

3.3.2 アルカリ分解・溶媒抽出

細砕し均一化した試料100gを500mL容のトールビーカーに量り採り、これに2mol/L水酸化カリウム水溶液を300mL加え、室温で12時間程度放置する。このアルカリ分解液（注20）を1Lの分液漏斗に移した後、メタノール150mL、ヘキサン100mLを加え10分間振とう抽出する。静置後ヘキサン層を分取し、水層にヘキサン100mLを加え同様の操作を2回行う。あるいは試料に1mol/L水酸化カリウム/エタノール溶液300mLを加え、アルカリ分解を行うこともできる。この場合は、室温でマグネチックスターラーにて穏やかに2時間程度攪拌する（注21）。アルカリ分解液を1Lの分液漏斗に移した後、ヘキサン洗浄水100mL、ヘキサン100mLを加え10分間振とう抽出する。静置後ヘキサン層を分取し、水層にヘキサン100mLを加え同様の操作を2回行う。

ヘキサン抽出液を合わせ、2%塩化ナトリウム溶液200mLを加えて回転するように緩やかに揺り動かし、静置後水層を取り除き、同様の操作を繰り返す。

3.3.3 ソックスレー抽出

細砕均一化した試料（注22）100gを円筒ろ紙（注23）に入れ、ソックスレー抽出管に装着する。下部にアセトン-ヘキサン（1:1）混液又はアセトン-トルエン（1:1）混液を入れたフラスコ上部にソックスレー抽出管を装置し、冷却管をつなぎ16時間以上のソックスレー抽出を行う。試料容量が大きくなる場合には、ソックスレー抽出管数本に試料を分割して抽出を行う。この抽出液を5mL程度に濃縮する。なお、肉類・魚類の場合は、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮器で有機溶媒を留去し、脂肪を得る。次に、硫酸処理のクリーンアップを行う場合は、有機溶媒を留去し、ヘキサン約100mLに溶解させる。

3.3.4 脂肪抽出・アルカリ分解

1) 脂肪抽出（注24）

牛乳：牛乳100g（粉乳及び濃縮乳の場合はヘキサン洗浄水で牛乳程度に希釈する）を500mLの分液漏斗にとり、シュウ酸ナトリウム又はシュウ酸カリウム1gを加え、溶解後、エタノール100mLを加え、よく混合する。次いでジエチルエーテル50mLを加え、1分間激しく振とうする。これに石油エーテル50mLをさらに加え、1分間激しく振とうする。有機溶媒層を分離し、水層をさらにジエチルエーテル-石油エーテル（1:1）混液50mLで2回抽出する。全抽出液を、あらかじめ2%塩化ナトリウム溶液500mLを入れた1Lの分液漏斗に移し、回転させるようにゆるやかに揺り動かしたのち、しばらく放置する。水層を除き、有機溶媒層はさらにヘキサン洗浄水100mLで2回洗い、無水硫酸ナトリウムで脱水したのち、減圧濃縮により有機溶媒を留去し、脂肪を得る。

肉類・魚類：細切した試料50gを乳鉢に取り、約4~10倍量の無水硫酸ナトリウムを加えよく攪拌しながら脱水、粉末状にする。これを1Lの分液漏斗に入れ、ジエチルエーテル-ヘキサン（1:2）混液150mLで3回、10分間振とう抽出する。抽出液をガラス繊維ろ紙でろ過した後、ヘキサン洗浄水100mLで2回洗浄する。次に抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮器で有機溶媒を留去し、脂肪を得る。

2) アルカリ分解

脂肪（約2g）を100mLのビーカーに取り、1mol/L水酸化カリウム/エタノール溶液40mL

を加え、室温でマグネチックスターラーにて緩やかに 2時間程度攪拌する (注21)。
 このアルカリ分解液を、200mLの分液漏斗に移し、ヘキサン洗浄水40mLとヘキサン35mL
 を加え、10分間振とうする。ヘキサン層を分離し、水層にさらにヘキサン35mLを加
 え同様の操作を2回行う。ヘキサン層を合わせヘキサン洗浄水100mLで3回洗浄する。

3.4 クリーンアップ (注25)

クリーンアップは硫酸処理、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、硝酸銀シリカゲル
 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、アルミナカラム
 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、DMSO分配処理操作、活
 性炭カラムHPLCの中から選択して、組み合わせで行う。

代表的なクリーンアップの組合せ例としては、①試料抽出液を硫酸処理した後、シリカ
 ゲルカラム若しくは硝酸銀シリカゲルカラム処理を行う、又は②試料抽出液を多層シリカ
 ゲルカラム処理した後、それぞれアルミナカラムによりPCDDs、PCDFs及びノンオルトPCBs
 画分とモノオルトPCBs画分に分離する方法がある。PCDDs、PCDFs及びノンオルトPCBs画分を
 さらにクリーンアップする必要がある時は、活性炭シリカゲルカラム処理を行う。図2-1参
 照。

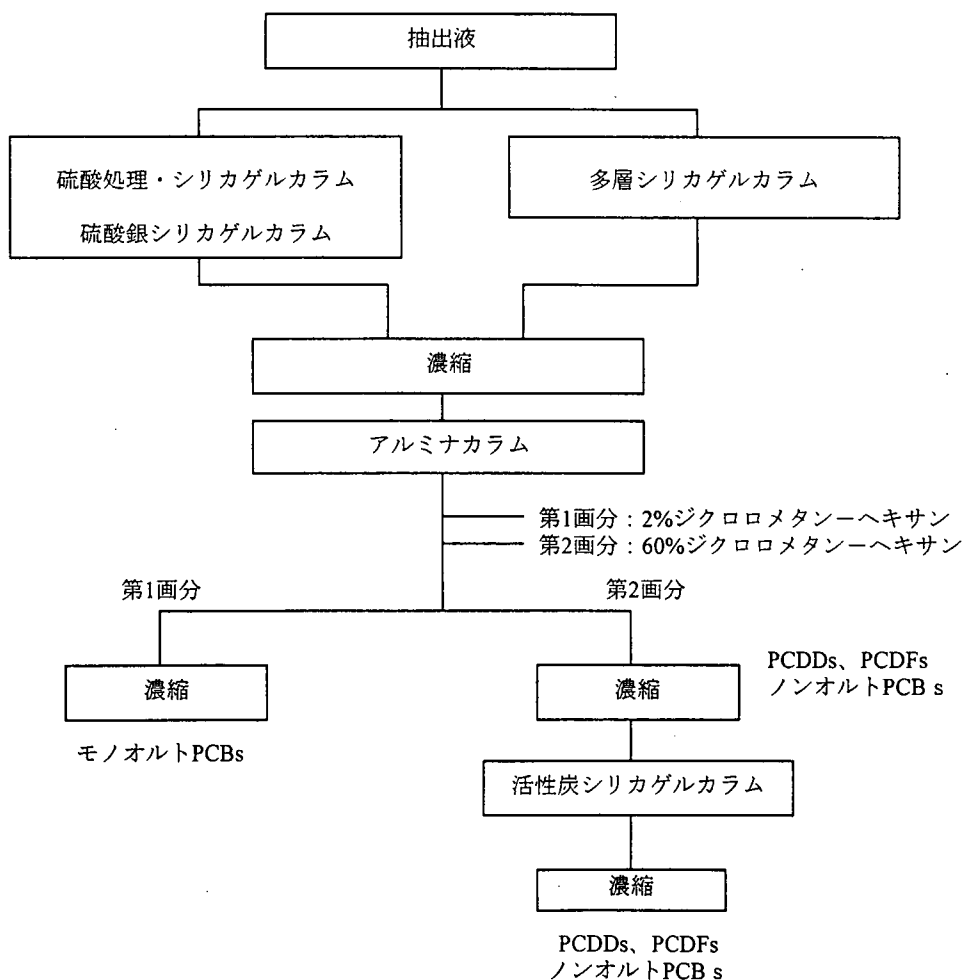


図2-1 代表的なクリーンアップの組合せ例

3.4.1 硫酸処理→シリカゲルカラムクロマトグラフィー又は硝酸銀シリカゲルカラムクロマトグラフィー (注26)→アルミナ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の組合せでのクリーンアップ法

3.4.1.1 硫酸処理

最終抽出液の入った分液漏斗に濃硫酸を適量加え、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 (注27)。ヘキサン層をヘキサン洗浄水50mLで3~4回洗浄し、ほぼ中性になったら、無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮器で濃縮した後、約5mLのヘキサンの溶解する。

3.4.1.2 シリカゲルカラムクロマトグラフィー (注28)

内径10mm、長さ300mmのカラムに活性化したシリカゲル3gをヘキサンで湿式充てんし、その上に無水硫酸ナトリウムを約10mm積層する。ヘキサンで充てん物を十分洗浄した後、ヘキサン液面が充てん物上部にくるようにする。これに、3.4.1.1で調製した試料溶液をパスツールピペット等で静かに移し入れ、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の上端まで下げ、ヘキサン150mLで滴下速度約2.5mL/min (毎秒1滴程度)の速度でゆっくり流し、溶出する。溶出液は約5mLに濃縮する。

3.4.1.3 硝酸銀シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径10mm、長さ300mmのカラムにシリカゲル1g及び10%硝酸銀シリカゲル1gを順次充てんし、その上に無水硫酸ナトリウムを約10mm積層する。ヘキサンで充てん物を十分洗浄した後、ヘキサン液面が充てん物上部にくるようにする。これに3.4.1.1で調製した試料溶液を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、ヘキサン200mLで滴下速度2.5mL/min (毎秒1滴程度)の速度でゆっくり流し、ダイオキシン類を溶出する。溶出液は濃縮器で約5mLに濃縮する。

3.4.1.4 アルミナカラムクロマトグラフィー (注29)

内径15mm、長さ300mmのカラムにアルミナ15gを、ヘキサンで湿式充てんし、その上に無水硫酸ナトリウムを約10mm積層する。ヘキサンで充てん物を十分洗浄した後、ヘキサン液面が充てん物上部にくるようにする。これに3.4.1.2又は3.4.1.3で調製した試料溶液を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、ヘキサン150mLで洗浄し、液面を無水硫酸ナトリウム層の上端まで下げ、2% (v/v) ジクロロメタン含有ヘキサン200mLを滴下速度約2.5mL/min (毎秒1滴程度)で流し、モノオルトPCBsを溶出する (モノオルトPCBs画分) (注30)。さらに60% (v/v) ジクロロメタン含有ヘキサン200mLを、滴下速度約2.5mL/min (毎秒1滴程度)でゆっくり流し、PCDDs、PCDFsとノンオルトPCBs画分を溶出する (PCDDs、PCDFs及びノンオルトPCBs画分)。

モノオルトPCBs画分は濃縮器で約5mLに濃縮した後、窒素気流下で極少量の溶媒が残る程度まで濃縮し、シリンジスパイク溶液を一定量加え、GC-MS試料溶液とする (3.5参照)。PCDDs、PCDFs及びノンオルトPCBs画分は濃縮器で約5mLに濃縮した後、窒素気流下で極少量の溶媒が残る程度まで濃縮し、少量のヘキサンで溶解し、次に活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行う。

3.4.1.5 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径10mm、長さ300mmのカラムに無水硫酸ナトリウム10mm、活性炭シリカゲル(注31)0.5g、無水硫酸ナトリウム10mmを積層する。ヘキサンで充てん物を十分洗浄した後、ヘキサン液面が充てん物上部にくるようにする。これに 3.4.1.4 で得られたPCDDs、PCDFs及びノンオルトPCBs画分をパスツールピペット等でカラムに静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、15分間放置した後、5% (v/v) ジクロロメタン含有ヘキサン100mLを滴下速度約2.5mL/min (毎秒1滴程度) の速度でゆっくりカラムを洗浄した後、トルエン250mLを滴下速度約2.5mL/min (毎秒1滴程度) の速度でゆっくり流す。この画分にはPCDDs、PCDFs及びノンオルトPCBsが含まれる。溶出液は濃縮器で約5mLに濃縮した後、窒素気流下で極少量の溶媒が残る程度まで濃縮し、シリンジスパイク溶液を一定量加え、GC-MS 試料溶液とする (3.5 参照)。

3.4.2 多層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→活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーの組合せでのクリーンアップ法 (注32)

3.4.2.1 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー

図2-2のように内径15mm、長さ300mmのカラムにシリカゲル0.9g、2%水酸化カリウムシリカゲル3g、シリカゲル0.9g、44%硫酸シリカゲル4.5g、22%硫酸シリカゲル6g、シリカゲル0.9g、10%硝酸銀シリカゲル3g及び無水硫酸ナトリウム6gを順次充てんし、多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管を作製する (注33)。

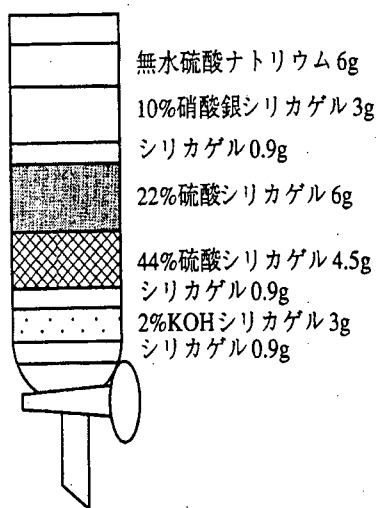


図2-2 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管模式図

次に、ヘキサン50mLを流して充てん物を十分洗浄した後、ヘキサン液面が充てん物上部にくるようにする。このカラムに前記アルカリ分解等により得られた試料抽出液(注34)を無水硫酸ナトリウムで脱水・濃縮した後、約5mLのヘキサンに溶解した抽出液をカラムに静かに移し入れ、液面を無水硫酸ナトリウム層の上端まで下げる。ヘキサン5mLで濃縮器を洗浄し、洗液はカラムクロマトグラフ管内壁を洗いながら入れる。この洗浄操作をもう一度繰り返す。ヘキサン3mLをカラムクロマトグラフ管に流入した後、ヘキサン120mLを滴下速度約2.5mL/min(毎秒1滴程度)の速度で流し、ダイオキシン類を溶出する(注35)。溶出液を濃縮器で約5mLに濃縮する。

次に、3.4.1.4 アルミナカラムクロマトグラフィー、3.4.1.5 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーを順次行う(注36)。

3.4.3 その他のクリーンアップ法

その他のクリーンアップ法として、ダイオキシン類の分画に活性炭カラム高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる方法がある(注37)。

3.4.3.1 ジメチルスルホキシド(DMSO)分配処理操作(注38)

減圧濃縮した試料溶液を、300mLの分液漏斗に少量のヘキサンで洗い込みながら移す。これに、ヘキサン飽和のDMSO25mLを加え、振とう抽出する。静置後DMSO層を分取し、ヘキサン飽和のDMSO25mLを加え同様の操作を3回行う。DMSO抽出液を合わせ300mLの分析漏斗に移した後、ヘキサン75mLとヘキサン洗浄水100mLを加え振とう抽出する。静置後ヘキサン層を分取し、DMSO層にヘキサン75mLを加え同様の操作を2回行う。ヘキサン層を合わせ、ヘキサン洗浄水25mLで数回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮器で濃縮する。

3.4.3.2 活性炭カラム高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

HPLCに活性炭カラム(例、内径4.6mm、長さ100mm)(注39)を装着し、あらかじめトルエンで十分にカラムを洗浄した後、十分量のヘキサンで置換する。調製した試料溶液をHPLCカラムに注入し、移動相としてヘキサン8mLを流し、次いで50%(v/v)ジクロロメタン含有ヘキサン40mLを流して、モノオルトPCBs画分を得、次いで30%(v/v)トルエン含有ヘキサン40mLを流して、ノンオルトPCBs画分を得る。次いでカラムオープンで50℃に加熱し、移動相の流れの向きを逆にして(reverse flow)、トルエン30mLで溶出する。この画分(50℃ reverseトルエン画分)に、PCDDs及びPCDFsが含まれる。なお、それぞれの画分について更にクリーンアップする必要がある場合は、アルミナカラム処理を行う。

3.5 試料溶液の調製と内標準物質の添加(シリンジスパイク)

クリーンアップ操作の終了後に、ダイオキシン類が溶出する画分を濃縮器で約1mLに濃縮する。次に、濃縮液を濃縮用試験管に移し、少量のヘキサンで洗い込み、窒素気流下で極少量の溶媒が残る程度まで濃縮した後(注40)、一定量のシリンジスパイク溶液を加え、GC-MS試料溶液とする(注41)。

4. 同定及び定量

ダイオキシン類の同定と定量はキャピラリーカラムを用いるガスクロマトグラフ (GC) と二重収束型質量分析計 (MS) を用いるガスクロマトグラフィーマス分析法 (GC-MS法) によって行う。

4.1 GC-MSの分析条件の設定

4.1.1 ガスクロマトグラフ (GC) の操作条件

分析対象物質のピークが他の異性体のものと良好に分離し、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等の条件を設定する。以下にGCの設定条件の例を示す。

(1) 例1

- 1) 分析対象物質 : TCDDs~OCDD、TCDFs~OCDFの同族体ごとの合計及び一部の2, 3, 7, 8-位塩素置換異性体

分析カラム : DB-17 ϕ 0.25mm×60m (膜厚0.25 μ m)

カラム温度 : 130°C (2分保持) → (30°C/min昇温) → 200°C → (3°C/min昇温) → 280°C (30分保持)

注入口温度 : 260°C

注入方法 : スプリットレス

- 2) 分析対象物質 : TCDDs、PeCDDs、PeCDFs及びHxCDFsの一部の2, 3, 7, 8-位塩素置換異性体

分析カラム : DB-5ms ϕ 0.32mm×60m (膜厚0.25 μ m)

カラム温度 : 130°C (2分保持) → (30°C/min昇温) → 200°C → (5°C/min昇温) → 220°C (16分保持) → (6°C/min昇温) → 300°C (8分保持)

注入口温度 : 260°C

注入方法 : スプリットレス

- 3) 分析対象物質 : ノンオルトPCBs及びモノオルトPCBs

分析カラム : HT-8 ϕ 0.22mm×50m (膜厚0.25 μ m)

カラム温度 : 130°C (1分保持) → (15°C/min昇温) → 220°C (5分保持) → (2°C/min昇温) → 300°C (1分保持)

注入口温度 : 260°C

注入方法 : スプリットレス

(2) 例2

- 1) 分析対象物質 : TCDDs~HxCDDs、TCDFs~HxCDFsの同族体ごとの合計及び主な2, 3, 7, 8-位塩素置換異性体

プレカラム : BPX5 ϕ 0.25mm×6m (膜厚0.25 μ m)

分析カラム : SP-2331 ϕ 0.32mm×60m (膜厚0.2 μ m)

カラム温度 : 160°C (2分保持) → (20°C/min昇温) → 250°C (11分保持) → (55°C/min昇温) → 210°C (2.77分保持) → (2°C/min昇温) → 250°C (24分保持)

注入口温度 : 280°C

注入方法 : ソルベントカット大量注入 (注42)

- 2) 分析対象物質 : HpCDDs、OCDD、HxCDFs、HpCDFs、OCDFの同族体ごとの合計と一部の2, 3, 7, 8-位塩素置換異性体、及びノンオルトPCBs

プレカラム : BPX5 φ0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)

分析カラム : DB-17 φ0.25mm×30m (膜厚0.25 μm)

カラム温度 : 160°C (2分保持) → (25°C/min昇温) → 300°C (5.4分保持) → (70°C/min昇温) → 230°C (2.5分保持) → (3°C/min昇温) → 300°C (10分保持)

注入口温度 : 280°C

注入方法 : ソルベントカット大量注入

- 3) 分析対象物質 : モノオルトPCBs

プレカラム : BPX5 φ0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)

分析カラム : HT8-PCB φ0.25mm×60m

カラム温度 : 160°C (2.5分保持) → (20°C/min昇温) → 300°C (5分保持) → (70°C/min昇温) → 160°C (1分保持) → (2°C/min昇温) → 280°C (5分保持)

注入口温度 : 280°C

注入方法 : ソルベントカット大量注入

(3) 例3

- 1) 分析対象物質 : TCDDs、PeCDDs、HxCDDs、TCDFs、PeCDFsの同族体ごとの合計及び主な2, 3, 7, 8-位塩素置換異性体

プレカラム : BPX-5 φ0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)

分析カラム : Rtx-2330 φ0.18mm×40m (膜厚0.10 μm)

カラム温度 : 160°C (3分保持) → (20°C/min昇温) → 260°C (12分保持) → (60°C/min昇温) → 170°C (0.5分保持) → (5°C/min昇温) → 260°C (22分保持)

注入口温度 : 300°C

注入方法 : ソルベントカット大量注入

- 2) 分析対象物質 : HpCDDs、OCDD、HxCDFs、HpCDFs、OCDFの同族体ごとの合計と主な2, 3, 7, 8-位塩素置換異性体、及びノンオルトPCBs

プレカラム : BPX-5 φ0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)

分析カラム : BPX-5 φ0.15mm×30m (膜厚0.15 μm)

カラム温度 : 160°C (3分保持) → (20°C/min昇温) → 300°C (8分保持) → (60°C/min昇温) → 210°C (0.5分保持) → (3°C/min昇温) → 300°C (1分保持)

注入口温度 : 300°C

注入方法 : ソルベントカット大量注入

- 3) 分析対象物質 : モノオルトPCBs

分析カラム : HT8-PCB φ0.25mm×60m

カラム温度 : 130°C (1分保持) → (20°C/min昇温) → 220°C → (3°C/min昇温) → 280°C → (20°C/min昇温) → 300°C (3.5分保持)

注入口温度 : 280°C

注入方法 : スプリットレス

4.1.2 質量分析計 (MS)の操作条件

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モニタリング (SIM)による分析を行うために、分解能、電子エネルギー、イオン化電流、イオン源温度、モニターイオン (分析対象物質は各塩素化物毎に2つ以上のモニターイオン、内標準物質は1つ以上のモニターイオン及びPFKのモニターイオン) 及びSIMの周期 (注43)を設定する。

以下に MS の設定条件の例を示す。

分解能 ($M/\Delta M$, 10%谷) : 10,000 以上

電子エネルギー : 25~70eV

イオン化電流 : 500~600 μ A

イオン源温度 : 260~290°C

質量数 : 表2-4及び表2-5参照

表 2-4 PCDDs及びPCDFsの設定質量数(モニターイオン)の例

| | | M ⁺ | (M+2) ⁺ | (M+4) ⁺ |
|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| 分析対象物質 | TCDDs | 319.8965 | 321.8936 | |
| | PeCDDs | 353.8576 | 355.8546 | 357.8517 * |
| | HxCDDs | 387.8186 | 389.8156 | 391.8127 * |
| | HpCDDs | | 423.7767 | 425.7737 |
| | OCDD | | 457.7377 | 459.7348 |
| | TCDFs | 303.9016 | 305.8987 | |
| | PeCDFs | | 339.8597 | 341.8568 |
| | HxCDFs | | 373.8207 | 375.8178 |
| | HpCDFs | | 407.7818 | 409.7788 |
| | OCDF | 439.7457 | 441.7428 | 443.7398 |
| 内標準物質 | ¹³ C ₁₂ -TCDDs | 331.9368 | 333.9339 | |
| | ¹³ C ₁₂ -PeCDDs | 365.8978 | 367.8949 | 369.8919 |
| | ¹³ C ₁₂ -HxCDDs | 399.8589 | 401.8559 | 403.8530 |
| | ¹³ C ₁₂ -HpCDDs | | 435.8169 | 437.8140 |
| | ¹³ C ₁₂ -OCDD | | 469.7780 | 471.7750 |
| | ¹³ C ₁₂ -TCDFs | 315.9419 | 317.9389 | |
| | ¹³ C ₁₂ -PeCDFs | | 351.9000 | 353.8970 |
| | ¹³ C ₁₂ -HxCDFs | | 385.8610 | 387.8580 |
| | ¹³ C ₁₂ -HpCDFs | | 419.8220 | 421.8191 |
| | ¹³ C ₁₂ -OCDF | 451.7860 | 453.7830 | 455.7801 |
| ³⁷ Cl ₄ -TCDDs | 327.8847 | | | |
| 質量校正用標準物質 (PFK) | | 330.9792 (4,5-塩素化物定量用) | | |
| | | 380.9760 (5,6-塩素化物定量用) | | |
| | | 430.9729 (7,8-塩素化物定量用) | | |
| | | 442.9729 (7,8-塩素化物定量用) | | |

* PCBsの妨害を受ける可能性あり。
 (一例として使用するカラムにより、PeCDDsとHxCBsの分離が、十分行われているかを確認する必要がある。)

表 2-5 コプラナーPCBs の設定質量数(モニターイオン)の例

| | | M ⁺ | (M+2) ⁺ | (M+4) ⁺ |
|-----------------|--------------------------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| 分析対象物質 | TCBs | 289.9224 | 291.9194 | 293.9165 |
| | PeCBs | 323.8834 | 325.8804 | 327.8775 |
| | HxCBs | 357.8444 | 359.8415 | 361.8385 |
| | HpCBs | 391.8054 | 393.8025 | 395.7995 |
| 内標準物質 | ¹³ C ₁₂ -TCBs | 301.9626 | 303.9597 | 305.9567 |
| | ¹³ C ₁₂ -PeCBs | 335.9237 | 337.9207 | 339.9178 |
| | ¹³ C ₁₂ -HxCBs | 369.8847 | 371.8817 | 373.8788 |
| | ¹³ C ₁₂ -HpCBs | 403.8457 | 405.8428 | 407.8398 |
| 質量校正用標準物質 (PFK) | | 304.9824 | | |
| | | 330.9792 | | |
| | | 380.9760 | | |

4.2 GC-MSの調整

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。

4.2.1 ガスクロマトグラフ (GC) の調整

応答が安定していること、各塩素置換体の保持時間が適切な範囲にあり、かつ、ピークが十分に分離されていること等を確認する。スプリットレスの時間、パージガス流量等を適切な値に調整する。

キャピラリーカラムの劣化により、分析対象物質と他物質との分離が十分でない場合には、新品と交換する。ただし、キャピラリーカラムを、300mm程度切断（両端又は片端）することにより、分析対象物質と他物質との分離に問題がなければ交換しなくてもよい。

4.2.2 質量分析計 (MS) の調整

MS にPFK を導入し、MSの質量校正用プログラム等により、測定質量範囲内のマスパターン及び分解能 (M/ΔM 10,000 以上、10%谷)等の校正を行う（注44）とともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。

4.2.3 GC-MSの感度確認

各分析対象物質を注入しS/N比 (S/N=3) から最小検出量を求める。最小検出量から計算した検出下限が、目標検出下限を越えないことを確認する（第3節 3.2.4 参照）（注45）。

4.3 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及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）及び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、0.1ng/mL～100ng/mL の濃度範囲で5段階程度の標準溶液を調製する（注46）。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及びシリンジスパイクに用いたものと同じ内標準物質を、ダイオキシン類が2～10ng/mL となるように添加しておく。標準溶液を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。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（注47）。各分析対象物質の対応する内標準物質（クリーンアップスパイク）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内標準物質（クリーンアップスパイク）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。

$$\text{RRF} = \frac{\text{Cis}}{\text{Cs}} \times \frac{\text{As}}{\text{Ais}}$$

Cis:標準溶液中の内標準物質（クリーンアップスパイク）の濃度

Cs :標準溶液中の分析対象物質の濃度

As :標準溶液中の分析対象物質のピーク面積

Ais:標準溶液中の内標準物質（クリーンアップスパイク）のピーク面積

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10%程度となることを目標とし、20%以内でなければならない。

また、検量線データより、最小二乗法で一次回帰直線を求め、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。

同様にして、内標準物質（クリーンアップスパイク）の内標準物質（シリンジスパイク）に対する相対感度係数（RRF_{ss}）を次式により算出する。

$$RRF_{ss} = \frac{C_{ss}}{C_{is}} \times \frac{A_{is}}{A_{ss}}$$

C_{ss}:標準溶液中の内標準物質（シリンジスパイク）の濃度

C_{is}:標準溶液中の内標準物質（クリーンアップスパイク）の濃度

A_{is}:標準溶液中の内標準物質（クリーンアップスパイク）のピーク面積

A_{ss}:標準溶液中の内標準物質（シリンジスパイク）のピーク面積

4.4 試料の分析

4.4.1 検量線の確認

測定開始時には、1濃度以上の検量線用標準溶液を測定して、各分析対象物質とそれに対応する内標準物質（クリーンアップスパイク）との相対感度係数（RRF）及び内標準物質（クリーンアップスパイク）とそれに対応する内標準物質（シリンジスパイク）との相対感度係数（RRF_{ss}）を求め（4.3参照）、検量線作成時のRRF及びRRF_{ss}と比較し、RRFの変動は10%以内、RRF_{ss}の変動は20%以内の変動であることを確認する。これを超えてRRF及びRRF_{ss}が変動する場合はその原因を取り除き、再度検量線用溶液を測定する。さらに保持時間については、比較的短い間に変動（通常、一日に保持時間が±1%以上、内標準物質との相対保持比が±0.5%以上）する場合には、その原因を取り除き、再度検量線用溶液を測定する。

なお、測定開始後は想定される試料溶液中の濃度と同程度の濃度の検量線用標準液を定期的に測定し、上記と同様にRRFと保持時間を確認する。RRFと保持時間が上記の範囲を超えて変動した時は、その原因を取り除き、それ以前の試料の再分析を行う。

4.4.2 試料の同定と定量（注48）

操作ブランク及び試料溶液をGC-MSに注入して分析を行う。4.1.2で設定した各分析対象物質のクロマトグラムを記録する。測定終了後、個々の試料ごとに、試料溶液中の内標準物質（シリンジスパイク）のピーク面積が標準液の内標準物質（シリンジスパイク）のピーク面積

ク面積の70%以上であることを確認する。この範囲からはずれた場合は、原因を調査し、その原因を取り除いて再度測定する。次に、二つのモニターイオンのピーク面積の比を計算する(注47)。個々の試料ごとにロックマスのモニターチャンネルの確認を行う(注49)。各分析対象物質とそれに対応する内標準物質(クリーンアップスパイク)のピーク面積の比を計算し、あらかじめ4.3で求めた対応する相対感度係数(RRF)を用いて、次式により試料溶液全量中の各分析対象物質の量を算出する(注50)。

$$Q_s = \frac{A_s}{A_i} \times \frac{Q_i}{RRF}$$

Q_s: 試料溶液全量中の各分析対象物質の量 (ng)

A_s: 試料溶液中の各分析対象物質のピーク面積

A_i: 試料溶液中の内標準物質(クリーンアップスパイク)のピーク面積

Q_i: 内標準物質(クリーンアップスパイク)の添加量 (ng)

RRF: 検量線作成時に求めた相対感度係数 (クリーンアップスパイク)

(4.3 参照)

4.4.3 回収率の算出

内標準物質(クリーンアップスパイク)のピーク面積と内標準物質(シリンジスパイク)のピーク面積の比、及び対応する相対感度係数(RRF_{ss}、4.3参照)を用いて、次式により、回収率を計算し、抽出及びクリーンアップの回収率を確認する(注51)。

$$R_c = \frac{A_i}{A_i(ss)} \times \frac{Q_i(ss)}{RRF_{ss}} \times \frac{100}{Q_i}$$

R_c: 抽出及びクリーンアップの回収率 (%)

A_i: 試料溶液中の内標準物質(クリーンアップスパイク)のピーク面積

A_{i(ss)}: 試料溶液中の内標準物質(シリンジスパイク)のピーク面積

Q_{i(ss)}: 内標準物質(シリンジスパイク)の添加量 (ng)

RRF_{ss}: 検量線作成時に求めた内標準物質(クリーンアップスパイク)の内標準物質(シリンジスパイク)に対する相対感度係数(4.3参照)

Q_i: 内標準物質(クリーンアップスパイク)の添加量 (ng)

5. 数値の取扱い

5.1 濃度の表示

5.1.1 濃度の算出

4.4.2で得られた結果から、次式を用いて食品中のダイオキシン類の濃度を算出する(注52)。濃度は原則として3けた目を四捨五入し、有効数字2けたで表す。

$$C = \frac{(Q_s - Q_t) \times 1,000}{W}$$

C : 分析対象物質の濃度 (pg/g)

Q_s : 試料溶液全量中の各分析対象物質の量 (ng)

Q_t : 操作ブランク試験の各分析対象物質の量 (ng) (第3節参照)

W : 試料採取量 (g)

5.1.2 毒性当量 (2,3,7,8-TCDD Toxic Equivalent Quantity; TEQ) への換算 (注53)

ダイオキシン類の濃度を毒性当量に換算する場合は、5.1.1で算出した各分析対象物質濃度に表2-6及び2-7に示した毒性等価係数 (2,3,7,8-TCDD Toxic Equivalency Factor; TEF) を乗じ、その合計を毒性当量 (pg-TEQ/g) とする。個々の異性体の毒性当量については、丸めの操作は行わず、合計値の3けた目を四捨五入し、有効数字2けたで表す。なお、実測濃度が検出下限値未満のものを換算する場合には、0 (ゼロ) 又は試料における検出下限値の1/2の値等どのの算定法を使用したのかを明記する (6参照)。

表 2-6 PCDDs及びPCDFsの毒性等価係数

| 異性体 | | TEF(2005) |
|-------|---------------------|-----------|
| PCDDs | 2,3,7,8-TCDD | 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 | 0.0003 |
| PCDFs | 2,3,7,8-TCDF | 0.1 |
| | 1,2,3,7,8-PeCDF | 0.03 |
| | 2,3,4,7,8-PeCDF | 0.3 |
| | 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 | 0.0003 |

表 2-7 コプラナーPCBsの毒性等価係数

| 異性体 | IUPAC No. | TEF(2005) |
|--------|----------------------------|-----------|
| ノンオルト体 | 3,3',4,4'-TCB #77 | 0.0001 |
| | 3,4,4',5'-TCB #81 | 0.0003 |
| | 3,3',4,4',5'-PeCB #126 | 0.1 |
| | 3,3',4,4',5,5'-HxCB #169 | 0.03 |
| モノオルト体 | 2,3,3',4,4'-PeCB #105 | 0.00003 |
| | 2,3,4,4',5'-PeCB #114 | 0.00003 |
| | 2,3',4,4',5'-PeCB #118 | 0.00003 |
| | 2',3,4,4',5'-PeCB #123 | 0.00003 |
| | 2,3,3',4,4',5-HxCB #156 | 0.00003 |
| | 2,3,3',4,4',5'-HxCB #157 | 0.00003 |
| | 2,3',4,4',5,5'-HxCB #167 | 0.00003 |
| | 2,3,3',4,4',5,5'-HpCB #189 | 0.00003 |

6. 表示方法

ダイオキシン類の測定結果の表示方法は次による。

a) PCDDs及びPCDFs

PCDDs及びPCDFsの測定結果は、表2-8 に示した2,3,7,8-位塩素置換異性体については表2-8 に、それら以外の四塩素化物～七塩素化物 (TCDDs～HpCDDs及びTCDFs～HpCDFs) を分析した場合は別表に従って表示する。

各異性体の濃度は、検出下限以上の値はそのまま記載し、検出下限未満のものは、検出下限未満であった、又は検出しなかったことがわかるように記載する (注54)。

表示する検出下限は各試料について実測した検出下限、もしくは実測した検出下限が目標検出下限より低い場合は目標検出下限を記載してもよい。

表 2-8 PCDDs及びPCDFsの表示方法

| | | 毒性等価 係数 (TEF) | 実測濃度 pg/g | 検出下限濃度 (LOD) pg/g | 毒性当量 (TEQ) pg-TEQ/g |
|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------|-------------------------|---------------------------|
| P C D D s | 2,3,7,8-TCDD | 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 | 0.0003 | | | |
| P C D F s | 2,3,7,8-TCDF | 0.1 | | | |
| | 1,2,3,7,8-PeCDF | 0.03 | | | |
| | 2,3,4,7,8-PeCDF | 0.3 | | | |
| | 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 | 0.0003 | | | |
| Total PCDDs+PCDFs | | — | — | — | |

TEF: Toxic Equivalency Factor は、表2-6 の値 (WHO, 2005)

実測濃度中の「ND」は、検出下限未満であることを示す。

b) コプラナーPCBs

コプラナーPCBs濃度の測定結果は、ノンオルト及びモノオルトPCBsについては表2-9に従って表示する。表示方法はa)と同様である（注54）。

表 2-9 コプラナーPCBsの表示方法

| | IUPAC No. | 毒性等価 係数 (TEF) | 実測濃度 pg/g | 検出下限濃度 (LOD) pg/g | 毒性当量 (TEQ) pg-TEQ/g |
|-----------------------|----------------------------|---------------------|--------------|-------------------------|---------------------------|
| ノ ン オ ル ト | 3,3',4,4'-TCB #77 | 0.0001 | | | |
| | 3,4,4',5-TCB #81 | 0.0003 | | | |
| | 3,3',4,4',5-PeCB #126 | 0.1 | | | |
| | 3,3',4,4',5,5'-HxCB #169 | 0.03 | | | |
| モ ノ オ ル ト | 2,3,3',4,4'-PeCB #105 | 0.00003 | | | |
| | 2,3,4,4',5-PeCB #114 | 0.00003 | | | |
| | 2,3',4,4',5-PeCB #118 | 0.00003 | | | |
| | 2',3,4,4',5-PeCB #123 | 0.00003 | | | |
| | 2,3,3',4,4',5-HxCB #156 | 0.00003 | | | |
| | 2,3,3',4,4',5'-HxCB #157 | 0.00003 | | | |
| | 2,3',4,4',5,5'-HxCB #167 | 0.00003 | | | |
| | 2,3,3',4,4',5,5'-HpCB #189 | 0.00003 | | | |
| Total Coplanar PCBs | | — | — | — | |

TEF: Toxic Equivalency Factor は表 2-7 の値 (WHO, 2005)
 実測濃度中の「ND」は、検出下限未満であることを示す。

別表 上記以外PCDDs及びPCDFsの表示方法

| | | 実測濃度 pg/g | 検出下限濃度 (LOD) pg/g |
|-----------------------|--------|--------------|-------------------------|
| P C D D s | TCDDs | | |
| | PeCDDs | | |
| | HxCDDs | | |
| | HpCDDs | | |
| P C D F s | TCDFs | | |
| | PeCDFs | | |
| | HxCDFs | | |
| | HpCDFs | | |

第3節 測定データの品質管理

ダイオキシン類の分析に当たっては、超高感度分析が要求されるばかりでなく、塩素置換同族体の多数の異性体を分離・定量するので、極めて高度な精度が要求されるため、精度の管理を十分に行う必要がある。図2-3 参照。

測定データの品質管理は、標準作業手順 (SOP:Standard Operation Procedure)の作成、分析法バリデーション(分析方法の妥当性評価)及び分析時の信頼性確認によって行われる。これらの作業は、実際の分析に先立って行う。

1. 標準作業手順 (SOP) の作成

試験機関においては、次の項目等について作業手順を設定しておく。この作業手順は、具体的で分かりやすいこと及び関係者に周知徹底しておくことが必要である。

- (1) 試料採取用器具等の準備、メンテナンス、保管及び取扱方法
- (2) 前処理用試薬類の準備、精製、保管及び取扱方法
- (3) 分析用試薬、標準物質等の準備、標準溶液の調製、保管及び取扱方法
- (4) 分析機器の分析条件の設定、調整、操作手順、維持管理 (注55)
- (5) 分析方法全行程の記録 (使用するコンピュータのハード及びソフトを含む)

2. 分析法バリデーション

新たに分析法を導入した場合及び分析法を変更した場合に実施し、その結果を記録する。

2.1 クリーンアップ操作の評価

カラムクロマトグラフィーにおいて、分画条件は使用する充てん剤の種類や活性度、あるいは溶媒の種類及び量によって異なるので、あらかじめ全分析対象物質を含む標準溶液を用いて、分画試験を行って条件を決めておく。

2.2 回収率の評価

クリーンアップスパイクの回収率を測定する。クリーンアップスパイクの回収率が40-120%であることを確認する (第2節4.4.3 参照)。

2.3 操作ブランクの評価

ブランク試験を5回以上繰り返し、操作ブランクの平均値と標準偏差を求める。

2.4 標準試料の分析による真度の確認

適当な標準試料を分析して、得られた値が認証値の範囲内であることを確認する。(注56)

2.5 検出下限の評価

2.3で操作ブランクが認められる化合物においては、ブランクの標準偏差の3倍に相当する量を求める。また、クロマトグラム上のノイズと標準溶液から求めたピーク高さから、 $S/N=3$ に相当する量を求める。この2つの値の大きい方を検出下限とする(注45)。

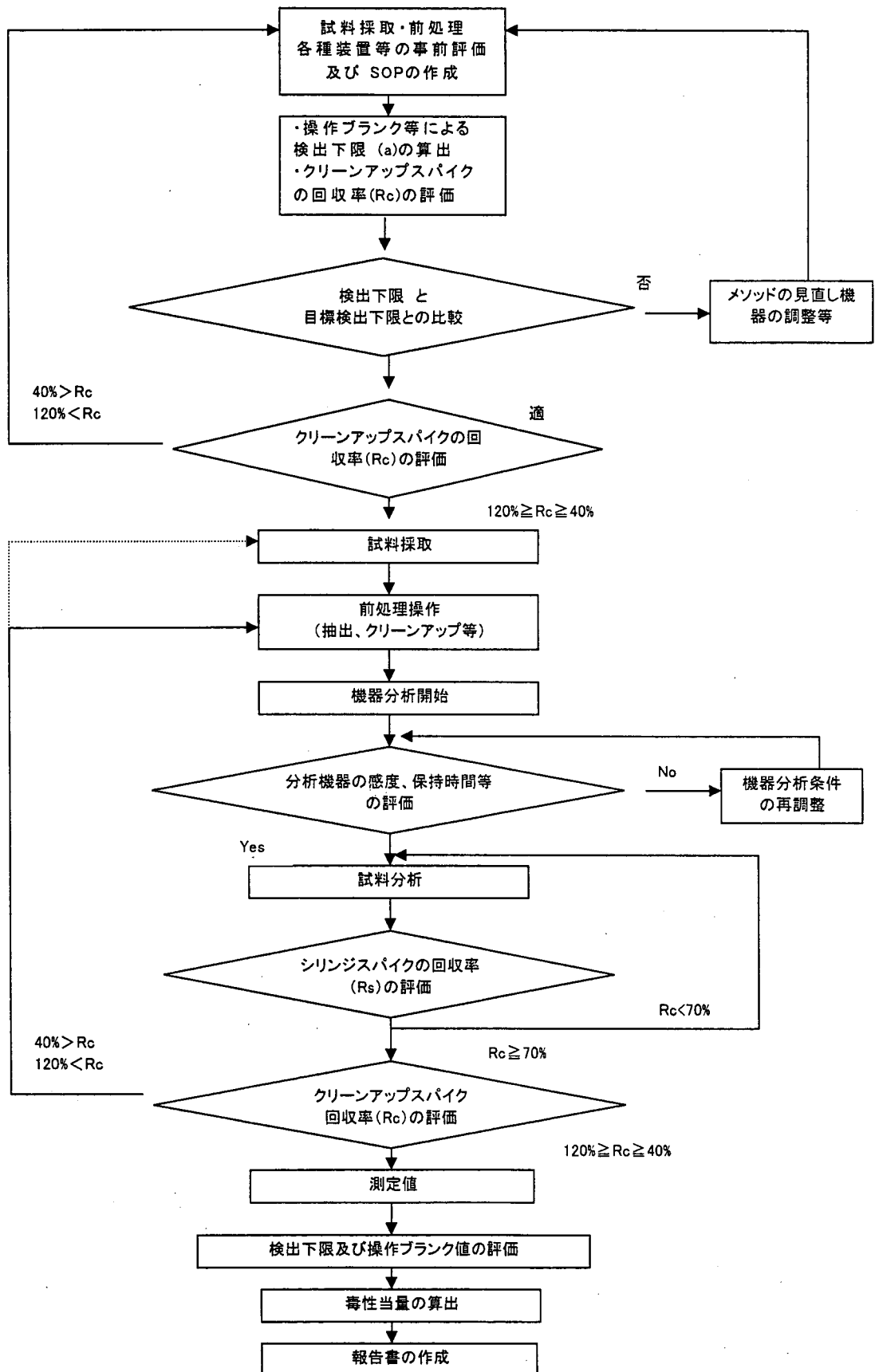


図 2-3 精度管理の概要

3. 分析時の信頼性の確認

以下の操作は、分析を行うごとに実施し、その結果を記録する。また、定められた基準が確認できない場合は、原則として再分析を行う。

3.1 装置の信頼性

3.1.1 装置感度の確認

GC-MS操作条件を設定し、適切な調整を行った後、標準溶液を注入しS/N比から最小検出量を求める。最小検出量から計算した検出下限が、目標検出下限を越えないことを確認して記録する（第2節4.2.3参照）。

3.1.2 検量線(RRF)の確認

定期的に検量線用標準溶液を分析して、ダイオキシン類の各塩素置換体と内標準物質の相対感度の変動していないことを確認する（第2節4.3参照）。

3.2 測定値の信頼性

3.2.1 操作ブランクの評価

操作ブランク試験の値が、分析法バリデーションで求めた操作ブランクと同程度であることを確認する。

3.2.2 注入量の確認

試料溶液中の内標準物質(シリンジスパイク)のピーク面積が標準液の内標準物質(シリンジスパイク)のピーク面積の70%以上であることを確認する（第2節4.4.2参照）。

3.2.3 回収率の評価

試料溶液中のシリンジスパイクとクリーンアップスパイクの面積比から回収率を求める（第2節4.4.3参照）。回収率が、40~120%の範囲内であることを確認する。

3.2.4 検出下限の評価

2.3で操作ブランクが認められる分析対象物質においては、ブランクの標準偏差の3倍に相当する量を求める。また、クロマトグラム上のノイズと標準溶液から求めたピーク高さから、S/N=3に相当する量を求める。この2つの値の大きい方を検出下限とする。操作ブランクが認められない分析対象物質においては後者を検出下限とする。検出下限が目標検出下限を越えないことを確認する。

ダイオキシン類の検出下限が、目標検出下限より大きい場合には、機器、器具等をチェックして、目標検出下限を越えないよう調整する。これに達しない場合は、その旨を検査成績書に明記する。

4. データの管理及び評価

4.1 異常値、欠測値の取扱い

分析機器の感度の変動が大きい場合は、分析値の信頼性に問題があるため、再分析を行ったり、欠測扱いとして、再度試料の採取を行う必要がある。このような問題が起こると、多大な労力、時間、コストがかかるだけでなく、異常値や欠測値が多くなると分析結果全体の評価に影響するため、事前のチェックを十分に行う等、異常値や欠測値を出さないように注意する。また、異常値や欠測値が出た経緯を十分に検討し、記録に残して、以後の再発防止に役立てることが重要である。