

日と比較することとなる。今回得られた関東地区の摂取量である 3.6 ng/kg/日 (ND=0)、4.7 ng/kg/日 (ND=1/2LOD) は耐容 1 日摂取量の約 1/28,300 から 1/21,700 となる。EFSA は判定基準 (ベンチマーク、BM) として MOE (暴露量と NOAEL 間のマージン) を採用しているが、日本人の HBCDs 暴露は EFSA の判定基準に照らしても全く問題ない。したがって、現時点で、健康に危害があるとは考えにくい。しかし、今後とも HBCDs 使用が継続されるならば、残留性や生物濃縮性が極めて高いこと、併せて内分泌攪乱作用や肝薬物代謝酵素チトクローム p-450 の誘導についての報告もあることから²²⁾⁻²⁴⁾、今後も食品における HBCDs による汚染やその摂取量の推移について注視する必要があると思われる。

3-2 HBCD の新異性体及び PBCD の LC/MS/MS 分析条件の検討

HBCD の新異性体の測定条件の検討については、Inertsil ODS-4 (3×150 mm, 5 μm, GL Science) と XTerra RP18 (3×150 mm, 5 μm, Waters) の 2 本のカラムを用い、溶離液・流速を変え、様々に検討した結果、Inertsil ODS-4 だけでは分析時間が 40 分以上を要し、しかも、δ 体はそれでも単一ピークとして分離困難であった。そこで、XTerra RP18 カラムに替えて検討したところ、感度は 2.5 分の 1 (試料中の検出下限値 : 0.05 ng/g) に低下したが、2 つの新異性体 (δ、ε) 体を α、β、γ 体から分離測定することができた。図 5 及び図 6 にその LC/MS/MS クロマトグラムと検量線 (内部標準として ¹³C-γ-HBCD を

用いた) を示す。これにより、α、β、γ、δ、ε の 5HBCD 異性体は 2 本の種類の異なる逆相カラムを組み合わせることにより測定できることがわかった。一方、PBCD は、今回の検討では、各 HBCD よりも感度が低く、LC/MS/MS での測定条件を確立することができなかった。次年度も検討を継続し、今後の HBCD 調査では、HBCD 新異性体や可能ならば光学異性体についても情報を得たいと考えている。この場合、これらの異性体について、まだラベル体が市場で供給されてないことがあり、数値化の際には、既にあるラベル化された α 体、β 体、γ 異性体を代わりに用いることとなる。

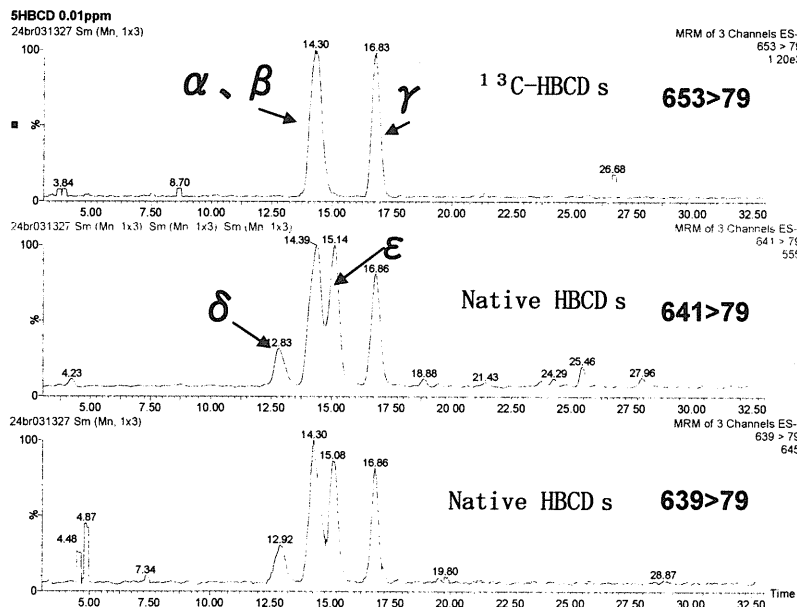


図5 α 、 β 、 γ 、 δ -及び ϵ -HBCDのLC/MS/MSクロマトグラム

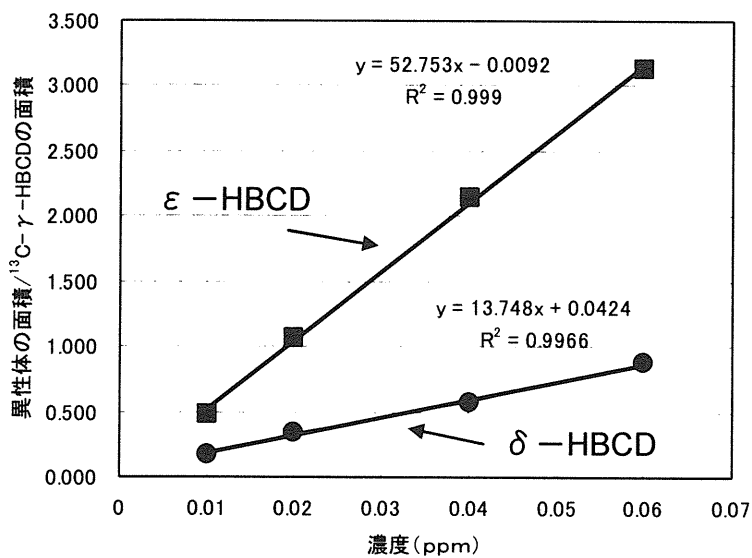


図6 δ -HBCD及び ϵ -HBCDの検量線

D 結論

1 臭素系難燃剤の DBDPE について、確立した分析法を用いて、魚試料個別食品 12 検体を分析した。その結果、12 検体中 4 検体から DBDPE が 5.86~8.08 pg/g ww の濃度で検出された。

2 マーケットバスケット方式による関東、九州地区の摂取量調査では、各地区における PBDE、PBB、Co-PXBs、DBDPE の一日摂取量を算出した。ND=0 とした場合の 1 日摂取量は PBDEs が 1.66 ng/kg/日 (関東地区) 及び 1.93 ng/kg/日 (九州地区)、PBBs が 0.00786 ng/kg/日 (関東地区) 及び 0.00238 ng/kg/日 (九州地区) であった。Co-PXBs はいずれの食品群別試料からも検出されなかった。DBDPE の 1 日摂取量は、関東地区が 0.0254ng/kg/日、九州地区は 0.0038 ng/kg/日であった。PBDEs は 2007 年度の摂取量に比べて 4-5 割少ない値であった。

3 マーケットバスケット方式による関東地区における HBCDs の摂取量調査では、ND=0 とした場合が 3.6 ng/kg/日、ND=1/2LOD とした場合が 4.7 ng/kg/日となり、2007 年の HBCDs 1 日摂取量 (ND=0 とした場合が 2.4 ng/kg/日、ND=1/2LOD とした場合が 3.4 ng/kg/日) に比べて 4-5 割の増加となった。

4 HBCDs の新異性体 (δ 、 ϵ) を LC/MS/MS 上で他の異性体から分離測定することができた。これにより、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の 5HBCD 異性体は 2本の種類の異なる逆相カラムを組み合わせるにより測

定できることがわかった。

E 研究発表

1 論文発表

・ Ashizuka, Y., Yasutake, D., Nakagawa, R., Shintani, Y., Hori, T., Tsutsumi, T., Matsuda R: Improvement of methods for analyzing brominated flame retardant in food. *Organohalogen Compounds*, 73, 2011.

2 学会・協議会発表

・ Ashizuka, Y., Yasutake, D., Nakagawa, R., Shintani, Y., Hori, T., Tsutsumi, T., Matsuda R: Improvement of methods for analyzing brominated flame retardant in food. 31st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2011.8).

・ 芦塚由紀, 安武大輔, 中川礼子, 新谷依子, 堀 就英, 堤 智昭, 松田りえ子: 食品における臭素系難燃剤分析法の検討. 第 48 回全国衛生化学技術協議会年会 (2011.11).

参考文献

1) Watanabe K, Senthilkumar K, Masunaga S, Takasuga T, Iseki N, Morita M, Brominated organic contaminants in the liver and egg of the common cormorants (*Phalacrocorax carbo*) from Japan, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004), 4071-4077.

- 2) Ishikawa Y, Nose K, Suzuki G, Takigami H, Noma Y, Sakai S, Quantitative analysis of polybrominated biphenyls (PBBs) in Japanese waste samples, *Organohalogen Compounds*, 68 (2004), 1776-1779.
- 3) Ohta S, Tokusawa H, Magota H, Nakao T, Aozasa O, Miyata H, Ochiai T, Shimizu Y, Contamination levels of polychlorinated / brominated coplanar biphenyls (Co-PXBs) in the market foods and mother's milk of Japan, *Organohalogen Compounds*, 69 (2007), 2018-2021.
- 4) Harrad S, Abdallah MA, Rose NL, Simon D, Turner SD, Davidson TA, Current-use brominated flame retardants in water, sediment and fish from English lakes. *Environ. Sci. & Technol*, 43(2009), 9077-9083.
- 5) Harrad S, Abdallah MA, Covaci A, Causes of variability in concentrations and diastereomer patterns of hexabromocyclododecanes in indoor dust, *Environ. Int.*, 35 (2009), 573-579.
- 6) He MJ, Luo XJ, Chen MY, Sun YX, Chen SJ, Mai BX, Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane in fish from a river system in a highly industrialized area, South China, *Science of Total Environment*, 419 (2012), 109-115.
- 7) Law K, Halldorson T, Danell R, Stern G, Gewurtz S, Alaee M, Marvin C, Whittle M, Tomy G, Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 (2006), 2177-2186.
- 8) Munschy M, Heas-Moisan K, Tixier C, Boulesteix L, Morin J, Classic and novel brominated flame retardants (BFRs) in common sole (*Solea solea L.*) from main nursery zones along the French coasts, *Sci. Total Environ.*, 409 (2011), 4618-4627.
- 9) 厚生労働科学研究「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」平成19年度-21年度研究報告書
- 10) Darnerud PO, Eriksen GS, Jóhannesson T, Larsen PB, Viluksela M, Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology, *Environ. Health Perspect.*, 109 supplement1 (2001), 49-68.
- 11) Hana RP, Stephen B, ATSDR's Guidance Values for Polybrominated Biphenyls (PBBs) and Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs), *Organohalogen Compounds*, 61 (2003), 211-214.

- 12) IPCS/WHO, POLYBROMINATED BIPHENYLS, Environmental Health Criteria, 152 (1994), Geneva, Switzerland.
- 13) Hardy ML, Margitich D, Ackerman L, Smith RL, The Subchronic Oral Toxicity of Ethane, 1,2-Bis(pentabromophenyl) (Saytex 8010) in Rats, International Journal of Toxicology, 21 (2002), 165-170.
- 14) Hardy M, Bieseemeier J, Banasik M, Stedeford T, Comment on "Alternate and new brominated flame retardants detected in U.S. house dust", Environ. Sci. Technol., 42 (2008), 9453-9454.
- 15) 厚生労働科学研究「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」平成20年度 研究報告書
- 16) 厚生労働科学研究「食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究」平成22年度 研究報告書
- 17) Nakagawa R, Murata S, Ashizuka Y, Shintani Y, Hori T, Tsutsumi T, Hexabromocyclododecane determination in seafood samples collected from Japanese coastal areas, Chemosphere, 81(2010), 445-452.
- 18) Ueno D, Isobe T, Ramu K, Tanabe S, Alaei M, Marvin C, Inoue K, Someya T, Miyajima T, Kodama H, Nakata H, Spatial distribution of hexabromocyclododecanes (HBCDs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorines in bivalves from Japanese coastal waters, Chemosphere, 78 (2010), 1213-1219.
- 19) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, 9(7), 2296.
- 20) Ema M, Fujii S, Hirata-koizumi M, Matsumoto M, Two generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats, Reprod. Toxicol., 25 (2008), 335-351.
- 21) NEDO事業における「初期リスク評価書」TDI (耐容一日摂取量) : <http://www.safe.nite.go.jp/risk.riskhykd01.html>.
- 22) Cantón RF, Peijnenburg AA, Hoogenboom RL, Piersma AH, van der Ven LT, van den Berg M, Heneweer M, Subacute effects of hexabromocyclododecane (HBCD) on hepatic gene expression profiles in rats, Toxicol. Appl. Pharmacol., 231 (2008), 267-272.
- 23) van der Ven LTM, Verhoef A, van de Kuil T, Slob W, Leonards PE, Visser TJ, Harmers T, Herlin M, Hakansson H., Olausson H., Piersma A.H., Vos J.G., A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of

hexabromocyclododecane in Wister rats,
Toxicol. Sci., 94 (2006), 281-292.

24) Germer S, Piersma AH, van der Ven
L, Kamyschnikow A, Fery Y, Schmitz HJ,
Schrenk D, Subacute effects of the
brominated flame retardants
hexabromocyclododecane and
tetrabromobisphenol A on hepatic

cytochrome P450 levels in rats,
Toxicology, 218 (2006), 229-236.

【謝辞】

マーケットバスケット試料の調製に
ご協力いただいた埼玉県衛生研究所の
諸氏に感謝いたします。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1. 坂本智徳, 赤木浩一, 渡邊敬浩, 松田りえ子, 樋脇弘	食品中メチル水銀の定量分析のためのフェニル誘導体化 GC-MS 法の開発	<i>BUNSEKI KAGAKU</i>	61	327-333	2012
2. Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Handa H, Yoshimura M, Matsuda R, Yoshida T	Characterization of natural AhR ligands in health foods estimated by in vitro reporter gene assay	<i>Organohalogen Compd.</i>	73	738-741	2011
3. Yasutake, D., Hori, T., Kurokawa, Y., Kajiwara, J., Tsutsumi, T., Amakura, Y.	The Measurement of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls without Derivatization using a high-resolution gas chromatograph / high-resolution mass spectrometer	<i>Organohalogen Compd.</i>	73	625-628	2011
4. Ashizuka, Y., Yasutake, D., Nakagawa, R., Shintani, Y., Hori, T., Tsutsumi, T., Matsuda, R	Improvement of methods for analyzing brominated flame retardant in food.	<i>Organohalogen Compd.</i>	73		2011

技術論文

食品中メチル水銀の定量分析のためのフェニル誘導体化 GC-MS 法の開発

坂本 智徳¹, 赤木 浩一¹, 渡邊 敬浩², 松田りえ子², 樋脇 弘¹

フェニル誘導体化-ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS) 法による食品中メチル水銀の分析法を検討した。臭化カリウム・硫酸銅(II) 飽和硫酸混液によってメチル水銀を試料から分離し、トルエンに抽出したのちL-システイン溶液に逆抽出した。抽出したメチル水銀をテトラフェニルホウ酸ナトリウムによってフェニル誘導体化し、*m*-ヘプタンに抽出した。誘導体化したメチルフェニル水銀を、1級-2級アミン (PSA) ミニカラムを用いて精製し、GC-MS (SIM) により測定した。5種の認証標準試料 (CRM-7402a, CRM-7403a, BCR-463, ERMCE-464 及び DOLT-4) を用いた分析法の性能評価の結果、真度 (%) 98~108, 併行精度 (RSD%) 10 未満, 室内精度 (RSD%) 15 未満であり, 厚生労働省によって示された性能基準を満たす分析法であることが確認された。

1 緒 言

メチル水銀は、有機水銀化合物の一つであり、多量に摂取すると水俣病のような中毒症状を引き起こすほか、胎児における脳の成長にも影響を及ぼすことが報告されている¹⁾。またメチル水銀は、生物濃縮のため食物連鎖の上位に位置するマグロやクジラ類のような大型水産動物に特に多く含まれている。これに対し厚生労働省は、該当する水産動物の大量摂取を介した健康危害の未然防止の観点から、妊婦らを対象とし、摂食に関する注意を喚起している²⁾。

食品に含まれるメチル水銀の分析法としては、厚生省環境衛生局長通知³⁾にガスクロマトグラフィー-電子捕獲型検出 (GC-ECD) 法が示されている。しかしこの分析法では、発がん性が指摘されているベンゼンを使用することに加え、パックドカラムの使用が規定されているために分解能が低く、さらに検出器の選択性及び安定性にも問題が認められる。

上記の GC-ECD 法のほかにも、メチル水銀の定量を目的とする分析法には、魚介類や血液等を対象としたジチゾン抽出法⁴⁾、塩酸酸性・トルエン抽出法⁵⁾、アルカリ分解抽出法⁶⁾、臭化カリウム・硫酸銅(II) 飽和硫酸混液添加トルエン抽出法⁷⁾ 及び超臨界流体抽出法⁸⁾ などにより抽出し、GC-ECD や高速液体クロマトグラフィー-誘導結合プラズ

マ質量分析法 (HPLC-ICP-MS)⁹⁾ により測定する方法のほか、メチル水銀をエチル、プロピルまたはフェニル誘導体化することで揮発性を高め、注入装置に固相マイクロ抽出 (SPME) 等を用いてガスクロマトグラフィー-原子蛍光分析法 (GC-AFS)⁶⁾¹⁰⁾ または GC-ICP-MS¹¹⁾ で測定する方法が報告されている。しかし、これらの方法はいずれも、感度及び選択性に優れるものの、高額かつ目的に特化した仕様の測定機器を必要とするため汎用性が低い。より汎用性の高いメチル水銀分析法として、抽出には溶媒抽出法を、測定には GC-MS を用いる方法が適当と考えられたが、食品分析の分野においては報告がない。

本研究では、食品中のメチル水銀定量を目指した高感度分析法の開発を目的とし、フェニル誘導体化を介して、農薬等の一斉分析法における測定機器としても採用されている GC-MS により測定する方法について検討し、その性能を明らかにしたので報告する。

2 実 験

2.1 試薬等

メチル水銀標準品はジーエルサイエンス製塩化メチル水銀を使用した。標準原液は標準品 58.2 mg をトルエンで溶解し 50 mL に定容した (メチル水銀として 1000 mg L⁻¹)。分液漏斗に標準原液 1 mL 及び 1% システイン溶液 100 mL を採り、15 分間振とうしたのち水層が清澄になるまで静置し、採取した水層を標準溶液とした (メチル水銀として 10 mg L⁻¹)。検量線用標準溶液は標準溶液を 1% システイン溶液で希釈し、1~100 ng mL⁻¹ の範囲で 5 濃度の溶液を調製した。

¹ 福岡市保健環境研究所: 810-0065 福岡県福岡市中央区地行浜 2-1-34

² 国立医薬品食品衛生研究所: 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Table 1 Analytical conditions for the determination of phenylated methylmercury by GC-MS

Gas chromatograph	Thermo Scientific TRACE GC ULTRA
Inlet temperature	250 °C
Column	GL Science InertCap 5MS/NP PROG 10M + TL (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness)
Carrier gas	He 1.0 mL min ⁻¹
Oven temperature program	50 °C (1 min), 10 °C min ⁻¹ to 200 °C (0 min)
Mass spectrometer	Thermo Scientific TSQ QuantumGC
Transfer line temperature	280 °C
Ion source temperature	280 °C
Mode	SIM
Monitor ions	<i>m/z</i> 292 ^{a)} , 294, 277

a) Quantitative monitor ion.

Walpole 緩衝液 (pH 1.0) は 1 mol L⁻¹ 酢酸ナトリウム溶液 250 mL に 1 mol L⁻¹ 塩酸を加え pH を 1.0 に調整したのち、水で 1 L に定容して使用した。

2 % テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液はテトラフェニルホウ酸ナトリウム 2.0 g を水で溶解し 100 mL に定容した。

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (PSA) はジールサイエンス製 InertSep PSA (200 mg/3 mL) を *n*-ヘプタン 2 mL でコンディショニングして使用した。

n-ヘプタンは和光純薬工業製 *n*-ヘプタン (環境分析用) を使用した。

その他の試薬は残留農薬試験用あるいは特級品を使用した。

2.2 試料

試料には 5 種の認証標準試料 [CRM-7402a (タラ魚肉粉末), CRM-7403a (メカジキ魚肉粉末), BCR-463 (マグロ魚肉粉末), ERMCE-464 (マグロ魚肉粉末) 及び DOLT-4 (ツノザメ肝臓粉末)] を用いた。

2.3 装置

ホモジナイザーは KINEMATICA 製ポリトロン PT3100 を、遠心分離機は久保田商事製 6200 を、ガスクロマトグラフは Thermo Scientific 製 TRACE GC ULTRA を、質量分析計は Thermo Scientific 製 TSQ Quantum GC を使用した。GC-MS の測定条件は Table 1 に示した。

2.4 操作

2.4.1 抽出 試料約 0.3 g を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに精確に秤量し、1 mol L⁻¹ 臭化カリウム溶液 10 mL を加え混合したのち、硫酸銅(II) 飽和 4 mol L⁻¹ 硫酸 10 mL 及びトルエン 15 mL を加え 45 分間振とうし、3000 rpm で 15 分間遠心分離した。1 % システイン溶液 4 mL を入れた容器にトルエン層 10 mL を分取して 15 分間振とうし、3000 rpm で 15 分間遠心分離したの

ち、水層を分取し抽出液を得た。エマルジョンが生じた試料については、トルエン層をピペットで除去したのち、*n*-ヘキサン 15 mL を加えて 5 分間振とうし、3000 rpm で 15 分間遠心分離してヘキサンを除去し抽出液を得た。

2.4.2 フェニル誘導体化 抽出液及び各濃度の標準溶液各 1 mL に Walpole 緩衝液 (pH 1.0) 5 mL を加え混合したのち、*n*-ヘプタン 2.5 mL 及び 2 % テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液 1 mL を加え混合し、30 °C に設定したウォーターバス中で 10 分間ごとに混和しながら 1 時間静置した。ヘプタン層を PSA に全量負荷し、初流 1 mL を廃棄して通過液を採取し測定溶液とした。

2.5 定量

2.4.2 に従い調製した溶液を GC-MS に注入し測定することにより得られたクロマトグラムのピーク面積から、絶対検量線法により試験溶液中のメチル水銀の濃度を求め、さらに下記の算術式に従って試料の含有量を算出した。

$$\text{メチル水銀含有量 (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{検量線より求めた試験溶液濃度 (ng mL}^{-1}\text{)} \times \text{抽出液量 (4 mL)} \times 15/10 \times \text{希釈倍率 / 試料採取量 (0.3 g) / 1000}$$

検量線の濃度範囲を超過するピーク面積が得られた試料については、抽出液を 1 % システイン溶液で適宜希釈することで測定溶液を再調製した。なお、CRM-7402a、CRM-7403a 及び DOLT-4 については、得られたメチル水銀含有量に 0.93 (水銀とメチル水銀との平均分子量の比) を乗じて、水銀としての含有量もあわせて算出した。

2.6 分析法の性能評価

食品中の化学物質分析法を性能評価するためのガイドラインとして、厚生労働省より“食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン¹⁵⁾”及び“食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン¹⁶⁾”が示されている。これらガイドラインを参考に、分析法の性能を評価することとした。性能評価を目的とする分析結果を

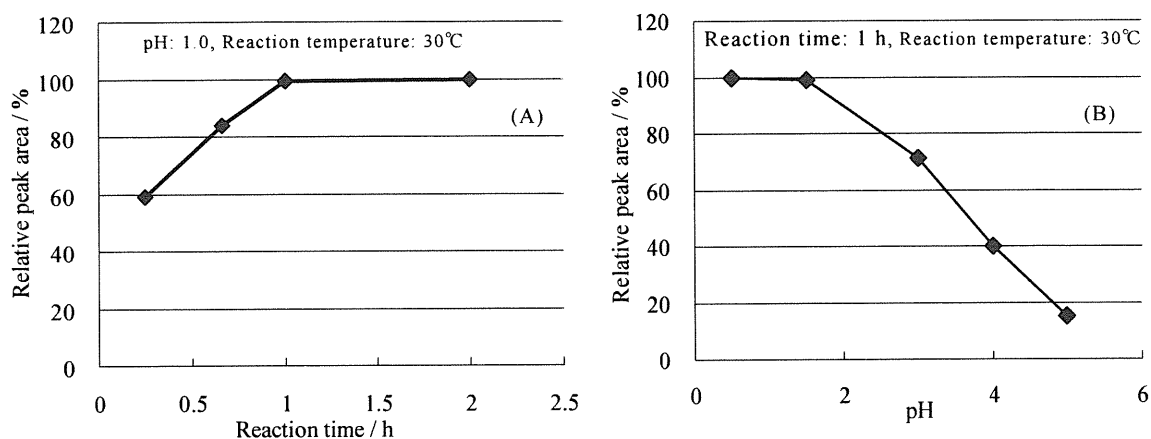


Fig. 1 Relationships between the relative peak area and (A) reaction time and (B) pH

得るための実験計画には、分析者1名による枝分かれ実験(2併行, 5日間)を採用した。本実験計画に従い得られた分析値を一元配置の分散分析により解析し、算出された分散から併行精度及び室内精度を推定した。また真度は各標準試料に付与された認証値に対する平均値($n = 10$)の割合として算出した。推定された真度及び精度は、濃度範囲が対応しているガイドライン¹³⁾中に示された目標値と比較することで評価した。なお、性能評価に先立ち、試薬のみを操作した試薬ブランクを測定した結果、メチル水銀定量の妨げとなるピークが現れなかったことにより選択性を確認した。また、 1 ng mL^{-1} の標準溶液を測定した結果得られたシグナル・ノイズ比(S/N)が10以上であることにより、マトリクス非共存下での定量下限を確認した。

3 結果及び考察

3.1 誘導体化条件の検討

メチル水銀の誘導体化には、エチル¹¹⁾、プロピル¹⁰⁾及びフェニル誘導体化法^{6)12)~14)}が報告されている。エチル及びプロピル誘導体化法では得られる誘導体の揮発性が非常に高く、GCへの注入にはSPME等の装置が必要であった。一方、環境分析の分野において、フェニル誘導体化の n -ヘキサンに抽出しGC-MSにより測定する、SPME等を必要としない分析法¹⁴⁾が報告されている。しかし、この分析法は標準溶液の定量下限が 100 ng mL^{-1} と高く、環境水の分析に対応するため濃縮操作を行っている。食品中のメチル水銀分析においては、定量下限をより下げる必要があると考えられたため、食品中のメチル水銀分析に用いられているGC-ECD法³⁾の定量下限(5 ng mL^{-1})の1/5~1/10を目標としてフェニル誘導体化反応条件を検討した。また、反応条件の最適化とあわせ、測定のノイズを減少させ、より低濃度のメチル水銀の定量を可能とする効果を期待し、誘導体化反応により生じる副生成物の除去について検

討した。なお、本精製により、より夾雑物の少ない測定液が注入されることになるため、GCカラムの劣化抑制効果も期待されると考えた。

標準溶液を1%システイン溶液で希釈し調整したメチル水銀 100 ng mL^{-1} 溶液を用いて、フェニル誘導体化反応の至適pH、温度及び時間を検討した。Caiら¹²⁾は、pH4~10の間ではフェニル化の進行とpHとの間に大きな相関はないことを報告している。本研究では、メチル水銀をシステイン錯体としてトルエンから逆抽出していることから、フェニル誘導体化の際にメチル水銀-システイン錯体を解離させる必要があると考えられた。そこで、至適pHについては、より酸性な条件下で、フェニル誘導体化の効率に対する影響を検討した。検討結果の一部をFig. 1に示す。結果は、検討した反応条件の範囲内で得られた最大のピーク面積値に対するその他のピーク面積値の比を百分率で示した。反応時間を1時間以上、反応時のpHを0.5~1.5に調整することで、フェニル誘導体化の効率が最大となることが示唆された。反応温度の検討結果については示していないが、同様の検討の結果から、 30°C とすることで誘導体化効率が最大となることが明らかとなった。これらの結果に基づき、以後、pH0.5~1.0の範囲内で 30°C 、1時間の誘導体化を行うこととした。

一方、誘導体化反応の進行に伴い、ヘプタン層に橙色の色素が生成した。そこでグラファイトカーボン及びPSAをそれぞれ充填した2種のカートリッジカラムを用いた精製について検討した。その結果、いずれのカラムでも着色成分の除去は可能であったが、分析対象となるメチルフェニル水銀の回収率は、いずれのカラムを用いるかにより大きく異なり、グラファイトカーボンカラムでは14%、PSAカラムでは105%であった。

以上の結果から、誘導体化反応終了後にPSAカラムによる精製を行うこととした。

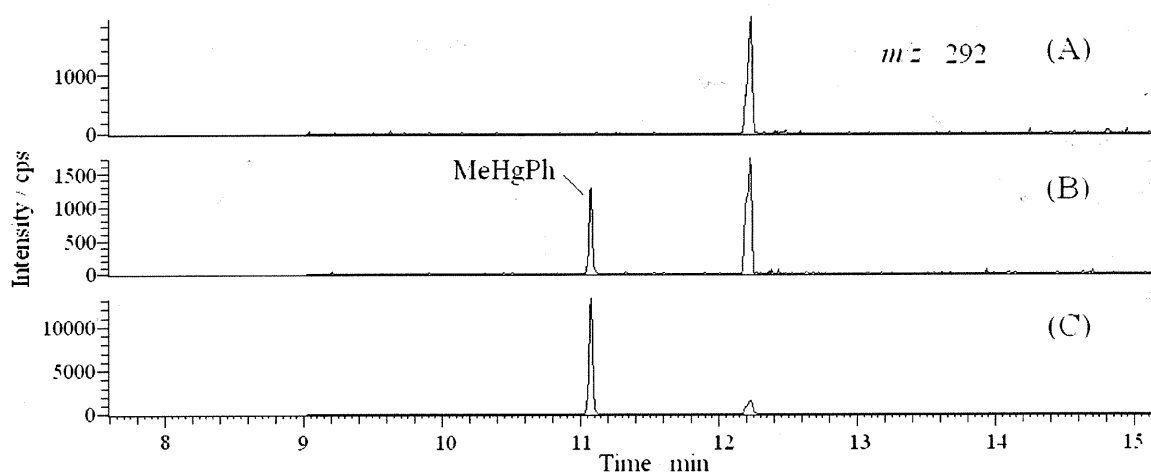


Fig. 2 Mass chromatograms of phenylated methylmercury ($m/z = 292$) in (A) blank solution (0 ng mL^{-1}), (B) standard solution (5 ng mL^{-1}) and (C) extract of CRM-7402a

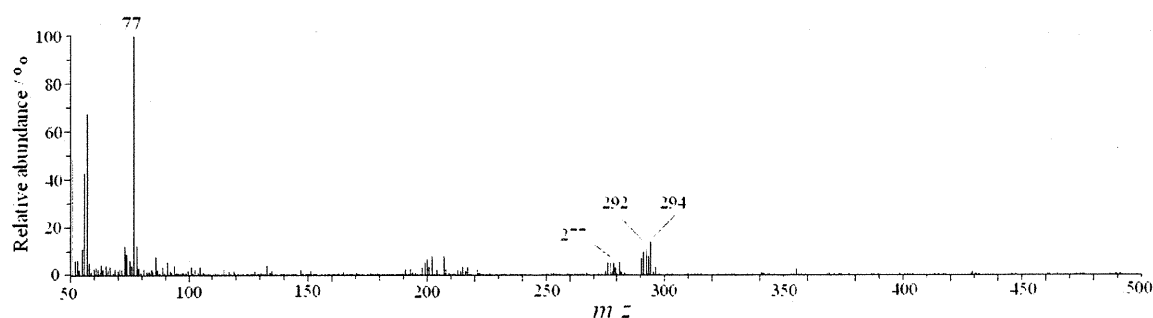


Fig. 3 Mass spectrum of phenylated methylmercury

3・2 GC-MS 測定条件の検討

誘導体化を行わずにガスクロマトグラフによりメチル水銀を分析するためのキャピラリーカラムとして、液相にアルキレングリコールフタル酸エステルポリマーを用いたカラムが市販されているが、最高使用温度が 160°C と低くカラムブリードが大きく、MSへの接続には適さなかった。また、一般的な微極性(5% フェニル-95% メチルポリシロキサン)、中極性(トリフルオロプロピルメチルポリシロキサン)及び高極性(ポリエチレングリコール)カラムを用いた分離についても検討したが、いずれのカラムを用いた場合でもピークの対称性が十分とは言えなかった。さらに、一定濃度範囲におけるフェニル化メチル水銀量とピーク面積値に十分な相関(直線性)が得られなかった。そこで、至適化した反応条件下でメチル水銀をフェニル化メチル水銀へと誘導したのち、5% フェニル-95% メチルポリシロキサンカラムを用いて分離することについて検討した。その結果、Fig. 2に示すように対称性のよいピークが観察された。この結果に基づき、本カラムの使用を決定し、さらに定量性及び感度の向上を目的に、GC-MS条件を検討した。 100 ng mL^{-1} メチル水銀標準溶液を試料としてフェ

ニル誘導体化及び精製した後にGC-MSに注入し、SCAN測定(m/z 50~500, EI)して得られたマススペクトル(Fig. 3)をもとに、 m/z 277 ($^{200}\text{HgPh}^+$)、292 ($\text{Me}^{200}\text{HgPh}^+$)及び294 ($\text{Me}^{202}\text{HgPh}^+$)をモニターイオンとして、SIMモードにより定量する測定条件を設定した。モニターイオンのうち、最も高い S/N が得られた m/z 292を定量イオンに、 m/z 277及び294を定性イオンとした。

続いて検量線のダイナミックレンジについて検討した結果、 $1\sim 100 \text{ ng mL}^{-1}$ の濃度範囲で作成した代表的な検量線の相関係数は0.998、傾きは916、切片は-778であった。

また、標準溶液の定量下限($S/N \geq 10$)は、 1 ng mL^{-1} であった。

3・3 前処理方法の検討

魚介類に分類される食品群には、メチル水銀を含む食品が高頻度に含まれており、またその濃度は個々の食品において大きく異なるものと考えられる¹⁷⁾。一方、前処理方法を含む分析法の検討には明らかな濃度のメチル水銀を含む均質な試料が不可欠である。しかし実際には、メチル水銀を含まない試料の入手あるいは、一定濃度を含む均質な試

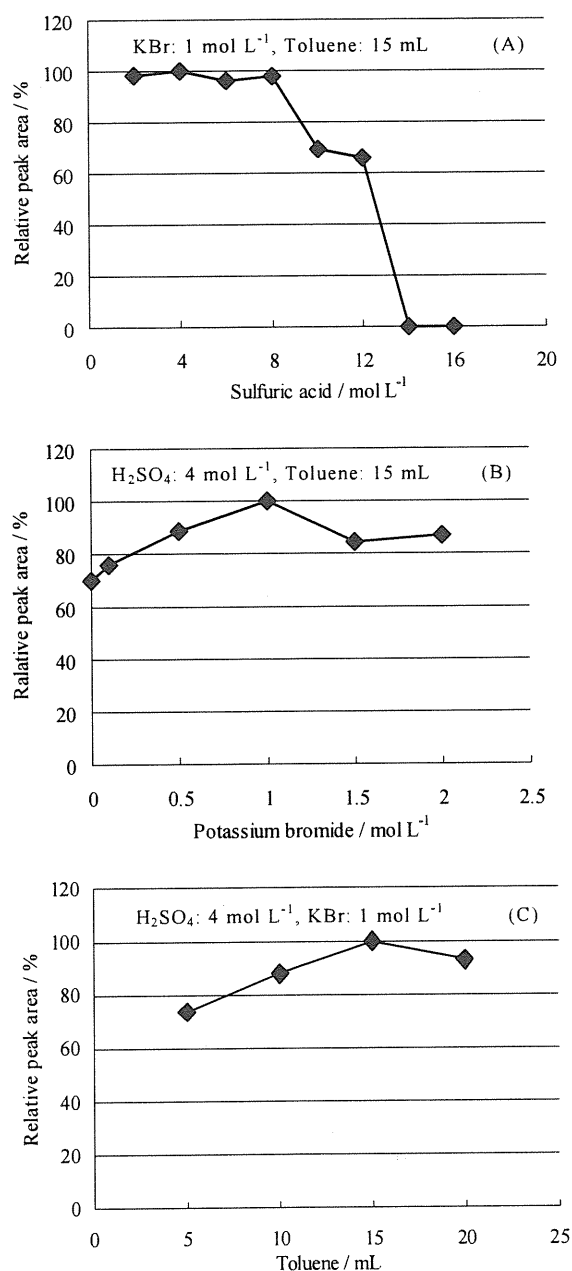


Fig. 4 Relationships between the relative peak area and (A) concentration of sulfuric acid, (B) concentration of potassium bromide and (C) volume of toluene

料の調製は極めて困難である。分析法の真度推定に使用する試料として、第一に認証標準試料を選択することが推奨されていることも勘案し、本研究では、メチル水銀含有量が明らかな認証標準試料を用いることとした。

産業総合研究所が制作した認証標準試料 CRM-7402a (基材: タラ) を用いて、試料の前処理法を検討した。本試料を対象に、塩酸酸性-ベンゼン抽出¹⁾を試みたところ、強固なエマルジョンを生じ、メチル水銀を効率よく抽出するためには3回以上抽出操作を繰り返すことが必要であった。

また、ベンゼンをトルエンに変更しても同様の結果であったことから、塩酸の添加がエマルジョン形成の一因と考えられた。そこで、臭化カリウム・硫酸銅(II)飽和硫酸混液添加トルエン抽出法⁷⁾を用いてエマルジョン形成の抑制及び抽出率の向上を検討した。

硫酸ならびに臭化カリウムの濃度、トルエン量、振とう時間及びシステイン濃度について最適化を行った。検討の結果、硫酸ならびに臭化カリウム濃度及びトルエン量が抽出率に大きく影響することが明らかとなった。結果を Fig. 4 に示す。硫酸濃度を 4 mol L⁻¹、臭化カリウム濃度を 1 mol L⁻¹、トルエン量を 15 mL、振とう時間を 45 分間、システイン濃度を 1% とすることで、1 回の抽出操作で 95% 以上の抽出率が得られたことから、上記の条件を抽出条件として採用した。

採用した条件に従い、メカジキ、マグロ及びツノザメを基材とする他の認証試料 (CRM-7403a, ERMCE-464 及び DOLT-4) からの抽出を試みた。その結果、トルエン抽出時にエマルジョンは生じなかったが、1% システイン溶液に逆抽出する際に CRM-7403a, ERMCE-464 及び DOLT-4 において、界面に若干のエマルジョンが生じた。試料に由来する両親媒性物質の影響が考えられたため、トルエンを除去したのち水層を *n*-ヘキサンで洗浄したところ、エマルジョンを消失させることが可能であった。

3.4 分析法の性能評価

タラ、メカジキ、マグロ及びツノザメを基材とする計 5 種の認証標準試料 (CRM-7402a, CRM-7403a, BCR-463, ERMCE-464, DOLT-4) を用いて、開発した分析法の性能を評価した。実験計画及び性能評価の目標値は、厚生労働省により通知されたガイドライン¹⁵⁾に準じた [2 併行 5 日間, 目標値: 真度 (%) 70~120, 併行精度 (RSD%) 10 未満, 室内精度 (RSD%) 15 未満]。

性能評価の結果は Table 2 に示すように、真度 (%) 98~108, 併行精度 (RSD%) 10 未満, 室内精度 (RSD%) 15 未満であり、試料によって若干の違いはあるものの、いずれの認証標準試料についても、ガイドラインに示された性能の目標値を満たす結果が得られた。また、魚種や部位が多岐にわたる認証標準試料を性能評価に使用したが、これらの試料間に明確な差異は認められなかった。以上の結果から、本分析法をメチル水銀分析法として用いることの基本的な妥当性が確認されたと判断できる。今後、適用する食品や濃度ごとに適宜性能を評価し、運用することが可能であると考えられる。

4 結 言

フェニル誘導体化を介した GC-MS 法による食品中メチル水銀の分析法の開発を検討し、その性能評価を行った。

Table 2 Evaluation of the performance characteristics of the method

Sample	Certified value ^{a)} (mg kg ⁻¹)		Measured value (mg kg ⁻¹)					Mean ^{b)} (mg kg ⁻¹)	Trueness (%)	Repeatability (RSD%)	Reproducibility within laboratory (RSD%)
			Days								
			1st	2nd	3rd	4th	5th				
CRM-7402a (cod fish tissue)	0.58 ± 0.02 (as Hg)	Portion 1	0.675	0.507	0.662	0.610	0.524	0.571	98	9.3	13.4
		Portion 2	0.570	0.484	0.655	0.483	0.543				
CRM-7403a (swordfish tissue)	5.00 ± 0.22 (as Hg)	Portion 1	4.975	4.112	5.382	5.378	5.365	4.952	100	9.9	11.7
		Portion 2	5.425	4.444	4.697	5.627	4.113				
BCR-463 (tuna fish tissue)	3.04 ± 0.16 (as CH ₃ Hg)	Portion 1	2.564	3.381	3.734	3.246	3.527	3.280	108	9.6	11.1
		Portion 2	3.157	3.675	3.426	3.243	2.851				
ERMCE-464 (tuna fish tissue)	5.50 ± 0.17 (as CH ₃ Hg)	Portion 1	6.394	4.963	5.351	6.592	5.243	5.694	104	4.1	14.9
		Portion 2	6.707	4.932	5.538	6.622	4.598				
DOLT-4 (dogfish liver)	1.33 ± 0.12 (as Hg)	Portion 1	1.441	1.265	1.435	1.344	1.273	1.364	103	7.1	10.0
		Portion 2	1.498	1.302	1.358	1.595	1.128				

a) Contain their expanded uncertainly ($k = 2$ is the coverage factor). b) $n = 10$.

食品試料からの抽出方法を臭化カリウム・硫酸銅(II)飽和硫酸混液添加トルエンを用いた方法とすることで、発がん性が指摘されているベンゼンを使用することなく、効率よくメチル水銀を抽出することが可能となった。抽出したメチル水銀をフェニル化することで、一般的な5%フェニル・95%メチルシロキサノカラムにより良好に分離することが可能となった。

本法の性能は、平成22年12月24日厚生労働省医薬食品局食品安全部通知食安発1224第1号「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」に示された性能の目標値を満たしていた。この結果により、本法を食品中のメチル水銀分析法とすることの妥当性が確認されたと判断できる。今後、試料の採取重量等も含め、本法の適用可能性について生鮮食品等を用いた検討を進めたい。

本研究は、平成22年度厚生労働科学研究費補助金・食品の安心・安全確保推進研究事業（課題名 食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究）の一部として実施した。

文 献

- 1) International Programme on Chemical Safety: "ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 101 METHYLMERCURY", available from <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm>>, (accessed 2010-04-11).
- 2) "妊婦への魚介類の摂食と水銀に関する注意事項", 厚生労働省 Web site, <<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/suigin/dl/index-a.pdf>>.
- 3) 厚生省環境衛生局: "魚介類の水銀の暫定的規制値について", (昭和48年7月23日, 環乳第99号).
- 4) 食品衛生協会: "食品衛生検査指針 理化学編", p. 404 (2005).
- 5) S. C. Hight, M. T. Corcoran: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 24 (1987).
- 6) Z. Jókai, L. Abrankó, P. Fodor: *J. Agr. Food Chem.*, **53**, 5499 (2005).
- 7) P. Hajeb, S. Jinap, F. A. Bakar, J. Bakar: *Food Addit. Contam.*, **26**, 829 (2009).
- 8) R. Cela-Torrijos, M. Miguéns-Rodríguez, A. M. Carro-Díaz, R. A. Lorenzo-Ferreira: *J. Chromatogr. A*, **750**, 191 (1996).
- 9) R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa: *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, 1560 (2002).
- 10) D. Gibičar, M. Logar, N. Horvat, A. Marn-Pernat, R. Ponikvar, M. Horvat: *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 329 (2007).
- 11) D. C. Baxter, I. Rodushkin, E. Engström, D. Klockare, H. Waara: *Clin. Chem.*, **53**, 111 (2007).
- 12) Y. Cai, S. Monsalud, K. G. Furton: *Chromatographia*, **52**, 82 (2000).
- 13) R. Rodil, A. M. Carro, R. A. Lorenzo, M. Abuín, R. Cela: *J. Chromatogr. A*, **963**, 313 (2002).
- 14) H. Matsubara, S. Nakayama, S. Funakoshi, K. Urano: *J. Jpn. Soc. Water Environ.*, **19**, 557 (1996).
- 15) 厚生労働省医薬食品局食品安全部: "食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて", (平成20年9月26日, 食安発第0926001号).
- 16) 厚生労働省医薬食品局食品安全部: "食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について", (平成22年12月24日, 食安発1224第1号).
- 17) "魚介類に含まれる水銀の調査結果(まとめ)", 厚生労働省 Web site, <<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2010/05/dl/s0518-8g.pdf>>.

Development of the GC-MS Method Following Phenylation to Quantify Methylmercury in Foods

Tomonori SAKAMOTO¹, Kouichi AKAKI¹, Takahiro WATANABE²,
Rieko MATSUDA² and Hiroshi HIWAKI¹

¹ Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment, 2-1-34, Jigyohama, Chuo-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 810-0065

² National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

(Received September 25, 2011 ; Accepted December 2, 2011)

A method for the determination of methylmercury in foods by GC-MS method following phenylation was investigated. Methylmercury was isolated by acid leaching (mixture of potassium bromide solution and sulfuric acid saturated with copper sulfate), the extraction of methylmercury into toluene, then back-extraction into L-cysteine solution. Methylmercury was phenylated with sodium tetraphenylborate, and extracted into *n*-heptane. Phenylated methylmercury was purified by PSA mini-column, then analyzed by GC-MS (SIM). As a result of the performance evaluation using five certified reference materials (CRM-7402a, CRM-7403a, BCR-463, ERMCE-464 and DOLT-4), trueness (%), repeatability (RSD%) and reproducibility within laboratory (RSD%) was 98-108, less than 10 and less than 15, respectively. It was shown that the method satisfy the performance satisfied criteria set by Ministry of Health, Labor and Welfare.

Keywords : methylmercury ; GC-MS ; phenylation.

CHARACTERIZATION OF NATURAL AHR LIGANDS IN HEALTH FOODS ESTIMATED BY IN VITRO REPORTER GENE ASSAY

Amakura Y¹, Tsutsumi T², Nakamura M³, Handa H³, Yoshimura M¹, Matsuda R², Yoshida T¹

¹Matsuyama University, 4-2 Bunkyo-cho, Matsuyama, Ehime 790-8578, Japan; ²National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; ³Hiyoshi Corporation, 908 Kitanosho-cho, Omihachiman, Shiga 523-8555, Japan

Introduction

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor that mediates the toxic and biological actions of many aromatic environmental pollutants such as dioxins. As part of an investigation to clarify the interaction of foods with AhR, we previously reported that excessive intake of foods containing AhR-activators may be conducive to promote dioxin-like toxicity though there would not be a problem following normal intake.¹⁾ Additionally, it is discussed that the signal transduction of natural AhR ligands, which occurs after AhR activation, should differ from that of dioxins. In this study, we examined the binding ability of fifty extracts prepared from kinds of commercial supplements and health foods containing high concentrations of their respective ingredients to the AhR using reporter gene assay. At the same time, the active sample extracts were fractionated to characterize the AhR active substances, and reversed-phase HPLC analysis was conducted for the active fractions

Materials and methods

1. Extraction and isolation

Fifty supplements and health foods were from drug stores in Japan. The samples were prepared as follows: Tablets were powdered and the contents of capsules and soft capsules were used for sample preparation. The materials (1 g) were homogenized in ethanol/water (4:1) (30 mL) for 10 min and filtered. The filtrates were concentrated under reduced pressure and freeze-dried (total extract). Total extracts were added to water (10 mL), and these solutions were subjected to liquid-liquid partition (each 30 mL) to give three extracts: *n*-hexane, ethyl acetate, and water soluble portions.

2. HPLC conditions

HPLC analysis was carried out using a Shimadzu Prominence system. Conditions were as follows: column, L-column ODS (5 μ m, 150 \times 2.1 mm i.d.); mobile phase, solvent A was 3% acetic acid and solvent B was acetonitrile (0–30 min, 0–50% B in A; 30–35 min, 50–85% B in A; 35–40 min, 85–85% B in A); injection volume, 5 μ L; column temperature, 40°C; flow-rate, 0.3 mL/min; detection, 200–400 nm.

3. Estimation for AhR ligand activity

For the identification of AhR-activating materials, a CALUX assay was used.²⁾ When mouse hepatoma (H1L6.1c2) cells are exposed to ligands such as dioxins, luciferase protein synthesis is induced. The amount of light emitted by the luciferase protein is correlated directly with the dioxin level, and this system is used as a simple dioxin monitoring method (Figure 1).

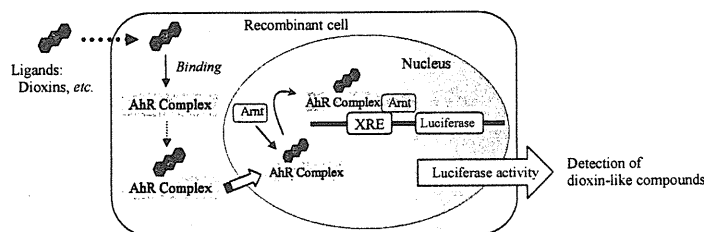


Figure 1. AhR-mediated *in vitro* bioassay (CALUX assay)

Results and discussion

Although most of the samples showed no dioxin-like activity even at a high concentration, some samples exhibited activity at high concentration in the order of mg/mL in dose-dependent manner. In order to characterize the active components of each sample from soybean-related samples (No. 30 and 31), sesame (No. 29), and propolis (No. 26), AhR activity was measured for the respective *n*-hexane, ethyl acetate, and water fractions. The *n*-hexane fraction of the propolis extract sample exhibited AhR activity, and marked AhR activity was noted for the ethyl acetate fractions of the other samples (soybean and sesame extract samples) at 0.1-10 mg/mL (Figure 2).

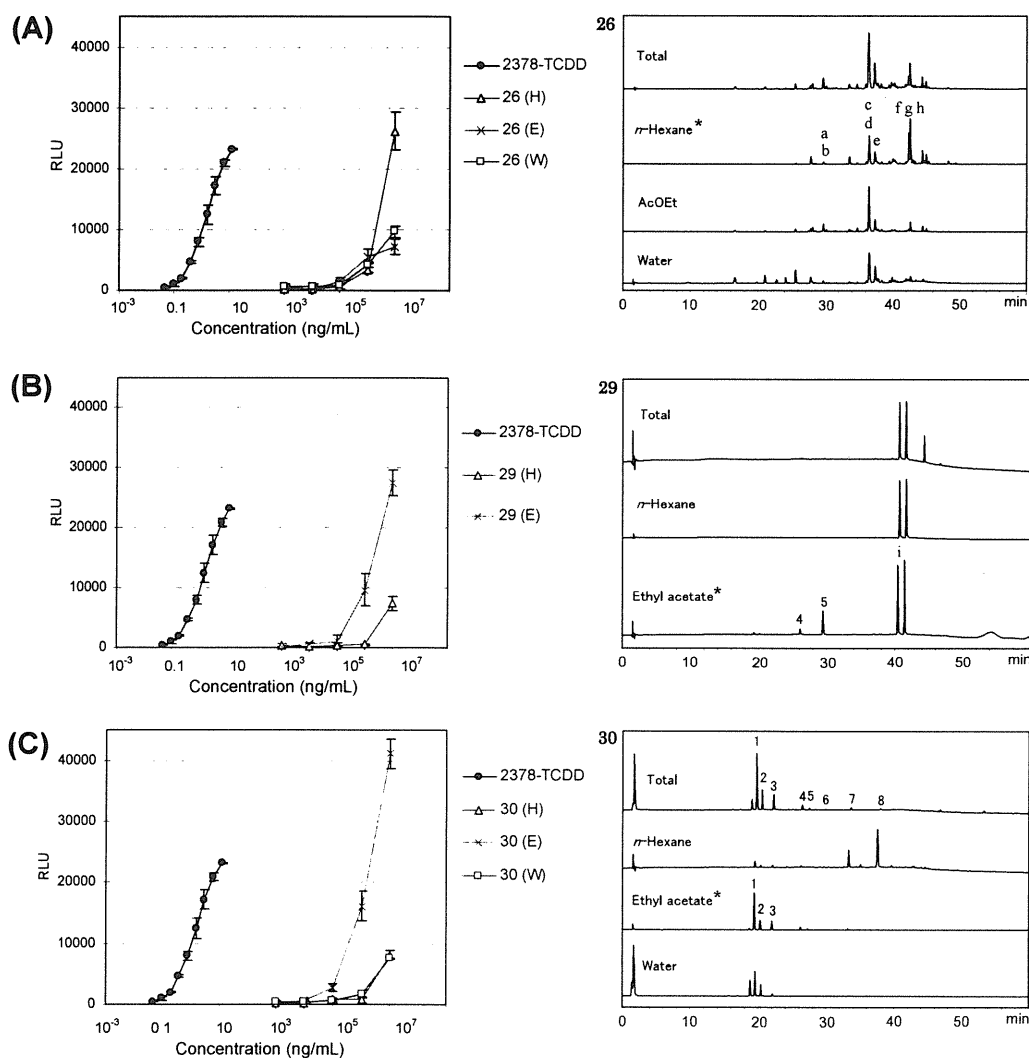


Figure 2 (continued on the following page).

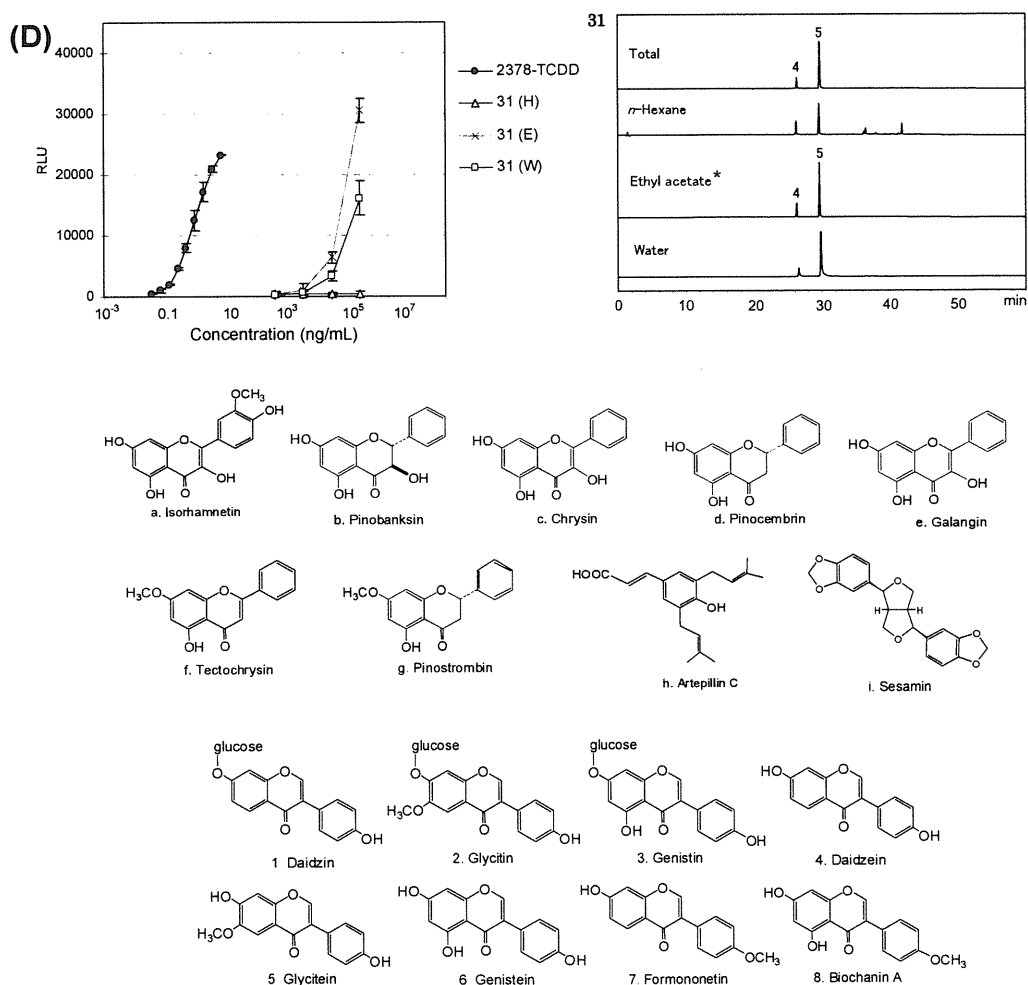


Figure 2. Concentration-response curve and RP-HPLC profiles of active samples and TCDD for the induction of luciferase activity in the CALUX assay.

(A) Propolis (No. 26), (B) Sesame (No. 29), (C) Soy-bean related samples (No. 30), (D) Soy-bean related samples (No. 31)

H, *n*-Hexane fraction; E, Ethyl acetate fraction; W, aqueous fraction

a, isorhamnetin; b, pinobanksin; c, chrysin; d, pinocembrin; e, galangin; f, tectochrysin; g, pinostrombin; h, artepillin C; i, sesamin

1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, daidzein; 5, glycitein; 6, genistein; 7, formononetin; 8, biochanin A
Signals in HPLC were detected at 254 nm except sample 26 (at 280 nm). Sample 29 did not provide an aqueous fraction for analysis. * AhR activated fraction

HPLC analysis of the active fractions of sesame and soybean-related samples identified isoflavones, such as daidzein and glycitein. The *n*-hexane fraction of the propolis product which showed AhR activity contained eight compounds such as tectochrysin and pinocembrin. Among these compounds, tectochrysin showed remarkable

AhR activation (Figure 3). AhR-activated compounds identified in this study are reported as beneficial constituents. Also, they do not have accumulation characteristics such as the dioxin. Most recently, several papers reported that AhR activation may be involved in novel physiological functions.³⁾⁻⁶⁾ Therefore it is suggested that natural AhR ligands characterized in the present study may play some beneficial regulatory role in human.

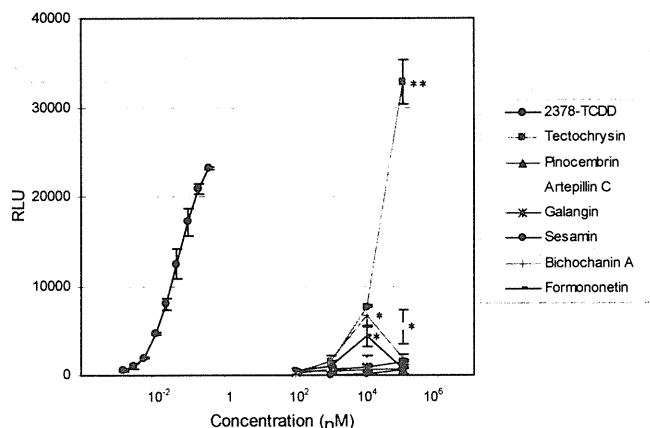


Figure 3. Concentration-response curve of selected compounds and TCDD for the induction of luciferase activity in the CALUX assay

Each point represents the mean of at least three replicate analyses. Results are expressed as means \pm SD, and asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Acknowledgements

This work was supported in part by a Health and Labour Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, as well as Grants-in aid for Scientific Research (C) (No. 20500733).

References

1. Amakura Y, Tsutsumi T, Sasaki K, Nakamura M, Yoshida T, Maitani T. (2008); *Phytochemistry* 69: 3117-3130.
2. Tsutsumi T, Amakura Y, Nakamura M, Brown DJ, Clark GC, Sasaki K, Toyoda M, Maitani T. (2003); *Analyst* 128: 486-492.
3. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renaud J, Stockinger B. (2008); *Nature* 453: 106-110.
4. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. (2008); *Nature* 453: 65-71.
5. Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. (2008); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 105: 9721-9726.
6. Kawajiri K, Kobayashi Y, Ohtake F, Ikuta T, Matsushima Y, Mumura J, Pettersson S, Pollenz RS, Sakaki T, Hirokawa T, Akiyama T, Kurosumi M, Poellinger L, Kato S, Fujii-Kuriyama Y. (2009); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 106: 13481-13486.

The Measurement of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls without Derivatization using a high-resolution gas chromatograph / high-resolution mass spectrometer

Daisuke Yasutake¹, Tsuguhide Hori¹, Yoichi Kurokawa¹, Jumboku Kajiwara¹,
Tomoaki Tsutsumi², Yoshiaki Amakura³

¹Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan;
²National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; ³Matsuyama
University, 4-2, Bunkyo-cho, Matsuyama, Ehime 790-8578, Japan

Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are persistent and bioaccumulative substances, the usage and disposal of which were banned in 2004 under the Stockholm Convention because they are persistent organic pollutants. Recently, various kinds of PCB metabolites have been detected in the environment. Mainly, the PCB metabolites are formed by the metabolism by living organisms of PCBs in the environment. Hydroxylated PCBs (OH-PCBs) are well known as metabolites of PCBs. OH-PCBs show a high affinity for thyroid hormone transport protein in the human blood, resulting in a reduced quantity of thyroid hormone. OH-PCBs have been detected in the blood and tissues of humans and several wildlife species and in environmental media.

In general, hydroxyl groups of OH-PCBs are derivatized to methoxy groups, OH-PCBs are measured using a high-resolution gas chromatograph / high-resolution mass spectrometer (HRGC/HRMS) as methoxylated PCBs (OMe-PCBs). However, the reaction efficiency of the derivatization depends on the substitution position of the hydroxyl group and the number of chlorine atoms. Moreover, because the stability of the reaction affects the measurement accuracy, it is desirable to measure OH-PCBs without derivatization. Our goal is to develop an analytical method for measuring the concentration of OH-PCBs in foods. In this study, we sought to determine which capillary column was most suitable for the measurement of OH-PCBs without derivatization using HRGC/HRMS.

Materials and methods

Chemicals

The standard solutions of 38 kinds of OH-PCB and 7 kinds of OMe-PCB were purchased from Accustandard, Inc. (CT, USA). The OH-PCBs standard for the evaluation of capillary columns and the labeled PCBs standard for the internal standard were purchased from the Wellington Laboratories, Inc. (ON, Canada). These standard solutions are listed in Table 1.

HRGC/HRMS

Identification of OH-PCBs and OMe-PCBs was performed using HRGC/HRMS (Agilent Technology, USA, 6890 series /Waters, UK, Autospec-Ultima) above 10,000 resolution.

Table 1 List of the standard solutions

The standard solution of 38 kinds of OH-PCB	
6-OH-CB2	3'-OH-CB65
4-OH-CB1	4'-OH-CB50
4-OH-CB2	4'-OH-CB61
4'-OH-CB3	4'-OH-CB69
2'-OH-CB9	4'-OH-CB72
3'-OH-CB9	4'-OH-CB65
4'-OH-CB9	6'-OH-CB106
4-OH-CB14	6'-OH-CB112
2'-OH-CB5	4'-OH-CB86
2'-OH-CB12	4'-OH-CB93
2'-OH-CB30	4'-OH-CB106
6'-OH-CB18	4'-OH-CB112
3'-OH-CB30	4'-OH-CB121
4'-OH-CB26	3'-OH-CB101
4'-OH-CB30	4'-OH-CB101
2'-OH-CB61	6'-OH-CB101
2'-OH-CB65	4'-OH-CB159
6'-OH-CB69	4'-OH-CB165
3'-OH-CB61	4'-OH-CB172
The standard solution of 7 kinds of OMe-PCB	
4'-OMe-CB3	4'-OMe-CB101
4'-OMe-CB9	4'-OMe-CB159
4'-OMe-CB26	4'-OMe-CB172
4'-OMe-CB72	
The OH-PCBs standard solution for the evaluation of capillary column	
4-OH-CB#54	4-OH-CB#146
4'-OH-CB#104	4-OH-CB#187
4-OH-CB#107	4'-OH-CB#172
3'-OH-CB#138	
The internal standard solution	
13C ₁₂ -PCB#70	13C ₁₂ -PCB#138
13C ₁₂ -PCB#111	13C _{12,1,2,3,4,6,7,8-H₉CBF}