

2 臍帯中のダイオキシン類の測定分析方法

1 はじめに

ダイオキシン類は、健康影響の未然防止の観点からの対策が必要な物質であり、環境汚染物質の中でも社会的関心の高い物質である。

これらの物質に係る健康影響調査を推進するためには、さまざまなヒト由来組織における濃度の把握が重要であるが、そのためには信頼できる測定分析マニュアルが不可欠である。

本マニュアルは臍帯中のダイオキシン類を測定するためのものであるが、臍帯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、一定の分析実験設備や測定分析に関わる一定水準以上の技術が要求される。そこで、臍帯中のダイオキシン類の濃度を決定する為の参考となるように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 ダイオキシン類

ポリクロロジベンゾーパラジオキシン、ポリクロロジベンゾフランおよびコプラナ PCBsⁱで表される化合物の総称。ただし、本マニュアルではテトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ及びオクタクロロジベンゾーパラジオキシン、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ及びオクタクロロジベンゾフラン、及び 2.3 に示したコプラナ PCBs を指す。

2.2 ダイオキシン類 2,3,7,8-位塩素置換異性体

ダイオキシン類の内、化学構造上 2, 3, 7 及び 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 PCBs

ポリクロロビフェニルⁱⁱで表される化合物であって、化学構造上 2, 2', 6 及び 6' で表記されるオルト位ⁱⁱⁱに配位する塩素数が 2 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.29)』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 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 及び 6' で表記されるオルト位に塩素が配位しない化合物の総称。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.29)』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 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 及び 6' で表記されるオルト位に塩素が 1 つ配位する化合物の総称。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.29)』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^{iv}

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^v

塩素の配位数が同じであって置換位置を異にする一群の化合物。

2.8 目標検出下限値

本マニュアルで規定する『定量する下限値』。

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。
vi. 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 10~50fg 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 試料の検出下限値

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測定分析方法の検出下限値とする. 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予測し, 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測定分析方法の検出下限値とする。

なお, 試料の検出下限値は目標検出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ーパラージオキシン^{vii}
- 3.2 PCDFs : ポリクロロジベンゾフラン^{viii}
- 3.3 Co-PCBs : コプラナ PCBs
- 3.4 non-*ortho* PCBs : ノンオルト PCBs
- 3.5 mono-*ortho* PCBs : モノオルト PCBs
- 3.6 TeCDDs : テトラクロロジベンゾーパラージオキシン^{ix}
- 3.7 PeCDDs : ペンタクロロジベンゾーパラージオキシン^x
- 3.8 HxCDDs : ヘキサクロロジベンゾーパラージオキシン^{xi}
- 3.9 HpCDDs : ヘプタクロロジベンゾーパラージオキシン^{xii}
- 3.10 OCDD : オクタクロロジベンゾーパラージオキシン^{xiii}
- 3.11 TeCDFs : テトラクロロジベンゾフラン^{xiv}
- 3.12 PeCDFs : ペンタクロロジベンゾフラン^{xv}
- 3.13 HxCDFs : ヘキサクロロジベンゾフラン^{xvi}
- 3.14 HpCDFs : ヘプタクロロジベンゾフラン^{xvii}
- 3.15 OCDF : オクタクロロジベンゾフラン^{xviii}
- 3.16 TeCBs : テトラクロロビフェニル^{xix}
- 3.17 PeCBs : ペンタクロロビフェニル^{xx}
- 3.18 HxCBs : ヘキサクロロビフェニル^{xxi}
- 3.19 HpCBs : ヘプタクロロビフェニル^{xxii}
- 3.20 2,3,7,8-TeCDD : 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾーパラージオキシン
- 3.21 1,2,3,7,8-PeCDD : 1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾーパラージオキシン
- 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ーパラージオキシン
- 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ーパラージオキシン
- 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ーパラージオキシン
- 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ーパラージオキシン
- 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 ; IUPAC77
- 3.36 3,4,4',5'-TeCB : 3,4,4',5'-テトラクロロビフェニル ; IUPAC81
- 3.37 3,3',4,4',5'-PeCB : 3,3',4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC126
- 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 ; IUPAC169
- 3.39 2,3,3',4,4'-PeCB : 2,3,3',4,4'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC105
- 3.40 2,3,4,4',5'-PeCB : 2,3,4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC114
- 3.41 2,3',4,4',5'-PeCB : 2,3',4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC118
- 3.42 2',3,4,4',5'-PeCB : 2',3,4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC123
- 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 ; IUPAC156
- 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 ; IUPAC157
- 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 ; IUPAC167
- 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 ; IUPAC189
- 3.47 TEF : 毒性等価係数^{xxiii}
- 3.48 TEQ : 毒性等量^{xxiv}
- 3.49 IDMS : 同位体希釈質量分析法^{xxv}
- 3.50 GC-MS : ガスクロマトグラフ質量分析法^{xxvi}またはガスクロマトグラフ質量分析計^{xxvii}
- 3.51 HRGC : 高分解能ガスクロマトグラフィー^{xxviii}または高分解能ガスクロマトグラフ^{xxix}
- 3.52 HRMS : 高分解能質量分析法^{xxx}または高分解能質量分析計^{xxxi}
- 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^{xxxii}または高分解能ガスクロマトグラフ/高分解質量分析計^{xxxiii}
- 3.54 SIM : 選択イオン検出法^{xxxiv}
- 3.55 RRF : 相対感度係数^{xxxv}
- 3.56 N.D. : 目標検出下限値未満^{xxxvi}
- 3.57 EI 法 : 電子衝撃イオン化^{xxxvii}法
- 3.58 IUPAC : 国際純正及び応用化学連合^{xxxviii}
- 3.59 WHO : 国連世界保健機関^{xxxix}
- 3.60 QA/QC : 品質保証・品質管理^{xl}
- 3.61 QCCS : 品質管理チェック試料^{xli}

4 調査対象物質

本マニュアルでは PCDDs, PCDFs 及び Co-PCB の内、『表-1. 定量する化合物の名称等 (p.29)』に示す化合物を調査対象とする。また、必要に応じて脂肪量を測定する。

5 目標検出下限値

本マニュアルでは『表-2. 本マニュアルで規定する PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs 各化合物の目標検出下限値 (p.22)』に示す目標検出下限値を設定する。通常、目標検出下限値は分

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。

なお、本マニュアルに記載されている商品名は、マニュアル使用者の便宜のために、マニュアル作成に伴い行われた検証試験等に使用し、かつ、一般に入手できるものを示したものであり、これを推奨するものではない。

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^{xiii}。

6.2 試薬類^{xiii}

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、PCDDs、PCDFs 及び 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

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 デカン

6.2.7 精製水

精製水製造器等で得られるもの。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

6.2.8 硫酸

市販の試薬をヘキサンで洗浄する。

6.2.9 無水硫酸ナトリウム

市販の試薬を 450℃で 4hrs 以上加熱処理する。

6.2.10 水酸化カリウム水溶液

水酸化カリウム適当量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。等して精製する。

6.2.11 40%(w/w)硝酸銀水溶液

硝酸銀適当量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等して精製する。

6.2.12 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 10mm 以下にして 130℃で約 18hrs 乾燥した後、密閉可能な容器に入れ、デシケーター内で保管する。

6.2.13 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、デシケーター内で保管する^{xiv}。

6.2.14 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、デシケーター内で保管する^{xlv}。

6.2.15 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、デシケーター内で保存する。調製及び保管は遮光した状態で行う。

6.2.16 塩基性アルミナ

6.2.17 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^{xlvi}、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、デシケーター内で保存する。

6.2.18 標準物質

『表-3. 測定に用いる標準物質. (p.31)』を用いる。

6.2.19 標準溶液

市販の標準溶液をデカン^{xlvii}で希釈、混合して調製する。

6.2.20 同位体スパイク

『表-4. 測定に用いる同位体スパイク. (p.32)』を用いる。

6.2.21 同位体スパイク溶液

市販の溶液をデカン^{xlviii}で希釈、混合して調製する。

6.3 器具・機材

6.3.1 分析前処理工具・機材

使用する全ての器具及び装置には PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs の測定分析に影響を及ぼさないことが要求される。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臍帯等の極めて低濃度である試料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。

6.3.1.1 乾燥機

ガラス製品及び試薬類を加熱処理するもの (450℃程度で連続使用可能なもの)。

6.3.1.2 マッフル炉

セラミック製品を加熱処理するもの (1000℃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^{xlix}。

6.3.1.4 ロータリーエバポレーター用真空ポンプ

有機溶媒の排気により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為に使用する。

6.3.1.7 シリカゲルカラムクロマト管

内径約 10mm、長さ約 300mm のガラス製カラムクロマト管にシリカゲル 3.0g、無水硫酸ナトリウム 6.0g をヘキサンで湿式充填する。ヘキサン 200mL を流速 2.5mL/min で流し、充填物を洗浄する^l。