

．農薬類及びニトロベンゼン類の分析法

1 対象物質

本分析法の対象物質を表 1 に示す。

表 1 対象物質

項目番号	物質名	Cas.No.	水溶解度 ($\mu\text{g/mL}$)	Log Pow
65	キントゼン (PNCB)	82-68-8	0.44	4.64
75	1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン	97-00-7	8	2.17
86	シアナジン	21725-46-2	170	2.22
99	1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン	89-61-2	14	3.09
108	ジチオピル	97886-45-8	1.4	4.75
207	ピリプチカルブ	88678-67-5	0.32	5.18
219	ブタミホス	36335-67-8	6.19	4.62
258	ペンディメタリン	40487-42-1	0.275	5.18
271	メタラキシル	57837-19-1	8400	1.65

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を表 2 に示す。目標定量下限値はその 3 倍である。

表 2 目標とする検出下限値

項目番号	物質名	水質 ($\mu\text{g/L}$)	底質 ($\mu\text{g/kg}$)	生物 ($\mu\text{g/kg}$)
65	キントゼン (PNCB)	0.01	3	5
75	1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン	0.01	3	5
86	シアナジン	0.02	5	10
99	1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン	0.01	3	5
108	ジチオピル	0.01	3	5
207	ピリプチカルブ	0.01	3	5
219	ブタミホス	0.01	3	5
258	ペンディメタリン	0.01	3	5
271	メタラキシル	0.02	5	10

3 分析法の概要

対象物質の水試料からの抽出は、固相抽出法または溶媒抽出法による。固相抽出法では 10～20 mL/min の速度で通水して対象物質を捕集し、ジクロロメタンで溶離、脱水、濃縮して前処理液を得る。溶媒振とう法では塩析条件下ジクロロメタンで振とう抽出し、脱水、濃縮して前処理液を得る。

底質試料はアセトンで振とう抽出し、その抽出液を塩化ナトリウム水溶液で希釈した後、ジクロロメタンによる振とう抽出を行い、脱水、濃縮して前処理液を得る。

生物試料は、メタノールによる攪拌抽出を行い、メタノール/ヘキサン分配による脂質除去の操作を行った後、ジクロロメタンによる振とう抽出をし、脱水、濃縮して前処理液を得る。

前処理液は、必要に応じてフロリジルカラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、非孔性グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、測定用の内標準物質混合溶液を添加して、GC/MS で同定・定量を行う。

なお、濃度の算出は測定用内標準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

- ・標準物質：純度 97%以上の試薬であって測定の妨害となる成分を含有しないもの、または既知濃度に調製した標準液。純品は個別に必要量を精秤して、アセトンで 1,000 ~ 2,000 µg/mL の標準原液を調製する。
- ・内標準物質：ナフタレン-d₈、フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀の重水素標識標準物質、または同様の用途に供することができる標準物質。これらは個別に必要量を精秤し、ヘキサンに溶解して 1,000 ~ 2,000 µg/mLの標準原液を調製する。
- ・試薬、溶媒類：無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどの試薬類、ヘキサン、アセトン、ジクロロメタン、メタノールなどの溶媒類は、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。
- ・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。
- ・固相抽出用カートリッジカラム（注 1）。
- ・5%含水シリカゲル：カラムクロマト用シリカゲル（注 2）を 130 °C で 15 時間加熱活性化した後、95 g を 300 mL の共栓（透明摺）付き三角フラスコにステンレス製ロートを用いて秤量し、密栓して室温まで冷却する。シリカゲルを攪拌しながら、5 mL のホールピペットを用いて精製水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 15 時間以上保存したものを使用する。

- ・フロリジル：130 で 12 時間程度加熱処理する。
- ・グラファイトカーボンカートリッジカラム：容量 3 mL 程度のカラムに非孔性グラファイトカーボンを 0.2~0.3 g 充てんしたもの（注 3）または同等品。使用に先立ち、トルエン、アセトン、ジクロロメタン、ヘキサンによる洗浄が不可欠である。
- ・シリカゲルカートリッジカラム、フロリジルカートリッジカラム：充てんカラムの代替として利用することができるが、あらかじめ操作条件の検討を要する。

（ 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、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、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 4）
- ・濃縮器：ロータリーエバポレータ（恒温槽付き）。（注 5）
- ・ホモジナイザー（注 6）
- ・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

固相抽出法(注1)

固相抽出カラムは、あらかじめジクロロメタン、メタノール、精製水の各10 mLでコンディショニング(注7)する。試料水500 mLを10~20 mL/minの速度で通水し対象物質を捕集する。通水終了後、固相抽出カラムに高純度窒素を通気して乾燥させる(注8)。ジクロロメタン5 mLで対象物質を溶出させ(注7)、無水硫酸ナトリウムで脱水した後(注9)、窒素気流下で0.5 mLまで濃縮して前処理液とする(注10)。

溶媒抽出法

試料水1Lに50gの塩化ナトリウムと100mLのジクロロメタンを加えて10分間振とうする。ジクロロメタン抽出液を分取して、さらに100mLのジクロロメタンで振とう抽出を繰り返す。抽出液にヘキサン100mLを加えて無水硫酸ナトリウムで脱水する。脱水した抽出液は、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下40以下で1mLまで濃縮して前処理液とする(注10)。

(イ) 底質試料

湿泥 20 g を共栓付遠心沈殿管に採り、アセトン 50 mL を加え密栓して 10 分間振とうする。アセトン抽出液は、遠心分離 (3,000 rpm、10 分) して 1 L 容分液ロートに分取する。この分液ロートにはあらかじめ塩化ナトリウム 25 g、精製水 500 mL を入れておく。遠心分離の残渣にはアセトン 50 mL を加えて 10 分間振とうして、遠心分離を行い、アセトン抽出液を先の分液ロートに併せる。アセトン抽出液を入れた分液ロートにジクロロメタン 100 mL を加えて 10 分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を分取、水層にジクロロメタン 100 mL を加えて、振とう抽出を繰り返し、抽出液を併せる。ジクロロメタン抽出液には、ヘキサン 100 mL を加え、無水硫酸ナトリウムで脱水、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で 1 mL まで濃縮して前処理液とする (注 10)。

(ウ) 生物試料

細切し均一化した湿組織 20 g にメタノール 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 15 分間遠心分離して、メタノール抽出液を 1 L 容分液ロートに分取する。遠心分離の残渣にはメタノール 50 mL を加えて、同様の操作を行い、抽出液を併せる。

次いで、メタノール/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。メタノール抽出液を入れた 1 L 容の分液ロートにメタノール飽和ヘキサン 100 mL を加え、5 分間激しく振とうする。静置後、下層のメタノール層は別の 1 L 容分液ロートに移し、ヘキサン層は捨てる。メタノール層は、メタノール飽和ヘキサン 50 mL を加え、5 分間激しく振とうして静置し、下層のメタノール層を先の 1 L 容分液ロートに移す。この分液ロートに精製水 5 mL を加えて、緩やかに攪拌、暫時静置する。メタノール層の上部にヘキサンが分離した後、メタノール層を別の 1 L 容分液ロートに移し、5% 塩化ナトリウム水溶液 500 mL を加えて混合、さらにジクロロメタン 100 mL を加え 10 分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を分取し、水層にジクロロメタン 100 mL を加えて振とう抽出を繰り返し、ジクロロメタン層を先の抽出液に併せる。ジクロロメタン抽出液には、ヘキサン 100 mL を加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で 1 mL に濃縮し、前処理液を得る (注 10)。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

前処理液は測定用内標準溶液(ナフタレン-d₈、フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀の各標識物質を10 µg/mLの濃度に調製したヘキサン溶液)を20 µL(固相抽出法の場合は10 µL)を添加し、窒素気流下で1.0 mLに定容(固相抽出法の場合は0.5 mL)してGC/MS測定する。測定を妨害する物質が共存する場合は、前処理液を後述するフロリジルまたはシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、溶出液に測定用内標準溶液を添加してGC/MS測定する。

(イ) 底質試料

前処理液はフロリジルまたは5%含水シリカゲルクロマトグラフィー法で精製する(注11)。フロリジルまたは5%含水シリカゲルの5 gをクロマトグラフ管にヘキサンで湿式充てんし、頂部に少量の無水硫酸ナトリウムを積層する。これに前処理液の全量を負荷して成分を吸着させる。その後、ヘキサン10 mLを1滴/秒程度の速度で通し、カラムを洗浄する(注12)。次いで5%アセトン含有ヘキサン30 mLを同様の速度で流下させる。この画分にメタラキシルとシアナジンを除くすべての成分が含まれる。次いで30%アセトン含有ヘキサン20 mLでメタラキシルとシアナジンを流出させる。これらの溶出液において、なお着色が著しく、不揮発性夾雑物が測定の妨害となる恐れがある場合は、非孔性グラファイトカーボン(注13)を0.2~0.3 g充てんしたカートリッジカラムで精製を行う。このカラムは使用直前に20%アセトン含有ヘキサン10 mLでコンディショニングする。その後、溶出濃縮液を負荷して、50%アセトン/ヘキサン5 mLで溶出し、この間の溶出液は全量を試験管に受ける。これらの溶出液は合せ、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下40以下で1 mLまで濃縮する。この濃縮液に測定用内標準混合溶液(各10 µg/mLヘキサン溶液)を20 µL添加し、1.0 mLに定容してGC/MS測定を行う。

(ウ) 生物試料

生物試料の前処理液はカラムクロマトグラフィーによる精製を行う。精製操作は底質と同様であり、溶出液は濃縮して、測定用内標準溶液(各10 µg/mLヘキサン溶液)を20 µL添加後1.0 mLに定容して、GC/MS測定を行う。

(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のアセトン溶液を加え、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

検量線作成用混合標準液、測定用内標準混合溶液を調製する。検量線作成用混合標準液は、その原液をヘキサンで希釈して 0 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で 5 段階以上個別に調製する。測定用内標準混合溶液は、ナフタレン- d_8 、フェナンスレン- d_{10} 、フルオランテン- d_{10} の各重水素標識標準物質を混合し、ヘキサンで希釈してそれぞれ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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：5%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 。
- ・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 cm/sec。
- ・カラム恒温槽：50 (1 min) (30 /min) 180 (5 /min) 280 。
- ・注入口温度：220 。

(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

対象物質および内部標準物質の検出に設定する測定イオンを表 3 にまとめた。

表 3 5%フェニルメチルシリコン系 GC カラムの溶出順位と測定イオン

項目 番号	物質名	質量数	モニタ - イオン m/z			参照 内標準
			定量	確認		
IS-1	ナフタレン-d ₈	136.17	136	-	-	-
99	1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン	192.00	191	145	109	IS-1
75	1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン	202.55	202	110	75	IS-1
65	キントゼン (PNCB)	295.33	295	265	237	IS-2
IS-2	フェナンスレン-d ₁₀	188.14	188	-	-	-
271	メタラキシル	279.34	206	249	279	IS-2
108	ジチオピル	401.42	354	306	286	IS-2
86	シアナジン	240.70	212	214	240	IS-3
258	ペンディメタリン	281.31	252	162	281	IS-3
IS-3	フルオランテン-d ₁₀	212.14	212	-	-	-
219	ブタミホス	332.36	286	200	232	IS-3
207	ピリプチカルブ	330.45	165	181	108	IS-3

(イ) 検量線

(a) 標準液の測定

各濃度段階の検量線作成用混合標準液 (0 ~ 1.0 µg/mL の範囲で 5 段階以上) の 1.0 mL にそれぞれに測定用内標準混合溶液 (10 µg/mL) を 20 µL 添加する。この標準液系列は、各標準物質を 0 ~ 1.0 µg/mL、各測定用内標準物質を 0.2 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 3 の通り、各標準物質と対応する測定用内標準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毎の強度比の変動が

5%以内であることを確認する。

(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に測定用内標準混合溶液（10 µg/mL）を 20 µL 添加して 1.0 mL に定容し、GC/MS 注入用の試料液とする。注入量は検量線作成用の混合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、対応する測定用内部標準物質のピーク強度（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内標準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 ±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

内標準物質と対象物質のピークの強度比から、検量線から濃度比を求め、次式により試料中の対象物質の濃度を算出する。

$$Ct(\mu\text{g}/\text{l}, \mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{RFt \times Qis(\mu\text{g})}{Vs(\text{l}, \text{kg})}$$

ここで、Ct：対象物質の試料中濃度（µg/L または µg/kg）、RFt：濃度比、Qis：内標準物質の添加量（µg）、分析への試料採取量：Vs（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 PS-2 または同等の性能を持つもの。ここでは、ポリマー系(スチレンジビニルベンゼン共重合体)であるウォーターズ社製 PS-2 カートリッジカラムを用いたがこの他にも充填剤としては C18 系など、形状としてはシリンジ型、ディスク型など多数の固相吸着剤がある。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、カラムの乾燥条件、溶出溶媒の種類や量などにより回収率が異なることがあるので、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) 和光純薬社製ワコーゲル C-200(備考1)。
- (注3) ENVI-Carb、250 mg/6 mL、スペルコ社製(備考1)。
- (注4) 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5) 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6) 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(備考1)。
- (注7) 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8) 高純度窒素は 0.5~1 L/min の流速で約 15 分間通気した。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対象物質が失われる可能性がある。
- (注9) 硫酸ナトリウムを充填したカートリッジカラム(セップパックスドライ)を吸着カラムに直結して溶出する方法もある。この場合、あらかじめジクロロメタン 5 mL でコンディショニングが必要。吸着カラムの乾燥が十分な場合はこの操作を省略してもよい(備考1)。
- (注10) 乾固しないよう注意する。乾固した場合、クロロニトロベンゼン類は特に減少しやすい。
- (注11) ここに示すカラムクロマトグラフィーによる精製条件は一例である。充てん剤の活性度や前処理液の性状等によって溶離パターンが異なるので、必ず事前に分画試験を行い、操作条件を決定する。また、本法では充てんカラムを基本としたが、カートリッジカラムの利用も効果が期待できる。

(注 12) キントゼンはヘキサン 20 mL で溶出するので、これ以上多量のヘキサンを用いてはならない。

(注 13) Envi-Carb など(備考 1)。

(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアル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 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）
- 2) 水野勝，角脇怜：「キントゼン」，平成 2 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，p100-109（平成 3 年 6 月）
- 3) 花田喜文，佐藤健司，門上希和夫：「2,4-ジクロロロニトロベンゼン」，平成 5 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，192-218（平成 6 年 6 月）

分析法フローチャート

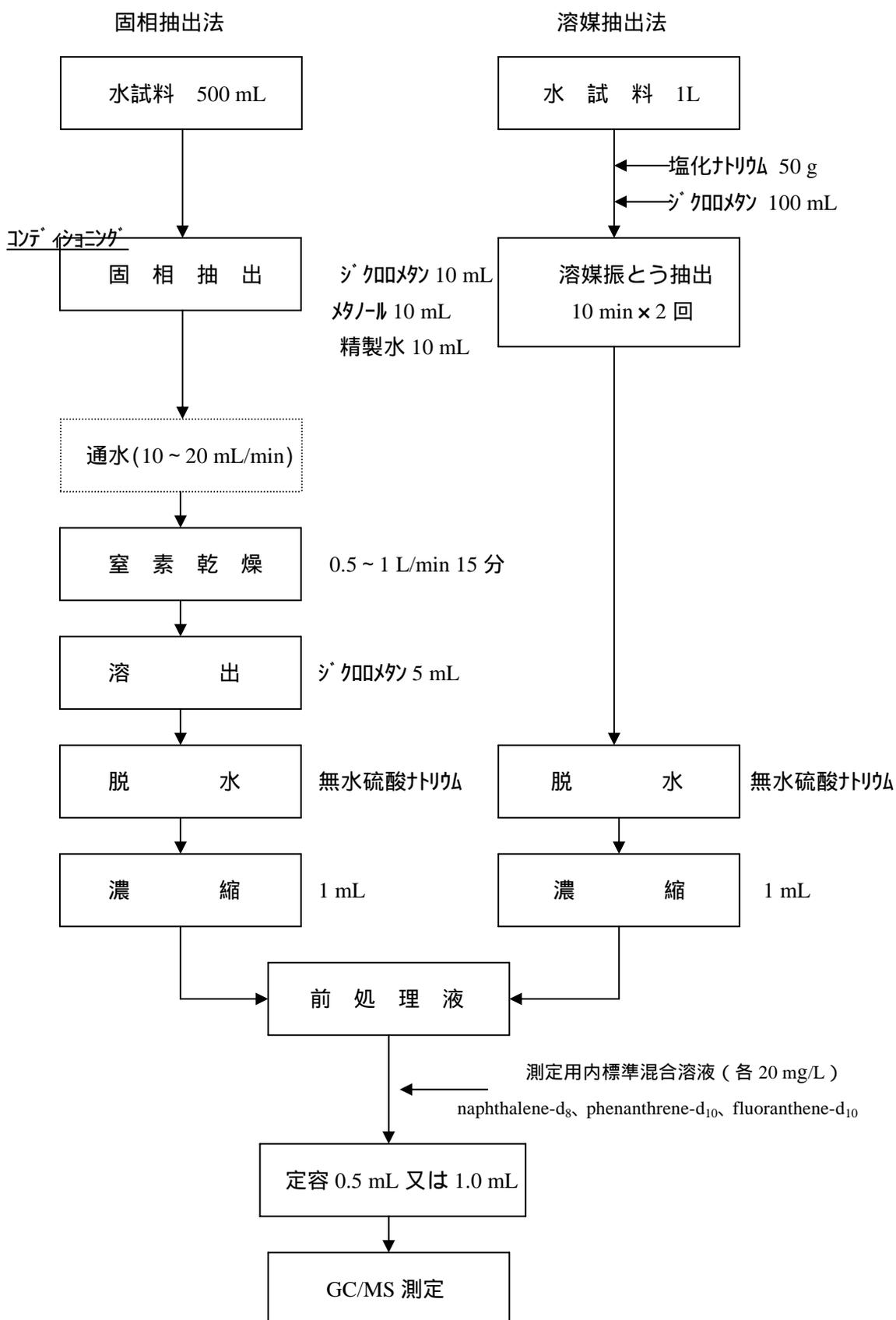


図1 水試料の分析操作手順

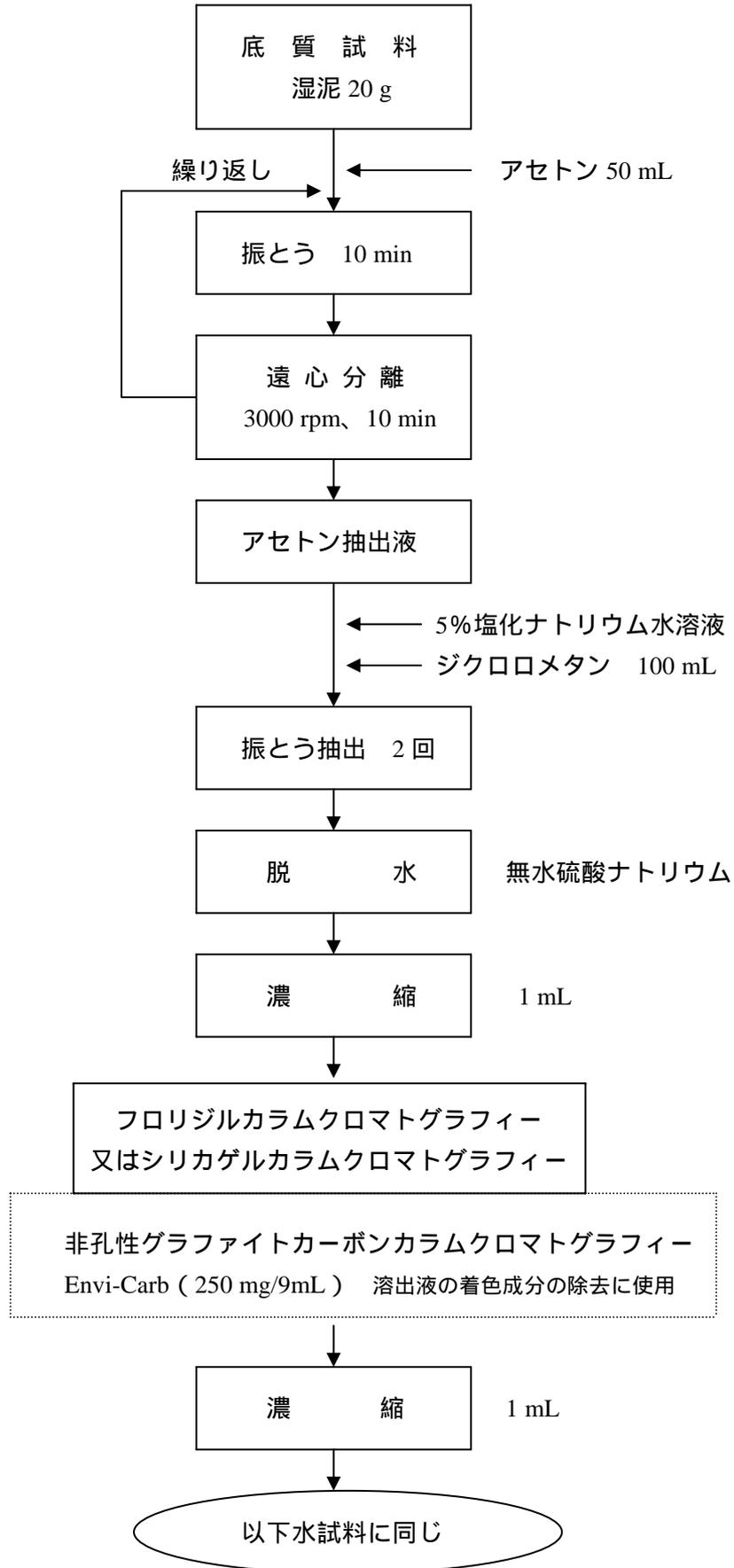


図 2 底質試料の分析操作手順

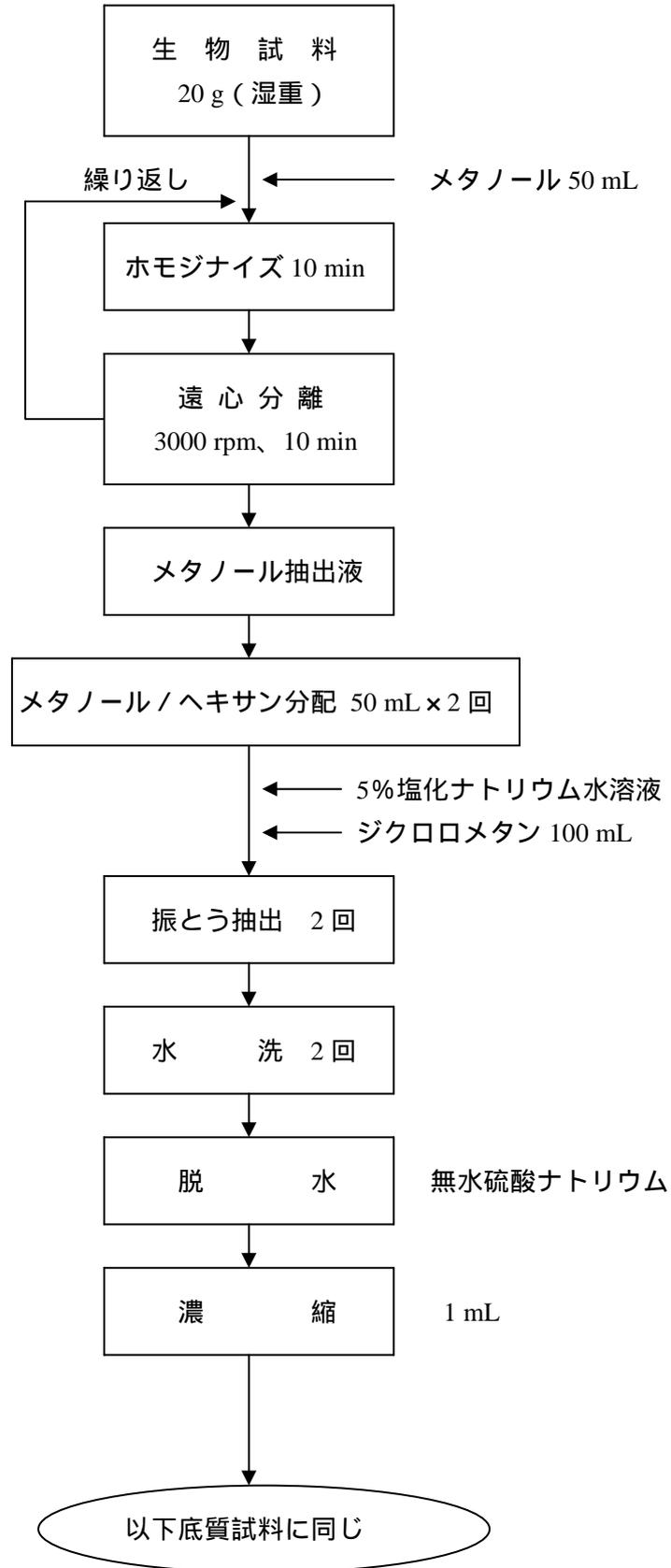


図3 生物試料の分析操作手順