

表 A-6. PCDDs および PCDFs の定量下限値

化合物の名称等	目標定量下限値 (血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル, 2000)		実測定量 下限値	血液 10mL、回収率 50%、 25 μ L 中 10 μ L を Inj したとして		
	(pg/g-lipid)	(pg/g または mL)	[S/N=10] (pg/Inj)	(pg/g-lipid)	(pg/g または mL)	
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	1	0.003	0.005	0.83	0.0025
	1,2,3,7,8-PeCDD	1	0.003	0.006	1	0.003
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	2	0.006	0.012	2	0.006
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2	0.006	0.012	2	0.006
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	2	0.006	0.012	2	0.006
	1,2,3,4,6,7,8-HpCD D	2	0.006	0.012	2	0.006
	OCDD	4	0.01	0.02	3.33	0.01
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	1	0.003	0.005	0.83	0.0025
	1,2,3,7,8-PeCDF	1	0.003	0.006	1	0.003
	2,3,4,7,8-PeCDF	1	0.003	0.006	1	0.003
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	2	0.005	0.012	2	0.006
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	2	0.005	0.012	2	0.006
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	2	0.005	0.012	2	0.006
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	2	0.005	0.012	2	0.006
	1,2,3,4,6,7,8-HpCD F	2	0.005	0.012	2	0.006
	1,2,3,4,7,8,9-HpCD F	2	0.005	0.012	2	0.006
	OCDF	4	0.01	0.02	3.33	0.01

注) 実測定量下限値：ピーク高 S/N=10 に相当するピークの面積値を、1 インジェクション内の量 (pg/Inj) に換算した値。

pg/g-lipid：脂肪重量あたりのダイオキシン類濃度に換算した値。

pg/g または mL：試料全量あたりの濃度あたりのダイオキシン類濃度。

(血液中の脂肪濃度を 0.3% として計算。血液中の脂肪濃度はかなり変動することに留意。)

B. 臭素化ダイオキシン類の分析

本研究の目的は、廃棄物焼却処理工場、リサイクル工場、プラスチック製品製造工場等の臭素化ダイオキシン類が発生すると予測される職場の労働者を対象にして、臭素化ダイオキシン類曝露及びその健康影響等に関して現状の実態調査を行い、労働者の健康影響を未然に防止するためにリスク評価を行うことである。本章は、これら労働者の臭素化ダイオキシン類の慢性曝露に関して、血液中臭素化ダイオキシン類の高感度分析法の開発及びその簡易化を達成して生物学的モニタリングを確立し、労働者のリスク評価を容易にしようとするものである。

臭素化ダイオキシン類は、塩素化ダイオキシン類より分子量が大きく、融点が高く、蒸気圧も低い。また熱や光に対して不安定であり、塩素化ダイオキシン類よりも取り扱いが難しい物質である。一方、その毒性は対応する塩素化ダイオキシン類以上か、少なくとも同等であると考えられている。人への健康影響を考え合わせると、従来の塩素化ダイオキシン類の分析法と同等の高感度分析が必要とされることは間違いない。

臭素化ダイオキシン類も化学的性質は塩素化ダイオキシン類と同様であるから、分析方法、特に試料前処理方法は基本的には塩素化ダイオキシン類と同じでよいと考えられる。ただし、臭素化ダイオキシン類分析に特有の注意点は多い。従って、臭素化ダイオキシン類に特化した高感度分析法確立のためには、まず塩素化ダイオキシン類と同様に行って得られた結果から細かいところを見直し、最適化してゆくこととした。本研究は、被験者負担軽減のために試料の少量化と分析方法の簡易・迅速化を達成した前章の塩素化ダイオキシン類の分析法を基本にして、臭素化ダイオキシン類の同等の分析法の確立を目指した。

B-a. 試料の前処理

B-a-i. 実験施設・試薬および実験器具

臭素化ダイオキシン類は光、特に紫外線、に対して非常に不安定である。そのため、本研究所の分析施設には外部の光が全く入ってこないように配慮されている。しかし、蛍光灯からほんのわずかであるが紫外線が放射されているので、それをも抑えるため、紫外線吸収膜付蛍光灯に全て交換した。

ガラス器具類は全て褐色のものを用いることとした。褐色ガラス製がない特殊な容器の場合はアルミ箔で覆うなどし、可能な限り遮光しながら実験を行った。

用いた試薬および実験器具は、塩素化ダイオキシン類の場合と同じである。

B-a-ii. 試料からの脂肪抽出

塩素化ダイオキシン類と同様に臭素化ダイオキシン類も主に脂肪にとけ込んでいるため、はじめに脂肪分を血液から抽出する。本研究では、高温高圧の条件下で抽出を行う高速溶媒抽出装置を用いて、時間と有機溶媒の節約を図った。高速溶媒抽出装置は、従来、主に固形試料からの抽出に用いられているが、塩素化ダイオキシン類のときと同様に、分散剤として珪藻土を混合させることにより、血液などの液体試料も同様に扱うことが出来る。

高速溶媒抽出操作：まず、予め分析試料と同条件で抽出操作を行って洗浄した珪藻土 10 g を 200mL ビーカーにとる。それを上皿電子天秤にのせ、ヒト血液 10g (約 10mL) を徐々に加えながら精秤する。血液を十分にしみこませ混合した珪藻土を、高速溶媒抽出装置用の 66mL 抽出セルに移す。取り残しの無いよう先のビーカーに新たに珪藻土 5g を入れて内壁を十分に洗い込み、これも抽出セルに加える。

なお、血液を含んだ珪藻土を抽出セルの一番下に入れてしまうと、血球などの組織までもが抽出液に混入してしまう。また抽出セル内に空隙が多いと抽出溶媒を無駄に必要とする。そのため、抽出セルの容量を見込んで一番下と上に新たな珪藻土を入れ、試料を含んだ珪藻土を挟むように充填する。

各抽出セルに内部標準物質 (クリーンアップスパイク) として ^{13}C 標識 PBDDs/PBDFs 各 40pg を添加する。添加量は試料の種類によって異なる。これを高速溶媒抽出装置にセットして、以下の条件で脂肪分の抽出を行う。

表 B-1. ダイオネクス社製 高速溶媒抽出装置 (ASE300) 抽出条件

項目	条件
抽出セルサイズ	66mL 抽出セル
分散剤	珪藻土
抽出溶媒	アセトン／ヘキサン (50 : 50)
抽出圧力	1500psi (10MPa)
オープン温度	150°C
オープン昇温時間	7 分
設定温圧静置時間	10 分
フラッシュ容積	セル容積の 50%
窒素ガスパージ時間	180 秒
静置サイクル数	2 回

B-a-iii. 脂肪重量測定

血液中の脂肪量は個人の体質・食事の内容・食事からの経過時間などに大きく左右される。そのため、主に脂肪中に溶け込んでいるダイオキシン類の濃度を単位血液量当たりで表すとばらつきが大きく比較が難しくなるので、通常、脂肪重量当たりの濃度として表される。

分析時間短縮のためには、一般に抽出液を二分し、一方は脂肪重量測定用のみ使用し、もう一方はダイオキシン分析用としてすぐに次の操作へ移す方法が行われている。しかしそれでは貴重な血液試料の一部が脂肪重量を測定しただけで無駄になってしまう。本研究では、塩素類ダイオキシン類の場合と同様に、被験者負担軽減のために、脂肪重量を測定した試料をダイオキシン分析用に使用する操作方法を開発した。

脂肪重量測定操作：脂肪重量測定も、塩素化ダイオキシン類のときと同様である。すなわち、高速溶媒抽出装置で得られた抽出液を、無水硫酸ナトリウム 15g を入れたロートでろ過しながら脱水し、500mL ナスフラスコに受ける。これを真空調節器付きのロータリーエバポレーターで減圧濃縮する。突沸あるいは乾固させないように注意しながら数十 mL 程度まで穏やかに濃縮する。これを 200mL ナスフラスコへ移し、同様に 2mL 程度まで更に濃縮する。

この濃縮液を、予め分析用精密上皿電子天秤で質量を量っておいた専用の秤量瓶（アンプル管の肩から上を切り落とした物）に移し、窒素気流下で更に濃縮する。溶媒がほぼ無くなったところでドラフト内に一晚静置し、溶媒を留去する。これを容器ごと秤量し、増加分を脂肪重量とする。

なお各容器の移し換えの際は、容器の大きさに応じて数 mL のヘキサンで洗い込みを行う。新しいヘキサンを加えては、超音波洗浄機を用いて内壁を洗い、これも次の容器に移す。この操作をそれぞれ 3 回行い、回収率を向上させる。

B-a-iv. 硫酸による脂肪分解

有機溶媒による抽出物中および脂肪中のダイオキシン類を、脂肪、その他の有機物から分離するには、濃硫酸を加えて攪拌するのが極めて有効である。着色物質や多環芳香族炭化水素・不飽和炭化水素など、抽出物中に存在する有機物の大部分はこの処理によって分解される。化学的に安定なダイオキシン類はこの操作ではほとんど影響されない。

脂肪分解操作：先ず、ヘキサン 1mL を脂肪重量測定後の容器に加えて脂肪を溶かす。これを 10mL 先細り遠沈管に移す。前述と同様、1mL のヘキサンで洗い込みを 3 回行う。全液量を 4mL に揃え、そこへ濃硫酸 2mL を静かに滴下する。エマルジョンが出来ると分離が困難になるため、振ったり混ぜたりせず、そのまま一晚静置する。

翌日、ヘキサン層（上層）が無色であることを確認し、遠心分離器（毎分 2800 回転、10 分）により硫酸層と分離する。もし着色が残っている場合は濃硫酸を 1mL 追加し、更に半日程度静置する。場合によっては硫酸層（下層）を取り除き、ヘキサン層が無色になるまでこれを繰り返す。

得られた上澄み液を 15mL スピッチへ注意深く移す。ここでの洗い込みは超音波洗浄機を使用せずに、加えたヘキサンをパスツールピペットで吸い上げては内壁を洗い落とす操作を繰り返す。最終的に全液量が 12mL になるようにヘキサンを加える。

B-a-v. 妨害物質のクリーンアップ（ダイオキシン類の分取）

前述の硫酸処理によって大部分の妨害物質は除去できる。しかし、それだけでは不十分である。試料中の含有量が非常に少ないダイオキシン類を定量するためには、桁違いに高い濃度で存在する妨害物質から分離し、濃縮することが極めて重要である。超微量物質を分析する HRGC-HRMS の性能維持のためにも、目的物質以外の妨害物質を可能な限り完

全に除去する必要がある。

この目的に従来は、何種類かのカラムクロマトグラフィを順次行う方法がとられている。すなわち除去目的物質に応じてアルミナ（酸化アルミニウム）やフロリジル（ケイ酸マグネシウム）・硫酸や水酸化カリウムあるいは硝酸銀を添加したシリカゲル・活性炭などをガラスカラムクロマト管に充填する。そこに濃縮した試料を入れ、種々の溶媒によって各成分を溶離し、ダイオキシン類を含む画分を捕集する。しかしこの方法は、1本1本充填剤を詰める作業、得られたダイオキシン画分を次のカラムクロマトグラフィのために再度濃縮する作業などに非常に時間と労力を必要とする。

本研究では、予め充填されたカラムを使い、連続してカラムクロマトグラフィを行える自動クリーンアップ装置 Power-Prep (Fluid Management System (FMS) 社製) を用いた。これによって妨害物質からダイオキシン画分を効率よく分取できるようになった。この装置は、3種類のカラムクロマトグラフ管とポンプおよび各電磁弁が全て連結されており、コンピューター制御によって各種溶離液を自動的に流す装置である。原理も含め、基本的な動作は従来のカラムクロマトグラフィと同じである。またこの装置は開発されてからまだ間もないが、既に米国環境保護庁 (EPA) から環境試料中のダイオキシン類分析の公定法に採用されている。

自動カラムクロマトグラフ操作：今回、カラムや溶離液の種類などの条件および動作プログラムは、ダイオキシン類分析用として FMS 社から提供されたものを用いた。その概要を以下に示す。

[使用カラム]

カラム 1：多層シリカゲルカラム (Disposable multi-layer silica column)

カラム 2：塩基性アルミナカラム (Disposable basic alumina column)

カラム 3：活性炭カラム (Disposable carbon/celite column)

[溶出条件]

- 1) 各カラム及び流路を使用する溶媒で洗浄・コンディショニングした後、ヘキサン溶液 (12mL) にした試料をカラム 1 へ添加。
- 2) カラム 1 からヘキサン 90mL (10mL/min) でカラム 2 へ溶出。
- 3) カラム 2 へ 2%ジクロロメタン/ヘキサン 60mL (10mL/min) を流した後、50%ジクロロメタン/ヘキサン 120mL (10mL/min) でカラム 3 へ溶出。
- 4) カラム 3 へ 50%酢酸エチル/トルエン 4mL (10mL/min)、ヘキサン 10mL (10mL/min) を流した後、逆側からトルエン 75mL (5mL/min) を流し、これをダイオキシン画分として 100mL ナスフラスコに採取した。

B-a-vi. クリーンアップ後の試料の濃縮

濃縮操作：塩素化ダイオキシン類のときと同様、得られたダイオキシン画分をロータリーエバポレーターで乾固寸前まで減圧濃縮する。このとき乾固させないように十分に注意する。これを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。バイアルには予め 15 μ L の印を付けておく。これにダイオキシン画分を少量ずつ移しては、窒素ガスを穏やかに吹き付けて濃縮し、洗い込みも含め全てを移す。最終的に液面が、15 μ L の印のところになるように濃縮する。

定容後すぐに、各バイアルへ内部標準物質（シリンジスパイク）として ^{13}C 標識化合物 各 40pg を添加し、これを高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計の測定試料とする。

以上の血液試料の前処理操作のフローチャートを図 B-1 に示した。

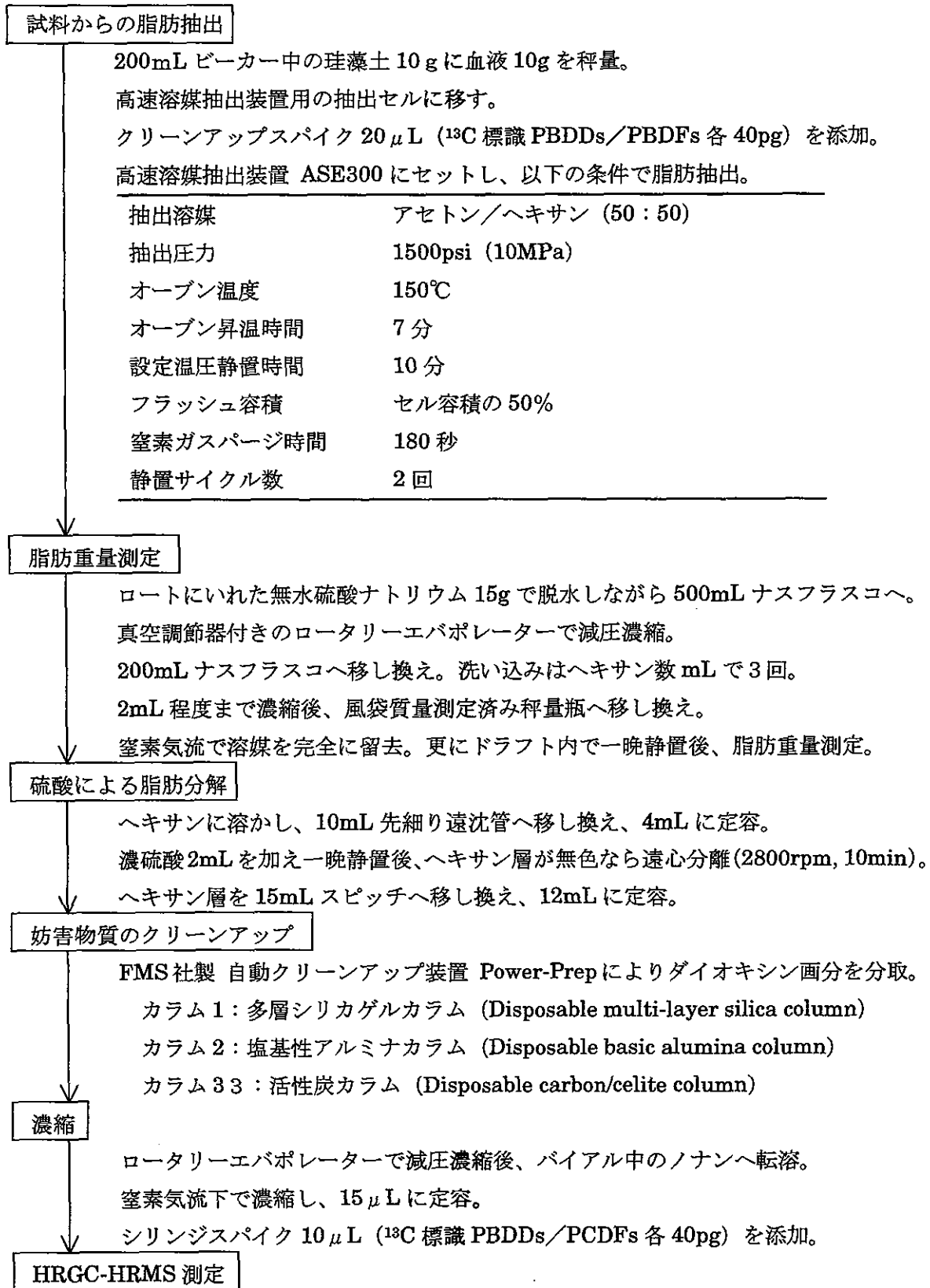


図 B-1. 血液中の臭素化ダイオキシン類分析の前処理フローチャート

B-b. 高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS) による測定

B-b-i. 分析機器

臭素化ダイオキシン類 (PBDDs/PBDFs) も塩素化ダイオキシン類 (PCDDs/PCDFs) と同様に同位体希釈法による定量を行うためには、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS) を用いる必要があるため、Micromass 社製二重収束型 HRGC-HRMS (AutoSpec Ultima NT) を使用した。ただし、臭素化ダイオキシン類では、その沸点の高さと高温での不安定性によってガスクロマトグラフによる分析を困難にする。更に、質量も非常に大きいため、これが質量分析計での測定を困難にする。臭素化ダイオキシン類は、HRGC-HRMS 装置にとって性能の限界近くでの測定であることに十分に注意を払う必要がある。

塩素化ダイオキシン類の超微量分析に有効であった大量注入装置 (SCLV Injection System、SGE 社) の使用も臭素化ダイオキシン類に試みた。しかし、この装置は最適化されたプログラムによって目的物質をコールドトラップにかけて濃縮し、それ以外を排出するシステムである。そのためプログラムが不適切であると、最悪の場合目的物質が全く分析機器へ導入されない事態も起こり得る。元々この装置は塩素化ダイオキシン類用に特化したプログラムしか用意されておらず、臭素化ダイオキシン類用のプログラムはメーカー側でもまだ開発していない。従って、今回行ったプログラムは一例にすぎず、十分に最適化されたものではない。また、実際には一連の測定ごとに検討・修正を加える必要があるため、試料によっては表 B-2 の条件とは若干異なることもある。

B-b-ii. 測定質量数 (モニターイオン)

分析対象のダイオキシン類およびそれらの内部標準物質の種類ごとに、臭素原子の天然同位体存在比から推定される最も強い 2 つのイオンの質量数 (表 B-3) を測定する。また、保持時間によって分割したグループごとに、そこで測定する質量範囲内にあるロックマス用 PFK のイオンの質量数を測定する。なお、1 つのピークに対して十分な測定点を確保するため、選択イオン検出のサンプリング周期は 1 秒以下になるよう設定する。

表 B-2. 高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計の臭素化ダイオキシン類測定条件

	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°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
	注入装置	SGE 社製 溶媒除去大量注入システム (SCLV Injection System)
	プレカラム	SGE 社製 BPX5 (0.25mm ID×6m、膜厚 0.25 μm)
	分析カラム	SGE 社製 BPX-Dioxin-I (0.15mm ID×30m)
	注入口温度	280°C
	カラムオープン昇温条件	160°C (3min hold) - <20°C/min> - 320°C (20min hold) - <-80°C/min> - 240°C (0.5min hold) - <5°C/min> - 320°C (20min hold)
	注入口キャリアガス圧力条件	469kPa (2.75min hold) - <418kPa /min> - 678kPa (27.75min hold) - <-407kPa /min> - 271kPa (0.5min hold) - <10.7kPa /min> - 442kPa (20min hold)
	追加キャリアガス (Aux#3) 圧力条件	455kPa (2.75min hold) - <414kPa /min> - 662kPa (27.75min hold) - <-407kPa /min> - 255kPa (0.5min hold) - <9.3kPa /min> - 403kPa (20min hold)
	溶媒追い出しガス (Aux#5) 圧力条件	416kPa (2.75min hold) - <-576kPa /min> - 128kPa (27.75min hold) - <76kPa /min> - 242kPa (0.5min hold) - <7.6kPa /min> - 364kPa (20min hold)
	ソルベントカットバルブ (Valve 5) 動作プログラム	0 → 2.75 → 31 (min) Off → On → Off
	コールドトラップバルブ (Valve 6) 動作プログラム	0 → 2.25 → 32.5 (min) Off → On → Off

表 B-3. PBDDs および PBDFs の質量数と臭素原子の天然同位体存在比から推定されるイオン強度比

	M ⁺	(M+2) ⁺	(M+4) ⁺	(M+6) ⁺	(M+8) ⁺	(M+10) ⁺
TeBDDs	495.6945	497.6924	499.6904	501.6883	503.6863	-
¹³ C-TeBDDs	507.7347	509.7327	511.7306	513.7286	515.7265	-
イオン強度比	17.56	68.41	100.00	65.07	15.99	-
TeBDFs	479.6996	481.6975	483.6955	485.6934	487.6914	-
¹³ C-TeBDFs	491.7398	493.7378	495.7357	497.7337	499.7316	-
イオン強度比	17.59	68.47	100.00	64.96	15.88	-
PeBDDs	573.6050	575.6029	577.6009	579.5988	581.5968	583.5948
¹³ C-PeBDDs	585.6452	587.6432	589.6412	591.6391	593.6371	595.6350
イオン強度比	10.55	51.34	100.00	97.48	47.61	9.38
PeBDFs	557.6101	559.6080	561.6060	563.6039	565.6019	567.5998
¹³ C-PeBDFs	569.6503	571.6483	573.6462	575.6442	577.6421	579.6401
イオン強度比	10.56	51.37	100.00	97.38	47.46	9.29
HxBDDs	651.5155	653.5134	655.5114	657.5094	659.5073	661.5053
¹³ C-HxBDDs	663.5558	665.5537	667.5517	669.5496	671.5476	673.5455
イオン強度比	5.41	31.63	76.99	100.00	73.13	28.59
HxBDFs	635.5206	637.5185	639.5165	641.5144	643.5124	645.5103
¹³ C-HxBDFs	647.5608	649.5588	651.5567	653.5547	655.5527	657.5506
イオン強度比	5.42	31.66	77.04	100.00	73.05	28.49
HpBDDs	729.4260	731.4240	733.4219	735.4199	737.4178	739.4158
¹³ C-HpBDDs	741.4663	743.4642	745.4622	747.4601	749.4581	751.4560
イオン強度比		21.10	61.61	100.00	97.44	57.03
HpBDFs	713.4311	715.4290	717.4270	719.4250	721.4229	723.4209
¹³ C-HpBDFs	725.4714	727.4693	729.4673	731.4652	733.4632	735.4611
イオン強度比		21.12	61.65	100.00	97.36	56.90

注) M は最低質量数のイオンを表す。

イオン強度比は、各臭素数ごとにそれぞれ最大強度を示すイオンを 100%とした値である。

B-c. 検量線の作製

B-c-i. 検量線作製用標準液の調製

検量線作製用の臭素化ダイオキシン類標準液は、

Cambridge Isotope Laboratories (CIL) 社製の

- EDF-2046-A, Polybrominated Dioxin and Furan Mixture (Unlabeled)
- EDF-4153, PBDD/PBDF Surrogate Spiking Solution
- EDF-4154, PBDD/PBDF Performance Standard Mixture

を購入し、それぞれを希釈・混合して検量線作製用の標準液を調製した(表 B-4)。これらは、分析対象物質であるダイオキシンおよびフランの 2,3,7,8-位臭素置換異性体が 7 段階の濃度系列をなしている。また全ての溶液には各異性体に対応する内部標準物質(クリーンアップスパイク; cs およびシリンジスパイク; rs)として使用する ^{13}C 標識化合物)が一定濃度で含まれている。

B-c-ii. 検量線作製用標準液の測定

この検量線作製用標準液を、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計により、実際の分析試料と同条件で測定した(表 B-5)。化合物ごとに臭素同位体組成の異なる二つの質量数を測定し、それぞれのクロマトグラムにおけるピーク面積を合計した。この値をその化合物のピーク面積とし、以降の計算に用いた。

B-c-iii. 検量線の作製(相対感度係数の計算)

臭素化ダイオキシン類のときと同様、臭素化ダイオキシン類の検量線作製用標準液を実際の分析試料と同条件で測定し、化合物ごとに検量線を作製した(図 B-2~B-6)。各分析対象物質とそれに対応する内部標準物質(クリーンアップスパイク)の、標準液における濃度比(C_{cs}/C_{rs})とクロマトグラムにおけるピーク面積の比(A_s/A_{cs})をそれぞれ x 軸と y 軸にとり、最小自乗法により一次回帰直線を求めた。その直線の傾きを相対感度係数(RRF_{cs})とし、これを用いて実際の試料中のダイオキシン類濃度を計算する。

$$Q_s = (A_s \times Q_{cs}) / (A_{cs} \times RRF_{cs})$$

Q_s : 分析試料中の各分析対象物質の量 (pg)

A_s : 分析試料中の各分析対象物質のピーク面積

Q_{cs} : 対応する内部標準物質(クリーンアップスパイク)の分析試料への添加量 (pg)

A_{cs} : 分析試料中の対応する内部標準物質(クリーンアップスパイク)のピーク面積

RRF_{cs} : 検量線から求めた内部標準物質(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

分析試料中の各分析対象物質の量 Q_s は、それぞれ対応する検量線から求めた相対感度

係数 $RRFcs$ を用いてこの式により算出した。

同じく臭素化ダイオキシン類の検量線作製用標準液を測定し、シリンジスパイク内部標準物質に対するクリーンアップスパイク内部標準物質のピーク面積比 (Acs/Ars) と、標準液における濃度比 (Ccs/Crs) とを比べ、その平均値を相対感度係数 ($RRFrs$) とした。実際の試料に添加したクリーンアップスパイクの回収率 (Rcs) は、この相対感度係数 ($RRFrs$) を用いて次式により算出した。

$$Rcs = (Acs \times Qrs) / (Ars \times RRFrs) \times 100 / Qcs$$

Rcs : 分析試料中のクリーンアップスパイクの回収率 (%)

Acs : 分析試料中の各内部標準物質 (クリーンアップスパイク) のピーク面積

Qrs : 対応する内部標準物質 (シリンジスパイク) の分析試料への添加量 (pg)

Ars : 分析試料中の対応する内部標準物質 (シリンジスパイク) のピーク面積

$RRFrs$: 検量線から求めたシリンジスパイクに対するクリーンアップスパイクの相対感度係数

Qcs : 内部標準物質 (クリーンアップスパイク) の分析試料への添加量 (pg)

表 B-4. 臭素化ダイオキシン類検量線作製用標準液 (pg/ μ L [= ppb] ノナン溶液)

	CS1/5	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6
Unlabeled Compounds							
2,3,7,8-TeBDD	0.001	0.005	0.02	0.1	0.4	2	10
2,3,7,8-TeBDF	0.01	0.05	0.2	1	4	20	100
1,2,3,7,8-PeBDD	0.005	0.025	0.1	0.5	2	10	50
1,2,3,7,8-PeBDF	0.05	0.25	1	5	20	100	500
2,3,4,7,8-PeBDF	0.05	0.25	1	5	20	100	500
1,2,3,4,7,8-HxBDD	0.025	0.125	0.5	2.5	10	50	250
1,2,3,4,7,8-HxBDF	0.04	0.2	0.8	4	16	80	400
1,2,3,6,7,8-HxBDD	0.025	0.125	0.5	2.5	10	50	250
1,2,3,7,8,9-HxBDD	0.025	0.125	0.5	2.5	10	50	250
1,2,3,4,6,7,8-HpBDF	0.1	0.5	2	10	40	200	1000
¹³ C Labeled Compounds (cs)							
2,3,7,8-TeBDD	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
2,3,7,8-TeBDF	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
1,2,3,7,8-PeBDD	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
1,2,3,7,8-PeBDF	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
2,3,4,7,8-PeBDF (rs)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
1,2,3,4,7,8-HxBDD (rs)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
1,2,3,6,7,8-HxBDD	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
1,2,3,7,8,9-HxBDD	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

注) rs : シリンジスパイク

cs : クリーンアップスパイク (シリンジスパイク以外の全ての¹³C 標識化合物)

表 B-5. 臭素化ダイオキシン類検量線作製用標準液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 ²)
		CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	傾き (RRFcs)	y切片	
2,3,7,8-TeBDF	面積比	0.19188	0.46384	1.9701	7.0729	34.639	164.01	1.3099	0.5330	0.9999
	濃度比	0.0625	0.25	1.25	5	25	125			
2,3,7,8-TeBDD	面積比	0.02721	0.07235	0.2306	0.8003	3.581	16.17	1.2878	0.1195	0.9996
	濃度比	0.00625	0.025	0.125	0.5	2.5	12.5			
1,2,3,7,8-PeBDF	面積比	0.40930	1.55018	6.6001	24.8336	111.342	524.62	0.8371	2.3417	0.9999
	濃度比	0.3125	1.25	6.25	25	125	625			
2,3,4,7,8-PeBDF	面積比	0.26558	1.14141	5.2219	22.2952	106.494	502.46	0.8029	1.5565	0.9999
	濃度比	0.3125	1.25	6.25	25	125	625			
1,2,3,7,8-PeBDD	面積比	0.12850	0.31309	1.3070	4.6620	22.192	97.74	1.5585	0.7227	0.9993
	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	1.39421	5.09684	4.1888	36.7503	146.584	505.16	0.7499	12.1743	0.9918
	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	3.53875	1.80513	10.7162	23.2657	114.855	427.05	0.5071	8.6540	0.9958
	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	2.60461	1.82103	1.3180	5.4170	31.545	157.49	0.3760	0.6605	0.9996
	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	2.56200	0	0.0980	2.036	178.11	0.1079	-7.0863	0.9651
	濃度比	0.83333	3.33333	16.6667	66.6667	333.333	1666.67			

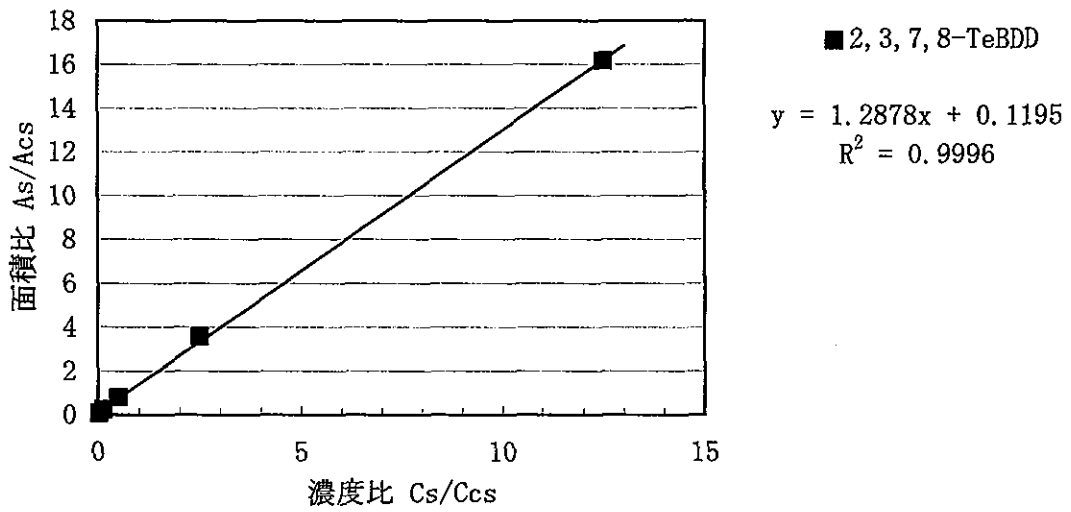
注) 面積比: 各分析対象物質のピーク面積 (As) と、対応する内部標準物質 (クリーンアップスパイク) のピーク面積 (Acs) との比。As/Acs。

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

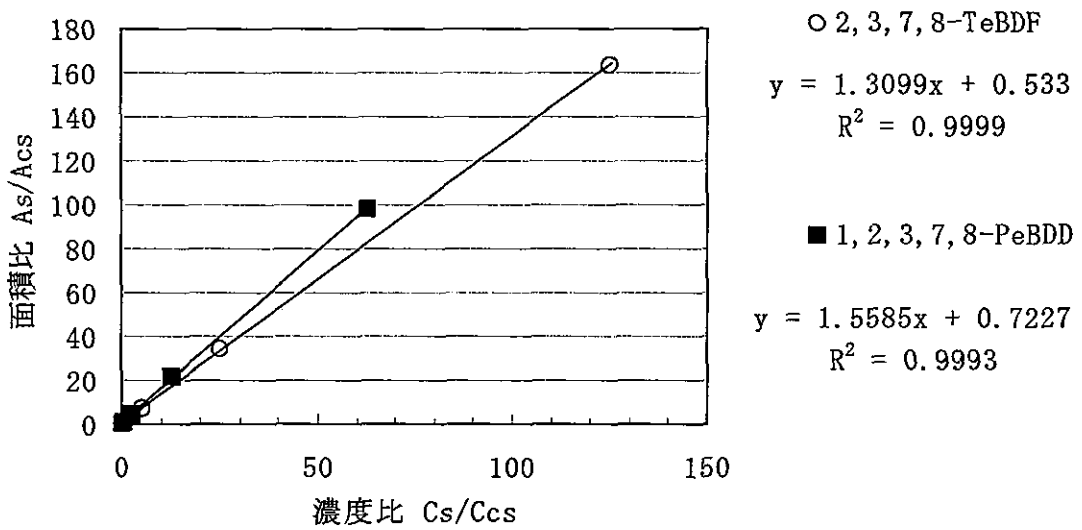
傾き(RRFcs): クリーンアップスパイクに対する分析対象物質の相対感度係数

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。

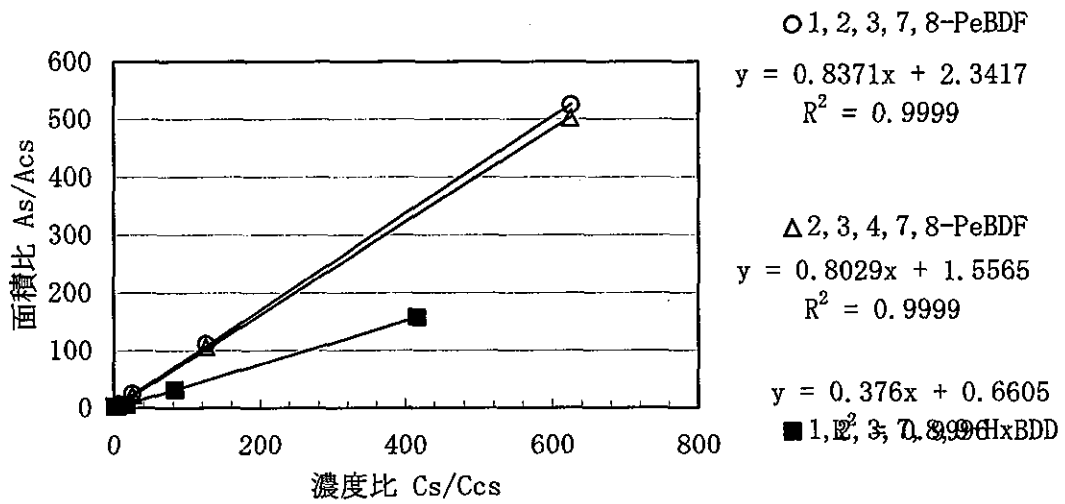
一次回帰直線: CS1/5 は検出限界以下であったため、ここでは除外した。



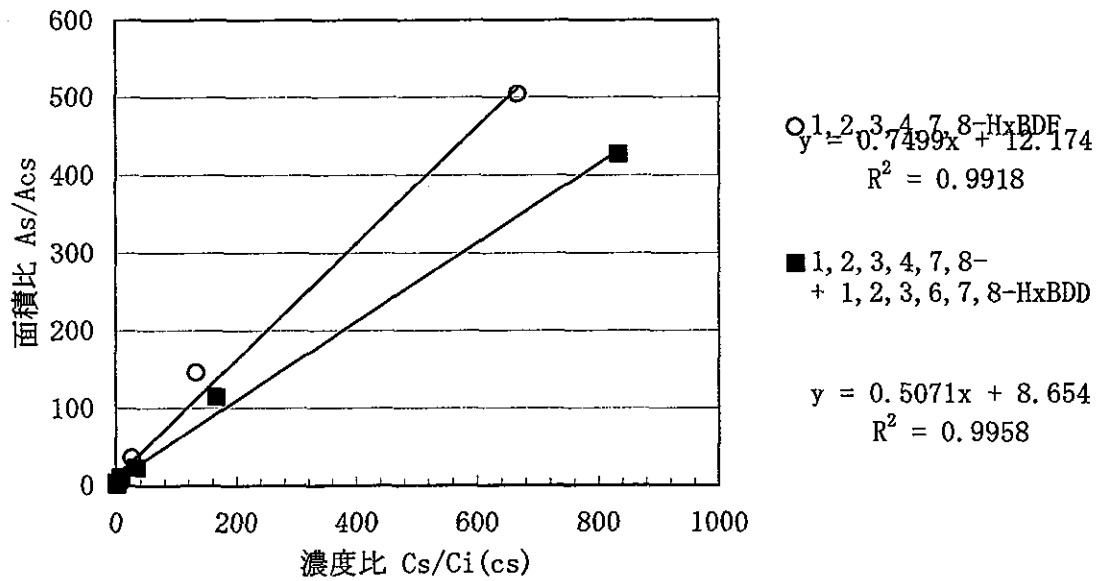
図B-2. TeBDDと内標準物質（クリーンアップスパイク）との相対感度



図B-3. TeBDF・PeBDDと内標準物質（クリーンアップスパイク）との相対感度

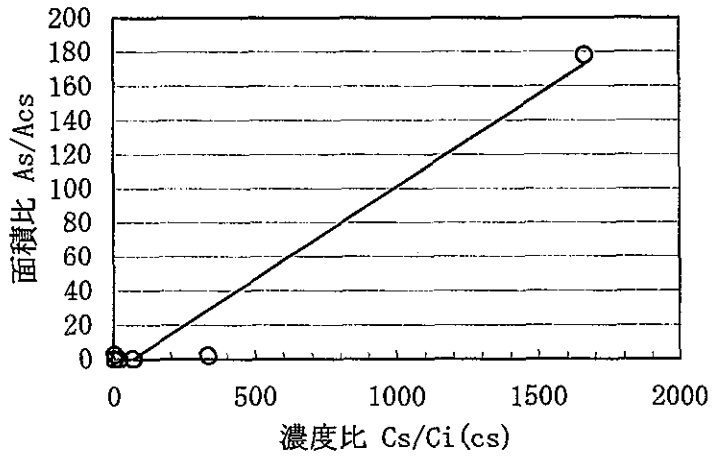


図B-4. PeBDF・HxBDDと内標準物質
 (クリーンアップスパイク)との
 相対感度



図B-5. HxBDD/Fと内標準物質 (クリーンアップスパイク)
 との相対感度

○ 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpBDF



$$y = 0.1079x - 7.0863$$
$$R^2 = 0.9651$$

図B-6. HpBDFと内標準物質（クリーンアップスパイク）との相対感度

C. 精度管理用（臭素化ダイオキシン類添加）標準動物血液を用いた分析法の評価

実際のヒト血液試料を対象とした PBDDs/Fs の測定を行う前に、構築した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 PBDDs/Fs 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検証を行うこととした。

検証方法は、動物（ウシ）血液に PBDDs/Fs の標準試薬を加えた試料について図 B-1 に示した PBDDs/Fs 分析法（以下産医研法）と、旧厚生省の血中（塩素化）ダイオキシン類分析暫定マニュアルに準拠した方法（以下既存法）とでそれぞれ分析を行い、その結果を比較することとした。

その際、既存法で血中 PCDDs/Fs 分析の実績がある測定機関がクロスチェックの相手として必要である。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。

C-a. 方法

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

PBDDs/Fs 標準試薬の混合溶液を動物（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した。当初 7 種類の濃度を調製し、同一試料を相互に分析することとしたが、一方の機関が既存法に関して試料の再調製および再測定などを行ったため、同一試料ではなく、ほぼ同等濃度の別の 5 種類の試料を産医研で測定し、比較した。

2) 臭素化ダイオキシン類の測定

本研究所においては、試料血液 5~10g を用い、産医研法により分析を行った。大塚製薬 EDC 分析センターでは、既存法と同様の方法で分析を行った。ただし既存法では、PBDDs が PCDDs よりも質量分析計で低い測定感度しかえられないことを考慮して、試料量を 120g に増やして分析を行った。

C-b. 結果および考察

試料中の PBDDs 含有量、測定値、回収率の結果を表 C-1 に示す。回収率の数値のみに着目すると、既存法が概ね 90-110% の範囲に収まっているのに対し、産医研法では、200% を超える測定結果も散見され、既存法がすぐれているという事になる。ただし、産医研法は既存法の 1/10 以下の試料量で分析を行った値である。

表 C-1. クロスチェックの結果

物質		濃度系列 1		濃度系列 2		濃度系列 3		濃度系列 4		濃度系列 5	
		既存法	産医 研法	既存法	産医 研法	既存法	産医 研法	既存 法	産医 研法	既存 法	産医 研法
2,3,7,8-TeBDF	含有量 (pg/mL)	571	250	114.29	62.5	22.86	15.6	4.57	3.91	0.91	0.977
	測定値 (pg/mL)	618	410	109.12	91	25.09	22	4.67	4.9	0.98	1.7
	回収率 (%)	108	164	95	146	110	141	102	125	94	174
2,3,7,8-TeBDD	含有量 (pg/mL)	57.14	25	11.43	6.25	2.29	1.56	0.46	0.391	0.09	0.0977
	測定値 (pg/mL)	64.32	73	11.09	13	2.41	3.8	0.45	0.77	0.09	0.22
	回収率 (%)	113	292	97	208	106	244	98	197	99	225
1,2,3,7,8-PeBDF	含有量 (pg/mL)	2857	1250	571	313	114	78.1	22.86	19.5	4.57	4.88
	測定値 (pg/mL)	2373	1800	556	450	120	110	22.96	26	4.68	7.9
	回収率 (%)	83	144	97	144	105	141	100	133	98	162
2,3,4,7,8-PeBDF	含有量 (pg/mL)	2857	1250	571	313	114	78.1	22.86	19.5	4.57	4.88
	測定値 (pg/mL)	2412	1700	541	420	120	100	23.01	24	4.65	7.4
	回収率 (%)	84	136	95	134	105	128	101	123	98	152
1,2,3,7,8-PeBDD	含有量 (pg/mL)	285.7	125	57.14	31.25	11.43	7.81	2.29	1.95	0.46	0.488
	測定値 (pg/mL)	287.5	240	55.78	55	11.97	12	2.17	2.6	0.45	0.94
	回収率 (%)	101	192	98	176	105	154	95	133	102	193
1,2,3,4,7,8-HxBDF	含有量 (pg/mL)	2286	1000	457.14	250	91.43	62.5	18.29	15.6	3.66	3.91
	測定値 (pg/mL)	2535	2900	381.72	470	94.87	200	18.61	32	3.93	13
	回収率 (%)	111	290	84	188	104	320	102	205	93	332
1,2,3,4,7,8- + 1,2,3,6,7,8-HxBDD	含有量 (pg/mL)	2857	1250	571.43	313	114.29	78.1	22.86	19.5	4.57	4.88
	測定値 (pg/mL)	2875	2200	505.08	440	118.90	190	23.98	31	4.98	13
	回収率 (%)	101	176	88	141	104	243	105	159	92	266
1,2,3,7,8,9-HxBDD	含有量 (pg/mL)	1429	625	285.71	156	57.14	39.1	11.43	9.77	2.29	2.44
	測定値 (pg/mL)	1466	950	263.91	210	59.60	67	11.88	13	2.48	5
	回収率 (%)	103	152	92	135	104	171	104	133	92	205
1,2,3,4,6,7,8-HpBDF	含有量 (pg/mL)	5714.29	2500	1142.86	625	228.57	156	45.71	39.1	9.14	9.77
	測定値 (pg/mL)	8874.09	440	858.00	130	177.93	25	27.68	4.2	5.18	0.38
	回収率 (%)	155	18	75	21	78	16	61	11	177	4

産医研法で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4~21%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、全てにおいて回収率120~300%と、元の含有量より多く見積もられた結果となった。

これらの結果は、HRGC-HRMS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。

C-c. HRGC-HRMS 測定時における問題点と対策

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-HRMS への試料の注入から順に検証してみた。

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) 質量分析計に関して

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