

# 魚試料中PCBの高速溶媒抽出装置による抽出法の検討

## A Study on Condition of PCB Extraction in Fish by Accelerated Solvent Extrator

氏家 愛子 長船 達也\* 佐藤 信俊

Aiko UJIIE, Tatsuya OSAFUNE, Nobutoshi SATO

加熱アルカリ分解法による魚介類試料へのPCB標準添加回収試験において、10塩素体等高塩素体の回収率が低く、加熱による分解が示唆された。回収率改善のため、高速溶媒抽出装置による抽出条件の検討を行った。試料は、乳鉢で無水硫酸ナトリウムと十分に摺り合わせ脱水した。抽出条件として、温度150℃、加圧1500psi、抽出溶媒にアセトニトリルを使用することにより、9, 10塩素体の標準添加回収率が95%以上となり、実試料からの抽出も同様に満足のいく結果が得られた。また、高速溶媒抽出装置による抽出は閉鎖系であり、溶媒使用量も少ないメリットがある。更に、前処理操作の簡便化を目的に、抽出用セルの下部に酸性アルミナを敷き、抽出と同時に精製の検討を行った。しかし、150℃、2000psi以上でのヘキサン抽出では、試料からの水分の流出によりアルミナ活性が失活し、精製効果が得られなかった。

キーワード：PCB；高速溶媒抽出装置；四重極型GC/MS；酸性アルミナ

**Keywords** : PCB ; Accelerated Solvent Extrator ; GC-Quadrupole Mass Detector ; Alumina A

### 1 はじめに

食品中のPCBの分析は、従来法では、加熱アルカリ分解法により抽出を行い、バックドカラムGC/ECDによる定量を行ってきた。近年、キャピラリーカラムGC/MSによる異性体毎の定量が可能となり、筆者らも食品中のPCBを四重極型GC/MSで調査した結果を報告<sup>1)</sup>した。このなかで、筆者らは加熱アルカリ分解法による抽出では、9, 10塩素体の標準添加回収率が低く、分解の可能性を指摘した。また、同法は分解液が強アルカリであり、操作上での危険性が高いことや、抽出溶媒を比較的多量に使用する等の問題点もある。そこで、これらの問題点を改善するため、加熱アルカリ分解法の代替として、高圧溶媒抽出装置（以下ASE）を使用して、各種抽出条件を検討し良好な結果が得られたので報告する。

### 2 方法

#### 2.1 分析方法

##### 2.1.1 装置

加熱還流抽出用6穴ウォーターバス

高圧溶媒抽出装置：DIONEX ASE-200, 33mlセル, 60ml  
バイアル

GC/MS：Agilent GC/MS 6890/5973

GC用カラム：HP-5Ms (25m×0.25mm, 膜厚0.25μm)

\*現 食と暮らしの安全推進課

##### 2.1.2 試薬等

n-ヘキサン、アセトン、アセトニトリル：残留農薬、  
PCB分析用300, 関東化学(株)

精製水：ヘキサン洗浄をしたMilliQ水

酸性アルミナ：ICN Alumina A-Super I, ICN Biomedicals  
GmbH

10%硝酸銀シリカゲル：ダイオキシン類分析用, 和光  
純薬工業(株)

硫酸：精密分析用, 和光純薬工業(株)

無水硫酸ナトリウム：残留農薬, PCB分析用

Sep pak Silica：690mg, ウォーターズ(株)製

PCB標準品: Custom PCB Mix (2.5μg/ml), AccuStandard  
Inc.製及びカネクロール300, 400, 500, 600  
(approx.1μg/ml)；(株)ジーエルサイエンス製

##### 2.1.3 試料調製及び分析方法

試料の調製は以下のとおり行った。均一化した検体を20gをガラス乳鉢に秤り取り、無水硫酸ナトリウム（以下Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）約21~25gと十分に搗りつぶしながら脱水する。これを、予めセルロースろ紙を底部に敷いたASE33mlセルに入れ、挿入工具（棒）で試料に隙間ができないよう上から押し、試料の上部にもセルロースろ紙を敷く。また、DIONEX社のASE技術資料「ASE法による魚組織中PCBの選択的抽出」で報告<sup>2)</sup>のある同時抽出・精製を検討するため、表1のヘキサンを抽出溶媒とする

表1 ASE抽出条件

	ASE-1	ASE-2	ASE-3	ASE-4	ASE-5
圧力(psi)	1500	2000	2000	1500	1500
温度(°C)	100	150	195	150	150
平衡時間(分)	15	15	15	15	15
フラッシュ(%)	60	60	60	60	60
バージ	300	300	300	300	300
サイクル	2	2	2	2	2
酸性アルミナ積層	10g	10g	10g	-	-
抽出媒体1回目	n-ヘキサン	n-ヘキサン	n-ヘキサン	アセトン	アセトニトリル
抽出媒体2回目	10%アセトン /n-ヘキサン	n-ヘキサン	n-ヘキサン	アセトン	アセトニトリル

条件「ASE-1」～「ASE-3」では、ASEの33mlセル下部に酸性アルミナ粉末を10g敷き抽出を行った。抽出は1試料につき2本のバイアルを使用し2回抽出を行った。

ASEの抽出条件を表1に示す。また、GC/MS測定条件は既報<sup>1)</sup>と同じ条件で行った。

抽出液の前処理は以下のとおり行った。抽出溶媒にヘキサンを使用した「ASE-1」～「ASE-3」は、抽出液の入った60mlバイアルにNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を入れて脱水し、ロータリーエバポレーターで約5mlまで濃縮、Sep pak Silica (690mg)で精製後、濃縮して0.5mlまたは1mlに定容しGC/MSで定量した。「ASE-3」では抽出条件が195°C、2000psiとかなり高い条件であったため、抽出液が2本(1回目、2回目)とも化成場臭に似た臭気と黄色または微黄色の着色があり、シリカゲル精製だけではGC/MS測定に妨害が大きかった。このため、この試験液0.5mlを更に10%硝酸銀シリカゲル(パスツールピペットに200mgをつめたもの)で精製し、0.5mlに定容してGC/MS測定を行った。また、アセトンを抽出溶媒とする条件「ASE-4」の抽出液は、アセトンを留去後、分液ロートに移してヘキサンに転溶し、硫酸及び精製水で洗浄後、Sep pak Silicaで精製した。アセトニトリルを抽出溶媒とする条件「ASE-5」の抽出液は、60mlバイアルにNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を入れて脱水し、ロータリーエバポレーターで約5mlまで濃縮後、分液ロートに移して10%食塩水を約15ml入れ、ヘキサンに転溶した。更に、硫酸及び精製水洗浄後、Sep pak Silicaで精製し、濃縮して0.5mlに定容しGC/MSで定量した。

## 2.2 分析対象

当所でPCBモニタリングとして分析を行っているスズキを対象として実施した。スズキは、2003年度の冷凍保存検体2検体を使用した。また、結果を検討する上で必要と考えられた脂質含有量について、食品中の脂質分析法<sup>3)</sup>に従い分析を行った。スズキー1は脂質平均2.7%(n=3, C.V.=2.7%)、スズキー2は脂質平均4.0%(n=3, C.V.=2.7%)でスズキー2の方が若干脂質含有量が多い検体であった。

## 3 結果と考察

### 3.1 温度及び圧力条件

各抽出条件のPCB同族体毎の濃度を表2に示す。

抽出溶媒にヘキサンを使用した「ASE-1(100°C, 1500psi)」, 「ASE-2(150°C, 2000psi)」, 「ASE-3(195°C, 2000psi)」の抽出結果の比較をすると、「ASE-1」では従来法である加熱アルカリ分解法の値に対し、スズキー1は48%、スズキー2は40%、「ASE-2」では2検体とも67%、「ASE-3」では92%、73%で、温度と圧力が高くなるに従い高い結果となった。ただし、「ASE-1」は2回目の抽出溶媒として10%アセトン/ヘキサンを使用したため、1回目のヘキサン抽出率だけを使用し、その他の条件は2回分のヘキサン抽出物を合わせた結果と比較している。図1に示すように、ASE-2での1, 2回目のヘキサン抽出率を比較すると、2回目は全体の約10%程度が抽出されるものと考えられ、これを加算しても傾向は変わらない。

また、圧力を一定にし、温度を変化させたASE-2とASE-3の比較をすると、スズキー2の温度による抽出率の増加は、スズキー1での増加ほど大きくないことから、脂質含有量など試料の質も、抽出率に影響すると考えられた。

### 3.2 抽出溶媒の種類

表2に示すように、ヘキサンを抽出溶媒とした「ASE-1」～「ASE-3」の温度及び圧力を変化させた条件では、ASEの最高値を使用する「ASE-3」でも、従来法の加熱アルカリ分解法の値に対し、スズキー1で92%、スズキー2で73%であり、加えて9, 10塩素体の抽出率はゼロで満足のいく結果が得られなかった。更に、この最高値を使用する条件下での抽出液は、試料のタンパク質等の熱変成によるアミン臭が非常に強く、かなりの夾雑物も同時に抽出されてくる。また、同時抽出・精製が可能かどうか、セル下部に酸性アルミナを敷いた試験において、圧力1500psiの「ASE-1」ではNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>により脱水した水は流出しなかったが、2000psiの「ASE-2」と「ASE-3」ではヘキサンと一緒に流出し、酸性アルミナが失活してしまい精製効果は得られなかった。

「ASE-1」の2回目の抽出に使用した10%アセトン/ヘキサンの抽出効果について「ASE-2」の抽出率と比較した結果を図2に示す。10%アセトンを使用することによって全体の約30%が抽出され、「ASE-1」と「ASE-2」がほぼ同等の抽出率となった(ただし、6塩素体が「ASE-2」より低い)。図1に示すヘキサン抽出の場合、2回目の抽出率は約10%であり、抽出率に寄与する要因として、温度、圧力だけではなく溶媒の極性も大きいと考えられた。

そこで、温度と圧力を150°C, 1500psiとし、抽出溶媒にアセトンとアセトニトリルを使用して検討を行った。アセトンを使用する条件「ASE-4」では、抽出率はスズキー1とスズキー2でそれぞれ81%、66%であり、抽出量トータルとしては「ASE-2」と「ASE-3」の間もしくは同等であった。しかし、図3に示すように、前2条件

表2 抽出条件別PCB濃度

「スズキー-1」

(ng/g)

塩素数	ASE-1			ASE-2 ヘキサン×2	ASE-3 ヘキサン×2	ASE-4 アセトン×2	ASE-5 アセトニトリル×2	加熱アルカリ 分解法
	ヘキサン	10%-アセトン /ヘキサン	Total					
1								
2								
3	0.23±0.04	0.32±0.05	0.56±0.09		0.25		0.41±0.11	0.53
4	1.2±0.33	0.86±0.16	2.1±0.39	2.2±0.11	2.4	2.0	2.7±0.13	2.6
5	2.3±0.59	1.0±0.16	3.1±0.55	3.1±0.11	4.1	3.4	4.6±0.23	4.1
6	1.6±0.35	0.34±0.10	1.9±0.32	2.1±0.17	3.0	3.2	4.4±0.12	3.8
7	0.49±0.22	0.05±0.08	0.54±0.20	0.62±0.08	1.1	0.98	1.0±0.04	1.1
8				0.02±0.04	0.03	0.14	0.11±0.00	0.04
9						0.02	0.01±0.00	
10						0.02	0.01±0.01	
Total	5.8±1.5	2.6±0.53	8.6±1.7	8.0±0.55	11	9.7	13±0.64	12

「スズキー-2」

(ng/g)

塩素数	ASE-1			ASE-2 ヘキサン×2	ASE-3 ヘキサン×2	ASE-4 アセトン×2	ASE-5 アセトニトリル×2	加熱アルカリ 分解法
	ヘキサン	10%-アセトン /ヘキサン	Total					
1								
2	0.01±0.02		0.01±0.02					
3	0.20±0.08	0.33±0.08	0.53±0.03	0.28±0.25	0.43±0.08	0.09±0.08	0.49±0.16	0.70
4	1.0±0.29	0.94±0.22	2.0±0.08	2.3±0.02	2.1±0.20	1.8±0.06	2.8±0.04	2.8
5	2.1±0.40	1.1±0.27	3.2±0.14	3.5±0.04	3.9±0.39	3.1±0.23	4.4±0.12	4.5
6	1.7±0.17	0.54±0.11	2.2±0.12	2.9±0.05	3.3±0.28	3.3±0.17	5.0±0.50	4.8
7	0.89±0.15	0.23±0.06	1.1±0.09	1.2±0.07	1.4±0.17	1.3±0.06	1.6±0.26	1.7
8	0.10±0.08		0.10±0.08	0.14±0.01	0.13±0.02	0.22±0.02	0.33±0.07	0.24
9						0.04±0.01	0.06±0.01	0.02
10					0.03±0.01	0.03±0.00	0.04±0.02	
Total	6.0±1.1	3.2±0.73	9.2±0.36	10±0.37	11±1.0	9.9±0.43	15±0.88	15

下及び加熱アルカリ分解法では抽出されなかった9,10塩素体が抽出されている。また、アセトニトリルを使用する条件「ASE-5」では、抽出率はスズキー-1とスズキー-2でそれぞれ108%, 100%であり、8, 9, 10塩素体の抽出率も満足のいく結果が得られた。標準添加回収試験(試料換算 1 ng/g)の8, 9, 10塩素体の回収率は、ヘキサン抽出である「ASE-3」では、9塩素体で約95%, 10塩素体で93%の回収率が得られ、アセトニトリルの「ASE-5」とほぼ同等の回収率が得られた。しかし、実試料においては「ASE-3」では全く抽出されず、添加したPCBの回収が良好であっても、細胞中のPCBを抽出するためには、細胞への浸透性が重要な因子であることが判明した。これらの結果から、アセトニトリルを抽出溶媒とする温度150°C、圧力1500psiの抽出条件が最適であると考えられる。

### 3.3 加熱アルカリ分解法及びASE各抽出条件下での異性体濃度

加熱アルカリ分解法による各異性体濃度をX軸に、ASEの各条件での異性体濃度をY軸に取り、2法の関係をスズキー-2について図4に示す。スズキー-1についてもほぼ同様な結果であった。

加熱アルカリ分解法と「ASE-1」～「ASE-4」との関係においては、図中の線で囲んだ部分が、加熱アルカリ分解法では抽出されているがASEでは抽出されない異性体である。ヘキサン抽出の「ASE-1」～「ASE-3」では、約20~30種の異性体が抽出されず、そのほとんどが0.1ng/g未満の濃度の低いものであった。また、ヘキサン抽出では、アセトン抽出「ASE-4」やアセトニトリル抽出「ASE-5」に比較して若干バラツキも大きい結果となっており、前項で述べた細胞中への浸透性が寄与しているものと考えられた。アセトン抽出「ASE-4」において、加熱アルカリ分解法では抽出されているがASEでは抽出

されない異性体数は、ヘキサン抽出の1/3以下であるが、比較的濃度の高い異性体も抽出されないものがあり、ヘキサン抽出とは傾向を異にしている。また、アセトニトリル抽出「ASE-5」では、濃度の低い異性体もほぼ同程度抽出されており、バラツキも少ない。Y=aXの傾きa及び決定係数 $r^2$ はそれぞれスズキー1で1.2, 0.99, スズキ

-2で0.97, 0.98であり各異性体毎に、加熱還流法と良い対応が認められた。脂質含有量の低いスズキー1は、「ASE-5」による抽出率が加熱アルカリ分解法に対し、2割程度高く、試料の質によっては、ASEによる抽出法の方が従来法より適していることが判明した。

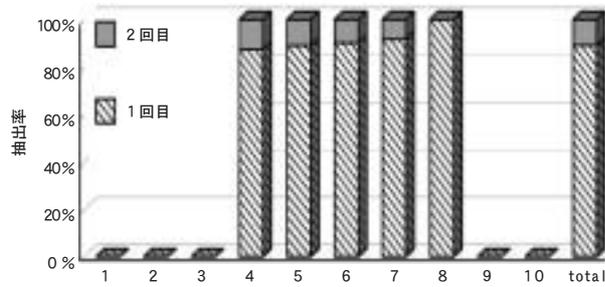


図1 抽出回数による抽出率 (ASE-2)

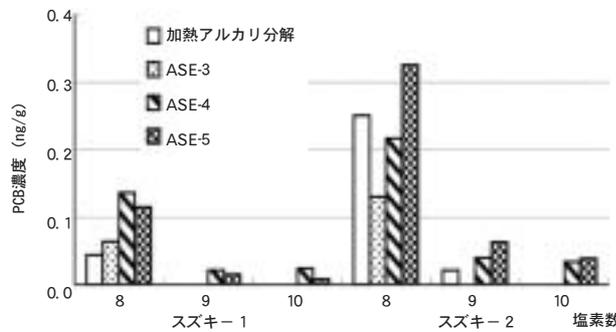
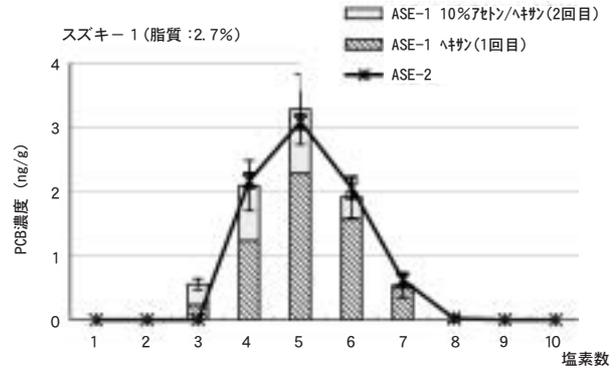


図3 高塩素体の抽出法別濃度比較

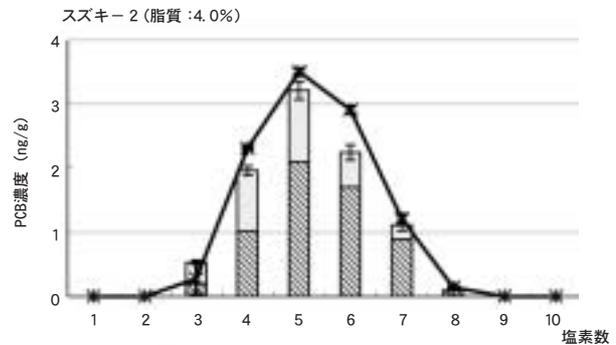
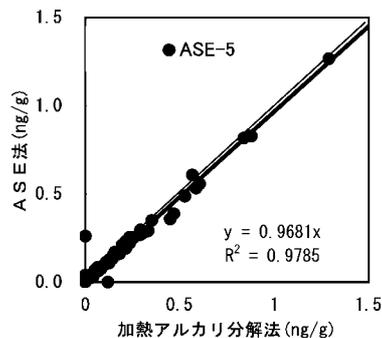
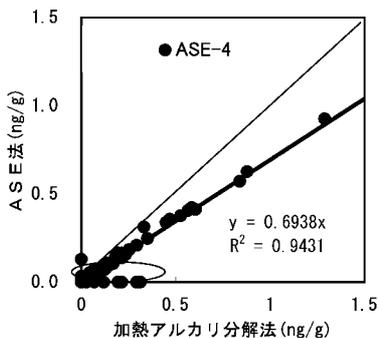
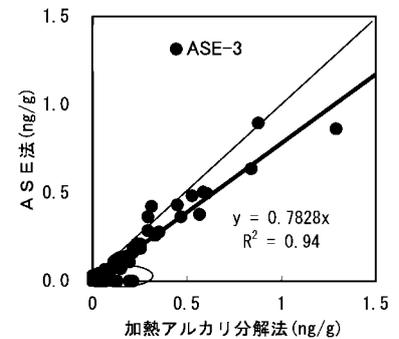
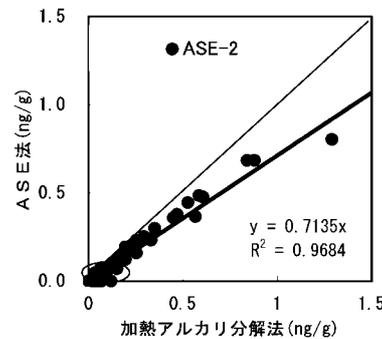
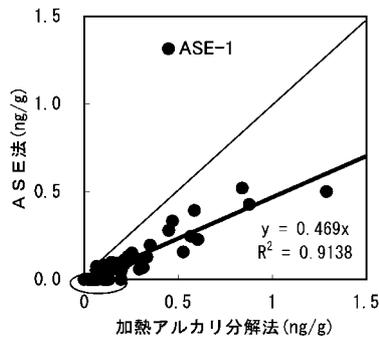


図2 抽出溶媒による抽出率



○で囲った部分は両者間の対応が悪いもの

図4 加熱アルカリ分解法とASE抽出条件別PCB濃度の相関 (スズキー-2)

表3 ビフェニルの抽出率

	スズキー-1	スズキー-2
加熱アルカリ分解法	1.0	1.0
ASE-1	0.1	0.1
ASE-2	4.0	3.4
ASE-3	30	46
ASE-4	1.0	0.5
ASE-5	0.6	0.9

### 3.4 ビフェニル

PCBの基本骨格であるビフェニルの抽出率について、加熱アルカリ分解法とASE抽出各条件との比較を表3に示す。

ビフェニル抽出率は、加熱アルカリ分解法を1とした場合、「ASE-1」～「ASE-5」では、それぞれ、0.13、3.7、38、0.77、0.76であり、ヘキサン抽出では、温度及び圧力が高くなる程高くなった。195℃、2000psiの「ASE-3」では、同じ圧力条件で温度が低い「ASE-2」の10倍の値となっており、両条件とも無極性のビフェニルが、試料以外の抽出系器材からヘキサンに溶出する等の、コンタミネーションの可能性が考えられる。

## 4 ま と め

PCB高塩素体を熱分解せずに抽出する方法として、アセトニトリルを抽出溶媒とするASE抽出法が、加熱アルカリ分解法より優れた方法であることが判明した。この方法は、閉鎖抽出系で行うことや、抽出溶媒が少ないことから、濃縮・精製操作において比較的容量の小さい器具類でコンパクトに実施することができる点でも優れている。しかし、魚試料のマトリックスも多く抽出されてくるため、加熱アルカリ分解法に比較し、夾雑物の除去のため硫酸洗浄の回数が多く、簡便な精製法の検討が必要である。

## 参 考 文 献

- 1) 氏家愛子, 長船達也, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, 20, 75 (2002)
- 2) DIONEX: ASE REPORT, AS004GU-0057” 高速溶媒抽出装置 (ASE) 法による魚組織中PCBの選択的抽出”
- 3) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解2000”, p 194 (2000), (金原出版株)