

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究

(2) 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発

(2-4) 食品中ベンゾトリアゾール類の迅速測定法の開発

研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

プラスチック用の紫外線吸収剤であるベンゾトリアゾール類は、難分解性、蓄積性を有し、毒性が懸念されている。最近、ベンゾトリアゾール類の1種が化審法の第1種特定化学物質に指定され、その類似化合物も含め食品汚染の把握が急務である。そこで本研究では、食品中のベンゾトリアゾール類の迅速測定法を開発することを目的とし、平成 21 年度には、加熱流下抽出の条件とアルカリ分解後の抽出条件を決定し、測定方法全体の回収率を確認した。また、脂肪含有率の異なる 5 種類の市販魚試料についてベンゾトリアゾール含有量の測定を行った。

研究協力者

横浜国立大学環境情報研究院

浦野紘平、清水優子

A.研究目的

プラスチック用の紫外線吸収剤として長年にわたって使用されてきたベンゾトリアゾール類の1種である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:(DBHP)BT が、環境中での残留性と生物への濃縮性および毒性があることが判明し、平成 19 年 11 月に、化学物質の審査および規制に関する法律(化審法)で第1種特定化学物質に指定され、日本での製造・使用が禁止された^{1),2)}。しかし、ベンゾトリアゾール類には指定された化合物と類似な物質もあり、また、世界的には使用が続いており、これらによる地球レベルの食品汚染が懸念されている。

そこで、本研究では食品中のベンゾトリアゾール類の迅速測定法を開発し、食品汚染の実態調査に役立てることを目的とした。

B.研究方法

1.試料

1.1 対象化合物

化審法で第1種特定化学物質に指定された(DBHP)BT および、ベンゼン環の置換基の炭素数や側鎖の形が異なるだけの 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:(DAHP)BT、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:(OHP)BT、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:(MHP)BT、およびトリアゾール環に塩素が付加した 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:(DBHP)CBT や 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:(BMHP)CBT、これら 6 種類のベンゾトリアゾール類を研究対象とした。これらの対象物質の構造式、分解性、蓄積性、製造・輸入禁止状況等をまとめて表 1-a、表 1-b に示す。

表 1-a 研究対象としたベンゾトリアゾール類の特性など(1)

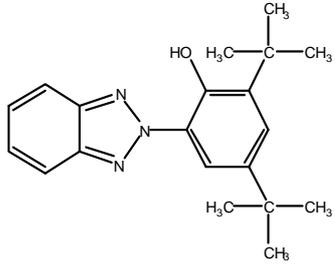
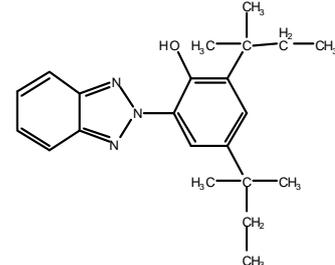
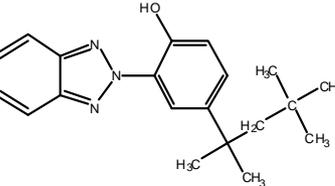
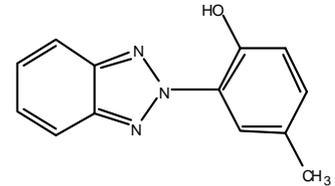
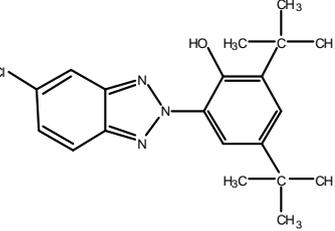
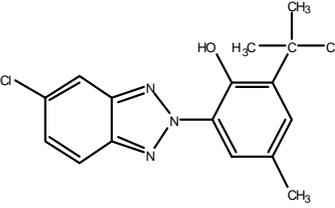
分析対象物	略称	cas番号	基本構造	法規制
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール	(DBHP)BT	3846-71-7		化審法 第一種特定 化学物質
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ペンチルフェノール	(DAHP)BT	25973-55-1		
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-tert-オクチルフェノール	(OHP)BT	3147-75-9		
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチルフェノール	(MHP)BT	2440-22-4		
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	(DBHP)CBT	3864-99-1		化審法 第一種監視 化学物質
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	(BMHP)CBT	3896-11-5		

表 1-b 研究対象としたベンゾトリアゾール類の特性など(2)

略称	分解性	蓄積性	長期毒性	日本での使用	食品モニタリングデータ	摂取量データ
(DBHP)BT	難	高	肝障害、肝発ガン性を有する疑い、NOELは0.1mg/kg/day (ラット、肝障害)	製造禁止 輸入禁止	ほとんどない (魚で4例、N.D.~0.5ng/g)	ない
(DAHP)BT	難	中	不明	未規制	ない	ない
(OHP)BT	(難)	(中)	不明	未規制	ない	ない
(MHP)BT	難	中	不明	未規制	ない	ない
(DBHP)CBT	難	高	不明	届出	ほとんどない (魚で2例、0.2、3ng/g)	ない
(BMHP)CBT	難	中	不明	未規制	ない	ない

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。

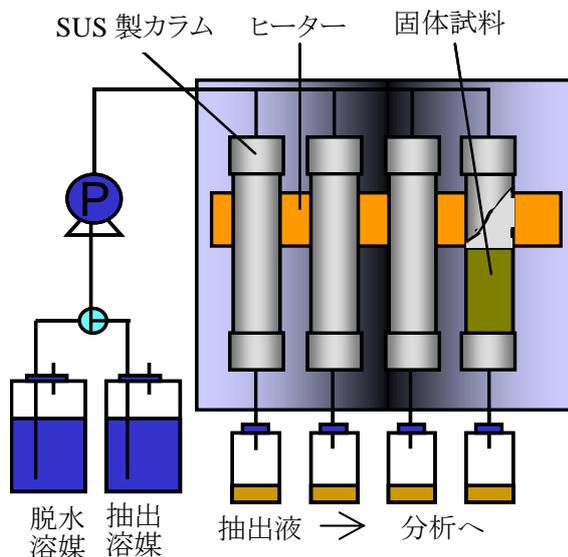


図1 加熱流下式高速抽出装置 フロー図

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°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°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

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

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

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

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

2.カートリッジ精製方法の再検討

2.1 NH2 カートリッジの劣化影響の検討

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

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

表 4 KOH処理後ヘキサン抽出回収率(標準液) [%]

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

表 5 ヘキサン抽出回収率(標準液) [%]

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

表 6 メタノール転溶後の超音波の有無と回収率(マダイ A) [%]

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

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

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

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

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

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

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

2.2 フロリジル、シリカゲル、NH₂カートリッジ精製の溶出溶媒の再検討

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.KOH 処理後のヘキサン抽出条件の決定

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

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

4.加熱流下抽出条件の決定

4.1 充填溶媒の選定

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

回収率の結果をそれぞれ表 10-1、10-2 に示す。

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

4.2 抽出温度の選定

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

4.3 無水硫酸ナトリウム量の決定と抽出カラムサイズの選定

フードプロセッサーで細かくしたマサバ B、マダイ A、サケ A、ブリ A、クロマグロ A それ

表 9 KOH 処理後のヘキサン抽出回数と回収率(ブリ A) [%]

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

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

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

表 10-2 エタノール充填の回収率(ブリ A) [%]

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

それ 5g-wet を任意の量の無水硫酸ナトリウムと混合し、乳ばちですりつぶし、その外観を観察したところ、比較的脂肪含有率の高いサケ A、ブリ A、クロマグロ A については 20g で脱水が十分であったが、脂肪含有率の低い、すなわち含水率の高いと思われるマサバ B、マダイ A については脱水に 30g くらい必要であると思われた。そこで、無水硫酸ナトリウム量は、一律 30g とした。無水硫酸ナトリウム 30g とすると、小カラム(φ 15mm、19cm)では充填しづらいため、中カラム(φ 25mm、19cm)で抽出することとした。抽出効率を考え、抽出カラム充填時の溶媒高さをカラム上端から約 8cm(下端から約 11cm)とすることとした。

4.4 抽出溶媒の選定と抽出液量の決定

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

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

表 11-1 抽出温度 30°C の回収率(ブリ A) [%]

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

表 11-2 抽出温度 45°C の回収率(ブリ A) [%]

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

表 12-1 ヘキサン・エタノール(1:1)抽出の回収率(ブリ A) [%]

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

表 12-2 エタノール抽出の回収率(ブリ A) [%]

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

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

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

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

5. 決定した方法での魚中濃度の測定

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

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

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

D. 結論

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

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

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

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

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

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

E. 参考文献

1) 経済産業省「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律」第一種特定化学物質関係 <http://www.meti.go.jp/policy/>

chemical_management/03kanri/a11.htm

2)環境省、中央環境審議会環境保険部会、第 58 回化学物質審査小委員会資料「2-(2H-1,2,3 ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノールについて」「2-(2H-1,2,3 ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノールの分解性、蓄積性及び人への長期毒性について」、

「今後の対策について」など、<http://www.env.go.jp/council/05hoken/yoshi05.html>

3)環境省環境保険部環境安全課、化学物質と環境、平成 17 年度化学物質分析法開発調査報告書、生物中 2-(2H-1,2,3 ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロ-2H-1,2,3 ベンゾトリアゾール-2-イル)-フェノールの分析法、Ⅲ-438～453(平成 18 年 7 月)

4) 山口県環境保健研究センター、下尾和歌子・古谷典子・嘉村久美子「底質及び生物試料における 2-(3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾールの分析方法」

<http://kanpoken.pref.yamaguchi.lg.jp/soshiki/syohou/17k04.pdf>

5)農林水産省平成 11～16 年度「魚介類中のダイオキシン類の実態調査」http://www.maff.go.jp/www/press/cont2/20050912press_7b.pdf

F.研究業績

1.論文発表

なし、(投稿準備中)

2.学会発表

なし

表 12-3 エタノール抽出の回収率(マダイ A) [%]

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

表 12-4 エタノール抽出の回収率(クロマグロ A) [%]

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

表 13 魚中濃度測定結果 [ng/g-wet]

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

表 14-1 表 12-2 補正後回収率(ブリ A) [%]

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

表 14-2 表 12-3 補正後回収率(マダイ A) [%]

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

表 14-3 表 12-4 補正後回収率(クロマグロ A) [%]

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

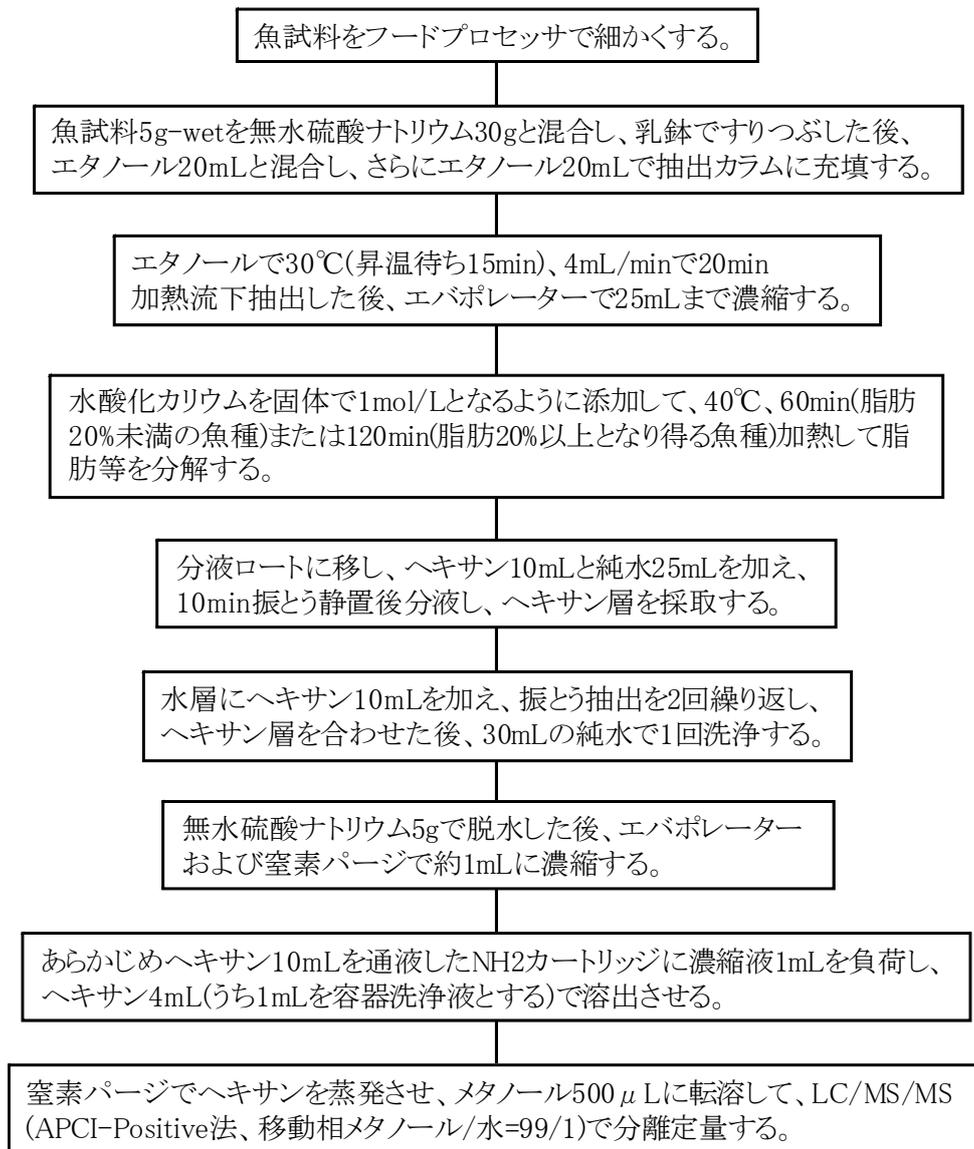


図2 魚中ベンゾトリアゾール類(BTs)の測定フロー

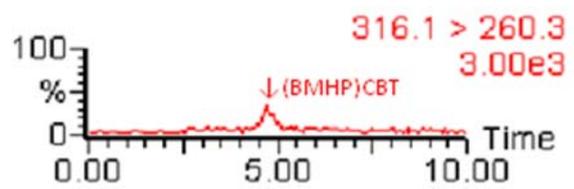
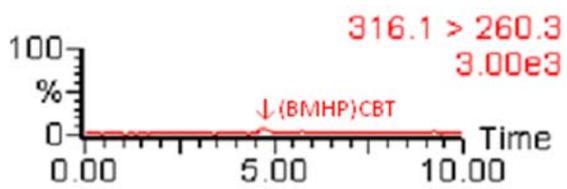
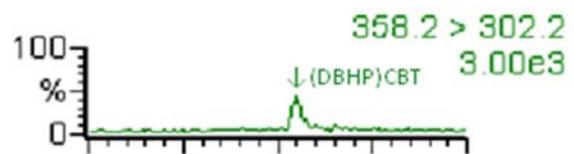
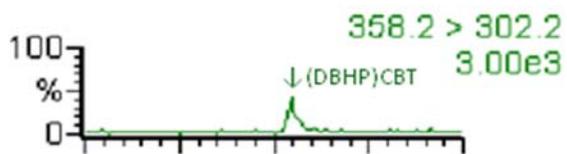
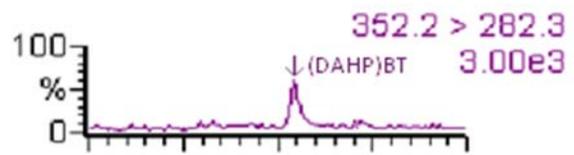
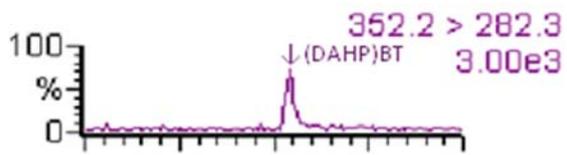
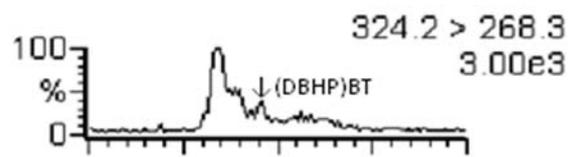
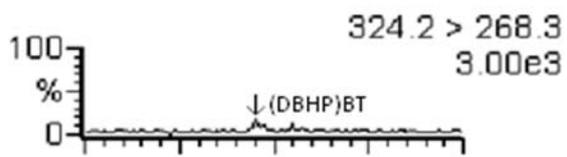


図3 クロマトグラム例(マサバB)

図4 クロマトグラム例(ブリA)