

技術論文

二次元高速液体クロマトグラフ精製法を用いる臭素化及び
塩素化ダイオキシン及び類似物質の一斉異性体別定量羽成 修康^{1,2}, 三宅 祐一¹, 堀井 勇一¹, 岡 澤 剛¹, 山下 信義^{®1}

2種類の高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用カラム (porous graphitic carbon 及び pyrenyl silica) を併用した二次元 HPLC 精製法と高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計を用いた高精度異性体分析により, 既報において適用可能となった塩素化ダイオキシン類似物質だけでなく, 臭素化難燃剤である臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs), 臭素化ビフェニル (PBBs) 及び臭素化ダイオキシン類 (PBDDs 及び PBDFs) の一斉異性体別定量法を開発した. 本法は精密質量数が近接しており, 分析精度の低下が問題となっている PBDEs と PBDFs の異性体分離を実現し, また, 高質量化合物のため高分解能質量分析計では脱臭素化物のモニターしかできず, 分析誤差の生じやすい PBDE IUPAC No. 209 異性体についても, M^+ の検出が可能なガスクロマトグラフ/タンデム型質量分析計を併用し高精度分析を可能とした. PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs の検量線は 2 pg (一部同族体では 10 pg) から 1000 pg の範囲で相関係数 0.992 以上を示し, 繰り返し測定による相対標準偏差は PBDEs では 2.7 から 11.2%, PBBs では 2.0 から 11.7%, PBDDs/DFs では 5.9 から 12.5% と良い再現性を示した. 更に本分析法の検証実験は大気汚染の長期的指標として有効性が確認されている常緑針葉樹葉及び国際精度管理試験用試料として配布された飛灰を用いて行い, クロマトグラム中の臭素化難燃剤の異性体別詳細分析データを初めて得ることに成功した. 本法は既に塩素化ナフタレン (PCNs), 塩素化ビフェニル (PCBs), 塩素化ダイオキシン類 (PCDDs 及び PCDFs) において適用可能であることを報告しているため, 同一試料中の有機ハロゲン (塩素及び臭素) 化ダイオキシン類似物質の一斉毒性評価を可能とした.

1 緒 言

臭素化難燃剤 (brominated flame retardants, BFRs) は, 数多くの工業製品に耐熱性・難燃性を持たせるために混合・添加する化学物質の総称であり, 世界中で膨大な量が幅広く使用されている^{1,2)}. なかでも臭素化ジフェニルエーテル (polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) の一部は, その有害性により, 経済協力開発機構 (OECD) 諸国において使用が禁止されている³⁾. 主な PBDEs としては五臭素化, 八臭素化, 十臭素化ジフェニルエーテル (pentaBDE, octaBDE, decaBDE) があり⁴⁾, 地域により使用量・割合が異なっている⁵⁾. 国内では主に decaBDE が使用されており, その環境動態を調査するため環境省の環境実態調査も行われている. また, 臭素化ビフェニル (polybrominated biphenyls, PBBs) も同用途で利用されており, 1970 年代から環境汚染物質として注目されてい

る⁶⁾が, 近年はほとんど使用されていない. これら BFRs を含んだ製品の燃焼等により, 実験的にであるが臭素化ジベンゾ-パラ-ジオキシン (polybrominated dibenzo-*p*-dioxins, PBDDs) 及び臭素化ジベンゾフラン (polybrominated dibenzofurans, PBDFs) といった毒性の高い臭素化ダイオキシン類を生成することが検証されている^{7)~9)}ため, 塩素系有害物質に続く環境問題として国際的な関心が高まっている. 更に難燃剤としての PBDEs 等の使用量が減少しているにもかかわらず, これら臭素化難燃剤は環境中から広く検出され¹⁰⁾¹¹⁾, また, 一部の異性体においては内分泌かく乱作用も疑われていることから¹²⁾, 国際精度管理等, 信頼性の高い分析法開発が必要とされている.

ところが, 高臭素化物が塩素系有害物質と比べて光及び熱による分解性が高く¹³⁾¹⁴⁾, また, PBDEs と PBDFs の精密質量数が近接しており, 共溶出現象 (co-elution) により分析誤差を生じやすい¹⁵⁾など, 信頼性の高い分析値を得ることが難しいのが現状である. 特に PBDE IUPAC No. 209 (decaBDE) は光分解等の影響が顕著で¹⁶⁾¹⁷⁾, 更に臭素原子が 10 個付加しているため高質量物質であり, 分析感度の低下及び適用可能な分析機器が限定されるなど分析

¹ 産業技術総合研究所環境管理技術研究部門: 305-8569 茨城県つくば市小野川 16-1 つくば西

² 現在所属 産業技術総合研究所計測標準研究部門: 305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央第 3

上の問題点も指摘されている。そこで本研究では、平面構造を持つ物質を選択的に分離する porous graphitic carbon (Hypercarb) カラム¹⁸⁾と π 結合を持つ化合物に有効な pyrenyl silica (PYE) カラム¹⁹⁾を高速液体クロマトグラフ (HPLC) に併用した二次元 HPLC 精製法と高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計 (HRGC/HRMS) を用いた高精度異性体分析により、臭素化難燃剤である PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs の分析条件を検討した。著者らは既にこの手法を用い、塩素化ダイオキシン類似物質の高精度異性体分析を実現しており²⁰⁾²¹⁾、今報告において塩素化及び臭素化ダイオキシン類似物質の一斉異性体別定量法の検討を試みた。また、PBDE-209 測定において、HRGC/HRMS では適用可能な質量範囲の制限から脱臭素化物 (八臭素化物) の検出しかできないため、十臭素化物を測定可能なガスクロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (GC/MS/MS) を併用し分析精度の確認を行った。

更に上記分析法の検証実験として、国際精度管理試験 (Örebro University ほか, International Intercalibration Study)²²⁾²³⁾ 用試料として配布された飛灰及び実環境試料として大気汚染の長期的指標として有効性が確認されている常緑針葉樹のクロマツ葉²⁴⁾中に残留する PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs の異性体詳細解析も行った。

2 実 験

2.1 標準品及び試薬

実験に使用した添加回収用標準物質及び定量用標準物質は、PBDEs (IUPAC No. 47, 77, 99, 100, 105, 126, 153, 183, 190, 209, 以上 K. Kannan 博士提供, State University of New York at Albany, 米国), PBBs (Firemaster BP-6, AccuStandard 製) 及び PBDDs/DFs (EDF-5059, CIL 製) を使用した。内標準物質は、安定同位体標識の ¹³C-PBDEs (EO-5003, -5100, CIL 製) 及び ¹³C-PBDDs/DFs (EDF-4153, -4154, CIL 製) を用いた。

その他の試薬はアセトン, トルエン, ヘキサン及びジクロロメタン (いずれも和光純薬製, 残留農薬試験用 5000 シリーズ), 多層シリカゲル, アルミナ, 石英ガラスウール, 円筒濾紙, シリカゲル及び無水硫酸ナトリウムは既報²¹⁾と同等品を使用した。また、ガラス器具は、臭素化物の光分解を防止する目的ですべて茶褐色品を用いた。以上の試薬及び器具使用下で試薬操作空試験チェックを行い、空試験画分には臭素化難燃剤の分析に妨害となるピークが検出されないことを確認した ($S/N < 3$)。

2.2 試料採集及び抽出

クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl. 及び *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 葉は、2003 年 4 月東京湾全周を含む定点観測地点から採取した湾奥地点 (F: 北緯 35°27', 東経

139°40', I: 北緯 35°38', 東経 139°50', M: 北緯 35°33', 東経 140°13') 及び湾口地点 (T: 北緯 34°58', 東経 139°45') のものを使用した。既報²¹⁾に従い乾燥させたクロマツ葉 (F: 46.5 g, I: 50.6 g, M: 47.9 g, T: 50.4 g) をビーカーに量り取り、クリーンアップスパイク (¹³C-PBDEs 及び ¹³C-PBDDs/DFs) を添加, ジクロロメタン 300 ml と混和し, ホモジナイズを行い, ソックスレー抽出を行った (Fig. 1)。その後トルエンで更にソックスレー抽出を続け, シリカゲルを用いて抽出液から葉緑素を除き, 3 ml まで濃縮した。飛灰 (臭素化物用 2.52 g, 塩素化物用 6.18 g) においては国際精度管理試験用試料として B. van Bavel 博士 (Örebro University, スウェーデン) から提供されたもの²²⁾²³⁾を, JIS 法 (K 0311)²⁵⁾ に準じ抽出を行った (ただし, ソックスレー抽出の溶媒はジクロロメタン及びトルエン, それぞれ 7 時間)。

2.3 ガラスカラムクリーンアップ

次に既報²¹⁾に準じ, 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びアルミナカラムクロマトグラフィーを適用した (Fig. 1)。アルミナの展開溶媒は *n*-ヘキサン (第 1 画分, 10 ml), 次いで 0.5% -ジクロロメタン/*n*-ヘキサン (第 2 画分, 40 ml), 最後にジクロロメタン (第 3 画分, 200 ml; PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs 画分) を展開した。HPLC 分画に備え, 第 3 画分を 200 μ l まで濃縮した。

2.4 HPLC (Hypercarb カラム及び PYE カラム)

Hypercarb カラムを装着した HPLC²⁰⁾²¹⁾ に, 2.3 で得た画分のうち 150 μ l を注入した (Fig. 1)。第 1 画分には大部分の PBDEs 及び PBBs, 第 2 画分には一部の PBDEs 及び PBDDs/DFs の溶出が認められた (Table 1)。残りの 50 μ l はアルミナカラム分画までの内標準物質の回収率を求めるために使用した。第 1 画分に乾固を防ぐためのイソオクタン 30 μ l をスパイク後, 100 μ l まで濃縮し, PBDEs (Br4-7) 及び PBBs (Br5-8) 分析溶液とした。第 2 画分にもイソオクタンをスパイク後, 100 μ l まで濃縮し, PYE カラムを用いた HPLC 分画溶液とした。

PYE カラムを装着した HPLC²⁰⁾²¹⁾ に, 上述の第 2 画分 (100 μ l) のうち 50 μ l を注入した (Fig. 1)。残りの 50 μ l は Hypercarb カラム分画までの内標準物質の回収率を求めるために使用した。各画分にイソオクタンをスパイクし, 100 μ l まで濃縮, 第 1, 3 及び 4 画分それぞれを PBDEs (Br4-10) 分析溶液又は PBDDs/DFs (Br4-8) 分析溶液とした (Table 2)。

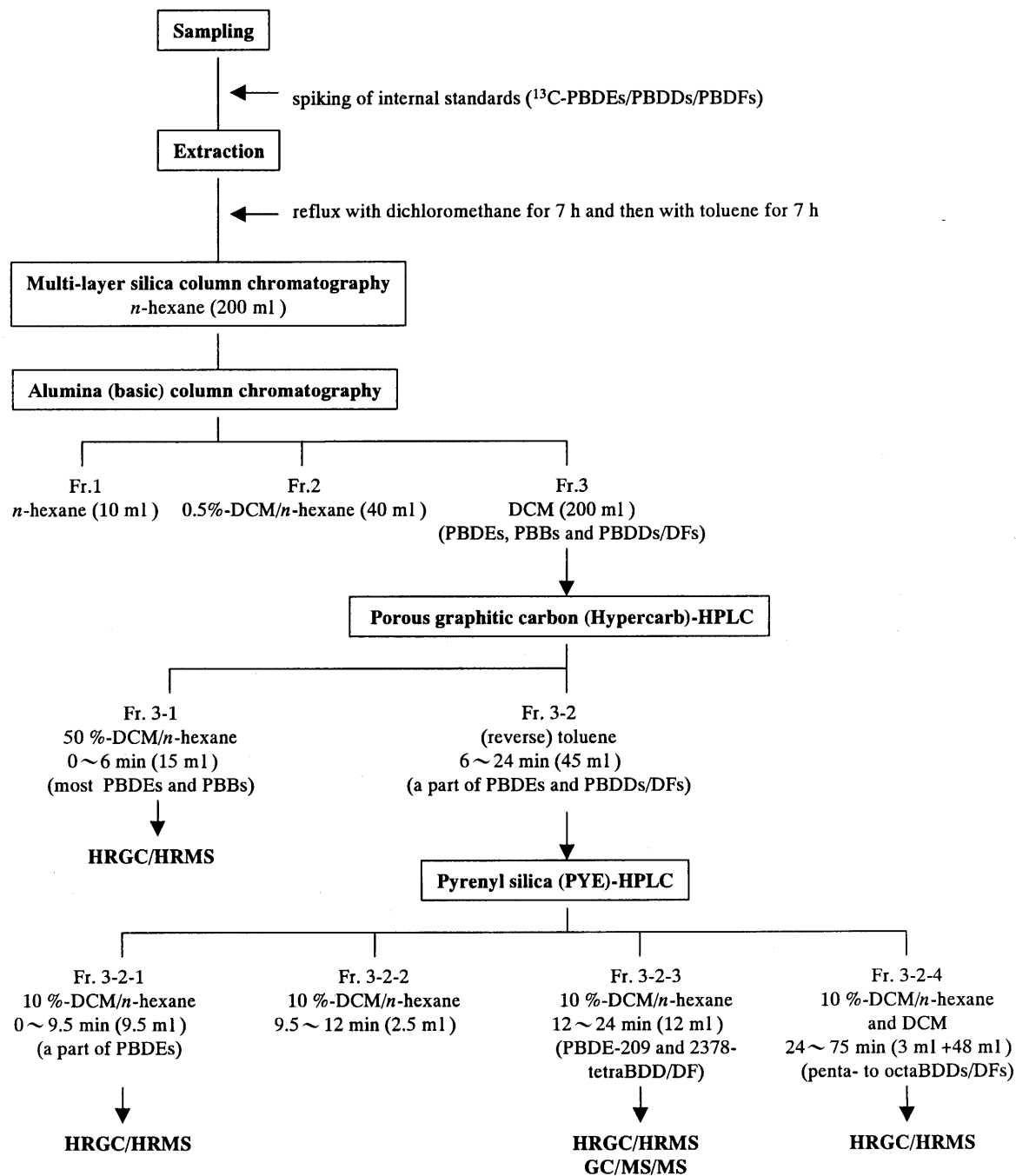


Fig. 1 Analytical procedure for PBDEs, PBBs and PBDDs/DFs

Table 1 Hypercarb-HPLC conditions for PBDEs, PBBs and PBDDs/DFs

Model	: HEWLETT PACKARD 1100 series	
Column	: porous graphitic carbon (Hypercarb, Hypersil Co.), 100 mm × 4.6 mm (i.d.) 7 μm (particle size)	
Injector	: RHEODYNE7125, sample loop: 200 μl, injection volume: 150 μl	
Flow rate	: 2.5 ml/min	
Detector	: UV-254 nm	
Column temperature	: room temperature	
Eluent	: 50%-dichloromethane/ <i>n</i> -hexane 15 ml	: fraction 1 (most PBDEs, PBBs)
	: toluene 45 ml (reverse flow)	: fraction 2 (a part of PBDEs, PBDDs/DFs)
	: toluene 45 ml (reverse flow)	: (wash)
	: 50%-dichloromethane/ <i>n</i> -hexane 15ml	: (wash)

Table 2 PYE-HPLC conditions for PBDEs, PBBs and PBDDs/DFs

Model	: HEWLETT PACKARD 1100 series	
Column	: pyrenyl silica (PYE, Nacalai Tesque Inc.), 250 mm (length) × 4.6 mm (i.d.) 5 μm (particle size)	
Injector	: RHEODYNE 7125 sample loop: 100 μl, injection volume: 50 μl	
Flow rate	: 1.0 ml/min	
Detector	: UV-254 nm	
Eluent	: 0 ~ 27 min	: 10%-dichloromethane/ <i>n</i> -hexane
	: 27 ~ 90 min	: dichloromethane
	: 90 ~ 105 min	: 10%-dichloromethane/ <i>n</i> -hexane
	: No. 1 (0 ~ 9.5 min)	: a part of PBDEs
	: No. 2 (9.5 ~ 12 min)	: —
Fraction	: No. 3 (12 ~ 24 min)	: PBDE-209, 2,3,7,8-tetraBDD/DF
	: No. 4 (24 ~ 75 min)	: 1,2,3,7,8-pentaBDD/DF, 2,3,4,7,8-pentaBDF, 1,2,3,4,7,8-hexaBDD/DF
		: 1,2,3,6,7,8-hexaBDD, 1,2,3,7,8,9-hexaBDD, 1,2,3,4,6,7,8-heptaBDF, octaBDD

The separation method was programmed from 0 to 75 min, and then to 105 min with a column washing.

Table 3 HRGC/HRMS conditions for PBDEs, PBBs and PBDDs/DFs

Instrument	: JEOL JMS-700D
Column	: DB-5 (J&W Scientific) 15 m (length) × 0.25 mm (i.d.), 0.10 μm (f.t.)
Column temp	: 150°C (2 min), 5°C/min to 300°C (10 min)
Injection	: splitless injection mode by auto injector
Ion source	: EI ion source, positive
Source temperature	: 250°C
Interface temperature	: 250°C
Injetor temperature	: 250°C
Ionization voltage	: 38 eV
Trap current	: 500 μA
Accel. Voltage	: 10 kV
Resolution	: > 10000

2.5 HRGC/HRMS による PBDEs, PBBs, PBDDs/DFs の同定・定量及び GC/MS/MS による decaBDE の分析精度確認

HRGC/HRMS のデータ処理は日本電子製のダイオキシン分析プログラム (DioK) を用いて行った。HRGC/HRMS における PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs の分析条件は Table 3, 4 に示した。測定化合物のイオン強度の強い $(M+2)^+$, $(M+4)^+$, $(M+6)^+$, $(M+8)^+$ イオンのうち、臭素化物ごとに native 成分 (内標準物質については添加した成分のみ) について各々 2 つ以上をモニターした。PBDDs/DFs の分析条件中には PBDEs のモニターイオンも追加し、常時 co-elution を確認できるよう配慮した。PBDE-209 においては、 M^+ のイオンよりも脱臭素化物 (M^+-Br_2) イオンの強度が高いことが知られているため²⁶⁾, また日本電子製 JMS-700D では質量範囲が 1 から 832 までのため、八臭素化物をモニターした。ただし、脱臭素化物イオンのモニターによる分析精度低下に配慮し、 M^+ イオンを直接測定可能な GC/MS/MS を併用し、八臭素化物及び十臭素化物における PBDE-209 の分析精度の確認も併せて行った。キャピラリーカラム及び昇温条件は HRGC/HRMS と同様で、モニターイオン等に関しては以下のように設定した (960.0 → 799.9, collision energy 25 eV,

ion voltage 70 eV, 日本分光製 Quattro micro GC)。

定性は添加回収用標準品及び内標準物質等の保持時間を用いて判断し、各 2 つのイオンのピーク面積比が標準品と ±15% 以内のもので、更に天然同位体比の理論値に対しても ±15% 以内のものを PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs と同定した (PBDE-209 は除く)。同定されたピークの面積を使用して外標準法により S/N 3 以上のピークについてピーク面積で異性体ごとに定量した。

3 結果と考察

3.1 PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs 混合標準品を用いた抽出条件の検討及び GC での分離・精製の評価

JIS 法²⁵⁾及び環境省マニュアル²⁷⁾では塩素化ダイオキシンをソックスレー抽出する際、トルエン 16 時間以上と明記されている。そこで同条件で PBDEs 標準品を用い、抽出を行い、回収率を確認した (Table 5)。その結果、トルエン 8 時間抽出では PBDE-105 が、16 時間では、PBDE-47, -77, -105, -190, -209 の回収率が極端に低下している。この原因は熱分解と考えられるため、抽出温度の低下及び回収率向上のため、抽出溶媒をトルエンからジクロロメタンに変更した。この変更により回収率が改善され、ジクロロメタン抽出後、トルエン抽出を行うことによ

Table 4 Monitor ions in HRGC/HRMS

Monitor ions	(M + 2) ⁺	(M + 4) ⁺	(M + 6) ⁺	(M + 8) ⁺
tetraBDE	483.7131	485.7111		
pentaBDE		563.6215	565.6195	
hexaBDE		641.5320	643.5300	
heptaBDE			721.4405	723.4385
octaBDE ^{a)}			799.3510	801.3490
¹³ C-tetraBDE	495.7533	497.7513		
¹³ C-pentaBDE		575.6618	577.6598	
¹³ C-hexaBDE		653.5723	655.5703	
¹³ C-heptaBDE			733.4808	735.4788
¹³ C-octaBDE ^{a)}			811.3912	813.3892
pentaBB		547.6266	549.6246	
hexaBB		625.5371	627.5351	
heptaBB			705.4456	707.4436
octaBB			783.3561	785.3541
tetraBDD	497.6923	499.6903		
pentaBDD		577.6008	579.5988	
hexaBDD		655.5113	657.5093	
octaBDD			813.3302	815.3282
tetraBDF	481.6974	483.6954		
pentaBDF		561.6059	563.6039	
hexaBDF		639.5164	641.5144	
heptaBDF			719.4248	721.4228
tetraBDE	483.7131	485.7111		
pentaBDE		563.6215	565.6195	
hexaBDE		641.5320	643.5300	
heptaBDE			721.4405	723.4385
octaBDE ^{a)}			799.3510	801.3490
¹³ C-tetraBDD	509.7326	511.7306		
¹³ C-pentaBDD		589.6411	591.6391	
¹³ C-hexaBDD		667.5515	669.5495	
¹³ C-tetraBDF	493.7377	495.7357		
¹³ C-pentaBDF		573.6462	575.6442	

a) octaBDE monitor ions were used for analysis of decaBDE

Table 5 Average recovery rate (%; *n* = 2) of Soxhlet extraction of PBDEs in fortified blank by toluene and dichloromethane (DCM)

	Toluene 8 h	Toluene 16 h	DCM 8 h
PBDE-47	80	39	88
-77	82	41	82
-100	110	72	99
-99	97	53	96
-126	123	75	89
-105	8	0	60
-153	121	77	107
-183	119	67	87
-190	87	33	70
-209	76	24	140

り, 塩素化物にも対応できることが明らかとなった。

次に PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs の分離・精製法を評価するため, これら物質に多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びアルミナカラムクロマトグラフィーを適用した。アルミナカラムへの吸着性が臭素化難燃剤は比較的高く, 回収率の低減が懸念されるため, 第 3 画分にジ

クロロメタン 200 ml を使用した。各画分を HRGC/HRMS を用いて測定し, 分析条件の検討と各異性体の同定を行った。Table 4 に選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) に用いる質量数を示した。例としてアルミナカラムクロマトグラフィー後の第 3 画分のクロマトグラムを Fig. 2 (a) に示す。この画分には PBDEs 及び PBDFs が混在し, これらの精密質量数は近接している。特に PBDE-99 と 2,3,7,8-tetraBDF, PBDE-190 と 1,2,3,4,7,8-hexaBDF の定量が困難である。理論上これら混合物を HRMS で分離するには 30000 から 40000 以上の分解能が必要である。また, 一部 PBDEs 及び PBDFs 異性体の保持時間も近接し, co-elution を防ぐためにも HRMS 測定以前にクロマト操作において PBDEs 及び PBDFs を分離することが必要である。更に環境試料においては PBDEs と PBDFs の濃度レベルは明らかに異なるため, アルミナ分画後の定量は分析誤差を生じやすい。そのため二次元 HPLC 精製法を適用して, PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs 混合標準試料を分離・精製した。

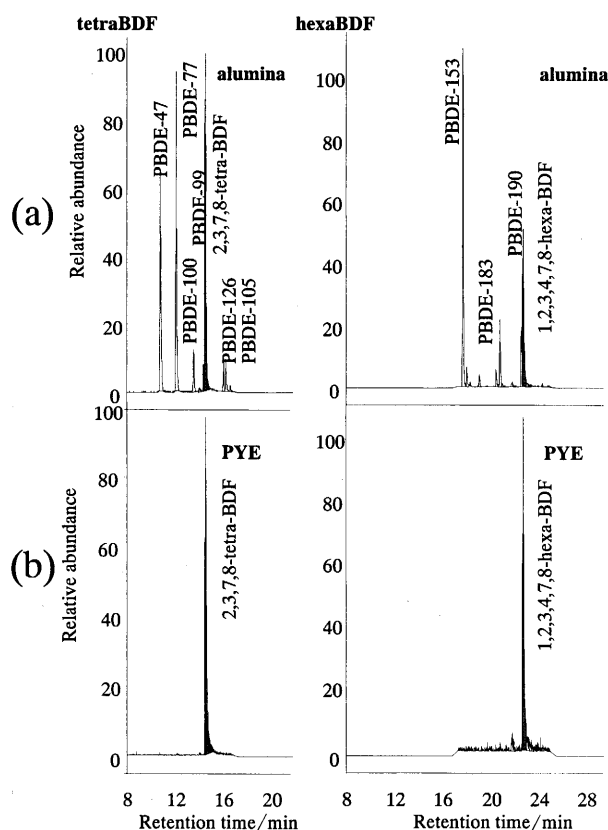


Fig. 2 Chromatograms of tetra- and hexaBDF after alumina glass column (a) and PYE-HPLC (b) fraction

3・2 PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs 混合標準品を用いた HPLC 分画条件の検討

PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs 混合標準品を HPLC で分画した結果, Hypercarb-HPLC の第 1 画分 (Hypercarb-Fr.1) では PBBs 及び大部分の PBDEs (主に低臭素化物) の溶出が, 第 2 画分 (Hypercarb-Fr.2) では PBDDs/DFs 及び一部 PBDEs (主に高臭素化物) の溶出が確認できた (Table 1). Hypercarb 分画により大部分の PBDEs を PBDDs/DFs から分離することが可能なため, 次に使用する PYE-HPLC の詳細分離における負荷低減が実現可能となった。

PYE-HPLC においては, 第 1 画分 (PYE-Fr.1) では PBDDs/DFs と混在していた PBDE-183, 190 の分離が確認できた (Table 2). 第 3 画分 (PYE-Fr.3) では PBDE-209 及び 2,3,7,8-tetraBDD/DF, 第 4 画分 (PYE-Fr.4) では 1,2,3,7,8-pentaBDD/DF, 2,3,4,7,8-BDF, 1,2,3,4,7,8-hexaBDD/DF, 1,2,3,6,7,8-, 1,2,3,7,8,9-hexaBDD, 1,2,3,4,6,7,8-heptaBDF 及び octaBDD の溶出が確認できた. PYE-Fr.3 では PBDE-209 及び 2,3,7,8-tetraBDF が混在しているが, 著者らの HRGC/HRMS 及び GC/MS/MS 測定条件では, 互いに定性・定量妨害物質に成り得ないことを確認している. 精密質量数の近接及び co-elution から,

PBDEs 及び PBDFs の分離が必要であったが, 二次元 HPLC の適用により, これら物質の分離が実現し, 異性体ごとの定量が可能となった [Fig. 2 (b)].

既報は環境試料中の塩素化ナフタレン (PCNs), 塩素化ビフェニル (PCBs) 及び塩素化ダイオキシン類 (PCDDs/DFs) の異性体別分析に適用可能であり²⁰⁾²¹⁾, 今回開発した方法を組み合わせることにより PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs も含めた有害有機ハロゲン類の包括的一斉分析法として有効であることが確認できた. 既に PBDEs 及び PBDDs/DFs の各種カラムクロマトグラフ操作による分離・精製法^{11)28)~30)}, また PBDE や塩素化ダイオキシン類似物質 (PCBs, PCDDs/DFs 及び塩素系農薬等) の一斉分析法^{31)~33)}は報告されている. 従来法においても, PBDDs/DFs の分析妨害物質である PBDEs からの分離, また臭素化及び塩素化ダイオキシン類の一斉分析は実施されているが, PBDEs, PBBs, PBDDs, PBDFs, PCNs, PCBs, PCDDs 及び PCDFs の一斉異性体別分析を実現可能な方法は著者らの知る限りなく, 更に co-elution により正確なダイオキシン毒性等量評価を困難にしている一部 PCNs 異性体, 及び精密質量数の近接から分析精度の低下が問題となっている PBDEs と PBDFs の一斉分離が可能で, かつ高精度な PBDE-209 分析も実施できる本法は, 有害有機ハロゲン類, 特に塩素及び臭素化ダイオキシン類似物質の一斉毒性評価法としても有効である. 最後に有害有機ハロゲン類の分離・精製パターンを Fig. 3 に示す.

3・3 分析精度

PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs について種々の濃度範囲において標準溶液を調製し, 各同族体の濃度及びピーク面積から検量線の直線性を調べた. HRGC/HRMS において 5 点検量線を作成し, PBDEs については 2~1000 pg, PBDE-209, PBBs 及び臭素化ダイオキシン類については 10~1000 pg の範囲で, 各同族体の相関係数 (r) は 0.995 以上を示し, 良好な直線性が得られた. PBDE-209 に関しては GC/MS/MS においても検量線を作成し, 50 pg から 1000 pg の範囲で相関係数 (r) は 0.992 以上を示した. また, 繰り返し注入による再現性を確認した結果, 相対標準偏差 (% RSD) は, PBDEs で 2.7 から 11.2% ($n=3$), PBBs で 2.0 から 11.7% ($n=4$), PBDDs/DFs で 5.9 から 12.5% ($n=6$) であった. この結果は PBDEs の国際精度管理試験で得られた標準偏差値 (17 から 77%)³⁴⁾ と同程度以上であった.

全操作後の針葉樹葉及び飛灰試料から得られた各内標準物質の回収率は, tetraBDE (PBDE-47) で $126 \pm 11\%$, pentaBDE (PBDE-99, -100, -118) で $160 \pm 43\%$, hexaBDE (PBDE-153) で $142 \pm 22\%$, heptaBDE (PBDE-183) で $117 \pm 10\%$, decaBDE (PBDE-209) で $84 \pm 15\%$,

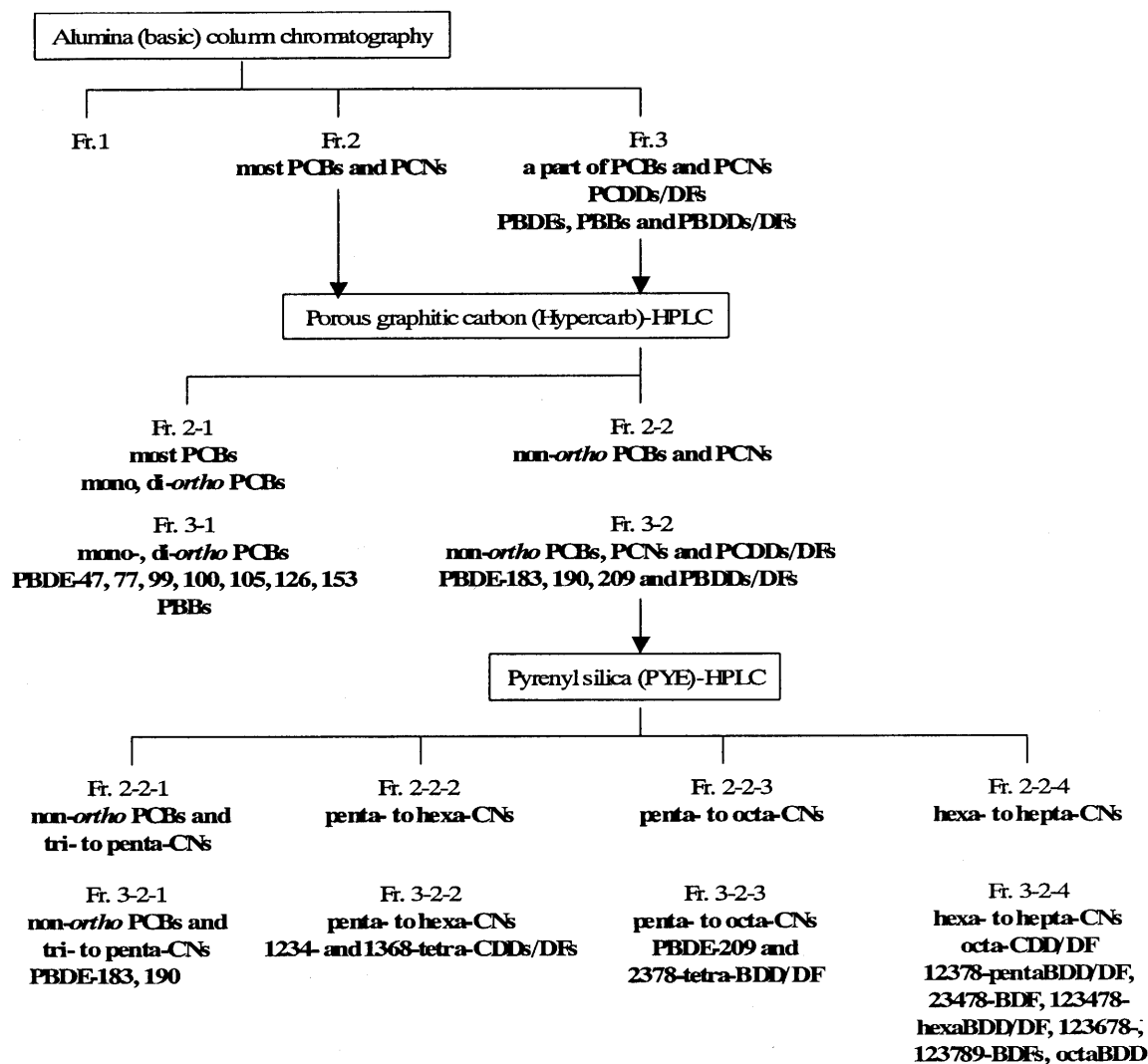


Fig. 3 Elution patterns of brominated and chlorinated dioxin-like compounds in analytical procedure

tetraBDD (2,3,7,8-tetraBDD) で $87 \pm 27\%$, pentaBDD (1,2,3,7,8-pentaBDD) で $93 \pm 26\%$, hexaBDD (1,2,3,4,7,8-/1,2,3,6,7,8-/1,2,3,7,8,9-hexaBDD) で $85 \pm 40\%$, tetraBDF (2,3,7,8-tetraBDF) で $104 \pm 33\%$, pentaBDF (1,2,3,7,8-/2,3,4,7,8-pentaBDF) で $98 \pm 34\%$ であった。本法は、低臭素化物から高臭素化物まで全操作後の高回収率が確認できる詳細分析法であると考えられる。また、PBDE-209 に関しては光分解等、分析誤差が生じやすいため、内標準物質の回収率を GC/MS/MS でも確認し、 $91 \pm 23\%$ であった。脱臭素化物（八臭素化物）及び十臭素化物それぞれの回収率が同程度であったことから、PBDE-209 についても本法は適用可能であることが明らかとなった。ただし、臭素化物の HRGC/HRMS 及び GC/MS/MS 分析結果は、塩素化物よりも試料中の夾雑物質及び最終溶液の溶媒組成の影響を受けやすく、試料測定時の再現性を高精度に確保することが今後の課題である。

3・4 国際精度管理試験用試料への適用

開発した分析方法の妥当性を検証するために、国際精度管理試験に参加し、塩素化及び臭素化ダイオキシン類分析法の国際比較を実施した。塩素化ダイオキシン類に関しては、第7回塩素化ダイオキシン類国際精度管理試験で配布された飛灰試料²²⁾で、臭素化ダイオキシン類に関しては、第1回臭素化ダイオキシン類国際精度管理試験で配布された飛灰試料²³⁾を用い、分析法を確認した。

塩素化ダイオキシン類においては、2,3,7,8-tetraCDD/DF, 1,2,3,7,8-pentaCDD/DF, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDD/DF, 1,2,3,6,7,8-hexaCDD/DF, 1,2,3,7,8,9-hexaCDD/DF, 2,3,4,6,7,8-heptaCDF, 1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD/DF, 1,2,3,4,7,8,9-heptaCDF 及び octaCDD/DF について比較検討し、PCDDs では標準偏差値 3.1 から 67%, PCDFs では 14 から 62% であった。参加研究機関全体では、それぞれ 85

から 262%, 53 から 207% であり, ばらつきの大きい試料についても適用可であることが明らかとなった。

臭素化ダイオキシン類においては, 2,3,7,8-tetraBDD/DF, 1,2,3,7,8-pentaBDD/DF, 2,3,4,7,8-pentaBDF, 1,2,3,4,7,8-hexaBDD/DF, 1,2,3,6,7,8-hexaBDD, 1,2,3,7,8,9-hexaBDD 及び 1,2,3,4,6,7,8-heptaBDF について比較検討し, PBDDs では標準偏差値

18 から 75%, PBDFs では 3.0 から 78% であった。参加研究機関全体では, それぞれ 38 から 78%, 29 から 111% であり, 本法は塩素化及び臭素化ダイオキシン類分析に適用可能な有効な手法であることが確認できた。

3・5 実試料への応用

分析法の実環境試料を用いた評価試験として, クロマツ葉及び 3・4 で使用した飛灰の結果を示す。まず二次元 HPLC 精製の効果を, 飛灰試料におけるアルミナカラムクロマトグラフィー後の第 3 画分及び PYE-HPLC 後の第 3 画分のクロマトグラムで示す (Fig. 4)。アルミナ画分 Fig. 4 (a) では, 夾雑物質及び PBDEs が PBDFs と混在しており, 精確な異性体同定が困難であるが, PYE-HPLC 画分 Fig. 4 (b) では, これらが PBDFs から分離・精製され, 高精度な PBDFs 異性体別の定量が可能となった。そのためクロマツ葉及び飛灰中の PBDEs, PBBs 及び PBDDs/DFs 異性体の詳細分離・分析に成功した (Fig. 5)。ほとんどの試料から PBDE-47, -77, -99, -100, -153, -183 及び -209 は検出され, 湾奥 (F, I 及び M) 及び湾口地点 (T) のクロマツ葉 wet weight (湿重量換算) 中に含有される PBDEs 濃度は, それぞれ 1580, 2400, 860 及び 380 pg/g であった。湾奥地点は湾口地点より比較的高濃度であり, これは塩素化ダイオキシン類似物質と同様の傾向を示した²¹⁾。また, クロマツ葉中の PBDEs 濃度は飛灰 {7350 ng/g, dry weight (乾重量換算)} より明らかに低濃度であった。次にクロマツ葉及び飛灰中の PBDEs 同族

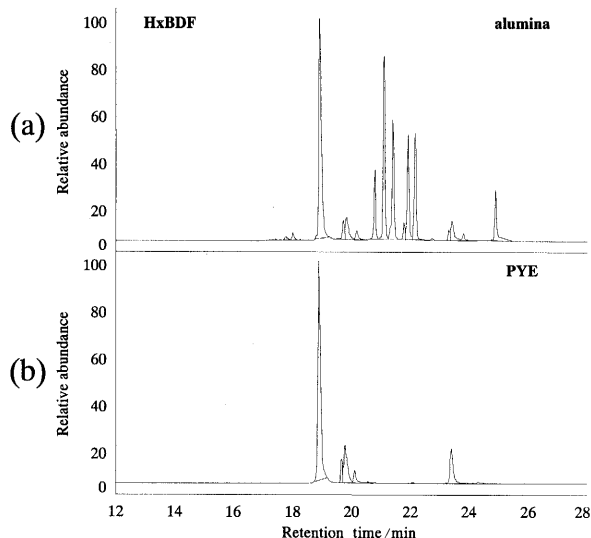


Fig. 4 Chromatograms of hexaBDF in fly ash sample after alumina glass column (a) and PYE-HPLC (b) fraction

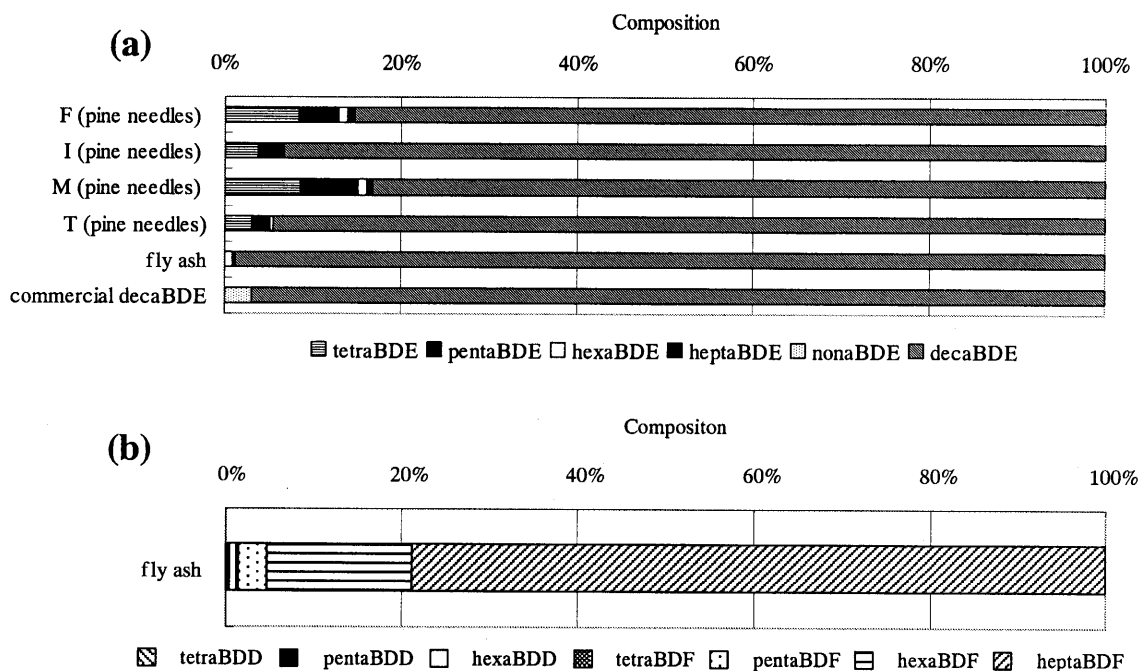


Fig. 5 PBDEs (a) and PBDDs/DFs (b) compositions of environmental matrices examined

体組成に関しては, PBDE-209 の存在割合が 85% 以上を占め {Fig. 5 (a)}, 国内及び欧州で最も多く使用されている PBDEs 製品の一つである decaBDE 製品の組成と類似しており⁵⁾, PBDEs 汚染源の一つとして考えられる。また, 五大湖周辺及び北欧大気中の PBDEs 同族体組成も東京湾クロマツ葉と同様に PBDE-209 の存在割合が高いことが報告されており³⁵⁾³⁶⁾, これら結果からクロマツ葉中 PBDEs は塩素化ダイオキシン類と同様に大気中の汚染を反映していると考えられる。更にクロマツ葉中には低臭素化 PBDEs が比較的高い割合で存在しており, 大気中及びクロマツ葉中での光分解等の影響により, 高臭素化物が脱臭素化したこと及び高臭素化物の含まれた難燃剤の燃焼等により低臭素化物が大気中に放出され, クロマツ葉中に反映したことが推察される。

PBBs に関しては, 未同定の pentaBB 異性体, IUPAC Nos. 153, 180 及び未同定の octaBB 異性体を測定し, ほとんどの試料で No. 153 及び 180 は検出された。No. 153 及び 180 は PBBs 製品 (Firemaster BP-6 等) 中の主成分であることが知られている³⁷⁾。測定した PBBs 濃度はクロマツでは 0.73~2.7, 飛灰では 200 pg/g であった。クロマツは飛灰よりも明らかに低濃度であった。国内では PBBs 製品がほとんど使用されていないが, クロマツ葉中に低濃度の PBBs が検出された。これらの汚染源は残留している PBBs 製品及び PBDEs 製品中に不純物として存在する PBBs の可能性³⁸⁾が考えられる。

PBDDs/DFs (2,3,7,8-tetraBDD/DF, 1,2,3,7,8-pentaBDD/DF, 2,3,4,7,8-pentaBDF, 1,2,3,4,7,8-hexaBDD/DF, 1,2,3,6,7,8-hexaBDD, 1,2,3,7,8,9-hexaBDD, 1,2,3,4,6,7,8-heptaBDF) に関しては飛灰のみから検出され, 測定した PBDDs 及び PBDFs 濃度はそれぞれ 2.3 及び 200 ng/g であった。組成に関しては heptaBDF の存在割合が高かった {Fig. 5 (b)}。また, 全試料から PCBs, PCNs 及び PCDDs/DFs も検出されており, 本法によって可能になった異性体詳細分析により, 臭素化物及び塩素化物の供給源推定及び環境モニタリングの高度化が期待される。

Kurunthachalam Kannan 博士 (State University of New York at Albany, 米国) の標準物質提供及びご助言に謝意を表す。また, 研究スタッフである谷保佐知氏の協力に感謝する。

(2004 年 5 月, 第 65 回日本分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) 化学工業日報社: 2002 年化学工業年鑑 (難燃剤), **3**, 381 (2003).
- 2) WHO: "Environmental Health Criteria", **192** (1997).
- 3) 日本機械輸出組合: 海外環境関連情報誌, **4** (2002, 7).
- 4) WHO: "Environmental Health Criteria", **162** (1994).
- 5) C. A. de Wit: *Chemosphere*, **46**, 583 (2002).
- 6) H. M. Blanck, M. Marcus, V. Hertzberg, P. E. Tolbert, C. Rubin, A. K. Henderson, R. H. Zhang: *Environ. Health Persp.*, **108**, 147 (2000).
- 7) H. Thoma, S. Rist, G. Hauschulz, O. Hutzinger: *Chemosphere*, **15**, 649 (1986).
- 8) H. R. Buser: *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 404 (1986).
- 9) S. Sakai, J. Watanabe, Y. Honda, H. Takatsuki, I. Aoki, M. Furumatsu, K. Shiozaki: *Chemosphere*, **42**, 519 (2001).
- 10) A. Sjodin, H. Carlsson, K. Thuresson, S. Sjodin, A. Bergman, C. Ostman: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 448 (2001).
- 11) J-W. Choi, J. Onodera, K. Kitamura, S. Hashimoto, H. Ito, N. Suzuki, S. Sakai, M. Morita: *Chemosphere*, **53**, 637 (2003).
- 12) WHO: "Environmental Health Criteria", **205** (1998).
- 13) W. Chatkittikunwong, C. S. Creaser: *Chemosphere*, **29**, 547 (1994).
- 14) 小野寺 潤, 上田祥久, 崔 宰源, 橋本俊次, 鈴木規之, 森田昌敏, 佐藤寿邦: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 505 (2003).
- 15) 小野寺 潤, 上田祥久, 崔 宰源, 橋本俊次, 鈴木規之, 森田昌敏, 佐藤寿邦: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 205 (2003).
- 16) I. Watanabe, R. Tatsukawa: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**, 953 (1987).
- 17) I. Hua, N. Kang, C. T. Jafvert, J. R. Fábrega-Duque: *Environ. Tox. Chem.*, **22**, 798 (2003).
- 18) K. R. Echols, R. W. Gale, K. Feltz, J. O'Laughlin, D. E. Tillitt, T. R. Schwartz: *J. Chromatogr. A*, **811**, 135 (1998).
- 19) K. Kimata, K. Hosoya, H. Kuroki, N. Tanaka, J. R. Barr, P. C. McClure, D. G. Patterson, E. Jakobsson, A. Bergman: *J. Chromatogr. A*, **786**, 237 (1997).
- 20) 堀井勇一, 岡田 誠, 天野一男, 羽成修康, 谷保佐知, 山下信義: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 1009 (2002).
- 21) 羽成修康, 堀井勇一, 谷保佐知, 山下信義: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 127 (2003).
- 22) B. van Bavel: Final report 7th round of the International Intercalibration Study (2002).
- 23) B. van Bavel, J. Hagberg, G. Lindström: *Organohalogen Compounds*, **66**, 583 (2004).
- 24) D. Calamari, P. Tremolada, A. D. I. Guardo, M. Vighi: *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 429 (1994).
- 25) JIS K 0311, 排ガス中のダイオキシン類及びコプラナー PCB の測定方法 (2005).
- 26) 生田悟史, 宮崎 徹, 今村 崇, 伊藤幹夫: 第 11 回環境化学討論会要旨集, p. 544 (2002).
- 27) 環境省環境管理局: ダイオキシン類に係る大気環境調査マニュアル (2001).
- 28) J. Ebert, W. Lorenz, M. Bahadir: *Chemosphere*, **39**, 977 (1999).
- 29) K. Hayakawa, H. Takatsuki, I. Watanabe, S. Sakai: *Chemosphere*, **57**, 343 (2004).
- 30) T. S. Kim, S. K. Shin, C. H. Lee, Y. H. Kim, S. R. Hwang, S. C. Kim, J. G. Na: *Organohalogen Compounds*, **60**, 131 (2003).
- 31) J-F. Focant, A. Sjodin, W. E. Turner, D. G. Patterson Jr.: *Anal. Chem.*, **76**, 6313 (2004).
- 32) V. Jaspers, A. Covaci, J. Maervoet, T. Dauwe, S. Voorspoels, P. Schepens, M. Eens: *Environ. Pollut.*, **136**, 81 (2005).

- 33) J. Hagberg, B. van Bavel, C.-J. Lothgren, G. Lindstrom: *Organohalogen Compounds*, **66**, 1133 (2005).
- 34) J. de Boer, W. P. Cofino: *Chemosphere*, **46**, 625 (2002).
- 35) C. M. Butt, M. L. Diamond, J. Truong, M. G. Ikonomou, A. F. H. ter Schure: *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 724 (2004).
- 36) A. F. H. ter Schure, P. Larsson: *Atmospheric Environment*, **36**, 4015 (2002).
- 37) U. Berger, W. Vetter, A. Gotsch, R. Kallenborn: *J. Chromatogr. A*, **973**, 123 (2002).
- 38) N. Hanari, K. Kannan, Y. Miyake, T. Okazawa, P. S. Kodavanti, K. M. Aldous, N. Yamashita: *Environ. Sci. Technol.*, accepted.

Congener-Specific Determination of Brominated/Chlorinated
Dioxins and Related Compounds by
Two-Dimensional HPLC Cleanup System

Nobuyasu HANARI^{1,2}, Yuichi MIYAKE¹, Yuichi HORII¹,
Tsuyoshi OKAZAWA¹ and Nobuyoshi YAMASHITA¹

¹ Institute for Environmental Management Technology (EMTECH), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 16-1, Onogawa, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8569

² Present address, National Metrology Institute of Japan (NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1, Umezono, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8563

(Received 17 January 2006, Accepted 31 March 2006)

The method enables congener-specific determination not only of polychlorinated dioxins but also of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), -biphenyls (PBBs), -dibenzo-*p*-dioxins (PBDDs) and -dibenzofurans (PBDFs) using two dimensional high performance liquid chromatograph (HPLC) with graphitized carbon and pyrenyl silica columns cleanup, and high resolution gas chromatograph with high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) system. Additionally, the analytical method developed enables separation and quantification not only of PBDFs without co-elution from PBDEs but also of PBDE IUPAC No. 209. The reliable analysis of PBDE-209 was operated in parallel by the HRGC/HRMS and GC with tandem mass spectrometry, because the quantitative analysis of PBDE-209 is relatively difficult task due to liable physical properties and high molecular weight. Calibration curves from the peak areas of PBDEs, PBBs and PBDDs/DFs were linear with high correlation coefficients of more than 0.992 at the range from 2 to 1000 pg/μl (some congeners: 10 to 1000 pg/μl). The relative standard deviations of PBDEs, PBBs and PBDDs/DFs by the peak areas were acceptable with a range of 2.7 to 11.2%, 2.0 to 11.7% and 5.9 to 12.5%, respectively. This analytical method could be applied to various matrices on pine needles as passive indicator and fly ash of international calibration study. Congener-specific determination of PBDEs, PBBs and PBDDs/DFs in pine needles was achieved in this study for the first time. Risk assessment by congener-specific data of brominated/chlorinated dioxins and related compounds was possible to carry out using this developed method.

Keywords : polybrominated diphenyl ethers; polybrominated biphenyls; polybrominated dibenzo-*p*-dioxins; polybrominated dibenzofurans; polychlorinated dioxins; congener-specific determination.