

ダイオキシン類の簡易分析技術

Techniques for Simplified Analysis of Dioxins

高柳 周二

TAKAYANAGI Shuji

古賀 郁美

KOGA Ikumi

野牧 辰夫

NOMAKI Tatsuo

ダイオキシン類の分析は、環境省などから示されている公定法により実施されているが、非常に煩雑な前処理と測定技術が要求されることから、分析時間やコストなどの点で課題が多い。近年、ダイオキシン類の分析は、環境調査にとどまらず、土壌汚染対策や無害化処理、焼却炉の日常管理などにおいてニーズが高まっており、簡便で迅速な分析方法の確立が急務となっている。

(株)テルムは、前処理条件の最適化により、イムノアッセイ法によるスクリーニングとイオントラップ型GC/MS/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometer/Mass Spectrometer)による定量を行い、従来の公定法と十分に相関のあるダイオキシン類簡易分析法を確立した。この分析法を土壌調査などに適用することで、分析期間とコストを約1/3～1/2に削減できた。

Environmental pollution due to dioxins (PCDDs, PCDFs, Co-PCBs) has recently become a serious problem. The analysis of very small concentrations of dioxins requires complex recovery and analysis procedures. However, to implement countermeasures against soil pollution by dioxins and perform daily control of incinerator operations, a quicker and more convenient analysis method needs to be established.

TERM Corporation has established simple analytical techniques consisting of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and ion-trap gas chromatography/mass spectrometer/mass spectrometer (GC/MS/MS) methods. These methods sharply reduce the time and cost of analysis. In addition, the results obtained using these methods are comparable to the results obtained by the official method. We have performed efficient environmental investigations and implemented countermeasures to reduce dioxins applying these simple methods.

1 まえがき

ダイオキシン類(ポリ塩化ジベンゾ・パラ・ジオキシン: PCDDs, ポリ塩化ジベンゾフラン: PCDFs, コプラナーポリ塩化ビフェニル: コプラナーPCBsの総称)による環境汚染が社会的に問題となり、大幅な環境の改善が求められている。

そのため、ダイオキシン類による環境汚染の実態やダイオキシン類の排出源の特定など、様々な調査が数多く行われている。一方、ダイオキシン類による汚染土壌や焼却灰など廃棄物の無害化処理の研究開発も進められており、その実証も急務になっている。しかしながら、日本工業規格や環境庁(現環境省)告示などに示された方法(公定法¹⁾⁽²⁾のダイオキシン類分析は、分析結果が出るのに約1か月かかることや、分析費用も高額である。そのため、調査・研究が中途半端になったり、本格的な調査・研究をちゅうちょしている場合も少なくない。

このような背景から、公定法の問題点を解決すべく多くの簡易化され効率化された分析法が提案³⁾されている。(株)テルムは、測定時間が短く、多検体同時測定が可能な生物化学的検出法の一つであるイムノアッセイ法と、公定法の一部を

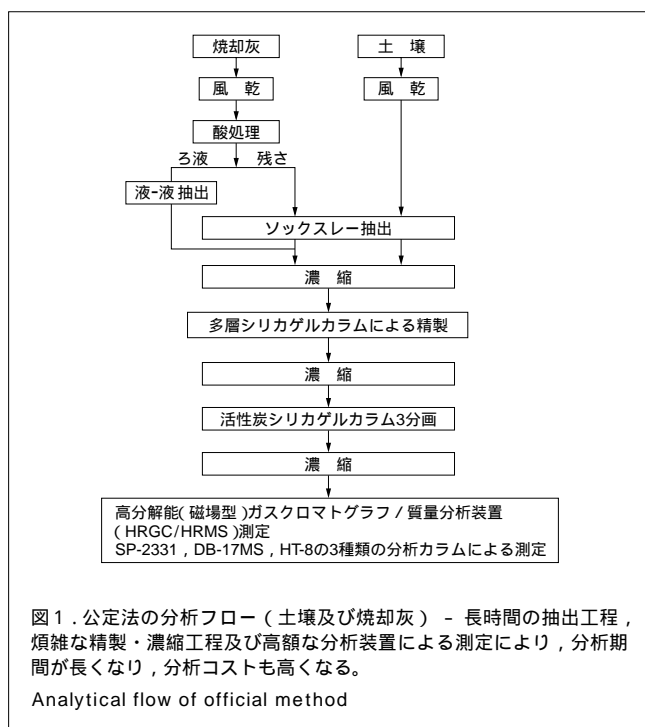
簡易化し、TEQ(Toxicity Equivalency Quantity: 毒性等量)^{注1)}換算や異性体分離分析など公定法と同レベルの測定が可能なイオントラップ型ガスクロマトグラフ質量分析装置(GC/MS/MS)を選択し、迅速性と簡易性を備えた、より実用的なダイオキシン類簡易分析法を確立した。

2 公定法の問題点

公定法は、おおむね図1に示すフローにより定性・定量分析が行われている。公定法は、極微量分析を対象としているため、精度管理にウエートが置かれている。したがって、以下のような問題点がある。

- (1) 長時間の抽出工程(ソックスレー抽出を16時間)
- (2) 煩雑な精製工程による夾雑(きょうざつ)成分の除去作業
- (3) 高額な分析装置による測定
- (4) 多量の有機溶剤の使用による環境問題の再発生

(注1) ダイオキシン類の濃度(毒性の強さ)を表示する際に、異性体ごとの毒性強度と存在量を乗じて算出した量の合計を明示するためのもの。



3 ダイオキシン類簡易分析法の概要

ダイオキシン類簡易分析法は、前処理を簡易化(効率化)する方法と測定を簡易化する方法に大別できる。更に、ダイオキシン類測定はイムノアッセイ法などの生物化学的検出法とガスクロマトグラフ質量分析法(GC/MS)に大別できる。当社は、イムノアッセイ法の一つであるELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)キットを用いてダイオキシン類総量として定量する簡易分析法(以下、ELISA法と略記)による測定と、可能な限りダイオキシン類異性体を分離するイオントラップ型GC/MS/MSを用いた簡易分析法(以下、イオントラップ型GC/MS/MS法と略記)の検討を行った。

3.1 ELISA法

ELISA法の測定は、ダイオキシン類に特異的に反応する抗体を固相化したプレートに、標準液や前処理された試料を標識ダイオキシン類と競合的に反応させ、反応後プレートを洗浄し、標識化試薬を加えて反応させる。その後、発色試薬を加えて各ウェル^{注2)}の吸光度を測定することによって行う。

この方法は、測定結果が得られるまでの時間が短く、多くの試料の測定が同時に可能である。

3.2 イオントラップ型GC/MS/MS法

イオントラップ型GC/MS/MS法は、汎用の四重極型GC/MSと比べ、イオン化された試料を保持し、2度のイオン化(MS/MS)をすることで、夾雑物による影響が減少し、高感度で測定することが可能である。この手法は分析カラムを1本で行い、メンテナンスが容易である利点と、公定法と同

じ異性体分離分析のため、測定結果からダイオキシン類汚染の由来などを解析することに適している。

4 簡易分析法の検討

4.1 前処理方法の検討

前処理方法の簡略化のために、以下の検討を行った。

4.1.1 抽出方法 公定法試料^{注3)}から、高温高压下の溶媒中に試料を保持するダイオネクス社製の高速溶媒抽出装置(ASE)を用いて、ダイオキシン類の抽出を行った。そこで、ASEの抽出効率とその妥当性を評価するために、ソックスレー抽出との比較実験を行った。各々の方法で試料から抽出を行い、その後は公定法で前処理と測定を行った。ソックスレー抽出とASE抽出の条件を表1に示す。

表1. ソックスレーとASEによる抽出条件
Conditions of Soxhlet extraction and accelerated solvent extractor (ASE)

分析法	抽出条件	
公定法(ソックスレー抽出)	トルエンで16h以上行う	
簡易分析法(ASE抽出)	温度	180
	圧力	2,000 psi
	加熱時間	9 min
	放置時間	10 min
	パージ時間	150 s
	サイクル数	2
	溶媒	方法1:アセトン 方法2:トルエン
	スケジュール	方法1:1サイクル 方法2:1サイクル
合計時間	1 h	

4.1.2 精製方法 公定法に準拠した多層シリカゲルカートリッジタイプの市販品カラム(スベルコ社製)を購入し、溶媒を自動的に送液できる前処理装置を用いて精製工程を自動化した。

4.1.3 分画方法 ELISA法はダイオキシン類濃度の総量を測定することや、前処理時間削減のため分画操作は行わなかった。

イオントラップ型GC/MS/MS法は異性体分析であるが、過度な分画は必要ないので、活性炭シリカゲルによる分画を3分画から2分画に簡略化した。

4.2 測定方法の検討

前記の前処理操作を行った後、ELISA法で土壌(10検体)及び焼却灰(46検体)を測定した。また、イオントラップ型GC/MS/MS法で土壌(7検体)、焼却灰(7検体)、排ガス(3検体)、環境大気(3検体)を測定した。一般に、公定法は

(注2) 直径5mm程度のつぼ状容器で、内壁に特定の抗原を塗布したもの。

(注3) 公定法で測定済みで、濃度が既知である試料。

表2. イオントラップ型 GC/MS/MS 法の分析条件
Analytical conditions of ion-trap GC/MS/MS method

ダイオキシン類の種類	分析条件
PCDDs PCDFs	<ul style="list-style-type: none"> ・使用カラム：CP-SIL8CB lowbleed/MS(バリアン社製)内径 0.25 mm, 長さ 60 m, 膜厚 0.25 μm ・カラム温度：120 (1 min) (20 /min) 200 (2 /min) 280 (10 /min) 300 (8 min) ・注入口温度：120 (200 /min) 310 (15 min) ・試料導入条件：スプリット方式, (0 min)スプリット比 20 (0.2 min)スプリット Off (2.5 min)スプリット比 50 ・試料注入量：2 μL
コプラナー PCBs	<ul style="list-style-type: none"> ・使用カラム：同上 ・カラム温度：100 (1 min) (20 /min) 185 (2 /min) 245 (6 /min) 300 (0.68 min) ・注入口温度：100 (200 /min) 310 (15 min) ・試料導入条件, 試料注入量：同上

* ()内は GC 装置の昇温条件

5 簡易分析法の検討結果と考察

5.1 抽出方法

ソックスレー抽出と ASE 抽出の比較検討実験を行った結果を図3に示す。ASE 抽出は,ソックスレー抽出より約1.2倍抽出効率が高い結果が得られた。一般に,試料の含水率が高いと抽出効率が悪くなるため,最初に疎水性のアセトンで抽出し,試料の含水率を下げた後にトルエンで抽出する2段階抽出により抽出効率を高くすることができた。

5.2 ELISA 法

ELISA 法と公定法による土壌と焼却灰の分析結果の相関を図4及び図5に示す。相関係数はそれぞれ0.988, 0.9241であり,良好な相関が得られた⁽⁴⁾。

ELISA 法の測定結果は,多環芳香族炭化水素類などによるものと思われる夾雑物の影響から,公定法と比べて高めに出る傾向があった。しかし,土壌の詳細調査の指標である 250 pg・TEQ/g ($p : 10^{-12}$)を十分に判別でき,かつ環境

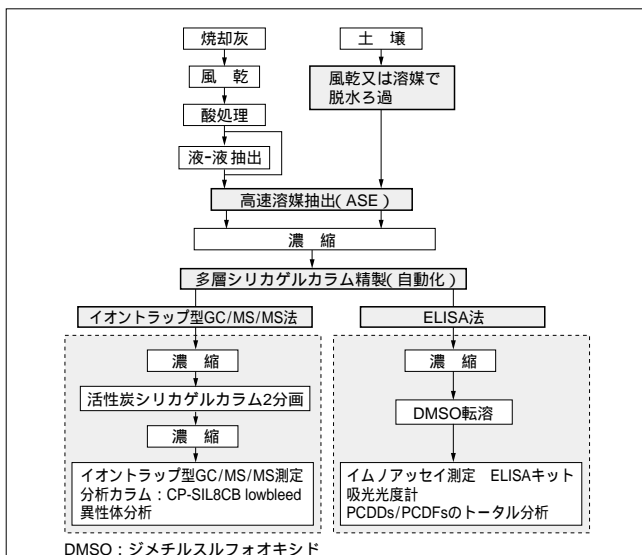


図2. ELISA 法とイオントラップ型 GC/MS/MS 法の分析フロー - 公定法の処理工程を一部簡易化して効率的な前処理を行うこと,及び安価な測定装置を用いることにより,公定法より分析期間が短くなり,分析コストも低くすることができる。

Analytical flow of ELISA and ion-trap GC/MS/MS method

1試料に対して3種類のカラムにより成分分離するが,イオントラップ型 GC/MS/MS 法は1種類のカラムで2回の測定とした。その分析条件を表2に示す。

これら二つの手法の測定フローを図2に示す。また,これらの試料を公定法で分析し値を比較するために,相関線を作成した。

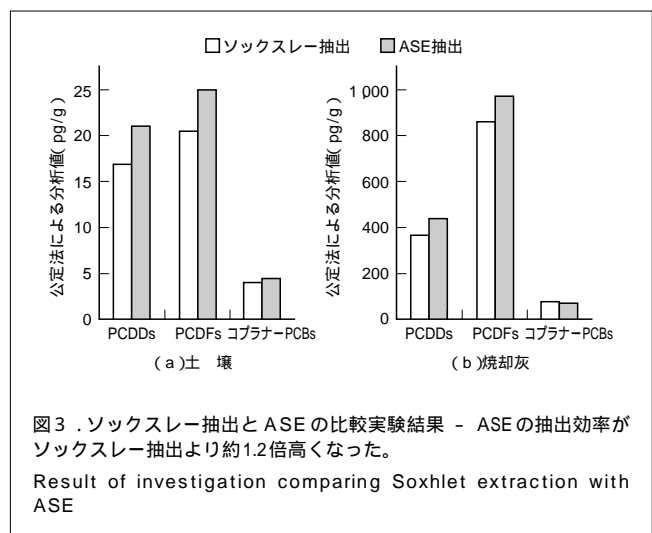


図3. ソックスレー抽出と ASE の比較実験結果 - ASE の抽出効率がソックスレー抽出より約1.2倍高くなった。

Result of investigation comparing Soxhlet extraction with ASE

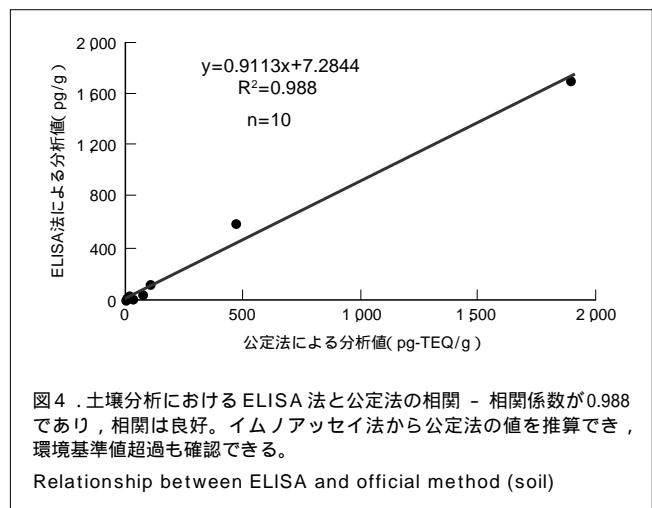


図4. 土壌分析における ELISA 法と公定法の相関 - 相関係数が0.988であり,相関は良好。イムノアッセイ法から公定法の値を推算でき,環境基準値超過も確認できる。

Relationship between ELISA and official method (soil)

6 あとがき

ダイオキシン類分析方法として、ELISA法及びイオントラップ型GC/MS/MS法による簡易分析法を確立した。

ELISA法においては、抽出方法におけるASEの条件設定、精製方法の自動化、またイオントラップ型GC/MS/MS法においては抽出・精製方法の改善に加えて分画回数を削減することにより、分析期間とコスト及び使用溶剤量を公定法の約1/3～1/2に削減することができた。

ELISA法は、土壌や焼却灰の基準値を判別できる感度があり、公定法との分析値の相関も0.9241～0.988と良好な相関が得られた。イオントラップ型GC/MS/MS法においては、更に環境大気と排ガスの基準値を判別できる感度があり、公定法との分析値の相関も0.9799と高い相関関係が得られた。これら相関線をもとにダイオキシン類土壌汚染サイトのスクリーニングや廃棄物処理の判別と無害化実験に十分適用できることがわかった。

全国で簡易測定技術の評価が行われているが、現在、公定法と呼ばれる簡易法マニュアルは示されていない。従来の公定法にこだわらず、ダイオキシン類の測定目的に応じた感度で、時間や費用のかからない簡易分析法を選択し、ダイオキシン類の削減対策を早急に進める必要がある。今回確立した簡易分析法が、その問題解決に役だつことを望んでいる。

文 献

- (1) JIS K 0311；排ガス中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法．日本規格協会，1999．
- (2) ダイオキシン類に係る土壌調査測定マニュアル．環境庁水質保全局土壌農業課，2000．
- (3) 加藤みか：“ダイオキシン類とその類縁物質の効率的な測定・評価技術”．第3回効率的な環境管理のための最新の簡易測定技術講演要旨集．東京，2002-12，エコケミストリー研究会．東京，2002，p.47 - 64．
- (4) 古賀郁美，ほか：“イムノアッセイ(ELISA)法によるダイオキシン類の迅速分析”．第14回日環境関東支部環境セミナー要旨集．長野，2002-10，日環境関東支部．2002，p.44 - 46．



高柳 周二 TAKAYANAGI Shuji

(株)テルム 環境エンジニアリング本部 環境分析部主任。ダイオキシン類の分析業務に従事。環境化学会，エコケミストリー研究会会員。TERM Corp.



古賀 郁美 KOGA Ikumi

(株)テルム 環境エンジニアリング本部 環境分析部主務。ダイオキシン類の分析業務に従事。TERM Corp.



野牧 辰夫 NOMAKI Tatsuo

(株)テルム 環境エンジニアリング本部 環境分析部参事。ダイオキシン類の分析業務に従事。TERM Corp.

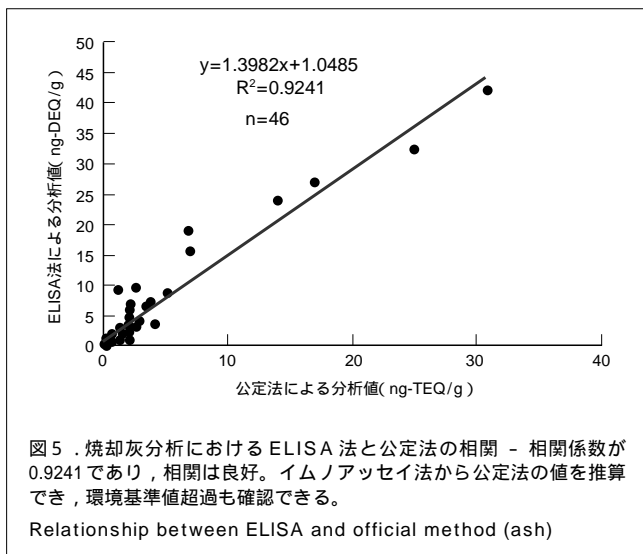


図5 焼却灰分析におけるELISA法と公定法の相関 - 相関係数が0.9241であり、相関は良好。イムノアッセイ法から公定法の値を推算でき、環境基準値超過も確認できる。

Relationship between ELISA and official method (ash)

基準の1,000 pg・TEQ/gを測定できる有効性を確認できた。また、焼却灰においては、処理基準である3 ng・TEQ/g (n: 10⁻⁹)の判別もできることを確認できた。この一連の方法により、分析期間と分析コストを約1/3に削減できた。

5.3 イオントラップ型GC/MS/MS法

イオントラップ型GC/MS/MS法と公定法との分析結果の相関を図6に示す。相関係数は0.9799であり、良好な相関が得られた。イオントラップ型GC/MS/MS法の測定結果は、ELISA法より夾雑物の影響を受けないため、すべての試料形態に関して公定法とほぼ同等の結果が得られた。この方法は、土壌と環境大気環境基準(土壌: 1,000 pg・TEQ/g, 環境大気: 0.6 pg・TEQ/m³)や排ガスの排出基準(新設: 0.1 ng・TEQ/m³)、及び焼却灰の処理基準が容易に判別できた。この一連の方法により、分析期間と分析コストを約1/2に削減できた。

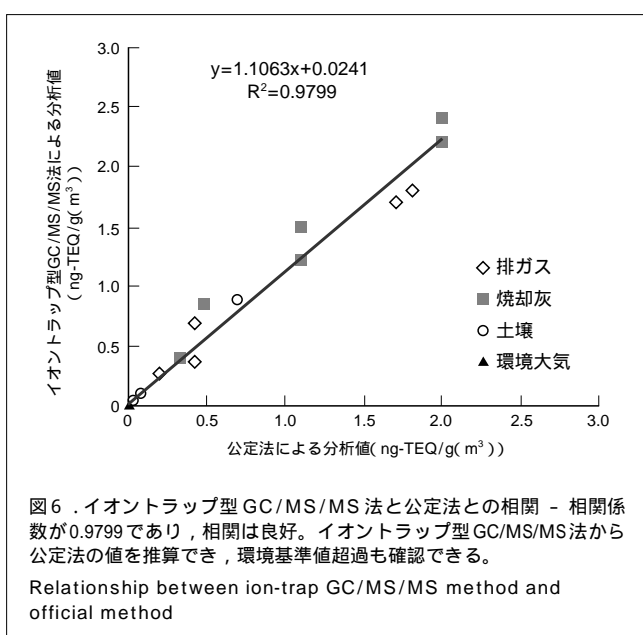


図6 イオントラップ型GC/MS/MS法と公定法との相関 - 相関係数が0.9799であり、相関は良好。イオントラップ型GC/MS/MS法から公定法の値を推算でき、環境基準値超過も確認できる。

Relationship between ion-trap GC/MS/MS method and official method