

生物試料中のポリ塩化ビフェニル及びダイオキシン類の前処理方法の検討

福田直大 奥本啓祐 水口定臣* 進藤三幸

Examination of Pretreatment Method for the Analysis of PCBs and Dioxins in Biological Samples

Naohiro FUKUDA, Keisuke OKUMOTO, Sadaomi MINAKUCHI, Kazuyuki SHINDO

Pretreatment method for the analysis of PCBs (all congener) and Dioxins (PCDDs, PCDFs, coplanar-PCBs) in biological samples was examined. As the pretreatment method for the analysis of PCBs, sulfuric acid treatment and silicagel column chromatography were examined first. Consequently, in these methods, removal of the interfering substance was not enough. Therefore, in order to remove the interfering substance, pretreatment method of 2%KOH-silicagel column chromatography, partition with acetonitrile/n-hexane, partition with DMSO/n-hexane and alumina column chromatography were examined after sulfuric acid treatment and silicagel column chromatography. Concerning the removal of interfering substance, three methods except the method of 2%KOH-silicagel column chromatography were effective. Concerning the recovery rate, the methods of partition with DMSO/n-hexane and alumina column chromatography were good and the other methods were not good. However, experiment operation was complicated in the method of partition with DMSO/n-hexane. As the result, the pretreatment method by alumina column chromatography was most effective and good recovery. Moreover the pretreatment method for the analysis of Dioxins by alumina column chromatography was also effective.

Keywords : PCDDs, PCDFs, Coplanar-PCBs, PCBs, biological Samples, acetonitrile/n-hexane, DMSO

はじめに

生物試料中（脂肪）のダイオキシン類分析法については、既報¹⁾において公定法^{2) 3)}であるアルカリ分解-n-ヘキサン抽出法とジクロロメタンによるソックスレー抽出法の比較検討を行い、ソックスレー抽出法で公定法と同等の精度を得ることができた。

一方、生物試料中のポリ塩化ビフェニル（以下PCBs）の分析法については、外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル⁴⁾ではアルカリ分解-n-ヘキサン抽出後に硫酸処理、シリカゲルカラムによる前処理法が採用されているが、この方法では抽出時に7塩素以上のPCBsにおいて分解が起こるとの報告⁵⁾がある。そこで、今回生体組織別に、前報で採用したジクロロメタンを用いたソックスレー抽出によるPCBs全異性体の分析を試みた。前処理方法については、公定法で採用されている硫酸処理とシリカゲルカラムによる操作の後に、種々の方法を検討したので報告する。また、ダイオキシン類についても生体組織別に既報¹⁾の前処理方法で分析を行ったと

ころ、生体組織によっては妨害物質の除去が不十分であったため、新たな前処理方法を検討したので報告する。

試料と実験方法

1. 試料

愛媛県内で採取された野生のタヌキの生体組織（肝臓、脂肪、腎臓、筋肉、脳）を用いた。

2. 標準試料

クリーンアップスパイクは、PCDDs, PCDFsについてはDF-LCS-A（Wellington社製）、コプラナーPCBについてはNK-LCSP-A（Wellington社製）、PCBsについてはEC-4189（CIL社製）を用いた。

シリンジスパイクは、PCDDs, PCDFsについてはDF-IS-I（Wellington社製）、コプラナーPCB, PCBsについてはPCB-IS-B（Wellington社製）を用いた。

3. 実験方法

実験方法は図1のとおりであり、図中のグレーの枠で示した前処理方法について今回検討を行った。その詳細を以下に示す。なお、クリーンアップの条件、試薬については既報^{6) 7)}に準じて行った。

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

*現 県民環境部環境局環境政策課

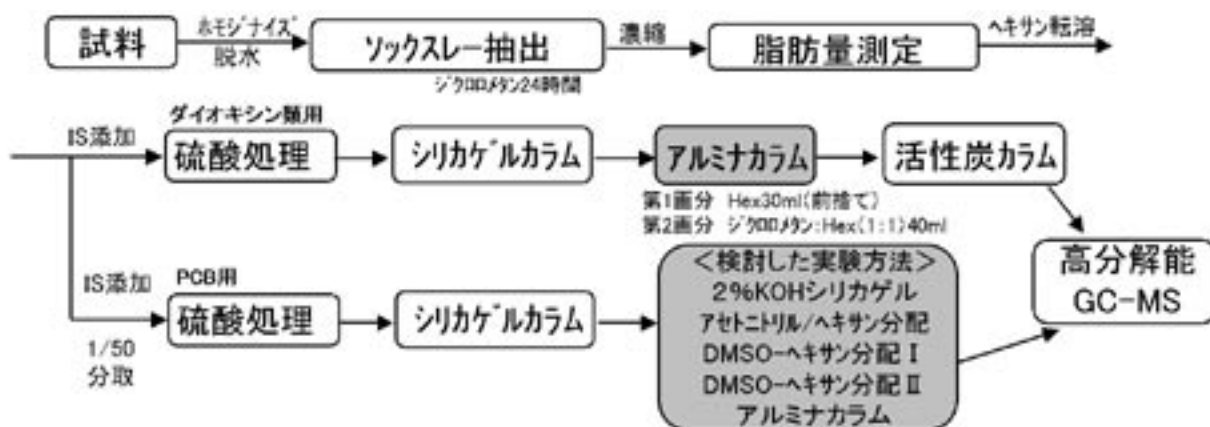


図1 分析方法のフローチャート

3. 1 PCBs前処理方法

試料を5~10倍量程度の硫酸ナトリウムを用いて乳鉢でホモジナイズした後円筒濾紙に移し、ジクロロメタンにより24時間ソックスレー抽出を行った。その後、抽出液の1/50をPCBs用に分取し、クリーンアップスパイクを添加後、着色がなくなるまで硫酸処理を行った。この操作の後、以下に示す種々の前処理方法の検討を行った。

1) シリカゲルカラムのみ

硫酸処理後のヘキサン溶液を脱水、濃縮し、130℃、3時間活性化したシリカゲルカラム（ヘキサン120ml）によりクリーンアップし、最終的に50 μ lまで濃縮してHRGC-HRMSの測定試料とした。

2) 2% KOHシリカゲル

1) のシリカゲルカラムによる前処理後の濃縮液を、2% KOHシリカゲル（和光純薬工業社製）3gを充填した口径10mm、長さ300mmのカラムに添加し、ヘキサン100mlを流した。得られた溶出液は最終的に50 μ lまで濃縮してHRGC-HRMSの測定試料とした。

3) アセトニトリル/ヘキサン分配法

食品試料についてAshizukaらが行った方法⁸⁾を参考に行った。

1) のシリカゲルカラムによる前処理後のヘキサン濃縮液10mlを分液ロートに取り、ヘキサン飽和アセトニトリル20mlを加えて振とう後、静置して下層のアセトニトリル層を分取した。残ったヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル20mlを加えて同様の操作を計3回行った。また、分取したアセトニトリル層（60ml）に5%塩化ナトリウム溶液200mlを加え、ヘキサン50mlを加え5分間振とうした。この操作を計3回行い、ヘキサン層をヘキサン洗浄水200mlで水洗し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、得られた溶出液は最終的に50 μ lまで濃縮してHRGC-HRMSの測定試料とした。

4) DMSO-ヘキサン分配法Ⅰ

小泉らが行った方法⁹⁾を参考に行った。

1) のシリカゲルカラムによる前処理後のヘキサン濃縮液20mlを分液ロートに取り、ヘキサン飽和DMSO60mlを加えて振とうし、DMSO層にPCBsを分配

抽出した。静置後、下層のDMSO層を分取し、再度残ったヘキサン層にヘキサン飽和DMSO60mlを加えて同様の操作を計2回行った。分取したDMSO層（120ml）に3M塩酸150mlを加え振とうし、DMSO層を分解させ、ヘキサン100mlを加えヘキサン層にPCBsを逆抽出した。この操作を計2回行い、得られたヘキサン層をヘキサン洗浄水50mlで3回水洗し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、得られた溶出液は最終的に50 μ lまで濃縮してHRGC-HRMSの測定試料とした。

5) DMSO-ヘキサン分配法Ⅱ

高菅らが行った方法¹⁰⁾を参考に行った。

1) のシリカゲルカラムによる前処理後のヘキサン濃縮液10mlを分液ロートに取り、ヘキサン飽和DMSO25mlを加えて振とう後、静置して下層のDMSO層を分取した。残ったヘキサン層にヘキサン飽和DMSO25mlを加えて同様の操作を計4回行った。分取したDMSO層（100ml）にヘキサン洗浄水100mlを加え、ヘキサン70mlを加えて振とうした。この操作を計4回行い、得られたヘキサン層をヘキサン洗浄水200mlで水洗し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、得られた溶出液は最終的に50 μ lまで濃縮してHRGC-HRMSの測定試料とした。

6) アルミナカラム

1) のシリカゲルカラムによる前処理後の濃縮液を、130℃で18時間加熱して活性化した活性アルミナ（和光純薬工業社製、300mesh）10gを充填した口径10mm、長さ300mmのカラムに添加し、第一画分としてヘキサン20mlを流し、第二画分としてジクロロメタン（50vol%）含むヘキサン溶液40mlを流した。この第二画分で得られた溶出液を最終的に50 μ lまで濃縮してHRGC-HRMSの測定試料とした。なお、分画条件は、既報⁷⁾で行った分画試験のサンプルを用いてPCBs各異性体について確認した。

3. 2 ダイオキシン類前処理方法

試料を5~10倍量程度の硫酸ナトリウムを用いて乳鉢でホモジナイズした後円筒濾紙に移し、ジクロロメタンにより24時間ソックスレー抽出を行った。その後、クリーンアップスパイクを添加し、硫酸処理、シリカゲルカ

ラム（ヘキサン100ml），アルミナカラム（第一画分ヘキサン30ml，第二画分ジクロロメタン（50vol%）含むヘキサン溶液40ml），活性炭カラム（第一画分ヘキサン20ml，第二画分ジクロロメタン（25vol%）含むヘキサン溶液25ml，第三画分トルエン200ml）によりクリーンアップし，活性炭カラムの第二画分で得られた溶出液はモノオルトコプラナーPCB用，第三画分で得られた溶出液はノンオルトコプラナーPCB及びPCDDs/PCDFs用としてそれぞれ最終的に50 μ lまで濃縮してHRGC-HRMSの測定試料とした。

4. 装置及び測定条件

使用した装置はMicromass社 Autospec NTS（SIM測定）を用いた。注入方法はスプリットレス，イオン化エネルギーは35eV，イオン化電流：0.5mA，イオン源温度：250 $^{\circ}$ Cで行った。それぞれの測定条件は以下に示した。

1) PCBs測定条件

カラム：HT-8PCB（SGE製）
長さ60m，内径250 μ m，

注入温度：280 $^{\circ}$ C

昇温条件：120 $^{\circ}$ C \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 180 $^{\circ}$ C \rightarrow 2 $^{\circ}$ C/min
 \rightarrow 260 $^{\circ}$ C \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C（4min）

流速：1.0ml/min

2) 4~6塩素置換PCDDs/DFs測定条件

カラム：SP-2331（スperlコ製）
長さ60m，内径250 μ m，膜厚0.20 μ m

注入温度：250 $^{\circ}$ C

昇温条件：140 $^{\circ}$ C（2min） \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 200 $^{\circ}$ C \rightarrow 2 $^{\circ}$ C/min
 \rightarrow 250 $^{\circ}$ C（36min）

流速：1.0ml/min

3) 7~8塩素置換PCDDs/DFs, Non-ortho Co-PCBs

カラム：DB-17（J&W製）
長さ60m，内径250 μ m，膜厚0.25 μ m

注入温度：260 $^{\circ}$ C

昇温条件：140 $^{\circ}$ C（1min） \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 200 $^{\circ}$ C（1min）
 \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 270 $^{\circ}$ C（51min）

流速：1.4ml/min

4) Mono-ortho Co-PCBs測定条件

カラム：DB-5MS（J&W製）
長さ60m，内径250 μ m，膜厚0.25 μ m

注入温度：250 $^{\circ}$ C

昇温条件：140 $^{\circ}$ C（1min） \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 220 $^{\circ}$ C（1min）
 \rightarrow 2 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 270 $^{\circ}$ C（5min）

流速：1.4ml/min

結果及び考察

1. PCBs前処理方法の検討

生物試料中のPCBs分析法として外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル⁴⁾で採用されているアルカリ分解-n-ヘキサン抽出は，抽出時に7塩素以上のPCBsにおいて分解が起こるとの報告⁵⁾がある。このため，今

回の研究では，生物試料の抽出にジクロロメタンによるソックスレー抽出を採用した。この抽出法は既報¹⁾において，PCDD，PCDF，コプラナーPCBsにおいて分析精度を確認済みであり，PCBsにおいても同等の抽出が可能と判断した。また，前処理方法については，公定法で採用されている硫酸処理，シリカゲルカラムによる方法を採用した。

図2に硫酸処理，シリカゲルカラムによる前処理を行った後の生体組織別のGC-MS（SIM）のTICクロマトグラムを示した。この図から，脂肪についてはTICクロマトグラムの変動が小さく，安定していることから，この前処理方法で，妨害物質の除去が十分可能であったが，それ以外の生体組織はTICクロマトグラムの変動が大きく，妨害物質を十分除去できていなかった。特に脳と腎臓については，TICクロマトグラムの変動が著しく大きく，多量の妨害物質が存在することが考えられた。そこで，特に妨害物質の残存が多いと思われる脳について，種々の前処理法を検討した。

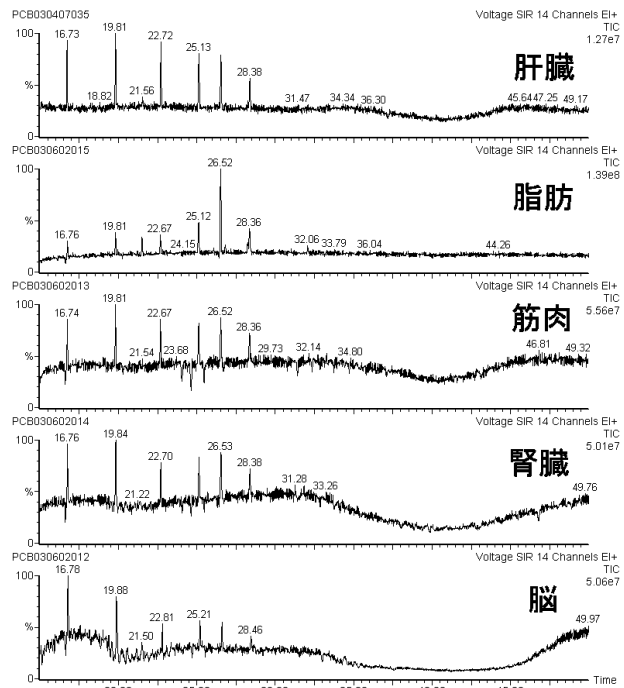


図2 硫酸処理，シリカゲルカラムによる前処理を行った後の生体組織別TICクロマトグラム

脳における，種々の前処理法によるTICクロマトグラムの結果を図3に示し，表1，図4にそれぞれの前処理方法におけるPCBs塩素数別の回収率を示した。この図から，シリカゲルカラムのみの場合と，シリカゲルカラムによる前処理後に，2% KOHシリカゲルカラムで処理した場合のTICクロマトグラムはほぼ同じであり，2% KOHシリカゲルカラムによる前処理では妨害物質の除去は不可能であると考えられた。また，アセトニトリル-ヘキサン分配については，妨害物質の除去は期待できるものの，表1，図4に示すように，低塩素，高塩素PCBで回収率が50%以下になり，適用できなかった。また，

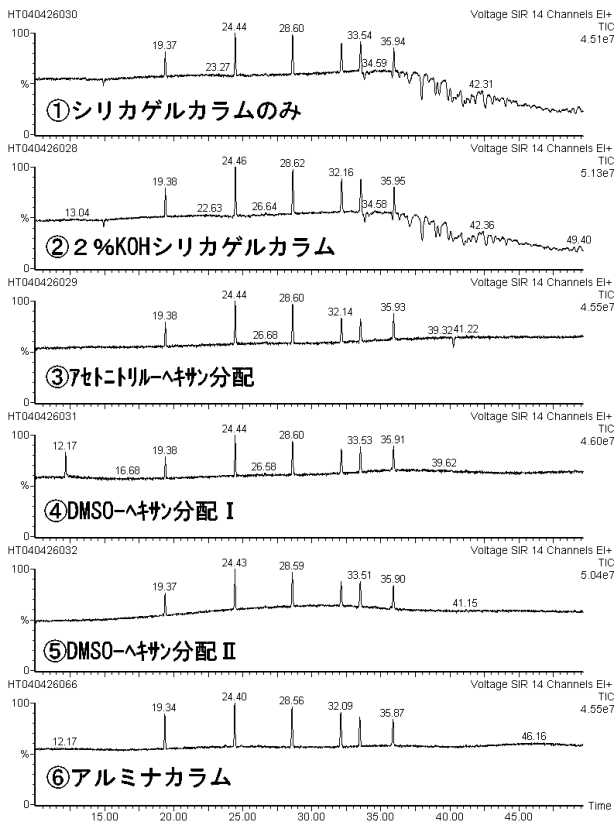


図3 脳における種々の前処理法後のTICクロマトグラム

表1 脳における各前処理法ごとのPCBs回収率 (%)

	シリカゲルのみ	2% KOHシリカゲル	アセトニトリル-ヘキサン分配	DMSO分配I (小泉)	DMSO分配II (高菅)	アルミナカラム (9件平均)
1 CB-#3	52.4	51.8	33.9	30.8	42.2	54.7
2 CB-#15	87.9	86.0	69.0	75.2	77.3	79.6
3 CB-#28	90.2	90.6	70.7	76.0	79.3	81.5
4 CB-#52	88.0	89.8	75.8	77.3	79.4	84.1
5 CB-#118	96.1	98.5	81.9	92.2	95.4	95.1
6 CB-#153	86.3	89.3	64.6	81.9	91.4	86.7
7 CB-#180	72.5	69.7	70.7	85.1	99.3	88.1
8 CB-#194	50.1	44.7	70.1	92.4	109.1	82.0
9 CB-#208	49.3	47.7	47.8	68.3	94.6	83.1
10 CB-#209	68.4	65.5	36.5	49.9	76.8	76.8

は50%以下

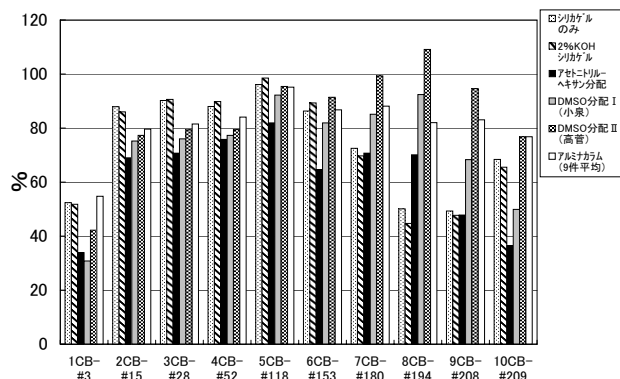


図4 脳における各前処理法ごとのPCBs回収率

DMSO-ヘキサン分配については、2種の方法を検討した結果、いずれの方法も妨害物質の除去には有効であった。しかしながら、小泉らの方法ではDMSOとヘキサンによる分配抽出の回数が2回と少ないため、表1、図4に示す

ように、低塩素、高塩素PCBで回収率が50%以下になり、適用できなかった。一方、高菅らの方法では妨害物質の除去が可能で、1塩素PCBsで50%以下の回収率であったが、それを除くと比較的PCBsの回収率は高い結果であった。この方法はDMSOとヘキサンによる分配抽出の回数が4回と多いため、高回収率が得られたものと考えられた。また、アルミナカラムによる前処理については、図3、図4からも明らかなように、妨害物質の除去が可能で、PCBsの回収率も高い結果であった。

これらの検討の結果、DMSO-ヘキサン分配Ⅱ及び、アルミナカラムによる前処理が、硫酸処理、シリカゲルカラム後の生物試料の前処理方法として有効であった。しかしながら、DMSO-ヘキサン分配ⅡはDMSOとヘキサンによる分配抽出を4回づつ行うため、実験操作はかなり煩雑となり、アルミナカラムによる前処理の方が有効であると考えられた。図5にアルミナカラム処理の有無による腎臓と脳のTICクロマトグラムの比較を示した。これらの生体試料ではアルミナカラムによる前処理の実施で妨害物質の除去が顕著であり、その後の生物試料にはアルミナカラムによる前処理方法を採用した。

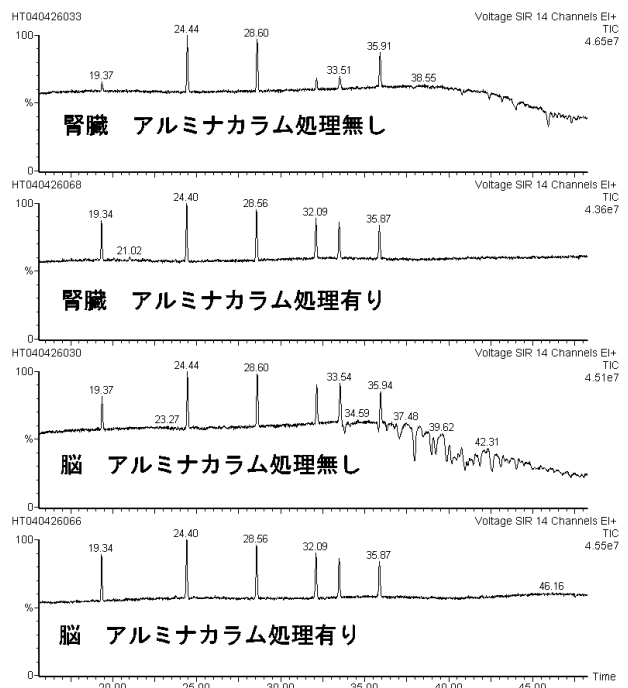


図5 PCBs分析におけるアルミナカラム処理の有無による腎臓及び脳のTICクロマトグラムの比較

2. ダイオキシン類前処理方法の検討

今回、生体組織別に、既報¹⁰⁾に従って、硫酸処理、シリカゲルカラム、活性炭カラムによる前処理を行い、ダイオキシン類分析を行った。その各生体組織別のGC-MS (SIM) TICクロマトグラムの結果を図6に示した。この図から、肝臓、脂肪、筋肉のクロマトグラムは問題ないものの、脳、腎臓におけるクロマトグラムでは、保持時間15-20分においての落ち込み、保持時間の変動、

ピークの分離に問題があり、妨害物質の除去が不十分であると考えられた。実際、脳、腎臓の試料において、シリカゲルカラム後の濃縮過程で、ヘキサンに不溶の油脂状の物質が存在しており、これらの物質が妨害物質の一部とも考えられる。このことから、活性炭カラムの前に何らかの前処理を施すことが必要と考えた。前述のPCBsの検討でアルミナカラムによる前処理法が有効であったので、活性炭カラムの前にアルミナカラムによる

前処理を行うことで、妨害物質を除去できないか考えた。アルミナカラムの分画条件はモノオルトコプラナーPCBである#167が溶出を始める直前のヘキサン30mlを第一画分とし、第二画分を次の活性炭カラムに用いた。このアルミナカラム後の第二画分の濃縮液に油脂状の物質は確認できなかったことから、第一画分に油脂状の物質を除去できた。図7に脳と腎臓におけるアルミナカラム処理の有無によるTICクロマトグラムを比較した。この図からダイオキシン類の前処理法においても、アルミナカラムの実施により、妨害物質が完全に除去可能であった。

まとめ

生物試料のPCBs全異性体の分析にあたり、様々な前処理方法を検討した。その結果、硫酸処理、シリカゲル処理後にアセトニトリル/ヘキサン分配、またはDMSO-ヘキサン分配、またはアルミナカラムによる前処理を行うことで、妨害物質の除去が可能となった。しかしながら、アセトニトリル/ヘキサン分配は回収率に問題があり、DMSO-ヘキサン分配は、実験操作が煩雑であるため、アルミナカラムによる前処理が最も迅速では正確なクリーンアップ方法であると考えた。また、ダイオキシン類の分析についてもアルミナカラムの実施により、有効なクリーンアップ効果が認められた。

文献

- 1) 福田直大, 水口定臣: 愛媛衛環研年報, 5, 64-67
- 2) 野生動物におけるダイオキシン類汚染状況調査マニュアル, (財)自然環境研究センター (1998)
- 3) ダイオキシン類に係る水生生物調査暫定マニュアル, 環境庁水質保全局水質管理課 (1998)
- 4) 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル, 環境庁水質保全局水質管理課 (1998)
- 5) 剣持堅志他: 岡山県環境保健センター年報, 26, 72-81 (2002)
- 6) 福田直大, 水口定臣: 愛媛衛環研年報, 3, 87-91
- 7) 福田直大, 水口定臣, 進藤三幸: 愛媛衛環研年報, 4, 74-79
- 8) Yuki Ashizuka他: Organohalogen Compounds, 50, 146-149, (2001)
- 9) 小泉敏章他: 分析化学, 34, T143-T147 (1985)
- 10) 高菅卓三他: 環境化学, Vol 5, No.3, 647-675 (1995)

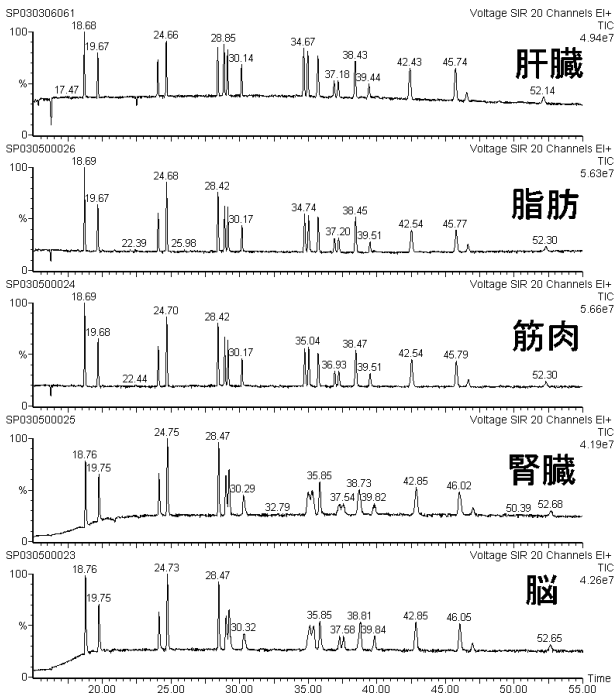


図6 ダイオキシン類分析における各生体組織別TICクロマトグラム

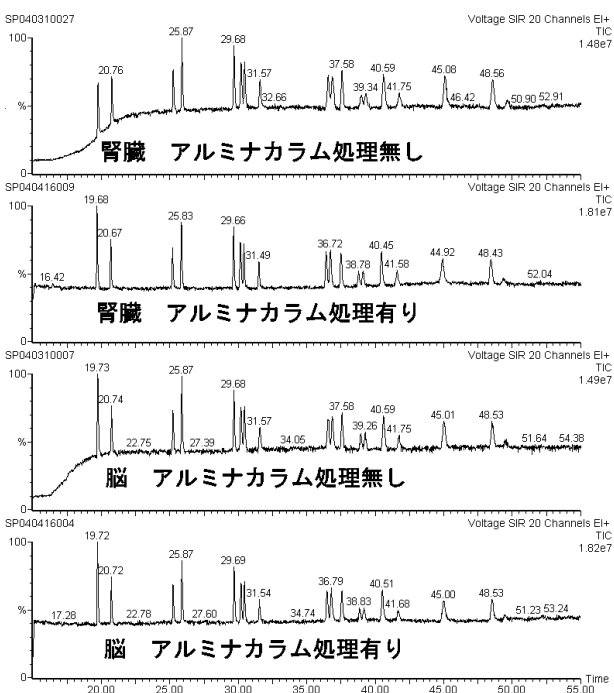


図7 ダイオキシン類分析におけるアルミナカラム処理の有無による腎臓及び脳のTICクロマトグラムの比較