

Focusing reviews by award winners of the Society of Chromatographic Sciences 2012

衛生化学分析へのクロマトグラフィーの展開

中澤裕之

Application of Chromatographic Techniques to Hygienic Chemical Analysis

Hiroyuki Nakazawa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University

Abstract

“Chromatography” is the essential separation and analytical method to learn now and in the future. My early experience and studies at the University of Tokyo and the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science are countercurrent chromatography (CCC) and the aqueous two-phase polymer system.

At NIH in the United States, CCC with the horizontal flow-through coil planet centrifuge was applied to isolation and purification of metabolites of anticancer drugs and the principle of CCC was also applied to sample pretreatment. At the National Institute of Public Health in Japan, many various residual analytical methods have been developed for regulatory and administrative research studies. Compounds that are subjected to food hygienic analysis include food contaminants such as pesticides, veterinary drugs, food additives, natural toxins and physiologically active compounds. In order to obtain reliable analytical data, various chromatographic techniques were applied for residual analysis of food. The combination of LC and/or GC with MS were applied to ensure the identification of the peak, before taking regulatory action. The part of developed residual analysis were adopted in the official testing method. An association between exposure to trace hazardous chemicals such as endocrine disrupting chemicals and an increased incidence of human endocrine disease might be continued to study by accurate and sensitive analytical method. The hyphenated analytical methods for determination of endocrine-disrupting chemicals such as bisphenol A, phthalate esters, perfluorochemicals and so on have been studied by the use of LC/MS and LC/MS/MS.

Chromatographic techniques might be applicable with the hopes of realizing scientific risk assessment of the chemicals derived from daily life products as regulatory sciences.

Keywords: Chromatography, Regulatory sciences, Hygienic chemical analysis, Residual analysis

1. クロマトグラフィーとの出会い

私の研究は千葉大学薬学部の修士論文「発光分光分析法による大気浮遊粉塵中の微量元素の分析」がスタートになる。振り返れば公的試験研究機関、大学での在職中の研究はクロマトグラフィーに支えられた仕事が大半である。クロマトグ

ラフィーに魅せられて研究を推進してきたと言っても過言ではない。本学会・特別学術貢献賞受賞の榮譽に恵まれ、レビュー執筆の機会を頂きましたので、約40年の研究生活についてクロマトグラフィーを中心にした研究で振り返る。

クロマトグラフィーを用いた処女論文は千葉大時代の故山

星薬科大学薬品分析化学教室

E-mail: yarazunikimeruna@jcom.home.ne.jp

根靖弘教授、宮崎元一助教授のご指導でGCにより「浮遊粉じん中の鉄」を測定した研究である[1]。修士課程を修了しようとしたときに、有機系の教授からこれから習得すべき分離分析法は「クロマトグラフィーだよ！」と言われた一言が鮮烈でこの手法に関心をもった。

両先生の出身教室である東京大学薬学部薬品分析化学教室に進み、「クロマトグラフィーを勉強したい」と故田村善藏教授に相談したところ、米国NIHから帰国されたばかりの谷村豊徳助教授を紹介された。谷村先生は米国NIHから帰国されたばかりで、早くに研究室にHPLCを導入された。当時、扱ったHPLCは外国製の大型のクロマトグラフであったが、研究室では高圧ポンプ、肉厚のガラス製カラムと固定測定波長のUV検出器を肉厚テフロンチューブで接続して液体クロマトグラフを組み立てた。肉厚のガラス製カラム管に充填剤を充填してカラムを作製、良好なピーク形状、安定したベースラインのクロマトグラムを得るために試行錯誤で脈流を減らすダンパーを作製したり、充填方法に取り組んだ。この時の経験はクロマトグラファーとしてその後の研究遂行にも役立った。

谷村先生から博士論文のテーマとして「大きさの有るものをクロマト的に分離するシステムの構築」を戴き、無謀にも細胞をクロマト的に分離することを目指した。そこで出会ったのは向流分配クロマトグラフィー (Countercurrent chromatography, CCC) と aqueous two-phase polymer system (水性二相系) である。

2. Countercurrent chromatography の概要と展開

CCCは米国、NIHの伊東洋一郎博士によって創始された、solid supporting materials を用いない液-液分配クロマトグラフィーである[2]。液-液分配が主たる分離モードであるCCCはクロマトグラフィーの理論や分離機構を考察する上で有用である。水-有機溶媒からなる二相分配系は天然物はじめ様々な有機化合物の分離・精製に展開されているが、細胞のような生体顆粒の分離に水-有機溶媒の二相分配系は使用できない。そこで出会ったのが、スウェーデンのP. Å. Albertssonが開発した、水性二相系[3]である。

ある分子量以上のpolyethylene glycol (PEG) と dextran のような水溶性ポリマーをある濃度以上で水に混合溶解すると水性二相系が構成される。等張になるように無機塩を添加すると、形成された二相系で細胞や酵素のようなタンパク質、核酸等の生体高分子を変性させることなく液-液分配を取り扱うことができるようになる。実験に用いる細胞には細胞濃度を定量的に扱える赤血球を選択した。赤血球は溶血させてからヘモグロビンの吸収を測定することで細胞濃度を換算できる。分子量約6000のPEGと分子量50万のデキストランを数パーセントの濃度で用いて水性二相系を構築した。この水性二相系は粘性が高く、二相分離に時間を要し、クロマトグラフィー的に細胞を分離するデバイスを構築するには至らな

かった[4]。赤血球をトリプシンやノイラミダーゼ等の酵素処理して水性二相系での分配挙動に細胞表面荷電が大きく寄与することを細胞電気泳動法により明らかにした。

この研究が注目されて学位取得後、東京都臨床医学総合研究所に研究員として採用され。折井弘武放射線医学部長 (MD) の指導のもと、放射性核診断薬の腫瘍集積機構について培養腫瘍細胞を用いてP. Å. Albertsson博士が開発したThin Layer Counter Current Distribution装置で検討した[5]。更に肝ペルオキシゾーム等のcross partitionを水性二相系で求めた[6]。

1978年、米国NIH、National Cancer Institute (NCI)、Division of Cancer Treatmentに留学、Dr. N. R. Bachur (MD) の研究室で抗がん剤の代謝研究に従事した。特にアンソラキノン系抗がん剤のフリーラジカルや活性酸素の生成機構を化学的、生化学的、電気化学的アプローチでESR等によって研究を遂行した[7-11]。Bachur博士は同じNIHの伊東洋一郎博士との共同研究を快諾され、一連の研究の中でCCCを用いて分解産物や患者尿中の抗がん剤代謝物の抽出・濃縮を行った。特にhorizontal flow-through coil planet centrifuge (Figure 1) を、diaziquone[13]、aclacinomycin A[14]の代謝物やdaunorubicinの還元反応 (Figure 2) 生成物[12]等の単離、精製 (Figure 3) に応用した。このCCCの原理を応用して化学療法の癌患者の尿から連続で塩析効果を利用してブタノール相に抗がん剤代謝物を抽出・濃縮して抽出物を機器分析に供した[15] (Figure 4)。

3. 衛生行政研究へのクロマトグラフィーの展開

1981年9月、米国から帰国、厚生労働省所管の国立公衆衛生院に勤務した。国立公衆衛生院の業務は衛生行政に携わる公務員の卒後教育と行政研究である。私の教育歴はこの国立公衆衛生院での社会人教育に始まる。配属した衛生薬学部では故高島英伍部長、故藤田昌彦部長の下で衛生化学分析法を開発する仕事に従事した。自分で研究テーマを選ぶというより行政依頼の研究や研修コースに参加された研究員が持参したテーマの展開に取り組んだ。地方衛生研究所の研究者等とクロマトグラフィーを駆使した残留分析法等を内外の学会や論文誌に発表するように指導し、共同研究として研究を展開した。

その内容は多岐にわたる。光学異性体の分析を含む製剤中の薬剤分析[16-24]、漢方製剤[25-29]、化粧品としてフケ防止剤[30]の分析法を構築、その成果は医薬品GMPの観点から医薬品の品質管理に展開された。また薬剤調剤については星薬科大学に勤務してから調剤作業中における揮発性抗がん剤の暴露評価にLC/MS/MSとパッシブサンプラーを用いたモニタリング法を検討した[31]。

家庭用品関連の物質として繊維製品等中のジアルキルスズ化合物を定量した[32,33]。河川水中の蛍光増白剤や塩素消毒剤の分析[34,35]についてHPLCを適用するとともに、微量環

境汚染物質については、スターパー抽出 (SBSE-GC/MS) (Figure 5) でエストロゲン類、クロロフェノール、アルキルフェノール、ベンゾフェノン等[36-44]を分析した。Figure 6 に示すように SBSE-GC/MS でエストロゲン (E1)、17 β -エチニルエストラジオール (E2)、17 α -エチニルエストラ

ジール (EE) を multi shot mode で高感度で分析した。E2 は *in situ* 誘導体化法でフェノール性水酸基をアシル化している。また、河川水中の多環芳香族炭化水素についてもスターパー抽出-LC/MS で分析した[45]。食品衛生分野における食品中の化学物質 (農薬、動物用医薬品・飼料添加物、食品添

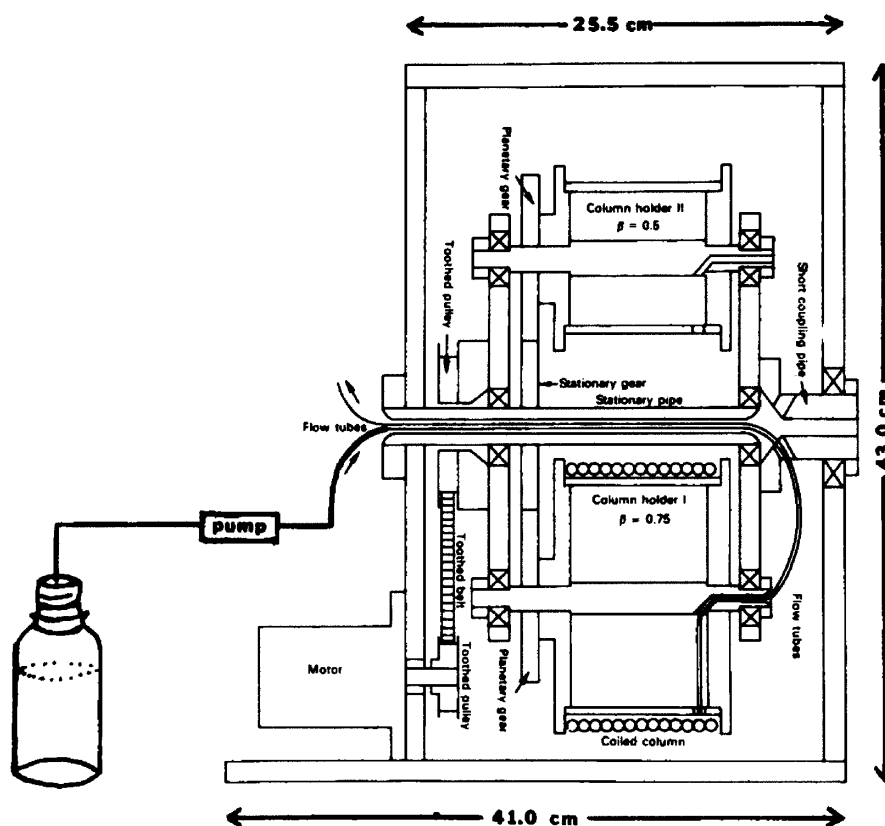


Figure 1. Cross-sectional view of the coil planet centrifuge for continuous extraction.

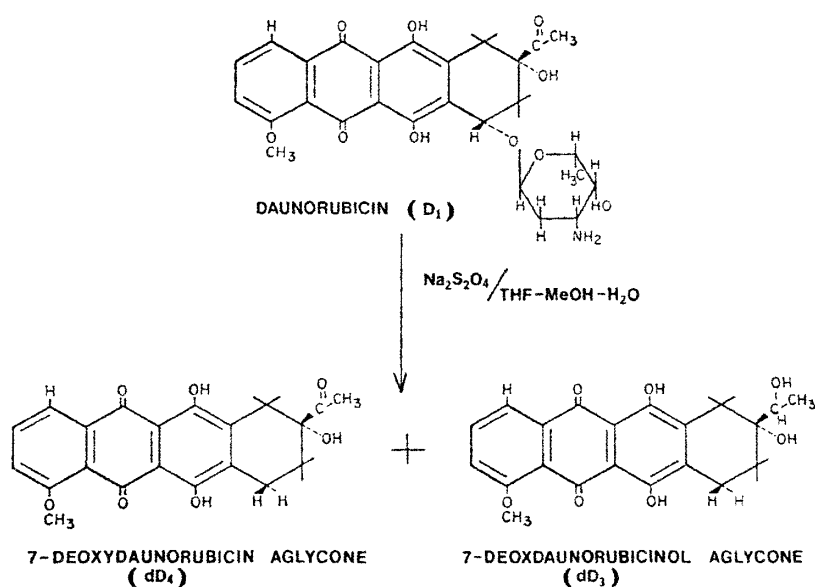


Figure 2. Aglycone formation from daunorubicin by sodium dithionite reduction.

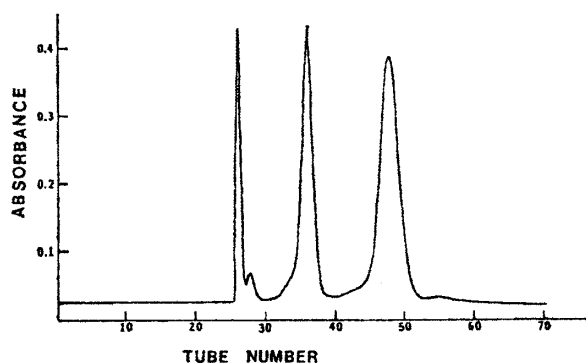


Figure 3. Isolation of daunorubicin reduction products by CCC with horizontal flow-through coil planet centrifuge.

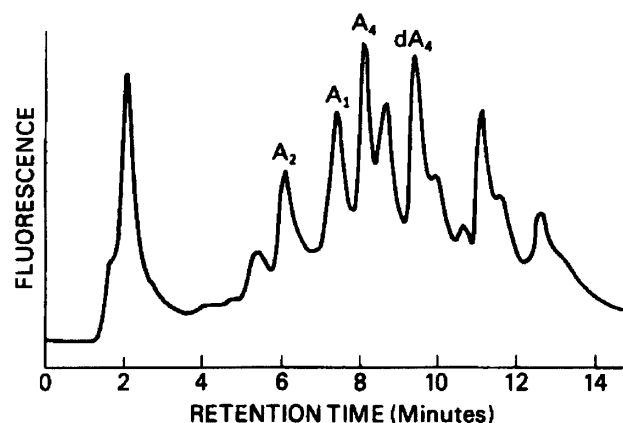


Figure 4. HPLC chromatogram of adriamycin extracts from patient urine. Urine from a patient receiving adriamycin was prepared, extracted, and enriched by coil planet centrifuge extraction. Adriamycin (A1) and three metabolites were enriched.

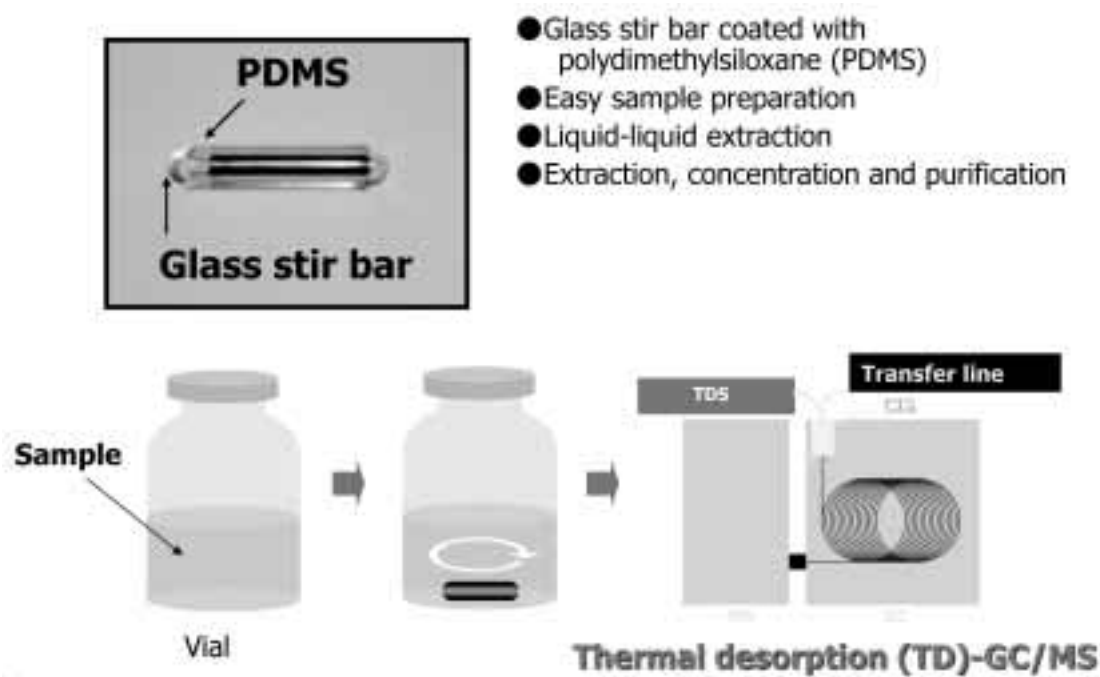


Figure 5. Overview of stir bar sorptive extraction (SBSE).

加物、自然毒等)や生理活性物質(イソフラボン、ポリアミン、チラミン、アリシン、ヒスタミン、バロバイン、グリチルリチン酸等)等の残留試験法については次章で紹介する。その一部は公定法に採用され、衛生行政に大きく貢献した。また、研修指導した研究者の中には業績をまとめて学位取得に至った人も多いが、生の食品衛生を研修者から学んだと言えよう。このようにクロマトグラフィーは国立公衆衛生院時代の私の研究生活を支えてくれた。

4. 食品分析へのクロマトグラフィーの応用

食品を介して我々は栄養成分を摂取する一方で、望ましく

ない化学物質も体内に取り込んでいる。食品が具備すべき基本的条件は、その安全性が確保され、保証されているかである。本章ではヒトの生命維持に欠かすことのできない食品に焦点をあててクロマトグラフィーの食品衛生領域への応用について研究成果を中心に紹介する。

4.1 食品の残留分析と安全性の評価

農薬は農産物の生産性向上に大きな役割を果たしている。また、今日の畜水産業において動物用医薬品、飼料添加物は必要不可欠な薬剤である。食品添加物も食品の製造の過程において又は加工若しくは保有の目的で食品に添加等の方法で

使用される化学物質である。本来、目的をもって使用された動物用医薬品、農薬、食品添加物等が使用基準を超えて使用された結果、食品中に残留することとなり、有用である化学物質がヒトに対する危害化学物質となる。これらの化学物質がその使用目的にそって適正に使用されれば、食品衛生上、なんら問題にはならないが、使用基準が適切に遵守されているかどうか、食品衛生上の課題になる。また、意図せずに生活環境や食品中で生成された化学物質が食品汚染物質として食品に混入し、私達に食中毒を引き起こし、不安をもたらす。そのために感度、精度に優れた残留分析法を駆使して当該化学物質を恒常的に食品監視することが必要である。

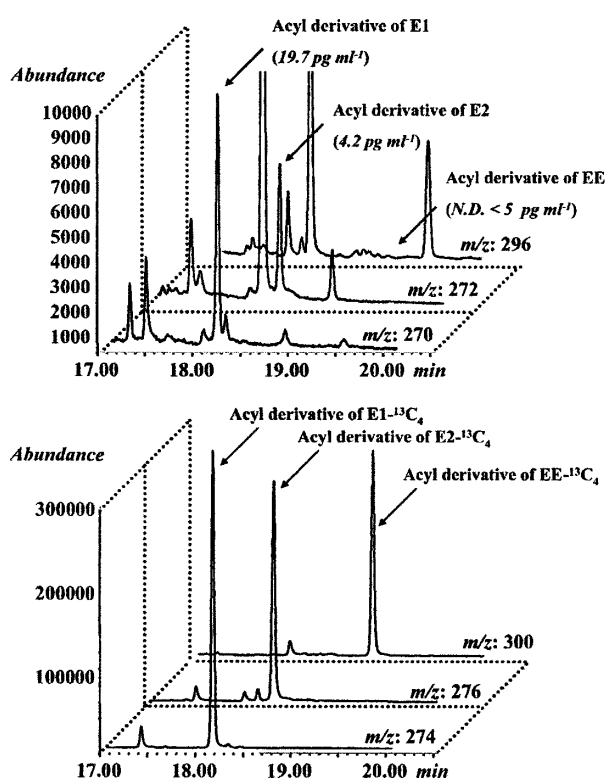


Figure 6. Chromatograms of acyl derivatives of estrogens in river water by TD-GC/MS.

4.1.1 動物用医薬品

畜水産食品には、その生産段階において種々の動物用医薬品や飼料添加物が使用されている (Table 1)。発育促進、疾病の予防・治療を目的に抗菌性薬剤、寄生虫用剤、ホルモン剤が使用されている。動物用医薬品は、「薬事法」や「飼料安全法」、「動物用医薬品の使用の規制に関する省令」等により法的に使用基準が設定されている。「食品衛生法」では、「食品は抗生物質を含有してはならない。食肉、食鳥卵及び魚介類は、抗生物質の他、化学的合成品たる抗菌性物質を含有してはならない」と定義されている。抗菌性物質は、国際基準 (Codex 基準) を参考に科学的根拠に基づいた残留規制がなされているが、国民の動物用医薬品の残留問題に対する関心は高い。国立公衆衛生院在職中にはバイオアッセイで測定が行われていた、飼料添加物、動物用医薬品、肥育用ホルモン剤の分析に高速液体クロマトグラフィーを導入して、残留分析法を発表した。

①合成抗菌剤：動物用医薬品として多くの合成抗菌剤が使用されている。クロマトグラフィーを用いた合成抗菌剤の個別残留試験法には HPLC により鶏肉中のクロビドール[46]、デコキネート[47]、チアンフェニコール[48]、エトパベート[49]の試験法を構築した。また、代謝物を含めた同時測定残留分析法をサルファ剤[50,51]、カルバドックス[52]について開発、検出された場合の同定能力を向上させた。キノロン系抗菌剤は飼料添加物、動物用医薬品としても多用されている医薬品で、エンロフロキサシンについては食肉[53]、水産食品[54]の HPLC による残留試験法を構築した。バイオアッセイ等で抗菌性が確認されて、薬剤を特定するには可能な限り多くの薬剤を同時分析する一斉分析法が必要になる。キノロン剤の一斉分析法としては魚肉や食肉について HPLC [55,56,58,59]および LC/MS[57]による残留試験法を開発した。サルファ剤 (Figure 7) も代表的な抗菌剤で、食肉を中心に HPLC[60–62]及び LC/MS[63]によるサルファ剤の一斉分析法 (Figure 8) を開発した。合成抗菌剤について食肉や魚肉を対象に HPLC による残留一斉分析法[64–68]を構築した。

Table 1. Comparison of feed additives and veterinary drugs.

	Feed additives	Veterinary drugs
Application	growth promotion	prevention and treatment of infectious diseases
Period	long (2–3month)	short
Dose	trace	relatively large amount
Regulation	SAQIF*	Pharmaceutical Affairs Law
Synthetic Antibacterials	sulfaquinoxaline, clopidol, nicarbazin, olaquinox etc.	sulfadimidine, carbadox, oxolinic acid etc.
Antibiotics	chlortetracycline, lasalosid etc.	ampicillin, kanamycin etc.

*Safety Assurance and Quality Improvement of Feed.

②抗生物質：動物用医薬品や飼料添加物に使用されている抗生物質を Table 2 に示す。食品衛生法で「食品中に抗生物質は残留してはならない」と規定されており、食肉を中心に抗生物質の残留分析法が必要で、HPLC、LC/MS を駆使して抗生物質の残留試験法を開発した。抗生物質についても個別試験、代謝物測定等による同定能力の向上、一斉試験を考慮

する必要がある、抗生物質の系別に開発した試験法を紹介する。

ポリペプチド系抗生物質については HPLC により鶏肉、豚肉中のエンライマイシン[69]やバージニアマイシン[70]、鶏肉についてアボパルシン[71,72]による分析法を構築した。バージニアマイシンについては飼料添加物の観点で飼

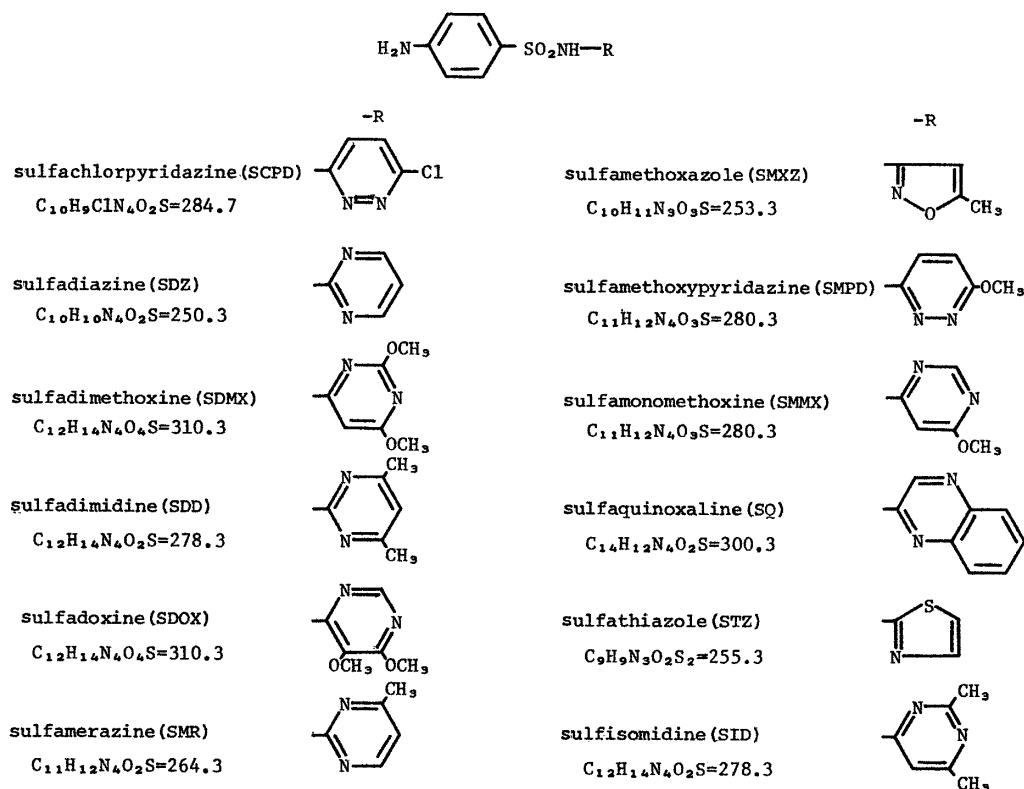


Figure 7. Structures of sulfa drugs used as veterinary drugs.

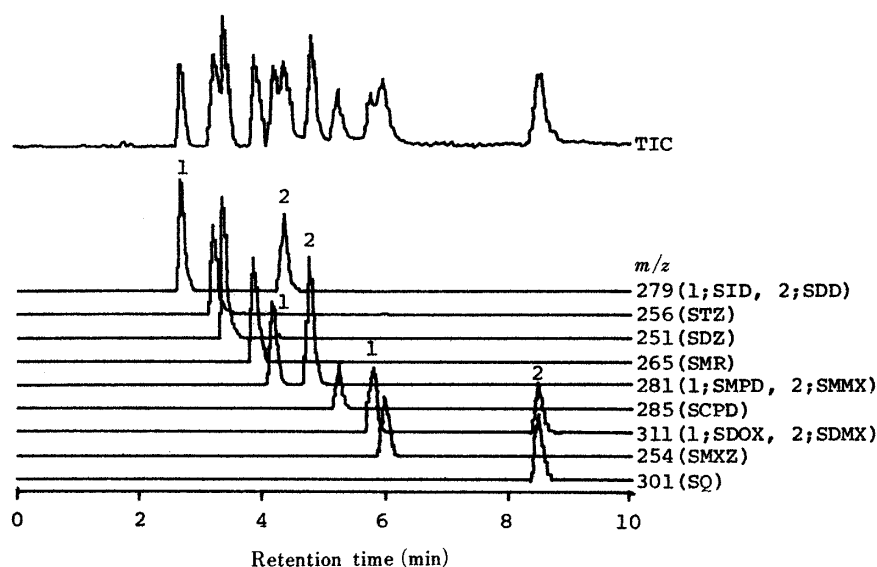


Figure 8. Total ion chromatogram and mass chromatograms of sulfonamides.

Table 2. Antibiotics as veterinary drugs and/or feed additives.

Antibiotics		Veterinary drugs ^a	Feed additives ^b
β -lactams	Amoxicillin	*	
	Ampicillin	*	
	Cloxacillin	*	
	Dicloxacillin	*	
	Mecillinam	*	
	Nafcillin	*	
	Penicillin G	*	
	Cepharonium	*	
Aminoglycosides	Apramycin	*	
	Destomycin A	*	*
	Dihydrostreptomycin	*	
	Fradiomycin	*	
	Gentamycin	*	
	Hygromycin B	*	*
	Kanamycin	*	
	Kasugamycin	*	
	Spectinomycin	*	
	Streptomycin	*	
Tetracyclines	Chlortetracycline	*	*
	Doxycycline	*	
	Oxytetracycline	*	*
	Tetracycline	*	
Macrolides	Carbomycin	*	
	Erythromycin	*	
	Josamycin	*	
	Kitasamycin	*	*
	Oleandomycin	*	*
	Sedecamycin	*	
	Spiramycin	*	*
	Tylosin	*	*
Polypeptides	Avoparcin		*
	Bacitracin	*	*
	Colistin	*	*
	Enramycin	*	*
	Mikamycin	*	
	Polymixin B	*	
	Thiopeptin	*	*
	Virginiamycin	*	*
Polysaccharides	Flavophospholipol	*	*
	Macarbomycin	*	
	Quebemycin	*	
Polyethers	Lasalosid		*
	Monensin	*	*
	Salinomycin	*	*
Others	Bicozamycin	*	*
	Chloramphenicol	*	
	Fosfomycin	*	
	Lincomycin	*	
	Nosiheptide		*
	Nystatin	*	
	Novobiocin	*	
	Tiamulin	*	

^a Veterinary drugs: regulated by the Pharmaceutical Affairs Law.

^b Feed additives: regulated as feed additives in the law concerning Safety Assurance and Quality Improvement of Feed

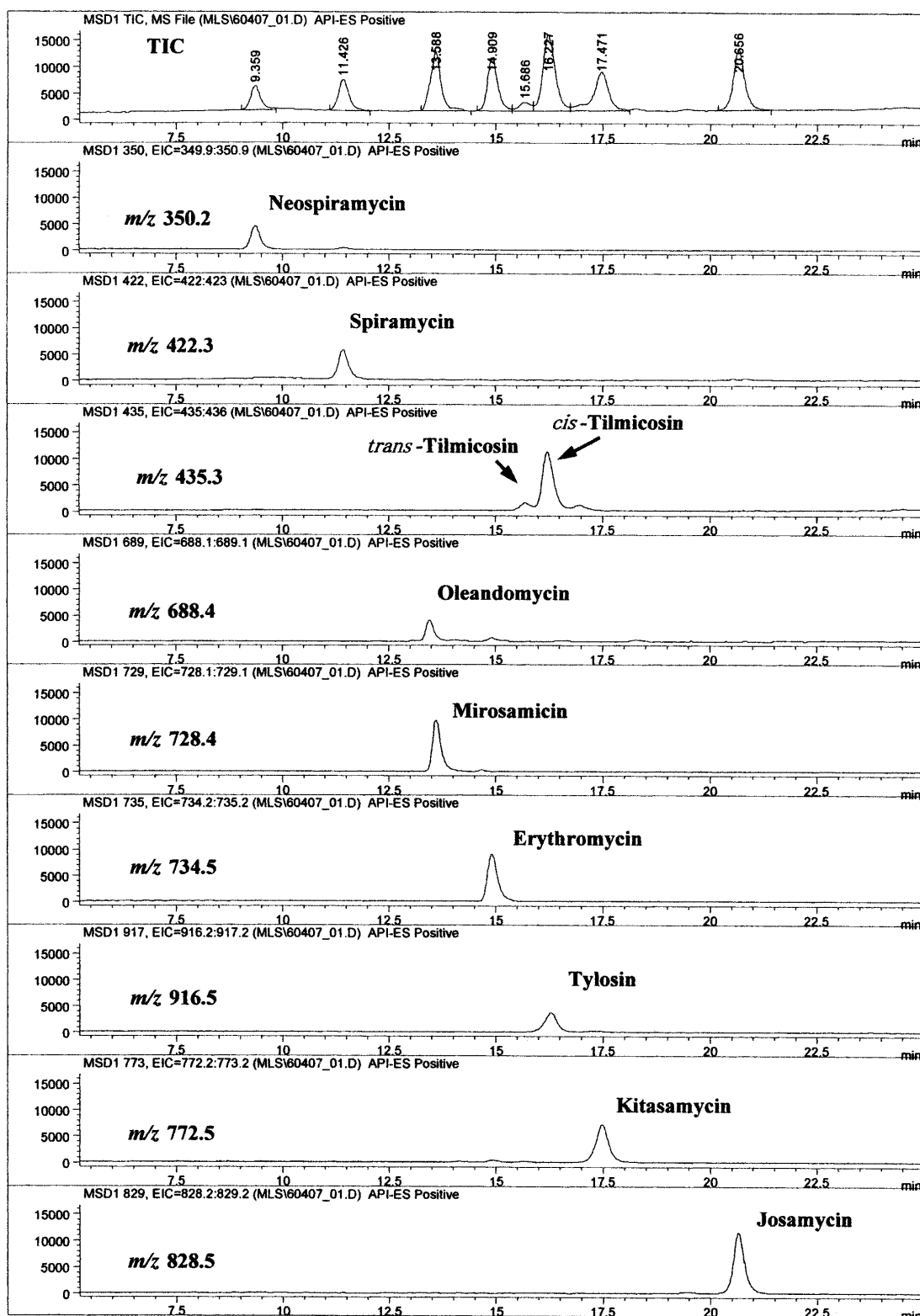


Figure 9. Typical LC-ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract fortified at $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ each macrolide antibiotics.

料についても分析した[73]。マクロライド系抗生物質としてスピラマイシについて HPLC による食肉中の残留分析[74]、製剤分析法[75]を構築した。また、代謝物との同時分析法を開発して同定能力を高めた[76]。タイロシン[77]、キタサマイシ[78]、ミロサマイシ[79]についても残留分析法を構築した。更に HPLC[80]、LC/MS[81–84]を用いた複数のマクロライド系抗生物質の一斉残留分析法 (Figure 9) も開発した。アミノグリコシド系抗生物質としては LC/MS によるストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの食肉及び蜂蜜中の分析法を開発した[85,86]。テトラサイクリン系抗生物質 (Figure 10) については LC/MS による食品中の残留分析法 (Figure 11) を作成した[87,88]。牛乳を対象にイオンペアクロマトグラフィー・HPLC を用いた β -ラクタム系抗生物質の一斉分析法を構築した[89]。ペニシリン系抗生物質についても HPLC を用いて牛乳を対象にサルファ剤との同時分析法を開発した[90]。

③肥育用ホルモン剤：タンパク質合成、成長ホルモン分泌を促進して肥育用ホルモン剤が使われる。天然型のエストラ

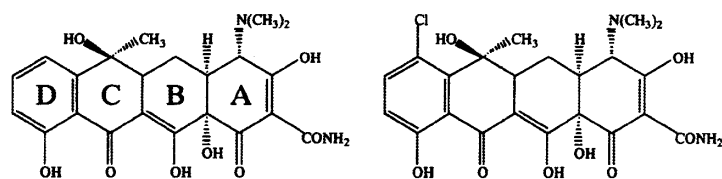
ジオール[91]、プロゲステロン[92]、合成型であるトレンボロン、ゼラノール[93]、サルブタモール[94]について HPLC による分析法[95]を構築した。GC/MS を用いた競走馬のドーピング試験法[96–98]は肥育用ホルモン剤の分析にも展開できると思われる。

④寄生虫薬剤他：家畜の寄生虫の予防・治療に様々なベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤等が用いられている。

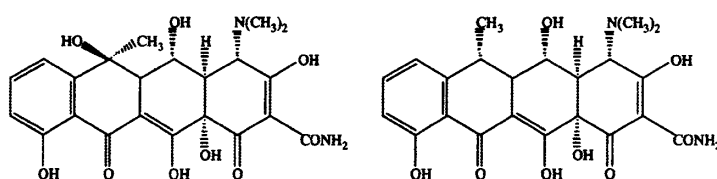
HPLC による残留試験法について電気化学検出器を用いて牛乳等の試料[99–103]を中心に構築した。

4.1.2 残留農薬の分析

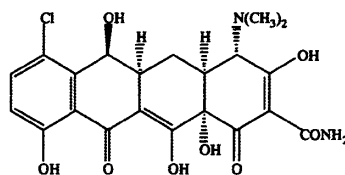
人類が農耕生活を始めて以来、農薬の登場は農産物の安定供給に大きな役割を果たしてきた。その一方で農薬の農作物への残留問題は食品の安全性の視点から社会的な関心も高い。食品中の残留農薬の分析は、分離手段として優れているガスクロマトグラフィー (GC) と定性情報を豊富に提供する質量分析 (MS) との結合により、極めてパワフルな GC/MS 分析装置が導入され、残留農薬の分析に威力を発揮することができた。内分泌かく乱化学作用の疑われる物質の中に



Tetracycline (TC, MW: 444) Chlortetracycline (CTC, MW: 478)



Oxytetracycline (OTC, MW: 460) Doxycycline (DC, MW: 444)



Demeclocycline (DMCTC, MW: 464)

Figure 10. Chemical structures of tetracyclines.

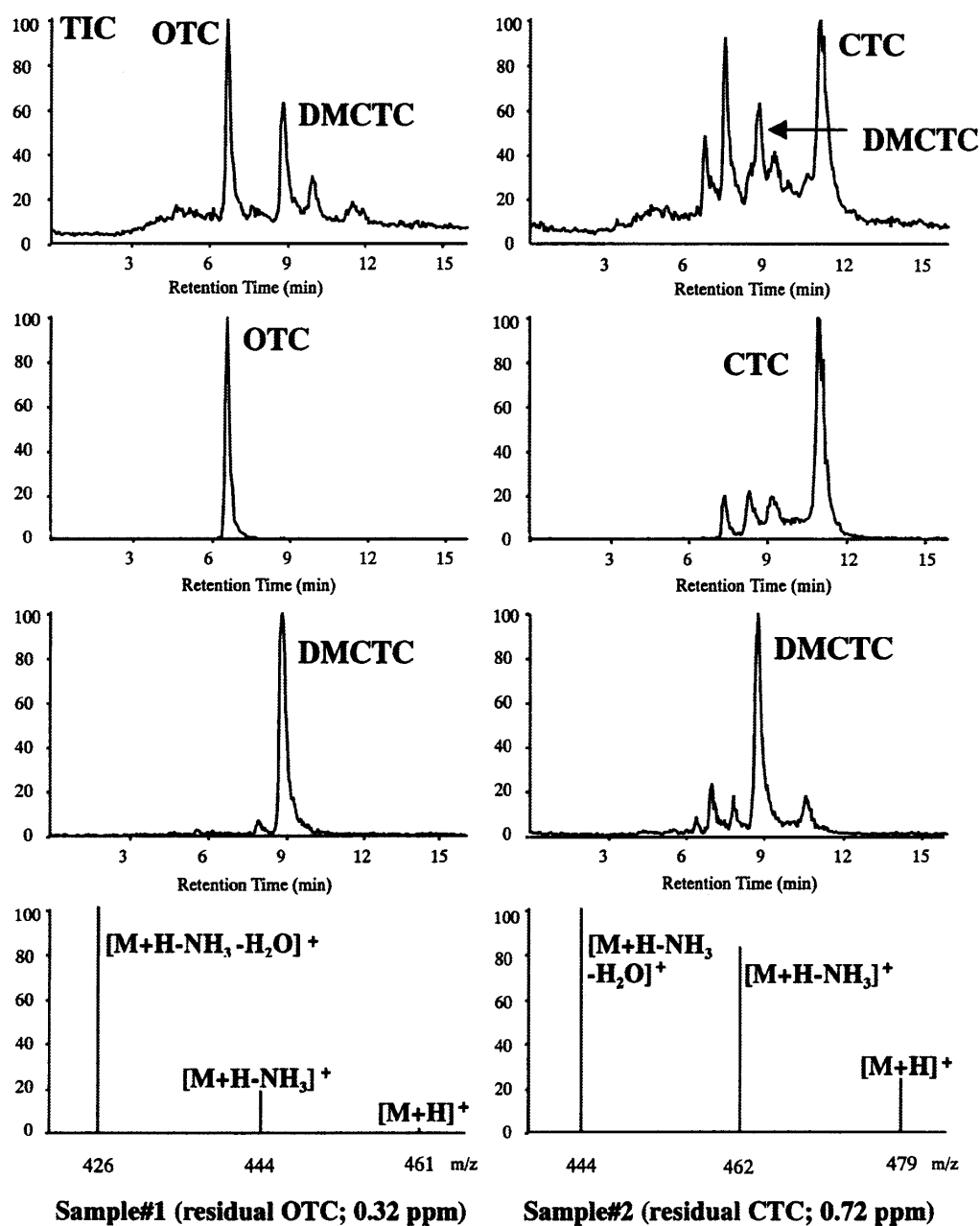


Figure 11. Total ion chromatogram and SRM profiles of residual oxytetracycline (sample #1) and chlortetracycline (sample #2) in swine kidney by APCI LC/MS/MS.

は登録失効した農薬（DDT、HCB、クロルデン、ドリネ系農薬等）、アトラジン、シマジン、マラチオン等のような登録されている農薬、DDE やオキシクロルデンのような分解生成物があり、農作物等への残留が問題にされている。DDT、BHC、ディルドリン、クロルデン、HCB 等について食事からの 1 日摂取量に関して長期間の経年変化を調査した貴重な報告がある。

個別試験法として有機塩素系農薬については GC[104]や GC/MS[105]による残留分析法を構築した。有機リン系農薬系農薬については野菜について FPD/GC[106]による残留分析

法を開発、農作物中の分解物[107]、不純物[108]、代謝物[109]を測定した。柑橘類やバナナの運搬、保存中に使用される防かび剤であるチアベンダゾール、イマザリル、オルトフェニルフェノールなどは食品添加物（指定添加物）として使用基準が定められているが、欧米ではポストハーベスト農薬として使用されており、関連農産物の残留試験法[110,111]を開発した。

2006年 5 月から残留基準のない農薬についてはポジティブリスト制度が施行され、一律基準（0.01ppm）を超えてはならないとされている。農産物中の残留農薬の一斉分析法の役

割も大きくなり、GC[112,113]、HPLC[114,115]、GC/MS[116–118]を構築したが (Figure 12)、測定対象の多い農薬ではタンデム質量分析計を用いたフローインジェクション MS/MS[111,119,120]も一斉分析法として有効であると思われる。構築した分析法を駆使して生鮮野菜・果実中の残留農薬の調理過程における消長[121]を検討した。

4.1.3 食品添加物の分析

食品添加物については食品衛生法第4条第2項に定義され、食品添加物の成分について同法・第11条、使用基準が同法・第21条に規定されている。着色料として合成着色である酸性タール系色素及び付随色素の分析や動物実験での代謝物の測定[122–125]に HPLC を用いた。また天然色素の分析には HPLC[126]や LC/MS[127,128]を用いた。なお、着色料については後述の向流分配クロマトグラフィーを用いて標品の

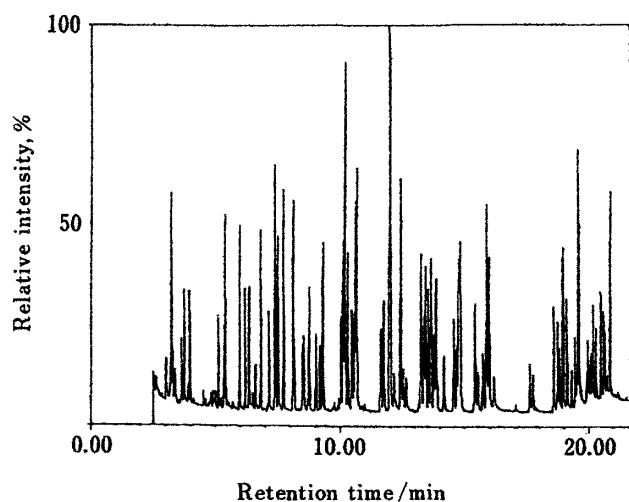


Figure 12. Total ion chromatogram of 79 pesticides mixture by GC/MS.

単離精製[185–188]を行った。食用油脂、バター、魚乾製品等には油脂の酸化等を防止して品質を保持するために酸化防止剤が不可欠である。HPLC を用いて食用油脂[129,130]、魚乾製品[131]中の抗酸化剤の分析法を構築するとともに、ショ糖脂肪酸エステル抗酸化剤の相乗効果[132]を検討した。甘味料 (グリチルリチン酸)、水溶性ビタミン類、カフェイン、保存料についても HPLC による清涼飲料水等の分析[133–134]を行った。

4.2 食品汚染物質の分析

食品中にはヒトに危害を及ぼす化学物質が様々な要因で含まれる。自然毒であるきのこ毒、ふぐ毒、真菌により産生されるマイコトキシン等はしばしば食中毒をひきおこす。これらの物質は食品衛生上、食品汚染物としてとりあげられる。

4.2.1 自然毒と食品中で生成される物質

食品に含まれる有害な生理活性物質の測定は食品の安全性確保の上で必要不可欠である。ベニテングタケ中のイボテン酸およびムッシモール[135]、フグ毒テトロドトキシン[136,137]、ジャガイモのアルカロイド配糖体[138]の定量に HPLC や LC/MS による分析法を検討した。カビ毒 (マイコトキシン) としては *Aspergillus* 属の真菌が産生するパツリンについて¹³C₃-パツリンをサロゲート物質に LC/MS を用いて市販リンゴ果実飲料を分析した。その結果、規制値である 50ppb を超えるパツリン残留飲料はなかったものの、一部の検体からパツリンが検出された (Figure 13) [139]。

食品中で生成され、含有される危害化学物質としてチーズ中のチラミン[140,141]、清涼飲料水のジケトピペラジン[142]、アクリルアミド[143]があり、HPLC による分析法を構築した。更に食肉中のニコチン酸アミドからニコチン酸生成に関与する細菌の検討にクロマトグラフィーを駆使した[144]。

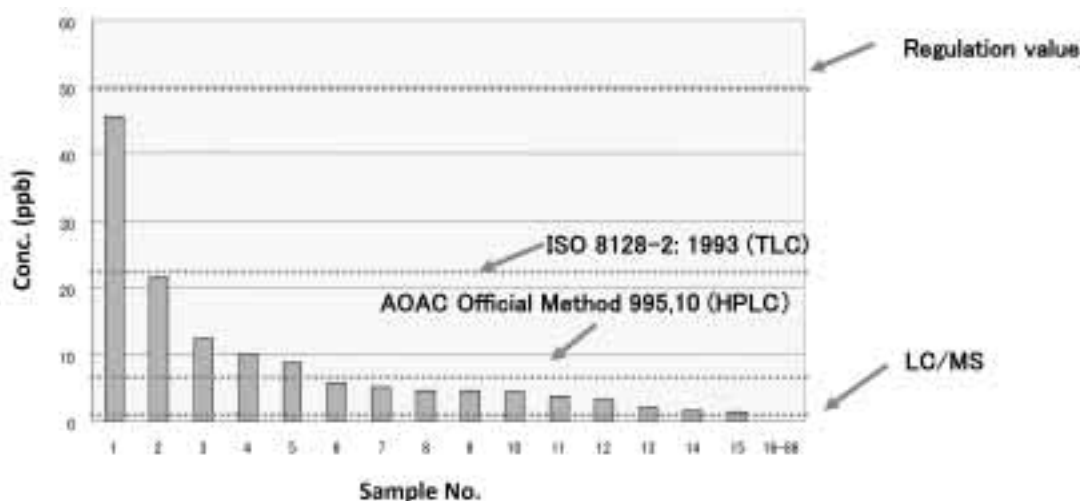


Figure 13. Levels of patulin in commercially available apple juice samples.

4.2.2 有機ハロゲン化合物

魚介類等の食品由来の食品汚染化学物質として今後もモニタリング等が必要な物質に塩素、臭素、フッ素等のハロゲン原子を含む有機ハロゲン化合物がある。その汚染物質の排出経路ともいわれるヒト母乳は乳幼児にとって重要な栄養源でもある。母乳については高分解 GC/MS によりダイオキシンを含む有機塩素系化合物[145–149]の分析法を検討した。臭素系化合物には難燃剤として知られる臭素化ジフェニルエーテルについて GC/MS により母乳[150,151]、魚肉[152]の分析を行った。新たな危害化学物質として注目されている、有機フッ素系化合物については PFOS (Figure 14) 等を LC/MS/MS で分析する高感度分析法を構築し、母乳、血液、ハウスダストを分析した。汚染源を探索する中で母乳と血液中の濃度の相関性を検討した (Figure 15) [153,154]。有機ハロゲン化合物でないが、塩ビ製品の可塑剤として多用され、内分泌かく乱物質としても注目されているフタル酸エステルの母乳の

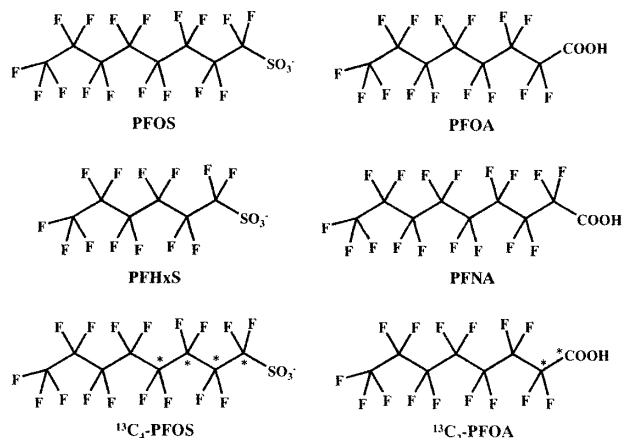


Figure 14. Chemical structures of PFCs and internal standard PFOS: perfluorooctanesulfonic acid; PFOA: perfluorooctanoic acid; PFNA: perfluorononanoic acid; PFHxS: perfluorohexanesulfonic acid.

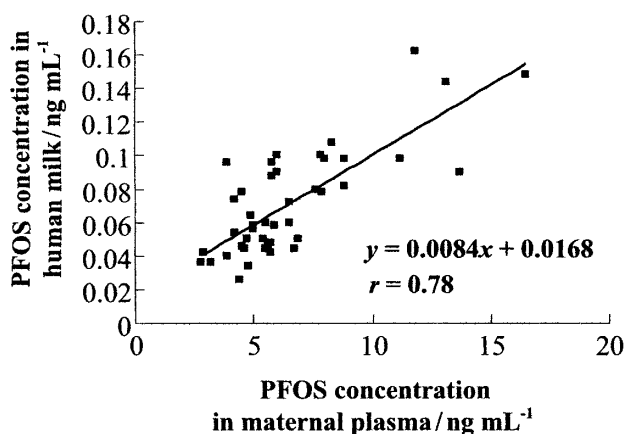


Figure 15. Correlation of PFOSs concentration between maternal plasma and human milk (n=41).

分析を LC/MS/MS により行った[155]。

4.2.3 内分泌攪乱化学物質

Endocrine Disruptor のような化学物質が多様なホルモン様作用に基づいて複雑な生体機能を微量で攪乱させ、しかも世代を越えて生体に様々な影響を及ぼすのではないかとという不透明な不安を私達に与えた。従来の安全性評価ではホルモン様作用の視点から化学物質の生体影響を検証したケースは少なかった。しかし、未だに内分泌攪乱作用がどの濃度レベルで発現される (低用量問題) のか、用量-作用関係が明らかにされておらず、暴露量の把握を含めて正確なリスク評価を導き出せない状況にある。

その代表例であるビスフェノール A (BPA) は、食器等に使用されるポリカーボネート樹脂や食品用缶の内面コーティング塗装材であるエポキシ樹脂の主原料として用いられている。ポリカーボネート製樹脂は耐熱性及び耐衝撃性に優れており、ビスフェノール A (BPA) の重合反応で合成されるが、未反応体や分解した BPA が食品用容器から溶出することが危惧されている。また、BPA とエピクロロヒドリンのグリシジル化合物であるエポキシ樹脂は飲料缶の内壁塗装に使用されており、一部の食品に BPA が移行することが報告されている。BPA とその関連化合物について、缶飲料、食品について HPLC や LC/MS を用いた分析法を構築し、溶出挙動を検討した[156–160]。また、ノニルフェノール等についても食品の移行等を LC/MS により分析した[161,162]。

一方、可塑剤としてフタル酸エステル類が、ポリ塩化ビニル製の製品に幅広く使用されている。フタル酸エステル類は測定環境からのコンタミネーションが大きい化学物質で、精度の高い分析を困難にしている。そこでオンライン固相抽出法を採用し、LC/MS を導入して高精度・高選択的な機能を有する、オンライン-カラムスイッチング-LC/MS を構築し、可塑剤の食品用手袋等から食品への移行を調査した[163–165]。

4.3 食品の品質及び機能性の評価

食品衛生法で定義されている「栄養機能食品」、「特定保健用食品」等の保健機能食品や健康食品等に関する社会的関心は高い。これら食品が具備すべき基本的条件は、有用性 (有効性) とその安全性 (品質面での) が確保され、保証されているかである。機能に関与する成分や危害物質を「化学物質」の視点から捉え、安全性と品質を担保する規格基準等の設定は良質な製品の提供につながる。衛生化学分析はこの食品の品質及び機能性の評価にも展開が期待される。政府の規制改革会議 WG で一般健康食品への機能性表示が話題になってから関連食品企業が、その動向に高い関心を示している。しかし、関連食品には様々な物質が含有されており、サイエンスの進歩に伴う新たな技術・手法を積極的にかつ恒久的に取り込む必要である。食品の品質評価の視点から生理活性物質の測定をアロエ製品[166,167]、ニンニク製品[168–

171]、葛製品の評価[172,173]について試験法を構築した。クロマトグラフィーを駆使した衛生化学分析法はこれからも保健機能食品や健康食品等の新たな開発に活用が期待される。

5. 精度の高い分析法を目指して：標品の確保と試料の前処理

市販試薬でも不純物が混在して純度が十分でないこともあり、精度の高い分析を実施するには純度の高い標品の確保が重要である。一方、衛生科学分析における分析対象の試料は空気、河川水、土壌等の環境試料の他に血液、尿などの生体試料や食品等多岐にわたる。食品分析の特徴は他の分析と比べて、測定対象となる試料の種類が多いこと、母集団を代表する試料の採取の難しさ、測定対象成分の濃度範囲が広いこと、共存成分の影響などが考えられ、分析化学的にみても難易度の高い分析と言えよう。最も困難な点は、食品という複雑なマトリックスから微量の測定対象物質をいかに多くの検体について効率かつ精度よく分析するかにある。従って測定装置に試料溶液を注入する段階のみならず、試料からの目的物質の抽出、クリーンアップなどの試料の前処理操作が必要である。優れた試料前処理法が開発されれば、一つの日常分析法がほぼ完成されたと言っても過言ではない。クロマトグラフィーの検出器にマススペクトロメーターが汎用されるようになって少々カラムでの分離が不十分であっても分析が可能になってきた。しかし、分析カラムや装置にかかる負荷を考慮すれば可能な限り軽減したいところであり、試料の前処理操作は依然にも増して重要である。標品の確保と試料の前処理を目的に CCC を展開した。谷村先生が NIH 留学中に伊東洋一郎博士と一緒に開発された CCC の一つに “Droplet counter-current chromatography (DCCC) がある[174]。この DCCC、high-speed counter-current chromatography や rotation locular countercurrent chromatography 等の CCC を用いて動物用医薬品[175-179]、食用色素[180-183]の単離・精製、生理活性物質の標品[184,185]を確保した。

一方、試料前処理操作において試料によってエマルジョンを形成してしまい、目的物質の初期段階のクリーンアップが困難なケースに遭遇する。シャンプー中のフケ防止剤であるピリチオン亜鉛の分析において DCCC の原理を用いた連続抽出装置で試料のクリーンアップを行い[186]、銅キレートに変換して HPLC による分析[30]に供した。食品分析ではヘキサン-アセトニトリル分配が脱脂操作として汎用されるが、試料によってはエマルジョンを形成して操作を困難にする。そこでアルミナカートリッジを接続した連続液-液分配装置を試作、魚肉中サルファ剤の分析[187]に応用した。Figure 16 に示すフローシステムでは魚肉のアセトニトリル抽出液をヘキサンで脱脂し、サルファ剤をアルミナカートリッジに捕集・濃縮した。溶出力を高めた溶離液を第 2 のポンプで送液してカートリッジからサルファ剤を溶出して濃縮して HPLC の分析に供した (Figure 17)。また、抗原抗体反応や分子インプリントポリマー等を利用してクリーンアップ操作

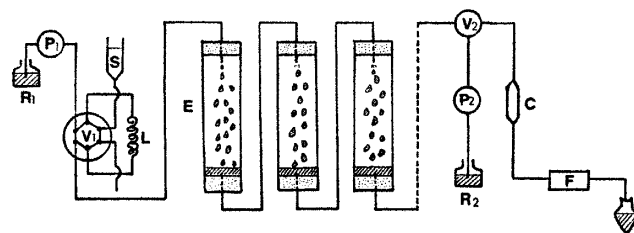


Figure 16. Schematic diagram of clean-up flow system with liquid-liquid partition.

P₁, P₂: pump; L: sample loop; R₁, R₂: reservoir; E: FEP tube; V₁, V₂: valve; C: alumina cartridge; F: UV detector; S: syringe

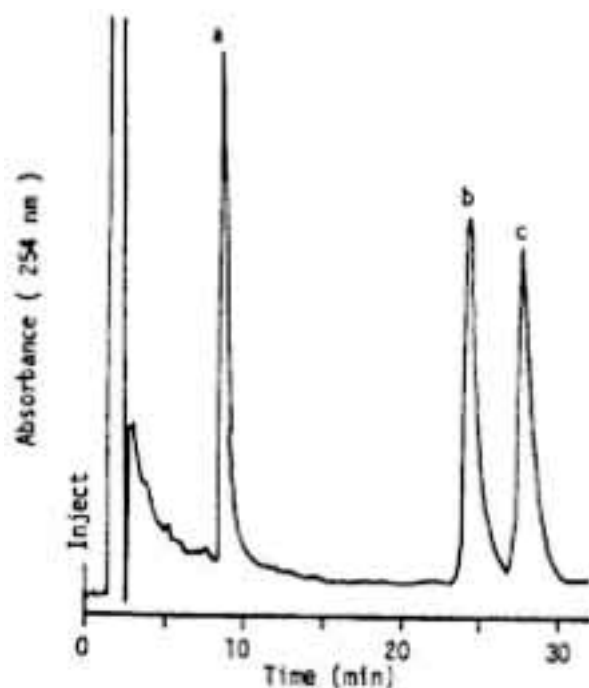


Figure 17. HPLC chromatograms of fish tissue extract spiked with 10ppm of sulfonamides by the clean-up system.

Sample was prepared by 3 tubes of liquid-liquid partition system. Peak a, sulfamonomethoxine; b, sulfadimethoxine; c, sulfaquinolone.

としてアフィニティーカラムを調製し、動物薬[188,189]及び農薬[190]の残留試験に特異性の高い手法を導入した。

6. おわりに

社会的関心の高い、食品に残留する様々な化学物質を中心にクロマトグラフィーを用いた試験法でレビューを編集した。一般に、化学物質の食品中での存在濃度レベルが微量であればあるほど、超高感度な分析法が要求され、分析値及び分析施設間のバラツキは大きくなる。

ポジティブリスト制度の導入に伴い、食品中に残留する多数の農薬や動物用医薬品の一斉分析が要求されている。LC/MS/MS や LC-TOF/MS のハード及びソフト両面での更なる

食品分析への展開は目覚ましく、残留食品分析法の構築が期待される。また免疫化学的手法を応用したイムノアフィニティーカラムによる試料調製法及びELISA等の簡易スクリーニング法を併用するような残留分析への導入も検討されるべき課題である。

私達は、利便性を追求するあまり、大量生産・大量消費に伴う化学物質が及ぼす複雑多岐にわたる環境や生体に対する影響に余り関心を持たずにきたのではないだろうか？薬学領域では科学技術の成果を人と社会に役立てることを目的に、科学的な根拠に基づいた確かな予測、評価、判断を行い、科学技術の成果を人と社会との調和の上で最も望ましい姿に調整するための科学＝レギュラトリーサイエンスが注目されている[19]。信頼性の保証されていない数値が安易に取り扱われた結果、データだけが一人歩きし、社会を混乱に陥れる。行政を通じて国民の健康に資する科学の一翼を担う基盤学問としてクロマトグラフィーを駆使した分析科学が期待される。

引用文献

- [1] Miyazaki, M.; Nakazawa, H.; Yamane, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1975**, *23*, 2436–2438.
- [2] Ito, Y. “Counter-current Chromatography, Theory and Practice”, ed. by N. B. Mandava, Y. Ito, Marcel Dekker (New York), **1988**, pp 79–442.
- [3] Albertsson, P. Å. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Almquist and Wiksell, Stockholm, John Wiley and Sons (New York), **1960**, pp 12–57.
- [4] Tamura, Z.; Tanimura, T.; Nakazawa, H. *Sep. Sci. Technol.*, **1978**, *13*, 745–752.
- [5] Yamaguchi, A.; Kawaguchi, H.; Orii, H.; Nakazawa, H. *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, *586*, 425–431.
- [6] Horie, S.; Ishii, H.; Nakazawa, H.; Suga, T.; Orii, H. *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, *585*, 435–443.
- [7] Chou, F. E.; Gutierrez, P. L.; Bachur, N. R.; Nakazawa, H. *Fed. Proc.*, **1980**, *39*, 310.
- [8] Pan, S. S.; Gutierrez, P. L.; Bachur, N. R.; Nakazawa, H. *Proc. Am. Ass. Cancer. Res.*, **1981**, *21*, 265.
- [9] Nakazawa, H.; Bachur, N. R.; Chou, F. T.; Mossoba, M. M.; Gutierrez, P. L. *Biophys. Chem.*, **1985**, *21*, 137–143.
- [10] Nakazawa, H.; Andrews, P. A.; Callery, P. S.; Bachur, N. R. *Biochem. Pharmacol.*, **1985**, *34*, 485–490.
- [11] Gutierrez, P. L.; Fox, B. M.; Mossoba, M. M.; Egorin, M. J.; Nakazawa, H.; Bachur, N. R. *Biophys. Chem.*, **1985**, *22*, 115–123.
- [12] Nakazawa, H.; Andrews, P. A.; Bachur, N. R.; Ito, Y. *J. Chromatogr.*, **1981**, *205*, 482–485.
- [13] Friedman, R. D.; Nakazawa, H.; Chou, F. E.; Bachur, N. R.; Ito, Y. *J. Chromatogr.*, **1982**, *252*, 283–287.
- [14] Egorin, M. J.; Andrews, P. A.; Nakazawa, H.; Bachur, N. R. *Drug Metab. Dispos.*, **1983**, *11*, 167–171.
- [15] Nakazawa, H.; Riggs, C. E.; Egorin, M. J.; Redwood, S. M.; Bachur, N. R. *J. Chromatogr.*, **1981**, *307*, 323–333.
- [16] Ishikawa, M.; Yamamoto, M.; Masui, T.; Hayakawa, K.; Miyazaki, M.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *Bunseki Kagaku*, **1986**, *35*, 309–311.
- [17] Yumie, Y.; Kowada, K.; Yamamoto, M.; Sano, T.; Masui, T.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **1988**, *37*, 580–584.
- [18] Hamasaki, K.; Kato, K.; Watanabe, T.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; Yamamoto, A.; Matsunaga, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, *16*, 1275–1280.
- [19] Mikami, E.; Fujii, Y.; Yamada, T.; Hayakawa, J.; Nakazawa, H.; Suzuki, S. *J. Pharm. Sci. Tech.*, **1991**, *51*, 241–245.
- [20] Inoue, M.; Yamamoto, M.; Ikeda, N.; Shiro, N.; Nakazawa, H. *Pharmaceutical Regulatory Science*, **1993**, *24*, 759–763.
- [21] Watanabe, T.; Takahashi, K.; Horiuchi, M.; Kato, K.; Sugimoto, T.; Nakazawa, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, *21*, 75–81.
- [22] Fukutsu, N.; Sakamaki, Y.; Kawasaki, T.; Saito, K.; Nakazawa, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, *41*, 1243–1250.
- [23] Fukutsu, N.; Sakamaki, Y.; Kawasaki, T.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, *54*, 1469–1472.
- [24] Fukutsu, N.; Kawasaki, T.; Saito, K.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1129*, 153–159.
- [25] Tosa, S.; Ishihara, A.; Nose, Y.; Ushikawa, T.; Yoshida, S.; Nakazawa, H.; Tomimatsu, T. *Shoyakugaku Zasshi*, **1989**, *43*, 28–34.
- [26] Ishihara, A.; Yoshida, S.; Tosa, S.; Nakazawa, H.; Tomimatsu, T. *Shoyakugaku Zasshi*, **1990**, *44*, 127–130.
- [27] Tosa, S.; Ishihara, A.; Toyota, M.; Yoshida, S.; Nakazawa, H.; Tomimatsu, T. *Shoyakugaku Zasshi*, **1991**, *45*, 52–56.
- [28] Ishihara, A.; Ushikawa, T.; Yoshida, S.; Tosa, S.; Nakazawa, H. *Shoyakugaku Zasshi*, **1992**, *46*, 125–130.
- [29] Tosa, S.; Ishihara, A.; Toyota, M.; Yoshida, S.; Nakazawa, H.; Tomimatsu, T. *Shoyakugaku Zasshi*, **1988**, *42*, 41–47.
- [30] Nakajima, K.; Yasuda, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr.*, **1990**, *502*, 379–384.
- [31] Wakui, N.; Ookubo, T.; Iwasaki, Y.; Ito, R.; Mitui, M.; Yano, Y.; Saito, K.; Nakazawa, H. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **2013**, *19*, 31–37.
- [32] Nakajima, H.; Hori, S.; Iwakami, S.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *Bunseki Kagaku*, **1987**, *36*, 867–871.
- [33] Nakajima, H.; Hori, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1990**, *36*, 15–20.
- [34] Tsuji, K.; Naito, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Toxicol. Environ.*

- Health*, **1988**, 34, 501–507.
- [35] Watanabe, T.; Idehara, T.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 796, 397–400.
- [36] Kawaguchi, M.; Ishii, Y.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Inoue, K.; Saito, K.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1049, 1–8.
- [37] Kawaguchi, M.; Ishii, Y.; Okanouchi, N.; Sakui, N.; Ito, R.; Inoue, K.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Organohalogen Compounds*, **2004**, 66, 181–185.
- [38] Kawaguchi, M.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1062, 23–29.
- [39] Kawaguchi, M.; Inoue, K.; Yoshimura, M.; Sakui, N.; Ito, R.; Nakazawa, H. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 505, 217–222.
- [40] Kawaguchi, M.; Inoue, K.; Yoshimura, M.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1041, 19–26.
- [41] Kawaguchi, M.; Ito, R.; Endo, N.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Sato, N.; Shiozaki, T.; Nakazawa, H. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 557, 272–277.
- [42] Kawaguchi, M.; Ito, R.; Honda, H.; Endo, N.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Seto, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1206, 196–199.
- [43] Kawaguchi, M.; Ito, R.; Honda, H.; Endo, N.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Seto, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1200, 260–263.
- [44] Ito, R.; Kawaguchi, M.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Seto, Y.; Nakazawa, H. *Talanta*, **2009**, 77, 1295–1298.
- [45] Ishii, Y.; Kawaguchi, M.; Ito, R.; Iwasaki, Y.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Bunski Kagaku*, **2006**, 55, 949–954.
- [46] Mtema, C.A.; Nakazawa, H.; Takabatake, E. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1984**, 67, 334–336.
- [47] Nagata, T.; Saeki, M.; Fujita, M.; Takabatake, E.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1984**, 25, 163–167.
- [48] Nagata, T.; Saeki, M.; Nakazawa, H.; Fujita, M.; Takabatake, E. *Jpn. J. Food Chem.*, **1985**, 26, 46–49.
- [49] Nagata, T.; Saeki, M.; Nakazawa, H.; Fujita, M.; Takabatake, E. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1985**, 68, 27–28.
- [50] Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Hamada, N.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr.*, **1990**, 502, 371–378.
- [51] Horie, M.; Saito, K.; Nose, N. H.; Nakazawa, N. *Chromatography*, **1994**, 15, 147–152.
- [52] Horie, M.; Saito, K.; Nose, N.; Miyajima, T.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1996**, 37, 8–13.
- [53] Horie, M.; Saito, K.; Nose, N.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1993**, 34, 289–293.
- [54] Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Terada, H.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1997**, 38, 329–334.
- [55] Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Mochizuki, E.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr.*, **1987**, 402, 301–308.
- [56] Horie, M.; Saito, K.; Nose, N.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1992**, 33, 442–448.
- [57] Horie, M.; Saito, K.; Nose, N.; Tera, M.; Nakazawa, H. *J. Liq. Chromatogr.*, **1993**, 16, 1463–1472.
- [58] Horie, M.; Saito, K.; Nose, N.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1995**, 36, 62–67.
- [59] Iwasaki, Y.; Ito, T.; Kitamura, S.; Kato, M.; Kodaira, T.; Horie, M.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **2006**, 55, 943–948.
- [60] Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Hamada, N.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1990**, 31, 171–176.
- [61] Hori, T.; Watabe, K.; Kikawa, H.; Kawamura, T.; Nakazawa, H. *Food Sanitation Research*, **1990**, 40, 87–91.
- [62] Horie, M.; Saito, K.; Nose, N.; Nakazawa, H. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1992**, 75, 786–789.
- [63] Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Tera, M.; Kit-suwa, G.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1990**, 36, 283–289.
- [64] Nakazawa, H.; Takabatake, E.; Hino, S.; Mtema, C. A. *Bunseki Kagaku*, **1983**, 32, 179–183.
- [65] Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Iwasaki, H.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1985**, 31, 371–376.
- [66] Nose, N.; Hoshino, Y.; Kikuchi, Y.; Horie, M.; Saitoh, K.; Kawachi, T.; Nakazawa, H. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1987**, 70, 714–717.
- [67] Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Nakazawa, H.; Yamane, Y. *J. Chromatogr.*, **1991**, 538, 484–491.
- [68] Horie, M.; Yoshida, S.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1998**, 39, 383–389.
- [69] Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Fujita, M.; Takabatake, E.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1985**, 26, 337–342.
- [70] Saito, K.; Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1989**, 35, 63–67.
- [71] Kadota, M.; Imanaka, M.; Ogawa, N.; Noshiro, K.; Mori, T.; Oka, H.; Ikai, Y.; Horie, M.; Suzuki, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1994**, 35, 23–27.
- [72] Kadota, M.; Imanaka, M.; Hino, S.; Namba, J.; Takeshi, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2003**, 44, 67–72.
- [73] Saito, K.; Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Nakazawa, H. *J. Liq. Chromatogr.*, **1989**, 12, 373–381.
- [74] Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Iwasaki, H.; Shida, Y.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *Bunseki Kagaku*, **1986**, 35, 219–224.
- [75] Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Shida, Y.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *Bunseki Kagaku*, **1988**, 7, 580–584.

- [76] Horie, M.; Kido, Y.; Murayama, M.; Toyoda, M.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1999**, *40*, 401–406.
- [77] Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1988**, *34*, 128–134.
- [78] Horie, M.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **1996**, *45*, 1089–1094.
- [79] Horie, M.; Saito, K.; Nose, N.; Oka, H.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. B*, **1994**, *655*, 47–52.
- [80] Saito, ; Ishii, R.; Yoshida, Y.; Haramaki, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr.*, **1998**, *812*, 295–302.
- [81] Horie, M.; Ishi, R.; Yoshida, T.; Hoshino, Y.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1999**, *40*, 309–313.
- [82] Horie, M.; Takegami, H.; Toya, K.; Kikuchi, Y.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2003**, *44*, 150–154.
- [83] Horie, M.; Takegami, H.; Toya, K.; Nakazawa, H. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, *492*, 187–197.
- [84] Takegami, H.; Horie, M.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **2006**, *55*, 627–634.
- [85] Horie, M.; Yoshida, T.; Kikuchi, Y.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2001**, *42*, 374–378.
- [86] Horie, M.; Saito, H.; Natori, T.; Nagata, J.; Nakazawa, H. *J. Liq. Chromatogr.*, **2004**, *27*, 863–874.
- [87] Oka, H.; Ikai, Y.; Hayakawa, J.; Harada, K.; Asukabe, H.; Suzuki, M.; Himei, R.; Horie, M.; Nakazawa, H.; MacNeil, J. D. *J. Agric. Food. Chem.*, **1994**, *42*, 2215–2219.
- [88] Nakazawa, H.; Ino, S.; Kato, K.; Watanabe, T.; Ito, Y.; Oka, H. *J. Chromatogr. B*, **1999**, *732*, 55–64.
- [89] Takeba, K.; Fujinuma, K.; Miyazaki, T.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **1998**, *812*, 295–302.
- [90] Yamamoto, S.; Suzuki, S.; Horie, M.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1992**, *34*, 392–397.
- [91] Watabe, K.; Kikawa, H.; Kawamura, T.; Miyazaki, Y.; Matsumoto, M.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *Bunseki Kagaku*, **1989**, *38*, 712–717.
- [92] Hashimoto, T.; Miyazaki, Y.; Kokubo, Y.; Suzuki, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1995**, *36*, 595–600.
- [93] Horie, M.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *882*, 53–62.
- [94] Hashimoto, T.; Sasamoto, T.; Miyazaki, Y.; Kokubo, Y.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1995**, *36*, 754–758.
- [95] Miyazaki, Y.; Hashimoto, T.; Maruyama, T.; Matsumoto, M.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1989**, *30*, 384–389.
- [96] Yamada, M.; Kinoshita, K.; Kurosawa, M.; Saito, K.; Nakazawa, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, *45*, 54–658.
- [97] Yamada, M.; Aramaki, S.; Hosoe, T.; Kurosawa, M.; Kijima–Suda, I.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Anal. Sci.*, **2008**, *24*, 911–914.
- [98] Yamada, M.; Aramaki, S.; Kurosawa, M.; Kijima–Suda, I.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Anal. Sci.*, **2008**, *24*, 1199–1204.
- [99] Takeba, K.; Fujinuma, K.; Sakamoto, M.; Jinbo, K.; Oka, H.; Ito, Y.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2003**, *44*, 246–252.
- [100] Takeda, K.; Matsumoto, M.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr.*, **1992**, *596*, 67–71.
- [101] Takeba, K.; Ito, T.; Matsumoto, M.; Nakazawa, H. *J. AOAC. Int.*, **1994**, *77*, 904–908.
- [102] Takeba, K.; Itoh, T.; Matsumoto, M.; Nakazawa, H.; Tanabe, S. *J. AOAC. Int.*, **1996**, *79*, 848–852.
- [103] Takeba, K.; Matsumoto, M.; Shida, Y.; Nakazawa, H. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1990**, *73*, 602–604.
- [104] Murakami, Y.; Murata, H.; Matsumoto, H.; Tanaka, R.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *Jpn. J. Food Chem.*, **1986**, *27*, 641–648.
- [105] Tanaka, Y.; Hosoi, S.; Shimizu, R.; Kirigaya, C.; Sasao, T.; Mizuno, A.; Nakazawa, H.; Fujita, M.; Kawamura, T. *Jpn. J. Food Chem.*, **1997**, *38*, 69–77.
- [106] Ueno, E.; Oshima, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Nakazawa, H. *J. Pestic. Sci.*, **2004**, *28*, 422–428.
- [107] Tanaka, Y.; Hosoi, S.; Shimizu, R.; Kirigaya, C.; Sasao, T.; Mizuno, A.; Kawamura, T.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1997**, *38*, 323–328.
- [108] Tanaka, Y.; Takahashi, K.; Sasao, T.; Kirigaya, C.; Hosoi, S.; Shirai, S.; Kawamura, T.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2001**, *42*, 206–209.
- [109] Tanaka, Y.; Sasao, T.; Kirigaya, C.; Hosoi, S.; Kawamura, T.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1999**, *40*, 137–142.
- [110] Oishi, M.; Onishi, K.; Kano, I.; Nakazawa, H.; Tanabe, S. *J. AOAC. Int.*, **1994**, *77*, 1293–1296.
- [111] Ito, Y.; Goto, T.; Oka, H.; Matsumoto, H.; Miyazaki, Y.; Takahashi, N.; Nakazawa, H. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 861–866.
- [112] Ueno, E.; Oshima, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2004**, *45*, 212–217.
- [113] Ueno, E.; Oshima, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2004**, *45*, 54–61.
- [114] Ohno, C.; Ohtaki, M.; Mori, K.; Hisamatsu, Y.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1999**, *40*, 75–79.
- [115] Kadota, M.; Imanaka, M.; Ikegawa, K.; Kumashiro, K.; Mori, T.; Suzuki, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1996**, *37*, 48–53.
- [116] Ogawa, M.; Sakai, T.; Ohkuma, K.; Matsumoto, T.; Hisamatsu, Y.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1997**, *38*, 48–61.
- [117] Yamaguchi, S.; Endo, S.; Eguchi, M.; Kido, K.; Hisamatsu, Y.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **1997**, *46*, 905–914.
- [118] Ueno, E.; Oshima, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Yoshimura,

- Y.; Nakazawa, H. *J. AOAC Int.*, **2004**, 87, 1003–1015.
- [119] Goto, T.; Ito, Y.; Oka, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Nakazawa, H. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 487, 201–209.
- [120] Nakazawa, H.; Takahashi, N.; Inoue, K.; Ito, Y.; Goto, T.; Kato, K.; Yoshimura, Y.; Oka, H. *Talanta*, **2004**, 64, 899–890.
- [121] Ueno, E.; Oshima, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Ashimoto, K.; Ando, Y.; Souchi, K.; Kato, Y.; Kameda, K.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. *Food Sanitation Research*, **2004**, 54, 39–45.
- [122] Kai, M.; Arakawa, T.; Takahashi, A.; Koizumi, A.; Hyodo, Y.; Suzuki, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1996**, 37, 146–150.
- [123] Yamada, M.; Kawahara, A.; Nakamura, M.; Nakazawa, H. *Food Additive Contam.*, **2000**, 17, 665–674.
- [124] Yamada, M.; Morimoto, T.; Nakamura, M.; Nakazawa, H. *Food Additive Contam.*, **2000**, 17, 379–386.
- [125] Yamada, M.; Morimoto, T.; Nakamura, M.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 754, 411–417.
- [126] Hayashi, T.; Hayashi, K.; Fujita, J.; Ono, M.; Oka, H.; Ito, Y.; Matsumoto, H.; Ozeki, N.; Itakura, Y.; Nakazawa, H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2001**, 24, 2347–2361.
- [127] Inoue, K.; Hamasaki, S.; Yoshimura, Y.; Yamada, M.; Nakamura, M.; Ito, Y.; Nakazawa, H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2003**, 26, 53–62.
- [128] Inoue, K.; Yamashita, Y.; Yoshimura, Y.; Yamada, M.; Nakamura, M.; Ito, Y.; Nakazawa, H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2003**, 26, 1207–1217.
- [129] Kitada, Y.; Tamase, K.; Mizobuchi, M.; Sasaki, M.; Tanigawa, K.; Yamamoto, M.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **1984**, 33, E33–E35.
- [130] Kitada, Y.; Ueda, Y.; Yamamoto, M.; Shinomiya, K.; Nakazawa, H. *J. Liq. Chromatogr.*, **1985**, 8, 47–57.
- [131] Kitada, Y.; Tamase, K.; Mizobuchi, M.; Sasaki, M.; Tanigawa, K.; Komiyama, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1984**, 25, 209–221.
- [132] Oishi, M.; Onishi, K.; Nishijima, M.; Nakagomi, K.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1990**, 36, 69–73.
- [133] Maeda, Y.; Yamamoto, Y.; Owada, K.; Sato, S.; Masui, T.; Nakazawa, H. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1989**, 72, 244–247.
- [134] Kitada, Y.; Sasaki, M.; Maeda, Y.; Yamamoto, M.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **1988**, 37, 561–565.
- [135] Komiyama, S.; Komiyama, S.; Yamaura, Y.; Nakazawa, H.; Fujita, M.; Kabasawa, Y. *Bunseki Kagaku*, **1985**, 34, 161–165.
- [136] Horie, M.; Ishii, R.; Kobayashi, S.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2002**, 43, 234–238.
- [137] Horie, M.; Kobayashi, S.; Shimizu, N.; Nakazawa, H. *Analyst*, **2002**, 127, 755–759.
- [138] Saito, K.; Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr.*, **1990**, 508, 141–147.
- [139] Ito, R.; Yamazaki, H.; Inoue, K.; Yoshimura, Y.; Kawaguchi, M.; Nakazawa, H. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 7464–7468.
- [140] Takeba, K.; Murakami, F.; Matsumoto, M.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **1990**, 31, 137–143.
- [141] Takeba, K.; Maruyama, T.; Matsumoto, M.; Ishida, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr.*, **1990**, 504, 441–444.
- [142] Saito, K.; Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *J. Liq. Chromatogr.*, **1989**, 12, 571–582.
- [143] Inoue, K.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2003**, 26, 1877–1884.
- [144] Oishi, M.; Irikura, Y.; Nakagomi, K.; Nakazawa, H.; Tanabe, S. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1995**, 41, 334–341.
- [145] Saito, K.; Ogawa, M.; Takekuma, M.; Ohmura, A.; Kawaguchi, M.; Ito, R.; Inoue, K.; Matsuki, Y.; Nakazawa, H. *Organohalogen Compounds*, **2004**, 66, 38–43.
- [146] Saito, K.; Ogawa, M.; Takekuma, M.; Ohmura, A.; Kawaguchi, M.; Ito, R.; Inoue, K.; Matsuki, Y.; Nakazawa, H. *Chemosphere*, **2005**, 61, 1215–1220.
- [147] Saito, K.; Ohmura, A.; Takekuma, M.; Fukui, M.; Iwasaki, Y.; Ito, R.; Matsuki, Y.; Nakazawa, H. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2006**, 76, 641–647.
- [148] Saito, K.; Ohmura, A.; Takekuma, M.; Sasano, R.; Matsuki, Y.; Nakazawa, H. *Anal. Sci.*, **2007**, 23, 661–666.
- [149] Takekuma, M.; Saito, K.; Falandysz, J.; Nakazawa, H. *Sci. Total Environ.*, **2011**, 409, 1368–1377.
- [150] Hori, S.; Akutsu, K.; Oda, H.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Makino, T. *Organohalogen Compounds*, **2002**, 58, 245–248.
- [151] Akutsu, K.; Kitagawa, M.; Nakazawa, H.; Makino, T.; Iwazaki, K.; Oda, H.; Hori, S. *Chemosphere*, **2003**, 53, 645–654.
- [152] Akutsu, K.; Obana, H.; Okihashi, M.; Kitagawa, M.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Makino, T.; Oda, H.; Hori, S. *Chemosphere*, **2001**, 44, 1325–1333.
- [153] Nakata, A.; Katsumata, T.; Iwasaki, Y.; Ito, R.; Saito, K.; Izumi, S.; Makino, T.; Kishi, R.; Nakazawa, H. *Organohalogen compounds*, **2007**, 69, 2844–2846.
- [154] Nakata, A.; Saito, K.; Iwasaki, Y.; Ito, R.; Kishi, R.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **2009**, 58, 653–659.
- [155] Takatori, S.; Akutsu, K.; Kondo, F.; Izumi, S.; Makino, T.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **2007**, 56, 1025–1032.
- [156] Horie, M.; Yoshida, T.; Ishii, R.; Kobayashi, S.; Nakazawa,

- H. *Bunseki Kagaku*, **1999**, 48, 579–587.
- [157] Sun, Y.; Wada, M.; Dirabashi, O. A.; Kuroda, N.; Nakazawa, H.; Nakashima, K. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 749, 49–56.
- [158] Kawamura, Y.; Inoue, K.; Nakazawa, H.; Yamada, T.; Maitani, T. *Jpn. J. Food Chem.*, **2001**, 42, 13–17.
- [159] Yoshida, T.; Horie, M.; Hoshino, Y.; Nakazawa, H. *Food Additive Contam.*, **2001**, 18, 69–75.
- [160] Inoue, K.; Murayama, S.; Takeba, K.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. *J. Food Compos. Anal.*, **2003**, 16, 497–506.
- [161] Inoue, K.; Kondo, S.; Yosie, Y.; Kato, K.; Yoshimura, Y.; Horie, M.; Nakazawa, H. *Food Additive Contam.*, **2001**, 18, 157–164.
- [162] Horie, M.; Kobayashi, H.; Ishii, R.; Saito, K.; Nakazawa, H.; Makino, T. *Bunseki Kagaku*, **2007**, 56, 1037–1043.
- [163] Hirayama, K.; Tanaka, H.; Kawana, K.; Tani, T.; Nakazawa, H. *Food Additive Contam.*, **2001**, 18, 357–362.
- [164] Tsumura, Y.; Ishimitsu, S.; Hirayama, K.; Fujimaki, T.; Nakazawa, H.; Tonokai, Y. *Jpn. J. Food Chem.*, **2002**, 43, 254–259.
- [165] Takatori, S.; Okamoto, Y.; Kitagawa, Y.; Hori, S.; Izumi, S.; Makino, T.; Nakazawa, H. *Int. J. Pharm.*, **2008**, 352, 139–145.
- [166] Yamamoto, M.; Ishikawa, M.; Masui, T.; Nakazawa, H.; Kabasawa, Y. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1985**, 68, 493–494.
- [167] Yamamoto, M.; Maeda, Y.; Masui, T.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1989**, 35, 140–146.
- [168] Saito, K.; Horie, M.; Hoshino, Y.; Mochizuki, E.; Nose, N.; Nakazawa, H. *Jpn. Toxicol. Environ.*, **1988**, 34, 536–541.
- [169] Mochizuki, E.; Nakayama, A.; Kitada, Y.; Saito, K.; Nakazawa, H.; Suzuki, S.; Fujita, M. *J. Chromatogr. A*, **1988**, 455, 271–277.
- [170] Saito, K.; Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Mochizuki, E.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1989**, 72, 917–920.
- [171] Mochizuki, E.; Yamamoto, T.; Komiyama, Y.; Nakazawa, H. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 5170–5176.
- [172] Kitada, Y.; Mochizuki, M.; Ueda, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr.*, **1985**, 347, 438–442.
- [173] Kitada, Y.; Sasaki, M.; Nakazawa, H. *J. Food Sci. Tec.*, **1988**, 35, 135–140.
- [174] Tanimura, T.; Pisano, J.J.; Ito, Y.; Bowman, R.L. *Science*, **1970**, 169, 54.
- [175] Saito, K.; Horie, M.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Shida, Y.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *J. Chromatogr.*, **1988**, 454, 387–391.
- [176] Harada, K.; Kimura, I.; Yoshikawa, A.; Suzuki, M.; Nakazawa, H.; Hattori, S.; Komori, K.; Ito, Y. *J. Liq. Chromatogr.*, **1990**, 13, 2373–2388.
- [177] Harada, K.; Ikai, Y.; Yamazaki, Y.; Suzuki, M.; Oka, H.; Nakazawa, H.; Ito, Y. *J. Chromatogr.*, **1991**, 538, 203–212.
- [178] Ikai, Y.; Oka, H.; Hayakawa, J.; Kawamura, N.; Harada, K.; Suzuki, M.; Nakazawa, H.; Ito, Y. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **1998**, 21, 143–155.
- [179] Oka, H.; Ikai, Y.; Hayakawa, J.; Harada, K.; Suzuki, M.; Shimizu, A.; Hayashi, T.; Takeda, K.; Nakazawa, H.; Ito, Y. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 723, 61–68.
- [180] Oka, H.; Ikai, Y.; Kawamura, N.; Hayakawa, J.; Yamada, M.; Harada, K.; Murata, H.; Suzuki, M.; Nakazawa, H.; Suzuki, S.; Sakita, T.; Fujita, M.; Maeda, Y.; Ito, Y. *J. Chromatogr.*, **1991**, 538, 149–156.
- [181] Oka, H.; Ito, Y.; Yamada, S.; Kagami, T.; Hayakawa, J.; Harada, K.; Atsumi, E.; Suzuki, M.; Odani, H.; Akahori, S.; Maeda, K.; Ito, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 813, 71–77.
- [182] Kabasawa, Y.; Shinomiya, K.; Nakazawa, H.; Fujita, M.; Tanimura, T. *Anal. Sci.*, **1991**, 7, 273–276.
- [183] Kabasawa, Y.; Tanimura, T.; Nakazawa, H.; Shinomiya, N. *Anal. Sci.*, **1992**, 8, 351–353.
- [184] Kabasawa, Y.; Nakazawa, H.; Yamatoshi, M.; Tanimura, T. *Bunseki Kagaku*, **1989**, 38, 16–20.
- [185] Shinomiya, K.; Kabasawa, Y.; Nakazawa, H.; Ito, Y. *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2003**, 26, 3497–3509.
- [186] Nakajima, K.; Yasuda, T.; Okuma, S.; Kubo, H.; Kinoshita, T.; Nakazawa, H.; Fujita, M. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1988**, 34, 15–20.
- [187] Nakazawa, H.; Shinomiya, K.; Fujita, M.; Kitada, Y.; Yamamoto, M.; Nagata, T.; Komiyama, S.; Takabatake, E. *Jpn. J. Food Chem.*, **1985**, 26, 7–12.
- [188] Ihara, Y.; Kato, M.; Kodaira, T.; Ito, S.; Terakawa, M.; Horie, M.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Jpn. J. Food Chem.*, **2009**, 50, 135–139.
- [189] Sakamoto, Y.; Saito, K.; Hata, R.; Katabami, S.; Iwasaki, Y.; Ito, R.; Nakazawa, H. *Bunseki Kagaku*, **2012**, 61, 383–389.
- [190] Nakazawa, H.; Kanzaki, Y.; Takahashi, N.; Oka, H. *Bunseki Kagaku*, **2004**, 53, 1295–1301.
- [191] Uchiyama, M. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1995**, 41, 250–255.