

表-7. TEQ算出のためのTEF

化合物の名称等		IUPAC Number	WHO, 1998-TEF	
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	-	1	
	1,2,3,7,8-PeCDD	-	1	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-	0.01	
	OCDD	-	0.0001	
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	-	0	
	1,2,3,7,8-PeCDF	-	0.05	
	2,3,4,7,8-PeCDF	-	0.5	
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	-	0.1	
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-	0.01	
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-	0.01	
	OCDF	-	0.0001	
Co-PCBs	<i>non-ortho</i>	3,3',4,4'-TeCB	# 77	0.0001
		3,4,4',5'-TeCB	# 81	0.0001
		3,3',4,4',5'-PeCB	#126	0.1
		3,3',4,4',5,5'-HxCB	#169	0.01
	<i>mono-ortho</i>	2,3,3',4,4'-PeCB	#105	0.0001
		2,3,4,4',5'-PeCB	#114	0.0005
		2,3',4,4',5'-PeCB	#118	0.0001
		2',3,4,4',5'-PeCB	#123	0.0001
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	#156	0.0005
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	#157	0.0005
		2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167	0.00001
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189	0.0001

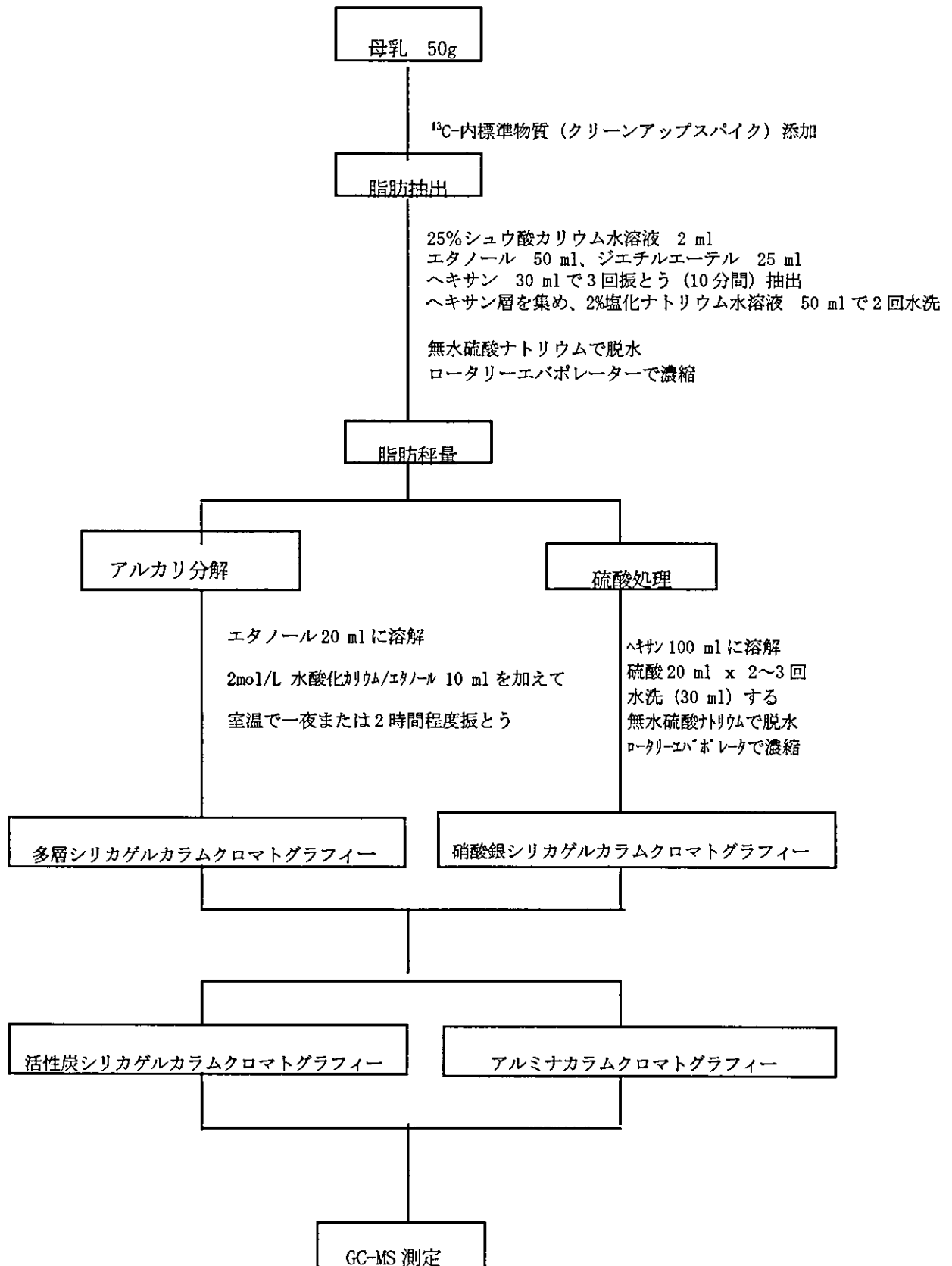
表-8. PCDDs, PCDFsおよびCo-PCBs測定分析結果の表記例

化合物の名称等	IUPAC Number	実測濃度 (pg/g-fat)	WHO,1998-TEF	
			毒性係数 TEF	毒性等量 TEQ (pg-TEQ/g-fat)
P C D D s	2,3,7,8-TeCDD	-	1	
	1,2,3,7,8-PeCDD	-	1	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-	0.01	
	OCDD	-	0.0001	
	Total PCDDs	-	-	
P C D F s	2,3,7,8-TeCDF	-	0	
	1,2,3,7,8-PeCDF	-	0.05	
	2,3,4,7,8-PeCDF	-	0.5	
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	-	0.1	
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-	0.01	
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-	0.01	
	OCDF	-	0.0001	
	Total PCDFs	-	-	
Total (PCDDs+PCDFs)		-	-	-
C o - P C B s	3,3',4,4'-TeCB	# 77	0.0001	
	3,4,4',5'-TeCB	# 81	0.0001	
	3,3',4,4',5'-PeCB	#126	0.1	
	3,3',4,4',5,5'-HxCB	#169	0.01	
	Total non-ortho PCBs	-	-	
	2,3,3',4,4'-PeCB	#105	0.0001	
	2,3,4,4',5'-PeCB	#114	0.0005	
	2,3',4,4',5'-PeCB	#118	0.0001	
	2',3,4,4',5'-PeCB	#123	0.0001	
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	#156	0.0005	
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	#157	0.0005	
2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167	0.00001		
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189	0.0001		
Total mono-ortho PCBs	-	-		
Total Co-PCBs		-	-	-
Total (PCDDs+PCDFs+Co-PCBs)		-	-	-

[注]

1. 実測濃度 : ダイオキシン類およびコプラナーPCB濃度 (pg/g-fat)
2. 毒性等量 : 2,3,7,8-TeCDD 毒性等量 (pg-TEQ/g-fat)
カッコ内の数値は実測濃度が目標定量下限値未満であった場合、目標定量下限値の1/2を用いて算出した最大見積もり濃度を表す。
3. 表中『N.D.』は目標定量下限値未満を表す。
4. Total PCDDs および Total PCDFs は PCDD および PCDF それぞれにおける各 2,3,7,8-位塩素置換異性体の合計を表す (その他の化合物は含んでいない)。
5. Total (PCDDs+PCDFs) は各 2,3,7,8-位塩素置換異性体の合計を表す (その他の化合物は含んでいない)。
6. Total non-ortho PCBs および Total mono-ortho PCBs はそれぞれ各 non-ortho Co-PCB および mono-ortho Co-PCB の合計を表す。
7. Total Co-PCBsはCo-PCBs各化合物の合計を表す。

図1. 母乳中ダイオキシン類の分析フロー



12 解説編

- 1 coplanar-PCBs
- 2 polychlorobiphenyl または polychlorinatedbiphenyl
- 3 *ortho*-position
- 4 isomer
- 5 congener または homologue
- 6 検出器の信号をスムージング等の処理によって取り込んでいる装置の場合、S/N の取り扱いに注意する。
- 7 polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins
- 8 polychlorinated dibenzofurans
- 9 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins
- 10 pentachlorodibenzo-*p*-dioxins
- 11 hexachlorodibenzo-*p*-dioxins
- 12 heptachlorodibenzo-*p*-dioxins
- 13 octachlorodibenzo-*p*-dioxin
- 14 tetrachlorodibenzofurans
- 15 pentachlorodibenzofurans
- 16 hexachlorodibenzofurans
- 17 heptachlorodibenzofurans
- 18 octachlorodibenzofuran
- 19 tetrachlorobiphenyls
- 20 pentachlorobiphenyls
- 21 hexachlorobiphenyls
- 22 heptachlorobiphenyls
- 23 2,3,7,8-TeCDD toxic equivalency factor
- 24 2,3,7,8-TeCDD toxic equivalency quantity
- 25 isotope dilution mass spectrometry. 定量する目的物質と同一の化学構造を持ち、特定の元素が天然の元素同位体組成と異なっている内標準物質を試料に添加し、最終的に試料中の同位体組成のずれから目的物質の濃度を定量する方法。PCDDs, PCDFs, Co-PCBs の場合、構成する炭素あるいは塩素の一部あるいは全部を ^{13}C または ^{37}Cl に置き換えた安定同位体の内標準物質を用いる。 ^{13}C の天然存在比は無視できるほど小さいので定量計算は簡単である。この方法は分析途中で同位体分離が起こらないことが条件となる。定量結果が回収率によらないという利点がある。
- 26 gas chromatograph/mass spectrometry
- 27 gas chromatograph/mass spectrometer
- 28 high resolution gas chromatography
- 29 high resolution gas chromatograph
- 30 high resolution mass spectrometry
- 31 high resolution mass spectrometer
- 32 high resolution gas chromatograph/high resolution mass spectrometry
- 33 high resolution gas chromatograph/high resolution mass spectrometer
- 34 selected ion monitoring. 磁場を固定し、加速電圧を変化させることによって指定した質量数のイオンをモニターする方法。機器によっては SIR (selected ion recording)、あるいは SID (selected ion detection) という呼称が用いられることがある。
- 35 relative response factor
- 36 not detected
- 37 electron ionization
- 38 International Union of Pure and Applied Chemistry
- 39 World Health Organization
- 40 Quality Assurance / Quality Control
- 41 Quality Control Check Sample
- 42 試料前処理室は前室を含む 2 重扉構造としたり、試料前処理室内への給気・排気はプレフィルター、活性炭フィルター、HEPA フィルターを通じた後行う構造とする等して試料前処理室雰囲気由来の汚染を防ぐよう留意することが望ましい。試料前処理室の給気側に活性炭フィルターおよび HEPA フィルターを設置し、目安としては米国連邦規格 (Federal Standard) FS 209E クラス 1,000~10,000, あるいは JIS B 9920 クラス 6~7 程度するとブランク値低減に有効であると考えられる。試料前処理室は加圧型、陰圧型どちらも良いが、クリーン度の観点から考えれば加圧型の試料前処理室の方が有利である。加圧型、陰圧型共に試料前処理室外に空気が漏洩しないような構造が必要であり、また、試料前処理室内作業者の安全の

観点から十分な空気供給量を確保することも必要である。この試料前処理室内では極力排ガス、灰、排水、土壌、堆積物等の試料を扱わないようにする。GC-MS は可能であれば母乳専用のものを用意する等して、試料の二次汚染に十分留意する。GC-MS を設置する部屋は試料前処理室とは別にする。GC-MS 室内空気の屋外への排気はプレフィルター、活性炭フィルター、HEPA フィルターを通じた後行う構造とする。試料前処理室の清浄度や温度をモニターする等して試料前処理室および GC-MS 室の室内空気が正常に管理されていることを確認することが望ましい。

⁴³ 試薬類の管理を行うこと。例えば有機溶媒に関しては購入した量と廃棄した量の記録を取り収支を把握すること。試料前処理室内では有機溶媒を回収するような装置、例えばロータリーエバポレーターの減圧ポンプの排気先にはガス冷却管等の回収装置を設けること。

⁴⁴ ロータリーエバポレーター等で減圧乾燥させてはならない。

⁴⁵ ロータリーエバポレーター等で減圧乾燥させてはならない。

⁴⁶ 活性炭シリカゲルは十分洗浄しないと測定に影響を与えるような妨害が出る場合が多い。

⁴⁷ デカンの代わりにノナンあるいはイソオクタン等でも良い。溶媒の種類によって GC 注入可能量が異なるので注意すること。

⁴⁸ デカンの代わりにノナンあるいはイソオクタンでも良い。

⁴⁹ ガラス器具等は合成洗剤を用いた洗浄、水洗浄、有機溶媒洗浄等により汚染がないようにする。

⁵⁰ トラップ球を使用することによりロータリーエバポレーター内での還流による接続部からの汚染を防ぐことができる。

⁵¹ カラムクロマトグラフィーにおいて使用する充てん剤や溶媒の種類および量は標準物質や実試料を用いた分画試験を行って決めること。

⁵² 乾式充てんでもよい。

⁵³ ロックマス、質量校正に使用する化合物は規定しない。

⁵⁴ 例えば内標準物質、ロックマスモニターの測定質量数のデータ取込時間を短くする等し、極力 1 ピークあたりのデータポイント数が多くなるようにする。

⁵⁵ 集中配管等でキャリアーガスのボンベが GC と離れている場合、GC 入口にガス精製装置を装着すると良い。

⁵⁶ 脂肪抽出後に内標準液を添加してもよい。

⁵⁷ 内標準物質として使用する ¹³C 化合物には不純物として ¹²C 化合物が存在する。内標準物質の添加量が多いと ¹²C 化合物の定量に妨害を与えるので、使用する ¹³C 化合物中の ¹²C 化合物濃度を確認すること。

⁵⁸ 石油エーテルを使用することができる。

⁵⁹ 内標準添加のために加えたデカンが残留する可能性があるため、デカンの添加の量を出来るだけ少なくする。

⁶⁰ 使用する GC 分離カラムの種類によってはこの溶出展開液を濃縮し、GC-MS 測定試料としてもよい。

⁶¹ 窒素吹き付け操作に関しては窒素流量が多い、あるいは温度が高すぎると回収率が低下する場合があるので注意する。また、試料を完全に蒸発乾固させてしまうと回収率が低下する場合があるので注意する。

⁶² シリンジスパイクには、試料に添加したクリーンアップスパイク以外のものを用いる。シリンジスパイクには GC-MS 測定における測定ごとに (1 injection に付) 1 種類以上使用する。

⁶³ 検量線用標準溶液の測定は毎回行う必要はない。検量線に使用する濃度範囲で 1 種類の標準溶液を試料とともに測定する。

⁶⁴ GC 注入量に関しては GC の注入口ライナーの内容積を考慮すること。使用する注入口ライナーと溶媒の種類によって注入可能な容積が異なる。

⁶⁵ Total (PCDDs+PCDFs) 実測濃度を有効数字 2 桁でまらめた Total PCDDs 実測濃度と Total PCDFs 実測濃度の和で表してはならない。

⁶⁶ Total Co-PCBs 実測濃度を有効数字 2 桁でまらめた non-ortho Co-PCBs 実測濃度と mono-ortho Co-PCBs 実測濃度の和で表してはならない。

⁶⁷ 1/2 以外にも 0 あるいは 1 を用いて計算する場合もある。

⁶⁸ 精度管理には内部精度管理と外部精度管理がある。ここではこの内、内部精度管理について示したものである。内部精度管理は調査から分析値の結果作成までの QA/QC に直接あるいは間接的に関係する事項に関して、調査機関が機関内で自主的に行う管理事項であり、基本的には、『いつ』・『誰が』・『どこで』・『何のために』・『何を』・『どのように』行ったかが判明し、保管した記録から関係する全ての情報をトレースできることが条件となる。

⁶⁹ 調査計画によって頻度等については変更することができる。また、2 重測定に必要な母乳試料量の採取が困難な時は、QCCS で代用できる。

⁷⁰ 母乳 QCCS を準備し、用いる。

別添2. 血液中のダイオキシン類測定マニュアル

1 はじめに

血液中のダイオキシン類の濃度は低濃度であり、現在の科学技術レベルで考えられる範囲において確からしい値を得るためには、分析実験設備や測定・分析操作等に関わる一定水準以上の技術が要求される。そこで、血液中のダイオキシン類の濃度を測定するための方法として技術的内容をまとめた。なお、ここで示した以外の方法であっても本方法と同等以上の性能を持つことが認められればその方法を採用しても良い。

2 用語の定義

本マニュアル中で記載する用語の定義を次のように定める。

2.1 ダイオキシン類

平成11年7月16日に公布されたダイオキシン類対策特別措置法において、ダイオキシン類とは、ポリクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン (PCDDs) とポリクロロジベンゾフラン (PCDFs) および同様な毒性を示すコプラナー-PCBs で表される化合物の総称である。ただし、本マニュアルではテトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタおよびオクタクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン (7種) およびテトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタおよびオクタクロロジベンゾフラン (10種) およびコプラナー-PCBs (12種) を示す。

2.2 2,3,7,8-位塩素置換異性体

PCDDs および PCDFs の内、化学構造上 2, 3, 7 および 8 で表記される位置に塩素が配位している化合物の総称。PCDDs 7 化合物、PCDFs 10 化合物、合計 17 化合物が存在する。

2.3 コプラナー-PCBs¹

ポリクロロビフェニル²で表される化合物であって、化学構造上 2, 2', 6 および 6' で表記されるオルト位の塩素置換数が 1 以下である化合物の総称。ただし、本マニュアルではこの化合物の内、『表-1. 定量する化合物の名称等 (p.15)』の Co-PCBs の欄に示す 12 種類の化合物を示す。

2.4 ノンオルトコプラナー-PCBs

ポリクロロビフェニルで表される化合物であって、化学構造上 2, 2', 6 および 6' で表記されるオルト位が塩素で置換されていない化合物の総称。ただし、本マニュアルではこの化合物の内、『表-1. 定量する化合物の名称等 (p.15)』の中で Co-PCBs の non-ortho の欄に示す 4 種類の化合物を示す。

2.5 モノオルトコプラナー-PCBs

ポリクロロビフェニルで表される化合物であって、化学構造上 2, 2', 6 および 6' で表記されるオルト位が塩素で 1 か所置換されている化合物の総称。ただし、本マニュアルではこの化合物の内、『表-1. 定量する化合物の名称等 (p.15)』の中で Co-PCBs の mono-ortho の欄に示す 8 種類の化合物を示す。

2.6 異性体⁴

同一の化学式を持ち、塩素の置換位置が異なる化合物を指す。

2.7 同族体⁵

塩素の配位数が同じであって置換位置を異にする化合物の一群。

2.8 目標定量下限値

本マニュアルで規定する『定量する下限値』。表-2 に示す。

2.9 検出下限値

2.9.1 装置の検出下限値

分析化学的な見地における検出下限値。標準物質を測定したときのクロマトグラムピーク高さが S/N=3 に相当する標準物質の絶対量を装置 (GC-MS) の検出下限値とする⁶。あるいは GC-MS で検出できる低濃度標準溶液 (各化合物の絶対量で 10~50 fg 程度) を 5 回以上繰り返し測定し、その標準偏差の 3 倍を検出下限値としても良い。

2.9.2 実測定の検出下限値

実際の試料を測定し、そのときの測定試料中の目的化合物クロマトグラムピーク高さを標準物質のピーク高さと比較し、測定試料中のピーク高さが $S/N=3$ に相当する標準物質濃度と、採取試料量等から計算した値を実測定における検出下限値とする。実試料でピークが出現しない化合物に関しては、 $S/N=3$ に相当するピーク高さを標準物質を測定したときのピーク高さから推定し、それに等しいピーク高さに相当する標準物質濃度と採取試料量等から計算した値を実測定における検出下限値とする。なお、試料の検出下限値は目標定量下限値を満足していなければならない。

3 略語の定義

本マニュアル中で記載する用語の定義を次のように定める。

- 3.1 PCDDs : ポリクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン⁷
- 3.2 PCDFs : ポリクロロジベンゾフラン⁸
- 3.3 Co-PCBs : コプラナーPCBs
- 3.4 non-ortho Co-PCBs : ノンオルトコプラナーPCBs
- 3.5 mono-ortho Co-PCBs : モノオルトコプラナーPCBs
- 3.6 TeCDDs : テトラクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン⁹
- 3.7 PeCDDs : ペンタクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン¹⁰
- 3.8 HxCDDs : ヘキサクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン¹¹
- 3.9 HpCDDs : ヘプタクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン¹²
- 3.10 OCDD : オクタクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン¹³
- 3.11 TeCDFs : テトラクロロジベンゾフラン¹⁴
- 3.12 PeCDFs : ペンタクロロジベンゾフラン¹⁵
- 3.13 HxCDFs : ヘキサクロロジベンゾフラン¹⁶
- 3.14 HpCDFs : ヘプタクロロジベンゾフラン¹⁷
- 3.15 OCDF : オクタクロロジベンゾフラン¹⁸
- 3.16 TeCBs : テトラクロロビフェニル¹⁹
- 3.17 PeCBs : ペンタクロロビフェニル²⁰
- 3.18 HxCBs : ヘキサクロロビフェニル²¹
- 3.19 HpCBs : ヘプタクロロビフェニル²²
- 3.20 2,3,7,8-TeCDD : 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.21 1,2,3,7,8-PeCDD : 1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.22 1,2,3,4,7,8-HxCDD : 1,2,3,4,7,8-ヘキサクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.23 1,2,3,6,7,8-HxCDD : 1,2,3,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.24 1,2,3,7,8,9-HxCDD : 1,2,3,7,8,9-ヘキサクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.25 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD : 1,2,3,4,6,7,8-ヘプタクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.26 2,3,7,8-TeCDF : 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフラン
- 3.27 1,2,3,7,8-PeCDF : 1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン
- 3.28 2,3,4,7,8-PeCDF : 2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン
- 3.29 1,2,3,4,7,8-HxCDF : 1,2,3,4,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン
- 3.30 1,2,3,6,7,8-HxCDF : 1,2,3,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン
- 3.31 1,2,3,7,8,9-HxCDF : 1,2,3,7,8,9-ヘキサクロロジベンゾフラン
- 3.32 2,3,4,6,7,8-HxCDF : 2,3,4,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン
- 3.33 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF : 1,2,3,4,6,7,8-ヘプタクロロジベンゾフラン
- 3.34 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF : 1,2,3,4,7,8,9-ヘプタクロロジベンゾフラン
- 3.35 3,3',4,4'-TeCB : 3,3',4,4'-テトラクロロビフェニル ; IUPAC#77
- 3.36 3,4,4',5'-TeCB : 3,4,4',5'-テトラクロロビフェニル ; IUPAC#81
- 3.37 3,3',4,4',5'-PeCB : 3,3',4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC#126
- 3.38 3,3',4,4',5,5'-HxCB : 3,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル ; IUPAC#169

- 3.39 2,3,3',4,4'-PeCB : 2,3,3',4,4'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC#105
- 3.40 2,3,4,4',5'-PeCB : 2,3,4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC#114
- 3.41 2,3',4,4',5'-PeCB : 2,3',4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC#118
- 3.42 2,3,4,4',5'-PeCB : 2,3,4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC#123
- 3.43 2,3,3',4,4',5'-HxCB : 2,3,3',4,4',5'-ヘキサクロロビフェニル ; IUPAC#156
- 3.44 2,3,3',4,4',5'-HxCB : 2,3,3',4,4',5'-ヘキサクロロビフェニル ; IUPAC#157
- 3.45 2,3',4,4',5',5'-HxCB : 2,3',4,4',5',5'-ヘキサクロロビフェニル ; IUPAC#167
- 3.46 2,3,3',4,4',5',5'-HpCB : 2,3,3',4,4',5',5'-ヘプタクロロビフェニル ; IUPAC#189
- 3.47 TEF : 毒性等価係数²³
- 3.48 TEQ : 毒性等量²⁴
- 3.49 IDMS : 同位体希釈質量分析法²⁵
- 3.50 GC-MS : ガスクロマトグラフィー/質量分析法²⁶またはガスクロマトグラフ/質量分析計²⁷
- 3.51 HRGC : 高分解能ガスクロマトグラフィー²⁸または高分解能ガスクロマトグラフ²⁹
- 3.52 HRMS : 高分解能質量分析法³⁰または高分解能質量分析計³¹
- 3.53 HRGC-HRMS : 高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析法³²または高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計³³
- 3.54 SIM : 選択イオン検出法³⁴
- 3.55 RRF : 相対感度係数³⁵
- 3.56 N.D. : 目標定量下限値未満³⁶
- 3.57 EI法 : 電子イオン化³⁷法
- 3.58 IUPAC : 国際純正および応用化学連合³⁸
- 3.59 WHO : 世界保健機関³⁹
- 3.60 QA/QC : 品質保証・品質管理⁴⁰
- 3.61 QCCS : 品質管理チェック試料⁴¹

4 調査対象物質

本マニュアルでは PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の内、『表-1. 定量する化合物の名称等 (p.15)』に示す化合物を調査対象とする。また、必要に応じて脂質含有量を測定する。

5 目標定量下限値

本マニュアルでは『表-2. 本マニュアルで規定する PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 各化合物の目標定量下限値 (p.16)』に示す目標定量下限値を設定する。通常、目標定量下限値は分析化学的な検出下限値を満足していなければならない。

6 分析に必要な施設・試薬・器具等

ここでは、分析を行うに当たって必要な施設・器具・試薬等に関して必要とされる、または望ましい要求事項を示す。

6.1 試料前処理室

器具や試薬の準備、抽出・濃縮・精製等の最終試料調製までの各作業を行う試料前処理室は試料の汚染を極力防ぐような構造とする⁴²。また、分析対象試料が生体試料のため、感染性に十分配慮した構造とする。

6.2 試薬類⁴³

試薬類は、高純度のものを使用する。必要に応じて蒸留、加熱処理、洗浄等の精製操作を行うことと

して、本方法によって使用する量が、PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の定量に影響を及ぼさないことを確認した後使用する。

- 6.2.1 アセトン
ダイオキシン分析用、残留農薬試験用等、高純度のものを使用する。必要に応じて蒸留精製する。
- 6.2.2 エタノール //
- 6.2.3 ヘキサン //
- 6.2.4 トルエン //
- 6.2.5 ジクロロメタン //
- 6.2.6 ノナン //
- 6.2.7 デカン //
- 6.2.8 硫酸アンモニウム //
- 6.2.9 精製水
精製水製造装置等で得られるもの。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。
- 6.2.10 硫酸
高純度のものを使用する。必要に応じて市販の試薬をヘキサンで洗浄する。
- 6.2.11 無水硫酸ナトリウム
残留農薬試験用等、高純度の試薬を使用する。必要に応じて市販の試薬を 450°C で 4 時間以上加熱処理する。
- 6.2.12 2 mol/L 水酸化カリウム水溶液/エタノール溶液 (KOH/EtOH)
市販されているものの中で高純度の水酸化カリウムを用いてエタノールに溶解する。そのままでは溶けにくい場合は全量の 1/10 程度の精製水に溶かし、エタノールで希釈する。
- 6.2.13 シリカゲル
カラムクロマトグラフィー用シリカゲルをメタノールにて超音波洗浄を行った後、減圧乾燥し、ガラス製ビーカーに入れ、層の厚さを 10 mm 以下にして 130°C で約 18 時間乾燥した後、密閉可能な容器に入れ、デシケータ内で保管する。ダイオキシン類分析用として市販されているものもある。
- 6.2.14 水酸化カリウム水溶液
高純度の水酸化カリウムを精製水適当量に溶かす。必要に応じてヘキサンで洗浄するなどして精製する。
- 6.2.15 2%水酸化カリウムシリカゲル
水酸化カリウム水溶液をシリカゲルに添加して作成する。水酸化カリウム水溶液をシリカゲルに、水酸化カリウムがシリカゲルに対して 2% (w/w) となるように加え、攪拌混合した後、ロータリーエバポレーター等で減圧乾燥させ、密閉可能な容器に入れ、デシケータ内で保存する。ダイオキシン類分析用として市販されているものもある。
- 6.2.16 22%硫酸含有シリカゲル
硫酸をシリカゲルに、硫酸がシリカゲルに対して 22% (w/w) となるように加え、攪拌混合し、密閉可能な容器に入れ、デシケータ内で保管する⁴⁴。なお、市販のものも使用できる。
- 6.2.17 44%硫酸含有シリカゲル
硫酸をシリカゲルに、硫酸がシリカゲルに対して 44% (w/w) となるように加え、攪拌混合し、密閉可能な容器に入れ、デシケータ内で保管する⁴⁵。なお、市販のものも使用できる。
- 6.2.18 40% (w/w) 硝酸銀水溶液
高純度の硝酸銀を精製水に溶かす。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。
- 6.2.19 10%硝酸銀含有シリカゲル
硝酸銀溶液をシリカゲルに、硝酸銀がシリカゲルに対して 10% (w/w) となるように加え、攪拌混合した後ロータリーエバポレーター等で減圧乾燥させ、密閉可能な容器に入れ、デシケータ内で保存する。調製および保管は遮光した状態で行う。なお、市販のものも使用できる。
- 6.2.20 活性炭シリカゲル
活性炭シリカゲルをアセトンで超音波洗浄し濾過した後、トルエンでソックスレー洗浄し⁴⁶、ロータリーエバポレーターで減圧乾燥させ、密閉可能な容器に入れ、デシケータ内で保存する。同等のものとして活性炭硫酸ナトリウムを使用することができる。この場合、活性炭 1g に対し無水硫

酸ナトリウム 1000 g を混合し、乳鉢でよくすって均一に分散させたものを使用する。必要に応じてトルエンでソックスレー抽出洗浄した後、ロータリーエバポレーターで減圧乾燥させ、デシケータ内で保存する。なお、市販のものも使用できる。

6.2.21 アルミナ

カラムクロマトグラフ用アルミナ(塩基性、活性度 I)は、あらかじめ活性化したものが入手できる場合はそのまま使用してもよい。活性化の必要のある場合には、ペトリ皿に層の厚さを約 5 mm 程度にして入れ 500°C で約 8 時間加熱し、デシケータ内で約 30 分間放冷後、密閉できる試薬瓶中で保存する。特に、活性化後は速やかに使用する

6.2.22 標準物質

『表-3. 測定に用いる標準物質 (p.17)』を用いる。

6.2.23 標準溶液

市販の標準溶液をノナンまたはデカン⁴⁷で希釈、混合して調製する。

6.2.24 内標準物質

クリーンアップスパイク (『表-4. 測定に用いる内標準物質の例 (p.18)』) およびシリンジスパイク。

6.2.25 内標準物質溶液

市販の内標準物質溶液をノナンまたはデカン⁴⁷で希釈、混合して調製する。

6.3 器具・機材

6.3.1 分析前処理器具・機材

使用する全ての器具および装置には PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の測定分析に影響を及ぼさないことが要求される⁴⁸。分析途中の試料の汚染を防ぐ観点から使用する全ての器具等は可能な限り血液等低レベルダイオキシン分析専用とすること。GC-MS も可能な限り低レベルダイオキシン類専用のものを用いるのが望ましい。

6.3.1.1 乾燥機

ガラス製品および試薬類を加熱処理するもの。

6.3.1.2 マッフル炉

セラミック製品を加熱処理するもの (1000°C 程度で連続使用可能なもの)。

6.3.1.3 ロータリーエバポレーター

大気開放コックの先に活性炭カラム、エアフィルターを装着したり、また、トラップ球を使用する等して汚染を防ぐようにすることが望ましい⁴⁹。

6.3.1.4 ロータリーエバポレーター用真空ポンプ

有機溶媒の排気に内部が耐えられるもの。排気側にガス冷却管等を接続し、有機溶媒の回収を行う。

6.3.1.5 クデルナダニッシュ (KD) 濃縮器

試料濃縮に用いる。ロータリーエバポレーターの代わりに用いることができる。

6.3.1.6 冷却水循環装置

ソックスレー抽出器、ロータリーエバポレーターおよび KD 濃縮器の冷却管 (コンデンサー) に使用する。

6.3.1.7 ガス吹き付け装置

抽出精製試料を濃縮するために使用する。

6.3.1.8 シリカゲルカラムクロマトグラフ管

内径約 10 mm、長さ約 300 mm のガラス製カラムクロマト管にシリカゲル 1.5 g をヘキサンで充てんし、上部に無水硫酸ナトリウム 3.0 g を積層する。ヘキサン 200 ml を流速 2.5 ml/min で流し、充てん物を洗浄する⁵⁰。溶出条件等を事前に調べてあれば同等のシリカゲルカラムを使用することは可能である。

6.3.1.9 硝酸銀カラムクロマトグラフ管

内径約 15 mm、長さ約 300 mm のガラス製カラムクロマト管に硝酸銀シリカゲル 2.0 g をヘキサンで充てんし、上部に無水硫酸ナトリウム 3.0 g を積層する。ヘキサン 100 ml を流速 2.5 ml/min で流し、充てん物を洗浄する。なお、充てんは乾式でも可能である。

- 6.3.1.10 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管
内径約 15 mm、長さ約 300 mm のガラス製カラムクロマト管にシリカゲル 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、44%硫酸シリカゲル 4.5 g、22%硫酸シリカゲル 6.0 g、シリカゲル 0.9 g、10%硝酸銀シリカゲル 3.0 g を順次ヘキサンで充てんする。その上部に無水硫酸ナトリウムを 6.0 g 積層する。ヘキサン 200 ml を流速 2.5 ml/min で流し、充てん物を洗浄する。なお、充てんは乾式でも可能である。
- 6.3.1.11 アルミナカラムクロマトグラフ管
内径約 10 mm、長さ約 300 mm のガラス製カラムクロマト管に、塩基性アルミナ 7.5 g をヘキサンで充てんし、上部に無水硫酸ナトリウム 3.0 g を積層する。ヘキサン 200 ml を流速 2.5 ml/min で流し、充てん物を洗浄する。
- 6.3.1.12 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフ管
内径約 10 mm、長さ約 150 mm のガラス製カラムクロマト管に、無水硫酸ナトリウム 3.0 g、活性炭シリカゲル 0.5 g、最後に無水硫酸ナトリウム 3.0 g を乾式充てんする。活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフ管の代わりに同程度の量の活性炭硫酸ナトリウムを用いることもできる。なお、充てんは乾式でも可能である。
- 6.3.2 ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC-MS)
高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計 (HRGC-HRMS) を用いる。質量分析計の質量分離方式は二重収束型とする。
- 6.3.2.1 ガスクロマトグラフカラムオープン
カラムオープンの温度制御範囲が 50~350°C であり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。
- 6.3.2.2 ガスクロマトグラフキャピラリーカラム
内径 0.22~0.32 mm 程度、長さ 30~60 m の熔融シリカ製のものであって、内面に液相を塗布または結合したもの。通常、微極性 (5%フェニルメチルシリコン系) のものを用いるが、必要に応じて中極性 (25%フェニルメチルシリコン系)、強極性 (シアノプロピル系) のものを用いる。
例えば、BPX5, DB5-MS, CP-SIL 8 CB-MS, HT-8, SP2331 等の商品がある。なお、ここで示した製品は参考のために表記したものであって、これら以外でも同等以上の性能を持つものを使用してもよい。
- 6.3.2.3 質量分析計 (MS)
二重収束型のもので、ロックマス方式⁵¹⁾により分解能 10,000 以上で測定可能なもの。イオン源は、温度を 160~350°C に保つことができ、EI 法が可能で、イオン化電圧を 25~70 eV 程度に制御可能なもの。検出法として SIM 法が可能であり、磁場スイッチング使用時の必要な測定質量数のチャンネル数、感度、安定性の関係から SIM 法における周期を最大でも 1 sec 以下にできるもの⁵²⁾。実際に試料を測定するときと同一の条件において、標準物質の 2,3,7,8-TeCDD 20~50 fg で SN>5、OCDD 50~100 fg で SN>5 の検出感度を得られることが望ましい。
- 6.3.2.4 試料導入部
本マニュアルで要求する定量を満足する方式のもの。高感度を得る目的で大量注入方式やマルチディメンジョン方式を採用してもよい。
- 6.3.2.5 キャリアーガス
純度 99.999% 以上の高純度ヘリウムガス⁵³⁾。

7 調査計画

採血の実施にあたっては、被験者や協力者に対して十分なインフォームド・コンセントを行う。調査の目的および背景、実際に協力してもらう内容、実施後のデータの取り扱いなどについて事前に文書で説明し、調査に対する理解を得、文書で同意を得る必要がある。このため調査計画は事前に綿密に作成されなくては

ならない。また、採血時の事故を防ぐため、採血現場には医師が立ち会い、必要に応じてアドバイス、問診、健康診断等を行えるような体制を整備すること。研究目的によっては倫理指針等が作成されている場合があるので、その際にはそれらに従うこと。

8 試料採取および試料の取り扱い

採血は医師、看護師（保健士、助産士を含む）等、採血について専門の技術を有するものが行う。例えば、試料採取には採血バッグ、ガラス製容器、フッ素樹脂製容器などを使用する。試料は100 ml程度を採取し⁵⁴、2回分として小分けし（1回分50 ml）、また1部は脂質分析や生化学試験に回せるようにしておくことと便利である（採血量は重量によって求める）。試料採取に当たっては試料採取に関わる情報を記録する。容器の選択に当たってはブランク試験を行い、汚染のないことを確認する。採取した試料は、変質を避けるため、採取後すぐによく混和し、分析するまで冷凍し暗所に保存する。血液検体は、病原菌等の感染の危険性があるので、感染防止に留意すること。

9 測定分析

9.1 測定方法の概要

同位体希釈質量分析法（IDMS）による。すなわち、試料（全血）に内部標準物質として定量する目的化合物の¹³C同位体を添加（スパイク）し、有機溶媒によってPCDDs、PCDFsおよびCo-PCBsを抽出し、精製し、GC-MSを用いて同位体比を測定する。分析方法のフローを図-1に示す。血液からダイオキシン類を抽出するにあたり、脂質抽出から入る場合と、アルカリ分解から入る場合があり、どちらを採用してもよい。なお、PCDDs、PCDFsおよびCo-PCBs濃度を脂質あたりで表記する場合は、後述の方法（9.2.2または9.2.3）によって脂質量を測定する。血清、または血漿も同様に行うことができる。脂質の抽出には現在いくつかの方法が提案されているが、それぞれの方法によって得られる結果は異なるので単位脂質重量あたりでダイオキシン類濃度を比較する際は注意が必要である。ここではエタノール：ヘキサン：飽和硫酸アンモニウムを用いる方法を採用する⁵⁵。

9.2 前処理

9.2.1 試料の分注および保存

採取した試料は容器内で十分混合した後、ダイオキシン類測定分析用、ダイオキシン類の二重測定用（必要に応じて）、脂質量測定用（別個に測定する場合）等、2つまたは3つに分けてフッ素樹脂製容器またはガラス製容器に分注する。分注した試料は分析を行うまで冷凍保存する。

9.2.2 脂質およびダイオキシン類の抽出（抽出した脂質を用いてダイオキシン類の分析を行う場合）

9.2.2.1 同位体スパイクの添加

試料を解凍後、約50 g（血清および血漿の場合は約25 g）を量り取り、同位体スパイクを添加し、攪拌する⁵⁴。なお、同位体スパイクの添加量は各化合物5～100 pg程度とする。

9.2.2.2 脂質の抽出および脂質濃度の測定

同位体スパイクを添加した血液試料に飽和硫酸アンモニウム15 mlおよび25%エタノール／n-ヘキサンを60 ml添加し、30分間振とう抽出を行う。エマルジョンが生じた場合は、遠心分離などの方法で除去する。ヘキサン層を分画後、水槽にn-ヘキサン50 mlを添加しての30分間振とう抽出を1～2回行う。2回あるいは3回の抽出によるn-ヘキサン分画を混合する。得られたn-ヘキサン分画を精製水20 mlで1回洗浄する。ガラス製ロート下部にガラスウールを詰め、無水硫酸ナトリウムを積層したもので脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を2 ml程度まで留去する⁵⁶。あらかじめ重量を測定し、恒量となったことを確認した秤量瓶など（重量が正確に測定できる容器）に移す。デシケータもしくは30℃以下に設定した浴温下での窒素ガスパージで乾燥し、重量を測定する。前後の重量差から血液中の脂質量を算出する。ただし、試料には抗凝固剤としてヘパリンナトリウム溶液等が含まれてい

るのでその重量を考慮しなければならない。

9.2.3 脂質およびダイオキシン類の抽出（脂質濃度を別個に求める場合）

9.2.3.1 脂質の抽出および脂質濃度の測定

9.2.1 で分注した脂質測定用の試料を解凍後、約 20 g（血清および血漿の場合は約 10 g）を量り取り、飽和硫酸アンモニウム 6 ml、25%エタノール/n-ヘキサンを 24 ml 添加し、30 分間振とう抽出を行う。エマルジョンが生じた場合は、遠心分離などの方法で除去する。ヘキサン層を分画後、水槽に n-ヘキサン 20 ml を添加しての 30 分間振とう抽出を 1～2 回行う。2 回あるいは 3 回の抽出による n-ヘキサン分画を混合する。得られた n-ヘキサン分画を精製水 20 ml で 1 回洗浄する。ガラス製ロート下部にガラスウールを詰め、無水硫酸ナトリウムを積層したもので脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を 2 ml 程度まで留去する⁵⁶。あらかじめ重量を測定し、恒量となったことを確認した秤量瓶など（重量が正確に測定できる容器）に移す。デシケーターもしくは 30℃以下に設定した浴温下での窒素ガスパージで乾燥し、重量を測定する。前後の重量差から血液中の脂質量を算出する。ただし、試料には抗凝固剤としてヘパリンナトリウム溶液等が含まれているのでその重量を考慮しなければならない。

9.2.3.2 同位体の添加およびアルカリ分解

9.2.1 で分注したダイオキシン類測定用の試料を解凍後、同位体スパイクを添加し、2 mol/L-水酸化カリウム/エタノール溶液 30 ml と搅拌した後、室温にて一夜放置する（2 時間程度の振とうでもよい）。なお、同位体スパイクの添加量は各化合物 5～100 pg 程度とする。翌日、エタノール 10 ml、精製水 20 ml およびヘキサン 30 ml を添加し 30 分間振とう抽出を行う。ヘキサン層を分画後、水槽に n-ヘキサン 30 ml を添加し更に 30 分間振とう抽出を行う。2 回の抽出によるヘキサン分画を混合する。

9.2.4 硫酸処理

9.2.2 で秤量した脂質全量をヘキサン 100 ml に溶解したもの、あるいは 9.2.3.2 で得られたヘキサン層を合わせたもの（約 60 ml）を分液ロートに移す。濃硫酸約 20 ml を加え、静置後硫酸層を除去する。新たに濃硫酸約 20 ml を加え、2 回目を降は穏やかに振とうし、静置後、硫酸層を除去する。この操作を硫酸層がほとんど無色になるまで繰り返す。

9.2.2 で秤量した脂質をアルカリ分解した後、ダイオキシン類をヘキサン抽出する方法もあり、この場合は、硫酸処理を省くことができる。

9.2.5 水洗・濃縮

硫酸処理が終了したヘキサン溶液（9.2.2 で秤量した脂質をアルカリ分解した後、ダイオキシン類をヘキサン抽出した場合は、そのヘキサン溶液）を精製水 30 ml で 2 回洗浄する。無水硫酸ナトリウムを用いて脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて約 2 ml まで濃縮し、カラムクロマトグラフィーに供する。

9.3 カラムクロマトグラフィー

硫酸処理の終了した試料をカラムクロマトグラフィーによって更に精製する。なお、ここではシリカゲルカラムクロマトグラフィー、硝酸銀カラムクロマトグラフィー、多層カラムクロマトグラフィー、アルミナカラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィーが示されている。必要に応じてこれらを組み合わせるが、前 3 者はクリーンアップのために、後 2 者はクリーンアップおよび PCDDs、PCDFs、Co-PCBs などのフラクション分離のために使用される。なお、ここで示すカラムクロマトグラフィーの展開溶媒の量は参考のために示したものであり、分画試験を行って決定する。

9.3.1 シリカゲルカラムクロマトグラフィー

次に示すシリカゲルカラムクロマトグラフィー、硝酸銀カラムクロマトグラフィーあるいは多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーのいずれかを行う。一般に、硫酸処理を行った場合は硝酸銀カラムクロマトグラフィーを、アルカリ分解を行った場合は多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行うことが多い。

9.3.1.1 シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルカラムクロマトグラフ管の液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げ、調製した試料を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げる。

ヘキサン 80 ml を流速 2.5 ml/min で流し展開溶出させる。得られた溶出液をロータリーエバポレーターにて約 2 ml まで濃縮し、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーまたはアルミナカラムクロマトグラフィーに供する。

9.3.1.2 硝酸銀カラムクロマトグラフィー

硝酸銀カラムクロマトグラフ管の液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げ、調製した試料を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げる。ヘキサン 100 ml を流速 2.5 ml/min で流し展開溶出させる。得られた溶出液をロータリーエバポレーターにて約 2 ml まで濃縮し、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーまたはアルミナカラムクロマトグラフィーに供する。

9.3.1.3 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クロマトグラフ管の液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げ、調製した試験溶液を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げる。ヘキサン 200 ml を流速 2.5 ml/min で流し展開溶出させる。得られた溶出液をロータリーエバポレーターにて約 2 ml まで濃縮し、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーまたはアルミナカラムクロマトグラフィーに供する。

9.3.2 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の分取

次に示すアルミナカラムクロマトグラフィーおよび活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーのいずれかを行う。あるいは両方を行う。

9.3.2.1 アルミナカラムクロマトグラフィー

アルミナカラムクロマトグラフ管の液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで溶出した画分を静かに移し入れ、ジクロロメタン含有ヘキサン溶液で分画する。最初に 2%ジクロロメタン含有ヘキサン 65 ml で溶出させ (第 1 画分: mono-ortho Co-PCBs 画分)、次いで 60%ジクロロメタン含有ヘキサン 100 ml で溶出させる (第 2 画分: PCDDs, PCDFs, non-ortho Co-PCBs 画分)。各画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、更にゆるやかに窒素を吹き付け⁵⁷、濃縮した後、各画分の測定に必要なシリンジスパイク⁵⁸を添加して 10~50 µl 程度に定容し、GC-MS 分析用溶液とする。

9.3.2.2 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィー

活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフ管に調製した試験溶液を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げる。これに 25%ジクロロメタン含有ヘキサン溶液 100 ml を流速 2.5 ml/min で流し展開溶出させる。この画分には mono-ortho Co-PCBs が含まれる。次いで、トルエン 100 ml で溶出させる。この画分には PCDDs, PCDFs および non-ortho Co-PCBs が含まれる。25%ジクロロメタン含有ヘキサン画分およびトルエン画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、更にゆるやかに窒素を吹き付け⁵⁷、濃縮した後、各画分の測定に必要なシリンジスパイク⁵⁸を添加して 10~50 µl 程度に定容し、GC-MS 分析用溶液とする。カラムクロマトグラフィーとして、活性炭/無水硫酸ナトリウムを充てんして用いることもできる。市販の活性炭シリカゲルによっては、mono-ortho Co-PCBs もトルエン画分にくるので、この場合、トルエン画分のみを GC-MS 分析すればよい。

9.4 検量線の作成

9.4.1 GC-MS 測定条件の設定および状態の確認

測定目的に応じて分析条件を設定し、試料の分析が可能なように調整する。この際、感度、直線性、安定性などのほか、分析の誤差となる干渉の有無の大きさ、その補正法など、十分信頼できるかどうか確認しておく (11 章参照 (p.12))。

9.4.2 検量線の作成 (RRF と RRF_{ss} の算出)

新たに GC-MS 装置を導入した場合、および標準溶液を変更した場合には、新たに検量線を作成して、RRF (各分析対象物質とそれに対応する同位体スパイク内標準物質との相対感度係数) および RRF_{ss} (同位体スパイク内標準物質とそれに対応するシリンジスパイク内標準物質との相対感度係数) を求める。各分析対象物質に対して、0.02~50 ng/ml の濃度範囲で 5 段階程度の標準溶液を調製する。この標準溶液には、定容前に、あらかじめ同位体スパイクおよびシリンジスパイクに用い

たものと同じ内標準物質を、ダイオキシン類および Co-PCBs が 2~10 ng/ml となるように添加しておく。標準溶液の 1~2 μl 程度を GC-MS に注入し、各分析対象物質のクロマトグラムを記録する。なお、注入量については、注入方式によって大きく異なる場合がある。

各分析対象物質の二つのモニターイオンのピーク面積の強度比を求め、天然存在比とほぼ一致することを確認する。各分析対象物質とクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積比と、注入した標準溶液中の各分析対象物質とクリーンアップスパイク内標準物質の濃度比を用いて、検量線を作成し、相対感度係数 (RRF) を算出する。

9.4.2.1 相対感度係数 (RRF) の算出

$$RRF = (A_{STD} \times C_{STD-IS}) / (A_{STD-IS} \times C_{STD})$$

A_{STD} : 標準溶液中の分析対象物質のクロマトグラムピーク面積値

A_{STD-IS} : 標準溶液中のクリーンアップスパイク内標準物質のクロマトグラムピーク面積値

C_{STD} : 標準溶液中の分析対象物質の量 (pg)

C_{STD-IS} : 標準溶液中のクリーンアップスパイク内標準物質の量 (pg)

検量線の作成では、1つの濃度に対して、最低3回の分析を繰り返して行い、全濃度領域では、合計で15点以上のデータを得る。その平均値を RRF とする。この時のデータの変動係数は20%以内でなければならない。また、検量線データより、最小二乗法で一回帰直線を求め、その傾きを RRF としてもよい。この場合直線性が十分であるとともに回帰式の切片が限りなく0 (ゼロ) に近いこと。

9.4.2.2 相対感度係数 (RRF_{SS}) の算出

クリーンアップスパイク内標準物質のシリンジスパイク内標準物質に対する相対感度係数 (RRF_{SS}) を次式により算出する。

$$RRF_{SS} = (A_{STD-IS} \times C_{STD-SS}) / (A_{STD-SS} \times C_{STD-IS})$$

A_{STD-IS} : 標準溶液中のクリーンアップスパイク内標準物質のクロマトグラムピーク面積値

A_{STD-SS} : 標準溶液中のシリンジスパイク内標準物質のクロマトグラムピーク面積値

C_{STD-IS} : 標準溶液中のクリーンアップスパイク内標準物質の量 (pg)

C_{STD-SS} : 標準溶液中のシリンジスパイク内標準物質の量 (pg)

9.5 試料の測定

標準溶液および試料の適当量を GC-MS に注入⁵⁹し、各同族体につき『表-5. 測定質量数の例 (p.19)』から任意の2つ以上の質量数のクロマトグラムを記録する。

9.6 試料中濃度の算出

PCDDs および PCDFs の 2,3,7,8-位塩素置換異性体はそれぞれ対応する17種類の2,3,7,8-位塩素置換異性体の標準物質およびクリーンアップスパイク内標準物質の濃度、クリーンアップスパイク内標準物質の添加量および RRF を用い、次式によって濃度を算出する。Co-PCBs に関してはそれぞれ対応する12種類の Co-PCBs の標準物質およびクリーンアップスパイク内標準物質の濃度、クリーンアップスパイク内標準物質の添加量および RRF を用い、次式によって濃度を算出する。

$$C_{Sample} = ((A_{Sample} \times C_{Sample-IS}) / (A_{Sample-IS} \times RRF)) \times (1/V)$$

C_{Sample} : 試料中の分析対象物質の濃度 (pg/ml または pg/g)

A_{Sample} : 試料中の分析対象物質のクロマトグラムピーク面積値

$A_{Sample-IS}$: 試料中のクリーンアップスパイク内標準物質のクロマトグラムピーク面積値

$C_{Sample-IS}$: 試料に添加したクリーンアップスパイク内標準物質の量 (pg)

V : 試料採取量 (ml または g)

9.7 回収率の算出

クリーンアップスパイク内標準物質のクロマトグラムピーク面積値とシリンジスパイク内標準物質のクロマトグラムピーク面積値の比、および対応する相対感度係数 (RRF_{SS}) を用いて、次式により、回収率 (R_c) を算出する。

$$R_c = (A_{Sample-IS} \times C_{Sample-SS} \times 100) / (A_{Sample-SS} \times RRF_{SS} \times C_{Sample-IS})$$

$A_{Sample-IS}$: 試料中のクリーンアップスパイク内標準物質のクロマトグラムピーク面積値

$C_{Sample-SS}$: 試料中のシリンジスパイク内標準物質の量 (pg)

$A_{Sample-SS}$: 試料中のシリンジスパイク内標準物質のクロマトグラムピーク面積値

RRF_{SS} : 検量線作成時に求めたクリーンアップスパイク内標準物質のシリンジスパイク内標準物質に対する相対感度係数

C_{Sample-IS} : 試料に添加したクリーンアップスパイク内標準物質の量 (pg)

9.8 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の同定

PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の各異性体は、モニターした2つ以上のイオンにおけるクロマトグラム上のピーク面積比が標準物質のものとはほぼ同じであり、『表-6. PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の塩素同位体の理論天然存在比 (p.20)』に示す塩素原子の同位体存在比から推定されるイオン強度比に対して±30%以内であり、更にピークの相対保持時間が標準物質および対応する内部標準物質と一致することで同定する。

9.8.1 実測濃度の表記

- ・2,3,7,8-位塩素置換異性体 (17化合物) および Co-PCBs (12化合物) の各実測濃度が目標定量下限値未満であった場合、2,3,7,8-置換位置異性体 (17化合物) およびコプラナーPCBs (12化合物) の各実測濃度が検出下限未満であったか検出しなかったのかがわかるように表記しておくことが望ましい。これらは実測値に加算する必要はないが、最大見積 TEQ 計算の際に参考とする必要がある。
- ・2,3,7,8-位塩素置換異性体 (17化合物) およびコプラナーPCBs (12化合物) の各実測濃度は有効数字2桁で表記する。
- ・2,3,7,8-位塩素置換異性体 (17化合物) の濃度の総和を Total (PCDDs+PCDFs) として有効数字2桁で表記する⁶⁰。
- ・PCDDs に含まれる全ての化合物が目標定量下限値未満であった場合、PCDDs の実測濃度は N.D. と表記する。
- ・PCDFs に含まれる全ての化合物が目標定量下限値未満であった場合、PCDFs の実測濃度は N.D. と表記する。
- ・PCDDs と PCDFs が共に N.D. であった場合、Total (PCDDs+PCDFs) の実測濃度は N.D. と表記する。
- ・IUPAC #77, #81, #126, #169 の実測濃度を積算し、non-ortho Co-PCBs 実測濃度として有効数字2桁で表す。
- ・IUPAC #105, #114, #118, #123, #156, #157, #167, #189 の実測濃度を積算し、mono-ortho Co-PCBs 実測濃度として有効数字2桁で表す。
- ・IUPAC #77, #81, #126, #169, #105, #114, #118, #123, #156, #157, #167, #189 の濃度を積算し、Total Co-PCBs 実測濃度として有効数字2桁で表す⁶¹。
- ・N.D.表記となっている異性体に関しては、定量下限値の半値も計算しておく。

9.8.2 TEQ の算出

- ・有効数字2桁でまるめた2,3,7,8-位塩素置換異性体 (17化合物) および Co-PCBs (12化合物) の各実測濃度に TEF を乗じ、TEQ を算出する。一例として WHO-1998 による TEF を『表-7. TEQ 算出のための TEF (p.21)』に示す。各2,3,7,8-位塩素置換異性体および Co-PCBs の TEQ は2桁表記とする。
- ・2,3,7,8-位塩素置換異性体および Co-PCBs 濃度が目標定量下限値未満であった場合、毒性等量は0 (ゼロ) として表記し、その右横にカッコ書きで最大見積 TEQ を記載する。最大見積 TEQ は各化合物の目標定量下限値の1/2に TEF を乗じたものとする⁶²。
- ・実測濃度に N.D. が表記された場合 (最大見積 TEQ が表記された場合)、Total PCDDs, Total PCDFs, Total (PCDDs+PCDFs), non-ortho Co-PCBs, mono-ortho Co-PCBs, Total Co-PCBs, Total (PCDDs+PCDFs+Co-PCBs) にもカッコ書きで最大見積 TEQ を記載する。この最大見積 TEQ は各化合物の TEQ と最大見積 TEQ の合計で表す。
- ・Total PCDDs (TEQ) および Total PCDFs (TEQ) は2桁表記とする。
- ・Total PCDDs (TEQ) +Total PCDFs (TEQ) は2桁表記とする。
- ・non-ortho Co-PCBs の TEQ は2桁表記とする。
- ・mono-ortho Co-PCBs の TEQ は2桁表記とする。
- ・Co-PCBs の Total TEQ は2桁表記とする。
- ・PCDDs, PCDFs, Co-PCBs の Total TEQ は2桁表記とする。

・各実測濃度から PCDDs, PCDFs, Co-PCBs の Total TEQ を算出するまでの過程で数値のまるめの操作は行わない。

9.8.3 測定結果の表記方法

測定結果の表記方法の例を『表-8. PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 測定分析結果の表記例 (p.22)』に示す。

10 安全管理

ここでは、測定分析に関係する者の安全や、区域外への化学物質や感染性試料の漏洩防御の観点から留意すべき事柄をまとめた。

10.1 試料前処理室および GC-MS 室の構造

試料前処理室および GC-MS 室内の空気は活性炭フィルターと HEPA フィルター等を通じた後、屋外へ排気する構造とすることが望ましい。

10.2 試薬の管理

測定分析に使用する有機溶媒の管理を行うこと。各有機溶媒毎に購入量と廃棄量の記録を取ること。有機溶媒が揮散することを可能な限り防御するように工夫し、さらに試料前処理室内の換気を十分とれるようにすること。

10.3 標準物質の管理

標準物質は施錠可能な冷蔵庫に保管し、購入および使用の記録を取ること。

10.4 分析者

区域内では専用の実験衣および靴を着用すること。化学物質への曝露と生体試料による感染を防止するために、試料前処理室内では常に耐溶剤製の不浸透手袋等および安全眼鏡を装着すること。

10.5 測定分析機関の義務

試料前処理室に立ち入る許可を持っている者に関しては労働安全衛生法に定められた特定化学物質に関わる定期的健康診断を年2回実施すること。

10.6 GC-MS

GC-MS のロータリーポンプの排気、GC のパージガスは、活性炭フィルターを通じた後、排気されるようにすること。

10.7 血液の付着したガラス器具の洗浄

滅菌した後、洗浄する。

10.8 血液の付着した廃棄物の管理

血液採取および搬入時に用いられた血液バッグや作業中に血液の付着した布等はオートクレーブバッグに入れた後、高圧蒸気滅菌し廃棄する。

10.9 その他の廃棄物の管理

上記以外に試料前処理室・実験室および GC-MS 測定室内で生じた各種廃棄物は種別に分類し、適切に保管すること。

11 精度管理および精度保証

PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の測定データに関しては、最終測定値のみでは結果の確からしさを確認することは困難である場合も多い。そこで、品質保証 (QA) / 品質管理 (QC) ・精度管理⁶⁹ について記述した。本記述は PCDDs, PCDFs および Co-PCBs に係る調査を行う機関が、一定水準以上の測定分析結果を報告することが可能となるように、調査に直接的に関わる事項に対して、記録として要求される項目について記述したものである。PCDDs, PCDFs および Co-PCBs に係る調査を行う全機関は、少なくともここで述べる項目に関する情報を記録・保管しなければならない。なお、本マニュアルでは PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の測定分析結果の報告までを対象としており、得られたデータを用いた考察や解析等の部分については含まない。

なお、ここで示した各項目が満足されていない場合、その原因を明らかにし、取り除いた後、再分析、再測定等適切な処置をおこなう。

11.1 精度管理にかかわる作業とその記録

11.1.1 試料採取の記録

試料の採取方法（例えばどの様な採血方法であったか）を記録する。

11.1.2 試料確認の記録

試料採取後、試験機関に試料が入る段階（試料の受付）における試料の確認を記録する。試料確認の日時、確認した人の所属・氏名、試料の試料前処理室まで搬送された手段・状態、試料の入っていた容器の種類・サイズ、保管する場合、その保管場所、保管方法、試料の管理番号を記録する。運送業者を利用した場合、その配送伝票の複製を保管する。

11.2 測定分析の記録

11.2.1 使用器具・機材・装置

使用した器具に関して、メーカー、準備方法（必要であれば洗浄方法）を記録する。

11.2.2 使用試薬

分析に用いた試薬のメーカー名、製品名、等級、精製方法等を記録する。

11.2.3 標準物質・標準溶液

分析に用いた試薬のメーカー名、製品名等を記録する。

11.2.4 標準溶液調製記録

標準溶液を調製した状況を記録する。

11.2.5 試料前処理室等の清浄度の記録

測定分析が行われた雰囲気客観的に判断可能な記録（例えば試料前処理室およびGC-MS室の温度・清浄度の記録等）を取る。

11.2.6 分析前処理記録

分析者の所属、氏名、試料の状態、分析の各段階における操作日時、試料量（分析に供した量）、各試薬使用量、試料前処理室雰囲気等、一連の前処理において必要な情報を記録する。

11.2.7 GC-MS の記録

11.2.7.1 GC-MS 日常点検記録

GC-MS の日常点検結果（冷却水、真空ポンプ、真空度等の基本的な事項）を記録する。

11.2.7.2 GC-MS メンテナンス記録

GC-MS に関して日常点検の範疇を超える点検・調整事項（修理、磁場調整等日常的には発生しない事柄）があれば記録する。

11.2.7.3 GC-MS 使用状況記録

GC-MS の使用状態（各種消耗品の交換、イオン源の交換、GC カラムの交換、GC カラムエージング、フライトチューブベーキング、イオン源ベーキング、測定検体数等、どのような状況で使用されたか）を記録する。

11.2.7.4 GC-MS 調整の記録

GC-MS 測定分析条件を記録する。

11.2.7.5 透過率の記録

設定分解能時のイオン透過率の記録。

11.2.7.6 GC 分離能の記録

測定時に必要な GC カラム分離能が得られていることを確認できるクロマトグラムの記録。

11.2.7.7 感度の記録

測定時に必要な感度が得られていることを確認できる記録（クロマトグラム等）。

11.2.7.8 標準物質の同位体比の確認

測定した標準物質中の各化合物に関して、2つのモニターイオンのピーク面積比が理論値とずれていないことを確認できる記録。理論塩素同位体存在比と実測同位体比の採用範囲は30%以内とする。『参照：表-6. PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の塩素同位体の理論天然存在比 (p.20)』

- 11.2.7.9 相対感度係数 (RRF)
RRFの変動は検量線作成時と比較して±20%以内であることとする。
- 11.2.7.10 測定順の記録
GC-MSによる測定の順番の記録。標準溶液、最終溶媒、全操作ブランク、試料、2重測定(同一測定バイアルからのGC-MS測定)、2重測定(試料採取からの2重測定)等、試料の測定順番の記録。
- 11.2.7.11 クロマトグラム
標準溶液、最終溶媒、全操作ブランク、試料に関する各測定質量数のクロマトグラムの記録。
- 11.3 計算
- 11.3.1 計算工程の記録
標準溶液の濃度、内部標準の添加量、GC-MS測定面積値、試料採取量から最終濃度までの計算過程がトレース可能である記録。
- 11.3.2 同位体比の確認記録
測定に用いた同位体の理論比との差が判明する記録。上記計算の工程に含まれていれば良い。
- 11.3.3 回収率の確認記録
シリンジスパイクを用いて計算した回収率の記録。上記計算の工程に含まれていれば良い。回収率は、17種類のPCDDsおよびPCDFsの2,3,7,8位塩素置換異性体および12種類のCo-PCBsにおいて各々50-120%の範囲であることが望ましい。25-150%の範囲の外にあるときは再測定を実施する。
- 11.4 ブランク試験
- 11.4.1 採血器材のブランク
採血器材のブランク試験を行い、その結果を記録する。採血器材の製造ロットが変わる毎に行う。
- 11.4.2 全操作ブランク
試料に対して行う分析方法と同一の方法で操作を行う。全操作ブランクの試験の記録。全操作ブランクは分析検体数10に対して1以上の頻度で行う。
- 11.4.3 同位体スパイクの検査
同位体スパイク中に存在する¹³C化合物が、用いる添加量で定量に影響を与えないことを確認した記録。
- 11.5 2重測定(試料の前処理から)⁶⁴
可能であれば試料採取の段階で2つの試料を採取し、個々に測定分析を行うことが望ましい。この操作は分析検体数およそ10に対して1程度の頻度で行う。この2重測定の結果は各2,3,7,8位塩素置換異性体の実測濃度と実測濃度の平均値との差で30%以内であることが望ましい(実測濃度が目標定量下限値の10倍以下の化合物に関しては規定しない)。試料採取日時が異なっても同一のプロジェクト内で発生する分析検体数10に対して1程度の頻度で行えば良い。
- 11.6 2重測定(GC-MS測定)
GC-MSによる2重測定を測定試料に対し、分析検体数およそ10に対して1程度の頻度で行う。この2重測定の結果は各2,3,7,8位塩素置換異性体の実測濃度の差で30%以内であることが要求される(実測濃度が目標定量下限値の10倍以下の化合物に関しては規定しない)。同一のプロジェクト内における総検体数が10未満の場合、あるいはGC-MS測定のバッチが同一プロジェクトで10試料未満であるような場合、2重測定(GC-MS測定)の結果は他のプロジェクトの結果と共用でもよい。
- 11.7 品質管理チェック試料(QCCS)の測定
定期的にQCCSを測定し、その結果を記録する⁶⁵。
- 11.8 外部機関とのインターキャリブレーション
定期的、もしくは必要に応じて外部機関とのインターキャリブレーションを実施し、その結果を記録・保存する。

表-1. 定量する化合物の名称等

化合物の名称等		CAS Registry Number	IUPAC Number	
PCDDs		2,3,7,8-TeCDD	1746-01-6	-
		1,2,3,7,8-PeCDD	40321-76-4	-
		1,2,3,4,7,8-HCDD	39227-28-6	-
		1,2,3,6,7,8-HxCDD	57653-85-7	-
		1,2,3,7,8,9-HxCDD	19408-74-3	-
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	35822-39-4	-
		OCDD	3268-87-9	-
PCDFs		2,3,7,8-TeCDF	51207-31-9	-
		1,2,3,7,8-PeCDF	57117-41-6	-
		2,3,4,7,8-PeCDF	57117-31-4	-
		1,2,3,4,7,8-HxCDF	70648-26-9	-
		1,2,3,6,7,8-HxCDF	57117-44-9	-
		1,2,3,7,8,9-HxCDF	72918-21-9	-
		2,3,4,6,7,8-HxCDF	60851-34-5	-
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	67562-39-4	-
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	55673-89-7	-
		OCDF	39001-02-0	-
Co-PCBs	<i>non-ortho</i>	3,3',4,4'-TeCB	32598-13-3	#77
		3,4,4',5'-TeCB	70362-50-4	#81
		3,3',4,4',5'-PeCB	57465-28-8	#126
		3,3',4,4',5,5'-HxCB	32774-16-6	#169
	<i>mono-ortho</i>	2,3,3',4,4'-PeCB	32598-14-4	#105
		2,3,4,4',5'-PeCB	74472-37-0	#114
		2,3',4,4',5'-PeCB	31508-00-6	#118
		2',3,4,4',5'-PeCB	65510-44-3	#123
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	38380-08-4	#156
		2,3,3',4,4',5,5'-HxCB	69782-90-7	#157
		2,3',4,4',5,5'-HxCB	52663-72-6	#167
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	39635-31-9	#189