

高速溶媒抽出法を応用したダイオキシン類の 簡易迅速分析法の検討

飯村文成 佐々木啓行 津久井公昭 吉岡秀俊 佐々木裕子

要 旨

長時間を要するソックスレー法に代わる抽出法として、高速溶媒抽出法（ASE）については多くの検討例がある。しかし、ASE では多量の夾雑物も同時に抽出されるため、かえって精製が煩雑になる場合も少なくない。そこで、抽出だけでなく精製においても簡易、迅速化を図るために、溶媒の切り換えによって夾雑物と目的成分を選択的に抽出する方法について検討した。その結果、最初に極性物質除去のためメタノールで抽出し、次いでトルエンなどの低極性溶媒で抽出することで、公定法であるトルエンでソックスレー抽出した場合と同等のダイオキシン類濃度を示し、かつ夾雑物が大幅に減少することがわかった。公定法との相関、溶媒の種類や温度条件等、さらに検討の余地はあるが、ASE を用いた選択的抽出は、簡易・迅速分析法として有効と考えられる。

キーワード：ダイオキシン類、簡易・迅速法、高速溶媒抽出法（ASE）、選択的抽出、溶媒

Study of Rapid and Simplified Analytical Method of Dioxin using Accelerated Solvent Extraction.

Fuminari Iimura, Hiroyuki Sasaki, Takaaki Tsukui, Hidetoshi Yoshioka, Yuko Sasaki

Many investigations have been done as to whether ASE has efficiency to replace the soxhlet extraction, which require long extraction time. Those methods, however, need complicated clean up processes subsequently because of much amount of matrices co-extracted. In order to simplify the clean up process, the selective extraction of dioxins was examined using combination solvents method. The extracts using non-polar solvent such as toluene alternating methanol extraction was observed to be nearly same level of dioxins compare with the extracts using soxhlet extraction by toluene. Furthermore, this selective extraction was found to reduce clean up process such as removal of sulfur compounds. Though it might require accumulating the data about various solvents and extraction conditions, the selective extraction ASE seemed to be useful for rapid analysis of dioxins.

Key Words: dioxin, rapid and simplified method, Accelerated Solvent Extraction, selective extraction, solvent

1 はじめに

ダイオキシン類分析の最初の工程である抽出においては、公定法に記載されているソックスレー抽出法が広く用いられている。しかし、ソックスレー法は16時間以上の長時間を要することや多量の有機溶媒を使用することなどから、より迅速・簡易な方法が模索されている。中でも、高速溶媒抽出（Accelerated Solvent Extraction、以下「ASE」という）は、短時間で高効率の抽出が行え

ることから、多くの研究機関で検討がなされている。しかし、抽出時間は短縮するものの多量の夾雑物も同時に抽出されるため、かえって精製が煩雑になる場合も少なくない。そこで、抽出時間だけでなく精製に要する時間の短縮化及び作業負担の軽減を目的に、溶媒の切り換えによって夾雑物と目的成分を選択的に抽出する方法について検討した。

また、定量範囲を超える高濃度異性体を含む試料に関

し、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計（以下、「GC-MS」という）の再測定回数を減らす試みを行ったので、あわせて報告する。

2 方法

(1) ASE のしくみと選択的抽出の考え方

現在、ダイオキシンの抽出に広く用いられているソックスレー抽出は、加熱・気化した溶媒を冷却管で液化し試料に滴下させ、液量が一定量に達するとサイフオンの原理で溶媒が受器に戻るシンプルな仕組みである。公定法では、これを16時間（通常20サイクル以上）行うよう定められている。一方、ASE はセルと呼ばれる金属製の耐圧容器に試料を封入し、プログラムにより、溶媒の注入、加熱・加圧状態での静置、溶媒の受器への排出を順次行い、これら一連の動作を通常1～3回繰り返すことで抽出する¹⁾。ASE では、1試料ずつの処理しかできないものの、通常1試料当たりの所要時間は1時間未満で済む。

ASE では高温抽出が可能のため、ダイオキシン類に対する抽出効率はソックスレーと同等以上であるが¹⁾、測定妨害となる夾雑物も大量に抽出される。そこで今回、

溶媒を換えて2ないし3段階の抽出を行うことで、目的成分を効率的、かつ選択的に抽出する方法を検討した。

図1に示すように、最初に極性物質の除去を目的に、穏やかな条件で極性溶媒を用いて前抽出を行った。この段階はいわば「洗浄」に相当する。次いで、目的成分であるダイオキシン類を低極性溶媒により抽出（以下、「本抽出」という）するが、前抽出溶媒と本抽出溶媒の親和性が低い場合は、本抽出の前に双方と親和性のある溶媒に置換することで抽出効率の向上を図った。この中間の段階は、以下「置換」という。置換の際に排出される溶媒は、本抽出液と合わせ分析に供した。このような溶媒を変えての選択的抽出は、ソックスレーでも不可能ではないが、操作が長時間に及び、前の溶媒の残存量が多いため、現実的ではない。

表1に、ダイオキシン類分析で使用する溶媒の物性等を示した。前抽出溶媒選択の基準として、高極性でダイオキシン類を抽出しにくいこと、本抽出時の抽出効率を高めるため脱水作用（親水性）が高いこと、本抽出溶媒との親和性が高いこと、が挙げられる。これらを考慮し前抽出溶媒として、メタノール及びエタノールについて検討した。

(2) 試料及び抽出装置

夾雑物を多く含む東京湾で採取された底質を均質化したものを、抽出条件検討用の試料として用いた。また、確認のための環境標準試料は国立環境研究所作成土壌試料・NIES No.21を用いた。ASEは、ダイオネクス社製高速溶媒抽出装置ASE200・溶媒コントローラー付、ソックスレー抽出器はButch社製B-811を用いた。

(3) 抽出

分析フローを、図2に示した。

あらかじめ洗浄した抽出セルに底質試料5g前後を正確に計り取り、ASE抽出した。

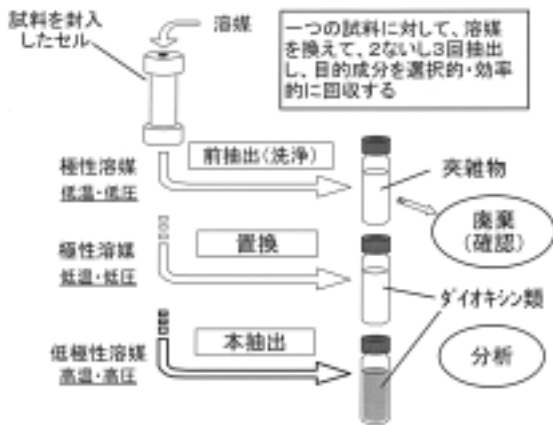


図1 ASEによる選択的抽出の考え方

表1 溶媒の相互親和性と物性

	相互親和性 (常温・常圧)						分子量	沸点 (°C)	双極子 モーメント (D)	参考	
	アセトン	ヘキサン	トルエン	メタノール	エタノール	水				危険物	劇物
アセトン	○	○	○	○	○	○	58.08	56.5	2.69	○	—
ヘキサン	○	○	○	×	○	×	66.18	68.7	0.09	○	—
トルエン	○	○	○	×	○	×	92.14	110	0.31	○	○
メタノール	○	×	×	○	○	○	32.04	64.1	2.87	○	○
エタノール	○	○	○	○	○	○	46.07	78.3	1.66	○	—

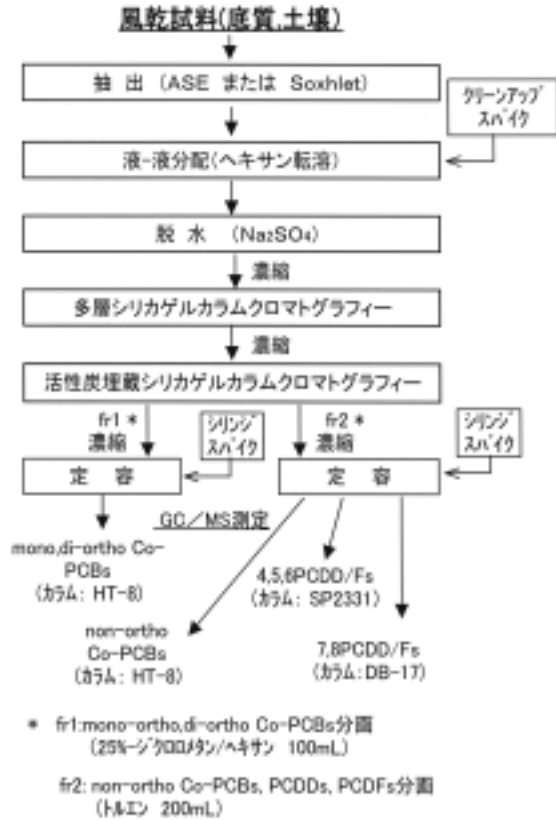


図2 ダイオキシン類の分析フロー

抽出溶媒は、表2に示した組み合わせとし、夾雑物の残存量や分析値の比較から、その有用性を検討した。また比較のため、一般的なASEの使用法であるトルエンあるいはアセトン単独で抽出した場合及び公定法であるソックスレー抽出についても測定した。抽出時の温度及び圧力は表3に示したとおりで、本抽出ではこれまで当所で用いてきた条件¹⁾、前抽出及び置換においては、温度及び圧力は装置で設定可能な最も穏やかな条件を選択し、時間及び抽出回数は目的に応じ決定した。

なお、ASEのオープンが本抽出の高温状態から前抽出などの低温状態までの冷却に時間を要するため、今回の検討では、各試料の前抽出を連続して行った後、順次、置換、本抽出を行った。

(4) 精製

精製は前報²⁾に準拠して行った。ただし、硫酸処理、還元銅による脱硫黄処理は行わず、多層シリカゲルカラムでこれらに相当する硫酸シリカゲルや硝酸銀シリカゲルの着色程度により、選択抽出による夾雑物の除去能を推定した。

(5) GC-MS 測定

今回使用した底質のような、比較的高濃度に汚染された試料の測定においては、Co-PCBの一部の異性体や8塩化のPCDD (08CDD) など、極端に高濃度の異性体が定量範囲を超過し、大半の試料で測定条件の変更や試料の希

表2 抽出における使用溶媒と条件

抽出方法 No.	ASE選択的抽出									ASE通常抽出			ソックスレー
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	
抽出条件	メタノール 前抽出 トルエン 本抽出	メタノール 前抽出 ヘキサン 本抽出	メタノール 前抽出 アセトン 置換 トルエン 本抽出	メタノール 前抽出 アセトン 置換 ヘキサン 本抽出	エタノール 前抽出 トルエン 本抽出	エタノール 前抽出 ヘキサン 本抽出	メタノール 前抽出 エタノール 本抽出	メタノール 前抽出 アセトン 本抽出	メタノール 前抽出 エタノール 置換 ヘキサン 本抽出	アセトン	トルエン	トルエン	
分析回数	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	

表3 各抽出条件におけるASE設定値

Step(工程)	Temp (温度)	Pressure (圧力)	Heat (予備加熱)	PreHeat (加熱安定化)	Static (加熱加圧静置)	Flush (溶媒入替え割合)	Purge (N2による排出)	Cycle (Static~Purge回数)	所要時間*
単位	°C	psi(気圧)	分	分	分	セル容量%	秒	回	分
前抽出	40	500 (35)	0	5	5	100	100	2	22
溶媒置換	40	500 (35)	0	5	1	100	100	3	20
本抽出/通常抽出	150	2000 (140)	0	7	10	100	100	3	45 (+10)
所要時間合計									87 (+10)

* セル容量等により変化する。()内はオープンの加温(40→150°C)に要する時間を示す。

積を行い再測定する必要がある。再測定には半日から1日を要するため、当所のように3本のGCカラムにより最低でも4回の測定を行う場合(図2参照)再測定も4回以上必要になる場合がある。また、高倍率の希釈はクリーンアップスパイク(内部標準液)を再度添加する必要が生じる。

そこで、再測定を減らすための測定条件を検討した。すなわち、通常、各同族体のモニターイオンは高感度検出を優先し、ダイオキシン類中の塩素同位体存在比により決まってくるイオン強度の高い方から2つを選ぶが、ここでは、それに加え強度が比較的低い2つのモニターイオンについても測定した。例としてCo-PCBのモニターイオンの理論存在比を表4、今回測定したモニターイオンの質量数を表5に示した。例えば、P5CBの異性体ピークが、通常のモニターイオンである323.8834(M)、325.8804(M+2)で定量範囲を超過しても、追加した329.8745(M+6)及び331.8716(M+8)においては信号強度が存在比に比例して小さくなるため、定量範囲に収まる確率が高くなる。これにより、正確な定量が可能であれば再測定が不要となる。今回は、定量範囲を超過することが多いT4CB、P5CB、H7CDD、H7CDF、O8CDDについて、モニターイオンを追加した条件で測定を行った。

表4 コプラナーPCBの理論天然存在比

	M	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10
T ₄ CB	76.67	100.00	49.11	10.83	0.93	
P ₅ CB	61.42	100.00	65.29	21.43	3.56	
H ₄ CB	51.22	100.00	81.48	35.51	8.75	1.17
H ₇ CB	43.93	100.00	97.67	53.09	17.38	3.43

注)塩素原子の質量数が全て35のものがM、質量数37の塩素の数に応じて+2ずつ増加。各塩素数毎に存在比が最も高い質量数の存在比を100として示した。

表5 コプラナーPCBのGC-MS測定におけるモニター質量数

	M	M+2	M+4	M+6	M+8
T ₄ CB	289.9224	291.9194		² 295.9135 ² 297.9106	
P ₅ CB	323.8834	325.8804		² 329.8745 ² 331.8716	
H ₄ CB		359.8415	361.8385		
H ₇ CB		393.8025	395.7995		
¹³ C ₁₂ -T ₄ CB	301.9626	303.9597			
¹³ C ₁₂ -P ₅ CB		337.9207	339.9177		
¹³ C ₁₂ -H ₄ CB		371.8817	373.8788		
¹³ C ₁₂ -H ₇ CB		405.8428	407.8398		

注)無印は通常の測定質量数、*印は今回追加した測定質量数。この他に、質量較正用に2つの質量数を測定。

3 結果と考察

(1) 夾雑物除去効果

メタノールによる前抽出液は無色~微黄色、エタノール前抽出液は微黄色で、本抽出液の着色に前抽出の有無による大きな差異は見られなかった。メタノールで前抽出した場合、直接トルエンやアセトンで抽出した場合に比べると、多層シリカゲルカラムの精製において、特に硝酸銀シリカゲルの着色が大幅に低減されており、硫黄化合物の除去効果が高いことが示唆された(写真1)。一方、メタノール前抽出の後にアセトンまたはエタノールで置換、続いて非極性溶媒で本抽出しこれらを合わせた場合は、夾雑物除去効果はやや低下する傾向があった(写真2)。なお、多層シリカゲルの着色状況については必ずしも一定の傾向は見られず再現性も十分でない

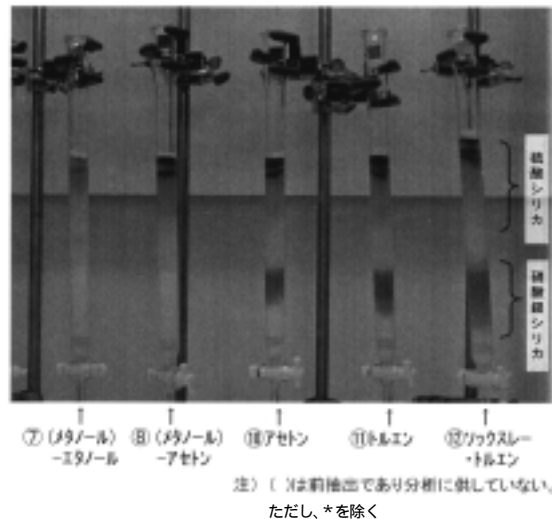


写真1 抽出溶媒による多層シリカゲルカラムの着色の例 - 1

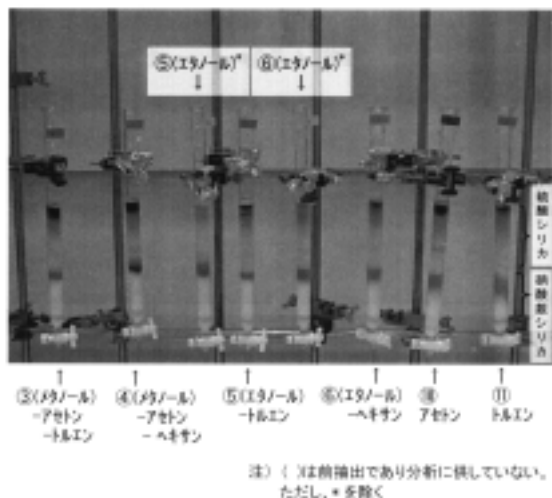


写真2 抽出溶媒による多層シリカゲルカラムの着色の例 - 2

め、さらに測定を行い確認する必要がある。

(2) ダイオキシン類濃度

結果を図3に示した。メタノールによる前抽出液は4試料分析しているが、いずれもダイオキシン類濃度は操作ブランクと同等レベルで、ほとんど検出されなかった。一方、エタノールの場合は最大で全量の50%程度のダイオキシン類が抽出され、前抽出溶媒としては不適切と判断された。

トルエンを使用した通常の単一溶媒によるASE抽出では、化合物によって多少の差はあるが、概ねトルエンによるソックスレー抽出と同程度の濃度を示した。

選択的抽出法の本抽出の濃度を、ソックスレー法と比較すると、メタノール前抽出 - エタノール本抽出ではやや低く、メタノール前抽出 - ヘキサン本抽出では大幅に低下していたが、それ以外は概ね同レベルであった。メタノール前抽出 - ヘキサン本抽出が低濃度を示したのは、ヘキサンとメタノールとの親和性が著しく低かったためと考えられ(表1)、アセトン等による置換を行うことで抽出効率は向上した。トルエンとメタノールも室温で

は親和性は低かったが、アセトンによる置換の有無でダイオキシン類濃度の差異が小さいことから、高温条件下では問題がないものと考えられる。

また、エタノールを本抽出に用いた場合はメタノールとの親和性は問題ないが、抽出力が弱く、本抽出には適さないことがわかった。

なお、本抽出にアセトンを使用した場合、PCDD/DFの一部の異性体組成が、トルエン - ソックスレーと大きく異なっており、脱塩素等の可能性について確認する必要がある。これについては(5)で詳述する。

以上の結果から、前抽出にはメタノールを用い、適切な置換溶媒を検討・選択し、本抽出にはトルエンを用いることが適当と考えられた。

(3) 環境標準試料

底質試料を用いた検討において比較的良好な結果が得られた方法のうち、溶媒の取り扱いの容易さも考慮し、2つの選択的抽出法で環境標準試料(土壌)を分析した。また、前述の異性体組成の変化を確認するためアセトンのみによるASE抽出も行った。当該試料に保証値は添付

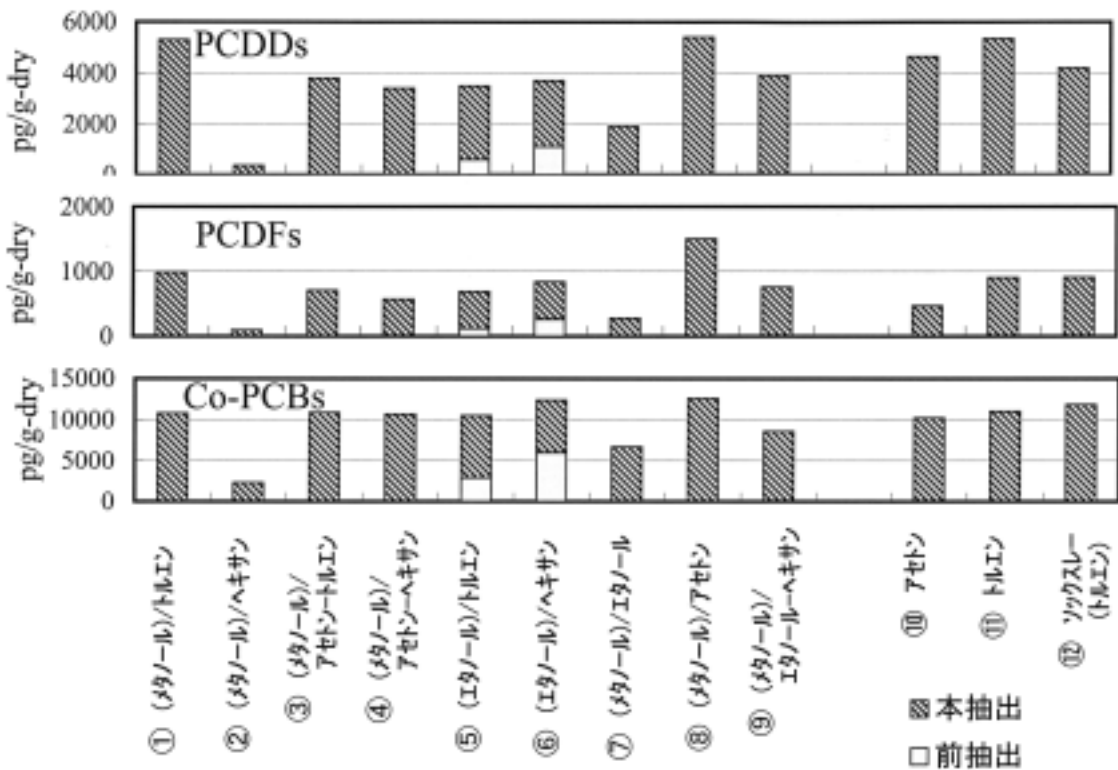


図3 底質中ダイオキシン類濃度の抽出法による比較

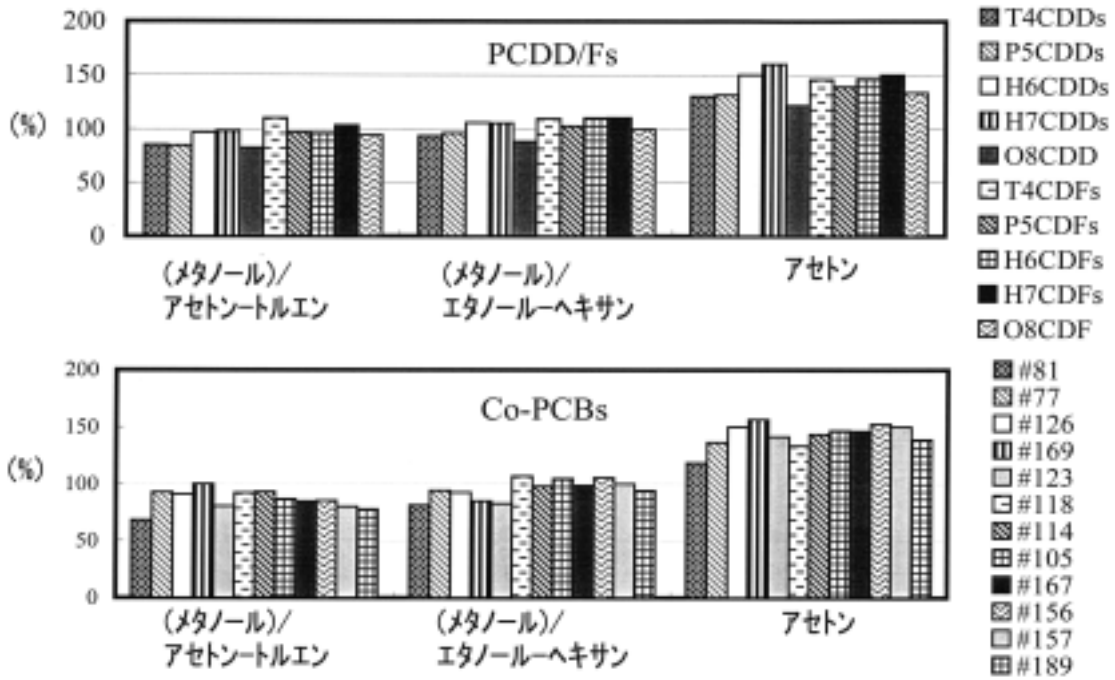


図4 環境標準試料中のダイオキシン類濃度のASE抽出溶媒による比較
(平成11年度環境測定分析統一精度管理調査の異常値棄却後の平均値を100とした係数)

されていないが、全国の分析機関が分析した結果が公表されている³⁾。今回の結果を、その平均値に対する比で図4に示した。

選択的抽出においては、アセトン置換 - トルエン本抽出におけるCo-PCBの2異性体がやや低かった以外、80～110%の範囲にあり良好な濃度を示した。一方、アセトン抽出では、118～160%で前報¹⁾同様すべて高濃度を示した。また、(2)の底質で見られたような溶媒による異性体組成の差異は見られなかった。

(4)GC-MS測定の迅速化

M+6、M+8などの各ピークにおいて、モニターイオンの同位体比は理論比に近く、他の化合物の影響はないと判断された。定量値も通常のモニターイオンで定量したものとほぼ一致した。また、今回のような高濃度試料においては、モニターイオン数が増えることによる感度低下及び検出下限値の上昇が、定量値に与える影響は無視し得るレベルと考えられた。

以上のことから、今回採用した方法は、妨害ピークの影響その他精度についてさらに検討が必要であるが、少なくとも緊急時やスクリーニング的な測定に有効であると判断された。

表6 底質中のダイオキシン類濃度の抽出条件

No.	ng/g-dry				
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
溶媒 (抽出法)	トルエン (ソックスレー)	トルエン (ASE)	アセトン (ASE)	トルエン (ASE・ 100℃)	アセトン (ASE・ 100℃)
2378-T4CDD	1.5	1.5	1.4	1.4	0.8
1368-T4CDD	500	477	510	390	280
1379-T4CDD	280	247	273	210	150
T4CDDs	825	790	873	650	470
12378-P5CDD	3.5	2.8	2.7	1.8	1.6
12347-P5CDD	5.5	4.7	4.1	3	11
P5CDDs	140	123	233	97	96
123478-H6CDD	4.0	3.6	4.2	2.8	2.6
123678-H6CDD	12	9.7	13	9	6
123789-H6CDD	8.3	8.0	8.7	4.2	5.1
H6CDDs	125	115	457	95	200
1234678-H7CDD	185	190	200	130	130
1234679-H7CDD	215	197	730	150	260
H7CDDs	400	393	943	280	400
O8CDD	2850	3233	2467	2100	1600
2378-T4CDF	6.1	7.2	6.8	4.4	2.7
1368-T4CDF	12	12	11	9.1	6.5
T4CDFs	150	160	147	120	79
12378-P5CDF	9.4	8.0	7.0	6.4	4.6
23478-P5CDF	6.7	7.2	6.2	5.6	3.7
P5CDFs	120	123	110	95	66
123478-H6CDF	16	12	9.4	12.0	7.6
123678-H6CDF	12	9.6	7.7	7.7	5.9
123789-H6CDF	1.2	0.79	0.49	0.49	0.79
234678-H6CDF	16	14	12	13	8
H6CDFs	150	130	102	110	78
1234678-H7CDF	89	82	38	65	46
1234789-H7CDF	18	16	4.6	11	7.1
H7CDFs	230	213	80	180	120
O8CDF	260	253	45	160	110

(5) 異性体組成の変化について

公定法であるトルエンを用いたソックスレー抽出の場合、抽出中に脱塩素が起こるとの指摘^{4,5)}がある。今回、底質を用いた検討において、アセトンで抽出したものは、トルエンを用いたソックスレー抽出、ASE抽出とは一部異なった異性体組成を示していた(表6の、)、

図5、図6)。また、前述の土壌の環境標準試料や、試料を入れずに標準品のみを添加し抽出した場合は組成変化が見られないことから、底質中の夾雑物質の影響によることも考えられる。そこで、溶媒の種類と温度の影響を調べるため、トルエン及びアセトンを用い、やや低温の100℃で抽出した場合の組成を調べた。

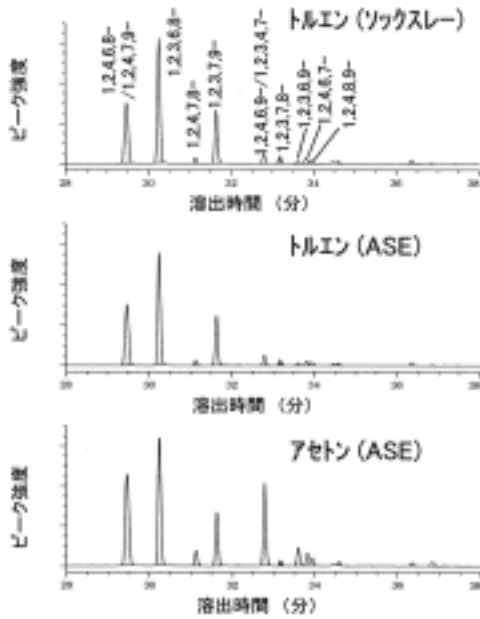


図5 底質中のP₅CDDs異性体組成の抽出条件による比較

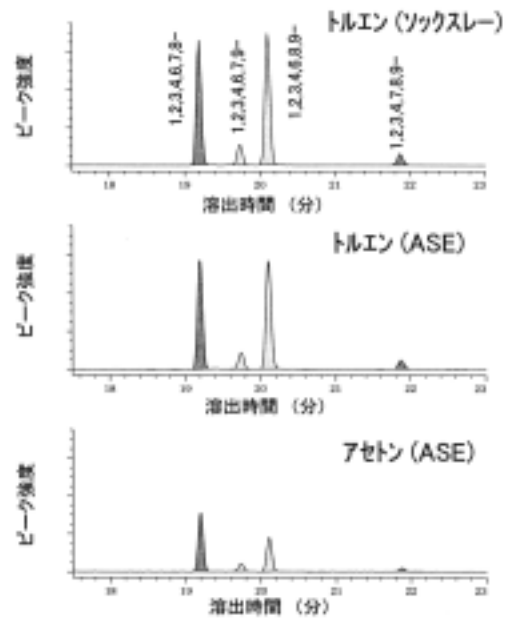


図6 底質中のH₇CDFs異性体組成の抽出条件による比較

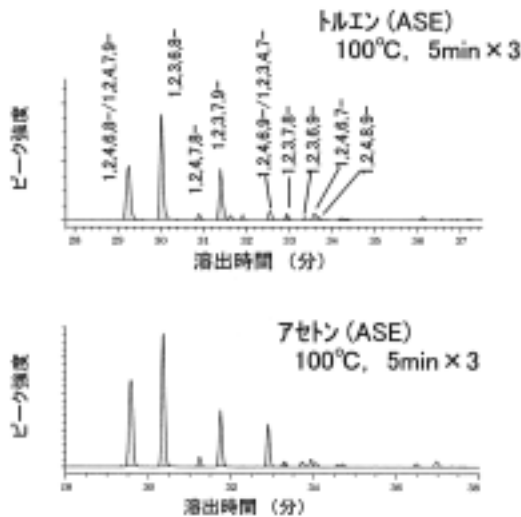


図7 低温抽出時の底質中のP₅CDDs異性体組成

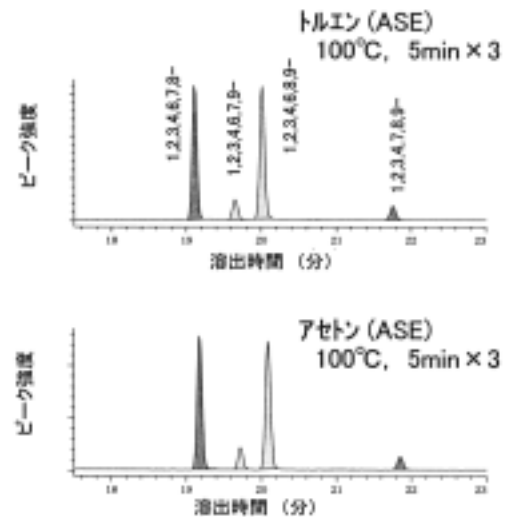


図8 低温抽出時の底質中のH₇CDFs異性体組成

その結果、表6の , に示したとおりで、それぞれ前出の 及び と比較すると、トルエンを用いた場合はいずれの異性体も抽出温度が高い方が高濃度で、組成はほとんど変わらないのに対し、アセトンを用いた場合、高塩化のPCDFでは高温抽出の方が低濃度になるものがあり、組成にも差異が見られた(図7、図8)。同様の現象は、大阪府が行った検討⁶⁾でも確認されており、異性体により抽出効率が異なることや脱塩素の可能性も考えられる。アセトンによるASE抽出は多くの機関により活用が検討されていることから⁹⁾、本件についてはさらに確認する必要がある。

4 おわりに

今回の検討から、再現性等についてさらにデータを集積して行く必要はあるが、従来活性化銅などによる硫黄除去操作が必要であった東京湾底質等の試料の精製を大幅に簡素化できる可能性が示された。また、従来乾燥後に抽出する必要があった試料でも、本法でメタノールにより十分な脱水ができれば未乾燥の状態でも抽出することも可能になり⁷⁾、作業時間の大幅な短縮が可能になると考えられる。ただし、抽出条件については、まだ課題が多く、溶媒の組み合わせ、温度条件等、さらに検討が必要である。

【謝辞】 本検討は、環境省の地域密着型研究「ダイオキシン類による地域環境汚染の実態とその原因解明に関する研究」の一環として行った。宮城、茨城、千葉、新潟、長野、岐阜、広島各県、国立環境研究所、産業技術総合研究所及び統計数理研究所の共同研究者に多大な助言と協力をいただいた。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) 東野ら：ダイオキシン類分析における迅速化の検討について，東京都環境科学研究所年報 2000，pp.187-193 (2000)
- 2) 飯村ら：都内運河におけるダイオキシン類の堆積状況，東京都環境科学研究所年報 2002，pp.105-112 (2002)
- 3) 環境庁企画調整局環境研究技術課：平成 11 年度環境測定分析統一精度管理調査結果，(2000)
- 4) 角脇ら：ソックスレー抽出による2,3,7,8-位ダイオ

キシン類の消失，第10回環境化学討論会講演要旨集，pp.192-195，(2001)

- 5) 村山ら：ダイオキシン類の簡易迅速抽出法の検討 - 1 高圧液体抽出による試料に応じた抽出条件の最適化，第12回環境化学討論会講演要旨集，pp.604-605，(2003)
- 6) 岸田ら：高速溶媒抽出装置を用いた底質中のダイオキシン類の分析，第12回環境化学討論会講演要旨集，pp.602-603，(2003)
- 7) 日浦ら：高圧液体抽出による湿泥試料の高効率抽出法の検討，第12回環境化学討論会講演要旨集，pp.610-611，(2003)
- 8) 新潟県、東京都：ダイオキシン類の測定に係る抽出方法に関するアンケート調査結果について，全国環境研究会誌，27(3)，pp.195-203，(2002)