

土壌試料等のダイオキシン類迅速分析法

三木 崇・川下博之・吉川昌範

Rapid Analysis of Dioxins in Contaminated Soil, Sediment and Dyes.

Takashi MIKI, Hiroyuki KAWASHITA, Masanori YOSHIKAWA

1. はじめに

土壌試料をはじめとする粒子状物質のダイオキシン類の測定は、「ダイオキシン類に係る土壌調査測定マニュアル」「ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル」「特別管理一般廃棄物及び特別管理産業廃棄物に係る基準の検定方法」(以下、公定法)に基づいており、これらの公定法は測定結果を得るまでに多大な時間やコスト、労力を要する。

このため平成 21 年 3 月、土壌底質試料を対象とした環境省簡易測定マニュアル¹⁾²⁾が策定されたが、作業工程が公定法に近いことや、分析結果が調査指標値を超える場合には公定法での再測定が必要となるなど、緊急時における迅速化・省力化の面で課題もある。

また環境中のダイオキシン類汚染源として知られている燃焼生成由来や過去の農薬成分(CNP、PCP)以外に、工業原料の有機顔料には、一部の製品に非意図的副生物として高濃度のダイオキシン類・PCB が確認されており³⁾⁶⁾、多量の夾雑物のためダイオキシン類分析の難易度も高い。

そこで染料系汚染土壌も対象とした迅速・安価なスクリーニング手法として、高速溶媒抽出を用いた迅速抽出、RH-12ms での 1 カラム簡易評価法、排ガス・ばいじん試料に適用されている生物検定法による簡易毒性評価法の適用について検討した。

2. 方法

2. 1 高速溶媒抽出法

土壌・底質の風乾試料に含水率が 5~50%となるよう純水を添加し、高速溶媒抽出(以下、ASE)条件下での抽出阻害影響を検討した。装置の抽出条件を表 1 に示す。

抽出操作以降の精製から分画までは、ダイオキシン類に係る土壌調査測定マニュアル(平成 21 年 3 月)に基づいて処理を行い、mono-ortho PCBs 画分と non-ortho PCBs/PCDDs/PCDFs 画分を 20 μL まで最終濃縮し、高分解能 GC/MS(日本電子:JMS 700D)で SP-2331、RH-12ms カラムを使用して各異性体を定量した。また、1 カラム簡易定量は RH-12ms を使用し、毒性等価係数(TEF)を持つ 29 異性体を定量した。

表 1 高速溶媒抽出装置条件(DIONEX ASE-200)

項目	条件
セル容量	33 mL
空隙充填	Na ₂ SO ₄
セル圧力	10.3 MPa (1500psi)
静置時間	20 min
フラッシュ溶媒量	20 mL
パージ時間	150 sec
抽出溶媒	トルエン

2. 2 生物検定法による毒性評価

ASE で得られた抽出液を、環境省の「排出ガス、ばいじん及び燃え殻のダイオキシン類に係る簡易測定法マニュアル(生物検定法)」⁷⁾に準拠して精製操作と定量操作を行った。(図 1)

なお、今回採用した手法は、告示第 92 号第 2 の 1 に記載された抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を用いた抗原抗体反応⁸⁾で、環境ソルテック社が販売している ELISA 分析キット(商品名:ダイオクイッカー)である。

マイクロプレート洗浄は BIO-RAD 社製の Immuno Wash 1575 にて行い、反応後の吸光度測定は TECAN 社製のサンライズリモート R で、波長 450nm にて測定した。なお、濃度換算式の係数はばいじん試料と排ガス試料で若干異なるため、土壌試料の評価には同じ固形物試料であるばいじん試料の換算式(図 2)を使用した。

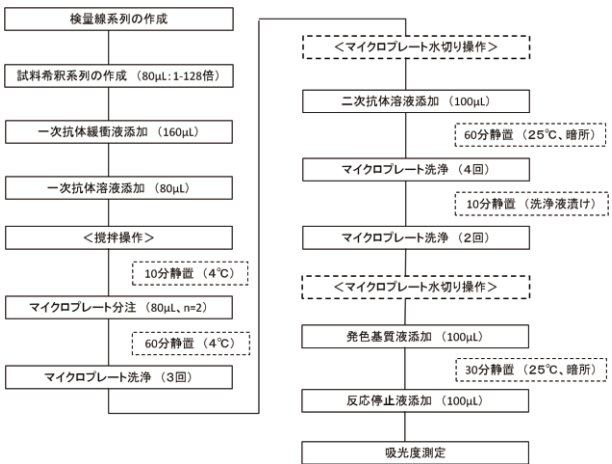


図 1 抗原抗体反応法 定量フロー

測定量(毒性等量) (ng-TEQ/g) = 0.0601 × (Q / 1000)^{0.9605} × (v / V_E) × (V_E / V)

Q : 希釈倍数×実測濃度 (ng/mL)
v : 測定用試料の液量 (mL)
V_E : 抽出液量 (mL)
V_E : 抽出液分取量 (mL)
V : 試料採取量 (g)

図 2 ばいじん試料の濃度換算式

3. 結果と考察

3. 1 高速溶媒抽出条件

①水分影響の検討

風乾土壌試料を前述の ASE 条件でトルエン抽出を行った結果、全濃度に対して1回目で 94.5%、2回目で 5.5%が回収され、3回目は ND であった。このため、抽出操作は全て2回抽出とした。

また、水分が多く含まれる試料はダイオキシン類の抽出効率が低下することが知られている⁹⁻¹²⁾。抽出阻害影響の評価のため、風乾試料(底質)に純水を添加して抽出量を評価した。図3に純水添加量0%(重量比)を基準とした異性体毎の抽出量の結果を示す。純水添加量とともに抽出量が低下し、添加量が30%を超えるあたりから抽出効率の低下が認められた。

なお湿泥試料からの直接抽出は、アセトントルエンの段階抽出を行うことで風乾試料と同等以上の回収率を得ることができる¹⁰⁻¹²⁾が、アセトン抽出では検体中の多量の水分や夾雑物まで抽出されてしまうため、精製操作の前にヘキサン-ヘキサン洗浄水での液-液抽出作業を行わなければならない、さらに1工程が増えることとなる。このため、簡易的な脱水操作などで水分影響を緩和してトルエン抽出で十分な回収率が得られれば、抽出効率の維持と作業工程の軽減に繋がるものと期待できる。

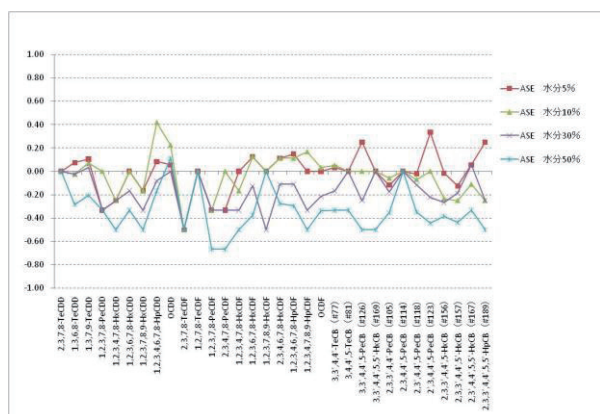


図3 底質試料 抽出量比較試験(水分0%基準)

②ASE-1カラム簡易評価法

公定法の定量結果を基準に、ASE-1カラム(RH-12ms)簡易定量法の値を評価した。

底質試料では、公定法のソックスレー抽出とASEの抽出量が概ね一致し、29異性体の単純平均でASEが3.9%高い結果となった(図4)。また1カラム簡易定量においては、Total-TEQは公定法とほぼ同値だが、一部の異性体が過大評価となり、1,2,3,6,7,8-HxCDF(TEF=0.1)は1,2,3,4,6,7-HxCDF(TEF=0)と分離できずに、約2倍の定量結果となった(図5、6)。

一方、土壌試料は低塩素体の抽出量は同程度であったが、OCDDなど一部の高塩素体の抽出量が大きくなり、ソックスレー法の数倍に達するものも認められた。今回の実験に使用した試料性状を鑑みると、この要因の一つとして粒子径の影響が考えられる。今回の土壌試料は粒子の粗い砂質状のため表面の凹凸も多く、ソックスレー法では吸着力の強い高塩素体が十分剥離しなかったこと、底質試料は粒子が小さいものが多く、抽出が容易でソッ

クスレー法/ASE法の差が小さかった可能性が考えられる。

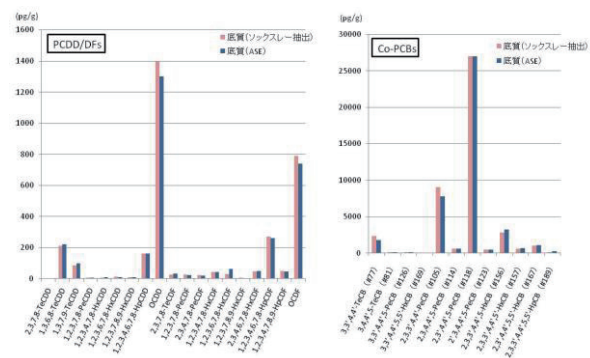


図4 ソックスレー/ASE抽出比較

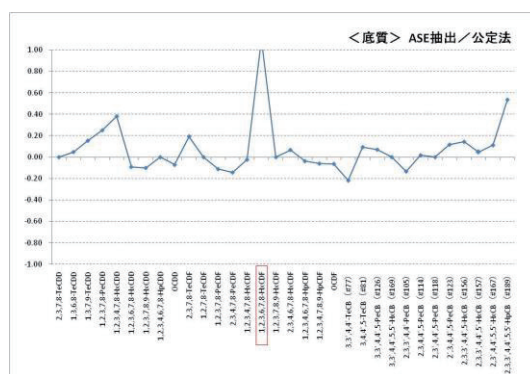


図5 ASE-1カラム定量法/公定法

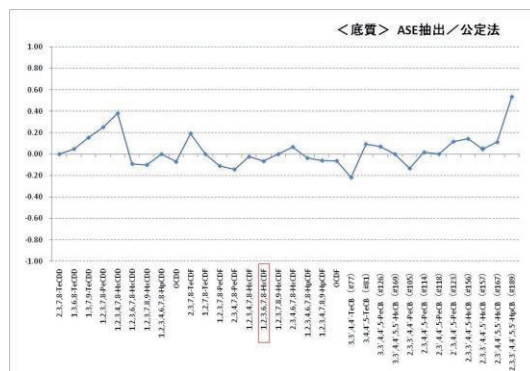


図6 ASE-2カラム定量法/公定法

3. 2 生物検定法による毒性評価

①ELISAキットの交差反応性

当該ELISAキットについて、藤平ら¹²⁾が求めた抗ダイオキシン類抗体の交差反応性を図7、8に示す。当該キットはばいじん・排ガス試料を対象としていることから、1,2,3,7,8-PeCDFをはじめとする燃焼由来に特徴的な異性体に高い反応性を有している。

一方で、ダイオキシン類の中でもOCDDなどの高塩素体やCo-PCB類、試料中の夾雑物である多環芳香族類との反応性が極めて低く設定されており、夾雑物等による誤定量のリスクが低いという利点はあるが、Co-PCBなど一部の異性体が測定対象外となる点について注意が必要である。

②反応性の試算

当該 ELISA キットに係る検討として、前述の交差反応性を用いて試料毎の反応性を試算した。

当センターが過去に行ったダイオキシン類分析結果を基に、各異性体の実測濃度に各々の交差反応性¹³⁾を掛け合わせて反応度を試算した結果、ばいじん試料、土壌・底質試料で有意な正の相関があり、良好な直線関係が得られた。結果を図9～11に示す。

底質試料の一部では回帰直線から若干外れる試料も認められたが、この試料は染色排水流入河川の底質で、Total-TEQの約半分をTEF=0.1～0.5の染料由来ピーク(2,3,4,7,8-PeCDF、2,3,4,6,7,8-HxCDF、PCB#126)が占めており、当該分析キットはこれらの異性体の交差反応性が総じて低いと考えられる。

また TEQ 当りの反応性は対象試料の異性体構成比によって左右されると考えられるが、実測濃度を基にした試算結果では、ばいじん試料より土壌・底質試料の方が反応性が高く、実際の生物検定評価でも、ばいじん試料は高分解能 GC/MS 定量値と同程度だが、土壌・底質試料は生物検定法の方が高めの値となる傾向が認められている。

生物検定法を利用した他の研究報告¹¹⁻²⁰⁾の中には、試料中の多環芳香族炭化水素類など夾雑物の影響によって公定法より高めの値となる傾向が報告^{12,20)}されているものもある。しかしながら、我々が用いた ELISA キットはダイオキシン類似化合物との反応性が極めて低く、今回の試験で高めの定量結果となった原因は、試料の異性体組成の差に起因するものと推定される。

異性体	TEF	交差反応性(%)	TEQとの相関係数※
2,3,7,8-TeCDD	1	1.1	0.20
1,2,3,7,8-PeCDD	1	29.9	0.32
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	24.8	0.43
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	18.0	0.46
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	39.8	0.45
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	17.0	0.51
OCDD	0.0001	<0.1	0.48
2,3,7,8-TeCDF	0.1	1.5	0.40
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	100.0	0.98
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	15.1	0.99
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	45.9	0.95
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	26.6	0.97
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	42.7	0.69
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	43.8	0.80
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	17.9	0.82
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	28.7	0.65
OCDF	0.0001	8.0	0.62

※ 排ガス試料(274検体)からの計算値。

図7 抗ダイオキシン類抗体の交差反応性①

(※藤平らの測定結果)

	物質名	交差反応性(%)
コプラナー-PCB類	3,3',4,4'-TeCB	<0.1
	3,3',4,4',5-PeCB	<0.1
	3,3',4,4',5,5'-HxCB	<0.1
多環芳香族炭化水素類	Anthracene	<0.1
	Naphthalene	<0.1
	Fluoranthene	<0.1
	Pyrene	<0.1
	Benz[a]anthracene	<0.1
	Benzo[b]fluoranthene	<0.1
	Benzo[k]fluoranthene	<0.1
	Benzo[ghi]perylene	<0.1
	Chrysene	<0.1
	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	<0.1
	Phenanthrene	<0.1
クロロベンゼン クロロフェノール類	m-Dichlorobenzene	<0.1
	1,2,3-Trichlorobenzene	<0.1
	2,4-Dichlorophenol	<0.1
	3,4-Dichlorophenol	<0.1
	2,4,5-Trichlorophenol	<0.1
その他	p-chlorobiphenyl	<0.1

図8 抗ダイオキシン類抗体の交差反応性②

(※藤平らの測定結果)

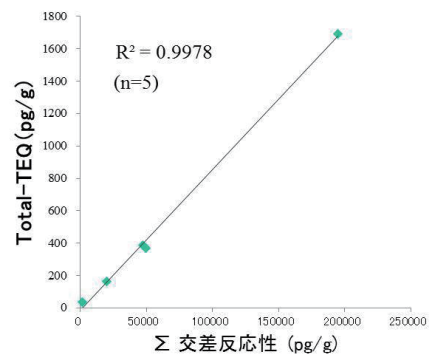


図9 ばいじん試料の交差反応性試算結果

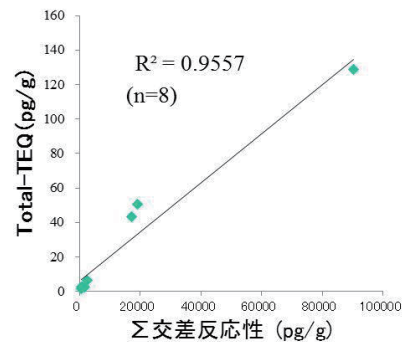


図10 土壌試料の交差反応性試算結果

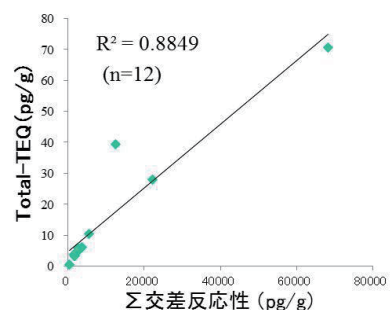


図11 底質試料の交差反応性試算結果

4. まとめ

ダイオキシン類のスクリーニング法として、高速溶媒抽出を用いた迅速抽出、RH-12msでの1カラム簡易評価法、排ガス・ばいじん試料に適用されている生物検定法による簡易毒性評価法の適用について検討した。

- ・風乾試料に純水を添加して抽出量を評価した結果、水分量とともに抽出量が低下し、水分量が30%を超えるあたりから抽出効率の低下が認められた。
- ・ASE-1カラム簡易定量を検討した結果、Total-TEQに関しては公定法とほぼ同値の結果が得られた。ただし異性体毎の評価では、底質試料で1,2,3,6,7,8-HxCDF (TEF=0.1)と1,2,3,4,6,7-HxCDF (TEF=0)が分離できず、約2倍の定量結果となるなど、一部で過大評価となる異性体が認められた。
- ・ELISAキットの検討として、異性体毎の交差反応性(%)を使用して試料毎の反応性を試算した。当センターのGC/MS定量結果を基に、各異性体毎の交差反応性を掛け合わせて反応度を試算した結果、ばいじん試料、土壌・底質試料で有意な正の相関があり、良好な直線関係が得られた。
- ・底質試料の一部では回帰直線から若干外れる試料も認められたが、この試料は染色排水流入河川の底質で、Total-TEQの約半分をTEF=0.1~0.5の染料由来ピーク(2,3,4,7,8-PeCDF、2,3,4,6,7,8-HxCDF、PCB#126)が占め、当該分析キットはこれらの異性体の交差反応性が総じて低いためと考えられる。
- ・土壌、底質試料は、試算結果と実際の生物検定法定量結果の両方で、生物検定法の方が高めの値となる傾向が認められた。

今後は、これらの知見を基に、染料汚染系土壌試料について精製工程の簡易化・迅速化と分析精度の向上に取り組む予定である。

なお、本研究は文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により、「化学物質対策調査研究事業(平成23~25年度)」として実施した。

参考文献

- 1) 環境省：土壌のダイオキシン類簡易測定法マニュアル，平成21年3月
- 2) 環境省：底質のダイオキシン類簡易測定法マニュアル，平成21年3月
- 3) 熊谷宏之他：分散染料中のダイオキシン類分析について―抽出法の検討と測定データの特徴―，福井県衛生環境研究センター年報，5，77-84 (2006)
- 4) 熊谷宏之他：未規制発生源である染色排水からのダイオキシン類排出機構について，第16回環境化学討論会講演要旨集，388-389 (2007)
- 5) 熊谷宏之他：未規制発生源である染色排水からのダイオキシン類排出機構について(その2)―太陽光照射によるPCDFsの生成反応―，第17回環境化学討論会講演要旨集，410-411 (2008)
- 6) 経済産業省 HP：有機顔料中に副生するPCBの工業技術的・経済的に低減可能なレベルに関する検討会第1回配布資料 (2012.7.10)
- 7) 環境省：排出ガス、ばいじん及び燃え殻のダイオキシン類に係る簡易測定法マニュアル (生物検定法)，平成22年3月
- 8) 滝上英孝他：ダイオキシン類、PCBを検出するパイオアッセイ，ぶんせき，503-510 (2003)
- 9) 市橋雅美他：土壌中ダイオキシン類の抽出における水分の影響，第19回環境化学討論会講演要旨集，322-323 (2010)
- 10) 東野和雄他：ダイオキシン類分析における迅速化の検討について，東京都環境化学研究所年報，p187-193 (2000)
- 11) 佐竹輝洋他：ダイオキシン類分析における湿泥試料中の多環芳香族炭化水素類の除去方法の検討，札幌市衛研年報 34，p76-82 (2007)
- 12) 高柳周二他：ダイオキシン類の簡易分析技術，東芝レビュー，vol.59，No.1，p42-45 (2004)
- 13) 藤平弘樹他：ダイオキシン類の高感度迅速測定法、環境浄化技術 vol.2 No.5、p63-66 (2003.5)
- 14) Malin Nording et al. : Rapid screening of dioxin-contaminated soil by accelerated solvent extraction/purification followed by immunochemical detection, Anal Bioanal Chem 385, 357-366 (2006)
- 15) 松枝隆彦他：ダイオキシン類の簡易分析，第15回環境化学討論会講演要旨集，332-333 (2006)
- 16) 半野勝正他：生物検定法を用いた底質中ダイオキシン類の迅速測定法の検討，第13回環境化学討論会講演要旨集，650-651 (2004)
- 17) 姉崎克典他：高感度 AhR レポーター細胞を用いた大気中ダイオキシン類の測定(第2報)，第17回環境化学討論会講演要旨集，374-375 (2008)
- 18) 片岡千和他：特異性の異なる複数の抗体を用いた土壌汚染迅速判定法(ダイオキシン類、PCB)の開発，第17回環境化学討論会講演要旨集，378-379 (2008)
- 19) 伊藤智博他：ELISA法を用いた土壌・底質中のダイオキシン類の測定(第二報)，第14回環境化学討論会講演要旨集，358-359 (2005)
- 20) 加藤陽一他：ダイオキシン類の迅速な抽出・分離法の開発，神奈川県環境科学センター研究報告第26号，p52-59 (2003)