

生物試料中のダイオキシン類分析方法について

福田直大 水口定臣 進藤三幸

Analytical Method for PCDDs/PCDFs and Co-PCBs in Biological Samples

Naohiro FUKUDA, Sadaomi MINAKUCHI, Kazuyuki SHINDO

On the analytical method for PCDDs, PCDFs and coplanar-PCBs in biological samples, three sorts of extraction methods, alkaline digestion extraction, alkaline digestion extraction added pyrogallol and soxhlet extraction, were examined. As the result, the analytical accuracy was not different between each isomer in these three extraction methods. Moreover, degradation of the high-chlorinated compounds was not recognized both on the alkaline digestion extraction and the alkaline digestion extraction added pyrogallol. However, as emulsion was formed in the hexane extraction process in these methods, experiment operation became complicated. On the other hand, in the soxhlet extraction, experiment steps were less than other extraction method, and also fat content could be calculated. Therefore, the soxhlet extraction was considered to be the best method of three sorts of extraction methods.

Keyword: PCDDs, PCDFs, Coplanar-PCBs, biological Samples, pyrogallol, emulsion

はじめに

生物試料中のダイオキシン類分析法には、公定法^{1) 2)}としてアルカリ分解-n-ヘキサン抽出法(以下アルカリ分解法)がある。この方法は、ダイオキシン類分析で妨害となる生物試料中の脂肪およびタンパク質をアルカリにより加水分解させた後、ヘキサンによる液-液抽出にて、ダイオキシン類を抽出する抽出法である。しかし、この方法では、試料の分解に半日程度の時間を要することと、高塩素フラン及び高塩素 PCB などの高塩素化体の分解が報告され、必ずしも確立された方法とは言いがたい³⁾。この改良法である、抗酸化試薬であるピロガロールを添加した後アルカリ分解する、ピロガロール添加アルカリ分解-n-ヘキサン抽出法(以下「ピロガロール添加アルカリ分解法」)^{4) 5)}は、より強いアルカリ条件下においてダイオキシン類の分解を抑えて、短時間に効率的なアルカリ分解が可能と報告されている。

今回、タヌキの皮下脂肪中のダイオキシン類を分析するにあたり、アルカリ分解法、ピロガロール添加アルカリ分解法、ジクロロメタンを用いたソックスレー抽出法の3種類の抽出方法を用いて、実験操作、定量値の再現性、クリーンアップスパイクの回収率の面から比較検討

を行ったので、その結果を報告する。

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皮下脂肪。

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製)、コプラナーPCBについてはNK-LCSP-A(Wellington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製)、コプラナーPCBについてはPCB-IS-B(Wellington製)を用いた。

3. 実験方法

図1に実験方法のフローを示す。

1) アルカリ分解法

ホモジナイザーにて粉碎、均一化した試料 45g を 500 ml ねじ口三角フラスコにとり、クリーンアップスパイクを添加した。2M-KOH 200ml およびメタノール 150ml を加え、時々攪拌しながら室温で一晩放置した。分解が不十分で残った脂肪は再度同様にアルカリ分解した。このアルカリ分解液をガラス繊維濾紙により濾過し、分液

アルカリ分解法

ピロガロール添加アルカリ分解法

ソックスレー抽出法

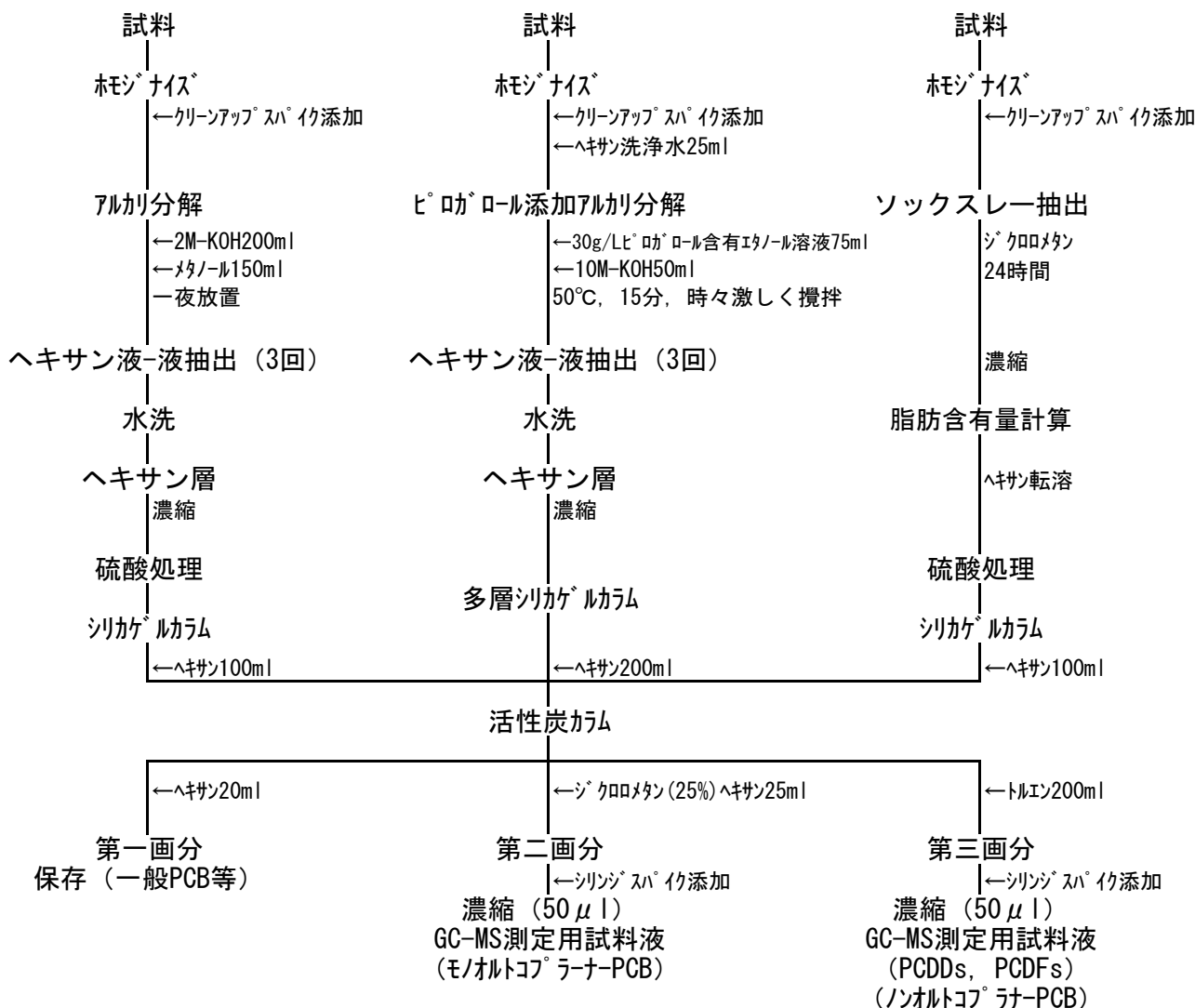


図1 実験方法のフロー

漏斗に移した。濾液にヘキサンを加えて振とう抽出を行い、2%NaClで水洗し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、硫酸処理、シリカゲルカラム処理、活性炭カラム処理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。なおクリーンアップの条件は既報⁶⁾に従って行った。

2) ピロガロール添加アルカリ分解法

この方法は、アルカリ分解法が穏和な分解反応であり、脂肪分の分解に時間を要するのに対し、抗酸化試薬であるピロガロールを添加することにより、高アルカリ条件下でのダイオキシン類の分解を抑え、かつ反応速度を速める方法である。今回は松田らが行った方法⁵⁾に準じ以下の方法で実験を行った。

ホモジナイザーにて粉碎、均一化した試料45gを500mlねじ口三角フラスコにとり、ヘキサン洗浄水25mlを加え、クリーンアップスパイクを添加した。30g/Lピロガロール含有エタノール溶液75mlを加えた後、10M-KOH水溶液50mlを加え密栓し、時々激しく攪拌しながら50°C

湯浴で15分間加熱した。分解液は直ちに氷冷した後、分液漏斗に移しヘキサン抽出を行った。ヘキサン層はヘキサン洗浄水による水洗、無水硫酸ナトリウムによる脱水の後濃縮し、多層シリカゲルカラム処理、活性炭カラム処理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。

3) ソックスレー抽出法

試料13gを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、硫酸処理、シリカゲルカラム処理、活性炭カラム処理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。

4) 脂肪含有量の測定

生物試料中のダイオキシン類は脂肪に蓄積することから、脂肪量当りのダイオキシン類濃度を評価するため、3)のジクロロメタンによるソックスレー抽出における抽出液を濃縮し、その重量が恒量になるまで常温で放置

することにより脂肪含有量を算出した。

4. 装置及び測定条件

使用した装置及び測定条件を以下に示す。

1) 4~6塩素置換PCDDs/DFs測定条件

使用機器：Micromass社 Autospec NTS(SIM測定)

カラム：SP-2331(スペルコ製)

長さ60m,内径250 μ m,膜厚0.20 μ m

注入方法：スプリットレス

注入温度：250 $^{\circ}$ C

昇温条件：100 $^{\circ}$ C(2min) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 200 $^{\circ}$ C \rightarrow 2 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C(35min)

イオン源温度：250 $^{\circ}$ C

イオン化エネルギー：35eV　イオン化電流：0.5mA

流速：1.0ml/min

2) 7~8塩素置換PCDDs/DFs, Non-ortho Co-PCBs

使用機器：Micromass社 Autospec NTS(SIM測定)

カラム：DB-17(J&W製)

長さ60m,内径250 μ m,膜厚0.25 μ m

注入方法：スプリットレス

注入温度：270 $^{\circ}$ C

昇温条件：100 $^{\circ}$ C(1min) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 200 $^{\circ}$ C(1min) \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 270 $^{\circ}$ C(56min)

イオン源温度：250 $^{\circ}$ C

イオン化エネルギー：35eV　イオン化電流：0.5mA

流速：1.7ml/min

3) Mono-ortho Co-PCBs測定条件

使用機器：Micromass社 Autospec NTS(SIM測定)

カラム：DB-5MS(J&W製)

長さ60m,内径250 μ m,膜厚0.25 μ m

注入方法：スプリットレス

注入温度：250 $^{\circ}$ C

昇温条件：100 $^{\circ}$ C(1min) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 220 $^{\circ}$ C(1min) \rightarrow 2 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C(1min) \rightarrow 4 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C(25min)

イオン源温度：250 $^{\circ}$ C

イオン化エネルギー：35eV　イオン化電流：0.5mA

流速：1.0ml/min

結果及び考察

1. 抽出法の検討

1) アルカリ分解法

アルカリ分解の際、試料粉碎の不均一により一夜放置後の脂肪の分解が不十分であった。このため分解液を濾過して、残った脂肪を再度アルカリ分解した。また、ヘキサン抽出においてはエマルジョンが形成されたため、水層とエマルジョン層を別の分液漏斗に移し、ヘキサン洗浄水、メタノール等を添加し水層とヘキサン層との分離を行った。その結果、ヘキサン抽出操作がかなり煩雑になった。

また、2%NaClでの水洗の際に若干エマルジョンが生成した。高タンパク質試料の場合は、NaClなどの塩析剤を含む水溶液による水洗によりエマルジョンの形成を抑制できるとされているが、今回のような高脂肪試料の場合は、注意が必要であった。

2) ピロガロール添加アルカリ分解法

試料は15分の反応時間で十分に分解されていた。脂肪のケン化による生成物のため、1回目のヘキサン抽出においてヘキサンがかなり水層に移ってしまい、150mlのうち50ml程度しか回収できなかった。また、2回目のヘキサン抽出において若干エマルジョンが形成されたが、エタノールを添加することで解消された。3回目のヘキサン抽出において多くのエマルジョンが形成されたため、水層とエマルジョン層を別の分液漏斗に移し、ヘキサン洗浄水、エタノールを添加し、水層とヘキサン層との分離を行った。その結果、1)と同様ヘキサン抽出が煩雑になった。松田らの報告によると⁸⁾、脂肪含量の高い試料については、アルカリ分解の後に同量のヘキサン洗浄水とエタノールで希釈するとエマルジョンの形成が抑制されるとのことであり、今後は、ヘキサン抽出における分解液の希釈、エタノールとヘキサン洗浄水の割合に注意する必要がある。

なお、水洗の際にはヘキサン洗浄水を使用したところ、エマルジョンの形成は起こらなかった。

本抽出法では、高アルカリ条件下で行っており、脂肪はケン化によりほとんど除去されているため、硫酸処理は省略し、多層シリカゲルカラムによるクリーンアップを行った。

3) ソックスレー抽出法

この方法では乳鉢でのホモジナイズに時間を要したが、同時に脂肪含有量が求められると言う利点がある。硫酸による処理回数も5回とさほど多くなく、実験方法としては特に問題がなかった。これらのことから、ソックスレー抽出法が今回の3種類の抽出法で最もよい方法と考えられた。なお、脂肪含有量は85.6%であった。

2. 定量値の再現性、回収率

3種類いずれの抽出法においても最終濃縮液のGC-MSのクロマトは良好で、ロックマス等の落ち込みによる測定への障害はなかった。

3種類の抽出法における定量値の結果を表1に示す。定量値については定量下限値以上のいずれの異性体においても、二重測定の精度管理(両者の差が平均値の30%以内)の範囲内であり、良好な結果であった。

3種類の抽出法における回収率の比較を表2に示した。回収率はモノオルトコプラナーPCBの#123と#114を除いて70~120%の範囲内であり、アルカリ分解法、ピロガロール添加アルカリ分解法で懸念されていた高塩素化物の分解はみられず、3種類の抽出法による違いはみられなかった。全ての抽出法でモノオルトコプラナー

表1 3種の抽出法における定量値の比較

	アルカリ分解法	ピロガロール添加 アルカリ分解法	ソックスレー抽出法
	pg/g-fat	pg/g-fat	pg/g-fat
PCDDs			
2,3,7,8-TCDD	1.2	1.1	1.2
1,2,3,7,8-PeCDD	4.0	4.1	4.1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	3.9	3.3	3.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	6.0	5.8	6.2
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1.5	1.4	(1.5)
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	21	23	22
OCDD	500	530	500
PCDFs			
2,3,7,8-TCDF	5.1	4.8	4.7
1,2,3,7,8-PeCDF	3.3	3.3	3.3
2,3,4,7,8-PeCDF	8.6	8.3	8.6
1,2,3,4,7,8-HxCDF	4.0	4.2	4.2
1,2,3,6,7,8-HxCDF	2.9	3.0	2.9
1,2,3,7,8,9-HxCDF	(0.11)	(0.18)	N D
2,3,4,6,7,8-HxCDF	2.8	3.0	3.4
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.7	1.7	1.8
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	(0.6)	(0.5)	N D
OCDF	(1.3)	1.6	(1)
non-ortho Co-PCB			
3,4,4',5'-TeCB(81)	5.2	5.2	5.1
3,3',4,4'-TeCB(77)	31	28	22
3,3',4,4',5'-PeCB(126)	140	140	140
3,3',4,4',5,5'-HeCB(169)	64	63	63
mono-ortho Co-PCB			
2',3,4,4',5'-PeCB(123)	32	35	34
2,3',4,4',5'-PeCB(118)	3300	3300	4200
2,3,4,4',5'-PeCB(114)	97	95	98
2,3,3',4,4'-PeCB(105)	1500	1500	1700
2,3',4,4',5,5'-HeCB(167)	520	520	540
2,3,3',4,4',5'-HeCB(156)	1700	1700	1900
2,3,3',4,4',5'-HeCB(157)	620	600	660
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(189)	570	600	610
TEQ (pg-TEQ/g-fat)	29	28	30

※()の数値は検出下限値以上定量下限値未満の濃度であることを示す。
 ※“ND”は検出下限未満であることを示す。

PCBの#123と#114の回収率が低めであった原因については、活性炭カラムに添加するヘキサン溶液中に試料中の未分解の油分等が含まれ、活性炭の第一フラクションで溶出したものと考えた⁷⁾。また、モノオルトコプラナーPCB#118についてはクリーンアップスパイクの濃度に対してNativeの濃度が100倍以上高いため、MS測定においてクリーンアップスパイクの検出に影響を与え、回収率が高くなったと考えられる。このことから、濃度に応じたクリーンアップスパイクの添加量を考慮すべきである。

まとめ

生物試料における、ダイオキシン類分析において、アルカリ分解法、ピロガロール添加アルカリ分解法、ソックスレー抽出法の3種類の抽出法を検討した。その結果、定量値はいずれの抽出法においても、良好な結果であり精度管理の範囲内であった。また、添加回収試験について、アルカリ分解法、ピロガロール添加アルカリ分解法で懸念されていた高塩素化体の分解はみられなかった。しかしながら、いずれの抽出法においても、試料中における未分解の油分等の影響により、活性炭カラムにおいて溶出のずれが生じており、注意が必要であった。

表2 3種の抽出法における回収率の比較

	アルカリ抽出法	ピロガロール添加 アルカリ抽出法	ソックスレー抽出法
	%	%	%
PCDDs			
2,3,7,8-TCDD	79.6	83.3	77.2
1,2,3,7,8-PeCDD	92.7	87.9	88.5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	111.6	111.9	102.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	118.8	107.6	96.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	115.0	108.8	95.9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	93.8	92.0	94.0
OCDD	98.6	96.6	96.6
PCDFs			
2,3,7,8-TCDF	85.2	83.8	80.5
1,2,3,7,8-PeCDF	91.4	91.7	84.6
2,3,4,7,8-PeCDF	85.0	88.8	81.5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	106.3	97.7	97.0
1,2,3,6,7,8-HxCDF	114.0	102.7	101.9
1,2,3,7,8,9-HxCDF	69.3	79.1	79.8
2,3,4,6,7,8-HxCDF	110.9	98.3	92.7
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	87.6	86.4	90.6
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	75.0	78.2	81.8
OCDF	70.2	85.8	83.2
non-ortho Co-PCB			
3,4,4',5'-TeCB(81)	76.4	76.6	78.8
3,3',4,4'-TeCB(77)	76.0	76.8	77.4
3,3',4,4',5'-PeCB(126)	83.8	84.8	84.2
3,3',4,4',5,5'-HeCB(169)	82.4	81.8	82.4
mono-ortho Co-PCB			
2',3,4,4',5'-PeCB(123)	66.6	74.4	63.0
2,3',4,4',5'-PeCB(118)	103.0	119.2	77.6
2,3,4,4',5'-PeCB(114)	50.6	59.6	47.8
2,3,3',4,4'-PeCB(105)	97.8	106.2	80.0
2,3',4,4',5,5'-HeCB(167)	74.8	84.0	69.4
2,3,3',4,4',5'-HeCB(156)	89.6	103.4	76.6
2,3,3',4,4',5'-HeCB(157)	79.2	88.8	71.0
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(189)	80.4	83.6	73.0

実験の操作性においては、アルカリ分解法、ピロガロール添加アルカリ分解法におけるヘキサン抽出においてエマルジョンが形成され実験操作が煩雑になった。ソックスレー抽出法においては特に問題なく、脂肪含有量も同時に求められることから、今回の3種類の抽出法の中では最もよい方法と考えられた。

文献

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 高菅卓三他: 第10回環境化学討論会講演要旨集, 28-29 (2001)
- 4) 大高広明, 牧野和夫: 第10回環境化学討論会講演要旨集, 128-129 (2001)
- 5) 松田壯一他: 第11回環境化学討論会講演要旨集, 273-274 (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) 松田壯一他: 環境化学, Vol.13, No.1, 133-142(2003)