

表 15. 対照群 (2,3,7,8-TeBDD 投与なし) のラットの臓器試料

経過日数	動物検体番号	体内負荷用試料			
		肝臓 (mg)	脂肪 (mg)	血液	脳 (mg)
2 日	1004	-	-	有	-
	1005	1243	2775	有	-
7 日	1008	1520	2930	-	-
	1009	1423	2473	有	-
	1010	1292	1905	有	-
	2004	-	-	有	-
	2005	45	1007	有	-
36 日	1013	1796	3370	-	-
	1014	2142	2205	有	-
	1015	2385	1810	有	147
	2008	1072	994	-	-
	2009	1433	2027	有	-
	2010	1076	1698	有	-
(雌)					
36 日	2013	1519	1993	-	-
	2014	1805	1863	有	-
	2015	1330	3615	有	123

表 16. 2,3,7,8-TeBDD 投与量 10  $\mu$ g/kg 体重のラットの臓器試料

経過日数	動物検体番号	体内負荷用試料			
		肝臓 (mg)	脂肪 (mg)	血液	脳 (mg)
2 日	1103	2000	1044	-	-
	1104	1947	1283	有	-
	1105	1764	1217	有	-
7 日	1108	1183	1364	-	-
	1109	1429	2326	有	-
	1110	1395	2071	有	-
	2103	1460	766	-	-
	2104	1595	1236	有	-
	2105	1285	627	有	-
36 日	1113	1967	1458	-	-
	1114	2595	2611	有	-
	1115	1959	2848	有	197
	2108	1553	1433	-	-
	2109	1430	1534	有	-
	2110	1148	1090	有	-
	(雌)				
36 日	2113	1166	1859	-	-
	2114	1385	1636	有	-
	2115	1642	2788	有	89

表 17. 2,3,7,8-TeBDD 投与量 30  $\mu$ g/kg 体重のラットの臓器試料

経過日数	動物検体番号	体内負荷用試料			
		肝臓 (mg)	脂肪 (mg)	血液	脳 (mg)
2 日	1204	-	-	有	-
	1205	1689	1715	有	-
7 日	1208	1667	1576	-	-
	1209	1747	2543	有	-
	1210	1390	1426	有	-
	2204	-	-	有	-
	2205	1631	1151	有	-
36 日	1213	1830	1454	-	-
	1214	2632	2524	有	-
	1215	2357	2600	有	138
	2208	1435	1889	-	-
	2209	1315	1549	有	-
	2210	1458	1588	有	-
(雌)					
36 日	2213	1597	2057	-	-
	2214	1906	1228	有	-
	2215	1714	2655	有	90

表 18. 2,3,7,8-TeBDD 投与量 100  $\mu$ g/kg 体重のラットの臓器試料

経過日数	動物検体番号	体内負荷用試料			
		肝臓 (mg)	脂肪 (mg)	血液	脳 (mg)
2 日	1304	-	-	有	-
	1305	1726	1105	有	-
7 日	1309	-	-	有	-
	1310	1348	1281	有	-
	2304	-	-	有	-
	2305	1440	684	有	-
36 日	1314	-	-	有	-
	1315	2611	1326	有	137
	2309	-	-	有	-
	2310	1115	538	有	-
(雌)					
36 日	2314	-	-	有	-
	2315	1752	2251	有	136

表 19. 2,3,7,8-TeBDD 投与量 300  $\mu$ g/kg 体重のラットの臓器試料

経過日数	動物検体番号	体内負荷用試料			
		肝臓 (mg)	脂肪 (mg)	血液	脳 (mg)
2 日	1404	-	-	有	-
	1405	2002	1731	有	-
7 日	1409	-	-	有	-
	1410	1320	1501	有	-
	2404	1098	841	有	-
	2405	-	-	有	有 (未秤量)
36 日	1412	1576	1618	-	-
	1414	-	-	有	-
	1415	3838	2424	有	136
	2409	-	-	有	-
	2410	1589	598	有	-
(雌)					
36 日	2411	2749	-	-	-
	2414	1548	-	有	-
死亡動物 (雌)					
27 日後 死亡	2412	3601	345	-	492
23 日後 死亡	2415	有 (未秤量)	有 (未秤量)	-	有 (未秤量)

## 2-4-2. 臓器中の臭素化ダイオキシン分析方法

前処理方法に関しては動物臓器も血液試料もほぼ同じ方法でよいと考えられる。即ち脂肪分を抽出してその質量を測定後、妨害物質を分解・除去しながら臭素化ダイオキシン類を濃縮し、HRGC-MSによって測定する。しかし、HRGC-MSでの臭素化ダイオキシン類の測定条件、特に大量注入装置のプログラム等についてはまだ十分に検討できていない状況であったが、経口投与量から

- ・ ヒト血液試料よりはるかに高濃度であると予想される、
- ・ 投与された臭素化ダイオキシンが2,3,7,8-TeBDDのみである、
- ・ 試料量が豊富にある、

などから、まず一部の試料を用いて臭素化ダイオキシン類の分析を試みた。

### 1) 前処理方法

基本的には血液試料と同じ方法で臓器試料の前処理を行った。しかし試料形態が血液とは異なるので、脂肪抽出する前に臓器試料を破碎し、均質化するところから始めた。破碎・均質化で、脂肪および臭素化ダイオキシンが臓器内で偏在していても、その偏在を均一化すれば試料の分取を可能にできる。

#### 前処理操作：

##### [試料の準備]

先ず、凍結保存された各臓器試料を自然解凍した後、50mLのビーカーに全量を秤量する。そこへ高速溶媒抽出装置と同じ抽出溶媒のアセトン／ヘキサン（65:35）を20mL加えた後、ホモジナイザー「ポリトロン PT3100」（KINEMATICA 社製）で臓器試料を破碎、均質化する。

##### [試料からの脂肪抽出]

血液のときと同様、珪藻土 10g を加え、よく混合した。それを高速溶媒抽出装置用のセルに移し、クリーンアップスパイクを 20pg 添加した後、血液のときと同条件で脂肪分の抽出を行う。

##### [脂肪質量測定]

得られた抽出液は、同じく無水硫酸ナトリウム 15g による脱水・ロータリーエバポレーターによる濃縮・窒素気流下での溶媒留去の後、脂肪質量を秤量する。

この時、脂肪量が非常に多かったこと、更に臭素化ダイオキシンも非常に高濃度であると予想されたので、得られた脂肪の 1/100 だけを分取して引き続き前処理を行い、残りは冷凍保存することとした。

##### [硫酸による脂肪分解]

脂肪質量測定後、ヘキサンに再び溶かし、50mL メスフラスコへ移し換え、メスアップする。そこから 0.5mL ホールピペットを用いて 1/100 量を先細り遠沈管に分取する。そこへクリーンアップスパイクを 200pg 追加してから、全液量を 4mL に揃える。これに濃

硫酸 2mL を静かに滴下し、そのまま一晩静置する。

一晩静置後、ヘキサン層（上層）にまだ着色が残っている時は、濃硫酸 1mL を追加し、更に半日程度静置する。ヘキサン層が無色であることを確認した後、遠心分離器（毎分 2800 回転、10 分）により硫酸層と分離し、上澄み液を 15mL スピッチへ移す。

#### [ダイオキシン類の分取]

硫酸処理後、同じく自動クリーンアップ装置 Power-Prep（FMS 社製）を用いて妨害物質を完全に除去し、ダイオキシン画分を分取する。

#### [濃縮]

得られたダイオキシン画分を濃縮してガスクロマトグラフ用オートサンプラーのバイアルへ移す。なお、今回 1/100 を分取した試料は依然として非常に高濃度の臭素化ダイオキシンを含んでいると予想されたので、シリンジスパイクを 200pg 添加し、濃縮終了時の最終液量を 1mL にした。

#### 2) HRGC-MS による測定

HRGC-MS による測定も基本的には血液試料と同様である。しかし、

- ・ 大量注入装置の条件検討が不十分であったこと
- ・ 非常に高濃度の臭素化ダイオキシンが含まれていると予想されたこと

から、通常のスプリットレス注入法で 1 $\mu$ L を注入し、臭素化ダイオキシンを測定することとした。

なお、検量線もこれと同条件で標準液を測定して作製した。

表 20. 動物臓器中臭素化ダイオキシンの高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計測定条件

	項目	条件など
MS 部	高分解能質量分析計	Micromass 社製 AutoSpec Ultima NT (二重収束型)
	分解能	10000 以上
	電子加速電圧	35 eV
	イオン化電流	0.5 mA
	イオン源温度	300 $^{\circ}$ C
	検出方法	質量校正用標準物質 PFK を用いたロックマス方式による選択イオン検出 (SIM) 法
GC 部	高分解能ガスクロマトグラフ	Agilent 社製 HP6890
	注入方法	スプリットレス注入法
	分析カラム	J&W 社製 DB-5 (0.25mm ID $\times$ 30m、膜厚 0.25 $\mu$ m)
	注入口温度	280 $^{\circ}$ C
	カラムオープン昇温条件	120 $^{\circ}$ C (1.5min hold) - <20 $^{\circ}$ C/min> - 240 $^{\circ}$ C (0min hold) - <5 $^{\circ}$ C/min> - 320 $^{\circ}$ C (7min hold)

### 2-4-3. 結果と考察

1) 先ず、臓器試料と同条件で測定した検量線作製用標準液の結果と、それらの一次回帰直線から求めた各化合物の相対感度係数(RRFcs)を以下に示す。

表 21. 通常のスプリットレス注入法による臭素化ダイオキシン類検量線作製用標準液の測定結果と相対感度係数(RRFcs)の計算結果

化合物		検量線作製用標準液						一次回帰直線		相関 (R <sup>2</sup> )
		CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	傾き (RRFcs)	y 切片	
2,3,7,8-TeBDF	面積比	0	0.91266	3.6578	30.3660	58.427	238.87	1.8524	8.4661	0.9926
	濃度比	0.0625	0.25	1.25	5	25	125			
2,3,7,8-TeBDD	面積比	0	0.09696	0.2985	0.7511	2.976	10.75	0.8405	0.3427	0.9952
	濃度比	0.00625	0.025	0.125	0.5	2.5	12.5			
1,2,3,7,8-PeBDF	面積比	0	5.15649	10.1444	48.7891	194.031	1006.46	1.6054	1.6650	0.9998
	濃度比	0.3125	1.25	6.25	25	125	625			
2,3,4,7,8-PeBDF	面積比	0	3.09704	8.8246	56.4027	187.760	1046.96	1.6711	-0.9245	0.9992
	濃度比	0.3125	1.25	6.25	25	125	625			
1,2,3,7,8-PeBDD	面積比	0	0.63472	0.9772	3.7673	10.832	116.82	1.8860	-2.9095	0.9881
	濃度比	0.03125	0.125	0.625	2.5	12.5	62.5			
1,2,3,4,7,8-HxBDF	面積比	0	1.49306	3.4259	46.2535	116.685	481.60	0.7090	11.5348	0.9960
	濃度比	0.33333	1.33333	6.6667	26.6667	133.333	666.67			
1,2,3,4,7,8-HxBDD + 1,2,3,6,7,8-HxBDD	面積比	0	0.79234	4.3447	51.3482	113.078	469.83	0.5511	12.8781	0.9947
	濃度比	0.41667	1.66667	8.3333	33.3333	166.667	833.33			
1,2,3,7,8,9-HxBDD	面積比	0	0.30387	1.1761	17.9066	50.123	204.19	0.4825	4.3955	0.9963
	濃度比	0.20833	0.83333	4.1667	16.6667	83.333	416.67			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	面積比	0.54313	0.88018	3.5292	41.0800	104.933	511.22	0.3034	5.7152	0.9983
	濃度比	0.83333	3.33333	16.6667	66.6667	333.333	1666.67			

注) 面積比: 各分析対象物質のピーク面積 (As) と、対応する内標準物質 (クリーンアップスパイク) のピーク面積 (Acs) との比。As/Acs。

濃度比: 標準液における分析対象物質と対応する内標準物質 (クリーンアップスパイク) の濃度の比。Cs/Ccs。

傾き(RRFcs): クリーンアップスパイクに対する分析対象物質の相対感度係数

1,2,3,4,7,8-HxBDD + 1,2,3,6,7,8-HxBDD: クロマトグラム上で分離できなかったため合計値として計算。

一次回帰直線: CS1 は検出限界以下であったため、ここでは除外して計算した。



検量線作製用標準液を測定した結果、特に高分子量側の PBDD で検出感度が著しく悪くなることが分かった。そのため一次回帰直線の相関も悪く、クリーンアップスパイクに対する分析対象物質の相対感度係数(RRFcs)も 1 から大きくかけ離れた値となった。これは、今回高分子量に対応した質量分析計の調整が不完全であったことが主な原因と考えられる。また臭素化ダイオキシン類は沸点も非常に高いため、温度と時間をかけないとガスクロマトグラフから溶出しにくい。これがクロマトグラムピークをブロードにし、定量性を悪くする原因となる。また、比較的熱に対する安定性が低い臭素化ダイオキシン類は途中で分解している可能性もある。

しかし、その段階ではこの相対感度係数(RRFcs)を用いるしかなく、その RRFcs を用いて臓器試料中の臭素化ダイオキシン類濃度を計算した。尚、CS1 はピークを検出出来なかったため、ここでは除外して一次回帰直線を求めた。

2) 次に臓器試料として、体重 1kg 当たり 0, 10, 30  $\mu$ g の 2,3,7,8-TeBDD を経口投与した後、7 日目に解剖したラットの肝臓と脂肪試料を分析した結果を示す。2,3,7,8TeBDD 以外の臭素化ダイオキシン類は検出されなかった。2,3,7,8-TeBDD のみの定量結果を表 22 に示す。

まだ測定結果が少ないが、各臓器への蓄積量が投与量に概ね比例するデータが得られている。

表 22. 投与後 7 日目のラット臓器中の 2,3,7,8-TeBDD 測定結果

臓器部位	2,3,7,8-TeBDD 投与量 ( $\mu$ g/kg 体重)	動物検体 番号	抽出脂肪 質量 (g)	2,3,7,8-TeBDD 濃度	
				臓器 質量当たり (ng/g)	抽出脂肪 質量当たり (ng/g-lipid)
肝臓	0	1008	0.032	0	0
	10	1108	0.063	15	270
	30	1208	0.058	44	1200
脂肪	0	1008	2.40	0	0
	10	1108	1.14	8.7	10
	30	1208	0.91	33	57

#### 2-4-4. 今後の予定

臭素化ダイオキシン類の定量性を出来る限り良くし、残りの試料全てを分析する。そして各臓器への蓄積量および減衰・半減期等を調べる。

## 2-5. 精度管理用（臭素化ダイオキシン類添加）標準動物血液の分析

実際のヒト血液試料を対象とした臭素化ダイオキシンの測定に先立ち、前処理法や分析技術等の検討および評価を目的として、動物（ウシ）血液に既知濃度の臭素化ダイオキシン類を添加した試料を作製し、これを用いて処理法ならびに分析法の適正化の検討を行うこととした。その際、分析精度を確かめるためには、分析者自身の結果だけでなく、同一試料を他機関で分析して、その結果と比較するクロスチェックが必要である。この作業を委託する機関として、大塚製薬株式会社（大塚ライフサイエンス事業部 EDC 分析センター生体ダイオキシン類分析室）を選んだ。その理由として、血液中塩素化ダイオキシン類分析において定評のある分析機関であること、また測定精度が保証された信頼できる検査機関であることを重視した。大塚製薬株式会社は厚生労働省委託によって中央労働災害防止協会労働衛生調査分析センターが行っている全国調査においても血液中ダイオキシン類濃度測定を担当しており、ダイオキシン類の微量測定に関する信頼性は保証されている。

### 2-5-1. 作業行程概略

#### 1) 精度管理用（臭素化ダイオキシン類添加）標準動物血液の調製

まず、分析対象の臭素化ダイオキシン類標準物質の混合溶液を調製する。これを動物（ウシ）血液に添加し、精度管理用臭素化ダイオキシン類含有標準動物血液を作製する。このとき、臭素化ダイオキシン類の含有量（添加量）を変えたもの7試料を作製する。同様のものを双方で作製する。ただし含有量は同じである必要はない。

#### 2) 試料の交換

おのおの作製した精度管理用標準動物血液7試料をそれぞれ2つに分け、一方を交換しあう。この時点では、相手に含有量を知らせない。

#### 3) 臭素化ダイオキシン類の測定

それぞれ精度管理用標準動物血液の前処理（クリーンアップ）を行い、HRGC-MSにより臭素化ダイオキシン類を測定する。

#### 4) 測定結果の交換および分析方法の検討

臭素化ダイオキシン類の測定結果を交換・比較し、前処理方法ならびに測定方法の適正化の検討を行う。

### 2-5-2. 標準動物血液試料

今回は、大塚製薬株式会社側で調製した精度管理用標準動物血液7試料を用いた。臭素化ダイオキシン類の含有量は未知のまま分析を行い、測定後に結果と比較した。

### 2-5-3. 分析方法

これを前述したとおりに前処理を行い、HRGC-MSにより臭素化ダイオキシン類の測定を行った。大量注入装置（SCLV）のプログラムについてはまだ十分に検討できていなかったが、通常のスプリットレス注入法では検出感度が悪いため（「臭素化ダイオキシン投与実

験動物の臓器」の結果を参照)、大量注入装置を使用することとした。

#### 2-5-4. 結果と考察

今回はまだ、大塚製薬での臭素化ダイオキシン類の測定を受領していないので、本研究所で行った精度管理用(臭素化ダイオキシン類添加)標準動物血液の分析結果のみを示す。

図 19~22 に HRGC-MS によって得られた精度管理用標準動物血液中の臭素化ダイオキシン類のマスキロマトグラムの例を示す。

前述のように、血液中ダイオキシン類の測定は同位体希釈法で行う。最初に既知量の内標準物質(クリーンアップスパイク)を血液試料に添加し、目的物質であるダイオキシン類と共に抽出・精製する。これを高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計で測定し、同位体比を求める。この同位体比から血液試料中の含有量を計算する。

精度管理用標準動物血液中の臭素化ダイオキシン類の量は、それぞれ対応する検量線から求めた相対感度係数  $RRFcs$  を用いて算出した。またクリーンアップスパイクの回収率は、対応する相対感度係数  $RRFrs$  を用いて算出した。

その定量結果を表 23、24 に示した。

精度管理用標準動物血液中の臭素化ダイオキシン類を測定した結果、今回測定した中で最も分子量の大きい七臭化物(1,2,3,4,6,7,8-HpBDF)の回収率はどの試料において 4~35% (平均 16.7%) と最も悪い結果であった。逆にその他の四臭化物から六臭化物は、最も濃度の高い試料 QC1 を除く全てにおいて回収率 120~330% と、元の含有量より多く見積もられた結果となった。一方、クリーンアップ内標準物質の回収率は、四臭化物で約 20~40%、五臭化物で約 50~90%、六臭化物で約 50~220% と化合物ごとに大きく異なる。

これらの結果は、HRGC-MS が安定して臭素化ダイオキシン類を測定できていなかったためと考えられる。検量線作成用標準液を測定した結果をみても、検出感度が特に高分子量側で非常に悪かった。そのため一次回帰直線の相関も悪く、クリーンアップスパイクに対する分析対象物質の相対感度係数( $RRFcs$ )も 1 から大きくかけ離れた値となったことから、そのように判断される。無論、前処理方法が不適切であった可能性も残されているが、測定に定量性がないままではその判断まではできない。

なぜ、臭素化ダイオキシン類を安定して測定できなかったのか、HRGC-MS への試料の注入から順に検証してみた。

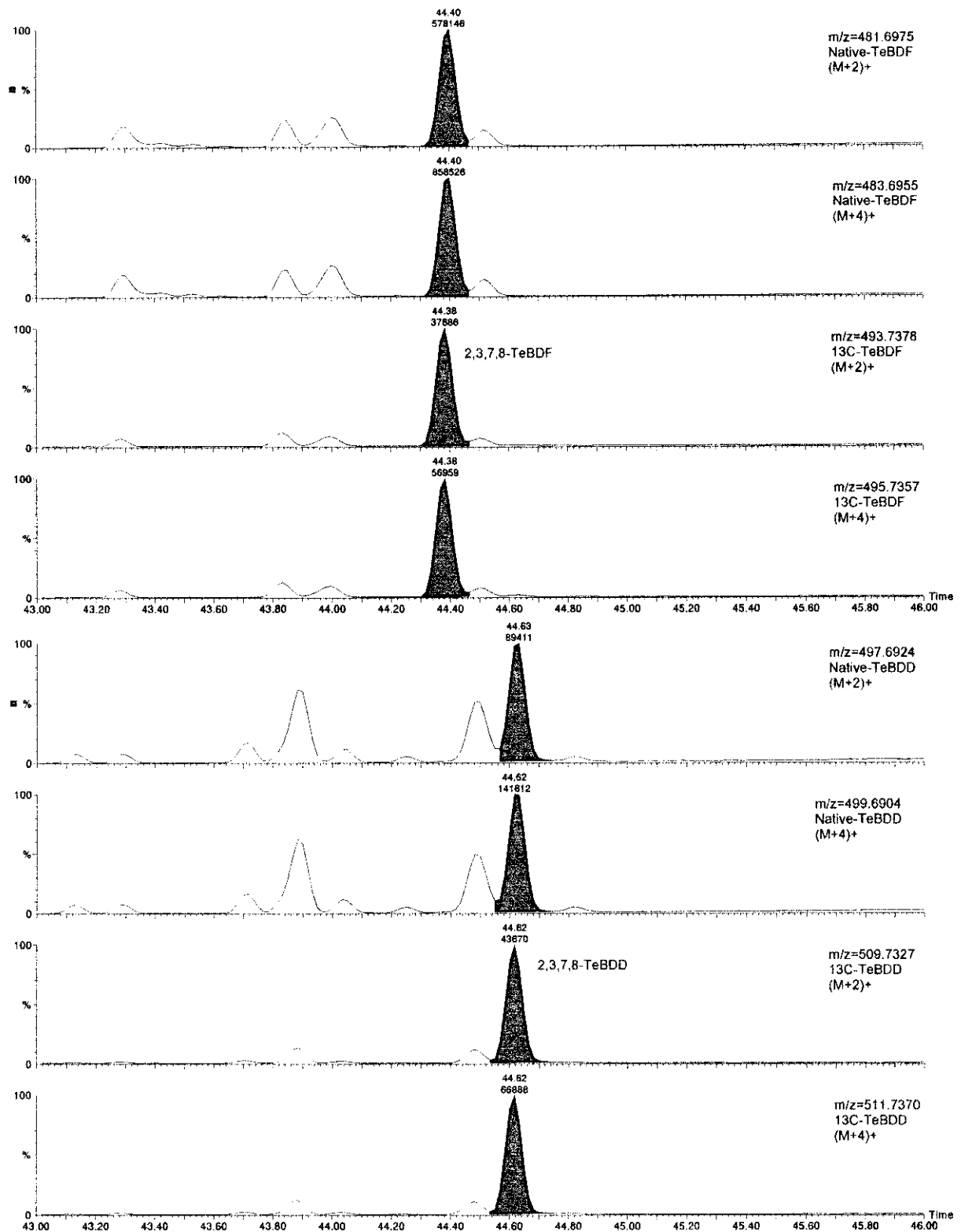


図 19. 精度管理用標準動物血試料中の TeBDDs および TeBDFs のマスクロマトグラム

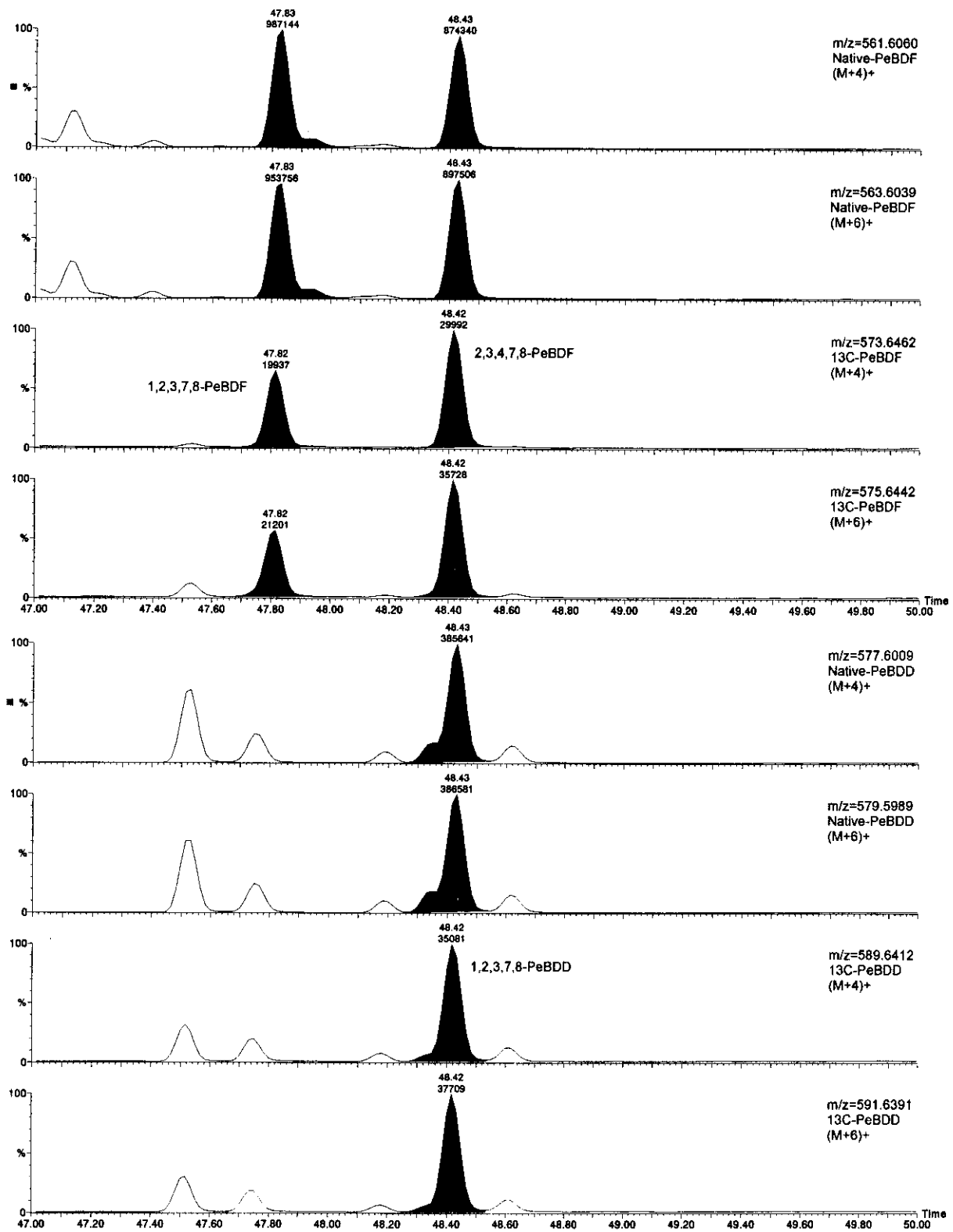


図 20. 精度管理用標準動物血試料中の PeBDD および PeBDF のマスクロマトグラム

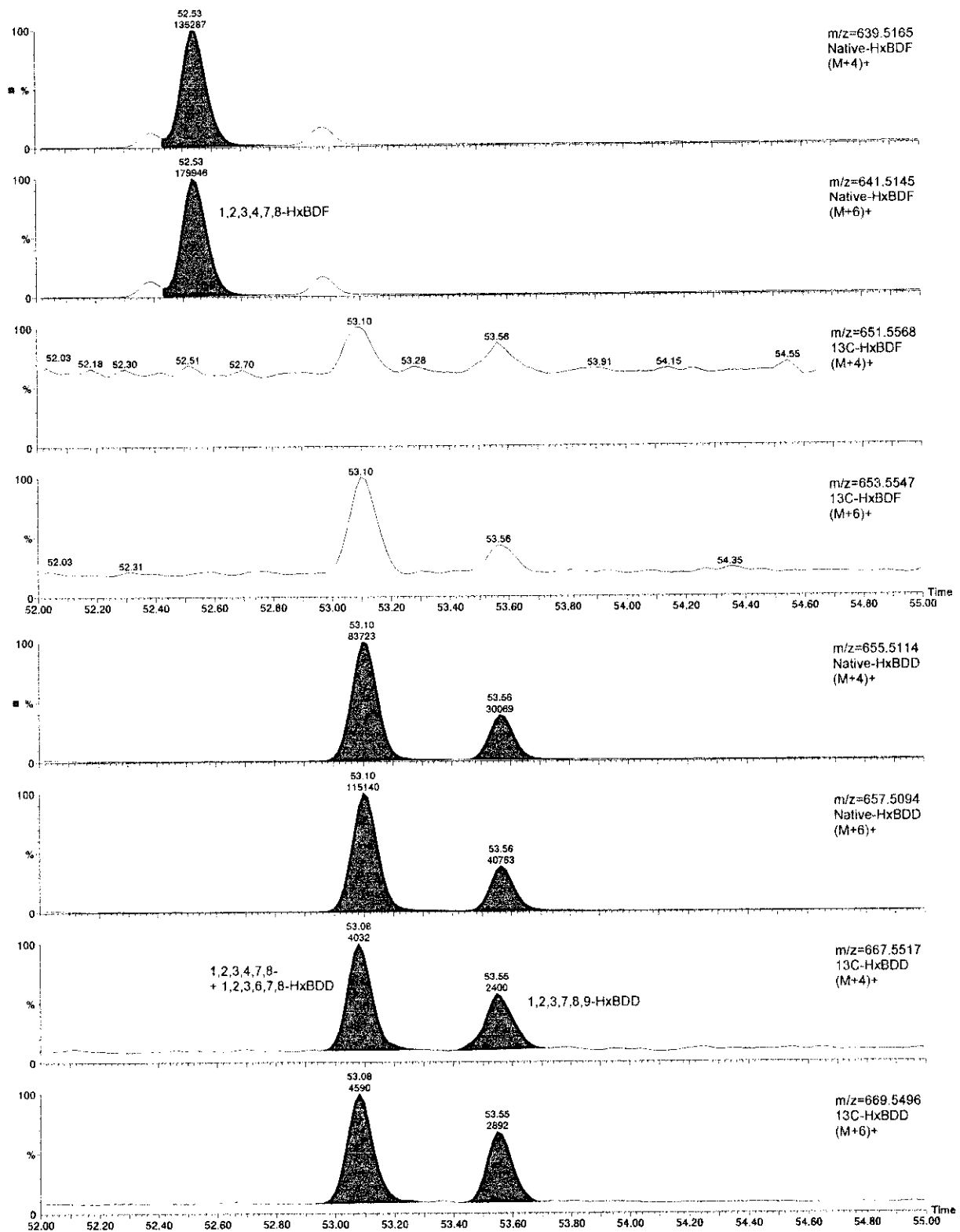


図 21. 精度管理用標準動物血試料中の HxBDD および HxBDF のマスクロマトグラム

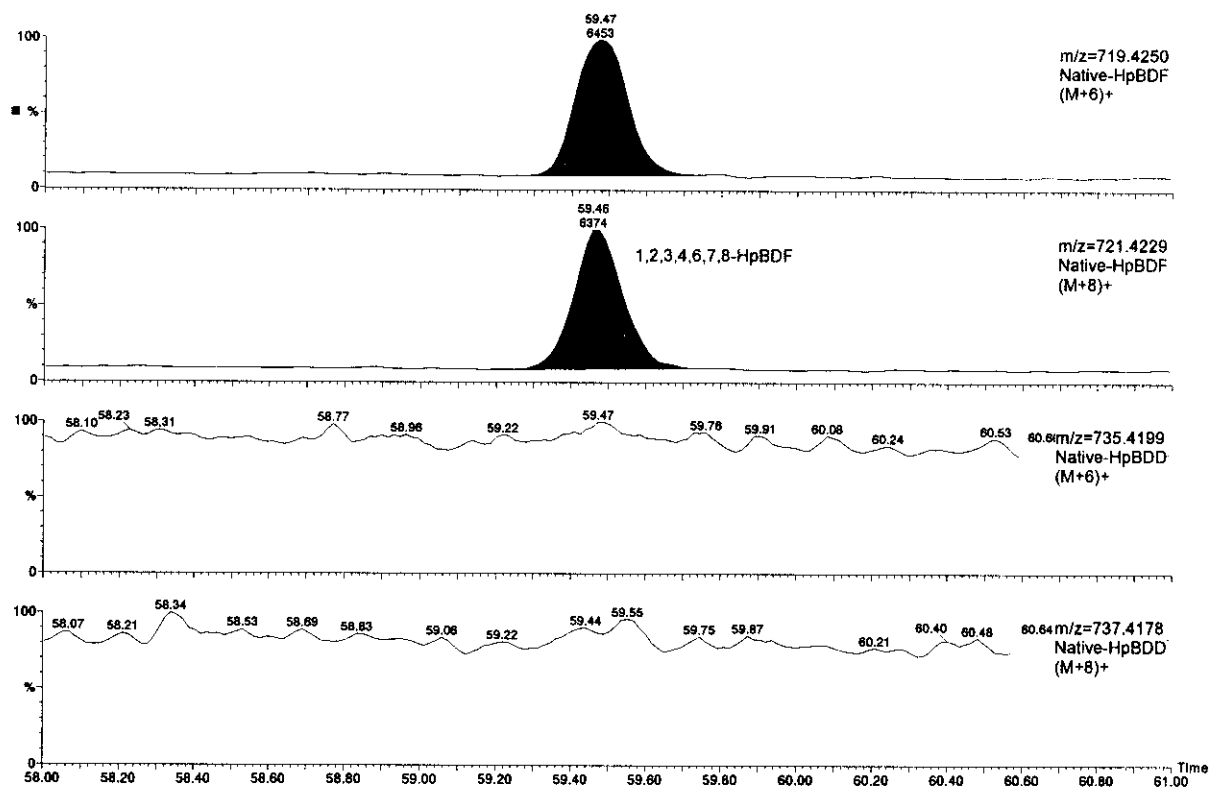


図 22. 精度管理用標準動物血試料中の HpBDD および HpBDF のマスクロマトグラム

注) HpBDD および HpBDF の  $^{13}\text{C}$  標識化合物が市販されていないため、クリーンアップ内標準物質は添加していない。それ故そのイオンもモニターせず、その分を Native 体の検出に充てた。

表 23. 精度管理用標準動物血試料中の臭素化ダイオキシン類の測定結果

Compound		QC1	QC2	QC3	QC4	QC5	QC6	QC7
2,3,7,8-TeBDF	含有量 (pg/mL)	4000	1000	250	62.5	15.6	3.91	0.977
	測定値 (pg/mL)	2900	1200	410	91	22	4.9	1.7
	回収率 (%)	73	120	164	146	141	125	174
2,3,7,8-TeBDD	含有量 (pg/mL)	400	100	25	6.25	1.56	0.391	0.0977
	測定値 (pg/mL)	330	150	73	13	3.8	0.77	0.22
	回収率 (%)	83	150	292	208	244	197	225
1,2,3,7,8-PeBDF	含有量 (pg/mL)	20000	5000	1250	313	78.1	19.5	4.88
	測定値 (pg/mL)	12300	5900	1800	450	110	26	7.9
	回収率 (%)	62	118	144	144	141	133	162
2,3,4,7,8-PeBDF	含有量 (pg/mL)	20000	5000	1250	313	78.1	19.5	4.88
	測定値 (pg/mL)	13000	5500	1700	420	100	24	7.4
	回収率 (%)	65	110	136	134	128	123	152
1,2,3,7,8-PeBDD	含有量 (pg/mL)	2000	500	125	31.25	7.81	1.95	0.488
	測定値 (pg/mL)	1100	650	240	55	12	2.6	0.94
	回収率 (%)	55	130	192	176	154	133	193
1,2,3,4,7,8-HxBDF	含有量 (pg/mL)	16000	4000	1000	250	62.5	15.6	3.91
	測定値 (pg/mL)	12000	6400	2900	470	200	32	13
	回収率 (%)	75	160	290	188	320	205	332
1,2,3,4,7,8- + 1,2,3,6,7,8-HxBDD	含有量 (pg/mL)	20000	5000	1250	313	78.1	19.5	4.88
	測定値 (pg/mL)	11000	6300	2200	440	190	31	13
	回収率 (%)	55	126	176	141	243	159	266
1,2,3,7,8,9-HxBDD	含有量 (pg/mL)	10000	2500	625	156	39.1	9.77	2.44
	測定値 (pg/mL)	4800	2900	950	210	67	13	5.0
	回収率 (%)	48	116	152	135	171	133	205
1,2,3,4,6,7,8-HpBDF	含有量 (pg/mL)	40000	10000	2500	625	156	39.1	9.77
	測定値 (pg/mL)	4600	3500	440	130	25	4.2	0.38
	回収率 (%)	12	35	18	21	16	11	4



表 24. 精度管理用標準動物血試料に添加したクリーンアップ内標準物質の回収率

Compound		QC1	QC2	QC3	QC4	QC5	QC6	QC7
<sup>13</sup> C-2,3,7,8-TeBDF	添加量 (pg)	40	40	40	40	40	40	40
	測定値 (pg)	7.8	9.1	16	15	17	13	17
	回収率 (%)	20	23	40	38	43	33	43
<sup>13</sup> C-2,3,7,8-TeBDD	添加量 (pg)	40	40	40	40	40	40	40
	測定値 (pg)	6.7	8.1	15	15	15	11	16
	回収率 (%)	17	20	38	38	38	28	40
<sup>13</sup> C-1,2,3,7,8-PeBDF	添加量 (pg)	40	40	40	40	40	40	40
	測定値 (pg)	20	24	26	28	22	18	29
	回収率 (%)	50	60	65	70	55	45	73
<sup>13</sup> C-1,2,3,7,8-PeBDD	添加量 (pg)	40	40	40	40	40	40	40
	測定値 (pg)	23	30	37	37	34	25	35
	回収率 (%)	58	75	93	93	85	63	88
<sup>13</sup> C-1,2,3,4,7,8- + 1,2,3,6,7,8-HxBDD	添加量 (pg)	60	60	60	60	60	60	60
	測定値 (pg)	96	170	59	90	65	83	120
	回収率 (%)	160	283	98	150	108	138	200
<sup>13</sup> C-1,2,3,7,8,9-HxBDD	添加量 (pg)	30	30	30	30	30	30	30
	測定値 (pg)	39	67	23	49	14	19	30
	回収率 (%)	130	223	77	163	47	63	100

注) <sup>13</sup>C-2,3,4,7,8-PeBDF シリンジスパイクとの相対感度係数 (RRFs) を基に各化合物の回収率を計算。

<sup>13</sup>C-1,2,3,4,7,8-HxBDD と <sup>13</sup>C-1,2,3,6,7,8-HxBDD とはクロマトグラム上で分離が出来なかったため、合計値として表記している。また、<sup>13</sup>C-1,2,3,4,7,8-HxBDD はシリンジスパイクとして添加したものであるため、一概に他との比較は出来ない。あくまでも参考として記載した。

## 1) ガスクロマトグラフに関して

ここでは主に、高沸点および熱的不安定性が問題となる。

### (ア) 試料注入口

臭素化ダイオキシン類は高分子量・高沸点であり、臭素数が増えれば増えるほど高分子量・高沸点となる。注入口から高沸点物質をキャピラリーカラム（ガスクロマトグラフ）へ送り込むには温度を上げるか時間をかけるしかない。しかし、そうすると熱に不安定な臭素化ダイオキシン類が注入口で分解してしまう可能性がある。これはまた、試料のバンド幅を広げたり、妨害物質をもカラム更には質量分析計へ送り込みことにもなり、キャピラリーカラムおよび質量分析計の分離性能を悪くする。

### (イ) キャピラリーカラム

上記と同様、高沸点物質になればなるほど、キャピラリーカラムでの保持力が強くなり、溶出に温度と時間を必要とする。ピークもブロードになり、定量性も感度（S/N 比）も悪くなる。

## 2) 質量分析計

質量分析計では主に、質量数が問題となる。

### (ア) チューニング

二重収束型質量分析計は、キャピラリーカラムから出てきた化合物に電子をぶつけてイオン化（EI 法）し、静電場と磁場の真空中を検出器まで飛ばしている。これが高分解能を得られるのは、同じ質量数でもイオン化された際、ある程度幅を持った運動エネルギーをその静電場でいったん収束させているためである。その静電場の種々のパラメーターをチューニング（調整）することが非常に重要であり、不適切であれば分解能が下がる。しかし、質量数が大きく異なるとその設定値も大きく異なってくる。臭素化ダイオキシン類の場合、約 480（四臭化物）から 800 以上（八臭化物）と 2 倍近い幅がある。

### (イ) 分解能

更に、必要とされる分解能も 10,000 では不十分である。ここでいう分解能とは、ある質量数  $m$  と  $(m+\Delta)$  とが同じピーク高で、その 10% の高さで両者を分離できるとき  $(m/\Delta)$  が分解能である。質量分析計で、同時に測定するグループには同じ臭素数の PBDD と PBDF およびそれらの  $^{13}\text{C}$  標識化合物が含まれている。測定条件で「臭素原子の天然同位体存在比から推定される最も強い二つのイオンの質量数を測定」するとしたが、Native-PBDD の  $M^+$ ,  $(M+2)^+$ ,  $(M+4)^+$  が内標準として添加した  $^{13}\text{C}$ -PBDF の  $(M+4)^+$ ,  $(M+6)^+$ ,  $(M+8)^+$  とそれぞれ非常に近い質量数である。これらを区別するために必要な分解能は、四臭化物で約 12,000、五臭化物で約 14,000、六臭化物で約 15,800、七臭化物で約 17,800、八臭化物では 19,700 も必要である。

### (ウ) 質量校正用標準物質（PFK）

また、チューニングおよび測定時（ロックマス）の質量校正用標準物質 PFK にも注意が

必要である。質量校正用の標準物質である PFK を質量分析計に流しながらチューニングおよび測定を行うが、そのときモニターする質量数に近い PFK のフラグメントイオンを使用しなければならない。しかし臭素化ダイオキシン類のように高分子量になると、それに対応する質量数の PFK のフラグメントイオンは非常に微弱な強度しか持っていない。最大強度を示す質量数 68.99521 の強度を 100% とすると、質量数 480 (四臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度は 0.5% 程度、質量数 570 (五臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度は 0.2% 程度、質量数 650 (六臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度も 0.2% 程度、質量数 730 (七臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度は 0.06% 程度、質量数 810 (八臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度に至っては 0.01% 程度しかない。そんなイオンをずっと捕捉しながら測定しなければならず、容易に妨害物質の影響を受ける。常に PFK のイオンを元にモニターする質量を校正しているため、妨害を受ければ即、モニターする質量も正しくなくなってしまう。

#### 2-5-5. 今後解決すべき問題と対策

先ずは上に挙げた測定上の問題点の対策を考案し、解消することが最優先である。現時点で考えられる対策をいくつか挙げる。

##### 1) ガスクロマトグラフ

###### (ア) 試料注入口

これに関しては、大量注入装置 (SCLV) で対応する。この装置は通常より高圧で試料をカラムへ送り込んでいる点、コールドトラップにより試料のバンド幅を再凝縮している点、分析対象物質の前後の妨害物質を排出し質量分析計へ導入しない点、などが有効であると思われる。当然、検出下限値の引き下げにも貢献する。ただし、そのプログラムの最適化が必要である。

###### (イ) キャピラリーカラム

これに関しては、種々のキャピラリーカラムを試す以外にない。例えば短いカラムや液相の極性が低いもの、液相の膜厚が薄いものを用いることで、より早く・低温で溶出させることが可能である。ただしこれは概して分離を悪くするので、それとの兼ね合いが必要である。

##### 2) 質量分析計

###### (ア) チューニング

測定そのものを臭素数ごとに分けて行い、その質量数にあった専用のチューニングを用意する。

###### (イ) 分解能

分解能 10,000 のままだでも、キャピラリーカラムで PBDD と PBDF とが完全に重ならないければ問題はない。しかし、それにはここでは測定していない異性体も含め全てのピ

ークの位置を調べる必要がある。これは標準試薬がないと不可能である。

或いは、 $^{13}\text{C}$ -PBDF なら最も軽い  $M^+$ 、Native-PBDD なら最も重い方の  $(M+8)^+$  などのように、お互いその質量になり得ない臭素同位体数のイオンをモニターする。または、これまでのような分子イオンではなく別のフラグメントイオンをモニターする。しかしこれらの場合、イオン強度が弱くなるので検出感度も悪くなると予想される。

測定ではなく、前処理操作から PBDD と PBDF とで血液試料を別々に分けて行い、内標準物質も別々に加えれば、この問題を回避できるが、その分、血液試料も倍必要となる。

#### (ウ) PFK

この質量数で測定する限り、チューニングおよび測定時（ロックマス）の質量校正用標準物質 PFK を大量に流しながらチューニングおよび測定を行う他ない。或いは前項の分解能とあわせて、質量数のもっと小さいフラグメントイオンをモニターする。