

ダイオキシン類分析の迅速化に関する試験研究

山 下 一 巳 赤 崎 昭 一 清 原 拓 二
四反田 昭 二 山 野 一 幸 川 元 孝 久

要 旨

公定法のダイオキシン類分析は前処理や機器分析に多くの時間と労力を要する。そこで、簡便で迅速な分析方法を開発するために、抽出に高速溶媒抽出装置、前処理の分画操作に自家製簡易多層シリカゲルや二層式活性炭シリカゲルカラム、機器分析にGC/MS/MSを使用する方法を比較検討した。今回、土壌、底質試料に関しては、公定法と比べ良好な結果を得た。

キーワード：高速溶媒抽出装置、自家製簡易多層シリカゲル、自家製二層式活性炭シリカゲル、GC/MS/MS

1 はじめに

ダイオキシン類分析については、公定法としてK 0311 (JIS), K 0312 (JIS) による規格を採用しているけれども、分析工程が複雑で多大な時間と労力を必要とする。また、ランニングコストも高くなる。近年、公定法に定められたダイオキシン類の前処理法を、より安価で、簡便かつ効率よく改善した様々なダイオキシン類分析の手法が検討されている^{1), 2)}。これらの手法を用いれば、簡便でかつ短い時間で分析が行えることから、汚染源の推定や汚染分布の把握を迅速に行う必要がある場合等に大変有効である。

当センターでも、2003年度から土壌、底質を中心に高速溶媒抽出装置、活性炭カートリッジカラム、GC/MS/MS等を使用したダイオキシン類の抽出・分画の前処理や測定など迅速、簡便な分析操作を検討し、各公定法との比較試験を行ったので報告する。

2 分析方法

2.1 使用装置

2.1.1 抽出装置

抽出時間や抽出効率を、ソックスレー法と比較するために、高速溶媒抽出装置を使用した。

高速溶媒抽出装置：DIONEX社製ASE300

2.1.2 ダイオキシン類分析装置

(a) 公定法

高分解能GC/MS：Micromass社製 Autospec NTS

(b) 比較測定法

イオントラップ型GC/MS/MS：Varian社製 Saturn2000

2.2 抽出及び測定条件

高速溶媒抽出装置の抽出条件を表1に、質量分析装置の測定条件を表2及び表3に示す。

表1 高速溶媒抽出装置 (ASE300) の抽出条件

溶媒：トルエン	温度：175℃	圧力：10.3MPa
静置加熱：10分	フラッシュ%：80%	
パージ：90秒	繰り返し回数：2回	

表2 高分解能GC/MSの測定条件

注入口温度：260~300℃
GCカラム：SP2331 (0.25mmID 60m Supelco社製)
昇温条件：100℃ (1.5min) - (20℃/min) -
200℃ (0min) - (3℃/min) -
260℃ (33.5min)
GCカラム：DB17 (0.25mmID 30m J&W社製)
昇温条件：100℃ (1min) - (20℃/min) -
180℃ (0min) - (10℃/min) -
280℃ (15min)
GCカラム：HT 8 CoPCB (0.25mmID 60m Cica社製)
昇温条件：120℃ (1min) - (20℃/min) -
(Co-PCB用) 200℃ (3min) - (6℃/min) -
320℃ (7min)
昇温条件：120℃ (1min) - (20℃/min) -
(7,8DD/DF用) 280℃ (0min) - (2.5℃/min) -
300℃ (0min) - (10℃/min) -
320℃ (11min)

表3 イオントラップ型GC/MS/MSの測定条件

注入口温度:	310°C
GCカラム:	DB 5 ms (0.25mmID 60m J&W社製)
昇温条件 (Diox用):	100°C (1min) - (20°C/min) - 200°C (0min) - (2°C/min) - 280°C (0min) - (10°C/min) - 300°C (12min)
昇温条件 (Co-PCB用):	100°C (1min) - (20°C/min) - 185°C (0min) - (2°C/min) - 245°C (0min) - (6°C/min) - 290°C (0.25min)

3 分析操作

3.1 前処理操作

公定法に準じ、図1のフローに従った。

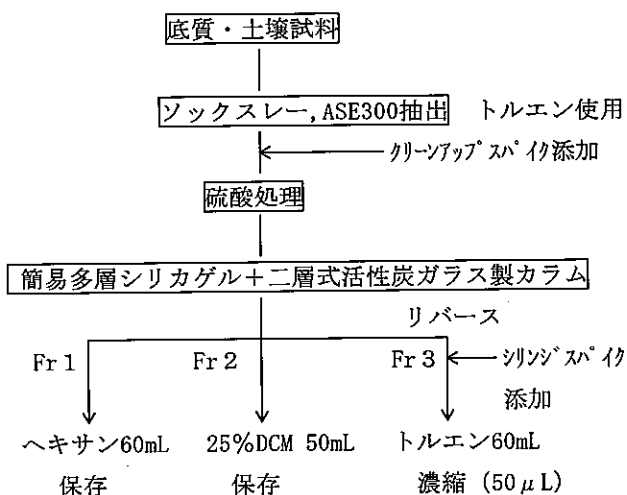


図1 前処理フローチャート

3.2 高速溶媒抽出法 (以下、「ASE法」という。)

前処理フローに従い、土壌、底質約1gを抽出セルに取り、硫黄分を除去するために、銅粉を約2g添加し抽出を行う。比較試験として、公定法に定めるソックスレーで同様に16時間以上抽出を行う。抽出液の全量に、クリーンアップスパイク500pgを添加し粗抽出液とする。

3.3 簡易多層シリカゲル及び二層式活性炭ガラス製カラムの使用法

当初市販されているPP製、PE製カートリッジを使用した。最終試料量を50μLまで濃縮すると、Co-PCBの測定時にロックマスの変動をかなり認めたことから使用を断念し、簡易多層シリカゲルと二層式活性炭シリカゲルガラス製カラムを自作し、使用した。

簡易多層シリカゲルカラムは、10%硝酸銀シリカゲル1g、キーゼルゲル0.5g、44%硫酸シリカゲル2g、キーゼルゲル0.5gを順番に充填した (以下、「MLカラム」という。)。また、2種類の自家製二層式活性炭シリカゲ

ルは、空ガラス製カラムにSupelco社製Carboxen1016を200mgとCarboxen1000を100mg (以下「C1016C1000カラム」という。)、あるいは関東化学製活性炭分散シリカゲルを500mgとCarboxen1000を100mg (以下「KC0.5gC1000カラム」という。) 各々充填した。なお、このガラス製カラムに充填する際、MLカラムと連結する方の空隙を出来るだけ少なくし、圧力がかからないように工夫する必要がある。

このカラムの使用法として、まず、MLカラムとC1016C1000カラム又はKC0.5gC1000カラムを連結し、自然流下でヘキサン60mLを流下させるけれども、この流下速度が遅くなる場合は、カラムを時々加圧する (以下、この画分を「Fr1」という。)。次にMLカラムをはずし、自家製二層式活性炭ガラス製カラムに25%DCMヘキサン50mLを流す (以下、この画分を「Fr2」という。)。次に、自家製二層式活性炭ガラス製カラムを逆に取り付けトルエン60mLを流下させ、試料中のダイオキシン、Co-PCBをすべて溶出させる (以下、この画分を「Fr3」という。)。)

4 結果及び考察

4.1 簡易多層シリカゲルによる分画試験

今回使用するMLカラムのクリーンアップ操作で、試料中のダイオキシン類がすべて活性炭シリカゲルへ移行するかを確認するため、ヘキサンによる溶出試験を行った。図2、図3にその試験結果を示す。

ダイオキシン及びCo-PCBの大部分が20~40mL付近で溶出するが、2,3,7,8-DD,#77は60mL付近まで溶出する。従って、ヘキサンの展開を60mLとした。

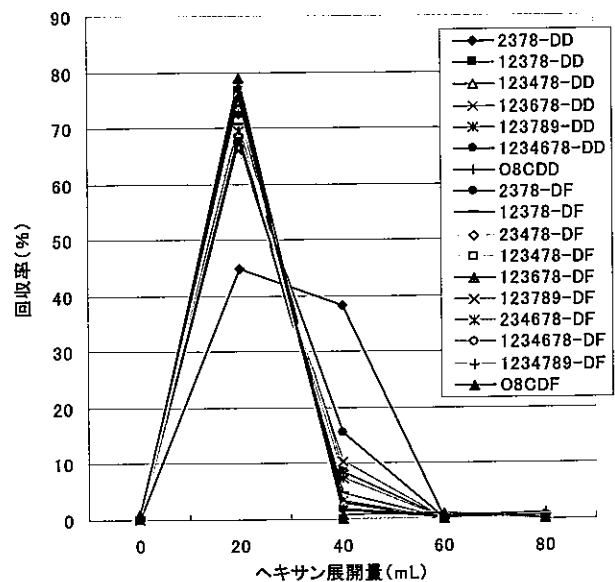


図2 ダイオキシン溶出試験結果

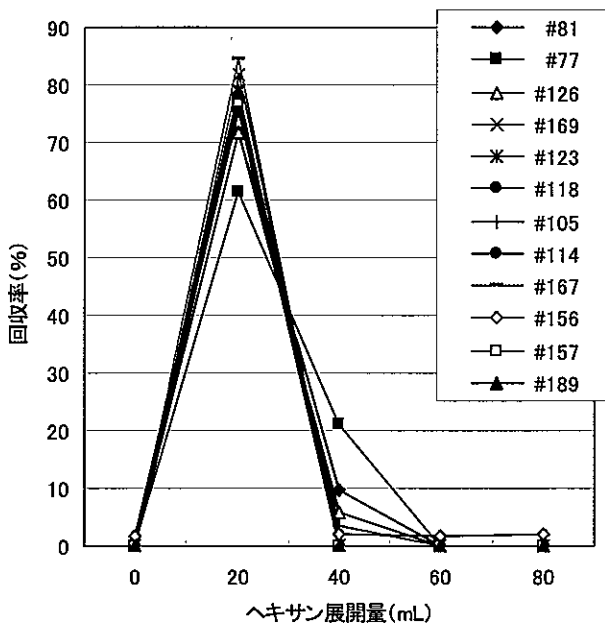


図3 Co-PCB溶出試験結果

4. 2 二層式活性炭ガラス製カラムによる分画及び回収試験

前号³⁾で吸着性の異なる活性炭シリカゲル (Supelco社製Carboxen) を二層式にしたカートリッジ型カラムを組み合わせた分画試験結果等について報告したところである。単一シリカゲルと連結し、減圧化で溶出試験を実施したけれども、今回は自然落下式で溶出試験ができるように装置の構成を変更し、その簡素化と試験の効率化を図った。二層式活性炭ガラス製カラムの分画試験及び追加回収は3. 3の方法により行い、クリーンアップスパイク500pgを、ガラス製クロマト管に負荷し展開を行い、Fr 1, Fr 2, Fr 3に分画した。このFr 3の画分にシリジンスパイク500pgを添加後、50μLまで濃縮して試験溶液とし、その1μLをGC/MSに注入した。標準物質の追加回収試験結果を表4に示す。自家製の二層式活性炭ガラス製カラムの回収率は、C1016C1000カラムが79~112%、KC0.5gC1000カラムが82~104%であり、いずれも良好であった。

表4 ダイオキシン類の回収率 (%) 試験結果

クリーンアップ スパイク500pg添加 二層式活性炭カラム	ダイオキシン Fr 3		クリーンアップ スパイク500pg添加 二層式活性炭カラム	Co-PCB Fr 3	
	C1016C1000	KC0.5gC1000		C1016C1000	KC0.5gC1000
2, 3, 7, 8-DD	96	97	#81	93	93
1, 2, 3, 7, 8-DD	97	93	#77	96	104
1, 2, 3, 4, 7, 8-DD	104	98	#126	112	99
1, 2, 3, 6, 7, 8-DD	105	97	#169	110	100
1, 2, 3, 7, 8, 9-DD	102	92	#123	98	95
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-DD	95	102	#118	106	96
OCDD	90	92	#105	92	88
2, 3, 7, 8-DF	93	86	#114	81	82
1, 2, 3, 7, 8-DF	91	89	#167	91	87
2, 3, 4, 7, 8-DF	90	90	#156	86	85
1, 2, 3, 4, 7, 8-DF	98	89	#157	84	82
1, 2, 3, 6, 7, 8-DF	96	90	#189	79	82
1, 2, 3, 7, 8, 9-DF	96	96			
2, 3, 4, 6, 7, 8-DF	97	93			
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-DF	90	99			
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-DF	91	95			
OCDF	90	97			

4. 3 土壌・底質における抽出・分画の比較試験

土壌・底質には、日本分析化学会の保証値のある標準土壌 (JSAC 0422; 森林土), 標準底質 (JSAC 0452; 海底底質) 及び本県の常時監視で採取した土壌・底質等を実試料とした。

4. 3. 1 ソックスレー法とASE法の回収比較試験

ASE法の抽出条件は表1に示し、また、抽出後のクリーンアップ操作は図1のフローに示した。図4の抽出率の表示には、公定法のソックスレー法による場合を100%とした場合の、ASE法における抽出率を換算した比率 (%) で示した。以上のことから、概ねASE法がソックスレー法より約1~2割程度回収率が良かった。

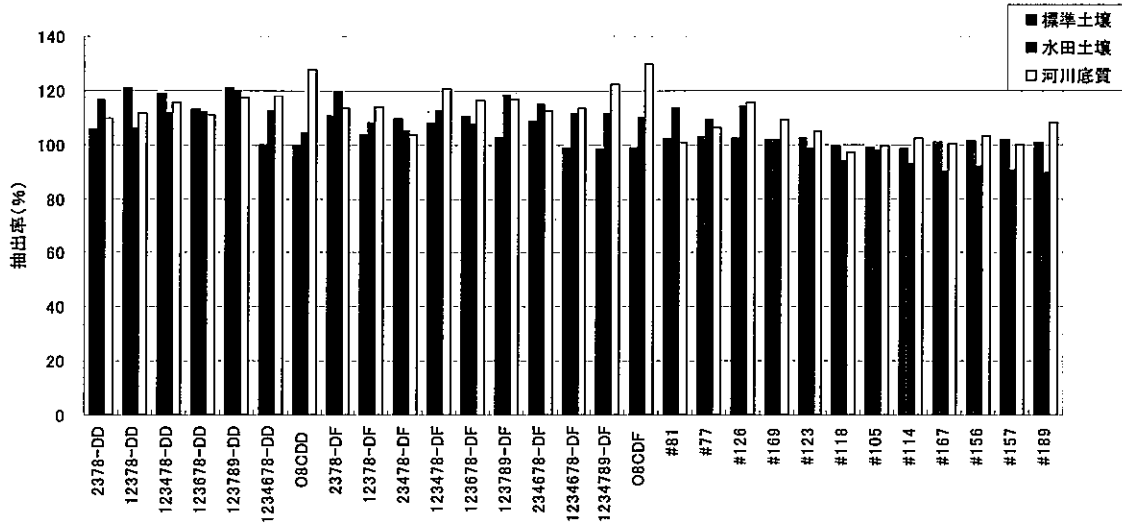


図4 実試料におけるASE法の抽出試験結果

なお、ソックスレー抽出後のクリーンアップ操作は公定法に従い、シリカゲルカラム（キーゼルゲル3g、10%硝酸銀シリカゲル2gを充填したもの。以下、「SLカラム」という。）及び活性炭分散シリカゲルリバースカラム（以下、「KC1gReverse」という。）を用いた。

4.3.2 簡易な前処理法による実試料への適用試験

分画試験を実試料へ適用するため、標準土壌及び標準底質試料を各々約1g採取し、図1のフローに従い、ASE法で抽出後、硫酸処理を行い、MLカラムと2種類の二層式活性炭ガラス製カラムを連結させ、分画操作を行い（以下、「簡易前処理法」という。）、夾雑物の除去が

公定法と同等に処理できたかの妥当性試験を行った。但し、公定法で前処理を実施した標準土壌及び底質はSLKC1gReverse So1, SLKC1gReverse Se1と表示している（試料表示の末尾でSoは土壌, Seは底質を表す。）。なお、PCDD/DFのすべての2, 3, 7, 8-位置換異性体及び同族体、並びにCo-PCBを比較した測定結果を図5-1, 図5-2に示す。いずれの前処理法もほぼ同じ結果であった。

従って、カラムクロマト分画の展開・濃縮時、公定法では2~3工程あるのに対し、今回のカラムを連結した簡易前処理法では、1工程に短縮できたことから、前処理操作の時間の短縮や労力の軽減を可能にした。

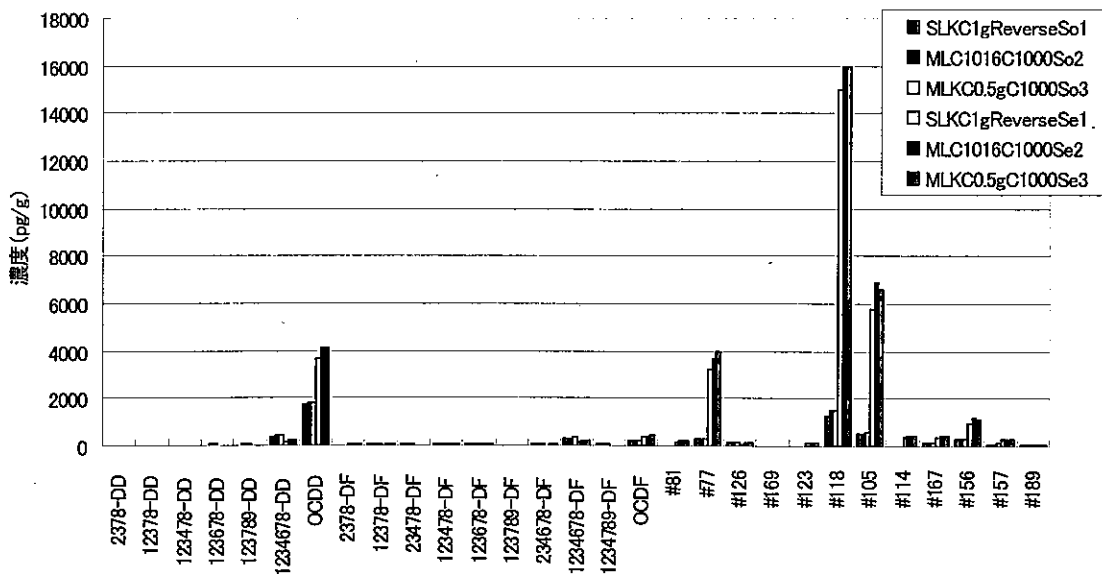


図5-1 各種活性炭カラムによる標準土壌、底質の2, 3, 7, 8-位置換異性体測定結果

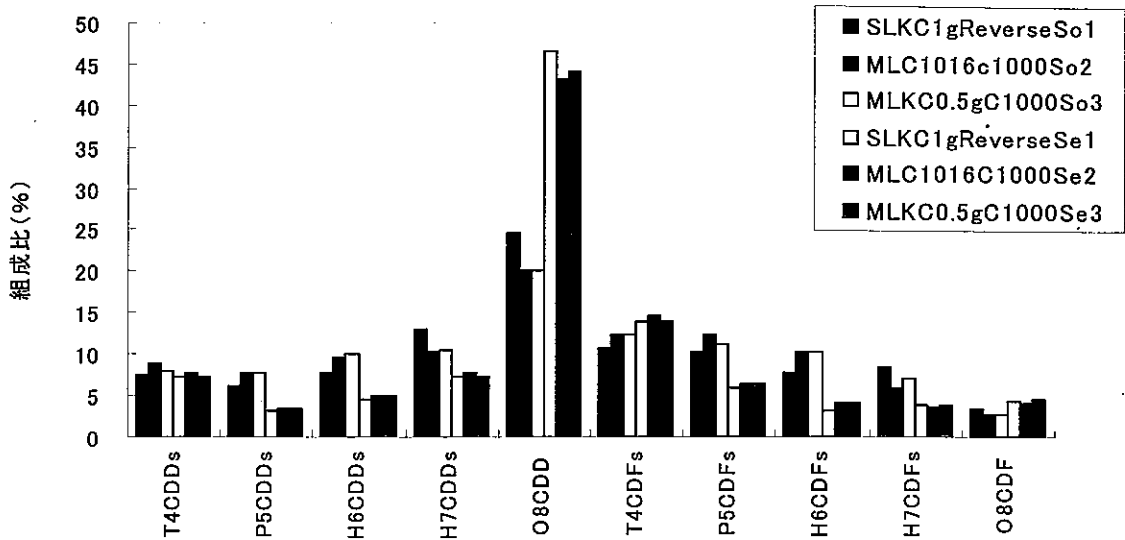


図5-2 各種活性炭カラムによる標準土壌、底質の同族体測定結果

4. 4 複数のキャピラリーカラムによる比較測定

これまで土壌、底質試料については、表2のとおり高分解能GC/MSでSP2331, DB17, HT 8 CoPCBの3種類のカラムで測定を行っている。DB17カラム使用時、今回使用した標準土壌の公定法によるFr 3の画分では、クロマトグラムにロックマスの変動はほとんど見られなかった。しかしながら、一括処理する簡易前処理法では、一部にロックマスの変動が見られた(図6-2)。また、定量に支障はなかったものの、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H7CDFのSIMクロマトグラムに重なり出現をみたけれども、この現象はカラムをHT 8 CoPCBに交換し、測定すれば解決される。その分析結果を図6-1に、そのクロマトグラムを図6-3に示す。図6-2でロックマスの変動はカラムクロマト

展開で活性炭シリカゲルC1016を充填剤として使用すれば、時々出現したが、その原因は明らかでない。また、図6-1のDB17, HT 8 CoPCBカラムで測定した結果を比較すれば、ほぼ同じであった。

なお、DB17とHT 8 CoPCBカラムは昇温条件が一部異なるけれども、検量線作成時の相対感度(RRF)はほぼ同じで、図6-1の測定結果もほぼ同じであった。このことから、今後SP2331とHT 8 CoPCBの2種類のカラムだけで、ダイオキシン類の測定を行うことも可能である。使用カラム数を少なくすることは、カラム脱着の煩雑さがなくなり、且つ高分解能GC/MSを安定的に連続使用できるなど、測定時間の短縮や省力化という点から評価できた。

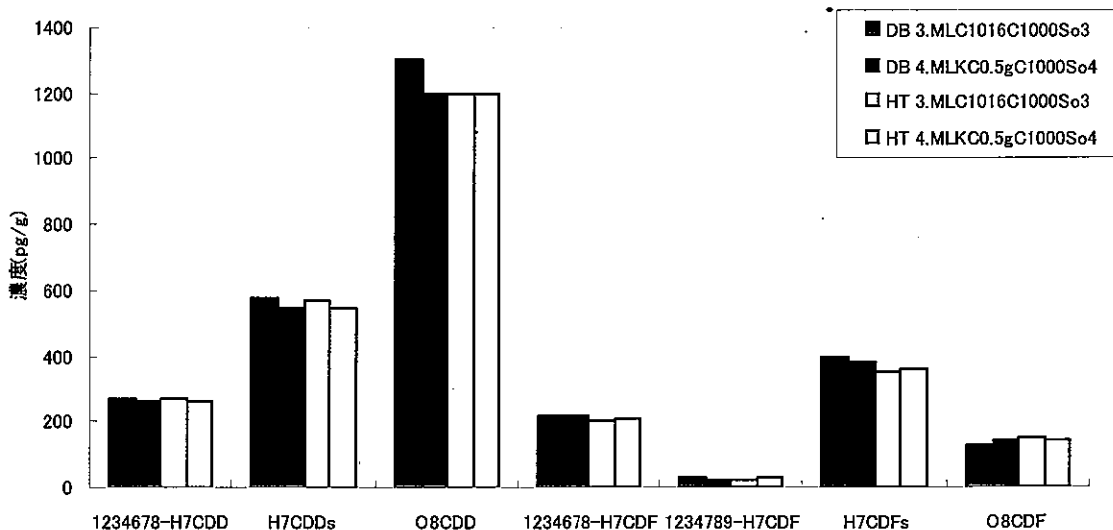


図6-1 DB17及びHT 8 CoPCBカラムによる測定結果

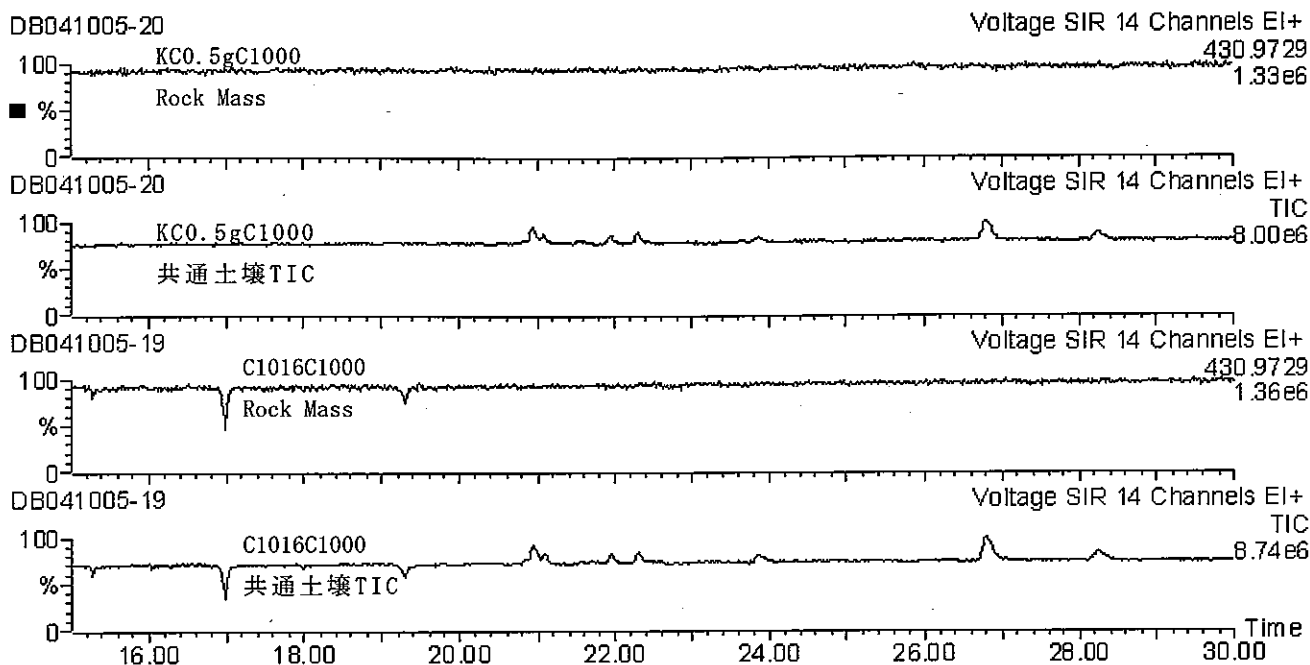


図 6-2 DB17カラム使用時のロックマスのクロマトグラム

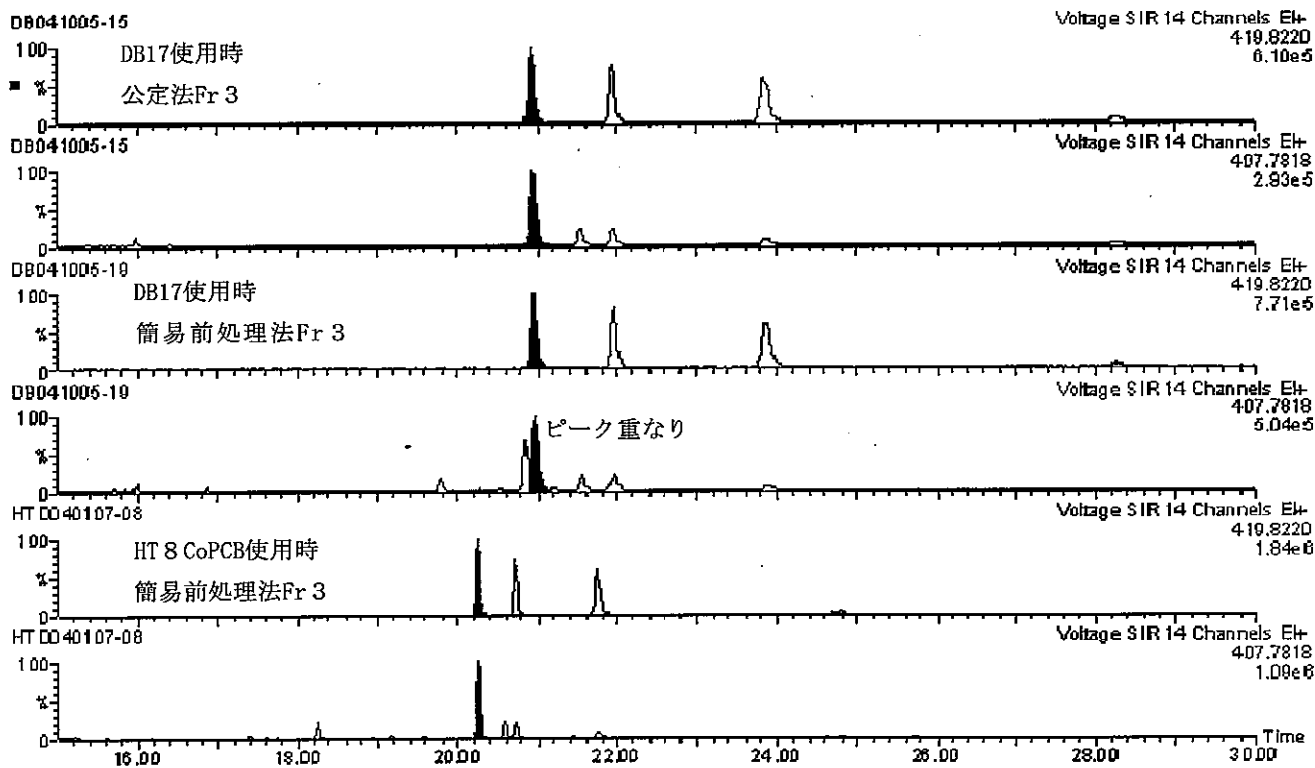


図 6-3 標準土壤のDB17, HT 8 CoPCBカラム使用時のクロマトグラム

4. 5 GC/MS/MS法と高分解能GC/MSによる測定比較

イオントラップ型GC/MS/MS (以下, 「QISMS/MS」という。)は, 感度や質量分離能において公定法の高分解能GC/MS (以下, 「HRGC/HRMS」という。)に比べ, 約1桁程度劣る。しかしながら, 特に突発的な事故やモニタリ

ング時に基準超過が観測される場合, あるいは汚染範囲の特定や汚染源の推定に多数の環境試料をスクリーニングする必要がある場合, 低コストで迅速に測定できるダイオキシン類の簡易測定法として報告^{4), 5)}がなされている。最近では, 特定施設での自主管理や小型焼却炉な

ど、環境汚染状況の実態把握に利用されている。今回は両装置の感度の違いをみるために、まず比較的濃度の高い標準土壌を使い、図1のフローに従って調整し、簡易測定法(QISMS/MS)と公定法(HRGC/HRMS)で測定した。そのTEQ値を表5に示す。TEQ値を比較すれば、簡易測定法ではダイオキシンの2,3,7,8-位置換異性体の低濃度成分のバラツキが大きいいため、公定法より測定値が2~3割程度高かった。これは、試料中の夾雑物による影響に起因していると考えられる。次に、簡易測定法と公定法で測定した、すべての2,3,7,8-異性体濃度(pg/g)の相関を見るため、図7-1、図7-2に両測定法の一次回帰を示す。

表5 標準土壌のTEQ値

(単位: pg-TEQ/g)

試料名	簡易測定法	公定法
SLKC 1gReverseSo 1	144	111
MLKCO.5gReverseSo 4	164	121
MLC1016C1000So 2	155	127
MLKCO.5gC1000So 3	155	131

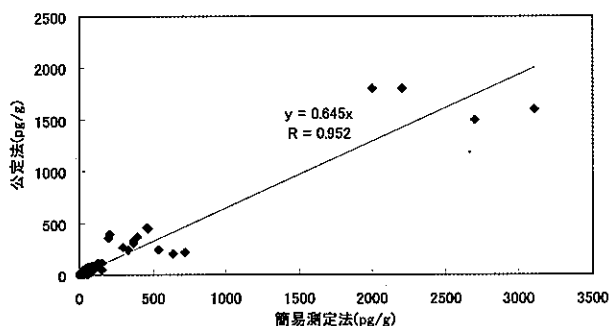


図7-1 4~8塩素化ダイオキシン測定比較

図7-1では、両測定法の相関係数は0.952であり、概ね相関関係は良かった。なお、4~8塩素化ダイオキシンの2,3,7,8-位置換異性体成分の濃度範囲は広く、なかでも7,8塩素化ダイオキシンのばらつきは大きかった。

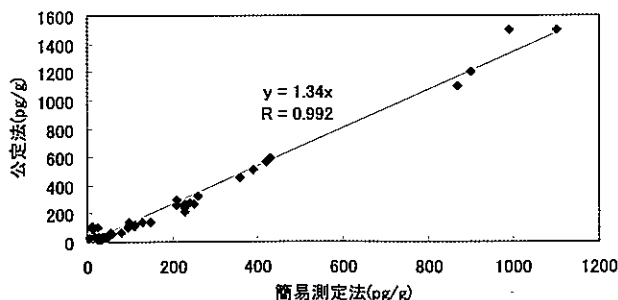


図7-2 Co-PCBの測定比較

図7-2では、Co-PCBの相関は両測定法でかなり良く、今回の土壌では、試料中の夾雑物による影響をあまり受けずに、簡易測定法でも定量が十分可能と考えられた。

4.6 実試料へのGC/MS/MS法の適用

ダイオキシン類に比較的汚染された水田土壌(4件)、河川底質(1件)を実試料とし、表2の条件で簡易測定法と公定法により測定を試みた。その測定結果を図8-1~8-3に示す。前述したとおり7,8塩素化ダイオキシンのばらつきが大きいことから、検量線濃度の範囲、¹³Cラベル化体のクリーンアップ添加量、実試料の濃度等を考慮して、4~8塩素化ダイオキシンを2グループに分けデータの解析をした。図8-1の4~6塩素化ダイオキシンにおいては、かなり高い相関が見られた。一方、図8-2の7,8塩素化ダイオキシンでは、見かけ上の相関は高いようだったが、個々の成分濃度を比較するとかなりのばらつきを認めた。この原因としては、7,8塩素に対するQISMS/MSの感度が、4~6塩素に比べ低いことや、実試料へのクリーンアップスパイクの添加量が少ないことなどが考えられた。

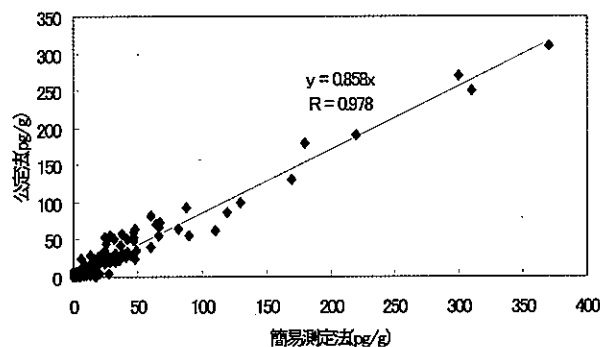


図8-1 4~6塩素化ダイオキシン測定結果

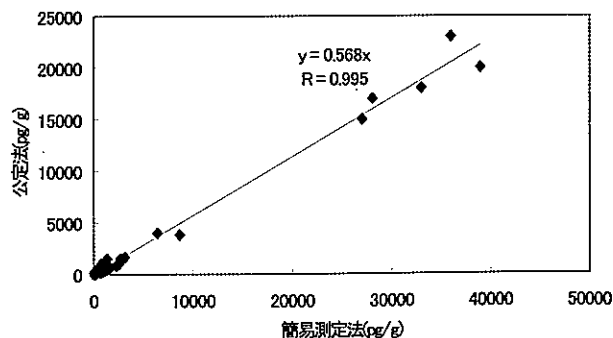


図8-2 7,8塩素化ダイオキシン測定結果

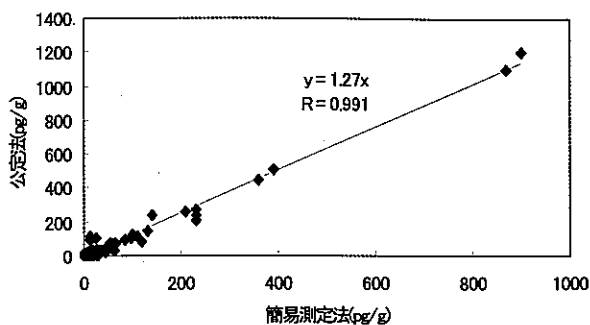


図 8-3 Co-PCBの測定結果

図 8-3 の Co-PCB においては、かなり高い相関が見られた。今回の実試料においても、簡易測定法で十分スクリーニングが可能である。

なお、これまでの調査結果から、本県の土壤、底質の特徴としては、7, 8 塩素化ダイオキシンの濃度が他のダイオキシンに比べ、かなり高い傾向を示すことから、簡易測定法でスクリーニングできるように、試料マトリックスの影響等を十分考慮した測定条件の最適化を今後検討する必要がある。

5 まとめ

ダイオキシン類分析に係る簡素化、迅速化の基礎実験で、次のような結果を得た。

1) ソックスレー法と ASE 法による抽出の比較

トルエンで 16 時間以上抽出するソックスレー法（公定法）に比べ、ASE 法の操作は自動化と安全性が確保され、測定時間は 1 検体あたり約 40 分程度で済み、多検体の抽出を効率的にでき、かつ溶媒の使用量も少なくて済むなどの利点があった。

2) カラム連結による分画試験及び測定結果

シリカゲルの分画試験が、公定法では、クロマト展開、及び濃縮工程が 2～3 回あるけれども、今回のカラム連結による簡易前処理法では 1 工程となり、大幅

な時間短縮や労力の軽減が可能となった。しかも、試料のクリーンアップも公定法に比較して、ほとんど遜色がなく、測定結果も概ね同じであった。

3) 複数のキャピラリーカラムの使用

現在、公定法では、3 種類のキャピラリーカラムを使用している。今回使用した標準土壤の簡易前処理法の一括分析で、DB17 カラム使用時、唯一、2, 3, 7, 8-位置換異性体である 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H₇CDF のクロマトに重なり の出現をみたけれども、HT 8 CoPCB カラムで測定すれば、この現象を解決できた。また、すべてのダイオキシン類を 2 種類のカラム（DB17 カラムを除く。）だけで測定することも可能なことから、大幅に測定時間を短縮できる。

4) 簡易測定法 (QISMS/MS) による測定

比較的濃度の高い土壤や底質では、Co-PCB と TEF の大きい 4～6 塩素化ダイオキシンで、公定法とかなり高い相関があることから、緊急時のスクリーニングに十分利用できる。

参考文献

- 1) 松村千理, 藤森一男, 他; 第 8 回環境化学討論会講演要旨集 202～203 (1999)
- 2) 岡本拓, 広瀬浩二, 他; 第 9 回環境化学討論会講演要旨集 256～257 (2000)
- 3) 山下一巳, 赤崎昭一, 他; 米ノ津川におけるダイオキシン類の調査結果; 鹿児島県環境保健センター所報, 4, 50～54 (2004)
- 4) 中村朋之, 清野陽子, 他; 第 12 回環境化学討論会講演要旨集 356～357 (2003)
- 5) 先山孝則, 大澤卓也, 他; 第 12 回環境化学討論会講演要旨集 360～361 (2003)

Test Research on the Simplification and Speeding up of the Analytical method of Dioxin

Kazumi YAMASHITA, Shoichi AKASAKI, Takuji KIYOHARA
Shoji SHITANDA, Kazuyuki YAMANO, Takahisa KAWAMOTO

[Kagoshima Prefectural Institute of Environmental Research and Public Health, 18,
Jonan-cho, Kagoshima-shi, 892-0835, JAPAN]

Abstract

Dioxin analysis of the regulating method takes about many time and labors to a pretreatment or apparatus analysis. Then, how to extract by Accelerated solvent extractor and how to use the homemade simple multilayer silica gel and two-layer formula activated carbon silica gel column for chromatographic fraction of a pretreatment, and use GC/MS/MS for apparatus analysis was examined whether it is possible or not as the simple and quick analytical method this time. Consequently, the good result was obtained about soil and sediment.

Key Words : Accelerated solvent extractor, homemade simple multilayer silica gel,
homemade two-layer formula activated carbon silica gel column, GC/MS/MS