

(C)

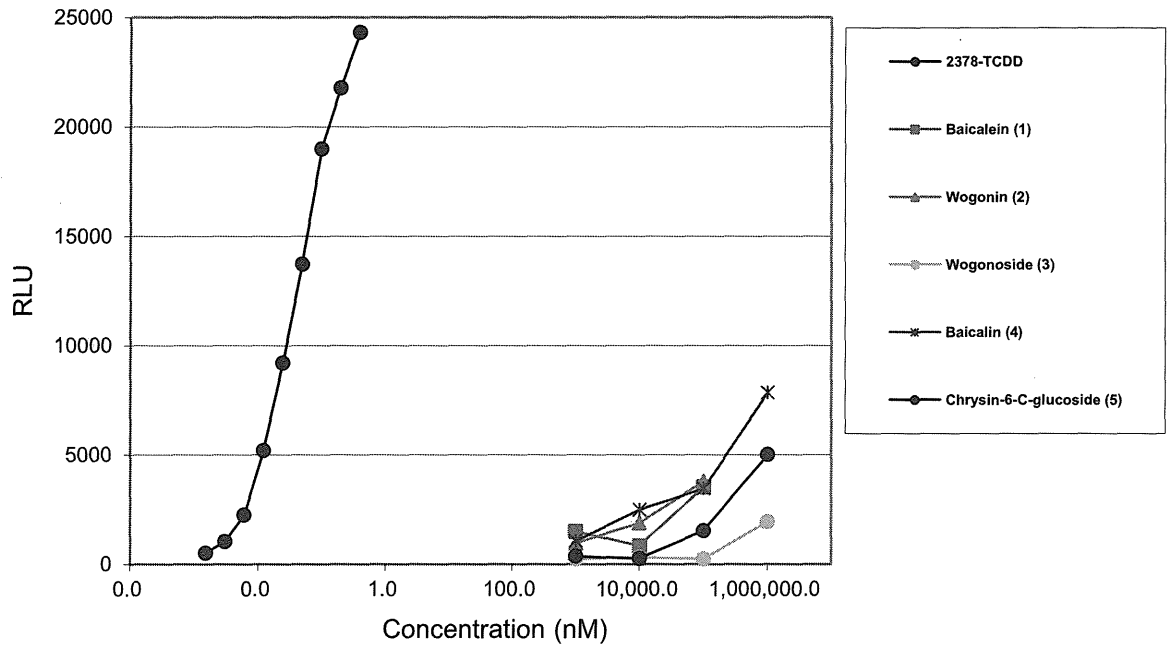


図 3. (続き)

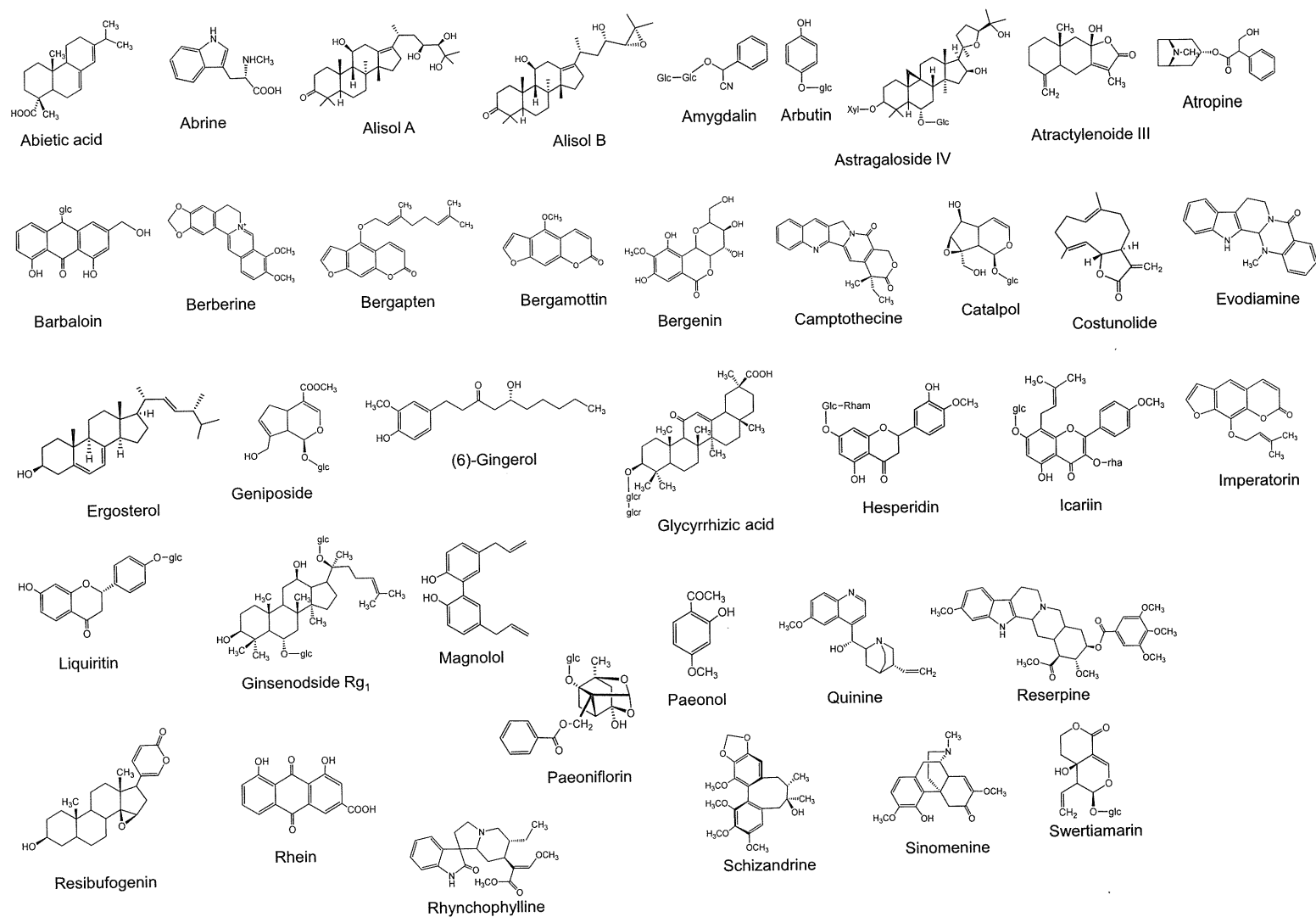


図 4. 天然由来成分 38 種の化学構造

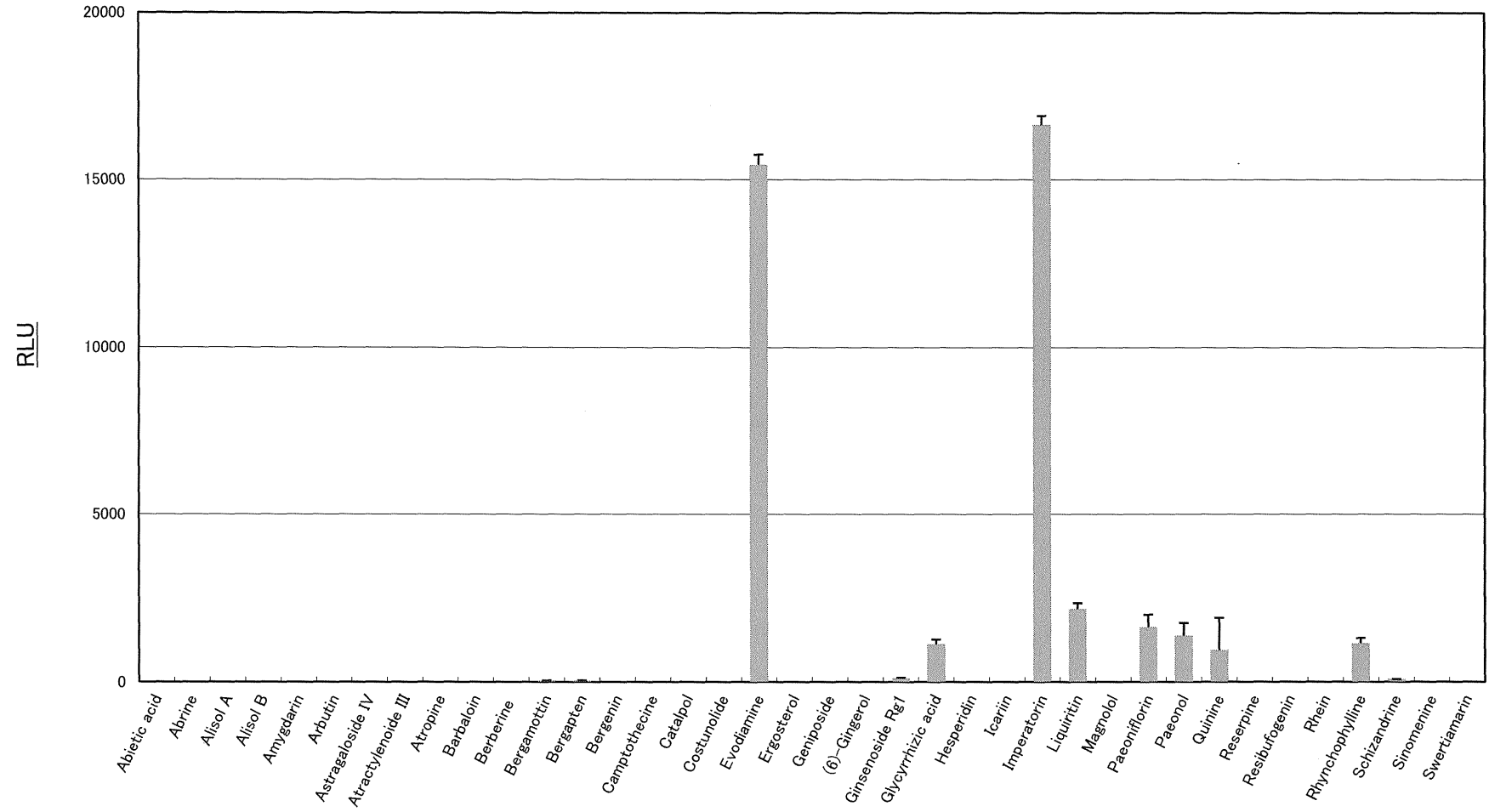


図 5. 植物由来(生薬)エキスの AhR 活性

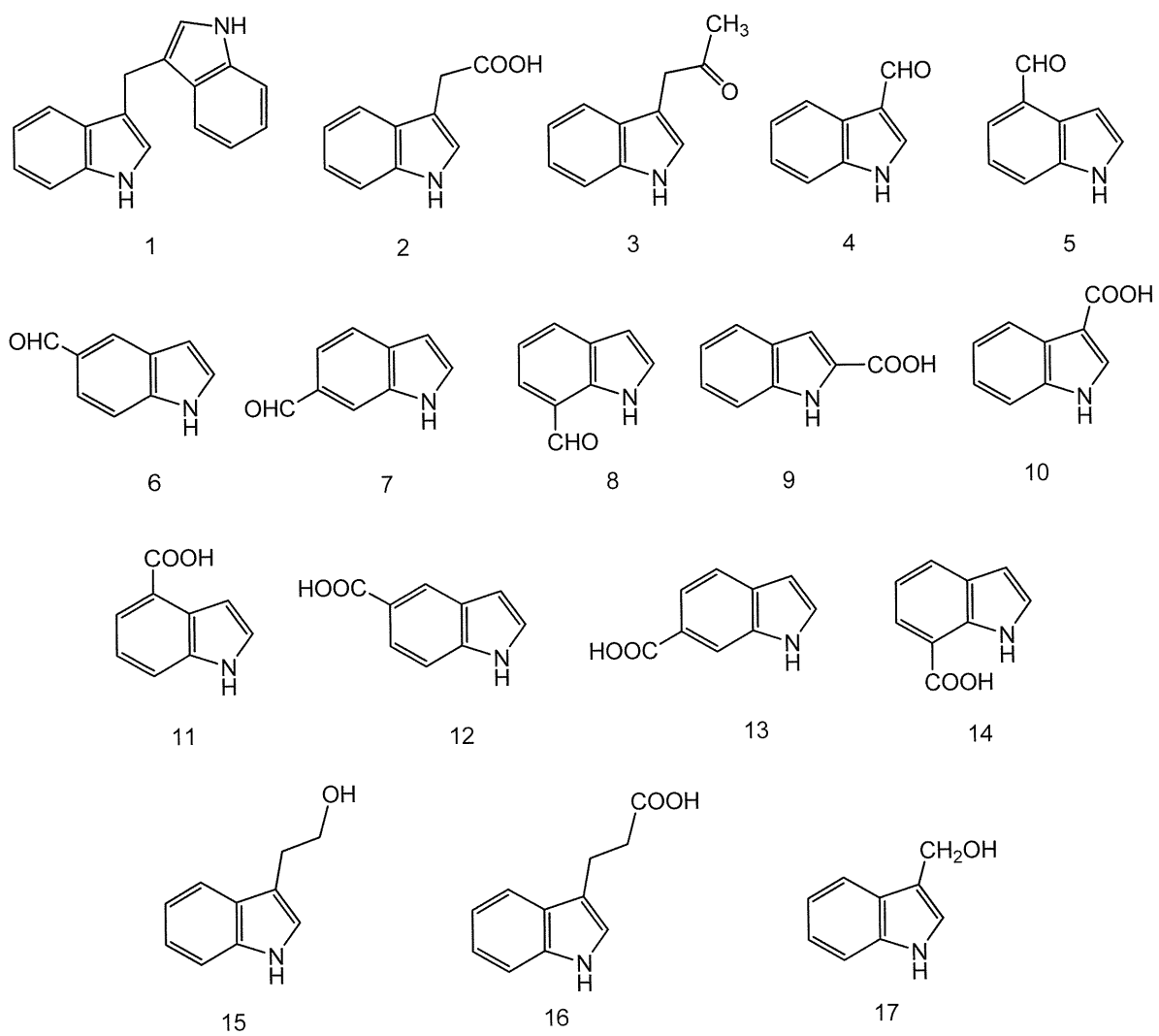


図6. インドール化合物 17 種の化学構造

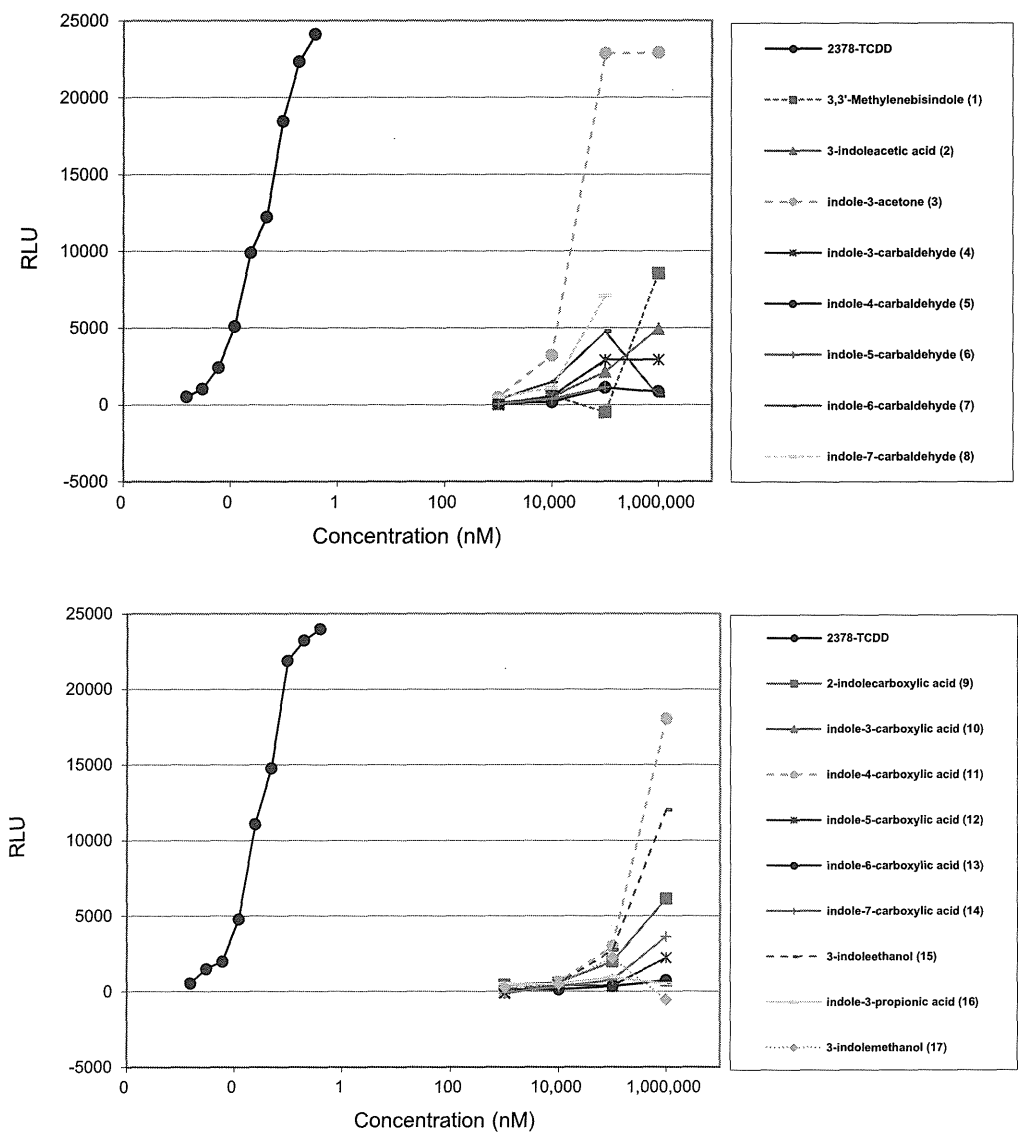


図 7. インドール化合物の AhR 活性

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

研究分担報告書

難分解汚染物(POPs)の摂取量推定に必要な分析法の開発
(2)食品中 PCB 代謝物の分析法開発に関する研究

研究代表者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部
分担研究者 天倉吉章 松山大学薬学部

研究要旨

食品中の PCB 代謝物 (OH-PCBs)の分析法開発に関する研究を行った。本課題で検討する OH-PCBs 分析法は 3 つの工程、すなわち①食品に残留する OH-PCBs の効率的な抽出、②食品に特有の分析妨害成分を取り除く精製、③高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計 (HRGC/HRMS)による OH-PCBs の異性体分離分析、から構成される。本年度は主に、食品試料中の OH-PCBs の抽出及び精製法に関する検討を行い、魚試料を用いた OH-PCBs 標準品の添加回収実験等を実施した。魚試料 20 g を量り取り、アセトニトリルを用いて高速溶媒抽出装置 (ASE) で抽出液を調製した。抽出液を硫酸処理、フロリジル固相カラム及び C18 固相カラムで精製する方法を作成した。魚試料のサバとブリに OH-PCBs 標準品を添加し、抽出・精製した試料液を高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析法 (HRGC/HRMS) を用いて非誘導体化法で測定した。OH-PCBs 標準品の添加回収率を算出したところ、サバで 5 塩素化物：72%及び 6 塩素化物：90%、ブリでは 5 塩素化物：78%及び 6 塩素化物：80%であった。昨年度までに本研究で開発した機器分析法が食品試料中の OH-PCBs 分析に適用可能であることが示唆された。

研究協力者

福岡県保健環境研究所

堀 就英、飛石和大

福岡県環境部環境保全課

安武大輔

国立医薬品食品衛生研究所

堤 智昭

生物代謝されて生成し、一部の PCB 代謝物は母化合物の PCB よりも強い毒性を有することが分かった⁹⁾。PCB 水酸化体 (OH-PCBs) は代表的な PCB 代謝物であり、ヒト体内で血液中の甲状腺ホルモン輸送タンパク質と高い親和性を有し、甲状腺ホルモン量の低下をもたらすとされ、その毒性が懸念されている⁹⁾。

現在までに食品中の PCB 代謝物の化学分析法は確立されておらず、当該物質による食品汚染度や残留実態は明らかでない。また、環境試料の分析方法を食品にそのまま適用できるかは明らかでない。食品試料に特有の成分を取り

A. 研究目的

生物試料や水底質等の媒体から、種々の PCB 代謝物を検出した事例が報告されている¹⁾⁻⁴⁾。PCB 代謝物は、環境中に残留する PCB が

除き、OH-PCBs を高い精度で測定可能な試験法の確立が望まれている。平成 22 年度の本分担研究では、OH-PCBs を誘導体化せずに HRGC/HRMS で測定し、従来の誘導体化法と同等の検出感度が得られる測定条件を確立した⁷⁾。また平成 23 年度は、食品中 OH-PCBs の抽出法並びに精製法に関する基礎検討、環境試料をモデル試料として非誘導体化法による OH-PCBs 分析の試行を行った⁸⁾。

今年度は、(1) 食品抽出物の抽出及び精製方法の検討、(2) 市販魚介類を用いた添加回収試験及び OH-PCBs 分析、の各項目を実施した。

B. 研究方法

1. 試料・試薬等

1.1 試料

食料品店でサバ、サケ及びブリを切身で購入し、フードプロセッサで均一化して使用した。

1.2 標準物質

食品の抽出及び精製法の予備検討に使用した標準溶液の組成等を表 1 に示した。測定は LC/MS/MS で行い、OH-PCBs の 5~7 塩素化体の 5 種化合物を指標として、各精製工程における標準品回収率を調べた。

魚試料を用いた添加回収試験で使用した標準品組成を表 2 に示した。Wellington Laboratories 製の MHPCB-MXA は、¹³C でラベル標識された PCB の 1 水酸化物 7 種類 (2~7 塩素化体) を各々 5 µg/mL 含有する混合溶液で、これをノナンで希釈して 10 ng/mL 溶液を調製し、実験に使用した。¹³C -OH-PCBs の回収率算出のために、シリンジスパイク用標準品溶液として ¹³C ラベル化 PCDD、PCDF 及び PCB の 5 化合物を各々 10 ng/mL 含有する混合溶液 (ノナン溶液) を用いた。機器分析は HRGC/HRMS で行った。

1.3 試薬及び器材

ヘキサン、アセトン及びノナンは関東化学製のダイオキシン類分析用を、アセトニトリル、ジエチルエーテル、蒸留水 (ヘキサン洗浄品)

及び無水硫酸ナトリウムは同社製の残留農薬・PCB 試験用を、メタノール及び酢酸アンモニウムは同社製の LC/MS 用を用いた。硫酸は和光純薬製の有害金属測定用を使用した。緩衝液は、ナカライテスク製の崩壊試験液第 1 液 (pH1.2、10 倍濃度) を用いた。

珪藻土は International Sorbent Technology 製の BULK ISOLUTE SORBENT HM-N を用いた。フロリジルカートリッジカラムは Waters 製の Sep-pak Plus Florisil (910 mg) を使用した。C18 カラムは Sigma-Aldrich 製の Supelclean Envi-18 (500 mg) を用いた。

2. 機器および使用条件

2.1 液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS/MS)

LC/MS/MS (Waters 製) は下記のシステムを使用し、測定条件を表 3 に示した。

LC : Alliance 2695 series

MS : Quattro micro API

2.2 高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析計 (HRGC/HRMS)

HRGC/HRMS は下記のシステムを使用し、OH-PCBs の測定条件は昨年度の報告書と同様であった。PCBs の測定条件は、既報と同様であった⁹⁾。

HRGC : Agilent 6890N

HRMS : Micromass AutoSpec Premier

2.3 高速溶媒抽出装置

高速溶媒抽出 (ASE) には DIONEX 社製の大容量型装置 ASE-350 を使用した。抽出条件は下記の通りであった。

セル温度 : 100°C、セル圧力 : 1500psi、加熱時間 : 5 分、静置時間 : 12 分、抽出サイクル数 : 3

3. 実験操作

3.1 食品抽出試料の精製条件の検討

精製条件の検討では機器分析に LC/MS/MS を使用した。

フロリジルカラム及び C18 カラムにおける OH-PCBs 標準品の溶出挙動を確認した。また、

硫酸処理操作における標準品回収率を検討した。

魚抽出液を用いて、固相カラムにおける精製効果を検討した。図1に示した方法に従って魚抽出液を調製した。魚均一化試料の約20gを正確に量り取り、珪藻土約20gと十分に混合した。ASE-350用のステンレス製抽出セル(99mL容)に試料を充填し、アセトニトリルで抽出した。抽出液を50~60mLになるまで減圧濃縮し、300mL容分液ロートに移し、5%塩化ナトリウム溶液200mLを加えて混和した。

ここで、フェノール性水酸基を有する目的化合物を極性溶媒から非極性溶媒へ効率的に抽出することを目的として、pH1.2の緩衝液を約6mL加え、液性をpH2~3に調整した。ヘキサン50mLで2回振とう抽出を行い、合わせたヘキサン層を2~3mLになるまで減圧濃縮した。この抽出液を固相カラムに負荷して、抽出液の着色等が十分に取り除けるか調べた。

上記の抽出法と精製法(硫酸処理、フロリジル及びC18精製)を組み合わせて分析全工程を実施した際の標準品回収試験を行った。

3.2 魚試料を用いた OH-PCBs 標準品の添加回収試験

魚試料(サバ、ブリ)でOH-PCBsの添加回収試験を行った。機器分析はHRGC/HRMS(非誘導体化法)で行った^{7,8)}。

抽出時に内部標準物質(¹³C-OH-PCBsの7物質)を添加した。抽出液の調製は3.1項と同様に行った(図1)。得られた抽出液を10mL容の先細型スピッツ管に移して試料液の全量を9mLとし、濃硫酸1mLを添加し一夜放置した(硫酸処理)。試料を遠心分離し、上澄みのヘキサン層をフロリジルカラム及びC18カラム精製に供した。

精製後の画分を窒素ガス気流下で穏やかに濃縮し、濃縮物を測定バイアルに移し、シリンジスパイク(表2)を添加した。最終検液をヘキサンに溶媒置換し、全量約1mLとし、この1μLをHRGC/HRMSに注入して測定した。

3.3 市販魚試料中の OH-PCB 濃度

市販の魚介類でPCBsが検出された試料(ブリ)を用いてOH-PCBs分析を実施した。内部標準物質(¹³C-OH-PCBsの7物質)に対応するネイティブ体の同定を試みた。

PCBsは既報の方法に従って分析した⁹⁾。OH-PCBsの抽出・精製は、3.2項の添加回収実験と同様の方法で行い、測定はHRGC/HRMS(非誘導体化法)で実施した。

C. 研究結果及び考察

1. 抽出試料の精製法

フロリジル固相カラムを用いた魚抽出物の精製を検討した。昨年度の本分担研究の結果では、OH-PCBsの溶出液として50%アセトン/メタノールを用いた場合に良好な回収率が得られた⁸⁾。

本項で使用する標準溶液は、昨年度に用いたものと組成が異なるため、50%アセトン/メタノール(6mL)で溶出挙動を再度確認したところ、81~90%の良好な回収率が得られた(表4)。一方、溶出液に50%アセトン/ヘキサン(6mL)を用いた場合は、固相に保持されたOH-PCBsを回収できなかった。

次に、魚試料の抽出液をフロリジルカラムに負荷し、十分な精製効果が得られるか検討した。図1のフローに従って調製したサバ、サケ(各20g)の抽出液を各々フロリジルカラムに負荷した。最初に0.5%ジエチルエーテル/ヘキサン6mLで溶出させたところ、抽出液由来の着色成分は固相部分に保持されたままであった(この画分には夾雑成分やMeO-PCBsが含まれる¹⁰⁾)。次に、50%アセトン/メタノール6mLで溶出したところ、固相の着色成分の多くが溶出液に移行した。結果として、50%アセトン/メタノールを溶出液に用いた場合、OH-PCBsとマトリックス成分の多くは溶出位置が重なるため、別途精製工程が必要と考えられた。

魚抽出液の精製法として、固相カラム精製の前に、硫酸処理を行う方法を検討した。昨年度

の本分担研究で、OH-PCBs 分析における硫酸処理時の回収率は、試験条件（用いる濃硫酸の量、濃硫酸と目的物質との相対比、目的物質の希釈率等）によって異なることが示唆された⁸⁾。今回は、抽出液（ヘキサン層）と硫酸の体積比を9:1に設定し、硫酸処理後のOH-PCBs標準品の回収率を調べた。ヘキサン9mLを10mL容の共栓スピッツ管に採り、OH-PCBs標準品を添加して混和後、硫酸1mLを加えて、一夜静置した。ヘキサン層を濃縮して、内部標準物質を加え、LC/MS/MSで測定した。この結果、標準品の回収率は83~95%と良好であった（表5）。ヘキサン層と硫酸層の体積比や静置時間は、本条件で適切と考えられた。

さらに追加精製法として、C18カラムの使用条件を検討した。あらかじめメタノール10mLでコンディショニングしたC18カラムにOH-PCBs標準品を負荷し、メタノール6mLで溶出し分画した後、さらにメタノール6mLで分画した。LC/MS/MS測定の結果、前者の画分でOH-PCBs負荷量の75~84%の溶出が確認できた。後者の画分には、溶出が認められなかった（表6）。以上の結果から、C18カラムの使用条件として、メタノール溶出量を6mLに設定した。

ASEで魚抽出液（サバ、サケ各1件）を調製し、フロリジルカラム精製前に、硫酸処理を行った。魚抽出液9mLに対して硫酸1mLで行ったところ、硫酸層と分離したヘキサン層は、ほぼ無色になった。次にヘキサン層をフロリジルカラムに負荷し、50%アセトン/メタノール画分を10mL容スピッツ管に取り、窒素ガス気流下で約300 μ Lになるまで濃縮したところ、白色の析出物が生じた。

上記の濃縮物をメタノール3mLで再溶解させ、C18カラムで精製・濃縮したところ、白色の析出物は大部分が除去され、魚由来のマトリックスに対して高い精製効果が認められた。

以上の結果を踏まえて、全分析フローを実施した場合のOH-PCBs標準品の回収実験（マト

リックスなし）を行った。珪藻土を充填した抽出セルにOH-PCBs標準品（ネイティブ体5物質）を添加し、抽出して得られたアセトニトリル層をヘキサンで逆抽出し、硫酸処理、フロリジルカラム及びC18カラムで精製し、LC/MS/MS測定試料を調製した。

得られた溶出液にシリンジスパイクを加えて全量約300 μ Lとし、この20 μ LをLC/MS/MSに注入して測定した。

得られたクロマトグラムを図2に示す。クロマトグラムを解析した結果、標準品回収率は46~73%の範囲であり、概ね良好な値であった（表7）。

2. 魚試料を用いたOH-PCBs標準品の添加回収率

魚試料の添加回収試料の測定に先立ち、VF5MSカラムを装着したHRGC/HRMSで標準溶液の測定を行った。

分析最終工程のC18カラム精製で得られる画分はメタノール溶液である。そこで、メタノールで希釈調製した標準溶液をHRGC/HRMSで測定したところ、OH-PCBsのピークは得られなかった。従来のノナンで調製した標準溶液では良好なピークが得られた。また、魚試料の添加回収実験の最終検液をメタノールで調製してHRGC/HRMSに注入した場合も結果は同様で、ピークを検出できなかった。以上のことから、メタノールで調製したOH-PCBs測定試料では、本研究のHRGC/HRMS分析条件に適さないことが分かった。C18カラム精製後の画分をメタノールからヘキサンに転溶し、測定試料の調製を行うこととした。

魚試料（サバ、ブリ）に¹³C-OH-PCB標準品（各異性体1ng相当）を添加し、図1のフローに従い抽出・精製操作を行った。ただし、C18カラムの溶出液を窒素ガス気流下約1mLまで濃縮したところ、両試料ともに白色の析出物が生じたため、メタノールを加えて再溶解させ、C18カラム精製を2回繰り返した。可能な限り夾雑成分を除去し、最終検液をヘキサンで1mL

として測定に供した。

添加回収実験の HRGC/HRMS クロマトグラムの一例を図 3 に示す。¹³C-OH-PCB 標準品の回収率は、7 塩素化物では当該ピークの定量性が悪く、評価が困難であった（サバ：227%、ブリ：217%）が、5 塩素化物は 72%と 78%、6 塩素化物が 90%と 80%となり、回収率は良好であった。C18 カラム精製を繰り返し行ったが、回収率の著しい低下などの影響は認められなかった。

3. 魚試料中の OH-PCBs 分析

あらかじめ PCB の分析を実施し、湿重量あたり 35 ng/g の PCB を含有することが明らかになったブリを用いて、OH-PCBs 分析を行った（図 4）。分析対象物質は、クリーンアップスパイクとして添加した¹³C ラベル体 7 物質に対応するネイティブ体とした。結果として、一部の OH-PCBs 異性体が検出され、定量値（湿重量あたり）は 4-OH-CB120 が 18 pg/g、4-OH-CB159 が 2.5 pg/g、4-OH-CB172 が 1.1 pg/g、4-OH-CB187 が 2.5 pg/g と見積もられた。

D. 結論

昨年度までの本分担研究で開発した HRGC/HRMS による OH-PCBs の非誘導体化測定法を活用し、食品中の当該物質を測定するための抽出法、精製法を検討した。結果として、抽出液を硫酸処理した後、2 種類の固相カラム精製を行うことで、OH-PCBs の測定が可能であることが示唆された。

本研究で開発した抽出・精製法の長所は、第一に高速溶媒抽出法によって迅速で簡便に抽出液を得られる点である。第二には、従来の誘導体化法に比べて精製を含めた前処理工程が短縮化され、操作上の効率性が向上した点が挙げられる。従来法では、誘導体化操作に加え、未反応物等を除去する精製操作を必要とするが、本法ではこの工程を省略することができる。また機器分析法では、前年度の本分担研究で示したように、誘導体化反応率のバラツキによる

分析精度の低下を考慮する必要がなく、有用な試験法と考えられる。

一方、試料精製時の操作性で課題も残った。食品由来のマトリックス成分の多少に応じて、C18 カラム精製を繰り返す必要があること、精製の最終段階でメタノール溶液からヘキサン溶液に転溶せざるを得ないなど、必ずしも効率的なものではなかった。従来の誘導体化法は、工程が長くなる反面、反応後に誘導体化物をほぼ選択的に抽出でき、この工程で一定の精製効果が望める利点もあった。精製法の改善・改良が今後の検討課題のひとつである。

本研究の HRGC/HRMS 測定における OH-PCBs 異性体の装置検出限界は 0.02~0.2 pg であった⁷⁾。また、実際の魚試料から検出された OH-PCBs の検出値は、1~20 pg/g であった。この値は、「食品中のダイオキシン類分析法ガイドライン」におけるモノオルト PCB の標準的検出下限値とほぼ同等である。非誘導体化法による HRGC/HRMS 測定で、従来の PCB 異性体と同等の検出感度で OH-PCBs を分析できることが分かった。本研究で開発した機器分析法は、食品分析に留まらず、多くの環境媒体に対しても適用可能と考えられ、環境モニタリング等への応用も期待できる。

E. 参考文献

- 1) Ueno D., Darling C., Alae M., Campbell L., Pacepavicius G., Teixeira C., Muir D. Detection of Hydroxylated Poly-chlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Abiotic Environment: Surface Water and Precipitation from Ontario, Canada. *Environ. Sci. Technol.* (2007) 41, 1841- 1848
- 2) 先山孝則、奥村為男、森義明 水環境中の水酸化 PCB について. 第 14 回環境化学討論会要旨集、(2005)498-499
- 3) Kunisue T., Tanabe S. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the blood of mammals and birds from Japan: lower chlorinated OH-PCBs and profiles. *Chemosphere*

- (2009) 74, 950-961
- 4) 難波智史、松田宗明、河野公栄、森田昌敏
水生生物とその周辺環境中における水酸化
PCB の挙動 第 18 回環境化学討論会要旨集、
(2009)438-439
 - 5) William P. Flanagan, Ralph J. May, Metabolite
detection as evidence for naturally occurring
aerobic PCB biodegradation in Hudson River
sediments. *Environ. Sci. Technol.* (1993) 27,
2207-2212
 - 6) 黒田純子、永田功、黒田洋一郎 低濃度水酸化
PCB による甲状腺ホルモン依存性小脳プル
キンエ細胞発達分化の阻害. 環境ホルモン学会
研究発表会要旨集、6、374
 - 7) 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「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、難分解性汚染
物 (POPs) の摂取量推定に必要な分析法の開
発」研究分担報告書.
 - 8) 平成 23 年度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「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、難分解性汚染物
(POPs) の摂取量推定に必要な分析法の開発」
研究分担報告書.
 - 9) 堀就英、梶原淳睦、安武大輔、中川礼子:魚介
類中 PCBs の異性体分離分析. 福岡県保健環境
研究所年報第 35 号、(2008)71-76.
 - 10) Sakiyama T., Yamamoto A., Kakutani N.,
Fukuyama J., Okuma T. Hydroxylated
polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the
aquatic environment: Levels and congener
profiles in sediments from Osaka, Japan.
Organohalogen Compounds (2007) 69,
1380-1383.

F. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 堀就英、安武大輔、黒川陽一、梶原淳睦、
堤智昭、天倉吉章：食品中の水酸化 PCBs
分析法の検討 (第 2 報). 第 49 回全国衛生
化学技術協議会年会 (2012.11)

表 1 OH-PCBs 測定に使用した標準物質 (LC/MS/MS 測定)

サンプル添加用ネイティブ体

化合物	略称	濃度 (ng/mL)
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	4-OH-CB109	8
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	8
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	8
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	8
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	8

シリンジスパイク用ラベル体

化合物	略称	濃度 (ng/mL)
¹³ C-4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	¹³ C-4-OH-CB109	4
¹³ C-4-OH-2',3,4',5,5'-PeCB	¹³ C-4'-OH-CB120	4
¹³ C-3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	¹³ C-3'-OH-CB138	4
¹³ C-4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	¹³ C-4-OH-CB146	4
¹³ C-4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB	¹³ C-4'-OH-CB159	4
¹³ C-4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	¹³ C-4'-OH-CB172	4
¹³ C-4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	¹³ C-4-OH-CB187	4

表 2 OH-PCBs 測定に使用した標準物質 (HRGC/HRMS 測定)

クリーンアップスパイク用溶液

化合物名	略称	濃度 (ug/mL)
¹³ C-4OH-3',4'-DiCB	¹³ C-4-OH-CB12	5
¹³ C-4OH-2',4',5'-TeCB	¹³ C-4-OH-CB29	5
¹³ C-4OH-2',3',4',5'-TeCB	¹³ C-4-OH-CB61	5
¹³ C-4OH-2',3,4',5,5'-PeCB	¹³ C-4-OH-CB120	5
¹³ C-4OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB	¹³ C-4-OH-CB159	5
¹³ C-4OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	¹³ C-4-OH-CB172	5
¹³ C-4OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	¹³ C-4-OH-CB187	5

シリンジスパイク用溶液

化合物名	略称	濃度 (ng/mL)
¹³ C-1,2,3,4-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	¹³ C-1234-TCDD	10
¹³ C-1,2,3,4,6,8,9-Heptachlorodibenzofuran	¹³ C-1234689-HpCDF	10
¹³ C-2,3',4',5-TeCB	¹³ C-PCB70	10
¹³ C-2,3,3',5,5'-PeCB	¹³ C-PCB111	10
¹³ C-2,2',3,4,4',5'-HxCB	¹³ C-PCB138	10

表3 OH-PCBs 測定のための LC/MS/MS 測定条件

移動相流量	0.2 mL/min.	化合物	プリカーサーイオン → プロダクトイオン <i>m/z</i>
注入量	20 μ L		
カラム	L-column 2 ODS, 2.1 mm \times 100 mm, 2 μ m (CERI, Tokyo, Japan)	Native	340.87 \rightarrow 34.97
カラム温度	50 $^{\circ}$ C	Labeled	352.91 \rightarrow 34.97
移動相	2mM Ammonium acetate : Methanol = 60 : 40 \rightarrow 5 : 95 linear gradient	Native	374.83 \rightarrow 34.97
イオンソース温度	120 $^{\circ}$ C	Labeled	386.87 \rightarrow 34.97
ディゾルベーション温度、ガス流量	350 $^{\circ}$ C, Nitrogen, 600 L/hr	Native	408.79 \rightarrow 34.97
コーン電圧、ガス流量	30-50 V, Nitrogen, 50 L/hr	Labeled	420.83 \rightarrow 34.97
キャピラリー電圧	1.0kV		
コリジョン電圧	Argon, 15eV		
イオン化法	ESI-Negative		

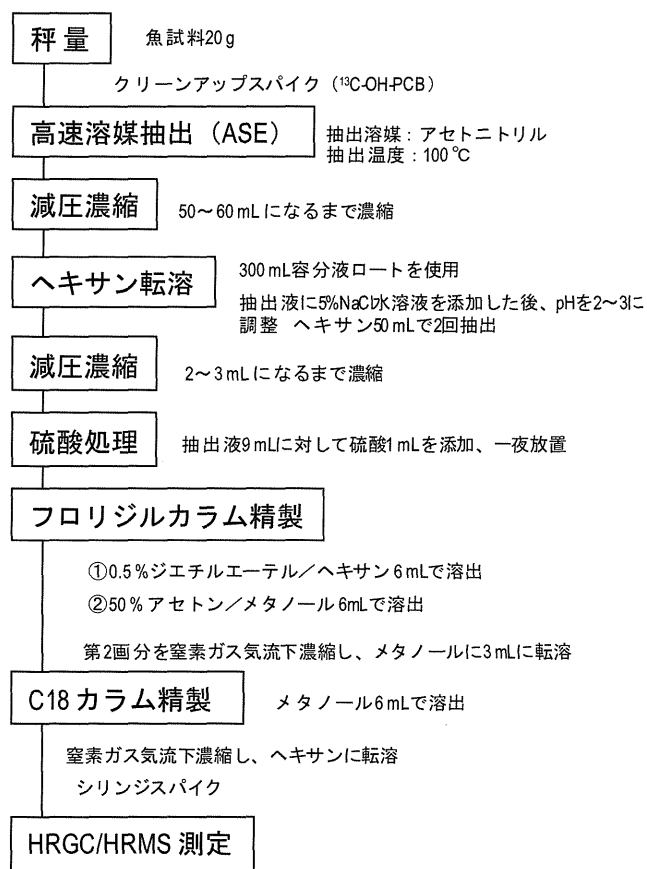


図1 魚試料中の OH-PCBs 分析フロー

表4 フロリジル固相カラムにおける OH-PCBs 標準品の回収率

化合物	回収率 (%)	
	アセトン/ヘキサ サン 6mL	アセトン/メタ ノール 6mL
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	0	81
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	0	90
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	0	85
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	0	81
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	0	86

表5 硫酸処理操作における OH-PCBs 標準品の回収率

化合物	回収率 (%)
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	88
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	95
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	83
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	88
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	94

表6 C18 固相カラムにおける OH-PCBs 標準品の回収率

化合物	回収率 (%)	
	メタノール 0-6mL	メタノール 6-12mL
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	73	0
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	57	0
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	61	0
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	46	0
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	73	0

表7 OH-PCBs 標準品回収試験結果

化合物	回収率 (%)
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	73
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	57
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	61
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	46
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	73

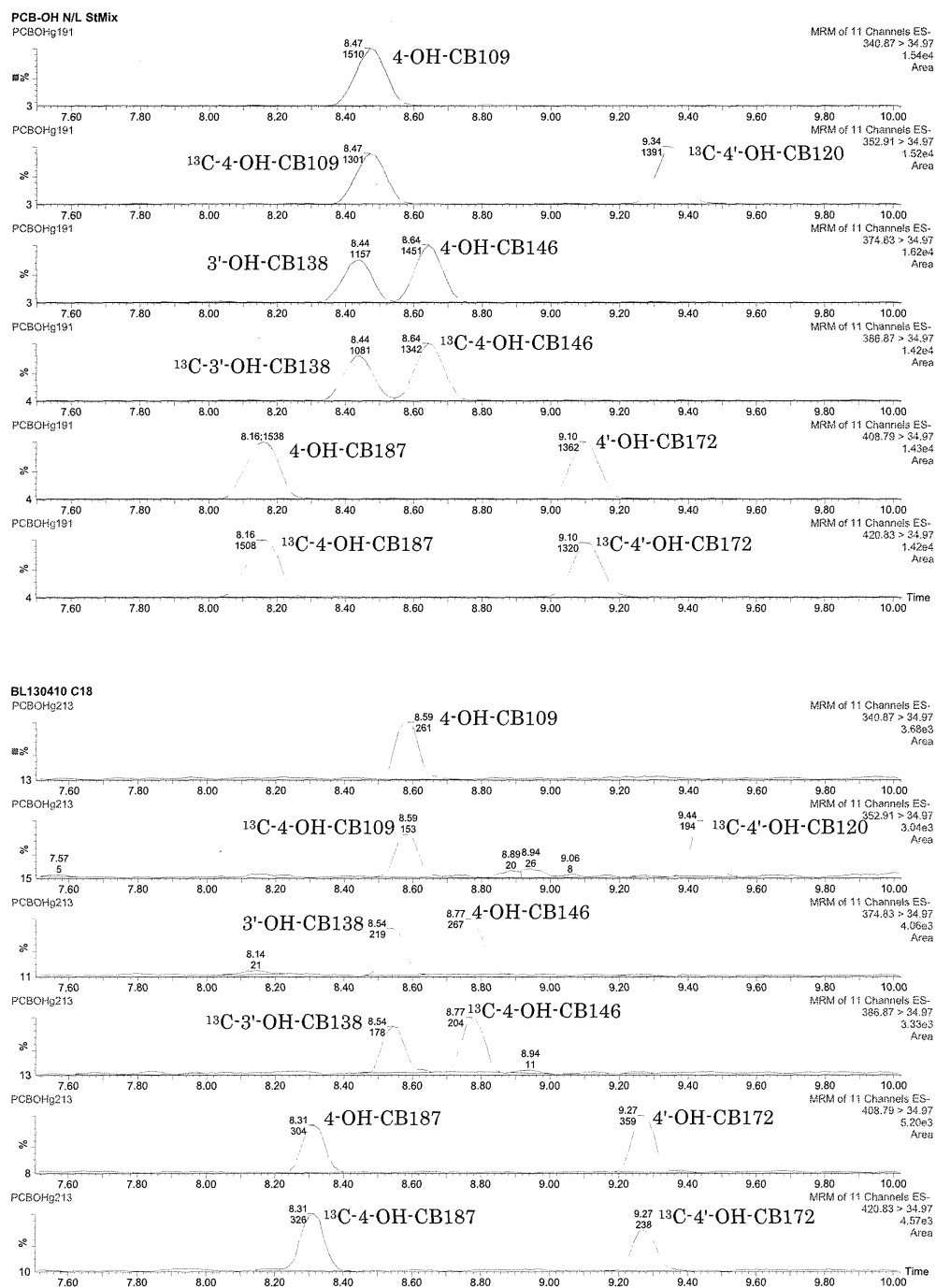


図2 OH-PCBs 標準品回収試験の LC/MS/MS 測定クロマトグラム。
上段) 標準品、下段) 標準品回収試料。

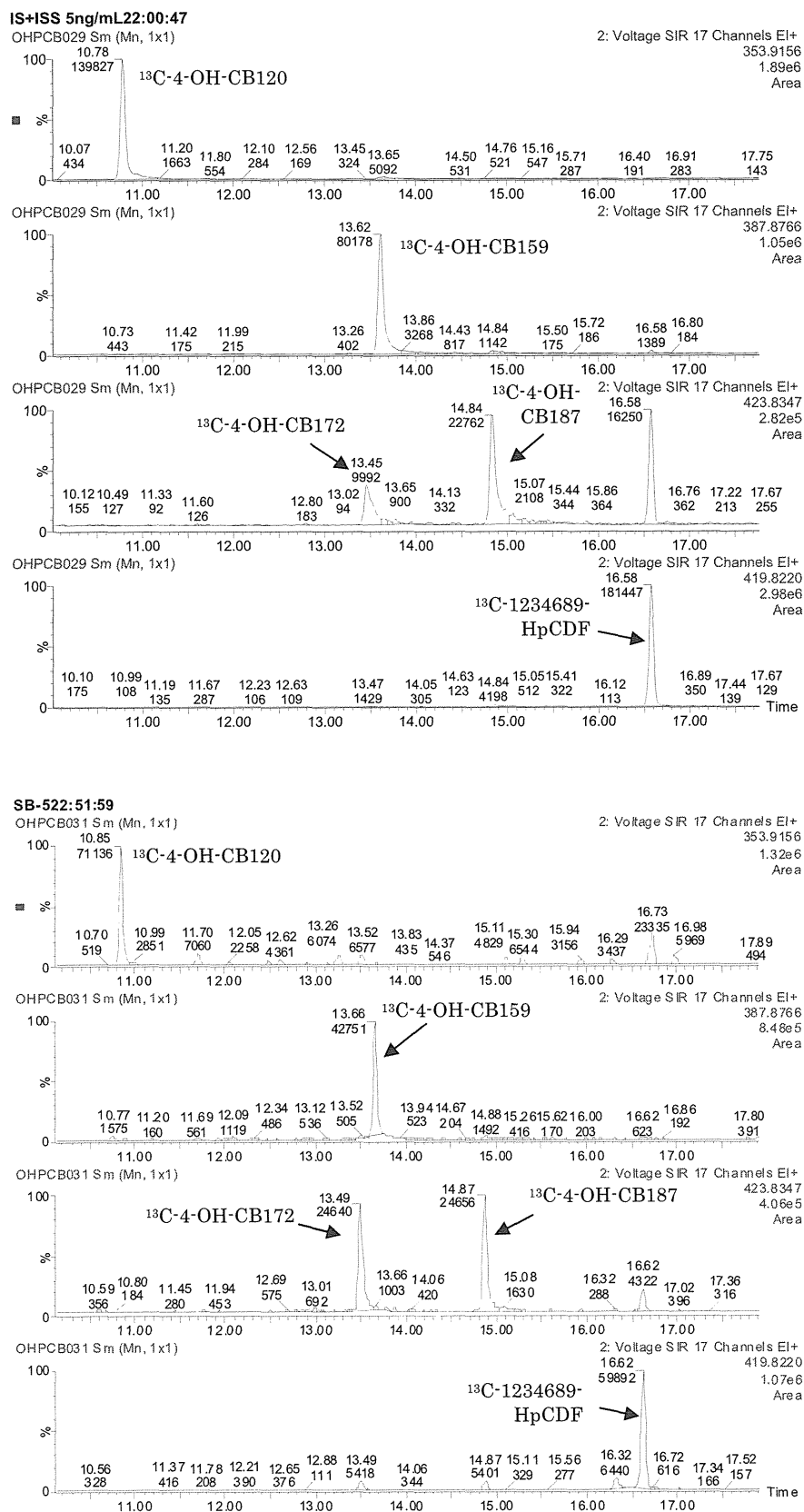


図3 OH-PCBs 添加回収実験の HRGC/HRMS 測定クロマトグラムの一例。
 上段) 標準溶液、下段) 添加回収実験試料 (サバ)。

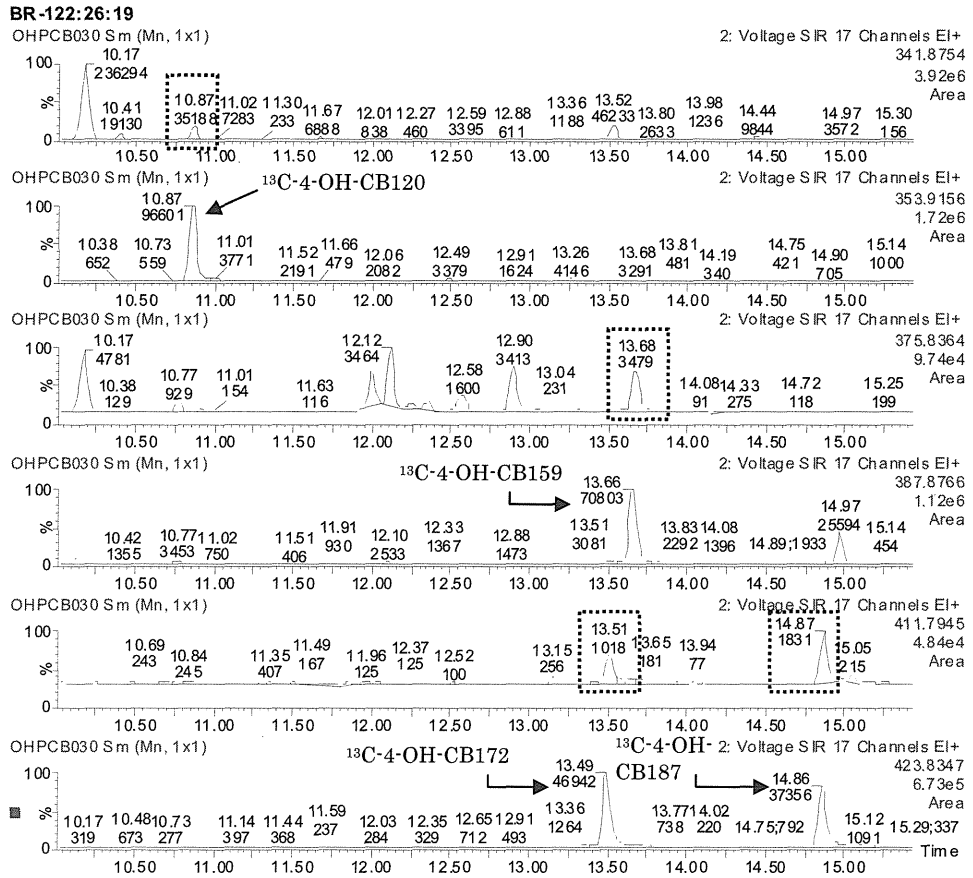


図 4 ブリ試料の HRGC/HRMS 測定クロマトグラム。
 点線で囲んだピークを OH-PCB 異性体として定量した。

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

研究分担報告書

難分解性汚染物 (POPs) の摂取量推定に必要な分析法の開発
(3) 食品中の多環芳香族炭化水素分析法の開発

研究代表者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部
研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部

研究要旨

多環芳香族炭化水素類には Benzo[a]pyrene (BAP) をはじめとする発がん性が懸念される物質が含まれている。本研究では、PAHs の含有が懸念される燻製食品を対象に、毒性が懸念される PAHs16 種を分析する GC/MS/MS 法を検討し、その性能評価を実施した。

実態調査への利用を目的とした性能評価として、PAHs16 種を添加した試料の繰り返し分析 (5 併行 1 日間) を実施した。添加濃度は、燻製サケ及び燻製ソーセージが 0.5 µg/kg、燻製卵が 1.0 µg/kg、かつお削り節が 10 µg/kg とした。燻製サケ及び燻製ソーセージでは、PAHs16 種の真度は 104~117%及び 104~119%、併行精度は 0.6~4.0%及び 0.4~3.0%であった。燻製卵では、PAHs16 種の真度は 79~104%、併行精度は 0.5~3.9%であり、Dibenzo[a, h]pyrene (DHP) の真度が 80%を僅かに下回った。かつお削り節については、PAHs16 種の真度は 77~142%、併行精度は 0.3~3.6%であり、Dibenzo[a, l]pyrene、Dibenzo[a, e]pyrene、DHP の真度が 20%以上乖離した。

また、BAP 等については、諸外国で基準値が設定されているため、基準値濃度への適合判定を目的とした性能評価についても実施した。PAHs16 種について 2.0 及び 5.0 µg/kg を添加濃度として、繰り返し分析 (2 併行 5 日間) を実施した。燻製サケでは、添加した 2 濃度において、PAHs16 種の真度は 86~105%、併行及び室内精度は 0.6~7.1%であった。また、燻製ソーセージでは、添加した 2 濃度において、PAHs16 種の真度は 77~116%、併行及び室内精度は 0.5~12.7%であった。DHP の真度がやや低く、室内精度がやや大きい傾向が認められた。多くの国で規制値が定められている BAP については、良好な真度及び精度が得られており、評価した濃度における適合判定が可能であると考えられた。

さらに、本分析法により認証標準試料及び市販食品試料 (燻製魚、燻製畜肉類、燻製卵、及びかつお削り節) を分析し、その適用性を検証した。その結果、Benzo[c]fluorine 及び Chrysene については、測定対象物質以外の PAHs 等の類似化合物による妨害が示唆された。市販食品では、かつお削り節で BAP を含む多数の PAHs が比較的高濃度に検出された。

研究協力者
国立医薬品食品衛生研究所

堤 智昭、足立利華、松田りえ子

A. 研究目的

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は芳香環を二つ以上持つ炭化水素化合物の総称であり、Benzo[a]pyrene (BAP) をはじめ、発ガン性の疑いがある物質が多く含まれている。PAHs については種々の化合物が存在するが、欧州食品科学委員会 (SCF) や食品添加物専門家会議 (JECFA) を中心にリスク評価が行われ、モニタリングすべき 16 種の PAHs (以下、PAHs16 種と表記) が提案されている。表 1 には、PAHs16 種の構造等の情報を示した。しかしながら、これらの PAHs を対象にした含有実態調査は国内では数が少なく、早急な汚染状況の把握が必要とされている。特に、食品の燻製や乾燥、加熱などの製造過程が PAHs の主な生成源となることが知られているため、燻製食品を中心とした PAHs 含有実態調査が緊急の課題となっている。また、日本では食品中の PAHs の基準値は設定されていないが、現在、EU、カナダ、中国及び韓国で食品中の BAP に基準値が設定されている。さらに、EU では BAP と共に、Benzo[a]anthracene (BAA)、Chrysene (CHR)、Benzo[b]fluoranthene (BBF) を含めた PAHs4 種の合計値について 2012 年 9 月より基準値が施行されている¹⁾。

本研究では、PAHs の含有が懸念される燻製食品を対象に、PAHs16 種を分析する GC/MS/MS 法を検討した。昨年度までに、嗜好飲料と魚燻製試料を対象に分析法の予備検討を実施した。今年度は、魚介類や畜肉類などの燻製食品を対象にした分析法の確立を目指し、PAHs 抽出法及び精製方法について追加検討した。また、本分析法の使用目的は、燻製食品中の PAHs 含有実態調査への利用であるが、多くの国で BAP 等の基準値が定められていることを鑑み、BAP 等の基準値濃度の適合判定への利用も検討した。そのため、PAHs 含有実態調査を目的とした性能評価に加えて、BAP 等の基準値濃度への適合判定を目的とした性能評価についても実施した。さらに、本分析法により認証標準試料や市販の燻製

食品を分析し、その適用性を検証した。

B. 研究方法

1. 試薬

PAHs として、Benzo[c]fluoranthene (BCL)、BAA、Cyclopenta[c, d]pyrene (CPP)、CHR、5-methylchrysene (5MC)、BBF、Benzo[k]fluoranthene (BKF)、Benzo[j]fluoranthene (BJF)、BAP、Indeno[1, 2, 3-c, d]pyrene (ICP)、Dibenzo[a, h]anthracene (DHA)、Benzo[g, h, i]perylene (BGP)、Dibenzo[a, l]pyrene (DLP)、Dibenzo[a, e]pyrene (DEP)、Dibenzo[a, i]pyrene (DIP)、Dibenzo[a, h]pyrene (DHP) を、PAHs の安定同位体として重水素(D)標識した D₁₂-BAA、D₁₂-CHR、D₁₂-BBF、D₁₂-BKF、D₁₂-BAP、D₁₂-ICP、D₁₄-DHA、D₁₂-BGP、D₁₄-DIP、D₁₂-Perylene (PYL) を AccuStandard 社、Cambridge Isotope Laboratories 社及び Chiron 社より購入した。

シリカゲルミニカラムは、GL Sciences 社製の InertSep SI FF (担体量 1 g) を使用した。PSA ミニカラムは、GL Sciences 社製の InertSep PSA (担体量 1 g) を使用した。

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) カラムは、昭和電工社製の Shodex CLNpak EV-2000 AC (300×20 mm i. d.)、またプレカラムとして Shodex CLNpak EV-G AC (100×20 mm i. d.) を使用した。

GC キャピラリーカラムは、Varian 社製の VF-17ms を使用した。

アセトニトリル 5000 (PCB 試験用)、アセトン 5000 (PCB 試験用及び高速液体クロマトグラフィー用)、エタノール 5000 (PCB 試験用)、水酸化カリウム (特級)、シクロヘキサン (高速液体クロマトグラフィー用)、トルエン 5000 (PCB 試験用)、ヘキサン 5000 (PCB 試験用)、ポリエチレングリコール (PEG) 300、無水硫酸ナトリウム (PCB 試験用) は関東化学 (株) より購入した。

2. 試料

燻製食品は、東京都内の小売店およびインターネットを介して購入した。購入した食品は、ホモジナイザーで均一化し使用した。認証標準試料（貝凍結乾燥品、SRM 2974a）は西進商事（株）より購入した。

3. 装置

ホモジナイザー：レッチェ社製 GM200

ポリトロン：Kinematica 社製 Polytron PT 10-35 GT

GPC：GL Sciences 社製 G-Prep GPC8100 plus

GC/MS/MS：Agilent（Hewlett-Packard）社製 7890A/7000B

4. 試験溶液の調製

4-1. 抽出

4-1-1. ポリトロン抽出

均一化した試料 20.0 g（かつお削り節については 2.0 g）を量りとった。これにサロゲート溶液（D 標識 PAHs9 種）を加え、室温で 30 分放置した。その後、かつお削り節については、水 8 mL を加えて 1 時間膨潤させた。水 20 mL とアセトン-ヘキサン（1：2）100 mL を加えてポリトロンによりホモジナイズ（15,000 rpm、約 90s）した後、1,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上澄み液を分取した。残渣にヘキサン 50 mL を加えて同様にホモジナイズした後、遠心分離し、上澄み液を合わせた。適量の無水硫酸ナトリウムを加えて 15 分放置後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。予め重量を測定しておいたナスフラスコにろ液を受け、40°C 以下で溶媒を留去した後、残留物の重量を測定し、これを粗脂肪重量とした。

4-1-2. アルカリ分解抽出

農林水産省の有害物質調査記載のアルカリ分解抽出を参考にした²⁾。概略を述べると、均一化した試料 20.0 g（かつお削り節については 2.0 g）を量りとった。これにサロゲート溶液（D 標識 PAHs9 種）を加え、室温で 30 分放置し

た。1 mol/L 水酸化カリウム含有エタノール溶液 50~100 mL を加え、15 時間室温で攪拌した。アルカリ分解液を分液ロートに移し、30 分間振とう後、エタノール-ヘキサン（1:1）20 mL、ヘキサン 50 mL 及び水 50 mL を加え、10 分間振とうし、ヘキサン層を分取した。水層にさらにヘキサン 50 mL を加え、同様の操作を行った後、ヘキサン層を合わせた。ヘキサン層に水 50 mL を加えて振とう後、水層を除去した。再度、ヘキサン層に水 25 mL を加え振とう後、水層を除去した。適量の無水硫酸ナトリウムを加えて 15 分放置後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。40°C 以下で溶媒を留去した後、残留物の重量を測定し、これを粗脂肪重量とした。

4-1-3. ソックスレー抽出

均一化した試料 20.0 g（かつお削り節については 2.0 g）を円筒ろ紙に量りとった。これにサロゲート溶液（D 標識 PAHs9 種）を加え、室温で 30 分放置した。その後、適量の無水硫酸ナトリウム（20g 程度）を加え、ソックスレー抽出器に装着した。アセトン-ヘキサン（1:1）220 mL を入れたフラスコの上部にソックスレー抽出感を装着し、冷却器を接続して 6 時間ソックスレー抽出（10 サイクル/h）を行った。フラスコに適量の無水硫酸ナトリウムを加えて 15 分放置後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。40°C 以下で溶媒を留去した後、残留物の重量を測定し、これを粗脂肪重量とした。

4-2. 精製

抽出操作により得られた粗脂肪をヘキサン 30 mL に溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ、40°C 以下で溶媒を留去した後、残留物をアセトン-シクロヘキサン（4:6）6 mL に溶解した。この溶液を、2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液 5 mL を GPC に導入した。GPC 精製条件を下記に示した。

【GPC 精製条件】

GPC 精製装置：G-Prep GPC8100 plus

カラム：CLNpak EV-2000 AC（300 × 20 mm