

II. 分担研究報告書

(3) 有害物質の摂取量推定に必要な分析法の開発に関する研究

(3-1) GC-MS/MS を用いた食品中のダイオキシン類分析の検討

研究分担者 堤 智昭

令和5年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発のための研究

分担研究報告書

(3) 有害物質の摂取量推定に必要な分析法の開発に関する研究

(3-1) GC-MS/MS を用いた食品中のダイオキシン類分析の検討

研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究要旨

GC-MS/MSを用いた食品中のダイオキシン類分析の検討として、本年度はGC-MS/MSの測定条件を改良した上で、食品中のダイオキシン類分析の性能評価を実施した。イオン源の汚れによる感度の低下を緩和することを期待して、昨年度のGC-MS/MS測定条件からエミッഷン電流及びイオン源温度等を変更した。また、ダイオキシン類異性体を良好に分離できるように、DB-5ms UIカラムについては昇温条件についても変更した。変更した測定条件により検量線用標準溶液を測定した結果、相対感度係数(RRF)の変動係数は10%以下であり、良好な結果であった。また、最低濃度の検量線用標準溶液を繰り返し測定して、試料測定時(50 g使用時)のダイオキシン類の定量下限値(LOQs)を推定した。推定したLOQsは「食品中のダイオキシン類測定方法暫定ガイドライン」で示されている目標検出下限を満たしていた。次にブリ、牛肉、及び鶏卵を用いてGC-MS/MSと高分解能GC/MSによるダイオキシン類の分析結果を比較した。GC-MS/MSの各異性体濃度の平均値は高分解能GC/MSに対して、ブリで94～111%、牛肉で93～107%、及び鶏卵で91～109%であり良く一致していた。さらに、認証標準試料(キングサーモン)を分析した結果、LOQs以上となった異性体は認証値(又は参考値)の平均値±2SDの範囲内であった。

以上のようにGC-MS/MSによるダイオキシン類の分析性能は良好であったものの、検討した分析条件ではマトリックスが多いと思われる食品試料を測定した後に大幅な感度低下が観察されたことがあった。今後はこの問題を解決するための検討を行う予定である。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

足立利華、高附 巧、張 天斉、鍋師裕美

暫定ガイドライン(以下、ガイドライン)¹⁾にもその使用が記載されている。しかし、高分解能GC/MSは大型で高価な装置であることから、汎用性が高いとは言い難い。GC-MS/MSは高分解能GC/MSと比較すると一般的に検出感度は劣るもの、小型で廉価であるため食品中の有害化学物質の分析に汎用されている。ヨーロッパでは食品にダイオキシン類の規制値が設けられており、最近では規制値への適合判定のための分析に高分解能GC/MSと共に、GC-MS/MSの

A. 研究目的

食品に含まれるダイオキシン類は極めて微量であることから二重収束型の高分解能GC/MS(以下、高分解能GC/MS)を用いた高感度分析が一般であり、食品中のダイオキシン類分析の

使用が認められている²⁾。また、最近では GC-MS/MS の高感度化が進んでおり、食品中のダイオキシン類分析への利用が進みつつある^{3, 4)}。しかし、GC-MS/MS を用いた食品中のダイオキシン類分析に関する知見は限られている。特に畜水産物はダイオキシン類摂取量に占める割合が大きいことから⁵⁾、これらの食品を対象に GC-MS/MS を用いたダイオキシン類分析が行えれば食品衛生上、有意義である。昨年度は、GC-MS/MS を用いた魚中のダイオキシン類の分析条件を検討した。そこで本年度は、GC-MS/MS の測定条件を改良した上で、魚、牛肉、及び鶏卵を対象にダイオキシン類分析の性能評価を実施した。

B. 研究方法

1. 試薬及び器具

クリーンアップスパイク標準溶液は、(株)ウェリントンラボラトリージャパンより NK-LCS-AD、MBP-MXF、及び MBP-MXK を購入した。シリジスパイク標準溶液は、(株)ウェリントンラボラトリージャパンより NK-SS-F 及び MBP-79-500 を購入した。PCDD/PCDFs 混合溶液、ノンオルト PCB 混合溶液、及びモノオルト PCB 混合溶液は、(株)ウェリントンラボラトリージャパンよりそれぞれ NK-ST-B4、NK-LCS-AD、NK-SS-F、MBP-MXF [1:100]、及び MBP-MXK [1:10]を購入した。検量線用 PCDD/PCDFs 標準溶液は(株)ウェリントンラボラトリージャパンより FDU-CS1～CS5 を購入した。最低濃度の検量線用 PCDD/PCDFs 標準溶液は、NK-ST-B4、NK-LCS-AD、NK-SS-F より調製した。検量線用 Co-PCBs 標準溶液は、(株)ウェリントンラボラトリージャパンより PCB-A5-CSL、FAT-CS1～CS5 を購入した。

アセトン(ダイオキシン類分析用)、メタノール(ダイオキシン類分析用)、ジクロロメタン(ダイオキシン類分析用)、水酸化カリウム(特級)、ヘキサン(ダイオキシン類分析用)、トルエン(ダイオキシン

類分析用)、無水硫酸ナトリウム(PCB 分析用)、アルミナは関東化学(株)より購入した。ノナン(ダイオキシン類分析用)、硫酸(特級)、塩化ナトリウム(特級)は富士フイルム和光純薬(株)より購入した。ヘキサン洗浄水は、ミリポア Milli-Q Integral 10 環境分析タイプから採取した超純水をヘキサンで洗浄し使用した。

多層シリカゲルカラム(内径 15 mm、長さ 30 cm のカラムにシリカゲル 0.9 g、2%KOH シリカゲル 3 g、シリカゲル 0.9 g、44%硫酸シリカゲル 4.5 g、22%硫酸シリカゲル 6 g、シリカゲル 0.9 g、10%硝酸銀シリカゲル 3 g、シリカゲル 0.9 g 及び無水硫酸ナトリウム 6 g 順次充填)は、ジーエルサイエンス(株)より購入した。アルミナカラムは、内径 15 mm、長さ 30 cm のカラムに無水硫酸ナトリウム 2 g、アルミナ 15 g、無水硫酸ナトリウム 2 g を順次充填し作製した。活性炭分散シリカゲルリバースカラムは関東化学(株)より購入した。

GC キャピラリーカラムは、DB-5ms UI(内径 0.25 mm × 60 m、膜厚 0.25 μm)をアジレント・テクノロジー株式会社より、RH-12ms(内径 0.25 mm × 60 m)を INVENTX 社より購入した。

認証標準試料として、WMF-01(キングサーモン切り身の凍結乾燥物)を(株)ウェリントンラボラトリージャパンより購入した。

2. 機器

- ・ホモジナイザー: レッヂェ社製 GM200
- ・GC-MS/MS: TSQ 9000 トリプル四重極 GC-MS/MS システム(Thermo Scientific 社製) with advanced electron ionization (AEI) source
- ・高分解能 GC/MS: 7890B (Agilent Technologies)/MStation JMS-800D UltraFOCUS 日本電子(株)社製

3. GC-MS/MS によるダイオキシン類分析

3-1. 試験溶液の調製

試料(50 g(認証標準試料は約 4 g))をビーカーに量りとり、クリーンアップスパイク(¹³C 標識した PCDD/PCDFs 各 40 pg(OCDD/F は 80 pg)、

ノンオルトPCBs 各 100 pg、モノオルトPCBs 各 2.5 ng)を加えた後、2 mol/L 水酸化カリウム水溶液を 200 mL 加え室温で約 16 時間放置した。このアルカリ分解液を分液ロートに移した後、メタノール 150 mL、ヘキサン 100 mL を加え 10 分間振とう抽出した。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にヘキサン 70 mL を加え同様の操作を 2 回行った。ヘキサン抽出液を合わせ、2% 塩化ナトリウム溶液 150 mL を加えて緩やかに振り動かし、静置後、水層を除き同様の操作を繰り返した。ヘキサン層の入った分液漏斗に濃硫酸を適量加え、緩やかに振とうし、静置後、硫酸層を除去した。この操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返した。ヘキサン層をヘキサン洗浄水 10 mL で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を留去し約 2 mL のヘキサンに溶解した。多層シリカゲルをヘキサン 200 mL で洗浄した後、試験溶液を注入し、ヘキサン 200 mL で溶出した。溶出液は溶媒を留去し、約 2 mL のヘキサンに溶解した。ヘキサンで湿式充填したアルミナカラムに試験溶液を注入し、ヘキサン 150 mL で洗浄後、2% (v/v) ジクロロメタン含有ヘキサン 200 mL でモノオルトPCBs 分画を溶出した。次いで、60%(v/v) ジクロロメタン含有ヘキサン 200 mL で PCDD/PCDFs 及びノンオルトPCBs 分画を溶出した。モノオルトPCBs 分画は溶媒を留去した後、活性炭分散シリカゲルリバースカラムに注入し、30 分程度放置した。ヘキサン 40 mL でカラムを洗浄後、25%(v/v) ジクロロメタン含有ヘキサン 60 mL でモノオルトPCBs 分画を溶出した。溶媒を留去後、シリジンスパイク 500 μL (¹³C 標識体 2.5 ng) を添加し GC-MS/MS に供した。PCDD/PCDFs 及びノンオルトPCBs 分画は溶媒を留去した後、活性炭分散シリカゲルリバースカラムに注入し、10 分程度放置した。25%(v/v) ジクロロメタン含有ヘキサン 80 mL でカラムを洗浄後、カラムを反転させ、トルエン 40 mL で PCDD/PCDFs 及びノンオルトPCBs 分画を溶出した。溶媒を留去後、シリジンスパイク 20 μL (PCDD/PCDFs 用 ¹³C 標識体 40 pg、ノンオルト

PCB 用 ¹³C 標識体 100 pg)を添加し GC-MS/MS に供した。

3-2. GC-MS/MS 測定条件

1) GC 条件

① 2,3,7,8 – TeCDD、1,2,3,7,8 – PeCDD、1,2,3,7,8 – PeCDF、1,2,3,4,7,8 – HxCDD、1,2,3,6,7,8 – HxCDD、1,2,3,7,8,9 – HxCDD、1,2,3,4,6,7,8 – HpCDD、OCDD、2,3,7,8 – TeCDF、1,2,3,4,7,8 – HxCDF、1,2,3,6,7,8 – HxCDF、2,3,4,6,7,8 – HxCDF、1,2,3,4,6,7,8 – HpCDF、1,2,3,4,7,8,9 – HpCDF、OCDF
カラム:DB-5ms UI(内径 0.25 mm × 60 m、膜厚 0.25 μm)

注入方式:スプリットレス

注入口温度:260°C

注入量:2 μL

昇温条件:120°C(2 分保持)-30°C/分-240°C(5 分保持)-0.7°C/分-254°C-8°C/分-310°C(4 分保持)

キャリアーガス:ヘリウム (流速: 1.2 mL/分)

② 2,3,4,7,8 – PeCDF、1,2,3,7,8,9 – HxCDF
カラム:RH-12ms(内径 0.25 mm × 60 m)

注入方式:スプリットレス

注入口温度:260°C

注入量:2 μL

昇温条件:130°C(1 分保持)-15°C/分-210°C-3°C/分-310°C (11 分保持)

キャリアーガス:ヘリウム (流速: 1.0 mL/分)

③ Co-PCBs

カラム:RH-12ms(内径 0.25 mm × 60 m)

注入方式:スプリットレス

注入口温度:260°C

注入量:1 μL

昇温条件:130°C(1 分保持)-15°C/分-200°C-1°C/分-220°C-2°C/分-250°C-3°C/分-270°C-15°C/分-310°C(5 分保持)

キャリアーガス:ヘリウム (流速: 1.0 mL/分)

2) MS/MS 条件

イオン化法: EI; イオン化電圧: 50 eV; エミッション電流: 20 μ A; イオン源温度: 320°C; 測定モード: SRM

設定した PCDD/PCDFs 測定及び Co-PCBs 測定の SRM 条件を表 1 に示した。

3-3. 検量線の作成

相対感度係数法により検量線を作成した。検量線用標準溶液(6 濃度)に対して 3 回測定を実施し、計 18 点の測定データを得た。検量線用標準溶液の組成と濃度を表 2 に示した。各測定データについて、各分析対象物質とそれに対応するクリーンアップスパイクとの相対感度係数(RRF)、及びクリーンアップスパイクとそれに対応するシリジンスパイクの相対感度係数(RRF_{ss})を算出した。検量線作成時の測定データにおける RRF の変動係数は 10%以内、RRF_{ss} の変動係数は 20%以内を目指した。

3-4. 検出下限値及び定量下限値

最低濃度の検量線用標準溶液を GC-MS/MS により繰り返し測定(10 回)し、測定値の標準偏差(σ)を求め、 3σ を検出下限値(LOD)、 10σ を定量下限値(LOQ)とした。また、操作プランク試験を 6 回行い、プランクが認められたダイオキシン類については、プランクの標準偏差の 3 倍を LOD、10 倍を LOQ として求めた。繰り返し測定から求めた値と比較し、大きい方を本分析法の LOD、又は LOQ とした。

3-5. 試験溶液の測定

試験溶液の測定開始時には 3 濃度の検量線用標準溶液を測定して、RRF 及び RRF_{ss} を求めた。これらの値が、検量線作成時の RRF 及び RRF_{ss} と比較し、RRF については±10%以内、RRF_{ss} については±20%以内であることを確認した。検量線作成時の RRF 及び RRF_{ss} を用いて、試験溶液に含まれるダイオキシン類を定量した。試験溶液より得られた分析対象物質と内標準物質の面積比が検量線用標準溶液の面積比の範

囲外となった場合は、外挿により定量値を算出した。

4. 高分解能 GC/MS によるダイオキシン類分析

前処理と高分解能 GC/MS 測定条件は、「(1-1)トータルダイエット試料の分析による塩素化ダイオキシン類摂取量推定」に従った。

C. 研究結果及び考察

1. GC-MS/MS 測定条件の改良

毒性等価係数(TEF)を有する 29 種のダイオキシン類を良好に分離する必要があることから、液相の種類が異なる 2 種類の GC カラム(DB-5ms UI 及び RH-12ms)を用いている。DB-5ms UI による PCDD/PCDFs 測定を行う際に、昨年度の昇温条件では、TEF を有する PCDD/PCDFs とその他の PCDD/PCDFs との分離が悪く、正確に定量できない懸念があった。そこで、分離の改善を目指して DB-5ms UI の昇温条件を検討した。136 種の PCDD/PCDFs を含む標準溶液を使用して検討を行った結果、昨年度の昇温条件(昇温条件 1)では TEF を有する 2,3,7,8-TeCDD 及び 2,3,7,8-TeCDF(図 1 の矢印のピーク)の分離が良好ではなかった。新しく検討した昇温条件(昇温条件 2)では分離の改善が認められることから、本年度は DB-5ms UI の昇温条件を昇温条件 2 とした。

また、食品試料ではマトリックスが多く含まれるためイオン源が汚れ、感度低下を招くことが懸念された。イオン源の汚れによる感度の低下を緩和することを期待して、昨年度の測定条件からエミッション電流及びイオン源温度等を変更した。昨年度はエミッション電流を 50 μ A としたが、20 μ A でも感度の大幅な低下が認められなかつたことから、本年度はエミッション電流を 20 μ A に変更した。さらに、イオン源温度をより高温とするため、300°C から 320°C に変更した。

上記の GC-MS/MS 測定条件の変更に伴い、PCDD/PCDFs の S/N が若干悪くなつた。検量線

用 PCDD/PCDFs 標準溶液の最低濃度を 0.01 ng/mL とすると、やや感度が不足してピーク形状が悪化する可能性があったことから、最低濃度を 0.02 ng/mL に変更した。

2. GC-MS/MS 分析法の性能評価

改良した測定条件を反映した GC-MS/MS 分析法の性能評価を以下の通り実施した。

2-1. 検量線の作成(RRF 及び RRF_{ss} の算出)

検量線用標準溶液(6 濃度)を測定し RRF 及び RRF_{ss} を求めた(表 3)。PCDD/PCDFs の RRF は 0.653～1.145(変動係数は 2.5～6.3%)、RRF_{ss} は 0.396～2.420(変動係数は 3.3～14.7%) であった。Co-PCBs の RRF は 0.913～1.016(変動係数は 1.7～4.9%)、RRF_{ss} は 0.46～0.835(変動係数は 2.0～6.9%) であった。ガイドラインでは検量線作成時の RRF の変動係数は 10%以内が目標とされている。今回得られた RRF の変動係数は 6.3% 以下であることから、ガイドラインの目標値を満たしていた。

2-2. ダイオキシン類分析の LODs 及び LOQs

最も濃度が低い検量線用標準溶液(Conc.1)の繰り返し測定(10 回)の標準偏差より推定した GC-MS/MS 分析の試料測定時(50 g 使用時)の LODs 及び LOQs を表 4 に示した。操作ブランクが認められた異性体は、OCDD、PCB 77 及び PCB 118 であったが、操作ブランク値の標準偏差より推定した LODs 及び LOQs は、検量線用標準液の繰り返し測定の標準偏差より推定した LODs 及び LOQs よりも小さい値となった。従って全てのダイオキシン類異性体の LODs 及び LOQs は検量線用標準液の繰り返し測定の標準偏差より推定した値となった。PCDD/PCDFs の LODs は 0.001～0.013 pg/g、LOQs は 0.003～0.043 pg/g であった。Co-PCBs の LODs は 0.002～0.11 pg/g、LOQs は 0.006～0.4 pg/g であった。SRMクロマトグラム(定量イオン)の一例を図 2 及び図 3 に示した。

ガイドラインでは、LODs や操作ブランク値等

の許容性を判断する基準として、目標検出下限が示されている。GC-MS/MS 分析の試料測定時の LODs を目標検出下限と比較すると、全てのダイオキシン類において目標検出下限を満たしていた。また LOQs についても目標検出下限を満たしており、本分析法はガイドラインに示された目標検出下限までのダイオキシン類を定量できると考えられた。

2-3. 畜水産物における GC-MS/MS と高分解能 GC/MS のダイオキシン類分析値の比較

ブリ、牛肉、及び鶏卵試料を用いて GC-MS/MS と高分解能 GC/MS(従来法)によるダイオキシン類の分析値を比較した(表 5、表 6、及び表 7)。各食品試料についてそれぞれ 5 試行の分析を行い、平均濃度と相対標準偏差(RSD)について比較した。

GC-MS/MS の各異性体濃度の平均値は、高分解能 GC/MS に対して、ブリで 94～111%、牛肉で 93～107%、及び鶏卵で 91～109% であり良好一致していた。また、RSD もブリで 16.1%以内、牛肉で 8.4%以内、鶏卵で 8.2%以内であり、高分解能 GC/MS(ブリで 20.6%以内、牛肉で 18.4%以内、鶏卵で 9.7%以内)と比較して大きな値となることはなかった。各食品の SRM クロマトグラム(定量イオン)の一例を図 4、図 5、図 6、図 7、図 8 及び図 9 に示した。ブリと鶏卵では PCB 123 等、牛肉では 2,3,7,8-TeCDF 等の近傍に分析対象物以外のピークが認められ注意が必要であったものの、これらのダイオキシン類の定量は可能であった。LOQs 以上となった各ダイオキシン類の定量イオンと定性イオンのピーク面積比は検量線用標準溶液のピーク面積比の±25%以内であった。

2-4. 認証標準試料の分析

GC-MS/MS を用いたダイオキシン類分析の信頼性を検証するため、ダイオキシン類濃度が付与されている認証標準試料(WMF-01)を分析した(表 8)。GC-MS/MS 分析を 2 試行で実施した

結果、認証値が付与されているダイオキシン類については、全て LOQs 以上の分析値が得られ、認証値の平均値±2SD の範囲内であった。また、LOQs 以上となったその他のダイオキシン類の分析値についても、参考値の平均値±2SD の範囲内であった。GC-MS/MS 分析の SRM クロマトグラムに分析対象となるダイオキシン類の定量を妨害する夾雜ピークは認められず(データ未掲載)、LOQs 以上となった各ダイオキシン類の定量イオンと定性イオンのピーク面積比は検量線用標準溶液のピーク面積比の±25%以内であった。以上の結果より、GC-MS/MS 分析により得られたダイオキシン類分析値の信頼性は高いことが示唆された。

3. 性能評価時における GC-MS/MS 分析の問題点

GC-MS/MS によるダイオキシン類分析の性能評価は良好であったものの、検討した分析条件ではマトリックスが多いと思われる食品試料を測定した後に大幅な感度低下が観察されることがあった。特に DB-5ms UI カラムでは食品試料を測定後に、PCDD/PCDFs のイオン強度が半分以下に低下する現象が生じた。イオン源の洗浄を行うとイオン強度が回復することから、恐らくマトリックスによるイオン源の汚れのためイオン強度が低下したものと考えられた。今回、予めイオン源の汚れを緩和することを期待して、エミッショントリップル電流とイオン源温度を変更したものの、イオン強度の低下を防ぐことができなかった。今後はイオン源の汚れによるイオン強度の大幅な低下を回避するために、より S/N の良い GC カラムを使用して試験溶液の注入量を可能な限り少なくしたり、場合によっては追加の精製方法を検討したりする等の必要があると考えられる。

D. 結論

昨年度の GC-MS/MS 測定条件を改良した上で、GC-MS/MS による食品中のダイオキシン類

分析の性能評価を実施した。推定した LOQs (50 g 試料を使用時) はガイドラインで示されている目標検出下限を満たしていた。ブリ、牛肉、及び鶏卵を用いて GC-MS/MS と高分解能 GC/MS によるダイオキシン類の分析結果を比較した結果、両者の分析値は良く一致した。また、認証標準試料を GC-MS/MS により分析した結果、LOQs 以上となった異性体は認証値(又は参考値)の平均値±2SD の範囲内であった。以上のように GC-MS/MS によるダイオキシン類の分析性能は良好であったものの、検討した分析条件ではマトリックスが多いと思われる食品試料を測定した後に大幅な感度低下が観察されることがあった。今後はこの問題を解決するための検討を行う予定である。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知“食品中のダイオキシン類測定方法暫定ガイドライン”平成 20 年 2 月 28 日、食安監発第 0228003 号
- 2) COMMISSION REGULATION (EU) No 589/2014 of 2 June 2014, laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012
- 3) Franchina FA, Lazzari E, Scholl G, Focant J-F. : Assessment of a New GC-MS/MS System for the Confirmatory Measurement of PCDD/Fs and (N)DL-PCBs in Food under EU Regulation. Foods, 8(8), 302 (2019)
- 4) Lyu B, Zhang X, Li J, Zhang L, Zhong, Y, Wu Y. : Determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans in food samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS) and comparison with gas chromatography-high

- resolution mass spectrometry (GC-HRMS).
Journal of Food Composition and Analysis,
115, 104947 (2023)
- 5) 令和 4 年度厚生労働行政推進調査事業費
補助金研究報告書「食品を介したダイオキ
シン類等有害物質摂取量の評価とその手法
開発のための研究」分担研究報告書(食品
の塩素化ダイオキシン類、PCB、難燃剤等
の摂取量推定及び汚染実態の把握に關す
る研究)

F.研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 堤 智昭, 足立利華, 張 天齊, 高附 巧, 鍋
師裕美: GC-MS/MSを用いた魚中のダイオキシ
ン類分析の検討. 第119回日本食品衛生学会学
術講演会 (2023.10).

表1 ダイオキシン類測定のSRM条件

表1-1) PCDD/PCDFs

化合物		定量イオン			定性イオン			
		Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)	
分析対象物質	PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	319.9	256.9	15	321.9	258.9	15
		1,2,3,7,8-PeCDD	355.9	292.9	15	353.9	290.9	15
		1,2,3,4,7,8-HxCDD	389.8	326.9	15	391.8	328.8	15
		1,2,3,6,7,8-HxCDD						
		1,2,3,7,8,9-HxCDD						
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	423.8	360.8	15	425.8	362.8	15
	PCDFs	OCDD	457.7	394.8	15	459.7	396.8	15
		2,3,7,8-TeCDF	303.9	240.9	25	305.9	242.9	25
		1,2,3,7,8-PeCDF	339.9	276.9	25	337.9	274.9	25
		2,3,4,7,8-PeCDF	373.8 (371.8) ¹⁾	310.9 (308.9)	25	375.8 (373.8)	312.9 (310.9)	25
内標準物質 (クリーンアップ スパイク)	PCDDs	1,2,3,4,7,8-HxCDF						
		1,2,3,6,7,8-HxCDF						
		1,2,3,7,8,9-HxCDF						
		2,3,4,6,7,8-HxCDF						
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	407.8	344.8	25	409.8	346.8	25
		1,2,3,4,7,8-HpCDF						
	PCDFs	OCDF	441.7	378.8	25	443.7	380.8	25
		¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TeCDD	331.9	268.0	15	333.9	270.0	15
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDD	367.9	303.9	15	365.9	301.9	15
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDD	401.9	337.9	15	403.9	339.9	15
	PCDFs	¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDD						
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDD						
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	435.8	371.8	15	437.8	373.8	15
		¹³ C ₁₂ -OCDD	469.8	405.8	15	471.8	407.8	15
内標準物質 (シリジンスパイク)	PCDDs	¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TeCDF	315.9	252.0	25	317.9	254.0	25
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDF	351.9	287.9	25	349.9	285.8	25
		¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeCDF						
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDF						
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDF	385.9	321.9	25	387.9	323.9	25
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDF						
	PCDFs	¹³ C ₁₂ -2,3,4,6,7,8-HxCDF						
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	419.8	355.9	25	421.8	357.9	25
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF						
		¹³ C ₁₂ -OCDF	453.8	389.8	25	455.8	391.8	25

1) RH-12ms測定時のモニターイオン

表1-2) Co-PCBs

化合物			定量イオン			定性イオン		
			Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)
分析対象物質	ノンオルト PCBs	3,3',4,4'-TCB (#77)	289.9	219.9	22	291.9	221.9	22
		3,3',4,4',5-TCB (#81)	323.9	253.9	22	325.9	255.9	22
		3,3',4,4',5-PeCB (#126)	359.9	289.9	25	357.9	287.9	25
		3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)						
	モノオルト PCBs	2,3,3',4,4'-PeCB (#105)						
		2,3,4,4',5-PeCB (#114)	323.9	253.9	22	325.9	255.9	22
		2,3,4,4',5-PeCB (#118)						
		2,3,4,4',5-HxCB (#123)						
内標準物質 (クリーンアップ スパイク)	ノンオルト PCBs	2,3,3',4,4'5-HxCB (#156)						
		2,3,3',4,4'5-HxCB (#157)	359.9	289.9	25	357.9	287.9	25
		2,3,4,4',5,5'-HxCB (#167)						
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	393.9	323.9	28	391.9	321.9	28
	モノオルト PCBs	¹³ C ₁₂ -3,3',4,4'-TCB (#77)	301.9	231.9	22	303.9	233.9	22
		¹³ C ₁₂ -3,4,4',5-TCB (#81)	335.9	265.9	22	337.9	267.9	22
		¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5-PeCB (#126)	371.9	301.9	25	369.9	299.9	25
		¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)						
内標準物質 (シリジンスパイク)		¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4'-PeCB (#105)						
		¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5-PeCB (#114)	335.9	265.9	22	337.9	267.9	22
		¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5-PeCB (#118)						
		¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5-PeCB (#123)						
		¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5-HxCB (#156)						
		¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5-HxCB (#157)	371.9	301.9	25	369.9	299.9	25
		¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5,5'-HxCB (#167)						
		¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	405.9	335.9	28	403.9	333.9	28

表2 検量線用標準溶液の組成と濃度

表2-1) PCDD/PCDFs

化合物		濃度(ng/mL)						
		Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	
分析対象物質	PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	0.02	0.05	0.2	1	5	25
		1,2,3,7,8-PeCDD	0.02	0.05	0.2	1	5	25
		1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.04	0.1	0.4	2	10	50
		1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.04	0.1	0.4	2	10	50
		1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.04	0.1	0.4	2	10	50
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.04	0.1	0.4	2	10	50
		OCDD	0.1	0.25	1	5	25	125
	PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	0.02	0.05	0.2	1	5	25
		1,2,3,7,8-PeCDF	0.02	0.05	0.2	1	5	25
		2,3,4,7,8-PeCDF	0.02	0.05	0.2	1	5	25
		1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.04	0.1	0.4	2	10	50
		1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.04	0.1	0.4	2	10	50
		1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.04	0.1	0.4	2	10	50
		2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.04	0.1	0.4	2	10	50
内標準物質 (クリーンアップ スパイク)	PCDDs	¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TeCDD	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDD	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDD	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDD	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDD	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -OCDD	4	4	4	4	4	4
	PCDFs	¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TeCDF	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDF	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeCDF	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDF	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDF	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDF	2	2	2	2	2	2
		¹³ C ₁₂ -2,3,4,6,7,8-HxCDF	2	2	2	2	2	2
内標準物質 (シリジンスパイク)		¹³ C ₁₂ -1,2,3,4-TeCDD	2	2	2	2	2	2

表2-2) Co-PCBs

化合物			濃度 (ng/mL)					
			Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6
分析対象物質	ノンオルト PCBs	3,3',4,4'-TeCB (#77)	0.05	0.2	1	10	50	200
		3,4,4',5-TeCB (#81)	0.05	0.2	1	10	50	200
		3,3',4,4',5-PeCB (#126)	0.05	0.2	1	10	50	200
		3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	0.05	0.2	1	10	50	200
	モノオルト PCBs	2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	0.05	0.2	1	10	50	200
		2,3,4,4',5-PeCB (#114)	0.05	0.2	1	10	50	200
		2,3',4,4',5-PeCB (#118)	0.05	0.2	1	10	50	200
		2',3,4,4',5-PeCB (#123)	0.05	0.2	1	10	50	200
内標準物質 (クリーンアップ スペイク)	ノンオルト PCBs	2,3,3',4,4',5-HxCB (#156)	0.05	0.2	1	10	50	200
		2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	0.05	0.2	1	10	50	200
		2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	0.05	0.2	1	10	50	200
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	0.05	0.2	1	10	50	200
	モノオルト PCBs	¹³ C ₁₂ -3,3',4,4'-TeCB (#77)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -3,4,4',5-TeCB (#81)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5-PeCB (#126)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5-PeCB (#114)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5-PeCB (#118)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -2',3,4,4',5-PeCB (#123)	5	5	5	5	5	5
内標準物質 (シリジンスペイク)		¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5-HxCB (#156)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	5	5	5	5	5	5
		¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	5	5	5	5	5	5
内標準物質 (シリジンスペイク)		¹³ C ₁₂ -3,3',4,5'-TeCB (#79)	5	5	5	5	5	5

表3 検量線用標準溶液のRRF及びRRFss

表3-1) PCDD/PCDFs

PCDD/PCDFs		RRF 平均値	RRF変動係数 (%)	RRFss 平均値	RRFss変動係数 (%)
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	0.973	5.3	1.633	3.3
	1,2,3,7,8-PeCDD	1.027	6.3	1.185	5.4
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.909	3.0	1.012	7.9
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.925	3.6	1.067	7.3
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.992	3.9	1.024	8.6
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1.077	3.6	0.967	11.8
	OCDD	1.145	6.3	0.396	13.8
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	0.955	3.9	2.420	4.0
	1,2,3,7,8-PeCDF	1.071	3.5	1.825	5.5
	2,3,4,7,8-PeCDF ¹⁾	1.024	2.5	1.727	3.5
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1.136	3.3	1.320	6.9
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	1.058	3.0	1.415	7.0
	1,2,3,7,8,9-HxCDF ¹⁾	0.653	3.6	1.104	7.2
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.028	2.8	1.449	7.5
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.091	3.3	1.443	8.2
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.047	6.1	1.269	11.7
	OCDF	1.054	3.1	0.646	14.7

1) RH-12ms測定データ

表3-2) Co-PCBs

Co-PCBs		RRF 平均値	RRF変動係数 (%)	RRFss 平均値	RRFss変動係数 (%)
ノンオルト PCBs	3,3',4,4'-TeCB(#77)	1.012	2.7	0.792	2.5
	3,4,4',5-TeCB(#81)	0.981	2.1	0.835	2.3
	3,3',4,4',5-PeCB(#126)	0.968	3.0	0.563	4.6
	3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)	0.996	4.9	0.491	6.9
モノオルト PCBs	2,3,3',4,4'-PeCB(#105)	0.922	3.1	0.620	2.7
	2,3,4,4',5-PeCB(#114)	0.913	3.1	0.625	2.0
	2,3',4,4',5-PeCB(#118)	0.937	2.5	0.617	2.8
	2',3,4,4',5-PeCB(#123)	0.914	1.7	0.618	2.6
	2,3,3',4,4',5-HxCB(#156)	0.948	3.6	0.519	2.0
	2,3,3',4,4',5'-HxCB(#157)	0.973	3.3	0.539	2.4
	2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167)	1.016	3.1	0.516	2.2
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(#189)	0.996	3.3	0.460	4.1

表4 試料測定時のLODs 及びLOQs

表4-1)PCDD/PCDFs

PCDD/PCDFs	LODs ¹⁾ (pg/g)	LOQs ¹⁾ (pg/g)	目標検出下限 ²⁾ (pg/g)
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	0.002	0.006
	1,2,3,7,8-PeCDD	0.003	0.009
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.005	0.016
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.005	0.015
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.004	0.013
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.005	0.015
	OCDD	0.013	0.043
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	0.002	0.005
	1,2,3,7,8-PeCDF	0.001	0.003
	2,3,4,7,8-PeCDF	0.003	0.008
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.004	0.012
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.003	0.008
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.004	0.013
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.003	0.009
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.003	0.010
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.004	0.013
OCDF		0.009	0.030
			0.05

1)食品試料50 g使用時

2)食品中のダイオキシン類の測定方法暫定ガイドライン(平成20年2月)

表4-2) Co-PCBs

Co-PCBs	LODs ¹⁾ (pg/g)	LOQs ¹⁾ (pg/g)	目標検出下限 ²⁾ (pg/g)
ノンオルト PCBs	3,3',4,4'-TeCB(#77)	0.003	0.010
	3,4,4',5-TeCB(#81)	0.002	0.006
	3,3',4,4',5-PeCB(#126)	0.003	0.010
	3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)	0.003	0.011
モノオルト PCBs	2,3,3',4,4'-PeCB(#105)	0.08	0.25
	2,3,4,4',5-PeCB(#114)	0.10	0.32
	2,3',4,4',5-PeCB(#118)	0.08	0.27
	2',3,4,4',5-PeCB(#123)	0.05	0.17
	2,3,3',4,4',5-HxCB(#156)	0.11	0.38
	2,3,3',4,4',5'-HxCB(#157)	0.06	0.19
	2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167)	0.07	0.23
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(#189)	0.06	0.20

1)食品試料50 g使用時

2)食品中のダイオキシン類の測定方法暫定ガイドライン(平成20年2月)

表 5 GC-MS/MS と高分解能 GC/MS のダイオキシン類分析値の比較(ブリ)

ダイオキシン類	ブリ (n = 5)					
	GC-MS/MS(A)		高分解能GC/MS(B)		比率, %	
	Mean±SD, pg/g	RSD, %	Mean±SD, pg/g	RSD, %	(A/B)	
PCDDs	2378-TeCDD	0.17 ± 0.0051	3.0	0.15 ± 0.012	7.8	111
	12378-PeCDD	0.39 ± 0.016	4.1	0.38 ± 0.022	5.8	104
	123478-HxCDD	0.056 ± 0.0050	9.1	0.055 ± 0.0024	4.4	102
	123678-HxCDD	0.12 ± 0.0052	4.2	0.13 ± 0.0040	3.2	98
	123789-HxCDD	0.030 ± 0.0026	8.4	0.032 ± 0.0054	16.7	94
	1234678-HpCDD	0.085 ± 0.0076	8.9	0.078 ± 0.0051	6.5	110
	OCDD	0.21 ± 0.018	8.3	0.22 ± 0.015	6.7	98
PCDFs	2378-TeCDF	2.9 ± 0.084	2.9	2.7 ± 0.038	1.4	109
	12378-PeCDF	0.44 ± 0.011	2.4	0.43 ± 0.020	4.6	101
	23478-PeCDF	1.1 ± 0.017	1.5	1.1 ± 0.043	3.9	100
	123478-HxCDF	0.11 ± 0.0052	4.6	0.11 ± 0.0081	7.3	102
	123678-HxCDF	0.074 ± 0.0061	8.2	0.068 ± 0.0087	12.9	109
	123789-HxCDF	nd ¹⁾	-	nd	-	-
	234678-HxCDF	0.071 ± 0.0060	8.5	0.068 ± 0.0025	3.6	104
	1234678-HpCDF	0.020 ± 0.0033	16.1	0.020 ± 0.0041	20.6	103
	1234789-HpCDF	tr ²⁾	-	tr	-	-
ノンオルトPCBs	OCDF	nd	-	nd	-	-
	33'44'-TeCB (#77)	86 ± 1.7	1.9	80 ± 1.0	1.3	107
	344'5-TeCB (#81)	5.3 ± 0.10	1.8	5.5 ± 0.16	2.9	96
	33'44'5-PeCB (#126)	36 ± 0.27	0.8	35 ± 1.2	3.4	101
	33'44'55'-HxCB (#169)	6.0 ± 0.050	0.8	5.9 ± 0.23	3.8	102
モノオルトPCBs	233'44'-PeCB (#105)	1113 ± 17	1.5	1069 ± 26	2.5	104
	2344'5-PeCB (#114)	85 ± 1.8	2.2	78 ± 1.5	1.9	109
	23'44'5-PeCB (#118)	4191 ± 99	2.4	3932 ± 35	0.9	107
	2'344'5-PeCB (#123)	74 ± 3.1	4.2	74 ± 1.2	1.6	100
	233'44'5-HxCB (#156)	516 ± 5.6	1.1	515 ± 12	2.4	100
	233'44'5'-HxCB (#157)	145 ± 3.2	2.2	136 ± 5.0	3.7	106
	23'44'55'-HxCB (#167)	341 ± 5.0	1.5	339 ± 7.7	2.3	101
	233'44'55'-HpCB (#189)	85 ± 1.9	2.3	83 ± 2.4	2.9	102

1) nd: not detected

2) tr: trace (LOD≤tr<LOQ)

表 6 GC-MS/MS と高分解能 GC/MS のダイオキシン類分析値の比較(牛肉)

ダイオキシン類	牛肉 (n = 5)					
	GC-MS/MS(A)		高分解能GC/MS(B)		比率, %	
	Mean±SD, pg/g	RSD, %	Mean±SD, pg/g	RSD, %	(A/B)	
PCDDs	2378-TeCDD	0.033 ± 0.0028	8.4	0.033 ± 0.0060	18.4	103
	12378-PeCDD	0.30 ± 0.0069	2.2	0.30 ± 0.041	13.8	103
	123478-HxCDD	0.40 ± 0.014	3.6	0.40 ± 0.0092	2.3	100
	123678-HxCDD	1.4 ± 0.074	5.2	1.3 ± 0.055	4.1	107
	123789-HxCDD	0.52 ± 0.014	2.7	0.52 ± 0.026	4.9	100
	1234678-HpCDD	6.7 ± 0.14	2.1	6.7 ± 0.25	3.7	99
	OCDD	34 ± 1.2	3.7	36 ± 1.3	3.6	94
PCDFs	2378-TeCDF	tr ¹⁾	-	tr	-	-
	12378-PeCDF	nd ²⁾	-	nd	-	-
	23478-PeCDF	0.12 ± 0.0036	3.0	0.12 ± 0.0064	5.6	103
	123478-HxCDF	0.50 ± 0.023	4.7	0.47 ± 0.0063	1.3	106
	123678-HxCDF	0.21 ± 0.010	4.8	0.20 ± 0.0093	4.7	105
	123789-HxCDF	nd	-	nd	-	-
	234678-HxCDF	0.28 ± 0.018	6.5	0.26 ± 0.012	4.5	106
	1234678-HpCDF	0.93 ± 0.013	1.4	0.94 ± 0.032	3.4	99
	1234789-HpCDF	0.11 ± 0.0050	4.6	0.10 ± 0.0056	5.4	105
ノンオルトPCBs	OCDF	0.20 ± 0.011	5.5	0.19 ± 0.010	5.3	105
	33'44'-TeCB (#77)	0.20 ± 0.014	7.4	0.19 ± 0.0068	3.6	103
	344'5-TeCB (#81)	0.054 ± 0.0046	8.5	tr	-	-
	33'44'5-PeCB (#126)	1.1 ± 0.013	1.2	1.1 ± 0.021	1.9	103
モノオルトPCBs	33'44'55'-HxCB (#169)	0.12 ± 0.0058	4.8	0.13 ± 0.0089	6.8	92
	233'44'-PeCB (#105)	141 ± 2.4	1.7	134 ± 2.5	1.9	105
	2344'5-PeCB (#114)	38 ± 0.96	2.5	36 ± 0.80	2.2	106
	23'44'5-PeCB (#118)	1386 ± 28	2.0	1318 ± 31	2.3	105
	2'344'5-PeCB (#123)	15 ± 0.17	1.1	14 ± 0.74	5.2	107
	233'44'5-HxCB (#156)	220 ± 1.5	0.7	226 ± 4.7	2.1	97
	233'44'5'-HxCB (#157)	49 ± 0.96	1.9	48 ± 1.1	2.2	102
	23'44'55'-HxCB (#167)	68 ± 0.89	1.3	70 ± 1.1	1.6	96
	233'44'55'-HpCB (#189)	11 ± 0.20	1.9	11 ± 0.60	5.6	98

1) tr: trace (LOD≤tr<LOQ)

2) nd: not detected

表 7 GC-MS/MS と高分解能 GC/MS のダイオキシン類分析値の比較(鶏卵)

ダイオキシン類	鶏卵 (n = 5)					
	GC-MS/MS (A)		高分解能GC/MS (B)		比率, %	
	Mean±SD, pg/g	RSD, %	Mean±SD, pg/g	RSD, %	(A/B)	
PCDDs	2378-TeCDD	0.069 ± 0.0027	3.9	0.065 ± 0.0045	6.9	106
	12378-PeCDD	0.56 ± 0.027	4.9	0.54 ± 0.016	3.0	104
	123478-HxCDD	0.70 ± 0.057	8.2	0.67 ± 0.013	1.9	104
	123678-HxCDD	1.9 ± 0.080	4.1	2.0 ± 0.072	3.6	98
	123789-HxCDD	0.85 ± 0.051	5.9	0.89 ± 0.019	2.2	95
	1234678-HpCDD	10 ± 0.44	4.5	10 ± 0.19	1.9	98
	OCDD	86 ± 1.5	1.7	94 ± 3.0	3.2	91
PCDFs	2378-TeCDF	0.14 ± 0.0064	4.4	0.14 ± 0.0050	3.7	106
	12378-PeCDF	0.080 ± 0.0023	2.8	0.078 ± 0.0067	8.6	102
	23478-PeCDF	0.15 ± 0.0046	3.0	0.15 ± 0.0059	4.1	104
	123478-HxCDF	0.19 ± 0.0046	2.4	0.19 ± 0.011	5.8	101
	123678-HxCDF	0.10 ± 0.0048	5.0	0.10 ± 0.010	9.7	96
	123789-HxCDF	tr ¹⁾	-	tr	-	-
	234678-HxCDF	0.10 ± 0.0051	4.9	0.10 ± 0.0032	3.3	103
	1234678-HpCDF	0.36 ± 0.0089	2.5	0.37 ± 0.014	3.7	98
	1234789-HpCDF	0.086 ± 0.0037	4.4	0.080 ± 0.0028	3.6	107
	OCDF	0.64 ± 0.019	3.0	0.64 ± 0.015	2.4	100
ノンオルトPCBs	33'44'-TeCB (#77)	2.6 ± 0.056	2.1	2.5 ± 0.051	2.1	106
	344'5-TeCB (#81)	0.28 ± 0.0034	1.2	0.27 ± 0.0076	2.8	104
	33'44'5-PeCB (#126)	1.9 ± 0.030	1.6	1.9 ± 0.017	0.9	102
	33'44'55'-HxCB (#169)	0.66 ± 0.0086	1.3	0.67 ± 0.0080	1.2	99
モノオルトPCBs	233'44'-PeCB (#105)	35 ± 0.33	0.9	35 ± 0.81	2.3	102
	2344'5-PeCB (#114)	3.5 ± 0.058	1.7	3.2 ± 0.10	3.1	109
	23'44'5-PeCB (#118)	109 ± 1.8	1.6	104 ± 1.5	1.5	105
	2'344'5-PeCB (#123)	2.6 ± 0.059	2.3	2.7 ± 0.12	4.3	97
	233'44'5-HxCB (#156)	17 ± 0.19	1.1	17 ± 0.66	3.8	98
	233'44'5'-HxCB (#157)	5.2 ± 0.064	1.2	5.0 ± 0.24	4.7	104
	23'44'55'-HxCB (#167)	11 ± 0.14	1.3	11 ± 0.67	6.3	98
	233'44'55'-HpCB (#189)	3.1 ± 0.088	2.8	3.1 ± 0.29	9.1	100

1) tr: trace (LOD≤tr<LOQ)

表8 認証標準試料(WMF-01)の分析結果

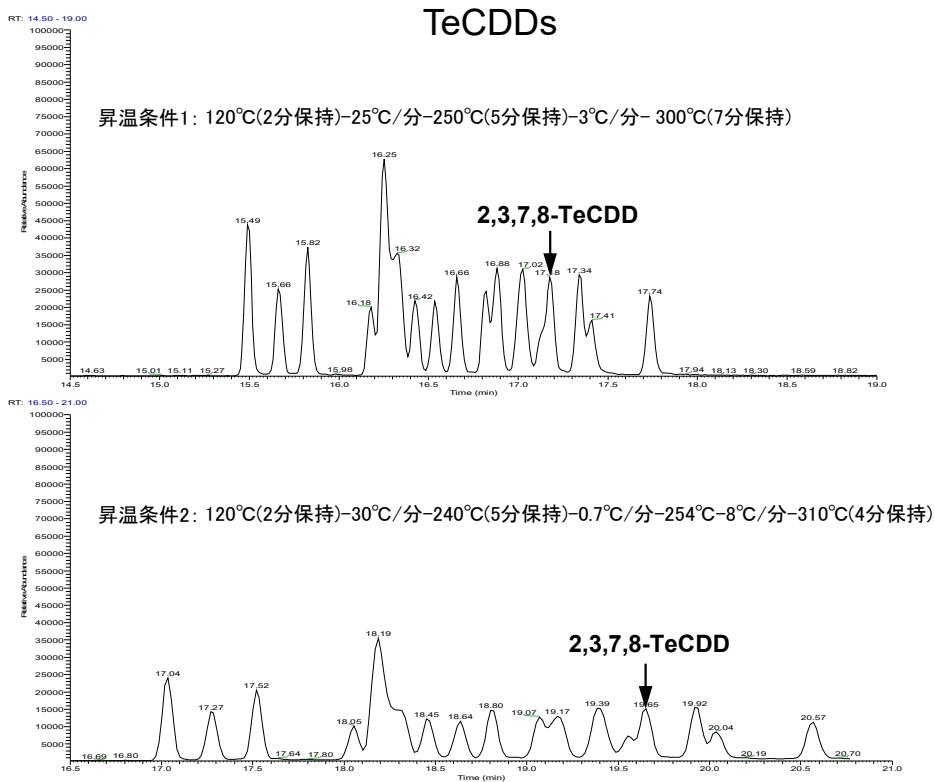
ダイオキシン類	認証値(参考値) pg/g	GC-MS/MS, pg/g	
		1st	2nd
2,3,7,8-TeCDD	13.1 ± 4.4	13.0	12.8
1,2,3,7,8-PeCDD	2.72 ± 1.3	2.46	2.63
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.22 * ¹⁾ ± 0.3	(0.14) ²⁾	(0.11)
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.88 ± 0.4	0.86	0.92
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.27 * ± 0.4	(0.10)	(0.09)
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.59 * ± 0.7	0.20	(0.17)
OCDD	3.91 * ± 6.2	0.76	0.66
2,3,7,8-TeCDF	13.1 ± 4.9	13.9	14.7
1,2,3,7,8-PeCDF	1.53 * ± 1.4	0.97	1.00
2,3,4,7,8-PeCDF	7.15 ± 2.2	6.52	6.77
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.86 * ± 1.0	0.42	0.48
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.51 * ± 0.7	0.27	0.26
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.25 * ± 0.4	- ³⁾	-
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.68 * ± 1.2	0.19	0.21
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.01 * ± 1.9	0.17	0.13
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.30 * ± 0.5	-	-
OCDF	1.38 * ± 2.1	-	-
3,3',4,4'-TeCB(#77)	2,233 ± 720	2,170	2,169
3,4,4',5-TeCB(#81)	201 ± 58	198	199
3,3',4,4',5-PeCB(#126)	739 ± 260	735	779
3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)	76 ± 30	72	73
2,3,3',4,4'-PeCB(#105)	49,050 ± 14,200	59,932	58,244
2,3,4,4',5-PeCB(#114)	3,523 ± 1,670	3,978	3,891
2,3',4,4',5-PeCB(#118)	130,100 ± 32,500	139,371	140,213
2',3,4,4',5-PeCB(#123)	4,233 ± 2,620	4,307	4,497
2,3,3',4,4',5-HxCB(#156)	14,890 ± 5,020	16,480	16,135
2,3,3',4,4',5'-HxCB(#157)	3,488 ± 870	4,290	4,092
2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167)	9,750 ± 3,090	11,310	10,977
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(#189)	2,016 ± 611	2,244	2,224

1) * は参考値

2) LODs以上LOQs未満

3) LODs未満

TeCDDs



TeCDFs

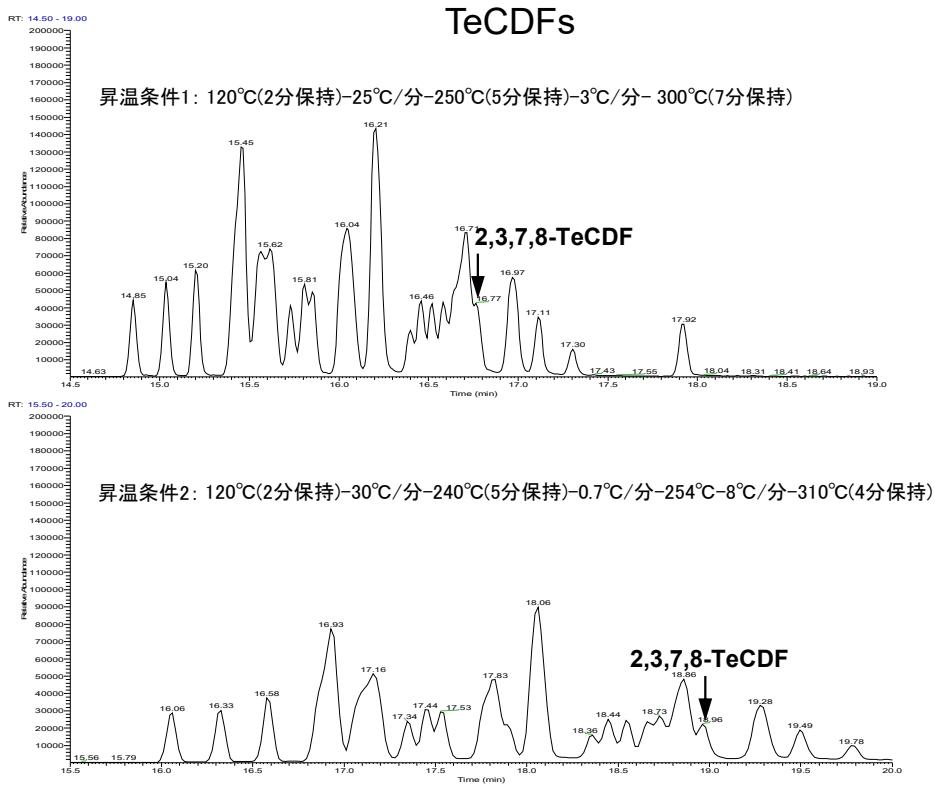
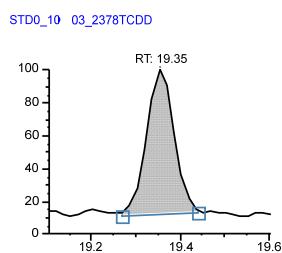
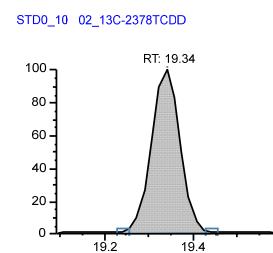


図 1 DB-5ms UI におけるの昇温条件の検討 (TeCDDs/TeCDFs)

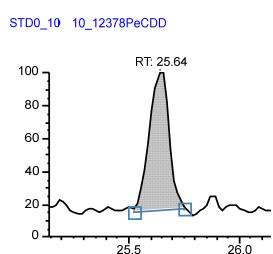
2,3,7,8-TeCDD



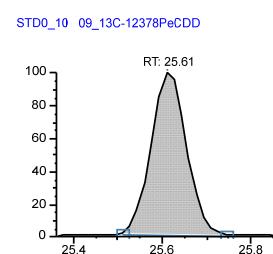
$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TeCDD



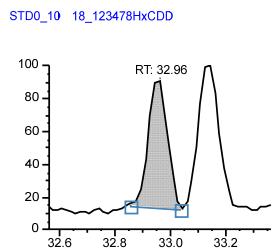
1,2,3,7,8-PeCDD



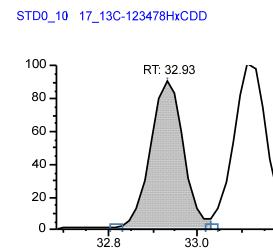
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8-PeCDD



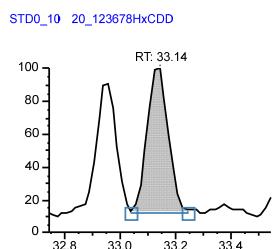
1,2,3,4,7,8-HxCDD



$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDD



1,2,3,6,7,8-HxCDD



$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDD

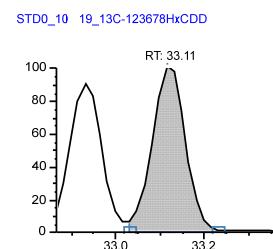
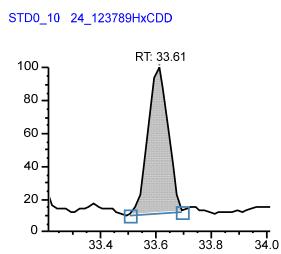
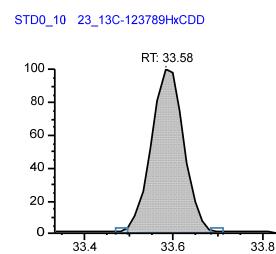


図 2 検量線用標準溶液(Conc.1)のSRMクロマトグラム(PCDD/PCDFs)

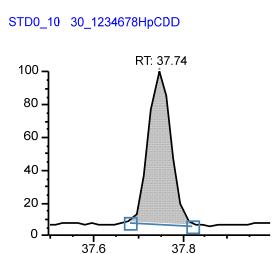
1,2,3,7,8,9-HxCDD



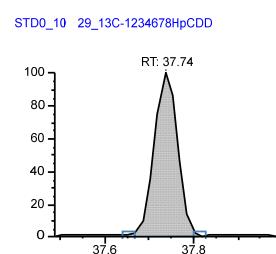
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDD



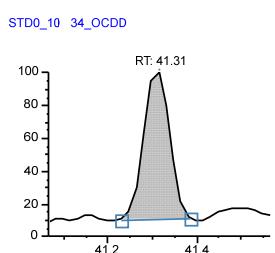
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD



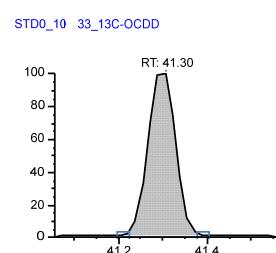
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD



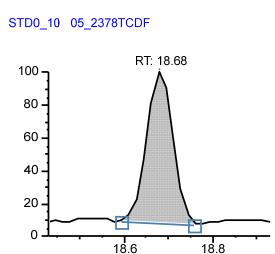
OCDD



$^{13}\text{C}_{12}$ -OCDD



2,3,7,8-TeCDF



$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TeCDF

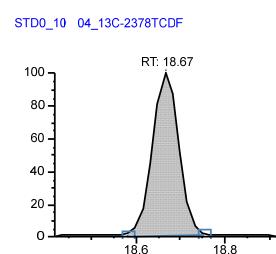
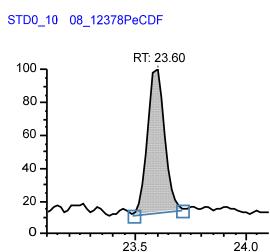
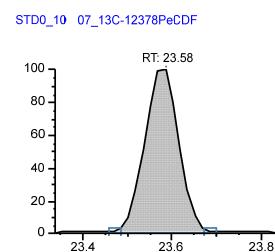


図 2 検量線用標準溶液(Conc.1)の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs)(つづき)

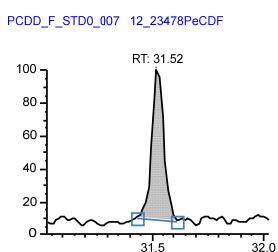
1,2,3,7,8-PeCDF



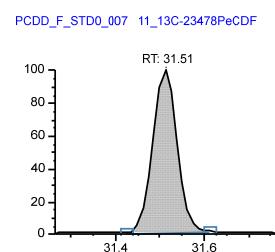
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8-PeCDF



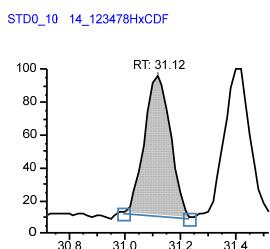
2,3,4,7,8-PeCDF



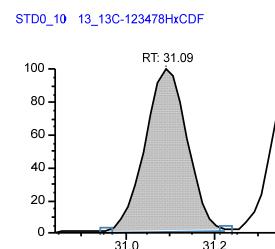
$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,7,8-PeCDF



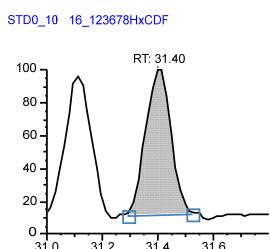
1,2,3,4,7,8-HxCDF



$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDF



1,2,3,6,7,8-HxCDF



$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDF

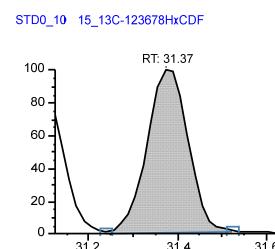
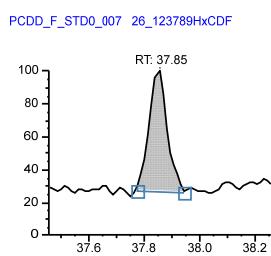
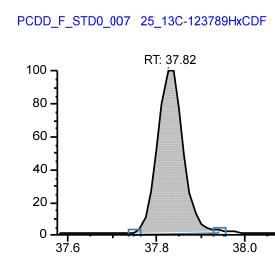


図 2 検量線用標準溶液(Conc.1)の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

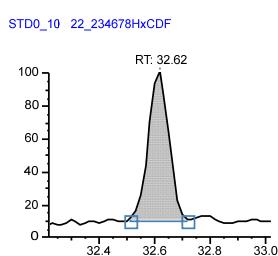
$1,2,3,7,8,9-\text{HxCDF}$



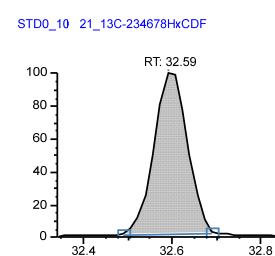
$^{13}\text{C}_{12}-1,2,3,7,8,9-\text{HxCDF}$



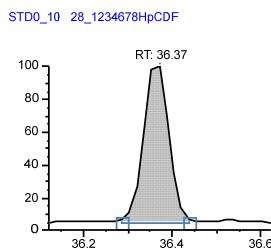
$2,3,4,6,7,8-\text{HxCDF}$



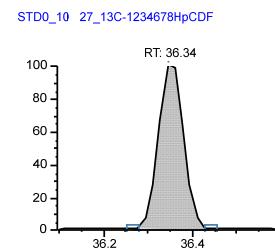
$^{13}\text{C}_{12}-2,3,4,6,7,8-\text{HxCDF}$



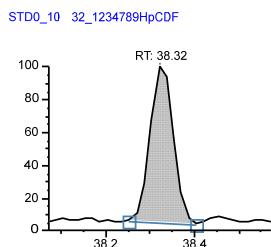
$1,2,3,4,6,7,8-\text{HpCDF}$



$^{13}\text{C}_{12}-1,2,3,4,6,7,8-\text{HpCDF}$



$1,2,3,4,7,8,9-\text{HpCDF}$



$^{13}\text{C}_{12}-1,2,3,4,7,8,9-\text{HpCDF}$

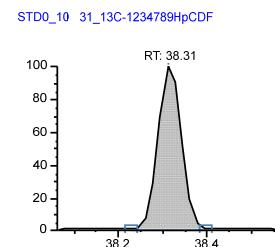


図 2 検量線用標準溶液(Conc.1)の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)



図 2 検量線用標準溶液(Conc.1)の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs)(つづき)

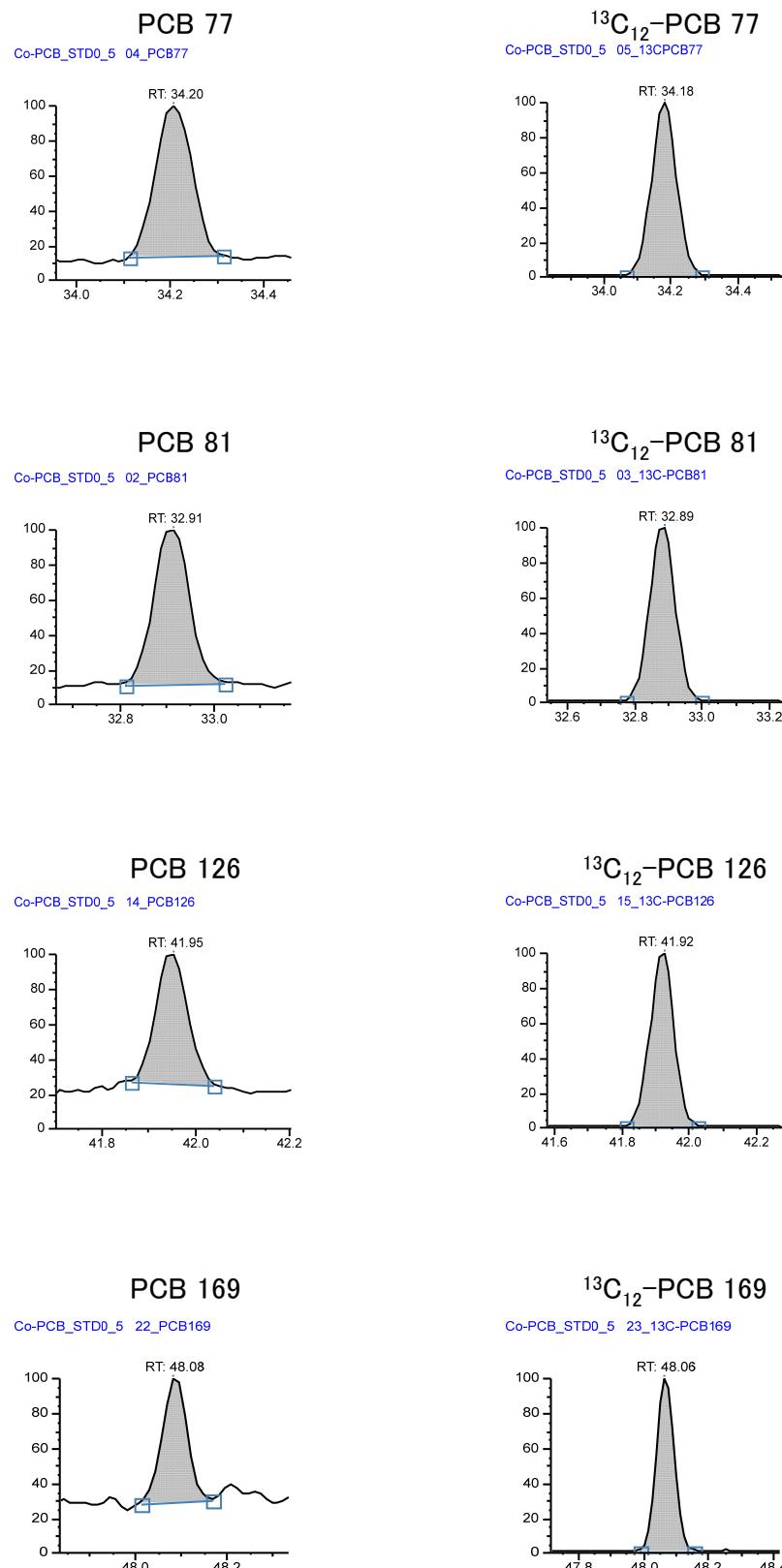


図 3 検量線用標準溶液(Conc.1)の SRM クロマトグラム(Co-PCBs)

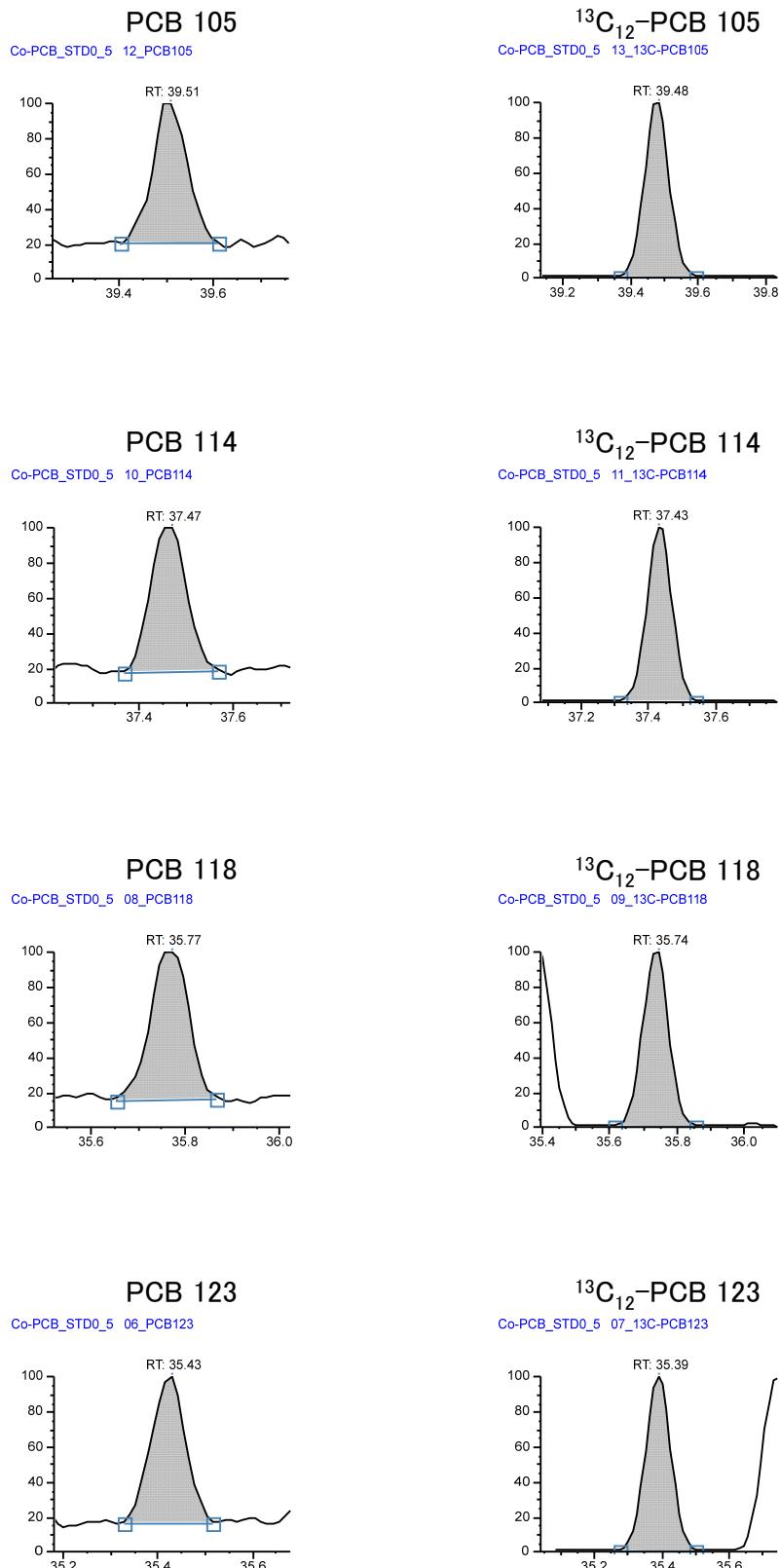


図 3 検量線用標準溶液(Conc.1)のSRMクロマトグラム(Co-PCBs)(つづき)

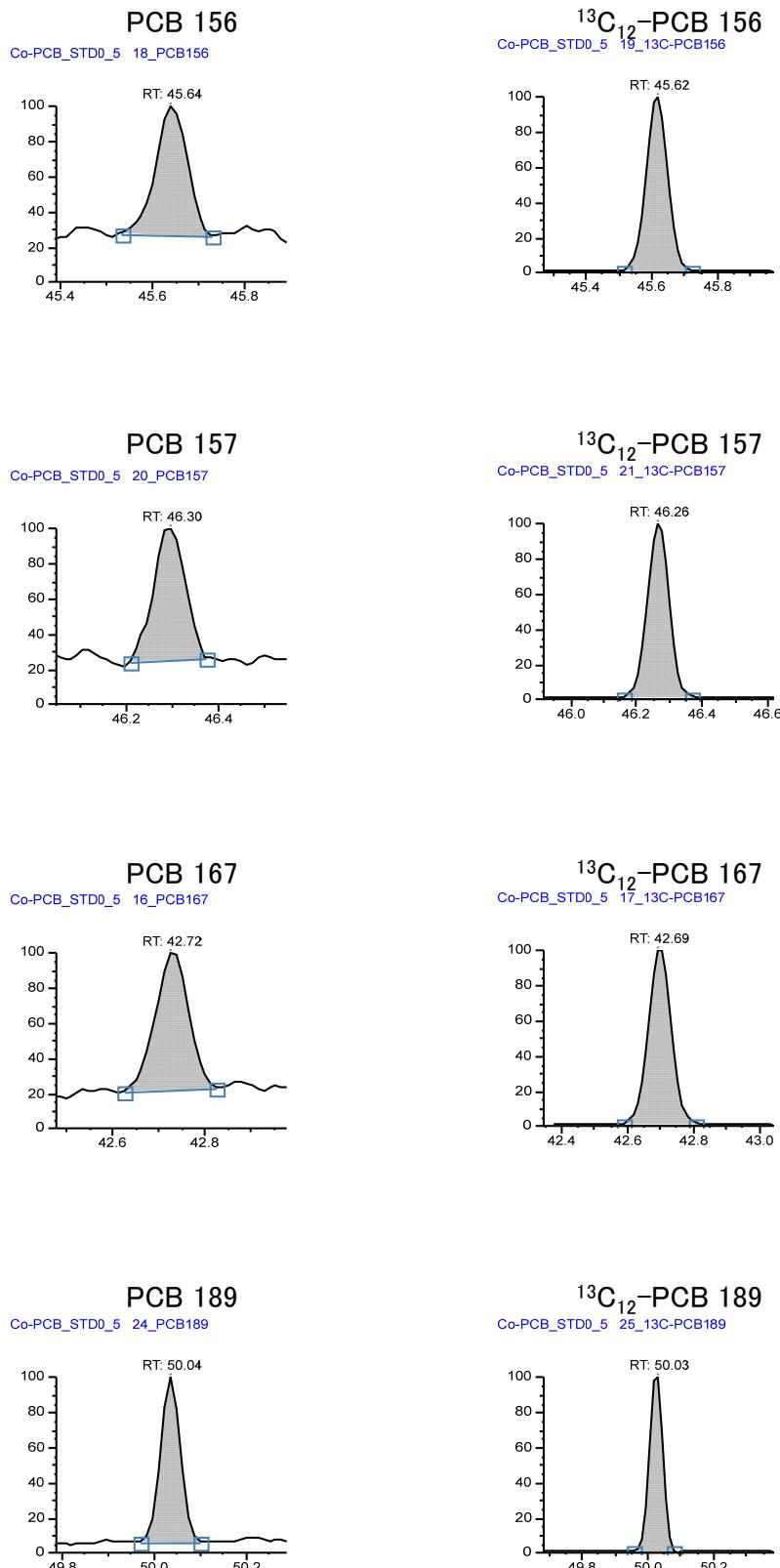


図 3 検量線用標準溶液(Conc.1)のSRMクロマトグラム(Co-PCBs)(つづき)

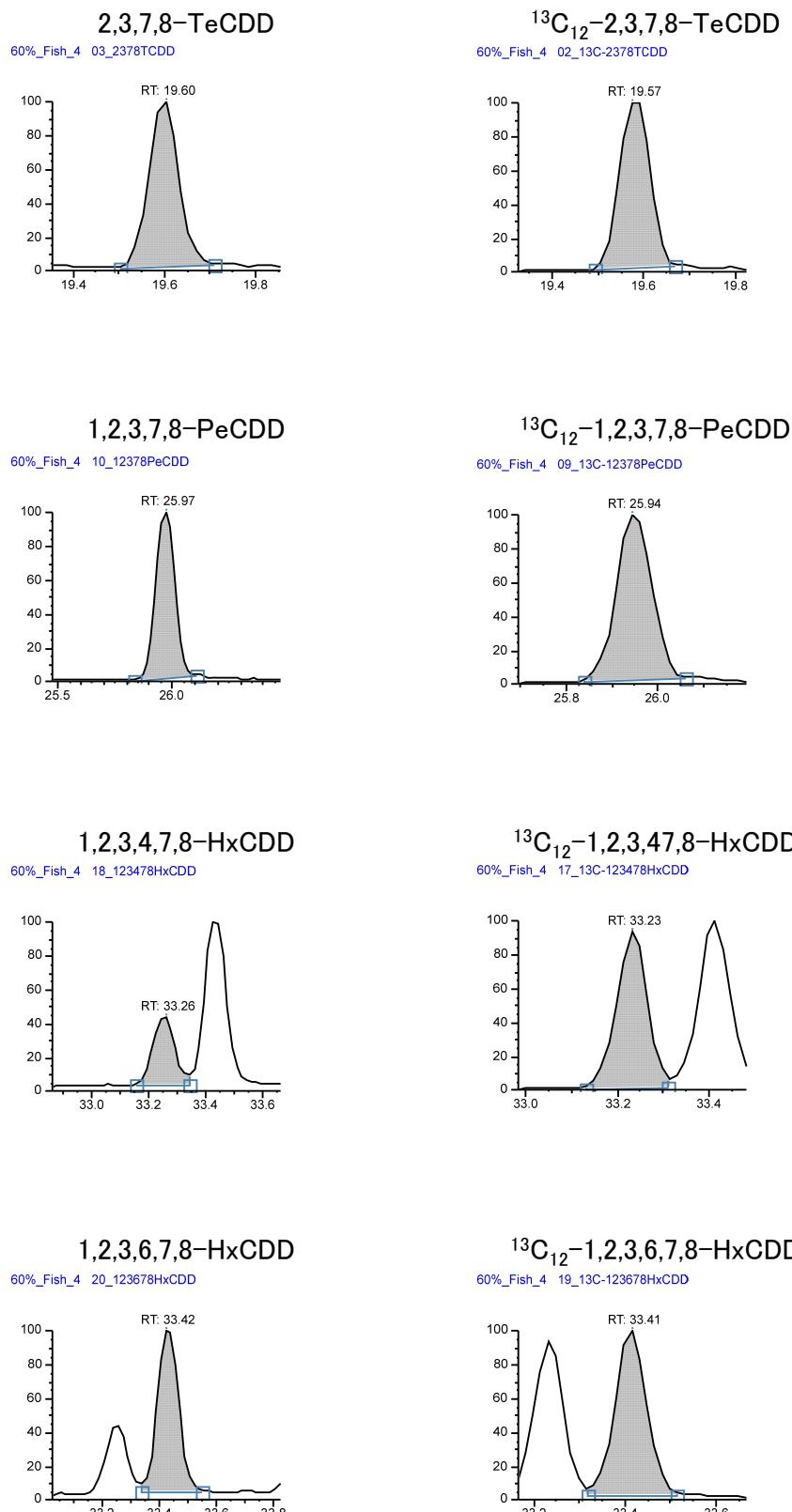


図 4 ブリの SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs)

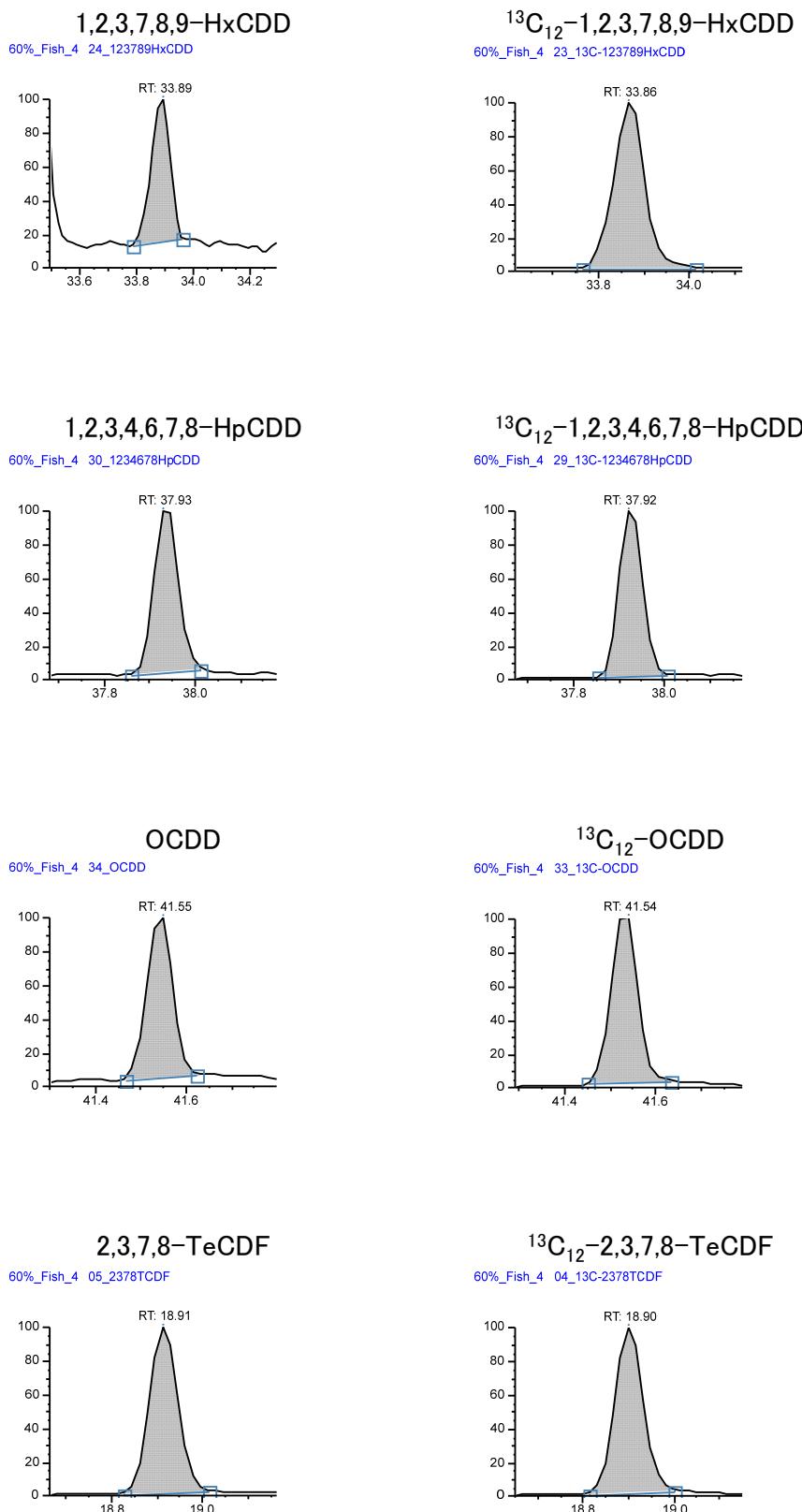


図 4 ブリの SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

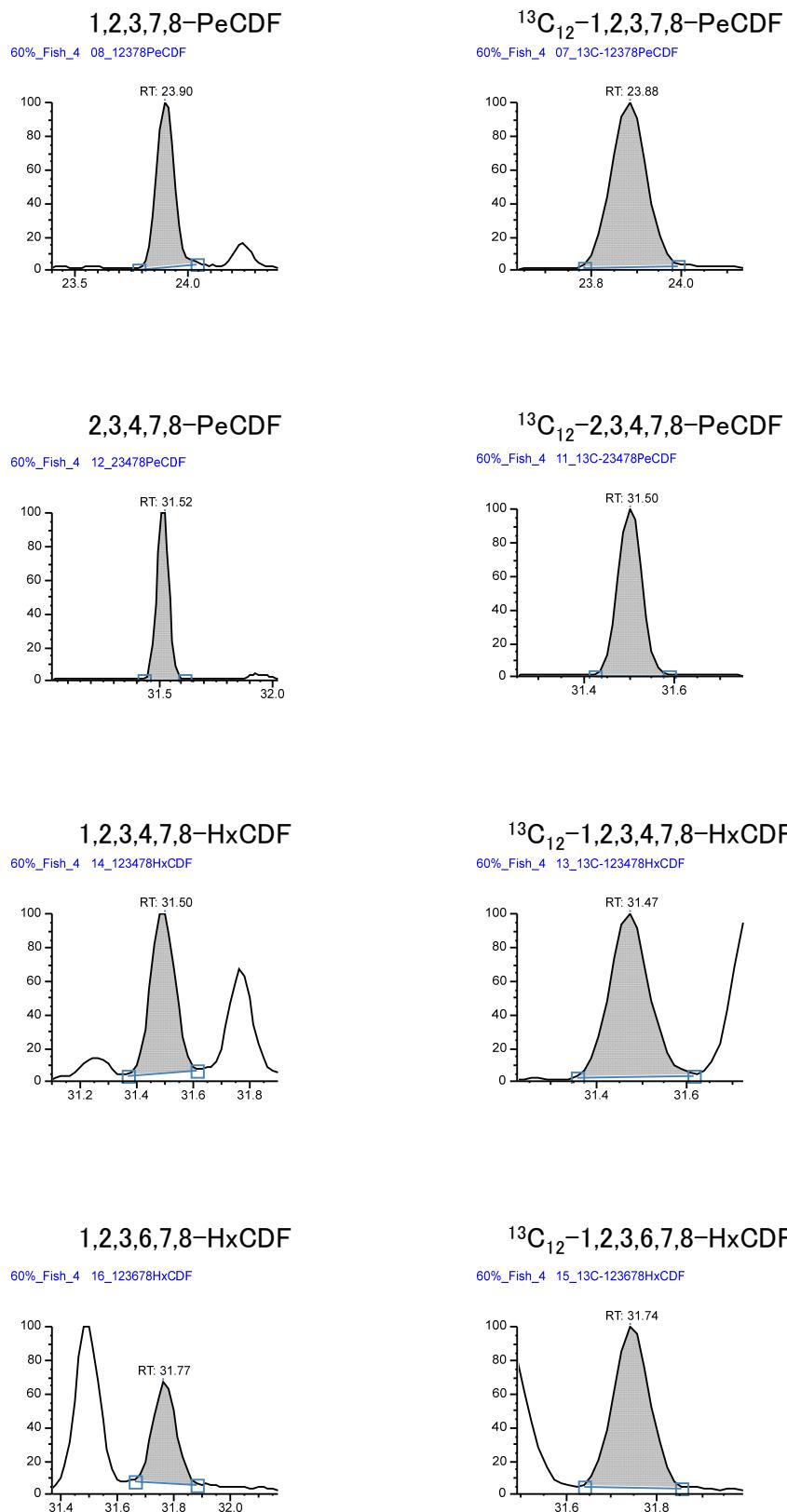


図 4 ブリの SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

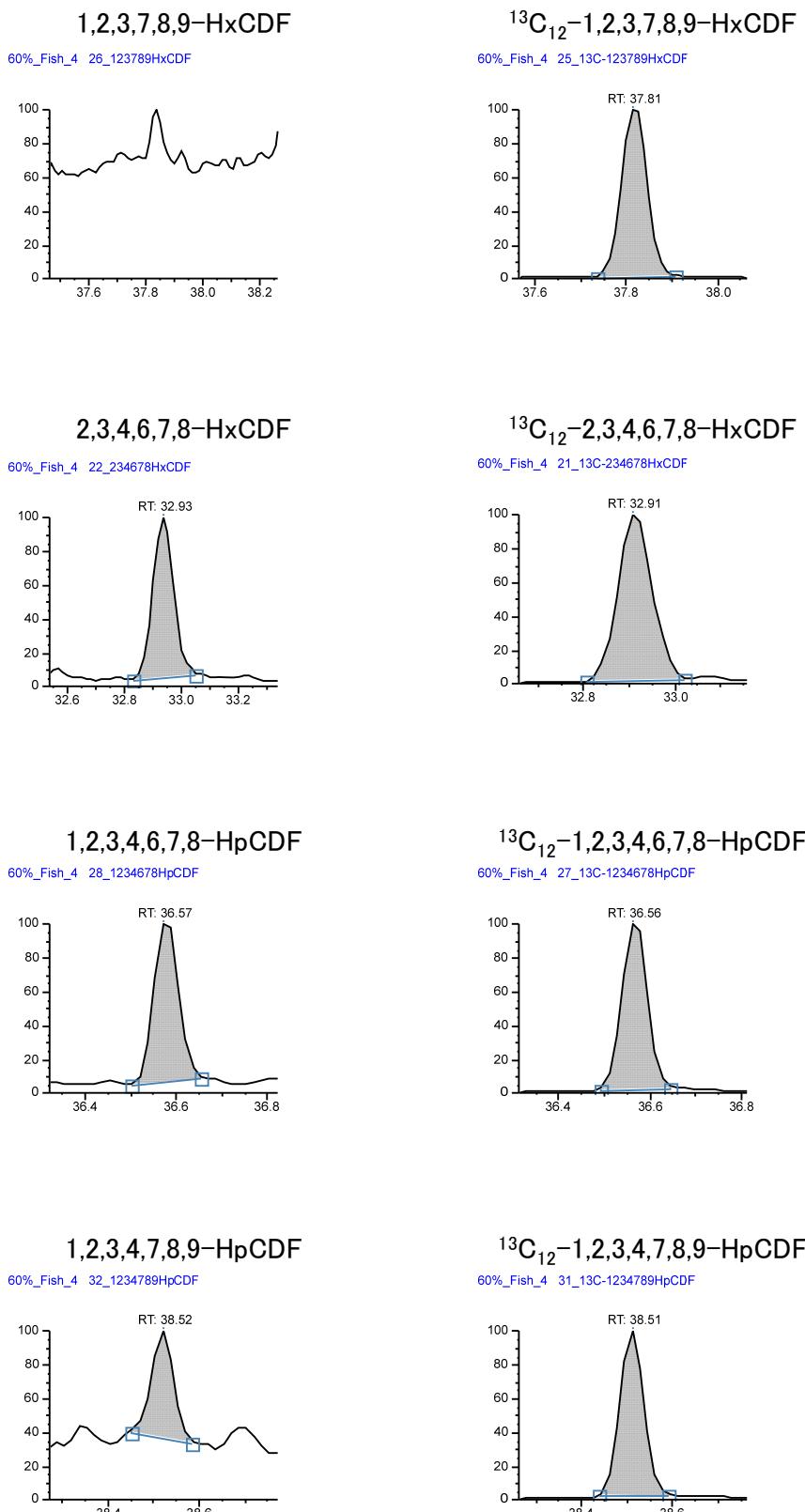


図 4 ブリの SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

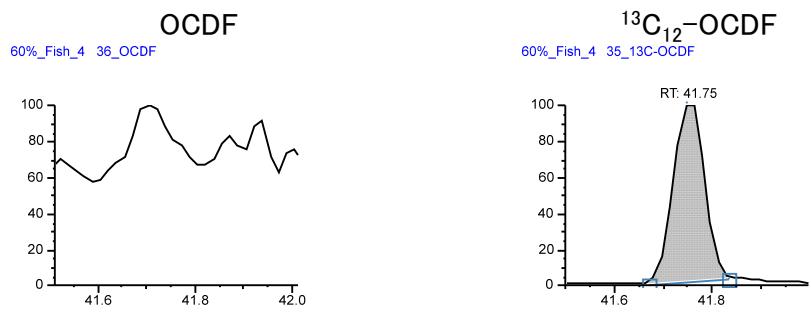


図 4 ブリの SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

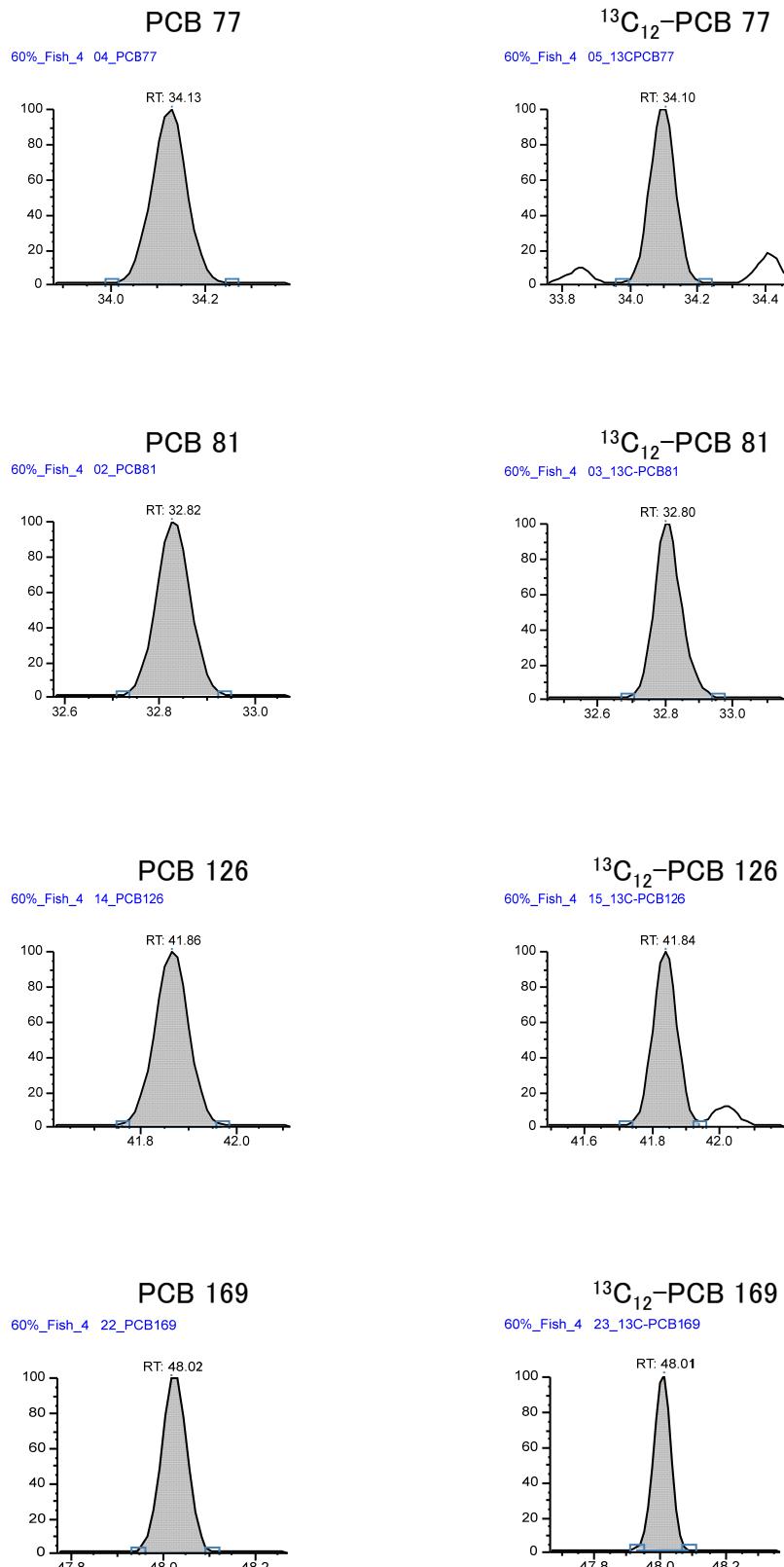


図 5 ブリの SRM クロマトグラム(Co-PCBs)

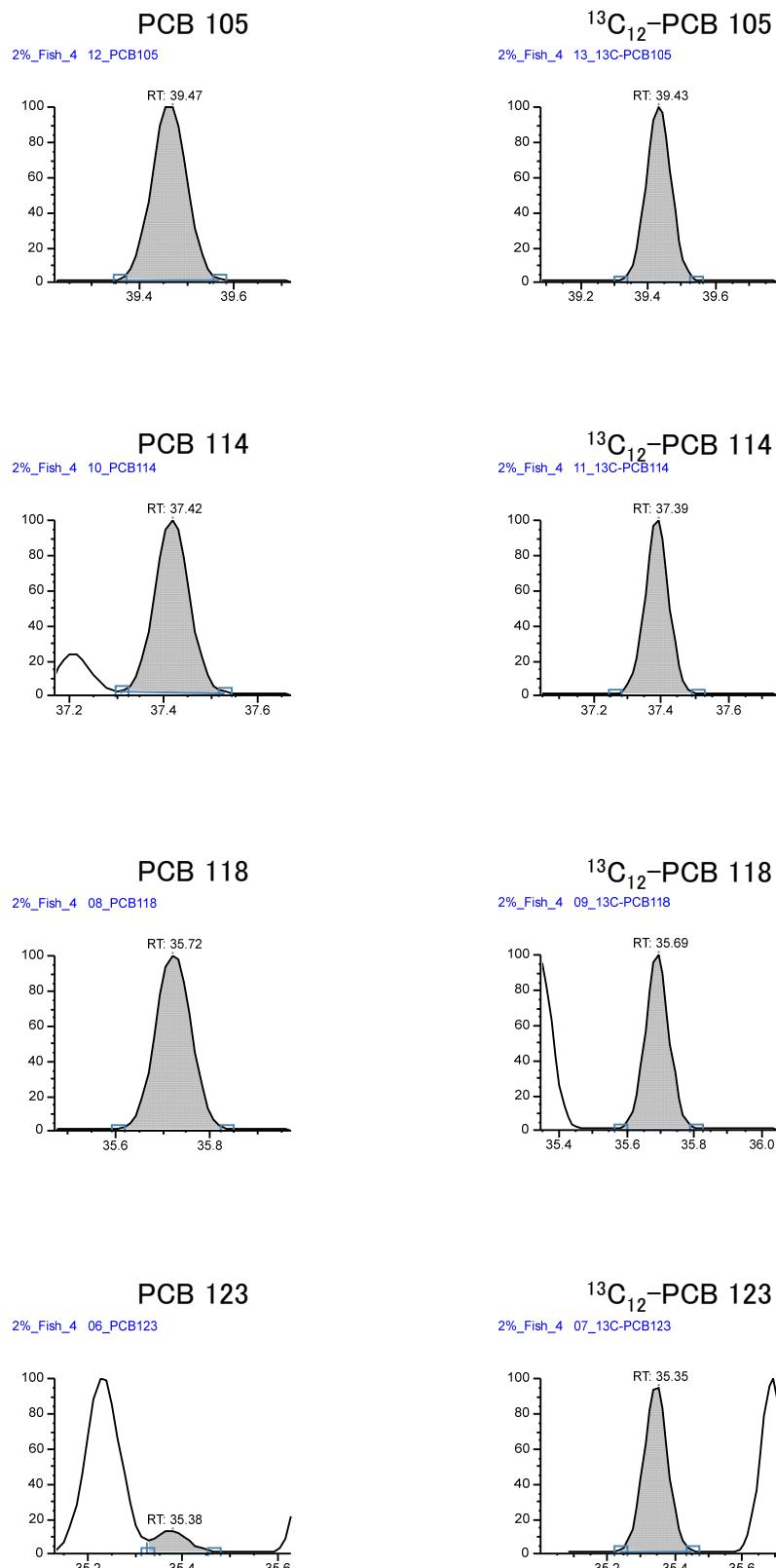


図 5 ブリの SRM クロマトグラム(Co-PCBs) (つづき)

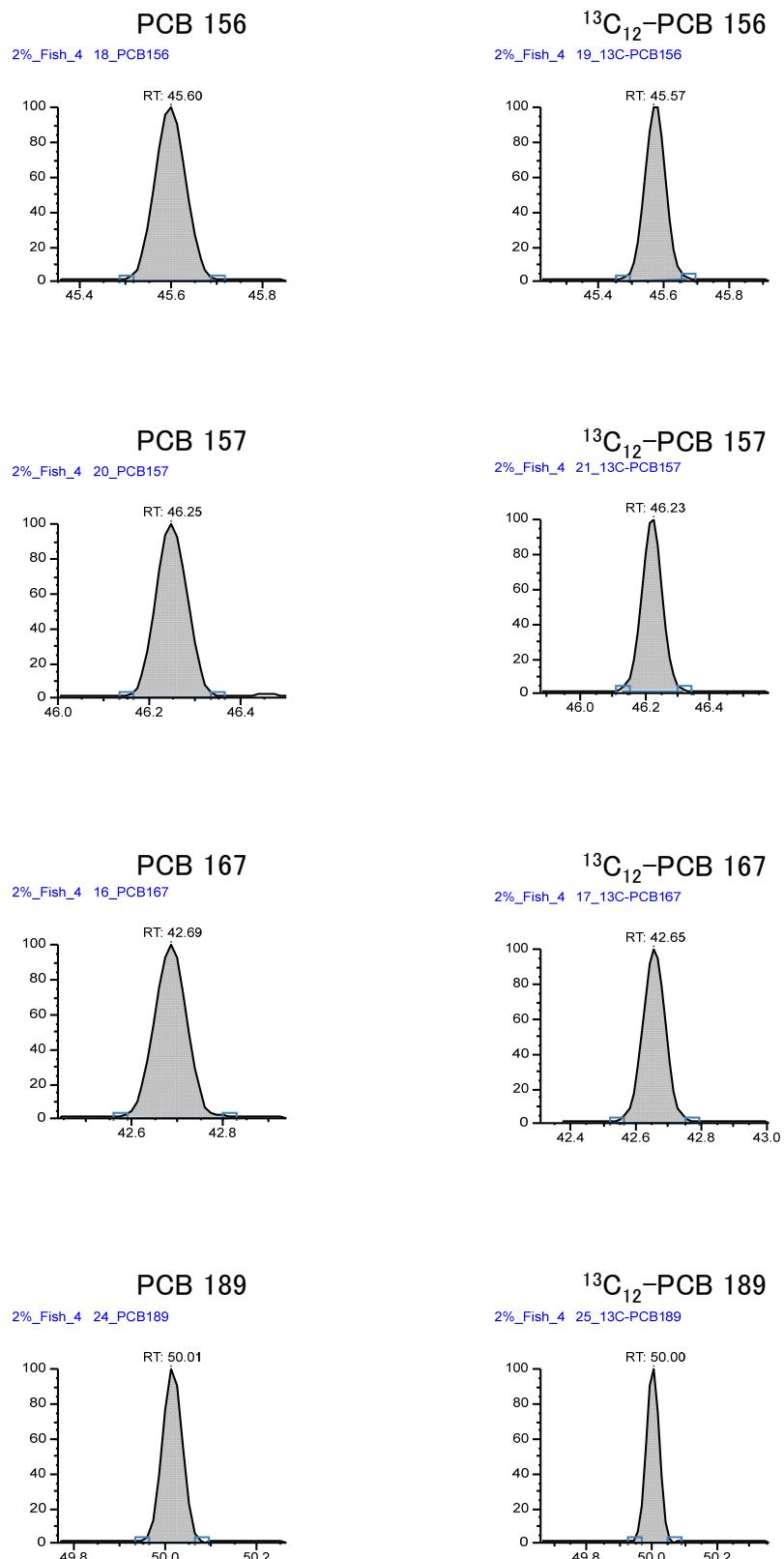


図 5 ブリの SRM クロマトグラム(Co-PCBs) (つづき)

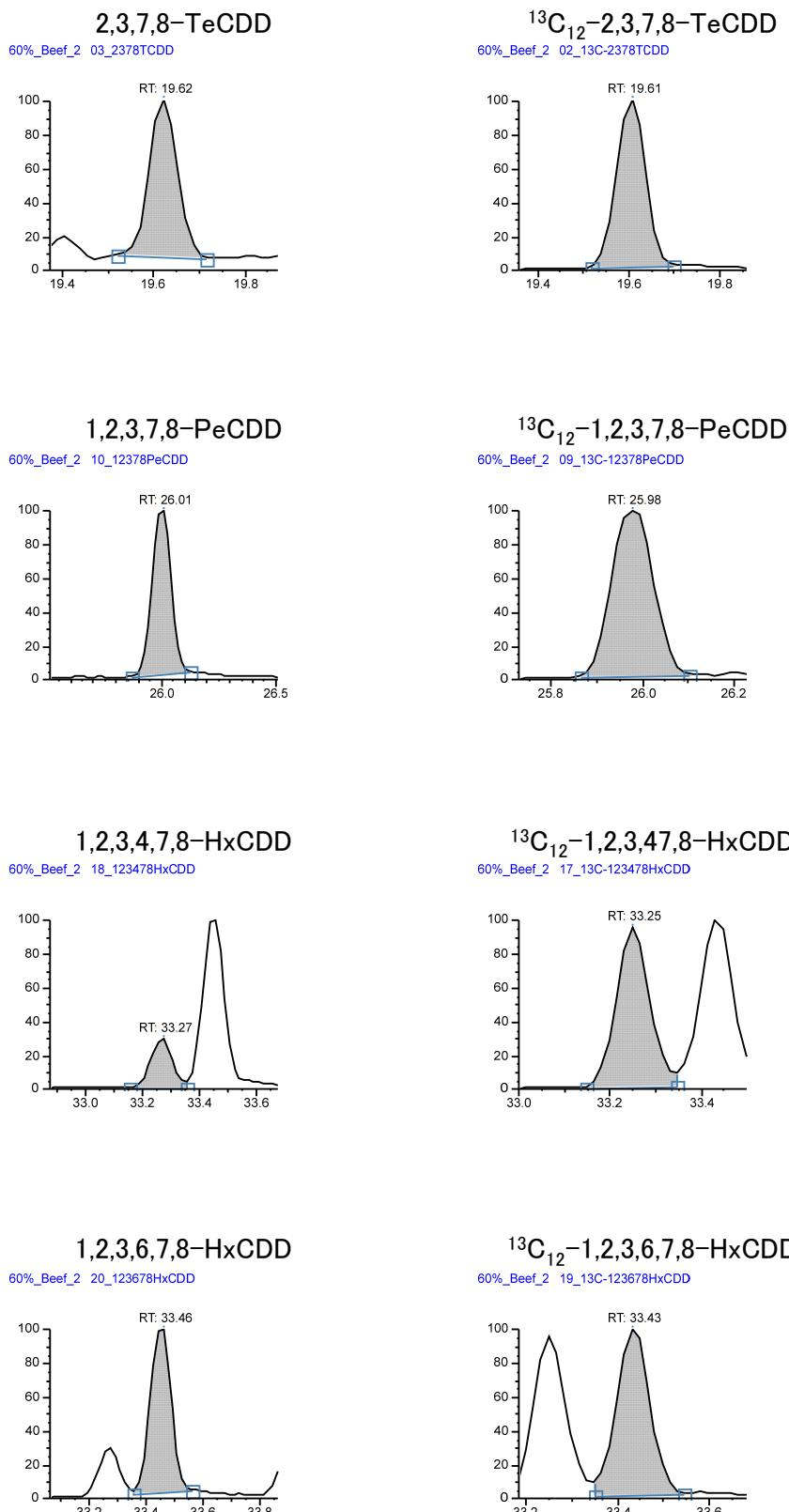


図 6 牛肉の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs)

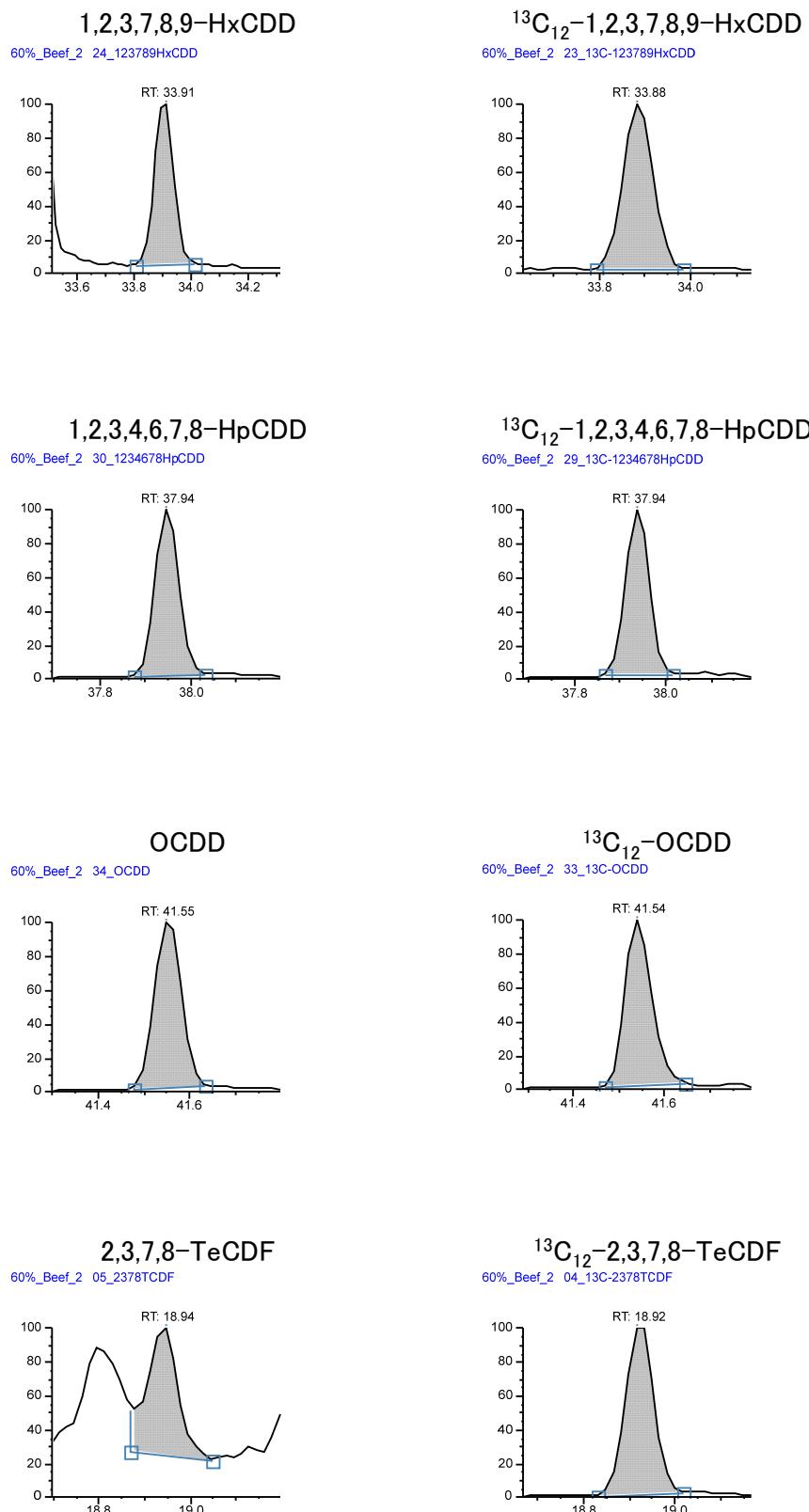


図 6 牛肉の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

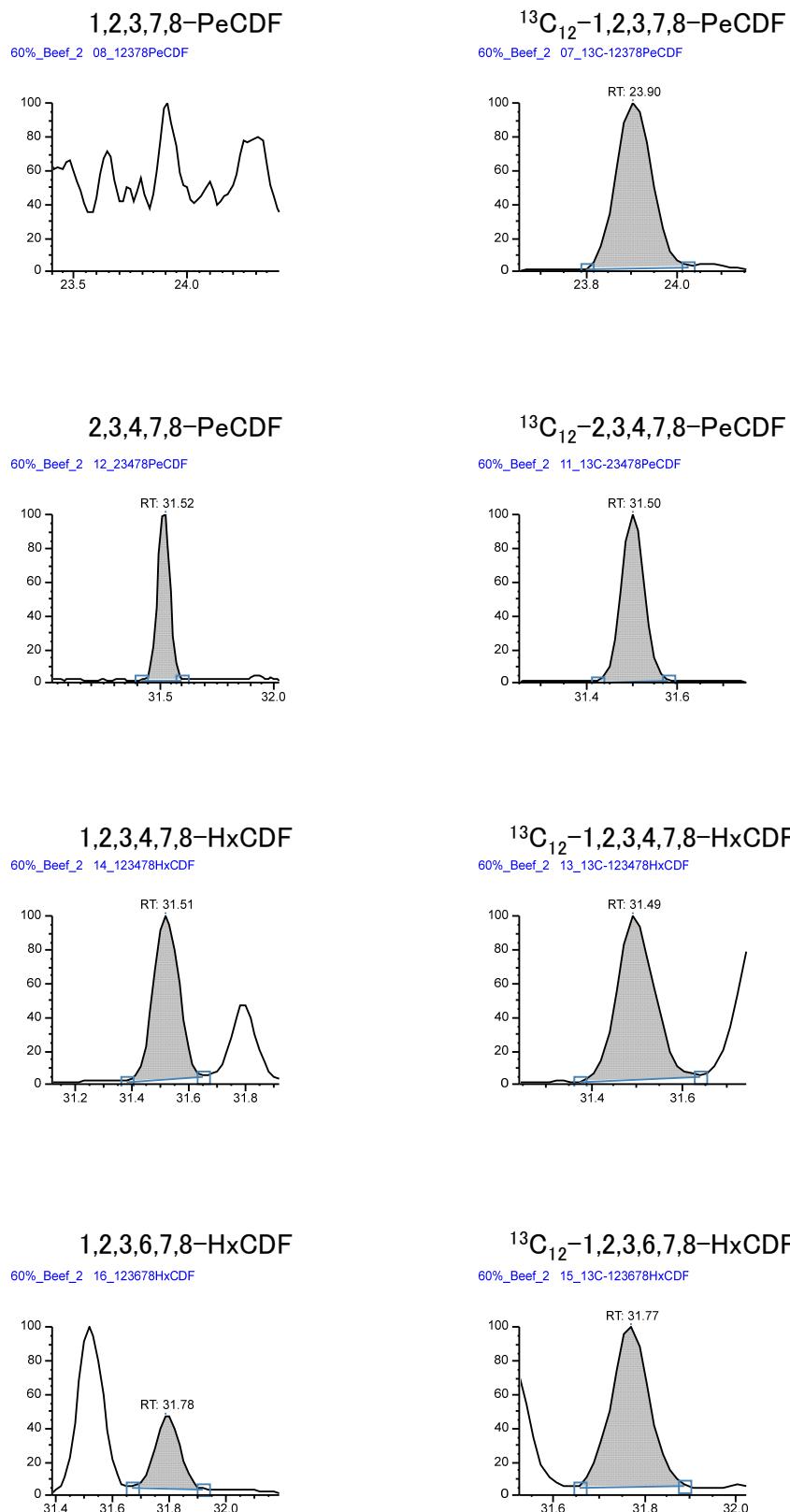


図 6 牛肉の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

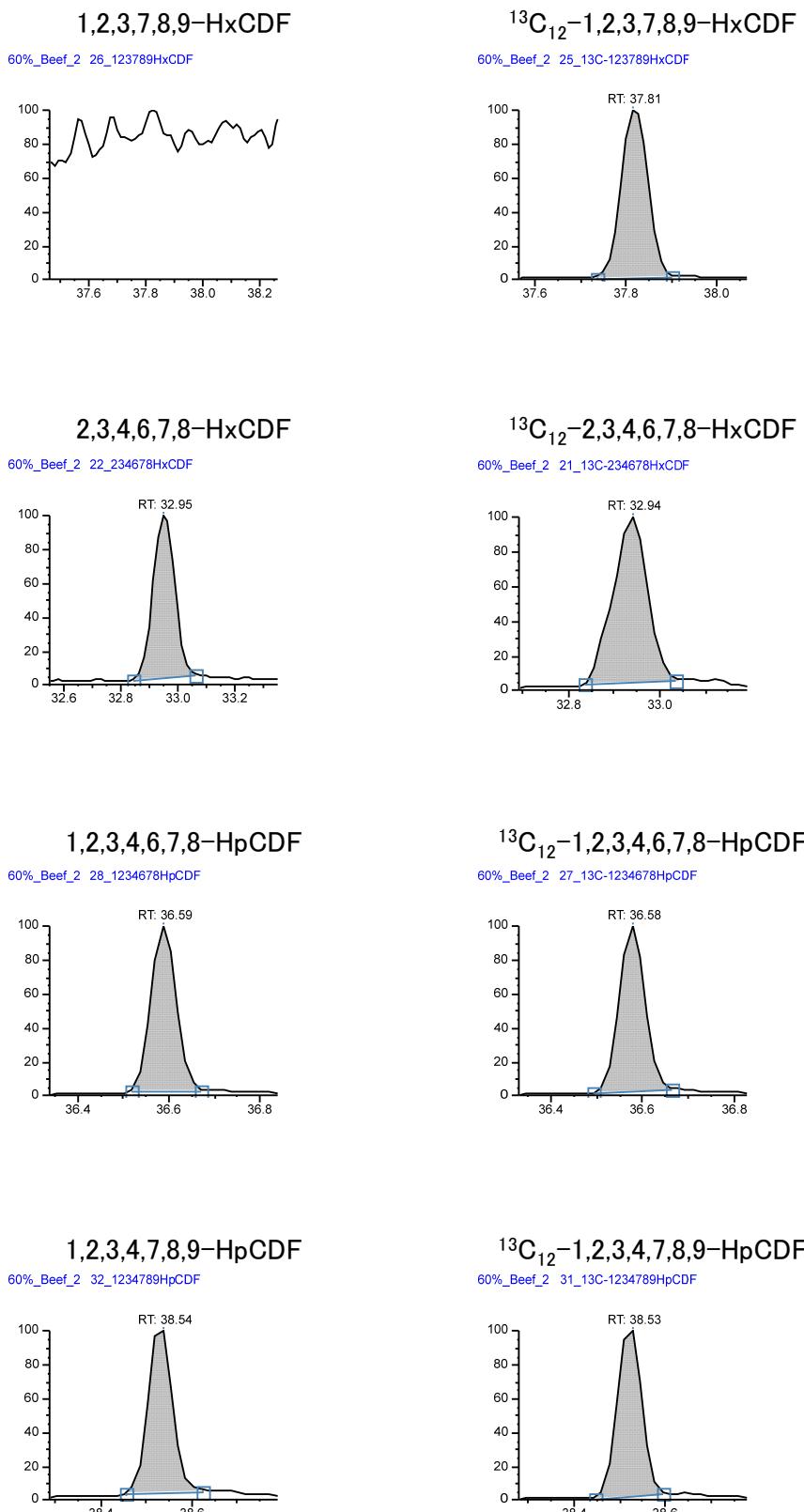


図 6 牛肉の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

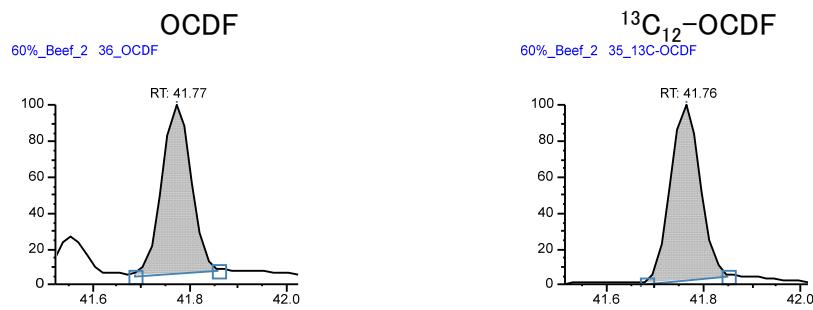


図 6 牛肉の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

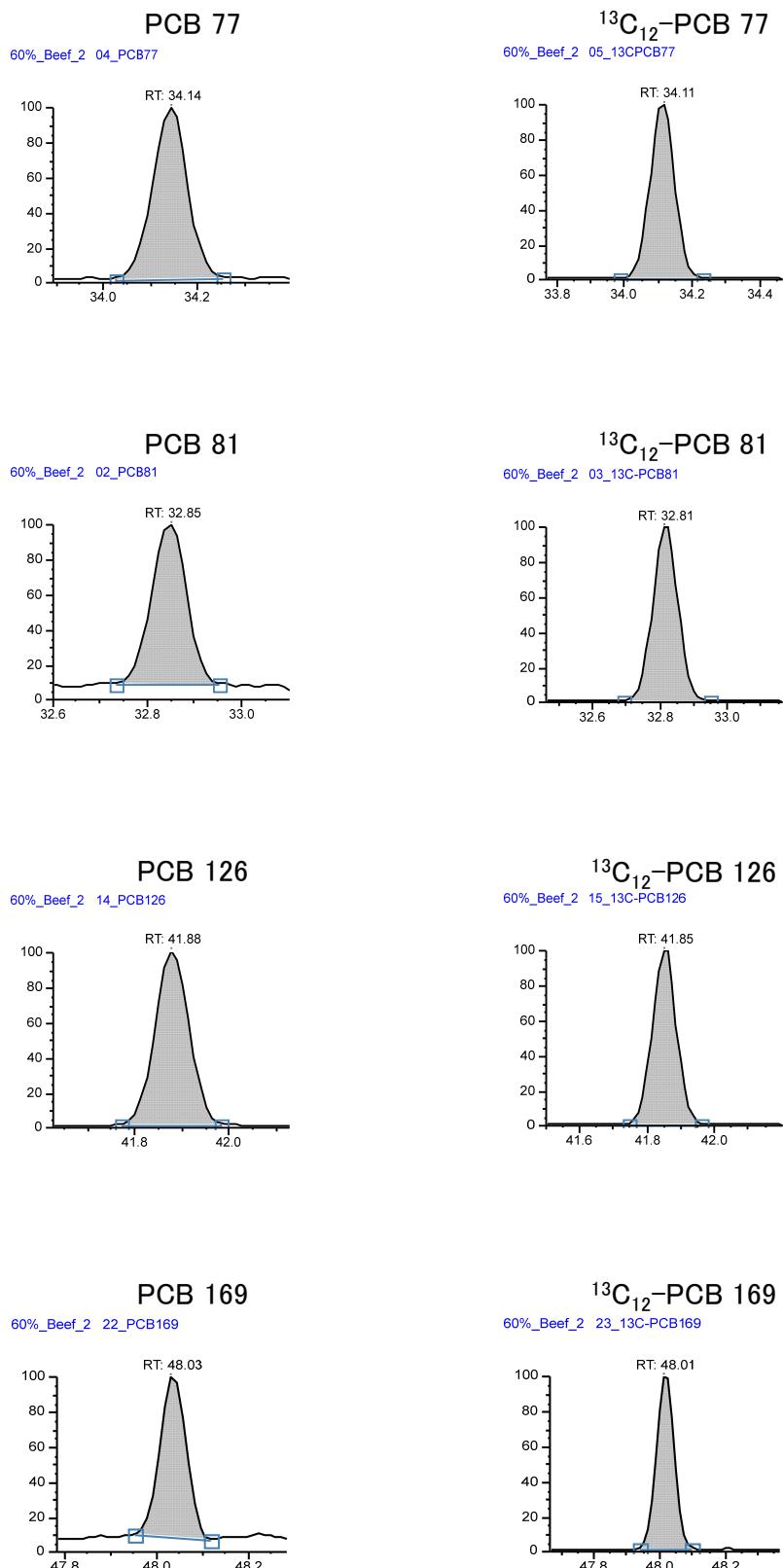


図 7 牛肉の SRM クロマトグラム(Co-PCBs)

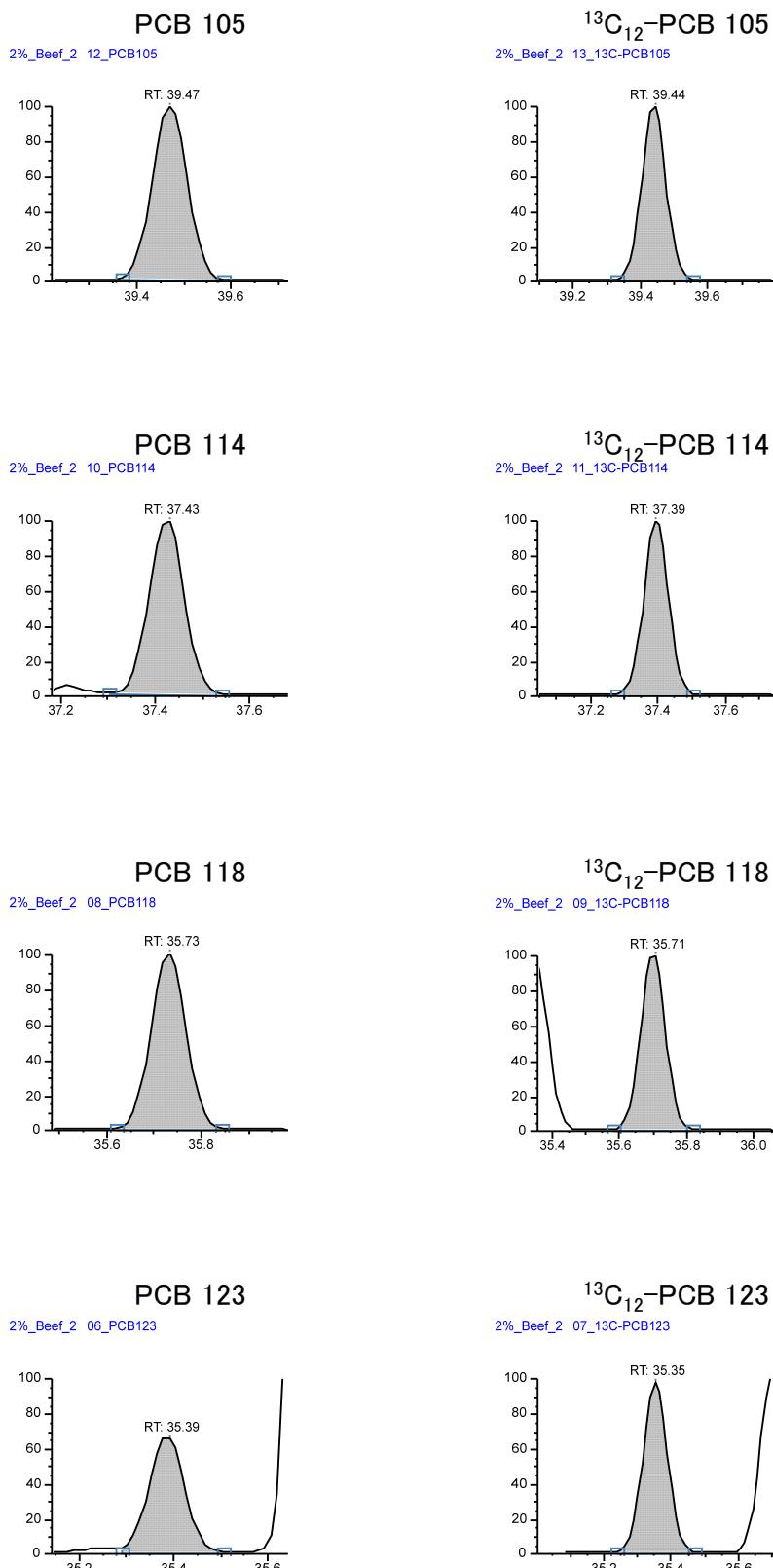


図 7 牛肉の SRM クロマトグラム (Co-PCBs) (つづき)

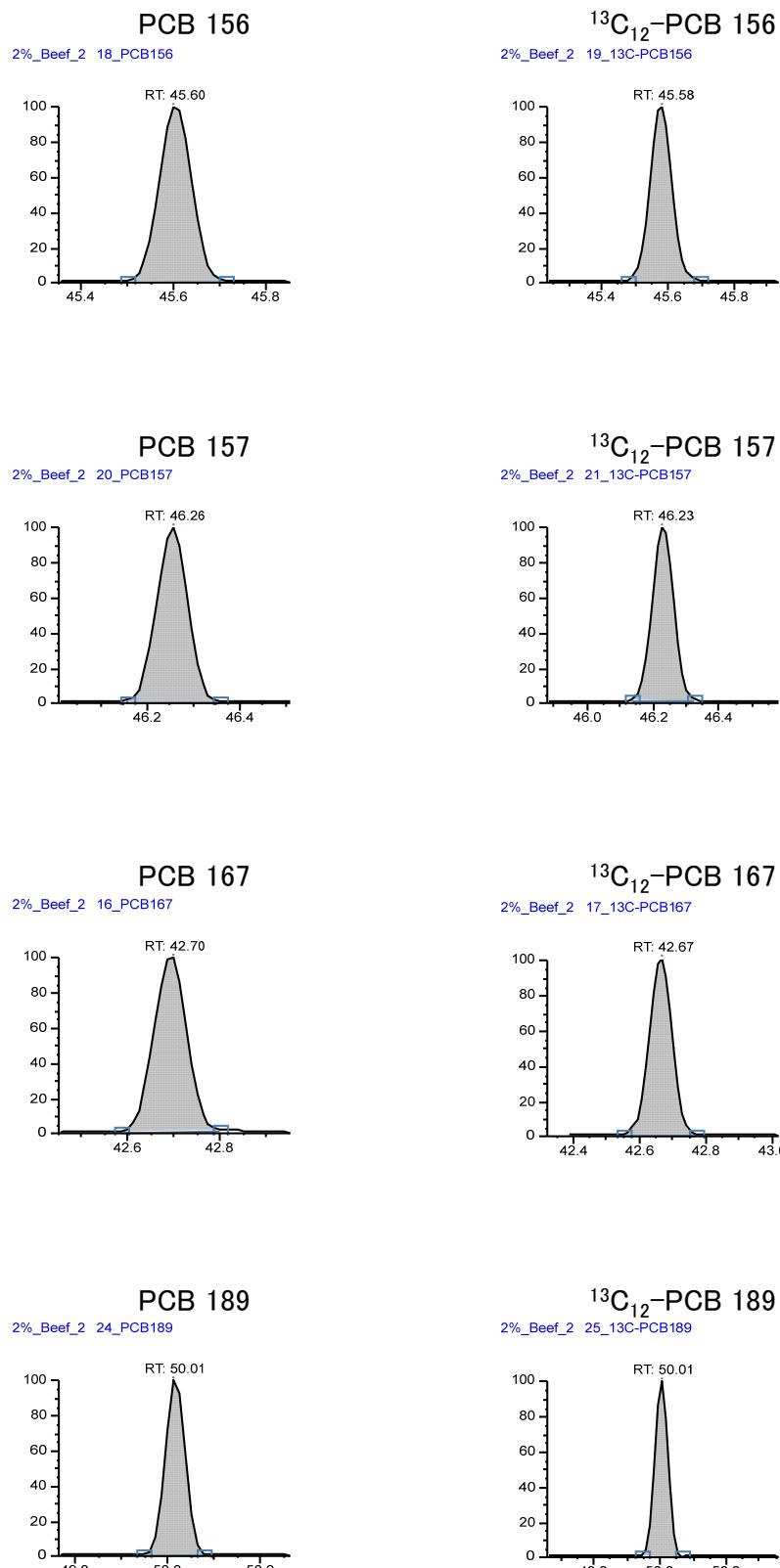


図 7 牛肉の SRM クロマトグラム(Co-PCBs) (つづき)

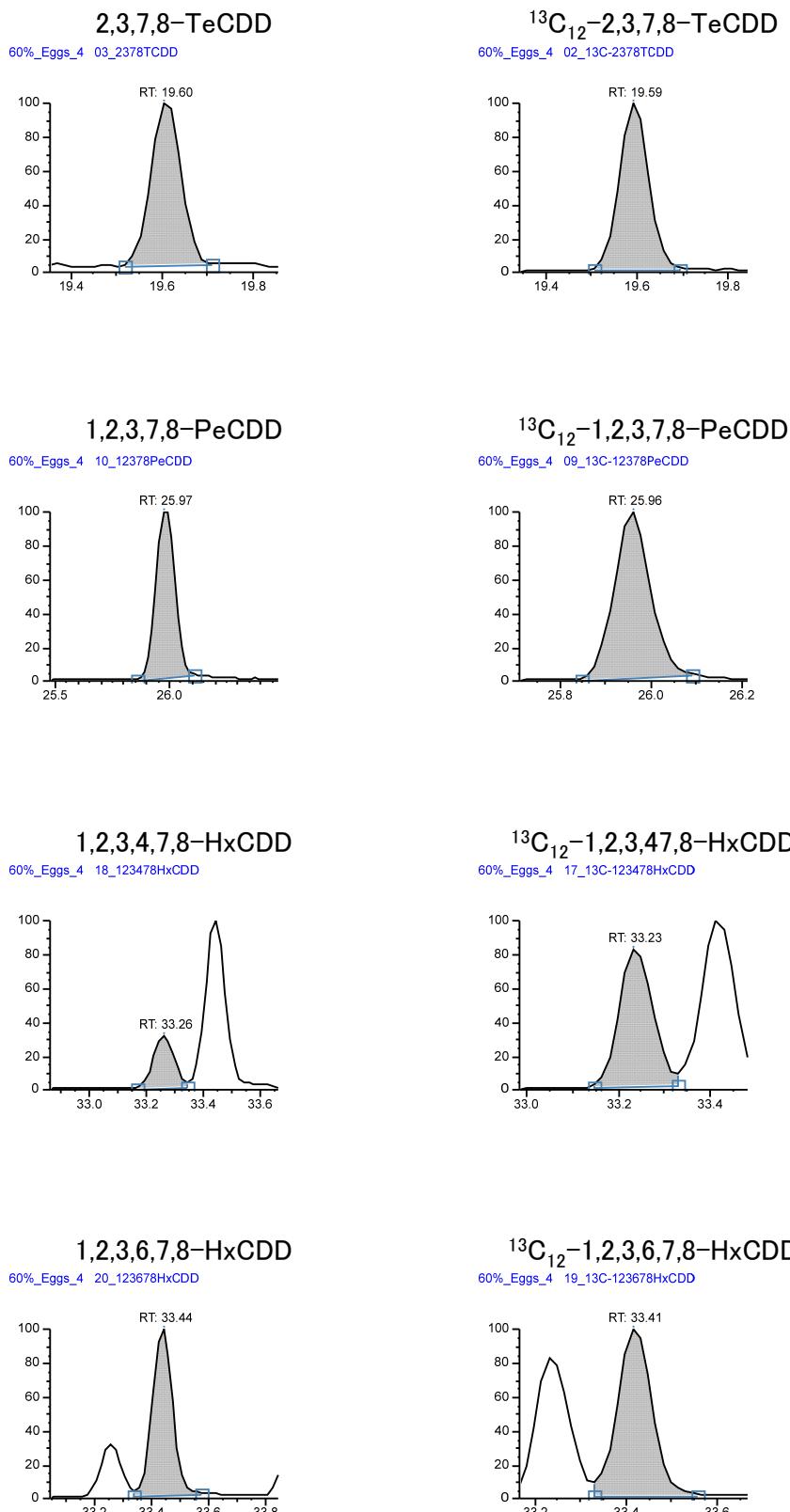


図 8 鶏卵の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs)

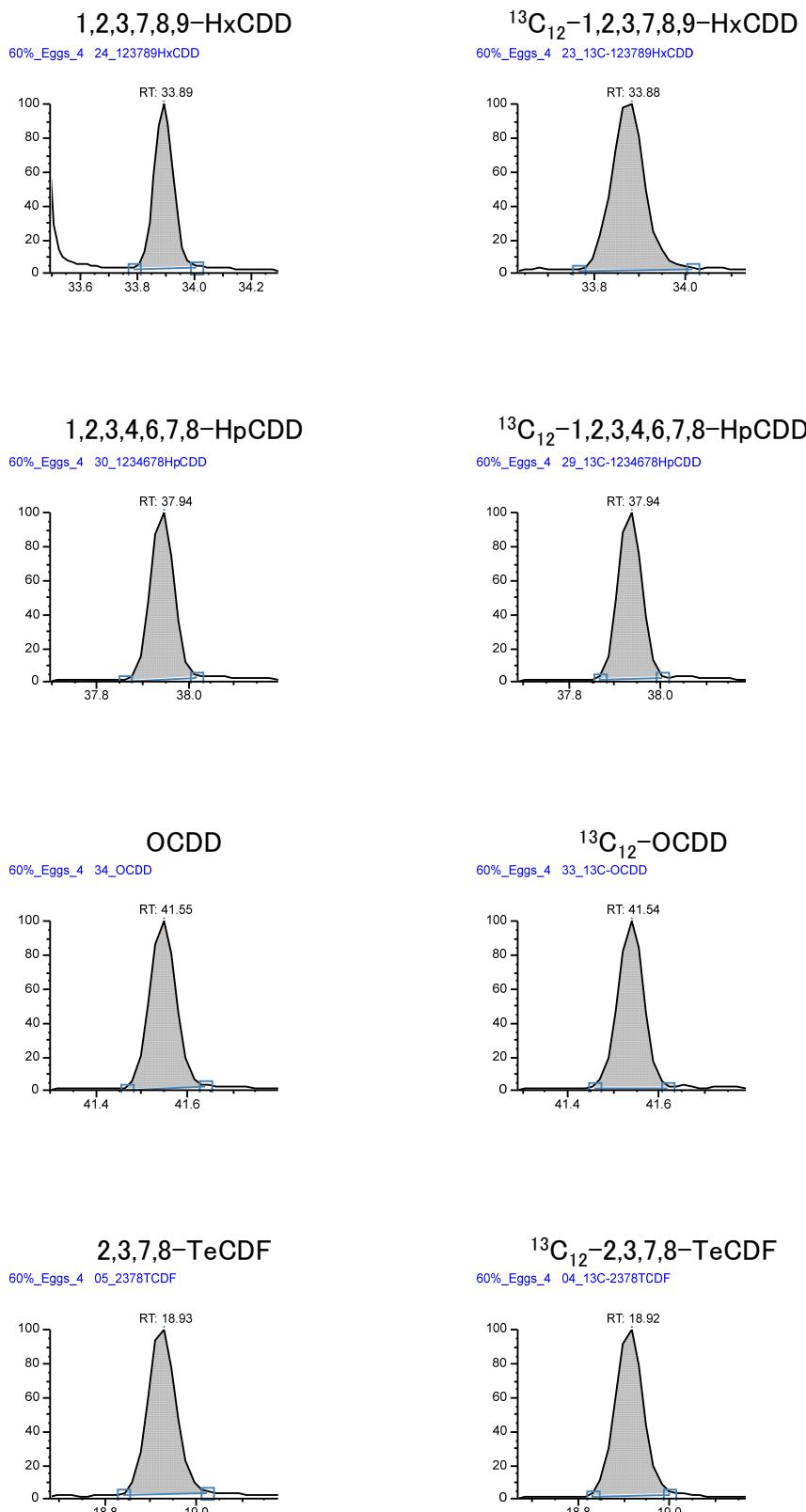


図 8 鶏卵の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

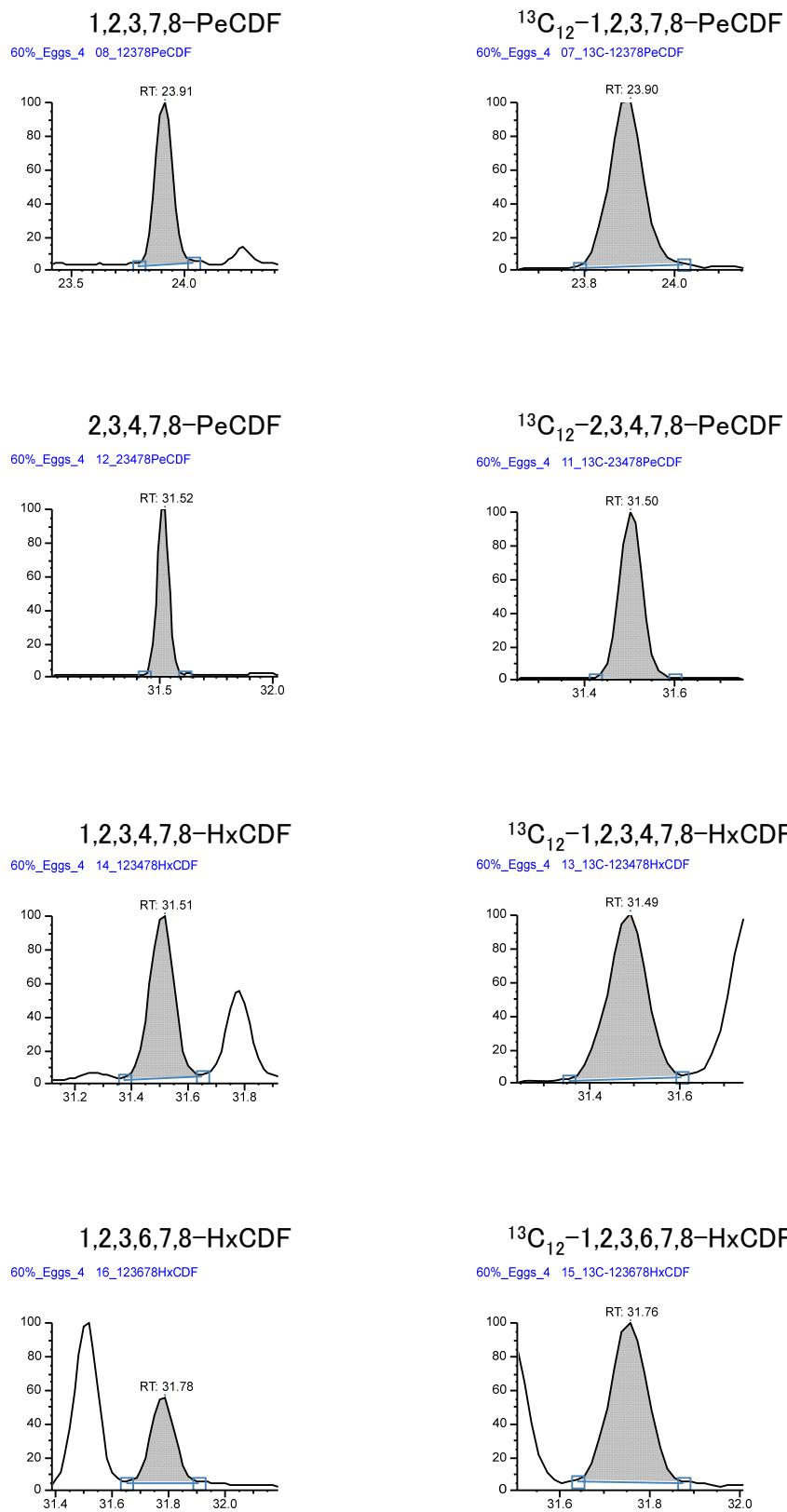


図 8 鶏卵の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

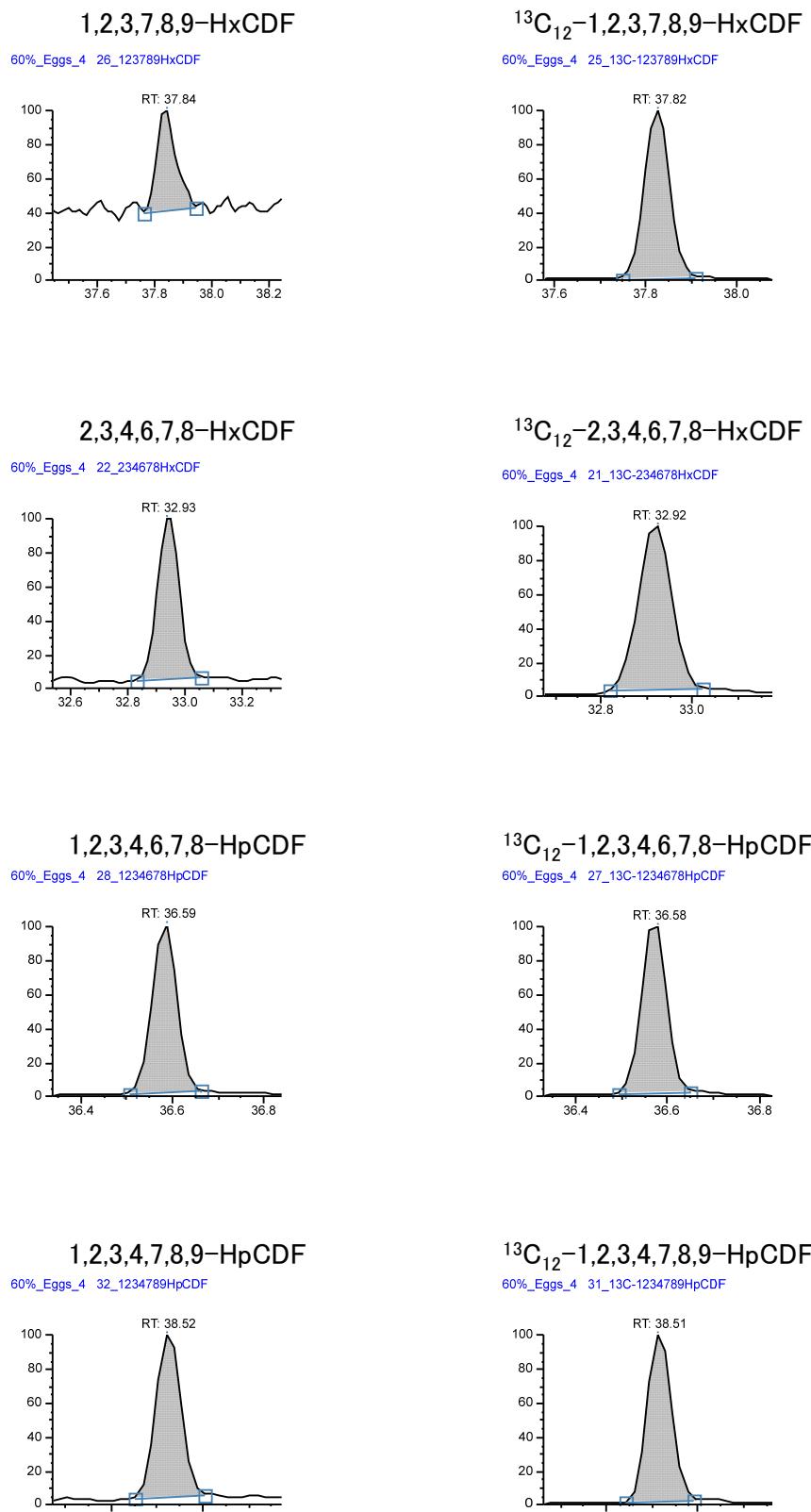


図 8 鶏卵の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

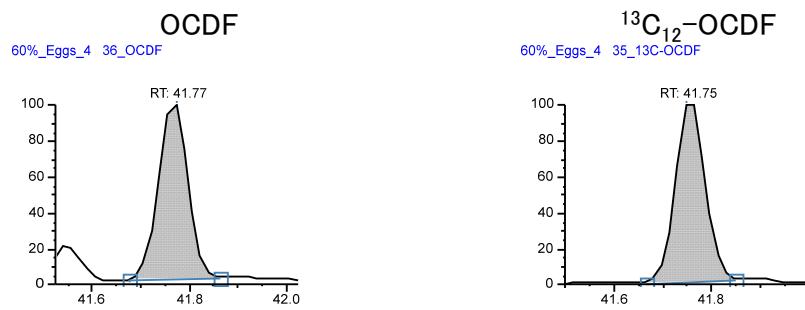


図 8 鶏卵の SRM クロマトグラム(PCDD/PCDFs) (つづき)

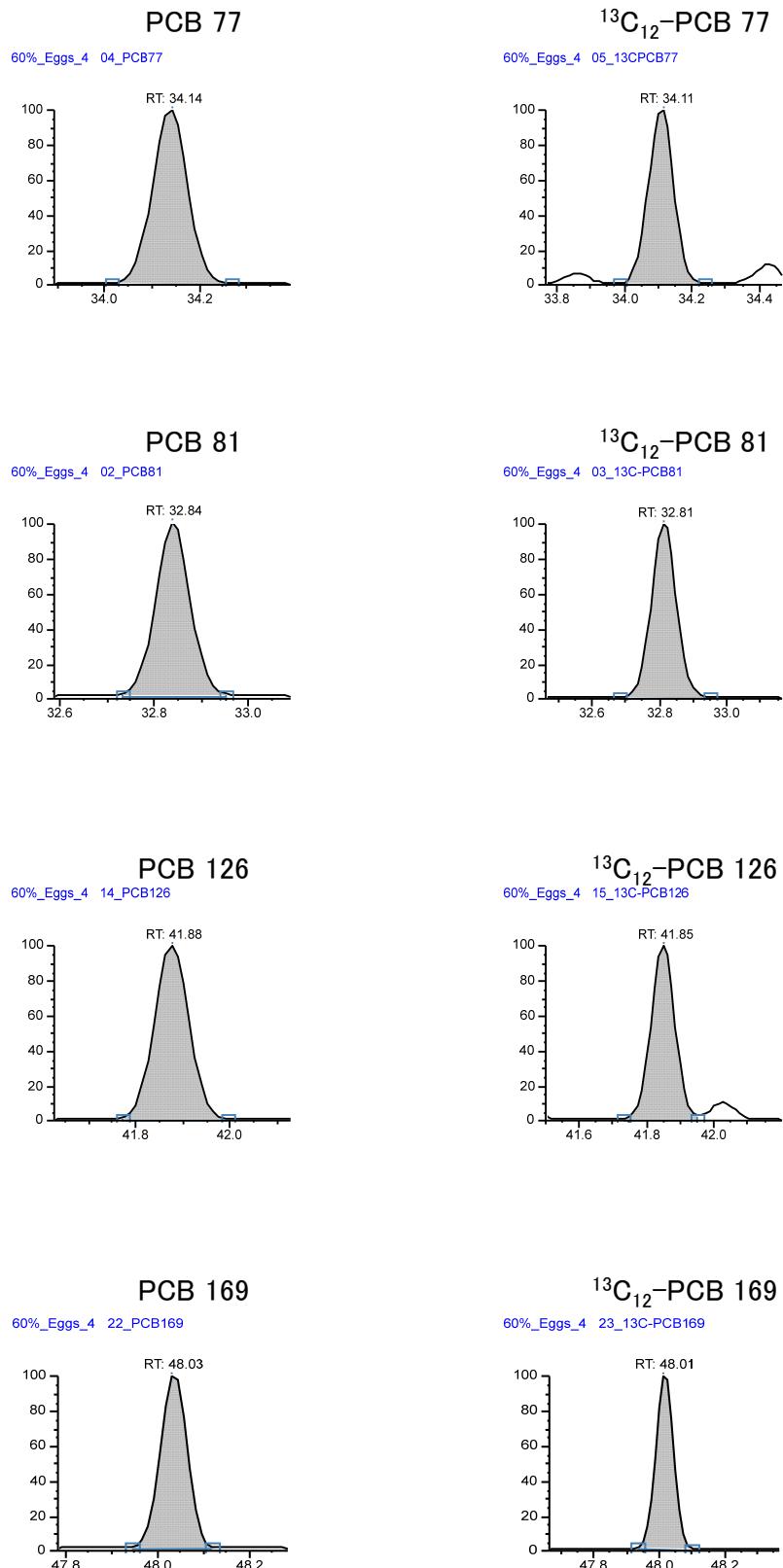


図 9 鶏卵の SRM クロマトグラム(Co-PCBs)

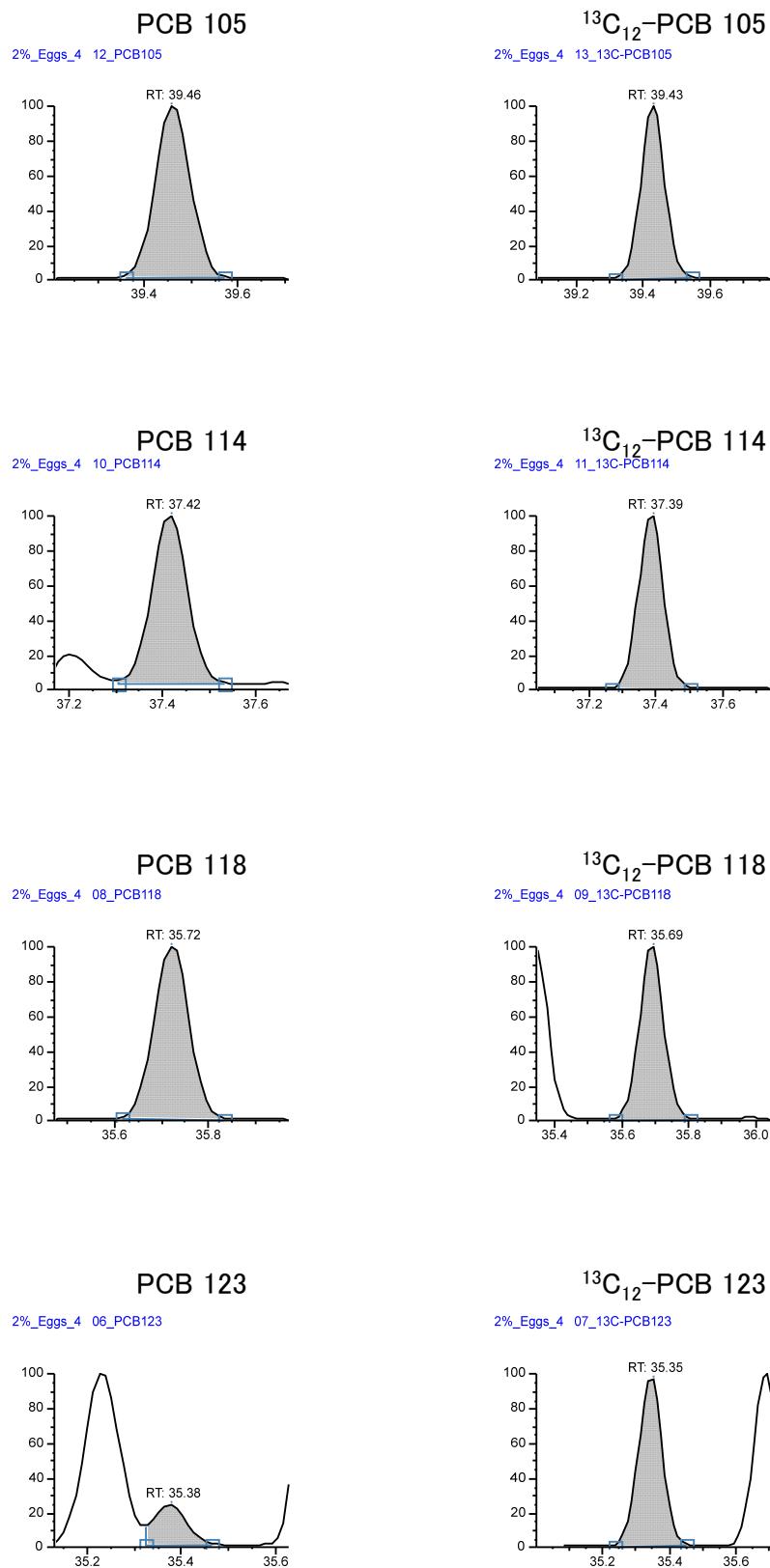


図 9 鶏卵の SRM クロマトグラム (Co-PCBs) (つづき)

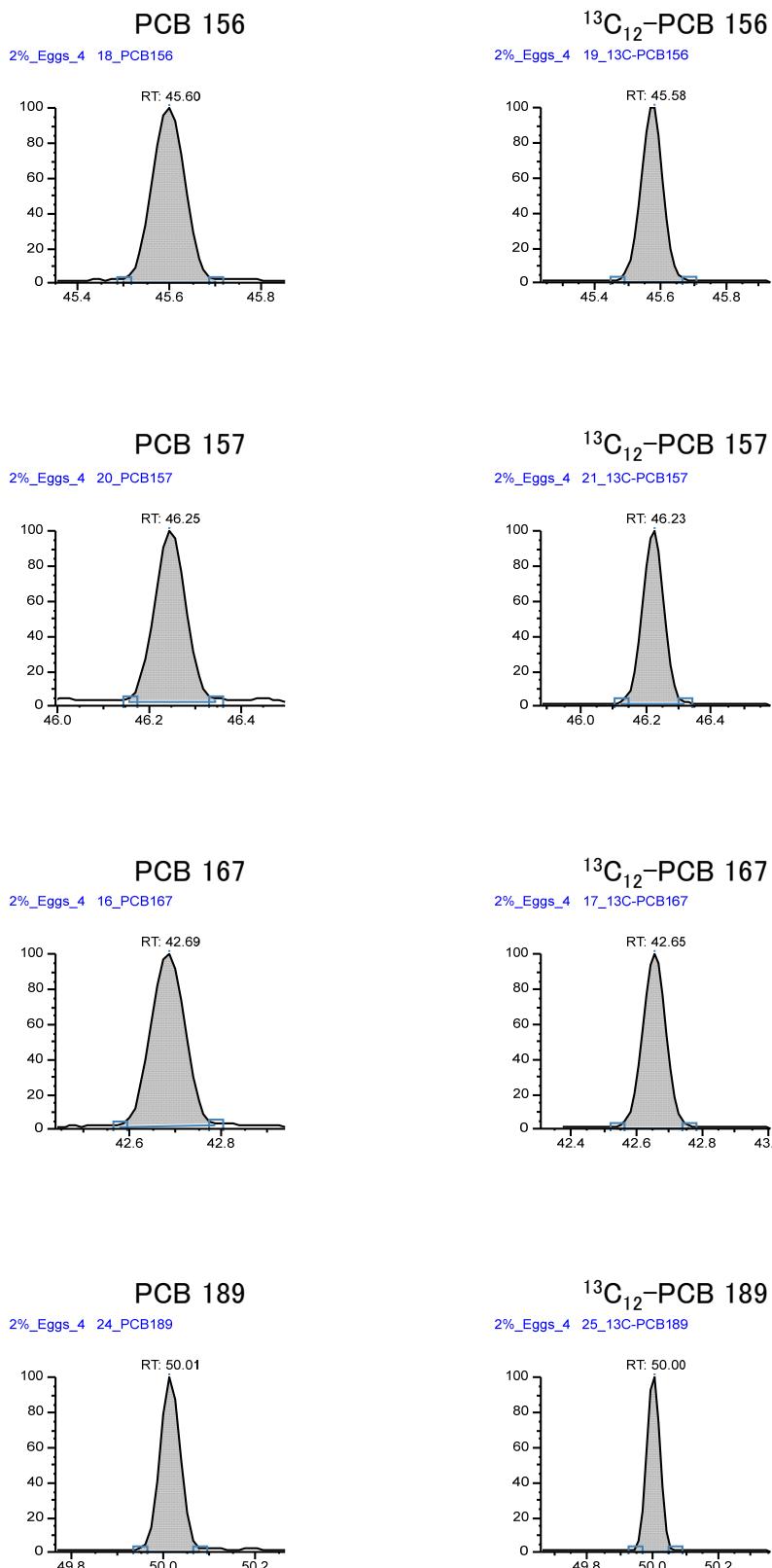


図 9 鶏卵の SRM クロマトグラム (Co-PCBs) (つづき)

II. 分担研究報告書

(3) 有害物質の摂取量推定に必要な分析法の開発に関する研究

(3-2) LC-MS/MS による食品中のベンゾトリアゾール系

紫外線吸収剤の分析法の検討

研究分担者 堤 智昭

令和5年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発のための研究

分担研究報告書

(3) 有害物質の摂取量推定に必要な分析法の開発に関する研究

(3-2) LC-MS/MSによる食品中のベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の分析法の検討

研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究要旨

ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤(BT)は、難分解性及び蓄積性を有し、毒性が懸念されている。わが国では、化審法の第1種特定化学物質や監視化学物質に指定されているBTもある。また、国際条約(POPs条約)の規制対象物質への追加が採択されたBTもあり、わが国においても、規制の対象となる予定である。そこで、本研究では、食品中のBTのリスク管理の必要性を検討することを目的として、食品中のBTの汚染実態や摂取量推定に必要となる分析法の開発を進めている。前年度は、LC-MS/MSを用いたBT分析法の測定条件及び測定感度について検討した。本年度は、LC-MS/MSを用いたBT分析法の前処理法を検討し、魚試料を対象とした添加回収試験を実施した。試料はメタノールで抽出し、*n*-ヘキサンと2 w/v%塩化ナトリウム溶液を加えて液-液分配した後、5%含水シリカゲルカラムとフロリジルミニカラムで精製した。測定条件として分析カラムにODSカラムを、移動相に蒸留水、メタノール及び5 mMギ酸アンモニウム溶液を用いたステップワイズ法で、イオン化はESIのポジティブモードを用いた。検討した前処理法を用いて魚試料4食品を対象とした添加回収試験を行った結果、9種のBTで良好な真度(76.8%~114.0%)と併行精度(<12%)が認められた。また、本法による試料中の定量限界値は0.4 ng/gであった。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

中代智菜美、今井 浩一

A. 研究目的

紫外線吸収剤は、紫外線による劣化を防ぐ目的として塗料やプラスチック製品等に使用されている。特に、ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤(BT)は、紫外線吸収能力が優れており、世界的に広く使用されている。

わが国では、2007年に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(UV-320)が難分解性、高蓄積性及び長期毒性があるとして、化学物質の審

査及び製造等の規制に関する法律(化審法)の第1種特定化学物質に指定され、その製造、輸入及び使用が原則禁止されている¹⁾。また、2004年には2,4-ジ-*tert*-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール(UV-327)、2006年には2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-6-(ブタン-2-イル)-4-*tert*-ブチルフェノール(UV350)が同法の監視化学物質に指定され、製造、輸入数量及び用途を毎年届け出る義務が生じている²⁾。さらに、2023年5月には2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-*tert*-ペンチルフェノール(UV-328)が生物や環境に悪影響を与える懸念

があるとして、国際条約(POPs 条約)の規制対象物質への追加が採択された³⁾。同年 11 月には製品等に含有される UV-328 の日本国民の健康影響に関するリスク評価の結果が報告され⁴⁾、今後、わが国においても、規制の対象となる予定である⁵⁾。UV-320、UV-327、UV-350 及び UV-328 以外の BT は、これら 4 化合物に類似した化学構造を有するにもかかわらず、使用や製造に関しての規制はない。

UV-320 は難分解性かつ高蓄積性であるほか、PPAR α シグナルを介して肝毒性を誘発することが報告されている⁶⁾。未規制の BT についても、類似した物理化学的な性質を有し、同様の毒性を持つ可能性があり、河川水、海水や食品、特に魚介類の汚染が懸念されている。さらに、ヒト母乳中から BT を検出したという報告もあり^{7), 8)}、食品中からの暴露も懸念されるが、BT によるヒトへの健康影響評価や汚染実態についての詳細は、まだ解明されていない。

有害物質の摂取量低減の施策等によるリスク管理を検討するためには、実態調査や摂取量推定は欠かせない。河川水及び底質の BT 汚染実態については多数報告されているが^{9)~14)}、魚介類の BT 汚染実態については報告が少ない^{15)~19)}。また、これらの報告では、UV-320、UV-327 及び UV-328 を主として 4 化合物程度を分析対象としている場合が多く、多数ある BT を網羅していない。

本研究では魚介類等の食品中の BT のリスク管理の必要性を検討することを目的として、魚介類を対象とした LC-MS/MS を用いた BT 分析法について検討する。本年度は LC-MS/MS 測定のための前処理法として液-液分配や固相抽出カラムによる精製を検討し、魚試料を対象とした添加回収試験を実施した。

B. 研究方法

1. 分析対象化合物

本検討では、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチルフェノール(UV-P)、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-tert-ブチルフェノール(UV-PS)、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチル-6-(プロパ-2-エン-1-イル)フェノール(UV-9)、2-[3-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-ヒドロキシフェニル]エチル 2-メチルプロパ-2-エノアート(UV-090)、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ビス(2-フェニルプロパン-2-イル)フェノール(UV-234)、UV-320、2-(tert-ブチル)-4-メチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール(UV-326)、UV-327、UV-328、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-tert-オクチルフェノール(UV-329)、UV-350、2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-6-{[3-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-2-ヒドロキシ-5-(2,4,4-トリメチルペンタン-2-イル)フェニル]メチル}-4-(2,4,4-トリメチルペンタン-2-イル)フェノール(UV-360)及び 2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-6-(2-フェニルプロパン-2-イル)-4-(2,4,4-トリメチルペンタン-2-イル)フェノール(UV-928)の全 13 化合物(図 1)を分析対象とした。

2. 試薬

1) 標準品

UV-P: 純度 100.0% (AccuStandard 製)

UV-PS: 純度 100.0% (AccuStandard 製)

UV-9: 純度 100.0% (AccuStandard 製)

UV-090: 純度 99.79% (Toronto Research Chemicals 製)

UV-234: 純度 99.9% (AccuStandard 製)

UV-320: 純度 100.0% (AccuStandard 製)

UV-326: 純度 100.0% (富士フィルム和光純薬製)

UV-327: 純度 100.0% (AccuStandard 製)

UV-328: 純度 98.0% (AccuStandard 製)

UV-329:純度 98.0% (AccuStandard 製)
UV-350:純度 97.52% (Toronto Research Chemicals 製)
UV-360:純度 98% (Toronto Research Chemicals 製)
UV-928:純度 98% (BLD pharm 製)
UV-P *d*₃:純度 99.6% (林純薬工業製)
UV-PS *d*₄:純度 99.7% (ASCA GmbH 製)
UV-234 *d*₄:純度 99.7% (ASCA GmbH 製)
UV-320 *d*₄:純度 99.8% (ASCA GmbH 製)
UV-326 *d*₃:純度 98.9% (林純薬工業製)
UV-327 *d*₃:純度 99.8% (ASCA GmbH 製)
UV-328 *d*₄:純度 99.8% (ASCA GmbH 製)
UV-329 *d*₄:純度 98.0% (ASCA GmbH 製)
UV-350 *d*₄:純度 99.4% (ASCA GmbH 製)
UV-928 *d*₄:純度 98.9% (ASCA GmbH 製)

2) その他試薬

アセトン: 残留農薬試験・PCB 試験用 (関東化学製)
n-ヘキサン: 残留農薬試験・PCB 試験用 (関東化学製)
酢酸エチル: 残留農薬試験・PCB 試験用 (関東化学製)
塩化ナトリウム: 試薬特級 (富士フィルム和光純薬製)
5%含水シリカゲル: 環境分析用 (富士フィルム和光純薬製)
フロリジルミニカラム: InertSep FL-PR 2g/12 mL (GL Sciences 製)
メタノール: HPLC 用 (関東化学製)
蒸留水: HPLC 用 (関東化学製)
ギ酸アンモニウム: 特級 (富士フィルム和光純薬製)

3. 標準原液・標準溶液の調製

UV-360 以外の標準原液: 各標準品 20 mg を精秤し、アセトンで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

UV-360 標準原液: 標準品 20 mg を精秤し、アセトンで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

安定同位体標識化合物標準原液: 各標準品 2.5~5 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液: 各標準原液をメタノールで適宜希釀し、0.02~1 µg/L の混合標準溶液を調製した。この混合標準溶液には、定容前に内標準物質として安定同位体標識化合物を 0.4 µg/L となるように添加して調製した。

添加用混合標準溶液: 各標準原液をメタノールで適宜希釀して、20 µg/L 混合標準溶液を調製した。

添加回収試験用混合標準溶液: 各標準原液をメタノールで適宜希釀して、2 µg/L 混合標準溶液を調製した。この混合標準溶液には、定容前に内標準物質として安定同位体標識化合物を 20 µg/L となるように添加して調製した。

4. 試料

魚試料 (マグロ、タラ、アジ及びサバ) は、関東地区のスーパー・マーケットで購入した。試料は筋肉部を採取した後、細切均一化した。

5. 機器

LC: ACQUITY Premier (Waters 製)
MS/MS: Xevo TQ-XS (Waters 製)
データ処理: MassLynx Ver.4.1 (Waters 製)

6. LC-MS/MS 測定

1) LC 条件

① 標準溶液を用いた検討

カラム: InertSustain C18 (GL Sciences 製)
(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm)
移動相流速: 0.2 mL/min

注入量: 5 μL

カラム温度: 40°C

移動相:

A 液: 蒸留水

B 液: メタノール

C 液: 5 mM ギ酸アンモニウム溶液

時間(分)	A(%)	B(%)	C(%)
0	10	89	1
27.5	10	89	1
27.6	0	99	1
58.0	0	99	1
58.1	10	89	1
65.0	10	89	1

測定時間: 65 分

② 魚試料を用いた検討

カラム: UHPLC PEEK Column InertSustain

C18 (GL Sciences 製)

(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm)

移動相流速: 0.2 mL/min

注入量: 5 μL

カラム温度: 40°C

移動相:

A 液: 蒸留水

B 液: メタノール

C 液: 5 mM ギ酸アンモニウム溶液

時間(分)	A(%)	B(%)	C(%)
0	9	90	1
27.0	9	90	1
27.1	0	99	1
60.0	0	99	1
60.1	9	90	1
67.0	9	90	1

測定時間: 67 分

2) MS 条件

測定モード: 選択反応モニタリング (SRM)

イオン化法: ESI (+)

キャピラリー電圧: 3.0 kV

イオン源温度: 150°C

脱溶媒温度: 500°C

コーンガス: 窒素 150 L/hr

脱溶媒ガス: 窒素 1000 L/hr

コリジョンガス: アルゴン 0.15 mL/min

定量イオン及び定性イオン:

UV-P: m/z 226 → 120 [30 V/15 eV]

m/z 226 → 107 [30 V/20 eV]

UV-PS: m/z 268 → 212 [40 V/20 eV]

m/z 268 → 57 [40 V/25 eV]

UV-9: m/z 266 → 119 [40 V/20 eV]

m/z 266 → 91 [40 V/30 eV]

UV-090: m/z 324 → 238 [30 V/15 eV]

m/z 324 → 91 [30 V/30 eV]

UV-234: m/z 448 → 119 [40 V/30 eV]

m/z 448 → 370 [40 V/20 eV]

UV-320: m/z 324 → 268 [30 V/20 eV]

m/z 324 → 212 [30 V/25 eV]

UV-326: m/z 316 → 260 [30 V/20 eV]

m/z 318 → 262 [30 V/20 eV]

UV-327: m/z 358 → 302 [40 V/20 eV]

m/z 360 → 304 [40 V/20 eV]

UV-328: m/z 352 → 282 [30 V/20 eV]

m/z 352 → 71 [30 V/25 eV]

UV-329: m/z 324 → 212 [30 V/25 eV]

m/z 324 → 57 [30 V/25 eV]

UV-350: m/z 324 → 268 [30 V/20 eV]

m/z 324 → 212 [30 V/25 eV]

UV-360: m/z 659 → 336 [30 V/20 eV]

m/z 659 → 224 [30 V/30 eV]

UV-928: m/z 442 → 364 [30 V/25 eV]

m/z 442 → 252 [30 V/30 eV]

UV-P d_3 : m/z 229 → 120 [30 V/15 eV]

m/z 229 → 110 [30 V/20 eV]

UV-PS d_4 : m/z 272 → 216 [40 V/20 eV]

m/z 272→57 [40 V/25 eV]
UV-234 d_4 : m/z 452→374[40 V/20 eV]
 m/z 452→119[40 V/30 eV]
UV-320 d_4 : m/z 328→272[30 V/20 eV]
 m/z 328→216[30 V/25 eV]
UV-326 d_3 : m/z 319→263[30 V/20 eV]
 m/z 321→265[30 V/20 eV]
UV-327 d_3 : m/z 361→305[40 V/20 eV]
 m/z 363→307[40 V/20 eV]
UV-328 d_4 : m/z 356→286[30 V/20 eV]
 m/z 356→71 [30 V/25 eV]
UV-329 d_4 : m/z 328→216[30 V/25 eV]
 m/z 328→57 [30 V/25 eV]
UV-350 d_4 : m/z 328→272[30 V/20 eV]
 m/z 328→216[30 V/25 eV]
UV-928 d_4 : m/z 446→368[30 V/25 eV]
 m/z 446→256[30 V/30 eV]
上段:定量イオン 下段:定性イオン
[コーン電圧/コリジョンエネルギー]

7. 検量線及び定量

検量線用混合標準系列は BT の濃度が 0.02、0.04、0.2、0.4、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、安定同位体標識化合物の濃度がそれぞれ 0.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ となるように標準原液をメタノールで希釈して調製した。試験溶液調製法の検討では絶対検量線法により BT を定量した。添加回収試験では、安定同位体標識化合物を用いた内部標準法により BT を定量した。

8. 試験溶液の調製

1) 抽出

均一化した試料 5.0 g をポリプロピレン製遠心管に量り採り、メタノール 30 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離し、上清を分取した。残留物にメタノール 30 mL を加えて同様に操作し、得られた上清を合わせ、メタノールを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に

20 mL を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。これに *n*-ヘキサン 30 mL 及び 2 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えて振とう抽出した後、*n*-ヘキサン層を分取した。残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加えて同様に操作し、*n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウム 2 g を加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で約 1 mL まで濃縮した。この残留物に *n*-ヘキサン 1 mL を加えて溶解した。

2) 精製

① 5%含水シリカゲルカラム

コック付きの長さ 30 cm、内径 10 mm のガラスカラムに 5%含水シリカゲル 5 g を *n*-ヘキサンを用いて湿式充填し、上部に無水硫酸ナトリウム 1 g を積層した。このカラムに、*n*-ヘキサン 40mL を注入し、流出液は捨てた。これに、1)で得られた溶液を注入した後、10 vol%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 100 mL で溶出させた。負荷液及び溶出液を合わせて 40°C以下で約 1 mL まで濃縮した。この残留物に *n*-ヘキサン 1 mL を加えて溶解した。

② フロリジルミニカラム

InertSep FL-PR (2 g/12 mL) に *n*-ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに 2)①で得られた溶液を注入し、負荷液を捨てた後、5 vol%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 25 mL で溶出させた。溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、メタノールで正確に 10 mL にして試験溶液とした。

9. 添加回収試験

添加回収試験用混合標準溶液を魚試料(マグロ、タラ、アジ及びサバ:各 5.0 g)に添加し、B. 研究方法の 8. 試験溶液の調製(図 2)に従って添加回収試験を実施した。

BT の添加濃度は、定量限界値濃度 (0.4 ng/g)とした。これに伴い、安定同位体標識化合物についても、それぞれ 4 ng/g となるように添加した。真度は安定同位体標識化合物で補正後の定量値から算出した。なお、安定同位体標識化合物を入手できなかつた UV-9、UV-090 及び UV-360 については、各保持時間や Log Pow が近似している UV-PS、UV-P 及び UV-328 でそれぞれ補正した。安定同位体標識化合物の回収率は、添加回収試験溶液と添加相当濃度の溶媒希釈標準溶液のレスポンス比により算出した。ブランク試料から BT が定量された場合は、添加試料から定量値を差し引いて真度を求めた。

C. 研究結果及び考察

1. 標準溶液を用いた試験溶液調製法の検討

はじめに、標準溶液を用いて前処理法について検討した。なお、本検討は絶対検量線法により実施した。

1) 抽出条件の検討

魚類試料を対象とした BT 分析法の抽出では、アセトン及び *n*-ヘキサン混液を用いた高速溶媒抽出 (ASE)¹⁸⁾、エタノールを用いた加熱流下式高速抽出¹⁹⁾、ジクロロメタン及びアセトン混液を用いたソックスレー抽出による方法^{15), 16)}及びアセトンを用いたホモジナイズ抽出による方法¹⁷⁾の報告がある。本研究ではこのうち、簡便かつ迅速な方法であるホモジナイズ抽出による方法を検討した。分析対象とした 13 種の BT は、Log Pow = 4.30 (UV-P) ~ 14.35 (UV-360) の脂溶性の高い物質であるため、抽出溶媒にはアセトンを採用し、30 mL で 2 回抽出することとした。

2) 有機溶媒への転溶条件の検討

BT 抽出液から有機溶媒への転溶条件としては、*n*-ヘキサンと塩化ナトリウム溶液との液-液分配を用いた報告がある^{17), 18)}。そこで、本検討では有機溶媒に転溶する際の塩化ナトリウム溶液の添加量、添加濃度及び転溶に用いる有機溶媒について BT 混合標準溶液を用いて検討した。

① 塩化ナトリウム溶液の添加量

はじめに、塩化ナトリウム溶液の添加量について検討した。アセトン 60 mL に 100 μg/L 混合標準溶液を 0.1 mL 添加し、2 w/v% 塩化ナトリウム溶液 (300 mL、100 mL 又は 60 mL) を加え、*n*-ヘキサン 30 mL で 3 回振とう抽出し、回収率を比較した (表 1)。その結果、2 w/v% 塩化ナトリウム溶液の添加量によらず、良好な回収率 (300 mL: 72.3% ~ 110.1%、100 mL: 78.5% ~ 104.2%、60 mL: 80.2% ~ 129.0%) が得られた。そこで、塩化ナトリウム溶液の添加量は、60 mL を採用した。

② 塩化ナトリウム溶液の添加濃度

次に、塩化ナトリウム溶液の添加濃度について検討した。アセトン 60 mL に 100 μg/L 混合標準溶液を 0.1 mL 添加し、0 w/v%、1 w/v%、2 w/v%、5 w/v% 又は 10 w/v% の各濃度の塩化ナトリウム溶液 60 mL を加え、*n*-ヘキサン 30 mL で 3 回振とう抽出し、回収率を比較した (表 2)。その結果、2 w/v% 又は 5 w/v% 塩化ナトリウム溶液を用いた場合に良好な回収率 (2 w/v% : 79.1% ~ 126.0%、5 w/v% : 72.3% ~ 106.7%) が認められた。5 w/v% 塩化ナトリウム溶液と比較して、2 w/v% 塩化ナトリウム溶液の方がより回収率が高い化合物が多かったため、塩化ナトリウム溶液の添加濃度は 2 w/v% を採用した。

③ 転溶に用いる有機溶媒

最後に、転溶に用いる有機溶媒について *n*-ヘキサンと酢酸エチルを用いて検討した。アセトン 60 mL に 100 µg/L 混合標準溶液を 0.1 mL 添加し、2 w/v% 塩化ナトリウム溶液 60 mL を加え、*n*-ヘキサン又は酢酸エチル 30 mL で 3 回振とう抽出し、回収率を比較した(表 3)。*n*-ヘキサンでは、良好な回収率が認められた(80.2%~129.0%)。一方で、酢酸エチルでは一部の BT において回収が得られなかつた(1.4%~114.2%)。また、*n*-ヘキサン転溶時の転溶回数における BT の回収率について検討した結果、UV-P 及び UV-360 以外の BT については、転溶操作を 1 回実施することで概ね 100% 回収されたものの、2 回目でも少なからず回収されている BT が複数あつた(図 3)。したがつて、転溶に用いる有機溶媒には *n*-ヘキサンを採用し、*n*-ヘキサンによる転溶操作は 2 回とした。

3) カラムによる精製の検討

食品中の BT 分析法のカラム精製法として、シリカゲル^{15)~18)}、フロリジル^{8), 18)}、HLB⁸⁾ 及び NH₂¹⁹⁾などを用いた報告がある。本検討では、西野らの報告¹⁸⁾にあるシリカゲル及びフロリジルを用いた精製について検討した。

① 5%含水シリカゲルカラム

シリカゲルカラムからの BT の溶出パターンを確認するため、標準溶液を用いて検討した。10 µg/L 混合標準溶液 1 mL を乾固し、*n*-ヘキサン 2 mL に溶解して、無水硫酸ナトリウムを積層したシリカゲルカラムに負荷した。*n*-ヘキサン、5 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン又は 10 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン各 200 mL で溶出させ、シリカゲル

カラムからの溶出状況を比較した(表 4)。その結果、10 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンで溶出した場合、UV-P(179.7%)、UV-090(47.3%) 及び UV-329(177.0%) 以外の BT において、良好な回収率(90.8%~121.5%) が得られた。5 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンで溶出した場合についても、同等の回収が認められたが、様々な魚種への適用を考慮し、シリカゲルカラムからの溶出液は 10 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンを用いることとした。UV-P や UV-329 において回収率が 170% を超えてしまったが、操作プランクから UV-P や UV-329 のピークは確認されておらず、その詳細については不明である。

また、シリカゲルカラムから 10 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 100 mL で 2 回溶出させ、その溶出状況を確認した。その結果、UV-P、UV-090 及び UV-329 以外の BT において、初めの 100 mL の溶出で概ね 100% 回収され、次の 100 mL 中に BT はほとんど検出されなかつた(図 4)。

カラムによる精製において、より精製効果を得るため、シリカゲルカラムの洗浄操作について検討した。しかしながら、UV-090、UV-234、UV-326、UV-350 及び UV-360 において負荷液に 5%~10% 程度の溶出が確認された(12.2%、4.6%、5.1%、5.3% 及び 14.6%)。そこで、洗浄操作は行わずに溶出することとした。

以上の結果より、シリカゲルカラムによる精製では、負荷液として *n*-ヘキサン、溶出液として 10 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 100 mL を採用し、負荷液と溶出液を採取することとした。

② フロリジルミニカラム

フロリジルミニカラムからの BT の溶出パターンを確認するため、過去の報告¹⁸⁾を参考

に標準溶液を用いて検討した。100 µg/L 混合標準溶液 0.25 mL を乾固し、*n*-ヘキサン 2 mL に溶解して、フロリジルミニカラムに負荷した。負荷液を捨てた後、*n*-ヘキサン又は 5 vol%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン各 35 mL で溶出させ、溶出状況を確認した(表 5)。その結果、*n*-ヘキサンによる溶出では 6 化合物に限り、良好な回収が得られた(76.1% ~ 93.6%)。一方、5 vol%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンでは全ての化合物で良好な回収(74.7%~105.8%)が確認された。さらに、5 vol%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンの溶出液量について検討したところ、25 mL の溶出液量で良好な回収(74.3%以上)が得られることが確認した(図 5)。

次に、フロリジルミニカラムにおける洗浄操作について検討した。その結果、負荷液中に化合物の流出は認められなかった。しかし、負荷後 *n*-ヘキサン 5 mL でフロリジルミニカラムを洗浄したところ UV-320、UV-326、UV-327 及び UV-328 の 20%~50% が溶出した。そこで、*n*-ヘキサンによる洗浄操作は行わずに溶出することとした。

以上の結果より、フロリジルミニカラムによる精製では、負荷液に *n*-ヘキサン、溶出液に 5 vol%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 25 mL を採用し、溶出液を採取することとした。

2. マグロ試料を用いた試験溶液調製法の検討

標準溶液を用いて検討した前処理条件が試料マトリックス存在下においても適用可能か、マグロ試料を用いて検討した。なお、試料マトリックス由来の夾雑成分による影響を考慮し、本検討における分析カラムはメタルフリーPEEK カラムを用いた。なお、メタルフリーPEEK カラムの使用により、UV-360 の保持時間の延長が認められたことから、移動相条件を若干変更して検討を実施した。

なお、本検討は絶対検量線法により実施した。

1) 抽出条件の検討

標準溶液を用いた試験溶液調製法に従って、マグロ試料をアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンへ転溶した後、シリカゲルカラム及びフロリジルミニカラムで精製したところ、試験溶液中に油分と疑われるメタノールに難溶性の物質が認められ、分析機器の感度低下を生じた。そこで、抽出溶媒をメタノールに変更し、抽出液を定容した後、試料 1.0 g 相当について同様に操作を行ったところ、試験溶液中の油分の残存はほとんど確認されず、分析機器の感度低下は認められなくなった。したがって、抽出溶媒をメタノールに変更して検討した。

2) 有機溶媒への転溶条件の検討

標準溶液を用いて検討した *n*-ヘキサンによる転溶条件が試料マトリックス存在下においても適用可能か、マグロ試料を用いて検討した。なお、食品中の BT 抽出液から有機溶媒への転溶条件としては、*n*-ヘキサンと塩化ナトリウム溶液 300mL との液-液分配を用いた報告^{17),18)}がある。そこで、塩化ナトリウム溶液 300 mL を用いて塩化ナトリウム溶液の添加濃度及び *n*-ヘキサンでの転溶回数を検討し、最後に塩化ナトリウム溶液の添加量を検討した。

① 塩化ナトリウム溶液の添加濃度

マグロ試料 5.0 g をメタノールで抽出し、定容した後、試料 1.0 g 相当の抽出液の溶媒を除去した。残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加えた後、20 µg/L 添加用混合標準溶液 0.2 mL を添加した。これに 2 w/v% 又は 5 w/v% 塩化ナトリウム溶液各 300 mL を加えて、*n*-ヘキサン 30 mL で 2 回振とう抽出

した。*n*-ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムにより脱水し、濃縮後にシリカゲルカラム及びフロリジルミニカラムで精製して回収率を比較した(表6)。その結果、2 w/v%と5 w/v%塩化ナトリウム溶液の回収率に大きな差は無かった(2 w/v%: 67.5%～102.3%、5 w/v%: 66.6%～108.3%)。過去の報告¹⁷⁾も考慮し、塩化ナトリウム溶液の添加濃度は2 w/v%を採用した。

② *n*-ヘキサンによる転溶回数

同様に、試料 1.0 g 相当のメタノール抽出液の溶媒を除去した後、*n*-ヘキサン 30 mL に溶解し、20 µg/L 添加用混合標準溶液 0.2 mL を添加した。これに 2 w/v% 塩化ナトリウム溶液 300 mL を加えて *n*-ヘキサン 30 mL で 1～3 回振とう抽出を行った。*n*-ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムにより脱水し、濃縮後にシリカゲルカラム及びフロリジルミニカラムで精製して回収率を比較した(表7)。その結果、*n*-ヘキサン転溶操作 2 回で良好な回収が得られた(71.0%～104.7%)。したがって、*n*-ヘキサンによる転溶操作は 2 回を採用した。

③ 塩化ナトリウム溶液の添加量

同様に、試料 1.0 g 相当のメタノール抽出液の溶媒を除去した後、*n*-ヘキサン 30 mL に溶解し、20 µg/L 添加用混合標準溶液 0.2 mL を添加した。これに 2 w/v% 塩化ナトリウム溶液(300 mL、100 mL 又は 60 mL)を加えて、2回振とう抽出した。*n*-ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムにより脱水し、濃縮後にシリカゲルカラム及びフロリジルミニカラムで精製して回収率を比較した(表8)。その結果、何れの 2 w/v% 塩化ナトリウム溶液の添加量でも概ね良好な回収が得られた(300 mL: 67.6%～95.5%、100 mL: 83.2%～100.4%、60 mL: 78.8%～

106.0%)。しかしながら、2 w/v% 塩化ナトリウム溶液 60 mL の添加では、若干のエマルジョンが認められたことから、2 w/v% 塩化ナトリウム溶液の添加量は 100 mL を採用した。

3) カラムによる精製の検討

① 5%含水シリカゲルカラム

マグロ試料 5.0 g をメタノールで抽出し、試料 1.0 g 相当について *n*-ヘキサン転溶を行い、約 1 mL に減圧濃縮した。残留物に *n*-ヘキサン 1 mL 及び 20 µg/L 添加用混合標準溶液 0.2 mL を添加した。これをシリカゲルカラム及びフロリジルミニカラムで精製したところ、良好な回収率(82.6%～105.0%)が得られた(表9)。シリカゲルカラムによる精製で 10 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 100 mL で溶出した後、さらに 10 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 50 mL で追加溶出したところ、何れの BT も溶出は確認されなかった。そこで、シリカゲルカラムによる精製の溶出液には、10 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 100 mL を採用した。

② フロリジルミニカラム

マグロ試料 5.0 g をメタノールで抽出し、試料 1.0 g 相当について *n*-ヘキサン転溶及びシリカゲルカラムによる精製を行い、約 1 mL に減圧濃縮した。残留物に *n*-ヘキサン 1 mL 及び 20 µg/L 添加用混合標準溶液 0.2 mL を添加した。これをフロリジルミニカラムで精製したところ、良好な回収率(83.7%～120.1%)が得られた(表10)。

フロリジルミニカラムによる精製で 5 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 25 mL で溶出した後、さらに 5 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 10 mL で追加溶出したところ、何れの BT も溶出は認められなかった。そこで、フロリジルミニカラムによる精製の溶出液には、5 vol% 酢酸エチル含有 *n*-ヘキサン 25 mL を

採用した。

3. 添加回収試験

マグロ、タラ、アジ及びサバの 4 試料を用いて、実験 B. 研究方法の 8. 試験溶液の調製に従って添加回収試験(定量限界濃度:0.4 ng/g)を実施した。なお、添加回収試験については、試料マトリックスによる影響を考慮して入手可能であった 10 種の安定同位体標識化合物を用いた内部標準法により実施した。安定同位体標識化合物を入手できなかった UV-9、UV-090 及び UV-360 については、UV-PS、UV-P 及び UV-328 でそれぞれ補正した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、マグロ試料のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図 6-1 及び図 6-2 に示した。

今回の検討で用いた検量線(0.02、0.04、0.2、0.4、1 μg/L)の範囲において、内部標準法により作成した検量線の相関係数は、検討した何れの試料においても 0.995 以上であった(相関係数 $r = 0.997 \sim 1.000$)。

1) 選択性

ブランク試料において UV-P、UV-326、UV328、UV-329 及び UV360 については、同一保持時間に定量限界濃度に相当するピーク強度の 1/10 以上のピークが検出された。これらは定性イオン／定量イオンの強度比が標準物質とほぼ一致したことから(80%～120%)、当該 BT がブランク試料に含まれていたものであり、妨害ピークではないと判断した。その他の BT については、同一保持時間にピークが認められても、定量限界濃度に相当するピーク強度の 1/10 未満であったことから、今回の定量限界濃度における定量への影響は少なく、選択

性に問題はないと考えた。

2) 真度、併行精度及び定量限界値

試料に BT が定量限界濃度(0.4 ng/g)となるように添加回収試験用混合標準溶液を添加し、30 分間室温で放置した後、試験溶液を調製し、内部標準法による 5 併行の添加回収試験を実施した(表 11)。

UV-P 及び UV-326 は、ブランク試料において添加量 0.4 ng/g 以上、UV-329 は添加量 0.4 ng/g の半値以上の定量値を示した。これらは、添加試料の定量値からブランク試料の定量値を差し引いて真度を評価することが困難であった。この点に関しては、今後、UV-P、UV-326 及び UV-329 の含有が問題とならないブランク試料を入手して、添加回収試験を実施する予定である。また、UV-360 については、ブランク試料の定量値は添加量 0.4 ng/g を下回っていたものの、良好な真度及び併行精度が得られず、今後の検討課題である。

UV-P、UV-326、UV-329 及び UV-360 以外の 9 種の BT について、検討した 4 種類の魚試料における真度($n = 5$)は、76.8%～114.0%、併行精度は 0.7%～12.0%の良好な結果が得られた。分析対象と同じ安定同位体標識化合物により補正を行った BT については、比較的良好な真度を示した(UV-PS : 105.5%～114.0%、UV-234 : 96.9%～110.9%、UV-320 : 94.7%～101.6%、UV-327 : 90.5%～101.5%、UV-328 : 94.9%～100.7%、UV-350 : 95.3%～104.3%、UV-928 : 87.4%～97.3%)。一方、分析対象と異なる安定同位体標識化合物により補正を行った UV-9 及び UV-090 の真度は、それぞれ 82.8%～100.9% 及び 76.8%～89.7% であり、真度がやや低下した。入手可能ならば分析対象と同じ安定同位体標識化合物を用いて補正した方が良

いと考えられた。また、安定同位体標識化合物の回収率は、71.5%～85.9%であった（表12）。

9種のBTについては、定量限界値濃度の添加回収試験において良好な結果が得られ、かつ、何れの試料においてもピークのS/Nは10以上であった。したがって、本法における定量限界値は9種のBTについて、0.4ng/gと設定が可能であった。

D. 結論

魚試料中のBT分析法として、BTを試料からメタノールで抽出し、n-ヘキサンと2w/v%塩化ナトリウム溶液を加え、n-ヘキサン転溶した後、シリカゲルカラムとフロリジルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

その結果、13種のうち9種のBTについて、定量限界値濃度(0.4ng/g)での添加回収試験における真度は76.8%～114.0%、併行精度(RSD%)は0.7%～12.0%であった。定量限界値濃度での添加回収試験のクロマトグラムより算出したS/Nは、検討した何れの試料においてもS/N \geq 10を満たしていた。安定同位体標識化合物を用いた内部標準法により補正することで、良好な真度が認められたことから、本法による分析は可能であると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 経済産業省 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 第1種特定化学物質一覧
https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/specified/class1specified_chemicals_list_20240201.pdf
- 2) 経済産業省 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 監視化学物

質一覧

https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/ippantou/monitoring_chemicals_list.pdf

- 3) Stockholm Convention Eleventh meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention
<https://chm.pops.int/TheConvention/ConferenceoftheParties/Meetings/COP11/tabid/9310/Default.aspx>
- 4) 独立行政法人製品評価技術基盤機構ほか 製品含有化学物質のリスク評価 UV-328
<https://www.mhlw.go.jp/content/1112000/001168233.pdf>
- 5) 経済産業省 ストックホルム条約第11回締約国会議で新たに廃絶対象とされた物質を 化学物質審査規制法の第一種特定化学物質に指定することについて
https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/oshirase_230810.pdf
- 6) M. Hirata-Koizumi et al.: Transcriptome analyses demonstrate that Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) activity of an ultraviolet absorber, 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl) benzotriazole, as possible mechanism of their toxicity and the gender differences. *The Journal of Toxicological Sciences*, **41**, 693-700, 2016
- 7) 中尾晃幸:科学研究費助成事業 2021年度研究成果報告書 母乳摂取量から推定するベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤による乳児へのリスク評価
- 8) 中尾晃幸ほか:母乳に含まれるベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の解析とその汚染原調査. 第2回環境化学物質3

学会合同大会要旨, P-128, 2023

- 9) 吉識亮介 ほか: 兵庫県内の河川および大気中のベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の汚染実態について. *環境化学*, **31**, 30-39, 2021
- 10) 西野貴裕 ほか: 国内における化審法関連物質(ヘキサブロモシクロドデカン及びベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤)の共同実態調査【国立環境研究所II型共同研究「国内における化審法関連物質の排出源および動態の解明」を通じて】. *環境化学*, **28**, 69-76, 2018
- 11) 木村久美子, 西野貴裕: ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の分析法の検討, 第 24 回環境化学討論会要旨, P-070, 2015
- 12) 栗原正憲, 中田利明, 飯村晃: 手賀沼における底質中 HBCD 及び BUVs の鉛直分布調査. 第 25 回環境化学討論会要旨, P-045, 2016
- 13) 津田泰三 ほか: GC/MS による水試料中のベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の定量法検討. 第 2 回環境化学討論会要旨, P-126, 2017
- 14) 中尾晃幸 ほか: 工業用紫外線吸収剤であるベンゾトリアゾール化合物による環境汚染実態について. 第 27 回環境化学討論会要旨, 1B-08, 2018
- 15) 山口貴弘 ほか: 魚介類中ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の汚染実態調

査について. 大阪府立公衛研所報, **52**, 35-40, 2014

- 16) H. Nakata, S. Murata and J. Filatreau: Occurrence and concentrations of benzotriazole UV stabilizers in marine organisms and sediments from the Ariake Sea, Japan. *Environmental Science & Technology*, **43**, 6920-6926, 2009
- 17) 津田泰三 ほか: GC/MS/MS による生物試料中のベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の定量法検討. 第 25 回環境化学討論会要旨, P-115, 2016
- 18) 西野貴裕: 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書 5-1954(II-2) 国内水環境における生活由来物質の蓄積実態解明、底生生物に対するリスクの評価
- 19) 堤智昭: 厚生労働科学研究補助金(食の安心・安全確保推進研究事業)平成 21 年度分担研究報告書 (2-4) 食品中ベンゾトリアゾール類の迅速測定法の開発

F. 研究業績

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

表 1 *n*-ヘキサン転溶時の2 w/v%塩化ナトリウム溶液の添加量によるBTの回収率(%)

標準溶液	2 w/v% 塩化ナトリウム溶液 添加量		
	300 mL	100 mL	60 mL
UV-P	72.3	88.0	80.2
UV-PS	98.9	102.7	106.8
UV-9	100.8	98.7	104.5
UV-090	98.6	99.0	104.8
UV-234	90.9	99.0	105.1
UV-320	96.2	99.1	103.8
UV-326	96.3	95.0	98.2
UV-327	97.7	95.7	102.7
UV-328	93.9	98.3	103.8
UV-329	110.1	104.2	129.0
UV-350	96.9	99.8	104.7
UV-360	73.3	78.5	80.8
UV-928	93.3	101.5	109.8

(n = 3)

表 2 *n*-ヘキサン転溶時の塩化ナトリウム溶液の添加濃度によるBTの回収率(%)

標準溶液	塩化ナトリウム溶液 60 mL の添加濃度				
	0 w/v%	1 w/v%	2 w/v%	5 w/v%	10 w/v%
UV-P	84.7	73.0	79.1	72.3	63.9
UV-PS	93.9	92.9	94.5	92.6	95.2
UV-9	94.0	91.3	94.6	87.3	91.0
UV-090	95.8	97.8	95.9	91.6	97.8
UV-234	91.2	89.5	93.5	96.9	103.8
UV-320	98.1	97.2	98.5	92.2	94.7
UV-326	96.2	96.4	97.2	87.8	92.9
UV-327	95.0	95.0	99.3	92.0	98.3
UV-328	98.5	98.0	100.3	92.0	98.0
UV-329	133.2	140.8	126.0	106.7	113.7
UV-350	97.8	99.8	98.9	92.8	97.9
UV-360	29.7	13.5	80.9	76.3	69.0
UV-928	95.8	92.8	96.4	94.1	100.5

(n = 2)

表 3 転溶溶媒による BT の回収率(%)

標準溶液	有機溶媒 30mL × 3 回	
	n-ヘキサン	酢酸エチル
UV-P	80.2	1.4
UV-PS	106.8	4.6
UV-9	104.5	10.1
UV-090	104.8	88.5
UV-234	105.1	107.6
UV-320	103.8	39.0
UV-326	98.2	50.7
UV-327	102.7	71.9
UV-328	103.8	72.8
UV-329	129.0	65.4
UV-350	104.7	43.8
UV-360	80.7	114.2
UV-928	109.8	111.2
(n = 3)		

表 4 5%含水シリカゲルカラムからの BT 溶出率(%)

標準溶液	n-ヘキサン中の酢酸エチル含有率		
	0 vol%	5 vol%	10 vol%
UV-P	7.5	171.3	179.7
UV-PS	0.0	99.0	103.3
UV-9	0.0	104.5	108.3
UV-090	0.0	58.4	47.3
UV-234	8.9	113.6	115.0
UV-320	63.4	88.6	90.8
UV-326	84.1	104.1	121.5
UV-327	80.7	93.2	99.4
UV-328	72.6	94.5	96.6
UV-329	33.6	199.4	177.0
UV-350	34.0	92.4	92.2
UV-360	0.0	93.5	90.5
UV-928	0.0	102.7	99.6
(n = 2)			

表 5 フロリジルミニカラムからの BT 溶出率(%)

標準溶液	<i>n</i> -ヘキサン中の 酢酸エチル含有率	
	0 vol%	5 vol%
UV-P	5.5	105.8
UV-PS	0.0	82.9
UV-9	33.5	74.7
UV-090	0.0	77.2
UV-234	5.5	94.3
UV-320	93.6	103.0
UV-326	91.7	98.8
UV-327	93.2	102.9
UV-328	92.7	103.1
UV-329	0.0	93.3
UV-350	80.0	92.5
UV-360	0.0	105.8
UV-928	76.1	102.1

(n = 1)

表 6 *n*-ヘキサン転溶時の塩化ナトリウム溶液の添加濃度による BT の回収率(%)

マグロ 試料	塩化ナトリウム溶液 60 mL	
	添加濃度	
	2 w/v%	5 w/v%
UV-P	85.9	85.4
UV-PS	86.2	86.5
UV-9	81.7	83.0
UV-090	67.5	66.6
UV-234	86.8	85.8
UV-320	83.4	84.1
UV-326	83.7	86.3
UV-327	85.0	83.0
UV-328	88.1	86.3
UV-329	102.3	92.3
UV-350	81.1	80.4
UV-360	82.9	108.3
UV-928	82.5	76.5

(n = 1)

表 7 *n*-ヘキサン転溶時の転溶回数による BT の回収率(%)

マグロ 試料	転溶回数		
	1 回	2 回	3 回
UV-P	84.0	92.8	88.0
UV-PS	83.7	93.6	89.1
UV-9	84.7	97.8	92.6
UV-090	65.5	71.0	63.6
UV-234	84.9	94.5	88.8
UV-320	85.0	96.2	93.1
UV-326	81.8	96.2	100.4
UV-327	99.9	100.7	102.1
UV-328	85.2	96.3	93.5
UV-329	87.7	104.7	93.3
UV-350	81.4	91.7	88.5
UV-360	80.0	93.6	100.8
UV-928	80.5	88.6	79.0

(n = 1)

表 8 *n*-ヘキサン転溶時の 2 w/v% 塩化ナトリウム溶液の添加量による BT の回収率(%)

マグロ 試料	2 w/v% 塩化ナトリウム溶液の添加量		
	300 mL	100 mL	60 mL
UV-P	91.5	94.0	95.4
UV-PS	87.9	94.0	92.1
UV-9	89.7	97.1	95.5
UV-090	67.6	83.2	78.8
UV-234	92.4	96.0	96.8
UV-320	90.5	97.6	94.9
UV-326	81.8	88.0	95.5
UV-327	87.4	96.9	94.7
UV-328	93.5	96.8	95.8
UV-329	95.5	100.4	106.0
UV-350	85.0	92.5	89.8
UV-360	81.5	99.2	100.7
UV-928	86.8	91.4	82.5

(n = 1)

表 9 5%含水シリカゲルカラムからの BT の溶出率(%)

マグロ試料	溶出率 (%)
UV-P	96.6
UV-PS	98.1
UV-9	100.9
UV-090	82.6
UV-234	101.0
UV-320	96.9
UV-326	102.7
UV-327	100.5
UV-328	104.6
UV-329	105.0
UV-350	94.2
UV-360	88.3
UV-928	91.7

(n = 1)

表 10 フロリジルミニカラムからの BT の溶出率(%)

マグロ試料	溶出率 (%)
UV-P	98.5
UV-PS	98.8
UV-9	103.2
UV-090	93.6
UV-234	99.1
UV-320	97.7
UV-326	89.9
UV-327	105.5
UV-328	105.6
UV-329	113.3
UV-350	96.0
UV-360	120.1
UV-928	83.7

(n = 1)

表 11 添加回収試験

BT	マグロ		タラ		アジ		サバ	
	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)
UV-P	108.0	102.2	79.0	94.9	91.5	122.7	34.2	193.9
UV-PS	105.5	4.0	114.0	2.8	108.0	8.7	112.7	5.1
UV-9	98.8	3.9	100.9	4.3	82.8	2.2	89.7	1.4
UV-090	78.1	11.2	89.7	7.9	76.8	12.0	88.5	6.9
UV-234	96.9	6.6	102.2	1.2	110.9	5.9	97.6	5.4
UV-320	94.7	6.9	99.6	2.0	97.5	3.3	101.6	4.3
UV-326	120.7	23.2	77.2	248.0	67.5	62.0	58.1	107.9
UV-327	93.6	10.5	92.0	10.6	90.5	8.4	101.5	2.9
UV-328	95.1	4.7	100.7	1.6	98.1	9.8	94.9	2.9
UV-329	102.7	17.2	78.0	16.3	151.0	14.5	101.9	30.2
UV-350	95.3	4.4	104.3	0.7	98.7	4.1	101.6	4.9
UV-360	176.4	15.1	173.9	45.4	73.3	34.5	51.3	48.4
UV-928	87.4	11.1	96.5	1.2	93.8	2.3	97.3	2.5

添加濃度: 0.4 ng/g (n = 5)

表 12 添加回収試験(安定同位体標識化合物の回収率)

BT <i>d</i>	マグロ		タラ		アジ		サバ	
	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)
UV-P <i>d</i> ₃	80.8	5.7	83.6	2.4	85.7	3.7	82.1	6.1
UV-PS <i>d</i> ₄	80.0	5.3	84.0	1.5	84.9	1.9	81.9	5.4
UV-234 <i>d</i> ₄	83.0	7.3	85.6	2.6	77.9	3.1	85.9	7.8
UV-320 <i>d</i> ₄	80.5	5.8	85.9	1.3	81.7	2.8	83.1	4.5
UV-326 <i>d</i> ₃	73.8	5.0	79.2	3.1	73.6	3.2	74.3	5.0
UV-327 <i>d</i> ₃	75.1	5.7	79.0	1.6	71.5	1.0	74.0	6.4
UV-328 <i>d</i> ₄	79.7	6.7	84.8	2.5	77.2	8.4	79.2	3.2
UV-329 <i>d</i> ₄	81.0	6.3	83.3	4.2	80.9	4.7	82.1	5.9
UV-350 <i>d</i> ₄	80.6	5.5	85.5	1.2	82.3	3.0	83.2	5.0
UV-928 <i>d</i> ₄	82.7	7.9	84.9	5.3	84.7	4.5	73.2	8.5

添加濃度: 4 ng/g (n = 5)

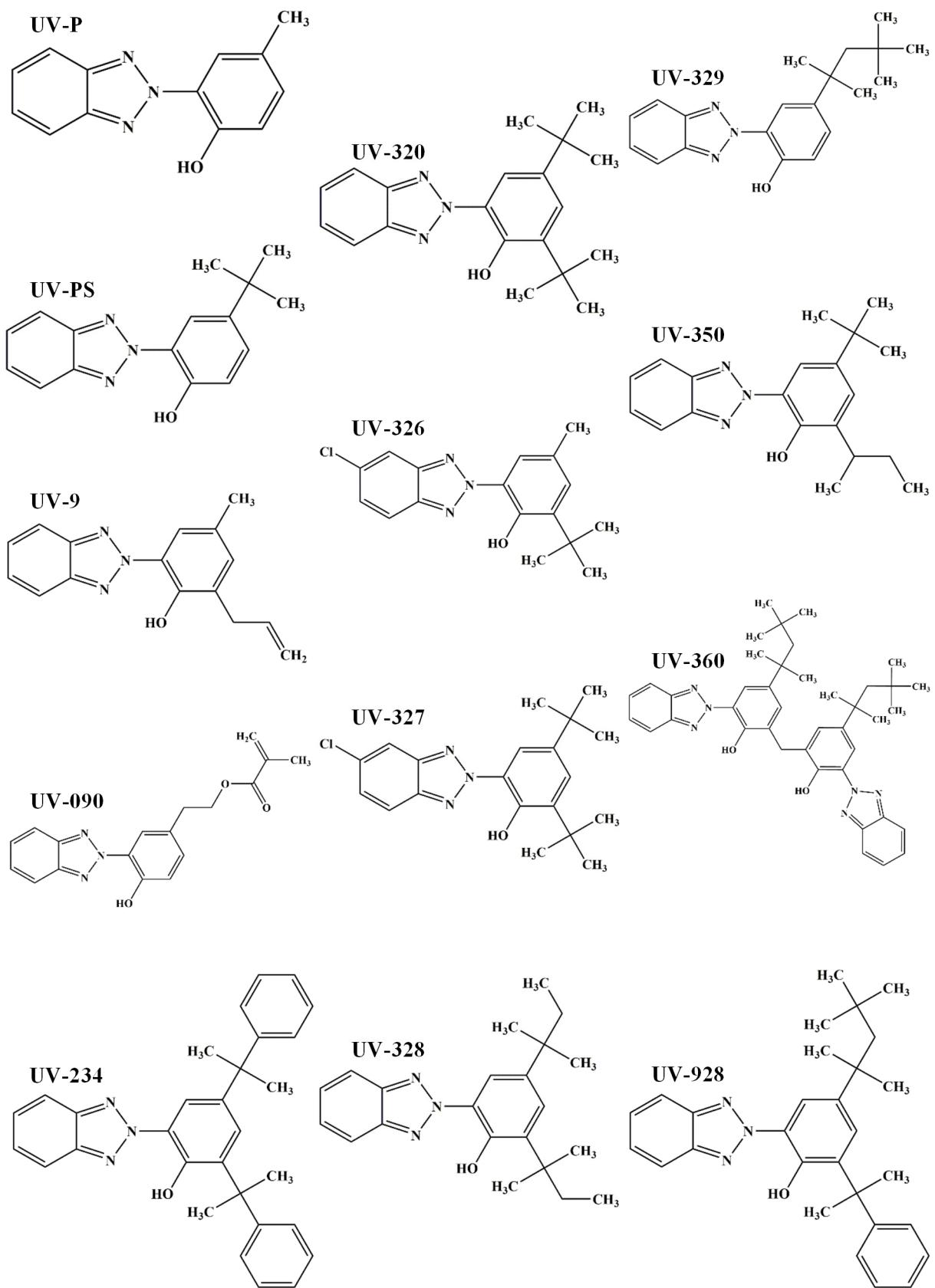


図 1 分析対象とした BT の構造式

秤 取

- ↓ 魚試料(マグロ、アジ、サバ及びタラ) : 5.0 g
- ↓ 内標準物質添加

メタノール抽出

- ↓ メタノール 30 mL を加えてホモジナイズ
- ↓ 每分 3,500 回転、5 分間遠心分離
- ↓ 上清を採取
- ↓ 残留物にメタノール 30 mL を加えてホモジナイズ
- ↓ 每分 3,500 回転、5 分間遠心分離
- ↓ 上清を合わせてメタノールで 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 20 mL(試料 1.0 g 相当)を採り、減圧濃縮して溶媒除去

n-ヘキサン転溶

- ↓ 2 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL 及び n-ヘキサン 30 mL を添加
- ↓ 振とう 5 分間
- ↓ n-ヘキサン層を採取
- ↓ 水層に n-ヘキサン 30 mL を加えて、同様に操作
- ↓ n-ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水
- ↓ 減圧濃縮(約 1 mL)し、n-ヘキサン 1 mL を加えて溶解…①

シリカゲル精製

- ↓ 5%含水シリカゲル 5 g に無水硫酸ナトリウム 1 g を積層
- ↓ n-ヘキサン 40 mL でコンディショニング
- ↓ ①を注入(負荷液を採取)
- ↓ 10 vol%酢酸エチル含有 n-ヘキサン 100 mL で溶出
- ↓ 負荷液及び溶出液を採取
- ↓ 減圧濃縮(約 1 mL)し、n-ヘキサン 1 mL を加えて溶解…②

InertSep FL-PR (2 g/12 mL)

- ↓ n-ヘキサン 10 mL でコンディショニング
- ↓ ②を注入(負荷液は捨てる)
- ↓ 5 vol%酢酸エチル含有 n-ヘキサン 25 mL で溶出
- ↓ 溶出液を減圧濃縮し、溶媒除去
- ↓ メタノールを加えて正確に 10 mL とする

試験溶液

- ↓
- ↓ LC-MS/MS

図 2 試験溶液の調製方法(分析法フローチャート)

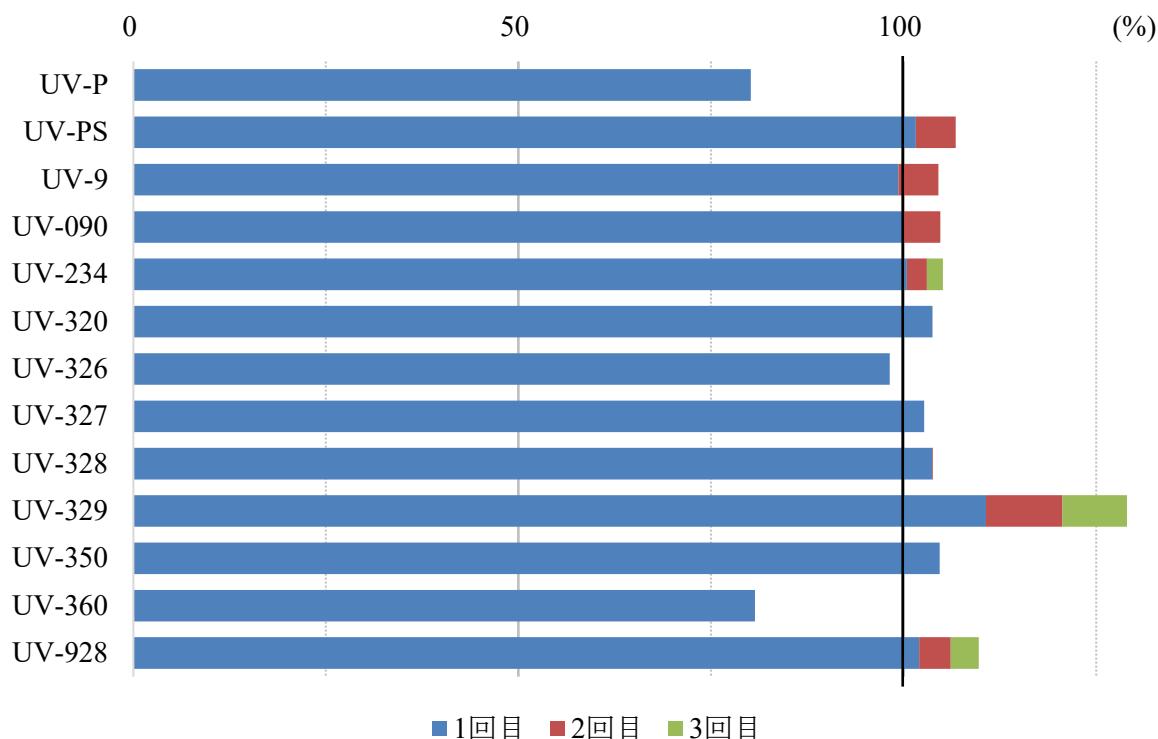


図 3 *n*-ヘキサン転溶時の転溶回数による BT の回収率 (%)

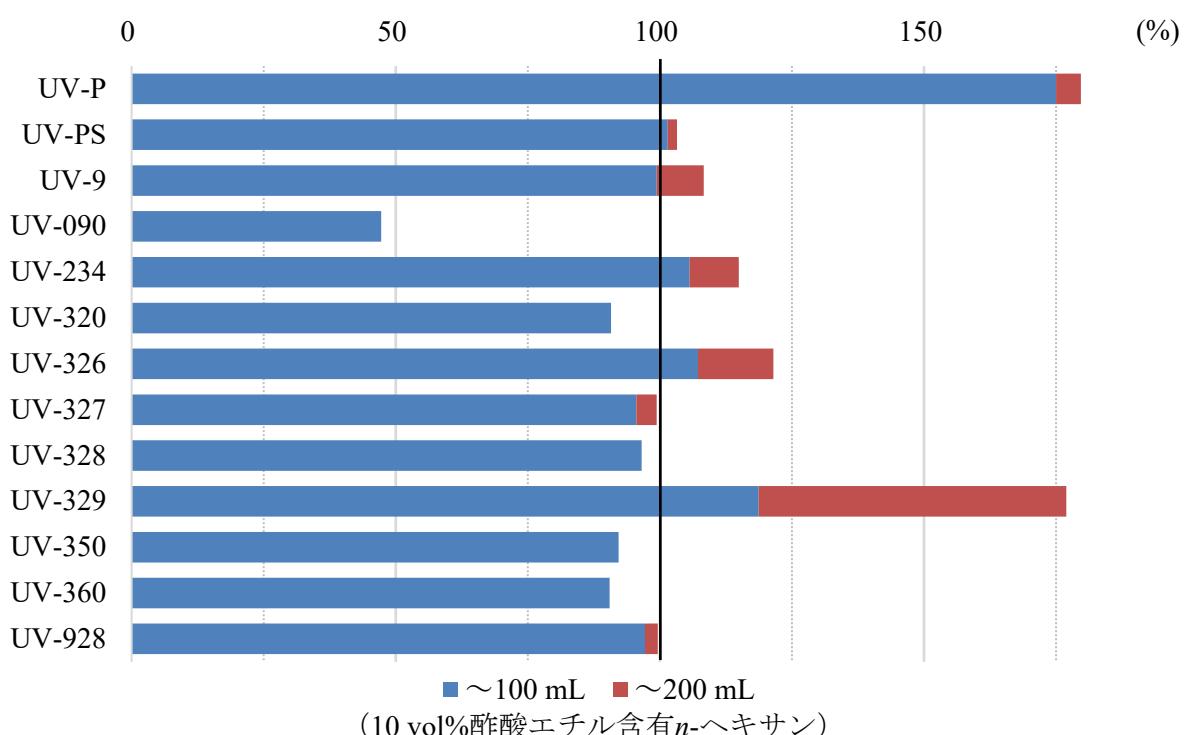


図 4 5%含水シリカゲルカラムからの BT 溶出率 (%)

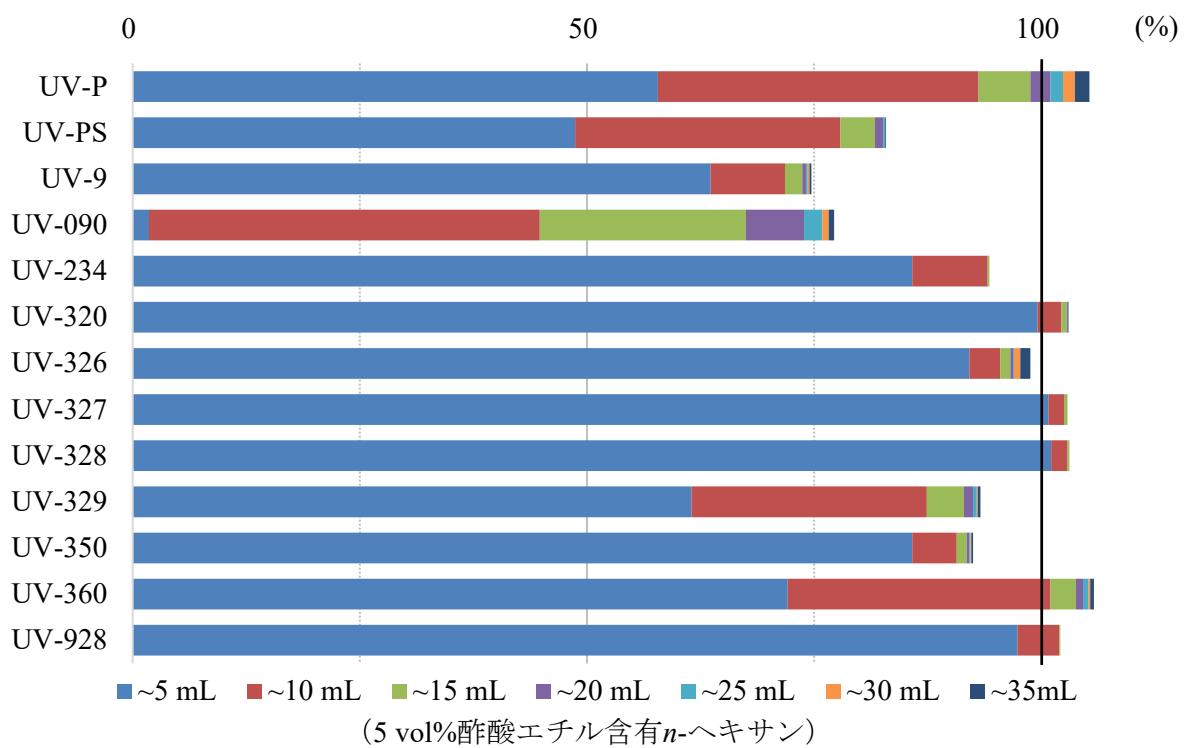


図 5 フロリジルミニカラムからの BT 溶出率(%)

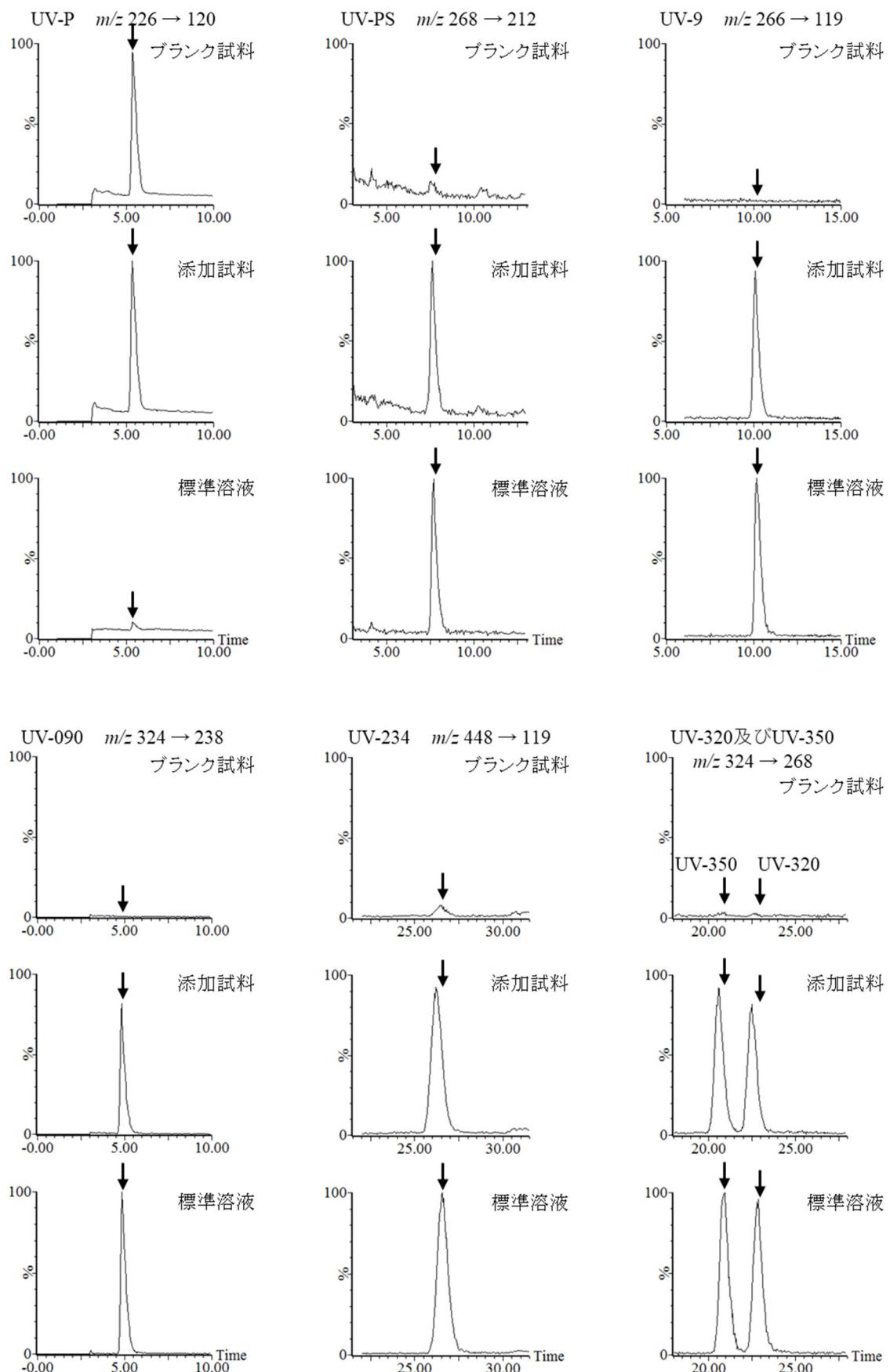


図 6-1 マグロの SRM クロマトグラム

添加濃度: 0.4 ng/g(試験溶液中濃度 0.04 μg/L) 標準溶液: 0.04 μg/L

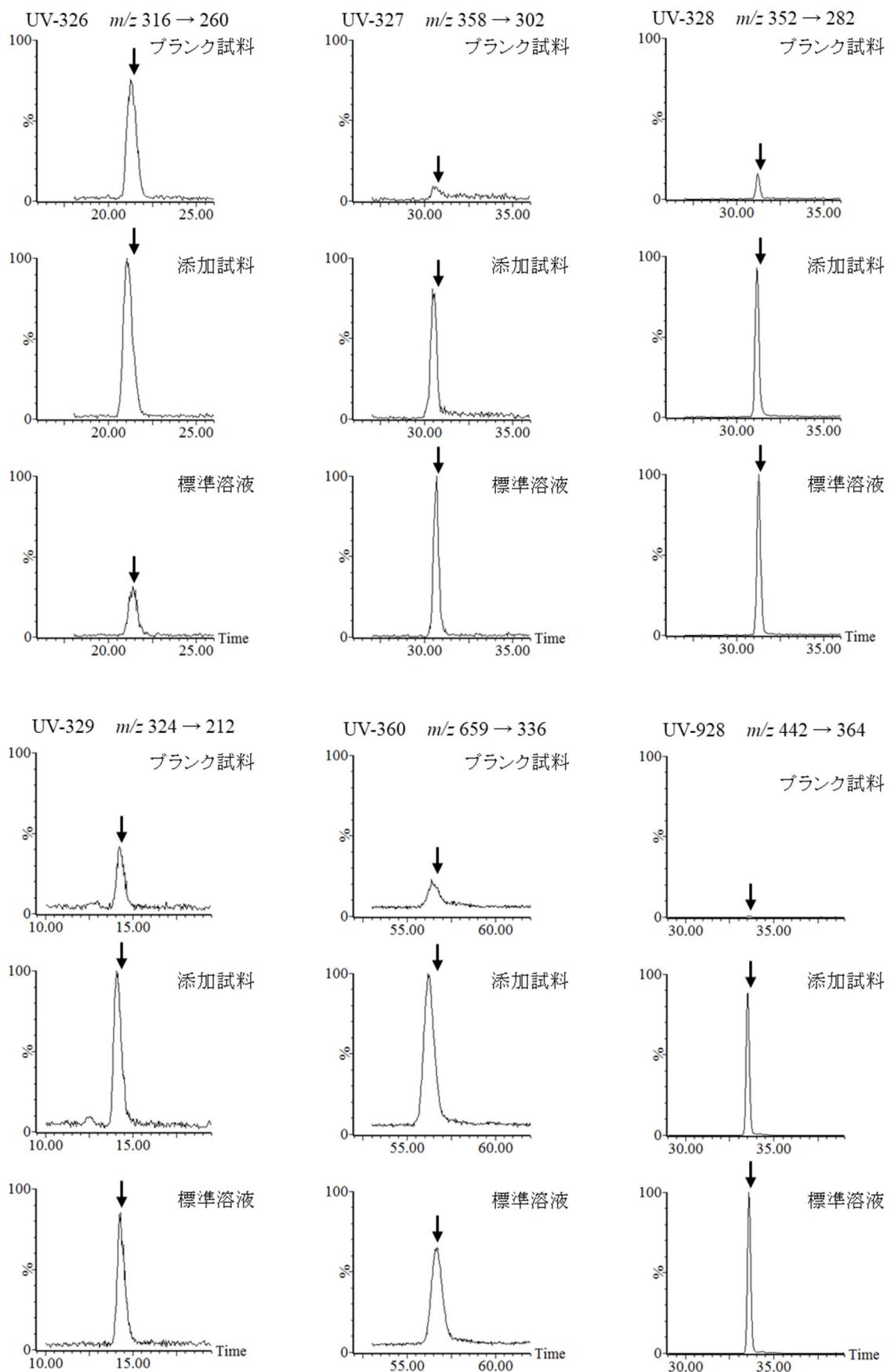


図 6-2 マグロの SRM クロマトグラム

添加濃度: 0.4 ng/g(試験溶液中濃度 0.04 µg/L) 標準溶液: 0.04 µg/L

II. 分担研究報告書

(3) 有害物質の摂取量推定に必要な分析法の開発に関する研究

(3-3) 食品中のリン酸エステル系難燃剤の分析法の検討

研究分担者 堤 智昭

令和5年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発のための研究

分担研究報告書

- (3) 有害物質の摂取量推定に必要な分析法の開発に関する研究
(3-3) 食品中のリン酸エステル系難燃剤の分析法の検討

研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究要旨

本研究では食品中のリン酸エステル系難燃剤の摂取量推定に必要な分析法の開発を目的とした。まず、大気圧ガスクロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析計(APGC-MS/MS)を用いて18種類のリン酸エステル系難燃剤を一斉に定量可能な測定方法を検討した。また、食品中のリン酸エステル系難燃剤の一斉分析が可能な前処理方法の検討を行った。

18種類のリン酸エステル系難燃剤について、APGC-MS/MS法の測定条件を検討した。リン酸エステル系難燃剤のうちリン酸トリス(2-ブトキシエチル)およびリン酸トリス(2,3-ジブロモプロピル)を除く16種類については、1～50 ng/mLの範囲で検量線の直線性が確認できた。現状では、令和4年度に検討したLC-MS/MS法が測定感度に優れており、微量分析に適していると考えられた。

また、食品中のリン酸エステル系難燃剤の一斉分析が可能な前処理方法として、アセトニトリル抽出・塩析法およびゲル浸透クロマトグラフィー精製法について検討を行った。試料は、過去に福岡県で調製したトータルダイエット試料のうち、7群(緑黄色野菜)、10群(魚介類)、13群(調味料類)とした。リン酸エステル系難燃剤の添加回収率は7群:77.5～110.9%、10群:40.4～94.4%、13群:51.6～90.3%であり、10群におけるリン酸トリス(2-クロロエチル)、リン酸トリス(1,3-ジクロロ-2-プロピル)、リン酸トリス(2,3-ジブロモプロピル)およびリン酸トリス(2-エチルヘキシル)を除いて50%以上の回収率が得られた。回収率が低かったリン酸エステル系難燃剤については、測定時の試料マトリックスの影響を受けていると考えられたため、食品群によっては更なる精製を考慮する必要がある。引き続き精製方法を検討した上で、リン酸エステル系難燃剤の一斉分析法の構築を目指す。

研究協力者

福岡県保健環境研究所

佐藤 環、飛石和大、古閑豊和、堀 就英

がある。このうちハロゲン系難燃剤は低コスト及び難燃効果に優れることから、プラスチック製品の添加剤として幅広く使用されてきた。

一方、ハロゲン系難燃剤の一部には、環境中の残留性、生物濃縮性、ヒトを含む生物への毒性、長距離移動性が懸念されているため、国内では「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)、国際的には「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs条約)で規制の対象となっている。

A. 研究目的

難燃剤は、プラスチック、ゴム、繊維等の高分子有機材料に添加され広く使用されており、ハロゲン系やリン系などの有機系難燃剤及び金属水酸化物やアンチモン系などの無機系難燃剤

現在では、ハロゲン系難燃剤に対する使用規制により、様々な難燃剤が代替利用されるようになった。中でも、塩素や臭素を含有しない分子構造を持ち、焼却処分における有害なダイオキシン類の発生リスクを低減した難燃剤が選定されるようになっており、その選択肢としてリン酸エステル系難燃剤（Organic Phosphate Flame Retardants; OPFRs）が挙げられる¹⁾。

OPFRs の多くは、リン酸($O=P(OH)_3$)が持つ 3 個の水素の全ておよび一部が有機基で置き換わった構造であり、その難燃化機構は加熱分解によりリン酸が生成しそのリン酸の還元作用によって樹脂の炭化を促進させると同時に、リン酸は脱水縮合反応によりポリメタリン酸を生成する²⁾。これら使用量は、2011 年において約 50 万トン、2015 年には約 68 万トンと報告されている³⁾。OPFRs は、空気⁴⁾、ハウスダスト⁵⁾、河川水^{6), 7)}、海水^{8), 9)}、土壤¹⁰⁾、堆積物⁴⁾など様々な環境中からの検出事例が報告されている。また、食品中においては、室内空気から精白米への OPFRs 汚染¹¹⁾や母乳からの OPFRs の検出¹²⁾が報告されており、環境から食品への移行が懸念される。一部の OPFRs には神経毒性、発がん性や遺伝毒性が疑われている^{13), 14)}ことから、食事を介した OPFRs の健康への影響を評価することは極めて重要である。

上記の現況を踏まえ、本研究では、食品中の OPFRs の摂取量推定に必要な分析法の開発を目的とした。令和 4 年度は、GC-MS/MS および LC-MS/MS を用いて、OPFRs を一斉に定量可能な測定方法を検討した。その結果、検討した機器における測定感度は LC-MS/MS 法が勝るが、ピーク分離に関しては GC-MS/MS 法が優れていた。OPFRs の測定方法としては、LC-MS/MS 法により定量を行うことを基本とし、高濃度で検出された場合に異性体分離に関して疑義が生じた際には GC-MS/MS 法を併用して確認する必要があると考えられた。また、将来的には、GC-MS/MS 法の高分離能と大気圧イオン化法の高感度を特徴に併せ持つ大気圧ガ

スクロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析計 (APGC-MS/MS) を用いた測定法の適用も考慮する必要があると結論付けた¹⁵⁾。

そこで、本年度の研究では、APGC-MS/MS 法による OPFRs の一斉分析法を検討した。また、食品中の OPFRs を一斉に分析可能な前処理方法として、アセトニトリル抽出・塩析法およびゲル浸透クロマトグラフィー (Gel Permeation Chromatography; GPC) 精製法について検討を行った。

B. 研究方法

1. 試薬及び器具

1.1 標準物質

分析対象とした OPFRs の標準溶液は、リン酸トリエチル(TEP)、リン酸トリブチル(TBP)、リン酸トリス(2-クロロエチル) (TCEP)、リン酸トリス(1-クロロ-2-プロパニル) (TCPP)、リン酸トリフェニル (TPhP)、リン酸トリプロピル(TPrP)、リン酸 2-エチルヘキシルジフェニル(EHDPhP)、リン酸トリス(2-メチルフェニル) (ToTP)、リン酸トリス(3-メチルフェニル) (TmTP)、リン酸トリス(4-メチルフェニル) (TpTP)、リン酸トリス(2-ブトキシエチル) (TBEP)、リン酸トリス(3,5-ジメチルフェニル) (T35DMPhP)、リン酸トリス(1,3-ジクロロ-2-プロピル) (TDCPP)、リン酸トリス(2-エチルヘキシル) (TEHP)、リン酸トリス(2-イソプロピルフェニル) (T2iPPhP)、リン酸トリス(3-イソプロピルフェニル) (T3iPPhP)、リン酸トリス(4-イソプロピルフェニル) (T4iPPhP)、リン酸トリス(2,3-ジブロモプロピル) (TDBPP) の非標識(ネイティブ体) 18 種類を(株)ウェリントンラボラトリージャパンより購入した。以上の物質について化学式や物性等の情報を表 1 にまとめた。

クリーンアップスペイク標準溶液は、リン酸トリエチル-d₁₅ (TEP-d₁₅)、リン酸トリブチル-d₂₇ (TBP-d₂₇)、リン酸トリス(2-クロロエチル)-d₁₂ (TCEP-d₁₂)、リン酸トリス(1,3-ジクロロ-2-プロピル)-d₁₅ (TDCPP-d₁₅)、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)-¹³C₂ (TBEP-¹³C₂)、リン酸トリフェニル

$^{-13}\text{C}_{18}$ (TPhP- $^{-13}\text{C}_{18}$)、リン酸トリプロピル-d₂₁ (TPrP-d₂₁)を(株)ウェリントンラボラトリージャパンより、リン酸トリス(4-イソプロピルフェニル)- $^{-13}\text{C}_{18}$ (T4iPPhP- $^{-13}\text{C}_{18}$)の安定同位体ラベル化体8種類をCambridge Isotope Laboratories, Inc.より購入した。

シリジスパイク標準溶液は、安定同位体ラベル化体であるリン酸トリフェニル-d₁₅ (TPhP-d₁₅)を(株)ウェリントンラボラトリージャパンより購入した。

1.2 試薬及び器具

アセトニトリル(残留農薬・PCB 試験用)、アセトニトリル(LC/MS 分析用)、アセトン(ダイオキシン類分析用)、塩化ナトリウム(残留農薬・PCB 試験用)、シクロヘキサン(残留農薬・PCB 試験用)、蒸留水(LC/MS 分析用)、ヘキサン(ダイオキシン類分析用)、メタノール(LC/MS 分析用)は関東化学(株)より購入した。硫酸マグネシウム(無水)(特級)は富士フイルム和光純薬(株)より購入した。

GC キャピラリーカラムは、Rxi-5Sil MS をRestek(株)より購入した。

LC カラムは、Acquity BEH C18 を日本ウォーターズ(株)より購入した。

2. 機器

大気圧ガスクロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析計(APGC-MS/MS)は、アジレント社製のAgilent 8890 GC system および日本ウォーターズ(株)社製のAPGC Xevo TQ-XS を使用した。

液体クロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析計(LC-MS/MS)は、日本ウォーターズ(株)社製のAcquity UPLC H-Class Plus Binary/Xevo TQ-XS を使用した。

3. 試験溶液の調製

3.1 ゲル浸透クロマトグラフィー精製条件の検討

ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)の装置構

成、使用条件等は以下の通りであった。ポンプおよびデガッサーは、島津製作所製のLC-20AD および DGU-20A を使用した。UV 検出器は島津製作所製のSPD-20A を使用し、254 nm の吸光度をモニターした。カラムオーブンはGLサイエンス社製のCO 903を使用し、カラム温度を40°Cに設定した。カラムは、昭和電工社製のCLNpak EV-G AC + EV-2000 AC を使用し、移動相としてアセトン/シクロヘキサン(2:8)を用いて、流速を5 mL/min に設定した¹⁶⁾。

試料は、平成30年度に福岡県で調製したトータルダイエット(TD)試料のうち、色素、タンパク質や油脂類等を比較的多く含む7群(緑黄色野菜)、10群(魚介類)、13群(調味料類)とした。既報^{17), 18)}を参考に、抽出液を調製した。試料約10 g をPP製の50 mL遠心チューブに量り採り、アセトニトリル20 mLを加えてホモジナイズ(10,000 rpm, 2分間)した。1 g の塩化ナトリウムおよび4 g の硫酸ナトリウム(無水)を加えて塩析、脱水を行った後、遠心分離した(4,000 rpm, 10min)。上澄み液を回収し、約1 mLまで濃縮後、窒素気流下で溶媒を除去した。残留物をGPCの移動相と同じ組成の溶液10 mLに溶解し、遠心分離(4,000 rpm, 10分間)して得られた上澄み液を抽出液とした。また、GPC精製における回収率を評価するため、ネイティブ体のOPFRs標準物質(T3iPPhP及びT4iPPhPを除く16種類)各90 ngを抽出液9 mLに溶解し、その内の2 mLをサンプルループ方式にてGPC装置に注入した。注入後9分から2分間隔で21分まで分取して画分1~6を得た。各画分にクリーンアップスパイクを各20 ng添加後、窒素気流下で溶媒を除去しメタノール1 mLに溶解したものをLC-MS/MS測定溶液とした。また、標準溶液の分画についても併行して実施した。

3.2 添加回収試験

試料は、平成30年度に福岡県で調製したTD試料のうち、7群(緑黄色野菜)、10群(魚介類)、13群(調味料類)とした。試料約10 g をPP

製の 50 mL 遠心チューブに量り採り、ネイティブ体の OPFRs 標準物質を各 200 ng、クリーンアップスパイクを各 50 ng 添加した後、アセトニトリル 20 mL を加えてホモジナ化(10,000 rpm, 2 分間)した。1 g の塩化ナトリウムおよび 4 g の硫酸ナトリウム(無水)を加えて塩析および脱水を行った後、遠心分離した(4,000 rpm, 10min)。上澄み液を回収し、約 1 mL まで濃縮後、窒素気流下で溶媒を除去した。残留物をアセトン/シクロヘキサン(2:8)混液 10 mL に溶解し、遠心分離(4,000 rpm, 10 分間)して得られた上澄み液を抽出液とした。抽出液 2 mL をサンプルループ方式にて GPC 装置に注入した。注入後 9~21 分を分取して濃縮・乾固後、シリジンスパイク 10 ng を添加して、メタノールで 10 mL に定容したものを LC-MS/MS 測定溶液とした。添加回収試験は 2 併行(13 群は 1 併行)で行った。また、OPFRs を添加していないブランク試料および操作ブランク試料についても併行して調製した。

3.3 試料マトリックス標準溶液の調製

試料は、平成 30 年度に福岡県で調製した TD 試料のうち、7 群(緑黄色野菜)、10 群(魚介類)、13 群(調味料類)とした。ネイティブ体の OPFRs 標準溶液およびクリーンアップスパイクの添加を行わずに、3.2 と同様の操作で試験溶液を調製した。ネイティブ体の OPFRs 標準物質各 8 ng を試験溶液 2 mL に溶解して試料マトリックス標準溶液を調製した。

4. OPFRs の測定

4.1 APGC-MS/MS 測定

4.1.1 APGC-MS/MS 用検量線の作成

購入した各標準溶液からヘキサンにて 0.5 mg/L 標準溶液を調製し、APGC-MS/MS の分析条件の検討に供した。また、18 種の OPFRs ネイティブ体および 9 種の OPFRs 安定同位体ラベル化体について、それぞれ混合標準溶液(トルエン溶液)を調製した。ネイティブ体とラベル化体の混合標準液を用いヘキサンにて順次希釈して

0.01~50 ng/mL の範囲で 12 点の検量線用混合標準液を調製し APGC-MS/MS にて測定を行った。なお、ラベル化体は、1 ng/mL となるように検量線用混合標準溶液に加えた。

4.1.2 APGC-MS/MS 測定条件

表 2-1 に示す測定条件及び表 2-2 に示す SRM 条件で測定した。

4.2 LC-MS/MS 測定

4.2.1 LC-MS/MS 用検量線の作成

18 種の OPFRs ネイティブ体および 9 種の OPFRs 安定同位体ラベル化体について、それぞれ混合標準溶液(アセトニトリル溶液)を調製した。ネイティブ体とラベル化体の混合標準液を用いメタノールにて順次希釈して 0.05~10 ng/mL の範囲で 8 点の検量線用混合標準液を調製し LC-MS/MS にて測定を行った。なお、ラベル化体は、1 ng/mL となるように検量線用混合標準溶液に加えた。

4.2.2 LC-MS/MS 測定条件

表 3-1 に示す測定条件¹⁵⁾及び表 3-2 に示す SRM 条件で測定した。

C. 研究結果及び考察

1) APGC-MS/MS 測定条件の検討

APGC は、LC-MS のイオン化法である大気圧化学イオン化法を応用したものであり、GC/MS の EI 法と比べてフラグメンテーションが少ないことから高感度な測定が期待できる。さらに、キャリアガスに窒素を用いても感度低下を引き起こさないとされている。^{19), 20)}そこで、キャリアガスとして窒素を用いた条件を検討した。令和 4 年度に検討した GC-MS/MS の測定条件¹⁵⁾をオンラインソフトウェア EZGC Method Translator(Restek 社製)を用いて、同等の線速度および分離度になるよう変換した。また、APGC ではイオン化を行うチャンバー内をドライ雰囲気にするかウェット雰囲気にするかによって生成する主なイオンが異なる

(電荷移動反応またはプロトン移動反応)¹⁹⁾。本研究では、ドライ雰囲気下を選択し検討を行った。

スキャンモードにて各OPFRs標準溶液を測定し、MSスペクトルの情報を基に適切なプリカーサーイオン($[M]^+$ または $[M+H]^+$)を選択した。ドライ雰囲気下においても、 $[M+H]^+$ が $[M]^+$ より高い感度で観測された化合物があったため、OPFRsの中にはウェット雰囲気下による測定が適している化合物もあると考えられた。

各OPFRsについて、イオン生成に最適なコーン電圧を5~60Vの範囲で検討した。また、プロダクトイオンの生成に最適なコリジョンエネルギーを5~60eVの範囲で検討した。各プレカーサーイオンに対するプロダクトイオンスキャンを行い、最適なSRMトランジション及びコリジョンエネルギーを設定した。最適化したSRM条件を表2-2に示した。各定量イオンのSRMクロマトグラムは図1-1~1-18に示した。分析対象としたOPFRs18種について、ピーク形状および分離に関して問題無く測定できた。また、内部標準法により作成した検量線の範囲及び決定係数を表2-2に示した。TPhP、T3iPPhP、T4iPPhPは0.01~50ng/mLの範囲で、T35DMPPhPは0.02~50ng/mLの範囲でToTP、TmTP、TpTP、EHDPhP及びT2iPPhPは0.1~50ng/mLの範囲で、TEP、TCPP、TPrP、TDCPP、TBPは0.5~50ng/mLの範囲で、TCEP及びTEHPは1~50ng/mLの範囲で直線性が確認できた。なお、これらの検量線の最低濃度のピーク強度は全て $S/N \geq 10$ であった。一方で、TBEPおよびTDBPPについては感度が不足しており、検討した範囲では検量線を作成できなかった。現状では、殆どのOPFRsについて、LC-MS/MS法¹⁵⁾が測定感度に優れていた。従って、以降の検討では、LC-MS/MS法により定量を行うこととした。

2) GPC精製条件の検討

GPC精製における、OPFRsの画分ごとの回収率を表4に示した。最も溶出が早かったのは

TEHP(9~13分)、最も溶出が遅かったのはTCEPおよびTPhP(17~21分)であった。OPFRsを一斉に分析するためには、注入後9~21分の分取が適切であると考えられた。

OPFRsの総回収率は標準溶液:91.1~125.5%、7群:62.6~115.4%、10群:75.8~113.6%、13群:73.8~134.1%であり、概ね良好な回収率であった。脂質や色素の除去の指標となるフルバリネットは画分2に溶出されるため、画分1には、除去できなかつた脂質や色素が含まれると予測される。このことから、測定時の試料マトリックスの影響について確認する必要がある。

3) ブランク試験

操作ブランク試料を3併行で調製し、測定して得られたピーク面積値を表5に示した。TEP、TCEP、TCPP、TPhP、TBP、TBEP、TEHPが検出された。また、LC-MS/MS測定溶液の調製に使用したメタノールを測定したところ、操作ブランク試料と同程度のピーク面積のTEHPが検出された。TEHPが操作ブランク試料から検出された原因は、LC-MS/MS測定溶液の調製に用いたメタノール、あるいはLC-MS/MSシステム由来によるものと考えられた。

4) 添加回収試験結果

添加回収試験の結果を表6に示した。回収率は絶対検量線法により算出した。定量に用いた検量線の決定係数は0.998~1.000の範囲であり、良好な直線性が得られた。OPFRsの回収率は7群:77.5~110.9%、10群:40.4~94.4%、13群:51.6~90.3%であり、10群の一部のOPFRsを除いて50%以上の回収率が得られた。10群においてはTCEP、TDCPP、TDBPPおよびTEHPの回収率が50%未満であった。また、クリーンアップスペイクの回収率は、7群:62.3~91.5%、10群:43.0~112.0%、13群:43~90.1%であった。「食品中のダイオキシン類の測定方法暫定ガイドライン」²¹⁾を適用した場合、目標値(40~120%)を満足した。

5) 試料マトリックスの測定値への影響

溶媒標準溶液のピーク面積に対するマトリックス標準溶液のピーク面積の割合を算出し、試料マトリックスの測定値への影響を検討した(表6)。各OPFRsに対する試料マトリックスの測定値への影響(ピーク面積比)は、7群:0.81~1.07、10群:0.36~0.87、13群:0.58~1.06であった。7群では全てのOPFRs、13群でも殆どのOPFRsのピーク面積比が0.8~1.2の範囲に収まり、測定時の試料マトリックスの影響は殆どないと考えられた。一方、10群においてはピーク面積比が0.8未満のOPFRsが多く、測定時に試料マトリックスの影響(イオン化抑制²²⁾)をうけていることが分かった。4)で算出した添加回収率を求めたピーク面積比で除して補正した回収率は、7群:88.9~112.9%、10群:89.1~116.0%、13群:79.8~95.3%であり、良好な回収率となった。このことから、一部のOPFRsにおいて低回収率となった原因是、抽出および精製時の損失ではなく、測定時に試料マトリックスの影響を受けていたと考えられ、食品群によっては更なる精製を考慮する必要がある。

D. 結論

本研究では食品中のOPFRsの摂取量推定に必要な分析法の開発を目的とした。まず、APGC-MS/MSを用いてOPFRsを一斉に分析可能な方法を検討した。また、食品中のOPFRsの一斉分析が可能な前処理方法の検討を行った。

OPFRs18種について、APGC-MS/MS法の測定条件を検討した。検量線はTBEPおよびTDBPPを除く16種類について1~50 ng/mLの範囲で直線性が確認できた。現状では、LC-MS/MS法が測定感度に優れており、微量分析に適していると考えられた。

また、食品中のOPFRsの一斉分析が可能な前処理方法として、アセトニトリル抽出・塩析法およびGPC精製法について検討を行った。TD試料(7群、10群、13群)におけるOPFRsの回

収率は7群:77.5~110.9%、10群:40.4~94.4%、13群:51.6~90.3%であり、10群のTCEP、TDCPP、TDBPPおよびTEHPを除いて50%以上の回収率が得られた。回収率が低かったOPFRsについては、測定時の試料マトリックスの影響を受けていると考えられたため、食品群によっては更なる精製を考慮する必要がある。引き続き精製方法を検討した上で、OPFRsの一斉分析の構築を目指す。

E. 参考文献

- 1) 松神秀徳、戸舘侑孝、Sicco H. BRANDSMA、Pim E.G. LEONARDS、滝上英孝、リン酸エステル系難燃剤の定量分析法の開発と国際相互検定研究による検証。環境化学(2014)24(2),41-49.
- 2) 西澤仁. 難燃剤・難燃化材料の最前線.(2015)p83.
- 3) Hou, R., Xu, Y., Wang, Z., Review of OPFRs in animals and humans: absorption, bioaccumulation, metabolism, and internal exposure research. Chemosphere (2016) 153, 78-90.
- 4) van der Veen I., de Boer J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. Chemosphere (2012) 88, 1119–1153.
- 5) He C., Zheng J., Qiao L., Chen S., Yang J., Yuan J., Yang Z., Mai B., Occurrence of organophosphorus flame retardants in indoor dust in multiple microenvironments of southern China and implications for human exposure. Chemosphere (2015) 133, 47–52.
- 6) 山崎隆博、吉川昌範. 福井県内の河川におけるリン酸エステル系難燃剤の実態について. 福井県衛生環境研究センタ一年報(2017) 16, 57–59.
- 7) 宮尻久美、坂 雅宏. リン酸エステル系難燃剤分析法の精度と京都府南部河川水を試料とした本法の適用結果について. 京都府

- 保環研年報 (2019) 64, 24–29.
- 8) Chen, M.Q., Gan, Z.W., Qu, B., Chen, S.B., Dai, Y.Y., Bao, X.M., Temporal and seasonal variation and ecological risk evaluation of flame retardants in seawater and sediments from Bohai Bay near Tianjin, China during 2014 to 2017. *Mar. Pollut. Bull.* (2019) 146, 874–883.
 - 9) Zheng, H.Y., Cai, M.H., Yang, C., Gao, Y., Chen, Z.Y., Liu, Y.G., Terrigenous export and ocean currents' diffusion of organophosphorus flame retardants along China's adjacent seas. *Environ. Pollut.* (2022) 299, 118873.
 - 10) Wang, Y., Sun, H.W., Zhu, H.K., Yao, Y.M., Chen, H., Ren, C., Wu, F.C., Kannan, K., Occurrence and distribution of organophosphate flame retardants (OPFRs) in soil and outdoor settled dust from a multi-waste recycling area in China. *Sci. Total Environ.* (2018) 625, 1056–1064.
 - 11) 渡邊美咲、野口実華子、橋本多美子、吉田精作. 室内における有機リン系難燃剤の精白米への吸着. *食品衛生学雑誌* (2019) 60, 159–167.
 - 12) Kim J.-W., Isobe T., Muto M., Tue N.M., Katsura K., Malarvannan G., Sudaryanto A., Chang K.-H., Prudente M., Viet P.H., Takahashi S., Tanabe S., Organophosphorus flame retardants (PFRs) in human breast milk from several Asian countries. *Chemosphere* (2014) 116, 91–97.
 - 13) Maddela N.R., Venkateswarlu K., Megharaj M., Tris (2-chloroethyl) phosphate, a pervasive flame retardant: critical perspective on its emissions into the environment and human toxicity. *Environ Sci Process Impacts* (2020) 22(9), 1809–1827.
 - 14) Wang C., Chen H., Li H., Yu J., Wang X., Liu Y., Review of emerging contaminant tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate: Environmental occurrence, exposure, and risks to organisms and human health. *Environment International* (2020) 143, 105946.
 - 15) 令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 食品の安全確保推進研究事業「食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発のための研究」分担研究報告書(有害物質の摂取量推定に必要な分析法の開発に関する研究)
 - 16) 食安発第 0124001 号「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」(平成 17 年 1 月 24 日)
 - 17) 高取 聰、山本遥菜、福井直樹、山口聰子、北川陽子、柿本 葉、小阪田正和、起橋雅浩、梶村計志、尾花裕孝. LC-MS/MS を用いた迅速な野菜類および果実類中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価. *食品衛生学雑誌* (2013) 54, 237–249.
 - 18) Han L., Sapozhnikova Y., Nuñez A., Analysis and Occurrence of Organophosphate Esters in Meats and Fish Consumed in the United States. *J Agric Food Chem.* (2019) 67(46), 12652–12662.
 - 19) 佐藤信武, 生方正章, 岩崎了教, 菊澤崇, 工藤寿治, 杉立久仁代. 質量分析における新しいイオン化技術. *日本農薬学会誌* (2016) 41(2), 223–235.
 - 20) 古閑豊和, 高橋浩司. 窒素キャリアガスを用いた大気圧ガスクロマトグラフィータンデム質量分析法による水質汚濁に係る環境基準の付表 6 シマジン及びチオベンカルブの測定法検討. *環境化学* (2023) 33, 74–82.
 - 21) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知“食品中のダイオキシン類測定方法暫定ガイドライン”平成 20 年 2 月 28 日, 食安監発第 0228003 号.
 - 22) 望月直樹. 食の安全における LC-MS/MS 分析の問題点. *薬学雑誌* (2011) 131(7),

F.研究業績

1. 論文発表

- 1) Sato T, Tobiishi K, Hori T, Tsutsumi T, Akiyama H, Matsui T : Simultaneous determination of hexabromocyclododecanes, Polybrominated diphenyl ethers, and dechlorane-related compounds in boxed sushi meals using a developed analytical method. Food Science and Technology Research, 2023;29(4): 347–356.

2. 学会発表

- 1) 飛石和大、佐藤 環、堀 就英、堤 智昭：魚介類を主菜とする市販の調理済み食品（弁当類）中のポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs），第 31 回環境化学討論会（2023.5）。
- 2) 佐藤 環、飛石和大、堀 就英、堤 智昭：食品中のリン酸エステル系難燃剤の一斉分析法の検討，第 119 回日本食品衛生学会学術講演会（2023.10）
- 3) 飛石和大、佐藤 環、堀 就英、堤 智昭：魚介類を主菜とする市販の調理済み食品（弁当類）中のハロゲン系難燃剤，第 49 回九州衛生環境技術協議会（2023.10）。

表1 分析対象としたOPFRs

Compound name	Abbreviation	CAS RN	Formula	Log Pow	Monoisotopic mass
Triethyl phosphate	TEP	78-40-0	C ₆ H ₁₅ O ₄ P	0.80	182.0708
Tripropyl phosphate	TPrP	513-08-6	C ₉ H ₂₁ O ₄ P	1.87	224.1178
Tributyl phosphate	TBP	126-73-8	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P	4.00	266.1647
Tris(2-chloroethyl) phosphate	TCEP	115-96-8	C ₆ H ₁₂ Cl ₃ O ₄ P	1.44	283.9539
Tris(1-chloro-2-propanyl) phosphate	TCPP	13674-84-5	C ₉ H ₁₈ Cl ₃ O ₄ P	2.59	326.0008
Triphenyl phosphate	TPhP	115-86-6	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	4.59	326.0708
2-ethylhexyl diphenyl phosphate	EHDPhP	1241-94-7	C ₂₀ H ₂₇ O ₄ P	5.73	362.1647
Tris(2-methylphenyl) phosphate	ToTP	78-30-8		5.11	
Tris(3-methylphenyl) phosphate	TmTP	563-04-2	C ₂₁ H ₂₁ O ₄ P	6.34	368.1177
Tris(4-methylphenyl) phosphate	TpTP	78-32-0		6.34	
Tris(2-butoxyethyl)phosphate	TBEP	78-51-3	C ₁₈ H ₃₉ O ₇ P	3.75	398.4718
Tris(3,5-dimethylphenyl)phosphate	T35DMPhP	25155-23-1	C ₂₄ H ₂₇ O ₄ P	7.98	410.1647
Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate	TDCPP	13674-87-8	C ₉ H ₁₅ Cl ₆ O ₄ P	3.65	427.8839
Tris(2-ethylhexyl)phosphate	TEHP	78-42-2	C ₂₄ H ₅₁ O ₄ P	9.49	434.3525
Tris(2-isopropylphenyl)phosphate	T2iPPhP	64532-95-2		9.07	
Tris(3-isopropylphenyl)phosphate	T3iPPhP	72668-27-0	C ₂₇ H ₃₃ O ₄ P	8.30	452.2116
Tris(4-isopropylphenyl)phosphate	T4iPPhP	26967-76-0		7.40	
Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate	TDBPP	126-72-7	C ₉ H ₁₅ Br ₆ O ₄ P	4.29	691.5807

表 2-1 APGC-MS/MS 測定条件

GC conditions	
GC	Agilent 8890
Column type	Rxi-5Sil MS (Restek, 0.18mm×20m, 0.18 μm)
Injection	Splitless
Injection volume	1 μL
Injector temperature	280 °C
Carrier gas (Flow rate)	N ₂ (0.3375 mL/min)
Oven temperature program	50°C (1.29 min)–7.77°C/min –280°C (10.3 min)
MS conditions	
MS	Waters Xevo TQ XS
Ionization mode	APCI-positive
Scan type	Scan / SRM
Corona current	2 μA
Interface temperature	280°C
Source temperature	150°C

表 2-2 MS/MS 条件 (APGC-MS/MS) 及び検量線の範囲

Compound	Retention time (min)	Precursor ion	Cone Voltage (V)	Transition m/z	Collision energy (eV)	Surrogate	Standard curve range (ng/mL)	R ²
TEP	10.7	[M] ⁺	30	182>155 182>99	20 10	TEP-d ₁₅	0.5-50	0.984
TCEP	21.0	[M+H] ⁺	30	285>223 285>99	20 10	TCEP-d ₁₂	1-50	0.992
TCPP	21.5	[M+H] ⁺	30	327>251 327>99	20 10	TPrP-d ₂₁	0.5-50	0.983
TPrP	15.3	[M+H] ⁺	10	225>141 225>99	30 10	TPrP-d ₂₁	0.5-50	0.991
TDCPP	27.8	[M+H] ⁺	30	431>99 431>321	20 10	TDCPP-d ₁₅	0.5-50	0.932
TPhP	28.7	[M] ⁺	5	326>215 326>168	40 30	TPhP- ¹³ C ₁₈	0.01-50	0.996
TDBPP	36.8	[M+H] ⁺	30	698.5>99 698.5>299	30 20	TBP-d ₂₇	20-50	-
TBP	19.4	[M+H] ⁺	20	267>155 267>99	20 10	TBP-d ₂₇	0.5-50	0.992
TBEP	28.6	[M+H] ⁺	5	399.5>199 399.5>225	20 10	TBEP- ¹³ C ₆	50	-
ToTP	30.5	[M] ⁺	40	368>165 368>181	40 20	TBEP- ¹³ C ₆	0.1-50	0.970
TmTP	31.1	[M] ⁺	20	368>165 368>243	40 30	TBEP- ¹³ C ₆	0.1-50	0.990
TpTP	32.1	[M] ⁺	20	368>165 368>243	40 30	TBEP- ¹³ C ₆	0.1-50	0.992
EHDPhP	28.9	[M] ⁺	20	362>251 362>153	30 20	TBEP- ¹³ C ₆	0.1-50	0.994
T35DMPhP	33.6	[M] ⁺	50	410>193 410>178	50 30	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈	0.02-50	0.996
T2iPPhP	32.3	[M] ⁺	40	452>410 452>118	20 20	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈	0.1-50	0.964
T3iPPhP	35.4	[M] ⁺	30	452>118 452>251	20 30	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈	0.01-50	0.995
T4iPPhP	39.4	[M] ⁺	10	452>437 452>395	30 20	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈	0.01-50	0.998
TEHP	29.2	[M+H] ⁺	5	435>99 435>323	20 5	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈	1-50	0.990
TEP-d ₁₅	10.5	[M] ⁺	40	197>103 197>167	20 10			
TCEP-d ₁₂	20.9	[M+H] ⁺	30	297>167 297>195	20 10			
TPrP-d ₂₁	15.0	[M+H] ⁺	5	246>102 246>198	20 10			
TDCPP-d ₁₅	27.7	[M+H] ⁺	40	446>102 446>332	30 10			
TPhP- ¹³ C ₁₈	28.7	[M] ⁺	40	344>227 344>245	20 20			
TBP-d ₂₇	19.1	[M+H] ⁺	30	294>102 294>166	20 10			
TBEP- ¹³ C ₆	28.6	[M+H] ⁺	30	405>201 405>303	20 10			
T4iPPhP- ¹³ C ₁₈	39.4	[M] ⁺	5	470>413 470>455	30 20			
TPhP-d ₁₅	28.6	[M] ⁺	10	341>176 341>223	40 30			

表 3-1 LC-MS/MS 测定条件

LC conditions	
LC	Waters Acquity UPLC H-Class Plus Binary
Column	Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 μm)
Column temperature	40 °C
Injection volume	2 μL
Mobile phase	A: Water B: Methanol A/B : 35/65 – 24 min – 0/100 (2 min) – 0.1 min – 35/65 (8.9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
MS condition	
MS	Waters Xevo TQ-XS
Ionization mode	ESI-Positive
Scan type	SRM
Desolvation temperature	400 °C
Capillary voltage	3.0 kV

表 3-2 MS/MS 条件 (LC-MS/MS)

Compound	Retention time (min)	Cone Voltage (V)	Transition <i>m/z</i>	Collision energy (eV)	Surrogate
TEP	1.7	16	[M+H] ⁺ 183.2>98.9, 183.2>155.0	12 16, 8	TEP-d ₁₅
TCEP	1.9	32	[M+H] ⁺ 285.0>98.9 285.0>160.8, 285.0>222.9	24 18, 14	TCEP-d ₁₂
TCPP	3.4	4	[M+H] ⁺ 327.0>98.9 327.0>174.9, 327.0>80.8	24 14, 58	TPrP-d ₂₁
TPrP	3.4	22	[M+H] ⁺ 225.3>140.9, 225.3>183.0	18 10, 8	TPrP-d ₂₁
TDCPP	5.7	40	[M+H] ⁺ 431.0>99.0 431.0>209.1, 431.0>321.1	26 14, 12	TDCPP-d ₁₅
TPhP	5.8	36	[M+H] ⁺ 327.0>152.0 327.0>251.0, 327.0>214.9	32 28, 26	TPhP- ¹³ C ₁₈
TDBPP	6.9	50	[M+H] ⁺ 698.5>99.0 698.5>299.0, 698.5>200.9	34 20, 38	TBP-d ₂₇
TBP	7.8	30	[M+H] ⁺ 267.1>98.8 267.1>154.9, 267.1>211.0	18 10, 8	TBP-d ₂₇
TBEP	8.9	34	[M+H] ⁺ 399.3>199.0 399.3>142.9, 399.3>82.9	16 18, 18	TBEP- ¹³ C ₆
ToTP	10.4	46	[M+H] ⁺ 369.2>165.0 369.2>90.9, 369.2>166.0	44 34, 44	TBEP- ¹³ C ₆
TmTP	10.9	24	[M+H] ⁺ 369.2>165.1 369.2>90.9, 369.2>243.0	42 34, 28	TBEP- ¹³ C ₆
TpTP	11.0	70	[M+H] ⁺ 369.2>165.0 369.2>90.9, 369.2>243.0	44 42, 28	TBEP- ¹³ C ₆
EHDPhP	12.5	22	[M+H] ⁺ 363.2>251.0 363.2>152.8, 363.2>214.9	14 32, 34	TBEP- ¹³ C ₆
T35DMPhP	15.8	76	[M+H] ⁺ 411.3>194.0 411.3>179.0, 411.3>105.0	28 40, 34	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈
T2iPPhP	16.5	54	[M+H] ⁺ 453.2>327.1 453.2>369.3, 453.2>411.3	28 20, 16	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈
T3iPPhP	17.7	70	[M+H] ⁺ 453.2>327.1 453.2>369.3, 453.2>411.3	34 26, 22	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈
T4iPPhP	18.1	76	[M+H] ⁺ 453.2>327.1 453.2>369.3, 453.2>411.3	32 26, 22	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈
TEHP	22.2	26	[M+H] ⁺ 435.4>98.8 435.4>71.0, 435.4>211.0	12 12, 8	T4iPPhP- ¹³ C ₁₈
TEP-d ₁₅	1.7	26	[M+H] ⁺ 198.2>102.0 198.2>134.1	16 12	
TCEP-d ₁₂	1.9	32	[M+H] ⁺ 297.1>102.0 297.1>130.1	30 14	
TPrP-d ₂₁	3.3	22	[M+H] ⁺ 246.3>102.0 246.3>150.1	18 12	
TDCPP-d ₁₅	5.6	40	[M+H] ⁺ 446.1>102.0 446.1>332.2	24 12	
TPhP- ¹³ C ₁₈	5.8	5	[M+H] ⁺ 345.2>164.2 345.2>227.2	44 26	
TBP-d ₂₇	7.5	26	[M+H] ⁺ 294.4>102.0 294.4>230.4	20 10	
TBEP- ¹³ C ₆	8.9	48	[M+H] ⁺ 405.4>303.3 405.4>201.1	12 16	
T4iPPhP- ¹³ C ₁₈	5.6	44	[M+H] ⁺ 342.2>81.9 342.2>175.9	40 38	
TPhP-d ₁₅	5.6	44	[M+H] ⁺ 342.2>81.9 342.2>175.9	40 38	

表 4 GPC 精製における OPFRs の画分ごとの回収率

Standard		(%)					
Compound	Fraction1	Fraction2	Fraction3	Fraction4	Fraction5	Fraction6	Total
TEP	0.3	0.3	0.4	65.9	23.9	0.5	91.3
TCEP	0.8	0.8	0.8	2.4	92.2	1.7	98.8
TPrP	0.0	0.0	102.3	11.1	0.0	0.0	113.5
TCPP	4.9	5.4	57.8	47.8	5.3	4.3	125.5
TDCPP	0.9	0.5	101.1	2.6	0.3	0.3	105.6
TPhP	0.4	0.4	0.4	2.7	94.4	1.8	100.2
TDBPP	0.0	0.0	0.3	87.5	9.9	0.0	97.7
TBP	0.8	18.3	84.8	0.6	0.8	0.7	105.9
TBEP	0.1	96.5	3.5	0.7	0.2	0.2	101.2
ToTP	0.0	0.0	1.3	97.0	2.4	0.0	100.6
TmTP	0.0	0.0	0.3	92.3	3.6	0.0	96.2
TpTP	0.0	0.0	2.6	88.8	1.7	0.0	93.1
EHDPhP	0.0	1.0	94.8	0.4	0.0	0.0	96.2
T35DMPhP	0.0	0.0	57.2	33.8	0.1	0.0	91.1
T2iPPhP	0.0	52.3	42.6	0.0	0.0	0.0	94.9
TEHP	47.7	51.6	0.1	0.0	0.1	0.1	99.6

Group 7		(%)					
Compound	Fraction1	Fraction2	Fraction3	Fraction4	Fraction5	Fraction6	Total
TEP	0.3	0.3	0.4	1.3	75.0	2.3	79.6
TCEP	0.9	0.8	1.0	0.8	24.9	71.6	100.1
TPrP	0.0	0.0	12.6	92.1	0.2	0.0	104.9
TCPP	3.3	4.2	5.3	93.5	4.8	4.3	115.4
TDCPP	0.5	0.5	49.2	40.6	0.6	0.6	92.0
TPhP	0.4	0.4	0.4	0.4	20.2	81.6	103.4
TDBPP	0.0	0.0	0.0	22.4	62.2	2.2	86.7
TBP	0.7	1.7	98.3	0.9	0.7	0.6	103.0
TBEP	0.3	57.6	41.7	0.3	0.6	0.4	100.9
ToTP	0.0	0.0	0.0	34.3	61.2	0.5	96.1
TmTP	0.0	0.0	0.0	16.6	75.7	1.4	93.6
TpTP	0.0	0.0	0.0	36.6	56.6	0.6	93.8
EHDPhP	0.0	0.0	44.1	18.6	0.0	0.0	62.6
T35DMPhP	0.0	0.0	3.4	77.5	12.5	0.1	93.5
T2iPPhP	0.0	17.3	68.9	1.9	0.0	0.0	88.2
TEHP	25.5	74.5	0.1	0.1	0.1	0.1	100.3

Group 10		(%)					
Compound	Fraction1	Fraction2	Fraction3	Fraction4	Fraction5	Fraction6	Total
TEP	0.9	0.6	0.6	1.5	96.0	1.9	101.6
TCEP	0.0	0.6	0.0	0.0	32.3	71.9	104.8
TPrP	0.0	0.0	11.6	98.7	0.2	0.0	110.5
TCPP	2.1	2.1	2.4	74.0	4.1	2.4	87.1
TDCPP	0.2	0.4	58.1	42.8	0.2	0.3	102.0
TPhP	0.3	0.2	0.2	0.3	21.6	75.7	98.3
TDBPP	0.0	0.0	0.0	16.4	57.4	2.0	75.8
TBP	0.9	3.9	106.8	1.1	0.5	0.4	113.6
TBEP	0.5	66.1	34.1	0.0	0.0	0.1	101.0
ToTP	0.0	0.0	0.0	33.1	62.6	0.6	96.4
TmTP	0.0	0.0	0.0	13.3	85.1	1.4	99.7
TpTP	0.0	0.0	0.0	35.6	56.2	0.7	92.6
EHDPhP	0.0	0.0	64.7	19.1	0.0	0.0	83.8
T35DMPhP	0.0	0.0	4.0	77.5	12.5	0.1	94.1
T2iPPhP	0.0	22.6	80.1	1.9	0.0	0.0	104.7
TEHP	10.1	66.3	0.3	0.1	0.1	0.1	76.9

Group 13		(%)					
Compound	Fraction1	Fraction2	Fraction3	Fraction4	Fraction5	Fraction6	Total
TEP	0.7	0.6	0.6	1.0	79.6	1.8	84.4
TCEP	0.5	0.9	0.3	1.3	36.6	94.4	134.1
TPrP	0.0	0.0	15.4	89.7	0.2	0.0	105.2
TCPP	7.4	9.9	5.8	97.1	8.0	5.2	133.4
TDCPP	0.4	0.6	59.5	42.7	0.9	0.8	104.9
TPhP	0.5	0.7	0.6	0.8	22.0	75.6	100.0
TDBPP	0.0	0.0	0.0	24.1	68.3	1.6	94.1
TBP	0.7	2.0	101.2	0.9	0.9	0.6	106.1
TBEP	0.2	63.1	36.8	0.8	0.3	0.3	101.6
ToTP	0.0	0.0	0.0	34.6	57.0	0.7	92.4
TmTP	0.0	0.0	0.0	14.3	74.6	1.8	90.8
TpTP	0.0	0.0	0.0	37.8	59.4	0.8	98.0
EHDPhP	0.0	0.0	55.2	18.6	0.0	0.0	73.8
T35DMPhP	0.0	0.0	4.9	71.4	10.1	0.1	86.4
T2iPPhP	0.0	15.7	79.7	1.6	0.0	0.0	97.0
TEHP	9.5	77.7	0.2	0.1	0.1	0.1	87.6

表 5 操作プランク試料および溶媒におけるピーク面積 (n=3)

Compound	BL1	BL2	BL3	MeOH1	MeOH2	MeOH3	Standard
TEP	6672	18561	14370	-	-	-	1183404
TCEP	13982	17724	9714	-	-	-	289408
TPrP	-	-	-	-	-	-	2179682
TCPP	333833	246978	260919	-	-	-	809510
TDCPP	-	-	-	-	-	-	301701
TPP	19302	22736	16035	-	-	-	441942
TDBPP	-	-	-	-	-	-	103767
TBP	87120	80840	52045	-	-	-	2206774
TBEP	22703	22439	10369	-	-	-	465002
TOTP	-	-	-	-	-	-	361034
TMTP	-	-	-	-	-	-	363402
TPTP	-	-	-	-	-	-	522601
EHDP	-	-	-	-	-	-	293552
T35DMPP	-	-	-	-	-	-	389212
T2iPPP	-	-	-	-	-	-	1120876
T3iPPP	-	-	-	-	-	-	854668
T4iPPP	-	-	-	-	-	-	849043
TEHP	116341	123332	123573	114177	113046	120279	933194

Standard: 1 ng/mL

表 6 添加回収試験結果及び試料マトリックスの測定値への影響

Compound	Group7			Group10			Group13	
	Recovery1	Recovery2	Matrix Effect	Recovery1	Recovery2	Matrix Effect	Recovery1	Matrix Effect
TEP	77.6	77.5	0.87	58.6	59.5	0.58	66.1	0.83
TCEP	88.8	84.8	0.84	40.7	40.4	0.36	51.6	0.58
TPrP	101.2	96.5	0.96	86.9	85.8	0.81	85.2	0.98
TCPP	107.2	103.8	1.00	79.9	79.3	0.74	90.0	1.06
TDCPP	96.8	89.4	0.87	46.3	45.4	0.41	79.3	0.87
TPhP	108.0	103.4	1.02	83.7	82.6	0.76	88.2	0.97
TDBPP	91.7	88.3	0.81	44.6	44.2	0.41	65.1	0.72
TBP	105.4	100.8	0.98	88.4	88.7	0.81	85.0	0.95
TBEP	110.9	105.0	0.98	94.4	90.9	0.87	88.2	1.00
ToTP	108.8	102.2	1.01	79.3	77.9	0.77	83.3	0.92
TmTP	110.0	96.8	1.07	78.4	79.5	0.81	90.3	0.95
TpTP	105.8	103.8	1.03	93.7	82.7	0.81	78.4	0.97
EHDPhP	100.0	96.3	0.95	75.7	73.7	0.72	78.8	0.92
T35DMPhP	107.4	103.1	0.99	72.3	70.2	0.71	83.7	0.96
T2iPPhP	102.5	96.2	0.93	64.2	63.0	0.62	76.1	0.89
T3iPPhP	108.6	101.5	0.98	66.9	65.6	0.65	83.0	0.95
T4iPPhP	107.4	99.9	1.01	54.8	53.9	0.54	79.7	0.93
TEHP	101.6	102.1	0.99	46.4	42.0	0.47	81.4	1.01

Recovery: (%)

Matrix effect: Matrix standard peak area/Standard peak area

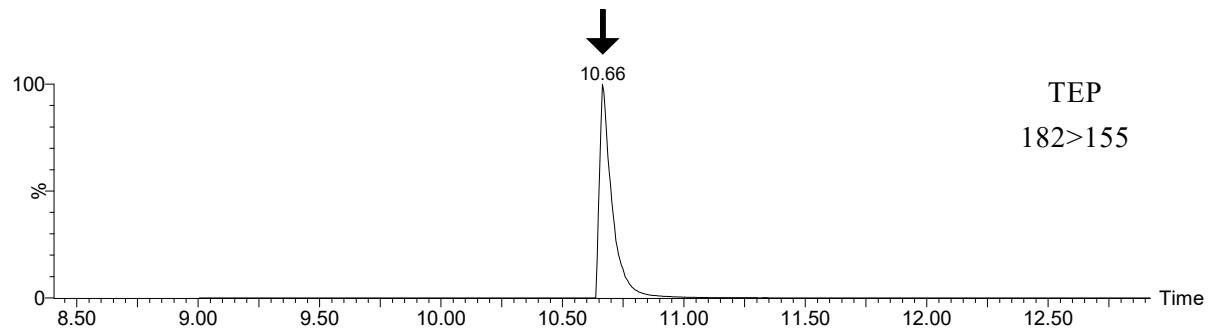


図 1-1 リン酸トリエチル(TEP)の SRM クロマトグラム(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

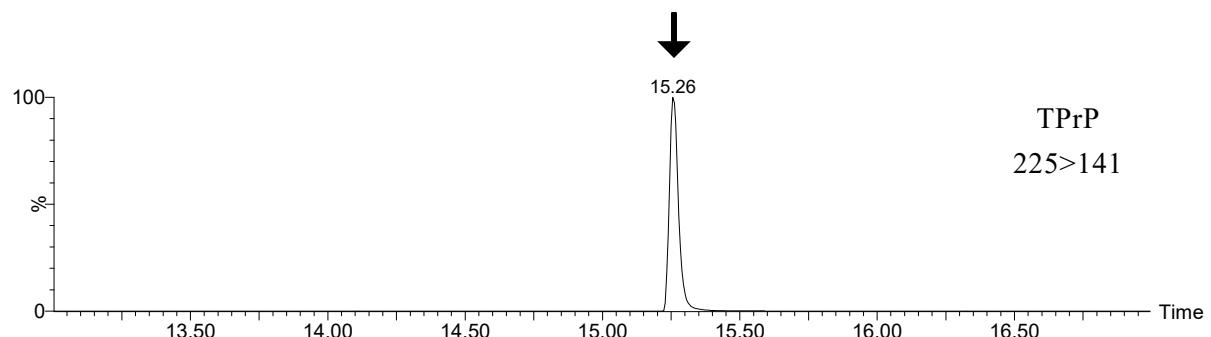


図 1-2 リン酸トリプロピル(TPrP)の SRM クロマトグラム(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

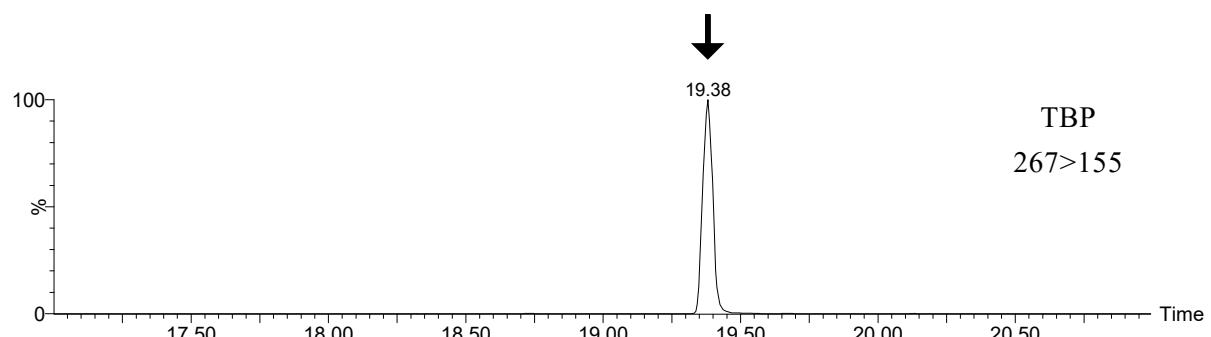


図 1-3 リン酸トリブチル(TBP)の SRM クロマトグラム(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

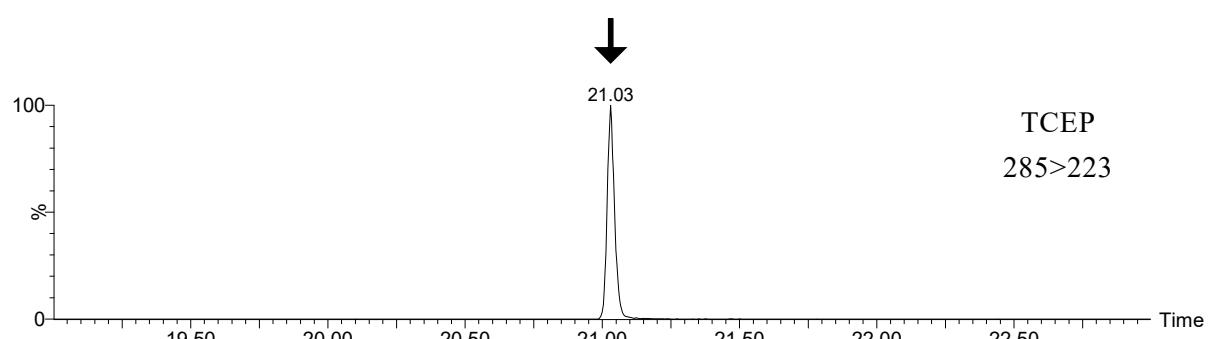


図 1-4 リン酸トリス(2-クロロエチル) (TCEP) の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

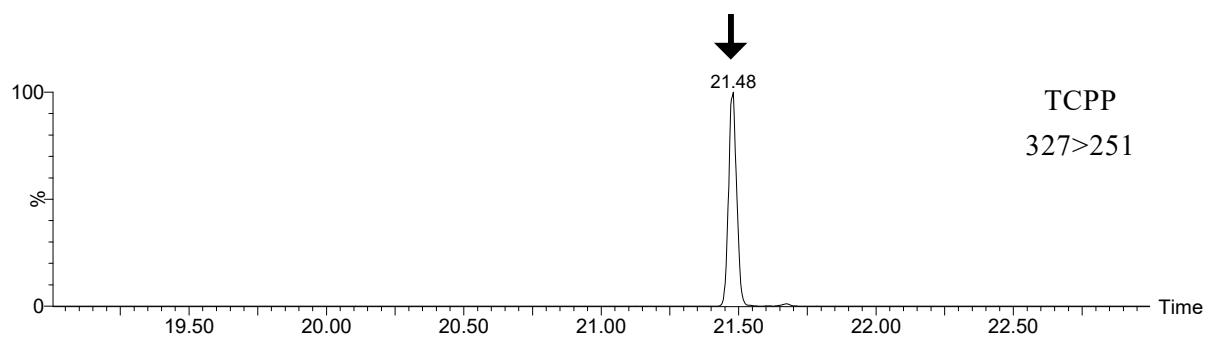


図 1-5 リン酸トリス(1-クロロ-2-プロパニル) (TCPP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

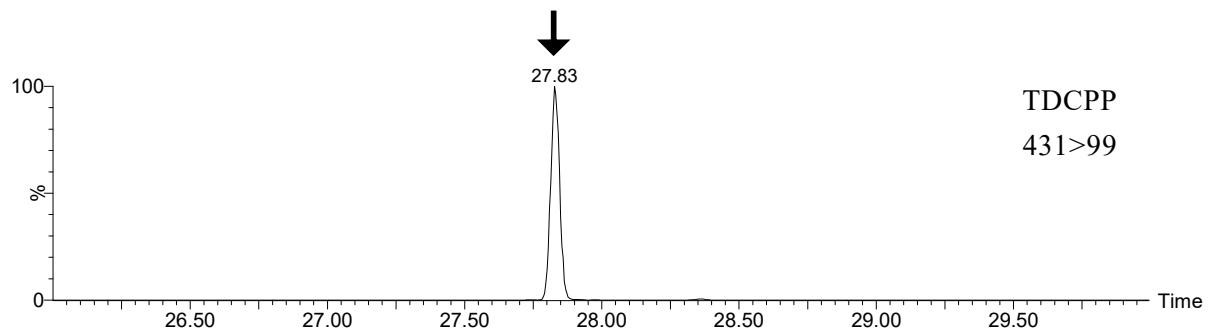


図 1-6 リン酸トリス(1,3-ジクロロ-2-プロピル) (TDCPP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

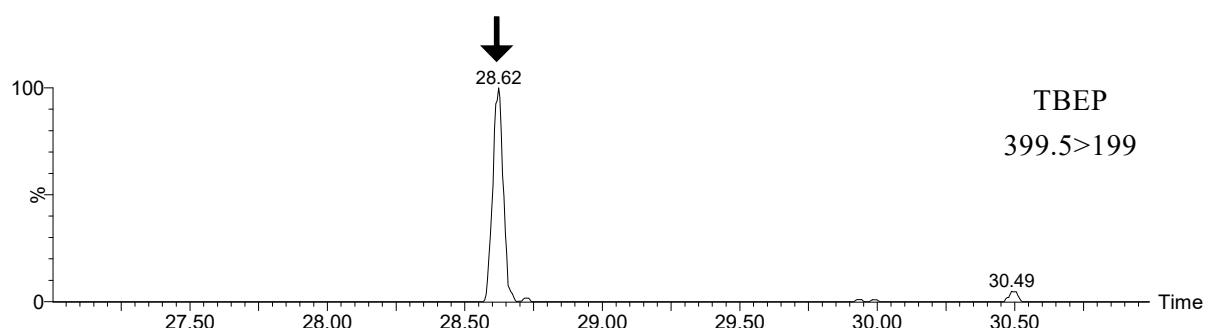


図 1-7 リン酸トリス(2-ブトキシエチル) (TBEP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

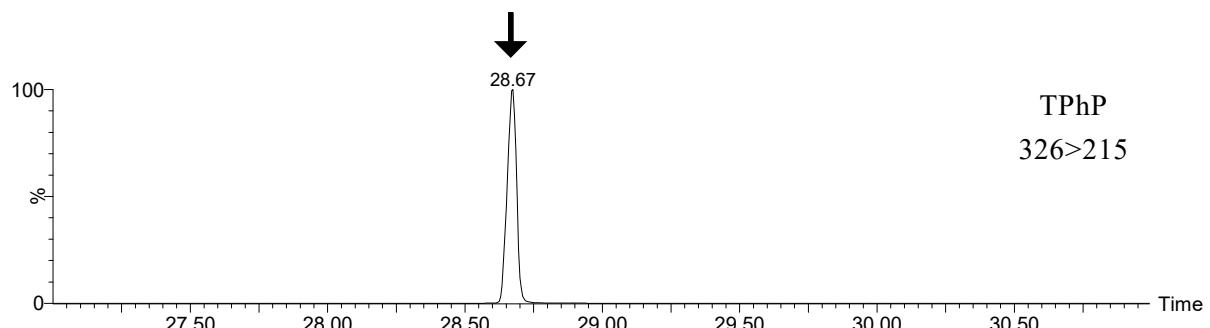
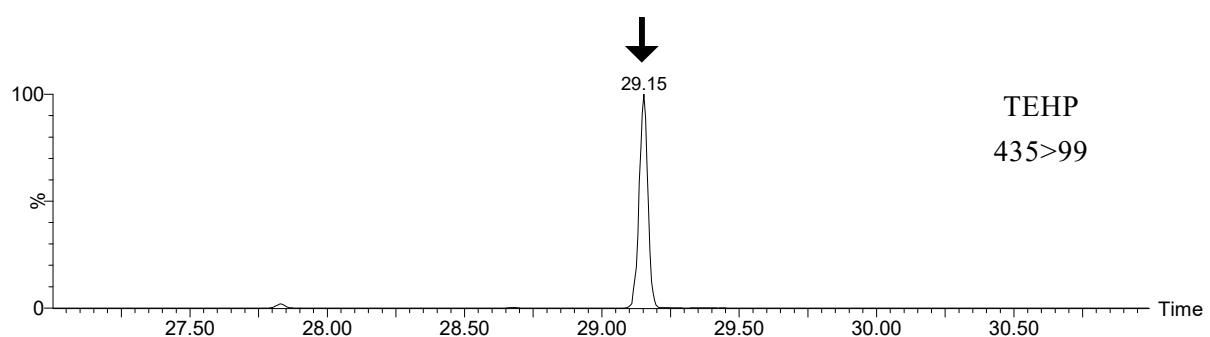
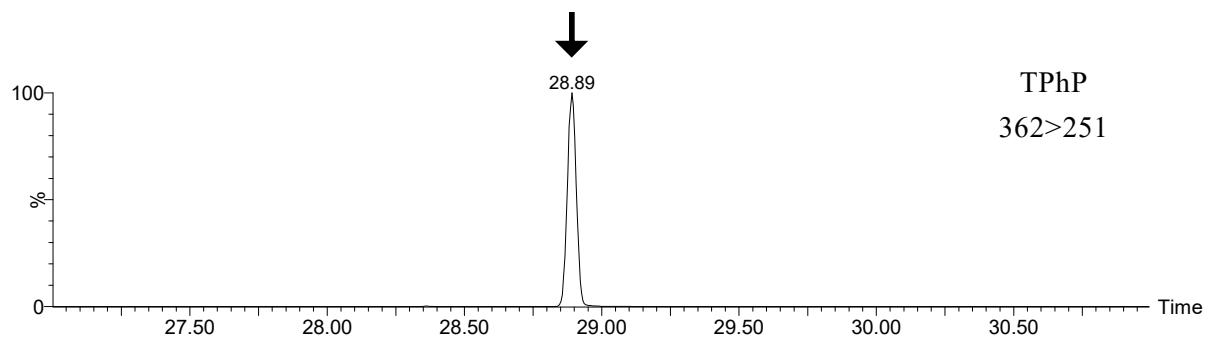


図 1-8 リン酸トリフェニル(TPhP)の SRM クロマトグラム (APGC-MS/MS、50 ng/mL)



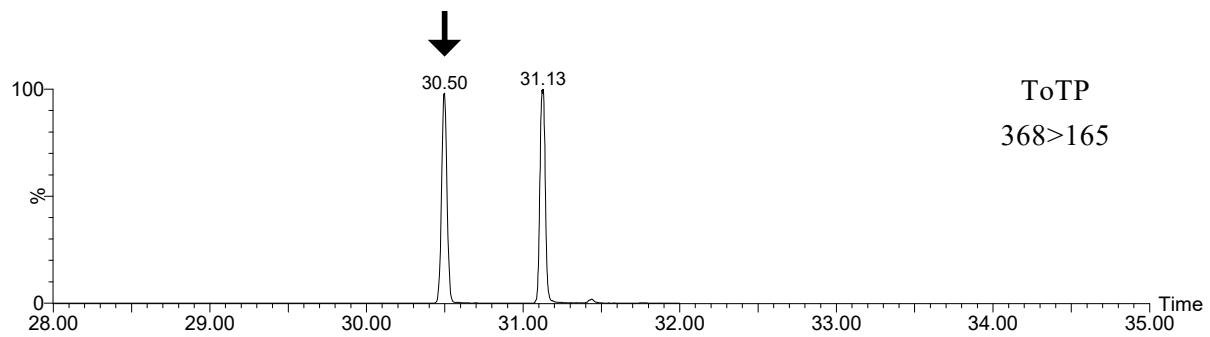


図 1-11 リン酸トリス(2-メチルフェニル) (ToTP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

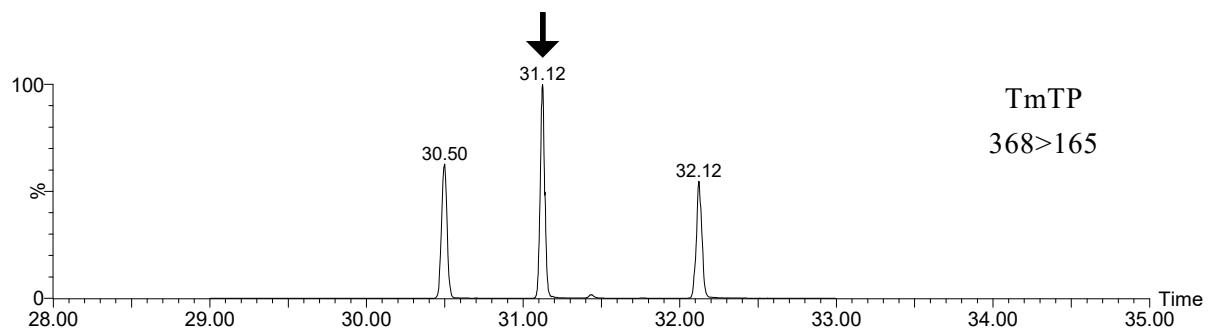


図 1-12 リン酸トリス(3-メチルフェニル) (TmTP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

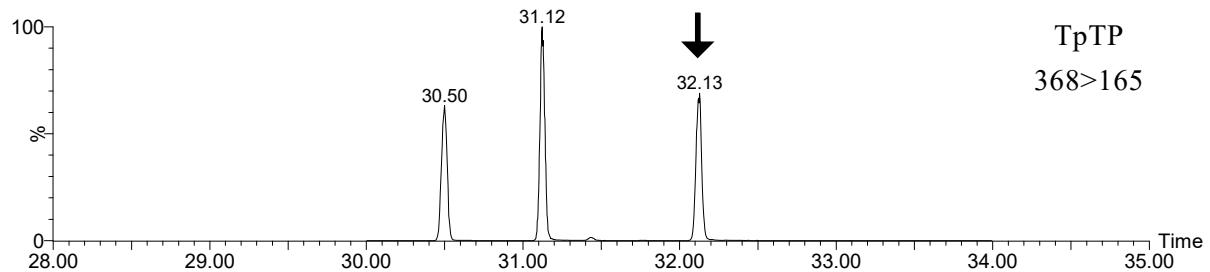


図 1-13 リン酸トリス(4-メチルフェニル) (TpTP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

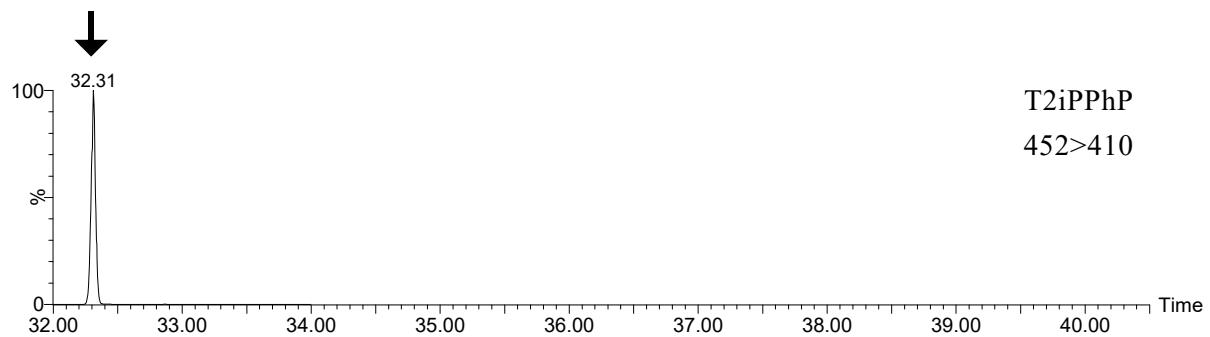


図 1-14 リン酸トリス(2-イソプロピルフェニル) (T2iPPhP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

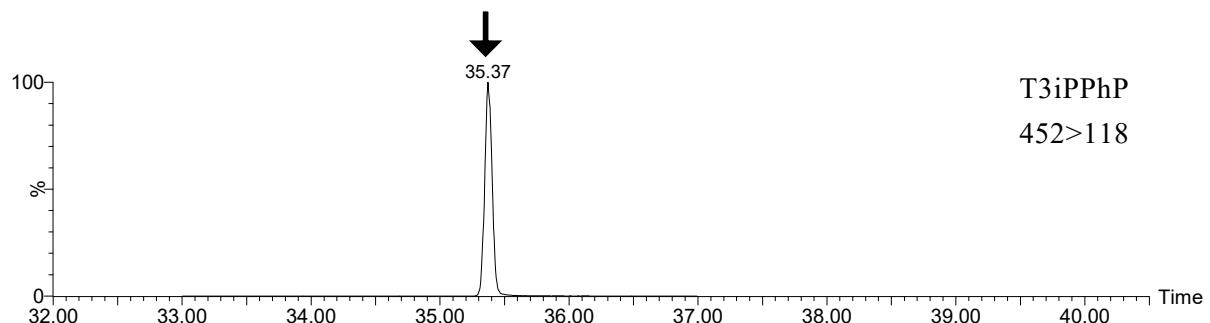


図 1-15 リン酸トリス(3-イソプロピルフェニル) (T3iPPhP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

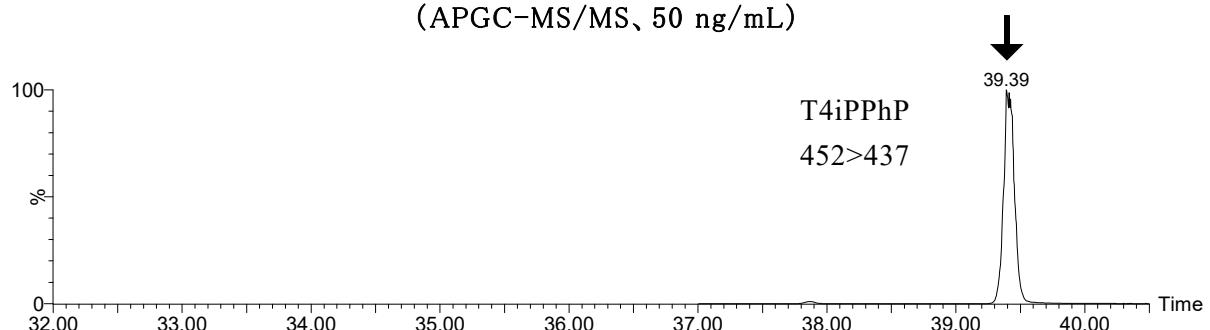


図 1-16 リン酸トリス(4-イソプロピルフェニル) (T4iPPhP)の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

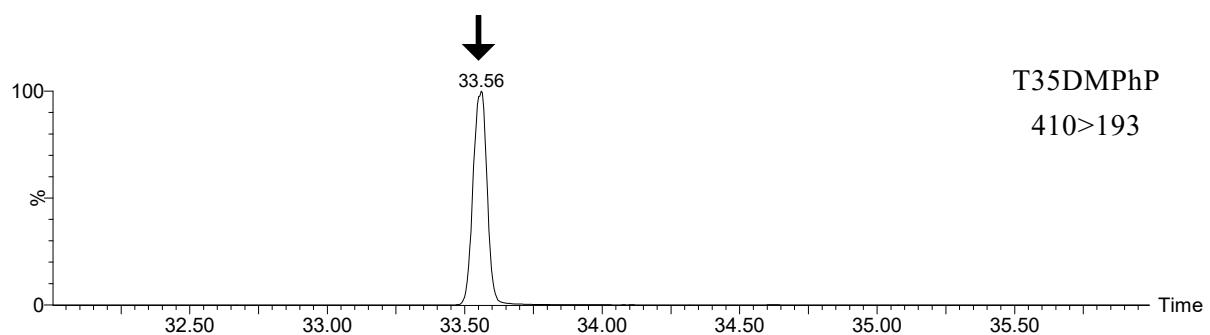


図 1-17 リン酸トリス(3,5-ジメチルフェニル) (T35DMPhP) の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)

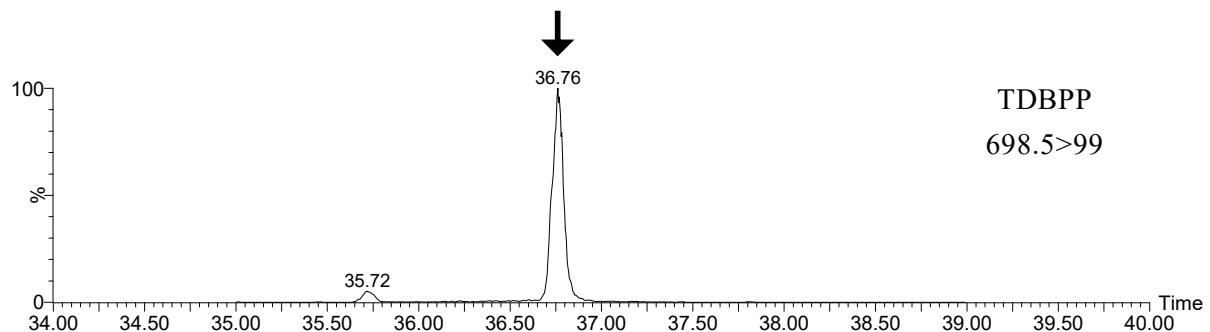


図 1-18 リン酸トリス(2,3-ジブロモプロピル) (TDBPP) の SRM クロマトグラム
(APGC-MS/MS、50 ng/mL)