完全塩素化法による塩化ジベンゾジオキシン および塩化ジベンゾフランの定量

(昭和 51 年 8 月 9 日受理)

増田 義人^{*1} 香川 梨絵^{*1} 倉恒 匡徳^{*2}

Determination of Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans by Exhaustive Chlorination Method

Yoshito MASUDA, Rie KAGAWA and Masanori KURATSUNE

(^{*1}Daiichi College of Pharmaceutical Sciences: 93 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka;

^{*2}Faculty of Medicine, Kyushu University: 1-1, Maidashi 3-chome, Higashi-ku, Fukuoka)

A method of quantitative determination of minute amount of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) and polychlorinated dibenzofurans (PCDF), complex mixtures of isomers, was described. PCDD and PCDF (1~10 μ g) were exhaustively chlorinated to octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) and octachlorodibenzofuran (OCDF) by heating with perchlorinating agent at 68~69°C for 2 hours. The perchlorinated compounds were quantitated by gas chromatography equipped with an electron capture detector using XE-60 as a liquid phase. Yields of perchlorinated compounds from dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran both having two or more chlorine atoms were more than 75%, while from those having no or one chlorine were 4~16%. This method was also applicable to quantitation of polychlorinated biphenyls.

By this perchlorination method, the contents of PCDD and PCDF in pesticide PCP, Kanechlor (KC) and Yusho oil were determined. From two brands of PCP, 430 and 0.6 μ g/g of OCDD and 290 and 1.3 μ g/g of OCDF were quantitated, respectively. Only PCDF were detected in KC-300, KC-400, KC-500, KC-600 and Yusho oil (3 samples), and their estimated contents calculated from the amounts of OCDF produced were 1.5, 16.6, 2.5, 2.7 and 4.9 μ g/g, respectively.

(Received August 9, 1976)

緒 言

ポリ塩化ジベンゾジオキシン (PCDD) およびポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) はポリ塩化ビフェニル (PCB) に比べて非常に毒性が強い化合物である^{1)~4)}。したがって、もしこれらの化合物が生活環境に存在するとすれば、特に注意すべき問題である。欧米においては、この PCDD および PCDF が塩素系農薬や PCB 製品の中に不純物として含まれていると報告されており^{5)~11)}、また、油症の病因に PCDF が関与しているのではないかと指摘もされている¹²⁾。しかし、日本においては、カネクロール (KC) 中に PCDF が検出されたとの報告はある^{13)~14)}が、農薬や PCB 製品および油症患者が使用し

た油 (油症油) についての PCDD および PCDF の定量はほとんど行われていない。PCDD および PCDF は塩素数およびその結合位置の違いにより種々の異性体があり、現在そのすべての異性体の標準品が得られるわけではないので、定量に際して数値化に困難を生じることがある。そこで、我々は PCDD および PCDF を完全塩素化し、octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) および octachlorodibenzofuran (OCDF) のそれぞれ単一化合物に変え、PCDD および PCDF の総量として定量する方法を検討し、この方法により、日本で製造された農薬 pentachlorophenol (PCP), KC および油症油に含まれる PCDD および PCDF を定量したので報告する。また、この方法で PCB を decachlorobiphenyl (DCB) として定量することも可能である。

^{*1} 第一薬科大学: 福岡市南区玉川町93

^{*2} 九州大学医学部: 福岡市東区馬出3-1-1

実験方法

1. 測定機器

1) ガスクロマトグラフ (ECD-GC) は(株)島津製作所製 GC-5A, カラム: ガラス管 3 mm×2 m, 固定相: 5% SE-30 または 3% XE-60 をクロモソルブ WAW-DMCS (60~80 メッシュ) にコーティング, 気化室温度: 250°, カラム温度: 230°, 検出器温度: 250°, 検出器: ⁶³Ni 電子捕獲型, キャリヤーガス: 超高純度窒素 35 ml/min.

2) ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC-MS) は日本電子(株)製 D-100, カラム: ガラス管 2 mm×1 m, 固定相: 3% OV-1 をクロモソルブ WAW-DMCS (100~120 メッシュ) にコーティング, カラム温度: 180°, エンリッチャー温度: 200°, キャリヤーガス: ヘリウム 30 ml/min, イオン化電圧: 25 eV.

2. 試薬

1) 試薬はいずれも特級, 溶媒は特級または蒸留により精製したものを使用.

2) 完全塩素化試薬 (BMC 試薬¹⁵⁾). A: 一塩化イオウ 5 g を塩化スルフル 500 ml に溶かす, B: 無水塩化アルミニウム 2.5 g を塩化スルフル 500 ml に溶かす. A および B の新しく調製した溶液を等量混和して使用.

3) 標準化合物. dibenzo-*p*-dioxin (DD) (K & K 社) ベンゼン・メタノールで再結晶, dibenzofuran (DF) (東京化成(株)製) ベンゼン・メタノールで再結晶, 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 富田らの方法¹⁶⁾に従い合成した. 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin, 2, 7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin, 3, 6-dichlorodibenzofuran (DCDF), OCDD, OCDF および DCB はいずれも米国 Analabs 社より純度99%のものを購入した.

4) 活性アルミナ. カラムクロマトグラフィー用, 約 300 メッシュ (和光純薬(株)製)を150°で3時間加熱した後使用.

3. 試料

1) PCP: 国産の A, B 2 種類, いずれもナトリウム塩, A はフェノールを塩素化して製造, B はヘキサクロベンゼンを水酸化ナトリウムで処理して製造したものである.

2) PCB 試料: 鐘淵化学工業(株)製, KC-300, KC-400, KC-500 および KC-600 を使用.

3) 油症油: 3 家族より集めた 3 検体を使用.

4. 試料から PCDD および PCDF の分離

1) PCP から PCDD および PCDF の分離は Firestone ら⁶⁾ および Woolson ら⁷⁾ の方法を応用して行った. すなわち, 試料 3 g を 1N 水酸化ナトリウム溶液に溶かし, *n*-ヘキサンで抽出した. *n*-ヘキサン抽出物をアルミナ (15 g) のカラムクロマトグラフィーにかけ, ① *n*-ヘキサン 100 ml, ② エーテル-*n*-ヘキサン (1:19)

50 ml, ③ エーテル-*n*-ヘキサン (1:3) 100 ml および ④ エーテル 100 ml で順次溶出させた. フラクション③および④の全量を合して KD 濃縮器で濃縮した後, *n*-ヘキサン 20 ml に溶かし, 硫酸 5 ml を加えて振とうした. *n*-ヘキサン層を分取し, 硫酸を *n*-ヘキサン 10 ml で洗浄し, 洗液は, 初めの *n*-ヘキサンと合せ, これを炭酸水素ナトリウムおよび無水硫酸ナトリウム (各 10 g) をつめたカラム (径 2 cm) を通して脱水した後, 濃縮し, 一部はそのまま, また, 他の一部は完全塩素化の方法に従って塩素化してから GC-MS および ECD-GC に供した.

2) KC および油症油から PCDD および PCDF の分離は長山らの方法^{17),18)}に従って行った. 油症油 (5~10 g) は 1N 水酸化ナトリウムエタノール溶液 150 ml に溶かし, 還流冷却器をつけて, 水浴上で1時間加熱した. 冷後, この溶液に水 75 ml を加えてよくかきまぜた後 *n*-ヘキサン 100 ml ずつで3回抽出した. *n*-ヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウム (10 g) のカラムに通して乾燥した後, KD 濃縮器で濃縮し, 約 5 ml とした. この *n*-ヘキサン濃縮液, またはいずれかの KC (0.5 g) の *n*-ヘキサン溶液 (5 ml) をアルミナ (5 g) のカラムクロマトグラフィーにかけ, ① 四塩化炭素-*n*-ヘキサン (1:4) 120 ml, ② *n*-ヘキサン 10 ml, および ③ 二塩化メチレン-*n*-ヘキサン (1:4) 30 ml で順次溶出させた. PCDD および PCDF はフラクション③に溶出される. フラクション③の溶媒を濃縮乾固し, 一定量の *n*-ヘキサンに溶かした. この *n*-ヘキサン溶液の1部で GC-MS を測定し, 残部を完全塩素化の方法で塩素化した後, ECD-GC および GC-MS に供した.

5. 完全塩素化

内径 14 mm, 長さ 20 cm の試験管に標準化合物の *n*-ヘキサン溶液 (1~10 μg/ml) または試料より分離された PCDD および PCDF フラクションの *n*-ヘキサン溶液の一定量を取り, 溶媒を蒸発させた後, 完全塩素化試薬 2 ml, 鉄粉 0.2 g を加え, アルミはくでふたをし, 68~69° で2時間反応させた. このとき, 塩化スルフルの容量が初めの 1/3 以下にならないように注意する. 次に温度を 80° に上げ, 塩化スルフルを蒸発させた. 冷後, ベンゼン 30 ml, 25% 塩酸 30 ml を用いて, 分液漏斗に洗い込み, ベンゼン層を25% 塩酸 30 ml で2回, 水 30 ml で3回洗浄した. このベンゼン層を炭酸水素ナトリウムおよび無水硫酸ナトリウム (各 10 g) の層を通して脱水した後, KD 濃縮器を用いて濃縮し, ECD-GC の試料とした.

6. ECD-GC による OCDD, OCDF および DCB の定量

OCDD, OCDF および DCB の定量は, それぞれの ECD-GC のピーク面積による絶対検量線法を採用した. 検量線は OCDD, OCDF および DCB のいずれの化合

物においても 2 μ l 注入の場合、0.1~1.0 μ g/ml の濃度範囲で原点を通る直線性を示し、その変動係数は 5% 以下であった。したがって、試料濃度をこの範囲になるように調整して定量した。

結果と考察

1. 試料中の PCDD および PCDF の分離過程における回収率

1) 実験方法 4. 1) の分離操作の回収率を検討するために、TCDD および DCDF 各 10 μ g を 1N 水酸化ナトリウム溶液に加え、この方法に従って操作したところ、TCDD および DCDF はカラムクロマトグラフィーのフラクション①および②には検出されなかったが、フラクション③に大部分 (90%以上) 溶出され、フラクション④に一部溶出された。フラクション③および④を合わせて、TCDD および DCDF を ECD-GC で定量したところそれぞれ 103% および 95% であった。また、試料を用いないでこの全行程を通したブランクテストのガスクロマトグラムには定量を妨害するピークは見られなかった。

2) 実験方法 4. 2) の分離操作の回収率を検討するために、DF を塩素化して得た PCDF⁽¹⁰⁾ (四塩化物+五塩化物) 1 μ g を植物油 10 g に添加して、この方法に従って操作したところ、PCDF はカラムクロマトグラフィーのフラクション①および②には検出されなかったが、フラクション③に 90% 回収された。

2. 完全塩素化法の反応時間

PCDD および PCDF には多くの異性体があり、これらがすべて全く同じ反応時間で完全塩素化されるとは考えにくい。しかし、これらの純異性体がすべて得られるわけではないので、これらのうちで最も毒性が強いとされている TCDD を用いて、完全塩素化の反応時間を検討した。TCDD 3.5 μ g を用い、完全塩素化の方法に従って、次の時間それぞれ 5 回反応させ、所定の処理をした後、OCDD の定量をした。その結果、OCDD の収率の平均値 $\pm$ 標準誤差は、反応時間 0.5 時間で $48.2\pm 6.8\%$ 、1 時間で $44.1\pm 8.1\%$ 、1.5 時間で $65.6\pm 2.6\%$ 、2 時間で $83.1\pm 5.2\%$ 、3 時間で $77.9\pm 4.2\%$ および 4 時間で $90.4\pm 2.6\%$ であった。以上より、2 時間以上になると収率が高くなるので、完全塩素化の反応時間を 2 時間として他の化合物の塩素化反応を行った。

3. 完全塩素化における鉄粉の効果

DCDF 10 μ g を完全塩素化する際に、鉄粉 0.2 g を加えた場合および加えなかった場合について、完全塩素化の方法に従って、それぞれ 5 回塩素化を行った。その結果、OCDF の収率の平均値 $\pm$ 標準誤差は、それぞれ $76.9\pm 2.2\%$ および $74.8\pm 1.8\%$ であった。鉄粉は塩素化そのものには影響していない。しかし、鉄粉を加えていない場合では、塩化スルフルを蒸発させる過程でより長時間を必要とし、また、その後、反応液をベンゼンで

抽出する過程で、塩酸を加えたときに、イオウで濁り、2 液相の分離が悪くなり、長時間かけて抽出しなくてはならなかった。したがって、この完全塩素化法では鉄粉を加えて反応させることにした。

4. 完全塩素化法の定量性

PCDD, PCDF および PCB が完全塩素化試薬によって塩素化された化合物を ECD-GC で検討した。TCDD, DCDF および KC-500 の場合の ECD-GC を Fig. 1 に示したが、それぞれ OCDD, OCDF および DCB の保持時間と同じところに顕著な 1 本のピークが現れた。これらのピークは GC-MS によっても OCDD, OCDF および DCB であることが確認され、いずれも完全塩素化が行われている。この ECD-GC において、液相に SE-30 または OV-1 を用いれば、OCDD および OCDF は分離されなかったが、XE-60 を用いれば、OCDD, OCDF および DCB が分離された。このように、これらが混合している場合においても分離したピークが現れるので、これらのピークを定量に利用できる。なお、試料を用いないで塩素化反応を行ったブランクのガスクロマトグラムは Fig. 1 の D のように OCDD, OCDF および DCB に重なるピークは示さなかった。

標準化合物および KC-500 について 1 μ g および 10 μ g を使用し、それぞれ 3 回または 5 回塩素化を行い、OCDD, OCDF または DCB として ECD-GC で定量した。その結果の平均値を Table 1 に示す。

Fig. 1. Gas chromatograms of perchlorinated compounds

A, from 2, 7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin; B, from 3, 6-dichlorodibenzofuran; C, from KC-500; D, blank.

Column, 3% XE-60, 2 m glass tube, temp. 230°C; detector, ECD.

Table 1. Yield of Perchlorinated Compounds by Exhaustive Chlorination for 2 Hours

Sample	Amount of samples (μg)	Number of exp.	Yield $\pm$ S. E.	
			(μg)	(%)
Dibenzo- <i>p</i> -dioxin	10	5	4.0 $\pm$ 1.1	15.9 $\pm$ 4.3
2-Chlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	10	5	3.4 $\pm$ 0.2	15.6 $\pm$ 1.1
2, 7-Dichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	10	5	14.4 $\pm$ 0.2	79.3 $\pm$ 1.4
2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	10	5	14.0 $\pm$ 1.7	98.3 $\pm$ 12.1
"	1	3	1.1 $\pm$ 0.09	75.2 $\pm$ 6.5
Dibenzofuran	10	5	1.1 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 1.5
3, 6-Dichlorodibenzofuran	10	5	14.4 $\pm$ 0.4	76.9 $\pm$ 2.2
"	1	3	1.5 $\pm$ 0.12	81.0 $\pm$ 6.6
Kanechlor-500	10	5	11.7 $\pm$ 0.5	76.6 $\pm$ 3.4
"	1	3	1.1 $\pm$ 0.09	72.4 $\pm$ 6.0

この塩素化反応の条件においては、塩素数が0および1個のDDおよびDF化合物では4~16%の収率でOCDDまたはOCDFを得たにとどまったが、塩素数2個以上のPCDDおよびPCDFでは75%以上の収率でOCDDまたはOCDFを得た。このように、毒性が比較的少ない、塩素が0か1個のDDおよびDF化合物は完全塩素化される割合が少なく、定量値に寄与することが少ないので、試料より分離されたPCDDおよびPCDFフラクションにこれらの化合物が存在しないか、存在しても、PCDDおよびPCDFの量に比較して少ないことがGC-MSなどで確認されている場合は、この方法による定量値は、主に、毒性の強い、塩素を2個以上持っているPCDDおよびPCDFによるものである。この方法によって、塩素の数および置換位置が異なる同族体の混合物で、標準物質がないため定量困難なPCDDおよびPCDFをグループとして定量することができる。

この完全塩素化法におけるPCDD、PCDFおよびDCBの定量限界はOCDD、OCDFおよびDCBのECD-GCの感度より、1gの試料を使った場合、いずれも0.1 $\mu\text{g/g}$ 程度と推定される。この方法はPCDDおよびPCDFの汚染状態の観測および毒性の評価には十分に役立つものと考えられる。

5. 試料中のPCDDおよびPCDFの定量

以上のように、完全塩素化によりPCDDおよびPCDFを定量できることが分かったので、PCP、KCおよび油症油に含まれるPCDDおよびPCDFをOCDDおよびOCDFとして定量した。

1) PCPより分離したPCDDおよびPCDFフラクションの1部をまずGC-MSで測定した。その結果、七塩化DDの異性体と考えられる m/e 406の分子イオンを持つ2本のGCピークと、OCDDおよびOCDFの混合と考えられる、 m/e 440および456より始まる一連の同位元素ピークを持つ1本のGCピークが見られたが、DD、DF、一塩化DDおよび一塩化DFと考えられるGCピークは見られなかった。このフラクションを完全塩素

化したもののGC-MSでは、OCDDおよびOCDFのGCピークのみが観察された。両者の分離定量はXE-60を液相に用いたECD-GC (Fig. 2)で行った。その結果をTable 2に示す。この定量値は完全塩素化後測定されたOCDDおよびOCDFの量である。フェノールを塩素化して製造したPCPからは多量のPCDDおよびPCDFが検出された。このような農薬を使用することは危険を伴うこともあると考えられる。

2) KCおよび油症油より分離されたPCDDおよびPCDFフラクションのGC-MSによれば、分子イオンの質量数および塩素の同位元素ピークより、PCBおよび塩素数2~7個のPCDFと考えられるGCピークは見られたが、DD、DF、一塩化DD、一塩素DFおよびPCDDを示すピークは現れなかった。このPCDDおよ

Fig. 2. Gas chromatograms of perchlorinated compounds

A, from impurities in PCP; B, from impurities in Yusho oil; C, authentic mixture of DCB+OCDF+OCDD;

Column, 3% XE-60, 2 m glass tube, temp. 230°C; detector, ECD.

Table 2. Amounts of OCDD and OCDF Produced by Perchlorination of PCDD and PCDF in PCP, KC and Yusho Oil ($\mu\text{g/g}$)

	PCP		KC				Yusho oil		
	A	B	300	400	500	600	A	B	C
OCDD	430	0.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
OCDF	290	1.3	2.1	24.0	2.9	2.9	5.7	6.6	6.7
PCDF*			1.5	16.6	2.5	2.7	4.4	5.1	5.2

Each value is average of 2 experiments.

nd: less than $0.1 \mu\text{g/g}$

PCDF*: Calculated by conversion of OCDF to the main component of PCDF.

び PCDF フラクションを完全塩素化して得たものの ECD-GC によれば DCB および OCDF の存在は見られた (Fig. 2) が, OCDD は検出されなかった (検出限界 $0.1 \mu\text{g/g}$). この OCDF の定量値を Table 2 に示す. 試料により含まれる PCDF の組成が異なるので, OCDF の定量値をその試料中の PCDF の主成分¹⁷⁾, すなわち, KC-300 および KC-400 は四塩化物, KC-500 は六塩化物, KC-600 は七塩化物, 油症油は五塩化物の PCDF にそれぞれ換算した値も Table 2 に示した. 分析した KC 4 種類のうちでは KC-400 に PCDF が最も多く検出された. また 3 種類の油症油からはいずれも約 $5 \mu\text{g/g}$ の PCDF が検出された. 油症患者は明らかに毒性の強い PCDF を摂取しているものと考えられる. したがって, 少量ではあるが, PCDF が油症の病因に何らかの関与があるのではないだろうか.

要 約

微量の PCDD および PCDF を完全塩素化して, OCDD および OCDF として定量する方法を検討し, この方法を用いて, 試料中の PCDD および PCDF を分析した.

1) PCDD および PCDF を完全塩素化試薬とともに $68\sim 69^\circ$ で 2 時間加熱して OCDD および OCDF を得, これを XE-60 を液相とした ECD-GC で定量した.

2) この塩素化の反応条件において, 塩素を 2 個以上持っている PCDD および PCDF より得た完全塩素化物の収率は 75% 以上であったが, 塩素が 0 か 1 個の DD および DF からの収率は 4~16% であった.

3) 2 種類の農薬 PCP より 430 および $0.6 \mu\text{g/g}$ の OCDD と, 290 および $1.3 \mu\text{g/g}$ の OCDF がそれぞれ定量された.

4) KC-300, KC-400, KC-500, KC-600 および油症油からは PCDF のみが検出され, その推定含量は, そ

れぞれ 1.5 , 16.6 , 2.5 , 2.7 および $4.9 \mu\text{g/g}$ であった.

本研究は倉恒匡徳が文部省科学研究費を受けて行ったものである. ここに感謝いたします.

文 献

- 1) Sparschu, G. L., Dunn, F. L., Rome, V. K.: Food Cosmet. Toxicol., **9**, 405 (1971).
- 2) Bauer, H., Schultz, B. H., Spiegelberg, K. H. U.: Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., **18**, 538 (1961).
- 3) 荒木泰典: 福岡医誌. **65**, 61 (1974).
- 4) 宮田秀明: 食衛誌. **15**, 135 (1974).
- 5) Jensen, S., Renberg, L.: AMBIO, **1**, 1 (1972).
- 6) Firestone, D., Ress, J., Brown, N. L., Barrow, R. P., Damico, J. N.: J. Ass. Offic. Anal. Chem., **55**, 85 (1972).
- 7) Woolson, E. A., Thomas, R. F., Ensor, P. O. J.: J. Agr. Food Chem., **20**, 351 (1972).
- 8) Plimmer, J. R., Ruth, J. M., Woolson, E. A.: *ibid.*, **20**, 90 (1973).
- 9) Villanueva, E. C., Jennings, R. W., Burse, V. W., Kimbrough, R. D.: *ibid.*, **22**, 917 (1974).
- 10) Bowes, G. W., Mulvihill, M. J., Simoniet, B. R. T., Burlingame, A. L., Risebrough, R. W.: Nature, **256**, 305 (1975).
- 11) Vos, J. G., Koeman, J. H., Van der Maas, H. L., Ten Noever de Brauw, M. C., de Vos, R. H.: Food Cosmet. Toxicol., **8**, 625 (1970).
- 12) Roach, J. A. G., Pomerantz, I. H.: Bull. Environ. Contam. Toxicol., **12**, 338 (1974).
- 13) 宮田秀明, 中村彰夫, 樫本 隆: 食衛誌. **16**, 129 (1975).
- 14) Miyata, H., Nakamura, A., Kashimoto, T.: J. Food Hyg. Soc. Japan, **17**, 227 (1976).
- 15) Hutzinger, O., Safe, S., Zitko, V.: Int. J. Environ. Anal. Chem., **2**, 95 (1972).
- 16) 富田真雄, 上田伸一, 成定昌幸: 薬誌. **79**, 186 (1959).
- 17) Nagayama, J., Masuda, Y., Kuratsune, M.: Fukuoka Acta Medica, **66**, 593 (1975).
- 18) Nagayama, J., Kuratsune, M., Masuda, Y.: Bull. Environ. Contam. Toxicol., **15**, 9 (1976).
- 19) 西住昌裕, 倉恒匡徳, 増田義人: 福岡医誌. **66**, 600 (1975).