

アセフェートの分析法

1 対象物質

アセフェート

2 目標検出下限値及び定量下限値

本分析法の目標検出下限値及び目標定量下限値を表 1 に示す。

表 1 目標とする検出下限値及び定量下限値

水質(μg/L)		底質(μg/kg)		生物(μg/kg)	
目標検出下限	目標定量下限	目標検出下限	目標定量下限	目標検出下限	目標定量下限
0.02	0.05	5	20	10	30

3 分析法の概要

対象物質の水試料からの抽出は、活性炭吸着により行う。水試料にサロゲート物質を添加し、活性炭カートリッジカラムに通水して対象物質を捕集し、ジクロロメタンで溶出する。溶出液を濃縮して前処理液を得る。

底質試料、生物試料は精製水で振とう抽出（生物試料はホモジナイズ抽出）し、その抽出液をヘキサンで洗浄したあと、水試料と同様に対象物質を捕集し、以下同様にして前処理液を得る。

各試料前処理液にポリエチレングリコールを添加して、GC/MS で同定・定量を行う。

なお、濃度の算出はサロゲート物質との相対検量線に基づく。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・アセフェート：純度 97%以上の市販標準品。必要量を精秤して、アセトンで 1,000 ~ 2,000 μg/mL の標準原液を調製する。
- ・アセフェート_{d6}：純度 97%以上の市販標準品。必要量を精秤して、標準物質と同様にアセトンで 1,000 ~ 2,000 μg/mLの標準原液を調製する。
- ・試薬、溶媒類：ヘキサン、アセトン、ジクロロメタンなどの溶媒類は、原則として残留農薬試験用の純度を用い、あらかじめ測定を妨害する成分が無いことを確認する。

なお、ポリエチレングリコールは試薬特級（平均分子量 200）を使用した。

- ・精製水：超高純度水（蒸留水を超純水製造装置で精製したもの）であって、妨害成分を含まないもの。必要に応じて、ジクロロメタンで洗浄して用いる。
- ・窒素ガス：高純度窒素 1 級（純度 99.999% 以上）を用い、配管に活性炭や水分吸収剤を装着する。
- ・固相抽出用活性炭カートリッジカラム（注 1）

（ 2 ）器具及び装置

- ・ガラス器具：試料瓶、分液ロート、共栓付試験管、濃縮フラスコ、遠沈管、メスシリンダー、メスフラスコ、ホールピペット、駒込ピペット、パスツールピペットなど。使用に先立ち、精製水や有機溶媒で十分に洗浄する。
- ・振とう機。
- ・固相抽出装置：加圧型。（注 2）
- ・濃縮器（注 3）
- ・ホモジナイザー：（注 4）
- ・超音波抽出器：超音波洗浄器または同等品。
- ・ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）
- ・マイクロシリンジ：内部標準液の添加あるいは GC/MS の注入に用いる。

5 試料の採取・運搬

（ 1 ）水質試料

水質試料は、あらかじめアセトン、ヘキサン等によく洗浄したもので、容量 1 L 程度の共栓またはねじ栓つき褐色硬質ガラス瓶を用い、氷冷して実験室へ持ち帰る。分析操作は可能な限り速やかに行う。やむを得ず保管が必要な場合は、1~2 日を限度として冷暗所（ 4 ）に置く。

（ 2 ）底質試料

底質試料は、エクマンバージ型採泥器等によって表層泥（0~10 cm）を採取し、目視できる夾雑物を除いて、硬質ガラス瓶、ポリエチレン製袋または箱等に入れ、氷冷・遮光状態で実験室へ持ち帰る。この試料は、孔径 2 mm 目の篩に通した後、20 分間の遠心分離（3,000

rpm)で間隙水を除き、均質に混合したものを分析に供する。底質試料の保存は、調製試料を -4 で凍結させる。

(3) 生物試料

採捕した生物試料は、ポリエチレン製袋に入れ、氷またはドライアイスで保冷したクーラーボックスに収納して、実験室に持ち帰る。生物試料の分析部位は、原則として筋肉組織(可食部)である。生物試料の保存は -4 での凍結による。

なお、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「 . 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

活性炭カートリッジカラムは、あらかじめジクロロメタン、アセトン、精製水の各 10 mL でコンディショニング(注5)する。試料水 1 L にサロゲート標準溶液(0.5 µg/mL のアセトン溶液)0.5 mL を添加して振とうし、十分に混合する。これを 10 mL/min の速度で活性炭カートリッジカラムに通水し対象物質を捕集する。通水終了後、精製水 50 mL を同様の速度で通水してカラムを洗浄したのち、カラムに高純度窒素を通気(注6)して乾燥させる。ジクロロメタン 5 mL で対象物質を溶出(注5)させ、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下で 1 mL まで濃縮して前処理液とする。

(イ) 底質試料

湿泥 20 g を共栓付遠心沈殿管に採り、サロゲート標準溶液(0.5 µg/mL のアセトン溶液)を 0.5 mL 添加、少量の精製水を添加して十分に攪拌する。これに精製水 50 mL を加え密栓して 10 分間振とうした後、遠心分離(3,000 rpm、10 分)して 200 mL 容分液ロートに分取する。遠心分離の残渣には精製水 50 mL を加えて 10 分間振とうして、遠心分離を行い、抽出液を先の分液ロートに併せる。抽出液を入れた分液ロートにヘキサン 20 mL を加えて 10 分間振とうする。静置後、ヘキサン層を捨て、水層に再度ヘキサン 20 mL を加えて、ヘキサン洗浄を繰り返し、水層を水試料と同様に処理して前処理液とする。

(ウ) 生物試料

細切し均一化した湿組織 20 g にサロゲート標準溶液(0.5 µg/mL のアセトン溶液)0.5 mL を添加しホモジナイザーで攪拌する。これに精製水 50 mL を加え、10 分間ホモジナイザーで攪拌し対象物質を抽出する。攪拌後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離して、抽出液を 200 mL 容分液ロートに分取する。遠心分離の残渣には精製水 50 mL を加えて、同様の操作を行い、抽出液を併せる。以下、底質試料と同様にヘキサン洗浄を行い、水層を水試料と同様に処理して前処理液とする。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

前処理液はポリエチレングリコールの 1% アセトン溶液 10 µL (注 7) を添加し、窒素気流下で 1.0 mL に定容して GC/MS 測定する。

(イ) 底質試料

前処理液は水質試料と同様に調製し、GC/MS 測定する。

(ウ) 生物試料

前処理液は水質試料と同様に調製し、GC/MS 測定する。

(3) 空試験液の調製

水試料はそれと同量の精製水、底質および生物試料は精製水 10 mL を用い、試験操作の「前処理」および「試料液の調製」と同様な操作を行って得られた試験液を空試験に用いる。

(4) 添加回収試験液の調製

任意の水試料 1,000 mL、底質と生物試料の 20 g に定量下限値の 5 ~ 10 倍になるよう検量線作成用標準液を加え、試験操作の「前処理」および「試料液の調製」と同様な操作を行って添加回収試験液を得る。

(5) 標準液の調製

検量線作成用標準液、サロゲート標準液を調製する。検量線作成用標準液は、その原液をジクロロメタンで希釈して0~2.0 µg/mLの範囲で5段階以上個別に調製する。サロゲート標準液は、アセフェートの重水素標識標準物質をアセトンで希釈して5 µg/mLの濃度に調製する。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件

GC/MS 測定条件の一例を参考として示す。これを参考にして適宜設定する。

(a) ガスクロマトグラフ部

- ・試料注入部：スプリットレス、オンカラム、昇温気化方式などの非分割方式のもの。
- ・キャピラリーカラム：50%フェニルメチルシリコン系、内径0.2~0.3 mm、長さ20~30 m、膜厚0.2~0.3 µm（注8）
- ・キャリアーガス：純度99.999%以上の高純度ヘリウム、流速1 mL/min、線速度35~42 cm/sec。
- ・カラム恒温槽：70（1 min）（30 /min） 200 （10 /min） 250 。（注9）
- ・注入口温度：250 。

(b) 質量分析部

イオン化法：電子衝撃イオン化 (EI) 法、イオン化電圧70 eV。

イオン源温度：230 。

インタフェース温度: 250 。

イオン検出法：選択イオンまたは全イオン検出。

(c) 測定イオン

対象物質およびサロゲート物質の測定イオンを表2に示す。

表 2 対象物質およびサロゲート物質の測定イオン

項目番号	物質名	質量数	モニタ - イオン m/z		
			定量	確認	
IS-2	アセフェート-d ₆	189.17	139	-	-
13	アセフェート	183.17	136	94	96

(イ) 検量線

(a) 標準液の測定

各濃度段階の検量線作成用標準液 (0 ~ 2.0 µg/mL の範囲で 5 段階以上) 0.5 mL にサロゲート標準液 (0.5 µg/L) 0.5 mL を添加し、さらにポリエチレングリコールの 1% アセトン溶液 10 µL を添加する。この標準液系列は、各標準物質を 0 ~ 1.0 µg/mL、サロゲート物質を 2.5 µg/mL の濃度で含み、1 濃度段階の 1 または 2 µL の一定量を最低 3 回 GC/MS に注入し、全濃度域で計 15 点以上のデータを得る。

(b) ピーク面積 (または高さ) の強度比の確認

得られたクロマトグラムから、定量用と確認用質量のイオン強度比が、対応するマススペクトル上の強度比とほぼ一致することを確認する。

(c) 検量線の作成

表 2 の通り、標準物質とサロゲート物質の濃度比と強度比の関係を XY プロットし、検量線を作成する。この時、各濃度段階における標準物質の強度比の変動が 5% 以内であることを確認する。

次式により相対感度係数 (RRF: Relative Response Factor) を求め、定量値の算出にあててもよい。

$$RRF = \frac{C_{is}}{C_t} \times \frac{A_t}{A_{is}}$$

ここで、C_{is}: 標準液中のサロゲート標準物質の濃度、C_t: 標準溶液中の対象物質の濃度、A_t: 標準溶液中の対象物質のピーク面積 (または高さ)、A_{is}: 標準溶液中のサロゲート標準物質のピーク面積 (または高さ) である。

(ウ) 試料液の測定

実試料、空試験あるいは添加回収試験から得られた試料液をそのまま GC/MS 注入用の試料液とする。注入量は検量線作成用の標準液と同量であって 1 または 2 μL である。検出されたクロマトグラム上のピークについて、同定確認の後、サロゲート物質のピーク強度（面積または高さ）に対する対象物質のピーク強度の比から、検量線または相対感度係数により定量する。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

測定対象物質およびサロゲート物質の定量イオンと確認イオンのピークが、検量線に用いた標準物質などの保持時間の ± 5 秒以内に出現し、定量イオンと確認イオンのピーク強度比が検量線作成に用いた標準物質などの強度比の $\pm 20\%$ 以内で一致していればその物質が存在しているとみなす。

(2) 定量及び計算

得られた対象物質とサロゲート物質とのピーク強度比から、検量線により濃度比を求め、次式により試料中の対象物質の濃度を算出する。

$$C_t(\mu\text{g}/\text{l}, \mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{RF_t \times Q_{is}(\mu\text{g})}{V_s(\text{l}, \text{kg})}$$

ここで、 C_t ：対象物質の試料中濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$ または $\mu\text{g}/\text{kg}$)、 RF_t ：濃度比、 Q_{is} ：内標準物質の添加量 (μg)、分析への試料採取量： V_s (L または kg)、

または、あらかじめ求めた対象物質のサロゲート標準物質に対する相対感度係数 (RRF) を用いて、次式により試料中の対象物質の濃度を算出する。

$$C_t(\mu\text{g}/\text{l}, \mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{A_s}{A_{is}} \times \frac{Q_{is}(\mu\text{g})}{RRF} \times \frac{1}{V_s(\text{l}, \text{kg})}$$

ここで、 C_t ：試料抽出液全量中の対象物質の量 ($\mu\text{g}/\text{L}$ または $\mu\text{g}/\text{kg}$)、 A_s ：試料液中の対象物質のピーク強度、 A_{is} ：試料液中のサロゲート標準物質のピーク強度、 Q_{is} ：内標準物質の総添加量 (μg)、RRF：サロゲート物質に対する対象物質の相対感度係数、分析への試料採取量： V_s (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「 . 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) ウォーターズ社製セップパック AC-2 または同等の性能を持つもの。ここでは、ウォーターズ社製 AC-2 カートリッジカラムを用いたが、この他にも各社からカートリッジ型、シリンジ型、ディスク型などが発売されている。固相吸着法では、コンディショニングの条件、試料の吸着速度、乾燥条件、溶出溶液の種類と量などにより回収率が異なるので、これらの諸条件も含めてあらかじめ添加回収テストを行ったのち使用する必要がある(備考1)。
- (注2) ウォーターズ社製セップパックコンセントレーターまたは同等の性能を持つ流量コントロールの可能なもの(備考1)。
- (注3) ロータリーエバポレータ(恒温槽付き)または Turbo Vap 、 Turbo Vap LV などの窒素吹き付けによるものまたは同等の性能を有するもの(備考1)。
- (注4) 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(ウルトララックス)または同等品。
- (注5) コンディショニング及び対象物質の溶出は 1~2 mL/min (1~2 滴/sec) の流速で行う。
- (注6) 高純度窒素は 0.5~1 L/min の流速で約 15 分間通気する。乾燥が不十分な場合は、カートリッジカラムからジクロロメタンとともに水が溶出し、脱水が必要となる。また、過剰に通気しすぎると吸着していたアセフェート及びサロゲート物質が失われる可能性がある。
- (注7) アセフェートは GC の注入口に吸着する。これを防止するため、ポリエチレングリコール(平均分子量 200)の 1%アセトン溶液 10 μ L を添加する。
- (注8) アセフェートは無極性や微極性カラムではテーリングを起し、定量値に影響するので 50%フェニルメチルシリコン系カラムを用いる。
- (注9) アセフェートはカラムコンディションによりピークが著しくテーリングを起すことがあり、場合によってはほとんどピークが出ないことがある。したがって、

連続測定する場合は、測定終了後カラムの最高使用温度付近まで温度を上げて 5 から 10 分間程度エージングを行うことが望ましい。また、あらかじめ検量線作成用標準液の最高濃度のものを数回注入し、ピーク面積が安定していることを確認してから一連の測定にとりかかること。

(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) 西野茂幸, 小田達也:「アセフェート:平成 4 年度化学物質分析法開発調査報告書」, 環境庁 環境保健部 保健調査室, p122-130 (平成 5 年 6 月)
- 2) 奥村為男:「水中のアセフェートのガスクロマトグラフィー質量分析法による定量」, 環境化学, 2, 31-35 (1992)
- 3) 倉田泰人, 杉崎三男:「水中のアセフェートのガスクロマトグラフィーによる定量」, 環境化学, 2, 533-539 (1992)
- 4) 環境庁 水質保全局 水質管理課:「置換ベンゼン類、有機酸エステル類、有機リン酸エステル類及び農薬類の分析法: 要調査項目等調査マニュアル」, p81-99 (平成 12 年 12 月)

分析法フローチャート
水質試料

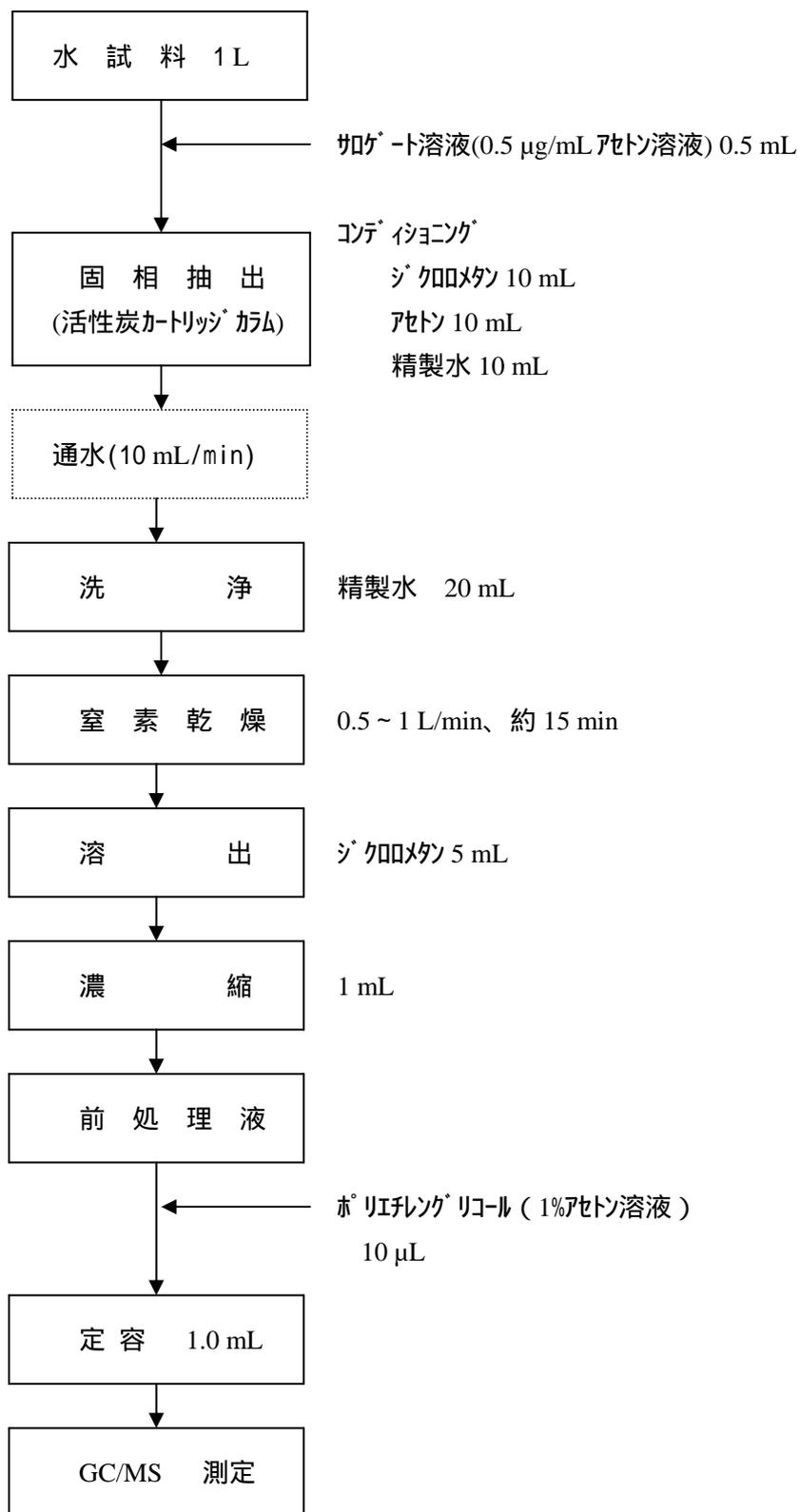


図1 水試料の分析操作手順

底質試料

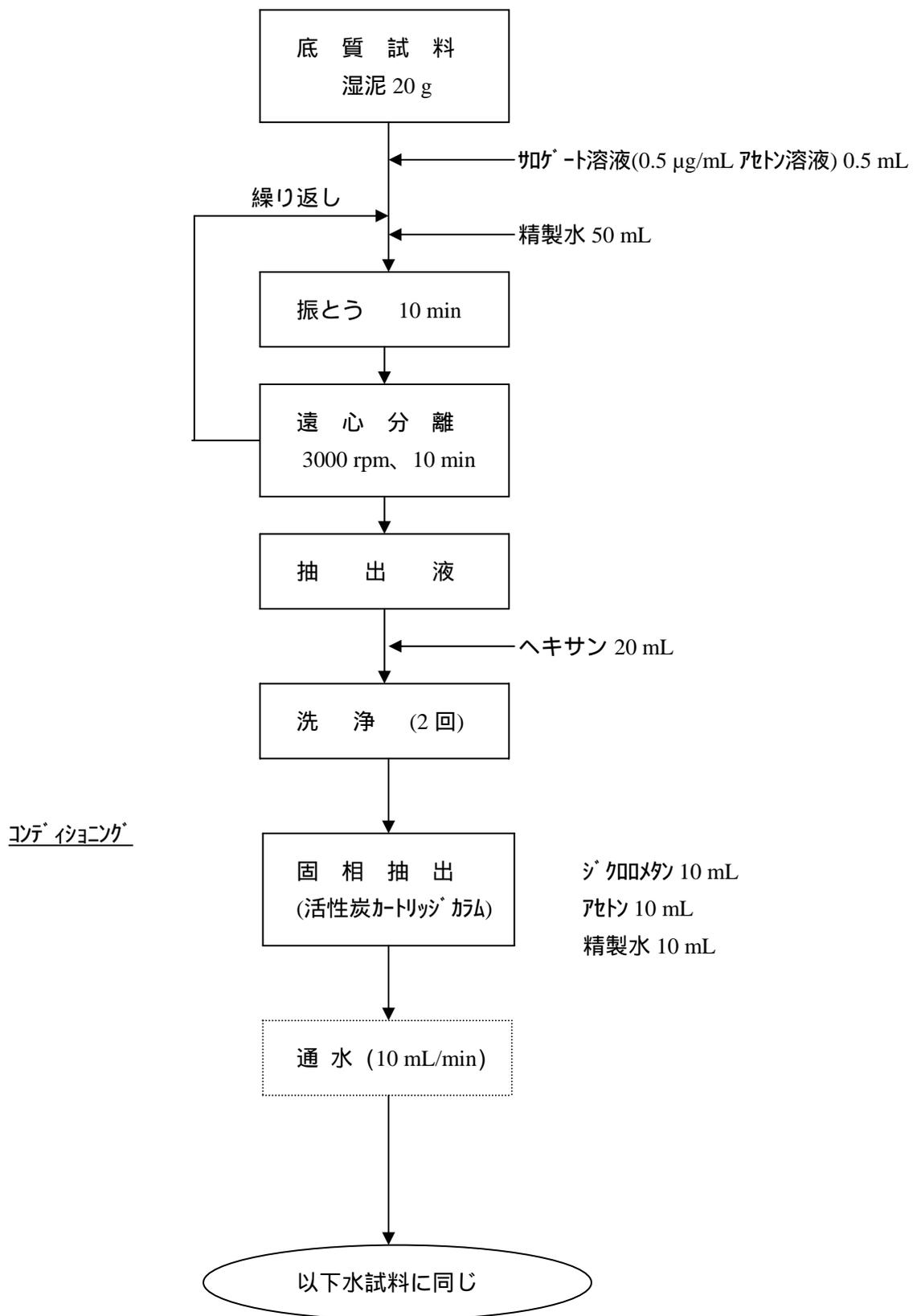


図2 底質試料の分析操作手順

生物試料

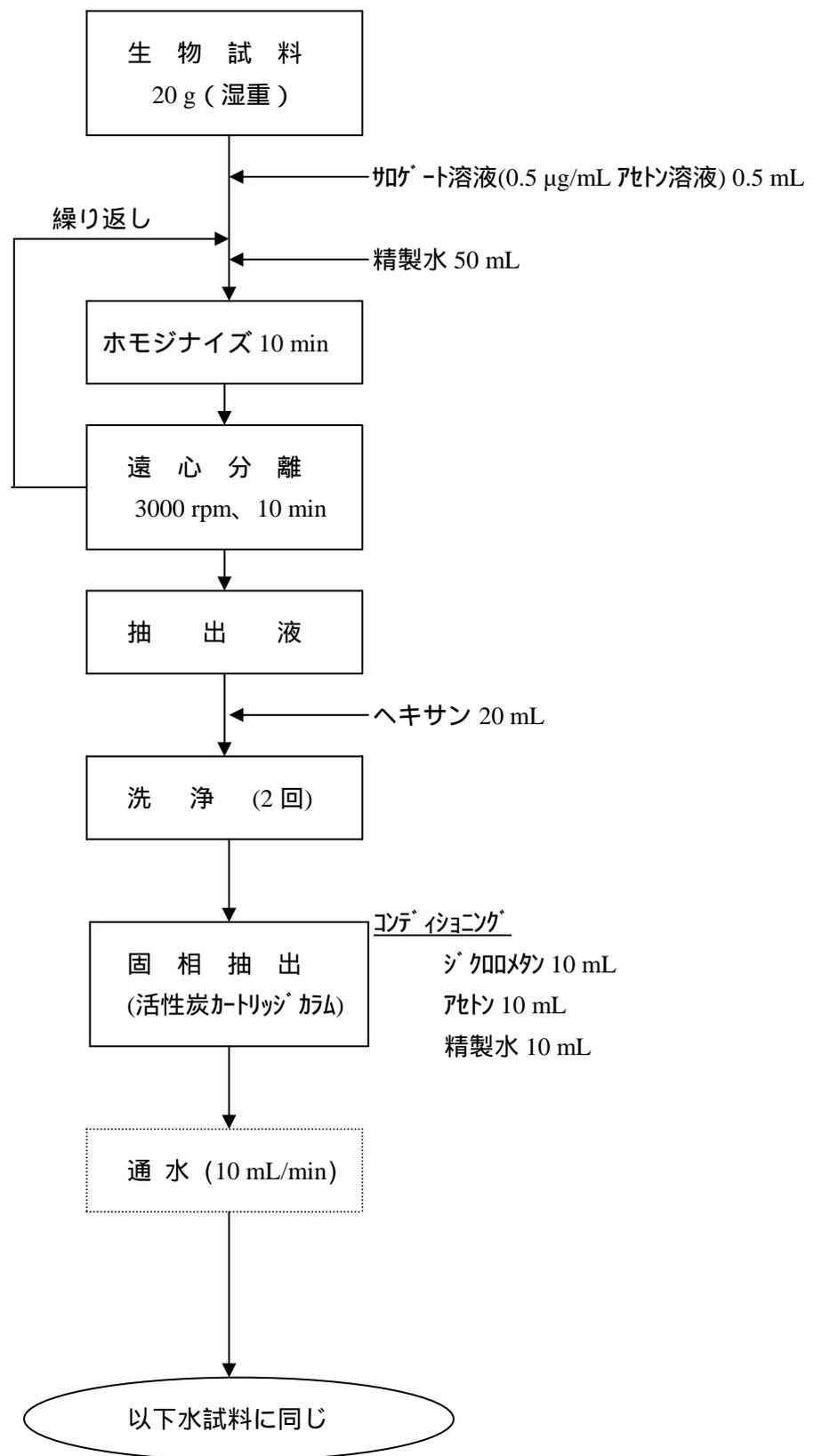


図3 生物試料の分析操作手順