

GC/MS/MS を用いた魚介類及び母乳中 PCBs の分析

伴 埜 行 則¹, 筒 井 達 也¹, 橋 本 貴 弘¹, 羽 室 夫 美 子¹, 米 田 昌 裕¹,
小 谷 野 貴 文¹, 川 勝 剛 志¹, 稲 田 眞 之 助¹, 森 田 正 和¹

Analysis of Polychlorinated Biphenyls in sea food and mother's milk by Tandem Mass Spectrometry

Yukinori BANNO, Tatsuya TSUTSUI, Takahiro HASHIMOTO, Fumiko HAMURO,
Masahiro KOMEDA, Takafumi KOYANO, Tsuyoshi KAWAKATSU,
Shinnosuke INADA, Masakazu MORITA

Abstract : In the past, PCBs in food and mother's milk were measured by the method of ECD/GC. In this study, GC/MS/MS was found useful to measure these samples accurately. The results obtained by GC/MS/MS were comparable with those by ECD/GC measurement.

Key Words : GC/MS/MS(タンデム質量分析計) tandem mass spectrometry, イオントラップ質量分析計 Ion trap mass spectrometer, 前駆イオン Precursor ion, 生成イオン Product ion, PCBs Polychlorinated biphenyls

I はじめに

ポリ塩化ビフェニル (PCBs) の測定は従来 ECD-GC を用いて行われてきた。ECD-GC による測定は非常に高感度ではあるが、妨害ピークの影響を受けやすく、PCBs 以外の化合物を定量値に加える可能性もある。

そこで、より真値に近い定量法として GC/MS を用いた方法が試みられている。外因性内分泌かく乱化学物質調査暫定マニュアルによると水質、底質の PCB 分析法は、分解能が10,000以上のガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC - HRMS) が用いられている。しかし、高額 of 設備を必要とし、かつ結果を得るまでに長期間を要するといわれている。

それに対しイオントラップ型質量分析計は、いわゆる整数マスで分解能は1,000程度であるが、質量分離を多段階行えることから、選択性が向上し夾雑物の多い試料でも測定できる特徴を有する。そこで食品中の PCB の分析にイオントラップ型質量分析計が適用できるか検討した。

II 方法

1. 試料の前処理

魚介類等はミンチ状にした検体の適量(脂肪量1 g 相当)をアルカリ分解し、n-ヘキサンで抽出後、水洗、脱水、濃縮後、硫酸処理シリカゲルカートリッジで精製した。

母乳は一定量のシュウ酸カリウム、エタノールを加え振

とう混和後、エチルエーテル、石油エーテルで脂肪分を抽出し、アセトニトリル分配後 GPC カラムで精製した。硫酸処理シリカゲルカートリッジでさらに精製し、試験溶液とした。

2. 標準

PCB 標準等量混液 : KC300, KC400, KC500, KC600 を重量比 1 : 1 : 1 : 1 で混合し 1 ppm 溶液を調製

BP-WD 標準溶液 : WELLINGTON 社製19種混合標準を 0.1, 0.01, 0.001ppm に n-ヘキサンで希釈

3. 装置

質量分析装置付ガスクロマトグラフ (サーモクエスト POLARIS)

エレクトロンキャプチャ検出器 (ECD) 付きガスクロマトグラム (SIMADZU, GC-17A)

測定条件を表 1, 2 に示す。

表 1 GC/MS/MS (GC部分測定条件)

カラム	Rtx-5MS : 内径0.25mm, 長さ60m, 膜厚0.15 μ m
カラム温度	50°C (1min) - (15°C/min) - 150°C - (1.2°C/min) - 275°C - (20°C/min) - 300°C
注入口温度	50°C - (14.5°C/sec) - 300°C (3 min)
検出器温度	250°C
キャリアガス	ヘリウム 1 ml/min
注入方法	スプリットレス注入法, 注入量 2 μ l Splitless time 1min, Split Flow 50ml/min

¹ 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

表 2 ECD-GC測定条件

カラム	SPD-5 : 内径0.32mm, 長さ30m, 膜厚0.15 μ m
カラム温度	60°C (1min) - (10°C/min) - 140°C - (1°C/min) - 210°C - (3°C/min) - 260°C
注入口温度	250°C
検出器温度	290°C
キャリアガス	ヘリウム 1 ml/min
メイクアップガス	窒素ガス 50kPa
注入方法	スプリットレス注入法, 注入量 2 μ l サンプリング時間 : 1.5min

III 結果

1. PCBs のマスペクトル

PCBs はビフェニルに10個までの塩素が置換した構造を有しており、分子量により1塩化物, 2塩化物, ... 10塩化物と10グループに分類できる。各グループの化学式は同じだが、塩素の位置により数種類の異性体が存在し、理論的には各グループ合計209種類の異性体が存在することになる。

中極性のキャピラリーカラム Rtx-5を用いて PCB 標準等量混液を測定した時のトータルイオンクロマトグラムを図1に示す。PCBs の特徴的なマスペクトルを示す103本のピークを検出した。

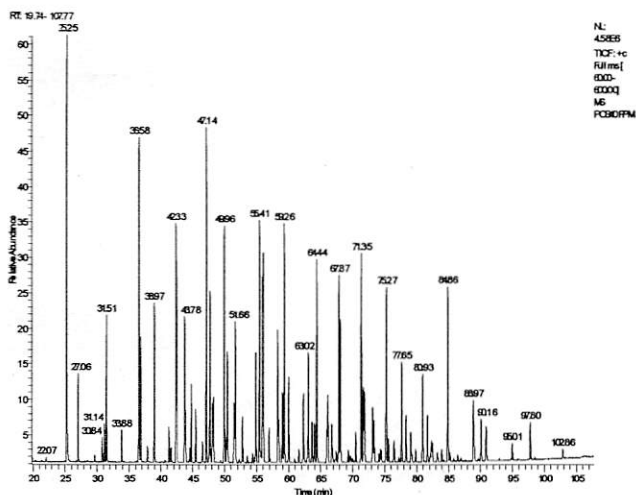


図 1 PCB標準等量混液のTIC

代表的な PCBs のマスペクトルとして、図2に7塩化ビフェニルのマスペクトルを示す。分子イオンピーク m/z 394と、1つの塩素原子が脱離したフラグメントイオンピーク m/z 359, 2つの塩素が脱離したと思われるフラグメントイオンピーク m/z 324などが観察される。このように PCBs のフラグメンテーションは塩素の脱離が主な反応経路となる。

一般に芳香族ハロゲン化物はハロゲン原子の脱離によるフラグメントがハロゲン化水素の脱離よりも強い⁸⁾。高塩素化物のフラグメンテーションは脱塩素化を繰り返しているようなマスペクトルが得られる。また、同じ塩素数で塩素置換の位置が異なるだけの異性体からはほとんど同じマスペクトルが得られる。

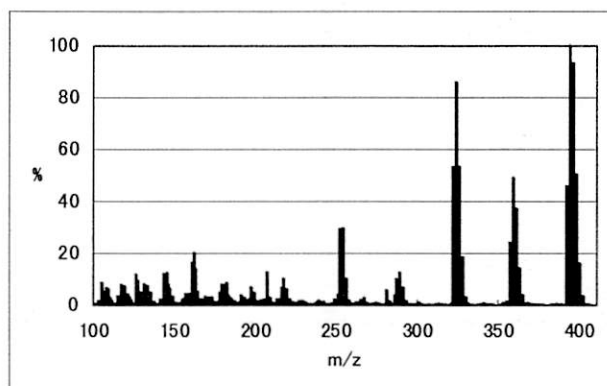


図 2 Heptachlorobiphenylのマスペクトル

2. Precursor ion の決定

イオントラップ型質量分析計における MS/MS 条件の設定の第一段階は MS/MS を行うイオン (Precursor ion) を決定することにある。通常分子イオンピークまたはベースピークを選択する。

MS/MS 法で PCBs の分子イオンピークを Precursor ion としてイオントラップに残し、エネルギーを与えて Product ion を生成させた場合、高塩素化物のフラグメンテーションで見られたような脱塩素化の繰り返しが見られる。従って、同一塩素数の異性体がクロマトグラム上で重なる場合は、両者を分離定量することは難しい。

PCBs は図2で示したように、分子イオンがベースピークとなる場合が多いので、選択する Precursor ion は分子イオンとした。従って PCBs の各グループ内は共通の Precursor ion を選択することになる。

表3に各グループの一覧と各々の異性体がガスクロマトグラム上に現れるリテンションタイム (RT) の範囲を示す。

3. 解離電圧の決定

MS/MS 条件の設定の第二段階として、Precursor ion を解離するのに必要な電圧 (解離電圧) を設定する。図3～6に Heptachlorobiphenyl の分子イオンピーク 394 m/z を解離電圧 1.0V, 1.5V, 4.0V, 6.0V で解離させた時のマスペクトルを示す。

解離電圧 1.0V では、ほとんど Precursor ion は解離しなかった。1.5V に上げると、2塩素脱離した Product ion が

表 3 PCBsの分類とRT範囲

分類	略号	RT 範囲 (min)	分子量	Precursor ion
Monochlorobiphenyls	MONO	21.81~24.95	188.6561	188
Dichlorobiphenyls	DI	26.95~36.78	223.1012	222
Trichlorobiphenyls	TRI	33.77~50.38	257.5463	256
Tetrachlorobiphenyls	TETRA	40.67~64.44	291.9914	292
Pentachlorobiphenyls	PENTA	49.28~76.57	326.4365	326
Hexachlorobiphenyls	HEXA	57.91~87.81	360.8816	360
Heptachlorobiphenyls	HEPT	70.39~93.02	395.3267	394
Octachlorobiphenyls	OCTA	82.21~98.60	429.7718	428
Nonachlorobiphenyls	NONA	94.85~102.9	464.2169	464
Decachlorobiphenyl	DECA	106.97	498.662	498

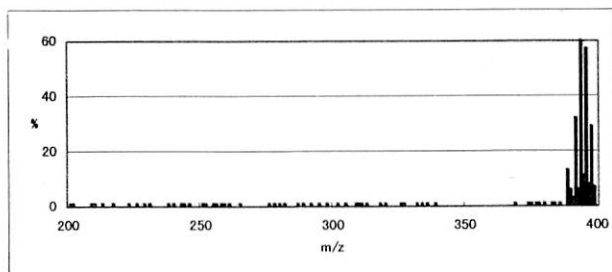


図 3 解離電圧 1.0V

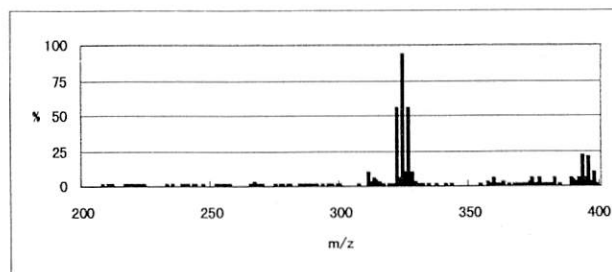


図 4 解離電圧 1.5V

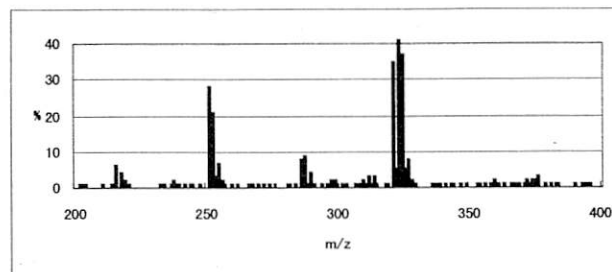


図 5 解離電圧 4.0V

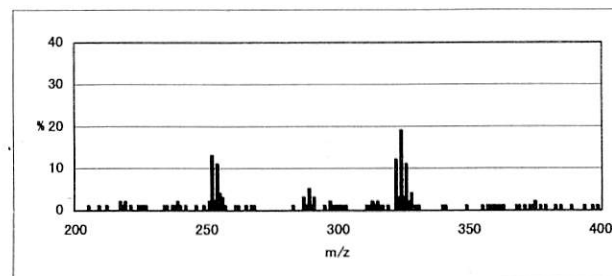


図 6 解離電圧 6.0V

得られ、さらに4.0Vに上げるとPrecursor ionはほとんど見られず、2塩素脱離したProduct ionと4塩素脱離したProduct ionが見られた。さらに解離電圧を6.0Vにまで上げても、Product ionの組成に変化は無かった。

BP-WD 標準溶液を用いて各塩化物別に解離電圧を変えていき、表4の条件で測定した。生成するイオン量をトータルイオンクロマト（以下 TIC）のピーク面積で表すと、解離電圧別イオン生成量は、塩素数に関わらず、解離電圧を高く設定するほど、トータルイオンのピーク面積は小さくなり、4.0Vを超えると一定水準を維持した（図7）。

表 4 BP-WD測定条件

略号	BP-WD 標準溶液中の異性体の IUPAC 番号	Precursor ion → Product ion 測定範囲
MONO	1, 3	188→100~190
DI	10, 15	222→120~230
TRI	19, 37	256→140~265
TETRA	54, 77	292→15~0300
PENTA	104, 126	326→18~0330
HEXA	155, 169	360→19~0370
HEPT	188, 189	394→20~0400
OCTA	202, 205	428→22~0440
NONA	206, 208	464→24~0470
DECA	209	498→26~0510

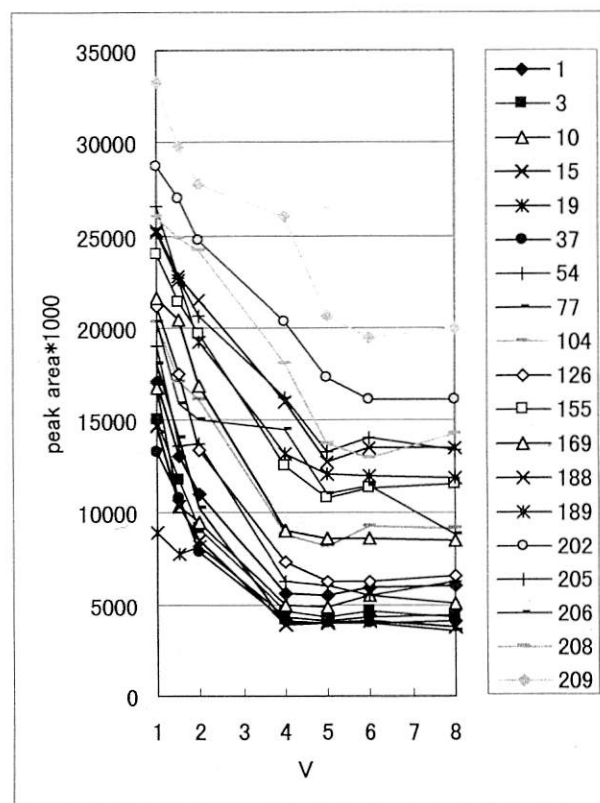


図 7 塩素化物別解離電圧とTICのピーク面積

また解離電圧別に各ピークのマスペクトルより、生成する Product ion を観察した。

各塩化物別に見た Precursor ion と生成する Product ion の関係は図8のようになった。

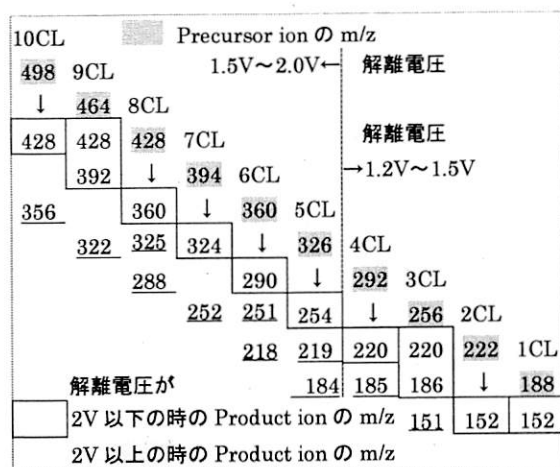


図8 塩素化物別Precursor ionとProduct ionの関係

今回選択した各 Precursor ion の解離過程において、1塩化物、3塩化物、9塩化物は-1CL、-2CLの脱離反応が見られたが、その他の塩化物は-2CLの脱離反応が主要経路となった。

塩素数が5つ以上の塩化物は解離電圧2.0Vで、塩素数が4つ以下の塩化物は解離電圧1.5VでPrecursor ionが10%以下となり、Product ionがベースイオンとなった。

解離電圧を2.0V以上に上げると、さらに塩素が脱離したProduct ionが出現した。しかし、4.0Vを超すと、それ以上に塩素が脱離したProduct ionは出現しなかった。

解離電圧を上げ過ぎるとProduct ionはさらに解離してしまい、結果として感度が低下してしまう。そこで、解離電圧を2.0V以下に設定することとし、以下表5に示す条件でPrecursor ionとProduct ionの両方をモニターしながら測定を行った。

表5 MS/MS条件

略号	Precursor ion → Product ion 測定範囲
MONO	188→150-154, 186-190
DI	222→150-154, 186-190, 220-224
TRI	256→150-154, 186-190, 252-260
TETRA	292→186-190, 220-224, 288-296
PENTA	326→220-224, 254-258, 320-330
HEXA	360→220-224, 288-294, 358-362
HEPT	394→254-258, 320-330, 390-400
OCTA	428→284-294, 355-365, 420-440
NONA	464→320-330, 390-400, 450-470
DECA	498→355-365, 425-435, 490-500

4. 実試料測定時の影響

イオントラップ型質量分析計は回転対称な双曲面電極に交流電圧を与えることで、イオンが振動しながら閉じ込められることを利用した装置である。一度に閉じ込めておけるイオンには制限があり、実試料の測定の際に、共存する試料由来の成分により、多くのイオン（夾雑物イオン）が生成すると測定対象物のイオン生成が抑制される。

夾雑物イオンにより測定対象物質のピークが損なわれる現象は“Space Charging”効果⁹⁾と呼ばれ、イオントラップ型質量分析計に特有の問題とされている。MS/MS条件を設定する際にもSpace Charging効果を考慮に入れなければならない。

そこで、通常の前処理方法で調製した試料溶液に標準を添加しSpace Charging効果の影響を検証した。試料はかんばち《脂肪濃度11%》を用い、定法に従い試験溶液を調製後、BP-WD標準溶液を試験溶液中0.002ppmになるように添加した。解離電圧は1.5V、2.0V、3.0Vの3段階に変化させて測定した。IUPAC番号3, 15, 37, 54, 104, 169, 189, 205, 208のPCBsは試料より検出しなかったため、これらの異性体について試験溶液と標準溶液のピーク面積を比較した。結果は図9にまとめた。

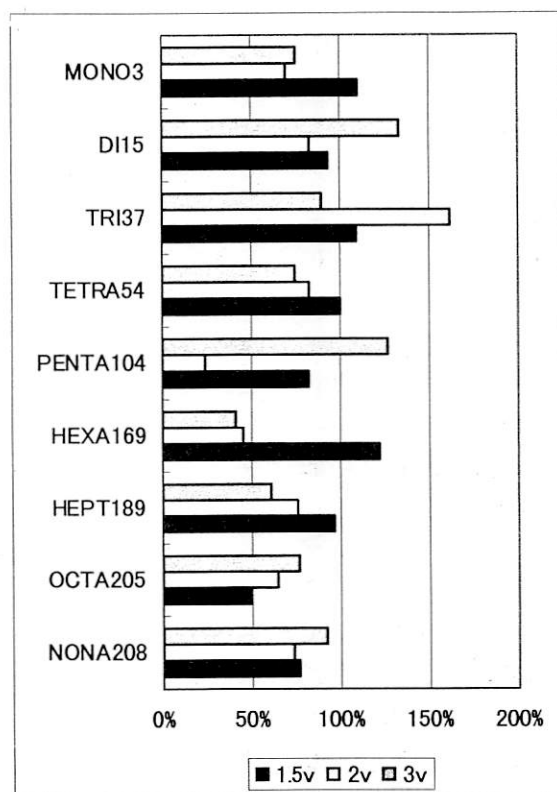


図9 解離電圧別試料中夾雑物イオンの影響

通常の前処理方法による試験溶液で夾雑物イオンによりピークが検出できなくなった成分は確認できなかった。解離電圧を上げることで夾雑物イオンにより失われたエネルギーを補い、影響を小さくすることも考えられるが、結果的に解離電圧1.5Vの時に標準のピーク面積に最も近い値が得られた。

5. 定量法

PCBの定量法として、従来各成分が種々な割合で混合したものから、単一の定量的数値を導き出す方法が検討されてきたが、最近では個々の成分ごとに定量する方向にある。GC/MS/MSでの定量は、十分に個々の成分ごとに定量することを可能にすると思われる。しかし、そのためには、個々の成分の標準物質をそろえる必要がある。また、当所で魚介類の前処理に採用しているアルカリ分解処理（1N KOH エタノール溶液、80℃で1時間処理）は特に8塩化物以上の高塩素化 PCBs が顕著に脱塩素化すると指摘もあり¹⁾、個々の成分による定量法を採用するには前処理法も十分に検討する必要がある。

食品衛生法における PCB の暫定基準値は、単一の定量的数値として設定されている。

環境庁の外因性内分泌化学物質調査暫定マニュアルにあるポリ塩化ビフェニルの分析法によると、GC/MS による総 PCB 濃度の求め方として2つの方法を示している。一つは、同一塩素数の PCB のイオン強度に大きな差がないという仮定の基に、用意出来た個々の標準溶液より塩素数別に平均感度を求め、同一塩素数の PCB を定量するものである。もう一つの方法は、KC300～600の等量混液の平均組成比(%)より塩素数毎の PCB 濃度を求め総 PCB 濃度を算出する。この場合は PCB 等量混液に含まれていない異性体は定量しない。

本報告では後者の方法、すなわち PCB 標準等量混液を用いて総 PCB 濃度を算出することとした。

6. GC/MS/MS と ECD-GC の定量値の比較

GC/MS/MS による測定は2 pg のレベル（0.001ppm を2 μ l 注入）を SN 比3～12で定量できる感度を示した。

添加回収試料としてシズ（魚介類）1検体、無添加試料として母乳2検体、トコブシ（魚介類）1検体について GC/MS/MS と ECD-GC により定量した。なお、ECD-GC では有機塩素系農薬と PCBs のピークと重なる部分は測定対象から除外して定量した。

図10に GC/MS/MS と ECD-GC の総 PCB 濃度の相関を示した。相関係数は0.9954とよく一致した。また、GC/MS/MS 法では有機塩素系農薬と PCBs は完全に分離定量出来た。

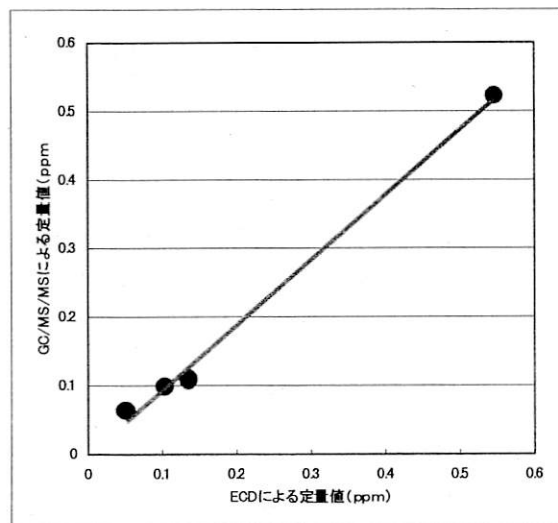


図10 ECDとGC/MS/MSによる定量値

IV 考察

MS/MS法の測定条件の決定は、Precursor ion から Product ion を生成させる解離電圧の設定が一つのポイントになる。

MS/MSによる脱塩素化は、Ⅲ 結果の3項（解離電圧の決定）の際に見られたように、高塩素化合物ほど解離電圧を高く設定しないと Product ion は生成しにくい傾向が見られた。すなわち、Precursor ion から Product ion への生成量が増大する電圧が高いほど脱塩素化が起こりにくいといえ、そのターニングポイントとなる電圧は、脱塩素化の起こり易さの目安に使えるものと思われる。

松村徹らの光照射による脱塩素速度の実験によるとオルト位 (2-Biphenyl) に配位する塩素が他の位置に配位する塩素より離脱しやすいとしている⁴⁾。

そこで、オルト位とパラ位に配位した PCBs について、Precursor ion から Product ion への生成量が増大するターニングポイントとなる電圧を1塩化物、2塩化物、6塩化物について比較した。図11～13に示したようにオルト位がやや低電圧を示し、脱塩素し易い事を示した。また、この傾向は高塩化物ほど顕著であった。

これらの構造上の特性を考慮してピーク毎に解離電圧の微調整を行うことも可能と思われる。

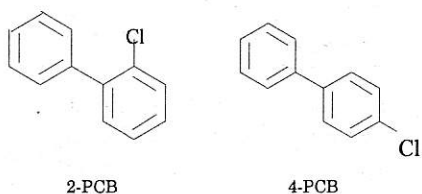
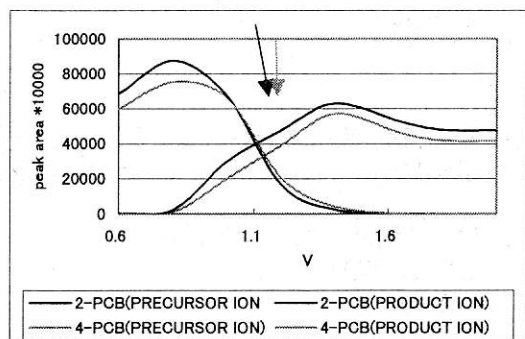


図11 1 塩化物の解離電圧とPRODUCT ION生成量

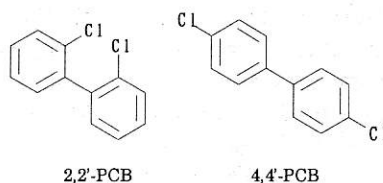
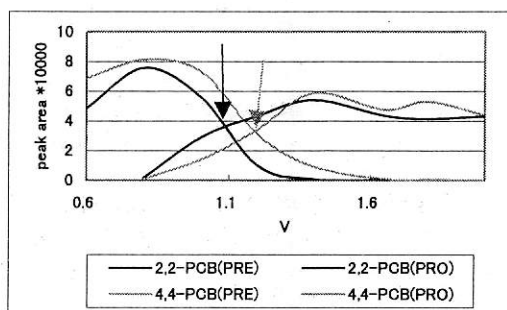


図12 2 塩化物の解離電圧とPRODUCT ION生成量

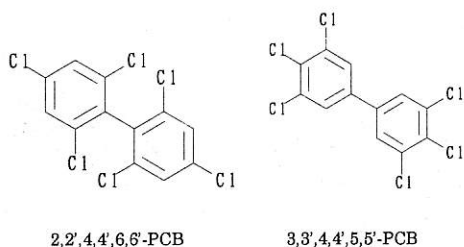
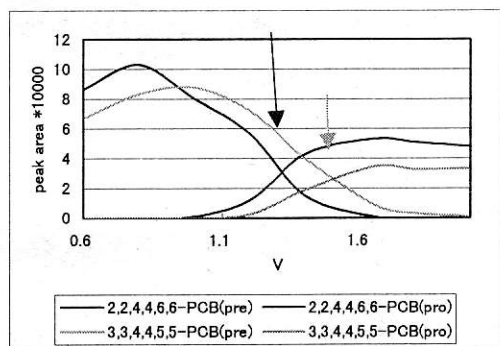


図13 6 塩化物の解離電圧とPRODUCT ION生成量

V まとめ

GC/MS/MS による PCBs の測定は ECD-GC と同程度の感度を得られ、通常の前処理法で夾雑物イオンの影響も見られなかった。

また、有機塩素系農薬はしばしば検出されるため、ECD-GC では PCBs のピークと重なる部分は測定対象から

除外して定量してきた。GC/MS/MS 法では有機塩素系農薬と PCBs は完全に分離定量出来た。

以上のことより、従来の ECD-GC で測定してきた試料について、そのままの前処理法で GC/MS/MS での測定に切り替えることが可能であることがわかった。

VI 文献

- 1) 社団法人日本化学物質安全情報センター：PCB 化合物および PCT 化合物(第2版)，平成6年3月
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法注解2000年版
- 3) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌化学物質調査暫定マニュアル「ポリ塩化ビフェニルの分析法」，平成10年10月
- 4) 松村徹：PCB の異性体分析とその応用
- 5) 兵庫県立公害研究所：平成8年度分析法開発調査報告書（ポリ塩化ビフェニル）
- 6) 剣持由起夫：イオントラップ型 GC/MS を用いたダイオキシン類迅速分析，サーモクエスト GC/MS ユーザーセミナー（2000）
- 7) 剣持堅志：微量化学物質における各種前処理技術の特性と効果 全国環境研会誌，Vol. 26(3)，151-160（2001）
- 8) Herbert budzikiewicz, Carl Djerassi, Dudley H. Williams, 中川有造, 池田正澄訳：有機化合物のマススペクトル，丸善（1973）
- 9) 松永充史, 安原昭夫：PCB の還元的脱塩素化反応 環境化学，Vol. 12(1)，33-43(2002)