

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NH<sub>2</sub>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、NH<sub>2</sub>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NH<sub>2</sub>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、NH<sub>2</sub>カートリッジ精製の溶出溶媒の再検討

NH<sub>2</sub>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、NH<sub>2</sub>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。NH<sub>2</sub>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 NH<sub>2</sub>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、NH<sub>2</sub> 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 NH<sub>2</sub> 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である。

### 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](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