

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)
分担研究報告書

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
(2) 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発
(2-3) 食品中ダイオキシン類および PCBs の迅速一斉分析法の検討

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品試料中のダイオキシン類およびポリ塩化ビフェニル(PCBs)の一斉迅速分析法を検討した。本研究では「高速溶媒抽出法(ASE)」を使用し、食品中ダイオキシン類・PCBsの迅速分析法の確立を目指す。本年度は基礎的検討として、分析に使用する内部標準物質中の不純物の検定を行い、種類の異なる内部標準製品を抽出時に同時使用する(混合して使用する)ことが可能であるか調べた。国内で市販されている内部標準製品のうち3種類を入手し、各々を高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計(HRGC/HRMS)に注入して分析した。その結果、 $^{13}\text{C}_{12}$ -mono-ortho PCBsの8種同族体を成分とする内部標準製品中に、微量ながら4種類の $^{13}\text{C}_{12}$ -non-ortho PCBs同族体(#77、#81、#126、#169)が不純物として含まれていることを確認した。当該製品を魚試料中ダイオキシン類分析に使用したとき、これらの不純物の影響によって、4種類のネイティブ non-ortho PCBs 各同族体の定量精度は著しく低下した。次に $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs(1~10塩化物の27種化合物)の内部標準物質で、組成と濃度が同じ2製品について不純物の有無を調べた結果、1製品に微量ながら2,3,4,6,7,8-hexaCDFの存在が示唆された。2,3,4,6,7,8-hexaCDFの不純物量は分析精度に著しい影響を及ぼすものではないと推察されたが、本製品を一斉迅速分析に使用する際には、検出限界値付近の低濃度領域において精度に少なからず影響を及ぼす量として、注意が必要と考えられた。

研究協力者

福岡県保健環境研究所
堀 就英、安武大輔、中川礼子

に抽出できることが明らかになった。すなわち、従来の抽出方法では最長で1件あたり約20時間を要していた抽出時間は、ASEの使用により約30分に短縮された。また使用する抽出溶媒量も1/3程度に少量化することが可能となった。さらにASEの抽出効率従来法に比べて同等またはそれ以上であることを確認した¹⁻³⁾。

A.研究目的

食品中のダイオキシン類の迅速分析方法を確立することは、当該物質による食品汚染調査研究の進展に大きく寄与するものである。また、食品汚染事件が発生した場合に速やかに食品の安全性を究明し、人的被害や社会影響を最小限に抑止する、いわゆる危機管理上の行政対応においても有用性は高い。

平成16~18年度の本分担研究において、高速溶媒抽出法(ASE)を使用すると食品試料に含まれるダイオキシン類を迅速かつ精密

本年度は、ASEを使用して食品中のダイオキシン類に加え、ポリ塩化ビフェニル(PCBs)の209種同族体(1~10塩素化物)を一斉に抽出・分析する方法を検討した。厚生労働省は食品中PCBsの残留基準値(暫定的規制値)を設けており、例えば遠洋沖合魚介類においては0.5 ppm、内海内湾魚介類では3 ppm(いずれも可食部)が適用されている。従

来、PCBs とダイオキシン類とは化学的構造・性質面において類縁関係にありながら個々の試験法によって定量分析が行われてきた。さらにそれらの分析工程は煩雑で定量値を得るまでに長期間を要する試験法であった。ASE を使用して食品試料中のダイオキシン類と PCBs を同時に抽出し、各々の定量値を迅速に得ることが可能になれば、食品の安全性確保の観点から有意義と考えられる。

現在、食品中の微量化学物質の精密分析においては、抽出時にあらかじめ目的物質の安定同位体 ($^{13}\text{C}_{12}$ -ラベル体) を内部標準物質 (クリーンアップスパイク、CS) として添加する同位体希釈法が主流となっている。本研究で構築を目指すダイオキシン類・PCBs の一斉分析法で使用するクリーンアップスパイクには、規定量のダイオキシン類 29 種化合物と PCBs の 1~10 塩化物 (少なくとも各塩素数ごとに数種類) の $^{13}\text{C}_{12}$ -ラベル体を含む必要がある。しかし、これらの化合物すべてを網羅する内部標準物質 (混合溶液) は国内外で市販されていない。したがって、目的の組成となるように複数の製品を組み合わせて (混合して) 用いざるを得ない。

Fürst らは $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDD/Fs (17 種化合物を含む) と $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs (3 種化合物を含む) の 2 種類の製品を食品や母乳試料に添加し、抽出・精製して HRGC/HRMS で分析したところ、PCDD/Fs のクロマトグラム上に複数の夾雑ピークが現れ、一部の化合物の添加回収率 (CS 回収率) が 100 % を超過する等の問題が生じたと報告している⁴⁾。 $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDD/Fs 製品を単独で使用した場合にこのような結果は得られなかったことから、 $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs 製品に含まれていた不純物に原因があると結論付けている。Fürst らが使用した内部標準物質の製造元等は明らかにされておらず、本研究で組み合わせて使用する内部標準物質についても、不純物の有無や定量性への影響について確認する必要がある。

本研究では食品、とりわけ我が国においてダイオキシン類・PCBs の主たる暴露源である魚介類を対象として、当該物質の迅速一斉分析法を構築するために、市販の内部標準製品中の不純物の検定を行い、異なる内部標準製品を混合して使用した際に分析精度に影響が生じるかについて検討した。併せて本報告では、市販の内部標準製品に微量に含まれる不純物によって魚試料中ダイオキシン類分析の定量性に影響が生じた実例を示す。

B. 研究方法

1. 魚試料中ダイオキシン類分析における内部標準試薬の混合の影響

魚試料 (鯉ホモジネート) に下記の 2 種類の内部標準物質を混合して添加し、ダイオキシン類 29 種化合物の分析を試みた。

「CS1」: $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-PCDD/Fs (17 種化合物) と $^{13}\text{C}_{12}$ -non-ortho PCBs (4 種化合物) を含む *n*-ノナン溶液 (A 社製)。

「CS2」: $^{13}\text{C}_{12}$ -mono-ortho PCBs (8 種化合物) を含む *n*-ノナン溶液 (A 社製)。

使用した内部標準物質 (CS1 および CS2) の化合物組成等を表 1 に示した。魚試料の抽出操作は「食品中のダイオキシン類及びコプラナー PCB 測定方法暫定ガイドライン」(ガイドライン)⁵⁾ に記載されているアルカリ分解・溶媒抽出法により行い、精製操作は平成 17 年度の本分担研究報告書に記載の方法に準じて行った²⁾。

2. 一斉分析法に使用する内部標準物質中の不純物の検定

国内で入手可能な組成の同じ $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs (1~10 塩化物、27 種化合物) の内部標準物質製品を国内 2 社 (A、B) より購入した (以下各々の製品を CS3、CS4 とする)。溶液中の化合物組成等は表 2 に示した通りであった。各製品はいずれも *n*-ノナン溶液であり、ガラスア

ンプルに封入されていた。アンプルを開封し、原液の一部をそのままマイクロバイアルに分注し、HRGC/HRMS 測定に供した。

検定の実施にあたり、まず検量線作成用の標準液を HRGC/HRMS に注入し、2,3,7,8-PCDD/Fs の各毒性評価対象物質の保持時間ならびに検出限界値を算出した。次に CS3 及び CS4 を各 0.5 μL (各同族体 500 pg) を HRGC/HRMS に注入し、不純物に該当するピークがないか確認した。

3.測定装置

測定に使用した HRGC/HRMS は Agilent 6890 /Micromass AUTOSPEC ULTIMA であり、測定条件は既報⁶⁾の通りであった。検出限界値の算出は「ガイドライン」の手法に従い、検量線作製用標準溶液の測定結果より S/N=3 に相当する量を求め、これを検出限界値 (pg) とした。

C.研究結果及び考察

1.魚試料中ダイオキシン類分析における内部標準試薬の混合の影響について

魚試料約 10 g をビーカーに量り取り、クリーンアップスパイクとして CS1 を各内標準物質が 50 pg ($^{13}\text{C}_{12}$ -octaCDD/F は各 100 pg) となるように添加した。CS2 については mono-ortho PCBs の残留濃度範囲が広く予測されたため、異なった 2 種類の添加濃度で試行した。すなわち、CS2 を条件 1 として各 200 pg、条件 2 として 20,000 pg を添加し分析した。なお、条件 2 の分析は 3 回試行した。条件 1 と条件 2 のダイオキシン類 29 種化合物の各定量結果を比較したところ、条件 2 の non-ortho PCBs (#77、#81、#126、#169) の定量値 (平均値) は条件 1 に比べて 36~75 % 低下し一致しなかった (表 3)。また、条件 2 の $^{13}\text{C}_{12}$ - non-ortho PCBs の回収率は 100 % を超過する傾向が顕著であった。この原因として

条件 2 の試行時に抽出試料の精製が十分でなく、残存するマトリックス成分の影響で当該化合物の定量性が悪化したことが考えられた。しかし HRGC/HRMS 測定時のロックマスを始め各設定質量数におけるクロマトグラムに夾雑ピークの出現やベースラインの変動は特に認められなかった。

そこで CS2 に含まれる不純物の有無を調べるために当該溶液の 1 μL を取り、HRGC/HRMS に注入した。その結果、図 2~4 のクロマトグラムに示すように $^{13}\text{C}_{12}$ - non-ortho PCBs の 4 種化合物に相当するピークを認め、CS2 に当該物質の $^{13}\text{C}_{12}$ -ラベル体が不純物として混入していることが確認できた。CS2 で認められた不純物に相当する各ピークの面積、ならびに $^{13}\text{C}_{12}$ - mono-ortho PCBs のピーク面積を各々求め、検量線用標準液の測定により求めた相対感度、さらに mono-ortho PCBs の注入量に照らして試算すると、不純物としての各 $^{13}\text{C}_{12}$ - non-ortho PCBs の量は、CS2 溶液 1 μL あたり 0.082~2.6 pg と見積もられた。この量は mono-ortho PCBs の規定量 (保証量) の 0.017~0.51 % に相当する量であった。

CS2 中に不純物として見いだされた $^{13}\text{C}_{12}$ - non-ortho PCBs の 4 種化合物のうち、含有量が最も多かったのは $^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5,5'-hexaCB (#169) であった。再分析時に魚試料に添加された $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 169 の量は、CS1 由来の 50 pg に対して CS2 中の不純物に由来する約 100 pg が加わり、計 150 pg と見積もられた。条件 1 に比べて条件 2 における定量値が低下したのは、目標とする $^{13}\text{C}_{12}$ -ラベル体の添加量 (50 pg) に不純物が上乘せされたためと考えられる。

今回検出された内部標準製品中の不純物の量は、保証値の付された同族体に対して 1 % に満たない微量であった。異なる標準溶液を混合して使用する場合、特に不純物を含む方の混合割合が高くなるほど、混合割合の低い方の成分に干渉しやすくなり、測定値の誤差を生む

可能性が増大すると考えられる。内部標準製品における不純物の有無は製品によって異なり、同じ製品でも製造時期(ロット)により異なる可能性がある。内部標準製品を混合して(組み合わせ)て使用する際には、当該試薬中の不純物の存在ならびに含有量をあらかじめ把握し、それらの測定精度への影響に留意する必要がある。

2. 一斉分析法に使用する内部標準物質中の不純物の検定結果

過去の調査事例をみると、魚試料中の PCDD/Fs と PCBs の残留濃度には差があり、後者が高く検出されている。例えば平成 10 年度の魚類の汚染調査結果⁷⁾によると、PCDD/Fs の各同族体濃度は ND(< 0.01) ~ 5 pg/g の範囲であるのに対し、PCBs は概ね ND (< 1) ~ 5,000 pg/g の範囲であり、両者の濃度範囲には 50,000 倍程度の開きがある。一斉分析に使用する CS の添加量を魚中の化合物組成に即したものとするには、¹³C₁₂-PCDD/Fs に対して ¹³C₁₂-PCBs の添加量を多くする(混合割合を高くする)必要がある。そこで本項では、添加量の多い ¹³C₁₂-PCBs 中にネイティブ体及び ¹³C₁₂-PCDD/Fs に干渉する不純物が含まれていないか、検定を行った。

CS3 を測定した結果、2,3,4,6,7,8-hexaCDF のネイティブ体に相当する保持時間に微弱ながらピークを認めた(図 5)、それ以外の毒性評価対象物質に相当するピークはネイティブ体・ラベル体ともに不検出であった(表 4)。2,3,4,6,7,8-hexaCDF に相当するピークの面積より検出量は約 0.030 pg と見積もられた。これは CS3 中の各 ¹³C₁₂-PCBs の規定量の 0.006 % に相当する量であった。一方、CS4 を同様に測定したところ、毒性評価対象物質に相当する不純物は認められなかった(表 4)。

ここで CS3 をダイオキシン類・PCBs の一斉分析に使用した場合、溶液中の不純物が分

析対象物質の定量性に与える影響について考察した。ダイオキシン類分析で求められる標準的検出下限値は 0.01 ~ 1 pg/g である(ガイドライン)。また HRGC/HRMS で安定的に得られるダイオキシン類・PCBs の検出感度(S/N=3)は約 0.02 pg である。さらに最終測定試料の濃縮率等を勘案すると、一斉分析法で想定される魚試料の分析採取重量は 20 g となる。よって、魚試料中のダイオキシン類・PCBs の残留実態に照らすと、抽出時の ¹³C₁₂-PCDD/Fs の添加量は 50 ~ 100 pg、¹³C₁₂-PCBs は 5,000 pg が妥当と考えられる。

一斉分析法において抽出時に CS3 を各同族体の量が 5,000 pg となるように添加したとすると、不純物の 2,3,4,6,7,8-hexaCDF は 0.30 pg が添加されることになる。この量は、分析採取重量の 20 g を考慮すれば、濃度換算値として 0.015 pg/g となり、2,3,4,6,7,8-hexaCDF の標準的検出下限値(0.02 pg/g)にほぼ匹敵する濃度である。以上のことから、CS3 をクリーンアップスパイクとして使用すると、魚試料中の当該物質濃度が検出限界値付近の低濃度であった場合、定量精度に少なからず影響が及ぶと考えられた。

以上の結果、¹³C₁₂-PCBs の内部標準物質 2 製品(CS3、CS4)をダイオキシン類・PCBs の一斉分析に用いたとき、2,3,7,8-PCDD/Fs の定量精度に大きな影響を及ぼす不純物の存在は認められなかった。しかし CS3 を一斉分析に使用した場合は、検出限界値付近の低濃度域において、不純物の影響により 2,3,4,6,7,8-hexaCDF の測定精度が低下する可能性が示唆された。

今後は、検定を実施した内部標準製品をクリーンアップスパイクとして実際の食品分析に適用し、ASE で調製した食品抽出液をゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で迅速に精製する方法を検討する。またダイオキシン類と PCBs の一斉分析法と、それらを個別に分析する従来法との間で定量値を比較するバリデーショ

ンを実施する計画である。

D.結論

(1) $^{13}\text{C}_{12}$ - mono-ortho PCBs の内部標準物質中に、不純物として $^{13}\text{C}_{12}$ - non-ortho PCBs が含まれていることを確認した。この内部標準物質を魚試料中のダイオキシン類分析に使用したとき、non-ortho PCBs の定量値は、不純物の影響によって著しい定量精度の低下をきたした。

(2) $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs (27 種化合物) の内部標準物質 2 製品における不純物を調べたところ、1 製品中に微量ながら 2,3,4,6,7,8-hexaCDF の存在が示唆された。一斉分析法のクリーンアップスパイクとして使用した場合、検出限界値付近の低濃度域において、定量精度の低下が生じる可能性が示唆された。

(3) ダイオキシン類・PCBs の一斉迅速分析法の確立に向けて、今後、精製方法やバリデーション等の検討を行う必要がある。

E.参考文献

- 1) 平成 16 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究(3)食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究(3-2)食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究」
- 2) 平成 17 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究(3)食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究(3-2)食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究」
- 3) 平成 18 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究(3)食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研

究(3-2)食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究」

4) Fürst, P., Bathe, L., Malisch, R., Winterhalter, H., Palavinskas, R., Mathar, W: Disturbance of PCDD/PCDF analysis caused by impurities from commercial ^{13}C -labeled PCB-standards. *Organohalogen Compounds*, **40**, (1999), 109-113.

5) 厚生省生活衛生局:「食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCB の測定方法暫定ガイドライン」、平成 11 年 10 月。

6) Hori, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Iida, T., Tsutsumi, T., Sasaki, K., and Toyoda, M.: Effects of cooking on concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds in fish and meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, (2005) 8820-8828.

7) 平成 10 年度厚生科学研究補助金研究報告書:「食品中のダイオキシン汚染実態調査研究(平成 10 年度報告書)その 2:個別食品中ダイオキシン濃度及び調理加工の影響」

F.研究業績

1.論文発表

Hori, T., Yasutake, D., Tobiishi, K., Ashizuka, Y., Kajiwara, J., Nakagawa, R., Iida, T., Tsutsumi, T., and Sasaki, K.: Comparison of accelerated solvent extraction and alkaline digestion-hexane shaking extraction for determination of dioxins in animal-origin food sample. *Organohalogen Compounds*, **69**, (2007) 1118-1121.

2.学会発表

なし

表1 魚試料の分析に使用したクリーンアップスパイク CS1 および CS2 の化合物組成と濃度

CS1		CS2*	
化合物名	濃度 (ng/mL)	化合物名	濃度 (ng/mL)
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-tetraCDD	0.5	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4'-pentaCB(#105)	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-pentaCDD	0.5	¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5-pentaCB(#114)	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-hexaCDD	0.5	¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5-pentaCB(#118)	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-hexaCDD	0.5	¹³ C ₁₂ -2',3,4,4',5-pentaCB(#123)	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-hexaCDD	0.5	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5-hexaCB(#156)	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD	0.5	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5'-hexaCB(#157)	100
¹³ C ₁₂ -octaCDD	1.0	¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5,5'-hexaCB(#167)	100
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-tetraCDF	0.5	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (#189)	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-pentaCDF	0.5		
¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-pentaCDF	0.5		
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-hexaCDF	0.5		
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-hexaCDF	0.5		
¹³ C ₁₂ -2,3,4,6,7,8-hexaCDF	0.5		
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-hexaCDF	0.5		
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-heptaCDF	0.5		
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8,9-heptaCDF	0.5		
¹³ C ₁₂ -octaCDF	1.0		
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4'-tetraCB(#77)	0.5		
¹³ C ₁₂ -3,4,4',5-tetraCB(#81)	0.5		
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5-pentaCB(#126)	0.5		
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-hexaCB(#169)	0.5		

*CS2 には不純物の検定を併せて実施した。

表2 不純物の検定を実施したクリーンアップスパイク CS3 および CS4 の化合物組成と濃度

化合物名	濃度(μg/mL)		化合物名	濃度(μg/mL)	
	CS3	CS4		CS3	CS4
¹³ C ₁₂ -2-monoCB(#1)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5-pentaCB(#126)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -4-monoCB(#3)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,2',4,4',6,6'-hexaCB(#155)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -2,2'-diCB(#4)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5-hexaCB(#156)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -4,4'-diCB(#15)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5'-hexaCB(#157)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -2,2',6-triCB(#19)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5,5'-hexaCB(#167)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -3,4,4'-triCB(#37)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-hexaCB(#169)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -2,2',6,6'-tetraCB(#54)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB(#188)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4'-tetraCB(#77)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB(#189)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -3,4,4',5-tetraCB(#81)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',5,5',6,6'-octaCB(#202)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -2,2',4,6,6'-pentaCB(#104)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5,5',6-octaCB(#205)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4'-pentaCB(#105)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaCB(#206)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5-pentaCB(#114)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonaCB(#208)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5-pentaCB(#118)	1.0	1.0	¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decaCB(#209)	1.0	1.0
¹³ C ₁₂ -2',3,4,4',5-pentaCB(#123)	1.0	1.0			