

VI . ベンゾ[a]ピレン、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、 スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体の分析法

1 対象物質

ベンゾ[a]ピレン (BaP)、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体

2 目標検出下限値

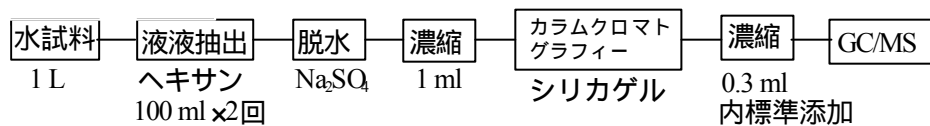
本分析法の目標検出下限は、水質試料は0.01 µg/L、底質及び生物質では 1 µg/kg である。

3 分析法の概要

水質試料中の対象物質は、ヘキサンで液液抽出し、必要に応じてシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーでクリーンアップし、濃縮後、GC/MS-SIMで定量する (注 1~ 3)。

底質及び生物試料中の対象物質のうち、BaP は、アルカリ分解後、ヘキサンで液液抽出する。シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーでクリーンアップし、濃縮後、GC/MS-SIMで定量する。ベンゾフェノン及び 4-ニトロトルエンは、アセトンで固液抽出 (生物試料のみ) 後、水蒸気蒸留し、ヘキサンで液液抽出する (注 4)。シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーでクリーンアップし、濃縮後、GC/MS-SIMで定量する。スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体は、底質試料についてはアセトンで抽出後、アセトン層に塩化ナトリウム水溶液を加え、ヘキサンで液液抽出する。シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーでクリーンアップし、濃縮後、GC/MS-SIMで定量する。生物試料については、アセトニトリルで抽出し、アセトニトリル・ヘキサン分配を行った後、アセトニトリル層に水を加えヘキサンで抽出する。シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーでクリーンアップし、濃縮後、GC/MS-SIMで定量する (注 5)。

水試料

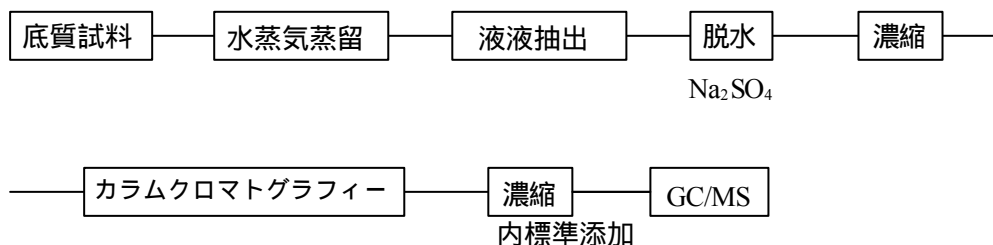


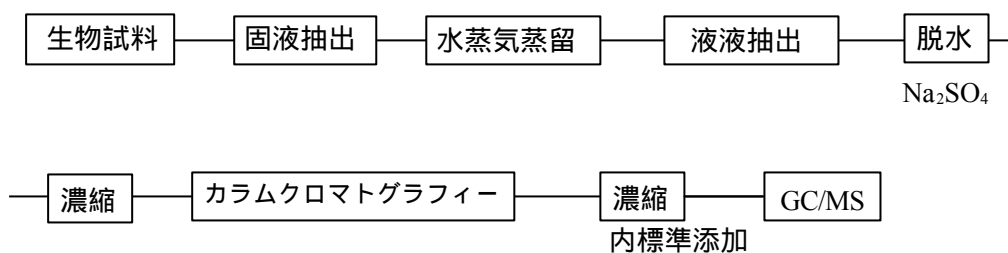
底質及び生物試料

BaP

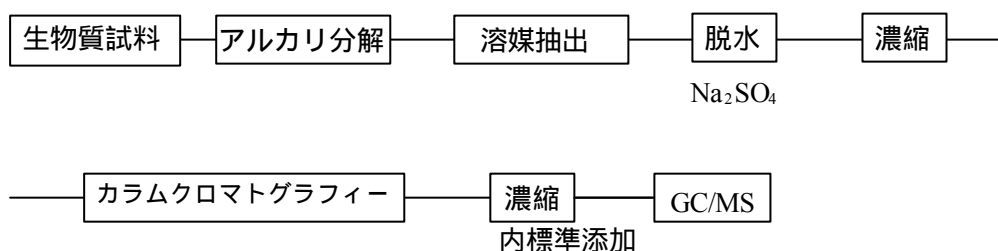
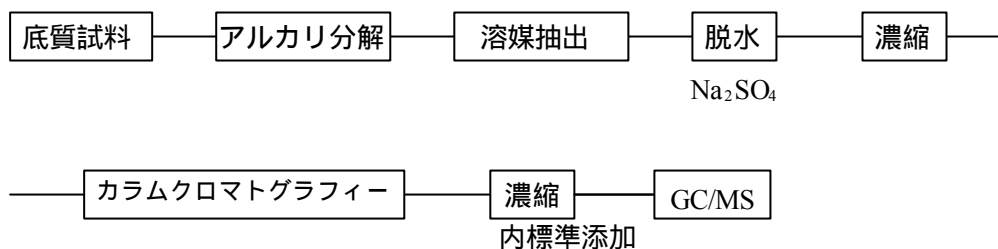
有機塩素系農薬の分析法、又はスチレン 2 量体及びスチレン 3 量体の前処理参照。

ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン





スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体



4 試薬・器具・装置

(1) 試薬

- ・ヘキサン、アセトン、残留農薬分析用またはこれと同等以上のもの (注 6)。
- ・塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム：残留農薬分析用またはこれと同等以上のもの (注 7)。
- ・BaP：市販の標準品 (注 8)。
- ・ベンゾフェノン及び 4-ニトロトルエン：市販の標準品。
- ・スチレン 2 量体：以下に示すもの (注9)。
 - 1,3-ジフェニルプロパン (DPP)、*cis*-1,2-ジフェニルシクロブタン (*cis*-DPCB)、*trans*-1,2-ジフェニルシクロブタン (*trans*-DPCB)、2,4-ジフェニル-1-ブテン(DPB)。
- ・スチレン 3 量体：以下に示すもの (注10)。
 - 2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン (TPH)、1-フェニル-4-(1'-フェニルエチル)テトラリン類 (PPET; 4種の異性体がある)、1,3,5-トリフェニルシクロヘキサン(TPCH)。
- ・内標準物質、サロゲート物質：BaP-d12、ベンゾフェノン-d10、フルオランテン-d10、ニトロベンゼン-d5、1,2-ジフェニルエタン-d14、クリセンd12(注11)。
- ・標準原液：標準物質 100 mg を各々別の 100 ml メスフラスコに精秤し、BaPにはアセトンを、その他の物質には ヘキサンを加えて正確に 100 ml とし、これを1000 µg/ml の標準原液とする。各標準原液 10 ml を 100 ml メスフラスコに正確にとり、ヘキサンで 100 ml とし、これを標準混合原液とする。標準混合原液は 1 ml 中に各標準物質 100 µg を含む (注12)。
- ・内標準溶液：各内標準物質 100 mg を各々別の 100 ml メスフラスコに精秤し、BaP-d12 にはアセトンを、その他の物質には ヘキサンを加えて正確に 100 ml とし、これを 1000 µg/ml の

内標準原液とする。各内標準原液 10 ml を 100 ml メスフラスコに正確にとり、ヘキサンで 100 ml とし、これを内標準溶液とする。内標準溶液は 1 ml 中に各内標準物質 100 μg を含む。

- ・シリカゲルカラム：市販の大容量シリカカートリッジ（注13）またはコック付きガラス製カラム（内径 1 cm、長さ 30 cm）に、5% 含水シリカゲル（注14）5 g 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 2 cm 積層したもの。使用前に、ヘキサン 10 ml を通して洗浄する。
- ・還元銅カラム：ロート（足外形 7 mm）の足にガラスウールを詰め、還元銅（有機元素分析用還元銅、60～80メッシュ）を2cm充填する。還元銅は、窒素ガス中で保存し、使用直前に使用する溶媒で洗浄する。
- ・水：対象対象及びその妨害物質を含まないもの（注15）。
- ・5% NaCl水溶液：水に5%(W/V)となるように塩化ナトリウムを加えて溶解させた後、ヘキサンで洗浄したもの。
- ・1 M 水酸化カリウムエタノール溶液：水酸化カリウム 28.1 g を少量の水に完全に溶かし、エタノールで 500 ml としたもの。

(2) 器具・装置

- ・試料採取容器：水質試料用は、ガラス製共栓付き褐色ガラス瓶（容量 1L）、又は、四フッ化エチレン樹脂張りシリコンゴム栓付きスクリュウキャップ用ネジ口褐色ガラス瓶（容量 1L）又はこれと同等以上のもの。底質試料用はガラス製共栓付き褐色広口ガラス瓶（容量 100～300 ml）、又は、四フッ化エチレン樹脂張りシリコンゴム栓付きスクリュウキャップ用ネジ口褐色広口ガラス瓶（容量 100～300 ml）又はこれと同等以上のもの。洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。アセトン及びヘキサンで洗浄し、乾燥する。キャップを強くしめ、汚染のない場所に保管する。
- ・水蒸気蒸留装置：洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。アセトン及びヘキサンで洗浄し、乾燥する。
- ・ガラス器具：洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。アセトン及びヘキサンで洗浄し、乾燥する。
- ・ロータリーエバポレーター（水浴付）または KD濃縮装置。
- ・振とう器
- ・超音波抽出装置
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー、超高速万能ホモジナイザー、攪拌分散器、又は同等品
- ・GC/MS：キャピラリーカラム取付可能なGC付き四重極型、または二重収束型MS。

5 分析操作（注16）

(1) 試料採取

(ア) 水質試料

試料採取容器を採取試料で数回共洗いしてから、試料を泡立たないように静かに採取容器に満たし、直ちにキャップをする。このとき、瓶内に空気層を残さないよう注意する。試料は遮光して運搬する。試験操作は試料採取後直ちに行う。直ちに行えない場合は、汚染のない冷暗所（4 以下）で凍結しないように保存する。

(イ) 底質試料

試料を採取容器に 8 割程度採り、キャップをする。試料は遮光して運搬する。試験操作は試料採取後直ちに行う。直ちに行えない場合は、汚染のない冷暗所で凍結保存する。

(2) 試験操作

(ア) 水質試料の前処理

試料 1 L を 2 L 分液ロートに取り（注17）、塩化ナトリウム 50 g を加えて充分混合し溶解させた後、ヘキサン 100 mlを加えて5分間振とう抽出し、静置してヘキサン層を分取する。再び水層に

ヘキサン 100 mlを加えて、同様な抽出操作を繰り返す。ヘキサン層を合わせ、5% NaCl水溶液 50 mlを加えて5分間振とうし、水層を捨てる。この操作を再度行う。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ナス型フラスコに入れてKD濃縮装置またはロータリーエバポレーターを用いて約 5 ml まで濃縮する (注18)。さらに、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付け 1 ml とし、前処理液とする (注19)。

(イ) 底質試料の前処理

(a) BaP

有機塩素系農薬の分析法、又はスチレン 2 量体及びスチレン 3 量体の前処理参照。

(b) ベンゾフェノン及び 4-ニトロトルエン

試料 20 g を1 L 丸底フラスコにとり (注20)、所定量のサロゲート物質 (注 2) を添加して混合した後、水蒸気蒸留を行い、流出液 200 ml を採取する。流出液に塩化ナトリウム 10 g を加えて溶かした後、ヘキサン 20 ml を加え 10 分間振とう抽出する (注21)。水層は別のヘキサン 20 ml を用いて10 分間振とう抽出する (注22)。ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、KD濃縮装置またはロータリーエバポレーターを用いて約 5 ml まで濃縮し、さらに、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付け 1 ml とし、前処理液とする。

(c) スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体 (注23)

試料 20 g (乾重量) を 200 ml のナスフラスコにとり、所定量のサロゲート物質 (注 2) を添加してスパーテルで十分混合する。これに 1 M 水酸化カリウムエタノール溶液 100 ml を加え、冷却管を付けて沸騰水中で 1 時間程度加熱環流する。冷却後、その内容物を 100 ml 共栓付き遠沈管に移し入れ、3000 rpm で10分間遠心分離し、上澄みをあらかじめ 5 % 塩化ナトリウム溶液 400 ml を入れた 1 L 分液ロートに加える。これにヘキサン 100 ml を加え 5 分間振とう抽出する。水層は別のヘキサン 100 ml を用いて抽出する。ヘキサン層を合わせて、5 % 塩化ナトリウム溶液 50 ml で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、KD濃縮装置またはロータリーエバポレーター (注 18)を用いて約 5 ml まで濃縮し、さらに、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付け 1 ml とし、前処理液とする。

(ウ) 生物試料の前処理

(a) BaP

有機塩素系農薬の分析法、又はスチレン 2 量体及びスチレン 3 量体の前処理参照。

(b) ベンゾフェノン及び 4-ニトロトルエン

試料 20 g を100mlの共栓付遠沈管にとり、所定量のサロゲート物質 (注 2) を添加して混合した後、アセトン 50 mlを加え、5 分間ホモジナイザーで攪拌抽出する。3000 rpm で10分間遠心分離し、上澄みを回収する。残さにアセトン 50 mlを加え、この抽出分離操作をさらに行う。アセトン層を合わせ、1 L 丸底フラスコに入れ、水蒸気蒸留を行い、流出液 300 ml を採取する (注21, 24)。流出液に塩化ナトリウム 10 g を加えて溶かした後、ヘキサン 20 ml を加え、10 分間振とう抽出する。水層は別のヘキサン 20 ml を用いて10 分間振とう抽出する (注22)。ヘキサン層を合わせ、水 10 ml で洗浄後 (注25)、無水硫酸ナトリウムで脱水後、KD濃縮装置またはロータリーエバポレーターを用いて約 5 ml まで濃縮し、さらに、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付け 1 ml とし、前処理液とする。

(c) スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体 (注23)

底質試料の前処理参照。

(工) 測定用試料液の調製 (注 5)

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。少量のヘキサ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 20 ml を流し、溶出液は捨てる。次に、アセトン - ヘキサン (5:95 V/V) 100 ml を流す (注26、27)。得られた溶出液をナス型フラスコで受け、KD濃縮装置またはロータリーエバポレーターを用いて約 5 ml まで濃縮する。得られた溶液を褐色目盛付試験管に移し、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付けて 0.3 ml とし、内標準物質を各 10 µl 添加し測定用試料液とする。

測定用試料液 1 µL を GC/MS に注入する。内標準物質と対象物質の面積比を求め、試料中の対象物質の濃度を内標準法で求める (注28)。

(3) 空試料液の調製

試料と同量の精製水を用いて、「試験操作」に従って試料と同様の処理をして得た試料液を空試料液とする。

(4) 標準液の調製

標準混合原液を順次ヘキサンで希釈し、0.1 ~ 5 µg/ml 程度の濃度の標準溶液を作製する。

(5) 測定

(ア) GC/MS 条件の例 (注29)

(a) GC

- ・カラム：50%フェニルメチルシリコン化学結合型 (内径 0.2~0.75 mm、長さ 15~30 m、膜厚 0.1~3.0 µm 程度) カラムまたは同等以上の分離性能をもつもの (注30~32)
- ・カラム温度：50 (1分) 20 /分 300 (30分)
- ・注入口温度：250
- ・キャリアガス：ヘリウム (線速度 40 cm / 秒)
- ・注入法：スプリットレス (1分後パージ)

(b) MS

- ・イオン化法:EI
- ・イオン化エネルギー：70eV
- ・イオン化電流：300 µA
- ・イオン源温度：230

(c) 定量イオン (注33、34)

- ・BaP：252 (250)
- ・ベンゾフェノン：105 (182)
- ・4-ニトロトルエン：137 (91)
- ・スチレン 2 量体 DPP：92(196)、*cis*-DPCB、*trans*-DPCB：104 (208)、DPB：91 (208)
- ・スチレン 3 量体 TPH：91 (207)、PPET：129 (207)、TPCH：104 (208)
- ・BaP-d₁₂：264
- ・フルオランテン-d₁₀：188
- ・ベンゾフェノン-d₁₀：192
- ・ニトロベンゼン-d₅：128
- ・1,2-ジフェニルエタン-d₁₄：196
- ・クリセン-d₁₂：240

() のイオンは確認用に用いる。

(6) 検量線

各標準液 0.3 ml に内標準溶液 10 µl を添加し、その 1 µl を GC/MS に注入する。内標準物質と対象物

質の面積比を求め、検量線を作製する (注26、34)。

(7) 計算

次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{濃度} (\mu\text{g/L}) = \text{検出量} (\text{ng}) \times \text{測定用試料液量} (\text{ml}) / \text{注入量} (\mu\text{l}) / \text{試料量} (\text{L})$$

注意事項

注 1) 適当なモニターイオンを用いてGC/MS測定すれば、本法の操作により、ピレン、フルオランテン、ベンゾ[a]アントラセン、ベンゾ[e]ピレン等の多環芳香族炭化水素、2-ニトロトルエン、3-ニトロトルエン等の分析が可能である。

GC/MS測定において、十分な感度が得られればSIM測定の代わりにスキャン測定でもよい。

注 2) サロゲート物質は、全操作を通しての回収率を確認するために用いる。表 - 1 の中から必要な物質を選定し、GC/MSの感度に応じて適量を添加する。サロゲート物質の選定にあたり、対象物質の構造により近い物質が入手可能であれば、それを用いることが望ましい。

表 - 1 サロゲート物質の例

対象物質	サロゲート物質
BaP	BaP-d12
ベンゾフェノン	ベンゾフェノン-d10
4-ニトロトルエン	ニトロベンゼン-d5
スチレン 2 量体	1,2-ジフェニルエタン-d14
スチレン 3 量体	同 上

注 3) 液液抽出の代わりに、オクタデシル基 (ODS)を化学結合したシリカゲル、ポリマーゲル、またはこれと同等の性能を有する基材を充填または成型した固相カラム、固相ディスク等を使用した固液抽出を用いることができる。この場合は、濃縮可能な試料量、固相からの溶出に用いる溶媒の種類、量等の条件を十分検討し、液液抽出に相当する回収結果が得られることを確認しておく。浮遊物が多い試料では、ガラス繊維ろ紙 (保留粒子径 1 μm程度のもので、あらかじめアセトン等の溶媒で洗浄するか、450 程度で焼成し、妨害物質の溶出がないことを確認したもの) でろ過し、ろ液について固液抽出を行う。浮遊物はアセトン等で超音波抽出等の抽出操作を行い、得られた抽出液を 3000 rpm で10 分間遠心分離後、固相カラムの溶出液にあわせる。

注 4) 精油定量装置を用いることにより、水蒸気蒸留と液液抽出の操作を同時に行うことが可能である。

注 5) シリカゲルカラムクロマトグラフィーの代わりにフロリジルカラムクロマトグラフィーを用いてもよい。また、両者を併用しても良い。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溶出液の種類とその量を求めておく。

フロリジルカラムの作成は以下のように行う。

フロリジル：フロリジル PR (60 ~ 100 メッシュ) 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、シリカゲルを入れたデシケータ中で室温まで冷却し、密栓して保存する (備考1)。

フロリジルカラム：市販の大容量シリカカートリッジ (メガボンドエリート FL、LC-Florigil 等で充填量が 5 ~ 10 g程度のも) またはコック付きガラス製カラム (内径 1 cm、

- 長さ 30 cm) に、フロリジル 7 g 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 2 cm 積層したもの (備考 1)。
- 注 6) いずれも使用前に空試験を行い使用の適否を確認すること。
- 注 7) 妨害が認められる場合は、250 ~ 450 で 8 時間程度加熱後、汚染のない場所で冷却して用いる。
- 注 8) 市販の標準溶液を用いても良い。BaP は分解されやすいので保管に留意する。
- 注 9) 不安定なものが多いと考えられるので試薬の保管条件を厳守するなど、保管に留意すること。
- 注 10) 不安定なものが多いと考えられるので試薬の保管条件を厳守するなど、保管に留意すること。
- 注 11) ナフタレン-d₈、フルオレン-d₁₀、フェナントレン-d₁₀、*p*-ターフェニル-d₁₄、ヘキサクロロベンゼン-¹³C₆ (HCB-¹³C₆) 等を用いてもよい。
- 注 12) スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体は溶液中で不安定なものがあるので、長期の保存はさける。保存した標準原液は、純度を確認してから使用する。
- 注 13) 例えばメガボンドエリート SI (5 g)、LC-Si (5 g) 等 (備考 1)。
- 注 14) 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、例えばワコーゲル C-200 (備考 1)、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。シリカゲルをかくはんしながら、シリカゲル 95 g に対して精製水 5 ml 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 15 時間以上放置する。
- 注 15) 蒸留水や逆浸透膜により精製した水をさらに炭素系吸着剤を充填したカラムや紫外線照射等より精製したもの等。必要に応じて ヘキサンで洗浄する。いずれも使用前に空試験を行い、使用の適否を確認すること。
- 注 16) BaP は水溶液や有機溶媒中で光分解される。そのため、試料液及び標準溶液は、保存中遮光しておくとともに、試験操作においても遮光に配慮する必要がある。
スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体は不安定なものがあるので、速やかに分析する。
- 注 17) 浮遊物が多い試料では、ガラス繊維ろ紙 (注 3 に示すもの) でろ過する。浮遊物はアセトン等で超音波抽出等の抽出操作を行い、得られた抽出液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離後、ろ液に合わせ、液液抽出操作を行う。
- 注 18) ロータリーエバポレーターを用いて濃縮する場合、湯浴温度は 30 以下とする。
- 注 19) 以下のカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ操作を必要としない試料の場合は、得られた溶液を褐色目盛付試験管に移し、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付けて 0.3 ml とし、内標準物質を各 10 µl 添加し測定用試料液とする。
- 注 20) 30 ml 程度の水で試料をよく分散させながらフラスコに入れる。
- 注 21) 対象物質の揮散による損失を防ぐため、流出口が受器の底部に来るようにするとともに、受器を氷水等で冷却する。
- 注 22) 精油定量装置を用いる場合は、試料 20 g を 500 ml 丸底フラスコ又はナスフラスコにとり、所定量のサロゲート物質 (注 1b) 及び硫酸銅 5 g を添加して混合した後、精油定量装置に接続する。精油定量装置に水及び ヘキサン 5 ~ 10 ml を加え、90 分間加熱蒸留を行う。冷却後、ヘキサン層を分取し、精油定量装置を少量の ヘキサンで洗浄する。洗浄液を分取したヘキサン層に合わせ、以下の操作を行う。
- 注 23) この方法で BaP を同時に分析することができる。
- 注 24) 最初にアセトンが約 100 ml 留出するので、300 ml を採取する。
- 注 25) 残存するアセトンを除去するために行う。
- 注 26) 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 - ヘキサン

(5:95 V/V) の量を求めておく。

- 注27) 底質試料で、単体硫黄が溶出しGC/MS測定の妨害となる場合は、還元銅カラムに通して硫黄を除去する。
- 注28) サロゲート物質を用いた場合は、内標準物質のかわりにサロゲート物質を用いて定量を行い、内標準物質はサロゲート物質の回収率の確認に用いる。
- 注29) GCの注入口セプタムからゴーストが出現することがある。その場合には、セプタムをGCに装着後、270 で一夜程度パージしてから使用する。
- 注30) 例えば DB-17、TC-17、HP-50+、SPB-50 等 (備考1)。
- 注31) PET類が十分に分離しない場合は、カラムとして DB-WAX等 (備考1) を用いる。カラム温度等の条件は適宜決定する。
- 注32) PET類の分離が必要でない場合は、カラムとして DB-1、HP-1、DB-5、HP-5等を用いることができる(備考1)。カラム温度等の条件は適宜決定する。
- 注33) 注11に示した物質を内標準物質に用いる場合、ナフタレン-d₈ : 136、フルオレン-d₁₀ : 176、フェナントレン-d₁₀ : 188、*p*-ターフェニル-d₁₄ : 244、HCB-¹³C₆ : 290 等をモニターイオンとして用いる。
- 注34) 水試料では内標準物質としてBaPの定量にはBaP-d₁₂を、ベンゾフェノンにはベンゾフェノン-d₁₀を、4-ニトロトルエンにはニトロトルエン-d₅を用いる。また、スチレン2量体及び3量体には1,2-ジフェニルエタン-d₁₄を用いるとよい。底質及び生物試料ではフルオランテン-d₁₀及びクリセン-d₁₂を用いる。

備考1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これらを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

参考文献

- 1 環境庁環境保健部環境安全課：平成6年度 化学物質分析法開発調査報告書 (1995).
- 2 環境庁環境保健部保健調査室：平成2年度 化学物質分析法開発調査報告書 (1991).
- 3 環境庁環境保健部保健調査室：昭和63年度 化学物質分析法開発調査報告書 (1989).
- 4 環境庁環境保健部保健調査室：昭和55年度 化学物質分析法開発調査報告書 (1981).
- 5 EPA: Method 8270B, US EPA.
- 6 EPA: Method 525, US EPA.
- 7 河村葉子ほか：食品衛生学雑誌、**39**, 110-119 (1998).
- 8 門上希和夫：私信.