

河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル(案)

平成16年7月

国土交通省河川局河川環境課

はじめに

国土交通省河川局河川環境課では、河川、湖沼における底質のダイオキシン類対策を実施するに当たり、平成 15 年 6 月に「河川、湖沼等における底質ダイオキシン類対策マニュアル(案)」を策定した。これにより、河川、湖沼において基準値を超えるダイオキシン類汚染が判明した場合、汚染対策の一環として汚染範囲の確定作業の実施が必要となるが、公定法によるダイオキシン類の測定には多額の費用と時間を要することが問題となっている。「河川、湖沼等における底質ダイオキシン類対策マニュアル(案)」でも簡易測定法の適用に関して言及しているが、ダイオキシン類の簡易測定法について具体的にまとめたマニュアル等は存在しない。このような状況を受け、国土交通省河川局河川環境課では、「河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル(案)」をまとめ、全国に周知することとした。

マニュアルの作成に当たっては、底質ダイオキシン類測定に関する技術を広く一般に募集し、それらの技術を用いて実際の試料を分析することにより、簡易測定法の適用範囲等について検討を行った。簡易測定技術の選定及び評価は、学識経験者等からなる「底質ダイオキシン類簡易分析法検討会」において行った。なお、現在、公定法と比較して簡易にダイオキシン類を測定する多くの方法（濁度、強熱減量等の代替指標の測定、特定のダイオキシン類異性体の測定による毒性等量の推測他）が検討されているが、河川、湖沼におけるダイオキシン類の汚染水域では、早急な汚染対策が求められていることから、今回は、技術的に既に確立されているガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）法及び生細胞もしくは生体機能に関わる物質を利用した測定法（本マニュアルでは生物法とする）を検討、評価の対象とした。

本マニュアルは、現時点における最新の知見及び技術に基づいてとりまとめたものであるが、ダイオキシン類の簡易測定法については、現在、各方面で研究、開発が続けられている。このため、今後の研究実績の積み重ねや新技術の開発動向及びダイオキシン類に関する今後の社会動向等を踏まえて、十分なバリデーションを行い有効と判断された手法については、今後も積極的に取り入れ、逐次、本マニュアルを改訂していくこととしている。

平成 16 年 7 月

国土交通省河川局河川環境課

目次

ページ

1. 適用範囲	1
2. 用語・略語の定義	2
3. ダイオキシン類簡易測定法の概要	5
3.1 測定方法	5
3.1.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法	5
3.1.2 生物法	5
3.2 目標定量下限	7
3.2.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法	7
3.2.2 生物法	7
4. 試料	8
4.1 試料の採取	8
4.1.1 器具	8
4.1.2 試料採取(採泥)方法	8
4.2 試料の取扱い	9
5. 試料の前処理	10
5.1 前処理の概要	10
5.2 試薬	12
5.3 器具及び装置	15
5.4 前処理操作	15
5.4.1 試料の乾燥	15
5.4.2 内標準物質の添加(クリーンアップスパイク)	15
5.4.3 試料からの抽出	16
5.4.4 精製	16
5.4.5 測定用試料の調製	21
6. 同定及び定量	22
6.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法	22
6.1.1 試薬	22
6.1.2 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)	22
6.1.3 測定操作	25
6.1.4 検量線の作成	31
6.1.5 ピークの検出	33
6.1.6 ピーク面積の算出	34

河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル（案）

6.1.7	ダイオキシン類の同定	34
6.1.8	ダイオキシン類の定量	35
6.1.9	濃度の算出	35
6.1.10	定量下限	35
6.1.11	回収率の確認	36
6.2	生物法	37
6.2.1	試薬及び装置	37
6.2.2	測定操作	38
6.2.3	検量線の作成	38
6.2.4	濃度の算出	38
6.2.5	定量下限	39
7.	結果の報告	40
7.1	ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法	40
7.2	生物法	40
8.	測定データの品質管理	41
9.	前処理方法の変更に必要なバリデーション試験の例	42
9.1	ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法	42
9.2	生物法	42

1 適用範囲

本マニュアルは、河川、湖沼の底質のダイオキシン類濃度を簡易に測定する際に適用する。

2 用語・略語の定義

本マニュアルでは、次により用語・略語を定義する。

- (a) ダイオキシン類： テトラからオクタクロロジベンゾーパラージオキシン、テトラからオクタクロロジベンゾフラン及びコプラナーPCB の総称。
- (b) 異性体： 塩素の置換数が同じで置換位置を異にする個々の化合物。
- (c) 同族体： 塩素の置換数が同じで置換位置を異にする化合物の一群。
- (d) PCDDs： ポリクロロジベンゾーパラージオキシン
- (e) PCDFs： ポリクロロジベンゾフラン
- (f) TeCDDs： テトラクロロジベンゾーパラージオキシン
- (g) PeCDDs： ペンタクロロジベンゾーパラージオキシン
- (h) HxCDDs： ヘキサクロロジベンゾーパラージオキシン
- (i) HpCDDs： ヘプタクロロジベンゾーパラージオキシン
- (j) OCDD： オクタクロロジベンゾーパラージオキシン
- (k) TeCDFs： テトラクロロジベンゾフラン
- (l) PeCDFs： ペンタクロロジベンゾフラン
- (m) HxCDFs： ヘキサクロロジベンゾフラン
- (n) HpCDFs： ヘプタクロロジベンゾフラン
- (o) OCDF： オクタクロロジベンゾフラン
- (p) 2,3,7,8-位塩素置換異性体： 2,3,7,8-位に置換塩素を持つテトラからオクタクロロジベンゾーパラージオキシン 7 種及びテトラからオクタクロロジベンゾフラン 10 種の計 17 化合物で次に示すものである。
 - (ア) テトラからオクタクロロジベンゾーパラージオキシン (PCDDs)
 - 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾーパラージオキシン (2,3,7,8-TeCDD)
 - 1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾーパラージオキシン (1,2,3,7,8-PeCDD)
 - 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 (1,2,3,4,7,8-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 (1,2,3,6,7,8-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 (1,2,3,7,8,9-HxCDD)
 - 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 (1,2,3,4,6,7,8-HpCDD)
 - オクタクロロジベンゾーパラージオキシン (OCDD)
 - (イ) テトラからオクタクロロジベンゾフラン (PCDFs)
 - 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフラン (2,3,7,8-TeCDF)
 - 1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン (1,2,3,7,8-PeCDF)
 - 2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン (2,3,4,7,8-PeCDF)
 - 1,2,3,4,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン (1,2,3,4,7,8-HxCDF)
 - 1,2,3,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン (1,2,3,6,7,8-HxCDF)
 - 1,2,3,7,8,9-ヘキサクロロジベンゾフラン (1,2,3,7,8,9-HxCDF)
 - 2,3,4,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン (2,3,4,6,7,8-HxCDF)
 - 1,2,3,4,6,7,8-ヘプタクロロジベンゾフラン (1,2,3,4,6,7,8-HpCDF)
 - 1,2,3,4,7,8,9-ヘプタクロロジベンゾフラン (1,2,3,4,7,8,9-HpCDF)

オクタクロロジベンゾフラン (OCDF)

- (q) PCBs: ポリクロロビフェニル
- (r) TeCBs: テトラクロロビフェニル
- (s) PeCBs: ペンタクロロビフェニル
- (t) HxCBs: ヘキサクロロビフェニル
- (u) HpCBs: ヘプタクロロビフェニル
- (v) コプラナーPCB (Co-PCB): ポリクロロビフェニル(PCBs)の中で TEF を持つ化合物を指す。オルト位⁽¹⁾ (2,2',6' 及び 6')に置換塩素をもたない化合物(ノンオルト体⁽²⁾)及びオルト位に置換塩素が1個ある化合物(モノオルト体⁽³⁾)がある⁽⁴⁾。
 - (ア) ノンオルト体
 - 3,3',4,4'-テトラクロロビフェニル[3,3',4,4'-TeCB (IUPAC No.77)]
 - 3,4,4',5-テトラクロロビフェニル[3,4,4',5-TeCB (IUPAC No.81)]
 - 3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル[3,3',4,4',5-PeCB (IUPAC No.126)]
 - 3,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル[3,3',4,4',5,5'-HxCB (IUPAC No.169)]
 - (イ) モノオルト体
 - 2,3,3',4,4'-ペンタクロロビフェニル[2,3,3',4,4'-PeCB (IUPAC No.105)]
 - 2,3,4,4',5-ペンタクロロビフェニル[2,3,4,4',5-PeCB (IUPAC No.114)]
 - 2,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル[2,3',4,4',5-PeCB (IUPAC No.118)]
 - 2',3,4,4',5-ペンタクロロビフェニル[2',3,4,4',5-PeCB (IUPAC No.123)]
 - 2,3,3',4,4',5-ヘキサクロロビフェニル[2,3,3',4,4',5-HxCB (IUPAC No.156)]
 - 2,3,3',4,4',5'-ヘキサクロロビフェニル[2,3,3',4,4',5'-HxCB (IUPAC No.157)]
 - 2,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル[2,3',4,4',5,5'-HxCB (IUPAC No.167)]
 - 2,3,3',4,4',5,5'-ヘプタクロロビフェニル[2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (IUPAC No.189)]
- (w) 目標定量下限: 本マニュアルで規定する「表記すべき最低濃度」。実際の定量下限は目標定量下限を十分満足している必要がある。
- (x) TEF: 2,3,7,8-TeCDD 毒性等価係数 (2,3,7,8-TeCDD toxic equivalency factor)
- (y) TEQ: 2,3,7,8-TeCDD 毒性等量(毒性当量) (2,3,7,8-TeCDD toxic equivalent quantity)
- (z) RRF: 相対感度係数 (relative response factor)
- (aa) IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry(国際純正応用化学連合)
- (bb) WHO: World Health Organization(世界保健機関)
- (cc) IPCS: International Programme on Chemical Safety(国際化学物質安全性計画)
- (dd) 生物法: 生細胞もしくは生体機能に関わる物質を利用してダイオキシン類を定量する方法
- (ee) ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
- (ff) TRFIA: Time Reduction Fluorescent Immuno Assay
- (gg) Ah 受容体: Aryl hydrocarbon 受容体

¹ ortho position

² non-ortho

³ mono-ortho

⁴ コプラナーPCBとは構造的な意味からはここで示す以外のPCB化合物も含んでおり、世界的にはモノオルト体のPCBはコプラナーPCBに入れないのが一般的であるが、本マニュアルでは便宜上TEFを持つPCBをコプラナーPCBとして定義する。

- (hh) ARNT : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Trans-locator
- (ii) DRE : Dioxin Response Element
- (jj) PCR : Polymerase Chain Reaction

3 ダイオキシン類簡易測定法の概要

底質試料からダイオキシン類を抽出後、精製し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法、又は生物法にて測定する。

3.1 測定方法

本マニュアルでは前処理後の測定方法として、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法及び生物法を採用している。それぞれの方法の原理について簡単に記す。

3.1.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法

本マニュアルにおいては原理を異にする 3 種類の質量分析計を用いることができる。それぞれの質量分離方式について簡単に述べる。

3.1.1.1 二重収束型 MS⁽⁵⁾

イオン源でイオン化された目的物質に対して、速度収束及び方向収束の両方を行わせるようにした質量分析計で、通常、電場と磁場を組み合わせる。速度収束及び方向収束の両方を行うことから、二重収束と呼ばれる。

3.1.1.2 イオントラップ型 MS(MS/MS)⁽⁶⁾

双曲面の 3 つの電極(リング電極)と 2 つのエンドキャップ電極で電場をつくり、その空間に GC で分離された目的物質をイオン化し閉じ込める(イオントラップ)。トラップされたイオンは先駆イオン(Precursor Ion)と呼ばれる。先駆イオンにさらに衝突解離を起こさせ、生じる生成イオン(Product Ion)を測定する方法を MS/MS と呼ぶ。

3.1.1.3 四重極型 MS⁽⁷⁾

直流と高周波を重ね合わせた電圧を、双曲線を持つ平行な 4 本の電極柱に印加する。四重極電場に入ったイオンは、高周波電場中を振動しながら進み、ある特定の周波数に対応したイオンだけが振幅が増幅されずに四重極を通過することができる。電極柱が 4 本あることから四重極と呼ばれる。

3.1.2 生物法

本マニュアルでは原理を異にする複数種類の生物法を用いることができる。それぞれの原理について簡単に述べる。

3.1.2.1 抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイ

特定のダイオキシン類化合物に特異的に結合するモノクローナル抗体もしくはポリクロー

⁵ Double-focusing mass spectrometer

⁶ Ion trap mass spectrometer (ITMS)

⁷ Quadrupole mass spectrometer (QMS)

ーナル抗体を用いて試料中の目的物質を定量する手法。

ダイオキシン類のイムノアッセイには、酵素標識抗原を吸光光度法で検出する酵素標識免疫測定法 (ELISA) やユーロピウム標識抗原を蛍光光度法で検出する時間分解蛍光免疫測定法 (TRFIA) 等がある。いずれも 96 ウェルマイクロプレートのウェル内で試料由来のダイオキシン類及び標識抗原を特異抗体と競合的に反応させ、未反応の抗原を洗浄後、発色基質を加え、抗体に結合した標識抗原量に由来する酵素活性もしくは蛍光強度を測定する。標準液の濃度列を試料と同時に測定し、作成した検量線から試料中のダイオキシン類を定量する。試料中のダイオキシン類濃度が高いほど標識抗原に由来する発色の度合いや蛍光強度は小さくなる。イムノアッセイでは、特定のダイオキシン類化合物に特異的な抗体を使用しているが、抗体は分子構造が類似した化合物に対しても交差反応する。そのため、イムノアッセイの測定値は、抗体に結合した化合物の総量として示され、総合的な毒性評価の指標とされている。交差の度合いが TEF に近ければ測定値は TEQ に近似される。

3.1.2.2 Ah レセプターバインディングアッセイ

3.1.2.2.1 抗 Ah レセプター複合体抗体を用いたイムノアッセイ

抗ダイオキシン類抗体を用いて試料中のダイオキシン類を直接検出するイムノアッセイとは異なり、ダイオキシン類の毒性発現に関わる Ah 受容体に結合したダイオキシン類化合物の複合体を特異抗体で検出する手法。

本手法では、Ah 受容体に結合したダイオキシン類化合物の複合体を特異抗体及び酵素標識した二次抗体で検出するため、試料中のダイオキシン類濃度が高いほど発色の度合いは強くなる。Ah 受容体はダイオキシン類以外の芳香族炭化水素やポリ塩化ビフェニル等とも結合する。そのため、Ah レセプターバインディングイムノアッセイの測定値は、Ah 受容体に結合した化合物の総量として示され、総合的な毒性評価の指標とされている。

3.1.2.2.2 レポータージーンアッセイ

ダイオキシン類の毒性発現に関わる遺伝子群に特定のレポーター遺伝子 (ホタルルシフェラーゼ遺伝子) を導入した遺伝子組換え細胞を利用してダイオキシン類を定量する手法。

細胞を播種した 96 ウェルマイクロプレートのウェルにダイオキシン類を含む試料を添加する。細胞膜を透過したダイオキシン類は Ah 受容体と結合し、その構造を変化させ、核内に移動する。そして ARNT と複合体を形成した後、DRE と結合し、特定のタンパク質を合成する。このとき細胞内のホタルルシフェラーゼ遺伝子も同時に発現し、Ah 受容体に結合したダイオキシン類の量に応じてルシフェラーゼが合成される。ルシフェラーゼの発光基質であるルシフェリンを添加し、ルミノメーターで発光量を測定する。標準液の濃度列を試料と同時に測定し、作成した検量線から試料中のダイオキシン類を定量する。試料中のダイオキシン類濃度が高いほど発光は強くなる。Ah 受容体には、ダイオキシン類以外にも芳香族炭化水素やポリ塩化ビフェニル等も結合するため、Ah 受容体に結合した化合物の総量として示され、

総合的な毒性評価の指標とされている。

3.1.2.2.3 Ah レセプターアッセイ PCR 法

ダイオキシン類と結合した Ah 受容体は、ARNT と複合体を形成し、DRE と特異的に結合する。この DRE を含んだ DNA 断片を PCR で増幅し、その増幅速度を蛍光強度として検出してダイオキシン類を定量する手法。Ah 受容体には、ダイオキシン類以外にも芳香族炭化水素やポリ塩化ビフェニル等も結合するため、Ah 受容体に結合した化合物の総量として示され、総合的な毒性評価の指標とされている。

3.2 目標定量下限

3.2.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法

TEF を持つ各化合物について、5pg/g-dry まで測定できるように、採用する測定方法において十分な実試料量を用いなければならない。

3.2.2 生物法

TEQ について、およそ 50pg-TEQ/g-dry まで測定できるように、採用する測定方法において十分な実試料量を用いなければならない。

【留意事項】ダイオキシン類の一部の化合物は害性を有していると考えられているので、吸入、誤飲、直接皮膚への接触等が起こらないように注意する。本マニュアルによる操作で使用するその他の薬品、溶媒等についても吸入及び誤飲によって作業者の健康を損なうものがあるので、取扱いは慎重に行う。前処理室及び測定室の換気並びに廃液及び廃棄物の管理は十分に行う。

4 試料

試料の採取方法は、次による。

4.1 試料の採取

4.1.1 器具

4.1.1.1 試料容器

試料容器はガラス製のものを用いる。使用前に有機溶媒等で洗浄する。その際、洗浄に用いた溶媒が容器内に残らないよう注意する。

採取検体数が多い場合等で上述の容器を用いることが困難な場合、これ以外の試料容器を使用してもよい。

4.1.1.2 採泥器

状況に合った採泥器⁸⁾を用いる。

4.1.2 試料採取(採泥)方法

表層試料は、採泥器によって、底質表面から 10cm 程度の泥を 3 回以上採取し、それらを混合して採泥試料とする。採取検体数が多い場合等で、3 回以上採取しそれらを混合する方法が必ずしも調査目的に合致しないと考えられる場合、1 回のみ採取でもよい。

深さ方向の調査が必要な場合には、アクリル製のパイプ⁹⁾を潜水土が底泥に差し込み引き上げる方法等で採取する。この柱状試料から表層試料を採取する場合、柱状試料表面から 10cm 程度の泥を採取し混合したものを試料とする。

試料採取の記録： 試料採取時には、次の事項を記録する。

- (a) 試料の識別(試料の名称、試料番号等)
- (b) 採取場所の識別(地点の名称、採取場所・位置等)
- (c) 採取年月日、時刻
- (d) 採取時の天候、前日の天候
- (e) 採取者の識別(所属、氏名等)
- (f) 採取方法(採泥器の種類、試料採取回数等)
- (g) 採取場所の状況(試料に影響を与えると思われる事項。例えば、採取現場の略図等。)
- (h) 試料の外観(試料の色相)、臭い等参考となる事項。柱状試料の場合深さ方向の外観等。
- (i) 必要に応じて採取時の気温と水温
- (j) 必要に応じて採取試料の主な物理・化学的情報(例えば、泥温、水分、強熱減量、粒度組成、有機炭素量、硫化物)等を測定する。
- (k) 必要に応じて採取場所の状況等の写真撮影を行う。

⁸⁾ 例えば、エクマンバージ型採泥器。

⁹⁾ アクリルパイプの内径及び長さは、試料として採取するのに必要な深さと、測定分析に必要な試料量から決定する。

4.2 試料の取扱い

採泥器で採泥した試料をバット等に移し、湿泥試料中に試料の代表性を妨害するような小石、貝殻、植物片等の異物がある場合、これらを取り除く。均一に混合し、必要量を密閉可能なガラス製容器に入れて、ポリエチレン袋等で密封した後、クーラーボックス等に入れ氷冷・遮光状態で実験室まで移送する。採取検体数が多い場合等で上述の容器を準備することが困難であるような場合、これら以外のものを使用してもよい。また、同じく、氷冷して実験室に持ち帰ることが困難である場合、遮光のみの状態で移送してもよい。

柱状試料の場合、柱状試料のまま実験室まで移送し、実験室で必要な堆積層の試料を切り出すか、あるいは試料を採取した現場付近で試料を切り出す。

試料はできるだけ速やかに分析する。直ちに分析が行えない場合には、遮光した状態において4℃以下で保存する。

5 試料の前処理

5.1 前処理の概要

採取した試料に対して溶媒抽出を行い、精製後、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法又は生物法によって測定する。図-1 及び図-2 に試料の前処理から測定までのフローを示す。

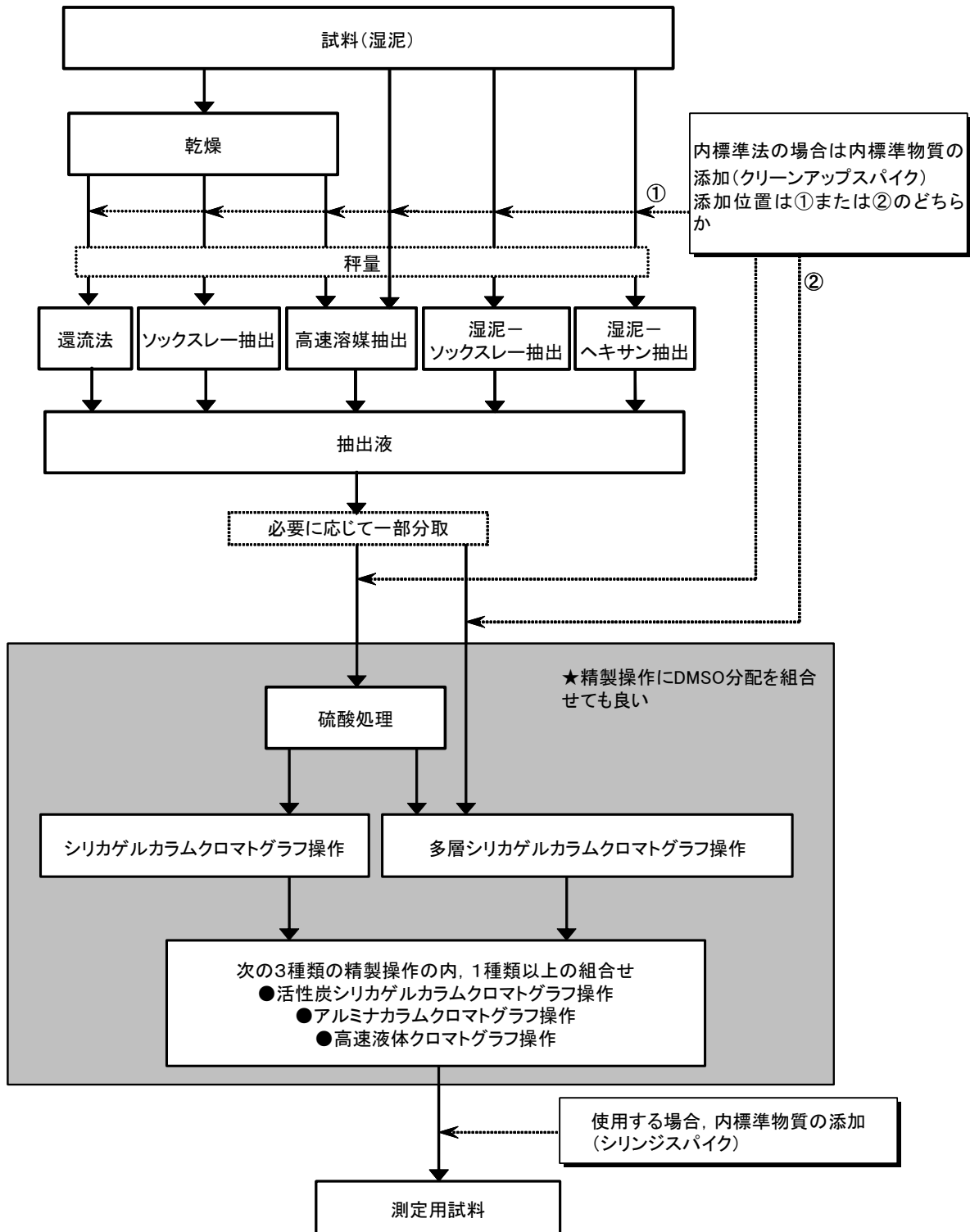


図-1. 底質試料の前処理から測定までのフローの例(GC/MS法)

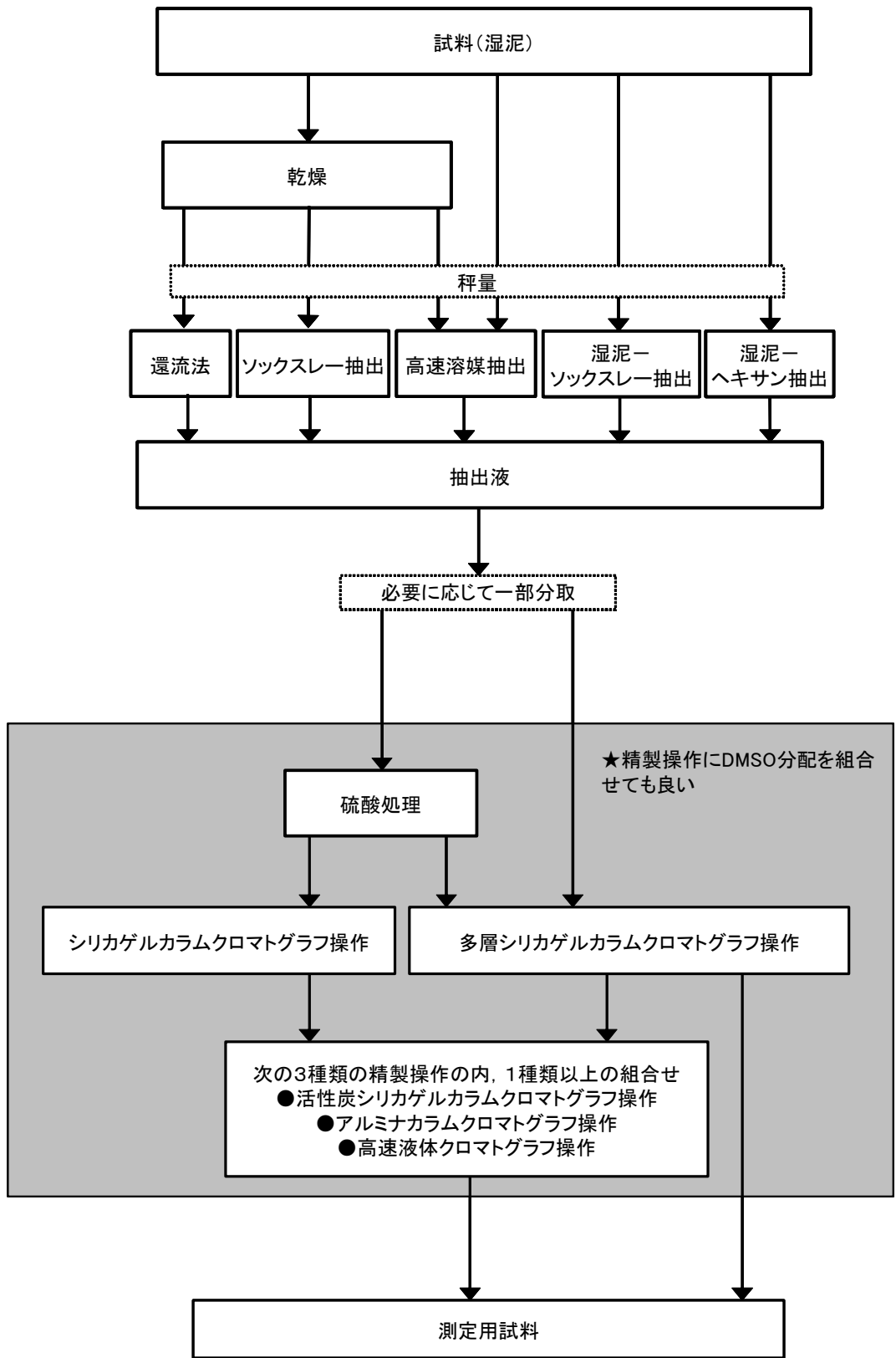


図-2. 底質試料の前処理から測定までのフローの例(生物法)

5.2 試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、空試験値等によって測定に支障のないことを確認する。

(a) 水

JIS K 0557 に規定する A4 (又は A3) の水。

(b) メタノール

JIS K 8891 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(c) アセトン

JIS K 8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(d) トルエン

JIS K 8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(e) ジクロロメタン

JIS K 8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(f) ヘキサン

JIS K 8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(g) ジメチルスルホキシド (DMSO)

JIS K 9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(h) デカン又はノナン又はイソオクタン

測定に支障のない品質のもの。

(i) 硫酸ナトリウム

JIS K 8987 に規定するもの、又は同質の品質のもの。

(j) 硫酸

JIS K 8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(k) 水酸化カリウム

JIS K 8574 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(l) 硝酸銀

JIS K 8550 に規定するもの、又は同質の品質のもの。

(m) 内標準物質

すべての炭素原子又は塩素原子が ^{13}C 又は ^{37}Cl でラベルされたダイオキシン類のうち、適正な種類及び濃度のものを用いる。表-1 に内標準物質の例を示す。内標準物質には、次の 2 種類があり、それぞれ別の化合物を用いる。

①クリーンアップスパイク用内標準物質

抽出から精製までの前処理操作全体の結果を確認し、ダイオキシン類を定量するための基準とするために添加する内標準物質である。

②シリンジスパイク用内標準物質

GC/MS への測定用試料液の注入及びクリーンアップスパイク用内標準物質の回収率を確認するために添加する内標準物質で、クリーンアップスパイク用で使用した種類以外のものを用いる。ノナン、デカン、イソオクタンあるいはトルエン溶液等、通常は GC/MS 測定用に調製した試料溶液と同じのものを用いる。

表-1. ダイオキシン類の内標準物質の例

		化合物の名称
PCDDs	四塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 4}\text{-TeCDD}$
		$^{13}\text{C}_{12-2, 3, 7, 8}\text{-TeCDD}$
		$^{37}\text{Cl}_4\text{-2, 3, 7, 8-TeCDD}$
	五塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 7, 8}\text{-PeCDD}$
	六塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 4, 7, 8}\text{-HxCDD}$
		$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 6, 7, 8}\text{-HxCDD}$
$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 7, 8, 9}\text{-HxCDD}$		
七塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8}\text{-HpCDD}$	
八塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9}\text{-OCDD}$	
PCDFs	四塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-2, 3, 7, 8}\text{-TeCDF}$
		$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 7, 8}\text{-TeCDF}$
	五塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 7, 8}\text{-PeCDF}$
		$^{13}\text{C}_{12-2, 3, 4, 7, 8}\text{-PeCDF}$
	六塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 4, 7, 8}\text{-HxCDF}$
		$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 6, 7, 8}\text{-HxCDF}$
		$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 7, 8, 9}\text{-HxCDF}$
	七塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8}\text{-HpCDF}$
$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 4, 7, 8, 9}\text{-HpCDF}$		
八塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9}\text{-OCDF}$	
Co-PCB	四塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-2, 3', 4', 5}\text{-TeCB (#70)}$
		$^{13}\text{C}_{12-3, 3', 4, 4'}\text{-TeCB (#77)}$
		$^{13}\text{C}_{12-3, 4, 4', 5}\text{-TeCB (#81)}$
	五塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-2, 3, 3', 4, 4'}\text{-PeCB (#105)}$
		$^{13}\text{C}_{12-2, 3, 4, 4', 5}\text{-PeCB (#114)}$
		$^{13}\text{C}_{12-2, 3', 4, 4', 5}\text{-PeCB (#118)}$
		$^{13}\text{C}_{12-2', 3, 4, 4', 5}\text{-PeCB (#123)}$
		$^{13}\text{C}_{12-3, 3', 4, 4', 5}\text{-PeCB (#126)}$
	六塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-2, 3, 3', 4, 4', 5}\text{-HxCB (#156)}$
		$^{13}\text{C}_{12-2, 3, 3', 4, 4', 5'}\text{-HxCB (#157)}$
		$^{13}\text{C}_{12-2, 3', 4, 4', 5, 5'}\text{-HxCB (#167)}$
		$^{13}\text{C}_{12-3, 3', 4, 4', 5, 5'}\text{-HxCB (#169)}$
	七塩素化物	$^{13}\text{C}_{12-2, 2', 3, 3', 4, 4', 5}\text{-HpCB (#170)}$
		$^{13}\text{C}_{12-2, 2', 3, 4, 4', 5, 5'}\text{-HpCB (#180)}$
$^{13}\text{C}_{12-2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'}\text{-HpCB (#189)}$		

(注) PCB の欄において、括弧内の数値は、IUPAC No. を示す。

(n) シリカゲル

カラムクロマトグラフ用シリカゲルをビーカーに入れてメタノールで洗浄し、メタノールを除去した後、メタノールを十分に揮散させる。これを層の厚さを 10mm 以下になるように蒸発皿又はビーカーに入れ、130℃で約 18 時間加熱した後、デシケーター中で約 30 分間放冷する。メタノール洗浄の代わりに 400℃で 4 時間以上加熱処理してもよい¹⁰⁾。密閉できる試薬瓶に入れ、デシケーター中で保存する。

(o) 水酸化カリウム (2mass%) シリカゲル

シリカゲル 100g に対して水酸化カリウム溶液 (50g/L) 40mL を加えた後、ロータリーエバポレーターを用いて約 50℃で減圧脱水し、水分のほとんどを除去した後、温度を 50～80℃に上げて更に約 1 時間減圧脱水を続けて粉末状にする。調製後、密閉できる試薬瓶に入れデシケーター中で保存する。

(p) 硫酸 (22mass%) シリカゲル

シリカゲル 100g に対して硫酸 28.2g を添加後、十分振とうし、粉末状にする。調製後、密閉できる試薬瓶に入れデシケーター中で保存する。

(q) 硫酸 (44mass%) シリカゲル

シリカゲル 100g に対して硫酸 78.6g を添加後、十分振とうし、粉末状にする。調製後、密閉できる試薬瓶に入れデシケーター中で保存する。

(r) 硝酸銀 (10mass%) シリカゲル

シリカゲル 100g に対して硝酸銀溶液 (400g/L) 28mL を加えた後、ロータリーエバポレーターで水分を完全に除去する。硝酸銀シリカゲルは褐色フラスコを使用して極力遮光して調製する。調製後は、密閉できる褐色瓶に入れデシケーター中で保存する。

(s) アルミナ

カラムクロマトグラフ用アルミナ(塩基性、活性度 I)は、予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。活性化する必要がある場合には、ビーカーに層の厚さを 10mm 以下にして入れて 130℃で約 18 時間乾燥、又はシャーレに層の厚さを約 5mm 程度にして入れて 500℃で約 8 時間加熱処理した後、デシケーター内で約 30 分間の放冷後、密閉できる試薬瓶中に保存する。活性化後は、速やかに使用する。

(t) 液体クロマトグラフ用カーボンカラム

液体クロマトグラフ用のグラファイトカーボンカラム、又はそれと同等の分離性能を持つもの。

(u) 活性炭シリカゲルカラム充てん剤

活性炭を含浸又は分散させたシリカゲル、又はそれと同等の分離性能を持つもの。

(v) 円筒ろ紙

ソックスレー抽出に用いる。ガラス製又は石英製で、必要量の風乾した底質試料が入るサイズのもの。使用に先立ってアセトン洗浄し、さらにジクロロメタン又はトルエン等でソックスレー抽出を行うか、又は 450℃以上で 4 時間以上加熱処理して用いるとよい。

(w) 窒素

JIS K 1107 に規定する高純度窒素 2 級。

(x) 清浄な空気

コンプレッサー又は空気を充填したボンベから供給されるもので、ラインに活性炭及びエアフィルター等を装着する。

¹⁰⁾ シリカゲルの熱による変質に注意する。

5.3 器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、溶媒等で洗浄、あるいは加熱処理するなどし、空試験値等によって測定に支障のないことを確認する。

(a) ガラス器具

JIS R 3503 及び JIS R 3505 に規定するもの。分液ロート及びカラムクロマトグラフ管ではコックの部分がふっ素樹脂製のものを用いてもよい。

(b) 抽出器

ソックスレー抽出器、高速溶媒抽出装置、又は還流抽出装置。

(c) 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。接続部にグリースを使用してはならない。

(d) カラムクロマトグラフ管

内径 10mm (又は内径 15mm) のガラス製カラムクロマトグラフ管。長さは充填材の量によって変更する。上部は組み合わせて使用する分液ロートと擦り合わせ接続可能なもの。下部にガラス製焼結フィルターが付いていてもよい。コックの部分がふっ素樹脂製のものを用いてもよい。接続部にグリースを使用してはならない。

(e) 高速液体クロマトグラフ

「5.4.4.2.2 高速液体クロマトグラフ操作」が可能なもの。

5.4 前処理操作

5.4.1 試料の乾燥⁽¹¹⁾

湿泥試料中に試料の代表性を妨害するような小石、貝殻、動植物片等の異物がある場合、これらを取り除き、十分に混合する。混合した湿泥試料から乾燥後の重量で測定分析に必要な量を金属性のスパーテル等でステンレス製あるいはガラス製容器に移し風乾する。風乾した試料は、乳鉢等ですりつぶし、よく混合した後、必要な重量を採取する。

湿泥から直接抽出する手法を採用する場合、風乾の操作は不要である。

なお、最終的なダイオキシン類の報告値は乾燥重量当たりの濃度で表すため、試料の水分量を適正な方法で別途測定する。

5.4.2 内標準物質の添加(クリーンアップスパイク)

同位体内標準法を採用する場合、抽出操作前の試料に、クリーンアップスパイクとして内標準物質⁽¹²⁾を添加する。ただし、試料中のダイオキシン類濃度が予測できない場合、抽出液にクリーンアップスパイクを添加してもよい。クリーンアップスパイクで添加した内標準物質の回収率は、シ

¹¹ 河川、湖沼等の底質試料においては、同一調査域であってもダイオキシン類濃度が試料によって大きく異なっていることがあるので、試料調製中の試料同士のクロスコンタミネーションが生じないように十分注意する。

¹² クリーンアップスパイクの内標準物質は、毒性等価係数のある化合物はすべて添加するのが望ましいが、PCDDs 及び PCDFs については少なくとも塩素数ごとに 2,3,7,8-位塩素置換異性体を最低 1 種類ずつ、PCB についてはノンオルト体の Co-PCB を全種類、モノオルト体の Co-PCB については塩素化物ごとに 1 種類ずつそれぞれ添加することにしてもよい。添加した内標準の種類は報告書に記述する。添加する内標準物質は、シリンジスパイクとは別の化合物を用いるが、内標準物質によっては、GC/MS の測定条件によって測定に妨害を与える場合があるので、その使用に際しては、十分に検討・確認しておく。

リンジスパイクを基準にして求め、50～120%の範囲内に入ることを目標とする。

同位体内標準法を採用しない場合、定量値の精確さが低下することが考えられるが、内標準物質の添加が定量に妨害を与えることが考えられる場合には、絶対検量線法を用いてもよいものとする。絶対検量線法を採用する場合、前処理のバッチごとに、5%以上の頻度で添加回収試験による回収率の確認を行い、回収率が50～120%の範囲内に入ることを目標とする。

5.4.3 試料からの抽出

秤量した湿泥あるいは風乾泥試料をトルエン等⁽¹³⁾を用いて適切な時間抽出を行う。抽出方法は、図-1 及び図-2 に示したように、ソックスレー抽出法、高速溶媒抽出法、還流法、湿泥-ソックスレー抽出法、あるいは湿泥-ヘキサン抽出法によって行う⁽¹⁴⁾。

抽出に供する試料量は乾燥重量当たりで 10～20g を目安とするが、採用する測定方法(抽出液を分取する割合、予測される回収率、検出系の相対感度・絶対感度)との組合せによるので、測定を始める前に十分計画を立てて決定する。

5.4.4 精製

5.4.4.1 硫酸処理-シリカゲルカラムクロマトグラフ操作又は多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作
得られた抽出液の適量を分取し⁽¹⁵⁾、濃縮器で濃縮しつつヘキサンに転溶する。ヘキサン溶液を濃縮し、硫酸処理あるいは硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフ操作、あるいは多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作へ供する。

5.4.4.1.1 硫酸処理

硫酸処理操作は、次の手順による⁽¹⁶⁾。

- (a) 濃縮液を分液ロート (300mL) にヘキサン 50～150mL で洗い込みながら移し入れ、硫酸 20～50mL を加え、振とうし、静置後、硫酸層を除去する。
- (b) (a)の操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返す⁽¹⁷⁾。
- (c) ヘキサン層を水 50mL で洗浄し、洗液がほぼ中性になるまで繰り返し洗浄する。
- (d) ロート等に充填した硫酸ナトリウムを通して脱水し、濃縮器で1～2mL程度に濃縮する。

¹³ ソックスレー抽出法及び湿泥-ソックスレー抽出法の場合、トルエンに少量のアセトン(10%程度)を入れてもよい。アセトンの量がソックスレー抽出器の容量を超えるとアセトンが優先的に乾留し、抽出率が下がるので注意する。高速溶媒抽出法の場合はアセトンとトルエン、湿泥-ヘキサン抽出法の場合はヘキサンを溶媒として用いる。

¹⁴ 硫黄成分の多い試料では抽出液中に銅チップや粒状銅を入れると、硫黄分除去に効果的である。また、精製工程において銅チップや粒状銅による硫黄分除去を行ってもよい。

¹⁵ 再測定が必要な場合があるため、抽出液の一部を保存しておくことが望ましい。

¹⁶ 本マニュアルで対象とする底質試料は有機物含有量が多いので、硫酸処理は有効である。

¹⁷ 硫酸と有機物の反応による溶媒の突沸が生じることがあるので十分注意する。硫酸の添加はゆっくり行う。有機物含量が多い場合、激しく振とうする。必ず手袋及びマスク等の保護具を使用する。

5.4.4.1.2 シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

シリカゲルカラムクロマトグラフ操作は、次の手順による。

- (a) ヘキサン約 10mL を入れたビーカーにシリカゲル 3g を量り取り、ガラス棒で緩やかにかき混ぜて気泡を除き、カラムクロマトグラフ管(内径 10mm)に充填する。
- (b) ヘキサンを流下させ、シリカゲル層を安定させた後、その上に硫酸ナトリウムを約 10mm の厚さになるように乗せ、少量のヘキサンで管壁に付着している硫酸ナトリウムを洗い落とす。
- (c) シリカゲルカラムにヘキサン 50mL 以上を流下させた後、液面を硫酸ナトリウムの上面まで下げ、試験溶液をカラムに静かに移し入れる。
- (d) ヘキサン 1mL で 2～3 回洗い込み、液面を硫酸ナトリウム面まで下げ、ヘキサン 150～200mL を入れた滴下用分液ロートをカラムクロマトグラフ管の上部に装着し、ヘキサンを約 2.5mL/min(毎秒 1 滴程度)の流量でゆっくりと流下させる⁽¹⁸⁾。
- (e) 溶出液は濃縮器で約 2mL に濃縮する。

5.4.4.1.3 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作は、次の手順による。

- (a) カラムクロマトグラフ管(内径 15mm)に、シリカゲル 0.9g、水酸化カリウム(2mass%) シリカゲル 3g、シリカゲル 0.9g、硫酸(44mass%) シリカゲル 4.5g、硫酸(22mass%) シリカゲル 6g、シリカゲル 0.9g、硝酸銀(10mass%) シリカゲル⁽¹⁹⁾3g 及び硫酸ナトリウム 6g を順次充填する。
- (b) ヘキサン 50mL を流下させた後、液面を硫酸ナトリウムの上面まで下げる。
- (c) 濃縮液をカラムに静かに注ぎ入れ、液面をカラム上端まで下げる。ヘキサン 1mL で抽出液の容器を洗浄し、洗液はカラム内壁を洗いながら入れる。
- (d) (c)の洗浄操作を 2～3 回繰り返す。
- (e) ヘキサン 120mL を入れた滴下用分液ロートをカラムクロマトグラフ管の上部に装着し、ヘキサンを約 2.5mL/min(毎秒 1 滴程度)の流量で流下させる⁽¹⁸⁾。
- (f) 溶出液を濃縮器で約 2mL に濃縮する。充填部の着色が多い場合は、本操作を繰り返す。

¹⁸ カラムクロマトグラフ操作におけるダイオキシン類の溶出条件は、底質試料の抽出液等を用いて分画試験を行って確認する。分画試験は、少なくとも充填剤のロットごとに行う。

¹⁹ 硝酸銀(10mass%) シリカゲルは特に硫黄分が多い試料に対して用いると効果的である。本マニュアルで対象とする底質試料では硫黄分が含まれる場合が多いと考えられるので有効である。

5.4.4.2 その他の精製操作

「5.4.4.1 硫酸処理-シリカゲルカラムクロマトグラフ操作又は多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作」で得られた濃縮液を、次に示すいずれかの操作、又はそれらの組合せを用いて精製し、測定用の濃縮液を調製する。

5.4.4.2.1 アルミナカラムクロマトグラフ操作

アルミナカラムクロマトグラフ操作⁽²⁰⁾について、PCDDs 及び PCDFs 測定用と Co-PCB 測定用とに濃縮液を分けて行う手順を以下に示す。同定及び定量の操作条件によっては、濃縮液を分けずに行うことも可能である。その場合の手順はこの限りではない。

5.4.4.2.1.1 PCDDs 及び PCDFs 測定用アルミナカラムクロマトグラフ操作

PCDDs 及び PCDFs 測定用のアルミナカラムクロマトグラフ操作は、次の手順による。

(a) ヘキサン 10mL を入れたビーカーにアルミナ 10g を量り取り、ガラス棒で緩やかにかき混ぜて気泡を除き、カラムクロマトグラフ管に充填する。

(b) ヘキサンを流下させ、アルミナ層を安定させた後、その上に硫酸ナトリウムを約 10mm の厚さになるように乗せ、ヘキサン数 mL で管壁に付着している硫酸ナトリウムを洗い落とす。

(c) ヘキサン 50mL を流下させた後、液面を硫酸ナトリウムの上面まで下げる。

(d) 濃縮液を正確に二分した後、その一つを窒素気流により約 0.5mL まで濃縮してカラムクロマト管に静かに移し入れ、ヘキサン 1mL で数回洗い込み、液面を硫酸ナトリウムまで下げた後、ジクロロメタン (2vol%) を含むヘキサン溶液 100mL を約 2.5mL/min (毎秒 1 滴程度) で流して第 1 画分⁽²⁰⁾を得る。この画分は測定が終了するまで保管する。

(e) さらにジクロロメタン (50vol%) を含むヘキサン溶液 150mL を、約 2.5mL/min で流して第 2 画分を得る。この画分に PCDDs 及び PCDFs が含まれる⁽²⁰⁾。

(f) 第 2 画分を濃縮器で約 2mL に濃縮する。

5.4.4.2.1.2 コプラナーPCB 測定用アルミナカラムクロマトグラフ操作

Co-PCB 測定用のアルミナカラムクロマトグラフ操作は、次の手順による。

(a) ヘキサン 10mL を入れたビーカーにアルミナ 10g を量り取り、ガラス棒で緩やかにかき混ぜて気泡を除き、カラムクロマトグラフ管に充填する。

(b) ヘキサンを流下させ、アルミナ層を安定させた後、その上に硫酸ナトリ

²⁰ アルミナの活性は製造ロット及び開封後の保存期間によって、かなり変化が認められる。活性の低下したものでは、8 塩素化物がジクロロメタン (50vol%) を含むヘキサン溶液の規定量では第 2 画分に溶出しない場合もあるため、底質等の抽出液等を用いた分画試験で活性度を確認する必要がある。

ウムを約 10mm の厚さになるように乗せ、ヘキサン数 mL で管壁に付着している硫酸ナトリウムを洗い落とす。

(c) ヘキサン 50mL を流下させた後、液面を硫酸ナトリウムの上面まで下げる。

(d) 濃縮液を正確に二分した後、その一つを窒素気流により約 0.5mL まで濃縮してカラムクロマトグラフ管に静かに移し入れ、ヘキサン 1mL で数回洗い込み、液面を硫酸ナトリウムまで下げた後、ヘキサン 40mL を約 2.5mL/min (毎秒 1 滴程度) で流して鎖状炭化水素等を溶出させる⁽²⁰⁾。

(e) ジクロロメタン (5vol%) を含むヘキサン溶液 120mL を約 2.5mL/min (毎秒 1 滴程度) で流して第 1 画分を得る。この画分には Co-PCB が含まれる⁽²⁰⁾。

(f) さらにジクロロメタン (50vol%) を含むヘキサン溶液 160mL を、約 2.5mL/min で流して第 2 画分を得る。この画分は測定が終了するまで保管する。

(g) 第 1 画分を濃縮器で約 2mL に濃縮する。

5.4.4.2.2 高速液体クロマトグラフ操作

高速液体クロマトグラフ操作は、次の手順による。ここで示す操作条件は、使用する機器、カラム等によって若干異なってくるので、予め底質の抽出液等を用いて分画試験を行って確認しなければならない。

(a) 流路切替えバルブを装着した高速液体クロマトグラフに活性炭 (porous graphitized carbon) カラムを移動相の流れの向きが切り替えられるように装着し、溶離液流量を 2mL/min に設定する。

(b) 検出器として吸光光度検出器を接続し、検出器出口から溶出液を分取できるようにしておく。

(c) 溶離液をトルエンとし、通常の流れの向きで流し、十分にカラムを洗浄した後、溶離液をヘキサンにしてカラム及び装置の流路内をヘキサンで置換する。検出器の指示値の変化でヘキサンに置換したかどうかを判断するのがよい。

(d) 濃縮液を更に窒素気流により 0.1mL 程度に濃縮する。この液を高速液体クロマトグラフに注入し、溶離液をヘキサンのままで 4 分間流し、溶出液 8mL を分取して第 1 画分とする。ここには、Co-PCB 以外の PCBs が含まれている⁽¹⁸⁾。

(e) 次に、溶離液をジクロロメタン (50vol%) を含むヘキサン溶液として 20 分間流し、溶出液 40mL を分取して第 2 画分とする。ここには、Co-PCB のモノオルト体が含まれている⁽¹⁸⁾。

(f) さらに、溶離液をトルエン (30vol%) を含むヘキサン溶液として 20 分間流し、溶出液 40mL を分取して第 3 画分とする。ここには、Co-PCB のノンオルト体が含まれている⁽¹⁸⁾。

(g) 最後に、オーブンを 50°C に加熱し、カラムでの移動相の流れの向きを逆にしてトルエンを 15 分間流し、溶出液 30mL を分取して第 4 画分とする。ここには、PCDDs 及び PCDFs が含まれている⁽¹⁸⁾。

(h) 第 2 及び第 3 画分を一つにし、Co-PCB 測定用として濃縮器で約 2mL に濃縮し、第 4 画分を PCDDs 及び PCDFs 測定用として同様に濃縮する。

5.4.4.2.3 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフ操作は、次の手順による。ここで示す操作条件は、使用する活性炭シリカゲルによって異なってくるので、予め底質等の抽出液等を用いて分画試験を行って確認しなければならない。

(a) カラムクロマトグラフ管(内径 10mm)の底部に石英ガラスウールを詰め、その上に硫酸ナトリウムを厚さ約 10mm、活性炭シリカゲルを 1g、硫酸ナトリウムを厚さ約 10mm に積層して充填する。

(b) トルエンを流下させて十分に洗浄⁽²¹⁾した後、ヘキサンを流下させてカラム内をヘキサンに置換⁽²²⁾する。

(c) 濃縮液を更に窒素気流で 0.5mL 程度に濃縮する。この液をカラムに負荷し、ヘキサン 50mL を 2.5mL/min で流下させる⁽²³⁾。

(d) 次いで、ジクロロメタン(25vol%)を含むヘキサン溶液 150mL を流下させ、第 1 画分を得る。ここに、Co-PCB のモノオルト体が含まれている⁽¹⁸⁾。

(e) 次いで、トルエン 200mL を流下させ⁽²⁴⁾、第 2 画分を得る。ここには、PCDDs、PCDFs 及び Co-PCB のノンオルト体が含まれている⁽¹⁸⁾。

(f) この第 1 画分及び第 2 画分を濃縮器でそれぞれ約 2mL に濃縮する。

5.4.4.2.4 ジメチルスルホキシド(DMSO)分配処理操作

ジメチルスルホキシド(DMSO)分配処理操作は、必要に応じて次の手順によって行う。本操作は、脂肪族炭化水素等の低極性物質の除去を目的として行うものであり、PCDDs 及び PCDFs 測定用、Co-PCB 測定用に分けることはできないので、他の精製操作と組み合わせて行う。

(a) 分液ロートにヘキサン飽和の DMSO 25mL を入れ、これに濃縮液をヘキサンで洗浄しながら移し入れ、振とう抽出を 4 回行って得られた合計約 100mL の DMSO 抽出液に、ヘキサン 40mL を加え、洗浄する。

(b) 分液ロートにヘキサン 75mL 及び水 100mL を入れ、(a)の操作で得られた DMSO 抽出液約 100mL を加え、振とう抽出を 3 回行う。ヘキサン抽出液約 225mL を得る。

(c) 得られた合計約 225mL のヘキサン抽出液を分液ロートに入れ、2mol/L 水酸化カリウム水溶液 10mL による洗浄を行う。

(d) さらに、水 25mL で 2 回洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水した後、濃縮器で 2mL に濃縮する。

²¹ トルエンが完全に除去できていないと分画が正確に行えないので注意する。空試験によってトルエン洗浄が必要ないことが確認されていればトルエンによる洗浄は不要である。

²² ヘキサンによる置換を行わない方がよい活性炭シリカゲルもある。

²³ 活性炭の種類によってはこの画分にいくつかのモノオルト体の PCB の一部が溶出する場合があるので注意する。

²⁴ トルエンによる展開時にカラムを反転させてもよい。この場合トルエン 50mL 程度で第 2 画分を得ることができる。

5.4.5 測定用試料の調製

5.4.5.1 GC/MS 法

「5.4.4 精製」の操作により得られた PCDDs 及び PCDFs 測定用及び Co-PCB 測定用の各濃縮液を窒素又は清浄な空気気流下⁽²⁵⁾で適当な液量に濃縮したものにシリンジスパイク用内標準物質を添加し、最終的に一定液量(0.02~0.1mL)にしたものをそれぞれ PCDDs 及び PCDFs 測定用、Co-PCB 測定用試料とする⁽²⁶⁾。GC/MS 測定で採用する各手法によっては、PCDDs 及び PCDFs 測定用及び Co-PCB 測定用の各濃縮液を適当な割合で混合してもよい。

5.4.5.2 生物法

「5.4.4 精製」の精製操作により得られた PCDDs 及び PCDFs 測定用及び Co-PCB 測定用の各濃縮液を適当な割合で混合し、窒素又は清浄な空気気流下⁽²⁵⁾で濃縮しつつ、最終的に各手法に合わせた有機溶媒に転溶したものを測定用試料とする。

²⁵溶液の表面が動いているのがようやく見える程度に窒素あるいは空気吹付け量を調節して溶液が飛散しないように注意する。また、溶液に大きな渦ができるほど窒素を吹付けたり、完全に乾固させたりすると、目的物質の損失を招くことがある。

²⁶シリンジスパイクは測定試料中の濃度が検量線作成用標準液と同程度になるように添加する。

6 同定及び定量

ダイオキシン類の同定及び定量は、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法、又は生物法によって行う。

6.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法

キャピラリーカラムを装着したガスクロマトグラフ(GC)及び質量分析計(MS)を用いるガスクロマトグラフ質量分析計法で、MSとしては二重収束型、イオントラップ型、四重極型を用いることができる。

なお、GC/MS法では、二重収束型MS、イオントラップ型MS(MS/MS)、四重極型MSによって測定、定量されたデータが1つの検体中に混在していてもよい。例えば、PCDDs及びPCDFsを二重収束型MSで測定、定量し、Co-PCBをイオントラップ型MS(MS/MS)で測定、定量し、それらのデータを組み合わせることによってTEQを算出してもよい。

6.1.1 試薬

同定及び定量に用いる試薬は、次による。

(a) 質量校正用標準物質

ペルフルオロクロセン(PFK)、ペルフルオロトリブチルアミン(PFTBA)等の質量分析用高沸点成分を使用する。質量校正用標準物質は使用するMSと定量法に適切なものを用いる。

(b) 標準物質

同位体内標準法によるダイオキシン類の同定及び定量に使用する標準物質は、表-2に示すものを用いる。

(c) 内標準物質

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内標準物質。

(d) 検量線作成用標準液

GC/MSの定量範囲内で濃度0を含めた4段階以上を調製する。同位体内標準法を用いる場合は、クリーンアップスパイク及びシリンジスパイクに対応する標準物質を混合する。

6.1.2 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)

同定及び定量に用いるガスクロマトグラフ質量分析計は、次による。

6.1.2.1 ガスクロマトグラフ(GC)

6.1.2.1.1 試料導入部

スプリットレス方式、オンカラム注入、又は大量注入方式(温度プログラム気化注入方式等)²⁷⁾。注入温度が250～280℃で使用可能であること。採用する装置と注入法の組合せから支障なく測定できることを予め確認しておくこと。

²⁷⁾ 大量注入方式の場合、ダイオキシン類の脱塩素が定量に影響を及ぼす可能性がある。例えば、OCDDがHpCDDsの濃度に比較して高濃度である場合、HpCDDsの定量が正確でなくなることが考えられるので注意する。

表-2. ダイオキシン類の同定及び定量に使用する標準物質

		化合物の名称
PCDDs	四塩素化物	2, 3, 7, 8-TeCDD
	五塩素化物	1, 2, 3, 7, 8-PeCDD
	六塩素化物	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD
		1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD
		1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD
	七塩素化物	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD
八塩素化物	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-OCDD	
PCDFs	四塩素化物	2, 3, 7, 8-TeCDF
	五塩素化物	1, 2, 3, 7, 8-PeCDF
		2, 3, 4, 7, 8-PeCDF
	六塩素化物	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
	七塩素化物	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF		
八塩素化物	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-OCDF	
Co-PCB	四塩素化物	3, 3', 4, 4'-TeCB (#77)
		3, 4, 4', 5-TeCB (#81)
	五塩素化物	2, 3, 3', 4, 4'-PeCB (#105)
		2, 3, 4, 4', 5-PeCB (#114)
		2, 3', 4, 4', 5-PeCB (#118)
		2', 3, 4, 4', 5-PeCB (#123)
		3, 3', 4, 4', 5-PeCB (#126)
	六塩素化物	2, 3, 3', 4, 4', 5-HxCB (#156)
		2, 3, 3', 4, 4', 5'-HxCB (#157)
		2, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB (#167)
		3, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB (#169)
	七塩素化物	2, 3, 3', 4, 4, 4', 5'-HpCB (#189)

(注) Co-PCB の欄において、括弧内の数値は、IUPAC No. を示す。
 ここで示す標準物質は全て使用しなければならない。

6.1.2.1.2 GC カラム

内径 0.1～0.52mm、長さ 25～60m の溶融シリカ製のキャピラリーカラム。

TEF を持つ化合物を可能な限り単独にて分離定量することが望ましいが、簡易測定法であることに鑑み、また安全側からの評価を行うという観点から、全ての TEF を持つ化合物を単離定量できなくともよいこととする。

ただし、単離定量できなかった化合物については、報告に際して他の化合物との合計値であることを記述する(「7.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法」参照)。

GC カラムは次の要件を満足していればよい。

- (a) PCDDs 及び PCDFs の測定では、TeCDDs、PeCDDs、HxCDDs、HpCDDs、OCDD、TeCDFs、PeCDFs、HxCDFs、HpCDFs、OCDF の全化合物について、採用する GC のカラム恒温槽温度プログラムに対応するクロマトグラムにおける溶出位置が判明していること。
- (b) コプラナー PCB の測定では、TeCBs、PeCBs、HxCBs、HpCBs、OCBs、NoCBs、DeCBs に含まれる全化合物について、採用する GC のカラム恒温槽温度プログラムに対応するクロマトグラムにおける溶出位置が判明していること。
- (c) 無極性の液相でないこと。

6.1.2.1.3 キャリヤーガス

純度 99.999%以上の高純度ヘリウム。

6.1.2.1.4 カラム恒温槽

温度制御範囲が 50～350℃であり、測定に用いる昇温プログラムの可能なもの。

6.1.2.2 質量分析計 (MS)

6.1.2.2.1 質量分離方式

二重収束型、イオントラップ型、四重極型を使用できる。

6.1.2.2.2 イオン検出方法

(a) 二重収束型 MS の場合

質量校正用標準物質を用いたロックマス方式による選択イオン(SIM)を検出する方法を用いる。

(b) イオントラップ型 MS(MS/MS)の場合

MRM⁽²⁸⁾法を用いる。

(c) 四重極型 MS の場合

選択イオン検出 (SIM) 法を用いる。

²⁸ multiple reaction monitoring

6.1.2.2.3 イオン化方法

電子衝撃イオン化 (EI) 法を用いる。

6.1.2.2.4 イオン源温度

200～300℃

6.1.2.2.5 イオン化電流

0.25～1mA

6.1.2.2.6 電子加速電圧

30～70V

6.1.3 測定操作

6.1.3.1 ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件の設定

ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件の設定は、次による。

6.1.3.1.1 ガスクロマトグラフ (GC)

PCDDs 及び PCDFs、Co-PCB のガスクロマトグラフの測定条件は、次による。

6.1.3.1.1.1 PCDDs 及び PCDFs

PCDDs 及び PCDFs の測定においては、クロマトグラム上における 2,3,7,8-位塩素置換異性体のピークと他の異性体との溶出時間の関係が既存の文献と一致し、各塩素化物の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ガスクロマトグラフの条件を設定する。設定した条件における各化合物の分離状況を底質の抽出液等の試料を測定して確認しておく。

6.1.3.1.1.2 Co-PCB

Co-PCB の測定においては、クロマトグラム上における、Co-PCB のピークと他の異性体との溶出時間の関係が既存の文献と一致し、各塩素化物の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ガスクロマトグラフの条件を設定する。設定した条件における各化合物の分離状況を底質の抽出液等の試料を測定して確認しておく。

6.1.3.1.2 質量分析計 (MS)

質量分析計は、次のことを満足するような条件に設定する。

6.1.3.1.2.1 検出方法

(a) 二重収束型 MS の場合

選択イオン検出 (SIM) 法を用いる。

- (b) イオントラップ型 MS(MS/MS)の場合
MRM 法を用いる。
- (c) 四重極型 MS の場合
選択イオン検出 (SIM) 法を用いる。

6.1.3.1.2.2 測定質量／電荷数 (m/z)²⁹⁾

各手法において、採用する測定質量／電荷数は十分吟味を行うこと。

(a) 二重収束型 MS の場合

試料及び内標準物質の塩素化物ごとに、2 つ以上の選択イオンの質量／電荷数とロックマス用の選択イオンの質量／電荷数を設定する⁽³⁰⁾。PCDDs 及び PCDFs の設定質量／電荷数の例を表-3 に、Co-PCB の設定質量／電荷数の例を表-4 にそれぞれ示す。

(b) イオントラップ型 MS(MS/MS)の場合

定量対象化合物及び内標準物質の塩素化物ごとに、先駆イオン (Precursor Ion) を選択し、先駆イオンに対応する 2 つ以上の生成イオン (Product Ion) を設定する。PCDDs 及び PCDFs の設定質量／電荷数の例を表-5 及び表-7 に、Co-PCB の設定質量／電荷数の例を表-6 及び表-8 にそれぞれ示す。

(c) 四重極型 MS の場合

①同位体内標準法を採用する場合

定量対象化合物及び内標準物質の塩素化物ごとに、2 つ以上の選択イオンの質量／電荷数を設定する⁽³⁰⁾。PCDDs 及び PCDFs の設定質量／電荷数の例を表-9 に、Co-PCB の設定質量／電荷数の例を表-10 にそれぞれ示す。

②絶対検量線法を採用する場合

定量対象化合物の塩素化物ごとに、2 つ以上の選択イオンの質量／電荷数を設定する⁽³⁰⁾。

6.1.3.2 質量分析計の調整

質量分析計の調整は、装置が作動している状態で必要な項目の条件を設定した後、質量校正用標準物質を導入し、質量校正用プログラムによって行う。質量目盛、分解能等を使用する装置の種類及び測定目的に応じて所定の値に校正する。

²⁹⁾ クロマトグラム上の各ピークの保持時間を考慮して、時間分割によるグルーピング方式によって測定してもよい。この場合、グループごとに、適切な内標準物質ピークが出現するように条件の設定を行う必要がある。

³⁰⁾ キャピラリーカラムによって得られるピークの幅は 5～10 秒程度であるが、1 つのピークに対して十分な測定点を確保するため、クロマトグラムにおける単独成分ピークのもっとも幅の狭いピークであってもそのピークを構成する測定点が 5 点以上となるように選択イオン検出のサンプリングの周期を設定しなければならない。1 回の測定で設定可能なチャンネルの数は、要求される感度との兼ね合いとなるので、十分に検討した上で設定する必要がある。

表-3. 二重収束型 MS の測定における設定質量／電荷数(モニタイオン)*の例
(PCDDs/PCDFs)

	塩素置換体	M ⁺	(M+2) ⁺	(M+4) ⁺
分析対象物質	TeCDDs	319.896	321.893	
	PeCDDs	353.857	355.854	357.851
	HxCDDs	387.818	389.815	391.812
	HpCDDs		423.776	425.773
	OCDD		457.737	459.734
	TeCDFs	303.901	305.898	
	PeCDFs		339.859	341.856
	HxCDFs		373.820	375.817
	HpCDFs		407.781	409.778
	OCDF	439.745	441.742	443.739
内標準物質	¹³ C ₁₂ -TeCDDs	331.936	333.933	
	³⁷ Cl ₄ -TeCDDs	327.884		
	¹³ C ₁₂ -PeCDDs	365.897	367.894	369.891
	¹³ C ₁₂ -HxCDDs	399.858	401.855	403.853
	¹³ C ₁₂ -HpCDDs		435.816	437.814
	¹³ C ₁₂ -OCDD		469.778	471.775
	¹³ C ₁₂ -TeCDFs	315.941	317.938	
	¹³ C ₁₂ -PeCDFs		351.900	353.897
	¹³ C ₁₂ -HxCDFs		385.861	387.858
	¹³ C ₁₂ -HpCDFs		419.822	421.819
¹³ C ₁₂ -OCDF	451.786	453.783	455.780	
質量校正用標準物質 (PFK)			330.979 (4-塩素化物定量用)	
			342.979 (5-塩素化物定量用)	
			380.976 (6-塩素化物定量用)	
			430.972 (7-塩素化物定量用)	
			442.972 (8-塩素化物定量用)	

注* 質量数は、IUPAC, Element by element review of their atomic weight, Pure Appl. Chem., 56, [6] p.695-768 (1984) を基にして算出した。

表-4. 二重収束型 MS の測定における設定質量／電荷数(モニタイオン)*の例
(Co-PCB)

	塩素置換体	M ⁺	(M+2) ⁺	(M+4) ⁺
分析対象物質	TeCBs	289.922	291.919	293.916
	PeCBs	323.883	325.880	327.877
	HxCBs	357.844	359.841	361.838
	HpCBs	391.805	393.802	395.799
内標準物質	¹³ C ₁₂ -TeCBs	301.962	303.959	305.956
	¹³ C ₁₂ -PeCBs	335.923	337.920	339.917
	¹³ C ₁₂ -HxCBs	369.884	371.881	373.878
	¹³ C ₁₂ -HpCBs	403.845	405.842	407.839
質量校正用標準物質 (PFK)			292.982 (4-塩素化物定量用)	
			330.979 (5-塩素化物定量用)	
			380.976 (6-塩素化物定量用)	
			387.976 (7-塩素化物定量用)	

注* 質量数は、IUPAC, Element by element review of their atomic weight, Pure Appl. Chem., 56, [6] p.695-768 (1984) を基にして算出した。

表-5. イオントラップ型 MS/MS の測定における設定質量／電荷数(モニタイオン)*の例
(PCDDs/PCDFs)

	塩素置換体	先駆イオン	生成イオン	
分析対象物質	TeCDDs	324	259	261
	PeCDDs	358	293	295
	HxCDDs	392	327	329
	HpCDDs	426	361	363
	OCDD	460	395	397
	TeCDFs	308	243	245
	PeCDFs	342	277	279
	HxCDFs	376	311	313
	HpCDFs	410	345	347
	OCDF	446	381	383
内標準物質	¹³ C ₁₂ -TeCDDs	334	268	270
	¹³ C ₁₂ -PeCDDs	368	302	304
	¹³ C ₁₂ -HxCDDs	402	336	338
	¹³ C ₁₂ -HpCDDs	436	370	372
	¹³ C ₁₂ -OCDD	472	406	408
	¹³ C ₁₂ -TeCDFs	318	252	254
	¹³ C ₁₂ -PeCDFs	352	286	288
	¹³ C ₁₂ -HxCDFs	386	320	322
	¹³ C ₁₂ -HpCDFs	420	354	356
	¹³ C ₁₂ -OCDF	454	388	390

注* 質量数は、IUPAC, Element by element review of their atomic weight, Pure Appl. Chem., 56, [6] p.695-768 (1984) を基にして算出した。

表-6. イオントラップ型 MS/MS の測定における設定質量／電荷数(モニタイオン)*の例
(Co-PCB)

	塩素置換体	先駆イオン	生成イオン	
分析対象物質	TeCBs	292	220	222
	PeCBs	326	254	256
	HxCBs	360	288	290
	HpCBs	396	324	326
内標準物質	¹³ C ₁₂ -TeCBs	304	232	234
	¹³ C ₁₂ -PeCBs	338	266	268
	¹³ C ₁₂ -HxCBs	372	300	302
	¹³ C ₁₂ -HpCBs	408	336	338

注* 質量数は、IUPAC, Element by element review of their atomic weight, Pure Appl. Chem., 56, [6] p.695-768 (1984) を基にして算出した。

表-7. イオントラップ型 MS/MS の測定における設定質量／電荷数(モニタイオン)*の例
(PCDDs/PCDFs)

	塩素置換体	先駆イオン	生成イオン	
分析対象物質	TeCDDs	324	194	196
	PeCDDs	358	228	230
	HxCDDs	392	262	264
	HpCDDs	426	296	298
	OCDD	460	332	334
	TeCDFs	308	206	208
	PeCDFs	342	240	242
	HxCDFs	376	274	276
	HpCDFs	410	308	310
	OCDF	446	344	346
内標準物質	¹³ C ₁₂ -TeCDDs	334	204	206
	¹³ C ₁₂ -PeCDDs	368	238	240
	¹³ C ₁₂ -HxCDDs	402	272	274
	¹³ C ₁₂ -HpCDDs	436	306	308
	¹³ C ₁₂ -OCDD	472	342	344
	¹³ C ₁₂ -TeCDFs	318	217	219
	¹³ C ₁₂ -PeCDFs	352	251	253
	¹³ C ₁₂ -HxCDFs	386	285	287
	¹³ C ₁₂ -HpCDFs	420	319	321
	¹³ C ₁₂ -OCDF	454	355	357

注* 質量数は、IUPAC, Element by element review of their atomic weight, Pure Appl. Chem., 56, [6] p.695-768 (1984) を基にして算出した。

表-8. イオントラップ型 MS/MS の測定における設定質量／電荷数(モニタイオン)*の例
(Co-PCB)

	塩素置換体	先駆イオン	生成イオン	
分析対象物質	TeCBs	292	150	151
	PeCBs	326	184	186
	HxCBs	360	218	220
	HpCBs	396	252	254
内標準物質	¹³ C ₁₂ -TeCBs	304	161	162
	¹³ C ₁₂ -PeCBs	338	196	198
	¹³ C ₁₂ -HxCBs	372	230	232
	¹³ C ₁₂ -HpCBs	408	264	266

注* 質量数は、IUPAC, Element by element review of their atomic weight, Pure Appl. Chem., 56, [6] p.695-768 (1984) を基にして算出した。

表-9. 四重極型 MS の測定における設定質量／電荷数(モニタイオン)*の例.
(PCDDs/PCDFs)

	塩素置換体	M ⁺	(M+2) ⁺	(M+4) ⁺
分析対象物質	TeCDDs	320	322	
	PeCDDs	354	356	358
	HxCDDs	388	390	392
	HpCDDs		424	426
	OCDD		458	460
	TeCDFs	304	306	
	PeCDFs		340	342
	HxCDFs		374	376
	HpCDFs		408	410
	OCDF	440	442	444
内標準物質	¹³ C ₁₂ -TeCDDs	332	334	
	³⁷ Cl ₄ -TeCDDs	328		
	¹³ C ₁₂ -PeCDDs	366	368	370
	¹³ C ₁₂ -HxCDDs	400	402	404
	¹³ C ₁₂ -HpCDDs		436	438
	¹³ C ₁₂ -OCDD		470	472
	¹³ C ₁₂ -TeCDFs	316	318	
	¹³ C ₁₂ -PeCDFs		352	354
	¹³ C ₁₂ -HxCDFs		386	388
	¹³ C ₁₂ -HpCDFs		420	422
	¹³ C ₁₂ -OCDF	452	454	456

注* 質量数は、IUPAC, Element by element review of their atomic weight, Pure Appl. Chem., 56, [6] p.695-768 (1984) を基にして算出した。

表-10. 四重極型 MS の測定における設定質量／電荷数(モニタイオン)*の例
(Co-PCB)

	塩素置換体	M ⁺	(M+2) ⁺	(M+4) ⁺
分析対象物質	TeCBs	290	292	294
	PeCBs	324	326	328
	HxCBs	358	360	362
	HpCBs	392	394	396
内標準物質	¹³ C ₁₂ -TeCBs	302	304	306
	¹³ C ₁₂ -PeCBs	336	338	340
	¹³ C ₁₂ -HxCBs	370	372	374
	¹³ C ₁₂ -HpCBs	404	406	408

注* 質量数は、IUPAC, Element by element review of their atomic weight, Pure Appl. Chem., 56, [6] p.695-768 (1984) を基にして算出した。

6.1.3.3 測定操作

測定操作は、次による。

- (a) GC/MS を所定の条件に設定する。
- (b) 質量校正用標準物質を導入しながらそのモニタチャンネルの応答が安定したら、測定試料の測定を行う。
- (c) 設定した各塩素化物に対応する質量数について、クロマトグラムを記録する。
- (d) 測定終了後、データ処理作業に入る前に個々の試料ごとに妨害成分の有無、定量する化合物の分離状況の確認を行う⁽³¹⁾。ロックマス方式を採用した場合、質量校正用標準物質の測定質量／電荷数のモニタチャンネルも確認する⁽³¹⁾。

6.1.4 検量線の作成

検量線の作成は、次による。なお、文中では GC/MS 法による応答としてピーク面積を用いているが、これをピーク高さに読み替えてもよい。

6.1.4.1 標準液の測定

6.1.4.1.1 同位体内標準法の場合

各検量線作成用標準液を 1 濃度に対して最低 3 回 GC/MS に注入し、「6.1.3 測定操作」の測定操作を行う。この操作は、標準溶液を変更したとき、装置の大幅な設定変更を行ったとき等に行う。

6.1.4.1.2 絶対検量線法の場合

各検量線作成用標準液を 1 濃度に対して 1 回以上 GC/MS に注入し、「6.1.3 測定操作」の測定操作を行う。この操作は、一連の測定バッチごとに行う。

6.1.4.2 ピーク面積の強度比の確認

二重収束型 MS 及び四重極型 MS の場合、得られたクロマトグラムから、各標準物質の対応する 2 つのイオンのピーク面積の強度比を求め、塩素原子の同位体存在比から推定されるイオン強度比と大きく変わらないことを確認する。

6.1.4.3 相対感度係数の算出

相対感度係数の算出は、次による。

6.1.4.3.1 同位体内標準法の場合

- (a) 各標準物質及び内標準物質のピーク面積を求め、各標準物質の対応するクリーンアップスパイク内標準物質に対するピーク面積の比と注入した標準液中のその標準物質と内標準物質の濃度の比を用いて検量線を作成し、検量線が原点近傍

³¹ 質量校正用標準物質のモニタチャンネルのクロマトグラムで、測定対象化合物の出現時間においてシグナルに大きな変動が認められた場合には、その化合物については定量してはならない。主な要因として、試料の前処理が不十分であることが考えられるので、試料の前処理を再度十分にを行い、ロックマスの変動を最小限に抑える必要がある。

を通る直線になっていることを確認する。

(b) 相対感度係数(RRF_{cs})は、式(A)によって測定ごとに求め、得られたデータを平均する。この場合、データの変動係数が10%以内になることを目標とする。

$$RRF_{cs} = \frac{Q_{cs}}{Q_s} \times \frac{A_s}{A_{cs}} \quad (A)$$

ここで、

RRF_{cs} : 測定対象物質のクリーンアップスパイク内標準物質との相対感度係数

Q_{cs} : 標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質の量 (pg)

Q_s : 標準液中の測定対象物質の量 (pg)

A_s : 標準液中の測定対象物質のピーク面積⁽³²⁾

A_{cs} : 標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積⁽³²⁾

(c) 同様にして、クリーンアップスパイク内標準物質のシリンジスパイク内標準物質に対する相対感度係数 (RRF_{rs}) を式(B)によって算出する。

$$RRF_{rs} = \frac{Q_{rs}}{Q_{cs}} \times \frac{A_{cs}}{A_{rs}} \quad (B)$$

ここで、

RRF_{rs} : クリーンアップスパイク内標準物質のシリンジスパイク内標準物質との相対感度係数

Q_{rs} : 標準液中のシリンジスパイク内標準物質の量 (pg)

Q_{cs} : 標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質の量 (pg)

A_{cs} : 標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積⁽³²⁾

A_{rs} : 標準液中のシリンジスパイク内標準物質のピーク面積⁽³²⁾

6.1.4.3.2 絶対検量線法の場合

同位体内標準法を採用しない場合、定量値の精確さが低下することが考えられるが、内標準物質の添加が定量に妨害を与えることが考えられる場合には、絶対検量線法を用いてもよいものとする。

(a) 各標準物質のピーク面積を求め、注入した標準液中のその標準物質の濃度を用いて検量線を作成し、検量線がほぼ原点近傍を通る直線になっていることを確認する。

³² ここで用いるピーク面積は、一方の測定チャンネルのピーク面積、両測定チャンネルのピーク面積の合計値、又は両測定チャンネルのピーク面積の平均値のいずれかとし、試料の測定までのすべての工程において同じものを用いなければならない。イオントラップ型 MS/MS では通常 2 つの生成イオンの応答の合計値を用いて定量計算を行う。

(b) 単位濃度当たりのピーク面積を計算し、原則として得られた全濃度域において合計 5 点以上のデータの変動係数が小さくなるようにし、定量する化合物に関しては変動係数が 10%以内となることを目標とする。

6.1.4.4 試料の測定

調製した測定用試料の測定は、次による。

6.1.4.4.1 検量線の確認

同位体内標準法を採用した場合、ある一定の周期(1日に1回以上)で、検量線作成用標準液の中から一つ以上選び、測定操作に従って測定し、各化合物のそれに対応したクリーンアップスパイク内標準物質に対する相対感度係数 (RRF_{cs}) を求める。さらに、クリーンアップスパイク内標準物質のそれに対応したシリンジスパイク内標準物質に対する相対感度係数 (RRF_{rs}) を求める。これらの相対感度係数が、「6.1.4.3 相対感度係数の算出」で求めた検量線作成時の相対感度係数 (RRF_{cs} 及び RRF_{rs}) に対して 20%以内となることを目標とする。

6.1.4.4.2 試料の測定

調製した測定用試料を測定操作に従って測定し、測定対象化合物に関する質量数についてクロマトグラムを得る。

6.1.5 ピークの検出

得られたクロマトグラムにおけるピークの検出は、次による。なお、文中では GC/MS 法による応答としてピーク面積を用いているが、これをピーク高さに読み替えてもよい。

6.1.5.1 シリンジスパイク内標準物質の確認

シリンジスパイク内標準物質を用いた場合、測定用試料中のシリンジスパイク内標準物質のピーク面積が標準液におけるシリンジスパイク内標準物質のピーク面積の 70%以上であることを確認する⁽³³⁾。

6.1.5.2 ピークの検出

クロマトグラム上において、検出されたピークについて次の同定及び定量の操作を行う。本マニュアルでは目標定量下限を規定しているので、試料量、濃縮倍率、GC/MS 測定溶液の最終溶媒液量、GC/MS への試料注入量などから計算して、目標定量下限の濃度が十分定量できていることが明らかであれば個々の検体、個々の化合物について正確に S/N を算出しなくともよい。

³³ この操作は GC/MS への注入が正常に行われていることを確認することが目的であるので、測定溶液を希釈した場合など割合に応じて注入されていることが確認できればよい。

6.1.6 ピーク面積の算出

検出されたピークについて、そのピーク面積を算出する。ピーク高さによる定量でもよい。

6.1.7 ダイオキシン類の同定

次の条件を満足することによって検出されたクロマトグラムピークをダイオキシン類と同定する。

(a) 二重収束型 MS の場合

- ①クロマトグラム上のピークの保持時間が標準物質とほぼ同じである。
- ②対応する内標準物質との相対保持時間が標準物質と一致する。
- ③モニターした二つ以上のイオンにおけるクロマトグラム上のピーク面積の比が標準物質のものと同様である。
- ④表-11 に示す塩素原子の同位体存在比の差がおおよそ±25%以内である。

(b) イオントラップ型 MS(MS/MS)の場合

- ①クロマトグラム上のピークの保持時間が標準物質とほぼ同じである。
- ②対応する内標準物質との相対保持時間が標準物質と一致する。

(c) 四重極型 MS の場合

- ①クロマトグラム上のピークの保持時間が標準物質とほぼ同じである。
- ②対応する内標準物質との相対保持時間が標準物質と一致する。
- ③モニターした二つ以上のイオンにおけるクロマトグラム上のピーク面積の比が標準物質のものと同様である。
- ④表-11 に示す塩素原子の同位体存在比の差がおおよそ±25%以内である。

表-11. 同位体存在比

	M	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10	M+12	M+14
TeCDDs	77.43	100.00	48.74	10.72	0.94	0.01		
PeCDDs	62.06	100.00	64.69	21.08	3.50	0.25		
HxCDDs	51.79	100.00	80.66	34.85	8.54	1.14	0.07	
HpCDDs	44.43	100.00	96.64	52.03	16.89	3.32	0.37	0.02
OCDD	34.54	88.80	100.00	64.48	26.07	6.78	1.11	0.11
TeCDFs	77.55	100.00	48.61	10.64	0.92			
PeCDFs	62.14	100.00	64.57	20.98	3.46	0.24		
HxCDFs	51.84	100.00	80.54	34.72	8.48	1.12	0.07	
HpCDFs	44.47	100.00	96.52	51.88	16.80	3.29	0.37	0.02
OCDF	34.61	88.89	100.00	64.39	25.98	6.74	1.10	0.11
TeCBs	76.67	100.00	49.11	10.83	0.93			
PeCBs	61.42	100.00	65.29	21.43	3.56			
HxCBs	51.22	100.00	81.48	35.51	8.75	1.17		
HpCBs	43.93	100.00	97.67	53.09	17.38	3.43		

備考1. M は、最低質量数の同位体を示す。

備考2. イオン強度比は、塩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。

6.1.8 ダイオキシン類の定量

ダイオキシン類各化合物の定量は同位体内標準法、又は絶対検量線法によって行う。一つの検体に同位体内標準法による定量値と絶対検量線法による定量値が混在していてもよい。

(a) 同位体内標準法の場合

抽出液全量中の同定された 2,3,7,8-一位塩素置換異性体及び Co-PCB の量 (Q_i) は、それに対応するクリーンアップスパイク内標準物質の添加量を基準にして同位体内標準法で式(C)によって求める。

$$Q_i = \frac{A_i}{A_{csi}} \times \frac{Q_{csi}}{RRF_{cs}} \quad (C)$$

ここで、

Q_i : 抽出液全量中の化合物の量 (pg)

A_i : クロマトグラム上の化合物のピーク面積⁽³²⁾

A_{csi} : 対応するクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積⁽³²⁾

Q_{csi} : 対応するクリーンアップスパイク内標準物質の添加量 (pg)⁽³⁴⁾

RRF_{cs} : 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

(b) 絶対検量線法の場合

抽出液全量中の同定された 2,3,7,8-一位塩素置換異性体及び Co-PCB の量 (Q_i) は、検量線と比較することによって求める。

6.1.9 濃度の算出

得られた各化合物の量から、試料中の濃度を式(D)によって算出し、JIS Z 8401 の規定によって数値を丸め、有効数字を 2 桁とする。

$$C_i = (Q_i - Q_t) \times \frac{1}{V} \quad (D)$$

ここで、

C_i : 試料中の化合物の濃度 (pg/g-dry)

Q_i : 抽出液全量中の化合物の量 (pg)

Q_t : 空試験での化合物の量 (pg)

V : 試料採取量 (g-dry)

6.1.10 定量下限

6.1.10.1 目標定量下限

本マニュアルでは目標定量下限という概念を用いる(「3.2 目標定量下限」参照)。測定に

³⁴ 試料を抽出後、分取し、内標準物質を添加した場合はその補正を行う。

においては本マニュアルで示す各化合物の目標定量下限を十分満足できるように採用する測定方法の定量下限を設定する。

なお、クロマトグラム上でピークが検出された化合物に関しては、そのピークの面積あるいは高さから計算した濃度を報告する⁽³⁵⁾。クロマトグラム上でピークが検出されなかった化合物に関しては、目標定量下限未満 (<5pg/g-dry) を報告する。

6.1.10.2 試料測定時の目標定量下限の確認

実際の試料の測定において、2,3,7,8-位塩素置換異性体及び Co-PCB に対応するピークが目標定量下限を十分満足していることを確認する。

6.1.11 回収率の確認

6.1.11.1 二重収束型 MS、イオントラップ型 MS(MS/MS)、四重極型 MS を用いて同位体内標準法を採用した場合

クリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積とシリンジスパイク内標準物質のピーク面積の比及び対応する相対感度係数 (RRF_{rs}) を用いて、式(E)によって回収率を計算し、クリーンアップの回収率を確認する。このクリーンアップの回収率が 50%以上 120%以下となることを目標とする。なお、クリーンアップスパイクを使用し、シリンジスパイクを使用しない方法を採用する場合、「6.1.11.2 絶対検量線法を採用した場合」と同様の方法で回収率の確認を行う。

$$R_c = \frac{A_{csi}}{A_{rsi}} \times \frac{Q_{rsi}}{RRF_{rs}} \times \frac{100}{Q_{csi}} \quad (E)$$

R_c : クリーンアップの回収率 (%)

A_{csi} : クリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積

A_{rsi} : 対応するシリンジスパイク内標準物質のピーク面積

Q_{rsi} : 対応するシリンジスパイク内標準物質の添加量 (pg)

RRF_{rs} : 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

Q_{csi} : 対応するクリーンアップスパイク内標準物質の添加量⁽³⁶⁾ (pg)

6.1.11.2 絶対検量線法を採用した場合

試料数の 5%以上の割合でダイオキシン類の標準品を添加した擬似試料を用いて添加回収試験を行う。擬似試料としてはダイオキシン類濃度の低い底質試料等を用いる。添加回収試験における回収率が 50%以上 120%以下であることを目標とする。

³⁵ クロマトグラム上でピークが検出され、そのピーク面積あるいは高さから計算された濃度が、例えば 3pg/g-dry であった場合、3pg/g-dry を報告する。

³⁶ 内標準物質添加後の分取・分割の補正をする。

6.2 生物法

6.2.1 試薬及び装置

生物法で使用する試薬、器具並びに装置は手法によって異なっている。市販キットによるイムノアッセイの例について次に示す。

6.2.1.1 試薬

全ての試薬類にはダイオキシン類の測定に影響を及ぼす妨害成分が含まれていないことが要求される。

(a) 水

JIS K 0557 に規定する A4 (又は A3) の水。

(b) ジメチルスルホキシド (DMSO)

JIS K 9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(c) 試薬 (キット)

① 同じ調査では、使用する試薬 (キット) のロットを統一し、それらを一括して入手することが望ましい。

② 使用まで指定された温度で適切に保管された有効期限内の試薬 (キット) を使用する。

③ 測定前に全ての試薬を指定された温度に戻し、指定された方法で必要な試薬類を調製する。

6.2.1.2 器具及び装置

各キットの操作マニュアルに従い、器具類は、適切な洗浄を行い、空試験値等により、測定に支障がないことを確認した上で用いる。

(a) ガラス器具

JIS R 3503 及び JIS R 3505 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

(b) マイクロピペット及びチップ

設定した容量を精度良く分取できるもの。

(c) 8 もしくは 12 チャンネルマルチピペット及びチップ

設定した容量を精度良く分取できるもの。

(d) 試薬リザーバー

(e) マイクロプレートシール

(f) ペーパータオル

(g) ストップウォッチ

(h) 測定機器 (マイクロプレート用吸光光度計、蛍光光度計等)

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルの吸光度、蛍光強度等が測定できるもの。

(i) マイクロプレート洗浄機

全自動もしくは半自動でマイクロプレートの各ウェルを洗浄できるもの。洗浄機を用いた場合と同等の洗浄効果が得られる場合は、マルチチャンネルマイクロピペット等を用いた手動の洗浄でもよい。

(j) データ解析用コンピューター及びソフトウェア

検量線の回帰式 (4 パラメーター、多項式等) の作成及び試料の濃度を算出できるもの。

(k) 反応用恒温機

設定温度を精度良く保持できるもの。

6.2.2 測定操作

6.2.2.1 試料の測定条件

- (a) 試料の測定は、2 回以上行う⁽³⁷⁾。
- (b) 未知濃度の試料の場合、適正な公比で合計 4 段階以上に希釈調製した試料の希釈列を測定することが望ましい。この場合、96 ウェルマイクロプレート 1 枚で、底質 10 試料程度の測定ができる。

6.2.2.2 測定操作

手法によって異なるが、生物法の測定操作は、次による。

- (a) 試薬類を指定の温度に戻す。
- (b) 前処理した試料液を指定の溶媒に交換した後、適切な公比で段階的に希釈し、測定用の希釈列を調製する。
- (c) 標準液の濃度列及び(b)で調製した試料の希釈列の各試料液を、生物法の各手法で指定されている操作方法に従って抗体や細胞等と反応させる。
- (d) 吸光度、蛍光強度、発光量等の応答値を指定の測定機器で記録する。
- (e) 測定終了後、試料ごとに検量線の定量範囲に入る有効な応答値を確認する。

6.2.3 検量線の作成

- (a) 検量線は、濃度 0 を含め、合計 5 段階以上に調製した標準液の濃度列を用いて、測定バッチごとに作成する。
- (b) 標準液の各濃度列の測定は、2 回以上行う⁽³⁷⁾。
- (c) 標準液の濃度 (X) 及び応答値(吸光度、蛍光強度、発光量等)又はその相対値等 (Y) について、4 パラメーター、多項式等の適正な回帰式による検量線を作成する。
- (d) 検量線は、適正なコンピューターソフトウェアを用いて作成する。
- (e) 検量線の相関係数は、 $r^2 \geq 0.98$ を目標とする。
- (f) 適正な手法によって検量線の定量範囲を設定する。

6.2.4 濃度の算出

- (a) 測定機器(マイクロプレート用吸光光度計、蛍光光度計、ルミノメーター等)で記録した測定試料の応答値のうち、検量線の定量範囲内にある応答値を検量線の回帰式に代入し、測定試料の標準物質相当濃度(測定値)を算出する。計算には適正なコンピューターソフトウェアを用いる。
- (b) 段階希釈して測定した試料の希釈倍率と測定値の間に良好な直線関係(希釈直線性)が得られる希釈段階について、測定値に希釈倍率を乗じて換算値を求め、それらの値の平均をもってその試料の測定結果とすることが望ましい。データの希釈直線性を簡便に判定する方法の例とし

³⁷ 例えば、マイクロプレートを用いた測定の場合、1 回の測定において同じ試料液を 2 ウェル以上用いて測定することを意味している。

て、連続した 2 つの希釈段階における換算値の比が 0.8～1.2 に収まることを確認する方法がある。

(c) (b)で求めた換算値の平均、抽出に供した底質の実試料量及び精製、測定に供した試料の分取割合等から底質 1g 当たりの標準物質相当濃度を計算する。

(d) (c)で求めた計算値を、予め用意した TEQ への補正式⁽³⁸⁾に代入し、TEQ を求める。

(e) 試料希釈列の全ての応答値(吸光度、蛍光強度、発光量等)が検量線の定量範囲から外れた場合、試料の希釈倍率を再び調整した上で再測定を行う。

(f) 2 回⁽³⁷⁾測定した同じ試料液の応答値(吸光度や発光量等)の平均との差が 30%を超える場合、そのデータは採用しないことが望ましい。

6.2.5 定量下限

(a) 生物法では、TEQ について、およそ 50pg-TEQ/g-dry まで測定できるように、採用する測定方法において十分な実試料量を用いて、適切な前処理及び試料調製方法の組合せによって分析工程を計画しなければならない。

(b) 応答値が検出された試料に関しては、その TEQ への換算濃度を報告する⁽³⁹⁾。応答値が検出されなかった試料に関しては、目標定量下限未満(<50pg-TEQ/g-dry)を報告する。

³⁸生物法と同じ測定手法であっても、TEQ に変換する補正式は底質の汚染状況によって異なる可能性が考えられる。そのため、調査水域の底質について当該生物法及び GC/MS 法で検討した TEQ 補正式を用いることが望ましいが、任意の底質について検討した TEQ 補正式でもよいものとする。

³⁹ 生物法で応答値が検出され、それから計算された TEQ が、例えば 30pg-TEQ/g-dry であった場合、30pg-TEQ/g-dry を報告する。

7 結果の報告

7.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法

GC/MS 法によるダイオキシン類測定結果の記載様式の例を表-12 に示す。

(a) TEF を持つ 29 化合物について、実測濃度を pg/g-dry で表示する。

(b) 各化合物の実測濃度は、目標定量下限以上の値はそのままの値を表示する。目標定量下限未満のものは、クロマトグラム上でピークが検出された化合物に関しては、そのピークの面積あるいは高さから計算した値を表示する⁽³⁵⁾。クロマトグラム上でピークが検出されなかった化合物に関しては、目標定量下限に不等号を付けた値 (<5pg/g-dry) を表示する。

(c) 単独のピークとして分離定量できなかつた 2,3,7,8-位塩素置換異性体あるいは Co-PCB については、単独で定量できていないことがわかるように結果表の「化合物の名称等」の欄に分離されていない異性体の名称を明記する。例えば、1,2,3,7,8-PeCDF に 1,2,3,4,8-PeCDF が重なっている場合、1,2,3,7,8-PeCDF の欄に「1,2,3,7,8 + 1,2,3,4,8-PeCDF」と記載する。

(d) 測定濃度に表-12 に示す TEF を乗じて TEQ を求める。TEQ の単位は pg-TEQ/g-dry とする。

(e) 目標定量下限以上の実測濃度はそのままその値を用いて各化合物の TEQ を算出する。目標定量下限未満のものは、クロマトグラム上でピークが検出された化合物に関しては、そのピーク面積あるいは高さから計算された濃度を用いて各化合物の TEQ を算出する。ピークが検出されなかった化合物に関しては、目標定量下限の 1/2 の値を用いて各化合物の TEQ を算出し、それらを合計して Total TEQ を算出する。

(f) TEF を持つ各化合物の実測濃度は、JIS Z 8401 によって数値を丸め、有効数字 2 桁で表示する。

(g) Total TEQ の算出に当たっては、(f)で丸めた実測濃度を用いて各化合物の TEQ を計算し、それらの合計の値をもって有効数字 2 桁で JIS Z 8401 によって丸める。つまり、個々の化合物の TEQ については丸めの操作は行わない。

7.2 生物法

生物法によるダイオキシン類測定結果の記載様式の例を表-13 に示す。

(a) 実測濃度を有効数字 2 桁で JIS Z 8401 によって丸め、pg/g-dry で表示する。

(b) 実測濃度を TEQ に換算する補正式が、調査水域で採取した底質について検討したものであるか、もしくは調査水域以外から採取した任意の底質について検討した補正式であるかを明記する。

(c) (a)で丸めた実測濃度を補正式に代入して TEQ を算出し、JIS Z 8401 によってその値を丸め、有効数字 2 桁で表示する。TEQ の単位は、pg-TEQ/g-dry とする。

(d) 応答値が検出された試料に関しては、その TEQ を報告する⁽³⁹⁾。ただし、報告値の表示は目標定量下限の桁までとし、それより下の桁は表示しない。応答値が検出されなかった試料に関しては、目標定量下限に不等号を付けた濃度 (<50pg-TEQ/g-dry) を表示する。

8 測定データの品質管理

簡易法であることに鑑み、本マニュアルでは個々の項目に関して品質管理の内容は記述しない。しかしながら、本マニュアルで得られたデータに基づいて種々の施工が行われるので、測定データの品質は調査目的に見合ったレベルで、かつ現在の技術レベルの範囲内で精確さを必要とする。測定データの品質管理は次による。

- (a) 測定分析に関連する物理量及びそれらの関連品目についてはトレーサビリティを確保すること。
- (b) 測定分析が再現可能であるように記録を取り、また、保管しておくこと。

9 前処理方法の変更に必要なバリデーション試験の例

本マニュアルで採用している前処理法は、おおよそ現在公表されている各種公定法に準拠している。「簡易測定」という観点から考えた場合、前処理方法の技術的な進歩は歓迎されるべきで、本マニュアルに記載した前処理方法以外の手法の採用を可能とする。しかしながら測定値の信頼性確保の観点から、前処理の変更に関して、すなわち本マニュアルで示す以外の前処理方法を採用するに当たり、適切な方法で実施したバリデーション試験により新規の前処理法の妥当性を確認する必要がある。

ここでは参考のため GC/MS 法及び生物法についてバリデーション試験の例を示す。バリデーション試験は、新規の前処理方法を採用しようとする機関内で行う。他機関によって行われたバリデーション試験結果を引用し、自機関内でのバリデーション試験なしに本マニュアルで示す以外の方法を採用してはならない。また、バリデーション試験によって評価、採用した前処理法を用いる場合、依頼者の同意を得ること、報告書(測定結果)には本マニュアルの変法である旨の記述が必要である。

9.1 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法

- (a) 新規に採用しようとする前処理方法によって得られた GC/MS 測定試料中の TEF を持つ 29 化合物の実測濃度及び PCDDs の TEQ、PCDFs の TEQ、non-ortho コプラナーPCB の TEQ、mono-ortho コプラナーPCB の TEQ 及び Total TEQ が、次の(b)及び(c)による方法によって得られたこれらの数値と比較したとき、平均値と差の%で 30%以内であることが望ましい。
- (b) 比較の対象とする測定方法は本マニュアルに記載されている GC/MS 法とする。
- (c) 新規に採用しようとする前処理方法によって得られた試料の測定は、新規に採用しようとする前処理方法と組み合わせて用いる GC/MS 法とする。
- (d) 比較は 5 つ以上の異なった調査地域で各調査地域において 5 つ以上の異なった底質試料(合計 25 以上の底質試料)について行うことが望ましい。
- (e) バリデーション試験に用いる試料には 150pg-TEQ/g-dry 以上の試料を含むことが望ましい。
- (f) 評価検討する試料中の TEF を持つ化合物の組成は、5 つ以上の異なった調査地域で異なっていることが望ましい。
- (g) 個々の検体に含まれる TEF を持つ化合物の濃度において、目標定量下限の 10 倍未満の濃度の化合物に関しては、(a)による評価を満足しなくともよいが、各化合物において目標定量下限未満の値はバリデーション試験に用いた検体数の 20%未満であることが望ましい。例えば、25 検体をバリデーション試験検体とした場合、TEF を持つ化合物ごとに最低 20 以上の評価できるデータが存在することが望ましい。
- (h) 1 つの調査地域において 10 以上の異なった試料についての評価を行えば、その調査地域に限って新規の前処理方法を採用してもよい。

9.2 生物法

- (a) 新規に採用しようとする前処理方法によって得られた測定試料中の TEQ が、次の(b)及び(c)による方法によって得られたこれらの数値と比較したとき、平均値と差の%で 50%以内であることが望ましい。
- (b) 比較の対象とする測定方法は本マニュアルに記載されている GC/MS 法あるいは生物法とする。

河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル（案）

- (c) 新規に採用しようとする前処理方法によって得られた試料の測定は、新規に採用しようとする前処理方法と組み合わせて用いようとする生物法とする。
- (d) 比較は5つ以上の異なった調査地域で各調査地域において5つ以上の異なった底質試料(合計25以上の底質試料)について行うことが望ましい。
- (e) バリデーション試験に用いる試料には、150pg-TEQ/g-dry以上の試料を含むことが望ましい。
- (f) 評価検討する試料中のTEFを持つ化合物の濃度組成は、5つ以上の異なった調査地域で異なっていることが望ましい。
- (g) 比較の対象とする測定分析方法による定量値が目標定量下限未満の検体数はバリデーション試験に用いた検体数の20%未満であることが望ましい。例えば、25検体をバリデーション試験検体とした場合、20以上の目標定量下限値以上のデータが存在することが望ましい。
- (h) 1つの調査地域において10以上の異なった試料についての評価を行えば、その調査地域に限って新規の前処理方法を採用してもよい。

表-12. 測定結果の報告様式 (例)

ダイオキシン類測定結果 (簡易法) 【GC/MS 法】

検体の識別(調査名, 地点名, 検体名等)		
試料採取日時		
測定分析方法	河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル(国土交通省河川局河川環境課、平成 16 年7月)	
前処理方法	抽出方法	<input checked="" type="checkbox"/> マニュアル <input checked="" type="checkbox"/> ソックスレー抽出(□乾泥, □湿泥) □高速溶媒抽出(□乾泥, □湿泥) □還流法 <input type="checkbox"/> 変法()
	抽出溶媒	<input checked="" type="checkbox"/> トルエン □アセトン □その他()
	精製方法	<input checked="" type="checkbox"/> マニュアル <input checked="" type="checkbox"/> 硫酸処理 □シリカゲル <input checked="" type="checkbox"/> 多層シリカゲル □アルミナ <input checked="" type="checkbox"/> 活性炭シリカゲル □DMSO <input type="checkbox"/> 変法()

化合物の名称等		実測濃度 (pg/g-dry)	目標 定量下限 (pg/g-dry)	毒性係数 TEF	毒性等量 TEQ (pg-TEQ/g-dry)	MS 種類	使用 IS	
PCDDs/PCDFs	PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	<5	5	1	2.5	IT	○
		1,2,3,7,8-PeCDD	<5	5	1	2.5	IT	○
		1,2,3,4,7,8-HxCDD	<5	5	0.1	0.25	IT	○
		1,2,3,6,7,8-HxCDD	12	5	0.1	1.2	IT	○
		1,2,3,7,8,9-HxCDD	5	5	0.1	0.50	IT	○
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	170	5	0.01	1.7	IT	○
		OCDD	1200	5	0.0001	0.12	IT	○
	PCDDs Total TEQ		-	-	-	8.8	-	-
	PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	16	5	0.1	1.6	IT	○
		1,2,3,7,8-PeCDF	4	5	0.05	0.20	IT	○
		2,3,4,7,8-PeCDF	6	5	0.5	3.0	IT	○
		1,2,3,4,7,8-HxCDF	11	5	0.1	1.1	IT	○
		1,2,3,6,7,8-HxCDF	3	5	0.1	0.30	IT	○
		1,2,3,7,8,9-HxCDF	<5	5	0.1	0.25	IT	○
		2,3,4,6,7,8-HxCDF	9	5	0.1	0.90	IT	○
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	94	5	0.01	0.94	IT	○
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	7	5	0.01	0.070	IT	○
		OCDF	260	5	0.0001	0.026	IT	○
		PCDFs Total TEQ		-	-	-	8.4	-
PCDDs/PCDFs Total TEQ		-	-	-	17	-	-	
Co-PCB	non-ortho	3,3',4,4'-TeCB (#77)	3300	5	0.0001	0.33	QP	○
		3,4,4',5'-TeCB (#81)	49	5	0.0001	0.0049	QP	○
		3,3',4,4',5'-PeCB (#126)	44	5	0.1	4.4	QP	○
		3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	<5	5	0.001	0.0025	QP	○
		non-ortho PCBs Total TEQ		-	-	-	4.7	QP
	mono-ortho	2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	2000	5	0.0001	0.20	QP	○
		2,3,4,4',5'-PeCB (#114)	51	5	0.0005	0.026	QP	×
		2,3',4,4',5'-PeCB (#118)	3200	5	0.0001	0.32	QP	×
		2',3,4,4',5'-PeCB (#123)	110	5	0.0001	0.011	QP	×
		2,3,3',4,4',5'-HxCB (#156)	760	5	0.0005	0.38	QP	○
		2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	170	5	0.0005	0.085	QP	×
		2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	220	5	0.00001	0.0022	QP	×
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	47	5	0.0001	0.0047	QP	○
		mono-ortho PCBs Total TEQ		-	-	-	1.0	-
Co-PCB Total TEQ		-	-	-	5.8	-	-	
Total TEQ		-	-	-	23	-	-	

【備考】

- 化合物の名称等: 複数の異性体名が同じセル内に表記されている場合、TEF を持つ異性体を単独定量しておらず、同じセル内に表記された複数の異性体の合計濃度を定量していることを示す。
- 実測濃度: 不等号付きの数値は、目標定量下限未満であることを示す。
- 毒性等価係数(TEF): WHO/IPCS(1998)の TEF を適用。
- 毒性等量(TEQ): 目標定量下限未満の実測濃度が存在する場合、その値を用いて TEQ を算出。
- MS 種類: 各化合物の定量に用いた MS の種類を示す。記号略記は次の通り。
DF: 二重収束型, IT: イオントラップ型 MS/MS, QP: 四重極型 MS
- 使用 IS: 対応する化合物の定量に同位体内標準を使用しているか否かの表記。記号略記は次の通り。
使用した場合: ○、使用しなかった場合: ×

表-13. 測定結果の報告様式（例）

ダイオキシン類測定結果（簡易法）【生物法】

検体の識別（調査名、地点名、検体名等）			
試料採取日時			
測定分析方法	河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル（国土交通省河川局河川環境課、平成 16 年 7 月）		
前処理方法	抽出方法	<input type="checkbox"/> マニュアル <input type="checkbox"/> ソックスレー抽出（ <input type="checkbox"/> 乾泥、 <input type="checkbox"/> 湿泥） <input type="checkbox"/> 高速溶媒抽出（ <input type="checkbox"/> 乾泥、 <input type="checkbox"/> 湿泥） <input type="checkbox"/> 還流法 <input type="checkbox"/> 変法（ ）	
	抽出溶媒	<input type="checkbox"/> トルエン <input type="checkbox"/> アセトン <input type="checkbox"/> その他（ ）	
	精製方法	<input type="checkbox"/> マニュアル <input type="checkbox"/> 硫酸処理 <input type="checkbox"/> シリカゲル <input type="checkbox"/> 多層シリカゲル <input type="checkbox"/> アルミナ <input type="checkbox"/> 活性炭シリカゲル <input type="checkbox"/> DMSO <input type="checkbox"/> 変法（ ）	
使用した生物法の識別（キットの名称等）			
生物法による実測濃度（標準溶液相当濃度）		pg-	/g-dry
毒性等量への補正式	任意の底質について設定した補正式		
	調査水域の底質について設定した補正式		
補正計算した毒性等量（TEQ）		pg-TEQ/g-dry	

【備考】

1. 「毒性等量への補正式」とは、予め検討して得た当該生物法測定値をTEQに変換する計算式を示す。実際に毒性等量の算出に用いた補正式を該当する欄に記載。
2. 「生物法による実測濃度」とは、当該生物法による底質 1g 当たりの測定濃度。
3. 「補正計算した毒性等量（TEQ）」とは、「TEQ への補正式」に「生物法による実測濃度」を代入して求めた値。