

GC-ECDによる血中PCB分析法最適化の検討(2020-2021年度)

松永 尚子, 谷口 香織, 辻村 和也

Studies on Optimization of PCB Analysis Method in Human Blood by GC-ECD (2020-2021)

Naoko MATSUNAGA, Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: PCB、血液、油症、GC-ECD

Key words: PCB, human blood, Yusho, GC-ECD

はじめに

1968年に発生したカネミ油症発生当時から長崎県は「長崎油症研究班」を組織し、毎年、五島市及び長崎市で油症検診を実施し、油症の診断と治療法に関する研究等を行っている。

当センター(旧、長崎県衛生公害研究所)においても1973年から血液中のポリ塩化ビフェニル(PCB)の分析を開始し、各年度の分析結果をカネミ油症認定審査の基礎資料として認定審査会に提供してきた。血中PCB分析は少量の血液量で安定した結果が求められる。今後限られた採血量採取および再分析を想定し、本検討では使用血液量の少量化によるPCB分析結果に与える影響について検討を行った。また、前処理方法の効率化を図り、分析結果の正確性、精度についても検討を行った。これまでは、ヘキサン抽出による前処理後、シリカゲルミニカラムとフロリジルミニカラムによる2段階の精製(以下、従来法)を行っている。本検討は、シリカゲル-フロリジルー一体型ミニカラムにより精製し、従来法との回収率等について比較検証し妥当性評価を行った。これらの検討結果について報告する。

試験方法

1 試薬等および器具

(1) PCB標準液

・カネクロールKC-300、KC-400、KC-500、KC-600、ジーエルサイエンス(株)製(1:1:1:1)より調製したPCB標準原液400 ppmを使用した。

・ヘキサン5,000: 関東化学(株)製、残留農薬・PCB分析用

(2) 試薬

・ヒト全血A型(個別別)、コスモ・バイオ(株)製
・蒸留水(ヘキサン洗浄品): 関東化学(株)製、残留農薬試験用

・エタノール(99.5): 富士フィルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB試験用

・無水硫酸ナトリウム: 富士フィルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB試験用

・水酸化カリウム: 林純薬工業(株)製、試薬一級

(3) 器具

・シリカゲルミニカラム(SPE DSC-Si Silica tube 6 mL(500 mg))、シグマアルドリッチ(株)製

・フロリジルミニカラム(Sep-Pak Vac Florisil 6 mL(500 mg))、Waters社製

・シリカゲルフロリジルー一体型ミニカラム(以下、一体型ミニカラム)(SI/FL(500 mg/500 mg/6 mL)カスタムメイド品)、ジーエルサイエンス(株)製

(4) PCB標準溶液の調製

PCB標準液400 ppmをヘキサン5,000で希釈し調製した。

2 分析方法及び分析機器

(1) 前処理法

血液5.0 g使用する、血中PCBの分析法(従来法)については山ノ内¹⁾の報告を参考にし、血液2.0 gを使用する前処理法は従来法を参考に実施した(図1)。また、一体型ミニカラム法は、血液5.0 gを用い、図1の方法で実施し、従来法(血液5.0 g)と比較した。

(2) 添加回収試験

血液5.0 gにPCB標準溶液(0.1 ppm)を血液量の

表1 GC-ECD測定条件

GC	GC-2014((株)島津製作所)
検出器	電子捕獲検出器(ECD)
カラム	SiliconOV-1 Uniport HP60/80 mesh (2.1 m x 3.2 mmI.D.)
カラム温度	200
注入口温度	250
検出器温度	290
キャリアガス、流量	N ₂ 40 mL/min
注入量	2 μL

1/10量の0.5 mLを添加して前処理を行い最終試料溶液を0.5 mLとした(図1 従来法)。血液2.0 gの場合は蒸留水(ヘキサン洗浄品)3.0 gを加え合わせて5.0 gを試料とし、血液量5.0 gと同様の前処理を行い最終試料溶液を0.2 mLとした。

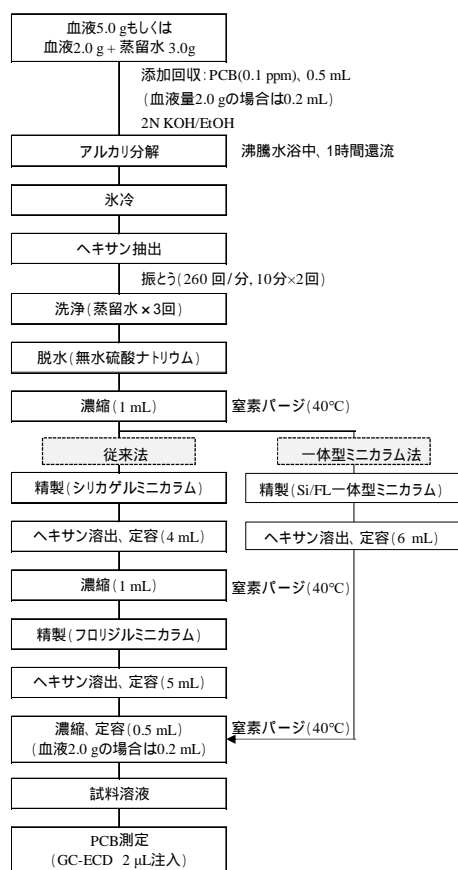


図1 血中PCB前処理法

(3) 分析機器、測定条件

表1の方法で行った。

(4) データ解析

PCBの定量はピーク面積値と同じ数値化法²⁾により行った。

表2 使用血液量と回収率の比較

血液量	回収率(%)	
	2020年度	2021年度
5.0 g	89.5% (n=37)	87.9% (n=24)
2.0 g	88.0% (n=17)	86.7% (n=5)

3 実施項目

(1) 使用血液量少量化によるPCB分析への影響
血液量5.0 gと2.0 gについて、PCB添加回収試験の回収率により比較した。

(2) 前処理法の違いによる血中PCB分析への影響

従来法と一体型ミニカラム法による精製法との比較をPCB添加回収試験(血液量5.0 g)により行い、各精製法のクロマトグラムについて標準品とのピーク形状を確認し、真度、精度について妥当性評価を実施した。妥当性評価の性能パラメータは、真度、精度(n=3、1濃度、3日間)とした。

結果と考察

1 血液量少量化によるPCB分析への影響

2020年度に実施した血液量5.0 gおよび2.0 gを用いた添加回収試験の結果は、それぞれ89.5%、88.0%であり、血液量2.0 gにおいても5.0 gと同等の回収率が得られた(表2)。クロマトグラムについても同様のピーク形状を示した。2021年度の回収率は血液量5.0 gは87.9%、2.0 gは86.7%であった。しかしながら、血液量2.0 g測定時に妨害ピークが検出されることがあり、今後血液量2.0 gの実用化に向けてさらなる検証が必要である。

2 従来法と一体型ミニカラム法の各ピークの添加回収率への影響比較

一体型ミニカラム法の各ピーク形状は従来法と同様のピーク形状を示した(図2)。各ピークの回収率についてもほぼ同等の回収率が得られた。各ピークの平均値(n=3)は、従来法は86.4%、一体型ミニカラム法は90.6%であり一体型ミニカラム法は従来法と比較し同等以上であった(表3)。

また、クロマトグラムによるパターン判定等に使用するピークNo.15、No.16、No.20、No.21(図2 1. PCB標準液のクロマトグラム参照)の一体型ミニカラム法の真度、精度は医薬品開発のガイドラインの目標値³⁾(真度:理論値の±15%以内、精度:目標値:±15%以下)を満たした(表4)。

表3 前処理の精製法の違いによる各ピークの添加回収率の影響比較

ピークNo.	従来法					一体型ミニカラム法				
	回収率(%) (n=3)					回収率(%) (n=3)				
	1回目	2回目	3回目	平均%	RSD%	1回目	2回目	3回目	平均%	RSD%
No.15	80.6	83.2	83.6	82.5	2.0	88.8	91.0	88.4	89.4	1.6
No.16	78.3	83.8	85.0	82.4	4.3	83.5	88.8	88.1	86.8	3.4
No.17	76.1	86.5	87.1	83.2	7.4	82.4	94.4	86.0	87.6	7.0
No.18	80.3	83.5	85.1	83.0	2.9	84.8	90.8	88.1	87.9	3.4
No.19	77.9	84.5	86.3	82.9	5.3	85.3	92.0	88.2	88.5	3.8
No.20	85.7	86.5	84.8	85.7	1.0	86.3	89.7	89.1	88.4	2.0
No.21	81.8	87.5	90.9	86.7	5.3	85.8	90.1	90.0	88.6	2.8
No.22	94.0	94.1	83.9	90.7	6.5	98.3	104.5	92.0	98.2	6.4
No.23	80.3	91.1	96.9	89.4	9.4	93.8	107.4	87.5	96.2	10.5
No.24	93.7	93.2	82.1	89.7	7.3	94.0	84.5	78.9	85.8	8.9
No.25	87.4	95.6	98.3	93.8	6.1	100.5	99.4	97.5	99.1	1.5
総ピーク平均値	83.3	88.1	87.6	86.4	3.1	89.4	93.9	88.5	90.6	3.1

表4 妥当性評価試験結果

	従来法			ミニカラム精製法			評価
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	
No.15	82.5	4.4	4.1	89.4	1.2	1.9	
No.16	82.4	5.2	6.1	86.8	1.8	3.7	
No.20	85.7	6.0	5.0	88.4	2.9	3.1	
No.21	86.7	4.8	6.6	88.6	2.8	3.6	
総ピークの平均値	86.4	4.1	4.6	90.6	1.5	3.4	

まとめ

血液少量化によるPCB濃度測定については、妨害ピークの解消と実検体による検証が必要である。また、前処理法の妥当性評価試験の結果、一体型ミニカラム法は従来法と同等の性能を示し、代替の精製法として実用化できる可能性が示唆された。今後、実検体による検討を蓄積してさらなる検証を実施していきたい。

参考文献

- 1) 山之内公子: 油症研究II-治療と研究の最前線-長崎県における油症患者の血液中PCB/PCQ濃度の測定, pp.40-45, 九州大学出版会, 福岡(2010).
- 2) 鷓川昌弘, 他: PCBの数値化方法に関する研究, 食衛誌, 14, 415 (1973).
- 3) 薬食審査発0711第1号「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について(2013年7月11日).

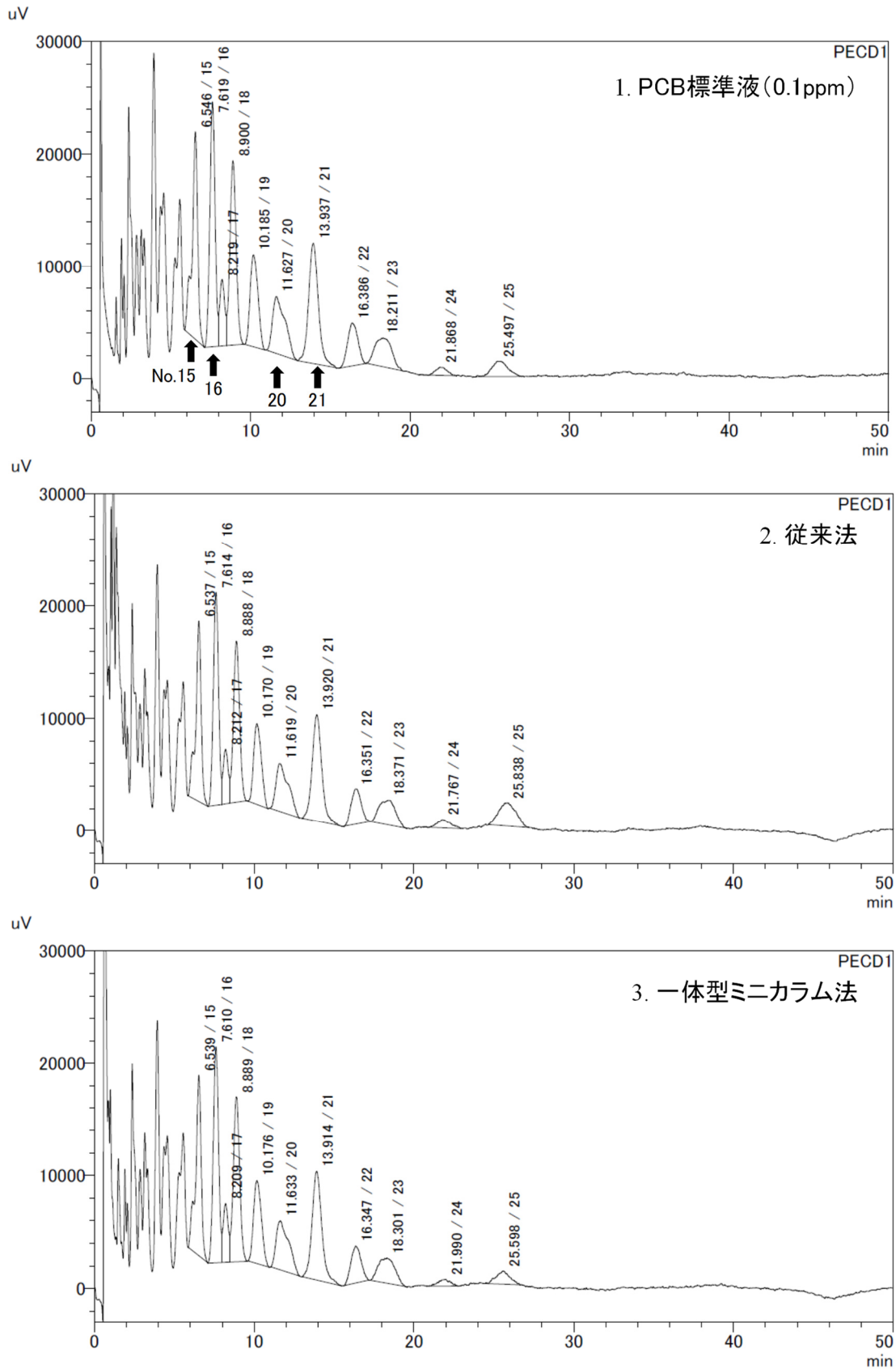


図2 精製法の違いによるクロマトグラムの比較
 1. PCB標準液(0.1 ppm)、2. 従来法、3. 一体型ミニカラム法