

present in the preincubation media. Cortisol was extracted from the medium as described previously [63]. The cortisol levels were measured using a time-resolved fluoroimmunoassay for cortisol [62].

2.8. Statistics

All data are expressed as the mean ± standard error values. The variances of the xanthophore index were tested by the Kruskal–Wallis test [50], a nonparametric test analog to one-way analysis of variance (ANOVA). When significant differences were detected, comparisons of treatments versus the control were performed with a post hoc multiple comparison test for the Kruskal–Wallis test. The amounts of cortisol in the head kidney were compared by one-way ANOVA. Significance was determined at 5% level.

3. Results

3.1. Nucleic acid sequence determination

Because *Mc4r* and *Mc5r* cDNAs have been cloned in goldfish [8,10], the nucleotide sequences of *Mc1r*, *Mc2r*, and *Mc3r* cDNAs

were determined in the present study. Fig. 1 shows the assembly of cDNA fragments amplified by RT-PCR for each *Mc*r cDNA. Nucleotide sequences were determined using these fragments.

3.1.1. Nucleic acid sequence of goldfish *Mc1r* cDNA

The nucleotide sequence of a cDNA amplified from goldfish brain total RNA was found to encode a reading frame consisting of 321 amino acid residues (Fig. 2). Phylogenetic analysis revealed that the new sequence is localized in a clade of MC1R of various species in a phylogenetic tree for the five different MCRs (Fig. 3). This indicates that the new receptor sequence encodes MC1R of goldfish. The locations of the seven transmembrane domains were predicted as shown in Fig. 2. The DRY motif is present at a position homologous to that of MC1R of the other species [33]. There are three potential sites for *N*-linked glycosylation [4] and eight potential sites for phosphorylation by protein kinase C [61] (Fig. 2).

3.1.2. Nucleic acid sequence of goldfish *Mc2r* cDNA

The nucleotide sequence of a cDNA amplified from goldfish head kidney total RNA was found to encode a reading frame consisting of 302 amino acid residues (Fig. 2). Phylogenetic analysis revealed that the new sequence is grouped into a clade together

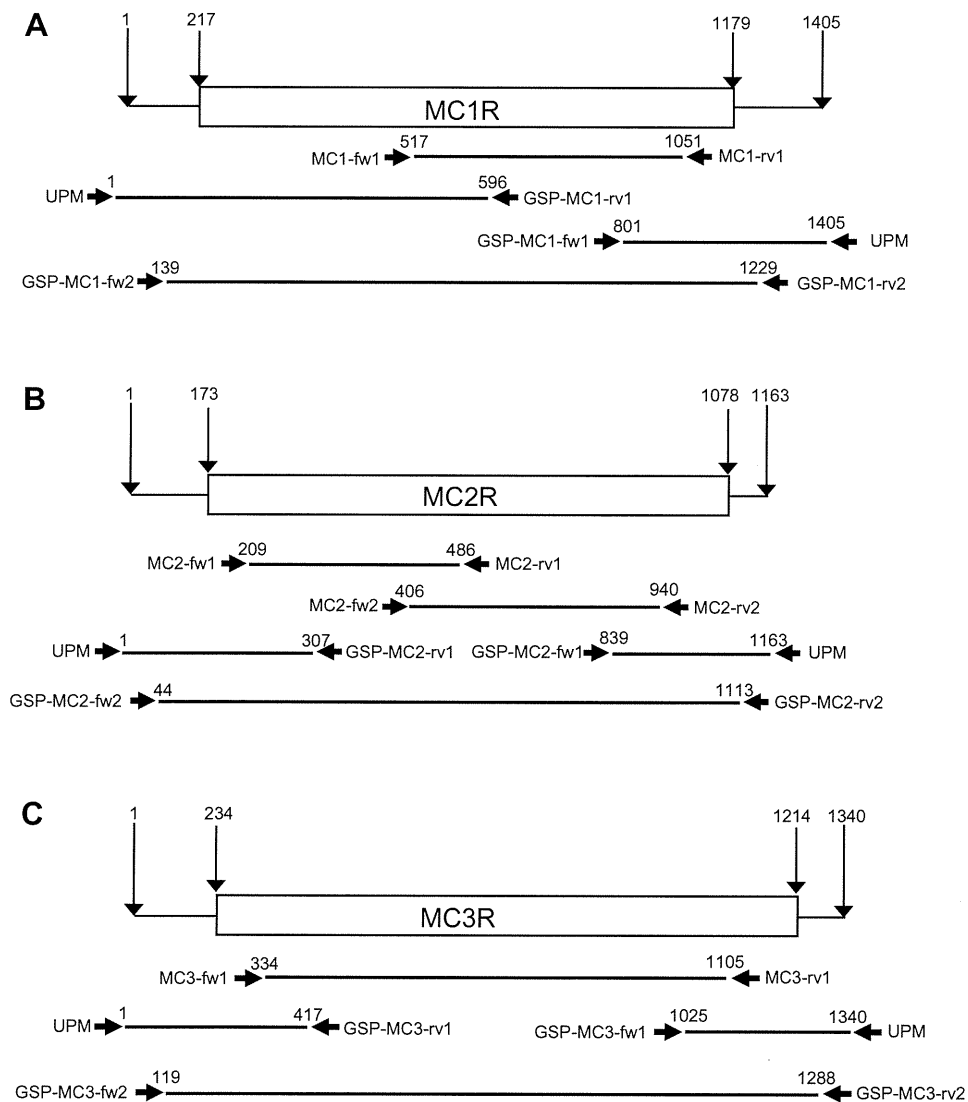


Fig. 1. Schematic representation of the relative positions of the DNA fragments of *Mc1r* (A), *Mc2r* (B), and *Mc3r* (C) in goldfish. DNA fragments were amplified from brain or head kidney cDNA. Boxes show reading frames. Horizontal arrow shows relative positions and direction of primers. The numbers show positions on each cDNA. For details regarding the nucleotide sequences, see Accession No. AB618067 for *Mc1r*, AB618068 for *Mc2r*, and AB618069 for *Mc3r*.

MC1R	M ND S rHYFsmkHMDYIYNIDN NI TL N TLGEMNA T GI AG IM IP Q EL FL ML GL IS LVEN IL VVA AI IK N	69	
MC2R	M NS S -----TEALSTHP DC AEVQ VP SQV FMA IAVAS LS EN IL V IL AV IK N	46	
MC3R	M ND S YL Q FL KG Q KPA NS TS LP P NS TV DP PP AG---AL CE Q VQ T Q AE V FL TL GV SL LEN IL V IL AV V K N	66	
MC4R	M NS S Y HH GH PH HS Y r N HS Q GA L PV GK PD Q GER ST SG Y EQ LL IT SE V FL TL GL V SL LEN IL V IA A AI IK N	69	
MC5R	M NS S Y SE AT LS L W AI SA NS SP VL DL L N 7 TE IP SH AK PK ACE QL N IA TE V FL IL GL IS LVEN IL V IC A IV K N	70	
	TM1		
MC1R	R N L H S PM Y F IC CL AV S D ML V S V SN V ET L F ML L KE H GL L L V ta k ML Q HL DN V ID IM IC SS V SS S FL C	139	
MC2R	R N L H S PM Y C F IC N L AV FN TI SS L CK S L ET IL LL F KE A GH EN --GR F EL N ID D IM D S LL CM C FL G S I F S IL	114	
MC3R	K N L H S PM Y F FL CS LA AD ML V S V SN S LE T IV IA V L NS R LL V AS D H F V RL MD N V F DS M IC IS L V AS I C N LL	136	
MC4R	K N L H S PM Y F FL CS LA AD ML V S V SN S LE T IV IA V L NS R LL V AS D H F V RL MD N V F DS M IC IS L V AS I C N LL	139	
MC5R	K N L H S PM Y F FL CS LA AD ML V S V SN S LE T IV IA V L NS R LL V AS D H F V RL MD N V F DS M IC IS L V AS I C N LL	140	
	TM2	TM3	
MC1R	T IA AD RY IT IF Y AL RY HS IM T t q r AV AI IA V V W LE TS IT SS SL F IV Y HT D NA VI ACL V T F FL T LV F T AV I	209	
MC2R	T IA AV DR Y IS I F H AL RY H T LM t mr R V V VL ST IV V FC GT SG V LM IG FS NA At v K I FF V VL FF T ALL IL L	184	
MC3R	A IA VD RY VT IF Y AL RY HS IV t v r R AL V AI AG IV LV CV CG IV F IV Y SE SK T V V CL IT MF F AM L VL M AT L	206	
MC4R	A IA VD RY VT IF Y AL RY H N IM t q r RA GT IT IC IT L CT V SG V L F IV Y SE ST IV L IC L IS M FF IM L AL M AS L	209	
MC5R	A IA VD RY VT IF Y AL RY H N IM t q r RA AF IT IG IT FT CT SC GV F II Y S D NT SV IV CL V S M F IM L AL M AS L	210	
	###	TM4	TM5
MC1R	Y L H MF L LA H V H sr F IM AL H-----K s rr QA T sm KG A IT L TL L GV F IC W GP FF L HL L L IL L IC P T N P	271	
MC2R	Y V H MF L LA R H H AN R IAS M P-----G L HAR Q R Q S L R G AL TL TL L IG V F V AC W AP FL SH L L IS M IC P EN P	248	
MC3R	Y V H MF L LA R L H V Q RI A AL PP AAAA AG NP AP R Q RS CM E GA VT IS IL IG V F CC W AP FF L HL L L V S CP HP P	276	
MC4R	Y V H MF L LA R L H M K RI A AL P -----G NG PI W AA N M KG A IT IT L TL L GV F VC W AP FF L HL L L M S CP R NP	273	
MC5R	Y SH M FL LA R SH V K RI A AL P -----G Y NS I H Q RA sm KA AV IT L TL L GI F IV CV AP FF L HL L L M S CP R N L	274	
	TM6		
MC1R	Y CK C Y F SH EN L L TL L IC NS L ID PL IY AY RS Q EL R KE L KE MI F CS W L F AM	-	321
MC2R	Y CE C Y R SL F Q L H V L L L V SH AV IE PA I Y AF R ST EL R NE y K V F LC S AS R I F KE CV	(40%)	302
MC3R	L CL C Y M SH FT Y L VL IM C NS V ID PL IY AC RS L EM R K E F KE IL CC F GC Q PP L	(49%)	327
MC4R	Y CC F M SH FN MY L L IM C NS V ID PL I Y AF RS Q EM R KE L KE IC CC Y GL AS L CV	(53%)	326
MC5R	Y CC F M SH FN MY L L IM C NS V ID PL I Y AF RS Q EM R KE L KE IC CC Y S U r N V F G MS R	(51%)	329
	TM7		

Fig. 2. Amino acid sequences of five subtypes of goldfish MCRs. Common amino acids with MC1R are shaded. Transmembrane domains (TM) were deduced for each MCR subtype. Italicized amino acids show potential *N*-glycosylation motifs. Lowercase letters show potential protein kinase C phosphorylation motifs. Numbers in parentheses show sequence identity with MC1R sequence. ### DRY motif.

with the remaining MC2Rs (Fig. 3). This indicates that the new receptor sequence encodes for the goldfish MC2R. The locations of the seven transmembrane domains are shown in Fig. 2. The DRY motif is present at a position homologous to that of MC2R of the other species. There is one potential site for *N*-linked glycosylation as well as three potential sites for phosphorylation by protein kinase C (Fig. 2).

3.1.3. Nucleic acid sequence of goldfish *Mc3r* cDNA

The nucleotide sequence of a cDNA amplified from total RNA of goldfish brain was found to encode a reading frame consisting of 327 amino acid residues (Fig. 2). Phylogenetic analysis revealed that the new sequence is related to the MC3Rs in other species (Fig. 3). This indicates that the new receptor sequence encodes a goldfish MC3R. The locations of the seven transmembrane domains were predicted as shown in Fig. 2. The DRY motif is present at a position homologous to that of MC3R of the other species. There are three potential sites for *N*-linked glycosylation and two potential sites for phosphorylation by protein kinase C (Fig. 2).

3.2. Expression of *Mcrs* in goldfish skin, fin and head kidney

Fig. 4 shows the detection by RT-PCR of all cloned goldfish *Mcrs* in the fin, skin and head kidney. The negative control for the expression of each *Mcr* and amplification of positive control β -actin are also shown. Expression of *Mc1r* was observed in skin and fin. Expression of *Mc2r* was observed in head kidney. When RT-PCR was performed for the all five goldfish *Mcrs* by using total RNA extracted from single cells of the fin and skin, a cDNA fragment of *Mc1r* was amplified from the total RNA derived from xanthophores (Fig. 5). None of the cDNA fragments of the five subtypes of *Mcr* were amplified from the total RNA derived from nonchromatophoric dermal cells. Because of the limitations of the kit used in this experiment, the absence of genomic DNA in the total RNA samples was indirectly evaluated using β -actin amplification. The β -actin fragment containing the intron was never amplified (Fig. 5).

3.3. Biological activities of α -MSH-related peptides

3.3.1. Pigment-dispersing activities

Fig. 6 shows the effects of α -MSH-related peptides on *in vitro* pigment dispersion in goldfish scales. Des-Ac- α -MSH was found to stimulate the dispersion of pigments in xanthophores in a dose-dependent manner (Fig. 6A). α -MSH and Di-Ac- α -MSH also showed similar effects on pigment dispersion (Fig. 6B and C). At a concentration of 1 nM, the effect of α -MSH was greater than that of Des-Ac- α -MSH. At a concentration of 100 nM, the effect of Di-Ac- α -MSH was greater than that of Des-Ac- α -MSH.

3.3.2. Cortisol-releasing activities

The effects of MC peptides on *in vitro* cortisol release from the head kidney of goldfish are shown in Fig. 7. ACTH₁₋₂₄ was found to stimulate cortisol release in a dose-dependent manner. However, Des-Ac- α -MSH, α -MSH, and Di-Ac- α -MSH were found to have negligible effects on cortisol release.

4. Discussion

4.1. Phylogenetic distribution of MCR and the MC system in goldfish

The presence of MCR has been demonstrated across a wide spectrum of vertebrate classes, including Cephalaspidomorpha (lampreys), Chondrichthyes (sharks), Sarcopterygii (lobe-finned fish including tetrapods), and Actinopterygii (ray-finned fish) [17,18,24,48]. While mammals and chickens possess five MCR subtypes (MC1R to MC5R), zebrafish is the only fish species in which the five subtypes were demonstrated with MC5R subdivided into MC5Ra and MC5Rb [30]. *Fugu* lacks *Mc3r*, while four *Mcr* subtypes have been identified by genomic studies [23,30]. In goldfish, the presence of *Mc4r* and *Mc5r* has been shown in our previous studies [8,10]. Therefore, the identification of *Mc1r*, *Mc2r*, and *Mc3r* cDNA provides a second line of evidence for the presence of five MCR subtypes in fish. The cypriniformes including goldfish and zebrafish are a rather primitive group of ray-finned fish when compared

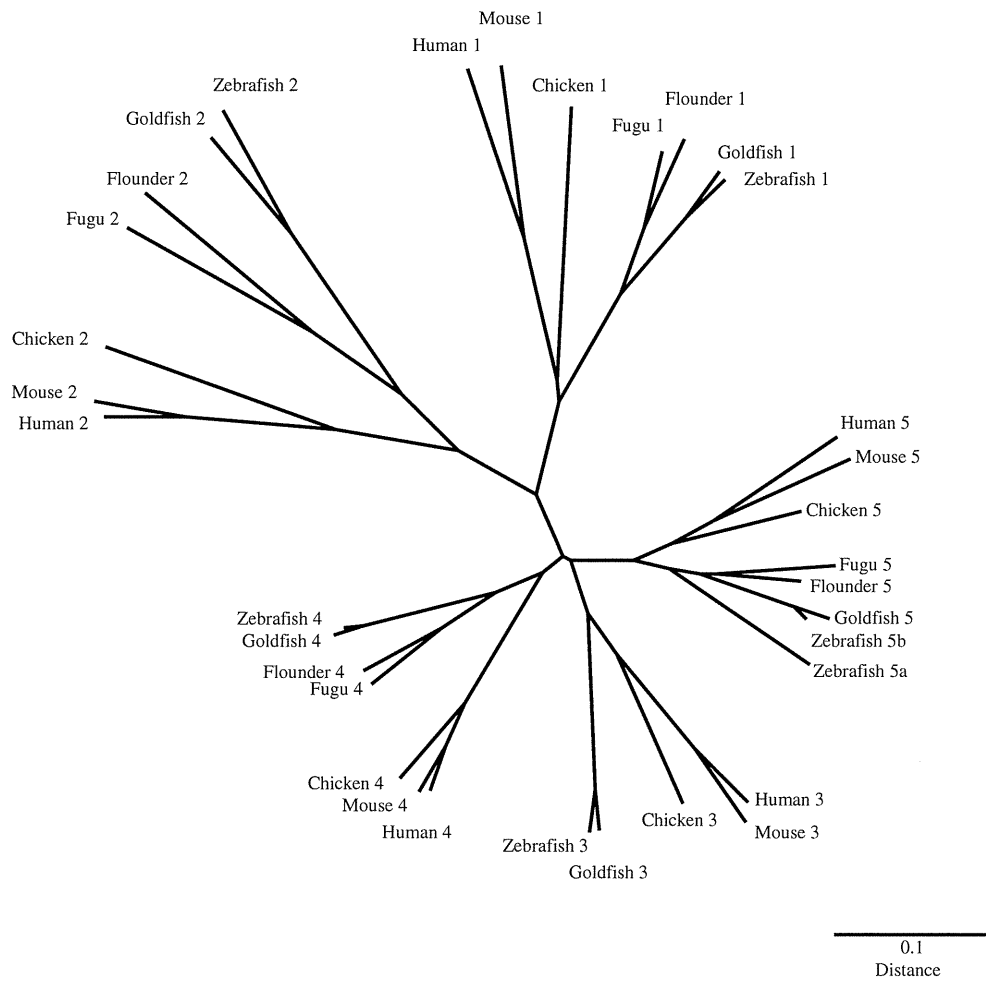


Fig. 3. Phylogenetic tree for MC receptors of fish, chickens, and mammals including 5 MCR subtypes of goldfish constructed by the NJ method. Accession Numbers of MC1R for *Fugu*: AAO65548, flounder: AB287974, goldfish: AB618067, zebrafish: NP_851301, chicken: P55167, mouse: BAD16661, and human: Q01726; MC2R for *Fugu*: AO65550, flounder: AB541411, goldfish: AB618068, zebrafish: NP_851302, chicken: BAA24002, mouse: NP_032586, and human: AAH69074; MC3R for goldfish: AB618069, zebrafish: NP_851303, chicken: BAA32555, mouse: NP_032587, and human: AAH69599; MC4R for *Fugu*: AAO65551, flounder: AB287975, goldfish: CAD58853, zebrafish: NP_775385, chicken: AAT73773, mouse: P56450, and human: AAH69172; MC5R for *Fugu*: AAO65553, flounder: AB540951, goldfish: CAE11349, zebrafish-a: NP_775386, zebrafish-b: NP_775387, chicken: BAA25640, mouse: P41149, and human: AAH69545.

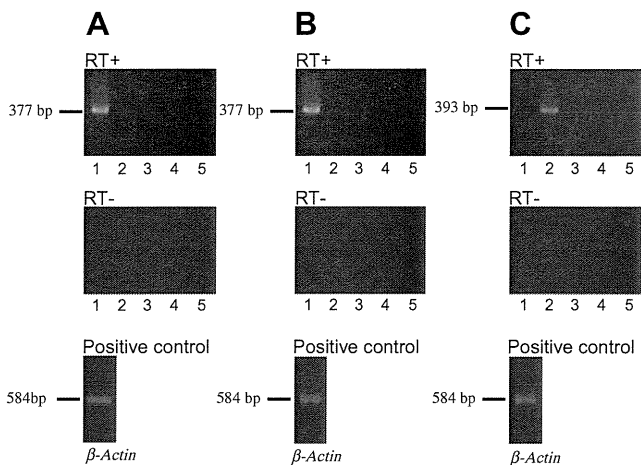


Fig. 4. Expression of *Mcrs* in caudal fin (A), dorsal skin (B), and head kidney (C). Total RNA samples prepared from these tissues were subjected to RT-PCR (RT+) using specific primers for *Mcrs* (see Table 2 for primer sequences). Numbers indicate *Mcr* subtypes. “RT-” indicates negative control (PCR for *Mcrs* in total RNA). “Positive control” shows amplification of β -actin fragment in each tissue.

to tetradontiformes [37]. It is therefore possible that the five subtypes of MCR may have appeared in a common ancestor of ray-finned fish and tetrapods. Subsequently, in the branch leading to derived group of ray-finned fish such as tetradontiformes, *Mcr3r* may have been deleted during the course of evolution.

In goldfish, the primary structure of POMC has been reported previously [11]. MC peptides such as Des-Ac- α -MSH, α -MSH, Di-Ac- α -MSH, and some ACTH variants released from pituitary cells have been identified [58]. Moreover, primary structures of agouti-signaling protein and agouti-related protein as endogenous antagonists for α -MSH have been reported in goldfish [7,9]. Here, we demonstrated the presence of five MCR subtypes thus showing that the goldfish MC system possesses a molecular repertoire comparable to that of tetrapods.

4.2. Effects of α -MSH-related peptides on pigment dispersion

The pigment-dispersing activity of Des-Ac- α -MSH, α -MSH, and Di-Ac- α -MSH are almost equal in goldfish, but the activity of α -MSH is somewhat greater than that of Des-Ac- α -MSH. These results are similar to those observed in xanthophores of barfin flounder [26]. In both species, the xanthophores express only one

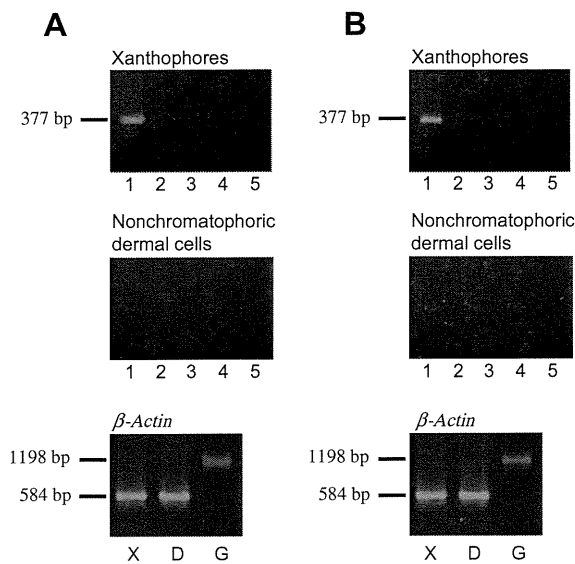


Fig. 5. Expression of *Mcrs* in cells isolated from the caudal fin (A) and dorsal skin (B). RT-PCR was performed using the total RNA extracted from xanthophores and nonchromatophoric dermal cells (see Table 2 for primer sequences). Numbers indicate *Mcr* subtypes. Total RNAs prepared from three single cells were combined. *Mcr* subtypes. Total RNAs prepared from three single cells were combined. *β-Actin* was used as an internal control. Amplification of the *β-actin* fragment from xanthophores “X,” and nonchromatophoric dermal cells “D” was not observed. Genomic DNA was used as a template in “G.” The amplified DNA for *β-actin* contained one intron.

Mcr subtype, i.e. *Mc1r* and *Mc5r* in goldfish and barfin flounder, respectively. On the other hand, the response of goldfish xanthophores to α -MSH is quite different from that of melanophores of barfin flounder in which α -MSH has negligible effects on melanin dispersion in a range from 1 nM to 1 μ M. Goldfish xanthophores are also different from barfin flounder melanophores because two different subtypes of *Mcr*—*Mc1r* and *Mc5r*—are expressed in the flounder melanophores [27]. We recently observed that *Mc1r* and *Mc5r* are expressed in melanophores of Japanese flounder where α -MSH showed no effects on pigment dispersion, while Des-Ac- α -MSH is effective. Moreover, both α -MSH and Des-Ac- α -MSH are effective in xanthophores where only *Mc5r* is expressed (manuscript in preparation). Taken together, these results indicate that there is a good correlation between pigment-dispersing activities, the degree of acetylation, and the specific *Mcr* subtype(s) expressed in chromatophores. α -MSH-related peptides exhibit pigment-dispersing activities irrespective of the degree of acetylation when one type of *Mcr* is expressed and monoacetylation, which leads to generation of α -MSH, cancels the activities when two types of *Mcrs* are concomitantly expressed.

Monoacetylation of the N-terminus may contribute to an increase in pigment-dispersing activity of α -MSH-related peptides in goldfish because the activity of α -MSH was found to be slightly but significantly higher than Des-Ac- α -MSH when their effects at the concentration of 1 nM were compared. Pharmacological studies on sea bass MC1R have revealed that α -MSH is more effective than Des-Ac- α -MSH in stimulation of cellular activities [45]. Acetylation-mediated augmentation of the binding affinity of α -MSH-related peptides was also observed during pharmacological studies with human and mouse MC1R [33,49]. Taken together, these results suggest that α -MSH may have higher activity than Des-Ac- α -MSH as a result of increased affinity for an MCR when only one MC subtype (at least MC1R or MC5R) is present. Similar enhancing effects of pigment-dispersion caused by monoacetylation have also been observed in grass carp, tilapia, and frogs [12,22,59]. According to our data, it is reasonable to propose that only one *Mcr* subtype may be expressed in melanophores of these species.

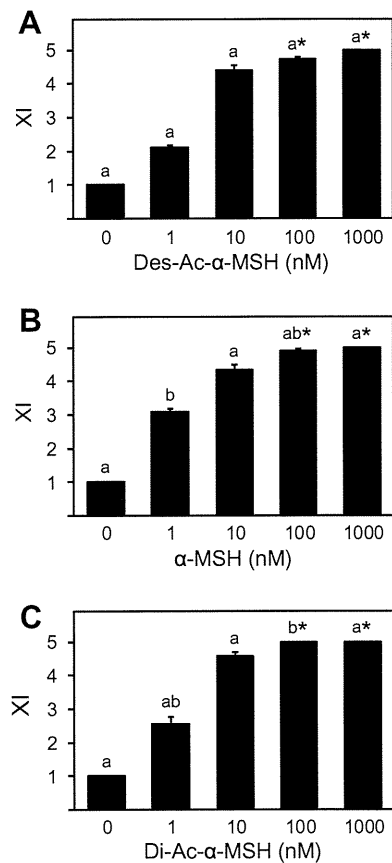


Fig. 6. Pigment-dispersing activity of synthetic Des-Ac- α -MSH, α -MSH, and Di-Ac- α -MSH on xanthophores. XI, xanthophore index analogous to the melanophore index. Asterisks show significant differences compared to the control value determined by a post hoc comparison test for the Kruskal–Wallis test at $P < 0.05$. Alphabetical letters indicate the differences in potency among the three peptides at one dose according to the results of the same test at $P < 0.05$ ($n = 5$). For example, the pigment-dispersing activity of 1 nM α -MSH was greater than that of 1 nM Des-Ac- α -MSH.

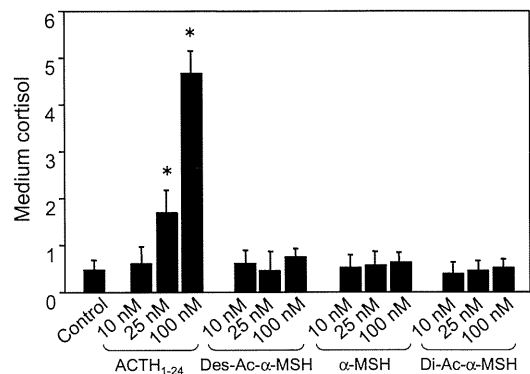


Fig. 7. Effects of MC peptides, including ACTH_{1–24}, Des-Ac- α -MSH, α -MSH, and Di-Ac- α -MSH on *in vitro* cortisol release from the head kidney of goldfish. Head kidney tissue parts were preincubated for 1 h and then followed by incubation with each MC peptide for 1 h. The concentration of cortisol in the incubation medium was estimated relative to that of the preincubation medium. Asterisks show significant differences compared to the control value by ANOVA at $P < 0.05$ ($n = 5$).

The pigment-dispersing activity of α -MSH was found to be indistinguishable from that of Di-Ac- α -MSH in the goldfish xanthophores. In pharmacological studies of sea bass, α -MSH was found to have efficacy similar to that of Di-Ac- α -MSH for stimulation of cellular activities via MC1R [45]. Given that goldfish MC1R may

have similar properties to sea bass, it is likely that α -MSH and Di-Ac- α -MSH interact with goldfish MC1R with similar binding affinities.

4.3. Effects of ACTH and α -MSH-related peptides on cortisol-release

Recently, we reported on interesting relationships among molecular forms of α -MSH-related peptides with respect to N-terminal acetylation, cortisol-releasing activity, and *Mcr* subtypes expressed in interrenal cells of barfin flounder [25]. First, Di-Ac- α -MSH and Des-Ac- α -MSH were found to stimulate cortisol release, and the former showed greater activity than the latter, while the activity of α -MSH was negligible. Second, transcripts of *Mc2r* and *Mc5r* were detected in the interrenal cell. These relationships are similar to those observed for pigment-dispersing activities of α -MSH-related peptides in melanophores of this specie [26,27]. Hence, we assumed that a heterodimer consisting of MC2R and MC5R is associated with the differences in the activity of these peptides in the interrenal cells. The present study was undertaken to characterize the relationships between all the three players in the goldfish. The *Mc2r* was found to be the only *Mcr* expressed in head kidney containing interrenal cells and, supporting our hypothesis, the three α -MSH-related peptides were found to not have cortisol-releasing activities.

Among the five MCR subtypes, MC2R has been shown to be an ACTH-specific receptor because MC2R exclusively binds ACTH but not α -MSH-related peptides [1,23,48]. A classical study has shown that a central region of the ACTH molecule, which consists of basic amino acid residues, is important for binding to the receptor [19,40]. These properties have been confirmed using native and expressed ACTH-receptors (namely MC2R) [19,20,41]. In the present study, it was found that ACTH_{1–24}, which consists of an N-terminal region corresponding to α -MSH, a central basic region corresponding to ACTH_{15–18}, and a short C-terminal region corresponding to ACTH_{19–24}, exhibits dose-dependent cortisol releasing activity. These results confirm that ACTH is a major secretagogue of cortisol in goldfish and MC2R the main link of the pituitary-interrenal axis.

Because MC2R is a specific receptor for ACTH, the other MC peptides never interact with this receptor [23,33,48]. Therefore, the finding that there are no cDNAs for *Mcr* subtypes other than *Mc2r* cDNA is in agreement with the lack of cortisol-releasing activities of α -MSH-related peptides in goldfish head kidney tissues. Also in carp, ACTH stimulates cortisol release, but α -MSH does not [31]. The presence and absence of the MC2R and MC5R, respectively, have been shown for this species, while investigations of the other MCR subtypes have not been reported. Even though cypriniformes such as goldfish and carp generally have only the MC2R subtype in interrenal cells, two MCR subtypes may heterodimerize in tilapia, rainbow trout and barfin flounder because cortisol-releasing activities of α -MSH-related peptides have been observed in these species [25,29,42]. Interestingly, tilapia has some similarities to barfin flounder in relation to potency of cortisol-releasing activities and degrees of acetylation. Di-Ac- α -MSH has greater activity than Des-Ac- α -MSH, and α -MSH exhibits the lowest activity among the three α -MSH-related peptides. Similar results have also been observed in investigations of rainbow trout, while data are not available for Di-Ac- α -MSH.

5. Conclusions

We recently hypothesized that coexpression of different types of *Mcr* leads to the formation of heterodimers of MCRs, which decrease the pigment-dispersing activities of α -MSH. The activity of this peptide is enhanced only when one subtype of MCR is present [26,27]. In goldfish xanthophores, where only *Mc1r* was expressed,

α -MSH displayed similar activity to that of Des-Ac- α -MSH and Di-Ac- α -MSH; moreover, the activity of α -MSH was greater than that of Des-Ac- α -MSH. These results support our assumption. On the other hand, ACTH_{1–24}, but not any α -MSH-related peptides, was found to stimulate cortisol release from goldfish head kidney where only the *Mc2r* subtype is expressed. These results indicate that MC2R is specific for ACTH and the link member in the pituitary-interrenal axis of the goldfish.

Acknowledgments

We thank Mr. Atsushi Suda, Miss Mami Asao, and Miss Masumi Kato of Kitasato University for technical assistance. This study was supported in part by a Grants-in-Aid for Scientific Research (A) (22248023) to A.T. from the Japan Society for the Promotion of Science. J.M.C-R was funded by AGL2010-22247-C03.01 and CSD 2007-00002.

References

- [1] M.J. Agulleiro, S. Roy, E. Sánchez, S. Puchol, N. Gallo-Payet, J.M. Cerdá-Reverter, Role of melanocortin receptor accessory proteins in the function of zebrafish melanocortin receptor type 2, *Mol. Cell. Endocrinol.* 320 (2010) 145–152.
- [2] S. Angers, A. Salahpour, M. Bouvier, Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002) 409–439.
- [3] P.H.M. Balm, P. Pepels, S. Helfrich, M.L.M. Hovens, S.E. Wendelaar Bonga, Adrenocorticotropin hormone in relation to interrenal function during stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 96 (1994) 347–360.
- [4] E. Bause, Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes, *Biochem. J.* 209 (1983) 331–336.
- [5] G.E. Breitwieser, G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling, *Circ. Res.* 94 (2004) 17–27.
- [6] M.G. Castro, E. Morrison, Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain, *Crit. Rev. Neurobiol.* 11 (1997) 35–57.
- [7] J.M. Cerdá-Reverter, T. Haitina, H.B. Schiöth, R.E. Peter, Gene structure of the goldfish agouti-signaling protea putative role in the dorsal-ventral pigment pattern of fish, *Endocrinology* 146 (2005) 1597–1610.
- [8] J.M. Cerdá-Reverter, M.K. Ling, H.B. Schiöth, R.E. Peter, Molecular cloning characterization and brain mapping of the melanocortin 5 receptor in the goldfish, *J. Neurochem.* 87 (2003) 1354–1367.
- [9] J.M. Cerdá-Reverter, R.E. Peter, Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene, *Endocrinology* 14 (2003) 4552–4561.
- [10] J.M. Cerdá-Reverter, A. Ringholm, H.B. Schiöth, R.E. Peter, Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: involvement in the control of food intake, *Endocrinology* 144 (2003) 2336–2349.
- [11] J.M. Cerdá-Reverter, H.B. Schiöth, R.E. Peter, The central melanocortin system regulate food intake in goldfish, *Regul. Pept.* 115 (2003) 101–113.
- [12] A.N. Ebelre, *The Melanotropins*. Karger, Basel, 1988.
- [13] R.M. Eglén, R. Bosse, T. Reisine, Emerging concepts of guanine nucleotide binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implication for high throughput screening, *Assay Drug Dev. Technol.* 5 (2007) 425–451.
- [14] R. Fujii, The regulation of motile activity in fish chromatophores, *Pigment Cell Res.* 13 (2000) 300–319.
- [15] R. Fujii, N. Oshima, Control of chromatophore movements in teleost fishes, *Zool. Sci.* 3 (1986) 13–47.
- [16] I. Gantz, T.M. Fong, The melanocortin system, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284 (2003) E468–E474.
- [17] T. Haitina, J. Klovin, A. Takahashi, M. Löwgren, A. Ringholm, J. Enberg, H. Kawachi, E.T. Larson, R. Fredriksson, H.B. Schiöth, Functional characterization of two melanocortin (MC) receptors in lamprey showing orthology to the MC1 and MC4 receptor subtypes, *BMC Evol. Biol.* 7 (2007) 101–114.
- [18] T. Haitina, A. Takahashi, L. Holmén, J. Enberg, H.B. Schiöth, Further evidence for ancient role of ACTH peptides at melanocortin (MC) receptors; pharmacology of dogfish and lamprey peptides at dogfish MC receptors, *Peptides* 28 (2007) 798–805.
- [19] K. Inouye, H. Otsuka, ACTH: structure–function relationship, in: C.H. Li (Ed.), *Hormonal proteins and peptides*, vol. 13, Academic press, New York, 1984, pp. 1–29.
- [20] S. Kapas, F.M. Cammas, J.P. Hinson, A.J.L. Clark, Agonist and receptor binding properties of adrenocorticotropin peptides using the cloned mouse adrenocorticotropin receptor expressed in a stably transfected HeLa cell line, *Endocrinology* 137 (1996) 3291–3294.
- [21] R.S. Kasper, N. Shved, A. Takahashi, M. Reinecke, E. Eppler, A systematic immunohistochemical survey of the distribution patterns of GH, prolactin, somatolactin, β -TSH, β -FSH, β -LH, ACTH, and α -MSH in the adenohypophysis of *Oreochromis niloticus*, the Nile tilapia, *Cell Tissue Res.* 325 (2006) 303–313.

- [22] H. Kawauchi, I. Kawazoe, Y. Adachi, D.I. Buckley, J. Ramachandran, Chemical and biological characterization of salmon melanocyte-stimulating hormones, *Gen. Comp. Endocrinol.* 53 (1984) 37–48.
- [23] J. Klovin, T. Haitina, D. Fridmanis, Z. Kilianova, I. Kapa, R. Fredriksson, N. Gallo-Payet, H.B. Schiöth, The melanocortin system in fugu: determination of POMC/AGRP/MCR gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs, *Mol. Biol. Evol.* 21 (2004) 563–579.
- [24] J. Klovin, T. Haitina, A. Ringholm, M. Löwngren, D. Fridmanis, M. Slaidina, A. Stier, H.B. Schiöth, Cloning of two melanocortin (MC) receptors in spiny dogfish: MC3 receptor in cartilaginous fish shows high affinity to ACTH-derived peptides while it has lower preference to γ -MSH, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 4320–4331.
- [25] Y. Kobayashi, H. Chiba, T. Yamanome, H.B. Schiöth, A. Takahashi, Melanocortin receptor subtypes in interrenal cells and corticotropic activity of α -melanocyte-stimulating hormones in barfin flounder, *Verasper moseri*, *Gen. Comp. Endocrinol.* 170 (2011) 558–568.
- [26] Y. Kobayashi, K. Mizusawa, T. Yamanome, H. Chiba, A. Takahashi, Possible paracrine function of α -melanocyte-stimulating hormone and inhibition of its melanin-dispersing activity by N-terminal acetylation in the skin of the barfin flounder, *Verasper moseri*, *Gen. Comp. Endocrinol.* 161 (2009) 419–424.
- [27] Y. Kobayashi, K. Tsuchiya, T. Yamanome, H.B. Schiöth, A. Takahashi, Differential expressions of melanocortin receptor subtypes in melanophores and xanthophores of barfin flounder, *Gen. Comp. Endocrinol.* 168 (2010) 133–142.
- [28] K.M. Kroeger, K.D.G. Pflieger, K.A. Eidne, G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways, *Front. Neuroendocrinol.* 24 (2004) 254–278.
- [29] A.E. Lamers, G. Flik, A. Atsma, S.E. Wendellar Bonga, A role for di-acetyl α -melanocyte-stimulating hormone in the control of cortisol release in the teleost *Oreochromis mossambicus*, *J. Endocrinol.* 135 (1992) 285–295.
- [30] D.W. Logan, R.J. Bryson-Richardson, K.E. Pagan, M.S. Taylor, P.D. Currie, I.J. Jackson, The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals, *Genomics* 81 (2003) 184–191.
- [31] J.R. Metz, E.J.W. Geven, E.H. van den Burg, G. Flik, ACTH, α -MSH and control of cortisol release: cloning, sequencing, and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in *Cyprinus carpio*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (2005) R814–R826.
- [32] G. Milligan, G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 825–835.
- [33] K.G. Mountjoy, Cloning of the melanocortin receptors, in: R.D. Cone (Ed.), *The Melanocortin Receptors*, Human press, Totowa NJ, 2000, pp. 209–235.
- [34] K.G. Mountjoy, L.S. Robbins, M.T. Mortud, R.D. Cone, The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors, *Science* 257 (1992) 1248–1251.
- [35] N. Naito, A. Takahashi, Y. Nakai, H. Kawauchi, Immunocytochemical identification of the proopiomelanocortin-producing cells in the chum salmon pituitary with antisera to endorphin and NH₂-terminal peptide of salmon proopiomelanocortin, *Gen. Comp. Endocrinol.* 56 (1984) 185–192.
- [36] H. Nakata, K. Yoshioka, T. Kamiya, H. Tsuga, K. Oyanagi, Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors, *J. Mol. Neurosci.* 26 (2005) 233–238.
- [37] J.S. Nelson, *Fishes of the World*, fourth ed., John Wiley and Sons, New York, 2006.
- [38] M. Pfeiffer, T. Koch, H. Schröder, M. Klutzny, S. Kirscht, H.J. Kreienkamp, V. Höllt, S. Schulz, Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A), *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 14027–14036.
- [39] M.L. Raffin-Sanson, Y. de. Keyzer, X. Brtagna, Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions, *Eur. J. Endocrinol.* 149 (2003) 79–90.
- [40] J. Ramachandran, The structure and function of adrenocorticotropin, in: C.H. Li (Ed.), *Hormonal Proteins and Peptides*, vol. 2, Academic press, New York, 1973, pp. 31–57.
- [41] J. Ramachandran, ACTH receptor, in: C.H. Li (Ed.), *Hormonal Proteins and Peptides*, vol. 13, Academic press, New York, 1984, pp. 1–29.
- [42] T.A. Rance, B.I. Baker, The *in vitro* response of the trout interrenal to various fragments of ACTH, *Gen. Comp. Endocrinol.* 45 (1981) 497–503.
- [43] M. Rocheville, D.C. Lange, U. Kumar, S.C. Patel, R.C. Patel, Y.C. Patel, Receptors for dopamine and somatostat formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity, *Science* 288 (2000) 154–157.
- [44] E. Sánchez, V.C. Rubio, J.M. Cerdá-Reverter, Characterization of the sea bass melanocortin 5 receptor: a putative role in hepatic lipid metabolism, *J. Exp. Biol.* 212 (2009) 3901–3910.
- [45] E. Sánchez, V.C. Rubio, J.M. Cerdá-Reverter, Molecular and pharmacological characterization of the melanocortin type 1 receptor in sea bass, *Gen. Comp. Endocrinol.* 165 (2010) 163–169.
- [46] E. Sánchez, V.C. Rubio, D. Thompson, J. Met, G. Flik, G.L. Millhauser, J.M. Cerdá-Reverter, Phosphodiesterase inhibitor-dependent inverse agonism of agouti-related protein on melanocortin 4 receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296 (2009) R1293–R1306.
- [47] H. Satake, T. Sakai, Recent advances and perceptions in studies of heterodimerization between G protein-coupled receptors, *Protein Pept. Lett.* 15 (2008) 300–308.
- [48] H.B. Schiöth, T. Haitina, M.K. Ling, A. Ringholm, R. Fredriksson, J.M. Cerdá-Reverter, J. Klovin, Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the melanocortin receptor subtypes, *Peptides* 26 (2005) 1886–1990.
- [49] H.B. Schiöth, R. Muceniece, M. Larsson, J.E.S. Wikberg, The melanocortin 1, 3, 4 or 5 receptors do not have a binding epitope for ACTH beyond the sequence of α -MSH, *J. Endocrinol.* 155 (1997) 73–78.
- [50] S. Siegel, J.N. Castellan Jr., *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, second ed., McGraw-Hill, New York, 1988.
- [51] A.I. Smith, J.W. Funder, Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues, *Endocr. Rev.* 9 (1988) 159–179.
- [52] A. Takahashi, M. Amano, T. Itoh, A. Yasuda, T. Yamanome, Y. Amemiya, K. Sasaki, M. Sakai, K. Yamamori, H. Kawauchi, Nucleotide sequence and expression of three subtypes of proopiomelanocortin mRNA in barfin flounder, *Gen. Comp. Endocrinol.* 141 (2005) 291–303.
- [53] A. Takahashi, Y. Amemiya, M. Nozaki, S.A. Sower, J. Joss, A. Gorbman, H. Kawauchi, Isolation and characterization of melanotropins from lamprey pituitary glands, *Int. J. Pept. Protein Res.* 46 (1995) 197–204.
- [54] A. Takahashi, H. Kawauchi, Diverse structures and functions of melanocortin endorphin and melanin-concentrating hormone in fish, in: Zaccane, G. Reinecke, M. Kapoor, B. G. (Eds.), *Fish Endocrinology*, Science Publisher, Enfield, 2006, pp. 325–392.
- [55] A. Takahashi, H. Kawauchi, Evolution of melanocortin systems in fish, *Gen. Comp. Endocrinol.* 148 (2006) 85–94.
- [56] A. Takahashi, Y. Kobayashi, M. Amano, T. Yamanome, Structural and functional diversity of proopiomelanocortin in fish with special reference to barfin flounder, *Peptides* 30 (2009) 1374–1382.
- [57] A. Takahashi, J. Kubota, H. Kawauchi, T. Hirano, Effects of N-terminal peptide of salmon proopiomelanocortin on interrenal function of the rainbow trout, *Gen. Comp. Endocrinol.* 58 (1985) 328–335.
- [58] T.N. Tran, J.N. Fryer, H.P.J. Bennett, M.C. Tonon, H. Vaudry, TRH stimulates the release of POMC-derived peptides from goldfish melanotropes, *Peptides* 10 (1989) 835–841.
- [59] A.L. van der Salm, J.R. Metz, S.E. Wendellar Bonga, G. Flik, Alpha-MSH the melanocortin-1 receptor and background adaptation in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*, *Gen. Comp. Endocrinol.* 144 (2005) 140–149.
- [60] S.E. Wendellar Bonga, The stress response in fish, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 591–625.
- [61] J.R. Woodgett, K.L. Gould, T. Hunter, Substrate specificity of protein kinase C. Use of the synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements, *Eur. J. Biochem.* 161 (1986) 177–184.
- [62] H. Yamada, R. Satoh, M. Ogoh, K. Takaji, Y. Fujimoto, T. Hakuba, H. Chiba, A. Kambegawa, M. Iwata, Circadian changes in serum concentrations of steroids in Japanese char *Salvelinus leucomaenis* at the stage of final maturation, *Zool. Sci.* 19 (2002) 891–898.
- [63] T. Yamanome, H. Chiba, A. Takahashi, Melanocyte-stimulating hormone facilitates hypermelanosis on blind side of barfin flounder, a pleuronectiform fish, *Aquaculture* 270 (2007) 505–511.

実験技術

分析対象の有機化合物の純度は大丈夫ですか？ 定量 NMR による絶対純度測定法の開発

杉本 直樹

要約：従来の手法では、有機化合物の絶対純度を簡単に測定することが困難であった。定量核磁気共鳴法（定量 NMR: quantitative NMR (qNMR)）は計量学的に信頼性の高い定量値または純度値を求めることができる強力なツールとして注目を集め始めている。

$^1\text{H-NMR}$ は、特に有機化合物の構造決定のための代表的な定性分析法の 1 つであり、これは官能基上の水素の数と信号強度が比例することを利用して、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上に観察される水素の数を示す信号強度は 10% を超えるばらつきがあり、有機化合物の精密な定量分析には不向きであるとされていた。しかし、近年、定性的な NMR 測定条件を全面的に定量用に最適化することで、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上の化合物の水素の信号強度は結合状態に依存せず分子構造が異なっても等モル量であれば等しく観察されることが見出された。この定量的な NMR 現象を利用することによって、qNMR は他の定量分析法に匹敵する不確かさ約 1% 以内の定量精度を実現した。さらに、これまでの定量分析技術の常識を覆し、たった 1 つの純度既知の基準物質を上位標準とするだけで無限の有機化合物の絶対量や絶対純度が国際単位系 (SI) にトレーサブルに求められるようになった。今後、qNMR は多分野の研究に関連する有機化合物の絶対純度決定法として応用がはじまり、得られた分析値や評価値の信頼性を間接的に裏付けるための必須の分析技術となると考えられる。本稿では、有機化合物の純度に関する SI トレーサビリティの重要性、qNMR の原理、市販標準品や試薬の絶対純度測定への応用例などを紹介する。

1. SI トレーサビリティの重要性

有機化合物の定量値だけではなく生理活性値などの

あらゆる分析値・評価値の信頼性だけでなく、近年のグローバル化に伴い、得られた分析結果に対する国際的な整合性も大きく問われるようになってきた。分析結果の信頼性・整合性を確保するために、繰り返し精度はもちろんのこと、さらにはバリデーションあるいはクロスチェックの実施が要求される。この際、分析・評価対象の有機化合物の標準品には純度が正確に値付けられていることが前提となっており、実際に、標準品あるいはその代用に用いられた市販試薬製品に表示された純度値や含量値の真否が具体的に問われることは通常まれである。仮に少しでも純度に疑義がある場合は同じロットの製品を用いることで純度の差異に由来する実験誤差を極力小さくし、その研究方法や実験系自体の再現性を確保しているのが現状である。従って、市販試薬や標準品の絶対的な純度や含量値の決定法に関しては、サイレントで大きな問題が残されたままである。

物質量の絶対値は、国際単位系 (International System of Units: SI) にトレーサブルな測定によって得られると定義されている。このような測定法は「一次標準測定法」と呼ばれている。「一次標準測定法」の資格を有する分析法は「一次直接法」と「一次比率法」に分類される。「一次直接法」は、「物質量の基準となる他の化学物質を用いず、自分自身で目的の化学物質の物質量を測れる方法 (絶対測定法)」であり、電量分析法、重量分析法および凝固点降下法がある。これらの分析法は物質量の絶対値が得られるが、分析できる物質の種類が限られる。一方、「一次比率法」は、「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」であり、すでに実用化されているものに滴定法および

キーワード：定量 NMR, qNMR, 純度, トレーサビリティ

国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

E-mail: nsugimot@nihs.go.jp 原稿受領日：2011 年 2 月 10 日, 依頼原稿

Title: How to determine the absolute purities of target organic compounds—Development of quantitative NMR (qNMR)

Author: Naoki Sugimoto

同位体希釈質量分析法があるが、こちらも分析できる物質の量が限られており、一般に分析の迅速性に欠ける。

市場に流通する「実用標準物質」は、「国家標準物質 (NMIJ CRM)」を介して同じ物質同士の校正の連鎖で SI トレーサビリティを確保している (計量標準供給制度 (JCSS: Japan Calibration Service System))。「国家標準物質」は SI にトレーサブルな方法である上述の「一次標準測定法」を利用して厳密に値付けを行っている。この「国家標準物質」を利用して「二次標準物質」、次いで「実用標準物質」を段階的に校正しつつ量的な拡大を行い、市場に要求される量を供給している (図 1 左)。この標準物質供給システムは必ず同じ物質の上位標準を 1 対 1 の関係で参照して SI へのトレーサビリティを確保している。従って、滞りなく段階的な校正が行われ、最終的に「実用標準物質」=「市販標準品」の関係が成り立ってれば、その純度値について疑うべき問題は全くない。しかしながら、現在、ケミカルアブストラクトには 5000 万以上の化合物が収録されており、分析・評価対象となり得る化合物が仮に 1000 分の 1 としても 5 万以上となり、これらすべてについて上位標準となる「国家標準物質」の作製がコスト面から到底実現できないことが想像できるだろう。一方、分析・評価対象となる有機化合物の標準品や試薬の供給について市場の要求は絶え間なくあるため、結果として、それぞれの試薬会社はその要求に応えるべく、各社独自の方法、たとえば、比吸光度あるいはクロマトグラム上で観察される主ピークの面積百分率などから純度や含量を品質保証の目的で値付けて供給している。すなわち、ほとんどの市販標準品や

試薬は、「国家標準物質」を上位標準とした標準物質供給システムで値付けされては供給されていない。従って、SI トレーサビリティの連鎖から完全に外れているため、極端に言えば、これらに表示された純度値を保証する根拠はないに等しいということになる。これが市販標準品や試薬の純度や含量値に関するサイレントで大きな問題である。

以上のことから、有機化合物の市販標準品や試薬の絶対純度の新規測定法の開発と SI トレーサビリティを確保した新たな標準物質供給システムの構築が要求されている。qNMR は「一次標準測定法」のうち、「一次比率法」の資格を原理的に有する簡便且つ迅速な分析法であると共に、これまでの標準物質供給システムを刷新する手法として国内外の研究機関および試薬会社より注目され始めている (図 1 右)。

2. 定量 NMR (quantitative NMR: qNMR) の原理 (1, 2)

有機化合物は炭素、水素、酸素などが共有結合した分子である。異なる分子構造で異なる物性値を持つ分子であっても、構成する最小単位の同種の原子同士は等価である。qNMR は、この原子レベルの比較分析である。定量用に最適化された ^1H -NMR では、化学シフトの異なる各シグナルの面積比は、分子上の各炭素に結合した水素原子の数の比に対応し、測定対象の化合物の分子構造に関わらず、すべて水素原子が定量的な信号として観測される。このことから、化合物 A の特定の置換基上の水素のシグナル面積 (I_A) は、置換基上の水素の数 (H_A) × 化合物 A のモル濃度 (m_A) として観測される (式 1 の分子)。別の分子構造の化合

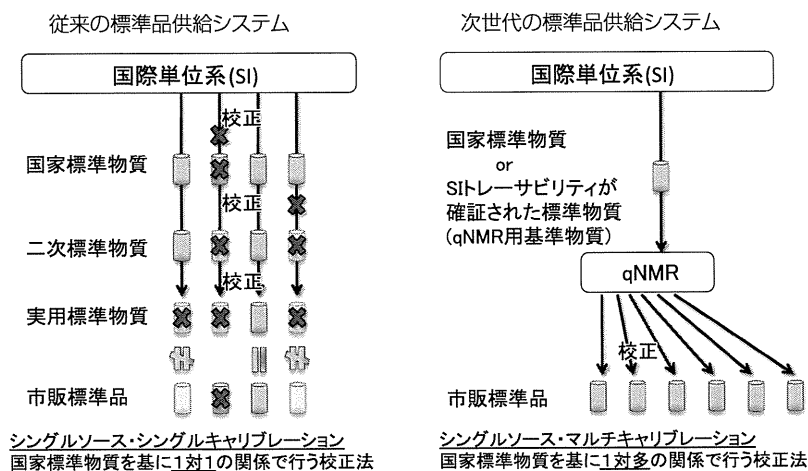


図 1 従来の標準物質供給システムと qNMR による SI トレーサビリティ体系の再構築
qNMR では、原理的に 1 つの上位標準を介した校正により、無限の有機化合物の市販標準品の純度を評価・供給することが可能。

物 B の特定の置換基上の水素のシグナル面積 (I_B) についても同様な関係式が当然成り立つ (式 1 の分母)。よって、2 つのシグナルが異なる化合物 (A, B) に由来する場合には個々のシグナル面積と化合物のモル濃度は式 1 の関係式で表すことができる。さらに純度が明らかな化合物を基準物質として用いれば、モル比と溶液の調製値の関係からあらゆる測定対象の有機化合物の純度を決定できる式 2 の関係式が成り立つ。qNMR は、式 2 を利用した分析技術である。従って、式 2 からわかるように「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」であり、前述の「一次標準測定法」のうち「一次比率法」の資格を有する測定法であると言える (図 1 右)。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad (\text{式 1})$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}}{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}} \times P_{\text{std}} \quad (\text{式 2})$$

I = シグナル面積, H = 特定基のプロトン数,

m = モル濃度, W = 重量, M = 分子量, P = 純度%,
sample = 測定対象の有機化合物, std = 基準物質。

測定対象の有機化合物の純度値の SI へのトレーサビリティの確保のために、基準物質は測定対象とは別の計量学的に正確に値付けられた上位標準である必要がある。いくつかの有機化合物が上位標準の候補として既に報告されていたが、測定対象の有機化合物のシ

グナルが重ならないことや重溶媒に対する溶解性等、測定対象毎に測定条件を考慮する必要がある点で汎用性が乏しく、これが qNMR の有効利用を妨げる最大の弱点となっていた。そこで、計量学的に正確に純度が値付けられ SI トレーサビリティ源として使用可能である 2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸- d_6 ナトリウム塩 (DSS- d_6) (水系用) および 1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン- d_4 (1,4-BTMSB- d_4) (非水系用) が qNMR 用の基準物質として新たに開発された。DSS- d_6 と 1,4-BTMSB- d_4 は、テトラメチルシラン (TMS) と同様に 0 ppm 付近にシグナルを示すため、測定対象の有機化合物のシグナルと重なってしまうことや溶解性等をほとんど考慮することも必要としない。さらに、これらを qNMR 用の基準物質として設定することで qNMR スペクトルは通常の構造解析用のスペクトルとしても利用することが可能となり、汎用性と利便性が大幅に改善されている。図 2 に、qNMR による絶対純度測定法の実際の手順を示した。基準物質と分析対象化合物を精密に秤取り混合したものを qNMR 最適条件下で測定し、qNMR スペクトル上に観察される両者のシグナル面積を求め、式 2 に化合物情報等を代入して絶対純度を算出する。得られる測定値は高い再現性を示し、不確かさは概ね 1% 以内であり、1 測定当たりの所要時間は約 10~20 分である。

また、本稿が掲載される時点では、qNMR 測定条件、自動解析ソフトウェアおよび qNMR 基準物質等の配

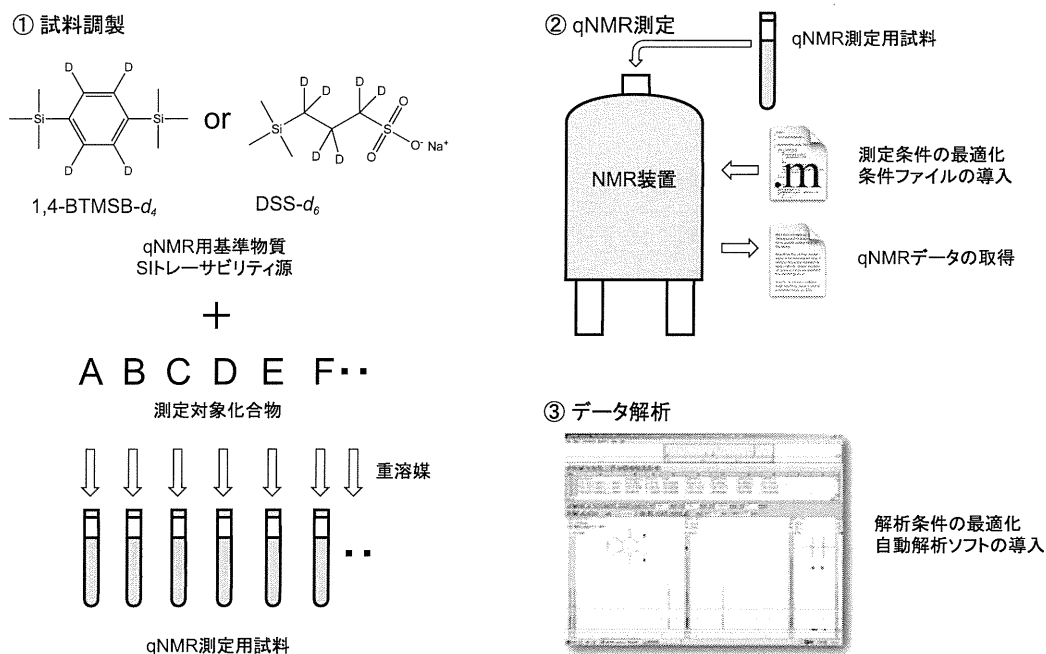


図 2 SI トレーサビリティを確保した qNMR による絶対純度測定法の実際の手順

布が開始され、これまでの「一次標準測定法」とは一線を画した1つの純度既知の基準物質を参照するだけで無限の有機化合物の絶対量や絶対純度がSIにトレーサブルに簡便かつ迅速に求められる、すなわち、「1対多型校正技術」による標準物質供給システムが実用化されていると思われる(図1右)。

3. qNMR の応用例(3-6)

有機リン系農薬の1つであるイソキサチオンオキソン(IXO)の市販標準品の絶対純度決定への応用例を示す。冷蔵保存しておいた残留農薬試験用IXO標準品2ロットについて、qNMR測定を行い、IXOの各置換基と基準物質(ここではヘキサメチルジシラン:HMD)のシグナル面積比より絶対純度を求めた。その結果、ロット1とロット2の純度値は大きく異なり、ロット1が75.4%、ロット2が98.5%であり、ロット1については試薬会社の表示値と大きく異なった。ロット1のqNMRスペクトル上にはIXOのシグナル以外に分解物に由来するいくつかのシグナルが観察され、保存中の分解によって絶対純度の低下が引き起こされたと考えられるものであった(図3)。従って、市販標準品として入手したものであっても、保存状態等により、その絶対純度と品質はロット毎に変化することが示唆された。食品残留農薬のポジティブリスト制度の導入により、国内外で流通する農薬が規制の対象となり、食品の安全性と直結する残留農薬試験には高い分析精度が求められている。qNMRはこれらの残留農

薬試験用標準品について絶対純度を付加できるだけでなく、日常的な品質管理に応用可能であり、科学的根拠に基づいた分析値の信頼性の確保にも重要であると言える。

次に、天然有機化合物の市販試薬、標準品および単離精製品の絶対純度測定に応用例を示す。カルミン酸(CA)は天然由来の赤色素で主に着色料に用いられている。試薬会社により純度値が>70%および>95%とラベル表示されたCA市販試薬A、Bを入手し、qNMRにより絶対純度を求めたところ、それぞれ21.3%および78.3%であった。CA市販試薬のラベル表示値が、試薬会社が独自の品質保証の目的でLC法または吸光度法により値付けただけであり、絶対量を示すものではないことが明らかとなった。また、代表的なフラボノイドであるクエルセチンやルチンの市販試薬各社製品について絶対純度を求めたところ、クエルセチン市販試薬製品については86.0%~92.9%(無水物として換算)、ルチン市販試薬製品については71.0%~90.2%(無水物として換算)と試薬製品によって大きく異なることが明らかとなった。これらの結果は、qNMRが天然物化学の分野で最も古くからある問題であった天然有機化合物の純度の問題を、根本的に解決する計量学的に正確な絶対純度測定法あるいは絶対定量法として有望であることを示している。

今後、qNMRは日本薬局方などの公定書や公定法に収載される分析用標準品の絶対純度決定にも応用可能であると考えられる。なぜなら、規格値や基準値など

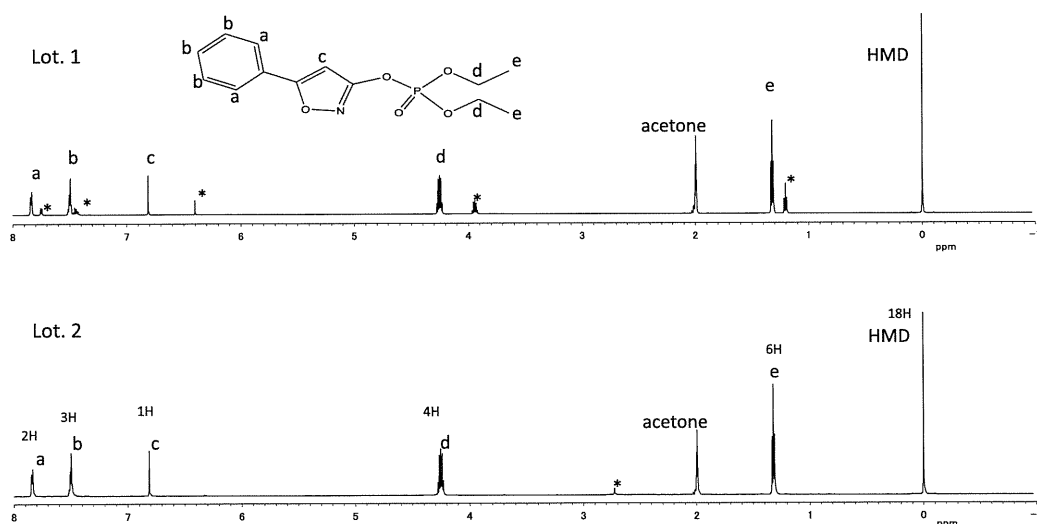


図3 残留農薬試験用イソキサチオンオキソン (IXO) 標準品(ロット1,2)のqNMRスペクトル
qNMR用に測定条件を最適化したJNM-ECA(600MHz)を用いた。重溶媒=アセトン- d_6 。基準物質=ヘキサメチルジシラン(HMD)($C_6H_{18}Si_2$)。HMDとIXOのa~eのシグナル強度比より絶対純度を算出した。a~eは各シグナルの帰属。*は分解物または不純物に由来するシグナル。

の定量精度を確保するためには分析用標品となる試薬や標準品の絶対純度が科学的根拠に基づいて求められているべきであるからである。たとえば、生薬および漢方処方エキスの各条規格などにその応用が有望視されている。生薬および漢方処方エキスの各条規格では、便宜上その時点で市販されている、あるいは市販可能な試薬について規格を試薬・試液の項で定め、その物質を分析用標品として、生薬および漢方処方エキス中の指標成分の定量法（成分含量測定法）と定量規格を規定している。しかし、天然由来の有機化合物は化学合成が困難であり、多くの場合、天然素材より単離精製したものに試薬会社独自の方法により純度の値付けがなされ、市販試薬あるいは標準品として流通している。これらは、原料、抽出方法、単離精製工程の差異により、共存する不純物組成やロット間の絶対純度の変動が化学合成された化合物に比べて大きいと予想され、これが結果として科学的根拠に基づいた生薬類の規格設定のボトルネックになっている。そこでこの問題を解消すべく、生薬に関連する日本薬局方の試薬、市販標準品や研究者が天然素材よりクロマトグラフィーにより単離精製した数種の天然有機化合物についてqNMRによる絶対純度測定を試みたところ、一定の評価ルールの下、これらの絶対純度が規格化できることが明らかとなってきている。

なお、本稿で示した応用例では、qNMRの技術開発を開始した当初、SIトレーサビリティ源となるDSS- d_6 と1,4-BTMSB- d_4 が開発段階であり、市場に流通していなかったため、qNMRによって得られる定量値のSIへのトレーサビリティは、認証標準物質（certified reference material: CRM）であるフタル酸水素カリウム（PHP）またはジエチルフタレート（DEP）を一次標準（上位標準）として用い、qNMR溶液中のDSS- d_6 またはHMDの濃度を校正した後に、これらを二次標準として測定対象化合物のqNMR測定を行う2段階の方式で実現していることをご了承いただきたい。

おわりに

計量学的に正確に純度が値付けられた標準品（標準物質）の供給・入手が今なお困難であることには変わりはない。分析・評価対象の標準物質が入手できない場合には、市販試薬や単離精製品を代用とすることが定法となっている。しかし、これらの純度の誤差が得られた結果に大きな影響を与えているのは紛れもなく事実である。qNMRは、SIにトレーサブルな1つの上位標準を参照して無限の数の有機化合物の絶対純度あるいは絶対量を正確に算出可能であることから、有機化合物の純度の問題を根本的に解決する方法として注目されている。また、「実用標準物質」の供給体系も根本的に刷新することができる。実際に国内外の試薬会社や標準物質を扱う研究機関において、本稿で述べたqNMRの導入が開始されており、計量学的に正確に値付けられたアミノ酸や農薬の市販標準品の供給体制が整いつつある。また、天然有機化合物、環境汚染物の市販標準品の供給も予定されており、多分野における標準物質の供給が期待されている。今後、SIトレーサビリティの確保は、分析・評価結果の信頼性に関して重要な「鍵」となることは間違いない。qNMRはその「鍵」を迅速かつ簡便に提供することから、分析化学者だけでなく生化学者による応用を強く期待したい。薬物や化合物の純度の正確な評価は、薬理学的生物効果の正確な評価体制の構築にも貢献するであろう。

文 献

- 1) Ihara T, et al. *Synthesiology*. 2009;2:13-24.
- 2) 杉本直樹, 他. *FFIジャーナル*. 2010;215:129-136.
- 3) 田原麻衣子, 他. *日食化誌*. 2009;16:28-33.
- 4) 杉本直樹, 他. *食衛誌*. 2010;51:19-27.
- 5) 多田敦子, 他. *食衛誌*. 2010;51:205-212.
- 6) 細江潤子, 他. *医薬品医療器レギュラトリーサイエンス*. 2010;41:960-970.

— 原 著 —

金沢市内における大気粉塵中多環芳香族炭化水素類および

ニトロ多環芳香族炭化水素類の最近 12 年間の変遷

濱 寛貴^{1*}, 徳田 貴裕², 伊崎 陽彦², 大野 友子¹, 渡辺 有梨¹,神田 哲雄¹, 唐 寧^{1,3}, 亀田 貴之¹, 鳥羽 陽¹, 早川 和一¹Variation in polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons
in airborne particulates collected in urban Kanazawa, Japan, in last 12 yearsHirotaka Hama^{1*}, Takahiro Tokuda², Akihiko Izaki², Tomoko Ohno¹, Yuri Watanabe¹,
Tetsuo Kanda¹, Ning Tang^{1,3}, Takayuki Kameda¹, Akira Toriba¹, Kazuichi Hayakawa¹

1 Faculty of Pharmaceutical Sciences/Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University

2 Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

3 Department of Public Health, Hyogo College of Medicine

Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan

*Corresponding author: (E-mail) cris@stu.kanazawa-u.ac.jp

Airborne particulates were collected at a roadside site in Kanazawa, Japan, in the summer and winter, 1999, 2004/2005, 2007/2008 and 2010. The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) were determined by HPLC with fluorescence and chemiluminescence detections, respectively. The total concentration of six PAHs (pyrene, benzo[*a*]anthracene, chrysene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene and benzo[*a*]pyrene) decreased by the factor of 63.9% in the winter and 75.6% in the summer from 1999 to 2010. The total concentration of seven NPAHs (1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrenes, 1-nitropyrene, 6-nitrochrysene, 7-nitrobenzo[*a*]anthracene and 6-nitrobenzo[*a*]pyrene) significantly decreased by the factor of 88.0% in the winter and 89.2% in the summer during the same period. The concentration ratio of 1-nitropyrene to pyrene also significantly decreased in this period, suggesting a decrease in the emission amount. As the main reason for the significant decrease in the PAHs and NPAHs, the regulation of exhaust gas/particulates from automobiles was considered.

Key words : Polycyclic aromatic hydrocarbon, nitropolycyclic aromatic hydrocarbon, urban air, Kanazawa, automobile

1. はじめに

大気中に存在する様々な化学物質の中に、多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon; PAH) とニトロ多環芳香族炭化水素 (nitropolycyclic aromatic hydrocarbon; NPAH) がある。これらの中には強い発がん性、変異原性をもつものがある (国際がん研究機関 (IARC), 2010)。IARC でグループ 1 に分類されている benzo[*a*]pyrene (BaP) に関しては、これまでその活性代謝物が DNA に結合することにより、発がん性を示すと考えられていたが、最近では、そのフリーラジカル生成能による発がん性も疑われている (Kim et al., 1997)。また、1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrenes (DNPs) や 1-nitropyrene (1-NP) は強い直接変異原性をもつ (Ames et al., 1975; Epstein et al., 1979)。したがって、これら PAH、NPAH の大気中濃度を測定し、監視することは極めて重要である。

PAH、NPAH は主に石炭、石油等の化石燃料の燃焼によって生じる。我が国の都市大気中 PAH、NPAH の主な発生源として自動車、工場、焼却炉、石油暖房器具などが考えられている。NPAH には一次生成するものと二次生成するものがあり、一次生成する NPAH としては 1,3-, 1,6-, 1,8-DNPs、1-NP、6-nitrochrysene (6-NC)、7-nitrobenzo[*a*]anthracene (7-NBaA)、6-nitrobenzo[*a*]pyrene (6-NBaP) などがある。これらは、PAH が NO₂ の存在下で求電子反応を受けることで生成し (Nielson et al., 1984)、我が国の都市域における主な発生源はこれまでディーゼル車であることが明らかになっている (Hayakawa et al., 1994; Murahashi et al., 1995)。一方、二次生成する NPAH としては 2-nitropyrene (2-NP) や 2-nitrofluoranthene (2-NFR) が知られており、これらは OH ラジカルとの反応が引き金となって大気中で生成する (Pitts et al., 1985)。

大気中に存在するこれら PAH、NPAH は蒸気圧や気温によ

って、ガス相または粒子相に存在する。通常の気温であれば、2,3環のPAHはガス相、5環以上のPAHは粒子相に存在し、4環PAHは温度が下がるほど粒子相への分布割合が増す(Yamasaki et al., 1982)。一方、DNP_s、1-NPは4環ではあるが、そのほとんどが粒子相に存在する(Araki et al., 1983)。

著者が所属する研究室では、金沢市の市街地幹線道路脇にある自動車排ガス測定局において大気粉塵のサンプリングを1999年、2004年度、2007年度および2010年の夏と冬に行い、PAHおよびNPAHの濃度測定を行ってきた。大都市地域では自動車NO_x・PM法により窒素酸化物(NO_x)や粒子状物質(PM)の濃度が下がり、大気質の改善がみられるようになってきた(環境省, 2011)。また、我が国では新車に対する規制が段階的に強化されてきた(国土交通省, 2011)。しかし、こうした対策が我が国の都市沿道大気中のPAH、NPAH濃度のように影響を及ぼしたかは、十分な解析が行われていない。そこで、本研究では上記期間中に捕集した沿道大気粉塵中のPAH、NPAH濃度を測定し、その変遷と要因を明らかにした。

2. 実験

2.1 大気粉塵のサンプリング

大気粉塵のサンプリング地点は幹線道路(国道8号)沿いでその上を北陸自動車道が通る金沢市藤江自動車排ガス測定局で行った。捕集期間は1999年1月26日~30日、2月1日の毎日(n=6)、1999年7月26日~27日、7月29日~8月1日の毎日(n=6)、2004年8月2日~8日、8月11日~8月15日の毎日(n=12)、2005年2月7日~20日の毎日(n=14)、2007年7月24日~8月5日の隔日1日(n=7)、2008年1月21日~2月3日の隔日(n=7)、2010年2月16日~2月22日の毎日(n=7)、2010年8月2日、4~8日の毎日および8月10日(n=7)である。以下の記載では、1~2月の捕集日は冬、7~8月の捕集日は夏にグループ化した。大気粉塵はハイボリュームエアサンプラー(123VL型、紀本電子工業株式会社)を用い、1,000 L min⁻¹の流速で石英繊維フィルター(2500QAT-UP、8×10 inch、PALLFLEX)上に24 hr捕集した。フィルターは毎日交換した。

2.2 試薬

米国環境保護庁610 PAH Mixおよび1,3-,1,6-DNP_s、1-NP、2-fluoro-7-nitrofluorene (FNF)はシグマアルドリッチジャパン(大阪)から購入した。Pyrene (Pyr)及びBaPの重水素化体であるPyr-*d*₁₀及びBaP-*d*₁₂は和光純薬工業株式会社(大阪)から購入した。1,8-DNP、6-NC、7-NBaA、6-NBaPはChrion AS(トロンハイム、ノルウェー)から購入した。

2.3 捕集フィルターの処理

フィルターの前処理は著者らの研究グループの既報(Hayakawa et al., 2011)に従った。大気粉塵を捕集したフィルターは細切して三角フラスコにいれ、回収率補正ならびに

定量のために内標準物質としてPAH分析にはPyr-*d*₁₀、BaP-*d*₁₂、NPAH分析にはFNFを加えた。さらにベンゼン/エタノール(3:1, v/v) 40 mLを加えて超音波処理を行い、得られた抽出液を5%水酸化ナトリウム水溶液80 mL、20%硫酸80 mLでそれぞれ1回ずつ洗浄し、最後に超純水80 mLで2回洗浄した。有機溶媒相にジメチルスルホキシドを100 μL加えて減圧し、ベンゼン層を留去した。残渣にエタノールを900 μL加え、メンブランフィルター(HLC-DISK3、直径3 mm、孔径0.45 μm、関東化学、東京)でろ過して、HPLC分析用の検液とした。

2.4 PAHおよびNPAHの分析

PAHはHPLC-蛍光検出法により分析を行った。分析システムは島津製作所製の2台のポンプ(LC-10AD)、オートインジェクター(SIL-10A)、デガッサー(DGU-14A)、カラムオーブン(CTO-10AS VP)、蛍光検出器(RF-10A XL)、システムコントローラー(SCL-10A)およびインテグレータ(CR-7Ae plus)で構成した。これに、ガードカラム(4.0 i.d. × 10 mm、5 μm、Inertsil ODS-P、ジーエルサイエンス)および分離カラム(4.6 i.d. × 250 mm、5 μm、Inertsil ODS-P、ジーエルサイエンス)を導入した。移動相はアセトニトリルと水の混液を用い、流速1 mL min⁻¹で、濃度グラジエント方式で流した。蛍光検出器は各PAHの最適励起波長と蛍光波長に設定し、タイムプログラムを用いてPAHを測定した。その他の条件は著者らの研究グループの既報(Toriba et al., 2003)に従った。Pyr、benz[a]anthracene (BaA)、chrysene (Chr)、benzo[b]fluoranthene (BbF)、benzo[k]fluoranthene (BkF)、BaPの回収率は91~106%、繰り返し精度(RSD、n=5)は0.31~1.9%、検出限界値(S/N=3)は7.9~43 fmol/注入であった。

NPAHは、著者らの研究グループが開発したHPLC-化学発光検出法により分析を行った(Hayakawa et al., 1991; Tang et al., 2003)。分析システムはいずれも島津製作所製の5台のポンプ(LC-20AD)、オートインジェクター(SIL-20A)、デガッサー(DGU-20A_s)、2台のカラムオーブン(還元カラム用; CTO-10A、分離カラム用; CTO-20AC)、化学発光検出器(CLD-10A)、システムコントローラー(CBM-20A)、インテグレータ(LCsolution)で構成した。更にガードカラム1(4.6 i.d. × 30 mm、5 μm、Spheri-5 RP-18、PerkinElmer)、ガードカラム2(6.0 i.d. × 10 mm、5 μm、ODP-50G 6A Shodex Asahipak、昭和電工)、クリーンアップカラム(4.6 i.d. × 150 mm、5 μm、Cosmosil 5C18-MS-II、ナカライテスク)、Pt/Rh還元カラム(4.0 i.d. × 10 mm、ニトロアレーン還元カラム、島津製作所)、濃縮カラム(4.6 i.d. × 30 mm、5 μm、Spheri-5 RP-18、PerkinElmer)、分離カラム(4.6 i.d. × (250+150) mm、5 μm、Cosmosil 5C18-MS-II、ナカライテスク)を用いた。クリーンアップカラムとPt/Rh還元カラム用の移動相として、75%エタノール-酢酸緩衝液(pH 5.5)を流速0.3 mL min⁻¹で流した。濃縮カラム用移動相として、30 mMアスコルビン酸溶液を流速1.8 mL min⁻¹で流し、クリーンアップカラム溶出

Table 1 Variation of PAH and NPAH concentrations in Kanazawa (Fujie).

Compound	1999				2004/2005			
	summer(n = 6)		winter(n = 6)		summer(n = 12)		winter(n = 14)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
TSP	33.6 ± 2.3		49.7 ± 30.6		31.4 ± 8.6		30.2 ± 13.2	
PAHs								
Pyr	1.22 ± 0.26		2.20 ± 0.74		0.804 ± 0.385		0.927 ± 0.630	
BaA	0.701 ± 0.154		1.77 ± 0.69		0.449 ± 0.218		0.753 ± 0.344	
Chr	0.957 ± 0.188		2.74 ± 0.81		0.733 ± 0.324		1.17 ± 0.47	
BbF	1.64 ± 0.28		2.72 ± 0.82		1.55 ± 0.94		1.01 ± 0.41	
BkF	0.590 ± 0.118		1.16 ± 0.36		0.833 ± 0.617		0.540 ± 0.226	
BaP	1.12 ± 0.29		1.65 ± 0.70		0.562 ± 0.143		0.974 ± 0.520	
Total	6.24 ± 0.97		12.2 ± 3.95		4.93 ± 1.60		5.37 ± 2.30	
NPAHs								
1,6-DNP	2.04 ± 1.05		3.20 ± 0.60		0.748 ± 0.559		0.669 ± 0.372	
1,8-DNP	2.41 ± 1.47		2.20 ± 0.68		3.19 ± 2.09		1.81 ± 2.37	
1,3-DNP	1.41 ± 0.57		4.53 ± 1.41		0.602 ± 0.311		0.552 ± 0.220	
1-NP	176 ± 44		424 ± 186		101 ± 52		101 ± 44	
6-NC	93.3 ± 15.4		55.3 ± 16.5		41.0 ± 20.5		29.3 ± 12.1	
7-NBaA	9.10 ± 1.89		20.2 ± 10.8		0.900 ± 0.994		6.57 ± 7.10	
6-NBaP	47.5 ± 15.5		43.7 ± 18.0		5.50 ± 2.30		12.1 ± 4.8	
Total	331 ± 61		553 ± 172		153 ± 76		152 ± 59	

Compound	2007/2008				2010			
	summer(n = 7)		winter(n = 7)		summer(n = 7)		winter(n = 7)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
TSP	39.1 ± 13.9		24.0 ± 8.20		29.5 ± 5.1		27.6 ± 6.1	
PAHs								
Pyr	0.526 ± 0.122		1.66 ± 0.53		0.395 ± 0.093		1.51 ± 0.54	
BaA	0.255 ± 0.064		0.835 ± 0.125		0.167 ± 0.049		0.431 ± 0.152	
Chr	0.400 ± 0.095		1.51 ± 0.18		0.306 ± 0.084		1.02 ± 0.19	
BbF	0.417 ± 0.108		1.33 ± 0.20		0.309 ± 0.052		0.785 ± 0.173	
BkF	0.160 ± 0.036		0.594 ± 0.089		0.126 ± 0.024		0.305 ± 0.064	
BaP	0.243 ± 0.044		0.673 ± 0.089		0.220 ± 0.054		0.363 ± 0.114	
Total	2.00 ± 0.38		6.60 ± 0.76		1.52 ± 0.32		4.41 ± 1.13	
NPAHs								
1,6-DNP	0.200 ± 0.140		0.478 ± 0.128		0.815 ± 0.918		0.234 ± 0.102	
1,8-DNP	0.248 ± 0.175		0.256 ± 0.071		0.577 ± 0.362		0.586 ± 0.209	
1,3-DNP	0.283 ± 0.168		0.253 ± 0.063		0.482 ± 0.264		0.247 ± 0.066	
1-NP	41.5 ± 14.7		51.1 ± 9.1		15.3 ± 5.2		43.3 ± 15.1	
6-NC	16.7 ± 5.7		21.0 ± 3.4		14.9 ± 4.3		15.8 ± 8.4	
7-NBaA	3.04 ± 1.97		17.3 ± 11.2		1.99 ± 4.57		3.23 ± 4.99	
6-NBaP	2.48 ± 0.51		4.29 ± 1.04		1.83 ± 1.12		2.91 ± 1.27	
Total	64.5 ± 22.2		94.7 ± 15.8		35.8 ± 10.2		66.3 ± 25.0	

Units: $\mu\text{g m}^{-3}$ (TSP), pmol m^{-3} (PAH), fmol m^{-3} (NPAH)

PAH Total = Pyr + BaA + Chr + BbF + BkF + BaP

NPAH Total = DNPs + 1-NP + 6-NC + 7-NBaA + 6-NBaP

液と混合した。分離カラム用移動相として、アセトニトリルと 10 mM イミダゾール緩衝液 (pH 7.6) をそれぞれ流速 0.5 mL min^{-1} で混合して流した。化学発光試薬として、アセトニトリルに別々に溶解した 0.04 mM bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate と 30 mM H_2O_2 をそれぞれ流速 0.5 mL min^{-1} で流して混合した。1,3-, 1,6-, 1,8-DNP、1-NP、6-NC、7-NBaP、6-NBaP の回収率は 93~105%、繰り返し精度 (RSD, n = 5) は 1.3~2.7%、

検出限界値 (S/N=3) は 0.27~11 fmol/注入 であった。なお、濃度が定量限界値以下になった場合は、その 1/2 の値とした。

3. 結果

サンプリング地点における最近 12 年間の全浮遊粒子状物質 (total suspended particulate; TSP) 濃度の変遷を Fig. 1 に示す。夏は顕著な変化が見られなかったが、冬についてはエラーバ

一が大きいため有意ではないが、平均値だけみれば 44.4% ($49.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ から $27.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$) 減少した。

最近 12 年間の変化を追跡するために、共通の分析対象化合物として、PAH は 4 環の Pyr, BaA, Chr, 5 環の BbF, BkF および BaP, NPAH は 1,3-, 1,6-, 1,8-DNPs, 1-NP, 6-NC, 7-NBaA および 6-NBaP を選んだ。各 PAH, NPAH の種類別濃度の変遷を季節別に Table 1 に示す。PAH, NPAH 共に、概ね冬の方が夏より濃度が高かったが、この傾向はこれまでの金沢市の大気中 PAH, NPAH についてなされた報告 (Murahashi et al., 1995; Kakimoto et al., 2000; Hayakawa et al., 2002; Tang et al., 2002) と一致している。冬の方が高濃度となる要因の一つとして、地表面の大気が冬季に比較的安定しているために、拡散しにくいことが挙げられる。

PAH 濃度 (Fig. 2) は 2008 年冬に上昇がみられたが、両季節共に概ね減少傾向であった。冬はこの期間に 63.9% ($12.2 \text{ pmol}/\text{m}^3$ から $4.41 \text{ pmol}/\text{m}^3$)、夏は 75.6% ($6.24 \text{ pmol}/\text{m}^3$ から $1.52 \text{ pmol}/\text{m}^3$) 減少した。各 PAH の種類別の割合を Fig. 3 に示したが、いずれの季節でも 4 環 PAH, 特に Pyr の割合が増加し、5 環 PAH の割合は減少傾向が見られた。

NPAH 濃度 (Fig. 4) は最近 12 年間に冬 88.0% ($553 \text{ fmol}/\text{m}^3$ から $66.3 \text{ fmol}/\text{m}^3$)、夏 89.2% ($331 \text{ fmol}/\text{m}^3$ から $35.8 \text{ fmol}/\text{m}^3$) 減少し、TSP や PAH に比較して大幅な減少が見られた。NPAH の種類別の割合を Fig. 5 に示したが、サンプリングした年と季節によらず 1-NP が大きな割合を占めた。

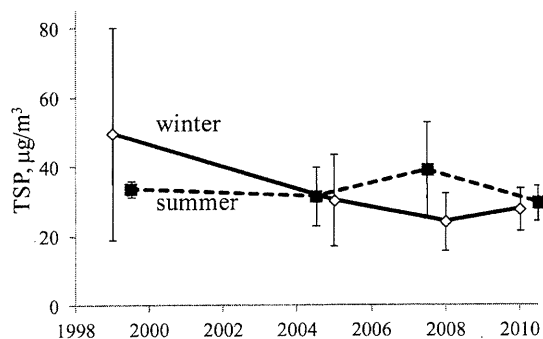


Fig. 1 Variations of TSP concentrations in Kanazawa (Fujie).

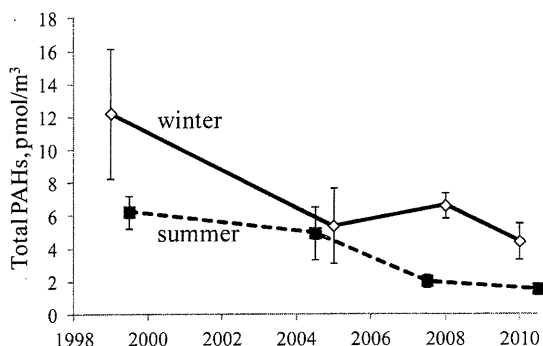


Fig. 2 Variations of Total PAH concentrations in Kanazawa (Fujie).

Total PAHs = [Pyr] + [BaA] + [Chr] + [BbF] + [BkF] + [BaP]

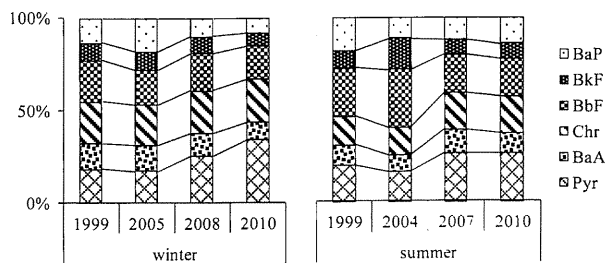


Fig. 3 The ratio of each PAH in Kanazawa (Fujie).

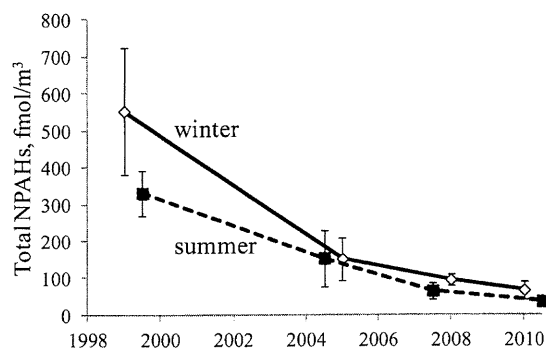


Fig. 4 Variations of Total NPAH concentrations in Kanazawa (Fujie).

Total NPAHs = [DNPs] + [1-NP] + [6-NC] + [7-NBaA] + [6-NBaP]

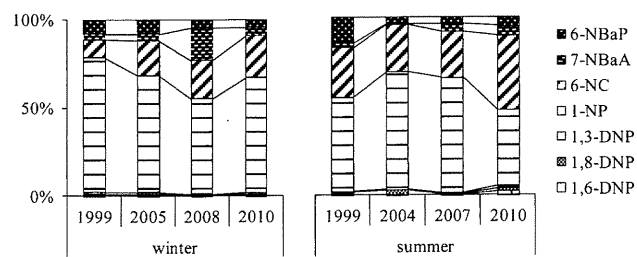


Fig. 5 The ratio of each NPAH in Kanazawa (Fujie).

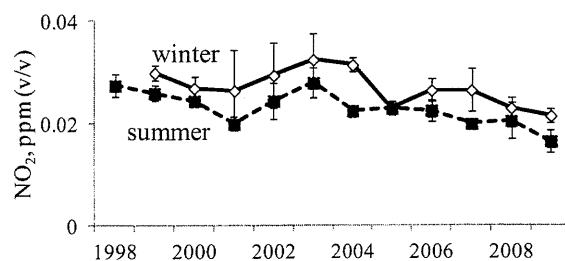


Fig. 6 Variations of NO_2 concentrations in Kanazawa (Fujie).

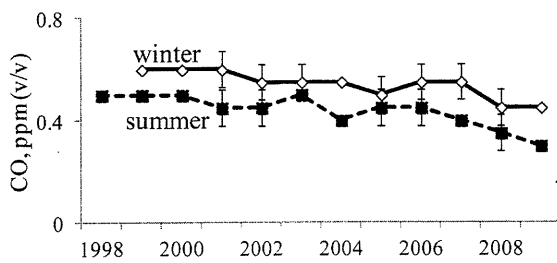


Fig. 7 Variations of CO concentrations in Kanazawa (Fujie).

藤江自動車排出ガス測定局における NO₂ 濃度、CO 濃度の推移をそれぞれ Fig. 6、Fig. 7 に示す。冬は 1~2 月の平均値、夏は 7~8 月の平均値を用いた。主要発生源がディーゼル車といわれる大気中 NO₂ は最近 11 年間の濃度推移を見ると、冬は 28.3%、夏は 36.5% 減少した。また、主要排出源が自動車といわれる大気中 CO は、同じ 11 年間に冬 25%、夏 40% 減少した。NO₂ と CO も夏より冬の濃度が高かった。以上の結果より、最近 12 年間に金沢市市街地沿道大気中の PAH、NPAH は、TSP、NO₂、CO より顕著に濃度が減少したことが明らかになった。

4. 考察

上述した大気中 PAH、NPAH 濃度の顕著な減少の理由を明らかにするため、気象（気温）、交通量、燃料および自動車排ガスの変化を順に考察した。

まず、PAH、NPAH のガス相と粒子相の分布比は気温の影響を受ける。しかし、サンプリングをした両季節の気温は 1999 年から 2010 年までの 12 年間にほぼ横ばいであった (Fig. 8 (気象庁 HP の公開データより作成、冬は 1~2 月の平均値、夏は 7~8 月の平均値))。したがって、気温が上昇したために PAH、NPAH の大半がガス相に移行し、粒子相中の PAH、NPAH 濃度の低下につながったとは考えられない。

かつて粉塵排出量はガソリン車よりディーゼル車の方が 30~100 倍多かったことから、1990 年代の我が国の都市大気中 1-NP の排出源は主にディーゼル車と報告されている (Murahashi et al., 1995)。また、燃焼温度に依存して PAH のニトロ化が促進するため、粉塵中の 1-NP と Pyr の濃度比 ([1-NP]/[Pyr]) は大きくなることが知られている。例えば、燃焼温度が高いディーゼル車 (2,500°C 以上) 排出粉塵の [1-NP]/[Pyr] 値は 0.36、燃焼温度が低い石炭ストーブ (約 1,100°C) 排出粉塵の値は 0.001 と報告されている (Tang et al., 2005)。そこで、Table 1 より算出した [1-NP]/[Pyr] 値の推移を Fig. 9 に示す。夏は 0.14 から 0.04、冬は 0.19 から 0.03 というずれの季節でも最近 12 年間に [1-NP]/[Pyr] 値が顕著に減少したことが明らかになった。夏の値が冬より概ね大きかった理由の一つとして、夏は気温が高いため比較的蒸気圧が高く、Pyr のガス相への移行が増し、粒子相中の Pyr 濃度が低下したことが考えられる。しかし、最近 12 年間の減少は、季節間差を

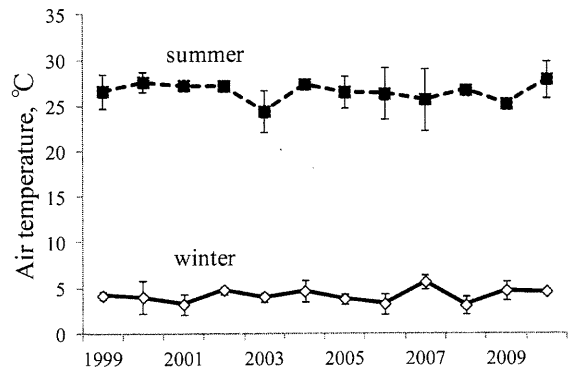


Fig. 8 Average air temperature of summer and winter in Kanazawa.

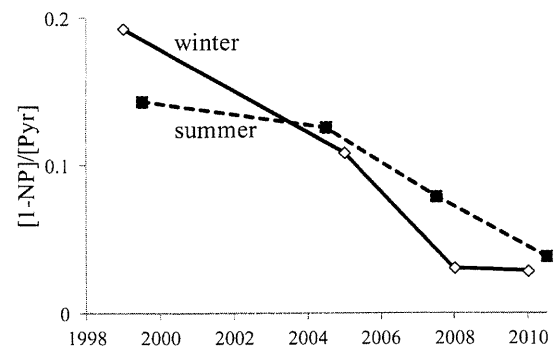


Fig. 9 Variation of [1-NP]/[Pyr] ratio in Kanazawa (Fujie).

大きく変えている。サンプリング地点の金沢市藤江自排局は、近くに石炭を燃焼するような施設はない。しかも、最近 12 年間の Pyr 濃度は顕著に減少した (Fig. 2)。したがって、この期間の [1-NP]/[Pyr] 値の減少は、石炭燃焼が増加したためとは考えられない。

金沢市の自動車登録台数 (Fig. 10) (金沢市, 2011) は、データを入手できた 2000 年から 2009 年までの 9 年間に 306,789 台から 323,296 台に 5.4% 増加したが、この増加の主体は軽自動車 (Light cars) である。一方、その多くがディーゼルエンジンを搭載していると思われる貨物用自動車 (Trucks)、乗合用自動車 (Buses) は微減している。また、サンプリング地点における交通量はデータを入手できた 2004 年と 2010 年とでほとんど変化しなかった (夏: 2004 年 8 月 2~15 日の平均値 13637 台、2010 年 8 月 2~15 日の平均値 15023 台、冬: 2005 年 2 月 7~20 日の平均値 9263 台、冬: 2010 年 2 月 10~23 日の平均値 9172 台)。よって、交通量の減少が上述の PAH、NPAH 濃度の減少の原因とは考えられない。以上のことから、上述の [1-NP]/[Pyr] 値の顕著な低下は、自動車からの 1-NP 排出量自体の減少、即ち排出源としての自動車の寄与が減少したことを示している。

大気中の PAH、NPAH 濃度が共に大幅に減少した (Fig. 2 および Fig. 4) 理由として、第一に排ガス規制の強化があげ

られる。例えば、ディーゼル重量車について、1997年の長期規制の規制値は、 NO_x は5.80 g/kWh、PMは0.49 g/kWhであったが、2003年の新短期規制で NO_x は3.38 g/kWh、PMは0.18 g/kWhに下げられ、更に2005年の新長期規制で NO_x は2.0 g/kWh、PMは0.027 g/kWhに下げられた。そして、2009年のポスト新長期規制で NO_x は0.7 g/kWh、PMは0.010 g/kWhにまで下げられた (Fig. 11) (国土交通省, 2011)。しかも、規制値の推移が、PAHとNPAHの大気中濃度の推移 (Fig. 2および Fig. 4) と関連していることより、PMと NO_x の規制の寄与は大きいと推察される。東京都でも自動車排ガス規制により大気中のPAHと1-NPの濃度が減少したとの報告 (Kojima et al., 2010) は、本研究結果と符合する。

その他の寄与として、エンジンの改良と燃料の質の改善も考えられる。ディーゼルエンジンには尿素SCRシステム (尿素水を噴射し、尿素水からアンモニアを生成させ、アンモニアにより NO_x を N_2 に還元する)、ディーゼルエンジン用 NO_x 触媒 (通常運転時は NO_x を吸蔵剤に溜めこみ、リッチバーン

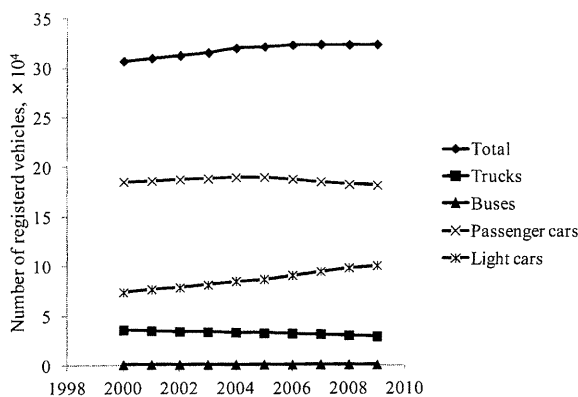


Fig. 10 Number of registered automobiles in Kanazawa.

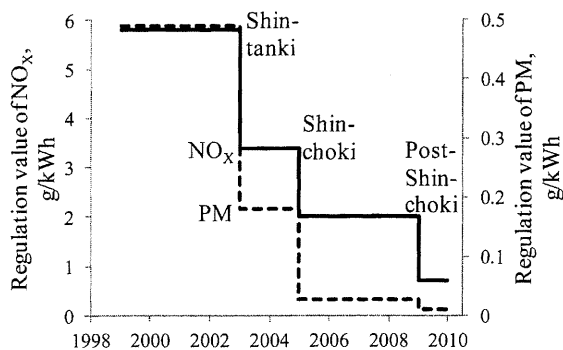


Fig. 11 Transition of Japanese regulation values of NO_x and PM against new diesel-engine automobiles.

の時に排出ガス中に含まれるCO、HC、 H_2 により NO_x を N_2 に還元する)、ディーゼル微粒子捕集フィルター (DPF) (ディーゼル排ガス中のPMを捕集する) が採用されてきた (日

本自動車工業会, 2011)。一方、ガソリンや軽油の品質は、「揮発油等の品質の確保等に関する法律」により規定されており、軽油中の硫黄の規制値は2005年までに50 ppm (w/w) 以下に、2007年までに10 ppm (w/w) に下げられた。実際には、石油業界の自主的な取り組みにより、2005年には硫黄含有量が10 ppm (w/w) 以下の軽油が供給され始めた。軽油中の硫黄成分はディーゼル車の粒子状物質 (PM) の発生に関係している。即ち、硫黄成分から酸化によって生じた硫酸化合物 (SO_x) により、DPFの酸化触媒やディーゼル用 NO_x 触媒が覆われてしまうと触媒作用が低下する (新エネルギー・産業技術開発機構, 2011)。したがって、軽油中の硫黄成分の濃度を下げることによって、PMの発生が抑制され、その結果、大気粉塵中のPAH、NPAHも減少した可能性も併せて考慮する必要がある。

ここで、1-NP濃度 (Fig. 4) の方がPyr濃度 (Fig. 2) より大きな減少率を示した理由は、次のように考察した。エンジン内でPyrと NO_x が発生しているの、1-NPの生成速度 v は反応速度定数を k とし、以下のように表されると考えた。

$$v = k[\text{Pyr}][\text{NO}_x] \quad (1)$$

式 (1) より、Pyrと NO_x 両方の濃度が減少すると、相乗効果によって1-NP濃度はPyr濃度より大きく減少するものと考察した。

なお、2004年10月～2005年4月の中国の暖房期における、能登半島先端でのBaP濃度は平均0.03 ng/m³ (0.01 pmol/m³) であり (Yang et al., 2007)、その北西風下に位置する金沢市 (藤江) の2005年冬のBaP濃度の約1/10である。したがって、市内発生PAHに比較して長距離輸送の影響は極めて小さい。NPAHも同様に、中国の暖房期に含まれる2007年1月の能登半島の先端での1-NP濃度は840 fg/m³ (3.40 fmol/m³) (Hayakawa et al., 2011) と、金沢市 (藤江) の2008年冬の1-NP濃度の約1/15であり、長距離輸送の影響は極めて小さい。

5. まとめ

金沢市市街地幹線道路脇で1999年から2010年までの夏と冬大気粉塵を捕集し、PAH、NPAHを分析した結果、以下のことがわかった。

- PAH濃度は、冬63.9%、夏75.6%減少した。
- NPAH濃度は、冬88.0%、夏89.2%減少した。
- PAHとNPAHの濃度の減少率は、 NO_2 、COよりはるかに顕著であった。
- [1-NP]/[Pyr]値は著しく減少した。その理由として排出源としての自動車の寄与が低下したことが考えられた。1-NP濃度の大幅な減少は NO_x とPyrの減少の相乗効果によると推察された。
- PAHとNPAHの濃度の減少の最大要因として、排ガス規制が考えられた。さらに、エンジンの改良、燃料質の改善も推察された。

謝 辞

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金 (No. 21256001) および環境省環境研究総合推進費 (B-0905) により実施した。また、サンプリングの協力および大気汚染常時監視データ提供をして頂いた金沢市環境局、並びに交通量のデータ提供をして頂いた石川県警察本部に深謝する。

(受稿日 2011.8.31) (掲載決定日 2011.11.11)

参考文献

- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E.: Method for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**, 347-364 (1975).
- Araki, Y., Tang, N., Ohno, M., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: Analysis of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in gas/particle phases separately collected by a High-volume air sampler equipped with a column packed with XAD-4 resin, *J. Health Sci.*, **55** (1), 77-85 (2009).
- Epstein, S.S., Fujii, K., Asahina, S.: Carcinogenicity of a composite organic extract of urban particulate atmospheric pollutants following subcutaneous injection in infant mice, *Environ. Res.*, **19**, 163-176 (1979).
- Hayakawa, K., Kitamura, R., Butoh, M., Imaizumi, N., Miyazaki, M.: Determination of Diamino- and Aminopyrenes by High Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection, *Analyt. Sci.*, **7**, 573-577 (1991).
- Hayakawa, K., Butoh, M., Hirabayashi, Y., Miyazaki, M.: Determination of 1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene in vehicle exhaust particulates, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 20-25 (1994).
- Hayakawa, K., Tang, N., Akutsu, K., Murahashi, T., Kakimoto, H., Kizu, R., Toriba, A.: Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates collected in downtown and suburban Kanazawa, Japan, *Atmos. Environ.*, **36**, 5535-5541 (2002).
- Hayakawa, K., Tang, N., Sato, K., Izaki, A., Tematsu, M., Hama, H., Li, Y., Kameda, K., Toriba, A.: Development of HPLC detection method for trace levels of 1-, 2-nitropyrenes and 2-nitrofluoranthene in airborne particulates and its application to samples collected at Noto Peninsula, *Asian J. Atmos. Environ.*, **5-3**, 146-151 (2011).
- IARC: Agents Classified by the IARC Monograph, Volumes 1-100 (2010).
- 金沢市: いいねっと金沢, 8. 運輸・通信, <http://www4.city.kanazawa.lg.jp/11018/toukeisho/22nendo/08uny u.html/> (2011.4.26 アクセス).
- Kakimoto, H., Kitamura, M., Matsumoto, Y., Sakai, S., Kanoh, F., Murahashi, T., Akutsu, K., Kizu, R., Hayakawa, K.: Comparison of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in Kanazawa, Sapporo and Tokyo, *J. Health Sci.*, **46**, 5-15 (2000).
- 環境省: 自動車 NOx・PM 法改正の背景, http://www.env.go.jp/air/car/pamph_kaiseihou/02.pdf/ (2011.8.21 アクセス).
- Kim, K.B., Lee, B.M.: Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo[a]pyrene, *Cancer Lett.*, **113**, 205-212 (1997).
- 気象庁: 気象統計情報, 過去の気象データ検索, <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etm/index.php/> (2011.4.27 アクセス).
- Kojima, Y., Inazu, K., Hisamatsu, Y., Okochi, H., Baba, T., Nagoya, T.: Changes in concentration levels of polycyclic aromatic compounds associated with airborne particulate matter in downtown Tokyo after introducing government diesel vehicle controls, *Asian J. Atmos. Environ.*, **4-1**, 1-8 (2010).
- 国土交通省: 新車排出ガス規制の経緯 (7), <http://www.mlit.go.jp/common/000019640.pdf/> (2011.5.9 アクセス).
- Murahashi, T., Miyazaki, M., Kakizawa, R., Yamagishi, Y., Kitamura, M., Hayakawa, K.: Diurnal concentrations of 1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrenes, 1-nitropyrene and benzo[a]pyrene in air in downtown Kanazawa and the contribution of diesel-engine vehicles, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **41**, 328-333 (1995).
- Nielson, T.: Reactivity of polycyclic aromatic hydrocarbons toward nitrating species, *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 157-163 (1984).
- 日本自動車工業会: 日本の自動車技術, http://www.jama.or.jp/safe/safe_eco_digest/pdf/vehicle_technology.pdf/ (2011.5.20 アクセス).
- Pitts, J.N., Jr., Sweetman, J.A., Zielinska, B., Winer, A.M., Atkinson, R.: Determination of 2-nitrofluoranthene and 2-nitropyrene in ambient particulate organic matter: Evidence for atmospheric reactions, *Atmos. Environ.*, **19**, 1601-1608 (1985).
- 新エネルギー・産業技術総合開発機構: よくわかる! 技術解説, <http://app2.infoc.nedo.go.jp/kaisetsu/evm/evm06/index.html#elmtop/> (2011.4.21 アクセス).
- Tang, N., Tabata, M., Mishukov, V.F., Sergienko, V., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K.: Comparison of atmospheric nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in Vladivostok, Kanazawa and Toyama, *J. Health Sci.*, **48**, 30-36 (2002).
- Tang, N., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K.: Improvement of an automatic HPLC system for nitropolycyclic aromatic hydrocarbons: Removal of an interfering peak and increase in the number of analytes, *Analyt. Sci.*, **19**, 249-253 (2003).
- Tang, N., Hattori, T., Taga, R., Igarashi, K., Yang, X., Tamura, K., Kakimoto, H., Mishukov, V.F., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulates and their relationship to emission sources in the Pan-Japan Sea countries,

- Atmos. Environ.*, **39**, 5817-5826 (2005).
- Toriba, A., Kuramae, Y., Chetiyakornkul, T., Kizu, R., Makino, T., Nakazawa, H., Hayakawa, K.: Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human hair by HPLC with fluorescence detection: a biological monitoring method to evaluate the exposure to PAHs, *Biomed. Chromat.*, **17**, 126-132 (2003).
- Yamasaki, H., Kuwata, K., Miyamoto, H.: Effects of ambient temperature on aspects of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 189-194 (1982).
- Yang, X.-Y., Okada, Y., Tang, N., Matsunaga, S., Tamura, K., Lin, J.-M., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: Long-range transport of polycyclic aromatic hydrocarbons from China to Japan, *Atmos. Environ.*, **41**, 2710-2718 (2007).

金沢市内における大気粉塵中多環芳香族炭化水素類および ニトロ多環芳香族炭化水素類の最近 12 年間の変遷

濱 寛貴^{1*}, 徳田 貴裕², 伊崎 陽彦², 大野 友子¹, 渡辺 有梨¹,

神田 哲雄¹, 唐 寧^{1,3}, 亀田 貴之¹, 鳥羽 陽¹, 早川 和一¹

1 金沢大学医薬保健研究域・薬学部 〒920-1192 石川県金沢市角間町

2 金沢大学大学院自然科学研究科 〒920-1192 石川県金沢市角間町

3 兵庫医科大学公衆衛生学 〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町1番1号

石川県金沢市藤江の幹線道路脇において 12 年間 (1999~2010 年) の夏と冬の大気粉塵を捕集し、多環芳香族炭化水素 (PAH) 6 種類 (pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene) およびニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) 7 種類 (1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrenes, 1-nitropyrene, 6-nitrochrysene, 7-nitrobenz[a]anthracene, 6-nitrobenzo[a]pyrene) をそれぞれ HPLC-蛍光検出法, HPLC-化学発光検出法で測定し、その変遷を明らかにした。この間に、PAH 濃度は冬 63.9%、夏 75.6%減少、NPAH 濃度は冬 88.0%、夏 89.2%減少した。また[1-NP]/[Pyr]値は冬と夏ともに著しく減少した。自動車排ガス規制の強化によって排出源としての自動車の寄与率が低下したことが、大気中 PAH、NPAH 濃度および[1-NP]/[Pyr]値が顕著に減少した主要因と考えられた。

On-Line Concentration and Fluorescence Determination HPLC for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seawater Samples and Its Application to Japan Sea

Ying Li, Shota Yoshida, Yvonne Chondo, Hossam Nassar, Ning Tang,[†] Yuki Araki, Akira Toriba, Takayuki Kameda, and Kazuichi Hayakawa*

Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University; Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920–1192, Japan.

Received December 12, 2011; accepted January 11, 2012; published online February 1, 2012

An on-line concentration and fluorescence determination HPLC for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater was proposed. An online concentration column packed with octadecyl polyvinyl alcohol polymer, a pump and a column switching valve were introduced in the conventional HPLC with a fluorescence detector. Only 1.0–100 mL seawater sample was introduced into the concentration column at 1.0 mL min⁻¹ without any other pretreatment except filtration. Then the trapped PAHs totally flew into the separation column and eluted separately to be detected fluorogenically. The proposed method had good linearity with correlation coefficients (*r*) ranged from 0.951 to 0.998, and limits of detection ranged from 0.002 to 0.50 ng L⁻¹ for 15 PAHs as 100 mL seawater was loaded. The sensitivity of the method was 10 to 100 times higher than those reported by other works. The proposed method was applied to the determination of PAHs in the seawater samples collected in the Japan Sea with satisfactory results and to check the present benzo[*a*]pyrene concentration at the beaches in Noto peninsula, Japan polluted with C-heavy oil spilled from the tanker in 1997.

Key words polycyclic aromatic hydrocarbon; HPLC; seawater; Japan Sea

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental pollutants. Humans and animals are exposed to PAHs from environmental, dietary and occupational sources. Benzo[*a*]pyrene (BaP) is carcinogenic to humans, dibenz[*a,h*]anthracene is probably carcinogenic to humans and benz[*a*]anthracene (BaA), chrysene (Chr), benzo[*b*]fluoranthene (BbF), benzo[*k*]fluoranthene (BkF), indeno[1,2,3-*cd*]pyrene (IDP) are possibly carcinogenic to humans.¹⁾ Due to their potential or proven carcinogenic or mutagenic properties, some PAHs have been designated as priority pollutants for monitoring by the U.S. and European environmental agencies. It is for these reasons that the European Union has fixed very restrictive limits for these compounds in different kinds of superficial water.²⁾

Many kinds of PAHs are contained in natural oil and oil spilled from tankers and wells causes serious marine contamination with PAHs. The Japan Sea is fruitful of fishery resources. In January 1997, a large amount of C-heavy oil more than 6000KL was spilled from the Russian tanker, Nakhodka, in the central part of the Japan Sea and the spilled oil was beached on the coastlines from Shimane to Akita, Japan. This accident gave the serious damage to the fishery in Japan. The contamination of PAHs was monitored for several years after the accident.³⁾ Now, more than 10 years after the accident, it is believed that the Japan Sea has become clean without detailed monitoring of PAHs.

For determining PAHs in marine, specific analytical protocols have been described in detail in several reviews.^{4–6)} Traditional pretreatment techniques for extraction of these organic compounds from aqueous samples are liquid–liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE).^{7–10)} However, these multistep techniques have disadvantages of labor-inten-

sive, heavy usage of toxic solvents and contamination. Solid-phase microextraction with different coating materials or polymeric fiber was employed for the determination of PAHs in tap water, river water or rainwater, and these techniques provided large extraction capacity and high sensitivity ranged ng L⁻¹ level when coupling with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)/HPLC.^{11–13)} However, the evaporation of the eluate reduced the recoveries of PAHs having 2 to 3 rings which have high vapor pressures.

Compared with the PAHs concentrations in rainwater, river water, sewage and even marine sediments, the concentrations of PAHs in seawater were much lower, so the reports concerning PAHs in seawater samples were scarce until now.^{8,9,14)} When seawater samples were analyzed, it is necessary to collect big volume sample, e.g. several or several-hundred liter sample, in order to achieve the limits of detection.^{5,7,8)} Moreover, the recoveries of PAHs became lower with decreasing concentrations.

In this work, in order to overcome the disadvantages of traditional methods described above, an on-line concentration and fluorescence determination HPLC was proposed for determining trace levels of PAHs in seawater samples. As effective applications of the proposed method, concentrations of PAHs were also determined in seawater samples collected in the southwest part of the Japan Sea and at beaches in Noto Peninsula which were heavily damaged by the oil spill in 1997.

Experimental

Materials An EPA 610 PAHs mix containing naphthalene (Nap), acenaphthene (Ace), fluorene (Fle), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Flu), pyrene (Pyr), BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, dienz[*a,h*]anthracene (DBA), benzo[*g,h,i*]perylene (BgPe) and IDP was purchased from Supelco

[†] Present address: *Hyogo College of Medicine; 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo 663–8501, Japan.*

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: hayakawa@p.kanazawa-u.ac.jp

© 2012 The Pharmaceutical Society of Japan