

(千葉大学学位申請論文)

家庭内に存在する有害物質の
微量分析法に関する研究

2003 年 7 月

中川 友夫

家庭内に存在する有害物質の微量分析法に関する研究

1	序論	
1.1	はじめに	1
1.1.1	化学物質の毒性	
1.1.2	有毒、有害物質の家庭への拡散	
1.2	本研究の背景	2
1.2.1	家庭内にある身近な化学物質	
1.2.2	微量有機化学物質の分析法	
1.3	本研究の目的と概要	4
1.3.1	難揮発性物質の微量分析	
(1)	天然物の毒	
a.	穀物中の黄変米毒チトリニン	
b.	穀物中の黄変米毒ルテオスカイリン	
(2)	非意図的化合物の毒	
a.	石油生産物中の B(a)P	
b.	工業化学品、医薬品、化粧品の原料中の PAH	
c.	食品中の PAH	
d.	生活環境中の PAH	
1.3.2	揮発性物質の極微量分析	
(1)	環境水中の内分泌攪乱化学物質	
(2)	生活用品中の内分泌攪乱化学物質	
2	HPLC を用いた難揮発性物質の微量分析	
2.1	天然物の毒	17
2.1.1	穀物中の黄変米毒チトリニンの測定	
2.1.2	穀物中の黄変米毒ルテオスカイリンの測定	
	ルテオスカイリンに含まれる不純物(Pi-1)の単離および細胞毒性について	
2.2	非意図的化合物の毒	53
2.2.1	石油生産物中の B(a)P の測定	

2.2.2	工業化学品、医薬品、化粧品の使用原料中に含有する PAH の測定	
2.2.3	食品中の PAH の測定	
2.2.4	生活環境中の PAH の測定	
3	GC/MS を用いた揮発性物質の極微量分析	
3.1	環境水中の内分泌攪乱化学物質・アルキルフェノールの測定	・ ・ 1 1 2
3.2	生活用品中の内分泌攪乱化学物質・アルキルフェノールの測定	・ ・ 1 1 9
4	謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 1 5 1

1 序 論

1.1 はじめに

1.1.1 化学物質の毒性

人類は火を使い化石燃料を使い始めて以来、化学物質と関わりを持ち環境に影響を及ぼしてきた。しかし、ごく近年まで人間が化学物質から得る恩恵と環境に与える影響力はごく僅かなものにすぎなかった。

1962年にレイチェル・カーソンが「Silent Spring (邦訳：沈黙の春)」を著した¹⁾。人工化学物質で持続性、脂溶性のある塩素系炭化水素化合物 DDT (*p,p'*-ジクロロジフェニルトリクロロエタン)などの農薬・殺虫剤を無差別、無尽蔵に使用すると環境や生態系に深刻な影響を与え、人類の存在さえも脅かしかねないことを、この本は誇張された部分があったものの環境問題を世界に発信した。この「沈黙の春」の警告が一般の人々に与えた衝撃は大きく、人工化学物質の危険性を認識させ、これを機に環境保全への取り組みが始まった。

1960年代、日本では高度成長期にあり、水俣病、イタイイタイ病など「公害」という環境問題が世間の関心を集めた。「公害」による人間への健康影響が顕著に現れ、その再発防止の観点から環境行政の取り組みが始まり、急性毒性物質だけでなく、慢性毒性物質や発癌性物質についても予防保全的立場から取り組みがなされてきた。

このように、科学技術・工業の発展に伴い、環境に与える影響が飛躍的に拡大し、生態系と環境の均衡、自然界のバランスが崩れいろいろな問題が露呈してきた。

近年、シーア・コルボーン等は「Our Stolen Future (奪われし未来)」を著わして²⁾、環境汚染が子孫や生態系に取り返しのつかない危険性、化学物質が内分泌系に悪影響を与える可能性を実証データに基づいて指摘した。内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）は生物の体内に入ると内分泌系を攪乱し、生殖障害など健康や生態系に悪影響を与える³⁾。

環境問題は、地球環境問題と生態に関わる環境問題に大別される。すなわち地球温暖化、オゾン層破壊、酸性雨などと、非意図的化合物としてダイオキシン類、ベンゾ(a)ピレン〔B(a)P〕等、内分泌攪乱化学物質などの有害化学物質による生態影響の問題である。

1.1.2 有毒、有害物質の家庭への拡散

古くは明治時代に産業が急速に発展し、その過程で、足尾銅山鉍毒事件(1890年頃)が起きた。工業の発展に伴い銅の採掘や精錬が盛んになるにつれ足尾銅山の近くを流れる渡良瀬川に沿った群馬県の農村では、毎年田の稲が枯れ川の魚が大量に死んだ⁴⁾。

昭和に入ってから産業が原因の公害が続いた。すなわち、化学肥料工場の排水に含まれていた有機水銀が、水俣湾に生息する魚介類に蓄積され、それを食べた人間や動物が神経を侵されたり手足がしびれたりする水俣病(1953 年頃)、新潟県阿賀野川流域で起きた新潟第二水俣病(1965 年頃)、神岡鉱山の排水に含まれていたカドミウムが水田に入りそこで収穫した米を食べた人がかかったイタイイタイ病(1955 年頃)、石油コンビナートの煙に含まれている亜硫酸ガスによる四日市喘息(1959 年頃)等のいわゆる四大公害が発生し問題化した⁵⁾。

このように、科学技術・工業の発展に伴い、環境に与える影響が飛躍的に拡大し、生態系と環境の均衡、自然界のバランスが崩れいろいろな問題が発生してきた。

環境汚染による異変は、最初に野生生物など生態系へ影響を与え、次いで人の健康に影響が及ぶことが知られている。内分泌攪乱化学物質問題は欧米では 1980 年代の終わりから注目され、日本では 1996 年頃から問題となり日本語訳の「奪われし未来」が出版され、市民の関心の高さを反映して、専門家による「内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班」設けられた⁶⁾。1998 年に環境省が公表した「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」において内分泌攪乱を引き起こす疑いのある化学物質として 67 物質(群)リストアップされている⁷⁾。この中には作用の強いものもあれば弱いものも含まれており、またそれらの環境放出量も様々である。

1.2 本研究の背景

1.2.1 家庭内にある身近な化学物質

日常生活で用いられている家庭用品には多くの化学製品、化学物質が使用され人の生活を豊かで便利なものとしている。しかし日常生活のなかで繁用される化学物質は、利便性が優先され人体への影響については十分に検討されないものがある。1965 年頃から家庭用品による健康被害の発生が社会問題として取り上げられ、消費者保護の立場から化学物質の各種毒性による人体への健康被害を防ぐために 1973 年に「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」⁸⁾が公布された。また、翌年には、家庭で使用するトイレ用の洗剤に添加されている塩化水素、硫酸等の濃度規制および噴射剤としてのエアゾル製品中の塩化ビニル(モノマー)の使用禁止、繊維製品の防縮、防しわを目的とした樹脂加工による遊離ホルムアルデヒド量の規制、繊維製品中の防菌、防かび剤として使用されていた有機水銀化合物の使用が禁止された。その後健康被害との関連が明らかになった化学物

質と、それを含有する恐れのある家庭用品が法規制され、現在までに有機スズ、防災加工剤等の17物質が指定されている。同様に飲料水、食品、医薬品の安全性が水道法⁹⁾、食品衛生法¹⁰⁾、薬事法¹¹⁾によって法制化されている。

人間が作り出した化学物質の総数は、1,800万種類を越えると言われ種々雑多である。また、これらの化学物質の測定対象になる試料も、水質、土壌、大気、粉塵、廃棄物、食品、生物、人体（母乳、血液、毛髪等）など幅広く、分析のための技術開発が問題を把握するために重要である。

近年大きな問題となっているこれらの化学物質は使用後、埋め立てあるいは焼却によって廃棄されている。環境中に放出されたダイオキシン類や内分泌攪乱化学物質は、ng/kg (ppt)あるいはそれ以下の濃度であっても生態影響が出る恐れがあると懸念がある。家庭内に低濃度で存在する化学物質による影響を正確に把握するために、微量分析技術が必要であり、精度の高い計測技術、微量分析法を確立することにより、明らかになっていなかった種々の環境影響を正確に把握出来るようになり、環境の監視・保全施策がとれるようになる。

一般的に、家庭内の工業化学製品の化学物質の濃度レベルはパーセント（%）オーダーのものもあり、一方、前述した公害、環境問題で対象となる急性毒性のある化学物質の濃度は約 $\mu\text{g/g}$ (ppm)レベル以下である。慢性毒性や発癌性を示す化学物質の環境中の汚染レベルは ng/g(ppb)レベルであるが、最近のダイオキシン類、内分泌攪乱化学物質問題に関しては pg/g(ppt)レベル或るいわそれ以下の低濃度の分析が要求される。

1.2.2 微量有機化学物質の分析法

前述の諸問題を解決する方法として試料の前処理・導入技術と分析機器の技術開発が重要である。微量有機化学物質の分析方法を大別すると化学分析法と生物検定法に分かれる¹²⁾。一般に化学分析法は的確に化学物質そのものを標的として測定するものであり、精度は高いものの検査に大型の分析機器が不可欠であるためコストが高くなるという点が指摘されている。なかでも代表的な高感度分析機器として分離分析法と同定能力の高い質量分析機器を組み合わせたガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) などがある。まだ応用例は比較的すくないが、高速液体クロマトグラフ装置に質量分析機器を組み合わせた液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS)、又は高速液体クロマトグラフ装置に蛍光検出器を接続し (HPLC/FL)、これらの化学物質を高感度に測定されている^{12) 13)}。また、

一方、生物検定法は、化学物質またはその影響、生物現象を利用して測定するもので、精度は低いものの簡便かつ安価であり、その影響を直接観察するという利点がある。

1.3 本研究の目的と概要

本研究は、身近な環境中及び家庭内に存在する種々の有害化学物質を迅速かつ詳細に把握するため、種々の分析機器を用いて高感度、高選択性の利用を追求、研究すると共に、それらの分析方法を実試料へ応用することを目的とした。研究対象とした化学物質は、人への健康影響や生態系への影響が懸念される発癌性物質、内分泌攪乱化学物質等の、実態把握が重要とされる有害化学物質のうち、多環芳香族炭化水素化合物(polycyclic aromatic hydrocarbon:PAH)、マイコトキシン、アルキルフェノールである。

1.3.1 難揮発性物質の微量分析

(1) 天然物の毒

a. 穀物中の黄変米毒チトリニン

1951年タイから輸入された米から見つかったカビ、*Penicillium citrinum* Thom(ペニシリウム・シトリヌム菌、Fig. 1)¹⁴⁾の寄生したカビ米の主毒性成分・チトリニンは、黄変米毒の中でも早くその毒性の本体が明らかにされた。チトリニンは1948年にD.J.クラムによって単離、構造決定された既知物質であった。化学構造をFig. 2に示す。タイから輸入された黄変米から、角田によって菌が分離され、浦口らによってその中毒学的研究が行われ、チトリニンは肝障害性の黄変米毒として知られた¹⁵⁾。ペニシリウム・シトリヌム菌はわが国のほか世界各地に広く分布し、輸入米、国内産食品として米、麦、小麦粉、豆類、味噌などから分離され、またこの抗酸性菌は、家具類、湖沼の泥土に至るまで検出された。

この物質は強酸性物質のため測定が困難な物の一つであり、食品汚染を対象としたチトリニンの微量分析法に関する報告は少ない。そこで本研究では逆相分配イオンペアークロマトグラフィーを用いることにより迅速かつ精度の高い微量分析法を確立した。

b. 穀物中の黄変米毒ルテオスカイリン

ルテオスカイリンはジアンスラキノン系代謝産物で発癌性をもつ代表的な黄変米毒として知られている。その化学構造をFig. 3に示す。この化合物は黄変米事件の対象になったカビ米を汚染していた *Penicillium islandicum* Sopp(ペニシリウム・イスランディクム菌、

Fig. 4) が生産したカビ毒であり、浦口の研究グループによって「脂溶性、遅効性毒物」として単離された化合物である¹⁶⁾。また化学構造に関しては、一連のこの系統の化合物は柴田らによって解明された¹⁷⁾。これらの研究はわが国で起きた黄変米研究の代表的な質の高い研究例として戦前の在来の黄変米の研究とともに世界に知られている。

食品汚染を対象としたルテオスカイリンの微量分析法に関する報告は少ない。また、ルテオスカイリンには多くの同族体が存在し、その分離、精製が困難な物質の一つである。本研究では高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い迅速かつ精度の高い微量分析を確立した。さらに、ルテオスカイリンの不純物として混在する物質がデオキシルテオスカイリン(DLs)であることを確認し、これらの化合物の細胞毒性を測定することに成功した。

(2) 非意図的化合物の毒

a. 石油生産物中の B(a)P

癌原性物質に関する研究の歴史は古く、特に PAH に関しては癌原性化学物質の中で最も長い研究の歴史を持ち、煙突掃除人夫の陰嚢癌の多発に関するイギリスの Percival Pott の報告(1775)、山極、市川(1915)がコールタールを長期間家兎の耳に塗布することにより、人工的に初めて癌を発生させることに成功した。B(a)P (Hieger,1930)およびジベンゾ(a,h)アントラセン(Kennaway&Hieger,1930)等は、イギリスの研究者によりコールタールに含まれる癌原性主成分として分離され、単一化学物質として初めて癌原性が確認された化学物質である。その化学構造を Fig. 5 に示す。

これらの PAH の起源はバクテリア、植物などによる生合成、化石燃料である石炭、石油、木材などの燃焼または有機物質の加熱により生成され、中でも強い発癌性及び変異原性を示す B(a)P は古くから知られている。また、これらの化学物質は最近、内分泌攪乱作用の点からも問題となっている化学物質の一つである。B(a)P に代表される 5 環芳香族炭化水素化合物で置換基を持たない基本化合物は 15 種類存在し、そのうち強い癌原性を持つ物は 5 種類である¹⁸⁾。その化学構造を Fig. 6 に示す。中でもその異性体ベンゾ(e)ピレン〔B(e)P〕は B(a)P よりも活性は弱いが化学構造が類似しているため B(a)P との分離は困難であった。本研究では流動パラフィン中の B(a)P を高感度な蛍光検出器付き HPLC を用いることによりこれらの PAH を分離し、迅速かつ精度の高い微量分析法を確立した。

b. 工業化学品、医薬品、化粧品原料中の PAH

工業化学品、医薬品、化粧品原料として油脂類が使われている。これらは天然資源を精製しそのまま用いるか、あるいは蒸留分別、溶剤分別、冷却圧搾、加水分解、水添、高圧水素還元、エステル化などの工程を経て誘導体として用いられる。油脂は、油、脂肪の総称であり化学構造上、脂肪酸とグリセリンのトリエステルであるが、ワセリン、流動パラフィン等は炭化水素類で構造上別の物である。しかし原料としては一般的呼名として油脂と呼ばれ、種々の軟膏基剤、化粧品基剤として広く用いられている¹⁹⁾。これらの炭化水素にはパラフィン系 (C_nH_{2n+2}) とナフテン系 (C_nH_{2n}) とがあるがこれらの原料として古くから多量に用いられているのは、ほとんど C_{15} 以上のパラフィン系のもので、石油資源から採取されたものは鉱物性と呼ばれている。このような石油生産物質中には発癌性 PAH が含まれている可能性があり、特に強い発癌性を示す B(a)P の混在は安全性の面で重要であり「第 14 改正日本薬局方」²⁰⁾等においては PAH 純度試験の規格が設けられている。工業化学品、医薬品、化粧品の使用原料を対象とした PAH の微量分析法に関する報告は少ない。本研究ではワセリン、クエン酸、流動パラフィン等の石油産生物質中の PAH の簡易迅速で高感度な精度の高い微量分析法を確立した。

c. 食品中の PAH

PAH の発癌性は古くから研究されている。複雑な夾雑物を多く含む食品中の PAH の微量分析は精密な技術と高度の熟練が要求される。一般食品中において PAH の中でも強い発癌性が知られている B(a)P と、従来分析が困難であった B(e)P、ベンゾ(b)フルオランテン [B(b)F]、ベンゾ(k)フルオランテン [B(k)F]、ペリレン [Per] について実際的な見地から検討を加え迅速かつ精度の高い微量分析法を確立した。

d. 生活環境中の PAH

PAH は化石燃料、有機物の加熱により生成し、古くから発癌性が知られている。生活環境中における発癌性物質の暴露実態の把握と評価のため成人女性が食事、水道水、空気を経由して摂取する生活環境中の PAH の摂取量を明らかにした。

1.3.2 揮発性物質の極微量分析

(1) 環境水中の内分泌攪乱化学物質

内分泌攪乱化学物質は、生体内のホルモン活性に影響を与える外因性の化学物質である。

そのメカニズムはいくつかあるが、1つはホルモンレセプターの結合サイトを占領することにより、生体内ホルモンを模倣するようなホルモン様の物質であり、またある場合はホルモンとの競合によりそれを妨害する場合である。さらには、ホルモンの合成あるいは代謝酵素の作用を阻害してその濃度を変える場合もある。このような結果として、野生生物や人における生殖に悪影響をひきおすことが社会的な関心を集め問題になっている。

アルキルフェノールは、抗酸化剤、非イオン性界面活性剤として近年大量に使用されているアルキルフェノールポリエトキシレートが環境中で容易に分解して作られる。なかでもノニルフェノールは内分泌攪乱化学物質としてのエストロゲン様作用（女性ホルモン様作用）が疑がわれていたが、一般環境中の濃度でも、メダカのオスの精巣に、卵子のもとになる卵母細胞が出来るとする環境省（2001年8月）の報告書²¹⁾が出され、ノニルフェノールは環境省が内分泌攪乱化学物質として世界で初めて認められた物質である。また、ノニルフェノールと同様に界面活性剤や合成樹脂製品の添加剤として使用されている4-オクチルフェノール[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol]を2002年6月に2例目として環境省が内分泌攪乱化学物質として認めた²²⁾。ノニルフェノールと女性ホルモンとして働くエストラジオールの構造式を示す(Fig.7)。

アルキルフェノールは、アルキル基の分枝が異なる異性体の混合物であり、キャピラリーガスクロマトグラフ分析では複数のピークがクロマトグラム上に検出される。特にノニルフェノールの異性体標準混合品をGC/MSで測定したとき複数のピークが検出され、フラグメントの異なるマススペクトルが見られる。環境中から検出されるノニルフェノールは多くの異性体の集まりであるため、個々に物質の構造とその毒性を明らかにすることは重要である。本研究では、環境水中のアルキルフェノール（9物質）の微量分析方法を確立し、マススペクトルより内分泌攪乱化学物質・ノニルフェノールの構造を明らかにした。

(2) 生活用品中の内分泌攪乱化学物質

アルキルフェノールは、一般にフェノール性水酸基を有し、パラ位に種々のアルキル鎖を持つ化合物の総称であり、アルキル基の長さ、分枝が異なる異性体の混合物である。

アルキルフェノール類中に、C₉アルキル鎖を持つ化合物の混合物であるノニルフェノールと呼ばれる一連の物質は、家庭の中の日常生活品として使われている合成樹脂製品の添加剤として使用されている。それらは食品包装用ラップフィルム、食器等の合成樹脂製品に使用されていた。合成樹脂製品ではノニルフェノールがそのまま酸化防止剤、腐食防

止剤として使用される他に添加剤として使用されている安定化助剤、トリス（モノ-、ジ-ノニルフェニル）フォスファイト（TNP）等の不純物として、あるいは熱分解物として存在すると言われている。

一般に合成樹脂製品の機能を高めるために多くの添加剤が含有されているので試料の分析は煩雑で時間がかかるため、迅速で高感度な分析方法が求められている。

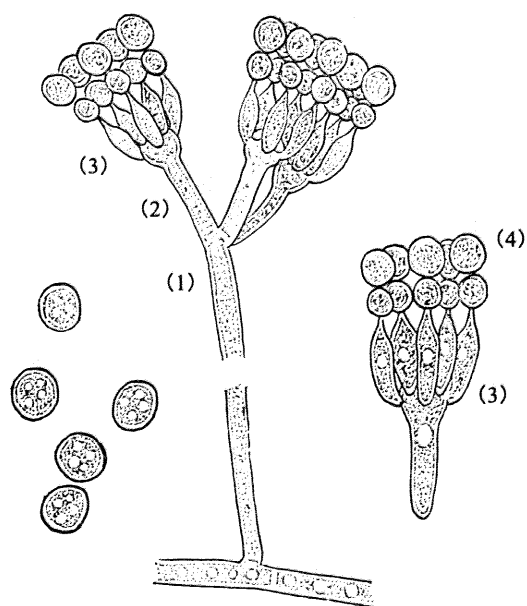
本研究は家庭の中の日常生活品として使われている合成樹脂製品中のアルキルフェノール類、特にノニルフェノール、オクチルフェノール等の一連の物質をTMS誘導体化したのち正化学イオン化法(PCI)を用いたPCI-GC/MSで高感度分析法を確立した。現在、ノニルフェノール標準品は、4-*n*-ノニルフェノールと22の異性体¹³⁾の分離が確認されている混合比が不明の混合物である。一方、オクチルフェノール標準品は、4-*n*-オクチルフェノールと4-*t*-オクチルフェノール[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol]の2化合物のみである。オクチルフェノールはノニルフェノール同様に理論的に多くの異性体を持つことが考えられるが現在まで異性体の分離等の報告例はない。オクチルフェノールの混合比は不明ではあるが本研究では8物質の分離を確認した。

文 献

- 1) Rachel Carson, 青木繁一邦訳：沈黙の春 (Silent Spring), (1974) 新潮社, 東京.
- 2) Theo Colborn, 長尾 力邦訳：奪われし未来 (Our Stolen Future), (1997) 翔泳社, 東京.
- 3) 日本化学会編：化学総説, No.50, 内分泌かく乱物質研究の最前線, (2001) 学会出版センター, 東京.
- 4) 藤原元典, 渡辺厳一, 高桑栄松 監修：総合衛生公衆衛生学 改訂第2版, 349 (1985) 南江堂, 東京.
- 5) 法律時報 7月号 (1971) 日本評論社, 東京.
- 6) 環境庁リスク対策検討会 監修：環境ホルモン 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, (1998) 環境新聞社, 東京.
- 7) 環境庁：「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98－」 (1998), 東京.
- 8) 有害物質を含有する家庭用品に規制に関する法律（昭和四十八年十月十二日法律第百

十二号).

- 9) 水道法 (昭和三十二年六月十五日法律第百七十七号).
- 10) 食品衛生法 (昭和二十二年十二月二十四日法律第二百三十三号).
- 11) 薬事法 (昭和三十五年八月十日法律第百四十五号).
- 12) 森田昌敏 監修: 環境ホルモンのモニタリング技術, (1976) シーエムシー, 東京.
- 13) 保母敏行, 小熊幸一編著: 理工系 機器分析の基礎, (2001) 朝倉書店, 東京.
- 14) 角田廣, 辰野高司, 上野芳夫: マイコトキシン図説, (1979) 地人書館, 東京.
- 15) 宇田川 俊一, 鶴田 理: かびと食物, 299 (1976) 医歯薬出版(株), 東京.
- 16) K. Uraguchi, M. Yamazaki: "TOXICOLOGY" Biochemistry and pathology of mycotoxins, (1978) KODANSHA, Tokyo.
- 17) N. Takeda, S. Seo, Y. Ogihara, U. Sankawa, I. Iitak, I. Kitagawa, S. Shibata: *Tetrahedon*, 29, 3703 (1973).
- 18) 小田嶋成和、橋本嘉幸: 化学物質と癌の発生, 53 (1978) 学会出版センター, 東京.
- 19) 日本化粧品技術者会 編: 最新化粧品科学 改訂増補II, 239 (1992) 薬事日報社, 東京.
- 20) 日本薬局方編集委員会: 第 14 改正日本薬局方, (2001) 廣川書店, 東京.
- 21) 環境庁: 平成 13 年度第 1 回外因性内分泌攪乱化学物質問題検討会議事次第・資料 (2001).
- 22) 環境庁: 平成 14 年度第 1 回外因性内分泌攪乱化学物質問題検討会議事次第・資料 (2002).
- 23) T. F. Wheeler, J. R. Heim, M. R. LaTorre, A. B. Janes: *J Chromatogr. Sci.*, 35, 19 (1997).



(1) conidiophore	$2.2 \sim 3.0 \times 50 \sim 200 \mu$	(2) sterigmata	$2.2 \sim 2.8 \times 8.0 \sim 11.0 \mu$
(3) metulae	$2.2 \sim 3.0 \times 12 \sim 20 \mu$	(4) conidia	$2.5 \sim 3.0 \mu$

Fig. 1. *Penicillium citrinum* Thom ¹⁴⁾

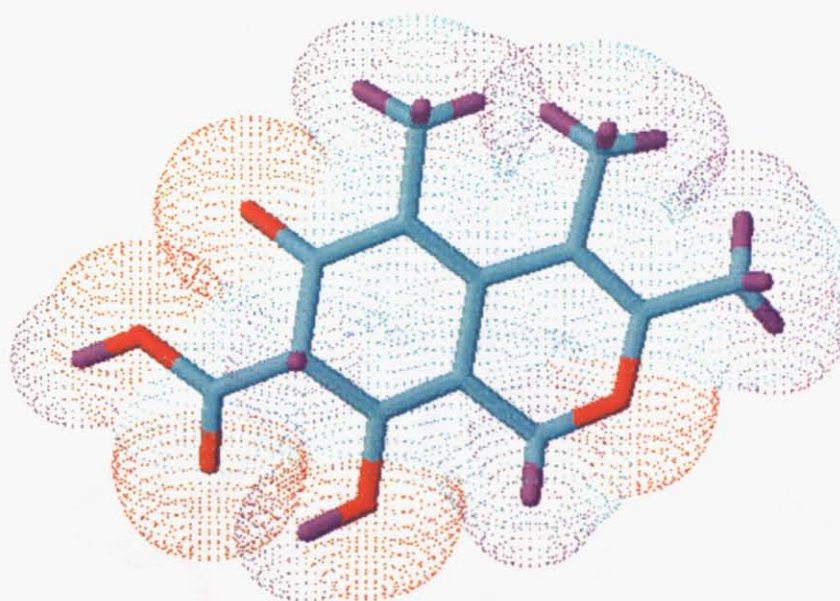


Fig. 2. Structure of citrinin

Hydrogen
Carbon
Oxygen

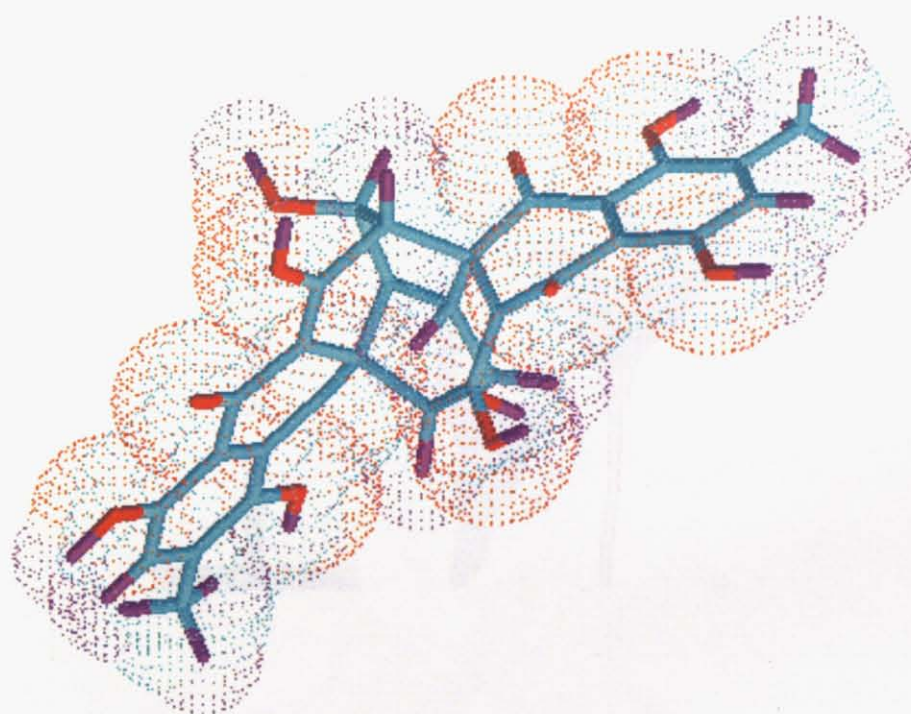
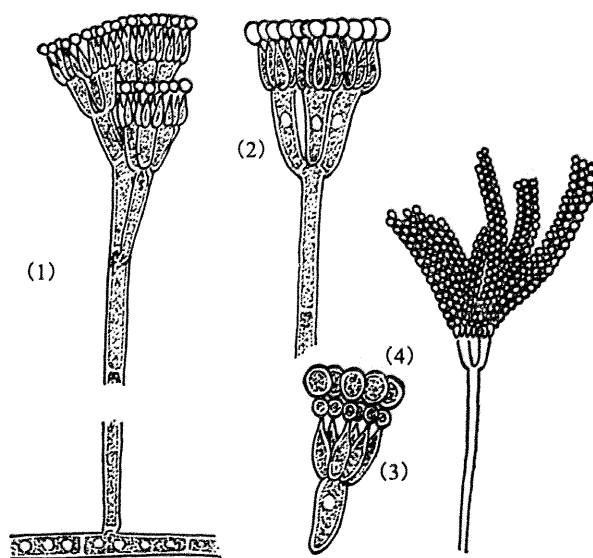


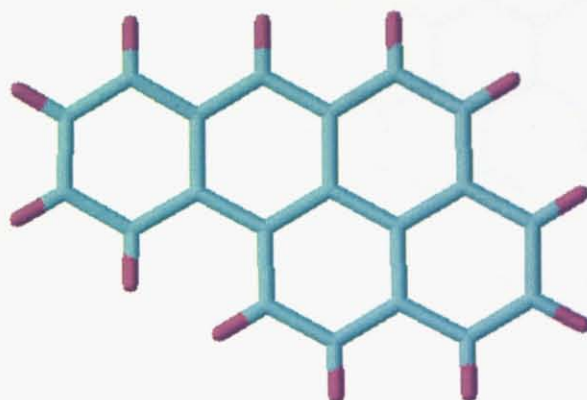
Fig. 3. Structure of luteoskyrin



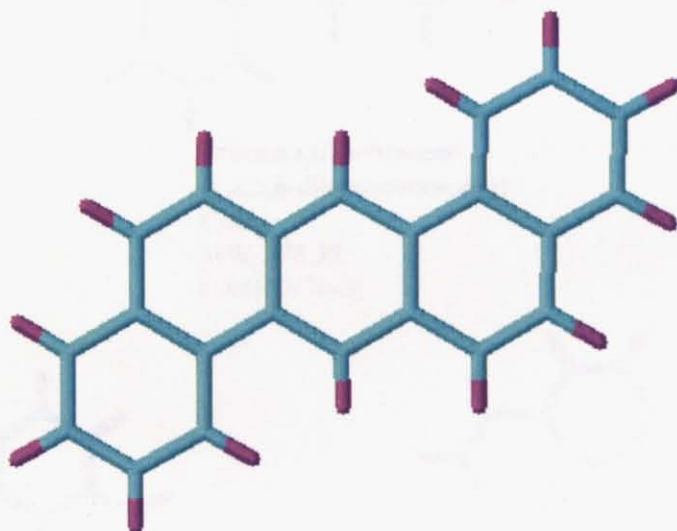


(1) conidiophore	$2.5 \sim 3.0 \times 100 \sim 150 \mu$	(2) sterigmata	$1.8 \sim 2.2 \times 7 \sim 9 \mu$
(3) metulae	$2.2 \sim 2.8 \times 8 \sim 10 \mu$	(4) conidia	$2.5 \times 3.5 \mu$

Fig. 4. *Penicillium islandicum* Sopp ¹⁴⁾



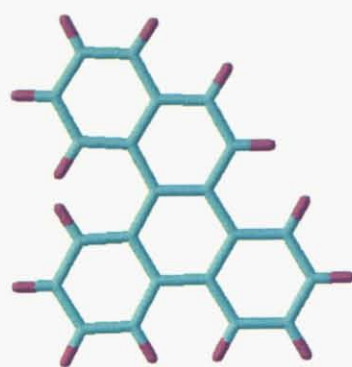
Benzo(a)pyrene
(3,4-benzopyrene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[50-32-8]



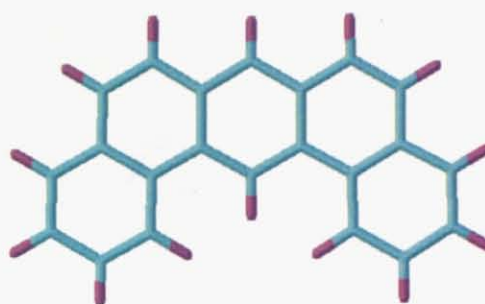
Dibenz(a,h)anthracene
(1,2:5,6-dibenzanthracene)
 $C_{22}H_{14}$
MW. 278.35
CAS[53-70-3]

Fig. 5. Structure of benzo(a)pyrene and dibenz(a.h)anthracene

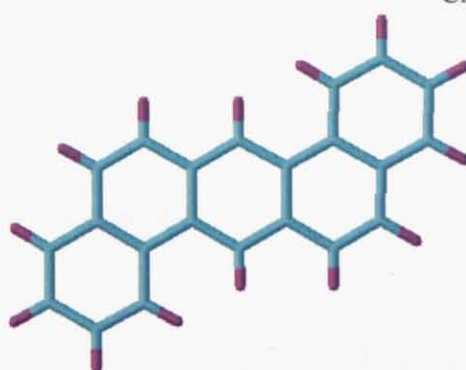
Hydrogen
Carbon



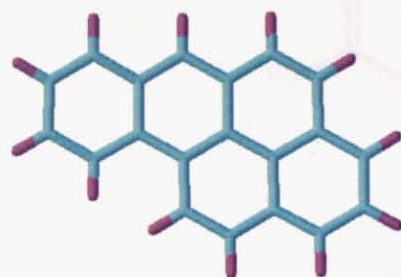
Benzo(g)chrysene
(1,2:3,4-dibenzophenanthrene)
 $C_{22}H_{14}$
MW. 278.35
CAS[196-78-1]



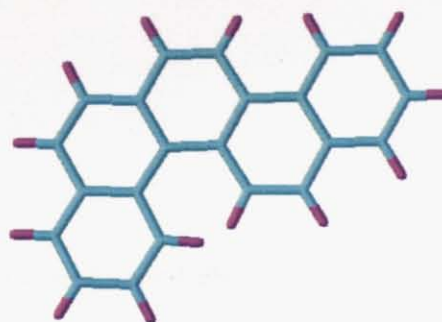
Dibenz(a,j)anthracene
(1,2:7,8-dibenzanthracene)
 $C_{22}H_{14}$
MW. 278.35
CAS[224-41-9]



Dibenz(a,h)anthracene
(1,2:5,6-dibenzanthracene)
 $C_{22}H_{14}$
MW. 278.35
CAS[53-70-3]



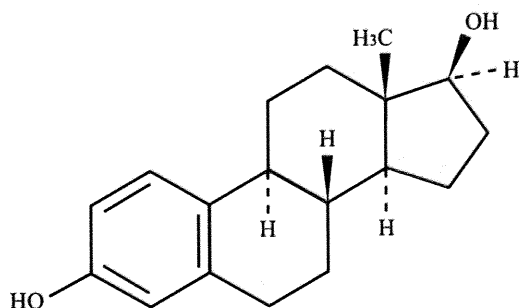
Benzo(a)pyrene
(3,4-benzopyrene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[50-32-8]



Benzo(c)chrysene
(1,2:5,6-dibenzophenanthrene)
 $C_{22}H_{14}$
MW. 278.35
CAS[194-69-4]

Fig. 6. Structure of polycyclic aromatic hydrocarbons

■ Hydrogen
■ Carbon

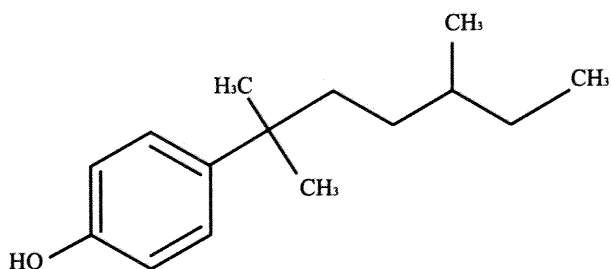


β -Estradiol [estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol]

$C_{18}H_{24}O_2$

MW. 272.38

CAS[50-28-2]



4-Nonylphenol [4-(1,1,4-trimethylhexyl)phenol]

$C_{15}H_{24}O$

MW. 220.35

CAS[25154-52-3]

Fig. 7. Structure of β - estradiol and 4- nonylphenol

2 HPLC を用いた難揮発性物質の微量分析

2.1 天然物の毒

2.1.1 穀物中の黄変米毒チトリニンの測定

人蓄に対して有害な菌類代謝産物（カビ毒）は古くから知られており、なかでもチトリニンは腎障害性の黄変米毒として知られている¹⁾。今では、伊東らにより腎臓に腫瘍を発生させることが報告され²⁾、食品衛生上関心が持たれていた。穀物中のチトリニンの微量分析は、化合物自身強酸性物質であるため、多くの試みが報告されているが非常に困難なものとされていた。報告されているチトリニンの主な分析方法は、TLCで展開後、当該スポットをそのまま、あるいは、増蛍光操作の後、蛍光検出器などで測定する方法が取られてきた^{3~5)}。最近、高感度・高分離能分析方法としてHPLCによる分析法が報告され種々のマイコトキシンの微量定量法に応用されている^{6~8)}がチトリニンなどの強酸性物質は溶離液を酸性とし分離するイオン抑制法では分離が悪くHPLCの使用は困難であった^{8) 10)}。そこで著者らは強酸性、強塩基性物質の分離に有効な手段として逆相分配イオンペアークロマトグラフィー¹²⁾を用いてチトリニンの分析方法を検討したところ良好な結果を得た。

実験方法

(1) 試料

1980年8月に購入した市販の白米、大麦を使用した。

(2) 試薬

エタノール、メタノール、アセトニトリル、イソオクタン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、ベンゼンはいずれも和光純薬工業製の液体クロマトグラフ用試薬を使用した。塩酸、硫酸、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウムは関東化学製の特級品を使用した。カウンターイオン試薬は、ウォーターズ製のPIC・A(テトラブチルアンモニウムホスフェート)試薬を使用した。

カラムクロマト用フロリジル(60~100 mesh)は和光純薬工業製、カラムクロマト用シリカゲルはメルク製のKieselge 160を使用した。カウンターイオン試薬溶液はPIC・A(テトラブチルアンモニウムホスフェート)試薬16 mlにエタノール：水(47：53)の混液を加え全量を1Lにして攪拌後、0.45 μ mのフィルターでろ過し使用した。

チトリニン標準品は *Penicillium citrinum* Thom 菌を 1%ペプトン添加-Czapek 培地に接種、23～25℃で 3 週間平面静置培養した培養ろ液を希塩酸で pH 1 とし、折出する粗チトリニンを集め、シクロヘキサンで再結晶して純品を得た¹⁾。

チトリニン標準溶液はチトリニン 10 mg をカウンターイオン試薬溶液 100 ml に溶解し標準原液(100 μ g/ml)とした。この標準原液をカウンターイオン試薬溶液で希釈して各濃度の標準溶液を調製し使用した。

(3) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ：ウォータース製 M-6000A 型ポンプ、ウォータース製 440 型紫外線検出器

分光光度計：島津製作所製 MPS-5000 マルチパーパス自記分光光度計

フィルター：日本ミリポア製、ポアサイズ 0.45 μ m

濃縮器：桐山製作所製のクデルナ・ダニッシュ型濃縮器

(4) 実験操作

a. 試料溶液の調製

粉碎均一化した試料 20 g を遠沈管に取り酢酸エチル 50 ml、塩化カリウム飽和溶液 50 ml 及び 6N 塩酸 1 ml を加え 10 分間振とう、遠心分離(2500 rpm、10 min)後上澄液を分取した。この上澄液を塩化カリウム飽和溶液 50 ml で洗浄後、5%炭酸水素ナトリウム溶液 30 ml で 3 回抽出した。この抽出液をイソオクタン 50 ml で 1 回洗浄した後、炭酸水素ナトリウム層を 6N 塩酸で約 pH 1 に調製し、酢酸エチル 20 ml で 3 回抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水しろ過後、ろ液をクデルナ・ダニッシュ型濃縮器で約 2 ml まで濃縮した。この濃縮液に静かに窒素ガスを吹きつけて残りの酢酸エチルを揮散させ残渣にカウンターイオン試薬溶液 1 ml を加えて溶かしフィルターでろ過後試料溶液とした。

b. 定性方法

試料溶液 5～30 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し得られたクロマトグラムを保持時間を標準品のそれと比較し同定した。

HPLC の条件

カラム：Partisil 10 ODS-3、250 mm x 6 mm I.D (ウォータース製)

溶離液：エタノール：水（47：53 v/v）（PIC-A 試薬・0.005M テトラブチルアンモニウムイオン）

カラム流量：1 ml / min

紫外線検出波長：波長 254 nm

c. 定量方法

試料溶液 5~30 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し得られたクロマトグラムのピーク高さを測定し、あらかじめ作成した検量線により定量した。

検量線は標準チトリニン(1~10³ ng)の各ピーク高さより検量線を作成した。

Fig. 1 に試験方法の概略を示す。

結果及び考察

(1) HPLC 条件の検討

逆相分配イオンペアクロマトグラフィーの変動ファクターとして溶媒極性、カウンターイオンの種類と濃度、固定相などが考えられる¹¹⁾。これらの条件のうち溶媒極性、カウンターイオンの濃度などを変化させてチトリニンの分析条件を検討した。アセトニトリル-水系、テトラヒドロフラン-水系、メタノール-水系ではチトリニンのピークがブロードになったり、ピークの形状が非対称形のため正確な定量値が得られなかったが、エタノール-水系の溶媒では1本のシャープなピークを示した。そこでエタノール-水系でのチトリニンの分析条件を検討した。まず混合比を一定にした溶離液エタノール-水混合液(40：60 v/v)を調製しカウンターイオン濃度を変化させた場合のチトリニンの保持容量を測定した(Fig. 1)。続いてカウンターイオン濃度(0.005M テトラブチルアンモニウムイオン)を一定にしてエタノール-水の混合比を変化させた場合の保持体積の変化を Fig. 2 に示す。いずれも流量は1 ml/minとした。溶離液の極性を高くすると保持体積は増加したが、カウンターイオン濃度を高めると同様に保持体積は増加しピークもブロードとなった。チトリニンの保持体積に及ぼす影響はカウンターイオン濃度よりも溶離液の極性に大きく影響されることがわかった。以上の結果を考慮して溶離液組成はエタノール-水(47：53 v/v)、テトラブチルアンモニウムイオンは0.005 Mとし、流量は1 ml/minとした。この時の標準チトリニンのクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

(2) チトリニンの検出波長の選択

HPLC を行う上で紫外線検出器の波長の選択は、高感度を維持しつつ妨害物の影響を少なくするために重要である。Phillips ら¹³⁾ はチトリニンを 0.25N リン酸-アセトニトリル-イソプロパノール(55 : 35 : 10 v/v)の溶媒系で検出波長 340 nm で測定している。エタノール-水系溶媒中のチトリニンの吸収スペクトルは、Fig. 4 に示すように、255 nm 付近と 318 nm 付近に極大吸収がある。この溶液にカウンターイオン試薬を添加しても吸収スペクトルの変化は観察されなかった。チトリニン分析の最適波長を見つけるために波長 254 nm、313 nm の各検出波長を用い実際に HPLC 検出器で測定した結果、波長 313 nm に比べ波長 254 nm は約 25 倍高い感度を示し優れていた。Marti ら¹⁰⁾ はチトリニンの蛍光特性を利用し励起波長 (Ex.) 325~285 nm、蛍光波長 (Em.) 451 nm 以上の波長を用い測定している。しかし、エタノール-水系溶媒にカウンターイオン試薬を添加するとチトリニンの蛍光は消失するので測定することができなかった。

(3) 検量線と検出限界

実験操作 c. 定量方法に従って作成した検量線は $1 \sim 10^3$ ng の範囲にわたって良好な直線性を示した。検量線の一例を Fig. 5 に示す。この方法での検出限界は 20 ng/g であった。

(4) 穀物からの抽出及びクリーンアップ

多くの妨害物を含む穀物から目的物質を抽出するには抽出率の高いことはもちろんのこと操作が容易でかつ迅速でなければならない。大麦を試料としてクリーンアップの検討を行った。エタノール、5 %炭酸水素ナトリウム溶液抽出、アセトニトリル、4 %塩化カリウム溶液及び 20 %硫酸抽出は抽出操作過程で多くのエマルジョンを作るため問題があったが、酢酸エチル、6N 塩酸及び塩化カリウム飽和溶液抽出ではエマルジョンを作ることなく、また HPLC のクロマトグラム上に妨害ピークは見られなかった。

一方、フロリジルカラム(フロリジル 1 g を内径 10 mm、長さ 300 mm のクロマト管に酢酸エチルで湿式充てんした)を用い、チトリニンのクリーンアップをクロロホルム 20 ml、ベンゼン 20 ml、アセトニトリル-塩酸溶液 (95 : 5 v/v) 20 ml を用いて検討したところ、回収率は 45~50 %以下であった。この条件では、チトリニンはアセトニトリル-塩酸混合液 (95 : 5 v/v) で溶出するが、一部がフロリジルカラムに吸着し溶出しないためと考えられる。また、シリカゲルカラムも同様な性質を示し、カラムクロマトグラフィーによる

クリーンアップは困難と考えた。一方、Fig. 6 に示す方法はカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップの必要がなく操作が簡便、迅速であった。

(5) 添加回収実験

チトリニンはかなり不安定な物質であるため回収率が低くまた回収率にバラツキがあり、微量分析は困難な物質である。粉碎均一化した大麦 20 g にチトリニンが 5 μ g/ml 含有する酢酸エチル溶液 1 ml を加えよく混合し、次いで 30 分間放放置したのち Fig. 6 の方法で測定したチトリニンの HPLC クロマトグラムを Fig. 7 に示す。この時の回収率は 66 %であった (Table 1)。この値は Marti ら¹⁰⁾ の方法と同様に高い再現性を示した。

(6) 市販穀物中のチトリニンの定量

前述の実験方法に従い白米 5 検体、大麦 5 検体について測定を行ったがいずれの試料からもチトリニンは検出されなかった。

まとめ

逆相分配イオンペークロマトグラフィーを用いることにより穀物(白米、大麦)中のチトリニンを迅速、かつ高感度に分析する方法を確立することができた。充填剤は ODS 系、溶離液はエタノール-水系が分離能、再現性に優れ良好な結果を与えた。

検量線は 1~10³ ng の範囲で直線性を示した。大麦に 0.25 μ g/g になるようにチトリニンを添加した回収実験での回収率は 66 %であった。また、市販の穀物からチトリニンは検出されなかった。以上の結果から逆相分配イオンペークロマトグラフィーは強酸、強塩基性の他のマイコトキシンの分離分析法としても適用できる可能性を示唆している。

文 献

- 1) 角田 廣, 辰野高司, 上野芳夫: マイコトキシン図説, 53 (1979) 地人書館, 東京.
- 2) Y. Shinohara, M. Arai, K. Hirano, S. Sugihara, K. Nakanishi, H. Tsunoda, N. Ito : *Gann.* 67, 147 (1976).
- 3) A. Gimeno : *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 62, 579 (1979).
- 4) V. R. Chalam, M. H. Stahr : *ibid.*, 62, 570 (1979).

- 5) 武田由比子, 五十畑悦子, 天野立爾, 内山 充, 中尾美津男 : 食衛誌. 17,193 (1976).
- 6) E. T. Moller, E. Joeffssos : *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 63, 1055 (1980).
- 7) A. W. Pons, A. O. Jr. Frans : *ibid.*, 61, 793 (1978).
- 8) G. Ware, W. L. Thorpe : *ibid.*, 61, 1058 (1978).
- 9) 五十畑悦子 : 防菌防黴, 4, 425 (1976).
- 10) R. L. Marti, M. D. Wilson, D. B. Evans : *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 61, 1353 (1978).
- 11) 波多野博行, 花井俊彦 : 実験高速液体クロマトグラフィー, 149 (1979) 化学同人, 東京.
- 12) 波多野博行編 : 新・高速液体クロマトグラフィー, 35 (1978) 南江堂, 東京.
- 13) D. R. Phillips, W. A. Hayes, O. W. Berndt : *J. Chromatography.*, 19, 419 (1980).

2.1.2 穀物中の黄変米毒ルテオスカイリンの測定

マイコトキシンは発癌性をはじめとして種々の毒性が知られており食品衛生上関心が持たれている。なかでもアンスラキノン系色素化合物は約数十種知られており、なかには癌原性や肝臓毒性を有するものも見出されている。ルテオスカイリン¹⁾はジアンスラキノン系代謝産物の代表的なマイコトキシンで発癌性等の中毒学的研究については詳細に報告されているが^{2) 3)}、食品汚染等を対象とした微量分析法としての報告例は少ない^{4) 5)}。そこで穀物中のルテオスカイリンとその同族体のルブロスカイリンについて HPLC を用いる迅速かつ精度の高い分析法を構築した。

実験方法

(1) 試料

1983 年 8 月に購入した市販の白米を使用した(1982 年度産米)。

(2) 試薬および標準物質

試薬は特級品あるいは残留農薬試験用試薬を用いた。ルテオスカイリン、ルブロスカイリン標準品は *Penicillium islandicum* Sopp 菌を Czapek 培地に接種、23~25℃で2週間平面静置培養したのち菌体と培養ろ液を分けた。乾燥、粉末化した菌体をヘキサソールで順次抽出しメタノール抽出物質について活性炭を充填剤とするカラムクロマトグラフィーを行ない粗ルテオスカイリン、粗ルブロスカイリンを得た。これを再結晶し純品を得た¹⁾。これらの化合物はマススペクトルで同定した。構造式を Fig. 8 に示す。

(3) 装置

高速液体クロマトグラフはウォーターズ製 M-600A 型ポンプ、検出器はウォーターズ社製 440 型紫外線検出器(254 nm)、日本分光製 UVDEC-100-III 型可視光検出器(429 nm)、日立製作所製 MPF-4 型分光蛍光光度計を用いた。

(4) 実験操作

a. 試料溶液の調製

粉碎均一化した試料 20 g にアセトニトリル-6N 塩酸(9 : 1 v/v)の混合液 50 ml を加え 10 分間振とう、遠心分離(2500 rpm、10 min)後、上澄液を分取した。この上澄液を正確に

25 ml 分取し、イソオクタン 20 ml で 2 回洗浄したのちアセトニトリル層に水 50 ml を加え、エチルエーテル 50 ml で 3 回抽出した。エチルエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過後、クデルナ・ダニッシュ型濃縮器で約 2 ml まで濃縮した。この濃縮液に静かに窒素ガスを吹きつけて残りのエチルエーテルを揮散させ、残渣をアセトニトリルに溶かし、ミリポアフィルター(0.45 μ m)でろ過して試料溶液とした。

b. 定性方法

試料溶液 10~50 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムの保持時間を標準品と比較し、定性分析を行なった。

HPLC の条件

カラム: Perkin- Elmer /Analytical PAH 250 mm x 2.6 mm I.D

溶離液: アセトニトリル-水-酢酸 (40 : 59.5 : 0.5 v/v)

流速: 0.7 ml / min

検出波長 : 429 nm

c. 定量方法

試料溶液 10~50 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さを測定し、あらかじめ作成した検量線により定量した。

検量線の作成 : 標準ルテオスカイリン、ルブロスカイリンの各ピーク高さより検量線を作成した。

結果および考察

(1) HPLC の条件の検討

ジアンスラキノ系色素化合物は酸性物質なので、溶離液を酸性として分離するイオン抑制法を用いた。ODS 系のカラム充填剤として Lichrosorb RP-18、Unisil C₁₈、Perkin-Elmer/Analytical PAH、溶離液はメタノール-水系、エタノール-水系、アセトニトリル-水系を用いて検討した結果、カラム充填剤は、Perkin-Elmer/Analytical PAH、溶離液はアセトニトリル-水系が未知物質との分離にすぐれていた。またルテオスカイリン、ルブロスカイリンとを同時に検出することを考慮して HPLC 条件として流速は 0.7 ml / min、溶離液はアセトニトリル-水-酢酸(40 : 59.5 : 0.5 v/v)とした。

(2) 検出波長の選択

可視、紫外および蛍光検出波長について検討した。Fig. 9 に可視・紫外部吸収スペクトルを示す。アセトニトリル-水系での主な吸収ピークは、ルブロスカイリンで 245 nm、429 nm である。ルテオスカイリンとルブロスカイリンを同時に HPLC で感度良く検出できる共通の検出波長は、可視 429 nm、紫外 254 nm である。ルテオスカイリンの蛍光スペクトルを Fig. 10 に示す。

Fig. 3 に示すように励起波長 420 nm、蛍光波長 475 nm 付近に極大吸収が観察されるが水の含有量が多くなるとルテオスカイリンの蛍光は弱まり、蛍光検出器による測定は困難であった。ルブロスカイリンは蛍光が観察されなかった。また、これらに 0.5 %に相当する酢酸を加えても各スペクトルの変化は観察されなかった。

これらの波長を用いて測定した標準物質のクロマトグラムを Fig. 11 に示す。最初にルブロスカイリン(保持時間 5 min)のピーク、つぎに小さい未知ピーク(保持時間 12 min)、最後にルテオスカイリン(14 min)のピークが出現する。

(3) 検量線と検出限界

定量方法に従って作成した検量線は Fig. 12 に示すように原点を通る直線性を示す。また本法による検出限界は可視光(波長 429 nm)で測定した場合、ルテオスカイリン、ルブロスカイリン共に 10 ng / g であった。

(4) 抽出・クリーンアップおよび添加回収

粉碎均一化した白米 20 g にルブロスカイリンとルテオスカイリンが 125 ng / ml 含有するアセトニトリル溶液 1 ml を加えよく混合したのち抽出、クリーンアップおよび添加回収の検討を行なった。

抽出方法はアセトニトリル・6N 塩酸抽出、酢酸エチル・6N 塩酸および塩化カリウム飽和溶液抽出、カラムクロマトグラフィーはセルロース、シリカゲル充填剤を用いた。カラムクロマトグラフィーは充填剤への吸着等があり、回収率が悪く困難であった。抽出はアセトニトリル・6N 塩酸抽出がエマルジョン等を作ることがなく良好であった。また可視光(波長 429 nm)で測定したとき HPLC のクロマトグラム上に妨害ピークは検出されずルブロスカイリン、ルテオスカイリン共に感度良く測定することができた。また紫外線(波長 254 nm)

で測定した場合、妨害物質の影響のためこれらの化合物の測定は困難である(Fig. 13)。

本法に従って操作し回収率を求め、Table 2 に示す。この時の平均回収率はルブロスカイリン 95 %、ルテオスカイリン 72 %であった。

(5) 市販白米中のルブロスカイリンとルテオスカイリンの定量

実験方法に従い白米検体について分析を行なったがいずれの試料からも検出されなかった。

・ルテオスカイリンに含まれる不純物(Pi-1)の単離およびその細胞毒性について

ルテオスカイリンの粗結晶中には、HPLC による分析で微量ではあるが不純物(Pi-1)が混在していることが明らかになった⁶⁾。この化合物は以前からルテオスカイリンの不純物として混在していることが蛍光分析等の結果から知られており分離が困難な物質として注目されていた。従来行なわれたルテオスカイリンの中毒学的、病理学的研究には微量ではあるが不純物(Pi-1)が混在するルテオスカイリンが用いられた可能性も考えられる。そこで HPLC でルテオスカイリンとこの不純物(Pi-1)を完全に分離し、これらの細胞毒性を明らかにした。

実験方法

(1) 試薬および装置

試薬はいずれも特級あるいは残留農薬試験用試薬(関東化学製)を用いた。高速液体クロマトグラフはウォーターズ製 M-6000A 型ポンプ、検出器はウォーターズ製 440 型紫外線(254 nm) 検出器を用いた。

(2) 実験操作

a. 菌の培養および代謝産物の分析

Penicillium islandicum Soop 菌を Czapek 培地に接種し、23~25℃で2週間平面静置培養したのち菌体と培養ろ液を分けた。乾燥、粉末化した菌体をヘキサン、メタノールで順次抽出し、メタノール抽出物質について活性炭を充填剤とするカラムクロマトグラフィーを行ない黄色の流出物質をアセトンにより再結晶し黄色の結晶を得た⁶⁾。

TLCは5%シュウ酸で処理したメルク製 HPTLC (Kieselgel 60 F254)プレートを、ベンゼン-酢酸エチル-2,2,4-トリメチルペンタノール(10 : 6 : 6 : 0.5v/v)を溶媒として暗所で展開した。

HPLC 条件

カラム : Perkin- Elmer/Analytical PAH 250 mm x 2.6 mm I.D

溶離液 : アセトニトリル-水-酢酸(40 : 59.5 : 0.5 v/v)

流速 : 0.7 ml / min

検出波長 : 254 nm

b. 分取用 HPLC による化合物の精製

活性炭カラムクロマトグラフィーによって得られた結晶をアセトンに溶かして高速液体クロマトグラフに注入し各ピーク部分を分取した。

HPLC 条件

カラム : Perkin-Elmer / Preparative HCODS 250 mm x 22 mm I.D

溶離液 : アセトニトリル-水-酢酸(40 : 58.5 : 1.5 v/v)

流速 : 9 ml / min

検出波長 : 254 nm

分取した各溶液は、約3倍の水を加えエチルエーテルで抽出後水洗し、このエチルエーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥ろ過後、溶媒を減圧留去した。

c. 細胞毒性試験

(a) 吉田肉腫細胞を用いた細胞毒性試験

吉田肉腫細胞は20%ウシ胎児血清を加えたDM-160組織培養液中に浮遊(2×10^5 細胞/ml)させたのち、各バイアルビンに2mlずつ分注した。次に各濃度の化合物を加え、ゴム栓をして37°Cで3日間培養し、その生細胞数を算定した。

(b) ラットヘパトーマ細胞 H4-II-E 株を用いた細胞毒性試験

ラットヘパトーマ細胞(H4-II-E株)は5%ウシ胎児血清を加えたMEM組織培養液中に浮遊(2×10^5 細胞/ml)させたのち、直径16mmの各ウェルに0.1mlずつ分注した。このウェルを炭酸ガス恒温器(7%炭酸ガス)に入れ37°Cで1日培養後、各濃度の化合物を加えた。

細胞はさらに 37℃の炭酸ガス恒温器（7% 炭酸ガス）に入れ2日間培養したのち、トリパンブルーで染色を行ない生細胞数を算定した。

結果および考察

(1)化合物の単離

従来、ジアンストラキノ系化合物の分離はシュウ酸で処理したシリカゲルを用いた分取用 TLC あるいはカラムクロマトグラフィーにより行なわれているが、この方法は煩雑で時間がかかりルテオスカイリン等の化合物は光で短時間に変化する等の問題があった。分取用 HPLC を用いることにより分離が困難であったルテオスカイリンと不純物 (Pi-1) を容易に分離することが出来た。そこで活性炭カラムクロマトグラフィーによって得られた結晶は TLC および分析用 HPLC を用いて検討した。TLC においては Fig. 14 に示すように Rf 値 0.4 にルテオスカイリンの強い黄色蛍光スポット、Rf 値 0.33 に黄色の蛍光スポットが観察された。分析用 HPLC のクロマトグラムを Fig. 15 に示す。この条件で約 14 分にルテオスカイリン約 12 分に不純物 (Pi-1) のピークが出現した。このピークの比からルテオスカイリンの約 1/6 の不純物 (Pi-1) が含まれていると考えられる。この化合物は TLC で Rf 値 0.33 の化合物と同一の物質であり、従来ルテオスカイリンと混在する化合物であることが確認された。これらの結果より分取用 HPLC を用いてルテオスカイリンと不純物 (Pi-1) の単離、精製を行った。

(2) 構造研究

ルテオスカイリンのマススペクトルは Fig. 16 に示すように、 m/z 574(M^+)、 m/z 286、270 に特徴のあるマスフラグメントピークが見られる。またその同族体のルブロスカイリンも同様なマスフラグメントピークが見られる。Pi-1 には m/z 558(M^+)、 m/z 286、270、256 のマスフラグメントピークが見られる。これらの結果から Pi-1 はルテオスカイリン、ルブロスカイリンよりも分子量が 16 少ない $C_{30}H_{42}O_{11}$ のジアントラキノ系化合物であろうと推定される。400MHz NMR スペクトルデータを Table 3 に示す。ルテオスカイリンは対称系の二量体構造をもち 6,6' 位、2,2' 位等のプロトンシグナルは各 2 個分のプロトンの吸収が見られた。一方 Pi-1 は 6,6' 位、2,2' 位等のプロトンは各 1 個分のプロトンの吸収が見られる。デカップリング等を詳細に検討したところ、Pi-1 はルテオスカイリンの 8' 位の水酸基が水素におきかわった構造であることが判った。Pi-1 は Shibata ら⁷⁾ が報告して

いるデオキシルテオスカイリンとスペクトルデータがよく一致することがわかった(Fig. 17)。

(3) ルテオスカイリンとデオキシルテオスカイリンの細胞毒性

ルテオスカイリンの毒性試験に関する報告^{8~10)}は数多く発表されてきたがデオキシルテオスカイリンに関しては報告されていない。デオキシルテオスカイリンは Fig. 18 に示すようにラットヘパトーマ細胞に対して $1.2\mu\text{g/ml}$ の濃度で 50% 生育阻害活性を示しルテオスカイリンは $0.17\mu\text{g/ml}$ の濃度で 50% 生育阻害活性を示した。また吉田肉腫細胞(Fig. 19)に対してデオキシルテオスカイリン、ルテオスカイリンは各々 $0.31\mu\text{g/ml}$ 、 $0.15\mu\text{g/ml}$ の濃度で 50 % 生育阻害活性を示す。

まとめ

HPLC を用いることによりルブロスカイリンとルテオスカイリンを ppb レベルで迅速かつ高感度に分析することができた。充填剤は ODS 系、溶離液はアセトニトリル-水系が分離能、再現性に擾れていた。一方、この分析方法は他のジアンスラキノン系色素についても適用できると思われる。また 12 分に出現する未知ピークは、従来ルテオスカイリンと混在するが分離不能とされた成分である。上記の条件でこの成分が分離されることが判明した。

化合物ルテオスカイリンは ODS 系充填剤、溶離液にアセトニトリル-水系を用いた分取 HPLC で容易に分離精製することができた。ルテオスカイリンに微量ではあるが不純物として混在し分離が困難とされていた化合物はデオキシルテオスカイリンであることが明らかになった。

ルテオスカイリンの毒性試験に関する報告が数多く発表されてきたが、今回単離され、ルテオスカイリンに不純物として含まれているデオキシルテオスカイリンが強い毒性をもつとすれば、ルテオスカイリンの毒性試験の結果も再検討しなければならないと考えられるが、2 種の細胞についてであるがデオキシルテオスカイリンの細胞毒性はルテオスカイリンの約 $1/2\sim 1/7$ であり、その含有量は最高でもルテオスカイリンの約 $1/6$ であることから、従来ルテオスカイリンの毒性と考えられていたものはルテオスカイリンのものであると考えてよいと推測された。

文 献

- 1) 角田 廣, 辰野高司, 上野芳夫: マイコトキシン図説, 93 (1979) 地人書館 東京.

- 2) M. Saito, M. Enomoto, T. Tatsuno : *Microbial Toxins.*, 6, 229 (1971), Acad. Press. Inc., New York and London.
- 3) K. Uruguchi, M. Saito, Y. Noguchi, K. Takahasi, M. Enomoto, T. Tatsuno : *Fd. Cosmet Toxicol.*, 10, 193 (1972).
- 4) 辰野高司, 若松秀行, 金沢裕子, 佐藤泰子, 角田 廣 : 薬学雑誌, 77, 689 (1957).
- 5) 辰野高司, 若松秀行, 金沢裕子, 佐藤泰子, 角田 廣 : 薬学雑誌, 77, 692 (1957).
- 6) 中川友夫, 河村太郎, 藤本康雄, 辰野高司 : マイコトキシン, 18, 31 (1983).
- 7) N. Takeda, S. Seo, Y. Ogihara, U. Sankawa, I. Iitak, I. Kitagawa, S. Shibata : *Tetrahedon.*, 29, 3703 (1973).
- 8) M. Umeda : *Acta Path. Japan.*, 14, 373 (1964).
- 9) Y. Ueno, K. Kubota : *Cancer Res.*, 36, 445 (1976).
- 10) Y. Ueno, M. Nakajima : *Chem. Phar. Bull.*, 22, 2258 (1974).

Table 1. Reproducibility and recovery

Sample		Found (μ g)
1		nd
2		nd
3		nd
1	Spiked with 5μ g citrinin	3.2
2		3.2
3		3.4
Recovery		66%

nd: not detected

Table 2. Reproducibility and Recovery

Sample (Polished rice)	Found	
	Rubroskyrin (μg)	Luteoskyrin (μg)
1	nd	nd
2	nd	nd
3	nd	nd
1 } 2 } 3 }	2.3 2.4 2.4	1.8 1.9 1.7
Spiked with 2.5 μg mycotoxins		
Recovery		95% 72%

nd: not detected

Table 3. Proton chemical shifts(δ , 400MHz) of luteoskyrin and Pi-1

Solvent		H ₆	H _{6'}	H ₂	H _{2'}
Luteoskyrin	CDCl ₃	7.18		4.84	
Pi-1	CDCl ₃	7.18	7.11	4.84	4.70

H ₁	H _{1'}	H ₃	H _{3'}	H _{8'}	CH ₃	CH _{3'}
3.48		3.02		-----	2.35	
3.48	3.55	3.02	2.99	7.49	2.35	2.45

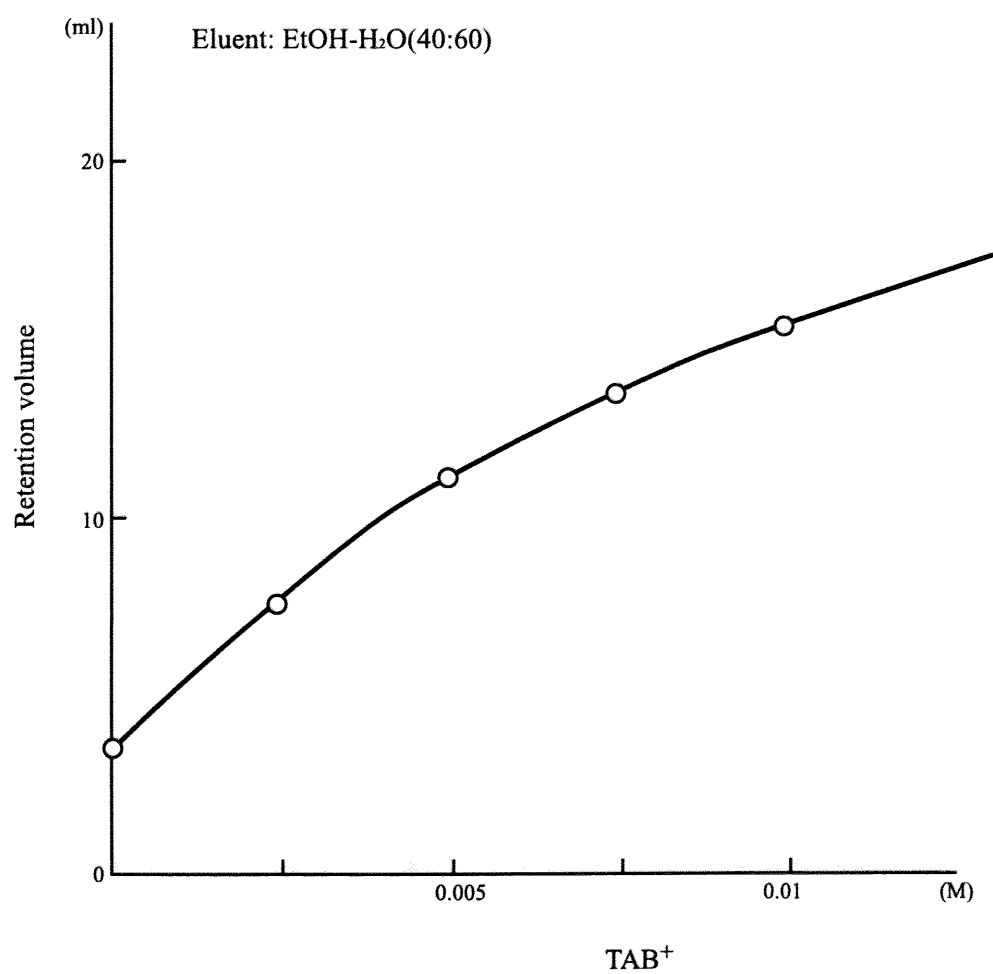


Fig. 1. Effect of counter-ion concentration on retention volume of citrinin
TAB⁺: tetrabutylammonium

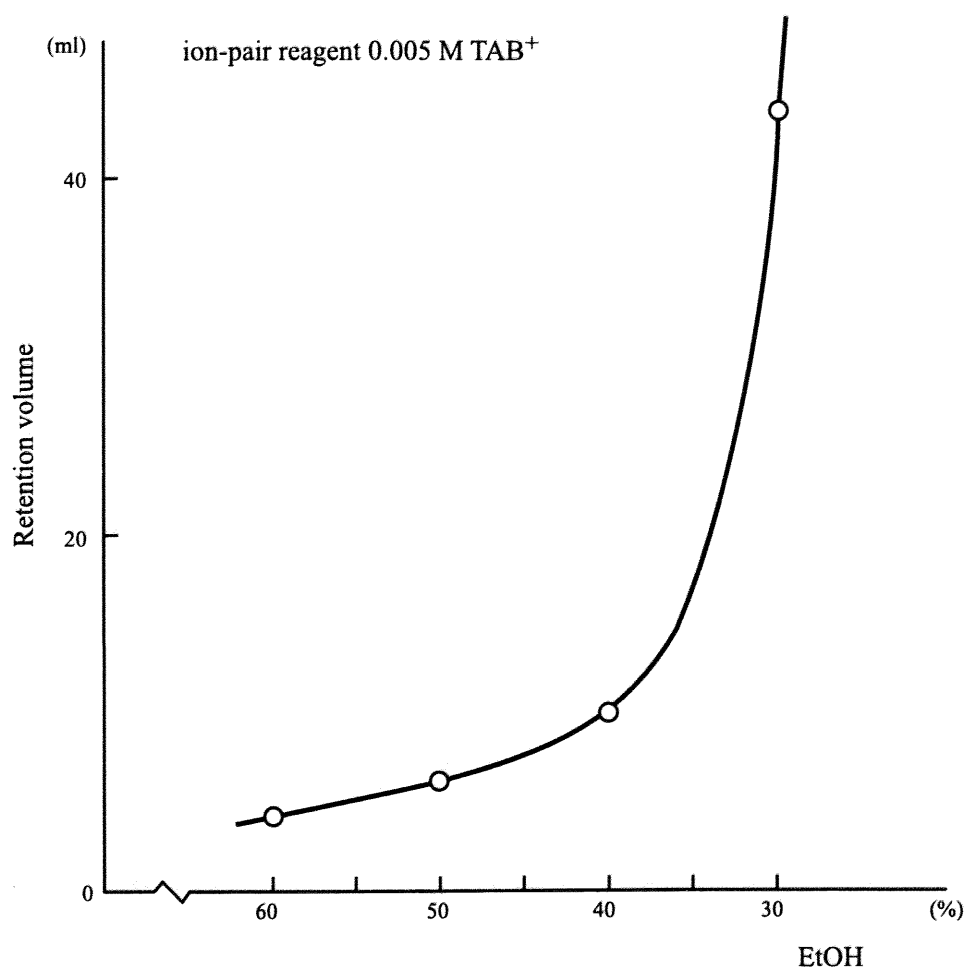
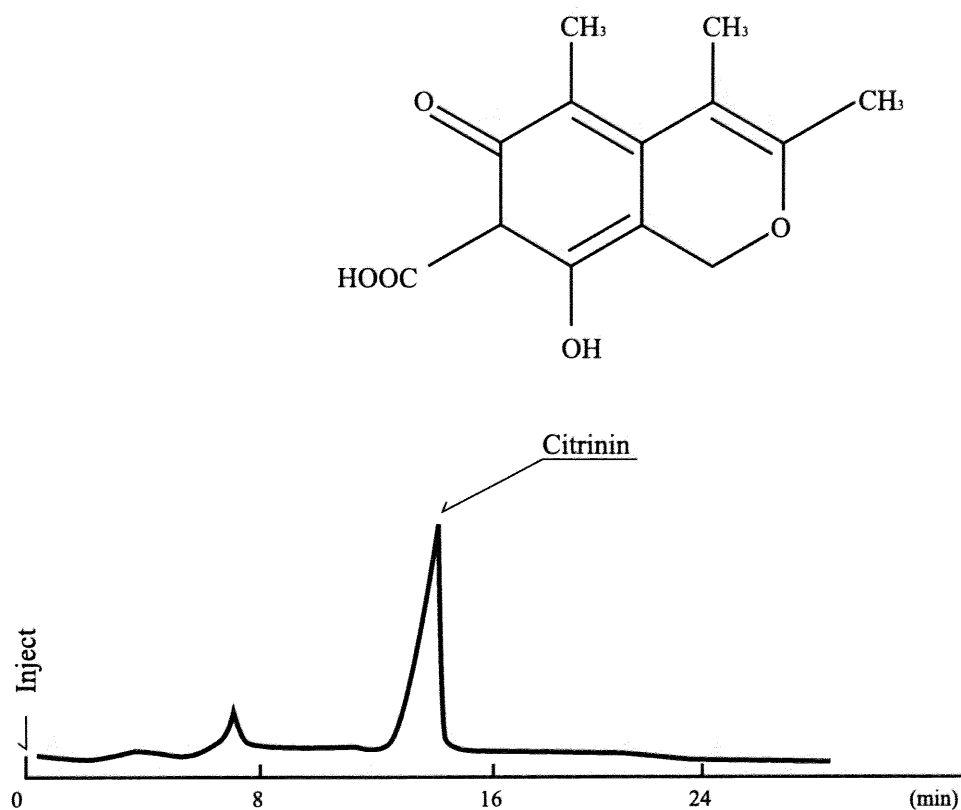


Fig. 2. Effect of mobile phase polarity on retention volume of citrinin



**Fig. 3. Reversed-phase ion-pair
partition chromatogram of citrinin**
Operating conditions
Column: Partisil-10 ODS-3 (6mm ϕ ID $\times$ 250mm)
Mobile phase: EtOH – H₂O (47:53)
Counter-ion reagent:
Tetrabutylammonium phosphate, 0.005M
Flow rate: 1ml/min
Detection: UV 254nm

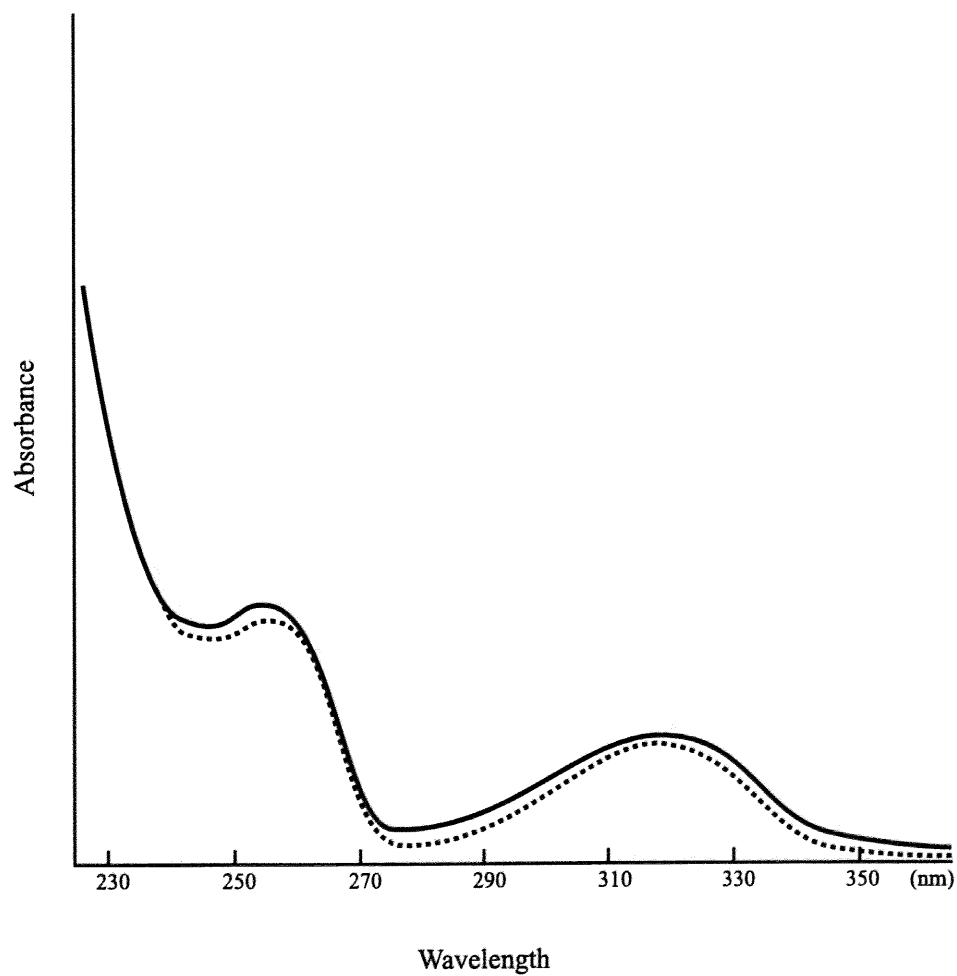


Fig. 4. UV spectra of citrinin
— : citrinin in EtOH—H₂O (47:53)
..... : citrinin in EtOH—H₂O (47:53)+ TAB⁺ 0.005M
TAB⁺ : tetrabutylammonium

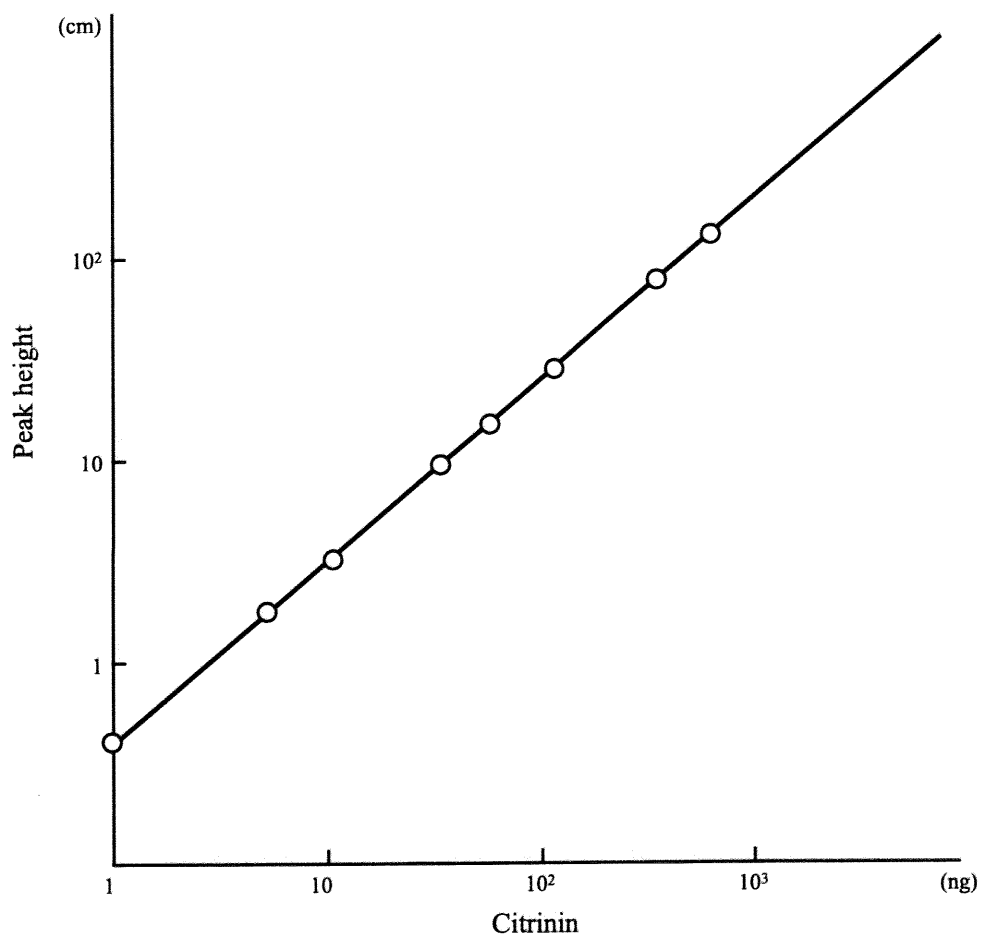


Fig. 5. Calibration curve of citrinin

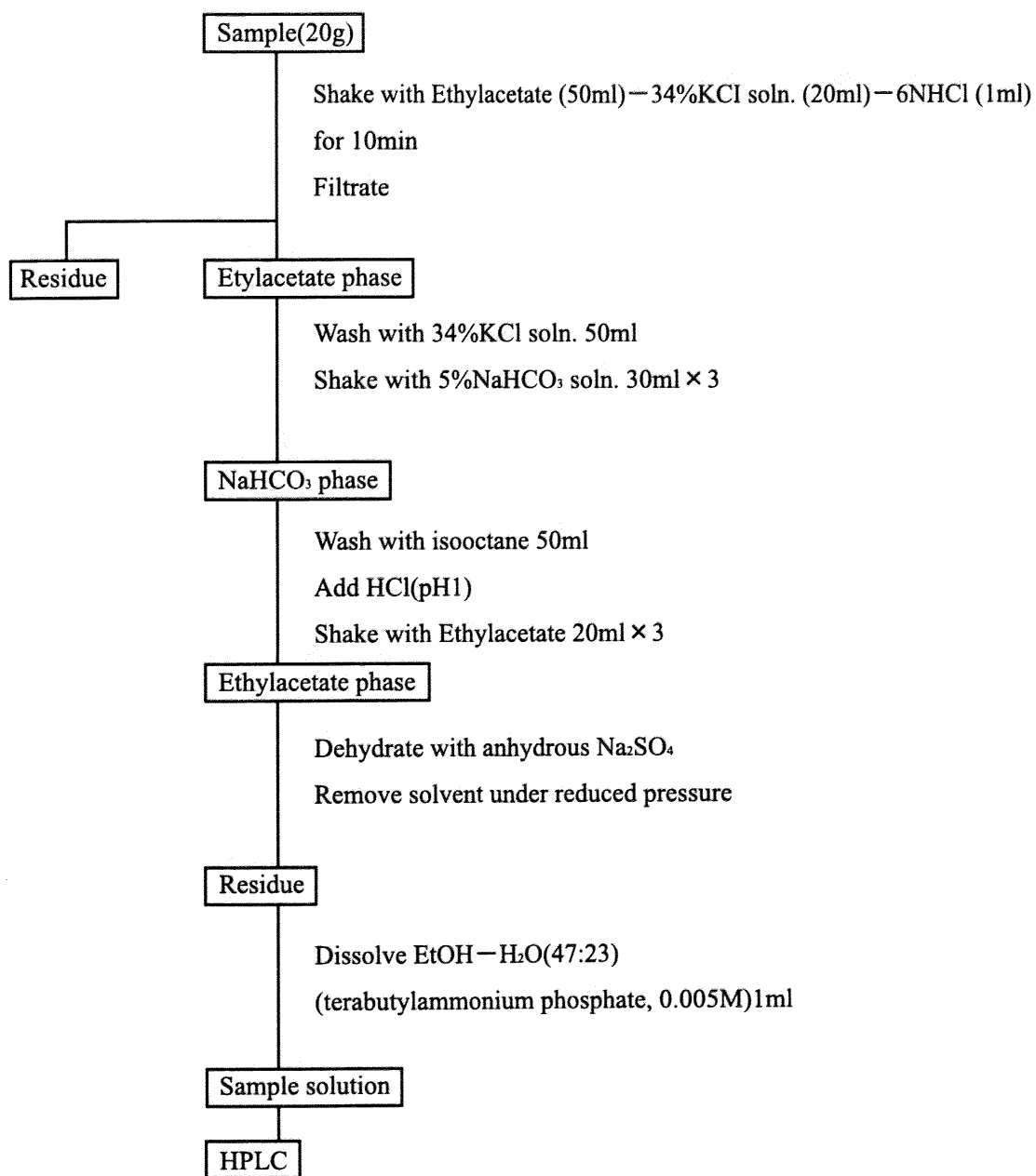


Fig. 6. Sample preparation of citrinin for HPLC

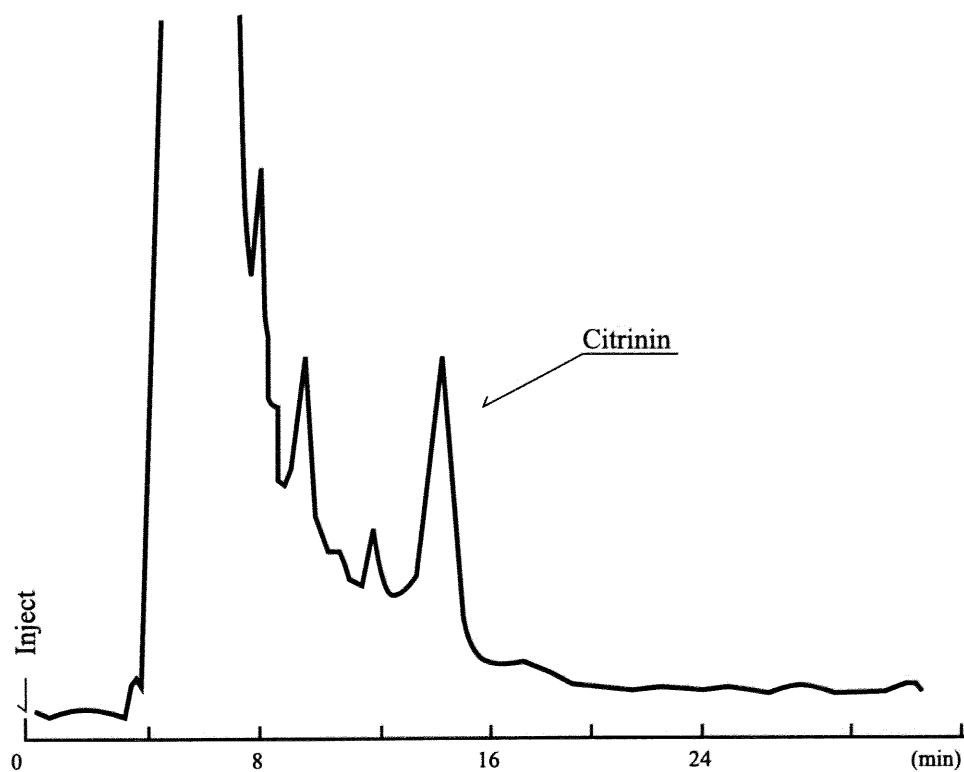
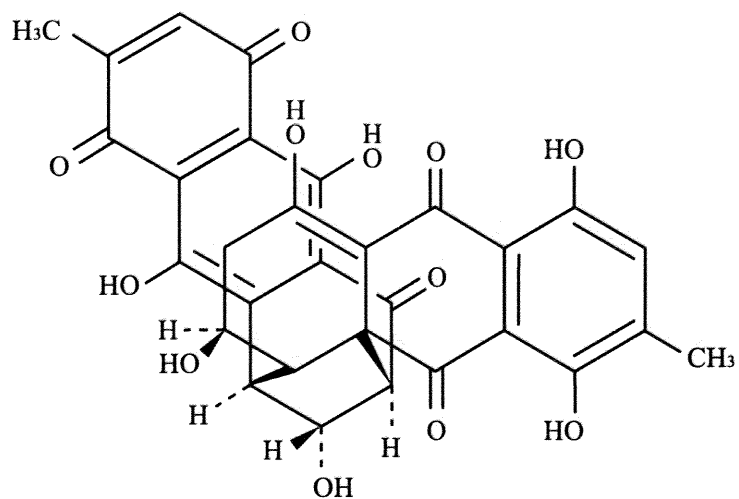
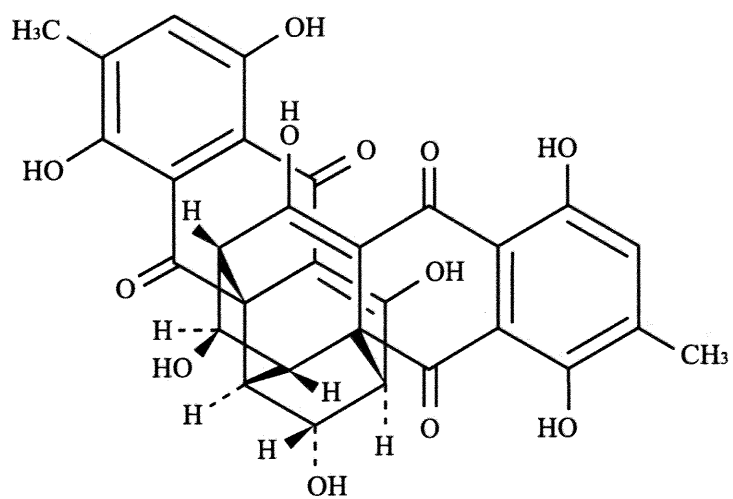


Fig. 7. Chromatogram of a barley extract spiked with 250ppb of citrinin standard



(-) - rubroskyrin



(-) - luteoskyrin

Fig.8. Structure of (-) - rubroskyrin and (-) - luteoskyrin

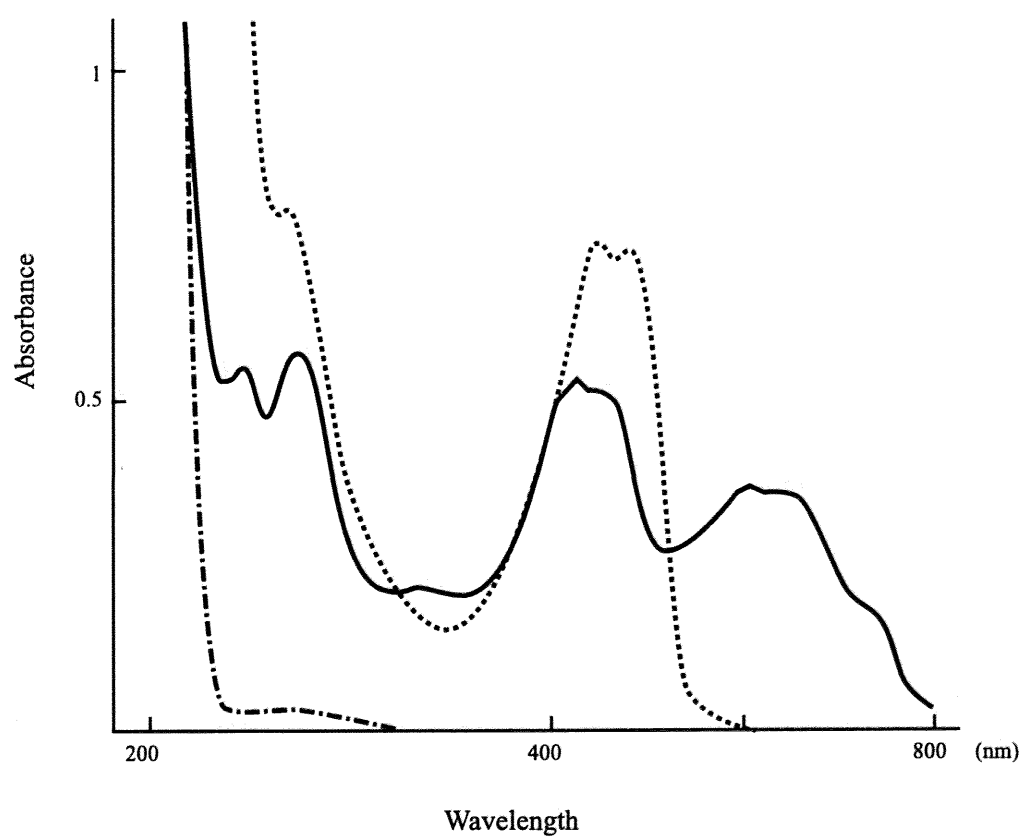


Fig. 9. Ultraviolet and visible absorption spectra

— : rubroskyrin
..... : luteoskyrin
.-.-.- : blank

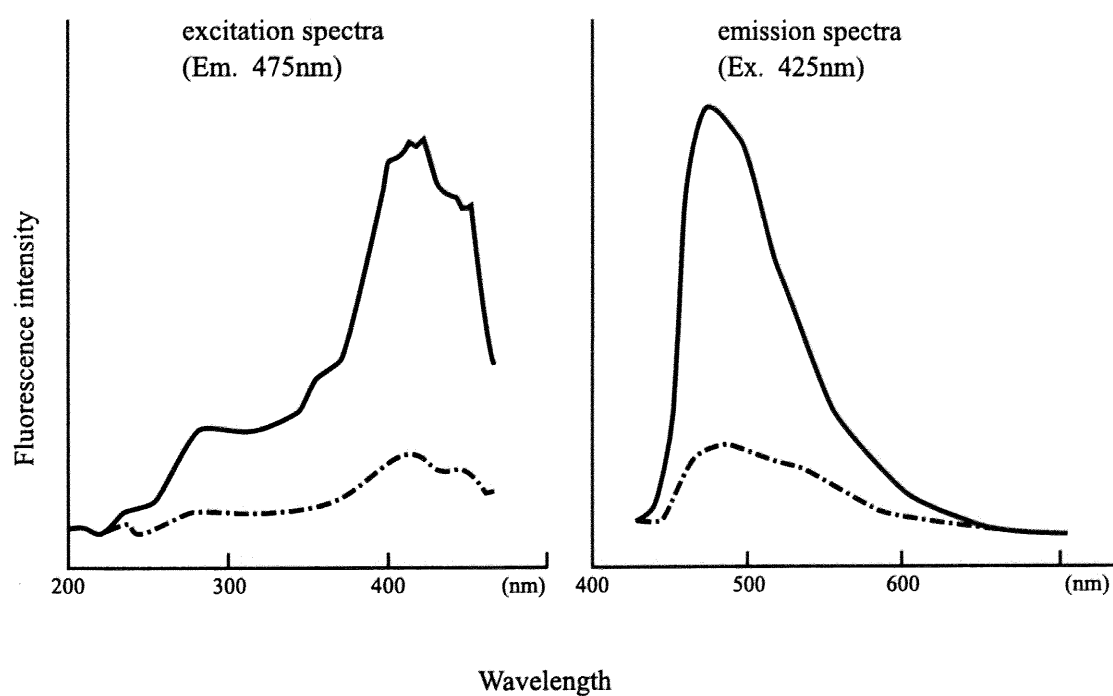


Fig. 10. Excitation and emission spectra of luteoskyrin
 — : luteoskyrin in CH_3CN
 - · - · : luteoskyrin in $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$
 (40:60)

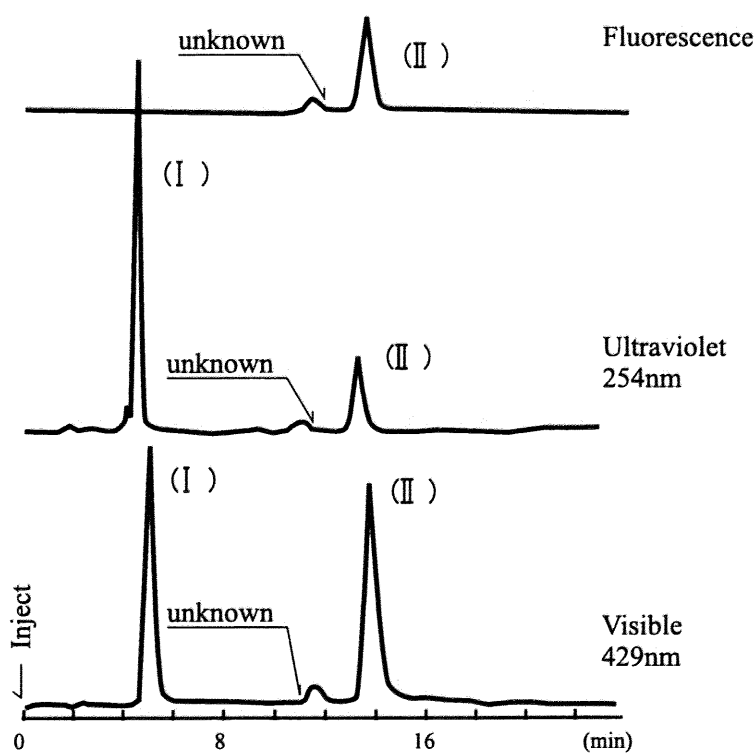


Fig. 11. High performance liquid chromatography of mycotoxins

Sample : (I) rubroskyrin

(II) luteoskyrin

**Solvent : $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{COOH}$
(40:59.5:0.5)**

Flow rate: 0.7ml/min

**Column : Perkin-Elmer/Analytical PAH
(2.6mm ϕ $\times$ 250mm)**

**Detector : Visible 429nm, Ultraviolet 254nm
Fluorescence Ex. 420nm, Em. 470nm**

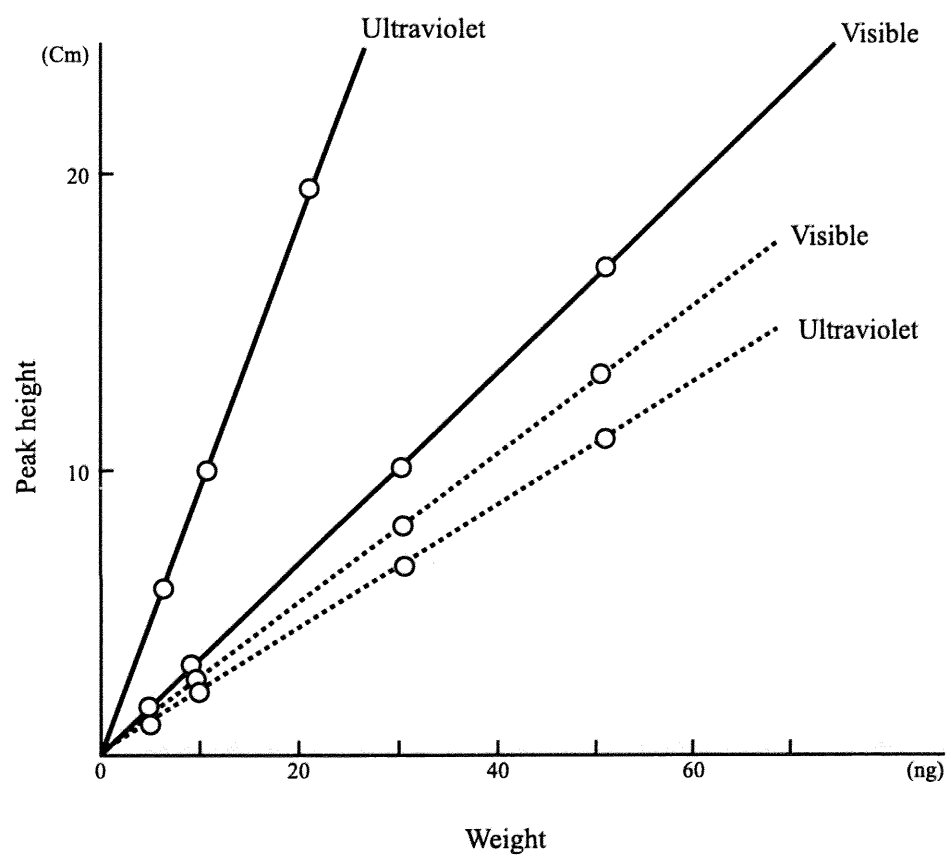


Fig. 12. Calibration curve

— : rubroskyrin

..... : luteoskyrin

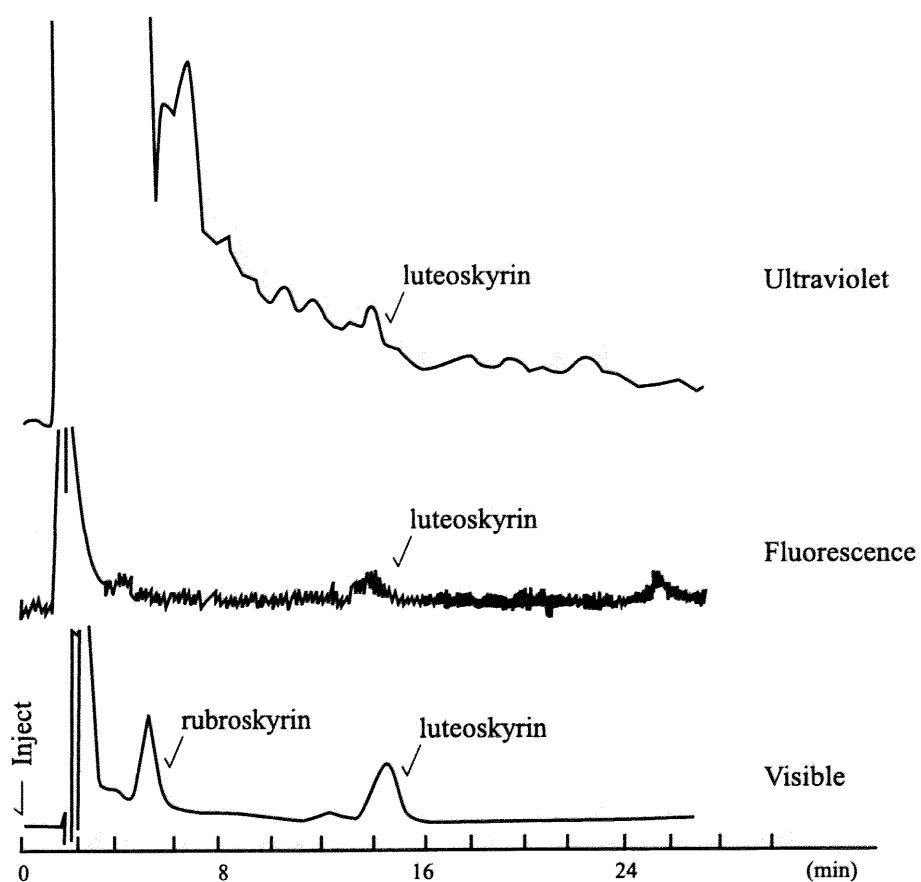


Fig. 13. High performance liquid chromatography of a rice extract spiked with 125ppb of mycotoxins standard

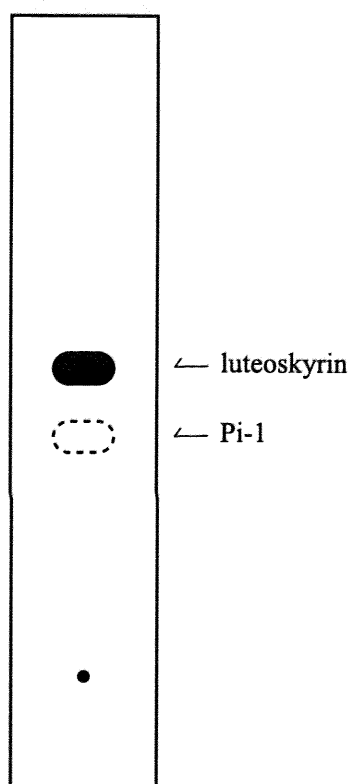


Fig. 14. TLC of luteoskyrin
TLC condition
Plate: HPTLC plate, Kieselgel 60 F₂₅₄
Developing solvent: benzene-ethyl acetate
-2,2,4-trimethylpentane -formic acid
(10:6:6:0.5)

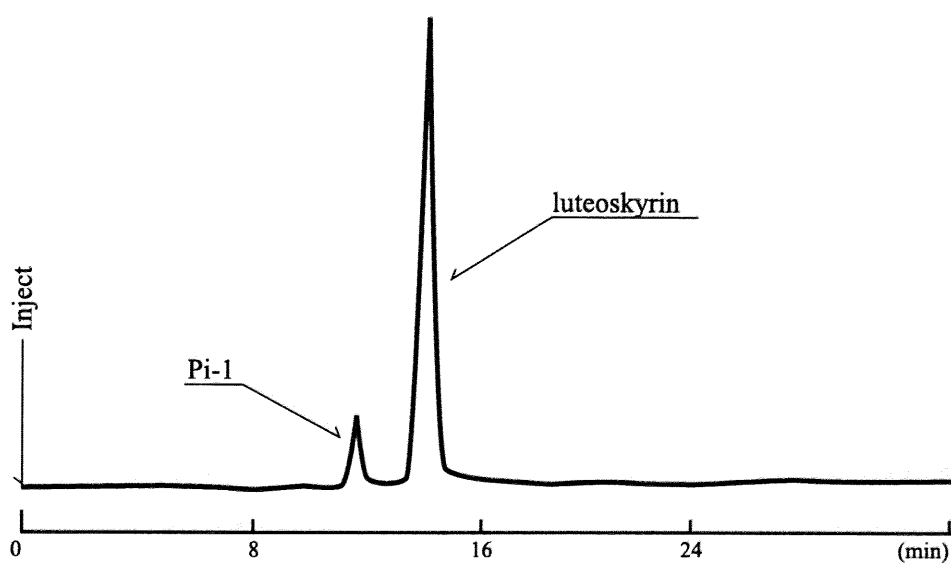


Fig. 15. HPLC of luteoskyrin

HPLC condition

**Solvent: acetonitrile-water-acetic acid
(40:59.5:0.5)**

Flow rate: 0.7ml/min

**Column: Perkin-Elmer/Analytical PAH
(2.6mm ϕ $\times$ 250mm)**

Detector: Ultraviolet 254nm

Sample: luteoskyrin

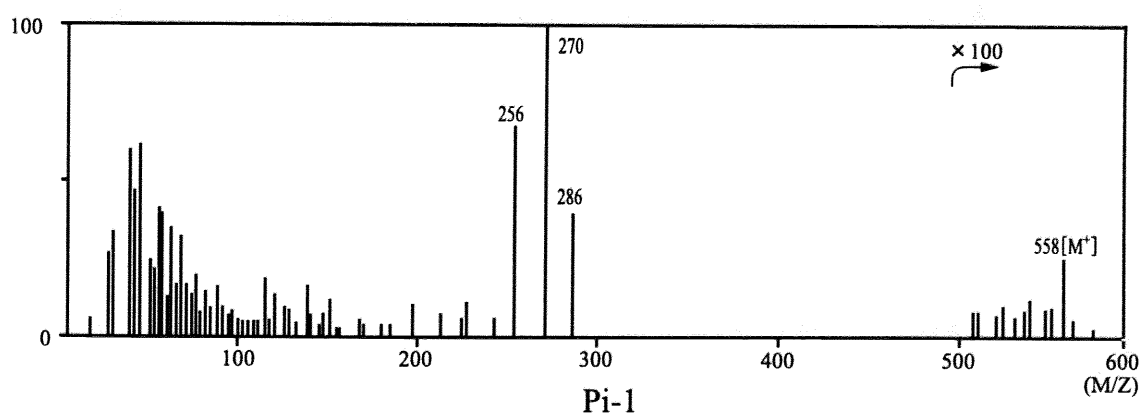
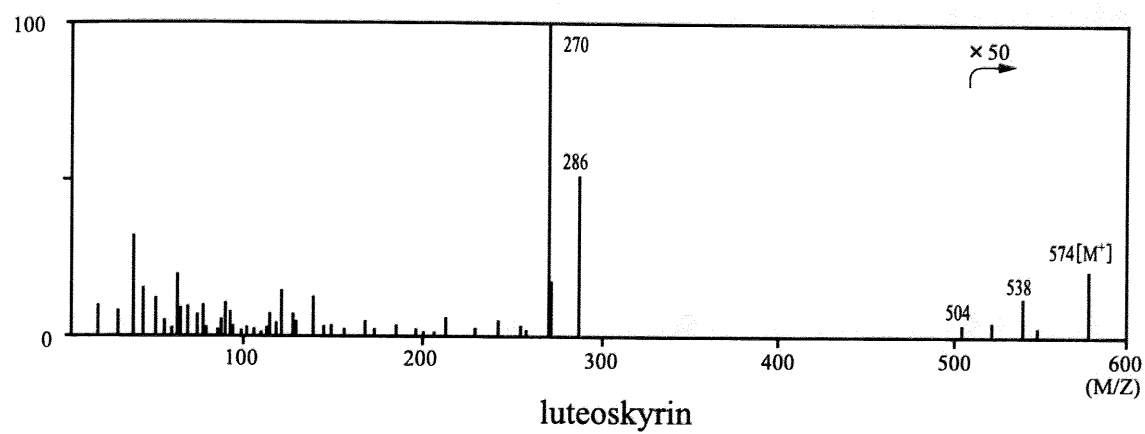
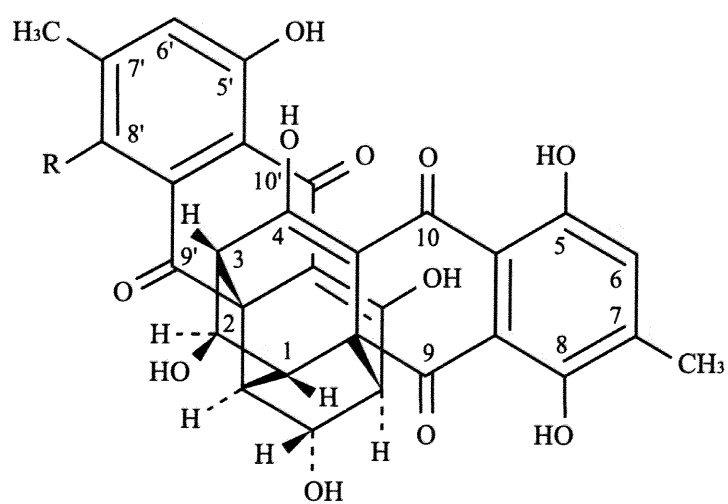


Fig. 16. Mass spectra of luteoskyrin and Pi-1



R= OH (-) - luteoskyrin
R= H (-) - deoxyluteoskyrin (Pi-1)

Fig.17. Structure of (-) - luteoskyrin and (-) - deoxyluteoskyrin

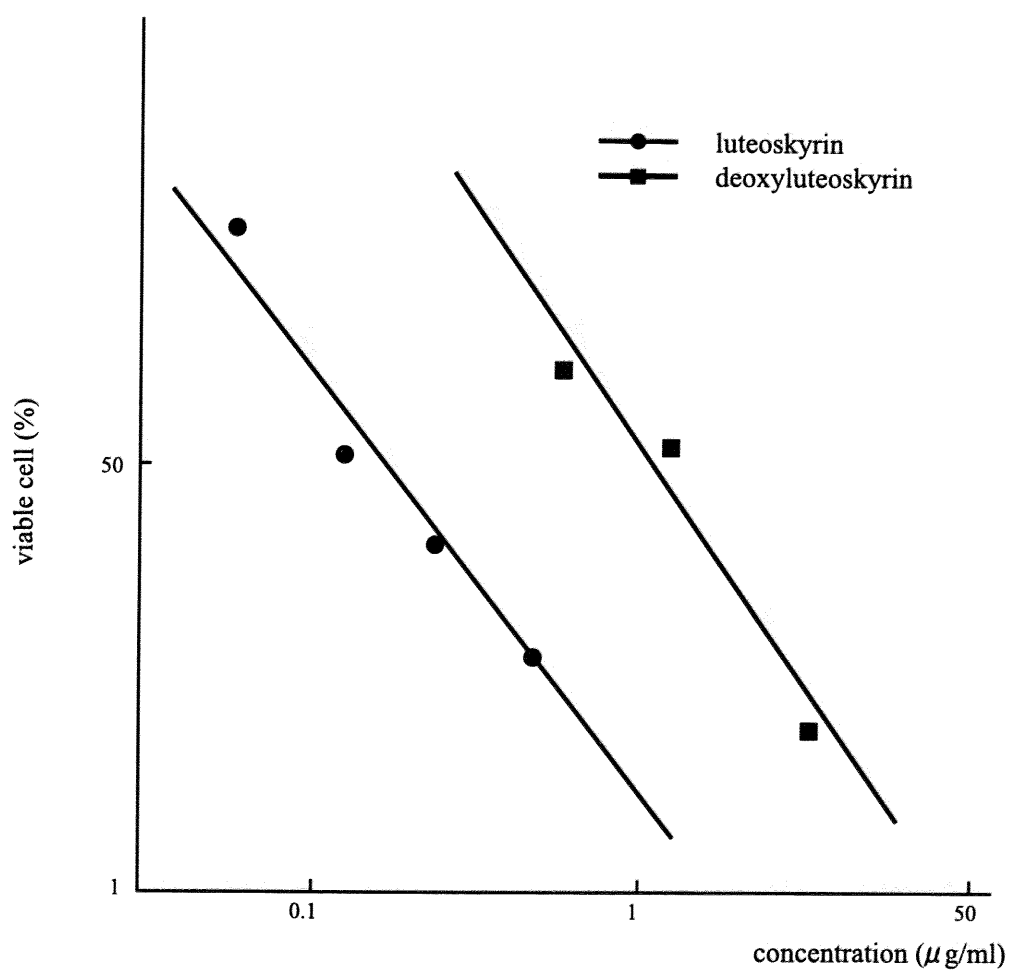


Fig. 18. Growth inhibition of rat hepatoma cells (H4-II-E) with luteoskyrin and deoxyluteoskyrin

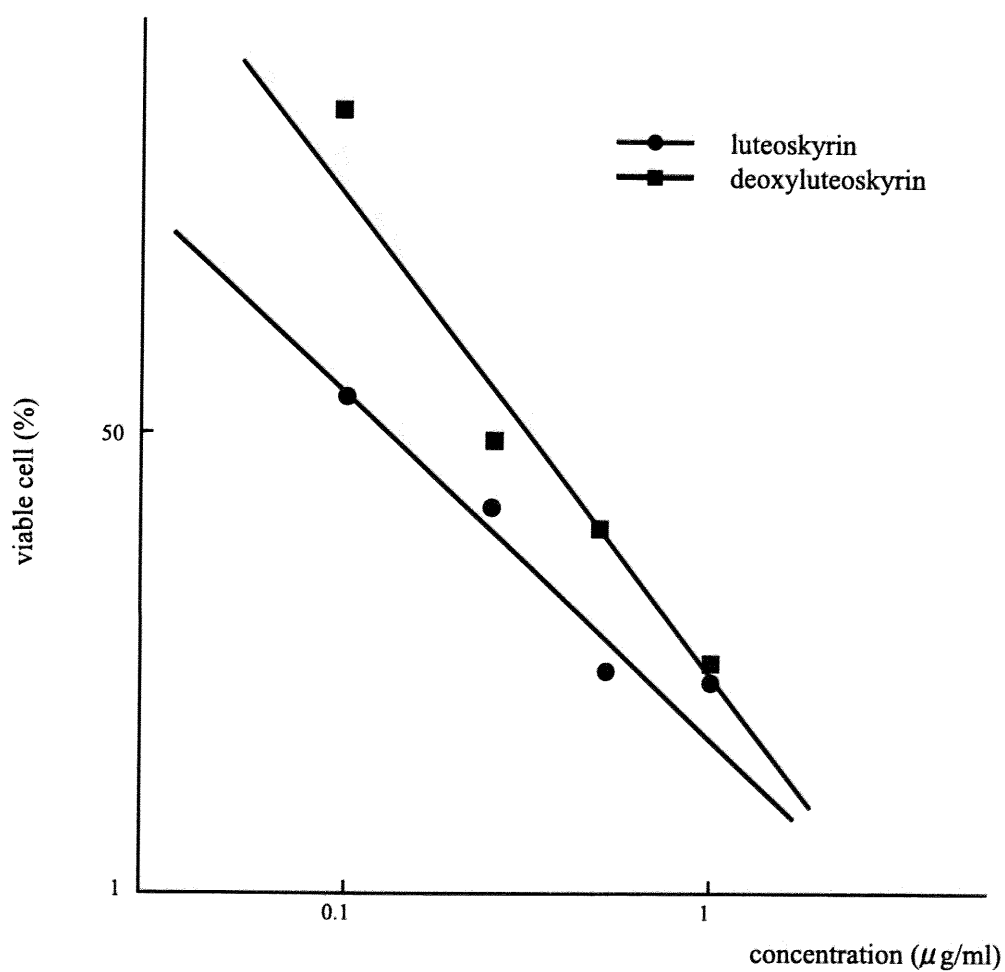


Fig. 19. Growth inhibition of Yoshida sarcoma cells with luteoskyrin and deoxyluteoskyrin

2.2 非意図的化合物の毒

2.2.1 石油生産物中の B(a)P の測定

癌原性物質に関する研究の歴史は古く、特に PAH（多環芳香族炭化水素化合物）に関しては癌原性化学物質の中で最も長い研究の歴史を持ちイギリスの煙突掃除人夫の陰嚢癌の多発に関する Percival Pott 卿の報告(1775)、山極、市川（1915）らのコールタールによる発癌に関する発見がある。B(a)P（Hieger、1930）およびジベンゾ(a,h)アントラセン（Kennaway&Hieger、1930）は、イギリスの研究者によりコールタールに含まれる癌原性主成分として分離され、単一化学物質として初めて癌原性が確認された化学物質である。

石油製品を原料とした種々の食品添加物等の製品中には発癌性 PAH が含まれていることが考えられる。そこで迅速で感度があり正確な分析法の必要性が求められる。石油ワックスに関しては、吸収分光測定法を使用して、発癌性 PAH を定量する方法が開発された^{1~3)}。

しかし PAH の多くは発癌性がなく、これらの発癌性物質を選択的に検出する方法はクロマトグラフ分析技術が開発されてきた。PAH の中でも B(a)P は強い発癌性及び変異原性の他に、最近では、B(a)P は内分泌攪乱作用の点でも注目されている物質の一つである。その測定に関しては、カラムクロマトグラフィーあるいは TLC で前処理した後、蛍光分光法を用いる方法が一般に使用されてきた。また電子捕獲型検出器（ECD）を使用したガスクロマトグラフ（ECD-GC）も報告⁴⁾されているが B(a)P と類似の構造(Fig.1)を持つ異性体ベンゾ(e)ピレン〔B(e)P〕との分離が困難であった。

HPLC は、蛍光検出器を接続した場合、個々の類似体の測定で、感度と特異性において特徴があることが認められる⁵⁾⁶⁾。ここでは、食品添加物用として広く使用されている流動パラフィン中の B(a)P のルーチン分析への HPLC の応用を研究した。

実験方法

(1) 試料と分析方法

供試した流動パラフィンは、食品添加物として使用されている市販品を使用した。溶媒類は特級・関東化学製試薬を使用した。

分析方法は、蛍光分光検出器(島津製作所製 RF 500LC 型)を接続した HPLC (ウォータース製 M6000A 型ポンプ)で行なった。

流動パラフィン（10 g）を、10 ml のヘキサンに溶解して、10 ml のジメチルスルフォキシド(DMSO)で 3 回の抽出を行った。DMSO 溶液を集め、DMSO 溶液に 30 ml の精製水を加

え更に、10 ml のヘキサンで3回の抽出を行った。ヘキサン抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水したのち、クデルナ・ダニッシュ型濃縮装置で濃縮後、窒素ガス気流中で1 ml に濃縮した。ヘキサン溶液の一部(20~50 μ l)をHPLCに注入した。

HPLC の条件

カラム： μ Bondapak C18 (1/4 ft x 1/8 inch) ウォータース製

移動相：アセトニトリル：水 (70 : 30 v/v)

流量：2 ml/ min

検出器：蛍光分光検出器 (励起波長 366 nm、蛍光波長 406 nm)

結果および考察

蛍光検出器を用いた微量分析を行う上で高感度を得るためには励起波長と蛍光波長の選択が重要である。クロマトグラム上でB(a)Pのピーク高さが最高になるように、励起波長と蛍光波長を選択しなければならない。最高感度は、励起波長 366nm と蛍光波長 406 nm の組み合わせで得られた。レコーダー・レスポンスは $10^{-11} \sim 5 \times 10^{-9}$ g、B(a)P の広い範囲で直線性があった (Fig. 2)。B(e)P は B(a)P の異性体で、クロマトグラムでの分離は困難とされ B(a)P の測定を行う上での妨害物質の一つである。本研究の方法では、B(a)P と B(e)P の分離能 (R_s) は 1.3 である (Fig. 3)。溶媒の極性を上げる(アセトニトリル：水 = 60 : 40 v/v)ことによって、分離能は改善されるが、分析に要する時間は約2倍と長くなる。上記の波長選択で、B(e)P が B(a)P に比べより感度が低かったことは、B(e)P の存在は実際には無視できることを示している。

2 ppb (2×10^{-4}) の B(a)P レベルでの添加回収実験をおこなった結果、試料の繰り返し分析では、0.8 %の変動で平均回収率が 94 %であることが明らかになった。この方法による検出限界は流動パラフィン中で 50 ppt (50×10^{-12}) である。

Fig. 4 に流動パラフィン中の B(a)P の典型的なクロマトグラムを示す。B(a)P はクロマトグラムに最も高いピークのうちの1つとして出現する。出現したピークが B(a)P であるかの確認するため分取する必要がある。流動パラフィンを HPLC に注入後 B(a)P ピークに対応する流出液を分取し、蛍光分光検出器でスペクトルを測定した (Fig. 5)。対応するピークの蛍光スペクトルは、標準試料の B(a)P とよく一致した。従って、他の物質による妨害は無視してもよいと考えられた。

測定した8検体の市販流動パラフィンの分析データを Table 1 に示した。レベルは低か

ったが、B(a)P は測定したすべてのサンプルから検出された。

前記の方法は、以前に報告されたものより流動パラフィン中の B(a)P のルーチン分析に、より適している。その理由は、この方法では、HPLC のカラムの寿命を短くすると考えられている共存物を前処理方法で除いているためである。HPLC に注入する前に試料をメンブランフィルター(0.45 μ m)でろ過することと、測定の終了後テトラヒドロフラン溶媒を HPLC の注入口とカラムに通して、カラムのコンデショニングを行うことにより、カラムの劣化を防いだ。この分析法で 200 回以上注入を行ったが、カラムの劣化は見られなかった。

2.2.2 工業化学品、医薬品、化粧品の使用原料中に含有する PAH の測定

パラフィン、ワセリン等は石油からの生産物で、種々の軟膏基剤、化粧品基剤等として広く用いられている。この様な石油生産物中には、発癌性のある PAH が含まれている可能性がある。「第 14 改正日本薬局方」(「日局 14」)等⁷⁾においても一部医薬品に PAH の純度試験の規格が設けられている。その方法は紫外線吸収スペクトルを測定し発癌性 PAH の全含有量を求めている。しかし PAH には、発癌性を有しないものも多く存在し、その癌原性を評価するには、個々に化合物を測定することが望ましい。またこれらの石油生産物中の PAH は微量のため紫外吸収スペクトル法による測定は困難である。

一方 PAH の測定法として迅速かつ精度の高い分析法として用いられる HPLC 法^{8) 9)}、二層一次元薄層クロマトグラフィー (二層一次元 TLC) 法¹⁰⁾ などの分離分析法を利用しパラフィン、クエン酸、ワセリン等の PAH 分析法の検討を行った。

実験方法

(1) 試料

- a. 流動パラフィン：特級試薬(3 検体)、1 級試薬(2 検体)
- b. クエン酸：特級試薬(5 検体)
- c. 黄色ワセリン：日本薬局方品(3 検体)
- d. パラフィン：日本薬局方品(2 検体)、化学用(1 検体)、組織包埋特装試薬(1 検体)の融点範囲 56~58 度
- e. イクタモール：日本薬局方品(5 検体)

(2) 試薬

- a. PAH 標準品

B(a)P、フルオランテン(Flu)、トリフェニレン(Tri)、ジベンゾ(a,h)アントラセン [Dib(a,h)A]、ジベンゾ(a,c)アントラセン [Dib(a,c)A] は和光純薬製、ペリレン(Per)、B(e)PはAldrich製、ベンゾ(k)フルオランテン[B(k)F]、ベンゾ(b)フルオランテン[B(b)F] は R.K.Chemical 製、ベンゾ(ghi)ペリレン [B(ghi)Per]、インデノ(1,2,3-cd)ピレン [I(1,2,3-cd)P] は東京化成製、ベンゾ(a)アントラセン [B(a)A] は Eastan Kodak 製、1,2,4,5-ジベンゾピレン(1,2,4,5-Dibp)は Laboratories 社製の合計 13 種類を使用した。

b. B(a)P 標準溶液はヘキサン、DMSO、アセトニトリルの各溶媒に B(a)P 5mg を正確にとり溶かして 100ml とする。この標準原液を更に各溶媒で希釈して所定濃度の標準溶液とした。

c. Flu、Tri、Dib(a,h)A、Dib(a,c)A、Per、B(e)P、B(k)F、B(b)F、B(ghi)Per、I(1,2,3-cd)Per、B(a)A、1,2,4,5-Dibp 標準溶液は B(a)P 標準溶液に準じて調製した。

d. ヘキサン、アセトニトリル、メタノール、エチルエーテルは関東化学製残留農薬試験用を使用した。

e. DMSO、石油エーテルは和光純薬製特級を使用した。

f. 薄層板は Acetyl Cellulose/Kieselguhr Plate、dualbandtype 20 x 20 cm 和光純薬製を使用した。

(3) 装置

a. HPLC

ウォータース製 ALC-244 型クロマトグラフ本体に組み込まれている紫外線検出器のフローセル出口と日立製作所製蛍光検出器 MPF-4 型のマイクロフローセルの入口をテフロンチューブで接続して使用した。

b. 自記分光光度計

日立製作所製 288 型分光光度計

c. 蛍光検査灯

東芝電気製 F1-3L 型

(4) 紫外線吸収スペクトル法による分析

以下の規格に準じ測定した。

a. 流動パラフィン

「日局 14」の流動パラフィン純度試験・PAH

b. クエン酸

「日局 14」のクエン酸純度試験・PAH

c. パラフィン「日局 14」の流動パラフィン純度試験・PAH

各試料 5 g をとり、石油エーテル 30 ml を加え、約 40℃に加温して溶かし、100 ml の分液ロートで、よく振り混ぜた。これに DMSO 10 ml を加え、2 分間激しく振り混ぜた後、15 分間静置した。下層を 50 ml の分液ロートに移し、石油エーテル 5 ml を加え、2 分間激しく振り混ぜた後、2 分間静置した。下層を 20ml の共栓付沈殿管に移し、毎分 2500～3000 回転で約 10 分間遠心分離して得た澄明な液を試験管にとり密栓し、これを試料溶液とした。別に石油エーテル 30 ml を分液ロートにとり、同様に操作して得た DMSO 溶液を対照とし、波長 260～350 nm の吸光度を測定した。

d. イクタモール

「日局 14」のクエン酸純度試験・PAH の項に準じた。試料 1g をとり、水 50 ml を加え溶かしヘキサン 20 ml で 3 回抽出した。毎回それぞれ毎分 2500～3000 回転で約 10 分間遠心分離しヘキサン層を合わせた後、ヘキサンを留去し 10 ml となるまで濃縮した後、1ml を分取しヘキサンで 50 ml としたものを試料溶液とした。別に水 50 ml をとり、同様に操作して得たヘキサン溶液を対照とし、波長 260～350 nm の吸光度を測定した。

e. 黄色ワセリン

試料 5 g をヘキサン 30 ml を加え、約 40℃に加温して溶かした。以下「日局 14」の流動パラフィン純度試験・PAH の項に準じ同様に操作して得た試料溶液を波長 260～350 nm の吸光度測定をした。

(5) HPLC による定性方法及び定量方法⁹⁾

a. 定性方法

試料溶液（試料溶液がヘキサン溶液のものはアセトニトリルを加え水浴中で静かに窒素ガスを吹きつけてヘキサンを揮散させてアセトニトリル溶液とした）および標準溶液 10～40 μ l をマイクロシリンジにとり HPLC に注入した。得られたクロマトグラムのピーク保持時間を比較し定性を行った。

HPLC の条件

カラム：Perkin-Elmer/Analytical PAH (10 μ m、250 mm x 2.6 mm I.D.)

溶離液：アセトニトリル-水(70 : 30 v/v)

流速：2 ml / min

蛍光検出波長：B(a)P、B(k)F、Dib(a,h)A (Ex. 298 nm、Em. 407 nm)

蛍光検出波長：Per (Ex. 407 nm Em. 440 nm)

蛍光検出波長：B(e)P (Ex. 316 nm、Em. 396 nm)

蛍光検出波長：B(b)F (Ex. 300 nm、Em. 439 nm)

b. 定量方法

定性方法に用いた試料溶液 10~40 μ l をマイクロシリンジに取り、定性方法と同様に HPLC に注入して得たクロマトグラムとあらかじめ作成した検量線により定量した⁹⁾。

(6) 二層一次元 TLC による分析

試料溶液(DMSO 溶媒のものは水を加えヘキサンで抽出しヘキサン溶液とした)及び標準溶液につき二層一次元 TLC 法によって試験を行った。試料溶液及び標準溶液をスポットの径が 10 mm をこえない範囲でマイクロピペットを用い各々100 μ l 薄層板にスポットした。次にエチルエーテル-エタノール-水(40 : 40 : 10)を展開溶媒として、10 cm 展開した後、薄層板を風乾した。これに紫外線(365 nm)を照射し試料溶液から得たスポットと標準溶液から得たスポットと比較した¹⁰⁾。

結果及び考察

(1) 紫外吸収スペクトル法による試験

流動パラフィン 5 検体、クエン酸 5 検体について紫外線 260~350 nm の吸光度を測定したがいずれも規定の吸光度である、流動パラフィン 0.1、クエン酸 0.05 以下であった。PAH の中でも強い発癌性化合物として知られている B(a)P を DMSO 溶媒で測定した時の規定の吸光度 0.1 ($\lambda_{\max}$ 300 nm)は 0.5 μ g/ml であった。流動パラフィン中の B(a)P 濃度に換算すると 0.1 μ g/ml となる。また同様に規定の吸光度 0.05 をクエン酸中の濃度に換算すると 0.1 μ g/g となる。流動パラフィンとクエン酸に B(a)P を 1 μ g/ml、0.5 μ g/g 添加した例を Fig. 6 に示す。

次に PAH の試験法は制定されていないが、石油生産物関係物質としてパラフィン 4 検体、黄色ワセリン 3 検体、イクタモール 5 検体について紫外線吸収スペクトル法による試験を

行った。波長 $\lambda_{\max}$ 275 nm前後にパラフィン⁸⁾は吸光度約0.3、黄色ワセリンは吸光度約0.5、イクタモールは約300と高い吸光度を示したがこの値のすべてがPAHとは考えにくく紫外線吸収スペクトル法での測定は困難であった。紫外線吸収スペクトル法は操作が単純ではあるが選択性及び感度等が悪く適用不能であった。例をFig. 7に示した。

(2) HPLCによるPAH分析

PAHは2ないしそれ以上の芳香環が縮合した化学構造を有しており逆相クロマトグラフィーで分離する場合、芳香環の縮合数あるいは炭素数が近い場合クロマトグラム上でピークが近接あるいは、互いに重なり合うことが知られておりHPLCのカラムの選択は重要であった¹¹⁾。市販のODS系の充填剤としてLichrosorb RP-18、Nucleosil 5C18、PartisilH10-ODS-3、Perkin-Elmer/Analytical PAHについて、Fig. 8のPAH(13種)の分離パターンを見るために紫外線検出器(254 nm)を用い検討した。結果はFig. 9に示す様にPerkin-Elmer/Analytical PAHがすぐれていた。またHPLCを行う上で検出器の波長の選択は高い感度を維持し、しかも不純物の影響を少なくするために重要である。数種のPAHをそれぞれ最適波長に合わせ何回も分析することは多くの手間と時間がかかり、また多くの夾雑物質を含んだ試料溶液を何度もHPLCに注入することはカラムの劣化を速める原因となる。そこで分離度(R_s)は1以上であり蛍光スペクトルの類似しているB(a)P、B(k)F、Dib(a,h)Aについては代表波長としてEx. 298 nm、Em. 407 nmを用いることにより同時に分析することができた(Fig. 10)⁹⁾。

市販の流動パラフィン、クエン酸、黄色ワセリン等の医薬品中のPAHの分析値と検出限界をTable 2、3に示す。流動パラフィン、クエン酸、パラフィン、イクタモールでは不検出であったが黄色ワセリンは約0.2~2 ppbのB(a)Pが含有していた⁸⁾。

(3) 二層一次元TLCによるPAH分析

二層一次元TLCによるB(a)P、B(b)F、B(k)F、B(e)Pの検出限界はFig. 11、12に示すように、紫外線吸収スペクトル法よりも高い感度を示した。この時の各化合物の R_f 値はB(a)P 0.12、B(b)F 0.16、B(k)F 0.23、B(e)P 0.15であった。

流動パラフィン、クエン酸、パラフィン、イクタモールの試料溶液100 μ lをスポットしたが、これらのPAHは検出されなかった。流動パラフィン、クエン酸試料溶液にそれぞれB(a)P 200 ng/ml、100 ng/mlになるように添加した。この添加量は吸光度0.1、0.05の他

を B(a)P 濃度に換算した値の約 2/5 であるが十分に確認できる濃度である。Fig. 13、14 に示すように添加した B(a)P はいずれも良好な結果を示した。同様に黄色ワセリンについても測定を行った。Fig. 15 は薄層板上の弱い蛍光を、またスポットした原点に強い蛍光を示している。PAH の位置には蛍光を有するスポットは全く検出されなかった。なお Fig. 16 に B(a)P を添加したクロマトグラムを示す。また、パラフィン、イクタモールに添加した PAH も良好であった⁹⁾。

まとめ

「日局 14」に流動パラフィン、クエン酸の PAH の試験として紫外線吸収スペクトル法がある。紫外線吸収スペクトル法は操作が単純ではあるが選択性及び感度等が悪く、また熟練等が要求され改良が望ましい。これに対して HPLC 法及び TLC 法は迅速かつ高感度に多くの PAH を個々に分析することが可能であった。現行の「日局 14」にはワセリン、イクタモール等中の PAH の試験の記載はない。一方紫外線吸収スペクトル法による測定で示された高い吸光度値のすべてが PAH とは考えにくく紫外線吸収スペクトル法での測定は困難であった。HPLC 法及び二層一次元 TLC 法では測定が可能であった。医薬品中の PAH の純度試験として HPLC 法と TLC 法が十分に利用できることが考えられるが HPLC 法は高価な機器とランニングコスト等の問題があると思われた。以上のことから二層一次元 TLC 法が医薬品中の純度試験として適していると考えられる。本研究ではワセリン、クエン酸、流動パラフィン等の石油生産物質中の PAH の簡易迅速で高感度な精度の高い微量分析法を確立した。

2.2.3 食品中の PAH の測定

PAH の発癌性は古くから知られており、食品中の PAH の含有量は衛生学の関心を引いてきた。なかでも強い発癌性を示す B(a)P については多くの分析法が報告されてきた^{12)~15)}。これらの中でも複雑な夾雑物を多く含む食品中の PAH の微量分析は精密な技術と高度の熟練が要求されている。GC を用いる PAH の微量分析方法は無極性の液相（メチルシリコーン等）を保持させたシリカキャピラリーカラムなどが広く用いられている。しかし環数の多い PAH ほど難揮発性となるため GC オープンの設定温度を高くする必要があるため熱分解も起こりやすくなり感度の低下やシリカキャピラリーカラムの液相の最高温度での使用等難点がある。

一方、HPLC のカラム充填剤の改良と充填技術の進歩により、HPLC による PAH に対するカ

ラム分離能は非常に向上してきた¹⁶⁾。また、HPLCの使用する検出器として紫外線吸収(UV)検出器が最も一般的ではあるが複雑な夾雑物を多く含む食品中の微量分析には蛍光検出器が使われている。直接試料を注入し蛍光検出器で検出する方法はカラムの高い分離能と蛍光検出器の高い選択性により、他の妨害性物質の影響を受けにくい利点を持つことからPAHの微量分析方法としてすぐれている⁸⁾。また、DasとThomas¹⁷⁾は同様な手法により大気粉塵中のPAHの分析法を報告している。一般食品中においてPAHの中でも強い発癌性が知られているB(a)Pと分析が困難であった同族体、B(e)P、B(b)F、B(k)F、Perの食品中の微量分析法に関しての研究を行った。

実験方法

(1) 試料

1977年11月から1978年10月にかけて横浜市内で市販されていた下記のものを使用した。カツオブシ、サバブシ、ナマリ、クサヤ、豚肉、ベーコン(豚)、サラミソーセージ、唐辛子、大豆、納豆、みそ、こうじ、玉ネギ、パイナップル、浅草のり、ソフトピーナッツ、クロレラ、緑茶、紅茶、パン、ドライイースト、ヨーグルト、ミルク、ビール、米酢、酒、ワイン、ウイスキー。

(2) 試薬

a. 溶媒

ヘキサン、アセトニトリル(Mallinckrodt製)、無水硫酸ナトリウム(和光純薬製)は残留農薬分析用、DMSO、エタノール、水酸化カリウム(和光純薬製)は特級試薬またテトラヒドロフラン(同仁化学製)は蛍光スペクトル用を使用した。

b. PAH試薬

Flu、フェナントレン、フルオランテン、Tri、Per、B(a)P、1,12ベンゾペリレン、ピーセン、クリセン(和光純薬製)、ピレン(東京化成製)、B(e)P(Aldrich製)、B(b)FおよびB(k)F(R.K.Chemical製)など合計13種類を使用した。

c. PAH標準試薬

標準溶液B(a)P溶液はB(a)Pをアセトニトリルに溶解し50 ng/mlの溶液を調整し用いた。B(e)P 100 ng/ml、B(b)F 50 ng/ml、B(k)F 50 ng/ml、Per 30 ng/ml、フルオレン 10 ng/ml、フェナントレン 1 μg/ml、フルオランテン 10 μg/ml、Tri 30 μg/ml、1・12ベンゾペリレ

ン 20 $\mu\text{g/ml}$ 、ピーセン 20 $\mu\text{g/ml}$ 、クリセン 10 $\mu\text{g/ml}$ 、ビレン 10 $\mu\text{g/ml}$ 標準液は、B(a)P 標準溶液と同様に調製し用いた。

(3) 装置および器具

a. HPLC

ウォータース製 ALC-244 型クロマトグラフ本体に組み込まれている UV 検出器(254 nm) セルの出口と日立作所製蛍光光検出器 MPF-4 型のマイクロフローセルの入口をテフロンチューブで接続し使用した。

b. 濃縮器

クデルナ・ダニッシュ型濃縮器 (桐山製作所製)

c. メンブランフィルター

ミリポアフィルター(サイズ 0.45 μm : ミリポアリミテッド製)

(4) 実験操作

a. 試料溶液の調製

(a)アルカリ分解法

5~25 g の食品試料を細粉し 300 ml のナス型フラスコに取り、エタノール 150 ml と水酸化カウム 10~30 g を加え還流冷却器をつけて水浴上で 1.5 時間加熱還流した。沈殿物がある場合、綿栓炉過し、エタノール 25 ml を用いて沈殿物を洗浄したのちろ液と洗液を合せ、これを蒸留水 150 ml の入っている分液ロートに移した。この分液ロートにヘキサン 50 ml を加え 5 分間振り混ぜ、静置後ヘキサン層を分取した。ヘキサン抽出操作を 3 回行ない、ヘキサン抽出液を合せ蒸留水 100 ml で 2 回洗浄し、つぎにヘキサン抽出液に DMSO 30 ml を加え 5 分間振とう静置後 DMSO 層を分取した。この操作を 3 回行ない、合せた DMSO 抽出液に蒸留水 50 ml を加えたのち、ヘキサン 30 ml を加え 5 分間振とうした。このヘキサン抽出操作を 3 回行ない、ヘキサン抽出液を合せ蒸留水 50 ml で 2 回洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで脱水しろ過後クデルナ・ダニッシュ型濃縮器に移し、約 3 ml になるまで濃縮した。この濃縮液にアセトニトリル 3 ml を加え水浴上で加温しながら窒素ガスを次ぎつけ、上層のヘキサンを揮散させたのち 1~3 ml とした。この濃縮液をメンブランフィルター(サイズ 0.45 μm)でろ過し試料溶液とした。

(b) 直接抽出法

液体試料 300 ml を 500 ml の分液ロートに取り、ヘキサン 100 ml を加え 5 分間振り混ぜ静置後ヘキサン層を分取した。この操作を 3 回行なったのちヘキサン抽出液を合せ蒸留水 100 ml で 2 回洗浄し、さらにヘキサン抽出液に DMSO 30 ml を加え 5 分間振とう静置後 DMSO 層を分取した。この操作を 3 回行い以下アルカリ分解法の操作法と同様に処理し、試料溶液とした。以上の操作を Fig. 17 に示す。

b. 定性方法

標準溶液ならびに試料溶液 5~50 μ l をマイマイクロシリンジにとり、HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク保持時間を比較し定性を行なった。HPLC の条件はカラム:Lichrosob RP-18(5 μ m、4 mm i.d.x150 mm)、溶離液 : アセトニトリル : 水(70 : 30v/v)、流速 : 2 ml/min、検出器:蛍光検出器を用いた。また、ストップフロー法により成分ピークが出現し、そのピークの高さが最高に達したときに溶離液をストップさせ、蛍光検出器を用い、その出現ピークに対する励起スペクトル、蛍光スペクトルを測定し、標準溶液の示す励起及び蛍光スペクトルと比較し同定した。

c. 定量方法

試料溶液 5~50 μ l をマイクロシリンジに取り HPLC に注入して得たクロマトグラムとあらかじめ作成した検量線により定量した。

検量線の作成:標準 B(a)P 10~50 pg の各クロマトグラムのピーク高より B(a)P の検量線を作成した。B(e)P、B(b)F、B(k)F および Per は B(a)P と同様に操作し検量線を作成した。

結果および考察

(1) HPLC の分析条件の選択

オクタデシルシラン結合シリカゲル C_{18} を充填剤とする HPLC について溶離液の組成及び流量を変化させて B(a)P の分析条件を検討した。いくつかの条件での理論段数を Table 4 に示す。溶離液の水含量が増大するにつれて B(a)P の保持時間は増加し理論段数も高くなるが、圧力が増大するため粘度の高いテトラヒドロフラン-水系、メタノール-水系よりもアセトニトリル-水系溶離液がすぐれていた。そこでアセトニトリル-水系での B(a)P の保持時間が短く理論段数の高い値を示す条件と、また他の化合物との分離を考慮し、混

合比アセトニトリル：水= 70：30、流速 2 ml/min の条件を用いることにした。Das と、Thomas¹⁷⁾ は同様な充填カラム Zorbax ODS (2.1mm i.d. x 250 mm)、溶離液：アセトニトリル：水= 82：18、流速：0.3ml/min で PAH を分析しているが B(k)F と B(e)P のクロマトグラムのピークが重なり本方法よりも分離が劣る。

(2) PAH の分離挙動

生活環境中あるいは食品中に見られる一般的な PAH としては、フルオレン、フェナントレン、アントラセン、Flu、ピレン、トリフェニレン、B(e)P、B(b)F、B(k)F、B(a)P、1.12 ジベソゾペリレンおよびビーセン等がある。本研究で用いたオクタデシルシラン結合シリカゲル充填カラムでこれらの PAH の分離挙動を見るために、検出器 UV 254nm で測定したクロマトグラムを Fig.18 に示す。B(a)P、B(e)P および B(k)F は従来から分離に問題があったが、このクロマトグラムからも明らかのように良好に分離された。また、Fig. 18 よりも希薄な濃度の B(a)P、B(e)P 及び B(k)F を蛍光検出器を用いて測定したものが Fig. 19 である。B(a)P と B(k)F の分離度(Rs)は 1.7、また、B(a)P と B(e)P との分離度(Rs)=3.3 と良好であった。ただし B(e)P はこの条件では B(b)F、Per との分離はできなかった。

(3) 蛍光検出波長の選択

B(a)P の定量に際して励起波長および蛍光波長についていくつかの組合わせが報告されてきた。流動パラフィンの分析に際しては励起波長 366 nm、蛍光波長 406 nm を用いた¹⁾。Das と Thomas¹⁷⁾ は励起波長 280 nm、蛍光波長 389 nm 以上を用いて測定している。また白山¹⁸⁾ は励起波長 292 nm、蛍光波長 405 nm を選んでいる。アセトニトリル—水系での主な波長は励起波長 295 nm、362 nm、384 nm、蛍光波長 406 nm、429 nm、455 nm である最も高感度で測定するためには蛍光強度が強いということと同時に、実際の試料での S/N 比を考えなければならない。そこで励起波長と蛍光波長の組合せを変えてカツオブシから抽出した試料溶液について HPLC で分析した結果を Fig. 20 に示す。この図からも明らかなように励起波長 284 nm、蛍光波長 406 nm の組合せが最も S/N 比が大きく分析に有利であった。

B(a)P、B(b)F、B(e)P、B(k)F および Per の励起ベクトルと蛍光スペクトルの測定結果を Fig.21(1)と Fig.21(2)に示した。これらをもとにして各化合物のスペクトルを組合せて、それぞれの標準溶液の蛍光強度を測定したところ

B(a)P Ex. 384 nm、 Em. 406 nm

B(e)P	Ex. 316 nm、	Em. 396 nm
B(b)F	Ex. 300 nm、	Em. 439 nm
B(k)F	Ex. 307 nm、	Em. 419 nm
Per	Ex. 407 nm、	Em. 440 nm

が高感度であった、また、水のラマン光の影響はフローセルで測定した場合、バックグラウンドでのノイズレベルが上昇することはなかった。

(4) B(b)F、B(e)P、Per の分析

B(b)F、B(e)P および Per は HPLC での保持時間が一致し分離が困難であるため、これらの化合物の励起波長、蛍光波長のちがいによる蛍光強度の差から定量した。B(b)F、B(e)P および Per の単位重量あたりの蛍光強度をそれぞれ a_1 、 b_1 、 c_1 (Ex.300 nm、Em.439 nm)、 a_2 、 b_2 、 c_2 (Ex.316 nm、Em.396 nm)、 a_3 、 b_3 、 c_3 (Ex.407 nm、Em.440 nm)とし、B(b)F、B(e)P および Per のそれぞれを x 、 y 、 z 量(ng)混合したものの蛍光強度 $H(\text{Ex.300、Em.439})\text{cm}$ 、 $H(\text{Ex.316、Em.396})\text{cm}$ 、 $H(\text{Ex.407、Em.440})\text{cm}$ とすると、それらは以下にあ

$$H(\text{Ex.300、Em.439})=a_1x+b_1y+c_1z$$

$$H(\text{Ex.316、Em.396})= a_2x+b_2y+c_2z$$

$$H(\text{Ex.407、Em.440})= a_3x+b_3y+c_3z$$

となるこの3元連立方程式を解くことにより測定値 $H(\text{Ex.300 Em.439})$ 、 $H(\text{Ex.316、Em.396})$ 、 $H(\text{Ex.407、Em.440})$ から x 、 y 、 z を計算することができる。ここで a_1 、 b_1 、 c_1 それぞれの実測値は以下であった。

$$a_1=4.1 \quad b_1=0 \quad c_1=0.63$$

$$a_2=0.41 \quad b_2=1.7 \quad c_2=0$$

$$a_3=0 \quad b_3=0 \quad c_3=41$$

計算の1例を示すと、カツオブシ 5g を用いて最終的に 2 ml 濃縮しそのうち 10 μ l を注入したとき

$$H(\text{Ex.300、Em.439})=0.95 \text{ cm}$$

$$H(\text{Ex.316、Em.396})= 0 \text{ cm}$$

$$H(\text{Ex.407、Em.440})=1.52 \text{ cm}$$

が実測され連立方程式から $x=0.226\text{ng}$ 、 $y=\text{nd}$ 、 $z=0.037\text{ng}$ が得られた。この値より濃度換算

すると以下のようになる。

(A)=絶対量 x 試験溶液全量/注入量 x1/試料

(A)=試料 1g についての B(b)F、B(e)P、Per の含有量

$B(b)F = 0.226 \times 2 / 0.01 \times 1 / 5 = 9.04 \text{ (ng/g)}$

$B(e)P = \text{nd}$

$Per = 0.037 \times 2 / 0.01 \times 1 / 5 = 1.48 \text{ (ng/g)}$

(5) クリーンアップおよび回収率

試料の抽出液を HPLC に直接注入すると妨害物質も多く保持時間を狂わせるだけでなくカラムの寿命を著しく短くするためクリーンアップが必要である。

本法ではクリーンアップとして DMSO 抽出を行った。また添加回収実験はカッオブシ 5g に対して標準 B(a)P 100ng(20ppb)、B(e)P 200ng(40ppb)、B(b)F 200ng(40ppb)、B(k)F 100ng(20ppb)、Per 30ng(6ppb)を添加し各化合物の添加回収率を測定した。結果を Table 5 に示す。

(6) PAH の確認

クロマトグラム上に出現したピークが目的とする PAH にもとづくものであるかどうかは実験方法(4)b.の定性に従い溶離液の流れをストップさせ、セル内の溶液のスペクトルを測定し標準スペクトルと比較することにより確認する方法を採った。B(a)P のピークについて実際におこなったものが Fig. 22 である。カッオブシは標準 B(a)P と同じ励起波長ピーク 285 nm、298 nm、362 nm、384 nm 蛍光波長ピークは 406 nm、429 nm、455 nm に蛍光を示し、波長パターンが標準 B(a)P と一致しており、B(a)P にもとづくものと考えられる。B(k)F は、励起波長ピーク 297 nm、307 nm、380 nm 蛍光波長ピーク 411 nm、437 nm 持ち B(a)P と極めて類似した波長パターンを示すため HPLC による十分な分離が必要であった。

(7) 検量線と検出限界

B(a)P、B(e)P、B(b)F、B(k)F および Per の検量線を Fig. 23 に示す。標準溶液を HPLC で検出した際の最小検出量は S/N 比を 3 にすると、B(a)P (10pg)、B(e)P (100pg)、B(b)F

(100pg)、B(k)F (10pg)、Per (10pg)であった。また、B(a)P を 1 例とした場合、試料 25g を用いて最終的に 1ml に濃縮し、そのうち 40 μ l 注入した場合、最小検出濃度は 0.01ppb であるが、試料によっては共存不純物質を多く含むためバックグラウンドノイズが上昇し、0.01ppb よりも高い濃度でなければ検出され難いものもあった。

(8) 食品中の B(a)P、B(e)P、B(b)F、B(k)F および Per 含有量

市販の食品中の B(a)P を定量した結果を Table 6 に示し、その中から 9 検体を選んで B(a)P、B(e)P、B(b)F、B(k)F および Per を定量した結果を Table 7 に示す。分析対象とした 35 検体中 26 検体から B(a)P が検出された。カツオブシは分析した試料中では最も B(a)P 含有量が多く 12.5 ppb を示した。これは増田ら¹⁹⁾の結果と一致した。また、サバブシ、唐辛子、クロレラ、緑茶・紅茶等も他の食品に比べて B(a)P 濃度が高く検出された。なお酒類は検出されなかった。その他の PAH も B(a)P と同様にカツオブシが最も高い値を示し、ベーコン、唐辛子にも多く含まれていたが B(e)P は 9 検体中には検出されなかった。分析した PAH うち発癌性があると言われている B(a)P と B(k)F が比較的高い値を示した。

まとめ

食品中の B(a)P、B(e)P、B(b)F、B(k)F および Per の分析法としてアルカリ分解-DMSO 分配クリーンアップ-蛍光検出器付 HPLC が ppb オーダーの微量分析に利用できることがわかった。過去に提案された方法が操作の煩雑さ、あるいはアイソトープの使用等かならずしも容易でない条件を含んでいるのに対し本法はカラムクロマトグラフィー等のクリーンアップを用いなくともよい等、かなり簡易化されておりルーチン分析に適していると考えられる。

2.2.4 生活環境中の PAH の測定

(1) 二枚貝に含まれる PAH²⁰⁾

PAH は、化石燃料、木材などの燃焼または有機物質の加熱により生成され、その発癌性は古くから知られており、大気、水、そして食品に至るまで広く分布している環境汚染物質である。

ムラサキイガイ (*Mytilus edulis*) 等の二枚貝に残留する B(a)P の量は単にその発癌性や内分泌攪乱化学物質という観点だけでなく、広く人為起源の汚染の指標として用いられる

と指摘されている。二枚貝に含まれる、B(a)P、B(k)F、B(ghi)Per の 3 種の PAH を分析した。

a. 実験操作

(a) 試料溶液の調製

試料 1~10 g を 300 ml のナス型フラスコに取り、エタノール 100 ml、水酸化カリウム 10 g、精製水 20 ml を加え、還流冷却器を付けて水浴上で 2.0 時間加熱還流した。放冷後、ガラスろ過器(2G)でろ過し、エタノール 25 ml を用い洗浄したのち、ろ液と洗液を合わせ、これを精製水 150 ml の入っている分液ロートに移した。この分液ロートにヘキサン 100 ml を加え、5 分間振り混ぜ静置後ヘキサン層を分取した。ヘキサン抽出操作を 2 回行い、ヘキサン抽出液を合わせ精製水 200 ml で 2 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過後ロータリーエバポレーターに移し約 5 ml になるまで濃縮した。この濃縮液を SEP-PAK シリカカートリッジ上に注入しヘキサン 25 ml を用い溶出し、溶出液を減圧濃縮した。さらに、この濃縮液にアセトニトリル 3 ml を加え水浴上で加温しながら静かに窒素ガスを吹き付け上層のヘキサンを揮散させたのち 1~3 ml とし試料溶液とした。

(b) HPLC の条件

ウォータース製 HPLC に蛍光検出器を接続して分析した。分析カラムは、Perkin-Elmer/Analytical HC-ODS/PAH 2.6 mm i.d. × 250 mm で、前段に New Guard Column RP-18 3.2 mm i.d. × 15 mm を接続して使用した。溶媒はアセトニトリル-水(80 : 20v/v)混合溶媒を用い、流速は 1.5 ml で展開した。蛍光検出器は励起波長 384 nm、蛍光波長 406 nm に波長を合わせて分析した。

結果および考察

本検出システムで、PAH のうち、B(a)P、B(k)F、B(ghi)Per の三種が高感度で検出された。Fig. 24 に、ミノクジャク(*Septifer bilocularis pilosus*)の分析例を示す。Table 8 に、日本各地から集めた二枚貝についての分析値を示す。本分析法での B(a)P の平均回収率は 80 %であったが、回収率補正は行なっていない。尚、各サンプリング地点について日本地図上にプロットしたのが Fig. 25 である。

(2) PAHの摂取量に関する研究^{21~24)}

食品に含まれるPAHは喫食することにより、また空気中に存在するPAHは呼吸により、そして水中に存在する場合にはそれを飲用することによって体内に摂取される。このように、それぞれの経路で人体に摂取されたPAHは、人の健康に影響を及ぼすことが考えられるので全摂取経路を考慮し、総合的に評価することが必要である。1987年、1988年および1989年度の3年間、横浜市在住の成人女性が食事、水道水、空気を経由して摂取するPAHとして強い発癌性が知られているB(a)P、B(k)F、発癌促進物質であるB(ghi)Per、Py、代表的3環系PAHであるアントラセン(An)等の暴露量を調査した。

a. 調査方法

調査対象者は7名~10名で各年度とも夏期および冬期にそれぞれ連続した3日間調査を行なった。調査対象者は調査年度により一部入れ替えがあったため、3年間連続調査したのは4名であった。

b. 調査物質

調査物質はPAHとして1987年および1988年度はB(k)r、B(a)P、B(ghi)Perの3物質を、1989年度にはAn、Pyの2物質を追加し、計5物質を調査した。

c. 採取方法

(a) 食事

調査対象者の一日分の食事(朝食、昼食、夕食、間食など一日摂取した食物の全て)を陰膳方式(同じ食事を一人分余分に作り、食べた量と同量を試料として用いる。たお、コーヒー等飲料も全て含む)により、一日分ずつまとめて採取し、これを均一に攪拌混合したものを試料とした。

(b) 空気

屋内試料として台所に近い居間の床上0.5m前後の位置で消音型エアースンプラー(通気速度20 L/分)を用いて石英繊維フィルター(径47 mm)に浮遊粉塵を24時間連続捕集し、その1/4を試料とした。

(c) 飲用水

台所の給水栓から朝起床後朝食等に十分使用した後、水500 mlを採取し試料とした。い

ずれも横浜市で給水している塩素処理を行なった水道水である。

d. 試験溶液の調製

試験溶液の調製および分析操作方法を Fig. 26 にまとめた。

e. 分析方法

Fig. 26 に示す方法によった。

結果および考察

PAH3 物質の年度毎の一日平均摂取量を Table 9 (1)、(2)に、媒体別摂取量を Table10 (1)、(2)、(3)に示した。

食事からは、夏期 119～274 ng、冬期 195～252 ng であり、空気からは夏期 25～35 ng、冬期 90～118 ng であった。飲用水からは夏期、冬期共に検出されなかった。PAH の食事寄与率は、夏期 81～89 %、冬期は 62～74 %を占めていた。食事中的 PAH 量は献立に、くん製品または焦げ目の多い焼き魚を含む場合高値になるため、一日摂取量は 600 ng から 1000 ng に及ぶことがあった。しかし PAH 摂取量については、調理時に焦げ目の少ない焼き方を工夫するなど個人的努力によりある程度低下させることができる。An、Py に関しては 1989 年度の一日摂取量の値であるが、An : 数 100 ng、Py: 数 1,000 ng のオーダーであった。交通量の多い幹線道路に面した家屋の移住者は(1987、1988 年度同一対象者)の PAH 一日摂取量は他の対象者より約 2 倍～3 倍高かった。

文 献

- 1) O. E. Haenni, F. L. JOE, J. W. Howard, L. R. Leibel : *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 45, 59 (1962).
- 2) W. Lijinsky, I. Domskey, R. C. Raha : *ibid.*, 46, 725 (1963).
- 3) J. W. Howard, O. E. Haenni : *ibid.*, 48, 304 (1965).
- 4) W. Lijinsky, I. I. Domskey, J. Ward : *J. Gas Chromatogr.*, 3, 152 (1965).
- 5) I. Berthold : *Compend.* 74/75, Vortr. Haupttag. Dtsch. Ges. Mineruloelwiss. Kohlenchem., 24th 1974. CA. 83, 149830s.
- 6) J. W. Chamberlain, B. D. Walters, T. O. Chortyk : *Anal. Chim. Acta.*, 76, 213 (1975).
- 7) 食品添加物公定書 1 (1973).
- 8) T. Nakagaw, Y. Sato, A. Watabe, T. Kawamura. M. Morita : *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 19, 703 (1978).
- 9) 中川友夫, 佐藤洋子, 渡部 愛, 河村太郎, 森田昌敏 : 衛生化学, 26, 286 (1980).
- 10) 松下秀鶴, 加藤幸彦, 板橋美恵子, 久松由東 : 大気汚染学会誌, 16, 44 (1981).
- 11) S. A. Wise, S. N. Chesler, H. S. Hertz, L. R. Hilopert, W. E. May : *Anal. Chem.*, 49, 2306 (1977).
- 12) D. L. Park(ed.) : *Official Method of Analysis of AOAC.*, twelfth edition, 385 (1975).
- 13) M. Popl, M. Stejskal, J. Mostecky : *Anal. Chem.*, 47, 1947 (1975).
- 14) 増田 義人, 島村 京子, 矢野 弘重 : 食衛誌, 18, 362 (1977).
- 15) J. M. Daisey, M. A. Leyko : *Anal. Chem.*, 51, 24 (1979).
- 16) H. J. Klimish : *ibid.*, 45, 1960 (1973).
- 17) B. S. Das, G. H. Thomas : *ibid.*, 50, 967 (1978).
- 18) 白山 肇 : 日化, 1, 118 (1977).
- 19) Y. Masuda, M. Kuratsune : *Gann*, 62, 27 (1971).
- 20) 環境庁 国立公害研資料 中川友夫, 森田昌敏 : 二枚貝に含まれる多環系芳香族炭化水素, 79(1989).
- 21) 石館守三 : 生活環境と発ガンー大気. 水. 食品ー, 93 (1979) 朝倉書院, 東京.
- 22) 早津彦哉 : 生体と有害・発ガン物質, 76 (1982) 講談社サイエソティフィク, 東京.

- 23) 後藤澄尾, 加藤幸彦, 折井章子, 田中一幸, 久松由東, 松下秀鶴 : 大気汚染学会誌, 17, 295 (1982).
- 24) B. S. Das, G. H. Thomas : *Anal. Chem.*, 50, 967 (1978).

Table 1. B(a)P level in commercial liquid paraffin

No.	B(a)P ng/g
1	0.20
2	0.32
3	0.20
4	0.21
5	0.17
6	0.26
7	0.30
8	0.36
Mean	0.25

Table 2. PAH level in liquid paraffin and citric acid

	sample	B(a)P	B(e)P	B(k)F	B(b)F	Per	Dib(a,h)A
Liquid paraffin	1	nd ¹⁾	nd ²⁾	nd ³⁾	nd ⁴⁾	nd ⁵⁾	nd ⁶⁾
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
.....							
Citric acid	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	5	nd	nd	nd	nd	nd	nd

detection limit: 1) 12pg 2) 150pg 3) 10pg
4) 85pg 5) 8pg 6) 90pg

nd: not detected

Table 3. B(a)P levels in paraffin, ichthammol and yellow petrolatum

	sample	B(a)P
Paraffin	1	nd
	2	nd
	3	nd
	4	nd
.....		
Ichthammol	1	nd
	2	nd
	3	nd
	4	nd
	5	nd
.....		
Yellow petrolatum	1	1.75 ng/g
	2	1.40 ng/g
	3	0.20 ng/g

nd: not detected

**Table 4. Theoretical plate numbers and analytical time
various solvent flow rate or solvent
composition for the chromatography of B(a)P**

Solvent	Flow rate (ml/min)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Theoretical plate numbers
CH₃CN :H₂O				
100 : 0	2	2.0	1400	700
	1	4.0	700	1600
80 :20	3	5.3	3000	1800
	2	7.5	2000	3000
	1	16.2	1000	3800
	0.5	34.3	500	5400
70 :30	3	9.0	3000	3600
	2	13.0	2000	4300
	1	27.2	1000	5300
	0.5	59.7	500	5900
THF :H₂O				
90 :10	2	0.8	3000	200
70 :30	1	2.0	2900	600
50 :50	0.8	7.4	2700	1600
	0.4	15.7	1300	1900
CH₃OH :H₂O				
100 : 0	2	3.1	1800	1700
	1	5.8	1000	2000
90 :10	1	18.5	1200	3400
80 :20	1	58.0	2000	3700

THF: tetrahydrofuran.

Table 5. Recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from HPLC

	Sample 5(g)	Added (ng)	Recovery (%)
B(a)P	Katsuobushi (dreid bonito)	100	70
B(e)P	Katsuobushi (dreid bonito)	200	60
B(b)F	Katsuobushi (dreid bonito)	200	98
B(k)F	Katsuobushi (dreid bonito)	100	85
Per	Katsuobushi (dreid bonito)	50	72

Table 6. B(a)P levels in food stuffs

Food stuff	B(a)P		Food stuff	B(a)P
1 Katsuobushi (dried bonito)	11.8	12.5	17 Asakusanori (seaweed)	0.69
2 Katsuobushi (infusion)	0.03		18 Peanut butter	0.60
3 Sababushi (dried mackerel)	1.36	1.45	19 Chlorella	3.00
4 Namari (half-dried bonito)	0.92		20 Green tea	2.12
5 Kusaya	0.11		21 Black tea	9.91
6 Pork	0.04		22 Green tea (infusion)	0.08
7 Bacon(pork)	0.30		23 Black tea (infusion)	0.24
8 Salami sausage	0.47	0.64	24 Bread	0.01
9 Dried red pepper	2.26		25 Dried yeast	0.34
10 Soybeans	0.03		26 Yogurt	nd
11 Natto(fermented soybeans)	0.05		27 Milk	nd
12 Miso(bean paste)	0.06		28 Beer	nd
13 Polished rice	0.03		29 Rice vinegar	nd
14 Koji(rice yeast)	0.31		30 Sake (rice wine)	nd
15 Onion	nd		31 Wine (rose)	nd
16 Pineapple	nd		32 Whisky	nd

nd: not detected unit: ng/g

Table 7. Polycyclic aromatic hydrocarbons levels in food stuffs

Food stuff	B(a)P	B(e)P	B(b)F	B(k)F	Per
1 Katsuobushi (dried bonito)	12.50	nd	10.20	8.36	2.15
2 Namari (half-dried bonito)	0.92	nd	0.71	0.56	0.16
3 Bacon (pork)	0.30	nd	3.43	2.27	0.52
4 Asakusanori (seaweed)	0.69	nd	1.38	0.86	1.79
5 Peanut butter	0.60	nd	0.39	0.30	0.16
6 Dried red pepper	2.26	nd	3.60	2.89	0.58
7 Onion	nd	nd	nd	nd	nd
8 Pineapple	nd	nd	nd	nd	nd
9 Rice vinegar	nd	nd	nd	nd	nd

nd: not detected unit: ng/g

Table 8. Polyaromatic hydrocarbons contained in bivalves

No.	Sample name	Collecting place	Date of collection	Sample weight(g)	B(a)P (ng/g)	B(k)F (ng/g)	B(ghi)per (ng/g)
1	(B)	Kagoshima-Yakushima	1985-3-20	1.25	1.29	1.04	2.60
2	(B)	Ogasawara-Miyanohama	1984-3-28	1.32	0.14	0.15	0.18
3	(B)	Kagoshima-Nomaikeura	1985-3-21	3.98	0.28	0.50	0.41
4	(B)	Kagoshima-Yakushimaonsen	1985-3-20	2.65	0.52	1.28	4.57
5	(B)	Okinawa-Zanbamisaki	1986-2-20	1.83	0.02	0.08	0.37
6	(B)	Okinawa-Tsukenjima	1979-9-20	1.43	0.15	0.20	0.39
7	(B)	Miyakejima-Miikeko	1986-3-26	3.18	0.68	0.85	1.19
8	(B)	Okinawa-Zamamito	1986-2-24	2.96	0.20	0.41	0.26
9	(B)	Okinawa-Itonawa	1986-2-28	2.99	0.22	0.30	0.39
10	(B)	Ogasawara-Hutami	1984-3-29	1.60	0.13	0.15	0.30
11	(B)	Shizuoka-Hamanako	1985-3-30	9.00	0.32	0.57	0.80
12	(B)	Okinawa-Iheyajima	1986-3-17	10.00	0.14	0.23	0.22
13	(B)	Okinawa-Shorechoukiharajima	1986-7-23	10.00	0.05	0.08	0.11
14	(B)	Okinawa-Shirigunkumejimaokutakejima	1987-3-4	9.50	0.33	0.43	0.37
15	(B)	Kagoshima-Yakushimaonsen	1985-3-20	10.00	0.12	0.13	0.24
21	(D)	Kagoshima-Nomaikeura	1985-3-21	1.83	0.30	0.52	0.80
22	(C)	Kagoshima-Dagutsumisaki	1985-3-22	10.65	0.04	0.14	0.20
23	(C)	Gotouaretto-Nakadorijimanigori	1983-10-20	7.93	0.27	0.21	0.53
24	(C)	Gotouaretto-Nakadorijimanarao	1983-10-20	0.88	0.18	0.26	0.39
25	(C)	Gotouaretto-Kiri-1	1983-10-20	0.89	0.55	0.52	1.39
26	(C)	Nagasaki-Tsushima	1986-7-31	13.58	0.02	0.11	0.23
27	(C)	Nagasaki-Tsushimauwazuki	1986-7-31	12.76	0.03	0.09	0.14
28	(C)	Shimane-Ikushima	1983	12.77	0.07	0.55	0.25
29	(A)	Hiroshima-Ohnasamijima	1986-7-22	12.55	0.01	0.02	0.02
30	(A)	Hyogo-Aioi	1986-8	12.08	0.31	0.45	0.42
31	(A)	Hyogo-Aioi	1986-8	19.53	0.29	0.64	0.65
32	(A)	Mie-Matoyawan	1983	18.70	13.90	11.7	12.5
33	(A)	Mie-Matoyawan	1984-11-19	10.70	14.51	20.0	9.12
34	(A)	Mie-Matoyawan	1984-11-19	3.25	5.80	8.58	5.71
35	(A)	Nigata-Sado	1984-7-29	10.31	0.06	0.21	0.22
36	(C)	Ibaraki-Hiraiso	1987-1-15	5.60	0.54	0.57	1.37
37	(C)	Miyagi-Kinkazan	1985-3-28	11.17	0.14	0.21	0.23
42	(A)	Hokkaido-Onishika	1984-7-20	16.80	0.11	0.11	0.15
43	(D)	Miyakejima-Airport	1986-3-27	6.98	0.65	1.20	1.81
51	(A)	Iwate-Yamadawan	1981-10-31	10.00	4.55	4.58	3.77
52	(A)	Iwate-Yamadawan	1982-10	10.00	2.28	3.25	2.60
53	(A)	Naruto		10.00	0.07	0.13	0.12
54	(A)	Tokushima		10.00	0.05	0.09	0.09
55	(A)	Tokyowan	1979	10.00	2.70	2.50	—
56	(A)	Ishikawa	1985	10.00	0.22	0.55	0.45
57	(A)	Iwate-Yamadawan	1979	10.00	1.66	2.42	0.68
58	(A)	Iwate-Yamadawan	1978-12-5	10.00	5.91	7.42	4.50

(A) *Mytilus edulis*

(C) *Septifer vuirgatug*

(B) *Saxostrea mordax*

(D) *Septifer bilocularis pilosus*

Table 9 (1). Comparison of PAH concentration and ingestion from food

Concentration of PAH in food (unit: ng/g)						
Year	Month	B(k)F	B(a)P	B(ghi)Per	An	Py
1987	August	0.02±0.04	0.02±0.04	0.02±0.04	—	—
	December	0.04±0.03	0.04±0.03	0.04±0.02	—	—
1988	August	0.01±0.01	0.02±0.03	0.03±0.02	—	—
	December	0.03±0.01	0.03±0.03	0.05±0.03	—	—
1989	August	0.03±0.05	0.05±0.13	0.05±0.12	0.24±0.34	0.98±0.49
	December	0.02±0.01	0.03±0.04	0.05±0.04	0.14±0.14	1.15±0.53
Daily ingestion of PAH from food (unit: ng/g)						
Year	Month	B(k)F	B(a)P	B(ghi)Per	An	Py
1987	August	35±85	45±93	39±81	—	—
	December	85±70	79±67	88±44	—	—
1988	August	29±35	46±83	61±64	—	—
	December	57±25	59±29	91±33	—	—
1989	August	57±109	109±284	108±246	459±716	1799±10
	December	32±29	66±92	97±105	314±349	2312±12
Total PAH: 119(81) ² 252(74) 136(85) 207(64) 274(89) 195(62)						

1: Total PAH: sum of B(k)F+B(a)P+B(ghi)per 2: () is percentage contribution of food to the total uptake of PAH

Table 9 (2). Comparison of PAH concentration and ingestion from indoor air

Concentration of PAH in house air (unit: ng/m³)

Year	Month	B(k)F	B(a)P	B(ghi)Per	An	Py
1987	August	0.32±0.21	0.32±0.28	0.75±0.52	—	—
	December	0.99±0.39	0.97±0.48	2.55±0.80	—	—
1988	August	0.28±0.15	0.27±0.27	0.69±0.43	—	—
	December	1.08±0.49	1.74±1.29	3.02±1.41	—	—
1989	August	0.44±0.21	0.40±0.28	0.92±0.42	0.10±0.00	0.70±0.21
	December	1.3±1.5	1.7±2.0	2.9±1.6	—	—

Daily ingestion of PAHs from house air

(unit: ng/day)

Year	Month	B(k)F	B(a)P	B(ghi)Per	An	Py	Total PAH ¹
1987	August	6.47±4.71	6.44±5.56	15.0±10.4	—	—	27.9(19) ²
	December	19.9±7.74	19.4±9.58	51.0±16.0	—	—	90.3(26)
1988	August	5.62±2.94	5.45±5.40	13.77±8.68	—	—	24.8(15)
	December	21.6±9.72	34.8±25.8	60.4±28.1	—	—	117(36)
1989	August	8.9±4.2	7.9±5.6	18.4±8.4	2.0±0.0	14.1±4.1	35.2(11)
	December	26.6±29.6	33.6±40.3	57.6±32.9	—	—	118(38)

1: Total PAH : sum of B(k)F+B(a)P+B(ghi)Per

2: () is percentage contribution of air to total uptake of PAH

Table 10 (1). Amount of ingestion of PAH and the percentage contribution by category (Year 1987)

Category	Ingestion amount	PAH	Concentration	Daily uptake	Daily ingestion	Contribution
	(g/day)		(ng/kg)	(ng/day)	(ng/day)	(%)
Food	summer 1294-2649	B(k)F	summer nd ^b ~220	6.7~466	39.7±83.2	86.1
		winter	15~149	24.3~223	84.7±69.7	81.0
	winter 1281-3076	B(a)P	summer nd ^a ~250	3.8~529.2	45.1±93.0	87.5
		winter	16~146	26.9~333	79.4±67.0	80.4
		B(ghi)Per	summer nd ^c ~211	3.4~446.6	41.1±80.0	73.3
		winter	19~100	38.1~228	87.7±44.4	63.2
Air		B(k)F	summer 0.01~0.82	0.20~16.5	6.43±4.71	13.9
		winter	0.45~1.72	9.00~34.4	19.9±9.58	19.0
	20	B(a)P	summer 0.01~1.11	0.14~222	6.44±5.56	12.5
		winter	0.29~1.93	5.82~38.7	19.4±9.58	19.6
		B(ghi)Per	summer 0.05~1.85	0.98~37.0	15.0±10.4	26.7
		winter	1.08~3.98	21.6~79.6	51.0±16.0	36.8

a :< 5ng/kg b :< 10ng/kg c :< 5ng/kg

Table 10 (2). Amount of ingestion of PAH and the percentage contribution by category (Year 1988)

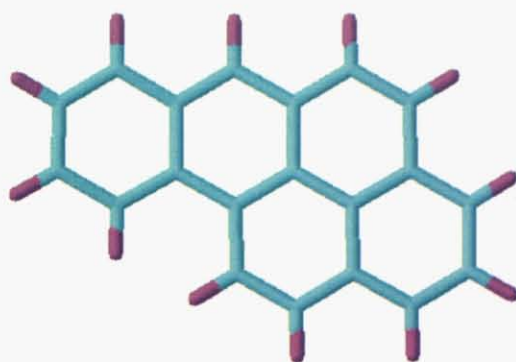
Category	Ingestion amount	PAH	Concentration	Daily uptake	Daily ingestion	Contribution
	(g/day)		(ng/kg)	(ng/day)	(ng/day)	(%)
Food	summer 1102-3142	B(k)F	summer	7.1~172.8	28.6±34.9	83.6
			winter	9.8~122.2	56.9±30.5	72.5
	winter 1275-3167	B(a)P	summer	4.1~411.5	46.2±83.0	89.4
			winter	14.3~253.2	59.0±52.9	62.9
		B(ghi) Per	summer	4.1~333.0	60.8±63.9	81.5
			winter	20.6~299.1	91.1±58.0	60.1
		B(k)F	summer	1.17~14.4	5.62±2.95	16.4
			winter	6.80~50.8	21.61±9.72	27.5
	20	B(a)P	summer	0.51~21.5	5.45±5.40	10.6
			winter	3.60~110.2	34.75±25.83	37.1
Air		B(ghi) Per	summer	2.75~41.7	13.77±8.68	18.5
			winter	14.8~133.6	60.39±28.09	39.9

a :< 10ng/kg b :< 5ng/kg c :< 5ng/kg

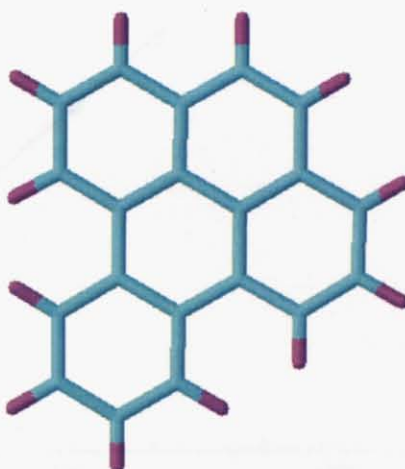
Table 10 (3). Amount of ingestion of PAH and the percentage contribution by category (Year 1989)

Category	Ingestion amount	PAH	Concentration	Daily uptake	Daily amount	Contribution
	(g/day)		(ng/kg)	(ng/day)	(ng/day)	(%)
Food	summer 1080-2357	B(k)F	summer	5.4~533.6	56.7±108.9	86.4
			winter	6.8~129.7	32.2±28.9	54.8
		B(a)P	summer	9.2~1354.7	109.1±283.6	93.2
			winter	9.4~396.3	66.3±92.0	66.4
	winter 1291-2886	B(ghi)Per	summer	21.7~1184.4	107.5±246.9	85.4
			winter	21.5~464.1	97.3±105.1	62.8
		An	summer	27.0~3411.8	459.1±715.8	99.6
			winter	32.3~1141.9	313.8±348.8	—
		Py	summer	589.4~4376.3	1798.9±1095.5	99.2
			winter	716.9~5532.4	2311.6±1289.8	—
		B(k)F	summer	1.3~17.7	8.9±4.2	13.6
			winter	8.2~146.8	26.6±29.6	45.2
Air	20	B(a)P	summer	0.7~17.7	7.9±5.6	6.8
			winter	7.8~199.7	33.6±40.3	33.6
		B(ghi)Per	summer	6.4~35.3	18.4±8.4	14.6
			winter	22.1~175.8	57.6±32.9	37.2
		An	summer	2.0	2.0±0	0.4
			winter	—	—	—
		Py	summer	9.5~27.0	14.1±4.1	0.8
			winter	—	—	—
		B(k)F	summer	1.3~17.7	8.9±4.2	13.6
			winter	8.2~146.8	26.6±29.6	45.2
		B(a)P	summer	0.7~17.7	7.9±5.6	6.8
			winter	7.8~199.7	33.6±40.3	33.6

a : < 10ng/kg b : < 50ng/kg c : < 0.2ng/m³



Benzo(a)pyrene
(3,4-benzopyrene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[50-32-8]



Benzo(e)pyrene
(4,5-benzopyrene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[192-97-2]

Fig. 1. Structure of benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene

 Hydrogen
 Carbon

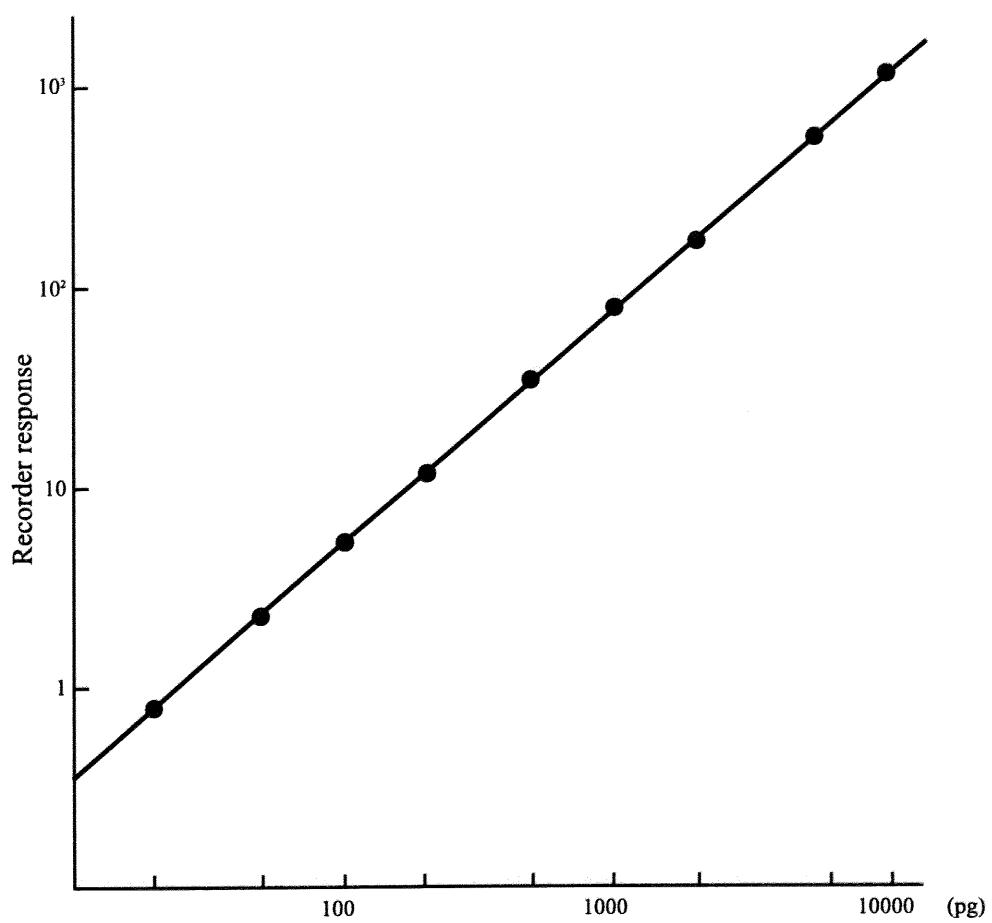


Fig. 2. Calibration curve of benzo(a)pyrene

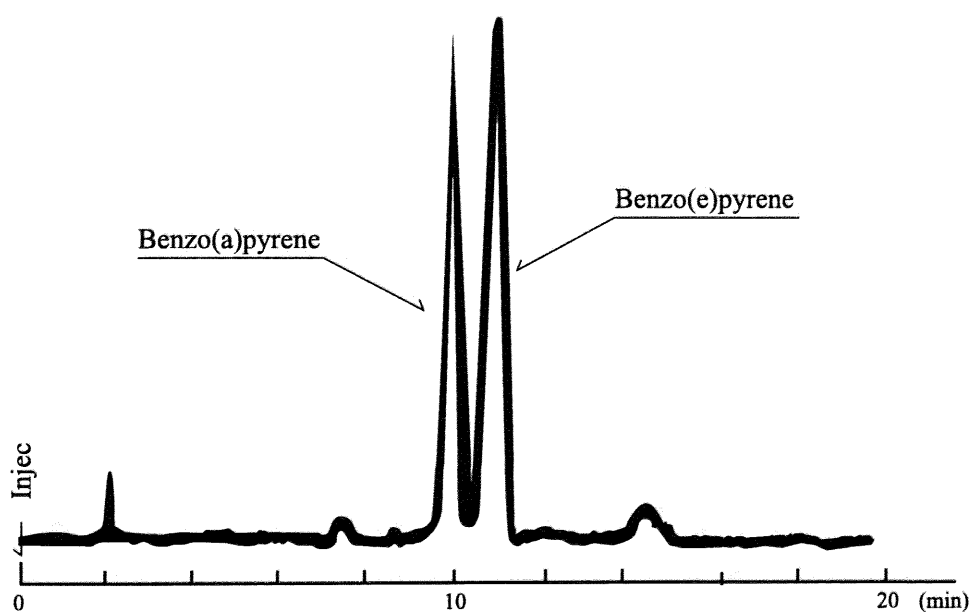


Fig. 3. Separation of benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene

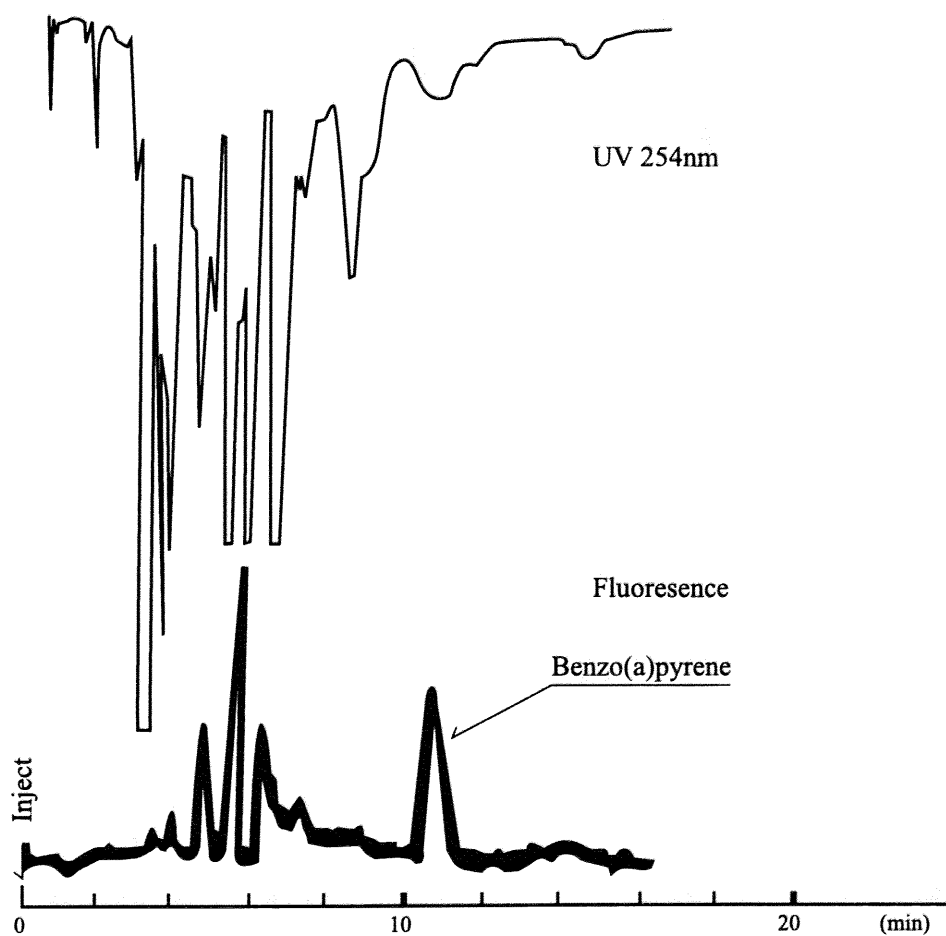


Fig. 4. Chromatograms of liquid paraffin

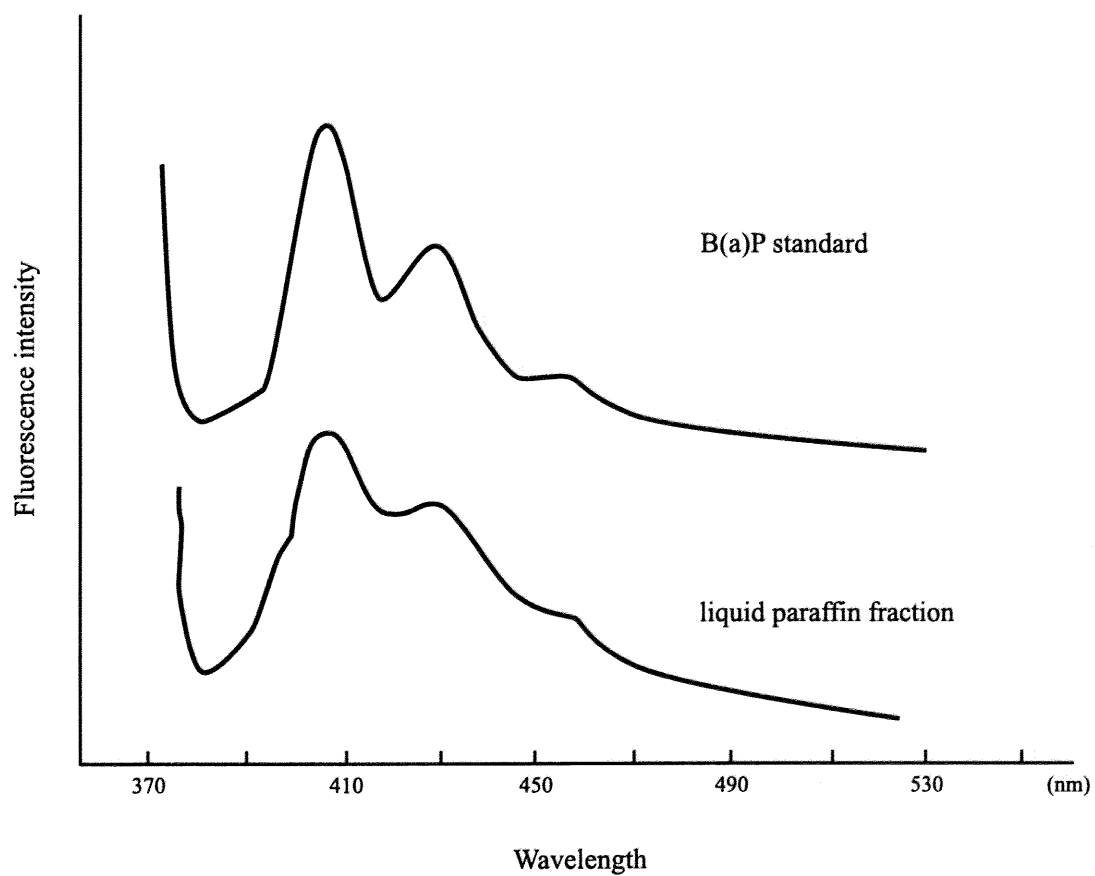


Fig. 5. Emission spectra of B(a)P corresponding fraction and a standard B(a)P EX. 366nm

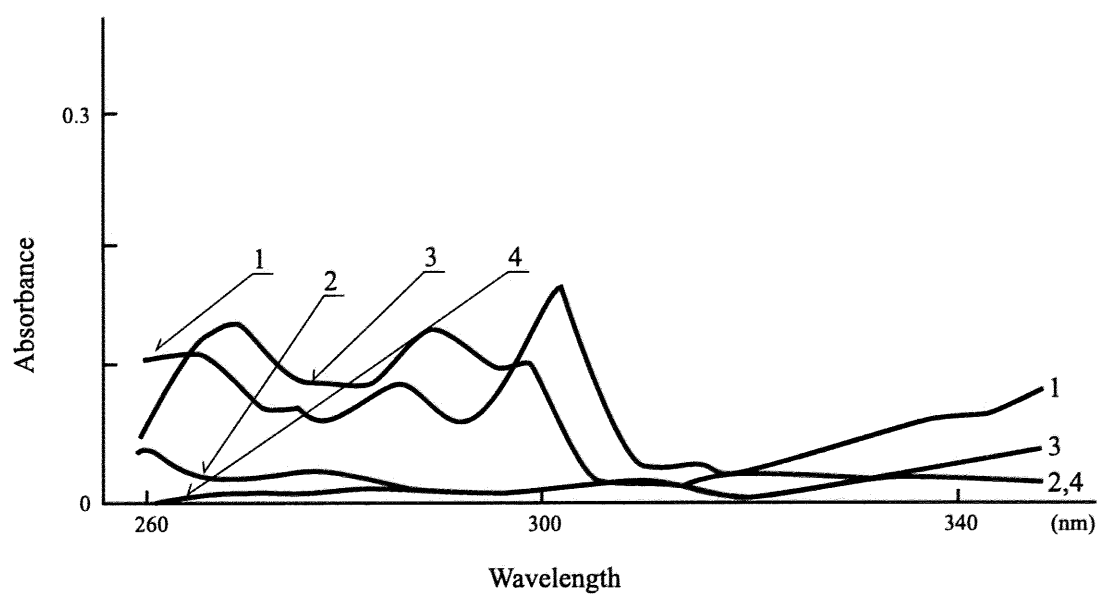


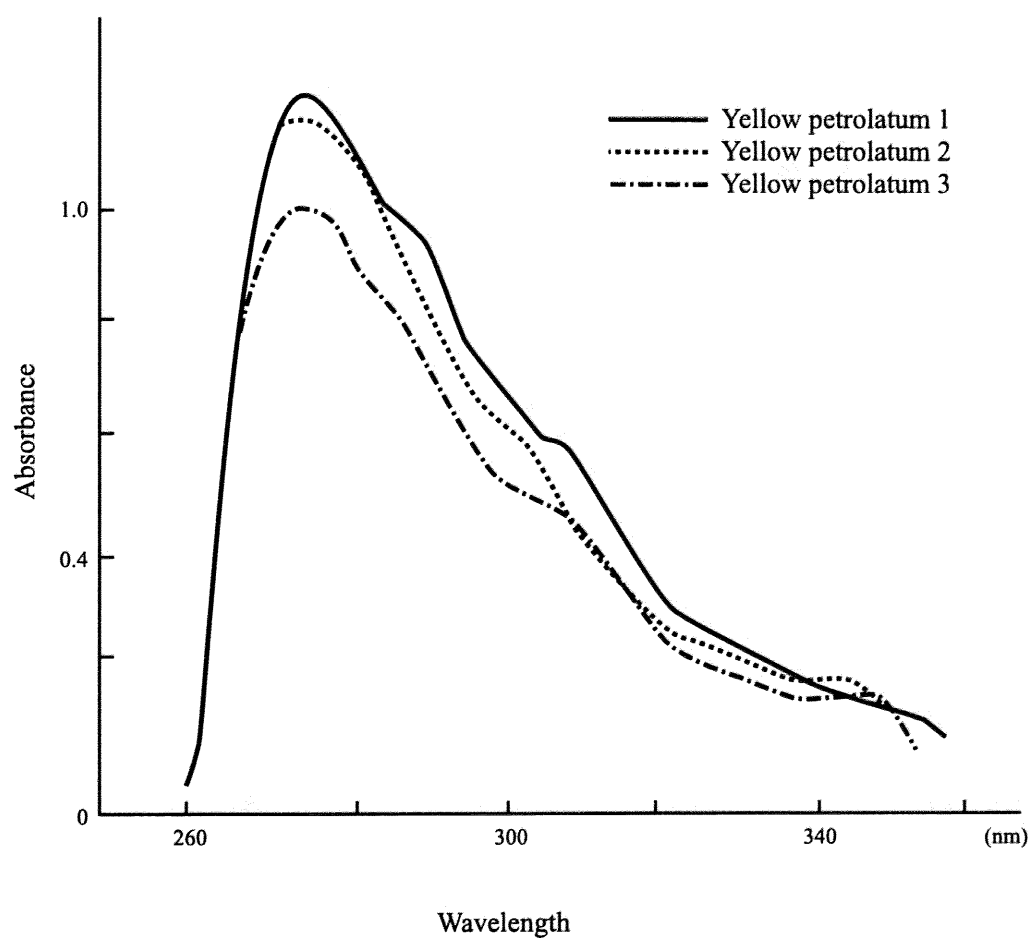
Fig. 6. UV spectra of liquid paraffin and citric acid

**1 Liquid paraffin+B(a)P 1.0 $\mu\text{g/ml}$
(DMSO solution)**

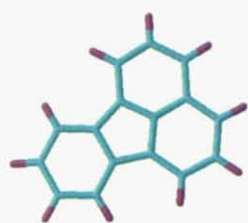
2 Liquid paraffin (DMSO solution)

**3 Citric acid+B(a)P 5.0 $\mu\text{g/ml}$
(Hexane solution)**

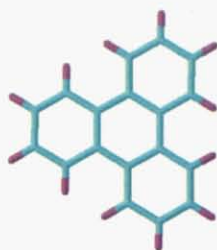
4 Citric acid (Hexane solution)



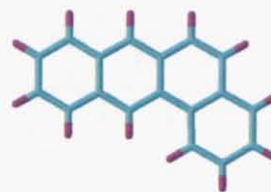
**Fig. 7. UV spectra of yellow petrolatum
solvent: DMSO
Sample size: 1g(yellow petrolatum)**



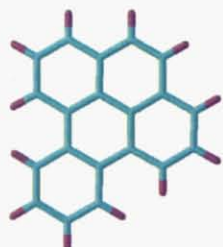
(1) Fluoranthene
(1,2-benzacenaphthylene)
 $C_{16}H_{10}$
MW. 202.26
CAS[206-44-0]



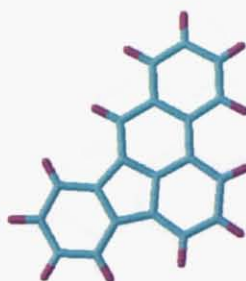
(2) Triphenylene
(9,10-benzophenanthrene)
 $C_{18}H_{12}$
MW. 228.29
CAS[217-59-4]



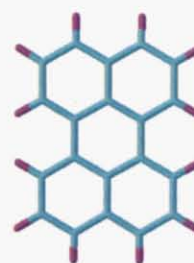
(3) Benz(a)anthracene
(1,2-benzanthracene)
 $C_{18}H_{12}$
MW. 228.29
CAS[56-55-3]



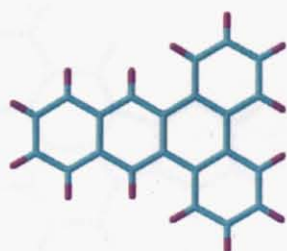
(4) Benzo(e)pyrene
(4,5-benzopyrene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[192-97-2]



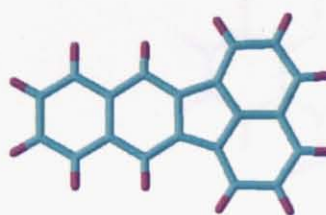
(5) Benzo(b)fluoranthene
(3,4-benzofluoranthene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.31
CAS[205-99-2]



(6) Perylene
(dibenz(de,kl)anthracene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.31
CAS[198-55-0]



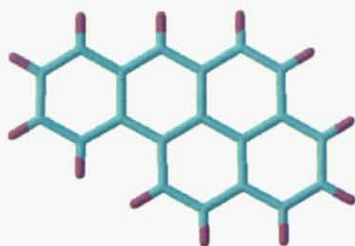
(7) Dibenz(a,c)anthracene
(1,2,3,4-dibenzanthracene)
 $C_{22}H_{14}$
MW. 278.34
CAS[215-58-7]



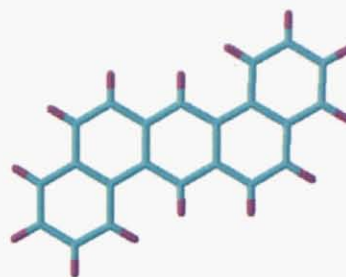
(6) Benzo(k)fluoranthene
(8,9-benzofluoranthene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.31
CAS[207-08-9]

Fig. 8(1). Structure of polycyclic aromatic hydrocarbons

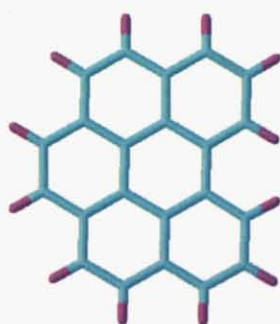
■ Hydrogen
■ Carbon



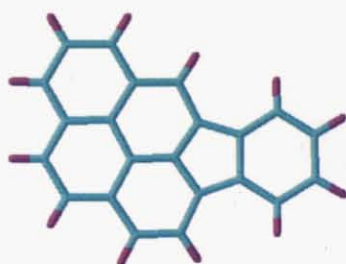
(9) Benzo(a)pyrene
(3,4-benzopyrene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[50-32-8]



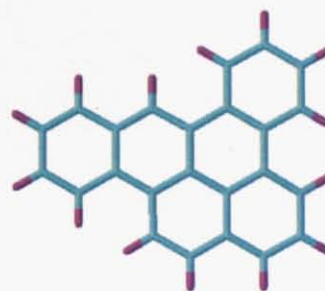
(10) Dibenz(a,h)anthracene
(1,2:5,6-dibenzanthracene)
 $C_{22}H_{14}$
MW. 278.35
CAS[53-70-3]



(11) Benzo(ghi)perylene
(1,12-benzoperylene)
 $C_{22}H_{12}$
MW. 276.33
CAS[191-24-2]



(12) Indeno(1,2,3-cd)pyrene
(o-phenylene-pyrene)
 $C_{22}H_{12}$
MW. 276.33
CAS[193-39-5]



(13) 1,2,4,5-Dibenzpyrene
(naphtho(1,2,3,4-def)chrysene)
 $C_{24}H_{14}$
MW. 302.38
CAS[192-65-4]

Fig. 8(2). Structure of polycyclic aromatic hydrocarbons

 Hydrogen
 Carbon

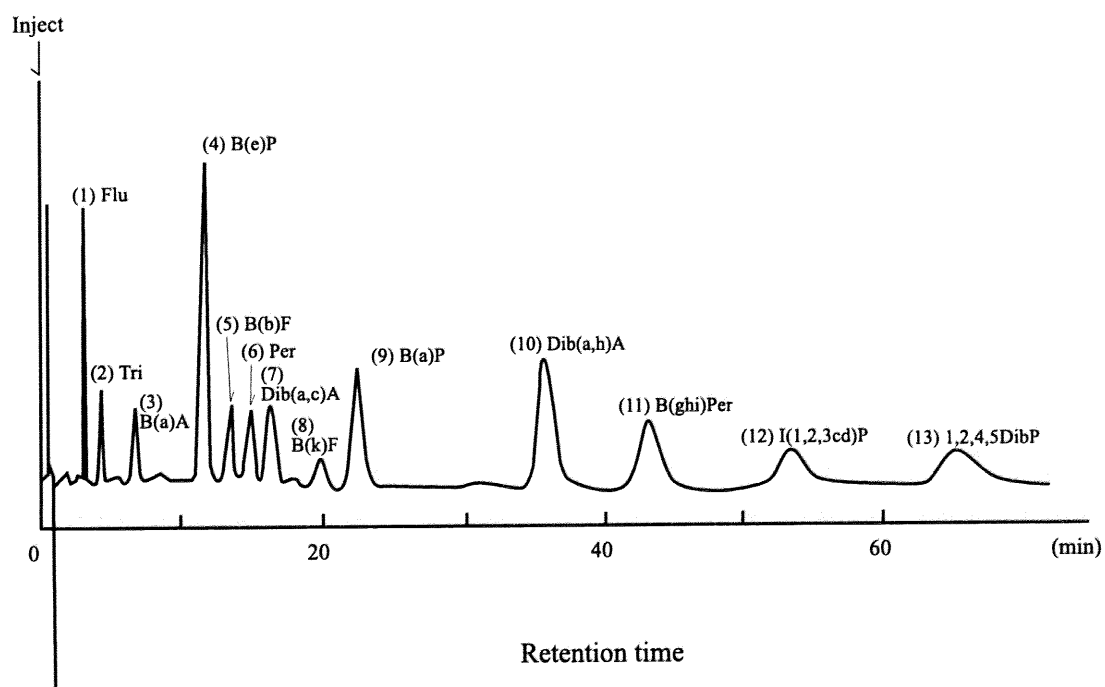
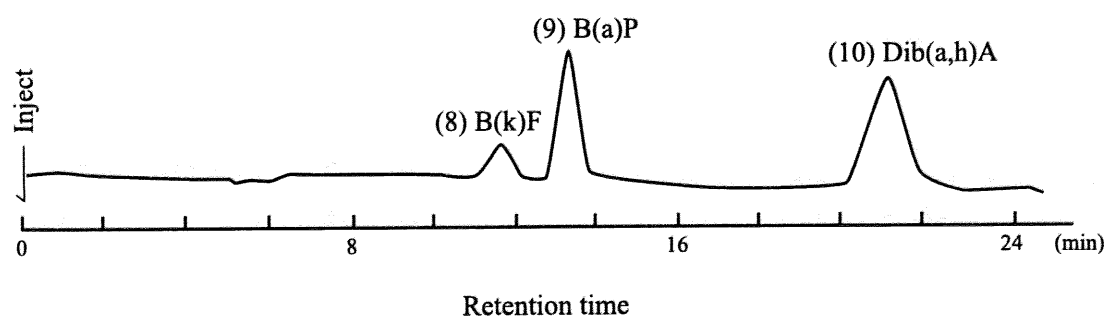


Fig. 9. Chromatogram of various polycyclic aromatic hydrocarbons on Perkin-Elmer/Analytical PAH column
Sample: PAH
Solvent: CH₃CN—H₂O (70:30)
Flow rate: 1.5ml/min
Column: Perkin-Elmer/Analytical PAH
(2.6mm ϕ $\times$ 250mm)
Detector: Ultraviolet 254nm



**Fig. 10. High performance liquid chromatography
of polycyclic aromatic hydrocarbons**
Sample: B(a)P, B(k)F, Dib(a,h)A
Solvent: CH₃CN—H₂O (70:30)
Flow rate: 2.0ml/min
Column: Perkin-Elmer/Analytical PAH
(2.6mm ϕ $\times$ 250mm)
Detector: Fluorescence Ex. 298nm, Em. 407nm

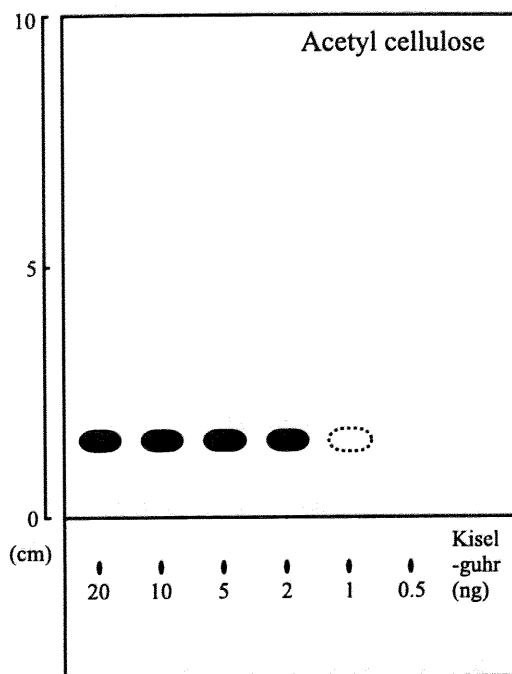


Fig. 11. Development of B(a)P
TLC plate:
 Acetyl cellulose/Kieselguhr
 dual bond type (20cm × 20cm)
Solvent:
 Ethyl ether-ethanol-water
 (40:40:10)

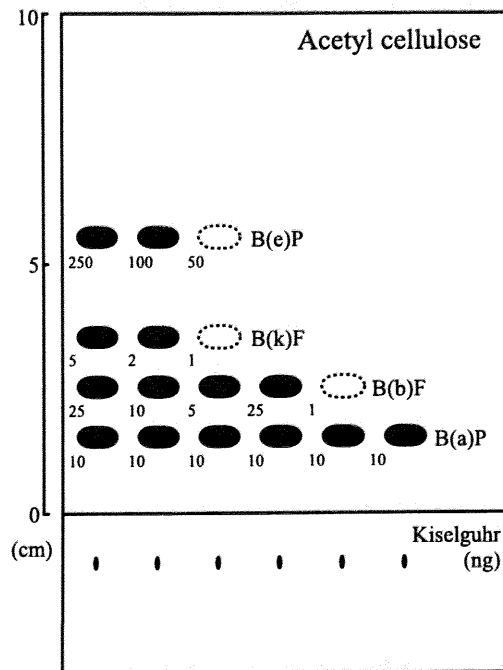
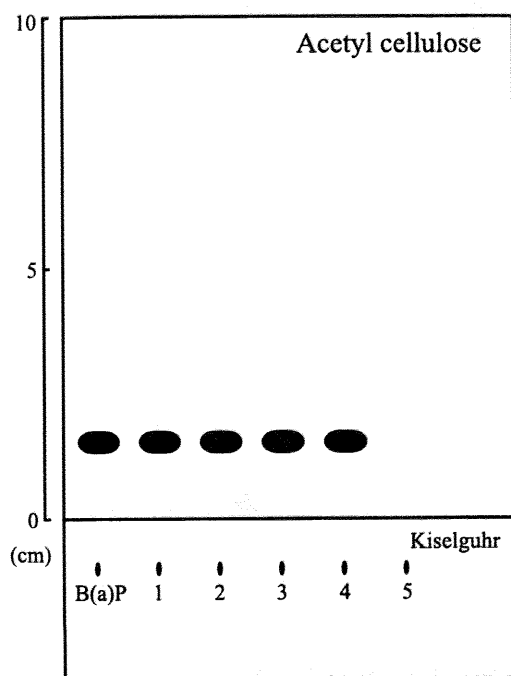


Fig. 12. Development of polycyclic aromatic hydrocarbons
TLC plate:
 Acetyl cellulose/Kieselguhr
 dual bond type (20cm × 20cm)
Solvent:
 Ethyl ether-ethanol-water
 (40:40:10)



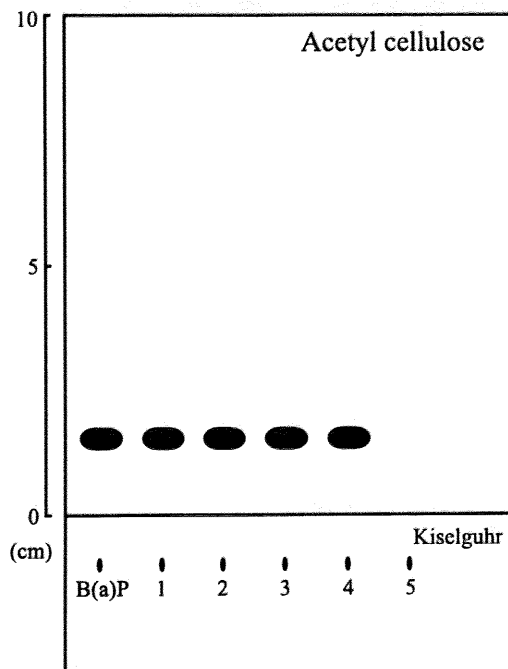
**Fig. 13. Chromatogram of
a liquid paraffin spiked with
200ng/ml B(a)P standard**

TLC plate:

**Acetyl cellulose/Kieselguhr
dual bond type (20cm × 20cm)**

Solvent:

**Ethyl ether-ethanol-water
(40:40:10)**



**Fig. 14. Chromatogram of
citric acid spiked with
200ng/ml B(a)P standard**

TLC plate:

**Acetyl cellulose/Kieselguhr
dual bond type (20cm × 20cm)**

Solvent:

**Ethyl ether-ethanol-water
(40:40:10)**

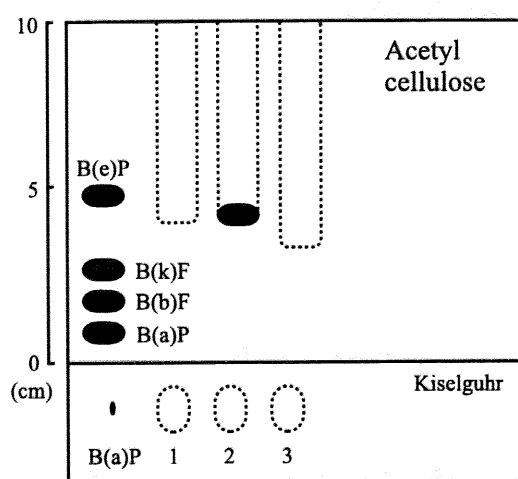


Fig. 15. Chromatogram of yellow petrolatum

TLC plate:

**Acetyl cellulose/Kiselguhr
dual bond type (20cm × 20cm)**

Solvent:

**Ethyl ether-ethanol-water
(40:40:10)**

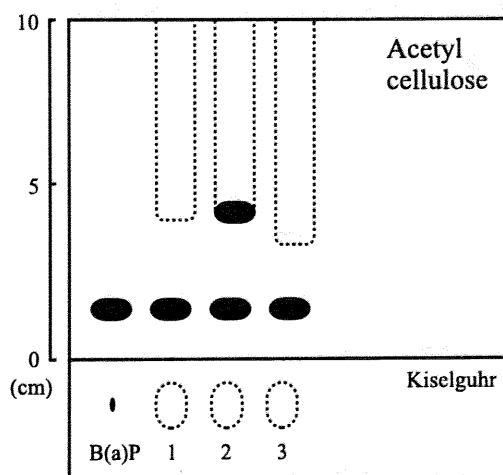


Fig. 16. Chromatogram of yellow petrolatum spiked with 200ng/ml of B(a)P standard

TLC plate:

**Acetyl cellulose/Kiselguhr
dual bond type (20cm × 20cm)**

Solvent:

**Ethyl ether-ethanol-water
(40:40:10)**

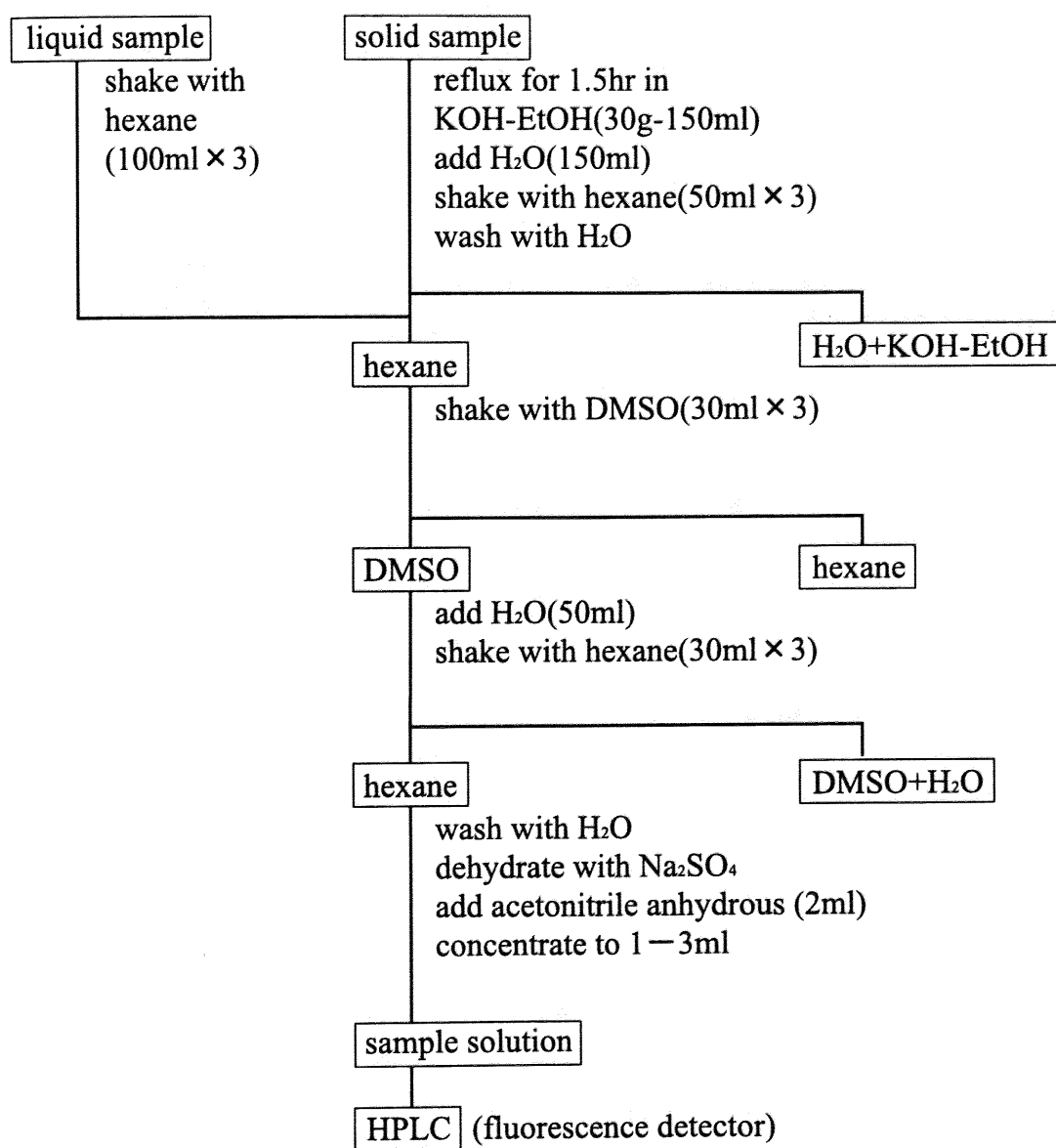


Fig. 17. Procedure for preparation of HPLC samples

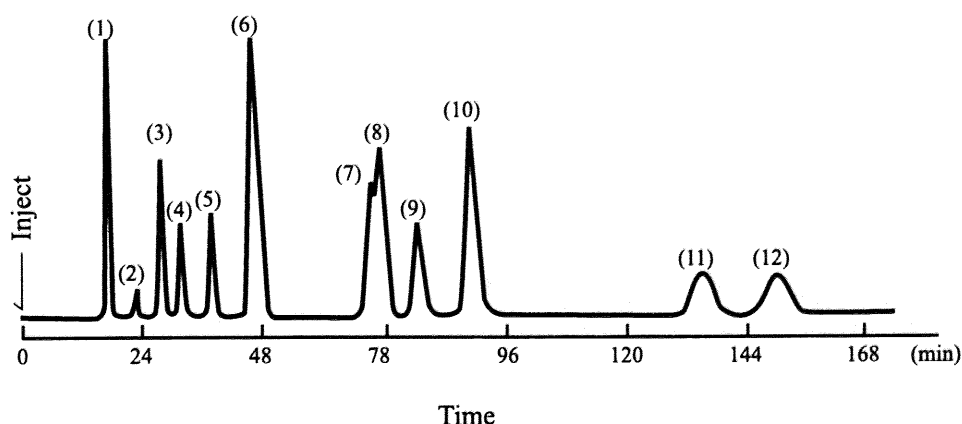


Fig. 18. Chromatogram of various polycyclic aromatic hydrocarbons by Lichrosorb RP-18

Solvent :CH₃CN:H₂O (70:30)

Flow rate :0.4ml/min

Pressure :7 ×100 psi

Column :Lichrosorb RP-18
(4mmϕi.d. × 250mm)

Detector :UV 254nm

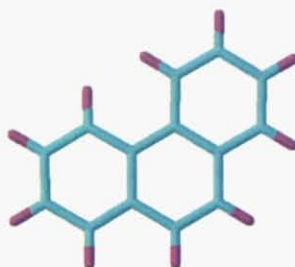
Peaks : (1) fluorene (2) phenanthrene
(3) fluoranthene (4) pyrene
(5) triphenylene (6) chrysene
(7) B(e)P (8) B(b)F (9) B(k)F
(10) B(a)P (11) 1,12 benzoperyrene
(12) picene

Concentration:

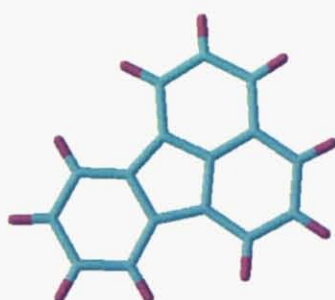
(1)10 μg/ml (2)1 μg/ml (3)10 μg/ml
(4)10 μg/ml (5)30 μg/ml (6)10 μg/ml
(7)150 μg/ml (8)100 μg/ml
(9)10 μg/ml (10)10 μg/ml
(11)20 μg/ml (12)20 μg/ml



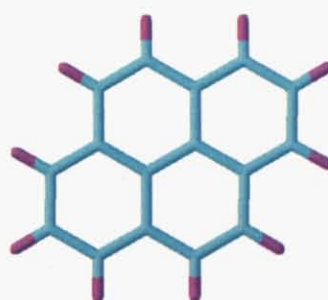
(1) Fluorene
(dibenzocyclopentadiene)
 $C_{13}H_{10}$
MW. 166.22
CAS[86-73-7]



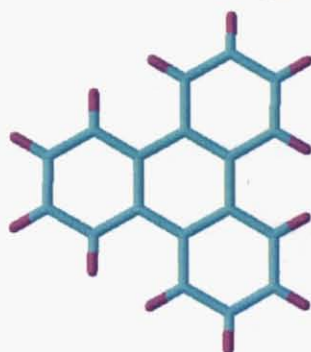
(2) Phenanthrene
(phenantrine)
 $C_{14}H_{10}$
MW. 178.23
CAS[85-01-8]



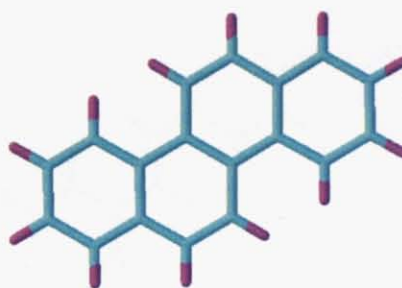
(3) Fluoranthene
(1,2-benzacenaphthylene)
 $C_{16}H_{10}$
MW. 202.26
CAS[206-44-0]



(4) Pyrene
(benzo(def)phenanthrene)
 $C_{16}H_{10}$
MW. 202.30
CAS[129-00-0]



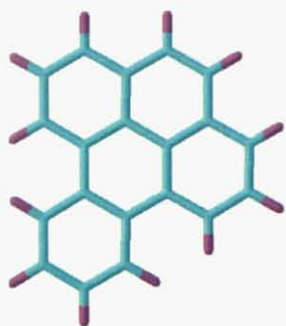
(5) Triphenylene
(9,10-benzophenanthrene)
 $C_{18}H_{12}$
MW. 228.29
CAS[217-59-4]



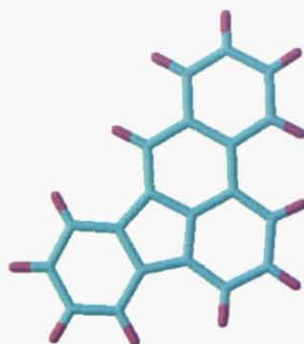
(6) Chrysene
(2-benzophenanthrene)
 $C_{18}H_{12}$
MW. 228.29
CAS[218-01-9]

Fig. 18(1). Structure of polycyclic aromatic hydrocarbons

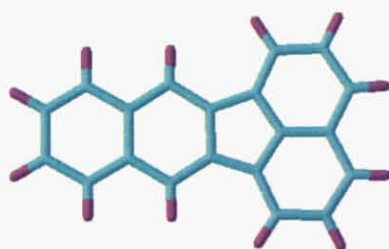




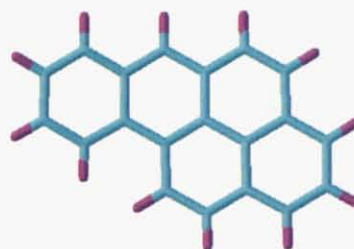
(7) Benzo(e)pyrene
(4,5-benzopyrene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[192-97-2]



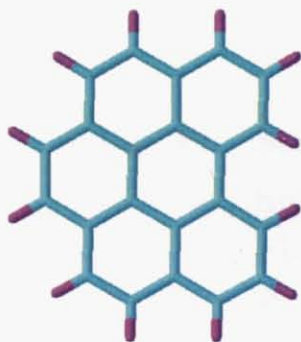
(8) Benzo(b)fluoranthene
(3,4-benzofluoranthene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.31
CAS[205-99-2]



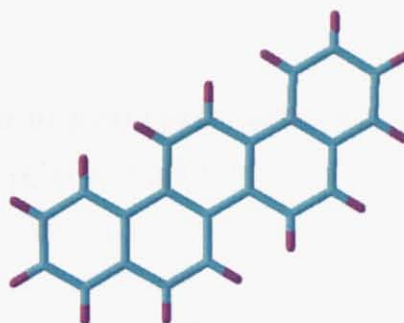
(9) Benzo(k)fluoranthene
(8,9-benzofluoranthene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[207-08-9]



(10) Benzo(a)pyrene
(3,4-Benzopyrene)
 $C_{20}H_{12}$
MW. 252.32
CAS[50-32-8]



(11) Benzo(ghi)perylene
(1,12-benzoperylene)
 $C_{22}H_{12}$
MW. 276.33
CAS[191-24-2]



(12) Picene
(1,2:7,8-dibenzophenanthrene)
 $C_{22}H_{14}$
MW. 278.35
CAS[213-46-7]

Fig. 18(2). Structure of polycyclic aromatic hydrocarbons

 Hydrogen
 Carbon

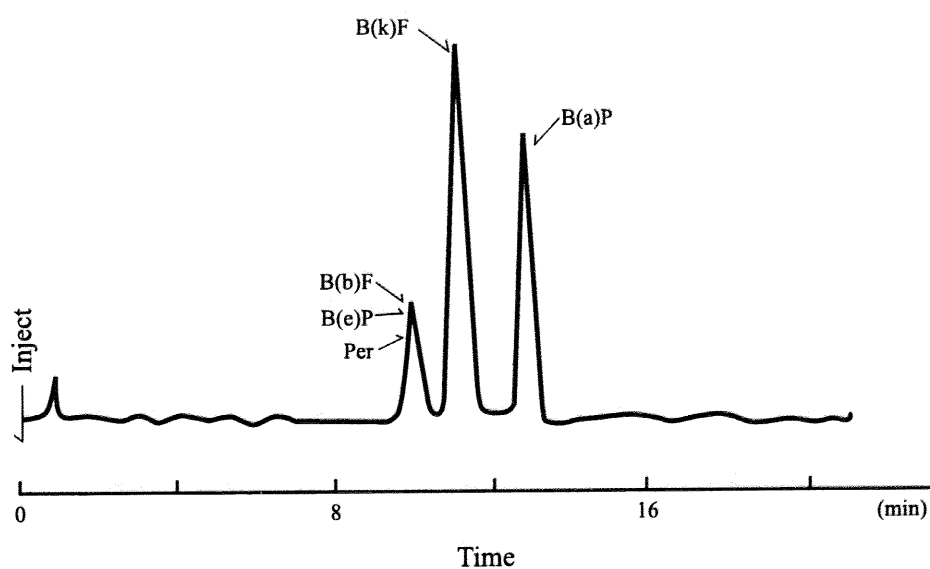


Fig. 19. Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons

Solvent :CH₃CN:H₂O(70:30)

Flow rate :2ml/min

Pressure :2 ×1000 psi

Column :Lichrosorb RP-18

Dectector :fluorescence monitor

Ex. 384nm, Em. 406nm

Concentration:

B(a)P 50ng/ml, B(k)F 160ng/ml,

B(b)F 1 μg/ml, B(e)P 9 μg/ml,

Per 5 μg/ml

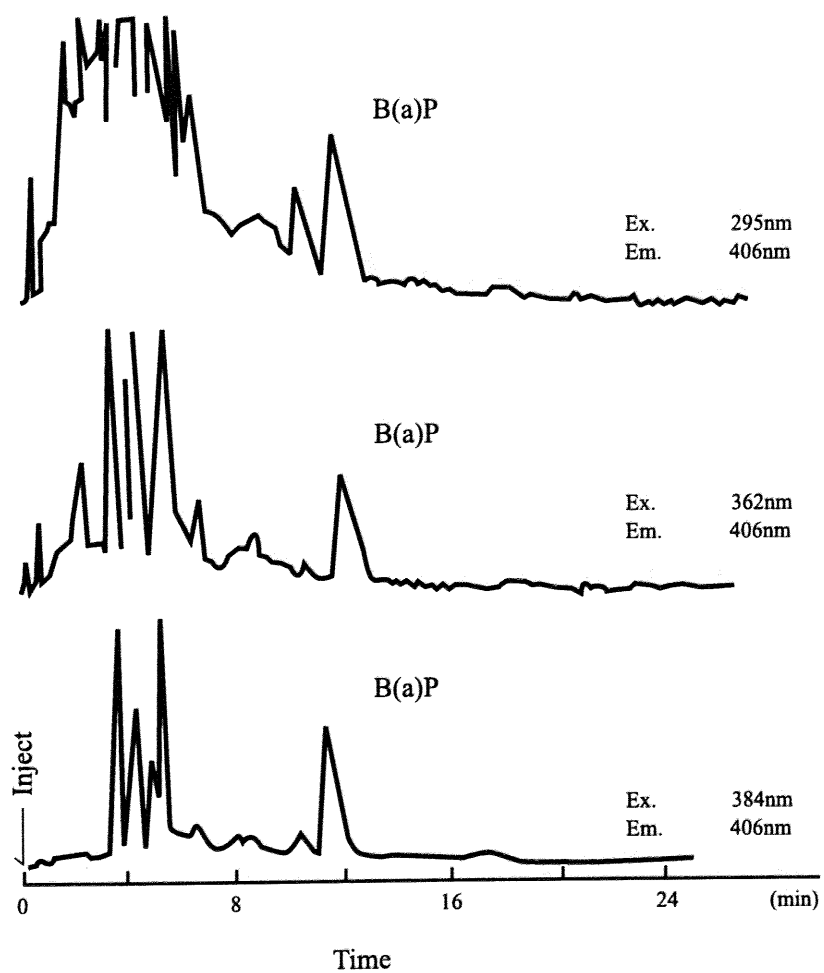


Fig. 20. Chromatograms of katsuobushi (dried bonito) with different excitation wavelengths

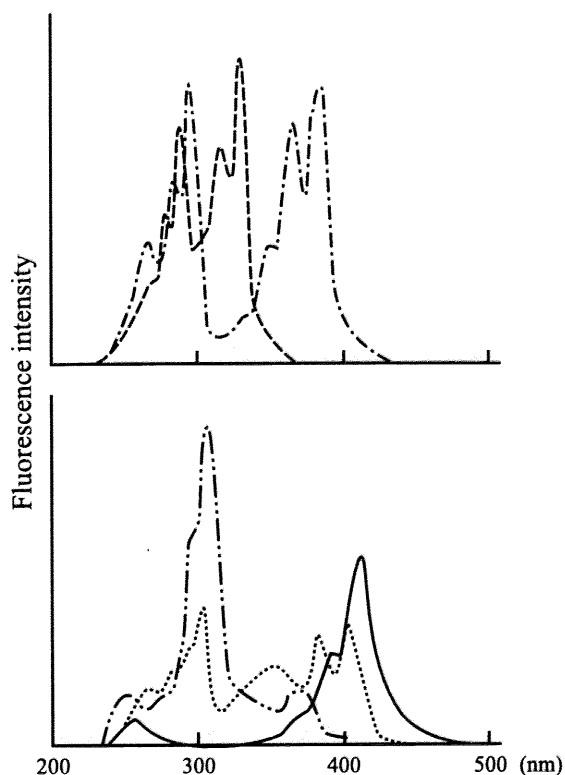


Fig. 21(1).

**Excitation spectra of B(a)P,
B(b)F, B(e)P, B(k)F and Per
(Em. B(a)P:406nm,
B(b)F:439nm, B(e)P:396nm,
B(k)F:421nm, Per:440nm)**

Concentrarion:

**B(a)P 50ng/ml: B(b)F 50ng/ml:
B(e)P 330ng/ml: B(k)F16ng/ml:
Per10ng/ml**

**B(a)P ---- B(b)F ---- B(e)P ----
B(k)F Per ——**

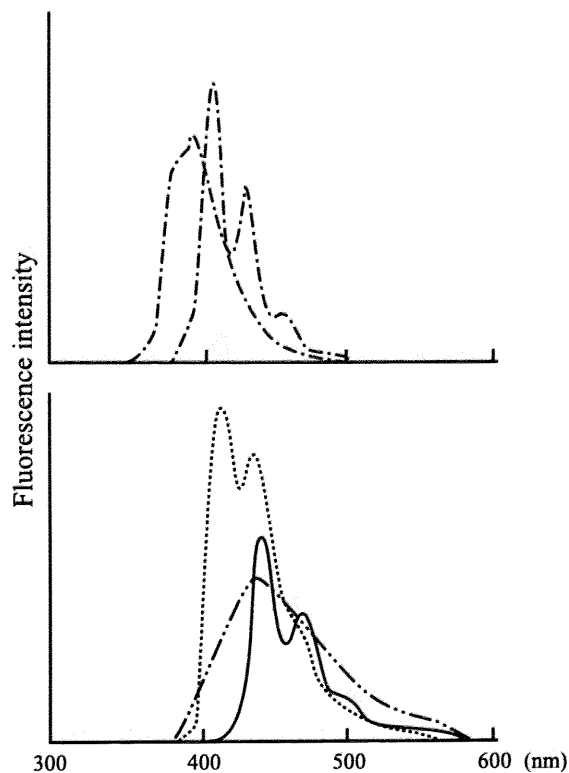


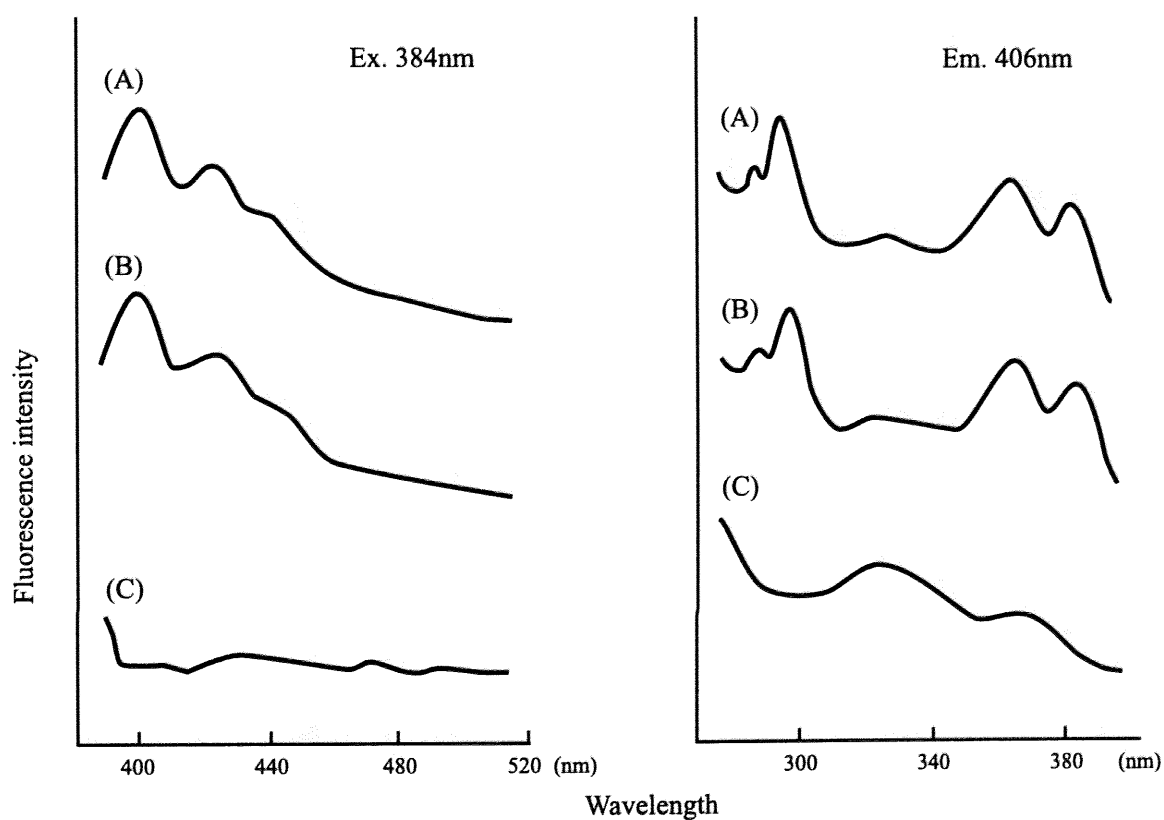
Fig. 21(2).

**Excitation spectra of B(a)P,
B(b)F, B(e)P, B(k)F and Per
(Em. B(a)P:384nm,
B(b)F:300nm, B(e)P:316nm,
B(k)F:307nm, Per:447nm)**

Concentrarion

**B(a)P 50ng/ml: B(b)F 50ng/ml:
B(e)P 330ng/ml: B(k)F16ng/ml:
Per10ng/ml**

**B(a)P ---- B(b)F ---- B(e)P ----
B(k)F Per ——**



**Fig. 22. Emission and excitation spectra of B(a)P
corresponding fraction**
(A) katsuobushi (dried bonito) sample
(B) B(a)P standard
(C) blank

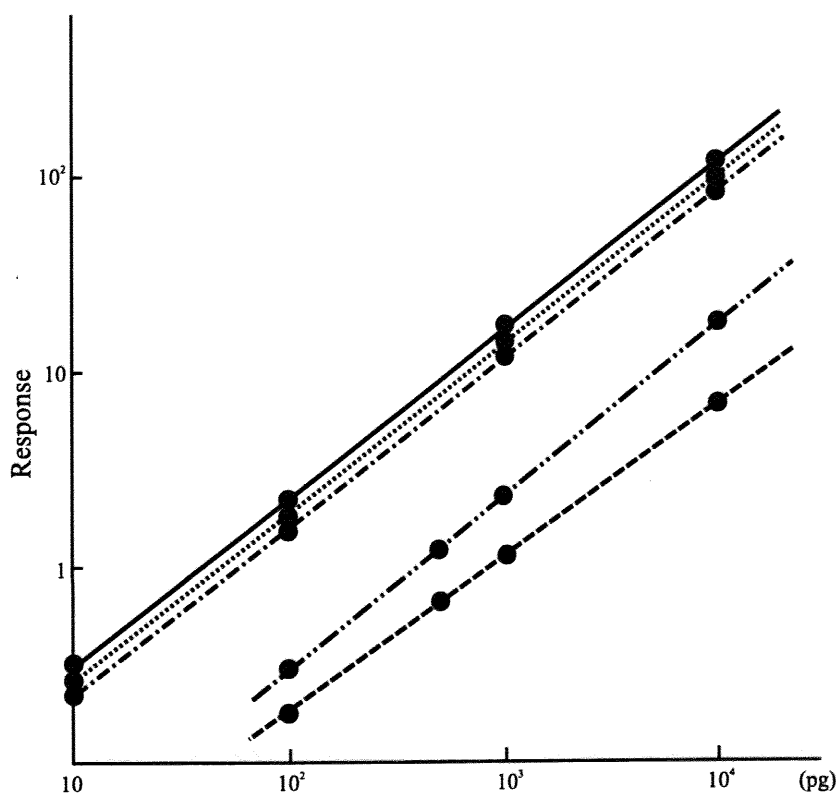


Fig. 23. Calibration curve for determination of various polycyclic aromatic hydrocarbons

B(a)P - - - - B(b)F - - - - B(e)P - - - -
 B(k)F Per ———

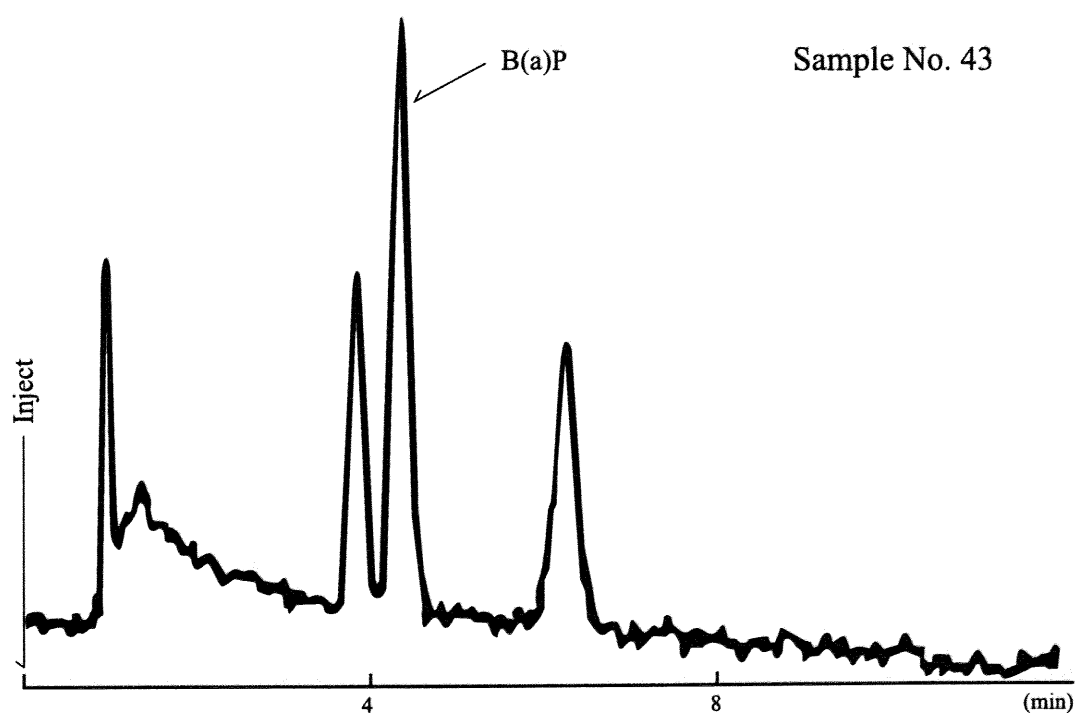


Fig. 24. HPLC of a bivalve (sample No. 43)

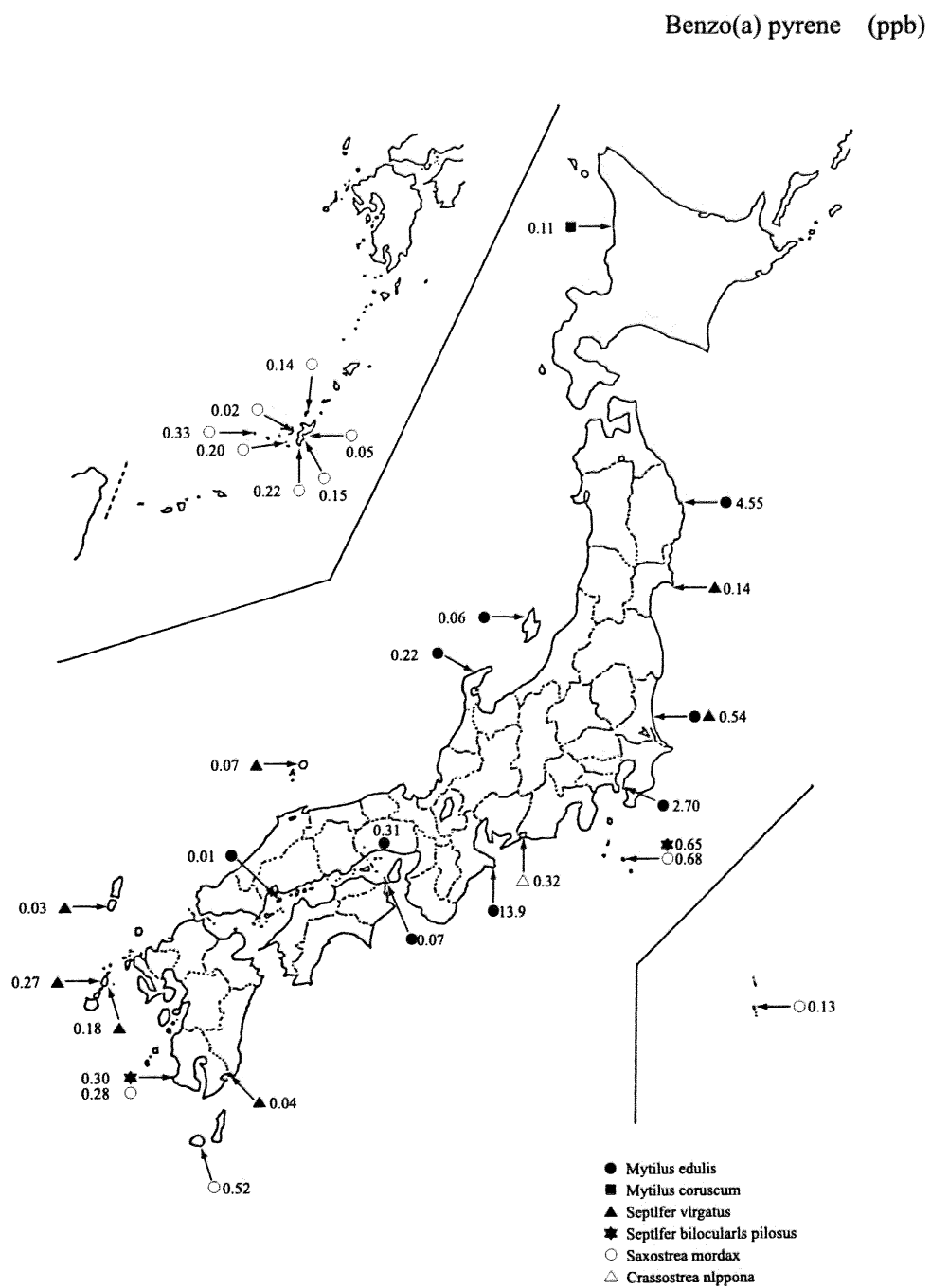


Fig. 25. Amount of B(a)P contained in bivalves

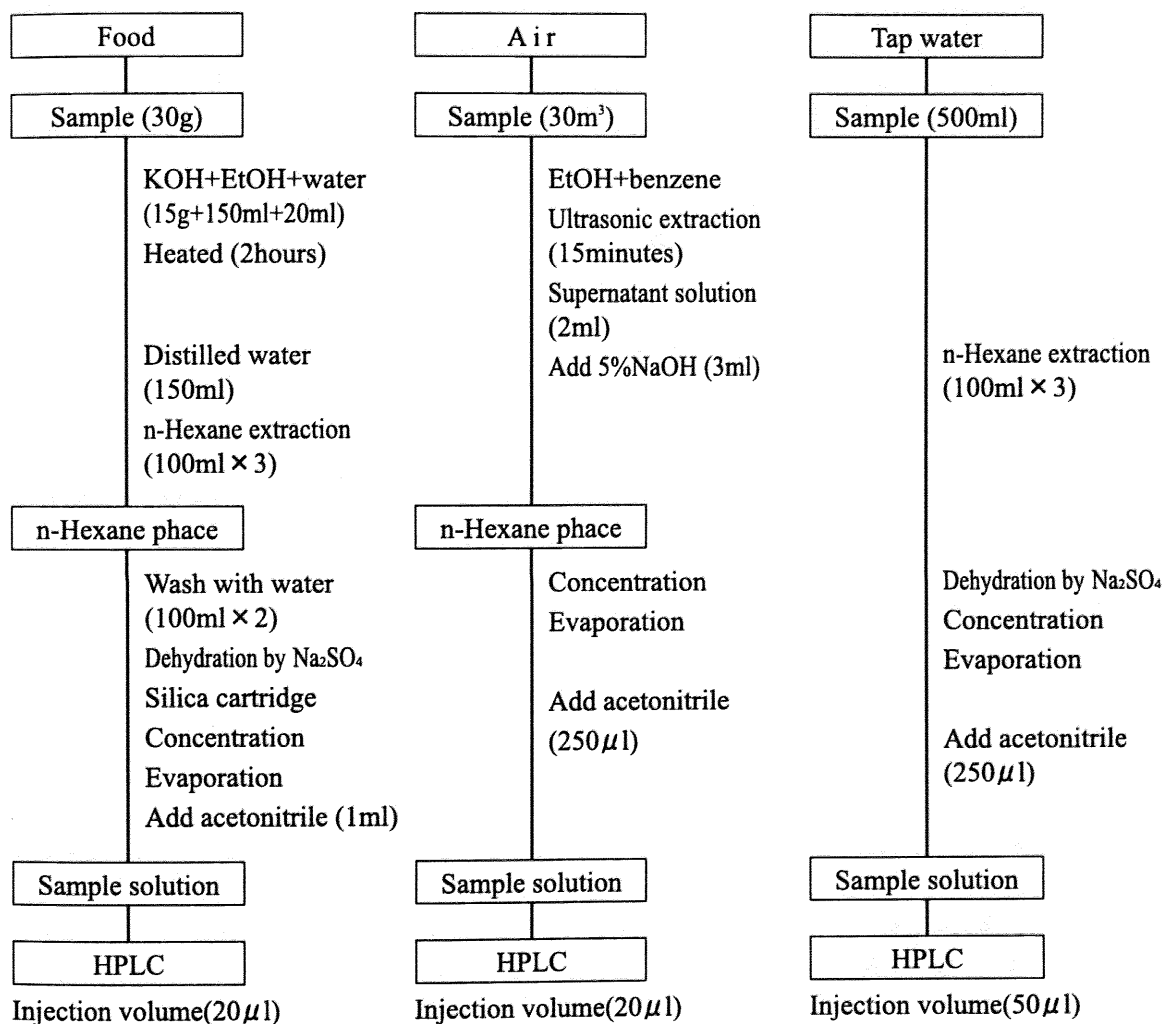


Fig. 26. Analytical methods of PAH in food, air and tap water

3 GC/MS を用いた揮発性物質の極微量分析

3.1 環境水中の内分泌攪乱化学物質・アルキルフェノールの測定

アルキルフェノールは、一般にフェノール性水酸基を有し、パラ位に種々のアルキル鎖を持つ化合物の総称であり、アルキル基の長さ、分枝が異なる異性体の混合物である。

アルキルフェノール類中に、C₉アルキル鎖を持つ化合物の混合物であるノニルフェノールと呼ばれる一連の物質の用途は、一般家庭用ではなく主に繊維工業、金属加工業などの産業用の界面活性剤を製造するための原料として化学工業において広く利用されている。また家庭の中の日常生活品として食品包装用ラップフィルム、食器等のプラスチック製品、プラスチック製玩具等の添加剤として使用されている¹⁾。

最近、界面活性剤が生物による分解によって環境にノニルフェノールの放出する源として考えられている。ノニルフェノールは関連する界面活性剤より有毒で、その大部分は排水処理工場の排水処理過程でノニルフェノールを生成すると言われている²⁾。他方では、内分泌攪乱化学物質として可能性のある物質として調査され、ノニルフェノールは、4-オクチルフェノールとともに日本の環境省により内分泌攪乱化学物質とし認められた物質で広く環境水および産業排水中から検出されている^{3~5)}。

ノニルフェノールを微量 (0.01 μg/l) レベルで測定するための分析手法としては、高濃縮操作と高感度で特異的な検出システムを必要とする。方法の 1 つとして溶媒抽出法と GC/MS 分析の組み合わせがあるが、産業排水のような界面活性剤を含んでいる試料は、界面活性剤が液-液抽出の分離の際に障害となるため、固相抽出法が選択されている。本研究では、スケールアップが容易であるため溶媒抽出法を実施した。一方、キャピラリーGC/MS の使用はキャピラリーカラムの高い分離能と質量分析計の持つ高い検出感度と選択性、マススペクトルから多くの構造情報が得られるために使用した。一般に、アルキルフェノール類は、容易に-OH の酸性基のためにカラム充填剤の表面上に吸着し、検出されない場合がある。本研究ではトリメチルシリル(TMS)誘導体を作成し、この吸着を弱くし、さらにマススペクトルの解釈を容易にした。アルキルフェノール類の各化合物の分子量を明確に確認するために、ホルムアルデヒドおよび他のアルキルアルデヒドの定量にもちいた負化学イオン化(NCI)法に対して本研究では正化学イオン化(PCI)法を試みた⁶⁾。PCI 法は、通常用いられる電子イオン化(EI)法と比べると反応ガスの選択、調整など、操作が複雑で高度な技術が必要ではあるが分子量の確認、特異な強いフラグメントイオンの検出等 EI 法と異

なる構造情報が得られる。本研究ではアルキルフェノール類を PCI 法と EI 法で測定したマススペクトルグラムを比較することにより、より多くの構造情報を解明することが可能になった。

実験方法

(1) 試料

東京都内のある工場廃水処理施設の排水口より採水した。

(2) 試薬

標準品：4-*t*-ブチルフェノール、4-*n*-ペンチルフェノール、4-*n*-ヘキシルフェノール、4-*n*-ヘプチルフェノール、4-*t*-オクチルフェノール (4- (1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol)、4-*n*-オクチルフェノール、混合ノニルフェノール (環境分析用、関東化学製) の 7 化合物質 (Table 1)。

内標準物質 (IS)：フェナントレン- d_{10} (関東化学製)

TMS(トリメチルシリル)誘導体化試薬：BSTFA(Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) (関東化学製)

ジクロロメタン、アセトン、塩酸、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム、(残留農薬用、関東化学製)

窒素ガス：高純度 (純度 99.999%)

(3) 器具及び装置

ロータリーエバポレーター

分液ロート (2L)

振とう機

PCI-GC/MS および EI 法測定は、PerkinElmer (Shelton, CT, 米国) 製の TurboMass ガスクロマトグラフ質量分析計を使用した。また、VG Instruments (Altrincham, 英国) 製の Trio-1 型 GC/MS を EI 法測定のために使用した。両方とも、GC/MS は、Table 2 に示される条件の下で Supelco (Bellefonte(米国)) 製のキャピラリーカラム (PTE-5) を取り付け測定した。

(4) 試験操作

a. 前処理

試料水 1L を 2L 分液ロートに入れ、1M 塩酸を用いて pH を 2~3 に調整後、塩化ナトリウム 30g を加え混合して溶解した。この酸性にした試料水にジクロロメタン 100mL を加え 10 分間振とう抽出した。この抽出を 2 回行いジクロロメタン層を合わせた。無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターで約 1ml まで濃縮しさらに窒素ガスを吹き付けて約 0.6 ml まで濃縮した。この濃縮液に TMS 誘導体化試薬 0.2ml を加え激しく振とう後室温で 1 時間放置後、内標準溶液 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$ フェナントレン- d_{10}) 0.1ml を添加後ジクロロメタンで 1 ml とし試験液とした (Fig. 1)。

b. 空試験溶液の調製

精製水を用いて「前処理」の項に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とした。

c. 標準液の調製

それぞれの標準品を正確に 100mg 秤り、ジクロロメタンを加えて、 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 標準原液を調製した。希釈液を用いて希釈混合して所定の濃度の標準液を調製した。内標準溶液 (フェナントレン- d_{10}) の標準原液及び標準液の調製も対象物質と同様に行った。

(5) 測定

a. EI 法で測定した対象物質及び内標物質の定量測定イオン、確認イオン等を Table 3、4 に示す。

b. PCI 法で測定した対象物質及び内標物質の定量測定イオン、確認イオン等を Table 5、6 に示す。

c. 検量線

標準液に所定量の内標準物質を加え、その $1\mu\text{l}$ を GC/MS に注入し、各対象物質と内標準物質とのピーク面積値の比から対象物質ごとの検量線を作成し、それを用いて試料を定量した。

d. 試料の測定

試験液及び空試験液各 $1\mu\text{l}$ を GC/MS に注入して測定を行った。

(6) 定量及び計算

試験液 1 μ l を GC/MS に注入し、得られた対象物質と内標準物質のピーク面積の比から検量線により検出量を求めた。次に、検出量、GC/MS 注入量、試料水量及び濃縮倍率等から試料水中の対象物質濃度を計算した。

結果及び考察

(1) 4-アルキルフェノール類の TMS 誘導体の分離

EI-GC/MS で測定した、4-アルキルフェノール類の TMS 誘導体類のクロマトグラムを Fig.2 に示す。Fig.3 の TMS 誘導体化しないもののクロマトグラムと比較して、4-アルキルフェノール TMS 誘導体類はすべてテーリングしないピーク形状で分離された。

ノニルフェノール標準品の誘導体化したものは、Fig.4 の示すように分離され、(a)から(i)に示される 9 種の化合物が確認された。

(2) PCI-GC/MS による 4-アルキルフェノールの測定

PCI-GC/MS で測定した 4-アルキルフェノールとノニルフェノール化合物のマススペクトルグラムを Fig.5 に示す。EI-GC/MS のスペクトルグラム (Fig. 6) よりフラグメンテーションが少なく、4-アルキルフェノールすべてのスペクトルで強いピークとしての M+1 のフラグメントイオンが検出され、それぞれ 4-アルキルフェノールの分子量が確認された。4-*n*-アルキルフェノール類はすべてのスペクトルで、M+1 に反応ガスの *iso*-ブタンに由来する質量数 42 の増加のフラグメントイオンが検出された。ベースピークは M+1、また強いフラグメントイオンとして $\text{CH}_3(\text{C}_6\text{H}_4)\text{OH}^+$ の m/z 107 が検出された。3 級アルキルフェノール類は強いピークとして $\text{C}(\text{CH}_3)_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{OH}^+$ の m/z 135 と M+1 のフラグメントイオンが検出されるが、M+1 に反応ガス *iso*-ブタンによる質量数 42 の増加のフラグメントイオンは検出されない。3 級オクチルフェノールでは、*n*-オクチルフェノールでは検出されないオクチル基 C_8H_{17} に由来する m/z 113 の強いフラグメントイオンが検出されている。分離されたノニルフェノール化合物は 3 級アルキルフェノール類の持つ $\text{C}(\text{CH}_3)_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{OH}^+$ に由来する m/z 135 の強いフラグメントイオン、ベースピークとしてノニル基 C_9H_{19} の m/z 127 のフラグメントイオンと親イオン M+1 が検出されるが、前述のように M+1 に反応ガス *iso*-ブタンに由来する質量数 42 の増加のフラグメントイオンが検出されない。

(3) PCI-GC/MS による 4-アルキルフェノールの TMS 誘導体類の測定

PCI-GC/MS で測定した 4-アルキルフェノールの TMS 誘導体および Fig. 4 で分離が確認されたノニルフェノール化合物の TMS 誘導体のマススペクトルグラムを Fig. 7 に示す。

PCI-GC/MS のスペクトルグラムは EI-GC/MS のスペクトルグラム (Fig. 8) よりフラグメンテーションが少なく、すべてのスペクトルで、4-アルキルフェノール誘導体についてのベースピークとしての $M+1$ のイオンが検出され、それぞれ 4-アルキルフェノールの分子量、トリメチルシリル誘導体化により質量数 72 の増加、およびプロトントランスファーのための質量数プラス 1 の合計と一致する。特有のフラグメントイオンとして 4-*n*-アルキルフェノール類は m/z 179 および 3 級アルキルフェノール類の 207、ピーク強度は弱い、4-*n*-アルキルフェノール類の $M+43$ が検出されている。それらの特有のイオンは Fig. 9 の構造による結果として推定される。

(4) ノニルフェノールに関する新しい知見

a. ノニルフェノールから誘導された化合物はすべて、 m/z 293 のベースピークを持っている。これは、上記の議論からの $M+1$ のイオンと等しく、ノニルフェノールの成分が分子量 220 から確認できたこと意味する。今まで非誘導体の EI スペクトルから推定されていた親イオンをソフトなイオン化である PCI 法で確認できる。

またトリメチル誘導体による質量数 72 およびプロトントランスファーの 1 の合計と明確に一致する。

b. ノニルフェノール成分はすべて、 $C_9H_9^+$ の質量に一致する m/z 127 のフラグメントイオンが検出される。

c. m/z 221 のフラグメントイオンは、トリメチルシリル基を失ったフラグメントとして解釈され、誘導体生成が確認できる。

d. m/z 235 のフラグメントイオンは、親イオンの $C_9H_9^+$ (m/z 57) の損失から由来する。

e. 9 種のノニルフェノール化合物のいずれも $M+43$ を検出しない。

ノニルフェノールの標準品から分離された 9 種の化合物がすべて構造異性体であると結論できる。それらは 179 のフラグメントイオンが検出されない。また、4-*n*-ノニルフェノールがそれらの 9 種の化合物中に存在しないことを意味する。この結論は、9 種の化合物の溶出より更に遅れた、4-*n*-ノニルフェノールのより大きい保持時間に一致する。

3-*n*-ウンデシルフェノールが他と全く異なっている一方、NIST スペクトルライブラリー

で見い出される、4-*n*-ウンデシルおよび2-*n*-ウンデシルフェノールのスペクトルは、ベースピークとして共通に m/z 107 を持っており同様のスペクトルを与える。したがって、上記の結論はベンゼンに置換したアルキル基の para(4-)と ortho(2-)の置換位置異性体を除外することができない。

標準 4-*n*-ノニルフェノールの EI-GC/MS のスペクトルグラムを Fig.10 に示す。

(5) TMS 誘導化 PCI-GC/MS 法の排水および超純水への応用

この分析手法を実試料に適用した。Fig.11 は産業排水および超純水の測定を示す。 m/z 293 および m/z 279 が、ノニルフェノール ($M+1$)とオクチルフェノール ($M+1$)を、 m/z 189 が内部標準のフェナントレン- d_{10} ($M+1$)の検出を示す。保持時間とあわせて考えて産業排水と超純水は 4-ノニルフェノールと 4-*t*-オクチルフェノールを含んでいる。

4-ノニルフェノールは各成分ごとの標準物質がないこと及び実試料のため夾雑物の可能性を排除できないことが有るが数 10 ppt、4-*t*-オクチルフェノールは同程度検出された。4-*t*-ブチルフェノール、4-*n*-ペンチルフェノール、4-*n*-ヘキシルフェノール、4-*n*-ヘプチルフェノール、4-*n*-オクチルフェノールは検出されなかった。

まとめ

アルキルフェノール類中に、 C_9 アルキル鎖を持つ化合物の混合物であるノニルフェノールは、広く環境水および産業排水中に存在し、最近、ノニルフェノールとオクチルフェノールは内分泌攪乱化学物質と認められた。ノニルフェノールの異性体を分離し同定する分析手法は、各異性体に特有の毒性を更に評価するために求められている。

試薬ガスとして *iso*-ブタンを使用して、PCI-GC/MS を測定し、一連の TMS 誘導化 4-アルキルフェノール類の質量スペクトルからノルマルと 3 級アルキル鎖置換フェノール類の異性体を区別できることが見出された。すべての 4-アルキルフェノール誘導体類は、ベースピークとして MH^+ のイオンを生じた。更に 4-*n*-アルキルフェノール類は、三級アルキルフェノール類では生じなかった $C_3H_7^+$ の付加から生成した $M+43$ の付加物イオンを与えた。特有のフラグメントイオンは、4-*n*-アルキルフェノール誘導体類では m/z 179、3 級アルキルフェノール誘導体では m/z 207 が検出された。

本研究は、毒物学および環境化学にノニルフェノールの高感度分析法を提供し特に PCI-GC/MS 技術は、化合物の混合物の同定に新しい分子情報与え精度の高い判断を可能に

する。

文 献

- 1) 日本化学会編：化学総説内分泌かく乱物質研究の最前線，50, 145 (2001)
学会出版センター，東京.
- 2) W. Giger, P. H. Brunner, W. Schaffner : *Science*, 225, 623 (1984).
- 3) 津田泰三, 加賀爪敏明：環境化学, 13, 1(2003).
- 4) S. muller, P. Schmid, C. Schlatter : *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 6, 27 (1998).
- 5) S. Sekine, H. Inoue , T. Katase : PROGRAM and ABSTRACTS of Japan
Society of Endocrine Disrupters Research, Yokohama, Japan , 145 (2000).
- 6) T.Nakagawa, N. Sugaya, K. Sakurai, C. Yamamoto, M. Morita, N. Onda :
22nd International Symposium on Capillary Chromatography, Gifu, Japan,
PF. 202 (1999).

3.2 生活用品中の内分泌攪乱化学物質・アルキルフェノールの測定

アルキルフェノールは、一般にフェノール性水酸基を有し、パラ位に種々のアルキル鎖を持つ化合物の総称であり、アルキル基の長さ、分枝が異なる異性体の混合物である。アルキルフェノール類の中で、C₉アルキル鎖を持つ混合物はノニルフェノールと呼ばれ、家庭の中の合成樹脂製品の添加剤として使用されている。合成樹脂製品にはノニルフェノールをそのまま酸化防止剤、腐食防止剤として、また安定化助剤などの、トリス（モノ-、ジ-ノニルフェニル）フォスファイト（TNP）等の不純物として、あるいは熱分解物としてこれらの製品に存在すると言われている¹⁾。一般に合成樹脂製品の機能を高めるために多く化合物が添加されているため、分析は煩雑で時間がかかるため、迅速で高感度な分析方法が求められている。

分析方法として、ガスクロマトグラフィー（GC）を用い分離したのち水素炎イオン化検出器（FID）²⁾や電子捕獲型検出器（ECD）³⁾で検出する方法がある。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用い分離したのち紫外可視吸光度計（UV）、蛍光光度計（FL）を用いて測定する方法がある⁴⁾。また高感度と高選択性をもつ分析方法として十分な感度とクロマトグラムのご良好なピーク形状と再現性のある分析値を得るためには誘導体化等の手法が必要となる。トリメチルシリル化（TMS化）^{5) 6)}、アセチル化⁷⁾、ヘプタフルオロ酪酸無水物（HFBA）誘導体化試薬⁸⁾で誘導体化等したのちガスクロマトグラフィー/質量分析計 GC/MS(EI) で測定する方法がある。高速液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC/MS) で誘導体化等の前処理なしで直接分析する方法がある⁹⁾。

本研究は、ノニルフェノール、オクチルフェノールをTMS誘導体化したのち正化学イオン化(PCI)用いたPCI-GC/MSによる高感度分析法を確立した。4-ノニルフェノールは22の異性体¹⁰⁾の分離が確認されている。また、オクチルフェノールでは4-*n*-オクチルフェノールと4-*t*-オクチルフェノール[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol]の2物質である。4-オクチルフェノールは4-ノニルフェノール同様に理論的に多くの異性体を持つが、異性体の分離等の報告例はない。本研究では8異性体の分離が確認された。

実験方法

(1) 試料

本研究では合成樹脂製品試料として、2003年2月にデパート、日常雑貨専門店において市販されていた合成樹脂製の小物入れ、シール、ペンケース、カードケース等の文具、

31 試料を無作為に選び、購入した。

試料は、FT-IR フーリエ変換赤外分析 により、製品の材質に関する表記を確認した。

(2) 試薬

標準品： 4-*t*-ブチルフェノール、4-*n*-ペンチルフェノール、4-*n*-ヘキシルフェノール、4-*n*-ヘプチルフェノール、4-*t*-オクチルフェノール[4- (1, 1, 3, 3-tetramethylbutyl) -phenol]、4-*n*-オクチルフェノール、ノニルフェノール混合物（環境分析用、関東化学製）の 7 物質(Table 1)である。

TMS(トリメチルシリル)誘導体化試薬： BSTFA(Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)（関東化学製）

n-ヘプタン（フタル酸分析用、関東化学製）、ジクロロメタン（残留農薬用、関東化学製）

窒素ガス：高純度（純度 99. 999%）

(3) 装置

PCI-GC/MS および EI 法測定には、PerkinElmer（Shelton, CT, 米国）社製の TurboMass ガスクロマトグラフ質量分析計を使用した。GC/MS は、Table 2 で示される条件の下で Supelco(Bellefonte(米国)) 社製のキャピラリーカラム（PTE-5）を取り付け測定した。赤外分析には、PerkinElmer（Shelton, CT, 米国）社製の、Spectrum One FT-IR にユニバーサル ATR を組み合わせて使用した。

(4) 操作

a. 試料溶液の調製

試料溶液は衛生試験法・注解（日本薬学会編）¹¹⁾ 生活用品試験法・溶出試験に準じ調製した。試料は 2 cm×5 cm に切り、試料の表面を精製水で洗い風乾した。その試料を *n*-ヘプタン 20 ml の入っているガラス製バイアルビンに浸し、25℃ 1 時間静置した。その後試料を取り出し抽出液の、*n*-ヘプタン溶液はナス型フラスコに移しロータリーエバポレーターで濃縮し、さらに窒素ガスを吹き付けて乾固した後、ジクロロメタン 0.5 ml を加えた。この溶液に TMS 誘導体化試薬（BSTFA） 0.2ml を添加後、ジクロロメタンで正確に 1 ml とし激しく振とう後、室温で 1 時間放置し試験溶液とした (Fig. 12)。

b. 空試験溶液の調製

試料は量らずに「a. 試料溶液の調製」の項に従って操作を行い、得られた試料溶液を空試験溶液とした。

c. 標準溶液の調製

それぞれの標準品を正確に 100mg 秤とり、ジクロロメタンを加えて、1000 μ l/ml 標準原液を調製した。これを適宜、希釈液を用いて希釈混合して所定の濃度の標準溶液を調製した。

(5) 測定

a. PCI 法で測定した対象物質の定量測定イオンを Table 7 に示した。

b. 検量線

標準液の 1 μ l を PCI-GC/MS に注入し、各対象物質のピーク面積値から対象物質ごとの検量線を作成し、それを用いて試料を定量した。

c. 試料の測定

試験液及び空試験液各 1 μ l を PCI-GC/MS に注入して測定を行った。

(6) 定量及び計算

試験液を GC/MS(PCI)に注入し、得られた対象物質のピーク面積から検量線により検出量を求めた。次に、検出量、GC/MS 注入量等から対象物質濃度を計算した。

結果及び考察

(1) 合成樹脂製品に含有する 4-アルキルフェノール類の溶出

合成樹脂製品中に含まれる物質が食品へ移行することが懸念されるため食品包装用ラップフィルム¹²⁾、合成樹脂製品の食器等¹³⁾からの 4-アルキルフェノール類の溶出に関する報告がある。河村ら¹⁴⁾¹⁵⁾はポリ塩化ビニル製のラップフィルム、手袋、玩具また種々の材質の食品用合成樹脂関連製品及び玩具中のノニルフェノールの残存量を食品擬似溶媒である *n*-ヘプタンを用いた溶出試験により報告している。この方法は合成樹脂製品の全体の含有量を測定してはいないが *n*-ヘプタンへの合成樹脂製品に対する溶解性と濃縮操作等が簡易で迅速なすぐれた方法である。

(2) 4-アルキルフェノール類の TMS 誘導体化

軟質合成樹脂製品は柔軟性を確保するために大量の可塑剤また抗酸化剤等の添加剤が使用されている。これらの夾雑物質を多く含む製品の測定はクリーナップの操作が必要である。抽出後、磯部ら¹⁶⁾は5% H_2O (w/w) 不活性化カラムクロマトグラフィーを使って分画・精製したのち 4-アルキルフェノールをEI-GC/MS/(SIM)で測定した。本研究ではクリーナップ操作をおこなわず、TMS 誘導体化試薬 (BSTFA) を用い 4-アルキルフェノールの TMS 誘導体化を行った。

(3) 4-アルキルフェノール類の PCI-GC/MS による測定

ノニルフェノールの一般的な測定方法⁵⁾である EI-GC/MS(質量分析装置)で測定した場合、異性体の分離による複数のピークが検出される。これらのフラグメントイオンの強度比の異なるマススペクトルと複数のピークをどの様に定量するかが問題であった。本研究では反応ガスに iso-ブタンを用い、PCI 法により前述のように定性をした。分離された全てのノニルフェノール (TMS 誘導体化)のクロマトグラムのマススペクトルに MW(分子量)292+1 の M^+ 293 の強いフラグメントイオンがベースピークとして検出された。また通常用いられる電子イオン化(EI)法と比べるとより試料中の夾雑物による妨害をより受けにくいすぐれた方法である。

(4) 合成樹脂製品中から溶出した 4-アルキルフェノールの PCI-GC/MS(SIM)法による定性

合成樹脂製小物入れ、シール、ペンケース、カードケース等の文具、31 試料について 4-*t*-ブチルフェノール、4-*n*-ペンチルフェノール、4-*n*-ヘキシルフェノール、4-*n*-ヘプチルフェノール、4-*t*-オクチルフェノール[4-(1,1,3,3-tetramethylbuty)-phenol]、4-*n*-オクチルフェノール、4-ノニルフェノールの 7 物質を測定した。この分析手法を用いて実試料に適用したその結果を Table 8 に示す。実試料 31 件の合成樹脂製小物入れ、デスクマット、パスケース等の文具、8 件から 4-ノニルフェノールが $0.20 \sim 10.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 検出された。しかし 4-*t*-ブチルフェノール、4-*n*-ペンチルフェノール、4-*n*-ヘキシルフェノール、4-*n*-ヘプチルフェノール、4-*t*-オクチルフェノール[4-(1,1,3,3-tetramethylbuty)-phenol]、4-*n*-オクチルフェノールは検出されなかった。

(5) PCI-GC/MS(SCN)による 4-オクチルフェノールの検出

実試料 2、7、10、14 (デスクマット、バッグ、小物入れ、ソフトケース)の合成樹脂製

品から、現在一般的に分析されているオクチルフェノールの2物質、4-*n*-オクチルフェノールと4-*t*-オクチルフェノール[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol]は検出されなかったが、オクチルフェノールの混合比は不明ではあるが新たに(a)から(h)の4-オクチルフェノールの8つの異性体が検出された。試料10の合成樹脂製小物入れのクロマトグラムとマススペクトルをFig.13、14に示す。オクチルフェノールはノニルフェノール同様に理論的に多くの異性体を持つことが考えられるが、現在まだ、4-*n*-オクチルフェノールと4-*t*-オクチルフェノール[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol]以外の異性体の検出の報告例はない。

これら8つの異性体のPCI-GC/MSスペクトルはフラグメンテーションが少なく、すべてのスペクトルで、4-オクチルフェノール誘導体についてのベースピークとして $M+1$ (m/z 279)のイオンが検出され、それは4-オクチルフェノールのMW(分子量206)、トリメチルシリル誘導体化により質量数72の増加、およびプロントランスファーの質量数1増加の合計(m/z 279)と一致した。その他、特有のフラグメントイオンとして3級アルキルフェノール類の m/z 207のピークと $C_8H_7^+$ の質量に一致する m/z 113のフラグメントイオンが検出された。これらの結果から、新たに検出された8種の化合物がすべて4-オクチルフェノールの構造の異性体であると結論する。また、新たに検出された8種の4-オクチルフェノール化合物のいずれも4-*n*-アルキルフェノールにのみ特徴的に見られる $M+43$ を検出せず、それらは1級アルキルフェノール類に特徴的に見られる m/z 179のフラグメントイオンが検出されない。この結果は、4-*n*-オクチルフェノールがそれらの8種の化合物に存在しないことを意味する。これは、8種の化合物の溶出より更に遅れた、4-*n*-オクチルフェノールのより長い保持時間に一致する。

(6) PCI-GC/MSによる4-ノニルフェノールの異性体の分離

実試料10の合成樹脂製小物入れは4-ノニルフェノールの混合物が高濃度($2.80\mu\text{g}/\text{cm}^3$)で検出され、Fig.15に示すように(a)から(i)の9異性体の他に(1)から(9)までの9異性体の合計18異性体の分離が確認された。PCI-GC/MSのスペクトルはフラグメンテーションが少なく、すべてのスペクトルでベースピークとして4-ノニルフェノール誘導体の $M+1$ のイオンが検出され、それぞれ4-ノニルフェノールのMW(分子量220)、トリメチルシリル誘導体化により質量数72の増加、およびプロントランスファーの質量数1の合計293と一致した。詳細は3.GC/MSを用いた揮発性物質の極微量分析 3.1 環境水中の内分泌

攪乱化学物質・アルキルフェノールの測定に示してある。実試料 10 から分離された 18 種の化合物がすべて構造の異性体であると結論できる。それらには m/z 179 のフラグメントイオンが検出されないことから 4-ノニルフェノールがそれらの 18 種には存在しないことが分かった。

(7) 合成樹脂材質と 4-アルキルフェノールの含有

実試料の合成樹脂製品の材質と、*n*-ヘプタン溶出試験で検出された可塑剤等を Table 8 に示す。合成樹脂製品の材質はフーリエ変換赤外分析より確認した。実試料 31 件中の材質として一番多く使われていたのが、ポリ塩化ビニル (PVC) 製の 18 件、次にポリプロピレン (PP) 製の 6 件、ポリエチレン (PE) 製の 3 件、ポリエチレンテレフタレート (PET) 製の 2 件、ポリ酢酸ビニル (EVA) 製の 1 件である。軟質合成樹脂製品はとくに柔軟性を必要とするため大量の可塑剤また抗酸化剤等の添加剤が使用されており、実試料の合成樹脂製品から検出された可塑剤 (フタル酸エステル類) は 22 件であった。また 4-ノニルフェノールは、測定した実試料 31 件のうち合成樹脂製小物入れ、デスクマット、パスケース等の文具類の 8 件から検出された。また、4-オクチルフェノールが検出された実試料は 4 件で高濃度の 4-ノニルフェノールが検出された合成樹脂製品と同一実試料(2、7、10、14)である。実試料 10 のクロマトグラムを Fig.16、に示す。Fig.17 は Fig.16 の 2 つの図をスケールを変えずに合成したものである。検出された 4-オクチルフェノールの量は 4-ノニルフェノールの約 0.03~0.20 と考えられる。結果として 4-アルキルフェノールの検出された合成樹脂製品の材質はすべて PVC 製であった。

まとめ

アルキルフェノール類の中で、 C_6 または C_8 のアルキル鎖を持つ混合物であるノニルフェノール、オクチルフェノールと呼ばれる一連の物質は、家庭の中で日常使われている合成樹脂製品の添加剤として使用されている。「ノニルフェノール」と「オクチルフェノール」(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol) は環境省が内分泌攪乱化学物質として初めて認めた物質である。

本研究は合成樹脂製品中の「ノニルフェノール」、「オクチルフェノール」をTMS誘導体化したのち正化学イオン化(PCI)用いたPCI-GC/MSで高感度分析法を確立した。標準品の4-ノニルフェノールには18の異性体の分離を確認した。また、本研究では実試料の合成樹脂製品

から4-オクチルフェノール8異性体の分離を確認した。

軟質合成樹脂製品には可塑剤としてフタル酸エステル類が多く検出された。また、4-ノニルフェノールは、測定した実試料31件のうち合成樹脂製小物入れ、デスクマット、バスケース等の文具などのPVC製品、8件から検出された。4-オクチルフェノールは実試料4件が検出された。これらは高濃度の4-ノニルフェノールが検出された合成樹脂製品と同一実試料で、材質はすべてPVC製であった。

文 献

1. 河村葉子, 互井千恵子, 前原玉枝, 山田 隆: 食衛誌. 40, 274(1999).
2. E. Stephanou, W. Giger: *Environ. Sci. Technol.*, 16, 800(1982)
3. C. Wahlberg, L. Renberg, U. Wideqvist: *Chemosphere*, 20, 179(1990)
4. K. K. Chee, M. K. Wong, H. K. Lee: *J. Liq. Chrom. Technol.*, 19, 259(1996)
5. 環境庁水質保全局水質管理課: 「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質, 底質, 水生生物)」, 1998年10月.
6. T. Nakagawa, N. Sugaya, K. Sakurai, J. Nakagawa, K. Usukura, N. Onda: *Analytical Sciences*. 17, 1597(2001).
7. A. Morales, D. A. Birkholz, S. E. Hrudey: *Water Environ. Res.*, 64, 669(1992)
8. 佐々木久美子, 高附 巧, 根本 了, 今中雅章, 衛藤修一, 村上恵美子, 豊田正武: 食衛誌. 40, 460(1999).
9. P. L. Ferguson, C. R. Iden, B. J. Brownawell: *Anal. Chem.*, 72, 4322(2000).
10. B. D. Bhatt, J. V. Prasad, G. Kalpana, S. Ali: *J. Chromatogr. Sci.*, 30, 203(1992).
11. 日本薬学会 編集: 衛生試験法・注解 2000, 579(2002) 金原出版(株), 東京.
12. 川中洋平, 鳥貝 真, 尹 順子, 橋場常雄, 岩島 清: 環境化学, 10, 73(2000).
13. 磯部友彦, 中田典秀, 間藤ゆき枝, 西山 肇, 熊田秀峰, 高田秀重: 環境化学, 12, 621(2002).
14. 河村葉子, 前原玉枝, 飯嶋広代, 山田 隆: 食衛誌. 41, 212(2000).
15. 河村葉子, 前原玉枝, 和久井千世子, 山田 隆: 食衛誌. 41, 331(2000).

Table 1. 4-alkyl phenol standards

	Compound	M.W.
(1)	4-t-butyl phenol	150
(2)	4-n-pentyl phenol	164
(3)	4-n-hexyl phenol	178
(4)	4-n-heptyl phenol	192
(5)	4-t-octyl phenol *	206
(6)	4-n-octyl phenol	206
(7)	"nonyl phenols"	220

* 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol

Table 2. Experimental parameters for the measurements

GC

Column:PTE-5(30m × 0.25mm I.D.,df:0.25 μm

Temp:60°C(1min)-10°C/min-280°C(5min)

Carrier gas:helium

Injector:280°C,Splitless

MS

PCI

Sample:2 μl

Reagent gas:isobutane(99.999%)

Ionization Energy:70eV

Ion source temp:150°C

EI

Sample:1 μl

Ionization Energy:70eV

Ion source temp:250°C

Table 3. Monitor ions of 4-alkyl phenol and internal standard (EI)

Compound	M.W.	R. T. min	Base peak fragment ion	Major fragment ion
(1) 4-t-butyl phenol	150	10.36	135	107,150
(2) 4-n-pentyl phenol	164	12.70	107	164
(3) 4-n-hexyl phenol	178	14.05	107	178
(4) 4-n-heptyl phenol	192	15.33	107	192
(5) 4-t-octyl phenol	206	14.69	135	107,206
(6) 4-n-octyl phenol	206	16.56	107	206
(7) nonyl phenols	220	15.80~16.45	135	107
phenanthrene-d ₁₀ (IS)	188	16.86	188	

Table 4. Monitor ions of TMS 4-alkyl phenol and internal standard (EI)

Compound	M.W.	R. T. min	Base peak fragment ion	Major fragment ion
(1) 4-t-butyl phenol	222	11.30	207	222
(2) 4-n-pentyl phenol	236	13.58	179	236
(3) 4-n-hexyl phenol	250	14.84	179	250
(4) 4-n-heptyl phenol	264	16.05	179	264
(5) 4-t-octyl phenol	278	15.15	207	278
(6) 4-n-octyl phenol	278	17.20	179	278
(7) nonyl phenols	292	16.07~16.88	207	292
phenanthrene-d ₁₀ (IS)	188	16.86	188	

Table 5. Monitor ions of 4-alkyl phenol and internal standard (PCI)

Compound	M.W.	R. T. min	Base peak fragment ion	Major fragment ion
(1) 4-t-butyl phenol	150	10.85	151	135
(2) 4-n-pentyl phenol	164	13.20	165	107 (207)
(3) 4-n-hexyl phenol	178	14.57	179	107 (221)
(4) 4-n-heptyl phenol	192	15.87	193	107 (235)
(5) 4-t-octyl phenol	206	15.23	113	135 207
(6) 4-n-octyl phenol	206	17.12	207	107 (249)
(7) nonyl phenols	220	16.3~17.1	127	221
phenanthrene-d ₁₀ (IS)	188		189	

() is the adduct ion (m/z) with CI gas of isobutane

Table 6. Monitor ions of TMS 4-alkyl phenol and internal standard (PCI)

Compound	M.W.	R. T. min	Base peak fragment ion	Major fragment ion
(1) 4-t-butyl phenol	222	11.73	223	207
(2) 4-n-pentyl phenol	236	14.03	237	179 (279)
(3) 4-n-hexyl phenol	250	15.32	251	179 (293)
(4) 4-n-heptyl phenol	264	16.53	265	179 (307)
(5) 4-t-octyl phenol	278	15.63	279	207
(6) 4-n-octyl phenol	278	17.70	279	179 (321)
(7) nonyl phenols	292	16.56~17.39	293	127
phenanthrene-d ₁₀ (IS)	188		189	

() is the adduct ion (M/Z) with CI gas of isobutane

Table 7. Monitor ions of TMS 4-alkyl phenols

Compound	M.W.	Base peak fragment ion	Major fragment ion
(1) 4- <i>t</i> -butyl phenol	222	223	207
(2) 4- <i>n</i> -pentyl phenol	236	237	179 (279)
(3) 4- <i>n</i> -hexyl phenol	250	251	179 (293)
(4) 4- <i>n</i> -heptyl phenol	264	265	179 (307)
(5) 4- <i>t</i> -octyl phenol	278	279	207
(6) 4- <i>n</i> -octyl phenol	278	279	179 (321)
(7) nonyl phenols	292	293	127

() is the adduct ion (m/z) with CI gas of isobutane

Table 8. Nonyl and Octyl phenols released from household utensils

#) Sample name	Sample weight (g)	Nonyl phenols		Phthalic acid ester	Plastics	Octyl / Nonyl*
		$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{g}$			
1 Mat	1.48	0.20	3	++	PVC	0
2 Mat	1.37	2.89	42	++	PVC	0.20
3 Sheet	0.05	0	0	+	PE	0
4 Sheet	0.03	0	0	±	PE	0
5 Sheet	2.46	0.31	3	++	PVC	0
6 Sheet	3.00	0	0	++	PVC	0
7 Bag	0.40	5.60	280	++	PVC	0.05
8 Bag	0.52	0	3	++	PVC	0
9 Bag	0.24	0	9	+	PVC	0
10 Letter bag	0.24	2.80	233	++	PVC	0.05
11 Carry bag	0.19	0	0	+	PP	0
12 Pen case	0.49	0	0	++	PVC	0
13 Pen case	0.36	0	0	++	PVC	0
14 Soft case	0.35	10.2	581	++	PVC	0.03
15 Soft card case	0.48	0	0	++	PVC	0
16 Soft card case	0.48	0	0	++	PVC	0
17 Soft card case	0.38	0	0	++	PVC	0
18 Card case	0.31	0	0	—	PP	0
19 Pass case	0.83	0.35	8	++	PVC	0
20 Card holder	0.06	0	0	±	PP	0
21 Card holder	0.18	0	0	—	PP	0
22 Card holder	0.20	0	0	—	PP	0
23 Card holder	0.04	0	0	—	PP	0
24 Seal	0.11	0	0	—	PET	0
25 Seal	0.39	0	0	++	PVC	0
26 Seal	0.05	0	0	++	PET	0
27 Header label	0.08	0	0	+	—	0
28 Frame	0.24	1.95	162	+	PVC	0
29 Rain coat	0.06	0	0	—	EVA	0
30 Rain wear (trousers)	0.09	0	7	++	PVC	0
31 Frost cover	0.06	0	0	—	PE	0

PVC: Polyvinyl chloride

PE : Polyethylene

PP : Polypropylene

PET : Polyethylene terephthalate

EVA: Polyvinyl acetate

* Peak height ratio of octyl phenols to nonyl phenols (not calibrated)

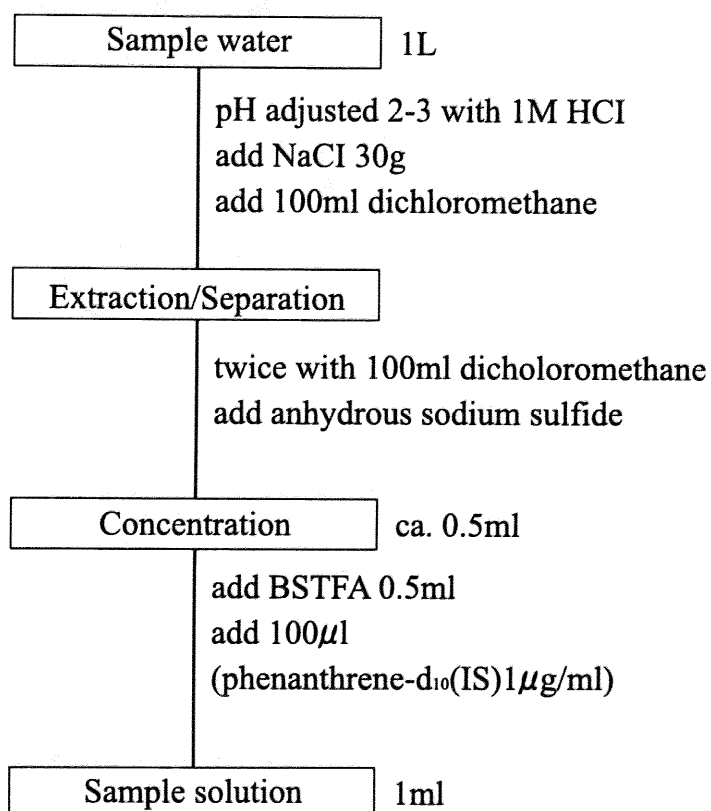


Fig. 1. Liquid-liquid extraction and concentration for the determination of 4-alkyl phenols
BSTFA: Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)

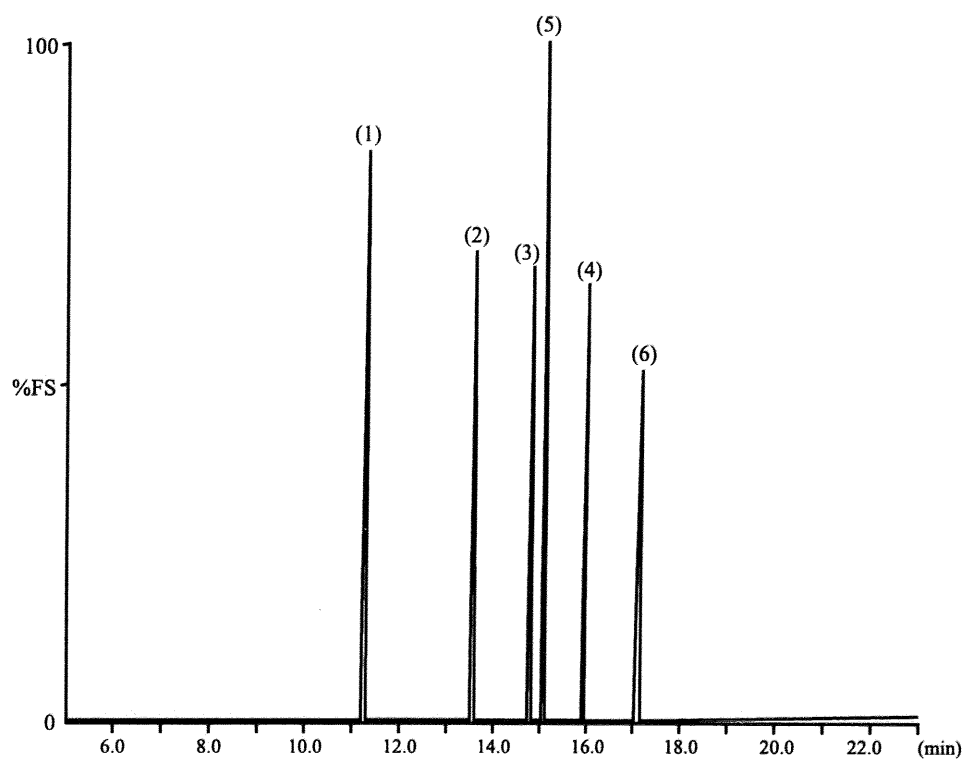


Fig. 2. Separation of TMS derivatives of 4-alkyl phenols
peak: (1) 4-*t*-butyl phenol (2) 4-*n*-pentyl phenol
(3) 4-*n*-hexyl phenol (4) 4-*n*-heptyl phenol
(5) 4-*t*-octyl phenol (6) 4-*n*-octyl phenol

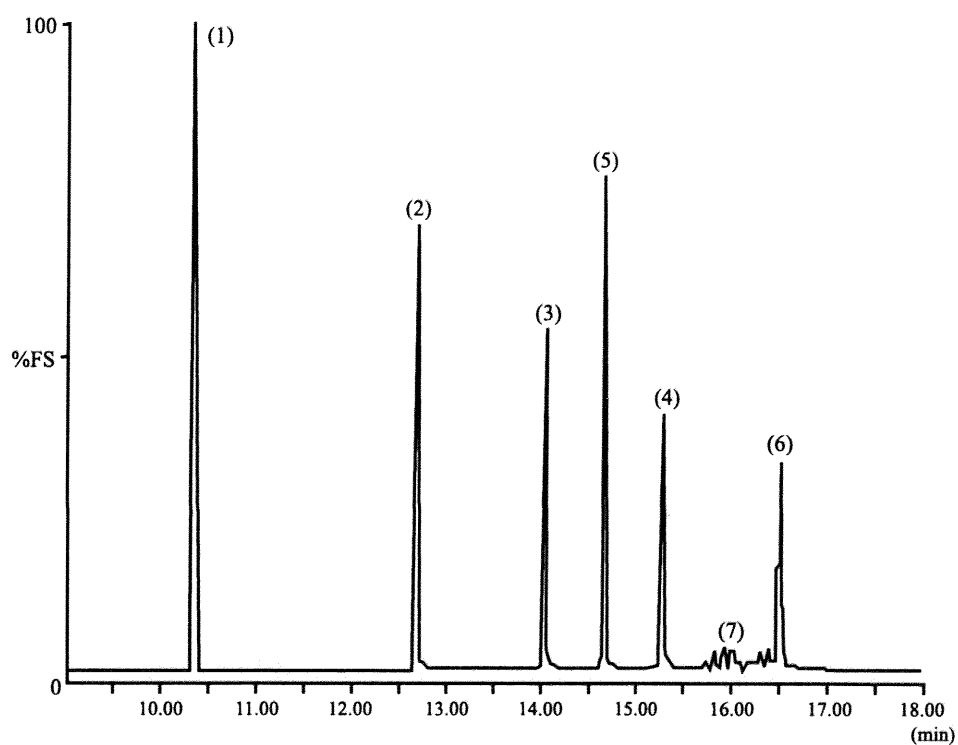


Fig. 3. Separation of 4-alkyl phenols without TMS derivatisation
peak: (1) 4-*t*-butyl phenol (2) 4-*n*-pentyl phenol
(3) 4-*n*-hexyl phenol (4) 4-*n*-heptyl phenol
(5) 4-*t*-octyl phenol (6) 4-*n*-octyl phenol
(7) "nonyl phenols"

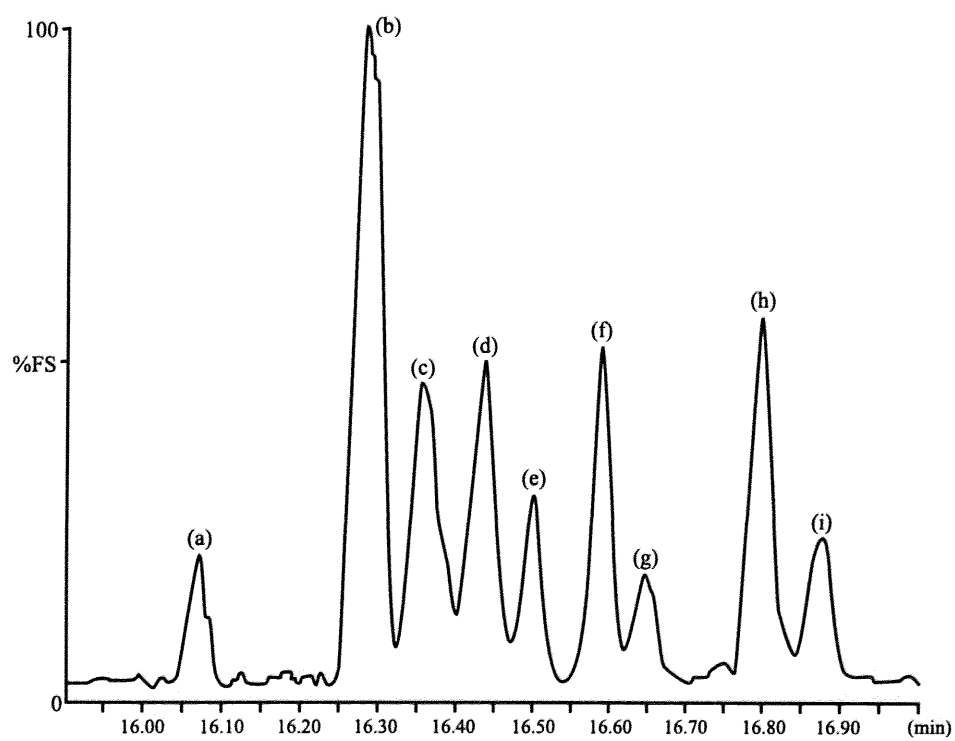


Fig. 4. Separation of TMS derivatives of "nonyl phenols"

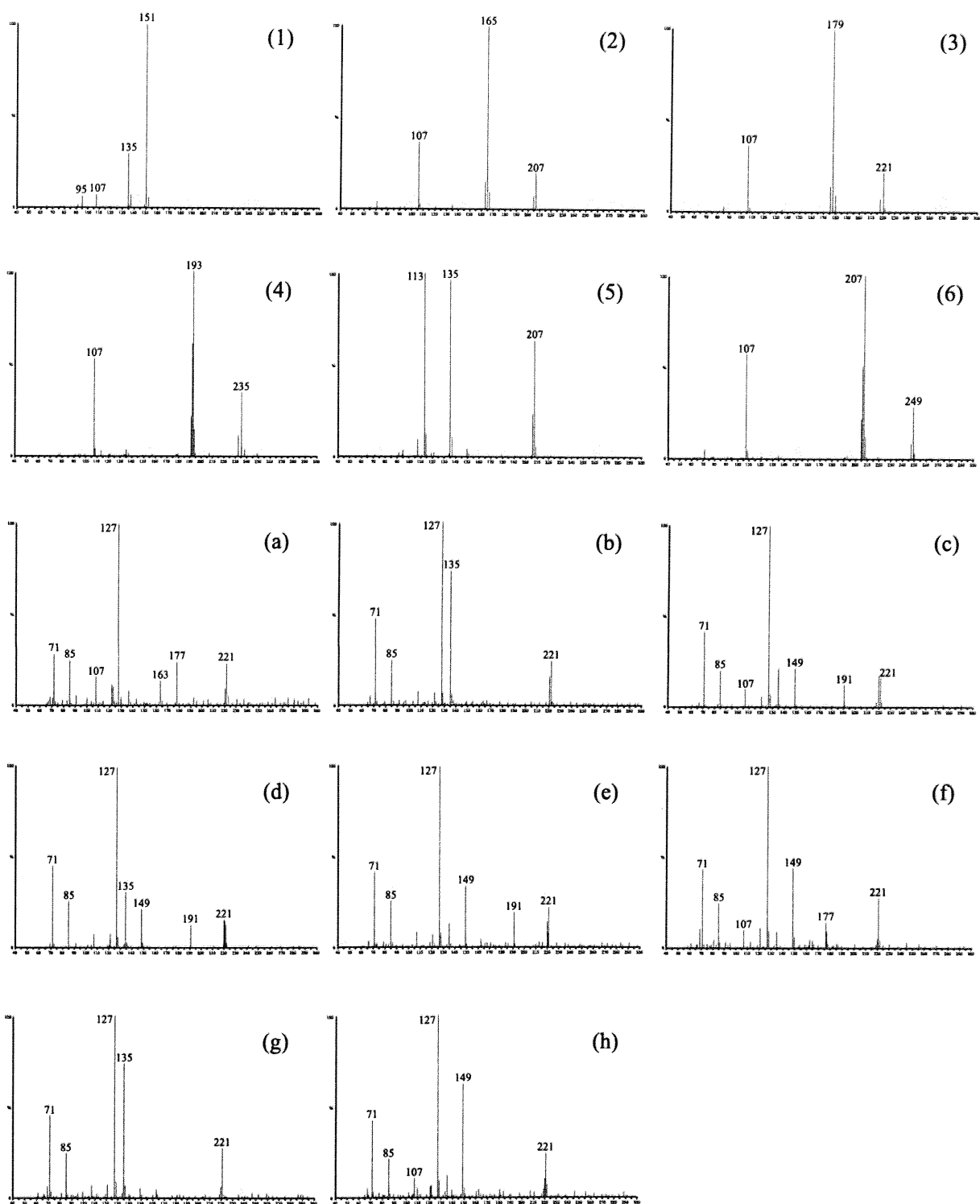


Fig. 5. PCI spectra of 4-alkyl phenols (1-6) and nonyl phenol compounds (a-h)

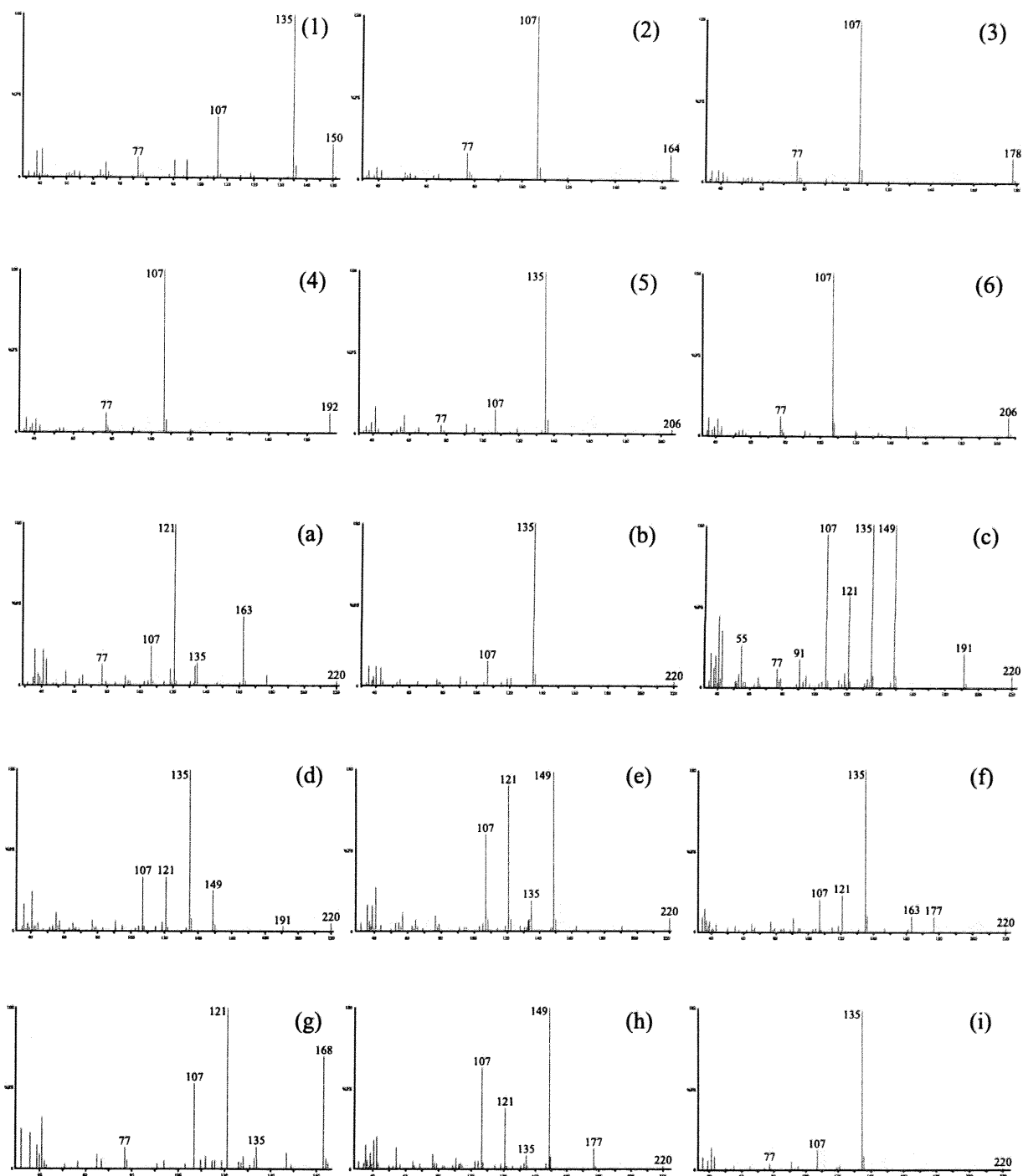


Fig. 6. EI spectra of 4-alkyl phenols(1-6) and nonyl phenol compounds(a-i)

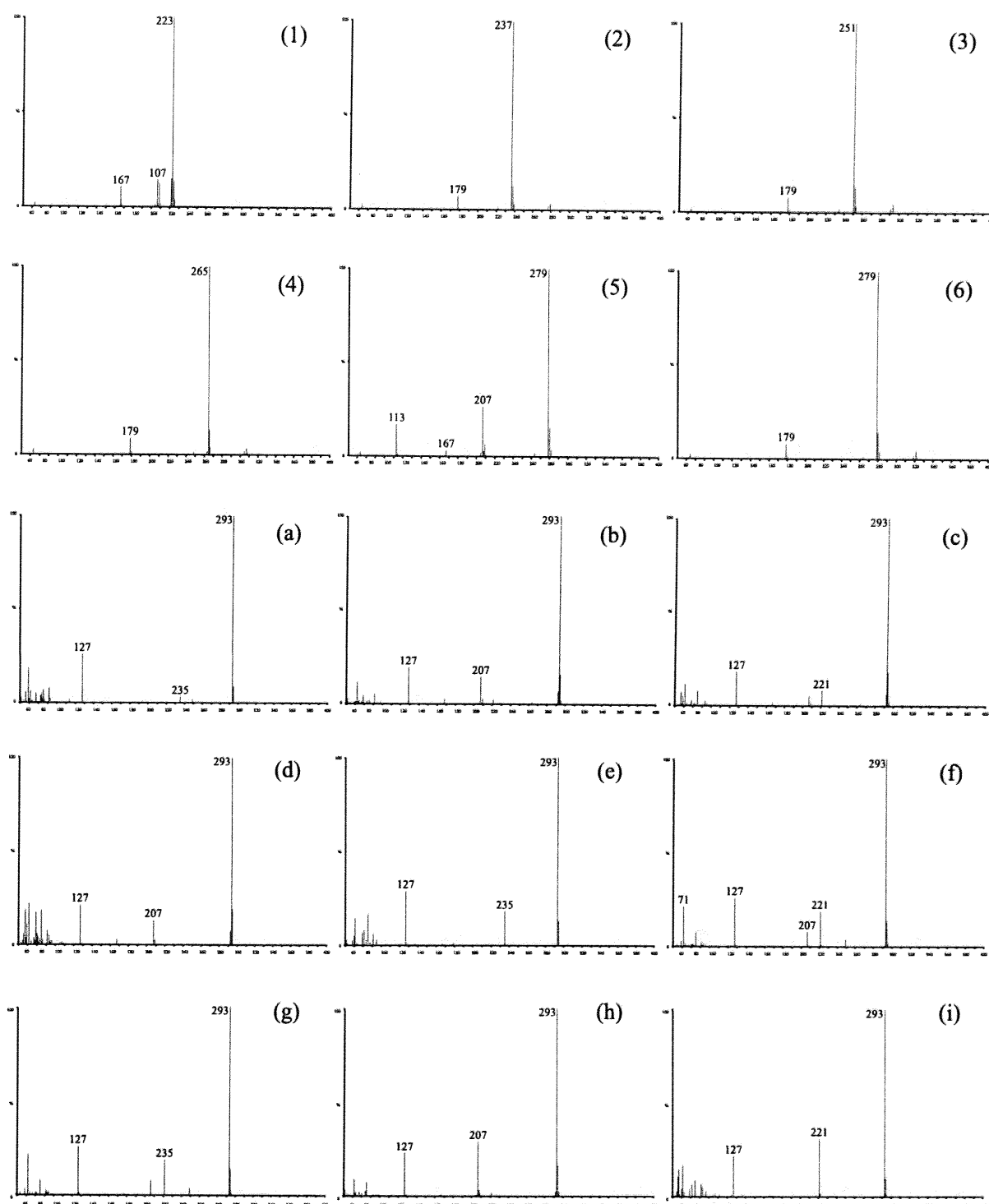


Fig. 7. PCI spectra TMS derivatives of 4-alkyl phenols(1-6) and nonyl phenol compounds(a-i)

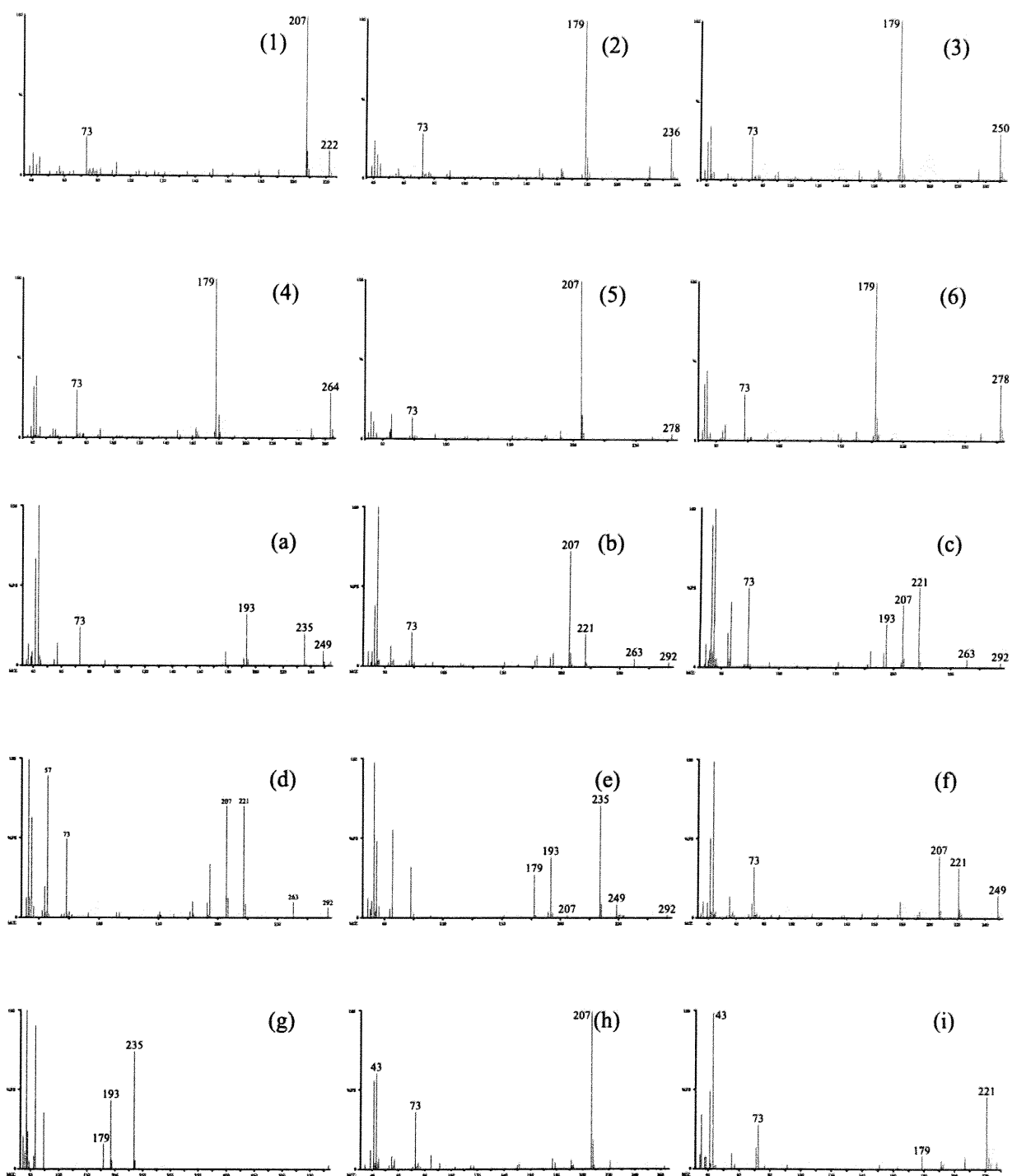


Fig. 8. EI spectra of TMS derivatives of 4-alkyl phenols(1-6) and nonyl phenol compounds(a-i)

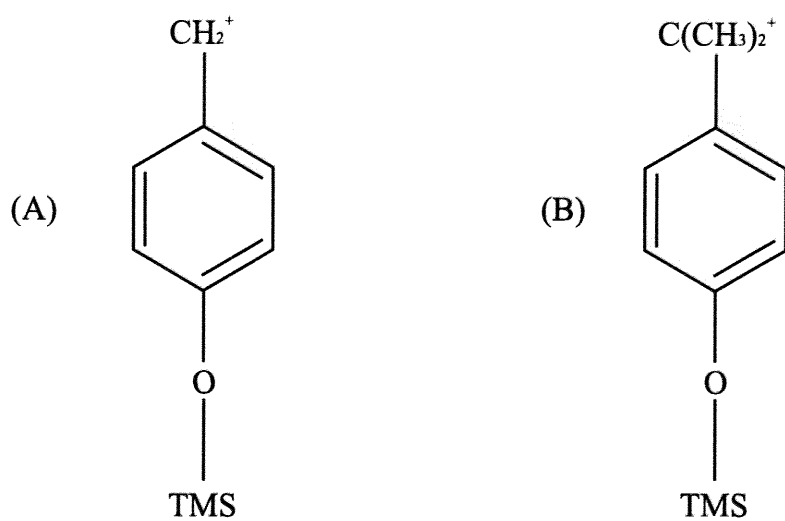


Fig. 9. The structure of the fragments of m/z 179(A) and 207(B)
TMS: Trimethylsilyl

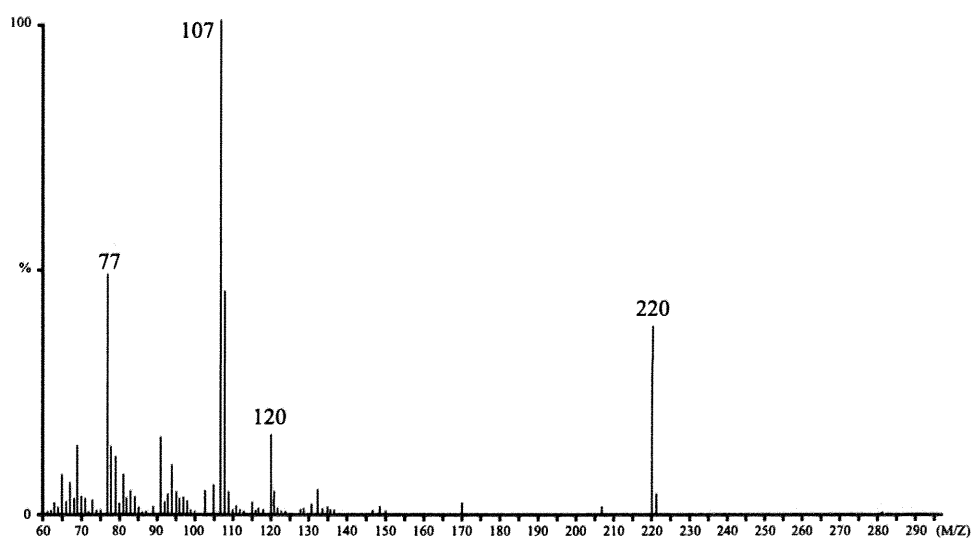


Fig. 10. EI MS spectrum of 4-normal nonyl phenol

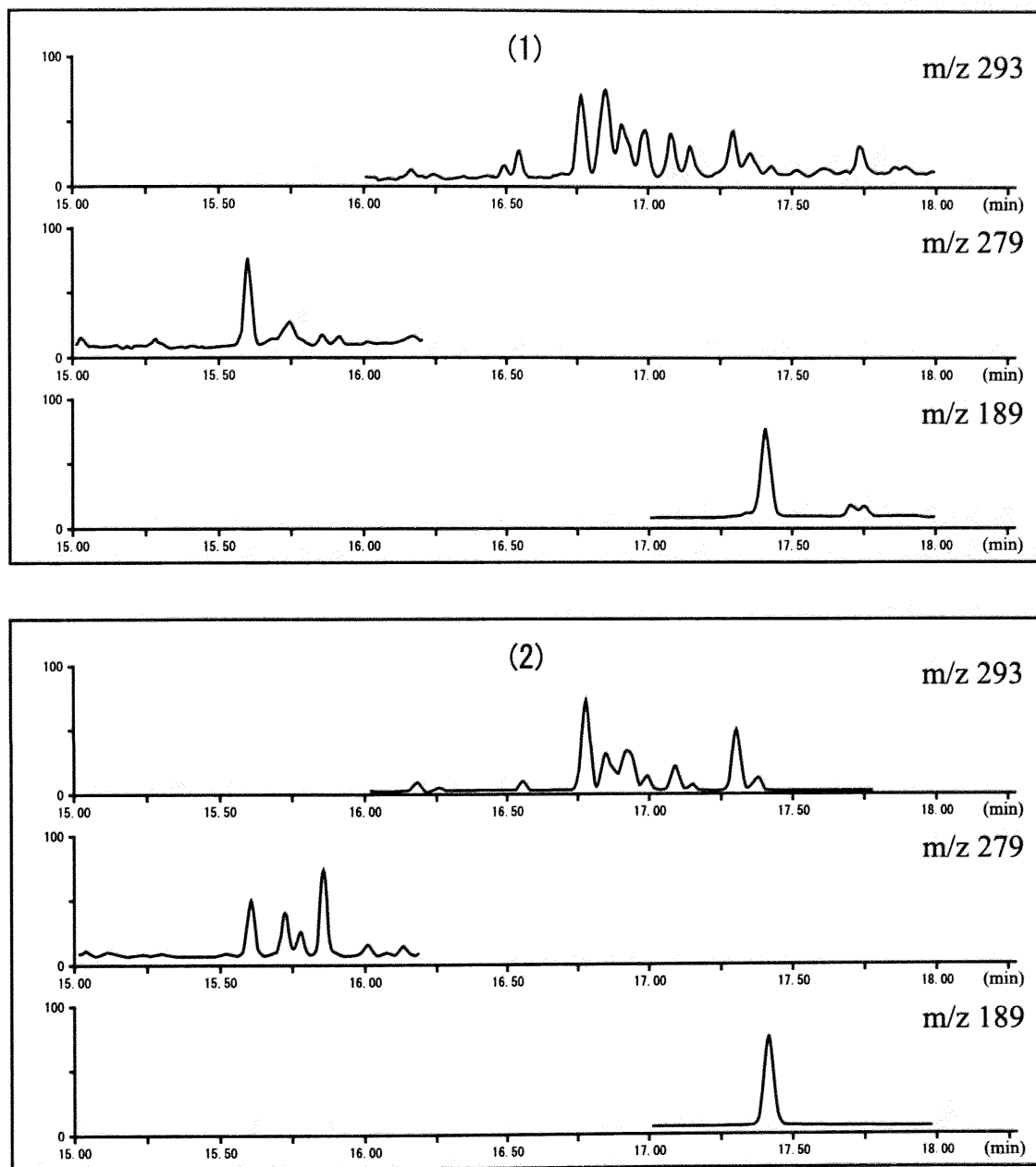


Fig. 11. Determination of 4-alkyl phenols in the practical samples
(1) industrial waste water
(2) ultra purified water

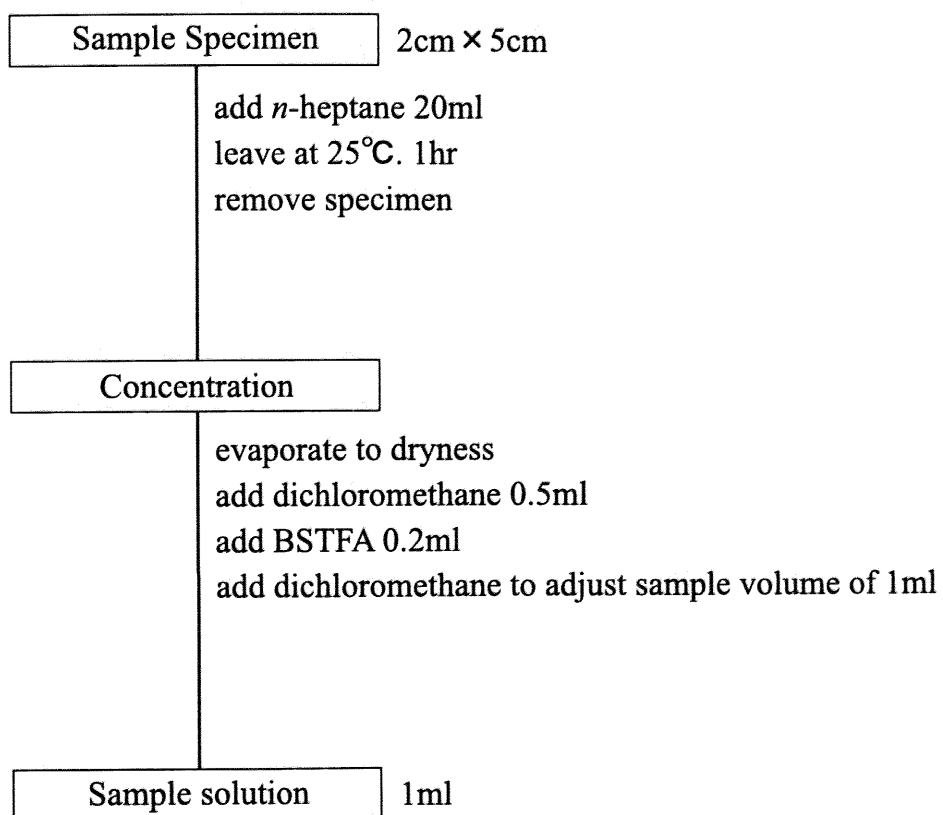


Fig. 12. Concentration for the determination of 4-alkyl phenols
BSTFA: Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)

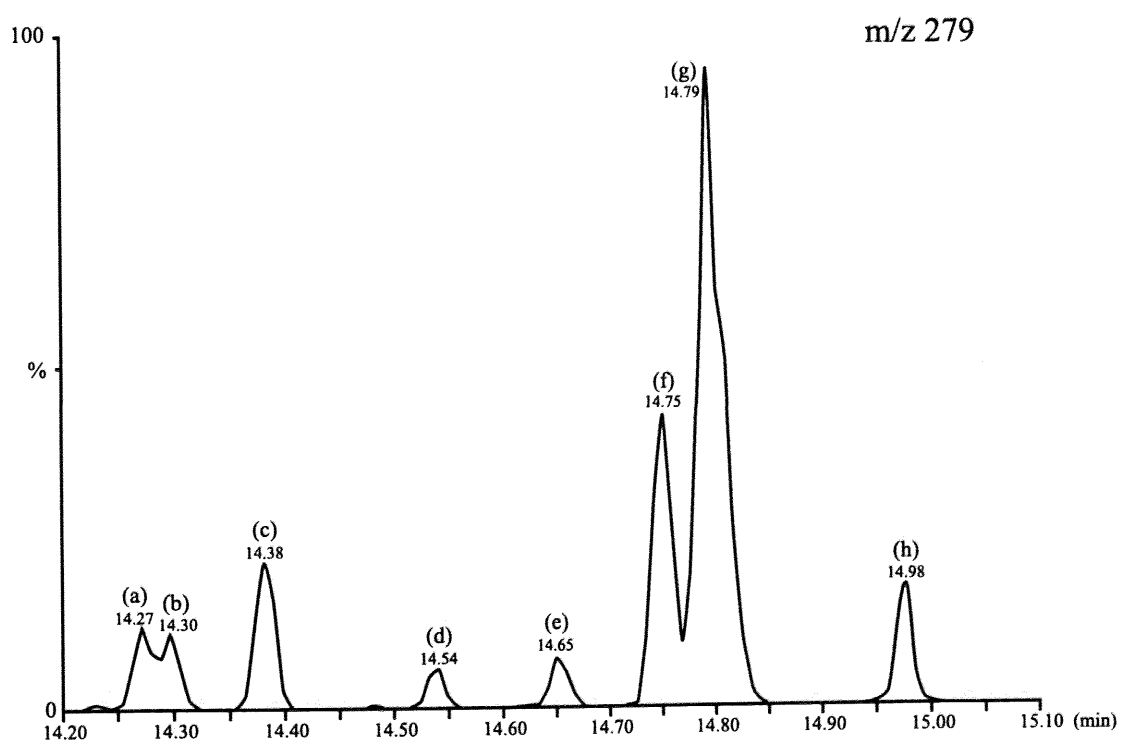


Fig. 13. Separation of TMS derivatives (a-h) of "octyl phenols"

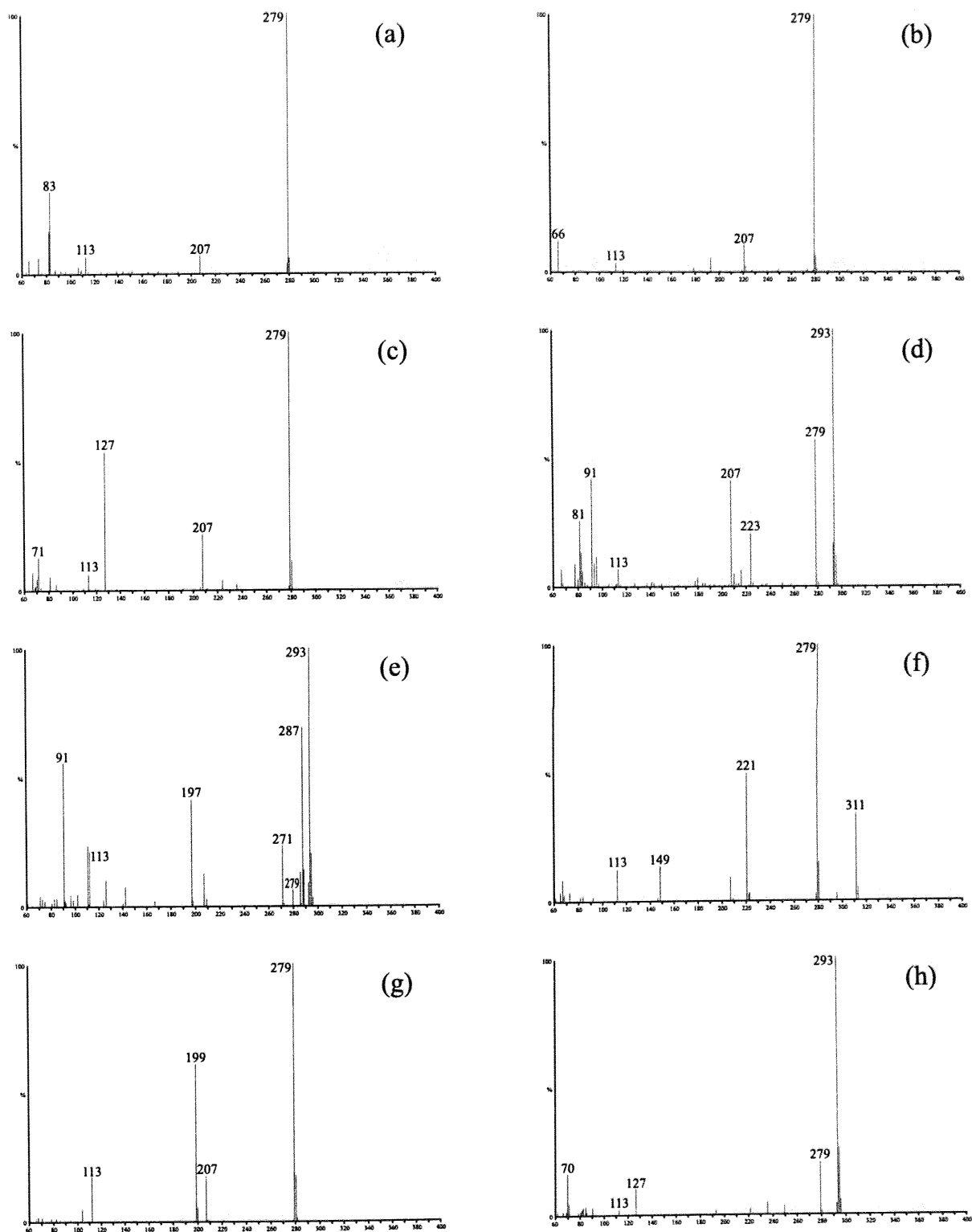


Fig. 14. PCI spectra of the peaks (a-h) in fig. 13.

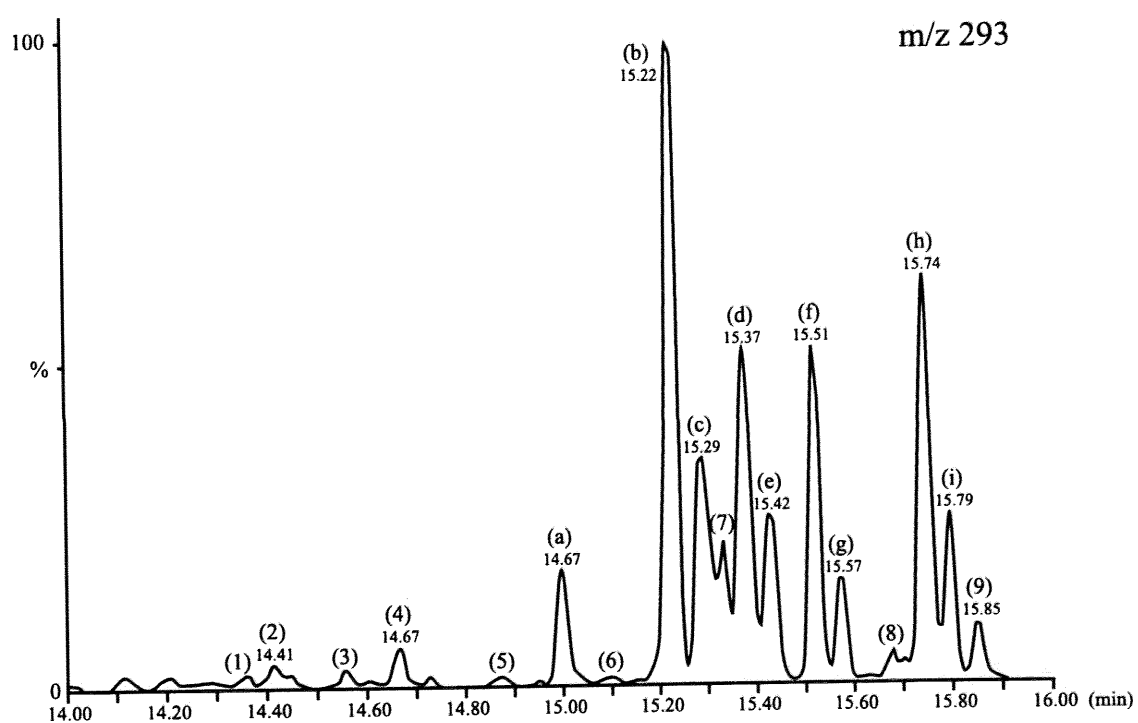


Fig. 15. Separation of TMS derivatives (1-9 and a-i) of "nonyl phenols"

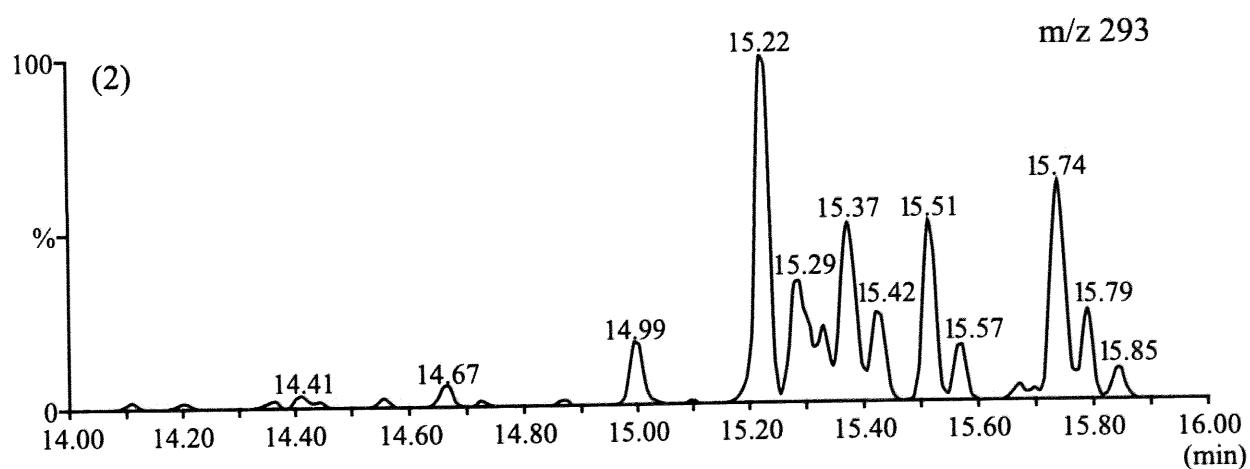
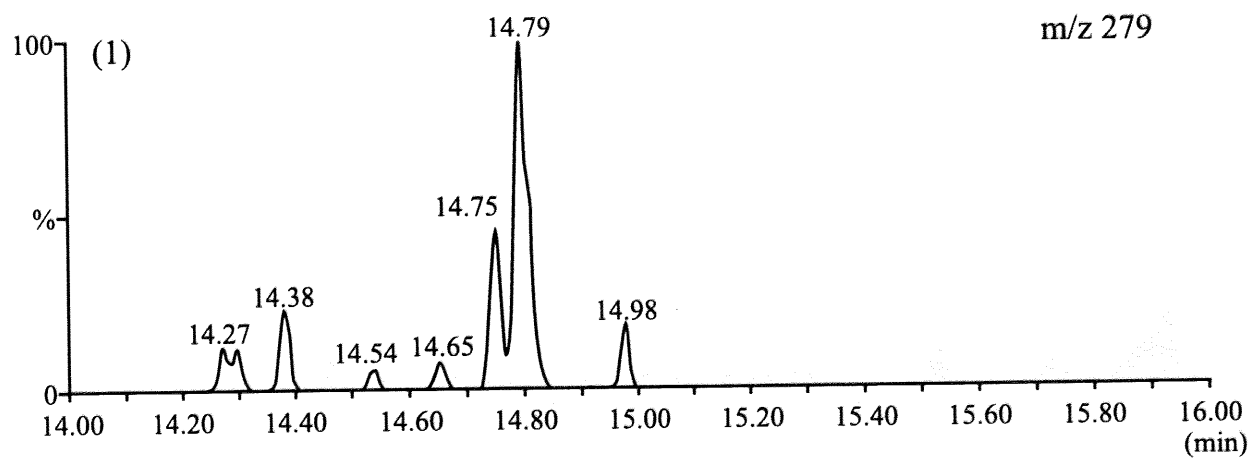


Fig. 16. Separation of TMS derivatives of octyl phenols (1) and nonyl phenols (2)

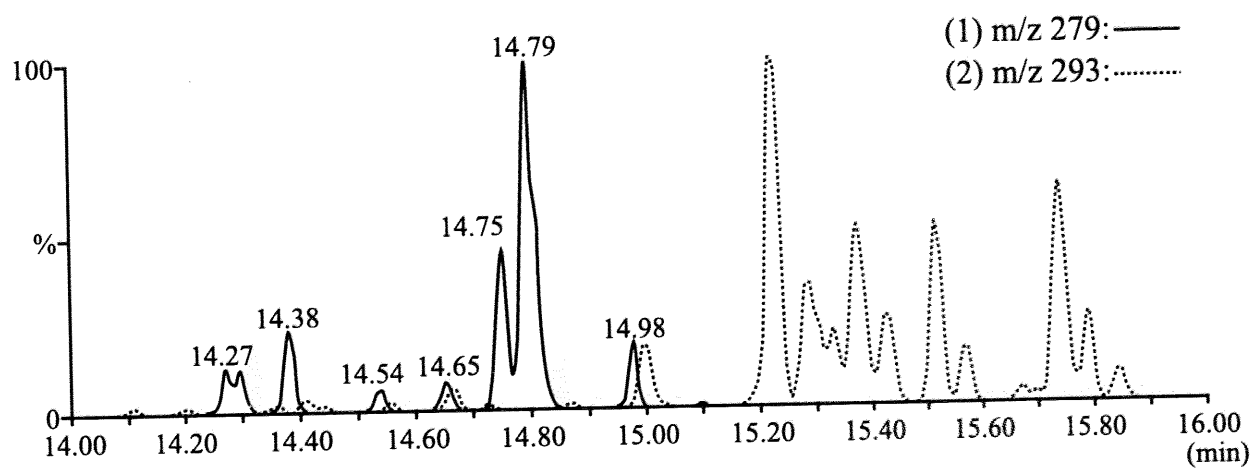


Fig. 17. Separation of TMS derivatives of octyl phenols (1) and nonyl phenols (2)

謝 辞

本研究論文をまとめるに当たり、格別の御高配とご指導を頂いた千葉大学工学部

小熊 幸一教授に感謝いたします。

ご精読と貴重なご助言を賜りました千葉大学工学部 山本 忠教授、立本 英機教授

並びに藤田 力教授に感謝の意を表します。

本研究論文の作成には、株式会社パーキンエルマージャパン恩田宣彦理学博士（元千葉大学工学部客員教授）には数々の御指導を頂きお礼申し上げるとともに深く感謝いたします。

最後に、内分泌攪乱化学物質の研究遂行に当たり多大なご協力を頂いた横浜市衛生研究所菅谷なえ子氏、桜井克巳氏並びに長期にわたって本研究にご理解を頂いた元横浜市衛生研究所家庭用品室の瀬下昭子氏、水質室の山本親男氏に厚く感謝いたします。