

GC/MS/MS による血液中のポリ塩化ビフェニルの分析

久保記久子・赤木浩一・畑野和広

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Analysis of PCBs in Human Blood by Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

Kikuko KUBO, Kouichi AKAKI and Kazuhiro HATANO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

血液中のポリ塩化ビフェニル(PCBs)について、GC/MS/MS を用いた分析法を検討した。試料にクリーンアップスパイクとして 5 種類の ^{13}C -PCBs(2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl(#118) ,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))をそれぞれ 0.5ng 添加し、熱アルカリ分解後、ヘキサンで抽出し、市販のシリカゲルカートリッジカラムを用いて精製を行った。測定は 3 ~ 8 塩化物を対象とし、内部標準法により定量を行った。クリーンアップスパイクの回収率は 84.8 ~ 99.2%で、0.002ppb まで検出可能であった。また、定量に支障をきたすような夾雑ピークはほとんど見られなかった。

Key Words : ガスクロマトグラフ/タンデム質量分析 GC/MS/MS, ポリ塩化ビフェニル PCB, 分析 Analysis, 血液 Blood

はじめに

ポリ塩化ビフェニル(PCBs)は 1881 年に Schmidt らにより初めて合成され、我が国では 1954 年に輸入されるとともに生産が開始された。高脂溶性、不燃性、高絶縁性などの優れた物性により 1960 ~ 70 年代を中心に絶縁油や熱媒体などとして多方面に使用された。しかし、このような広範な使用がその化学的安定性により広く環境を汚染することとなり、欧米で 1966 年頃から環境汚染物質として注目され始め、我が国でも 1972 年に生産が中止され、法律^{1),2)}によりその使用、廃棄が厳しく規制されている。

我が国で PCB が大きく取り上げられるきっかけとなったのは、1968 年福岡県、長崎県を中心とした西日本一帯で発生したカネミ油症事件である。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 PCB 等が混入したことが原因で起こった大規模食中毒事件であった。

当所では昭和 49 年より福岡県油症一斉検診に参画し、受診者の血液中の PCBs の測定を行っている。現在、食品中の PCBs の分析法³⁾に準じて、熱アルカリ分解後、充填式カラムで精製を行い、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)を用いて測定しているが、操作が煩雑で前処理に長時間を要している。また夾雑ピークの影響を受けやすく、ピークの判定が困難な場合が多い。

そこで、精製に市販のカートリッジカラムを用い、測定に GC/MS より選択性があり相対感度が高く得られるガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計(GC/MS/MS)を用いた分析法を検討した。

実験方法

1. 試料

健康者の血液を用いた。

2. 試薬等

標準物質：Accu Standard 社製

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) 並びに ,
Cambridge Isotope Laboratories 社製 PCB Window
Defining Mixture(3 塩化物 ; 2,4,6-Trichlorobiphenyl(#30) ,
3,4,4'-Trichlorobiphenyl(#37) , 4 塩化物 ;
2,2',6,6'-Tetrachlorobiphenyl(#54) ,
3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl(#77) , 5 塩化物 ;
2,2',4,6,6'-Pentachlorobiphenyl(#104) ,
3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl(#126) , 6 塩化物 ;
2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl(#155) ,
3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl(#169) , 7 塩化物 ;
2,2',3,4',5,6,6'-Heptachlorobiphenyl(#188) ,
2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl(#189) , 8 塩化物 ;
2,2',3,3',5,5',6,6'-Octachlorobiphenyl(#202) ,
2,2',3,3',5,5',6,6'-Octachlorobiphenyl(#194) , 各 2.5µg/mL)
を使用した .

内部標準物質 (¹³C-PCBs) : Cambridge Isotope
Laboratories 社製 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) , いずれも
40µg/mL n-ノナン溶液を使用した .

標準溶液：標準物質を n-ノナンで溶解後混合し、さ
らに内部標準物質を混合して n-ノナンで適宜希釈した .

クリーンアップスパイク：5 種類の内部標準物質
(#118 , #153 , #156 , #170 , #180) を混合して n-ノナン
で希釈し 5ng/mL に調製した .

シリジンスパイク：内部標準物質(#138) を n-ノナン
で希釈し 5ng/mL に調製した .

蒸留水：ヘキサンで洗浄したものを使用した .

水酸化カリウム：特級を使用した .

シリカゲル：和光純薬工業(株)製 ワコーゲル S-1 を
使用した .

充填式シリカゲルカラム：内径 10mm のリザーバー
付ガラスカラムに、130 で 3 時間以上加熱しデシケー
ター中で放冷したシリカゲル 1.5g を n-ヘキサンに懸濁
し流し入れ、静置後無水硫酸ナトリウムを 5mm 程度積

層し、n-ヘキサン 100mL で洗浄したものを使用した .

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

その他の試薬：PCB 試験用を使用した .

3. 装置

ガスクロマトグラフ：Varian 社製 CP-3800 を使用し
た .

質量分析装置 (MS/MS) : Varian 社製 1200 を使用し
た .

4. 測定条件

1) ガスクロマトグラフ

注入口温度：220

カラム：(株) J&W 社製 DB-5MS+DG (0.25mm i.d. ×
30m, 0.25µm)

カラム温度：130 (2min) - 20 /min - 200
(0min) - 3 /min - 260 (10min)

カラム流量：1.2mL/min

注入量：2µL (スプリットレス)

2) 質量分析計

イオン化電流：150µA

イオン化モード (電圧) : EI (70 eV)

イオン源温度：225

インターフェース温度：250

コリジョンエネルギー：-30eV

モニターイオン：表 1 に示すとおり、各塩化物ごとに
定量イオン、確認イオンを各 1 イオンずつ設定した .

表 1 各塩化物のモニターイオン

PCBs	モニターイオン (m/z)		
	定量イオン	確認イオン	¹³ C-PCBs
3 塩化ビフェニル	258 → 186	258 → 188	
4 塩化ビフェニル	292 → 220	292 → 222	
5 塩化ビフェニル	326 → 256	326 → 254	338 → 268
6 塩化ビフェニル	360 → 290	360 → 288	372 → 302
7 塩化ビフェニル	396 → 324	396 → 326	408 → 336
8 塩化ビフェニル	430 → 358	430 → 360	

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 5g にクリーンアップスパイク 100µL を添加し、
エタノールを加えて 15mL とした . 2mol/L となるよう
水酸化カリウムを加えて 90 で 3 時間アルカリ分解
後、室温まで放冷した . これに蒸留水を加えて 30mL と
し、n-ヘキサン 10mL を加えて 10 分間振とうし、静置
後 n-ヘキサン層を採った . 水層にさらに n-ヘキサン
10mL を加え、同様に抽出した . n-ヘキサン層を合わせ、
蒸留水 5mL で 3 回洗浄した . 無水硫酸ナトリウムで脱

水後，エバポレーターを用いて 1mL まで濃縮して抽出液とした．

2)精製

シリカゲルカートリッジカラムに抽出液を負荷し，n-ヘキサン 6mL で溶出させ，溶出液をスピッツ管に採り，窒素吹き付けで約 1mL まで濃縮した．これにシリンジスパイク 100 μ L を添加し，窒素吹き付けで約 100 μ L まで濃縮し，試験溶液とした．

6. ピークの同定及び定量

PCB Window Defining Mixture に含まれる各塩化物の異性体の保持時間を参考とし，その範囲内に溶出するピークのうち，定量イオン及び確認イオンの強度比が標準物質と概ね $\pm 20\%$ 以内で一致したものを定量対象とした．定量は表 2 のとおり標準物質と内部標準物質との相対感度係数 (RRF) を求めて内部標準法で行った．油症患者の判定に必要な #118, #138, #153, #156, #170, #180 及び #187 については当該標準物質の RRF を用いて，その他については各塩化物の溶出ウィンドウで最初に溶出する標準物質と最後に溶出する標準物質の RRF の平均を用いて定量した．

表 2 定量に用いた標準物質と内部標準物質

PCBs		標準物質	内部標準物質
3 塩化ビフェニル	全異性体	#30, #37	#118
	全異性体	#54, #77	#118
4 塩化ビフェニル	全異性体	#118	#118
	その他	#104, #126	#118
6 塩化ビフェニル	#138	#138	#153
	#153	#153	#153
	#156	#156	#156
	その他	#155, #169	#153
7 塩化ビフェニル	#170	#170	#170
	#180	#180	#180
	#187	#187	#180
	その他	#188, #189	#180
8 塩化ビフェニル	全異性体	#202, #194	#180

表 3 市販カートリッジカラムに各異性体を負荷したときの回収率

PCBs		回収率 (%)					
		0-2mL	2-4mL	4-6mL	6-8mL	8-10mL	total
3 塩化ビフェニル	#30	66.8	15.3	0.0	0.0	0.0	82.1
	#37	51.9	32.6	0.8	0.0	0.0	85.3
4 塩化ビフェニル	#54	13.2	56.8	0.6	0.0	0.0	70.6
	#77	51.2	48.5	1.1	0.0	0.0	100.8
5 塩化ビフェニル	#104	69.3	15.0	0.0	0.0	0.0	84.3
	#118	85.2	12.3	0.8	0.0	0.0	98.3
6 塩化ビフェニル	#126	63.2	26.5	0.0	0.0	0.0	89.7
	#138	76.1	14.1	0.0	0.0	0.0	90.2
	#153	85.3	5.9	0.0	0.0	0.0	91.2
	#155	83.8	5.8	0.0	0.0	0.0	89.6
7 塩化ビフェニル	#156	83.1	11.2	0.0	0.0	0.0	94.3
	#169	75.8	12.7	0.0	0.0	0.0	88.5
	#170	78.2	12.6	0.0	0.0	0.0	90.8
	#180	84.7	4.9	0.0	0.0	0.0	89.6
	#187	99.4	9.1	0.0	0.0	0.0	108.5
	#188	84.5	6.2	0.0	0.0	0.0	90.7
8 塩化ビフェニル	#189	90.8	6.0	0.0	0.0	0.0	96.8
	#194	83.3	7.4	0.0	0.0	0.0	90.7
	#202	82.4	8.3	0.0	0.0	0.0	90.7

結果および考察

1. GC/MS/MS条件の検討

電子イオン化(EI)により各塩化物ごとに SCAN 測定し，最も高い感度が得られたイオンをプレカーサーイオンとした．コリジョンエネルギーを -5 ~ -45eV の間で変化させプロダクトスキャンを行い，各塩化物において最も高い感度が得られたプロダクトイオンを定量イオンとし，2 番目に高い感度が得られたプロダクトイオンを確認イオンとした．なお，コリジョンエネルギーは，いずれの塩化物においても -30eV で最大感度が得られた．

2. 市販シリカゲルカートリッジカラムの検討

現在血液中の PCBs の精製には，充填式シリカゲルカラムを使用している．しかし，これにはガラスカラムの洗浄，シリカゲルの活性化，充填及び洗浄にかなりの時間を要し，操作が煩雑である．また，作業スペースを広く要するため，多くの検体を分析する場合，一度に処理することができない．そこで，市販のシリカゲルカートリッジカラムを用いた精製法について検討した．

シリカゲルカートリッジカラムに各標準物質 0.5ng を負荷し，n-ヘキサン 10mL で溶出させた．溶出液は 2mL ごとに分画し回収率を求めた．各標準物質の回収率を表 3 に示す．2,2',6,6'-Tetrachlorobiphenyl (#54) で 70.5% と若干低い値となったが，これは濃縮時の揮散によるものと考えられる．その他については，82.1 ~ 108.5% と概ね良好に回収された．すべての標準物質が 6mL で完全に溶出したため，n-ヘキサン 6mL でシリカゲルカートリッジカラムから溶出させることにした．

3. 血液の測定

本法を用いて健常者の血液を測定したときのクリーンアップスパイクの回収率を表 4 に示す．回収率は 84.8 ~ 99.2%と良好に回収された．

表 4 クリーンアップスパイクの回収率

¹³ C-PCBs		回収率(%)
5 塩化ビフェニル	#118	87.6
6 塩化ビフェニル	#153	92.2
	#156	98.9
7 塩化ビフェニル	#170	84.8
	#180	99.2

また，カートリッジカラム精製による夾雑物質の除去効果をみるため，充填式シリカゲルカラムとシリカゲルカートリッジカラムを使用した時の健常者の血液中の PCBs の測定値を比較した．表 5 に示すとおり，総 PCBs 濃度は，充填式シリカゲルカラムで 0.437ppb，シリカゲルカートリッジカラムで 0.471ppb と同等の値であった．また，各化合物及び各塩化物ごとの定量値もほぼ同等の値であり，各化合物とも 0.002ppb まで検出可能であった．

表 5 血液中の PCBs の測定値

PCBs		測定値(ppb)	
		充填式	カートリッジ
3 塩化ビフェニル	全異性体	0.002	0.004
4 塩化ビフェニル	全異性体	0.017	0.021
5 塩化ビフェニル	#118	0.025	0.025
	その他	0.027	0.027
6 塩化ビフェニル	#138	0.052	0.055
	#153	0.103	0.113
	#156	0.008	0.008
	その他	0.053	0.050
7 塩化ビフェニル	#170	0.015	0.021
	#180	0.070	0.066
	#187	0.030	0.036
	その他	0.020	0.028
8 塩化ビフェニル	全異性体	0.015	0.017
総 PCBs 濃度		0.437	0.471

シリカゲルカートリッジカラムを用いたときのクロマ

トグラムの例を図 1 に示す．定量に支障をきたすような夾雑ピークはほとんど見られなかった．

本法はカラム精製が簡便で，測定結果のピークの判定も容易であるため，血液中の PCBs の分析法として有用であると考ええる．

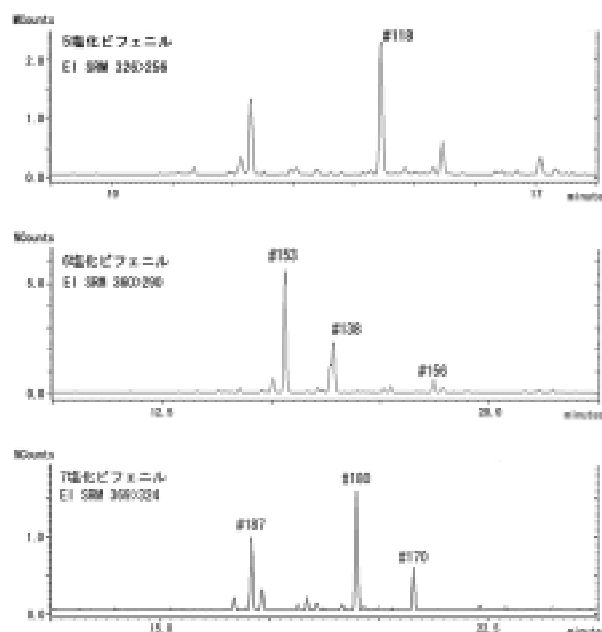


図 1 健常者の血液中のポリ塩化ビフェニルの SRM クロマトグラムの例

文 献

- 1) 法律第 117 号：化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律，昭和 48 年 10 月 16 日公布
- 2) 法律第 137 号：廃棄物の処理及び清掃に関する法律，昭和 45 年 12 月 25 日公布
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，486 ~ 496，金春出版(株)，2005