

【調査研究】

食品中の有害化学物質等に関する研究
- ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs) 全異性体及びポリ塩化ナフタレン類 (PCNs)
の同時分析法確立のための基礎的検討 -

剣持 堅志, 武 志保, 難波 順子 (衛生化学科)
吉岡 敏行, 西島 倫子, 今中 雅章 (水質第二科)

要 旨

底質, 魚介類等に含まれるポリ塩化ビフェニル類(PCBs)全異性体(209種類)及びポリ塩化ナフタレン類(PCNs)を同時分析するための基礎的条件を検討した。測定は高分解能GC/MSを使用し, PCBs及びPCNs異性体を分離するための最適操作条件を検討した。分析方法は, 室温アルカリ分解抽出法, 硫酸洗浄, Gel Permeation Chromatography (GPC)及びフロリジルカートリッジカラムを用いる方法を検討した。この結果, 底質試料中の鉱物油成分, 生物試料中に含まれる脂肪等の妨害成分の除去法としてGPC法が優れたクリーンアップ効果を示すことを見いだすとともに, PCBs及びPCNsの同時分析法を確立した。

[キーワード: ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs), ポリ塩化ナフタレン類 (PCNs), 底質, 魚介類, Gel Permeation Chromatography (GPC), 室温アルカリ分解, 硫酸洗浄, 高分解能GC/MS-SIM, キャピラリーカラム分離]

1 はじめに

ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs) は209種類の異性体からなるが, その汚染源は使用製品からの漏洩の他に, 廃棄物等の燃焼により非意図的にも生成するといわれている¹⁾。また, ポリ塩化ナフタレン類 (PCNs: 75異性体) についても燃焼による生成²⁾が指摘されており, PCBs及びPCNsの異性体比を解析することは, 環境汚染の原因を推定するための有効な手段となる。しかしながら, GC/ECD法を使用する現行の公定分析法³⁻⁶⁾は個々の異性体濃度を測定できないこと, 一部の異性体は前処理操作過程において分解して測定できないことから, 平成12年度に環境庁の委託を受けて実施したポリ塩化ナフタレン類 (PCNs) の分析法の開発^{7, 8)}にあたり, PCBs全異性体をPCNsと同時に分析できる分析法の検討を行った。

その結果, Gel Permeation Chromatography (GPC)法が底質試料中の鉱物油成分, 生物試料中に含まれる脂肪等の妨害成分の除去法として優れたクリーンアップ効果を示すことを見いだすとともに, PCBs及びPCNsの同時分析法を確立したので報告する。

2 実験方法

2・1 試薬及び標準液

PCB混合標準液: Wellington Laboratories社製 (BP-MS), PCNs混合標準液: Wellington Laboratories社製 (MX-B), 個別PCB標準品: AccuStandard社製

その他標準品, 内標準及びサロゲート化合物標準液: Wellington Laboratories社及びCAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES (CIL) 社製

シリカゲルカートリッジカラム: Supelclean LC-Si 6ml Glass Tube, 1g (SUPELCO社製)

フロリジルカートリッジカラム: Supelclean Florisil 6ml Glass Tube, 1g (SUPELCO社製)

その他の試薬: 残留農薬分析用, PCB分析用またはダイオキシン分析用試薬を用いた。

2・2 GC/MSの測定条件

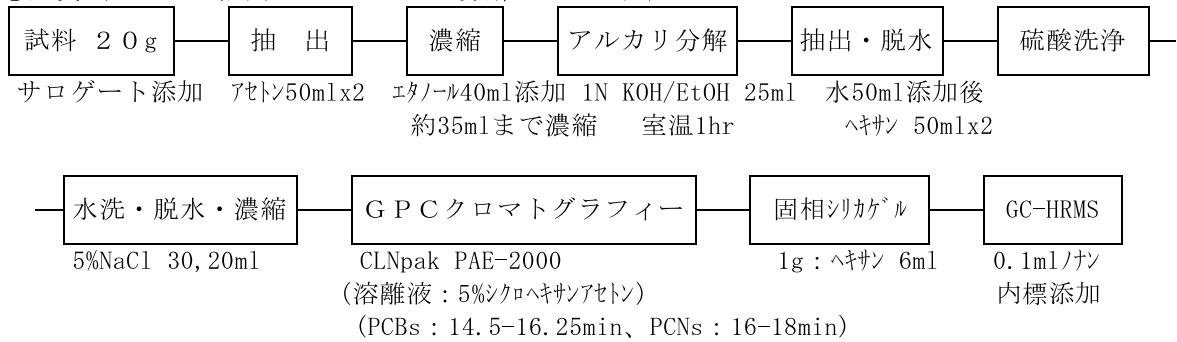
使用機器: 日本電子 JMS-700D (高分解能SIM)

日本電子 Automass20またはSun(スキャン測定)

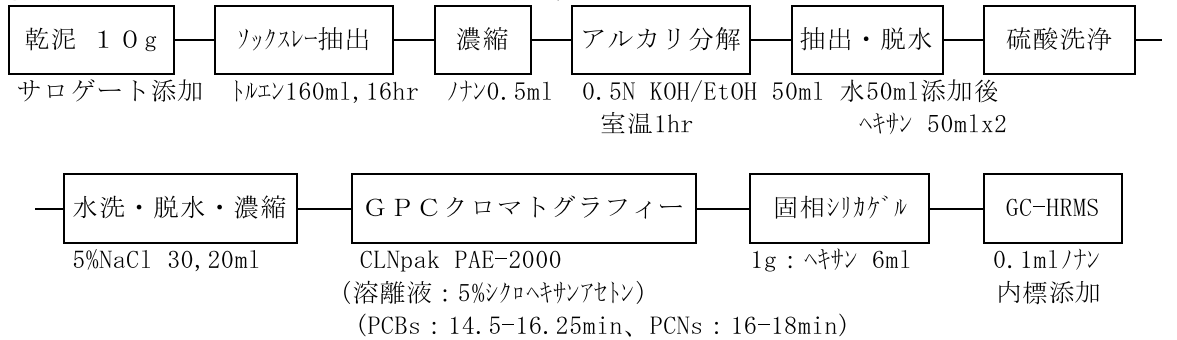
使用カラム: キャピラリーカラム

液相: 5% Phenyl Methylpolysiloxane (J&W社, DB-5MS)

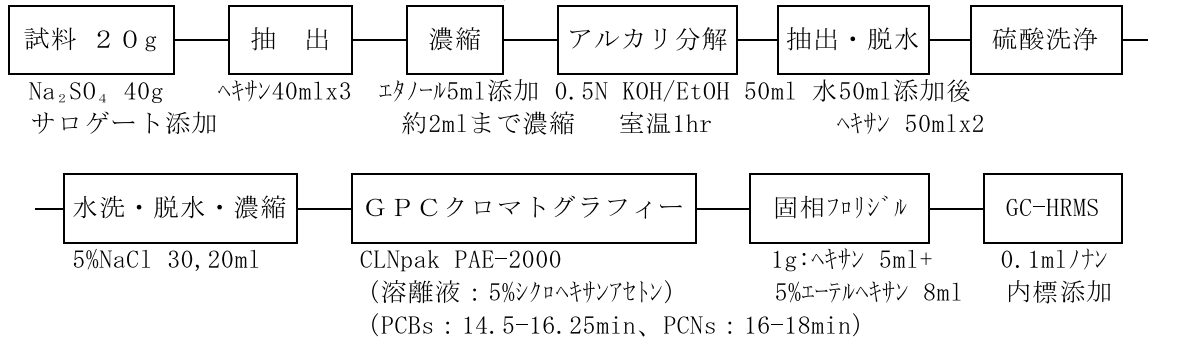
①底質（アセトン抽出・室温アルカリ分解・GPC法）



②底質（ソックスレー抽出・室温アルカリ分解・GPC法）



③生物（ヘキサン抽出・室温アルカリ分解・GPC法）



④生物（室温アルカリ分解抽出・GPC法：PCBsのみを分析対象とする場合）

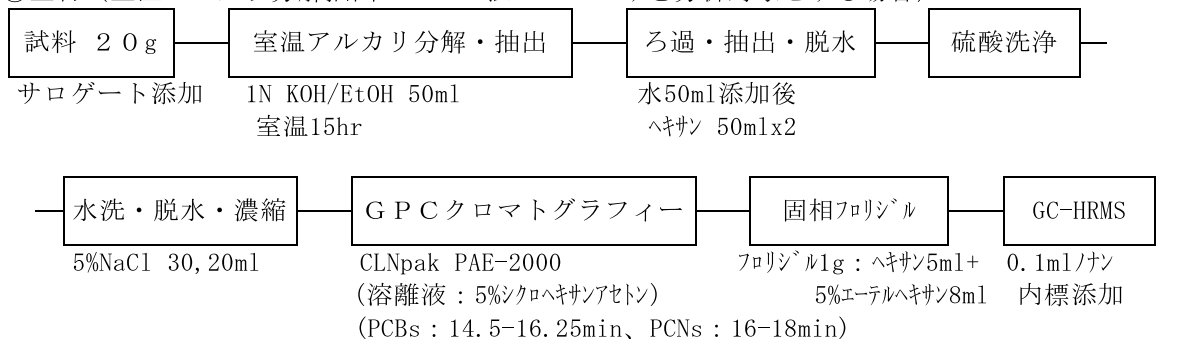


図1 分析フローチャート

膜厚：0.25 μm 長さ，内径：60mm x
0.32mm

液相：8% Phenyl Polysiloxane-carborane
(SGE社，HT8)

膜厚：0.25 μm 長さ，内径：50mm x
0.22mm

カラム昇温条件： 90 (2分) - 20 /分 - 160 -
5 /分 - 310 (5分)
100 (1.5分) - 25 /分 -
200 -3.5 /分 - 320 (5分)

注入法：スプリットレス法 注入口温度：270 注入
量：1μL

流速：1ml/min (ヘリウム：定流量) パージ開始時間：
1.5分

インタフェース部：ダイレクトカップリング (300)

イオン化条件：イオン化電圧：45eV (EI)，イオン化電
流：700 μA，イオン源温度：250

測定条件：分解能：10,000 (加速電圧：10kV，イオンマ
ルチプライヤ電圧：1.2kV)

測定法：SIM法 モニターイオンは，別報^{9,10)}に記載し
た。

2・3 GPC装置の操作条件

カラム：昭和電工 CLNpak PAE-2000 AC (プレカラ
ム：PAE-G AC)

移動相及び流速：シクロヘキサン/アセトン (5：95)
4ml/min

カラム温度：40 ，注入量：2ml (サンプルループ容
量：2ml)

サイクルタイム：30min (洗浄時間を含めると1時間)

2・4 分析方法

図1に示す分析方法について検討した。その詳細を，
下記に示す。

なお，分析の実施に当たっては，分析精度の向上を目
的として，対象試料に安定同位体のサロゲート化合物
(PCBs19物質，PCNs8物質)を添加して前処理操作を行
い，同位体希釈法による定量を行うとともに，最終試料
液には内標準物質 (6物質)を添加して回収率等を算出
した。その詳細は，別報^{9,10)}に記載した。

2・4・1 抽出方法

1) 底質：アセトン抽出法

湿泥試料約20g (乾泥換算試料量として10g相当)を遠

心分離管に採取し，試料を遠心分離 (3,000rpm，10分)
した後，遠沈管を転倒させ，間隙水をできるだけ除去す
る。サロゲート化合物標準液 (0.2 μg/ml)を5 μl添加
し混合した後，アセトン50mlを加え，振とう・超音波抽
出 (各10分間)した後，遠心分離を行った。残渣にアセ
トン50mlを加え，再度抽出操作を繰り返し，得られた抽
出液は先の抽出液と合わせた後，抽出液にエタノール
40mlを加えロータリーエバポレータを用いて約35mlま
で減圧濃縮 (35)して，アセトンを除去し，試料抽出
液とした。

2) 底質：ソックスレー抽出法

乾泥試料約10g (乾泥換算試料量として10g相当)をガ
ラス製円筒ろ紙に採取し，ソックスレー抽出装置に装着
した。サロゲート化合物標準液を添加した後，少量のガ
ラスウールをろ紙上部に挿入し，トルエン約160mlを抽
出部から加え，16時間以上ソックスレー抽出を行った。
抽出終了後，冷却管部及び抽出部を少量のトルエンで数
回洗浄し，洗浄液は抽出液に合わせ，無水硫酸ナトリウ
ムで脱水後，ロータリーエバポレータを用いて約1mlま
で減圧濃縮 (50)し，更に，ノナン0.5ml添加後，ヘ
キサン10mlを用いてナス型フラスコの内壁を洗浄し，再
度約0.5mlまで減圧濃縮してトルエンを除去した，濃縮
液にエタノール25mlを添加し，試料抽出液とした。

3) 生物：ヘキサン抽出法

湿試料約20gを遠心分離管に採取し，サロゲート化合
物標準液を添加した。無水硫酸ナトリウム40g及びヘキ
サン40mlを加えた後，直ちにホモジナイザーを用いてホ
モジナイズし，遠心分離により脂肪抽出液を得た。残渣
にヘキサン40mlを加え，再度ホモジナイズし・遠心分離
操作を繰り返し，この操作を合計3回行い，得られた抽
出液は先の抽出液と合わせた。抽出液を無水硫酸ナトリ
ウムで脱水し，エタノール5mlを加えた後，ロータリー
エバポレータを用いて約1mlまで減圧濃縮 (35)し，
濃縮液にエタノール25mlを添加し，試料抽出液を得た。

4) 生物：室温アルカリ分解抽出法

試料約20gを100mlの三角フラスコに採取し，サロゲ
ート化合物標準液を添加した。1N KOH/エタノール溶
液50mlを加えた後，磁気攪拌子を投入し，マグネチック
スターラーで攪拌しながら，室温で15時間アルカリ分解
した。分解終了後，磁気攪拌子を取り出した後，振とう
機を用いて30分以上激しく振とうし，分解を完了させた。

分解液をエタノール10ml及びヘキサン60mlを用いて、予め精製水50ml加えた250mlの分液ロートに移し、振とう後、分液した。アルカリ分解液はヘキサン50mlを用いて再度抽出し、得られたヘキサン抽出液は、5%塩化ナトリウム溶液30及び20mlを用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。

2・4・2 試料液の調製方法

下記1)～4)に示すクリーンアップ操作を図1のフローチャートに従って行い、試料液を精製した。

1) 室温アルカリ分解操作

試料抽出液(エタノール溶液25ml)に1N KOH/エタノール溶液25mlを加え、室温で暗所に1時間放置した。アルカリ分解液をエタノール10ml及びヘキサン60mlを用いて、予め精製水50ml加えた分液ロートに移した後、10分間振とうした。分液後、アルカリ分解液は、ヘキサン50mlを用いて再度振とう抽出し、得られたヘキサン抽出液は、先のヘキサン抽出液と合わせ、5%塩化ナトリウム溶液30及び20mlを用いて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。

2) 硫酸洗浄操作

脱水した試料液(ヘキサン溶液、約100ml)を乾燥した分液ロートに移し、濃硫酸10mlを加え、穏やかに振とうした。硫酸層を除去した後、更に濃硫酸5mlを加え振とう洗浄し、この操作を硫酸相が着色しなくなるまで繰り返した(通常5回程度)。洗浄後、ヘキサン試料液は、5%塩化ナトリウム溶液30及び20mlで穏やかに振とうして洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。

3) GPC処理

試料液(ヘキサン溶液)を約0.5ml以下まで減圧濃縮(35)し、アセトンを加え2mlとした後、GPC装置に注入し、14.0～18.5minの分画を分取した。

なお、分取開始前及び分取終了の度に、テトラヒドロフラン(THF)/トルエン(1:1)2mlをGPC装置に注入し、カラムを洗浄した。

分取した試料液は、0.5mlまで減圧濃縮(35)し、ノナン0.2ml及びヘキサン5mlを添加してロータリーエバポレータを用いて約0.5mlまで減圧濃縮(35)し、更に、ヘキサン5mlを添加して0.5mlまで再濃縮し、アセトンを除去した。

4) シリカゲルまたはフロリジルカートリッジカラムクロマトグラフィー

予めヘキサン10mlで洗浄したカートリッジカラムに試料液を負荷し、液面をカラムベッドまで下げてから、2mlのヘキサンで濃縮容器及びカラム壁面を洗いながら試料をカラムに負荷し、ヘキサン6ml(フロリジルの場合は、ヘキサン5ml及び5%エーテルヘキサン8ml)を用いて溶出した。溶出液を約0.2mlまで減圧濃縮(35)し、測定用内標準液(0.2µg/ml)を正確に5µl加えた後、窒素ガスを吹き付けて0.1mlまで濃縮した。

注: GPC処理液を濃縮する際にノナンを添加してあるため、最終溶液はノナン溶液となる。

3 結果及び考察

3・1 イオン化条件の最適化

GC/MS分析では一般にイオン化電圧を70eVに設定して測定するが多いが、ダイオキシン類等の高分解能GC/MS測定では、分子イオンを測定することから目的物質のフラグメンテーションをできるだけ防止し、また、夾雑成分のイオン化を抑制する目的からイオン化電圧を通常より下げて分析するが多い。PCBs及びPCNsの感度(ピーク面積値)に対するイオン化電圧の影響を図2に示したが、PCBsは40eV付近、PCNsは45eV付近で最大感度を示した。しかし、40eV以下のイオン化電圧では、ロックマスに使用するPFKのフラグメント強度が著しく低下したことから、イオン化電圧を45eVに定めた。

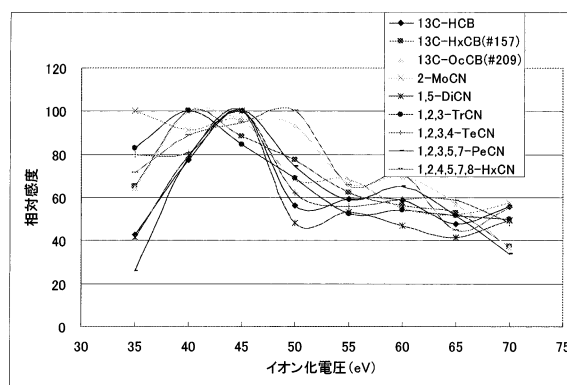


図2 PCBs及びPCNsの感度(ピーク面積値)に対するイオン化電圧の影響

3・2 ガスクロマトグラフ(GC)条件の最適化と装置検出限界

今回の分析法の検討では、試料液を100µlまで濃縮して測定する必要があったため、揮発性が小さく、容量安定性が優れたノナンを注入溶媒として検討した。GCの

操作条件は、コプラナーPCBsの測定条件¹¹⁾、PCBsの分析法^{12, 13)}及び中野らが報告したPCNsの測定条件^{14, 15)}を参考に最適化を試みた。

図3にコプラナーPCBのGC測定条件（DB-5MS，カラム長60m，初期温度150℃）におけるPCBs1塩素化物のクロマトを示したが、ヘキサン及びノナン注入のいずれにおいても著しいピーク割れを生じた。この現象は3塩素化物まで及んだため、カラムをJISがDB-5MSとも推奨しているHT8に変更したが改善されなかった。この原因は、4塩化物以上を測定することを目的としているコプラナーPCBのGC測定条件は恒温槽の初期温度が高いために、低塩素化が十分にカラムに保持されないためと考えられたため、初期温度を下げるるとともに昇温条件を変更した。この結果、図3に示すようにヘキサン注入の場合は初期温度を50℃程度、ノナンの場合は90℃程度が最も良好な分離特性を示した。また、ノナンの沸点（149.5℃）を越える160℃付近まで急速に昇温してノナンをカラムから揮発・脱離させた後、その後に昇温速度を下げることで良好な分離特性が得られた。

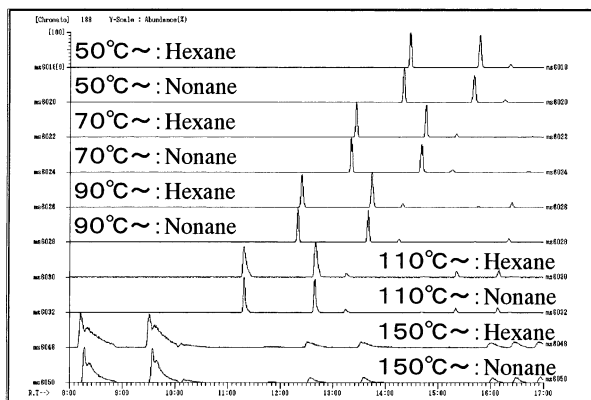


図3 PCBs1塩素化物のGC分離に対する初期温度と注入溶媒の影響（DB 5MS）

今回設定したGC測定条件におけるPCBs全異性体の分離状況を表1に示す。DB 5MSでは、PCBs全異性体209物質中105物質が45ピークとして重なり、また、HT8では95物質が40ピークとして重なって検出された。また、コプラナー性の異性体は、DB 5MSでは5物質が他の異性体と重なり、HT8では3物質が他の異性体と重なる結果となり、HT8が良好な分離特性を示した。HT8は低塩素のPCNsの分離が良好な反面、PCNs7塩素化物の異性体が分離できなかった。PCNs全異性体の標準品は市販されていないこと、HT8はPCNs異性体のGC分離に関す

る情報が全く入手できないことから、今回の検討ではDB-5MSを測定カラムとして採用した。

PCBsは、表1に示したように各塩素化物が相互に重なり合い、各塩素化物毎に分離して測定することが不可能なことから、最低2回に分けて測定する必要がある。このため、PCBs4～7塩素化物の異性体比を精度よく測定することを目的に、PCBsは4～7塩素化物を測定した後、再度1～3塩素化物と8～10塩素化物を2グループに分割して測定し、PCNsは別途4グループに分割して測定した（図4）。

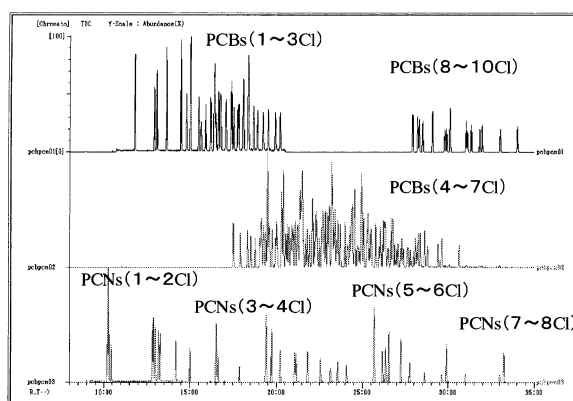


図4 PCBs全異性体及びPCNsのSIMクロマトグラム（DB 5MS）

表1 PCBsの分離状況

No	DB-5MS					HT8				
	Cl	IUPAC#	M/Z	Rt	重複	Cl	IUPAC#	M/Z	Rt	重複
1	1	1	188	12.78		1	1	188	9.73	
2	1	2	188	13.98		1	2	188	10.83	
3	1	3	188	14.13		1	3	188	10.97	
4	2	10	222	14.72	*	2	10	222	11.28	*
5	2	4	222	14.73	10	2	4	222	11.33	10
6	2	9	222	15.58	*	2	9	222	12.05	
7	2	7	222	15.60	9	2	7	222	12.13	
8	2	6	222	15.95		2	6	222	12.57	
9	2	5	222	16.18	*	2	8	222	12.77	*
10	2	8	222	16.18	5	2	5	222	12.80	8
11	2	14	222	16.67		2	14	222	13.27	
12	2	11	222	17.40		2	11	222	14.12	
13	2	12	222	17.60	*	2	13	222	14.37	
14	2	13	222	17.65	12	2	12	222	14.42	
15	2	15	222	17.87		2	15	222	14.63	
16	3	19	256	16.83		3	19	256	13.22	
17	3	30	256	17.10		3	30	256	13.45	
18	3	18	256	17.63		3	18	256	14.03	
19	3	17	256	17.72		3	17	256	14.18	
20	3	27	256	17.97	*	3	24	256	14.42	
21	3	24	256	18.02	27	3	27	256	14.52	
22	3	16	256	18.30	*	3	32	256	14.82	
23	3	32	256	18.32	16	3	16	256	14.93	
24	3	34	256	18.60	*	3	23	256	15.22	*
25	3	23	256	18.63	34	3	34	256	15.28	23
26	3	29	256	18.77		3	29	256	15.42	
27	3	26	256	19.00		3	26	256	15.65	
28	3	25	256	19.08		3	25	256	15.82	
29	3	31	256	19.33	*	3	31	256	15.95	
30	3	28	256	19.35	31	3	28	256	16.13	
31	3	21	256	19.62	*	3	21	256	16.53	*
32	3	20	256	19.65	21	3	20	256	16.65	21
33	3	33	256	19.65	21	3	33	256	16.65	21
34	3	22	256	19.93		3	22	256	16.95	
35	3	36	256	20.17		3	36	256	17.20	
36	3	39	256	20.52		3	39	256	17.57	
37	3	38	256	20.82		3	38	256	18.15	
38	3	35	256	21.22		3	35	256	18.68	

No	DB-5MS					HT8					No	DB-5MS					HT8				
	CI	IUPAC#	M/Z	Rt	重複	CI	IUPAC#	M/Z	Rt	重複		CI	IUPAC#	M/Z	Rt	重複	CI	IUPAC#	M/Z	Rt	重複
39	3	37	256	21.53		3	37	256	19.10		130	6	152	360	24.35	6	152	360	21.73		
40	4	54	292	18.78		4	54	292	15.12		131	6	145	360	24.58	*	6	145	360	22.12	
41	4	50	292	19.22		4	50	292	15.65		132	6	148	360	24.63	145	6	148	360	22.40	*
42	4	53	292	19.62		4	53	292	16.12		133	6	136	360	24.90		6	136	360	22.47	148
43	4	51	292	19.83		4	51	292	16.38		134	6	154	360	24.95		6	154	360	22.87	
44	4	45	292	20.08		4	45	292	16.68		135	6	151	360	25.37		6	151	360	23.38	
45	4	46	292	20.35	*	4	46	292	17.17	*	136	6	135	360	25.50		6	135	360	23.62	*
46	4	69	292	20.43	46	4	52	292	17.23	46	137	6	144	360	25.53		6	144	360	23.72	135
47	4	73	292	20.48	46	4	69	292	17.25	46	138	6	147	360	25.63		6	147	360	23.77	135
48	4	52	292	20.55	*	4	73	292	17.33	46	139	6	149	360	25.80		6	149	360	24.05	*
49	4	43	292	20.62	52	4	43	292	17.45	*	140	6	139	360	25.82		6	139	360	24.10	149
50	4	49	292	20.72		4	49	292	17.48	43	141	6	140	360	25.92		6	140	360	24.30	
51	4	47	292	20.80	*	4	75	292	17.67	*	142	6	143	360	26.12	*	6	143	360	24.50	
52	4	48	292	20.80	47	4	65	292	17.70	75	143	6	134	360	26.15	143	6	134	360	24.65	
53	4	75	292	20.83	47	4	47	292	17.72	75	144	6	133	360	26.20		6	133	360	24.92	*
54	4	65	292	20.88	*	4	48	292	17.73	75	145	6	131	360	26.32	*	6	142	360	24.92	133
55	4	62	292	20.93	65	4	62	292	17.85		146	6	142	360	26.37	131	6	131	360	24.95	133
56	4	44	292	21.27	*	4	44	292	18.33	*	147	6	165	360	26.37	131	6	165	360	25.52	*
57	4	59	292	21.32	44	4	59	292	18.40	44	148	6	146	360	26.45	*	6	146	360	25.23	165
58	4	42	292	21.40	44	4	42	292	18.55		149	6	161	360	26.48	146	6	161	360	25.50	*
59	4	72	292	21.65	*	4	72	292	18.77	*	150	6	153	360	26.72	*	6	132	360	25.53	161
60	4	71	292	21.67	72	4	64	292	18.80	72	151	6	168	360	26.75	153	6	153	360	25.72	
61	4	41	292	21.73	*	4	71	292	18.88	72	152	6	132	360	26.78		6	168	360	25.83	
62	4	64	292	21.75	41	4	41	292	19.00	*	153	6	141	360	27.17		6	141	360	26.30	
63	4	68	292	21.77	41	4	68	292	19.03	41	154	6	137	360	27.38		6	137	360	26.67	
64	4	40	292	22.02		4	40	292	19.45	*	155	6	130	360	27.45		6	130	360	26.82	
65	4	57	292	22.07		4	57	292	19.45	40	156	6	164	360	27.63	*	6	164	360	27.07	*
66	4	67	292	22.25		4	67	292	19.73		157	6	163	360	27.65	164	6	163	360	27.10	164
67	4	58	292	22.32		4	63	292	19.87	*	158	6	138	360	27.67	*	6	138	360	27.20	
68	4	63	292	22.45		4	58	292	19.92	63	159	6	158	360	27.73	138	6	160	360	27.33	*
69	4	61	292	22.57	*	4	61	292	20.15	*	160	6	160	360	27.73	138	6	158	360	27.38	160
70	4	74	292	22.65	74	4	74	292	20.17	61	161	6	129	360	27.93		6	129	360	27.58	
71	4	76	292	22.75	*	4	70	292	20.38		162	6	166	360	28.20		6	166	360	27.90	
72	4	70	292	22.78	76	4	76	292	20.50	*	163	6	159	360	28.32		6	159	360	28.40	
73	4	66	292	22.87	*	4	80	292	20.57	80	164	6	162	360	28.52		6	162	360	28.67	*
74	4	80	292	22.90	66	4	66	292	20.67		165	6	128	360	28.65		6	128	360	28.70	162
75	4	55	292	23.15		4	55	292	21.10		166	6	167C	360	28.73		6	167C	360	29.08	
76	4	56	292	23.43	*	4	60	292	21.52	*	167	6	156C	360	29.52		6	156C	360	30.30	
77	4	60	292	23.48	56	4	56	292	21.57	60	168	6	157C	360	29.68		6	157C	360	30.60	
78	4	79	292	24.02		4	79	292	22.28		169	6	169C	360	30.85		6	169C	360	32.53	
79	4	78	292	24.38		4	78	292	22.87		170	7	188	394	26.38		7	188	394	24.38	
80	4	81C	292	24.75		4	81C	292	23.40		171	7	184	394	26.65		7	184	394	24.82	
81	4	77C	292	25.13		4	77C	292	24.03		172	7	179	394	27.18		7	179	394	25.52	
82	5	104	326	21.08		5	104	326	17.63		173	7	176	394	27.43		7	176	394	25.95	
83	5	96	326	21.88		5	96	326	18.67		174	7	186	394	27.77		7	186	394	26.42	
84	5	103	326	21.97		5	103	326	18.87		175	7	178	394	27.88		7	178	394	26.98	
85	5	100	326	22.18		5	100	326	19.20		176	7	175	394	28.07		7	175	394	27.33	
86	5	94	326	22.42		5	94	326	19.53		177	7	187	394	28.17	*	7	182	394	27.45	*
87	5	98	326	22.70	*	5	102	326	19.90	*	178	7	182	394	28.20	187	7	187	394	27.47	182
88	5	102	326	22.70	98	5	95	326	19.98	102	179	7	183	394	28.38		7	183	394	27.83	
89	5	93	326	22.78	*	5	93	326	20.00	102	180	7	185	394	28.80		7	185	394	28.38	
90	5	95	326	22.83	93	5	98	326	20.00	102	181	7	174	394	29.02	*	7	174	394	28.68	
91	5	121	326	22.85	93	5	88	326	20.27	*	182	7	181	394	29.08	174	7	181	394	28.80	
92	5	88	326	22.92		5	91	326	20.32	88	183	7	177	394	29.22		7	177	394	28.98	
93	5	91	326	23.08		5	121	326	20.33	121	184	7	171	394	29.40		7	171	394	29.33	
94	5	92	326	23.45		5	92	326	21.00		185	7	173	394	29.58		7	173	394	29.68	
95	5	84	326	23.60	*	5	84	326	21.17	*	186	7	192	394	29.77	*	7	172	394	30.25	
96	5	90	326	23.65	84	5	89	326	21.28	84	187	7	172	394	29.78	192	7	192	394	30.50	
97	5	101	326	23.67	84	5	90	326	21.32	84	188	7	180C	394	30.03	*	7	180C	394	30.68	*
98	5	89	326	23.68	84	5	101	326	21.35	84	189	7	193	394	30.07	180	7	193	394	30.77	180
99	5	113	326	23.75	84	5	113	326	21.53		190	7	191	394	30.22		7	191	394	31.10	
100	5	99	326	23.83		5	99	326	21.67		191	7	170C	394	31.05	*	7	170C	394	32.22	
101	5	119	326	24.08	*	5	112	326	22.07	*	192	7	190	394	31.05	170	7	190	394	32.42	
102	5	112	326	24.12	119	5	119	326	22.07	112	193	7	189C	394	32.05		7	189C	394	34.28	
103	5	83	326	24.22	*	5	83	326	22.20	*	194	8	202	428	29.30		8	202	428	28.45	
104	5	108	326	24.22	83	5	108	326	22.28	83	195	8	201	428	29.57		8	201	428	28.92	
105	5	97	326	24.42	*	5	86	326	22.53	*	196	8	204	428	29.67		8	204	428	29.02	
106	5	86	326	24.43	97	5	97	326	22.55	86	197	8	197	428	29.87		8	197	428	29.38	
107	5	125	326	24.50	97	5	117	326	22.55	86	198	8	200	428	30.43		8	200	428	30.18	
108	5	111	326	24.58	*	5	125	326	22.62	86	199	8	198	428	31.13		8	198	428	31.93	*
109	5	117	326	24.58	111	5	116	326	22.70	*	200	8	199	428	31.27		8	199	428	31.97	198
110	5	87	326	24.63	111	5	87	326	22.75	116	201	8	203	428	31.48	*	8	196	428	32.37	*
111	5	116	326	24.63	111	5	115	326	22.77	116	202	8	196	428	31.50	203	8	203	428	32.43	196
112	5	115	326																		

GC昇温条件の変更, DB-5MSのカラム長の変更により, 下記に示す方法¹⁶⁾により算出した装置検出限界値 (IDL) は図5に示すように約3倍程度改善し, PCBs及びPCNsで約30fgのIDL値が得られた。また, 低塩素化物から高塩素化物までの感度変動を小さくすることができた。

$$IDL = t(n-1, \alpha) \times Sd$$

...危険率[ここでは, 危険率5%(片側)]

$t(n-1, \alpha)$...自由度 $n-1$, $\alpha=0.05$ におけるt値
($n=7$ の場合は1.943)

Sd ...検量線下限付近の濃度で繰り返し測定した定量値の標準偏差

なお, PCBs及びPCNsのSIM分析における妨害・干渉を検討するため, 相互にIDL値の約3,000倍に相当するPCBs及びPCNs標準品 (1ng) を注入して互いの干渉を検討したが, PCBs及びPCNsに相互の干渉は認められなかったが, PCBsでは塩素数が2個多いPCBs異性体の干渉が認められ, 環境試料の定量では干渉の影響を考慮する必要があった。

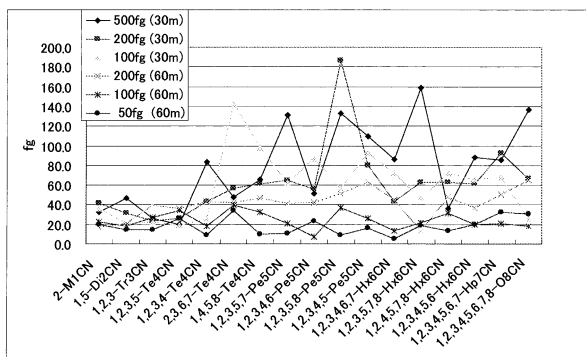


図5 装置検出感度IDLに対するイオンGC条件最適化の効果

30m : DB-5MS (膜厚 : 0.25 μ m 長さ、内径 : 30m x 0.25mm)

70 (2分) - 8 /分 - 310 (5分)¹⁵⁾

60m : DB-5MS (膜厚 : 0.25 μ m 長さ、内径 : 60m x 0.32mm)

90 (2分) - 20 /分 - 160 - 5 /分 - 310 (5分)

3.3 アルカリ分解法の検討

GC/ECD法を使用する現行の公定分析法^{3・6)}及びGC/MS法を採用している環境ホルモン調査マニュアル

¹⁷⁾では, 加熱アルカリ分解法を前処理法に採用している。PCBsを加熱アルカリ分解した結果を図6に示したが, 7塩素以上のPCBsが分解し, 特に8塩素 (#205), 9塩素 (#206, 208) の分解は著しく, 10塩素体 (#209) は完全に分解した。一方, 室温分解では, PCBsは20時間を経過しても分解は認められなかったが, PCNsは, 室温分解においても7及び8塩素体が分解したため, アルカリ濃度を0.5Nに下げるとともに, 分解時間を1時間とした。

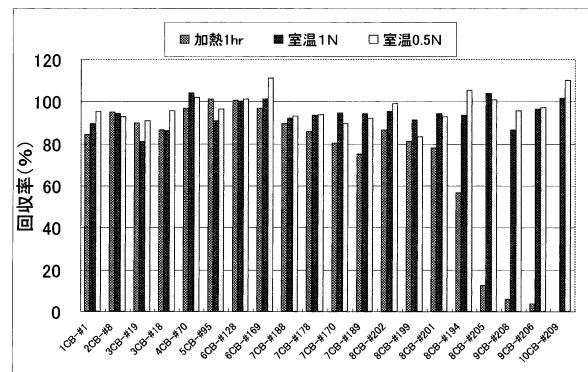


図6 PCBsの加熱及び室温アルカリ分解 (1時間分解、KOH/エタノール溶液)

なお, アルカリ分解におけるPCNsの分解は微量濃度になるほど促進される傾向を示し, また, 底質の抽出で使用するアセトンが分解液中に残留するとPCNsの分解が促進される傾向があった。このため, 底質の分析操作 (図1, 項) では, 底質を抽出したアセトン溶液にエタノールを添加して減圧濃縮することによりアセトンを完全に留去する方法を採用する必要があった。

室温アルカリ分解法は, 生物試料の脂肪の大部分を除去できること, また, 底質では酸性及び水溶性成分を除去し, また, 底質に多量に含まれる単体硫黄を除去できることから, GPCにおける流路の目詰まりの防止, 硫酸洗浄における洗浄回数の削減に効果があった。

3.4 硫酸洗浄

PCNsの同時分析を目的に, アルカリ濃度を下げた室温アルカリ分解を採用したため, 加熱分解法に比較してクリーンアップ効果が低下する可能性があることから, 残存する夾雑成分を除去する目的で硫酸洗浄を行った。その結果を図7に示したが低濃度になると3塩素以下のPCBsは回収率が低下する傾向を示した。また, PCNsも同様な傾向を示したが, 特に, PCNsは水分が混入すると低塩素体の回収率が低下したため, 脱水を十分に行っ

た後に硫酸洗浄することとした。

硫酸洗浄は高いクリーンアップ効果を示すものの、かなり危険な分析操作であるため、硫酸洗浄に代えて大容量フロリジルカートリッジカラム(5g,容量20ml)によるクリーンアップを試みたが、低脂肪の魚介類(コイ、ボラ等)では問題は生じなかったが、高脂肪の魚介類(アナゴ等)ではクリーンアップ効果が不十分となり、キャピラリーカラムの分離性能の低下が生じた。今後、ダイオキシン分析で使用されている硫酸シリカゲルカラム等のクリーンアップ操作を検討する必要が認められた。

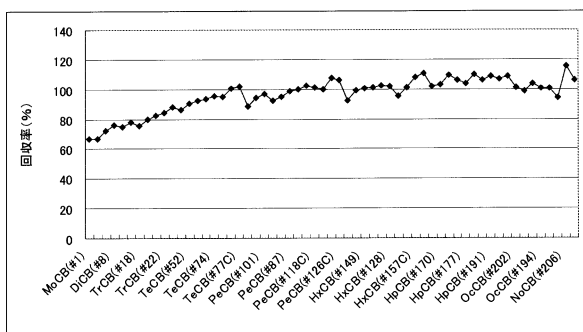


図7 PCBsの硫酸洗浄(添加量:1ng)

3・5 GPC処理

底質試料は、多量の鉱物油成分を含む。環境ホルモン調査マニュアルに準拠して前処理した場合のTICクロマトグラムを図8に示したが、多量の鉱物油成分がPCBs及びPCNs分析分画(1st:Hexane40ml)に溶出し、カラムの劣化、バックグラウンドの上昇を引き起こし、また、高濃縮測定(試料容積100μl)は不可能であった。鉱物油成分は、アルカリ分解、硫酸洗浄、銅粉処理等では除去できなかった。また、鉱物油はPCBs、PCNs等の物質

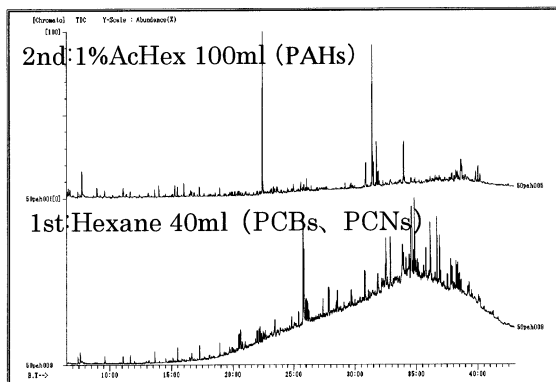


図8 環境ホルモン調査マニュアルに準拠した底質試料のカラムクロマト分画(5%含水シリカゲルカラム、5g、10mm)

と極性が類似しているため、シリカゲル、フロリジル等のカラムクロマトグラフィーでも前者を分離することは困難であった。また、鉱物油の除去に有効なアセトニトリル/ヘキサン分配は、PCBs及びPCNsの回収率が低く適用できなかった。

このため、前報⁷⁾で鉱物油の分離に有効であったGPC法を適用した。図9に示すように、鉱物油成分の大部分は14分までに溶出し、PCBsは14~16分に、PCNsは16~18分に溶出し、この分画のTICクロマトグラムはベースラインが認識できる程度まで夾雑物質が除去されていた。また、18~20分には単体硫黄が溶出し、底質に多量に含まれる単体硫黄の影響も排除できた。

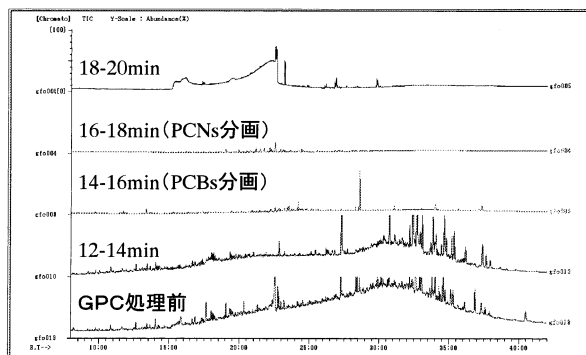


図9 GPCを用いた底質試料のクリーンアップ
カラム: Shodex GLNpak PAE-2000(20mm x300mm) 溶離液: アセトニトリル/ヘキサン4ml/分、40

しかし、GPCを長期間使用した場合にはカラムの劣化が生じ、図10に示すように本来16~18分の分画に溶出するPCNsが18~20分の分画に溶出するようになった。このため、プレカラムの交換、注入溶媒の変更等を行ったが、注入溶媒をシクロヘキサン、ベンゼン、トルエンの芳香属性のある溶媒にした場合には、各物質の溶出時間が早くなる傾向があったため、移動相にシクロヘキサンを添加し、分離性能の回復を試みた。その結果、5%程度のシクロヘキサンを移動相に添加するとカラムが劣化する以前の状態に近い分離性能(PCBs:14.5~16.25分に、PCNsは16~18分)に復帰できた。また、シクロヘキサンを添加することで長期間安定した分離性能を維持できるようになった。

GPC法を適用することで、試料中に存在する高分子の夾雑物質を除去できたことから、キャピラリーカラムとGC/MSの性能を長期間維持することが可能になった。

また、従来のオープンカラムに代えてカートリッジカラムが使用できるようになったことから、実質的な溶媒使用量が削減され、高感度測定に必要なブランク値の低減化を図ることができた。

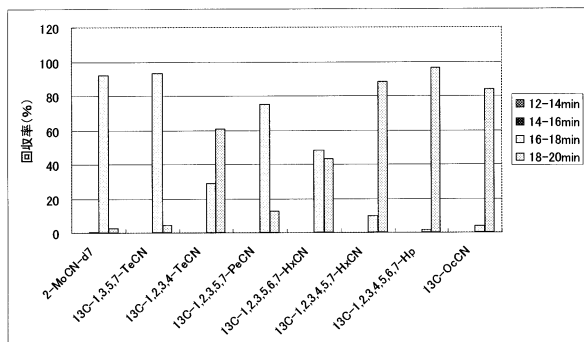


図10 GPCカラムの劣化による分解の変化
(プレカラム交換後、溶離液：アセトン)

3・6 カートリッジカラムクロマトグラフィー

GPCのみでは低分子の極性妨害物質を除去できないことから、カートリッジカラム(1g, ガラス製注射筒形)を用いてクリーンアップを行った。シリカゲルでは、PCBs及びPCNsはヘキサン6mlで完全に溶出した。一方、フロリジルでは、PCBsはヘキサン6mlで溶出したが、PCNsの7塩素化物はヘキサン20mlを使用しても完全に溶出しなかったため、ヘキサン5mlで溶出後、5%エーテル含有ヘキサン8mlで溶出する必要があった。

なお、当初はプラスチック製カラムハウジングのカートリッジを使用した。ハウジングからの溶出物が多かったため、ガラス製カラムに変更した。

3・7 添加回収率と分析法の検証

図1に示す分析フローに従って添加回収実験を行ったが、PCBs及びPCNsの低塩素化物(1~2塩素)及びPCNsの8塩素化物がやや低い回収率(50~75%)を示した以外は、80%以上の良好な回収率が得られた。その詳細は別報^{9,10)}に記載した。

添加回収実験では、できるだけ低濃度の添加量で実験を行う必要があるため、添加に用いる試料中の対象物質の濃度はできる限り低いことが望ましい。しかし、汚染の少ない試料は、魚介類中では脂肪濃度が低い場合が多く、また、底質では強熱減量値(IL)が低いなど、妨害物質の含有量が少ない場合が多い。しかし、実際のモニタリングでは様々な試料を分析する必要があることから、分析法の検証を試みた。

魚介類中の脂肪量は、魚種、魚齢の違いにより大きく異なるため、脂肪量が多い試料はクリーンアップ効果が低下する危険性がある。このため、生物の分析法(図1、

項)について脂肪量を増加させて分析を行い、その定量値に対する脂肪負荷量の影響を検討した。図11に示すように、脂肪中に含まれる対象物質の相対検出量は脂肪量に正比例して増加し、また、一定量の濃度で添加してあるサロゲート物質(¹³C安定同位体)は脂肪負荷量の変化にほとんど影響されなかった。この試験の結果、分析法は2gまでの脂肪量に分析法が耐えられることが判明したが、平成13年度に実施した魚介類のモニタリング調査¹⁰⁾では最大脂肪含量が17.5%(3.5g)達する例があったが、分析に支障は生じなかった。

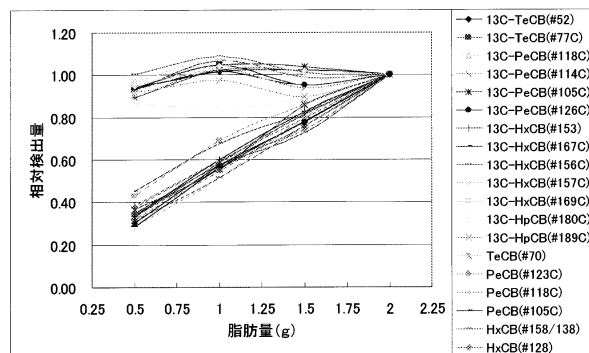


図11 生物試料分析法における脂肪負荷量の影響

一方、底質については、日本分析化学会が作成した河川底質標準試料を用いて分析値の比較検討を試みた。分析方法は図1(及び項)に従ってアセトン抽出法とトルエンを用いたソックスレー抽出法を分析化学会の認証値と比較検討したが、図12に示すように、DB-5MSカラムで他の異性体との分離に問題がある#128を除いて、その定量値は良い一致を示した。底質についても、実際の環境調査⁹⁾に適用したが、最大13.5%のIL値を示す河

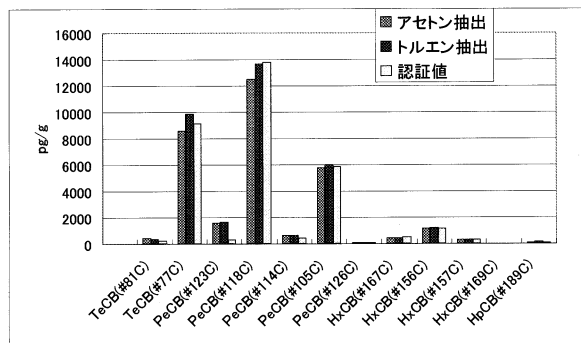


図12 生物試料分析法における脂肪負荷量の影響

川底質も問題なく分析できた。

4 まとめ

PCBs全異性体及びPCNsの測定条件と前処理法の検討を行い、次の結果を得た。

- 1) ノナンを注入溶媒としたときのGC操作条件の検討を行い、DB-5MS及びHT8カラムにおける異性体別の分離状況を把握するとともに、イオン化条件の最適化により分析感度の向上を図った。
- 2) アルカリ分解法として室温アルカリ分解法を採用し、PCNs異性体が分解しない条件としてアルカリ濃度0.5N、分解時間を1時間とした。また、硫酸洗浄、カートリッジカラムクロマトグラフィー等の操作条件の最適化を行った。
- 3) GPC法では、PCBsは14.5～16.25分、PCNsは16～18分の分画に溶出し、底質試料中に含まれる鉱物油成分、生物試料に含まれる妨害成分の大部分は10～14分に溶出し、PCBs及びPCNsの分画には妨害となるピークは認められなかった。

以上の検討結果から、底質及び生物試料中のPCBs全異性体及びPCNsの同時分析法を確立した。

なお、本研究の一部は環境省委託の平成12年度化学物質分析法開発調査(環境安全課)の一環として実施した。

文 献

- 1) 安原昭夫：しのびよる化学物質汚染，p200-208，合同出版，1999
- 2) 今川 隆：廃棄物焼却におけるポリ塩素化ナフタレンの生成に関する研究，資源環境技術総合研究所研究報告，Vol29，2000
- 3) 日本薬学会：衛生試験法・注解，p467-477，2000
- 4) 日本工業規格(JIS)K0093(ポリ塩素化ビフェニル)，日本規格協会，1998
- 5) 日本工業規格(JIS)K0102(工場排水試験方法)，日本規格協会，1998
- 6) 環境庁水質保全局水質管理課編：底質調査方法，2001
- 7) 吉岡敏行他：GPC法を用いたポリ塩化ビフェニル(PCBs)及びポリ塩化ナフタレン(PCNs)の迅速分析，岡山県環境保健センター年報，25，15-21，2000
- 8) 剣持堅志他：GC-HRMSを用いた環境試料(水質，底質及び生物)中のポリ塩化ナフタレン類(PCNs)の分析法，第10回環境化学討論会要旨集，26-27，2001
- 9) 吉岡敏行他：ポリ塩化ビフェニル(PCBs)及びポリ塩化ナフタレン(PCNs)の同時分析法と環境中濃度，岡山県環境保健センター年報，26，16-20，2002
- 10) 武 志保他：PCB全異性体(209種類)分析法を用いた魚介類の実態調査，岡山県環境保健センター年報，26，65-71，2002
- 11) 日本工業規格(JIS)K0312(工業用水・工場排水中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法)，日本規格協会，1999
- 12) 高菅卓三，井上毅，大井悦雅：各種クリーンアップ法とHRGC/HRMSを用いたポリ塩化ビフェニル(PCBs)の全異性体詳細分析法，環境化学，5，667-675，1995
- 13) 環境省環境安全課：水質・底質・生物モニタリング調査マニュアル(改訂版)(ポリ塩化ビフェニル：国土環境)，作成中
- 14) 中野 武他：ポリクロロベンゼン，ポリクロロフェノール，ポリクロロナフタレンのGC/MS-SIM分析：兵庫県公害研究所年報，24，30-37，1992
- 15) 環境庁環境安全課：平成9年度化学物質分析法開発調査報告書(ポリ塩化ナフタレン；兵庫県公害研究所)，1998
- 16) 環境庁環境安全課：第16回環境科学セミナー要旨集，164-169，1999
- 17) 環境庁水質保全局：水質，底質及び生物の内分泌攪乱攪乱化学物質(環境ホルモン)の分析法，1999
- 18) 日本分析化学会：ダイオキシン類及びPCB同族体分析用河川底質標準物質開発成果報告書，2001