

厚生労働科学研究補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)
分担研究報告書

(3) 食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究
(3-1) 高速流下加熱抽出装置による市販魚中ダイオキシン類の抽出法の検討

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

高速加熱流下抽出装置(ダイアインストルメンツ社製 SE-100 型)を用いた魚試料からのダイオキシン類の抽出法を検討した。抽出条件を検討した結果、溶媒にアセトン-ヘキサン(1:1)混液を使用し、温度 30℃、流速 6 ml/min の条件で 1 時間抽出を行えば、良好に魚試料からダイオキシン類を抽出できることが判明した。従来法であるアルカリ分解・溶媒抽出法と比較した結果、得られたダイオキシン類異性体の各定量値は従来法と良く一致した(±10%以内)。また、種々の魚試料($n = 12$)に適用し、従来法の毒性等量濃度と比較した結果、非常に高い相関($r = 0.99$)が認められた。本抽出法は短時間(約 1.5 時間)でダイオキシン類を抽出でき、さらに従来法のようにアルカリ溶液を使用しないためダイオキシン類の分解を懸念する必要がない。従って、本抽出法は魚試料中のダイオキシン類分析の迅速化・信頼性の向上に有効であると考えられる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所・食品部

天倉吉章、佐々木久美子

株式会社ダイアインストルメンツ

伊藤 日本男、栗原 浩

A. 研究目的

ダイオキシン類の摂取は、そのほとんどが食事経由であり、我が国では魚介類を介した摂取が多い¹⁾。特に鮮魚はダイオキシン類濃度が高いことから、汚染状況を迅速に把握することが、人の健康への影響を防ぐ上で重要な課題となっている。これら食品中のダイオキシン類分析では、試料由来の強力なマトリックスのため、アルカリ溶液によりマトリックスを分解後、溶媒抽出を行う方法が汎用されている。しかし、アルカリ分解中に一部のダイオキシン類の分解が指摘されており、アルカリ分解条件には注意を要する^{2,3)}。また、高濃度のアルカリ溶液を使用するため危険性が高いことや、アルカリ分解に長時間(長い場合で一晩)要する等の

問題点もある。そこで、これらの問題点を改善するため、アルカリ溶液を使用しない抽出法である高速加熱流下抽出装置(ダイアインストルメンツ社製SE-100 型)の市販魚試料に対する適用を検討した。

近年開発された高速加熱流下抽出装置は、加温した有機溶媒によりダイオキシン類を迅速に抽出する装置である。試料の抽出をほぼ常圧で行うため、安全性も高い。なお、装置の概要を図 1 に示した。本装置は土壌、飛灰などの環境試料で、ソックスレー抽出よりも迅速かつ効率よくダイオキシン類を抽出できることが明らかになっている⁴⁾。本研究では本装置を用いて、魚試料からのダイオキシン類の抽出条件の検討、及び従来法であるアルカリ分解・溶媒抽出法とのダイオキシン類定量値の比較を行った。

B. 研究方法

1. 試薬、試液及び器具

ジエチルエーテル及び無水硫酸ナトリウム

は残留農薬試験・PCB試験用(関東化学株)を使用した。その他の溶媒は、全てダイオキシン類分析用(関東化学株)を使用した。多層シリカゲルカラム(ガラス製4層)はジーエルサイエンス(株)を使用した。アルミナはダイオキシン分析用(ICN社)、活性炭は活性炭分散シリカゲル(関東化学株)を使用し、各カラムは食品のダイオキシン分析暫定ガイドライン⁵⁾に従い作製した。ダイオキシン類標準品はWellington社製を使用した。

2. 試料

魚試料は、東京都内のスーパーマーケットで購入した。魚試料は筋肉部を採取後、ホモジナイザーで均一化し使用した。

3. 装置

ホモジナイザーは(株)日本精機製作所製マルチブレンダーミルを用いた。また、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)は日本電子製(JMS-700)を使用した。

4. 高速加熱流下抽出

魚試料(20 g)をガラス乳鉢に秤とり、無水硫酸ナトリウム(80 g)と十分にすりつぶしながら混合した。これを予め無水硫酸ナトリウム(5 g)を詰めたSUS製抽出カラム(160 ml)に抽出溶媒を満たしながら充填した。さらに試料の上部に無水硫酸ナトリウム(5 g)を積層し、抽出管を溶媒で満たした後、抽出装置に装着した。抽出溶媒としてアセトノーヘキサン(1:1)混液を使用した場合、恒温槽を30°Cに昇温し(昇温後の静置時間15 min)、6 ml/minで通液し抽出液を得た。また、抽出溶媒としてトルエンを使用した場合は、恒温槽を80°Cに昇温し(昇温後の静置時間15 min)、6 ml/minで通液し抽出液を得た。なお、クリーンアップスパイクは抽出条件を検討する試験では抽出液に、従来法とダイオキシン類定量値の比較を行う

試験では抽出カラムに詰めた魚試料に添加した。図2には、本抽出法のフローチャートを示した。

5. アルカリ分解・溶媒抽出

平成13年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)分担研究報告書(1-2)(ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究)と同様に行った。概略を述べると、魚試料(20 g)にクリーンアップスパイクを添加した後、水酸化カリウム水溶液(2 mol/L)を加え室温で16時間放置し、アルカリ分解を行った。アルカリ分解後、メタノールを加え、ヘキサンで振とう抽出を行った。その後、抽出液は塩化ナトリウム水溶液により洗浄した。

6. クリーンアップ及びHRGC/HRMS分析

食品のダイオキシン分析暫定ガイドライン⁵⁾に従い分析した。

7. 脂肪含量の測定

魚試料(10 g)をガラス乳鉢に秤とり、無水硫酸ナトリウム(40 g)と十分にすりつぶしながら混合した。これを分液ロートに入れ、ジエチルエーテルーヘキサン(1:2)混液(150 ml)で3回、10分間振とう抽出した。抽出液はヘキサン洗浄水で2回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を留去し、デシケーター内で乾燥後、重量を測定した。

C. 研究結果及び考察

1. 高速加熱流下抽出装置における抽出条件の検討

本装置を用いたダイオキシン類の抽出条件を2種の魚試料を用いて検討した。魚試料の選択にあたっては、脂肪含量の多い試料としてブリ(脂肪含量21.8%)、脂肪含有量が少ない試料としてスズキ(脂肪含量0.8%)の2種の魚試料を選択した。図3には両試料を用いて、

アセトン-ヘキサン(1:1)混液による抽出液を1時間毎に4時間まで分画し、その後、トルエンによる抽出を行った場合のダイオキシン類累積濃度を示した。その結果、両試料ともアセトン-ヘキサン混液を1時間通液(6 ml/min、30°C)すれば、ほぼ完全に PCDD/Fs 及び Co-PCBs を抽出できることが判明した。また、本試験で使用した魚試料は比較的高濃度にダイオキシン類を含んでいる試料を選択した。魚試料は高濃度の Co-PCBs に汚染されている場合が多いが、本条件ではこのような試料においても短時間で十分な抽出効率が得られるものと考えられる。

2. 本抽出法とアルカリ分解・溶媒抽出法との比較

本抽出法で得られたダイオキシン類異性体の定量値を従来法と比較するため、2種の魚試料を用いて比較試験を行った(表1)。同一の魚試料を3回、本抽出法と従来法で測定した結果、本抽出法で得られたダイオキシン類異性体の平均定量値は従来法と比較して大きな差は認められず(±10%以内)、ダイオキシン類異性体の魚試料からの抽出効率は従来法と同等であることが示唆された。また、本抽出法で得られた定量値の相対標準偏差(RSD)はブリで17.4%以下、スズキで17.6%以下であり、従来法のRSD(ブリで24.2%以下、スズキで26.2%以下)と同等以上であり、良好な分析精度であった。両抽出法により得られたブリのSIMクロマトグラムを図4に示した。このように、本法により得られたクロマトグラムのパターンは従来法とほぼ同一であり、定量ピークに対する夾雑物の妨害ピークは認められなかった。なお、ロックマスの変動は両抽出法のクロマトグラムにおいて認められなかった(データ未掲載)。

さらに種々の魚試料($n=12$)に適用し、従来法の毒性等量濃度と比較を行った(図5)。その結果、本法と従来法で得られたPCDD/Fs及

びCo-PCBsのTEQ濃度の間には、非常に高い相関($r=0.99$)が認められた。また、いずれの場合も回帰直線の傾きは1に近く、切片は0に近い値を示すことから、本抽出法により得られたTEQ濃度は従来法と同等であると示唆された。図6には、比較試験(図5)で得られた本法と従来法のクリーンアップスパイクの回収率の比較を示した。本法の回収率は従来法と比較して同程度であり、全ての異性体についてガイドライン⁵⁾で定められている範囲内(40~120%)であった。

本抽出法は短時間(約1.5時間)でダイオキシン類を抽出でき、従来法の所要時間(長い場合で20時間程度)と比較すると大幅に抽出時間が短縮できた。さらに、アルカリ溶液を使用しないためダイオキシン類の分解を懸念する必要が無く、信頼性・安全性の向上に有効であると考えられる。しかし、従来法と比較すると前処理過程における硫酸処理に若干、時間を要する問題点があった。従来法ではアルカリ分解中に脂質・タンパク質等のマトリックスの分解がある程度行われるため、多少の精製効果が得られる。一方、本法は抽出時にこのような精製効果は期待できないため、前処理過程が若干、煩雑になったと考えられる。本法において、抽出と同時に何らかの精製効果が得られるような工夫が将来必要になると考えられる。

D. 結論

- 1) 高速加熱流下抽出装置は、市販魚中のダイオキシン類を短時間で抽出することが可能であった。
- 2) 比較試験を行った結果、魚試料からのダイオキシン類の抽出効率は従来法と同等であると考えられた。
- 3) 本抽出法はアルカリ溶液を使用しないためダイオキシン類の分解を懸念する必要が無く、ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性の向上に有効であると考えられる。

E.参考文献

- 1) Tsutsumi, T., Iida, T., Hori, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Yanagi, T., Kono, Y., Uchibe, H., Matsuda, R., Sasaki, K., Toyoda, M., Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere*, **45** (2001) 1129-1137.
- 2) 高菅卓三、青野さや香、秋月哲也、中川貴之、渡邊清彦、井上毅:アルカリ分解法を用いたPCB、ダイオキシン分析の課題. 第10回環境化学討論会講演要旨集(2001) 28-29.
- 3) Tsutsumi, T., Amakura, Y., Sasaki, K., Toyoda, M., Maitani, T., Evaluation of an aqueous KOH digestion followed by hexane extraction for analysis of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retailed fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **375** (2003) 792-798.
- 4) 加藤みか、浦野紘平、清水優子、小口正弘、伊藤日本男、栗原浩:固体試料からのダイオキシン類等高沸点有機物の「高速流下抽出装置」.第12回環境化学討論会講演要旨集(2003) 616-617.
- 5) 厚生省生活衛生局“食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法暫定ガイドライン”平成11年10月

F.研究業績

1.論文発表

なし

2.学会発表

- 1) 堤 智昭^{*1}、天倉吉章^{*1}、松本輝樹^{*1}、伊藤日本男^{*2}、栗原 浩^{*2}、佐々木久美子^{*1}、米谷民雄^{*1}:高速加熱流下抽出装置による市販魚中ダイオキシン類の抽出法の検討. 第14回環境化学討論会(2005.6)

*1 国立医薬品食品衛生研究所

*2 株式会社ダイアインストルメンツ

表1 本抽出法と従来法のダイオキシン類異性体定量値の比較

Dioxins	高速度加熱流下抽出 (A)				アルカリ分解・溶媒抽出 (B)				高速加熱流下抽出 (A)				アルカリ分解・溶媒抽出 (B)			
	定量下限値 pg/g	Mean ± SD	RSD, %	比率 (A/B)	Mean ± SD	RSD, %	比率 (A/B)	Mean ± SD	RSD, %	Mean ± SD	RSD, %	比率 (A/B)	Mean ± SD	RSD, %	比率 (A/B)	
PCDDs	2378-TCDD	0.014	0.13 ± 0.010	7.7	0.13 ± 0.010	7.7	1.0	0.11 ± 0.012	10.5	0.12 ± 0.020	16.7	0.9				
	12378-PeCDD	0.022	0.27 ± 0.010	3.7	0.27 ± 0.020	7.4	1.0	0.19 ± 0.021	11.0	0.19 ± 0.025	13.2	1.0				
	123478-HxCDD	0.038	tr ¹⁾	-	tr	-	-	nd	-	nd	-	-				
	123678-HxCDD	0.035	0.11 ± 0.0058	5.2	0.12 ± 0.010	8.3	0.9	0.14 ± 0.021	14.9	0.13 ± 0.015	11.8	1.1				
	123789-HxCDD	0.034	tr	-	tr	-	-	nd	-	nd	-	-				
	1234678-HpCDD	0.030	0.079 ± 0.0031	3.9	0.077 ± 0.0066	8.5	1.0	0.046 ± 0.0081	17.6	0.049 ± 0.013	26.2	0.9				
	OCDD	0.11	0.15 ± 0.023	15.4	0.14 ± 0	0.0	1.1	tr	-	tr	-	-				
	2378-TCDF	0.0059	2.1 ± 0.12	5.5	1.9 ± 0	0.0	1.1	0.6 ± 0.057	10.2	0.6 ± 0.030	5.2	1.0				
	12378-PeCDF	0.010	0.28 ± 0.010	3.6	0.27 ± 0.012	4.3	1.0	0.11 ± 0.017	15.7	0.11 ± 0	0.0	1.0				
	23478-PeCDF	0.0069	0.91 ± 0.035	3.9	0.96 ± 0.010	1.0	0.9	0.48 ± 0.035	7.3	0.49 ± 0.020	4.1	1.0				
123478-HxCDF	0.014	0.052 ± 0.0091	17.4	0.050 ± 0.012	24.2	1.0	0.034 ± 0.0055	16.2	0.032 ± 0.0021	6.5	1.1					
123678-HxCDF	0.017	0.058 ± 0.0035	6.0	0.057 ± 0.0081	14.2	1.0	0.034 ± 0.0058	17.0	0.034 ± 0.0030	8.8	1.0					
123789-HxCDF	0.025	nd ²⁾	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	-					
234678-HxCDF	0.019	0.060 ± 0.0012	1.9	0.055 ± 0.0070	12.7	1.1	0.044 ± 0.0060	13.6	0.044 ± 0.0070	15.9	1.0					
1234678-HpCDF	0.040	tr	-	tr	-	-	tr	-	tr	-	-					
1234789-HpCDF	0.031	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	-					
OCDF	0.044	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	-					
PCDFs	3344'-TCB (#77)	0.18	84 ± 2.1	2.5	83 ± 2.1	2.5	1.0	120 ± 10	8.3	130 ± 5.8	4.4	0.9				
	344'5'-TCB (#81)	0.045	4.5 ± 0.058	1.3	4.4 ± 0.20	4.5	1.0	4.8 ± 0.46	9.5	4.8 ± 0.40	8.4	1.0				
	3344'5'-PeCB (#126)	0.018	22 ± 0.58	2.6	21 ± 0.58	2.7	1.0	19 ± 1.2	6.0	21 ± 1.5	7.3	0.9				
	3344'55'-HxCB (#169)	0.033	3.0 ± 0.058	1.9	3.0 ± 0.058	1.9	1.0	1.9 ± 0.15	8.2	1.9 ± 0.20	10.5	1.0				
	23344'-PeCB (#105)	1.4	910 ± 25	2.8	920 ± 12	1.3	1.0	3200 ± 210	6.5	3000 ± 170	5.8	1.1				
HxCDFs	2344'5'-PeCB (#114)	0.51	62 ± 4.7	7.6	61 ± 2.6	4.3	1.0	230 ± 21	9.1	230 ± 10	4.3	1.0				
	2344'5'-PeCB (#118)	2.9	2800 ± 0	0.0	2800 ± 58	2.1	1.0	11000 ± 580	5.2	11000 ± 580	5.2	1.0				
	2'344'5'-PeCB (#123)	0.52	45 ± 0.58	1.3	44 ± 2.1	4.7	1.0	190 ± 12	6.1	180 ± 25	14.0	1.1				
	23344'5'-HxCB (#156)	0.85	290 ± 5.8	2.0	290 ± 5.8	2.0	1.0	820 ± 64	7.8	810 ± 64	7.8	1.0				
	23344'5'-HxCB (#157)	0.76	84 ± 1.7	2.1	84 ± 2.0	2.4	1.0	200 ± 15	7.6	190 ± 15	8.0	1.1				
	23344'55'-HxCB (#167)	0.70	190 ± 0	0.0	180 ± 5.8	3.2	1.1	410 ± 50	12.2	400 ± 25	6.3	1.0				
	23344'55'-HpCB (#189)	2.2	31 ± 1.2	3.7	29 ± 1.5	5.3	1.1	45 ± 5.6	12.4	47 ± 4.0	8.6	1.0				
	OCDF	0.044	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	-				

1) tr: trace (検出下限 tr < 定量下限)

2) nd: not detected

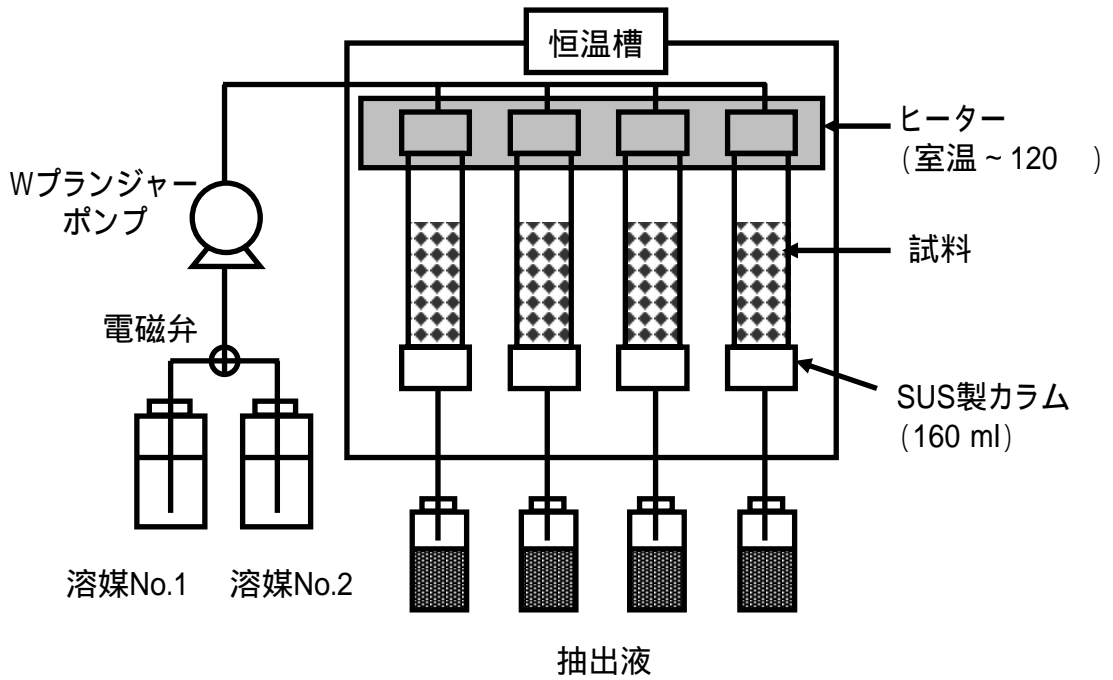


図1 高速加熱流下抽出装置(SE-100型)の概要



魚試料
(湿重量で20 g)



無水硫酸ナトリウム
(80 g)とよく混合する。



抽出管(160 ml)につめ、
クリーンアップスパイクを添加する。



高速加熱流下抽出装置による抽出

抽出条件(最終条件)

溶媒; アセトン - ヘキサン(1:1)混液

カラムオープン; 30

昇温後の静置時間; 15 min

流量; 6 ml/min

抽出時間; 60 min



定法により精製(硫酸処理、多層シリカゲルカラム、アルミナカラム及び活性炭カラム)を行う。

図2 高速加熱流下抽出装置による魚試料からのダイオキシン類抽出フロー

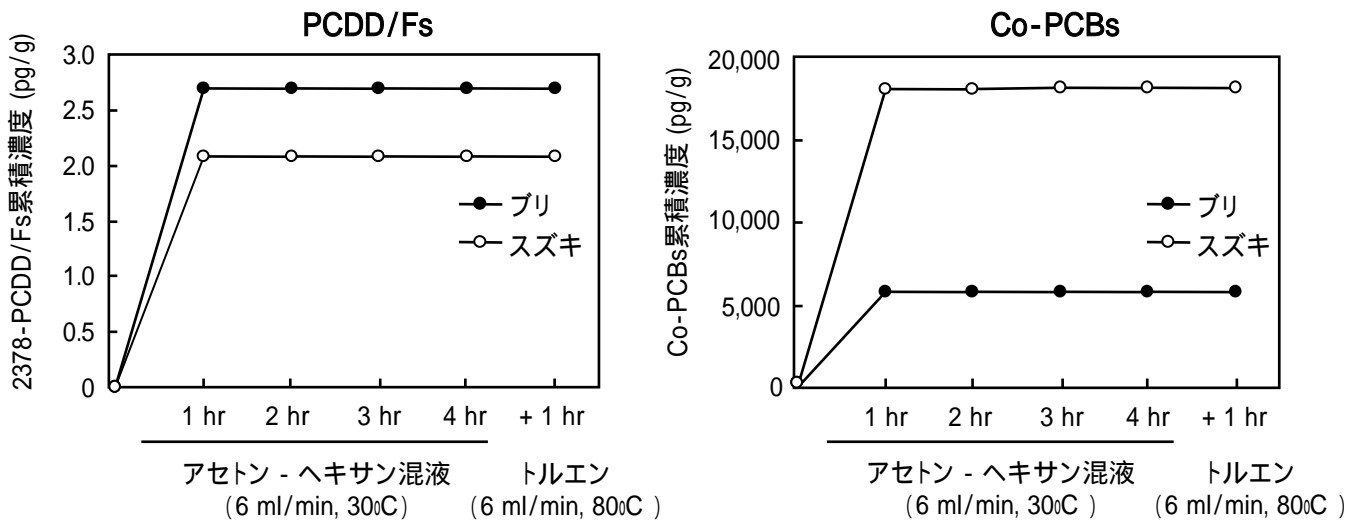


図3 種々の抽出条件におけるダイオキシン類濃度

高速加熱流下抽出

アルカリ分解・溶媒抽出

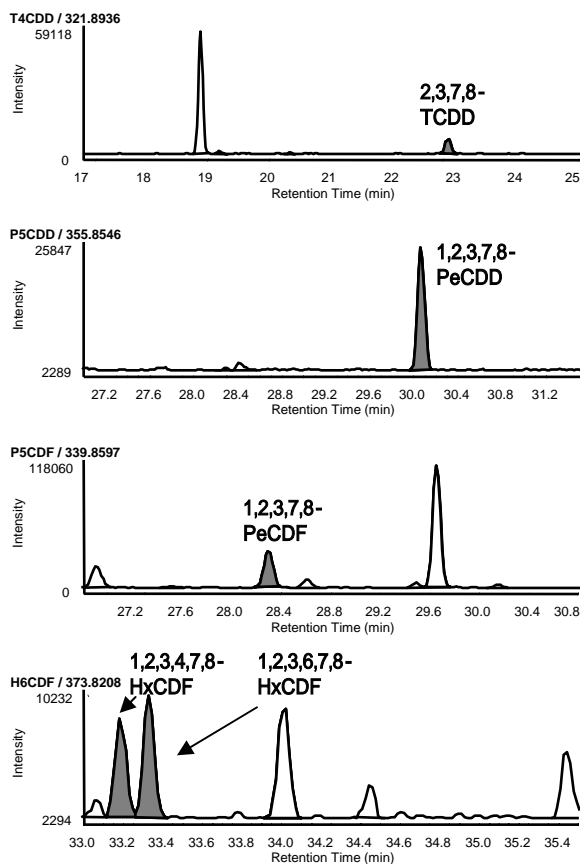
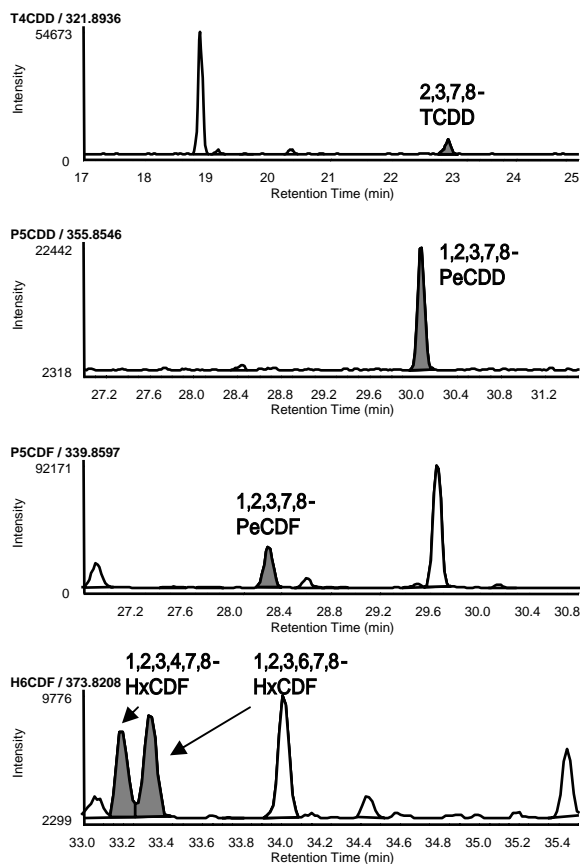


図4-1 プリ試料における本抽出法と従来法のSIMクロマトグラム(DB-5MSカラム対象異性体)

高速加熱流下抽出

アルカリ分解・溶媒抽出

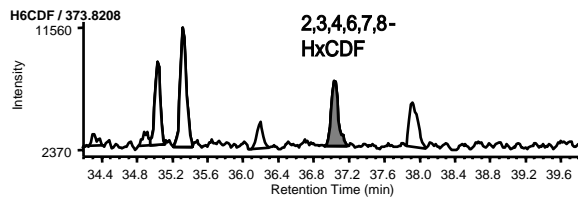
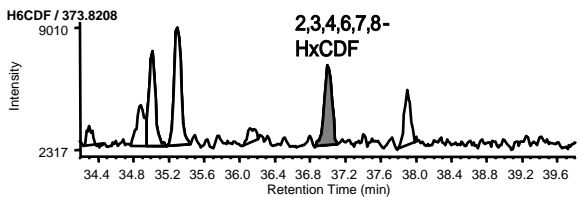
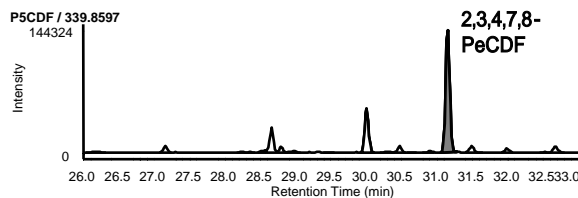
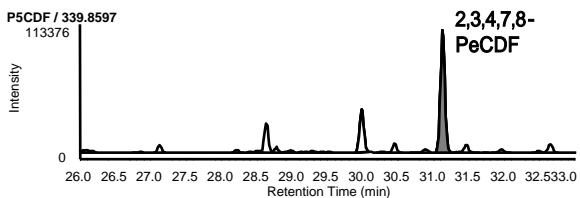
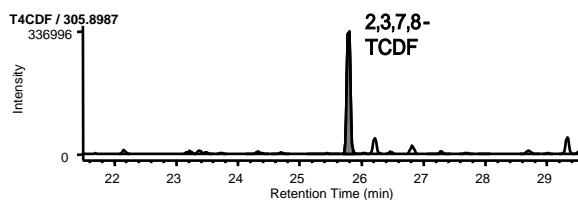
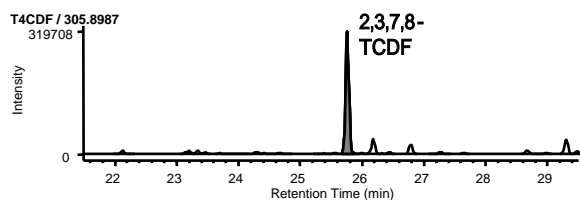
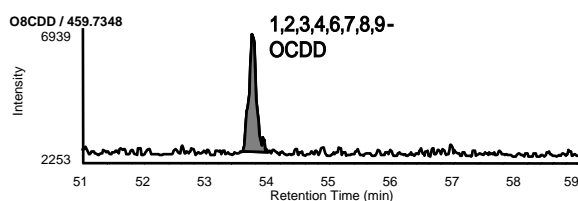
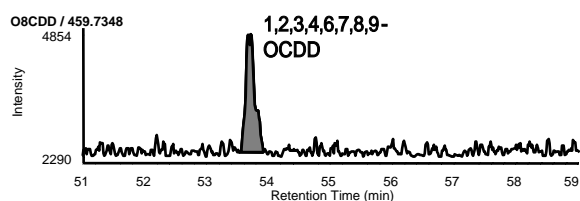
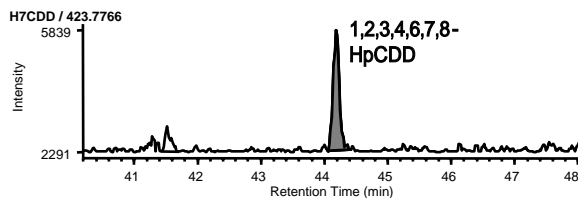
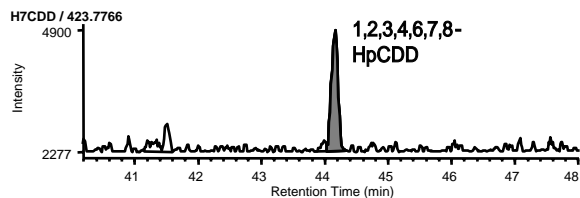
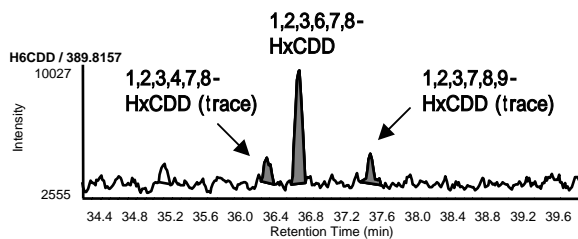
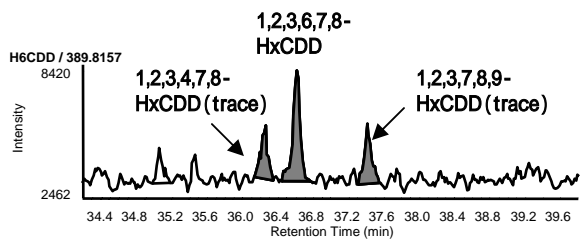


図4-2 プリ試料における本抽出法と従来法のSIMクロマトグラム(DB-17カラム対象異性体)

高速加熱流下抽出

アルカリ分解・溶媒抽出

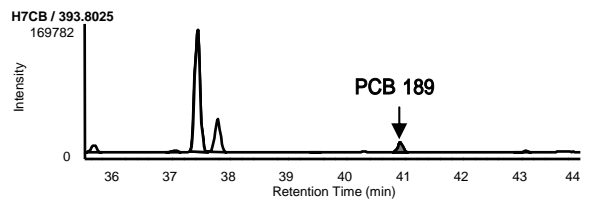
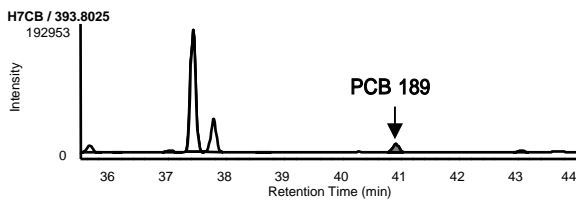
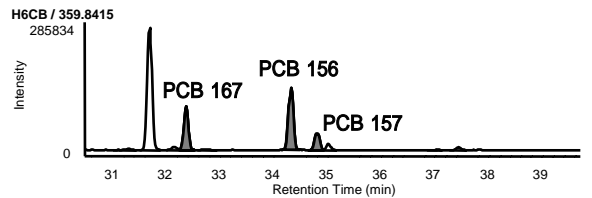
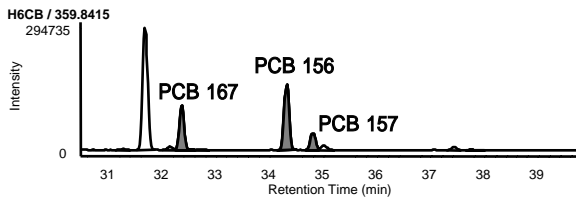
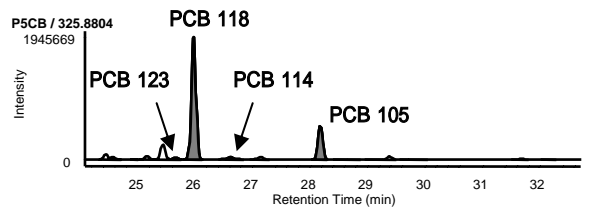
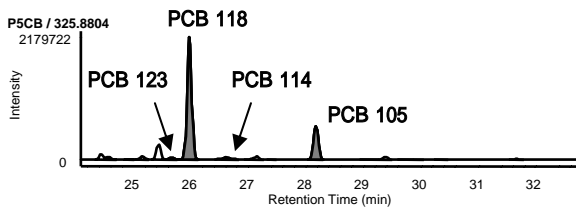
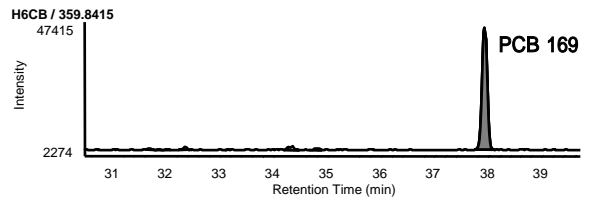
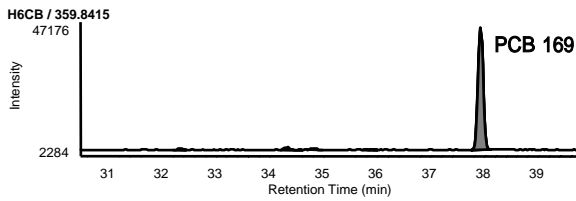
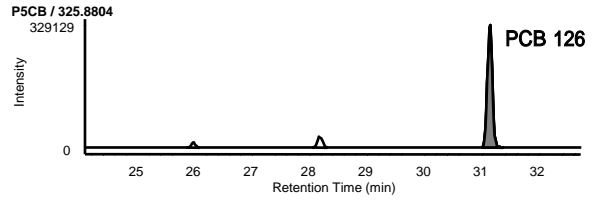
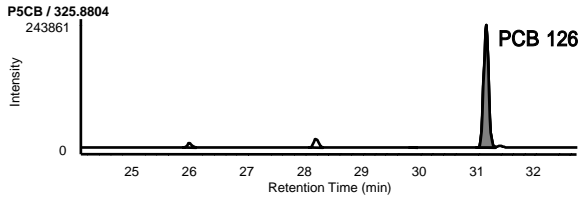
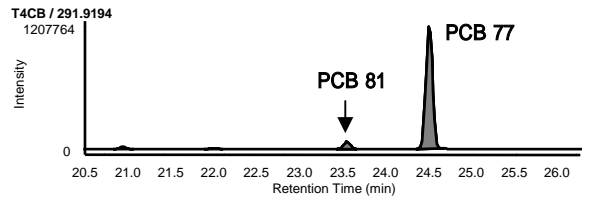
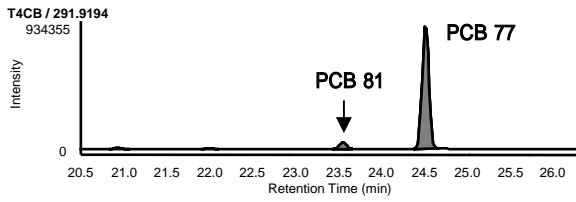


図4-3 プリ試料における本抽出法と従来法のSIMクロマトグラム(HT-8カラム対象異性体)

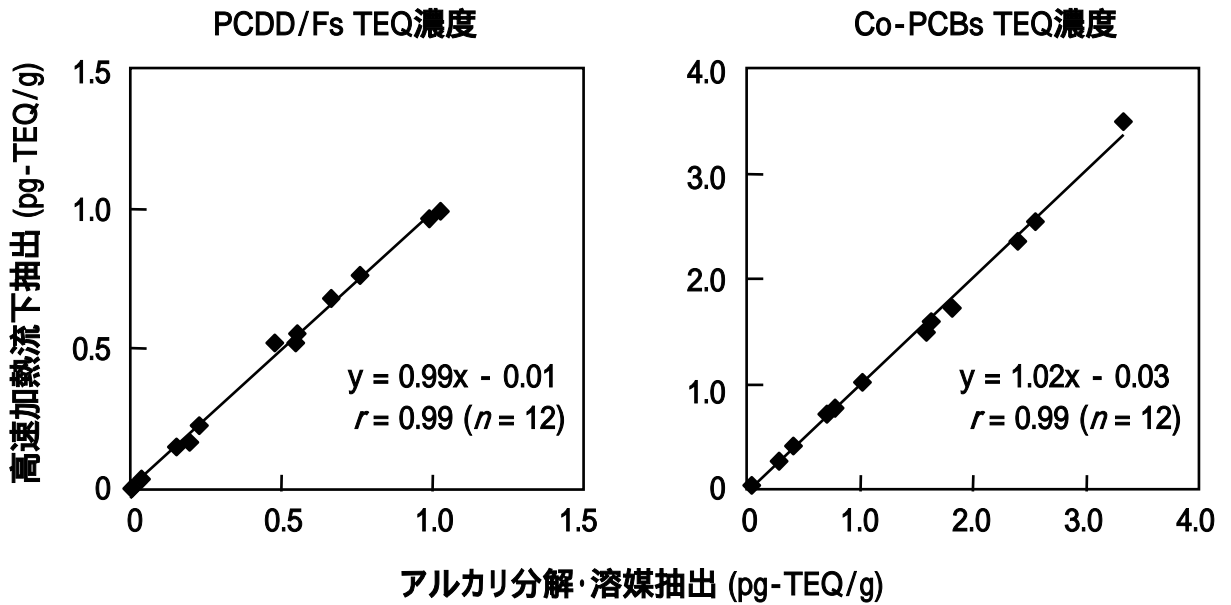


図5 種々の魚試料における毒性等量濃度の比較

12試料(アジ1試料、アナゴ1試料、イワシ1試料、カジキ1試料、カツオ1試料、サケ2試料、ブリ4試料、マグロ1試料)に両抽出法を適用した。

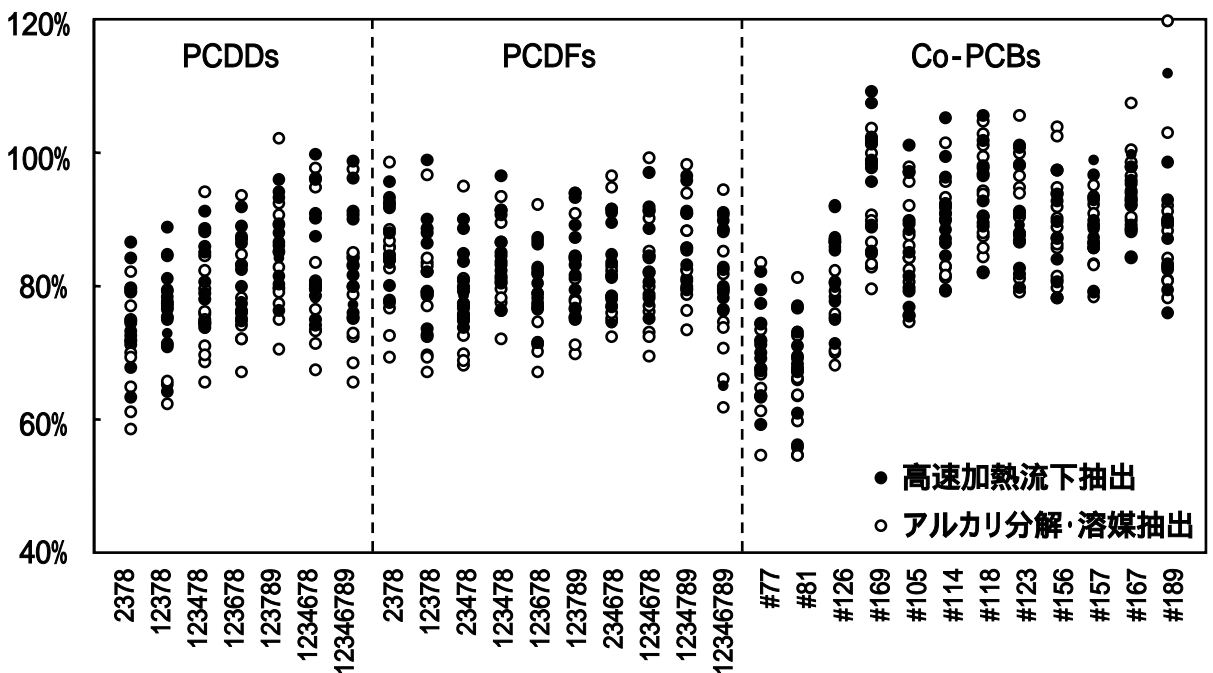


図6 クリーンアップスパイク回収率の比較

図5で分析した12試料のクリーンアップスパイク回収率を示す。