

図 3d. 試料(G, H)分画物の HPLC クロマトグラム
 Total, 分画前エキス; hexane, ヘキサン分画物; AcOEt, 酢酸エチル分画物; Water, 水分画物
 1, Daidzein; 2, Glycitein; 3, Genistein; 4, Daidzin; 5, Glycitin; 6, Genistin
 分析条件, 研究方法参照

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

2-3. 食品中ダイオキシン類および PCBs の迅速一斉分析法の検討

研究分担者 堤 智昭

厚生労働科学研究補助金(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
(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
(2-3)食品中ダイオキシン類およびPCBsの迅速一斉分析法の検討

研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品試料中ダイオキシン類およびポリ塩化ビフェニル(PCBs)の一斉迅速分析法の開発を行った。本研究課題で検討した分析法は主に4つの工程、すなわち高速溶媒抽出法(ASE)による自動迅速抽出、多層シリカゲルカラム及び活性炭シリカゲルカラムによる試料精製、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による試料の迅速精製、高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計(HRGC/HRMS)によるダイオキシン類・PCBsの異性体分離分析、から構成される。本年度は①食品抽出物の精製工程の条件検討、②高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析計(HRGC/HRMS)の測定条件の検討、ならびに上記①②の検討経過を踏まえて③実際の食品試料を用いて全試験操作を試行しダイオキシン類及びPCBs異性体の測定値と添加回収率を求めた。

結果として、①では多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びGPCの操作条件を最適化した。②においてはHRGC/HRMS測定で1~10塩素化PCBs各異性体を注入回数1回、計測時間約30分で分離・定量する条件を確立した。③では同一の生鮮魚介試料を用いて全分析操作を複数回繰り返して行い、標準品添加回収率と測定値の再現性を確認した。

研究協力者

福岡県保健環境研究所
堀 就英、安武大輔、中川礼子

A.研究目的

食品中のダイオキシン類分析では食品1gあたり1pg(ピコグラム)に満たない微量を精密に同定し定量することが求められる。分析の工程が長く、操作が煩雑なため、測定値の確定までに長期間を要する。従ってダイオキシン類分析法を簡便化・迅速化することで、当該物質による食品汚染調査研究の進展に大きく寄与できると考えられる。迅速分析法の確立は、食品汚染事件が発生した場合など、速やかな行政対応が求められる場面においても、食品の安全性の究明に役立ち、有用と考えられる。

平成16~18年度の本分担研究において、高速溶媒抽出法(ASE)を使用すると食品試料に含まれるダイオキシン類を迅速かつ精密に抽出できることが明らかになった。すなわち、従来の抽出方法では最長で1件あたり約20時間を要していた抽出時間は、ASEの使用により約30分に短縮された。また抽出に使用する溶媒量も1/3程度に少量化することが可能となった。さらにASEの抽出効率は従来法に比べて同等またはそれ以上であることを確認した¹⁾³⁾。すなわち我が国における食品中ダイオキシン類分析の準公定法である「ガイドライン」⁴⁾に記載されている標準的抽出法に替わりASEを使用しても、得られる分析値の信頼性・精密性は損なわれないことを確認した。

さらに平成19年度より、本迅速抽出法における対象物質をダイオキシン類の類縁化合物

であるPCBs(1~10塩素化物、209異性体)に拡大し、一斉迅速抽出法として適用するための追加検討に着手した。厚生労働省は食品中PCBsの残留基準値(暫定的規制値)を設けている(遠洋沖合魚介類:0.5 ppm、内海内湾魚介類:3 ppm)。従来、PCBsとダイオキシン類とは化学的構造・性質面において類縁関係にありながら個々の試験法によって定量分析が行われてきた。ASEを使用して食品試料中のダイオキシン類とPCBsを同時に抽出し、各々の定量値を迅速に得ることが可能になれば、食品の安全性確保の観点から有意義と考えられる。

これまでに一斉分析法の構築のための予備検討として、ダイオキシン類とPCBsの市販内部標準液に含まれる不純物の検定を行い、これらを各々混合して抽出時に使用しても分析精度上問題にならないことを確認した⁹⁾。

本年度は①高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析計(HRGC/HRMS)の測定条件の検討、②食品抽出物の精製工程の条件検討、ならびに上記項目の検討経過を踏まえ、③実際の食品試料を用いた全試験操作の試行、の各項目について検討した。

B.研究方法

1.試料、試薬等

1.1 試料

市販の粉末ミルクと生鮮魚介類(カンパチ)可食部のホモジネートを用いて抽出液を調製し検討に供した。

1.2 試薬

アセトン、ヘキサン、トルエン、ジクロロメタン、無水硫酸ナトリウムは関東化学(株)製のダイオキシン分析用を、シリカゲル類は和光純薬(株)のダイオキシン分析用を用いた。硫酸は和光純薬(株)製の有害金属測定用を使用した。

各種PCBs標準品並びにノナンはWellington Laboratories社製を使用した。検量線作成用として68A-CVS(CS1からCS5の5本組試薬)を、クリーンアップスパイク用内部標準溶液は68A-LCSを用いた。シリンジスパイク用内部標準溶液は68A-ISを用いた。

PCDDs及びPCDFsのクリーンアップスパイクにはWellington Laboratories社製のNK-LCS-Fをノンナンで希釈して使用した。

1.3 器材

多層シリカゲルカラムは内径1.5 cm、長さ約30 cmのコック付きガラス管に各種充填剤を積層して調製した(図1)。活性炭シリカゲルによる試料の精製には関東化学(株)製の「活性炭分散シリカゲルリバースカラム」を使用した。

2.機器および使用条件

2.1 高速溶媒抽出装置

高速溶媒抽出にはダイオネクス社製のASE-300を使用した。抽出セルの容量は99 mLであり、使用条件は抽出温度150℃、抽出溶媒はアセトン・ヘキサン(1:1)であった。装置使用条件の詳細は本研究の年次報告書に記載した¹⁾。

2.2 ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)

GPCの装置構成は以下の通りであった。オートサンプラー:MIDAS、送液ポンプGL-7410、カラムオープン:GL-7430、UV検出器:GL7451(以上GLサイエンス(株)製)、フラクションコレクター:FC203(エムエス機器(株)製)、GPCカラム:MSpak GF-310 4D(内径4.6 mm、長さ150 mm、昭和電工(株)製)

移動相にはアセトンを使用し、流速を0.1 mL/minに設定した。GPCカラムオープンの温度は40℃、装置注入量は50 μLとした。

2.3 高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析計(HRGC/HRMS)

HRGC/HRMS は Agilent6890/Micromass AUTOSPEC ULTIMA を使用した。PCBs の測定には関東化学(株)製のキャピラリーカラム HT8-PCB を用い、PCBs 各異性体の溶出位置は文献⁶⁾を参考に決定した。PCDD/Fs 及び non-ortho PCBs は、SP-2331(スベルコ社製)と BPX-DXN(SGE 社製)の各カラムを組み合わせて使用し測定した。

3.実験操作

3.1 HRGC/HRMSによるPCBs全異性体の測定条件の検討

PCBs 検量線作製用標準溶液 68A-CS3 のノナン希釈液(PCBs 各異性体のネイティブ体及びラベル体濃度 5~10 pg/mL)及び PCBs ネイティブ体混合溶液(1 塩化物#1、#2、#3を含むノナン溶液)の各 1 µL を HRGC/HRMS に繰り返し注入し、最適なピーク分離とピーク形状が得られるように測定条件を調整した。

3.2 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおけるPCBs異性体の溶出挙動の検討

多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーの溶出溶媒として、ヘキサン、5%ジクロロメタン含有ヘキサン、10%ジクロロメタン含有ヘキサンの3種類の溶媒を用い、PCBs の溶出挙動を比較した。

1.3 項に記したガラスカラムに各種充填剤を積層し(図1)、溶出溶媒 100 mL で洗浄した。次にカラム上端よりマイクロシリンジで 68A-LCS のノナン希釈液 100 ng/mL を 10 µL (各成分 1 ng 相当量)添加し、直ちに溶出溶媒 150 mL を 50 mL ずつ 3 回に分けてカラム上端より穏やかに注ぎ入れ、2 滴/秒程度の速度で滴下して、溶出液をナス型フラスコに回収した。各溶出液を減圧濃縮したのちマイクロバイアルに移し、シリンジスパイク用溶液 68A-IS のノナン希釈液 50 ng/mL を 20 µL (各成分 1 ng 相当量)添加した。最終検液量をノナンで 500 µL とし、この 1 µL を HRGC/HRMS

に注入して各分画における PCBs の回収率を算出した。

上記検討の結果を踏まえて、実際の食品抽出液(粉末ミルク由来)を多層シリカゲルカラムに負荷し、充填剤の着色の様子等から期待する精製効果が得られるか調べた。まず粉末ミルク 20 g を量り取り、クリーンアップスパイク(68A-LCS)を添加し ASE で抽出液を調製した。抽出液を 30 mL 程度に減圧濃縮し、濃縮液を 250 mL 容テフロン製遠沈管に移した。さらに濃縮液の容量をヘキサンで 150 mL 程度まで増やし、硫酸 40 mL を加えて一夜放置した。分離した上澄みの有機層を多層シリカゲルカラムによる精製操作に供した。

3.3 GPCにおけるPCBs異性体の溶出挙動と精製効果に関する検討

2.2 項に記した GPC 装置に 68A-LCS 100 ng/mL を注入し、溶出液を注入開始から 40 分経過時まで 2 分間隔で 1.5 mL 容バイアルに分取した。各々の分画にシリンジスパイクを添加し、HRGC/HRMS で測定して PCBs の溶出位置を調べた。

次に、市販粉末ミルク由来の抽出物を GPC に注入し、油状成分と PCBs が分離できるか検討した。まず 3.2 項に記した方法で粉末ミルクの抽出液を調製した。引き続き行った多層シリカゲルカラム精製では下記の通り操作した。硫酸処理後の有機層を減圧濃縮して 10 mL 容スピッツ管に移し、ジクロロメタン 1 mL を加え、試料の全量をヘキサンで 10 mL とし十分に混和した。この溶液を多層シリカゲルカラムに負荷し、10%ジクロロメタン含有ヘキサン 100 mL で溶出させた。溶出液を減圧濃縮した後、シリンジスパイクを添加し、HRGC/HRMS 測定を行い、妨害物の影響の無い良好なクロマトグラムが得られるか確認した。

3.4 魚介試料を用いた全試験操作の試行

分析方法の概略を図 2 に示した。市販の生

鮮魚(カンパチ)のホモジネート25 gを量り取り、珪藻土粉末約 20 g とよく混合した。試料を ASE の抽出セルに移し、PCDD/Fs 及び PCBs のグリーンアップスパイクを添加し、抽出を行った。グリーンアップスパイクの添加量は以下の通りであった。¹³C ラベル化 2,3,7,8-PCDD/Fs の 17 異性体においては各 50 pg(OCDD/F は 100 pg)、¹³C ラベル化 PCBs は各 500 pg とした。

二相に分離した抽出液の有機層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。残りの水層にヘキサン 30 mL を加え振とうし、分離したヘキサン層を同様に乾燥させた後、さきの有機層に合わせた。抽出液の溶媒を留去して乾燥させ、残留物の重量を測定し、これを粗脂肪重量とした。

得られた粗脂肪をヘキサンで溶解させ、硫酸 10 mL を加え一夜放置した。ヘキサン層を分離し、10% (v/v) となるようにジクロロメタンを添加して混和し、多層シリカゲルカラムに負荷して精製した。溶出液の 1/5 量(試験品約 5g に相当)を GPC 精製して PCBs 異性体分離分析に供した。残り 4/5 量(試験品約 20 g に相当)は活性炭分散シリカゲルリバースカラムで精製し、2,3,7,8-PCDD/Fs の 17 化合物と non-ortho PCBs の 4 化合物を分析した。

C. 研究結果及び考察

1. HRGC/HRMS による PCBs 全異性体測定条件

測定対象成分を mono-ortho PCBs とするガイドライン及び PCBs 全異性体を対象とする文献⁶⁾に記載された HRGC/HRMS 測定条件を参考にして PCBs 標準品の測定を行った。

その結果、一塩素化物 PCBs(monoCBs)のクロマトグラムがピーク割れを起こし、十分な測定感度が得られなかった。このような現象は DB-5MS カラムによる測定でも確認されている⁷⁾。原因として、GC カラムオープンの初期温度(130°C)が適切でなかったために目的物質が

十分にカラム液相に保持されなかったことが考えられた。そこで GC カラムオープンの初期温度を 90°C から 130°C まで 10°C 間隔で変更しながら PCBs 標準品を繰り返し測定し、得られるクロマトグラムを比較した。

この測定結果の一例を図 3 に示した。GC オープンの初期温度を 90°C または 100°C とした場合にピーク割れのない良好なクロマトグラムを得ることができ、分析時間の短縮を考慮して以後の測定は初期温度を 100°C に設定することとした。GC 昇温条件は以下の通りであった。

100°C (1 分保持) → (20°C/min 昇温) → 220°C (0 分保持) → (3°C/min 昇温) → 280°C (0 分保持) → (20°C/min 昇温) → 300°C (4 分保持)

キャピラリーカラムで PCBs の異性体分離を行うと、各塩素化物の溶出時間は相互に重なり合っている。塩素化数に応じてシグナル値の取り込み時間を設定した場合、全異性体を網羅して計測するためには 1 試料あたり最低 2 回の注入が必要である⁷⁾。一方、各塩素化物の計測を複数の区間に分け、シグナル取り込み時間を他の塩素化物とグルーピングする方法も考えられる。しかし HT8-PCB カラムでは non-ortho PCBs の 4 化合物(#77、#81、#126、#169)が液相に保持されやすく、4~6 塩化物のデータ取得に長い時間範囲を割り当てざるを得ないなど、グルーピングが困難であった。

今回の一斉迅速分析法では、non-ortho PCBs はダイオキシン類の測定項目に含まれているため、全 PCBs としての測定項目から除外することができる。#126 を全 PCBs 測定対象が除くことで 5 塩化物のデータ取得時間を短縮することができ、結果として 1 回の試料注入で #126 を除く PCBs 全異性体を網羅する機器分析条件を考案した(表 1)。以下、この測定条件を用いて検討を行った。

2. 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおける PCBs 異性体の溶出挙動と精製効果

ガイドラインに例示されているように、多層シリカゲルカラムは規定量の硝酸銀シリカゲル、硫酸シリカゲル、KOH シリカゲルの化学修飾シリカゲル等を積層して用いる。このうち硝酸銀シリカゲルは non-ortho PCBs や 2,3,7,8-tetraCDD 等の目的物質を比較的強く吸着する性質があり、これらの化合物の低回収率の一因と示唆されている⁸⁾。また低塩素化 PCBs も多層シリカゲルによる精製操作の際に損失の起こりやすいことが報告されている⁹⁾。多層シリカゲルカラムの各充填剤量を可能な限り少量化することで、目的物質の吸着・損失を抑制できると考えられる。

今回、充填剤の量をガイドライン記載の重量に対し各々1/3量とし、PCBs 標準品の溶出挙動を調べた。この結果を表2に示した。ヘキサン、5%ジクロロメタン含有ヘキサン、10%ジクロロメタン含有ヘキサンの各溶出溶媒で4~10塩化物はカラム負荷量のほぼ全量が100 mLまでに回収されることがわかった。一方、1~3塩化物については10%ジクロロメタン含有ヘキサンで最も良いカラム回収率が得られた。これらの化合物のカラム回収率は溶出溶媒をヘキサン及び5%ジクロロメタン含有ヘキサンとした場合に比べて約10%向上し、67~93%であった。

次に、10%ジクロロメタン含有ヘキサンを溶出溶媒とし、粉末ミルク由来抽出物を多層シリカゲルカラムに負荷し溶出させたところ、無色透明の溶出液が得られた。このとき各充填剤の着色は各充填剤層に留まって保持されており、カラムの破過に伴う妨害成分の溶出は特に認められなかった。

次に、得られた溶出液を減圧濃縮し、少量のヘキサンでスピッツ管に洗い込み、窒素ガス気流を穏やかに吹き付けて数十μL程度になるまで濃縮したところ、スピッツ管の内壁に無色の油状成分が多数付着した。従ってこの試料を HRGC/HRMS 測定に供するには精製が不十分であり、何らかの追加精製が必要と

考えられた。

3 GPC における PCBs 異性体の溶出挙動

多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーの溶出液を迅速に精製する方法として GPC の適用を検討した。まず PCBs 標準品の分画試験の結果より、PCBs の溶出位置は注入開始から22~24分であることがわかった。そこで3.3項より得られた粉末ミルク由来抽出物(試料10g相当)をアセトン100μLで溶解させ、このうち50μLをGPCに注入し、注入開始から22分までの溶出液を捨て、22~32分までを PCBs 測定試料として1.5 mL 容濃縮バイアルに分画した。分画後、バイアルを室温常圧下に放置して濃縮し、シリンジスパイク及びノナンを添加して全量50μLとしたうちの1μLをHRGC/HRMSに注入した。その結果、1塩素化から10塩素化物にわたり妨害物の影響の無い良好なクロマトグラムが得られた。

4 魚介試料を用いた全試験操作—PCBs 異性体の回収率と定量値の再現性—

図2の試験フローに従って魚介試料(カンパチ)を分析した(n=3)。カンパチ抽出物を多層シリカゲルカラムで精製した際の充填剤の着色は、粉末ミルクの場合と同様、充填剤層に保持されていた(図4)。HRGC/HRMS 測定により得られたクロマトグラムの一例を図5~9に示した。クロマトグラムのベースラインの変動や各ピーク形状に妨害物の影響は認められなかった。

PCBs 内部標準物質の26化合物の添加回収率を表3に示す。1塩化物の#1及び#3の回収率が41~54%とやや低い傾向を示したが、総じてダイオキシン類分析時の回収率の目安とされる40~120%の値が得られた。3回の繰り返し試験による回収率の相対標準偏差は、#15と#104で20%を超えていたが、他の異性体は6~18%と再現性は良好であった。

表4に PCBs の1~10塩素化物の定量結

果を示す。定量値は内部標準物質に対応する 26 異性体について示した。#15 は全試行で不検出となった。また、3 塩化物の#37 については、並行して実施したブランク試験 (n=1) において比較的高濃度に検出された (2.6 pg/g)。このため実試料の測定値 (n=3) と統計量については定量の精密性を考慮し、各々参考値として記載した。各定量値の相対標準偏差をみると、#37 を除き 1~18% の範囲であり、良好であった。また、活性炭分散シリカゲルリバースカラムより得られたトルエン画分の測定結果においても良好な添加回収率が得られた。活性炭シリカゲルカラム精製における PCDD/Fs 及び non-ortho PCBs の 17 種異性体の平均添加回収率は 59~83% であった。

松村らは HT8-PCB カラムにおける PCBs 全異性体の相対保持時間を報告している⁶⁾。従って得られたクロマトグラムを詳細に解析すれば、26 種類以外の全ての PCBs についてもピークアサインと定量が可能である。また活性炭分散シリカゲル精製から得られるダイオキシン類測定試料の分析結果と合わせることで、ダイオキシン類と PCBs の残留濃度を同時に把握することが可能と考えられる。

本分析方法では抽出時にアルカリ性の試薬を使用しないため、アルカリ性試験廃液を生じない。従って作業上の安全性と環境保全の面で有利である。今後は、魚介類試料等を用いて一斉迅速分析法と従来法 (アルカリ分解によるダイオキシン類、PCBs の各個別分析法) との同等性評価 (バリデーション) を実施する計画である。また操作ブランクの低減に関する検討を合わせて行うこととしている。

D. 結論

(1) ガイドラインに記載されている多層シリカゲルカラムの使用条件を変更し、ダイオキシン類・PCBs の一斉分析に使用できるように改良した。

(2) GPC によって魚及び粉末ミルクの抽出液

に共存する妨害成分と目的成分の PCBs を分離させ、HRGC/HRMS 測定において良好なクロマトグラムが得ることができた。

(3) 全試験操作における PCBs の 1~10 塩素化体の 26 種異性体の添加回収率と定量値の再現性はほぼ良好であった。

(4) 本研究結果は食品中のダイオキシン類・PCBs の迅速一斉分析法として、高速溶媒抽出法の応用の可能性を示唆するものである。

E. 参考文献

- 1) 平成 16 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「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 (3) 食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究 (3-2) 食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究」
- 2) 平成 17 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「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 (3) 食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究 (3-2) 食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究」
- 3) 平成 18 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「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 (3) 食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究 (3-2) 食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究」
- 4) 厚生労働省:「食品中のダイオキシン類の測定方法暫定ガイドライン」、平成 20 年 2 月。
- 5) 平成 19 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「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 (2-3) 食品中ダイオキシン類および PCBs の迅速一斉分析法の検討」
- 6) 松村千里、鶴川正寛、中野 武、江崎達哉、大橋 眞:キャピラリーカラム (HT8-PCB) によ

- るPCB全209異性体の溶出順位. 環境化学, **12**, (2002) 855-865.
- 7) 劔持堅志、武 志保、難波順子、吉岡敏行、西島倫子、今中雅章:食品中の有害化学物質等に関する研究ーポリ塩化ビフェニル類(PCBs)全異性体及びポリ塩化ナフタレン類(PCNs)の同時分析法確立のための基礎的検討ー. 岡山県環境保健センター年報, **26**, (2002) 72-81.
- 8) 水上桐子、濱田典明、本田克久:ダイオキシン類分析における多層シリカゲルカラムの問題点. 第15回環境化学討論会講演要旨集, (2004) 280-281.
- 9) 鈴木 滋、菱沼早樹子、加藤謙一、齋藤善則:全PCB分析法の検討. 宮城県保健環境センター年報, **24**, (2006)165-166.

F.研究業績

1.論文発表

なし

2.学会発表

堀 就英、安武大輔、中川礼子、堤 智昭:食品中ダイオキシン類・PCBsの一斉迅速分析法の検討ー市販内部標準製品中の不純物の同定ー. 第45回全国衛生化学技術協議会年会(2008.11)

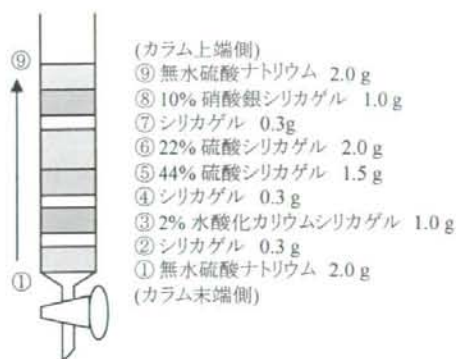


図1 本研究で使用した多層シリカゲルカラム

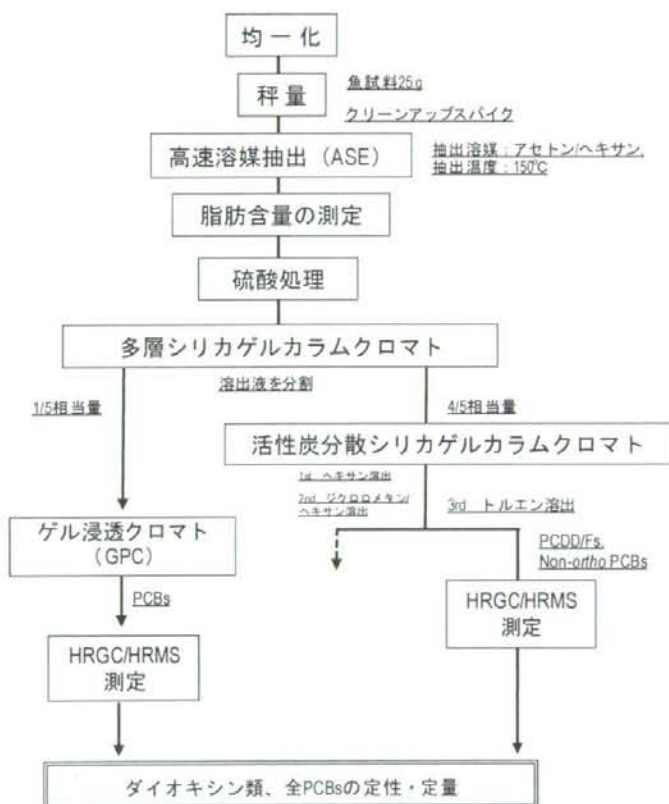


図2 食品中ダイオキシン類・PCBsの一斉迅速分析フロー

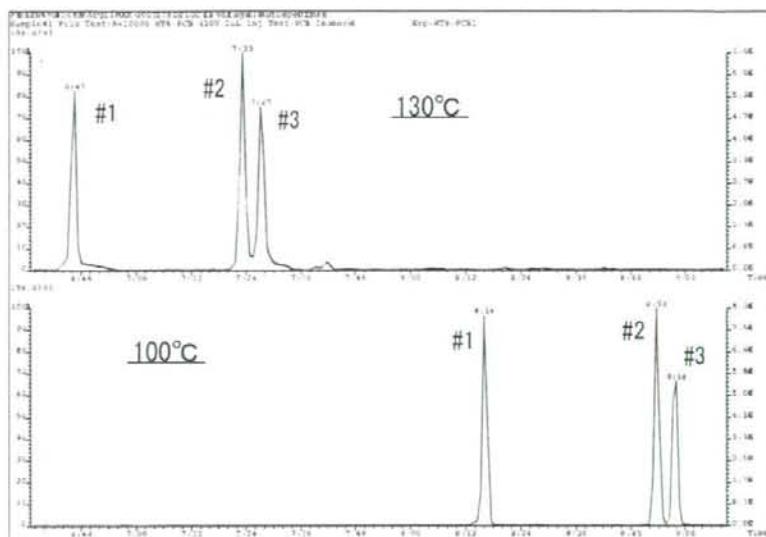


図3 PCBs標準品1塩化物のHRGC/HRMSクロマトグラム。上段：GCカラムオープン初期温度130°C。下段：同100°C。

表1 本研究におけるPCBs1~10塩素化物のHRGC/HRMS測定条件*。

	測定質量数 定量用 確認用 内部標準	測定時間区分(グループ)				
		1	2	3	4	5
		測定時間 8分00秒~11分00秒	測定時間 11分00秒~14分47秒	測定時間 14分47秒~21分50秒	測定時間 21分50秒~ 28分30秒	測定時間 28分30秒~ 32分00秒
1塩化物	188.0393 190.0366 200.0795	#1 #2 #3				
2塩化物	222.0003 223.9975 234.0406	#10 #4 #9 #7 #6 #8 #5 #14	#11 #13 #12 #15			
3塩化物	255.9613 257.9585 268.0016	#19 #30	#18 #17 #24 #27 #32 #16 #23 #34 #29 #26 #25 #31 #28 #21 #20 #33 #22 #36 #39 #38 #35 #37			
4塩化物	291.9195 289.9224 303.9597		#54 #50 #53 #51 #45 #46 #52 #59 #73 #43 #49 #65 #75 #48 #47 #62 #44 #59 #42 #64 #72 #71 #41 #68	#40 #57 #67 #63 #58 #61 #74 #70 #76 #80 #66 #55 #60 #56 #79 #78 #81 #77		
5塩化物	325.8805 327.8776 337.9207		#104 #96 #103 #100 #94	#102 #93 #98 #95 #88 #91 #121 #92 #84 #89 #90 #101 #113 #99 #112 #119 #83 #115 #86 #117 #97 #125 #116 #87 #108 #111 #85 #120 #110 #82 #124 #109 #107 #123 #106 #118 #114 #122 #105 #127		
6塩化物	359.8415 361.8385 371.8817			#125 #150 #152 #145 #136 #148 #154 #151 #135 #144 #147 #149 #139 #140 #143 #134 #142 #131 #133 #165 #146 #132 #161 #153 #168 #141 #137 #130 #164 #163 #138 #160 #158 #129 #166	#159 #128 #162 #167 #156 #157 #169	
7塩化物	393.8025 395.7995 405.8428			#188 #184 #179 #176 #186 #178 #175 #182 #187 #183	#185 #174 #181 #177 #171 #173 #172 #192 #180 #193 #191 #170 #190 #189	
8塩化物	429.7606 427.7636 441.8008				#202 #201 #204 #197 #200 #198 #199 #196 #203 #195	#194 #205
9塩化物	463.7217 461.7246 475.7619				#208 #207	#206
10塩化物	497.6827 499.6798 509.7229					#209

*クリーンアップスパイクに含まれる異性体にアンダーラインを付した。

表2 多層シリカゲルカラムにおける3種類の溶出溶媒によるPCBs標準品の溶出挙動の比較.

化合物	カラム回収率(%)											
	ヘキサン				5%ジクロロメタン含有ヘキサン				10%ジクロロメタン含有ヘキサン			
	0- 50mL	50- 100mL	100- 150mL	計	0- 50mL	50- 100mL	100- 150mL	計	0- 50mL	50- 100mL	100- 150mL	計
¹³ C-2-CB(#1)	54	1	0	55	57	0	0	57	87	0	0	87
¹³ C-4-CB(#3)	59	1	0	60	57	0	0	57	72	0	0	72
¹³ C-2,2'-diCB(#4)	62	0	0	62	66	0	0	66	77	0	0	77
¹³ C-4,4'-diCB(#15)	72	1	1	74	70	0	0	70	82	0	0	82
¹³ C-2,2',6,6'-triCB(#19)	73	1	1	75	69	1	0	70	81	0	0	81
¹³ C-3,4,4'-triCB(#37)	83	0	1	84	87	1	0	88	93	0	0	93
¹³ C-2,2',6,6'-tetraCB(#54)	78	0	1	79	71	1	0	72	83	0	0	83
¹³ C-3,3',4,4'-tetraCB(#77)	93	0	0	93	94	0	0	94	95	0	0	95
¹³ C-3,4,4',5-tetraCB(#81)	95	0	0	95	95	0	0	95	101	0	0	101
¹³ C-2,2',4,6,6'-pentaCB(#104)	95	0	1	96	79	0	0	79	91	0	0	91
¹³ C-2,3,3',4,4'-pentaCB(#105)	102	1	1	104	98	1	1	100	100	1	1	102
¹³ C-2,3,4,4',5-pentaCB(#114)	96	0	0	96	94	0	0	94	98	0	0	98
¹³ C-2,3,4,4',5-pentaCB(#118)	96	0	0	96	94	0	0	94	97	0	0	97
¹³ C-2,3,4,4',5-pentaCB(#123)	95	0	0	95	94	0	0	94	97	0	0	97
¹³ C-2,2',4,4',6,6'-hexaCB(#155)	85	0	0	85	82	0	0	82	92	0	0	92
¹³ C-2,3,3',4,4',5-hexaCB(#156)	94	2	2	98	96	2	2	100	103	2	2	107
¹³ C-2,3,3',4,4',5-hexaCB(#157)	93	1	0	94	97	1	0	98	102	0	0	102
¹³ C-2,3,4,4',5,5'-hexaCB(#167)	94	0	0	94	96	0	0	96	106	0	0	106
¹³ C-3,3',4,4',5,5'-hexaCB(#169)	93	0	0	93	97	0	0	97	101	0	0	101
¹³ C-2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB(#188)	105	0	0	105	95	0	0	95	97	0	0	97
¹³ C-2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB(#189)	99	0	0	99	101	0	0	101	100	0	0	100
¹³ C-2,2',3,3',5,5',6,6'-octaCB(#202)	99	0	0	99	97	0	0	97	99	0	0	99
¹³ C-2,3,3',4,4',5,5',6-octaCB(#205)	101	0	0	101	99	0	0	99	98	0	0	98
¹³ C-2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaCB(#206)	100	0	0	100	99	0	0	99	100	0	0	100
¹³ C-2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonaCB(#208)	106	0	0	106	101	0	0	101	98	0	0	98
¹³ C-decaCB(#209)	92	0	0	92	84	0	0	84	88	0	0	88

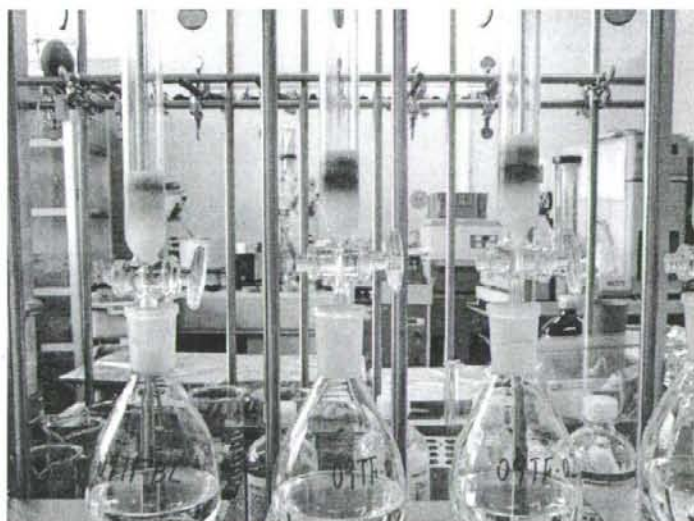


図4 多層シリカゲルカラムにカンパチ抽出物を負荷し溶出させた際の充填剤の着色の様子。左：ブランク試料、中及び右：カンパチ 25g 相当の抽出試料。

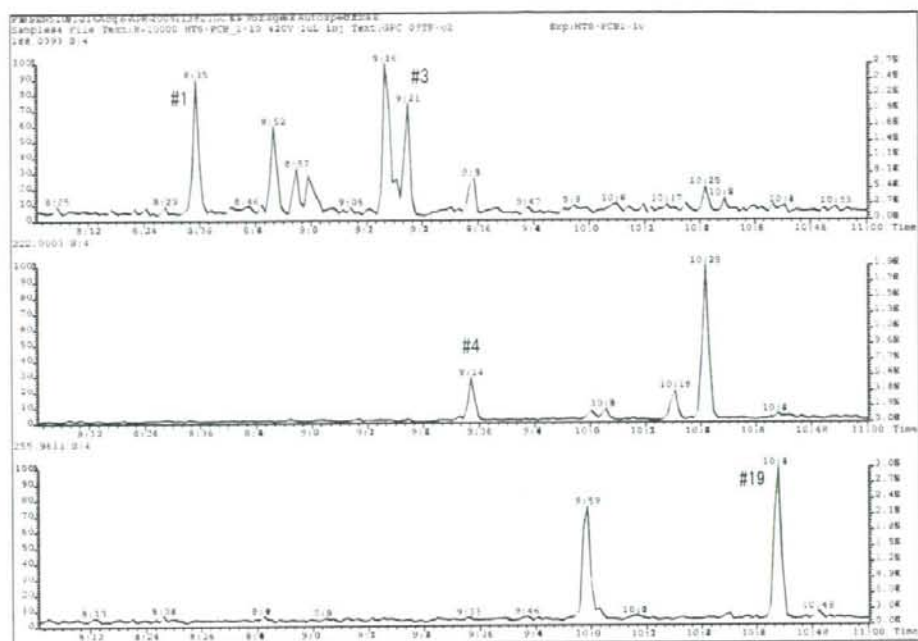


図5 魚（カンパチ）抽出物の GPC 精製試料の HRGC/HRMS クロマトグラム（保持時間 11 分～14 分 47 秒）。上段より順に 2 塩化物, 3 塩化物, 4 塩化物, 5 塩化物。

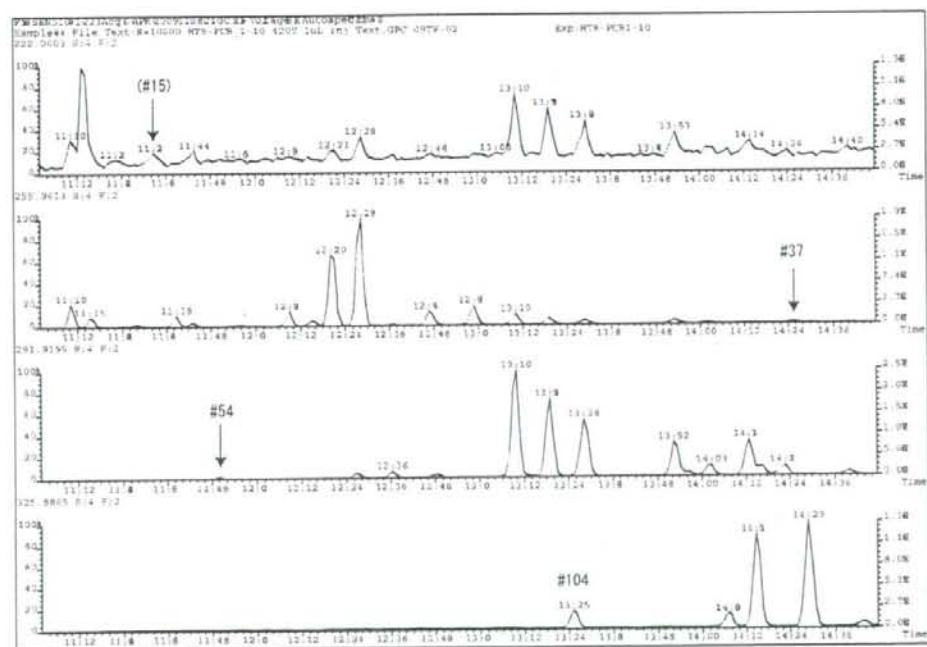


図6 魚（カンパチ）抽出物の GPC 精製試料の HRGC/HRMS クロマトグラム（保持時間 11 分～14 分 47 秒）。上段より順に 2 塩化物, 3 塩化物, 4 塩化物, 5 塩化物。

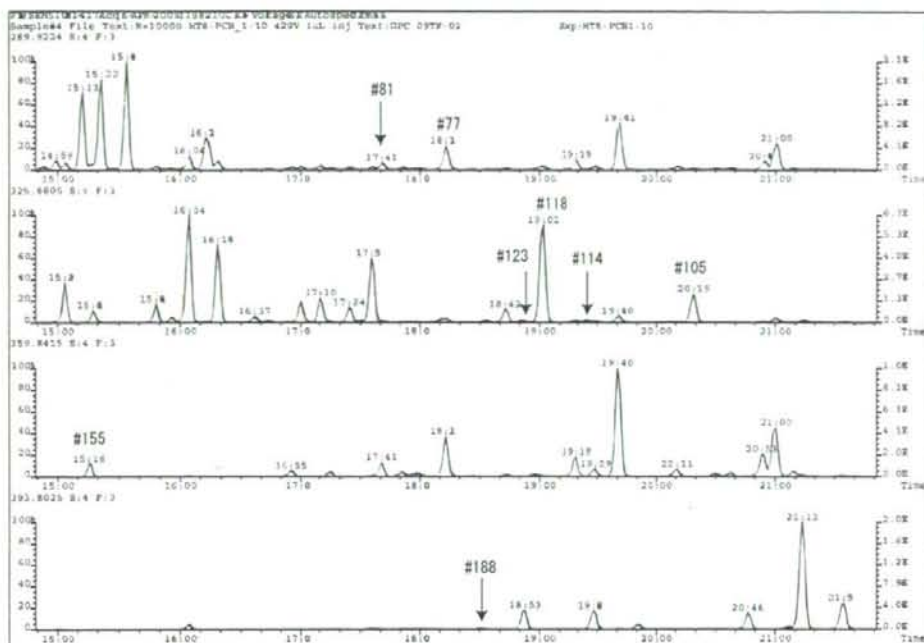


図7 魚（カンパチ）抽出物の GPC 精製試料の HRGC/HRMS クロマトグラム（保持時間 14 分 47 秒～21 分 50 秒）。上段より順に 4 塩化物, 5 塩化物, 6 塩化物, 7 塩化物。

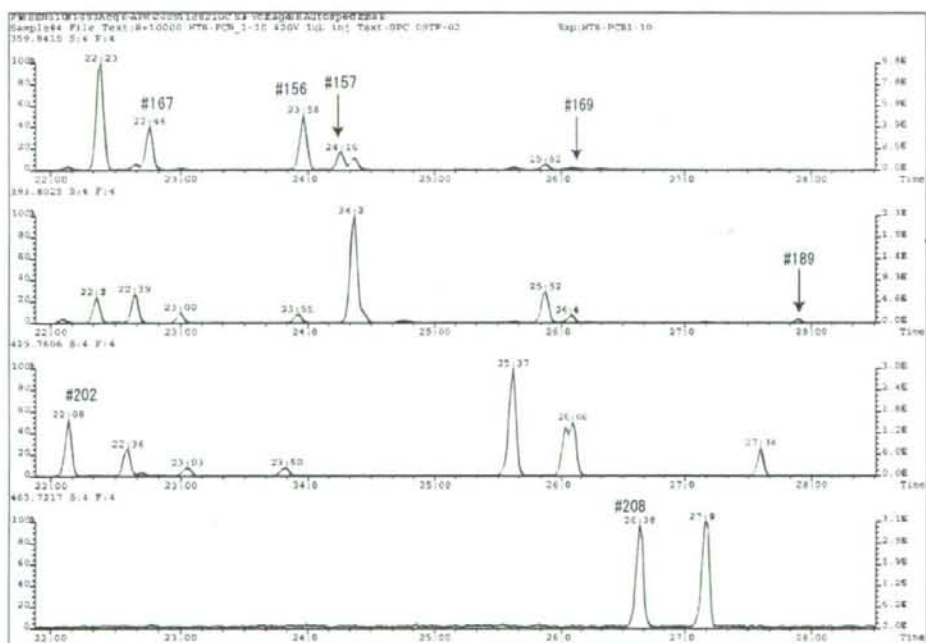


図8 魚（カンパチ）抽出物の GPC 精製試料の HRGC/HRMS クロマトグラム（保持時間 21 分 50 秒～28 分 30 秒）。上段より順に 6 塩化物, 7 塩化物, 8 塩化物, 9 塩化物。

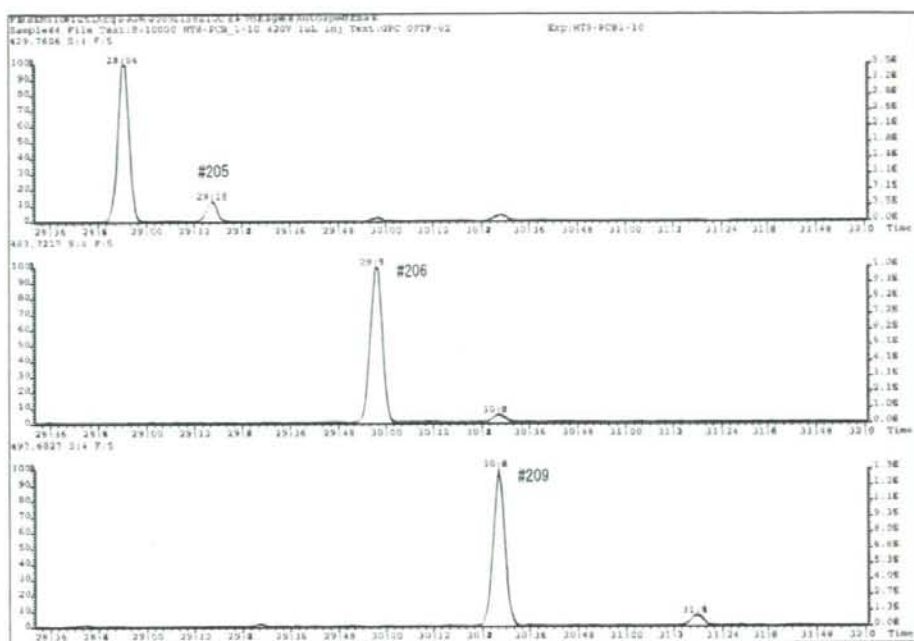


図9 魚（カンパチ）抽出物の GPC 精製試料の HRGC/HRMS クロマトグラム（保持時間 28 分 30 秒～32 分）。上段より順に 8 塩化物, 9 塩化物, 10 塩化物。

表3 魚試料（カンパチ）分析における PCBs26 種標準品の添加回収率。

化合物	回収率(%)			平均値 (%)	標準偏差	相対標準 偏差(%)
	1回目	2回目	3回目			
¹² C-2-CB(#1)	41	52	45	46	5	12
¹³ C-4-CB(#3)	49	54	47	50	4	7
¹² C-2,2'-diCB(#4)	59	70	57	62	7	11
¹³ C-4,4'-diCB(#15)	95	72	58	75	19	25
¹² C-2,2',6-triCB(#19)	90	91	87	89	2	2
¹³ C-3,4,4'-triCB(#37)	131	103	117	117	14	12
¹² C-2,2',6,6'-tetraCB(#54)	68	69	60	66	5	7
¹² C-3,3',4,4'-tetraCB(#77)	91	81	79	84	7	8
¹² C-3,4,4',5-tetraCB(#81)	85	75	71	77	7	9
¹² C-2,2',4,6,6'-pentaCB(#104)	74	64	49	62	12	20
¹² C-2,3,3',4,4'-pentaCB(#105)	94	88	84	88	5	6
¹² C-2,3,4,4',5-pentaCB(#114)	98	90	84	90	7	7
¹² C-2,3',4,4',5-pentaCB(#118)	92	84	81	86	6	7
¹² C-2',3,4,4',5-pentaCB(#123)	102	96	88	96	7	7
¹² C-2,2',4,4',6,6'-hexaCB(#155)	63	62	53	59	5	9
¹² C-2,3,3',4,4',5-hexaCB(#156)	60	61	50	57	6	11
¹² C-2,3,3',4,4',5'-hexaCB(#157)	76	77	70	74	4	5
¹² C-2,3',4,4',5'-hexaCB(#167)	73	73	64	70	5	7
¹² C-3,3',4,4',5'-hexaCB(#169)	68	68	54	63	8	13
¹² C-2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB(#188)	62	54	48	55	7	13
¹² C-2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB(#189)	64	63	53	60	6	11
¹² C-2,2',3,3',5,5',6,6'-octaCB(#202)	69	65	54	62	8	13
¹² C-2,3,3',4,4',5,5',6-octaCB(#205)	80	81	69	76	7	9
¹² C-2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaCB(#206)	90	87	75	84	8	9
¹² C-2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonaCB(#208)	68	61	47	59	11	18
¹² C-decaCB(#209)	92	83	74	83	9	11

表4 魚試料（カンパチ）中のPCBs26種異性体濃度*

化合物	濃度(µg/g, 全重量あたり)			平均値 (µg/g)	標準偏差	相対標準 偏差(%)
	1回目	2回目	3回目			
2-monoCB(#1)	1.7	1.4	1.2	1.6	0.27	18
4-monoCB(#3)	1.6	1.4	1.3	1.5	0.17	12
2,2'-diCB(#4)	6.2	5.5	6.5	5.8	0.55	9
4,4'-diCB(#15)	ND	ND	ND	-	-	-
2,2',6-triCB(#19)	6.4	5.6	5.7	6.0	0.41	7
3,4,4'-triCB(#37)	(3.6)	(6.6)	(3.8)	(5.1)	(1.6)	(35)
2,2',6,6'-tetraCB(#54)	5.9	5.0	5.2	5.4	0.44	8
3,3',4,4'-tetraCB(#77)	55	56	55	56	0.36	1
3,4,4',5-tetraCB(#81)	9.5	11	12	10	1.1	10
2,2',4,6,6'-pentaCB(#104)	5.3	5.0	4.9	5.1	0.19	4
2,3,3',4,4'-pentaCB(#105)	350	300	310	325	26	8
2,3,4,4',5-pentaCB(#114)	30	22	24	26	4.2	16
2,3',4,4',5-pentaCB(#118)	1100	960	980	1000	76	8
2',3,4,4',5-pentaCB(#123)	21	20	20	21	1.0	5
2,2',4,4',6,6'-hexaCB(#155)	230	200	220	220	15	7
2,3,3',4,4',5-hexaCB(#156)	74	68	69	71	3.4	5
2,3,3',4,4',5'-hexaCB(#157)	48	36	38	42	6.3	15
2,3',4,4',5,5'-hexaCB(#167)	99	76	91	87	12	14
3,3',4,4',5,5'-hexaCB(#169)	3.6	3.5	3.9	3.6	0.20	6
2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB(#188)	7.2	6.4	6.5	6.8	0.45	7
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB(#189)	22	19	20	21	1.7	8
2,2',3,3',5,5',6,6'-octaCB(#202)	53	44	49	49	4.8	10
2,3,3',4,4',5,5',6-octaCB(#205)	12	10	11	11	1.1	10
2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaCB(#206)	38	32	34	35	3.2	9
2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonaCB(#208)	18	16	18	17	1.5	9
DecaCB(#209)	53	44	48	49	4.2	9

*#37の定量値等は暫定値として記載した。

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

研究分担者 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

研究分担者 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種特定化学物質に指定され、その類似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 20 年度には、脂肪のアルカリ分解条件として前年度に提案した抽出液分解法について魚種による分解条件を決定した。また、アルカリ分解処理液の精製方法と LC/MS/MS 分析条件を決定した。

研究協力者

横浜国立大学環境情報研究院

浦野紘平、清水優子

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 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種特定化学物質に指定され、日本での製造・使用が禁止された^{1),2)}。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。

B. 研究方法

1. 試料

1.1 対象化合物

化審法で第1種特定化学物質に指定された(DBHP)BT および、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-ベンチルフェノール:(DAHP)BT、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-tert-オクチルフェノール:(OHP)BT、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチルフェノール:(MHP)BT、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 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、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。これらの対象物質の構造式、分解性、蓄積性、製造・輸入禁止状況等をまとめて表 1-a、表 1-b に示す。

表 1-a 研究対象としたベンゾトリアゾール類の特性など(1)

分析対象物	略称	cas番号	基本構造	法規制
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	3846-71-7		化審法 第一種特定 化学物質
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ペンチルフェノール	(DAHP)BT	25973-55-1		
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-tert-オクチルフェノール	(OHP)BT	3147-75-9		
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチルフェノール	(MHP)BT	2440-22-4		
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	3864-99-1		化審法 第一種監視 化学物質
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	3896-11-5		

表 1-b 研究対象としたベンゾトリアゾール類の特性など(2)

略称	分解性	蓄積性	長期毒性	日本での使用	食品モニタリングデータ	摂取量データ
(DBHP)BT	難	高	肝障害、肝発ガン性を有する疑い、NOELは0.1mg/kg/day (ラット、肝障害)	製造禁止 輸入禁止	ほとんどない (魚で4例、N.D.～0.5ng/g)	ない
(DAHP)BT	難	中	不明	未規制	ない	ない
(OHP)BT	(難)	(中)	不明	未規制	ない	ない
(MHP)BT	難	中	不明	未規制	ない	ない
(DBHP)CBT	難	高	不明	届出	ほとんどない (魚で2例、0.2、3ng/g)	ない
(BMHP)CBT	難	中	不明	未規制	ない	ない