

外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル
（水質、底質、水生生物）

平成10年10月

環境庁水質保全局水質管理課

マニュアル制定に当たって

外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）による環境汚染は、科学的に未解明な点が多く残されているものの、それが生物生存の基本的条件に関わるものであり、世代を越えた深刻な影響をもたらすおそれのあることから、環境保全上の重要課題である。

また、いわゆる環境ホルモンは超微量測定を要求され、高度な測定技術等が必要な物質であるが、水質、底質、水生生物については、これまで測定方法の詳細について標準化されておらず、測定方法の確立に対する社会的要請が高かった。

本マニュアルの作成に当たっては、国立環境研究所地域環境研究グループ森田昌敏統括研究官の御指導のもと、下記の方々のご尽力により作成し、マニュアルとして取りまとめたものである。

本マニュアルにより、外因性内分泌攪乱化学物質の分析方法が標準化され、測定値の信頼性向上等に寄与し、環境保全活動の一助となれば幸いである。

平成10年10月

環境庁水質保全局水質管理課

総括	森田 昌敏	国立環境研究所地域環境研究グループ 統括研究官
	安原 昭夫	国立環境研究所地域環境研究グループ 有害廃棄物対策研究チーム総合研究官
	奥村 為男	大阪府公害監視センター調査室主任研究員
	門上 希和夫	北九州市環境科学研究所アクア研究センター水質環境係長
	彼谷 邦光	国立環境研究所化学環境部化学毒性研究室長
	川田 邦明	新潟県保健環境科学研究所水質科学科 専門研究員
	白石 寛明	国立環境研究所化学環境部計測管理研究室長
	高橋 保雄	東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科主任研究員
	福島 実	大阪市環境科学研究所生活衛生課 研究主任

目 次

・ ポリ塩化ビフェニルの分析法	- 1 ~ 16
・ 有機塩素系農薬、ポリ臭化ビフェニル及びベンゾ (a) ピレン の分析法	- 1 ~ 16
・ フェノール類の分析法		
・ アルキルフェノール類の分析法	- 1 ~ 7
・ ビスフェノール A とクロロフェノール類の分析法	- 8 ~ 16
・ 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)	- 16 ~ 25
・ フタル酸エステル類の分析法	- 1 ~ 8
・ アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの分析法	- 1 ~ 10
・ 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 3 量体の分析法	- 1 ~ 8
・ 1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、スチレン及び n-ブチルベン ゼンの分析法 (ヘッドスペース法)	- 1 ~ 5
・ 1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、スチレン及び n-ブチルベン ゼンの分析法 (パージトラップ法)	- 1 ~ 4
・ 農薬の分析法		
・ 多成分農薬分析法	- 1 ~ 6, 23
・ フェノキシ酢酸系農薬の分析法	- 7 ~ 10, 24
・ ベノミルの分析法	- 11 ~ 14, 25
・ アミトロールの分析法	- 14 ~ 18, 26
・ メソミルの分析法	- 18 ~ 22, 27
・ トリブチルスズ化合物、トリフェニルスズ化合物の分析法	- 1 ~ 7
・ エストラジオールの分析法	- 1 ~ 10

I ポリ塩化ビフェニルの分析法

1 対象物質

ポリ塩化ビフェニル(PCB)

2 目標検出限界

目標検出限界値(注1)を表1に示す。

表1 目標検出限界値(注2)

対象物質	水質 (ng/L)	底質(μg/kg, wet)	生物 (μg/kg)
塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
二塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
三塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
四塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
五塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
六塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
七塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
八塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
九塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)
十塩化ビフェニル	10 (0.01)	1 (0.001)	1 (0.001)

() は、高分解能 MS における検出限界である。

3 分析法概要

水質試料は、サロゲート物質を添加後、ヘキサンで液液抽出するか固相抽出カートリッジなどで抽出して脱水・濃縮する。次に、濃縮液をシリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップして、GC/MS-SIMで測定する。

底質試料及び生物試料は、サロゲート物質を添加後、1M KOH/エタノール溶液を用いてアルカリ分解を行い、ヘキサン抽出する。次に、ヘキサン抽出液を濃硫酸処理し、シリカゲルカラムでクリーンアップして GC/MS-SIMで測定する。

なお、定量は、サロゲート物質を内標準とした同位体希釈法を用いて各塩素数毎に行う(注3)。

4 試薬・器具

(1) 試薬

- 対象物質：市販標準混合液(例：表2に示す Wellington Laboratories の BP-WD または、表3の Wellington Laboratories の BP-MS)。または、KC-300, KC-400, KC-500, KC-600 (100mg/L 等量混合液及び 400mg/L 標準液がジーエルサイエンスから発売予定)

表2 Wellington Laboratories の BP-WD に含まれる PCB

PCB Congener	IUPAC No.
2-Chlorobiphenyl	1
4-Chlorobiphenyl	3
2,6-Dichlorobiphenyl	10
4,4'-Dichlorobiphenyl	15
2,2',6-Trichlorobiphenyl	19
3,4,4'- Trichlorobiphenyl	37
2,2',6,6'-Tetrachlorobiphenyl	54
3,3',4,4'- Tetrachlorobiphenyl	77
2,2',4,6,6'-Pentachlorobiphenyl	104
3,3',4,4',5- Pentachlorobiphenyl	126
2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl	155
3,3',4,4',5,5'- Hexachlorobiphenyl	169
2,2',3,4',5,6,6'-Heptachlorobiphenyl	188
2,2',3,4,4',5,5'- Heptachlorobiphenyl	189
2,2',3,3',4,4',5,5'-Octachlorobiphenyl	202
2,3,3',4,4',5,5',6-Octachlorobiphenyl	205
2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonachlorobiphenyl	206
2,2',3,3',4,5,5',6,6'- Nonachlorobiphenyl	208
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-Decachlorobiphenyl	209

表3 Wellington Laboratories の BP-MS に含まれる PCB

PCB Congener	IUPAC No.
Monochlorobiphenyl	1, 3
Dichlorobiphenyl	4, 8, 10, 15
Trichlorobiphenyl	18, 19, 22, 28, 33, 37
Tetrachlorobiphenyl	44, 49, 52, 54, 70, 74, 77, 81
Pentachlorobiphenyl	87, 95, 99, 101, 104, 105, 110, 114, 118, 119, 123, 126
Hexachlorobiphenyl	128, 138, 149, 151, 153, 155, 156, 157, 158, 167, 168, 169
Heptachlorobiphenyl	170, 171, 177, 178, 180, 183, 187, 188, 189, 191
Octachlorobiphenyl	194, 199, 201, 202, 205
Nonachlorobiphenyl	206, 208
Decachlorobiphenyl	209

・ サロゲート物質：市販標準混合液（例：表4に示す Wellington Laboratories の MBP-CG）

表4 Wellington Laboratories の MBP-CG に含まれる ¹³C ラベル化 PCB

PCB Congener	IUPAC No.
4-Chloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	3
4,4'- Dichloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	15
2,4',5- Trichloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	31
2,2',5,5'- Tetrachloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	52
2,3',4,4',5- Pentachloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	118
2,2',4,4',5,5'- Hexachloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	153
1. 2,2',3,4,4',5,5'- Heptachloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	180
2,2',3,3',4,4',5,5'- Octachloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	194
2,2',3,3',4,4',5,5',6- Nonachloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	206
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'- Decachloro[¹³ C ₁₂]biphenyl	209

- ・ シリンジスパイク：多環芳香族炭化水素の重水素ラベル化物（例ペリレン d12）
- ・ 有機溶媒：残留農薬分析用（1000 倍濃縮保証）
- ・ ガラス繊維ろ紙（水試料ろ過用）：保留粒子径 1 μm のバインダーを含まないもの。
使用前にアセトン及び精製水で十分に洗浄する。
- ・ 無水硫酸ナトリウム，塩化ナトリウム：残留農薬試験用，または試薬特級を 700 で 8 時間加熱後，放冷したもの。
- ・ 精製水：蒸留水など化学分析用の水をヘキサンで 2 回洗浄したもの。
- ・ ODS 又はポリスチレン系樹脂などを充填した固液抽出用カートリッジまたはディスク：使用前に溶出溶媒及び精製水で十分に洗浄する。
- ・ シリカゲルカートリッジカラム：例，Sep-Pak Plus Silica Cartridge (690 mg) (Waters 社製)，使用直前にパックを開封し，ヘキサン 10ml で洗浄する。
- ・ 還元銅：有機元素分析用還元銅（60～80 メッシュ）。使用直前に使用する溶媒で洗浄する。ヘキサン中で保存する。
- ・ 水酸化カリウム：試薬特級
- ・ 硫酸：特級硫酸（96%）
- ・ 1M KOH / エタノール溶液：水酸化カリウムの含量を考慮して，1M となる量をガラス製三角フラスコに秤り取り，所定量のエタノールを加えた後，テフロン被覆磁気回転子とマグネチックスターラーを用いて水酸化カリウムを溶解させる。用時調製する。
- ・ 5%含水シリカゲル：カラムクロマト用シリカゲル（和光純薬社製ワコーゲル C-200）を 130 で 15 時間加熱活性化した後，95g を 300ml の褐色共栓（透明摺）付き三角フラスコに秤取り，密栓して室温まで冷却する。シリカゲルを攪拌しながら，ホールピペットを用いて精製水 5ml を滴下して含水させ，密栓して発熱が終了するまで静かに混合する。更に，振とう器で 30 分間振とうした後，デシケータ（乾燥剤：シリカゲル）中に密栓して 15 時間以上保存したものを使用する。

- ・ ガラス繊維ろ紙（底質試料用）：例，GF/A（Whatman社製）
- ・ その他の試薬：試薬特級

（２）器具及び装置

- ・ シリカゲルカラム：テフロンコック付きの長さ 30cm，内径 10mm のガラスカラムに 5% 含水シリカゲル 5g 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。使用前に，ヘキサン 40ml で洗浄する。なお，市販の大容量シリカゲルカートリッジを使用してもよい。
- ・ 振とう器
- ・ 還流冷却装置
- ・ ロータリーエバポレータ（恒温槽付き）
- ・ 分液漏斗
- ・ 減圧ろ過装置
- ・ 超音波照射器（超音波洗浄器でもよい）
- ・ 遠心分離器
- ・ 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，四重極型 MS または高分解能 MS。

5 試料の前処理

（１）水質（注４）

試料 1L（注５）を 2L の分液ロートに採取し，試料容器（ガラス製）はアセトン 10ml で 2 回洗浄した後，得られたアセトン洗液を分液ロート内の試料水に合わせる（注６）。塩化ナトリウム 30g（海水は無添加）及びサロゲート物質（10ng～100ng，測定装置の感度による）を加え十分混合して溶解後，ヘキサン 100ml を加えて約 10 分間振とう抽出し，十分静置してヘキサン相を採取する。水相はヘキサン 50ml を用いて振とう抽出操作を更に 1 回繰り返して，得られたヘキサン抽出液は 200ml のビーカーに合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，200ml のナス型フラスコに移して，ロータリーエバポレータを用いて 30 で約 1ml まで減圧濃縮し，前処理液とする（注７）。

（２）底質・生物

試料 20g を 200ml のナス型フラスコに採取（注８）し，サロゲート物質（10ng～100ng）を添加後，1M KOH／エタノール溶液 50ml を加えて還流冷却管に装着し，水浴中（80）で 1 時間アルカリ分解する（注９）。分解終了後，還流冷却を継続しながらナス型フラスコを室温まで冷却し，冷却管上部からヘキサン 50ml を加える（注 10）。得られた分解液は，ガラスろ紙（GF/A）を用いて減圧ろ過し，ナス型フラスコ内の残渣は，エタノール／ヘキサン（1：1）20ml 及びヘキサン 30ml を用いてろ過装置に洗い込みろ過する（注

11)。ろ液を少量のヘキサンを用いて、300mlの分液ロートに移し、精製水50mlを加えた後、10分間振とう抽出し、十分静置する（生物試料の場合は、減圧ろ過操作を省略し、分解液をエタノール/ヘキサン（1：1）20mlを用いて300mlの分液ロートに移して、50mlの精製水を加えて振とう抽出する）（注12）。ヘキサン相を300mlの分液ロートに移し、水相はヘキサン50mlを用いて再度振とう抽出し、得られたヘキサン抽出液は300mlの分液ロートに合わせ、硫酸50mlを加えて振とう洗浄する（注13）。この硫酸洗浄を硫酸相がきれいになるまで繰り返した後、ヘキサン相を精製水で3回洗浄する。ヘキサン相を200mlのビーカーに移し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、200mlのナス型フラスコに移して、ロータリーエバポレータを用いて30分で約3mlまで減圧濃縮し、前処理液とする（注7）。

6 試料液の調製

(1) 水質

予めヘキサン10mlで洗浄したシリカゲルカートリッジカラムに10mlのスピッツ型試験管をセットした後、注射筒を用いて前試料液（注14）をカラムに負荷して液面をカラムヘッドまで下げる。少量のヘキサンで濃縮容器を洗浄し、カラムに負荷した後、予め求めていた量のヘキサンを流して目的物質を溶出する（注15）。次に、溶出液に窒素ガスを吹き付けて1mlまで濃縮し、シリンジスパイクを添加して（100ng、測定装置の感度による）試料液とする。

(2) 底質・生物（注16）

シリカゲルカラム（または、大容量シリカゲルカートリッジ）に50mlのナス型フラスコをセットした後、試料液をカラムに負荷して液面をカラムヘッドまで下げる。少量のヘキサンで濃縮容器を洗浄し、カラムに負荷した後、予め求めていた量のヘキサンを一滴/秒の速度で流し目的物質を溶出する（注15）。次に、溶出液（注17）をロータリーエバポレータを用いて30分で約3mlまで減圧濃縮し（注7）、さらにヘキサンを用いてスピッツ型試験管に移し、窒素ガスを吹き付けて1mlまで濃縮し、シリンジスパイクを添加して（100ng、測定装置の感度による）試料液とする。

7 空試験液の調製

試料を用いずに「5 試料の前処理」及び「6 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。

8 標準液の調製

対象物質及びサロゲート物質が溶液以外の場合は、10mgを正確に秤取り、ヘキサンを

加えて正確に 100ml とし，100 µg/ml の標準原液を調製する。次に，標準原液をヘキサ
ンで適宜希釈混合して所定の濃度の混合標準液を調製する（注 1 8）。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。

9 測定

(1) GC / 四重極型 MS の測定条件 (注 1 9) (注 2 0)

- ・ 使用カラム：キャピラリーカラム（例：長さ 30m，内径 0.25mm，膜厚 0.25 µm）
- ・ 液相：5%フェニルメチルシリコン等（例：J & W社 DB-5MS，HP社 Ultra2，SGE HT8 など）
- ・ カラム温度：(例) 70 （ 2 分 ） - 30 / 分 - 170 - 5 / 分 - 300 （ 10 分 ）
- ・ 注入法：スプリットレス法，パーズ開始時間：1.5 分
- ・ 注入量：1 ~ 2 µL
- ・ 注入口温度：250
- ・ キャリヤーガス：He 線速度：40cm/sec
- ・ イオン化条件：E I 法 イオン源温度：装置指定温度 イオン化電圧：70 e V

表 5 対象物質の測定イオン (注 2 1)

対象物質	定量イオン	確認イオン
塩化ビフェニル	188.0	190.0, 152.0
二塩化ビフェニル	222.0	224.0, 152.0
三塩化ビフェニル	256.0	258.0, 186.0
四塩化ビフェニル	289.9	291.9, 293.9
五塩化ビフェニル	325.9	323.9, 327.9
六塩化ビフェニル	359.8	361.8, 357.8
七塩化ビフェニル	393.8	395.8, 397.8
八塩化ビフェニル	429.8	427.8, 431.8
九塩化ビフェニル	461.7	463.7, 465.7
十塩化ビフェニル	497.7	499.7, 495.7

表6 サロゲート物質の測定イオン(注21)(注22)

サロゲート物質	定量イオン	確認イオン
塩化ビフェニル (4-Chloro[13C12]biphenyl)	200.1	202.1
二塩化ビフェニル (4,4'-Dichloro[13C12]biphenyl)	234.0	236.0
三塩化ビフェニル (2,4',5-Trichloro[13C12]biphenyl)	268.0	270.0
四塩化ビフェニル (2,2',5,5'-Tetrachloro[13C12]biphenyl)	302.0	304.0
五塩化ビフェニル (2,3',4,4',5-Pentachloro[13C12]biphenyl)	335.9	337.9
六塩化ビフェニル (2,2',4,4',5,5'-Hexachloro[13C12]biphenyl)	371.9	373.9
七塩化ビフェニル (2,2',3,4,4',5,5'-Heptachloro[13C12]biphenyl)	405.8	407.8
八塩化ビフェニル (2,2',3,3',4,4',5,5'-Octachloro[13C12]biphenyl)	439.8	441.8
九塩化ビフェニル (2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonachloro[13C12]biphenyl)	473.8	475.8
十塩化ビフェニル (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-Decachloro[13C12]biphenyl)	509.7	511.7

シリンジスパイクの測定イオン

ペリレン d₁₂ : 264.2

(2) GC / 高分解能型MSの測定条件

- ・ カラム : キャピラリーカラム (長さ 25m , 内径 0.20mm , 膜厚 0.33 μm)
- ・ 液相 : 5%フェニルメチルシリコン (例 : HP 社 Ultra-2)
- ・ カラム温度条件 : 70 (1.9min)--8 /min--300 (15min)
- ・ 注入方法 : スプリットレス (パ - ジオフ時間 2分)
- ・ キャリア - ガス : He , カラム流量 : 1.63mL /min , 線速度 : 51.5cm/sec
- ・ 注入口温度 : 200
- ・ イオン源温度 : 250
- ・ イオン化電圧 : 70 eV
- ・ 注入量 : 1 ~ 2 μL
- ・ 試料導入法 : Capillary 質量幅 [ppm] : 400
- ・ イオン化法 : EI+ 制御場 : Electric Field
- ・ 加速電圧 [kV] : 10.0 スイッチング時間 [ミリ秒] : 50
- ・ 磁場コイル : HS 質量微調整法 : Lock & Check Method
- ・ 質量分解能 : 10000 マスロック用物質 : PFK. EIpos

- ・ SIM 検出法 : Fix

表7 ロックマス質量数

ロックマス 1	168.9888	ロックマス 3	318.9792
ロックマス 2	230.9856	ロックマス 4	442.9729

表8 対象物質の測定イオン (注21)

対象物質	定量イオン	確認イオン
一塩化ビフェニル	188.0393	190.0364
二塩化ビフェニル	222.0003	223.9974
三塩化ビフェニル	255.9613	257.9587
四塩化ビフェニル	289.9224	291.9195
五塩化ビフェニル	323.8834	325.8805
六塩化ビフェニル	359.8415	361.8386
七塩化ビフェニル	393.8025	395.7996
八塩化ビフェニル	427.7636	429.7606
九塩化ビフェニル	461.7246	463.7216
十塩化ビフェニル	497.6826	499.6797

表9 サロゲート物質の測定イオン (注21)

サロゲート物質	定量イオン	確認イオン
一塩化ビフェニル (4-Chloro[13C12]biphenyl)	200.0795	202.0766
二塩化ビフェニル (4,4'- Dichloro[13C12]biphenyl)	234.0406	236.0376
三塩化ビフェニル (2,4,5- Trichloro[13C12]biphenyl)	268.0016	269.9986
四塩化ビフェニル (2,2',5,5'- Tetrachloro[13C12]biphenyl)	301.9626	303.9597
五塩化ビフェニル (2,3',4,4',5- Pentachloro[13C12]biphenyl)	335.9237	337.9207
六塩化ビフェニル (2,2',4,4',5,5'- Hexachloro[13C12]biphenyl)	371.8817	373.8788
七塩化ビフェニル (2,2',3,4,4',5,5'- Heptachloro[13C12]biphenyl)	405.8428	407.8398
八塩化ビフェニル (2,2',3,3',4,4',5,5'- Octachloro[13C12]biphenyl)	439.8038	441.8008
九塩化ビフェニル (2,2',3,3',4,4',5,5',6- Nonachloro[13C12]biphenyl)	473.7648	475.7619
十塩化ビフェニル (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'- Decachloro[13C12]biphenyl)	509.7229	511.7199

シリンジスパイクの測定イオン

ペリレン d₁₂ : 264.169

(3) GC/MS 性能評価試験 (注23)

測定開始前に GC/MS 性能評価を行い、基準を満足することを確認した後、測定を行う。

(ア) GC の性能評価

・ p,p'-DDT, ベンジジン及びペンタクロロフェノールの 1mg/L 混合標準液(ヘキサン溶液)の 1µL を GC/MS に注入してスキミングモードで測定し, 次の確認を行う。

・ インサートの不活性さ及びカラムの性能評価

DDT の DDD 及び DDE への分解が, 20%を越えないこと, 及びベンジジンとペンタクロロフェノールが著しくテーリングしないことを確認する。これらを満足しない場合(特に DDT の 20%以上が分解した場合は), インサートを交換し, カラムの先端を数十 cm 切断除去するか, またはカラムを交換する。

(イ) SIM の感度確認

検量線の最下限濃度を測定し, 必要な感度が得られることを確認する。

(4) 検量線

感度係数法(RF)により試料を定量する。分析法の検出限界付近と予想される検出濃度レベルを含む5段階以上の標準液1~2µlを測定し, 次式からRFを求める。RFの相対標準偏差が15%以下の場合は, 平均RFを用いて試料を定量する。毎測定時の試料測定前に, 検量線の間濃度の標準液を測定して感度係数法で定量し, 得られた定量値が注入標準液濃度の±15%以内であるなら, 平均RFをそのまま用いて試料を定量する。±15%を外れた場合は, 全ての標準液を測定し直して新たな平均RFを求めて試料の定量を行う。

$$RF=(As \times Cis)/(Ais \times Cs)$$

ここで, As: 対象物質の測定イオンのピーク面積

Ais: サロゲート物質の測定イオンのピーク面積

Cis: 検量線標準液中のサロゲート物質質量(ng)

Cs: 検量線標準液中の対象物質質量(ng)

なお, KC-300~KC-600の混合液を用いた場合は, 個々の異性体の注入量(Cs, ng)は, 次式で求める。

各異性体量(ng) = 混合液注入量(ng) × 表11に示すKC平均値組成比(%) × 0.01

例えば, 100mg/LのKC-300~KC-600混合液を1µl注入した場合のBZ#1の注入量は, BZ#1の注入量(ng) = 100ng × 0.1856 × 0.01 = 0.1856ng となる。

(5) 試料の測定

GC/MS性能評価, SIMの感度確認及びRF確認後, 測定用試料液1~2µlをGCに注入して測定を行う(注24)。測定時8時間毎に検量線の間濃度の標準液を測定し, そのRFが平均RFの±15%以内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, RFを確認して測定を再開する。

10 同定，定量及び計算

対象物質の有無の確認後，存在する場合は定量を行う。また，シリンジスパイクを用いてサロゲートの回収率を求める。

(1) 同定

(ア) PCB の同定

表2及び表3に示した PCB 溶出 window 決定混合物(5% phenyl methyl siloxane)は，PCB の IUPAC 番号 #1, #3, #10, #15, #19, #37, #54, #77, #104, #126, #155, #169, #188, #189, #202, #205, #206, #208, #209 の各異性体を含んでいる。これらの異性体混合物は，GC カラムとして，5% phenyl methyl siloxane を用いて測定した場合の，各塩化物の中で最初と最後に溶出する異性体のリストである。4 塩化物を例に上げると，4 個ともオルソ位に塩素が置換した 2,2',6,6'-異性体(IUPAC 番号: #54)と，コプラナ PCB として有名な，オルソ位に塩素を持たない 3,3',4,4'-異性体(IUPAC 番号: #77)が，GC クロマト上では最初と最後のピークとなる。従って，クロマトグラムでの最初と最後の PCB 異性体溶出ウインドウの外側に存在するピークは，定量すべきピークではない。PCB 異性体溶出ウインドウの範囲に入るピークで，対象物質の定量イオン及び確認イオンのピークが，検量線に登録された保持時間と ± 5 秒以内に出現し(注25)，確認イオンのピーク強度が検量線に登録された定量イオンとの相対強度と $\pm 20\%$ 以下であれば，物質が存在していると思なす。PCB の全異性体の保持時間情報の例を表10に示す。また，SGE HT8 カラムの保持時間情報は，メーカーが公表している。これらを参考にして各 PCB 異性体を同定する(注26)。PCB 異性体は，高塩素化 PCB と溶出範囲が重複するため，同定時には塩素が脱離したフラグメントイオン(M-70)に注意する(注27)。

(イ) サロゲート物質の同定

定量イオン及び確認イオンのピークが，検量線に登録された保持時間と ± 5 秒以内に出現し(注25)，確認イオンのピーク強度が検量線に登録された定量イオンとの相対強度と $\pm 20\%$ 以下であれば，物質が存在していると思なす。

(2) 定量

本分析法では，次の2つの方法のいずれかを用いて塩素数毎の PCB 濃度及び総 PCB 濃度を求める。

(ア) 同一塩素数の PCB の定量イオン(通常分子イオン)のイオン強度に大きな差がないとして，標準液に含まれる同一塩素数の全異性体の平均 RF を用いて，その塩素数の PCB 濃度を計算する。具体的には，表3に示した Wellington Laboratories の BP-MS を用い，BP-MS に含まれる各塩素数毎の平均 RF を用いて同一塩素数を持つ異性体の濃度を求める。

(イ) KC-300 ~ KC-600 を等量混合し，表11に示した異性体毎の濃度を求め，それから塩素数毎の PCB 濃度及び総 PCB 濃度を算出する。この場合，KC-300 ~ KC-600 に含まれ

ていない異性体は定量しない。

(ウ) 計算法

RF を用いて、次式から検出量(ng)を求める。

$$\text{検出量(ng)} = (\text{As} \times \text{Cis}) / (\text{Ais} \times \text{RF})$$

ここで、As：対象物質の測定イオンのピーク面積

Ais：サロゲート物質の測定イオンのピーク面積

Cis：試料に添加したサロゲート物質質量(ng)

1.1 分析精度管理

正確な分析値が得られていることを保証するために以下の作業を行い、その結果を記録・保存する。

(1) 内部精度管理

(ア) 10 検体又は 1 バッチ試験毎に全操作ブランク、二重分析及び添加回収試験(注 2.8)を各 1 検体以上行う。

- ・ 操作ブランクが通常値を超えた場合は、原因を究明して対策を講じた後、全ての試料の再試験を行う。
- ・ 二重分析の結果が許容差(注 2.9)を超えた場合は、その試料について再試験を行う。
- ・ サロゲート物質の回収率は、50%～120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。
- ・ 添加回収試験における回収率は、80%～120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。

(イ) 標準物質の確認

標準原液の調製時に、異なる供給元の標準物質を用いて使用する標準物質を検定する。

(ウ) 保証標準試料(CRM)を半年に 1 回以上の頻度で分析し、正確さと精度を確認する。

(注 3.0)

1.2 注意事項

注 1：検出限界の算出法

試料の分析を開始する前に、次の試験を行い検出限界値を達成できることを確認しておく。達成できない場合は、試料量を増やすなどの対策を講じる。

- ・ 操作ブランクから対象物質が検出される場合

操作ブランクを 7 回行い、ブランク値の平均(x)及び標準偏差(s)を得て、次式から検出限界値(DL)を得る。

$$DL = x + 1.943 s$$

- ・ 操作ブランクから対象物質が検出されない場合

検量線の最下限の 2~5 倍（又は目標検出限界の 2~5 倍）になるよう精製水に対象物質を加えて、添加回収試験を行う。7 回の添加回収試験の結果から、検出値の標準偏差(s)を求めて、次式から検出限界値(DL)を得る。

$$DL = 1.943 s$$

注 2：四重極型 MS における 1 異性体当たりの検出限界値。検出限界値は、使用する装置の感度により異なるが、できるだけ低い値を目標とする。

注 3：各塩素数毎のマスペクトルの解裂が同一として定量する。なお、必要な場合は PCB の全異性体の検出値も求める。

注 4：ODS やポリマーなどを充填した固相抽出カートリッジや固相抽出ディスクにより、ヘキサン抽出と同等の抽出率が得られる場合は、固液抽出を用いることができる。

注 5：液液抽出または固液抽出のいずれの場合でも、排水など浮遊物質が多量に存在する試料では、抽出する前にガラス繊維ろ紙で試料をろ過する。次に、浮遊物質をろ紙と共に少量のアセトンで 2 回超音波抽出し、抽出液をろ液に合わせた後、抽出操作に移る。なお、この場合、サロゲート物質はろ過する前に添加し、十分に混合した後にろ過を行う。

注 6：試料容器の壁面に付着した目的物質の溶出と水中の懸濁成分に吸着した目的物質の水中への脱離を促進する目的で加える。

注 7：減圧濃縮では、室内からのコンタミに十分注意をする。

注 8：1M KOH / エタノール溶液 50ml を加えたときに、試料が完全に浸漬・分解されるように、ナス型フラスコの壁面に試料が付着しないように試料を採取する。なお、脂肪量が多いなど、アルカリ分解が十分でない場合は、1M KOH / エタノール溶液の添加量を 100ml にするとともに、以後の分析操作で使用する抽出溶媒、洗浄用精製水等の使用量を 2 倍にして分析を実施する。

注 9：アルカリ分解中に、時々ナス型フラスコを振り混ぜて分解を促進する。

注 10：冷却管に付着した目的成分を回収する目的で加える。添加したヘキサンは、次の抽出操作における抽出溶媒となる。

注 11：少量ずつ分割して洗い込むことで、残渣中に残存する目的成分を回収する。

注 12：水とヘキサンの界面に不溶性物質が生じるので、ヘキサン中に残存しないように分液する。

注 13：硫酸洗浄では、分液ロートに残った水と硫酸とで発熱するため、注意が必要である。なお、生物試料では、硫酸処理に伴い夾雑物が生成する可能性があるため、硫酸処理が必要か事前に検討しておく。

注 14：固液抽出の溶離液としてアセトンなどの極性を持つ溶媒を用いた場合は、ヘキサンに溶媒転溶してカラムに負荷する。

注 15：事前に試料と同様の濃縮液を用いて溶出パターンを確認し、最小量のヘキサンで溶出する。

注 16：汚染の著しい底質では、目標検出限界を達成できない場合がある。そのような場

合は、シリカゲルカラムクリーンアップ後、次に示す順相 HPLC でさらにクリーンアップする。

カラム：(例) μ Bondapak NH₂, 9mm i.d. × 30cm, Waters 製(LC-NH₂)

溶離液：ヘキサンで PCB 画分を分取後、5%ジクロロメタン - ヘキサンで極性成分を溶出する。

試料液：シリカゲルカラムクリーンアップ溶出液を 400 μ l まで濃縮したもの。

注 17：アルカリ分解で底質試料中の硫黄は除去されるが、除去が不十分な場合は、溶出液に還元銅 5 ~ 10g を加えて 1 分間激しくかき混ぜ硫黄を除去後、濃縮する。

注 18：試料に添加する混合標準液は、アセトンで調製する。

注 19：四重極型 MS での測定を基本とするが、妨害を受けて正確な測定ができない場合は、高分解能 MS を使用するか、注 16 に示す順相 HPLC によるクリーンアップを行う。

注 20：全異性体の保持時間データがあるカラムを用いる場合は、その GC 条件を用いるとよい。

注 21：定量イオンが妨害を受ける場合は、妨害を受けていない確認イオンを用いて定量を行う。

注 22：試料中に七 ~ 十塩化ビフェニルが大量に含まれてサロゲート物質の測定を妨害する場合は、サロゲート物質の測定イオンを変更すること。

注 23：PCB は、GC カラムの調子が悪ければ、各異性体のピーク強度が違ってくる。

注 24：試料間のクロスコンタミを防止するため、高濃度の試料測定後は、溶媒を測定するなどしてキャリーオーバーが無いことを確認する。

注 25：最終試料液中に夾雑物が多い場合は、保持時間が遅くなることがある。

注 26：PCB 全異性体または KC300 ~ KC600 を測定して保持時間を確認するとその後の同定作業が容易である。

注 27：対象物質の M+70 に高塩素 PCB 由来のピークがないことを合わせて確認する。

注 28：添加回収試験は、試料と同じあるいは類似の試料に対象物質のアセトン標準液を検出限界の 5 ~ 10 倍量程度添加して行う。

注 29：許容差の求め方は、JIS Z8402、分析・試験の許容差通則、1974 を参照

注 30：PCB の CRM では、河川底質で NIST SRM 1939、魚試料で Wellington Laboratories の CARP-1 などがある。

1.3 添加回収試験結果

東京湾の底質 20g (湿泥) とマダイの可食部 20g に WindowsPCB19 種を各 100ng 添加して全操作を行い、得られた最終試料液に内標準としてフェナンソレン-d₁₀ を加えて測定した結果を表に示す。

東京湾底質添加回収試験結果（湿泥 20g，添加量 100ng）

IUPAC	PCB	検出量(ng)		平均回収率 %
		添加1	添加2	
1	2-	93.4	96	94.7
3	4-	101.9	108.1	105.0
10	2,6-	72.3	95.8	84.1
19	2,2',6-	54.2	68.5	61.4
15	4,4'-	96.6	101.4	99.0
54	2,2',6,6'-	42.2	46.3	44.3
104	2,2',4,6,6'-	64.4	68	66.2
37	3,4,4'-	162.5	114.1	138.3
155	2,2',4,4',6,6'-	77.3	78.6	78.0
77	3,3',4,4'-	103.3	126.1	114.7
188	2,2',3,4',5,6,6'-	75.4	79	77.2
126	3,3',4,4',5-	42.9	51.4	47.2
202	2,2',3,3',5,5',6,6-	77.3	102.4	89.9
169	3,3',4,4',5,5'-	59.9	51.6	55.8
189	2,3,3',4,4',5,5'-	156.6	175.2	111.1
208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-	60	80.4	70.2
205	2,3,3',4,4',5,5',6-	145.5	93.7	119.6
206	2,2',3,3',4,4',5,5,6-	78.7	86.6	82.7
209	2,2',3,3',4,4',5,5,6,6'-	45.9	82.2	64.1

マダイ添加回収結果（20g，添加量 100ng）

IUPAC	PCB	検出量(ng)		平均回収率 %
		添加1	添加2	
1	2-	69	69.2	69.1
3	4-	76	93.2	84.6
10	2,6-	83.8	82.2	83.0
19	2,2',6-	96.3	90.2	93.3
15	4,4'-	83.2	87.1	85.2
54	2,2',6,6'-	90.1	84.4	87.3
104	2,2',4,6,6'-	56.7	60.5	58.6
37	3,4,4'-	100	83.1	91.6
155	2,2',4,4',6,6'-	77.1	74.6	75.9
77	3,3',4,4'-	77.3	82.1	79.7
188	2,2',3,4',5,6,6'-	78	75.2	76.6
126	3,3',4,4',5-	91.3	93.1	92.2
202	2,2',3,3',5,5',6,6-	58.4	57	57.7
169	3,3',4,4',5,5'-	64.6	65.7	65.2
189	2,3,3',4,4',5,5'-	53.7	59.2	56.5
208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-	64.8	69.8	67.3
205	2,3,3',4,4',5,5',6-	79.7	74	76.9
206	2,2',3,3',4,4',5,5,6-	67.2	65.3	66.3
209	2,2',3,3',4,4',5,5,6,6'-	74.2	73.9	74.1

参考文献

- 1 ポリ塩化ビフェニル，平成 8 年度 化学物質分析法開発報告書，環境庁環境保健部環境安全課，1997．
- 2 4,4'-ジブロモビフェニル，平成 8 年度化学物質分析法開発報告書，環境庁環境保健部環境安全課，1997．
- 3 JIS Z8402，分析・試験の許容差通則，1974．
- 4 WHO 環境保健クライテリア，日本化学物質安全・情報センター，1994．
- 5 Analytical Chemistry of PCBs, M. D. Erickson, Butterworth Publishers, 1986.
- 6 Polychlorinated biphenyls in the environment, V. Lang, *J. Chromatogr.*, **595**, 1-43, 1992.
- 7 Mass Spectrometric Determination of Polychlorinated Biphenyls as Isomer Groups, J. E. Gebhart, T. L. Hayes, A. L. Alford-Stevens and W. L. Budde, *Anal. Chem.*, **57**, 2458-2463, 1985.
- 8 Determination of Byproduct Polychlorobiphenyls in Commercial Products and Waters by High-Resolution Gas Chromatography/Electron Impact Mass Spectrometry, M. D. Erickson, J. S. Stanley, J. K. Turman, J. E. Going, D. P. Redford and D. T. Heggem, *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 71-76, 1988.
- 9 Comparison of methods for the gas-chromatographic determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in marine reference materials, M. M. Schantz, R. M. Parris, J. Kurz, K. Ballschmiter and S. A. Wise, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **346**, 766-778, 1993.

ポリ塩化ビフェニルの分析フローチャート

《水質試料》



《底質・生物試料》

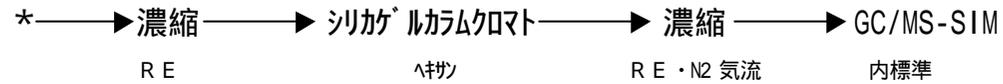


表 1 0 P C B 異性体のIUPAC番号及び保持時間

GC conditions

Injection : Pulsed splitless (35 psi, 1.5 min) ; 200 C ; purge off time, 2min

Column : HP-5 (same as ultra2), 0.25 mm i.d., 30 m , 0.25 um

Oven temp. : 80 C (2min) - 8 C/min - 300 C (5.5min)

Carrier : He, 26cm/s , constant flow mode

	IUPAC	R t [min]		IUPAC	R t [min]		IUPAC	R t [min]
mono-	1	13.45	penta-	97	22.19	octa-	199	26.60
	2	14.53		87	22.31		203/196	26.71
	3	14.66		85	22.41		195	
di-	10/4	15.28		110	22.53		194	27.87
	7/9	15.97		82	22.82		205	
	6	16.26		124	22.86	nona-	208	27.31
	8/5	16.42		107	22.93		207	
	14	16.79		123	23.01		206	28.54
	11	17.31		118	23.12	deca-	209	29.17
	12/13	17.48		114	23.39			
tri-	15	17.61		122	23.50			
	19	16.98		105	23.75			
	30	17.20	hexa-	126	24.45			
	18	17.56		155	21.43			
	17	17.62		136	22.47			
	24/27	17.83		151	22.81			
	16/32	18.06		135/147	22.92			
	23			149	23.08			
	34	18.28		134	23.34			
	29	18.39		131	23.39			
	26	18.51		146	23.50			
	25	18.58		153	23.63			
	31/28	18.73		132	23.72			
	33/20	19.00		141	23.91			
	22	19.19		130	24.08			
35	20.02		137	24.15				
37	20.20		138	24.25				
tetra-	54	18.42		158	24.49			
	50	18.73		129	24.78			
	53	19.02		128/167	24.89			
	51	19.14		156	25.40			
	45	19.33		157	25.50			
	69/46	19.50		169	26.20			
	52	19.60	hepta-	188	23.47			
	49	19.72		179	24.09			
	47/75/48	19.79		176	24.19			
	44	20.11		186				
42	20.20		178					
41/64	20.42		175					
40	20.62		187	24.65				
67	20.74		183	24.77				
63	20.87		185	24.89				
74	20.97		174	25.15				
70	21.06		177	25.29				
66	21.14		171	25.43				
55	21.33		173					
60/56	21.55		172					
77	22.56		180	25.77				
penta-	104	19.97		193				
	96	20.51		191				
	100	20.75		170/190				
	95	21.14		189	26.99			
	91	21.30	octa-	202	25.34			
	92/84	21.55		201				
	101	21.67		204				
	99	21.79		197				
	119	21.95		200	25.53			
	83	22.05		198				

表 1 1 KC-300 , KC-400 , KC-500及びKC-600標準液中の異性体組成比

GC/MS条件	注入口	280
	カラム温度	130 (1min)-20 /min-220 -5 /min-320 (14.5)
	イオン源	340
	Trap Current(μ A)	500
	Electron Energy(eV)	40
	Emission Current(mA)	1.13
	Filament Current(A)	4.51
	カラム	HT-8: 50m * 0.22mm i.d., 0.25um

塩素数	溶出順位	BZ#	KC300 組成比 (%)	KC400 組成比 (%)	KC500 組成比 (%)	KC600 組成比 (%)	K C 平均値 組成比 (%)
1	1	1	0.44986024	0.19758507	0.06669843	0.02822865	0.1855931
1	2	2	0.05677848	0.03841932	0.01905669	0.00705716	0.03032791
1	3	3	0.23584906	0.08781559	0.02382087	0.00940955	0.08922377
2	2	4	2.79524808	0.43358946	0.26202954	0.17407669	0.91623594
2	6	5	4.36757512	0.45554336	0.1619819	0.11056222	1.27391565
2	5	6	0.96086653	0.08781559	0.06193425	0.03999059	0.28765174
2	4	7	0.24021663	0.11525796	0.02858504	0.01176194	0.09895539
2	6	8	0	0	0	0	0
2	3	9	0.37997904	0.11525796	0.04764173	0.01646671	0.13983636
2	1	10	0	0	0	0	0
2	8	11	0.26642208	0.08232711	0.01429252	0.00470478	0.09193662
2	9	12	0.13539483	0.06586169	0.03811339	0.01646671	0.06395916
2	9	13	0	0	0	0	0
2	7	14	0	0	0	0	0
2	10	15	1.66404612	0.14270033	0.04287756	0.02352388	0.46828697
3	8	16	4.36757512	1.38858397	0.37160553	0.18348624	1.57781272
3	4	17	4.78686233	1.30076839	0.29061458	0.15996236	1.63455192
3	3	18	13.4346611	4.95609221	0.80990948	0.36932486	4.89249691
3	1	19	1.32774284	0.26344676	0.08575512	0.08468596	0.44040767
3	15	20	4.07931516	1.44346872	0.35731301	0.11291461	1.49825287
3	15	21	0	0	0	0	0
3	16	22	4.28022362	1.41053787	0.18580276	0.06821924	1.48619587
3	9	23	0	0	0	0	0
3	5	24	0.14412998	0.06586169	0.10481182	0.02587626	0.08516994
3	12	25	0.79926625	0.12623491	0.03334921	0.0188191	0.24441737
3	11	26	2.06586303	0.45554336	0.09528347	0.0376382	0.66358202
3	6	27	0.68570929	0.13172338	0.01429252	0.0188191	0.21263607
3	14	28	4.36757512	3.91877058	0.30967127	0.13643849	2.18311387
3	10	29	0.10045423	0.08232711	0.10481182	0	0.07189829
3	2	30	0	0	0	0	0
3	13	31	10.2026555	5.18660812	0.33349214	0.15055281	3.96832714
3	7	32	3.17085954	0.98792536	0.11434016	0.0564573	1.08239559
3	15	33	0	0	0	0	0
3	9	34	0.03930818	0	0	0	0.00982704
3	20	35	0.06551363	0	0.05240591	0.02117149	0.03477276
3	17	36	0.1222921	0.29088913	0.1429252	0	0.13902661
3	21	37	2.27550664	0.64215148	0.17627442	0.03528582	0.78230459
3	19	38	0	0	0.05717008	0	0.01429252
3	18	39	0	0	0.02858504	0	0.00714626
4	15	40	0.53284416	0.79582876	0.0714626	0.01646671	0.35415056
4	14	41	0.44112509	0.61470911	0.13816103	0.04704775	0.31026075
4	11	42	1.83438155	2.83205269	0.20009528	0.0564573	1.23074671

塩素数	溶出順位	BZ#	KC300 組成比 (%)	KC400 組成比 (%)	KC500 組成比 (%)	KC600 組成比 (%)	K C 平均値 組成比 (%)
4	7	43	2.07023061	3.84193194	0.57170081	0.08233357	1.64154923
4	10	44	5.1974144	10.3183315	2.30109576	0.22582922	4.51066772
4	5	45	1.51118099	1.92096597	0.27155788	0.15525759	0.96474061
4	6	46	1.7557652	3.81997805	2.06765126	0.12938132	1.94319396
4	8	47	0.69881202	1.2349067	0.13816103	0.06586685	0.53443665
4	8	48	0	0	0	0	0
4	7	49	0	0	0	0	0
4	2	50	0.02183788	0.0219539	0	0	0.01094794
4	4	51	0.37561146	0.49396268	0.02858504	0.01646671	0.22865647
4	6	52	0	0	0	0	0
4	3	53	1.13120196	1.71789243	0.1619819	0.04940014	0.7651191
4	1	54	0.02620545	0.0219539	0	0	0.01203984
4	22	55	0.13102725	0	0	0	0.03275681
4	23	56	1.52428372	3.54006586	0.40019057	0.07998118	1.38613033
4	15	57	0	0	0	0	0
4	17	58	0.0873515	0.21953897	0.00952835	0	0.0791047
4	10	59	0.44986024	0.39517014	0.06193425	0.01411433	0.23026974
4	23	60	0	0	0	0	0
4	18	61	1.04385045	2.766191	0.36207718	0.04704775	1.0547916
4	9	62	0	0	0	0	0
4	17	63	0	0	0	0	0
4	13	64	2.40216632	5.15367728	0.55740829	0.07527641	2.04713207
4	8	65	0	0	0	0	0
4	21	66	3.721174	9.07244786	0.95759886	0.13643849	3.4719148
4	16	67	0.21401118	0.20307355	0.0714626	0.01176194	0.12507732
4	14	68	0	0	0	0	0
4	6	69	0	0	0	0	0
4	19	70	3.59014675	5.4884742	3.05383516	0.21171489	3.08604275
4	13	71	1.17487771	2.2557629	0.1619819	0.03999059	0.90815327
4	12	72	0	0	0	0	0
4	6	73	0	0	0	0	0
4	18	74	0	0	0	0	0
4	8	75	0	0	0	0	0
4	20	76	0	0	0	0	0
4	27	77	0.22711391	0.56531284	0.41448309	0.36697248	0.39347058
4	25	78	0	0	0	0	0
4	24	79	0	0	0	0	0
4	20	80	0	0	0	0	0
4	26	81	0	0	0	0.14349565	0.03587391
5	18	82	0.13539483	1.08122942	1.11481658	0.35991531	0.67283904
5	13	83	0.00873515	0.13172338	0.18580276	0.00940955	0.08391771
5	9	84	0.17907058	1.31723381	3.35397808	0.67513526	1.38135443
5	16	85	0.06551363	0.63666301	0.05717008	0.05880969	0.2045391
5	14	86	0.06114605	0.4884742	0.78608861	2.58762644	0.98083383
5	15	87	0.05677848	0.43358946	0.95759886	0.06821924	0.37904651
5	7	88	0.0524109	0.29637761	0.3049071	0.05410492	0.17695013
5	9	89	0	0	0	0	0
5	9	90	0	0	0	0	0
5	7	91	0	0	0	0	0
5	8	92	0.08298393	0.54335895	0	0.21171489	0.20951444
5	6	93	0.174703	1.11416026	2.52501191	0.69160198	1.12636929
5	5	94	0	0.04939627	0.02858504	0.01176194	0.02243581
5	6	95	0	0	0	0	0

塩素数	溶出順位	BZ#	KC300 組成比 (%)	KC400 組成比 (%)	KC500 組成比 (%)	KC600 組成比 (%)	K C 平均値 組成比 (%)
5	2	96	0.03057303	0.12623491	0.05717008	0.04469537	0.06466834
5	14	97	0	0	0	0	0
5	6	98	0	0	0	0	0
5	11	99	0.24895178	2.15697036	2.95855169	0.29640085	1.41521867
5	4	100	0	0.0219539	0.00952835	0	0.00787056
5	9	101	0	0	0	0	0
5	6	102	0	0	0	0	0
5	3	103	0	0.04390779	0.03811339	0	0.0205053
5	1	104	0	0	0	0	0
5	26	105	0.1222921	1.66849616	2.31538828	0	1.02654414
5	22	106	0.1222921	1.39407245	3.84945212	0.21406728	1.39497099
5	20	107	0	0.12074643	0.20485946	0.01411433	0.08493005
5	20	108	0	0	0	0	0
5	13	109	0	0	0	0	0
5	17	110	0.37997904	3.60592755	9.6950929	0.98565044	3.66666248
5	15	111	0	0	0	0	0
5	12	112	0.00873515	0.06037322	0.05717008	0.00940955	0.033922
5	10	113	0	0	0	0	0
5	23	114	0.01310273	0.1481888	0.14768938	0	0.07724523
5	15	115	0	0	0	0	0
5	15	116	0	0	0	0	0
5	14	117	0	0	0	0	0
5	22	118	0	0	0	0	0
5	12	119	0	0	0	0	0
5	16	120	0	0	0	0	0
5	7	121	0	0	0	0	0
5	24	122	0.01310273	0.06037322	0.14768938	0	0.05529133
5	21	123	0	0.10428101	0.09051929	0	0.04870008
5	19	124	0	0.11525796	0.29061458	0.0188191	0.10617291
5	14	125	0	0	0	0	0
5	27	126	0	0	0	0.0376382	0.00940955
5	25	127	0	0	0	0	0
6	31	128	0	0.15367728	2.64411625	0	0.69944838
6	27	129	0	0.04390779	0.87660791	0.3058104	0.30658152
6	23	130	0	0.06586169	0.8956646	2.00188191	0.74085205
6	16	131	0	0	0.12863268	0.06351447	0.04803679
6	18	132	0.02620545	0.28540066	4.38303954	0	1.17366141
6	15	133	0	0	0.11910434	0.06351447	0.0456547
6	14	134	0	0.03841932	0.83849452	0.40461068	0.32038113
6	9	135	0	0.07135016	1.47689376	1.59491884	0.78579069
6	6	136	0.01310273	0.09330406	1.61981896	2.22065396	0.98671993
6	22	137	0	0.07683864	0.81467365	0.27993413	0.29286161
6	25	138	0.06114605	0.57080132	11.6341115	7.09715361	4.84080312
6	11	139	0.03930818	0.20307355	4.38780372	6.71371442	2.83597496
6	12	140	0	0	0	0	0
6	21	141	0	0.10976948	2.08670796	3.35450482	1.38774557
6	16	142	0	0	0	0	0
6	13	143	0	0	0	0.1340861	0.03352152
6	10	144	0	0.05488474	0.76703192	1.04681251	0.46718229
6	4	145	0	0	0	0	0
6	17	146	0	0.03841932	0.65269176	0.60926841	0.32509487
6	10	147	0	0	0	0	0
6	5	148	0	0	0	0	0

塩素数	溶出順位	BZ#	KC300 組成比 (%)	KC400 組成比 (%)	KC500 組成比 (%)	KC600 組成比 (%)	K C 平均値 組成比 (%)
6	11	149	0	0	0	0	0
6	2	150	0	0	0	0.00940955	0.00235239
6	8	151	0	0.07683864	1.648404	5.09997648	1.70630478
6	3	152	0	0	0	0.0376382	0.00940955
6	19	153	0.07424878	0.36772777	9.7665555	0	2.55213301
6	7	154	0	0	0.0714626	0	0.01786565
6	1	155	0	0	0	0	0
6	33	156	0	0.08781559	1.44830872	0.46577276	0.50047427
6	34	157	0	0.03293085	0.33349214	0.41872501	0.196287
6	26	158	0	0.04390779	0.79561696	0.47988709	0.32985296
6	29	159	0	0	0	0	0
6	26	160	0	0	0	0	0
6		161	0	0	0	0	0
6	30	162	0	0	0	0	0
6	24	163	0	0.06586169	1.40066698	1.60432839	0.76771427
6	24	164	0	0	0	0	0
6	17	165	0	0	0	0	0
6	28	166	0	0	0.08099095	0	0.02024774
6	32	167	0	0.03293085	0.5192949	0.31992472	0.21803762
6	20	168	0	0	0	0	0
6	35	169	0	0	0	0	0
7	21	170	0	0	0.89090043	4.03434486	1.23131132
7	14	171	0	0	0.33349214	1.28205128	0.40388586
7	16	172	0	0	0.11910434	0.79275465	0.22796475
7	15	173	0	0	0.04764173	0.08939073	0.03425812
7	11	174	0	0	0.63363506	6.34438956	1.74450615
7	7	175	0	0	0.03334921	0.17407669	0.05185648
7	4	176	0	0	0.10481182	0.83274524	0.23438926
7	13	177	0	0	0.38589805	3.09809457	0.87099815
7	6	178	0	0	0.09528347	1.10797459	0.30081452
7	3	179	0	0	0.2334445	3.11456128	0.83700144
7	18	180	0	0	1.21010005	13.0604564	3.5676391
7	12	181	0	0	0	0	0
7	8	182	0	0	0.25726536	3.84144907	1.02467861
7	9	183	0	0	0.39066222	3.23923783	0.90747501
7	2	184	0	0	0	0	0
7	10	185	0	0	0.05240591	0.88214538	0.23363782
7	5	186	0	0	0	0	0
7	8	187	0	0	0	0	0
7	1	188	0	0	0	0	0
7	23	189	0	0	0	0.08703834	0.02175959
7	22	190	0	0	0.14768938	1.0491649	0.29921357
7	20	191	0	0	0.02382087	0.1529052	0.04418152
7	17	192	0	0	0	0	0
7	19	193	0	0	0.03811339	0	0.00952835
8	9	194	0	0	0	2.78993178	0.69748295
8	8	195	0	0	0	1.27734651	0.31933663
8	7	196	0	0	0	1.78546224	0.44636556
8	4	197	0	0	0	0.11056222	0.02764056
8	6	198	0	0	0	1.80898612	0.45224653
8	5	199	0	0	0	2.35238767	0.58809692
8	2	200	0	0	0	0.45401082	0.11350271
8	6	201	0	0	0	0	0

塩素数	溶出順位	BZ#	KC300 組成比 (%)	KC400 組成比 (%)	KC500 組成比 (%)	KC600 組成比 (%)	K C 平均値 組成比 (%)
8	1	202	0	0	0	0.64690661	0.16172665
8	7	203	0	0	0	0	0
8	3	204	0	0	0	0	0
8	10	205	0	0	0	0.10820983	0.02705246
9	3	206	0	0	0	0.7057163	0.17642908
9	2	207	0	0	0	0.06821924	0.01705481
9	1	208	0	0	0	0.13173371	0.03293343
10	1	209	0	0	0	0.00940955	0.00235239
11			100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000

II. 有機塩素系農薬，ポリ臭化ビフェニル及びベンゾ（a）ピレンの分析法

1 対象物質

HCH, γ -HCH, δ -HCH (リンデン), α -HCH, p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, メトキシクロル, ケルセン (ディコホル), アルドリン, ディルドリン, エンドリン, エンドサルファン, γ -エンドサルファン, ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシサイド, trans-クロルデン, cis-クロルデン, オキシクロルデン, trans-ノナクロル, cis-ノナクロル, ヘキサクロロベンゼン (HCB), オクタクロロスチレン, ポリ臭化ビフェニル (PBB), ベンゾ（a）ピレン (BaP)

2 目標検出限界

本分析法の目標検出限界（注1）は，水質が 25ng/L，底質及び生物試料が 5 μ g/kg である。

3 分析法概要

水質試料は，ヘキサンで液液抽出（または固相抽出カートリッジで抽出）後，脱水，濃縮して GC/MS-SIM で測定する。

底質試料は，アセトンで抽出後，食塩水を加えてヘキサンで抽出する。ヘキサン相を脱水，濃縮後，フロリジ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，アセトン - ヘキサン混合溶媒で抽出後，水洗して有機塩素系農薬・BaP 用とポリ臭化ビフェニル用試料に2分する。次に，有機塩素系農薬用試料は，アセトニトリル - ヘキサン分配で脂質を除き，フロリジルカラムクロマトグラフィーで分画して GC/MS-SIM で測定する。ポリ臭化ビフェニル用試料は，硫酸洗浄後フロリジルカラムクロマトグラフィーで分画して GC/MS-SIM で測定する。

4 試薬・器具

(1) 試薬

- ・ 対象物質：有機塩素系農薬は市販標準試薬。ポリ臭化ビフェニルは，臭化ビフェニル(2-, 3-, 4-体)及び二臭化ビフェニル(4,4'-体)が現在市販されている。今後，三臭化ビフェニル，四臭化ビフェニル，五臭化ビフェニル，六臭化ビフェニル及び十臭化ビフェニルが，市販の予定である。
- ・ サロゲート物質 (p,p'-DDT- $^{13}\text{C}_{12}$, HCB- $^{13}\text{C}_6$, BaP-d $_{12}$): 市販標準試薬
- ・ 内標準物質 (フェナンソレン-d $_{10}$, フルオランテン-d $_{10}$, p-ターフェニル-d $_{14}$): 市販標準試薬
- ・ 有機溶媒：残留農薬分析用 (1000 倍濃縮保証)

- ・ ガラス繊維ろ紙：保留粒子径 1 μm のバインダーを含まないもの。使用前にアセトン及び精製水で十分に洗浄する。
- ・ 無水硫酸ナトリウム，塩化ナトリウム：残留農薬試験用，または試薬特級を 700 で 8 時間加熱後，放冷したもの。
- ・ 精製水及び 5 % 塩化ナトリウム水：蒸留水など化学分析用の水（5 % 塩化ナトリウム水）をヘキサンで 2 回洗浄したもの。
- ・ フロリジル：残留農薬分析用（60/100 メッシュ）を 130 で 16 時間加熱し，デシケーター中で放冷・保存する。加熱後 2 日以上経ったものは，再加熱して使用する。また，フロリジルは，バッチ毎に活性が異なるので，バッチ毎に溶出パターンを確認する（注 2）。なお，市販の大容量フロリジルカートリッジを用いてもよい。
- ・ 5%含水シリカゲル：カラムクロマト用シリカゲル（和光純薬社製ワコーゲル C-200）を 130 で 15 時間加熱活性化した後，95g を 300ml の褐色共栓（透明摺）付き三角フラスコに秤取り，密栓して室温まで冷却する。シリカゲルを攪拌しながら，ホールピペットを用いて精製水 5ml を滴下して含水させ，密栓して発熱が終了するまで静かに混合する。更に，振とう器で 30 分間振とうした後，デシケータ（乾燥剤：シリカゲル）中に密栓して 15 時間以上保存したものを使用する。
- ・ 精製活性炭：ダルコ G 活性炭(Atlas Powder Co. 和光純薬)100g を 2L の分液ロートに取り，ベンゼン 1L で 30 分振とう洗浄する。静置後，沈降した活性炭を別の分液ロートに移し，アセトン 1L，続いてベンゼン 1L で洗浄する。沈降した活性炭をガラス繊維ろ紙でろ過し，少量のアセトンでさらに洗浄ろ過する。次に，活性炭を風乾し，さらに 130 で乾燥後，乳鉢で粉碎する。これを 130 で乾燥して三角フラスコに移し，シリカゲル入りのデシケータ中に保存する。
- ・ 2.5%活性炭含有無水硫酸ナトリウム：精製活性炭 25g と無水硫酸ナトリウム 75g を三角フラスコにはかり取り，振とう機で 30 分振とう混合後，シリカゲル入りのデシケータ中に保存する。
- ・ ODS 又はポリスチレン系樹脂などを充填した固液抽出用カートリッジまたはディスク：使用前に溶出溶媒及び精製水で十分に洗浄する。
- ・ シリカゲルカートリッジカラム（注 3）：例，Sep-Pak Plus Silica Cartridge (690 mg)（Waters 社製），使用直前にパックを開封し，ヘキサン 10ml で洗浄する。
- ・ 還元銅：有機元素分析用還元銅（60～80 メッシュ）。使用直前に使用する溶媒で洗浄する。ヘキサン中で保存する。
- ・ 硫酸：特級硫酸（96%）
- ・ その他の試薬：試薬特級

(2) 器具及び装置

- ・ フロリジルカラム：テフロンコック付きの長さ 30cm，内径 15mm のガラスカラムにフロリジル 10g 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。使用前に，ヘキサン 100ml で洗浄する。なお，市販の大容量フロリジルカートリッジを用いてもよい。
- ・ シリカゲルカラム：テフロンコック付きの長さ 30cm，内径 10mm のガラスカラムに 5%含水シリカゲル 5g 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。使用前に，ヘキサン 40ml で洗浄する。なお，市販の大容量シリカゲルカートリッジを使用してもよい。
- ・ 活性炭カラム：テフロンコック付きの長さ 30cm，内径 10mm のガラスカラムに 2.5%活性炭含有無水硫酸ナトリウム 10g を 30%アセトン含有ヘキサンで湿式充填し，上部に無水硫酸ナトリウムを 2cm 積層したもの。使用前に，30%アセトン含有ヘキサン 30ml で洗浄する。
- ・ ロータリーエバポレーター（またはクデルナダニッシュ(KD)濃縮装置）
- ・ 分液漏斗
- ・ 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
- ・ 超音波照射器（超音波洗浄器でもよい）
- ・ 遠心分離器
- ・ 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，四重極型もしくは二重収束型のもの。

5 試験操作（注4）

(1) 前処理法

(ア) 水質試料（注5）

試料水 1L（注6）を 2L 分液ロートに入れ，塩化ナトリウム 30g（海水は無添加）及びサロゲート物質（10ng～100ng，測定装置の感度による）を加え十分混合して溶解後，ヘキサン 50ml を加え 10 分間振とう抽出する。この抽出を計 2 回行い，ヘキサン層を合わせ，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（又は KD 濃縮）で約 5ml まで濃縮し，更に窒素気流で 1ml として前処理液とする。

(イ) 底質試料

湿泥 20g を 100ml 共栓付遠沈管にとり，サロゲート物質（10ng～100ng）を添加し十分混合して 1 時間放置後，アセトン 50ml を加えて 10 分間振とう抽出する。さらに，超音波洗浄器を用いて 10 分間超音波抽出を行った後，3000rpm で 10 分間遠心分離し，上澄みを回収する。この抽出分離操作を計 3 回行い，抽出液を合わせて 5%塩化ナトリウム

溶液 500ml を入れた 1L 分液ロートに加える。これにヘキサン 50ml を加え 5 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い、ヘキサン層を合わせて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（又は KD 濃縮装置）で 5ml まで濃縮して前処理液とする。

(ウ) 生物試料

a. 有機塩素系農薬及び BaP

均一化しペースト状にした試料 40g にサロゲート物質（20ng～200ng）を添加し十分混合して 1 時間放置後、アセトン 40ml とヘキサン 80ml を加えてホモジナイザーを用い 2 分間ホモジナイズする。これを 3000rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを回収する。この抽出分離操作を計 2 回行い、抽出液を 500ml 分液ロートに合わせて、精製水 200ml を加えて回転するように緩やかに揺り動かす（注 7）。静置後（注 8）、水層を捨て、同様の水洗浄を繰り返して、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（又は KD 濃縮装置）で 50ml 以下まで濃縮し、50ml メスフラスコに移してヘキサンで定容とし、その内 25ml を有機塩素系農薬用前処理液とする。

濃縮液 25ml を 100ml 分液ロートに取り、ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を加えて 1 分間振とう後、静置して（注 8）アセトニトリル層を分取する。残ったヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を加えて同様に振とう・静置して、アセトニトリル層を回収する。アセトニトリル層を合わせ、水 5ml を加えて緩やかに揺り動かし、静置して（注 8）ヘキサンを浮上させアセトニトリル層と分離する。

アセトニトリル層を 5% 塩化ナトリウム溶液 500ml を入れた 1L 分液ロートに入れ、ヘキサン 50ml を加えて 5 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い、ヘキサン層を 300ml 分液ロートに合わせて、精製水 100ml で振とう洗浄する。次に、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（又は KD 濃縮）で 5ml まで濃縮して前処理液とする。

b. ポリ臭化ビフェニル

有機塩素系農薬用前処理液を分取した残りの濃縮液 25ml を 50ml 分液ロートに移し、濃硫酸 10ml を加えて振とう洗浄する（注 9）。この硫酸洗浄を硫酸相がきれいになるまで繰り返した後、ヘキサン相を精製水で 3 回洗浄して無水硫酸ナトリウムで脱水し、50ml のナス型フラスコに移して、ロータリーエバポレーター（又は KD 濃縮）で 5ml まで濃縮して前処理液とする。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質（注 10）

シリカゲルカラムカートリッジ（注 3）に前処理液（注 11）を負荷し、事前に求めていた量の 2%アセトン含有ヘキサンを流して対象物質を溶出する（注 12）。溶出液を

数 ml までロータリーエバポレーター(又は KD 濃縮)で濃縮後、内標準を添加して(100ng ~ 1000ng, 測定装置の感度による), 窒素気流で 1ml まで濃縮して測定試料液とする。

(イ) 底質

前処理液をフロリジルカラム(注13)に負荷し, 事前に「フロリジルの溶出パターンの確認」で求めている量のヘキサン(Fr. 1)(注2)(注14), 4%エチルエーテル含有ヘキサン 100ml(Fr. 2), 15%エチルエーテル含有ヘキサン 150ml(Fr. 3)を毎分 5ml の流速で順次流して対象物質を溶出する。次に, Fr. 1 に還元銅 5 ~ 10g を加え, 1 分間激しくかき混ぜて, 無水硫酸ナトリウム 10g を充填したガラスカラム(内径 10mm, 長さ 300mm)に通してろ過する。各分画は, ロータリーエバポレーター(又は KD 濃縮)により数 ml とし, 内標準を添加(100ng ~ 1000ng)して窒素気流で 1ml まで濃縮し測定試料液とする。(注15)。

(ウ) 生物

a. 有機塩素系農薬

前処理液をフロリジルカラム(注13)に負荷し, 事前に「フロリジルの溶出パターンの確認」で求めている量のヘキサン(Fr. 1)(注2), 4%エチルエーテル含有ヘキサン 100ml(Fr. 2), 15%エチルエーテル含有ヘキサン 150ml(Fr. 3)を毎分 5ml の流速で順次流して対象物質を溶出する。各分画は, ロータリーエバポレーター(又は KD 濃縮)により数 ml とし, 内標準を添加(100ng ~ 1000ng)して窒素気流で 1ml まで濃縮し測定試料液とする。(注15)。

b. ポリ臭化ビフェニル

前処理液をフロリジルカラム(注13)に負荷し, 事前に「フロリジルの溶出パターンの確認」で求めている量のヘキサンを毎分 5ml の流速で順次流して対象物質を溶出する。次に, ロータリーエバポレーター(又は KD 濃縮)により数 ml とし, 内標準を添加して窒素気流で 1ml まで濃縮し測定試料液とする。

(3) 空試験液の調製

試料を用いずに「試料の前処理」及び「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) 標準液の調製

各測定対象物質の標準品を正確に 10mg 取り, ヘキサンを加えて正確に 100mg/L 標準原液を調製する。これを, 適宜ヘキサ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(p,p'-DDT-¹³C₁₂, HCB-¹³C₆, BaP-d₁₂)及び内標準物質(フェナンソレン-d₁₀, フルオランテン-d₁₀, p-ターフェニル-d₁₄)の標準原液及び混合標準液の調製も, 対象物質と同様に行う。但し, 試料に添加するサロゲート物質や混合標準液は,

アセトンで調製する（注16）。

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。

(5) 測定

(ア) GC/MS 測定条件

(a) GC

有機塩素系農薬

- ・ カラム：溶融シリカキャピラリーカラム（30m×0.25mmi.d.，0.25 μm）
- ・ 液相は、メチルシリコンまたは5%フェニルメチルシリコン
- ・ カラム温度：50（1分）- 10℃/分 - 280（5分）
- ・ 注入口温度：250
- ・ 注入法：スプリットレス法（1分後パーズ），1 μL 注入
- ・ キャリアーガス：He，平均線速度：40cm/秒
- ・ インレット温度：280

ポリ臭化ビフェニル

- ・ カラム：溶融シリカキャピラリーカラム（15m×0.25mmi.d.，0.10 μm），イオン源の真空が不十分な時は、カラムの先端に不活性フューズドシリカ管（15m×0.25mmi.d.）を付ける。
- ・ 液相：メチルシリコン
- ・ カラム温度：50（1分）- 10℃/分 - 300（十臭化ビフェニルが流出するまで）
- ・ 注入口温度：250
- ・ 注入法：スプリットレス法（1分後パーズ），1 μL 注入
- ・ キャリアーガス：He，平均線速度：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：使用機器による
- ・ 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及び表2

に示す(注17)。

表1-1 有機塩素系農薬の測定イオン及び保持指標(PTRI, Programmed Temperature Retention Index)

No.	物質名	CAS RN	PTRI*	測定イオン		
				定量用	確認用	確認用
1	-ヘキサクロロシクロヘキサ(H C H)	319-84-6	1700	180.9	218.9	182.9
2	- H C H	319-85-7	1748	180.9	218.9	182.9
3	- H C H (リンデン)	58-89-9	1767	180.9	218.9	182.9
4	- H C H	319-86-8	1822	180.9	218.9	182.9
5	p,p'-DDT	50-29-3	2361	235.0	237.0	165.1
6	p,p'-DDE	72-55-9	2185	246.0	317.9	316.9
7	p,p'-DDD	72-54-8	2275	235.0	237.0	165.1
8	メトキシクロル	72-43-5	2487	227.1	228.1	
9	ケルセン(ディコホル)	115-32-2	2473	139.0	250.0	111.0
10	アルドリン	309-00-2	1983	262.9	264.9	66.0
11	ディルドリン	60-57-1	2200	79.0	262.9	276.8
12	エンドリン	72-20-8	2245	262.9	81.0	264.9
13	エンドサルファン	959-98-8	2142	195.0	240.9	338.9
14	エンドサルファン	33213-65-9	2270	195.0	240.9	338.9
15	ヘプタクロル	76-44-8	1910	271.8	100.0	273.8
16	ヘプタクロルエポキサイド(異性体B)	1024-57-3	2064	352.8	354.8	81.0
17	trans-クロルデン	5103-74-2	2113	374.8	372.8	236.8
18	cis-クロルデン	5103-71-9	2140	374.8	372.8	236.8
19	オキシクロルデン	27304-13-8		115.0	386.8	236.8
20	trans-ノナクロル	39765-80-5	2146	408.8	406.8	410.8
21	cis-ノナクロル	5103-73-1	2302	408.8	406.8	410.8
22	ヘキサクロロベンゼン(HCB)	118-74-1	1705	283.8	285.8	248.8
23	オクタクロロスチレン	29082-74-4		379.7	377.7	381.7
24	ベンゾ(a)ピレン	50-32-8	2920	252.1		

*: 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。

表1-2 ポリ臭化ビフェニルの測定イオン(注17)

対象物質	定量イオン	確認イオン
臭化ビフェニル	234.0	152.1, 232.0
二臭化ビフェニル	311.9	309.9, 313.9
三臭化ビフェニル	389.8	391.8, 230.0
四臭化ビフェニル	469.7	467.7, 471.7
五臭化フェニル	547.6	549.6, 387.8
六臭化ビフェニル	627.5	625.5, 629.5
十臭化ビフェニル	623.5	621.5, 625.5

表2 サロゲート物質及び内標準物質の測定イオン

No .	物質名	測定イオン		
		定量用	確認用	確認用
1	p,p'-DDT- ¹³ C ₁₂	247.0	249.0	177.1
2	HCB- ¹³ C ₆	289.8	291.8	283.8
3	ベンゾ(a)ピレン-d ₁₂	264.2		
4	フェナンソレン-d ₁₀	188.1		
5	フルオランテン-d ₁₀	212.1		
6	p-ターフェニル-d ₁₄	244.2		

(6) GC/MS 性能評価試験

測定開始前に GC/MS 性能評価を行い、基準を満足することを確認した後、測定を行う。

(ア) GC の性能評価

・ p,p'-DDT , デカフロロトリフェニルホスフィン(DFTPP) , ベンジジン及びペンタクロロフェノールの 1mg/L 混合標準液(ヘキサン溶液)の 1μL を GC/MS に注入してスキャンニングモードで測定し、次の確認を行う。

・ インサートの不活性さ及びカラムの性能評価

DDT の DDD 及び DDE への分解が、20%を越えないこと、及びベンジジンとペンタクロロフェノールが著しくテーリングしないことを確認する。これらを満足しない場合(特に DDT の 20%以上が分解した場合は、インサートを交換し、カラムの先端を数十 cm 切断除去するか、またはカラムを交換する。

(イ) MS の性能評価

DFTPP のマススペクトルが表 3 を満足すること。

表3 DFTPP のマススペクトル評価

51	m/z 198 の 15 ~ 75%
68	m/z 69 の 2%以下
70	m/z 69 の 2%以下
127	m/z 198 の 15 ~ 60%
197	m/z 69 の 1%以下
198	ベースピークかまたは第二のピーク
199	m/z 198 の 4.5 ~ 9%
275	m/z 198 の 10 ~ 60%
365	m/z 198 の 0.5%以上
442	m/z 198 がベースピークの時は、 その 40%以上、またはベースピーク
443	m/z 442 の 15 ~ 24%

(ウ) SIM の感度確認

検量線の最下限濃度を測定し、必要な感度を得られることを確認する。

(7) 検量線

感度係数法(RF)または内標準を用いた検量線により試料を定量する(注18)。

(ア) 感度係数法(RF)

分析法の検出限界付近と予想される検出濃度レベルを含む5段階以上の標準液を測定し、次式からRFを求める。RFの相対標準偏差が15%以下の場合は、平均RFを用いて試料を定量する。毎測定時の試料測定前に、検量線の間濃度の標準液を測定して感度係数法で定量し、得られた定量値が注入標準液濃度の±15%以内であるなら、平均RFをそのまま用いて試料を定量する。±15%を外れた場合は、全ての標準液を測定し直して新たな平均RFを求めて試料の定量を行う。

$$RF=(A_s \times C_{is})/(A_{is} \times C_s)$$

ここで、 A_s ：対象物質(サロゲート物質)の測定イオンのピーク面積(高さ)

A_{is} ：内標準物質の測定イオンのピーク面積(高さ)

C_{is} ：検量線標準液中の内標準物質質量(ng)

C_s ：検量線標準液中の対象物質(サロゲート物質)量(ng)

(イ) 検量線法(注19)

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 μ l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、分析法の検出限界付近と予想される検出濃度レベルを含む5段階以上とする。

(8) 試料の測定

GC/MS性能評価、SIMの感度確認及びRF確認(または、検量線作成)後、測定用試料液1 μ lをGCに注入して測定を行う(注20)。なお、試料の測定に当たっては、サロゲート物質のp,p'-DDT-¹³C₁₂のDDD及びDDEへの分解が、20%を越えないことを確認する。20%以上分解した場合は、クリーンアップが不十分な可能性があるため、クリーンアップを検討して再分析する。測定時8時間毎に検量線の間濃度の標準液を測定し、そのRFが平均RFの±15%以内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、RFを確認して測定を再開する。

(9) 同定、定量及び計算

対象物質(サロゲート物質)の有無の確認後、存在する場合は定量を行う(注21)。

(ア) 同定

対象物質(サロゲート物質)の定量イオン及び確認イオンのピークが、検量線に登録された保持時間の±5秒以内に出現し、確認イオンのピーク強度が検量線に登録された定量イオンとの相対強度と±20%以下であれば、物質が存在していると見なす。

(イ) 定量

(a) RF 法

RF を用いる場合は、次式から検出量(ng)を求める。次に、検出量、分析した試料量及び分取量などから試料中の対象物質(サロゲート物質)の濃度を計算する。

$$\text{検出量(ng)} = (\text{As} \times \text{Cis}) / (\text{Ais} \times \text{RF})$$

ここで、As：対象物質及びサロゲート物質の測定イオンのピーク面積(高さ)

Ais：内標準物質の測定イオンのピーク面積(高さ)

Cis：測定試料液中の内標準物質質量(ng)

(b) 検量線法

検量線法を用いる場合は、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、分析した試料量及び分取量などから試料中の対象物質(サロゲート物質)の濃度を計算する。

6 分析精度管理

正確な分析値が得られていることを保証するために以下の作業を行い、その結果を記録・保存する。

(1) 内部精度管理

(ア) 10 検体又は 1 バッチ試験毎に全操作ブランク、二重分析及び添加回収試験(注 2 2)を各 1 検体以上行う。

- ・ 操作ブランクが通常の値を超えた場合は、原因を究明して対策を講じた後、全ての試料の再試験を行う。
- ・ 二重分析の結果が許容差(注 2 3)を超えた場合は、その試料について再試験を行う。
- ・ 回収率は、80%～120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。

(イ) サロゲート物質は、80%～120%の回収率が得られることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明してその試料について再試験を行う。

(ウ) 標準物質の確認

標準原液の調製時に、異なる供給元の標準物質を用いて使用する標準物質を検定する。異なる試薬会社から購入する方法もあるが、米国 NIST や EU 標準局 BCR が販売している CRM が最適である。

(エ) 保証標準試料(CRM)の分析(注 2 4)

CRM を入手して、半年に 1 回以上の頻度で分析精度と正確さを確認する。

7 注意事項

注1：検出限界の算出法

試料の分析を開始する前に、次の試験を行い検出限界値を達成できることを確認しておく。検出限界値は、対象物質や使用装置の感度により異なるが、できるだけ低い値を目標とする。達成できない場合は、試料量を増やすなどの対策を講じる。但し、高臭素化ビフェニルの検出限界が目標を満足しなくても問題ない。

(ア) 操作ブランクから対象物質が検出される場合

操作ブランクを7回行い、ブランク値の平均(x)及び標準偏差(s)を得て、次式から検出限界値(DL)を得る。

$$DL = x + 1.943 s$$

(イ) 操作ブランクから対象物質が検出されない場合

検量線の最下限の2~5倍(又は目標検出限界の2~5倍)になるよう精製水に対象物質を加えて、添加回収試験を行う。7回の添加回収試験の結果から、検出値の標準偏差(s)を求めて、次式から検出限界値(DL)を得る。

$$DL = 1.943 s$$

注2：フロリジルの溶出パターンの確認法

オープンカラムの場合は、分析試料と類似の試料を用いてカラムクリーンアップまでの前処理を行って得た濃縮液(5ml)に全対象物質の混合標準溶液(2µg, ヘキサン溶液)を添加する。これをフロリジルカラムに負荷し、最初にヘキサンを毎分5mlの流速で流して、その溶出液を20mlずつ分取して、GC/MSで測定してp,p'-DDEが溶出し終わり、p,p'-DDTが溶出してこないヘキサン量を求める。p,p'-DDEの溶出終了後、溶離液を4%エーテル含有ヘキサンに替えて100ml流してp,p'-DDTとヘプタクロルエポキシドが溶出し、さらに溶離液を15%エーテル含有ヘキサンに替えて、その150mlで残った物質が全て溶出することを確認する。なお、市販のカートリッジを用いる場合も、オープンカラムと同様に溶出パターンを確認する。

注3：フロリジルカートリッジカラムを用いてもよい。

注4：BaPは光分解しやすいため、使用するガラス器具は褐色ガラスを用いるか、遮光して分析する。さらに、太陽光などにさらさないよう注意して、短時間で処理する。

注5：ODSやポリマーなどを充填した固相抽出カートリッジや固相抽出ディスクにより、ヘキサン抽出と同等の抽出率が得られる場合は、固液抽出を用いることができる。

注6：液液抽出または固液抽出のいずれの場合でも、排水など浮遊物質が多量に存在する試料では、抽出する前にガラス繊維ろ紙で試料をろ過する。次に、浮遊物質をろ紙と共に少量のアセトンで2回超音波抽出し、抽出液をろ液に合わせた後、抽出操作に移る。なお、この場合、サロゲート物質はろ過する前に添加し、十分に混合した後にろ過を行う。

注7：強く振とうするとエマルジョンができる場合がある。ここでは、軽く水洗する程度でよい。

注8：15～30分静置する。静置時間が短いと分配効果が十分でなく、回収率低下の恐れがある。

注9：硫酸洗浄では、分液ロートに残った水と硫酸とで発熱するため注意が必要である。

注10：GC/MS測定において妨害を受けない場合は、カラムクロマトグラフィーを省略できる。

注11：固液抽出の溶離液としてアセトンなどの極性を持つ溶媒を用いた場合は、ヘキサンに溶媒転溶してカラムに負荷する。

注12：カラムクロマトグラフィーにおける各物質の溶出パターンと回収率を確認しておく。

注13：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も良い。5%含水シリカゲル(5g)での対象物質(一部)の溶出パターンの例を表4に示す。底質の30%アセトン-ヘキサンフラクションには、大量の色素等が溶出するため、Fr.3は濃縮後、活性炭カラムクリーンアップが必要である。但し、Fr.3の最初に溶出するエンドサルファンは、5%アセトン-ヘキサンを10ml追加すれば、溶出可能と思われる。

表4 5%含水シリカゲル(5g)の溶出パターン(一例) フラクション容積: 10ml

対象物質	Hexane				5% Acetone-Hexane				30% Acetone-Hexane			
	Fr.1-1	Fr.1-2	Fr.1-3	Total	Fr.2-1	Fr.2-2	Fr.2-3	Total	Fr.3-1	Fr.3-2	Fr.3-3	Total
ヘキサクロロベンゼン	74	25	1	99	1	0	0	1	0	0	0	0
BaP	0	0	1	1	86	12	0	99	0	0	0	0
α-HCH	0	0	0	0	2	71	27	100	0	0	0	0
β-HCH	0	0	0	0	0	0	99	99	1	0	0	1
γ-HCH	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
δ-HCH	0	0	0	0	0	0	98	98	2	0	0	2
ヘプタクロル	0	97	2	99	1	0	0	1	0	0	0	0
アルドリン	0	99	1	99	1	0	0	1	0	0	0	0
ヘプタクロルエポキシド	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
trans-クオルテン	0	0	3	3	82	14	0	97	0	0	0	0
cis-クオルテン	0	0	33	33	65	2	0	67	0	0	0	0
エンドサルファン I	0	0	0	0	0	1	99	100	0	0	0	0
trans-ノカロル	0	1	91	92	7	0	0	8	0	0	0	0
4,4'-DDE	0	98	1	99	1	0	0	1	0	0	0	0
ディルドリン	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
エンドリン	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
エンドサルファン II	0	0	0	0	0	0	87	87	13	0	0	13
4,4'-DDD	0	0	1	1	29	59	11	99	0	0	0	0
4,4'-DDT	0	19	79	98	2	0	0	2	0	0	0	0
メトキシクロル	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0

注14：フロリジル(シリカゲル)カラムクロマトグラフィーのヘキサン分画(Fr.1)には、分子状硫黄が溶出してくる。

注15：各分画を合わせても妨害を受けずに分析できる場合は，合わせて測定してもよい。その場合，最初から15%エチルエーテル含有ヘキサン150mlを流して溶出できる。また，内標準物質は合わせた試料に添加する。

注16：ヘキサンに溶解しにくい内標準物質は，少量のベンゼンに溶解後，ヘキサンで希釈して定容とする。

注17：定量イオンが妨害を受ける場合は，妨害を受けていない確認イオンを用いて定量を行う。

注18：ポリ臭化ビフェニルには209種の異性体が存在するが，標準品が入手できた異性体のみを定量する。

注19：RFの%RSDが，15%以上である場合に用いるとよい。

注20：試料間のクロスコンタミを防止するため，高濃度の試料測定後は，溶媒を測定するなどしてキャリーオーバーが無いことを確認する。

注21：サロゲート物質としてDDT，HCBの¹³Cラベル化合物及び，BaPの重水素化合物を用いる。80%～120%の回収率が得られることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は，原因を究明してその試料について再試験を行う。

注22：添加回収試験は，試料と同じあるいは類似の試料に対象物質のアセトン標準液を検出限界の5～10倍量程度添加して行う。

注23：許容差の求め方は，JIS Z8402，分析・試験の許容差通則，1974を参照

注24：有機塩素系農薬の土壌及び魚のCRMは販売されていないが，性状が似ているものとしてタラの肝油(米国NIST SRM 1588)，粉ミルク(EU標準局BCR CRM 187, CRM 188)及び豚の脂肪(EU標準局BCR CRM 430)などが入手可能である。また，ヘキサンなどの溶媒に溶解したCRMも販売されている。

8 添加回収試験結果及び検出限界値

精製水1L及び洞海湾底質20gを用いて対象物質の一部について添加回収試験を行った。その結果及び注1に従って求めた検出限界値を表5に示す。

表5 添加回収試験結果及び検出限界

Compound	水質, 100ng添加			底質, 20ng又は120ng添加		
	回収率%	RSD%	検出限界 µg/L	回収率%	RSD%	検出限界 µg/kg
Hexachlorobenzene	96	6.2	0.019	*		
alpha-HCH	83.0	6.0	0.019	48	0.57	1.9
beta-HCH	85.6	6.9	0.022	55	0.87	2.9
gamma-HCH	85.4	7.2	0.022			
delta-HCH	84.1	6.5	0.021			
Heptachlor	91.1	6.6	0.021			
Aldrin	83.6	6.1	0.019			
Heptachlor epoxide	92.9	6.8	0.021			
Oxychlordene	91.9	9.2	0.029			
trans-Chlordane	93.6	6.9	0.022	60	0.1	0.34
cis-Chlordane	94.4	5.4	0.017	152	0.15	0.49
Endosulfan I	84.3	7.1	0.022			
trans-Nonachlor	92.4	6.9	0.022	139	0.2	0.7
4,4'-DDE	86.4	5.7	0.018	58	0.6	2
Dieldrin	92.9	7.4	0.023	74	1.4	4.8
Endrin	97.6	5.9	0.019			
4,4'-DDD	75.7	6.7	0.021	*		
cis-Nonachlor	84.9	5.8	0.018			
Endosulfan sulfate	77.6	6.3	0.020			
4,4'-DDT	81.0	5.2	0.016	*		
Endrin ketone	71.7	6.9	0.022			
Methoxychlor	82.1	5.4	0.017			
Benzo(a)pyrene	98.4	8.3	0.026	*		

空白及び生物試料は、未実施。

* : 添加量の10倍以上が検出されたため計算を行わなかった。

参考文献

- 1 水質・底質モニタリング調査マニュアル(1991年版), 環境庁環境保健部保健調査室, 1991.
- 2 生物モニタリング調査マニュアル, 環境庁環境保健部保健調査室, 1987.
- 3 Standard Methods 19th ed. American Public Health Association, 1995.
- 4 EPA Method 8270B, US EPA, 1994.
- 5 Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists 15th ed. Vol. 1, Association of Official Analytical Chemists, Inc., 1990.

- 6 4,4'-ジブロモビフェニル，平成 8 年度化学物質分析法開発報告書，環境庁環境保健部環境安全課，1997．
- 7 テトラブロモビフェニル，ヘキサブロモビフェニル，デカブロモビフェニル，昭和 63 年度化学物質分析法開発報告書，環境庁環境保健部保健調査室，1989．
- 8 環境中有害化学物質のマススペクトルデータベース(1996 年版)，日本環境化学会，1996．
- 9 JIS Z8402，分析・試験の許容差通則，1974．
- 10 有機質量分析法，J.R. Chapman 著，土屋正彦ら訳，丸善・Wiley，1995．
- 11 WHO 環境保健クライテリア 152 ポリ臭化ビフェニル，日本化学物質安全・情報センター，1995．

有機塩素系農薬及びポリ臭化ビフェニールの分析フローチャート

《水質試料》



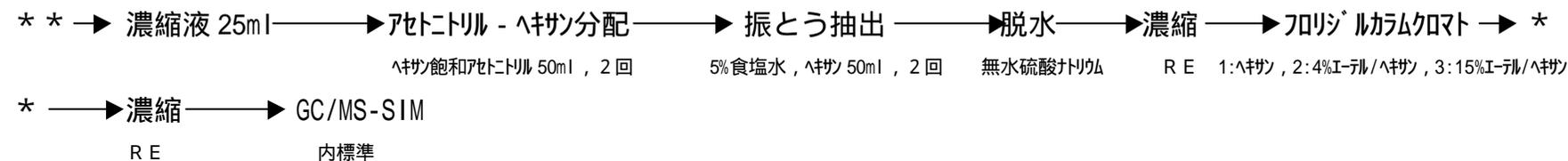
《底質試料》



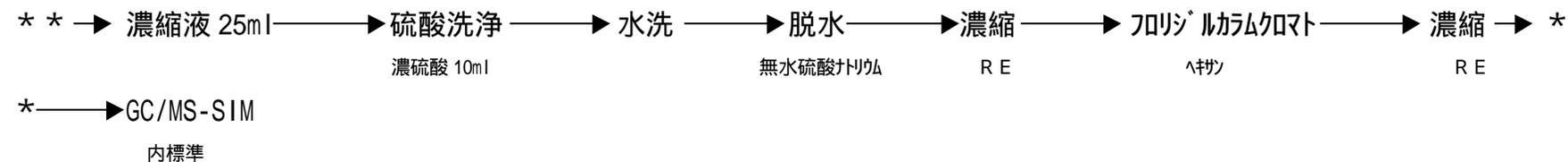
《生物試料》



〔有機塩素系農薬〕



〔ポリ臭化ビフェニール〕



III . フェノール類の分析法

. 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
- ・分液漏斗
- ・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、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		371 (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。

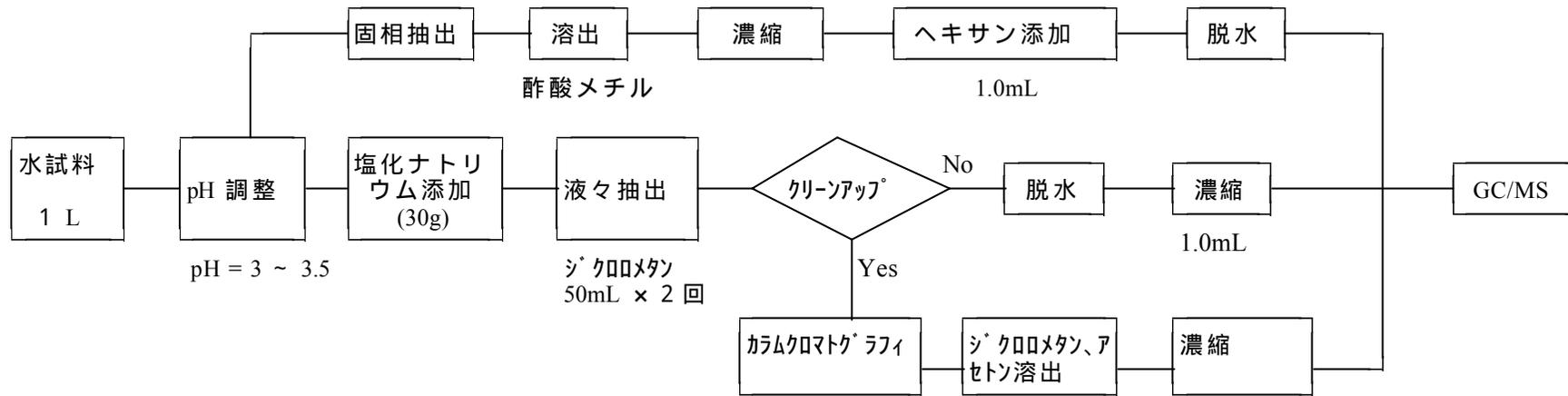
注 9 : この表に示された質量数はビスフェノール A-d₁₆ の場合の値である。重水素の数が 6 ~ 8 個のビスフェノール A の場合にはトリメチルシリル体の質量スペクトルを測定して、最適の測定イオンを決める。

参考文献

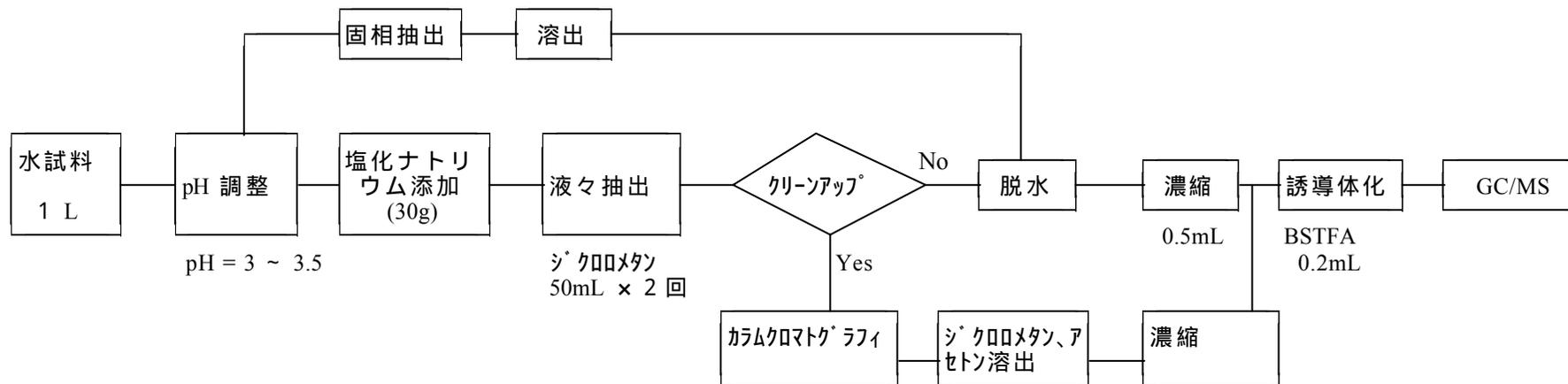
平成 7 年度化学物質分析法開発調査報告書。

平成 8 年度化学物質分析法開発調査報告書。

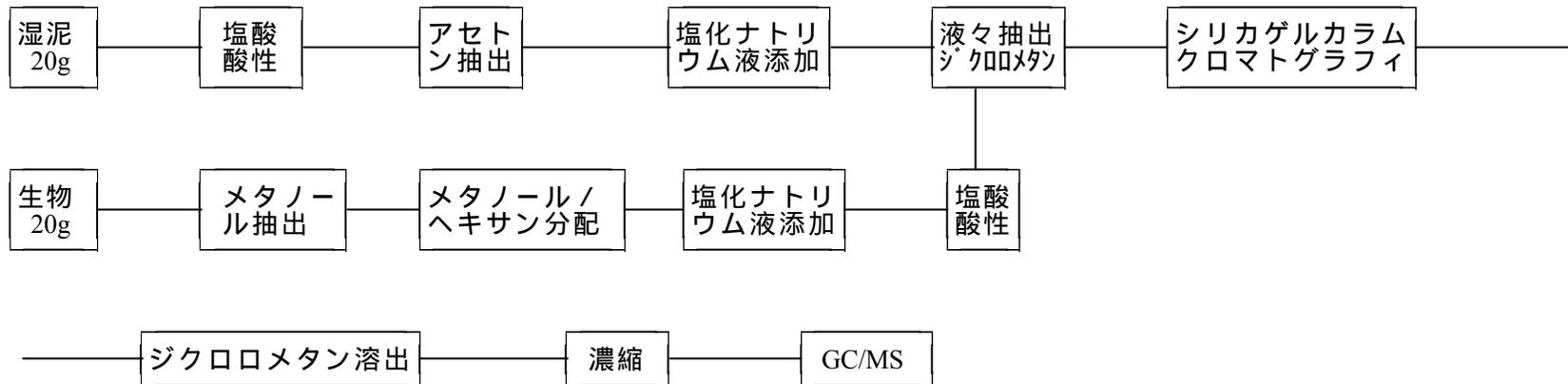
水質試料中のアルキルフェノールの分析



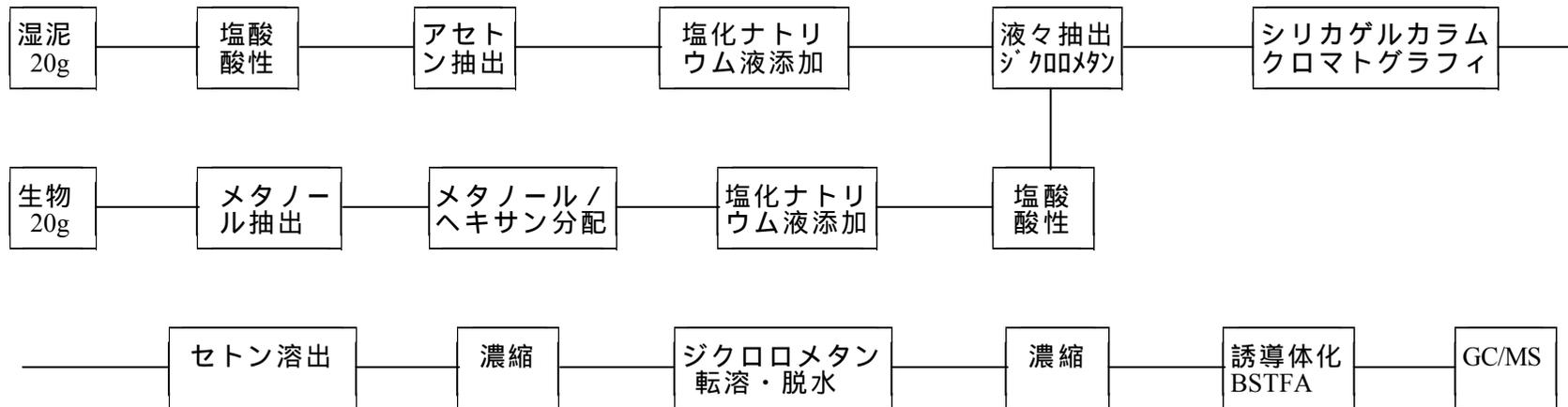
水質試料中のビスフェノールA、クロロフェノールの分析



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 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：70e V
- ・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思なす。

(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。以下の通りに操作する。

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лина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лина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) 1N 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。

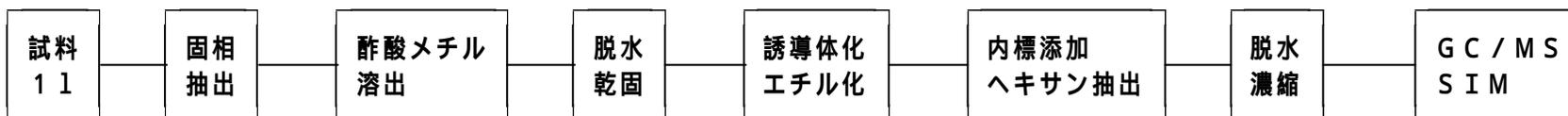
(注18) ノニルフェノールは多くの異性体混合物であるので他の物質の10倍濃度とする。また、通常環境中には他の物質よりも存在量が多いので、10倍濃度とした方が好都合である。

(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。

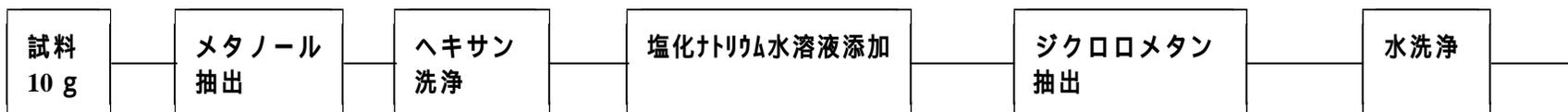
(注20) フェネトール体は原体のフェノールよりも安定であり、検量線用標準液は測定のたび毎に作製する必要はない。冷蔵庫内に保管すれば半永久的に使用できる。

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



．フタル酸エステルの分析法

1 対象物質 (注1)

フタル酸ジエチル，フタル酸ジプロピル，フタル酸ジイソブチル，フタル酸ジ-n-ブチル，*フタル酸ジペンチル，*フタル酸ジヘキシル，フタル酸ジ-2-エチルヘキシル，フタル酸ジシクロヘキシル，フタル酸ブチルベンジル，但し，*は混合物注 2)であるが，今回はノルマルとした.)

2 目標検出限界

本分析法の水質試料の検出限界はフタル酸ジ-n-ブチル，フタル酸ジ-2-エチルヘキシルで 0.5 μ g/L，その他のフタル酸エステルで 0.2 μ g/L を目標とする．また底質試料・生物試料の検出限界はフタル酸ジ-n-ブチル，フタル酸ジ-2-エチルヘキシルで 25 μ g/kg，その他のフタル酸エステルで 10 μ g/kg を目標とする．

なお，対象物質の内，最も感度の良い物質はフタル酸ジ-n-プロピル，最も感度の悪い物質はフタル酸ジ-2-エチルヘキシルであり，その感度差は約 10 倍である．

3 分析法概要

水質試料は試料水に塩化ナトリウムを加えてヘキサンで抽出後，GC/MS-SIM で測定する．

試料水 —— 塩析 —— 攪拌抽出 —— 濃縮 —— 脱水 —— 定量

底質試料は振とう器と超音波洗浄器を用いてアセトニトリルで抽出する．このアセトニトリル抽出液をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)にかけ，フタル酸エステル分画を分取し，GC/MS-SIM で測定する．またはアセトニトリル抽出液に 5 %塩化ナトリウム水溶液を加えた後，ヘキサンに転溶し，フロリジ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．

底質試料 —— アセトニトリル超音波抽出 —— 濃縮 —— GPCカラム —— 濃縮 —— 脱水 —— 定量
| |
塩化Na溶液 —— ヘキサン抽出 —— 脱水濃縮 —— 含水フロリジルカラム

生物試料はホモナイザーを用いてアセトニトリルで抽出する．このアセトニトリル抽出液をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)にかけ，フタル酸エステル分画を分取し，GC/MS-SIM で測定する．またはアセトニトリル抽出液をアセトニトリルヘキサン分配で脂質を除去した後，アセトニトリル層に 5 %塩化ナトリウム水溶液を加え，ヘキサンで抽出する．ヘキサン抽出液を脱水濃縮後，このヘキサン抽出液をフロリジ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 —— アセトニトリルホモナイザー抽出 —— 濃縮 —— GPCカラム —— 濃縮 —— 脱水 —— 定量
| |
脂質除去 —— 塩化Na水溶液 —— ヘキサン抽出 —— 脱水濃縮 —— 含水フロリジルカラム

なお，試験方法では試薬，溶媒類，器具類からの汚染，操作中及び空気中からの汚染がフ

タル酸エステルの測定結果に大きく影響を及ぼすので、細心の注意が必要である。操作中及び空気中からの汚染を避ける為、また試薬、溶媒類、器具類の管理上、クリーンルームで試験を行うことが望ましい。多くの試験室ではクリーンルームはないので、試薬量、溶媒量を最小に、また空気との接触量、接触時間を最小にする必要がある。

4 試料の採取及び保存方法

4.1 水質試料

洗剤、水、アセトン、ヘキサン(注 3)の順に洗浄した後、200 で 2 時間以上加熱し、放冷した 1L のネジ口ガラスビン(注 4)に試料水を泡立てないように静かに採取し、満水にして密栓をする。試験は試料採取後速やかに行う。速やかに試験できない場合には冷暗所(4)で保存する。

なお、ガラスビンのネジ口はフタル酸エステルの汚染のないテフロンまたはアルミホイル等の付いた内蓋を使用すること。

4.2 底質試料

水質試料と同様の方法で洗浄・加熱した摺り合わせの広口ガラスビンに入れ密栓し、-10 以下で保存する。

4.2 生物試料

試料をミキサーで摩砕均一化し、底質試料と同様にして保存する。

5 試薬・器具(注 5)

5.1 試薬

有機溶媒：使用直前に、未開封の残留農薬 1000 倍試験用(注 6)を使用。

フタル酸エステル：市販標準試薬、または特級試薬。

サロゲート物質(フタル酸ジエチル-d₄、フタル酸ジイソブチル-d₄、フタル酸ジ-n-ブチル-d₄、フタル酸ジ-n-ヘプチル-d₄、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d₄、フタル酸ブチルベンジル-d₄、フタル酸ジシクロヘキシル-d₄)：市販標準試薬。

内標準物質(4-クロロトルエン-d₄、ナフタレン-d₈、ピフェニル-d₁₀、フェナントレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀、クリセン-d₁₂、ペリレン-d₁₂)：市販標準試薬。

無水硫酸ナトリウム：PCB・フタル酸エステル試験用(注 7)。

塩化ナトリウム：試薬特級を 500 ~ 700 で 8 時間加熱後、汚染のないところで放冷したもの。

精製水(注 8)：逆浸透さらにミリQ処理した精製水(注 9)を活性炭カートリッジ(注 10)に通したもの。(備考 1)

5 %塩化ナトリウム：精製水に 5 %(W/V)となるように処理済の塩化ナトリウムを加えて、溶解させたもの。

含水フロリジル：残留農薬試験用(60/100 メッシュ)フロリジルを 130 で 16 時間加熱し、デシケーター内で放冷する。このフロリジル 100g を共栓付き三角フラスコにとり、精製水

5.7mL 加えて栓をし、時々振りまぜながら均一になるまで 4 ~ 5 時間放置したもの。

窒素ガス：窒素ガス吹き付けに使用するガスは高純度窒素ガス(純度 99.999 %以上)を使用する。但し、フタル酸エステルの汚染が認められる窒素ガスの場合には活性炭カートリッジを通して使用する。

その他の試薬：未開封の特級試薬。

5.2 器具及び装置

含水フロリジルカラム：長さ 30cm，内径 1cm のガラスカラムに 2g のフロリジルをヘキサンを用いて湿式充填し，この上部に無水硫酸ナトリウムを 1cm 積層したもの。

ロータリーエバポレーター，または K D 濃縮装置

分液漏斗：S P 摺り合わせまたは透明摺り合わせを使用する。この分液漏斗は 200 以上の温度で 2 時間以上加熱(注 11)し，汚染のないところで放冷する。

共栓付試験管，共栓付遠沈管，ナス型フラスコ等のガラス器具：SPC 摺り合わせ，または透明摺り合わせを使用する。これらガラス器具は 200 以上の温度で 2 時間以上加熱(注 11)し，汚染のないところで放冷する。

その他のガラス器具：200 以上の温度で 2 時間以上加熱(注 11)し，汚染のないところで放冷する。

マグネチックスターラー：水質試料の抽出に使用する。

ホモジナイザー：生物試料の溶媒抽出に使用する。

超音波照射器（超音波洗浄器でもよい）：底質試料の溶媒抽出に使用する。

遠心分離器：底質・生物試料の固液分離に使用する。

乾燥器：ガラス器具等の加熱に使用する。

電気炉：塩化ナトリウムの焼成に使用する。

振とう器：液液抽出に使用する。

高速液体クロマトグラフィー用充填カラム：水溶媒有機溶媒両用タイプで排除限界分子量 40000 以下のポリビニルアルコール系ハードゲル(通称，GPC)をステンレス鋼製分離管(内径は 8 ~ 20mm，長さは 300mm)に充填したもの(注 12)。

高速クロマトグラフ (HPLC)：GPC カラムを使用して，フタル酸エステル分画を分取するのに使用する。

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。

6 試験操作

6.1 測定用試料液の調製

(1) 水質試料 (注 13)

試料水 95ml を SPC 共栓付又は透明摺り合わせ共栓付メスフラスコ 100ml(注 14)にとり，所定量のサロゲート物質(注 15)及び塩化ナトリウム 15g(注 16)，ヘキサン 2.5ml(注 17)，攪拌子(注 18)を加え，マグネチックスターラーで攪拌を 1 ~ 4 時間(注 19)行う。この抽出液に窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml(注 20)に濃縮し，更に無水硫酸ナトリウムをミクロスパーテ

ル 1 杯を加えて脱水した後，これを GC/MS 測定用試料液(注 21)とする。

但し，夾雑物の多い試料(注 22)では，「測定用試料液の調製」の底質・生物試料の GPC カラムクロマトグラフィー，またはフロリジルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップを行う。

なお，内標準法で測定する場合には，測定用試料液に内標準液を所定量添加後，GC/MS に注入する。

(2) 底質試料

底質(湿泥)20g を共栓付遠沈管 100ml にとり，所定量のサロゲート物質(注 15)を添加後，アセトニトリル(注 23)30ml を加えて 5 分間振とうする。さらに，超音波洗浄器を用いて 10 分間超音波抽出を行った後，3000rpm で 10 分間遠心分離し，上澄液を回収する。この抽出分離操作を計 2 回行い，このアセトニトリル抽出液を合わせる。

このアセトニトリル抽出液の 1/4，即ち 15ml を SPC 試験管に移し，窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1 ~ 5ml(注 24，注 25)に濃縮する。この濃縮液を GPC カラムに注入して，フタル酸エステル分画(注 26)を SPC 試験管に分取する。この分取液を窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml に濃縮(注 25)し，更に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後，GC/MS 測定用試料液(注 21，注 27)とする。

または上澄液のアセトニトリル抽出液の 1/4，即ち 15ml を，予め 5 %塩化ナトリウム溶液 100ml を入れた分液漏斗 300ml に加える。これにヘキサン 25ml を加え 5 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い，ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後，40

以下の湯浴中でロータリーエバポレーター(注 28)を用いて，10ml 弱まで濃縮する。この濃縮液を含水フロリジルカラムに負荷する。受器を設置し，1ml 強/分の速度で液面をカラムヘッド面まで下げてから，ヘキサン 50ml(注 29)を同速度で流す。このヘキサン溶出液は捨てる。再び，受器を変えてヘキサンが断続しないようにアセトニトリル/ヘキサン(0.5 : 100)100ml(注 30)を用いて，1ml 強分の速度で溶出させる。この溶出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後，40 以下の湯浴中でロータリーエバポレーター(注 28)を用いて，約 10ml 弱まで濃縮し，更に窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml(注 20)にし，GC/MS 測定用試料液(注 21，注 27)とする。

なお，内標準法で測定する場合には，測定用試料液に内標準液を所定量添加後，GC/MS に注入する。

(3) 生物試料

均一化した試料 20g を共栓付遠沈管 200ml にとり，所定量のサロゲート物質(注 15)を添加後，アセトニトリル(注 23)30ml を加えてポリトロン型ホモジナイザーを用いて 2 ~ 5 分間ホモジナイズする。これを 3000rpm で 10 分間遠心分離し，上澄液を回収する。この抽出分離操作を計 2 回行い，このアセトニトリル抽出液を合わせる。

このアセトニトリル抽出液の 1/4，即ち 15ml を SPC 試験管に移し，窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1 ~ 5ml(注 24，注 25)に濃縮する。この濃縮液を GPC カラムに注入して，フタル酸エステル分画(注 26)を SPC 試験管に分取する。この分取液を窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml に濃縮(注 25)し，更に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後，GC/MS 測定用試料液(注 21，注 27)とする。

または上澄液のアセトニトリル抽出液の 1/4，即ち 15ml にヘキサンを滴下して飽和にする。

これにヘキサン 5ml を加えて 5 分間振とうし、アセトニトリルを分取する。残ったヘキサン層に 5 % 含水アセトニトリル 20ml を加えて逆抽出し、アセトニトリル層と先のアセトニトリル抽出液を合わせる。これを予め 5 % 塩化ナトリウム溶液 100ml を入れた分液漏斗 300ml に加える。これにヘキサン 25ml を加え 5 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い、ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 以下の湯浴中でロータリーエバポレーター(注 28)を用いて、10ml 弱まで濃縮する。この濃縮液を含水フロリジルカラム(10 × 300mm のカラムに 2g の含水フロリジルをヘキサンで湿式充填し、この上層に無水硫酸ナトリウムを 1cm の高さに層積して調製)に負荷する。受器を設置し、1ml 強/分の速度で液面をカラムヘッド面まで下げてから、ヘキサン 50ml(注 29)を同速度で流す。このヘキサン溶出液は捨てる。再び、受器を変えてヘキサンが断続しないようにアセトニトリル/ヘキサン(0.5 : 100)100ml(注 30)を用いて、1ml 強/分の速度で溶出させる。この溶出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 以下の湯浴中でロータリーエバポレーター(注 28)を用いて、約 10ml 弱まで濃縮し、更に窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml(注 20)にして、GC/MS 測定用試料液(注 21, 注 27)とする。

なお、内標準法で測定する場合には、測定用試料液に内標準液を所定量添加後、GC/MS に注入する。

6.2 GPC カラムによるフタル酸エステル分画の分取条件 (注 31)

使用カラム：ポリビニルアルコール系ハードゲルの GPC カラム(注 12)

移動相：アセトニトリル(注 32)

流速：最高分離能を示す流速

(一例として、内径 8mm の Shodex AsahipakGF-310HQ の場合には 0.5 ~ 0.6ml/min)

カラム槽温度：30

6.3 空試験液の調製

試料を用いずに「測定用試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。

6.4 標準液の調製(注 33)

各測定対象物質の標準品または特級試薬をヘキサンに溶解させ、1000mg/L 標準原液を調製する。水質測定用試料液及び含水フロリジルカラムでクリーンアップした場合の底質・生物測定用試料液の場合には、ヘキサン標準原液を適宜ヘキサンで希釈混合して所定濃度の混合標準液を 5 段階以上作製、GPC カラムでフタル酸エステル分画を分取した底質・生物測定用試料液の場合には、ヘキサン標準原液を適宜アセトニトリルで希釈混合して所定濃度の混合標準液を 5 段階以上作製する。

サロゲート物質は各測定対象物質と同様にヘキサンに溶解し 100mg/L 標準原液を調製し、またこの標準原液をアセトンに溶解して、所定濃度(通常、0.1mg/L)の混合標準液も調製する。

内標準物質は各対象物質と同様にヘキサンに溶解し 1000mg/L 標準原液を調製し、またこの標準原液をアセトンに溶解して、所定濃度(通常、1 ~ 10mg/L)の混合標準液を調製する。

全ての標準原液及び混合標準液は暗所-5 以下で保存する。

6.5 GC/MS測定条件

(1) GC(注 34)

カラム：溶融シリカキャピラリーカラム (30m × 0.25mm i.d., 0.25 μ m)

液相は、メチルシリコンまたは5%フェニルメチルシリコン

カラム温度：50 (2分) - 約 10 /分 - 270 (10分)

注入口温度：210 ~ 250

注入法：スプリットレス法 (1分後パーズ), 1 μ l 注入

キャリアーガス：He, 平均線速度：40cm / 秒

インターフェース温度(またはデテクター温度)：270

(2) MS

イオン化法：EI

イオン化電圧：70V

イオン源温度：220 ~ 280 (機種により200以下でも可能)

検出モード：SIM法(注 35), または同等のもの

(3) 定量イオン

対象物質の測定質量数(m/z)：149

対象物質の確認用イオン(m/z)：以下の通り

フタル酸ジエチル：177, フタル酸ジ-n-プロピル：209, フタル酸ジイソプロピル：209, フタル酸ジ-n-ブチル：223, フタル酸ジペンチル：237, フタル酸ジ-n-ヘキシル：251, フタル酸ジ-2-エチルヘキシル：167, フタル酸ジシクロヘキシル：167, フタル酸ブチルベンジル：206,

サロゲートの測定質量数(m/z)：153

内標準物質の測定質量数(m/z)：以下の通り

4-クロロトルエン-d₄：130, ナフタレン-d₈：136, ビフェニル-d₁₀：164, フェナントレン-d₁₀：188, フルオランテン-d₁₀：212, クリセン-d₁₂：240, ペリレン-d₁₂：264

6.6 検量線

絶対検量線法を用いる場合は、所定濃度の各対象物質の混合標準液をそれぞれ 1 μ l を GC に注入し、得られた各対象物質のピーク面積値(高さ)から対象物質毎に検量線を作成する。検量線の濃度範囲は、分析法の検出限界付近と予想される検出濃度レベルを含む5段階以上とする。

内標準法を用いる場合は、所定濃度の各対象物質の混合標準液に所定量の内標準を加え、その 1 μ l 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する。検量線の濃度範囲は、分析法の検出限界付近と予想される検出濃度レベルを含む5段階以上とする。

サロゲートを用いる場合は、混合標準液に所定量のサロゲート物質を加え、以下内標準法と同様に行う。

6.7 定量及び計算(注 36)

絶対検量線法を用いる場合は、測定試料液 1 μ l を GC に注入し、得られた各対象物質のピーク面積値（高さ）から検量線により検出量を求める。

内標準法を用いる場合は、測定試料液 1 μ l を GC に注入し、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、GC 注入量、分析した試料量及び濃縮率などから試料中の各対象物質の濃度を計算する。

〔計算〕次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

試料濃度 (μ g/ml または μ g/g) = 検出量 (ng) × (測定用試料液量 (ml) / 注入量 (μ l)) × (1 / 試料量 (ml または g))

但し、底質試料・生物試料では約 20g の内、1/4 を測定試料に使用しているため、実際の試料量は約 5 g である。

サロゲートを用いる場合は、測定試料液 1 μ l を GC に注入し、得られた各対象物質とサロゲート物質とのピーク面積値（高さ）の比から検量線により検出量を求める。これに添加したサロゲート物質の重量を乗じて各対象物質の重量を求め、これを試料量で除して算出する。なお、サロゲート物質と内標準物質とのピーク面積値（高さ）の比を求め、相対感度係数からサロゲート物質の重量を求め、その時の回収率を求める。この回収率が 70 ~ 130 % の範囲内にある測定値を採用し、それ以外の測定値は棄却する。

7 添加回収試験

10 試料毎に 1 回または 1 日に 1 回、試料と同じあるいは類似の試料をもちいて添加回収試験を行い回収率を求める。対象物質のアセトン標準液を検出限界の 10 倍量程度添加して十分に混合後、60 分以上放置してから回収試験を開始する。

8 注意事項

(1) 水中から検出されるフタル酸エステルでは、フタル酸-n-ブチル、フタル酸ジエチルヘキシルは特に、高濃度、高頻度で検出される。その次にフタル酸ジヘブチル、フタル酸ジオクチル等が検出される。

(2) 市販のフタル酸ジヘキシルは約 13 種類の異性体の混合物である。

(3) 使用器具があまり汚染されていない場合には、ヘキサン洗浄を省略してもよい。

(4) 一例として、残留農薬試験用の空瓶を加熱処理して使用。

(5) 有機溶媒、試薬、精製水は定量に支障のないものを使用する。有機溶媒、試薬、精製水、ガラス器具等は汚染を受け易いので、細心の注意を払う。

(6) 開封と共に、アセトン・アセトニトリルはヘキサンより早く DBP、DEHP 等に汚染される。開封後、数時間経過したら、新たに未開封の 1000 倍残留農薬試験用・PCB 試験用を使用する。なお、1000 倍残留農薬試験用・PCB 試験用のアセトニトリルに比較して、HPLC 用のアセトニトリルは DBP、DEHP 等の汚染が少ない場合が多い。

(7) PCB・フタル酸エステル試験用は残留農薬試験用に比較して、DBP、DEHP 等の汚染量は約 1 / 3 である。

無視できない汚染が認められる場合には、500 ~ 700 で 8 時間程度焼成した後、汚染のない場所で放冷してから用いる。

(8) 市販のミネラルウォーターの中にはフタル酸エステル汚染の比較的少ないものがある。予めチェックすれば、使用可能なミネラルウォーターもある。

(9) 精製水の貯蔵するタンク等は塩化ビニール製で、かつ空気との接触に活性炭を付けていない場合が多くある。タンク等はテフロン製等にし、空気との接触口は必ず活性炭を付ける。

(10) 活性炭カートリッジはステンレス製、もしくはテフロン製であることが望ましい。

(11) 環境庁保健調査室の報告書では採水ピンを含めたガラス器具等は 200 で 2 時間以上加熱した後、使用することを推奨している。一方上水試験方法では 500 で 2 時間以上加熱した後、Giam らの分析法では 320 で 10 時間以上加熱した後、使用することを推奨している。但し、500 で加熱すると、SPC 等の摺り合わせがダメになり、またフタル酸エステルは固化して、除去不可能になる可能性がある。

(12) 一例として、Shodex AsahipakGF-310HQ

(13) EPA method506 では検出器 PID を、EPA method525.2 では検出器 GC/MS を使用したカートリッジ型固相抽出法、ディスク型抽出法の試験方法が報告されている。また「平成 6 ~ 8 年度 化学物質分析法開発調査報告書」では SPME 抽出法の試験方法が報告されている。しかし、今回試験方法を併記しなかった。

(14) 空気中からの汚染を考慮すると、SPC 共栓付又は透明摺り合わせ共栓付メスフラスコは使用可であるが、従来の摺り合わせは使用不可である。

(15) サロゲート法で測定しない場合には省略する。サロゲート法で測定する場合には測定対象の全フタル酸エステルのサロゲート物質を用いて行うことが望ましい。しかし、DBP、DEHP 及び他のフタル酸エステル(1 ~ 2 物質)のサロゲート物質を用いても良い。

(16) 塩化ナトリウムをメスフラスコに入れる時、摺り合わせ箇所塩化ナトリウムを絶対に付着させないこと。ロートを用いて塩化ナトリウムを入れると便利である。また塩化ナトリウムの添加量は試料水に対して 10 % で十分であるが、ここでは 15 % 添加することにした。

(17) Speed98' のフタル酸エステルの抽出にはヘキサン量は十分であるが、Speed98' の対象外であるフタル酸ジメチルの抽出にはヘキサン量が足りない。

浮遊物が多い場合、即ち下水処理水等にはアセトンを 0.1 ~ 0.5ml 添加することにより、フタル酸エステルの回収が上がる。

(18) 攪拌子は金属製、または金属をガラス等で覆ったもの。

(19) 攪拌時間はスタラーの回転速度に大きく影響されるので、各自が攪拌時間を確認すること。攪拌時間が長い場合には、最初に十二分振とうした後、スタラーで攪拌する。スタラーの攪拌時間が長くなればなるほど、スタラーが加熱し、フタル酸エステルの抽出率はバラッキ、またコンタミの影響を受ける可能性が高くなる。

(20) 窒素ガス吹き付けで濃縮する時、絶対に乾固させないこと。乾固させると河川水等ではキーパー量が少ないので、特にフタル酸ジメチル、フタル酸ジエチルは顕著に損失する。

(21) 夾雑物の除去法として、硫酸処理がある。フタル酸イソプロピル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジフェニルは硫酸処理により加水分解する

ので、硫酸処理を行えないが、それ以外のフタル酸エステルに対して、硫酸処理は可能である。しかし、硫酸処理により、多数の夾雑物が発生するので、硫酸処理を推奨しない。

(22) マススペクトルにより確認する事が望ましい。しかし、マススペクトルの確認ができない場合には、測定質量数と確認イオンのピーク強度比で確認する。

(23) アセトンでも可能である。アセトンはアセトニトリルに比較して、夾雑物をより多く抽出する。

(24) GPC カラムに1回に注入できる量から、濃縮量を決める。先端濃縮効果が得られるので、内径 8mm の GPC カラムでは1回につき 500 μ l 注入することが可能である。内径 8mm の GPC カラムでは1 ~ 2ml に濃縮して、数回注入する。

(25) SPC 試験管を約 60 の湯浴中に浸けて、窒素ガスを吹き付けると、アセトニトリル抽出液及びアセトニトリル分画液は比較的早く濃縮できる。

(26) 使用する GPC カラム、及びその内径等により、フタル酸エステルの溶出パターンが異なるので、予めフタル酸エステル分画を確認すること。

試料によっては、フタル酸エステルが溶出後、多数の物質が長時間に渡り、溶出する場合がある。この場合、THF 溶媒を注入し、多数の物質を素早く溶出させて、次の操作に移る。

(27) 夾雑物が多い場合には、さらに他のカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ(フロリジル、シリカゲルなど)を行う。

(28) 活性炭で汚染を除去した窒素・空気等で減圧を解除する。

(29) 含水フロリジルカラムクロマトグラフィーの第1分画には、分子状硫黄が溶出してくる。含水フロリジルカラムクロマトグラフィーのクリーンアップで単体硫黄を十分に除去できない場合には、測定用試料液を還元銅カラムに通して、硫黄を除去する。

(30) 予め含水フロリジルカラムクロマトグラフィーにおける各物質の溶出パターンと回収率を確認しておく。

(31) 高濃度のフタル酸エステル等を注入すると、注入口及び流路のラインを汚すので、特に注意すること。

(32) アセトンを用いても良いが、アセトンはアセトニトリルに比較して、脂肪等とフタル酸エステルとの分離が多少悪い。

(33) 各対象物質の標準原液・標準液、サロゲート物質の標準原液・標準液、内標準物質の標準原液・標準液は汚染されやすい。汚染が認められた場合には、再度調製する。

(34) ゴーストがでない GC 注入口セプタムを使用する。一例として、スペルコのグリーンセプタム等がある。(備考1) また GC 注入口のインジェクターライナーも油滴等が付着すると、ピークの分離の悪化及びゴーストの原因になるので、清浄な状態が保たれるようにインサートを維持管理する必要がある。

(35) 十分な感度が得られる場合には SIM 測定の代わりにスキャン測定でもよい。

(36) 絶対検量線法では定量値のバラッキが大きいので、内標準法またはサロゲート法を推奨する。

(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上、一般に入手できるものとして例示したが、これを推奨するものではない。これと同等または同等以上の品質・性能のものを用いても良い。

参考文献

1. 環境庁環境保健部環境安全課：平成 7 年度 化学物質分析法開発調査報告書
2. 環境庁環境保健部環境安全課：昭和 59 年度 化学物質分析法開発調査報告書
3. 環境庁環境保健部環境安全課：昭和 58 年度 化学物質分析法開発調査報告書
4. 環境庁環境保健部環境安全課：昭和 56 年度 化学物質分析法開発調査報告書
5. 環境庁環境保健部環境安全課：昭和 50 年度 化学物質分析法開発調査報告書
- 6.(財)日本公衆衛生協会：生物試料中の化学物質分析法の確立に関する研究（昭和 5 6 年度
環境庁公害防止等調査研究委託費による報告書）
7. EPA:Method 8270B, US EPA
8. EPA:Method 525.2, USEPA
9. EPA:Method 506, USEPA

アジピン酸ジ'-2-エチルヘキシルの分析法

1 対象物質

アジピン酸ジ'-2-エチルヘキシル(DEHA)

2 目標検出限界

本分析法の目標検出限界は水質試料では 0.01 μ g/L, 底質試料・生物試料では 10 μ g/kg である。

3 分析法概要

水質試料は塩化ナトリウム等を加えてヘキサンで抽出後, GC/MS-SIM で測定する。

試料水 —— 塩析 —— 振とう抽出 —— 脱水・濃縮 —— 定量

底質試料は振とうと超音波洗浄器を用いてアセトニトリルで抽出し, このアセトニトリル抽出液に 5 % 塩化ナトリウム水溶液を加えた後, ヘキサンで抽出する。ヘキサン抽出液を脱水濃縮後, フロリジ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。(注1)

底質試料 —— アセトニトリル超音波抽出 —— 塩化Na水溶液 —— ヘキサン抽出 —— 脱水濃縮

カラムクロマトグラフィー —— 濃縮脱水 —— 定量

生物試料はホモジナイザーを用いてアセトニトリルで抽出し, アセトニトリル/ヘキサン分配で脂質を除去した後, アセトニトリル層に 5 % 塩化ナトリウム水溶液を加え, ヘキサンで抽出する。ヘキサン抽出液を脱水濃縮後, フロリジ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。(注1)

生物試料 —— アセトニトリルホモジナイザ'-抽出 —— アセトニトリル/ヘキサン分配 —— 塩化Na水溶液

ヘキサン抽出 —— 脱水濃縮 —— カラムクロマトグラフィー —— 濃縮脱水 —— 定量

なお, アジピン酸ジ'-2-エチルヘキシルはブランクの影響を受けやすいので, 分析を行うにあたり, 十分注意すること。(注2)

4 試料の採取及び保存方法

4.1 水質試料

洗剤, 水, アセトン, ヘキサン(注3)の順に洗浄し, 乾燥させた 1L のネジ口ガラスビン(注4)に試料水を泡立てないように静かに採取し, 満水にして密栓をする。試験は試料採取後直ちに行う。直ちに行得ない場合には冷暗所(4)で保存する。

なお, ガラスビンのネジ口はアジピン酸エステル類の汚染のないアルミホイル等の付いた内蓋を使用すること。

4.2 底質試料

水質試料と同様の方法で洗浄したネジ口の広口ガラスビンに入れ密栓し、-10℃以下で保存する。

4.3 底質試料

試料をミキサーで摩砕均一化し、底質試料と同様にして保存する。

5 試薬・器具

5.1 試薬

有機溶媒：PCB 試験用，または残留農薬 1000 倍用(注 5)を使用。

DEHA：市販標準試薬。

サロゲート物質 (DEHA-d₈)：市販標準試薬。

内標準物質 (フルオランテン-d₁₀)：市販標準試薬。

無水硫酸ナトリウム：PCB・フタル酸エステル試験用(注 6)を使用。

塩化ナトリウム：特級試薬を 500 ~ 700℃で 8 時間程度焼成した後，汚染のない場所で放冷して用いる。

精製水：逆浸透さらにミリQ処理した精製水(注 7)をヘキサンで洗浄したもの。(備考 1)

5 %無水硫酸ナトリウム：精製水に 5 % (w/V)となるように無水硫酸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。

5 %塩化ナトリウム：精製水に 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。

含水フロリジル：残留農薬試験用(60/100 メッシュ)フロリジルを 130℃で 16 時間加熱し，デシケーター内で放冷する。このフロリジル 100g を共栓付き三角フラスコにとり，精製水 5.7ml 加えて栓をし，時々振りまぜながら均一になるまで 4 ~ 5 時間放置したもの。

その他の試薬：特級試薬。

5.2 器具及び装置

含水フロリジルカラム：長さ 30cm，内径 1cm のガラスカラムに 2g のフロリジルをヘキサンを用いて湿式充填し，この上部に無水硫酸ナトリウムを 1cm 積層したもの。

ロータリーエバポレーター，または K D 濃縮装置：抽出液の濃縮に用いる。

分液漏斗：SPC 摺り合わせ，または透明摺り合わせを使用する。

共栓付試験管，共栓付遠沈管，ナス型フラスコ等のガラス器具：SPC 摺り合わせ，または透明摺り合わせを使用する。

電気炉：塩化ナトリウムの焼成に使用する。

ホモジナイザー：生物質の均一化及び固液抽出に用いる。

超音波照射器 (超音波洗浄器でもよい)

遠心分離器：底質，生物質の固液抽出時の分離抽出に用いる。

振とう器：液々抽出に用いる。

乾燥器：フロリジルの活性化，及びガラス器具等を乾燥させるのに用いる。

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。

6 試験操作

6.1 試料の前処理

(1) 水質試料 (注 8)

試料水 1000ml を分液漏斗 2L にとり(注 9)、所定量のサロゲート物質(注 10)及び塩化ナトリウム(注 11)50g を加え溶解した後、ヘキサン 100ml を加え 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 100mL 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、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 30 以下の湯浴中でロータリーエバポレーター(注 12)を用いて、約 10ml まで濃縮し、さらに窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml(注 13、注 14)とし、前処理液とする。

(2) 底質試料

底質(湿泥)20g を共栓付遠沈管 100ml にとり、所定量のサロゲート物質(注 10)を添加後、アセトニトリル(注 15)50ml を加えて 5 分間振とうする。さらに、超音波洗浄器を用いて 10 分間超音波抽出を行った後、3000rpm で 10 分間遠心分離し、上澄液を回収する。この抽出分離操作を計 2 回行い、上澄液を合わせた後、予め 5 % 塩化ナトリウム溶液 500ml(注 16)を入れた分液漏斗 1000ml に加える。これにヘキサン 100ml を加え 5 分間振とう抽出する。この抽出操作を計 2 回行い、ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、30 以下の湯浴中でロータリーエバポレーターを用いて、約 10ml まで濃縮し、更に窒素ガスを穏やかに吹き付けて約 5ml とし、前処理液とする。

(3) 生物試料

均一化した生物試料 20g を共栓付遠沈管 100ml にとり、所定量のサロゲート物質(注 10)を添加後、アセトニトリル(注 15)50ml を加えてポリトロン型ホモジナイザーを用いて 2 ~ 5 分間ホモジナイズする。これを 3000rpm で 10 分間遠心分離し、上澄液を回収する。この抽出分離操作を計 2 回行い、抽出液を合わせる。

このアセトニトリル抽出液にヘキサンを滴下して飽和にする。これにヘキサン 10ml を加えて 5 分間振とうし、アセトニトリルを分取する。残ったヘキサン層に 5 % 含水アセトニトリル 20ml を加えて逆抽出し、アセトニトリル層と先のアセトニトリル抽出液を合わせる。これを予め 5 % 塩化ナトリウム溶液 500ml(注 16)を入れた 1000ml 分液漏斗に加える。これにヘキサン 100ml 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、ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、30 以下の湯浴中でロータリーエバポレーターを用いて、約 10ml まで濃縮し、更に窒素ガスを穏やかに吹き付けて約 5ml とし、前処理液とする。

6.2 測定用試料液の調製

(1) 水質試料

通常、試料の前処理液を測定用試料液とする。但し、排水等の狭雑物が多い試料は底質・生物試料と同様に、含水フロリジルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップ操作を行い、GC/MS 測定用試料液(注 17)とする。

なお、内標準法で測定する場合には、測定用試料液に内標準液を所定量添加後、GC/MS

に注入する。

(2) 底質・生物試料

前処理液を含水フロリジルカラム(10 × 300mm のカラムに 5g の含水フロリジルをヘキサンで湿式充填し、この上層に無水硫酸ナトリウムを 1cm の高さに層積して調製)に負荷する。受器を設置し、1ml 強/分の速度で液面をカラムヘッド面まで下げてから、ヘキサン 50ml(注 18)を同速度で流す。このヘキサン溶出液は捨てる。再び、受器を変えてヘキサンが断続しないようにアセトニトリル/ヘキサン(1:100)100ml(注 19)を用いて、1ml 強/分の速度で溶出させる。この溶出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、30 以下の湯浴中でロータリーエバポレーターを用いて、約 10ml 弱まで濃縮し、更に窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml(注 14)にして、GC/MS 測定用試料液(注 17)とする。但し、クリーンアップ不足である場合には、更にシリカゲルカラムクロマトグラフィー(注 20)、または活性炭含有フロリジルカラムクロマトグラフィー(注 21)を行う。

なお、内標準法で測定する場合には、測定用試料液に内標準液を所定量添加後、GC/MS に注入する。

6.3 空試験液の調製

試料を用いずに「試料の前処理」及び「測定用試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。

6.4 標準液の調製(注 22)

DEHA 標準品をヘキサンに溶解し 1000mg/L 標準原液を調製する。これを、適宜ヘキサンで希釈混合して所定濃度の混合標準液を 5 段階以上作製する。サロゲート物質(DEHA-d)は DEHA 標準品と同様にヘキサンに溶解し 100mg/L 標準原液を調製し、またこの標準原液をアセトンに溶解して、所定濃度(通常、0.1mg/L)の混合標準液も調製する。内標準物質(フルオランテン-d₁₀)は DEHA 標準品と同様にヘキサンに溶解し 1000mg/L 標準原液を調製し、またこの標準原液をアセトンに溶解して、所定濃度(通常、1 ~ 10mg/L)の混合標準液も調製する。

全ての標準原液及び混合標準液は暗所-5 以下で保存する。

6.5 測定

GC/MS 測定条件(注 23)

GC カラム：溶融シリカキャピラリーカラム (30m × 0.25mm i.d., 0.25 μ m)

液相は、メチルシリコンまたは 5%フェニルメチルシリコン

カラム温度：50 (2分) - 約 10 /分 - 260 (10分)

注入口温度：250

注入法：スプリットレス法 (1分後ページ), 1 μ l 注入

キャリアーガス：He, 平均線速度：40cm / 秒

トランスファーライン温度またはデテクター温度)：270

MS イオン化法：EI

イオン化電圧：70V

イオン源温度：220 ~ 280 （機種により 200 以下でも可能）

検出モード：SIM(注 24)，または同等のもの

対象物質の測定質量数(m/z)：以下の通り 但し，() 内は確認用イオン

DEHA：129(147)

サロゲート物質の測定質量数(m/z)：以下の通り

DEHA-d₈：137

内標準物質の測定質量数(m/z)：以下の通り

フルオランテン-d₁₀：212

6.6 検量線

絶対検量線法を用いる場合は，所定濃度の DEHA を調製し，それぞれ 1 μ l を GC に注入し，得られた DEHA のピーク面積値（高さ）から検量線を作成する．検量線の濃度範囲は，分析法の検出限界付近と予想される検出濃度レベルを含む 5 段階以上とする．

内標準法を用いる場合は，所定濃度の DEHA に所定量のフルオランテン-d₁₀ を加え，その 1 μ l を GC に注入し，DEHA とフルオランテン-d₁₀ とのピーク面積値（高さ）の比から検量線を作成する．検量線の濃度範囲は，分析法の検出限界付近と予想される検出濃度レベルを含む 5 段階以上とする．

サロゲート物質を用いる場合は，所定濃度の DEHA に所定量の DEHA-d₈ を加え，以下内標準法と同様に行う．

6.7 定量及び計算(注 25)

絶対検量線法を用いる場合は，測定用試料液 1 μ l を GC に注入し，得られた DEHA のピーク面積値（高さ）から検量線により検出量を求める．

内標準法を用いる場合は，測定用試料液 1 μ l を GC に注入し，得られた DEHA とフルオランテン-d₁₀ 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，GC 注入量，分析した試料量及び濃縮率などから試料中の DEHA 濃度を計算する．

〔計算〕次式で試料中の DEHA 濃度を計算する．

水質，底質及び生物濃度（μ g/ml または μ g/g）= 検出量(ng) × (測定用試料液量(ml)/注入量(μ l)) × (1/試料量(ml または g))

サロゲート物質を用いる場合は，測定用試料液 1 μ l を GC に注入し，得られた DEHA と DEHA-d₈ 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．これに添加した DEHA-d₈ の重量を乗じて DEHA の重量を求め，これを試料量で除して算出する．なお，サロゲート物質(DEHA-d₈)と内標準物質(フルオランテン-d₁₀)とのピーク面積値（高さ）の比を求め，相対感度係数からサロゲート物質(DEHA-d)の重量を求め，その時の回収率を求める．この回収率が 70 ~ 130 % の範囲内にある測定値を採用し，それ以外の測定値は棄却する．

7 添加回収試験

10 試料毎に 1 回または 1 日に 1 回，試料と同じあるいは類似の試料をもちいて添加回収試験を行い回収率を求める．対象物質のアセトン標準液を検出限界の 10 倍量程度添加して十分に混合後，60 分以上放置してから回収試験を開始する．

8 注意事項

- (1) ポリビニルアルコール系ハードゲルのカラムを用いたゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC によるクリーンアップを検討したが，コーンオイルとアジピンサンジ-2-エチルヘキシルの分離が不十分であったので，今回 GPC を不採用とした．
- (2) DEHA は最近，DEHP の代替品として使用されてきている．その為，実験室内は DEHP と同様に汚染されている可能性があるため，特に注意する必要がある．
- (3) 使用器具があまり汚染されていない場合には，ヘキサン洗浄を省略してもよい．
- (4) 一例として，残留農薬試験用の空瓶を加熱処理して使用．
- (5) 300 倍残留農薬試験用を用いると，GC/MS のクロマトグラム上にアジピン酸ジ^o-2-エチルヘキシルと同一の保持時間にピークが認められる場合もある．その為，1000 倍残留農薬試験用を使用する．
- (6) 無視できない汚染が認められる場合には，500 ~ 700 で 8 時間程度焼成した後，汚染のない場所で放冷してから用いる．
- (7) タンクの材質等より汚染が認められる場合がある．その為，ヘキサン洗浄の操作を加えた．DEHA は通常，水道水から検出されない．水道水中の残留塩素を除去すれば精製水と見なせる．
- (8) EPA method506 では検出器 PID を，EPA method525.2 では検出器 GC/MS を使用したカートリッジ型固相抽出法，デスク型抽出の試験方法が報告されている．しかし，今回試験方法を併記しなかった．
- (9) 浮遊物が多い試料では，アセトンを 1 ~ 5ml 加えると，DEHA より一層回収される．
- (10) サロゲート法で測定しない場合には省略する．
- (11) PCB・フタル酸エステル試験用の無水硫酸ナトリウムを使用してもよい．
- (12) ロータリーエバポレーター又は K.D.濃縮器で濃縮する場合，測定用試料液中にキーパーが存在すれば，濃縮しすぎ及び乾固してもロスはほとんどない．しかし，河川水等では通常キーパー量が少ないので，濃縮しすぎ及び乾固(即ち 5ml 以下)は絶対に行わないこと．
- (13) 窒素吹き付けで濃縮する時，絶対に乾固させないこと．
- (14) DEHA の感度は良くないので，0.25ml まで濃縮するが多い．
- (15) アセトンでも可能である．アセトンはアセトニトリルに比較して，夾雑物をより多く抽出する．
- (16) ヘキサンの沸点は 68.8 であり，アセトニトリルの沸点は 81.6 であるので，アセトニトリルが残留すると，次の濃縮操作でアセトニトリルが残留する．その為，アセトニトリルが残留するとカラムクロマトグラフィーに影響するので，5 %塩化ナトリウムの洗浄は充分に行う必要がある．
- (17) マススペクトルにより確認する事が望ましい．しかし，マススペクトルの確認がで

きない場合には測定質量数と確認イオンのピーク強度比で確認する。

(18) 含水フロリジルカラムクロマトグラフィーの第 1 分画には、分子状硫黄が溶出してくる。含水フロリジルカラムクロマトグラフィーだけのクリーンアップで単体硫黄を十分に除去できない場合には、試料液を還元銅カラムに通して、硫黄を除去する。

(19) 予め含水フロリジルカラムクロマトグラフィーにおける DEHA の溶出パターンと回収率を確認しておく。

(20) 測定用試料液を含水シリカゲルカラム(10 × 300mm のカラムに 5g の含水シリカゲルをヘキサンの湿式充填し、この上層に無水硫酸ナトリウムを 2cm の高さに層積して調製)に負荷し、ヘキサン 50ml を流し、溶出液を捨てる。次に、アセトン/ヘキサン(5:95)50ml を流し、この溶出液を、以下含水フロリジルカラムの場合と同様に、濃縮操作を行い、測定用試料液を調製する。

なお、含水シリカゲルは以下のように作成する。カラムクロマトグラフ用シリカゲルを 130 で約 15 時間加熱後、透明摺り合わせ共栓付き三角フラスコに入れ、密栓して室温まで放冷する。シリカゲルを攪拌しながら、シリカゲル 95g に対して精製水 5g を滴下する。密栓し、発熱が終了するまで、静かに混合する。更に振とう器で 30 分振とう後、乾燥剤としてシリカゲルを入れたデシケーター中で 15 時間以上放置する。

(21) 測定用試料液を活性炭フロリジルカラム(10 × 300mm のカラムに 5g の 5 %活性炭含有フロリジルをヘキサンの湿式充填し、この上層に無水硫酸ナトリウムを 2 cm の高さに層積して調製)に負荷し、ヘキサン 50ml を流し、溶出液を捨てる。次に、アセトン/ヘキサン(2:98)50ml を流し、この溶出液を、以下含水フロリジルカラムの場合と同様に、濃縮操作を行い、測定用試料液を調製する。

なお、含水活性炭フロリジルは以下のように作成する。精製活性炭 5g と 5 %含水フロリジル 95g を透明摺り合わせ共栓付き三角フラスコに入れ、振とう器で 30 分振とう後、乾燥剤としてシリカゲルを入れたデシケーター中に保存する。

精製活性炭とはダルコ G 活性炭 100g を 2L の分液ロートにとり、ベンゼン 1L で 30 分間振とう洗浄する。静置後、沈降した活性炭を別の分液ロートに移し、アセトン 1L つづいてベンゼン 1L で洗浄する。沈降した活性炭をガラスファイバー濾紙で減圧濾過し、少量のアセトンで濾過・洗浄する。130 で乾燥後、乳鉢で粉碎し、更に 130 で乾燥した後、透明摺り合わせ三角フラスコに移し、密栓し、デシケーター中に保存する。

(22) DEHA 標準液、DEHA-d₈ 標準液、フルオランテン-d₁₀ 標準液は DEHA 汚染されないように注意する。

(23) セプタムゴーストがあるので、セプタムを GC に装着し、270 にして 1 晩パージしたものを使用する。

生物・底質試料では注入口に油滴等が付着し、ピークの分離の悪化等が認められたら、インジェクトライナーの交換が必要である場合がある。

(24) 十分な感度を得られる場合には SIM 測定の代わりにスキャン測定でもよい。

(25) 絶対検量線法では定量値のバラッキが大きいので、内標準法またはサロゲート法を推奨する。

(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上、一般に入手できるも

のとして例示したが，これを推奨するものではない．これと同等または同等以上の品質・性能のものを用いても良い．

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
2. 環境庁環境保健部環境安全課：昭和 55 年度 化学物質分析法開発調査報告書
3. 環境庁環境保健部環境安全課：昭和 53 年度 化学物質分析法開発調査報告書
4. EPA:Method 8270B, US EPA
5. EPA:Method 525.2, USEPA
6. EPA:Method 506, USEPA

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

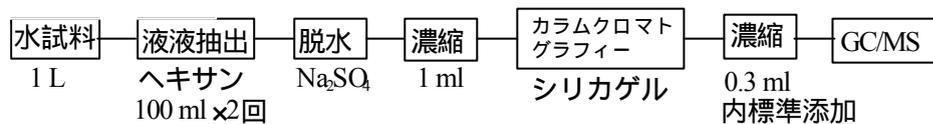
本分析法の目標検出下限は、水質試料は0.01 µg/L、底質及び生物質では 1 µg/kg である。

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

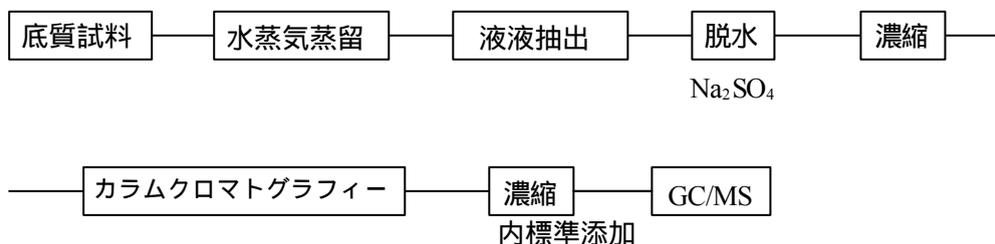


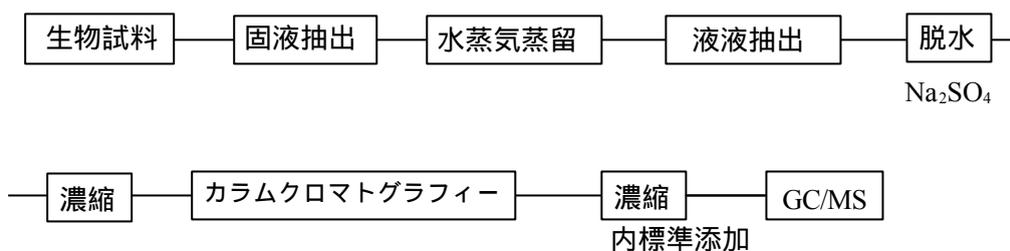
底質及び生物試料

BaP

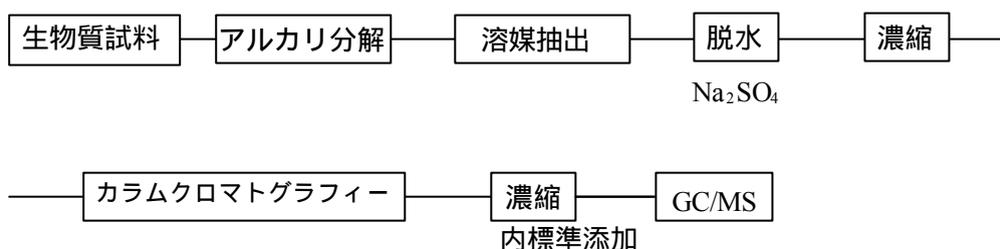
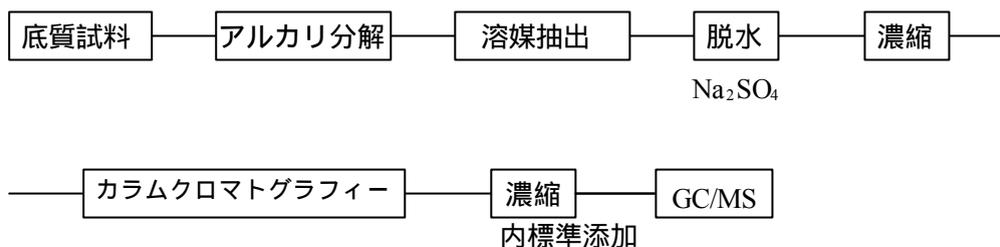
有機塩素系農薬の分析法、又はスチレン 2 量体及びスチレン 3 量体の前処理参照。

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。キャップを堅くしめ、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成型 (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。

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

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.

VII . 1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、スチレン及び *n*-ブチルベンゼンの分析法 (ヘッドスペース法)

1 対象物質

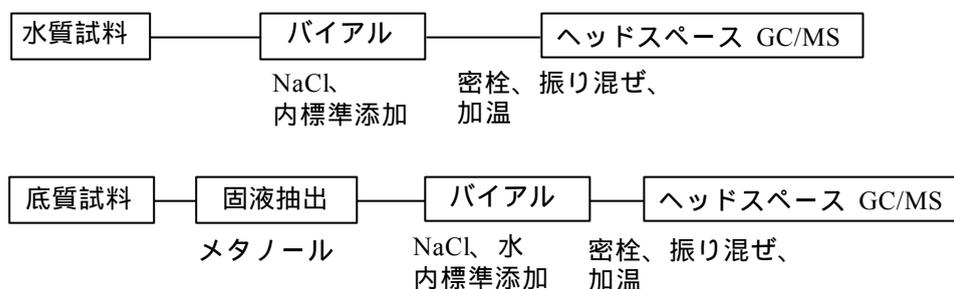
1,2-ジブromo-3-クロロプロパン (DBCP)、スチレン及び *n*-ブチルベンゼン

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

水質試料については、バイアルに採り内標準を加えて密栓して混和する。底質試料については、試料中の対象物質をメタノールで抽出後、一部を水及び塩化ナトリウムを入れたバイアルにとり、内標準を加えて密栓して混和する。これらのバイアルは一定温度で保持し、対象物質を気液平衡状態とし、気相の一部をGC/MS-SIMで定量する (注 1 ~ 3)。



4 試薬・器具・装置

(1) 試薬

- ・メタノール：残留農薬分析用。
- ・塩化ナトリウム：残留農薬分析用。約 105 の電気乾燥器内で3時間程度放置し、汚染のない場所で冷却したもの。
- ・水：対象物質の分析に影響のないもの (注 4)。
- ・DBCP、スチレン及び *n*-ブチルベンゼン：試験に支障のない純度のもの (注 5)。
- ・標準原液：メタノールを 30~50 ml 入れた 100 ml メスフラスコに、DBCP、スチレン及び *n*-ブチルベンゼンの標準品 100 mg を精秤し、メタノールで 100 ml とし標準原液とする (注 6)。
- ・内標準原液：メタノールを 50~90 ml 入れた 100 ml メスフラスコに、4-プロモフルオロベンゼン 100 mg を秤量し、メタノールで 100 ml とする (注 7)。
- ・内標準溶液：メタノールを 50~80 ml 入れた 100 ml メスフラスコに、内標準原液 10 ml をとり、メタノールで 100 ml とし内標準溶液とする。

(2) 器具・装置

- ・試料採取容器：水質試料用は、容量50~250 ml 程度の四フッ化エチレン樹脂張りシリコーンゴム栓付きスクリュウキャップ用ネジ口ガラス瓶。底質試料用は、容量50~250 ml 程度の四フッ化エチレン樹脂張りシリコーンゴム栓付きスクリュウキャップ用広口ネジ口ガラス瓶、またはこれと同等以上の瓶。洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。約105 の電気乾燥器内で3時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。冷却後、キャップを強くしめ、汚染のない場所に保管する。
- ・遠心管：容量 50 ml の共栓付きガラス製のもの。洗浄し、水ですすぎ、メタノールで洗浄後、乾燥する。約105 の電気乾燥器内で3時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。冷却後、

キャップを堅くしめ、汚染のない場所に保管する。

- ・バイアル：試料 (10 ~ 100 ml) を入れた時に、試料量の10 ~ 30%の空間が残るガラス製容器で、その上部の口に四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコンゴム栓 (注 8)、アルミニウムキャップをキャップ締め器で固定し、加温、冷却しても容器の機密性が保たれるもの (注 9)。洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。約105 °Cの電気乾燥器内で3時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。
- ・ヘッドスペースサンプラー (注10、11)
- ・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

(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。前処理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

試料は採泥器で採取後、採泥器内で水切りをし、小石、貝類、動植物片等の固形物を含まないよう混和し、速やかに試料採取容器に移し入れ、空隙が残らないように直ちに密栓する。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 (注12)。試料はフルイを通さず、容器内の表層の水を捨て、表層部をかき取った下層とし、固形物を含まないものを試験する。

(2) 試験操作

(ア) 水質試料の前処理

塩化ナトリウムをバイアルに入れる (注13)。試料10 ~ 100 mlの適量を静かに泡立たないようにバイアルにホールピペットで入れ、内標準溶液 1 μ l を添加する。四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコンゴム栓及びアルミシールで直ちに密栓してふりまぜる。

(イ) 底質試料の前処理

試料 20 g を遠心管に採り、3000 rpm で20 分間遠心分離し、上澄みは捨てる。試料にメタノール 10 ml を加え、10分間超音波抽出を行う。3000 rpm で10 分間遠心分離し、液層を全量フラスコに入れる。残さにメタノール 10 ml を加え、10分間超音波抽出を行う。3000 rpm で10 分間遠心分離し、液層を全量フラスコに加え、定容(25 ~ 50 ml)とし、試料液とする。

塩化ナトリウムをバイアルに入れる (注13)。バイアルに、水9.4 mlに対して試料液0.6 mlの割合となるように、水 9.4 ~ 94 ml 及び試料液 0.6 ~ 6 ml を静かに泡立たないように入れ (注 14)、内標準溶液 1 μ l を添加する。四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコンゴム栓及びアルミシールで直ちに密栓してふりまぜる。

(ウ) ヘッドスペース分析

前処理操作により得られたバイアルは、ヘッドスペースサンプラーにより20 ~ 70 °Cの範囲の一定温度で、30 ~ 120分の範囲で一定時間放置する。ヘッドスペースガスの一定量を採取し、GC/MSに注入する (注15)。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。

(3) 空試料液の調製

水質試料については、試料と同量の水を用いて、また、底質試料については、試料と同量の水及びメタノールを用いて、「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

少量のメタノールを入れた 10 mlメスフラスコに標準原液各 1 ml をとり、メタノールで 10 mlとし標準混合原液 (100 µg/ml) とする。標準混合原液をメタノールで希釈し、1 ~ 50 µg/mlの標準混合溶液を調製する。

(5) 測定

(ア) ヘッドスペース条件の例 (注16)

注入圧：10 psi

ループ温度：140

トランスファーライン温度：150

ループ充填時間：0.01 分

ループ平衡時間：0.05 分

注入時間：0.1 分

(イ) GC-MS条件の例

(a) GC

- ・カラム：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 25~120 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17)
- ・カラム温度：35 (3 分) 10 /分 230 (7分)
- ・注入口温度：200
- ・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

- ・DBCP：75 (157)
 - ・スチレン：104 (78)
 - ・*n*-ブチルベンゼン：134 (91)
 - ・4-ブロモフルオロベンゼン：174
- () 内のイオンは確認用に用いる。

(6) 検量線

「試験操作」に従って水質試料の場合は試料と同量の水に、また、底質試料の場合は、試料と同量の水及びメタノールに、標準混合溶液を添加して 0.02~50 µg/lとし (注18)、内標準溶液 1 µl を添加する。「試験操作」に従って試料と同様の処理をし、GC/MS測定をする。内標準物質と対象物質の面積比を求め、検量線を作成する。

(7) 計算

次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{濃度 (µg/L)} = \text{検出量 (ng)} / \text{試料量 (ml)}$$

注意事項

- 注 1) 本法において適当なモニタリーオンを用いてGC/MS測定することにより、ジクロロメタン、ジブロモクロロメタン、テトラクロロメタン、トリクロロメタン (クロロホルム)、トリプロモメタン (プロモホルム)、プロモジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、1,1,1-トリクロロエタン、1,1,2-トリクロロエタン、1,1-ジクロロエチレン、*cis*-1,2-ジクロロエチレン、*trans*-1,2-ジクロロエチレン、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、1,2-ジクロロプロパン、1,3-ジクロロ-1-プロペン、1,4-ジクロロベンゼン、キシレン、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン等の分析が可能である。
- 注 2) 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 3) 底質試料を直接バイアルにとり、水及び塩化ナトリウムを加えてヘッドスペース法で測定した場合の回収率は、対象物質や底質の性状等により異なるが、11 ~ 55 % 程度である。
- 注 4) 蒸留水、逆浸透膜により精製した水、イオン交換水等の 1~3 L を三角フラスコにとり、これをガスコンロ等で強く加熱して、液量が約 1/3 になるまで煮沸する。直ちに環境からの汚染がない場所に静置して冷却する。蒸留水等を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、市販の揮発性有機化合物試験用の水、市販のミネラルウォーター等を用いても良い。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 5) 市販の揮発性有機化合物混合メタノール溶液 (1 mg/ml) を用いても良い。
- 注 6) 標準原液は使用時に調製する。ただし、調製した標準品を直ちに液体窒素で冷却し、液体窒素またはアセトン・ドライアイスなどの冷媒を用いた冷却条件下でアンプルに移し、溶封して冷暗所に保存すれば 1 ~ 3 か月は保存できる。それ以上の期間を経過したものは純度を確認してから使用する。
- 注 7) 標準原液と同様にアンプルに封入し、冷暗所に保存すれば 1 ~ 3 か月は保存できる。それ以上の期間を経過したものは純度を確認してから使用する。
- 注 8) 四フッ化エチレン樹脂はりシリコーンゴム栓を用いてもよい。
- 注 9) バイアルによっては多少の誤差があるので、使用前に容量を確認し、誤差が大きいバイアルは除いて使用する。
- 注10) ヘッドスペースサンプラーの取り扱い説明書等に従って洗浄し、試験操作に支障のある妨害等がないことを確認する。
- 注11) ヘッドスペースサンプラーを用いない場合は、0.5~5 ml の容量が正確に採取できるガスタイトシリンジと 20~60 程度の範囲で ± 0.5 に調節可能な恒温水槽を用いる。
- 注12) 保存中は試料体積の変動にともない汚染されることがあるので、この場合は、試料採取容器をチャック付きポリエチレン製袋等に入れて密封し、試料採取容器の口を下にした状態で保存する。
- 注13) 塩化ナトリウムは試料量に対し、濃度が 30 % となるように加える。
- 注14) または、あらかじめ、全量フラスコに容量の90%程度の水を入れ、水9.4 mlに対して試料液 0.6 mlの割合となるように静かに泡立てないように加え、水で標線までメスアップする。泡立てないように静かに混和後、その 10~100 ml を塩化ナトリウムを入れたバイアルに静かに泡立てないように入れる。
- 注15) ヘッドスペースサンプラーの取り扱い説明書等に従って操作する。ヘッドスペースサンプラーを用いない場合は、一定温度に保った恒温水槽中にバイアルをくびまで入れ、一定時間放置する。バイアル瓶の気相の一定量をシリコーンゴム栓を通じてガスタイトシリンジで採取し、GC/MSに注入する。
- 注16) ヘッドスペースサンプラーの構造等により、最適な条件を設定する。
- 注17) 例えば、VOCOL、Aquatic、DB-624、DB-WAX、DB-1301等 (備考 1)。
- 注18) 試料中の対象物質濃度や試験操作条件に応じて適切な濃度範囲とする。

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 環境庁水質保全局水質規制課：環境水質分析マニュアル、環境化学研究会 (1993).
- 2 環境庁水質保全局水質規制課：新しい排水基準とその分析、環境化学研究会 (1994).
- 3 JIS K0125 (1990).
- 4 田辺顕子ほか：環境化学, 7, 69-79 (1997).

VIII 1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、スチレン及び *n*-ブチルベンゼンの分析法 (パージトラップ法)

1 対象物質

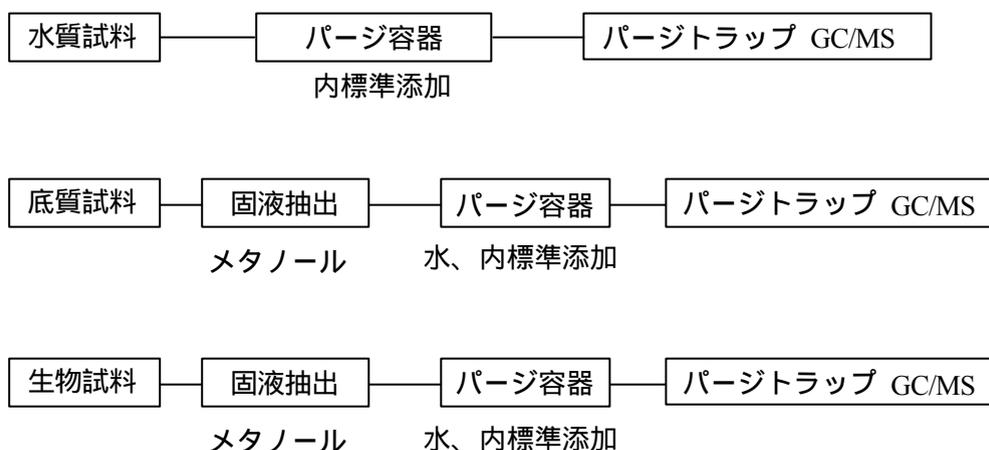
1,2-ジブromo-3-クロロプロパン (DBCP)、スチレン及び *n*-ブチルベンゼン

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

水質試料については、試料液中に不活性ガスを通気して対象物質を気相中に移動させてトラップ管に捕集し、次にトラップ管を加熱し対象物質を脱着して、冷却凝縮装置でクライオフォーカスさせ、GC/MS-SIM に導入して測定する。底質試料及び生物試料については、試料中の対象物質をメタノールで抽出後、抽出液の一部に水を加えたものに不活性ガスを通気することにより、水質試料と同様に測定する (注 1~ 3)。



4 試薬・器具・装置

(1) 試薬

- ・メタノール：ヘッドスペース法参照。
- ・水：ヘッドスペース法参照 (注 4)。
- ・DBCP、スチレン及び *n*-ブチルベンゼン：ヘッドスペース法参照。
- ・標準原液：ヘッドスペース法参照。
- ・内標準原液：ヘッドスペース法参照。
- ・内標準溶液：メタノールを 50~80 ml 入れた 100 ml メスフラスコに、内標準原液 1 ml をとり、メタノールで 100 ml とし内標準溶液とする。
- ・内標準原液：ヘッドスペース法参照。

(2) 器具・装置

- ・パージ瓶：試料 5~25 ml のパージが可能なガラス製容器またはそれに試料導入部を有するもので、試験操作中に加温、冷却しても容器の機密性が保たれるもの (注 5)。洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。約105 °C の電気乾燥器内で3時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。
- ・パージトラップ装置 (注 6)。
- ・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

(1) 試料採取

(ア) 水質試料

ヘッドスペース法参照。

(イ) 底質試料

ヘッドスペース法参照。

(2) 試験操作

(ア) 水質試料の前処理

試料5～25 mlの適量を静かに泡立てないようにパージ瓶にホールピペットで入れ、内標準溶液 1 μ l を添加する。

(イ) 底質試料の前処理

試料液の調製はヘッドスペース法参照。

パージ瓶に、水9.8 mlに対して試料液0.2 mlの割合となるように、水 4.9～24.5 ml 及び試料液 0.1～0.5 ml を静かに泡立てないように入れ (注 7)、内標準溶液 1 μ l を添加する。

(ウ) 生物試料の前処理

試料 20 g を遠心管に採り、3000 rpm で20 分間遠心分離し、上澄みは捨てる。試料にメタノール 10 ml を加え、3 分間ホモジナイズする。3000 rpm で10 分間遠心分離し、液層を全量フラスコに入れる。残さにメタノール 10 ml を加え、10分間超音波抽出を行う。3000 rpm で10 分間遠心分離し、液層を全量フラスコに加え、定容(25～50 ml)とし、試料液とする。

パージ瓶に、水9.8 mlに対して試料液0.2 mlの割合となるように、水 4.9～24.5 ml 及び試料液 0.1～0.5 ml を静かに泡立てないように入れ (注 7)、内標準溶液 1 μ l を添加する。

(エ) パージトラップ分析

パージ瓶をパージトラップ装置のトラップ部に接続する。パージガスを一定量通気して対象物質を気相中に移動させてトラップ管に捕集し、次にトラップ管を加熱し対象物質を脱着して、冷却凝縮装置でクライオフォーカスさせ、GC/MSに導入して測定する (注 8～10)。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。

(3) 空試料液の調製

水質試料及び生物試料については、試料と同量の水を用いて、また、底質試料については、試料と同量の水及びメタノールを用いて、「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

標準原液：ヘッドスペース法参照。

(5) 測定

(ア) パージトラップ条件の例 (注 8～10)

パージ時間：10 分

パージ温度：室温

ドライパージ時間：4 分

トラップ温度：-150

トラップ管加熱時間：2 分

トラップ管加熱温度：220

注入時間：3 分
注入温度：220
トラップ管焼きだし時間：20 分
トラップ管焼きだし温度：260

(イ) GC-MS条件の例

(a) GC

- ・カラム：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 25~120 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11）
- ・カラム温度：40（5分） 7 /分 230（5分）
- ・注入口温度：180
- ・キャリアガス：ヘリウム（線速度40cm/秒）

(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

- ・DBCP：75 (157)
 - ・スチレン：104 (78)
 - ・*n*-ブチルベンゼン：134 (91)
 - ・4-ブロモフルオロベンゼン：174
- () のイオンは確認用に用いる。

(6) 検量線

「試験操作」に従って、試料と同量の水に対象物質量が0.25~250 ngとなるように標準混合溶液を添加し（注12）、内標準溶液 1 μl を添加する。「試験操作」に従って試料と同様の操作をし、GC/MS測定をする。内標準物質と対象物質の面積比を求め、検量線を作成する。

(7) 計算

次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{計算値} (\mu\text{g/L}) = \text{検出量} (\text{ng}) / \text{試料量} (\text{ml})$$

注意事項

- 注 1) クライオフォーカスを行わない場合は、対象物質をトラップ管に捕集後、トラップ管を加熱して、そのままGC/MSに導入する。
- 注 2) 十分な感度を得られればSIM測定の代わりにスキャン測定でもよい。
- 注 3) 本法において適当なモニターイオンを用いてGC/MS測定することにより、ジクロロメタン、ジブromクロロメタン、テトラクロロメタン、トリクロロメタン（クロロホルム）、トリブromメタン（ブromホルム）、ブromジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、1,1,1-トリクロロエタン、1,1,2-トリクロロエタン、1,1-ジクロロエチレン、*cis*-1,2-ジクロロエチレン、*trans*-1,2-ジクロロエチレン、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、1,2-ジクロロプロパン、1,3-ジクロロ-1-プロペン、1,4-ジクロロベンゼン、キシレン、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン等の分析が可能である。
- 注 4) 市販のミネラルウォーター等を用いる場合、パージトラップ装置の経路にアルカリ土類金属塩等が析出することがある。

- 注 5) パージ瓶によっては、多少の誤差があるので、使用前に容量を確認し、誤差が大きいものは除いて使用する。
- 注 6) パージトラップ装置の取り扱い説明書等に従って洗浄し、試験操作に支障のある妨害等がないことを確認する。
- 注 7) または、あらかじめ、全量フラスコに容量の90%程度の水を入れ、水9.8 mlに対して試料液0.2 mlの割合となるように静かに泡立てないように加え、水で標線までメスアップする。泡立てないように静かに混和後、その 5~25 ml をパージ瓶に静かに泡立てないように入れる。
- 注 8) パージトラップ装置の取り扱い説明書等に従って操作する。
- 注 9) クライオフォーカスを行わない場合は、対象物質をトラップ管に捕集後、トラップ管を加熱して、そのままGC/MSに導入する。
- 注10) パージトラップの最適条件は使用する吸着剤の種類、量等によって異なるため、あらかじめ十分な回収結果のえられる条件を求めておく。パージ条件はトラップ管の破過容量を超えないよう注意する。
- 注11) 例えば、VOCOL、Aquatic、DB-624、DB-WAX、DB-1301等 (備考 1)。
- 注12) 試料中の対象物質濃度や試験操作条件に応じて適切な濃度範囲とする。

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、性能のものをを用いてもよい。

参考文献

- 1 環境庁環境保健部保健調査室：昭和61年度 化学物質分析法開発調査報告書 (1987).
- 2 環境庁水質保全局水質規制課：環境水質分析マニュアル、環境化学研究会 (1993).
- 3 環境庁水質保全局水質規制課：新しい排水基準とその分析、環境化学研究会 (1994).
- 4 JIS K0125 (1990).
- 5 EPA: Method 624, US EPA.

. 多成分農薬分析法

1. 対象物質

本法は、トリアジン系除草剤のアトラジン、シマジン、メトリブジン、N-メチルカルバメート系殺虫剤のカルバリル^{注1)}、酸アミド系除草剤のアラクロール、有機リン系殺虫剤のエチルパラチオン、マラチオン、ジフェニルエーテル系除草剤のニトロフェン、ジニトロフェノール系除草剤のトリフルラリン、ピレスロイド系殺虫剤のシペルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ペルメトリン、ピンクロゾリンの各農薬の測定に適用する。ここで、エスフェンバレレートは光学異性体の混合物であるフェンバレレートの有効成分であるため、定量用標準混合液の作成にあっては注意を要す。また、一部^{注2)}を除いて水質環境基準の健康項目と要監視項目に挙げられる農薬にも適用できる。

注1) カルバリルはGC/MSの装置条件によって分解する場合がある。この際は、HPLCのポストカラム誘導体化法、あるいはGC/MSのアセチル化などの誘導体化を行う。

注2) 底質、生物試料のクロロタロニルやイソキサチオンの分析など困難なものもある。

2. 目標検出限界

各農薬の検出限界値は、水質では0.01~0.05 $\mu\text{g/l}$ 程度、底質と生物試料では0.5~50 $\mu\text{g/kg}$ を目標とする。

3. 分析法の概要

水試料中の農薬は、ジクロロメタンによる溶媒抽出または逆相型のカートリッジカラムで固相抽出し、脱水・濃縮、内標準物質を添加した後、GC/MS(SIM)で定量する。底質試料については、アセトンで振とうし、超音波抽出を行った後、アセトン抽出液に精製水を加えてジクロロメタンで振とう抽出または一旦濃縮して精製水に溶解させた溶液から固相抽出を行い、フロリジルとグラファイトカートリッジカラムで精製、内標準物質を添加した後、GC/MS(SIM)で定量する。生物試料は、アセトニトリルで抽出後、ヘキサンで洗浄して脂質成分を除去し、精製水を加えてジクロロメタンで再抽出、脱水・濃縮の後、フロリジルカラムで精製して、測定用内標準物質を加えてGC/MS(SIM)で定量する。

4. 試薬・器具

(1) 試薬類

- a) 農薬標準品： 残留農薬分析用で純度または濃度が保証されたもの
- b) 内標準物質： フェナンスレン- d_{10} 、フルオランテン- d_{10} 、クリゼン- d_{12} 、ペリレン- d_{12}
- c) ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、メタノール、アセトニトリル、無水硫酸ナトリウム： 残留農薬分析用
- d) 塩化ナトリウム： 600°C で4時間加熱、または同等のもの
- e) 窒素ガス： 高純度窒素1級(純度99.999%以上)
- f) 精製水： 蒸留水または超純水など測定の妨害となる物質を含有しないもの

(2) 器具および装置

- a) 分液ロート、共栓付試験管、クロマトグラフ管、濃縮フラスコ、遠沈管、メスシリンダー、メスフラスコなどガラス器具
- b) 振とう機

- c) 固相抽出カラム：オクタデシル基結合型シリカゲル(ODS)、スチレンジビニルベンゼン共重合体(ポリスチレン樹脂)、ポリメタクリレート樹脂、ポリアミド樹脂またはこれらと同等の性能を有する基材を200-1,000mg充てんしたもので、試料を通す直前にジクロロメタン5ml、アセトン5ml、精製水5mlで洗浄したもの
- d) 固相抽出装置：加圧型または吸引型で、通水速度の制御が可能なもの
- e) フロリジリカートリッジカラム：容量3ml程度のカラムにクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムを約1g充てんしたもの、または同等品
- f) グラファイトカーボンカートリッジカラム：容量3ml程度のカラムに非孔性グラファイトカーボンを0.2～0.3g充てんしたもの、または同等品
- g) 濃縮器：クデルナダニッシュ(KD型)型濃縮器又はロータリーエバポレータ
- h) 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)、攪拌粉散器(ウルトラターラックス)またはその同等品
- i) 超音波抽出器：超音波洗浄器または同等品
- j) ガラス繊維ろ紙：孔径1 μ mであって、測定妨害となる物質を含まないこと
- k) ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)

5. 分析操作

5.1 抽出法

5.1.1 水質試料

a) 溶媒抽出

懸濁物質量の多い試料水(目安としてSS濃度50 μ g/ml以上)は予めガラス繊維ろ紙(孔径：1 μ m)によるろ過を行い、懸濁物質とろ液を個別に抽出する。

懸濁物質中の農薬は、アセトンによる超音波抽出を行い、抽出液はろ液試料に移す。抽出と洗浄に用いるアセトンの量は、ろ液量の5%程度にとどめる。

懸濁物質量の少ない試料水またはろ液試料は、その1/を分液ロートにとり、塩化ナトリウム50gおよびジクロロメタン50mlを加え、振とう機で10分間抽出し、静置してジクロロメタン層を分取する^{注3)}。同様な抽出操作を繰り返し、ジクロロメタン抽出液は300ml容の分液ロートに合わせ、ヘキサン100mlを加えて^{注4)}、無水硫酸ナトリウムで脱水する。ジクロロメタンとヘキサンの混合抽出液は、KD濃縮器またはロータリーエバポレータを用いて2mlまで濃縮する。

注3) ジクロロメタン抽出液の分取は、振とう後十分に静置し、水とジクロロメタン層が分離した後に行う。エマルジョンのために分離が進まない場合は、200ml程度のヘキサンを入れた分液ロートを準備し、この中にエマルジョンを入れて軽く振とうすることで分離を促すことができる。

注4) ヘキサンは脱水効果を高め、かつ濃縮時の被検物質の損失防止で加える。

b) 固相抽出

固相カラム通水時に目詰まりが想定される場合、試料水は孔径1 μ m程度のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を検液とする。ろ紙は5-10ml程度のアセトンで超音波抽出を行い、アセトン抽出液はろ液に合わせる。

試料500mlを固相カラムに吸引または加圧しながら、毎分10mlで通水させる。次に、精製水10mlを流し、カラムを洗浄した後、約10分間アスピレーター吸引で、または遠心分離等で水分を分離除去する。固相カラムの上端からアセトン3mlまたは20%アセトン/ヘキサン溶液10mlを緩やかに通し、農薬を溶離させ、試験管に受ける。アセトン抽出液に窒素ガスを緩やかに吹き付けて一旦2ml程度まで濃縮し、ヘキサン5mlを加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、再び窒素ガスで2mlに濃縮する。

5.1.2 底質試料

均一化した湿泥10~25gを遠沈管に採り、アセトン25mlを加え、10分間振とう抽出し、さらに10分間超音波抽出を行う。抽出後、3,000rpmで10分間遠心分離し、上澄みのアセトン層を分取する。この操作を3回繰り返してアセトン層を合わせる。本操作の後、溶媒抽出または固相抽出のいずれかの操作を行う。

溶媒抽出では、アセトン抽出液を5%塩化ナトリウム水溶液400mlを入れた1l容分液ロートに移し、ジクロロメタン50mlを加えて、振とう機で約10分間振とうする。放置後、ジクロロメタン層を三角フラスコ500mlに移す。分液ロートの水層にジクロロメタン100mlを加え、再び約10分間振とうし、放置後、ジクロロメタン層を先の三角フラスコに合わせる。ジクロロメタン抽出液は無水硫酸ナトリウム約30gを用いて脱水した後、ヘキサン約50mlを加え、ロータリーエバポレータまたはKD濃縮器で2mlに濃縮する。

固相抽出では、アセトン抽出液をロータリーエバポレータまたはKD濃縮器で約10mlまで濃縮し、全量を精製水250mlに溶解する。濃縮フラスコまたは管は少量のアセトンで洗い合わせる。精製水中のアセトン量は5%を超えないよう注意する。水質試料と同様に、この試料容液を予めコンディショニングした固相カラムに吸引または加圧しながら5~10ml/minで通す。通水後、精製水10mlを通してカラムを洗浄し、約10分間吸引または遠心分離等で水分を分離除去する。次いで、固相カラムの上端からアセトン3mlまたは20%アセトン/ヘキサン溶液10mlを穏やかに通し、分析対象農薬を溶出させ、試験管に受ける。溶出液は、窒素ガスを緩やかに吹き付けて約2mlとし、ヘキサン約5mlを加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、再度窒素ガスで濃縮し2mlとする。

5.1.3 生物試料^{注5)}

細切し均一化した湿組織10~25gにアセトニトリル50mlを加え、10分間ホモゲナイザーで高速攪拌し、さらに10分間超音波容器内に置いて抽出する。生物組織とアセトニトリルの混合物は、3,000rpmで15分間遠心分離し、上澄み液のアセトニトリル層を分取する。残渣にはアセトニトリル50mlを加えて、同様の操作を行い、アセトニトリル層を合わせる。

次いで、アセトニトリル・ヘキサン分配によって抽出液から脂質成分を除く操作を行う。アセトニトリル抽出液は1l容の分液ロートに移し、アセトニトリルを飽和させたヘキサン30mlを加え、5分間振とうする。静置後、下層のアセトニトリル層を別の分液ロートに移し、ヘキサン層は捨てる。アセトニトリル層に再度アセトニトリル飽和ヘキサン30mlを加えて5分間振とうし静置する。アセトニトリル層を別の分液ロートに移し、精製水5mlを加えて、緩やかに攪拌、暫時静置する。アセトニトリル層の上部にヘキサンが分離した後、アセトニトリル層を別の分液ロートに移し、5%塩化ナトリウム水溶液500mlを加えて攪拌混合する。これにジクロロメタン50mlを加え、10分間振とうして静置、ジクロロメタン層を分取する。アセトニトリルと塩化ナトリウム水溶液の混合層には再びジクロロメタン50mlを加えて振とうし、ジクロロメタン層を先の抽出液に合わせる。ジクロロメタン抽出液は、無水硫酸ナトリウムで脱水し、浴温40℃以下のロータリーエバポレータで約10mlに濃縮する。混在するアセトニトリルを完全に留去させるために、濃縮液にノナン10mlを加えて、再び約2mlまで濃縮する。

注5) 抽出溶媒にメタノールを用いてもよい。この場合、メタノール・ヘキサン分配法を用いて脂質成分を除去する。メタノール抽出液をヘキサンで振とう洗浄し、5%塩化ナトリウム水溶液を加えて、ジクロロメタンで抽出する操作である。ここで得られた濃縮液にはメタノールの残存はない。

5.2 精製法

水質試料は必要に応じて精製を行うが、一般にはその必要はなく、5.2項の「測定用試料容液

液の調製」に進む。

底質と生物試料については、原則としてフロリジルカラムクロマトグラフィーによる抽出濃縮液の精製を行う。なお、クロマトグラフィーの操作条件を一例として示すが、用いる基材の特性、活性状況、充てん量等により測定対象農薬の溶出範囲が変わるので、溶出量など最良の精製効果が得られる条件を予め確認するものとする。

底質試料からの抽出液の精製にはフロリジルカートリッジカラムを用いる。予めヘキサン10ml通したフロリジルカートリッジカラムに5~10mlの注射筒を装着する。粗抽出液の全量を注射筒に移し、容器内壁をヘキサン1mlずつで2回洗浄して合わせ、自然落下させる。注射筒内に粗抽出液が無くなったのをみて、ヘキサン10mlを加え、同様に流下させる。この溶出画分は捨てる。次いで、20%アセトン含有ヘキサン10mlで溶出し、試験管に受ける。この溶出液は濃縮器あるいは窒素ガスで約2mlまで濃縮する。

この濃縮液の着色が著しく、不揮発性夾雑物が測定の妨害となる恐れがある場合は、グラフアイトカーボン系カートリッジカラム(Envi-Carb, 3ml, 0.25gなど)による精製を行う。このカラムは使用直前に20%アセトン含有ヘキサン10mlでコンディショニングする。その後、濃縮液を負荷して、50%アセトン含有ヘキサン5mlで溶出し、この間の溶出液は全量を試験管に受け、窒素ガスを吹き付けて約2mlまで濃縮する。

生物試料の粗抽出液はフロリジルカラムクロマトグラフィーで精製する。フロリジルは130℃で一夜乾燥し、デシケータ中で放冷したものを使う。このフロリジル10gをクロマトグラフ管(内径1.0~1.5×長さ30cm)にヘキサンで湿式充てんして、約2gの無水硫酸ナトリウムを積層する。カラムはヘキサン10ml程度で洗い、液面をカラムヘッドまで下げる。無水硫酸ナトリウムの層が乱れないように粗抽出液をカラムに負荷して流下させ、続いて少量のヘキサン(2ml程度)で数回容器を洗ってカラムに注ぎ、カラム壁面を洗いながら流下させ、液面をカラムヘッドに合わせる。最初にヘキサン100mlで展開して、この溶出液は捨てる。次いで、20%アセトン含有ヘキサン100mlで展開し、この溶出液を濃縮器で約2mlに濃縮する。

5.3 測定用試料溶液の調製

水質試料の粗抽出液あるいは底質、生物試料から得られた溶出液は、さらに窒素ガスを緩やかに吹き付けて溶媒を留去し、直ちに測定用内標準溶液を0.5ml添加し、GC/MSの試験液とする。

5.4 空試験液の調製

試料と同量の精製水を用いて、5.1~5.3項の操作を行い水質、底質および生物試料ごとに空試料液を調製する。

5.5 標準液の調製

各農薬標準物質の100μg/mlアセトン溶液を標準原液とする。標準原液を等量混合してアセトンで順次希釈して1.0μg/mlの標準混合溶液を調製する^{注6)}。これを0-1.0ml段階的にとり、測定用内標準溶液0.5ml加えて、窒素ガス気流下で0.5ml定容として、検量線作成用の標準液とする。

測定用内標準溶液は、フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀、クリセン-d₁₂、ペリレン-d₁₂の各0.5μg/mlアセトン混合溶液である。

これらの標準溶液は密閉し冷暗所で保管する。

注6) フェンバレレートは、光学異性体の混合物であり、エスフェンバレレートを有効成分とする。したがって、これらを混合すると濃度が不明瞭となる恐れがある。エスフェンバレレートは国内流通していない状況があるので、環境モニタリングにあっては、フェンバレレートのみを標準液に混合するとよい。ピークトップ部分が僅かに分離する後方成分がエ

がエスフェンバレレートに相当する。

5.6 測定

a) GC/MSの分析条件の設定

分析条件の一例を参考として示す。

[ガスクロマトグラフ(GC)]

使用カラム： 溶融シリカキャピラリーカラム(内径 0.25mm 長さ 30m 液相膜厚 0.25 μ m)
液相はメチルシリコン系またはフェニルメチルシリコン系の無極性から微極性カラムでブリーディングがなく、分離性能と再現性に優れたもの。

カラム温度： 50°C(1min)-20°C/min-200°C -5°C/min-280°C(5min)

注入口温度： 250

注入法： スプリットレス(1.0min)

キャリアーガス： ヘリウム(線速度 40-50cm/sec)

[質量分析計(MS)]

インターフェイス温度： 280°C

イオン源温度： 270°C

イオン化エネルギー： 70eV

イオン化電流： 300 μ A

イオン化法： 電子衝撃イオン化(EI)法

質量校正

MS に質量校正用標準物質の DFTPP (decafluorotriphenylphosphin)、PFTBA(Perfluorotributylamine)または PFK(Perfluorokerosene)を導入して、MS の質量校正プログラムによりフラグメントパターンおよび分解能(500 以上)などの校正を行うと共に、装置の感度等の基本的なチェックを行い、これらの結果は測定結果とともに記録に残す。

モニターイオン： 表1 のとおり

表1 測定対象物質のモニターイオン

測定対象物質	最多同位体 分子量	モニターイ オン(M/Z)	参照 内標準物質
内標準物質			
IS-1 フェナンスレン-d ₁₀	188	188	-
IS-2 フルオランテン-d ₁₀	212	212	-
IS-3 クリゼン-d ₁₂	240	240	-
IS-4 ペリレン-d ₁₂	264	264	-
測定対象農薬			
()内のモニターイオンは確認用			
アトラジン	215	200 (215)	IS-1
アラクロール	269	160 (188)	IS-1
シマジン	201	201 (186)	IS-1
エチルパラチオン	291	109 (291)	IS-2
カルバリル	201	144 (115)	IS-2
マラチオン	330	173 (127)	IS-2
ニトロフェン	283	283 (202)	IS-3
トリフルラリン	335	306 (335)	IS-1
メトリブジン	214	198 (144)	IS-1
シペルメトリン (4成分)	415	163 (181)	IS-4

エスフェンバレート	419	125 (167)	IS-4
フェンバレート (2成分)	419	125 (167)	IS-4
ペルメトリン (2成分)	390	183 (163)	IS-4
ピンクロゾリン	285	198 (212)	IS-1

注：内標準物質の対照はメチルシリコン系のカラムによる。

b) 検量線

検量線作成用の試験液2 μ lをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの標準物質と内部標準のピーク強度（面積または高さ）比および濃度比から検量線を作成する。

c) 定量

試料液2 μ lをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの被検物質と内部標準のピーク強度（面積または高さ）比により、検量線から定量する。

d) 計算

水質試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng/l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})$$

ここで、C： 試料水中の農薬濃度($\mu\text{g/l}$)

S_{abs} ： 検量線から求めた試料液中農薬量(ng)

V_{conc} ： 試料液の最終液量(ml)

V_{inj} ： GC/MSへの注入量(μl)

V_{spl} ： 試料水量(ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度（定量限界値付近）の標準溶液をGC/MSに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s ($\mu\text{g/l}$ またはkg)

定量下限値 = 10s ($\mu\text{g/l}$ またはkg)

7. GC/MS装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

. フェノキシ酢酸系農薬の分析法

1. 対象物質

本法はフェノキシ酢酸系の2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸(2,4-D) および2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4,5-T) の測定に適用する。

2. 目標検出限界

本法の検出限界は、水質では0.05 $\mu\text{g/l}$ 、底質と生物では5~10 $\mu\text{g/kg}$ を目標とする。

3. 分析法の概要

水試料を pH2 の酸性条件でジエチルエーテル抽出して、アルカリ分解、ジクロロメタンによる洗浄と抽出を経て、ジアゾメタンで誘導体化し、GC/MS (SIM) で定量する。底質と生物試料中のフェノキシ酢酸系の農薬は、1N 水酸化ナトリウム-アセトン(1:9) で抽出し、濃縮、アルカリ分解の後、ジクロロメタン洗浄、pH2 への調整、20%ジクロロメタン/ヘキサン抽出、濃縮、メチル誘導体化を経て、GC/MS で定量する。

本方法は、生体内で加水分解作用を受ける可能性を想定して、フェノキシ酢酸系農薬の遊離型と結合型(エステル化物)の総量を求めることを意図している。

4 試薬・器具

(1) 試薬類

- a) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D): 農薬分析試験用標準品
- b) 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸(2,4,5-T): 残留農薬試験用標準品
- c) 内標準物質(フェナンスレン-d₁₀)
- d) 内標準物質: 2,4-ジクロロフェニル酢酸
- e) ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、メタノール、無水硫酸ナトリウム: 残留農薬分析用
- f) ジエチルエーテル: 残留農薬分析用、用時に蒸留したもの
- g) 塩化ナトリウム: 600°C で4時間加熱、または同等のもの
- h) N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン: ジアゾメタン発生試薬
- i) 水酸化ナトリウム: 試薬特級
- j) 塩酸: 精密分析用
- k) 窒素ガス: 高純度窒素1級(純度99.999%以上)
- l) 精製水: 蒸留水または超純水

(2) 器具および装置

- a) 分液ロート、共栓付試験管、メスシリンダー、メスフラスコなどガラス器具
- b) 振とう機
- c) 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)またはその同等品
- d) 超音波抽出装置: 超音波洗浄器を用いることができる
- e) ロータリーエバポレータ(恒温槽つき)
- f) ウォーターバス
- g) ジアゾメタン発生器具: 密閉性が高い専用器具
- h) シリカゲルカートリッジカラム: 容量3ml程度のミニカラムにクロマトグラフィー用シリカゲルを0.5~1g充填したもの
- i) ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)

5. 分析操作

5.1 抽出法

5.1.1 水質試料^{注1)}

試料水1lを分液ロートにとり、塩化ナトリウム25gを添加した後、20%塩酸でpH2に調整し、ジエチルエーテル100mlを加えて10分間振とう抽出し、十分静置してジエチルエーテル層を分取する。水層は再度ジエチルエーテル100mlを加えて同様の抽出操作を繰り返し、十分静置してジエチルエーテル層を先の抽出液に合わせる。ジエチルエーテル抽出液は、ロータリーエバポレータを用いて浴温25°C^{注2)}で流出液が出なくなるまで減圧濃縮した後、メタノール10ml、1N水酸化ナトリウム10ml、精製水10mlを添加し、70°Cの水浴中で15分間アルカリ分解を行う^{注3)}。分解液を100ml容の分液ロートに移し、液性がアルカリ性であることをみて、ジクロロメタン30mlを加え5分間振とう洗浄、十分静置してジクロロメタン層を分液する^{注4)}。続いて、水層を20%塩酸でpH2に調整し、ジクロロメタン30mlを加えて10分間振とう抽出を行う。十分静置してジクロロメタン層を分取して、別の容器に移す。水層には再度ジクロロメタン30mlを加えて同様の抽出を繰り返し、先のジクロロメタン抽出液に合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水する。このジクロロメタン抽出液は、ロータリーエバポレータを用いて25°Cで減圧濃縮した後、窒素気流下で乾固直前まで濃縮する。

注1) フェノキシ酢酸系の物質は、強陰イオン交換体を有する固相カラムによって効果的に抽出できるが、保持容量とマトリックスの影響に課題が残っており、溶媒抽出法のみを示した。

注2) 乾固しないよう注意する。

注3) 2,4-D、2,4,5-Tのエステル化合物が存在すれば、それらを含めた測定法となる。

注4) アルカリ分解後のジクロロメタン洗浄では、水層が透明になるまで十分に静置時間をとって分離させる。

5.1.2 底質試料

均一化した湿泥10~25gを50mlの遠沈管に採取し、内標準液として2,4-ジクロロフェニル酢酸(20µg/ml) 0.1mlを添加、十分に混合した後、1N水酸化ナトリウム-アセトン(1:9) 20mlを加え、振とう機を用いて10分間振とう、さらに10分間超音波振動を与えて、3,000rpmで10分間遠心分離を行い、上澄みのアセトン層を分取する。残渣には1N水酸化ナトリウム-アセトン(1:9) 20mlを加えて、同様な操作をさらに2回繰り返し、アセトン層を合わせる。アセトン抽出液は、浴温25°Cの+ロータリーエバポレータでアセトンの留出がなくなるまで減圧濃縮し、メタノール5mlと1N水酸化ナトリウム溶液を10ml加えて、70°Cのウォ-タバス中で15分間アルカリ分解を行う。分解液は100ml分液ロートに移し、液性が塩基性であることを確認して、ジクロロメタン30mlを加え、5分間振とうする。十分に静置した後、ジクロロメタンを捨て、水層を20%塩酸でpH2に調整、20%ジクロロメタン含有ヘキサン50mlを加えて、10分間振とう抽出を行う。十分に静置して、20%ジクロロメタン含有ヘキサン層を分取し、水層にこの混合溶媒を50ml加えて抽出を繰り返す。抽出操作は3回を行い、合わせた20%ジクロロメタン含有ヘキサン抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ロータリーエバポレータを用いて25°Cで減圧濃縮した後、窒素気流下で乾固直前まで濃縮する。

5.1.2 生物試料

細切し均一化した湿組織10~25gに内標準液として2,4-ジクロロフェニル酢酸(20µg/ml) 0.1mlを添加して混合した後、1N水酸化ナトリウム-アセトン(1:9) 30mlを加え、10分間ホモゲナイザー抽出を行い、さらに10分間超音波抽出して、3,000rpmで10分間遠心分離を行い、上澄みのアセトン層を分取する。この抽出操作は3回繰り返して、アセトン抽出液を合わせ、濃縮する。その後のアルカリ分解、20%ジクロロメタン含有ヘキサンによる抽出、脱水、濃縮の操作は底質試料と同

と同様である。

5.2 測定用試料液の調製

水質、底質および生物質試料から得られた抽出濃縮物は直ちにメタノール0.5mlとジアゾメタン/ジエチルエーテル溶液1ml^(注5)を加えて室温で1時間静置、メチル化反応を行う。反応終了後、ドラフト内で窒素ガスを緩やかに吹き付け、乾固直前まで濃縮し、ヘキサン0.5mlと内標準物質のフェナンスレン-d₁₀(0.5μg/mlヘキサン溶液) 10μlを加えてよく混合したものを測定用の試料液とする。

注5) ジアゾメタン発生の専用器具にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンとジエチルエーテルを入れ、氷冷下、10%水酸化ナトリウム水溶液を加えて発生させたジアゾメタンをジエチルエーテルに捕集し、ジアゾメタン/エーテル溶液を調製する。この操作は必ずドラフト内で行う。

5.3 精製操作

精製の必要があれば、誘導體化の後、シリカゲルカートリッジカラムに負荷し、ヘキサン5mlで洗浄、次いで20%エチルエーテル含有ヘキサン5mlで被験物質を溶出し、窒素気流下で0.5mlまで濃縮して測定用の試料液を得る。

5.4 空試験液の調製

試料量に対応した精製水を用いて、5.1～5.3項に従った操作を行い、水質、底質および生物質試料の空試料液を調製する。

5.5 標準液の調製

2,4-Dと2,4,5-T標準品をそれぞれ100mg正確に秤取り、100mlのメスフラスコに移してヘキサンに溶解し、1,000μg/mlの標準原液とする。標準原液を等量混合しヘキサンで順次希釈、10μg/mlの標準容液を調製する。測定用内標準溶液は、フェナンスレン-d₁₀の0.5μg/mlヘキサン溶液である。

5.6 測定

a) GC/MS測定条件

分析条件の一例を参考として示す。

[ガスクロマトグラフ(GC)]

使用カラム: 溶融シリカキャピラリーカラム(内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25μm) 液相はメチルシリコン系またはフェニルメチルシリコン系の無極性から微極性カラムでブリーディングがなく、分離性能と再現性に優れたもの。

カラム温度: 50°C(1min)-20°C/min-200°C -5°C/min-280°C(5min)

注入口温度: 250

注入法: スプリットレス(1.0min)

キャリアーガス: ヘリウム(線速度 40-50cm/sec)

[質量分析計(MS)]

インターフェイス温度: 280°C

イオン源温度: 270°C

イオン化エネルギー: 70eV

イオン化電流: 300μA

イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)法

モニターイオン: m/z188 (フェナンスレン-d₁₀)

m/z199、234 (2,4-D-Me)
m/z233、263 (2,4,5-T-Me)

b) 検量線

混合標準液をヘキサンで希釈し、対象物質(0-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を目安に5段階程度の検量線用標準液を作成し、各濃度の溶液0.5mlを正確に試験管に入れる。これにメタノール0.5mlとジアゾメタン/エチルエーテル溶液1mlを加え、1時間室温でメチル化を行う。反応終了後、ドラフト内で窒素を緩く吹き付け、乾固直前まで濃縮する。これにヘキサン0.5mlとフェナンスレン-d₁₀ヘキサン溶液(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を10 μl を加える。

これらの2 μl をGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの標準物質と内部標準のピーク強度(面積または高さ)比および濃度比から検量線を作成する。

c) 定量

試料液2 μl をGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの被検物質と内部標準のピーク強度(面積または高さ)比により、検量線から定量する。

d) 計算

水質試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng}/\text{l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / (V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml}))$$

ここで、C: 試料水中の農薬濃度($\mu\text{g}/\text{l}$)

S_{abs} : 検量線から求めた試料液中農薬量(ng)

V_{conc} : 試料液の最終液量(ml)

V_{inj} : GC/MSへの注入量(μl)

V_{spl} : 試料水量(ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度(定量限界値付近)の標準溶液をGC/MSに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s ($\mu\text{g}/\text{l}$ またはkg)

定量下限値 = 10s ($\mu\text{g}/\text{l}$ またはkg)

7. GC/MS装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

・ベノミルの分析法

1. 対象物質

本法はベノミルの測定に適用する。ベノミルの加水分解物であるメチル2-ベンゾイミダゾール (MBC: Methylbenzimidazol-2-yl carbamate) について定量する間接法であり、ベンゾイミダゾール系のチオファネートメチルやチアベンダゾールが共存すればそれらの総量となる。

2. 目標検出限界値

水質におけるMBCの検出限界値は $0.1\mu\text{g/l}$ 、底質については $2\mu\text{g/kg}$ 、生物は $20\mu\text{g/kg}$ を目標とする。MBC濃度に1.52(ベノミル分子量/MBC分子量)を乗じた値がベノミル濃度に相当する。

3. 分析法の概要

水試料は塩化ナトリウムの塩析条件下でジクロロメタン抽出し、脱水、濃縮、ジアゾメタンによるメチル化の後、GC/MSで定量する。底質試料中のベノミルは、メタノールとともに振とうと超音波抽出を行い、酢酸エチルに溶媒置換して0.1N塩酸で分解、pH2への調整の後、ジクロロメタン抽出し、ジアゾメタンによるメチル化を経て、GC/MSで定量する。生物試料については、アセトニトリルで超音波と振とう抽出した後、ヘキサンで脱脂洗浄を行い、酢酸エチルへの溶媒置換、0.1N塩酸による分解以後の操作は底質試料と同様である。

4 試薬・器具

(1) 試薬

- a) ベノミル: 農薬分析試験用標準品、純度98%以上
- b) 内標準物質(フェナンスレン- d_{10})
- c) ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、メタノール、酢酸エチル、無水硫酸ナトリウム: 残留農薬分析用
- d) ジエチルエーテル: 残留農薬分析用、用時に蒸留したもの
- e) 塩化ナトリウム: 600°C で4時間加熱、または同等のもの
- f) N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンまたはトリメチルシリルジアゾメタン: ジアゾメタン発生試薬
- g) 水酸化ナトリウム: 試薬特級
- h) 塩酸: PCB分析用
- i) 窒素ガス: 高純度窒素1級(純度99.999%以上)
- j) 精製水: 蒸留水または超純水

(2) 器具および装置

- a) 分液ロート、共栓付試験管、メスシリンダー、メスフラスコなどガラス器具
- b) 振とう機
- c) 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)またはその同等品
- d) 超音波抽出装置: 超音波洗浄器を用いることができる
- e) 濃縮器: クデルナダニッシュ(KD型)型濃縮器又はロータリーエバポレータ
- f) ジアゾメタン発生器具: 密閉性が高い専用器具
- g) ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)

5. 試験操作

5.1 抽出法

5.1.1 水質試料

試料1lを分液ロートにとり、塩化ナトリウム50gを加え、ジクロロメタン50mlで10分間振とう抽出する。静置後、ジクロロメタン層の分離をみて、別の300ml容分液ロートに分取する^{注1)}。この操作をさらに2回繰返し、ジクロロメタン抽出液を合わせる。

この抽出液はロータリーエバポレータを用いて減圧濃縮し、酢酸エチル10-20mlに再溶解して100ml容の分液ロートに移す。このなかに0.1N塩酸50mlを加えて5分間振とうして、静置後塩酸層を別の分液ロートに移す。さらに、酢酸エチルで塩酸層を洗浄して、分離後ビーカーに移す。

塩酸層は水酸化ナトリウム(5Nまたは0.2N)水溶液でpHを6.4に調整して、200ml容の分液ロートに移す。これにジクロロメタン50mlを加えて5分間振とうして静置する。分離後、ジクロロメタン層を別の容器に分取する。水層はジクロロメタン50mlを加え同様に振とう抽出し、分離後ジクロロメタン抽出液を合わせる。ジクロロメタン抽出液にヘキサン50mlを加え、無水硫酸ナトリウムで脱水し、KD濃縮器またはロータリーエバポレータで3-5ml程度まで濃縮、さらに窒素気流下で乾固する。

注1) エマルジョンのために分離が進まない場合は、200ml程度のヘキサンを入れた分液ロートを準備し、この中にエマルジョンを入れて軽く振とうすることによって分離を促すことができる。

注2) ジアゾメタン発生の専用器具にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンとジエチルエーテルを入れ、氷冷下、10%水酸化ナトリウム水溶液を加えて発生させたジアゾメタンをジエチルエーテルに捕集し、ジアゾメタン/エーテル溶液を調製する。この操作は必ずドラフト内で行う。ジアゾメタン/エーテル溶液の代わりに、トリメチルシリルジアゾメタンを用いることができるが、不純物が多く、反応時間も長くなる傾向がある。

5.1.2 底質試料

均一化した湿泥試料10~25gにメタノール50mlを加えて15分間振とう抽出し、さらに15分間超音波抽出を行い、3,000rpmで10分間遠心分離する。上澄みのメタノール層を分取した後、残渣にメタノール50mlを加えて、同様の抽出操作を繰り返して、メタノール層を先の抽出液に合わせる。メタノール抽出液は浴温約40°Cのロータリーエバポレータで乾固直前まで濃縮し、残液に0.1N塩酸30mlおよび酢酸エチル50mlを加え、200ml分液ロートに移して5分間振とうする。静置後酢酸エチル層を分取して、水層に酢酸エチル50mlを加えて、同様に振とう抽出、酢酸エチル層を先の抽出液に合わせて、浴温40°C以下で乾固直前まで減圧濃縮する。残留物を酢酸エチル50mlに溶解して100ml分液ロートに移し、0.1N塩酸30mlを加えて5分間振とうする。塩酸層を分取して、酢酸エチル層に0.1N塩酸を20ml加え、再び5分間振とう、塩酸層を分取して合わせる。塩酸抽出液は5Nおよび0.2N水酸化ナトリウム水溶液でpH6.4に調整した後、ジクロロメタン50mlを加えて5分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を分取して、水層にジクロロメタン30mlを加えて5分間振とう、ジクロロメタン層を合わせる。ジクロロメタン抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、ジクロロメタンを減圧留去する。

5.1.3 生物試料

細切し均一化した生物組織10~25gにアセトニトリル50mlを加えて15分間ホモゲナイズ抽出し、さらに15分間超音波抽出を行い、3,000rpmで10分間遠心分離する。上澄みのアセトニトリル層を分取した後、残渣にアセトニトリル50mlを加えて、同様の抽出操作を繰り返して、アセトニトリル層を先の抽出液に合わせる。アセトニトリル抽出液は、アセトニトリル飽和ヘキサン30mlで2回振とう洗浄した後、浴温約40°Cのロータリーエバポレータで乾固直前まで濃縮し、残液に0.1

0.1N塩酸30mlおよび酢酸エチル50mlを加えて溶解し、以後は底質試料と同様の操作を行う。

5.2 測定用試料液の調製

ジクロロメタン抽出液の溶媒留去後直ちにメタノール0.5ml、ジアゾメタン/エーテル溶液1mlを加え^{注2)}、室温で1時間静置してメチル化反応を行う。反応終了後、ドラフト内で窒素ガスを緩やかに吹き付け、乾固直前まで濃縮、内標準物質のフェナンスレン-d₁₀ (0.5μg/mlヘキサン溶液) 0.2mlを加えて、よく混合したものを測定用の試料液とする。

5.3 空試験液の調製

試料量に相当する精製水を用いて、5.1～5.3項の操作を行い、水質、底質および生物湿試料の空試料液を調製する。

5.4 標準液の調製

ベノミル標準物質の100mgを正確に秤とり、メタノールで溶解して100mlとしたものが1,000μg/mlの標準原液である。標準原液の1mlを予め0.2N塩酸50mlを入れた100ml容の分液ロートに入れ5分間振とうする。その後、5Nと0.2Nの水酸化ナトリウムでpH6.5に調整し、塩化ナトリウム2.5gを加えて、ジクロロメタン20mlで加水分解産物のMBCを振とう抽出する。静置後、分離したジクロロメタンは無水硫酸ナトリウムで脱水しながら100mlのメスフラスコに移す。この抽出操作をさらに2回繰り返し、メスフラスコにジクロロメタン抽出液を合わせ、ジクロロメタンで全量を100mlとする。この10μg/ml MBCジクロロメタン溶液をさらに10倍希釈した標準溶液を0-1.0mlの間で段階的に試験管にとり、窒素ガスを緩やかに吹き付けて溶媒を除去、直ちにメタノール0.5mlとジアゾメタン/ジエチルエーテル溶液1mlを加えて1時間室温で放置してメチル化を行う。反応後、ドラフト内で窒素ガスを緩やかに吹き付けて溶媒を除き、内標準物質のフェナンスレン-d₁₀ (0.5μg/mlヘキサン溶液) 0.2mlを加えて、よく混合したものを検量線作成用の試料液とする。

MBCの分析用標準物質を用いて検量線用標準液を作成することもできる。ベノミル濃度への換算は1.52を乗じる。

5.5 測定

a) GC/MS測定条件

分析条件の一例を参考として示す。

[ガスクロマトグラフ(GC)]

使用カラム: 5%フェニルメチルシリコン化学結合型キャピラリーカラム(内径0.25mm、長さ30m、液相膜厚0.25μm)またはこれと同等の性能をもつもの

カラム温度: 50°C(1min)-20°C/min-200°C-5°C/min-280°C(5min)

注入口温度: 250

注入法: スプリットレス(1.0min)

キャリアーガス: ヘリウム(線速度40-50cm/sec)

[質量分析計(MS)]

インターフェイス温度: 280°C

イオン源温度: 270°C

イオン化エネルギー: 70eV

イオン化電流: 300μA

イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)法

モニターイオン: m/z188 (フェナンスレン-d₁₀)

m/z146、205 (MBC-Me)

b) 検量線

検量線作成用の試料液2μlをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの標準物質と内部標準のピーク強度(面積または高さ)比および濃度比から検量線を作成する。

c) 定量

試料液2μlをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムの被検物質と内部標準のピーク強度(面積または高さ)比により、検量線から定量する。

d) 計算

水質試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng/l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})$$

ここで、C: 試料水中の農薬濃度(μg/l)

S_{abs}: 検量線から求めた試料液中農薬量(ng)

V_{conc}: 試料液の最終液量(ml)

V_{inj}: GC/MSへの注入量(μl)

V_{spl}: 試料水量(ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度(定量限界値付近)の標準溶液をGC/MSに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s (μg/lまたはkg)

定量下限値 = 10s (μg/lまたはkg)

7. GC/MS装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて±20%以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

. アミトロールの分析法

1. 対象物質

アミトロール(3-アミノ-1,2,4-トリアゾール)

2. 目標検出限界

本分析法の検出限界は水質で 1 μ g/l、底質で 1 μ g/kg を目標とする。

3. 分析法の概要

本分析法は、水試料を pH4.0 に調整後フルオレスカミンと反応させ、ODS 系の固相カラムを用いて濃縮し、HPLC-蛍光検出法で定量する方法である。底質試料については 2%アンモニア水で超音波と振とう抽出を行い、遠心分離の後、ろ過する。ろ液は煮沸によってアンモニアを除去して、*o*-フタルアルデヒド溶液を加え、ジクロロメタンで妨害物質を洗浄除去した後、フルオレスカミンによる誘導体化反応を行う。反応終了後、アミトロールのフルオレスカミン誘導体を固相抽出し、HPLC で分離した後、蛍光検出する。生物試料は、エタノールと 40%含水エタノールで超音波と振とう抽出を行い、陽イオン交換樹脂カラムで精製の後、フルオレスカミンによって誘導体化を行い、HPLC で蛍光検出する。

4. 試薬・器具

(1) 試薬

- a) アミトロール(amitrol)、3-アミノ-1,2,4-トリアゾール： 農薬分析試験用標準品、純度 98%以上
- b) フルオレスカミン(fluorescamine)： 商品名フルラム(fluram)に同じ。市販品をそのまま使用
- c) フタルアルデヒド溶液： 0.1M ほう酸緩衝液(pH9.5)50ml、*o*-フタルアルデヒド-エタノール溶液 5ml(5ml のエタノールに 270mg の *o*-フタルアルデヒドを溶解)および 2-メルカプトエタノール 0.2ml を混合する。この試薬は使用の都度 2-メルカプトエタノールを 50 μ l 追加して用いる。
- d) 酢酸緩衝液： 氷酢酸(特級)と酢酸ナトリウム(特級)のそれぞれ 60g、16.4g を精製水に溶かし 600ml としたものを、pH3.8-4.0 となるよう酢酸または酢酸ナトリウムで微調整する。
- e) メタノール、アタノール、ジクロロメタンおよびアセトン： 残留農薬分析用
- f) 塩化ナトリウム： 700 $^{\circ}$ C で 4 時間加熱後使用。または、残留農薬分析用
- g) アンモニア、プロパノール： 試薬特級
- h) ろ紙： No.5C(5 種 C)
- i) オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)系固相カラム： 大容量で保持能力の高いもの
- j) 精製水： 蒸留水または超純水
- k) 強酸性陽イオン交換樹脂： ムロマック AG50W-X8 あるいはその同等品
- l) 弱酸性陽イオン交換樹脂： アンバーライト IRC-50 あるいはその同等品

(2) 器具および装置

- a) 高速液体クロマトグラフ： 蛍光検出器付
- b) 恒温槽
- c) 注射筒
- d) クロマトグラフ管
- e) 比色管、メスフラスコ、分液ロート、共栓付試験管、メスフラスコなどガラス器具
- f) ホモジナイザー： 万能ホモジナイザー(ポリロン)、超高速万能ホモジナイザイザー(ヒスコロン)、攪拌分散器(ウルトラターラックス)またはその同等品
- g) 超音波抽出装置： 超音波洗浄器を用いることができる

5. 分析操作

5.1 抽出および測定用試料調製法

5.1.1 水質試料

試料水を5種Cのろ紙でろ過し、ろ液20mlを50ml容の比色管に移す。次に、2mlの酢酸緩衝液(pH4.0)^{注1)}と0.2%フルオレスカミン-アセトン溶液4ml^{注2)}を加え、直ちに充分混合して2時間20℃の恒温槽中で反応させる。反応完了後、50mlの注射筒に移し、塩化ナトリウム17gと1N塩酸1mlを加え、毎分5-10mlの流速でODS系カートリッジカラムを通過させ、フルオレスカミン誘導体を吸着させる。精製水2mlで洗浄した後、メタノールを用いて溶出し、正確に2mlとして試料液とする^{注3), 4)}。

注1) 酢酸緩衝液添加後、pH3.8-4.0の範囲にあることを確認する。

注2) 0.2%フルオレスカミン-アセトン溶液の添加量は、反応効率に影響することから正確に4ml添加する。ちなみに、アミトロール水溶液に対して15-30%に相当する0.2%フルオレスカミン-アセトン溶液が最大蛍光強度を示す。

注3) 通常の河川水や海水では妨害は認められないが、必要に応じてo-フタルアルデヒドによる精製を行う。o-フタルアルデヒドはフルオレスカミンと同様に1級アミン類(R-NH₂)と反応するが、アミトロールとは反応しない。このため、フルオレスカミン-アセトン溶液を添加する前に、o-フタルアルデヒドでアミノ基をもつ妨害物質と反応させ、ジクロロメタンで抽出除去する。

注4) アミトロールフルオレスカミン誘導体は、安定性に乏しいため、固相カラム溶出後は直ちに分析に供する。反応開始後2時間で蛍光強度は最大となり2時間から4時間後までほぼ一定、その後は時間経過とともに退色する。

5.1.2 底質試料

均一化した湿泥10~25gを50mlの遠沈管にとり、2%アンモニア水10mlを加えて10分間振とう、さらに10分間超音波抽出する。抽出後、3,000rpmで5分間遠心分離を行い、上澄みの水層を分取して、No.5Cのろ紙でろ過する。この操作は2回繰返す。100mlビーカーにろ液を合わせ、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0)10mlを加え、煮沸してアンモニアを完全に除去する。冷却後20ml定容として、50mlの分液ロートに移し、o-フタルアルデヒド溶液1mlを加え10分間放置して反応させる。ここで、アンモニアの除去が不完全な場合は水層が黄色を呈するので、o-フタルアルデヒド溶液による精製を繰返す。次いで、ジクロロメタン10mlを加えて5分間振とうし、水層を洗浄する。この洗浄操作は2回繰返す。洗浄後、水層は煮沸することによってジクロロメタンを除去し、放冷して50mlの比色管に移す。以後は水質試料と同様に操作する。

5.1.3 生物試料

細切均一化した湿組織10~25gを遠沈管にとり、エタノール20mlを加えて5分間ホモゲナイズし、さらに5分間超音波抽出して、3,000rpmで10分間遠心分離する。上澄みのエタノール層を分取して、残渣に40%含水エタノール20mlを加えて、同様な操作を繰返し、上澄み液を先のエタノール抽出液に合わせる。エタノール抽出液に精製水50mlを加えて分液ロートに移し、ヘキサン20mlで5分間振とう洗浄する。静置後、下層を別の分液ロートに採り、ヘキサンによる洗浄を繰返す。エタノール/水抽出液は100ml定容として、うち10mlを丸底フラスコに採り、過酸化水素1mlを加え、75℃で30分間加熱還流し、放冷する。

酸化処理した抽出液10mlは、強酸性陽イオン交換カラム^{注5)}に負荷して、精製水10mlで洗浄後、2.8%アンモニア水12mlで溶出し、減圧濃縮器フラスコに採る。これにn-プロパノール30mlを加え、45℃以下で濃縮して乾固する。残留物は精製水5mlで再溶解する。

次いで、弱酸性陽イオン交換カラム^{注6)}に溶解液5mlを負荷して、精製水50mlで洗浄した後、2.8%アンモニア水35mlで溶出し、濃縮フラスコに採る。溶出液にはn-プロパノール100mlを加えて、濃縮乾固し、0.1M酢酸緩衝液2mlに溶解する。

この溶解液の1mlに0.2%フルオレスカミン/アセトン溶液0.1mlを加えて十分に混合し、1時間放置する。その後、0.1Mホウ酸ナトリウム0.5mlを加えて、HPLCの定量用試験液とする。

注6) 内径 10mm、長さ 300mm のカラム管に、強酸性陽イオン交換樹脂(粒径 0.063 ~ 0.156 μ m) 1ml を精製水で充てんし、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流下させる。このカラムは精製水 5ml で洗い、抽出液を負荷する。

注7) 同様のクロマトグラフ管に、弱酸性陽イオン交換樹脂(粒径 0.33 ~ 0.50 μ m) 5ml を精製水で充てんし、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流下させる。このカラムは 1N 塩酸、2.8%アンモニア水、1N 塩酸の順に洗浄し、続いて精製水で洗液が中性になるまで洗う。これに溶解液を負荷する。

5.2 空試験液の調製

試料量に対応する精製水を用いて、5.1 項の操作を行い水質、底質、生物試料の空試験液を調製する。

5.3 標準液の調製

アミトロールを正確に 100mg 秤り取り、精製水を加えて 100ml とし、これを標準原液 (1,000 μ g/ml) とする。標準原液は精製水で順次希釈して、5 μ g/ml まで個別に 5 段階程度の検量線作成用の標準液を調製する。

5.4 測定

a) HPLC-蛍光検出の測定条件例

カラム: ODS 系充填剤、内径 5mm×長さ 15cm 程度、粒径 5 μ m

カラム槽温度: 40°C

溶離液: 9%酢酸水溶液-メタノール(10:9)

流量: 2ml/min

検出器: 励起波長: 395nm、蛍光波長: 480nm

b) 検量線

精製水と各濃度段階の標準液を個別に 10ml 容のメスフラスコに 1ml 入れ、精製水 1ml、酢酸緩衝液 (pH4.0) 0.2ml、0.2%フルオレスカミン-アセトン溶液 0.4ml を加え直ちに十分混合する。2 時間 20°C の恒温槽中に静置後、メタノールを加えて 10ml 定容とし、ゼロを含む 0.5 μ g/ml までの検量線作成用の試験溶液とする。これらの試験溶液は 20 μ l を HPLC に注入し、濃度とピーク強度 (面積または高さ) から検量線を作成する。検量線作成用の試験溶液は用時調製が原則であるが、-20°C で 1 週間以内の保管であれば、蛍光強度の低下はない。

なお、試料水を o-フタルアルデヒドによる精製を行った場合は、検量線用の試験溶液も予め同様な処理を行わなければならない。

c) 定量

試料液 20 μ l を HPLC に注入し、得られたピーク強度により、検量線から定量する。

d) 計算

水質試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng/l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times \frac{V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000}{V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})}$$

ここで、C: 試料水中の農薬濃度(μ g/l)

S_{abs} : 検量線から求めた試料液中農薬量 (ng)

V_{conc} : 試料液の最終液量 (ml)
 V_{inj} : HPLCへの注入量 (μl)
 V_{spl} : 試料水量 (ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度(定量限界値付近)の標準溶液をHPLCに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = $3s$ ($\mu\text{g/l}$ または kg)

定量下限値 = $10s$ ($\mu\text{g/l}$ または kg)

7. HPLC装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

・メソミルの分析法

1. 対象物質

メソミルの測定に適用する。また、アルディカーブやカルバリルなどのN-メチルカルバメート農薬の測定にも利用できる。

2. 目標検出限界

メソミルの検出限界は水質で $0.03\mu\text{g/l}$ 、底質で $2\mu\text{g/kg}$ 、生物で $1\mu\text{g/kg}$ を目標とする。

3. 分析法の概要

本法は、N-メチルカルバメート系農薬のアルカリ条件下での加水分解で生成するメチルアミン(CH_3NH_2)を一級アミンの蛍光誘導体化試薬であるo-フタルアルデヒド(OPA)と反応させ、蛍光検出することを測定原理とする。

水試料は塩化ナトリウムによる塩析下でジクロロメタン抽出し、OPAによるポストカラム誘導体化蛍光法で定量する。底質については、アセトンで超音波と振とう抽出し、また生物試料はメタノールでホモジナイズ抽出した後、遠心分離を行い、それぞれ抽出液を得る。抽出液には10%塩化ナトリウム水溶液を加え、ヘキサンで振とう洗浄して、ジクロロメタンで再抽出する。ジクロロメタン抽出液は脱水し、減圧濃縮して、シリカゲルカートリッジカラムで精製、10%アセトン含有ヘキサンで溶出させる。溶出液は濃縮し、内部標準物質としてのアルディカーブスルフォキシドを添加し、HPLCのポストカラム誘導体化法で蛍光検出する。

4. 試薬・器具

- (1) 試薬
- a) メソミル: 残留農薬標準品(純度99%以上)
 - b) アルディカーブスルフォキシド: 残留農薬標準品
 - c) ヘキサン、ジクロロメタン、アセトン、アセトニトリル: 残留農薬分析用
 - d) メタノール: 高速液体クロマトグラフ用
 - e) o-フタルアルデヒド、2-メルカプトエタノール: 生化学用またはそれと同等のもの、または専用反応液
 - f) ほう酸緩衝液
 - g) 塩化ナトリウム: 特級試薬を650Cで24時間加熱またはそれと同等のもの
 - h) 無水硫酸ナトリウム: 残留農薬分析用
 - i) 精製水: 蒸留水または超純水で測定の妨害となる物質を含まないもの
 - j) シリカゲル: クロマトグラフ用
 - k) 水酸化ナトリウム: 試薬特級、または専用反応液
 - l) 窒素ガス: 高純度(99.99%以上)
- (2) 器具及び装置
- a) 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)またはその同等品
 - b) 超音波抽出装置: 超音波洗浄器を用いることができる
 - c) ロータリエバポレータ(恒温槽付き)
 - d) クデルナダニッシュ型(KD)濃縮器
 - e) 振とう機
 - f) 分液ロート、ビーカー、フラスコ、共栓付試験管など
 - g) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): カルバメート農薬分析システムを付属したもの

5. 分析操作

5.1 抽出および測定用試料調製

5.1.1 水質

試料1 lを2 l容の分液ロートにとり、塩化ナトリウム100g(海水では70g)およびジクロロメタン50 mlを加え、振とう機で10分間抽出、静置してジクロロメタン層を分取する^{注1)}。同様な抽出操作をさらに2回繰り返す。ジクロロメタン抽出液は300 ml容の分液ロートに合わせ、ヘキサン100mlを加えて^{注2)}、無水硫酸ナトリウムで脱水する。ジクロロメタンとヘキサンの混合抽出液は、ロータリエバポレータを用いて30°Cで乾固直前まで減圧濃縮する^{注2, 3, 4)}。さらに、窒素気流下で乾固、その直後に内部標準物質として1µg/mlのアルディカーブスルフォキシドのメタノール/精製水溶液(1:9)を1ml正確に加え、測定用の試料液とする^{注5)}。

注1) ジクロロメタン抽出液の分取は、振とう後充分に静置し、水とジクロロメタン層が分離した後に行う。エマルジョンのために分離が進まない場合は、200ml程度のヘキサンを入れた分液ロートを準備し、この中にエマルジョンを入れて軽く振とうすることによって分離を促すことができる。

注2) ヘキサンは脱水効果を高め、かつ減圧濃縮時における被検物質の損失防止の目的で加える。なお、30°C濃縮では損失は認められない。

注3) クデルナダニッシュ型(KD)濃縮器および窒素気流下での濃縮も可能である。

注4) 試料水中に測定の妨害となる物質が存在する場合は、ヘキサン洗浄またはシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を試みる。ヘキサン洗浄は、ジクロロメタン抽出に先だって、ヘキサン50mlで数回抽出と同様の操作を行う方法である。また、5%含水シリカ

カゲルカラムクロマトグラフィー(充てん量1g)では、ジクロロメタン10mlによる洗浄の後、10%アセトン含有ジクロロメタン20mlで溶出させることができるが、事前に溶出パターンのチェックを要す。

注5) クロマトグラムの形状不良(ピーク割れなど)の原因となるため、HPLCの移動相と同じ組成の溶媒とする。

5.1.2 底質および生物

試料10~25gを100mlの共栓付き遠沈管に採取し、メタノール50mlを加えて、底質試料は10分間振とう抽出、生物試料はホモジナイズ抽出して、さらに両試料とも10分間超音波抽出を行う。その後、遠心分離(3,000rpm 10分)により、上澄みのメタノール層を分離する。試料に再びメタノール50mlを加えて振とう抽出分離を行い最初のメタノール層と合わせる。得られた抽出液を、予め10%塩化ナトリウム水溶液500mlの入った1lの分液ロートへ移し、ヘキサン50mlを加え、振とう機で5分間振とうする。静置後、水層を1l容の三角フラスコに採りヘキサン層を捨てる。水層を分液ロートに戻して再びヘキサン50mlを加え同様の操作で洗浄し水層を採取する。水層を分液ロートに戻してジクロロメタン50mlを加えて振とう機で5分間振とうし、静置してジクロロメタン層を採取する。再び水層にジクロロメタン50mlを加えて、同様な抽出操作をさらに2回繰り返す。ジクロロメタン抽出液は合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水して、ヘキサン10mlを加え、浴温30°Cのロータリーエバポレータを用いて乾固直前まで減圧濃縮する。

5.1.3 精製

底質と生物試料から得られた抽出濃縮液はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。シリカゲルカラムは内径10~12mm、長さ300mmのクロマトグラフ管に5%含水シリカゲル1gをジクロロメタンで充填し、無水硫酸ナトリウムを2cmの高さに積層して作成し、抽出濃縮液を負荷する。液面をカラムベッドまで下げてから、少量のジクロロメタンで濃縮容器を洗い、カラムに再度負荷した後、ジクロロメタン10mlでカラムを洗浄し、この溶出液は捨てる。液面が断続しないように受器として50mlの褐色ナス型フラスコを置き、10%アセトン/ジクロロメタン20mlを流して被検物質を溶出させる。溶出液に1mlのメタノールを加えて減圧濃縮し、乾固直後1µg/mlの測定用内部標準(アルディカーブスルフォキシド)液(溶媒はメタノール:水=1:9)を正確に1ml加え、測定用試料液とする。なお、カラムクロマトグラフィーの溶出条件は事前にチェックしなければならない。

5.2 空試験液の調製

試料量に対応した精製水を用いて、5.1項に従った操作で空試料液を調製する。

5.3 標準液の調製

標準物質100mgを正確に秤取り、メタノールを正確に100ml加えて1000µg/mlの標準原液とする。標準原液は溶媒(メタノール:精製水=1:9)を用いて希釈し、対象物質(0-1.0µg/ml)および測定用内部標準物質(アルディカーブスルフォキシドµg/ml)を含む混合標準液を作成する。この標準液は常温で10日間程度安定であるが、冷暗所保存が望ましい。

5.4 測定

a) HPLC

測定条件の一例を示す。

〔分離〕

使用カラム: カルバメート系農薬分析用ODSカラム

移動相: メタノール: 精製水(1:9)

流速： 1ml/min
カラム温度： 40°C

〔反応〕

反応液1： 50mM 水酸化ナトリウム
温度： 100°C
流量： 0.4ml/min
反応液2： α -フタルアルデヒド/ほう酸緩衝液
温度： 50°C
流量： 0.4ml/min

〔検出〕

蛍光検出器： 励起波長345nm、 蛍光波長450nm

b) 検量線

検量線作成用の標準液20 μ lをHPLCに注入し、被験物質と内部標準物質の示すピーク強度（面積または高さ）比を用いて検量線を作成する。

c) 定量

試料液20 μ lをHPLCに注入し、被験物質と内部標準物質のピーク強度比を用いて検量線から定量する。

d) 計算

水試料を例として計算式を示す。

$$C(\text{ng/l}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / V_{\text{inj}}(\text{nl}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})$$

ここで、C： 試料水中の農薬濃度(μ g/l)
S_{abs}： 検量線から求めた試料液中農薬量(ng)
V_{conc}： 試料液の最終液量(ml)
V_{inj}： HPLCへの注入量(μ l)
V_{spl}： 試料水量(ml)

6. 検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度（定量限界値付近）の標準溶液をHPLCに注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料中の濃度を算出する。5試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から、農薬類の検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、操作ブランク値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

検出下限値 = 3s (μ g/lまたはkg)

定量下限値 = 10s (μ g/lまたはkg)

7. HPLC装置の感度試験

10試料に1回以上、検量線の中位程度の濃度の標準溶液を測定し、その感度変動が検量線作成時の感度に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動している場合はその原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。

8. 2重測定

2重測定は採取後から試料数の10%程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2つ以上の測定値の差が30%以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

追記

農薬の分析法は、主に次の知見に基づいてまとめている。

- 1) 環境庁水質保全局水質規制課 監修 (1993) 環境水質分析法マニュアル. 環境化学研究会.
- 2) 荻野泰夫、今中雅章、畑宏、石田立夫 (1983) 1-ナフチルカーバメイト(NAC). 昭和57年度化学物質分析法開発調査報告書, pp207-213, 環境庁環境保健部保健調査室 (昭和58年5月)
- 3) 奥村為男、今村清、西川嘉範 (1988) カルバメート剤 (BPMC、MTMC、PHC、MIPC、XMC、NAC、methyl 2-benzimidazol carbamate). 昭和62年度化学物質分析法開発調査報告書, pp83-99, 環境庁環境保健部保健調査室 (昭和63年6月)
- 4) 橋本浩一、高橋幸治、西川嘉範、服部幸和 (1992) シメトリン、トリシクラゾール、プロベナゾール、イソプロチオラン、ベンチオカーブ、キャプタン、カルボスルファン、ベンタゾン、カルボフラン. 平成3年度化学物質分析法開発調査報告書, pp35-54, 環境庁環境保健部保健調査室 (平成4年6月)
- 5) 奥村為男、西川嘉範 (1993) キタジンP、フェニトロチオン(MEP)、ダイオジノン、フェンチオン(MPP)、エジフェンフォス(EDDP)、マラチオン、イソキサチオン、EPN、メチダチオン、サリチオン、ホサロン、ホスメット(PMP)、 α -クロルフェンビンホス(α -CVP)、 β -クロルフェンビンホス(β -CVP). 平成4年度化学物質分析法開発調査報告書, pp65-94, 環境庁環境保健部保健調査室 (平成5年6月)
- 6) 内藤宏孝、角脇怜 (1994) トリフルラリン、ツマサイド. 平成5年度化学物質分析法開発調査報告書, pp35-55, 環境庁環境保健部保健調査室 (平成6年6月)
- 7) 中村又善、黒川陽一、松枝隆彦、高田智、深町和美 (1996) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、メコプロップ、p-t-ブチル安息香酸. 平成7年度化学物質分析法開発調査報告書, pp109-126, 環境庁環境保健部環境安全課 (平成8年6月)
- 8) 門上希和夫 (1984) 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール. 昭和58年度化学物質分析法開発調査報告書, pp269-276, 環境庁環境保健部保健調査室 (昭和59年5月)
- 9) 肥塚加奈江、劔持堅志 (1992) メソミル、オキサミル. 平成3年度化学物質分析法開発調査報告書, pp55-68, 環境庁環境保健部保健調査室 (平成4年6月)
- 10) 永山敏廣、小林麻紀、塩田寛子、森野雅世、田村行弘 (1994) 農産物中のN-メチルカーバメイト系農薬分析法. 食衛誌 35, 470-478.
- 11) 志賀直史、俣野修身、後藤真康 (1977) ベノミルおよびチオファネートメチルの残留分析法. 日農誌 2, 27-27.

目標検出限界を達成する意図から、結果的にGC/MSに頼ることとなり、前処理がかなり煩雑となっている。現状では、検討結果の不十分さから取り上げることができなかったが、最近のLC/MSやGC/MS/MSなどの分析機器の進歩には著しいものがあり、これらの活用で操作上の簡略化など、早急な測定方法の改良が期待される。

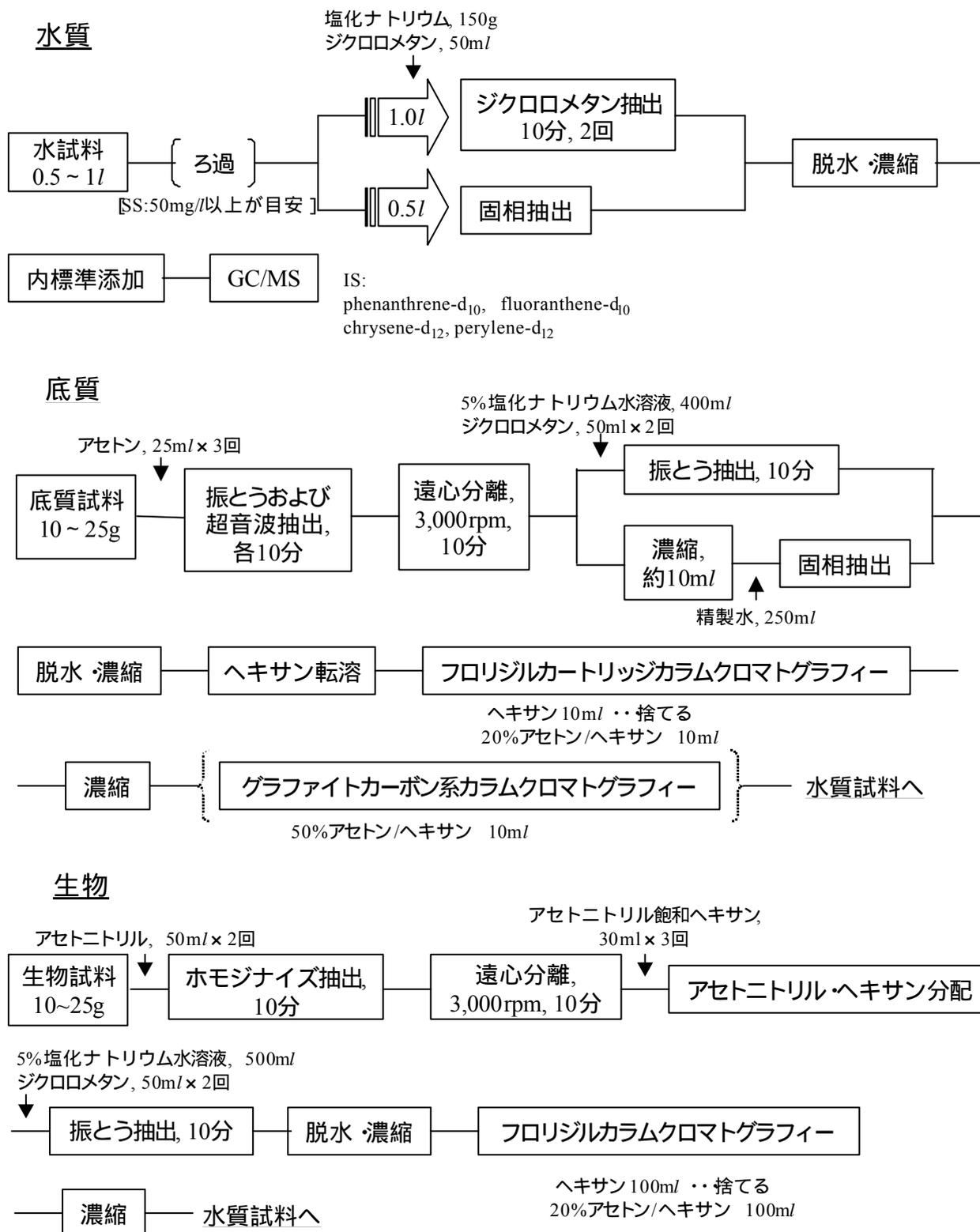


図1 農薬類の多成分一括分析法

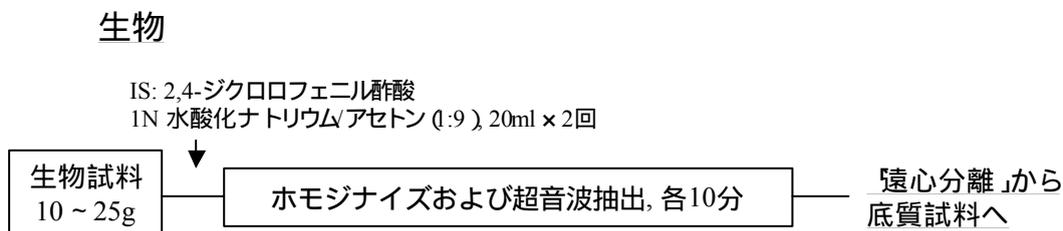
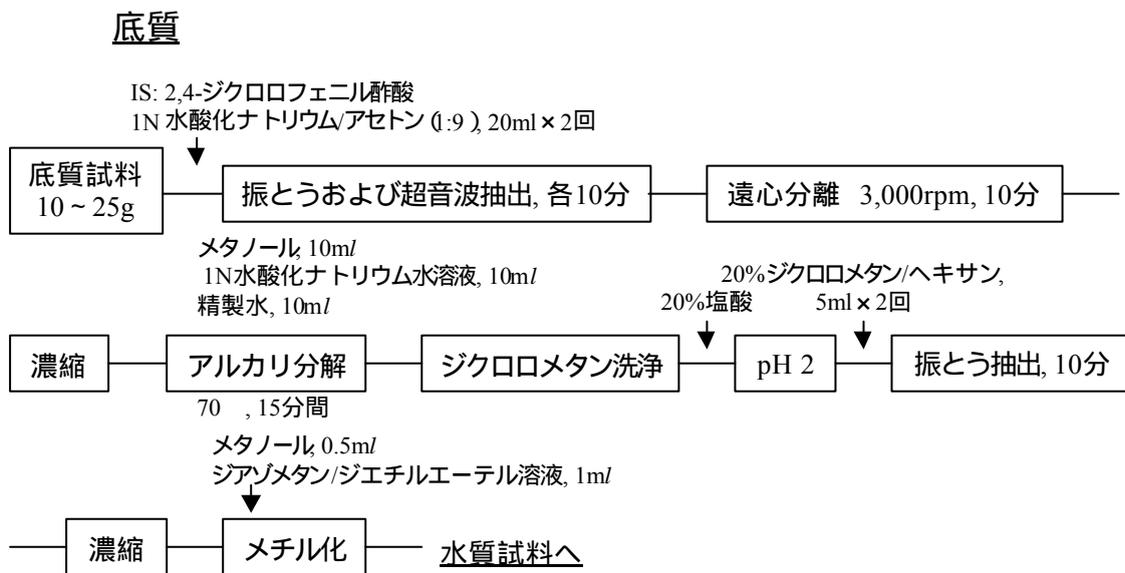
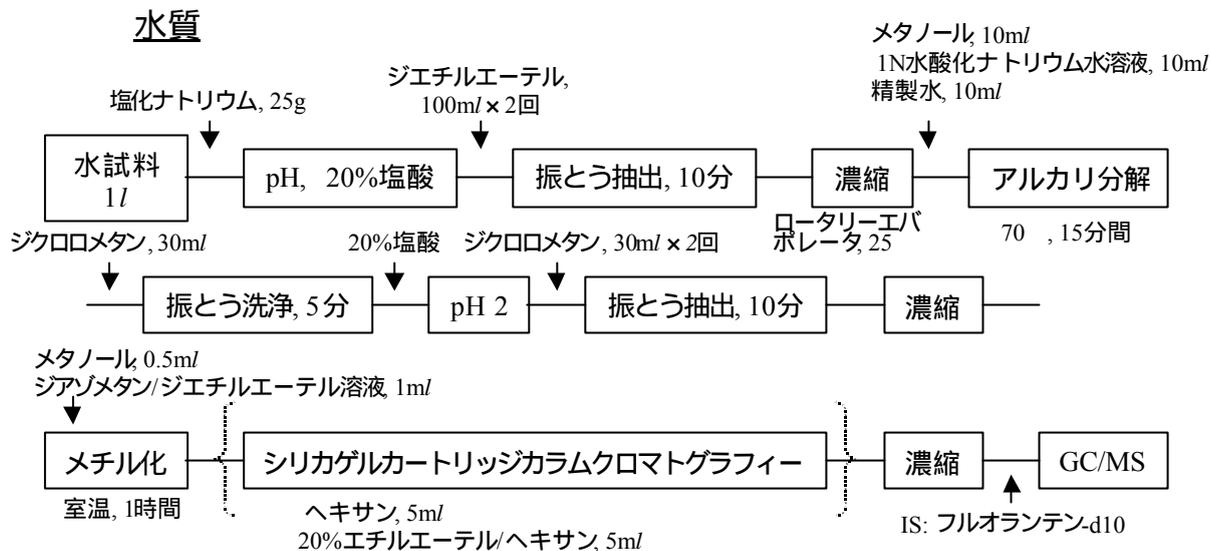
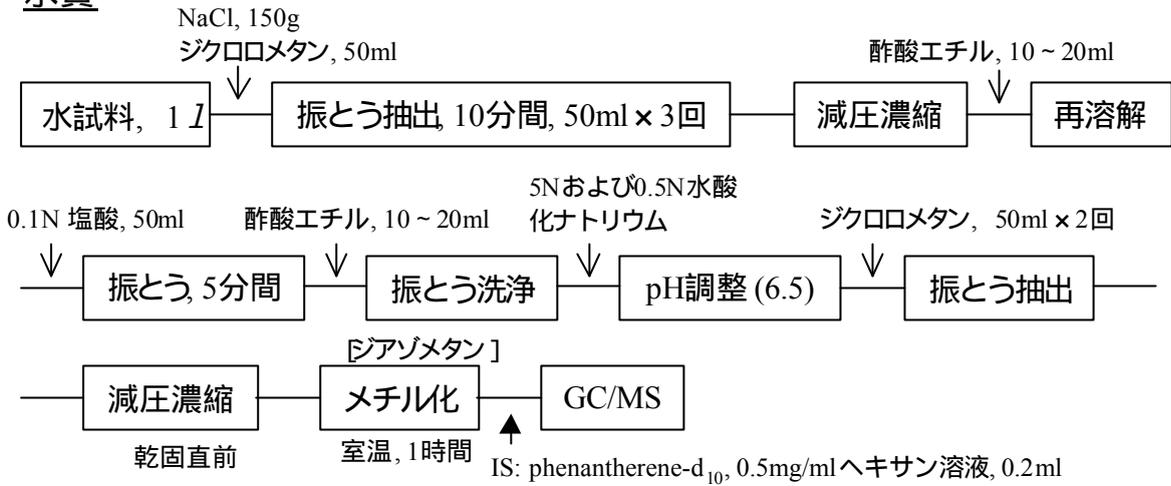
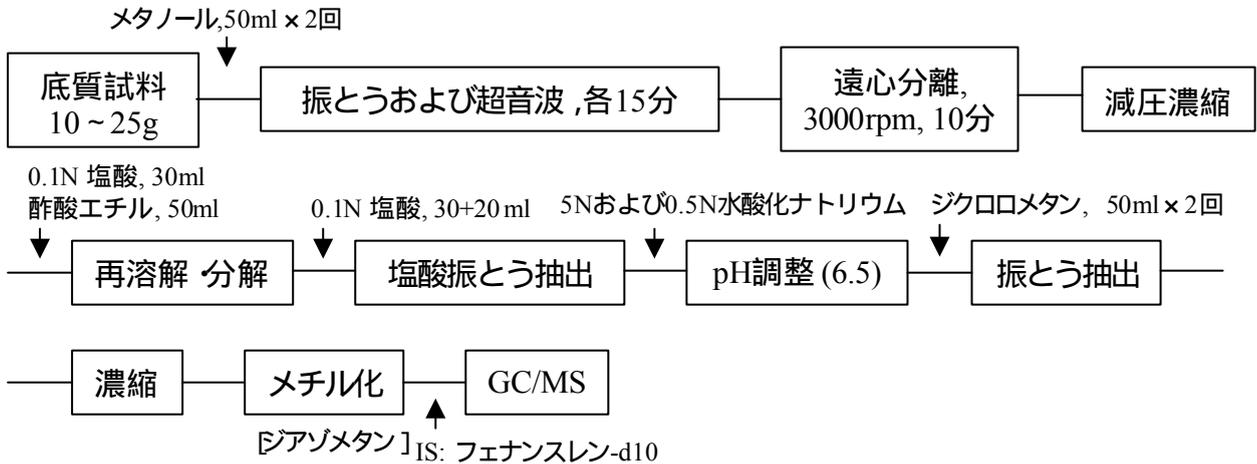


図2 フェノキシ酢酸系農薬の分析法

水質



底質



生物

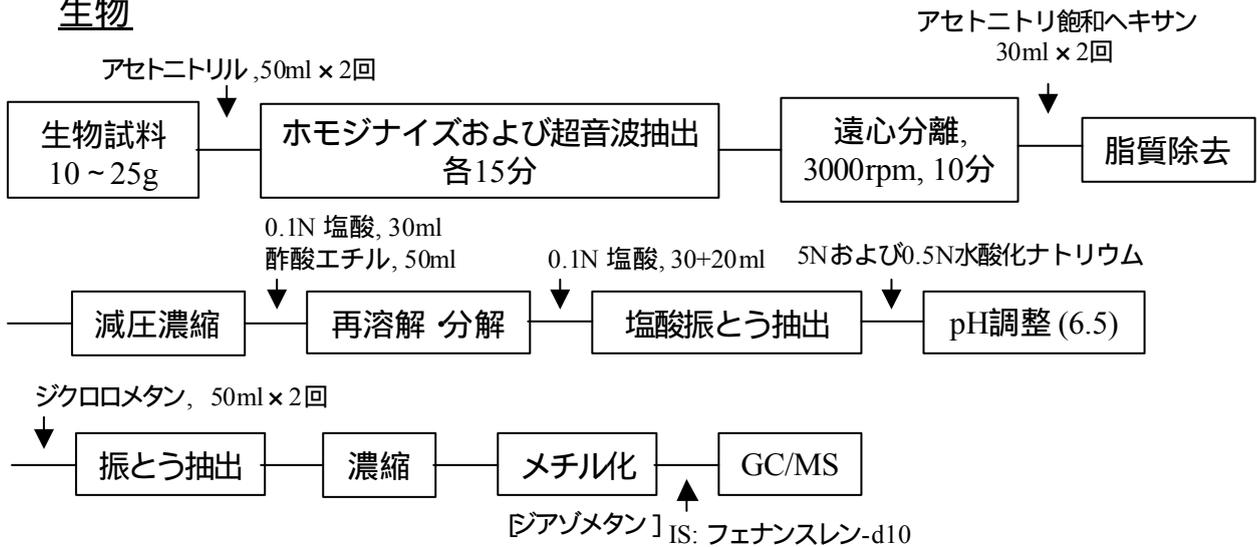
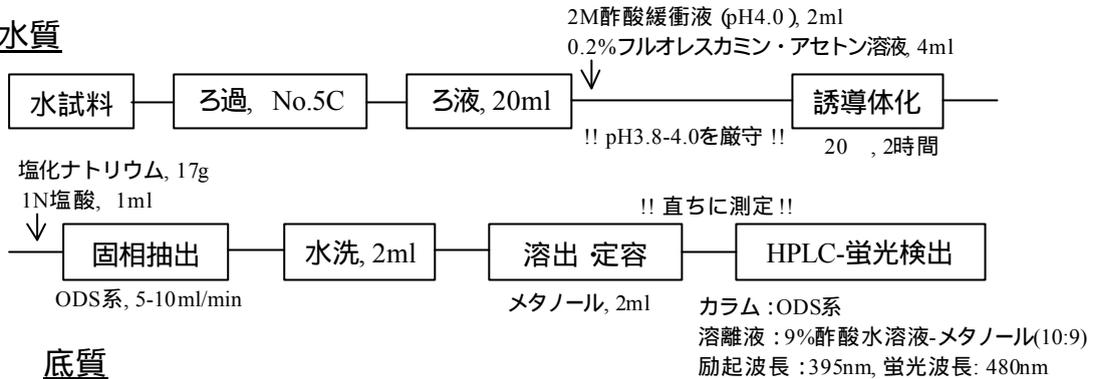
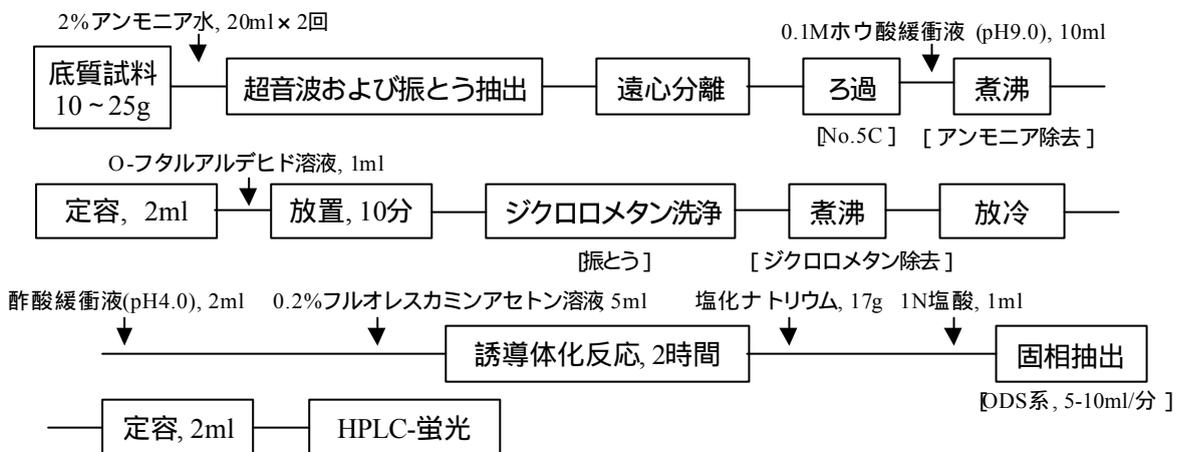


図3 ベノミルの分析法

水質



底質



生物質

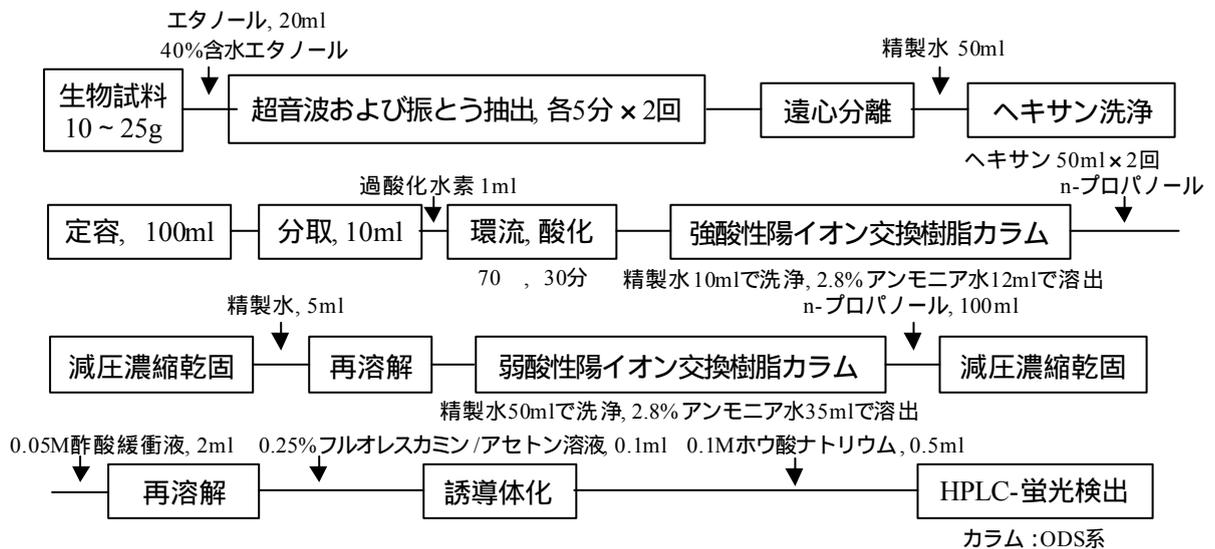
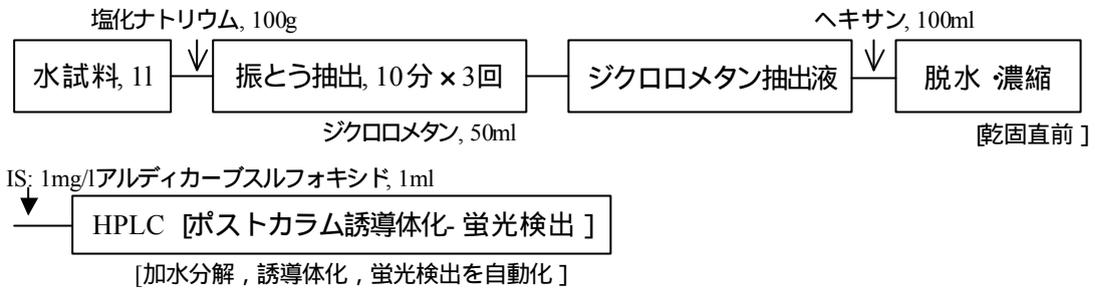
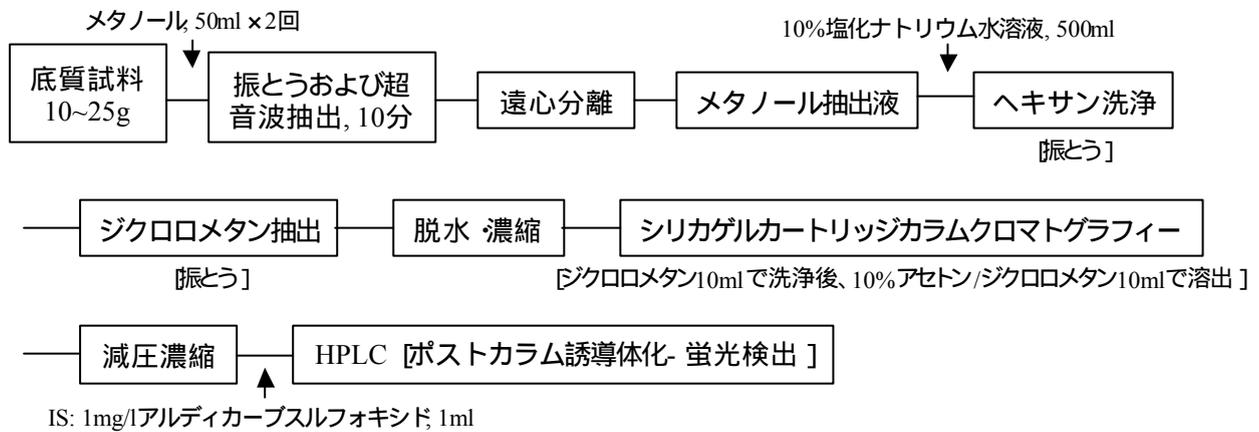


図4 アミトロールの分析法

水質



底質



生物

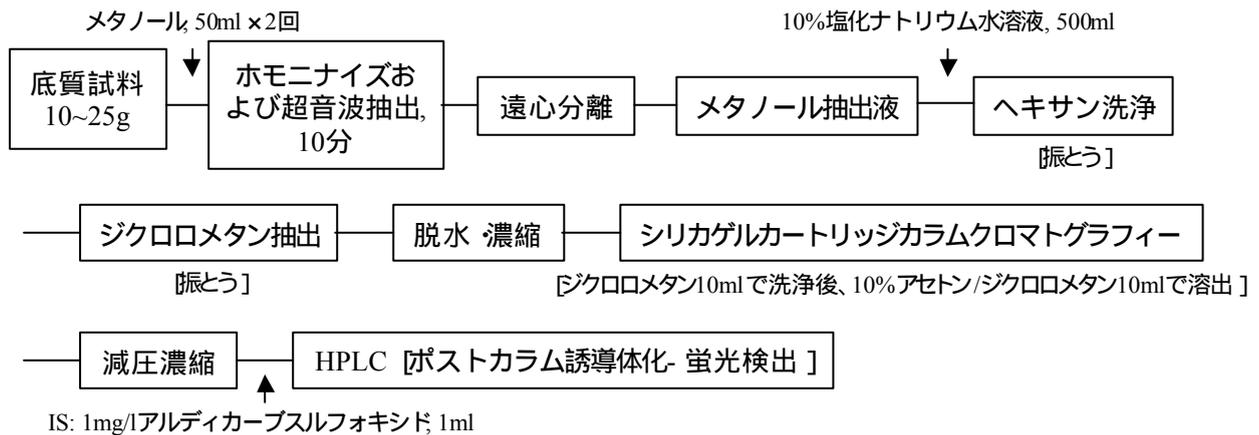


図5 メソミルの分析法

X トリブチルスズ化合物、トリフェニルスズ化合物の分析法

1 対象物質

トリブチルスズ化合物、トリフェニルスズ化合物

2 目標検出限界

本分析法の目標検出限界は、GC/MS-SIM法で水質が1 ng/L、底質及び生物試料が100 ng/kg、GC-FPDで水質が10 ng/L、底質及び生物が1 µg/kgである。

3 分析法概要

水質試料は、同位体標識した有機スズ化合物または塩化トリペンチルスズをサロゲート物質として添加後、塩酸酸性下ヘキサンで抽出して脱水・濃縮後、臭化プロピルマグネシウムでプロピル化する。次に、プロピル化体を有機溶媒で抽出し、フロリジルカラムでクリーンアップ後濃縮してGC-FPDあるいはGC/MS-SIM法で定量する。固体試料は、水質試料と同様に同位体標識した有機スズ化合物または塩化トリペンチルスズを添加し、塩酸酸性メタノール-酢酸エチル混合溶媒で抽出し、さらに酢酸エチル-ヘキサンで再抽出後、陰イオン及び陽イオン交換樹脂によりクリーンアップする。次に、水質と同様にプロピル化してGC-FPDあるいはGC/MS-SIM法で定量する。

4 試薬・器具

(1) 試薬

ヘキサン： 残留農薬試験用

アセトン： 残留農薬試験用

メタノール： 残留農薬試験用

エーテル： 残留農薬試験用

酢酸エチル： 残留農薬試験用

シクロヘキサン： 試薬特級以上の有機スズ化合物の保持時間に相当する位置にピークのないもの。

硫酸、塩酸： 試薬特級以上のもの。

臭化プロピルマグネシウム： 2 M臭化プロピルマグネシウムテトラヒドロフラン溶液

塩化ナトリウム： 試薬特級

無水硫酸ナトリウム： 試薬特級またはPCB分析用

陰イオン交換樹脂： 市販のカートリッジタイプのもの(注1)。使用する直前に0.2 M NaOH 10 ml、精製水20 ml、エタノール20 mlを流して調製する。

陽イオン交換樹脂： 市販のカートリッジタイプのもの(注1)。使用する直前に1 M HCl 10 ml、精製水20 ml、エタノール20 mlを流して調製する。

フロリジルミニカラム： 内径10 mm、長さ25 mmのカラムにカラムクロマトグラフィ用合成ケイ酸マグネシウム900 mgを充填したものまたはこれと同等の性能を有するもの(注2)。

トリブチルスズ化合物標準品： 本品は、トリブチルスズクロリドを99%以上含む。

トリフェニルスズ化合物標準品： 本品は、トリフェニルスズトリクロリドを99%以上含む。

トリブチルスズクロリド-d27標準品(注3)： 本品は、トリブチルスズクロリド

ド - d 2 7 を 9 9 % 以上含む。

トリフェニルスズトリクロリド - d 1 5 標準品：本品は、トリフェニルスズトリクロリド - d 1 5 を 9 9 % 以上含む。

テトラブチルスズ - d 3 6 標準品：本品は、テトラブチルスズ - d 3 6 を 9 9 % 以上含む。

(2) 器具及び装置

ロータリーエバポレーター（すり合わせ減圧濃縮器）

分液ロート

振とう機

ガスクロマトグラフ質量分析計または炎光光度型検出器付きガスクロマトグラフ

5 試料の前処理

(1) 水質試料

洗剤、水、1 M 塩酸 - メタノール、水、アセトンの順で洗浄した 1 L の共栓付ガラスビンに試料水を採取し、冷暗所（4℃以下）で保存する（注 4）。

(2) 底質試料

水質試料と同様の方法で洗浄した広口ガラスビンに入れて密栓し、- 1 0℃以下で保存する。

(3) 生物試料

試料を、ミキサーで摩砕均一化し、底質試料と同様にして保存する。

6 試験溶液の調整

(1) 水質

1) 試料 1 L を正確に分液ロートにはかりとり、0 . 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サロゲート溶液 1 0 0 μl （注 5）塩酸 1 0 m l 及び塩化ナトリウム 2 0 g を加え、ヘキサン 1 0 0 m l を加えて振とう抽出する。ヘキサン 5 0 m l で抽出を繰り返し、ヘキサン層を合わせる。ヘキサン層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水・ろ過した後、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 4 0℃以下で、約 5 m l まで減圧濃縮する。濃縮液を共栓付試験管に窒素ガスを吹き付けて約 1 m l まで濃縮する。

2) この溶液に臭化プロピルマグネシウム溶液 1 m l を加えて軽く振り混ぜて、室温で 3 0 分間放置する。0 . 5 M 硫酸 1 0 m l を水冷しながら徐々に加えて、分液ロートに移し、メタノール 1 0 m l 及び水 1 0 m l を加える。これを 5 % エーテル含有ヘキサン 2 . 5 m l で 2 回抽出する。抽出液を水 1 0 m l で 2 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水する。あらかじめヘキサン 1 0 m l を通して洗浄したフロリジルミニカラムに後、カラム処理用試験液を負荷する。5 % エーテル含有ヘキサン 1 0 m l で溶出させて共栓付試験管に受ける（注 6）。溶出液に窒素ガスを吹き付けて 0 . 2 m l まで濃縮する。

(1) 底質・生物

1) 試料 1 0 g を遠沈管にはかりとり、0 . 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サロゲート溶液 1 0 0 μl （注 7）加えて十分混合する。次に、1 M 塩酸含有メタノール - 酢酸エチル（1 : 1 v / v）7 0 m l を加えて 3 0 分振とう抽出後、吸引濾過器を用い吸引ろ過する（注 8）。遠沈管を 1 M 塩酸含有メタノール - 酢酸エチル（1 : 1 v / v）3 0 m l で洗浄し、吸引ろ過して残さを洗浄する。ろ液を合わせて分液ロートに入れ、1 0 % 塩化ナトリウム溶液 1 0 0 m l と酢酸エチル - ヘキサン（3 : 2 v / v）

50 ml を加え 5 分間振とう抽出する。この抽出操作を、別の酢酸エチル - ヘキサン (3 : 2 v / v) 30 ml を用いて繰り返す。有機溶媒層を分液ロートに合わせ、ヘキサン 150 ml を加えて 20 分以上放置して、生じた水層を除く (注 9)。これに 10 % 塩化ナトリウム溶液 100 ml を加えて有機溶媒層を振とう洗浄する。この洗浄操作を水層の pH が中性になるまで繰り返す (注 10)。洗浄後、有機溶媒層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 40 以下で約 1 ml まで濃縮し、さらに窒素ガスを緩やかに吹き付け溶媒を除去する。残留物を 10 ml のエタノールで溶解し、あらかじめ調整ずみの陰イオン交換カラムと陽イオン交換カラム (上が陰イオン交換カラム) を直列に接続したカラムに 1 ml / min の速度で流し入れる。エタノール 20 ml でカラムを洗浄後、陰イオン交換カラムを取り除く。1 M 塩酸含有メタノール 15 ml を陽イオンカラムに通し、有機スズを溶出する。溶出液を分液ロートに受け、これに水 30 ml とヘキサン - シクロヘキサン (1 : 1 v / v) 5 ml を加えて 5 分間振とう抽出する。ヘキサン - シクロヘキサン (1 : 1 v / v) 5 ml を用いて再度抽出する。有機溶媒層をナス型フラスコに合わせ、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 40 以下で約 5 ml まで濃縮した後、共栓付遠沈管に移し、窒素ガスを緩やかに吹き付けて約 1 ml まで濃縮して、プロピル化用試料液とする。

2) 以後、水質 2) と同様の操作を行なう。

7 空試験液の調整

試料と同量の精製水を用いて、試料と同時に、同操作を行い空試験溶液とする。

8 標準液の調整

サロゲート混合溶液： トリブチルスズクロリド d 27 及びトリフェニルスズクロリド d 15 をそれぞれ 10 mg 正確に秤り取り、ヘキサンでそれぞれ正確に 100 ml とし、100 µg / ml のサロゲート標準原液を調製する。サロゲート標準原液からそれぞれ 1 ml を正確に分取し、ヘキサンで 10 ml としてサロゲート物質 10 µg / ml を含む混合溶液を作成する。サロゲート混合溶液をアセトンで 100 倍希釈し、0.1 µg / ml の混合溶液とする。

内部標準物質溶液： テトラブチルスズ - d 36 を 10 mg 正確に秤り取り、ヘキサンでそれぞれ正確に 100 ml とし、100 µg / ml の内部標準原液を調製する。内部標準原液からそれぞれ 1 ml を正確に分取し、ヘキサンで 10 ml として内部標準物質 10 µg / ml を含む混合溶液を作成する。混合溶液から 1 ml を正確に分取し、ヘキサンで 10 ml として 1 µg / ml の混合溶液とする。

9 測定

(1) ガスクロマトグラフの測定条件

カラム： 内径 0.25 ~ 0.3 mm、長さ 30 m の溶融シリカ製の管の内面に 5 % フェニルメチルポリシロキサンを 0.1 ~ 1.5 µm の厚さで被覆したもの又はこれと同等の分離性能を有するもの (注 11)。

カラム槽温度： 60 で 2 分保持した後、毎分 5 ~ 20 の速度で 300 まで昇温し 2 分間保持する (注 12)。

キャリアーガス： ヘリウム、流量 1 ml / min (定流量モード)

注入法： スプリットレス (1 分後パージ)

注入口温度： 290

(2) 質量分析計の測定条件

インターフェース温度： 280

イオン源温度： 180～230

イオン化エネルギー 70 eV

感度： 有機スズ化合物の5 pgから誘導されるプロピル体が十分確認できるように感度を調整する。

測定質量数(注13)

[対象物質]

プロピルトリブチルスズ 277 (275)、プロピルトリフェニルスズ 351 (349)

[サロゲート物質]

プロピルトリブチルスズ-d27 295 (293)、プロピルトリフェニルスズ-d15 366 (364)

[内部標準物質]

テトラブチルスズ-d36 318 (316)

(3) 炎光度型検出器の測定条件

スズ用フィルター付を装着し、水素ガスおよび空気の流量を至適条件になるように調整する。

検出器温度： 300

感度： 有機スズ化合物の50 pgから誘導されるプロピル体が十分確認できるように感度を調整する。

(4) 検量線

トリブチルスズクロリド10 mg及びトリフェニルスズクロリド10 mgを正確に秤り取り、ヘキサンでそれぞれ正確に100 mlとして(注14)、100 µg/mlの標準原液を調製する。各標準原液からそれぞれ1 ml分取し、ヘキサンで10 mlとして有機スズ化合物(塩化物)10 µg/mlを含む混合標準溶液を作成する。混合標準溶液をヘキサンで希釈し、10 µg/ml、1 µg/ml及び0.1 µg/mlの混合標準溶液とする(注15)。

100 mlのナス型フラスコに対象物質の10 µg/ml、1 µg/ml及び0.1 µg/mlの混合標準溶液を用いて対象物質を段階的に0.01～5 µgの範囲で添加し、各々のナス型フラスコに10 µg/mlのサロゲート混合溶液を0.5 ml(各0.5 µg)ずつ添加した後、ヘキサンで1 mlとする。次に、臭化プロピルマグネシウム溶液1 mlを加えてプロピル化を行い、0.5 M硫酸10 ml、メタノール10 ml及び精製水10 mlを加えて処理した後、ヘキサン4 mlで2回抽出する。抽出液を合わせて脱水後、10 µg/mlの内部標準混合溶液100 µl(各1 µg)を正確に添加し、ヘキサンで10 ml定容とする(注16)。

この溶液1 µl(注17)をガスクロマトグラフに注入し、TBTはTBT-d27とのピーク面積比、TPTはTPT-d15とのピーク面積比を用いて横軸に対象物質(塩化物)とサロゲート物質との濃度(重量)比を、縦軸にピーク面積比をとり検量線を作成する。また、TBT-d27およびTPT-d15のテトラブチルスズ-d36とのピーク面積比をサロゲート物質と内部標準物質との濃度(重量)比で割って相対感度係数を算出する。GC-FPDによる測定にあっては、ピーク面積比のかわりにピーク高比を用いてもよい。

1 0 同定、定量及び計算

検量線と同様に測定用試料液（1 μ l）をガスクロマトグラフに注入し、対象物質とサロゲート物質とのピーク面積比から、検量線により対象物質（塩化物）とサロゲート物質との濃度（重量）比を求める。これに添加したサロゲート物質の重量を乗じて対象物質の重量を求め、これを試料量で除し、検体中の有機スズ濃度を塩素化合物として算出する。なお、トリブチルスズ化合物については、得られた重量に係数0.916を乗じて、ビストリブチルスズ オキシドの重量に換算し、検体中のトリブチルスズ化合物濃度とする。

また、サロゲート化合物と内部標準物質とのピーク面積比を求め、相対感度係数からサロゲート化合物の重量を求め、その回収率を求める。

1 1 分析精度管理

空試験による濃度が、定量下限値以下であり、かつ、相対感度係数を用いて算出したサロゲート物質の回収率が70%～130%の範囲内にある測定値を採用し、それ以外の測定値は棄却する。

（注1）イオン交換樹脂の種類により回収率に差が出る場合があるため、事前に回収率を確認しておく。陰イオン交換カラムにはボンドエリュートJ R S A X（Varian）アクセルQMA（Waters）MCI GEL CP08P（三菱化学）など、陽イオン交換カラムにはボンドエリュートJ R S C X（Varian）TOYOPAK IC-SP（東ソー）などの市販の製品がある。

（注2）例えば、Sep-Pak フロリジル（Waters）ボンドエリュートF L（Varian）などの市販の製品がある。

（注3）以下に記載してある重水素標識化合物は、林純薬などより入手できる。トリペンチルスズクロリド標準品（本品は、トリペンチルスズクロリドを99%以上含む）をサロゲート物質としてもよいが、トリフェニルスズ化合物との類似性は、同位体標識化合物より劣るので注意が必要である。また、テトラペンチルスズなどの標準品をテトラブチルスズ-d 3 6かわりに内部標準物質としてもよい。

（注4）有機スズ化合物は保存容器に吸着されやすいため、試料採取後速やかに前処理操作を行う。

（注5）この添加量は、水質試料中濃度に換算すると10 ng / Lに相当する。試料中の有機スズ化合物のおおよその濃度がわかっている場合は、試料濃度と同程度になるようにサロゲート物質を添加してもよいが、この場合、検量線作成標準液の添加量も変更する必要がある。

（注6）フロリジルカラムクリーンアップは、GC分析を妨害する物質がない場合は省略できる。

（注7）この添加量は、試料中濃度に換算すると1 μ g / k gに相当する。試料中の有機スズ化合物のおおよその濃度がわかっている場合は、試料濃度と同程度になるようにサロゲート物

質を添加してもよいが、この場合、検量線作成標準液の添加量も同様に変更する必要がある。

(注8) 吸引ろ過が困難な場合は、遠心分離する。

(注9) 酢酸エチルの含量が高く無水硫酸ナトリウムでは脱水が困難なため、ヘキサンを加えて疎水性を増し脱水可能とする。

(注10) 酢酸エチルが加水分解して生成した酢酸が残ると、陽イオン交換樹脂での回収率が低下するため、水洗(4回程度)を充分に行う。

(注11) 例えば J & W DB - 5 ms 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm などがある。GC - FPDで、重水素標識体を用いる場合には非標識体との分離が重要であるので、事前に分離度を確認しておく。

(注12) 例えば、60 で2分保持した後、毎分20 の速度で130 まで、次いで、毎分10 の速度で210 まで、毎分5 の速度で260 、毎分10 /minの速度で300 まで昇温し2分間保持する

(注13) () は確認用イオン

(注14) 混合すると組成が変化する恐れがあるため、標準原液は別々に調製する。

(注15) 混合標準溶液は用時調製とする。

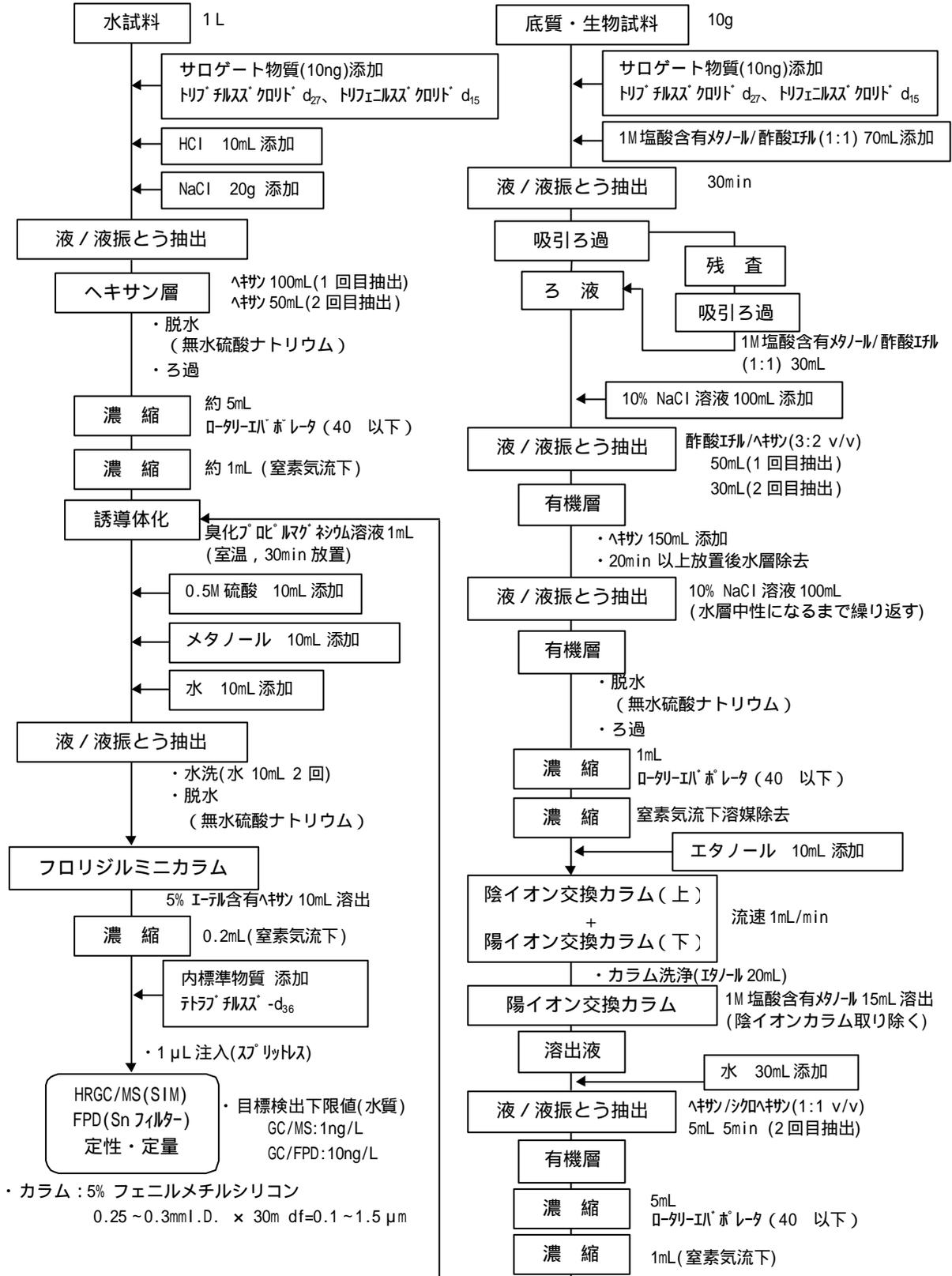
(注16) 水質試料として0.2 ~ 100 ng/L、底質試料に対して0.02 ~ 10 μg/kgに相当する。

(注17) FPDによる測定においてガスクロマトグラフへの注入量を増加させることによってのみ所定の感度が得られる場合は、ガスクロマトグラフへの注入量をふやしてもよい。

参考文献

- 1) 環境庁環境保健部保健調査室：平成5年度化学物質分析法開発報告書
- 2) 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報告書

有機スズ（水質・底質・生物中）の分析



XI . -エストラジオールの分析法

1 対象物質

-エストラジオール

2 目標検出限界

本分析法の目標検出限界は2.8ng/L (10pM)である。

3 分析法の概要

下水処理場などから環境中に放出されるエストロゲン様物質にはヒトや家畜の排泄物由来のもの、食物由来のもの、医薬品由来のものなど有りあらゆるものが含まれているはずである。この中でエストロゲンとしての活性が最も高く、環境中への放出量も多いと思われるものは -エストラジオールである。ここでは -エストラジオールがエストロジェンの活性のほとんどを占めるものと考え、 -エストラジオールを定量することによってエストロゲン量に代えることとする。ヒトの場合、尿から排泄される -エストラジオールのほとんどは硫酸やグルクロン酸の抱合体で、一方糞ではほとんどがフリーの状態であると云われている。 -エストラジオールの抱合体の活性は弱いとされているが、環境中や生体に取り込まれた時に抱合体がはずれて、活性を取り戻すことも予想される。したがって、環境中の -エストラジオールの測定に際してはフリーの -エストラジオールとその抱合体の合計を測定することが必要となる。

ラジオアイソトープラベルした -エストラジオールを用いた底質からの回収実験では、添加した -エストラジオールの40%は水溶液で溶出されるが、60%は底質と強く結合し、有機溶媒でないと回収できないことが知られている¹⁾。ここでは、底質からの -エストラジオールの抽出にメタノールを用いることとした。

次に問題となるのはどこまで測定すれば良いのかという問題である。これまでの文献には、20pM以上のエストロゲンで湖沼の生態系に影響があったこと、20pMの -エストラジオールでアルファルファの成長が促進されたこと、等が記載されている²⁾。ここでは20pMの1/2である10pMを定量することを条件として測定法を組み立てた。

-エストラジオールの定量法にはELISA法とGC/MS法がある。この他にLC/MS法も良い方法と思われるがLC/MSの普及がまだ十分ではないので、前の二者で測定することとした。

前段でも述べたように、 β -エストラジオールの抱合体も測定の対象とするので、試料の前処理に抱合体を加水分解するステップが必要となる。前処理後の試料は ELISA 法と GC/MS の両方に使用される。市販されている ELISA 法のキットでは 10~500pg/ml の β -エストラジオールが検出できるが検量線が対数目盛りであるので、誤差もその分だけ大きくなることになる。また、エストロンなど類似構造を持つステロイドも弱い結合することも考慮しておくことが必要であろう。回収率は 85~90%であるが、製品によっては 100%±5%というものもあるようである。

GC/MS 法では、混在するステロイドの数が数十種類を越えることが予想されるので、TLC や HPLC によるクリーンアップが必要である。操作の煩雑さから定量誤差が生じないように内部標準として d₄- β -エストラジオールを使うことにした。 β -エストラジオールは t-BDMS 化誘導体として 100 μ l に定容量にする。1 μ l を GC に注入する。GC はステロイド分析用のキャピラリーカラムを使う昇温プログラムとした。MS のイオン化は電子衝撃イオン化とし、検出は内部標準として用いた d 置換 β -エストラジオールの m/z 447(d₄)[M⁺-57(C(CH₃)₃)]と β -エストラジオール m/z 443[M⁺-57(C(CH₃)₃)]の選択イオン検出とした。

4 試薬・器具

(1) 試薬

メタノール： 残留農薬試験用

ヘキサン： 残留農薬試験用

酢酸エチル： 残留農薬試験用

クロロホルム：残留農薬試験用

塩化ナトリウム：試薬特級

アセトニトリル：残留農薬試験用

アセトン：残留農薬試験用

トリエチルアミン：試薬特級以上で、エストラジオールの保持時間に相当する位置にピークのないもの。

ウンデカン：試薬特級以上で、エストラジオールの保持時間に相当する位置にピークのないもの。

酢酸、酢酸ナトリウム、塩酸、水酸化ナトリウム：試薬特級以上のもの

t-BDMS 化剤：N-メチル-N-t-ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド

(注1)

フィルター：グラスマイクロファイバーフィルター (GF/C) (注2)

固相抽出カートリッジ：シリカにオクタデシル (ODS または C18 と呼ばれているもの) が結合したもの (注3)

TLC プレート：厚さ 0.25mm のシリカゲルプレートで蛍光剤が添加してあるもの

(注4)

高速液体クロマト用カラム：逆相 (C18) 分析用カラム

標準品： - エストラジオールおよび - エストラジオール (試薬用のもの)

内部標準品： - エストラジオール(2,4,16,16-d4) (市販のもの) (注5)

窒素ガス：99.99%以上の高純度のもの

ELISA キット (注6)

(2) 器具および装置

50ml のディスプレイザブル注射器または固相抽出装置

アスピレーター

ガラス濾過器

薄層クロマトグラフ用展開槽または液体クロマトグラフ装置

ガスクロマト質量分析計

5 試料の前処理

(1) 環境水

洗剤、水、1 M塩酸-メタノール、水、アセトンの純で洗浄した 1L の共栓付ガラスビンに試料水を採取し、冷暗所 (4 以下) で保存する (注7)

(2) 底質

湿重量約 50 g の底質を採取し、遠心分離 (2,000g, 20分) して水分をできるだけ除いた後、凍結乾燥する。乾燥試料は均一に混合し、冷暗所 (4 以下) で保存する。

6 試験溶液の調整

(1) 試料水の濾過と分画

(a)ELISA 用試料

試料水 1 L を正確に計り取り、ガラスフィルター（GF/C）で濾過する。フィルターに残った SS(浮遊物質) からエストラジオールを抽出するためにメタノール・pH 5.0 の 1 M 酢酸緩衝液（9:1,v/v）10 ml でフィルターをよく洗う。（注 8）メタノール溶液は SS 濾過液に加えて均一に混合しておく。この溶液を 10 ml のメタノールおよび 20 ml の水で洗浄し、活性化した固相抽出用カートリッジに通し、エストラジオールをカートリッジに吸着させる。通し終わったら、純水 5 ml，ヘキサン 5 ml で洗浄し、酢酸エチル・メタノール（5:1,v/v）5 ml でエストラジオールを溶出させる。溶出液をねじ蓋付き試験管に取り窒素気流下、40 で蒸発乾固させる。

(b)GC/MS 用試料

試料水 1 L を正確に計り取り、ガラスフィルター（GF/C）で濾過する。フィルターに残った SS(浮遊物質) からエストラジオールを抽出するためにメタノール・pH 5.0 の 1 M 酢酸緩衝液（9:1,v/v）10 ml でフィルターをよく洗う。（注 8）メタノール溶液は SS 濾過液に加え、さらに内部標準（2,4,16,16-d4-エストラジオール）5ng 相当を添加し、均一に混合する。この溶液を 10 ml のメタノールおよび 20 ml の水で洗浄し、活性化した固相抽出用カートリッジに通し、エストラジオールをカートリッジに吸着させる。通し終わったら、純水 5 ml，ヘキサン 5 ml で洗浄し、酢酸エチル・メタノール（5:1,v/v）5 ml でエストラジオールを溶出させる。溶出液をねじ蓋付き試験管に取り窒素気流下、40 で蒸発乾固させる。

（ 2 ）底質からの抽出と分画

(a)ELISA 用試料

底質 10 g を正確に計り、50 ml の遠沈管に入れる、40 ml のメタノール・pH5.0 の 1 M 酢酸緩衝液（9:1,v/v）を加えて 30 分間振とう抽出後、遠心分離（2000rpm，20 分）し、上澄を分取する。残渣に 40 ml のメタノールを加えて 5 分間振とう抽出し、吸引ろ過する。遠沈管およびろ過器の残渣を 20ml のメタノールで洗浄し、吸引ろ過する。上澄およびろ液を合わせてロータリーエバポレーター用フラスコに入れ、40 で 10 ml 以下（5~10 ml）になるまで濃縮する。これに精製水 200 ml を加えて超音波で均一にする。この溶液を 10 ml のメタノールおよび 20ml の水で洗浄し、活性化した固相抽出用カートリッジに通し、エストラジオールをカートリッジに吸着させる。通し終わったら、純水 5 ml，ヘキサン 5 ml で洗浄し、酢酸エチル・メタノール（5:1,v/v）5 ml でエストラジオールを溶出させる。

溶出液をねじ蓋付き試験管に取り窒素気流下、40℃で蒸発乾固させる。

(b)GC/MS 用試料

底質 10 g を正確に計り、50ml の遠沈管に入れる。内部標準 (2,4,16,16-d4- エストラジオール)5ng 相当を添加し、40ml のメタノール・pH5.0 の 1 M 酢酸緩衝液 (9:1, v/v) を加えて 30 分間振とう抽出後、遠心分離 (2000rpm, 20 分) し、上澄を分取する。残渣に 40 ml のメタノールを加えて 5 分間振とう抽出し、吸引ろ過する。遠沈管およびろ過器の残渣を 20ml のメタノールで洗浄し、吸引ろ過する。上澄およびろ液を合わせてロータリーエバポレーター用フラスコに入れ、40℃で 10 ml 以下 (5~10 ml) になるまで濃縮する。これに精製水 200 ml を加えて超音波で均一にする。この溶液を 10 ml のメタノールおよび 20 ml の水で洗浄し、活性化した固相抽出用カートリッジに通し、エストラジオールをカートリッジに吸着させる。通し終わったら、純水 5 ml, ヘキサン 5 ml で洗浄し、酢酸エチル・メタノール(5:1, v/v) 5ml でエストラジオールを溶出させる。溶出液をねじ蓋付き試験管に取り窒素気流下、40℃で蒸発乾固する。

(3) 抱合体の分解

蒸発乾固させた残渣に 1M 塩酸メタノール溶液 1 ml を添加し、強く密封した後 80℃で 20 分間加熱する。冷却後、窒素気流下、40℃で蒸発乾固する。

(4) ELISA 用試料の調整

残渣を 0.1 ml メタノールに懸濁させ、これに 1M トリエチルアミン/メタノール溶液を 1 滴加え攪拌後、窒素で蒸発乾固させる。残渣に ELISA キットの緩衝液 1 ml を加えて残渣を溶かす。

(5) GC/MS 用クリーンナップ

TLC クリーンナップ:

残渣を 0.2 ml のメタノール溶かし、シリカゲル TLC (F254 の蛍光指示薬入り) に帯状に塗布し、風乾後、展開する。展開溶媒はクロロホルム/アセトン (9:1, v/v) またはベンゼン/アセトン (2:1, v/v) を用いる。(R_f はそれぞれ 0.50 と 0.62 である)。R_f0.50 または 0.65 付近をかき取りメタノールで抽出する。抽出液は窒素気流下、40℃で蒸発乾燥固する。

HPLC クリーンナップ：

試料を 20%アセトニトリル/蒸留水に溶かし、ODS カラム (ODS, 2.1mm x 150mm)、移動相 36%アセトニトリルで展開すると、約 20 分にエストラジオールが溶出する。検出は 280nm、検出限界は 10 pmol 程度である。エストラジオールの部分を分取し、蒸留水で 10 倍に希釈して ODS カートリッジで濃縮・洗浄して酢酸エチル・メタノール(5:1,v/v) 5 ml で溶出する。溶出液は窒素気流下、40 ℃ で蒸発乾固する。

(6) 誘導体 (tBDMS) 化

残留物を 5%塩酸ジエチルアミンを含むジメチルホルムアミド溶液 100 μ l に溶かし、N-メチル-N-tert ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MTBSTFA) 50 μ l 添加し、80 ℃、60 分間加熱する。窒素気流下、40 ℃ で蒸発乾燥固する。これをクロロホルム・ヘキサン (1:1,v/v) 0.2ml に溶解する。

(7) 誘導体の精製

Sephadex-LH20 カラム：ゲルをクロロホルム・ヘキサン (1:1, v/v) 混合液で 1 2 時間以上膨潤させ、シラン処理した石英ウールを詰めたパスツールピペット (内径 5mm, 長さ 145mm) に 20mm の高さに充填し、2 ml のクロロホルム・ヘキサン(1:1)で洗浄、tBDMS 溶液添加し、2.5ml のクロロホルム/ヘキサン(1:1)で溶出した画分を分取。これを窒素気流下で濃縮乾固。これを 100 μ l のウンデカンに溶解する。1 μ l を注入する。

7 空試験液の調整

試料と同量の精製水を用いて、試料と同時に、同操作を行い空試験溶液とする。

8 内部標準物質溶液：

-エストラジオール-d4 を 10mg 正確に秤り取り、メタノールで正確に 100ml とし、100 μ g/ml の標準液を調整する。この標準液 1ml をを正確に取り、メタノールで正確に 100ml にする。この溶液には -エストラジオール 1 μ g/ml を含む。これを正確に 100 倍希釈し、10ng/ml の溶液を調整する。

9 測定

(1) ELISA による測定

市販の ELISA キットの 場合、各キットによって使用する試料の量が異なるが、一例として試料溶液 50 μ l を添加する。測定の誤差を小さくするために、試料溶液を 2 段階に希釈し（原液 1 段希釈および 2 段希釈の 3 試料となる）これを 2 系列（3 試料 \times 2 系列 = 6 試料）セットする。標準液はキットのものを使用する。回収率はセットに記入されている方法で求める。国内で 20 種類前後のキットが入手可能です。使用にあたってキットの反応特異性、定量範囲、回収率等を確認することが必要です。

（ 2 ） GC/MS の測定条件

カラム：溶融シリカ管（内径 0.25 mm，長さ 15m）の内壁に液相メチルシリコンを化学結合させたもの（膜厚 0.25 μ m）カラム温度：150 から 210 まで 1 分間に 20 の割合で昇温し、210 から 300 まで 1 分間まで 1 分間に 10 の割合で昇温した後、300 を 8 分間保持する。

注入口温度：250

試料注入方式：スプリットレス、パージタイム 3.0 分

内標物質：[2,4,16,16-d4]- β -エストラジオール（添加量：5 ng）

イオン化法（イオン化エネルギー）：電子衝撃イオン化（70 eV）

選択イオン： β -エストラジオール m/z 443{ M^+ -57[C(CH₃)₃] }

d4- β -エストラジオール m/z 447{ M^+ -57[C(CH₃)₃] }

（ 3 ） 検量線

β -エストラジオール 10 mg を正確に秤り取り、メタノールで正確に 100ml とする（100 μ g/ml）。この溶液から正確に 1ml を取り、メタノールで 100 倍に希釈する（1 μ g/ml）。さらに希釈液から正確に 1ml を取り、メタノールで 100 倍に希釈する（10 ng/ml）。この基準液 0.1ml，0.2ml，0.4ml，0.8ml，1.6ml を正確に共栓付き耐圧スピッツ管に取り分け、各々に内部標準液 0.5ml（5ng 相当を添加する。窒素気流下、40 で蒸発乾固させ、以下試料と同様の操作を行う。ウンデカン 100 μ l に溶かし、1 μ l をガスクロマトグラフに注入する。 β -エストラジオール(m/z 443)と内部標準の d4- β -エストラジオール(m/z 447)の面積比から β -エストラジオールの重量を求め、検量線を作成する。

10 同定、定量および計算

検量線と同様に測定用試料液（1 μ l）をガスクロマトグラフに注入し、内部標準（m/z

447)と -エストラジオール(m/z 443)との面積比から、検量線により -エストラジオールの重量を求める。

1 1 分析精度管理

内部標準物質である d4- -エストラジオールの回収率は通常87%から94%で、SDは±4.4%である。回収率が70%以上の測定値を採用し、それ以下の場合の測定値は棄却する。

(注1) N-メチル-N-t-ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MTBSTFA) は5%塩酸ジエチルアミンを含むジメチルホルムアミド (DMF) 中で反応させる。

(注2) グラスマイクロファイバーフィルター (GF/C) はワットマンの製品ですが同程度の品質のものでよい

(注3) 例えばセップパックプラス C18 カートリッジなど

(注4) メルクの HPTLCF254 (10 cm×20 cm) を切って使うと便利である。

(注5) C I L 社から販売されている (純度 97%)

(注6) ハイエストロテック (持田製薬)、ハイモニター E (帝国臓器)、ネオエスト (森永乳業)、ケーマン社、NEOGEN 社、Diagnostic System Laboratory, Inc. などがある。

(注7) ガラスに吸着されやすいので、試料採取後速やかに前処理操作を行う。

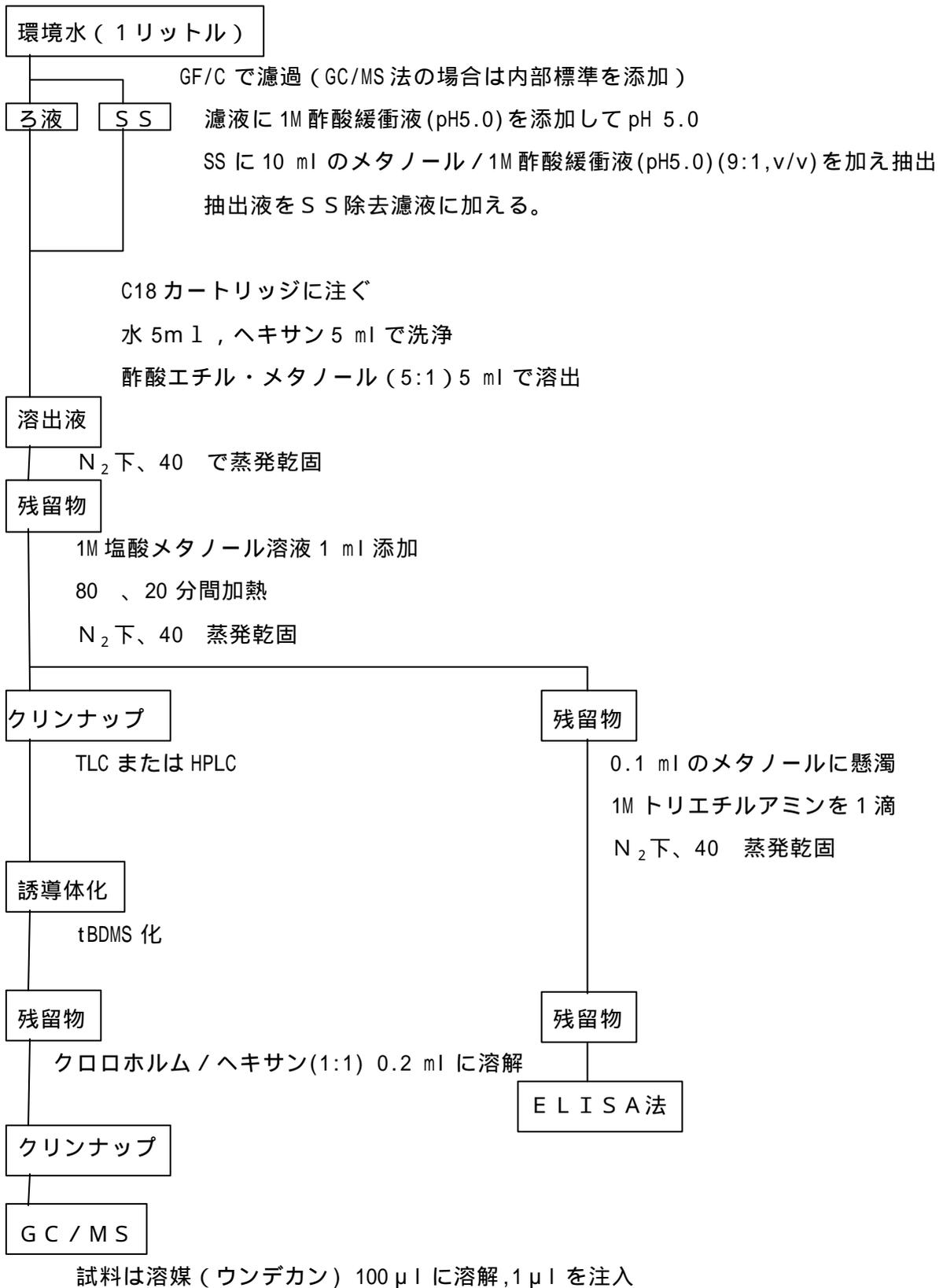
(注8) アスピレーターを止め、フィルターを外してビーカーに入れ、メタノール溶液でフィルターを洗う。メタノール溶液は GF/C で濾過し、ろ液を SS 除去ろ液に加える。

文献

1) Shore, L. S., Gurevitz, M., and Shemesh. Estrogen as an Environmental Pollutant, Environ. Contam. Toxicol. 51, 361-366(1993)

2) 環境庁リスク対策検討会監修「環境ホルモン」 環境新聞社発行

環境水中のエストラジオール定量の概略



底質からの -エストラジオールの抽出

-

