

キャピラリーカラム・ECD 法による魚介類の PCB 測定の検討

松木 司 小中 ゆかり 福田 裕

平成 23 年に環境省が作成した「絶縁油中の微量 PCB に関する簡易定量法マニュアル(第 3 版)」¹⁾(以下、「マニュアル」)にあるキャピラリーカラム・ECD 法を参考とし、試料に魚を用い添加回収試験を行った。異なる 4 つの定量法による結果から、1 物質のクリーンアップスパイクによる回収率補正を行う手法は、測定誤差を大きくし、シリンジスパイクによる感度補正のみを行う手法の方が、より精度の高い測定結果を得ることが推察された。

標準溶液を用いて、設定濃度に対する実測濃度の関係を検証した。通常行われている 1 濃度の標準溶液におけるピーク情報を基に試料濃度を算出する手法では、測定試料濃度が標準溶液の濃度から離れる程、誤差が大きくなる。従って、測定試料濃度に近い標準溶液を用いるか、濃度の異なる数点の標準溶液のピーク情報を基に試料濃度を算出する手法を用いることが望ましい。

キーワード： PCB, キャピラリーカラム, ECD, 魚介類

はじめに

食品中の PCB に関しては、昭和 47 年に厚生省より「食品中に残留する PCB の規制について」²⁾が通知され、8 品目について暫定的基準値が示された。このうち魚介類については、遠洋沖合魚介類が 0.5ppm、内海内湾魚介類が 3ppm である。

また、PCB 分析方法に関しては、この通知の中で、検査にあたっての分析方法については、同年に通知された「分析方法に関する研究」によることが記述されている。これは、厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班によるものであり、測定はバックドカラム・ECD 法で、定量方法はパターン合わせ法と十塩素化法が記述されている³⁾。その後、この通知に係る改正は無く、公定法として存在している。

一方、様々な分野で、より信頼性の高い分析方法が開発され^{1), 4)-6)}、現在は、バックドカラム・ECD 法に加え、キャピラリーカラム・ECD 法、GC/HRMS 法、GC/QMS 法等が、その検査目的に応じて使い分けられている。

今回、平成 23 年に環境省が作成したマニュアル¹⁾を参考として、キャピラリーカラム・ECD 法を用い、魚介類を試料とした添加回収試験と、設定濃度に対する実測濃度に係る検証を行った。これらの検討結果について報告する。

方 法

1 試薬

(1) 標準原液

PCB 製品である KC-300, KC-400, KC-500 及び KC-600 の当量混合物(以下、KC-mix)として、ジエールサイエンス(株)製のカネクロール混合溶液(100 μ g/ml ヘキサン溶液)を使用した。

シリンジスパイクとクリーンアップスパイクは、それぞれ、マニュアル¹⁾で採用されている PCB#209 と PCB#189 を使用した。

PCB#209 は、CIL 製の PCB-209-CS(100 μ g/ml イソオクタン溶液)を、PCB#189 は、CIL 製の PCB-189-CS(100 μ g/ml イソオクタン溶液)を使用した。

なお、検量線用、添加回収試験用標準溶液は、標準原液をヘキサンで希釈し調整した。

(2) その他の試薬

水酸化カリウムは、特級で和光純薬工業(株)製を使用した。

エタノール、ヘキサン、塩化ナトリウム、蒸留水(ヘキサン洗浄品)、無水硫酸ナトリウムは、残留農薬試験・PCB 試験用で関東化学(株)製を使用した。

ジエチルエーテルは、残留農薬試験・PCB 試験用で和光純薬工業(株)製を使用した。

カートリッジ式シリカゲルカラムは、Waters 製 Sep-Pak Vac 20cc(5g) Silica Cartridges を使用した。

2 装置及び測定条件

表 1 に示す。

表 1 測定装置及び測定条件

装置	Shimadzu GC 2010 plus
カラム	DB-5(長さ 30m, 内径 0.25mm, 膜厚 0.25 μ m)
昇温条件	120(1min) $\rightarrow$ 20 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 160 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 2 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 220 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 5 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 280 $^{\circ}$ C (5min)
キャリア	ヘリウム, 1.6ml/min
注入口	250 $^{\circ}$ C, スプリットレス(1min), スプリット比(1:15)
検出器	310 $^{\circ}$ C, N ₂ 20ml/min

3 前処理方法

当所の標準作業書により, 熱アルカリ分解, シリカゲルカートリッジカラムによる精製等の前処理を行い, シリンジスパイク(PCB#209)とクリーンアップスパイク(PCB#189)を追加で使用した。前処理の概略を図 1 に示す。

4 定量方法

定量方法は, 以下のとおりマニュアル¹⁾に準じて行った。

- (1) KC-mix 標準液を測定し, 得られたクロマトグラムのピークを, マニュアル¹⁾のクロマトグラムを参照し, ピーク番号を付け各ピークの高さ(H_1)を求める。
- (2) H_1 と各ピークの PCB 成分存在比率である CB_0 (%)により次式で, 各ピークの K 値を算出する。

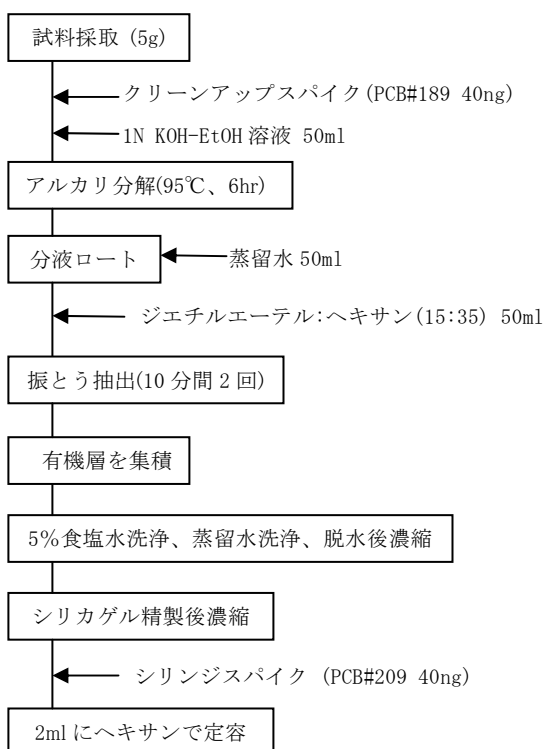


図 1 前処理の概略

K 値は, ピーク高さを重量相当量にする換算係数となる。

$$K = CB_0(\%) / H_1$$

(3) 試料溶液を測定し, 各ピークに同様にピーク番号を付け, 各ピークの高さ(H_2)を求める。

(4) 次式により, 各ピークの CB_2 (%)を算出する。 CB_2 (%)は, 試料中における各ピーク¹⁾の重量相当量となる。

$$CB_2(\%) = K \times H_2$$

(5) 次式により, 測定試料溶液の濃度(ppm)を算する。

$$\text{測定試料溶液の濃度} = \frac{\text{標準液濃度} \times \sum CB_2(\%)}{\sum CB_0(\%)}$$

なお, 各ピークの CB_0 (%)はマニュアル¹⁾に記載されており, これを参照した。

K 値の算出に用いた KC-mix 標準液を, 以後, 定量基準点とする。また, 記述した定量方法を, 以後, CB (%)法とする。

5 添加回収試験

試料には, マダイの可食部をスピードカッターで細断均一化したものを用い, 5 検体に各々 KC-mix0.8ppm 標準液を 2ml 添加の後, 前処理を行い, 最終測定溶液は 2ml に定容した。

定量には, KC-mix0.8ppm 標準液(シリンジスパイクとクリーンアップスパイクの濃度は, 各々 20ppb)を使用し, そのクロマトグラムを図 2 に示す。

(1) PCB 総量の回収率の算定について

以下の 4 つの定量法を用いて算出した。なお, PCB を添加した試料における CB_2 (%)を CB_{add} (%)とし, PCB を添加していない試料の CB_2 (%)を CB_{BL} (%)として算出した。

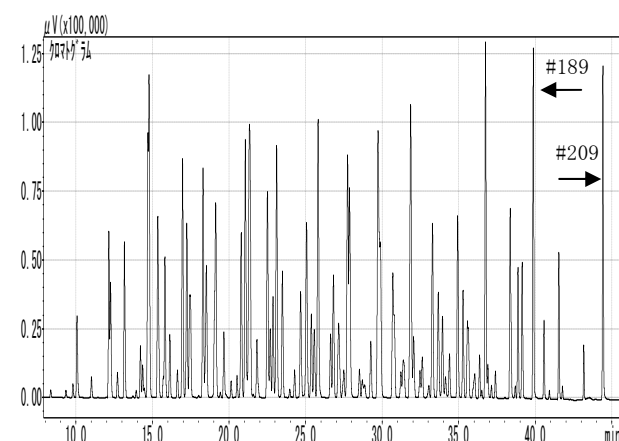


図 2 標準溶液のクロマトグラム

a 絶対検量法(定量法 1)

次式により回収率を算出した。

$$\text{回収率}(\%) = 100 \times (\Sigma \text{CB}_{\text{add}}(\%) - \Sigma \text{CB}_{\text{BL}}(\%)) / \Sigma \text{CB}_0(\%)$$

b シリンジスパイクによる感度補正を行った定量法(定量法 2)

次式により回収率を算出した。

$$\begin{aligned} A &= \Sigma \text{CB}_{\text{add}}(\%) / \text{PCB 添加試料の PCB\#209 の高さ} \\ B &= \Sigma \text{CB}_{\text{BL}}(\%) / \text{PCB 無添加試料の PCB\#209 の高さ} \\ C &= \Sigma \text{CB}_0(\%) / \text{標準溶液の PCB\#209 の高さ} \\ \text{回収率}(\%) &= 100 \times (A - B) / C \end{aligned}$$

c クリーンアップスパイクによる感度及び回収率補正を行った定量法(定量法 3)

次式により回収率を算出した。

$$\begin{aligned} A &= \Sigma \text{CB}_{\text{add}}(\%) / \text{PCB 添加試料の PCB\#189 の高さ} \\ B &= \Sigma \text{CB}_{\text{BL}}(\%) / \text{PCB 無添加試料の PCB\#189 の高さ} \\ C &= \Sigma \text{CB}_0(\%) / \text{標準溶液の PCB\#189 の高さ} \\ \text{回収率}(\%) &= 100 \times (A - B) / C \end{aligned}$$

d 回収率の補正を行った定量法(定量法 4)

これは、マニュアル¹⁾に採用されている手法に基づいたものである。まず PCB#189 の回収率を算出し、次式により回収率を算出した。

$$\begin{aligned} A &= \Sigma \text{CB}_{\text{add}}(\%) \times (100 / \text{PCB 添加試料の PCB\#189 の回収率}(\%)) \\ B &= \Sigma \text{CB}_{\text{BL}}(\%) \times (100 / \text{PCB 無添加試料の PCB\#189 の回収率}(\%)) \\ \text{回収率}(\%) &= 100 \times (A - B) / \Sigma \text{CB}_0(\%) \end{aligned}$$

(2) 全ピーク各々の回収率について

PCB を添加した試料の PCB ピーク高さから、PCB を添加していない試料の PCB ピーク高さを減算し、これと KC-mix0.8ppm 標準液の PCB ピーク高さの比率より算出した。

6 設定濃度に対する実測濃度

通常の実験手法では、濃度の異なる数点の標準液の実測値により、検量線を作成し定量するが、CB(%)法は、1 濃度の定量基準点のピーク情報により定量する。

そこで、0.1~0.7ppm の KC-mix 標準液を作成し、中央濃度の 0.4ppm を定量基準点として、CB(%)法により、他の標準液の濃度を求めた。

この実測濃度と設定濃度の関係を検証した。

結 果 と 考 察

1 添加回収試験

添加回収試験結果を表 2 に、クリーンアップスパイクの回収率を表 3 に示す。以下に記す定量対

表 2 添加回収試験結果 (n=5)

定量法	回収率範囲(%)	平均回収率(%)	CV(%)
1	89.1 ~ 98.1	93.9	3.7
2	96.3 ~ 101	98.7	2.3
3	116 ~ 123	119	2.4
4	107 ~ 118	113	3.6

表 3 クリーンアップスパイクの回収率 (n=5)

回収率範囲(%)	平均回収率(%)	CV(%)
82.0 ~ 85.2	83.0	1.3

象外としたピークを除く全ピークの平均回収率を図 3 に示す。

全ピークの帰属はマニュアル¹⁾を参照して行った。その一例として、KC-mix0.4ppm 標準液のクロマトグラムにおける全ピークの帰属を図 4 と表 4 に示す。

No. 88 ピークは PCB#189 であり、クリーンアップスパイクとして使用しているため、定量対象外とした。

No. 1, 3, 24 ピークは、試料として使用したマダイにもピークが存在し、そのピーク高さは、KC-mix0.8ppm 標準液における各ピーク高さの 2.6 倍以上であったため、定量対象外とした。

また、No. 6 ピークは、CB₀(%)が 0.034 でピーク強度はかなり低い。直後に出現する No. 7 ピークは、CB₀(%)が 3.597 でピーク強度はかなり強く、両ピークの分離も完全ではない。そのため、添加試料中の No. 6 ピークは、No. 7 ピークの影響で、強度が増し、再現性も非常に悪いため、定量対象外とした。

以上の 5 ピークを定量対象外としたが、これらの CB₀(%)の合計は、1.390 であり、PCB 総量の回収率の算出における影響は、ほとんど無いものと考えられる。

定量法 1 は、前処理過程における分析誤差とガスクロマトグラフの感度変動を含む。定量法 2 では、定量法 1 より CV 値が低下し回収率の範囲も狭くなった。これは、シリンジスパイクによる感度補正を行ったことに起因していると考えられる。そこで、シリンジスパイクの高さと全ピーク高さの合計値の関係を図 5 に示す。

おおむね、ガスクロマトグラフの感度変動を示すシリンジスパイクの高さ変動に応じて、全ピーク高さの合計値が変動している。感度変動には、時系列的に随時変動するものと、試料注入ごとに

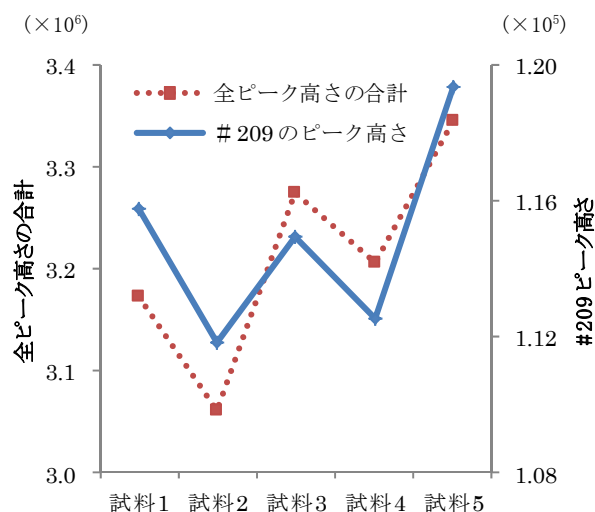


図5 添加試料ごとのシリンジスパイクの高さと全ピーク高さの合計値の関係

変動するものが考えられる。保持時間が最も遅いPCB#209をシリンジスパイクとし、感度補正ができたことから、後者の寄与の方が大きかったと推察される。

定量法3では、感度補正によりCV値は定量法2と同程度になったが、平均回収率は119%と大きな値となった。

図3より、各ピークの回収率には、ばらつきがあり、特に後半のピークにおいて低下していることがわかる。これらを1物質のクリーンアップスパイクの回収率で一律に補正することは適切ではない。定量法3では、全ピークを一律に15~18%程度押し上げるような計算が生じ、高い平均回収率になったと考えられる。

また、回収率が50%未満の5個のピークについての回収率と塩素数を表5に示す。これらは、いずれも8又は9塩素化物であった。熱アルカリ分解で8~10塩素化物は分解する⁶⁾ことが知られており、このことが要因と考えられる。なお、KC-mix中に10塩素化物は存在しない¹⁾。

この5個のピークのCB₀(%)の合計は、0.561であり、PCB総量の回収率の算出に影響を与えるものではない。

なお、マニュアル¹⁾における対象物は絶縁油であり、アルカリ分解の処理は無いため、このような高塩素化物の分解は無いと思われる。

定量法4は、同様に平均回収率が高くなり、感度補正が無い場合CV値は定量法1と同程度になっ

表5 回収率50%未満のピーク

ピーク NO.	PCB 異性体	回収率(%)	塩素数
83	#200	37.3	8
85	#198	25.4	8
89	#208, #195	42.1	9, 8
90	#207	0.0	9
93	#206	8.6	9

たと考えられる。

2 設定濃度に対する実測濃度

CB(%)法で求めた実測濃度と設定濃度との比を図6に示す。定量基準点の0.4ppmより低い設定濃度では実測濃度の方が設定濃度より高い値となり、0.4ppmより高い設定濃度では実測濃度の方が設定濃度より低い値となった。また、0.4ppmから離れるほど両者の差が大きくなっている。この現象は、本来、切片が存在する検量線での定量を、1点検量で定量した場合に生じる現象である⁷⁾。

この実測値の算出要素である ΣCB_2 (%)と設定濃度の関係を図7に示す。両者は直線関係にあることがわかる。これを検量線として用い、相関式により試料の ΣCB_2 (%)から濃度を算出すれば、前述した1点検量で生じる誤差が、低減できるものと考えられる。

そこで、各設定濃度における ΣCB_2 (%)を基に、相関式から算出した実測濃度と設定濃度との比を図8に示す。図5と比較してみると、CB(%)法での1点検量で生じる誤差が低減されていることがわかる。

実際の試料測定においては、まず、濃度の異な

実測濃度/設定濃度

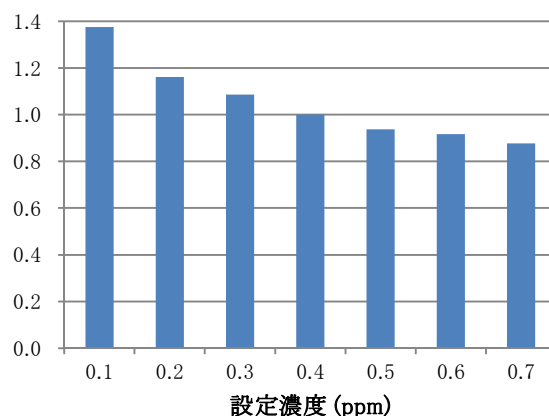


図6 設定濃度と実測濃度(CB(%)法)の比

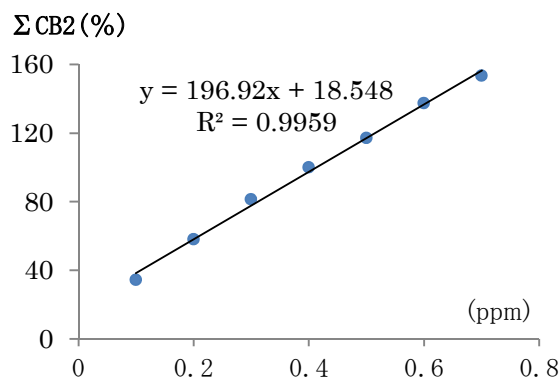


図7 ΣCB₂ (%)と設定濃度の相関図

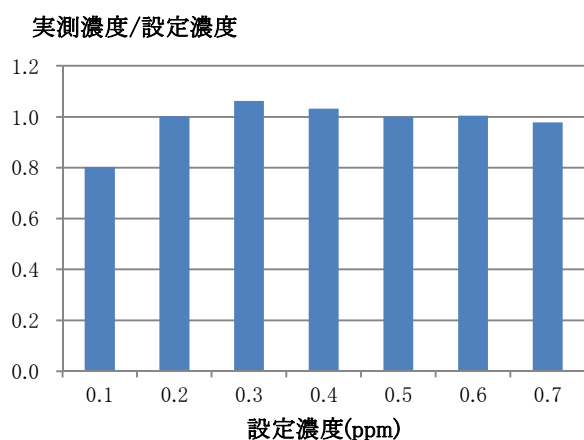


図8 設定濃度と実測濃度(相関式算出)の比

る数点の KC-mix 標準液を測定する。中央濃度の標準液を検量基準点とし、その他の KC-mix 標準液の ΣCB₂ (%) を求める。各々の濃度と ΣCB₂ (%) より検量線を作成し相関式を求める。

次に、実試料を測定し、検量基準点より実試料の ΣCB₂ (%) を求め、相関式より濃度を求める。

一方、CB (%) 法を用いる場合は、まず、濃度の異なる数点の KC-mix 標準液を測定する。

次に、実試料を測定し、強度の強い数本の主要ピーク高さから、最も濃度の近い KC-mix 標準液を推定し、それを定量基準点として採用することが望ましい手法と思われる。

まとめ

1 添加回収試験

(1) 全 PCB ピークのうち、回収率が 50% 未満の 5 個のピークは、8 又は 9 塩素化物であった。これは、熱アルカリ分解に起因していると考えられるが、PCB の総量を求める場合には大きな誤差とはならない。

(2) 最も保持時間が遅い PCB#209 をシリンジスパイクとした感度補正であったが、絶対検量に比べ測定値の変動が小さくなったことより、シリンジスパイクによる感度補正の有効性が示唆された。

(3) 全 PCB ピークの回収率にばらつきがあるため、1 物質のクリーンアップスパイクでの回収率補正による定量は、誤差要因となる。

2 設定濃度に対する実測濃度

(1) 定量基準点 1 濃度のピーク情報より定量を行う CB (%) 法では、測定試料溶液の濃度が標準液濃度より低い場合は高めに、測定試料溶液の濃度が標準液濃度より高い場合は低めになる。また、測定試料溶液の濃度が標準液濃度より離れるほど、その誤差は大きくなる。

従って、測定試料液濃度に近い標準液を用いて定量することで、この誤差を低減することができる。

(2) 濃度の異なる数点の KC-mix 標準液を測定し、中央濃度の標準液を定量基準点として、他の標準液の ΣCB₂ (%) を算出する。PCB 濃度と ΣCB₂ (%) の関係で検量線を作成し定量に用いる。

この手法を用いれば、(1) での誤差を低減することができる。

文 献

- 1) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部産業廃棄物課：絶縁油中の微量 PCB に関する簡易測定法マニュアル(第 3 版)(2011)
- 2) 厚生省通知，環食第 442 号，昭和 47 年 8 月 24 日
- 3) 千葉幹雄：PCB 汚染とその分析法，65～87 (1973)
- 4) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質暫定調査マニュアル(水質，底質，水生生物)，I-1～I-16(1998)
- 5) (財)日本規格協会：工業用水・工場排水中のポリクロロビフェニル(PCB)試験方法 JIS K 0093(2006)
- 6) 日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 理化学編 2015，683～693(2015)
- 7) (株)島津製作所：絶縁油中微量 PCB 測定の簡易測定法(第 1 版，第 2 版，第 3 版)に関する解説書，<http://www.an.shimadzu.co.jp/gc/support/faq/pcb-exp-c.pdf>

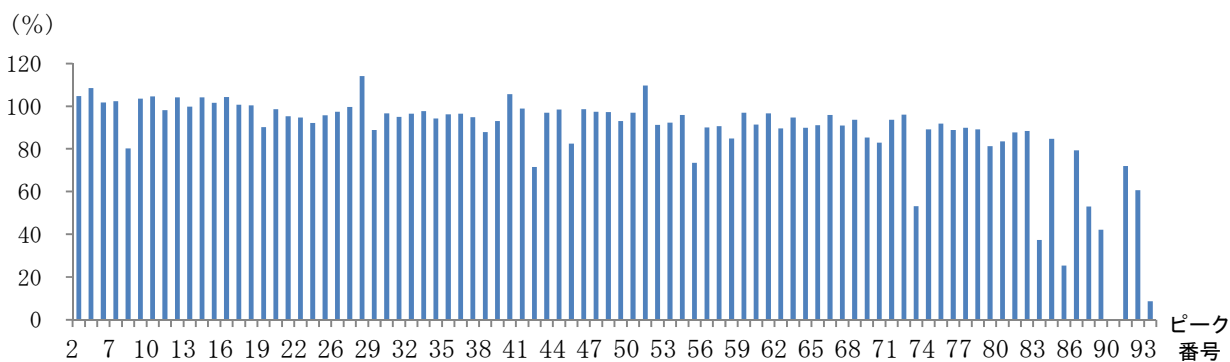


図3 全ピークの平均回収率 (n=5)

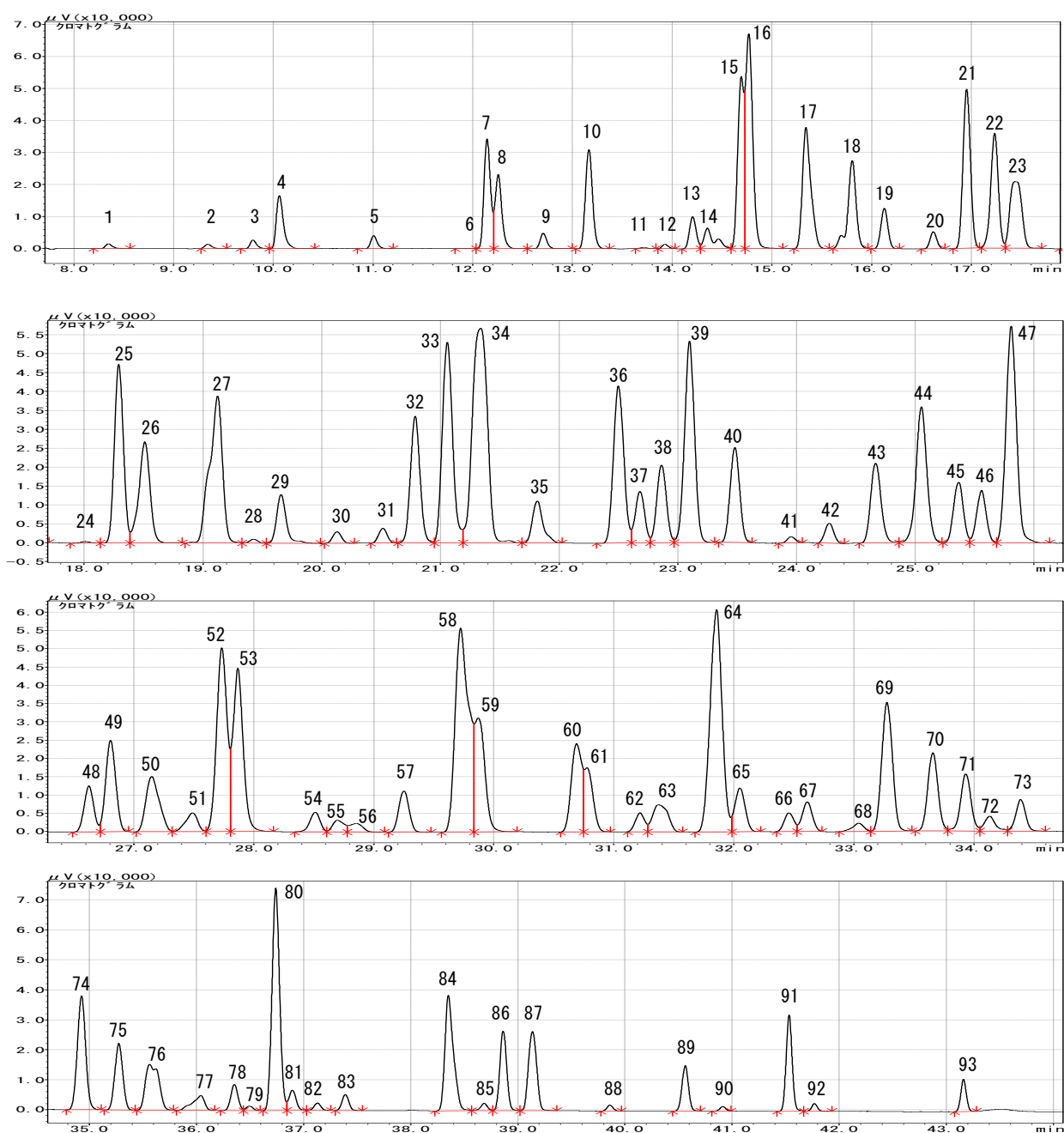


図4 KC-mix 標準液のピーク帰属

表 4 KC-mix 標準液のピーク帰属

ピーク 番号	保持時間 (min)	CB ₀ (%)	PCB	ピーク 番号	保持時間 (min)	CB ₀ (%)	PCB
1	8.35	0.928	#10, #4	48	26.63	0.338	#82
2	9.34	0.131	#7, #9	49	26.81	1.086	#151
3	9.80	0.371	#6	50	27.15	0.802	#135, #144, #124
4	10.07	2.145	#8, #5	51	27.49	0.195	#147, #107, #108
5	11.01	0.341	#19	52	27.74	3.409	#123, #139, #149
6	11.98	0.034	#12, #13	53	27.86	2.350	#118
7	12.15	3.597	#18	54	28.51	0.170	#134
8	12.26	1.762	#15, #17	55	28.70	0.091	#114
9	12.71	0.262	#24, #27	56	28.85	0.077	#131, #133, #122
10	13.16	2.160	#16, #32	57	29.25	0.437	#146
11	13.72	0.015	#34	58	29.72	3.786	#153
12	13.93	0.033	#29, #54	59	29.87	2.033	#105, #132
13	14.21	0.518	#26	60	30.69	0.847	#141
14	14.35	0.224	#25	61	30.78	0.848	#179
15	14.70	3.165	#31	62	31.22	0.129	#137
16	14.77	2.904	#28	63	31.38	0.408	#176, #130
17	15.34	2.710	#20, #33, #53	64	31.86	3.874	#164, #163, #138
18	15.81	1.306	#22, #51	65	32.05	0.430	#158
19	16.13	0.467	#45	66	32.46	0.135	#129
20	16.62	0.189	#46	67	32.61	0.275	#178
21	16.96	3.692	#52	68	33.04	0.066	#175, #166
22	17.24	1.948	#49	69	33.28	1.775	#187
23	17.44	1.330	#47, #48	70	33.66	0.848	#162, #183
24	18.01	0.030	#35	71	33.93	0.458	#128
25	18.30	2.604	#44	72	34.13	0.119	#167
26	18.51	1.738	#59, #37, #42	73	34.39	0.198	#185
27	19.12	2.521	#41, #64, #71	74	34.92	1.511	#174
28	19.43	0.029	#96	75	35.28	0.739	#177
29	19.66	0.442	#40, #103, #57	76	35.56	0.820	#156, #202, #171
30	20.13	0.089	#67	77	36.04	0.209	#173, #157, #201
31	20.51	0.110	#63	78	36.35	0.182	#172
32	20.79	1.535	#74, #94	79	36.50	0.033	#197
33	21.06	3.678	#70	80	36.74	2.952	#180
34	21.33	5.437	#102, #66, #95	81	36.90	0.153	#193
35	21.82	0.414	#91, #55	82	37.13	0.047	#191
36	22.50	2.189	#56, #60	83	37.39	0.122	#200
37	22.68	0.504	#92	84	38.36	1.271	#170, #190
38	22.87	0.809	#84	85	38.69	0.032	#198
39	23.10	3.490	#101, #90	86	38.87	0.656	#199
40	23.48	1.077	#99	87	39.14	0.790	#196, #203
41	23.96	0.037	#119	88	39.86	0.027	#189
42	24.28	0.142	#83, #78	89	40.56	0.276	#208, #195
43	24.67	0.887	#86, #97	90	40.91	0.020	#207
44	25.06	1.614	#87, #115, #117	91	41.53	0.546	#194
45	25.37	0.459	#85	92	41.77	0.024	#205
46	25.56	0.656	#136	93	43.16	0.111	#206
47	25.81	3.453	#77, #110, #154	合計		99.881	

PCB#209 の保持時間は 44.411(min), CB₀(%) と PCB 異性体名はマニュアル¹⁾より引用した。