

(8) LC 用移動相 アセトニトリル-精製水-酢酸 (55+43+2)、アセトニトリル 55 容、精製水 43 容、酢酸 2 容の割合で混合する。必要があればアスピレーター等で脱気する。

(14) オクラトキシン A LC 用検量線溶液
オクラトキシン A 標準液 (2 μ g/ml) を室温に戻した後、40 μ l を正確にシラン処理褐色バイアルにとり窒素カスで溶媒を完全に除去し、40ml の LC 用注入液を正確に加え密栓後、試験管攪拌機等で完全に溶解する (20ng/ml 溶液)。この標準溶液 200 μ l を正確にシラン処理褐色バイアルにとり、1800 μ l の LC 用注入液を正確に加え密栓後、良く攪拌する (2ng/ml 溶液)。

(15) 塩酸-特級

(16) 生理的リン酸緩衝液 (PBS) -Phosphate buffered saline tablet (Supelco)5 粒を 1L の精製水にて溶解 (pH7.4)

(17) PBS-0.01% Tween 20-PBS に 100 μ l の Tween 20 を加え溶解

(18) HPLC 移動相-アセトニトリル+水+酢酸 (55+43+2)

(19) HPLC 注入液-アセトニトリル+水+酢酸 (70+30+1)

(20) 抽出溶媒 - ①アセトニトリル+水 (6+4)、②メタノール+1% 炭酸水素ナトリウム水溶液 (7+3)、③メタノール+3% 炭酸水素ナトリウム水溶液 (1+1)、④メタノール-水 (8+2)

(21) IAC - OchraTest (VICAM), Ochraprep (R-BIOPHARM RHÔNE LTD), RIDA ochratoxin column (R-Biopharm AG), IMSORB-column ochratoxin (Romer Labs)

(22) OTA 標準液-1 μ g/ml (トルエン+酢酸=99+1)

(23) 検量線用 OTA 標準液-0.05, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 ng/ml OTA 標準液 100 μ l をバイアルにとり、窒素気流下で蒸発乾固し、1ml の HPLC 注入液にて溶解 (100ng/ml)、この溶液を用い規定の濃度の標準液を HPLC 注入液にて調製した。各濃度の標準液 100 μ l を HPLC に注入し、検量線を作成した。

を取り付けた (OchraPrep, IMSORB)

III-3 手順

III-3-1 多機能カラム法

<抽出および精製>

(1) 試料を正確に 25.0g 量りとり 200ml の共栓三角フラスコに入れ、多機能カラム用抽出溶媒 100ml を静かに加える。

(2) 振とう器を用いて 30 分間激しく振り混ぜてオクラトキシン A を抽出し、抽出液とする。

(1) ガラスロート (直径 75mm) を 100ml 共栓付き三角フラスコに乗せ、ガラス繊維ろ紙を軽く 4 つ折りにしたものを装着する。

(2) 抽出液を静かにガラスロートに注ぎ、ろ液をとる。

(3) ろ液を正確に 10.0ml とり、10ml 目盛り付き試験管に移し、酢酸 100 μ l を加え良く混合する。

(4) 多機能カラムにリザーバーアダプターを装着し、ガラス注射筒を取り付ける。ガラス注射筒に上記酢酸酸性化ろ液を移し、シリコンで約 2 滴/秒程度の速さでろ液を 10ml 目盛り付き試験管に押し出し、流出液を約 5ml 採取する。

(5) 流出液を十分に混合し、正確に 4 0ml とりシラーン処理褐色バイアルに移す。

(6) 50℃以下にて濃縮装置で濃縮乾固する。

(7) LC 用注入液を正確に 1 0ml 加え、試験管ミキサーで 30 秒間攪拌し、高速液体クロマトグラフに供する試験溶液とする。

(III)-3-2 イムノアフィニティーカラム法 〈抽出および精製〉

(1) 試料を正確に 25 0g 量りとり 200ml の共栓三角フラスコに入れ、イムノアフィニティーカラム用抽出溶媒 100ml を静かに加える。

(2) 振とう器を用いて 30 分間激しく振り混ぜてオクラトキニン A を抽出し、抽出液とする。

(3) ガラスロート（直径 90mm）を 100ml 共栓付き三角フラスコに乗せ、ろ紙を 4 つ折りにしたものを装着する。

(4) 抽出液を静かにガラスロートに注ぎ、ろ液をとる。

(5) ろ液を正確に 8 0ml とり、100ml メスフラスコに移し、イムノアフィニティーカラム用希釈液 [2 (10)] で 100ml に定容し、良く混合する。

(6) ガラスロート（直径 75mm）を 100ml 共栓付き三角フラスコに乗せ、ガラス繊維ろ紙をかるく 4 つ折りにしたものを装着する。

(7) 希釈混合液を静かにガラスロートに注ぎろ液をとる。

(8) イムノアフィニティーカラムを室温に戻し、キリ等で上キャップに穴を開けてから上キャップおよび下キャップをはずし、ストップコックを取り付けたバキュームマニ

ホールド、あるいはカラム下部にストップコックを取り付けカラムスタンドに装着する。

(9) ストップコックを開け、カラム内容液を自然落下で排出させた後、イムノアフィニティーカラム用希釈液約 3ml をカラム内を洗浄するように注ぎ、自然落下で排出させる。ストップコックを閉め、約 2ml のイムノアフィニティーカラム希釈液をカラム内に入れる。カラムにリザーバーアダプターを取り付け、リザーバーを装着する。

(10) 希釈混合ろ液を正確に 50 0ml とり、リザーバーに静かに全量注ぎ、ストップコックを開け、自然落下させる。

(11) 全量流出後、リザーバーおよびアダプターを取り外し、イムノアフィニティーカラム用希釈液 [2 (10)] 約 3ml をカラム内に満たし、自然落下させる。この操作をもう一度繰り返す。

(12) イムノアフィニティーカラム用洗浄液約 3ml をカラム内に満たし、自然落下させる。この操作をもう一度繰り返した後、注射器等を用いてカラムゲル内の溶液を押し出す。

(13) カラムを取り外し、シラーン処理褐色バイアル [1 (17)] 上にセトし、メタノール [2 (2)] 3ml をカラム内に加え、30 秒放置する。注射器等を用いてカラム上から少量の圧を加えながら、約 1 滴/秒の速度でメタノールをバイアル中に溶出させ、最後に空気を通しゲル内のメタノールも溶出させる。

(14) 50℃以下にて濃縮装置で濃縮乾固する。

(15) LC 用注入液を正確に 1.0ml 加え、試験管ミキサーで 30 秒間攪拌し、高速液体クロマトグラフに供する試験溶液とする。

IV 検量線の作成

オクラトキシン A の LC 用検量線溶液を用い、それぞれの濃度から得られたピークの高さを横軸に、オクラトキシン A の濃度を縦軸にとり検量線を作成する

V 測定

高速液体クロマトグラフによる測定条件は次のように行った。

測定条件

カラム ODS カラム (4.6mm i.d. × 250mm, 5μm)

移動相 アセトニトリル、水、酢酸 (55+43+2)

流速 1ml/min

カラム温度 45℃

検出器 蛍光検出器 (励起波長 333nm、蛍光波長 460nm)

注入量 100μl

VI 定量

試料溶液から得られたクロマトグラムから、標準液のオクラトキシン A と溶出時間が同一のピークの高さをもとめ、4 で作成した検量線によって、試験溶液中のオクラトキシン A 量を定量し、試料中のオクラトキシン A 量は次式によって算出する。

オクラトキシン A 濃度 (ng/g) = C (試験溶液中濃度、ng/ml) × 1ml × 25 - 試料量 (g)

C 研究結果

(1) パソリンの測定法

(1)-1 AOAC 995.10 法の妥当性

AOAC 995.10 法を用いた 11 機関による妥

当性試験の結果、クリアタイプリンコンユースおよび混濁タイプリンコンユースの RSD_r は、それぞれ 3.2 および 7.10 であり、RSD_R は、それぞれ 10.0 および 21.68 であった。HORRAT 値は、クリアタイプで 0.5、混濁タイプで 1.16 であり、両者とも良好な値を示した。回収率は、基準値と同等の添加量の場合でも、その半分の添加量でも平均 84%の回収率を示した。

(1)-2 AOAC 2000.2 法の妥当性

AOAC 2000.2 法の妥当性試験は、6 機関で行い、RSD_r はクリアタイプで 3.89%、混濁タイプで 5.68%、RSD_R はクリアタイプ 6.64%、混濁タイプ 11.86%であった。HORRAT 値はクリアタイプでは 0.23、混濁タイプで 0.47 を示した。回収率試験では 49.3ng/g 添加試料では 85.18%、20.2ng/g 添加試料では 87.36%であった。

(1)-3 ケムエルト法の妥当性

ケムエルト法は 5 機関で妥当性試験を行った。その RSD_r は、クリアおよび混濁でそれぞれ 4.57% および 2.37%、RSD_R は、それぞれ 10.04%、11.01%であった。この試験法での回収率は 49.3ng/g 添加試料では 89.55%、20.2ng/g 添加試料では 89.70%であった。

(2) オクラトキシンの測定法

(2)-1 多機能カラム法の評価

多機能カラム法を前処理に用いた場合の回収率は、小麦では 89.6% (低濃度添加) 93.0% (高濃度添加)、コーンでは 77.2% (低濃度添加) 82.62% (高濃度添加)、生コーヒー豆では 146.3% (低濃度添加) 85.8% (高

濃度添加)であった。自然汚染干しふとう (132 ng/g 汚染) の測定値の平均は 170 であった (Table 2)。室内再現性は生コーヒー豆においては 68%を示したが、小麦では両濃度とも 20%以下であり、IAC 法により得られた再現性より低い値を示した。コーンでは低濃度のオクラトキシン A を添加した場合高い値を示したが、これは一機関における分析値の差が大きかったためであると考えられた。高濃度のオクラトキシン A を添加した場合には IAC 法よりも低い値を示した。生コーヒー豆では多機能カラム法も IAC 法もほぼ同じ程度の室内再現性を示した。干しふどうでの室内再現性は 12%であった。

室間再現性は、特に低濃度のオクラトキシン A を添加した生コーヒー豆での回収率は、各機関で大変ばらつきが大きかったため 36%であったが、他の食品ではほぼ 156%から 279%の間であった。干しふどうの室間再現性は 372%と良好な結果が得られた。

(2)-2, IAC 法の評価

IAC 法を前処理に用いた場合の回収率は、小麦では 826% (低濃度添加) 846% (高濃度添加)、コーンでは 785% (低濃度添加) 947% (高濃度添加)、生コーヒー豆では 642% (低濃度添加) 589% (高濃度添加) であった。自然汚染干しふとう (132 ng/g 汚染) の測定値の平均は 112 であった (Table 2)。

小麦およびコーンでの室内再現性は、多機能カラム法とくらべるとやや高めの値を示したが、生コーヒー豆では多機能カラム

法より良好な値が得られた。室間再現性では他の食品でも 25%以下の値を示していた。

D 考察

(1) パツリンの試験法

パツリンの試験法として、3種の試験法を比較検討した結果、回収率はケムエルト法が最もよく、次に AOAC20002 法、AOAC99510 法であったが、多重比較検定では3方法の間ではいずれも有意差は認められなかった。室内再現性 (RSDr) はいずれの方法でも 2-7%の間であった。室間再現性 (RSDr) は、10-21%の間であった。AOAC99510 法では室間再現性が他の測定法に比べてやや高い値を示していたが、これは参加機関の数が多いためであると思われた。しかし、統計学的には回収率と同しく3方法の間で有意差は認められなかった。

さらに妥当性試験に参加した機関の分析者から、汎用性が高く煩雑さの少ない試験法は AOAC99510 法であるとの意見が出され、公定法として AOAC99510 法を適用することとした。

妥当性試験では、測定条件として 276nm を用いた HPLC 法を採用したが、しばしばパツリン溶出位置と同位置に妨害ピークが認められることから、290nm の波長での測定を試みた。その結果、やや感度は 276nm で測定した場合に比べて落ちるが、検出限界 10ppb を十分満たしていることから公定法ではこの波長での測定も可能とした (Fig 1)

(2) オクラトキシン A の試験法

オクラトキシン A の測定法を、多機能カラム法および IAC 法で検討した。食品は

オクラトキシンの報告が多い、小麦、コーン、生コーヒー豆、干しふどうを検討した。

小麦中のオクラトキシン A は、比較的抽出しやすく、夾雑物も少ないことから、多機能カラム法で高い回収率が得られ、室内再現性、室間再現性とも良好であった。IAC 法では多機能カラム法に比べ、やや室内再現性が高かった。コーン中のオクラトキシン A の分析法では、IAC 法がやや高い回収率を示し、室内、室間再現性も良好であった。低濃度より高濃度のオクラトキシン A の方が、回収率が良い傾向が見られた。生コーヒー豆においては、多機能カラム法では夾雑物が多く高めに測定される傾向が認められた。イムノアフィニティー法では、夾雑物は認められなかったが、回収率が低かった。いずれにしても生コーヒー豆に対する分析法は今後検討する必要があると思われた。自然汚染の干しふどうでは、多機能カラム法での分析値は、イムノアフィニティー法に比べ高い値を示しており、イムノアフィニティー法の分析値の方が、干しふどうには適していると思われた。

E まとめ

パツリンおよびオクラトキシンの試験法としての妥当性試験を今年度の課題として行ってきたが、パツリンは妥当性試験に供した3方法の分析値には有意差がみられず、経済的、時間的な観点から AOAC 995 10 法を基本とした抽出、精製法を我が国の公定法として設定した。しかし AOAC 995 10 法では測定は UV 276nm を用いた HPLC 法で

あるが、この波長ではしばしばリンゴ果汁中の不純物に妨害される事例があったため、公定法ではパツリンにより特異性の高い 290nm の波長を使えるようにした。

オクラトキシン A の分析法としては、食品の種類によって、その前処理法を帰る必要があることがわかった。小麦では多機能カラム法が、コーンおよび干しふどうには IAC 法が、適当であると思われた。また、生コーヒー豆の分析法は両者とも良好な結果が得られなかったことから、さらに検討する必要があると考えられた。

F 発表論文

1 論文発表

特になし

2 学会発表

1) 中島正博、新山和人、青_光敏、長南隆夫、会田紀雄、田端節子、久城真代、田中健治、水野和俊、石黒瑛一、金丸直樹、南沢正敏、横浜検疫所 濃野正典、田中敏嗣、神戸検疫所 中家陽子、木船信行 小麦中のデオキシニハレノール分析法の複数機関による評価研究—HPLC 法および ELISA 法について—日本食品衛生学会第 86 回学術講演会 平成 15 年 10 月 岩手

2) 小西良子、長南隆夫、田中敏嗣、吉川邦衛、高鳥浩介、熊谷 進 製粉、調理工程におけるデオキシニハレノールの減衰 日本食品衛生学会第 86 回学術講演会 平成 15 年 10 月 岩手

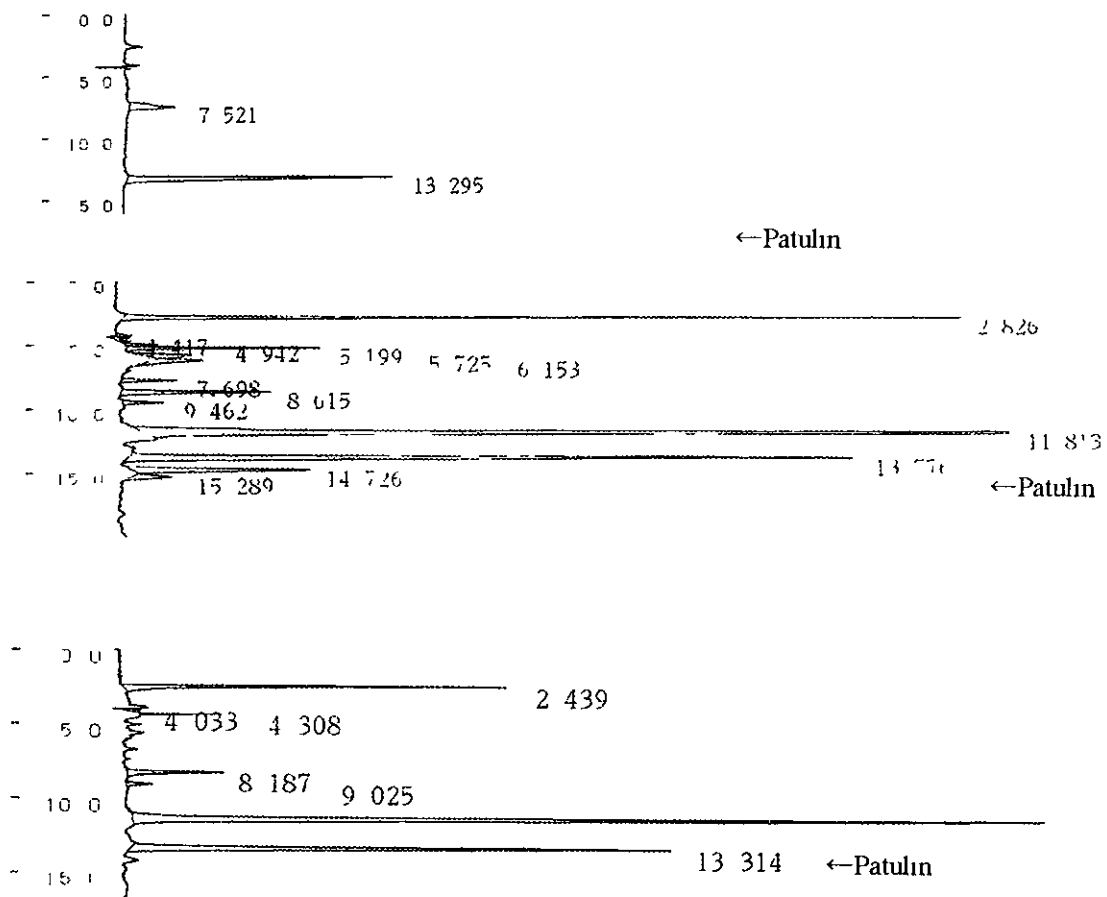


Fig 1 Typical chromatogram of apple juice extract (upper, 276nm) , extract spiked with 49.3 ng/g of Patulin (middle, 276 nm) and extract spiked with 49.3 ng/g of Patulin (lower 290 nm)

資料 2

パツリン試験法（告示法） 平成15年11月

食安発第1126001号

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令及び食品，添加物等の規格基準の一部改正について

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（昭和26年厚生省令第52号 以下「乳等省令」という）及び食品，添加物等の規格基準（昭和34年12月厚生省告示第370号 以下「告示」という）の一部が，それぞれ平成15年11月26日厚生労働省令第170号及び厚生労働省告示第369号をもって改正されたので，下記の事項に留意の上，その運用に遺憾のないようにされたい

記

第1 改正の内容

1 乳等省令関係

乳に残留する動物用医薬品（シヒトロストレプトマイシン及びストレプトマイシン）について，残留基準値及び試験法を新たに設定したこと

2 告示関係

(1) パツリンについて

パツリンは，ペニシリウム属やアスペルギルス属等の真菌によって産生されるかび毒であり，真菌が付着した果実等から検出され，パツリン汚染の可能性の高い主要食品としてりんご果汁が知られている。今般，りんご果汁についてパツリンの汚染実態調査が行われ，一部のものから比較的高濃度のパツリンが検出されたことから，食品安全委員会及び薬事・食品衛生審議会の審議結果を踏まえ，清涼飲料水の成分規格の一部を改正し，りんごジュース及び原料用りんご果汁について，パツリン規格を設定したこと

(2) 動物用医薬品の残留基準について

省略

第2 運用上の注意

パツリンについて

(1) りんごの搾汁及び搾汁された果汁のみを原料とする清涼飲料水とは，果汁分100%のりんごジュース及び原料用りんご果汁であり，りんごジュース（ストレート），りんごジュース（濃縮還元），りんご濃縮果汁等が含まれること。また，香料や酸化防止剤等を添加したも

のを含むものであること

(2) りんこ以外の果実の搾汁や果汁，野菜汁等を含む果実ミックスジュース，果実・野菜ミックスジュース，果汁入り飲料等の清涼飲料水にあつては，原料用りんこ果汁に成分規格を設定することにより，衛生確保を図つたものであること

(3) りんこ濃縮果汁等にあつては，告示の試験法に示したとおり，濃縮した倍数の水で希釈した検体について，基準値が適用されるものであること

第3 施行期日

平成16年6月1日から施行する

<パツリン告示法>

りんこの搾汁及び搾汁された果汁のみを原料とするものにあつては，パツリンの含有量が0.050ppmを超えるものであつてはならない。この場合の試験法は，次に掲げるパツリン試験法又はこれと同等以上の性能を有すると認められる試験法とする

1 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ・質量分析計又はガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる

2 試薬・試液

次に示すもの以外は，第1 食品の部D 各条の項の○ 穀類，豆類，果実，野菜，種実類，茶及びホップの2 穀類，豆類，果実，野菜，種実類，茶及びホップの成分規格の試験法の目の(2) 試薬・試液に示すものを用いる

トリメチルシリル化剤 N,O-ヒス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミド 0.5ml に酢酸エチルを加えて20ml とする

パツリン標準溶液 パツリンを酢酸エチル又はアセトニトリルを加えて溶かし，調製する

3 標準品

パツリン 本品はパツリン98%以上を含む

融点 本品の融点は110～111°である

4 試験溶液の調製

a 抽出法

検体50g（希釈して飲用に供する清涼飲料水にあつてはその飲用に際して希釈する倍数の水で，濃縮した原料用果汁にあつてはその濃縮した倍数の水で希釈したもの）を正確に採り，30～50mlの共栓付き試験管に入れ，酢酸エチル10mlを加える。1分間激しく振り混ぜた後，

静置し、酢酸エチル層を他の 30～50ml の共栓付き試験管に移す。水層に酢酸エチル 10ml を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル層を上記の共栓付き試験管中に合わせる操作を 2 回繰り返す。

b 精製法

a の抽出法で得られた溶液に 15%炭酸ナトリウム溶液 2 ml を加え、速やかに 10～20 秒間激しく振り混ぜる。酢酸エチル層を、約 10 g の硫酸ナトリウムを載せた漏斗又は液層分離ろ紙を用いて減圧濃縮器中にろ過する。残った炭酸ナトリウム層に酢酸エチル 5 ml を加え 30 秒間激しく振り混ぜた後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40° 以下で約 2 ml に濃縮する。これをガラス試験管又はハイアルに移す。次いで、少量の酢酸エチルを用いて減圧濃縮器を洗い、上記の容器に合わせる操作を 3 回繰り返し、40° 以下で窒素気流下で酢酸エチルを除去する。この残留物に酢酸水溶液 (pH 3.6～4.0) 10ml を正確に加えて溶かし、激しく振り混ぜた後、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターを用いてろ過し、これを試験溶液とする。

ガスクロマトグラフ・質量分析計用試験溶液にあつては、上記の残留物にトリメチルシリル化剤 0.5ml を加え、栓をして振り混ぜた後、室温で 60 分間放置し、これを試験溶液とする。

5 操作法

a 定性試験

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いて、次の操作条件で試験を行う。試験結果はパツリン標準溶液と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 シラノール基のフルエントキャップ処理済みオクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5 μm) を用いる。

カラム管 内径 4.0～4.6 mm, 長さ 250 mm のステンレス管を用いる。

カラム温度 40°

検出器 波長 276nm 又は 290nm で操作する。

移動相 アセトニトリル及び水の混液 (4 : 96) を用いる。パツリンは約 14 分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

c 確認試験

① 高速液体クロマトグラフ・質量分析計を用いて試験を行う場合

a 定性試験と同様の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行う 試験結果はパツリン標準溶液と一致しなければならない また、必要に応じてピーク高法又はピーク面積法により定量を行う

② ガスクロマトグラフ・質量分析計を用いて試験を行う場合

次の操作条件で試験を行う 試験結果はパツリン標準溶液について4 試験溶液の調製のガスクロマトグラフ・質量分析計用試験溶液と同様に操作をして得られたものと一致しなければならない また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う

操作条件

カラム 内径 0.25~0.25 mm, 長さ 25~30m のケイ酸ガラス製の細管に, ガスクロマトグラフィー用 35%フェニルポリシルフェニレンシロキサンを 0.25~1.5 μ m の厚さでコーティングしたもの

カラム温度 80° で2分間保持し, その後毎分 10° で昇温する 150° に到達後, 毎分 5° で昇温し, 230° に到達後 15分間保持する

試験溶液注入口温度 230°

注入方式 スプリットレス

検出器 230° で操作する

ガス流量 キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる パツリンが約 14分て流出する流速に調整する

分 担 研 究 報 告

PCB及び水銀試験法の開発に関する研究

堀 伸二郎

15年度 厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）分担研究報告書

食品中の有害物質等の評価に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 松田 りえ子

分担研究者 大阪府立公衆衛生研究所 堀 伸二郎

協力研究者 大阪府立公衆衛生研究所 桑原 克義, 阿久津 和彦

新潟県保健環境科学研究所 酒井 洋

PCB 及び水銀試験法の開発に関する研究

要 旨

1 PCB

1) アルカリ分解、フロリシルカラム精製/キャピラリーカラムーガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)による PCB 異性体分析法を確立した。

2) 上記分析法を用いて、トータルダイエントスタディー試料中の PCBs 異性体分析を行った。

ΣPCBs(3~7 塩化物、10~12 群の合計)の一日摂取量を 80 年代(1982~1988 年)と 90 年代(1992~1999 年)に分けて比較したところ、各々の平均値は $2.8 \mu\text{g}/\text{日}$ および $1.4 \mu\text{g}/\text{日}$ となり PCBs 汚染の低下傾向が認められた。また、PCBs に占める高塩化物(6~7 塩化物の合計)の割合については 80 年代(42~50%、平均 46%)より 90 年代(48~59%、平均 54%)の方が全体的に高い値となり、高塩素化合物主体の汚染傾向が強まっていることが示唆された。なお、いずれの年においても最も摂取量が多かった異性体は 2, 2', 4, 4', 5, 5'-六塩化ヒフェニル(CB-153)であり、PCBs の 9~15%を占めていた。

2 水銀

1) 従来法を用いて総水銀及びメチル水銀の測定を行った。

2) メチル水銀については、従来法のパノクドカラム ECD/GC 法よりより精密なキャピラリーカラム GC/MS 法を開発した。従来法との比較検討の結果、両分析法の間に高い相関が認められた。

3) メチル水銀分析における直接抽出法とアルカリ分解-シチゾン抽出法を比較検討した。その結果、両分析法の間で差異は認められなかった(相関係数)。

4) メチル水銀の実態調査は、日本で食されている 6 種類(銀ダラ、アラスカメヌケ、本メヌケ、キンメダイ、トチザメ、シロザメ(4 試料))の魚類について総水銀及びメチル水銀を測定した。

各魚類のメチル水銀濃度の平均値は、銀ダラ(7 試料) $0.18 \text{ mg}/\text{kg}$ ($0.03 \sim 0.37$)、アラスカメヌケ(3 試料) $0.21 \text{ mg}/\text{kg}$ ($0.08 \sim 0.31$)、本メヌケ(7 試料) $0.27 \text{ mg}/\text{kg}$ ($0.17 \sim 0.45$)、キンメダイ(10 試料) $0.48 \text{ mg}/\text{kg}$ ($0.27 \sim 0.83$)、トチザメ(3 試料) $0.41 \text{ mg}/\text{kg}$ ($0.30 \sim 0.61$)、シロザメ(4 試料) $0.05 \text{ mg}/\text{kg}$ ($0.04 \sim 0.08$)であった。

I PCB 試験法の開発に関する研究

I-1 キャピラリー-GC/MS による食品中の PCBs 異性体分析

A 研究目的

学物質の環境・食品汚染を介したこれら化合物のヒトにたいする暴露や健康影響に関する国民の不安が近年、内分泌かく乳化学物質をはしめ種々の化

広がり、社会的関心が高まっている。これら化合物のヒトへの暴露はその90%以上が食事を介して行われる。そこで、ヒト暴露評価を行うには、食品中のPCB及び水銀の正確な汚染レベルを把握する必要があり、GLPに適応した精密な測定方法の確立が不可欠である。本研究では、食品中のPCB及び水銀濃度測定について、抽出、精製、分析等における技術的検討を行うと共に、施設整備、機器及び試薬等の整備・管理等、測定の信頼性の確保に関する手法を確立する。

B キャピラリーGC/MSによる食品中のPCBs異性体分析法

1 概要

本試験法では、食品試料中のPCBsを抽出後、熱アルカリ分解および活性フロリシラカラムクロマトグラフィーを行い、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)の選択イオン検出法(SIM)を用いて定性・定量する方法について示した。しかし、本試験法以外の手法であっても、実証試験等を行い、本試験法に示した手法と同等あるいはそれ以上の性能を有することが客観的に証明されたものであれば、その採用を妨げるものではない。

本試験法は魚介類、肉類、卵類、牛乳・乳製品類に適用できる。定量はサロゲート物質(¹³C-PCBs)を内標準とした同位体希釈法を用いて各ピークあるいは各塩素数毎に行う。1異性体あたりの検出限界は0.001ppm以下を目標とする。

2 試薬

- 1) 対象物質標準溶液 食品中で比較的高濃度に存在する主要PCBs異性体(例 6塩化物であれば#153、#138など)が3~7塩化物の各グループにつき最低1種類は含まれている市販標準混合溶液(例 Wellington LaboratoriesのBP-MS、Cambridge Isotope Laboratories(CIL)のEC-1431)。
- 2) 溶出ウィンドウ決定用標準溶液 PCBsの#19、#37、#54、#77、#104、#126、#155、#169、#188、#189

が含まれている市販混合溶液(例 Wellington LaboratoriesのBP-MS、BP-WD)。これらを用いて3~7塩化物のGCカラム溶出ウィンドウを決定する。代用品としてカネクロール製品(KC-300~KC-600)等量混合溶液(以下KC-mix)を用い、そのクロマトグラムパターンから各塩化物の概ねの溶出ウィンドウを決定しても良い。

- 3) サロゲート物質 ¹³Cで標識化した3~7塩化物の主要PCBs異性体(ノノオルトコプラナー体以外の異性体)を各グループにつき1種類以上含む市販標準混合溶液(例 Wellington LaboratoriesのMBP-CG、CILのEC-4189)

- 4) 蒸留水 ヘキサンで十分に洗ったもの。ノナンダイオキシン類分析用(または濃硫酸で洗浄した特級品)。水酸化カリウム(KOH) 特級。KOHエタノール溶液はKOHを少量の水に溶解した後エタノールを加えて調製する。フロリシル 60~100メッシュ、130℃で一夜加熱した後、デシケーター中で放冷したもの。その他の試薬 残留農薬・PCB試験用

3 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS) GCはキャピラリーカラム対応で300℃以上までの正確な昇温制御が可能なカラムオープンか付属したもの。MSは二重収束型MSまたは四重極型MS。

1) 測定条件

使用カラム キャピラリーカラム(例 長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25μm)。

液相 5%シフェニル/95%ジメチルポリシロキサン(例 Restek社Rtx-5MS、J&W社DB-5MS)または100%シメチルポリシロキサン(例 Restek社Rtx-1MS、J&W社DB-1MS)等

カラム温度 (例) 130℃(2分)-15℃/分-180℃-3℃/分-260℃-20℃/分-300℃(3分)

注入法 スプリットレス法、パーシ開始時間 15分

注入量 2μL

注入口温度 250℃

キャリアーガス He、1mL/min

イオン化条件 電子イオン化 (EI) 法、

イオン源温度 装置指定温度、

イオン化電圧 30~70eV

分解能 1000 以上が望ましい。

検出モード SIM (原則として各塩化物ごとのグループ設定は行わずに1回の注入で測定する)

2) Native-PCBs のモニターイオンおよびイオン強度比 (塩素同位体の天然存在比として ^{35}Cl 75.77%, ^{37}Cl 24.23% を用いて計算した場合の理論値)

3 塩化ヒフェニル 255 96 257 96 (100 96)

4 塩化ヒフェニル 291 92 289 92 (100 78)

5 塩化ヒフェニル 325 88 327 88 (100 64)

6 塩化ヒフェニル 359 84 361 84 (100 80)

7 塩化ヒフェニル 393 80 395 80 (100 96)

3) ^{13}C -PCBs (IS) のモニターイオンおよびイオン強度比

3 塩化ヒフェニル 268 00 270 00 (100 96)

4 塩化ヒフェニル 303 96 301 96 (100 78)

5 塩化ヒフェニル 337 92 339 92 (100 64)

6 塩化ヒフェニル 371 88 373 88 (100 80)

7 塩化ヒフェニル 405 84 407 84 (100 96)

4 試験溶液の調製

1) アルカリ分解 試料 10~20g (油脂分として 3g 以下) を 200~300mL 容量のナス型フラスコに (試料がフラスコ上部に付着しないように注意しながら) 採取し、クリーンナノプスパイク (サロゲート物質) として 3~7 塩化物の異性体を含む ^{13}C -PCBs (0.5~100ng、測定装置の感度による) を添加した後、1~2mol/L NaOH (または KOH) エタノール溶液 50~100mL を加え、還流冷却器をつけ、沸騰水浴上で 1 時間還流した後、約 50°C まで冷却する。冷却管上部からヘキサン 50~200mL を加えた後、室温まで放冷する。

これを分液漏斗に移し、蒸留水 50~100mL を加え、激しく振とうする。静置後ヘキサン層を採取し、水層はさらにヘキサン 50~100mL で同様に抽出する。

ヘキサン層を合わせ、蒸留水 50~100mL で 3~4 回洗う。ヘキサン層に残留する水滴を無水硫酸ナトリウムで除去後、溶液をクデルナ・ダニシユ型濃縮器あるいはロータリーエバポレーターを用いて約 5mL に濃縮する。

2) フロリシルカラムクロマトグラフィー 長さ 30cm、内径 1cm 程度のクロマト管にフロリシル 5g をヘキサンによる湿式で充填し、さらに無水硫酸ナトリウムを 3g 程度積層する。ヘキサン 50 mL でカラムを洗浄した後、液面を無水硫酸ナトリウム層の上端部に合わせる。

上記アルカリ分解で得た抽出濃縮液をカラム上端に負荷し、毎分 5mL 以下の割合に流量を調節する。溶出液は 100~200mL 容量のナス型フラスコで回収する。液面を無水硫酸ナトリウム層の上端部まで下げた後、容器のヘキサン洗液 (約 5mL) をカラムに加える。カラム内壁を少量のヘキサンで洗った後、さらにヘキサン 50mL で溶出し、溶出液をロータリーエバポレーターを用いて約 1mL に濃縮する。濃縮液を濃縮用試験管に移した後、シリンスパイク (クリーンナノプスパイクと異なる ^{13}C -PCB 異性体 0.5~100ng、測定装置の感度による) およびノナン 0.1~1mL を正確に添加し、添加したノナンと同量の液量になるまで窒素吹きつけにより緩やかに濃縮する。濃縮後、タノチミキサー等で試験管の下部壁面を洗うようにしながら溶液を十分に混和し試験溶液とする。

5 測定値の算出

1) 標準溶液の測定

分析法の検出限界付近と予想される検出濃度レベルを含む 3~5 段階程度の標準混合溶液 (シリンスパイクおよびサロゲート物質濃度は全溶液共通) 2 μ L を測定し、次式から相対感度係数 (RRF) を求める。

$$\text{RRF} = (\text{As} \times \text{C}_{1s}) / (\text{A}_{1s} \times \text{Cs})$$

ここで、

As 分析対象物質の定量イオンにおけるピーク面積

C_{1s} 標準溶液中の内標準物質の濃度 (ng/mL)

A_{1s} 内標準物質の定量イオンにおけるピーク面積

C_s 標準溶液中の分析対象物質の濃度 (ng/mL)

各段階濃度から得られた RRF を平均し、その平均 RRF を用いて試料溶液中の各対象異性体を定量する。RRF の相対標準偏差は 20%以下になることが望ましい。なお、標準溶液中に含まれない異性体については各同族体を代表する RRF (標準溶液に含まれる同一塩素数の全異性体の平均 RRF) を用いて定量する。食品中に残留する主要な PCBs の定量イオンのピーク面積は同一塩素数であれば概ね同程度の値であり、代替 RRF を用いることによる各同族体濃度の定量誤差は通常 10~20%未満である。

2) 試料の測定

(1) 同定、定量及び計算

対象物質の有無の確認後、存在する場合は定量を行う。また、シリシスパイクを用いてサロゲートの回収率を求める。サロゲートの回収率が 50~120% の範囲を大きく外れる場合は原因を解明し、必要であれば再分析を行う。

①同定

PCB 溶出ウイントウ決定標準溶液には、5%フェニル/95%シメチルポリシロキサヌまたは 100%シメチルポリシロキサヌ系の液相を用いて測定した場合に、各塩化物の中で最初と最後に溶出する異性体の組み合わせが含まれている。各塩化物グループに共通する特徴として、ベンゼン環のオルト位 (2, 2', 6, 6' の位置) に最大数の塩素が置換した異性体 (#19, #54, #104, #155, #188) が最初に GC カラムから溶出し、オルト位に塩素が置換していないノンオルト (#37, #77, #126, #169) あるいはモノオルトコブラーナ異性体 (#189) が最後に溶出する。これらの保持時間から各塩化物の溶出ウインドウを決定する。

実試料においては PCB 溶出ウイントウの範囲に入るピークで、対象物質の定量イオン及び確認イオンのピーク面積比が理論値 (または標準品のピーク面積比) と ±20%以内で一致するものを定量対象とする。ただし、簡便なスクリーニング分析においてはピーク面積比の確認作業を省略し、各同族体の定量イオン及び確認イオンにおける溶出ウイントウ全体のクロマトグラムパターンを目視で比較して、明らかに両者の間でパターンが異なっている部分のピークを除外した後、残りのピークについて定量を行うという方法を用いても良い。なお、保持時間等から判別可能な高塩化物のフラグメントイオンピークは可能な限り除外して定量することか望ましいか、一般の食品試料では高塩化物のフラグメントイオンピークの干渉か全体の総 PCBs 値に及ぼす影響は極めて小さいので、スクリーニング分析においてはこれらの面積を含めて一括定量しても差し支えない。

②定量

標準溶液から求めた各異性体の RRF あるいは代表的な RRF を用いて、次式から各ピークごとの検出量 (μg) を求める。

$$\text{各異性体の検出量}(\mu\text{g}) = (\text{As} \times \text{C}_{1s}) / (\text{A}_{1s} \times \text{RRF})$$

ここで、

As 各異性体の定量イオンにおけるピーク面積

A_{1s} サロゲート物質の定量イオンにおけるピーク面積

C_{1s} 試料に添加したサロゲート物質質量 (μg)

各異性体の検出量 (μg) を合計した後、前処理に用いた試料量 (g) で除し、総 PCBs 濃度 (ppm) を算出する。

なお、より簡便なスクリーニング法として、同一塩素数の全異性体ピーク面積を合計後、各同族体を代表する RRF のみを用いて一括定量しても差し支えない (次式)。

$$\text{各同族体の合計検出量}(\mu\text{g}) = (\sum \text{As} \times \text{C}_{1s}) / (\text{A}_{1s} \times \text{RRF})$$

ここで

ΣAs 各同族体の定量イオンにおけるピーク面積の合計値 (例 3 塩化物の場合は#19~#37 の溶出ウイントウ内の全対象ピークの面積合計値)

A_{1s} サロゲート物質の定量イオンにおけるピーク面積

C_{1s} 試料に添加したサロゲート物質質量 (μg)

各同族体の検出量 (μg) を合計した後、前処理に用いた試料量 (g) で除し、総 PCBs 濃度 (ppm) を算出する。

6 注解

1) PCBs 標準品および魚介類試料のクロマトグラムを図 1 に、魚介類における主要異性体の検出パターン例を図 2 に示す。一般に動物性食品に残留する PCBs の大部分 (魚介類では平均 95%程度) はカネクロール製品中に存在する 3~7 塩化ヒフェニルによって占められており、便宜上「3~7 塩化ヒフェニルの合計濃度=総 PCBs 濃度」と近似することか可能である。本法は、高選択性の GC/MS により 3~7 塩化ヒフェニルを一斉分析し、その定量結果に基づき総 PCBs 濃度のスクリーニング判定を行うものである。

2) 試験溶液調製法の概略を図 3 に示す。8~10 塩化ヒフェニルは熱アルカリ分解処理によって著しく分解することか知られているが、一般の動物性食品ではこれらの高塩素化物の相対濃度が低く、分解による影響が実質的に問題とならないので熱アルカリ分解を適用することができる。特殊な事情によりこれらの高塩化物を対象とした分析を実施する場合には室温条件下でのアルカリ分解 (室温一晚放置、数時間振とう) や濃硫酸処理など高塩化物が分解しない穏和前処理法を用いる必要がある。また、比較的揮発性が高い 1、2 塩化ヒフェニルを分析対象とする場合には濃縮時の対象物の揮散や作業環境由来のコンタミネーションに特に留意せねばならない。

3) 参考資料として以下に 1、2、8、9、10 塩化ヒフ

ェニルのモニターイオン例およびイオン強度比 (理論値) を示す。1~10 塩化物ヒフェニルを対象とした分析を行う場合、測定チャンネル数の制限や感度面の問題から 1 回の試料注入による一斉分析は困難であり、異なるモニターイオン条件で 2 回に分けて試料を注入することか必要となる。なお、各種キャピラリーカラムにおける 1~10 塩化ヒフェニル全 209 異性体の相対保持時間については、Frame の報告に詳しい (文献 1)。

Native-PCBs のモニターイオンおよびイオン強度比 (理論値)

1 塩化ヒフェニル	188 04	190 04	(100 32)
2 塩化ヒフェニル	222 00	224 00	(100 64)
8 塩化ヒフェニル	429 76	427 76	(100 89)
9 塩化ヒフェニル	463 72	461 72	(100 78)
10 塩化ヒフェニル	497 68	499 68	(100 85)

^{13}C -PCBs (IS) のモニターイオンおよびイオン強度比

1 塩化ヒフェニル	200 08	202 08	(100 32)
2 塩化ヒフェニル	234 04	236 04	(100 64)
8 塩化ヒフェニル	441 80	439 80	(100 89)
9 塩化ヒフェニル	475 76	473 76	(100 78)
10 塩化ヒフェニル	509 72	511 72	(100 85)

4) 本法で採用している熱アルカリ分解 フロリシルカラムクロマトグラフィーによる前処理法は従来の食品中 PCBs 分析で汎用されてきた手法であり、通常の操作手順に従えば良好な (80~100%) 総 PCBs 回収率が得られることが経験的に確かめられている。本法では原則的に PCBs の回収率補正が可能な同位体希釈法を用いるか、サロゲート化合物の入手が困難である場合、シリンススパイクのみを用いて定量を行っても差し支えない。その場合は定量計算式における A_{1s} 、 C_{1s} を各々「シリンススパイクのモニターイオンにおけるピーク面積」、「試験液に添加したシリンススパイク物質質量 (μg)」に置き換えて計算する。なお、シリンススパイクに ^{13}C -PCB 以外の任意の代替物質を用いても差し支えない。

5) ノンオルトコプラナーPCBs (#37、#77、#81、#126、#169) は活性フロリシルカラムからの溶出が遅く本法で用いているヘキサン 50mL の溶出条件では十分に回収されないため、これらの ^{13}C 標識化物を同族体を代表するサロゲートとして使用しないこと。なお、上述した理由により本法ではノンオルトコプラナーPCBs を精度良く測定することはできないが、一般に食品中におけるこれらの異性体の相対濃度は低いので、全体の PCBs 濃度からみるとその定量誤

差は実質的に無視できる範囲内である。

6) PCBs 全異性体の構造式および対応する IUPAC No の一覧を表 1 に示す。

【文献】

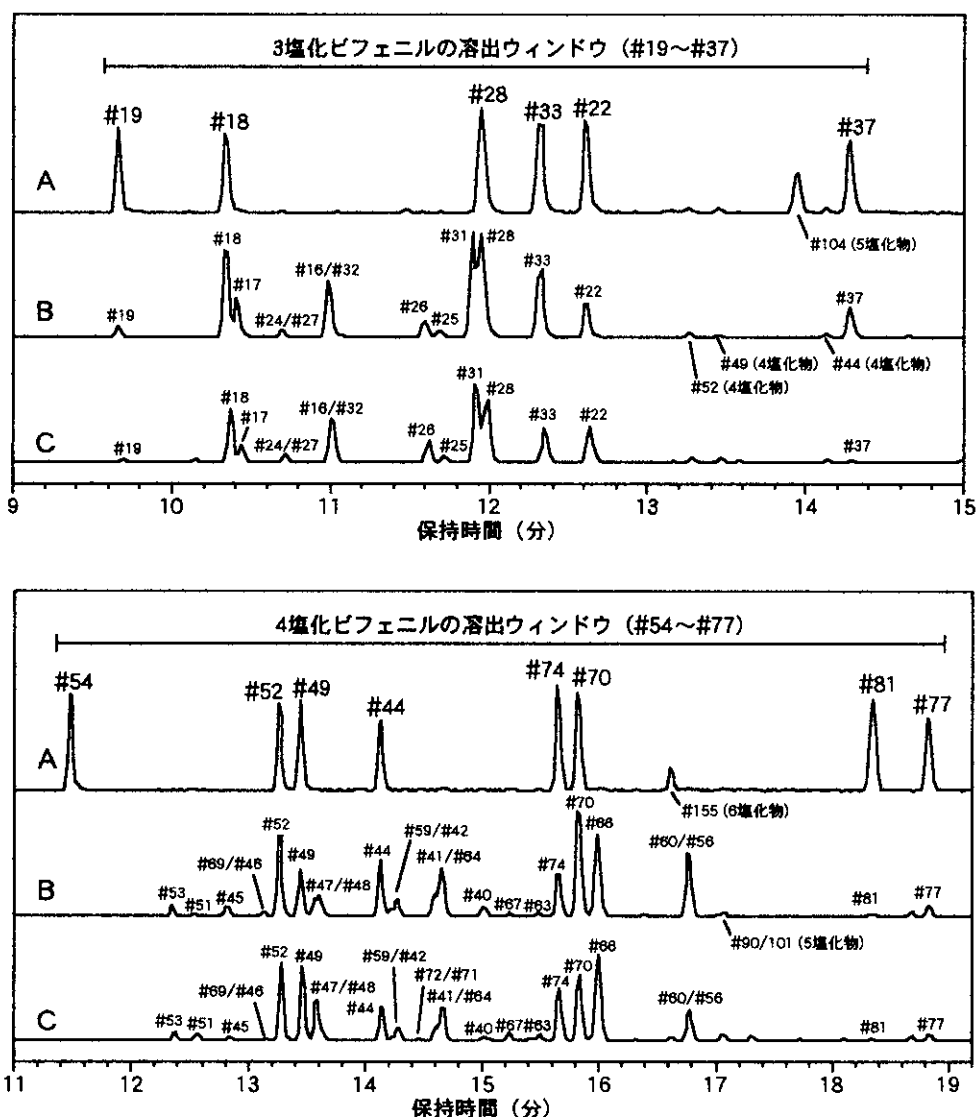
1) Frame G M "A collaborative study of 209 PCB congeners and 6 Aroclors on 20 different HRGC columns 1 Retention and coelution database", Fresenius J Anal Chem, 357, 701-713 (1997)

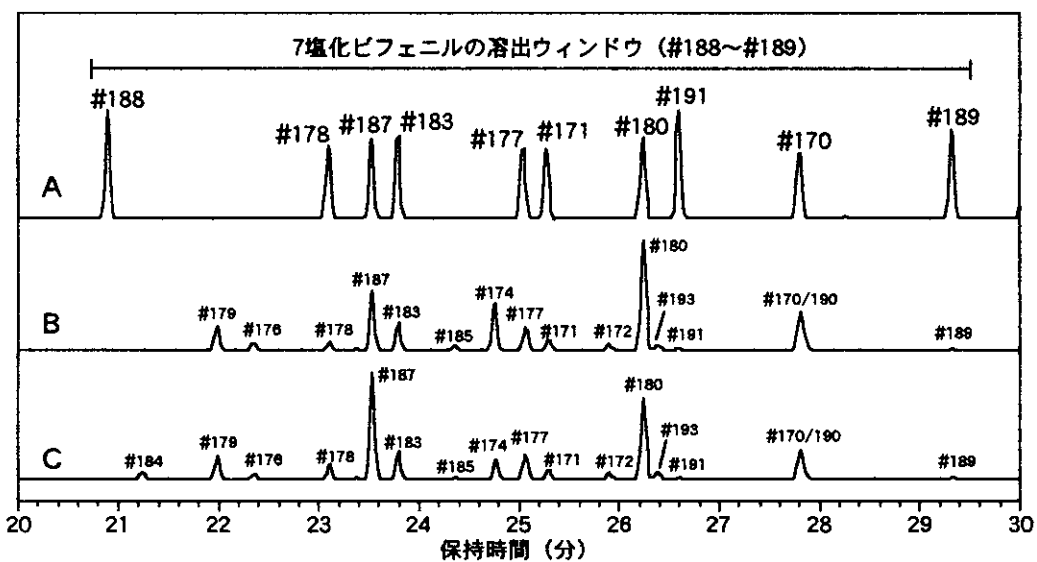
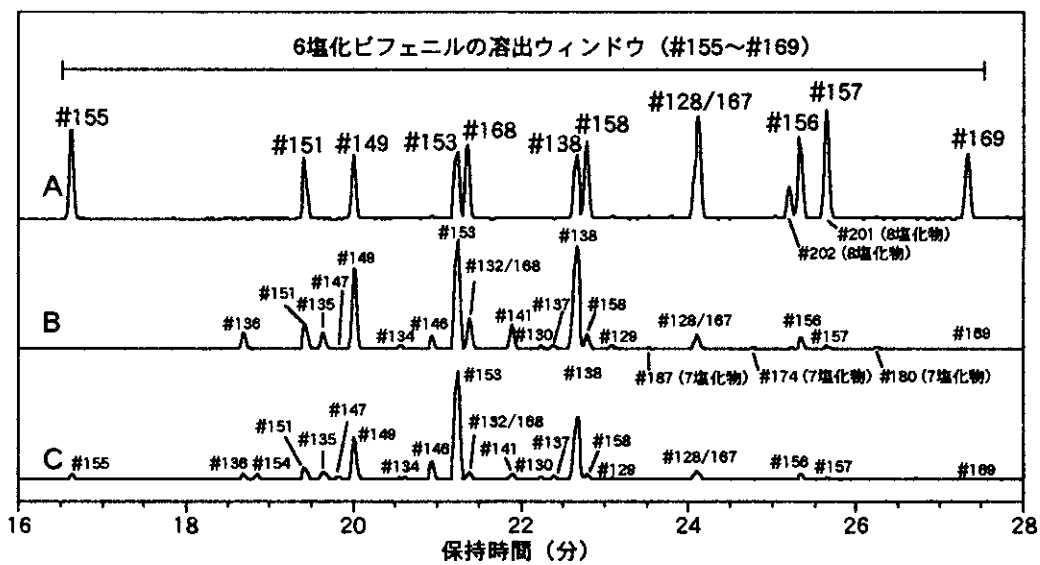
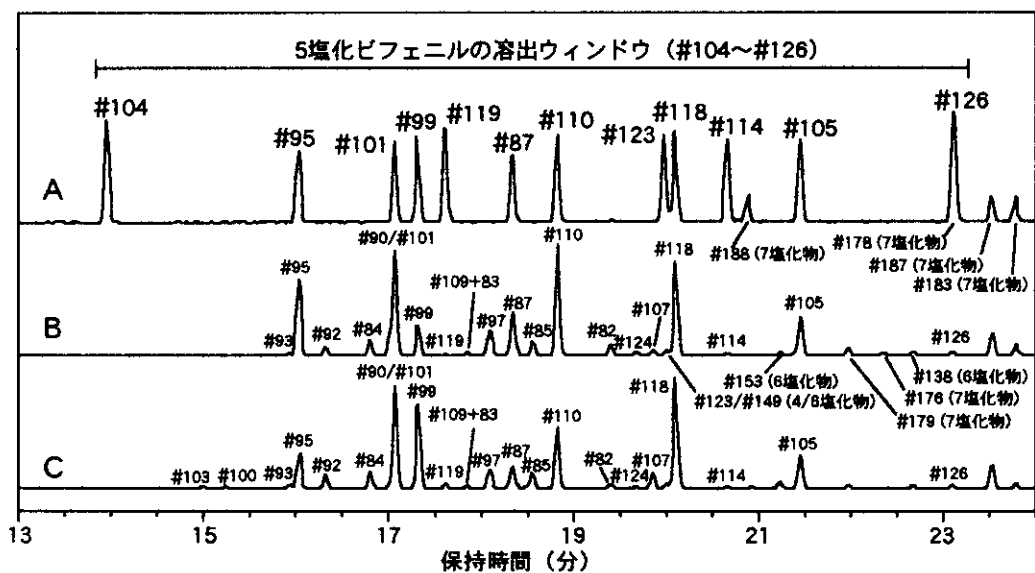
図 1 3~7 塩化ビフェニルの GC/MS(SIM)クロマトグラム ($m/z=255\ 96, 291\ 92, 325\ 88, 359\ 84, 393\ 80$)

A 市販 PCBs 標準溶液 (Wellington Laboratories 製 BP-MS、各 4ng/mL)

B 4 種カネクロール等量混合溶液 (KC-300 400 500 600=1 1 1 1、 $2\ \mu\text{g/mL}$)

C 魚介類試料





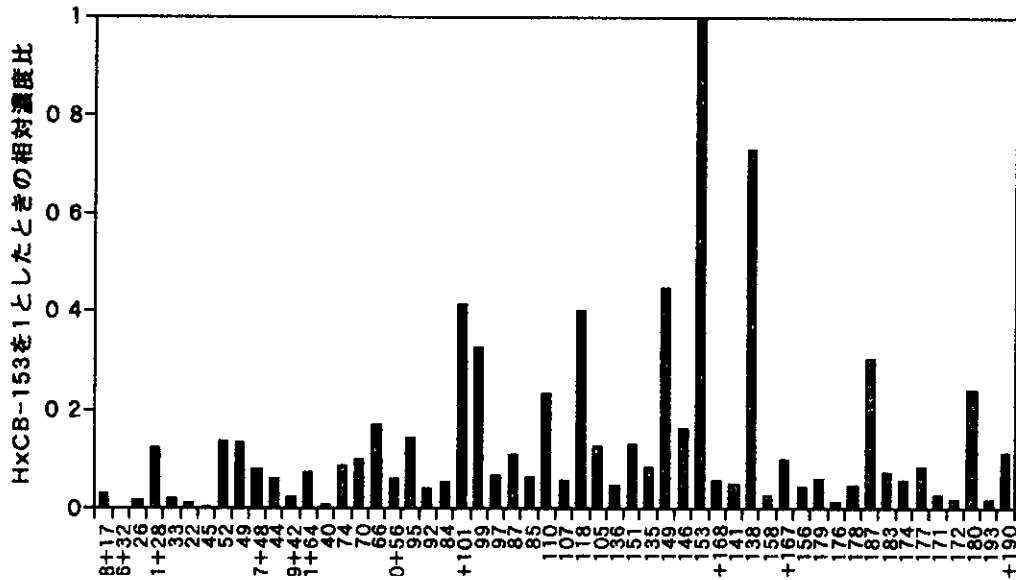


図 2 魚介類における主要異性体の検出パターン

試料10~20g

クリーンナプスパイク (サロゲート物質) 0.5~100ng
 1~2mol/L KOHエタノール溶液 50~100mL

加熱還流アルカリ分解 1時間

ヘキサン50~100mL
 内容物を分液漏斗に移し水50~200mLを加える

振とう抽出 (ヘキサン50~100mL、2回)

ヘキサン層

水50~100mLで洗浄 (3~4回)
 無水硫酸ナトリウムで脱水

濃縮 (約5mL)

活性フロリジルカラムクロマトグラフィー

ヘキサン50mLで溶出

濃縮 (約1mL)

シリンジスパイク 0.5~100ng
 ノナン 0.1~1mL

窒素吹きつけ濃縮

添加したノナンと同量の液量になるまで緩やかに濃縮

試験溶液

図3 試験溶液調製法の概略

I-2 トータルダイエントスタディー試料中の PCBs 分析

A 研究目的

ポリ塩化ビフェニル(PCBs)は1960-70年代に絶縁油や熱媒体として大量に使用された高蓄積性・難分解性の化合物であり、近年では内分泌攪乱物質の一つとして問題視されている。PCBsには毒性の高いコプラナー異性体の他にも数多くの異性体が存在し、各々生体内での吸収・代謝排泄率が異なることが知られている。近年、我が国ではダイオキシン類調査の一環として食品中のコプラナーPCBsの研究が進み、その組成分布や経年的な変化が明らかにされつつある。一方、その他の非コプラナーPCBsについては情報が少なく不明な点が多い。環境食品中に残留するPCBsの大部分は非コプラナーPCBsであり、その組成分布と経年変化を明らかにすることは、PCBsの汚染ルートや環境生体内挙動の解明に有用と考えられる。今回、演者らは低分解能の卓上型GC/MSを用い、過去20年間分のトータルダイエントスタディー試料(10~12群)中の主要PCB異性体(3~7塩素化体)の分析を行い、それらの一日摂取量の推移について調べた。

B 研究方法

1 試料

トータルダイエントスタディー法に基づき大阪地区で1982~2001年の期間に調製された14食品群のうち、PCBsの一日摂取量における寄与が大きい10群(魚介類)11群(肉・卵類)・12群(乳製品)の長期冷凍保存試料(各群15検体、計45検体)を分析対象とした。

2 分析方法

PCB異性体分析は「I-1 キャピラリーGC/MSによる食品中のPCBs異性体分析」に従って分析した。

C 結果及び考察

PCBs(3~7塩化物, 10-12群の合計)の一日摂取量を80年代(1982-1988年)と90年代(1992~1999年)に分けて比較したところ、各々の平均値は28μg/

日および14μg/日となりPCBs汚染の低下傾向が認められた。また、PCBsに占める高塩化物(6-7塩化物の合計)の割合については80年代(42~50%、平均46%)より90年代(48~59%、平均54%)の方が全体的に高い値となり、高塩素化物主体の汚染傾向が強まっていることが示唆された(図1~図5)。なお、いずれの年においても最も摂取量が多かった異性体は2,2',4,4',5,5'-六塩化ビフェニル(CB-153)であり、PCBsの9-15%を占めていた(図6)。

D 結論

ヒトが傾向的に暴露するPCBs量は経年的に減少していた。また、異性体組成は80年代より90年代の方が高塩素化物主体に変化していた。

E 研究発表

1 論文発表

1) Yoshimasa Konishi, Katsuyoshi Kuwabara, Shinjiro Horii, Continuous Monitoring of PCB Isomers in Human Breast Milk from 1973 to 2000 in Osaka, Japan, Organohalogen Compounds, 63, 441-444(2003)

2 学会発表

1) 阿久津和彦、桑原克義、堀伸二郎、卓上GC/MSによる食品中のPCBs異性体分析 -パノクトカラムGC/ECD法との比較-、日本食品衛生学会第86回学術講演会、2003年10月30日(盛岡)
2) 桑原克義、村上保行、小西良昌、阿久津和彦、堀伸二郎、卓上GC/MSによるトータルダイエントスタディー試料中のPCBs分析、日本食品衛生学会第86回学術講演会、2003年10月30日(盛岡)