

て同等またはそれ以上であることを確認した。すなわち「ガイドライン」に記載されている標準的抽出法に替えて 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が示された。

本分担研究課題(平成 19 年度～)では、ASE による抽出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、ダイオキシン類と PCBs を一斉に抽出、分析する方法の検討を開始した。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(例 遠洋沖合魚介類:0.5 ppm、内海内湾魚介類:3 ppm)。ダイオキシン類と PCBs は化学構造が酷似し、化学的性質・毒性面においても共通点の多い食品汚染化学物質である。従来、これらの化学物質は、各々工程の長い煩雑な個別分析法によって測定されている。これらの化学物質を同時かつ迅速に分析することが可能になれば、当該物質による汚染実態調査の進展に寄与するほか、食品汚染事件が発生した場合など、速やかな原因究明が求められる場面においても有用と考えられる。

平成 19 年度は、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<sup>5)</sup>。

平成 20 年度は、ASE 抽出物の効率的な精製方法を検討し、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。また、機器分析条件を改良し、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。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ったところ、標準品添加回収率と測定値は良好な再現性を示した<sup>6)</sup>。

本年度は分析法開発の最終段階として、

分析法の妥当性評価試験を行った。共通の生鮮魚介類試料を従来法(アルカリ分解溶媒抽出法)と迅速一斉分析法で分析し、各々から得られる定量値が一致するか比較した。また各々の方法で分析を繰り返し行った際の定量値の再現性(ばらつき)を比較した。

## B.研究方法

### 1.試料、試薬等

#### 1.1 試料

福岡県内の食料品店でサケ及びカンパチの切り身を購入し、各々フードプロセッサーで十分に均一化して実験に使用した。

#### 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として 68A-LCS を、またシリンジスパイク用内部標準溶液として 68A-IS をそれぞれ用いた。

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平成 20 年度の本分担研究報告書<sup>6)</sup>に記載の方法に従い、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。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サカラム」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 °C、抽出溶媒はアセトン・ヘキサン(1:1)であった。その他の装置使用条件は平成 16 年度厚生労働科学研究報告書に記載の内容に従った<sup>2)</sup>。

### 2.2 ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)

GPC システムを構成する製品(ポンプ、カラム等)の構成は平成 20 年度の本分担研究報告書<sup>6)</sup>に記載したものと同様であった。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 カラムオーブンの温度は 40 °C、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 Agilent 6890/Micromass AUTOSPEC ULTIMA を使用した。PCBs の測定には関東化学(株)製の HT8-PCB を、PCDD/Fs 及び non-ortho PCBs の測定には SP-2331(スペルコ社製)及び BPX-DXN(SGE 社製)の各キャピラリーカラムを使用した。

PCBs の機器分析条件は、平成 20 年度の本分担研究において確立した PCBs 全異性体分析法に従った<sup>6)</sup>。本条件によって検量線作製用標準溶液 68A-CS3 のノナン希釈液を測定し、相対感度係数(RRF)を算出した。また 209 種類の全 PCBs 異性体(ネイティブ体)を含む溶液及び文献の情報<sup>7)</sup>を用い、PCBs 異性体のピーク同定を行った。

## 3. 実験操作

### 3.1 ダイオキシン類・PCBs の一斉迅速分析法

平成 20 年度の本分担研究報告<sup>6)</sup>に記載した方法に従って実施した。分析法のフロー図を図 1 に示した。

本フロー図に基づき、サケのホモジネートを用いて PCBs の異性体分離分析を行った(試行回数:3)。また、カンパチ試料を用いて全試験操作を行い(試行回数:1)、全 PCBs 異性体(209 種化合物)及び 2,3,7,8-PCDD/Fs(17 種化合物)計 226 化合物を同定・定量した。

試料約 25 g を 250 mL 容のテフロン性遠沈管に正確に量り取り、PCBs 及び PCDD/Fs の各クリーンアップスパイク(68A-LCS 及び NK-LCS-F)を添加した(試行例数:3)。内部標準物質の添加量は、<sup>13</sup>C ラベル化 2,3,7,8-PCDD/Fs においては各 50 pg (OCDD/F は 100 pg)、<sup>13</sup>C ラベル化 PCBs は各 5,000 pg とした。なお、これらの異なる内部標準溶液を組み合わせる抽出に使用しても、不純物の干渉等による分析精度への影響は生じないことをあらかじめ確認している<sup>5)</sup>。

ASE で調製した抽出液を減圧濃縮し、濃縮物をあらかじめ風袋を量った 100 mL 容ビーカーに移してクリーンベンチ内に放置し、溶媒成分を蒸発・乾固させた。恒量に達したことを確認し、重量法により粗抽出脂肪量を求めた。

多層シリカゲルカラムによる精製は、平成 20 年度の本分担研究で確立した改良型カラムを使用して行った<sup>6)</sup>。多層シリカゲルカラムクロマトから得られた溶出液を減圧濃縮後、ヘキサンで 10 mL に定容した。ここで溶出液を二分し、2 mL(試験品約 5 g 相当)を PCBs 測定試料の調製に、残り 8 mL(試験品約 20 g 相当)を 2,3,7,8-PCDD/Fs 及びノンオルト PCBs 測定試料の調製に用いた。

前者(2 mL)をスピッツ管に分取し、窒素ガス気流を穏やかに吹き付けて濃縮・乾固した。残留物を少量のアセトンで溶解し、全量 500 µL としたうちの 50 µL を GPC に注入した。GPC で分離された PCBs 画分は 1.5 mL 容の濃縮用バイアルをリザーバーとして回収した。バイアルをクリーンベンチ内で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、全量約 50 µL 中の 1 µL を

HRGC/HRMS に注入した。

後者(8 mL)は活性炭分散シリカゲルリバー  
スカラムに負荷して精製した。本カラム精製で  
得られたトルエン画分を濃縮し、シリンジスパ  
イクを添加し、ダイオキシン類 PCDD/Fs 及び  
2,3,7,8-PCDD/Fs の 17 種化合物とノンオルト  
PCBs の 4 種化合物の分析試料とした。最終  
測定試料の液量は約 25  $\mu$ L であり、このうち  
の 1  $\mu$ L を HRGC/HRMS に注入して測定し  
た。

### 3.2 アルカリ分解・溶媒抽出法(従来法)による の PCBs 異性体分離分析

平成 10 年に環境庁(当時)が策定した「外因  
性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル  
(水質、底質、水生生物)」に記載された方法  
に準じ、魚介類試料中の PCBs 異性体分離分  
析を実施した。操作手順は以下の通りであっ  
た。

3.1 項で使用したものと同一サケのホモジネ  
ート約 20 g を 250 mL 容のテフロン性遠沈管  
に正確に量り取り、PCBs のクリーンアップスパ  
イク(68A-LCS)を添加した(試行回数:3)。添  
加量は PCBs 各化合物につき 4,000 pg とした。  
量り取った試料に 1N KOH/エタノール溶液  
100 mL を加え、室温で 1 時間振とうしてアル  
カリ分解を行った。

アルカリ分解後の溶液を 2,500 rpm で 10 分  
間遠心分離し、得られた上清を 300 mL 容の  
分液ロートに移し入れ、ヘキサン洗浄水 100  
mL を添加し、十分に混和した。遠心分離後の  
残渣にヘキサン 50 mL を加え、約 10 分間超  
音波抽出を行った後、遠心分離を行った。上  
清のヘキサン相をさきの分液ロートに合わせ、  
10 分間振とう抽出を行った後、静置して有機  
層を分離させた。

有機相を別の 300 mL 容の分液ロートに移  
し、残った水相にヘキサン 50 mL を加え、振と  
う抽出を繰り返した。すべての有機相を合わ  
せた後、ヘキサン洗浄水 100 mL を加え穏や

かに振り混ぜ洗浄した。有機相を無水硫酸ナ  
トリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターで  
約 5 mL まで減圧濃縮した。濃縮液を 50 mL  
容のガラス製共栓遠沈管に移し、硫酸 20 mL  
を添加して穏やかに振り混ぜ、一夜静置した  
(硫酸処理)。

次に有機相を多層シリカゲルカラムクロマト  
グラフィーに負荷し精製した。多層シリカゲル  
カラムによる精製は、3.1 項と同様に改良型カ  
ラムを使用して行った。得られた溶出液を減  
圧濃縮してシリンジスパイク(68A-IS)を添加し、  
最終検液の全量約 1 mL のうち 1  $\mu$ L を  
HRGC/HRMS に注入して分析した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 一斉迅速分析法と従来法との定量値の比 較

図 1 の試験フローに従って同一のサケ試料  
の分析を 3 回繰り返して行った。ASE の抽出  
物より重量法で求めた粗脂肪含量は 14.4~  
15.2%の範囲であった。昨年度に ASE を同じ  
条件で使用した際の粗脂肪含量は、カンパチ  
試料(試行回数 3)で 4.6~5.7 %、粉末ミルク  
試料(試行回数 5)で 23.5~25.0 %であった。  
これらの抽出物を硫酸処理して改良多層シリ  
カゲルカラムに負荷し、10 %ジクロロメタン含  
有ヘキサンで溶出した場合、いずれも充填剤  
の着色は充填剤層に保持されていた<sup>6)</sup>。

今回のサケ抽出物の精製においても、カラム  
溶出時の着色は充填剤層に留まり、カラム  
の破過に伴う妨害成分の溶出は特に認められ  
ず、改良カラムの充填剤量と溶出溶媒の極性  
選択は適切なものと考えられた。

また、サケ抽出物の硫酸処理操作において  
は、硫酸層の一部が強粘性の褐色タール状と  
なり、ヘキサン層との分離が不十分な現象が  
認められた。硫酸処理前にヘキサンで抽出脂  
肪を溶解する際の液量(希釈率)がやや不足  
していたことが原因と考えられる。

サケ抽出物を HRGC/HRMS で測定して得

られた PCBs の 1~10 塩素化物のクロマトグラム  
の一例を図 2~6 に示した(内部標準物質の  
クロマトグラムは省略している)。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  
られず、良好なクロマトグラムが得られた。  
多層シリカゲルカラムクロマト後の溶出液を濃  
縮乾固した際には、試料由来の油状成分の  
残存が明瞭に認められた。しかし GPC 精製後  
の溶出液には当該成分は目視できず、GPC  
によって測定妨害成分を効果的に分離・除去  
できたと考えられた。

サケ分析時の PCBs 内部標準物質の 26 化  
合物の添加回収率を表 1 に示す。平均添加  
回収率は 23~75 %の範囲であった。昨年度  
に本分担研究で実施したカンパチ試料分析  
時の平均添加回収率(48~117 %、試行回数  
3)に比べて総じて低下していた。先に述べた  
硫酸処理操作において硫酸相とヘキサン相  
の分離が不十分であったことが、全般的な低  
回収率の一因として考えられる。また、平均回  
収率の最も低かった化合物は質量数が最も小  
さい 1 塩素化物の <sup>13</sup>C-2-CB(#1)であり、減圧  
濃縮や窒素ガス気流の濃縮時に特に揮散・損  
失しやすかったものと考えられる。

表 2 に PCBs の 1~10 塩素化物の定量結  
果を示す。迅速一斉分析法とアルカリ分解・溶  
媒抽出法から得られた定量値を比較した。定  
量値は、クリーンアップスパイクに対応する 26  
種化合物、ならびに環境試料や食品試料から  
検出される主要な異性体 6 種(Indicator  
PCBs)を加えた計 32 種類の化合物について  
示した。2,2'-diCB(#4)と 4,4'-diCB(#15)の両  
化合物は、いずれの試験法においても不検出  
であった。結果として、各々の方法から得られ  
た PCBs 化合物の定量値は総じてよく一致し  
ており、迅速一斉分析法を使用して従来法と  
同等の定量値が得られた。定量値のくり返し  
再現性の指標となる相対標準偏差を算出した  
ところ、従来法は 1~34 %の範囲に、迅速一  
斉分析法では 2~18 %の範囲となり、両者で

著しい定量値のばらつきは認められなかった。  
迅速一斉分析法では相対標準偏差が 20 %を  
超える異性体が皆無であり、この点では従来  
法より優れた再現性を示していた。

また、従来法に対する一斉迅速分析法の定  
量値(平均値)の比を算出すると、0.75~2.3 の  
範囲(平均 1.1)であった。例えば、一斉迅速  
分析法における 4-mono-CB(#3)の定量値(平  
均値)は、従来法よりも 2.3 倍高くなっていた。  
ASE は抽出効率に優れた抽出法であり、緑色  
野菜中ダイオキシン類の抽出に適用した場合、  
従来法(溶媒振とう抽出法)に対して定量値が  
高くなる傾向が認められている。このとき、従  
来法に対する定量値の比は 1.1~3.2 の範囲  
であった<sup>2)</sup>。同様に、マグロ試料中ダイオキシ  
ン類の抽出に ASE を適用した場合、従来法  
(アルカリ分解・溶媒抽出法)に対する定量値  
の比は 0.91~2.0 の範囲となり、ASE の抽出効  
率の優位性は振とう抽出と比べた場合より低  
くなる結果が得られた<sup>3)</sup>。今回の従来法と迅速  
一斉分析法との定量値の比較結果は、アルカ  
リ分解法との比較を行ったマグロのダイオキシ  
ン類分析例と類似していた。アルカリ分解・溶  
媒抽出法では試料組織(マトリックス)を粥状  
に分解して行うため、抽出溶媒がマトリックス  
によく浸透して抽出効率が高く、ASE との効率  
差が現れにくいものと考えられる。

表 2 に表示した 32 種化合物の定量値の総  
和を求め、「総 PCBs 濃度」として試験法間の  
比較を行った。従来法における総 PCBs 濃度  
(全重量あたり)は 26.1~26.4 ng/g(平均 26.5  
ng/g)、同様に迅速一斉分析法では 25.3~  
27.2 ng/g(平均 26.0 ng/g)となり、両者でよく一  
致していた。

以上のように、迅速一斉分析法によって得  
られる PCBs 異性体の定量値は、従来法で得  
られる値とよく一致し、繰り返し再現性の指標  
となる相対標準偏差(%)に著しい相違は認め  
られなかった。また、「総 PCBs 濃度」によって  
基準値が定められる食品規格検査においても、

本方法の適用性が示唆された。

## 2. 迅速一斉分析法による全 PCBs 異性体の同定及びダイオキシン類の毒性評価

本分担研究で確立した迅速一斉分析法の全試験操作を、カンパチ試料を用いて試行した(試行回数 1)。ここでは、HRGC/HRMS 測定結果を詳細に解析し、全 PCBs 異性体並びにダイオキシン類として毒性評価の対象となる全化合物の定量を行った。これらの結果を表 3 に示す。なお、カンパチ試料分析時の内部標準品添加回収率は、GPC 精製から得られた PCBs 画分において 52~103 %、活性炭リバーサラム精製から得られたダイオキシン画分で 70~86 %の範囲であり、いずれもガイドラインでダイオキシン類分析時の回収率の目安とされる 40~120 %の範囲内の良好な値が得られた。

表 3-(1)は 1 塩素化から 10 塩素化物までの各 PCBs 異性体を定量した結果である。表 3-(2)には、2,3,7,8-PCDD/Fs の 17 種化合物及びノンオルト PCBs の 4 種化合物の同定結果を示した。また、表 3-(3)には、各 PCBs 異性体濃度より求めた塩素置換数ごとの PCBs 濃度(Total MoCBs~DeCB)、総 PCBs 濃度(Total PCBs)を算出して示した。さらに(1)の PCBs 異性体分析結果から、8 種類のモノオルト PCBs 濃度を抜き出し、(2)の結果と総和してダイオキシン類濃度(Total dioxins)を算出した。

表中に示した算出値はすべて湿重量(全重量)あたりの濃度である。本迅速一斉分析法では操作の過程で抽出試料の脂肪含量を把握している。カンパチ試料の脂肪含量は表 3-(3)に示すように 4.9 %であった。この値を用いて各定量値を脂肪重量あたりの濃度に換算することも可能である。

以上の結果、本方法の適用によって食品試料中のダイオキシン類と PCBs を迅速かつ同時に抽出し、合計 226 種類の化合物の濃度を

同定して、様々な濃度指標を得ることが可能であった。

## D. 結論

平成 19 年度以降、段階的に検討を実施した結果、ASE を使用して食品中のダイオキシン類と PCBs を迅速かつ一斉に抽出し、系統的に分析できる方法を確立した。過去の研究において、食品中のダイオキシン類抽出に ASE を使用することの妥当性が示されている<sup>2)4)</sup>。従って本研究では、ダイオキシン類と同じ抽出条件を PCBs 抽出に適用し、PCBs 分析の従来法と同等の結果が得られるかに重点をおき、検討した。PCBs の化学構造や化学的性質はダイオキシン類と類似点が多いが、4~8 塩素化物を抽出対象とするダイオキシン類に対し、1~10 塩素化物の PCBs はダイオキシン類よりも質量数の範囲が広く、異性体数も多岐に亘るため、ダイオキシン類の抽出条件がそのまま適用できるかは未知であった。

前年度までに、ダイオキシン類と PCBs の一斉分析のための前処理法を構築した。今回、魚介類のサケをモデル試料として、動物性食品中 PCBs の標準的分析法であるアルカリ分解・溶媒抽出法との比較試験を行ったところ、両者の定量値は良く一致していた。ASE による食品中ダイオキシン類の抽出条件(抽出温度:150℃、抽出溶媒:アセトン・ヘキサン(1:1))を適用して、ダイオキシン類と同時に PCBs を効率的に抽出し、これらの異性体を分離同定することが可能であった。

従来のダイオキシン類や PCBs の分析法は工程が長く、煩雑で測定結果を得るまでに長期間を要することが課題とされてきた。標準的な試験設備環境(人員 1 名)を想定すると、10 試料の食品試料について、ダイオキシン類の分析試料を調製するのに従来法では概ね 7 日間以上が必要である。同じ食品試料について PCBs 測定を実施するとすれば、別途煩雑な抽出操作から開始せざるを得ず、さらに期

間を要することになる。これに対し、ダイオキシン類分析の抽出に ASE に用いると、試料調製の全工程をほぼ 4 日間で完了することが可能であった<sup>4)</sup>。さらに本迅速一斉分析法を使用すると、1 回の抽出操作で効率的にダイオキシン類と PCBs の測定試料を各々調製することができる。

また、ガイドラインでは動物性食品の分析時に脂肪含量を併せて測定することが求められている。従来のアルカリ分解・溶媒抽出法では、脂肪含量を把握するための抽出操作を別途必要としていたが、本迅速一斉分析法では脂肪含量の測定が工程に含まれているため、効率的に分析を行うことができる。

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、ASE の有用性を示すものである。本抽出法を GPC など自動化した精製工程と組み合わせることで、多検体に及ぶ食品試料分析を効率的に進めることが可能となり、当該調査研究の推進ならびに日常的な検査業務の効率化に寄与すると考えられる。

## E.参考文献

- 1) 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。
- 2) 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」
- 3) 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」
- 4) 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」

- 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(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」
- 6) 平成 20 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(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」
- 7) 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.

## F.研究業績

### 1.論文発表

Hori, T., Yasutake, D., Ashizuka, Y., Kajiwara, J., Nakagawa, R., Yoshimura, T., and Tsutsumi, T.: Simultaneous determination of dioxins and all PCB isomers in food samples using accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography. *Organohalogen Compounds*, **71** (2009) 2578-2582.

### 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及び PCBs 全異性体の迅速一斉分析法の検討. 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会(2009.11).

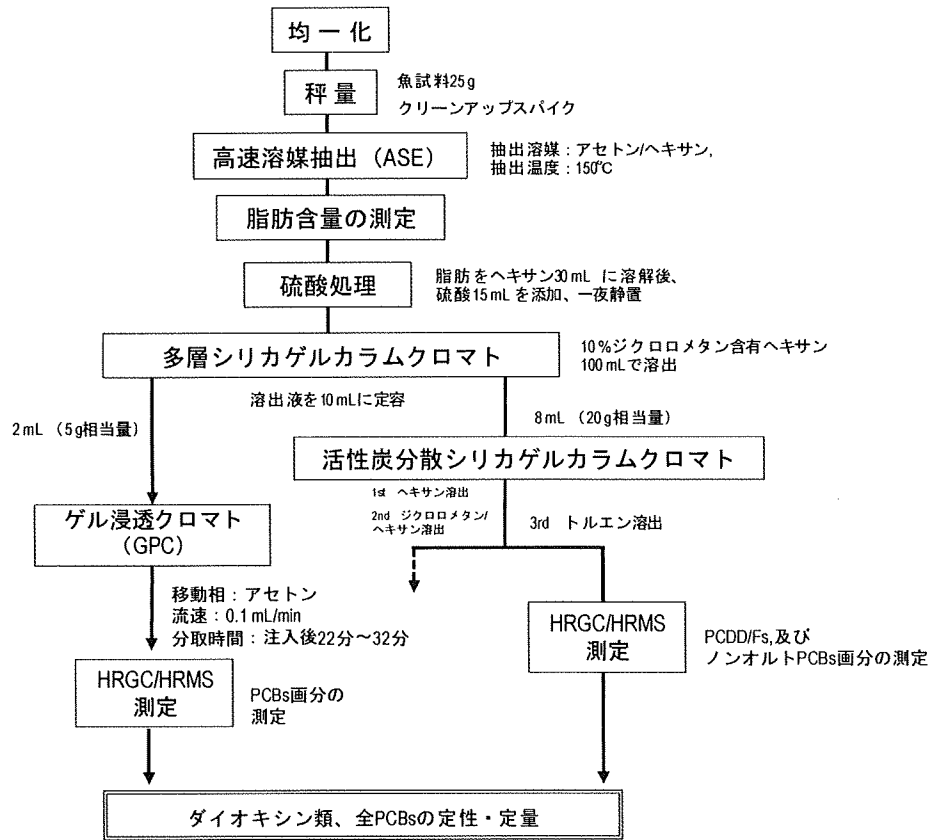


図1 食品中ダイオキシン類・PCBsの迅速一斉分析フロー

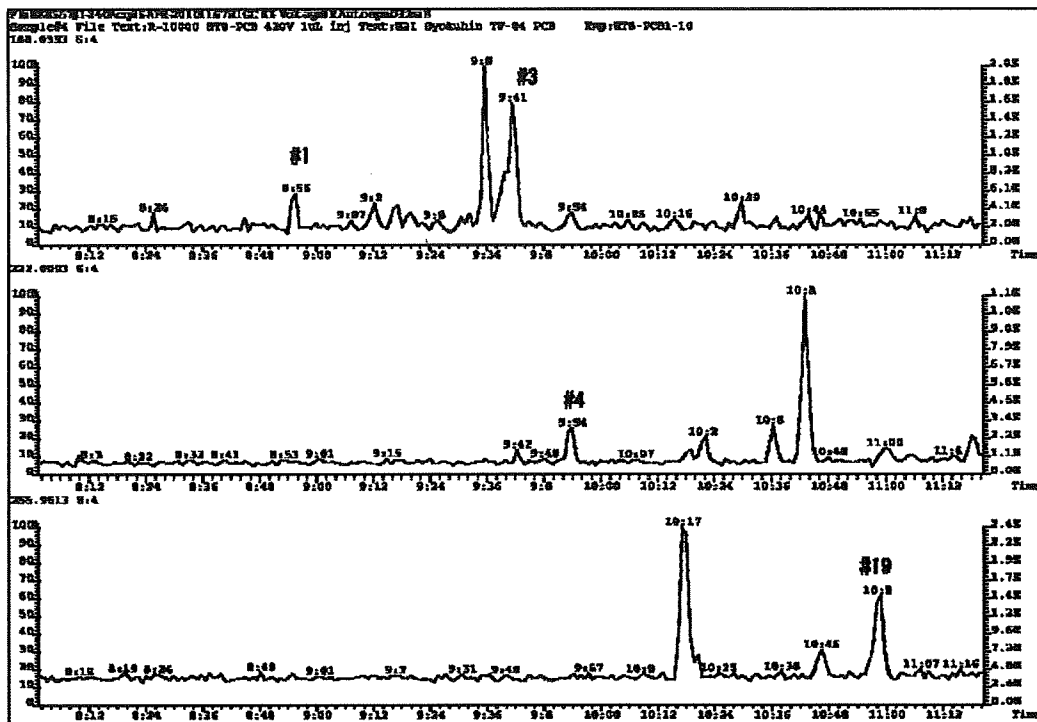


図2 HRGC/HRMSにおける魚(サケ)抽出物のPCBs分析クロマトグラム(保持時間8分00秒~11分20秒)。上段より順に1塩化物, 2塩化物, 3塩化物。

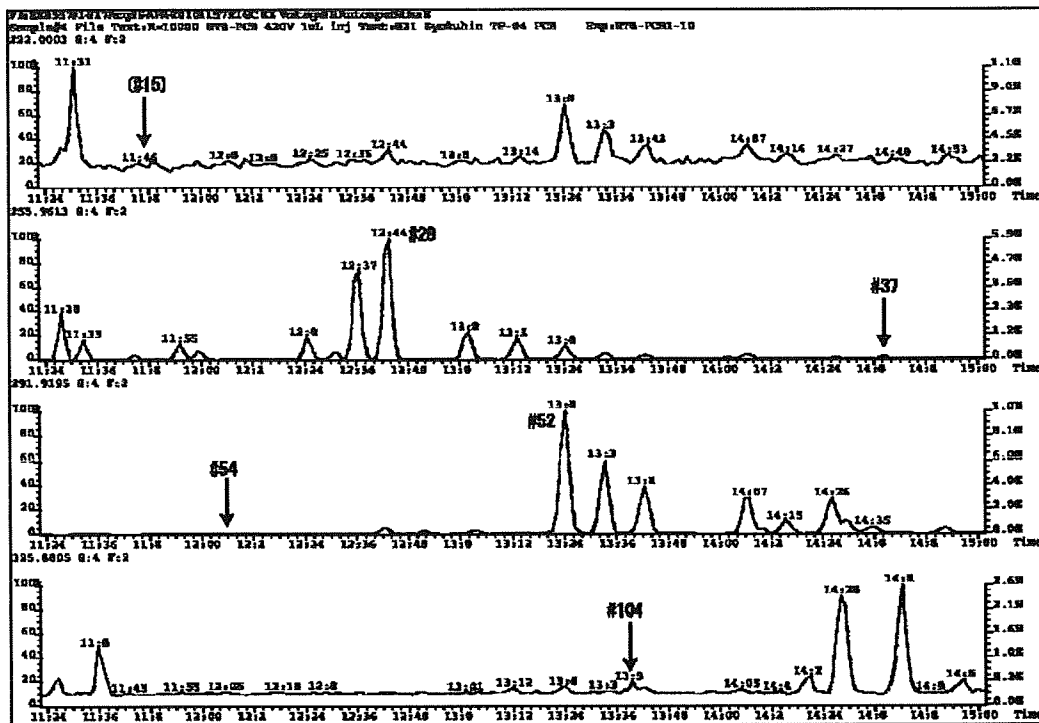


図3 HRGC/HRMSにおける魚(サケ)抽出物のPCBs分析クロマトグラム(保持時間11分20秒~15分01秒)。上段より順に2塩化物, 3塩化物, 4塩化物, 5塩化物。

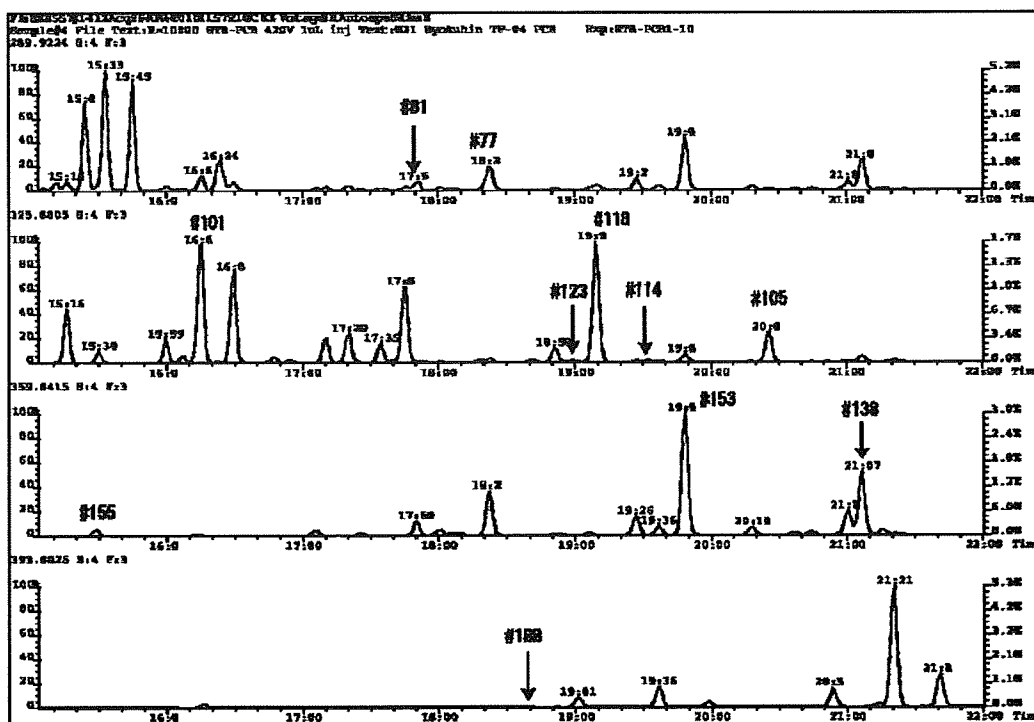


図4 HRGC/HRMSにおける魚(サケ)抽出物のPCBs分析クロマトグラム(保持時間15分01秒~22分00秒)。上段より順に4塩化物, 5塩化物, 6塩化物, 7塩化物。



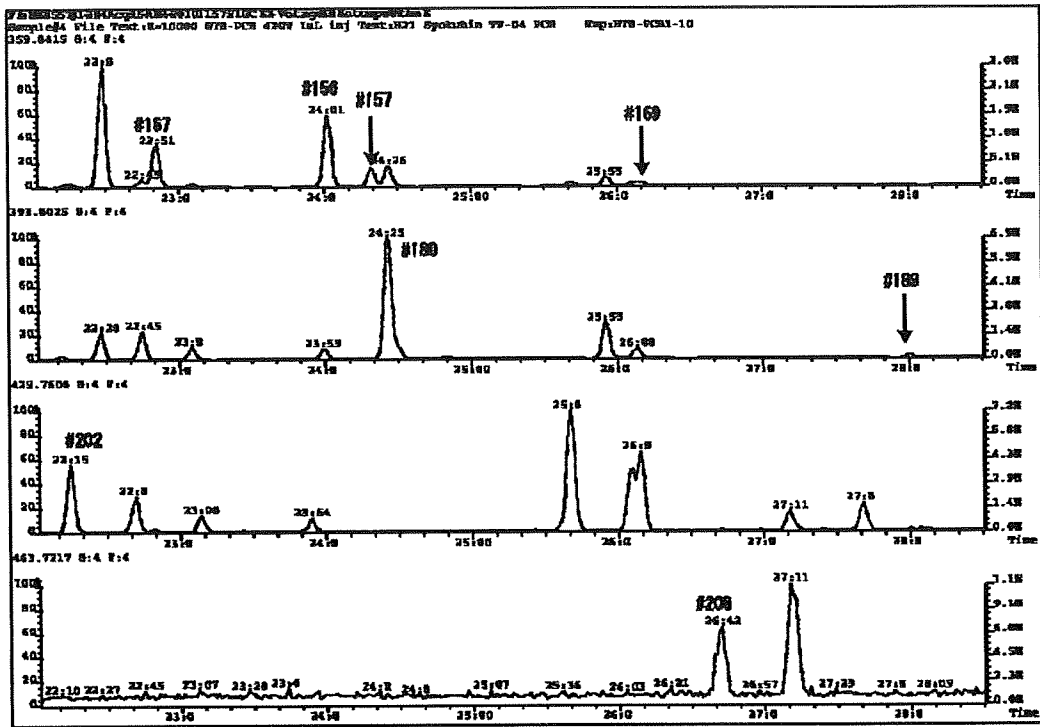


図5 HRGC/HRMSにおける魚(サケ)抽出物のPCBs分析クロマトグラム(保持時間22分00秒~28分30秒)。上段より順に6塩化物, 7塩化物, 8塩化物, 9塩化物。

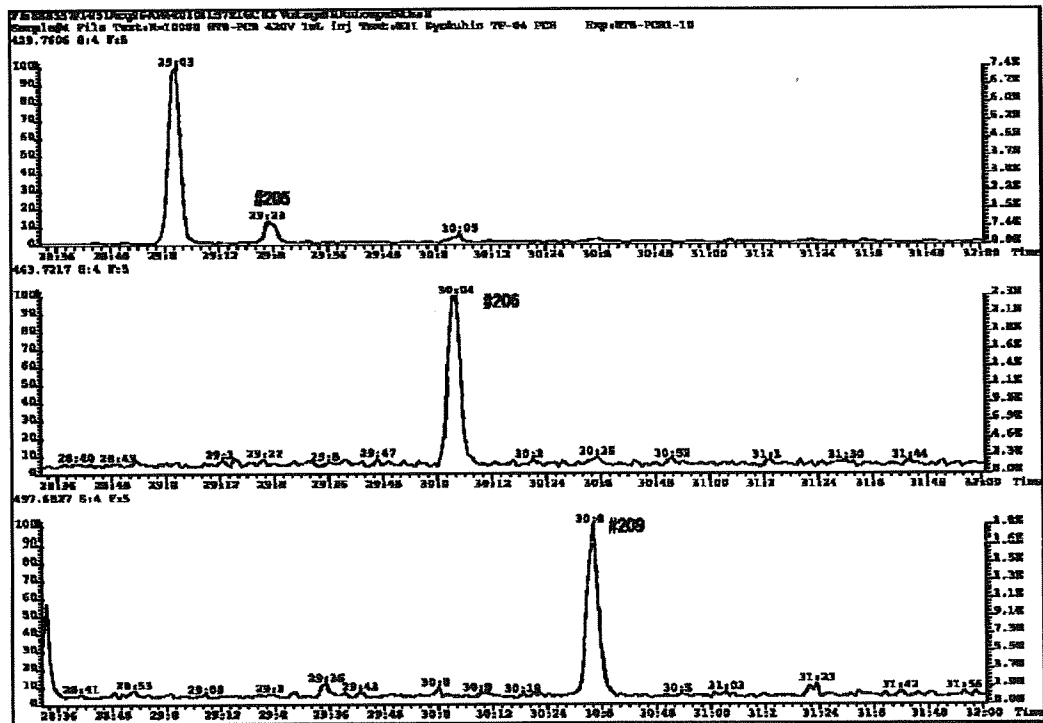


図6 HRGC/HRMSにおける魚(サケ)抽出物のPCBs分析クロマトグラム(保持時間28分30秒~32分00秒)。上段より順に8塩化物, 9塩化物, 10塩化物。

表1 魚試料(サケ)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			
<sup>13</sup> C-2-CB(#1)	14	33	32	26	11	42
<sup>13</sup> C-4-CB(#3)	28	39	37	35	6	17
<sup>13</sup> C-2,2'-diCB(#4)	27	36	33	32	5	14
<sup>13</sup> C-4,4'-diCB(#15)	32	32	27	30	3	10
<sup>13</sup> C-2,2',6-triCB(#19)	30	32	29	31	2	6
<sup>13</sup> C-3,4,4'-triCB(#37)	51	49	48	49	1	3
<sup>13</sup> C-2,2',6,6'-tetraCB(#54)	35	34	30	33	2	7
<sup>13</sup> C-3,3',4,4'-tetraCB(#77)	42	38	39	40	2	5
<sup>13</sup> C-3,4,4',5-tetraCB(#81)	39	41	40	40	1	2
<sup>13</sup> C-2,2',4,6,6'-pentaCB(#104)	31	18	20	23	7	32
<sup>13</sup> C-2,3,3',4,4'-pentaCB(#105)	46	41	40	42	3	7
<sup>13</sup> C-2,3,4,4',5-pentaCB(#114)	43	39	39	40	2	6
<sup>13</sup> C-2,3',4,4',5-pentaCB(#118)	44	41	41	42	2	4
<sup>13</sup> C-2',3,4,4',5-pentaCB(#123)	43	39	39	41	2	5
<sup>13</sup> C-2,2',4,4',6,6'-hexaCB(#155)	36	31	27	31	5	15
<sup>13</sup> C-2,3,3',4,4',5-hexaCB(#156)	44	41	39	42	3	6
<sup>13</sup> C-2,3,3',4,4',5'-hexaCB(#157)	48	44	43	45	3	6
<sup>13</sup> C-2,3',4,4',5,5'-hexaCB(#167)	43	41	41	41	1	3
<sup>13</sup> C-3,3',4,4',5,5'-hexaCB(#169)	46	42	44	44	2	4
<sup>13</sup> C-2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB(#188)	45	37	34	38	6	14
<sup>13</sup> C-2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB(#189)	70	61	62	64	5	8
<sup>13</sup> C-2,2',3,3',5,5',6,6'-octaCB(#202)	52	43	43	46	5	12
<sup>13</sup> C-2,3,3',4,4',5,5',6-octaCB(#205)	86	70	70	75	9	12
<sup>13</sup> C-2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaCB(#206)	47	38	33	40	7	18
<sup>13</sup> C-2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-nonaCB(#208)	71	61	61	64	6	9
<sup>13</sup> C-decaCB(#209)	66	48	48	54	10	19

表2 魚試料(サケ)中の32種PCBs異性体の濃度. アルカリ分解・溶媒抽出法による測定結果との比較.

	アルカリ分解・溶媒抽出法(従来法)						ダイオキシン類・PCBsの迅速一斉分析法(開発法)					
	濃度(pg/g, 全重量あたり)			平均値 (pg/g)	標準偏差	相対標準 偏差(%)	濃度(pg/g, 全重量あたり)			平均値 (pg/g)	標準偏差	相対標準 偏差(%)
	1回目	2回目	3回目				1回目	2回目	3回目			
2-monoCB(#1)	7.1	8.8	8.5	8.1	0.9	11	8.8	7.7	7.6	8.0	0.69	9
4-monoCB(#3)	8.4	9.0	11	10	1.6	17	23	24	18	22	3.6	16
2,2'-diCB(#4)	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
4,4'-diCB(#15)	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
2,2',6-triCB(#19)	31	20	19	24	6.6	28	41	38	39	39	1.2	3
2,4,4'-triCB(#28)	1200	1200	990	1100	130	11	1000	1100	1000	1000	44	4
3,4,4'-triCB(#37)	26	22	12	20	6.7	34	21	19	17	19	2.3	12
2,2',6,6'-tetraCB(#54)	3.8	4.6	3.1	3.8	0.8	20	4.5	3.9	4.3	4.2	0.33	8
2,2',5,5'-tetraCB(#52)*	1900	2000	1900	2000	33	2	2000	1900	1900	1900	83	4
3,3',4,4'-tetraCB(#77)	100	100	120	110	8.8	8	160	150	180	160	14	9
3,4,4',5-tetraCB(#81)	18	17	15	17	1.7	10	41	33	28	34	6.3	18
2,2',4,5,5'-pentaCB(#101)**	3000	3300	3100	3200	90	3	3600	3300	3400	3400	120	3
2,2',4,6,6'-pentaCB(#104)	5.2	4.5	6.3	5.3	0.9	17	6.0	6.9	7.3	6.7	0.65	10
2,3,3',4,4'-pentaCB(#105)	990	1100	1000	1000	31	3	1000	1000	1100	1000	22	2
2,3,4,4',5-pentaCB(#114)	79	77	79	78	1.0	1	67	90	72	76	12	16
2,3',4,4',5-pentaCB(#118)	3400	3500	3400	3400	58	2	3600	3500	3700	3600	83	2
2',3,4,4',5-pentaCB(#123)	58	52	56	56	3.0	5	55	55	61	57	3.3	6
2,2',3,4,4',5-hexaCB(#138)	3800	3800	3900	3800	82	2	3700	3700	4200	3900	320	8
2,2',4,4',5,5'-hexaCB(#153)***	7400	7400	7600	7500	130	2	7000	7000	8000	7300	600	8
2,2',4,4',6,6'-hexaCB(#155)	270	290	290	290	10	4	290	290	310	300	8.4	3
2,3,3',4,4',5-hexaCB(#156)	350	370	350	360	13	4	370	340	360	360	16	4
2,3,3',4,4',5'-hexaCB(#157)	110	120	100	110	8.6	8	110	93	95	98	8.1	8
2,3',4,4',5,5'-hexaCB(#167)	240	260	300	270	28	11	230	220	220	220	5.8	3
3,3',4,4',5,5'-hexaCB(#169)	7.0	7.4	13	9.0	3.1	34	12	15	12	13	2.0	15
2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB(#180)	2700	2900	2800	2800	110	4	2100	2000	2100	2100	35	2
2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB(#188)	13	11	12	12	1.1	9	14	15	13	14	1.0	8
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB(#189)	38	42	43	41	2.4	6	42	37	32	37	4.9	13
2,2',3,3',5,5',6,6'-octaCB(#202)	130	130	120	120	5.3	4	130	140	140	140	2.2	2
2,3,3',4,4',5,5',6-octaCB(#205)	21	18	22	20	2.2	11	18	17	22	19	2.3	12
2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaCB(#206)	68	69	78	72	5.5	8	77	72	78	76	3.5	5
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-nonaCB(#208)	43	41	37	41	3.2	8	39	47	50	45	5.5	12
DecaCB(#209)	59	51	54	55	4.2	8	54	56	60	57	3.2	6

\*PCB46 及び PCB69 と未分離. \*\* PCB90 と未分離. \*\*\* PCB168 と未分離.

表3 ダイオキシン類・PCBsの迅速一斉分析法による魚試料(カンパチ)の分析結果.

(1) PCBs異性体分離分析結果

化合物 (IUPAC No.)	濃度 (pg/g)	回収率* (%)
MoCBs #1	1.4	52
#2	2.1	—
#3	1.4	54
DiCBs #10	ND	—
#4	5.5	70
#9	ND	—
#7	ND	—
#6	4.3	—
#8/#5	22	—
#14	ND	—
#11	17	—
#13/#12	ND	—
#15	ND	72
TrCBs #19	5.6	91
#30	ND	—
#18	44	—
#17	21	—
#24	0.93	—
#27	4.7	—
#32	23	—
#16	7.2	—
#23/#34	2.6	—
#29	0.76	—
#26	32	—
#25	12	—
#31	180	—
#28	250	—
#21/#20/#33	36	—
#22	45	—
#36	27	—
#39	ND	—
#38	ND	—
#35	ND	—
#37	6.6	103
TeCBs #54	5.0	69
#50	0.87	—
#53	16	—
#51	20	—
#45	11	—
#46/#52/#69	380	—
#73/#43/#49	270	—
#65/#75/#48/47	220	—
#62	ND	—
#44/#59	140	—
#42	44	—
#64/#72	150	—
#71	29	—
#41	40	—
#68	1.3	—
#40/#57	16	—
#67	8.4	—
#63/#58	32	—
#61/#74	280	—
#70/#76	330	—
#80	ND	—
#66	400	—
#55	ND	—
#60/#56	170	—
#79	2.0	—
#78	2.5	—
PeCBs #104	5.0	64
#96	41	—
#103	27	—
#100	31	—
#94	1.3	—
#102/#93/#98/#95	320	—
#88/#91/#121	92	—
#92/#84	140	—
#89	42	—
#90/#101	90	—
#113	3.2	—
#99	630	—
#112/#119	42	—
#83/#115	16	—
#86/#117/#97/#125/#1	180	—
#87/#108/#111	220	—
#85	130	—
#120	15	—

(2) ダイオキシン類(モノオルトPCBsを除く)分析結果

化合物	濃度 (pg/g)	回収率* (%)
PCDDs** 2,3,7,8-TeCDD	0.041	70
1,2,3,7,8-PeCDD	0.16	74
1,2,3,4,7,8-HxCDD	ND	79
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.039	73
1,2,3,7,8,9-HxCDD	ND	85
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.027	80
OCDD	0.087	73
PCDFs** 2,3,7,8-TeCDF	0.43	73
1,2,3,7,8-PeCDF	0.19	76
2,3,4,7,8-PeCDF	0.66	74
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.053	79
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.043	78
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.034	83
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.045	76
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	ND	86
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	80
OCDF	ND	74
Non-ortho 3,3',4,4'-TeCB (#77)	27	75
PCBs** 3,3',4,5'-TeCB (#81)	1.6	75
3,3',4,4',5'-PeCB (#126)	12	75
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	3.2	79

(3) 総合分析結果(総PCBs濃度、ダイオキシン類濃度)

化合物	濃度 (pg/g)
Total MoCBs	5.0
Total DiCBs	49
Total TrCBs	700
Total TeCBs	2600
Total PeCBs	4200
Total HxCBs	6200
Total HpCBs	2900
Total OcCBs	380
Total NoCBs	63
Total DeCB	44
Total PCBs (µg/g)	0.017
Total dioxins (pg-TEQ/g)**	1.9
Fat content (%)	4.9

\*クリーンアップスパイクの添加回収率.  
\*\*ダイオキシン類の毒性評価対象物質.  
\*\*\*WHO-TEF(2005)により算出.

## 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 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 21 年度には、加熱流下抽出の条件とアルカリ分解後の抽出条件を決定し、測定方法全体の回収率を確認した。また、脂肪含有率の異なる 5 種類の市販魚試料についてベンゾトリアゾール含有量の測定を行った。

### 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<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-ペンチルフェノール:(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)

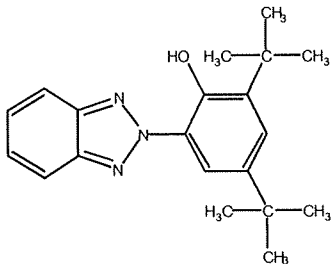
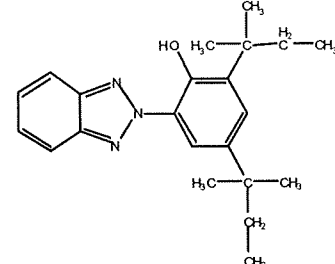
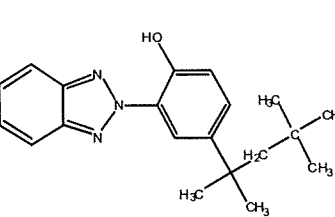
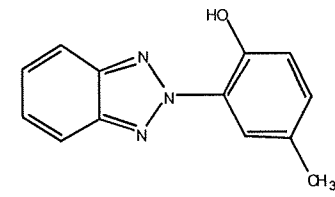
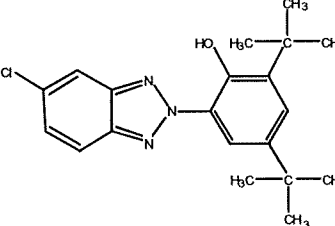
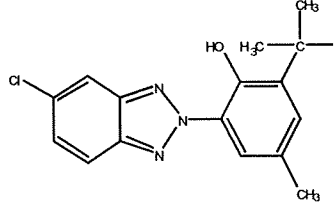
分析対象物	略称	cas番号	基本構造	法規制
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール	(DBHP)BT	3846-71-7		化審法 第一種特定 化学物質
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ペンチルフェノール	(DAHP)BT	25973-55-1		
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-tert-オクチルフェノール	(OHP)BT	3147-75-9		
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチルフェノール	(MHP)BT	2440-22-4	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

## 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 1種類 B(脂肪含有率 5%)、とマダイ 1種類 A(11%)、サケ 1種類 A(18%)、ブリ 1種類 A(21%)と脂肪分がとくに多いクロマグロの大トロ部分 1種類 A(33%)、の 5種類をフードプロセッサー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。

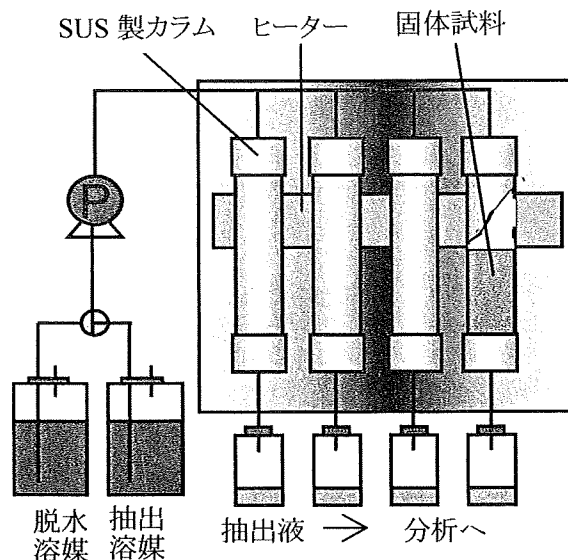


図1 加熱流下式高速抽出装置 フロー図

LC/MS/MSには、Waters 2695 Separation ModuleのHPLCとMicromass Quattro Microを用いた。LC/MS/MSの分析条件を表2に、モニターイオンの条件を表3に示す。

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	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 ポジティブ法
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	200L/hr
コーンガス流量	50L/hr
コロナ電流	3 $\mu$ A
モニタリング方法	MRM

表3 モニターイオン

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 標準液による KOH 処理とヘキサン抽出での回収率の検討

20年度までに決定した魚からの抽出液のKOH処理条件と同一となるように、エタノール25mLにベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-メタノール)500  $\mu$ Lを添加した液について、KOHを1mol/Lとなるように添加し、40 $^{\circ}$ Cで60min振とうした。一方、エタノール25mLにベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-メタノール)500  $\mu$ Lを添加し、KOH処理を行わない液を用意した。

これらをそれぞれ分液ロートに移し、20年度までに決定した魚からの抽出液のヘキサン抽出条件と同一となるように、ヘキサン10mLと純水25mLを加え、10min振とう抽出後、静置



し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取し、先のヘキサン層と合わせた後、20mL の純水で 2 回洗浄した。このヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウム 5g で脱水した後、エバポレーターで濃縮し、窒素パージで乾固させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶した。このメタノール溶液を LC/MS/MS で分離・定量し、KOH 処理とヘキサン抽出での回収率およびヘキサン抽出のみでの回収率を算出した。

## 2.3 カートリッジ精製方法の再検討

### 2.3.1 NH<sub>2</sub> カートリッジの劣化影響の検討

マダイ A について標準添加回収試験を 6 回繰り返して行った結果、回収率が 61~87% の間で変動し、再現性が低かった。原因を明らかにするため、NH<sub>2</sub> カートリッジ処理後の標準添加回収試験、また、購入後約 1 年半経過した NH<sub>2</sub> カートリッジおよび購入後約 3 か月の NH<sub>2</sub> カートリッジを用いた NH<sub>2</sub> カートリッジ処理前標準添加回収試験を行った。

フードプロセッサーで細かくしたマダイ A 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 30g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノール約 20mL と混合した後、中カラム( $\phi$  25mm)に詰め、高速抽出装置で 30 $^{\circ}$ C、ヘキサン・エタノール(1:1) 4mL/min で抽出した。抽出液をエバポレーターで 25mL(エタノール)まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40 $^{\circ}$ C で 60min 振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらに 2 回ヘキサン 10mL を水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 30mL で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パージで約 1mL に濃縮し、あらかじめヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH<sub>2</sub> Jr.カートリッジに添加した後、

ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。この NH<sub>2</sub> カートリッジ処理後の液にベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-メタノール) 500  $\mu$ L を添加し、窒素パージでヘキサンを蒸発させた。メタノール 500  $\mu$ L に転溶した後、超音波をかけて溶解したものと、超音波をかけないものとを LC/MS/MS で分離・定量を行い、NH<sub>2</sub> カートリッジ処理後の回収率を算出した。

また、同様に魚からの高速抽出、濃縮、KOH 処理、ヘキサン抽出、脱水を行った試験液をエバポレーターで数 mL まで濃縮した。この液にベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-ヘキサン) 500  $\mu$ L を添加し、窒素パージで約 1mL に濃縮したものを、あらかじめヘキサン 10mL を通液した購入後約 1 年半と約 3 か月の Bond Elut NH<sub>2</sub> Jr.カートリッジに添加し、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。また、購入後約 1 年半後の NH<sub>2</sub> カートリッジ処理については、Fr.2 として、さらにヘキサン 1mL で溶出させた。各フラクションを窒素パージでヘキサンを蒸発させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶した後、LC/MS/MS で分離・定量を行い、NH<sub>2</sub> カートリッジ処理の回収率を算出した。

### 2.3.2 フロリジル、シリカゲル、NH<sub>2</sub> カートリッジ精製の溶出溶媒の再検討

NH<sub>2</sub> カートリッジによる精製の再現性が低かったことから、カートリッジ精製方法を再検討するため、山口県環境保健研究センター、下尾和歌子・古谷典子・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」を参考にして次のような実験を行った。

まず、フロリジルまたはシリカゲルカートリッジにあらかじめヘキサンを 5~10mL 通液し、ベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-ヘキサン) 500  $\mu$ L を添加し、添加時の流出液は捨て、ヘキサン・アセトン(4:1)または(9:1)を Fr.1:

2mL(うち 1mL は容器洗浄液)、Fr.2~5:各 2mL で溶出させ、窒素パージで各溶媒を蒸発させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶した後、LC/MS/MS で分離・定量を行い、回収率を確認した。

つぎに、フロリジルとシリカゲルカートリッジの回収率の結果を比較し、溶出しやすいと考えられたフロリジルカートリッジでさらに溶媒を変えて、溶出溶媒を検討した。

すなわち、フロリジルカートリッジにあらかじめヘキサンを 5~10mL 通液し、ベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-ヘキサン) 500  $\mu$ L を添加し、添加時の流出液は捨て、ヘキサン・アセトン(1:1)またはアセトンのみを Fr.1:2mL(うち 1mL は容器洗浄液)、Fr.2~5:各 2mL で溶出させ、窒素パージで各溶媒を蒸発させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶した後、LC/MS/MS で分離・定量を行い、回収率を確認した。

さらに、カートリッジをあらかじめ洗浄する溶媒の種類と、添加する溶媒の種類と量による、魚試料中共存物質の挙動とベンゾトリアゾールの溶出回収率を同時に確認するため、次のような実験を行った。

フードプロセッサーで細かくしたマダイ A 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 30g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノール約 20mL と混合した後、中カラム( $\phi$  25mm)に詰め、高速抽出装置で 30 $^{\circ}$ C、ヘキサン・エタノール(1:1) 4mL/min で抽出した。抽出液をエバポレーターで 25mL(エタノール)まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40 $^{\circ}$ C で 60min 振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を 2 回、水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 30mL で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水した。これを 9 試料分行い、混合して均一化してから

再度 9 つに分取し、各々にベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-ヘキサン) 500  $\mu$ L を添加した。これらのうち、6 試料分はヘキサン 200  $\mu$ L まで濃縮し、3 試料分はアセトン 1mL に転溶した。これをフロリジル、シリカゲル、NH<sub>2</sub> の 3 種のカートリッジについて次の 3 通りの条件で処理を行った。

条件 1) カートリッジにあらかじめアセトン 5~10mL 通液し、ヘキサン 200  $\mu$ L まで濃縮した試料を添加し、アセトンで溶出し以下の Fr.1 と Fr.2 を分取した。すなわち Fr.1:2mL(NH<sub>2</sub> のみ 1mL) (うち 1mL は容器洗浄液)、Fr.2~5:2mL(NH<sub>2</sub> のみ 1mL)とした。

条件 2) カートリッジにあらかじめメタノール 5~10mL 通液し、ヘキサン 200  $\mu$ L まで濃縮した試料を添加し、添加時の流出液は Fr.1 に含めるとし、メタノールで溶出し、以下の Fr.1 と Fr.2 を分取した。すなわち、Fr.1:2mL(うち 1mL は容器洗浄液、NH<sub>2</sub> のみ 1mL)と Fr.2~5:各 2mL(NH<sub>2</sub> のみ 1mL)を分取した。

条件 3) カートリッジにあらかじめアセトン 5~10mL 通液し、アセトン 1mL に転溶した試料を添加し、添加時の流出液は Fr.1 に含めるとし、アセトンで溶出し、以下の Fr.1 と Fr.2 を分取した。Fr.1:2mL(うち 1mL は容器洗浄液、NH<sub>2</sub> のみ 1mL)と Fr.2~5:各 2mL(NH<sub>2</sub> のみ 1mL)を分取した。

これらの溶出液を、まず目視で着色物質の挙動を確認して、着色成分が除去されていると判断できるものについて共存物質の挙動とベンゾトリアゾールの回収率を算出した。

## 2.4 KOH 処理後のヘキサン抽出条件の決定

フードプロセッサーで細かくしたブリ A 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 20g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノールと混合し、ベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-メタノール) 500  $\mu$ L を添加した。これを小カラム( $\phi$  15mm)に詰め、高速抽出装置の 30 $^{\circ}$ C、ヘキサン・エタノール(1:1)2mL/min で 30min(抽出液

量 60mL)で抽出した。抽出液をエバポレーターで 25mL(エタノール)まで濃縮し、KOH を 1mol/Lとなるように添加して、40°Cで 60min 振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を 2 回、水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置しヘキサン層を採取した。1 回目と 2 回目のヘキサン層を合わせたもの、3 回目のヘキサン層をそれぞれ純水 20mL、10mL で 2 回ずつ洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パーズで約 1mL に濃縮した。これをあらかじめヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH2 Jr. カートリッジに添加した後、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。溶出液を窒素パーズしてヘキサン蒸発させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶して、LC/MS/MS で分離・定量を行い、各回収率を算出し、魚試料における KOH 処理後のヘキサン抽出回数を決定した。

また、ヘキサン層の純水による洗浄回数を洗浄後の水の汚れ具合により決定した。

## 2.5 加熱流下式高速抽出条件の決定

### 2.5.1 充填溶媒の選定

フードプロセッサーで細かくしたブリ A 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 20g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、ヘキサン・エタノール (1:1)と混合したもの、また、エタノールと混合したものに、それぞれベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-メタノール) 500  $\mu$ L を添加した。これを小カラム( $\phi$  15mm)に洗液もそれぞれの溶媒で詰め、加熱流下抽出装置で 30°C、ヘキサン・エタノール(1:1)2mL/min で抽出した。抽出液は Fr.1:30min(抽出液量 60mL)、Fr.2:15min(抽出液量 30mL)とした。抽出液をそれぞれエバポレーターで 25mL(エタノール)まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40°Cで 60min 振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min

振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 20mL で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パーズで約 1mL に濃縮した。あらかじめ濃縮液をヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH2 Jr. カートリッジに添加した後、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。窒素パーズでヘキサンを蒸発させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶して、LC/MS/MS で分離・定量を行い、各回収率を算出し、充填溶媒を決定した。

### 2.5.2 抽出温度の選定

フードプロセッサーで細かくしたブリ A 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 20g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノールと混合したものに、ベンゾトリアゾール混合標準液(0.2  $\mu$ g/mL-メタノール) 500  $\mu$ L を添加した。これを小カラム( $\phi$  15mm)に詰め、高速抽出装置で 30°Cおよび 45°Cで、ヘキサン・エタノール (1:1)2mL/min で Fr.1:30min(抽出液量 60mL)、及び Fr.2:15min(抽出液量 30mL)を抽出した。抽出液をそれぞれエバポレーターで 25mL(エタノール)まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40°Cで 60min 振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 20mL で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パーズで約 1mL に濃縮し、あらかじめヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH2 Jr. カートリッジに添加した後、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。窒素パーズでヘキサンを蒸発させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶して、LC/MS/MS で分離・定量を行い、

各回収率を算出し、抽出温度を決定した。

### 2.5.3 無水硫酸ナトリウム量の決定と抽出カラムサイズの選定

フードプロセッサーで細かくしたマサバ B、マダイ A、サケ A、ブリ A、クロマグロ A それぞれ 5g-wet を任意の量の無水硫酸ナトリウムと混合し、乳ばちですりつぶし、その外観から無水硫酸ナトリウム量を決定した。無水硫酸ナトリウムの必要量と操作性を考慮してカラムサイズを選定した。

### 2.5.4 抽出溶媒の選定と抽出液量の決定

フードプロセッサーで細かくしたブリ A 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 30g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノール 20mL と混合したものに、ベンゾトリアゾール混合標準液 (0.2  $\mu$ g/mL-メタノール) 500  $\mu$ L を添加した。これを中カラム( $\phi$  25mm)に詰め、加熱流下抽出装置で 30°C、ヘキサン・エタノール(1:1)およびエタノールのみ 4mL/min で Fr.1:10min(抽出液量 40mL)、Fr.2, 3:各 5min(抽出液量各 20mL)を抽出した。抽出液をそれぞれエバポレーターで 25mL(エタノール)まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40°C で 60min 振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を 2 回、水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 30mL で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パージで約 1mL に濃縮し、あらかじめヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH<sub>2</sub> Jr.カートリッジに添加した後、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。窒素パージでヘキサンを蒸発させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶して、LC/MS/MS で分離・定量を行い、各回収率を確認し、抽出溶媒と抽出液量を決定した。

また、決定した抽出溶媒と抽出液量で、マダイ A とクロマグロ A について同様に標準添加回収試験を行い、回収率を確認した。このとき、脂肪含有量が 25%以上のクロマグロ A の KOH 処理時間は 120min とした。

### 2.6 決定した方法での魚中濃度の測定

2.5 の検討によって決定した方法で、脂肪含有率の異なる 5 種類の魚試料マサバ B、マダイ A、サケ A、ブリ A、クロマグロ A について魚中濃度測定を行った。

フードプロセッサーで細かくした魚試料 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 30g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノール 20mL と混合した。これを中カラム( $\phi$  25mm)に詰め、加熱流下抽出装置で 30°C、エタノール 4mL/min で 20min(80mL)で抽出した。抽出液をエバポレーターで 25mL まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40°C で 60min(脂肪含有量が 25%以上のクロマグロ A のみ 120min)振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を 2 回、水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 30mL で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パージで約 1mL に濃縮し、あらかじめヘキサン 10mL を通液した製造後半年以内の Bond Elut NH<sub>2</sub> Jr.カートリッジに添加した後、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。窒素パージでヘキサンを蒸発させ、メタノール 500  $\mu$ L に転溶して、LC/MS/MS で分離・定量を行った。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 標準液による KOH 処理とヘキサン抽出での回収率の確認

標準液を KOH 処理後にヘキサン抽出した場合の回収率と標準液をヘキサン抽出のみし