

# GC-MS法による魚体中の化学物質の 分析方法の検討 第4報\*

Evaluation of GC-MS analysis to the identification  
of chemicals in fish (4)

伊藤 恵 治\*\* 仲山 伸 次\*\* 石黒 智 彦\*\*  
Keiji Ito, Shinzi Nakayama and Tomohiko Ishiguro

## 1. はじめに

大気、水質、土壌および魚貝類の各対象別に、有機汚染質の分析法が検討されている。魚貝類については、特定物質として、主としてPCB、BHC等の塩素系殺虫剤について、ECDによる分析方法が数多く報告されている<sup>1)2)3)4)</sup>。しかし魚貝類中の有機汚染質全般に対しては、船坂ら<sup>5)6)</sup>が、異臭魚を、GC、GC-MS法によって分析し、揮発性脂肪酸類、芳香族炭化水素類等の異臭物質の同定、定量を行った例はあるが、その報告例は数少ない。

そこで著者ら<sup>7)8)9)</sup>は、魚体中の有機汚染質全般についての分析法の検討を行ってきた。すなわち、揮発性成分は、液体酸素により試料を凍結処理後、粉碎してヘッドスペース法により分析を行い、一方難揮発性成分は、クロロホルム-メタノール抽出後、クロロホルム留分を分析するにあたり、クリーンアップ方法として、プレカラム法および気化法について検討を行ってきた。また定量方法として、GC-MSを用いて、マスフラグメントグラフィィー(MF)およびマスクロマトグラフィィー(MC)の適用について検討してきた。

第1報<sup>9)</sup>によると、フタル酸エステルなどの高沸点成

分では、プレカラム法による回収率において良い結果が得られなかったが、これは、これらの高沸点成分が加熱追い出し時に、プレカラムの針の部分で凝集してしまうためと考えられる。そこで本報では、難揮発性成分のクリーンアップ方法として、引き続きプレカラム法を適用し、プレカラムの針の部分をも加熱できるようにし、さらにプレカラム用充てん剤としてOV-17を用いて、プレカラム法の検討を行った。

定量法については、前報で一部報告を行ったMC法による定量分析の検討を引き続き行い、特に再現性を中心に検討を行った。

MC法は、一定の間隔で質量走査を行い、これらのマススペクトルをいったん磁気ディスクにストックさせ、後で特定の質量数のイオン強度を呼び出し、連続的に記録させるコンピューターシステムを用いた分析方法である。

また、日本沿岸地域および湖沼、計10か所で採取した魚試料について分析を行った結果、揮発性成分、難揮発性成分計120成分を検出することができたので以下報告する。

## 2. 試薬および装置

### 2-1. 試薬

クロロホルム：特級、蒸留して用いる。

メタノール：特級、2回蒸留して用いる。

無水硫酸ナトリウム：クロロホルム+メタノール(1:1)を用い、ソックスレ抽出器で24時間洗浄後、480°C

\*) 本調査は、昭和54年度環境庁委託研究“難分解性化学物質検索調査”によって実施された。

\*\*\*) 日本環境衛生センター公害部特殊公害課

Odor Laboratory, Department of Environmental Pollution, Janan Environmental Sanitation Center

Table 1-a Operation condition of GC-MS for volatile organic chemicals in fishes

	Sampling by cold trapped GC tube	Sampling by Tenax tube
Column	PEG 1000 25% + OV-17 2% (2.7m + 0.3m) × 3mmφ on chromosorb W AW, DMCS 60~80 mesh	Apiezon L20% + OV-17 15% (4.8m + 0.2m) × 3mmφ on chromosorb W AW, DMCS 60~80 mesh
Temperature		
Column	30°C→95°C, 6°C/min	30°C→195°C, 8°C/min
Injection port	210°C	260°C
Separator	210°C	260°C
Ion source	270°C	310°C
Carrier gas	He 30ml/min	He 30ml/min
Trap current	60 μA	60 μA
Accelerating voltage	3.5 kV	3.5 kV
Scan speed	9	9
Electron energy	70 eV	70 eV
Apparatus	Shimadzu LKB-9000, PAC-300 DG	Shimadzu LKB-9000, PAC-300 DG

Table 1-b Operation condition of GC-MS for high boiling organic chemicals in fishes

	Neutral or basic constituent	acidic constituent
Column	OV-17 2% on chromosorb W AW, DMCS 60~80mesh, 3m × 3mm φ	Thermon 1000 2% on chromosorb W AW, DMCS 80~100 mesh, 3m × 3mm φ
Temperature		
Column	50°C→270°C, 10°C/min	50°C→200°C, 10°C/min
Injection port	280°C	280°C
Separator	300°C	300°C
Ion source	310°C	310°C
Carrier gas	He, 30 ml/min	He, 30 ml/min
Trap current	60 μA	60 μA
Accelerating voltage	3.5 kV	3.5 kV
Scan speed	9	9
Electron energy	70 eV	70 eV
Apparatus	Shimadzu LKB-9000, PAC-300 DG.	Shimadzu LKB-9000, PAC-300 DG.

で2時間加熱する。

## 2-2 装置

ガスクロマトグラフ質量分析計：島津 LKB-9000, コンピューターシステム PAC-300 DG. 分析条件を Table 1-a, 1-b に示す。

プレカラム法によるクリーンアップ装置および GC-MS への導入方法：Fig. 1 に示す。200°C で加熱追い出し分析を行った。

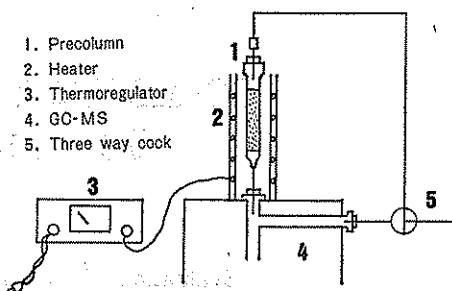


Fig. 1 Clean up apparatus of precolumn method

## 3 分析方法

揮発性成分および難揮発性成分における分析方法は、既報<sup>7, 8)</sup>と同様である。

次に難揮発性成分のクリーンアップ方法としてのプレカラム法について説明する。Fig. 1 に示すように、OV-17 (担体 chromosorb W, AW DMCS) を充てんしたガラス管 (内径 3mm, 長さ 60mm) 内に、クロロホルム留分の濃縮試料 20 μl を注入し、ガラス管に針を接続、200°C で加熱追い出し分析を行った。なお、加熱の際、針がはずれるのを防ぐために、シールテープでガラス管と針の接続部分をしっかりと巻いておく。また試料が薄い場合には、濃縮試料 100 μl をマイクロシリンジにとり、プレカラムに注入後、純窒素を 500 ml 流し、溶媒を飛ばして、更に試料の濃縮を行って分析した。

## 4 クリーンアップ法 (プレカラム法) の検討

炭素数 30 までの n-パラフィンについてプレカラム用充てん剤として OV-17 を用い、前記のように針の部分も加熱できるようにして、200°C で加熱追い出し分析を行い、回収率を調べた。その結果、Table 2 に示すように、回収率はすべて 90% 以上と良好な結果が得られた。

## 5 MC 法の検討

マスクロマトグラフのピーク面積を測る MC 法による定量分析法の適用について、前報では DMP, DEP, DBP, DHP, DOP のフタル酸エステルおよび BHT の 6 成分について検討を行った。本報では、揮発性成分として既報において検出された化学物質のうち、芳香族炭化水素、脂肪族炭化水素、ハロゲン化炭化水素、ケトン、エーテル計 18 成分について検討を行った。方法を次に述べる。

対象試薬を各々 2 μl, マイクロシリンジにとり、1 l 真空ビンに注入して標準試料とした。真空ビンを温めな

Table 2 Recovery by precolumn method

Chemicals	Recovery (%)	Chemicals	Recovery (%)
n-Nonane	100	n-Octadecane	96.3
n-Decane	96.8	n-Nonadecane	95.9
n-Undecane	98.8	n-Eicosan	93.3
n-Dodecane	99.4	n-Heneicosan	93.1
n-Tridecane	95.2	n-Docosane	102
n-Tetradecane	99.0	n-Tetracosane	94.6
n-Pentadecane	97.9	n-Hexacosane	100
n-Hexadecane	95.7	n-Octacosane	94.4
n-Heptadecane	94.7		

Table 3 Reproducibility of volatile organic chemicals from standard sample by MC

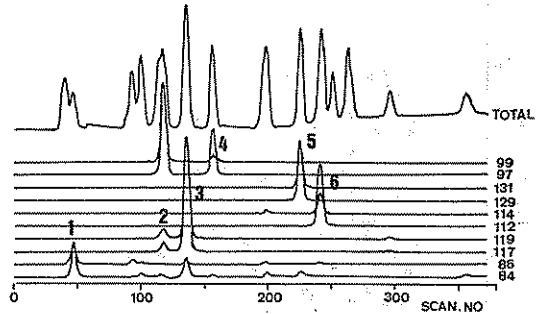
Scan interval: 4 sec

Sample	m/e	Average of peak area ( $\times 10^3$ )	Coefficient of variation (%)
Dichloromethane	84	3.142	4.16
	86	2.041	4.16
Chloroform	83	1.200	5.72
	85	7.793	4.39
Tetrachloromethane	117	10.92	5.58
	119	10.66	5.81
1,2-Dichloroethane	62	7.982	3.11
	64	2.659	8.11
1,1,1-Trichloroethane	97	9.024	2.81
	99	5.708	2.73
Trichloroethylene	130	5.110	4.13
	132	4.968	4.13
Tetrachloroethylene	129	4.931	3.64
	131	4.827	3.50
Chlorobenzene	112	6.122	4.05
	114	1.978	3.73
Benzene	78	7.553	3.60
	52	1.283	8.29
Toluene	91	7.723	6.12
	92	4.798	3.75
Ethylbenzene	105	0.4657	4.09
	106	2.534	8.83
m-Xylene	105	1.402	6.08
	106	2.871	9.90
o-Xylene	105	1.504	4.08
	106	2.794	8.21
Ethyltoluene	105	4.595	2.19
	120	1.119	2.03
Styrene	103	2.287	6.87
	104	4.284	6.59
Acetone	43	0.3818	13.2
	58	0.06912	9.28
Methyl ethyl ketone	72	0.3407	3.97
	31	4.039	2.34

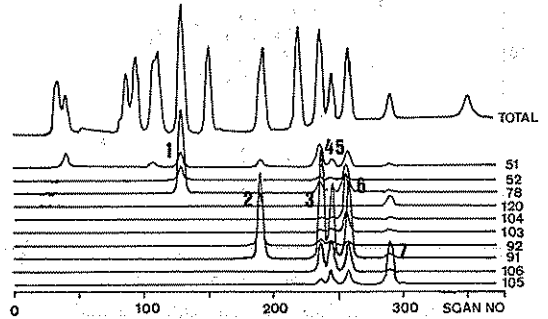
がら、ガスタイトシリンジで1ml採取し、GC-MSに注入、分析を行った。この操作を5回繰り返し、再現性を求めた。

Table 3に、再現性の検討に用いた成分、そのフラグメント及び結果を示す。また、用いた成分のクロマトグラム例をFig. 2に示す。なお、走査時間間隔は4秒で行った。また、これらの主なフラグメントと他の同時に検出されたピークについて、面積と変動係数との関係をグラフにプロットした。その相関図をFig. 3に示す。

以上に示したように、再現性については、変動係数が



- 1. Dichloromethane
- 2. 1,1,1-Trichloroethane
- 3. Tetrachloromethane
- 4. Trichloroethylene
- 5. Tetrachloroethylene
- 6. Chlorobenzene



- 1. Benzene
- 2. Toluene
- 3. Ethylbenzene
- 4. m, p-Xylene
- 5. Styrene
- 6. o-Xylene
- 7. Ethyltoluene

Fig. 2 Mass chromatogram of standard sample

5%前後で多くとも10%以内にあり、また Fig. 3から変動係数がピーク面積に依存しないことも認められたため、一応の再現性があるものと考えた。そこで本法を定量法として採用した。

### 6 応用例

以上の検討結果に基づき、日本沿岸地域および湖沼10か所で採取した魚について分析を行った。魚の名称および採取場所をTable 4に示す。その結果、揮発性成分については、飽和炭化水素、芳香族炭化水素、ハロゲン化炭化水素等、難揮発性成分についてはフタル酸エステル、ハロゲン化合物、含窒素化合物等計約120成分を検出することができた。定量結果の一部をTable 5-a, 5-bに、TICクロマトグラム例をFig. 4-a, 4-bに、マスククロマトグラム例をFig. 4-cに示す。

また、これらの結果から揮発性成分において、いくつかのパターンを見ることができた。すなわち、i) 芳香族炭化水素、ハロゲン化炭化水素を中心とする地域、ii) i)に加えて飽和炭化水素のC<sub>4</sub>~C<sub>8</sub>の成分、つまりガソリン成分が含まれている地域、iii) i)に加えて飽

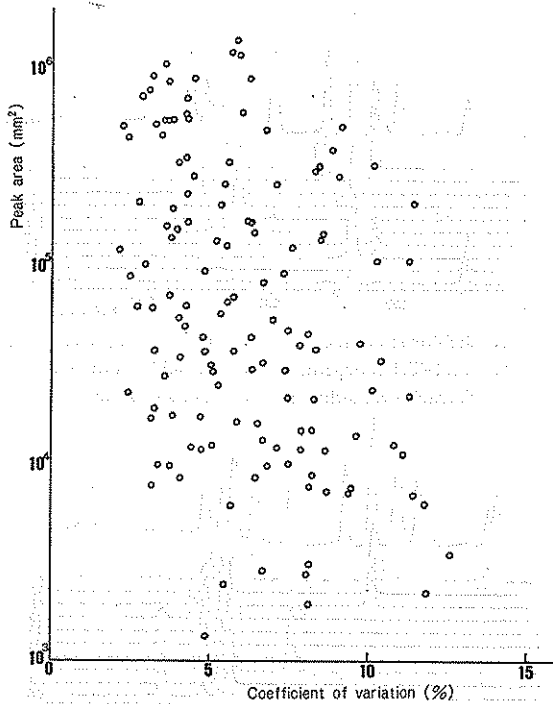


Fig. 3 Relation between peak area and coefficient of variation

和炭化水素の  $C_8 \sim C_{14}$  の成分、つまり灯油、軽油成分が含まれている地域、iv) ii) と iii) の混合した地域に分けることができる。

i) の地域としては、A, B, E, G, I, J, ii) の地域としては、C, H, iii) の地域としては、D, iv) の地域としては、F をそれぞれ挙げるができる。その他の成分については、次のような地域の特徴を見出すことができた。有機塩素化合物は、A, C, F で比較的高濃度を示しており、芳香族炭化水素は、A, F において高い濃度を示しており、特にスチレンにおいて顕著である。H の試料は、同じセイゴでありながら、他の地域に比べて低い濃度を示しており、E の試料は魚種の違いによるものか、一般に低濃度であった。また D の試料においても魚種の違いによるものか、 $C_8$  以上の比較的高沸点の成分の方が高い濃度を示している。Fig. 5-a. b. c. d に定量結果を成分別にプロットした。

難揮発性成分についてみると、フタル酸エステル類、BHT、ジソプロピルナフタレン、1-フェニル-3,4-キシリル-エタンは、ほぼすべての試料で検出されている。PCB は、B, C, F, H で多く検出されており、DDE は、E を除く全ての地域で、HCB は、A, F, H, I で、DDT または、DDE は、B, H でそれぞれ検出されている。しかし他の分析機関で検出されている PCT、トリ

Table 4 Fishes and sampling point

Sample number	Sampling point	Fishes	Body length (cm)	Body weight (g)
1	A	<i>Lateolabrax japonicus</i> (seigo)	515	31.5
2		"	370	29.5
3		"	640	33.0
4	B	"	570	34.0
5		"	580	32.0
6		"	550	34.2
7	C	"	348	25.4
8		"	340	28.2
9		"	395	27.4
10	D	<i>Mugil cephalus</i> (bora)	530	36.4
11		"	735	35.0
12	E	Flat fish (karei)	104	11.4
13		"	156	17.0
14		"	120	16.0
15	F	<i>Lateolabrax japonicus</i> (seigo)	440	32.4
16		"	420	32.2
17		"	610	36.4
18	G	<i>Tribolodon hakonensis</i> (ugui)		
19	H	<i>Lateolabrax japonicus</i> (seigo)	643	35.4
20		"	650	32.0
21	I	<i>Carassius cuvieri</i> (herabuna)	350	23.0
22		"	338	20.2
23	J	<i>Lateolabrax japonicus</i> (seigo)	mix {1790 1670	{56.0 53.0

ブチルホスフェート、トリス (クロロエチル) ホスフェートは検出されなかった。この理由として、本法の検出限界は、約  $0.005 \sim 0.02 \mu\text{g/g}$  であり、これらの成分検出値として、これ以下であるためと思われる。

## 7 まとめ

プレカラム法による魚体抽出試料のクリーンアップ法の検討、および定量方法として、GC-MS法の検討を行い、クリーンアップ法としてのプレカラム法による回収率および定量法としてのMC法の再現性において、良好な結果が得られた。また、検討して結果に基づく日本沿岸地域および湖沼10か所で採取した魚を分析したところ、多成分について検出、定量することができた。

Table 5-a Quantitative analysis of volatile organic chemicals in fishes

unit: ng/g

	Chemicals	Sampling Point									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Chlorinated compounds	Dichloromethane	0.34	0.23	2.3							
	Chloroform	0.60		1.2		0.56	6.6		0.90	0.30	
	Tetrachloromethane	0.26	5.6	0.34			0.067				
	1,2-Dichloroethane						2.3				
	1,1,1-Trichloroethane	1.6		0.36			0.14			0.14	
	Trichloroethylene	1.9	0.12	0.57			0.42			0.29	0.30
	Tetrachloroethylene	1.5	0.37	1.2			1.2	0.19	0.14	0.26	0.32
	Dichlorobenzene (1) " (2)	11	6.4	0.16	0.63		80 16				0.47
hydrocarbon	Isopentane	0.68		13						0.34	
	n-Pentane	2.0	2.1	23					0.75	0.73	
	Methylcyclopentane								0.62	0.43	
	n-Hexane	8.0		24	2.7				2.0	1.1	
	n-Octane			2.6	1.1		20			0.60	
	n-Nonane	0.83		1.8							
	n-Decane				26		17				
	n-Undecane				12		13				
	n-Dodecane				1.5		5.3				
	Octene (1) " (2) " (3)	2.2		15 1.3 2.3							
	Aromatic compounds										
	Benzene	2.2	0.78	1.2	0.18	0.20	1.2	1.5	0.28	0.42	
	Toluene	9.3	3.1	2.2	1.9	0.58	4.4	6.5	0.84	0.50	
	Ethyl benzene	1.6	2.2	0.51	11	1.7	5.7	0.27	0.20	0.20	1.0
	m, p-Xylene	3.0	3.1	1.1	8.9		8.3	0.38	0.34	0.45	1.1
	o-Xylene	1.1	1.3	0.37	3.5	0.32	3.0	0.16	Tr.	0.17	0.41
	Cresol		0.83				2.1				
Styrene	0.33	0.99	2.0	1.7	1.5	7.0					
Isopropylbenzene						1.1					
compounds including oxygen	Methyl alcohol		2.5				3.1				
	Ethyl alcohol	0.32	0.79	0.94			9.8	4.3	0.29		
	Acetone	6.5		0.15	63	4.1	3.9	3.0	0.91	0.68	
	Acetaldehyde	34	44	19	12	1.4		62	8.4	58	13
	Propionaldehyde			5.8			43				
	Benzaldehyde		0.64	0.34	0.59	0.21	0.87				
	Acetophenone		0.31						0.39	0.97	

Tr.: 0.02 ng/g

Table 5-b Quantitative analysis of high boiling organic chemicals in fishes

unit: ng/g

Chemicals	Sampling point									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
D M P	71	54	54		300		35	100	25	46
D B P	3600	330	190	410	230	340	13	280	230	280
D I H P		120	19	78	Tr.	31		Tr.	Tr.	
D H P		430	130	520	89	140	250	51	48	94
D E H P	Tr.	550	490	1400	170	250	670	150	29	240
D n O P		44	180				130			
B H T	30	570	41	44	42	77	75	54	85	110

Tr.: 8.0ng/g

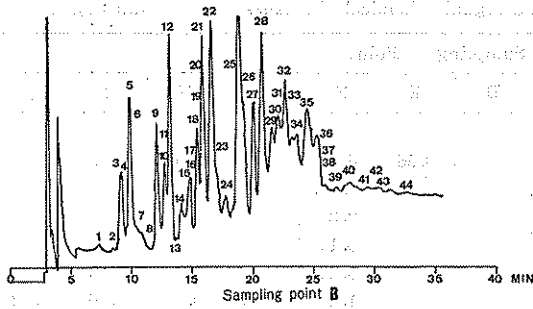


Fig. 4-a TIC chromatogram of volatile organic chemicals in fish

- |                                       |                                       |                                |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 1 n-Butane                            | 16 C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> (1) | 31 Dimethyldisulfide           |
| 2 Freon 11                            | 17 C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> (2) | 32 n-Nonane                    |
| 3 Isopentane                          | 18 2-Methylhexane                     | 33 Ethylbenzene                |
| 4 Propionaldehyde                     | 19 Tetrachloromethane                 | 34m, p-Xylene                  |
| 5 n-Pentane                           | 20 Benzene                            | 35 o-Xylene                    |
| 6 Dichloromethane                     | 21 3-Methylhexane                     | 36 α-Pinene                    |
| 7 n-Butylaldehyde                     | 22 n-Heptane                          | 37 Benzaldehyde                |
| 8 C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> (1)  | 23 Trichloroethylene                  | 38 n-Decane                    |
| 9 2-Methylpentane                     | 24 C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> (1) | 39 C <sub>3</sub> -Benzene (1) |
| 10 C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> (2) | 25 C <sub>7</sub> H <sub>14</sub>     | 40 C <sub>6</sub> -Benzene (2) |
| 11 3-Methylpentane                    | 26 Toluene                            | 41 C <sub>2</sub> -Benzene (3) |
| 12 n-Hexane                           | 27 n-Octane                           | 42 Limonene                    |
| 13 Chloroform                         | 28 C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> (2) | 43 Dichlorobenzene             |
| 14 1,2-Dichloroethane                 | 29 C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> (3) | 44 C <sub>1</sub> -Benzene     |
| 15 1,1,1-Trichloroethane              | 30 Tetrachloroethylene                |                                |

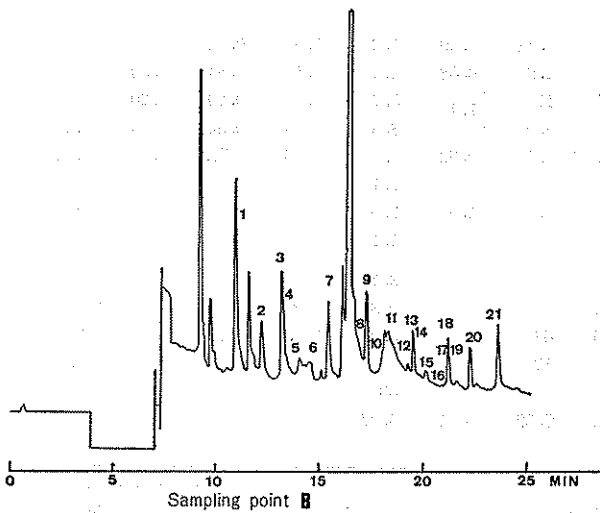


Fig. 4-b TIC chromatogram of high boiling organic chemicals in fish

- |                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 1 B H T                          | 12 P C B (Cl=5)                 |
| 2 D M P                          | 13 Eicosanoic acid methyl ester |
| 3 Methyl myristate               | 14 D D E                        |
| 4 Diisopropyl-naphthalene        | 15 N-(2-hydroxyethyl) Octamid   |
| 5 1-Phenyl-(3,4-xylyl)ethane     | 16 P C B (Cl=6)                 |
| 6 Pentadecylic acid methyl ester | 17 DDT or DDD                   |
| 7 Methyl palmitate               | 18 DiHP                         |
| 8 P C B (Cl=3)                   | 19 DHP                          |
| 9 Methyl stearate                | 20 DEHP                         |
| 10 P C B (Cl=4)                  | 21 DnOP                         |
| 11 N-(2-hydroxyethyl)Octamid     |                                 |

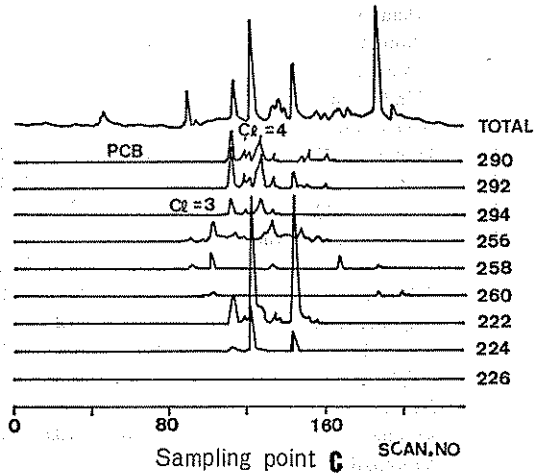
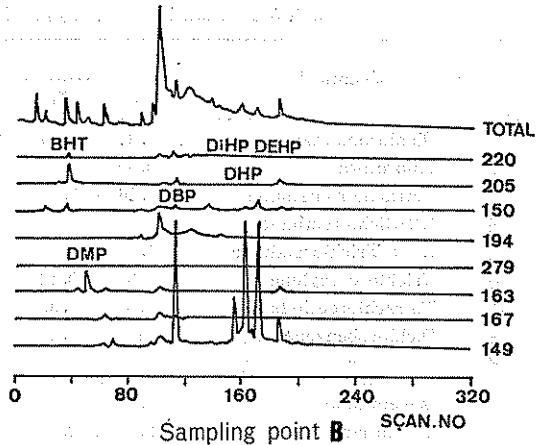


Fig. 4-c Mass chromatogram of high boiling organic chemicals in fish

#### 引用文献

- 1) 福原克治, 武田明治, 内山充: 魚介類中の 1,2,3,4,6,7,8,9-オクタクロルジベンゾ-p-ジオキソンの分析法, 衛生化学, 22(1)31~38, 1976.
- 2) Gruger, H.G., T. Hruby & N.L. Karrick: Sabiethal effects of structurally related tetrachloro, pentachloro-and hexachlorobiphenyl on juvenile coho salmon. Environ. Sci. Technol., 10: 1033~1037, 1976.
- 3) Wszolek, P.C., Lisk, D.J., T. Wachsd & Youngs, W.D.: Persistence of polychlorinated biphenyls and 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene (p,p'-DDE) with age in lake trout after 8 years. Amer. Chem.

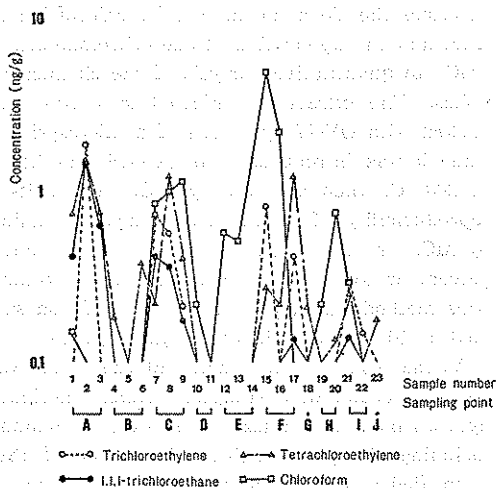


Fig. 5-a Concentration levels of each sampling point

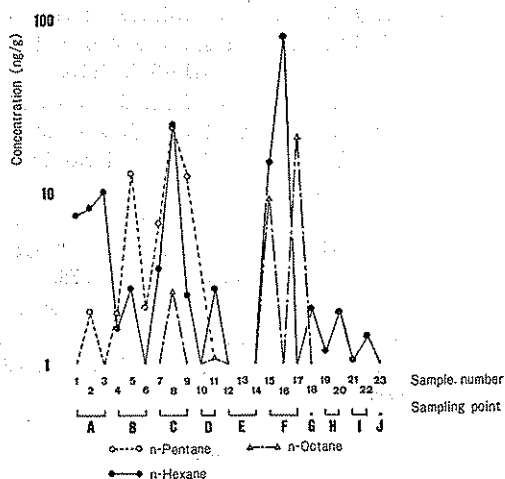


Fig. 5-c Concentration levels of each sampling point

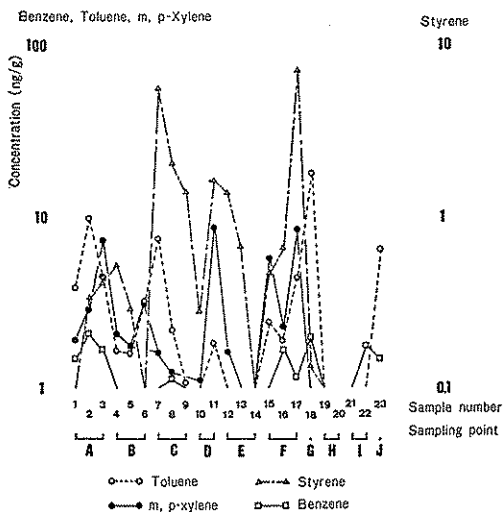


Fig. 5-b Concentration levels of each sampling point

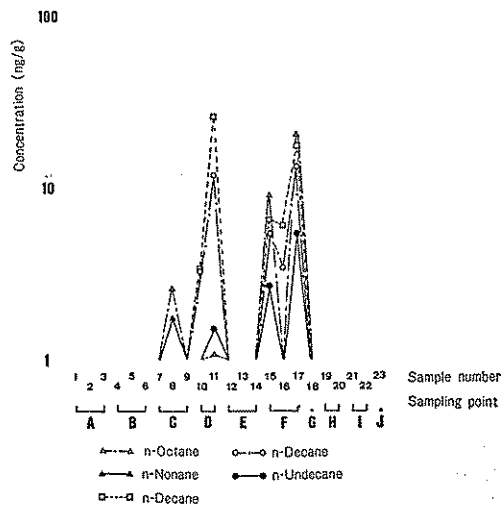


Fig. 5-d Concentration levels of each sampling point

Soc., 13: 1269~1271, 1979.

- 4) 渡辺信矢, 石丸優, 石田紀郎, 片山幸士, 喜多山繁: イサザによるPCB汚染の追跡, Jap. J. Limnol, 40: 66~73, 1979.
- 5) 船坂敏三, 田中一夫, 坂垣又丕, 小瀬洋喜, 佐藤孝彦: 長良川の異臭魚に関する研究 (第5報), 衛生化学, 21: 341~347, 1975.
- 6) 仲山伸次, 河辺安男, 石黒智彦, 滝本まゆみ, 高橋誠二: GC-MS法による魚体中の化学物質の分析方法の検討, 日環セ所報 No. 4: 106~115, 1977.
- 7) 河辺安男, 仲山伸次, 石黒智彦, 高橋誠二, 坂田衛: GC-MS法による魚体中の化学物質の分析, 日環セ所報 No. 5: 76~84, 1978.
- 8) 仲山伸次, 河辺安男, 石黒智彦, 高橋誠二: GC-MS法による魚体中の化学物質の分析方法の検討 第3報, 日環セ所報 No. 6: 82~88, 1979.

#### Summary

The experiments for evaluating the application

of a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) to the identification of chemicals contained in fish were already reported by Nakayama et al (1976, 1977) and Kawabe et al (1978). This paper describes the clean up method for chloroform extract and the application of mass-chromatography (MC) to quantitative analysis of the chemicals in fishes. The extract was injected to a glass tube packed with OV-17 by means of a microsyringe. Then it was introduced into GC-MS and heated at 200 °C, then analyzed by MC. As results of reproducibility of quantitative analysis examined by MC, the coefficient of variation was about 5 percent on average and 10 percent at a maximum. This method was applied to analysis of fish sampled at 10 different sites throughout Japan.

As the results, more than 120 chemicals were detected as follows: parafins, olefins, chlorinated hydrocarbon, aromatics, phthalates, compounds including nitrogen and PCB. And some of them quantified and some patterns were established.