

絶縁油中 PCB 簡易バイオアッセイ用前処理法の開発
○澤田石一之, 立石典生, 本田克久 (愛媛大学農学部)

【はじめに】

高度な分析機器の利用により高水準な技術レベルにある環境分析分野に生物検定法を普及させるには、迅速性・簡便性と共に、得られる分析値の信頼性を保障することが鍵である。この分析値の信頼性は、測定法自体の原理のみならず、試料調製（前処理）における再現性や精製度が密接に関係していることから、我々は、生物検定法に適した前処理法の研究開発を進めている。既に、ダイオキシン類簡易分析法（生物検定法）用前処理法^{1, 2)}を開発し、その原理に基づいた自動前処理装置（SPD-600）も市販され、再現性と精製度が極めて高い試料調製が可能となり、ダイオキシン類の各種測定系において分析精度と再現性ととも分析値の信頼性の向上をもたらしている。今回、昨年の本討論会でアナウンスされ立ち上がった絶縁油中 PCB 簡易バイオアッセイワーキンググループ（PCB-WG）が測定対象としている絶縁油中 PCB に対して、簡易バイオアッセイ用の前処理法を検討し、絶縁油中に含まれる影響成分の除去法を開発したので報告する。

【方法】

試料： PCB 不含絶縁油として市販の JIS 規格品 6 種類（松村石油：1 種 1 号, 1 種 2 号, 1 種 4 号, 7 種 2 号, 7 種 4 号, JOMO：1 種 4 号）と重電機器から回収した 12 種類を用いた。

前処理法：ダイオキシン分析用自動前処理装置 SPD-600（京都電子工業社製）の多層シリカゲルカラムの処理工程部分を利用した。絶縁油 0.2g（1 検体当り）をヘキサンで希釈した後、多層カラムに添加し SPD-600 を稼働させ、多層カラムから溶出した PCB 含有ヘキサン溶液を濃縮後、DMSO 400 μ l（200 μ l で 2 回）に転溶した。

測定法：京都電子工業の絶縁油中 PCB 測定システム（ダイオキシンバイオセンサ DXS-600 の使用する抗体を KC300~600 に対しほぼ同等に親和性を示すモノクローナル抗体（抗 KC 抗体）に、測定セル部に固定化する抗原誘導体を PCB 測定に適した化合物に変更したもの）を使用した。

評価方法：前処理した試料のブランク値の分析と前処理した試料に一定量の PCB（2ng）を添加して回収量を求める添加回収試験を行い、前処理法の妥当性と測定系への妨害影響の有無を評価した。

【結果と考察】

1. ブランク値の分析（図 1）

ダイオキシン試料調製と同様に PCB 試料調製においても、自動前処理装置 SPD-600 のような高い再現性を有しかつ高い精製能力を有する装置が望まれる。従って、最初に直接 SPD-600

Development of a sample preparation method for PCBs in transformer oil useful for biosensing

○Kazuyuki Sawadaishi, Norio Tateishi, Katsuhisa Honda

Faculty of Agriculture, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan, TEL

089-946-9970, Fax 089-946-9980, E-mail: kz-sawa@syd.odn.ne.jp

により絶縁油を処理し精製度を調べたところ、標準の絶縁油として PCB-WG で使用されている松村石油 1 種 4 号に関しては、現状のダイオキシン精製用の多層カラム (図 1、多層カラム (DXN) と表記) で十分精製が可能であることが判明した。しかしながら他社の JIS 1 種 4 号の絶縁油やアルキルベンゼンが添加されている JIS 7 種の絶縁油は精製が不十分であり、重電機器で使用された素性の不明な使用済絶縁油も精製は不可能であった。カラム内容物と処理条件を検討した結果、カラムは下端から順にシリカ、硝酸銀シリカ、硫酸シリカと積層させたものを用い、絶縁油をカラムに添加後の 60°C での加熱処理時間を 10 分から 60 分間にすることで、全ての試料において図 1 の多層カラム (PCB) で示される様に絶縁油不含試料に対する測定値の 90~100% (B/B0 値が 0.9~1.0) を示し、影響成分の除去が可能となった。

2. 添加回収試験 (図 2)

絶縁油を直接多層カラムに添加して精製した場合、主成分のパラフィンやナフテンなどの飽和炭化水素類は PCB と共にカラムからの溶出液中に存在する。図 1 の結果から、これらの成分はブランク値に影響を及ぼしていないことは明らかであったが、図 2 に示す様に添加回収試験では試料は一様に 82% 程度の回収率を示し、これらの成分が反応系に影響を及ぼしていることが判明した。DMSO 試料溶液のヘキサン洗浄を検討したところ、回収率はほぼ 100% となり、これら影響成分の除去も可能となった。

【まとめ】

バイオアッセイ用の絶縁油中 PCB の前処理は、ダイオキシン類簡易分析法 (生物検定法) 用前処理法^{1, 2)}を改良することで、多層カラムでの絶縁油直接精製が可能となった。多層カラムから溶出する影響成分は、DMSO 転溶後のヘキサン洗浄により十分除去は可能であるが、迅速性・人為的誤差の排除のためには、今後ダイオキシン同様、多層カラム後の固層濃縮・精製・転溶法の導入が必要であり、それにより絶縁油中 PCB 簡易分析においても高精製度・高再現性の自動前処理装置の完成が期待できる。

【参考文献】

- 1) 藤田寛之、濱田典明、本田克久：環境化学 15, 117-128, 2005
- 2) 藤田寛之、濱田典明、澤田石一之、本田克久：環境化学 15, 585-596, 2005

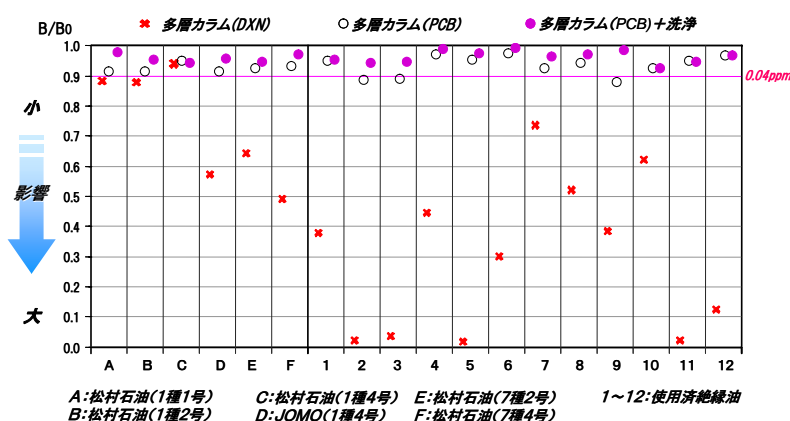


図1. 多層カラム処理条件と影響成分の除去効果(ブランク値の分析)

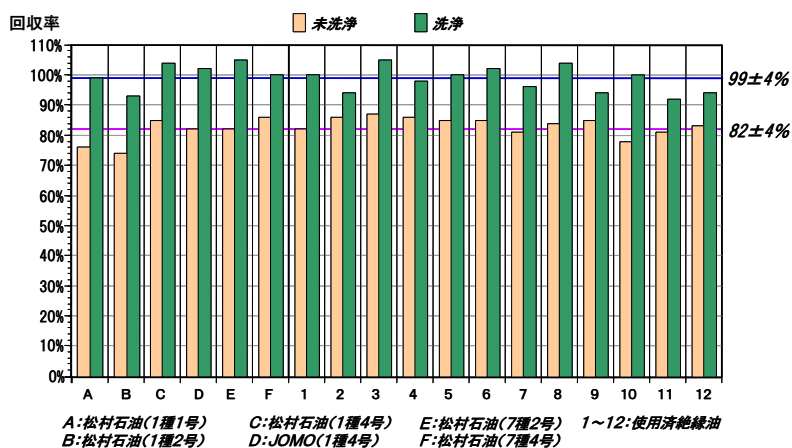


図2. 多層カラム処理後のヘキサン洗浄効果(添加回収試験)

バイオアッセイによる絶縁油中 PCB 測定のための迅速前処理法

○ 澤田石一之, 高橋知史, 本田克久 (愛媛大学農学部)

【はじめに】

バイオアッセイの一つである免疫測定方法は、測定対象成分の濃度を定量する為に、測定対象成分に対して調製された抗体を用いて、抗原抗体反応の特異性に基づいて測定を行う方法であり、定量法として規格化されている(JIS K0461:2006 競合免疫測定方法通則)。測定方法における定量値の精度プロファイル上の CV(%)が 10%以内を定量範囲として定めているように、測定方法は精度が高い方法であるにもかかわらず、環境分析分野においては必ずしも精度が高い定量法として認知されていない。これは、バイオアッセイにおいては、簡単・簡便な方法でというイメージが先行し、提供されている試料調製(前処理)方法が測定方法の高い精度を維持できるほど十分な再現性と精製度を有していない事に起因している。我々は、測定法の性能を 100% 発揮せしめるバイオアッセイ用の前処理法の研究開発を進めている中で、開発が急務とされている絶縁油中 PCB の簡易測定法に対して定量法というレベルで分析値の信頼性を保証する前処理法を開発した^{1,2)}。バイオアッセイ用の前処理法としての本法の性能評価の結果を報告する。

【方法】

試料: ブランク試験用として重電機器から回収した 92 種類の PCB 不含絶縁油(製造年:1970 年代(3 検体)、1980 年代(30 検体)、1990 年代(33 検体)、2000 年代(7 検体)、不明(9 検体))を用いた。告示法(平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第二)との比較には PCB 含量が 3.0mg/kg 以下の 20 種類の絶縁油を用いた。

前処理法: 迅速前処理法(固相転溶法)と溶媒転溶法のスキームを図 1 に示した。精製カラムは下端から硝酸銀シリカゲル、硫酸シリカゲルを積層させたものを用い、濃縮カラムには独自の高性能アルミナを充填したものを用いた。溶媒希釈した絶縁油 0.1g を 80°C の精製カラムで 30 分間保持した後、冷却した。本法(固相転溶法)の場合には、濃縮カラムを接続した後、ヘキサン 20ml で展開させた後、PCB が吸着した濃縮カラムを取り外して乾燥させ、200 μ l の DMSO (ジメチルスルホキシド)で逆方向から PCB を溶出させ、測定試料とした。一方、溶媒転溶法の場合には、ヘキサン 20ml で展開して精製カラムから溶出してくる PCB 含有ヘキサン溶液を濃縮後、DMSO 400 μ l (200 μ l で 2 回)に転溶し、ヘキサン 200 μ l で洗浄し、測定試料とした。

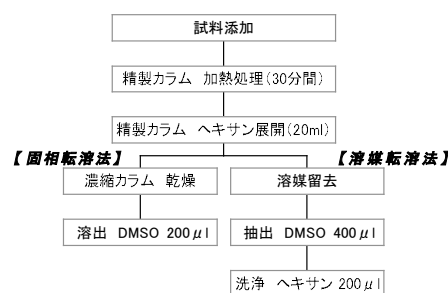


図 1. 前処理の流れ

測定法: KinExA(結合平衡除外法)は京都電子工業社製のフロースルー型バイオセンサ DXS-600 と PCB 測定キットを用いて行った。

Rapid Pretreatment for Measurement of PCB in Insulating Oil by Biosensing

○Kazuyuki Sawadaishi, Tomofumi Takahashi, Katsuhisa Honda

Faculty of Agriculture, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan

TEL 089-946-9970, Fax 089-946-9980, E-mail: cbst_sawadaishi@mac.com

【結果と考察】

1. ブランク試験

PCB 不含絶縁油 92 種類を本迅速前処理法により処理し、その調製液を KinExA (結合平衡除外法) により分析した結果、92 検体全てにおいてブランク値は検出下限値(0.04mg/kg)未満となり、測定系に影響を及ぼす成分を完全に除去できている事が確認された。本法は極めて高い精製能力を有している事は明らかであり、汎用的な前処理法であるとともに PCB の定量値の信頼度を高める前処理方法として期待することができる。

2. 告示法との比較

20 種類の絶縁油(PCB 濃度(告示法):3.0mg/kg 以下)について、本法(固相転溶法)と溶媒転溶法のそれぞれと告示法との PCB 測定値の相関図を図 2 に示した。両法とも、高い相関係数を示し、強い相関が得られた。また、図 3 に示す様に、本法(固相転溶法)と溶媒転溶法は同等な前処理法である事が確認された。

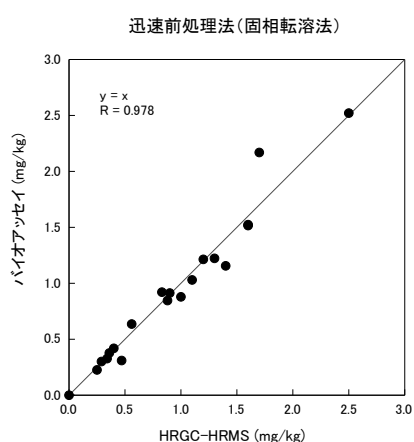


図 2. 告示法との相関

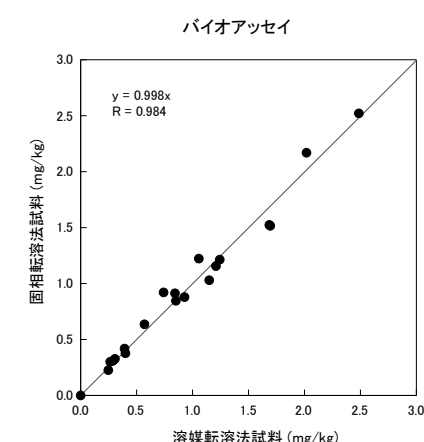
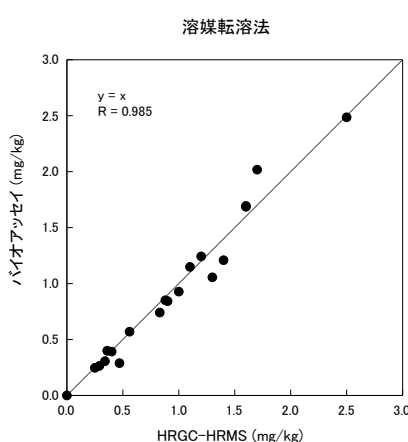


図 3. 固相転溶法と溶媒転溶法との相関

3. PCB 定量値の再現性

基準値 0.50mg/kg 付近の PCB を含有する 6 種類の絶縁油を用い、繰り返し数 3 にて本法(固相転溶法)と溶媒転溶法の 2 種類の前処理法の再現性を KinExA で評価した結果を図 4 に示した。変動係数はほぼ 10% 以下であり、非常に高い精度を有している事は明らかである。現在は固相からの溶出条件を改善した事により、両方法の差はほとんど無い。

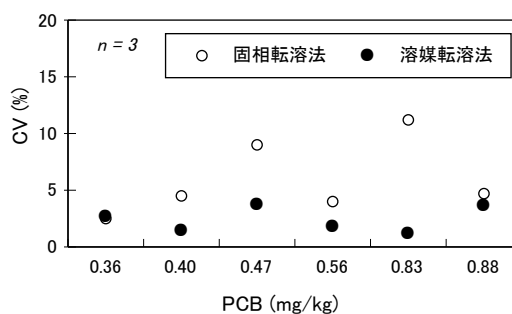


図 4. 測定の再現性(変動係数)

【結論】

本迅速前処理法(固相転溶法)は、迅速性、簡便性に優れているのみならず、高精製度と高再現性の試料調製法であり、バイオアッセイ(免疫測定法)本来の定量法としての分析値の信頼性を保証する前処理方法となり得る。

【参考文献】

- 1) 澤田石一之 他:第 16 回環境化学討論会要旨集, 60-61, 2007
- 2) 高橋知史 他:第 16 回環境化学討論会要旨集, 62-63, 2007

絶縁油中 PCB の迅速分析法

～機器分析およびバイオアッセイへの適用性評価～

○高橋知史、澤田石一之、本田克久
(愛媛大学農学部)

【はじめに】

絶縁油に混入した微量 PCB を、短時間にかつ低廉な費用で測定できる方法の確立が望まれている。平成 14 年 7 月に、日本に現存するトランス、コンデンサ等の電気機器約 600 万台のうち約 120 万台の絶縁油に微量 PCB が混入していることが判明した。微量 PCB 混入電気機器は、PCB が使用された電気機器とは異なり銘板等で PCB 含有を判別できないため、600 万台全ての絶縁油中 PCB 濃度を測定する必要がある。PCB 汚染物の期限内(平成 28 年 7 月まで)処理の実現には、短時間の測定方法が必要である。一方、絶縁油中 PCB 分析が煩雑で高コストといわれる由縁は、僅かでも前処理が不十分だと絶縁油成分が容易に測定系に持ち込まれ、機器分析及びバイオアッセイのいずれにおいても PCB 定量操作に甚大な影響を及ぼすためである。更に機器分析においては GC 注入口周辺の汚れ、GC カラム及び検出器の早期劣化等を誘発することが予想される。以上の背景より、我々は迅速・安価・簡便・精確な迅速前処理法を開発した¹⁻³⁾。本法の機器分析及びバイオアッセイへの適用性を評価する。

【迅速前処理用カラムと操作フロー】

迅速前処理用カラムと操作フローを Fig.1,2 に示す。精製カラムは上から硫酸シリカゲル、硝酸銅シリカゲル、硝酸銀シリカゲルを積層している。濃縮カラムは独自開発した高性能アルミナを充填している。なお、バイオアッセイ向けの精製カラムは、硝酸銅シリカゲルを省略することも可能である。操作は、絶縁油約 0.1g を 80°C の精製カラムで 30 分保持し、冷却後ヘキササン 20ml を流下する。次に PCB が吸着した濃縮カラムを取り外して乾燥する。その後、機器分析向けの測定溶液を調整する場合は 200 μ l のトルエンで PCB を溶出する。バイオアッセイ向けの測定溶液を調整する場合は 200 μ l の DMSO (ジメチルスルホキシド) で PCB を溶出する。PCB 溶出はいずれも自然滴下を利用する。

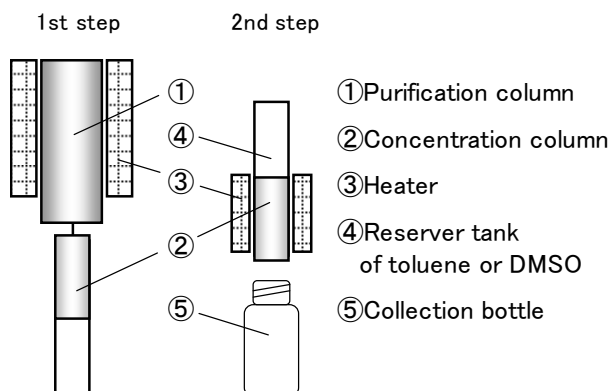


Fig.1 Column for rapid pretreatment

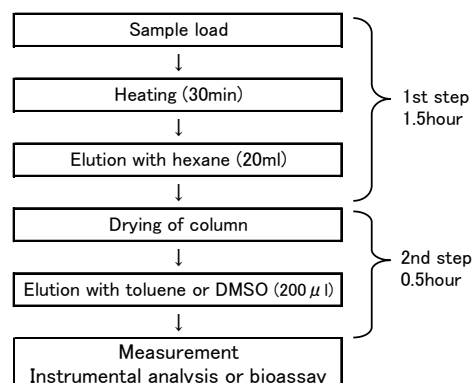


Fig.2 Procedure of rapid pretreatment

Rapid Analysis of PCB in Insulating Oil ~Application to Instrumental Analysis and Bioassay~

○Tomofumi Takahashi, Kazuyuki Sawadaishi, Katsuhisa Honda

Environmental Science for Industry, Ehime University, 3-5-7, Tarumi, Matsuyama City, Ehime, 790-8566, Japan,
TEL: +81-89-946-9970, FAX: +81-89-946-9980, E-mail: tomo-tak@agr.ehime-u.ac.jp

【迅速前処理法の特徴】

本迅速前処理法の特徴は、エバポレーターや窒素濃縮等の濃縮操作が全く不要であること、及び、前処理操作は機器分析向けとバイオアッセイ向けで共通かつ簡便なため安価なシステムになり得ること、前処理工程が 2 時間以内で完了すること、複数検体の同時処理が可能であること等である。

【迅速分析法 vs 告示法 PCB 定量値の相関】

20 種類の絶縁油 [PCB 濃度(告示法) : 3.0mg/kg 以下]について、迅速分析法と平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第二による PCB 定量値の相関図を Fig.3 に示す。いずれも相関係数 R は+0.97 以上と極めて強い相関を得たことから、本法は機器分析及びバイオアッセイ等に広範に適用できると判断する。なお、迅速分析法には機器分析 3 法 (GC-ECD,GC-QMS,GC-MS/MS) 及びバイオアッセイ 2 法 (KinExA,ELISA) を適用した。KinExA (結合平衡除外法) は京都電子工業社製バイオセンサー (DXS-600) と PCB 測定キットを、ELISA はアースソリューション社の「絶縁油中 PCB 分析キット」を用いて、各マニュアルに従って測定を行った。

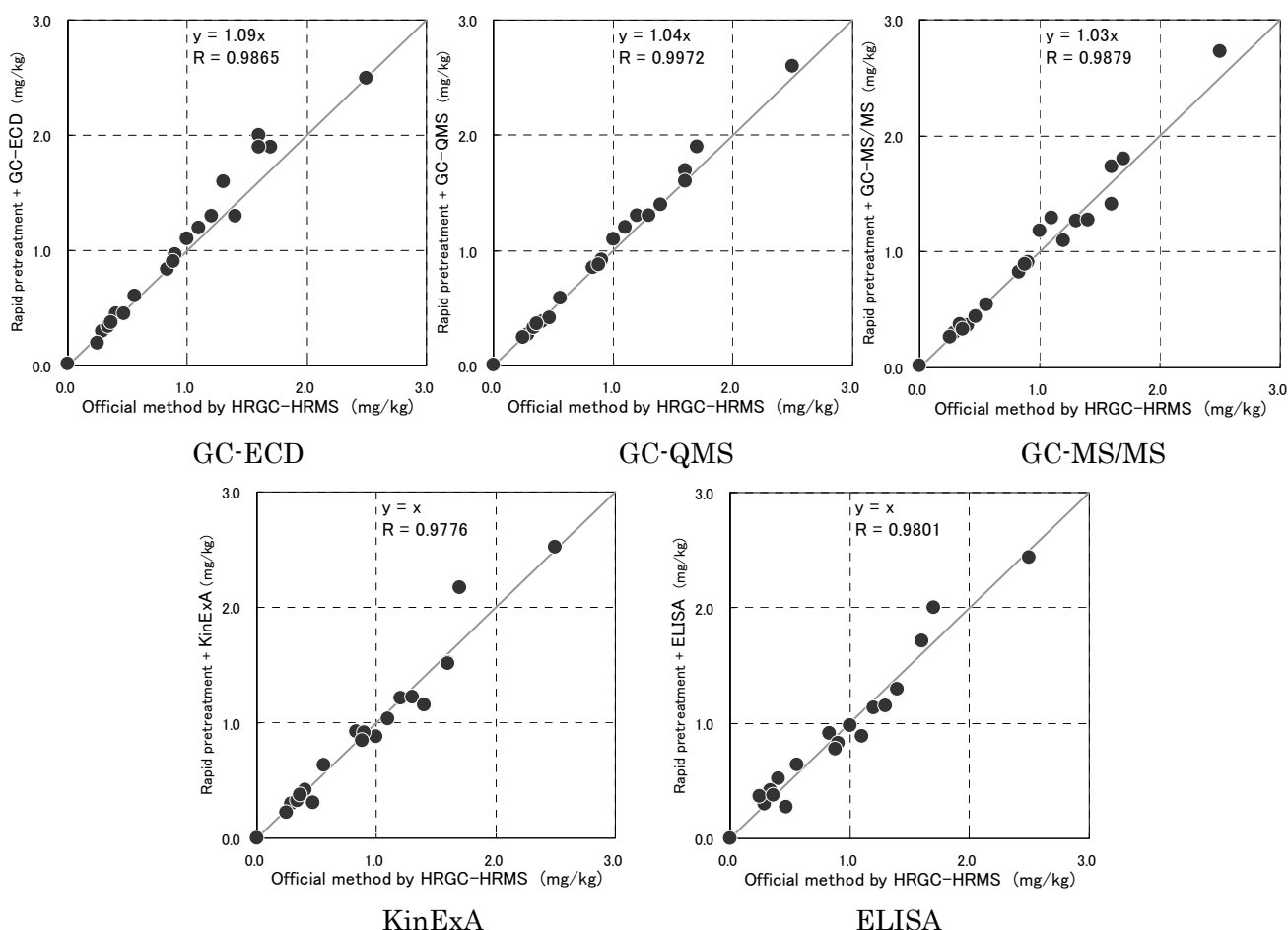


Fig.3 Correlation diagram (Rapid analysis vs Official method)

【結論】

本法は、機器分析及びバイオアッセイといった広範な測定方法に適用できる PCB 混入絶縁油の迅速前処理法として非常に有用である。PCB 問題早期解決に向け本法の貢献を期待すると共に、多くの分析機関が一丸となって絶縁油中 PCB 測定を進めて頂く事を切に願います。

- 【参考】 1) Organohalogen Compounds,69:489-492 (2007) 2) Organohalogen Compounds,69:1257-1260 (2007)
3) 高橋:第 16 回環境化学討論会要旨集,p62(2007)