

vii. フェノール類の分析法

1 対象物質

フェノール、*o*-クレゾール、*m*-クレゾール、*p*-クレゾール

2 目標検出下限値及び定量下限値

水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)	
目標検出下限値	目標定量下限値	目標検出下限値	目標定量下限値
0.03	0.1	2	5

3 分析法の概要

水質試料は、サロゲート物質を加え、固相抽出法またはジクロロメタンにより抽出を行なう。固相抽出では捕集された対象物質を、メタノールで溶出する。濃縮後、臭化ペンタフルオロベンジル (PFBB) で誘導体化を行いガスクロマトグラフ-質量分析法 (GC/MS : 負イオン化学イオン化法 : NCI、または電子衝撃イオン化法 : EI) により定量する。底質試料は、塩酸酸性メタノールで抽出後、水を加えアルカリ条件下でヘキサン洗浄を行う。水層を分取し、6M塩酸でpH 3以下とし、水質と同様の操作を行う。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・ *o*-クレゾール- d_8 (注1)
- ・ *m*-クレゾール- d_8 (注1)
- ・ *p*-クレゾール- d_8 (注1)
- ・ フェノール-2,3,4,5,6- d_5 (注1)
- ・ 2-プロパノール (試薬特級)
- ・ ヘキサン、メタノール (残留農薬分析用)
- ・ 無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム (残留農薬分析用)
- ・ 精製水 : 対象物質を含まないもの
- ・ 6M 塩酸
- ・ PFBB 溶液 : 臭化ペンタフルオロベンジル 1 g、18-クラウン 6-エーテル 1 g を 2-プロパノールで溶かし 50 mL としたもの (この溶液は冷暗所保存で 1 週間安定である) (注

2)

- ・ シリカゲルミニカラム：(注3)
- ・ 固相抽出カラム：(注4)
- ・ グラスファイバー濾紙：試料水の濾過に用いる（注5）。

(2) 器具及び装置

- ・ ガスクロマトグラフ質量分析計（負イオン化学イオン化法で測定が可能なものが望ましい）
- ・ ろ過器
- ・ パスツールピペット
- ・ コンセントレーター：固相抽出カラムによる水質試料からの捕集に用いる。
- ・ 遠心分離器：底質及び生物試料の液固分離に用いる。
- ・ 窒素吹き付け装置：試料液の濃縮・乾固及びアルカリ分解に用いる。

5 試料の採取・運搬

試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「Ⅲ. 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。前処理操作は試料採取後速やかに行う。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

固相抽出：試料水500 mLを正確に計り取り、グラスファイバー濾紙で濾過をする。サロゲート100 ng（2 µg/mLメタノール溶液50 µL、200 ppt相当）塩化ナトリウム100 gを加え、よく振り混ぜて混合する。6M塩酸でpH 3以下とし、固相抽出カラムに通水する。精製水10 mLでカートリッジカラムを洗浄後、メタノール5 mLで溶出し、10 mLの遠心管に受ける。この溶出液に2-プロパノールを1 mL加え、窒素を吹き付け1 mLに濃縮する。

溶媒抽出：試料水500 mLを正確に計り取り、サロゲート100 ng（2 µg/mLメタノール溶液50 µL、200 ppt相当）と塩化ナトリウム15 gを加える。6M塩酸でpH 3以下とし、ジクロロメタン100 mLで2回抽出する。これを脱水、濃縮した溶液に2-プロパノールを1 mL加え、窒素を吹き付け1 mLに濃縮する。

(イ) 底質試料

試料10 gを50 mLの遠心管にとり、サロゲート100 ng (2 µg/mLメタノール溶液50 µL、10 ppb相当)と1N塩酸-メタノール30 mLを加えて10 分間振盪する。2000 rpmで10分間遠心し、上澄みを分取する。残った底質にさらに1M塩酸-メタノール20 mLを加えて、同様の操作を繰り返す。450 mLの精製水を加えた1 Lの分液ロートに合わせ、1M水酸化ナトリウム溶液50 mL、塩化ナトリウム100 gを加え、ヘキサン100 mLで10分間振盪する。

水層を分取し以下水質試料と同様に、6M塩酸でpH 3以下とし固相抽出カラムに通水、または、ジクロロメタン抽出以下の操作をする。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

水の前処理液に、PFBB 誘導体化試薬 0.5 mL 及び炭酸カリウム約 3 mg を加えた後、密栓をし、80°Cで 30 分間加熱する。冷却後、20%塩化ナトリウム溶液水 6 mL、ヘキサン 2 mL を加え、激しく振り混ぜて静置する。パスツールピペットを用いてヘキサン層を採取し、抽出を再度繰り返す。ヘキサンを少量の無水硫酸ナトリウムをつめたカラムに通じ乾燥し、容器とカラムをヘキサン 5 mL で洗浄し、抽出液とあわせ、窒素を吹き付け 1 mL とする。

(イ) 底質試料

底質の前処理液に、PFBB 誘導体化試薬 0.5 mL 及び炭酸カリウム約 3 mg を加えた後、密栓をし、80°Cで 30 分間加熱する。冷却後、20%塩化ナトリウム溶液 6 mL、ヘキサン 2 mL を加え、激しく振り混ぜて静置する。パスツールピペットを用いてヘキサン層を採取し、抽出を再度繰り返す。ヘキサンを少量の無水硫酸ナトリウムをつめたカラムに通じ乾燥し、容器とカラムをヘキサン 5 mL で洗浄し、抽出液とあわせ、窒素を吹き付け 1 mL とする。妨害物質が認められる試料は、シリカゲルミニカラムに添加し、ヘキサン 5 mL で洗浄、ついで10%エーテル含有ヘキサン 10 mL で溶出する。これに窒素を吹き付け 1 mL とする。

(3) 空試験液の調製

試料と同量の対象物質を含まない精製水を用い、試料の前処理と試料液の調製と同様の操作をしたものを空試験液とする (注6)。

(4) 添加回収試験液の調製

試料と同量の各標準物質100 ngを添加した精製水を用い、試料の前処理と試料液の調製と同様の操作をしたものを添加回収試験液とする（注7）。

(5) 標準液の調製

各標準物質 50 mg を精秤してメタノールで正確に 50 mL とし、1 mg/mL の標準原液とする。各標準液から、1 mL を正確に計り取り混合する。2-プロパノールで 50 mL とし 20 µg/mL の 1 次希釈混合標準液とする。1 次希釈混合標準液を 2-プロパノールで希釈し、各対象物質濃度を 0.01 µg/mL から 1 µg/mL の範囲で数点の希釈混合標準液を作成する。

フェノール-2,3,4,5,6-d₅、*o*-クレゾール-d₈、*m*-クレゾール-d₈、*p*-クレゾール-d₈ の 1000 µg/mL メタノール溶液を調製する。これを 2 µg/mL となるようにメタノールで希釈したものを、サロゲート溶液とする。

2-プロパノール（ゼロ点とする）および各濃度の希釈混合標準液 1 mL をとり、サロゲート 100 ng (2 µg/mL メタノール溶液 50 µL) を加えよく混合する。PFBB 誘導体化試薬 0.5 mL 及び炭酸カリウム約 3 mg を加えた後、密栓をし、80°C で 30 分間加熱する。冷却後、精製水 6 mL、ヘキサン 2 mL を加え、激しく振り混ぜて静置する。パスツールピペットを用いてヘキサン層を採取し、抽出を再度繰り返す。ヘキサンを少量の無水硫酸ナトリウムをつめたカラムに通じ乾燥し、容器とカラムをヘキサン 5 mL で洗浄し、抽出液とあわせ、窒素を吹き付け 1 mL とする（注8）。

(6) 測定

(ア) GC/MS測定条件

(a) ガスクロマトグラフ部

- ・カラム：溶融シリカキャピラリーカラム (25m×0.25mm I.D., df=0.25 µm)
- ・液相：5%フェニルメチルシリコン
- ・カラム温度：50°C (1分) → 10°C/分 → 260°C (5分)
- ・注入口温度：260°C
- ・注入法：スプリットレス法 (1分後ページ、2 µL 注入)
- ・キャリアガス：He カラムヘッド圧 15 psi

・インターフェース温度：260℃

(b)質量分析部

・イオン化法：NCI または EI (10 pg の対象物質が十分に検出できるように、装置条件を設定する)

・CI 反応ガス：メタンまたはイソブタン

・イオン源温度：150℃～250℃

・検出モード：SIM

(c)測定イオン

対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の測定イオンを表 1 に示す。

表 1 対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の測定イオン

化合物名	測定イオン		
	定量イオン (EI)	確認イオン (EI)	定量イオン (NCI)
フェノール-d ₅ -PFB	279	181	98
<i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -クレゾール-d ₇ -PFB	295	181	114
フェノール-PFB	274	181	93
<i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -クレゾール-PFB	288	181	107
フェナントレン-d ₁₀	188	—	—

(イ) 検量線

標準液（ゼロ点を含む）をそれぞれ一定量（1 μL から 2 μL）を注入し、対象物質及びサロゲート物質とのピーク面積比より検量線を作成する。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験駅および測定用試験液を注入して行う。なお、一定時間ごとに検量線の間濃度の標準液を測定し、期待値の20%以内の変動であることを確認する。もし、20%を越えていれば、装置を再調整後、検量線を作成しなおして測定を行う。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

試料における保持時間が標準のそれと±0.1 分以内であり、EI 法においては定量イオンと確認用イオンとの比が標準のそれの±20%以内であること。

(2) 定量及び計算

試料中の濃度 ($\mu\text{g/L}$ または kg)

=検量線から求めた濃度比×サロゲート添加量 (μg) /試料量 (L または kg)

なお、底質の試料量は乾燥試料量とする。

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「II. 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

(注1) ここでは C/D/N Isotopes 社製のものをを用いた (備考1)。

(注2) PFBB は毒性が不明であり、また催涙性が強いいため、必ず手袋を着用し、ドラフト内で扱うこと。また、使用済の器具は、付着した試薬をアルカリ液で分解後、洗浄すること。標準試薬の秤量操作などもドラフト内で行い、実験者への化学物質の曝露を出来るだけ避けること。

(注3) ここではウォータズ社製セップパックシリカゲルを用いた (備考1)。

(注4) ここでは Shodex EDS-1 をを用いた (備考1)。固相カラムを用いるときはフェノール、クレゾールの抽出効率を確認すること。あらかじめ、メタノール 15 mL、精製水 15 mL でコンディショニングした EDS-1 (備考1) でのフェノール及びクレゾールの回収率は、水質ではおおむね 80%、底質では 60%程度である。

(注5) ここではワットマン GF/C (47 mm) をを用いた (備考1)。

(注6) 対象物質を含まない精製水を調製することが困難な場合は、試薬ブランクをもって空試験とする。2-プロパノールは標準液の希釈に用いた溶媒を空試験に用いる。フェノール類は空試験でしばしば検出されることが知られているため、汚染をできるだけ減らすように努めること。

(注7) 添加回収試験時には、無添加の精製水を用いた試験液を試料の前処理と試料液の調製と同様の操作をしたものをブランクとし、ブランク値を差し引いたものを添加回収試験結果とする。

(注8) 装置の感度にあわせて希釈してもよい。特に、NCI 法を用いる場合、高濃度側で検量線が飽和する場合がある。また、EI 法による場合は、フェナントレン- d_{10} を

内部標準物質として一定量加えること。

(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掲げたが、これ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) 環境庁環境保健部保健調査室：昭和 56 年化学物質分析法開発調査報告書
- 2) 環境庁環境保健部保健調査室：昭和 60 年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：平成 10 年化学物質分析法開発調査報告書

分析法フローチャート

水質試料

