

ダイオキシン類分析における湿泥抽出試料中の 多環芳香族炭化水素類の除去方法の検討

佐竹 輝洋 木原 敏博* 五十嵐 正次 井上 邦雄 矢野 公一

要 旨

ダイオキシン類分析における、河川湿泥からの高速溶媒抽出装置による抽出方法及び湿泥抽出試料中の多環芳香族炭化水素類(PAHs)の除去を目的としたクリーンアップ方法の検討を行った。湿泥からの抽出は、高速溶媒抽出装置(ASE200)を用いてアセトンとトルエンの段階抽出を行い、従来の風乾試料からのトルエンソクスレー抽出と同等の抽出効果が得られることを確認した。また、生物検定法における夾雑物質であるPAHsの除去に10%硝酸銀シリカゲルが有効であることを高分解能GC/MSで確認した。これらの結果から、ASE200による湿泥抽出試料に10%硝酸銀シリカゲルを2層にした多層シリカゲルカラム処理を行なった際のPAHs除去効果を確認した。

1. 緒 言

河川や湖沼の底質におけるダイオキシン類の測定は、平成12年に当時の環境庁から「ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル」¹⁾(以下、マニュアルと記載)として発表され、高分解能GC/MSによる高精度な分析が可能となった。

その後、これまでに生物検定法を始めとする簡易測定法などの新しい測定方法や前処理方法が開発され、その一部は排ガス等に限るが公定法として指定されている²⁾。しかし、これらの簡易測定法は高分解能GC/MSによる測定法と比較し迅速・簡便であるが、測定精度は若干劣るとされている。その原因として、生物反応を利用したことによる交差反応の問題やマトリックスの問題などが挙げられるが、特に多環芳香族炭化水素類(PAHs)による偽陽性反応が起こりやすいことがあげられる。そこで今回、各種シリカゲルのPAHs除去効果と、高速溶媒抽出装置(ASE200)を用いて抽出した河川底質の湿泥試料に対する各種シリカゲルのPAHs除去効果の検討を行ったので、報告する。

2. 方 法

2-1 試薬

ダイオキシン類の標準品及び各スパイク用の内部標準品はWELLINTON社製を用いた。

多環芳香族炭化水素Mix標準品はSUPELCO社製を用い、内部標準物質としてDr. Ehrenstorfer社製Benzo(a)pyrene-d12を用いた。

アセトン、ヘキサン、活性炭分散シリカゲルは関東化学(株)のダイオキシン類分析用を用いた。

トルエン、ジクロロメタン、ノナン、無水硫酸ナトリウム、多層カラム用各種シリカゲル、多環芳香族炭化水素類除去効果試験用各種シリカゲルは和光純薬工業(株)のダイオキシン類分析用を用いた。

2-2 各種シリカゲルの多環芳香族炭化水素類(PAHs)除去効果試験

各種修飾シリカゲル(シリカゲル、2%水酸化カリウムシリカゲル、44%硫酸シリカゲル、10%硝酸銀シリカゲル)

*札幌市保健所

ル)は、各1gを130、3時間で活性化処理を行った後、ヘキサンで満たした内径15mmのカラムクロマト管中に充填し、さらに無水硫酸ナトリウムを5g充填した。ヘキサンを無水硫酸ナトリウム層まで下げた後、多環芳香族炭化水素標準品Mixを50ng添加し、ヘキサン60mlを毎秒1滴程度の速度で流下し、その溶出液を回収した。

回収した溶出液にBenzo(a)pyrene-d12 500pgを内部標準物質として添加後、約50μlに濃縮し、高分解能GC/MSでPAHsの測定を行った。

2-3 底質試料の調製

試料は、平成17年度から平成18年度にかけて札幌市内の河川で採取した底質試料を用いた。

底質試料は、湿泥のまま2mm Meshにかけたものをガラス瓶に入れ、冷蔵保存した。試料の抽出の際には、その含水率と強熱減量を測定するため、抽出に用いた試料を110、2時間で減量した重量から含水率を、さらに600、2時間で減量した重量から強熱減量を算出した。なお、ダイオキシン類測定の際は、この含水率の補正を行ったものを試料量として算出した。

2-4 ASEによる湿泥試料の抽出

ASE(DIONEX社製 ASE200)抽出セル33mlの底に、ハイドロマトリクスを約1g充填後、調製した湿泥40~50g程度(補正後乾燥重量:20~40g程度)を充填し、ダイオキシン類測定と回収率確認のためのクリーンアップスパイクを10μl添加した。ASEの抽出条件は表1に示すMethod1~4を順次行い、得られた抽出液を合わせたものを試料液とした。

また、マニュアルに従い湿泥を風乾させ2mm Meshにかけた試料30g程度を16時間以上トルエンソクスレー抽出した試料液を比較用として調整した。

2-5 精製(ダイオキシン類分析用)

湿泥抽出液を濃縮後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒をヘキサンに置換し、硫酸処理を行った。処理後に濃縮し、還元銅で硫黄成分の除去後、マニュアルに従い多層シリカゲルカラムを用いて夾雑物を取り除いた。

流出液を濃縮後、活性炭分散シリカゲルによる画分精製を行った。試料を負荷した後、30分ほど放置してからヘキサン20mlでDL-PCB以外のPCB及びその他の夾雑物を洗浄、その後ヘキサン:ジクロロメタン(3:1)40mlでmono-ortho PCBs画分を流出、最後にカラムを加熱しながらトルエン200mlでnon-ortho PCBs及びPCDDs/DFs画分を流出した。それぞれの画分を濃縮し、シリンジスパイクを5μl添加したあと、ノナンを加えさらに50μlまで窒素吹きつけで濃縮し、GC/MS用試料液とした。

表1 ASE抽出条件

	Method1	Method2	Method3	Method4
Solvent	Acetone	Acetone	Acetone	Toluene
Temp. (°C)	100	150	200	200
Pressure (psi)	500	1500	2000	2000
Pre heat (min)	3	5	5	2
Static (min)	5	15	15	15
Flush (%)	80	50	50	50
Purge (sec)	60	60	60	60
Cycle (time)	1	1	1	1

2-6 精製(湿泥試料からのPAHs除去確認用)

湿泥抽出液を濃縮後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ヘキサン置換後、硫酸処理を行った。

処理後に濃縮し還元銅数gで硫黄成分を除去した後、マニュアルで示される順に各種シリカゲルを積んだ上、さらに最下層に活性化10%硝酸銀シリカゲルを加えた多層シリカゲルカラム処理を行った(表2)。多層シリカゲルカラム処理後に濃縮し、Benzo(a)pyrene-d12を250pg添加後、ノナンを加え50μlまで窒素吹きつけで濃縮し、GC/MS用試料液とした。

また、別途ダイオキシン類測定用として、多層シリカゲルカラム処理後に2-5と同様の活性炭分散シリカゲル処理を行った。

表2 多層シリカゲルカラム処理

上 ↑ ↓ 下	無水硫酸ナトリウム	1 cm
	10%硝酸銀シリカゲル	3.0 g
	シリカゲル	0.9 g
	22%硫酸シリカゲル	4.0 g
	44%硫酸シリカゲル	3.0 g
	シリカゲル	0.9 g
	2%水酸化カリウムシリカゲル	3.0 g
	シリカゲル	0.9 g
	10%硝酸銀シリカゲル	2.0 g
(130 3時間で活性化済み)		
下から順次積み上げた多層シリカゲル層に試料を添加し、ヘキサン180mlで溶出させた。		

2-7 GC/MS分析条件

分析機器及び条件を表3に示す。GCはAgilent社製6890Plusを用い、注入量は1μlとした。シリンジの洗浄にはアセトン及びヘキサンの2段階洗浄を行った。

使用カラムについて、4,5,6Cl-PCDDs/DFsの分析にはSUPELCO社製 SP2331、7,8Cl-PCDDs/DFs及びDL-PCBsの分析には関東化学のHT8-PCB、PAHsの分析にはJ&W SCIENTIFIC社製DB-5を用いた。

MSは日本電子社製 JMS700Dを用い、分解能10000以上で分析した。

2-8 同定及び定量

ダイオキシン類については、対応するクリーンアップスパイクのピークとのマッチングにより同定を行った。また、PAHsについては、Benzo(a)pyrene-d12のピークとのマッチングにより同定を行った。

表3 GC/MS分析条件

GC: Agilent 6890 Plus (Agilent Technologies)

	Injection mode : splitless Injection volume : 1 μl Flow mode : Constant Flow mode
456Cl PCDDs/DFs	Column : SP2331 60m/0.32mm/0.2 μm (supelco) Oven temp. : 100 (1min)-20 /min-200 -2 /min-260 (24min) Injection temp. : 260 Pressure : 108.3kPa
78Cl PCDDs/DFs	Column : HT8-PCB 60m/0.25mm (Kanto Kagaku) Oven temp. : 130 (1min)-20 /min-320 (10min) Injection temp. : 280 Pressure : 230.5kPa
DL-PCBs	Column : HT8-PCB 60m/0.25mm (Kanto Kagaku) Oven temp. : 130 (1min)-20 /min-200 -2 /min-240 -8 /min-320 (10min) Injection temp. : 280 Pressure : 230.5kPa
PAHs	Column : DB-5 60m/0.32mm/0.25 μm (J&W Scientific) Oven temp. : 90 (1min)-20 /min-270 -3 /min-300 -20 /min-320 (15min) Injection temp. : 280 Pressure : 45.2kPa

MS: JMS700D(JEOL)

Ionized energy : 38eV Current : 600 μA Resolution : >10000 Accel. Volt : 10kV	Ion source temp. : 260 (456Cl PCDDs/DFs) : 280 (78Cl PCDDs/DFs) : 280 (DL-PCBs) : 280 (PAHs)
--	---

PCDDs/DFsの2378体以外のコンジェナーについては、Ryanらの文献³⁾を元にして同定を行い、Benzo(a)pyrene以外のPAHsについては「有害大気汚染物質測定の実際」⁴⁾のピーク溶出順序を元にして同定を行なった。

定量は対応するクリーンアップスパイク、あるいはBenzo(a)pyrene-d12を内部標準として、相対感度係数法により行なった。ダイオキシン類の検量線、下限値はマニュアルに従った。PAHsの検量線範囲は0.5～50ng/mlの5段階で作成し、1μlをインジェクションした際の検量線の最低濃度(0.5pg/μl)を定量下限とした。

3. 結果

3-1 各種シリカゲル類のPAHs除去効果

活性化処理を行なった各種シリカゲルのPAHs除去効果を試験した結果を図1に示す。50ngのPAHsに対し、10%硝酸銀シリカゲルにおいて、測定を行ったPAHsの全てで除去効果(<0.5pg/μl)があることが認められた。44%硫酸シリカゲルにおいても、Benzo(a)pyreneやIndeno(1,2,3-cd)pyreneについては良好な除去効果があったが、ChryseneやBenzo(b)(k)Fluorantheneについては61～84%の残存率を示した。またこの結果は、異なるロットにおいてもほぼ同様の結果を示した。

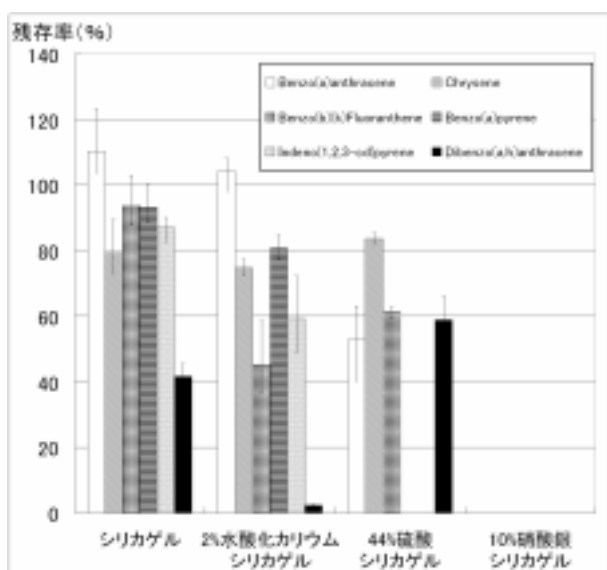


図1 各種シリカゲルによるPAHsの残存率

3-2 湿泥からのASE抽出

湿泥からASEで抽出を行った場合と、マニュアル通り処理(風乾させた試料に対し、16時間以上トルエンソクスレー抽出を行った場合)とで、クリーンアップスパイクによる抽出率の比較を図2に示す。ここで得られたASE抽出の回収率は、マニュアルに示された50～120%の範囲にあり、良好な結果を示した。

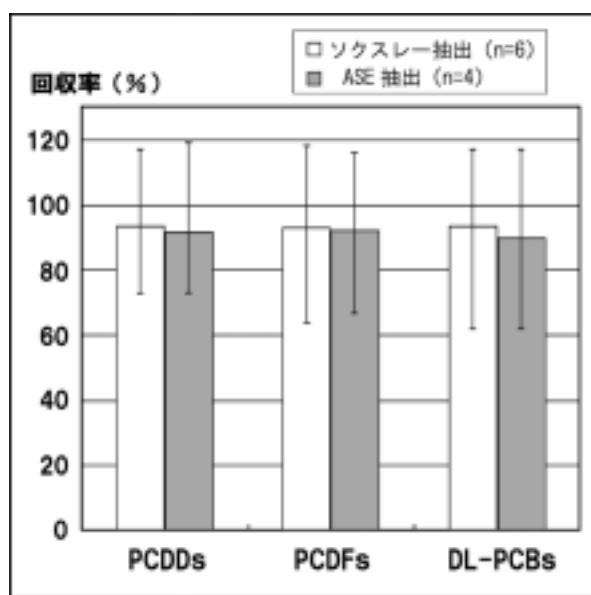


図2 ASE法と公定法との回収率の比較

3-3 湿泥抽出試料に対するPAHs除去効果

湿泥からASEで抽出を行なった試料に、活性化した10%硝酸銀シリカゲル2gを最下層に敷いた多層シリカゲルカラム処理を行なった溶出液に含まれるPAHsを測定したクロマトグラムを、図3に示す。全て異なる場所で採取した試料(n=3)で行なった試験のいずれもPAHsは溶出しなかった。

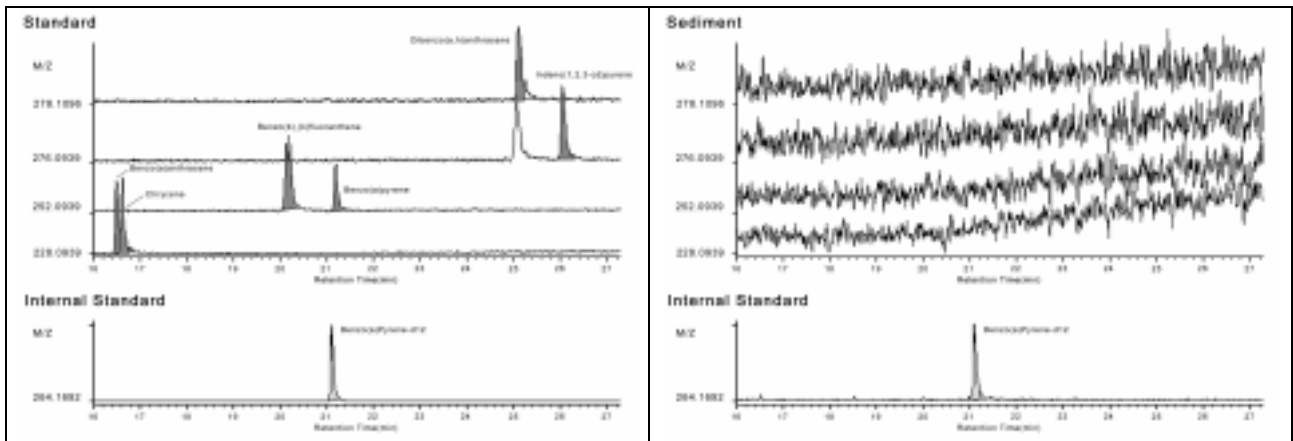


図3 PAHs Standard(左)と多層シリカゲル処理後の湿泥抽出試料(右)のSIMクロマトグラム

Sedimentの表示倍率はStandardのおよそ12～20倍 (Internal Standardを除く)

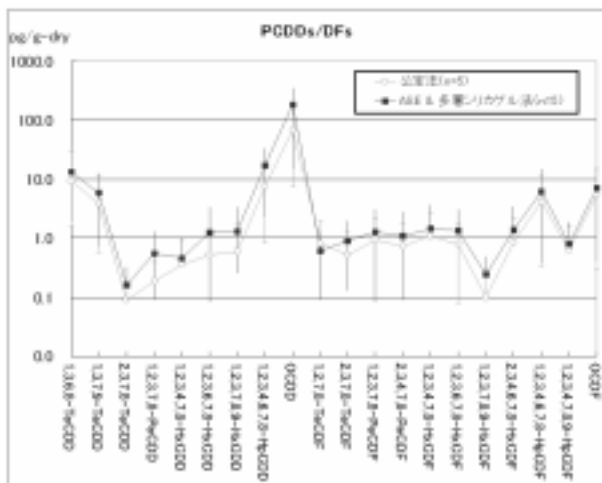


図4 公定法との比較 (PCDDs/DFs)

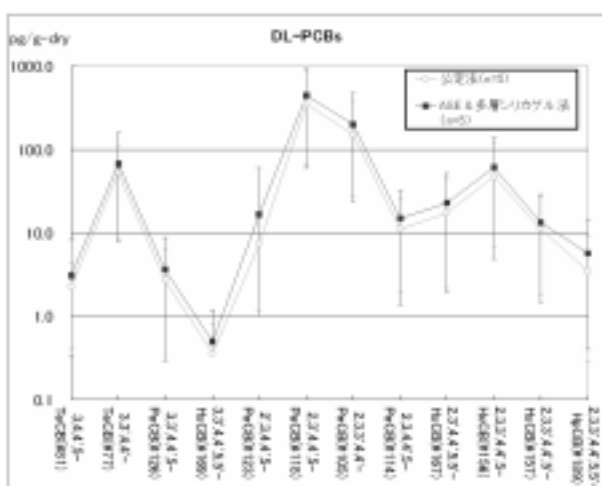


図5 公定法との比較 (DL-PCBs)

3-4 活性化10%硝酸銀シリカゲルを加えた多層シリカゲルカラム処理後の、ダイオキシン類濃度

ASE抽出及び変則多層シリカゲルカラム処理による測定法と、公定法とのダイオキシン類濃度の測定結果の比較を図4及び図5に示す。ASE抽出を行なった測定法と公定法とで、ほぼ同等の結果が得られた。

また、毒性等量への換算値は、公定法が平均1.7pg-TEQ/g(0.2～4.0pg-TEQ/g)でASE抽出法が平均2.9pg-TEQ/g(0.3～6.9pg-TEQ/g)と、ASE抽出法の方が高い値を示した。

4. 考 察

標準品を用いたPAHs除去能については、活性化を行なった10%硝酸銀シリカゲルで最も高い効果を示した。しかし、水上らの報告⁵⁾にもあるように、PAHsの除去能はシリカゲルの水分含量の影響を受けやすく、活性化を行なわなかった場合は、PAHsの除去能が著しく低下する場合があった。そのため、今回行なった130、3時間の活性化は、10%硝酸銀シリカゲルのPAHs除去効果を安定して得られる有効な手段だと考えられる。

また、湿泥からのASE抽出では、従来の風乾試料からのソクスレー抽出と比較し、時間が大幅に短縮でき、さらに溶媒量も少量で済んだ。クリーンアップスパイクから算出した回収率は、公定法と比較しても遜色なく抽出

が行えることが確認できた。

湿泥からのASE抽出試料の前処理として検討した、活性化10%硝酸銀シリカゲルを最下層に用いた多層シリカゲル処理では、測定した全ての試料についてPAHsの除去効果を示しており、生物検定法をはじめとする簡易測定法に応用できる可能性が示唆された。さらに、ダイオキシン類の濃度も従来のソクスレー抽出法とほぼ同等であった。毒性等量への換算値を比較すると、若干高い値が見られたが、ASE抽出がソクスレー抽出に比べ高い抽出効率を示すこと⁶⁾が原因として考えられる。しかし、短時間かつ溶媒が少量に抑えられるASE抽出のメリットを考慮すると、有効な抽出法であると考えられる。

また、今回はデータに示さなかったが、ダイオキシン類測定の際に使用した活性炭シリカゲルカラム処理の際に、トルエン層からPAHsが溶出されることが確認された。ロット間やメーカーによる比較を行っていないため、詳しくは言及できないが、未処理の活性炭シリカゲルへトルエンを流すことでPAHsの溶出が確認できたことから、製造過程でPAHsが活性炭へ吸着している可能性があった。

2004年に国土交通省から河川、湖沼の底質中ダイオキシン類の簡易測定マニュアルの案⁷⁾が出され、現在底質への簡易測定法の適用へ向けた検討が行なわれている。今回の検討により、湿泥のASE抽出法と活性化10%硝酸銀シリカゲル処理によるPAHsの除去法を組み合わせた前処理方法が、生物検定法等の簡易測定法へ応用できる可能性が示唆された。しかし、底質における夾雑物質の影響は、その試料により大きな差があり未だ未知の部分も多く、さらには今回述べた活性炭シリカゲルの問題等もあるため、今後さらなる検討を必要とする。

5. 文 献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課：ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル，2000
- 2) 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室：ダイオキシン類に係る生物検定法マニュアル（排出ガス、ばいじん及び燃え殻），2006
- 3) Ryan.J.J, CONACHER.H.B.S,PANOPIO.L.G *et.al* : Gas

chromatographic separations of all 136 tetra- to octa-polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans on nine different stationary phases,

Journal of Chromatography, 541, 131-183, 1991

- 4) 有害大気汚染物質測定の実際編集委員会：有害大気汚染物質測定の実際，221-238，2000
- 5) 水上桐子，濱田典明，本田克久：第15回環境化学討論会講演要旨集，280-281，2006
- 6) 岸田真男，山本仁史，服部幸和：第12回環境化学討論会講演要旨集，602-603，2003
- 7) 国土交通省河川局河川環境課：河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル（案），2004

Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Wet Sediment Specimens in Analysis of Dioxins

Akihiro Satake, Satohiro Kihara^{*}, Masatsugu Igarashi,
Kunio Inoue and Koichi Yano

We studied extraction methods of dioxins from wet sediment specimens using accelerated solvent extractor (ASE 200) and clean-up methods to remove polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The recovery rates of dioxins from wet sediments specimens using ASE 200 were almost the same as the recovery rates using Soxhlet extraction which takes 10 to 20 days to dry. High resolution GC/MS demonstrated that clean-up by 10% silver nitrate silica gel was effective to remove PAHs from wet sediment specimens. Our study suggested that the extraction of dioxins using ASE 200 combined with the clean-up by 10% silver nitrate silica gel is a suitable method to analyze dioxins rapidly and effectively.

^{*}Public Health Office, City of Sapporo