

魚介類中ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の 汚染実態調査について

山口貴弘* 柿本健作* 永吉晴奈* 小西良昌* 梶村計志*

魚介類中のベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤についてガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計 (GC-MS/MS) を用いて汚染実態調査を行った。その結果、複数の魚介類から UV-P、UV-326、UV-327 および UV-328 が検出された。

キーワード：紫外線吸収剤、ガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計、魚介類

Key words : UV stabilizer, GC-MS/MS, seafood

紫外線吸収剤は劣化防止を目的として建材、雑貨や自動車部品等のプラスチック製品に使用されている。中でもベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 (BUVSs) は紫外線吸収能力が優れており、国内外で広く使用される化学物質である¹⁾。2007 年に環境中における蓄積性や毒性により 2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール (UV-320) が化学物質の審査および規制に関する法律 (化審法) で第 1 種特定化学物質に指定され、製造および使用が禁止された²⁾。また 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール (UV-327) が監視化学物質に指定された²⁾。

UV-320 や UV-327 以外にも BUVSs には類似物質が多く存在し、現在でも国内外で使用されていることから河川水、海水や食品、特に魚介類の汚染が懸念されている³⁾⁻⁷⁾。

2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチルフェノール (UV-P) や 2-(tert-ブチル)-4-メチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール (UV-326) は酵母レポータージーンアッセイ系でヒトダイオキシン受容体 (AhR) 活性を有することが報告さ

れており⁸⁾、ダイオキシンや多環芳香族炭化水素類と同様に有害性を持つ可能性が示唆されている。食品中の BUVSs の汚染実態を解明することは、ヒトに対するリスクを評価するための有益な知見となると考えられる。

本研究では、GC-MS/MS を用いて魚介類中の BUVSs 分析し、汚染実態調査を行ったので報告する。

実験方法

1 試料

汚染実態調査には大阪府内で市販されている魚介類 (筋肉部) を使用した (表 1)。また添加回収試験にはサケ (筋肉部) を使用した

2 試薬および器具等

2-1 標準品

UV-P、2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチル-6-(2-プロフェニル)フェノール (UV-9)、UV-326、2-(2-ヒドロキシ-5-tert-オクチルフェニル)ベンゾトリアゾール (UV-329)、2-[2-ヒドロキシ-5-[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]フェニル]-2H-ベンゾトリアゾール (UV-090) は Sigma-Aldrich 社製、UV-327、2-(3,5-ジ-tert-アミル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾール (UV-328) は東京化成工業 (株) 製を用いた (図 1)。内標準物質 (IS) としてクリセン-d12、ペリレン-d12 は和光純薬工業 (株)

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Surveillance of Benzotriazole UV Stabilizers in Seafoods

by Takahiro YAMAGUCHI, Kensaku KAKIMOTO, Haruna NAGAYOSHI, Yoshimasa KONISHI and Keiji KAJIMURA

製、ピレン-d10はCIL社製を用いた。

2-2 試薬および器具

ジクロロメタン、n-ヘキサン、シクロヘキサン、アセトン、ジエチルエーテル、無水硫酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製 残留農薬・PCB 試験用

シリカゲル：ワコーゲル C-200 和光純薬工業(株)製

円筒ろ紙：アドバンテック東洋(株)製 円筒ろ紙 (No. 86R、ガラス繊維)

3 装置

凍結乾燥機：東京理化工械(株)製 EYELA FDU-2100 を使用した。

GC-MS/MS: GCはAgilent社製 7890A、MS/MSはWaters社製 Quattro Micro を用いた。

4 GC-MS/MS 測定条件

カラム: Agilent社製 VF-5ms (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

注入量: 1 μL (スプリットレス)

キャリアーガス流量: 1 mL/min (ヘリウム)

測定モード: EI-Positive、選択反応モニタリング (SRM)

イオン化電圧: 70 eV

イオン源温度: 250°C

昇温条件: 80°C (1 min)-20°C/min→140°C-

8°C/min→300°C (6 min)

化合物ごとの保持時間およびモニターイオンは表2、各化合物のクロマトグラムは図2に示した。

表 1 試料情報

No.	魚種	採取海域
1	クロマグロ	トルコ
2	メバチマグロ	韓国
3	アトランティックサーモン	オーストラリア
4	タラ	アメリカ (アラスカ)
5	トラウトサーモン	チリ
6	カラスカレイ	デンマーク
7	エビ	ベトナム
8	赤魚 (アラスカメヌケ)	アイスランド
9	ツバス	島根県
10	ビンナガマグロ	和歌山県
11	タイ	愛媛県
12	ブリ	宮崎県
13	アジ	静岡県
14	タラ	北海道
15	サワラ	鳥取県
16	キハダマグロ	インドネシア
17	サワラ	韓国
18	サゴシ	京都府
19	アナゴ	大阪府
20	サバ	青森県

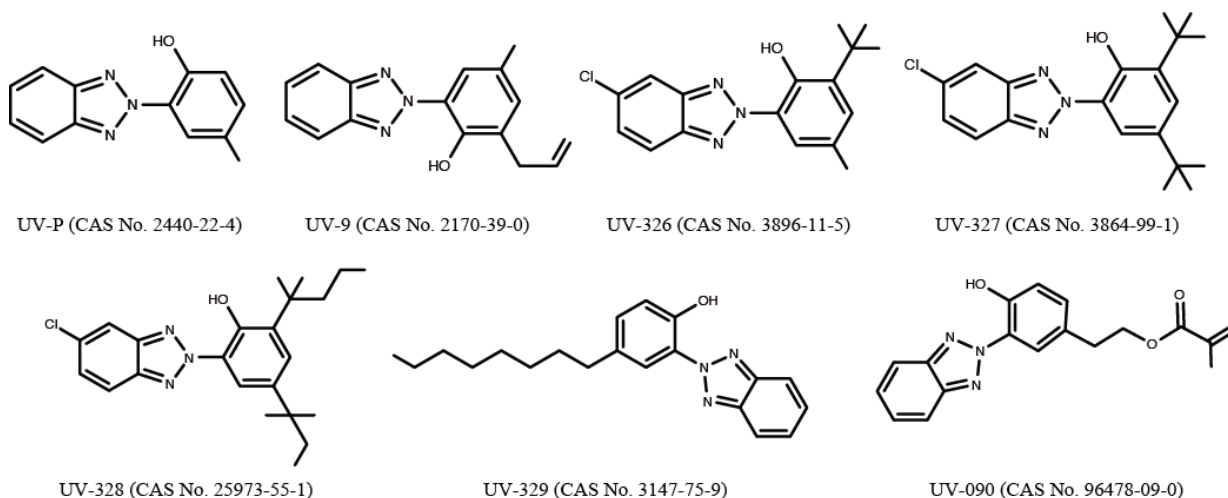


図 1 BUVSs 構造式

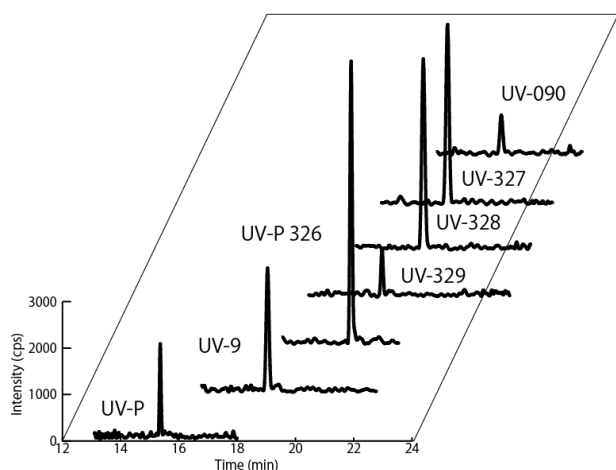


図 2 BUVSs のクロマトグラム (各 50 ng/mL)

5 抽出および精製方法

5-1 抽出

抽出法については中田らの方法を参考に実施した²⁾。粉碎した試料 10 g を凍結乾燥した。凍結乾燥した試料をガラス繊維製円筒ろ紙に入れ、各 IS を 40 ng 加えた後、ジクロロメタンとヘキサンの混合液 (4 : 1) によりソックスレー抽出を行った (5 時間)。

5-2 精製

抽出液を約 40°C で減圧濃縮し、残渣にシクロヘキサンとアセトンの混合液 (7 : 3) を加え 4 mL に定容した。定容した溶液を GPC 装置にかけ精製を行った。GPC カラムには昭和電工 (株) 製 Shodex EV-2000 AC を使用し、移動相はシクロヘキサン : アセトン (7 : 3)、

カラム温度は 40°C、流速は 5 mL/min、インジェクション量は 2 mL とした。フラクションは 12 min から 36 min の 120 mL を採取した。採取溶液は減圧下濃縮し溶媒を留去し、5 mL のヘキサンに溶解した。あらかじめ 5% エーテルヘキサン溶液 50 mL でコンディショニングを行った 5% 含水シリカゲル (5 g) のオープンカラムに負荷し、60 mL の 5% エーテルヘキサン溶液で溶出させ、ナス型フラスコに回収した。溶出液を窒素気流下で 200 μ L に濃縮し試験液とした。空試験も併せて実施し、空試験から検出される対象化合物については、検出した値から差し引きし濃度を算出した。検出限界 (LOD) および定量下限値 (LOQ) は各対象化合物の S/N が 3 および 10 の値とした (表 3)。

表 3 BUVSs の検出限界および定量下限値

化合物	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
UV-P	0.1	0.6
UV-9	0.2	0.4
UV-326	0.1	0.2
UV-327	0.2	0.4
UV-328	0.1	0.6
UV-329	0.4	1
UV-090	0.2	0.6

表 2 GC-MS/MS 測定条件

化合物	保持時間 (min)	プリカーサー	プロダクト	プロダクト	IS
		イオン (m/z)	イオン (定量) (m/z)	イオン (定性) (m/z)	
UV-P	15.4	225	154	196	ピレン d10
UV-9	18.3	265	250	132	クリセン d12
UV-326	20.4	315	300	272	クリセン d12
UV-327	21.4	357	342	286	クリセン d12
UV-328	21.3	322	252	133	クリセン d12
UV-329	20.7	253	133	225	クリセン d12
UV-090	22.2	237	180	78	ペリレン d12
ピレン d10	16.1	212	210	208	-
クリセン d12	19.7	240	236	212	-
ペリレン d12	23.7	264	236	232	-

結果および考察

1 空試験からの BUVSs の検出について

空試験において、BUVSs が検出されたため、使用する溶媒、ろ紙およびシリカゲルからの検出の有無について確認を行った。

① ソックスレー抽出溶媒

(ジクロロメタン：ヘキサン 4：1)

② 5%エーテルヘキサン溶液

③ GPC 移動溶媒 (シクロヘキサン：アセトン 7：3)

④ 円筒ろ紙 (セルロース製)

⑤ 5%含水シリカゲル

①～③についてはそれぞれの溶媒 100 mL を減圧濃縮下 1 mL に濃縮、④についてはソックスレー抽出溶媒 100 mL に浸し、20 分間超音波洗浄機にかけた後、減圧濃縮下 1 mL に濃縮、⑤はカラムに充填後、5%エーテルヘキサン溶液を通液したものを回収し、減圧濃縮下 1 mL に濃縮した。それらを GC-MS/MS を用いて測定を行った。

④を除き、BUVSs の検出は見られなかった。④については UV-P、UV-326、UV-328 の検出が見られた。円筒ろ紙をガラス繊維製のものに変更し、空試験を実施したところ UV-P、UV-326 および UV-328 の検出はセルロース製円筒ろ紙を使用した結果と比較して 1/10 程度に低減することができた。しかし、完全に除去することはできなかったため、本研究では空試験での検出値を差し引いて算出することとした。

2 添加回収試験

前述の方法で添加回収試験を実施した (試料：サケ、添加濃度 4 ng/g、試行数：3)。空試験および BUVSs を添加しないサケから検出された UV-P および UV-326 については差し引いて値を算出した (表 4)。UV-P および UV-090 を除き平均回収率が 82～98%、RSD は 13% となり良好な結果であった。ただし、UV-090 は 130%、UV-P では 170% を超える回収率となった。特に UV-P はサケから検出される UV-P 濃度 (5.1 ng/g) が添加濃度と近かったため影響が大きく良好な添加回収試験結果を得ることができなかった。

表 4 添加回収試験結果

	回収率(%)	RSD(%)
UV-P	173	93
UV-9	84	5
UV-326	98	13
UV-327	84	11
UV-328	88	3
UV-329	82	2
UV-090	130	7

3 検量線

検量線を 0.01、0.05、0.1 および 0.5 mg/L の範囲で、内標準法を用いて作成したところ、決定係数 $r^2=0.99$ 以上の直線性が認められた (図 3)。

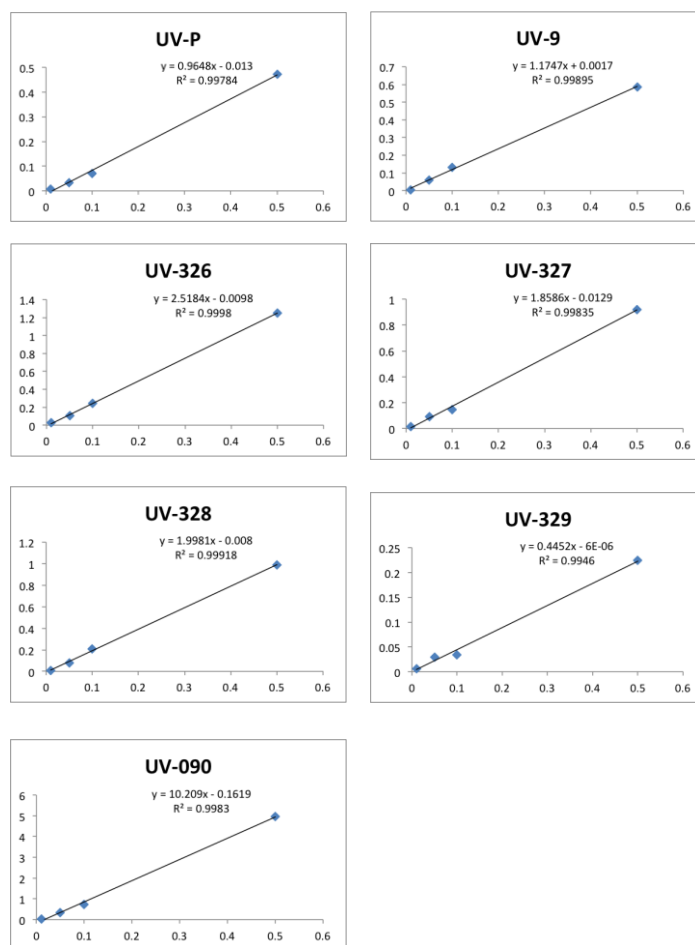


図 3 BUVSs 検量線

(縦軸：内標準物質との強度比，横軸：濃度 $\mu\text{g/mL}$)

4 魚介類の測定結果

表 1 に示した魚介類について BUVSs の汚染実態調査を行った (表 5)。ただし、測定結果において UV-P については添加回収試験結果が良好ではなかったため、測定値については参考値とした。

UV-9、UV-329 および UV-090 については、すべての試料が検出下限以下であった。UV-P は No. 2、4、7、8、9、10、11 および 13 以外の試料から、UV-326 は No. 2、3 および 16 以外の試料から検出された。UV-327 は No. 1 および 12 から、UV-328 は No. 1、6 および 12 から検出された。No. 1、2、10 および 16 はマグロであるが、No. 1 のみトルコ産の養殖マグロであり、その他は日本周辺や東南アジアで採取されたものであった。

サワラ (No. 15、17) およびサゴシ (No. 18) は同一魚種であり、採取海域が近いことため総検出濃度が類似していると考えられた。

多くの残留性有機汚染物質 (POPs) では魚介類中の脂肪重量に比例する傾向がみられるが、BUVSs 総検出量と脂肪重量との関係についても同様に脂肪重量に比例して増加する傾向が確認できた。これにより BUVSs は脂肪中に蓄積している可能性が示唆された (図 4)。

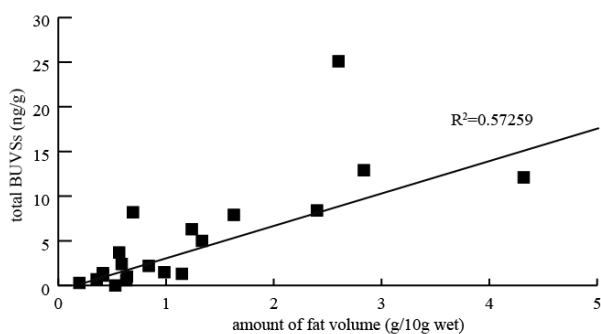


図 4 Total BUVSs と脂肪重量との関係

表 5 魚介類中の BUVSs 濃度 (ng/g)

No.	魚種	UV-P	UV-326	UV-327	UV-328	total BUVSs
1	クロマグロ	3.7	5.5	1.0	1.9	12
2	メバチマグロ	ND	ND	ND	ND	ND
3	アトランティックサーモン	6.3	ND	ND	ND	6.3
4	タラ	ND	0.3	ND	ND	0.3
5	トラウトサーモン	0.7	0.6	ND	ND	1.3
6	カラスカレイ	ND	2.1	ND	0.8	5.0
7	エビ	2.1	1.1	ND	ND	1.1
8	赤魚 (アラスカメヌケ)	ND	1.0	ND	ND	1.0
9	ツバス	ND	2.4	ND	ND	2.4
10	ビンナガマグロ	ND	1.9	ND	ND	2.2
11	タイ	ND	1.4	ND	ND	1.5
12	ブリ	6.2	5.1	0.8	0.7	13
13	アジ	ND	0.6	ND	ND	0.6
14	タラ	1.0	0.4	ND	ND	1.4
15	サワラ	7.1	0.8	ND	ND	7.9
16	キハダマグロ	0.7	ND	ND	ND	0.7
17	サワラ	6.9	1.5	ND	ND	8.4
18	サゴシ	7.9	0.3	ND	ND	8.2
19	アナゴ	3.1	0.6	ND	ND	3.7
20	サバ	20.4	4.7	ND	ND	25

ND: Not detected

5 まとめ

魚介類中のベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の汚染実態調査を行った。UV-P、UV-326 については、空試験で除去が不十分であることが確認できた。今後、抽出・精製法を検討する。

魚介類中からは UV-P、UV-326、UV-327 および UV-328 が検出された。今後は食品からの BUVSs 曝露量を評価するため、魚介類を含め他の食品についても調査を実施したい。

参考文献

- 1) 経済産業省 HP
(http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kaasinhou/1stkind.html)
- 2) 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (昭和 49 年 6 月 7 日政令第 202 号)
- 3) M. E. Balmer, H.-R. Buser, M. D. Müller, and T. Poiger. : Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish From Swiss Lakes. *Environmental Science & Technology*, 39 (4), 953–62 (2005)
- 4) H. Nakata, S. Murata, and J. Filatreau. : Occurrence and Concentrations of Benzotriazole UV Stabilizers in Marine Organisms and Sediments From the Ariake Sea, Japan. *Environmental Science & Technology*, 43 (18), 6920–26 (2009)
- 5) H. Nakata, R.-I. Shinohara, S. Murata, and M. Watanabe. : Detection of Benzotriazole UV Stabilizers in the Blubber of Marine Mammals by Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (GC-HRMS). *Journal of environmental monitoring*, 12 (11), 2088–92 (2010)
- 6) Zhang, Z. et al. : Determination of Benzotriazole and Benzophenone UV Filters in Sediment and Sewage Sludge. *Environmental Science & Technology*, 45 (9), 3909–16 (2011)
- 7) Y. Kameda, K. Kimura, and M. Miyazaki. : Occurrence and Profiles of Organic Sun-Blocking Agents in Surface Waters and Sediments in Japanese Rivers and Lakes. *Environmental pollution*, 159 (6), 1570–76 (2011)
- 8) 永吉晴奈, 吉田仁, 川西優喜, 原島小夜子, 椎崎一宏, 八木孝司, 松田知成, 高木総吉, 安達史恵, 柿本健作, 山口貴弘, 小西良昌, 酵母レポーター遺伝子アッセイを用いた紫外線吸収剤の核内受容体リガンド活性の評価, 第 21 回環境化学討論会講演要旨集, 957- 958 (2012)