完全クロル化法による塩化ビフェニルの定量

(昭和 47 年 5 月 4 日受理)

水谷 民雄* 松本 正義*

Determination of Polychlorinated Biphenyls by Exhaustive Chlorination Method

Tamio MIZUTANI and Masayoshi MATSUMOTO

(Kyoto City Institute of Public Health: 1-2, Mibu Higashitakada-cho, Nakakyo-ku, Kyoto)

Technique to determine residual polychlorinated biphenyls (PCBs) has been complicated by the fact that PCBs are not single compound, but complex mixtures of isomers having various degrees of chlorination.

A method is described for the determination of PCBs through exhaustive chlorination. The procedure is as follows.

1. Approximately 1 μ g of the ordinarily cleaned-up sample of PCBs is treated with 0.5 ml of antimony pentachloride at 220°C for 2 hours in a sealed glass tube.

No prior separation of PCBs from DDE is required.

2. Decachlorobiphenyl formed is taken up into 20 ml of benzene, and the solution is washed successively with 30% hydrochloric acid, 10% tartaric acid solution and water, dried by passing through micro-column packed with 1 g of silica gel containing 5% water, and concentrated under stream of dry air.

3. Decachlorobiphenyl is analysed by gas-liquid chromatography with electron capture detector by using liquid phases such as DEGS-PA and OV-1.

At levels higher than 1 μ g, the described procedure gives almost quantitative yield of decachlorobiphenyl.

By this method total PCBs can be determined unequivocally as decachlorobiphenyl equivalent. Therefore, on assuming that residual PCBs constantly contain 50% chlorine, estimation of the amount of PCBs originally present can also be made with an error of up to 25%, because the chlorine contents of the common commercial PCBs preparations varies exclusively between 40 and 60%.

(Received May 4, 1972)

1. ま え が き

塩化ビフェニル (PCB) の残留分析は一般に電子捕獲型検出器 (ECD) を付したガスクロマトグラフを用いて行なわれている。しかし PCB は置換の数と位置が異なる多数の塩化ビフェニルの混合物であるので、ガスクロマトグラフィーによってその定量を行なうためには、原理的にはその個々の成分を単品として入手しこれを標準品とする必要がある。

しかしながら PCB を構成するすべての成分を単一に得ることは実際上不可能であるため、従来報告では多くの場合試料抽出物のクロマトグラムと近似的なパター

ンを示す適当な市販 PCB の銘柄の 1 つを標準品として選び一定の定義に基づいて算出した値が定量値として採用されている。たとえば Holden¹⁾, Koeman²⁾ は 1 つないし複数のピーク高の和を基準とし、Presst³⁾, Armour⁴⁾ はピーク面積の総和を基準として定量値を算出している。また Reisebrough⁵⁾ は PCB の各ピーク高の総和に相当する DDE の量を算出したのち、この値に微量電量滴定型検出器による測定で得た係数をかけて補正した数値を PCB の定量値としている。

これらの定量法はいずれも PCB の各成分が ECD に対して同一の感度を有するものとの前提に立ってみかけの定量値を算出する方法である。しかし、実際は Zitko

* 京都市衛生研究所: 京都市中京区壬生東高田町 1-2

ら⁶⁾の報告からも一部明らかなように、塩化ビフェニル類の ECD に対する感度はその構造の相違に従って相当の幅をもって変動することが知られており、これらの方法によって得た値が時として相当過大な誤差を伴うことは避けられない。またこれらの方法では真値との関係を別としても、標準品の選定、ガスクロマトグラフィーの条件の変動などに伴ってみかけの値自体が少なからず変動するため、異なった測定者のもとで得られたデータの比較が困難となっている。

また以上の方法とは別の試みとして、Rote ら⁷⁾は PCB の各成分の ECD に対する感度がその置換塩素数に支配されるとの仮定のもとに、置換塩素数の異なる塩化ビフェニルごとの平均的な感度を算出し、この値に基づいて各ピークごとに定量を行なっている。しかし、この方法ではガスクロマトグラフ質量分析計を用いて各ピークの置換塩素数を知る必要があり、ルーチン分析法としては適当でないと考えられる。

そこで著者は、Weber ら⁸⁾がビフェニルに五塩化アンチモンを作用させてデカクロルビフェニルを合成していることに着目し、この反応を PCB に適用してその各成分を一挙にデカクロルビフェニルに変換した後、これを ECD 付きガスクロマトグラフによって定量する方法について検討し、知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2-1. 試薬および装置

2-1-1. 試薬

n-ヘキサン：残留農薬試験用

ベンゼン：特級品を濃硫酸、水、10% 水酸化ナトリウム溶液および水を用いて順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、蒸留して使用した。

五塩化アンチモン：化学用 丸若化学工業製品

塩酸および酒石酸：特級品

5% 含水シリカゲル：Merck 社製 カラムクロマトグラフィー用シリカゲル (70-325 メッシュ) をエーテルで十分洗浄し、120°、2 時間乾燥した後 5% の水を加え約 30 分間振とうして全体を均質として使用した。

カネクロール 300 (KC-300)、カネクロール 400 (KC-400)、カネクロール 500 (KC-500) およびカネクロール 600 (KC-600)：鐘淵化学工業製品

デカクロルビフェニル：Weber ら⁸⁾の方法によって合成し、ベンゼンからの再結晶をくりかえして精製した。mp 310~312°。

元素分析 実験値：C, 29.08; H, 0.00; Cl, 71.00 理論値 (C₁₂Cl₁₀)：C, 28.90; H, 0.00; Cl, 71.10

ECD 付きガスクロマトグラフィーで単一のピークを

Fig. 1. Solvent evaporation apparatus

Table 1. Gas Chromatographic Conditions for Detection of Decachlorobiphenyl

Stationary phase and support	I	II
	2-0.3% DEGS-PA on 60-80 mesh Chromosorb W	1% OV-1 on 60-80 mesh Chromosorb W
Column size, cm	0.3×200	0.3×200
Temperature, °C		
Column	200	210
Inlet	220	220
Detector	220	220
Carrier gas	N ₂	N ₂
Flow rate, kg/cm ²	1.5	2.0

示した。

2-1-2. 装 置

ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-5 APE
ブロックヒーター：宮本理研製微量蒸留昇華装置
溶媒除去装置：Fig. 1 に示す装置を用いた。

2-2. 完全クロル化

直径 0.8 cm, 長さ 25 cm の一端を封じたバイレックスガラス管にカネクロール標準溶液 (*n*-ヘキサン) もしくはクリーンアップした試料抽出 PCB 溶液 (*n*-ヘキサン) の一定量 (1 ml 以下) を注入し, Fig. 1 に示す装置によって約 50° に加熱しながらおだやかに乾燥空気を吹きこんで溶媒を除いた。

五塩化アンチモン 0.5 ml を加えた後ガラス管の開口端をガスバーナーで加熱し溶閉, ついで管全体をブロックヒーター または 恒温乾燥器で 220°, 2 時間加熱した後室温まで冷却した。

2-3. デカクロルビフェニルの抽出

2-3-1. 方法 1

ガラス封管を注意して開き, 内容物をベンゼン 50 ml を用いて 100 ml 分液ロートに洗いこんだ。ベンゼン層を 30% 塩酸 30 ml, 10% 酒石酸溶液 25 ml ずつ 2 回および水 25 ml で順次洗浄した後無水硫酸ナトリウムで乾燥し, Kuderna-Danish 濃縮器で必要な容量となるまで濃縮してガスクロマトグラフィーの検液とした。

2-3-2. 方法 2

ガラス封管を注意して開き, 内容物をベンゼン 20 ml を用いて 50 ml 分液ロートに洗いこみ, ベンゼン溶液を 30% 塩酸 20 ml, 10% 酒石酸溶液 20 ml ずつ 2 回および水 20 ml で順次洗浄した。ベンゼン溶液を分液ロートの脚部から流出させ 5% 含水シリカゲル 1 g を充てんしたガラスカラム (0.8 cm × 30 cm, コックなし) を通過させ, さらにベンゼン 8 ml を用いて分液ロートおよびカラムを洗浄した後, カラム流出液を約 50° に加熱しながら乾燥空気を吹きこんで必要な容量となるまで濃縮, ガスクロマトグラフィーの検液とした。

2-4. ガスクロマトグラフィー

デカクロルビフェニルのガスクロマトグラフィーは Table 1 に示す条件のもとに行なった。

また定量はピーク高法による絶対検量線法に基づいて行なった。

3. 実験結果

3-1. 反応条件の検討

カネクロールの各銘柄をそれぞれ 5 μg について ① 180°, 2 時間 ② 180°, 6 時間 ③ 200°, 2 時間 ④ 200°, 6 時間 ⑤ 220°, 1 時間 ⑥ 220°, 6 時間の反応条件を設定し, 2-2 にかかげた方法で五塩化アンチモンによるクロル化反応を行ない, 2-3-1 の方法で抽出した後, 反応の進行状況をガスクロマトグラフィーによって追跡した。

KC-400 について検討した結果を Fig. 2 に示す。すなわち反応条件①～③においてはデカクロルビフェニル標準品と一致するピークのほかになお 1 本の副ピークが存在するが, 反応条件④および⑤においてピークはただ 1 本となり反応が完結したことが明らかである。さらに反応条件⑥においてもピーク高の減少などは認められず, 反応によって生成したデカクロルビフェニルが安定であることを示している。

以上の実験により PCB の完全クロル化は 200° においてはかなり長時間を要するが, 220° では速やかに完結し, しかも反応生成物が安定であることを確認できたので以後の実験は 220° で行なうこととした。またこの温度で反応を行なう時は 1 時間以上 6 時間までの加熱によって得られる結果はまったく同一であるが, ここでは加熱時間を 2 時間と定めて実験を行なうこととした。

KC-400 以外のカネクロールもさきの各反応条件のもとで KC-400 とほぼ同一の挙動を示すことから塩素置換数による反応性の難易を考慮する必要はないものと思われる。したがって以後の実験は, KC-300 から KC-600 に至る各銘柄の組成成分を代表するものとして KC-400 を選び, これについて行なった。

Fig. 2. Chromatograms, on DEGS-PA column, of decachlorobiphenyl and products resulted from reacting KC-400 with SbCl_5 under various conditions: 1, 180°C/2 hr; 2, 180°C/6 hr; 3, 200°C/2 hr; 4, 200°C/6 hr; 5, 220°C/1 hr; 6, 220°C/6 hr

3-2. デカクロルビフェニル抽出操作法の検討

2-2 の反応によって生成したデカクロルビフェニルを反応溶液から抽出する際、デカクロルビフェニルの溶解度、五塩化アンチモンとの相溶性などを考慮して、溶媒としてはベンゼンを用いるのが適当であると判断した。

ベンゼンの使用量、抽出後のベンゼンの乾燥法および除去法をかえた2つの方法(2-3-1 方法1 および 2-3-2 方法2)を設定し、それぞれの方法で KC-400 の 5 μ g, 1 μ g および 0.5 μ g の反応液の抽出をくりかえして行ない、得られたデカクロルビフェニルを2-4の方法で定量し、クロル化反応と抽出操作を一括した回収率を求めた (Table 2)。

なお実験に用いた KC-400 の塩素含量を元素分析によって測定したところ、表示された組成(平均塩素数=4)とはほぼ一致する値を得た (Table 3) ので、Table 2 に示した回収率の計算は簡便のため表示組成をベースと

Table 2. Recovery Data for Exhaustive Chlorination Method

Method 1.

KC-400 added (μ g)	Exp.	Decachlorobiphenyl	
		Found (μ g)	Recovery (%)
5.0	1.	8.31	97
	2.	8.13	95
	3.	8.30	97
	4.	8.40	98
	5.	8.15	95
1.0	Theoretical Mean	8.55	96
	Std. dev.		± 1.4
	1.	1.54	90
	2.	1.52	89
	3.	1.45	85
	4.	1.42	83
	5.	1.48	87
0.5	Theoretical Mean	1.71	87
	Std. dev.		± 2.9
	1.	0.59	69
	2.	0.55	64
	3.	0.75	87
	4.	0.53	62
	5.	0.59	69
	Theoretical Mean	0.86	70
	Std. dev.		± 9.9

Table 2. (Continued)

Method 2.

KC-400 added (μ g)	Exp.	Decachlorobiphenyl	
		Found (μ g)	Recovery (%)
5.0	1.	8.20	96
	2.	8.38	98
	3.	8.03	94
	4.	8.20	96
	5.	8.35	98
1.0	Theoretical Mean	8.55	96
	Std. dev.		± 1.7
	1.	1.67	98
	2.	1.68	98
	3.	1.60	94
	4.	1.64	96
0.5	Theoretical Mean	1.71	97
	Std. dev.		± 1.8
	1.	0.82	96
	2.	0.80	94
	3.	0.74	86
	4.	0.79	92
	5.	0.77	90
	Theoretical Mean	0.86	92
	Std. dev.		± 3.9

Table 3. Chlorine Contents of Commercial PCBs Preparations

	n*	Cl (%)	
		Calcd. for $C_{12}H_{10-n}Cl_n$	Found
KC-300	3	41.30	43.08 43.08
KC-400	4	48.57	48.80 48.70
KC-500	5	54.30	55.70 55.79
KC-600	6	58.96	60.84 60.64

*n average number of chlorine atoms per molecule according to the catalog

して行なった。

2つの方法の結果の比較から、回収率の低下は主として抽出操作の過程で生じ、クロル化反応自体はほぼ定量的に進行しているものと考えられる。

方法2においてもベンゼン溶液の乾燥に際して、5%含水シリカゲルカラムにかわって無水硫酸ナトリウムのカラムを使用すると、時として回収率の著しい低下が認められた。

以上の検討の結果、2-2の方法に続いて2-3-2の方法に従うとき、1 μ g以上のPCBを良好な再現性のもとに、ほぼ定量的にデカクロルビフェニルに変換しうることが明らかとなった。

3-3. ガスクロマトグラフィー

デカクロルビフェニルの分析にあたって、2-4にあげたカラム液相のほかにSE-30、DC-11およびOV-17などのカラムについても検討を行なったが、一般に無極性カラムでは保持時間が長く分析に時間がかかるとともに、ピークの尖鋭度が低下しピーク高法による定量には必ずしも適当ではない。この点を考慮して定量には主としてDEGS-PAを用い補助的にOV-1を使用するのが望ましいとした。

2-4の条件でのデカクロルビフェニルの相対保持時間(DDE=1)をTable 4に示した。

これらの条件のもとでPCBの各成分ピークとデカクロルビフェニルのピークとは完全な分離を示すため、仮に未反応の成分ピークが存在しても、これらとの混同のおそれはない(Fig. 3)。

またこれらの条件のもとでデカクロルビフェニルは絶対検量線法(ピーク高法)においてほぼ0.2~1.0 ngの範囲内で直線性を示した(Fig. 4)。

3-4. 共存物質の影響

実際試料中のPCBの分析にあたって共存する有機塩素農薬との分離が種々の方法⁴⁾⁹⁾¹⁰⁾によって試みられているが、一般にDDEとPCBとの分離がもっとも困難であるとされている。そこで試料中にDDEが共存する場合を予想して五塩化アンチモンによる完全クロル化反応に際してDDEがどのような挙動をとるかを検討した。

その結果DDEからの生成物はTable 4に示したように各条件下で3本のピークを与えるが、いずれのピークもデカクロルビフェニルのピークとは完全な分離を示し、その定量を妨げるおそれはない。

さらに各種試料に固有の成分が完全クロル化反応に際して妨害物質を生成することがないかどうかを検討する目的で、各種の魚および野鳥、牛肉、人体組織などからn-ヘキサンで抽出した脂肪について①Holdenら¹⁰⁾のドライカラム法②厚生省PCB分析研究班予試験法¹¹⁾③同本試験法¹¹⁾によるクリーンアップを行ない、得られた試料に対して本法を適用した。その結果一部の試料については溶媒ピークにひき続く若干のテーリ

ングが観察されたが、いずれの場合もデカクロルビフェニルの定量の妨害となるような生成物はまったく認められなかった。

Table 4. Retention Times, Relative to DDE, of Decachlorobiphenyl and Products Resulted from Reacting DDE with SbCl₅

	Decachlorobiphenyl	Products from DDE		
DEGS-PA 200°C	3.5	14	22	28
OV-1 210°C	6.8	17	29	36

Fig. 3. Chromatograms of KC-600 before (A) and after (B) treatment with SbCl₅ on DEGS-PA column

Fig. 4. Typical recording of recorder response at various amounts of decachlorobiphenyl

4. 考 察

本法を実際試料に適用して得られる値は試料中の PCB の量を等モルのデカクロルビフェニルとして表現したものとなり、もとの PCB の量を算出するためにはデカクロルビフェニルに変換する前の試料クロマトグラムパターンをカネクロール標準品のそれと対比して、その近似的な組成（平均塩素含量）を知る必要がある。

しかし一般に使用されている市販 PCB の組成はその平均塩素含量にして40～60%の範囲のものに限られているため、上記の手順を省略し仮に PCB の組成を一律に平均塩素含量にして50%とみなして計算を行なったとしても、この仮定から生じる最大の誤差は25%どまりである。

まえがきに述べたピーク高やピーク面積を基準とする従来の数値算出法で得られる値が1/2～2倍の範囲内でしか信頼しえないものとみなされている¹²⁾のに比し、本法ではより正確な定量値を一義的に求める特徴がある。

なお本法によれば試料中にビフェニルが共存した場合は正の誤差をまねくことになる。しかしビフェニルはラット¹³⁾やウサギ¹⁴⁾の体内では相当はやい速度で代謝されて4-ヒドロキシビフェニルなどの極性化合物に変化することが知られており、したがって少なくとも動物性試料に対して本法を適用する場合にはビフェニルの残留性蓄積を考慮する必要はないものと考えられる。またこの推定はマウス¹⁵⁾やラット¹⁶⁾に対する PCB の投与実験において、ビフェニルに比して代謝をうけにくいとされている塩化ビフェニルですら塩素数の低い誘導体は急速に

代謝される事実によっても支持される。

5. ま と め

PCB に対して徹底的なクロル化反応を行ない、生成したデカクロルビフェニルをガスクロマトグラフィーによって定量する方法について検討を行なった。

1. ガラス封管中で五塩化アンチモンと220°, 2時間加熱し反応液をベンゼンで抽出することにより、1 μg 以上の PCB をほぼ定量的にデカクロルビフェニルに変換することができる。

2. 生成したデカクロルビフェニルは DEGS-PA, OV-1 などのカラムを用いたガスクロマトグラフィーによって定量することができる。

3. 本法は通常の方法でクリーンアップした実際試料に対して適用しうる。また DDE の共存は妨害とならない。

4. 本法によって試料中の PCB の量に対応するデカクロルビフェニルの量を一義的に求めることができる。また試料中の PCB の塩素含有率を一律に50%と仮定するとき、もとの PCB の量を最大誤差25%の範囲内で算出することができる。

終りにのぞみ元素分析を行なって頂いた京都大学元素分析センターの諸氏に謝意を表します。

本研究は厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班による分析方法に関する研究の一環として行なったものである。

本報の要旨は日本薬学会第92年会（1972年4月）において発表した。

文 献

- 1) Holden, A. V.: Monitoring Organochlorine Contamination of the Marine Environment by the Analysis of Residues in Seals (Proceedings of FAO Technical Conference on Marine Pollution and its Effects on Living Resources and Fishing, Rome, Italy, 1970).
- 2) Koeman, J. H., Ten Noever De Brauw, M. C., De Vos, R. H.: *Nature* **221**, 1126 (1969).
- 3) Presst, I., Jefferies, D. J., Moore, N. W.: *Environmental Pollution* **1**, 3 (1970).
- 4) Armour, J. A., Burke, J. A.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **53**, 761 (1970).
- 5) Risebrough, R. W., Rieche, P., Peakall, D. B., Herman, S. G., Kirven, M. N.: *Nature* **220**, 1098 (1968).
- 6) Zitko, V., Hutzinger, O., Safe, S.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **6**, 160 (1971).
- 7) Rote, J. W., Murphy, P. G.: *Bull. ibid.* **6**, 377 (1971).
- 8) Weber, A., Söllscher, C.: *Ber.* **16**, 882 (1883).
- 9) Reynolds, L. M.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **4**, 128 (1969).
- 10) Holden, A. V., Marsden, K.: *J. Chromatog.* **44**, 481 (1969).
- 11) 厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班: 食品衛生研究 **22**, 238 (1972).
- 12) Edwards, R.: *Chem. & Ind.* 1340 (1971).
- 13) West, H. D., Lawson, J. R., Miller, I. H., Mathura, G. R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 14 (1956).
- 14) Block, W. D., Cornish, H. H.: *J. Biol. Chem.* **234**, 3301 (1959).
- 15) 吉村英敏, 大島美奈子: 福岡医誌. **62**, 5 (1971).
- 16) Grant, D. L., Phillips, W. E. J., Villeneuve, D. C.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **6**, 102 (1971).