

第2章 各論

第1節 試料採取

1. 試料採取量

試料採取にあたっては、サンプリングの均一性に留意すること。原則として、検査対象ロットの5ヵ所以上から1kg以上採取する。

目的とする分析対象に対して、代表試料の採取が適切に行われなければならない。採取後の試料は、外部からの混入や分解等を防ぐため、密封・遮光できる容器に入れ、保管・運搬する。また、分析に用いた試料の残りを長期間保存する場合は、冷凍保存する(注2)。

2. 分析に使用する試料量

第1章表1-1に示した目標検出下限を得るには、GC-MSの検出下限を四塩化物で0.05pg、最終検液量を20 μ L、GC-MSへの注入量を1 μ Lとした場合、1回の分析に使用する試料量は、100g程度が目安となる(表2-1)。食品の種類によって、当該試料採取量で目標検出下限を得ることが困難な場合や、さらに低い検出下限を得るには、試料量を増やすことにより対応する(注3)。

表2-1 分析に使用する試料量の目安

	GC-MS検出下限 ①pg	最終検液量 ② μ L	注入量 ③ μ L	採取量 ④g	検出可能な最低濃度 ⑤pg/g
食品	0.05	20	1	100	0.01

① \leq ⑤ \times ④ \times ③ \div ② の関係より必要な試料量を求める。

3. 試料の採取及び処理

- (1) 採取した試料は、必要に応じ、水洗して、泥、塵埃等を除去し、不可食部を除去して可食部を検査に供する。
- (2) 洗浄等を行う場合は、外因性のダイオキシン類による試料汚染が最小限となるように努める。
- (3) 農産物の採取及び処理については、原則として、食品の規格基準(残留農薬基準)の試料に準ずる(注4)。
- (4) 食肉の採取及び処理については、次に留意する(注5)。

可食部全体を均一化する。食鳥肉のもも肉であって、皮を含む場合は、皮の部分を含め均一化する。当該試料中の脂肪含量を併せて測定する。

- (5) 魚介類の採取及び処理については、次に留意する(注5)。

大型魚は、頭部、骨、内臓を除いた可食部を採取し、均一化する。具体的には、三枚におおして両外側を対象とし、混合する。小アジなどの小型魚で、骨や内臓も含め丸ごと食すものは、全体を対象とする。当該試料中の脂肪含量を併せて測定する。

- (6) 乳、乳製品の採取及び処理については、全体を均一化する。当該試料中の脂肪含量を併せて測定する。

第2節 分析方法

1. 試薬及び標準物質

分析に用いる試薬はブランク試験（第3節参照）を行い、ダイオキシン類の分析に影響を及ぼす妨害成分が含まれていないことを確認してから使用する。

- (1) ヘキサン、メタノール、エタノール、アセトン、トルエン、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、石油エーテル

ダイオキシン類分析用（注6）、残留農薬試験用又はPCB分析用のもの。分析時の濃縮倍数に応じて濃縮したものをGC-MSに注入したとき、ダイオキシン類の標準物質及び内標準物質のクロマトグラムに妨害を生じないもの。

- (2) ノナン、デカン、イソオクタン

ダイオキシン類分析用、市販の試薬特級又はこれと同等以上のもの。分析時の濃縮倍数に応じて濃縮したものをGC-MSに注入したとき、ダイオキシン類の標準物質及び内標準物質のクロマトグラムに妨害を生じないもので、分析に支障をきたさないもの。

- (3) ヘキサン洗浄水

蒸留水をヘキサンで十分に洗浄し、分析に支障をきたさないもの。

- (4) 硫酸

市販の試薬特級又は同等以上のもので、分析に支障をきたさないもの。

- (5) ヘキサン飽和ジメチルスルホキシド（以後、DMSOと略称）

ダイオキシン類分析用、市販の特級試薬又はこれと同等以上のDMSOをヘキサンで飽和したもので、分析に支障をきたさないもの。

- (6) 無水硫酸ナトリウム

ダイオキシン類分析用、残留農薬試験用又はPCB分析用のもので、分析に支障をきたさないもの。

- (7) 水酸化カリウム、硝酸銀、シュウ酸カリウム（ナトリウム）

市販の試薬特級又は同等以上のもので、分析に支障をきたさないもの。

- (8) シリカゲル

ダイオキシン類分析用又はPCB分析用（注7）のものを、必要に応じて以下により洗浄及び活性化する。シリカゲルをガラスカラムにメタノールを用いて湿式充てんしたのち、2倍重量のメタノールを流す。次に内容物を取り出し、ロータリーエバポレーターで完全にメタノールを留去したのち、ビーカーに入れ、層の厚さを10mm以下にして、130℃で約18時間乾燥して活性化した後、デシケーター中で30分間放冷したもの。

- (9) 2%水酸化カリウム被覆シリカゲル（以後、水酸化カリウムシリカゲルと略称）

メタノール洗浄済みシリカゲル100gに、水酸化カリウム溶液（50g/L）40mLを加え、ロータリーエバポレーターで約50℃で減圧脱水し、水分のほとんどが除去された後、80℃でさらに1時間脱水を続けて粉末状にしたもの（注8）。調製後、密閉できる試薬瓶に入れデシケーター中に保存する。

- (10) 44%及び22%硫酸被覆シリカゲル（以後、硫酸シリカゲルと略称）

メタノール洗浄済みシリカゲル100 gに、硫酸を78.6 g 及び 28.2 g 添加後、十分振とうし粉末状にしたもの（注9）。調製後、密閉できる試薬瓶に入れ、デシケーター中に保存する。

(11)10%硝酸銀被覆シリカゲル（以後、硝酸銀シリカゲルと略称）

未洗浄のシリカゲル1g当たり40%硝酸銀溶液を0.25mL 加えた後、振とう機でよく混合し、使用直前に130℃で約3時間乾燥して活性化したもの（注10）。調製後、密閉できる褐色瓶に入れ、デシケーター中に保存する。

(12)アルミナ

カラムクロマトグラフィー用アルミナ（塩基性又は中性、活性度 I、粒径0.063～0.200mm）（注11）を使用する。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が、保存期間や保存状態により、活性度が著しく異なるので、カラムからの溶出条件を調べる必要がある。活性化する場合には、ビーカー又はシャーレに層の厚さを10mm 以下にして入れ、130℃で18 時間乾燥、もしくは500℃で約8時間加熱処理した後、デシケーター中で室温まで放冷する。調製後密閉できる試薬瓶中に保存する。

(13)活性炭シリカゲル

市販のダイオキシン類分析用又は同等以上のもので、妨害物質の溶出等分析に支障をきたさないもの。事前にカラムの溶出条件を確認すること（注12）。

(14)ガラス繊維ろ紙

保留粒子径0.6 μm 程度のもの。ブフナー漏斗に用いる。

(15)標準物質（注13）

ダイオキシン類の同定及び定量に用いる標準物質の例を表2-2及び表2-3に示す。

(16)標準溶液

市販の混合溶液（注14）を用いて検量線の濃度範囲に応じてノナン（注15）で希釈したものを用意する。

(17)内標準物質（注13）

全ての炭素原子又は塩素原子が¹³C 又は³⁷Cl でラベルされたPCDDs、PCDFs 及びコプラナーPCBsをクリーンアップスパイク及びシリンジスパイクに用いる（注16）。表 2-2及び表 2-3参照。

(18)内標準溶液

市販の混合溶液（注14）を用いて、内標準物質として添加する量及び検量線の濃度範囲に応じて、ノナン（注15）で希釈したものを用意する。

表 2-2 PCDDs及びPCDFsの標準物質、内標準物質の例

PCDDs		
	標準物質	内標準物質
四塩化物	2,3,7,8-TCDD	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4-TCDD ¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TCDD ³⁷ Cl ₄ -2,3,7,8-TCDD
五塩化物	1,2,3,7,8-PeCDD	¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDD
六塩化物	1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDD ¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDD ¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDD
七塩化物	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD
八塩化物	OCDD	¹³ C ₁₂ -OCDD
PCDFs		
四塩化物	2,3,7,8-TCDF	¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TCDF
五塩化物	1,2,3,7,8-PeCDF 2,3,4,7,8-PeCDF	¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDF ¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeCDF
六塩化物	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	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDF ¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDF ¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDF ¹³ C ₁₂ -2,3,4,6,7,8-HxCDF
七塩化物	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF ¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF
八塩化物	OCDF	¹³ C ₁₂ -OCDF

表 2-3 コプラナーPCBsの標準物質、内標準物質の例

コプラナーPCBs			
	標準物質		内標準物質
ノンオルトPCBs			
四塩化物	3,3',4,4'-TCB	#77	¹³ C ₁₂ -3,3',4,4'-TCB
	3,4,4',5-TCB	#81	¹³ C ₁₂ -3,4,4',5-TCB
五塩化物	3,3',4,4',5-PeCB	#126	¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5-PeCB
六塩化物	3,3',4,4',5,5'-HxCB	#169	¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-HxCB
モノオルトPCBs			
五塩化物	2,3,3',4,4'-PeCB	#105	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4'-PeCB
	2,3,4,4',5-PeCB	#114	¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5-PeCB
	2,3',4,4',5-PeCB	#118	¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5-PeCB
	2',3,4,4',5-PeCB	#123	¹³ C ₁₂ -2',3,4,4',5-PeCB
六塩化物	2,3,3',4,4',5,-HxCB	#156	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5-HxCB
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	#157	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5'-HxCB
	2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167	¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5,5'-HxCB
七塩化物	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189	¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5,5'-HpCB

#番号は、IUPAC No.を示す。

2. 器具及び装置

分析に用いる器具（試料の保管、輸送用容器を含む）は専用のもを用い、アセトン及びトルエン等で、よく洗浄したものを使用する。特に前の試料からの汚染が懸念される場合には、ブランク試験（第3節参照）を行い、ダイオキシン類の分析に影響を及ぼす妨害成分が含まれていないことを確認してから使用する。

2.1 前処理用器具

すり合わせの部分にはグリースを使用してはならない。

(1) 一般的な分析器具

ブフナー漏斗、分液漏斗、ソックスレー抽出器等。

(2) 濃縮器

クデルナ・ダニッシュ (KD) 濃縮器又はロータリーエバポレーターを使用する。

2.2 ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS)

二重収束型の質量分析計を用いる高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS)。

(1) カラム恒温槽

恒温槽の温度制御範囲が50~350℃であり、分析対象物質の最適分離条件の温度にできるような昇温プログラムの可能なもの。

(2) キャピラリーカラム

内径0.1~0.32mm、長さ25~60mの熔融シリカ製のものであって、内面に液相をコーティングしたもの（注17）。

(3) 検出器 (MS)

二重収束型のもので、分解能 (M/ΔM, 10%谷) 10,000 以上の高分解能で分析できるもの。

イオン源は、温度を160~350℃に保つことができ、電子イオン化法（以後EI法と略称）が可能で、電子エネルギーが25~70eV程度のもの。

検出法として、選択イオン検出法（以後SIM法と略称）で定量できるもので、SIM法における周期を、最大1秒以下にでき、ロックマス方式が可能なもの。

(4) 試料導入部

試料の全量を再現性良く導入できるもの（スプリットレス、オンカラム方式又は大量注入方式）。250~280℃にできること。

(5) キャリアーガス

高純度ヘリウム（純度99.999%以上）。

3. 試料の前処理

分析法のバリデーション時及び試料分析時には実試料の試験と併行して操作ブランク試験を実施する（注18）。

3.1 試料の均一化

試料はホモジナイザー等を使用して細碎し均一化したのち、一定量を秤量する。

3.2 内標準物質の添加（クリーンアップスパイク）

抽出操作前の試料に、PCDDs及びPCDFsについては、少なくとも各塩素数ごとに¹³C又は³⁷Clでラベルされた2,3,7,8-塩素置換体を最低1種類ずつ、コプラナーPCBsについては、ノンオルトPCBs、モノオルトPCBsは各塩素数ごとに最低1種類ずつの¹³Cでラベルされた塩素置換体を内標準物質として添加する。内標準物質の添加量は、GC-MS試料溶液中の濃度が検量線作成用標準溶液と同濃度になるようにする。通常はGC-MS試料溶液中のダイオキシン類が、2~10ng/mLとなるように添加する。

3.3 抽出

抽出は試料の量、共存有機物の量などを考慮し、溶媒抽出、脂肪抽出・アルカリ分解、アルカリ分解・溶媒抽出、ソックスレー抽出法等から選択する。なお、溶媒量は、試料量等に応じ、適宜増減させる。

試料と併行して、操作ブランク試験についても、同様の操作を行う。

3.3.1 溶媒抽出

試料の種類による溶媒抽出法の例

米、小麦類、豆、豆加工品、果実、野菜、海藻—アセトン・ヘキサン抽出

水—ジクロロメタン抽出

油脂、魚介類、肉、卵、乳、乳製品—アルカリ分解・溶媒抽出

3.3.1.1 アセトン・ヘキサン溶媒抽出

細碎し均一化した試料100gを1Lの分液漏斗にとり、アセトン—ヘキサン（1:1）混液200mLを加え、1時間振とうする。次に、ガラス繊維ろ紙を用い吸引ろ過し、残留物についてさらにアセトン—ヘキサン（1:1）混液200mLを加え10分間振とうし、同様に吸引ろ過する。全抽出液（ろ過溶液）にヘキサン洗浄水200mLを加え、10分間振とうし、ヘキサン層を分離する。ヘキサン層を2%塩化ナトリウム溶液100mLで2回洗浄する。

3.3.1.2 ジクロロメタン溶媒抽出（注19）

試料10Lを1.25L毎に2L分液漏斗にとり、ジクロロメタン150mLを加え、10分間振とうする。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水する。水層にさらにジクロロメタン150mLを加え同様に処理する。ジクロロメタン層を合わせて約5mLまで濃縮した後、ヘキサン200mLで300mLの分液漏斗に移す。

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、組み合わせて行う。

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。

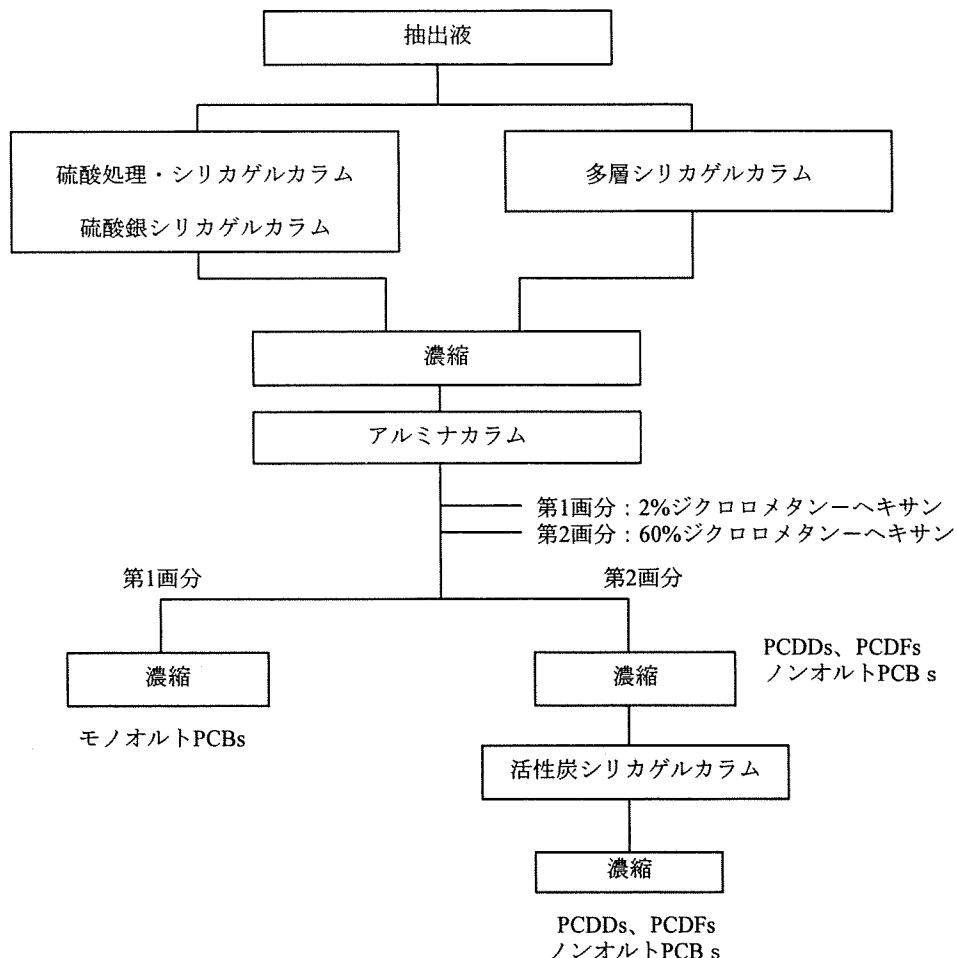


図2-1 代表的なクリーンアップの組合せ例

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のヘキサンに溶解する。

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)。

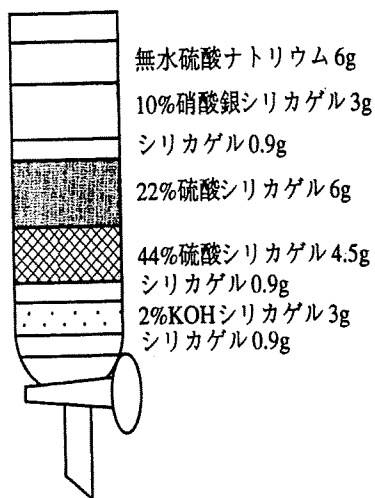


図2-2 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管模式図

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。次いでカラムオーブンを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 φ0.25mm×60m (膜厚0.25 μm)
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 φ0.32mm×60m (膜厚0.25 μm)
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 φ0.22mm×50m (膜厚0.25 μm)
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 φ0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)
分析カラム : SP-2331 φ0.32mm×60m (膜厚0.2 μm)
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 φ 0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)

分析カラム : DB-17 φ 0.25mm×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 φ 0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)

分析カラム : HT8-PCB φ 0.25mm×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 φ 0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)

分析カラム : Rtx-2330 φ 0.18mm×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 φ 0.25mm×6m (膜厚0.25 μm)

分析カラム : BPX-5 φ 0.15mm×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 φ 0.25mm×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、バ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RRF_{ss}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RRF_{ss}（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。

$$\text{RRF} = \frac{C_{is}}{C_s} \times \frac{A_s}{A_{is}}$$

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
 C_s :標準溶液中の分析対象物質の濃度
 A_s :標準溶液中の分析対象物質のピーク面積
 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

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

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