銅フタロシアニン化学結合シリカゲルによる ダイオキシン類の迅速前処理法

松本幸一郎, 亀田 洋, 大原 正広*, 塩崎 卓哉

財団法人日本環境衛生センター (〒210-0828 神奈川県川崎市川崎区四谷上町10-6)

*和光純薬工業株式会社 (〒350-1101 埼玉県川越市大字の場1633)

[平成17年11月 7 日受理]

Rapid Clean-up Procedure for the Analysis of PCDD/Fs and DL-PCBs using Copper Phthalocyanine Bound Silica Gel

Koichiro MATSUMOTO, Hiroshi KAMEDA,
Masahiro OHARA* and Takuya SHIOZAKI

Japan Environmental Sanitation Center
(10-6 Yotsuyakami, Kawasaki, Kawasaki, Kanagawa 210-0828)

*Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
(1633 Matoba, Kawagoe, Saitama 350-1101)

[Received November 17, 2005]

Summary

The rapid clean-up procedure for the analysis of PCDD/Fs and Dioxin-like PCBs (DL-PCBs) using copper phthalocyanine bound silica gel column (CuPc column) was established. Mono-*ortho* PCBs with non-planar chemical structures were eluted with 15 ml of hexane but PCDD/Fs and non-*ortho* PCBs as target compounds were not eluted with 100 ml of hexane. However, PCDD/Fs and non-*ortho* PCBs were eluted only with 5 ml of toluene. Consecutively, we developed a new clean-up procedure fractionate sequentially by CuPc column after clean-up by sulfuric acid immersed diatomite column and simplified multilayer silica gel column. The repeatability by the new method was less than 10 %, and obtained data between this method and an official standard method of "Manual for the Survey and Measurement of Dioxins in Soil" were almost same. This method was confirmed as an effective and rapid clean-up procedure for the analysis of PCDD/Fs and DL-PCBs in soil sample.

Key words: copper phthalocyanine bound silica gel, PCDD/Fs, DL-PCBs, rapid clean-up procedure

1. はじめに

我が国におけるダイオキシン類の分析方法は、日本工業規格 K0311や K0312に代表される規格や公定法によって行われ、その一般的な前処理操作としては、多層シリ

カゲルカラム処理によるマトリックスの精製処理後、アルミナカラム処理あるいは活性炭カラム処理により目的成分の分画を行う。この前処理操作は、それぞれが独立しているだけでなく、厳密な分画条件が求められ、使用する溶媒量が多いこと、さらには個々の操作が独立して

いるために前処理操作全体に要する時間が長いことなどから、通常3日～1週間程度の日数を要している。

一方、本年6月に改正された日本工業規格による方法^{1,2)}でも同様の前処理操作を行うこととなっているが、ここでは新たに規定されている条件を満たせばこれらの前処理操作以外であっても適用できることとなった。銅フタロシアニートリスルホン酸を綿に結合させたブルーコットンや銅フタロシアニン誘導体をレーヨンに結合させたブルーレーヨンは、複素環式化合物を特異的に吸着し、水や尿中に存在する複素環構造の平面分子を持つ突然変異誘発物質や発がん性物質を効果的に吸着すること^{3,4)}が報告されており、フタロシアニン化合物の吸着特性は平面分子に対して化学分析における分画能を有することが示唆される。そこで、PCDD/FsおよびDL-PCBsを分画するためにFig. 1に示すような巨大芳香族環状化合物である銅フタロシアニンを化学結合したシリカゲル（銅フタロシアニン化学結合シリカゲル、以下CuPcシリカ）を用いたダイオキシン類分析における前処理の迅速化について検討した。

2. 実験方法

2. 1 CuPc シリカの分画

CuPc シリカを100mg 充填したカラム（和光純薬製）をトルエン1mℓ、エタノール2mℓ、アセトン3mℓ、ヘキサン3mℓの順にコンディショニングし、クリーンアップスパイク（2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン毒性等価係数（TEF）が設定されている17種のPCDD/Fsおよび12種のDL-PCBs⁵⁾）を溶解したヘキサン溶液1mℓをカラムで分画した。第1画分はヘキサン、第2画分はトルエンを溶出溶媒として展開することによって得た。また、CuPc シリカによるPCDD/Fsおよびnon-ortho PCBsの吸着保持力を調べるために、ヘキサン100mℓまでの溶出画分を分取した。

2. 2 活性炭カラムの分画

CuPc シリカと同量の活性炭分散シリカゲルをCuPc シリカと同型のカラムに充填して、クリーンアップスパイク（同2. 1）を添加したヘキサン溶液1mℓをカラムで分画した。第1画分はヘキサン、第2画分は25%ジクロロメタン／ヘキサン、また第3画分はトルエンを溶出溶媒として展開し、それぞれの溶出画分を分取した。

2. 3 CuPc シリカを使用した実試料処理

けい藻土ガラスカートリッジ（Merck Extrelut NT-3）に2mℓの濃硫酸を含浸させた硫酸含浸けい藻土カラムと下から44%硫酸シリカゲル（1.5g）、10%硝酸銀シリカゲル（2g）、活性シリカゲル（1.5g）を無水硫酸ナト

リウムで挟んで積層した簡略化多層カラム、および2. 1と同様にコンディショニングを行ったCuPc シリカカラム（100mg）を連結してタンデムカラムを作成した（Fig. 2）。これに平成16年度環境測定分析統一精度管理調査の共通土壌試料（10g）⁶⁾をトルエンで18時間以上ソックスレー抽出したものをヘキサンに転溶後、土壌1g相当抽出分を1試料として3試料（Pc-1, Pc-2, Pc-3）を分取し、クリーンアップ・分画の精製操作を行った。80mℓのヘキサンを用いて溶出させた画分をmono-ortho PCBs画分、その後、簡略化多層カラムを除去後、CuPc シリカカラムからトルエン5mℓで溶出させた画分をPCDD/Fsおよびnon-ortho PCBs画分とした。

2. 4 測定

SCLV（Solvent Cut Large Volume Injection: SGE 製）を装備したAgilent 6890N（HRGC: Agilent 製）に、BPX-Dioxin IおよびBPX-Dioxin II（共に0.15mm I.D.×30m: SGE 製）キャピラリーカラムを装着し、AutoSpec Ultima NT（HRMS: Micromass 製）を用いて分解能10,000以上で測定した^{7,8)}。GCおよびMSの測定条件をTable 1に示す。

3. 結果と考察

3. 1 CuPc シリカの分画条件

CuPc シリカ分画試験の結果をFig. 3に示す。ヘキサン画分には、mono-ortho PCBsが溶出し、トルエン画分には、PCDD/Fsおよびnon-ortho PCBsが溶出した。ヘキサン15mℓまでに100%近いmono-ortho PCBsが溶出したが、その後100mℓまでヘキサンを展開してもPCDD/Fsおよびnon-ortho PCBsは溶出しなかった。また、PCDD/Fsおよびnon-ortho PCBsはトルエン5mℓで完全に溶出した。以上の結果が示すように、CuPc シリカは、co-planer 構造をしたPCDD/Fs及びnon-ortho PCBsに対する吸着力が強く、少量のヘキサンでmono-ortho PCBsとの分離を可能にした。一方、CuPc シリカに吸着したPCDD/Fs及びnon-ortho PCBsは、少量のトルエンで容易に溶出でき、溶出時間および溶媒の濃縮時間を短縮できる可能性が示唆された。

CuPc シリカは銅フタロシアニン分子一個に対して、シリカゲルのシリル基が最大4ヶ所まで化学結合していると考えられるが、1～2ヶ所で結合したものが主体で銅フタロシアニン分子の自由回転が可能と推測される。そのため、平面構造を有する化合物でコンディショニングすることによって、同じく平面構造を有するPCDD/FsおよびDL-PCBsの認識能を高め、分画を可能にしていると考えられる。従って、平面構造を有するトルエンを用いたコンディショニングの必要性が示唆され

た。

次に、ダイオキシン類分析で一般的に常用されている活性炭カラムと CuPc シリカカラムとの溶出挙動を比較するために、CuPc シリカと同量の活性炭分散シリカゲルを使用して分画を行った。その結果、mono-ortho PCBs は25%ジクロロメタン/ヘキサン12mℓ程度で溶出したが、PCDD/Fs および non-ortho PCBs はトルエン

30mℓを展開しても10~20%程度がカラムに残存しており、CuPc シリカと同量の活性炭分散シリカゲルでは PCDD/Fs および non-ortho PCBs の溶出にはより多くのトルエンが必要とされた (Fig. 3)。通常の活性炭カラムでは、1g を用いるため、溶出液はさらに多い。以上のように、CuPc シリカカラムは、ダイオキシン類の分画においては、活性炭カラムより優れていた。

Fig. 1 Molecular structure of copper phthalocyanine bound silica gel

3. 2 実試料への適用

実試料について、硫酸含浸けい藻土カラムおよび簡略化多層シリカゲルカラムから成る精製カラムを連結したCuPc シリカカラムで処理したものと、“ダイオキシン類に係る土壌調査測定マニュアル”¹⁰⁾ (以下公定法) に従って分析したものとを比較した結果を Table 2 に示す。本法により得られた各異性体・同族体の TEQ 値は公定法の値と良く一致した。また、処理を行った3試料について、すべての異性体に関する CV % は10%以下であり、安定した再現性を示した。以上の結果から、CuPc シリカカラムを用いた方法は、活性炭カラムを用いた方法よりも溶媒量が少量であり、活性炭カラムでは必須となっているジクロロメタンを全く使用せずにヘキサンとトルエンのみで短時間で前処理を行うことが可能であったことから、ダイオキシン類分析の前処理の迅速化として効果的であることが確認された。

4. まとめ

ダイオキシン類分析における前処理の迅速化を目的に、芳香族環状化合物の CuPc シリカを用いた分画試験について検討した。CuPc を用いて、TEF の設定されている17種の PCDD/Fs および12種の DL-PCBs について分画を行った結果、mono-ortho PCBs は15mℓのヘキサンで溶出し、PCDD/Fs および non-ortho PCBs は5mℓのトルエンで溶出することが確認された。また、ヘキサンは100mℓまで展開しても、PCDD/Fs および non-ortho PCBs は溶出しなかった。硫酸含浸けい藻土カラムと簡略化多層シリカゲルカラムを CuPc シリカカラムと連結して土壌試料のクリーンアップを行った結果、測定結果の再現性はすべての異性体において CV % は10%以下であり、本法により得られた各同族体・異性体の TEQ 値は、公定法の“ダイオキシン類に係る土壌調査測定マニュアル”に従って分析した場合の TEQ 値と良く一致した。

以上の結果から、ダイオキシン類分析における迅速処

Fig. 2 Schematic design on sequential connections of sulfuric acid immersed diatomite column, simplified multilayer silica gel column, and copper phthalocyanine bound silica gel column

理法として、CuPc シリカカラムが有効な処理方法であることが実証された。

要 約

銅フタロシアニン化学結合シリカゲルの平面構造を有する有機化合物に対する選択的吸着能に着目し、環境試料中のダイオキシン類分析におけるクリーンアップカラムとして、溶出条件の最適化と迅速化に関する検討を行った。その結果、mono-ortho PCBs を含む平面性の低い化合物は15mℓのヘキサンで溶出し、non-ortho PCBs 及び PCDD/Fs はそれに続く 5 mℓ のトルエンで溶出できることを確認した。この処理に先立って、カラムクリーンアップを行うことにより、従来法と同等の効果が得られ、かつ極めて迅速なクリーンアップ方法となることがわかった。

文 献

- 1) 日本工業規格、排ガス中のダイオキシン類の測定方法, JIS K 0311 (2005)
- 2) 日本工業規格、工業用水・工場排水中のダイオキシン類の測定方法, JIS K 0312 (2005)
- 3) Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H. and Arimoto, S.: Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine, *Mutat. Res.*, **119**, 233-238 (1983)
- 4) Bartsch, H.: Blue rayon, *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1408 (1992)
- 5) Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., Rolaf van Leeuwen, F.X., Dijen Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M.,

Table 1 Measurement condition of SCLV-GC/MS for PCDD/Fs and DL-PCBs

GC	Agilent 6890N	
Referent	<u>Tetra-Octa CDD/Fs</u>	
Column	SGE BPX-Dioxin I, 30m, 0.15mm I.D.	
Rate	160°C(1.1min)→(50°C/min)→260°C(13min)→(60°C/min)→200°C(2min) →(3°C/min)→265°C→(10°C/min)→300°C(5min)	
Pressure	Injection	449kPa(1.1min)→(478kPa)→688kPa(14.5min)→(365kPa)→323kPa(2min) →(4.7kPa/min)→442kPa(5min)
	Auxiliary#3	455kPa(1.1min)→(450kPa)→680kPa(14.5min)→(380kPa)→300kPa(2min) →(5.6kPa/min)→440kPa(5min)
	Auxiliary#5	424kPa(1.1min)→(568kPa)→140kPa(14.5min)→(158kPa)→298kPa(2min) →(5.5kPa/min)→436kPa(5min)
Inlet	Splitless, 280°C	
Referent	<u>Penta-Hexa CDD/Fs, DL-PCBs</u>	
Column	SGE BPX-Dioxin II, 30m, 0.15mm I.D.	
Rate	160°C(1.1min)→(50°C/min)→260°C(11min)→(2°C/min)→300°C(5min)	
Pressure	Injection	449kPa(1.1min)→(478kPa)→688kPa(9.5min)→(365kPa)→323kPa(2min) →(4.7kPa/min)→442kPa(5min)
	Auxiliary#3	455kPa(1.1min)→(450kPa)→680kPa(9.5min)→(380kPa)→300kPa(2min) →(5.6kPa/min)→440kPa(5min)
	Auxiliary#5	424kPa(1.1min)→(568kPa)→140kPa(9.5min)→(158kPa)→298kPa(2min) →(5.5kPa/min)→436kPa(5min)
Inlet	Splitless, 280°C	
MS	micromass AutoSpec Ultima NT	
Ionization Mode	EI	
Source Temp.	300°C	
Resolution	>10000	
Ionization Current	500 μA	
Detector Voltage	350V	

Younes, M., Wærn, E. and Zacharewski, T.: Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health. Perspect.*, **106**, 775-792 (1998)

- 6) 環境省環境管理局総務課環境管理技術室：平成16年度環境測定分析精度管理調査結果（本編），平成17年6月（2005）
- 7) 亀田 洋，松本幸一郎，江崎達哉，藤井大将，大橋 眞，塩崎卓哉：BPX-Dioxin I及びBPX-Dioxin

II キヤピラリーカラムによるダイオキシン類測定 of 効率化に関する検討，日本環境衛生センター所報，**31**，58-65（2004）

- 8) 亀田 洋，松本幸一郎，江崎達哉，藤井大将，大橋 眞，塩崎卓哉：ソルベントカット大量注入法（SCLV）を用いたダイオキシン類測定 of 効率化に関する検討，第7回日本水環境学会シンポジウム講演集，206-207（2004）
- 9) 亀田 洋，松本幸一郎，江崎達哉，藤井大将，大

Fig. 3 Elution pattern of PCDD/Fs and DL-PCBs with copper phthalocyanine bound silica gel (A) and active carbon-dispersed silica gel (B)

橋 眞, 塩崎卓哉: ソルベントカット大量注入法
(SCLV) における OCDD 及び OCDF の分解の抑制に
関する検討, 第14回環境化学討論会講演要旨集,

374-375 (2005)

10) 環境庁水質保全局土壌農薬課, ダイオキシン類に係
る土壌調査測定マニュアル 平成12年1月 (1999)

Table 2 Replicatability by present procedure using CuPc column treatment (Soil sample)

Compounds	Pc-1	Pc-2	Pc-3	CV%	Mean	Standard Method*
1,3,6,8-TeCDD	45	41	46	6.0	44	41
1,3,7,9-TeCDD	23	21	22	4.5	22	21
2,3,7,8-TeCDD	0.95	0.92	1	4.2	0.96	0.99
1,2,3,7,8-PeCDD	8.6	8.3	8.1	3.0	8.3	8.6
1,2,3,4,7,8-HxCDD	12	12	12	0	12	11
1,2,3,6,7,8-HxCDD	21	19	22	7.4	21	20
1,2,3,7,8,9-HxCDD	19	20	18	5.3	19	19
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	240	240	240	0	240	220
OCDD	3,700	3,800	3,800	1.5	3,800	3,800
1,2,7,8-TeCDF	7.1	7.1	7.0	0.82	7.1	7.2
2,3,7,8-TeCDF	6.7	6.9	6.8	1.5	6.8	6.8
1,2,3,7,8-PeCDF	9.9	10	9.4	3.3	9.8	9.6
2,3,4,7,8-PeCDF	12	11	11	5.1	11	12
1,2,3,4,7,8-HxCDF	18	18	17	3.3	18	17
1,2,3,6,7,8-HxCDF	20	21	21	2.8	21	20
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.1	(1.0)	(1.1)	5.4	1.1	1.2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	25	25	26	2.3	25	26
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	130	120	120	4.7	120	120
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	16	14	16	7.5	15	14
OCDF	220	210	220	2.7	217	210
TeCDDs	98	92	97	3.4	96	91
PeCDDs	110	100	100	5.6	100	110
HxCDDs	210	210	210	0	210	200
HpCDDs	460	450	450	1.3	450	410
OCDD	3,700	3,800	3,800	1.5	3,800	3,800
Total PCDDs	4,600	4,700	4,600	1.2	4,600	4,600
TeCDFs	150	140	150	3.9	150	150
PeCDFs	190	190	190	0	190	200
HxCDFs	230	240	230	2.5	230	230
HpCDFs	270	250	270	4.4	260	250
OCDF	220	210	220	2.7	220	210
Total PCDFs	1,100	1,000	1,100	5.4	1,100	1,000
Total (PCDDs + PCDFs)	5,700	5,700	5,700	0	5,700	5,600
3,4,4',5'-TeCB (#81)	2.8	2.8	2.7	2.1	2.8	3
3,3',4,4'-TeCB (#77)	41	40	40	1.4	40	43
3,3',4,4',5'-PeCB (#126)	17	16	16	3.5	16	17
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	4.9	4.8	5.2	4.2	5.0	4.9
Total non-ortho PCBs	65	63	64	1.6	64	69
2',3,4,4',5'-PeCB (#123)	11	12	11	5.1	11	11
2,3',4,4',5'-PeCB (#118)	240	240	240	0	240	230
2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	120	130	120	4.7	120	120
2,3,4,4',5'-PeCB (#114)	5.4	5.4	5.4	0	5.4	5.3
2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	42	40	42	2.8	41	34
2,3,3',4,4',5'-HxCB (#156)	68	68	68	0	68	69
2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	26	28	28	4.2	27	25
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	12	11	10	9.1	11	10
Total mono-ortho PCBs	530	530	520	1.1	530	500
Total DL-PCBs	600	590	590	1.0	590	570
Total TEQ(PCDDs+PCDFs+DL-PCBs)	34	33	34	1.7	34	34

*: "Manual for the Survey and Measurement of Dioxins in Soil" method