

SPD-600による ダイオキシン類生物検定法の前処理

京都電子工業株式会社 研究開発本部
バイオ研究部 主席研究員
澤田石一之、片岡千和
(愛媛大学農学部 客員教授)

はじめに

平成16年12月27日、ダイオキシン類対策特別措置法施行規則の一部が改正され、測定法の一部に生物検定法による簡易測定法が追加された。それに伴い、環境省では、該当する測定法の公募と技術評価を行い、本年9月14日に4種類の方法を指定した。これにより、ダイオキシン類の測定において生物検定法の本格的利用が始まろうとしている。

生物検定法においても、これまでのGC/MS分析法と同様に十分な測定精度管理が求められているが、その中でも特に測定データの信頼性の確保のため、前処理操作の再現性が重要となる。すなわち、GC/MS分析法の前処理で用いられる内部標準は使用することができないため、前処理操作ごとの回収率の確認と濃度補正が不可能であり、同一試料であっても前処理いかんによっては異なる測定値が得られる危険性が存在する。前処理の再

現性に影響する要因としては、複数のカラムクロマトグラフィーによる精製やエバポレータ1等を用いた濃縮等の煩雑な操作に由来する人為的誤差と、前処理に使用する化学修飾シリカゲル等の精製能力に由来する妨害物質除去効率の違いが挙げられる。

これらの要因を極力排除した生物検定法用の前処理法^{①②}が、本田克久・愛媛大学農学部客員教授らにより開発されており、当社ではその前処理法に基づく「ダイオキシン分析用自動前処理装置 SPD-600」(写真)を開発した。本装置は試料粗抽出液の精製から濃縮および溶媒転溶を連続的に全自動で行う装置であり、再現性と精製度が極めて高い測定用試料を調製できることから、今回公定法として指定された4種類の測定法を含め、生物検定法の普及に貢献できるものと期待される。

ダイオキシン分析用自動前処理装置 SPD-600の特徴(表1)

本前処理装置は、多層シリカゲルからなる



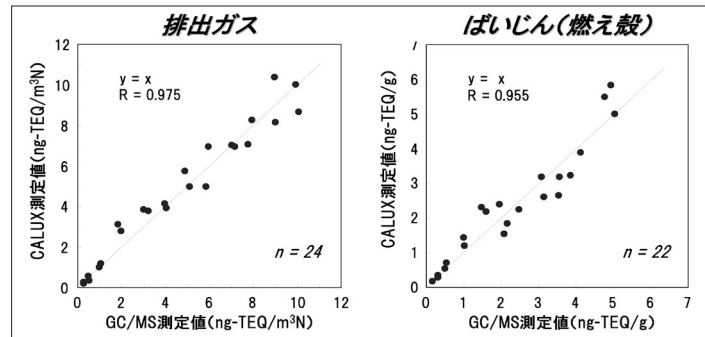
▲ダイオキシン分析用自動前処理装置 SPD-600

精製カラム部と分離濃縮カラム(アルミナカラム)部から構成される。精製カラム部は、加熱処理により多環芳香族化合物や硫黄化合物等の、生物検定法における妨害物質を効率的に排除し、高精製度の試料調製を可能とした(図1、図2)。また、この加熱処理により、室温処理において見られた硫酸シリカゲルの口

表2 排ガス・燃え殻・ばいじん試料調製時の回収率と繰り返し精度

異性体	試料			排出ガス			燃え殻			ばいじん		
	N=3		内標準物質の回収率(%)	N=3		内標準物質の回収率(%)	N=3		内標準物質の回収率(%)	N=3		内標準物質の回収率(%)
pg	RSD (%)	pg		RSD (%)	pg		RSD (%)	pg		RSD (%)		
PCDD	2,3,7,8-TeCDD	74	0.5	80	140	3	84	160	1	81		
	1,2,3,7,8-PeCDD	240	3	83	510	4	85	560	4	80		
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	230	0.6	82	410	2	82	680	1	80		
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	390	3	83	600	5	77	1,800	4	74		
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	260	2	87	560	4	82	1,100	3	87		
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,800	4	81	3,800	2	83	9,200	1	89		
	OCDD	2,000	4	76	5,800	5	83	13,000	2	89		
PCDF	2,3,7,8-TeCDF	560	0.1	83	790	2	79	850	3	77		
	1,2,3,7,8-PeCDF	950	2	79	1,800	3	83	1,300	5	77		
	2,3,4,7,8-PeCDF	840	6	80	1,600	2	79	1,400	4	81		
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	800	6	83	2,300	5	85	1,700	1	80		
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	750	3	80	2,000	2	70	1,600	2	73		
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	60	4	82	170	2	85	180	1	82		
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	790	2	82	2,000	4	79	1,900	1	80		
PCB	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1,600	6	76	8,400	4	78	5,300	0.7	73		
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	40	5	80	930	3	86	900	3	86		
	OCDF	560	4	75	4,500	6	83	2,700	0.7	85		
	3,4,4',5'-TeCB (#81)	390	6	74	500	2	67	460	4	64		
3,3',4,4'-TeCB (#77)	1,100	3	78	1,400	5	72	1,300	3	75			
3,3',4,4',5'-PeCB (#126)	690	0.8	75	1,100	3	68	980	0.7	70			
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	200	2	76	390	3	73	470	3	69			

図4 ケイラックス®アッセイ測定値とGC/MS測定値との相関



数(22検体)のケイラックス®アッセイとGC/MSによる測定値には良好な相関が示されており、SPD600は本法の前処理法として適応可能であることが確認された。

指定された他の3種類の測定方法への適用についても確認している。

図1 加熱処理による精製効果(多環芳香族化合物除去効果)

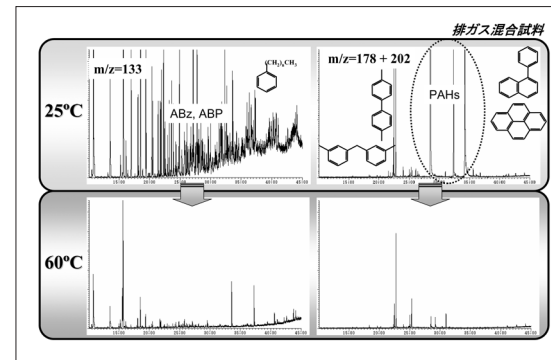
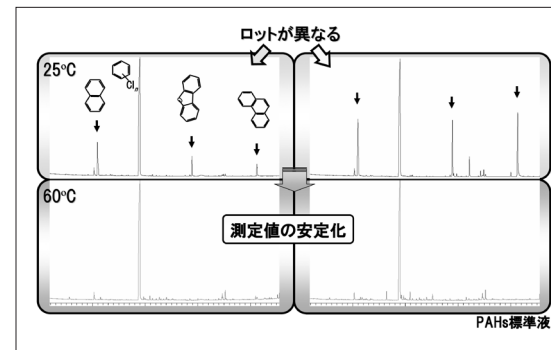


図3 加熱処理による硫酸シリカゲルのロット間差の減少



これにより、従来の活性炭やアルミナからトルエンなどの有機溶媒で溶出させた後のDMSO溶媒への転溶により生じる恐れのある測定試料液の不均一性の問題も排除することが可能となった。また、流路切り替えにバルブレスを採用、微量分析で重要なクロスコンタミネーションを排除している。本装置により、これまでGC/MS分析や各種生物検定法で必要であった、複数のカラムクロマトグラフィーによる精製やエバポレーター等を用いた濃縮等の煩雑な前処理が不要となり、さらに完全自動化により、

表1 ダイオキシン分析用自動前処理装置 SPD-600の特徴

- ・JIS 準拠の前処理方法
- ・約3時間で3検体を同時処理
- ・ヘキサン転溶粗抽出液 5ml を処理し、DMSO 溶液 1ml 以下として調製
- ・PCDD/PCDF17種類、non-ortho Co-PCB を再現性良く回収
- ・加熱精製により有機物を低減、PAH 等の芳香族化合物を効率的に除去
- ・完全自動化により人為的誤差を排除し、高い再現性を達成 (RSD6%未満)
- ・前処理済み試料は、簡単な操作でGC/MS 分析用試料とすることが可能

図2 加熱処理による精製効果(硫黄化合物除去効果)



の測定に直接利用できることのできる溶媒であるDMSO(ジメチルスルホキシド)により、ダイオキシン類を直接アルミナカラムから溶出させることが可能である。

これにより、従来法の活性炭やアルミナからトルエンなどの有機溶媒で溶出させた後のDMSO溶媒への転溶により生じる恐れのある測定試料液の不均一性の問題も排除することが可能となった。また、流路切り替えにバルブレスを採用、微量分析で重要なクロスコンタミネーションを排除している。本装置により、これまでGC/MS分析や各種生物検定法で必要であった、複数のカラムクロマトグラフィーによる精製やエバポレーター等を用いた濃縮等の煩雑な前処理が不要となり、さらに完全自動化により、

ロット差による精製能力の差を減少させ、精製度を一定に保つことができる(図3)。多層カラムとアルミナカラムを連結することにより精製と濃縮を容易にし、さらに、生物検定法

の測定に直接利用できることのできる溶媒であるDMSO(ジメチルスルホキシド)により、ダイオキシン類を直接アルミナカラムから溶出させることが可能である。

回収率と繰り返し精度

排出ガス・燃え殻・ばいじん試料を本前処理装置により調製した場合の回収率および繰り返し精度を表2に示した。いずれも好成績が得られ、内部標準(13C)添加による濃度補正のない生物検定用試料として最も、重要な繰り返し精度の高い試料調製が可能であることが示された。さらに、精製度についても、当社のダイオキシンスイッチャーDXS600を用いて分析したところ、3回同時処理試料の測定値の変動係数は3%程度に収まり、極めて高い再現性が得られている。

SPD600の生物検定法への適用

今回指定された方法の一つで、ダイオキシン類がアリアル炭化水素受容体に結合することを利用した「ケイラックス®(CALUX®)アッセイ」(環境省平成17年告示第92号第1の1)を用いて、SPD600により調製した試料を測定した結果を図4に示した。なお、ケイラックス®アッセイによる測定は、株式会社日吉にご協力いただいた。SPD600で調製した試料(排出ガス24検体、ばいじん(燃え

今後の展望

SPD600により調製した排出ガス・ばいじん・燃え殻の環境試料は、ケイラックス®アッセイへ適用することができた。

SPD600は、試料粗抽出液の精製から濃縮、および溶媒転溶を連続的に全自動で行う装置であり、再現性と精製度が極めて高い測定用試料を調製できることから、前処理操作における精度管理を容易にするものである。

本装置は、それぞれ特徴ある生物検定法に対し分析精度と再現性の向上をもたらすと期待され、環境省の進める生物検定法の普及と発展に対し貢献できると考えている。

※参考文献

- (1) 藤田寛之、濱田典明、本田克久...ダイオキシン類分析における加熱多層シリカゲルカラム精製法の検討、環境化学、第15巻1号、117~128ページ、2005年
- (2) 藤田寛之、濱田典明、澤田石一、本田克久...GC/MS法及び生物検定法によるダイオキシン類測定のための簡易精製・濃縮法に関する検討、環境化学、第15巻3号、585~596ページ、2005年

お問い合わせ先

京都電子工業株式会社
環境機器部 ダイオキシンプロジェクト
TEL: 03-3239-7336
Eメール: tokyo@kem.co.jp
URL: http://www.kyoto-kem.com