高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた異径キャピラリーカラムによる血液中ポリ塩化クアテルフェニルの迅速測定

安武, 大輔
福岡県保健環境研究所

芦塚, 由紀
福岡県保健環境研究所

堀, 就英
福岡県保健環境研究所

黒川, 陽一
福岡県保健環境研究所

他

https://doi.org/10.15017/19736

出版情報：福岡醫學雜誌. 102 (4), pp.145-152, 2011-04-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた異径キャピラリーカラムによる血液中ポリ塩化クアテルフェニルの迅速測定

[1)]福岡県保健環境研究所
[2)]北九州生活科学センター
[3)]九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野
[4)]九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

安武大輔[1)]，芦塚由紀[1)]，堀　就英[1)]，黒川陽一[1)]，梶原淳睦[1)]，平田輝昭[1)]，石黒靖尚[2)]，飯田隆雄[2)]，内　博史[3)4)]，古江増隆[3)4)]

The Rapid Analysis of Polychlorinated Quaterphenyls in Blood Using Different Diameter Capillary Column with the High-Resolution Gas Chromatograph High-Resolution Mass Spectrometer

Daisuke Yasutake[1)], Yuki Ashizuka[1)], Tsuguhide Hori[1)], Youichi Kurokawa[1)], Jumboku Kajiwara[1)], Teruaki Hirata[1)], Yasuhisa Ishiguro[2)], Takao Iida[2)], Hiroshi Uchi[3)4)] and Masutaka Furue[3)4)]

[1)]Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, Fukuoka, Japan
[2)]Kitakyushu Life Science Center, Fukuoka, Japan
[3)]Department of Dermatology, Faculty of Medical Scicence, Kyusyu University, Fukuoka, Japan
[4)]Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyusyu University Hospital, Fukuoka, Japan

Abstract　The polychlorinated quaterphenyl (PCQ) concentrations in blood are important discriminative parameters in yusho patient.
In this study, a rapid analytical method for PCQ using different diameter capillary column (rapid-Rtx65TG) with high-resolution gas chromatograph high-resolution mass spectrometer (HRGC/HRMS) instead of the gas chromatograph electron capture detector (ECD/GC) was developed. Using different diameter capillary columns, the analysis time of the HRGC/HRMS was drastically shortened, and the detection sensitivity was improved.
In the rapid-Rtx65TG column, a small-bore capillary column (length 1m, I.D. 0.1mm) was connected with the inlet side of the GC, and behind that column, a large-bore capillary column (length 15mm, I.D. 0.53mm) for octadecachloroquaterphenyl (ODCQ) analysis was connected. In the HRGC/HRMS measurement of ODCQ by the rapid-Rtx65TG column, the minimum limit of detection for the apparatus was 0.4 pg, and the minimum limit of determination for the blood was 0.008 ppb.
On ECD/GC in the conventional method and HRGC/HRMS in this study, the PCQ concentration in blood including yusho patients and yusho suspected persons was almost equivalent.

Key words：Yusho, PCQ, Blood, HRGC/HRMS

はじめに

ポリ塩化クアテルフェニル（PCQ）は，油症認定患者が摂取したライスオイル中に高濃度に含まれていたことが報告されており[1)]，ポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）と同様に，ポリ塩化ビフェニル（PCB）を熱媒体として加熱使用中に生成し，ライスオイルに混入したと考えられる[1)2)]．PCQは，動物実験によりPCDFに比べて酵素誘導能，肝肥大，胸腺萎縮，体重増加抑制などの毒性は弱

いと考えられている．PCQ は，健常者の血液中ではほとんど検出されないが（平均で 0.02ppb 以下）[3]，油症認定患者の血液には健常者に見られない高濃度の PCQ が検出されている[4]．そのため，血液中 PCQ 濃度は 1981 年に油症の診断基準に追加され，現在も油症に特徴的かつ有用な基準の一つとなっている．その基準では，血液中 PCQ 濃度は 0.1ppb 以上が「高い濃度」とされ，0.02 ppb 以下が「通常みられる濃度」，0.03～0.09ppb が「境界領域濃度」とされている．

PCQ の分析法は前田らにより[5]，PCQ の完全塩素化物である十八塩素化クアテルフェニル（ODCQ）として電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ（ECD/GC）で定量する方法として確立され，飯田らによりキャピラリーカラムを用いた高感度な分析法が開発された[6]．また，芦塚らは，分析の小スケール化を行うことによって，分析操作を簡易化及び迅速化した方法を報告している[7]．

ECD/GC は，最新のガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）に比べ，機器の感度変動が大きく不安定である．また，ECD は，原理上，機器内に放射性物質，^{63}Ni を内蔵しているため，機器維持管理及び測定者の健康維持管理が不可欠である．さらに，近年，PCB，PCDF 及びハロゲン化有機化合物等の微量分析の測定機器が，ECD/GC から GC/MS へ移行しており，ECD の老朽化が進んでいる．今回は，これらの問題を解決するために，ECD/GC の代わりに高分解能 GC/MS（HRGC/HRMS）を用いた二種類の異径キャピラリーカラムによる PCQ の高速分析について検討し，ECD/GC の測定結果と比較・検証する．

材料及び実験方法

1．血液試料

油症検診で，39 名（認定患者 14 名，未認定者 25 名）の受診者血液について PCQ の分析を行った．

2．標準液

PCQ 標準液：PCQ 標準液（10ng/mL）を完全塩素化して，PCQ 濃度で 5 ng/mL に相当する ODCQ 標準溶液を調整した．この標準溶液から，0.2～50ng/mL の検量線溶液を n-ノナンで調整し，内標準物質として 1ng/mL の 14 塩素化-o ターフェニル（o-TDCT）を添加した．

3．試薬・試液

ヘキサン，エタノールは，キシダ化学社製の残留農薬・PCB 分析用を用いた．ジエチルエーテル，ジクロロメタンは関東化学社製の残留農薬・PCB 分析用を用いた．水酸化カリウムは和光純薬株式会社製の特級を，無水硫酸ナトリウムは関東化学社製の残留農薬・PCB 分析用を用いた．硫酸は和光純薬株式会社製の有害金属測定用を，発煙硫酸はキシダ化学社製を用いた．フロリジルは Floridin 社製のものを 130℃で 3 時間活性化させ，アルミナはメルク社製の Aluminiumoxid（70～230mesh）を 130℃で 3 時間活性化後，精製水を 2％加えてよく混合したものを用いた．

4．使用機器，測定条件

ECD/GC 測定では，Hewlett-Packard 社 HP5890A（^{63}Ni-ECD）を用いた．ECD/GC の使用カラム及び GC 条件を Table 1 に示す．また，ECD の検出器温度は 350℃とした．HRGC/HRMS 測定では，HRGC は Agilent 社 HP6890N を，HRMS は Waters 社 AutoSpec Premier を用いた．HRGC/HRMS の使用カラム及び GC 条件を Table 1 に示す．また，HRMS の測定条件を Table 2 に示す．

5．分析方法

血液は，既報にしたがって処理した[7]．分析フローを Fig.1 に示す．ECD/GC 測定では，最終検液を 0.2 mL のヘキサン溶液とした．HRGC/HRMS 測定では，内標準物質として 25pg の o-TDCT を添加し，25μL のノナン溶液とした．

結果及び考察

1．ODCQ 測定のキャピラリーカラムの検討

6 種類の異性体を含む ODCQ 混合標準溶液を HRGC/HRMS で測定し，Table 3 に示す 9 種類の化学結合性シリカキャピラリーカラムについて ODCQs の分離を検討した．ODCQ 測定では，50ng/ml の ODCQs 標準溶液を 1μl 注入し，GC 温度は 80℃で 1 分間保持し，1 分間あたり 40℃で昇温，310℃で保持された．Table 3 に示すように，7 種類が（5% フェニル）－メチルポリシロキ

Table 1　Measurement condition of the gas chromatograph in ECD/GC and HRGC/HRMS

	ECD/GC	HRGC/HRMS
Column type	Quadrex 007-65HT (Length 25m, I.D. 0.25mm, Thickness 0.1μm)	1st：Deactivated Silica Column (Length 1m, I.D.0.1mm) 2nd：Restek Rtx65TG (Length 15m, I.D.0.53mm, Thickness 0.1μm) 3rd：Deactivated Silica Column (Length 1m, I.D.0.32mm)
Injector temperature	300 ℃	
Injection method	Splitless	
Injection volume	4 μl	
He	Head Pressure 25 psi	Flow rate 1.5ml/min
Column temperature	80℃(1min)→ 30℃/min → 320℃(45min)	130℃(1min)→ 120℃/min → 360℃(12.08min)

Table 2　The measurement condition of the mass spectrometer for OCDQ

Ionization Mode		EI
Electron Energy		35 eV
Ion Source Temperature		270 ℃
Ionization Current		650 μA
Transfer Temperature		280 ℃
Resolution		5000
Selected Ion Monitoring by	Quantification	925.4275
Lockmass Mode	Confirmation	927.4246

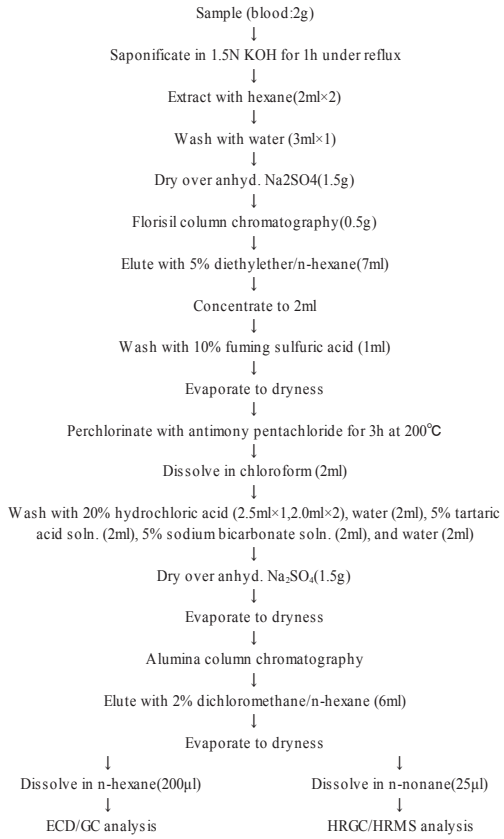

Fig. 1　Flow diagram for the determination of polychlorinated quaterphenyl (PCQ) in blood

サンを液相としたキャピラリーカラムであり，製造元，長さ，内径，膜厚等を検討した．また，(5% フェニル) − メチルポリシロキサンの液相のほかに，100% ジメチルポリシロキサンや (65% フェニル) − メチルポリシロキサンなどの液相による違いを検討した．6 種類の ODCQ を各キャピラリーカラムで測定したマスクロマトグラムを Fig. 2 に示す．DB5 では，長さ 30m，内径 0.25mm，膜厚 0.1μm のキャピラリーカラムを基準にして，長さ，内径，膜厚を変更した．その結果，膜厚が 0.25μm と厚くなると ODCQ のピークの出現が遅くなった．また，長さや内径の比較では，キャピラリーカラムの長さが短いほど，内径が太いほど，ODCQ のピークの出現が早く，ピーク数が 5 つから 4 つに減少し，分離度が低下した．液相が (5% フェニル) − メチルポリシロキサン系で長さ 30m，内径 0.25mm，膜厚 0.1μm のキャピラリーカラムにおいて製造元の異なるすべてのキャピラリーカラムでは，6 種類の ODCQ が 5 つのピークに分離した．また，100% メチルポリシロキサンや (65% フェニル) − ジメチルポリシロキサンの液相においては，ピークのパターンは異なるが，

Table 3 List of evaluated capillary columns

Capillary Column	Length	Inner Diameter	Film Thickness	Stationary phase	Temperature limit	Manufacturer
DB1	30m	0.32mm	0.1μm	100% Dimethylpolysiloxane	340℃	Agilent
DB5	15m	0.32mm	0.1μm	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	325℃	Agilent
DB5	30m	0.25mm	0.1μm	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	325℃	Agilent
DB5	30m	0.32mm	0.1μm	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	325℃	Agilent
DB5	30m	0.25mm	0.25μm	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	325℃	Agilent
ENV5MS	30m	0.25mm	0.1μm	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	360℃	Kanto
VF5ht	30m	0.25mm	0.1μm	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	370℃	Varian
SLB5MS	30m	0.25mm	0.1μm	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	340℃	Supelco
007-65ht	25m	0.25mm	0.1μm	(65%-phenyl)-methyl polysiloxane	400℃	Quadrex

4つのピークに分離することが分かった．さらに，キャピラリーカラムの最高使用可能な温度が高いほど，短時間でODCQが溶出されることが確認された．したがって，ODCQ測定で使用するキャピラリーカラムには，高温使用可能で，膜厚が薄く，今回検討したすべてのタイプの液相が有効であることが分かった．

2．ODCQ用rapid-Rtx65TGカラムの検討

EDC/GCにおけるODCQのガスクロマトグラムでは，各ピークのピーク幅は約1分で非常にブロードであり，測定時間は60分で，非常に長い．近年，PCBの測定技術の一つとして，2種類の異径のキャピラリーカラムを用いてPCB測定時間を10分の1に短縮することが可能となっている[8]．具体的には，この異径のキャピラリーカラムは，GCの注入口側に内径0.1mm長さ1mの内径の小さい不活性シリカキャピラリーカラムを接続し，次に，内径0.53mmの内径の大きい分析用カラムを接続している．これによりMSの真空状態が利用可能となり，分析用カラムの分離状態を生かしたまま，高速分析が可能となる．

上記のように，長さ30m，内径0.25mm，膜厚0.1μmの（5%フェニル）－メチルポリシロキサン系キャピラリーカラムがODCQ測定に有効であったが，最高使用可能温度が低く，膜厚0.1μmで内径0.53mmのキャピラリーカラムが市販されていない．また，最高使用温度が高いVF5htやQuadrex007-65htの内径0.53mmのキャピラリーカラム及びVF5MSの同質品で内径0.53mmのキャピラリーカラムは，市販されていない．そこで，Quadrex007-65htと同品質であるRestek社製RTX-65TG（長さ15m，内径0.53mm，膜厚0.1μm，最高使用温度370℃）を分析用カラムとして使用した．今回は，注入口側に内径0.1mm長さ1mの不活性シリカキャピラリーカラムを，次に，内径0.53mm長さ15mのRtx-65TGを，次に内径0.32mm長さ1mの不活性シリカキャピラリーカラムを接続し，これをODCQ用Rapid-Rtx65TGカラムとした．尚，分析用カラムが内径0.53mmと大きくGCとMSの間のトランスファーラインに導入できないため，分析用カラムRtx-65TGに内径0.32mm長さ1mの不活性シリカキャピラリーカラムを接続した．

HRGC/HRMSを用いてQuadrex 007-65ht（長さ25m，内径0.25mm，膜厚0.1μm）とODCQ用rapid-Rtx65TGカラムでODCQを測定した結果をFig. 3に示す．尚，OCDQ測定では，50ng/mlのODCQs標準溶液を1μl注入し，GC温度は80℃で1分間保持し，1分間あたり40℃で昇温，340℃で42.5分間保持された．Fig. 3に示すように，Quadrex 007-65htにおけるODCQのマスクロマトグラムでは，ピーク幅が1分と長く，低濃度領域ではノイズに対するシグナルの比が小さくなり，検出感度も低いと考えられる．rapid-Rtx65TGにおけるODCQのマスクロマトグラムでは，ODCQの溶出時間は早く，ピーク幅も小さくノイズに対するシグナルの比も大きくなり，検出感度も向上すると考えられ，rapid-Rtx65TGの有効性が確認された．次に，rapid-Rtx65TGによるGC条件の最適化を行った．

Table 1の条件に従って，Quadrex 007-65htを用いてECD/GCでODCQsを測定したガスクロマトグラムとODCQ用rapid-Rtx65TGを用いてHRGC/HRMSでODCQsを測定したマスクロマトグラムをFig. 4に示す．Quadrex 007-65htを

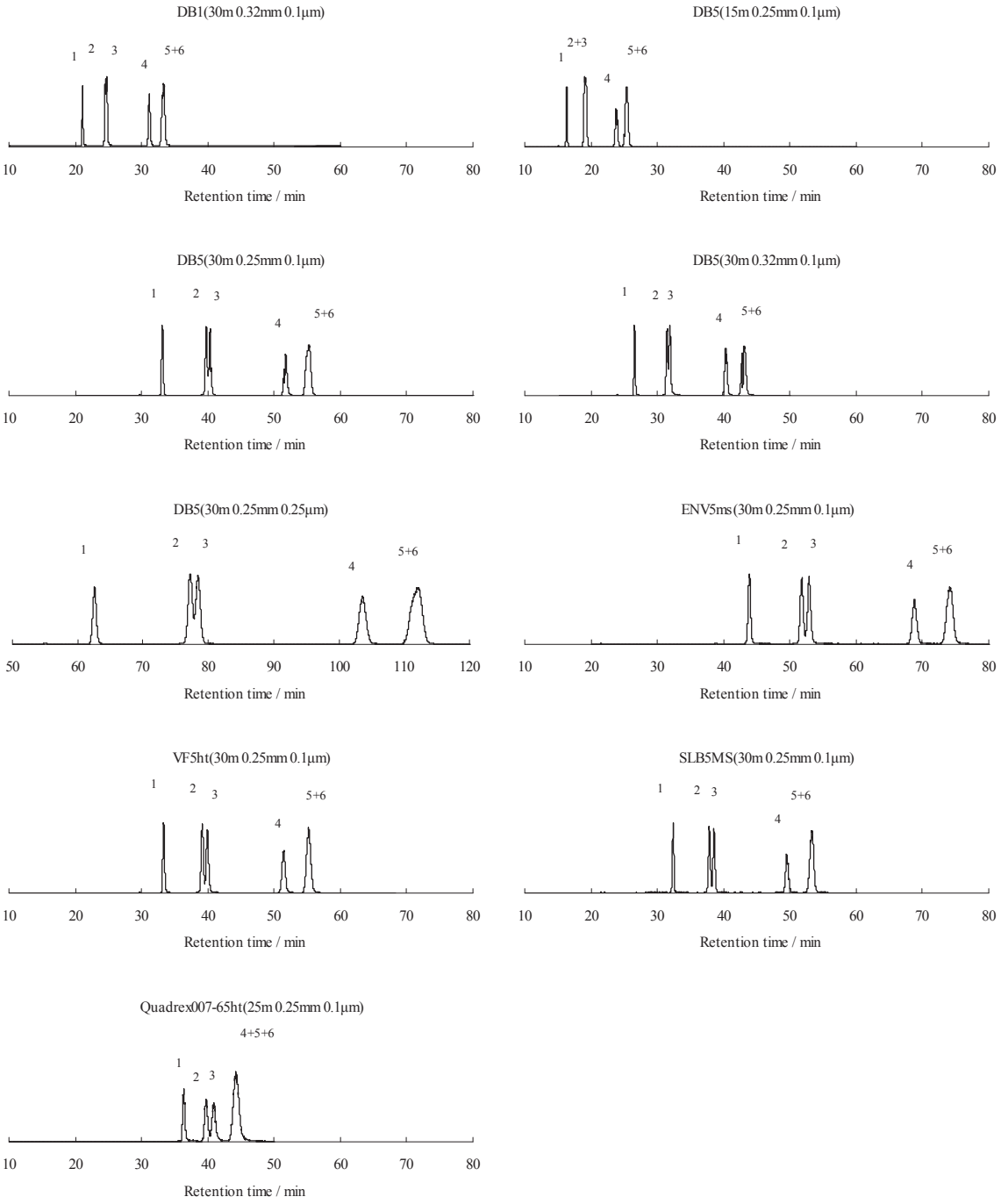

Fig. 2 Mass chromatogram of six types of ODCQs on nine different capillary columns
Peak1 : 2,2'-ODCQ, Peak2 : 2,3'-ODCQ, Peak3 : 2,4'-ODCQ, Peak4 : 4,4'-ODCQ, Peak5 : 3,3'-ODCQ, Peak6 : 3,4'-ODCQ.

用いた ECD/GC では，約 41 分に 2,2'-ODCQ の最初のピークが，約 52 分に 3,4'-ODCQ の最後のピークが検出された．ODCQ 用 rapid-Rtx65TG を用いた HRGC/HRMS では，約 6.6 分に 2,2'-ODCQ の最初のピークが検出され，約 7.4 分に最後のピークが検出された．ODCQ 用 rapid-Rtx65TG の利用により，ピークの分離を損なうことなく，HRGC/HRMS における ODCQ 測定時間を ECD/GC に比べて約 7 倍に短縮できた．

3．検量線及び検出限界

HPLC や GC（GC/MS を含む）などの機器分析では，内標準物質を用いる内標準法を適用できれば，一般的に測定精度が向上すると考えられる．ECD/GC ではクロマトグラム上で重なり合うと想定される内標準物質が，本法では，検出器に高

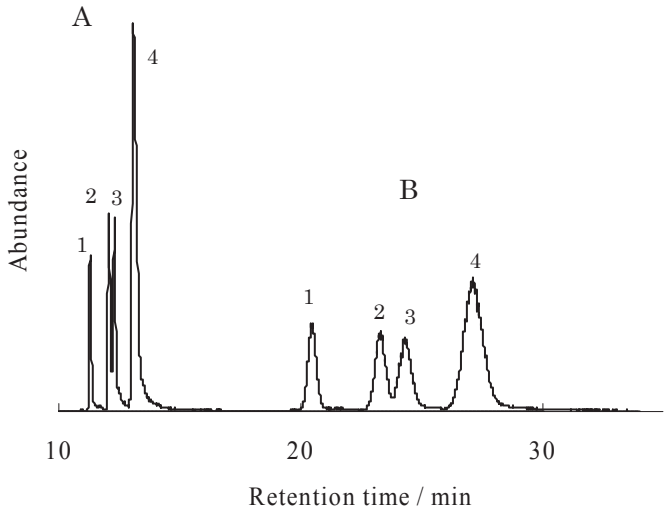

Fig. 3 Mass chromatograms of six types of ODCQs by the HRGC/HRMS with quadrex 007-65ht capillary column and rapid-Rtx65TG capillary column
Peak1 : 2, 2'-ODCQ, Peak2 : 2, 3'-ODCQ, Peak3 : 2, 4'-ODCQ, Peak4 : 4, 4'-ODCQ + 3, 3'-ODCQ + 3, 4'-ODCQ. A) The mass chromatogram with rapid-Rtx65TG capillary column ; B) The mass chromatogram with the Quadrex 007-65ht capillary column

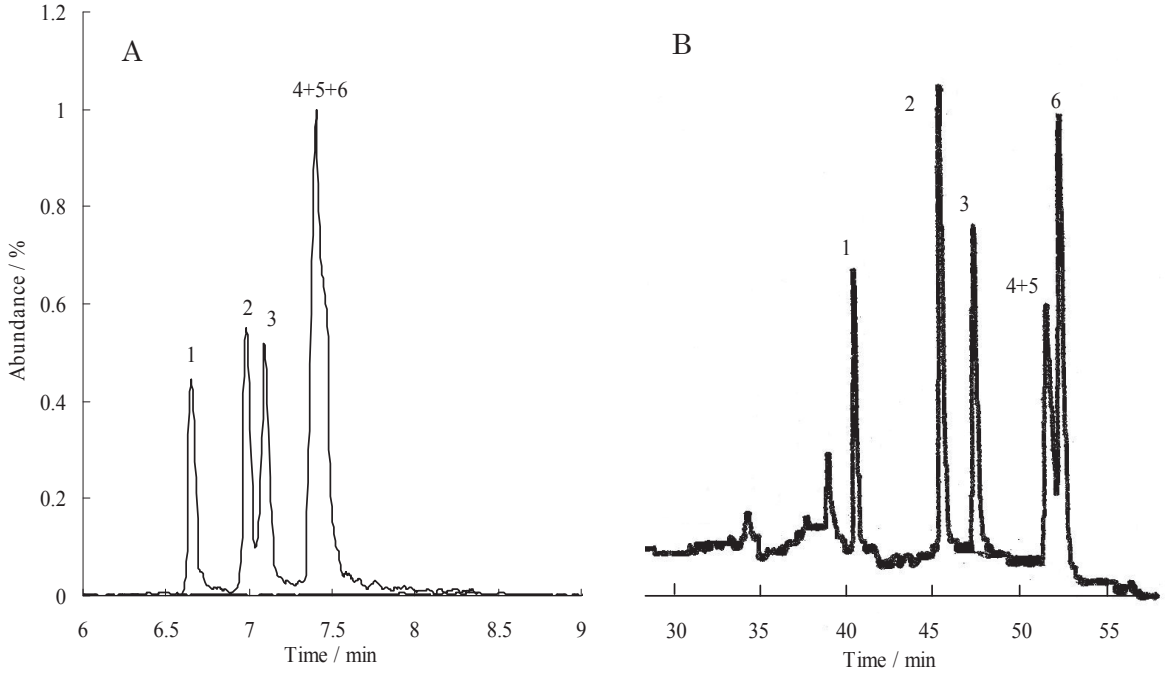

Fig. 4 The HRGC/HRMS chromatogram and the ECD/GC chromatogram of six types of octadecachloro-qtaterphenyls (ODCQs)
Peak1 : 2, 2'-ODCQ, Peak2 : 2, 3'-ODCQ, Peak3 : 2, 4'-ODCQ, Peak4 : 4, 4'-ODCQ, Peak5 : 3, 3'-ODCQ, Peak6 : 3, 4'-ODCQ. A) The HRGC/HRMS chromatogram with the OCDQ rapid-Rtx65TG capillary column ; B) The ECD/GC chromatogram with the Quadrex 007-65ht capillary column

分解能質量分析計を用いているため，ODCQ に ^{13}Cを導入した化合物を内標準物質とすることで，内標準法として機能すると考えられる．しかし，^{13}C を導入した ODCQ は市販品ではなく，非常に高額である．内標準法の有効性を検討するため，今回は，o-TDCT を内標準物質として ODCQ 標準溶液に添加し，検量線を作成し，検出下限を求めた．検量線は，0.5ng/ml の内標準物質を含

む ODCQ 標準液（PCQ 濃度として，0.2，0.5，2，5，20 及び 50 ng/ml）をそれぞれ 4μl ずつ GC に注入し，それぞれのピーク面積から絶対検量線法と内標準法で作成した．また，検出下限値は，0.5ng/ml の内標準物質を含む ODCQ 標準液（PCQ 濃度として 0.2pg/mL）を 6 回繰り返し測定し，同様に，絶対検量線法と内標準法で求めた．Fig. 5 に絶対検量線法と内標準法で作成した検量線を示す．Fig. 5 に示すように，検量線は，両者とも PCQ 濃度として 0.8～200ng/ml の範囲で原点を通る良好な直線であり，絶対検量線法では相関係数は 0.988，内標準法では相関係数は0.998であった．また，装置の検出下限は両方法とも0.4 pg であり，本測定法における血液中の PCQ の検出下限は，絶対検量線法では 0.003ppb，内標準法では 0.002ppb で，両方法に大きな差はなかった．しかし，本測定法では，最終測定検液の量が 25μl と微量であるため，絶対検量線法では濃度の制御や溶液の管理が困難である．したがって，ODCQ 測定では，内標準法が有効であり，^{13}C の導入された ODCQ もしくはその類縁化合物の合成が不可欠であると考えられる．

4．HRGC/HRMS による血液中 PCQ 測定の検証（既存法である EDC/GC による ODCQ 測定との比較）

油症認定患者及び未認定患者の血液試料，39 検体について，Fig. 1 の方法に従って ECD/GC 用試料と HRGC/HRMS 用試料に調製し，各分析機器で PCQ を測定した．尚，本検証において，HRGC/HRMS 測定では，血液中に TDCT が存在することから，PCQ の定量には絶対検量線法を用いた．その検証結果について，両測定法における測定結果の比較を Fig. 6 に示す．Fig. 6 に示すように，HRGC/HRMS での PCQ 測定結果は，ECD/GC での測定結果とほぼ同等であり，高い相関を示した．Fig. 6 において低濃度領域は評価しにくいため，血液中 PCQ が 0.1ppb 以下（油症の診断基準において血液中 PCQ が 0.1ppb 以上の場合，「高い濃度」と定義されている）の個別の測定結果を Table 4 に示す．Table 4 に示すように，ECD/GC では PCQ が未検出であった血液試料が，HRGC/HRMS では PCQ が検出され，より低濃度の血液試料についても PCQ の検出が可能となった．さらに，PCQ を内標準法で定量すれば，測定精度も向上すると考えられる．

総　　括

二種類の異径のキャピラリーカラム（GC の注入口側に内径の小さいキャピラリーカラム（内径 0.1mm，長さ 1m），次に，内径の大きい分析用キャピラリーカラム（内径 0.53mm，長さ 15m））を用いることで機器分析時間の大幅な短縮と検出感度の向上が確認された．HRGC/HRMS と異径キャピラリーカラムの組み合わせにより，装置の検出下限値は 0.4pg，血液試料における PCQ の

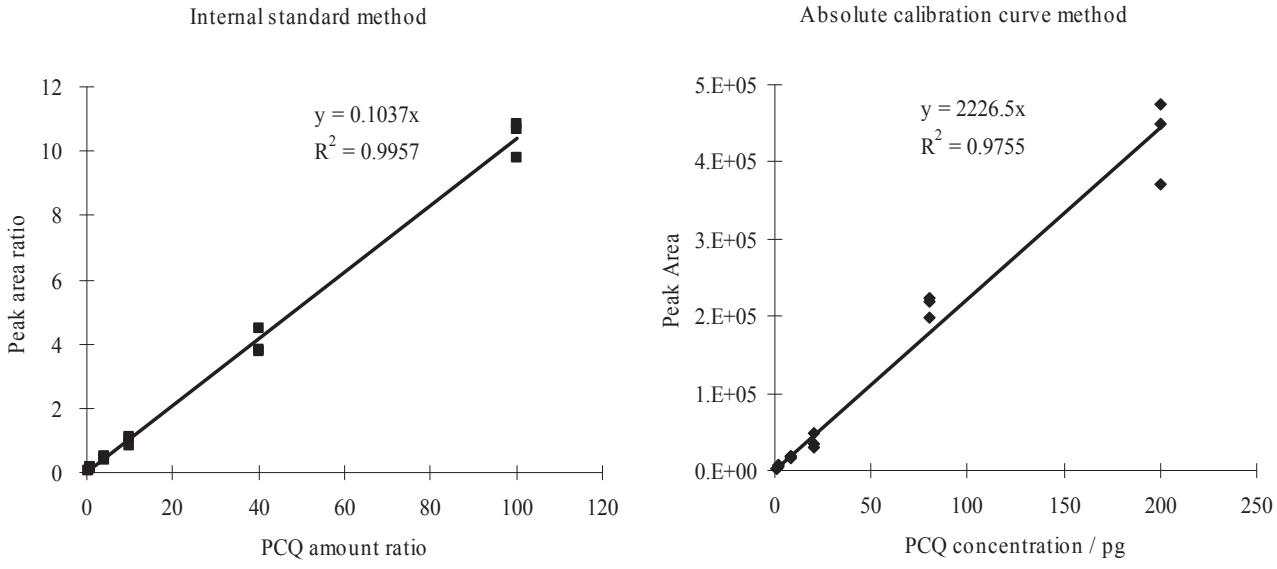

Fig. 5　The calibration curve of PCQ for the HRGC/HRMS measurement

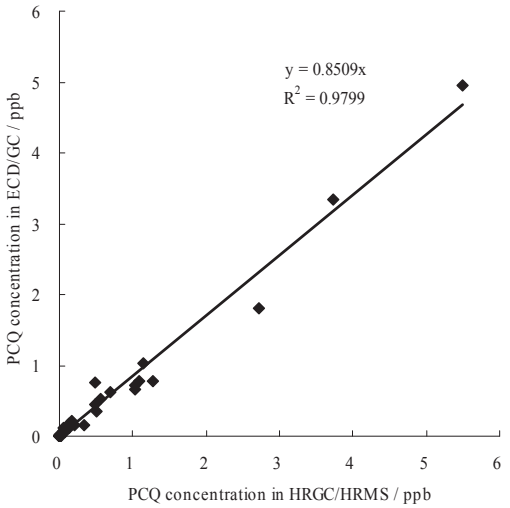

Fig. 6 The comparison of PCQ concentration in blood by ECD/GC and PCQ concentration in blood by HRGC/HRMS

Table 4 The comparison of PCQ in blood by ECD/GC and PCQ in blood by HRGC/HRMS in low concentration region.

PCQ (ppb) in ECD/GC	PCQ (ppb) in HRGC/HRMS
0.048	0.031
0.025	0.020
0.03	0.045
0.05	0.083
0.02	0.028
0.02	0.019
0.07	0.051
N.D.	0.004
N.D.	0.007
N.D.	0.01
N.D.	0.003
N.D.	0.004
N.D.	0.005
N.D.	0.004
N.D.	0.005
N.D.	0.002
N.D.	0.001
N.D.	0.004
N.D.	0.001
N.D.	0.004

定量下限値は，0.008ppb であった．健常者の血液中 PCQ 濃度は平均で 0.02ppb 以下と結論づけられており，目標定量下限値である 0.02ppb を達成することができた．従来法である ECD/GC 測定と本研究の HRGC/HRMS 測定では，油症認定患者及び健常者を含む血液中 PCQ 濃度は，両方法ともほぼ同等の結果であった．本研究では，HRGC/HRMS 測定において絶対検量線法を用いたが，内標準物質（^{13}C を導入した ODCQ もしくはその類縁化合物）を合成し，内標準法を採用すれば，PCQ の ECD/GC による測定より HRGC/HRMS による測定の方が測定精度も向上すると考えられる．

謝　　辞

本研究は平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金に負うものである．ここに記して謝意を表します．

参 考 文 献

1） 飯田隆雄，深町和美，高橋克巳，増田義人：油症原因油および油症患者血液中の PCB，PCQ および PCT，福岡医誌　76：126-131，1985.
2） 増田義人，倉恒匡徳：油症を起こしたライスオイル中の毒性物質，福岡医誌　70：229-237，1979.
3） 飯田隆雄，竹中重幸，中川礼子，深町和美，高橋克巳，旭　正一：正常者の血液中ポリ塩化クアテルフェニル濃度，福岡医誌　78，305-308，1987.
4） Kashimoto T, Miyata H and Kunita N : The presence of polychlorinated quaterphenyls in the tissues of Yusho victims. Fd. Cosmet. Toxicol. 19 : 335-340, 1981.
5） 前田浩一郎，樫本　隆：大阪府立公衆衛生研究所報告　食品衛生編，9，89，1978.
6） 飯田隆雄，深町和美，竹中重幸，中川礼子，高橋克巳：ポリ塩化クアテルフェニルのキャピラリーガスクロマトグラフィーによる定量，分析化学　37：230-235，1988.
7） 芦塚由紀，中川礼子，平川博仙，堀　就英，飯田隆雄：油症検診における血液中ポリ塩化クアテルフェニルの分析，福岡医誌　96：227-231，2005.
8） J D Zeeuw, J Peene, H G Jansen and X Lou : A simple way to speed up separations by GC-MS using short 0.53mm columns and vacuum outlet conditions. J. High Resol. Chromatogr. 23 : 677-680, 2000.

(Received for publication March 17, 2011)