

6.5 有機スズ化合物

本分析方法は、有機スズ化合物について記したものである。

6.5.1 プロピル誘導体化法

ここで、有機スズ化合物とは、次に挙げる物質を示す。

トリブチルスズ (TBT) 化合物、トリフェニルスズ (TPT) 化合物

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(1) 測定方法の概要

試料に同位体標識した有機スズ化合物をサロゲート物質として添加後、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を用いてクリーンアップを行う。さらに臭化プロピルマグネシウムでプロピル化を行いガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) またはガスクロマトグラフ炎光光度検出器 (GC/FPD) で測定する。

(2) 試薬

- a) 水：蒸留水、超純水、試薬水、ヘキサン洗浄水など、有機スズ化合物の保持時間に相当する位置にピークを生じないもの
- b) ヘキサン：残留農薬試験用
- c) アセトン：残留農薬試験用
- d) メタノール：残留農薬試験用
- e) エタノール：残留農薬試験用
- f) ジエチルエーテル：残留農薬試験用
- g) 酢酸エチル：残留農薬試験用
- h) シクロヘキサン：試薬特級以上で、有機スズ化合物の保持時間に相当する位置にピークを生じないもの
- i) 硫酸、塩酸：JIS K 8951 および JIS K 8180 に規定するもの
- j) 塩化ナトリウム：残留農薬 PCB 試験用。または JIS K 8150 に規定する塩化ナトリウムを 250 ~ 450 で 2 ~ 6 時間加熱し、デシケーターで放冷したもの
- k) 硫酸ナトリウム：試薬特級または PCB 分析用
- l) 臭化プロピルマグネシウム溶液⁽¹⁾：2mol/L 臭化プロピルマグネシウムテトラヒドロフラン溶液
- m) 陰イオン交換樹脂：市販カートリッジタイプのもの⁽²⁾。使用する直前に 0.2mol/L 水酸化ナトリウム 10mL、水 20mL、エタノール 20mL を流して調製する。
- n) 陽イオン交換樹脂：市販カートリッジタイプのもの⁽³⁾。使用する直前に 1mol/L 塩酸 10mL、水 20mL、エタノール 20mL を流して調製する。
- o) フロリジルミニカラム：内径 10mm、長さ 25mm 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 0.9g を充填したもの、またはこれと同等の性能を有するもの⁽⁴⁾。
- p) トリブチルスズ化合物標準品：トリブチルスズクロリドを 99%以上含むもの
- q) トリフェニルスズ化合物標準品：トリフェニルスズクロリドを 99%以上含むもの
- r) トリブチルスズクロリド- d_{27} 標準品：トリブチルスズクロリド - d_{27} を 99%以上含むもの
- s) トリフェニルスズクロリド- d_{15} 標準品：トリフェニルスズクロリド - d_{15} を 99%以上含むもの

の

- t) **テトラブチルスズ- d_{36} 標準品**：テトラブチルスズ - d_{36} を 99%以上含むもの
- u) **混合標準液(0.1 $\mu\text{g/mL}$)**：トリブチルスズ化合物標準品及びトリフェニルスズ化合物標準品 10mg を個別に全量フラスコ 100mL へ取り、ヘキサンを標線まで加えて、各 100 $\mu\text{g/mL}$ の標準液を調製する⁽⁵⁾。各 100 $\mu\text{g/mL}$ の標準液からそれぞれ 1mL を全量フラスコ 10mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、有機スズ化合物(塩化物) 10 $\mu\text{g/mL}$ を含む混合標準液を調製する。また、混合標準液をヘキサンで希釈し、1 $\mu\text{g/mL}$ 及び 0.1 $\mu\text{g/mL}$ の混合標準液とする⁽⁶⁾。
- v) **サロゲート混合溶液(0.1 $\mu\text{g/mL}$)**：トリブチルスズクロリド- d_{27} 標準品及びトリフェニルスズクロリド- d_{15} 標準品をそれぞれ 10mg 全量フラスコ 100mL に取り、ヘキサンを標線まで加えて、各 100 $\mu\text{g/mL}$ のサロゲート標準液を調製する。各 100 $\mu\text{g/mL}$ のサロゲート標準液 1mL を全量フラスコ 10mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、各サロゲート物質 10 $\mu\text{g/mL}$ を含む混合溶液を作成する。この溶液をアセトンで 100 倍希釈し、0.1 $\mu\text{g/mL}$ の混合溶液とする。
- w) **内標準液(1 $\mu\text{g/mL}$)**：テトラブチルスズ- d_{36} 10mg を全量フラスコに取り、ヘキサンを標線まで加え、100 $\mu\text{g/mL}$ の内標準液を調製する。100 $\mu\text{g/mL}$ の内標準液から 1mL を全量フラスコ 10mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、内標準物質 10 $\mu\text{g/mL}$ を含む溶液を調製する。この溶液から 1mL を全量フラスコに取り、ヘキサンを標線まで加え、1 $\mu\text{g/mL}$ の溶液とする。

注(1) 臭化プロピルマグネシウムは、空気中の水分により分解するおそれがあるため、開封後 1 ヶ月以内に使用する。

注(2) 例えば、Bond Elut JR SAX、Sep-Pak Accell QMA、MCI GEL CP08P など(備考 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。

注(3) 例えば、Bond Elut JR SCX、TOYOPAK IC-SP など(備考 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。

注(4) 例えば、Sep-Pak Florisil、Bond Elut Florisil など(備考 1)

注(5) 混合すると組成が変化するおそれがあるため、100 $\mu\text{g/mL}$ の標準液は別々に調製する。

注(6) 混合標準液は使用時に調製する。

(3) 器具及び装置

a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ - ルピペット等
遠沈管、ナス型フラスコ、ピーカー、分液ロート、共栓付試験管等

b) 減圧ろ過装置

c) 振とう機

d) 濃縮器：ロータリーエバポレーター

e) マイクロシリンジ

f) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)

ガスクロマトグラフ (GC)

試料導入部：スプリットレス、またはオンカラム方式など、試料の全量をカラム内に導入可能なもの

カラム⁽⁷⁾：内径 0.2 ~ 約 0.7mm、長さ 10 ~ 30m の熔融シリカ製のキャピラリーカラム。内壁にフェニルメチルポリシロキサン(またはジ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。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム

カラム恒温槽：温度制御範囲が 50 ~ 350 であり、測定対象物質の最適分離条件の温度にで

きるような昇温プログラムが可能なもの

質量分析計

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

検出器：選択イオン検出法 (SIM 法) が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

g) 炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ

ガスクロマトグラフ (GC)

f) による。

炎光光度検出器 (FPD)

スズ用フィルター (610nm カットオフ) を装着し、水素ガス及び空気の流量を最適条件になるように調整する。

注(7) 例えば、J&W DB-5・DB-5ms、Restek Rtx-5、HP HP-5ms、Supleco SPB-5、SGE BPX-5 等がある (備考 1)。

(4) 前処理操作

a) 抽出操作

3.1 で調製した湿試料 10g を遠沈管にはかり取り、サロゲート混合溶液 (0.1 μ g/mL) 100 μ L⁽⁸⁾を加えて十分混合する。

1mol/L 塩酸含有メタノール - 酢酸エチル溶液 (1+1)70mL を加えて 30 分間振とう抽出し、ろ紙 5A を用いて減圧ろ過する⁽⁹⁾。

遠沈管の残渣を 1mol/L 塩酸含有メタノール - 酢酸エチル溶液 (1+1)30mL で洗浄し、減圧ろ過して のろ液に合わせる。

ろ液を分液ロート [A] に入れ、10%塩化ナトリウム溶液 100mL と酢酸エチル - ヘキサン (3+2) 混合溶液 50mL を加え 5 分間振とう抽出する。水層を別の分液ロート [B] に移し、酢酸エチル - ヘキサン (3+2) 混合溶液 30mL を用いて 5 分間振とう抽出する。有機溶媒層を分液ロート [A] に合わせ、ヘキサン 150mL を加えて 20 分以上放置して、生じた水層を除く⁽¹⁰⁾。

これに 10%塩化ナトリウム溶液 100mL 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⁽¹¹⁾。

洗浄後、有機溶媒層を硫酸ナトリウムで脱水し、濃縮器を用いて 40 以下で約 1mL まで濃縮し、さらに窒素を穏やかに吹き付け溶媒を除去する。

残留物をエタノール 10mL で溶解し、調製済みの陰イオン交換カラムと陽イオン交換カラムを直列に接続したカラム (上が陰イオン交換カラム) に 1mL/min の速度で流し入れる。

エタノール 20mL でカラムを洗浄後、陰イオン交換カラムを取り除く。

陽イオン交換カラムに 1mol/L 塩酸含有メタノール 15mL を通し、有機スズを溶出させる。

溶出液を分液ロート [C] に受け、これに水 30mL とヘキサン - シクロヘキサン混合溶液 (1+1) 5mL を加えて 5 分間振とう抽出する。水層を分液ロート [D] に移し、ヘキサン - シクロヘキサン混合溶液 (1+1) 5mL 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、濃縮器を用いて 40 以下で約 5mL まで濃縮した後、共栓付試験管に移し、窒素を穏やかに吹き付けて約 1mL まで濃縮して、前処理溶液とする。

b) プロピル化

プロピル化用試料溶液に臭化プロピルマグネシウム溶液 1mL を加えて軽く振り混ぜて、室温で 30 分間放置する。

0.5mol/L 硫酸 10mL を氷冷しながら徐々に加えて、分液ロート [A] に移し、メタノール 10mL 及び水 10mL を加える。5%ジエチルエーテル - ヘキサン混合溶液 2.5mL で抽出する。水層を分液ロート [B] に移し、5%ジエチルエーテル - ヘキサン混合溶液 2.5mL で再度抽出する。

抽出液を分液ロート [A] に合わせ、水 10mL で 2 回洗浄した後、硫酸ナトリウムで脱水する。

あらかじめヘキサン 10mL を通して洗浄したフロリジルミニカラムに、で脱水した抽出液を負荷した後、5%ジエチルエーテル - ヘキサン溶液 10mL を通液し、溶出液を共栓付試験管に受ける⁽¹²⁾。溶出液に窒素を吹き付けて 0.2mL まで濃縮する。

1 μ g/mL の内標準液を正確に 20 μ L 添加して試験溶液とする。

c) 操作ブランク試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、試料と同時に a) と b) の操作を行い操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(8) この添加量は、試料中濃度に換算すると 1 μ g/kg 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分かっている場合は、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(9) 減圧ろ過が困難な場合は、遠心分離する。

注(10) 酢酸エチルの含量が高く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(11) 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、水洗を十分に (4 回程度) 行う。

注(12) 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。

(5) 測定

a) GC/MS または GC の分析条件の例

GC/MS、GC (炎光光度検出器) の分析条件の設定を行う。GC/MS、GC の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

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⁽⁷⁾

内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25 μ m

カラム温度 : 60 (2min) (5~20 /min) 300 (2min)⁽¹³⁾

キャリアーガス : ヘリウム、流量 1mL/分 (定流量モード)

試料導入法 : スプレットレス方式 (60sec)

注入口温度 : 290

質量分析計 (MS)

インターフェース温度 : 280

イオン化法 : 電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化電圧 : 70eV

イオン源温度 : 250

検出法：選択イオン検出法（SIM法）

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

測定質量数：表 6.5-1 による

質量分析計の調整：MSに質量校正用標準物質（PFTBAまたはPFK）を導入し、MSの質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能{質量数(m/z)=18~300程度以上の範囲で1質量単位(amu)以上}等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.5-1 測定質量数

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[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-d ₂₇	295	293
プロピルトリフェニルスズ-d ₁₅	366	364
[内標準物質]		
テトラブチルスズ-d ₃₆	318	316

注(13) 例えば、60 (2min) (20 /min) 130 (10 /min) 210 (5 /min) 260 (10 /min) 300 (2min)

ガスクロマトグラフ炎光光度検出器

ガスクロマトグラフ(GC)：のガスクロマトグラフによる。⁽¹⁴⁾

炎光光度検出器(FPD)：スズ用フィルター(610nm カットオフ)を装着し、水素ガス及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50pgから誘導されるプロピル体が十分に確認できるように感度を調整する。

b) 検量線

100mLのナス型フラスコに対象物質の10 μ g/mL、1 μ g/mL及び0.1 μ g/mLの混合標準液を用いて対象物質を段階的に0.01~5 μ gの範囲で添加する。

それぞれのナス型フラスコにサロゲート混合溶液(10 μ g/mL)0.05mL(各0.5 μ g)ずつ添加した後、ヘキサンで1mLとする。

次に臭化プロピルマグネシウム溶液1mLを加えてプロピル化を行い、0.5 mol/L硫酸10mL、メタノール10mL及び水10mLを加えて処理した後、ヘキサン4mLで2回抽出する。

抽出液を合わせて脱水後、10 μ g/mLの内標準混合液100 μ L(各1 μ g)を正確に添加し、ヘキサンで10mL定容とする⁽¹⁵⁾。

この溶液1 μ L⁽¹⁶⁾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、縦軸にはピーク面積比を取り、検量線を作成する。

GC-FPDによる測定にあっては、ピーク面積比の代わりにピーク高比を用いてもよい。

6.5 有機スズ化合物

注(14) FPD による測定では、測定対象物質とサロゲート物質との分離可能な条件とする。

注(15) 試料に対して 0.02 ~ 10 μ g/kg に相当する。

注(16) 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つ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増やしてもよい。

c) 試料の測定

検量線と同様に試験溶液 (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。

d) 定量及び計算

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、検体中の有機スズ化合物 (塩化物) 濃度を算出する。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、これに基づき、検体中のトリブチルスズ化合物濃度を算出する。

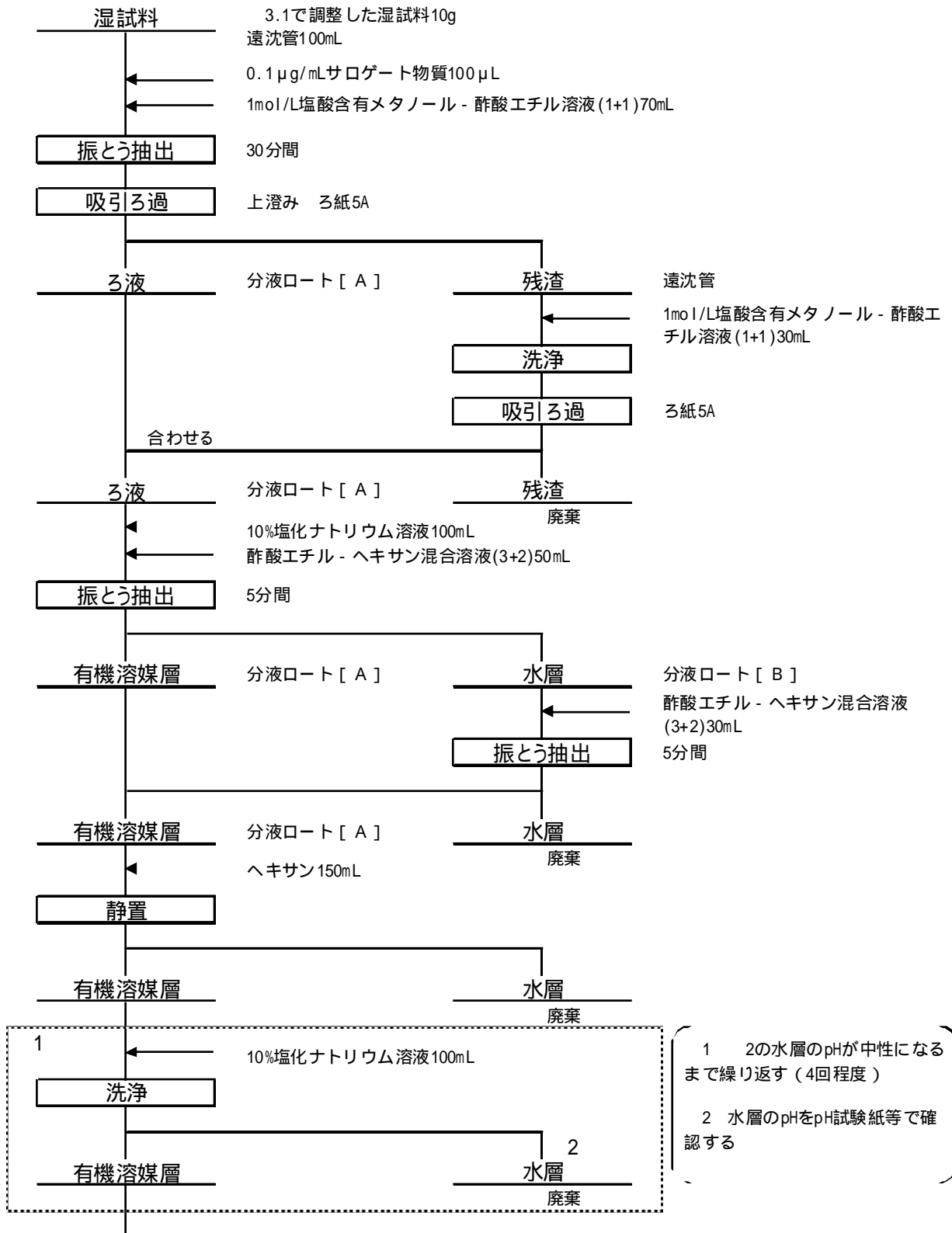
また、サロゲート化合物と内標準物質とのピーク面積比を求め、相対感度係数からサロゲート化合物の重量を求め、その回収率を求める。回収率が 70 ~ 130% の範囲内にある測定値を採用し、それ以外の測定値の場合は再測定する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

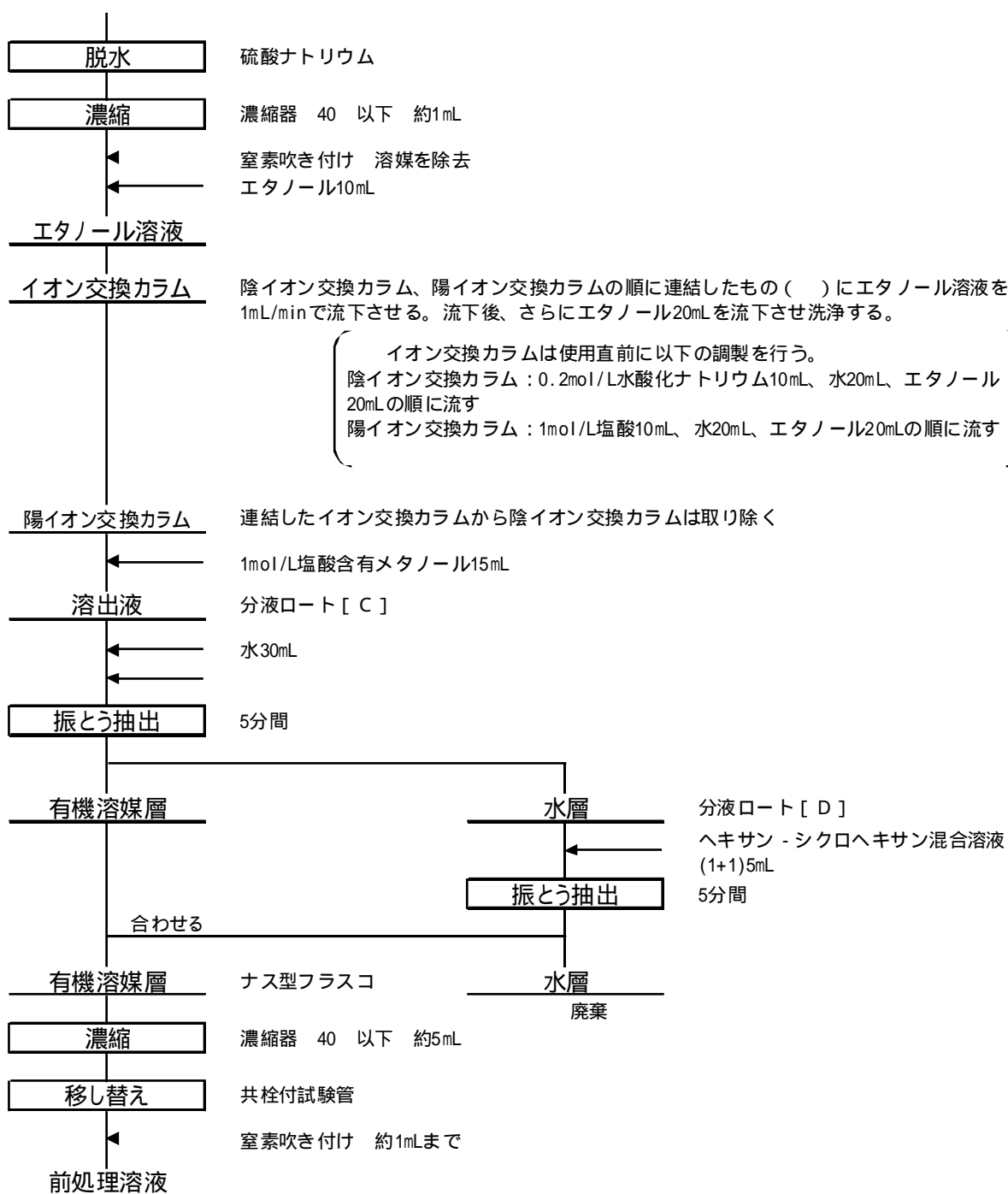
ここで、W : 試料採取量 (乾燥試料に換算した量) (g)

(6) 分析フローシート

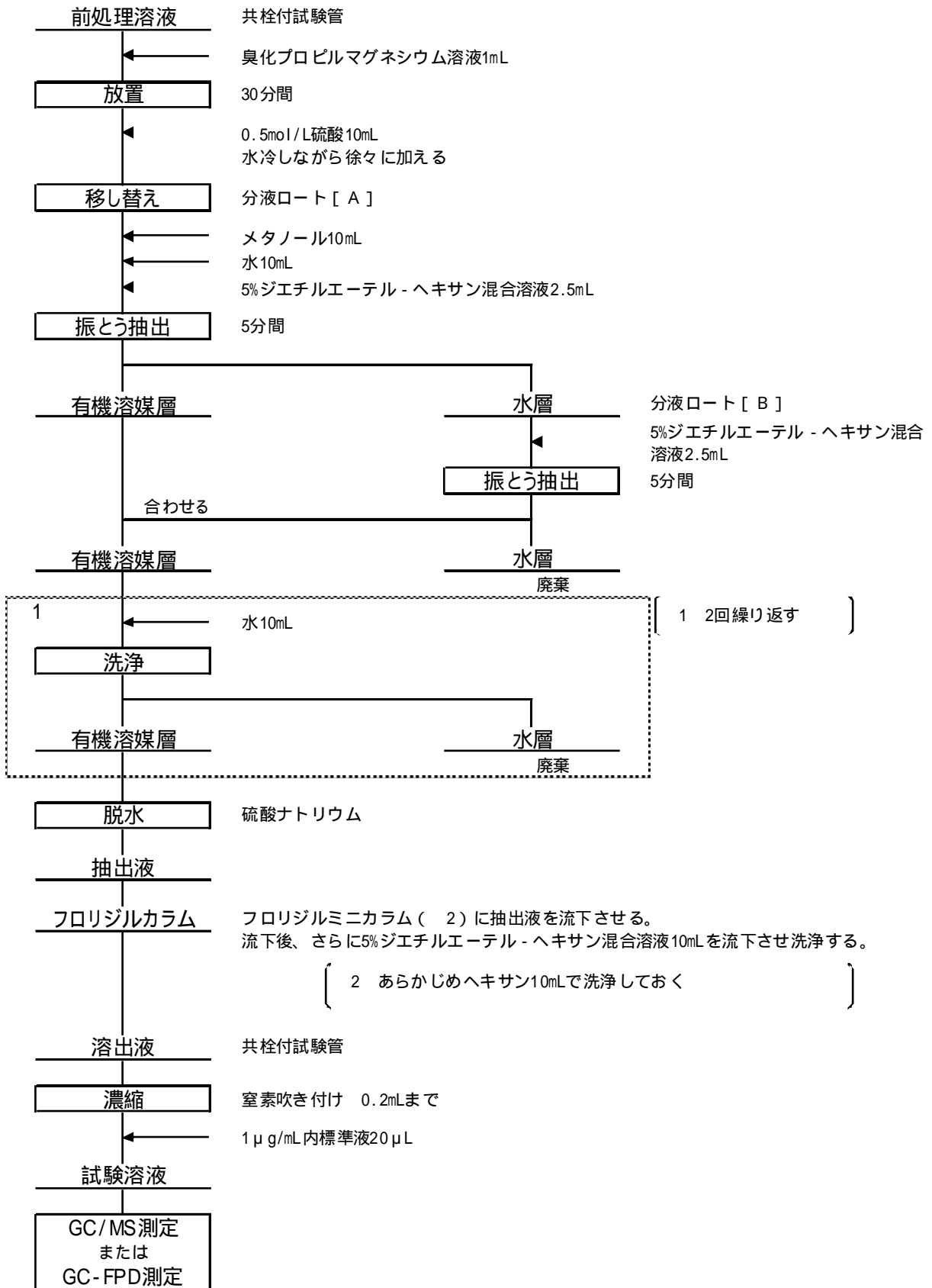
a) -1 前処理溶液の調製



a) -2 前処理溶液の調製 (つづき)



b) 試験溶液の調製（プロピル誘導体化）及び測定



6.5.2 (参考法) エチル誘導体化法

本分析方法は、ジブチルスズ (DBT) 化合物、トリブチルスズ (TBT) 化合物、モノフェニルスズ (MPT) 化合物、ジフェニルスズ (DPT) 化合物、トリフェニルスズ (TPT) 化合物を対象とする。

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(1) 測定方法の概要

試料にサロゲート物質を添加後、臭化水素酸含有メタノール - 酢酸エチル混合溶液を加えて抽出し、この抽出液から酢酸エチル - ヘキサン混合溶液で有機スズ化合物を抽出する。抽出液を脱水・濃縮後、エタノールに溶解して水及び緩衝液を加え、テトラエチルホウ酸ナトリウム (NaBEt₄) 溶液を添加して有機スズ化合物を誘導体化する。次に水酸化カリウム - エタノール溶液を加えて室温で 1 時間振とうし、NaBEt₄ のアルカリ分解を行う。この分解液に水及びヘキサンを加えて有機スズ化合物のエチル誘導体化合物を振とう抽出し、脱水・濃縮後、フロリジルカートリッジカラムによるクリーンアップを行ない、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定する。

(2) 試薬

- a) 水：蒸留水、超純水、試薬水、ヘキサン洗浄水など、有機スズ化合物の保持時間に相当する位置にピークを生じないもの
- b) ヘキサン、アセトン、メタノール、エタノール、酢酸エチル：残留農薬試験用
- c) 臭化水素酸、酢酸：JIS K 8509 に規定する臭化水素酸、JIS K 8355 に規定する酢酸またはこれらと同等以上のもの
- d) 塩酸：JIS K 8180 に規定するもの
- e) 塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、臭化ナトリウム、水酸化カリウム：JIS K 8159 に規定する塩化ナトリウム、JIS K 8371 に規定する酢酸ナトリウム三水和物、JIS K 8514 に規定する臭化ナトリウム、JIS K 8574 に規定する水酸化カリウムまたはこれらと同等以上のもの
- f) 硫酸ナトリウム：残留農薬試験用
- g) テトラエチルホウ酸ナトリウム (NaBEt₄)⁽¹⁾：市販試薬
- h) 2%NaBEt₄ 溶液、10%NaBEt₄ 溶液：使用用時調製し、残った溶液は捨てる。
- i) 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH5)：2mol/L 酢酸と 2mol/L 酢酸ナトリウムを pH5 になるように混合する (酢酸：酢酸ナトリウム = 5.9 : 14.1)。
- j) フロリジルミニカラム：内径 10mm、長さ 25mm 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 0.9g を充填したもの、またはこれと同等の性能を有するもの⁽²⁾。
- k) ジブチルスズ化合物標準品：ジブチルスズクロリドを 99%以上含むもの。
- l) トリブチルスズ化合物標準品：トリブチルスズクロリドを 99%以上含むもの
- m) モノフェニルスズ化合物標準品：モノフェニルスズクロリドを 99%以上含むもの。
- n) ジフェニルスズ化合物標準品：ジフェニルスズクロリドを 99%以上含むもの。
- o) トリフェニルスズ化合物標準品：トリフェニルスズクロリドを 99%以上含むもの
- p) ジブチルスズクロリド-*d*₁₈、トリブチルスズクロリド-*d*₂₇、フェニルスズクロリド-*d*₅、ジフェニルスズクロリド-*d*₁₀、トリフェニルスズクロリド-*d*₁₅、テトラブチルスズ-*d*₃₆：市販標準試薬
- q) 混合標準液：ジブチルスズクロリド 10mg、トリブチルスズクロリド 10mg、モノフェニルスズクロリド 10mg、ジフェニルスズクロリド 10mg、トリフェニルスズクロリド 10mg を個別に全量フラスコ 100mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、各 100µg/mL の標準液をそれぞれ

6.5 有機スズ化合物

れ調製する⁽³⁾。各 100 μ g/mL の標準液からそれぞれ 1mL を全量フラスコ 10mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、各有機スズ化合物（塩化物）10 μ g/mL を含む混合標準液を調製する。また、混合標準液をヘキサンで希釈し、1 μ g/mL 及び 0.1 μ g/mL の混合標準液とする⁽⁴⁾。

- r) **サロゲート混合溶液**：ジブチルスズクロリド- d_{18} 、トリブチルスズクロリド- d_{27} 、フェニルスズクロリド- d_5 、ジフェニルスズクロリド- d_{10} 、トリフェニルスズクロリド- d_{15} をそれぞれ 10mg を全量フラスコ 100mL に取り、それぞれヘキサンを標線まで加え、100 μ g/mL のサロゲート標準液を調製する。100 μ g/mL のサロゲート標準液からそれぞれ 1mL を全量フラスコ 10mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、サロゲート物質 10 μ g/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 10 倍希釈し、1 μ g/mL の混合溶液とする。
- s) **内標準液**：テトラブチルスズ- d_{36} 10mg を全量フラスコに取り、ヘキサンを標線まで加え、100 μ g/mL の内標準液を調製する。100 μ g/mL の内標準液から 1mL を全量フラスコ 10mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、内標準物質 10 μ g/mL を含む溶液を調製する。この溶液から 1mL を全量フラスコに取り、ヘキサンを標線まで加え、1 μ g/mL の溶液とする。

注(1) テトラエチルホウ酸ナトリウムは白色の粉末であるが、開封後は徐々に黄変する。試薬ビンをチャック付きビニール袋に入れて冷凍保存することにより黄変を抑えることができる。また、試薬が紙製のワイパー等に付着すると数十秒後に発火するため、試薬をふき取ったワイパー等は直ちに水に浸ける。

注(2) 例えば、Sep-Pak Florisil、Bond Elut FL など（備考 1）

注(3) 混合すると組成が変化するおそれがあるため、100 μ g/mL の標準液は別々に調製する。

注(4) 混合標準液は使用時に調製する。

(3) 器具及び装置

a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ - ルピペット等

遠沈管、ナス型フラスコ、ピーカー、分液ロート、共栓付試験管等

b) 減圧ろ過装置

c) 振とう機

d) 濃縮器：ロータリーエバポレーター

e) マイクロシリンジ

f) ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）

ガスクロマトグラフ

試料導入部：スプリットレス、またはオンカラム方式など、試料の全量をカラム内に導入可能なもの

カラム⁽⁵⁾：内径 0.2 ~ 約 0.7mm、長さ 10 ~ 30m の熔融シリカ製のキャピラリーカラム。内壁にフェニルメチルポリシロキサン(またはジメチルポリシロキサン)を 0.1 ~ 1.5 μ m の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム

カラム恒温槽：温度制御範囲が 50 ~ 350 であり、測定対象物質の最適分離条件の温度にできるような昇温プログラムが可能なもの

質量分析計

イオン化法：電子衝撃イオン化法（EI 法）

検出器：選択イオン検出法（SIM 法）が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

注(5) 例えば、J&W DB-5・DB-5ms、Restek Rtx-5、HP HP-5ms、Supleco SPB-5、SGE BPX-5 等がある（備考1）。

(4) 前処理操作

a) 抽出操作

3.1 で調製した湿試料 5g(乾泥換算)を共栓三角フラスコ 200mL にはかり取り、1 μ g/mL サロゲート混合溶液 50 μ L⁽⁶⁾及びアスコルビン酸 1g⁽⁷⁾を加えて十分攪拌し 1 時間放置する⁽⁸⁾。

1mol/L 臭化水素酸含有メタノール - 酢酸エチル混合溶液(1+1)70mL を加えて 30 分間振とう抽出し、ろ紙 5A で減圧ろ過する。三角フラスコを 1mol/L 臭化水素酸含有メタノール - 酢酸エチル混合溶液(1+1)30mL で洗浄し、この洗液も同様に減圧ろ過し、抽出液と合わせる。

得られた抽出液をあらかじめ飽和臭化ナトリウム溶液 100mL を入れた分液ロート 300mL [A]に移し、酢酸エチル - ヘキサン混合溶液(3+2)30mL を加え 10 分間振とう抽出する⁽⁹⁾。

静置した後、水層を、別の分液ロート [B]に移し、さらに酢酸エチル - ヘキサン混合溶液(3+2)30mL を加え同様の抽出操作を繰り返す。

有機溶媒層を分液ロート [A] に合わせ、ヘキサン 200mL を加えて混合し、20 分間放置し、生じた水層を廃棄後、硫酸ナトリウムで脱水する。

ロータリーエバポレーターで約 5mL まで濃縮した後、乾固しないように気をつけながら、窒素を穏やかに吹き付けて溶媒を揮散させる。

残渣にエタノール 5mL を加え溶解し⁽¹⁰⁾、前処理溶液とする。

b) エチル誘導体化

前処理溶液を少量のエタノールを用いて分液ロート 200mL [A] に洗いこむ。

酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5)5mL 及び水 10mL を加え混合後⁽¹¹⁾、10%テトラエチルホウ酸ナトリウム (NaBEt₄) 溶液 1mL を添加し、10 分間振とうして有機スズ化合物を誘導体化する。

に 1mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液 40mL を加えて 1 時間振とうし、過剰の NaBEt₄ をアルカリ分解する。

分解終了後、水 25mL 及びヘキサン 40mL を加え 10 分間振とう抽出する。

水層を別の分液ロート [B]に移し、ヘキサン 40mL を加えて同様の操作を繰り返す。

ヘキサン層を分液ロート [A] に合わせ、硫酸ナトリウムで脱水後、減圧クデルナダニッシュ (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 2mL まで濃縮する⁽¹²⁾⁽¹³⁾。

あらかじめヘキサン 10mL でコンディショニングしたフロリジルカートリッジカラムに濃縮液を負荷して流出液を回収し、さらにカートリッジに 5%ジエチルエーテル - ヘキサン混合溶液 6mL を流して有機スズ化合物を溶出させ、先の溶出液と合わせて、窒素を穏やかに吹き付けて 1mL まで濃縮する。

1 μ g/mL の内標準液を正確に 50 μ L 添加して測定溶液とする。

c) 操作ブランク試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、試料と同時に a) と b) の操作を行い操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(6) この添加量は、試料中濃度に換算すると 1 μ g/kg 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分かっている場合は、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(7) 嫌気性の底質の場合に、湿泥 1g に 0.1g の割合で加える。砂状で嫌気性ではない底質には、添加の必要はない。
- 注(8) サロゲート物質を試料に十分なじませるため、添加後 1 時間放置する。減圧ろ過が困難な場合は、遠心分離する。
- 注(9) 飽和臭化ナトリウム溶液を加えた際に、臭化ナトリウムが析出する可能性があるが、析出物も水層として操作する。
- 注(10) MPT はエタノール中で不安定であるため、試料前処理液を長く保存せず、できるだけ早く次の操作を行う。
- 注(11) pH 試験紙を用いて pH5 であることを確認する。pH5 になっていない場合は、緩衝液の添加量を増やす。その場合は、水の添加量を減らし、緩衝液と水の添加量の合計を 20mL とする。
- 注(12) DBT、TBT、MPT のエチル誘導体化合物に濃縮損失が見られるため注意が必要である。減圧クデルナダニッシュ (KD) 濃縮装置がない場合はロータリーエバポレーターを用いてもよい。ロータリーエバポレーターを使用する場合は、水浴上の温度を 40 以下とし、バキュームコントローラー等を用いて必要以上に減圧しないよう注意する。
- 注(13) 試料によっては濃縮液に濁りが生じて柔らかいゲル状になることがある。このような試料は次のクリーンアップ操作においてカートリッジが詰まるが、注射筒などで上から加圧すればよい。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。

(5) 測定

a) GC/MS または GC の分析条件の例

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

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

内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25 μ m

カラム温度：60 (2min)→20 /min→130 →10 /min→210 →5 /min→260 →
10 /min→300 (2min)

キャリアーガス：ヘリウム、流量 1mL/分 (定流量モード)

試料導入法：スプレットレス方式 (60sec)

注入口温度：270

質量分析計 (MS)

インターフェース温度：280

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：230

検出法：選択イオン検出法 (SIM 法)

感度：有機スズ化合物の 5pg から誘導されるエチル体が十分に確認できるように感度を調整する。

測定質量数：表 6.5-2 による

質量分析計の調整：MS に質量校正用標準物質 (PFTBA または PFK) を導入し、MS の質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能 { 質量数 (m/z) = 18 ~ 300 程度以上の範囲で 1 質量単位 (amu) 以上 } 等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.5-2 測定質量数

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
エチルジブチルスズ	261	263
エチルトリブチルスズ	263	261
エチルフェニルスズ	253	255
エチルジフェニルスズ	303	301
エチルトリフェニルスズ	351	349
[サロゲート物質]		
エチルジブチルスズ- <i>d</i> ₁₈	279	281
エチルトリブチルスズ- <i>d</i> ₂₇	318	316
エチルフェニルスズ- <i>d</i> ₅	260	258
エチルジフェニルスズ- <i>d</i> ₁₀	313	311
エチルトリフェニルスズ- <i>d</i> ₁₅	366	364
[内標準物質]		
テトラブチルスズ- <i>d</i> ₃₆	318	316

b) 検量線の作成

50mL 分液ロートに対象物質の 10 μ g/mL、1 μ g/mL 及び 0.1 μ g/mL の混合標準液を用いて対象物質を段階的に 0.01 ~ 5 μ g の範囲とサロゲート混合溶液(1 μ g/mL)500 μ L を添加した後、酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5) 1mL を加えて軽く振り混ぜる。

次に、2% NaBEt₄ 溶液 0.5mL を添加して 10 分間振とうする。これをヘキサン 3 mL で 2 回抽出し、抽出液を合わせて脱水後、内標準液 (1 μ g/mL) 500 μ L を正確に添加し、ヘキサンを加えて 10mL 定容として検量線作成用混合標準溶液とする。

この溶液 1 μ L をガスクロマトグラフに注入し、各対象物質はそれぞれのサロゲート物質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、縦軸にはピーク面積比を取り、検量線を作成する。また、サロゲート物質の回収率を計算するため、TeBT-*d*₃₆ に対する各サロゲート物質のピーク面積比をそれぞれ求めておく。

c) 試料の測定

検量線と同様に試験溶液 (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。

d) 定量及び計算

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、検体中の有機スズ化合物 (塩化物) 濃度を算出する。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、これに基づき、検体中のトリブチルスズ化合物濃度を算出する。

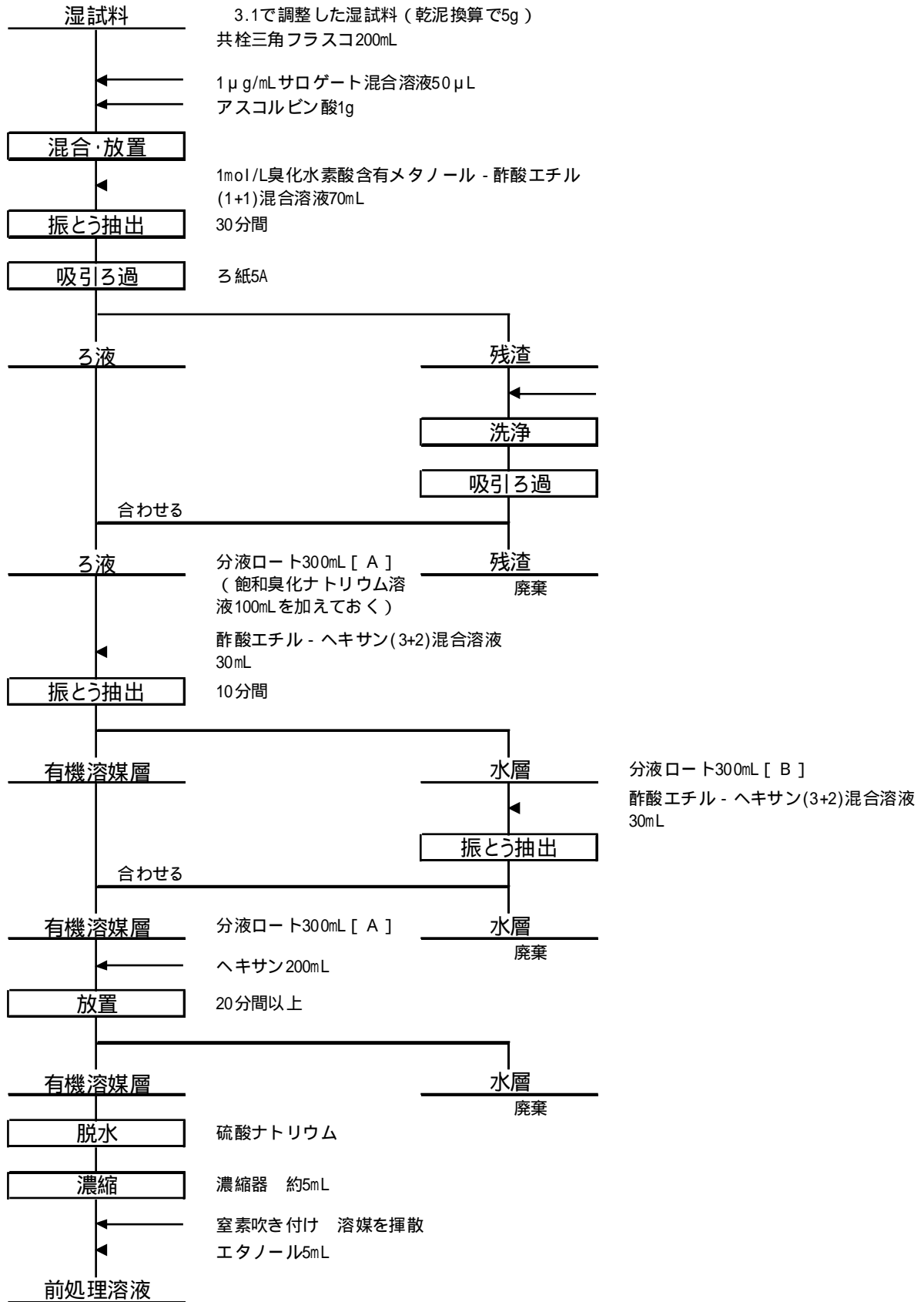
また、サロゲート化合物と内標準物質とのピーク面積比を求め、相対感度係数からサロゲート化合物の重量を求め、その回収率を求める。回収率が 70 ~ 130% の範囲内にある測定値を採用し、それ以外の測定値の場合は再測定する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

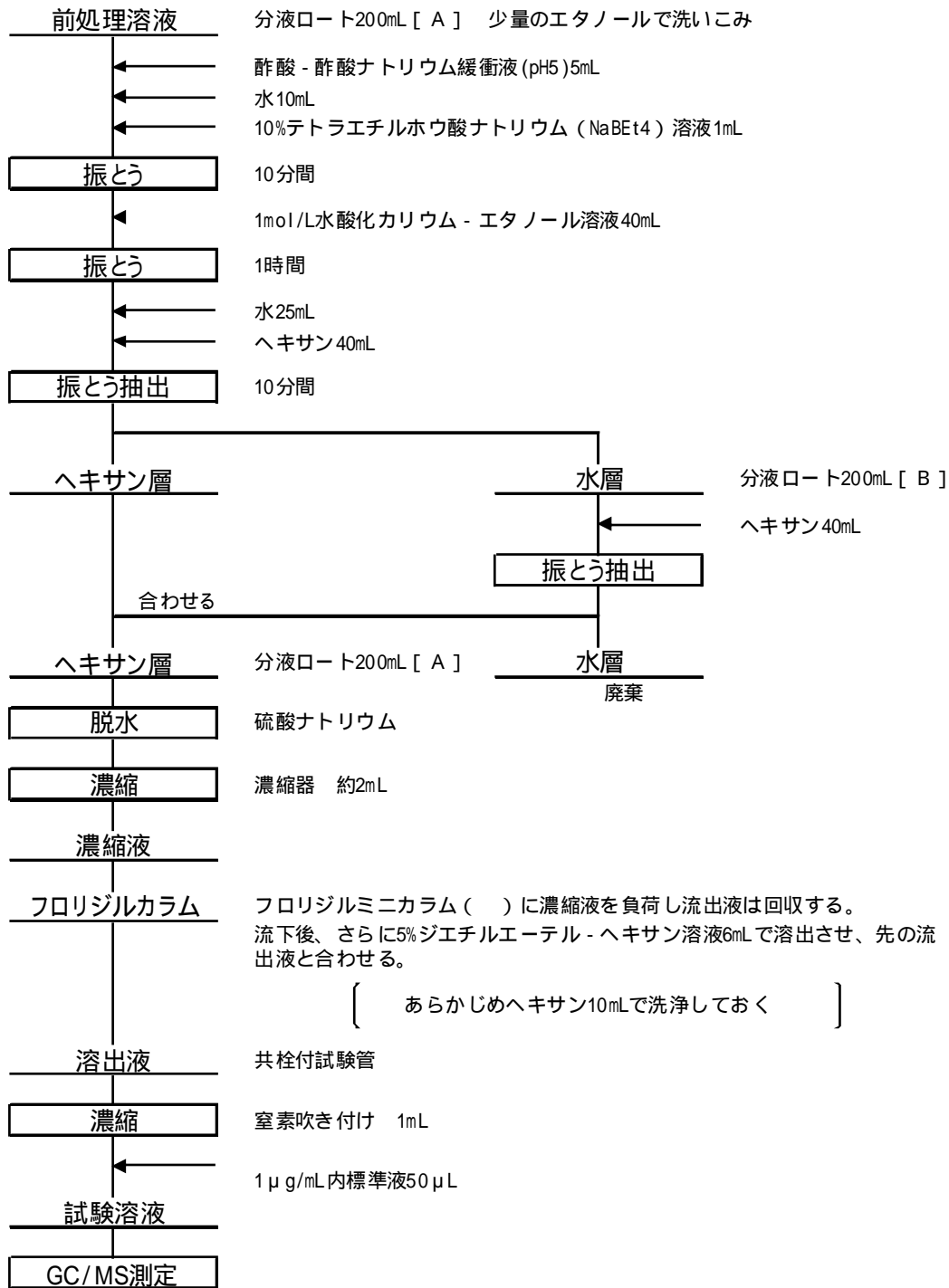
ここで、W : 試料採取量 (乾燥試料に換算した量) (g)

(6) 分析フローシート

a) 前処理溶液の調製



b) 試験溶液の調製 (エチル誘導体化) 及び測定



6.6 多環芳香族炭化水素

ここでの対象物質は、以下に示すものである。

ベンゾ[a]ピレンを含む多環芳香族炭化水素 (PAHs)

アントラセン、ベンゾ[a]アントラセン、ジベンゾ[a,h]アントラセン、フェナントレン、フルオランテン、ベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[k]フルオランテン、ベンゾ[j]フルオランテン、ピレン、ベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[e]ピレン、インデノ[1,2,3-cd]ピレン、クリセン、ペリレン、ベンゾ[ghi]ペリレン

スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体

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)、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; 2 種の異性体がある)

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(1) 分析法の概要

試料をアルカリ分解後、ヘキサンで溶媒抽出する。シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフ操作でクリーンアップし、濃縮後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定する。スチレン 2 量体、3 量体については 6.7 の注(1)及び注(11)に示す精油定量装置による前処理でベンゾフェノン、4-ニトロトルエンとの同時定量も可能である。

(2) 試薬

- a) 水：測定対象物質に相当する保持時間にピークを示さないもの⁽¹⁾
- b) ヘキサン、アセトン、ジクロロメタン、エタノール、メタノール：残留農薬試験用またはこれと同等以上のもの⁽²⁾
- c) 塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム：残留農薬試験用またはこれと同等以上のもの⁽³⁾
- d) 水酸化カリウム：JISK 8574 に規定する水酸化カリウム
- e) 塩化ナトリウム水溶液 (50g/L)：塩化ナトリウム 50g を水に溶かし、1L とした後、ヘキサンで洗浄したもの。
- f) 水酸化カリウム - エタノール溶液 (1mol/L)：水酸化カリウム 28.1g を少量の水に完全に溶かし、エタノールで 500mL としたものの。
- g) シリカゲルカラム：市販の大容量シリカゲルカートリッジ⁽⁴⁾またはコック付きガラス製カラム (内径 1cm、長さ 30cm) に、5%含水シリカゲル⁽⁵⁾5g をヘキサンを用いて湿式充填し、上部に硫酸ナトリウムを 2cm 積層したもの。使用前に、ヘキサン 10mL を通して洗浄する。
- h) 還元銅カラム：ロート (足外径 7mm) 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、窒素中で保存し、使用前に使用する溶媒で洗浄する。
- i) 多環芳香族炭化水素：市販標準品、または市販特級品・一級品
- j) スチレン 2 量体：以下に示すもの⁽⁶⁾。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)。
- k) スチレン 3 量体：以下に示すもの⁽⁶⁾。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; 2 種の異性体がある)

- l) サロゲート物質、内標準物質：アントラセン- d_{10} 、ジベンゾ[*a,h*]アントラセン- d_{14} 、フェナントレン- d_{10} 、フルオランテン- d_{10} 、ベンゾ[*k*]フルオランテン- d_{12} 、ピレン- d_{10} 、ベンゾ[*a*]ピレン- d_{12} 、ベンゾ[*e*]ピレン- d_{12} 、クリセン- d_{12} (7)、ペリレン- d_{12} 、ベンゾ[*ghi*]ペリレン- d_{12} 、*p*-ターフェニル- d_{14} は市販標準品
1,2-ジフェニルエタン- d_{14} 、1,3-ジフェニルプロパン- d_5 (DPP- d_5)、*cis*-1,2-ジフェニルシクロブタン- d_5 (*cis*-DP CB- d_5)、*trans*-1,2-ジフェニルシクロブタン- d_5 (*trans*-DP CB- d_5)、2,4-ジフェニル-1-ブテン- d_5 (DPB- d_5)、2,4-ジフェニル-1-ブテン- d_{10} (DPB- d_{10})、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン- d_5 (TPH- d_5)、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン- d_{15} (TPH- d_{15})、1e,3e,5a-トリフェニルシクロヘキサン- d_5 、1e,3e,5e-トリフェニルシクロヘキサン- d_5
- m) 標準液(各 1000 $\mu\text{g/mL}$)：標準物質 0.100g を各々別の全量フラスコ 100mL にはかり取り、少量のアセトン及びベンゼンに溶解した後、ヘキサンを標線まで加え、1000 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液とする。
- n) 混合標準液(10 $\mu\text{g/mL}$)：各標準溶液(1000 $\mu\text{g/mL}$) 1mL を全量フラスコ 100mL に取り、アセトンを標線まで加え、これを混合標準溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)とする。混合標準液は 1mL 中に各標準物質 10 μg を含む。
- o) 内標準液(1000 $\mu\text{g/mL}$)、サロゲート溶液(各 1000 $\mu\text{g/mL}$)：各内標準物質、サロゲート物質 0.100g を各々別の全量フラスコ 100mL にはかり取り、少量のアセトン及びベンゼンに溶解した後、ヘキサンを標線まで加え、1000 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液とする。
- p) 内標準混合溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)、サロゲート混合溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)：内標準液(1000 $\mu\text{g/mL}$)、サロゲート溶液(各 1000 $\mu\text{g/mL}$)1mL をそれぞれ全量フラスコ 100mL に取り、内標準液にはヘキサンを、サロゲート溶液にはアセトンを標線まで加え、これを内標準液(10 $\mu\text{g/mL}$)、サロゲート溶液(各 10 $\mu\text{g/mL}$)とする。

注(1) 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。必要に応じてヘキサンで洗浄する。いずれも使用前に操作ブランク試験を行い、使用の適否を確認すること。

注(2) いずれも使用前に操作ブランク試験を行い使用の適否を確認すること。

注(3) 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(4) 例えばメガボンドエルト SI(5g)、LC-Si(5g)等(備考1)

注(5) 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。シリカゲルを攪拌しながら、シリカゲル 95g に対して水 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、振とう機で 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ー中で 15 時間以上放置する。

注(6) スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体は不安定なものが多いと考えらるので試薬の保管条件を厳守するなど、保管に留意する。また、溶液中で不安定なものがあるので、長期の保存は避ける。保存した標準原液は、純度を確認してから使用する。

注(7) フルオレン- d_{10} 、フェナントレン d_{10} 、ヘキサクロロベンゼン- $^{13}\text{C}_6$ (HCB- $^{13}\text{C}_6$) 等を用いてもよい。

(3) 器具・装置**a) ガラス器具⁽⁸⁾**

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ - ルピペット等
遠沈管、ナス型フラスコ、ピーカー、分液ロート、共栓付試験管等

b) 加熱還流冷却装置**c) 遠心分離機****d) 振とう機****e) 濃縮器：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****f) マイクロシリンジ****g) ガスクロマトグラフ質量分析計****ガスクロマトグラフ**

キャピラリーカラム：内径 0.2 ~ 0.75mm、長さ 25 ~ 30m の石英ガラス製、硬質ガラス製または内面を不活性処理したステンレス鋼製の内壁に 50%フェニルメチルポリシロキサンを 0.1 ~ 3.0 μ m の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム(99.999%)を線速度 20 ~ 40 cm/sec の範囲に調節して用いる。

カラム槽温度：35 ~ 230 で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの

試料導入方法及び試料導入部温度：試料導入方法は、スプリットレス、コールドオンカラム、昇温気化方式等のいずれかの非分割方式が行えるもの。スプリットレス方式のものは 200 ~ 270、コールドオンカラム方式のものは 50 ~ 100 を保つ。また、昇温気化方式のものでは、初期温度 40 ~ 50 から 100 /min 程度で 250 ~ 280 まで昇温する。

質量分析計

インターフェース温度：150 ~ 280

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

検出器：選択イオン検出法 (SIM 法) が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

注(8) ガラス器具は洗浄後、水ですすいで乾燥させた後、アセトン及びヘキサンで洗浄したものを使用する。

(4) 前処理操作**a) 前処理⁽⁹⁾**

3.1 で調製した湿試料 (乾燥試料に換算で 20g 程度) をナス型フラスコ 200mL に取り、サロゲート混合標準液 (10 μ g/mL) を正確に 10 μ L⁽¹⁰⁾ 加えスパテルで十分混合する。

これに水酸化カリウム - エタノール溶液 (1mol/L) 100mL を加え、還流冷却管を付けて沸騰水浴中で 1 時間程度加熱還流する⁽¹¹⁾。

冷却後、その内容物を 100mL 共栓付き遠沈管に移し入れ、3000rpm で 10 分間遠心分離し、上澄をあらかじめ塩化ナトリウム水溶液 (50g/L) 400mL を入れた分液ロート 1L [A] 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。

水層は別の分液ロート 1L [B] に移し、ヘキサン 100mL を用いて抽出する。

ヘキサン層を分液ロート [A] に合わせて、塩化ナトリウム水溶液 (50g/L) 50mL で 2 回洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮器⁽¹²⁾ を用いて約 5mL まで濃縮する。

さらに、清浄な窒素を穏やかに吹き付けて 1mL とし、前処理液とする⁽¹³⁾。

b) 試験溶液の調製⁽¹⁴⁾

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 20mL を流し、溶出液は捨てる。

次に、5%アセトン - ヘキサン混合溶液 100mL を流す⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。

得られた溶出液をナス型フラスコで受け、濃縮器を用いて約 5mL まで濃縮する。

得られた溶液を褐色目盛付試験管に移し、清浄な窒素を穏やかに吹き付けて 0.3mL とし、内標準混合溶液(100 μ g/mL)を 10 μ L 添加し試験溶液とする。

c) 操作ブランク試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、試料と同様の処理をして得た試験溶液を操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(9) PAHs には光分解しやすい物質があるので、褐色の透明摺りのガラス器具を推奨する。また、実験操作中、太陽光、蛍光灯等に長時間さらさず、短時間で前処理を完了すること。なお、ヘキサン等の疎水性有機溶媒中で、冷暗所に保存した場合には、PAHs は長期間安定である。

注(10) 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。底質中には高濃度の PAHs が存在する場合があるので、測定試料液を希釈して測定することがある。サロゲート混合標準液、内標準液の添加量及び測定試料液の濃縮量は試料中の PAHs 濃度等の状況に応じて適宜変更する。測定時には GC/MS 検出器の飽和に注意する。

注(11) 擦り合せ部分にアルカリが付着すると、擦り合せが固着する。擦り合せ部分に水酸化カリウム - エタノール溶液を付着させない。

注(12) ロータリーエバポレーターを用いて濃縮する場合、水浴温度は 30 以下とする。また、ロータリーエバポレーター濃縮の場合には濃縮液量を約 5mL 以下にすると、キーパーの少ない場合、特に低分子の PAHs は損失する。

注(13) 窒素吹き付け濃縮の場合でも乾固させると、キーパーの少ない場合、PAHs は損失する。

注(14) シリカゲルカラムクロマトグラフ操作の代わりにフロリジルカラムクロマトグラフ操作を用いてもよい。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のを用いて、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ー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-Florisil 等で充填量が 5~10g 程度のもの) またはコック付きガラス製カラム (内径 1cm、長さ 30cm) に、フロリジル 7g をヘキサンを用いて湿式充填し、上部に硫酸ナトリウムを 2cm 積層したもの (備考 1)。

注(15) 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のを用いて、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 5%アセトン - ヘキサン溶液の量を求めておく。

注(16) 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。

(5) 測定

a) GC/MS条件の例⁽¹⁷⁾

GC/MSの分析条件の設定を行う。GC/MSの分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

ガスクロマトグラフ (GC)

使用カラム：メチルシリコンまたは5%フェニルメチルシリコン⁽¹⁸⁾

内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25 μ m

カラム温度⁽¹⁹⁾：50 (2min) 20 /min 120 7 /min 310 (10min)

注入口温度：300

キャリアーガス：ヘリウム (線速度 40cm / 秒)

試料導入法：スプリットレス方式 (1.5min パージ)

質量分析計 (MS)

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：230

測定質量数：多環芳香族炭化水素は表 6.6-1 による。スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体表 6.6-2 による。

質量分析計の調整：MSに質量校正用標準物質 (PFTBA または PFK) を導入し、MSの質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能 { 質量数 (m/z) = 18 ~ 300 程度以上の範囲で 1 質量単位 (amu) 以上 } 等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.6-1 測定質量数

測定物質	測定質量数	サロゲート
[対象物質]		
アントラセン	178, 152	A
ベンゾ[a]アントラセン	228, 114	H
ジベンゾ[a,h]アントラセン	278, 139	B
フェナントレン	178, 152	C
フルオランテン	202, 101	D
ベンゾ[b]フルオランテン	252, 126	E
ベンゾ[k]フルオランテン	252, 126	E
ベンゾ[j]フルオランテン	252, 126	E
ピレン	202, 101	F
ベンゾ[a]ピレン	252, 126	G
ベンゾ[e]ピレン	252, 126	G
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	276, 138	B
クリセン	228, 114	H
ペリレン	252, 125	I
ベンゾ[ghi]ペリレン	276, 138	J
[サロゲート物質]		
A. アントラセン-d ₁₀	188	

6.6 多環芳香族炭化水素

B.	ジベンゾ[a,h]アントラセン-d ₁₄	292
C.	フェナントレン-d ₁₀	188
D.	フルオランテン-d ₁₀	212
E.	ベンゾ[k]フルオランテン-d ₁₂	264
F.	ピレン-d ₁₀	212
G.	ベンゾ[e]ピレン-d ₁₂	264
H.	クリセン-d ₁₂	240
I.	ペリレン-d ₁₂	264
J.	ベンゾ[ghi]ペリレン-d ₁₂	288
[内標準物質]		
	<i>p</i> -ターフェニル-d ₁₄	244

表 6.6-2 測定質量数 (スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体) (19)

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[スチレン 2 量体]		
DPP	92	91, 196, 197
<i>cis</i> -DPCB, <i>trans</i> -DPCB	104	208
DPB	91	115, 130, 208
[スチレン 3 量体]		
TPH	91	117, 207, 208
PPET	91	129, 207, 208
TPCH	91	104, 312
[サロゲート物質]		
ベンゾ[a]ピレン-d ₁₂	264	
DPP-d ₅	97	
<i>cis</i> -DPCB-d ₅	109	
<i>trans</i> -DPCB-d ₅	109	
DPB-d ₅	213	
TPH-d ₅	212	
TPCH-d ₅	109	
[内標準物質]		
フルオランテン-d ₁₀	188	
クリセン-d ₁₂ (20)	240	
1,2-ジフェニルエタン-d ₁₄	196	

b) 検量線の作成

対象物質の混合標準液はヘキサンを用いて 0.005 ~ 1.0µg/mL を 5 段階以上作成する。

対象物質の混合標準液 (0.005 ~ 1.0µg/mL、5 段階以上) 1mL にサロゲート物質の混合標準液 (10 µg/mL) 10µL を添加した標準液 1 µL を GC/MS に注入し、各対象物質のピーク面積 (または高さ) とサロゲート物質のピーク面積 (または高さ) の比から検量線を作成する。

また、ヘキサン 1mL にサロゲート混合標準液 (10µg/mL) を 2、4、6、8、10、12 µL を添加し、更に内標準液 (10 µg/mL) 10µL 加えた標準液 1 µL を GC/MS に注入し、サロゲート

ト物質のピーク面積（または高さ）と内標準物質のピーク面積（または高さ）の比から検量線を作成する。これを用いて、試料中の各サロゲート物質の回収率を確認する。

c) 試料の測定

試験溶液 1 μ L 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⁽²¹⁾。

d) 定量及び計算

次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

ここで、W : 試料採取量（乾燥試料に換算した量）(g)

注(17) GC の注入口セプタムからゴーストピーク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 °C で一夜程度パージしてから使用する。

注(18) 例えば DB-1、HP-1、DB-5、HP-5、DB-17、TC-17、HP-50+、SPB-50 等（備考 1）。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。

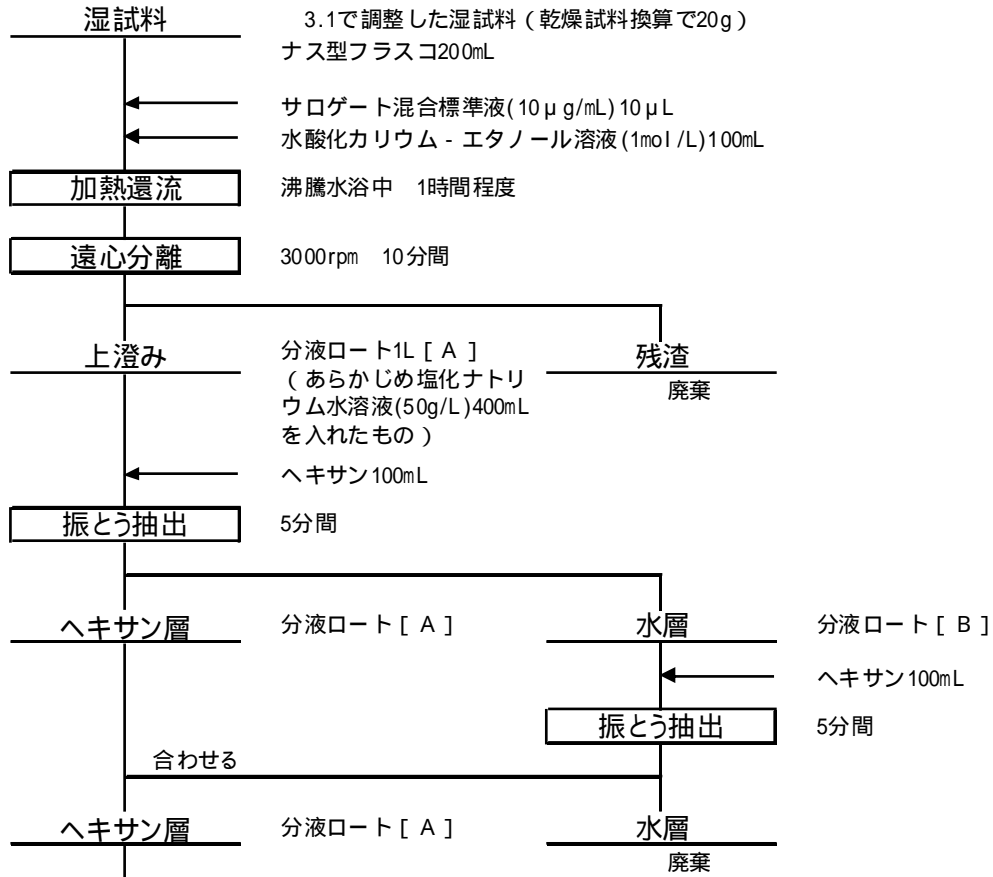
注(19) 昇温条件はベンゾ[a]アントラセンとクリセン、ベンゾ[e]ピレンとベンゾ[a]ピレン及びベリレンが完全に分離できる条件に設定する。この設定条件は、Ultra-1 カラムを使用すると容易である。使用するカラムは、予め温度限界より-10 °C で十分にエージングを行っておく。

注(20) 内標準物質として次の物質を用いた場合は、フルオレン-*d*₁₀ : 176、フェナントレン *d*₁₀ : 188、*p*-ターフェニル-*d*₁₄ : 244、HCB-¹³C₆ : 290 等をモニターイオンとして用いる。

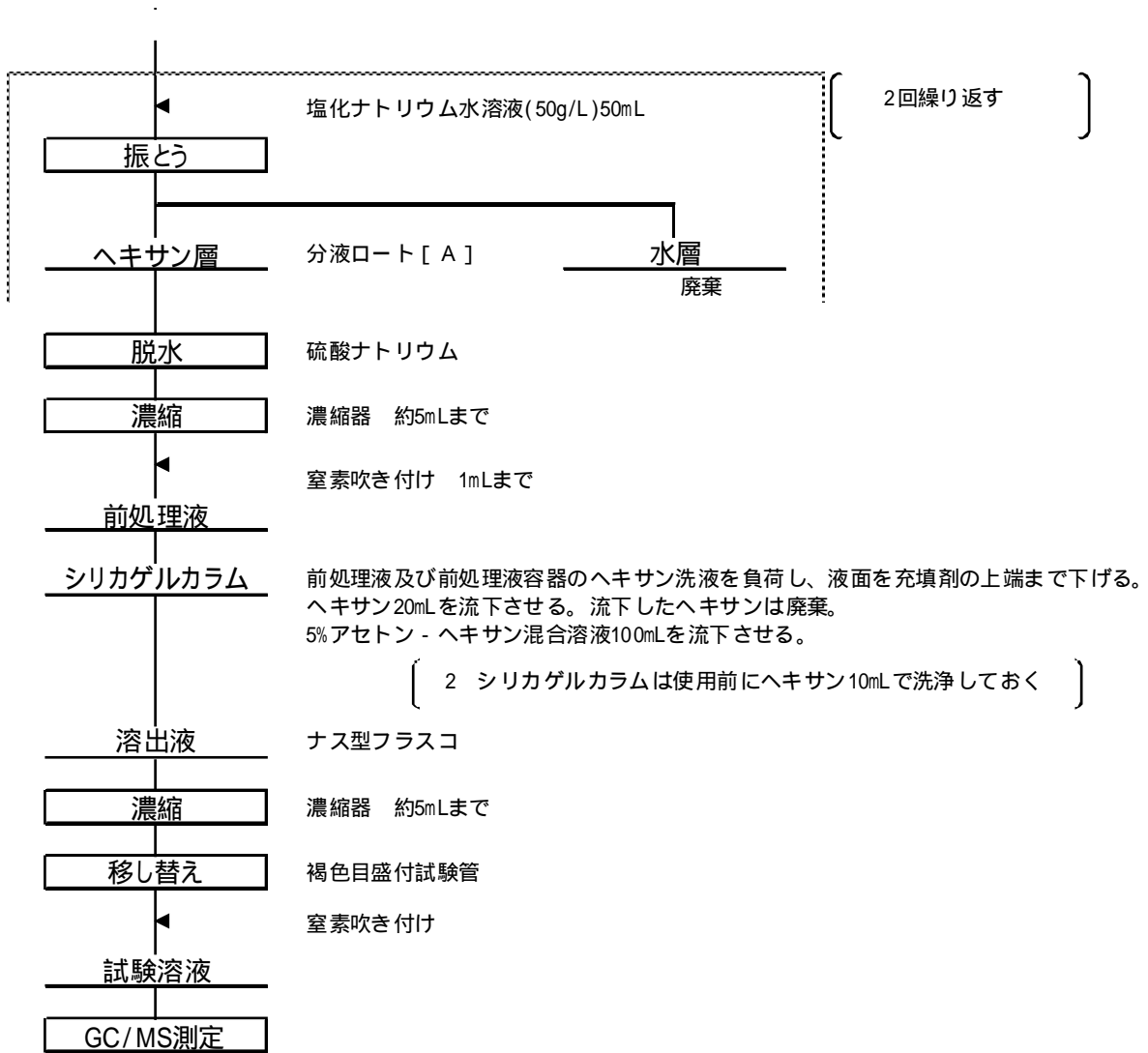
注(21) サロゲート物質を用いた場合は、内標準物質のかわりにサロゲート物質を用いて定量を行ってもよい。この場合、内標準物質はサロゲート物質の回収率の確認に用いる。

(6) 分析フローシート

a) 前処理



b) 前処理 (つづき) ~ 測定



6.7 ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン

(1) 分析法の概要

試料を水蒸気蒸留により対象物質を分離し、ヘキサンで抽出する⁽¹⁾。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濃縮した後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定する。

注(1) 精油定量装置を用いることにより、水蒸気蒸留と溶媒抽出の操作を同時に行うことが可能である。

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(2) 試薬

- a) 水：測定対象物質に相当する保持時間にピークを示さないもの⁽²⁾
- b) ヘキサン、アセトン：残留農薬試験用またはこれと同等以上のもの⁽³⁾
- c) 塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム：残留農薬試験用またはこれと同等以上のもの⁽⁴⁾
- d) ベンゾフェノン及び4-ニトロトルエン：市販の標準品
- e) 内標準物質、サロゲート物質：ベンゾフェノン- d_{10} 、フルオランテン- d_{10} 、ニトロベンゼン- d_5 、クリセン- d_{12} ⁽⁵⁾
- f) 標準液(1mg/mL)：標準物質 0.1g を各々別の全量フラスコ 100mL にはかり取り、ヘキサンを標線まで加え、標準液(1mg/mL)とする。
- g) 混合標準液(0.1mg/mL)：各標準液(1mg/mL)10mL を全量フラスコ 100mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、混合標準液(0.1mg/mL)とする。
- h) 内標準液(1mg/mL)、サロゲート溶液(1mg/mL)：各内標準物質、サロゲート物質 0.1g を各々別の全量フラスコ 100mL にはかり取り、ヘキサンを標線まで加え、内標準液(1mg/mL)またはサロゲート溶液(1mg/mL)とする。
- i) 内標準液(0.1mg/mL)、サロゲート溶液(0.1mg/mL)：内標準液(1mg/mL)10mL を全量フラスコ 100mL に取り、ヘキサンを標線まで加え、内標準液(0.1mg/mL)またはサロゲート溶液(0.1mg/mL)とする。
- j) シリカゲルカラム：市販の大容量シリカカートリッジ⁽⁶⁾またはコック付きガラス製カラム(内径 1cm、長さ 30cm)に、5%含水シリカゲル⁽⁷⁾5g をヘキサンを用いて湿式充填し、上部に硫酸ナトリウムを 2cm 積層したもの。使用前に、ヘキサン 10mL を通して洗浄する。
- k) 還元銅カラム：ロート(足外径 7mm)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、窒素中で保存し、使用直前に使用する溶媒で洗浄する。

注(2) 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。必要に応じてヘキサンで洗浄する。いずれも使用前に操作ブランク試験を行い、使用の適否を確認すること。

注(3) いずれも使用前に操作ブランク試験を行い使用の適否を確認すること

注(4) 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(5) フルオレン- d_{10} 、フェナントレン d_{10} 、*p*-ターフェニル- d_{14} 、ヘキサクロロベンゼン- $^{13}C_6$ (HCB- $^{13}C_6$) 等を用いてもよい。

注(6) 例えばメガボンドエルト SI(5g)、LC-Si(5g)等(備考1)

注(7) 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。シリカゲルを攪拌しながら、シリカゲル 95g に対して水 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、振とう機で 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ー中で 15 時間以上放置する。

(3) 器具・装置

a) ガラス器具⁽⁸⁾

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ-ルピペット等

遠沈管、ナス型フラスコ、ビーカー、分液ロート、共栓付試験管等

b) 水蒸気蒸留装置

c) 振とう機

d) 濃縮器：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

e) マイクロシリンジ

f) ガスクロマトグラフ質量分析計

ガスクロマトグラフ(GC)

キャピラリーカラム：内径 0.2~約 0.7mm、長さ 15~30m の石英ガラス製、硬質ガラス製または内面を不活性処理したステンレス鋼製の内壁にジメチルポリシロキサンを 0.1~1.0 μ m の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム(99.999%)を線速度 20~40cm/sec の範囲に調節して用いる。

カラム槽温度：35~230 で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。

試料導入方法及び試料導入部温度：試料導入方法は、スプリットレス、コールドオンカラム、昇温気化方式等のいずれかの非分割方式が行えるもの。スプリットレス方式のものは 200~270、コールドオンカラム方式のものは 50~100 を保つ。また、昇温気化方式のものでは、初期温度 40~50 から 100 /min 程度で 250~280 まで昇温する。

質量分析計(MS)

インターフェース温度：150~280

イオン化法：電子衝撃イオン化法(EI法)

検出器：選択イオン検出法(SIM法)が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

(4) 前処理操作

a) 前処理

3.1 で調製した湿試料 20g を丸底フラスコ 1L に取り⁽⁸⁾、所定量のサロゲート物質⁽⁹⁾を添加して混合する。

混合後、水蒸気蒸留を行い、留出液 200mL を採取する⁽¹⁰⁾。

留出液に塩化ナトリウム 10g を加えて溶かした後、ヘキサン 20mL を加え 10 分間振とう抽出する⁽¹¹⁾。

水層は別のヘキサン 20mL を用いて 10 分間振とう抽出する。

ヘキサン層を合わせて硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮器を用いて約 5mL まで濃縮する。

さらに、清浄な窒素を穏やかに吹き付け 1mL とし、前処理液とする。

b) 試験溶液の調製⁽¹²⁾

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 20mL を流し、溶出液は捨てる。

次に、5%アセトン - ヘキサン混合溶液 100mL を流す⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾。

得られた溶出液をナス型フラスコで受け、濃縮器を用いて約 5mL まで濃縮する。

得られた溶液を褐色目盛付試験管に移し、清浄な窒素を穏やかに吹き付けて 0.3mL とし、内標準液(0.1mg/mL)を 10 μ L 添加し試験溶液とする。

c) 操作ブランク試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、試料と同様の処理をして得た試験溶液を操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(8) 30mL 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(9) 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 6.7-1 の中から必要な物質を選定し、GC/MS の感度に応じて適当量を添加する。サロゲート物質の選定に当たり、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 6.7-1 サロゲート物質の例

対象物質	サロゲート物質
ベンゾフェノン	ベンゾフェノン- d_{10}
4-ニトロトルエン	ニトロベンゼン- d_5

注(10) 対象物質の揮散による損失を防ぐため、留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(11) 精油定量装置を用いる場合は、試料 20g を 500mL 丸底フラスコまたはナスフラスコに取り、所定量のサロゲート物質及び水 350mL を加えて、混合した後、ヘキサン 5 ~ 10mL 及び沸騰石を入れ、あらかじめ水を入れた精油定量装置に接続する。マントルヒーターでヘキサンが留出するまで穏やかに加熱後、さらに 90 分間加熱し蒸留する。冷却後、精油定量装置内の水を捨て、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。精油定量装置の一例を図 6.7-1 に示す。

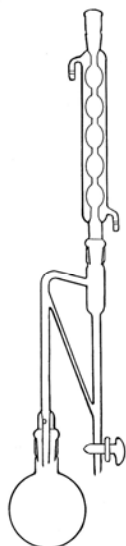


図 6.7-1 精油定量装置の一例

注(12) 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調製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ー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：市販の大容量フロリジルカートリッジ (メガボンドエリート FL、LC-Florisil 等で充填量が 5~10g 程度のもの) またはコック付きガラス製カラム (内径 1cm、長さ 30cm) に、フロリジル 7g をヘキサンを用いて湿式充填し、上部に硫酸ナトリウムを 2cm 積層したもの (備考 1)。

注(13) 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 5%アセトン - ヘキサン混合溶液の量を求めておく。

注(14) 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。または、蒸留時に試料フラスコに硫酸銅 5g 程度を加えてもよい。

(5) 測定

a) GC/MS条件の例⁽¹⁵⁾

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

ガスクロマトグラフ (GC)

使用カラム：メチルシリコンまたは 5%フェニルメチルシリコン化学結合型 (内径 0.2~0.75mm、長さ 15~30m、膜厚 0.1~3.0 μ m 程度) カラムまたは同等以上の分離性能をもつもの⁽¹⁶⁾

カラム温度：50 (1min) (20 /min) 300 (30min)

注入口温度：250

キャリアーガス：ヘリウム (線速度 40cm / 秒)

試料導入法：スプリットレス方式 (60sec)

質量分析計 (MS)

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：230

検出法：選択イオン検出法 (SIM 法)

測定質量数：表 6.7-2 による。

質量分析計の調整：MS に質量校正用標準物質 (PFTBA または PFK) を導入し、MS の質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能 { 質量数 (m/z) = 18~300 程度以上の範囲で 1 質量単位 (amu) 以上 } 等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.7-2 測定質量数⁽¹⁷⁾

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
ベンゾフェノン	105	182
4-ニトロトルエン	137	91
[サロゲート物質、内標準物質]		
ベンゾフェノン- <i>d</i> ₁₀	192	
ニトロベンゼン- <i>d</i> ₅	128	
フルオランテン- <i>d</i> ₁₀	188	
クリセン- <i>d</i> ₁₂	240	

b) 検量線

標準混合液(0.1mg/mL)を順次ヘキサンで希釈し、0.1～5μg/mL 程度の濃度の標準液を調製する。

各標準液 0.3mL に内標準液 (0.1mg/mL) 10μL を添加し、その 1μL 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、検量線を作成する⁽¹⁸⁾。

c) 試料の測定

試験溶液 1μL 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⁽¹⁸⁾。

d) 定量及び計算

次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

ここで、W : 試料採取量 (乾燥試料に換算した量) (g)

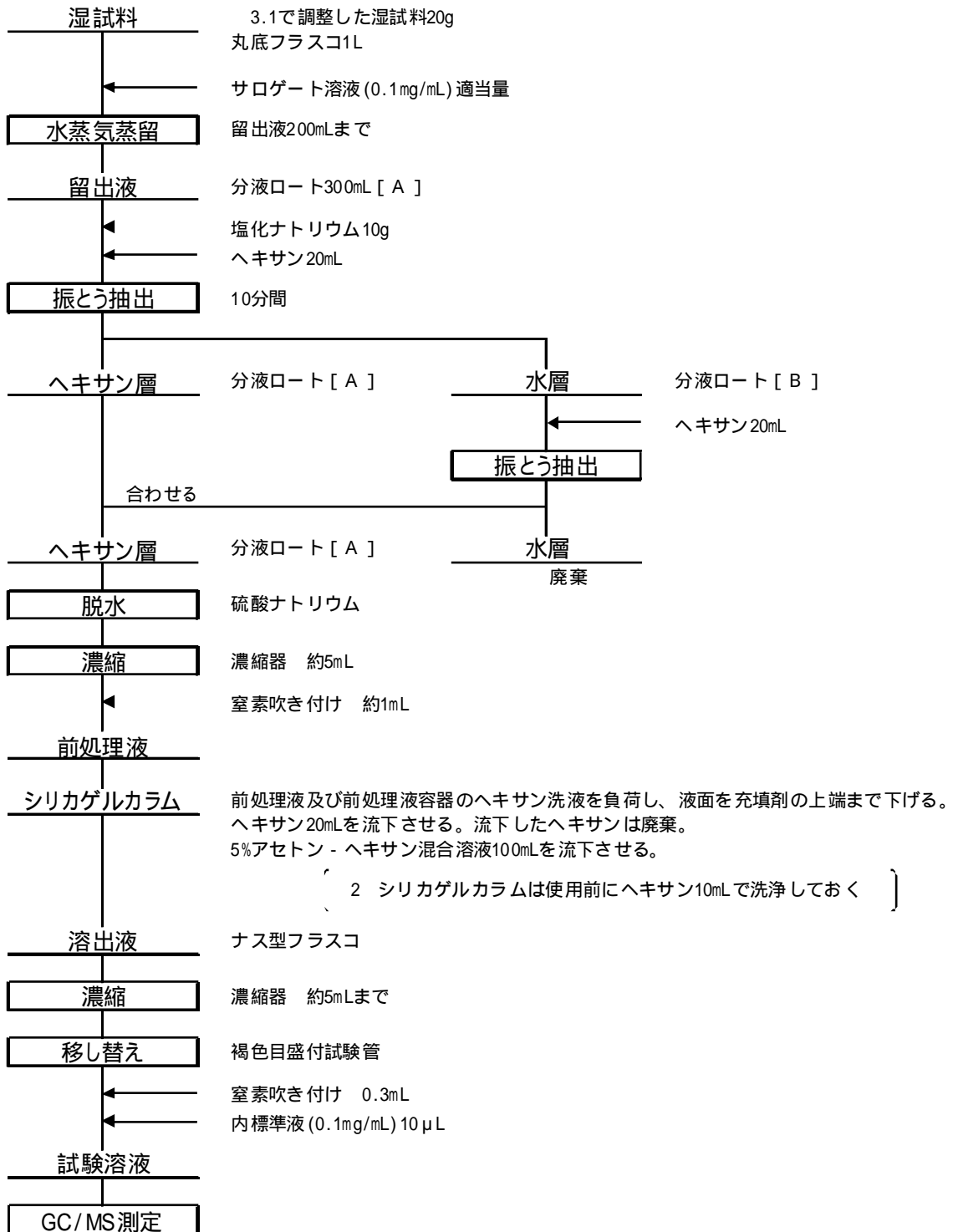
注(15) GC の注入口セプタムからゴーストピークが出現することがある。その場合には、セプタムを GC に装着後、270℃ で一夜程度パーージしてから使用する。

注(16) 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(17) 内標準物質として次の物質を用いた場合は、フルオレン-*d*₁₀ : 176、フェナントレン *d*₁₀ : 188、*p*-ターフェニル-*d*₁₄ : 244、HCB-¹³C₆ : 290 等をモニターイオンとして用いる。

注(18) 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ってもよい。この場合、内標準物質はサロゲート物質の回収率の確認に用いる。

(6) 分析フローシート



6.8 フタル酸エステル類

本分析方法で対象とするフタル酸エステル類は、下記に示すものをいう⁽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。ただし、*フタル酸ジペンチル、*フタル酸ジヘキシルは混合物⁽²⁾であるが、本分析方法ではフタル酸ジ-*n*-ペンチル、フタル酸ジ-*n*-ヘキシルを対象とする。

注(1) 水中から検出されるフタル酸エステル類では、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。

注(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。

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(1) 測定方法の概要

試料を振とう機と超音波照射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、フタル酸エステル画分を分取し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)で測定する。GPCを使用しない場合は、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、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)で測定する。

なお、フタル酸エステル類は試薬、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ため、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。クリーンルームがない場合は、空気との接触量、接触時間を最小にする必要がある。

(2) 試薬⁽³⁾

- a) 水⁽⁴⁾：フタル酸エステル類を含まない水（例として清浄な地下水や有機溶媒で洗浄した水）⁽⁵⁾を活性炭カートリッジ⁽⁶⁾に通したもの（備考1）
- b) アセトニトリル：残留農薬・PCB試験用またはこれと同等以上のもの⁽⁷⁾。使用直前に開封する。
- c) ヘキサン：残留農薬・PCB試験用またはこれと同等以上のもの⁽⁷⁾。使用直前に開封する。
- d) フタル酸エステル標準物質：市販標準試薬、または特級試薬。ヘキサンに溶解させ、1mg/mL標準液を調製する。暗所-5以下で保存する。
- e) サロゲート物質（フタル酸ジエチル-*d*₄、フタル酸ジイソブチル-*d*₄、フタル酸ジ-*n*-ブチル-*d*₄、フタル酸ジ-*n*-ヘブチル-*d*₄、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-*d*₄、フタル酸ブチルベンジル-*d*₄、フタル酸ジシクロヘキシル-*d*₄）：市販標準試薬。ヘキサンに溶解し100µg/mL標準液を調製し、この標準液をアセトンに溶解して、0.1µg/mLの混合標準液も調製する。暗所-5以下で保存する。
- f) 内標準物質（4-クロロトルエン-*d*₄、ナフタレン-*d*₈、ピフェニル-*d*₁₀、フェナントレン *d*₁₀、フルオランテン-*d*₁₀、クリセン-*d*₁₂、ペリレン-*d*₁₂）：市販標準試薬。ヘキサンに溶解し1mg/mL標準液を調製し、またこの標準液をアセトンに溶解して、1~10µg/mLの混合標準液を調製する。暗所-5以下で保存する。
- g) 硫酸ナトリウム：PCB・フタル酸エステル試験用⁽⁸⁾。使用直前に開封する。

- h) 塩化ナトリウム：JIS K8150 に規定する塩化ナトリウムまたは同等品以上のものを 500～700 で 8 時間加熱後、汚染のないところで放冷したもの。
- i) 含水フロリジル：残留農薬試験用フロリジル(60/100 メッシュ)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取り、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。
- j) ヘリウム：ヘリウム(純度 99.999 %以上)
- k) 窒素：窒素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。ただし、フタル酸エステル類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。
- l) その他の試薬：特級試薬。使用直前に開封する。

注(3) 有機溶媒、試薬、水は定量に支障のないものを使用する。有機溶媒、試薬、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。

注(4) 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。あらかじめチェックすれば、使用可能なミネラルウォーターもある。

注(5) 水を貯蔵するタンクは、塩化ビニール製で、かつ空気との接触口に活性炭をつけていない場合が多い。タンクは、四フッ化エチレン樹脂製にし、空気との接触口は必ず活性炭をつける。

注(6) 活性炭カートリッジはステンレス製、もしくは四フッ化エチレン樹脂製であることが望ましい。

注(7) 開封とともに、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、新たに未開封のものを開封して使用する。なお、1000 倍残留農薬・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。

注(8) 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 時間程度加熱した後、汚染のない場所で放冷してから用いる。

(3) 器具及び装置

a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ - ルピペット等：使用時にアセトン及びヘキサンで洗浄して用いる。

共栓付遠沈管、ナス型フラスコ、ピーカー、分液ロート、共栓付試験管、カラムクロマトグラフ管等⁹⁾：200 以上の温度で 2 時間以上加熱し、汚染のないところで放冷する。摺り合わせのある器具については SPC 摺り合わせ、または透明摺り合わせを使用する。

b) 超音波照射器(超音波洗浄器でもよい)

c) 遠心分離機

d) 振とう機

e) 濃縮器：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

f) マイクロシリンジ

g) 高速液体クロマトグラフィー用充てんカラム：水溶媒有機溶媒両用タイプで排除限界分子量 40,000 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)に充てんしたもの¹⁰⁾

h) 含水フロリジルカラム：長さ 30cm、内径 1cm のガラス製カラムクロマトグラフ管に 2g のフロリジルをヘキサンを用いて湿式充填し、この上部に硫酸ナトリウムを 1cm 積層したもの

i) **高速液体クロマトグラフ**：GPC カラムを使用して、フタル酸エステル画分を分取するのに使用する。

j) **ガスクロマトグラフ質量分析計**

ガスクロマトグラフ (GC)

キャピラリーカラム：内径 0.2～約 0.7mm、長さ 15～30m の石英ガラス製、硬質ガラス製または内面を不活性処理したステンレス鋼製の内壁にジメチルポリシロキサンを 0.1～1.0 μ m の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム (99.999%) を線速度 20～40cm/sec の範囲に調節して用いる。

カラム槽温度：35～230 で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの

カラム槽温度：35～230 で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの

試料導入方法及び試料導入部温度：試料導入方法は、スプリットレス、コールドオンカラム、昇温気化方式等のいずれかの非分割方式が行えるもの。スプリットレス方式のものは 200～270、コールドオンカラム方式のものは 50～100 を保つ。また、昇温気化方式のものでは、初期温度 40～50 から 100 /min 程度で 250～280 まで昇温する。

質量分析計 (MS)

インターフェース温度：150～280

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

検出器：選択イオン検出法 (SIM 法) が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

注(9) 試料採取容器にもガラス製のものをを用いる。他のガラス器具と同様に 200 以上の温度で 2 時間以上加熱した後、放冷したものを使用する。

注(10) 一例として、Shodex Asahipak GF-310HQ (備考 1)。

(4) 前処理操作

a) **前処理液の調製**

3.1 で調製した湿試料 20g を共栓付遠沈管 100mL に取り、所定量のサロゲート物質⁽¹¹⁾ を添加後、アセトニトリル⁽¹²⁾30mL を加えて 5 分間振とうする。

さらに、超音波照射器を用いて 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前処理液とする。前処理液はメスシリンダー等で液量を測っておく。

b) **試験溶液の調製**

以下の b)-1 GPC 分画または b)-2 溶媒抽出のいずれかの方法で a)の前処理液のクリーンアップを行い、試験溶液を調製する。

b)-1 **GPCによる分画**

前処理液の 15mL を共栓付試験管に移し、窒素を穏やかに吹き付けて 1～5mL⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾に濃縮する。

の濃縮液を下記の条件例を参考に GPC カラムに注入して、フタル酸エステル画分⁽¹⁵⁾を共栓付試験管に分取する。

[GPC カラムによるフタル酸エステル分画の分取条件]⁽¹⁶⁾

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⁽¹⁰⁾

移動相：アセトニトリル⁽¹⁷⁾

流速：最高分離能を示す流速（一例として、内径 8mm の Shodex Asahipak GF-310HQ の場合には 0.5 ~ 0.6mL/min）（備考 1）

カラム槽温度：30

で得たフタル酸エステル画分に窒素を穏やかに吹き付けて 1mL に濃縮⁽¹³⁾し、さらに硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、内標準液を所定量添加し、試験溶液⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾とする。

b)-2 溶媒抽出

前処理液の 15mL を、あらかじめ 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硫酸ナトリウムで脱水後、40 以下の水浴中で濃縮器⁽²⁰⁾を用いて、10mL 程度まで濃縮する。

この濃縮液を含水フロリジルカラムに負荷し、1mL/分程度の流速で液面を充填剤上端まで下げた後、ヘキサン 50mL⁽²¹⁾を同流速で流す。このヘキサン溶出液は捨てる。

含水フロリジルカラムから 0.5%アセトニトリル - ヘキサン溶液 100mL⁽²²⁾を用いて、1mL/分程度の流速でフタル酸エステルを溶出させる。この溶出液は硫酸ナトリウムで脱水後、40 以下の水浴中で濃縮器⁽²⁰⁾を用いて、10mL 程度まで濃縮し、さらに窒素を穏やかに吹き付けて 1mL⁽²³⁾とし、内標準液を所定量添加し、試験溶液⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾とする。

c) 操作ブランク試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、a)及び b)の操作を行って試験溶液を調製したものを操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、試料の検出量から操作ブランク試験の検出量を差し引いて試料の検出量とする。

注(11) 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が、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よい。

注(12) 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。

注(13) SPC 試験管を約 60 の水浴中に浸けて、窒素を吹き付けると、アセトニトリル抽出液及びアセトニトリル画分は比較的早く濃縮できる。

注(14) 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。

注(15) 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、あらかじめフタル酸エステル画分を確認すること。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。

注(16) 高濃度のフタル酸エステル類を注入すると、注入口及び流路のラインを汚すので、特に注意すること。

注(17) 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類との分離が多少悪い。

注(18) 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。それ以外のフタル酸エステルについては可能であるが、多数の夾雑物が発生するので、推奨しない。

注(19) 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、シリカゲルカラムクロマトグラフィー - など）を行う。

注(20) 活性炭で汚染を除去した窒素・空気等で減圧を解除する。

注(21) 含水フロリジルカラムクロマトグラフィーの第1画分には、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、測定溶液を還元銅カラムに通して、硫黄を除去する。

注(22) あらかじ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。

注(23) 窒素吹き付けで濃縮する際、絶対に乾固させないこと。乾固させると、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。

(5) 測定

a) GC/MS測定条件の例

GC/MSの分析条件の設定を行う。GC/MSの分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

ガスクロマトグラフ

使用カラム：メチルシリコンまたは5%フェニルメチルシリコン

（内径0.25mm、長さ30m、液相膜厚0.25 μ m）

カラム温度：50（2min）（約10 / min）270（10min）

注入口温度：210～250

試料導入法：スプリットレス方式（60sec）、1 μ L注入⁽²⁴⁾

キャリアーガス：ヘリウム、平均線速度：40cm / 秒

質量分析計

イオン化法：電子衝撃イオン化法（EI法）

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：220～280（機種により200以下でも可能）

検出法：選択イオン検出法（SIM法）⁽²⁵⁾

測定質量数：表6.8-1による。

質量分析計の調整：MSに質量校正用標準物質（PFTBAまたはPFK）を導入し、MSの質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能{質量数(m/z)=18～300程度以上の範囲で1質量単位(amu)以上}等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.8-1 測定質量数

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
フタル酸ジエチル	149	177
フタル酸ジ- <i>n</i> -プロピル	149	209
フタル酸ジイソプロピル	149	209
フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル	149	223
フタル酸ジペンチル	149	237
フタル酸ジ- <i>n</i> -ヘキシル	149	251
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	149	167
フタル酸ジシクロヘキシル	149	167
フタル酸ブチルベンジル	149	206
[サロゲート物質]		
フタル酸ジエチル- <i>d</i> ₄	153	
フタル酸ジイソブチル- <i>d</i> ₄	153	
フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル- <i>d</i> ₄	153	
フタル酸ジ- <i>n</i> -ヘプチル- <i>d</i> ₄	153	
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル- <i>d</i> ₄	153	
フタル酸ブチルベンジル- <i>d</i> ₄	153	
フタル酸ジシクロヘキシル- <i>d</i> ₄	153	
[内標準物質]		
4-クロロトルエン- <i>d</i> ₄	130	
ナフタレン- <i>d</i> ₈	136	
ビフェニル- <i>d</i> ₁₀	164	
フェナントレン <i>d</i> ₁₀	188	
フルオランテン- <i>d</i> ₁₀	212	
クリセン- <i>d</i> ₁₂	240	
ペリレン- <i>d</i> ₁₂	264	

b) 検量線⁽²⁶⁾

含水フロリジルカラムでクリーンアップした場合には、フタル酸エステル混合標準液を適宜ヘキササンで希釈し5段階以上の濃度の標準液を調製する。GPCカラムでフタル酸エステル画分を分取した場合には、フタル酸エステル混合標準液を適宜アセトニトリルで希釈したものを調製する。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。

絶対検量線法を用いる場合⁽²⁷⁾は、で調製した混合標準液1 μ LをGC/MSに注入し、得られた各対象物質のピーク面積値(または高さ)から対象物質ごとに検量線を作成する。

内標準法を用いる場合は、で調製した混合標準液1mLに所定量の内標準物質を加え、その1 μ LをGC/MSに注入し、各対象物質と内標準物質とのピーク面積値(または高さ)の比から対象物質ごとに検量線を作成する。

サロゲートを用いる場合は、で調製した混合標準液1mLに所定量の内標準物質及びサロゲート物質を加え、その1 μ LをGC/MSに注入し、各対象物質とサロゲート物質とのピーク面積値(または高さ)の比から対象物質ごとに検量線を作成する。

c) 試料の測定

試験溶液 1 μ L を GC/MS に注入して測定を行う。

d) 定量及び計算

絶対検量線法を用いる場合⁽²⁷⁾は、試験溶液 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（または高さ）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、試験溶液 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（または高さ）の比から検量線により検出量を求める。

サロゲートを用いる場合⁽²⁸⁾は、試験溶液 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（または高さ）の比から検量線により検出量を求める。

～ のいずれかで求めた検出量から次式により試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{試料濃度 } (\mu\text{g/kg}) = \text{検出量 (ng)} \times \frac{\text{試験溶液量 (mL)}}{\text{注入量 } (\mu\text{L})} \times \frac{\text{粗抽出液量}}{\text{分取量}} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

ここで、W (g) : 試料採取量（乾燥試料に換算した量）

注(24) ゴーストピークがでない 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ト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ピークの原因になるので、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。

注(25) 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。

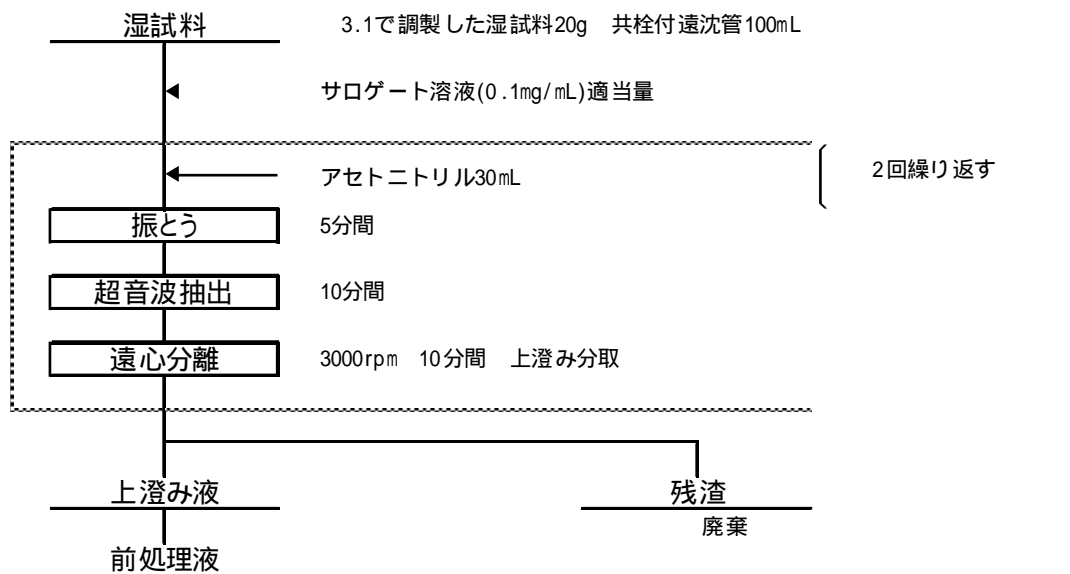
注(26) 各対象物質標準液、サロゲート物質標準液、内標準物質の標準液は汚染されやすい。汚染が認められた場合には、再度調製する。

注(27) 絶対検量線法では定量値のばらつきが大きいので、内標準法またはサロゲート法を推奨する。

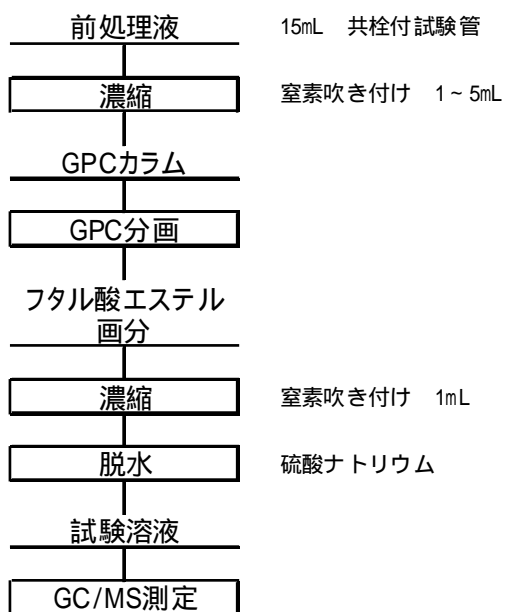
注(28) サロゲートを用いる場合は、サロゲート化合物と内標準物質とのピーク面積比を求め、相対感度係数からサロゲート化合物の重量を求め、その回収率を求めておく。この回収率が 70～130%の範囲内にある測定値を採用し、それ以外の測定値は棄却する。

(6) 分析フローシート

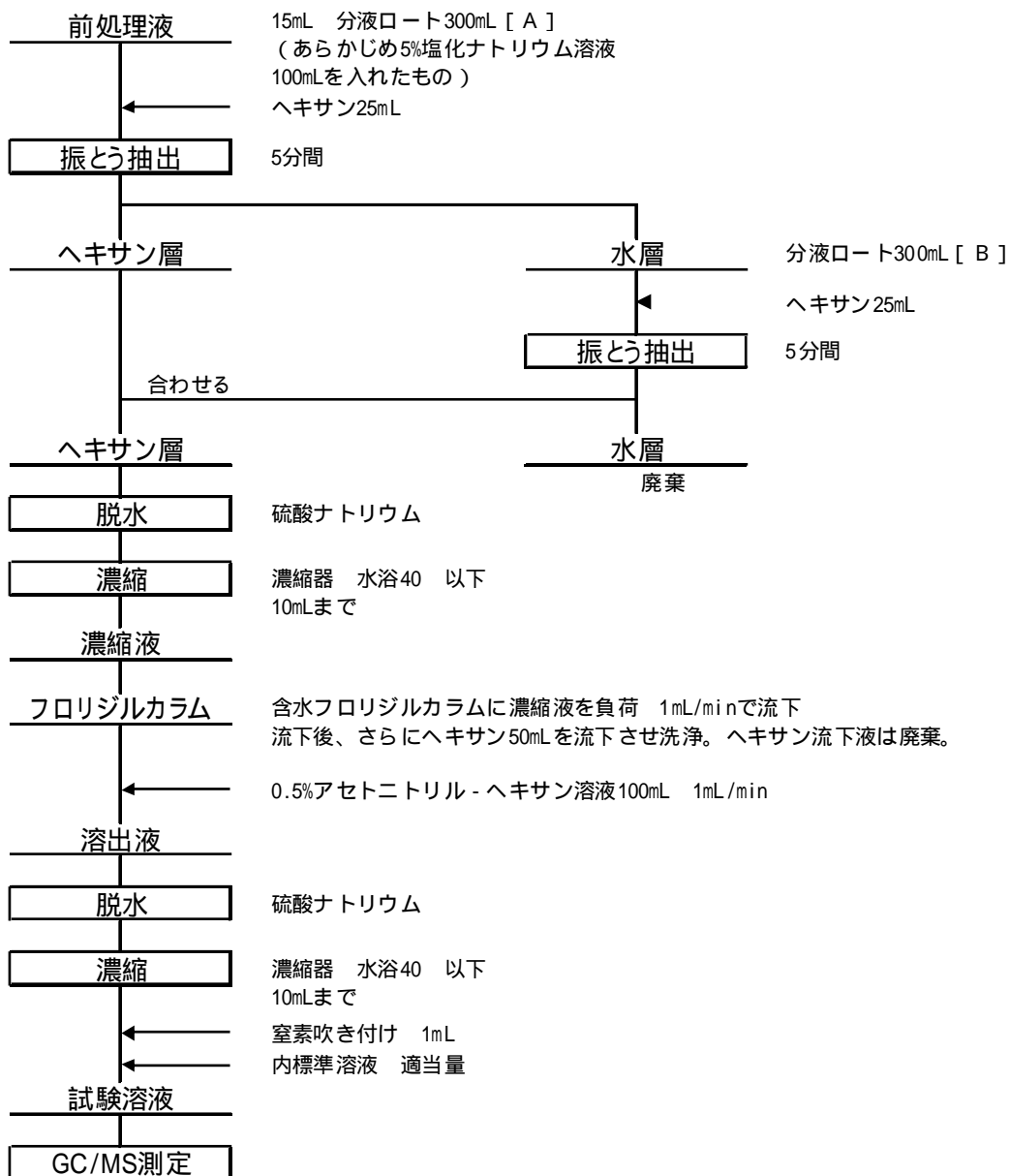
a) 前処理



b) クリーンアップ (GPCによる分画)



c) クリーンアップ (溶媒抽出)



6.9 アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)

(1) 測定方法の概要

試料を振とう機と超音波照射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、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定する。

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⁽¹⁾ため、分析を行うに当たり、十分注意する。

注(1) アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA) はフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) の代替品として使用されている。そのため、実験室内は DEHP と同様に DEHA で汚染されている可能性がある。

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(2) 試薬

- a) 水：アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルを含まない水（例として清浄な地下水やヘキサンで洗浄した水）⁽²⁾を活性炭カートリッジに通したもの（備考 1）
- b) アセトニトリル：残留農薬・PCB 試験用またはこれと同等以上のもの⁽³⁾
- c) ヘキサン：残留農薬・PCB 試験用またはこれと同等以上のもの⁽³⁾
- d) アセトン：残留農薬・PCB 試験用またはこれと同等以上のもの⁽³⁾
- e) 硫酸ナトリウム：PCB・フタル酸エステル試験用⁽⁴⁾
- f) 塩化ナトリウム：JIS K8150 に規定する塩化ナトリウムまたは同等品以上のもの 500～700 で 8 時間程度加熱した後、汚染のない場所で放冷して用いる。
- g) 含水フロリジル：残留農薬試験用フロリジル (60/100 メッシュ) 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取り、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。
- h) その他の試薬：特級試薬。
- i) アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA) 標準液：市販標準試薬をヘキサンに溶解し 1mg/mL の標準液を調製する。暗所-5 以下で保存する。1mg/mL の標準液をヘキサンで適宜希釈して所定濃度の混合標準液を調製する。
- j) サロゲート溶液 (DEHA- d_6)：市販標準試薬をヘキサンに溶解し 0.1mg/mL 標準原液を調製する。暗所-5 以下で保存する。0.1mg/mL のサロゲート溶液をアセトンに溶解して、0.1 μ g/mL のサロゲート溶液も調製する。
- k) 内標準液 (フルオランテン- d_{10})：市販標準試薬をヘキサンに溶解し 1mg/mL の内標準液を調製する。暗所-5 以下で保存する。1mg/mL の内標準液 (フルオランテン- d_{10}) をアセトンに溶解して、1～10 μ g/mL の内標準液も調製する。

注(2) 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 DEHA を含まない水とみなせる。

注(3) 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-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。

注(4) 無視できない汚染が認められる場合には、500～700 で 8 時間程度加熱した後、汚染のない場所で放冷してから用いる。

(3) 器具及び装置

a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ - ルピペット等：使用時にアセトン及びヘキサンで洗浄して用いる。

共栓付遠沈管、ナス型フラスコ、ビーカー、分液ロート、共栓付試験管、カラムクロマトグラフ管等⁽⁶⁾：200 以上の温度で 2 時間以上加熱し、汚染のないところで放冷する。摺り合わせのある器具については SPC 摺り合わせ、または透明摺り合わせを使用する。

b) 超音波照射器 (超音波洗浄器でもよい)

c) 遠心分離機

d) 振とう機

e) 濃縮器：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

f) マイクロシリンジ

g) 含水フロリジルカラム：長さ 30cm、内径 1cm のカラムクロマトグラフ管に 5g の含水フロリジルをヘキサンを用いて湿式充填し、この上部に硫酸ナトリウムを 1cm 積層したもの

h) ガスクロマトグラフ質量分析計

ガスクロマトグラフ (GC)

キャピラリーカラム：内径 0.2～約 0.7mm、長さ 15～30m の石英ガラス製、硬質ガラス製または内面を不活性処理したステンレス鋼製の内壁にジメチルポリシロキサンを 0.1～1.0 μ m の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム (99.999%) を線速度 20～40cm/sec の範囲に調節して用いる。

カラム槽温度：35～230 で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。

試料導入方法及び試料導入部温度：試料導入方法は、スプリットレス、コールドオンカラム、昇温気化方式等のいずれかの非分割方式が行えるもの。スプリットレス方式のものは 200～270、コールドオンカラム方式のものは 50～100 を保つ。また、昇温気化方式のものでは、初期温度 40～50 から 100 /min 程度で 250～280 まで昇温する。

質量分析計 (MS)

インターフェース温度：150～280

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

検出器：選択イオン検出法 (SIM 法) が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

注(5) 試料採取容器にもガラス製のものを用いる。他のガラス器具と同様に 200 以上の温度で 2 時間以上加熱した後、放冷したものを使用する。

(4) 前処理操作

a) 試料の前処理

3.1 で調製した湿試料 20g を共栓付遠沈管 100mL に取り、所定量のサロゲート物質⁽⁶⁾を添加後、アセトニトリル⁽⁷⁾50mL を加えて 5 分間振とうする。

6.9 アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA)

さらに、超音波照射器を用いて 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、あらかじめ 5%塩化ナトリウム水溶液 500mL⁽⁸⁾を入れた分液漏斗 1L 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硫酸ナトリウムで脱水後、30 以下の水浴中でロータリーエバポレーターを用いて、約 10mL まで濃縮する。

さらに窒素を穏やかに吹き付けて約 5mL とし、前処理液とする。

b) 試験溶液の調製

前処理液を含水フロリジルカラムに負荷し、1mL/分程度の流速で液面を充填剤上端まで下げた後、ヘキサン 50mL⁽⁹⁾を同流速で流す。このヘキサン溶出液は捨てる。

含水フロリジルカラムから 1%アセトニトリル - ヘキサン溶液 100mL⁽¹⁰⁾を用いて、1mL/分程度の流速でアジピン酸ジ-2-エチルヘキシルを溶出させる。この溶出液を硫酸ナトリウムで脱水し、30 以下で水浴中ロータリーエバポレーターを用いて、10mL 程度まで濃縮し、さらに窒素を穏やかに吹き付けて 1mL⁽¹¹⁾とし、試験溶液とする。

ただし、クリーンアップ不足である場合には、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー⁽¹²⁾、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⁽¹³⁾を行う。

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

c) 操作ブランク試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、試料と同様の処理をして得た試験溶液を操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(6) サロゲート法で測定しない場合には省略する。

注(7) 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。

注(8) 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、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。

注(9) 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、試験溶液を還元銅カラム(有機元素分析用還元銅、60~80メッシュ)に通して、硫黄を除去する。

注(10) あらかじ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。

注(11) DEHA の感度はよくないので、0.25mL まで濃縮するが多い。

注(12) 試験溶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で湿式充填し、この上層に硫酸ナトリウムを 2cm の高さに積層して調製)に負荷し、ヘキサン 50mL を流し、溶出液を捨てる。次に、5%アセトン - ヘキサン溶液 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、試験溶液を調製する。

[含水シリカゲルの作成方法] 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 に対して水 5g を滴下して密栓し、発熱が

6.9 アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA)

終了するまで、静かに混合する。さらに振とう機で 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。

注(13) 試験溶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 5%含水フロリジルをヘキサンで湿式充填し、この上層に硫酸ナトリウムを 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、2%アセトン - ヘキサン溶液 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、試験溶液を調製する。

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、振とう機で 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ー中に保存する。

[精製活性炭の作成方法] ダルコ G 活性炭 100g を 2L の分液ロートに取り、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紙で減圧ろ過し、少量のアセトンでろ過・洗浄する。130 で乾燥後、乳鉢で粉碎し、さらに 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。

(5) 測定

a) GC/MS測定条件の例⁽¹⁴⁾

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

ガスクロマトグラフ (GC)

使用カラム：メチルシリコンまたは 5%フェニルメチルシリコン

(内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25 μ m)

カラム温度：50 (2min) (約 10 /min) 260 (10min)

注入口温度：250

試料導入法：スプリットレス方式 (60sec)、1 μ L 注入

キャリアーガス：ヘリウム、平均線速度：40cm / 秒

質量分析計 (MS)

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：220 ~ 280 (機種により 200 以下でも可能)

検出法：選択イオン検出法 (SIM 法)⁽¹⁵⁾

測定質量数：表 6.9-1 による。

表 6.9-1 測定質量数

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
DEHA	129	147
[サロゲート物質]		
DEHA- <i>d</i> ₈	137	
[内標準物質]		
フルオランテン- <i>d</i> ₁₀	212	

b) 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（または高さ）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- d_{10} を加え、その 1 μ L を GC に注入し、DEHA とフルオランテン- d_{10} とのピーク面積値（または高さ）の比から検量線を作成する。

サロゲート物質を用いる場合は、所定濃度の DEHA に所定量のフルオランテン- d_{10} 及び DEHA- d_8 を加え、その 1 μ L を GC に注入し、DEHA と DEHA- d_8 とのピーク面積値（または高さ）の比から検量線を作成する。

c) 試料の測定

試験溶液の 1 μ L を GC/MS に注入して、測定を行う。

d) 定量及び計算

絶対検量線法を用いる場合⁽¹⁶⁾は、試験溶液 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（または高さ）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、試験溶液 1 μ L を GC に注入し、得られた各対象物質と内標準物質とのピーク面積値（または高さ）の比から検量線により検出量を求める。

サロゲート法を用いる場合⁽¹⁷⁾は、試験溶液 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（または高さ）の比から検量線により検出量を求める。

～ のいずれかで求めた検出量から次式により試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{試料濃度 } (\mu\text{g/kg}) = \text{検出量 (ng)} \times \frac{\text{試験溶液量 (mL)}}{\text{注入量 } (\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

ここで、W (g) : 試料採取量 (乾燥試料に換算した量)

注(14) セプタムブリードがあるので、セプタムを GC に装着し、270 にして 1 晩パーージしたものを使用する。注入口に油滴等が付着し、ピーク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。

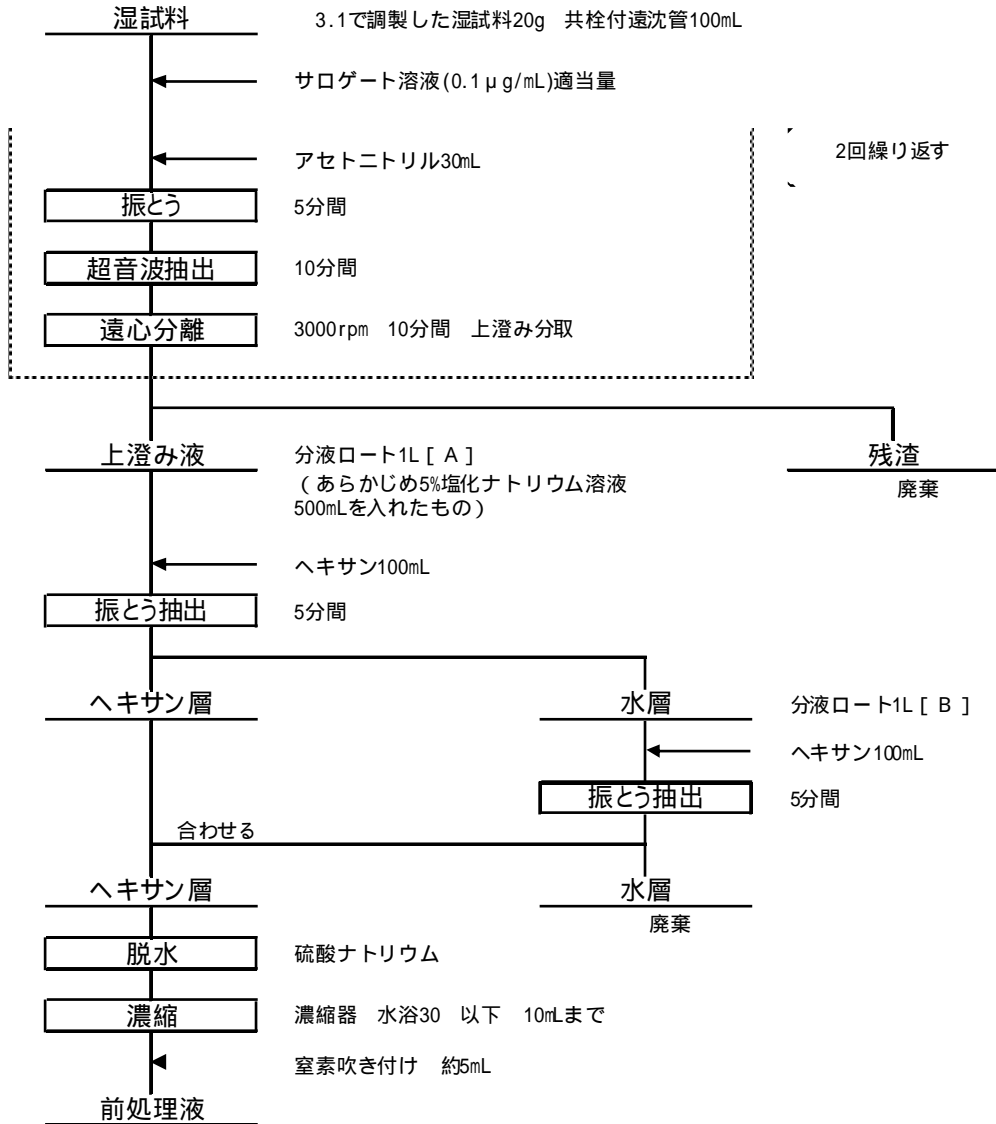
注(15) 十分な感度が得られる場合には SIM 測定の代わりにスキャン測定でもよい。

注(16) 絶対検量線法では定量値のばらつきが大きいので、内標準法またはサロゲート法を推奨する。

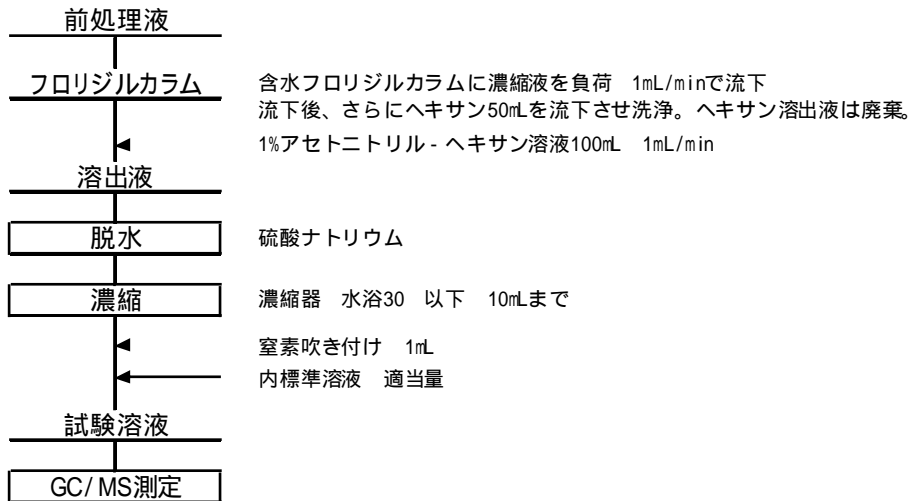
注(17) サロゲートを用いる場合は、サロゲート化合物と内標準物質とのピーク面積比を求め、相対感度係数からサロゲート化合物の重量を求め、その回収率を求めておく。この回収率が 70 ~ 130% の範囲内にある測定値を採用し、それ以外の測定値は棄却する。

(6) 分析フローシート

a) 前処理



b) 試験溶液の調製



6.10 アルキルフェノール類、ビスフェノール A 及びクロロフェノール類

アルキルフェノール類、ビスフェノール A 及びクロロフェノール類とは、次に挙げる物質を示す。

アルキルフェノール類

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

ビスフェノール A 及びクロロフェノール類

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

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

6.10.1 トリメチルシリル誘導体化法

(1) 測定方法の概要

試料を酸性条件下、アセトンで抽出後、塩化ナトリウム溶液を加えてジクロロメタンで抽出する。ジクロロメタン層を脱水、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する。アルキルフェノール類はそのまま、ビスフェノール A 及びクロロフェノール類はトリメチルシリル (TMS) 誘導体化を行い、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて測定する。

(2) 試薬

- a) 水：蒸留水を活性炭カートリッジで処理したもの。
- b) アセトン：残留農薬試験用
- c) ジクロロメタン：残留農薬試験用
- d) エタノール：残留農薬試験用
- e) 硫酸ナトリウム：残留農薬試験用。または JIS K 8987 に規定する硫酸ナトリウムを 700 で 8 時間加熱後、放冷したもの。
- f) 塩化ナトリウム：残留農薬試験用。または JIS K8150 に規定する塩化ナトリウムまたは同等品以上のものを 700 で 8 時間加熱後、デシケーターで放冷したもの。
- g) 5% 塩化ナトリウム溶液：水 1L に塩化ナトリウム 50g を加えて溶解させ、活性炭カートリッジで処理したもの。
- h) シリカゲル：残留農薬試験用 (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 1 日以上経ったものは、再加熱して使用する。また、シリカゲルは、ロットごとに活性が異なるので、ロットごとに溶出パターンを確認する。
- i) 5% 含水シリカゲル：シリカゲル 95g に対して水 5mL を攪拌しながら滴下して密栓し、発熱が終了するまで静かに混合する。さらに、振とう機で 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ー中でさらに 15 時間以上放置する。
- j) 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。
- k) *N*,*O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(BSTFA): ガスクロマトグラフ用(冷所保管)
- l) ヘリウム：ヘリウム (純度 99.999 vol%以上)
- m) 窒素：JIS K 1107 に規定する高純度窒素 1 級 (純度 99.999vol%以上)。
- n) アルキルフェノール類標準液：全ての標準液は、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。
4-*t*-ブチルフェノール標準液(1mg/mL)：4-*t*-ブチルフェノール標準品 0.100g をそれぞれ全

量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。

4-*n*-ペンチルフェノール標準液(1mg/mL):4-*n*-ペンチルフェノール標準品 0.100g を全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。

4-*n*-ヘキシルフェノール標準液(1mg/mL):4-*n*-ヘキシルフェノール標準品 0.100g を全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。

4-*h*-プチルフェノール標準液(1mg/mL):4-*h*-プチルフェノール標準品 0.100g を全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。

4-*t*-オクチルフェノール標準液(1mg/mL):4-*t*-オクチルフェノール標準品 0.100g を全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。

4-*n*-オクチルフェノール標準液(1mg/mL):4-*n*-オクチルフェノール標準品 0.100g を全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。

ノニルフェノール標準液(1mg/mL):ノニルフェノール標準原液標準品 0.100g を全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。

- o) アルキルフェノール類混合標準液(10 µg/mL) (ノニルフェノールは 100 µg/mL)⁽¹⁾: 全量フラスコ 100mL にアルキルフェノール類標準液(1mg/mL)を各 1mL(ノニルフェノールは 10mL)取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。ただし、添加回収率試験として試料に添加する混合標準液はアセトンで調製する。
- p) ビスフェノール A 及びクロロフェノール類標準液: 全ての標準液は、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。
- ビスフェノール A 標準液(1mg/mL): ビスフェノール A 標準品 0.100g をそれぞれ全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。
- 2,4-ジクロロフェノール標準液(1mg/mL): 2,4-ジクロロフェノール標準品 0.100g を全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。
- ペンタクロロフェノール標準液(1mg/mL): ペンタクロロフェノール標準品 0.100g を全量フラスコ 100mL にはかり取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。
- q) ビスフェノール A 及びクロロフェノール類混合標準液(10 µg/mL): 全量フラスコ 100mL にビスフェノール A 及びクロロフェノール類標準液(1mg/mL)を各 1mL を取り、ジクロロメタンを標線まで加えたもの。ただし、添加回収率試験として試料に添加する混合標準液はアセトンで調製する。
- r) 内標準物質
- アルキルフェノール類用: ナフタレン-*d*₈、フェナントレン-*d*₁₀ の 10µg/mL ジクロロメタン溶液を調製する。
- ビスフェノール A 及びクロロフェノール類用: ピレン-*d*₁₀ の 1µg/mL ジクロロメタン溶液を調製する。
- s) サロゲート物質 (ビスフェノール A-*d*₁₆ 及び 4-*n*-ノニルフェノール-*d*₁₀): ビスフェノール A-*d*₁₆ 及び 4-*n*-ノニルフェノール-*d*₁₀ の 10µg/mL アセトン溶液を調製する。

注(1) ノニルフェノールは多くの異性体混合物であるため、他の物質の 10 倍濃度とする。なお、通常環境中には他の物質よりも存在量が多い。

(3) 器具及び装置

a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ - ルピペット等: あらかじめ水及びアセトンで洗浄したもの。

共栓付遠沈管、ナス型フラスコ、ビーカー、分液ロート、共栓付試験管、カラムクロマト

グラフ管等：あらかじめ水及びアセトンで洗浄したもの。

- b) 超音波照射器（超音波洗浄器でもよい）
- c) 遠心分離機：3000rpm 遠心分離可能なもの。定温（約 15℃以下）に保てる機器が望ましい。
- d) 振とう機
- e) 濃縮器：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
- f) マイクロシリンジ
- g) 濃縮器：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。濃縮時における試料溶媒に接触する部分のガラス器具類をあらかじめ水及びアセトンで洗浄したもの。
- h) シリカゲルカラム：四フッ化エチレン樹脂コック付きの長さ 30cm、内径 10mm のガラス製カラムクロマトグラフ管に 5%含水シリカゲル 15g をヘキサンを用いて湿式充填し、上部に硫酸ナトリウムを 2cm 積層したもの。使用前に、ヘキサン 100mL で洗浄する。
- i) マイクロシリンジ。
- j) ガスクロマトグラフ質量分析計

ガスクロマトグラフ（GC）

キャピラリーカラム⁽²⁾：内径 0.2～約 0.7mm、長さ 15～30m の石英ガラス製、硬質ガラス製または内面を不活性処理したステンレス鋼製の内壁にジメチルポリシロキサンを 0.1～1.0 μ m の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム（99.999%）を線速度 20～40cm/sec の範囲に調節して用いる。

カラム槽温度：35～230℃で 0.5℃以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。

試料導入方法及び試料導入部温度：試料導入方法は、スプリットレス、コールドオンカラム、昇温気化方式等のいずれかの非分割方式が行えるもの。スプリットレス方式のものは 200～270℃、コールドオンカラム方式のものは 50～100℃を保つ。また、昇温気化方式のものでは、初期温度 40～50℃から 100℃/min 程度で 250～280℃まで昇温する。

質量分析計（MS）

インターフェース温度：150～280℃

イオン化法：電子衝撃イオン化法（EI 法）

検出器：選択イオン検出法（SIM 法）が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

注(2) 例えば、J&W DB-5ms、Restek Rtx-5、HP HP-5ms、Supelco SPB-5、SGE BPX-5 等がある。

(4) 前処理操作

a) 抽出操作

3.1 で調製した湿試料 20～30g を共栓付遠沈管 100mL にはかりとり、塩酸 5mL 及びサロゲート物質（ビスフェノール A-d₁₆）2 μ g を加えて混合し、アセトン 50mL を加えて 10 分間振とう抽出する。

さらに、超音波照射器を用いて 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硫酸ナトリウムで脱水し、濃縮

器で 5mL 程度まで濃縮して共栓付試験管に移し、さらに窒素吹き付けで約 0.5mL まで濃縮して前処理液とする。

b) クリーンアップ

a) の前処理液をシリカゲルカラムに負荷し、液面をカラム充填剤上端まで下げる。

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⁽³⁾。

得られた溶出液を濃縮器と窒素吹き付けで約 2mL まで濃縮する。

の濃縮液にジクロロメタン 15mL を加えて混合し、硫酸ナトリウムで脱水後、窒素吹き付けで約 2mL まで濃縮したものを試料溶液とする。

c) 試験溶液の調製

試料溶液をアルキルフェノール類用とビスフェノール A 及びクロロフェノール類用の 2 つに分け、アルキルフェノール類用は c)-1 を、ビスフェノール A 及びクロロフェノール類用は c)-2 の操作によりそれぞれ試験溶液を調製する。

c)-1 アルキルフェノール類

内標準物質(ナフタレン- d_8 及びフェナントレン d_{10} の各 1 μ g/mL ヘキサン溶液)1mL を添加後、さらに窒素気流吹き付けで 1mL まで濃縮し、試験溶液とする。

c)-2 ビスフェノール A 及びクロロフェノール類

ビスフェノール A 及びクロロフェノール類用に *N,O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (BSTFA) 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 時間放置し、トリメチルシリル (TMS) 誘導体化する。

この後、窒素を吹き付けて 0.2~0.3mL まで濃縮する。

内標準物質(ピレン- d_{10} 1 μ g/mL ジクロロメタン溶液)1mL を添加後、さらに 1mL まで濃縮し、試験溶液とする⁽⁴⁾。

d) 操作ブランク試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、試料と同様の処理をして得た試験溶液を操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(3) 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(4) 誘導体化後、窒素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*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド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。また、十分な精度管理を実施すれば、アルキルフェノール類も TMS 誘導体化してもよい。

(5) 測定

a) GC/MS測定条件の例

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

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。内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25 μ m

カラム温度：60 (1min) (10 /min) 280 (5min)

注入口温度：280

試料導入方法：スプリットレス方式(60sec)、1 μ L 注入

キャリアーガス：ヘリウム (平均線速度：40cm / sec)

質量分析計 (MS)

インターフェース温度：280

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：250

検出法：選択イオン検出法 (SIM 法)

測定質量数：表 6.10-1 及び表 6.10-2 による。

質量分析計の調整：MS に質量校正用標準物質 (PFTBA または PFK) を導入し、MS の質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能 { 質量数 (m/z) = 18 ~ 300 程度以上の範囲で 1 質量単位 (amu) 以上 } 等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.10-1 アルキルフェノール類の測定質量数及び保持指標

測定物質	CAS Registry Number	PTRI*	測定質量数	
			定量用	確認用
4- <i>t</i> -ブチルフェノール	98-54-4	1306	135	107
4- <i>n</i> -ペンチルフェノール	14938-35-3	1461	107	164
4- <i>n</i> -ヘキシルフェノール	2446-69-7	1522	107	178
4- <i>n</i> -ヘプチルフェノール	1987-50-4	1668	107	192
4- <i>t</i> -オクチルフェノール	140-66-9	1614	135	107
4- <i>n</i> -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- <i>d</i> ₈	-	<1200	136	
フェナントレン- <i>d</i> ₁₀	-	1794	188	

* : PTRI, Programmed Temperature Retention Index

表 6.10-2 ビスフェノール A 及びクロロフェノール類の測定質量数及び保持指標

測定物質	PTRI	測定質量数	
		定量用	確認用
ビスフェノール A の TMS 誘導体化物	2230	357	372
2,4-ジクロロフェノールの TMS 誘導体化物	1372	219	234
ペンタクロロフェノールの TMS 誘導体化物	1883	323	338
ビスフェノール A- <i>d</i> ₁₆ の TMS 誘導体化物	-	368	386
ピレン- <i>d</i> ₁₀	2140	212	

* : PTRI, Programmed Temperature Retention Index

PTRI は *n*-アルカン基準物質とし、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。

b) 検量線

b)-1 アルキルフェノール類

アルキルフェノール類混合標準液を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 段階以上に適宜希釈したもの 1mL に所定量の内標準物質とサロゲート物質を加え、窒素吹き付けにより 1mL としたものを検量線用試験溶液とする。

得られた検量線用試験溶液 1 μ L を GC/MS に注入し、各対象物質と内標準物質とのピーク面積値（または高さ）の比から対象物質ごとに検量線を作成する。検量線の作成は測定時ごとに行う。

b)-2 ビスフェノールA及びクロロフェノール類

混合標準液を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 段階以上適宜希釈したもの 1mL に、所定量のサロゲート物質を加え、窒素を吹きつけて 0.5mL 程度に濃縮し、(4)c)-2 ~ により TMS 誘導体化、内標準の添加等の操作を行い 1mL としたものを検量線用試験溶液とする。

得られた検量線用試験溶液 1 μ L を GC/MS に注入し、各対象物質のトリメチルシリル誘導体化物と内標準物質（サロゲート物質）とのピーク面積値（または高さ）の比から対象物質ごとに検量線を作成する。検量線の作成は測定時ごとに行う。

c) 試料の測定

測定対象物質及び内標準物質（サロゲート物質）の測定質量数（表 6.10-1、表 6.10-2 に示す質量数⁽⁵⁾）を 1 つの測定対象物質について 2 つ以上設定する。

検量線作成後、試験溶液、操作ブランク試験溶液及び添加回収試験液の 1 μ L を GC/MS に注入して、測定を行う。

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。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。

で設定した測定対象物質の定量用質量数と確認用質量数についてクロマトグラムを記録し、2 つ以上の測定質量数のピーク面積比を計算する。

測定対象物質の定量用質量数及び内標準物質のピーク面積を求める。

d) 同定、定量及び計算

同定

対象物質あるいは対象物質のトリメチルシリル（TMS）誘導体化物の定量用質量数及び確認用質量数のピークが、検量線に登録された保持時間と ± 5 秒以内に出現し、確認用質量数と定量用質量数のピーク強度比が検量線測定の強度比と $\pm 20\%$ 以内の差で合っていれば、物質が存在していると見なす。

定量⁽⁶⁾

得られた各対象物質あるいは対象物質の TMS 誘導体化物と内標準（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、次式により、試料中の対象物質の濃度を計算する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

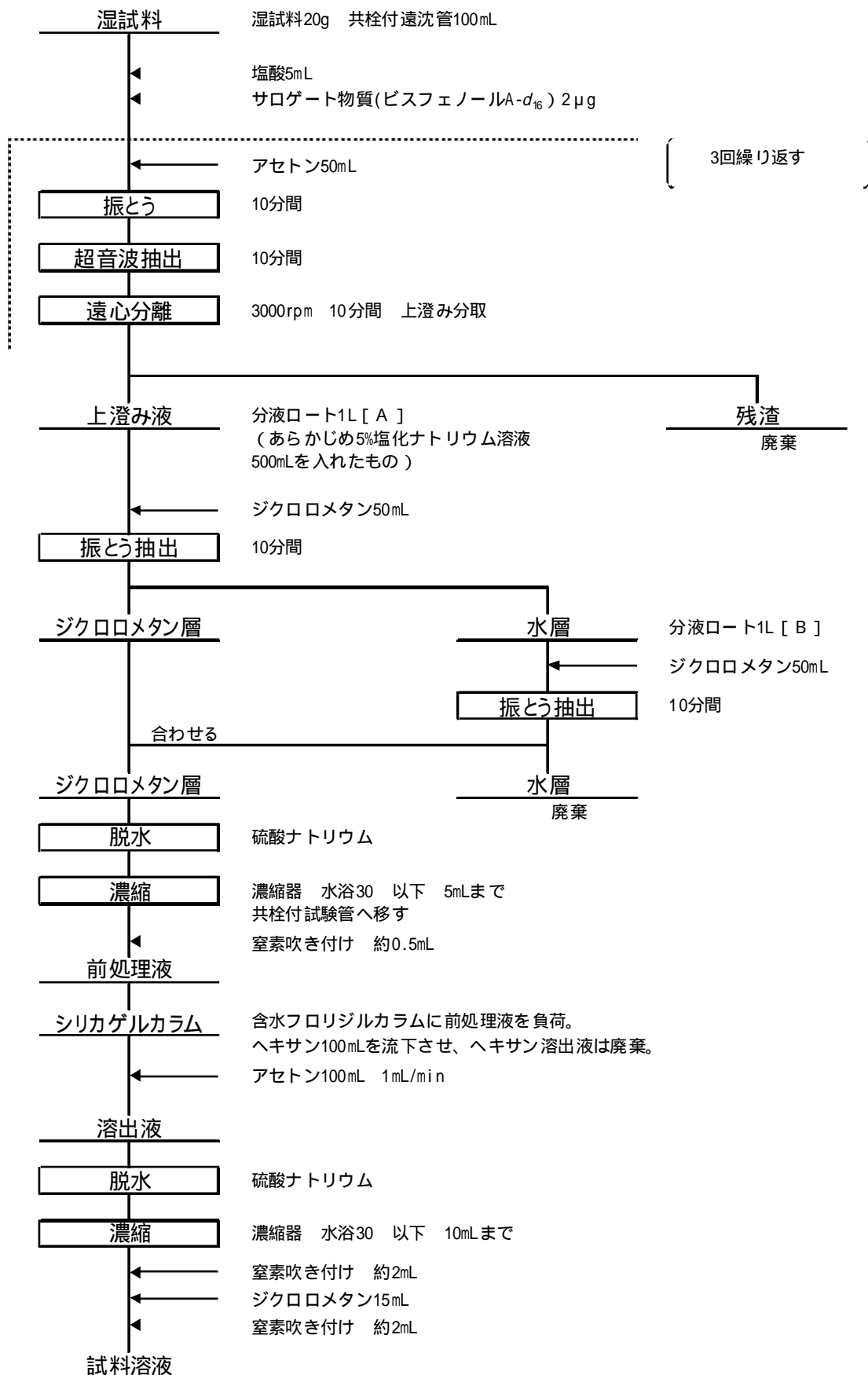
ここで、W : 試料採取量（乾燥試料に換算した量）(g)

注(5) 定量用質量数が妨害を受ける場合は、妨害を受けていない確認用質量数を用いて定量を行う。

注(6) ノニルフェノールは多くの異性体混合物であるので、定量イオンと確認イオンのピーク強度比が予想値と合っているいくつかのピークを合計して定量してもよい。

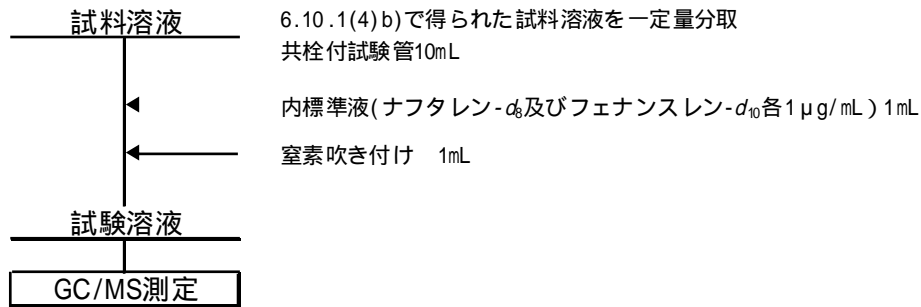
(6) 分析フローシート

a) 抽出操作及びクリーンアップ

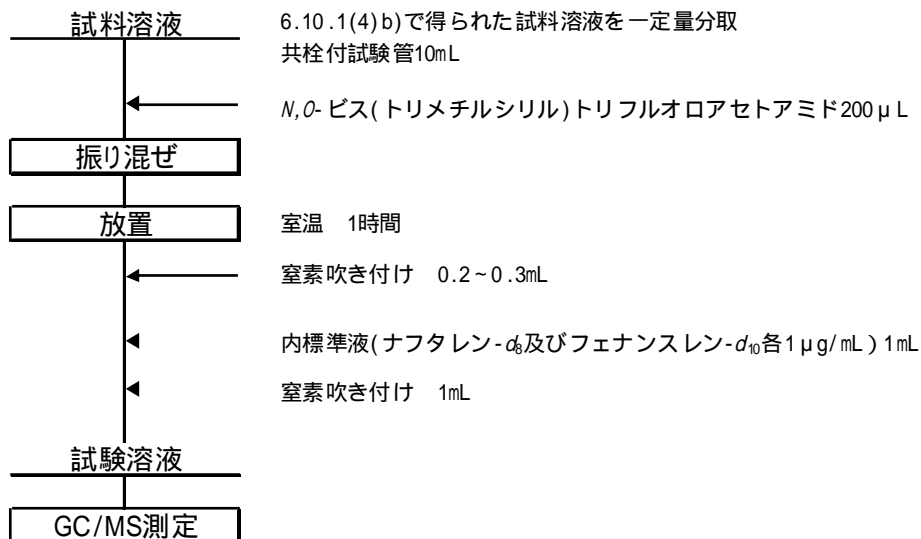


b) 試験溶液の調製

【アルキルフェノール類】



【ビスフェノールA及びクロロフェノール類】



6.10.2 エチル誘導体化法

(1) 測定方法概要

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、エチル誘導体化を行い、フロリジルカートリッジカラムによりクリーンアップを行い濃縮し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定する。

備考 2 本分析方法中ではアルキルフェノール類及びビスフェノール A についてのみ測定条件等を記載しているが、クロロフェノール類 (2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール) についても同時分析が可能である。本分析方法でクロロフェノール類の分析を行う場合は事前に測定条件等を確認すること。

(2) 試薬

- a) 水：市販ミネラルウォーター
- b) ジクロロメタン：残留農薬試験用
- c) アセトン：残留農薬試験用
- d) ヘキサン：残留農薬試験用
- e) メタノール：残留農薬試験用
- f) エタノール：残留農薬試験用
- g) ジエチルエーテル：残留農薬試験用
- h) 硫酸ジエチル：試薬 1 級
- i) 水酸化カリウム：JIS K 8574 に規定するもの。またはこれと同等以上のもの。
- j) 硫酸ナトリウム：6.10.1(2)e)による。
- k) 塩化ナトリウム：6.10.2(2)f)による。
- l) フロリジルカートリッジカラム：ここではウォーターズ社製 Sep-Pak Cartridges Florisil 等。同等品であれば他の製品でも良い (備考 1)。使用前に 4%ジエチルエーテル - ヘキサン溶液 10mL で洗浄しておく。
- m) アルキルフェノール類及びビスフェノール A 標準液：6.10.1(2)n)及び p)による。ただし、ジクロロメタンに代えてアセトンで調製したものとする。
- n) 内標準物質：市販標準試薬のアセナフテン- d_{10} 、フェナントレン- d_{10} 、フルオランテン- d_{10} のアセトン溶液を調製する。
- o) 混合標準液：アルキルフェノール類及びビスフェノール A 標準液を希釈し 100 μ g/mL (ノニルフェノールは 1000 μ g/mL⁽¹⁾) のアセトン溶液を調製する。検量線作成時にはこれをさらに希釈し、1 μ g/mL (ノニルフェノールは 10 μ g/mL) を使用する⁽²⁾。

注(1) ノニルフェノールは多くの異性体混合物で、通常環境中には他の物質よりも存在量が多い。そのため他の物質の 10 倍濃度とする。

注(2) 試験溶液調製時の濃縮率を高め、定容量を少なくすることにより検出下限を下げる場合は、混合標準液の濃度も適宜薄める。

(3) 器具及び装置

- a) 濃縮器：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
- b) 超音波照射器：超音波洗浄機でもよい。
- c) 遠心分離機
- d) 分液ロート

- e) KD 濃縮管 (10mL 標線付き)
- f) 小ロート
- g) 水浴
- h) 共栓付遠心管：容量 100mL のものであって、あらかじめ水及びアセトンで洗浄したもの
- e) ガスクロマトグラフ質量分析計

ガスクロマトグラフ (GC)

キャピラリーカラム：内径 0.2 ~ 約 0.7mm、長さ 15 ~ 30m の石英ガラス製、硬質ガラス製または内面を不活性処理したステンレス鋼製の内壁にジメチルポリシロキサンを 0.1 ~ 1.0 μ m の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム (99.999%) を線速度 20 ~ 40cm/sec の範囲に調節して用いる。

カラム槽温度：35 ~ 230 で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。

カラム槽温度：35 ~ 230 で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。

試料導入方法及び試料導入部温度：試料導入方法は、スプリットレス、コールドオンカラム、昇温気化方式等のいずれかの非分割方式が行えるもの。スプリットレス方式のものは 200 ~ 270、コールドオンカラム方式のものは 50 ~ 100 を保つ。また、昇温気化方式のものでは、初期温度 40 ~ 50 から 100 /min 程度で 250 ~ 280 まで昇温する。

質量分析計 (MS)

インターフェース温度：150 ~ 280

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

検出器：選択イオン検出法 (SIM 法) が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

(4) 前処理操作

a) 抽出操作

3.1 で調製した湿試料 10g を共栓付遠心管 100mL にはかりとり、メタノール 30mL を加えてよく混合する。

超音波照射器を用いて 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。

この操作をもう一度繰り返し、上澄液を合わせて分液ロート 100mL に移す。

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%塩化ナトリウム溶液 200mL を入れた分液ロート 300mL [A] に入れ、ジクロロメタン 50mL を加えて振とう抽出を行い、ジクロロメタン層は別の分液ロート 300mL [B] に移す。

ジクロロメタン 50mL による抽出をもう一度繰り返し、抽出液を分液ロート [B] に合わせる。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硫酸ナトリウムで脱水し、濃縮器で 5mL 程度まで濃縮して KD 濃縮管 10mL に移し、さらに窒素を吹き付けて乾固させたものを試料抽出物とする。

b) 試験溶液の調製

a)の試料抽出物に 1mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液 0.5mL を加え⁽³⁾、次いで硫酸ジエチル 0.2mL を加え⁽⁴⁾室温で 10 分間放置する。

1mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液を液量が 5mL となるよう加えて栓をし、70 の

水浴中で 1 時間放置する⁽⁵⁾。室温に戻した後、水を液量が 8mL となるよう加え、よく振り混ぜて固形物を溶解させる⁽⁶⁾。これに内標準液（各 0.5µg/mL ヘキサン溶液）1mL を加えて栓をして激しく振り混ぜて静置する⁽⁷⁾。

別の KD 濃縮管にグラスウールで栓をし、約 3g の硫酸ナトリウムを乗せた小ロートをセットする。これに のヘキサン層の約 0.7mL をパスツールピペットで分取し⁽¹²⁾、硫酸ナトリウムの上の全体に広がるようにしみ込ませ、ヘキサン 3mL で溶出させる。この溶出液を窒素気流下で乾固し、4%ジエチルエーテル - ヘキサン溶液 1mL に溶解する。

の溶液を、フロリジルカートリッジに負荷し、4%ジエチルエーテル - ヘキサン溶液を流下させ、最初からの溶出液 8mL を採取する⁽⁹⁾。これを窒素気流下で 0.5mL まで濃縮し試験溶液とする。

c) 操作ブランク試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、試料と同様の処理をして得た試験溶液を操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(3) 1mol/L 水酸カリウム - エタノール溶液を加えてから、KD 濃縮管を軽く振り、窒素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(4) 硫酸ジエチルを加えてしばらくすると硫酸カリウム生成により固化するため、硫酸ジエチルを加えたら直ちに軽くふりまぜる。また、硫酸ジエチル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鹸でよく洗う。（硫酸ジメチルよりは有害性は小さい）

注(5) ケン化処理。この操作によりフェネトール体（フェノール類のエチルエステル）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ーンアップを効果的なものにする。検量線用試験溶液調製ではこの操作は不要である。

注(6) 固形物が溶解しにくいときはスパテルで軽くつついて壊すと簡単に溶解する。

注(7) 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似ており、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(8) 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(9) 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確認しておく。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、標準液で確認した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。

(5) 測定

a) GC/MS測定条件の例

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

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⁽¹⁰⁾、内径 0.32mm、長さ 25m、液相膜厚 0.52µm

カラム温度：60 (1min) (15 /min) 280 (5min)

注入口温度：250

試料導入法：スプリットレス方式 (90sec)、1µL 注入

キャリアーガス：He カラムヘッド圧 7.5psi

質量分析計 (MS)

インターフェース温度 : 250

イオン化法 : 電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化電圧 : 70eV

イオン源温度 : 250

検出法 : 選択イオン検出法 (SIM 法)

測定質量数 : 表 6.10-3 による。

質量分析計の調整 : MS に質量校正用標準物質 (PFTBA または PFK) を導入し、MS の質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能 { 質量数 (m/z) = 18 ~ 300 程度以上の範囲で 1 質量単位 (amu) 以上 } 等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.10-3 対象物質及び内標準物質の測定質量数

測定物質	測定質量数		内標準物質
	定量用	確認用	
[対象物質]			
4- <i>t</i> -ブチルフェノールのエチル誘導体化物	163	178	A
4- <i>n</i> -ペンチルフェノールのエチル誘導体化物	192	135	A
4- <i>n</i> -ヘキシルフェノールのエチル誘導体化物	206	135	A
4- <i>t</i> -オクチルフェノールのエチル誘導体化物	163	135	A
4- <i>n</i> -ヘプチルフェノールのエチル誘導体化物	135	220	A
4- <i>n</i> -オクチルフェノールのエチル誘導体化物	234	135	A
ノニルフェノールのエチル誘導体化物	177	163	B
ビスフェノールAのエチル誘導体化物	269	284	C
[内標準物質]			
A. アセナフテン- <i>d</i> ₁₀	164		-
B. フェナントレン <i>d</i> ₁₀	188		-
C. フルオランテン- <i>d</i> ₁₀	212		-

b) 検量線

標準混合液 (各 1.0µg/mL、ノニルフェノールは 10µg/mL アセトン溶液) を 0 ~ 1.0mL の範囲で段階的に KD 濃縮管 10mL に取り、窒素気流で乾固する。

1mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液 0.5mL を加え、さらに硫酸ジエチル 0.2mL を加え室温で 10 分間放置する。

これに、1mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液を液量が 5mL となるよう加え、次いで水を液量が 8mL となるよう加え、振り混ぜて固形物を溶解させる。内標準液 (各 0.5µg/mL ヘキササン溶液) 1.0mL を加え、栓をして激しく振り混ぜる。

静置後、パストゥールピペットでヘキササン層の約 0.7mL を取り、少量の硫酸ナトリウムを加えて脱水する。

この 1µL を GC/MS に注入し、各対象物質 (エチル誘導体化物) と内標準とのピーク面積比から検量線を作成する。

この検量線用試験溶液は一度作成すると何度でも使用できる⁽¹¹⁾。

c) 試料の測定

測定対象物質及び内標準物質の測定質量数(表 6.10-3 に示す質量数⁽¹²⁾)を1つの測定対象物質について2つ以上設定する。

検量線作成後、操作ブランク試験溶液、試験溶液及び添加回収試験液の1 μ LをGC/MSに注入して、測定を行う。

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 $\pm 20\%$ 以内の変動であることを確認する。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。

で設定した測定対象物質の定量用質量数と確認用質量数についてクロマトグラムを記録し、2つ以上の測定質量数のピーク面積比を計算する。

測定対象物質の定量用質量数及び内標準物質のピーク面積を求める。

d) 同定、定量及び計算

同定

対象物質のエチル誘導体化物の定量用質量数及び確認用質量数のピークが、検量線に登録された保持時間と ± 5 秒以内に出現し、確認用質量数と定量用質量数のピーク強度比が検量線測定の強度比と $\pm 20\%$ 以内の差で合っていれば、物質が存在していると見なす。

定量⁽¹³⁾

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、次式により試料中の対象物質の濃度を計算する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

ここで、W : 試料採取量(乾燥試料に換算した量)(g)

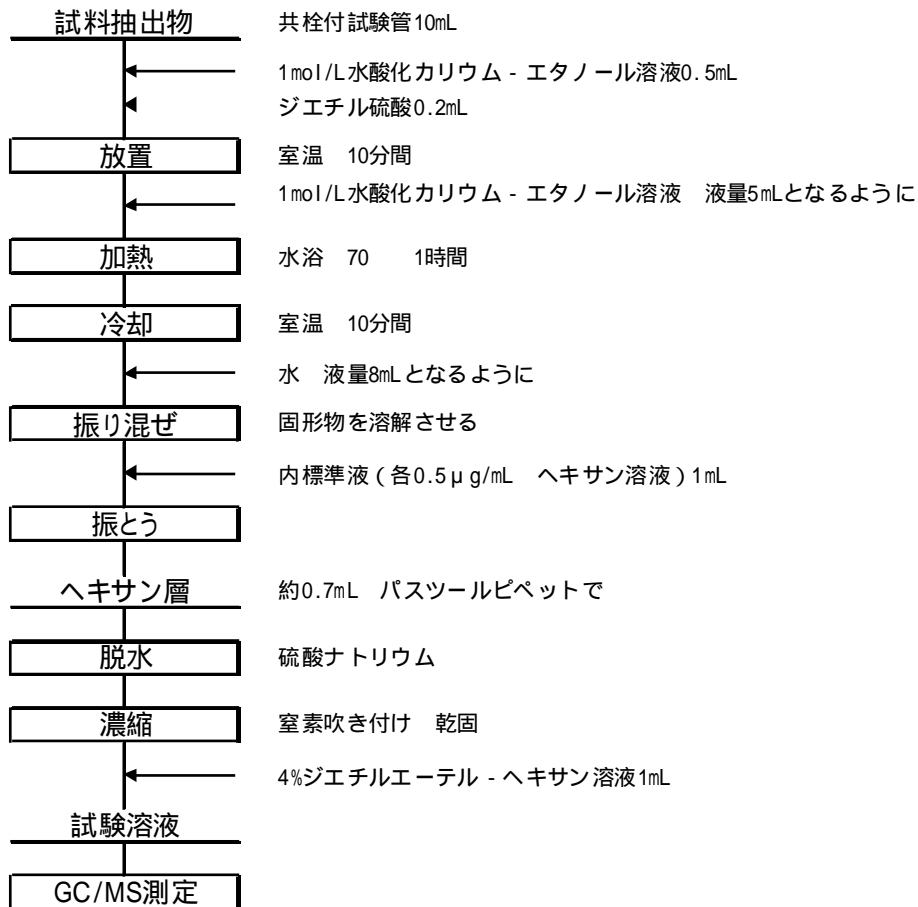
注(10) 例えば、J&W DB-5 ms、Restek Rtx-5、HP HP-5ms、Supelco SPB-5、SGE BPX-5 等がある。

注(11) 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めごとに調製する必要はない。冷蔵庫内に保管すれば半永久的に使用できる。

注(12) 定量用質量数が妨害を受ける場合は、妨害を受けていない確認用質量数を用いて定量を行う。

注(13) ノニルフェノールは多くの異性体混合物であるので、定量用質量数と確認用質量数のピーク強度比が予想値と合っているいくつかのピークを合計して定量してもよい。

b) 試験溶液の調製



6.11 エストラジオール類

本分析法の対象物質は 17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール、エチニルエストラジオールである。本方法は、遊離のエストラジオールのみを対象とし、抱合体の分解処理は行わない。

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

6.11.1 エストラジオール類（メチル誘導体化 - ガスクロマトグラフ質量分析法）

(1) 測定方法の概要

試料にサロゲート物質を添加し、メタノールで抽出した後、メタノール/ヘキサン分配を行う。ジクロロメタンに転溶後、脱水濃縮・乾固し、ジクロロメタン - ヘキサン混合溶液で溶解し、硫酸ナトリウムで脱水し、フロリジルカートリッジカラムでクリーンアップを行う。これを乾固し、ジメチル誘導体化処理を行う。反応終了後、水酸化カリウム - エタノール溶液と水を加えて 70℃ で 1 時間アルカリ分解を行う。内標準（クリセン- d_{12} ）のヘキサン溶液を加えて振とうし、ヘキサン層をフロリジルカートリッジカラムでクリーンアップし、濃縮してガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）で測定する。

(2) 試薬

- a) 水：市販ミネラルウォーター
- b) L-アスコルビン酸：試薬特級
- c) ヘキサン：残留農薬試験用
- d) ジクロロメタン：残留農薬試験用
- e) アセトン：残留農薬試験用
- f) メタノール：残留農薬試験用
- g) エタノール：残留農薬試験用
- h) エチルエーテル：残留農薬試験用
- i) 酢酸メチル：試薬1級
- j) 硫酸ジメチル：試薬1級（新しく購入したものを使用すること）
- k) 硫酸ナトリウム：残留農薬試験用
- l) 塩化ナトリウム：残留農薬試験用
- m) 過塩素酸マグネシウム：元素分析用（20~48 mesh）
- n) 1mol/L水酸化ナトリウム - メタノール溶液：2gの水酸化ナトリウムにメタノールを加えて 50mLとし、時々振り混ぜて溶解させる（調製時に水は加えないこと）。吸水しないように密栓して室温で保存する。
- o) 1mol/L水酸化カリウム - エタノール溶液：56gの水酸化カリウムに水50mLを加え、ホットプレートで加熱して溶解させる。これを熱いうちに約950mLのエタノールに加えて調製する。使用後は冷蔵庫内に保管すると長期にわたり安定である（室温に放置しておくると徐々に黄色化する）。
- p) フロリジルカートリッジカラム：ウォーターズ社製 Sep-Pak Cartridges Florisil等（備考1）
- q) C18カートリッジ：ウォーターズ社製 Sep-Pak Plus C18 Cartridges等（備考1）
- r) 標準物質：17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール、エチニルエストラジオール（市販標準試薬）
- s) サロゲート物質：17 β -エストラジオール-16,16,17- d_3 、17 α -エストラジオール-2,4,16,16- d_4

(市販標準試薬)

t) 内標準物質：クリセン- d_{12} (市販標準試薬)

u) 標準液の調製⁽¹⁾：

混合標準液：各対象物質の $1\mu\text{L}/\text{mL}$ (標準混合液 A) 及び $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ (標準混合液 B) のアセトン溶液を調製する。

サロゲート溶液：サロゲート物質(17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ または 17 β -エストラジオール-16,16,17- d_3) の $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のアセトン溶液を調製する。

内標準液：内標準液は、クリセン- d_{12} $0.005\mu\text{g}/\text{mL}$ (内標準液 A) 及び $0.0005\mu\text{g}/\text{mL}$ (内標準液 B) のヘキサン溶液を調製する。検量線作成時には標準液 A を使用する。

注(1) 混合標準、サロゲート及び内標準液の濃度は使用する MS の感度に合わせて調製しても良い。

(3) 器具及び装置

a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ-ルピペット、丸底型 KD 濃縮管等：使用時にアセトン、メタノール、またはヘキサンで洗浄して用いる。

共栓付遠沈管、ナス型フラスコ、ビーカー、分液ロート、共栓付試験管、カラムクロマトグラフ管等⁽⁵⁾：使用時にアセトン、メタノール、またはヘキサンで洗浄して用いる。

微量用 KD 濃縮管 10mL：最終試験溶液量が $10\sim 50\mu\text{L}$ でマイクロシリンジでサンプリングが可能なもの。先端の内径が $2\sim 3\text{mm}$ と極細のもの。

b) 超音波洗浄器

c) 遠心分離機

d) 振とう機

e) 濃縮器：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。

f) 恒温水槽

g) マイクロシリンジ。

h) 脱水管：例えば、パスツ-ルピペットの先端部分を切断し、グラスウール、過塩素酸マグネシウム、グラスウールの順で充填した長さ約10cmのもの。これを3本作成し、直列に繋いで使用する。

i) ガスクロマトグラフ質量分析計

ガスクロマトグラフ (GC)

キャピラリーカラム：内径 $0.2\sim$ 約 0.7mm 、長さ $15\sim 30\text{m}$ の石英ガラス製、硬質ガラス製または内面を不活性処理したステンレス鋼製の内壁にジメチルポリシロキサンを $0.1\sim 1.0\mu\text{m}$ の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム (99.999%) を線速度 $20\sim 40\text{cm}/\text{sec}$ の範囲に調節して用いる。

カラム槽温度： $35\sim 230$ で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。

カラム槽温度： $35\sim 230$ で 0.5 以内の温度調節の精度があり、測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。

試料導入方法及び試料導入部温度：試料導入方法は、スプリットレス、コールドオンカラム、昇温気化方式等のいずれかの非分割方式が行えるもの。スプリットレス方式のものは $200\sim 270$ 、コールドオンカラム方式のものは $50\sim 100$ を保つ。また、昇温気化方式のものでは、初期温度 $40\sim 50$ から 100 /min 程度で $250\sim 280$ まで昇温する。

質量分析計 (MS)

インターフェース温度：150～280

イオン化法：電子衝撃イオン化法（EI法）

検出器：選択イオン検出法（SIM法）が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化電圧：70eV

(4) 前処理操作

a) 前処理

湿試料 10g⁽²⁾を遠沈管 50mL に取り、サロゲートを添加し⁽³⁾、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、上澄み液を分液ロート 100mL に移す。

残渣にメタノール 30mL を加え、同じ抽出操作を行い、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、振とう後、静置する。

メタノール層（下層）を、5%塩化ナトリウム水溶液 200mL を入れた分液ロート 500mL に移し、ジクロロメタン 50mL を加えて、振とう抽出を行って静置した後、ジクロロメタン層を三角フラスコ 300mL に取る。水層にジクロロメタン 50mL を加え再度振とう抽出し、抽出液を合わせる。

ジクロロメタン抽出液を硫酸ナトリウムで脱水し、濃縮器で濃縮後、窒素を吹き付けて乾固する⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

ジクロロメタン - ヘキサン混合溶液(1+1)1mL を加えて溶解させ、これをフロリジルカートリッジカラムに負荷する（備考 1）。濃縮管はさらにジクロロメタン - ヘキサン混合溶液(1+1)1mL で洗浄し、洗液もフロリジルカートリッジカラムに負荷する。シリンジ 10mL をセットし、ジクロロメタン - ヘキサン混合溶液(1+1)溶液 10mL を流下させる。（負荷時の分も含めて）この画分は捨てる⁽⁶⁾。

次いで 5%アセトン - ジクロロメタン溶液 6mL で対象物質を丸底型 KD 濃縮管 10mL⁽⁷⁾に溶出させ、窒素を吹き付けて乾固する。

b) 試験溶液の調製

乾固した試料に 1mol/L 水酸化ナトリウム - メタノール溶液⁽⁸⁾0.5mL を加え、50 の水浴中で、窒素を吹き付けて充分乾固・乾燥する⁽⁹⁾。

これに硫酸ジメチル 0.5mL を加え、析出している固体部分に硫酸ジメチルを接触させ、直ちにスパーテルを用いて KD 濃縮管の内面に付着している固形物をすりつぶし、スパーテルを入れたまま約 30 分間室温で放置する⁽¹⁰⁾。

1mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液を 5mL の標線まで、次いで水を 8mL の標線まで加え、栓をして 70 の水浴中で 1 時間加熱し、アルカリ分解を行う⁽¹¹⁾。

室温に放冷後、内標準液 B（クリセン-*d*₁₂0.0005μL/mL）2mL を加え、激しく振り混ぜて静置する。

別の KD 濃縮管にガラスウールで栓をし、約 7g の硫酸ナトリウムを乗せた小ロートをセットする。これに のヘキサン層をパスツールピペットで分取し⁽¹²⁾、硫酸ナトリウムの上の全体に広がるようにしみ込ませる。ヘキサン 5mL で流下させた溶出液に、窒素を吹き付け、乾固させる。

ジエチルエーテル - ヘキサン混合溶液(3+17)1mL で溶解させ、フロリジルカートリッジ⁽¹³⁾に負荷する。KD 濃縮管は少量のジエチルエーテル - ヘキサン混合溶液(3+17)1mL で洗浄し、洗浄液もフロリジルカートリッジに負荷する。シリンジ 10mL をセットし、ジエチルエーテル - ヘキサン混合溶液(3+17)を流下させ、最初から（負荷時の分も含めて）の 8mL を微量

用 KD 濃縮管に採取する。

窒素を吹き付けて乾固し、10～50 μ L のヘキサンで容器内面を洗うようにして底部に溶かし込み⁽¹⁴⁾、試験溶液とする。

c) 操作ブランク試験溶液の調製

メタノール 60mL にサロゲート及び水 5mL を添加したものについて、試料と同様の処理をして得た試験溶液を操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(2) 有姿のまま採取した試料から小石等の異物を除去し均質な状態とし、3000rpm で 10 分間遠心分離して脱水したものを使用する。4.1 により乾燥減量を求めておくこと。

注(3) サロゲートの添加量は MS の感度により調整しても良い。サロゲート物質としては抱合体分解処理を行わない場合、17 β -エストラジオール-16,16,17- d_3 より 17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 のほうが好ましい (m/z300 及び 227 がほとんど無視できるほど小さい)。なお、本分析方法では対象としないが、抱合体の分解処理を行う場合、17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 は塩酸含有メタノールでの加熱により H-D 交換が起こるのでサロゲート物質として使用できない。17 β -エストラジオール-16,16,17- d_3 は塩酸含有メタノールで加熱しても H-D 交換は起こらない (但し、m/z227 はサロゲートからの寄与が大きく使用できない)。

注(4) 乾固する操作では加熱しすぎによる揮発ロスに充分注意すること。アルミヒートブロックによる加熱は内部が見えないので好ましくない。ヘアドライヤーによる加熱のほうが好ましい。

注(5) 遊離のエストラジオール類のみを対象とする。

注(6) 対象 3 物質のうちエチニルエストラジオールが最初に 15mL 程度から溶出しはじめるので、最初の 10mL (負荷分も含めて) を捨てる。この操作を行わないと、底質試料では誘導体化反応がうまく進行しない。また、本操作によりクロマトグラムが著しく改善される。なお、ここで使用するフロリジルカートリッジは使用前の洗浄はしなくてよい。

注(7) 先の尖ったスピッツ型の KD 濃縮管を用いると b) の試験溶液の調製で行う誘導体化操作の窒素吹き付けによる濃縮・乾固時に濃縮液が一ヶ所に集まり均一に乾燥できにくくなり、ジメチル誘導体の生成率のばらつきの原因になる。

注(8) 共栓付きメスシリンダー 50mL に水酸化ナトリウム 2g を入れ、メタノールで 50mL とし、栓をして時々振り混ぜて溶解させる。使用時以外は栓をして水分が入らないようにしておく。

注(9) 溶媒のメタノールが揮散して無くなった時点からさらに 15 分間通気して十分に乾燥させる。また、ポンペからの窒素には、極めて微量ではあるが、水分が含まれていて十分に乾燥できず反応率が低くなることがある。(特に、梅雨期に製造されたものに著しい。)そこで窒素ラインの途中に 30cm 程度の過塩素酸マグネシウム管を接続して完全に脱水することが重要である。さらに、温度コントロールも重要であり 50 ± 2 を保つこと。(温度が高くなるとエチニルエストラジオールのピークが小さくなる。)本分析法の精度は、この乾燥操作が極めて重要な位置を占めているので、窒素ガスの脱水、恒温槽の温度コントロール及び通気速度に十分配慮し、分析に使用する窒素吹き付け装置を用いて、乾燥時間と誘導体生成率の関係を検討し、その装置の乾燥時間を決めること。各ピークが最高値を示し(クリセン- d_{12} とのピーク面積比)、経時的に安定しているところを乾燥時間とする。通気速度は通常溶媒を濃縮する時よりも強くする。

注(10) 本反応は硫酸ジメチルと接触すると瞬時に起こるが、固体の内部に硫酸ジメチルがしみ込みにくいので、すりつぶして十分に接触させる。硫酸ジメチルは危険であるので

絶対に皮膚に付けてはならない。もし、付着した場合は直ちに石鹼で洗うこと。

注(11) 固形物がある場合は、10分程して内容物が暖まった状態で振り混ぜれば簡単に溶解する。

注(12) 全量を採取する必要はない。出来るだけ水が入らないように80~90%採取する。きつく吸い上げると水が入りやすいのでゆっくり吸い上げる。

注(13) カートリッジは使用直前にジエチルエーテル-ヘキサン混合溶液(3+17)10mLで洗浄して使用すること。また、開封後は直ちに乾燥剤の入った清浄なデシケーター内に保管すること。

注(14) 微量用KD濃縮管での窒素吹き付けによる10~50 μ Lまでの濃縮の最終段階で器壁に付着しやすいので、いったん乾固して、少量のヘキサンで器壁内面に付着したものを洗い落とすようにする。ヘキサン量はMSの感度に応じて目標検出下限を達成できるようにする。

(5) 測定

a) GC/MS測定条件の例

GC/MSの分析条件の設定を行う。GC/MSの分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

ガスクロマトグラフ (GC)

カラム：溶融シリカキャピラリーカラム。内径0.2mm、長さ25m、液相膜厚0.52 μ m

液相：5% フェニルメチルシリコン

カラム温度：60 (1min) (20 /min) 280 (10min)⁽¹⁵⁾

注入口温度：260

注入法：スプリットレス法 (1.5分後パーズ、2 μ L注入)

キャリアーガス：He カラムヘッド圧 15psi

質量分析計 (MS)

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI法)

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：250

検出法：選択イオン検出法 (SIM法)

測定質量数：対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の測定質量数を表 6.11-1 に示す。

表 6.11-1 測定質量数

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
17 -エストラジオールのジメチル誘導体化物	227	300
17 -エストラジオールのジメチル誘導体化物	300	227
エチニルエストラジオールのジメチル誘導体化物	227	324
[サロゲート物質]		
17 -エストラジオール- <i>d</i> ₃ のジメチル誘導体化物	303	
17 -エストラジオール- <i>d</i> ₄ のジメチル誘導体化物	304	
[内標準物質]		
クリセン- <i>d</i> ₁₂	240	

b) 検量線⁽¹⁶⁾

標準混合液 A (各 1.0 μ g/mL アセトン溶液) を 0 ~ 50 μ L の範囲で段階的に採り、これらにサロゲート標準液 (1.0 μ g/mL アセトン溶液) 50 μ L を添加し⁽³⁾、窒素を吹き付けて乾固する。以下、(4)b) 以降の操作を行い、ジメチル誘導体化処理を行う。得られたヘキサン溶液は窒素を吹き付けて 0.1 ~ 0.5mL まで濃縮する。この 2 μ L を GC/MS に注入し、各対象物質 (ジメチル化物) とサロゲート物質とのピーク面積比から検量線を作成する。

c) 試料の測定

検量線作成後、操作ブランク試験溶液、試験溶液及び添加回収試験溶液を注入して測定を行う。一定時間ごとに検量線用の中間濃度の標準液を注入し、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 を再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

d) 同定、定量及び計算**同定**

対象物質 (ジメチル誘導体化物) の定量用質量数及び確認用質量数のピークが、検量線に登録された保持時間と ± 5 秒以内に出現し、確認用質量数と定量用質量数のピーク強度比が検量線測定強度比と $\pm 20\%$ 以内の差で合っていれば⁽¹⁷⁾、物質が存在していると見なす。

定量

得られた各対象物質とサロゲートとのピーク面積比から検量線により検出量を求め、次式により試料中の濃度を計算する⁽¹⁸⁾。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

ここで、W : 試料採取量 (乾燥試料に換算した量) (g)

注(15) GC カラムの条件は、17 α -エストラジオールと 17 β -エストラジオールが完全に分離するように設定する。

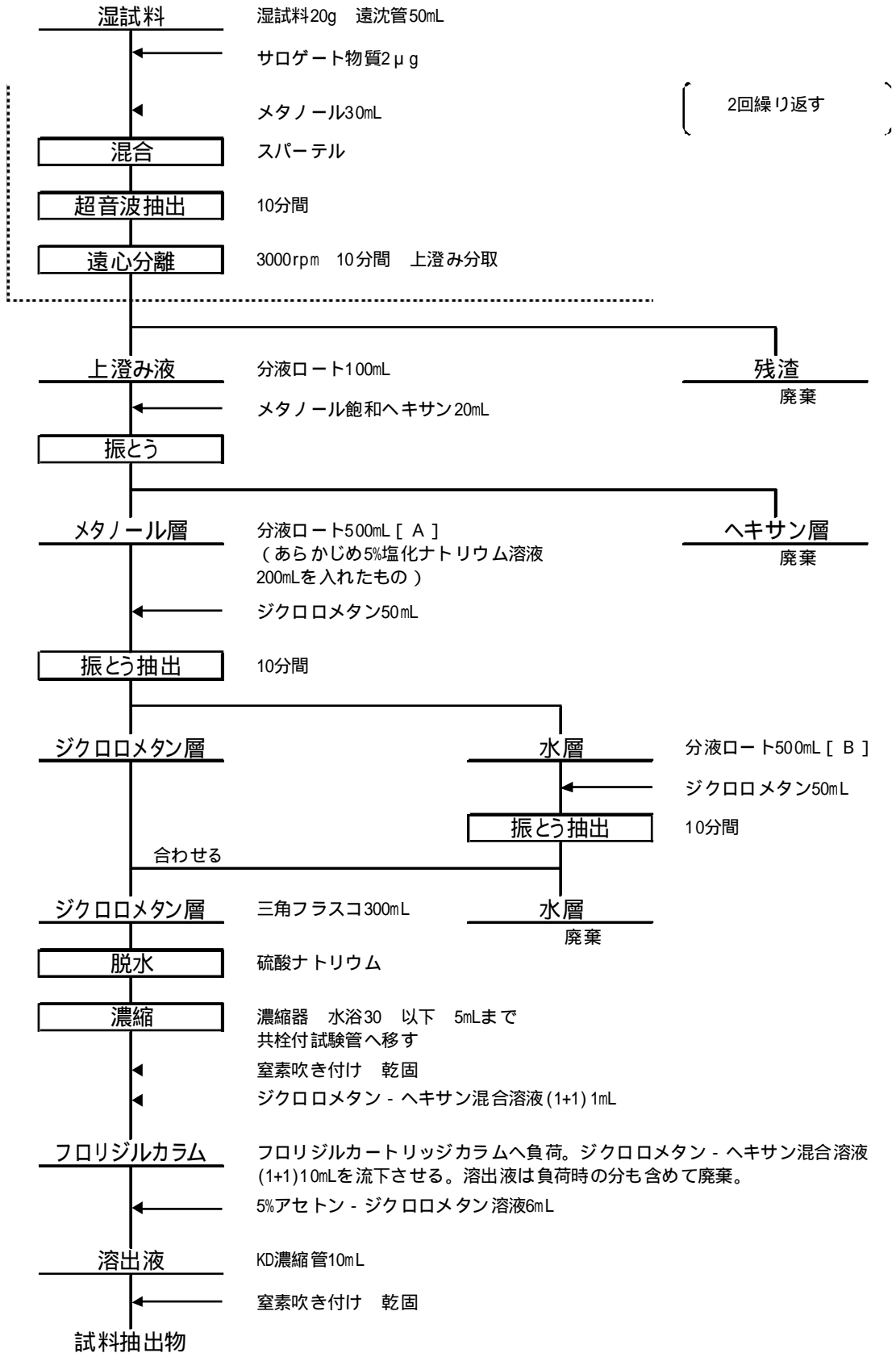
注(16) 標準液を誘導体化した溶液は、一度作成すれば多数回使用できるように、10 倍量のレベルで調製することとした。従って最終処理液は 0.1 ~ 0.5mL となっている。このものは安定であり、冷蔵庫内に保管すれば半永久的に使用可能である。

注(17) 17 β -エストラジオールの m/z 300 は、環境試料中に 17 β -エストラジオールでないピークが認められるので、m/z 227 により定量すること。17 β -エストラジオールの m/z 227 のピーク面積には、サロゲートからの寄与があるので全く使用できない。

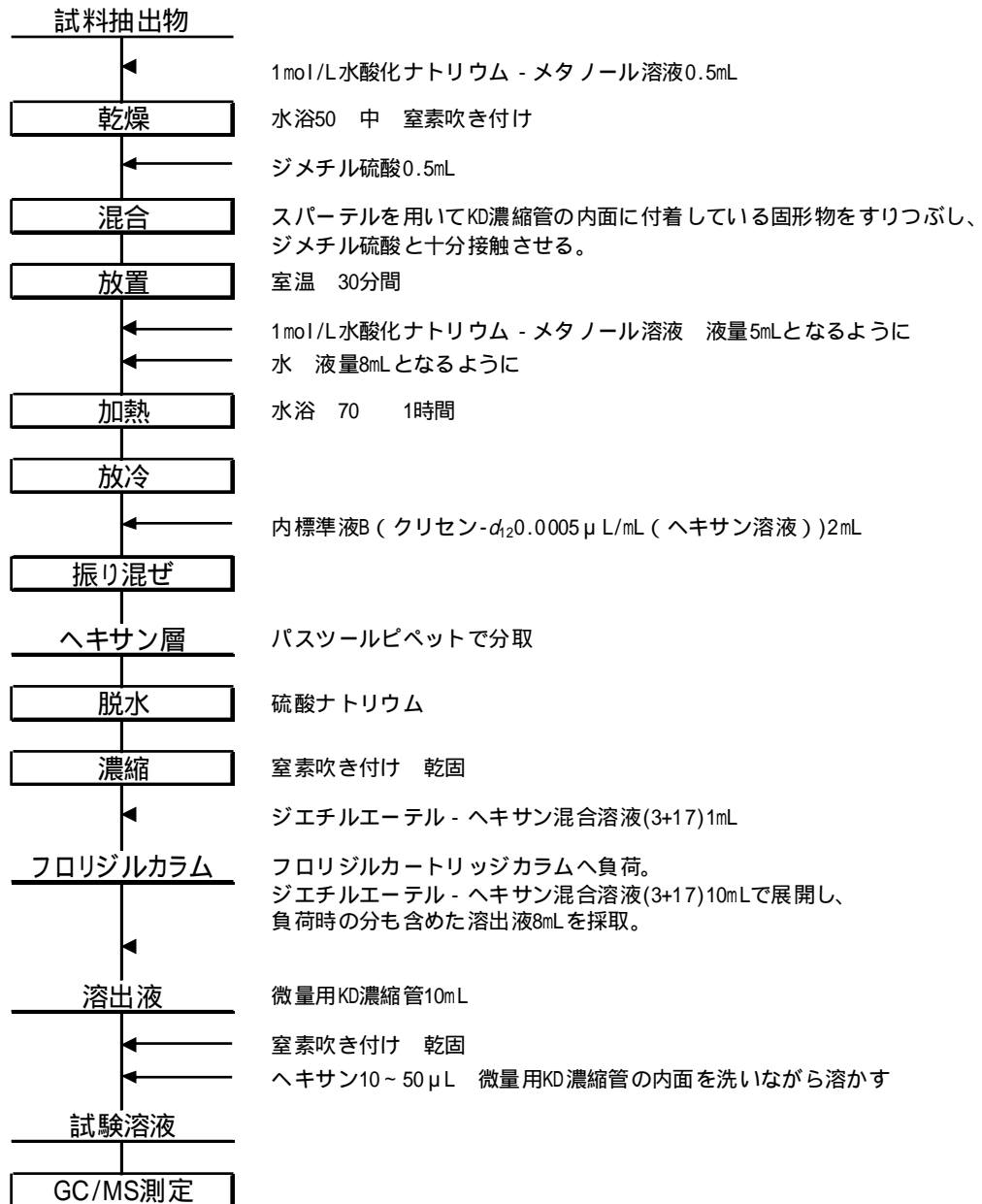
注(18) 内標準として使用したクリセン-d₁₂ (m/z 240) との比で定量すると過小に定量されることがある。これは、検量線用試験溶液ではクリセン-d₁₂ のピークにテーリングが見られる (ピーク面積が小さくなっている) が、実試料ではマトリックス効果のためテーリングが解消され (ピーク面積が大きくなる)、一方対象物質及びサロゲートのジメチル誘導体のピークは両者共左右対称のきれいなピークを与えるためである。

(6) 分析法フローシート

a) 前処理



b) 試験溶液の調製



6.11.2 エストラジオール類（ペンタフルオロベンジル誘導体化 - ガスクロマトグラフ - 負イオン化学イオン化質量分析法）

(1) 測定方法の概要

試料にサロゲート物質を添加し、pH5 酢酸緩衝液を含むメタノール溶液で抽出した後、メタノール/ヘキサン分配により、脂質を除去する。これを水に溶解し固相抽出した後、濃縮する。カラムクロマトグラフィー等によるクリーンアップを行った後、ペンタフルオロベンジル（PFB）誘導体化を行う。生成した PFB 誘導体化物をヘキサンで抽出し、フロリジルカラムで精製後、トリメチルシリル（TMS）誘導体化を行う。これを、シリカゲルカラムにより精製し、ガスクロマトグラフ負イオン化学イオン化質量分析計（GC/NCI/MS）により定量する。

(2) 試薬

- a) 水：対象物質を含まないもの
- b) 2-プロパノール：試薬特級
- c) ヘキサン：残留農薬試験用
- d) アセトン：残留農薬試験用
- e) メタノール：残留農薬試験用
- f) エタノール：残留農薬試験用
- g) ジクロロメタン：残留農薬試験用
- h) 酢酸エチル：残留農薬試験用
- i) 硫酸ナトリウム：残留農薬試験用
- j) 塩化ナトリウム：残留農薬試験用
- k) 1mol/L - 酢酸緩衝剤
- l) 臭化ペンタフルオロベンジル（PFBB）溶液：臭化ペンタフルオロベンジル 1g、18-クラウン 6-エーテル 1g を 2-プロパノールで溶かし 50mL としたもの（この溶液は冷暗所保存で 1 週間安定である）⁽¹⁾
- m) フロリジルミニカラム：市販カートリッジタイプのもの。Sep-Pak Florisil 等がある（備考 1）。
- n) C18 カートリッジカラム：市販カートリッジタイプのもの。Sep-Pak Plus C18 等がある（備考 1）。
- o) *N*-トリメチルシリルイミダゾール（TMSI）：ガスクロマトグラフ用
- p) 標準物質：17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール、エチニルエストラジオール（市販標準試薬）
- q) サロゲート物質：17 β -エストラジオール-2,4,16,16-*d*₄（市販標準試薬）
- r) 標準液⁽²⁾：

混合標準液：各標準物質の 1000 μ g/mL のアセトン溶液を調製後、それらを一定量正確にはかり取り混合して、アセトンで希釈したもの。各標準物質濃度がそれぞれ 1 μ g/mL（標準混合液 A）、0.1 μ g/mL（標準混合液 B）及び 0.01 μ g/mL（標準混合液 C）となるように調製する。

サロゲート溶液：サロゲート物質（17 β -エストラジオール-2,4,16,16-*d*₄）の 1000 μ g/mL アセトン溶液を調製後、0.1 μ g/mL となるようにアセトンで希釈したもの。

注(1) 本試薬は毒性が懸念されるため取扱いに注意すること。PFBB は催涙性があるので、必ずドラフト内で操作をし、使用済の容器はドラフト内でアルカリ洗浄（水酸化カリウム - メタノール溶液など）により PFBB を分解してから水洗すること。

注(2) 検量線用の標準液は、一度作成すれば多数回使用できるように、10 倍量のレベルで

調製することとした。従って最終処理液は 2mL となっている。このものは安定であり、冷蔵庫内に保管すれば 1 ヶ月程度、使用可能である。

(3) 器具及び装置

a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ-ルピペット、丸底型 KD 濃縮管等：使用時にアセトン、メタノール、またはヘキサンで洗浄して用いる。

共栓付遠沈管、ナス型フラスコ、ビーカー、分液ロート、共栓付試験管、カラムクロマトグラフ管等⁽⁵⁾：使用時にアセトン、メタノール、またはヘキサンで洗浄して用いる。

b) 超音波洗浄器

c) 遠心分離機

d) 振とう機

e) 濃縮器：ロータリーエバポレーター

f) 恒温水槽

g) マイクロシリンジ。

h) GPC カラム：GPC による精製を行う場合に用いる。Shodex EV-2000 や PAE-2000 等がある（備考 1）。

i) 高速液体クロマトグラフ：GPC による精製を行う場合に用いる。

j) ガクス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）

6.11.1(3)i)による。ただし、6.11.1(3) のイオン化法は負イオン化学イオン化法とする。

(4) 前処理操作

a) 前処理

湿試料 10g⁽³⁾を 50mL の遠沈管に取り、サロゲートを添加し⁽⁴⁾、pH5 酢酸緩衝液(10vol%) を含むメタノール溶液 40mL を加え、30 分間振とう抽出後、2000rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄液を取る。

残渣にメタノール 40mL を加え、5 分間振とう抽出して減圧ろ過する。さらに、残渣をメタノール 20mL で洗浄して減圧ろ過する。

上澄液とろ液を合わせて分液ロート 200mL に移し、これにメタノール飽和ヘキサン溶液 20mL を加えて振とうして静置した後、メタノール層（下層）を取り、40 の水浴上で濃縮器を用いて 10mL 以下まで濃縮する。

水 200mL に の濃縮液を加えて超音波洗浄機などを用いて均一に混合し、C18 カートリッジカラムに通水し、水 5mL、ヘキサン 5mL で C18 カートリッジカラムを洗浄する。

C18 カートリッジカラムにメタノール 5mL を流下させ、溶出液を遠沈管 10mL に受け、窒素を吹き付け乾固する。

これを、下記に例示する(i)~(iv)のいずれかの方法またはその組み合わせで精製したものを試料抽出物とする⁽⁵⁾。

(i) ジクロロメタン - ヘキサン(1+1)混合溶液 1mL で溶解し、あらかじめヘキサン 5mL で洗浄したフロリジルミニカラムに負荷する。遠沈管はジクロロメタン - ヘキサン(1+1)混合溶液 1mL で洗い、洗浄液もフロリジルミニカラムに負荷する。ジクロロメタン - ヘキサン(1+1)混合溶液を流下させ、流出液 10mL は捨てる⁽⁶⁾。これに 5%アセトン - ジクロロメタン溶液 5mL を流下させ、溶出液を遠沈管 10mL に取る。窒素を吹き付けて乾固する。

(ii) 10%メタノール水溶液 5mL に溶解し⁽⁷⁾、C18 カートリッジカラムに通す。50%メタノール水溶液 5mL を流下させ、流出液は捨てる。これにメタノール 6mL を流下させ、溶出液を遠沈管 10mL に取る。窒素を吹き付けて乾固する。

- (iii) GPC の溶離液に溶解し、GPC カラムに注入し対象成分が溶出する部分⁽⁸⁾を分取する。これを濃縮し、濃縮物を遠沈管 10mL に移しいれ、窒素を吹き付けて乾固する。
- (iv) その他の方法⁽⁹⁾

- 注(3) 有姿のまま採取した試料から小石等の異物を除去し均質な状態とし、3000rpm で 10 分間遠心分離して脱水したものを使用する。4.1 により乾燥減量を求めておくこと。湿試料は、3000rpm で 10 分間遠心分離し、脱水したものを使用する。水分含量を求めておくこと。
- 注(4) サロゲートの添加量は試料中濃度に応じて 1~5ng の範囲で添加する。塩酸 - メタノールとの加熱によって抱合体を分解する場合には、17 β -エストラジオール-16,16,17-*d*₃を使用すること。
- 注(5) 必要な場合に行う。十分な回収率が得られることをあらかじめ確認しておくこと。本方法では、メチル誘導体化のようにアルカリ分解が使用できないため、この段階で十分に精製しておく必要がある。
- 注(6) 対象 3 物質のうちエチニルエストラジオールが最初に 15mL 程度から溶出しはじめるので、最初の 10mL (負荷分も含めて) を捨てる。ここで使用するフロリジルカートリッジは使用前の洗浄はしなくてよい。
- 注(7) メタノール 0.5mL に溶解した後、水 4.5mL を加えるとよい。カラムはメタノール 6mL、次いで 10%メタノール水溶液 10mL であらかじめコンディショニングしておく。
- 注(8) GPC カラムは対象成分が溶出する時間をあらかじめ確認したものを用いること。例として、PAE-2000 (Shodex) を用いアセトン (4.0mL/min) で溶離すると、対象成分は 16~18 分 (16.9 分がピーク) 付近に、シクロヘキサン - 酢酸エチル(1+1)混合溶液 (4.0mL/min) で溶離すると、14~17 分 (15.1~15.9 分がピーク) 付近に溶出する。脂質や硫黄を除去できる。
- 注(9) その他の方法には、TLC や HPLC を用いる方法がある。

b) 試験溶液の調製

試料抽出物に PFBB 溶液 0.5mL 及び炭酸カリウム約 3mg を加えて密栓し、80℃ で 30 分間加熱する。

冷却後、水 6mL 及びヘキサン 2mL 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取る⁽¹⁰⁾。水層にヘキサン 2mL を加えて激しく振り混ぜて静置し、同様にヘキサン層を取る。

ヘキサン抽出液を少量の硫酸ナトリウムをつめたカラムに通して脱水する。遠沈管をヘキサン 5mL で洗浄した洗液も同様に脱水して抽出液に合わせ、窒素を吹き付けて乾固する⁽¹¹⁾。

これにヘキサン 1mL を加えて溶解し、あらかじめヘキサン 10mL で洗浄したフロリジルミニカラム⁽¹²⁾に負荷する。遠沈管を少量のヘキサンで洗った洗液もフロリジルミニカラムに負荷した後、ヘキサン 5mL を流下させ、流出液は捨てる。

酢酸エチル - ヘキサン混合溶液(1+1)5mL を流下させ、溶出液を遠沈管 10mL に採取し、窒素を吹き付けて乾固する。

これに *N*-トリメチルシリルイミダゾール (TMSI) 約 20 μ L を加え、遠沈管の内面を洗うようにして内容物とよく混合した後、室温で 30 分間放置する。(トリメチルシリル (TMS) 誘導体化)

反応液にヘキサン 1mL を加えよく混合した後、シリカゲルミニカラムに負荷する⁽¹³⁾。遠沈管を少量のヘキサンで洗った洗液も負荷した後、ヘキサンを流下させ、最初の流出液 5mL を捨てる。

次いで、ヘキサン - 酢酸エチル混合溶液(9+1)5mL を流下させて溶出液を 10mL の遠沈管に取り、窒素を吹き付けにより乾固する。これを、ヘキサン 0.2mL に溶解し試験溶液とする。

c) 操作ブランク試験溶液の調製

メタノール 60mL にサロゲート及び水 5mL を添加したものについて、試料と同様の処理をして得た試験溶液を操作ブランク試験溶液とする。操作ブランク試験溶液から対象物質が検出された場合は、操作ブランク試験値を差し引いて検出値とする。

注(10) 全量を採取する必要はないが、出来るだけ水が入らないように 80 ~ 90% 採取する。ゆっくり吸い上げると水が入り難い。

注(11) 乾固する操作ではやりすぎによる揮発ロスに注意すること。クラウンエーテルが残るので乾固した状態にはならない。

注(12) カートリッジは使用直前にヘキサン 10mL で洗浄して使用すること。また、開封後は直ちに乾燥剤の入った清浄なデシケータ内に保管すること。

注(13) 白色結晶(イミダゾール)が生じるが分析上の問題とはならない。

(5) 測定

a) GC/MS測定条件の例

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

ガスクロマトグラフ (GC)

カラム：溶融シリカキャピラリーカラム(内径 0.2mm、長さ 25m、膜厚 0.25 μ m)

液相：5% フェニルメチルシリコン

カラム温度：150 (1min) (10 / min) - 300 (10min)

注入口温度：260

注入法：スプリットレス法(1分後パージ、2 μ L 注入)

キャリアーガス：He カラムヘッド圧 15psi

質量分析部

インターフェース温度：260

イオン化法：負イオン化学イオン化法(NCI法)(1pg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)

反応ガス：メタンまたはイソブタン

イオン源温度：150 ~ 250

検出法：選択イオン検出法(SIM法)

測定質量数：表 6.11-2 による⁽¹⁰⁾。

表 6.11-2 測定質量数

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
17 α -エストラジオールのTMS誘導体化物	343	344
17 β -エストラジオールのTMS誘導体化物	343	344
エチニルエストラジオールのTMS誘導体化物	367	368
[サロゲート物質]		
17 β -エストラジオール- d_4 のTMS誘導体化物	347	348

b) 検量線⁽¹¹⁾

標準混合液 A、B、C を遠沈管 10mL にそれぞれ 500 μ L はかり採る。これらにサロゲート標準液 (0.1 μ g/mL アセトン溶液) 500 μ L を添加し、窒素を吹き付けて乾固する。

(4b) ~ の操作を行い、TMS 誘導体化物とする。ただし、(4b) の窒素吹き付けによる乾固後、ヘキサン 2mL に溶解する。

標準液中のサロゲート物質の濃度が試験溶液中に含まれるサロゲート物質の濃度にほぼ等しくなるようにさらに希釈し、この 2 μ L を GC/MS に注入し、各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を作成する。

c) 試料の測定

検量線作成後、操作ブランク試験溶液及び試験溶液を注入して測定を行う。

一定時間ごとに検量線用の中間濃度の試験溶液を注入し、期待値の $\pm 15\%$ 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 を再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

注(10) 表 6.12-2 の確認イオンは、脱 TMSO のフラグメントが生成するイオン化条件であれば、それぞれ、定量イオン - 90 (17 α -エストラジオールと 17 β -エストラジオールは m/z253、エチニルエストラジオールは m/z277、サロゲートは m/z257) を選択できる。エストロンを測定する場合には、定量イオン m/z269、確認イオン m/z270 を使用できる。エストリオールでは、定量イオン m/z431、確認イオン m/z432 などを使用できる。

注(11) 混合標準液及びサロゲート液の濃度は使用する試料の濃度に合わせて調製することが望ましい。

d) 同定、定量及び計算

同定

対象物質の TMS 誘導体化物の定量用質量数及び確認用質量数のピークが、検量線に登録された保持時間と ± 5 秒以内に出現し、確認用質量数と定量用質量数のピーク強度比が検量線測定強度比と $\pm 20\%$ 以内の差で合っていれば、物質が存在していると見なす。

定量

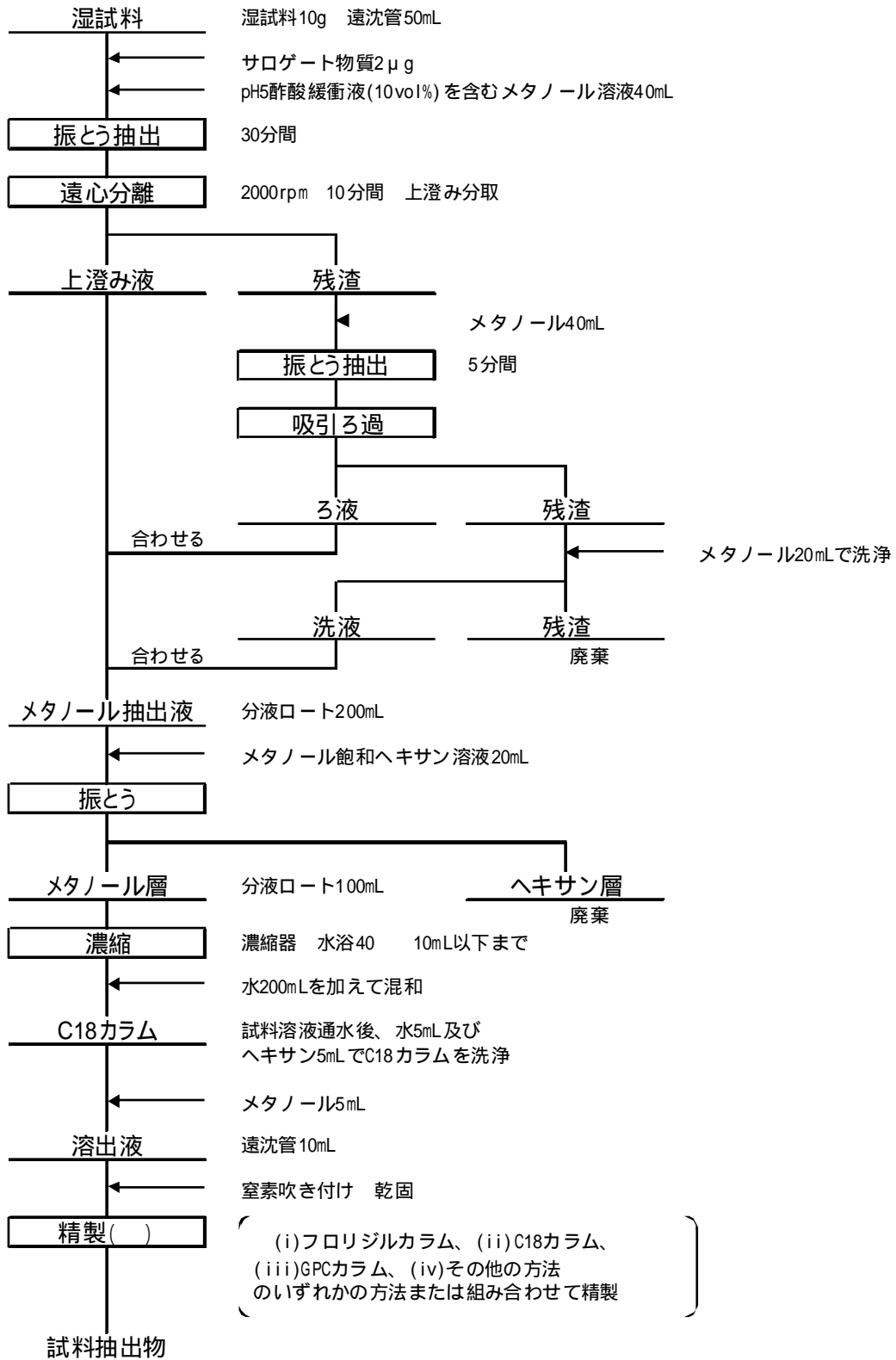
得られた各対象物質とサロゲートとのピーク面積比から検量線により検出量を求め、次式により試料中の濃度を計算する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

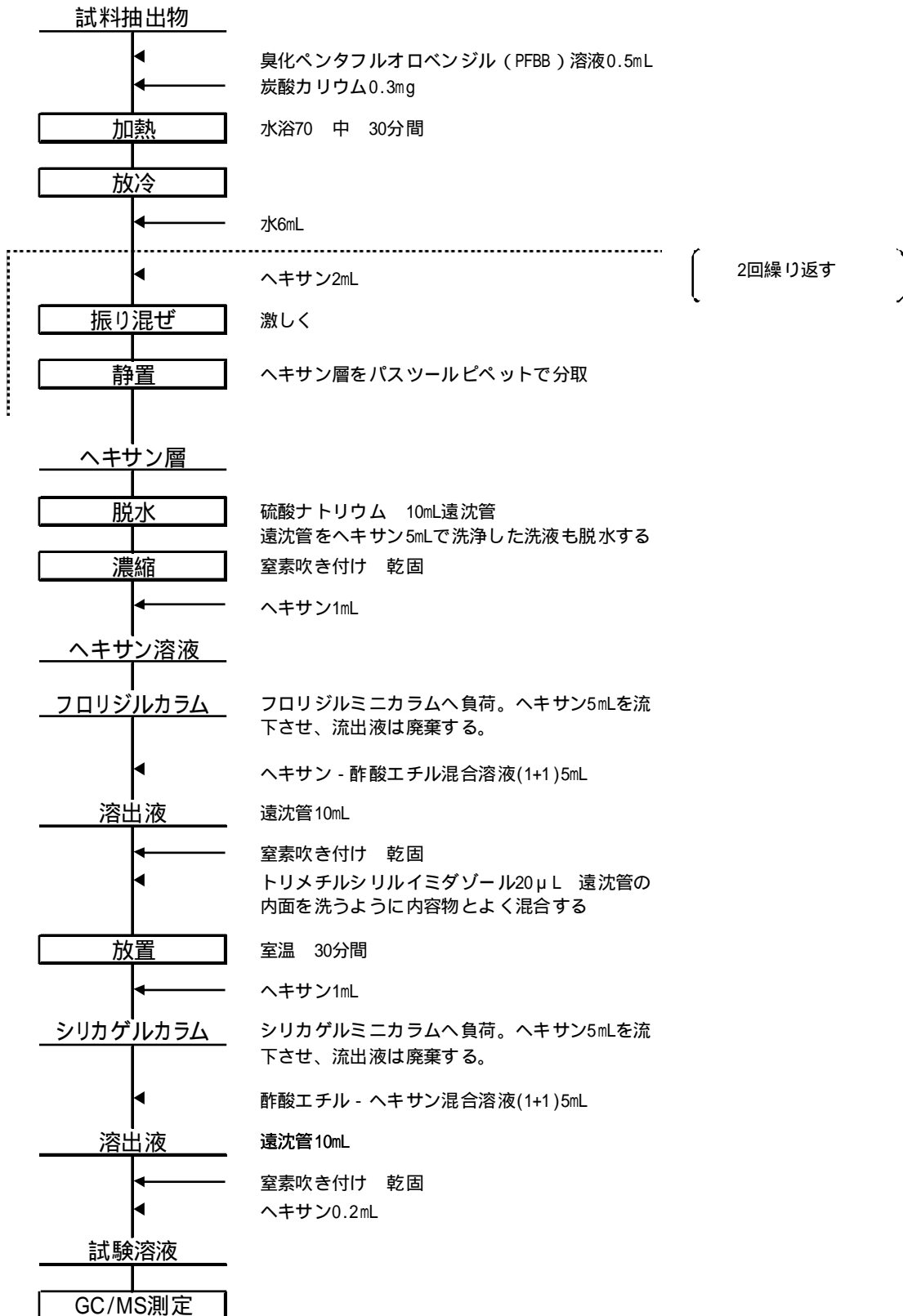
ここで、W : 試料採取量 (乾燥試料に換算した量) (g)

(6) 分析フローシート

a) 前処理



b) 試験溶液の調製



6.12 1,4-ジオキサン

(1) 測定方法の概要

試料に水を加え、振とう、遠心分離を行い、1,4-ジオキサンを水層へ抽出する。活性炭カートリッジに吸着させた後、アセトンで溶出しガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)で測定する。

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(2) 試薬

- a) 水：1,4-ジオキサンを含まないもの。
- b) アセトン：1,4-ジオキサンを含まないもの。
- c) メタノール：1,4-ジオキサンを含まないもの。
- d) 標準物質(10 µg/mL)：市販標準試薬の1,4-ジオキサンをメタノールで希釈し10µg/mLとしたもの。
- e) サロゲート物質(10 µg/mL)：市販標準試薬の1,4-ジオキサン-*d*₈をメタノールで希釈し10µg/mLとしたもの。
- f) 内標準液(10 µg/mL)：市販標準試薬のフルオロベンゼンまたは4-ブロモフルオロベンゼンをメタノールで希釈で希釈し10µg/mLとしたもの。
- g) 活性炭固相カートリッジカラム：市販の活性炭固相カートリッジカラム。使用前にアセトン20mL及び水40mLを順に通液してコンディショニングする。
- h) 固相カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体(ポリスチレン樹脂)またはこれと同等の性能を有するものを0.2~1gを充てんしたもの。使用前にアセトン20mL及び水40mLを順次穏やかに通して洗浄する。
- i) 硫酸ナトリウム：残留農薬試験用

(3) 器具及び装置

- a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ-ルピペット等：使用時にアセトン、メタノール、またはヘキサンで洗浄して用いる。

共栓付遠沈管、ピーカー、共栓付試験管：使用時にアセトン、メタノール、またはヘキサンで洗浄して用いる。
- b) 遠心分離機
- c) 振とう機
- d) 固相抽出装置
- e) アスピレーター
- f) マイクロシリンジ。
- g) 窒素吹き付け装置
- h) ガスクロマトグラフ/質量分析計

ガスクロマトグラフ(GC)

キャピラリーカラム：内径0.25mm、長さ30mの溶融シリカ製で、25%フェニル-75%ジメチルポリシロキサンを0.5µm程度の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム(99.999v/v%)を線速度20~40cm/secの範囲に調節して用いる。

カラム槽：40~150の範囲で5/minの昇温を行うことができ、測定対象物質の最適分離

条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの

注入口：250 程度に保つことができるもの

注入部：スプリットレス法により 2 分後にパージオフできるもの。

質量分析計 (MS)

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

検出器：選択イオン検出法 (SIM 法) が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

(4) 前処理操作

a) 抽出操作

有姿のまま採取した試料から小石等の異物を除去し均質な状態としたもの 20g を 50mL 遠沈管にはかり取り、サロゲート物質 (10 μ g/mL) 20 μ L を添加してよく混合する。

水 20mL を加え 10 分間振とう抽出し、2500rpm で 5 分間遠心分離を行い、上澄液をビーカー等適当な容器に移す。この操作を 3 回繰り返し、上澄液を合わせる。

上段にガラスウールを積層した固相カラム、下段に活性炭固相カートリッジカラム⁽¹⁾ となる連結カラムを固相抽出装置にセットし、 で得られた上澄液を 5mL / 分程度で通過させる。

の連結カラムを水 10mL で洗浄し、上段の固相カラムを外す。活性炭固相カートリッジカラムをアスピレーターで 2 分間吸引した後、3000rpm で 10 分間遠心分離を行い脱水する。さらに、窒素を 30 分間通気し脱水する。

で脱水した活性炭固相カートリッジカラムに通水方向と逆向きにアセトン 5mL を 0.5mL / 分程度で通液する。溶出液は硫酸ナトリウム (無水) を用いた脱水カラムにより脱水し試験管等に受ける。これに、内標準物質 (10 μ g/mL) 20 μ g/L を加えて混合し試験溶液とする。必要に応じて窒素吹き付けにより 1mL 程度まで濃縮する。

b) 空試験溶液の調製

水 60mL にサロゲート物質 (10 μ g/mL) 20 μ L を添加してよく混合する。

a) ~ の操作を行って得られた溶液を空試験溶液とする。空試験溶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。

注(1) 回収率が低い場合、活性炭固相カートリッジカラムからの破過が考えられるので、その場合は活性炭固相カートリッジカラムを 2 個直列に用いるとよい。

(5) 測定

a) GC/MS条件の例

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

ガスクロマトグラフ (GC)

使用カラム：25%フェニル-75%ジメチルポリシロキサンを被覆したカラム (内径 0.25mm、長さ 30m、膜厚 0.5 μ m) または同等以上の分離性能をもつもの⁽²⁾

カラム温度：50 (5min) (10 /min) 70 (40 /min) 310

注入口温度：250

キャリアーガス：純度 99.999v/v%以上のヘリウム

質量分析計 (MS)

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化電圧：70V

検出法：選択イオン検出法（SIM法）

測定質量数：表 6.11-2 による⁽¹⁰⁾

質量分析計の調整：MS に質量校正用標準物質（PFTBA または PFK）を導入し、MS の質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能 { 質量数 (m/z) = 18 ~ 300 程度以上の範囲で 1 質量単位 (amu) 以上 } 等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.12-1 測定質量数

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
1,4-ジオキサン	88	58
[サロゲート物質]		
1,4-ジオキサン- <i>d</i> ₈	96	94
[内標準物質]		
フルオロベンゼン	96	70
4-ブロモフルオロベンゼン	174	95

b) 検量線

標準物質（10µg/mL）を適宜アセトンで希釈し、0.05 ~ 5µg/mL の範囲で段階的に標準液を調製する。

各標準液 960µL にサロゲートおよび内標準液各 20µL を添加し、その 1µL を GC/MS に注入する。注入した物質質量（検出量）に対するサロゲートと対象物質の面積比を求め、検量線を作成する。

c) 試料の測定

試験溶液 1µL 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検出量を内標準法で求める。

d) 定量及び計算

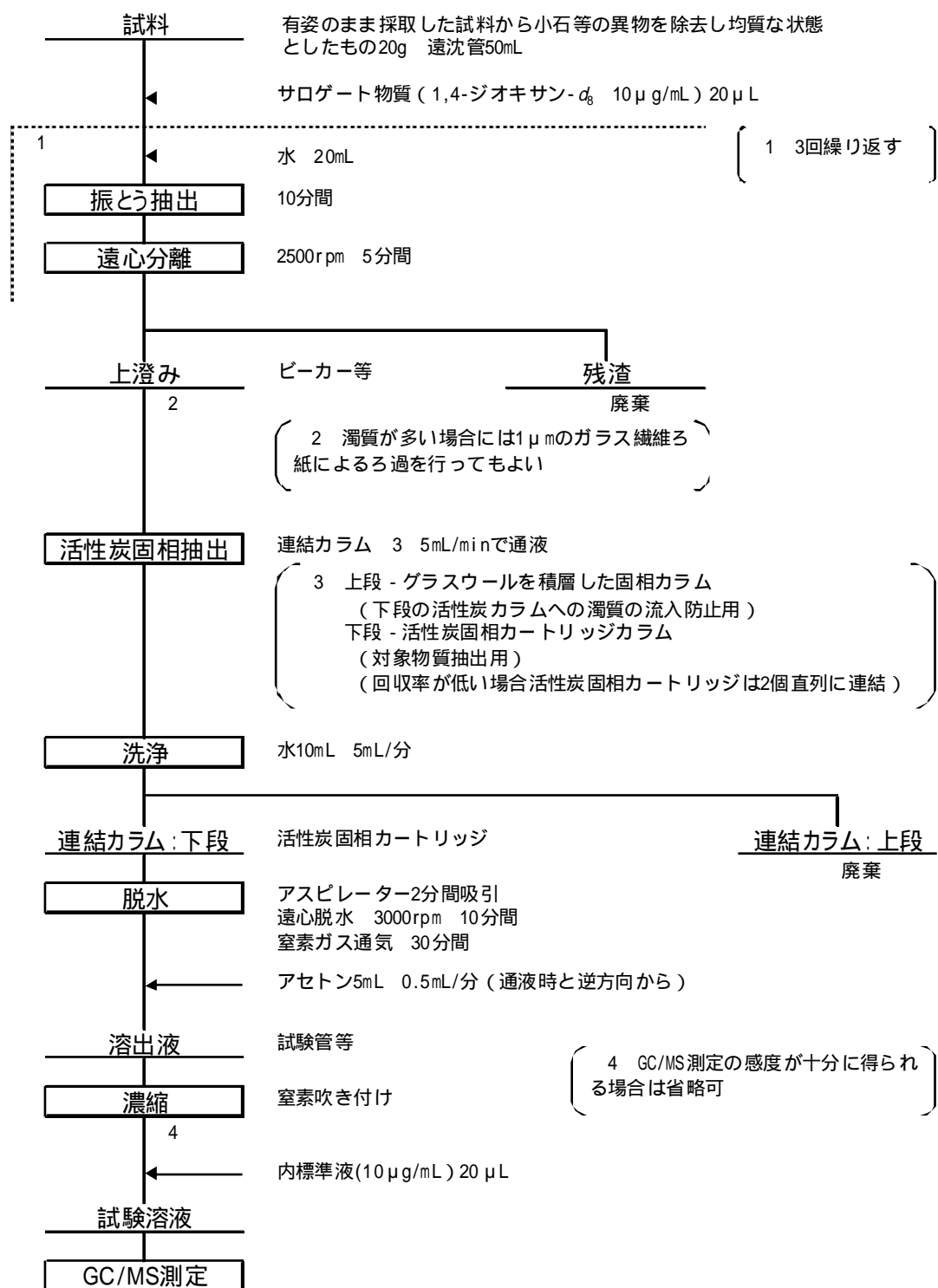
次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

ここで、W : 試料採取量（乾燥試料に換算した量）(g)

注(2) DB-WAX など（備考 1）

(6) 分析フロー



6.13 フェノール

本分析方法は、フェノールについて記したものである。

(1) 測定方法の概要

試料にサロゲート物質を添加し、塩酸酸性にしたメタノールで抽出する。その抽出液を水酸化ナトリウムでアルカリ性にし、ヘキサンで洗浄後、再度塩酸酸性とし、ジクロロメタンで抽出する。この抽出液を脱水・濃縮して、2-プロパノールに転溶後、ペンタフルオロベンジル (PFB) 誘導体化を行う。PFB 誘導体化物をヘキサンで抽出し、脱水・濃縮し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて測定する。

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(2) 試薬

- a) 水：フェノールを含まないもの
- b) メタノール：残留農薬試験用
- c) ヘキサン：残留農薬試験用
- d) ジクロロメタン：残留農薬試験用
- e) 2-プロパノール：試薬特級
- f) 塩酸：JIS K 8180 に規定するもの
- g) 水酸化ナトリウム：試薬特級
- h) 塩化ナトリウム：残留農薬試験用
- i) 硫酸ナトリウム：残留農薬試験用
- j) 臭化ペンタフルオロベンジル (PFBB) 溶液：臭化ペンタフルオロベンジル市販品⁽¹⁾1g 及び 18-クラウン-6-エーテル 1g を 2-プロパノールで溶かし 50mL としたもの (この溶液は冷暗所保存で 1 週間安定である)
- k) 炭酸カリウム：試薬特級
- l) フェノール標準物質：市販標準試薬のフェノール。
- m) サロゲート物質：市販標準試薬のフェノール-2,3,4,5,6-*d*₅
- n) 内標準物質：市販標準試薬のフェナントレン-*d*₁₀
- o) フェノール標準液：フェノール標準物質 100mg をメタノール 100mL に溶かし 100mL としたものの⁽²⁾から調製する
 - フェノール標準液(2 µg/mL)：フェノール標準液(1mg/mL)1mL をメタノールで適宜希釈し 2µg/mL としたもの。
 - フェノール標準液(20 µg/mL)：フェノール標準液(1mg/mL)1mL を 2-プロパノールで 50mL としたもの。添加回収試験用に用いる。
- p) サロゲート溶液(2 µg/mL)：サロゲート物質 100mg をメタノールに溶かし 100mL としたものの (1mg/mL) を原液とし、これをメタノールで適宜希釈して 2µg/mL としたもの。
- q) 内標準液(2 µg/mL)：内標準物質(フェナントレン-*d*₁₀)100mg をヘキサンに溶かして 100mL としたものの (1mg/mL) を原液とし、これをヘキサンで適宜希釈して 2µg/mL としたもの。

注(1) 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(2) 市販の標準液を用いても良い。

(3) 器具及び装置

a) ガラス器具

全量フラスコ、全量ピペット、パスツ-ルピペット等：使用時にアセトン及びヘキサンで洗淨して用いる。

共栓付遠沈管、分液ロート、ナス型フラスコ、共栓付試験管等：使用時にアセトン及びヘキサンで洗淨して用いる。

b) 遠心分離機

c) 振とう機

d) 濃縮器：ロータリーエバポレーター

e) マイクロシリンジ。

f) 窒素吹き付け装置

g) 水浴

h) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)

ガスクロマトグラフ (GC)

試料導入部：スプリットレス、またはオンカラム方式など、試料の全量をカラム内に導入可能なもの

カラム：内径 0.2 ~ 約 0.7mm、長さ 10 ~ 30m の熔融シリカ製のキャピラリーカラム。内壁にフェニルメチルポリシロキサン（またはジメチルポリシロキサン）を 0.1 ~ 1.5 μ m の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム

カラム恒温槽：温度制御範囲が 50 ~ 350 であり、測定対象物質の最適分離条件の温度にできるような昇温プログラムが可能なもの

質量分析計 (MS)

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

検出器：選択イオン検出法 (SIM 法) が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

電子加速電圧：70V

(4) 前処理操作

a) 抽出操作

3.1 で調整した湿試料 1 ~ 10g を遠沈管 50mL にはかり取り、サロゲート (2 μ g/mL) 溶液 50 μ L を加えて十分混合する⁽³⁾。

1mol/L 塩酸含有メタノール 30mL を加えて 10 分間振とう抽出する。抽出後、2000rpm で 10 分間遠心分離を行い上澄み液を分取し、分液ロート 1L (A) に移す。残渣に 1mol/L 塩酸含有メタノール 20mL を加えて再度振とう抽出及び遠心分離を行い上澄み液を分液ロート 1L (A) に合わせる。

これに水 450mL、1mol/L 水酸化ナトリウム溶液 50mL、塩化ナトリウム 100g を加えてよく振り混ぜた後、ヘキサン 100mL を加え 10 分間振とうし、水層を洗淨する。

の水層を、別の分液ロート 1L (B) に移し、6mol/L 塩酸を用いて pH3 以下に調整する。

ジクロロメタン 50mL を加えて 10 分間振とう抽出を行い、ジクロロメタン層は硫酸ナトリウムを用いた脱水カラムにより脱水して、ナス型フラスコ 300mL に受ける。この操作を再度繰り返しジクロロメタン層を合わせる。

ジクロロメタン抽出液をロータリーエバポレーターを用いて 40 以下で約 10mL まで濃縮して共栓付試験管 20mL に移す。ナス型フラスコはジクロロメタンで洗浄し、その洗液も合わせる。窒素を穏やかに吹き付け、液量を 1mL 程度とする。これに、2-プロパノール 1mL を加え、窒素を穏やかに吹き付けて液量を 1mL 程度とし、ジクロロメタンを 2-プロパノールに置換したものを前処理液とする。

b) 試験溶液の調製

(4)(a)で調製した前処理液に、臭化ペンタフルオロベンジル (PFBB) 溶液 0.5mL 及び炭酸カリウム 3mg を加えて軽く振り混ぜて密栓し、80 の水浴上で 30 分間加熱する。

放冷後、20%塩化ナトリウム水溶液 6mL を加えて振り混ぜ、未反応の PFBB 溶液を分解する。

これにヘキサン 2mL を加えて激しく振り混ぜフェノールのペンタフルオロベンジル (PFB) 誘導体化物を抽出する。ヘキサン層をパスツールピペットで取り、少量の硫酸ナトリウムを詰めた脱水カラムを通して脱水し、共栓付試験管 10mL に移す。この操作を再度繰り返しヘキサン層を合わせる。

ヘキサン抽出液を窒素吹き付けにより 1mL 以下としたのち、内標準液(フェナントレン- d_{10}) 100ng を加え、ヘキサンで正確に 1mL に定容したものを試験溶液とする。

c) 空試験溶液の調製

試料と同量の水を用いて、試料と同時に a)と b)の操作を行い空試験溶液とする。空試験溶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。

注(3) この添加量は、10g 採泥の場合の試料中濃度に換算すると 10 μ g/kg に相当する。試料中のフェノールのおおよその濃度が分かっている場合は、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。その場合、検量線作成標準液の添加量も変更する。

(5) 測定

a) GC/MSの分析条件の例

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

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 (内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25 μ m)

カラム温度：60 (2min) (5~20 /min)⁽⁴⁾ 300 (2min)

キャリアーガス：ヘリウム、流量 1mL/分 (定流量モード)

試料導入法：スプレットレス方式 (60sec)

注入口温度：290

質量分析計 (MS)

インターフェース温度：280

イオン化法：電子衝撃イオン化(EI)法

電子加速電圧：70V

イオン源温度：250

検出法：選択イオン検出法 (SIM 法)

測定質量数：表 6.13.1 による

質量分析計の調整：MS に質量校正用標準物質 (PFTBA または PFK) を導入し、MS の質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能 { 質量数 (m/z) =18 ~ 300 程度以上の範囲で 1 質量単位 (amu) 以上 } 等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.13-1 測定質量数

測定物質	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
フェノールのPFB誘導体化物	274	65
[サロゲート物質]		
フェノール- <i>d</i> ₅ のPFB誘導体化物	279	70
[内標準物質]		
フェナントレン- <i>d</i> ₁₀	188	184

注(4) 例えば、60 (2min) (20 /min) 130 (10 /min) 210 (5 /min) 260 (10 /min) 300 (2min)

b) 検量線

10mL の共栓付試験管に 2-プロパノール 1mL、フェノール標準溶液(20 μ g/mL)を適宜希釈し段階的に 0.01 ~ 1 μ g の範囲で添加する。

サロゲート 100ng (2 μ g/mL メタノール溶液 50 μ L) を加えよく混合する。

(4b) ~ の操作を行い、検量線用試料とする。

この溶液 1 μ L を GC/MS に注入し、内標準物質により補正したサロゲート物質とのピーク面積比を用いて横軸にフェノールとサロゲート物質との濃度比を、縦軸にはピーク面積比を取り、検量線を作成する。

c) 測定

検量線と同様に試験溶液 (1 μ L) を GC/MS に注入し、内標準物質により補正したフェノールとサロゲート物質とのピーク面積比から、検量線によりフェノールとサロゲート物質との濃度(重量)比を求める。

d) 定量及び計算

c)で求めたフェノールとサロゲート物質との濃度(重量)比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、検体中のフェノール濃度を算出する。

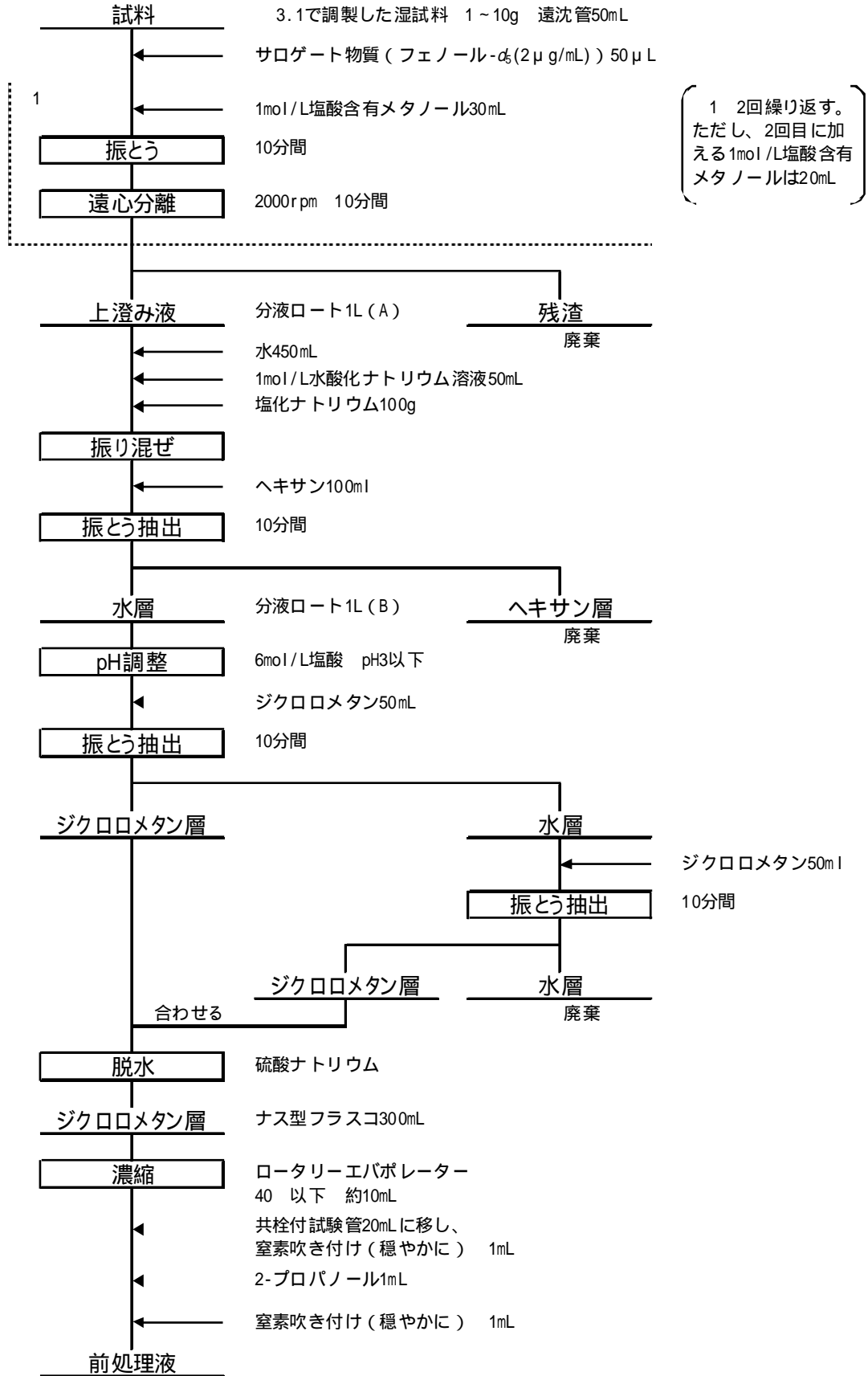
また、サロゲート化合物と内標準物質とのピーク面積比を求め、相対感度係数からサロゲート化合物の重量を求め、その回収率を求めておく。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

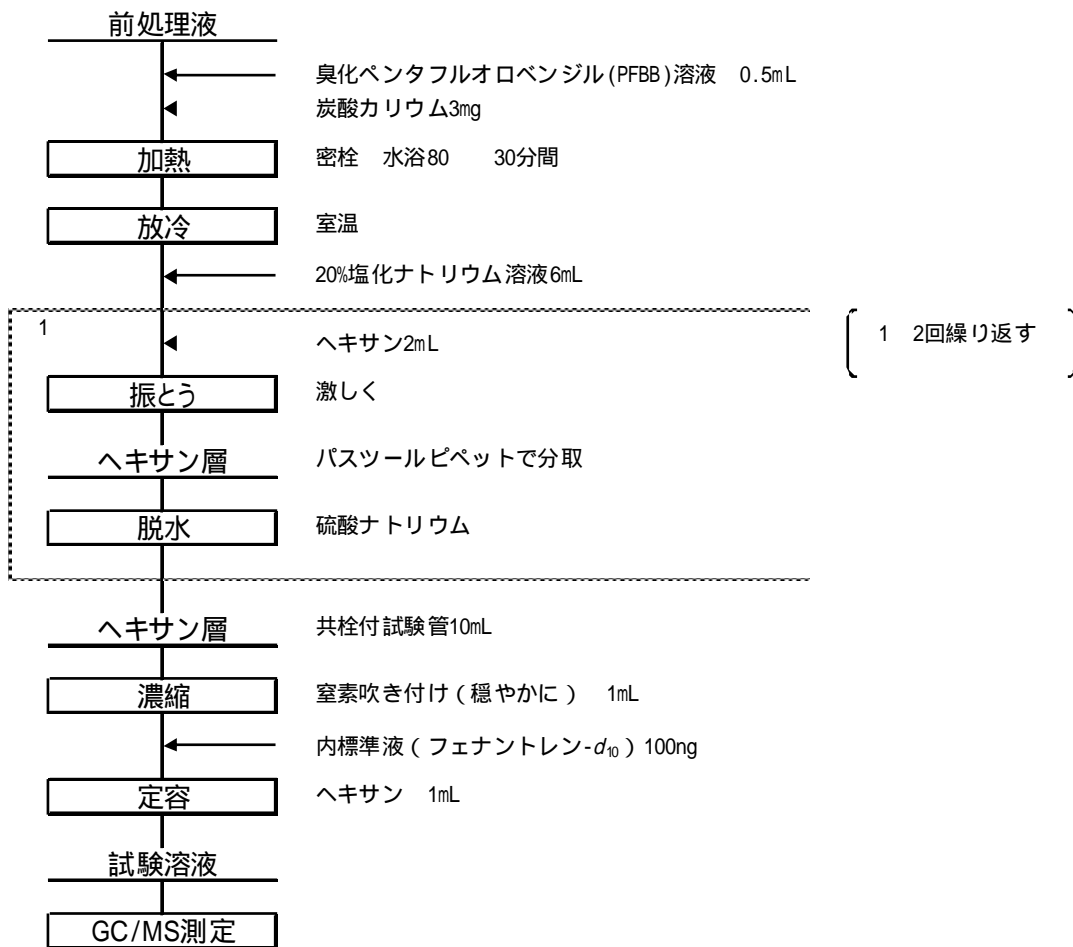
ここで、W : 試料採取量(乾燥試料に換算した量)(g)

(6) 分析フローシート

a) 抽出操作



b) 試験溶液の調製



6.14 ホルムアルデヒド

(1) 測定方法の概要

試料に水を加え、ホルムアルデヒドを抽出する。これに *O*-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン (PFBOA) 溶液を加えて PFBOA ホルムアルドキシム誘導体化物とし、ヘキサンで抽出後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定する。

ここで対象とするホルムアルデヒドは遊離状態のもので、結合状態のものとは対象としない。

備考 1 本分析方法で記載する器材はこのマニュアル使用者の便宜のため、一般に入手できるものとして商品名等を例示している場合があるが、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。

(2) 試薬

- a) 水：ホルムアルデヒドを含まないもの
- b) ヘキサン：残留農薬試験用
- c) 硫酸(1+1)：水 1 容をビーカーにとり、これをかき混ぜながら JIS K 8951 に規定する硫酸 1 容を徐々に加えて調製する
- d) 塩化ナトリウム：JIS K 8150 に規定する塩化ナトリウムを 250 以上で 2 時間以上加熱したものの
- e) 硫酸ナトリウム：JIS K 8987 に規定するもの
- f) 標準物質 (1000 µg/mL)⁽¹⁾：市販のホルムアルデヒド標準品
- g) 内標準物質 (10 µg/mL)：ナフタレン-*d*₈
- h) *O*-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン (PFBOA) 溶液：市販の *O*-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)-ヒドロキシルアミン塩酸塩 600mg を水に溶かして 100mL としたものの

注(1) ホルムアルデヒド標準品の溶媒がメタノールである場合に底質への添加回収試験でホルムアルデヒドが生成することがあるので、標準溶液の希釈は水で行うこと。

(3) 器具及び装置

- a) ガラス器具
 - 全量フラスコ、全量ピペット、パスツ - ルピペット等：使用時にアセトン及びヘキサンで洗浄して用いる。
 - 共栓付遠沈管、分液ロート、共栓付試験管等：使用時にアセトン及びヘキサンで洗浄して用いる。
- b) 遠心分離機
- c) 振とう機
- d) 濃縮器：ロータリーエバポレーター
- e) マイクロシリンジ
- f) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)
 - ガスクロマトグラフ
 - 試料導入部：スプリットレス、またはオンカラム方式など、試料の全量をカラム内に導入可能なもの。
 - キャピラリーカラム：内径 0.25mm、長さ 30m の溶融シリカ製で、5%フェニルメチルポリシロキサンを 0.25µm 程度の厚さで被覆したもの。またはこれと同等の分離性能をもつもの。

キャリアーガス：ヘリウム (99.999vol %)

カラム恒温槽：温度制御範囲が 50～350 であり、測定対象物質の最適分離条件の温度にできるような昇温プログラムが可能なもの。

質量分析計

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

検出器：選択イオン検出法 (SIM 法) が行え、所定の定量範囲に感度が調節できるもの。または同等の方法が行えるもの。

イオン源温度：機器の最適条件にする。

イオン化エネルギー：70eV

(4) 前処理操作

a) 抽出操作

3.1 で調製した湿試料 2g を遠沈管 100mL にはかりとり、水 50mL を加え 20 分間振とう抽出し、2500rpm で 20 分間遠心分離を行い、上澄み液を分液ロート 200mL へ移す。残渣に水 50mL を加え同様に抽出した上澄み液を分液ロート 200mL へ合わせる。

抽出液に PFBOA 溶液 2mL 加えて密栓して振り混ぜ、2 時間放置する。

硫酸(1+1)1.6mL を加えて 5 分間振とうした後、分液ロート 200mL に塩化ナトリウム 25g を加えて溶解させる。これにヘキサン 10mL を加えて 10 分間振とう抽出して水層を捨てる。

内標準液 1mL を加えて混合した後、硫酸ナトリウム 2g で脱水したものを試験溶液とする⁽²⁾。

b) 空試験溶液の調製

水 100mL を 200mL 分液ロートにとり、a) ~ の操作を行った溶液を空試験溶液とする。空試験溶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。

注(2) PFBOA ホルムアルドキシムは揮発性が高いために、濃縮操作を行うと揮散する可能性がある。

(5) 測定

a) GC/MSまたはGCの分析条件の例

GC/MS の分析条件の設定を行う。GC/MS の分析条件の一例を参考として示す。これを参考に適宜設定する。

ガスクロマトグラフ (GC)

使用カラム：HP-5ms 5%フェニルメチルポリシロキサン⁽³⁾

(内径 0.25mm、長さ 30m、液相膜厚 0.25 μ m)

カラム温度：50 (1分) - (20 /分) - 140 - (10 /分) - 230 - (40) - 310

キャリアーガス：ヘリウム、流量 0.9mL/分 (定流量モード)

試料導入法：スプレットレス方式 (1 分後にパージ開始)

試料注入量：1 μ L

注入口温度：250

質量分析計 (MS)

インターフェース温度：280

イオン化法：電子衝撃イオン化法 (EI 法)

イオン化エネルギー：70eV

イオン源温度：250

検出法：選択イオン検出法 (SIM 法)

測定質量数⁽⁴⁾：表 6.14-1 による

質量分析計の調整：MS に質量校正用標準物質（PFTBA または PFK）を導入し、MS の質量校正プログラム等によりマスパターン及び分解能 { 質量数 (m/z) = 18 ~ 300 程度以上の範囲で 1 質量単位 (amu) 以上 } 等の校正を行うとともに、装置の感度等の基本的なチェックを行う。質量校正結果は測定結果とともに保存する。

表 6.14-1 測定質量数

化 合 物 名	測定質量数	
	定量用	確認用
[対象物質]		
PFBOAホルムアルドキシム	181	195
[内標準物質]		
ナフタレン- <i>d</i> ₈	136	

b) 検量線

水 100mL を入れた 200mL 分液ロートに、ホルムアルデヒド標準物質（1000μg/mL）を適宜希釈⁽¹⁾し段階的に 0.1 ~ 1μg の範囲で添加する。

について(4)a) ~ の操作を行った溶液を検量線用試料とする。

この溶液 1μL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、ホルムアルデヒド量を横軸に、内標準物質で補正した PFBOA ホルムアルドキシムのピーク面積比を縦軸に検量線を作成する。

c) 試料の測定

検量線と同様に試験溶液（1μL）を GC/MS に注入し、内標準物質と PFBOA ホルムアルドキシムとのピーク面積比を求め、試料溶液中のホルムアルデヒドの検出量を求める。

d) 定量及び計算

次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

$$\text{試料濃度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{検出量}(\text{ng}) \times \frac{\text{試験溶液量}(\text{mL})}{\text{注入量}(\mu\text{L})} \times \frac{1}{W(\text{g})} \times 1000$$

ここで、W : 試料採取量（乾燥試料に換算した量）(g)

注(3) DB-5、SPB-5、CP-SIL-5、及び HP-5 等の名称で市販されている（備考 1）。

注(4) () は確認用質量数

(6) 分析フロー

