

#### 6.3.1.8 多層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 0.9g, 44%硫酸シリカゲル 4.5g, 22%硫酸シリカゲル 6.0g, シリカゲル 0.9g, 10%硝酸銀・シリカゲル 3.0g, 無水硫酸ナトリウム 6.0g を順次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。

#### 6.3.1.9 活性炭シリカゲルカラムクロマト管

内径約 10mm, 長さ約 150mm のガラス製カラムクロマト管に, 無水硫酸ナトリウム 3.0g, 活性炭シリカゲル 0.5g, 最後に無水硫酸ナトリウム 3.0g を乾式充填する。

### 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 0.22~0.32mm, 長さ 30~60m 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, 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 (25%フェニルメチルシリコン系), 強極性 (シアノプロピル系) のものを用いる。ここで, 使用するカラムはダイオキシン類が不用意に吸着することなく, また, ダイオキシン類 2,3,7,8-位塩素置換異性体およびコプラナ PCBs の他の異性体との分離が良好なものを選択する必要がある, そのため事前に本マニュアルで要求される目標検出下限等を満足していることを確認することが望ましい。

例) BPX5 (長さ: 30m, 内径: 0.25mm, 膜厚: 0.25 μm, SGE 社製)

CP-SIL 8 CB-MS (長さ: 30m, 内径: 0.25mm, 膜厚: 0.25 μm, Varian 社製)

なお, ここで示した製品は参考のために表記したものであってこれらを使用しなければならない訳ではない。

#### 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>4)</sup>により分解能 10,000 以上で測定可能なもの。イオン源は, 温度を 160~300°C に保つことができ, EI 法が可能で, イオン化電圧を 25~70V 程度に制御可能なもの。検出法として SIM 法が可能であり, 磁場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 sec 未満にできるもの<sup>4)</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-TeCDD 10fg で SN>5, OCDD 50fg で SN>5 の検出感度を得られるもの。

#### 6.3.2.4 試料導入部

本マニュアルで要求する定量を満足する方式のもの。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

高純度ヘリウムガス<sup>4)</sup>。

## 7 測定分析

### 7.1 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  $^{13}\text{C}$  同位体をスパイクし、有機溶媒によって PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs を抽出し、精製し、GC-MS を用いて同位体比を測定する。分析方法のフローを図-1 に示す。

なお、PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs 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。

### 7.2 前処理

本測定においては、臍帯試料中の脂肪重量も併せて測定する必要があるが、試料量が限られているため、1本の臍帯を用いて脂肪重量及びダイオキシン類濃度の両方について測定しなければならない。

#### 7.2.1 試料

採取した試料は精秤したのち、臍帯1本当たり 100mL の 25%エタノール/ヘキサンと 50g の無水硫酸ナトリウムおよび同位体スパイクを加えて毎分 10,000 回転で約 5 分間ホモジネートする。ここで十分にホモジナイズされた試料の全量を測定に用いる。なお、同位体スパイクの添加量は各化合物 50~200pg 程度とする<sup>iv</sup>。

#### 7.2.2 脂肪抽出

7.2.1 で得られた試料を、桐山ロートにてグラスフィルターを用い吸引濾過を行い、脂肪やダイオキシン類などを抽出する。

#### 7.2.3 水洗・脱水

7.2.2 で得られたエタノール/ヘキサン抽出液を、ヘキサン洗浄蒸留水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを加え含まれている水分を吸収させる。

#### 7.2.4 脂肪重量測定

7.2.3 で得られた抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮後、あらかじめ重量を測定した秤量皿に可能な限り損失がないように移した後、静置させ溶媒を揮発させる。秤量皿を秤量し、前後の重量差から試料中の脂肪重量を測定する。

#### 7.2.5 アルカリ分解

脂肪重量を測定した後の抽出物に 2mol/L-水酸化カリウム/エタノール溶液 30mL、さらに、蒸留水 50mL を加え攪拌後室温にて一夜放置する。

#### 7.2.6 抽出

エタノール 10mL、精製水 20mL、ヘキサン 30mL を添加し、30 分間振盪抽出を行う。ヘキサン層を分画後、水層にヘキサン 30mL を添加し、さらに 30 分間振盪抽出を行う。3 回の抽出によるヘキサン分画を混合する。

#### 7.2.7 硫酸処理

得られたヘキサン分画を精製水 20mL で 1 回洗浄した後、水層を捨て、濃硫酸を 20mL 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。

#### 7.2.8 水洗・濃縮

硫酸処理が終了したヘキサン分画を精製水 20mL で 2 回洗浄する。ガラス製ロート下部にグラスウールを詰め、無水硫酸ナトリウムを積層したもので脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて約 2ml まで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供する。

### 7.3 カラムクロマトグラフィー

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。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為示したものであり、分画試験を行って決定する。

### 7.3.1 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。

#### 7.3.1.1 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管の液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げ、調製した試料を静かに移し入れ、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 150ml を流速 2.5mL/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バポレーターにて約 2ml まで濃縮し、アルミナカラムクロマトグラフィーに供する。

#### 7.3.1.2 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 200ml を流速 2.5mL/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バポレーターにて約 2ml まで濃縮し、アルミナカラムクロマトグラフィーに供する<sup>iv</sup>。

### 7.3.2 アルミナカラムクロマトグラフィー

アルミナクロマト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 100ml を流速 2.5mL/min で洗浄を行う。次いで 50%ジクロロメタン含有ヘキサン 100mL を流速 2.5mL/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バポレーターにて約 2ml まで濃縮し、活性炭カラムクロマトグラフィーに供する。

### 7.3.3 活性炭カラムクロマトグラフィー

次に示す活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーのどちらかを行う。

#### 7.3.3.1 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管に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 2.5mL/min で流し展開溶出させる。この画分には mono-*ortho*-CBs が含まれる。次いで、トルエン 100ml で溶出する。この画分には PCDDs, PCDFs 及び non-*ortho*-CBs が含まれる。25%ジクロロメタン含有ヘキサン画分及びトルエン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>vi</sup>、濃縮した後、各画分に測定に必要なシリンジスパイク<sup>vi</sup>を添加して 10  $\mu$ L に定容し、GC-MS 分析用溶液とする。なお、GC の注入方式が 10  $\mu$ L 以上注入できる場合は、最終試料液量を適切な量に変更することは妨げない。

トルエン画分から 1~2  $\mu$ L 分取り 25%ジクロロメタン含有ヘキサン画分に加え、トルエン画分と同様の方法で濃縮し、測定に必要なシリンジスパイクを添加し 10  $\mu$ L に定容し、GC-MS 分析用溶液としても良い。最終試料液量については前述と同様である。

#### 7.3.3.2 液体クロマトグラフィー

LCに活性炭カラムを装着し、予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しておく。調製した試験溶液を注入後、移動層としてヘキサン60mLで洗浄し、30%トルエン含有ヘキサン75mLで溶出させる。この画分にはCo-PCBsが含まれる。次いで、reverse flowでトルエン120mlで溶出する。この画分にはPCDDs, PCDFsが含まれる。30%トルエン含有ヘキサンヘキサン画分及びトルエン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>hii</sup>、濃縮した後、各画分に測定に必要なシリンジスパイク<sup>ix</sup>を添加して10 $\mu$ Lに定容し、GC-MS分析用溶液とする。なお、GCの注入方式が10 $\mu$ L以上注入できる場合は、最終試料液量を適切な量に変更することは妨げない。

なお、活性炭カラムは発売メーカー、サイズによりダイオキシン類の挙動が異なることが予想されるため、予め、標準品等を用いて溶出条件の確認を行っておく。

#### 7.4 測定準備

##### 7.4.1 検量線の作成

標準溶液中のPCDDs, PCDFs及びCo-PCBs各化合物に対して0.01~50pg/ $\mu$ L程度の濃度範囲で0を含めて5段階程度の標準濃度系列を調製する。この標準濃度系列には同位体スパイクを添加しておく<sup>k</sup>。

##### 7.4.2 GC-MS状態の確認

GC-MSが本法に対して適切な状態であることを確認する(QA・QC参照)。

#### 7.5 測定

標準溶液及び試料の適当量をGC-MSに注入<sup>hii</sup>し、各同族体につき『表-5. 測定質量数の例. (p.33)』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。

#### 7.6 計算

次式によって濃度を算出する。

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

$C_{\text{Sample}}$  : 分析対象物質の濃度 (pg/g)

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

$A_{\text{Sample-IS}}$  : 分析試料中の各同位体スパイクのクロマトグラムピーク面積値

$C_{\text{Sample-IS}}$  : 分析試料への同位体スパイクの量 (pg)

$V$  : 試料採取量 (g)

$$\text{RRF} = (A_{\text{STD}} \times C_{\text{STD-IS}}) / (A_{\text{STD-IS}} \times C_{\text{STD}})$$

$A_{\text{STD}}$  : 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

$A_{\text{STD-IS}}$  : 標準溶液中の同位体スパイクのクロマトグラムピーク面積値

$C_{\text{STD}}$  : 標準溶液中の各化合物の量 (pg)

$C_{\text{STD-IS}}$  : 標準溶液中の各同位体スパイクの量 (pg)

PCDDs及びPCDFs 2,3,7,8-位塩素置換異性体はそれぞれ対応する。17種類の2,3,7,8-位塩素置換異性体の標準物質及び同位体スパイクの濃度、添加量及びレスポンスを用いて濃度を算出する。Co-PCBに関してはそれぞれ対応する。12種類のCo-PCBの標準物質及び同位体スパイクの濃度、添加量及びレスポンスを用いて濃度を算出する。