

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表・その他

高菅卓三, 松神秀徳, 嶽盛公昭
GC-HRTOFMS による環境試料の高感度・高精度スクリーニング分析の有用性評価; 第18 回環境化学討論会, 講演要旨集, 541 (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

1. 嶽盛公昭ら; 第 16 回環境化学討論会講演要旨集, 374 (2007)
2. 嶽盛公昭ら; 第 17 回環境化学討論

会, 講演要旨集, 368 (2008).

3. 松神秀徳ら; 第 11 回日本水環境学会シンポジウム, 講演集, 148 (2008)
4. 高菅卓三ら; 第 19 回廃棄物学会研究発表会, 講演論文集Ⅱ, 878 (2008)
5. 松神秀徳ら; 第 16 回環境化学討論会講演要旨集, 1501 (2007)
6. Takasuga T. et. al.;
Organohalogen Compounds; 69, 1134 (2007)
7. Matsukami H. et. al.;
Organohalogen Compounds; 69, 1218 (2007)
8. 高菅卓三ら; 第 17 回環境化学討論会, 講演要旨集, 541 (2008)
9. 松神秀徳ら; 第 17 回環境化学討論会講演要旨集, 52 (2008)
10. Matsukami, H., et. al.;
Organohalogen Compounds; 70, 46 (2008)

表1 GC-TOFMSの分析条件

GC	HP 6890 Series GC System (Agilent)
Injector	7683 Series Injector (Agilent)
Auto sampler	7683 Series Auto Sampler (Agilent)
Column①	DB-5MS (J&W) 30m x 0.25mm(id) 0.25 or 0.1 μm
Column②	DB-17HT (J&W) 30 m x 0.32 mm, 0.15 μm
Column ①Temp.	120°C (1 min)-(20°C/min)-220°C (0 min)-(3°C/min)-280°C (0 min) - (5°C/min)-300°C (10 min)
Column ②Temp.	130°C (1 min)-(20°C/min)-200°C (0 min)-(3°C/min)-250°C(0 min) - (5°C/min)-300°C (10 min)
Column ②Temp. for POPs	120°C (1 min)-(20°C/min)-160°C (0 min)-(3°C/min)-220°C (0 min) - (10°C/min)-300°C (10 min)
He flow ratio	1.0 mL/min
Injection	Splitless or ON-Column injection
Injection Temp.	280°C
ON-Column Injection Temp.	120 or 130°C-(100°C/min)-300°C
Injection Volume	1 or 2 μL
MS	GCT Premier (Micromass)
Ionization method	EI or NCI (methane)
Ionization Volt.	40 - 70 eV
Trap current	200 μA
Interface Temp.	280 - 300 °C
Ion source Temp.	260 or 300 °C
Resolution	M/ΔM >7,000
Monitor ion range	m/z = 30~500
Cycle time	0.5 sec

検量線 RRFcs1 - p,p'-DDE

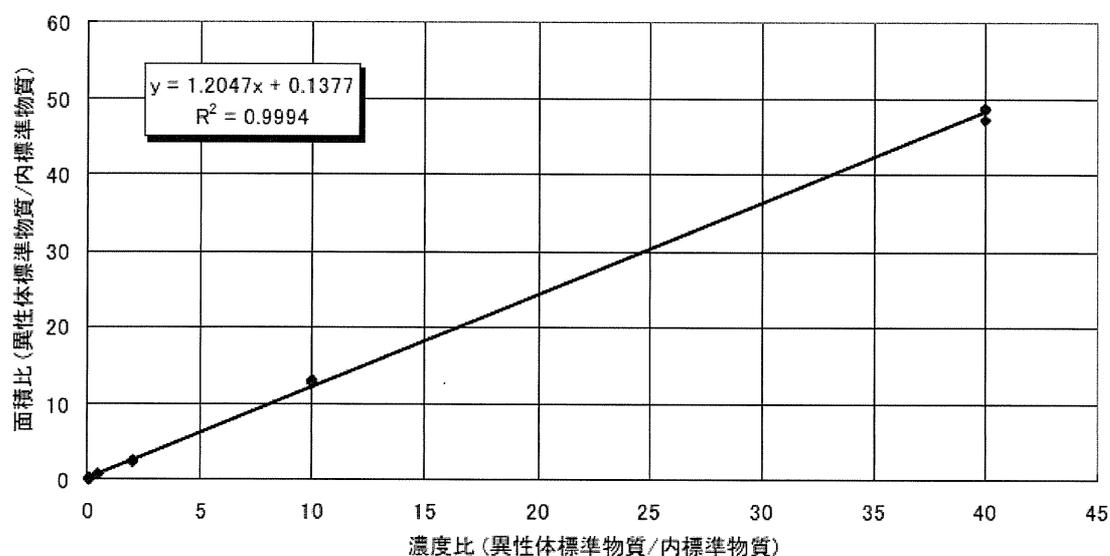


図1 p,p'-DDEの検量線

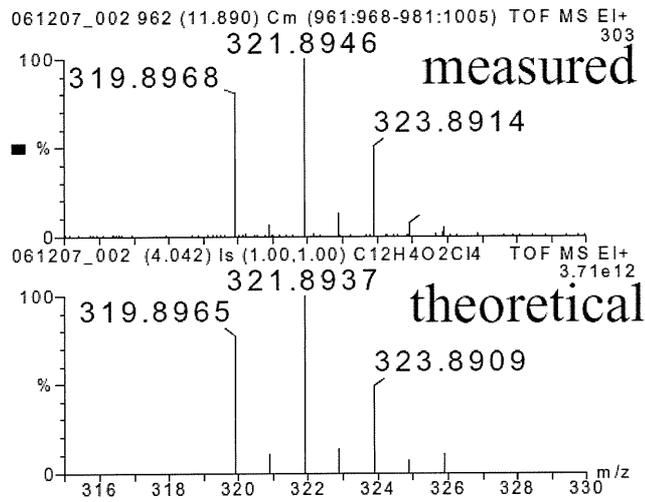


図2 TeCDDのマススペクトル
 上段は実測されたスペクトル、下段は理論値

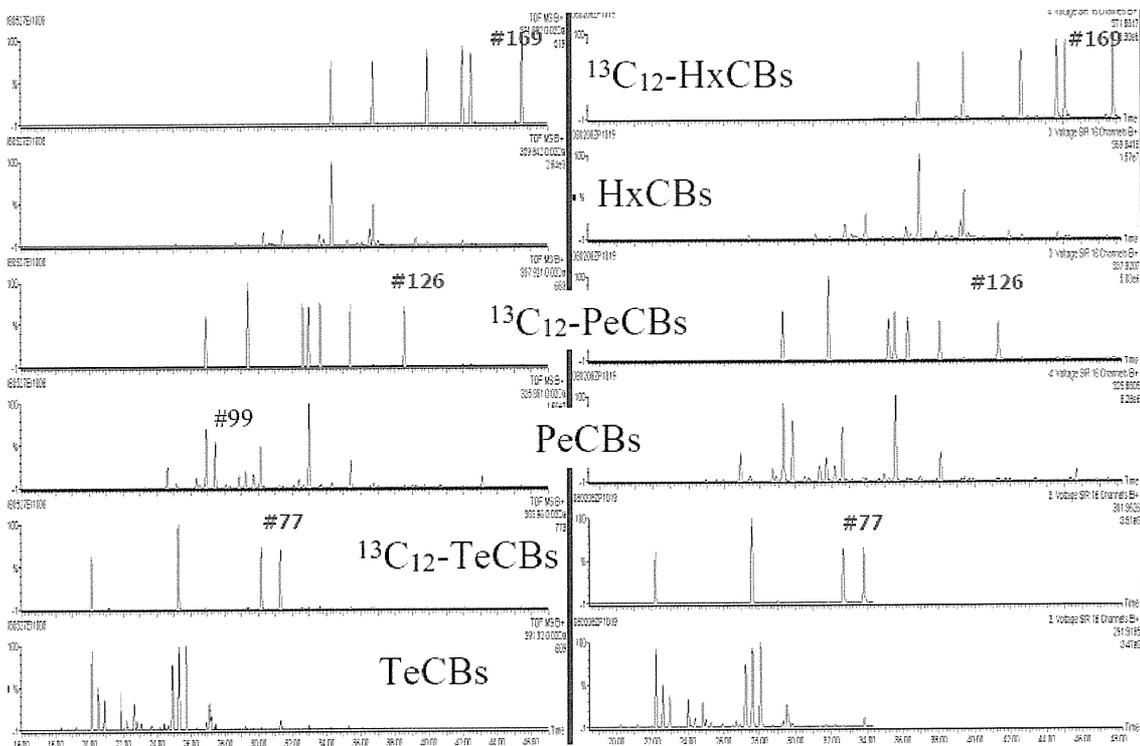


図3 魚アイナメ試料のTOFMSとHRMSでのスペクトルの比較
 PCBについて、TOFマスクロマトグラムは±10mDaで得られた。

表2 TOFMSとHRMSでの測定値の比較

Sample Instrument unit	shelfish		sea bass	
	GC-HRMS	GC-TOFMS	GC-HRMS	GC-TOFMS
	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g
δ -HCH	4	ND	6	ND
γ -HCH	17	(14)	25	ND
β -HCH	45	(59)	130	110
α -HCH	27	(29)	47	(35)
Mirex	2	ND	25	(26)
HCB	16	(17)	290	320
trans-Heptachlor epoxide	33	ND	ND	ND
Heptachlor	ND	ND	4	ND
Aldrin	26	(12)	4	ND
Oxychlordane	1200	1400	190	(270)
cis-Nonachlor	180	180	1400	1400
trans-Nonachlor	630	710	2700	2700
cis-Chlordane	11000	11000	2000	1900
trans-Chlordane	580	590	650	600
p,p'-DDD	8	(10)	2100	2100
o,p'-DDD	7	(9)	640	660
p,p'-DDE	630	670	7000	9700
o,p'-DDE	69	71	970	1000
p,p'-DDT	63	59	990	840
o,p'-DDT	27	(21)	350	360

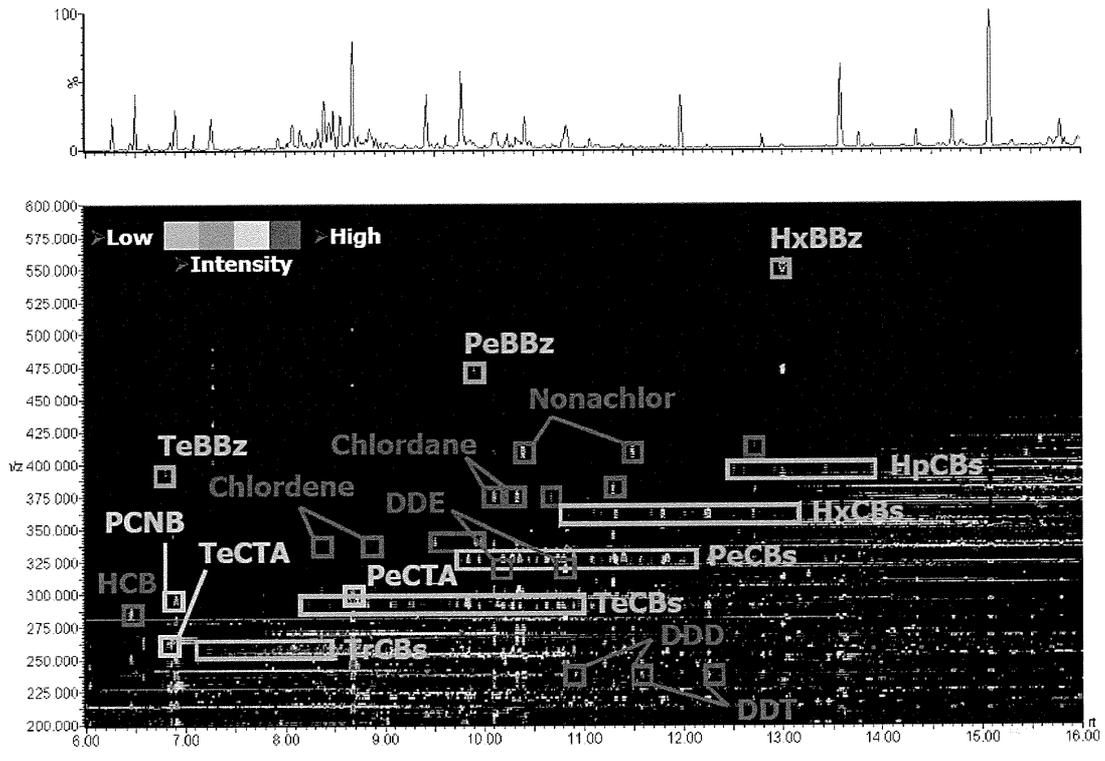


図4 クロマトグラムとマススペクトルの二次元プロット
各化学物質を群別に表記している。

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）
分担研究報告書

短鎖塩素化パラフィンの分析手法の検討

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学分野
分担研究者 原田 浩二 京都大学医学研究科環境衛生学分野
分担研究者 高菅 卓三 島津テクノリサーチ

研究要旨

現在POPs候補物質とされている短鎖塩素化パラフィンについて、高感度高選択性の機器による測定方法を開発した。

POPsについて既存の確立された前処理技術と、高分解能型ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-HRMS）を用いた分析技術で、より高感度で効率よく測定が可能となった。特に同族体を数多く含む塩素化パラフィンにおける定量法について、標準となる試料について電子イオン化により塩素化数を決定し、高感度な化学イオン化における検量線を作成する手法を考案した。施設間にある定量性の問題を解決する糸口となると期待される。

A. 研究目的

短鎖塩素化パラフィン（SCCPs、C10-13）を含む塩素化パラフィン（CP）は、プラスチック材料、金属加工流体および難燃剤として使用される工業製品である（1）。SCCPsは、環境中に残留し、生物に蓄積するとされ、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約により審査されている。高曝露レベルでは、SCCPsはニジマス、ラットにおける肝毒性を引き起こすことが報告されている（2,3）。SCCPsはアメリカ、ヨーロッパ、日本、インド、中国およびその他の国で生産されている（4）。SCCPsの生産量は、2005年に米国では8800トン、2006年に欧州連合では1500から2500トン、2001年に日本で502万トンと推定されている（4,5）。EUでは、SCCPsは、その潜在的な環境リスクのため、2004年から

EU指令76/769/EECの下で規制されている。日本では、SCCPsは、2005年以来、化審法の下で第1種監視化学物質に指定された後に金属加工産業では自主的に2007年までにSCCPsの使用を廃止した。これとは対照的に、中国の総CPの生産は、2007年で60万トンに達し、増加を続けている（6）。中国でのCPの生産と使用は、汚染の拡大の懸念があったが、SCCPsへの曝露情報は乏しい（7）。

そこで本研究では食事、母乳試料中の短鎖塩素化パラフィンについて高分解能ガスクロマトグラフィー電子捕獲負イオン化法高分解能質量分析計（HRGC / ECNI / HRMS）を用いて測定可能な方法を検討した。

B. 研究方法

定量化のための標準液として使用さ

れた化学物質はポリ塩素化デカン（塩素含有量44.82パーセント、55.00パーセント、65.02パーセント）、ポリ塩素化ウンデカン（塩素含有量45.50パーセント、55.20パーセント、65.25パーセント）、ポリ塩素化ドデカン（塩素含有量45.32パーセント、55.00パーセント、65.08パーセント）およびポリ塩素化トリデカン（塩素含有量44.90パーセント、55.03パーセント、65.18パーセント）である（Dr.Ehrenstorfer社製）。さらにポリ塩素化デカン異性体 1,1,1,3-tetrachlorodecane, 2,5,6,9-tetrachlorodecane, 1,2,9,10-tetrachlorodecane, 1,2,5,6,9 - pentachlorodecane, 1,1,1,3,9,10-hexachlorodecane, 1,2,4,5,9,10 - hexachlorodecane, 1,2,5,6,9,10 - hexachlorodecane, 1,2,4,5,6,9,10-heptachlorodecane, 1,2,5,5,6,9,10-heptachlorodecane, 3,4,5,6,7,8,9-octachlorodecane, 1,1,1,3,8,10,10,10-octachlorodecane, 1,2,3,4,5,6,7,8,9-nonachlorodecane（Dr.Ehrenstorfer社製、ChironAS社製）を用いて質量分析計での感度の差を評価した。¹³C₁₂-2,3,3',5,5' - ペンタクロロビフェニル（CB-111、CIL社製）をSCCPs定量の内部標準として使用した。アセトン、ヘキサン、ジクロロメタン、硫酸ナトリウムは残留農薬試験及びポリ塩化ビフェニル試験用（関東化学社製）を使用した。

・抽出、精製と機器分析

試料を攪拌し、20gを分取し、1:1 (vol/vol) アセトン/ヘキサン100mLを加えて、10分間分液漏斗で振盪し抽出した。抽出液を濾過し、残留物をさらに10分間1:1アセトン/ヘキサン100mLで再び抽出した。抽出液を合わせ、10分間ヘキサン洗浄蒸留水500mlで振盪し、水溶成分を除去した。洗浄した水層をヘ

キサン50mlで2回抽出した。有機層を合わせ、ヘキサン洗浄蒸留水100mlで再び洗浄した。有機画分を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ロータリーエバポレーターを用いて約20 mLに濃縮させた。粗抽出液をメスフラスコを用いて20 mLに希釈した。粗抽出液の2 mLを取り、脂肪含有量を電子天秤で計量した。

粗抽出液2mLをホールピペットを用いて分取し、8g活性化フロリジルカラム（Florisil PR、和光純薬製）に滴下し、SCCPsを1:4ジクロロメタン/ヘキサン90 mLで溶出した。溶出液をデカン0.1 mLに濃縮して¹³C₁₂標識CB-111を添加し、HRGC / ECNI / HRMS分析に供した。

・測定

HRGC / ECNI / HRMS は、Hewlett-Packard 6890、サーモフィッシャーMAT 95 XLを用いた。キャピラリーカラムはDB-5MSを用いて、15m×内径0.25 mm、膜厚0.1 μmで異性体が同時に溶出する条件とした。[M-Cl]のフラグメントを定量イオンとして用いた。

各同族体の感度は塩素数に大きく依存したため、異なる塩素含有量の標準溶液を使用した。まず、ポリ塩化デカンの13異性体の標準を分析し、塩素数と感度との関係が評価した。各塩素化デカンの異性体のピーク面積は、電子衝撃イオン化と化学イオン化で比較した。トータルイオンクロマトグラム（TIC）は、スキャンモード（質量範囲50-550）で得た。SIMは電子イオン化では[M-2H3Cl]⁺、化学イオン化では[M-Cl]⁻を選択した。それぞれの炭素鎖長（C10-13）の塩素化パラフィンについて、塩素化度45%、

55%、65%およびそれらの1:1:1混合物を調製した。塩素含有量はEI/MSのTICのピーク面積に基づいて算出した。

塩素化度45%、55%、65%のSCCPsの1:1:1混合物を希釈し、検量線に使用した。

検出限界 (IDL) はS/N比3のとして定義した。ブランクサンプルではSCCPsがIDL以下なので、検出限界 (MDL) の値はIDLに等しいとした。

抽出効率と回収率は、20g食品試料に標準溶液添加し、評価した。

ブランク試料を用いて、抽出精製でのコンタミネーションを評価した。

C. 研究結果

イオン化効率は、異なる塩素数、塩素化位置の異性体ではECNI/MSで大きく異なっていたのに対し、EI/MSでは、4倍以内であった(図1)。EI/MSでは異なる塩素数でも比較的同等の感度が得られると考えられたため、標準溶液の塩素化割合を定量化するために用いた。

45%塩素含有度の塩素化デカン標準溶液では計算された塩素含有度は56.04パーセントであり、2、3塩素化SCCPsはEI/MSであっても低感度である可能性があった。一方、塩素化度55%溶液および65%溶液ではEI/MSで計算された結果と一致した(表1)。

各同族体の化学イオン化での定量には、[M-Cl]のピーク面積を用いて検量線を作成した。SCCPsの1:1:1混合標準の同族体濃度を、EI/MSで測定し、ピーク面積の割合に比例して同族体が含まれると仮定している。混合標準液を5段階希釈したものを分析し、線形回帰式を使用した。同族の直線性

(r) は0.998以上であった(表2)。各同族体の感度は、9塩素化同族体がそれぞれの炭素鎖長で最も感度であった(表3)。また回収率は高濃度添加回収で81%から134パーセント、低濃度添加回収で97%~119%であった(表3)。日内および日間変動(相対標準偏差(RSD))はほとんどの同族体で10%未満であった(表3)。最大で日間変動がC₁₁H₁₉Cl₅について14.1%であった。ブランク試料(n=9)ではSCCPは不検出であった。

D. 考察

SCCPsの分析は、異性体および同族体が膨大な数にのぼるため、困難であった。個々の異性体の標準溶液は数が限られており、定量には使用不可能である。また異性体の混合標準液を使用する場合、塩素化数の異なる同族体でMSでの感度が異なるため、その組成を正しく評価できないことが示唆されてきた。

今回、混合標準液の同族体組成をEI/MSであらかじめ測定し、それを用いて化学イオン化での検量線を作成するという手順を採用した。同族体組成をもとに計算した塩素含有度は、元素分析の結果に合致し、EI/MSでの測定の妥当性が示された。

現時点でSCCP分析についてはコンセンサスは得られていない。今後、研究室間での校正、また認証標準物質の策定が期待される。

E. 結論

短鎖塩素化パラフィンの定量において、同族体組成を電子イオン化であらかじめ決定し、化学イオン化で高感度に測定する方法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Harada KH, Takasuga T, Hitomi T, Wang PY, Matsukami H, Koizumi A. Dietary exposure to short-chain chlorinated paraffins has increased in Beijing, China. *Environ Sci Technol*. Accepted 20 Jul, 45(16):7019-7027, 2011 doi: 10.1021/es200576d

2. 学会発表・その他

原田浩二、高菅卓三、人見敏明、王培玉、小泉昭夫. 日中韓の食事試料中の短鎖塩素化パラフィンとその汚染源の探索. 第51回 近畿産業衛生学会 2011年11月5日 奈良県立文化会館

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

(1) alkanes, C10-13, chloro; European Union Risk Assessment Report 2008, Volume: 81; European Chemicals Bureau; 2008

(2) Nilsen, O. G.; Toftgard, R.; Glaumann, H. Changes in rat liver morphology and metabolic activities after exposure to chlorinated paraffins. *Dev Toxicol Environ Sci* 1980, 8, 525-528.

(3) Cooley, H. M.; Fisk, A. T.; Wiens, S. C.; Tomy, G. T.; Evans, R. E.; Muir, D. C. Examination of the behavior and liver and thyroid histology of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to high dietary concentrations of C(10)-, C(11)-, C(12)- and C(14)-polychlorinated n-alkanes. *Aquat Toxicol* 2001, 54, 81-99.

(4) Study contract on "support related to the international work on Persistent Organic Pollutants (POPs)" management option dossier for Short Chain Chlorinated Paraffins (SCCPs), 12 June 2007"; NV.D.1/SER/2006/0123r; DG Environment; European Commission; 2007.

(5) Nakanishi, J.; Tsunemi, K. Short-chain Chlorinated paraffins; Maruzen Co., Ltd.; Tokyo, Japan, 2005.

(6) Yuan, B.; Wang, Y.; Fu, J.; Jiang, G. Evaluation of the pollution levels of short chain chlorinated paraffins in soil collected from an e-waste dismantling area in China. *Organohalogen Compd*. 2009, 71, 3106-3109.

(7) Yuan, B.; et al. An analytical method for chlorinated paraffins and their determination in soil samples. In *Chinese Science Bulletin*; Science China Press, co-published with Springer, 2010; Vol. 55, pp 2396-2402.

表1. EI/MSにより求められた塩素化パラフィンの異なる塩素化同族体の組成

C ₁₀ Cl _x congeners	(a) C ₁₀ (44.82% Cl)		(b) C ₁₀ (55.00% Cl)		(c) C ₁₀ (65.02% Cl)		(d) 1:1:1 mixture of a),b),c)	
	Peak area	Composition (%)	Peak area	Composition	Peak area	Composition	Peak area	Composition
C ₁₀ H ₁₈ Cl ₃	50.12	2.15%	69.76	2.58%	-	-	80.16	1.57%
C ₁₀ H ₁₈ Cl ₄	638.17	27.42%	559.84	20.69%	-	-	816.32	16.00%
C ₁₀ H ₁₇ Cl ₅	1104.8	47.48%	1305.11	48.22%	70.28	1.75%	1476.22	28.93%
C ₁₀ H ₁₆ Cl ₆	473.8	20.36%	680.39	25.14%	712.07	17.72%	1217.82	23.86%
C ₁₀ H ₁₅ Cl ₇	60.1	2.58%	91.21	3.37%	1588.36	39.52%	910.4	17.84%
C ₁₀ H ₁₄ Cl ₈	-	-	-	-	1382.02	34.38%	489.7	9.60%
C ₁₀ H ₁₃ Cl ₉	-	-	-	-	266.84	6.64%	112.48	2.20%
total C ₁₀ Cl _x	2327.0	100%	2706.31	100%	4019.57	100%	5103.1	100%
calculated Cl content		56.04%		56.67%		65.62%		60.03%
C ₁₁ Cl _x congeners	(a) C ₁₁ (45.50% Cl)		(b) C ₁₁ (55.20% Cl)		(c) C ₁₁ (65.25% Cl)		(d) 1:1:1 mixture of (a), (b), (c)	
	Peak area	Composition (%)	Peak area	Composition	Peak area	Composition	Peak area	Composition
C ₁₁ H ₂₂ Cl ₂	62.43	1.50%	-	-	-	-	-	-
C ₁₁ H ₂₁ Cl ₃	600.14	14.44%	36.82	1.10%	-	-	153.11	4.07%
C ₁₁ H ₂₀ Cl ₄	2017.46	48.55%	529.17	15.78%	-	-	673.86	17.91%
C ₁₁ H ₁₉ Cl ₅	960.1	23.10%	1345.94	40.15%	-	-	861.82	22.91%
C ₁₁ H ₁₈ Cl ₆	431.6	10.38%	1047.99	31.26%	69.08	1.35%	852.87	22.67%
C ₁₁ H ₁₇ Cl ₇	84.0	2.02%	325.34	9.70%	1489.07	29.21%	569.49	15.14%
C ₁₁ H ₁₆ Cl ₈	-	-	67.3	2.01%	2702.25	53.00%	491.25	13.06%
C ₁₁ H ₁₅ Cl ₉	-	-	-	-	725.76	14.24%	131.03	3.48%
C ₁₁ H ₁₄ Cl ₁₀	-	-	-	-	112.12	2.20%	28.94	0.77%
total C ₁₁ Cl _x	4155.7	100%	3352.60	100%	5098.28	100%	3762.37	100%
calculated Cl content		50.23%		55.87%		65.27%		57.91%
C ₁₂ Cl _x congeners	(a) C ₁₂ (45.32% Cl)		(b) C ₁₂ (55.00% Cl)		(c) C ₁₂ (65.08% Cl)		(d) 1:1:1 mixture of (a), (b), (c)	
	Peak area	Composition (%)	Peak area	Composition	Peak area	Composition	Peak area	Composition
C ₁₂ H ₂₄ Cl ₂	22.32	1.21%	-	-	-	-	-	-
C ₁₂ H ₂₃ Cl ₃	151.15	8.16%	51.95	1.54%	-	-	59.33	3.31%
C ₁₂ H ₂₂ Cl ₄	635.46	34.31%	503.23	14.88%	-	-	251.1	14.00%
C ₁₂ H ₂₁ Cl ₅	593.1	32.02%	821.63	24.30%	-	-	357.65	19.94%
C ₁₂ H ₂₀ Cl ₆	343.3	18.53%	1066.08	31.53%	35.81	0.80%	399.83	22.29%
C ₁₂ H ₁₉ Cl ₇	106.7	5.76%	770.15	22.78%	571.38	12.83%	334.48	18.65%
C ₁₂ H ₁₈ Cl ₈	-	-	167.8	4.96%	2009.74	45.11%	212.8	11.86%
C ₁₂ H ₁₇ Cl ₉	-	-	-	-	1309.17	29.39%	139.21	7.76%
C ₁₂ H ₁₆ Cl ₁₀	-	-	-	-	467.7	10.50%	39.28	2.19%
C ₁₂ H ₁₅ Cl ₁₁	-	-	-	-	61.02	1.37%	-	-
total C ₁₂ Cl _x	1851.91	100%	3380.88	100%	4454.82	100%	1793.68	100%
calculated Cl content		50.47%		55.29%		65.27%		57.12%
C ₁₃ Cl _x congeners	(a) C ₁₃ (44.90% Cl)		(b) C ₁₃ (55.03% Cl)		(c) C ₁₃ (65.18% Cl)		(d) 1:1:1 mixture of (a), (b), (c)	
	Peak area	Composition (%)	Peak area	Composition	Peak area	Composition	Peak area	Composition
C ₁₃ H ₂₆ Cl ₂	49.2	2.55%	-	-	-	-	-	-
C ₁₃ H ₂₅ Cl ₃	138.81	7.21%	13.7	0.51%	-	-	39.93	3.08%
C ₁₃ H ₂₄ Cl ₄	481.99	25.02%	114.25	4.23%	-	-	121.78	9.40%
C ₁₃ H ₂₃ Cl ₅	735.1	38.16%	735.38	27.24%	-	-	261.7	20.21%
C ₁₃ H ₂₂ Cl ₆	349.9	18.16%	944.53	34.99%	27.96	1.43%	275.14	21.25%
C ₁₃ H ₂₁ Cl ₇	141.0	7.32%	648.12	24.01%	150.25	7.66%	244.86	18.91%
C ₁₃ H ₂₀ Cl ₈	30.41	1.58%	207.4	7.68%	813.7	41.49%	192.98	14.90%
C ₁₃ H ₁₉ Cl ₉	-	-	36.26	1.34%	716.92	36.56%	121.83	9.41%
C ₁₃ H ₁₈ Cl ₁₀	-	-	-	-	223.81	11.41%	36.75	2.84%
C ₁₃ H ₁₇ Cl ₁₁	-	-	-	-	28.36	1.45%	-	-
total C ₁₃ Cl _x	1926.40	100%	2699.67	100%	1961	100%	1294.97	100%
calculated Cl content		49.22%		54.66%		63.25%		56.05%

Concentration of reference solutions was 10 µg/mL. Injection volume was 1 µL.

The congener composition of SCCPs was assumed to be proportional to the peak area percent of the TIC although SCCPs consisted of an enormous number of congeners with different molecular weight, position of chlorine atom, volatility, ionization efficiency and other

表2. ECNI/MSにおける塩素化パラフィン混合標準液を用いた検量線

SCCPs congeners	Range ^a (ng mL ⁻¹)	Calibration curves (Y=ax+b)			Instrument detection limit ^b (pg μL ⁻¹)	Reproducibility RSD (%) ^c (n=7)
		Slope (a)	Intercept (b)	Linearity (r)		
C ₁₀ H ₁₇ Cl ₅	29–579	0.00131	-0.000791	0.9999	7.9	5.9
C ₁₀ H ₁₆ Cl ₆	4.8–477	0.00947	-0.0138	0.9996	2.2	12.8
C ₁₀ H ₁₅ Cl ₇	3.6–357	0.0369	-0.0563	0.9997	0.5	4.8
C ₁₀ H ₁₄ Cl ₈	1.9–192	0.0464	-0.0399	0.9997	0.4	6.3
C ₁₀ H ₁₃ Cl ₉	0.44–44	0.0612	-0.0123	0.9994	0.15	9.8
C ₁₁ H ₁₉ Cl ₅	23–458	0.000854	0.00314	0.9996	8.1	8.1
C ₁₁ H ₁₈ Cl ₆	23–453	0.00666	0.00122	0.9999	4.2	4.5
C ₁₁ H ₁₇ Cl ₇	3.0–303	0.0187	-0.0146	0.9998	0.9	8.6
C ₁₁ H ₁₆ Cl ₈	2.6–261	0.0302	-0.0169	0.9996	0.7	7.0
C ₁₁ H ₁₅ Cl ₉	0.7–70	0.0695	-0.0047	0.9998	0.2	6.5
C ₁₂ H ₂₁ Cl ₅	40–399	0.000667	-0.00149	0.9995	11.1	7.0
C ₁₂ H ₂₀ Cl ₆	45–446	0.00548	-0.0081	0.9998	7.8	4.2
C ₁₂ H ₁₉ Cl ₇	9.3–373	0.0187	-0.026	0.9984	2.6	7.5
C ₁₂ H ₁₈ Cl ₈	5.9–237	0.0302	-0.0423	0.9994	1.4	6.9
C ₁₂ H ₁₇ Cl ₉	3.9–155	0.0695	-0.0577	0.9990	0.8	5.6
C ₁₃ H ₂₃ Cl ₅	40–404	0.000425	-0.000714	0.9991	17.6	9.5
C ₁₃ H ₂₂ Cl ₆	42–425	0.00357	0.00332	0.9998	13.9	7.9
C ₁₃ H ₂₁ Cl ₇	9.5–378	0.00767	0.000342	0.9990	3.8	8.7
C ₁₃ H ₂₀ Cl ₈	7.5–298	0.014	-0.0171	0.9995	2.8	9.7
C ₁₃ H ₁₉ Cl ₉	4.7–188	0.0267	-0.0243	0.9997	0.9	5.0

^a 20, 100, 200, 500, 1000 and 2000 ng/mL of polychlorinated decanes and undecanes; 50, 200, 500, 1000 and 2000 ng/mL of polychlorinated dodecanes and tridecanes

^b 2-μl injection in ECNI/MS

^c RSD: relative standard deviation

表3. 化学イオン化における測定限界、回収率、測定間の変動の評価

SCCP congeners	detection limit ^a (pg g ⁻¹)	non-fortified sample ^b (pg g ⁻¹)	Fortified amount ^c (pg)	Concentration of fortified sample (pg g ⁻¹) (n=7)	Recovery % (RSD%) ^d (n=7)	Fortified amount (pg)	Concentration of fortified sample (pg g ⁻¹) (n=5)	Recovery % (RSD%) (n=5)	Intra-day variation ^e RSD% (n=5)	Inter-day variation ^f RSD% (n=5)
C ₁₀ H ₁₇ Cl ₅	400	ND	46000	2200±42	94 (1.9)	23000	1200±87	108 (7.0)	9.4	9.7
C ₁₀ H ₁₆ Cl ₆	200	ND	20000	900±33	90 (3.6)	11000	640±49	117 (7.6)	4.1	7.7
C ₁₀ H ₁₅ Cl ₇	50	ND	3900	180±7.2	93 (4.0)	-	-	-	12.3	13.4
C ₁₀ H ₁₄ Cl ₈	20	ND	620	33±1.7	106 (5.2)	-	-	-	9.9	7.8
C ₁₀ H ₁₃ Cl ₉	10	ND	230	13±1.3	117 (9.8)	-	-	-	8.7	9.4
total C ₁₀ Cl _x	400	ND	71000	3300±68	92 (2.1)	34000	1800±100	109 (5.5)	7.7	8.1
C ₁₁ H ₁₉ Cl ₅	500	ND	40000	2200±97	111 (4.4)	20000	1100±87	107 (8.1)	11.5	14.1
C ₁₁ H ₁₈ Cl ₆	300	ND	42000	2300±70	107 (3.1)	31000	1500±76	97 (5.0)	2.1	7.5
C ₁₁ H ₁₇ Cl ₇	100	ND	15000	750±33	100 (4.4)	11000	620±63	112 (10.2)	9.0	8.0
C ₁₁ H ₁₆ Cl ₈	50	ND	2700	150±4.2	107 (2.9)	-	-	-	10.8	7.9
C ₁₁ H ₁₅ Cl ₉	20	ND	120	<20	-	-	-	-	-	-
total C ₁₁ Cl _x	500	ND	100000	5400±160	108 (2.9)	62000	3100±180	99 (6.0)	9.2	10.0
C ₁₂ H ₂₁ Cl ₅	600	ND	69000	3900±170	113 (4.3)	30000	1700±140	116 (8.1)	6.4	9.2
C ₁₂ H ₂₀ Cl ₆	400	ND	78000	4300±140	111 (3.2)	66000	3600±220	109 (6.1)	6.3	6.9
C ₁₂ H ₁₉ Cl ₇	200	ND	44000	2600±56	119 (2.1)	31000	1800±130	113 (7.6)	5.5	8.0
C ₁₂ H ₁₈ Cl ₈	100	80	8900	520±14	99 (3.2)	-	-	-	6.3	9.0
C ₁₂ H ₁₇ Cl ₉	50	71	740	120±5.2	124 (11.3)	-	-	-	7.1	6.5
total C ₁₂ Cl _x	600	151	200000	11000±210	115 (1.8)	127000	7200±380	114 (5.3)	6.3	7.7
C ₁₃ H ₂₃ Cl ₅	900	ND	63000	4000±220	127 (5.6)	29000	1700±190	116 (11.1)	7.8	9.1
C ₁₃ H ₂₂ Cl ₆	700	ND	69000	3900±180	113 (4.6)	72000	3800±210	106 (5.6)	8.0	8.7
C ₁₃ H ₂₁ Cl ₇	300	ND	46000	2900±86	126 (3.0)	28000	1700±90	119 (5.6)	3.6	5.2
C ₁₃ H ₂₀ Cl ₈	200	ND	17000	1100±38	134 (3.3)	-	-	-	8.7	8.9
C ₁₃ H ₁₉ Cl ₉	50	84	4100	250±9.3	81 (5.6)	-	-	-	9.3	6.3
total C ₁₃ Cl _x	900	84	200000	12000±240	122 (2.0)	129000	7100±460	111 (6.5)	7.5	8.4

^a 2-μL injection in ECNI/MS

^b 20-g food composite sample was extracted and 2 mL aliquot of 20-mL crude extract was analyzed.

^c 20 g food composite sample was fortified before extraction.

^d RSD: relative standard deviation

^e Five replicated samples prepared from a single fortified food composite sample were analyzed.

^f Five replicated samples prepared from a single fortified food composite sample were analyzed on 5 different days.

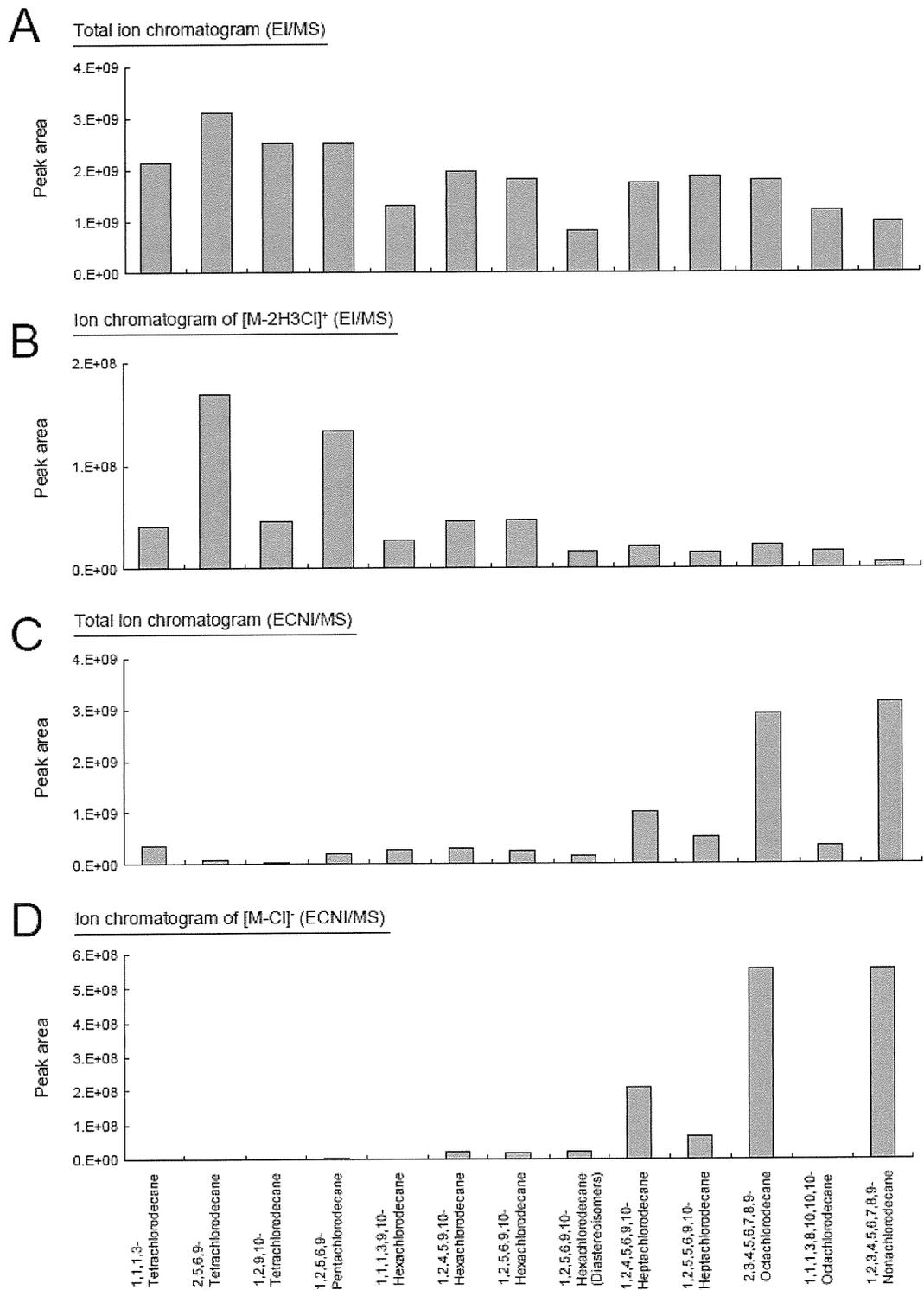


図1. 電子イオン化、化学イオン化における塩素化デカン異性体間の感度の違い

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）
分担研究報告書

食事試料中のPFCA分析法の確立

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学分野
分担研究者 原田 浩二 京都大学大学院医学研究科環境衛生学分野
研究協力者 藤井 由希子 京都大学大学院医学研究科環境衛生学分野

研究要旨

近年、PFOA(C8)以外の炭素鎖長の異なるペルフルオロアルキルカルボン酸(PFCAs: 炭素鎖 9~14)の血清中での増加が見られている。食事中 PFCAs が主な曝露経路とされている報告もあり、魚介類など個別食材レベルでの分析例は数少ないが報告されている。しかしながら 1 日の全量の食事のホモジナイズ処理を行った陰膳試料での長鎖 PFCAs 類の直接分析の例は、LC/MS/MS での分析法確立が難しいことから限られている。本研究では、食事中 PFCAs(C8-C14)類のプロファイルを明らかにすることを目的とし、従来より高感度の分析法の開発を行った。

A. 研究目的

人工の有機フッ素化合物であるペルフルオロオクタン酸(PFOA)は、工業用乳化剤、フッ素樹脂合成補助剤に使用されてきており、フッ素樹脂などの製品中に微量残存し、また環境中で検出されている。PFOA は、難分解性で、また生物蓄積性を示し、疫学研究は、出生体重の低下が報告されており (Apelberg et al., 2007, Fei et al., 2007)、ヒトの健康影響が懸念されている。近年、PFOA(C8)と構造が類似する炭素鎖長の異なるペルフルオロアルキルカルボン酸(PFCAs: C6~7, C9~14)が日本人を含む東アジアでのヒト血清中で経年的に増加している (Harada et al., 2011)。

日本以外の地域での報告では、食事中 PFCAs が主な曝露経路とされている報告もあり (D'Hollander et al.,

2010)、魚介類など個別食材レベルでの分析例は数少ないがマーケットバスケット方式による研究が報告されている (Haug et al., 2010)。しかしながら 1 日の全量の食事のホモジナイズ処理を行った陰膳試料での長鎖 PFCAs 類の直接分析の例は、LC/MS/MS での分析法確立が難しいことから 1 例に限られている ((Karrman et al., 2009, Vestergren et al., 2012)。食事ホモジナイズ試料を用いた pg/g レベルの PFCAs の質量分析はそのマトリックスの複雑さから複雑な clean-up の手順が求められる (Vestergren et al., 2012)。一方 GC/MS はマトリックスの影響を受けにくく (Scott et al., 2006)、electron-capture negative ionization (ECNI) モードでの分析は PFCA anilides の分析感度を向上させるとの報告がある (De Silva et al., 2006)。

本研究の主な目標は、上記のようにPFCAs分析に優れた適性を持つGC/MSを用いて簡便でありながら高感度の食事中PFCAs分析法を開発することである。

B. 研究方法

1. 試料の抽出方法

調査対象物質は、PFOA (C8)、PFNA (C9)、PFDA (C10)、PFUnDA (C11)、PFDoDA (C12)、PFTrDA (C13)、およびPFTeDA(C14)の7化合物とした。食事試料は一日分の全量を大型ミキサーで粉碎・ホモジナイズ処理を行ったものを使用した。今回はその保存された食事試料からから1gを分注し分析用試料とした。分注後、¹³C標識のPFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA内部標準、t-ブチルメチルエーテル(MTBE)1ml、0.5Mテトラブチルアンモニウム溶液(TBA) 0.3ml、0.5M炭酸ナトリウム緩衝液0.6mlを加えた。チューブローターにて24時間回転混和させた後、遠心分離を行い、上清を量りとった。さらにMTBEを1ml追加し、24時間回転、遠心分離、上清を取る操作を繰り返した(計2回の抽出)。この溶液を高純度窒素気流で乾固した。誘導体化効率を確認するために1 ng 11H-perfluoroundecanoic acid と1ng ¹³C12-labeled CB111 0.1 M を加えた臭化ベンジルアセトン溶液を添加し、ベンジルエステル誘導体化した。分析は誘導体化後24時間以内に行った。

2. 分析方法・検出限界

GC/MS (Agilent 6890GC/

5973MSD, Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan)を用いて測定した。DB-5MS(全長30m、内径0.25mm、膜厚1 μ m)のカラムで分離し、Single ion monitoringを使用し、化学イオン化陰イオンモードで分析した。試薬ガスにはメタンを用いイオン源温度は150 $^{\circ}$ Cとした。昇温条件は70 $^{\circ}$ Cで2分保持後、100 $^{\circ}$ Cまで20 $^{\circ}$ C/min、280 $^{\circ}$ Cまで30 $^{\circ}$ C/minで昇温した。Table 1に示すイオンを測定した。PFCAsベンジルエステルの分析感度の確認としてECNIと電子イオン化(EI)の両方のイオン化モードにて検出を行った。EIでは、イオン源の温度は250 $^{\circ}$ Cに設定し、Table 1に示すイオンを測定した。

3. 検出限界、ブランク値、回収率

装置の検出限界(IDL)はシグナル/ノイズ比=3はにて設定を行った。操作ブランクにはMilli-Q waterを使用し、10サンプルごとに1とした(計6)。ブランク値が検出された場合はサンプルの値からブランク値を引いたうえで、ブランク値の2倍の値をMethod detection limit (MDL)として扱った(Table2)。回収率は100pgの各標準物質を抽出前の食事ホモジネートサンプルに添加して確認した。

C/D. 研究結果・考察

誘導体化.

本研究ではベンジルエステル化とGC-ECNI-MSの組み合わせで非常に簡便でありながら高感度の食事中PFCAsの分析手法を開発した。ECNIは一般的にハロゲン化合物に対して感度が高く、ベンジル化したPFCAsとの組み合わせで簡単な抽出法で精製なしでありながら、高感度な分析が

可能である。食事試料から抽出された PFCAs を 1 ng 11H-perfluoroundecanoic acidと1 ng 13C12-CB-111 共に benzyl bromide/acetone溶液に融解し、60℃ 60 分 反応させ、11H-perfluoroundecanoic acidと1 ng 13C12-CB-111のピークエリアを比較することにより平衡状態に達したことを確認した。またピークエリアは24時間は変化せず、安定であることを確認した (coefficient of variance: 104 ±5.6%, n=10)。

EIとECNIモードにおけるPFCAsベンジルエステルのマススペクトルと検出機器限界値(IDL)。

PFCAs標準物質を用いEIとECNIのfull-scan modeでretention timeとフラグメントパターンの確認を行った。EI-modeでは[M]+イオンがm/z 504にて確認された。一方、ECNI-modeでは[M-C7H7]-イオンがcarboxylate anion (C8F15COO-)に対応する形でm/z 413に確認された(Fig1)。他のPFCAs (C9-C14にも同様のECNIモードにて[M-C7H7]-イオンがEIモードに比べ非常に高いレスポンスがみられた(Fig2,3)。ECNI得られたIDLをTable1に示す。

抽出法。

抽出法はIon-pair法にて行った(Ylinen et al., 1985)。凍結乾燥を行わず、食事ホモジナイズ試料から水分を除外し効率よくPFCAsの抽出を行うには適した方法とされる(Vestergren et al., 2012)。ECNIモードではクロマトグラフィに他の交雑物が見られず(Fig4)、Ion-pair抽出のみでその後の精製は行う必要がないと判断した。

ブランク値と Method detection limits (MDL)。

ブランク値が検出された場合はサンプルの値からブランク値を引いたうえで、ブランク値の2倍の値を Method detection limit (MDL)として扱った。その結果、PFCAsにおいて2から10pg/g-w.wのMDLを得た(table2)。この結果は我々の先行研究よりも1もしくは2オーダー低い値となる。(MDL: 100 pg g⁻¹ for PFNA, 500 pg g⁻¹ for PFDA and PFUnDA; Kärman et al., 2009, Fujii et al., 2011)。

回収率 (リカバリー)。

回収率は100pgの各標準物質を抽出前の食事ホモジネートサンプルに添加して確認した。PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, PFTeDA についてそれぞれ 97 ±16%, 98 ±19%, 91 ±17%, 94 ±18%, 90 ±18%, 93 ±16%, 97 ±17%と高い回収率を達成した。

E. 結論

本研究では、ベンジルエステル誘導体化と化学イオン化陰イオンモード測定を組み合わせ、高感度にPFCAsを測定できることを示した。またこの分析手法は、食事中PFCAsの微量分析が少ない試料(1g-w.w)を用いて簡便な方法で可能であることを示した。なお本方法を用いた実際の食事サンプルの分析は本報告書の「汚染が懸念される物質のモニタリングー食事試料、有機フッ素化合物」にて実施した。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表・その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

- Apelberg, B.J., Witter, F.R., Herbstman, J.B., Calafat, A.M., Halden, R.U., Needham, L.L., Goldman, L.R., 2007. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Persp* 115, 1670-1676.
- Fei, C.Y., McLaughlin, J.K., Tarone, R.E., Olsen, J., 2007. Perfluorinated chemicals and fetal growth: A study within the Danish National Birth Cohort. *Environ Health Persp* 115, 1677-1682.
- D'Hollander W, de Voogt P, De Coen W, Bervoets L., 2010. Perfluorinated substances in human food and other sources of human exposure. *Rev Environ Contam Toxicol* 208. 179-215
- De Silva AO, Mabury SA. Isomer distribution of perfluorocarboxylates in human blood: potential correlation to

source. *Environ Sci Technol* 2006;40:2903-9.

Haug LS, Salihovic S, Jogsten IE, Thomsen C, van Bavel B, Lindström G, Becher G., 2010. Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway. *Chemosphere* 80,1137-43.

Harada, K.H., Hitomi, T., Niisoe, T., Takanaka, K., Kamiyama, S., Watanabe, T., Moon, C.S., Yang, H.R., Hung, N.N., Koizumi, A., 2011. Odd-numbered perfluorocarboxylates predominate over perfluorooctanoic acid in serum samples from Japan, Korea and Vietnam. *Environ Int* 37, 1183-1189.

Scott BF, Moody CA, Spencer C, Small JM, Muir DC, Mabury SA. Analysis for perfluorocarboxylic acids/anions in surface waters and precipitation using GC-MS and analysis of PFOA from large-volume samples. *Environ Sci Technol* 2006;40:6405-10.

Kärrman A, Harada KH, Inoue K, Takasuga T, Ohi E, Koizumi A., 2009. Relationship between dietary exposure and serum perfluorochemical (PFC) levels--a case study. *Environ Int* 35, 712-7.

Vestergren, R., Ullah, S., Cousins, I.T., Berger, U., 2012. A matrix effect-free method for reliable quantification of perfluoroalkyl carboxylic acids and perfluoroalkane sulfonic acids at low parts per trillion levels in dietary samples. *J Chromatogr A* 1237, 64-71.

Table 1				
Quality assurance for PFCAs analysis in food samples				
Compound (carbon atoms)	Quantification	Quantification	Instrument detection	Instrument detection
	(confirmation)	(confirmation)	limit ^a (pg)	limit ^a (pg)
	ECNI	EI	ECNI	EI
PFOA (C8)	413 (414)	504 (485)	0.003	0.2
PFNA (C9)	463 (464)	554 (535)	0.003	0.2
PFDA (C10)	513 (514)	604 (585)	0.004	0.2
PDU _n DA (C11)	563 (564)	654 (635)	0.004	0.2
PDFDoDA (C12)	613 (614)	704 (685)	0.005	0.4
PFT _r DA (C13)	663 (664)	754 (735)	0.005	0.4
PFDeDA (C14)	713 (714)	804(785)	0.007	2

^a 1µl injection

^b RSD: relative standard deviation

Table 2			
Recovery and method detection limit for PFCAs analysis in food samples			
Compound (carbon atoms)	Recovery and (reproducibility)	Blank (SD)	Method detection
	% (RSD%) ^a (n=10, fortified)	pg g ⁻¹ , N=6,	limit ^b (pg g ⁻¹)
PFOA (C8)	97 (16)	5(0.4)	10
PFNA (C9)	98 (19)	2(0.3)	4
PFDA (C10)	91 (17)	1(0.3)	2
PDU _n DA (C11)	94 (18)	1.5(0.4)	3
PDFDoDA (C12)	90 (18)	1(0.2)	2
PFT _r DA (C13)	93 (16)	1(0.2)	2
PFDeDA (C14)	93 (17)	1(0.4)	2

^a RSD: relative standard deviation

^b food sample of 1g (the mean blank signal was subtracted from the calculated sample concentration only if the calculated sample concentration was three times higher than the blank concentration).

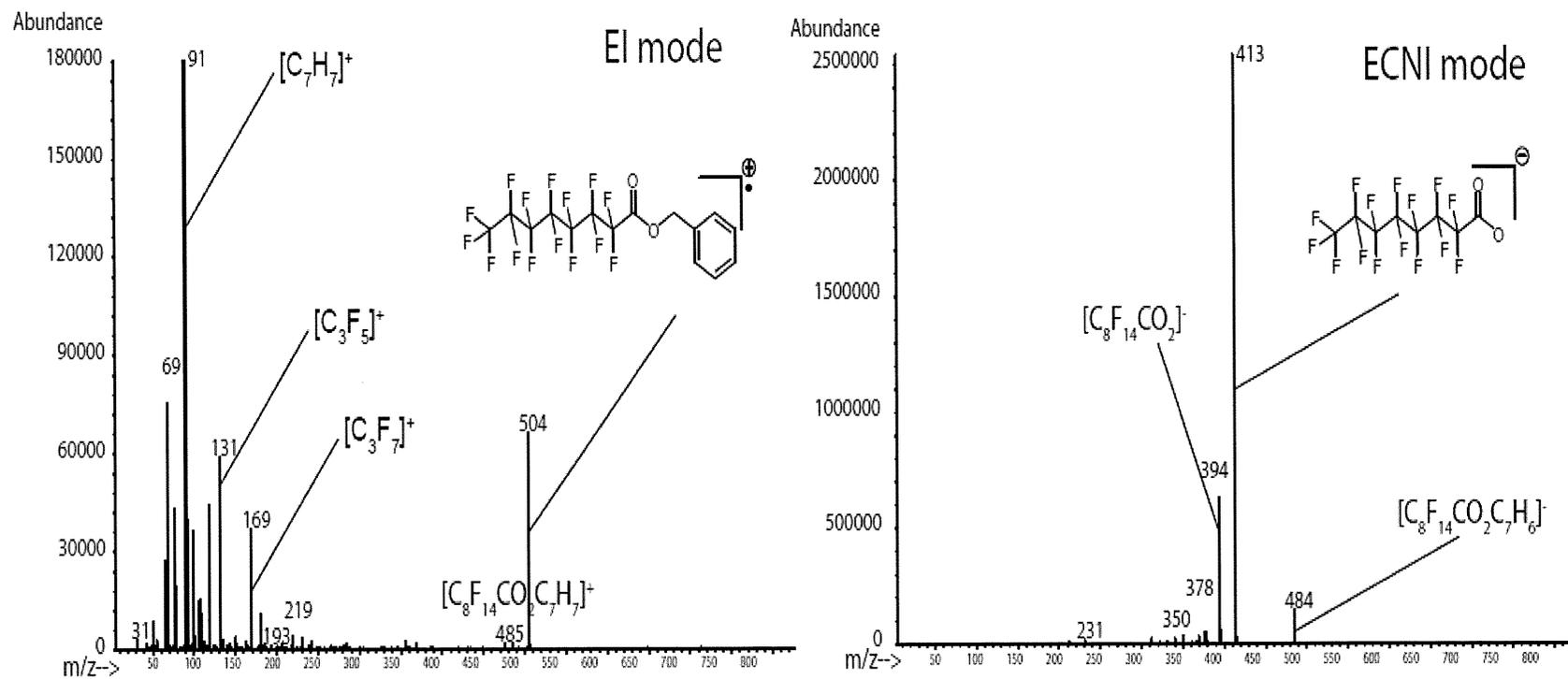


Fig. 1. Mass spectra acquired for PFOA benzyl ester in EI mode and ECNI mode (m/z: 30-800)

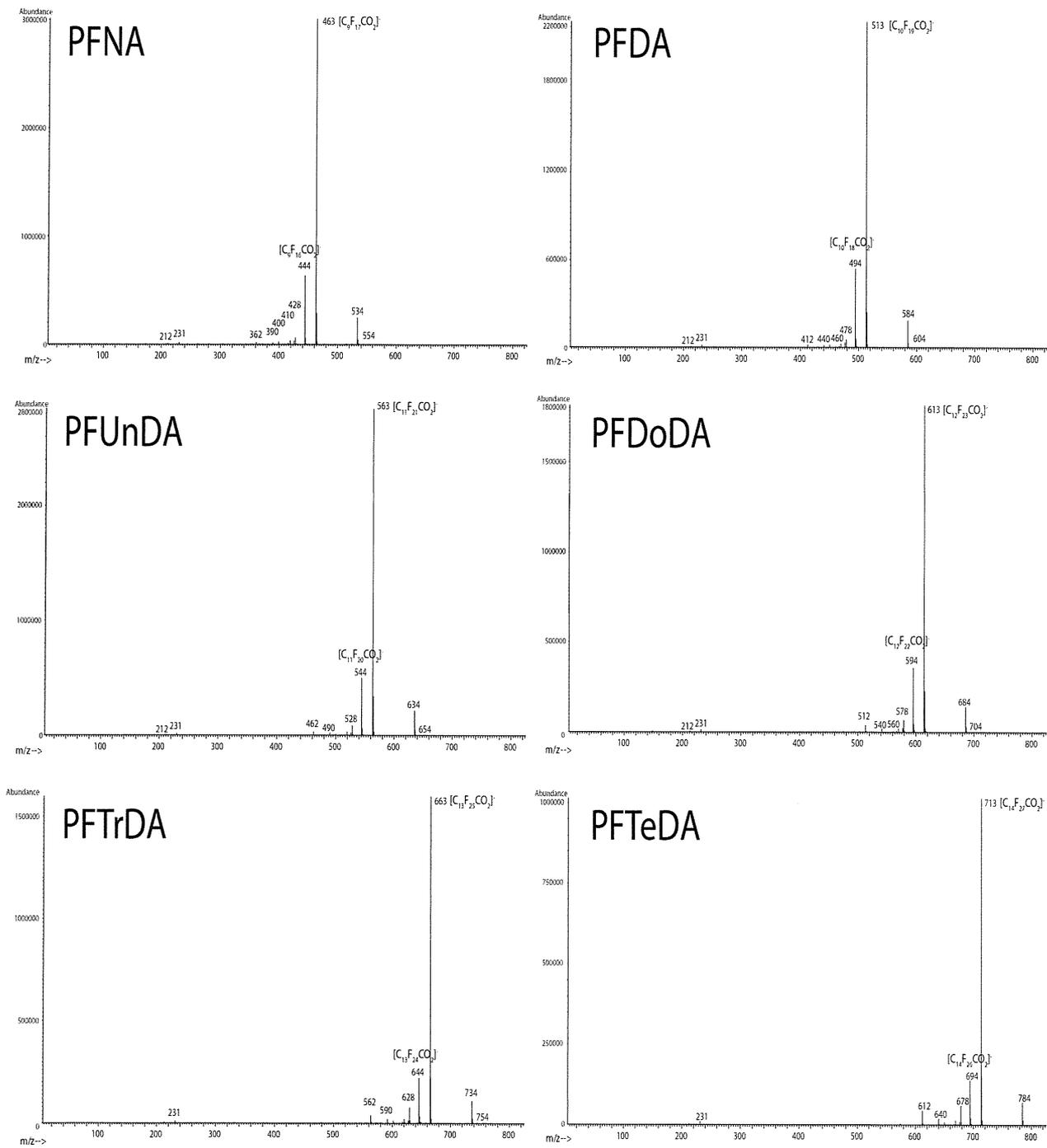


Fig.2. Mass spectra acquired for PFCA benzyl esters in ECNI mode (m/z: 30-800)