

【調査研究】

環境中超微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究

— ポリ臭化ビフェニル，ポリ塩化ビフェニル，ポリ塩化ナフタレン及び
ポリ塩化ターフェニル同時分析のための基礎的検討 —

吉岡敏行，林 隆義，山辺真一，斎藤直己（水質第二科）
劔持堅志，武 志保，難波順子，今中雅章（衛生化学科）

要 旨

環境試料（水質，底質及び生物試料）中のポリ臭化ビフェニル（PBBs）の分析法を検討した。分析法は，既に開発しているポリ塩化ビフェニル（PCBs），ポリ塩化ナフタレン（PCNs），ポリ塩化ターフェニル類（PCTs）の同時分析法をもとに，室温アルカリ分解，硫酸洗浄，GPC（Gel Permeation Chromatography）を用いる方法とし，PBBsを含む4系統の化学物質群を同時分析するための基礎的な検討を行った。

[キーワード：GPC(Gel Permeation Chromatography)，ポリ臭化ビフェニル(PBBs)，ポリ塩化ビフェニル(PCBs)，ポリ塩化ナフタレン（PCNs）及びポリ塩化ターフェニル類（PCTs），高分解能 GC/MS-SIM]

1 はじめに

ポリ臭化ビフェニル（PBBs）は，ビフェニルに臭素が置換した物質であり，ポリ塩化ビフェニル（PCBs）と同様に209個の異性体が存在する。現在国内では，PBBsの製造・使用は行われていないが，PBBsは環境ホルモン物質として収載（Speed 98）¹⁾されていること，また臭素数が6個のヘキサブプロモビフェニル類は，過去にABS樹脂，ポリウレタンフォーム等の難燃剤として使用された実績があることから，高感度で精度の良い分析法の確立が求められている。

当センターでは，平成14年度に環境省が実施している化学物質環境汚染実態調査においてヘキサブプロモビフェニル（HxBBs）の分析法を開発したが，平成13年度までに開発していたポリ塩化ビフェニル（PCBs），ポリ塩化ナフタレン（PCNs）の及びポリ塩化ターフェニル（PCTs）²⁻⁹⁾の同時分析法をもとに，室温アルカリ分解，硫酸洗浄，GPC(Gel Permeation Chromatography)用いて，ポリ臭化ビフェニル（PBBs）を含む4系統の化学物質群を同時分析するための基礎的な検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試 薬

ヘキサブプロモビフェニル（2,2' 4,4' ,6,6' -HxBrB,

2,2' 4,4' ,5,5' -HxBrB, 3,3' 4,4' ,5,5' -HxBrB）：
AccuStandard 製

Decachlorobiphenyl-13C12, Octachlorobiphenyl-
13C12：Cambridge Isotope Laboratories 製

ポリエチレングリコール(PEG) 200, PEG 300, PEG
400：和光純薬製

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

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

シリカゲル（ワコーゲルC-200）：和光純薬製

エムポアディスクC18FF（90mm）：Empore 製

その他試薬は，残留農薬分析用または特級試薬を用いた。

2.2 測定方法

使用機器：日本電子 JMS-700D（高分解能 SIM）

使用カラム：Methylpolysiloxane（J & W社，

DB-1 HT）膜厚：0.1μm 長さ，

内径：15m×0.25mm

カラム昇温条件：50℃（2分）-20℃/分-120℃-

7℃/分-310℃（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：1.2ml/min（ヘリウ

ム：定流量） ページ開始時間：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：45 eV (EI)

イオン化電流：700 μ A

イオン源温度：270℃

測定条件：分解能：10,000 加速電圧：10 kV

イオンマルチプライヤ電圧：1.2 kV

測定法：SIM 法

[モニターイオン]

対象物質 Hexabromobiphenyl

m/z 625.5373, 627.5352

サロゲート物質 Decachlorobiphenyl-¹³C₁₂

m/z 509.7229, 511.7199

内標準物質 Octachlorobiphenyl-¹³C₁₂

m/z 441.8008, 439.8038

2.3 分析方法

図1に示す分析方法について検討した。

その詳細を次に示した。

2.3.1 試料液の前処理

[水質試料：固相ディスク法]

試料水1 Lを2 Lの分液ロートに採取し、サロゲート化合物標準液(0.2 μ g/ml)を正確に5 μ l添加した後、約10分間振とうした。予めコンディショニングした固相ディスク(C18-FF, 90 mm)に試料水を通水(通液速度約100 ml/min)した。更に、試料水1 Lを先の分液ロートに採取し、サロゲート化合物の添加・振とう・通水操作を行い、この通水操作を合計5回行った(通液総量5 L)。

通水終了後、ガラスファンネルと固相ディスクを精製水20 mlで2回洗浄した後、5秒程度の強い減圧と常圧に戻す操作を数回繰り返して、固相ディスク及びガラスサポートベースに付着した水滴を除去した。

固相ディスク及びガラス繊維ろ紙をソックスレー抽出装置に装着し、トルエン約150 mlを加え、6時間以上ソックスレー抽出を行い、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た。

試料容器は、転倒により水分を除去した後、試料容器、浸透に用いた分液ロート及びガラスファンネルをトルエンで洗浄し、洗浄液は先のソックスレー抽出液と合わせた。抽出液は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水し、ロータリーエバポレータを用いて乾固直前まで減圧濃縮を行い、更にヘキサンを添加した減圧濃縮を繰り返してトルエンを除去したのち、ヘキサン約0.5 mlに溶解して、試料抽出液を得た。

[底質及び生物試料：アセトン抽出法]

試料約20 g(底質の場合は、乾泥換算試料量として10 g相当)を100 mlの遠心分離管に採取し、遠心分離(3,000 rpm, 10分)した後、遠沈管を転倒させ、間隙水をできるだけ除去した。サロゲート化合物標準液(0.2 μ g/ml)を正確に5 μ l添加した後、アセトン50 mlを加え、密栓して10分間振とう後、10分間超音波抽出した。遠心分離(3,000 rpm, 10分)を行い、得られたアセトン抽出液は、ガラス繊維ろ紙GF/Cでろ過した。残渣にアセトン50 mlを加え、振とう・超音波抽出・遠心分離・ろ過操作を繰り返し、得られた抽出液は先の抽出液と合わせた。抽出液にエタノールを20 ml加えロータリーエバポレータを用いて約25 mlまで減圧濃縮して、アセトンを除去し、試料抽出液を得た。

2.3.2 クリーンアップ操作

下記①～⑤に示すクリーンアップ操作を組み合わせ、試料液を精製した。

[水質]

試料抽出液をGPC処理(③項参照)を行った後、シリカゲルカートリッジカラム(④項参照)によるクリーンアップを行い、ロータリーエバポレータを用いて約0.2 mlまで減圧濃縮し、測定用内標準液(0.2 μ g/ml)を正確に5 μ l加えた後、窒素ガスを吹き付けて0.1 mlまで濃縮した。

[底質及び生物試料]

試料抽出液を室温アルカリ分解(①項参照)、硫酸洗浄(②項参照)、GPC処理(③項参照)を行った後、シリカゲルカラム(④または⑤項参照)によるクリーン

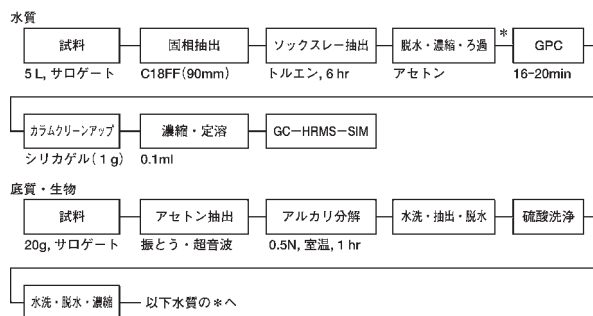


図1 分析法フローチャート

ンアップを行い、ロータリーエバポレータを用いて約0.2mlまで減圧濃縮し、測定用内標準液(0.2 μ g/ml)を正確に5 μ l加えた後、窒素ガスを吹き付けて0.1mlまで濃縮した。

クリーンアップ操作の詳細を次に示す。

① 室温アルカリ分解

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を加えた分液ロートに移したのち、10分間振とうし、抽出を行った。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30ml及び20mlを用いて2回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。

② 硫酸洗浄

脱水した試料液(ヘキサン溶液、約100ml)を少量のヘキサンを用いて乾燥した分液ロートに移し、濃硫酸10mlを加え、穏やかに振とう洗浄した。硫酸層を除去した後、更に濃硫酸5mlを加え振とう洗浄し、この操作を硫酸層が着色しなくなるまで繰り返した。ヘキサン試料液を別の分液ロートに移し、5%塩化ナトリウム溶液30ml及び20mlを用いて、穏やかに振とうして洗浄した。得られたヘキサン試料液は、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)をロータリーエバポレータにより約0.5ml以下まで減圧濃縮後、シリンジフィルターでろ過した。少量のアセトンでフィルターを洗浄後、ろ液を窒素ガスをを用いて2mlまで濃縮した後、GPC装置に注入し、16~20分の分画を分取した。分取した試料液は、0.5mlまで減圧濃縮後、ヘキサン5mlを添加して0.5mlまで再濃縮する操作を2回繰り返し、アセトンを除去した。

なお、分取開始前及び分取終了のたびに、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、GPCカラムを洗浄した。

[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) ラインフィルター：

ジーエルサイエンス テフロン製ラインフィルター

移動相及び流速：シクロヘキサン/アセトン(5:95)
4 ml/min

カラム温度：40℃

注入量：2 ml (サンプルループ容量：2 ml)

サイクルタイム：30 min(洗浄時間を含めると1時間)

検出器：紫外吸収検出器(UV:330 nm)または示差屈折検出器(IR)

④ シリカゲ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で洗浄したシリカゲルカートリッジカラムに試料液を負荷し、ヘキサン10mlで溶出した。

⑤ 5%含水シリカゲルクロマトグラフィー

5%含水シリカゲル5gを内径10mmのカラムクロマト管にヘキサンで湿式充填し、ヘキサンで洗浄後、無水硫酸ナトリウムを約2cm積層した。試料液をカラムに負荷し、液面をカラムベッドまで下げてから、少量のヘキサンで濃縮容器及びカラムの壁面を数回洗いながら試料をカラムに負荷したのち、ヘキサン50mlで溶出した。

3 結果及び考察

3.1 キャピラリーカラムの検討

PBBsは分子量が大きい(10臭化物：分子量943)ことから、通常のカラム長(30m)や膜厚(0.25 μ m)では10臭化物を検出することはできなかつたため、高沸点物質の測定に使用されるDB-1HT(カラム長15m、膜厚0.1 μ m、内径0.25mm)を使用したが、このカラムは、ノナン等の高沸点溶媒を注入した場合には、低臭化物(1~3臭素)のピークがブロードになる現象が生じた。このことから、注入溶媒はヘキサンとし、カラム初期温度は50℃にして、全臭化物を測定できる条件を設定した。しかし、この設定条件においても、底質等の実試料を数十回程度測定したのちに、標準物質(ヘキサン溶液)を測定すると図2に示すようにピークがテーリングする現象が生じた。特に、濃度が低いときは、ピークの低い3,3',4,4',5,5'-Hexabromobiphenylと2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenylに影響が強く現れた。この対策として、標準溶液にポリエチレングリコール(PEG)の添加を試みたところ、PEG 200とPEG 300及びPEG 400の当量混合品を約200 μ g/

ml程度添加した場合が、最も実試料のピーク形状に近くなるとの結果を得た。このことから、カラムが劣化した場合には、ポリエチレングリコールを添加することとした。

3.2 固相ディスクの検討

ダイオキシン類の分析法¹⁰⁾に準拠して大容量固相抽出法を採用した。海水5LにPBBsを1ng添加・振とう後、ガラス繊維ろ紙GB-140(90mm:ADVANTEC製)でろ過し、ろ液をエムポアディスクC18FF(90mm)で固相抽出した場合の絶対回収率を図3に示した。分子量が大きくなるに従って、ろ紙上に捕捉される割合が高くなった。このことから、環境試料水中のPBBsは懸濁物質(SS)に吸着されて存在することが予想されることから、試料水の抽出では、SS成分が吸着する可能性が高い試料容器も洗浄・抽出することとした。

3.3 シリカゲルカラムクロマトグラフィーの検討

シリカゲルカートリッジカラム(Supelclean LC-Si, 1g)と5%含水シリカゲル(5g)における溶出パターンを図4に示した。カートリッジカラムはヘキサン5ml、5%含水シリカゲル(5g)はヘキサン50mlでほぼ全成分が溶出したが、カートリッジカラムでは6臭化物の回収率が低い傾向があったことから、溶出量をヘキサン10mlに増加させた。

3.4 GPCにおける分離状況

塩化物であるPCBsはGPCにおいて14~16分に溶出するが、PBBsは、その大部分が16~18分に溶出し、PCBsに比較して保持時間が大きくなった、特に、5、6及び10臭化物化物の一部異性体は22分までの保持時間を示した(表1)。この保持時間の遅れは、溶離液のシクロヘキサン含有量の増加、カラム温度の高温化などにより改善された。この保持時間の遅れの主原因はカラムの劣化と推定されたため、カラムを新品に交換したところ、PBBs全成分が18.5分までに溶出した。このように、臭化物は塩化物に比較してGPCカラムへの吸着性が高いことから、設置条件や使用状況等により保持時間が変動する可能性があるため、必ず事前に標準物質で溶出パターンを確認する必要がある。

3.5 添加回収率

水質、底質及び生物試料(前処理法は、底質と同じ)におけるPBBs6臭化物の添加回収率を表2に示した。PCBs10塩化物をサロゲート物質とした回収率は、各

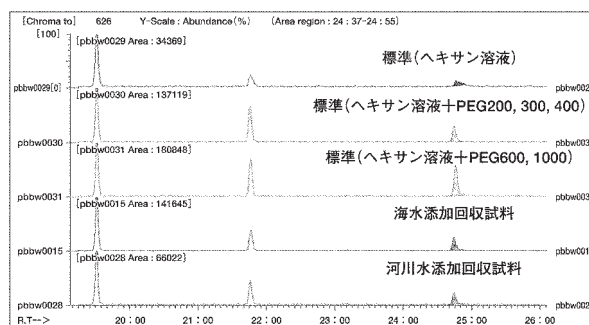


図2 カラム劣化時の6臭化物のSIMクロマトグラムとポリエチレングリコールの添加効果

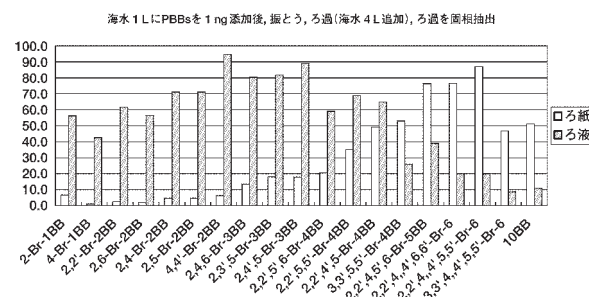


図3 海水の大容量固相抽出におけるPBBsの懸濁物質及びろ液への分布状況

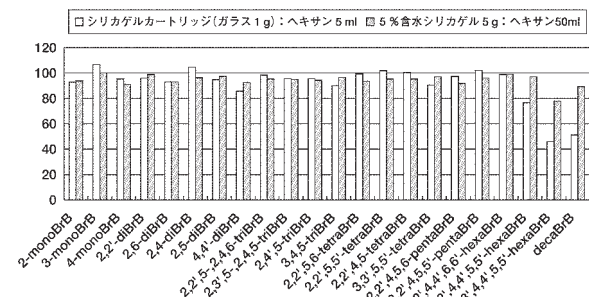


図4 シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおけるPBBsの溶出状況

媒体ともほぼ100%に近い値を示した。なお、他の臭化物(1~5臭化物及び10臭化物)の回収率については現在検討中である。

3.6 PBBsの分解性について

6臭化物及び10臭化物の分解性試験結果を表3に示したが、6臭化物(3,3',4,4',5,5'-体)及び10臭化物は光分解する傾向を示した。なお、他の臭化物(1~5臭化物)には光分解性は認められなかった。

3.7 環境試料の分析結果

河川水(笹ヶ瀬川)、海水(水島沖)、底質(水島沖)、

表1 PBBs の GPC カラム劣化時における分離状況

	12-14min	14-16min	16-18min	18-20min	20-22min	22-24min	回収率(%)
2-monoBrB	0	9	89	0	0	0	98
3-monoBrB	0	0	108	0	0	0	108
4-monoBrB	0	0	101	0	0	0	101
2,2'-diBrB	0	12	85	0	0	0	97
2,6-diBrB	0	3	93	0	0	0	96
2,4-diBrB	0	0	100	0	0	0	100
2,5-diBrB	0	0	100	0	0	0	100
4,4'-diBrB	0	0	104	0	0	0	104
2,2',5-,2,4,6-triBrB	0	1	98	0	0	0	98
2,3',5-,2,4,5-triBrB	0	0	98	0	0	0	98
2,4',5-triBrB	0	0	99	0	0	0	99
3,4,5-triBrB	0	0	94	0	0	0	94
2,2',5,6-tetraBrB	0	0	97	0	0	0	97
2,2',5,5'-tetraBrB	0	0	94	0	0	0	94
2,2',4,5-tetraBrB	0	0	97	0	0	0	97
3,3',5,5'-tetraBrB	0	0	94	0	0	0	94
2,2',4,5,6-pentaBrB	0	0	0	16	71	0	87
2,2',4,5,5'-pentaBrB	0	0	97	0	0	0	97
2,2',4,4',6,6'-hexaBrB	0	0	94	0	0	0	94
2,2',4,4',5,5'-hexaBrB	0	0	99	0	0	0	99
3,3',4,4',5,5'-hexaBrB	0	0	0	79	0	0	79
decaBrB	0	0	0	0	105	0	105

40ng : Shodex CLNpak PAE-2000 AC (5%シクロヘキサン/アセトン, 40℃, 4 ml/min) ; Automass 20測定

表2 PBBs 6 臭化物の添加回収率 (サロゲート法)

物質名	試料	試料量	添加量(ng)	測定回数	回収率(%)	変動係数(%)		
2,2',4,4',6,6'-HxBrB	精製水	5 L	0.1	4	97.7	9.0		
			0.2	4	107.4	8.4		
			0.3	4	153.2	3.9		
	河川水	5 L	0.5	7	107.1	9.6		
			海水	5 L	0.5	7	117.4	16.8
			底質	20g	1	7	113.9	4.6
	生物	20g	1	7	126.3	17.2		
2,2',4,4',5,5'-HxBrB	精製水	5 L	0.1	4	104.4	10.9		
			0.2	4	102.1	13.1		
			0.3	4	119.5	7.1		
	河川水	5 L	0.5	7	118.2	15.9		
			海水	5 L	0.5	7	130.5	16.6
			底質	20g	1	7	107.9	7.6
	生物	20g	1	7	98.8	15.2		
3,3',4,4',5,5'-HxBrB	精製水	5 L	0.1	4	92.3	8.9		
			0.2	4	93.7	7.2		
			0.3	4	100.8	4.6		
	河川水	5 L	0.5	7	92.7	9.3		
			海水	5 L	0.5	7	95.2	16.4
			底質	20g	1	7	98.8	11.2
	生物	20g	1	7	100.6	14.3		

表3 分解性スクリーニング試験

	1 hr			5 day				
	pH5	pH7	pH9	暗所	明(室内)	明(屋外)		
2,2',4,4',6,6'-HexaBrB	81	83	105	pH5 94	pH7 109	pH9 114	pH7 113	pH7 103
2,2',4,4',5,5'-HexaBrB	86	90	104	94	112	105	107	120
3,3',4,4',5,5'-HexaBrB	96	97	111	93	119	108	104	62
decaBrB	93	103	88	80	80	78	67	41

初期濃度：10 μ g/ml

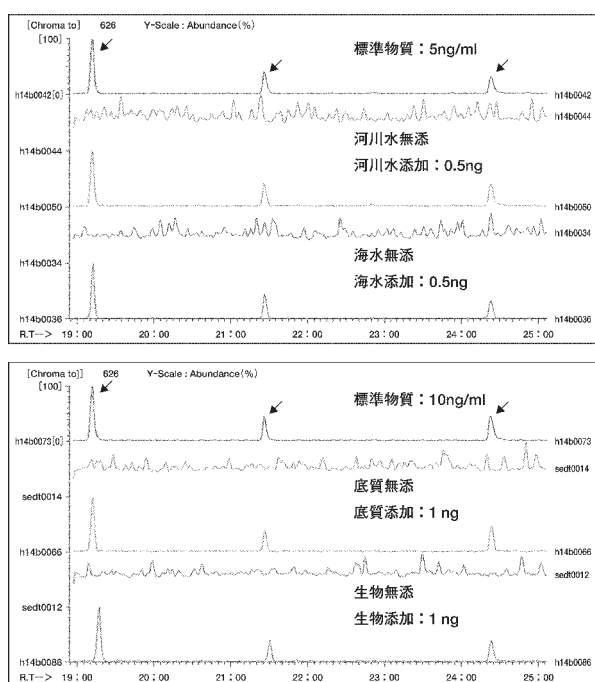


図5 環境試料の分析例（6臭化物）

生物（水島沖，ボラ）の分析例を図5に示した。いずれの媒体からもヘキサブロモビフェニルは検出されなかった。なお，他の臭化物（1～5臭化物及び10臭化物）についても，岡山県内で調査を実施した水質23地点及び底質12地点では検出されなかった。

4 まとめ

6臭化物を主体にPBBsの分析法の基礎的検討を行い，次に示す結果を得た。

1. PBBsは，前処理法においてPCBs，PCNs及びPCTsと同様な挙動を示し，同時分析が可能であった。
2. 5，6及び10臭化物の一部異性体はキャピラリーカラム及びGPCカラムで強い吸着性を示し，カラ

ムの劣化等の影響を強く受けた。

3. サロゲート法による6臭化物の添加回収率は良好な結果を示し，水質で0.01ng/L，底質で0.08ng/gレベルの検出限界が得られた。
4. GPCは，妨害物質の除去に効果的で，分析操作の簡便化と迅速化に有効であった。

なお，本研究は環境省委託の平成14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) 環境庁水質保全局：水質，底質及び生物の内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の分析法，1999
- 2) 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，25-15，21，2001
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 剣持堅志他：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，岡山県環境保健セ

ンター年報, 26-72, 81, 2002

- 7) 剣持堅志他：GPC (Gel Permeation Chromatography) の微量化学物質 (PCBs, PCNs 等) 分析への応用, 第11回環境化学討論会要旨集, 78-79, 2002
- 8) 環境省環境安全課：平成13年度化学物質分析法開発調査報告書 (ポリ塩化ターフェニル；岡山県環境保健センター), 2002

- 9) 環境省環境安全課：平成14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及びポリ塩化ビフェニルの同時分析法；岡山県環境保健センター), 2003
- 10) 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