

血液中 PCB 分析における低温アルカリ分解法を用いた 前処理方法

増田 栞・常松 順子・矢野 智也・佐藤 秀樹

福岡市保健環境研究所保健科学課

Pretreatment Using Low Temperature Alkali Digestion Method for Analysis of PCB in Whole Blood Sample

Shiori MASUDA, Junko TSUNEMATSU, Tomoya YANO and Hideki SATO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

福岡市保健環境研究所における血液中 PCB 分析は、食品中の PCBs の分析法に準じて行っている。油脂等のアルカリ分解操作は、試験管に秤量した血液に蒸留水、エタノール及び水酸化カリウムを加え、83℃以上で2～3時間加熱する方法（熱アルカリ分解法）を用いているが、本手法は空冷管の取付けを要するため分析操作の簡便性に劣り、加熱中に突沸が起こりやすく危険を伴うといった課題がある。そこで、堀らの報告に準じて、低温（30℃）条件下で一晩放置するアルカリ分解法（低温アルカリ分解法）の検討を行った。令和5年度福岡県油症一斉検診受診者血液7検体を用いて検証した結果、熱アルカリ分解法に対する低温アルカリ分解法の総 PCB 濃度比は0.872～1.033であった。また、血中 PCB パターン判定に用いられる指標異性体#118, #153 及び #156 の各濃度比についても0.828～1.170となり、両分解法による大きな差は認められなかった。

Key Words : 油症 Yusho, ポリ塩化ビフェニル PCB, 血液 blood, ガスクロマトグラフ-タンデム型質量分析計 GC-MS/MS

1 はじめに

昭和43年に福岡県、長崎県を中心とした西日本一帯でカネミ油症事件が発生した。これは、米ぬか油中に、脱臭工程の熱媒体として用いられたポリ塩化ビフェニル（PCB）等が混入したことで起こった大規模食中毒であった。当所では昭和49年から福岡県油症一斉検診に参画し、受診者血液の PCB 濃度を測定している。当所における血液中 PCB 分析は、食品中の PCBs 分析法に準じて行っているが^{1, 2)}、油脂等のアルカリ分解操作は、試験管に秤量した血液に蒸留水、エタノール及び水酸化カリウムを加え、83℃以上で2～3時間加熱する方法（以下、「熱アルカリ分解法」とする。）を用いている。しかし、本手法は空冷管の取付けを要するため分析操作の簡便性に劣り、加熱中に突沸が起こりやすく危険を伴うといった課題がある。これらの課題に対し、堀ら³⁾は低温（30℃）条件下で一晩放置するアルカリ分解

法（以下、「低温アルカリ分解法」とする。）の検討を行い、有用な結果を得ている。そこで当所でも前処理の安全性確保及び操作性向上のため、低温アルカリ分解法を検討したので結果を報告する。

なお、本検討は福岡市保健環境研究所倫理委員会による審査を受け、承認されたものである（許可番号第2024-01号）。

2 実験方法

2.1 試料

令和5年度福岡県油症一斉検診において、インフォームドコンセントを得て血液中 PCB 濃度を測定した受診者血液7検体を試料とした。熱アルカリ分解法で分析した結果、比較的濃度が低かった検体 69, 73, 128, 136（以下、「低濃度群」とする。）と比較的濃度が高かった

た検体 82, 134, 162 (以下, 「高濃度群」とする.) を選び, 低温アルカリ分解法の検討対象とした.

2.2 標準品・試薬等

標準品: ケンブリッジアイソトープ研究所製

2,3',4,4',5-PentaChloroBiphenyl (#118),
2,2',3,4,4',5'-HexaChloroBiphenyl (#138),
2,2',4,4',5,5'-HexaChloroBiphenyl (#153),
2,3,3',4,4',5-HexaChloroBiphenyl (#156),
2,2',3,3',4,4',5-HeptaChloroBiphenyl (#170),
2,2',3,4,4',5,5'-HeptaChloroBiphenyl (#180)及び
2,2',3,4',5,5',6-HeptaChloroBiphenyl (#187)

ウインドウ標準品: ケンブリッジアイソトープ研究所製 PCB WINDOW DEFINING MIXTURE(DB-5) EC-1430. 本標準品は#30,#37 (3 塩化物), #54,#77 (4 塩化物), #104,#126 (5 塩化物), #155,#169 (6 塩化物), #188,#189 (7 塩化物) 及び#194,#202 (8 塩化物) の混合品である.

内部標準品 (^{13}C -PCBs): ケンブリッジアイソトープ研究所製

2,3',4,4',5-PentaChloroBiphenyl (#118),
2,2',3,4,4',5'-HexaChloroBiphenyl (#138),
2,2',4,4',5,5'-HexaChloroBiphenyl (#153),
2,3,3',4,4',5-HexaChloroBiphenyl (#156),
2,2',3,3',4,4',5-HeptaChloroBiphenyl (#170)及び
2,2',3,4,4',5,5'-HeptaChloroBiphenyl (#180)
#118, #153, #156, #170 及び#180 はクリーンアップスパイクとして, #138 はシリンジスパイクとして使用した.

シリカゲルカートリッジカラム: SUPELCO 社製 SPE DSC-Si Silica Tube 6 mL/500 mg をあらかじめヘキサン 10 mL でコンディショニングして使用した.

蒸留水: ヘキサン洗浄品を使用した.

その他の試薬: PCB 測定用又は特級を使用した.

検量線用混合標準溶液: 標準品及びウインドウ標準品については, n-ノナンで溶解し 1~20 ng/mL の範囲内で段階的に調製した.

2.3 装置及び測定条件

GC-MS/MS の測定条件を表 1 に, 対象化合物の測定イオン等を表 2 に示す.

表 1 GC-MS/MS 測定条件

機種	島津TQ8050-NX
カラム	HT-8 PCB 60 m, 0.25 mm, 0.25 μm
カラム温度	130°C (4 min) – 20°C/min – 240°C – 2°C/min – 285°C – 20°C/min – 310°C (12 min)
注入口温度	250°C
キャリアガス	He 2.6 mL/min
注入量	2 μL
イオン化法	EI
エミッション電流	160 μA

表 2 対象化合物の測定イオン等

PCBs	M.W.	Q1(m/z)	Q3(m/z)	CE (eV)
3塩化物	256	255.9	定量イオン	186.0
		257.9	確認イオン	186.0
4塩化物	290	289.9	定量イオン	219.9
		291.9	確認イオン	221.9
5塩化物	324	323.9	定量イオン	253.9
		325.9	確認イオン	255.9
6塩化物	358	359.9	定量イオン	289.9
		361.9	確認イオン	291.9
7塩化物	392	393.8	定量イオン	323.9
		395.8	確認イオン	325.9
8塩化物	426	427.8	定量イオン	357.8
		429.8	確認イオン	359.8

2.4 試験溶液の調製

2.4.1 熱アルカリ分解法

既報²⁾ に準じた方法で調製した. 試料 3 g を量り取り, 内部標準品 (クリーンアップスパイク) を各化合物につき 0.5 ng 相当になるよう添加した. 次に, 蒸留水で 8 mL にし, エタノールを加えて 15 mL にメスアップして, 2 mol/L となるように水酸化カリウム 1.6 g を加え, 攪拌した. 本法では, 試験管上部に空冷管を取り付け, 約 83°C の湯浴で 2 時間程度加熱してアルカリ分解を行った. 放冷後, 蒸留水を加えて 30 mL にし, ヘキサン 10 mL で振とう抽出した後, ヘキサン層を採取した. 水層にさらにヘキサン 10 mL を加え, 同様に抽出した. これらのヘキサン層を合わせ, 蒸留水で水層が中性になるまで洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, ターボバップを用いて約 1 mL まで濃縮し抽出液とした. 続いて, シリカゲルカートリッジカラムに抽出液を負荷し, ヘキサン 8 mL で溶出させ, 溶出液を先尖試験管に採り, ターボバップで約 0.1 mL まで濃縮した. これに内部標準品 (シリンジスパイク) を 0.5 ng 相当になるように添加し, 試験溶液とした.

2.4.2 低温アルカリ分解法

試料 3 g を量り取り, 内部標準品 (クリーンアップスパイク) を各化合物につき 0.5 ng 相当になるよう添加した. 次に, 1.5 mol/L 水酸化カリウム/エタノール溶液を

4.5 mL 加え、攪拌した。本法では、30℃で一晩（約 17 時間）放置し、アルカリ分解を行った。その後、ヘキサン 5 mL でボルテックスにて振とう抽出し、エタノールを 0.5 mL 以上添加後、添加量分のヘキサン層を採取し、水層にさらにヘキサン 5 mL を加えて同様に抽出した。これらのヘキサン層を合わせ、蒸留水で水層が中性になるまで洗浄した。無水硫酸ナトリウムでの脱水以降の操作は「2.4.1 熱アルカリ分解法」と同様に行った。

2.5 ピークの同定及び定量

既報²⁾と同様の手順でピークの同定及び定量を行った。

3 結果及び考察

3.1 前処理方法の変更点

堀ら³⁾の報告する低温アルカリ分解法を当所用に変更した。変更点は以下 3 点である。

3.1.1 アルカリ溶液添加量

堀らの報告では量り取る血液量が 2 g となっている。当所で量り取る血液量は 3 g であるため、堀らの報告よりもアルカリ溶液添加量をスケールアップした。

3.1.2 抽出用ヘキサン量

堀らの報告では高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能質量分析計（HRGC/HRMS）を用いて分析している。当所で用いる GC-MS/MS は HRGC/HRMS よりも測定感度が低いため、抽出用のヘキサンを増量した。

3.1.3 エタノール添加によるエマルジョンの低減

抽出時のエマルジョンを低減させるため、堀らの報告では遠心分離機を使用して水層とヘキサン層を分離させているが、当所のスケールでは遠心分離機を使用できない。PCB に係る環境基準の測定方法では、エマルジョンの分離改善にエタノールが用いられている⁴⁾。そこで、当所でもエタノールを 0.5 mL 以上添加することにより分離改善を図り、ヘキサン層を確保した。

3.2 総 PCB 濃度

アルカリ分解の温度条件を 30℃に変更した場合も、妨害のない良好なクロマトグラムが得られた。低濃度群検体の代表的な結果を図 1 に示す。本検討における PCB 内部標準物質の回収率は 53～99%で、目標値¹⁾の 50～120%を満たした。定量値の一致性を確認するため、熱アルカリ分解法で得られた濃度値に対する低温アルカリ分解法濃度値の比を算出した。結果を表 3 に示

す。総 PCB 濃度について、濃度比は 0.872～1.033 という結果であり、低濃度群、高濃度群ともに、両試験法間で大きな差は認められなかった。

3.3 「血中 PCB パターン」の判定に用いられる指標異性体の濃度

油症診断項目である「血中 PCB パターン」の判定に用いられる指標異性体の 2,3',4,4',5-PentaCB (#118)、2,2',4,4',5,5'-HexaCB (#153)及び 2,3,3',4,4',5-HexaCB (#156)の各濃度についても、熱アルカリ分解法で得られた濃度値に対する低温アルカリ分解法濃度値の比を算出した。結果を表 3 に示す。各濃度比は 0.828～1.170 となり、低濃度群、高濃度群ともに、両試験法間で大きな差は認められなかった。

4 まとめ

熱アルカリ分解法と低温アルカリ分解法を用いて血液中 PCB 分析を行った。油症診断の指標となる総 PCB 濃度並びに指標異性体である 2,3',4,4',5-PentaCB (#118)、2,2',4,4',5,5'-HexaCB (#153)及び 2,3,3',4,4',5-HexaCB (#156)濃度は、低濃度群、高濃度群ともに、両試験法間で大きな差は認められなかった。熱アルカリ分解法に比べて前処理の安全性及び操作性に優れる低温アルカリ分解法は有用と考えられた。

謝辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）に負うものである。ここに記して謝意を表します。

文献

- 1) 食品衛生検査指針理化学編：公益社団法人日本食品衛生協会，683～694，2015
- 2) 久保記久子，他：GC/MS/MS による血液中のポリ塩化ビフェニルの分析，福岡市保健環境研究所報，31，95～98，2005
- 3) 堀就英，他：血液中 PCB 異性体分離分析におけるアルカリ分解温度の検討，福岡医誌，104(4)，152～160，2013
- 4) 環境庁告示第 59 号：水質汚濁に係る環境基準について，付表 4 PCB の測定方法，昭和 46 年 12 月 28 日

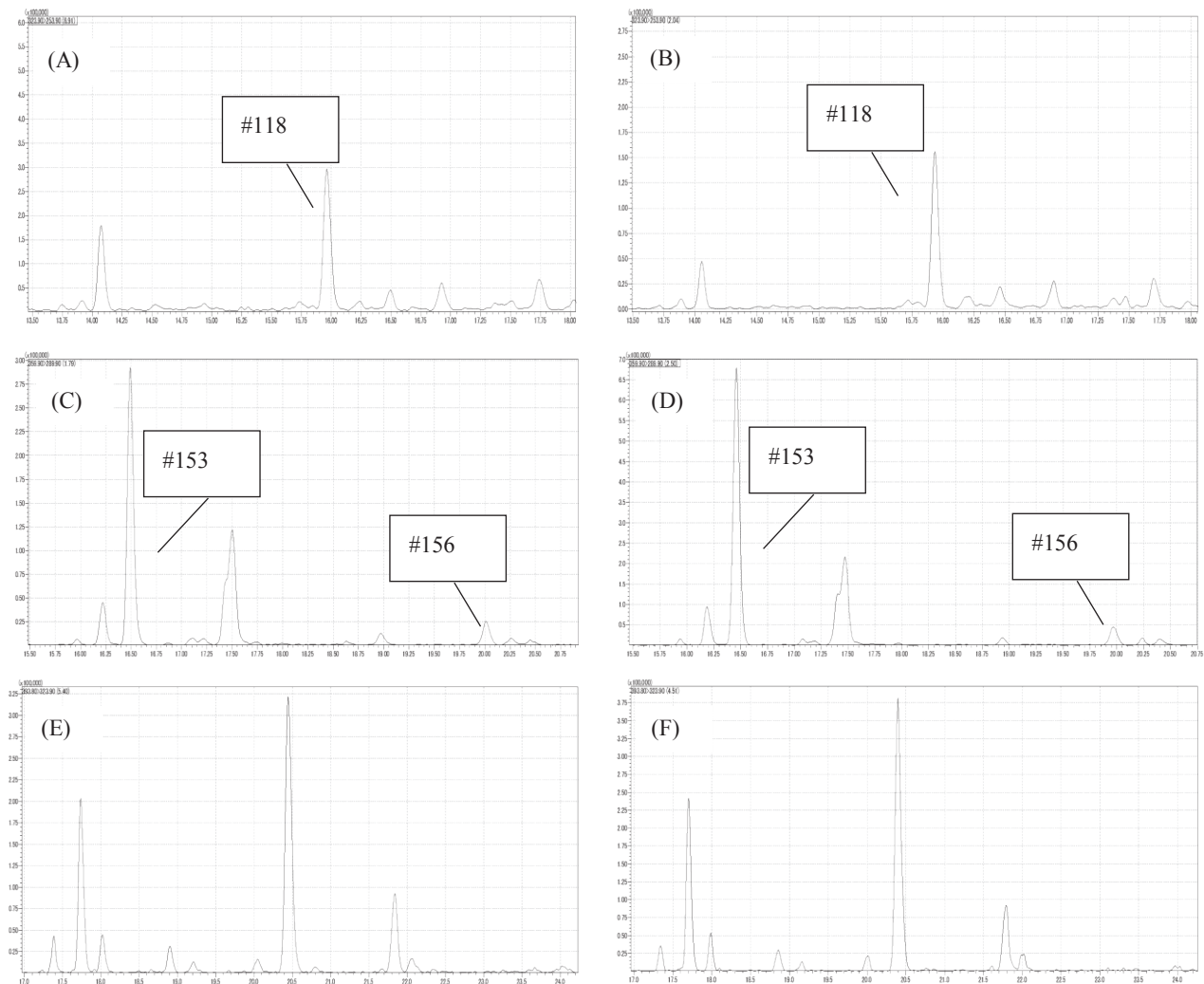


図1 低濃度群検体 (73) のクロマトグラム

- (A) 熱アルカリ分解法 5 塩化物
- (B) 低温アルカリ分解法 5 塩化物
- (C) 熱アルカリ分解法 6 塩化物
- (D) 低温アルカリ分解法 6 塩化物
- (E) 熱アルカリ分解法 7 塩化物
- (F) 低温アルカリ分解法 7 塩化物

表3 各化合物の分析濃度値 (ng/g) 及び熱アルカリ分解法濃度値に対する低温アルカリ分解法濃度値の比

		#118	#153	#156	Total TrCBs	Total TeCBs	Total PeCBs	Total HxCBs	Total HpCBs	Total OcCBs	Total PCBs
低濃度群	熱アルカリ分解法濃度	0.011	0.055	0.013	0.001	0.008	0.011	0.020	0.019	0.022	0.281
検体69	低温アルカリ分解法濃度	0.011	0.057	0.014	0.001	0.006	0.008	0.019	0.018	0.022	0.275
	濃度比	1.053	1.031	1.061	0.905	0.723	0.674	0.957	0.948	1.039	0.977
低濃度群	熱アルカリ分解法濃度	0.019	0.079	0.007	0.003	0.006	0.020	0.024	0.023	0.016	0.336
検体73	低温アルカリ分解法濃度	0.023	0.088	0.007	0.004	0.006	0.014	0.023	0.021	0.016	0.347
	濃度比	1.170	1.118	0.908	1.593	0.923	0.701	0.957	0.937	0.998	1.033
低濃度群	熱アルカリ分解法濃度	0.012	0.068	0.010	0.002	0.007	0.011	0.021	0.025	0.031	0.333
検体128	低温アルカリ分解法濃度	0.010	0.059	0.010	0.001	0.002	0.009	0.016	0.024	0.029	0.295
	濃度比	0.844	0.867	0.998	0.563	0.315	0.778	0.779	0.958	0.949	0.886
低濃度群	熱アルカリ分解法濃度	0.010	0.060	0.004	0.001	0.005	0.010	0.011	0.014	0.012	0.225
検体136	低温アルカリ分解法濃度	0.010	0.049	0.004	0.001	0.002	0.007	0.012	0.011	0.010	0.196
	濃度比	1.006	0.828	1.081	0.970	0.364	0.695	1.050	0.786	0.822	0.872
高濃度群	熱アルカリ分解法濃度	0.036	0.275	0.063	0.004	0.030	0.078	0.113	0.091	0.065	1.308
検体82	低温アルカリ分解法濃度	0.036	0.272	0.062	0.003	0.020	0.061	0.118	0.098	0.066	1.274
	濃度比	0.994	0.990	0.989	0.707	0.671	0.783	1.049	1.080	1.014	0.974
高濃度群	熱アルカリ分解法濃度	0.041	0.597	0.332	0.004	0.023	0.089	0.332	0.301	0.201	3.387
検体134	低温アルカリ分解法濃度	0.042	0.564	0.328	0.001	0.018	0.117	0.361	0.298	0.211	3.338
	濃度比	1.013	0.945	0.987	0.309	0.803	1.310	1.086	0.992	1.051	0.986
高濃度群	熱アルカリ分解法濃度	0.018	0.257	0.227	0.004	0.007	0.041	0.182	0.166	0.124	1.837
検体162	低温アルカリ分解法濃度	0.019	0.240	0.227	0.003	0.006	0.038	0.196	0.165	0.133	1.806
	濃度比	1.020	0.933	1.000	0.980	0.855	0.939	1.075	0.992	1.069	0.983