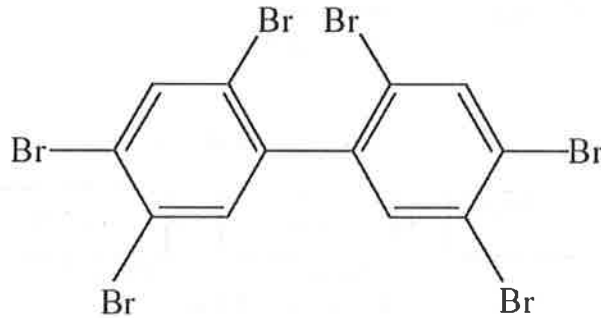


ヘキサブロモビフェニル

Hexabromobiphenyl

(別名 HBB)

【対象物質の構造】



CAS 番号 : 59080-40-9 (2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl)

分子式 : $C_{12}H_4Br_6$

*ヘキサブロモビフェニルには臭素の置換位置により異性体が 42 種類存在するが、構造、物理化学的性状については 2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl の内容を記載した。

【物理化学的性状】

| 分子量 | 沸点 (°C) | 蒸気圧 (kPa) | 水溶解度 (mg/L) | log P _{ow} |
|--------|---------|--|----------------------------|-------------------------|
| 627.59 | 報告なし | 1×10^{-6} (90 °C)* ¹ | 0.011 (25°C)* ¹ | 7 以下(計算値)* ¹ |

*1: National Library of Medicine (2001) Hazardous substances data bank (HSDB), STN online

【毒性、用途】

毒性 : ラット 経口 LD₅₀ : 21500 mg/kg (FM BP-6)

ウサギ 経皮 LD₅₀ : >5000 mg/kg (FM BP-6)

用途 : ABS 樹脂、ポリウレタンフォームなどの難燃剤

FM BP-6 : Firemaster BP-6

§1 分析法

(1) 分析法概要

・母乳試料

母乳試料に飽和シュウ酸カリウム水溶液、ジエチルエーテルおよび 50%エタノール/ヘキサンを加え、振とう抽出を行う（計 2 回。但し 2 回目はヘキサン）。ヘキサン抽出液を 5%塩化ナトリウム水溶液で水洗後、脱水ろ過を行い、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮する。脂肪重量の測定後、一定量に定容し、粗抽出液とする。

粗抽出液の一部を分取して多層シリカゲルカラム(注 1)によりクリーンアップを行い、GC/HRMS-SIM を用いて分析を行う。

・血液（全血）試料（母体血および臍帯血）

母体血および臍帯血試料に飽和硫酸アンモニウム水溶液および 25%エタノール/ヘキサンを加え、振とう抽出を行う（計 3 回。但し 2、3 回目はヘキサン）。ヘキサン抽出液をヘキサン洗浄水で洗浄後、脱水ろ過を行い、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮する。脂肪重量の測定後、一定量に定容し、粗抽出液とする。

粗抽出液の一部を分取して多層シリカゲルカラム(注 1)によりクリーンアップを行い、GC/HRMS-SIM を用いて分析を行う。

なお、試料の取扱いに関しては「ヒト生体試料の取扱いに関する倫理指針（暫定版）」（平成 18 年 11 月 環境省環境保健部環境安全課）および「ヒト生体試料の取扱いに関する指針」（平成 18 年 11 月 環境省環境保健部環境安全課）に準拠して実施する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

ヘキサブロモビフェニル

2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl (#153) : AccuStandard 製（純度 94.8%）

2,2',4,4',6,6'-Hexabromobiphenyl (#155) : AccuStandard 製（純度 98.4%）

3,3',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl (#169) : AccuStandard 製 35 µg/mL

サロゲート物質

2,2',4,4',5,5'-Hexabromo[¹³C₁₂]biphenyl (#153) : Wellington Laboratories 製 50 µg/mL

内標準物質

2,2',3,4,4',6-Hexabromo[¹³C₁₂]diphenylether (#139) : Wellington Laboratories 製 5 µg/mL

その他各種異性体の標準品や、混合調製品も Wellington Laboratories 製または Cambridge Isotope Laboratories 製等で利用可能である。

市販の工業製品のヘキサブロモビフェニルには、Firemaster BP-6 (Dow Chemical 社)

などがあり、2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl (#153)が主成分である。

アセトン、エタノール、ヘキサン、ジクロロメタン：和光純薬製 ダイオキシン類
分析用または関東化学製 残留農薬試験用（5000倍濃縮）

ジエチルエーテル、アセトニトリル：関東化学製 残留農薬試験用（5000倍濃縮）

硫酸アンモニウム、シュウ酸カリウム：試薬特級

デカン、ジメチルスルホキシド、水酸化カリウム：試薬特級

塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用

メタノール：HPLC用

濃硫酸：精密分析用

活性化シリカゲル：Merck製シリカゲル60 (63~200 μm)をメタノールで洗浄して減
圧乾燥後、130℃で4時間活性化したもの。

22%(w/w)H₂SO₄ コーティングシリカゲル：活性化シリカゲル234gに濃硫酸66gを
加え、約40分間振とうし、コーティング
したもの。

44%(w/w)H₂SO₄ コーティングシリカゲル：活性化シリカゲル224gに濃硫酸176g
を加え、約40分間振とうし、コーティン
グしたもの。

2%(w/w)KOH コーティングシリカゲル：メタノールで洗浄して減圧乾燥後のシリ
カゲル196gにエタノール約80mLを加え
シリカゲルの固まりがなくなるまで振と
うし、水酸化カリウム4gをヘキサン洗浄
水約20mLに溶かした溶液をさらに加え
振とう後、ロータリーエバポレーターを
用いて約3時間減圧乾燥したもの。

フロリジル PR：150~250 μm (60~100 mesh) 130℃で5時間活性化したもの。

ヘキサン洗浄水：蒸留水2Lとヘキサン100mLを3L分液ロートに入れ15分間振
とう機で振とうし、一晩静置後の水層。

【試薬の安定性・毒性】

有害性が高いため、暴露されないよう取扱いに注意する。

一般に有機臭素系化合物は光分解が起こりやすいため、標準品および試料は褐色ガ
ラスを用いるか、アルミホイル等で遮光する。分析室内も紫外線カットの蛍光灯を用
いる等して光分解が起きないように注意する。

【器具】

天秤：0.1 mgの感度の電子天秤を用いる。

乾燥機：ガラス製品及び試薬類を加熱処理する。

ロータリーエバポレーター（恒温槽付き）：抽出液の濃縮に用いる。

振とう器：分液ロートの振とう抽出に用いる。

マイクロシリンジ（25 μ L、250 μ L）：サロゲート及び内標準物質の添加に用いる。

カラムクロマト管（内径 15 mm 長さ 35 cm、内径 13 mm 長さ 35 cm）

スキューブ型分液ロート（100 mL、300 mL）、ナス型フラスコ（10 mL、300 mL）、ネジ口試験管（10 mL、25 mL）、メスシリンダー（20 mL、50 mL、100 mL）、メスフラスコ、パスツールピペット、褐色バイアル

ロート：直径 90 mm ガラス製 脱水ろ過に用いる。

ガラス器具類は使用前にアセトン及びヘキサンで洗浄し、乾燥して用いる。ガラス器具類は褐色が望ましい。

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

提供を受けた試料は分析を行うまで、冷凍保存する。

試料の取扱いに関しては「ヒト生体試料の取扱いに関する倫理指針（暫定版）」（平成 18 年 11 月 環境省環境保健部環境安全課）および「ヒト生体試料の取扱いに関する指針」（平成 18 年 11 月 環境省環境保健部環境安全課）に準拠して実施する。その他は環境省「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。

【試料の前処理及び試料液の調製】

〔母乳試料の抽出〕

試料を解凍（前日又は、当日室温に戻す）後、電子天秤に分液ロートを乗せる台（プラスチック製の広口容器：フロリジルの空容器などを利用）と 100 mL スキューブ型分液ロートを乗せ、風袋引きした後、パスツールピペットを用いて母乳試料 5 g を秤量する。100 mL スキューブ型分液ロートにサロゲート物質(2,2',4,4',5,5'-Hexabromo[¹³C₁₂] biphenyl) 20 ng/mL を 100 μ L(2 ng)添加し、攪拌する。サロゲート物質の添加量は、各化合物の装置の感度と分割比によるため、あらかじめ必要な量を確認しておく。

飽和シュウ酸カリウム水溶液 2 mL、ジエチルエーテル 10 mL、および 50%エタノール/ヘキサン 20 mL を加えた後 30 分間、液/液振とう抽出を行う。静置後、下層の水層を別の分液ロートに移し、新たにヘキサン 20 mL 加えて、再度 30 分間振とう抽出を行う。静置後、計 2 回の抽出によるヘキサン層を合わせ、5%塩化ナトリウム水溶液を 20 mL 加え水洗する。水層を除去した後、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過（注 2）を行い、ロータリーエバポレーターを用いて約 2 mL まで濃縮後、必要に応じて脂肪重量測定を行う。

〔血液試料の抽出〕

試料を解凍（前日又は、当日室温に戻す）後、電子天秤に分液ロートを乗せる台（プラスチック製の広口容器：シリカゲルの空容器などを利用）と 300 mL スキープ型分液ロートを乗せ、風袋引きした後、パストゥールピペットを用いて母体血試料 20 g（臍帯血：30g）を秤量する。300 mL スキープ型分液ロートにサロゲート物質(2,2',4,4',5,5'-Hexabromo[¹³C₁₂] biphenyl) 20 ng/mL を 100 µL (2 ng) 添加し、攪拌する。サロゲート物質の添加量は、各化合物の装置の感度と分割比によるため、あらかじめ必要な量を確認しておく。

飽和硫酸アンモニウム 12 mL（臍帯血：18 mL）、および 25%エタノール/ヘキサン 48 mL（臍帯血：72 mL）を加えた後 30 分間、液/液振とう抽出を行う。静置後、下層の水層を別の分液ロートに移し、新たにヘキサン 40 mL（臍帯血：60 mL）加えて、再度 30 分間振とう抽出を行う。この操作を繰り返し、計 3 回の抽出によるヘキサン層を合わせ、ヘキサン洗浄水 40 mL（臍帯血：60 mL）加え水洗する。水層を除去した後、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過(注 2)を行い、ロータリーエバポレーターを用いて約 2 mL まで濃縮後、必要に応じて脂肪重量測定を行う。

〔脂肪重量測定〕（必要に応じて）

あらかじめ 105 °C で 3 時間加熱、放冷し、0.1 mg の単位まで重量を測定した 10 mL ナス型フラスコに濃縮液を少量のヘキサンで洗いこみ、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を慎重に留去する。水及び溶媒が完全でないことを確認し、ナス型フラスコの外側をよくふいた後、0.1 mg の単位まで重量を測定する。前後の重量差から試料中の脂肪量を算出する。天秤は前処理室に設置する。

〔抽出液の精製〕

重量測定後、ヘキサンに溶解させネジロ試験管に洗いこみ、10 mL に定容した後、試料を測定用に分割する。なお、分割比は装置の感度により異なるため、あらかじめ分割比を確認しておく。

多層シリカゲルカラムクリーンアップ

10 mL に定容した抽出液を 1 mL 分取して多層シリカゲルカラム(注 1)に負荷し、10% ジクロロメタン/ヘキサン 60 mL で溶出させる。溶出液をロータリーエバポレーターで約 5 mL まで濃縮し、ヘキサンを用いて試験管に洗いこんだ後、窒素気流で少量まで濃縮する。GC/MS 測定用の褐色バイアルに、内標準物質(2,2',3,4',6-Hexabromo [¹³C₁₂]diphenylether #139) 50 ng/mL を 10 µL (0.5 ng) 添加し、濃縮した試料を慎重に移し替えさらに試験管を少量のヘキサンで洗いこみ、ゆるやかな窒素気流で濃縮してヘキサンを除去した後、デカンを加えて 20 µL とし測定試料液とする。

なお、以上のクリーンアップでも測定試料液の精製が不十分な場合は多層シリカゲルカラムによるクリーンアップを行った後に、ジメチルスルホキシド(DMSO)/ヘキサ

ン分配による処理を追加(注 3)し、上記と同様に内標準物質を添加して測定試料液とする。

ジメチルスルホキシド(DMSO)/ヘキサン分配 (試験管での操作方法)

DMSO はヘキサンで飽和して使用する(3 L 分液ロートに、DMSO 1000 mL 及びヘキサン 100 mL を入れ、振とう機で 15 分間振とうした後、静置し、DMSO 層をヘキサン飽和 DMSO として使用する)。

250 mL 容のデュラン瓶等に塩化ナトリウム 75 g とヘキサン洗浄水 150 mL を入れてよく振り混ぜ、飽和塩化ナトリウム水溶液を作成する。使用時には溶け残りの塩化ナトリウムがあるかを確認して使用する。

多層シリカゲルカラムからの溶出液をロータリーエバポレーターで約 5 mL まで濃縮した後、10 mL ネジロ試験管に移し、窒素気流で 1 mL 程度になるまで濃縮(ジクロロメタンを除く為)し、ヘキサンを加えて 2 mL とする。

ヘキサン飽和 DMSO を 2.5 mL 加える。ネジロ試験管に栓をし、手振りで約 10 秒間振とうする。静置後、二層に分かれてから、パスツールピペットを用いて下層の DMSO を 25 mL ネジロ試験管に移す(ヘキサブロモビフェニルはこの DMSO 層に含まれている)。この操作を合計 4 回行い、ヘキサブロモビフェニルを DMSO に分配する。

DMSO (合計約 10 mL) を移し込んだ 25 mL ネジロ試験管に、ヘキサン洗浄水 10 mL と飽和塩化ナトリウム水溶液 1 mL を加える(DMSO と水は混ざる)。

さらにヘキサン 2 mL を加えて試験管に栓をし、手振りで約 10 秒間振とうする(DMSO と水が混ざることによりヘキサブロモビフェニルはヘキサンへ分配される)。静置後、二層に分かれてから、パスツールピペットを用いて上層のヘキサンを新たに用意した 10 mL ネジロ試験管に移す(ヘキサブロモビフェニルはこのヘキサン層に含まれている)。この操作を合計 3 回行いヘキサンに逆分配する。

ヘキサン溶液の入った 10 mL ネジロ試験管に、ヘキサン洗浄水 2 mL を加える。試験管に栓をし、手振りで約 10 秒間振とうする(ヘキサン溶液中に残留している DMSO を水へ分配する)。静置後、二層に分かれてから、上層のヘキサン溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水する。試料は濃縮後、内標準物質を添加した GC/MS 測定用の褐色バイアルにヘキサンで移し替え、窒素気流で濃縮してヘキサンを除去した後、デカンを加えて 20 μ L とし測定試料液とする。

フロリジルカラムクリーンアップ (参考 POPs との同時分析の場合)

あらかじめ活性化 (130 $^{\circ}$ C、約 5 時間乾燥) したフロリジル 8 g をヘキサンに懸濁し、カラムクロマト管 (内径 13 mm 長さ 35 cm ガラス製; ストップコック付き) の上下に無水硫酸ナトリウムをはさんでフロリジルを湿式充填する。20%ジクロロメタン/ヘキサン 80 mL でカラムを洗浄した後、300 mL のナス型フラスコをセットし、試料液をカラムに負荷する。クロマト管の液面を無水硫酸ナトリウム層の上端まで下げた後、少量の 20%ジクロロメタン/ヘキサンで数回濃縮容器およびカラムの壁面を

洗いながら試料をカラムに負荷する。20%ジクロロメタン/ヘキサン 80 mL で目的成分を溶出する (画分 1)。ナス型フラスコを取り替え、さらにジクロロメタン 80 mL で溶出を継続する (画分 2)。画分 1 をロータリーエバポレーターで約 5 mL まで濃縮し、ヘキサンを用いて試験管に洗いこんだ後、窒素気流で少量まで濃縮する。GC/MS 測定用の褐色バイアルに、内標準物質(2,2',3,4,4',6-Hexabromo[¹³C₁₂]diphenylether #139) 50 ng/mL を 10 μL (0.5ng)添加し、濃縮した試料を慎重に移し替えさらに試験管を少量のヘキサンで洗いこみ、ゆるやかな窒素気流で濃縮してヘキサンを除去した後、デカンを加えて 20 μL とし測定試料液とする。

この操作により、ヘキサブプロモビフェニルは 20%ジクロロメタン/ヘキサン (画分 1) で溶出する。参考として、ディルドリンとエンドリンとヘプタクロルエポキサイドは画分 2 に溶出し、それら以外の POPs は画分 1 に溶出する。

なお、フロリジルのロットにより溶出パターンが異なるため、必ず事前に溶出試験で確認を行った上で使用する。

【空試験液の調製】

試料を用いないで、【試料の前処理及び試料液の調製】の項に従って操作し、得られた試料液を空試験液とする。

【標準液の調製】

2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl 及び 2,2',4,4',6,6'-Hexabromobiphenyl を正確に 10 mg はかりとり、それぞれトルエンを加えて正確に 10 ml とし、各々 1000 μg/ml の標準原液とする。ヘキサブプロモビフェニル各異性体の標準液をデカンで希釈・混合し、2 ng/mL から 1000 ng/mL の混合標準溶液を作成する。

サロゲート物質(2,2',4,4',5,5'-Hexabromo[¹³C₁₂]biphenyl)は、デカンで希釈して 200 ng/mL のサロゲート物質標準溶液を作成する。内標準物質(2,2',3,4,4',6-Hexabromo[¹³C₁₂] diphenylether)はデカンで希釈して 50 ng/mL の溶液を作成する。

以上の溶液を混合し 0.1~200 ng/mL の 5 段階の検量線用標準液(サロゲート物質及び内標準物質は各々 20 ng/mL)を作成する。

試料に添加するサロゲート物質溶液はアセトンで希釈して 20 ng/mL の溶液を作成する。

【試料液の保存・安定性】

一般に有機臭素系化合物は光分解が起こりやすいため、標準品および試料は褐色ガラス器具を用いるか、アルミホイル等で遮光する。分析室内も紫外線カットの蛍光灯を用いる等して光分解が起きないように注意する。

【測定】

[GC/MS 条件]

| | |
|------------|--|
| 使用機器 | Autospec Ultima (Waters/Micromass) |
| カラム | HP 6890 (Agilent) ENV-5MS 15 m × 0.25 mm I.D. (0.1 μm) (関東化学製) (5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane) |
| 昇温条件 | 120 °C (1 min) – 20 °C/min – 200 °C (0 min) – 10 °C/min – 300 °C (8 min) |
| 注入方法 | オンカラム |
| ガードカラム | 不活性キャピラリーカラム 0.5 m × 0.53 mm I.D. |
| 注入口温度 | 120 °C (0.1 min) – 100 °C/min – 300 °C (15 min) |
| 注入量 | 2 μL |
| キャリアーガス | ヘリウム(1.0 mL/min) |
| イオン化法 | EI |
| イオン化電圧 | 30~40 eV |
| トラップ電流 | 500 μA |
| 加速電圧 | 8 kV |
| インターフェース温度 | 300°C |
| イオン源温度 | 300°C |
| 検出モード | SIM |
| 分解能 | M/ΔM > 10000 (10% Valley) |

モニターイオン (注4)

| | | 定量用 | 確認用 |
|---------|--|----------|----------|
| 対象物質 | Hexabromobiphenyl | 627.5352 | 625.5372 |
| サロゲート物質 | Hexabromo ^[13C12] biphenyl | 639.5754 | 637.5775 |
| 内標準物質 | Hexabromo ^[13C12] diphenylether | 655.5703 | 653.5723 |
| ロックマス | Perfluorokerosene | 642.9600 | |

[検量線]

検量線用標準液及びサロゲート物質のみを添加した溶媒ブランク 2 μL を GC/MS に導入して分析する。溶媒ブランク試料からは対象物質のピークが検出されない事を確認する。

得られる各クロマトグラムにおいて、標準物質のピーク面積をサロゲート物質のピーク面積で割って得られる面積比を計算し、検量線の縦軸とする。分析した検量線用標準溶液に含まれる標準物質の濃度をサロゲート物質の濃度で割って得られる濃度比を計算し、検量線の横軸とする。重み付けなしで、最小二乗法により、原点を通過する一次の検量線を作成し、関係式及び寄与率 (r^2) を計算する。寄与率が 0.995 以上であることを確認する。

[定量]

試料液 2 μL を GC/MS に導入して分析する。以下に示す式を用いて相対感度係数

(RRF)を算出し、検量線用標準液の濃度範囲における RRF の平均を求め、定量計算に用いる。

$$\text{RRF} = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times C_s}$$

- RRF : 相対感度係数
As : 標準液中の対象物質のピーク面積
Ais : 標準液中のサロゲート物質のピーク面積
Cs : 標準液中の対象物質の濃度 (pg/μL)または注入量(pg)
Cis : 標準液中のサロゲート物質の濃度 (pg/μL) または注入量(pg)

本分析法では、ヘキサブロモビフェニル各異性体のイオン強度に大きな差が見られる場合がある。標準品に対応する異性体（標準品が入手できた異性体）については上記計算で求めた個々の相対感度係数（RRF）を用い、その他のヘキサブロモビフェニルは構造の類似した溶出位置の近いものを用いる他、平均の RRF を用いて、対象物質濃度を算出する(注 5)。

[濃度の算出]

RRF を用いて、以下の式から定量値を求める。

$$\text{濃度 (pg/g)} = \frac{A \times C_{is}}{A_{is} \times \text{RRF}} \times \frac{1}{W}$$

- A : 対象物質のピーク面積
Ais : サロゲート物質のピーク面積
Cis : サロゲート物質の添加量 (pg)
RRF : 相対感度係数
W : 試料量 (g)

脂肪重量換算濃度が必要な場合は、上記の結果(湿重量当たりの結果)を脂肪含量(%)で割算して算出する。

$$\text{脂肪重あたり濃度 (pg/g (lipid))} = \frac{\text{湿重量あたり濃度}}{\text{脂肪含量(\%)}} \times 100$$

〔装置検出下限(IDL)〕

本分析に用いた GC/HRMS の IDL を以下に示す(注 6)。

〔母乳〕

| 物質 | IDL (pg) | 試料量 (g) | IDL 試料換算値 (pg/g) |
|--|-------------|------------|---------------------|
| 2,2',4,4',6,6'-Hxabromobiphenyl (#155) | 0.051 | 5 | 1.0 |
| 2,2',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#153) | 0.042 | 5 | 0.85 |
| 3,3',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#169) | 0.085 | 5 | 1.7 |

〔血液〕

| 物質 | IDL (pg) | 試料量 (g) | IDL 試料換算値 (pg/g) |
|--|-------------|------------|---------------------|
| 2,2',4,4',6,6'-Hxabromobiphenyl (#155) | 0.051 | 20 | 0.26 |
| 2,2',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#153) | 0.042 | 20 | 0.21 |
| 3,3',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#169) | 0.085 | 20 | 0.42 |

〔測定方法の検出下限(MDL)、定量下限(MQL)〕

本測定方法における MDL 及び MQL を以下に示す(注 7)。

〔母乳〕

| 物質 | 試料量 (g) | 検出下限値 (pg/g) | 定量下限値 (pg/g) |
|--|------------|-----------------|-----------------|
| 2,2',4,4',6,6'-Hxabromobiphenyl (#155) | 5 | 0.69 | 1.9 |
| 2,2',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#153) | 5 | 1.1 | 3.0 |
| 3,3',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#169) | 5 | 1.5 | 4.0 |

〔血液〕

| 物質 | 試料量 (g) | 検出下限値 (pg/g) | 定量下限値 (pg/g) |
|--|------------|-----------------|-----------------|
| 2,2',4,4',6,6'-Hxabromobiphenyl (#155) | 20 | 0.31 | 0.83 |
| 2,2',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#153) | 20 | 0.24 | 0.65 |
| 3,3',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#169) | 20 | 0.57 | 1.5 |

注 解

(注 1)

本分析法の多層シリカゲルカラムには 2%(w/w)KOH、22%及び 44%(w/w)H₂SO₄ コーティングシリカゲルを用いる。硝酸銀(AgNO₃)コーティングシリカゲルを用いた場合、PCB の低塩素化体等の回収が低下する事がある為、PCB を同一検液で分析する時には用いない(ヘキサブロモビフェニルのみを分析する場合は使用しても差し支えないが、事前に溶出試験を行った上で使用する)。また、市販の多層シリカゲルカラムやカートリッジカラムを使用する場合には、メーカーやロットにより溶出パターンが異なるため、事前に溶出試験で確認を行った上で使用する。

ピンセットでヘキサン洗浄綿を適量とり、カラムクロマト管（内径 15 mm 長さ 35 cm ガラス製；ストップコック付き）に入れ底部に詰める。溶媒を流したときにコックに気泡が入らないように針金等で詰める。

カラムクロマト管に以下の順序で下から順に各充填材を乾式充填する。

| | | | |
|--|-----------|----|----|
| ・ 無水硫酸ナトリウム | 1 cm (厚さ) | 下側 | |
| ・ 活性化シリカゲル | 0.5 g | ↓ | |
| ・ 2%(w/w)KOH コーティングシリカゲル | 0.5 g | | |
| ・ 活性化シリカゲル | 0.5 g | | |
| ・ 44%(w/w)H ₂ SO ₄ コーティングシリカゲル | 5.0 g | | |
| ・ 22%(w/w)H ₂ SO ₄ コーティングシリカゲル | 3.0 g | | |
| ・ 活性化シリカゲル | 0.5 g | | |
| ・ 無水硫酸ナトリウム | 1 cm (厚さ) | | 上側 |

この際、各充填材の上面が平面になるよう充填していく。充填後、10%ジクロロメタン/ヘキサン 60 mL で洗浄を行い、クロマト管の液面を無水硫酸ナトリウム層の上端まで下げてから試料の負荷を行う。

(注 2)

ロートに少量のヘキサン洗浄綿を詰め無水硫酸ナトリウムを約 50 g 入れロートの端より内壁をつたうようにヘキサン約 5 mL を 3 回流し洗浄する。この時の洗液は廃棄する。

洗浄後の無水硫酸ナトリウムに抽出液を滴下して脱水ろ過をする。抽出液が入っていたフラスコの内壁をヘキサン約 5 mL で 3 回洗い、洗液も脱水ろ過する。

さらに、ロートの端より内壁をつたうようにヘキサン約 5 mL で 3 回洗い流す。

(注 3)

多層シリカゲルカラムによるクリーンアップのみで試料液を測定した時に、除去されなかった脂質等の影響でピークがブロードになる等の現象が起きた場合、ジメチルスルホキシド(DMSO)/ヘキサン分配による処理を追加する。また、アセトニトリル/

ヘキサン分配や GPC によるクリーンアップも利用可能である²⁾。

なお、本分析法で検討を行った母乳試料については多層シリカゲルカラムによるクリーンアップのみで測定可能であったが、血液（全血）試料については、多層シリカゲルカラムによるクリーンアップの後、DMSO/ヘキサン分配による処理が必要であった。

アセトニトリル/ヘキサン分配（参考）

アセトニトリルはヘキサンで飽和して使用する(3 L 分液ロートに、アセトニトリル 1000 mL 及びヘキサン 100 mL を入れ、振とう機で 15 分間振とうした後、静置し、アセトニトリル層をヘキサン飽和アセトニトリルとして使用する)。

蒸留水はヘキサンで洗浄したもの(ヘキサン洗浄水)を使用する(蒸留水 2 L とヘキサン 100 mL を 3 L 分液ロートに入れ 15 分間振とう機で振とうし、一晚静置後の水層)。

多層シリカゲルカラムからの溶出液をロータリーエバポレーターで約 5 mL まで濃縮した後、分液ロート①に移しヘキサンを加えて 10 mL とする。

ヘキサン飽和アセトニトリルを分液ロート①に 10 mL 加え、10 分間振とうする。静置後、二層に分かれてから、分液ロート②に下層のアセトニトリル層を移す(ヘキサブロモビフェニルはこのアセトニトリル層に含まれている)。この操作を合計 2 回行いアセトニトリルに分配する。

アセトニトリル(合計約 20 mL)を移した分液ロート②にヘキサン洗浄水を加える(アセトニトリルと水は混ざる)。

さらにヘキサン 20 mL を加えて 10 分間振とうする(アセトニトリルと水が混ざることによりヘキサブロモビフェニルはヘキサンへ分配される)。静置後、二層に分かれてから、分液ロート③に下層の水層を移す。

水層の入った分液ロート③にヘキサン 20 mL を加えて 10 分間振とうする。静置後、二層に分かれてから、下層の水層を捨て、上層のヘキサン層を分液ロート②に移す。分液ロート③の内壁を少量のヘキサンで 2 回洗い、洗液も分液ロート②に移す。

ヘキサンの入った分液ロート②にヘキサン洗浄水を加えて 10 分間振とうする(ヘキサン溶液中に残留しているアセトニトリルを水へ分配する)。静置後、二層に分かれてから、下層の水層を捨て、上層のヘキサンを無水硫酸ナトリウムで脱水する。試料は濃縮後、内標準物質を添加した GC/MS 測定用の褐色バイアルにヘキサンで移し替え、窒素気流で濃縮してヘキサンを除去した後、デカンを加えて 20 μ L とし測定試料液とする。

(注 4)

ヘキサブロモビフェニル、サロゲート物質及び内標準物質の分子イオンの精密質量と相対イオン強度を表 1 に示す。

本分析法では分子イオンの中で、相対イオン強度の強い $[M+4]^+$ 及び $[M+6]^+$ をモニターオンに用いて測定を行い、 $[M+6]^+$ を定量用に $[M+4]^+$ を確認用として使用する。

表 1. 各分子イオンの精密質量及び相対イオン強度

| | M ⁺ | [M+2] ⁺ | [M+4] ⁺ | [M+6] ⁺ | [M+8] ⁺ | [M+10] ⁺ | [M+12] ⁺ |
|---|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Hexabromobiphenyl | 621.5413 5% | 623.5393 32% | 625.5372 77% | 627.5352 100% | 629.5332 73% | 631.5313 29% | 633.5295 5% |
| Hexabromo ¹³ C ₁₂ biphenyl | 633.5815 5% | 635.5795 32% | 637.5775 77% | 639.5754 100% | 641.5733 73% | 643.5713 28% | 645.5692 5% |
| Hexabromo ¹³ C ₁₂ diphenylether | 649.5764 5% | 651.5744 32% | 653.5723 77% | 655.5703 100% | 657.5682 73% | 659.5662 28% | 661.5642 5% |

(注 5)

ヘキサブロモビフェニル異性体は全部で 42 種類あり GC カラムでの溶出順が、ヘキサクロロビフェニルと同じであるとして、2,2',4,4',6,6'-Hxabromobiphenyl の溶出位置から 3,3',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl の溶出位置までをヘキサブロモビフェニル異性体の溶出範囲とする(図 1)。この溶出範囲内で検出されたピークの中で、2 つのモニターイオンの面積比率が臭素化合物の天然同位体比の理論値に対して±15%以内のものをヘキサブロモビフェニルとして同定し、定量を行う。

ヘキサブロモビフェニル各異性体のイオン強度に大きな差が見られる場合がある。標準品に対応する異性体については個々の相対感度 (RRF) を用い、その他のヘキサブロモビフェニルは 3 異性体の RRF の平均を用いて、対象物質濃度を算出する。

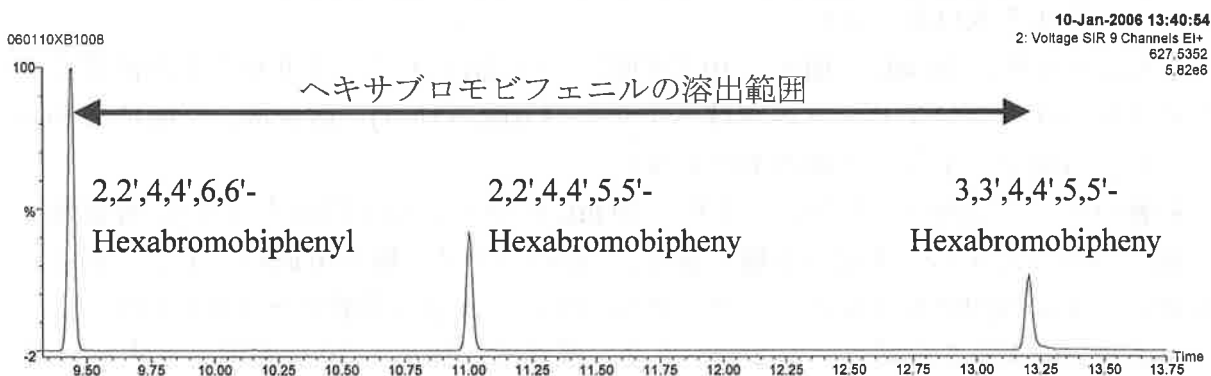


図 1 ヘキサブロモビフェニルの溶出範囲

(注6)

装置検出下限(IDL)は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成17年3月)に従って、表2及び表3のとおり算出した。

表2 母乳の装置検出下限(IDL)の算出

| 対象物質名 | 2,2',4,4',6,6'- HxBB (#155) | 2,2',4,4',5,5'- HxBB (#153) | 3,3',4,4',5,5'- HxBB (#169) |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 試料量(g) | 5 | 5 | 5 |
| 抽出液量(mL) | 10 | 10 | 10 |
| 分取量(mL) | 1 | 1 | 1 |
| 最終液量(μL) | 20 | 20 | 20 |
| 注入液濃度(pg/μL) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 装置注入量(μL) | 2 | 2 | 2 |
| 結果1 (pg) | 0.186 | 0.195 | 0.178 |
| 結果2 (pg) | 0.183 | 0.201 | 0.188 |
| 結果3 (pg) | 0.194 | 0.186 | 0.166 |
| 結果4 (pg) | 0.215 | 0.195 | 0.168 |
| 結果5 (pg) | 0.216 | 0.184 | 0.155 |
| 結果6 (pg) | 0.209 | 0.213 | 0.191 |
| 結果7 (pg) | 0.216 | 0.190 | 0.225 |
| 結果8 (pg) | 0.205 | 0.178 | 0.162 |
| 平均値 (pg) | 0.203 | 0.193 | 0.179 |
| 標準偏差 | 0.0135 | 0.0112 | 0.0223 |
| IDL (pg) | 0.051 | 0.042 | 0.085 |
| 試料換算値(pg/g) | 1.0 | 0.85 | 1.7 |
| S/N | 37 | 14 | 7.3 |
| CV(%) | 6.6 | 5.8 | 12 |

※IDL= $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

表3 血液の装置検出下限(IDL)の算出

| 対象物質名 | 2,2',4,4',6,6'- HxBB (#155) | 2,2',4,4',5,5'- HxBB (#153) | 3,3',4,4',5,5'- HxBB (#169) |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 試料量(g) | 20 | 20 | 20 |
| 抽出液量(mL) | 10 | 10 | 10 |
| 分取量(mL) | 1 | 1 | 1 |
| 最終液量(μL) | 20 | 20 | 20 |
| 注入液濃度(pg/μL) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 装置注入量(μL) | 2 | 2 | 2 |
| 結果1 (pg) | 0.186 | 0.195 | 0.178 |
| 結果2 (pg) | 0.183 | 0.201 | 0.188 |
| 結果3 (pg) | 0.194 | 0.186 | 0.166 |
| 結果4 (pg) | 0.215 | 0.195 | 0.168 |
| 結果5 (pg) | 0.216 | 0.184 | 0.155 |
| 結果6 (pg) | 0.209 | 0.213 | 0.191 |
| 結果7 (pg) | 0.216 | 0.190 | 0.225 |
| 結果8 (pg) | 0.205 | 0.178 | 0.162 |
| 平均値 (pg) | 0.203 | 0.193 | 0.179 |
| 標準偏差 | 0.0135 | 0.0112 | 0.0223 |
| IDL (pg) | 0.051 | 0.042 | 0.085 |
| 試料換算値(pg/g) | 0.26 | 0.21 | 0.42 |
| S/N | 37 | 14 | 7.3 |
| CV(%) | 6.6 | 5.8 | 12 |

※IDL= $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

(注7)

測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成17年3月)により、母乳及び血液(全血)についてそれぞれ表4及び表5のとおり算出した。

表4 母乳の測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出

| 対象物質名 | 2,2',4,4',6,6'- | 2,2',4,4',5,5'- | 3,3',4,4',5,5'- |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | HxBB (#155) | HxBB (#153) | HxBB (#169) |
| 試料量 (g) | 5 | 5 | 5 |
| 標準添加量 (pg) | 30 | 30 | 30 |
| 試料換算濃度 (pg/g) | 6.00 | 7.11 | 6.00 |
| 抽出液量 (mL) | 10 | 10 | 10 |
| 分取量 (mL) | 1 | 1 | 1 |
| 最終液量 (μL) | 20 | 20 | 20 |
| 注入液濃度 (pg/μL) | 0.15 | 0.18 | 0.15 |
| 装置注入量 (μL) | 2 | 2 | 2 |
| 操作ブランク平均 ^① (pg/g) | 0 | 0 | 0 |
| 無添加平均 ^② (pg/g) | 0 | 1.11 | 0 |
| 結果1 (pg/g) | 5.70 | 6.50 | 5.73 |
| 結果2 (pg/g) | 5.41 | 6.86 | 5.40 |
| 結果3 (pg/g) | 5.36 | 6.61 | 5.69 |
| 結果4 (pg/g) | 5.20 | 6.77 | 5.49 |
| 結果5 (pg/g) | 5.11 | 7.40 | 5.62 |
| 結果6 (pg/g) | 5.61 | 7.09 | 5.82 |
| 結果7 (pg/g) | 5.33 | 6.75 | 6.67 |
| 結果8 (pg/g) | 5.41 | 7.14 | 5.45 |
| 結果9 (pg/g) | 5.50 | 7.24 | 5.35 |
| 平均値 (pg/g) | 5.40 | 6.93 | 5.69 |
| 標準偏差 | 0.186 | 0.304 | 0.399 |
| MDL (pg/g) | 0.69 | 1.1 | 1.5 |
| MQL (pg/g) | 1.9 | 3.0 | 4.0 |
| S/N | 51 | 28 | 16 |
| CV (%) | 3.4 | 4.4 | 7.0 |

※MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

※MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

① 操作ブランク平均:

試料マトリックスのみがない状態で他は同様の操作を行い、測定した値の平均値

② 無添加平均:

MDL 算出用試料に標準品を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

表 5 血液（全血）の測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出

| 対象物質名 | 2,2',4,4',6,6'- HxBB (#155) | 2,2',4,4',5,5'- HxBB (#153) | 3,3',4,4',5,5'- HxBB (#169) |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 試料量 (g) | 20 | 20 | 20 |
| 標準添加量 (pg) | 30 | 30 | 30 |
| 試料換算濃度 (pg/g) | 1.50 | 2.68 | 1.50 |
| 抽出液量 (mL) | 10 | 10 | 10 |
| 分取量 (mL) | 1 | 1 | 1 |
| 最終液量 (μL) | 20 | 20 | 20 |
| 注入液濃度 (pg/μL) | 0.15 | 0.27 | 0.15 |
| 装置注入量 (μL) | 2 | 2 | 2 |
| 操作ブランク平均 ^① (pg/g) | 0 | 0 | 0 |
| 無添加平均 ^② (pg/g) | 0 | 1.18 | 0 |
| 結果1 (pg/g) | 1.47 | 2.63 | 1.63 |
| 結果2 (pg/g) | 1.62 | 2.55 | 1.51 |
| 結果3 (pg/g) | 1.68 | 2.62 | 1.35 |
| 結果4 (pg/g) | 1.55 | 2.70 | 1.68 |
| 結果5 (pg/g) | 1.47 | 2.65 | 1.81 |
| 結果6 (pg/g) | 1.46 | 2.65 | 1.48 |
| 結果7 (pg/g) | 1.58 | 2.77 | 1.71 |
| 結果8 (pg/g) | 1.42 | 2.64 | 1.58 |
| 結果9 (pg/g) | 1.50 | 2.56 | 1.80 |
| 平均値 (pg/g) | 1.53 | 2.64 | 1.61 |
| 標準偏差 | 0.083 | 0.065 | 0.154 |
| MDL (pg/g) | 0.31 | 0.24 | 0.57 |
| MQL (pg/g) | 0.83 | 0.65 | 1.5 |
| S/N | 59 | 50 | 21 |
| CV (%) | 5.5 | 2.5 | 9.5 |

※MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

※MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

① 操作ブランク平均：

試料マトリックスのみがない状態で他は同様の操作を行い、測定した値の平均値

② 無添加平均：

MDL 算出用試料に標準品を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析のフローチャートを図2に示す。

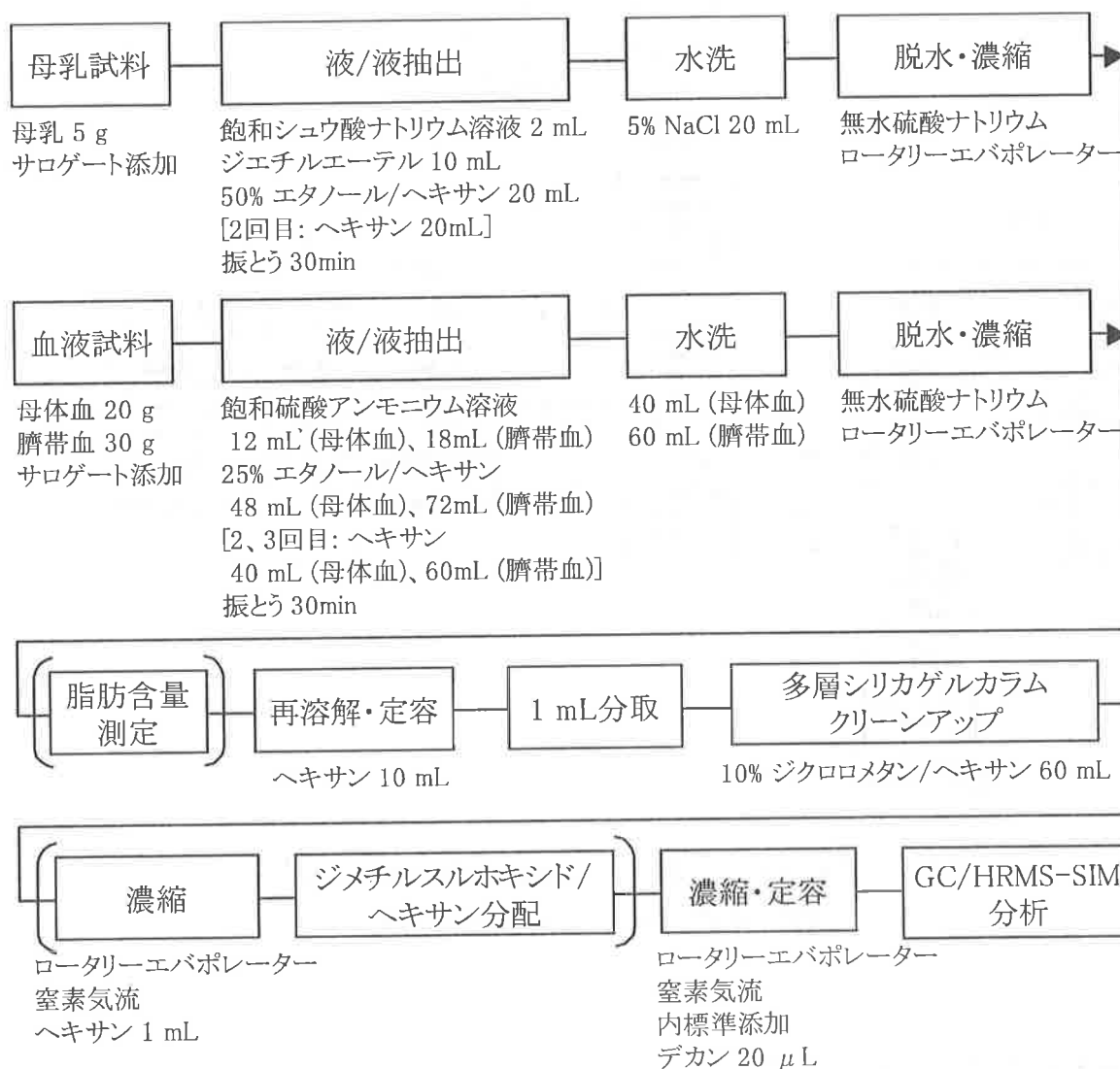


図2 ヘキサブロモビフェニルの分析フロー

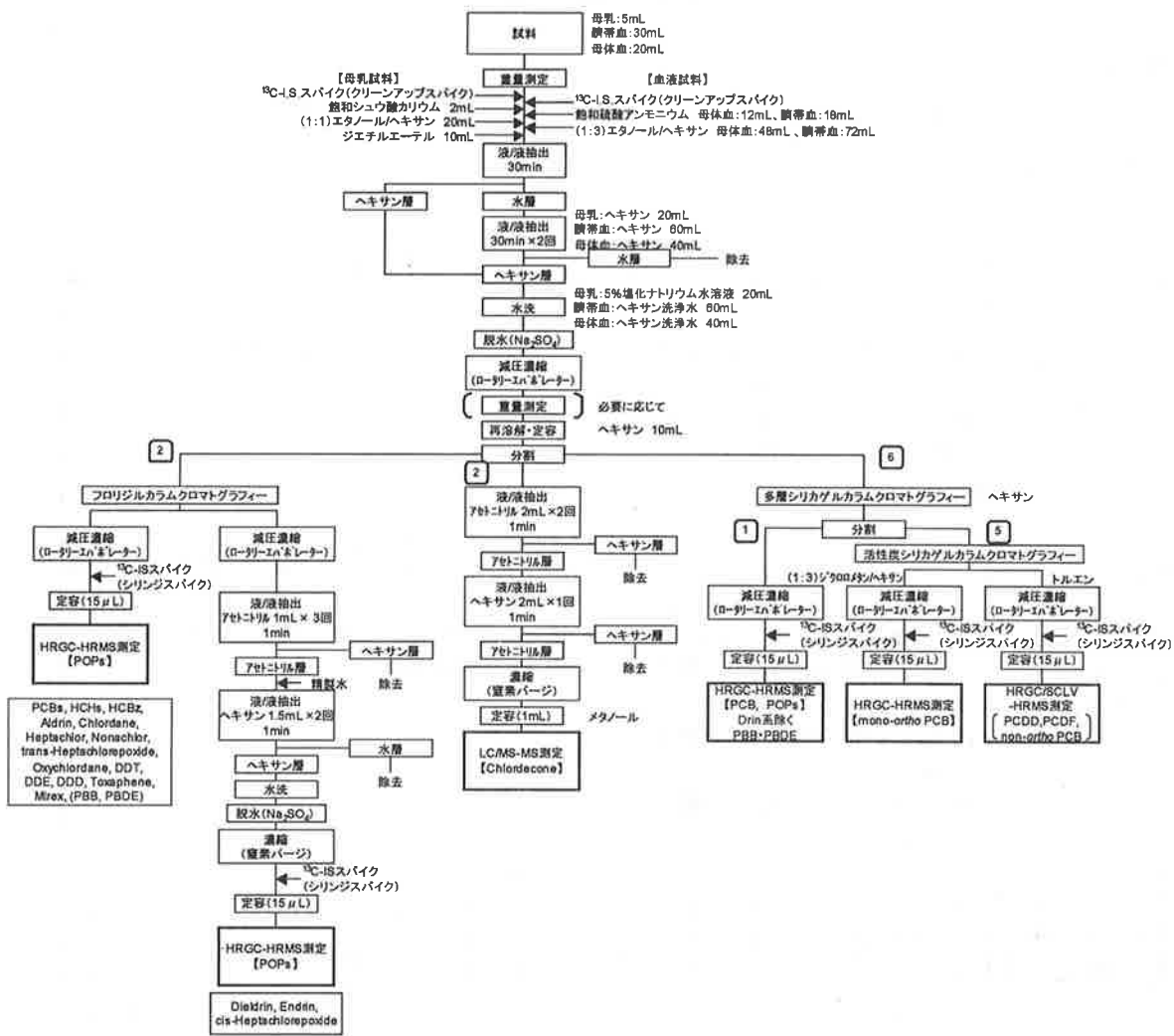
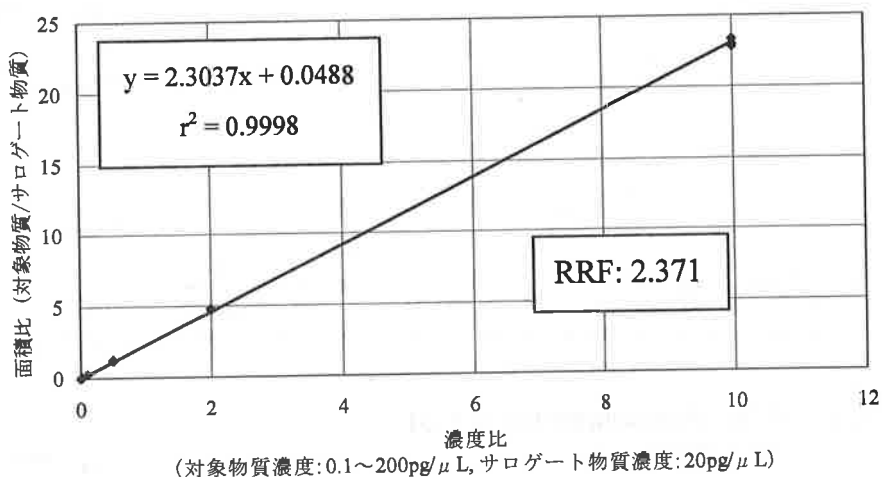


図3 ダイオキシン類等を含めた場合の分析フロー
 (四角内数字は試料溶液の分割比)

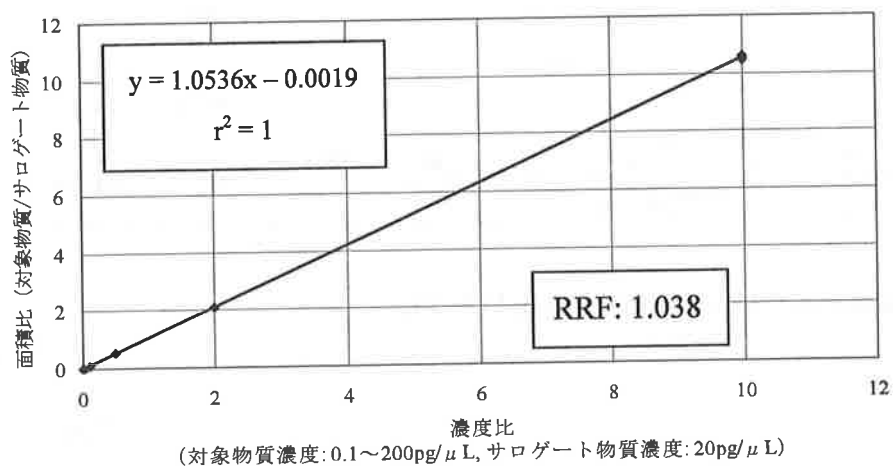
〔検量線及びマススペクトル〕

検量線及びマススペクトル図等を次に示す。

2,2',4,4',6,6'-Hexabromobiphenyl (#155)



2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl (#153)



3,3',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl (#169)

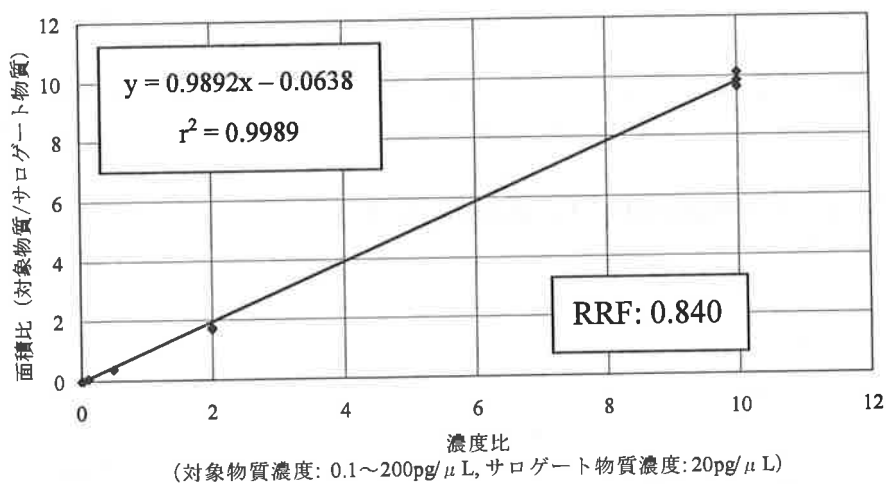
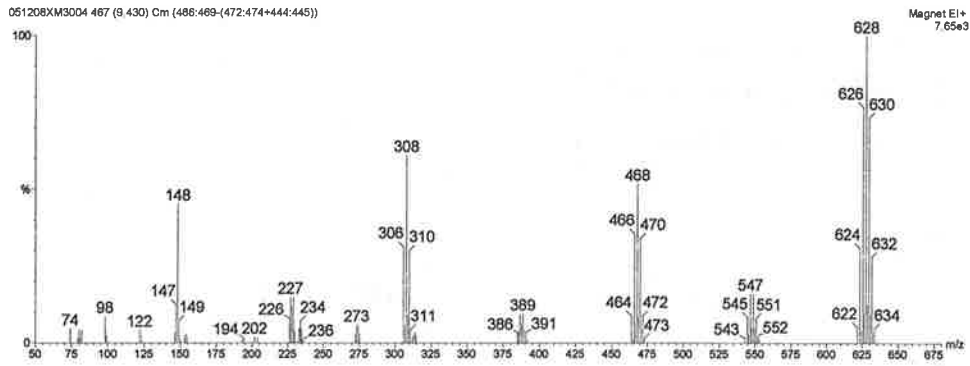
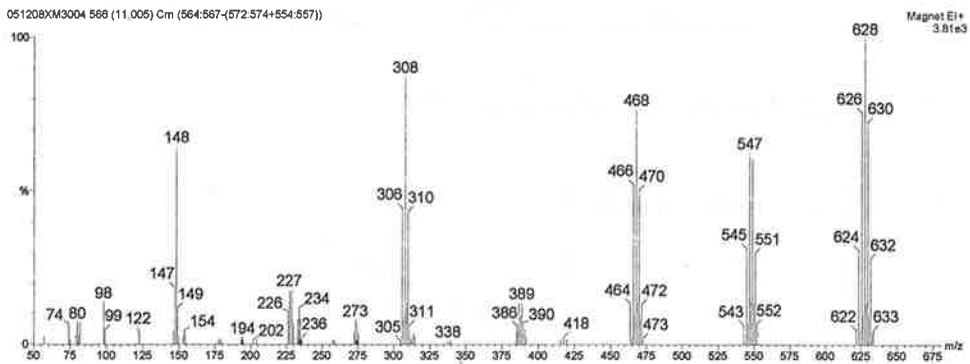


図 4 ヘキサブロモビフェニル 検量線
サロゲート物質 : 2,2',4,4',5,5'-Hexabromo[¹³C₁₂]biphenyl (#153)

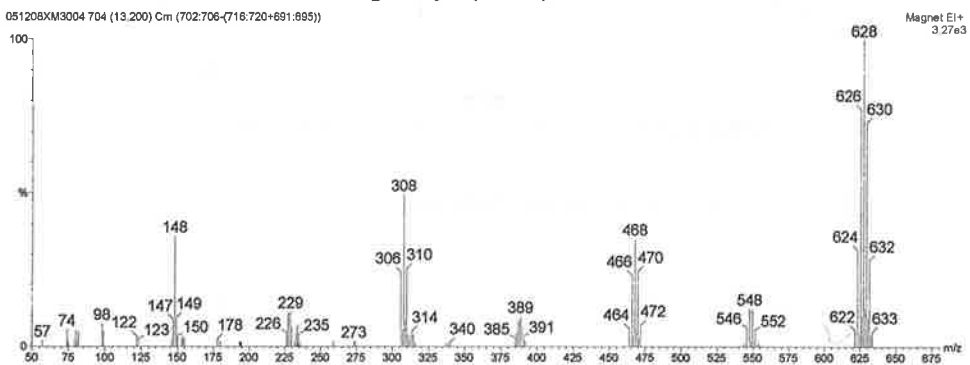
2,2',4,4',6,6'-Hexabromobiphenyl (#155)



2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl (#153)



3,3',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl (#169)



2,2',4,4',5,5'-Hexabromo[¹³C₁₂]biphenyl (#153)

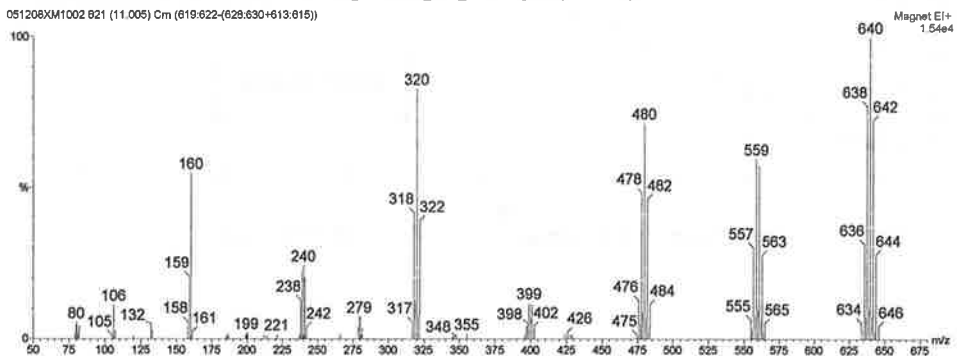


図 5 ヘキサブロモビフェニル マススペクトル

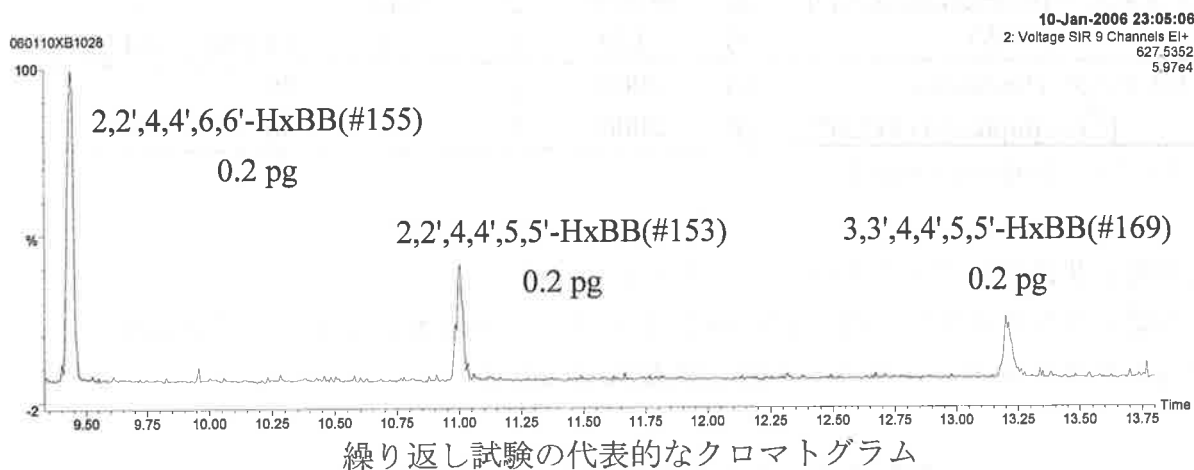
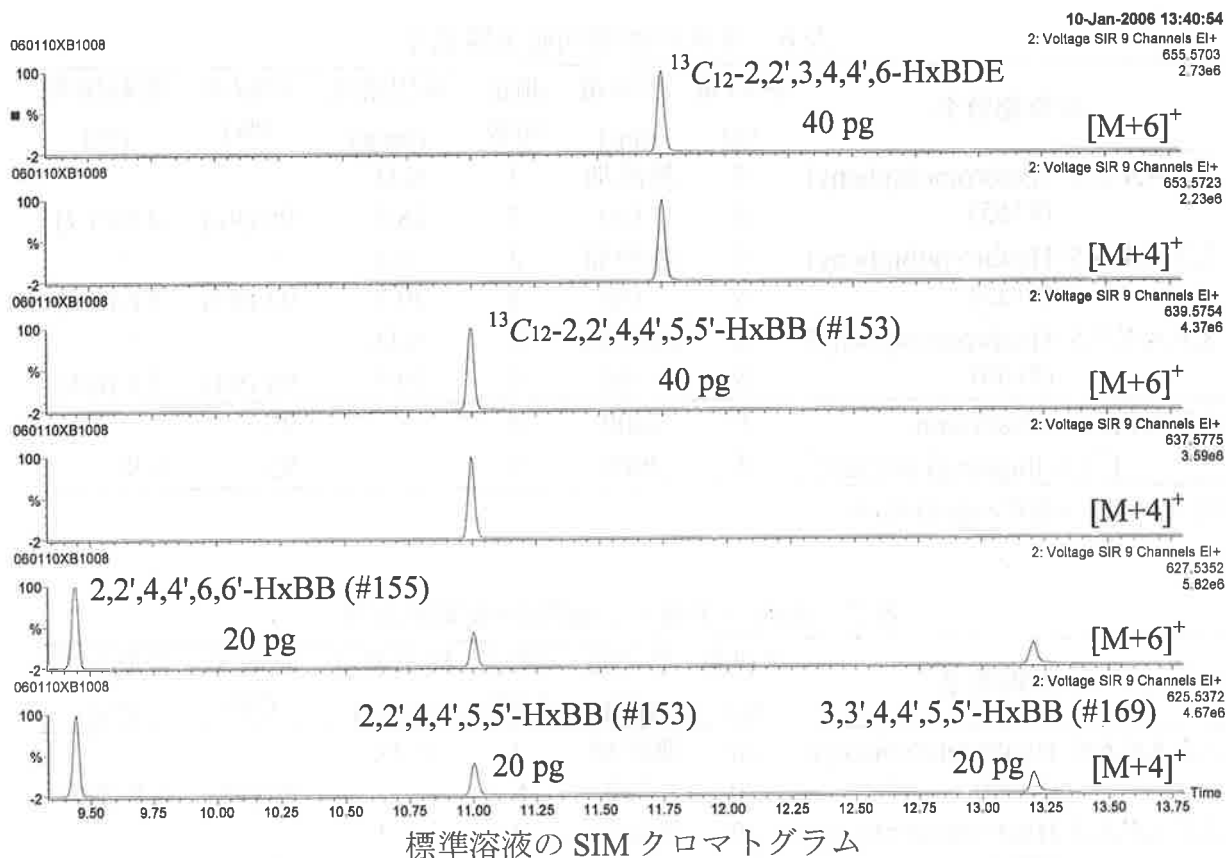


図 6 ヘキサブロモビフェニル クロマトグラム

〔添加回収実験結果〕

混合標準溶液 10 ng/mL を 15 μ L (150 pg) 添加した試料と無添加の試料を用いて分析を行い、その定量値の差からサロゲート法による相対回収率を求める。

添加回収実験の結果を表 6 及び表 7 に示した。また、サロゲートを計算に用いずに求めた内標準法による絶対回収率及びその変動係数については括弧付で併記した。

表 6 母乳の添加回収実験結果

| 対象物質名 | 試料量 | 添加量 | 測定 | 検出濃度 | 回収率 | 変動係数 |
|--|-----|------|----|--------|---------|-----------|
| | (g) | (pg) | 回数 | (pg/g) | (%) | (%) |
| 2,2',4,4',6,6'-Hxabromobiphenyl (#155) | 5 | 無添加 | 2 | N.D. | — | — |
| | 5 | 150 | 5 | 28.6 | 95 (91) | 2.9 (5.7) |
| 2,2',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#153) | 5 | 無添加 | 2 | 1.7 | — | — |
| | 5 | 150 | 5 | 29.7 | 93 (89) | 1.6 (7.2) |
| 3,3',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#169) | 5 | 無添加 | 2 | N.D. | — | — |
| | 5 | 150 | 5 | 29.5 | 98 (94) | 2.5 (6.5) |
| 2,2',4,4',5,5'- Hxabromo [¹³ C ₁₂]biphenyl (#153)* ¹ | 5 | 2000 | 2 | — | 95 | — |
| | 5 | 2000 | 5 | — | 95 | 6.9 |

*1 サロゲート物質の絶対回収率

表 7 血液（全血）の添加回収実験結果

| 対象物質名 | 試料量 | 添加量 | 測定 | 検出濃度 | 回収率 | 変動係数 |
|--|-----|------|----|--------|---------|-----------|
| | (g) | (pg) | 回数 | (pg/g) | (%) | (%) |
| 2,2',4,4',6,6'-Hxabromobiphenyl (#155) | 20 | 無添加 | 2 | N.D. | — | — |
| | 20 | 150 | 5 | 7.5 | 99 (95) | 1.9 (9.5) |
| 2,2',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#153) | 20 | 無添加 | 2 | 1.2 | — | — |
| | 20 | 150 | 5 | 8.4 | 97 (93) | 2.7 (7.9) |
| 3,3',4,4',5,5'-Hxabromobiphenyl (#169) | 20 | 無添加 | 2 | N.D. | — | — |
| | 20 | 150 | 5 | 7.1 | 94 (90) | 2.4 (6.3) |
| 2,2',4,4',5,5'- Hxabromo [¹³ C ₁₂]biphenyl (#153)* ¹ | 20 | 2000 | 2 | — | 89 | — |
| | 20 | 2000 | 5 | — | 96 | 7.9 |

*1 サロゲート物質の絶対回収率

〔多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー〕

多層シリカゲルカラム(注 1)からの溶出パターンを表 8 に示した。この結果から、10%ジクロロメタン/ヘキサンの溶出液量は 60 mL とした。

表 8 多層シリカゲルカラムからの溶出パターン

| | 10%ジクロロメタン/ヘキサン | | | | | 回収率 (%) |
|--|-----------------|----------|----------|----------|-----------|------------|
| | 0-20 mL | 20-40 mL | 40-60 mL | 60-80 mL | 80-100 mL | |
| 2,2',4,4',6,6'-HxBB | 88 | 2 | 0 | 0 | 0 | 91 |
| 2,2',4,4',5,5'-HxBB | 97 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 3,3',4,4',5,5'-HxBB | 102 | 3 | 0 | 0 | 0 | 105 |
| ¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-HxBB | 98 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100 |

標準物質 200 pg、サロゲート物質 2 ng 添加

[ジメチルスルホキシド/ヘキサン分配]

ジメチルスルホキシド/ヘキサン分配(注3)による回収率を表9に示した。

表9 ジメチルスルホキシド/ヘキサン分配による回収率

| | 回収率 (%) | |
|--|---------|-----|
| | n-1 | n-2 |
| 2,2',4,4',6,6'-HxBB | 100 | 100 |
| 2,2',4,4',5,5'-HxBB | 98 | 97 |
| 3,3',4,4',5,5'-HxBB | 96 | 104 |
| ¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-HxBB | 104 | 99 |

標準物質 1 ng、サロゲート物質 2 ng 添加

[環境試料分析例]

母乳から、ヘキサブロモビフェニル(#153)が 1.7 pg/g 検出された(図 7)。

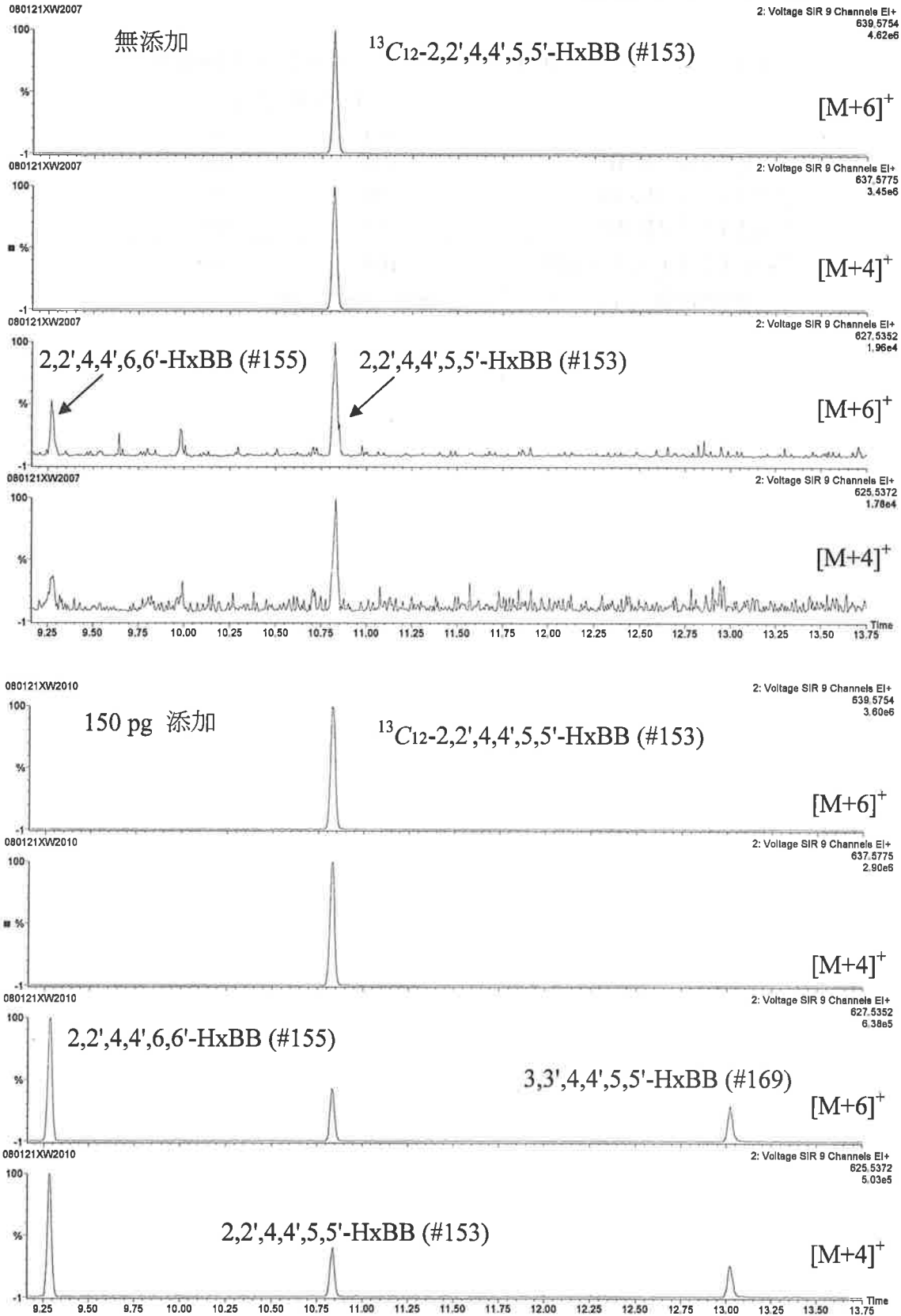


図 7 ヘキサブロモビフェニル 母乳のクロマトグラム

血液（全血）から、ヘキサブロモビフェニル(#153)が 1.2 pg/g 検出された(図 8)。

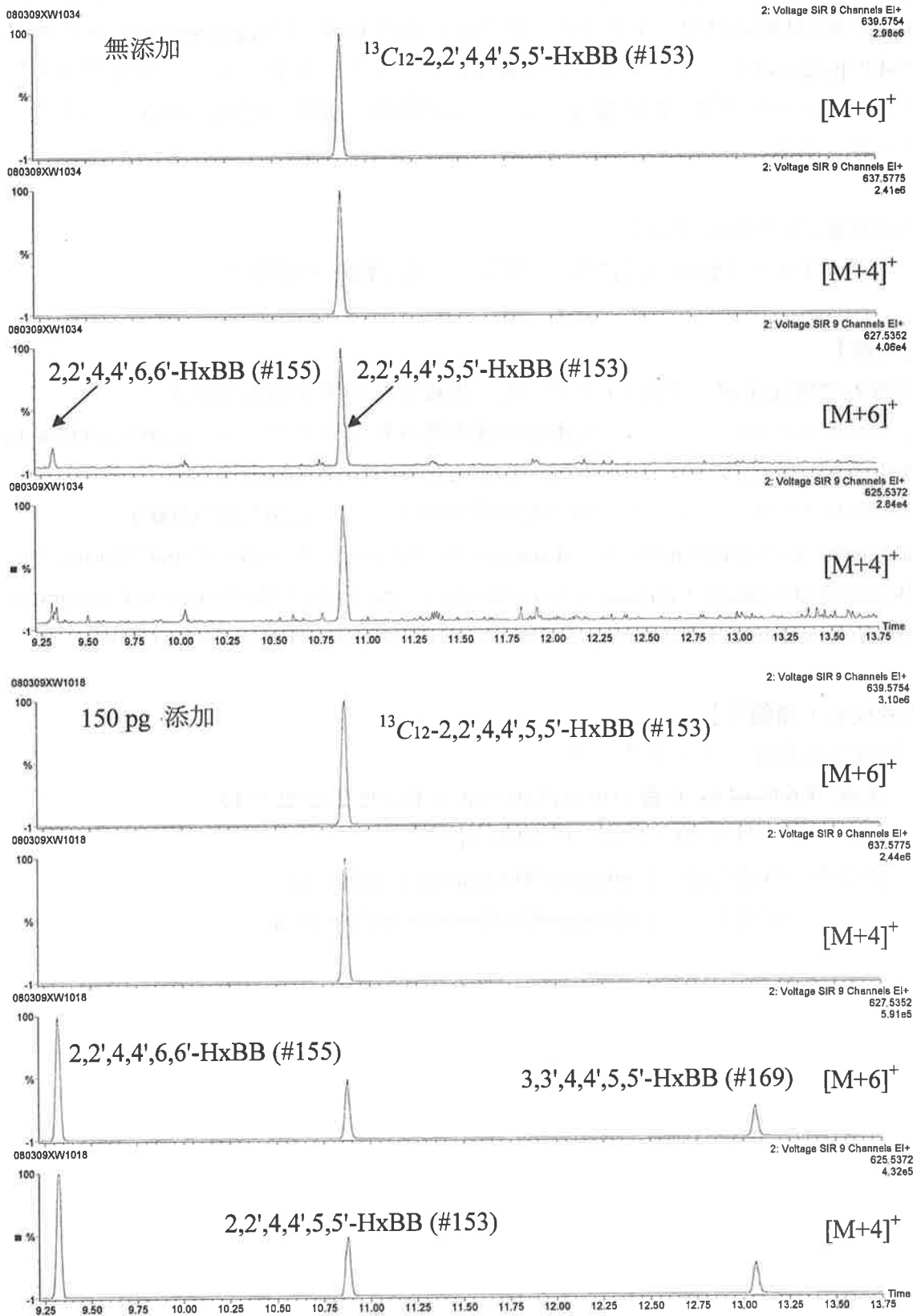


図 8 ヘキサブロモビフェニル 血液（全血）のクロマトグラム

【評価】

本法により、母乳試料中へキサブロモビフェニルの 0.69～1.5 pg/g-wet レベルの検出 (1.9～4.0 pg/g-wet レベルの定量) が可能である。また、血液 (全血) 試料中へキサブロモビフェニルの 0.24～0.57 pg/g-wet レベルの検出 (0.65～1.5 pg/g-wet レベルの定量) が可能である。

【採取試料及び試料液の輸送】

試料採取後はガラス製の容器に入れ、遮光・冷凍で輸送・保管する。

【参考文献】

- 1) 環境省環境安全課：平成 14 年度 化学物質分析法開発調査報告書 (へキサブロモビフェニル；兵庫県立健康環境科学研究所センター), 202-224 (2003)
- 2) 環境省環境安全課：平成 14 年度 化学物質分析法開発調査報告書 (へキサブロモビフェニル；岡山県環境保健センター), 267-277 (2003)
- 3) Watanabe K, Senthilkumar K, Masunaga S, Takasuga T, Iseki N and Morita, M.: Brominated Organic Contaminants in the Liver and Egg of the Common Cormorants (*Phalacrocorax carbo*) from Japan. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 4071-4077 (2004).

【担当者氏名・連絡先】

担当 株式会社島津テクノリサーチ

住所 〒604-8436 京都市中京区西ノ京三条坊町 2 番地の 13

TEL : 075-811-3181 FAX : 075-821-7837

担当者 嶽盛公昭 h_takemori00@shimadzu-techno.co.

高菅卓三 t_takasuga00@shimadzu-techno.co.jp

Hexabromobiphenyl

This method provides procedure for the determination of hexabromobiphenyl in human breast milk and whole blood samples by gas-chromatography high resolution mass spectrometry (GC/HRMS).

[Human breast milk]

Human breast milk (5 g) spike with 2,2',4,4',5,5'-hexabromo[¹³C₁₂]biphenyl and extracted by liquid-liquid extraction. Human milk is two times extracted with hexane, after adding 2 mL of saturated potassium oxalate aqueous solution, 10 mL of diethyl ether and 20 mL of 50% ethanol/hexane. The extract is washed with 5% sodium chloride and then dehydrated with anhydrous sodium sulfate. After solvent evaporation, lipid content of sample is determined by gravimetric method. The lipid is quantified sufficient to 10 mL of hexane. One milliliter of sample extract is subjected to multi layer silicagel column and then elute with 60 mL 10% dichloromethane/hexane. After the solution is evaporated and further concentrated to 20 microL by nitrogen gas purge, it is added internal standard. The analysis is measured with GC/HRMS-SIM. The method detection limits (MDL) and the method quantification limits (MQL) are 0.69-1.5 pg/g and 1.9-4.0 pg/g. The averages of recoveries (N=5) of hexabromobiphenyl in human milk containing 30 pg/g are 93-98%, and the relative standard deviations are 1.6-2.9%.

[Human whole blood]

Human whole blood (maternal blood 20 g or cord blood 30 g) spike with 2,2',4,4',5,5'-hexabromo[¹³C₁₂]biphenyl and extracted by liquid-liquid extraction. Human blood is three times extracted with hexane, after adding saturated ammonium sulfate aqueous solution and 25% ethanol/ hexane. The extract is washed with hexane-washed water and then dehydrated with anhydrous sodium sulfate. After solvent evaporation, lipid content of sample is determined by gravimetric method. The lipid is quantified sufficient to 10 mL of hexane. One milliliter of sample extract is subjected to multi layer silicagel column and then elute with 60 mL 10% dichloromethane/hexane. After the solution is evaporated and further concentrated to 20 µL by nitrogen gas purge, it is added internal standard. The analysis is measured with GC/HRMS-SIM. The method detection limits (MDL) and the method quantification limits (MQL) are 0.24-0.57 pg/g and 0.65-1.5 pg/g. The averages of recoveries (N=5) of hexabromobiphenyl in human blood containing 7.5 pg/g are 94-99%, and the relative standard deviations are 1.9-2.7%.

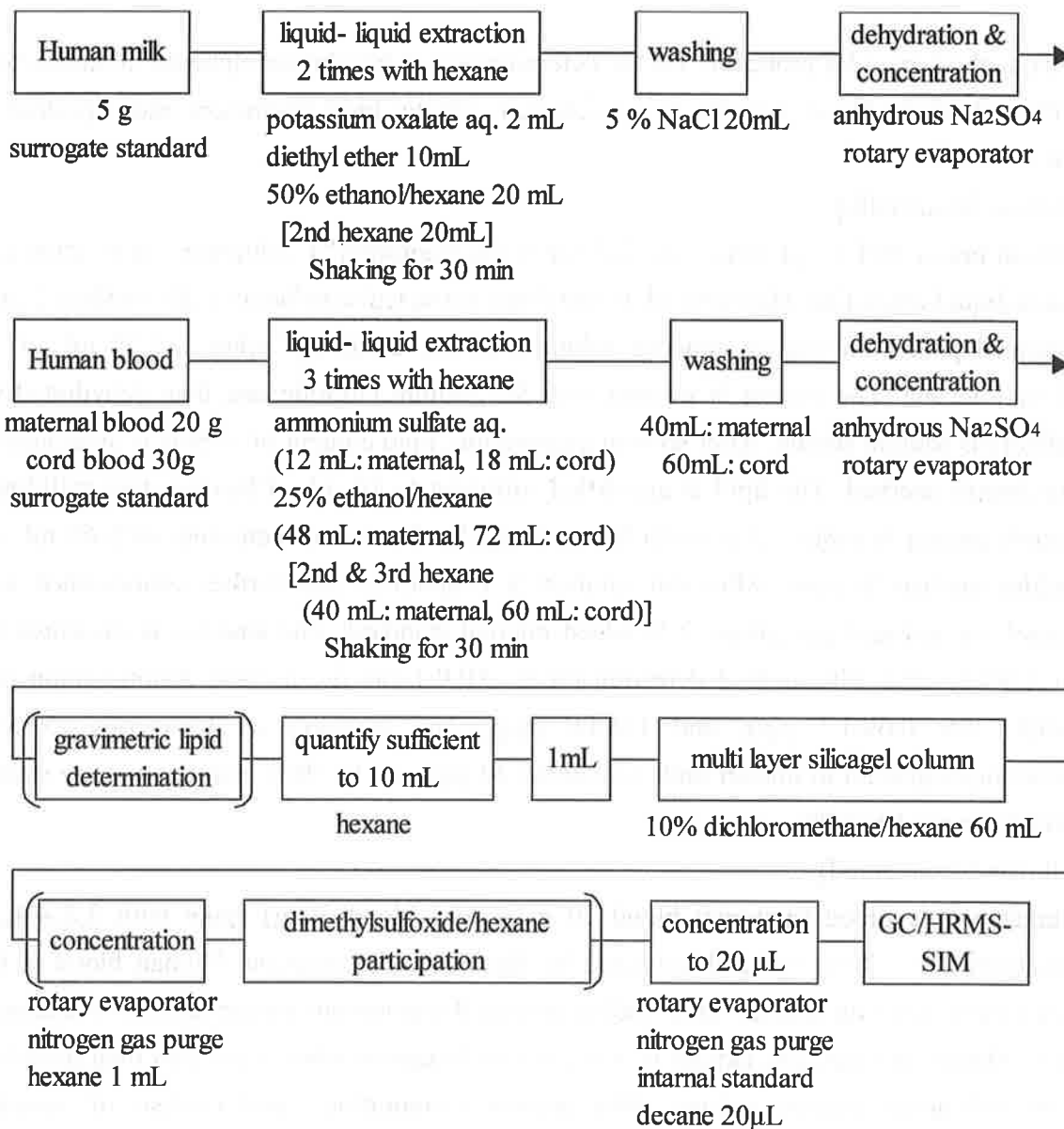


Figure 1. Flow chart illustrate sample extraction, cleanup and analytical method for hexabromobiphenyl in human milk and blood samples

| 物質名 | 分析法フローチャート | 備考 |
|-----------------|--|---|
| ヘキサブロモ ビフェニル | <p>母乳試料 → 液/液抽出</p> <p>母乳 5 g サロゲート添加</p> <p>飽和シユウ酸ナトリウム溶液 2 mL ジエチルエーテル 10 mL 50% エタノール/ヘキサン 20 mL [2回目: ヘキサン 20mL] 振とう 30min</p> | GC/HRMS-SIM |
| | <p>水洗 → 脱水・濃縮</p> <p>5% NaCl 20 mL</p> <p>無水硫酸ナトリウム ロータリーエバポレーター</p> | カラム ENV-5MS (関東化学) |
| | <p>血液試料 → 液/液抽出</p> <p>母体血 20 g 臍帯血 30 g サロゲート添加</p> <p>飽和硫酸アンモニウム溶液 12 mL (母体血)、18mL (臍帯血) 25% エタノール/ヘキサン 48 mL (母体血)、72mL (臍帯血) [2、3回目: ヘキサン 40 mL (母体血)、60mL (臍帯血)] 振とう 30min</p> | カラム長: 15 m 内径: 0.25 mm 膜厚: 0.1 μm |
| | <p>水洗 → 脱水・濃縮</p> <p>40 mL (母体血) 60 mL (臍帯血)</p> <p>無水硫酸ナトリウム ロータリーエバポレーター</p> | 検出下限 < 母乳 > 0.69~1.5 pg/g < 血液 > 0.24~0.57 pg/g |
| | <p>脂肪含量測定 → 再溶解・定容</p> <p>ヘキサン 10 mL</p> | 定量下限 < 母乳 > 0.69~4.0 pg/g |
| | <p>1 mL分取 → 多層シリカゲルカラム クリーンアップ</p> <p>10% ジクロロメタン/ヘキサン 60 mL</p> | < 血液 > 0.65~1.5 pg/g |
| | <p>濃縮 → ジメチルスルホキシド/ ヘキサン分配</p> <p>ロータリーエバポレーター 窒素気流 ヘキサン 1 mL</p> <p>濃縮・定容 → GC/HRMS-SIM 分析</p> <p>ロータリーエバポレーター 窒素気流 内標準添加 デカン 20 μL</p> | |