

# 「母乳中のdioxin類およびcoplanar PCBの分析法の確立」 —PCB、BHC、クロルデン等の乳汁移行と乳児への影響—

分担研究：母乳内物質の人体への影響に関する研究

国立環境研究所

研究協力者 森田昌敏

要約：母乳中のダイオキシン類、コプラナー PCB を高精度に分析するための方法を検討した結果、精度・回収率ともに十分満足できる分析法を確立することができた。その概要は次の通りである。母乳中の脂肪分を溶媒で液々抽出して、脂肪含量を測る。次にアルコールカリウムでこの脂肪分を加水分解後、ダイオキシン類とコプラナー PCB など液々抽出し、積層充填カラム(硝酸銀カラム、硫酸カラム、アルカリカラムから成る)、活性炭カラム、アルミナカラムによるクリーンアップを経て、キャピラリーガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析法で定量する。定量法は<sup>13</sup>C同位体ラベル化物を使用する内部標準法である。微量添加回収実験によるクロスチェックの結果、この方法による回収率は平均 68 - 121 %で、相対標準偏差は 5 - 9 %程度であった。また、本分析法で実際に母乳試料を分析した結果、脂肪当たりの 2,3,7,8 - T<sub>4</sub>CDD 毒性等価濃度でダイオキシンは 6.5 - 15 pg/g、ジベンゾフランは 2.1 - 3.8 pg/g、コプラナー PCB は 22 - 33 pg/g であった。

見出し語：ダイオキシン、コプラナー PCB、積層カラム、活性炭カラム、キャピラリーガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析法

研究方法：母乳中の極微量のダイオキシン類及びコプラナー PCB を高精度に測定するために、文献に記載されている既存分析法を検討のうえ、牛乳を使用した予備実験を行い、回収率、精度が満足できる分析条件を探した。こうして以下に述べる分析法を確立した。母乳 50g に蔞酸カリウム 0.5g、エタノール 50mL、ジエチルエーテル 25mL、ヘキサン 25mL を加え、10 分間振とう抽出する。ヘキサン層を分離後、さらに 2 回、ヘキサン 25mL を加えて振とう抽出する。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリエバポレータで減圧濃縮して、秤量する。この脂肪に内

部標準物質(ダイオキシン類およびコプラナー PCB の<sup>13</sup>Cラベル化体)をそれぞれ 1 - 2ng 添加後、1 モル水酸化カリウムエタノール溶液 100mL を加えて、一晚放置して脂肪分を分解する。分解後、蒸留水 50mL を加えてから、ヘキサン 50mL を加え、10 分間振とう抽出する。ヘキサン層を分離後、さらに 2 回、ヘキサン 25mL を加えて振とう抽出する。ヘキサン層を合わせ、2% 塩化ナトリウム水溶液 100mL で洗浄する。無水硫酸ナトリウムで脱水後、10mL まで濃縮する。このヘキサン抽出液 10mL を、下からシリカゲル 0.6g、2% 水酸化カリウムシリカゲル 2g、シリカゲル 0.6g、44% 硫酸シリカゲル 3g、22% 硫酸シリカゲル 4g、シリカゲル 0.6g、10% 硝酸銀 2g の順に積層充填したカラムに移し、ヘキサン 90mL で溶出させる。溶出液を 0.5mL まで濃縮し、活性炭埋蔵シリカゲル 1g を乾式充填(下側と上側には少量の無水硫酸ナトリウムを充填する)したカラムに移し、まず 2.5% ジクロロメタン/ヘキサン 200mL でコプラナー PCB 以外の PCB 類を溶出する。次にトルエン 200mL を流して、ダイオキシン類とコプラナー PCB を溶出させる。この 2 番目の溶出液を減圧濃縮した後、ヘキサン 1mL に溶解させて、アルミナ Sep-Pak カートリッジカラムに移し、50% ジクロロメタン/ヘキサン 30mL でダイオキシン類とコプラナー PCB を溶出させる。減圧濃縮後、トルエン 20μL に溶かして、キャピラリーカラムガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析-選択イオン検出法(GC/MS-SIM)で定量する。GC/MS 測定条件を以下に示す。

|          |   |
|----------|---|
| カラム      | : PTE-5 (30m × 0.32mm)                    |
| インジェクション | : スプリットレス (270°C)                         |
| 昇温プログラム  | : 120°C(1分)-20°C/分-200°C-4°C/分-270°C(10分) |
| イオン化法    | : 電子衝撃法 (40eV)                            |
| イオン化電流   | : 600μA                                   |

イオン源温度 : 230°C  
 加速電圧 : 10kV  
 分解能 : 7,000 以上  
 スイッチング : 電場(50msec)

SIMモニターイオン:

T<sub>4</sub>CDD ; 319.8965, 321.8936 (331.9368, 333.9339)  
 P<sub>5</sub>CDD ; 355.8546, 357.8518 (367.8949, 369.8919)  
 H<sub>6</sub>CDD ; 389.8158, 391.8128 (401.8561, 403.8531)  
 H<sub>7</sub>CDD ; 423.7769, 425.7739 (435.8172, 437.8142)  
 O<sub>8</sub>CDD ; 457.7380, 459.7350 (469.7783, 471.7753)  
 T<sub>4</sub>CDF ; 303.9016, 305.8987 (315.9419, 317.9390)  
 P<sub>5</sub>CDF ; 339.8598, 341.8569 (351.9000, 353.8970)  
 H<sub>6</sub>CDF ; 373.8209, 375.8179 (385.8612, 387.8582)  
 H<sub>7</sub>CDF ; 407.7818, 409.7788 (419.8223, 421.8193)  
 O<sub>8</sub>CDF ; 441.7431, 443.7400 (453.8223, 455.7801)  
 T<sub>4</sub>CB ; 289.9224, 291.9194 (301.9626, 303.9397)  
 P<sub>5</sub>CB ; 323.8834, 325.8804 (335.9237, 337.9207)  
 H<sub>6</sub>CB ; 357.8444, 359.8415 (369.8847, 371.8817)

上の略号は、T<sub>4</sub>; 四塩素, P<sub>5</sub>; 五塩素, H<sub>6</sub>; 六塩素, H<sub>7</sub>; 七塩素, O<sub>8</sub>; 八塩素, CDD; ダイオキシン, CDF; ジベンゾフラン, CB; ビフェニル。また、括弧内のイオンは<sup>13</sup>Cラベル化体のもの。

次に、一定濃度のダイオキシン類とコプラナー PCB 及び内部標準物質 (ダイオキシン類とコプラナー PCB の<sup>13</sup>Cラベル化体) を添加した牛乳を使用して、この分析方法のクロスチェックを行った。

この後、この分析法で実際に母乳試料を分析した。

結果: 母乳中のダイオキシン類、コプラナー PCB の含

有量を単位脂肪量当りで表示するために、母乳中の脂肪の抽出からスタートした。脂肪の抽出およびアルカリ分解は AOAC (American Official Analyst Committee) の標準法に従って行った。

抽出物のクリーンアップ法は3種類のクロマトグラフィで行った。最初は宮田らが開発した積層カラムを使う方法で、ダイオキシン類およびコプラナー PCB の標準品で実験した場合の溶出パターンを図1に示した。この時の回収率は1,2,3,4-T<sub>4</sub>CDD で94%、O<sub>8</sub>CDD で109%、3,3',4,4'-T<sub>4</sub>CB で121%であった。

活性炭埋蔵シリカゲルカラムは最近のダイオキシン類、PCB の分析で広く用いられているもので、この研究で調べた溶出パターンを図2に示した。この時の回収率は1,2,3,4-T<sub>4</sub>CDD で81%、O<sub>8</sub>CDD で88%、3,3',4,4'-T<sub>4</sub>CB で117%であった。

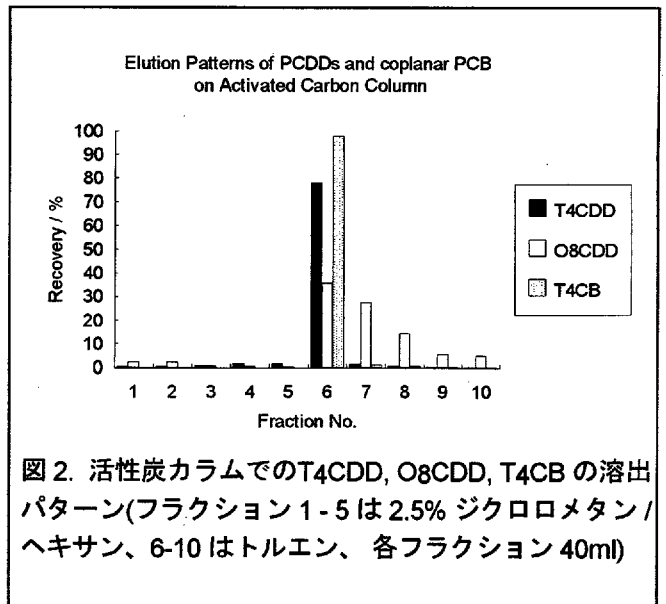


図2. 活性炭カラムでのT<sub>4</sub>CDD, O<sub>8</sub>CDD, T<sub>4</sub>CB の溶出パターン(フラクション1-5は2.5%ジクロロメタン/ヘキサン、6-10はトルエン、各フラクション40ml)

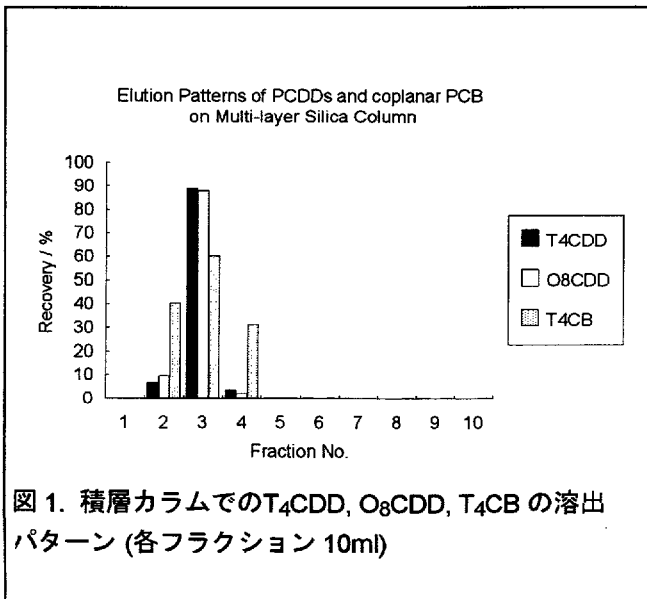


図1. 積層カラムでのT<sub>4</sub>CDD, O<sub>8</sub>CDD, T<sub>4</sub>CB の溶出パターン (各フラクション10ml)

アルミナ Sep-Pak カートリッジカラムでの回収率は2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDD で87%、1,2,3,7,8-P<sub>5</sub>CDD で96%、1,2,3,6,7,8-H<sub>6</sub>CDD で89%、1,2,3,4,6,7,8-H<sub>7</sub>CDD で83%、O<sub>8</sub>CDD で70%、2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDF で78%、1,2,3,7,8-P<sub>5</sub>CDF で88%、1,2,3,4,7,8-H<sub>6</sub>CDF で82%、1,2,3,4,6,7,8-H<sub>7</sub>CDF で82%、O<sub>8</sub>CDF で67%、3,3',4,4'-T<sub>4</sub>CB で64%、3,3',4,4',5-P<sub>5</sub>CB で69%、3,3',4,4',5,5'-H<sub>6</sub>CB で81%であった。

| PCDDs    | T <sub>4</sub> CDD | P <sub>5</sub> CDD | H <sub>6</sub> CDD | H <sub>7</sub> CDD | O <sub>8</sub> CDD |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Recovery | 87                 | 96                 | 89                 | 83                 | 64                 |
| PCDFs    | T <sub>4</sub> CDF | P <sub>5</sub> CDF | H <sub>6</sub> CDF | H <sub>7</sub> CDF | O <sub>8</sub> CDF |
| Recovery | 78                 | 88                 | 82                 | 82                 | 66                 |
| co- PCBs | T <sub>4</sub> CB  | P <sub>5</sub> CB  | H <sub>6</sub> CB  |                    |                    |
| Recovery | 60                 | 69                 | 81                 |                    |                    |

表1. 添加回収実験の回収率 (添加量は各1ng。)

|                        | Sample 1   | Sample 2    | Sample 3   | Sample 4   | Sample 5   | 平均         |
|------------------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 脂肪 /g                  | 2.02 (4.0) | 2.08 (4.2)  | 1.94 (3.9) | 2.52(5.0)  | 1.87(3.7)  | 2.08 (12)  |
| T <sub>4</sub> CDD /ng | 1.96 (78)  | 1.97 (76)   | 2.18 (75)  | 2.08 (82)  | 1.83 (91)  | 2.00 (6.6) |
| P <sub>5</sub> CDD /ng | 2.03 (86)  | 2.09 (94)   | 2.17 (86)  | 2.06 (101) | 1.88 (102) | 2.05 (5.2) |
| H <sub>6</sub> CDD /ng | 1.87 (93)  | 2.03 (93)   | 2.09 (84)  | 2.02 (94)  | 1.76 (106) | 1.95 (6.9) |
| H <sub>7</sub> CDD /ng | 1.81 (91)  | 2.01 (94)   | 2.07 (84)  | 1.95 (99)  | 1.80 (104) | 1.93 (6.2) |
| O <sub>8</sub> CDD /ng | 2.24 (66)  | 2.37 (67)   | 2.75 (59)  | 2.31 (73)  | 2.15 (74)  | 2.36 (9.8) |
| T <sub>4</sub> CDF /ng | 1.74 (85)  | 1.73 (86)   | 1.99 (76)  | 1.87 (85)  | 1.70 (94)  | 1.81 (6.7) |
| P <sub>5</sub> CDF /ng | 1.92 (82)  | 2.07 (83)   | 1.99 (76)  | 2.07 (84)  | 1.90 (91)  | 2.04 (6.7) |
| H <sub>6</sub> CDF /ng | 1.89 (83)  | 1.89 (82)   | 2.15 (69)  | 1.96 (83)  | 1.79 (90)  | 1.93 (6.9) |
| H <sub>7</sub> CDF /ng | 2.12 (73)  | 2.05 (76)   | 2.54 (62)  | 2.32 (76)  | 2.14 (81)  | 2.23 (8.9) |
| O <sub>8</sub> CDF /ng | 1.90 (77)  | 1.94 (80)   | 2.02 (68)  | 2.01 (85)  | 1.76 (87)  | 1.93 (5.5) |
| T <sub>4</sub> CB /ng  | 5.11 (128) | 12.08 (120) | 5.46 (118) | 2.14 (136) | 1.55 (101) | 5.27 (79)  |
| P <sub>5</sub> CB /ng  | 2.31 (89)  | 2.39 (82)   | 2.37 (81)  | 2.13 (100) | 2.61 (71)  | 2.36 (7.3) |
| H <sub>6</sub> CB /ng  | 1.72 (114) | 1.74 (105)  | 1.75 (101) | 1.70 (131) | 1.54 (91)  | 1.69 (5.2) |

表 2. クロスチェックの結果

(添加量は各 2ng。定量値は回収率補正後のもの。括弧内の値は <sup>13</sup>C ラベル化体の回収率。

脂肪の欄の括弧内の値は、脂肪含量 (%)。平均値の欄の括弧内の値は相対標準偏差 (%)。)

牛乳を使用して添加回収実験を行った結果は表 1 の通りであった。

考察: 母乳中のダイオキシン類や PCB などは大部分、脂肪の中に溶け込んでいる状態なので、これらの物質の分析には妨害となる脂肪を分解する必要がある。母乳中の脂肪を抽出してから脂肪を分解する方法と、まず母乳中の脂肪を分解してからダイオキシン類を抽出する方法がある。ダイオキシン類の含有量の表示法としては、全乳当りでの濃度表示と乳脂肪当りでの濃度表示が使われており、もし母乳中の脂肪を最初に分解してしまうと、脂肪当りでの濃度が計算できなくなる。従って、母乳中の脂肪を抽出してから分解する方法を採用した。

カラムクロマトグラフィによるクリーンアップがもっとも検討を要する部分であり、回収率が向上するような溶出溶媒を決め、溶出パターンから溶出液量を定めた。積層充填カラムの使用により、従来の手間のかかるクリーンアップ操作が簡便化され、精度も向上した。活性炭埋蔵シリカゲルカラムの使用はダイオキシン類やコプラナー PCB を他の芳香族化合物と分離するのに極めて有効なカラムであることがはっきりした。アルミナカラムの使用はダイオキシン分析では一般的で

あるが、活性度を常に同じにすることは困難であった。そこで同じ品質のものが使えるという観点から、市販されているアルミナのカートリッジカラム (Sep-Pak) を使用することとし、その再現性をチェックした。開封直後の製品は安心して使用できたが、開封後、時間の経過したものは活性度が変化していき、使用を避けた方がよいことが分かった。

GC/MS による微量分析の精度を高くするには、<sup>13</sup>C 同位体でラベルされたダイオキシン類およびコプラナー PCB を内部標準として使用する方法が広く用いられており、ここでもその方法を採用した。さらに分析精度をチェックするためにクロスチェックを行った。この結果を表 2 に示す。

最後に、本分析法を用いて実際に母乳試料を分析した結果を、表 3 に示す。この結果、もっとも毒性の高い 2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDD の量に換算した量 (TEQ) で示すと、母乳脂肪当たりでダイオキシンで 6.5 - 16pg/g、ジベンゾフランで 2.1 - 3.8pg/g、コプラナー PCB で 22 - 34pg/g であった。母乳中のダイオキシン類の TEQ の報告されている値は 10 - 40pg/g 程度であり、国内では 20pg/g 程度の値が報告されている。今回の測定結果もこれらの報告値と大きな差は見られなかった。ジベンゾフランの TEQ の値は、国内では 10 - 20pg/g という報告があ

|                    |                 | 毒性等価<br>係数† | 濃度<br>(pg/g Fat)‡ |      |      | 毒性等価濃度<br>(pg/g Fat<br>as 2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD) |       |       |
|--------------------|-----------------|-------------|-------------------|------|------|---|-------|-------|
| Isomer             |                 |             | No.1              | No.2 | No.3 | No.1  | No.2  | No.3  |
| T <sub>4</sub> CDD | 2,3,7,8         | 1           | 3.3               | 1.1  | 2.1  | 3.3   | 1.1   | 2.1   |
| P <sub>5</sub> CDD | 1,2,3,7,8       | 0.5         | 15                | 6.2  | 8.7  | 7.5   | 3.1   | 4.4   |
| H <sub>6</sub> CDD | 1,2,3,4,7,8     | 0.1         | 6.7               | N.D. | 2.0  | 0.7   | 0.0   | 0.2   |
|                    | 1,2,3,6,7,8     | 0.1         | 35                | 15   | 24   | 3.5   | 1.5   | 2.4   |
|                    | 1,2,3,7,8,9     | 0.1         | 5.7               | 4.6  | 5.1  | 0.6   | 0.5   | 0.5   |
| H <sub>7</sub> CDD | 1,2,3,4,6,7,8   | 0.01        | 22                | 20   | 13   | 0.2   | 0.2   | 0.1   |
| O <sub>8</sub> CDD | 1,2,3,4,6,7,8,9 | 0.001       | 180               | 137  | 148  | 0.2   | 0.1   | 0.1   |
| sum of PCDD        |                 |             |                   |      |      | 16  | 6.5   | 9.9   |
| T <sub>4</sub> CDF | 2,3,7,8         | 0.1         | 5.1               | 4.7  | 2.7  | 0.51  | 0.47  | 0.27  |
| P <sub>5</sub> CDF | 1,2,3,7,8       | 0.5         | 1.9               | 0.97 | 1.4  | 0.93  | 0.49  | 0.72  |
|                    | 2,3,4,7,8       | 0.05        | 16                | 3.3  | 5.1  | 0.79  | 0.17  | 0.25  |
| H <sub>6</sub> CDF | 1,2,3,4,7,8     | 0.1         | 5.8               | 4.8  | 5.4  | 0.58  | 0.48  | 0.54  |
|                    | 1,2,3,6,7,8     | 0.1         | 7.1               | 2.2  | 4.1  | 0.71  | 0.22  | 0.41  |
|                    | 2,3,4,6,7,8     | 0.1         | 0.42              | 2.1  | N.D. | 0.04  | 0.21  | 0     |
| H <sub>7</sub> CDF | 1,2,3,7,8,9     | 0.1         | 1.13              | N.D. | N.D. | 0.113   | 0     | 0     |
|                    | 1,2,3,4,6,7,8   | 0.01        | 6.20              | 7.5  | 5.3  | 0.062   | 0.075 | 0.053 |
| O <sub>8</sub> CDF | 1,2,3,4,7,8,9   | 0.01        | 1.81              | N.D. | N.D. | 0.018   | 0     | 0     |
|                    | 1,2,3,4,6,7,8,9 | 0.001       | 8.5               | 5.3  | 5.7  | 0.009   | 0.005 | 0.006 |
| sum of PCDF        |                 |             |                   |      |      | 3.8   | 2.1   | 2.3   |
| T <sub>4</sub> CB  | 3,3',4,4'       | 0.01        | 1100              | 900  | 1738 | 11  | 9.0   | 17    |
| P <sub>5</sub> CB  | 3,3',4,4',5     | 0.1         | 194               | 114  | 138  | 19  | 11    | 14    |
| H <sub>6</sub> CB  | 3,3',4,4',5,5'  | 0.05        | 76                | 24   | 41   | 3.8   | 1.2   | 2.0   |
| sum of PCB         |                 |             |                   |      |      | 34  | 22    | 33    |
| Total              |                 |             |                   |      |      | 54  | 30    | 45    |

表 3. 母乳試料中のダイオキシン類およびコプラナー PCB の濃度

† 毒性等価係数は、PCDD、PCDFに関しては I-TEF (1988)、コプラナー PCB に関しては Safe (1992) の値を用いた。

‡ 脂肪重量は今回の分析法に基づいたものであり、公定法によるものではない。

り、今回の分析結果はこれよりも低い値を示した。コプラナーPCBに関しては国内で21.7pg/gという報告があり、今回の分析結果はこれよりもやや多かった。

文献：(1)井上清, 他：大阪府公衆衛生研究所所報  
食品衛生編第5号：19-23, 1974

(2) T. Yakushiji et. al. : J.Chromatogr., 154 : 203-210, 1978

(3) H.Miyata et. al. : Chemosphere, 18(1-6) : 407-416, 1989

(4) 樫本隆, 他：福岡医誌, 78(5) : 325-336, 1987

(5) 森田昌敏他, : 環境化学, 3(4) : 797-833, 1993

(6) T.Matsueda et. al. : Chemosphere, 27(1-2) : 187-194,  
1993



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:母乳中のダイオキシン類、コプラナー PCB を高精度に分析するための方法を検討した結果、精度・回収率ともに十分満足できる分析法を確立することができた。その概要は次の通りである。母乳中の脂肪分を溶媒で液々抽出して、脂肪含量を測る。次にアルコールカリウムでこの脂肪分を加水分解後、ダイオキシン類とコプラナー PCBなどを液々抽出し、積層充填カラム(硝酸銀カラム、硫酸カラム、アルカリカラムから成る)、活性炭カラム、アルミナカラムによるクリーンアップを経て、キャピラリーガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析法で定量する。定量法は<sup>13</sup>C 同位体ラベル化物を使用する内部標準法である。微量添加回収実験によるクロスチェックの結果、この方法による回収率は平均 68-121%で、相対標準偏差は 5-9%程度であった。また、本分析法で実際に母乳試料を分析した結果、脂肪当たりの 2,3,7,8-T4CDD 毒性等価濃度でダイオキシンは 6.5-15pg/g、ジベンゾフランは 2.1-3.8pg/g、コプラナー PCB は 22-33pg/g であった。