後、ヘキサンを蒸発させ、残さの観察と重量測定を行った。

抽出液分解法では、4 試料が同時に抽出できる加熱流下式高速抽出装置 SE-100 型(ダイインスツルメンツ社製)を用いて抽出を行った。抽出条件は、平成 16 年度厚生労働科学研究補助金による研究成果「高速加熱流下抽出装置による市販魚中ダイオキシン類の抽出法の検討」<sup>5)</sup> でダイオキシン類が十分抽出

された条件を参考にした。操作簡略化のため、抽出溶媒をエタノール・ヘキサン混合液に変更した。すなわち、細かく砕いた魚試料と4倍量の無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を混合してすりつぶし、抽出管に充填する。本装置に装着し、 $30^\circ\text{C}$  で15min 静置後、エタノール・ヘキサン混合液 (1:1) を 6mL/min で 75min 間通液して抽出液を得た。抽出液を所定量まで濃縮(残液がほとんどエタノールになるまで)し、固体の KOH を所定量加えて  $20^\circ\text{C}$  または  $40^\circ\text{C}$  で所定時間振とう攪拌して分解した後、KOH エタノール液量の 2/5 倍量のヘキサンと、KOH エタノール量と同量の水を加えて振とう抽出した。ヘキサン相の分離状態を観察し、分離できた場合には水・エタノール相にヘキサンを再度添加して抽出後、合わせたヘキサンを同量の精製水で2回洗浄し、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水後、ヘキサンを除去し、残さの観察と重量測定を行った。なお、いずれの抽出法の場合も、残さが固体状のさらさらしたものになり、重量が試料 25g-wet あたり、20mg(0.08%)以下になれば脂肪等の分解がほぼ十分にできたと判定した。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. ベンゾトリアゾール類の基本物性

ベンゾトリアゾール類の紫外線吸収スペクトルの例を図2、図3に示した。

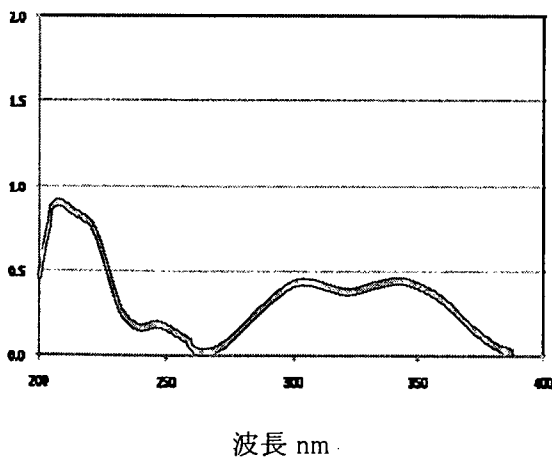


図2 (DBHP)BT の紫外吸収スペクトル

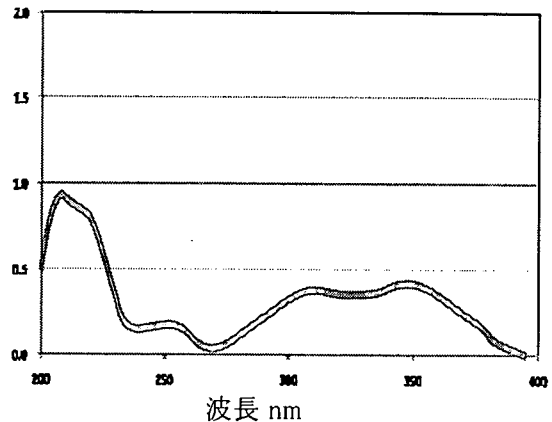


図3 (DBHP)CBT の紫外吸収スペクトル

また、対象とする6種類のベンゾトリアゾール類の最大吸収波長  $\lambda_{\text{max}}$  と、その波長での 1mol/L あたりの吸光度(分子吸光係数)  $\epsilon$  を表3に示す。

表3 各ベンゾトリアゾールの紫外吸収特性

化合物	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\epsilon$ (L/mol)
(DBHP)BT	302.5, 342.5	15,500, 14,800
(DAHP)BT	305.5, 342.0	15,700, 15,000
(MHP)BT	297.5, 334.0	13,900, 15,200
(OHP)BT	299.0, 334.5	14,500, 14,800
(DBHP)CBT	313.5, 344.0	15,500, 17,000
(BMHP)CBT	312.0, 349.5	14,500, 16,200

これらの  $\lambda_{\text{max}}$  は、いずれも 305nm 付近と 340nm 付近であったことから、ベンゾトリアゾール類の HPLC 分析では、305nm または 340nm を測定波長に用いた。

また、分子吸光係数  $\epsilon$  は、いずれも 15,000 程度で著しく大きかった。そこで6成分混合標準液(各約  $100 \mu\text{g/L}$ )について、表1に示した条件(メタノール:水=99:1,  $10 \mu\text{L}$  注入)で HPLC 分析したクロマトグラフの例を図4に示す。

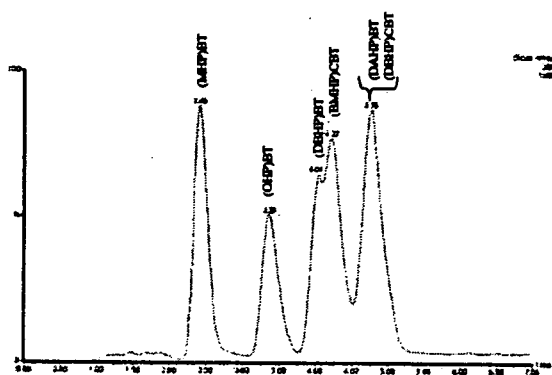


図4 HPLC 分析でのクロマトグラフの例

各ピークの面積とS/N比とから、100~200pg 注入量まで高感度に定量可能と推算されたが、(DBHP)BT と(BMHP)CBT、および(DAHP)BT と(DBHP)CBT の分離が不十分であった。そこで、移動相のメタノールと水の混合比を 98:2 および97:3 に変えてみたが、分離状態は改善されなかった。魚介類中にこれらが共存するか否かは現時点では不明であるが、HPLC で分析する場合には、さらに分離条件や妨害物質の除去方法を検討する必要があると考えられた。

次に、LC/MS/MS 分析を検討するため、6種類のベンゾトリアゾール類の Parent イオンと Daughter イオンを調べた結果を表4に示す。ただし、LC/MS/MS の分析条件については今後さらに最適化する予定である。

表4 ベンゾトリアゾールの定性・定量用イオン

化合物	Parentイオン	Daughterイオン
(DBHP)BT	324.2	212.2と268.3
(DAHP)BT	352.2	282.3と212.2
(MHP)BT	226.1	119.8と106.8
(OHP)BT	324.2	212.2
(DBHP)CBT	358.2	302.2と246.2
(BMHP)CBT	316.1	260.3と106.9

また、表2に示した条件(メタノール:水=99:1、10 $\mu$ L 注入)で LC/MS/MS 分析した (DBHP)BT と(DBHP)CBT のクロマトグラフを図

5に示す。0.01ng/ $\mu$ L のメタノール溶液を 5 $\mu$ L 注入して分析した際の S/N 比が 5~10 であったことから、50~100pg 程度までは定量可能と推算され、10g 程度の試料を用いれば、魚介類中濃度で 0.1ng/g-wet 程度までの分析が可能になると推算された。

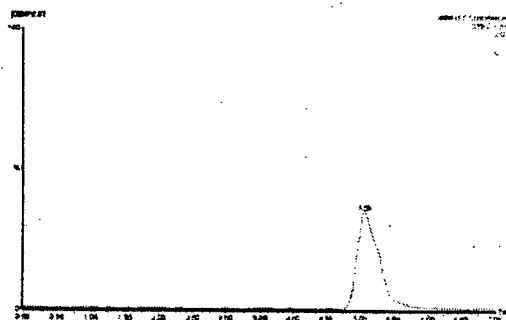
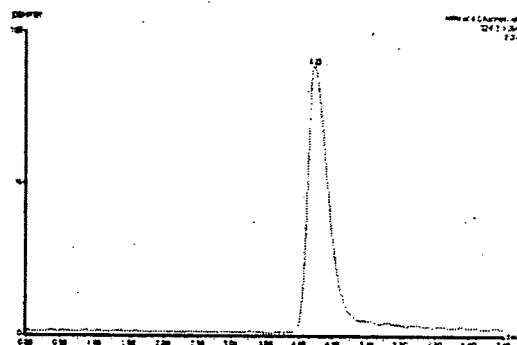


図5 LC/MS/MS でのクロマトグラフの例  
上:(DBHP)BT、下:(DBHP)CBT

## 2. 魚試料の脂肪含有量とアルカリ分解法の比較

### (1)魚試料の脂肪含有量(ヘキサン抽出物量)

実験に用いた市販魚の脂肪含有量を、ヘキサン抽出し残さ重量から求めた結果、マサバ①は 1.64g/100g-wet、マサバ②は 11.1g/100g-wet、クロマグロは 49.8g/100g-wet であり、約 30 倍の差があった。多くの市販魚の脂肪含有量は、この範囲内に入ると考えられる。

### (2)A 法とその改良法

まとめた結果を表5に示した。A法によりマサバ②10g-wetを1mol/L-KOHエタノール溶液で加熱還流分解後、ヘキサン抽出した。しかし、ヘキサン層に安定なエマルジョンが生成し、1時間以上静置してもエマルジョンはなくならなかった(写真1参照)。

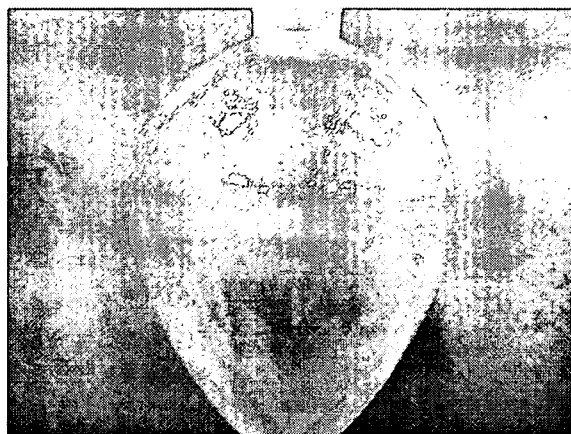


写真1 A法でのヘキサン抽出時のエマルジョン生成

そこで改良法として、抽出時のヘキサン/エタノール/水の体積比を8/5/50からエタノールを増やして水を減らした2/5/5に変更し、脂肪分の多いクロマグロに適用した。その結果、分離が大幅に改善されて適用可能であることが分かった。ただし本法は、90℃で反応させる加熱環流装置が必要であり、多数の試料を同時に処理しにくいこと、及び危険も伴うことなどの欠点がある。そこで、B法とその改良法を次に検討した。

### (3)B法とその改良法

まとめた結果を表5に示した。B法として、20℃で2時間攪拌する方法をマサバ②とクロマグロに適用し、20℃で12時間以上(15時間)静置する方法をクロマグロに適用した。なお、クロマグロではフードプロセッサで細かくした試料にKOHエタノール溶液を加えた後、ホモジナイザーをかける際に、組織が挟まり動作しない上に試料量もロスしたため、ホモジナイザーによる処理は行わなかった。また、

いずれの試料でもKOH分解後に、分解試料がゼリー状となり、ろ過が非常に困難であった(写真2参照)。



写真2 (20℃、マサバ②分解後のろ過残さ)

ヘキサン抽出後の残さは、マサバ②の攪拌法では、固体で25g-wet試料あたり20mgとなり、十分な分解ができると考えられたが、後述する抽出液分解法に比べると、ろ過時にろ紙上に大量に残ったゲル状の残さ中にベンゾトリアゾール類が残っている可能性があると考えられた。一方、クロマグロでは、いずれの方法でもヘキサン抽出後の残さが液体状で、残さの重量も25g-wet試料あたり、2時間攪拌法で550mg、15時間静置法で1000mgとなり、脂肪の分解が不十分であった。

そこで、クロマグロについて、反応温度を40℃にした攪拌法で、KOHエタノール溶液(1mol/L)の添加量を単位試料重量あたり3mL/g-wetまたは5mL/g-wetで分解する改良法を検討した。その結果、3mL/g-wetでは、ヘキサン抽出後のヘキサン蒸発残分が液体状で分解不十分であったが、5mL/g-wetでは固体となり、分解処理が可能であると考えられた。しかし、依然としてKOH分解液をろ過したろ紙上に、脂肪を含むと思われる固体が多く残っている状態であった(写真3、4)。従って、改良法でもベンゾトリアゾール類がろ過時に損失する可能性があると考えられた。そこで、夾雑物を減らし、固液分離操作が不要な“抽出液分解法”を新規に検討した。



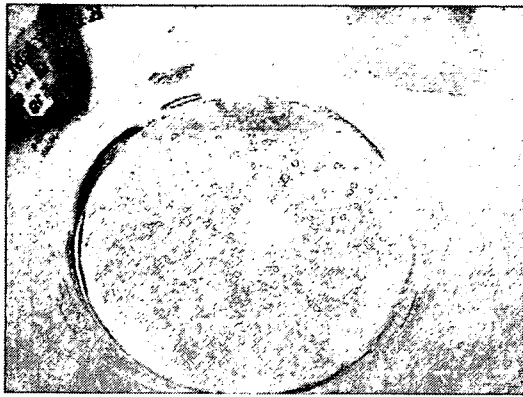


写真3 40℃、KOH エタノール溶液/クロマグロ  
3mL/g-wet の場合のろ過残さ

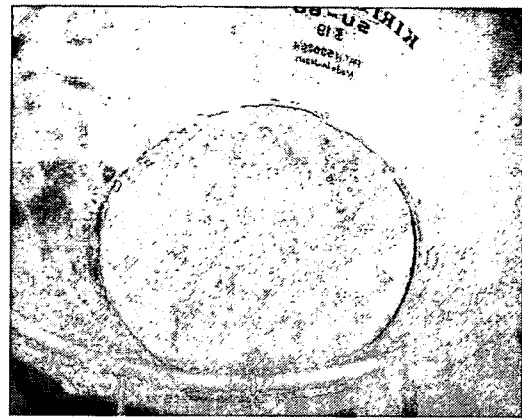


写真4 40℃、KOH エタノール溶液/クロマグロ  
5mL/g-wet の場合のろ過残さ

表5 各種アルカリ分解法の条件と分解結果のまとめ(1)

	A法	A法改良法	B法		B法改良法	
反応温度(℃)	90	90	20		40	
KOHエタノール溶液濃度(mol/L)	1	1	1		1	
KOH溶液/魚(mL/g-wet)	5	5	3		3	5
反応時間(h)	2	2	2	15	2	
分解時の状態	加熱環流		攪拌	静置	攪拌	
ヘキサン/エタノール/水又は食塩水抽出混合比	8/5/50	2/5/5	2/5/5		2/5/5	
食塩水添加の有無	有	無	無		無	
マサバ①脂肪分1.64%	—	(○)	(△)	—	—	(△)
マサバ②脂肪分11.1%	分離できず×	(○)	△	—	—	(△)
クロマグロ脂肪分49.8%	(分離できず×)	○	×	×	×	△

注1) ○:十分に分解可、(○):未実験だが他の条件結果から十分に分解可。

×:分解不十分、(X):未実験だが他の条件結果から分解不十分。

△:ろ過時に残さが認められるため、分析対象物が損失する可能性あり。

—:分解できる可能性があるが優先度が低いので未実験。

注2)A法とその改良法では、夾雑物が多くなり、90℃還流反応装置が必要であるため、やや危険。

#### (4)抽出液分解法

まとめた結果を表6に示した。

##### (a)抽出液の性状観察

エタノール-ヘキサン混液で抽出した抽出液は、抽出直後はうっすらと2層になっているように見え、その境界に白い固体が浮遊しているような状態であった。これを振り混ぜてみると、1層となり全体に白濁した。さらにアルカリ分解するためにエバポレータで25mL (1mL/g-wet 試料) まで濃縮すると固体が多量に析出し、とくに脂肪分の多いマサバ②とクロマグロでは油粒のようなものが観察された。しかし、KOH 処理後に固体が残らなければ支障がないと考え、この抽出液にKOH を加えて振とう攪拌して分解した。なお、KOH 溶解には20℃で25min程度、40℃で10min程度かかった。また、振とう中に固体の塊が生じることがあったが、この塊は水に良く溶け、抽出操作時の水・エタノール相に除去された。25g-wet の魚からの抽出液を各種の条件でアルカリ分解した場合の残さ重量測定を行い、20mg 以下のさらさらした固体になるか否かで脂肪の分解程度を判定した結果、以下の通りとなった。

##### (b)20℃での分解

脂肪分の少ないマサバ①では、抽出液を1mL/g-wet まで濃縮後、KOH を濃度が1mol/L相当となるように添加した。1時間反応では残分が液体状で31mgあり、分解不十分であった。一方、2時間反応では固体状で17mgとなり、分解できた。また、抽出液を同様に濃縮後、KOH 濃度を3mol/L相当とした場合は、0.5時間反応でも残さが固体状で20mgとなり、分解は十分であった。

脂肪分の多いクロマグロの抽出液では、3mol/L分のKOHが溶解せず、1mol/Lの場合には、KOH不足で分解不十分になると考えられたため実験を行わなかった。

マサバ②の抽出液は、マサバ①の抽出液で

分解に2時間要したことから、実験を行わず、40℃の分解実験を行うこととした。

##### (c)40℃での分解

脂肪分の少ないマサバ①では、抽出液を1mL/g-wet まで濃縮後、KOH を濃度が0.3mol/L相当となるように添加した。1時間反応では残さが液体状で47mgあり、分解不十分であったが、2時間反応では残さは固体状で19mgとなり分解できた。また抽出液を同様に濃縮後、KOH 濃度を1mol/L相当とした場合は、0.5時間反応でも残さが固体状で16mgとなり分解できた。

やや脂肪分の多いマサバ②では、抽出液を同様に濃縮後、KOH 濃度を1mol/L相当とし分解した。その結果、0.5時間反応でも残さが固体状で10mgとなり、十分に分解できた。従って、KOH 濃度をより増加させた実験は行わなかった。

脂肪分の多いクロマグロでは、抽出液を同様に濃縮後、KOH 濃度を1mol/L相当となるように添加を試みたが、KOH が完全に溶解せず、2時間反応での残さも液体状で分解不十分であった。そこで、抽出液の濃縮倍率を3mL/g-wet まで下げ、KOH 濃度を1mol/L相当で分解を試みたが、2時間反応での残さが液体状で76mgあり、分解不十分であった。さらに、抽出液の濃縮倍率を5mL/g-wet まで下げ、KOH 濃度を1mol/L相当で分解したところ、1時間反応では液体状で残さが43mgであったが、2時間反応では固体状で残さが14mgとなり十分に分解できた。

##### (d)アルカリ分解液のヘキサン抽出

アルカリ分解後のヘキサン抽出条件については、ヘキサン/エタノール/水の体積比を水が多い2/5/25にして抽出を検討した。最初にマサバ①のアルカリ分解液（抽出液を1mL/g-wet まで濃縮後、KOH 濃度を1mol/L相当にした分解液）について検討したところ、

エマルジョンが形成しヘキサン層の分離が不可能であった。そこで、水の代わりに10%NaCl水溶液を使用することで、エマルジョンの形成を抑え良好にヘキサン層を分離することが可能であった。しかし、マサバ②の同一条件のアルカリ分解液に適用したところ、ヘキサン層がゼリー状になり、分離が不可能であった。KOH量が不足かと考え、4mol/L相当になるようにKOHを添加したが、結果は同じであった。このことから、脂肪分解物が水相に溶解しきれなくなった可能性が考えられた。このゼリー状の固体は、水には溶けず、エタノールには溶けた。

以上の結果から、脂肪分解物はエタノールには溶けやすいが、水やヘキサンには溶けにくいと考えられたため、水に対するエタノールの割合を増やし、ヘキサン/エタノール/水の比を2/5/5にして抽出を検討した。その結果、マサバ②やクロマグロの分解液でも全く泡立たず、静置後も水・エタノール相は少し白濁しているものの、ヘキサン相は透明で2層の分離は良好であった。従って抽出液分解法では、分解後のエタノール液に0.4倍量のヘキサンと、等量の水を加えて抽出する方法が適当であると考えられた。

表6 各種アルカリ分解法の条件と分解結果のまとめ(2)

反応温度(°C)	抽出液分解法										
	20				40						
加熱流下抽出液の濃縮液(エタノール)量/魚(mL/g-wet)	1				1	1	3	5			
KOH添加量/魚(mmol/g-wet)	1	3			0.3	1	3	5			
KOHエタノール溶液相当濃度(mol/L)	1	3			0.3	1					
反応時間(h)	1	2	0.5	1	1	2	0.5	1	2	1	2
分解時の状態	攪拌										
ヘキサン/エタノール/水抽出混合比	2/5/5 (2/5/25ではヘキサン分離不良)										
食塩添加の有無	無										
マサバ①脂肪分1.64%	×	○	○	○	×	○	○	○	(○)	(○)	(○)
マサバ②脂肪分11.1%	(×)	—	—	—	(×)	—	○	○	(○)	(○)	(○)
クロマグロ脂肪分49.8%	(KOH不溶×)				(×)	(×)	KOH不溶×	×	×	○	

注1) ○:十分に分解可、(○):未実験だが他の条件結果から十分に分解可。

×:分解不十分、(×):未実験だが他の条件結果から分解不十分。

—:分解できる可能性があるが優先度が低いので未実験。

## D. 結論

- 1) 6種類のベンゾトリアゾール類の基本物性およびHPLCとLC/MS/MS分析の例から、魚介類試料中のベンゾトリアゾール類を高感度で迅速測定できる可能性を示した。
- 2) 従来のアルカリ分解・抽出法の問題点を改善し、新規の抽出液分解法を提案して分解条件と分解後の抽出条件を決定した。
- 3) 今後は、HPLC および LC/MS/MS での分離定量の最適条件と適用範囲を明らかにし、精製方法等の前処理条件を決定し、代表的な魚介類への適用性を確認する予定である。

## E. 参考文献

- 1) 経済産業省「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律」第一種特定化学物質 関係 [http://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/03kanri/all.htm](http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/03kanri/all.htm)
- 2) 環境省、中央環境審議会環境保険部会、第 58 回化学物質審査小委員会資料「2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノールについて」「2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノールの分解性、蓄積性及び人への長期毒性について」、「今後の対策について」など、<http://www.env.go.jp/council/05hoken/yoshi05.html>
- 3) 環境省環境保険部環境安全課、化学物質と環境、平成 17 年度化学物質分析法開発調査報告書、生物中 2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-フェノールの分析法、Ⅲ-438~453(平成 18 年 7 月)
- 4) 厚生労働省「食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCB 測定方法暫定ガイドライン」、[http://www1.mhlw.go.jp/topics/dioxin\\_13/so\\_kutei.html](http://www1.mhlw.go.jp/topics/dioxin_13/so_kutei.html)
- 5) 堤 智昭、天倉吉章、松本輝樹、伊藤日本

男、栗原 浩、佐々木久美子、米谷民雄、加熱流下抽出装置による市販魚中ダイオキシン類抽出法の検討、第 14 回環境化学討論会要旨集、p.332-333(2005) :平成 16 年度厚生労働科学研究補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」報告書(2005)

## F. 研究業績

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## Ⅱ．分担研究報告書

### 3. 食品中の臭素化ダイオキシン類及びその関連化合物の汚染調査

分担研究者 中川 礼子

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究  
(3) 食品中の臭素化ダイオキシン類及びその関連化合物の汚染調査

分担研究者 中川礼子 福岡県保健環境研究所

研究要旨

臭素化ダイオキシン類は、プラスチック等に使用される臭素系難燃剤の製造過程や臭素系難燃剤を含む製品の燃焼によって生成することが明らかとなっており、毒性は塩素化ダイオキシン類とほぼ同等であることが報告されている。また、デカブロモジフェニルエーテル (DeBDE)、テトラブロモビスフェノール A (TBBPA) 等の臭素系難燃剤は、現在もテレビやパソコン等の電化製品や、カーテン等の繊維に使用されており、これらの臭素系難燃剤の人体への影響が懸念されている。我々は、人への暴露源と考えられる食品の安全性を確保するため様々な食品における臭素化ダイオキシン類及びその関連化合物の汚染実態を明らかにすることを目的として研究を行っている。本年度は、(1) 臭素系ダイオキシン類 (PBDD/DFs、MoBrPCDD/DFs)、臭素化ジフェニルエーテル類 (PBDEs) に、臭素化ビフェニル (PBBs)、コプラナー塩素・臭素化ビフェニル (PXBs) を加えた新たな分析法の検討と、その分析法を用いた個別食品での汚染調査、(2) 三地域 (九州、中国・四国、中部) の魚介個別食品 45 試料についてヘキサブロモシクロドデカン (HBCDs) を分析した。その結果、(1) では、高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計 (HRGC/HRMS) の条件検討の結果、PBDEs、PBBs、PXBs 及び TBBPA については 1 種類のカラム (SLB-5MS) で測定が可能であった。また、高臭素化体における高感度化の検討では、カラムの MS 側を一時的に冷却することによって、デカブロモジフェニルエーテル (DeBDE) の高感度検出ができた。魚試料の汚染調査では、アナゴから 4 臭素化ダイオキシンが微量に検出されたが、その他の魚からは PBDD/DFs は検出されなかった。PBDEs ではすべての魚から #49、#47、#100、#99、#154、#153、#209 などの異性体が検出され、PBBs では 4 種類の魚から 4-6 臭素化体の異性体が検出された。PXBs は今回の魚試料からはいずれの異性体も検出されなかった。(2) では、 $\Sigma$ HBCDs の中央値は、九州 (0.04 ng/g ww, 1.1 ng/g lw) < 中国・四国 (0.08 ng/g ww, 7.0 ng/g lw) < 中部 (1.2 ng/g ww, 100 ng/g lw) の順に汚染が高くなり、この結果からも、海産食品の HBCD 汚染が地域によっては、進んでいることが示唆された。

研究協力者

芦塚由紀

(福岡県保健環境研究所)

村田さつき

(福岡県保健環境研究所)

堀 就英

(福岡県保健環境研究所)

安武大輔

(福岡県保健環境研究所)

堤 智昭

(国立医薬品食品衛生研究所)

## A 研究目的

臭素系難燃剤は、国内で現在もテレビやパソコン等の電化製品や、カーテンなどの繊維に使用されている。これら臭素系難燃剤の人体への影響や、毒性の高い臭素系ダイオキシン類の発生が懸念されてきた。そのため国内ではメーカーの自主規制により、1990年以降、臭素化ジフェニルエーテル類(PBDEs)については大きく需要が減少している。しかしながら、デカブロモジフェニルエーテル(DeBDE)は現在も使用されており、またテトラブロモビスフェノールA(TBBPA)やヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)の需要は増加している。また、最近では、国内では難燃剤として使用されていない臭素化ビフェニル(PBBs)の環境試料からの検出<sup>1),2)</sup>や、非意図的な生成物と考えられるコプラナー塩素・臭素化ビフェニル(PXBs)の魚介類からの検出<sup>3)</sup>が報告されている。これらの臭素系有機化合物の汚染実態についてはまだデータが少ない。臭素系難燃剤を使用した製品の廃棄が今後ピークを迎えることが指摘されることから、臭素系有機化合物の環境や食品における汚染実態調査を行っていくことが必要であると考えられる。特に、人への主な暴露源と考えられる食品における汚染実態を明らかにし、人体影響の評価、食品の安全を確保することは急務である。我々はこれまで調査を行ってきた臭素系ダイオキシン(PBDD/DFs)と臭素系難燃剤のPBDEs、TBBPA、HBCDsに加えて、今回は新たにPBBs及びPXBsの分析を同時に行うことを試み、分析法の検討を行った。検討した分析法によって、魚介類中のPBDD/DFs、PBDEs、PBBs、PXBsを分析した。

さらに高臭素化体(DeBDE)の高感度化についても一部検討した。また、近年使用が多いとされるHBCDsについては、H18年度に分析法を検討し、マーケットバスケット食事試料を対象に分析を行った。その結果、第10群の試料(魚介類が構成食材)からの検出がほとんどであったことから<sup>4),5)</sup>、今年度は同様の分析法を用いて3地域の個別食品(魚介類)の汚染調査を実施し、これまで得られた他の臭素系難燃剤による汚染と比較した。

## B 研究方法

### 1. 臭素化ダイオキシン類(PBDD/DFs)、臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)、臭素化ビフェニル(PBBs)及びコプラナー塩素・臭素化ビフェニル(PXBs)の分析

#### 1-1 高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計(HRGC/HRMS)における測定条件の検討

今年度から新たに分析を行うPBBs及びPXBsについて、高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計(HRGC/HRMS)における測定条件を検討した。さらに、これまで分析を行ってきたPBDD/DFs、PBDEs、TBBPA(エチル化体)も含めた全ての臭素系化合物の測定を、1種類のカラムで測定できないかを検討した。即ち、いくつかの市販のGCカラムについて、これらの臭素系化合物の測定条件を検討し、異性体分離及び感度を比較検討し、その有用性を評価した。

#### 1-1-1 標準品

PBDD/DFsはCambridge Isotope Laboratories社製のNative体、<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-ラベル体標準品(4~8臭素化体)を希釈して使用した。PBDEsはWellington

Laboratories 社製の Brominated Diphenyl Ether Calibration Solution 及びクリーンアップ用標準溶液 (#3, #15, #28, #47, #99, #153, #154, #183, #197, #207, #209)、シリンジスパイクは  $^{13}\text{C}_{12}$ -2, 2', 3, 4, 4', 5'-HxBDE (#138L) を使用した。PBBs は Wellington 社製及び AccuStandard 社製の臭素化ビフェニル標準溶液を、PXBs は Cambridge Isotope Laboratories 社製の標準品を使用した。TBBPA は Cambridge Isotope Laboratories 社のテトラプロモビスフェノール A 標準溶液 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  メタノール溶液) 及びテトラプロモビスフェノール A-ring- $^{13}\text{C}_{12}$  (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  メタノール溶液) をジエチル硫酸でエチル化したものを測定に用いた。

### 1-1-2 測定機器

高分解能質量分析計 (HRMS) :

Micromass Autospec ULTIMA

高分解能ガスクロマトグラフ (HRMS) :

Hewlett Packard 社 HP6890

### 1-2-3 GC カラム及び測定条件

検討したカラムは以下に示す 5%フェニルメチルポリシロキサン系の 4 種類である。

①DB-5, 0.25  $\mu\text{m}$  i. d.  $\times$  30 m,

膜厚 0.1  $\mu\text{m}$  (Agilent)

②ENV-5MS, 0.25  $\mu\text{m}$  i. d.  $\times$  30 m,

膜厚 0.1  $\mu\text{m}$  (関東化学)、

③SLB-5MS, 0.25  $\mu\text{m}$  i. d.  $\times$  30 m,

膜厚 0.1  $\mu\text{m}$  (SUPELCO)

④Factor Four VF-5MS, 0.25  $\mu\text{m}$  i. d.

$\times$  30 m, 膜厚 0.1  $\mu\text{m}$  (Varian)

各異性体のモニターイオンを表 1~6 に、その他の測定条件を表 7 に示す。

表 1. PBDD/DFs 測定に用いたモニターイオン

	定量イオン	確認イオン
TeBDD	499.6904	497.6924
PeBDD	577.6009	579.5989
HxBDD	657.5094	655.5114
OcBDD	815.3282	813.3302
TeBDF	483.6955	481.6975
PeBDF	561.6060	563.6039
HxBDF	641.5145	639.5165
HpBDF	719.4248	721.4228
$^{13}\text{C}_{12}$ -TeBDD	511.7307	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeBDD	589.6412	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxBDD	669.5496	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -OcBDD	827.3685	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -TeBDF	495.7357	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeBDF	573.6462	—

表 2. Mono-Br-PCDD/DFs 測定に用いたモニターイオン

	定量イオン	確認イオン
Mono-Br-TriCDD	365.8436	367.8410
Mono-Br-TeCDD	399.8045	401.8019
Mono-Br-PeCDD	435.7628	433.7655
Mono-Br-HxCDD	469.7237	467.7265
Mono-Br-HpCDD	503.6847	505.6819
Mono-Br-TriCDF	349.8487	351.8460
Mono-Br-TeCDF	383.8096	385.8070
$^{13}\text{C}_{12}$ -Mono-Br-TeCDF	411.8448	—

表 3. PBDEs 測定に用いたモニターイオン

	定量イオン	確認イオン
TriBDE	405.8027	407.8006
TeBDE	485.7111	483.7132
PeBDE	563.6216	565.6196
HxBDE	643.5301	641.5321
HpBDE	721.4406	723.4386
OcBDE	641.5145	639.5160
NoBDE	719.4250	721.4230
DeBDE	799.3335	797.3355
$^{13}\text{C}_{12}$ -TriBDE	417.8429	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -TeBDE	497.7514	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeBDE	575.6619	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxBDE	655.5704	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -HpBDE	733.4809	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -OcBDE	653.5547	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -NoBDE	731.4652	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -DeBDE	811.3737	—

表 4. PBBs 測定に用いたモニターイオン

	定量イオン	確認イオン
TriBB	389.8077	391.8057
TeBB	469.7162	467.7182
PeBB	547.6266	549.6246
HxBB	627.5351	625.5371
HpBB	705.4456	707.4436
OcBB	785.3541	783.3561
NoBB	863.2645	865.2625
DeBB	943.1730	941.1750
$^{13}\text{C}_{12}$ -TeBB	481.7565	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxBB	639.5754	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -OcBB	797.3944	—
$^{13}\text{C}_{12}$ -DeBB	955.2133	—



表 5. PXBs 測定に用いたモニターイオン

	定量イオン	確認イオン
Mono-Br-TeCB	369.8299	371.8279
Mono-Br-PeCB	403.7910	405.7890
Tri-Br-DiCB	459.7279	457.7299
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> - Mono-Br-TeCB	381.8702	—
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> - Mono-Br-PeCB	415.8312	—
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> - Tri-Br-DiCB	471.7681	—

表 6. TBBPA(エチル化体)測定に用いたモニターイオン

	定量イオン	確認イオン
TBBPA	528.7296	556.7609
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> - TBBPA	540.7699	—

表 7 臭素系化合物の高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計における測定条件

化合物名	GC 測定条件			MS 条件
	注入方式及び注入量	注入口温度	昇温条件	
PBDD/DFs	スプリットレス, 1 μL	280°C	130°C—(20°C/min)—240°C—(5°C/min)—320°C(7.5 min)	イオン源温度: 270°C 分解能: 10000 以上
PBDEs	スプリットレス, 1 μL	260°C	125°C(1 min)—(20°C/min)—200°C—(10°C/min)—330°C(5.2 min)	
TBBPA(エチル化体)	スプリットレス, 1 μL	280°C	120°C(1 min)—(20°C/min)—300°C(8 min)	
PBBs,PXBs	スプリットレス, 1 μL	260°C	120°C(1 min)—(20°C/min)—200°C(10 min)—(10°C/min)—330°C(2 min)	

### 1-2 高臭素化体の HRGC/HRMS 測定における高感度化についての検討

臭素系化合物の中で 8 から 10 の臭素が付加した高臭素化体は HRGC/HRMS 測定における感度が低臭素化体に比べて悪く、100 分の 1 から 10 分の 1 程度であるという機器分析上の課題がある。これを解決するために、目的化合物の溶出時間に GC カラムの MS 側を液化炭酸で一時的に冷却する方法(図 1)を試みた。これにより、ピーク形状がシャープになり、感度向上が期待できる。カラムを部分的に冷却するために、SGE 社製の溶媒除去大容量注入装置(SCLV)のコールドトラップ T 字管を使用した。

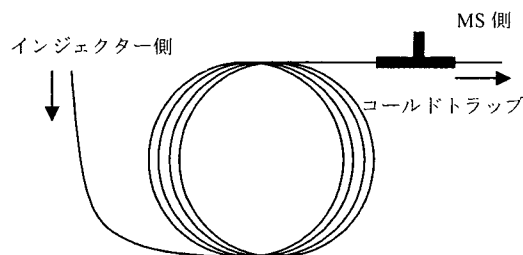


図 1 分析カラムの冷却方法

#### HRGC/HRMS 測定条件

使用カラム: HP-5MS

注入口温度: 260°C

昇温条件: 120°C (2 min) → 20°C/min → 200°C → 10°C/min → 300°C (1 min) → 20°C/min → 310°C (4.5 min)

コールドトラップ時間: 40 秒

### 1-3 PBBs 及び PXBs のカラムクロマトグラフィーにおける分画試験

食品試料における PBBs 及び PXBs の前処理法を検討するため、これまで PBDD/DFs 及び PBDEs 分析の際の精製操作に用いてきたシリカゲルカラム、フロリジルカラム、活性炭カラムにおける PBBs 及び PXBs の分画試験を行った。

3 種類のカラムを表 8 に示す条件でコンディショニングした後、PBBs 及び PXBs の Native 体標準溶液を添加した。それぞれの画分の溶出溶媒(表 8)を流した後、濃縮し、<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-ラベル体混合溶液(シリンジ

スパイク)を加えて測定試料とした。HRGC/HRMSで測定し、各異性体の回収率を求めた。

表8 カラムクロマトグラフィーの調製法

	調製法	溶出溶媒
シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wako S-1)	活性化: 130°Cで3時間 充填量: 1g、乾式 充填 コンディショニング: 10%ジクロロメタン/ヘキサン 100 mL	10%ジクロロメタン/ヘキサン 150 mL
フロリジルカラムクロマトグラフィー(関東化学)	活性化: 130°Cで3時間後、1%含水に調製 充填量: 5g、乾式 充填 コンディショニング: ヘキサン 100 mL	第1画分: ヘキサン 150 mL 第2画分: 60%ジクロロメタン/ヘキサン 200 mL
活性炭カラムクロマトグラフィー (ナカライテスク)	トルエンで洗浄し、無水硫酸ナトリウムに分散させたもの (1:1000, w/w)	第1画分: 10%ジクロロメタン/ヘキサン 50 mL 第2画分: トルエン 200 mL

#### 1-4 実試料の分析

##### 1-4-1 分析試料

魚介類試料として、岡山及び鹿児島で購入した魚を用いた。試料の詳細を表9に示す。

##### 1-4-2 分析方法

均一化した試料 50 g を特注ビーカー (直径 9 cm、高さ 7 cm) に精秤し、-20°C で凍結した後、凍結乾燥機 (VIRTIS 社製 AD2.0 ES-BC) で約 35 時間かけて乾燥させた。乾燥した試料をスパーテルで細かく砕き、洗浄したガラスビーズを混ぜながら、高速溶媒抽出装置の抽出セル (99 mL) に充填した。クリーンアップスパイクの  $^{13}\text{C}_{12}$ -PBDD/DFs (4-8 臭素化体 125-500 pg)、 $^{13}\text{C}_{12}$ -PBDEs (1-10 臭素化体 500-2500 pg)、

$^{13}\text{C}_{12}$ -1-Br-2, 3, 7, 8-TeCDD (50 pg)、 $^{13}\text{C}_{12}$ -PBBs (250-1250 pg) 及び  $^{13}\text{C}_{12}$ -PXBs (250-500 pg) を添加した後、高速溶媒抽出を行った。高速溶媒抽出の条件を表10に示す。抽出液は 40°C 以下で約 100 mL になるまで減圧濃縮した。ここで抽出液の一部を採取し、乾固させた後の残物の重量を脂肪量とした。硫酸 20 mL を加えて 3 回処理を行った後、ヘキサン洗浄水 20 mL で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、2 mL まで減圧濃縮し、シリカゲルカラムで精製した。溶出液 150 mL を減圧濃縮し、ヘキサン 5 mL に置換した後、フロリジルカラムに負荷し、第1画分 (PBDEs、PBBs 及び PXBs 画分) と第2画分 (PBDD/DFs 画分) に分画した。第1画分は約 1 mL まで濃縮し、さらに夾雑物を除去するために、DMSO 分配を行い、測定試料とした。第2画分は濃縮し、ヘキサン 5 mL に置換した後、活性炭カラムで精製を行い測定試料とした。PBDEs、PBBs 及び PXBs の最終検液はリンジスパイク  $^{13}\text{C}_{12}$ -2, 2', 3, 4, 4', 5' -HxBDE (#138L) を加えて 25  $\mu\text{L}$  とした。PBDD/DFs の最終検液はリンジスパイク  $^{13}\text{C}_{12}$ -2, 3, 4, 7, 8-PeBDF を加えて 15  $\mu\text{L}$  とした。PBDD/DFs、PBDEs、PBBs 及び PXBs をそれぞれ HRGC/HRMS で測定した。GC カラムは、PBDD/DFs は DB-5 を、その他の化合物 (PBDEs、PBBs、PXBs) については、SLB-5MS を使用した。分析フローを図2に示す。

表9 分析に用いた魚試料

魚種名	産地		ブールした 個体数	平均体長 (cm)	平均体重 (g)
アナゴ	瀬戸内	天然	9	42.6	120
アジ	鹿児島	天然	4	32.3	360
キス	瀬戸内	天然	10	21.7	89.1
サバ	鹿児島	天然	3	34.1	573
タイ	瀬戸内	天然	1	42.5	1060

表10 高速溶媒抽出の条件

機器	DIONEX 社製 ASE-300
抽出条件	オープン温度 100°C
抽出圧力	1500psi
抽出溶媒	ジクロロメタン/ヘキサン (1:9)
オープン昇温時間	7分
設定温圧保持時間	10分
フラッシュ容積	セル容量の40%
ガスバージ時間	120秒
静置サイクル数	3回
充填用ガラスビーズ	使用前にアセトン/ヘキサン (2:1)、ジクロロメタン/ヘキサン (1:9)で洗浄

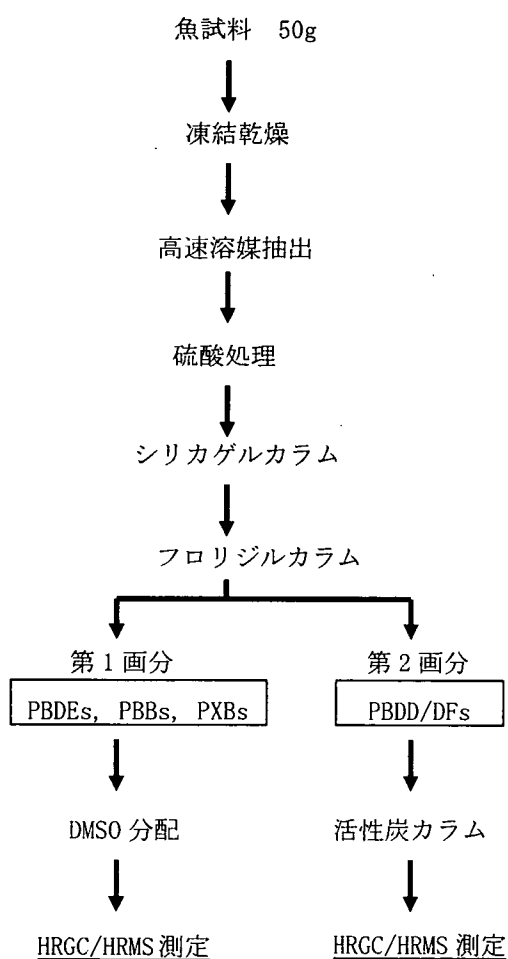


図2 臭素系化合物の分析フロー

## 2 ヘキサブロモシクロドデカン (HBCDs) の分析

### 2-1 実験材料

2004年-2005年に九州地方(天草)、中部地方(三河湾、伊勢湾)、中国・四国地方(瀬戸内海)の鮮魚店から、各地域で捕れた魚介類を購入した。各15件、計45試料で生鮮魚介が44試料、加工食品が1試料であった。可食部をそれぞれフードプロセッサで均一化し、-20°Cで保存したものをを用いた。

### 2-2 標準溶液及び試薬

標準品として、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -ヘキサブロモシクロドデカン[ $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclo-dodecane]溶液(各50 $\mu$ g/mLトルエン溶液) Cambridge Isotope Laboratories社

製を用いた。クリーンアップスパイクは  
同社製の  $^{13}\text{C}_{12}$ - $\alpha$ -、 $^{13}\text{C}_{12}$ - $\beta$ -、 $^{13}\text{C}_{12}$ - $\gamma$ -ヘ  
キサプロモシクロドデカン (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ト  
ルエン溶液) を用いた。

メタノール、ジクロロメタン、*n*-ヘキ  
サンは関東化学のダイオキシン類分析用  
または PCB 分析用を用いた。

また、ゲルパーミエーション (GPC) 分  
画後の精製に、Varian 社製の Bond Elut  
PSA (500 mg, 3 mL) 固相ミニカラムを  
使用した。

## 2-3 機器及び測定条件

### GPC 装置

ポンプ : Büchi Pump Module C-601

分画機器 : 東京理化学株式会社 EYELA  
FRACTION COLLECTOR DC-1500

カラム : Shodex CLNpak PAE800AC (8.0 mm  
 $\phi \times 300$  mm)

プレカラム : Shodex CLNpak PAE800AC (8.0  
mm  $\phi \times 40$  mm)

流速 : 0.8 mL/min

移動相 : アセトン

LC/MS/MS

装置 : Waters Quattro Micro API

カラム : GL Sciences 社製 Inertsil  
ODS-3

粒径 : 5  $\mu\text{m}$  内径 : 2.1 mm 長さ : 150 mm

カラム温度 : 40°C

注入量 : 10  $\mu\text{L}$

移動相流量 : 0.2 mL/min

移動相 : 10 mM 酢酸アンモニウム : メタノ  
ール : アセトニトリル = 10 : 55 :  
35

測定モード : ESI ネガティブ MRM 測定  
キャピラリー電圧 : 2.0 kV

イオン源温度 : 130°C

モニターイオン :

Native-HBCDs ; 641>79 (定量), 639>79 (確  
認)

$^{13}\text{C}_{12}$ -HBCDs ; 653>79 (定量), 651>79 (確認)

## 2-4 分析操作

試料約 5 g を秤取し、 $^{13}\text{C}_{12}$ ラベル化  $\alpha$ -  
 $\beta$ -、 $\gamma$ -HBCD 各 1ng をクリーンアップ  
スパイクとして添加した。これをジクロ  
ロメタン 20 mL で 2 回ホジナイズ抽出  
し、  
ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム  
に通して脱水させた後、減圧濃縮した。  
これを 20 mL の 10%ジクロロメタン/*n*-  
ヘキサンに再溶解したのち、濃硫酸 5 mL を  
加えて攪拌処理し、2000 rpm で遠心分離  
した。上層を減圧濃縮後、0.2 mL のアセ  
トンに再溶解した。この 1/2 量を GPC に  
注入した。

## 2-5 試料の精製及び測定溶液の調製

前処理を行って得られた試料の抽出液  
を 100  $\mu\text{L}$  GPC に注入し、脂質の溶出直  
後の HBCDs 溶出画分を分取した。これを、  
窒素ガスで乾固し、トルエン/アセトニ  
トリル (1 : 3, v/v) 混液 2 mL に溶解した。  
さらに、あらかじめ同混液 10 mL でコン  
ディショニングした Varian 製 PSA カラム  
に負荷した後、トルエン/アセトニトリル  
混液 18 mL で溶出した。得られた溶出液  
を減圧濃縮後、窒素ガスで乾固し、少量  
のジクロロメタンでバイアルへ移した。  
バイアル内の溶媒を留去後、メタノール  
50  $\mu\text{L}$  に溶解し、測定サンプルとした。