

1.2 試薬

ベンゾトリアゾール類の試薬は、(DBHP)BT、(DAHP)BT、(OHP)BTは東京化成社製、(DBHP)CBT、(BMHP)CBT、(MHP)BT は和光純薬社製を用いた。また、メタノールはLC/MS用、アセトニトリルはHPLC用、エタノールは特級発酵エタノール、ヘキサンは残留農薬試験用、水酸化カリウム(KOH)は特級の和光純薬製試薬を用いた。

1.3 魚試料

魚試料は、神奈川県内で購入したマサバ 1種類 B(脂肪含有率 5%)、とマダイ 1種類 A(11%)、サケ 1種類 A(18%)、ブリ 1種類 A(21%)と脂肪分がとくに多いクロマグロの大トロ部分 1種類 A(33%)、の 5種類をフードプロセッサーで細かく砕いて均一化して使用した。

2. 装置と方法

2.1 抽出装置と分析機器

抽出装置は4試料が同時に抽出できる加熱流下式高速抽出装置 SE-100 型(三菱化学アナリティック社製)を用いた。

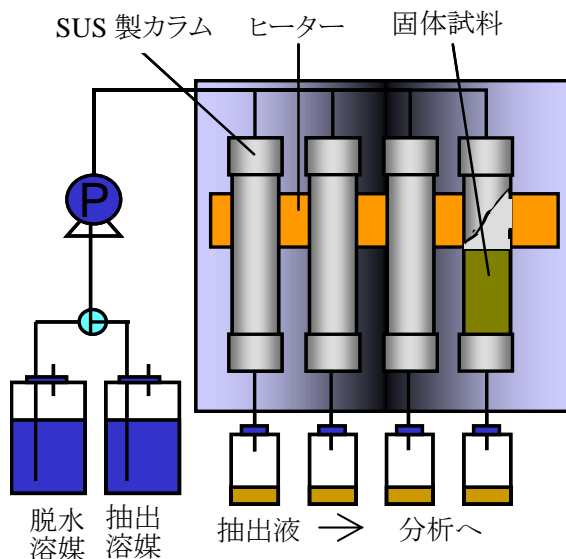


図1 加熱流下式高速抽出装置 フロー図

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

表2 LC/MS/MSの分析条件

カラム	3.5 μ m の SunFireC18 (2.1 \times 150mm)
温度	40 $^{\circ}$ C
移動相組成	メタノール/水=99/1
移動相流量	0.3mL/min
試料注入量	50 μ L
ネブライザーガス	N ₂
コリジョンガス	Ar
イオン化法	APCI ポジティブ法
イオン源温度	120 $^{\circ}$ C
プローブ温度	450 $^{\circ}$ C
デゾルベーションガス流量	200L/hr
コーンガス流量	50L/hr
コロナ電流	3 μ A
モニタリング方法	MRM

表3 モニターイオン

化合物	Parentイオン	Daughterイオン
(DBHP)BT	324.2	268.3 と 212.2
(DAHP)BT	352.2	282.3 と 212.2
(OHP)BT	324.2	212.2
(MHP)BT	226.1	119.8 と 106.8
(DBHP)CBT	358.2	302.2 と 246.2
(BMHP)CBT	316.1	260.3 と 106.9

2.2 標準液による KOH 処理とヘキサン抽出での回収率の検討

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

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

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

2.3 カートリッジ精製方法の再検討

2.3.1 NH₂ カートリッジの劣化影響の検討

マダイ A について標準添加回収試験を 6 回繰り返し行った結果、回収率が 61~87% の間で変動し、再現性が低かった。原因を明らかにするため、NH₂ カートリッジ処理後の標準添加回収試験、また、購入後約 1 年半経過した NH₂ カートリッジおよび購入後約 3 か月の NH₂ カートリッジを用いた NH₂ カートリッジ処理前標準添加回収試験を行った。

フードプロセッサーで細かくしたマダイ A 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 30g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノール約 20mL と混合した後、中カラム(ϕ 25mm)に詰め、高速抽出装置で 30 $^{\circ}$ C、ヘキサン・エタノール(1:1) 4mL/min で抽出した。抽出液をエバポレーターで 25mL(エタノール)まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40 $^{\circ}$ C で 60min 振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらに 2 回ヘキサン 10mL を水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 30mL で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パージで約 1mL に濃縮し、あらかじめヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH₂ Jr.カートリッジに添加した後、

ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。この NH₂ カートリッジ処理後の液にベンゾトリアゾール混合標準液(0.2 μ g/mL-メタノール) 500 μ L を添加し、窒素パージでヘキサンを蒸発させた。メタノール 500 μ L に転溶した後、超音波をかけて溶解したものと、超音波をかけないものとを LC/MS/MS で分離・定量を行い、NH₂ カートリッジ処理後の回収率を算出した。

また、同様に魚からの高速抽出、濃縮、KOH 処理、ヘキサン抽出、脱水を行った試験液をエバポレーターで数 mL まで濃縮した。この液にベンゾトリアゾール混合標準液(0.2 μ g/mL-ヘキサン) 500 μ L を添加し、窒素パージで約 1mL に濃縮したものを、あらかじめヘキサン 10mL を通液した購入後約 1 年半と約 3 か月の Bond Elut NH₂ Jr.カートリッジに添加し、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。また、購入後約 1 年半後の NH₂ カートリッジ処理については、Fr.2 として、さらにヘキサン 1mL で溶出させた。各フラクションを窒素パージでヘキサンを蒸発させ、メタノール 500 μ L に転溶した後、LC/MS/MS で分離・定量を行い、NH₂ カートリッジ処理の回収率を算出した。

2.3.2 フロリジル、シリカゲル、NH₂ カートリッジ精製の溶出溶媒の再検討

NH₂ カートリッジによる精製の再現性が低かったことから、カートリッジ精製方法を再検討するため、山口県環境保健研究センター、下尾和歌子・古谷典子・嘉村久美子「底質及び生物試料における 2-(3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾールの分析方法」を参考にして次のような実験を行った。

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

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

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

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

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

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

再度 9 つに分取し、各々にベンゾトリアゾール混合標準液(0.2 μ g/mL-ヘキサン) 500 μ L を添加した。これらのうち、6 試料分はヘキサン 200 μ L まで濃縮し、3 試料分はアセトン 1mL に転溶した。これをフロリジル、シリカゲル、NH₂ の 3 種のカートリッジについて次の 3 通りの条件で処理を行った。

条件 1) カートリッジにあらかじめアセトン 5~10mL 通液し、ヘキサン 200 μ L まで濃縮した試料を添加し、アセトンで溶出し以下の Fr.1 と Fr.2 を分取した。すなわち Fr.1:2mL(NH₂ のみ 1mL) (うち 1mL は容器洗浄液)、Fr.2~5:2mL(NH₂ のみ 1mL)とした。

条件 2) カートリッジにあらかじめメタノール 5~10mL 通液し、ヘキサン 200 μ L まで濃縮した試料を添加し、添加時の流出液は Fr.1 に含めるとし、メタノールで溶出し、以下の Fr.1 と Fr.2 を分取した。すなわち、Fr.1:2mL(うち 1mL は容器洗浄液、NH₂ のみ 1mL)と Fr.2~5:各 2mL(NH₂ のみ 1mL)を分取した。

条件 3) カートリッジにあらかじめアセトン 5~10mL 通液し、アセトン 1mL に転溶した試料を添加し、添加時の流出液は Fr.1 に含めるとし、アセトンで溶出し、以下の Fr.1 と Fr.2 を分取した。Fr.1:2mL(うち 1mL は容器洗浄液、NH₂ のみ 1mL)と Fr.2~5:各 2mL(NH₂ のみ 1mL)を分取した。

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

2.4 KOH 処理後のヘキサン抽出条件の決定

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

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

また、ヘキサン層の純水による洗浄回数を洗浄後の水の汚れ具合により決定した。

2.5 加熱流下式高速抽出条件の決定

2.5.1 充填溶媒の選定

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

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

2.5.2 抽出温度の選定

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

各回収率を算出し、抽出温度を決定した。

2.5.3 無水硫酸ナトリウム量の決定と抽出カラムサイズの選定

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

2.5.4 抽出溶媒の選定と抽出液量の決定

フードプロセッサーで細かくしたブリ A 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 30g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノール 20mL と混合したものに、ベンゾトリアゾール混合標準液 (0.2 μ g/mL-メタノール) 500 μ L を添加した。これを中カラム(ϕ 25mm)に詰め、加熱流下抽出装置で 30 $^{\circ}$ C、ヘキサン・エタノール(1:1)およびエタノールのみ 4mL/min で Fr.1:10min(抽出液量 40mL)、Fr.2, 3:各 5min(抽出液量各 20mL)を抽出した。抽出液をそれぞれエバポレーターで 25mL(エタノール)まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40 $^{\circ}$ C で 60min 振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を 2 回、水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 30mL で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パージで約 1mL に濃縮し、あらかじめヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH₂ Jr.カートリッジに添加した後、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。窒素パージでヘキサンを蒸発させ、メタノール 500 μ L に転溶して、LC/MS/MS で分離・定量を行い、各回収率を確認し、抽出溶媒と抽出液量を決定した。

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

2.6 決定した方法での魚中濃度の測定

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

フードプロセッサーで細かくした魚試料 5g-wet を無水硫酸ナトリウム 30g と混合し、乳鉢ですりつぶした後、エタノール 20mL と混合した。これを中カラム(ϕ 25mm)に詰め、加熱流下抽出装置で 30 $^{\circ}$ C、エタノール 4mL/min で 20min(80mL)で抽出した。抽出液をエバポレーターで 25mL まで濃縮し、KOH を 1mol/L となるように添加して、40 $^{\circ}$ C で 60min(脂肪含有量が 25%以上のクロマグロ A のみ 120min)振とうした。分液ロートに移し、ヘキサン 10mL と純水 25mL を加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。さらにヘキサン 10mL を 2 回、水・エタノール層に加え、10min 振とう抽出後、静置し、ヘキサン層を採取した。ヘキサン層を合わせたものを純水 30mL で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウム 5g で脱水し、エバポレーターおよび窒素パージで約 1mL に濃縮し、あらかじめヘキサン 10mL を通液した製造後半年以内の Bond Elut NH₂ Jr.カートリッジに添加した後、ヘキサン 4mL(うち 1mL は容器洗浄液)で溶出させた。窒素パージでヘキサンを蒸発させ、メタノール 500 μ L に転溶して、LC/MS/MS で分離・定量を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 標準液による KOH 処理とヘキサン抽出での回収率の確認

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