

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

	化合物の名称等	IUPAC Number	目標定量下限値		
			(pg/g-lipid)	(pg/g または pg/ml)	
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	-	1	0.003	
	1,2,3,7,8-PeCDD	-	1	0.003	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	2	0.006	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-	2	0.006	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	2	0.006	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-	2	0.006	
	OCDD	-	4	0.01	
	PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	-	1	0.003
1,2,3,7,8-PeCDF		-	1	0.003	
2,3,4,7,8-PeCDF		-	1	0.003	
1,2,3,4,7,8-HxCDF		-	2	0.006	
1,2,3,6,7,8-HxCDF		-	2	0.006	
1,2,3,7,8,9-HxCDF		-	2	0.006	
2,3,4,6,7,8-HxCDF		-	2	0.006	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF		-	2	0.006	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF		-	2	0.006	
OCDF		-	4	0.01	
Co-PCBs		<i>non-ortho</i>	3,3',4,4'-TeCB	# 77	10
	3,4,4',5-TeCB		# 81	10	0.03
	3,3',4,4',5-PeCB		#126	10	0.03
	3,3',4,4',5,5'-HxCB		#169	10	0.03
	<i>mono-ortho</i>	2,3,3',4,4'-PeCB	#105	50	0.15
		2,3,4,4',5-PeCB	#114	50	0.15
		2,3',4,4',5-PeCB	#118	50	0.15
		2',3,4,4',5-PeCB	#123	50	0.15
		2,3,3',4,4',5-HxCB	#156	50	0.15
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	#157	50	0.15
		2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167	50	0.15
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189	50	0.15

pg/g-lipid : 脂質重量あたりの濃度

pg/gまたはpg/ml : 試料全量あたりの濃度 (血液中の脂質濃度を0.3%として計算している。血液中の脂質濃度はかなり変動することに留意する必要がある)

表-3. 測定に用いる標準物質

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

表4. 測定に用いる内標準物質の例

		化合物の名称等
PCDDs		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TeCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8-PeCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -OCDD
PCDFs		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TeCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8-PeCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,7,8-PeCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,6,7,8-HxCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF
	$^{13}\text{C}_{12}$ -OCDF	
Co-PCBs	non-ortho	$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4'-TeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -3,4,4',5-TeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5,5'-HxCB
	mono-ortho	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4'-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,4',5-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4,4',5-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2',3,4,4',5-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5-HxCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5'-HxCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4,4',5,5'-HxCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5,5'-HpCB

表-5. 測定質量数の例

化合物の名称等	測定質量数				
	M	M+2	M+4		
PCDDs	<sup>12</sup> C <sub>12</sub>	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -TeCDDs	319.8965**	321.8936*	323.8906
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -PeCDDs	353.8576	355.8546*	357.8516**(1)
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -HxCDDs	387.8186	389.8157*	391.8127**(2)
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -HpCDDs	421.7796	423.7766*	425.7737**
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -OCDD	455.7407	457.7377**	459.7348*
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -TeCDDs	331.9368**	333.9339*	335.9309
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PeCDDs	365.8978	367.8949*	369.8919**
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -HxCDDs	399.8589	401.8559*	403.8530**
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -HpCDDs	433.8199	435.8169*	437.8140**
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -OCDD	467.7809	469.7779	471.7750*
PCDFs	<sup>12</sup> C <sub>12</sub>	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -TeCDFs	303.9016**	305.8987*	307.8957
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -PeCDFs	337.8627	339.8597*	341.8567**
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -HxCDFs	371.8237	373.8208*	375.8178**
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -HpCDFs	405.7847	407.7818*	409.7789**
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -OCDF	439.7457	441.7428**	443.7399*
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -TeCDFs	315.9419**	317.9389*	319.9360
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PeCDFs	349.9029	351.9000*	353.8970**
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -HxCDFs	383.8639	385.8610*	387.8580**
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -HpCDFs	417.8250	419.8220*	421.8191**
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -OCDF	451.7860	453.7830**	455.7801*
Co-PCBs	<sup>12</sup> C <sub>12</sub>	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -TeCBs	289.9224**	291.9194*	293.9165
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -PeCBs	323.8834	325.8804*	327.8775**
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -HxCBs	357.8444	359.8415*	361.8385**
		<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -HpCBs	391.8054	393.8025*	395.7995**
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -TeCBs	301.9626**	303.9597*	305.9567
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PeCBs	335.9236	337.9207*	339.9177**
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -HxCBs	369.8847	371.8817*	373.8788**
		<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -HpCBs	403.8457	405.8428*	407.8398**

\*: 親イオン群の中で存在比が最も高い塩素同位体の質量数

\*\* : 親イオン群の中で存在比が2番目に高い塩素同位体の質量数

(1)および(2): 試料中のPCBs濃度が高い場合、この質量数は妨害を受ける可能性がある

表-6. PCDDs, PCDFsおよびCo-PCBsの塩素同位体の理論天然存在比

化合物の名称等		理論天然存在比				
		M	M+2	M+4	M+6	M+8
PCDDs	TeCDDs	77.43	100.00	48.74	10.72	0.94
	PeCDDs	62.06	100.00	64.69	21.08	3.50
	HxCDDs	51.79	100.00	80.66	34.85	8.54
	HpCDDs	44.43	100.00	96.64	52.03	16.89
	OCDDs	34.54	88.80	100.00	64.48	26.07
PCDFs	TeCDDs	77.55	100.00	48.61	10.64	0.92
	PeCDDs	62.14	100.00	64.57	20.98	3.46
	HxCDDs	51.84	100.00	80.54	34.72	8.48
	HpCDDs	44.47	100.00	96.52	51.88	16.80
	OCDDs	34.61	88.89	100.00	64.39	25.98
Co-PCBs	TeCBs	76.67	100.00	49.11	10.83	0.93
	PeCBs	61.42	100.00	65.29	21.43	3.56
	HxCBs	51.22	100.00	81.48	35.51	8.75
	HpCBs	43.93	100.00	97.67	53.09	17.38

各塩素数毎に存在比が最も高い質量数の存在比を100として示してある

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	
	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	non-ortho	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
	mono-ortho	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',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

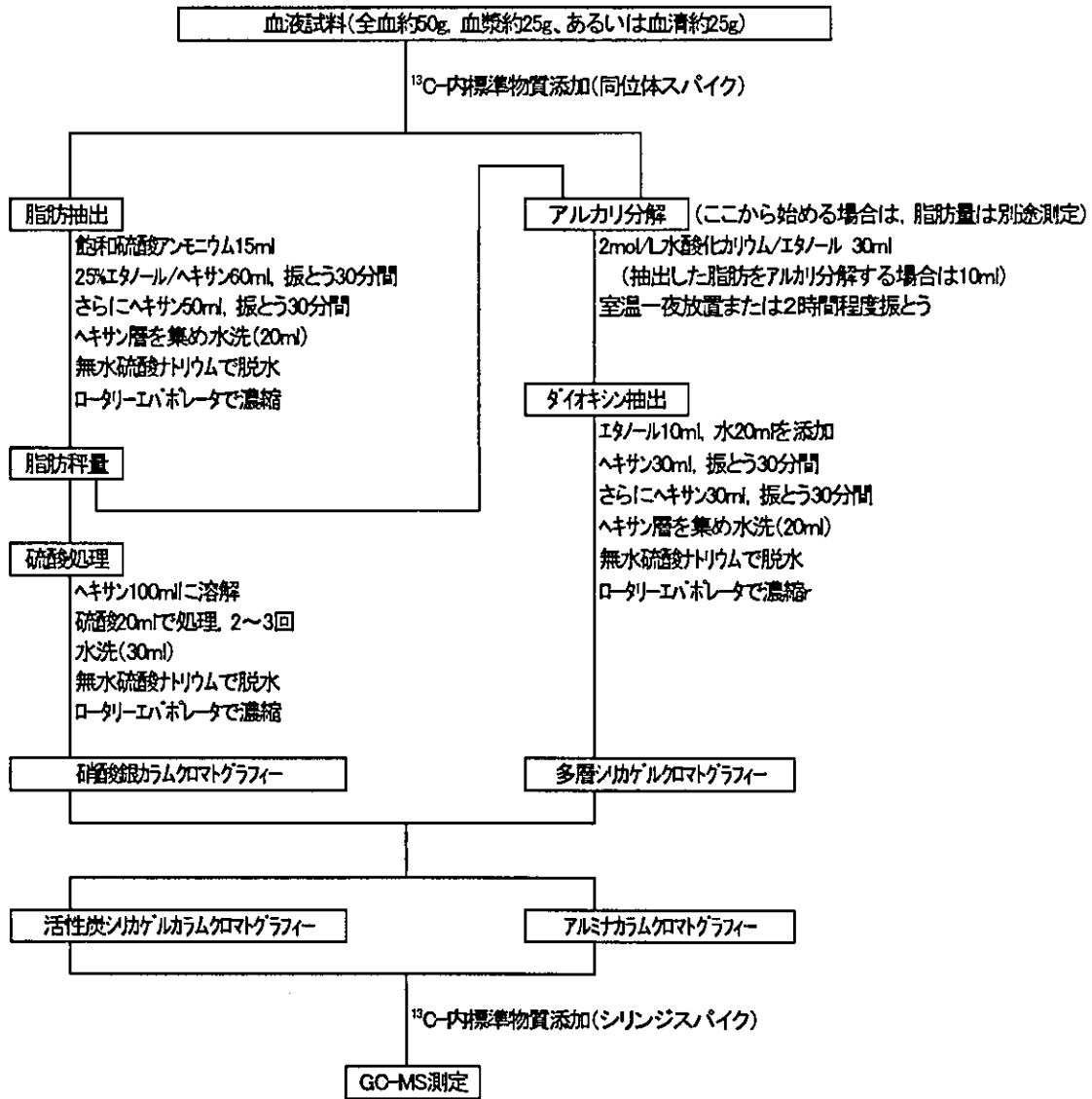
化合物の名称等	IUPAC Number	実測濃度 (pg/g-lipid)	WHO,1998-TEF	
			毒性係数 TEF	毒性等量 TEQ (pg-TEQ/g-lipid)
P C D D s	2,3,7,8-TeCDD	-	1	
	1,2,3,7,8-PeCDD	-	1	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-	0.01	
	OCDD	-	0.0001	
	Total PCDDs	-	-	
P C D F s	2,3,7,8-TeCDF	-	0.1	
	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 Co-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',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 Co-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PCBs濃度 (pg/g-lipid)
2. 毒性等量 : 2,3,7,8-TeCDD 毒性等量 (pg-TEQ/g-lipid)  
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カッコ内に示す
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PCDDs およびPCDFs 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 Co-PCBs および Total mono-ortho Co-PCBs はそれぞれ各 non-ortho Co-PCBs および mono-ortho Co-PCBs 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. 血液中ダイオキシン類の分析フロー図

分析手順にはいくつかのオプションがありうる。ここでは標準的なフロー図を示す。





## 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 toxicity equivalency factor
- 24 2,3,7,8-TeCDD toxicity 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濃縮同位体スパイクを試料に添加し、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  $^{13}\text{C}$  または  $^{37}\text{Cl}$  に置き換えた安定同位体スパイクを用いる。 $^{13}\text{C}$  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に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、陰圧型どちらでも良いが、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 は可能であれば血液専用のものを用意する等し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 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。

49 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。

50 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。

51 ロックマス、質量校正に使用する化合物は規定しない。

52 例えば同位体スパイク、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増えるようにする。

53 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。

54 分析装置の高感度化により超微量の検出が可能な時は試料採取量を少なくできる。

55 他にアセトン：ヘキサン、メタノール：クロロホルム、エタノール：ジエチルエーテルを用いる方法もある。

56 内部標準をデカン溶液とした時は、デカンが留去されにくいので、バス温度を高め設定してデカンを十分に除く必要がある。また、バス温度を高くしすぎると回収率が低下するので注意する必要がある。

57 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所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所があるので注意する。

58 シリンジスパイクには、試料に添加した同位体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測定における各測定毎に(1 injectionに付)1種類以上使用する。

57 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所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所があるので注意する。

58 シリンジスパイクには、試料に添加した同位体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測定における各測定毎に(1 injectionに付)1種類以上使用する。

59 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。

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

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

62 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。

63 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。

64 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重測定に必要な血液試料量の採取が困難な時は、QCCSで代用できる。

65 血液QCCSを準備し用いる。

## 別添3 母乳中の臭素化ダイオキシン類の測定マニュアル (案)

### 1 はじめに

臭素化ダイオキシン類は、ダイオキシン類対策特別措置法附則第2条に調査研究の推進が規定されているが、塩素系ダイオキシン類と比較して、分析が非常に困難とされている物質である。特に母乳中の臭素化ダイオキシン類の濃度は低濃度であると予測され、臭素化ダイオキシン類の人体影響を把握し、かつ信頼性のある値を得るためには、極めて高い分析技術が要求される。今回、母乳中の臭素化ダイオキシン類の測定を行うにあたり、現在得られる知見を集積し、測定マニュアル(案)をまとめた。なお、本マニュアル(案)は、今後の科学的知見の発展、標準試薬類の整備などを受け、一部改訂されるものである。また、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確認さ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 臭素化ダイオキシン類

ポリブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン (PBDDs) とポリブロモジベンゾフラン (PBDFs) とする。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ブロモジベンゾ-パラ-ジオキシンおよびテトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタおよびオクタブロモジベンゾフランを指す。

#### 2.2 PBDDs および PBDFs の 2,3,7,8-位臭素置換異性体

PBDDs および PBDFs のうち、化学構造上 2, 3, 7 および 8 で表記される位置に臭素が配位している化合物の総称。PBDDs 7 化合物、PBDFs 10 化合物、合計 17 化合物が存在する。

#### 2.3 異性体<sup>1</sup>

同一の化学式を持ち、臭素の置換位置が異なる化合物を指す。

#### 2.4 同族体<sup>2</sup>

臭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。

#### 2.5 目標定量下限値

前処理から GC-MS による測定までの一連の操作において、定量が可能な目標とする最小濃度。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。

#### 2.6 検出下限値

##### 2.6.1 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<sup>3</sup>。あるいは GC-MS で検出できる低濃度標準溶液<sup>4</sup>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。

##### 2.6.2 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の検出下限値とする。

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 PBDDs : ポリブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン<sup>5</sup>
- 3.2 PBDFs : ポリブロモジベンゾフラン<sup>6</sup>
- 3.3 TeBDDs : テトラブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン<sup>7</sup>
- 3.4 PeBDDs : ペンタブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン<sup>8</sup>
- 3.5 HxBDDs : ヘキサブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン<sup>9</sup>
- 3.6 HpBDDs : ヘプタブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン<sup>10</sup>
- 3.7 OBDD : オクタブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン<sup>11</sup>
- 3.8 TeBDFs : テトラブロモジベンゾフラン<sup>12</sup>
- 3.9 PeBDFs : ペンタブロモジベンゾフラン<sup>13</sup>
- 3.10 HxBDFs : ヘキサブロモジベンゾフラン<sup>14</sup>
- 3.11 HpBDFs : ヘプタブロモジベンゾフラン<sup>15</sup>
- 3.12 OBDF : オクタブロモジベンゾフラン<sup>16</sup>
- 3.13 2,3,7,8-TeBDD : 2,3,7,8-テトラブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.14 1,2,3,7,8-PeBDD : 1,2,3,7,8-ペンタブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.15 1,2,3,4,7,8-HxBDD : 1,2,3,4,7,8-ヘキサブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.16 1,2,3,6,7,8-HxBDD : 1,2,3,6,7,8-ヘキサブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.17 1,2,3,7,8,9-HxBDD : 1,2,3,7,8,9-ヘキサブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.18 1,2,3,4,6,7,8-HpBDD : 1,2,3,4,6,7,8-ヘプタブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.19 2,3,7,8-TeBDF : 2,3,7,8-テトラブロモジベンゾフラン
- 3.20 1,2,3,7,8-PeBDF : 1,2,3,7,8-ペンタブロモジベンゾフラン
- 3.21 2,3,4,7,8-PeBDF : 2,3,4,7,8-ペンタブロモジベンゾフラン
- 3.22 1,2,3,4,7,8-HxBDF : 1,2,3,4,7,8-ヘキサブロモジベンゾフラン
- 3.23 1,2,3,6,7,8-HxBDF : 1,2,3,6,7,8-ヘキサブロモジベンゾフラン
- 3.24 1,2,3,7,8,9-HxBDF : 1,2,3,7,8,9-ヘキサブロモジベンゾフラン
- 3.25 2,3,4,6,7,8-HxBDF : 2,3,4,6,7,8-ヘキサブロモジベンゾフラン
- 3.26 1,2,3,4,6,7,8-HpBDF : 1,2,3,4,6,7,8-ヘプタブロモジベンゾフラン
- 3.27 1,2,3,4,7,8,9-HpBDF : 1,2,3,4,7,8,9-ヘプタブロモジベンゾフラン
- 3.28 PBDEs : 臭素化ジフェニルエーテル<sup>17</sup>
- 3.29 TEF : 毒性等価係数<sup>18</sup>
- 3.30 TEQ : 毒性当量<sup>19</sup>
- 3.31 IDMS : 同位体希釈質量分析法<sup>20</sup>
- 3.32 GC-MS : ガスクロマトグラフィー/質量分析法<sup>21</sup>またはガスクロマトグラフ/質量分析計<sup>22</sup>
- 3.33 HRGC : 高分解能ガスクロマトグラフィー<sup>23</sup>または高分解能ガスクロマトグラフ<sup>24</sup>
- 3.34 HRMS : 高分解能質量分析法<sup>25</sup>または高分解能質量分析計<sup>26</sup>
- 3.35 HRGC-HRMS : 高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析法<sup>27</sup>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<sup>28</sup>
- 3.36 SIM : 選択イオン検出法<sup>29</sup>
- 3.37 RRF : 相対感度係数<sup>30</sup>
- 3.38 N.D. : 目標定量下限値未満<sup>31</sup>
- 3.39 EI法 : 電子イオン化<sup>32</sup>法
- 3.40 IUPAC : 国際純正および応用化学連合<sup>33</sup>
- 3.41 WHO : 国連世界保健機関<sup>34</sup>

- 3.42 QA/QC：品質保証・品質管理<sup>35</sup>
- 3.43 QCCS：品質管理チェック試料<sup>36</sup>

#### 4 調査対象物質

本マニュアルでは『表-1. 測定対象 PBDDs および PBDFs 化合物および目標定量下限値 (p.16)』に示す PBDDs および PBDFs の 2,3,7,8-位臭素置換異性体を調査対象とする。ただし、現在標準品が入手不可能な物質については、暫定的に調査対象物質より除外する<sup>37</sup>。現在標準品が入手可能な物質は、PBDDs 6 種：2,3,7,8-TeBDD, 1,2,3,7,8-PeBDD, 1,2,3,4,7,8-HxBDD, 1,2,3,6,7,8-HxBDD, 1,2,3,7,8,9-HxBDD, OBDD および PBDFs 6 種：2,3,7,8-TeBDF, 1,2,3,7,8-PeBDF, 2,3,4,7,8-PeBDF, 1,2,3,4,7,8-HxBDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpBDF, OBDF である。

#### 5 目標定量下限値

本マニュアルでは『表-1. 測定対象 PBDDs および PBDFs 化合物および目標定量下限値 (p.16)』に示す目標定量下限値を設定する。

#### 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<sup>38</sup>。

##### 6.2 試薬類<sup>39</sup>

試薬類は、必要に応じて可能なものは蒸留、加熱処理、洗浄等の精製操作を行う等して、本方法によって使用する量が、PBDDs および PBDFs の定量に影響をおよぼさないことを確認した後使用する。以下に使用する試薬とその調製法の一例を示す。

##### 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 ジエチルエーテル //

6.2.4 ヘキサン //

6.2.5 トルエン //

6.2.6 ジクロロメタン //

6.2.7 ノナン //

6.2.8 デカン //

##### 6.2.9 塩化ナトリウム

残留農薬用、または同等の純度を有するもの。

##### 6.2.10 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。

##### 6.2.11 シュウ酸カリウム水溶液

高純度の試薬を精製水に溶かす。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

##### 6.2.12 硫酸

高純度の試薬を使用する。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

##### 6.2.13 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。

6.2.14 2 mol/L 水酸化カリウム/エタノール溶液

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。そのまままで溶けにくい場合には全体の1/10量程度の精製水に溶かし、エタノールで定容する。

6.2.15 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に適当量溶かす。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

6.2.16 40% (w/w) 硝酸銀水溶液

高純度の硝酸銀を精製水に適当量溶かす。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

6.2.17 シリカゲル

カラムクロマトグラフ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<sup>40</sup>。

6.2.18 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<sup>40, 41</sup>。

6.2.19 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<sup>40, 41</sup>。

6.2.20 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<sup>40</sup>。

6.2.21 2% 水酸化カリウム含有シリカゲル

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<sup>40</sup>。

6.2.22 フロリジル

カラムクロマトグラフ用フロリジルを層の厚さを10 mm以下にして130°Cで16時間加熱し、デシケータ内で放冷する。このフロリジルを共栓付き三角フラスコにとり、精製水をフロリジルに対し1%量加えて栓をし、十分振とう後、密閉可能な容器に入れ、デシケータ中で保存する<sup>40</sup>。

6.2.23 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抽出洗浄し<sup>42</sup>、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<sup>40</sup>。

6.2.24 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<sup>40</sup>。

6.2.25 標準物質

『表-1. 測定対象 PBDDs および PBDFs 化合物および目標定量下限値 (p.16)』に示す測定対象物の市販標準物質を用いる。

#### 6.2.26 標準溶液

市販の標準溶液をノナンまたはデカン<sup>43</sup>で希釈、混合して調製する。

#### 6.2.27 内標準物質 (クリーンアップスパイクおよびシリンジススパイク)

『表-3. 標準物質と内部標準物質の対応例 (p.18)』に示す市販標準物質を用いる。

#### 6.2.28 内標準物質溶液

市販の溶液をノナンまたはデカン<sup>43</sup>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 PBDDs および PBDFs の測定分析に影響をおよぼさないことが要求される。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母乳分析専用とすることが望ましい。GC-MS も超微量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 (450°C程度で連続使用可能なもの)。

##### 6.3.1.2 マッフル炉

セラミック製品 (主に GC-MS のイオン源部品など) 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やエアフィルターを装着したり、また、トラップ球を使用したりする等して汚染を防ぐようにすることが望ましい<sup>44</sup>。

##### 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 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の冷却管 (コンデンサー) に使用する。

##### 6.3.1.6 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。

##### 6.3.1.7 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 2.0 g (130°C, 3 時間活性化したもの)、無水硫酸ナトリウム 1.0 g をヘキサンで湿式充てんする。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<sup>45</sup>。

##### 6.3.1.8 フロリジ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フロリジルを 5 g (130°C, 3 時間活性化後、1%の水を加えたもの)、無水硫酸ナトリウム 1.0 g をヘキサンで湿式充てんする。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<sup>45</sup>。

##### 6.3.1.9 多層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 0.5 g, 2%水酸化カリウム含有シリカゲル 1 g, シリカゲル 0.5 g, 44%硫酸含有シリカゲル 5 g, 22%硫酸含有シリカゲル 3.0 g, シリカゲル 0.5 g, 10%硝酸銀含有シリカゲル 3.0 g, 無水硫酸ナトリウム 2.0 g を順次ヘキサンで湿式充てんする<sup>46</sup>。ヘキサン 50 ml を流速 2.5 ml/min で流し、充てん物を洗浄する<sup>45</sup>

#### 6.3.1.10 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 1.0 g, 活性炭シリカゲル 1.0 g, 最後に無水硫酸ナトリウム 1.0 g を乾式充てんする<sup>45</sup>。

#### 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アルミナ 10 g をヘキサンで湿式充てんする。ヘキサンを流下させ、アルミナ層を安定させた後、その上に無水硫酸ナトリウムを約 10 mm の厚さになるようにのせ、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<sup>45</sup>。

### 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, 長さ 15~60 m の熔融シリカ製のものであって、内面に液相を塗布したもの。通常、無極性 (100%メチルシリコン系)、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 (50%フェニルメチルシリコン系) のものを用いる。また、さまざまな要因を考慮し、長さや極性の異なるカラムの併用が望ましい<sup>47</sup>。

#### 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<sup>48</sup>により分解能 10,000 以上<sup>49</sup>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、電圧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 秒未満にできるもの<sup>50</sup>。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-TeBDD 100 fg で S/N>5, OBDD 5000 fg で S/N>5 の検出感度を得られるものが望ましい。

#### 6.3.2.4 試料導入部

スプリットレス方式またはオンカラム注入方式で最高使用温度が 240~300°C<sup>51</sup>であること。感度を稼ぐ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<sup>52</sup>。

## 7 調査計画

採乳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、採乳時の事故を防ぐため、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が望ましい。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、その際はそれらに従うこと。

## 8 試料採取

採取は、母乳提供者本人あるいは医師、看護師 (保健師、助産師を含む)、本人が協力を希望するもの



が行う。通常の試料採取には50~100 mlの採乳バッグあるいはガラス製容器、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、2回分として小分けし(1回50 ml)、また一部は生化学試験に回せるようにしておくが便利である。採取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、変質や脂肪の分離を避けるため、採取後すぐによく攪拌し、分析するまで冷凍し暗所に保存する。

## 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、試料に内部標準物質として定量する目的化合物の<sup>13</sup>C同位体を添加(スパイク)し、有機溶媒によってPBDDsおよびPBDFsを抽出し、精製し、GC-MSを用いて同位体比を測定する。分析方法のフロー例を図-1(p.23)に示す。

なお、PBDDsおよびPBDFs濃度を脂肪あたりで表記する場合は、後述の方法によって脂肪量を測定する。

### 9.2 前処理

前処理操作にあたって、一切の試料の取り扱いおよび操作は照明度の低い環境で実施することが望ましい。抽出およびクリーンアップ時に使用する容器は、褐色のガラス製容器などを用いて遮光する。

#### 9.2.1 試料

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、二重測定ダイオキシン類分析用(必要に応じて)2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 内標準物質(クリーンアップスパイク)の添加

試料を解凍後、約50~100 gの試料を量り取り、クリーンアップスパイクを一定量添加し<sup>53</sup>、攪拌する。なお、クリーンアップスパイクの添加量は各化合物100~5000 pg程度とする<sup>54</sup>。

#### 9.2.3 脂質の抽出

25%シュウ酸カリウム水溶液2 ml, エタノール50 ml, ジエチルエーテル25 mlを順に加え、その都度よく攪拌する。最後にヘキサン30 mlを加え、10分間振とう抽出を行う。ヘキサン層を分取後、残層にヘキサン30 mlを添加し、更に10分間振とう抽出を行う。この操作をもう1回繰り返す、計3回の抽出によるヘキサン分画を混合する。得られたヘキサン分画を2%塩化ナトリウム含有精製水50 mlで2回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水する。

#### 9.2.4 脂質濃度の測定

あらかじめ105°Cで3時間加熱、放冷し、重量を測定し恒量となったことを確認したナス型フラスコに、脂質抽出液を移し、これをロータリーエバポレーターでヘキサンがなくなるまで濃縮する。フラスコの外部に付着する水をよく拭いて除いた後、放冷し、重量を測定する。ヘキサンの残留や水分の残留のないように十分に留去する。水の残留がある時は、110°Cで1時間程度加熱すると除くことができる。得られた重量の差を抽出物重量とし、これを脂肪の重量とみなす。

#### 9.2.5 アルカリ分解

100 mlの三角フラスコに正確に秤量した脂肪(1 g程度)をエタノール20 mlに溶解したものを加える。ここに2 mol/L水酸化カリウム/エタノール溶液10 mlを加えてよく振とうし、室温で1~2時間振とうまたは一夜静置する。この溶液に精製水60 mlを加え、ヘキサン50 mlで振とう抽出を3回行う。

#### 9.2.6 硫酸処理

秤量した脂肪全量をヘキサン100 mlに溶解し、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 回目以降は穏やかに振とうし、静置後硫酸層を除去する。この操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返す。

#### 9.2.7 水洗・濃縮

アルカリ分解で得られたヘキサン抽出液あるいは硫酸処理が終了したヘキサン抽出液を精製水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

アルカリ分解あるいは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、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー、フロリジ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ィー、アルミナ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2 者はクリーンアップのために、後3 者はクリーンアップおよびPBDDs, PBDFs とPBDEs などの妨害物質と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<sup>45)</sup>。また、一般的な臭素化ダイオキシン類の分析フロー例を図1 に示した。

#### 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あるいは多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーのどちらかを行う。

##### 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ポレーターにて約2 ml まで濃縮し、フロリジ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 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー

多層シリカゲルクロマトグラフ管の液面を無水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。5%ジクロロメタン含有ヘキサン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ポレーターにて約2 ml まで濃縮し、フロリジ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 フロリジルカラムクロマトグラフィー

フロリジ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、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで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。ヘキサン溶液100 ml を2.5 ml/min で流下させ、第1 画分を得る。ここには、PBDEs 類が含まれている。次いで、60%ジクロロメタン含有ヘキサン溶液200 ml を2.5 ml/min で流下させ、第2 画分を得る。ここには、PBDDs およびPBDFs が含まれる。第2 画分をロータリーエポレーターを用いて濃縮し、更にゆるやかに窒素を吹き付け<sup>46)</sup>、シリンジスパイクを添加し10 μl 程度に定容して、GC-MS 分析用溶液とする。必要があれば、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。

#### 9.3.3 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィー

活性炭シリカゲルクロマトグラフ管にシリカゲルまたはフロリジルカラムクロマトグラフィーで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100mlを流速2.5 ml/minで流し第1画分を得る。次いで、トルエン250mlを2.5 ml/minで流下させ、第2画分を得る。この画分にはPBDDsおよびPBDFsが含まれる。第2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<sup>56</sup>、濃縮した後、シリンジスパイクを添加し10 µl程度に定容して、GC-MS分析用溶液とする。

#### 9.3.4 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にシリカゲルまたはフロリジルカラムクロマトグラフィーで調製した試験溶液を静かに移し入れ、少量のヘキサンで数回洗い込み、液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げる。2%ジクロロメタン含有ヘキサン溶液100mlを約2.5 ml/minで流して第1画分を得る。更に50%ジクロロメタン含有ヘキサン溶液100mlを約2.5 ml/minで流して第2画分を得る。この画分にはPBDDsおよびPBDFsが含まれる。第2画分をロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、更にゆるやかに窒素を吹き付け<sup>56</sup>、シリンジスパイクを添加し10 µl程度に定容して、GC-MS分析用溶液とする。

### 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、安定性等のほか、分析の誤差となる干渉の有無の大きさ、その補正法等、十分信頼できる分析ができるかどうか確認しておく (QA・QC 参照)。

#### 9.4.2 検量線の作成 (RRF と RRFss 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クリーンアップスパイク内標準物質との相対感度係数) および RRFss (クリーンアップ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、0.1~500 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、あらかじめクリーンアップ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、10~100 ng/ml となるように添加しておく<sup>57</sup>。標準溶液の1 µl 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<sup>58</sup>。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。各分析対象物質の対応するクリーンアップスパイク内標準物質に対するピーク面積の比と、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の比を用いて、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<sub>STD</sub> : 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<sub>STD-IS</sub> : 標準溶液中のクリーンアップスパイクのクロマトグラムピーク面積値

C<sub>STD</sub> : 標準溶液中の各化合物の量 (pg)

C<sub>STD-IS</sub> : 標準溶液中の各クリーンアップスパイクの量 (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関係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 (RRFss) 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 (RRFss) 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のクロマトグラムピーク面積値

$C_{STD-IS}$  : 標準溶液中の各クリーンアップスパイクの量 (pg)

$C_{STD-SS}$  : 標準溶液中のシリンジスパイクの量 (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<sup>59</sup>し、各同族体につき『表-4. 測定質量数の例 (p.18)』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。PBDDs および PBDFs の測定においては、2,3,7,8-位臭素置換異性体のクロマトグラム上でのピークが他の異性体のものと良好な分離が得られ、各臭素化物の保持時間が適切な範囲にあり、安定した応答が得られるように、カラム槽温度、注入口温度、キャリアーガス流量などを設定する<sup>60</sup>。『表-8 PBDDs および PBDFs のガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件例 (p.22)』にその一例を示す。ここに示す条件は、参考として示したものである。

## 9.6 濃度の算出

### 9.6.1 試料中濃度の算出

次式によって濃度を算出する。

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

$C_{sample}$  : 分析対象物質の濃度 (pg/ml または pg/g)

$A_{sample}$  : 分析試料中の各化合物のクロマトグラムピーク面積値

$A_{sample-IS}$  : 分析試料中の各クリーンアップスパイクのクロマトグラムピーク面積値

$C_{sample-IS}$  : 分析試料へのクリーンアップスパイクの量 (pg)

$V$  : 試料採取量 (ml または g)

PBDDs および PBDFs の 2,3,7,8-位臭素置換異性体はそれぞれ対応する 17 種類の 2,3,7,8-位臭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の濃度、添加量およびレスポンスを用いて濃度を算出する。ただし、標準物質が得られない場合は入手可能になるまで測定対象からはずしておく。

### 9.6.2 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 (RRFss) を用いて、次式により、回収率を算出する。

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

$A_{sample-IS}$  : 分析試料中の各クリーンアップスパイクのクロマトグラムピーク面積値

$C_{sample-SS}$  : 分析試料中のシリンジスパイクの量 (pg)

$A_{sample-SS}$  : 分析試料中のシリンジスパイク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

$C_{sample-IS}$  : 分析試料へのクリーンアップスパイクの量 (pg)

## 9.7 測定結果の表記方法

母乳中の PBDDs および PBDFs は通常低濃度であると考えられ、本マニュアルの方法をもってしても目標定量下限値付近あるいは目標定量下限値未満の数値が出現する場合もある。数値の取り扱い方法が異なることにより、得られる最終結果に差異が生じることがないように数値の取り扱い方法を定める。なお、有効数字の取扱方法は JIS Z 8401 にしたがう。