

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、アセトニトリルはHPLC用、エタノールは特級発酵エタノール、ヘキサンは残留農薬試験用、水酸化カリウム(KOH)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マサバ3種類A、B、Cとマダイ1種類A、ブリ1種類Aと脂肪分が多いクロマグロの大トロ部分2種類A、Bの7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。

2. 装置と方法

2.1 抽出装置と分析機器

抽出装置は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(三菱化学アナリテック社製)を用いた。

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 λ Absorbance Detector を接続したものをを用いた。また、LC/MS/MSには、上記のHPLCとMicromass Quattro Microを用いた。

HPLCの分析条件を表2に、LC/MS/MS(ESIポジティブ法)の分析条件を表3-aに、LC/MS/MS(APCIポジティブ法)の分析条件を表3-bに示す。

また、表3-cにモニターイオン(ESIポジティブ法)の条件を示し、表3-dにモニターイオン(APCIポジティブ法)の条件を示す。

表2 HPLCの分析条件

カラム	3.5 μ 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	10 μ L
検出波長	220nm

表3-a LC/MS/MSの分析条件
(ESIポジティブ法)

カラム	3.5 μ mのSunFireC18(2.1 \times 150mm)
温度	40 $^{\circ}$ C
移動相組成	今回検討
移動相流量	0.3mL/min
試料注入量	今回検討
ネブライザーガス	N ₂
コリジョンガス	Ar
イオン源温度	120 $^{\circ}$ C
デゾルベーション温度	350 $^{\circ}$ C
デゾルベーションガス流量	600L/hr
コーンガス流量	50L/hr
キャピラリー電圧	3kV
モニタリング方法	MRM

表3-b LC/MS/MSの分析条件
(APCIポジティブ法)

カラム	3.5 μ mのSunFireC18(2.1 \times 150mm)
温度	40 $^{\circ}$ C
移動相組成	今回検討
移動相流量	0.3mL/min
試料注入量	今回検討
ネブライザーガス	N ₂
コリジョンガス	Ar
イオン源温度	120 $^{\circ}$ C
プローブ温度	450 $^{\circ}$ C
デゾルベーションガス流量	600L/hr
コーンガス流量	50L/hr
コロナ電流	3 μ A
モニタリング方法	MRM

表 3-c モニターイオン(ESI ポジティブ法)

化合物	Parent イオン	Daughter イオン
(DBHP)BT	324.2	268.3 と 212.2
(DAHP)BT	352.2	282.3 と 212.2
(OHP)BT	324.2	212.2 と 119.8
(MHP)BT	226.1	119.8 と 106.7
(DBHP)CBT	358.2	302.2 と 246.2
(BMHP)CBT	316.1	260.2 と 106.7

表 3-d モニターイオン(APCI ポジティブ法)

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

2.2 抽出液の KOH 処理条件の検討

前年度の本分担研究において、ヘキサン抽出してヘキサンを蒸発除去した後の残さ重量から求めた脂肪含有率 1.6%のマサバ A、11%のマサバ C、50%のクロマグロ B を用いて抽出液のアルカリ分解条件を決定したが、脂肪含有率 11%~50%の間の試料、脂肪含有率 21%のブリ A と脂肪含有率 33%のクロマグロ A について分解条件を検討した。前年度の本分担研究と同様の方法で抽出、分解し、分解前処理方法としての妥当性の判定を行った。

また、これらの結果と文献から魚種ごとの脂肪含有率をグループ分けし、抽出液の KOH 処理条件を決定した。

2.3 標準液での LC/MS/MS のイオン化法による分析感度の比較

(DBHP)BT の 1mg/L 標準溶液(メタノール)をシリンジポンプから 10 μ L/min で流し、メタノール/水(99/1)0.3mL/min と合流させ、イオン源に導入して、ESI ポジティブ法、ESI ネガティブ法、APCI ポジティブ法、APCI ネガティブ法

で分析して、感度の比較を行った。

2.4 標準液での LC/MS/MS の移動相の種類による分析感度の比較

ESI ポジティブ法と APCI ポジティブ法について、まず、移動相をメタノール/水系とアセトニトリル/水系を比較した。すなわち、(DBHP)BT の 1mg/L 標準メタノール溶液をシリンジポンプから 10 μ L/min で流し、メタノール/水(95/5) 0.3mL/min もしくはアセトニトリル/水(95/5) 0.3mL/min と合流させ、イオン源に導入して測定し、感度の比較を行った。

つぎに、ESI ポジティブ法および APCI ポジティブ法について、高感度であったメタノール/水系について、さらに感度を高められる可能性が報告されている添加剤の効果を確認した。すなわち、(DBHP)BT の 1mg/L 標準メタノール溶液をシリンジポンプから 10 μ L/min で流し、メタノール/水(99/1) 0.3mL/min もしくはメタノール/0.1%ギ酸溶液(99/1) 0.3mL/min もしくはメタノール/5mM 酢酸アンモニウム溶液(99/1) 0.3mL/min と合流させ、イオン源に導入して測定し、感度の比較を行った。

APCI ポジティブ法についても、メタノール/水系について、添加剤の効果があるかどうか確認した。すなわち、移動相をメタノール/水(99/1) 0.3mL/min もしくはメタノール/5mM 酢酸アンモニウム溶液(99/1) 0.3mL/min とし、6 種ベンゾトリアゾールについて定量分析を行い、結果の強度比を求め、感度が向上するかどうかを判断した。

2.5 注入限界量の検討

ESI ポジティブ法の場合には、移動相メタノール/5mM 酢酸アンモニウム溶液(99/1) 0.3mL/min で、また APCI ポジティブの場合には、移動相メタノール/水(99/1) 0.3mL/min で、同濃度の標準液を注入量を変えて分析し、6 種類のベンゾトリアゾールを定量して、注入量とピーク面積との関係から注入限界量を検討

した。

2.6 魚試料液でのイオン化法による共存物影響の比較

LC/MS の分析において、サンプル中の共存物の影響によって、対象物質のイオン化効率が変化してしまうことが知られている。イオン化が抑制されることもイオン化が促進されることもあるが、両方を合わせてマトリックス効果という。マトリックス効果は対象物質と同時にイオン源に入る共存成分によるため、共存成分の異なるサンプルではイオン化効率、すなわち感度に変化し、正しく定量することができなくなってしまうことがある。

機器メーカーの Waters はマトリックス効果の評価方法として、STD1 を測定対象成分標準液とし、STD2 をサンプルマトリックス液に測定対象成分標準溶液を添加した溶液として、両者のレスポンスの比から(1)式によって求めた値によって判定する方法を提案している。

マトリックス効果 [%] = (STD2 のレスポンス / STD1 のレスポンス - 1) × 100 ……(1)式

なお、Waters が推奨しているマトリックス効果の許容範囲は ±15% である。

そこで、ESI ポジティブ法と APCI ポジティブ法の 2 つのイオン化法についてマトリックス効果を確認した。すなわち、ESI ポジティブ法の場合は、移動相メタノール/5mM 酢酸アンモニウム溶液(99/1) 0.3mL/min で、注入量を 10 μL とし、APCI ポジティブ法の場合は移動相メタノール/水(99/1) 0.3mL/min で、注入量を 50 μL とし、マトリックス効果を調べた。

2.7 精製方法の検討

魚抽出液の KOH 処理液中の共存物をできるだけ少なくするための精製方法を検討した。

環境省の化学物質分析法開発調査報告書にある住化分析センターの方法³⁾を参考にして、精製にはまず Bond Elut Jr-NH2 500MG (Varian 社製)を使用した。住化分析センター

の方法では、あらかじめヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH2 Jr. カートリッジに濃縮液 1mL を負荷し、容器洗浄液としてヘキサン 2mL、溶出液としてヘキサン 2mL を流した場合、回収率が (DBHP)BT で 96.2%、(DBHP)CBT で 100.6% であったとしている。

そこで、まず、同様の方法で、残りの 4 種を含む全 6 種類のベンゾトリアゾールについて溶出液の必要量を確認してみた。Fr1 を負荷液(ヘキサン溶液)1mL+容器洗浄液 2mL(ヘキサン)を入れた後、ヘキサンを流して、順次分取して各フラクションからヘキサンを蒸発させ、メタノールに転溶して LC/MS/MS で分離・定量した。

Bond Elut Jr-NH2 500MG の NH2 カートリッジ、Waters のポリスチレン系樹脂カートリッジ PS-2 および Waters フロリジルカートリッジと Waters シリカゲルカートリッジを組み合わせるなどして、魚抽出液 KOH 処理液を精製する方法を検討した。フロリジルカートリッジ、シリカゲルカートリッジの溶出条件は、山口県環境保健研究センターの底質及び生物試料における 2-(3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾールの分析方法⁴⁾を参考にし、次のようにした。すなわち、フロリジルカートリッジは(洗浄)ヘキサン 5mL、(溶出)アセトン 5mL とし、シリカゲルカートリッジは(洗浄)ヘキサン 10mL、(溶出)アセトン 5mL とした。それぞれの溶出液について UV-HPLC のクロマトグラムから妨害ピークの数と大きさを比較した。UV の検出波長はほとんどの有機物が検出される 220nm とした。

C. 研究結果及び考察

1. 抽出液の KOH 処理条件の検討

脂肪含有率 21%のブリ A について、抽出液を 5mL/g-wet まで濃縮後、分解温度 40℃で KOH を濃度が 1mol/L 相当となるように添加して分解した結果、0.5 時間反応では残渣が液体状で(25g-wet あたり)57mg あり、分解不十分であったが、1 時間反応では残渣は固体状で(25g-wet あたり) 17mg となり、ほぼ完全に分解できた。

脂肪含有率 33%のクロマグロ A について、抽出液を 5mL/g-wet まで濃縮後、分解温度 40℃で KOH を濃度が 1mol/L 相当となるように添加して分解した結果、1 時間反応では残渣は、液体状で(25g-wet あたり) 21mg となり、分解がやや不十分であった。

これらの結果を 19 年度の主要な結果と合わせて表 4 にまとめて示す。

表 4 抽出液分解法のアルカリ分解条件と分解結果のまとめ

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	0.5	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											
食塩添加の有無	無											
マサバA 脂肪含有率1.6%	×	○	○	○	×	○	○	○	(○)	(○)	(○)	(○)
マサバC 脂肪含有率11%	(×)	—	—	—	(×)	—	○	○	(○)	(○)	(○)	(○)
ブリA 脂肪含有率21%	(×)	—	—	—	(×)	—	(×)	—	—	×	○	(○)
クロマグロA 脂肪含有率33%	(×)	—	—	—	(×)	—	(×)	(×)	—	(×)	×	(○)
クロマグロB 脂肪含有率50%	(KOH不溶×)				(×)	(×)	KOH不溶×		×	(×)	×	○

注) ○: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。

これらの結果から、脂質含有率 20%未満と考えられる魚種の分解条件と、20%以上と考えられる魚種の分解条件を表 5 のようにすることとした。

表 5 決定した魚種によるアルカリ分解条件

	脂質含有率	
	20%未満の魚種	20%以上となり得る魚種
反応温度(°C)	40	
加熱流下抽出液の濃縮液(エタノール)量/魚(mL/g-wet)	5	
KOH添加量/魚(mmol/g-wet)	5	
KOHエタノール溶液相当濃度(mol/L)	1	
反応時間(h)	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	
食塩添加の有無	無	

なお、農林水産省の平成 11~16 年の「魚介類中のダイオキシン類の実態調査」⁵⁾の魚種による脂質含有率のデータからすると、脂質含有率 20%以上となる可能性のある魚種はクロマグロ、ミナミマグロ、ウナギ、サンマ、ブリ、サバ、ギンダラ、メロ、マイワシ、カジキ、キチジ、(キアンコウ(肝臓)、カワハギ(肝臓)、スルメイカ(内臓))であり、その他の魚種では 20%未満と考えられる。

2. 標準液での LC/MS/MS のイオン化法による分析感度の比較

(DBHP)BT について、メタノール/水=99/1 で各検出方法によって強度が一番高く出るコーン電圧での結果を図 1 に示す。ESI でも、APCI でもポジティブ法の方が強度が大きく、

感度が高いことがわかったため、この後は ESI も APCI もポジティブ法のみで分析を行うこととした。

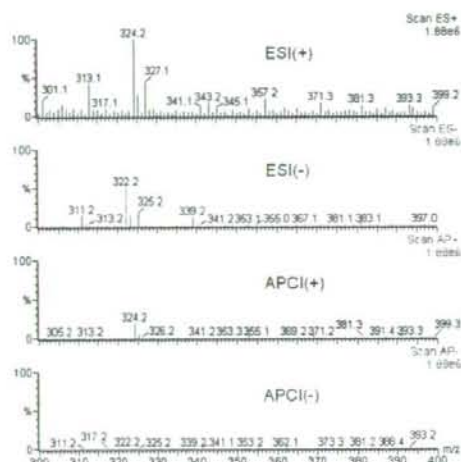


図 1 イオン化法による分析感度の比較
(メタノール/水=99/1、(DBHP)BT)

3. 標準液での LC/MS/MS の移動相の種類による分析感度の比較

3.1 メタノール/水系とアセトニトリル/水系の比較

(DBHP)BT についてメタノール/水=95/5 またはアセトニトリル/水=95/5 での強度の一番出るコーン電圧の結果を図 2-a (ESI ポジティブ法)と、図 2-b (APCI ポジティブ法)に示した。ESI ポジティブ法でも APCI ポジティブ法でも、メタノール/水系の方がアセトニトリル/水系よりも強度が大きく、感度が高いということがわかった。

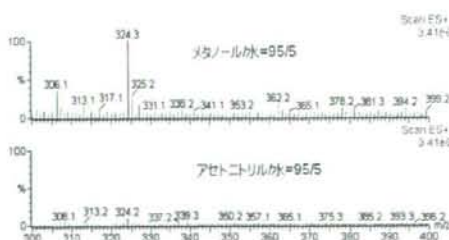


図 2-a 移動相による分析感度の比較
(ESI ポジティブ法、(DBHP)BT)

表6 APCI ポジティブ法での

移動相添加剤の効果

(メタノール/水又は5mM酢酸アンモニウム=99/1)

	5mM酢酸アンモニウム 添加/無添加の強度比
(DBHP)BT	1.0
(DAHP)BT	1.0
(OHP)BT	1.1
(MHP)BT	1.1
(DBHP)CBT	1.1
(BMHP)CBT	0.6

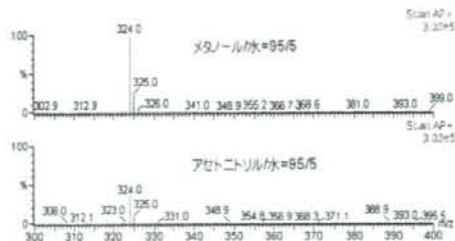


図2-b 移動相による分析感度の比較
(APCI ポジティブ法、(DBHP)BT)

3.2 メタノール/水系での添加剤の効果の確認

(i) ESI ポジティブ法の場合

(DBHP)BTについてメタノール/水=99/1とメタノール/0.1%ギ酸=99/1 またはメタノール/5mM 酢酸アンモニウム=99/1 で強度の一番強いコーン電圧の結果を図3に示す。5mM 酢酸アンモニウムを添加した場合が一番強度が大きく、感度が高いことがわかった。

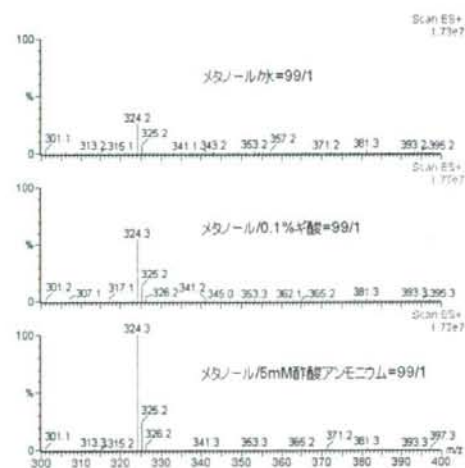


図3 添加剤の効果
(ESI ポジティブ法、(DBHP)BT)

(ii) APCI ポジティブ法の場合

結果の強度比を表6に示す。いずれの溶媒でもイオン化されたが、5mM 酢酸アンモニウムを添加しても感度は向上しないことがわかった。

4. 標準液での検出下限値と定量下限値

4.1 注入限界量の検討

5、10、20、30、50 μ Lと注入量を変化させたところ、APCI ポジティブの場合は、注入液量とピーク面積の間に直線関係があったものの、ESI ポジティブでは注入量を増やすと、感度が低くなる傾向があった。例として(MHP)BTについての結果を図4に示す。

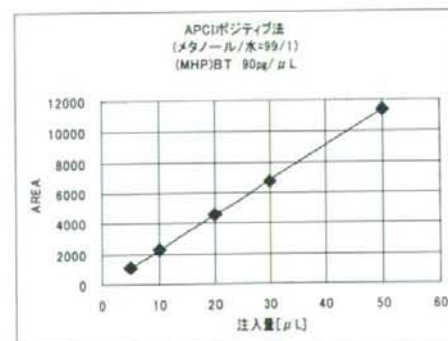
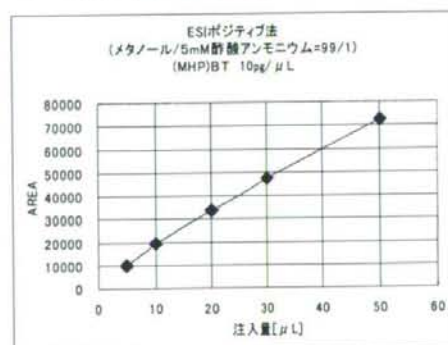


図4 注入量によるピーク面積の変化の例

また、APCI ポジティブ法について 50 μ L 注入の場合と 100 μ L 注入の場合のばらつきを比較した結果を表 7 に示す。100 μ L 注入の場合にはばらつきが大きく、イオン化効率が不安

定になっている可能性があった。

これらの結果から ESI ポジティブ法での注入量は最大 10 μ L とし、APCI ポジティブ法での注入量は最大 50 μ L とした。

表 7 APCI ポジティブ法での注入量 50 μ L と 100 μ L のばらつきの比較

50 μ L 注入の場合(n=3): 測定日 2009年1月23日

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
調製濃度[pg/ μ L]	11	9.9	9.9	10	9.6	10
平均面積	1560	1277	681	1511	385	339
標準偏差	30	39	10	61	27	11
変動係数[%]	2	3	1	4	7	3

100 μ L 注入の場合(n=3): 測定日 2009年3月31日

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
調製濃度[pg/ μ L]	9.6	9.2	9.4	8.9	9.3	9.6
平均面積	4109	4136	1234	2506	1110	536
標準偏差	1448	2037	189	195	373	78
変動係数[%]	35	49	15	8	34	15

4.2 検出下限値と定量下限値

ESI ポジティブ法の場合は、移動相メタノール/5mM 酢酸アンモニウム溶液(99/1) 0.3mL/min で、APCI ポジティブ法の場合は、移動相メタノール/水(99/1) 0.3mL/min で、標準液を LC/MS/MS 分析し、S/N 比から 6 種のベンゾトリアゾールの検出下限値(S/N=3)、定量下限値(S/N=8)を算出した結果を表 8-a、8-b に示す。ESI ポジティブの場合は、5 μ L 注入時、APCI ポジティブの場合は、50 μ L 注入時の値である。

また、魚試料量を 5g-wet とし、最終濃縮液量を 500 μ L、LC/MS/MS 注入量を ESI ポジティブは 10 μ L、APCI ポジティブは 50 μ L とした場合の魚試料あたりの検出下限濃度、定量下限濃度を表 9-a、9-b に示す。

表 8-a 標準液での ESI ポジティブ法での
検出下限値と定量下限値
(メタノール/5mM 酢酸アンモニウム=99/1)

	検出下限値[ng]	定量下限値[ng]
(DBHP)BT	0.0004	0.001
(DAHP)BT	0.0003	0.0007
(OHP)BT	0.0006	0.002
(MHP)BT	0.0007	0.002
(DBHP)CBT	0.0006	0.002
(BMHP)CBT	0.003	0.008

表 8-b 標準液での APCI ポジティブ法での
検出下限値と定量下限値
(メタノール/水=99/1)

	検出下限値[ng]	定量下限値[ng]
(DBHP)BT	0.04	0.1
(DAHP)BT	0.04	0.1
(OHP)BT	0.06	0.2
(MHP)BT	0.03	0.08
(DBHP)CBT	0.05	0.1
(BMHP)CBT	0.1	0.3

表 9-a 標準液での ESI ポジティブ法での
魚中検出下限濃度と定量下限濃度
(魚 5g-wet, 500 μL 濃縮, 10 μL 注入)

	検出下限濃度 [μg/kg-wet]	定量下限濃度 [μg/kg-wet]
(DBHP)BT	0.004	0.01
(DAHP)BT	0.003	0.007
(OHP)BT	0.006	0.02
(MHP)BT	0.007	0.02
(DBHP)CBT	0.006	0.02
(BMHP)CBT	0.03	0.08

表 9-b 標準液での APCI ポジティブ法での
魚中検出下限濃度と定量下限濃度
(魚 5g-wet, 500 μL 濃縮, 50 μL 注入)

	検出下限濃度 [μg/kg-wet]	定量下限濃度 [μg/kg-wet]
(DBHP)BT	0.08	0.2
(DAHP)BT	0.08	0.2
(OHP)BT	0.1	0.3
(MHP)BT	0.06	0.2
(DBHP)CBT	0.1	0.3
(BMHP)CBT	0.2	0.6

5. NH₂ カートリッジによる精製

5.1 NH₂ カートリッジによる精製時のベンゾトリアゾール類の溶出液量の確認

NH₂ カートリッジを用いて、Fr.1 を負荷液(ヘキサン溶液)1mL+容器洗浄液 2mL(ヘキサン)+溶出液(ヘキサン)2mL とし、以下 Fr.2~7 を溶出液(ヘキサン)1mL ずつとして、各フラクションをメタノール転溶して LC/MS/MS で分離・定量した結果を表 10-a に示す。

(DBHP)BT、(DAHP)BT、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT については、Fr.1 もしくは Fr.2 までで溶出しきれており、94.2~98.3%の回収率が得られることが確認された。しかし、(OHP)BT、(MHP)BT の 2 種については Fr.4 から溶出し始め、Fr.7 でも溶出しきれていない可能性があった。

そこで、さらに Fr.1 を負荷液(ヘキサン溶液)1mL+容器洗浄液(ヘキサン) 2mL+溶出液(ヘキサン)8mL とし、以下 Fr.2~4 を溶出液(ヘキサン)1mL ずつとして、各フラクションをメタノール転溶して LC/MS/MS で分離・定量した結果を表 10-b に示す。

負荷液(ヘキサン溶液) 1mL+容器洗浄液(ヘキサン)2mL+溶出液(ヘキサン)11mL であれば、(OHP)BT、(MHP)BT の 2 種についても 100.1%、99.6%の回収率が得られることが確認された。

表 10-a NH₂ カートリッジによる対象物質のヘキサン分画での回収率[%](1)

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1 負荷液1mL+ 容器洗浄液2mL+ 溶出液2mL	94.1	95.5	0.0	0.0	98.3	95.7
Fr.2 溶出液1mL	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Fr.3 溶出液1mL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fr.4 溶出液1mL	0.0	0.0	0.2	3.3	0.0	0.0
Fr.5 溶出液1mL	0.0	0.0	2.0	16.9	0.0	0.0
Fr.6 溶出液1mL	0.0	0.0	10.1	40.9	0.0	0.0
Fr.7 溶出液1mL	0.0	0.0	37.1	37.0	0.0	0.0
合計	94.2	95.7	49.5	98.1	98.3	95.7

表 10-b NH₂ カートリッジによる対象物質のヘキサン分画での回収率[%](2)

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1 負荷液1mL+ 容器洗浄液2mL+ 溶出液8mL	98.0	98.1	43.2	87.7	98.4	95.8
Fr.2 溶出液1mL	0.0	0.1	35.1	8.9	0.0	0.0
Fr.3 溶出液1mL	0.0	0.0	15.8	2.3	0.0	0.0
Fr.4 溶出液1mL	0.0	0.0	5.4	1.1	0.0	0.0
合計	98.0	98.2	99.6	100.1	98.4	95.8

5.2 魚試料液の NH₂ カートリッジ精製後のマトリックス効果

ブリ A 抽出液 KOH 処理液を NH₂ カートリッジに負荷し、負荷液(ヘキサン溶液)1mL+容器洗浄液(ヘキサン)2mL+溶出液(ヘキサン)11mL で溶出させた液について ESI ポジティブ法と APCI ポジティブ法でのマトリックス効果の大小を確認した。

すなわち、6 種ベンゾトリアゾール標準液をカラム溶出液に添加したもの、しないものについて LC/MS/MS 分析を行い、標準添加したものから標準添加しないものの結果を差し引いたものを STD2 のレスポンスとして、前述した(1)式によりマトリックス効果を調べた結果を表 11 に示す。

表 11 NH₂ カートリッジ処理後サンプルのマトリックス効果(ブリ A)

	ESIポジティブ法でのマトリックス効果[%]	APCIポジティブ法でのマトリックス効果[%]
(DBHP)BT	-79.9	1.5
(DAHP)BT	-91.9	1.0
(OHP)BT	分離不能	5.0
(MHP)BT	-67.5	0.0
(DBHP)CBT	-97.9	0.2
(BMHP)CBT	分離不能	-21.3

注) ESI ポジティブ法ではメタノール/5mM 酢酸アンモニウム=99/1、APCI ポジティブ法ではメタノール/水=99/1 (ESI ポジティブ法では魚 5g-wet、500 μL 濃縮、10 μL 注入、APCI ポジティブ法では魚 5g-wet、500 μL 濃縮、50 μL 注入)

イオン化法 ESI ポジティブ法の場合には、イオン化抑制を大きく受けていることがわかった。また、(OHP)BT と (BMHP)CBT に関してはマトリックス由来の妨害ピークがかさなり、分離不能であった。また、ほとんどの対象物質のピーク近くに妨害ピークがあった。

一方、イオン化法 APCI ポジティブ法の場合には、ほとんど影響を受けておらず、(BMHP)CBT 以外は Waters の推奨値±15% に入っていた。ただし、(DBHP)BT と (MHP)BT については、対象物質のピーク近くに妨害ピークがあった。また、(BMHP)CBT についてはマトリックス効果というよりはベースラインの変動による誤差の可能性が大きいのではないかと考えられた。

HPLC/MS/MS メーカーの Waters によると、APCI の場合は、試料を気化させた後、イオン化しているのに対し、ESI の場合は、液体の状態ですべてイオン化させてから気化させているので、対象化合物イオンと共存成分イオンの間で気相イオンへの転換に競合が生じるため、ESI の方がマトリックス効果が大きくなってしまいう傾向があるということであった。

5.3 NH₂ カートリッジによる精製効果の確認

ブリ A 5g-wet 分抽出液の KOH 処理(1h)液、クロマグロ A 5g-wet 分抽出液の KOH 処理(2h)液をそれぞれ 1mL まで濃縮し、NH₂ カートリッジに負荷し、Fr.1 を負荷液(ヘキサン溶液)1mL+容器洗浄液(ヘキサン) 2mL+溶出液(ヘキサン)3mL とし、Fr.2 を溶出液(ヘキサ

ン)8mLとして、処理後の液を1mLまで濃縮した。その時の処理後のカートリッジの写真を図5に示す。

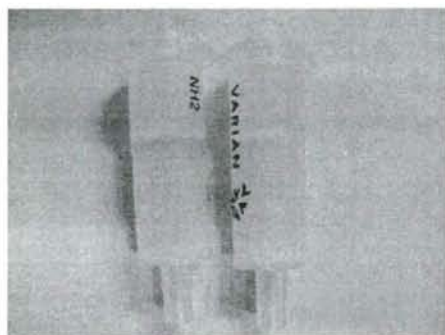
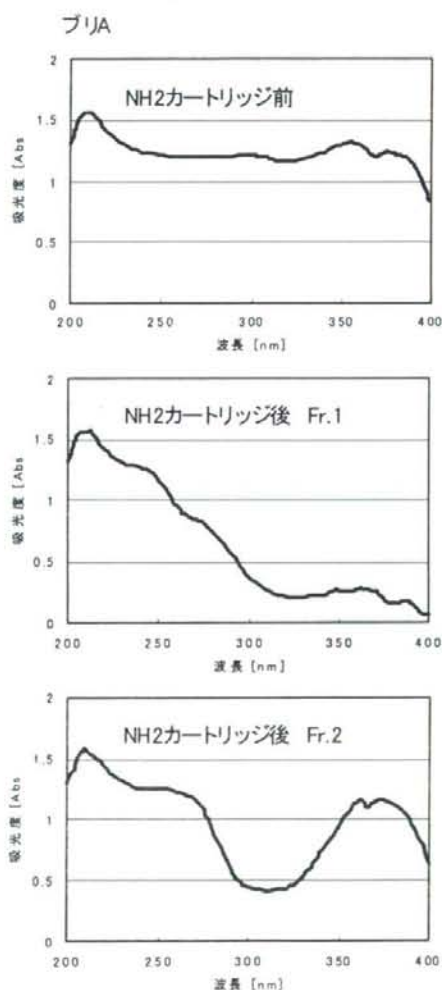


図5 NH2カートリッジ使用後着色状況
(左:ブリA、右:クロマグロA)



NH2カートリッジ処理前の液には、少し黄色味があったが、処理後の液は黄色味がとれて、使用後のカートリッジには黄色の着色が見られた。

また、NH2カートリッジ前後の液について測定した200nmから400nmのUV吸収スペクトルを図6に示す。NH2カートリッジ処理前の液は200nmから400nmまでほぼ一様に高い吸収が見られたが、処理後の液は300nmから400nmの長波長の範囲の吸光度が、1/2～1/3程度に減少していた。

図6 NH2カートリッジ処理後の液のUV吸収スペクトル(1mL濃縮時)

さらに、プリ A 5g-wet 分抽出液の KOH 処理(1h)液、クロマグロ A 5g-wet 分抽出液の KOH 処理(2h)液をそれぞれ 1mL まで濃縮し、NH₂ カートリッジに負荷した。負荷液(ヘキサン溶液)1mL+容器洗浄液(ヘキサン)2mL+溶出液(ヘキサン)11mL で溶出させた液をメタノール転溶し、HPLC-220nm 吸光度検出で分析した結果を図 7 に示す。APCI 分析での HPLC/MS/MS の場合の LC 条件と同条件で注入量は 10 μ L とした。また、図にはベンゾトリアゾールの溶出位置も示した。

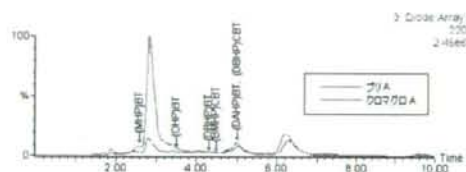


図 7 NH₂ カートリッジ処理後 UV-HPLC クロマトグラム (220nm)

ベンゾトリアゾールの検出されるリテンションタイムを含む広範囲に強度の大きいピークが検出された。マトリックス効果では対象化合物と同時にイオン源に入ってくる共存物が問題となるため、これらが影響していると考えられる。

そこで、NH₂ カートリッジでの溶出液量で分離出来るのではないかと考え、先に溶出する (DBHP)BT、(DAHP)BT、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT を対象とする Fr.1、後に溶出する (MHP)BT、(OHP)BT を対象とする Fr.2 に分けて妨害物を調べた。すなわち、プリ A 抽出液 KOH 処理液を NH₂ カートリッジに負荷し、Fr.1 を負荷液(ヘキサン溶液)1mL+容器洗浄液(ヘキサン)2mL+溶出液(ヘキサン)2mL とし、Fr.2 を溶出液(ヘキサン)9mL とし、メタノール転溶して同条件で UV-HPLC 分析した結果を図 8 に示す。また、図にはそれぞれのフラクションで対象としているベンゾトリアゾールの溶出位置も示した。

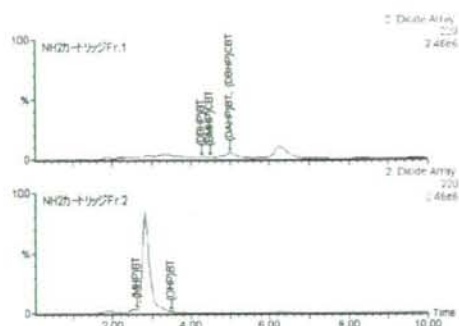


図 8 NH₂ カートリッジ処理(フラクション分け)後 UV-HPLC クロマトグラム (220nm)

Fr.1 と Fr.2 とに共存物のピークは分かれたが、Fr.1 の対象とする (DBHP)BT、(DAHP)BT、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT のリテンションタイムは 4~5min 付近であり、Fr.2 の対象とする (OHP)BT、(MHP)BT のリテンションタイムは 2.5~3.5min 付近であるため、フラクションを分けない場合と変わらない妨害があると考えられた。

6. PS-2 カートリッジによる精製方法の検討

6.1 溶出溶媒、溶出液量の確認

溶出溶媒をヘキサン、アセトン、ヘキサン・アセトン(1:1)の3種類とし、Fr.1 を負荷液(ヘキサン溶液)200 μ L+容器洗浄液(各溶媒)1mL、Fr.2 を容器洗浄液(各溶媒)1mL、Fr.3~5 を溶出液(各溶媒)1mL ずつとして、各フラクションをメタノール転溶して LC/MS/MS で分離・定量した結果を表 12-a~12-c に示す。

アセトンとヘキサン・アセトン(1:1)は同等の結果であり、ヘキサンでは、溶出しきれないものがあることがわかった。出来るだけ共存物と分離することを考えて、溶出溶媒はヘキサン・アセトン(1:1)とし、溶出液量は容器洗浄液を含めて 3mL として精製効果を調べることにした。

表 12-a PS-2 カートリッジによる対象物質のヘキサンでの分画

		(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1	負荷液200 μ L + 容器洗浄液1mL	6.8	8.5	3.5	0.0	7.8	3.2
Fr.2	容器洗浄液1mL	75.1	76.8	45.3	0.8	74.8	30.3
Fr.3	溶出液1mL	15.3	14.2	45.5	6.0	17.4	48.6
Fr.4	溶出液1mL	1.3	1.0	5.8	11.2	1.8	10.8
Fr.5	溶出液1mL	0.0	0.0	0.0	19.7	0.0	3.2
合計		98.5	100.5	100.1	37.6	101.8	96.2

表 12-b PS-2 カートリッジによる対象物質のアセトンでの分画

		(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1	負荷液200 μ L + 容器洗浄液1mL	23.6	22.6	21.1	9.0	21.1	18.2
Fr.2	容器洗浄液1mL	58.1	56.5	56.9	54.1	56.0	55.0
Fr.3	溶出液1mL	22.1	22.4	20.4	31.2	22.2	27.9
Fr.4	溶出液1mL	1.7	2.6	2.3	4.4	1.8	3.6
Fr.5	溶出液1mL	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0
合計		105.6	104.1	100.7	99.1	101.0	104.6

表 12-c PS-2 カートリッジによる対象物質のヘキサン・アセトン(1:1)での分画

		(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1	負荷液200 μ L + 容器洗浄液1mL	29.9	33.8	27.5	9.5	30.6	21.6
Fr.2	容器洗浄液1mL	54.2	56.8	60.4	66.1	57.4	58.2
Fr.3	溶出液1mL	9.7	10.8	11.2	21.8	11.5	15.1
Fr.4	溶出液1mL	1.2	1.3	1.1	2.6	2.1	2.7
Fr.5	溶出液1mL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合計		94.9	102.6	100.2	100.0	101.6	97.6

6.2 処理後サンプルの HPLC 分析

ブリ A 5g-wet 分抽出液 KOH 処理(1h)液を 200 μ L まで濃縮し、PS-2 カートリッジに負荷した。負荷液(ヘキサン)200 μ L + 容器洗浄液(ヘキサン・アセトン(1:1))2mL + 溶出液(ヘキサン・アセトン(1:1))1mL で溶出させた液をメタノール転溶し HPLC-UV(220nm)で分析した結果を NH₂ カートリッジ処理の結果と比較して図 9 に示す。

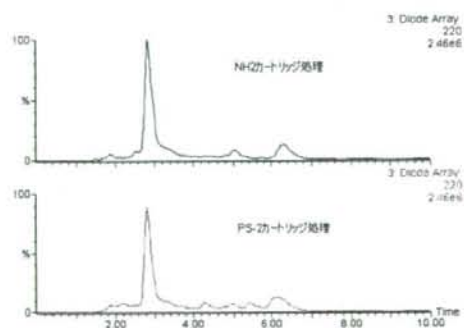


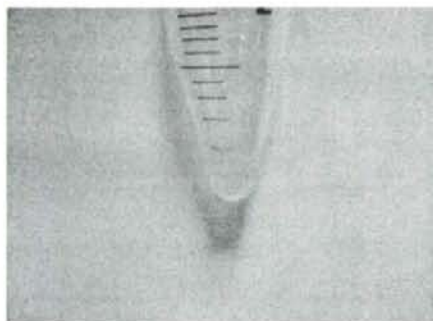
図9 PS-2カートリッジ処理後 UV-HPLC クロマトグラム (220nm)

NH₂ カートリッジ処理の場合と比較してほとんど変わらないか、少し悪くなっていた。また、PS-2 カートリッジ処理を行った際、PS-2 カートリッジはわずかに着色した程度であった。さらに、PS-2 カートリッジ処理後の液をメタノール転溶する際に、一旦乾固させた時の析出物がNH₂ カートリッジ処理の場合よりも非常に多く

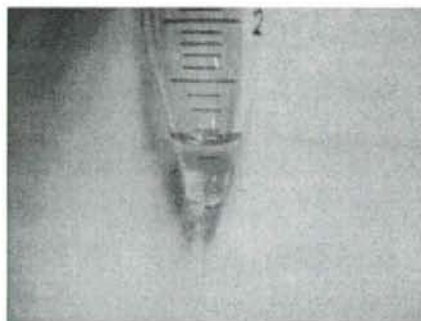
なった。この析出物はメタノール添加後にほとんど溶けたが、液の黄色味は残ったままであったことから、分析機器を汚してしまう可能性が高いことが考えられた(図10)。

これらの結果から、PS-2 での精製は困難と考えられた。

PS-2 カートリッジ 乾固時 (プリA)



PS-2 カートリッジ メタノール転溶時(プリA)



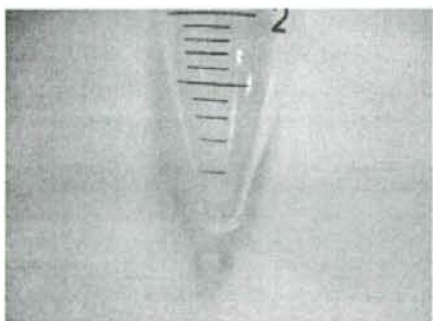
NH₂ カートリッジ Fr.1 乾固時(プリA)



NH₂ カートリッジ Fr.1 メタノール転溶時(プリA)



NH₂ カートリッジ Fr.2 乾固時(プリA)



NH₂ カートリッジ Fr.2 メタノール転溶時(プリA)

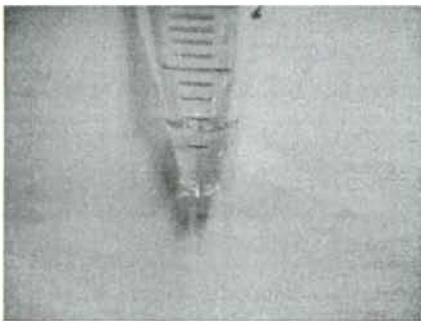


図10 カートリッジ処理後液の色

7. NH₂ カートリッジ+フロリジルまたはシリカゲルカートリッジによる精製方法の検討

ブリ A 抽出液 KOH 処理液を NH₂ カートリッジに負荷し、Fr.1 を負荷液 1mL(ヘキサン溶液)+容器洗浄液 2mL(ヘキサン)+溶出液 2mL(ヘキサン)とし、Fr.2 を溶出液 9mL(ヘキサン)とし、Fr.1、2 それぞれについて 1mL まで濃縮後、フロリジルカートリッジもしくはシリカゲルカートリッジ処理を行い、メタノール転溶して HPLC-UV(220nm)で分析した結果を NH₂ カートリッジ処理のみの場合の結果と比較して図 11-a、11-b に示す。

NH₂ カートリッジの Fr.1、Fr.2 の両方とも、フロリジルカートリッジでもシリカゲルカートリッジでもほとんどピークは減っておらず、ほとんど効果がないことがわかった。

なお、このとき、NH₂ カートリッジの Fr.2 を処理したフロリジルカートリッジにのみ、ほんの少しピンク系の着色がみられた。

以上のことから、NH₂ カートリッジにフロリジルやシリカゲルを追加して精製しても妨害物の除去効果が高くなることはほとんどないと考えられた。

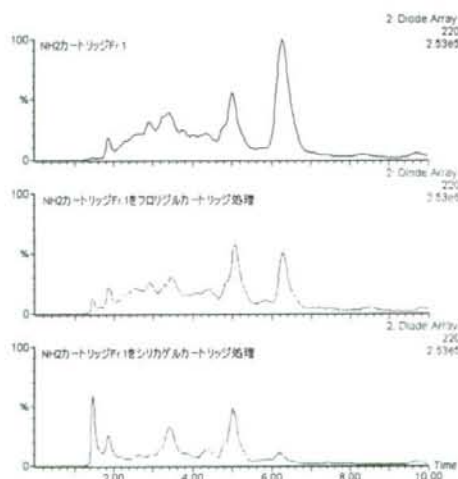


図 11-a NH₂ カートリッジ処理(Fr.1)
+フロリジル or シリカゲルカートリッジ処理後
UV-HPLC クロマトグラム(220nm)

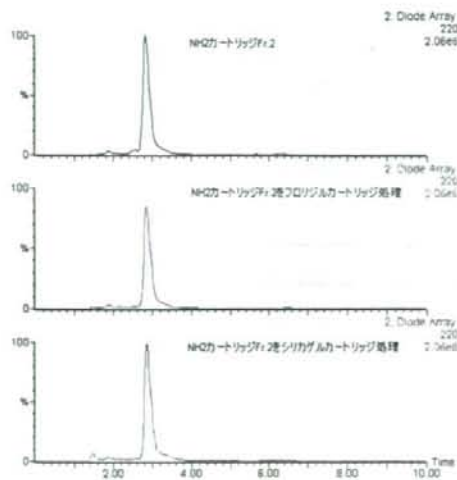


図 11-b NH₂ カートリッジ処理(Fr.2)
+フロリジル or シリカゲルカートリッジ処理後
UV-HPLC クロマトグラム(220nm)

8. 決定した方法による魚試料液での検出限界値と定量限界値

以上の結果から、カートリッジ精製方法は、NH₂ カートリッジのみで行い、(DBHP)BT、(DAH)BT、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT を対象とする Fr.1 は、負荷液(ヘキサン溶液)1mL+容器洗浄液(ヘキサン)2mL+溶出液(ヘキサン)2mL とし、(OHP)BT、(MHP)BT を対象とする Fr.2 は、溶出液(ヘキサン)9mL とすることとした。

LC/MS/MS 分析はイオン化法はマトリックス効果が小さかった APCI ポジティブ法とし、移動相はメタノール/水(99/1) 0.3mL/min で、注入量を 50 μL とすることとした。

この条件で、ブリ A 抽出液の KOH 処理液について精製処理した後、マトリックス効果を確認した結果を表 13 に示す。6 種類すべてのベンゾトリアゾールについて Waters 推奨値の ±15% 内に入り、この方法であれば、前処理は十分であると言えた。

表 13 決定した精製方法で処理したサンプルの APCI ポジティブ法におけるマトリックス効果(ブリ A)、(メタノール/水=99/1) (魚 5g-wet、500 μ L 濃縮、50 μ L 注入)

	マトリックス効果[%]
(DBHP)BT	-3.7
(DAHP)BT	5.8
(OHP)BT	-5.8
(MHP)BT	-4.5
(DBHP)CBT	-2.6
(BMHP)CBT	-4.9

また、この条件で、マサバ B、マダイ A、ブリ A 5g-wet を加熱流下抽出して KOH 処理した液について、NH₂ カートリッジで精製処理し、最終濃縮液量を 500 μ L、LC/MS/MS 注入量を 50 μ L とした場合のクロマトグラムのノイズ幅を測定し、標準液のノイズ幅と比較した。両者の大きい方をノイズ幅として S/N 比を求め、魚試料あたりの検出下限濃度と定量下限濃度を算出した結果を表 14 に示す。また、実サンプルのクロマトグラムの例を図 12 に示す。

これから、5g の試料を用いた場合の対象とした 6 種類のベンゾトリアゾール類の検出下限濃度は 0.06~0.4 [μ g/kg-wet]、定量下限濃度は 0.2~0.9 [μ g/kg-wet] となった。

表 14 実サンプルでの検出下限濃度と定量下限濃度

	マサバB (脂肪含有率5%)		マダイA (脂肪含有率11%)		ブリA (脂肪含有率21%)	
	検出下限濃度 [μ g/kg-wet]	定量下限濃度 [μ g/kg-wet]	検出下限濃度 [μ g/kg-wet]	定量下限濃度 [μ g/kg-wet]	検出下限濃度 [μ g/kg-wet]	定量下限濃度 [μ g/kg-wet]
(DBHP)BT	0.09	0.2	0.1	0.3	0.09	0.2
(DAHP)BT	0.08	0.2	0.1	0.3	0.08	0.2
(OHP)BT	0.1	0.3	0.1	0.3	0.2	0.5
(MHP)BT	0.06	0.2	0.08	0.2	0.07	0.2
(DBHP)CBT	0.2	0.4	0.1	0.4	0.1	0.3
(BMHP)CBT	0.3	0.7	0.3	0.7	0.4	0.9

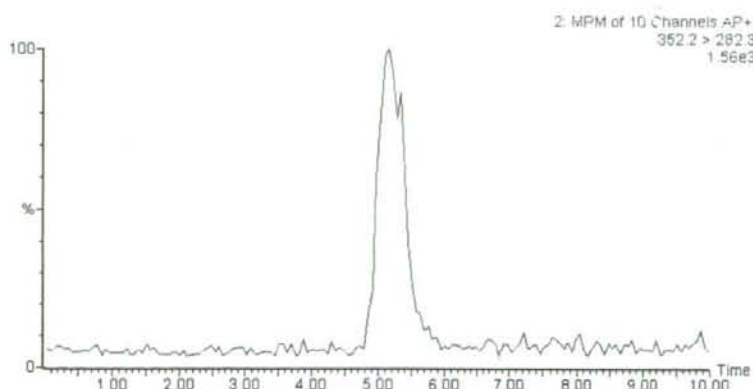


図 12 実サンプルの LC/MS/MS クロマトグラムの例 (マサバ B、(DAHP)BT)

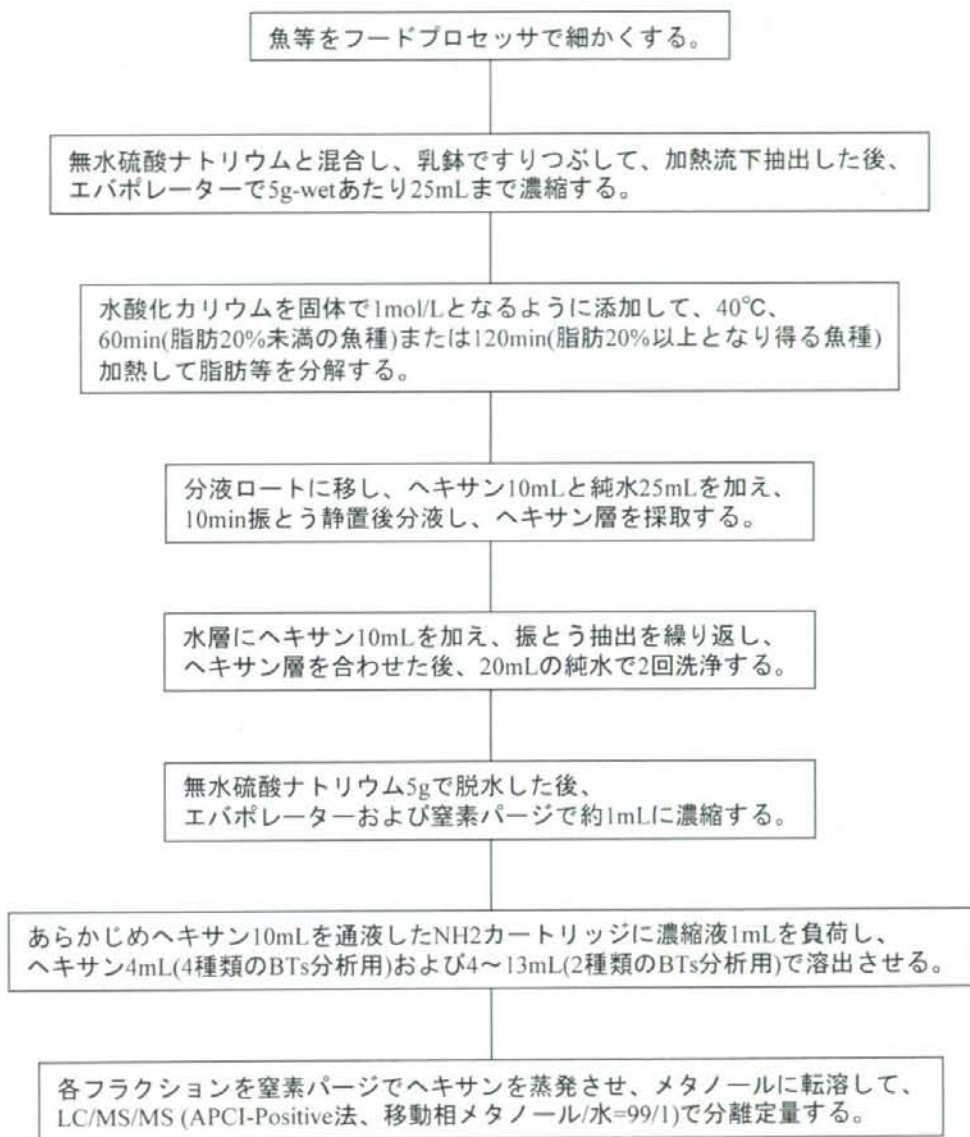


図 13 食品中ベンゾトリアゾール類(BTs)の測定フロー
(抽出と分離定量の詳細な最適条件は一部検討中)

D. 結論

表 1 に示した 6 種類のベンゾトリアゾール類の迅速測定法の開発を目的とした 20 年度の研究所から、以下のような結論を得た。

1) 新規に提案した抽出液の KOH による脂肪等分解法に関して、魚種を 2 つに分け、それぞれに対する分解条件を決定した(表 5)。

2) ベンゾトリアゾール類の LC/MS/MS 分析における 4 種類のイオン化法による感度を比較し(図 1)、比較的感度が高かった ESI ポジティブ法と APCI ポジティブ法について移動相の選択を行い(表 6、図 2、図 3)、検液の注入可能量(表 7、図 4)と感度を確認した(表 8、表 9)。

3) 魚抽出液の KOH 分解液について、ESI ポジティブ法では感度は高いが、共存物によるマトリクス効果が大きく、実用困難であった。一方、APCI ポジティブ法ではマトリクス効果が小さく、実用可能であることを示した(表 11)。

4) 4 種類のカートリッジ精製方法を検討し(表 10、表 12、表 13、図 5～図 11)、NH₂ カートリッジを用いる精製の条件を決定した。以上から、魚中のベンゾトリアゾール類の測定方法を提案した(図 13)。

5) 脂肪含有率の異なる 3 種類の魚試料について、決定した精製方法で処理し、LC/MS/MS のクロマトグラム(図 12)から実サンプルでの検出下限濃度と定量下限濃度を算出した(表 14)。

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/a11.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-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) 山口県環境保健研究センター、下尾和歌子・古古典子・嘉村久美子「底質及び生物試料における 2-(3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾールの分析方法」<http://kanpoken.pref.yamaguchi.lg.jp/soshiki/syohou/17k04.pdf>

5) 農林水産省平成 11～16 年度「魚介類中のダイオキシン類の実態調査」http://www.maff.go.jp/www/press/cont2/20050912press_7b.pdf

F. 研究業績

1. 論文発表

なし、(投稿準備中)

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

研究分担者 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

研究分担者 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及びその関連化合物の人への暴露源と考えられる食品の汚染実態を明らかにすることを目的とし、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)、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(Co-PXBs)の魚介類個別食品における汚染調査、国内2地域におけるマーケットバスケット方式による摂取量調査、(2)関連化合物としてヘキサプロモシクロドデカン(HBCDs)及び4臭素化ビスフェノールA(TBBPA)について、上記と同じ2地域における摂取量調査、魚介類個別食品での汚染調査、及びHBCDsの分析法の検討を行った。その結果、(1)の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及びMoBrPCDD/DFsは検出されなかった。PBDEsではすべての魚から#28、#47、#99、#154、#206、#207、#209などの異性体が検出され、PBBsでは7件中5件の魚から4-6臭素化体の異性体が検出された。Co-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。マーケットバスケット方式による国内2地域の摂取量調査では、一日摂取量は臭素系ダイオキシン類が平均0.000073 pgTEQ/kg/日、PBDEsが平均2.98 ng/kg/日、PBBsが平均0.00546 ng/kg/日であった(いずれもND=0として算出)。Co-PXBsは2地域ともいずれの食品群別試料からも検出されなかった。(2)では、あらゆる食品に適用できるHBCDsの標準的前処理法を開発することができた。本方法によって、HBCDsの2地域平均の摂取量は2.1 ng/kg/日(ND=0)、3.2 ng/kg/日(ND=1/2LOD)、TBBPAの平均摂取量は1.7 ng/kg/日(ND=0)、1.8 ng/kg/日(ND=1/2LOD)となった。魚試料の汚染調査では、HBCDsがND-36.9 ng/g、TBBPAがND-0.31 ng/g検出され、HBCDsの蓄積性が示された。

研究協力者
福岡県保健環境研究所
芦塚由紀、新谷依子、堀 就英、
安武大輔
埼玉県衛生研究所
堀江正一
大阪府立公衆衛生研究所
田中之雄、柿本健作

宮城県保健環境センター
氏家愛子
国立医薬品食品衛生研究所
堤 智昭

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^{1),2)}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(Co-PXBs)の魚介類からの検出³⁾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することは、人体影響の評価、食品の安全を確保するために急務である。我々は昨年度、これまで調査を行ってきた臭素系ダイオキシン(PBDD/DFs, MoBrPCDD/DFs)と臭素系難燃剤のPBDEs, TBBPA, HBCDsに加えて、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。また、検討した分析法によって、魚介類中の

PBDD/DFs, MoBrPCDD/DFs, PBDEs, PBBs, Co-PXBsを分析した。今年度は魚介類個別試料の分析に加え、国内2地域におけるマーケットバスケット方式による臭素系化合物の摂取量調査を行った。また、HBCDsの前処理法について、あらゆる形態の食品にも適用できる標準的前処理の検討を行い、マーケットバスケット試料や魚介類個別試験に適用した。TBBPAについても、同じ検体試料について汚染調査を実施し、汚染実態と摂取量の把握を行った。

B 研究方法

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(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(Co-PXBs)の分析

1-1 魚介類個別試料の分析

1-1-1 分析試料

魚介類試料として、九州地方(鹿児島)、中部地方(名古屋)、中国・四国地方(瀬戸内海)で購入した魚介類を用いた。試料の詳細を表1に示す。

1-1-2 標準品

PBDD/DFs及びMoBrPCDD/DFsはCambridge Isotope Laboratories社製のNative体、¹³C₁₂-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)、シリンジスバイクは¹³C₁₂-2,2',3,4,4',5'-HxBDE(#138L)を使用した。PBBsはWellington