

III . フェノール類の分析法

1. アルキルフェノール類の分析法

1 対象物質

4-t-ブチルフェノール、4-n-ペンチルフェノール、4-n-ヘキシルフェノール、4-ヘプチルフェノール、4-t-オクチルフェノール、4-n-オクチルフェノール、ノニルフェノール

2 目標検出限界

本分析法の目標検出限界（注1）はノニルフェノールの場合、水質が 100ng/L、底質及び生物試料が 50ng/g、それ以外のフェノール化合物の場合、水質が 10ng/L、底質及び生物試料が 5ng/g である。

3 分析法概要

水質試料で、けん濁物（SS）が多く認められる時は、ガラスファイバーフィルターでろ過し、SS はアセトンで抽出して、ろ液に合わせて以下の操作を行う。水質試料（またはろ液）を酸性にしてジクロロメタンで抽出後、脱水・濃縮して GC/MS-SIM で測定する。ジクロロメタンによる抽出の代わりに、固相抽出を行い、酢酸メチルで溶出後、脱水して GC/MS-SIM で測定してもよい。クリーンアップが必要な時はジクロロメタン抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかける。

底質試料は酸性条件下、アセトンで抽出後、塩化ナトリウム水溶液に加えて、ジクロロメタンで抽出する。抽出液を脱水・濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップして GC/MS-SIM で測定する。

生物試料はメタノールで抽出後、メタノール/ヘキサン分配で脂質を除去する。メタノール層を塩化ナトリウム水溶液に加えた後、ジクロロメタンで抽出する。抽出液を脱水・濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップして GC/MS-SIM で測定する。

4 試薬・器具

(1) 試薬

- ・対象物質：市販標準試薬
- ・内標準物質（ナフタレン-d₈、フェナントレン-d₁₀）：市販標準試薬
- ・ジクロロメタン、アセトン、メタノール、ヘキサン：残留農薬分析用
- ・無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留農薬試験用または特級試薬を 700 で 8 時間加熱後、放冷したもの。
- ・精製水：蒸留水を活性炭カートリッジで処理したもの。

- ・シリカゲルカラム：コック付きガラス製カラム（内径 2cm、長さ 20cm）に 5%含水シリカゲル（注 2）15g をヘキサンを用いて湿式充填し、上部に無水硫酸ナトリウムを 2cm 積層したもの。
- ・その他の試薬：特級試薬を用いる。

（ 2 ）器具及び装置

- ・ロータリーエバポレーター
- ・超音波洗浄器
- ・遠心分離機
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー（ポリトロン）、超高速万能ホモジナイザー（ヒスコトロン）、攪拌分散器（ウルトラターラックス）または同等品
- ・分液ロート
- ・振とう機
- ・固相抽出用器具（カートリッジあるいはディスク、ろ過装置など）
- ・ガスクロマトグラフ / 質量分析計（GC/MS）：GC はキャピラリーカラム対応のもの。MS は二重収束型もしくは四重極型のもの。

5 試験操作

（ 1 ）前処理法

（ア）水質試料（注 3）

（ a ）液々抽出

試料水 1 L を 1M 塩酸で pH を 3 前後に調整後、塩化ナトリウム 30g（海水は無添加）を加え十分混合して溶解する。試料水にけん濁物（SS）が多く認められる時は抽出前にガラスファイバーフィルターで試料水をろ過する。一方、余分の試料水を使い、JIS-K0102 に従って SS を別途測定しておく。SS はフィルターごと、超音波洗浄機を使って少量のアセトンで数回抽出し、抽出液を合わせて 5mL 程度に減圧濃縮し、ろ液に加える。酸性にした試料水（またはろ液）にジクロロメタン 50mL を加え 10 分間振とう抽出する。この抽出を計 2 回行い、ジクロロメタン層を合わせる。無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターと窒素吹き付けで約 0.5mL まで濃縮して前処理液とする。

（ b ）固相抽出（注 4）

あらかじめ有機溶剤と精製水で洗浄及びコンディショニングをしたカートリッジ（あるいはディスク）に、1M 塩酸で pH3.5 に調整した試料水 1 L を通水する。通水終了後、余分の試料水を除去し、酢酸メチル 5mL で吸着された対象物質を 10mL 容積の濃縮管内に溶出させる。この際、約 0.3mL 程度の水が下層にできる。軽く加温しながら、窒素ガスを吹き付け、水層の上にわずかな量（0.2～0.3mL）の酢酸メチルが残る程度まで濃縮して前

処理液とする。

(イ) 底質試料

湿泥 20g と濃塩酸 5ml を 100ml 共栓付遠沈管に入れてよく混合し、アセトン 50ml を加えて 10 分間振とう抽出し、さらに超音波洗浄器を用いて 10 分間超音波抽出を行う。3000rpm で 10 分間遠心分離して上澄み液を取り出す。この抽出操作を 3 回行い、上澄み液を合わせて 5% 塩化ナトリウム水溶液 500ml を入れた分液ロート (1L) に加える。これにジクロロメタン 50ml を加え 10 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い、合わせたジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターと窒素吹き付けで約 0.5ml に濃縮して前処理液とする。

(ウ) 生物試料

試料 20g をホモジナイザーで均質のペースト状にし、メタノール 100ml を加えて 10 分間振とう抽出する。3000rpm で 20 分間遠心分離した後、上澄み液を取り出す。この抽出操作を計 2 回行い、合わせた上澄み液を分液ロート (300ml) に入れた後、精製水 3~5ml を加える。この溶液に飽和するまでヘキサンを滴下する (注 5)。飽和後さらにヘキサン 30ml を加えて 5 分間振とう抽出する。メタノール層を別の分液ロート (300ml) に移し、再度ヘキサン 30ml を加えて洗浄する。この操作をさらに 1 回行う。メタノール層を 5% 塩化ナトリウム水溶液 500ml を入れた分液ロート (1L) に移す。濃塩酸 1mL を添加後、ジクロロメタン 50ml で 10 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い、合わせたジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターと窒素吹き付けで約 0.5ml に濃縮して前処理液とする。

(2) 試料液の調製

水質試料 (液々抽出でクリーンアップが必要な場合)、底質試料、生物試料は以下に示す方法で調製する。前処理液をシリカゲルカラムに負荷し、液面をカラムヘッドまで下げる。少量 (約 0.5mL) のジクロロメタンで抽出液の容器を洗い、洗液をシリカゲルカラムに負荷後、ヘキサン 100ml を流し、溶出液は捨てる。次にアセトン 100ml を流す (注 6)。得られた溶出液をロータリーエバポレーターと窒素吹き付けで約 1ml 程度に濃縮し、内標準溶液 (ナフタレン- d_8 及びフェナントレン- d_{10} の各 $1\mu\text{g/ml}$ ヘキサン溶液) 1ml を添加後、更に窒素吹き付けで 1ml まで濃縮する。

液々抽出でクリーンアップが不要な水質試料では以下に示す方法で調製する。前処理液に内標準溶液 (ナフタレン- d_8 及びフェナントレン- d_{10} の各 $1\mu\text{g/mL}$ ヘキサン溶液) 1 mL を添加した後、窒素気流吹き付けで 1mL まで濃縮する。

固相抽出を行った水質試料では以下に示す方法で調製する。前処理液に内標準溶液 (ナフタレン- d_8 及びフェナントレン- d_{10} の各 $1\mu\text{g/mL}$ ヘキサン溶液) 1 mL を添加し、栓を

して振り混ぜた後、無水硫酸ナトリウム 3g を加えて脱水し、硫酸ナトリウムを濾別することなく試料液とする。

(3) 空試験液の調製

試料を用いずに「前処理法」ならびに「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。空試験液から対象物質が検出された場合は、空試験値を差し引いて検出値とする。

(4) 添加回収試験液の調製

任意の水質試料 1 L あるいは任意の底質 / 生物試料 20g に対象物質各 1 μ g を添加し、十分に混合した後、「前処理法」および「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

各測定対象物質の標準品を正確に 100mg 取り、ジクロロメタンを加えて正確に 1000mg/L 標準原液を調製する。これを適宜ジクロロメタンで希釈混合して所定の濃度の混合標準液を作製する。内標準物質（ナフタレン- d_8 、フェナントレン- d_{10} ）の標準原液及び標準混合液の調製も、対象物質と同様に行う。但し、試料に添加する混合標準液はアセトンで調製する。全ての標準原液及び標準液は、暗所 - 20 以下で保存し、有効使用期間は分解が認められない場合 1 年間とする。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件

(a) GC

- ・カラム：熔融シリカキャピラリーカラム（30m×0.25mmI.D.、 $d_f=0.25\mu\text{m}$ ）
- ・液相：5%フェニルメチルシリコン
- ・カラム温度：60（1分）- 10 /分 - 280（5分）
- ・注入口温度：280
- ・注入法：スプリットレス法（1分後パージ） 1 μ L 注入
- ・キャリアガス：He、線速度：40cm / 秒
- ・インレット温度：280

(b) MS

- ・イオン化法：EI
- ・イオン化電圧：70eV
- ・イオン源温度：250

・検出モード：SIM

(c) 定量イオン

対象物質及び内標準物質の定量イオンと確認イオンを表1に示す。

表1 対象物質及び内標準物質の測定イオン及び保持指標 (PTRI= Programmed Temperature Retention Index)

化合物名	CAS Registry Number	PTRI	測定イオン	
			定量用	確認用
4-t-ブチルフェノール	98-54-4	1306	135	107
4-n-ペンチルフェノール	14938-35-3	1461	107	164
4-n-ヘキシルフェノール	2446-69-7	1522	107	178
4-ヘプチルフェノール	1987-50-4	1668	107	192
4-t-オクチルフェノール	140-66-9	1614	135	107
4-n-オクチルフェノール	1806-26-4	1770	107	206
ノニルフェノール	104-40-5	1669 ~ 1801	135	107
ナフタレン-d ₈		<1200	136	
フェナントレン-d ₁₀		1794	188	

PTRI は n-アルカンを基準物質とし、液相として 5 % フェニルメチルシリコンを用いた時の値である。

(イ) 検量線

毎測定時に検量線を作成する。混合標準液に所定量の内標準を加え、その 1 μL を GC に注入し、各対象物質と内標準とのピーク面積値 (高さ) の比から対象物質毎の検量線を作成し、それを用いて試料を定量する。検量線の濃度範囲は、分析法の検出下限及び定量上限と予想される濃度レベルを含む 5 段階以上とする。

(ウ) 試料の測定

検量線作成後、測定用試料液、空試験液及び添加回収試験液各 1 μL を GC に注入して測定を行う。一定時間毎に、検量線の間濃度の標準液を測定し、期待値の 15% 以内の変動であることを確認する。もし、この範囲を外れた場合は、GC/MS を再調整後、検量線を作成し直して、測定を再開する。

6 同定、定量及び計算

(ア) 同定

対象物質の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間と ± 5 秒以内に出現し、確認イオンと定量イオンのピーク強度比が予想値と ± 20% 以内の差で合っておれば、物質が存在しているを見なす。

(イ) 定量

得られた各対象物質と内標準とのピーク面積値（高さ）の比から検量線により検出量を求める。次に検出量、分析した試料量などから次式により、試料中の対象物質の濃度を計算する。

水質試料中濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ） =

$$\text{検出量 (ng)} \times [\text{測定用試料液量 (mL)} / \text{GC 注入量 (}\mu\text{L)}] \times [1 / \text{試料量 (mL)}]$$

底質 / 生物試料中濃度（ $\mu\text{g/g}$ ） =

$$\text{検出量 (ng)} \times [\text{測定用試料液量 (mL)} / \text{GC 注入量 (}\mu\text{L)}] \times [1 / \text{試料量 (g)}]$$

注意事項

注 1：試料の分析を開始する前に、検出限界を算出して、目標検出限界を達成できることを確認しておく。達成できない場合は、試料量を増やしたり、試料液量を数 100 μL に減ずるなどの対策を講じる。検出限界の求め方は「有機塩素系化合物の分析法」の注意事項を参照のこと。

注 2：5%含水シリカゲルは、カラムクロマトグラフ用シリカゲルを用いて以下のように作成する：シリカゲルを 130 で 15 時間加熱後、透明すり合わせ共栓付き三角フラスコに入れ、密栓して室温まで冷却する。シリカゲルをかく拌しながら、シリカゲル 95 g に対して精製水 5mL を滴下する。密栓し、発熱が終了するまで静かに混合する。さらに、振とう器で 30 分間振とう後、乾燥剤としてシリカゲルを入れたデシケータ中でさらに 15 時間以上放置する。

注 3：妨害ピークが少なく、クリーンアップが不要と判断される時は、クリーンアップの部分を省略できる。また、クリーンアップが必要な水試料の場合には、固相抽出ではなく、液々抽出を用いる。

注 4：SS が多い時は液々抽出を行うのがよい。固相吸着剤の例としては、Sep-Pack SP-2 や OasisTM HLB カートリッジあるいはエムポアディスク SDB-RPS 等がフェノール類の固相抽出に適している。コンディショニングの手順や回収率などを事前にチェックした上で使用するのが望ましい。

注 5：メタノールを飽和させるヘキサン量は 15 ~ 30ml 程度である。また、添加する精製水が多すぎると、エマルジョンが出来やすく、対象物質がヘキサン層へ移行する可能性があるため注意する。脂肪分が多くない場合は精製水の添加をしなくてもよい。

注 6：事前に試料と同様の濃縮液に既知量の標準物質を添加したものをを用いて、対象物質の溶出パターンを確認し、カラムクロマトグラフ操作に必要なヘキサン及びアセト

ンの量を求めておく。

参考文献

平成7年度化学物質分析法開発調査報告書。

平成8年度化学物質分析法開発調査報告書。

高橋保雄、森田昌敏；環境化学、6 (1996) 363-373.

近藤秀治、中嶋敏秋；第7回環境化学討論会講演要旨集、30-31 (1998).

奥村為男；第7回環境化学討論会講演要旨集、74-75 (1998).

．ビスフェノールAとクロロフェノール類の分析法

1 対象物質

ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール

2 目標検出限界

本分析法の目標検出限界（注1）は水質試料が 10ng/L、底質及び生物試料が 5ng/g である。

3 分析法概要

水質試料にけん濁物（SS）が多く認められる時は、ガラスファイバーフィルターでろ過し、SS はアセトンで抽出して、ろ液に合わせて以下の操作を行う。水質試料（またはろ液）を酸性にしてジクロロメタンで抽出後、脱水・濃縮してトリメチルシリル化を行い、GC/MS-SIM で測定する。ジクロロメタンによる抽出の代わりに、固相抽出を行い、ジクロロメタンで溶出後、脱水・濃縮してトリメチルシリル化を行い、GC/MS-SIM で測定してもよい。クリーンアップが必要な時はジクロロメタン抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかける。

底質試料は酸性条件下、アセトンで抽出後、塩化ナトリウム水溶液に加えて、ジクロロメタンで抽出する。抽出液を脱水・濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップしてからトリメチルシリル化を行い、GC/MS-SIM で測定する。

生物試料はメタノールで抽出後、メタノール/ヘキサン分配で脂質を除去する。メタノール層を塩化ナトリウム水溶液に加えた後、ジクロロメタンで抽出する。抽出液を脱水・濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップしてからトリメチルシリル化を行い、GC/MS-SIM で測定する。

4 試薬・器具

（1）試薬

- ・対象物質：市販標準試薬
- ・サロゲート物質：重水素化ビスフェノールA（注2）
- ・内標準物質（ピレン-d₁₀）：市販標準試薬
- ・ジクロロメタン、アセトン、メタノール、ヘキサン：残留農薬分析用
- ・N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide：ガスクロマトグラフ用（冷所保管）
- ・無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留農薬試験用または特級試薬を 700 ℃ で 8 時間加熱後、放冷したもの。
- ・精製水：蒸留水を活性炭カートリッジで処理したもの。
- ・シリカゲルカラム：コック付きガラス製カラム（内径 2cm、長さ 20cm）に 5% 含

水シリカゲル（注3）15g をヘキサンを用いて湿式充填し、上部に無水硫酸ナトリウムを 2cm 積層したもの。

- ・その他の試薬：特級試薬を用いる。

（2）器具及び装置

- ・ロータリーエバポレーター
- ・超音波洗浄器
- ・遠心分離機
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー（ポリトロン）、超高速万能ホモジナイザー（ヒスコトロン）、攪拌分散器（ウルトラターラックス）または同等品
- ・分液ロート
- ・振とう機
- ・ガスクロマトグラフ / 質量分析計（GC/MS）：GC はキャピラリーカラム対応のもの。MS は二重収束型もしくは四重極型のもの。

5 試験操作

（1）前処理法

（ア）水質試料（注4）

（a）液々抽出

試料水 1L を 1M 塩酸で pH を 3 前後に調整後、塩化ナトリウム 30g（海水は無添加）及びサロゲート物質（ビスフェノール A-d₁₆、1 μg）を加え十分混合して溶解する。試料水にけん濁物（SS）が多く認められる時は抽出前にガラスファイバーフィルターで試料水をろ過する。一方、余分の試料水を使い、JIS-K0102 に従って SS を別途測定しておく。SS はフィルターごと、超音波洗浄機を使って少量のアセトンで数回抽出し、抽出液を合わせて 5mL 程度に減圧濃縮し、ろ液に加える。酸性にした試料水（またはろ液）にジクロロメタン 50mL を加え 10 分間振とう抽出する。この抽出を計 2 回行い、ジクロロメタン層を合わせる。無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターと窒素気流吹き付けで約 0.5mL まで濃縮して前処理液とする。

（b）固相抽出（注5）

あらかじめ有機溶剤と精製水で洗浄及びコンディショニングをしたカートリッジ（あるいはディスク）に、1M 塩酸で pH3.5 に調整した試料水 1L（重水素化ビスフェノール A を 1 μg 添加したもの）を通水する。通水終了後、精製水で洗浄し、窒素ガスを通気して乾燥させる。ジクロロメタン 9mL で吸着された対象物質を 10mL 容積の濃縮管内に溶出させる。得られた溶出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、軽く加温しながら、窒素気流吹き付けで約 0.5mL 程度まで濃縮して前処理液とする。

(イ) 底質試料

湿泥 20g と濃塩酸 5ml 及びサロゲート物質(重水素化ビスフェノールA、1 µg)を 100ml 共栓付遠沈管に入れてよく混合し、アセトン 50ml を加えて 10 分間振とう抽出し、さらに超音波洗浄器を用いて 10 分間超音波抽出を行う。3000rpm で 10 分間遠心分離して上澄み液を取り出す。この抽出操作を 3 回行い、上澄み液を合わせて 5%塩化ナトリウム水溶液 500ml を入れた分液ロート(1L)に加える。これにジクロロメタン 50ml を加え 10 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い、合わせたジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターと窒素気流吹き付けで約 0.5ml に濃縮して前処理液とする。

(ウ) 生物試料

試料 20g とサロゲート物質(重水素化ビスフェノールA、1 µg)をホモジナイザーで均質のペースト状にし、メタノール 100ml を加えて 10 分間振とう抽出する。3000rpm で 20 分間遠心分離した後、上澄み液を取り出す。この抽出操作を計 2 回行い、合わせた上澄み液を分液ロート(300ml)に入れた後、精製水 3~5ml を加える。この溶液に飽和するまでヘキサンを滴下する(注6)。飽和後さらにヘキサン 30ml を加えて 5 分間振とう抽出する。メタノール層を別の分液ロート(300ml)に移し、再度ヘキサン 30ml を加えて洗浄する。この洗浄操作をさらに 1 回繰り返した後、メタノール層を 5%塩化ナトリウム水溶液 500ml を入れた分液ロート(1L)に移す。濃塩酸 1mL を添加後、ジクロロメタン 50ml で 10 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い、合わせたジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターと窒素気流吹き付けで約 0.5ml に濃縮して前処理液とする。

(2) 試料液の調製

水質試料、底質試料、生物試料ともに以下に示す方法で調製する。

前処理液をシリカゲルカラムに負荷し、液面をカラムヘッドまで下げる。少量のジクロロメタンで抽出液の容器を洗い、洗液をシリカゲルカラムに負荷後、ヘキサン 100ml を流し、溶出液は捨てる。次にアセトン 100ml を流す(注7)。得られた溶出液をロータリーエバポレーターで数 ml まで濃縮してからジクロロメタン 15ml を加え、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターと窒素吹き付けで約 1ml 程度に濃縮し、内標準溶液(ナフタレン-d₈及びフェナントレン-d₁₀の各 1µg/ml ヘキサン溶液) 1ml を添加後、更に窒素吹き付けで 0.5ml 程度まで濃縮する。

水質試料でクリーンアップが不要の場合は、前処理液に内標準溶液(ピレン-d₁₀、1 µg/mL ジクロロメタン溶液) 1 mL を添加後、更に窒素気流吹き付けで 0.5mL 程度まで濃縮する。

各試料の濃縮液に N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide 200 μ L を加え、すばやく栓をしてよく振り混ぜた後、室温で 1 時間放置させ、誘導体化する。この後、窒素ガスを吹き付けて 0.2 ~ 0.3mL まで濃縮し、ジクロロメタンを加えて 1mL とする。(注 8)

(3) 空試験液の調製

試料を用いずに「前処理法」ならびに「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。空試験液から対象物質が検出された場合は、空試験値を差し引いて検出値とする。

(4) 添加回収試験液の調製

任意の水質試料 1000mL あるいは任意の底質 / 生物試料 20g に対象物質とサロゲート物質、各 1 μ g を添加し、十分に混合した後、「前処理法」ならびに「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

各測定対象物質の標準品を正確に 100mg 取り、ジクロロメタンを加えて正確に 1000mg/L 標準原液を調製する。これを適宜ジクロロメタンで希釈混合して所定の濃度の混合標準液を作製する。サロゲート物質 (重水素化ビスフェノール A) 及び標準混合液の調製も、対象物質と同様に行う。内標準物質 (ピレン-d₁₀) の標準原液及び希釈標準液の調製も、対象物質と同様に行う。但し、試料に添加する混合標準液はアセトンで調製する。

全ての標準原液及び標準液は、暗所 - 20 以下で保存し、有効使用期間は分解が認められない場合 1 年間とする。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件

(a) GC

- ・カラム：熔融シリカキャピラリーカラム (30m \times 0.25mm I.D.、 d_f =0.25 μ m)
- ・液相：5 % フェニルメチルシリコン
- ・カラム温度：60 (1 分) - 10 / 分 - 280 (5 分)
- ・注入口温度：280
- ・注入法：スプリットレス法 (1 分後パーズ) 1 μ L 注入
- ・キャリアガス：He、線速度：40cm / 秒
- ・インレット温度：280

(b) MS

- ・イオン化法：EI
- ・イオン化電圧：70eV
- ・イオン源温度：250

・検出モード：SIM

(c) 定量イオン

対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の定量イオンと確認イオンを表1に示す。

表1 対象物質及びサロゲート物質のTMS体及び内標準物質の測定イオン及び保持指標
(PTRI=Programmed Temperature Retention Index)

化合物名	PTRI	測定イオン	
		定量用	確認用
ビスフェノールAのTMS体	2230	357	372
2,4-ジクロロフェノールのTMS体	1372	219	234
ペンタクロロフェノールのTMS体	1883	323	338
重水素化ビスフェノールAのTMS体		368 (注9)	386 (注9)
ピレン-d ₁₀	2140	212	

PTRIはn-アルカンを基準物質とし、液相として5%フェニルメチルシリコンを用いた時の値である。

(イ) 検量線

毎測定時に検量線を作成する。混合標準液1~数mLに所定量の内標準を加え、窒素ガスを吹き付けて0.5mL程度に濃縮し、「試料液の調製」の誘導体化に従って操作を行い、得られた試料液の1μLをGCに注入する。各対象物質(サロゲート物質)のトリメチルシリル体と内標準とのピーク面積値(高さ)の比から対象物質(サロゲート物質)毎の検量線を作成し、それを用いて試料を定量する。検量線の濃度範囲は、分析法の検出下限及び定量上限と予想される濃度レベルを含む5段階以上とする。

(ウ) 試料の測定

検量線作成後、測定用試料液、空試験液及び添加回収試験液各1μLをGCに注入して測定を行う。一定時間毎に、検量線の間濃度の標準液を測定し、期待値の15%以内の変動であることを確認する。もし、この範囲を外れた場合は、GC/MSを再調整後、検量線を作成し直して、測定を再開する。

6 同定、定量及び計算

(ア) 同定

対象物質(サロゲート物質)のトリメチルシリル体の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間と±5秒以内に出現し、確認イオンと定量イオンのピーク強度比が予想値と±20%以内の差で合っておれば、物質が存在していると見なす。

(イ) 定量

得られた各対象物質(サロゲート物質)のトリメチルシリル体と内標準とのピーク面積

値（高さ）の比から検量線により検出量を求める。次に検出量、分析した試料量などから次式により、試料中の対象物質（サロゲート物質）の濃度を計算する。次に検出量、分析した試料量などから次式により、試料中の対象物質の濃度を計算する。

水質試料中濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）＝

$$\text{検出量 (ng)} \times [\text{測定用試料液量 (mL)} / \text{GC 注入量 (}\mu\text{L)}] \times [1 / \text{試料量 (mL)}]$$

底質 / 生物試料中濃度（ $\mu\text{g/g}$ ）＝

$$\text{検出量 (ng)} \times [\text{測定用試料液量 (mL)} / \text{GC 注入量 (}\mu\text{L)}] \times [1 / \text{試料量 (g)}]$$

注意事項

- 注 1：試料の分析を開始する前に、検出限界を算出して、目標検出限界を達成できることを確認しておく。達成できない場合は、試料量を増やしたり、試料液量を数 100 μL に減ずるなどの対策を講じる。検出限界の求め方は「有機塩素系化合物の分析法」の注意事項を参照のこと。
- 注 2：重水素の数が 16 個のものと 6～8 個のものがあり、いずれを使用してもよい。誘導体化した時には水酸基の部分の重水素はなくなる。
- 注 3：5% 含水シリカゲルは、カラムクロマトグラフ用シリカゲルを用いて以下のように作成する：シリカゲルを 130 で 15 時間加熱後、透明すり合わせ共栓付き三角フラスコに入れ、密栓して室温まで冷却する。シリカゲルをかく拌しながら、シリカゲル 95 g に対して精製水 5mL を滴下する。密栓し、発熱が終了するまで静かに混合する。さらに、振とう器で 30 分間振とう後、乾燥剤としてシリカゲルを入れたデシケータ中でさらに 15 時間以上放置する。
- 注 4：妨害ピークが少なく、クリーンアップが不要と判断される時は、クリーンアップの部分を省略できる。
- 注 5：SS が多い時は液々抽出を行うのがよい。固相吸着剤の例としては、Sep-Pack SP-2 や OasisTM HLB カートリッジあるいはエムポアディスク SDB-RPS 等がフェノール類の固相抽出に適している。コンディショニングの手順や回収率などを事前にチェックした上で使用するのが望ましい。
- 注 6：メタノールを飽和させるヘキサン量は 15～30ml 程度である。また、添加する精製水が多すぎると、エマルジョンが出来やすく、対象物質がヘキサン層へ移行する可能性があるため注意する。脂肪分が多くない場合は精製水の添加をしなくてもよい。
- 注 7：事前に試料と同様の濃縮液に既知量の標準物質を添加したものをを用いて、対象物質の溶出パターンを確認し、カラムクロマトグラフ操作に必要なヘキサン及びアセト

ンの量を求めておく。

注 8 : 誘導体化後、窒素ガスを吹き付けて濃縮する際、ビスフェノール A と 2,4-ジクロロフェノールの TMS 誘導体は乾固しても安定であるが、ペンタクロロフェノールの TMS 誘導体は誘導体化試薬の N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide がある程度残存していないと、元のペンタクロロフェノールに戻ってしまうために、乾固してはならない。

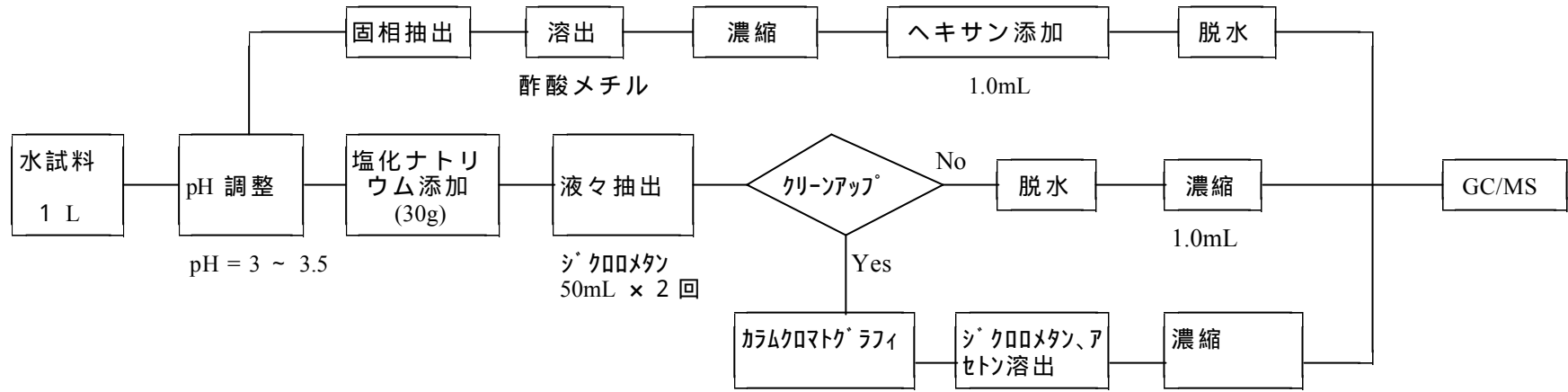
注 9 : この表に示された質量数はビスフェノール A-d₁₆ の場合の値である。重水素の数が 6 ~ 8 個のビスフェノール A の場合にはトリメチルシリル体の質量スペクトルを測定して、最適の測定イオンを決める。

参考文献

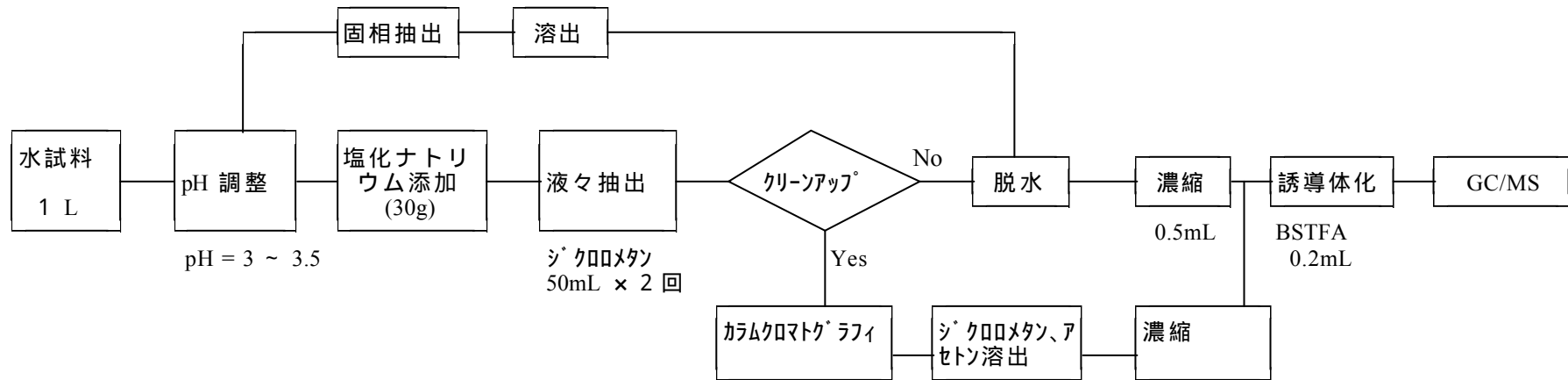
平成 7 年度化学物質分析法開発調査報告書。

平成 8 年度化学物質分析法開発調査報告書。

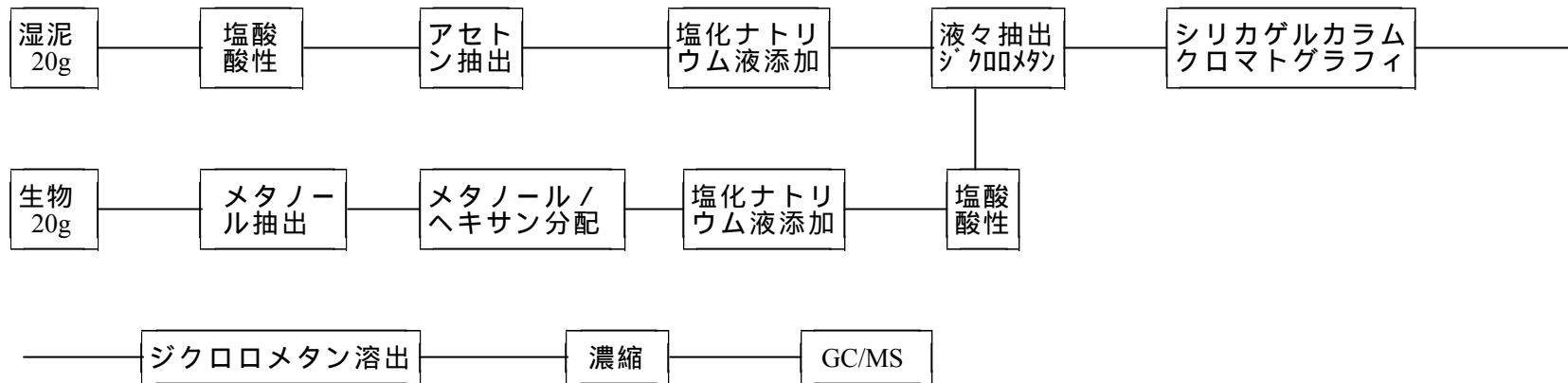
水質試料中のアルキルフェノールの分析



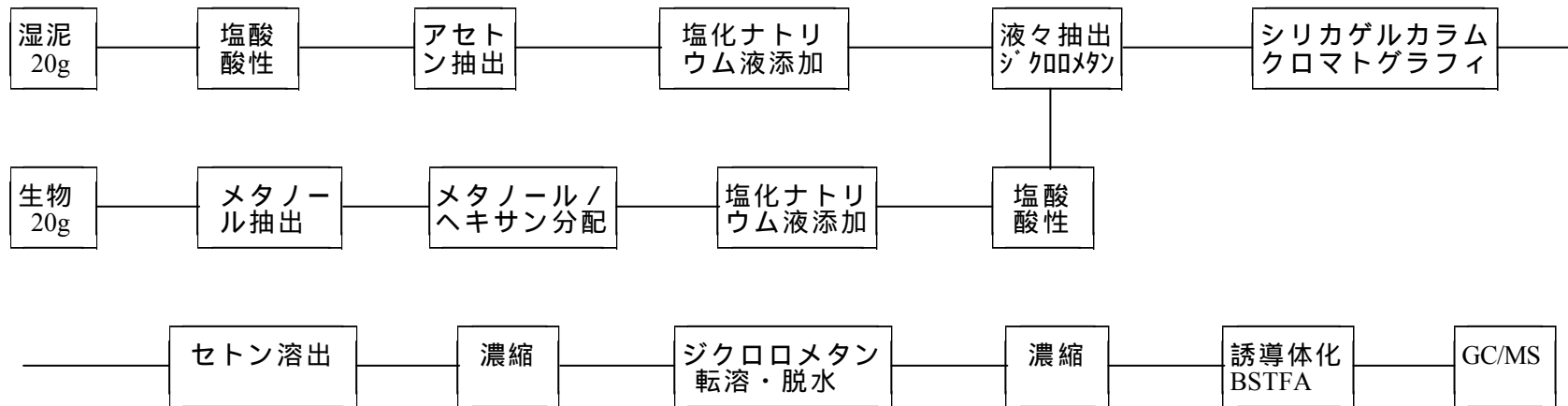
水質試料中のビスフェノール A、クロロフェノールの分析



底質・生物試料中のアルキルフェノールの分析



底質・生物試料中のビスフェノールA、クロロフェノール類の分析



・参考法：アルキルフェノール類とビスフェノールAの分析法（エチル誘導体化法）

1．対象物質

4-t-ブチルフェノール、4-n-ペンチルフェノール、4-n-ヘキシルフェノール、4-n-ヘプチルフェノール、4-t-オクチルフェノール、4-n-オクチルフェノール、ノニルフェノール、ビスフェノール-A

2．目標検出限界値

水質試料では 0.01 μ g/l（ノニルフェノールのみ 0.1 μ g/l）、底質及び生物試料で 1.0 μ g/kg（ノニルフェノールのみ 10 μ g/kg）である。

本法による分析で、標準液（誘導体化したもの）の注入から S/N=3 を検出限界とし、各試料の推定検出限界値を表 - 1 に示した（注 1）。

表 - 1 検出限界推定値

	水質（ μ g/l）	底質・生物試料（ μ g/kg）
4-t-ブチルフェノール	0.005	0.5
4-n-ペンチルフェノール	0.01	1.0
4-n-ヘキシルフェノール	0.01	1.0
4-t-オクチルフェノール	0.003	0.3
4-n-ヘプチルフェノール	0.01	1.0
4-n-オクチルフェノール	0.01	1.0
ノニルフェノール	0.03	3.0
ビスフェノール-A	0.002	0.2

水質試料は 1 l を、底質及び生物試料は 10 g を分析した場合である。

3．分析法概要

水質試料は固相カートリッジに通水捕集後、酢酸メチルで溶出し、濃縮、ヘキサンに転溶する。無水硫酸ナトリウムで脱水し乾固する。KOH 存在下ジエチル硫酸でエチル化をおこない、内標準含有のヘキサン溶液で抽出し、脱水後 GC/MS-SIM で定量する。

底質及び生物試料はメタノール抽出し、メタノール飽和ヘキサンで洗浄する。塩化ナトリウム水溶液で希釈し、ジクロロメタンで抽出する。ジクロロメタン層を水洗し、脱水後濃縮乾固し、以下水質試料と同様にエチル化を行い、フロリジルカートリッジカラムによりクリンアップを行い、濃縮し GC/MS-SIM で定量する。

本法は、極性の大きなフェノール類を物理化学的に安定で、極性の小さいフェネトール体に誘導化した後、ケン化処理を行う。この処理手順によって生体成分との分離に絶大な威力を発揮する（注2）。

4．試薬・器具

（1）試薬

- ・対象物質：市販標準試薬
- ・内標準物質：(アセナフテン - d₁₀、フェナンスレン - d₁₀)市販標準試薬
- ・ジクロロメタン、アセトン、n-ヘキサン、メタノール、エタノール：残留農薬分析用
- ・酢酸メチル、ジエチル硫酸：試薬1級
- ・水酸化カリウム：試薬特級
- ・無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留農薬分析用
- ・水：市販ミネラルウォーター
- ・固相カートリッジ（捕集用）：ここではウォーターズ社製 Sep-Pak Plus PS-2 を使用したが、同性能であれば他の製品でも良い。またディスク型でも良い。
- ・固相カートリッジ（クリンアップ用）：ここではウォーターズ社製 Sep-Pak[®] Cartridges Florisil[®] を使用したが、同等品であれば他の製品でも良い。

（2）器具及び装置

- ・KD濃縮器
- ・ホモジナイザー（生物試料の抽出に用いる。）
- ・超音波洗浄器（底質試料の抽出に用いる。）
- ・遠心分離器
- ・分液ロート
- ・KD濃縮管（10ml 標線付き）
- ・小ロート
- ・湯浴

5．試験操作

（1）前処理法

（ア）水質試料

試料水 1 l（注3）を捕集用固相カートリッジ（注4）に通水する（注5）。通水終了後、カートリッジにシリンジを接続して軽く空気を送り込み間隙水を取り除く（注6）。酢酸メチル 4ml で溶出し、10ml 容KD濃縮管に受ける（注7）。濃縮管をヘヤードライヤー等で軽く加熱しながらチソガスを吹き付け（注8）。水層の上にわずかに酢酸メチル層が残る

程度まで濃縮する。これにヘキサン 5ml を入れ、栓をして振り混ぜる。別に、10ml 容 K D 濃縮管に小ロートをセットし、軽く綿栓をし、この上に無水硫酸ナトリウム約 7 g を乗せておく。振り混ぜた含水ヘキサン溶液をこの無水硫酸ナトリウム上に入れ、さらに容器をヘキサン 3ml で洗浄し、これも無水硫酸ナトリウム上に入れて合わせる。K D 濃縮管に得られたヘキサン溶液にチッソガスを吹き付けて乾固する（注 9）。

（イ）底質試料

湿泥 10g を 100ml 容ビーカーにとり、メタノール 30ml を加え、スパーテルでかき混ぜてよく混合し、超音波洗浄器を用いて 10 分間抽出を行う。3000rpm で 10 分間遠心分離を行い上澄み液を 100ml 容分液ロートにとる。この操作をもう一度繰り返し、上澄み液を合わせる。これにメタノール飽和ヘキサン 20ml を加えて振とうし、静置する。メタノール層を、あらかじめ 5% 塩化ナトリウム水溶液 200ml を入れた分液ロートに入れ、ジクロロメタン 50ml を加えて振とう抽出を行う。ジクロロメタン 50ml による抽出をもう一度繰り返し、抽出液を合わせる。この抽出液に水 50ml を加えて振とうし、水洗を行う。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、K D 濃縮器で 5 ml 程度まで濃縮し、チッソガスを吹き付けて乾固する。

（ウ）生物試料

試料 10g を 100ml 容ビーカーにとりメタノール 30ml を加え約 10 分間ホモジナイザーで抽出する。遠心管に移し替え、3000rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄み液を 100ml 容分液ロートにとる。この抽出操作をもう一度行い、上澄み液を合わせる。以下底質試料と同じ処理を行う（注 10）。

（2）試料液の調整

誘導体化及びケン化処理：

乾固した試料に 1N-KOH エタノール溶液 0.5ml を加え（注 11）次いでジエチル硫酸 0.2ml を加え（注 12）室温で 10 分間放置する。これに 1N-KOH エタノール溶液を 5ml の標線まで加え、栓をして 70 °C の湯浴に 1 時間放置する（注 13）。

抽出及びクリンアップ：

室温に戻した試料に 8ml の標線まで水を加え、よく振り混ぜて固形物を溶解させる（注 14）。これに内標準溶液（各 0.5 μ g/ml ヘキサン溶液）1.0ml を加え栓をして激しく振り混ぜて静置する（注 15）。あらかじめ 10ml K D 濃縮管に小ロートをセットし、軽く綿栓をした上に約 3 g の無水硫酸ナトリウムを乗せておく。パスツールピペットを用いてヘキサン層の約 0.7ml をとり、無水硫酸ナトリウムの上にしみ込ませ、ヘキサン 3ml で溶出させる（注 16）。このものをチッソ気流下で乾固し、4%エーテル/ヘキサン 1ml を加えて溶解させる。この溶液を、あらかじめ 4%エーテル/ヘキサン 10ml で洗浄したフロリジ

ルカートリッジに負荷し、4%エーテル/ヘキサンで展開させ、最初からの溶出液 8ml を採取する（注 17）。これをチツソ気流下で 0.5ml まで濃縮し試料処理液とする。

（ 3 ）空試験液の調製

試料を用いずに「前処理法」ならびに「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。空試験から対象物質が検出された場合は、空試験値を差し引いて検出値とする。

（ 4 ）添加回収試験液の調製

水質試料 1 l、底質及び生物試料 10g に対象物質各 1 μ g（ノニルフェノールは 10 μ g）を添加し、十分に混合した後、「前処理法」ならびに「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

（ 5 ）標準液の調製

各対象物質の 100 μ g/ml（ノニルフェノールは 1000 μ g/ml）アセトン溶液を調製する（注 18）。これを適宜アセトンで希釈して所定の標準混合液を作製する。検量線作成時は、1.0 μ g/ml（ノニルフェノールは 10 μ g/ml）を使用する（注 19）。

（ 6 ）測定

（ア）GC / MS 測定条件

（a）GC

- ・カラム：溶融シリカキャピラリーカラム（25m × 0.32mm I.D., d=0.52 μ m）
- ・液相：5%フェニルメチルシリコン
- ・カラム温度：60（1分）- 15 /分 - 280（5分）
- ・注入口温度：250
- ・注入法：スプリットレス法（1.5分後ページ）、1 μ l 注入
- ・キャリアガス：He カラムヘッド圧 7.5psi
- ・インレット温度：250

（b）MS

- ・イオン化法：EI
- ・イオン化電圧：70eV
- ・イオン源温度：250
- ・イオン化電流：300 μ A
- ・検出モード：SIM

（c）定量イオン

対象物質及び内標準物質の定量イオンと確認イオンを表 - 2 に示す。

表 - 2 対象物質及び内標準物質の測定イオン

化合物名	測定イオン	
	定量用	確認用
4-t-ブチルフェノール	163	178
4-n-ヘキシルフェノール	192	135
4-n-オキシルフェノール	206	135
4-t-オクチルフェノール	163	135
4-n-ヘプタフルフェノール	135	220
4-n-オクチルフェノール	234	135
ノニルフェノール	177	163
ビスフェノール-A	269	284
アセナフテン - d ₁₀	164	
フェナンスン - d ₁₀	188	
フルオランテン - d ₁₀	212	

4-t-ブチルフェノール、4-n-ヘキシルフェノール、4-n-オキシルフェノール、4-t-オクチルフェノールはアセナフテン - d₁₀ を、4-n-ヘプタフルフェノール、4-n-オクチルフェノール、ノニルフェノールはフェナンスン - d₁₀ を、ビスフェノールA はフルオランテン - d₁₀ を内標準として定量する。

(イ) 検量線

標準混合液（各 1.0 μg/ml、ノニルフェノールは 10 μg/ml アセトン溶液）を 0 ~ 1.0ml の範囲で段階的に 10ml 容 KD 濃縮管にとり、チッソ気流で乾固する。1N-KOH エタノール溶液 0.5ml を加え、さらにジエチル硫酸 0.2ml を加え室温に 10 分間放置する。これに、1N-KOH エタノール溶液を 5ml 標線まで加え、次いで水を 8ml 標線まで加え、栓をし振り混ぜて固形物を溶解させる。内標準溶液（各 0.5 μg/ml ヘキサン溶液）1.0ml を加え、栓をして激しく振り混ぜる。静置後、パスツールピペットでヘキサン層の約 0.7ml をとり、少量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、この 1 μl を GC/MS に注入し、各対象物質（エチル化物）と内標準とのピーク面積比から検量線を作成する。この検量線用試料液は一度作成すると何度でも使用できる（注 20）。

(ウ) 試料の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収試験液を注入し測定を行う。一定時間毎に検量線用の中間濃度の試料液を注入し、期待値の 15%以内の変動であることを確

認する。もし、15%を越えていれば GC/MS を再調製後、検量線を作成し直して測定を再開する。

6 . 同定、定量及び計算

(ア) 同定

対象物質（エチル化物）の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間と ± 5 秒以内に出現し、確認イオンと定量イオンのピーク強度比が予想値と ± 20%以内の差で合っ
ておれば、物質が存在していると見なす。

(イ) 定量

得られた各対象物質と内標準とのピーク面積比から検量線により検出量を求める。次に
検出量、分析した試料量などから次式により試料中の対象物質の濃度を計算する。

$$\text{水質試料濃度 (} \mu \text{ g/l)} = \text{検出量 (ng)} \times \frac{1}{\text{試料量 (ml)}}$$
$$\text{底質・生物中濃度 (} \mu \text{ g/g)} = \text{検出量 (ng)} \times \frac{1}{\text{試料量 (g)}} \times \frac{1}{1000}$$

7 . 分析精度管理

別に定める分析精度管理の操作手順に従って、分析精度を管理する。

注解

(注1) 表 - 1 に示した検出限界推定値 (JEOL DX-303 で測定) よりもさらに検出限界
を、わずかに処理操作を変更することにより 1 オーダー下げることができる。以下のとう
りに操作する。

誘導体化後、加える内標準液の濃度を 1/10 (0.05 μ g/ml) とし、3ml 加えて激しく振り
混ぜ、静置後約 2.7ml を採取し、フロリジルカートリッジでのクリンアップ後 0.1ml まで
濃縮して試料処理液とする。操作的にはやや手間がかかるが、検出限界を約 1/10 に下げる
ことができる。

検量線作成用の試料作製も同様の操作を行う。検量線用試料液もクリンアップを行う。
(注2) 2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノールも本法により 10 分以内にエ
チル化が完了し、フロリジルカートリッジでの溶出もほとんど同じで本法での同時分析が
できる。

TMS 化物はケン化処理により分解するため本手法のための誘導体化には使用できなかった。また、メチル化は環境中にメチル化物が僅かながらも存在するため採用しなかった。

(注3) SS が多量にあり通水が出来ない試料については濾過しておく。(濾過操作については共通事項に従う) また環境試料は通常中性であり、必ずしも酸性にする必要はなく、中性でも捕集できる。酸性にすることにより通水しやすくなるメリットはある。

(注4) カートリッジはあらかじめアセトン 10ml で洗浄し、水 10ml を通水してコンディショニングしておく。

(注5) 捕集率は通水速度にほとんど影響されない。ここでは 20ml/min で加圧型コンセントレーターを用いて通水した。

(注6) アスピレーター吸引による脱水は行ってはならない。アルキルフェノール類は酸化されやすいので回収率が低下する。

(注7) 約 0.3ml 程度の水層が下層にできている。

(注8) チッソガスのラインに約 1 m 程度の活性炭パイプをつけておくとボンベからの汚染防止に効果的である。

(注9) 乾固する操作はやりすぎると気散によるロスをまねくので、溶媒等がわずかに残る程度にとどめる。

(注10) 生体試料の場合、ジクロロメタン溶液を水洗するとき、絶対に振とうしてはいけない。エマルジョンを生成して分離しなくなる。分液ロートを軽く回転させるようにして水面とジクロロメタン面が緩やかに接触するように操作する。

(注11) IN KOH エタノール溶液を加えてから、KD 濃縮管を軽く振り、チッソ気流で乾固したときに濃縮管内面に付着している試料にもよく接触させるようにする。

(注12) ジエチル硫酸を加えたらすぐに軽くふりまぜる。しばらくすると硫酸カリウム生成により固化するから。また、ジエチル硫酸はアルキル化剤であり有害であるので皮膚への接触には注意する。皮膚に付いたときは直ちに石鹼でよく洗う。(ジメチル硫酸よりは有害性は小さい)

(注13) ケン化処理である。この操作によりフェネトール体と極性の似かよったエステル類を加水分解し、あとのフロリジルカートリッジによるクリンアップを効果的なものにする。検量線用試料液作製ではこの操作は不要である。

(注14) 固形物が溶解しにくいときはスパーテルで軽くつついて壊すと簡単に溶解する。

(注15) この段階で内標準を入れる。フェネトール体と内標準物質とは物理化学的な性質がにっており、液々分配及びフロリジルカラムでの挙動もほとんど同じであるので、操作途中で添加しサロゲートの役割を持たせる。

(注16) すでに内標準を加えサロゲートの性格を持たせてあるので、ヘキサン層の全量を採取する必要はない。

(注17) 使用するフロリジルカートリッジは、事前に溶出パターンをチェックしておく。通常実試料の場合は標準液の場合より早く溶出するので、標準液での溶出液量を採取すればよい。また、開封したカートリッジは必ずシリカゲルの入ったデシケーター内に保存する。

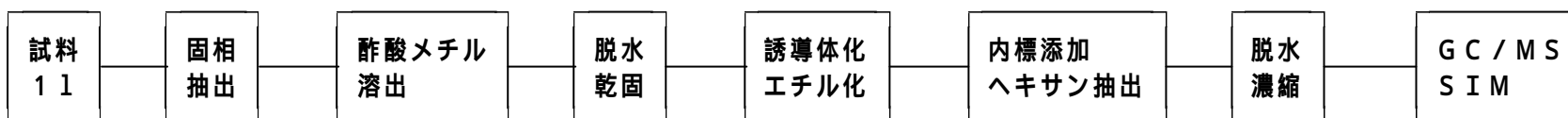
(注18) ノニルフェノールは多くの異性体混合物であるので他の物質の10倍濃度とする。また、通常環境中には他の物質よりも存在量が多いので、10倍濃度とした方が好都合である。

(注19) 検出限界を10倍下げる方法を採用する場合は、標準混合溶液の濃度も1/10とする。

(注20) フェネトール体は原体のフェノールよりも安定であり、検量線用標準液は測定のため毎に作製する必要はない。冷蔵庫内に保管すれば半永久的に使用できる。

参考法：アルキルフェノール類及びビスフェノール - A の分析法（エチル誘導体化法）

水質試料の分析



底質・生物試料の分析

