

た場合の回収率をそれぞれ表4、5に示す。標準液を KOH 処理後にヘキサン抽出した結果は(OHP)BT と(MHP)BT の回収率が 2~3%になった。

ヘキサン抽出のみ行った結果は6種のベンゾトリアゾールで 95~99%の回収率が得られていることから、ベンゼン環にアルキル基が1つしか付いていない(OHP)BT と(MHP)BT は、KOH 処理によって分解されてしまうことが分かった。このため、(OHP)BT と(MHP)BT は分析対象物質からはずさざるを得ないと判断し、(DBHP)BT、(DAHP)BT、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT の4種を対象物質とした。

今までの NH2 カートリッジ処理の検討では、NH2 カートリッジに濃縮液 1mL を負荷した後、4 種ベンゾトリアゾール ((DBHP)BT、(DAHP)BT、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT) 分析用として Fr.1:ヘキサン 0~4mL(うち 1mL を容器洗浄液とする)を溶出させ、その後、2 種ベンゾトリアゾール((OHP)BT、(MHP)BT)分析用として Fr.2:ヘキサン 4~13mL を溶出させて

いたが、Fr.2 に入る物質を分析対象外としたため、Fr.1:ヘキサン 0~4mL(うち 1mL を容器洗浄液とする)のみで溶出を行った。

2.カートリッジ精製方法の再検討

2.1 NH2 カートリッジの劣化影響の検討

マダイ A を NH2 カートリッジ処理まで行った後、標準添加した試料をメタノール転溶し、超音波をかけた場合と、かけていない場合の回収率の結果を表 6 に示す。回収率は、超音波をかけた場合 97~101%、かけていない場合でも 95~101%と同様の良い結果が得られた。この結果から超音波はかけなくてもよいことがわかった。

次に NH2 カートリッジの劣化の影響をみるため、マダイ A を KOH 処理まで行い、NH2 カートリッジ処理前に標準添加した試料を購入後約 1 年半と約 3 か月の NH2 カートリッジで処理をした場合の回収率の結果を表 7-1、7-2 に示す。購入後約 1 年半の NH2 カートリッジ処理の回収率は 54~61%となり、さらにヘキサ

表 4 KOH処理後ヘキサン抽出回収率(標準液) [%]

(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
97	98	3	2	99	87

表 5 ヘキサン抽出回収率(標準液) [%]

(DBHP)BT	(DAHP)BT	(OHP)BT	(MHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
97	97	95	96	99	98

表 6 メタノール転溶後の超音波の有無と回収率(マダイ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
超音波 有	97	101	100	97
超音波 無	95	100	101	97

表 7-1 購入後約 1 年半の NH2 カートリッジによる処理後回収率(マダイ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1:ヘキサン 4mL	61	54	55	61
Fr.2:ヘキサン 1mL	0	0	0	0

表 7-2 購入後約 2~3 か月の NH2 カートリッジによる処理後回収率(マダイ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1:ヘキサン 4mL	96	95	94	98

ンを通液しても回収されなかったが、購入後約3か月のNH₂カートリッジ処理の回収率は94~98%となり、十分に回収された。この結果から、NH₂カートリッジは劣化しやすく、劣化したカートリッジでは魚中の共存物質の作用なども関係してベンゾトリアゾールが溶出しきれずにカートリッジ内に留まってしまいう可能性が考えられた。

なお、20年度の研究では、購入後6ヶ月のNH₂カートリッジを用いて問題がなかったことから、冷暗所で保存すれば6ヶ月程度は使用可能と考えられた。

2.2 フロリジル、シリカゲル、NH₂カートリッジ精製の溶出溶媒の再検討

NH₂カートリッジに代るカートリッジを検討するため、マダイAのKOH処理後液に標

準添加した試料をフロリジル、シリカゲル、NH₂カートリッジによって3条件で処理した時の溶出液の各フラクションの着色成分の流出の様子を表8-1~8-3に示す。また、使用後カートリッジの着色の様子も表8-1~8-3に示す。いずれもベンゾトリアゾールが溶出しきれいていないと考えられるFr.2までには着色成分が溶出しており、また、カートリッジに残存もなかった。NH₂カートリッジのアセトン溶出の場合のみ使用後カートリッジは全体に淡黄となったが、試料を添加せずアセトンのみを通液した場合でも淡黄となることがわかり、カートリッジがアセトンによって変化したと考えられた。これらの結果から魚中共存物質とベンゾトリアゾールの分離はこれらのカートリッジ処理条件では行えないと考えられた。2.1と2.2の結果からカートリッ

表8-1 フロリジルカートリッジ処理の溶出液と処理後カートリッジの着色状況(マダイA)

	条件1) ヘキサン添加 アセトン溶出	条件2) ヘキサン添加 メタノール溶出	条件3) アセトン添加 アセトン溶出
Fr.1: 添加液+溶出液 2mL	黄、白濁	黄、白濁	黄、白濁
Fr.2: 溶出液 2mL	弱黄	弱黄	なし
Fr.3~5: 各溶出液 2mL	なし	なし	なし
処理後カートリッジ着色	なし	なし	なし

表8-2 シリカゲルカートリッジ処理の溶出液と処理後カートリッジの着色状況(マダイA)

	条件1) ヘキサン添加 アセトン溶出	条件2) ヘキサン添加 メタノール溶出	条件3) アセトン添加 アセトン溶出
Fr.1: 添加液+溶出液 2mL	黄	黄	黄
Fr.2: 溶出液 2mL	黄	弱黄	なし
Fr.3~5: 各溶出液 2mL	なし	なし	なし
処理後カートリッジ着色	なし	なし	なし

表8-3 NH₂カートリッジ処理の溶出液と処理後カートリッジの着色状況(マダイA)

	条件1) ヘキサン添加 アセトン溶出	条件2) ヘキサン添加 メタノール溶出	条件3) アセトン添加 アセトン溶出
Fr.1: 添加液+溶出液 1mL	弱黄	黄	黄
Fr.2: 溶出液 1mL	黄	黄	弱黄
Fr.3~5: 各溶出液 1mL	なし	なし	なし
処理後カートリッジ着色	弱黄	なし	弱黄

ジ精製は、NH₂ カートリッジに KOH 処理後濃縮液 1mL を負荷した後、ヘキサン 4mL(うち 1mL を容器洗浄液とする)で溶出させることとした。ただし、使用する NH₂ カートリッジは、購入後は冷暗所に保存して 6 ヶ月程度以内に使用する必要である。

3.KOH 処理後のヘキサン抽出条件の決定

ブリAに標準添加した場合の KOH 処理後のヘキサン抽出回数と回収率の結果を表 9 に示す。ヘキサン抽出 3 回目でも、(BMHP)BT は 9%、その他でも 2~4%回収されており、ヘキサン抽出は 3 回行うこととした。

また、ヘキサン層の純水による洗浄操作では、水層に 1 回目は白濁するような汚れが見られるが、2 回目はほとんど何も見られなかったため、1 回で十分と判断した。

4.加熱流下抽出条件の決定

4.1 充填溶媒の選定

ブリAに標準添加した試料を抽出カラムにヘキサン・エタノール(1:1)で充填した場合の回収率とエタノールのみで充填した場合の

回収率の結果をそれぞれ表 10-1、10-2 に示す。

ヘキサン・エタノール(1:1)で充填した場合は、Fr.1:30min(60mL)で回収率 80~83%であり、さらに抽出液を流しても回収されなかったが、エタノールで充填した場合は、Fr.1 で 86~98%の回収率が得られた。これは、水分を含む魚試料に対しては、ヘキサン・エタノール(1:1)の浸透性が悪く、回収率が低下すると推測された。本結果から、充填溶媒にはエタノールを使用することとした。

4.2 抽出温度の選定

ブリ A に標準添加した試料を加熱流下抽出装置で抽出温度を 30℃とした場合と、45℃とした場合の回収率の結果を表 11-1、及び表 11-2 に示す。30℃と 45℃で同等の結果が得られたため、抽出温度は 30℃とした。

4.3 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

表 9 KOH 処理後のヘキサン抽出回数と回収率(ブリ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
1・2 回目	87	95	95	88
3 回目	4	2	4	9
合計	91	97	99	96

表 10-1 ヘキサン・エタノール(1:1)充填の回収率(ブリ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(30min:60mL)	80	83	81	80
Fr.2(15min:30mL)	0	0	0	1
合計	80	83	81	80

表 10-2 エタノール充填の回収率(ブリ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(30min:60mL)	91	98	94	86
Fr.2(15min:30mL)	0	0	0	2
合計	91	98	94	88

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、その外観を観察したところ、比較的脂肪含有率の高いサケ A、ブリ A、クロマグロ A については 20g で脱水が十分であったが、脂肪含有率の低い、すなわち含水率の高いと思われるマサバ B、マダイ A については脱水に 30g くらい必要であると思われた。そこで、無水硫酸ナトリウム量は、一律 30g とした。無水硫酸ナトリウム 30g とすると、小カラム(φ 15mm、19cm)では充填しづらいため、中カラム(φ 25mm、19cm)で抽出することとした。抽出効率を考え、抽出カラム充填時の溶媒高さをカラム上端から約 8cm(下端から約 11cm)とすることとした。

4.4 抽出溶媒の選定と抽出液量の決定

ブリ A に標準添加した試料を加熱流下抽出装置でヘキサン・エタノール(1:1)およびエタノールによって抽出した場合の回収率の結果を表 12-1、12-2 に示す。

ヘキサン・エタノール(1:1)抽出では、合計でも回収率は 64~72%であり、さらに抽出液量を増やしても回収されない結果であった。小カラムで抽出した場合(表 8)は、88~98%の回収率が得られていた。中カラムで抽出した場合に回収率が悪くなる原因としては、抽出液流入時にヘキサンの揮発による抽出カラム内の加圧のため、抽出液の急速な流出が起り、試料中に液の流れやすい部分が生じ、試料全体に抽出液が流れなくなった

表 11-1 抽出温度 30°Cの回収率(ブリ A)

[%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(30min:60mL)	91	98	94	86
Fr.2(15min:30mL)	0	0	0	2
合計	91	98	94	88

表 11-2 抽出温度 45°Cの回収率(ブリ A)

[%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(30min:60mL)	85	93	91	82
Fr.2(15min:30mL)	0	0	0	1
合計	85	93	91	83

表 12-1 ヘキサン・エタノール(1:1)抽出の回収率(ブリ A)

[%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(10min:40mL)	69	65	62	67
Fr.2(5min:20mL)	2	2	3	4
Fr.3(5min:20mL)	0	0	0	1
合計	70	68	64	72

表 12-2 エタノール抽出の回収率(ブリ A)

[%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(10min:40mL)	91	94	92	88
Fr.2(5min:20mL)	3	3	5	5
Fr.3(5min:20mL)	0	0	0	1
合計	94	97	97	94

ためと考えられた。なお、抽出終了時には液面が試料より上にあることは確認しているが、開始時の液面より約 4cm ほど下がっており、カラム内の溶媒は約 20mL ほど減少していた。

一方、エタノール抽出では、合計で 94～97%の回収率が得られており、そのほとんどが 15min(60mL)までに回収された。また、抽出液流入時に急速なカラムからの抽出液の流出もなく、抽出終了時の液面も開始時液面より 1cm ほど下がっていただけであった。これらの結果から、抽出溶媒はエタノールとした。また、抽出時間(液量)は 15min(60mL)～20min(80mL)で十分であることがわかった。

マダイ A とクロマグロ A に標準添加した試料を加熱流下抽出装置でエタノールによって抽出した場合の回収率を表 12-3、12-4 に示す。マダイ A で合計 95～99%、クロマグロ A で合計 94～110%の回収率が得られた。また、マダイ A ではブリ A と同様、15min(60mL)までに回収されたが、クロマグロ A では 15-20min(20mL)に 4～7%回収された。本結果から、抽出時間(液量)は一律、20min(80mL)とした。

5. 決定した方法での魚中濃度の測定

平成 19 年度、20 年度および 21 年度の研究によって決定した魚中ベンゾトリアゾール類の分析方法を図 2 にまとめて示す。

この方法でマサバ B、マダイ A、サケ A、ブリ A、クロマグロ A の魚中濃度を測定した結果を表 13 に示す。ただし、KOH 処理時間はマサバ B、マダイ A、サケ A、ブリ A は 60min、クロマグロ A のみ 120min とした。同じ試料に標準添加して得られた表 12-2～12-4 の回収率から、表 13 で得られた測定値を差し引いて回収率を補正した結果を表 14-1～14-3 に示す。また、実試料クロマトグラムの例を図 3、4 に示す。(DBHP)BT は

すべての試料で検出下限値以下であったが、ピークの痕跡が認められる試料はいくつかあった。(DAHP)BT と(DBHP)CBT が多く検出され、次いで(BMHP)CBT という順であった。

D. 結論

1) 2 種のベンゾトリアゾール((OHP)BT、(MHP)BT)は KOH 処理で分解されたため、対象化合物を 4 種ベンゾトリアゾール((DBHP)BT、(DAHP)BT、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT)とした。

2) KOH 処理後のヘキサン抽出は、KOH 処理後の液(エタノール 25mL)に対し、ヘキサン 10mL、純水 25mL で、3 回抽出すればよいことを明らかにした。

3) 魚試料からの抽出は、加熱流下式高速抽出装置を使用し、中カラム(φ 25mm、19cm)で行い、魚試料 5g-wet に対し無水硫酸ナトリウム 30g 混合・すりつぶし後、エタノールで充填し、さらにエタノール 4mL/min で 20min(80mL)で抽出を行えばよいことを明らかにした。

4) 魚中ベンゾトリアゾール測定方法を決定し、脂肪含有率の異なる 3 種類の魚試料で測定方法全体の回収率を確認した。(図 2、表 14-1～14-3)

5) 脂肪含有率の異なる 5 種類の魚試料の 4 種ベンゾトリアゾール濃度を測定し、幅広い試料に適用できることを確認した。(表 13)

今後、確立された方法によって多くの魚介類等の中のベンゾトリアゾール類含有量の分析が行われ、汚染実態の把握と汚染原因の究明および汚染防止対策が進められることが期待される。

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/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」

<http://kanpokken.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

表 12-3 エタノール抽出の回収率(マダイ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(15min:60mL)	95	99	96	98
Fr.2(5min:20mL)	0	0	0	0
合計	95	99	96	98

表 12-4 エタノール抽出の回収率(クロマグロ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(15min:60mL)	91	95	90	103
Fr.2(5min:20mL)	4	5	6	7
合計	94	100	96	110

表 13 魚中濃度測定結果 [ng/g-wet]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
マサバ B	N.D.(<0.08)	0.4	0.5	N.D.(<0.1)
マダイ A	N.D.(<0.08)	0.08 (trace)	0.1 (trace)	0.2 (trace)
サケ A	N.D.(<0.1)	0.1 (trace)	N.D.(<0.2)	0.3 (trace)
ブリ A	N.D.(<0.1)	0.4	0.6	0.5
クロマグロ A	N.D.(<0.1)	0.9	0.4	N.D.(<0.2)

表 14-1 表 12-2 補正後回収率(ブリ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(10min:40mL)	91	92	90	86
Fr.2(5min:20mL)	3	3	4	5
Fr.3(5min:20mL)	0	0	0	1
合計	94	96	94	91

表 14-2 表 12-3 補正後回収率(マダイ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(15min:60mL)	95	98	95	96
Fr.2(5min:20mL)	0	0	0	0
合計	95	98	95	96

表 14-3 表 12-4 補正後回収率(クロマグロ A) [%]

	(DBHP)BT	(DAHP)BT	(DBHP)CBT	(BMHP)CBT
Fr.1(15min:60mL)	91	91	88	103
Fr.2(5min:20mL)	4	5	6	7
合計	94	96	94	110

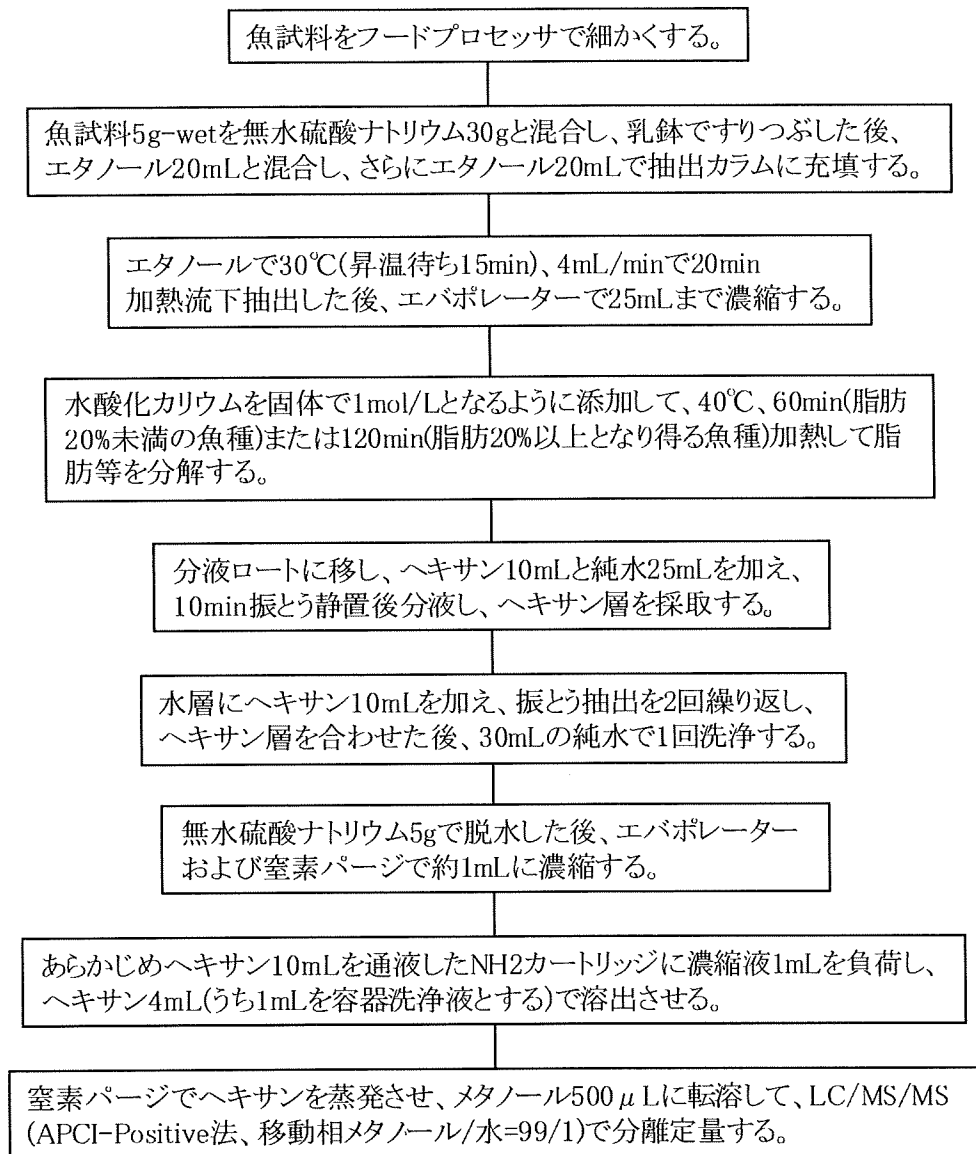


図2 魚中ベンゾトリアゾール類(BTs)の測定フロー

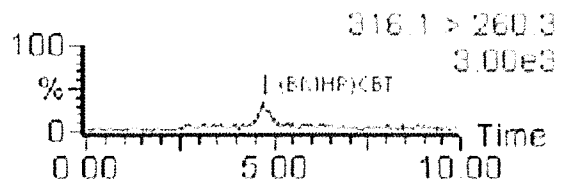
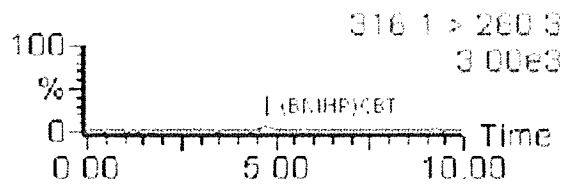
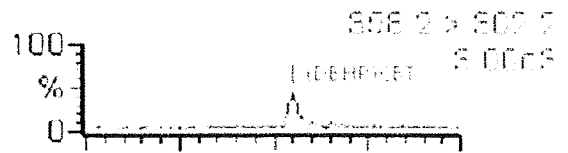
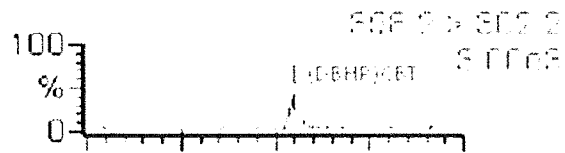
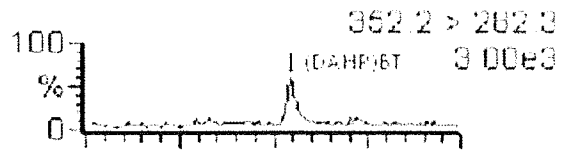
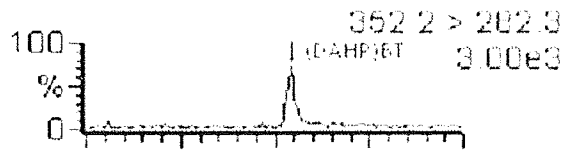
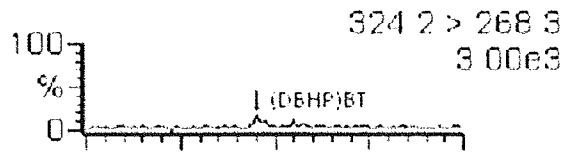


図3 クロマトグラム例(マサバB)

図4 クロマトグラム例(ブリA)

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 芦塚 由紀

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質の汚染調査

研究分担者 芦塚由紀 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)、コプラナー塩素・臭素化ビフェニル(Co-PXBs)及びテトラブロモビスフェノール(TBBPA)の高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計(HRGC/HRMS)における測定条件検討、(2)臭素系ダイオキシン類、PBDEs、PBBs及びCo-PXBsの魚介類個別食品における汚染調査及び九州地区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ブロモシクロドデカン(HBCDs)及びTBBPAについて、上記と同じ九州地区における摂取量調査を行った。その結果、(1)の測定条件検討では、臭素系ダイオキシン類を含む臭素系化合物計66化合物について、ガスクロマトグラフにおける分析カラムを交換することなく、1種類のカラム(DB-5)で測定することが可能となった。(2)の魚介類試料の汚染調査では臭素化ダイオキシン類は4検体中1検体から微量に検出され、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た。PBBsでは4検体中3検体の魚から4-6臭素化体の異性体が検出され、Co-PXBsはいずれの検体からも検出されなかった。マーケットバスケット方式による九州地区の摂取量調査では1日摂取量はND=0とした場合、臭素系ダイオキシン類が0.00384 pgTEQ/kg/日、PBDEsが3.14 ng/kg/日、PBBsが0.00648 ng/kg/日であった。Co-PXBsはいずれの食品群別試料からも検出されなかった。(3)のHBCDs及びTBBPAの摂取量調査ではND=0とした場合、HBCDsは3.1 ng/kg/日、TBBPAは0.2 ng/kg/日と算出された。

研究協力者

福岡県保健環境研究所

中川礼子、安武大輔、新谷依子、

堀 就英

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。我々は平成19年度より、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てきた。また構築した分析法を用いて、魚介類の

個別試料やマーケットバスケット試料の分析を行い、臭素系化合物の食品における網羅的な調査を行ってきた。今年度は、臭素系化合物について測定法の検討を行った。また前年度にひきつづき、魚介類個別試料の分析と国内1地域 (九州地区) の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。さらに個別分析による定量を行っている HBCDs 及び TBBPA についても九州地区におけるマーケットバスケット試料の分析を行い、これらの化合物の摂取量を推定した。

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類 (PBDEs)、臭素化ビフェニル (PBBs)、コプラナー塩素・臭素化ビフェニル (Co-PXBs) 及びテトラブロモビスフェノール A (TBBPA) の高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計 (HRGC/HRMS) における測定条件検討

現在、我々は臭素系ダイオキシン類 (PBDD/DFs, MoBrPCDD/DFs) 18 異性体、臭素化ジフェニルエーテル類 (PBDEs) 23 異性体、臭素化ビフェニル (PBBs) 18 異性体、コプラナー塩素・臭素化ビフェニル (Co-PXBs) 6 異性体及びテトラブロモビスフェノール A (エチル化体) の計 66 異性体について高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計 (HRGC/HRMS) で測定を行っている。図1に HRGC/HRMS で測定を行っている臭素系化合物の分析フローを示す。図1に示す通り、試料の前処理を行った後に HRGC/HRMS で測定を行う際、①PBDEs、②PBBs 及び Co-PXBs、③PBDD/DFs 及び

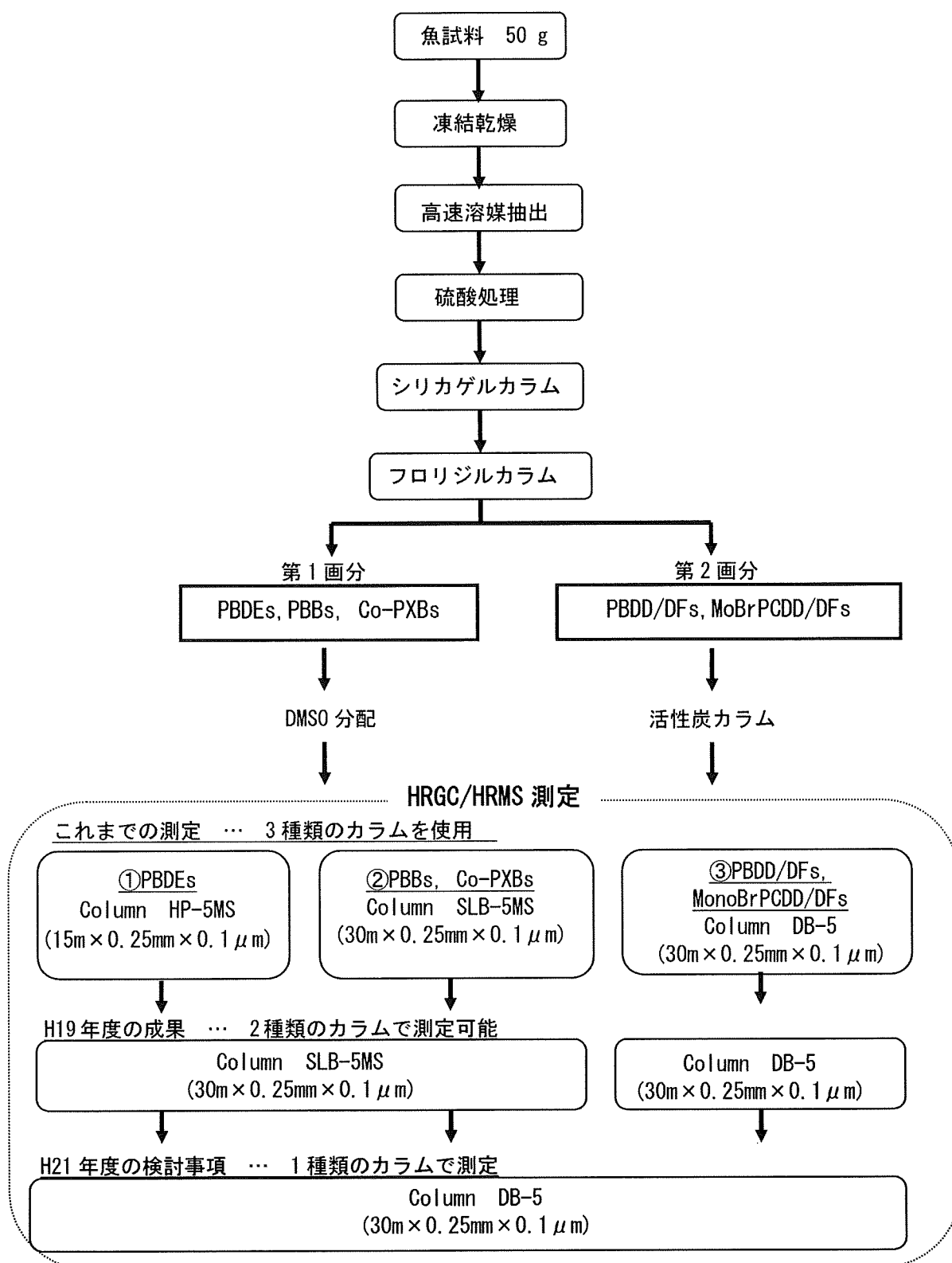


図1 臭素系ダイオキシン類、臭素化ジフェニルエーテル、臭素化ビフェニル及び
 コプラナー塩素・臭素化ビフェニルの分析フロー

MoBrPCDD/DFs の計 3 回の測定を行っている。当初はこれら 3 回の測定を行う際、ガスクロマトグラフの分析カラムとしてそれぞれ種類の異なるカラムを使用していた。これは、全ての化合物において良好な分離及び感度を得るためである。特に臭素系化合物は高臭素化体ほど極端に感度が悪くなるため、カラムの選択は非常に重要である。しかしながら、HRGC/HRMS でのカラム交換は、非常に煩雑で時間がかかることから、本研究では全化合物で共通に使用できる分析カラムを検討してきた。平成 19 年度の研究成果として、臭素系ダイオキシン類以外の化合物についてはカラム交換をすることなしに 1 種類のカラムで測定を行うことに成功した。本年度は、さらに市販の 8 種類のカラムを用いて測定条件等を検討し、各化合物の分離及び感度を比較検討した。

1-1 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 (HRGC) :

Agilent 社 HP6890

1-2 使用カラム

1) DB-1 (Agilent)

0.32 μm i. d. \times 30m, 膜厚 0.1 μm

2) HP-1 (Agilent)

0.32 μm i. d. \times 30m, 膜厚 0.25 μm

3) DB-5 (Agilent)

0.32 μm i. d. \times 30m, 膜厚 0.1 μm

4) DB-35MS (Agilent)

0.25 μm i. d. \times 30m, 膜厚 0.25 μm

5) DB-XLB (Agilent)

0.25 μm i. d. \times 30m, 膜厚 0.1 μm

6) VF-5HT (Varian)

0.25 μm i. d. \times 30m, 膜厚 0.1 μm

7) DB-5 (Agilent)

0.25 μm i. d. \times 15m, 膜厚 0.1 μm

8) DB-5 (Agilent)

0.25 μm i. d. \times 30m, 膜厚 0.1 μm

1-3 測定条件

各異性体のモニターイオンを表 1~6 に示す。

2. 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

2-1 魚介類個別試料の分析

2-1-1 分析試料

魚介類試料として、4 検体の魚介類を用いた。試料の詳細を表 7 に示す。

2-1-2 標準品

PBDD/DFs 及び MoBrPCDD/DFs は Cambridge Isotope Laboratories 社製の Native 体、 $^{13}\text{C}_{12}$ -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、Co-PXBs は Cambridge Isotope Laboratories 社製の標準品を使用した。

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 C ₁₂ -TeBDD	511.7307	—
¹³ C ₁₂ -PeBDD	589.6412	—
¹³ C ₁₂ -HxBDD	669.5496	—
¹³ C ₁₂ -OcBDD	827.3685	—
¹³ C ₁₂ -TeBDF	495.7357	—
¹³ C ₁₂ -PeBDF	573.6462	—

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	545.6111	547.6090
OcBB	623.5216	625.5195
NoBB	703.4300	705.4280
DeBB	781.3406	783.3385
¹³ C ₁₂ -TeBB	481.7565	—
¹³ C ₁₂ -HxBB	639.5754	—
¹³ C ₁₂ -OcBB	637.5598	—
¹³ C ₁₂ -DeBB	795.3788	—

表 2. MoBrPCDD/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 C ₁₂ -Mono-Br-TeCDF	411.8448	—

表 5. Co-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
Di-Cl-TriBB	459.7279	457.7299
¹³ C ₁₂ -Mono-Br-TeCB	381.8702	—
¹³ C ₁₂ -Mono-Br-PeCB	415.8312	—
¹³ C ₁₂ -Tri-Br-DiCB	471.7681	—

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 C ₁₂ -TriBDE	417.8429	—
¹³ C ₁₂ -TeBDE	497.7514	—
¹³ C ₁₂ -PeBDE	575.6619	—
¹³ C ₁₂ -HxBDE	655.5704	—
¹³ C ₁₂ -HpBDE	733.4809	—
¹³ C ₁₂ -OcBDE	653.5547	—
¹³ C ₁₂ -NoBDE	731.4652	—
¹³ C ₁₂ -DeBDE	811.3737	—

表 6. TBBPA 測定に用いたモニターイオン

	定量イオン	確認イオン
TBBPA(エチル化体)	528.7296	556.7609
¹³ C ₁₂ -TBBPA(エチル化体)	540.7699	568.8023

表 7 分析に用いた魚試料

魚種名	産地		個体数	平均体長 (cm)	平均体重 (g)
タイ①	大分	天然	1	37.5	866.0
タイ②	青森	天然	3	27.0	288.7
カレイ	福島	天然	4	25.1	213.8
アナゴ	福島	天然	2	65.3	417.0

表 8 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	注入方式及び 注入量	He ガス流量	注入口温度	昇温条件
PBDDs PBDFs MoBrPCDDs MoBrPCDFs	スプリットレス, 1 μ L	1.5mL/min	280 $^{\circ}$ C	120 $^{\circ}$ C—(20 $^{\circ}$ C/min)—240 $^{\circ}$ C—(5 $^{\circ}$ C/min)—300 $^{\circ}$ C (6min)
PBDEs			260 $^{\circ}$ C	125 $^{\circ}$ C(1min)—(20 $^{\circ}$ C/min)—200 $^{\circ}$ C—(10 $^{\circ}$ C/min) —300 $^{\circ}$ C(10min)
PBBs Co-PXBs			300 $^{\circ}$ C	130 $^{\circ}$ C(1min)—(20 $^{\circ}$ C/min)—170 $^{\circ}$ C(10min)— (4 $^{\circ}$ C/min)—210 $^{\circ}$ C—(20 $^{\circ}$ C/min)—300 $^{\circ}$ C(7.5min)
TBBPA(エチル 化体)		1.3mL/min	280 $^{\circ}$ C	120 $^{\circ}$ C(1min)—(20 $^{\circ}$ C/min)—300 $^{\circ}$ C(8min)

2-1-3 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

2-1-4 測定条件

1) 使用カラム: DB-5, 0.25mm i. d. \times 30m,
膜厚 0.1 μ m (Agilent)

2) 測定条件

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。

2-1-5 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 $^{\circ}$ 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 9 に示す。抽出液は 40 $^{\circ}$ 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
リウムで脱水後、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 Co-PXBs 画分) と
第 2 画分 (PBDD/DFs、MoBrPCDD/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。カラムクロマトグラフィーによる精
製法の詳細は表 10 に示す。PBDEs、PBBs
及び Co-PXBs の最終検液はシリンジスパ
イク $^{13}\text{C}_{12}$ -2, 2', 3, 4, 4', 5' -HxBDE
(#138L) を加えて 25 μ L とした。PBDD/DFs、
MoBrPCDD/DFs の最終検液はシリンジスパ
イク $^{13}\text{C}_{12}$ -2, 3, 4, 7, 8-PeBDF を加えて 15 μ L
とした。PBDD/DFs、PBDEs、PBBs 及び
Co-PXBs をそれぞれ HRGC/HRMS で測定し
た。

表9 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℃
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

表10 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℃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℃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

表11 九州地区におけるマーケットバスケット試料の食品群別重量表

食品群	食品分類	1日摂取量(g)	最終分析重量(g)	
第1群	米、米加工品	357.1	423.8	
第2群	米以外の穀類、種実類、いも類	162.9	200.8	
第3群	砂糖類、菓子類	33.1	35.5	
第4群	油脂類	10.4	10.4	
第5群	豆類、豆加工品	59.9	63.1	
第6群	果実、果汁	106.2	118.2	
第7群	緑黄色野菜	90.5	107.1	
第8群	その他の野菜類、キノコ類、海藻類	196.0	235.6	
第9群	酒類、嗜好飲料	581.6	581.6	
第10群*	魚介類	81.5	A	91.1
			B	90.9
第11群*	肉類、卵類	114.7	A	131.3
			B	135.1
第12群*	乳、乳製品	144.5	A	144.5
			B	144.5
第13群	調味料	86.2	86.2	

* 第10、11、12群は n=2 で調製した試料を用いた。

2-2 マーケットバスケット試料の分析

2-2-1 分析試料

2007年に九州(福岡県)で調製したマーケットバスケット試料の第1群から13群(第10群から12群についてはn=2)の食品群別試料を分析した。各食品群の食品分類、九州地区における食品群別の1日摂取量及び最終分析試料重量(試料調製後の重量)を表11に示す。

2-2-2 分析方法

各食品群別試料(第4群以外の群)50gをそれぞれ特注ビーカーに精秤した後、凍結乾燥し、2-1-2~2-1-5の魚介類個別食品の分析方法と同様の方法で分析及び測定を行った。第4群の試料は試料採取後、100mLのヘキサンに溶解させて硫酸処理を行った後、シリカゲルカラムで精製し、後は他の食品群と同様に精製した。HRGC/HRMSで試料中の臭素系化合物濃度を定量した後、1日摂取量を算出した。

3 ヘキサブロモシクロドデカン (HBCDs) 及びテトラブロモビスフェノール A (TBBPA) のマーケットバスケット試料の分析

3-1 実験材料

2007年に九州（福岡県）で調製したマーケットバスケット試料の第1群から13群（第10群から12群についてはn=2）の食品群別試料を分析した。各食品群の食品分類は臭素系ダイオキシン類、PBDEs、PBBs及びCo-PXBsと同様である。

3-2 標準溶液及び試薬

メタノール、ジクロロメタン、ヘキサンは、関東化学社製ダイオキシン類分析用、または残留農薬試験・PCB試験用を、また、 α -、 β -、及び γ -HBCDs標準品、及びその $^{13}\text{C}_{12}$ ラベル体、TBBTA標準溶液及びその $^{13}\text{C}_{12}$ ラベル体はCambridge Isotope Laboratories社製を用いた。シリンジスパイクには関東化学社製のInternal standard Mix 25（内容物 クリセン-d₁₂、アセナフテン-d₁₀、ピレン-d₁₀、フェナントレン-d₁₂）を用いた。

44%硫酸シリカゲルは和光純薬工業社製ダイオキシン類分析用を用いた。

3-3 機器及び測定条件

GPC 装置

HBCDs分析での精製過程に、GPCを下記の条件（表12）で用いた。GPCのポンプは島津製作所のLC-10AD VPを用い、分画装置は東京理化学器械製EYELA FRACTION CORECTOR DC-1500を使用した。

表12 HBCDs分析に用いたGPC条件

カラム	昭和電工社製 Shodex CLNpak EV-2000 (300×20 mm i.d.)
プレカラム	昭和電工社製 Shodex CLNpak EV-G ム AC
移動相	アセトン/シクロヘキサン(3:7, v/v) 流速: 5 mL/min

LC/MS/MS 装置

HBCDs分析にはLC/MS/MS（Waters社製2695 / Quatro Micro API）を下記の分析条件（表13）で用いた。

表13 LC/MS/MSの分析条件

カラム	GL Sciences社製 Intersil ODS-3(150×2.1 mm i.d., 5 μ m)
カラム温度	40℃
注入量	5 μ L
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=20:50:30
移動相流量	0.2 mL/min
測定モード	ESI negative 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)

3-4 分析操作

3-4-1 HBCD s の分析操作

試料約 5 g を秤取して精製水 5 mL を加え、 $^{13}\text{C}_{12}$ -HBCDs 1 ng を内標準 (IS) として添加した。これに抽出溶媒としてメタノール 20 mL を加え 2 分間高速ホモジナイザーにより攪拌抽出した。これをろ過し、ろ液は 300 mL 容分液ロートに移した。残渣は、2 回目はメタノール 20 mL と 10%ジクロロメタン/ヘキサン混液 (以下 10% DCM/Hex) 20 mL で、3 回目には 10% DCM/Hex 20 mL で再度ホモジナイズ抽出を行った。また、洗液は 10% DCM/Hex 20 mL を用いた。ろ液及び洗液をすべて 300 mL 容分液ロートに合わせてジクロロメタンで洗浄した 5% NaCl 水溶液 120 mL を加え、5 分間振とうした後、静置した。分離した有機層は綿栓した三角ロート上の無水硫酸ナトリウムを通過させ、ナス型フラスコに採った。その後、10% DCM/Hex 40 mL で 2 回同様の液—液抽出及び脱水を行った。集めた有機層はエバポレータで減圧濃縮し、アセトン/シクロヘキサン (3:7) に置換し 10 mL に定容した。その内 2.5 mL を GPC 装置に注入し、粗脂肪溶出直後の 12 分~18 分の HBCDs 溶出画分を集めて濃縮後、44%硫酸シリカゲルミニカラムで精製し、窒素ガス気流下で溶媒除去した。その後、少量のジクロロメタンに溶解させインサートバイアルに移し、窒素ガスで乾固後、メタノール 25 μL に溶解させて LC/MS/MS で測定した (図 2)。

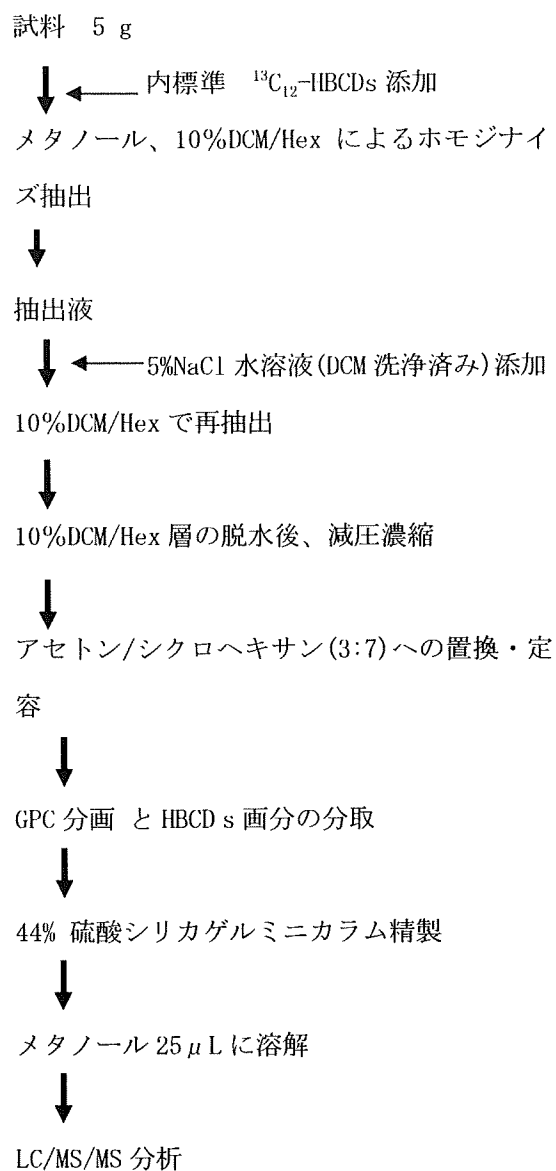


図 2 HBCD s の分析フロー

3-4-2 TBBPA の分析操作

試料約 5 g を秤取し、 $^{13}\text{C}_{12}$ -TBBPA 0.5 ng を添加した。これに抽出溶媒としてメタノール 20 mL を加え、高速ホモジナイザーにより 2 分間攪拌抽出した。3000 rpm で 2 分間遠心分離して上清を 100 mL 容の分液ロートに移し、再度メタノール 20 mL を加え同様に操作した。分液ロートにヘキサン 20 mL を加え振とう、静置した。下層のメタノール層を予め DCM 洗浄済み 5%NaCl 水溶液 120 mL を入れた 200 mL 容の分液ロートに移し、ジクロロメタン 20 mL で 2 回、5 分間振とう抽出した。ジクロロメタン抽出液は綿栓した三角ロート上の無水硫酸ナトリウムを通過させて脱水したのち、エバポレータで減圧濃縮し、窒素ガス気流下で乾燥させた。これに、1M KOH/エタノール溶液 1 mL、ジエチル硫酸を 0.2 mL 加えて十分に混和したのち、35°C で 30 分間静置しエチル化した。その後 1M KOH/エタノール溶液 4 mL を加え、70°C で 1 時間還流し粗脂肪をアルカリ分解した。次に精製水 3 mL 加え、100 mL 容分液ロートに移し、ヘキサン 5 mL で 2 回抽出した。ヘキサン抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水し、1 mL まで減圧濃縮した。これを、フロリジル 0.5 g を充填したミニカラムに通過させ、ジエチルエーテル/ヘキサン (2 : 98) 8 mL で溶出させた。溶出液にクリセン- d_{12} 5 ng 加えて濃縮後、バイアルにジクロロメタンで移した後、ノナン 25 μL に置換して GC/MS で分析した (図 3)。

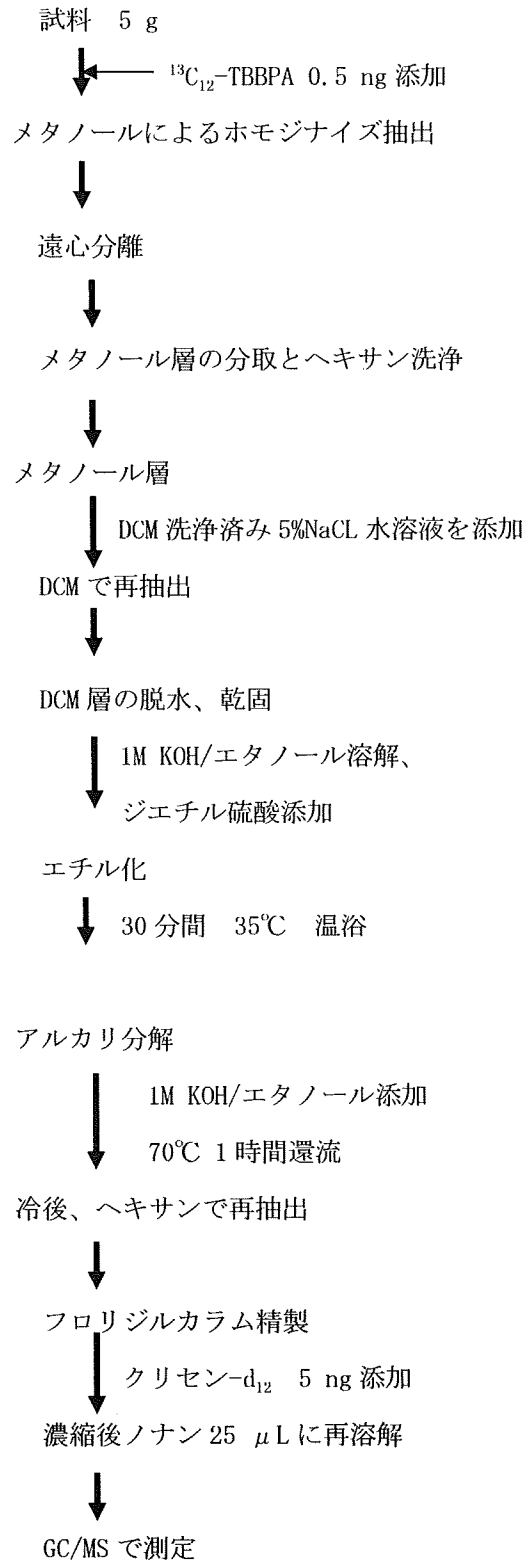


図 3 TBBPA の分析フロー