

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 330609

(P2001 - 330609A)

(43)公開日 平成13年11月30日(2001.11.30)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S 4 D 0 1 7
B 0 1 D 11/02		B 0 1 D 11/02	A 4 D 0 5 6
	15/08	15/08	
// G 0 1 N 33/577		G 0 1 N 33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 10数)

(21)出願番号 特願2000 - 150181(P2000 - 150181)

(22)出願日 平成12年5月22日(2000.5.22)

(71)出願人 390010205

富士薬品工業株式会社

富山県高岡市長慶寺530番地

(72)発明者 坂田 一登

富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業

株式会社内

(72)発明者 藤本 昇

富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業

株式会社内

(74)代理人 100097582

弁理士 水野 昭宣

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ダイオキシン測定方法

(57)【要約】

【課題】 排ガス、排水、焼却灰、土壌、生物、食品などのダイオキシン類の濃度を簡易・迅速に且つ低コストで大量に測定する手段の開発。

【解決手段】 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法に付し、次いで得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、得られた試料につき免疫学的測定法によりダイオキシン類を測定することで、ダイオキシン類の濃度を簡易・迅速に且つ低コストで大量に測定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法に付し、次いで得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、得られた試料につき免疫学的測定法によりダイオキシン類を測定することを特徴とするダイオキシンの測定方法。

【請求項2】 簡易クリーンアップ処理は、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びアルミナカラムクロマトグラフィーを用いることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、多層充填剤充填カラムを使用して行われるものであることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】 アルミナカラムクロマトグラフィーは、多層充填剤充填カラムを使用して行われるものであることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項5】 多層充填剤充填カラムが、充填剤層をサンドイッチする形式で且つ該充填剤層の移動を実質的に防止あるいは該カラムに実質的に固定する形式でフィルターが配置されているものであることを特徴とする請求項3又は4記載の方法。

【請求項6】 該フィルターが石英繊維フィルター及び/又はガラス繊維フィルターであることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項7】 多層充填剤充填カラムは、ディスプレイ式のものであることを特徴とする請求項3～6のいずれか一記載の方法。

【請求項8】 (A) 分析対象試料からダイオキシン類成分を抽出するための高速溶媒抽出装置、(B) 該抽出装置により得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理するための多層シリカゲルカラム及びアルミナカラム及び(C) 該簡易クリーンアップ処理された試料を免疫学的測定するための装置を備えることを特徴とするダイオキシン測定装置。

【請求項9】 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法で抽出し、得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、次に得られた試料を免疫学的測定法で測定することを特徴とするダイオキシンの測定システム。

【請求項10】 簡易クリーンアップ処理に、予めパックされている多層充填剤充填カラムを使用することを特徴とする請求項9記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、排煙、排ガス、排水、焼却灰、廃棄物、土壌、食品、動植物等の中のダイオキシン類及び/又はポリ塩化ビフェニル類 (PCB類) の濃度を簡易・迅速に測定することができ、さらに安価に且つその操作も簡便で、そして正確で且つ信頼できる定量をも可能にする分析測定法、そのための装置及

び該測定システムに関する。

【0002】

【従来の技術】ダイオキシン類は環境汚染物質としてその正確な分析測定、そして定量が大きな課題となっている。ダイオキシン類は農薬等に混入していた汚染物質であるだけでなく、ゴミの焼却にともなって排煙中に含まれたり、焼却灰など、さらには様々な廃棄物中に存在して水や大気や土壌を汚染していることが大きな問題となっている。ダイオキシン類は、環境ホルモンとして人体だけでなく、広く動植物に有害な作用を与え、自然環境をも破壊するものとして深刻な社会問題化した化合物である。したがって、ダイオキシン類の存在形態は様々であるが、微量に存在するだけでも毒性が強いなど大きな問題を生ずることから、正確で且つ信頼できるダイオキシン類の定量が必要とされている。ダイオキシン類と一般に言われているが、日本で規制の対象となっているダイオキシン類とは、ポリ塩化ジベンゾダイオキシン (PCDD) とポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) の一部の異性体である。PCDDでは異性体が75、PCDFでは135の異性体がある。また欧米では、209の異性体をもつポリ塩化ビフェニル (PCB)の一部の中でも毒性の強い12種類についてはコプラナPCB (Co-PCB)と呼んで、ダイオキシン類に含めている。普通、ダイオキシン類の濃度を表すには、最も毒性の強い2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) の毒性に換算した等価毒性濃度 (TEQ)で示される。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】ダイオキシン類及び/又はPCB類の測定・分析は、基本的には超微量の分離定量分析であるにもかかわらず、厳密な精度管理が要求される。また分析時間の短縮、自動化、コストダウンも重要な課題である。ダイオキシン類及び/又はPCB類の測定・分析には、主に試料(サンプル)から溶剤を用いてダイオキシン類及び/又はPCB類を抽出する第一工程、抽出液中に含まれる物質とダイオキシン類及び/又はPCB類を分離する第二工程、そして分離したダイオキシン類及び/又はPCB類を分析定量する第三工程からなる。この中で、試料の前処理としてのダイオキシン類及び/又はPCB類の抽出(第一工程)では、多量の溶媒等の試薬類を使用するだけでなく、抽出時間も固体試料で一般的なソックスレー抽出の場合、16時間以上をも要する。普通この16時間以上を要する抽出は、2日に分けて行われ、溶媒を除去する処理と併せると大変な長時間を要することになる。ダイオキシン類は、上記したようにその試料の形態は様々であるにもかかわらず、超微量の分離分析操作であることから、器壁への付着を避ける工夫や、廃液や抽出処理に使用した溶媒からも幾度となく回収処理をしなければならないというように大変煩雑な操作を必要とする。さらに、排ガス、排水、土壌、焼却灰などの中のダイオキシン類を分析し

て、その濃度を示そうとすれば、問題となるダイオキシン類の異性体のそれぞれを測定して積算しなければならない。第三工程では、普通ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を使用するが、ダイオキシン類を異性体ごとに分析するために、そのGC-MS は高分解能のものを使用してしかその測定ができない。ダイオキシン類を分析することのできる高分解能GC-MS は非常に高価で、日本国内では約100 台程度普及しているだけであるのが現状である。また、そのGC-MS を使用しての測定も特定の技能をもつ者によらなければ解析して結果を出せないという 10 問題もある。

【0004】

【課題を解決するための手段】様々な試料を対象として、それらの中に含まれる可能性のあるダイオキシン類及び/又はPCB類の極めて微量を、迅速且つ低コストで、信頼性のある結果を与える方法につき鋭意研究を進めた結果、試料(サンプル)から溶剤を用いてダイオキシン類及び/又はPCB類を抽出し(第一工程)、抽出液中に含まれる物質とダイオキシン類及び/又はPCB類を分離し(第二工程)、分離したダイオキシン類及び/又はPCB類を分析定量する(第三工程)からなるダイオキシン類及び/又はPCB類の測定法において、第一工程として高速溶媒抽出法、第二工程として簡易クリーンアップ処理、そして第三工程として免疫学的測定法を採用することにより、優れた利点が見出されて、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、

〔1〕 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法に付し、次いで得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、得られた試料につき免疫学的測定法によりダイオキシン類を測定することを特徴とするダイオキシンの測定方法；

〔2〕 簡易クリーンアップ処理は、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びアルミナカラムクロマトグラフィーを用いることを特徴とする上記〔1〕記載の方法；

〔3〕 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、多層充填剤充填カラムを使用して行われるものであることを特徴とする上記〔2〕記載の方法；

〔4〕 アルミナカラムクロマトグラフィーは、多層充填剤充填カラムを使用して行われるものであることを特徴とする上記〔2〕記載の方法；

〔5〕 多層充填剤充填カラムが、充填剤層をサンドイッチする形式で且つ該充填剤層の移動を実質的に防止あるいは該カラムに実質的に固定する形式でフィルターが配置されているものであることを特徴とする上記〔3〕又は〔4〕記載の方法；

【0006】〔6〕 該フィルターが石英繊維フィルター及び/又はガラス繊維フィルターであることを特徴とする上記〔5〕記載の方法；

〔7〕 多層充填剤充填カラムは、ディスパーザブル式のものであることを特徴とする上記〔3〕～〔6〕のいずれか一記載の方法；

〔8〕 (A) 分析対象試料からダイオキシン類成分を抽出するための高速溶媒抽出装置、(B) 該抽出装置により得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理するための多層シリカゲルカラム及びアルミナカラム及び(C) 該簡易クリーンアップ処理された試料を免疫学的測定するための装置を備えることを特徴とするダイオキシン測定装置；

〔9〕 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法で抽出し、得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、次に得られた試料を免疫学的測定法で測定することを特徴とするダイオキシンの測定システム；及び〔10〕 簡易クリーンアップ処理に、予めバックされている多層充填剤充填カラムを使用することを特徴とする上記〔9〕記載のシステムを提供するものである。

【0007】本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び/又は改変(あるいは修飾)をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

【0008】

【発明の実施の形態】本明細書中、「高速溶媒抽出法」とは、一般的に高速溶媒抽出 (Accelerated Solvent Extraction; ASE) と呼ばれる方法により、セルに充填した試料から、有機溶媒をその沸点以上の高温(例えば、50～200) / 高压(例えば、1500～2000 psi = おおよそ 105～141 kgf/cm²、但し 1 psi = おおよそ 0.070307 kgf/cm²) の条件下にて迅速に抽出する方法である。該ASE 技術については、米国特許明細書第 5,843,311号 (USP No.5,843,311)、国際公開第95/34360号明細書(W 095/34360)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる(それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる)。さらにASEに適した装置は、米国特許明細書第 5,785,856号 (USP No.5,785,856)、米国特許明細書第 5,647,976号 (USP No.5,647,976) に開示がある(これらの文献などに記載の装置やその使用方法あるいはそこで引用された文献記載の装置や方法あるいはそれらと実質的に同様な装置や方法(改変された装置や方法を含む)

は当業者であれば適宜選択使用することもできる（該文献の中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

【0009】本発明にしたがい、Co-PCBを含めたダイオキシン類を試料からASE法で抽出するには、以下のような条件で行うことが好ましい。まず、抽出温度は、使用する抽出有機溶媒にもよるが、通常、使用溶媒の沸点以上の高温、例えば、80~250 で、より好ましくは100~200 であってよい。代表的な例では、トルエン又は5%酢酸含有トルエンを抽出溶媒として使用した場合では、150~200 で好ましく抽出操作でき、アセトン
10 を抽出溶媒として使用した場合は、150 で好ましく抽出操作できる。所望成分の分解を避ける必要がある場合は、適宜低い温度を選択する。抽出時の圧力としては、使用する抽出有機溶媒にもよるが、通常、80~250 kgf/cm² で、例えば、100~200 kgf/cm² が好ましく使用でき、代表的な抽出圧力としては、130~150 kgf/cm² が好ましい。抽出溶媒としては、例えば、Co-PCBを含めたダイオキシン類は脂溶性であるので、有機溶媒を使用するのが好ましい。代表的な抽出溶媒としては、例え
20 ば、トルエン、ベンゼン、アセトン、あるいは酢酸などの混和性を持つ有機溶媒をそれらに混合した溶媒が挙げられるが、これらに限定されることなく、本発明において有利な性状のものを適宜選択して使用できる。また、抽出溶媒は、後の免疫学的測定法によるダイオキシン類の測定には、水性媒体中で試料を扱えるようにすることも必要であり、これに適した溶媒に転換する処理が必要とされるので、これに適した溶媒を選択する。一つの試料に対する抽出処理は、繰り返し行うことも可能であり、例えば1又は複数のサイクルを適用できる。好適に
30 は、2又は3サイクルの抽出処理を施すが、適宜そのサイクル数は増減できる。

【0010】ASE法は、個々の試料に応じてその最適な抽出条件、例えば、溶媒の種類、抽出温度、抽出時間、抽出圧力、抽出サイクルなどを、予め実験などを行って決定しておくことができる。ASEを実行する装置は、CPU及びメモリーを搭載したコンピューターを備えたものであってよく、そうした装置は予め決められたプログラムに従い、最適な抽出を行うことができるように設定できる。また該装置は、その操作を自動化できると共に、
40 個々の試料毎に抽出条件を変えることも可能であり、例えば24時間のフル操業を可能にする。こうした装置を使用することにより、時間の短縮、大量処理、操作の簡素化、低コスト化、省力化を大幅に図ることが可能となる。高速溶媒抽出装置は、ダイオネクス社（Dionex Corporation, CA, USA）から入手することができ、所要の処理を自動化並びにプログラム制御したものが好ましく使用できるが、本発明にしたがい有利な利点が得られるならば特に限定されることはない。土壌や生物体由来試料などで水分が存在する場合には、水分除去をしておいた
50

り、水溶性溶媒で処理した後抽出するとかの工夫を加えることも任意に採用できる。また、抽出溶媒を選択して任意に特定の成分を選択的に抽出してもよい。また試料の内部からもダイオキシン類などを抽出する必要がある場合には、事前に塩酸などで処理することも可能である。

【0011】ダイオキシン類及び/又はPCB類の測定・分析は、基本的には超微量の分離定量分析で、厳密な精度管理が要求される一方、分析時間の短縮、自動化、コストダウンも重要な課題である。この中で、試料の前処理としてのダイオキシン類及び/又はPCB類の抽出では、多量の溶媒等の試薬類を使用するだけでなく、抽出時間も固体試料で一般的なソックスレー抽出の場合、16時間以上を要するものである。普通この16時間以上を要する抽出は、2日に分けて行われる。これに対し、上記高速溶媒抽出法によれば、例えば30分~2時間程度、もしもっと長時間を要したとしてもせいぜい4時間程度までで完了させることができる。つまり、本発明で抽出に2時間程度要したとしても、抽出時間は約1/8程度に大幅に短縮することができる。

【0012】一般に環境試料には多種多様の有機化合物などの有機物質が存在する上、ダイオキシン類及び/又はPCB類の存在量はppb~ppqのオーダーという極微量であるため、確実な測定を行うためには、ダイオキシン類及び/又はPCB類の損失を極力抑えながら、できる限りダイオキシン類などの分析に妨害あるいは影響を与える化合物などを除去する必要がある。このためにもクリーンアップ操作は非常に重要である。被検試料中には数多くの有機物が存在しており、ダイオキシン類などの分析を妨害する化合物も少なくない。特に芳香族成分の存在量は、ダイオキシン類と比較して圧倒的に高濃度であり、分析への影響は大きい。そこで、そうした妨害成分などを除く目的で硫酸による処理を加えていたが、それに代わるものとして、その作業効率を上げ、さらに作業の安全性などを配慮したものとして、また、焼却灰や一部の汚泥その他には単体の硫黄などが含まれている場合があり、この硫黄を除去しないまま分析を行うと、所定のダイオキシン成分の分析を大きく妨害することからこれを排除するため、硝酸銀による処理も同時に可能なものとして、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる処理がなされる。該多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーでは、普通、試料液に含まれる強極性物質の除去を目的としたシリカゲルカラム処理が同時に
なされる工夫もなされている。

【0013】該多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー処理された試料は、次にアルミナカラムクロマトグラフィー処理される。こうした抽出液中に共存する妨害物質を除去するの目的には、例えば「続・ダイオキシン類測定マニュアル（資源環境対策 別冊 第34巻第13号）」に記載のシリカゲルカラム、多層シリカゲルカラム

ム又はアルミナカラム等を組み合わせて共存する妨害物質を充填剤に吸着させて除去する方法、「PCB 処理技術ガイドブック（編集 財団法人 産業廃棄物処理事業振興財団、発行 ぎょうせい）」のシリカゲルカラム、多層シリカゲルカラム、アルミナカラム、フロジリルカラム、活性炭カラム等を組み合わせて用いて共存する妨害物質を充填剤に吸着させて除去する方法などが挙げられる。ところで、上記の方法では、カラム材質にガラスを使用し、充填剤の流出を防ぐためにカラム出口に石英ウールを使用したりしているが、石英繊維フィルターやガラス繊維フィルターは使用されておらず、かつ充填剤の境界部分又は最上部に充填剤の移動や混合を防止するための石英ウールやフィルターは使用されていない。また、流速を調節するためにカラム出口にコックを備えたカラムを使用し、流速を2.5 mL/分に調節している。しかしながら、こうした従来のダイオキシン類やPCB 類等をクリーンアップするためのカラムは、充填剤の移動防止のための措置が講じられていないため、充填後にカラムを横向きにしたり転倒すると充填剤が漏れたり、混合したりする。この充填剤の移動防止のための措置が講じられていないのは、フィルターや石英ウールをカラムに固着するために接着剤やプラスチック押さえ等を用いるとダイオキシン類やPCB 類がそれに吸着し、正確な測定ができなくなるためである。このため、通常カラムは使用前に充填剤を充填し、充填した場所から別の場所へ移動することができないため、サンプル採取場所等のカラム充填ができない場所での使用ができない。

【0014】本発明に従った好ましい態様では、充填剤層をサンドイッチする形式で且つ該充填剤層の移動を実質的に防止あるいは該カラムに実質的に固定する形式でフィルターが配置されているカラムを使用する。つまり、カラムの外壁とフィルター淵との摩擦力によりフィルターをカラムに固定することにより充填剤をカラム内に保持することにより、充填剤の充填後でも移動可能なカラムが製造でき、かつ、挿入するフィルターの枚数を調節することにより流速が調節できる。該カラムは、2種以上の充填剤を層状に充填したオープンカラムにおいて、カラムの出口及び充填剤の境界部分及び/又は最上部にカラムの断面と同じ形状でかつカラム壁とのフィルター淵との摩擦力によりカラム内に固定できるフィルターを入れて充填剤の移動を防止することを特徴とする多層充填剤充填カラムである。該カラムは、オープンカラムを使用するが、オープンカラムの外筒の素材としては、ガラス、石英、ステンレス、フッ素樹脂を用いることができる。このうち好ましいものは、ダイオキシン類やPCB 類などの吸着がほとんどないガラスである。オープンカラムの断面形状としては、円形、楕円形、四角形、三角形など用途に応じて任意のものを用いることができる。このうち好ましいものは、加工し易い円形である。これらオープンカラムは、出口の径を細くすること

によりカラムを通過した溶液を採取し易くすることができる。オープンカラムの太さと長さは、充填する充填剤の量に応じて任意に設定することができる。充填剤の量が同じ場合、カラムの太さが太くなるほど通過する液体の圧力損失が小さくなり流速が早くなり、逆に細くすると圧力損失が大きくなり流速が遅くなる。また、充填剤の粒子径や密度によっても圧力損失が変化するため、カラムの太さは、最も適する流速となるように設定することができる。通常のクリーンアップカラムの充填剤の量では、内径5 mmから30 mmの円形断面のカラムで、長さが5 cmから30 cmのカラムを用いることができる。

【0015】充填剤としては、ダイオキシン類やPCB 類等の難分解性化合物を測定するために、サンプル中から抽出して得た抽出液中に共存する妨害物質を取り除くためクリーンアップ用充填剤を用いることができる。例えば、ダイオキシン類やPCB 類測定のための多層カラムとしては、「続・ダイオキシン類測定マニュアル（資源環境対策 別冊 第34巻第13号）」又は「PCB 処理技術ガイドブック（編集 財団法人 産業廃棄物処理事業振興財団、発行 ぎょうせい）」に記載されているように、カラム出口側からシリカゲル、2%水酸化カリウム被覆シリカゲル、シリカゲル、44%硫酸被覆シリカゲル、22%硫酸被覆シリカゲル、シリカゲル、10%硝酸銀被覆シリカゲル及び硫酸ナトリウムを積層した多層シリカゲルカラムやアルミナと硫酸ナトリウムを積層したアルミナカラム、活性炭埋蔵シリカゲルと硫酸ナトリウムを積層した活性炭カラム、シリカゲルと硫酸ナトリウムを積層したシリカゲルカラムなどがあげられる。

【0016】該多層充填剤充填カラムに使用するフィルターの材質としては、石英繊維フィルターとガラス繊維フィルターがあげられる。特に好ましくは、ダイオキシン類の吸着がなく、フィルターとカラム外筒との間に適度な摩擦力を生じさせる弾性を持ち、充填剤を通過させないポアサイズを持っており、厚さが0.1 mmから1.5 mm、好ましくは0.2 mmから1.0 mmの石英繊維フィルターである。ナイロン、ニトロセルロースなどのプラスチック製のフィルターは、ダイオキシン類やPCB 類などの測定対象物質を吸着するため好ましくない。

【0017】フィルターの形状としては、カラムの断面の形状と同じ形状であり、フィルターとカラム外筒との間の摩擦力を強くして密着させるため、カラムの断面よりわずかに大きいものが好ましい。例えば、断面が内径9.5 mmの円形カラムでは内径10 mmの円形フィルターが好ましく、断面が内径15 mmの円形カラムでは内径16 mmの円形フィルターが好ましい。フィルターはカラムの出口と充填剤の最上部に挿入することが必須であり、必要に応じて異なる充填剤の間に挿入することができる。充填剤の間にフィルターを入れることにより、充填剤の混合を防止でき、充填剤の接触による変性を防止することができる。フィルターの挿入枚数は、カラムを通

過する液体の流速を調節するために増減することができる。カラムの太さが太く、充填剤の量が少ないほど圧力損失が小さくなるため流速が早くなる。この場合、フィルターの枚数を増加させる。逆に、カラムの太さが細く、充填剤の量が多いほど圧力損失が大きくなるため流速が遅くなる。この場合、フィルターの枚数を減少させる。流速を調整するためのフィルターは、カラムの出口、充填剤の最上部又は充填剤の間に挿入することができる。好ましくは、挿入が簡単な充填剤最上部である。

【0018】該カラムは、製造後、密閉した容器又は袋の中にシリカゲルなどの吸湿剤や脱酸素剤と共に入れ、保存性を高めることができる。本発明に従った好ましい態様における多層シリカゲルカラムの例につき、その断面を図1に示した。また、本発明に従った好ましい態様におけるアルミナカラムの例につき、その断面を図2に示した。該本発明の好ましい態様における多層充填剤充填カラムによれば、あらかじめ多層充填剤充填カラムを大量に作製して用意しておくことができるため、クリーンアップなどの処理用のカラムの作製時間を省くことができ、全工程を通して測定に必要とされる時間を大幅に削減できる。また、カラムを移動させても充填層の乱れや漏れがないため、カラムの作製ができない場所へ移動させて使用することができる。更に、カラムへ挿入するフィルターの枚数を調節することによりカラムに通液する液体の流速が調節でき、従来のカラムにおけるようなカラム出口にコックなどの流速を調節するための装備が不要となり、安価にカラムを作製することができる。また、サンプル液などをカラムに流す場合、フィルターが存在しているので最初の充填剤層をかき乱すなどという恐れも少なく、さらに流速も調節できることから、よりスムーズで良好なクリーンアップ処理を期待することもできる。上記フィルターを配置してカラム内に充填剤層を保持しておくあるいは充填剤層の移動を実質的に防止することにより、予め充填剤を層状に詰めておくことが可能となったので、該充填剤をカラムに順次積層していく工程を自動化でき、均一で且つ所定の性能・品質を有するカラム（従来は、分析測定場で用時調製であったので、充填剤を多層に充填する者の技能に依存するという側面もあったし、また注意深く各充填剤を積層していく必要もあるので時間と手間がかかっていた）を、大量に且つ安価に、そして省力化を図りながら製造しておくことができる。したがって、大量のサンプルにも対応でき、低コストで分析測定を行うことが可能となるし、得られるデータの信頼性も高めることが可能である。使用済みの充填剤は、ダイオキシン類で汚染されている可能性があることから、従来その再使用や廃棄については問題を抱えていたが、本発明にしたがいディスポーザブル式多層充填剤充填カラムを使用するというシステムを採用することにより、可能な限り実験室などの汚染を避けながら分析測定を実施でき、また使用済みカラムはその

内容物をそれぞれの実験室などで取り出すことなく、例えば集中廃棄物処理場などに集めた後、まとめて再生あるいは廃棄処理することが可能となるので、安全性の面でも有利である。

【0019】本明細書中、「免疫学的測定法」とは、抗原抗体反応を利用した測定原理に基づいて分析対象（アナライト）の検知、定性及び定量を含めた測定、検出などを行う技術を指している。Co-PCBを含めたダイオキシン類を免疫学的に測定する技術は、例えば、Kennel et al., Chemosphere, 15(9-12): pp.2007-2010 (1986); Kennel et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 82: pp.256-263 (1986); 米国特許明細書第 4,798,807号 (USP No.4,798,807);特開昭63-14691号;米国特許明細書第 5,429,925号 (USP No.5,429,925);米国特許明細書第 5,464,746号 (USP No.5,464,746);米国特許明細書第 5,538,852号 (USP No.5,538,852);Watkins et al., Chemosphere, 19(1-6): pp.267-270 (1989); Stanker et al., Chemosphere, 16(8/9): pp.1635-1639 (1987); Stanker et al., Toxicology,45: pp.229-243 (1987); Kennel et al., Chemosphere, 15(9-12): pp.2007-2010 (1986); 米国特許明細書第 5,674,697号 (USP No.5,674,697) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法が挙げられる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。特に上記文献に記載のモノクローナル抗体や、該文献に記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により得られるモノクローナル抗体は、好適にそれを使用することができる。特に好ましくは、2,3,7,8-TCDDに対して高い特異性を持つモノクローナル抗体を使用したものが挙げられる。

【0020】免疫学的測定法では、好適には標識が使用されるが、本発明では、時間分解蛍光測光法（time resolved fluorescent spectroscopy）の原理に従った標識が好適に利用されることができる。時間分解蛍光測光法の原理に従った測定法は、例えば、米国特許明細書第 4,058,732号 (USP No.4,058,732);特公昭62-18868号公報; 米国特許明細書第 4,374,120号 (USP No.4,374,120);特開昭57-186170号公報; 特開昭58-8783号公報; 特開昭59-68673号公報; 特開昭61-87680号公報; 特開昭61-200988号公報; 特開昭64-47952号公報; 特表昭64-500458号公報; 特開平1-127957号公報; 米国特許明細書第 4,374,120号 (USP No.4,374,120) などに記載あるいはそこで引用された文献に記載され、それらが適用できる他、それらと実質的に同様な方法や改変法が挙げられる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。時間分解蛍光測光法では、希土類元素、より好ましくはランタニドが挙げられ、例えば Eu (III), Tb (III)などが形成するキレー

トの強い蛍光を利用することができる。

【0021】本発明に従った免疫学的測定の具体的な態様では、

第1反応：抗マウスIgG抗体を結合したプラスチックウェル(A)にダイオキシン含有試料(サンプル)(B)と抗ダイオキシンモノクローナル抗体(C)を入れて反応させる。すると、〔プラスチックウェル結合抗マウスIgG抗体-抗ダイオキシンモノクローナル抗体-ダイオキシン〕の免疫複合体が形成される。

第2反応：該免疫複合体にヨーロピウム(Eu)標識ダイオキシン(D)を反応させると、未反応の抗ダイオキシンモノクローナル抗体とEu標識ダイオキシンが反応し、〔プラスチックウェル結合抗マウスIgG抗体-抗ダイオキシンモノクローナル抗体-Eu標識ダイオキシン〕の免疫複合体が形成される。

第3反応：エンハンサー(E)を加え、免疫複合体中のEuの量を時間分解蛍光測定機で測定し、その得られた値を基に予め作成しておいた検量線から、サンプル中のダイオキシン量を読み取る。本免疫学的測定に適した試薬としては、例えば、ハイブリザイム社、米国から入手できるものが挙げられる。本発明にしたがえば、例えば2,3,7,8-TCDDなどその毒性などが特に問題とされているダイオキシン類及び/又はPCB類の評価のためのデータを迅速且つ簡単な手法で短時間に得ることができる。また、多数のサンプルの分析測定処理にも対応できるという利点がある。免疫学的測定法では、その測定自体に高価な測定機器を必要とされることもなく、さらにそのデータの解析・評価に(特に、TEQを得るなど、その毒性などと関係したデータの取得に)、GC-MSのようには特別な技能が要求されるということもなく、殆ど誰でも扱えるといった汎用性が高いという利点も認められる。また、免疫学的測定装置としては、当業者に知られたものを本ダイオキシン測定に適合しうるようにしたものであってよい。そうした装置は、CPU及びメモリーを搭載したコンピューターを備えたものであってよく、そうした装置は予め決められたプログラムに従い、最適な測定を行うことができるように設定できる。また該装置は、その操作を自動化できると共に、個々の試料毎に測定条件を変えることも可能であり、所要の処理を自動化並びにプログラム制御したものが好ましく使用できるが、本発明にしたがえば有利な利点が見られるならば特に限定されることはない。本発明では試料(サンプル)から溶剤を用いてダイオキシン類及び/又はPCB類を抽出する第一工程、抽出液中に含まれる物質とダイオキシン類及び/又はPCB類を分離する第二工程、分離したダイオキシン類及び/又はPCB類を分析定量する第三工程を含む一連の工程からなるダイオキシン類及び/又はPCB類の測定法にあって、それぞれ利点のある各手段を採用し、それを一体としたシステムとして運用することにより、全体としても簡易迅速な測定を実現できるなどの格

別の利点が見られる。免疫学的測定法を利用しながら、従来法(公定法)と変わらないかあるいはそれに匹敵する結果(高い相関性のある結果)を得ることができる。

【0022】

【実施例】以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。

【0023】実施例1 ばいじん中のダイオキシンの測定と回収率の検討

1) ダイオキシン類の抽出

ばいじん(ばいじんA)2gをASE200(ダイオネクス社製)用11mLセルに入れる。ASE200の使用マニュアルに従い、抽出溶媒として5%酢酸含有トルエンを用いて150、2000psi、15分間2サイクルの抽出条件で抽出を行った。抽出により得られた24mLの抽出液を遠心型エバポレータを用いて乾燥させ5%酢酸含有トルエンを除去したのち、ヘキサン10mLに残留物を溶解し、抽出液Aを得た。この操作に、100分間が必要であった。また、ばいじんA2gに、5ng/mLの2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ダイオキシンを含むヘキサン溶液0.5mLを添加しヘキサンを蒸発させればいじんBを同様に抽出、エバポレート、ヘキサン溶解し、10mLの抽出液Bを得た。

【0024】2) 多層シリカゲルカラムの調製

出口に内径4mm、長さ1cmの円筒状ガラス管を備えた内径15mm、長さ10cmの円筒状ガラスカラムに、直径16mmの円形状に成形した厚さ0.45mmの石英繊維フィルター(ワットマン社製)をフィルターの淵がカラム外壁に接触するように入れた。このカラムにシリカゲル0.09g、2%水酸化カリウム被覆シリカゲル0.3g、シリカゲル0.09g、44%硫酸被覆シリカゲル0.45g、22%硫酸被覆シリカゲル0.60g、シリカゲル0.09g、10%硝酸銀被覆シリカゲル0.3g、硫酸ナトリウム0.6gを出口側から順番に積層し、直径16mmの円形状石英繊維フィルターを硫酸ナトリウムの上にかぶせた。本カラムは予め作製してデシケータ内に保存しておいた。

【0025】3) アルミナカラムの調製

出口に内径2mm、長さ1cmの円筒状ガラス管を備えた内径9.6mm、長さ15cmの円筒状ガラスカラムに、直径10.0mmの円形状に成形した厚さ0.45mmの石英繊維フィルター(ワットマン社製)をフィルターの淵がカラム外壁に接触するように入れた。このカラムにアルミナ(活

性度1)を2.5 g、硫酸ナトリウム1.0 gを出口側から順番に積層し、直径10 mmの円形状石英繊維フィルターを硫酸ナトリウムの上にかぶせた。本カラムは予め作製してデシケータ内に保存しておいた。

【0026】4) サンプルのクリーンアップ

多層シリカゲルカラムにヘキサン 20 mLを流し、カラムを洗浄した。次いで、抽出液Aをチャージし、溶出液を採取する。次いで、ヘキサン50 mLを用いて洗浄し、溶出液を採取して先程の溶出液と混合した。この操作に90分間が必要であった。次にアルミナカラムをヘキサン10 mLを流し、カラムを洗浄した。次に、得られた溶出液を全量チャージし、次いでヘキサン10 mL、2%ジクロロメタン含有ヘキサン20 mLで洗浄する。次いで、50%ジクロロメタン含有ヘキサン20 mLでカラムを洗浄し、溶出液を採取した。この溶出液を遠心型エバポレータを用いて乾燥させ50%ジクロロメタン含有ヘキサンを除去したのち、メタノール 0.2 mLに残留物を溶解し、測定*

*用検体Aを得た。この操作に120分間が必要であった。同様の操作を抽出液Bについても行い、測定用検体Bを得た。

【0027】5) 検体の免疫測定

時間分解蛍光免疫測定法の原理に基づくダイオキシン免疫測定キット(ハイブリザイム社製)を用い、0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mLの各濃度の2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ダイオキシン標準液及び測定検体A、測定検体Bを測定し、標準から作成した検量線を用いて、測定検体A及び測定検体Bの濃度を読みとった。得られた濃度からばいじん中のダイオキシン量及び回収率を計算し、表1に示した。本法では、86%と高い回収率が得られた。この操作に40分間が必要であり、ダイオキシンの測定のためにトータル350分が必要であった。

【0028】

【表1】

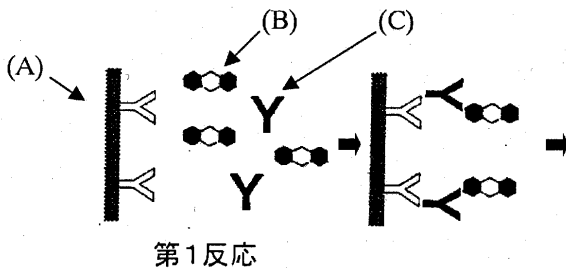
項目	
ばいじんA (2g中) ダイオキシン量	1.20 ng
ばいじんB (2g中) ダイオキシン量	3.34 ng
2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾ-パラ-ダイオキシン添加量	2.50 ng
回収率	86%

【0029】上記ダイオキシン免疫測定キットの測定原理は次のようなものである:

第1反応: 抗マウスIgG抗体を結合したプラスチックウェル(A)にダイオキシン含有サンプル(B)と抗ダイオキシンモノクローナル抗体(C)を入れ反応させると〔プラスチックウェル結合抗マウスIgG抗体-抗ダイオキシンモノクローナル抗体-ダイオキシン〕の免疫複合30体が形成される。

【0030】

【化1】

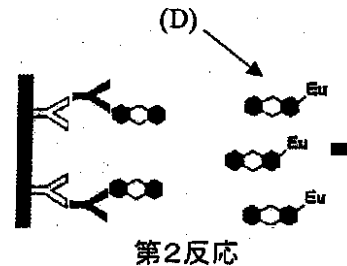


【0031】第2反応: 該生成複合体にヨーロッパウム(Eu)標識ダイオキシン(D)を反応させると、未反応の抗

ダイオキシンモノクローナル抗体とEu標識ダイオキシンが反応し、〔プラスチックウェル結合抗マウスIgG抗体-抗ダイオキシンモノクローナル抗体-Eu標識ダイオキシン〕の免疫複合体が生成する。

【0032】

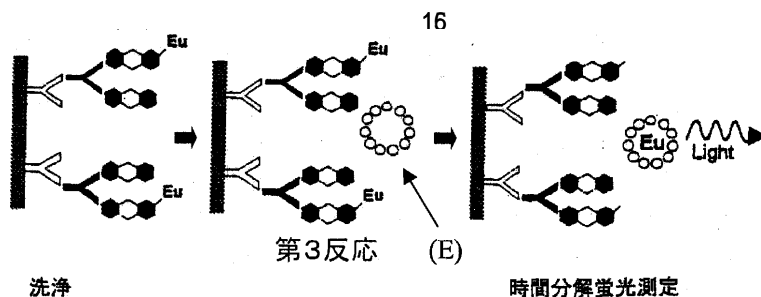
【化2】



【0033】第3反応: エンハンサー(E)を加え、免疫複合体中のEuの量を時間分解蛍光測定器で測定する。あらかじめ作成した検量線から、サンプル中のダイオキシン類量を読みとる。

【0034】

【化3】



以上の結果を基に検討したところ、測定対象試料を採取して後、含有ダイオキシン類及び/又はPCB類の測定を依頼され、その測定を行って結果報告までに要する時間は、従来法（公定法）では約1カ月半程度を要するのに対し、本発明の測定システムでは、約1週間程度と大幅に期間短縮を図ることができると評価された。

【0035】実施例2 相関性

本発明の方法でダイオキシン類濃度を測定した結果と、「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」（平成4年7月厚生省告示第192号改正：平12厚生告6号）別表第1に準じた方法で測定した結果を比較した。

1) 従来の測定方法での測定

「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」別表第1に準じた方法で3検体のばいじんの測定を行った。ダイオキシン類の濃度は、各ダイオキシン類の毒性係数を乗じて算出したTEQで表した。

2) 本発明法での測定

実施例1と同様の方法で、3検体のばいじん（ばいじんC：0.99g、ばいじんD：2.0g、ばいじんE：3.83g）に含まれているダイオキシン類量の測定を行った。ASE200の抽出に用いるセルは、検体の量に応じて、11mLまたは22mLのセルに変えて用いた。結果を表2に、相関性を図3に示した。この結果、相関係数0.99と高い相関性が得られた。

【0036】

【表2】

サンプル名	従来の方法	本発明の方法
	(ng-TEQ/g)	(ng/g)
ばいじんC	25	5.25
ばいじんD	2.55	0.60
ばいじんE	0.96	0.22

本発明の免疫学的測定法によれば、簡単な操作で、対象とする問題の多いダイオキシンを迅速に多数の検体につき測定できる。

【0037】

【発明の効果】本発明により、様々な試料を対象にして、簡単且つ短時間にダイオキシン類及び/又はPCB類の迅速測定が可能となる。また迅速測定が可能であることから、大量の検体を従来に比し非常に短時間に扱うことが可能であり、また省力化にも大きく貢献するが、一方で毒性などに問題の大きいダイオキシン類についての測定結果を信頼性をもって得ることができる。特に、免疫学的測定により測定対象ダイオキシン類に対して特異的な測定が可能であることから、簡易クリーンアップ処理と組み合わせても、その得られる値が十分に満足できるものが得られ、さらにその測定操作においても測定実施者の熟練度をそれ程問題にすることなしに、満足のいく結果を得ることができる。本発明により、ダイオキシン類及び/又はPCB類の測定が低コストで行うことができる。本発明では、簡易クリーンアップ処理を予め

パックしておいた多層充填剤充填カラムを使用することにより、汚染されている充填剤を測定実施者が測定のために洗浄してカラムにパックするといった煩雑で且つ注意を要する操作を省くことができ、また廃棄された使用済みカラムもまとめて再生及び/又は廃棄処理に付すことができるので、低コスト化並びに安全性の面でもその貢献するところが大きい。またクロマトグラフィー処理の効果についても、そのバラツキを排除して安定したクリーンアップ効果を期待できることとなる。本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

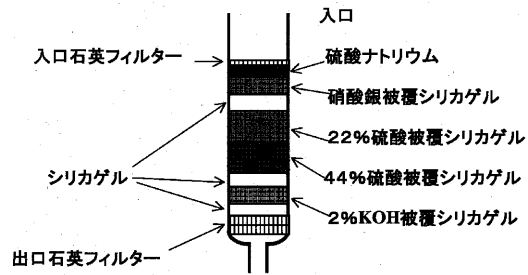
【図面の簡単な説明】

【図1】多層シリカゲルカラムの部分断面正面図である。

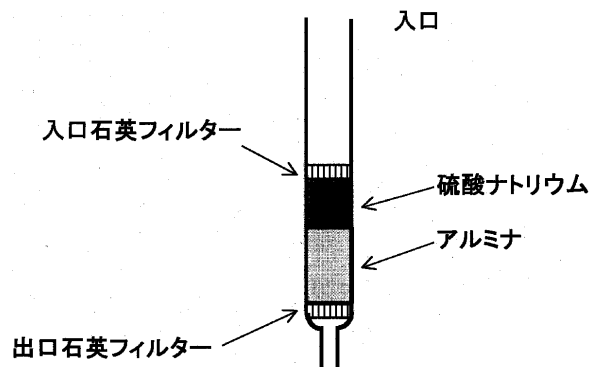
【図2】アルミナカラムの部分断面正面図である。

【図3】従来の方法と本発明の方法とのダイオキシン測定における相関関係を示す。

【図1】

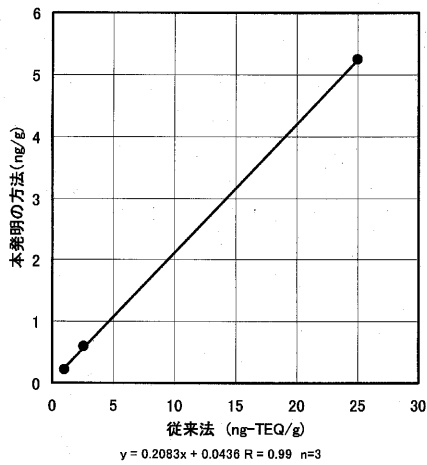


【図2】



【図3】

相関性



フロントページの続き

(72)発明者 多田 雅人
 富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(72)発明者 岡本 巧誠
 富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内
 Fターム(参考) 4D017 AA03 BA03 CA05 CB01 DA03
 EA01
 4D056 AB18 AC03 AC08 AC09 BA16
 CA05 CA21 CA22 CA31

专利名称(译)	二恶英测量方法		
公开(公告)号	JP2001330609A	公开(公告)日	2001-11-30
申请号	JP2000150181	申请日	2000-05-22
申请(专利权)人(译)	Fujiyaku Hinkogyo 有限公司		
[标]发明人	坂田一登 藤本昇 多田雅人 岡本巧誠		
发明人	坂田一登 藤本昇 多田雅人 岡本巧誠		
IPC分类号	G01N33/53 B01D11/02 B01D15/08 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.S B01D11/02.A B01D15/08 G01N33/577.B B01D15/12 B01D15/22		
F-TERM分类号	4D017/AA03 4D017/BA03 4D017/CA05 4D017/CB01 4D017/DA03 4D017/EA01 4D056/AB18 4D056/AC03 4D056/AC08 4D056/AC09 4D056/BA16 4D056/CA05 4D056/CA21 4D056/CA22 4D056/CA31		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：开发一种简单，快速且低成本的方法来测量二恶英的浓度，例如废气，废水，焚烧的灰烬，土壤，生物，食品等。将二恶英成分从待分析的样品中进行高速溶剂萃取，然后对获得的萃取物进行简单的净化处理，然后通过免疫测定法对获得的样品中的二恶英进行测定。因此，可以以低成本容易，快速且大量地测量二恶英的浓度。

2 mlに残留物を溶解し、測定* 【表1】

項目	
ばいじんA (2g中) ダイオキシン量	1.20 ng
ばいじんB (2g中) ダイオキシン量	3.34 ng
2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾ-パラ-ダイオキシン添加量	2.50 ng
回収率	86%