

試験標準作業書

多環芳香族炭化水素類(PAH)(ガスクロマトグラフ質量分析法)

(フィルター)

1. 概要

本試験法はフィルターに捕集した PAH をジクロロメタンで抽出したのち、シリカゲルカラムで精製し、ガスクロマトグラフ質量分析計で測定する方法である。

・試験サンプルの種類: ガラスフィルター

・試験項目 : 多環芳香族炭化水素類(PAH)

benz[<i>a</i>]anthracene	(BaA)
benzo[<i>b</i>]fluoranthene	(BbFA)
benzo[<i>j</i>]fluoranthene	(BjFA)
benzo[<i>k</i>]fluoranthene	(BkFA)
benzo[<i>a</i>]pyrene	(BaP)
chrysene	(CHR)
dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	(DBahA)
dibenzo[<i>a,e</i>]pyrene	(DBaeP)
dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene	(DBahP)
dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene	(DBaiP)
dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene	(DBalP)
indeno[1,2,3- <i>c,d</i>]pyrene	(IP)
5-methylchrysene	(MCH)

・試験法の種類 : ガスクロマトグラフ質量分析法

・参考文献 : ・食品衛生検査指針 理化学編 2015 , P709-716
 ・有害大気汚染物質測定方法マニュアル, 第 1 編, 第 3 部, 第 1~3 章,
 環境省 水・大気環境局 大気環境課, 平成 31 年 3 月
 ・Fast Separation of EU and US EPA Regulated PAHs on Agilent J&W
 Select PAH GC Columns , Application Note, Agilent Technologies,
 Inc.

2. 試薬及び機器

2.1 試薬

- 1) ジクロロメタン:残留農薬試験用
- 2) 無水硫酸ナトリウム:残留農薬試験用
- 3) 窒素ガス
- 4) ヘキサン:残留農薬試験用
- 5) シリカゲルミニカラム:
固相カートリッジカラム(Waters 社: Sep-Pak Silica Plus Long Cartridge, 690 mg Sorbent per Cartridge, 55-105 μ m Particle Size)
- 6) トルエン:残留農薬試験用

2.2 標準品

2.2.1 標準物質

- 1) benz[*a*]anthracene :AccuStandard
- 2) chrysene :和光純薬工業
- 3) benzo[*b*]fluoranthene:AccuStandard
- 4) benzo[*j*]fluoranthene:AccuStandard
- 5) benzo[*k*]fluoranthene:AccuStandard
- 6) benzo[*a*]pyrene :和光純薬工業
- 7) indeno[1,2,3-*cd*]pyrene :和光純薬工業
- 8) dibenz[*a,h*]anthracene :和光純薬工業
- 9) dibenzo[*a,h*]pyrene :AccuStandard
- 10) dibenzo[*a,i*]pyrene :AccuStandard
- 11) dibenzo[*a,l*]pyrene :AccuStandard
- 12) benzo[*a*]pyrene - d_{12} :和光純薬工業

2.2.2 標準溶液

- 1) 5-methylchrysene (50 μ g/mL):AccuStandard
- 2) dibenzo[*a,e*]pyrene(50 μ g/mL) :AccuStandard

2.3 標準溶液の調製

- 1) 各標準物質から標準溶液の調製

対象物質:

benz[*a*]anthracene, chrysene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*j*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, dibenz[*a,h*]anthracene, dibenzo[*a,h*]pyrene, dibenzo[*a,i*]pyrene, dibenzo[*a,l*]pyrene,

各標準物質 10 mg を 20 mL メスフラスコに正確に量り、トルエンで定容する(500 μ g/mL)。そこから 2 mL をホールピペットで 20 mL メスフラスコに量り取り、トルエンで定容する(50 μ g/mL)。調製した各標準原液は、遮光、冷凍で保存する。

	採取元濃度	採取量	定容量	調製濃度
各標準原液 1	–	10 mg	20 mL	500 μ g/mL
各標準原液 2	500 μ g/mL (標準原液 1)	2 mL	20 mL	50 μ g/mL

2) 内部標準溶液の調製

対象物質: benzo[a]pyrene- d_{12}

benzo[a]pyrene- d_{12} 10 mg を 20 mL メスフラスコに正確に量り、トルエンで定容する (500 μ g/mL)。これを内部標準原液とする。以下同様に、下記の表に従って内部標準溶液を調製した。

調製した内部標準原液、溶液は、遮光、冷凍で保存する。

調製溶液名	採取元濃度	採取量	定容量	調製濃度
内部標準原液	–	10 mg	20 mL	500 μ g/mL
内部標準溶液 1	500 μ g/mL (内部標準原液)	2 mL	20 mL	50 μ g/mL
内部標準溶液 2	50 μ g/mL (内部標準溶液 1)	1 mL	20 mL	2.5 μ g/mL
内部標準溶液 3	2.5 μ g/mL (内部標準溶液 2)	2 mL	20 mL	0.25 μ g/mL
内部標準溶液 4 (添加用)	2.5 μ g/mL (内部標準溶液 2)	4 mL	20 mL	500 ng/mL

3) 検量線用混合標準溶液:

各標準原液 2、標準溶液 dibenzo[a,e]pyrene (50 μ g/mL) 及び dibenzo[a,e]pyrene (50 μ g/mL) をそれぞれ 1 mL ホールピペットで 20 mL メスフラスコに量り取り、トルエンで定容する。これを混合標準原液 1 とする。以下、下記の表の採取溶液、採取量、定容量に従い、混合標準原液 2、3 及び混合標準溶液 1～7 を調製する。混合標準原液 2 以降の定容する溶媒はヘキサンで行う。調製した各混合標準原液、溶液は、遮光、冷凍で保存する。

調製溶液名	採取元濃度	採取量	定容量	調製濃度
混合標準原液 1	各標準原液 2	1 mL	20 mL	2.5 μ g/mL
	5-methylchrysene	1 mL		
	dibenzo[a,e]pyrene	1 mL		
混合標準原液 2	混合標準原液 1	2 mL	20 mL	0.25 μ g/mL
混合標準原液 3	混合標準原液 2	2 mL	20 mL	25 ng/mL
・検量線用混合標準溶液				
混合標準溶液 1	混合標準原液 1	1 mL	25 mL	100 ng/mL (IS: 50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	5 mL		
混合標準溶液 2	混合標準原液 2	6 mL	20 mL	75 ng/mL (IS: 50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	4 mL		
混合標準溶液 3	混合標準原液 2	5 mL	25 mL	50 ng/mL (IS: 50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	5 mL		
混合標準溶液 4	混合標準原液 2	2.5 mL	25 mL	25 ng/mL

	内部標準溶液 3	5 mL		(IS:50 ng/mL)
混合標準溶液 5	混合標準原液 2	2.5 mL	50 mL	12.5 ng/mL
	内部標準溶液 2	1 mL		(IS:50 ng/mL)
混合標準溶液 6	混合標準原液 3	5 mL	25 mL	5 ng/mL
	内部標準溶液 3	5 mL		(IS:50 ng/mL)
混合標準溶液 7	混合標準原液 3	2.5 mL	25 mL	2.5 ng/mL
	内部標準溶液 3	5 mL		(IS:50 ng/mL)

*IS: benzo[a]pyrene- d_{12} の濃度

2.4 機器及び器具

2.4.1 機器

- 1) ガスクロマトグラフ質量分析計 : 6890N(アジレント・テクノロジー株式会社)
- 2) 天秤 : 最小表示 0.0001 g AUX220(株式会社島津製作所)、AEG220(株式会社島津製作所)
- 3) ロータリーエバポレーター : Rotavapor R-210(日本ビュッヒ株式会社)
- 4) 窒素吹き付け装置 : リアクティーバップ(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)
- 5) 超音波洗浄器 : US-105(株式会社エスエヌディ)
- 8) 吸引マニホールド

2.4.2 器具

- 1) ナスフラスコ(100 mL)
- 2) ホールピペット(1 mL、2 mL、2.5 mL、3 mL、4 mL、5 mL)
- 3) 駒込ピペット(5 mL、10 mL)
- 4) メスフラスコ(20 mL、25 mL、50 mL)
- 5) ロート
- 6) 濃縮管
- 7) パスツールピペット
- 8) ガラスバイアル
- 9) マイクロシリンジ(50 μ L、100 μ L)

3. 試験方法

3.1 試験操作

フィルターを半分に取り取り、試験サンプルと保管用に分ける。試験サンプルを細切し、50 mLの共栓付き遠心沈殿管に入れる。細切に使用した器具は、駒込ピペットで量り取ったジクロロメタン10 mLで50 mLの共栓付き遠心沈殿管に洗いこむ。サロゲートとして、benzo[a]pyrene- d_{12} の内部標準溶液4をマイクロシリンジで20 μ L添加する。(後工程で希釈をする場合は添加量に希釈倍率を乗じた量を添加する(最終検液濃度として50 ng/mLとなるようにする))。超音波洗浄器で15分間超音波抽出後、無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過し、ろ液を100 mLのナスフラスコに受ける。ロータリーエバポレーター(水浴40℃)で約3 mLになるまで濃縮する。窒素気流で乾固した後、ヘキサン3 mLに溶解する。希釈が必要な試料の場合、濃縮液を50 mLメスフラスコに移し、フラスコ内をヘキサンで洗浄後、定容する。

シリカゲルミニカラムにリザーバーを取り付け、吸引マニホールド、アスピレーターを用いてヘキサン10 mLでコンディショニングを行う。(シリカゲルミニカラム内に空気をいれないようにする)先の濃縮液をシリカゲルミニカラムに負荷(希釈が必要な試料の場合、50 mL定容した試料から1～5 mLホールピペットで分取し負荷)し、ナスフラスコ内の残留物はヘキサン2 mLを用いて洗い、この洗液もシリカゲルカラムに負荷する。100 mLナスフラスコをセットし、負荷した試料溶液がリザーバー内に残らなくなるまで流下させる(シリカゲルミニカラム内に空気をいれないようにする)。その後、ヘキサン25 mLを加え、100 mLのナスフラスコに流下させる。この溶出液をロータリーエバポレーター(水浴40℃)で2～3 mLまで濃縮する。その後、パスツールピペットを用いて、濃縮管に移し、窒素気流で0.2 mL以下まで濃縮し、ヘキサンで0.2 mLにする。パスツールピペットで濃縮管内をピペッティング後、ガラスインサート入りガラスバイアルに移したものを試験溶液とし、ガスクロマトグラフ質量分析計で測定する。

3.2 測定

「GC/MS 安全作業手順書」に基づいて、測定を実施する。

3.2.1 GC 条件

- ・カラム: Select PAH, 30 m x 0.25 mm, df=0.15
- ・試料導入量: 1 μ L
- ・カラム温度: 70℃(0.7 min), 85℃/min, 180℃, 3℃/min, 230℃(7 min), 28℃/min, 280℃(10 min), 14℃/min, 350℃(10 min)
- ・キャリアガス: Helium, constant flow 2 mL/min
- ・導入部: 300℃, Splitless mode, 1 min @ 50 mL/min
- ・検出器: EI in SIM mode, ion source 275℃, Transfer line 300℃

3.2.2 MS 条件

- イオン源温度: 230℃
- 四重極温度: 150℃
- イオン化法: 電子衝撃(EI)
- 測定方式: 選択イオンモニタリング(SIM)

分子種	モニタリングイオン (m/z)	
	定量用	確認用
benz[<i>a</i>]anthracene	228.1	226.1
chrysene	228.1	226.1
5-methylchrysene	242.1	240.1
benzo[<i>b</i>]fluoranthene	252.1	250.1
benzo[<i>j</i>]fluoranthene	252.1	250.1

benzo[<i>k</i>]-fluoranthene	252.1	250.1
benzo[<i>a</i>]pyrene	252.1	250.1
indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	276.1	274.1
dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	278.1	276.1
dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene	302.1	300.1
dibenzo[<i>a,e</i>]-pyrene	302.1	300.1
dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene	302.1	300.1
dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene	302.1	300.1
benzo[<i>a</i>]pyrene - <i>d</i> ₁₂	264.1	260.1

3.3 計算

各検量線用混合標準溶液中の benzo[*a*]pyrene-*d*₁₂ (以下 BaP-*d*₁₂) の濃度及びピーク面積と各 PAH の濃度及びピーク面積より、相対濃度と相対面積を算出する。

$$\text{標準溶液相対濃度} = \frac{\text{標準溶液中の各 PAH 濃度(ng/mL)}}{\text{標準溶液中の BaP-}d_{12} \text{ 濃度(ng/mL)}}$$

$$\text{標準溶液相対面積} = \frac{\text{標準溶液中の各 PAH ピーク面積}}{\text{標準溶液中の BaP-}d_{12} \text{ ピーク面積}}$$

各検量線用混合標準溶液から得られた相対濃度と相対面積より、検量線の傾きと切片を求める。

試験溶液中の benzo[*a*]pyrene-*d*₁₂ と各 PAH のピーク面積から相対面積を算出し、検量線の傾きと切片より検査溶液中の各 PAH 相対濃度を算出する。

$$\text{試験溶液相対面積} = \frac{\text{試験溶液中の各 PAH ピーク面積}}{\text{試験溶液中の BaP-}d_{12} \text{ ピーク面積}}$$

$$\text{試験溶液相対濃度} = \frac{(\text{試験溶液中の PAH 相対面積} - \text{検量線の切片})}{\text{検量線の傾き}}$$

得られた試験溶液中の各 PAH 相対濃度より、次式によって試験サンプル(ガラスフィルター)中の各 PAH 濃度(ng/枚)を計算する。

試験フィルター中 PAH 濃度 (ng/枚)

$$= \text{試験溶液相対濃度} \times \text{BaP-}d_{12} \text{ 添加量(ng)} \times 2$$

4. 検出下限 (LOD) および定量下限 (LOQ)

各 PAH 標準溶液の S/N 比から算出したフィルター中の LOD、LOQ

LOD: シグナル/ノイズ=3 となる濃度

LOQ: シグナル/ノイズ=10 となる濃度

* フィルター 1/2 枚使用、希釈無し、最終試験溶液 0.2 mL として算出

標準溶液の S/N 比から算出した分析用検液および燻煙フィルター中の PAH の検出下限および定量下限値

No.	分子種	標準溶液 S/N 比から算出		フィルター濃度換算値	
		ng/mL		ng/枚	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ
1	benzo[<i>a</i>]anthracene	2.32	7.72	0.93	3.09
2	chrysene	2.84	9.45	1.13	3.78
3	5-methylchrysene	0.83	2.76	0.33	1.10
4	benzo[<i>b</i>]fluoranthene	1.11	3.71	0.45	1.48
5	benzo[<i>k</i>]fluoranthene	0.82	2.73	0.33	1.09
6	benzo[<i>j</i>]fluoranthene	1.06	3.55	0.43	1.42
7	benzo[<i>a</i>]pyrene	1.89	6.31	0.76	2.52
8	indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	1.10	3.65	0.44	1.46
9	dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	2.06	6.87	0.82	2.75
10	dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene	7.25	24.2	2.90	9.66
11	dibenzo[<i>a,e</i>]pyrene	12.5	41.7	5.00	16.7
12	dibenzo[<i>a,i</i>]pyrene	23.1	76.9	9.23	30.8
13	dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene	25.0	83.3	10.0	33.3

試験標準作業書

多環芳香族炭化水素類(PAH)(ガスクロマトグラフ質量分析法)(食品)

1. 概要

本試験法は試料をアルカリ分解後、PAHをヘキサンで抽出したのち、シリカゲルカラムで精製し、ガスクロマトグラフ質量分析計で測定する方法である。

・試験サンプルの種類: 魚類

・試験項目 : 多環芳香族炭化水素類(PAH)

benz[<i>a</i>]anthracene	(BaA)
benzo[<i>b</i>]fluoranthene	(BbFA)
benzo[<i>j</i>]fluoranthene	(BjFA)
benzo[<i>k</i>]fluoranthene	(BkFA)
benzo[<i>a</i>]pyrene	(BaP)
chrysene	(CHR)
dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	(DBahA)
dibenzo[<i>a,e</i>]pyrene	(DBaeP)
dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene	(DBahP)
dibenzo[<i>a,i</i>]pyrene	(DBaiP)
dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene	(DBalP)
indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	(IP)
5-methylchrysene	(MCH)

・試験法の種類 : ガスクロマトグラフ質量分析法

・参考文献 : ・食品衛生検査指針 理化学編 2015 , P709-716
 ・有害大気汚染物質測定方法マニュアル, 第 1 編, 第 3 部, 第 1~3 章,
 環境省 水・大気環境局 大気環境課, 平成 31 年 3 月
 ・Fast Separation of EU and US EPA Regulated PAHs on Agilent J&W
 Select PAH GC Columns , Application Note, Agilent Technologies,
 Inc.

2. 試薬及び機器

2.1 試薬

- 1) エタノール:残留農薬試験用
- 2) 水酸化カリウム:特級
- 3) ヘキサン:残留農薬試験用
- 4) 無水硫酸ナトリウム:残留農薬試験用
- 5) トルエン:残留農薬試験用
- 6) イオン交換水
- 7) シリカゲルミニカラム:
固相カートリッジカラム(Waters 社: Sep-Pak Silica Plus Long Cartridge, 690 mg Sorbent per Cartridge, 55-105 μm Particle Size)
- 8) 窒素ガス

2.2 標準品

2.2.1 標準物質

- 1) benz[*a*]anthracene :AccuStandard
- 2) chrysene :和光純薬工業
- 3) benzo[*b*]fluoranthene:AccuStandard
- 4) benzo[*j*]fluoranthene:AccuStandard
- 5) benzo[*k*]fluoranthene:AccuStandard
- 6) benzo[*a*]pyrene :和光純薬工業
- 7) indeno[1,2,3-*cd*]pyrene :和光純薬工業
- 8) dibenz[*a,h*]anthracene :和光純薬工業
- 9) dibenzo[*a,h*]pyrene :AccuStandard
- 10) dibenzo[*a,l*]pyrene :AccuStandard
- 11) dibenzo[*a,l*]pyrene :AccuStandard
- 12) benzo[*a*]pyrene - d_{12} :和光純薬工業

2.2.2 標準溶液

- 1) 5-methylchrysene (50 $\mu\text{g/mL}$):AccuStandard
- 2) dibenzo[*a,e*]pyrene(50 $\mu\text{g/mL}$) :AccuStandard

2.3 標準溶液の調製

1) 各標準物質から標準溶液の調製

対象物質:

benz[*a*]anthracenechrysene、benzo[*b*]fluoranthene、benzo[*j*]fluoranthene、benzo[*k*]fluoranthene、
benzo[*a*]pyrene、indeno[1,2,3-*cd*]pyrene、dibenz[*a,h*]anthracene、dibenzo[*a,h*]pyrene、
dibenzo[*a,i*]pyrene、dibenzo[*a,l*]pyrene、

各標準物質 10 mg を 20 mL メスフラスコに正確に量り、トルエンで定容する(500 μ g/mL)。そこから 2 mL をホールピペットで 20 mL メスフラスコに量り取り、トルエンで定容する(50 μ g/mL)。調製した各標準原液は、遮光、冷凍で保存する。

	採取元濃度	採取量	定容量	調製濃度
各標準原液 1	–	10 mg	20 mL	500 μ g/mL
各標準原液 2	500 μ g/mL (標準原液 1)	2 mL	20 mL	50 μ g/mL

2) 内部標準溶液の調製

対象物質: benzo[*a*]pyrene-*d*₁₂

benzo[*a*]pyrene-*d*₁₂ 10 mg を 20 mL メスフラスコに正確に量り、トルエンで定容する(500 μ g/mL)。これを内部標準原液とする。以下同様に、下記の表に従って内部標準溶液を調製した。

調製した内部標準原液、溶液は、遮光、冷凍で保存する。

調製溶液名	採取元濃度	採取量	定容量	調製濃度
内部標準原液	–	10 mg	20 mL	500 μ g/mL
内部標準溶液 1	500 μ g/mL (内部標準原液)	2 mL	20 mL	50 μ g/mL
内部標準溶液 2	50 μ g/mL (内部標準溶液 1)	1 mL	20 mL	2.5 μ g/mL
内部標準溶液 3	2.5 μ g/mL (内部標準溶液 2)	2 mL	20 mL	0.25 μ g/mL
内部標準溶液 4 (添加用)	2.5 μ g/mL (内部標準溶液 2)	4 mL	20 mL	500 ng/mL

3) 検量線用混合標準溶液:

各標準原液 2、標準溶液 dibenzo[*a,e*]pyrene(50 μ g/mL) 及び dibenzo[*a,e*]pyrene(50 μ g/mL)をそれぞれ 1 mL ホールピペットで 20 mL メスフラスコに量り取り、トルエンで定容する。これを混合標準原液 1 とする。以下、下記の表の採取溶液、採取量、定容量に従い、混合標準原液 2、3 及び混合標準溶液 1～7 を調製する。混合標準原液 2 以降の定容する溶媒はヘキサンで行う。調製した各混合標準原液、溶液は、遮光、冷凍で保存する。

調製溶液名	採取元濃度	採取量	定容量	調製濃度
混合標準原液 1	各標準原液 2	1 mL	20 mL	2.5 μ g/mL
	5-methylchrysene	1 mL		
	dibenzo[<i>a,e</i>]pyrene	1 mL		
混合標準原液 2	混合標準原液 1	2 mL	20 mL	0.25 μ g/mL
混合標準原液 3	混合標準原液 2	2 mL	20 mL	25 ng/mL
・検量線用混合標準溶液				
混合標準溶液 1	混合標準原液 1	1 mL	25 mL	100 ng/mL (IS:50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	5 mL		
混合標準溶液 2	混合標準原液 2	6 mL	20 mL	75 ng/mL (IS:50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	4 mL		
混合標準溶液 3	混合標準原液 2	5 mL	25 mL	50 ng/mL (IS:50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	5 mL		
混合標準溶液 4	混合標準原液 2	2.5 mL	25 mL	25 ng/mL (IS:50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	5 mL		
混合標準溶液 5	混合標準原液 2	2.5 mL	50 mL	12.5 ng/mL (IS:50 ng/mL)
	内部標準溶液 2	1 mL		
混合標準溶液 6	混合標準原液 3	5 mL	25 mL	5 ng/mL (IS:50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	5 mL		
混合標準溶液 7	混合標準原液 3	2.5 mL	25 mL	2.5 ng/mL (IS:50 ng/mL)
	内部標準溶液 3	5 mL		

*IS: benzo[*a*]pyrene-*a*₁₂ の濃度

2.4 機器及び器具

2.4.1 機器

- 1) ガスクロマトグラフ質量分析計 : 6890N(アジレント・テクノロジー株式会社)
- 2) 天秤 : 最小表示 0.0001 g AUX220(株式会社島津製作所)、AEG220(株式会社島津製作所)
- 3) ロータリーエバポレーター : Rotavapor R-210(日本ビュッヒ株式会社)
- 4) 窒素吹き付け装置 : リアクティーバップ(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)
- 5) ウォーターバス
- 6) 振とう機
- 7) アスピレーター
- 8) 吸引マニホールド

2.4.2 器具

- 1) ナスフラスコ(100 mL、500 mL)
- 2) 三角フラスコ(300 mL)
- 3) ホールピペット(1 mL、2 mL、2.5 mL、3 mL、4 mL、5 mL)
- 4) 駒込ピペット(5 mL、10 mL)
- 5) メスフラスコ(20 mL、25 mL、50 mL)
- 6) メスシリンダー(100 mL、200 mL)
- 7) 分液ロート(500 mL)
- 8) ビーカー
- 9) 還流冷却器
- 10) ロート
- 11) 濃縮管
- 12) パスツールピペット
- 13) ガラスバイアル
- 14) マイクロシリンジ(50 μ L、100 μ L)
- 15) ガラスろ過器(1G)

3. 試験方法

3.1 試験操作

試験サンプル2～10 gを300 mLの三角フラスコに正確に量りとる。サロゲートとして、benzo[a]pyrene- d_{12} の内部標準溶液4をマイクロシリンジで20 μ L添加する。(後工程で希釈をする場合は添加量に希釈倍率を乗じた量を添加する(最終検液濃度として50 ng/mLとなるようにする))。エタノール150 mL、イオン交換水10～20 mL及び水酸化カリウム10～15 gを、それぞれメスシリンダー、駒込ピペット及び天秤で量り取り加える。ボイルストーン2個を加え、還流冷却器を付けて水浴上で2時間加熱還流する。還流中は約30分おきに軽く振り混ぜる。油滴の消失を確認し、放冷後、還流冷却器の上部から駒込ピペットでエタノール5 mLを加える。沈殿物がある場合は、アスピレーターを用いてガラスろ過器(1G)で吸引ろ過し、ろ液を500 mL分液ロートに入れる。メスシリンダーにてイオン交換水150 mL、エタノール20 mL及びヘキサン100 mLを測り、この順で、三角フラスコ内及びガラスろ過器を洗浄する。洗浄液は500 mL分液ロートに移す。分液ロートを軽く振り混ぜ、分液ロート内のガス抜きを行い、ガスが出なくなることを確認した後、振とう機を用いて5分間振り混ぜる。静置したのち、下層を別の500 mL分液ロートへ移し、ヘキサン100 mLを加え、振とう機を用いて5分間振り混ぜ、再度抽出を行う。2層に分離後、下層を別の分液ロートに移し、再度この抽出操作を行う。下層を廃棄し、ヘキサン抽出液を合わせ、イオン交換水50 mLを加え、軽く振り混ぜて水洗する。2層に分離後、下層を廃棄する。上層に再度イオン交換水50 mLを加えて水洗を行う。下層を廃棄し、上層を無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過し、ろ液を500 mLのナスフラスコに受ける。分液ロートをヘキサンで洗浄し、洗液はろ液の入ったナス型フラスコに合わせる。ロータリーエバポレーター(水浴40℃)で約3 mLになるまで濃縮する。希釈が必要な試料の場合、濃縮液を50 mLメスフラスコに移し、フラスコ内をヘキサンで洗浄後、定容する。

シリカゲルミニカラムにリザーバーを取り付け、吸引マニホールド、アスピレーターを用いてヘキサン10

mLでコンディショニングを行う。(シリカゲルミニカラム内に空気をいれないようにする)先の濃縮液をシリカゲルミニカラムに負荷(希釈が必要な試料の場合、50 mL定容した試料から1~5 mLホールピペットで分取し負荷)し、ナスフラスコ内の残留物はヘキサン2 mLを用いて洗い、この洗液もシリカゲルカラムに負荷する。100 mLナスフラスコをセットし、負荷した試料溶液がリザーバー内に残らなくなるまで流下させる(シリカゲルミニカラム内に空気をいれないようにする)。その後、ヘキサン25 mLを加え、100 mLのナスフラスコに流下させる。この溶出液をロータリーエバポレーター(水浴40℃)で2~3 mLまで濃縮する。その後、パストゥールピペットを用いて、濃縮管に移し、窒素気流で0.2 mL以下まで濃縮し、ヘキサンで0.2 mLにする。パストゥールピペットで濃縮管内をピペッティング後、ガラスインサート入りガラスバイアルに移したものを試験溶液とし、ガスクロマトグラフ質量分析計で測定する。

3.2 測定

「GC/MS 安全作業手順書」に基づいて、測定を実施する。

3.2.1 GC 条件

- ・カラム: Select PAH, 30 m x 0.25 mm, df=0.15
- ・試料導入量: 1 μ L
- ・カラム温度: 70℃(0.7 min), 85℃/min, 180℃, 3℃/min, 230℃(7 min), 28℃/min, 280℃(10 min), 14℃/min, 350℃(10 min)
- ・キャリアガス: Helium, constant flow 2 mL/min
- ・導入部: 300℃, Splitless mode, 1 min @ 50 mL/min
- ・検出器: EI in SIM mode, ion source 275℃, Transfer line 300℃

3.2.2 MS 条件

イオン源温度:	230℃
四重極温度:	150℃
イオン化法:	電子衝撃(EI)
測定方式:	選択イオンモニタリング(SIM)

分子種	モニタリングイオン (m/z)	
	定量用	確認用
benz[<i>a</i>]anthracene	228.1	226.1
chrysene	228.1	226.1
5-methylchrysene	242.1	240.1
benzo[<i>b</i>]fluoranthene	252.1	250.1
benzo[<i>j</i>]fluoranthene	252.1	250.1
benzo[<i>k</i>]-fluoranthene	252.1	250.1
benzo[<i>a</i>]pyrene	252.1	250.1
indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	276.1	274.1
dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	278.1	276.1
dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene	302.1	300.1
dibenzo[<i>a,e</i>]-pyrene	302.1	300.1
dibenzo[<i>a,i</i>]pyrene	302.1	300.1
dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene	302.1	300.1
benzo[<i>a</i>]pyrene - d_{12}	264.1	260.1

3.3 計算

各検量線用混合標準溶液中の benzo[*a*]pyren- d_{12} (以下 BaP- d_{12}) の濃度及びピーク面積と各 PAH の濃度及びピーク面積より、相対濃度と相対面積を算出する。

$$\text{標準溶液相対濃度} = \frac{\text{標準溶液中の各 PAH 濃度}(\text{ng/mL})}{\text{標準溶液中の BaP-}d_{12}\text{ 濃度}(\text{ng/mL})}$$

$$\text{標準溶液相対面積} = \frac{\text{標準溶液中の各 PAH ピーク面積}}{\text{標準溶液中の BaP-}d_{12}\text{ ピーク面積}}$$

各検量線混合標準溶液から得られた相対濃度と相対面積より、検量線の傾きと切片を求める。
試験溶液中の benzo[*a*]pyrene- d_{12} と各 PAH のピーク面積から相対面積を算出し、検量線の傾きと切片より試験溶液中の各 PAH 相対濃度を算出する。

$$\text{試験溶液相対面積} = \frac{\text{試験溶液中の各 PAH ピーク面積}}{\text{試験溶液中の BaP-}d_{12}\text{ピーク面積}}$$

$$\text{試験溶液相対濃度} = \frac{(\text{試験溶液中の PAH 相対面積} - \text{検量線の切片})}{\text{検量線の傾き}}$$

得られた試験溶液中の各 PAH 相対濃度より、次式によって試験サンプル中の各 PAH 濃度(μ g/kg)を計算する。

$$\begin{aligned} &\text{試験サンプル中 PAH 濃度 } (\mu \text{ g/kg}) \\ &= \frac{\text{試験溶液相対濃度} \times \text{BaP-}d_{12}\text{添加量(ng)}}{\text{試験サンプル採取量(g)}} \end{aligned}$$

4. 検出下限(LOD)および定量下限(LOQ)

1.各 PAH 標準溶液の S/N 比から算出した食品中の LOD、LOQ

2.生カツオ検液中各 PAH の S/N 比から算出した食品中の LOD、LOQ

LOD:シグナル/ノイズ=3となる濃度

LOQ:シグナル/ノイズ=10 となる濃度

* 試料 10 g、希釈無し、最終試験溶液 0.2 mL として算出

No.	分子種	1.各 PAH 標準溶液の S/N 比から算出		2.生カツオ検液中 各 PAH の S/N 比から算出	
		(μ g/kg wet)*		(μ g/kg wet)*	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ
1	benz[a]anthracene	0.05	0.15	0.04	0.15
2	chrysene	0.06	0.19	0.07	0.22
3	5-methylchrysene	0.02	0.06	0.02	0.07
4	benzo[b]fluoranthene	0.02	0.07	0.03	0.10
5	benzo[k]fluoranthene	0.02	0.05	0.02	0.06
6	benzo[<i>l</i>]fluoranthene	0.02	0.07	0.02	0.08
7	benzo[a]pyrene	0.04	0.13	0.04	0.13
8	indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	0.02	0.07	0.03	0.08
9	dibenz[a,h]anthracene	0.04	0.14	0.04	0.14
10	dibenzo[a, <i>l</i>]pyrene	0.14	0.48	0.13	0.44
11	dibenzo[a,e]pyrene	0.25	0.83	0.22	0.72
12	dibenzo[a, <i>i</i>]pyrene	0.46	1.54	0.47	1.57

13	dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene	0.50	1.67	0.51	1.71
----	-----------------------------	------	------	------	------

各 PAH 標準溶液の S/N 比と生カツオ検液中の各 PAH の S/N 比から算出した LOD 及び LOQ に違いは見られなかったため、前者を採用した。

試験方法(食品)の妥当性試験結果

中課題 4

実機検証：焙乾装置における薪の実態把握および水分条件による食品中 PAH 濃度への影響

実施内容

PAH13 成分の添加回収率および試験併行精度を求める。

報告内容

- ① PAH13 成分の検量線範囲(最小、最大)と検量線範囲から試料濃度へ換算した範囲
- ② 検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)
- ③ 添加回収試験結果

① PAH13 成分の検量線範囲(最小、最大)と検量線範囲から試料濃度へ換算した範囲

検量線の最大最小濃度から以下の条件で試料濃度に換算した

* 試料採取量：10 g、最終試験溶液：0.2 mL

No.	分子種	検量線濃度範囲 (ng/mL)		試料濃度換算範囲 (μ g/kg wet)*	
		最小	最大	最小	最大
1	benz[a]anthracene	2.30	92.0	0.05	1.84
2	chrysene	2.50	100.0	0.05	2.00
3	5-methylchrysene	2.50	100.0	0.05	2.00
4	benzo[b]fluoranthene	2.23	89.0	0.04	1.78
5	benzo[k]fluoranthene	2.56	102.5	0.05	2.05
6	benzo[j]fluoranthene	2.20	88.0	0.04	1.76
7	benzo[a]pyrene	2.50	100.0	0.05	2.00
8	indeno[1, 2, 3-cd]pyrene	2.50	100.0	0.05	2.00
9	dibenz[a, h]anthracene	2.50	100.0	0.05	2.00
10	dibenzo[a, j]pyrene	5.00	100.0	0.10	2.00
11	dibenzo[a, e]pyrene	12.50	100.0	0.25	2.00
12	dibenzo[a, i]pyrene	12.50	100.0	0.25	2.00
13	dibenzo[a, h]pyrene	11.88	95.0	0.24	1.90

② 検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)

以下の 2 条件の LOD、LOQ を算出した。

1. 各 PAH 標準溶液の S/N 比から算出した食品中の LOD、LOQ
2. 生カツオ検液中各 PAH の S/N 比から算出した食品中の LOD、LOQ

LOD : シグナル/ノイズ=3 となる濃度

LOQ : シグナル/ノイズ=10 となる濃度

* 試料 10 g、希釈無し、最終試験溶液 0.2 mL として計算

No.	分子種	1. 各 PAH 標準溶液の S/N 比から算出 ($\mu\text{g/kg wet}$)*		2. 生カツオ検液中 各 PAH の S/N 比から算出 ($\mu\text{g/kg wet}$)*	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ
1	benz[a]anthracene	0.05	0.15	0.04	0.15
2	chrysene	0.06	0.19	0.07	0.22
3	5-methylchrysene	0.02	0.06	0.02	0.07
4	benzo[b]fluoranthene	0.02	0.07	0.03	0.10
5	benzo[k]fluoranthene	0.02	0.05	0.02	0.06
6	benzo[j]fluoranthene	0.02	0.07	0.02	0.08
7	benzo[a]pyrene	0.04	0.13	0.04	0.13
8	indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.02	0.07	0.03	0.08
9	dibenz[a,h]anthracene	0.04	0.14	0.04	0.14
10	dibenzo[a,l]pyrene	0.14	0.48	0.13	0.44
11	dibenzo[a,e]pyrene	0.25	0.83	0.22	0.72
12	dibenzo[a,i]pyrene	0.46	1.54	0.47	1.57
13	dibenzo[a,h]pyrene	0.50	1.67	0.51	1.71

各 PAH 標準溶液の S/N 比と生カツオ検液中の各 PAH の S/N 比から算出した LOD 及び LOQ に違いは見られなかったため、前者を採用した。

③ 添加回収試験結果

分析法の妥当性を確認するために、定量下限相当及び検量線中間濃度の PAH13 成分を添加し、回収率及び中間精度を求めた。

実施内容

試料 生カツオ
試料採取量 10 g
最終試験溶液量 0.2 mL
添加濃度 2 濃度（定量下限相当、検量線中間濃度）
試験回数 日を変えて 3 回
併行測定回数 7 点

結果

1. 定量下限相当

No.	分子種	添加濃度	回収率(%)	併行再現精度	中間精度
		(μ g/kg wet)	平均	RSDr (%)	RSDi (%)
1	benz[a]anthracene	0.092	74.96	5.98	6.76
2	chrysene	0.100	98.92	5.51	9.61
3	5-methylchrysene	0.100	83.84	5.00	8.90
4	benzo[b]fluoranthene	0.089	76.30	6.82	7.36
5	benzo[k]fluoranthene	0.103	79.58	9.54	9.57
6	benzo[j]fluoranthene	0.088	84.66	6.43	9.19
7	benzo[a]pyrene	0.100	110.96	4.11	5.78
8	indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.100	101.55	7.18	9.13
9	dibenz[a,h]anthracene	0.100	98.23	7.75	8.64
10	dibenzo[a,l]pyrene	0.400	108.44	3.08	6.65
11	dibenzo[a,e]pyrene	1.00	70.63	3.87	3.87
12	dibenzo[a,i]pyrene	1.00	95.66	3.08	5.03
13	dibenzo[a,h]pyrene	0.95	97.44	2.97	3.05

2. 検量線中間濃度

No.	分子種	添加濃度	回収率(%)	併行再現精度	中間精度
		(μ g/kg wet)	平均	RSDr (%)	RSDi (%)
1	benz[<i>a</i>]anthracene	0.92	83.00	4.34	4.80
2	chrysene	1.00	77.90	3.47	3.47
3	5-methylchrysene	1.00	90.57	3.55	3.70
4	benzo[<i>b</i>]fluoranthene	0.89	85.22	3.88	3.88
5	benzo[<i>k</i>]fluoranthene	1.03	90.93	3.52	3.52
6	benzo[<i>j</i>]fluoranthene	0.88	72.76	2.86	3.36
7	benzo[<i>a</i>]pyrene	1.00	101.77	2.86	2.86
8	indeno[1, 2, 3- <i>cd</i>]pyrene	1.00	93.22	4.41	4.41
9	dibenz[<i>a, h</i>]anthracene	1.00	96.47	3.44	3.95
10	dibenzo[<i>a, i</i>]pyrene	1.00	73.60	2.62	3.17
11	dibenzo[<i>a, e</i>]pyrene*	—	—	—	—
12	dibenzo[<i>a, i</i>]pyrene*	—	—	—	—
13	dibenzo[<i>a, h</i>]pyrene*	—	—	—	—

*:dibenzo[*a, e*]pyrene、dibenzo[*a, i*]pyrene、dibenzo[*a, h*]pyrene の3分子種については、農水省と協議の上、時間の都合上、定量下限相当のみ実施した。

以上