

平成12年度環境測定分析統一精度管理調査
実施要領

- 水質試料 -

1. 調査目的

本調査は、環境測定分析に従事する諸機関が、均一に調製された環境試料を指定された方法又は任意の方法により分析することによって得られる結果と前処理条件、測定機器の使用条件等との関係その他分析実施上の具体的な問題点等の調査を行うことにより、全国の分析機関におけるデータのばらつきの程度に関する実態を把握し、参加機関の分析者が自己の技術を客観的に認識して、環境測定分析技術の一層の向上を図る契機とするとともに、各分析法についての得失を明らかにして、分析手法、分析技術の改善を図り、もって、環境測定分析の精度の向上を図り、環境測定データの信頼性の確保に資することを目的とする。

2. 分析対象項目

(1) 模擬水質試料1（金属類分析用）

試料中のアンチモン、ニッケル、水銀及びカドミウムの4項目を測定対象とする。

参加機関は2項目以上を選択し、分析を行う。

(2) 模擬水質試料2（内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン類）分析用）

試料中のスチレン2量体（1,3-ジフェニルプロパン、~~シス~~1,2-ジフェニルシクロブタン、~~トランス~~1,2-ジフェニルシクロブタン及び2,4-ジフェニル-1-ブテンの4項目）、スチレン3量体（2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、1-フェニル-4-(1'-フェニルエチル)テトラリン及び1,3,5-トリフェニルシクロヘキサンの3項目）及びエストラジオール類（17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール及びエチニルエストラジオールの3項目）の3種類（10項目）を測定対象とする。

参加機関は1項目以上を選択し、分析を行う。

3 . 共通試料の概要

区分	名 称	送付量	容 器	個 数	備 考
共通試料 1	模擬水質試料 1 (金属類分析用)	約100 ml	ホ [°] リエチレン 製瓶	1	硫酸(2mol/l)酸性 水溶液 塩化ナトリウム1.5g/l
共通試料 2	模擬水質試料 2 (環境ホルモン類 分析用)	約20 ml	ガ [°] ラス製 ア [°] ンプル	1	有機溶媒(メタノール) 溶液

上記の共通試料 1 及び 2 は、いずれも高濃度に調製しているので、分析に際しては、必ず 5 . の (1) に示す希釈方法に従って分析用試料を作成すること。

4 . 分析方法

共通試料 1 については、「水質汚濁に係る環境基準について」(昭和 46 年環境庁告示第 59 号。以下、「水質環境基準告示」という)に定める方法又は「水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準の測定方法及び要監視項目の測定方法について」(平成 5 年環水規 121。以下、「要監視項目測定方法通知」という)に定める方法により分析する。

共通試料 2 については、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物)」(平成 10 年環境庁水質保全局水質管理課。以下、「環境ホルモン測定方法通知」という)に定める方法又は「要調査項目等調査マニュアル(水質、底質、水生生物)」(平成 11 年環境庁水質保全局水質管理課。以下、「要調査項目等測定方法通知」という)に定める方法により分析する。

なお、以上の方法に基づき作成した「平成 12 年度環境測定分析統一精度管理調査参考方法 - 水質試料 - 」(以下、「参考方法」という)を添付している。

【分析方法の概要】

(1) 水質試料 1 (金属類)

分析方法	アンチモン	ニッケル	水銀	カドミウム
フレイム原子吸光法				
電気加熱原子吸光法				
還元気化原子吸光法				
水素化物発生原子吸光法				
ICP 発光分析法				
水素化物発生 ICP 発光分析法				
ICP 質量分析法				

注) : 水質環境基準告示の方法
 : 要監視項目測定方法通知の方法

(2) 水質試料 2 (環境ホルモン類)

分析方法	スチレン 2 量体	スチレン 3 量体	エストラジール類
溶媒抽出 - ガスクロマトグラフ質量分析法			
固相抽出 - メチル誘導体化 - ガスクロマトグラフ質量分析法			
固相抽出 - ペンタフルオロペンシル誘導体化 - ガスクロマトグラフ質量分析法			

注 1) : 環境ホルモン測定方法通知の方法
 : 要調査項目等測定方法通知の方法

注 2) 環境ホルモン測定方法通知では 17 - エストラジールの分析方法として、固相抽出 - tBDMS 誘導体化 - ガスクロマトグラフ質量分析法及び固相抽出 - ELISA 法が規定されているが、以下の事項により表には含めていない。
 ・ tBDMS 誘導体化法はクリーンアップ操作が煩雑であり、また高度な技術が必要である。
 ・ ELISA 法は 17 - エストラジール、17 - エストラジール及びイチニルエストラジールの 3 項目を区別して測定できない。

【基準値及び測定方法】

項目	基準値、指針値 (mg/l)	測定方法	備考 (目標検出限界)
アンチモン (Sb)	(0.002以下：監視項目の指針値) *	規格62.2に定める方法又は要監視項目測定方法通知付表6に掲げる方法	-
ニッケル (Ni)	(0.01以下：監視項目の指針値) *	規格59.3に定める方法又は要監視項目測定方法通知付表4若しくは5に掲げる方法	
水銀 (Hg)	0.0005以下 (水質環境基準)	水質環境基準告示付表1に掲げる方法	-
カドミウム (Cd)	0.01以下 (水質環境基準)	規格55.1、55.2、55.3又は55.4に定める方法	-
スチレン2量体	-	環境ホルモン測定方法通知に定める方法	0.01 µg/l
スチレン3量体	-		0.01 µg/l
エストロゲン類	-	要調査項目等測定方法通知に定める方法	0.1ng/l
(17-β-エストロゲン)	-	環境ホルモン測定方法通知に定める方法	2.8ng/l

注) * : 要監視項目としては指針値は、設定されていない。この表中には、参考として「水道水質に関する基準の制定について」(平成4年衛水第264号)において設定されている監視項目の指針値を示す。

5. 分析実施上の注意

(1) 分析用試料の作成方法

共通試料1 (金属類析用、模擬水質試料1)

試料到着後、直ちに測定できない場合は、冷蔵庫等冷暗所で保存する。

試料を水で正確に100倍に希釈し、分析用試料とする(例えば、全量ピペットで10mlをとり、1000ml全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて分析用試料とする)。

なお、分析用試料を調製後、直ちに分析する。

共通試料2 (環境ホルモン類分析用、模擬水質試料2)

試料到着後、直ちに測定できない場合は、冷蔵庫等冷暗所で保存する。

試料をメタノール及び水で、次のように正確に10000倍に希釈し、

分析用試料を調製する。

まず、試料をメタノールで正確に10倍に希釈し、10倍希釈試料を調製する。(例えば、全量ピペットで10mlをとり、100ml全量フラスコに入れ、メタノールを標線まで加えて、10倍希釈試料とする)。次に、この10倍希釈試料を水で正確に1000倍に希釈し、分析用試料とする(例えば、全量ピペットで10倍希釈試料2mlをとり、2000ml全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて、分析用試料とする)。

なお、分析用試料を調製後、直ちに分析する。

(2) 分析結果については、共通試料1は希釈した分析試料1リットル当たりの各成分mg (mg/l)、共通試料2のスチレン2量体及びスチレン3量体は希釈した分析試料1リットル当たりの各成分μg (μg/l)、共通試料2のエストラジオール類は希釈した分析試料1リットル当たりの各成分ng (ng/l)として報告する。

なお、共通試料2のスチレン3量体の内、1-フェニル-4-(1'-フェニルエチル)テトラリンについては、異性体の合計濃度(μg/l)として報告する。

(3) 分析にあたっては、試薬、器具等からの汚染に十分注意して行う。また、上記(1)の分析用試料の作成においても汚染に十分注意して行う。

6. 報告書記入に当たっての留意点

(以下に示す番号、 、 、 、 、 、 、 は報告書中の回答欄番号)

- ・ *印の欄には記入しない。
- ・ 報告書分析結果及びフローシートの記入例(アンチモン)を参考とし、次の点に留意して記入すること。

ISO9001等の認証を得ているかどうか、平成12年7月1日時点で記入する。

「分析主担当者氏名」欄は、実際にその項目の分析を手がけた人の氏名(複数で分析を行った場合は主として実施した人の氏名)を記入する。

「分析主担当者の経験年数」欄には分析主担当者の分析業務経験年数を記入する。

「分析主担当者の実績(検体数)」欄は、分析主担当者が昨年度(平成11年度)に分析を行った環境試料の該当項目のおよその検体数を記入する。

「分析結果」は、有効数字3桁(有効数字4桁目を四捨五入する)で表示する。2回以上の測定を行った場合には、平均値を記入する。ただし、不検出の場合は検出限界値(例：)を示す。検出限界値は、次のように求める。

- ・原子吸光法については、ベースラインのノイズの2倍相当として算出する。
- ・ICP発光分析法については、ベースラインのノイズの3倍相当として算出する。
- ・質量分析法については、空試験溶液を調製し、それらの測定値の標準偏差の3倍相当として算出する。

3回以上の測定を行った場合には「標準偏差」欄に次式で計算した結果を有効数字3桁で表示する。

「測定回数」はn（整数）を記入する。「測定回数」とは、分析用試料の計り取りから吸光度等の測定までの一連の操作を行った回数である。

$$\text{標準偏差} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

ただし、 x_i は分析結果
 \bar{x} は平均値
 nは測定回数

「分析開始日」には分析（前処理操作を含む）を開始した日を、また「分析終了日」には定量操作を完了した日付を記入する。

⑩ 選択した分析法の番号を選ぶ。

以降は、2回以上の測定を行った場合には、それらの中から代表となる一例を選び、その測定について必要事項を記入欄に記入する。

- ・原子吸光法等において選択した測定波長を記入する。
 - ・試料の計り取り量（試料量）を記入する。
 - ・予備還元を用いた試薬の番号を選ぶ。
 - ・水素化物発生原子吸光法における測定条件について記入する。
 - ・水素化物発生ICP発光分析法における測定条件について記入する。
 - ・検量線の作成方法等について記入する。
- ・「分析実施にあたっての留意した点及び問題と感じた点」については、「前処理」、「測定方法」、「分析全般」に分けて記入する。分析試料の調製（使用した水等）、器具の洗浄方法、空試験に関する事項は、「分析全般」として記入する。
 - ・質問のうち、番号はそのうちのひとつを選び、（ ）内には具体的に記入する。
 - ・アンチモン以外の項目についても、上記を参考にして記入する。
 - ・報告書は必要に応じてコピーして使用する。

- ・ 報告書用紙は、「参考方法」の内容を考慮して作成してあるので、それ以外の方法を用いる場合には、分析法の選択（アンチモンでは の回答欄）において「その他」を選び、（ ）内に具体的な分析方法を記入し、必要な場合はフローシートを添付する。

7 . 提出報告書等

- ・ 報告書（分析結果及びフローシート）[1] ~ [6]
 - ・ 原子吸光法、I C P 発光分析法及び I C P 質量分析法のチャート類、ガスクロマトグラフ質量分析法の S I M クロマトグラム、並びに検量線（チャート類、S I M クロマトグラム及び検量線については整理の都合上、分析項目別に 1、2 枚以内にまとめて下さい）
 - ・ 分析フローシート（「参考方法」と異なる方法を用いた場合）
- なお、報告書にはチャート類、S I M クロマトグラム（試料と標準液の両方）を必ず付けてください。

8 . 報告書の提出期限

平成 1 2 年 1 0 月 2 日（月）（必着）

なお、昨年度までは、結果報告の受領後であっても、参加機関からの申し出に基づき、計算間違いや記述間違いの訂正を行っていましたが、今年度は一旦受領した報告については、訂正があっても受け付けませんので、ご了承願います。

9 . 提出書類の送り先及び本調査に対する問合せ先

〒 2 1 0 - 0 8 2 8 川崎市川崎区四谷上町 1 0 - 6
（財）日本環境衛生センター 環境科学部環境対策課
T E L 0 4 4 (2 8 8) 5 1 3 2 担当者 西尾

(記入例)

報告書〔1〕 分析結果及びフローシート

1 アンチモン

分析依頼者名	(株)日環センター	電話番号	044-288-5132	依頼された業務	① 110 9901~9905 ② 100 (499) ③ 150/IC 11021 ④ 11/231 4. その他
分析依頼者名	日環花工	分析依頼者の関係機関	11	分析依頼者の所属(部署)	30 課

検体 分析結果 (mg/l)	検体濃度 (mg/l)	測定結果 (値)
0.105	-	1

図1) 2層以上の測定を行った場合は、平均値を記入する。また、測定結果(1)の検体濃度に基づいて算出した分析結果の値を記入する。
 なお、二重測定した結果については、算出された検体濃度の平均値を記入する。測定結果(1)の検体濃度に基づいて算出した分析結果の値を記入する。

分析開始日	9月1日
分析終了日	9月1日



<分析結果>

分析種	① 水酸化亜鉛生成元素分析法 ② 水酸化亜鉛生成ICP発光分析法 ③ その他()
測定結果	0.00329mg
試料の分量	0.125ml
分析結果に用いた試薬	① ナトリウム ② 高純カリウム ③ その他()



<水酸化亜鉛生成ICP発光分析法>

導入方法	① 連続式 ② 逐次式 ③ その他()
分析装置の構成	① 1. しない ② 高純硝酸 ③ 高純硝酸 ④ その他()
分析装置の構成	① 水酸化亜鉛 ② 高純硝酸 ③ その他()

<水酸化亜鉛生成ICP発光分析法>

測定装置	① 検出装置 ② 検出装置(1+1)
分析装置の構成	① 1. 有り ② 行かない
測定時間	① ()分/検体

<検出装置の作成等>

測定装置	① 検出装置 ② 検出装置
検出装置の作成	検出装置(1+1) ① 5 検出装置(1+1) ① 10 ② 10 検出装置(1+1) ① 10 ② 10 検出装置(1+1) ① 10 ② 10 検出装置(1+1) ① 10 ② 10 検出装置(1+1) ① 10 ② 10
検出装置の構成	① 6990
検出装置 検体	① (0.00)mg/l

図1) 測定結果中の値又は検出装置です。
 図2) 試料中の濃度です。

分析結果にあたっての留意した点及び問題と対応した点

測定値について	なし。
測定方法について	なし。
分析装置について	なし。

平成12年度環境測定分析統一精度管理調査参考方法

- 水質試料 -

1. アンチモン

(1) 水素化物発生原子吸光法

省略（JIS K 0102の62.2を参考にする）。

(2) 水素化物発生ICP発光分析法

1) 試薬

【アンチモン標準液（2mgSb/l）】JIS K 0025に規定するSb200の10mlを全量フラスコ1000mlにとり、硫酸（1+10）を標線まで加える。

【アンチモン標準液（0.1mgSb/l）】アンチモン標準液（2mgSb/l）10mlを全量フラスコ200mlにとり、硫酸（1+10）を標線まで加える。

【臭化カリウム溶液（1mol/l）】JIS K 8506に規定する臭化カリウム11.9gを水に溶かして100mlとする。

【テトラヒドロほう酸ナトリウム溶液（10g/l）】テトラヒドロほう酸ナトリウム5gを水酸化ナトリウム溶液（0.1mol/l）500mlに溶かす。使用時に調製する。

2) 操作

試料（実施要領5.（1）①により作成した分析用試料）の適量をビーカーにとり、硫酸（1+1）1ml及び硝酸2mlを加えた後、加熱して硫酸の白煙を発生させる。室温まで放冷した後、水8ml、塩酸8ml及び臭化カリウム溶液（1mol/l）8mlを加え、約50で約50分間加熱し、全量フラスコ50mlに移し、水を標線まで加える。水素化物発生装置とICP発光分析装置を連結し、この溶液とテトラヒドロほう酸ナトリウム溶液及び塩酸（1～6mol/l）を定量ポンプを用いて連続的に装置に導入し、水素化アンチモンを発生させる。水素化アンチモンをプラズマ中に導入し、波長206.833nmにおける指示値を読む。

空試験として、試料と同量の水をとり、試料と同様の操作を行って指示値を読みとり、試料について得た指示値を補正する。

検量線からアンチモン量を求め、試料中の濃度（mgSb/l）を算出する。

検量線：アンチモン標準液（0.1mgSb/l）0.5～5mlを全量フラスコ50mlに段階的とり、試料と同じ条件になるように、酸及び臭化カリウム溶液を加えた後、水を標線まで加える。試料と同様の操作を行って、アンチモン量と指示値との関係線を作成する。検量線の作成は試料測定時に行う。

2 . ニッケル

(1) 電気加熱原子吸光法

1) 試薬

【ニッケル標準液 (100mgNi/l) 】 JIS K 0013に規定するニッケル標準液Ni1000から作成する。

【ニッケル標準液 (1mgNi/l) 】ニッケル標準液 (100mgNi/l) 5mlを全量フラスコ500mlにとり、硝酸 (1+1) 10mlを加え、水を標線まで加える。

2) 準備操作

試料 (実施要領 5 . (1)①により作成した分析用試料) を JIS K 0102の5.5によって前処理を行う。

3) 操作

2) の準備操作を行った試料の一定量 (例えば10 μ l) をマイクロピペットで発熱体に注入し、電気加熱原子吸光分析装置でニッケル (232.0nm) の指示値を読みとる。

空試験として、試料と同量の水について、試料の場合と同様に操作を行って指示値を読みとり、結果を補正する。

検量線からニッケル量を求め、試料中の濃度 (mgNi/l) を算出する。

検量線 : ニッケル標準液 (1mgNi/l) を全量フラスコ100mlに段階的とり、試料と同じ条件になるように酸を加えた後、水を標線まで加え、試料と同様の操作を行う。別に、空試験として水について同じ条件となるように酸を加えた後、同様の操作を行って、標準液について得た指示値を補正し、ニッケル量と指示値との関係線を作成する。検量線の作成は試料測定時に行う。

(2) I C P 発光分光分析法

1) 試薬

【ニッケル標準液 (100mgNi/l) 】 JIS K 0013に規定するニッケル標準液Ni1000から作成する。

【ニッケル標準液 (10mgNi/l) 】ニッケル標準液 (100mgNi/l) 50mlを全量フラスコ500mlにとり、硝酸 (1+1) 10mlを加え、水を標線まで加える。

2) 準備操作

試料 (実施要領 5 . (1)①により作成した分析用試料) を JIS K 0102の5.5によって前処理を行う。

3) 操作

2) の準備操作を行った試料を I C P 発光分析装置のプラズマトーチ中に噴霧し、波長 221.647nm の発光強度を読みとる⁽¹⁾。

空試験として水について、試料と同様に操作を行って発光強度を読みとり、結果を補正する。

検量線からニッケルの量を求め、試料中の濃度 (mgNi/l) を算出する。

検量線：ニッケル標準液 (10mgNi/l) を段階的に全量フラスコ 100ml にとり、試料と同じ条件になるように酸を加え、水を標線まで加えた後、試料と同様に操作を行って発光強度を読みとる。別に、空試験として水について、同様に操作を行って発光強度を補正した後、ニッケルの量と発光強度の関係線を作成する。検量線の作成は、試料測定時に行う。

注(1)内標準法を用いる場合には、試料の適量を全量フラスコ 100ml にとり、市販の原子吸光分析用 1000mg/l 標準溶液を希釈して得られたイットリウム溶液 (50mgY/l) 10ml を加えた後、水を標線まで加え、この溶液について同様の操作を行って、ニッケルの発光強度と内標準元素 (イットリウム) の発光強度との比を求める。

別に、ニッケル標準液 (10mgNi/l) を段階的に全量フラスコ 100ml にとり、イットリウム溶液 (50mgY/l) 10ml を加えた後、水を標線まで加え、この溶液について同様の操作を行って、ニッケルの濃度に対するニッケルとイットリウムとの発光強度比の関係線を作成し、検量線とする。この検量線から試料について得た発光強度比に相当するニッケルの量を求め、試料中の濃度 (mgNi/l) を算出する。

(3) I C P 質量分析法

1) 試薬

【ニッケル標準液 (10mgNi/l)】JIS K 0013 に規定するニッケル標準液 Ni1000 から作成する。

【ニッケル標準液 (0.1mgNi/l)】ニッケル標準液 (10mgNi/l) 1ml を全量フラスコ 100ml にとり、硝酸 (1+1) 2ml を加え、水を標線まで加える。

2) 準備操作

試料 (実施要領 5 . (1)① により作成した分析用試料) を JIS K 0102 の 5.5 によって前処理を行う⁽¹⁾。

3) 操作

2) の準備操作を行った試料を I C P 質量分析装置に導入し、ニッケル (60) の測定質量数のイオンカウント値を測定する⁽²⁾。

空試験として水について、試料と同様に操作を行ってイオンカウント値を読み、

結果を補正する。

検量線からニッケルの量を求め、試料中の濃度 (mgNi/l) を算出する。

検量線：ニッケル標準液 (0.1mgNi/l) を段階的に全量フラスコ100mlにとり、試料と同じ条件になるように酸を加え、水を標線まで加えた後、3)と同様に操作を行ってイオンカウント値を読みとる。別に、空試験として水について、同様に操作を行ってイオンカウント値を補正した後、ニッケルの量とイオンカウント値の関係線を作成する。検量線の作成は、試料測定時に行う。

注(1) 前処理後の溶液は0.1~0.5mol/lの硝酸溶液とする。

注(2) 内標準法を用いる場合には、試料の適量を全量フラスコ100mlにとり、市販の原子吸光分析用1000mg/l標準溶液を希釈して得られた1mg/l標準溶液(イットリウム又はインジウム)を1~10mlの一定量を加えた後、水を標線まで加え、この溶液について同様の操作を行って、ニッケルの質量数におけるイオンカウント値と内標準元素[イットリウム(89)又はインジウム(115)]の質量数におけるイオンカウント値との比を求める。

別に、ニッケル標準液(0.1mgNi/l)を段階的に全量フラスコ100mlにとり、試料と同様に内標準物質を加え、この溶液について同様の操作を行って、ニッケルの濃度に対するニッケルと内標準元素[イットリウム又はインジウム]とのイオンカウント値比の関係線を作成し、検量線とする。この検量線から試料について得たイオンカウント値比に相当するニッケルの量を求め、試料中の濃度(mgNi/l)を算出する。

3. 水銀

(1) 還元気化原子吸光法

省略(「水質汚濁に係る環境基準について(昭和46年環境庁告示第59号付表1)」を参考にする)。

4. カドミウム

(1) フレーム原子吸光法

1) 試薬

【ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(10g/l)】JIS K 8454に規定するN,N-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物1.3gを水に溶かして100mlとし、着色びんに保存する。調製後、2週間以上経過したものを使用しない。

【くえん酸水素アンモニウム溶液（100g/l）】JIS K 8284に規定するくえん酸水素二アンモニウム10gを水約80mlに溶かし、アンモニア水（1+1）を滴加してpHを約7に調節した後、水を加えて100mlとする。

くえん酸水素アンモニウム中にカドミウム等の不純物が含まれるおそれがあるときは、次の操作によって精製する。

くえん酸水素アンモニウム10gを水80mlに溶かし、アンモニア水（1+1）を加えてpH約9とした後、水を加えて100mlとする。これを分液漏斗に入れ、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液（10g/l）2ml及び酢酸ブチル10mlを加え、激しく振り混ぜて放置する。水層を乾いたろ紙でろ過し、酢酸ブチルの微泡を除いたろ液を用いる。

【カドミウム標準液（0.1mgCd/ml）】カドミウム（99.9%以上）0.100gをとり、硝酸（1+1）20mlに溶かす。煮沸して窒素酸化物を追い出し、放冷後、全量フラスコ1000mlに移し入れ、水を標線まで加える。または、JIS K 0012に規定するカドミウム標準液のCd 100を用いる。

【カドミウム標準液（10mgCd/l）】カドミウム標準液（0.1mgCd/ml）10mlを全量フラスコ100mlにとり、硝酸（1+1）2mlを加え、水を標線まで加える。

2）準備操作

試料（実施要領5.（1）①により作成した分析用試料）の適量をビーカーにとり、塩酸5mlを加え、約5分間煮沸する。

3）操作

2）の準備操作を行った試料を分液漏斗に移し入れ、くえん酸水素アンモニウム溶液（100g/l）10ml及び指示薬としてメタクレゾールパープル溶液（1g/l）2、3滴を加えた後、アンモニア水（1+1）を溶液の色がわずかに紫になるまで加える。

ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液（10g/l）5mlを加えて振り混ぜた後、JIS K 8377に規定する酢酸ブチル10mlを加えて約1分間激しく振り混ぜる。静置して水層と酢酸ブチル層とを十分分離した後、水層は別の分液漏斗200mlに入れ、酢酸ブチル層はビーカー50mlに入れる。

水層を入れた分液漏斗に酢酸ブチル5mlを加えて抽出操作を繰り返す。抽出した酢酸ブチル層は先のビーカー50mlに合わせる。酢酸ブチル層を入れたビーカーを熱板上で静かに加熱して、酢酸ブチルを揮散させる。放冷後、硝酸2mlと過塩素酸2mlを加えて、有機物を分解する。ほとんど乾固した後、放冷する。残留物を硝酸（1+15）10mlに溶かす。

原子吸光分析装置でカドミウム（228.8nm）の指示値を読みとる。

空試験として、試料と同量の水について、試料の場合と同様に操作を行って指示値を読みとり、結果を補正する。

検量線からカドミウムの量を求め、試料中の濃度（mgCd/l）を算出する。

検量線：カドミウム標準液（10mgCd/l）を全量フラスコ100mlに段階的とり、硝酸

(1+15)を標線まで加えた後、原子吸光分析装置で指示値を読みとり、濃度と指示値との関係線を作成する。検量線の作成は、試料測定時に行う。

(2) 電気加熱原子吸光法

1) 試薬

【硝酸パラジウム()溶液(10mgPd/l)】硝酸パラジウム()0.108gを硝酸(1+1)10mlを加えて溶かし、全量フラスコ500mlに移し入れ、水を標線まで加える。この溶液20mlを全量フラスコ200mlにとり、水を標線まで加える。

【カドミウム標準液(0.1mgCd/ml)】カドミウム(99.9%以上)0.100gをとり、硝酸(1+1)20mlに溶かす。煮沸して窒素酸化物を追い出し、放冷後、全量フラスコ1000mlに移し入れ、水を標線まで加える。または、JIS K 0012に規定するカドミウム標準液のCd 100を用いる。

【カドミウム標準液(1mgCd/l)】カドミウム標準液(0.1mgCd/ml)10mlを全量フラスコ1000mlにとり、硝酸(1+1)20mlを加え、水を標線まで加える。

【カドミウム標準液(0.1mgCd/l)】カドミウム標準液(1mgCd/ml)10mlを全量フラスコ100mlにとり、硝酸(1+1)2mlを加え、水を標線まで加える。

2) 準備操作

試料(実施要領5.(1)①により作成した分析用試料)をJIS K 0102の5.5によって前処理を行う。

3) 操作

2)の準備操作を行った試料の15mlずつをそれぞれ全量フラスコ20mlにとり、カドミウム標準液(0.1mgCd/l)を加えないものと、0.1~2mlの範囲で段階的に3段階以上添加したものとを調製し、それぞれの溶液の酸の濃度が同じになるように硝酸(1+1)を加えた後、水を標線まで加える。この試料の100 μ l以上の一定量をマイクロピペットで小型の容器にとり、これと同体積の硝酸パラジウム()溶液(10mgPd/l)を加え、よく混ぜ合わせる。この試料の一定量(例えば10~50 μ l)をマイクロピペットで発熱体に注入し、電気加熱原子吸光分析装置でカドミウム(228.8nm)の指示値を読みとる。

空試験として、試料と同量の水について、試料の場合と同様に操作を行って指示値を読みとり、結果を補正する。

標準液によるカドミウムの添加量と指示値との関係線を作成し、カドミウムの量を求め、試料中の濃度(mgCd/l)を算出する。

(3) ICP発光分析法

1) 試薬

【カドミウム標準液(0.1mgCd/ml)】カドミウム(99.9%以上)0.100gをとり、硝

酸(1+1)20mlに溶かす。煮沸して窒素酸化物を追い出し、放冷後、全量フラスコ1000mlに移し入れ、水を標線まで加える。または、JIS K 0012に規定するカドミウム標準液のCd100を用いる。

【カドミウム標準液(8mgCd/l)】カドミウム標準液(0.1mgCd/ml)40mlを全量フラスコ500mlにとり、硝酸(1+1)10mlを加え、水を標線まで加える。

2) 準備操作

試料(実施要領5.(1)①により作成した分析用試料)をJIS K 0102の5.5によって前処理を行う。

3) 操作

2)の準備操作を行った試料をICP発光分析装置のプラズマトーチ中に噴霧し、波長214.438nmの発光強度を読みとる⁽¹⁾。

空試験として水について、試料と同様に操作を行って発光強度を読みとり、結果を補正する。

検量線からカドミウムの量を求め、試料中の濃度(mgCd/l)を算出する。

検量線：カドミウム標準液(8mgCd/l)を段階的に全量フラスコ100mlにとり、試料と同じ条件になるように酸を加え、水を標線まで加えた後、試料と同様に操作を行って発光強度を読みとる。別に、空試験として水について、同様に操作を行って発光強度を補正した後、カドミウムの量と発光強度の関係線を作成する。検量線の作成は、試料測定時に行う。

注(1)内標準法を用いる場合には、試料の適量を全量フラスコ100mlにとり、市販の原子吸光分析用1000mg/l標準溶液を希釈して得られたイットリウム溶液(50mgY/l)10mlを加えた後、水を標線まで加え、この溶液について同様の操作を行って、カドミウムの発光強度と内標準元素(イットリウム)の発光強度との比を求める。

別に、カドミウム標準液(8mgCd/l)を段階的に全量フラスコ100mlにとり、イットリウム溶液(50mgY/l)10mlを加えた後、水を標線まで加え、この溶液について同様の操作を行って、カドミウムの濃度に対するカドミウムとイットリウムとの発光強度比の関係線を作成し、検量線とする。この検量線から試料について得た発光強度比に相当するカドミウムの量を求め、試料中の濃度(mgCd/l)を算出する。

(3) ICP質量分析法

1) 試薬

【カドミウム標準液(0.1mgCd/ml)】カドミウム(99.9%以上)0.100gをとり、硝酸(1+1)20mlに溶かす。煮沸して窒素酸化物を追い出し、放冷後、全量フラスコ

1000mlに移し入れ、水を標線まで加える。または、JIS K 0012に規定するカドミウム標準液のCd 100を用いる。

【カドミウム標準液(1mgCd/l)】カドミウム標準液(0.1mgCd/ml)10mlを全量フラスコ1000mlにとり、硝酸(1+1)20mlを加え、水を標線まで加える。

【カドミウム標準液(0.05mgCd/l)】カドミウム標準液(1mgCd/l)50mlを全量フラスコ1000mlにとり、硝酸(1+1)3mlを加え、水を標線まで加える。

2) 準備操作

試料(実施要領5.(1)①により作成した分析用試料)をJIS K 0102の5.5によって前処理を行う⁽¹⁾。

3) 操作

2)の準備操作を行った試料をICP質量分析装置に導入し、カドミウム(111又は114)の測定質量数のイオンカウント値を測定する⁽²⁾。

空試験として水について、試料と同様に操作を行ってイオンカウント値を読み、結果を補正する。

検量線からカドミウムの量を求め、試料中の濃度(mgCd/l)を算出する。

検量線：カドミウム標準液(1mgCd/l又は0.05mgCd/l)を段階的に全量フラスコ100mlにとり、試料と同じ条件になるように酸を加え、水を標線まで加えた後、3)と同様に操作を行ってイオンカウント値を読みとる。別に、空試験として水について、同様に操作を行ってイオンカウント値を補正した後、カドミウムの量とイオンカウント値の関係線を作成する。検量線の作成は、試料測定時に行う。

注(1)前処理後の溶液は0.1~0.5mol/lの硝酸溶液とする。

注(2)内標準法を用いる場合には、試料の適量を全量フラスコ100mlにとり、市販の原子吸光分析用1000mg/l標準溶液を希釈して得られた1mg/l標準溶液(イットリウム、インジウム又はビスマス)を1~10mlの一定量を加えた後、水を標線まで加え、この溶液について同様の操作を行って、カドミウムの質量数におけるイオンカウント値と内標準元素[イットリウム(89)、インジウム(115)又はビスマス(209)]の質量数におけるイオンカウント値との比を求める。

別に、カドミウム標準液(1mgCd/l又は0.05mgCd/l)を段階的に全量フラスコ100mlにとり、試料と同様に内標準物質を加え、この溶液について同様の操作を行って、カドミウムの濃度に対するカドミウムと内標準元素[イットリウム、インジウム又はビスマス]とのイオンカウント値比の関係線を作成し、検量線とする。この検量線から試料について得たイオンカウント値比に相当するカドミウムの量を求め、試料中の濃度(mgCd/l)を算出する。

5. スチレン2量体及び3量体

スチレン 2 量体とは、1,3-ジフェニルプロパン、cis-1,2-ジフェニルシクロブタン、trans-1,2-ジフェニルシクロブタン、2,4-ジフェニル-1-ブテンの 4 項目を示す。

スチレン 3 量体とは、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、1-フェニル-4-(1'-フェニルエチル)テトラリン、1,3,5-トリフェニルシクロヘキサンの 3 項目を示す。

(1) 溶媒抽出 - ガスクロマトグラフ質量分析法

1) 試薬

【ヘキサン、アセトン】残留農薬分析用又はこれと同等以上のもの⁽¹⁾

【塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム】残留農薬分析用又はこれと同等以上のもの⁽²⁾

【標準物質：スチレン 2 量体】以下に示すもの⁽³⁾。

1,3-ジフェニルプロパン (D P P)、cis-1,2-ジフェニルシクロブタン (cis-D P C B)、trans-1,2-ジフェニルシクロブタン (trans-D P C B)、2,4-ジフェニル-1-ブテン (D P B)

【標準物質：スチレン 3 量体】以下に示すもの⁽³⁾。

2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン (T P H)、1-フェニル-4-(1'-フェニルエチル)テトラリン類 (P P E T；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 (T P C H)

【内標準物質】1,2-ジフェニルエタン-d₁₄⁽⁴⁾

【標準原液】標準物質100mgを各々別の100mlメスフラスコに精秤し、ヘキサンを加えて正確に100mlとし、これを1000 μg/mlの標準原液とする。

【標準混合原液】各標準原液10mlを100mlメスフラスコに正確にとり、ヘキサンで100mlとし、これを標準混合原液とする。標準混合原液は1ml中に各標準物質100 μgを含む⁽⁵⁾。

【内標準液】内標準物質100mgを100mlメスフラスコに精秤し、ヘキサンを加えて正確に100mlとし、これを1000 μg/mlの内標準原液とする。内標準原液10mlを100mlメスフラスコに正確にとり、ヘキサンで100mlとし、これを内標準液とする。内標準液は1ml中に内標準物質100 μgを含む。

【シリカゲルカラム】市販の大容量シリカカートリッジ⁽⁶⁾又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、上部に無水硫酸ナトリウムを2cm積層したもの。使用前に、ヘキサン10mlを通して洗浄する。

【水】対象対象及びその妨害物質を含まないもの⁽⁸⁾。

【5%NaCl水溶液】水に5%(W/V)となるように塩化ナトリウムを加えて溶解させた後、ヘキサンで洗浄したもの。

注1) 使用前に空試験を行い、使用の適否を確認する。

注2) 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3)市販の標準液を用いてもよい。不安定なものが多いと考えられるので試薬の保管条件を厳守するなど、保管に留意する。

注4)サロゲート物質として用いることもできる。また、内標準物質として、ナフタレン-d₈、フルオレン-d₁₀、フェナントレン-d₁₀、p-ターフェニル-d₁₄、ヘキサクロロベンゼン-¹³C₆(HCB-¹³C₆)等を用いてもよい。

注5)スチレン2量体及びスチレン3量体は溶液中で不安定なものがあるので、長期の保存はさける。保存した標準原液は、純度を確認してから使用する。

注6)例えばメガボンドエルトS I(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に対して精製水5mlを滴下する。密栓し、発熱が終了するまで静かに混合する。さらに、振とう器で30分間振とう後、乾燥剤としてシリカゲルを入れたデシケータ中で15時間以上放置する。

注8)蒸留水や逆浸透膜により精製した水をさらに炭素系吸着剤を充填したカラムや紫外線照射等より精製したもの等。必要に応じてヘキサンで洗浄する。いずれも使用前に空試験を行い、使用の適否を確認する。

備考1)ここに示す商品は、使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これらを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

2) 器具・装置

【ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)】キャピラリーカラム取付可能なGC付き四重極型、または二重収束型MS。

【ガラス器具】洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。アセトン及びヘキサンで洗浄し、乾燥する。

【ロータリーエバポレーター(水浴付)又はKD濃縮装置】

【振とう器】

3) 操作⁽⁹⁾

(ア) 前処理

試料(実施要領5.(1)②により作成した分析用試料)1000mlを分液漏斗に取り、塩化ナトリウム50gを加えて充分混合し溶解させた後、ヘキサン100mlを加えて5分間振とう抽出し、静置してヘキサン層を分取する。再び水層にヘキサン100mlを加えて、同様な抽出操作を繰り返す。ヘキサン層を合わせ、5%NaCl水溶液50mlを加えて5分間振とうし、水層を捨てる。この操作を再度行う。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ナス型フラスコに入れてKD濃縮装置又はロータリーエバポレーターを用いて約5mlまで濃縮する⁽¹⁰⁾。さらに、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付

け1mlとし、前処理液とする⁽¹¹⁾。

(イ) 測定用試料液の調製⁽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、アセトン/ヘキサン(5:95v/v)100mlを流す⁽¹³⁾。得られた溶出液をナス型フラスコで受け、KD濃縮装置又はロータリーエバポレーターを用いて約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、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付けて0.3mlとし、内標準液を各10μl添加し測定用試料液とする。

(ウ) 空試験の調製

試料と同量の水を用いて、(ア)及び(イ)に従って試料と同様の処理をして得た試料液を空試験液とする。

(エ) 標準液の調製

標準混合原液を順次ヘキサンで希釈し、0.1~5μg/ml程度の濃度の標準液を調製する。

(オ) 測定

(ア)GC / MS条件の例⁽¹⁴⁾

(a)GC

- ・カラム：50%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0.1~3.0μm程度)カラム又は同等以上の分離性能をもつもの^{(15)~(17)}
- ・カラム温度：50 (1分) 20 /分 300 (30分)
- ・注入口温度：250
- ・キャリアガス：ヘリウム(線速度40cm/秒)
- ・注入法：スプリットレス(1分後パーズ)

(b)MS

- ・イオン化法：EI
- ・イオン化エネルギー：70e
- ・イオン化電流：300μA
- ・イオン源温度：230

(c)定量イオン

- ・スチレン2量体 DPP : 92 (196)
cis-DPCB、trans-DPCB : 104 (208)
DPB : 91 (208)
- ・スチレン3量体 TPH : 91 (207)
PPET : 129 (207)

TPCH : 104 (208)

・ 1,2-ジフェニルエタン-d₁₄ : 196

() のイオンは確認用に用いる。

(イ) 検量線

各標準液 0.3ml に内標準溶液 10 μl を添加し、その 1 μl を GC / MS に注入する。内標準物質と対象物質の面積比を求め、検量線を作製する。

(ウ) 試料液の測定

検量線を作成後、測定用試料液及び空試験液の 1 μl を GC / MS に注入する。内標準物質と対象物質の面積比を求め、試料中の対象物質の濃度を内標準法で求める⁽¹⁸⁾。

(カ) 計算

次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

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

注9) スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体は不安定なものがあるので、速やかに分析する。

注10) 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。

注11) カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ操作を必要としない試料の場合は、得られた溶液を褐色目盛付試験管に移し、清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付けて 0.3ml とし、内標準物質を 10 μl 添加し測定用試料液とする。

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作成は以下のように行う。

フロリジル：フロリジル PR (60 ~ 100メッシュ) を 130 で 15 時間加熱後、透明すり合わせ共栓付き三角フラスコに入れ、シリカゲルを入れたデシケータ中で室温まで冷却し、密栓して保存する (備考1)。

フロリジルカラム：市販の大容量シリカカートリッジ (メガボンドエルト FL、LC-FLORIGIL 等で充填量が 5 ~ 10 g 程度のもの) 又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 7 g をヘキサンを用いて湿式充填し、上部に無水硫酸ナトリウムを 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アセトン / ヘキサン (5 : 95V/V) の量を求めておく。

注14) GCの注入口セプタムからゴーストが出現することがある。その場合には、セプタムをGCに装着後、270℃で一夜程度パージしてから使用する。

注15) 例えばDB-17、TC-17、HP-50+、SPB-50等(備考1)。

注16) PPE T類が十分に分離しない場合は、カラムとしてDB-WA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17) PPE T類の分離が必要でない場合は、カラムとしてDB-1、HP-1、DB-5、HP-5等を用いることができる(備考1)。カラム温度等の条件は適宜決定する。

注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い、内標準物質はサロゲート物質の回収率の確認に用いる。

6. エストラジオール類

エストラジオール類とは、17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール及びエチニルエストラジオールを示す。

(1) メチル誘導体化-GC/MS法

1) 試薬

【標準物質】市販標準試薬(17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール及びエチニルエストラジオール)

【サロゲート物質】17 β -エストラジオール-16,16,17-d₃及び17 α -エストラジオール-2,4,16,16-d₄

【内標準物質】クリセン-d₁₂

【L-アスコルビン酸】試薬特級

【ヘキサン、ジクロロメタン、アセトン、メタノール、エタノール、エチルエーテル】残留農薬分析用又はこれと同等以上のもの

【酢酸メチル】試薬1級

【ジメチル硫酸】試薬1級(新しく購入したものを使用すること)

【無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム】残留農薬分析用又はこれと同等以上のもの

【過塩素酸マグネシウム】元素分析用(20~48mesh)

【1mol/l NaOH/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(調製時に水を加えないこと)。吸水しないように密栓して室温で保存する。

【1mol/l KOH/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(冷えると固まる)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)。

【水】対象物質を含まないもの(市販ミネラルウォーター等)

【フロリジルカートリッジカラム】例えば、ウォータズ社製Sep-Pak Cartridges Florisil（備考1）。

【C18カートリッジ】例えば、ウォータズ社製Sep-Pak Plus C18 Cartridges（備考1）。

備考1）ここに示す商品は、使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これらを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

2) 器具・装置

【ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）】⁽¹⁾

【パスツールピペット】

【コンセントレーター】C18カートリッジによる試料からの捕集に用いる。

【KD濃縮器又はロータリーエバポレーター】

【恒温水槽】試料液の濃縮・乾固に用いる。

【脱水管】パスツールピペットの細くなった部分を切断し、グラスウールを詰め、過塩素酸マグネシウムを充てんし、グラスウールで栓をする。長さ約10cmのものを3本作製し、直列に繋いで使用する。

【10ml丸底型KD濃縮管】

【10ml微量用KD濃縮管】最終試料液の調製時に用いる。最終試料液量が10～50μl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2～3mmと極細のもの。

注1) 目標定量下限値(0.1ng/l)を達成するには、高分解能等の高感度MSが必要である。

3) 操作

(ア) 前処理

試料（実施要領5. (1)②により作成した分析用試料）1000mlにサロゲート5.0ng（1.0μg/mlアセトン溶液5μl）⁽²⁾、塩酸1ml及びアスコルビン酸1gを加え、振り混ぜて溶解させる⁽³⁾。これを捕集用カートリッジカラム⁽⁴⁾に20ml/分の流速で通水する。通水終了後、カートリッジに10mlシリンジを取り付け、軽く空気を送りカートリッジ内の間隙水を取り除く⁽⁵⁾。酢酸メチル4mlで溶出し、10ml KD濃縮管に受ける⁽⁶⁾。窒素を吹き付け1mlの標線まで濃縮する⁽⁷⁾。これにヘキサン5mlを入れ、栓をして激しく振り混ぜる。別に10ml KD濃縮管に小ロートをセットし、綿栓をし、この上に無水硫酸ナトリウムを約7gを乗せておく。振り混ぜた含水ヘキサン溶液をこの無水硫酸ナトリウムの上に入れ、さらに容器をヘキサン3mlで洗浄し、これも無水硫酸ナトリウムの上に入れて合わせる。KD濃縮管に得られたヘキサン溶液に窒素を吹き付けて乾固する⁽⁸⁾⁽⁹⁾。これにヘキサン/ジクロロメタン(1:1)を1mlを加えて溶解させる、これを、別に10mlシリンジをセットしたフロリジルカートリッ

ジカラムに負荷する。K D濃縮管はさらにヘキサン/ジクロロメタン(1:1)1mlで洗淨しカートリッジに負荷する。ヘキサン/ジクロロメタン(1:1)10mlで展開し(負荷時の分も含めて)この画分は捨てる⁽¹⁰⁾。次いで、5%アセトン/ジクロロメタン6mlで対象物質を10ml丸底型K D濃縮管⁽¹¹⁾に溶出させ、窒素を吹き付けて乾固する。

(イ) 測定用試料液の調製

乾固した試料に1mol/l NaOH/メタノール溶液⁽¹²⁾0.5mlを加え、50℃の水浴にセットし、窒素を吹き付けて充分乾固・乾燥する⁽¹³⁾。これにジメチル硫酸0.5mlを加え、析出している固体部分にジメチル硫酸を接触させ、直ちにスパテルを用いてK D濃縮管の内面に付着している固形物をすりつぶす。スパテルを入れたままで約30分間室温に放置する⁽¹⁴⁾(栓はしなくてよい)。1mol/l KOH/エタノール溶液を5mlの標線まで、次いで水を8mlの標線まで加えてスパテルで内容物をかき混ぜ、スパテルを取り出し、栓をして激しく振り混ぜて内容物を溶解させる⁽¹⁵⁾。これに内標準液(クリセン-d₁₂0.0005µg/mlヘキサン溶液)2.0mlを加え、激しく振り混ぜて静置する。別に、微量用K D濃縮管に小ロートをセットし、綿栓をした上に約7gの無水硫酸ナトリウムを乗せておく。パスツールピペットを用いてヘキサン層を採取し⁽¹⁶⁾、無水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で溶出させ、窒素を吹き付けて乾固し、10~50µlのヘキサンのK D濃縮管の内面を洗うようにして付着物を底部に溶かし込み試料液とする⁽¹⁷⁾。

(ウ) 空試験液の調製

水1000mlにサロゲート、塩酸1ml及びアスコルビン酸1gを添加し、「前処理」及び「測定用試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。

(エ) 標準液の調製⁽¹⁸⁾

各対象物質の1.0µg/ml(混合標準液A)及び0.1µg/ml(混合標準液B)のアセトン溶液を調製する。

サロゲート溶液は、17β-エストラジオール-2,4,16,16-d₄又は17β-エストラジオール-16,16,17-d₃の1.0µg/mlアセトン溶液を調製する。

内標準液は、クリセン-d₁₂の0.0005µg/ml(内標準液A)及び0.0005µg/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。

(オ) 測定

(ア) GC/MS測定条件例

(a) GC

- ・カラム：溶融シリカキャピラリーカラム(25m×0.2mm、膜厚0.52µm)
- ・液相：5%フェニルメチルシリコン
- ・カラム温度：60(1分) 20/分 280(10分)⁽¹⁹⁾
- ・注入口温度：260

- ・ 注入法：スプリットレス法（1.5分後ページ、2 μ l注入）
- ・ キャリアガス：He、カラムヘッド圧15pai
- ・ インターフェース温度：260

(b) MS

- ・ イオン化法：EI
- ・ イオン化電圧：70eV
- ・ イオン源温度：250
- ・ イオン化電流：300 μ A
- ・ 検出モード：SIM

(c) 測定イオン

対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の測定イオンを表1に示す。

表1 対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の測定イオン

化合物名	測定イオン	
	定量用	確認用
17 - エストラジオール	227	300
17 - エストラジオール	300	227
エチニルエストラジオール	227	324
17 - エストラジオール-d ₃	303	
17 - エストラジオール-d ₄	304	
クリセン-d ₁₂	240	

注) 17 - エストラジオールの質量数300は、環境試料中に17 - エストラジオールでないピークが認められるので、質量数227により定量する。

(イ) 検量線⁽²⁰⁾

混合標準液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⁽²⁾、窒素を吹き付けて乾固する。以下「測定用試料液の調製」と同様に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。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、測定用試料液及び空試験液を注入して測定を行う。一定時間毎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%を超えていればGC/MSを再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

(カ) 同定、定量

(a) 同定

対象物質（ジメチル化物）の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間と±5秒以内に出現し、確認イオンと定量イオンのピーク強度比が予想値と±20%以内で合っておれば^(2.1)、物質が存在しているを見なす。

(b) 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る。次に、検出量、分析した試料量等から、次式により試料中の濃度を計算する^(2.2)。

$$\text{試料濃度 (ng/l)} = \text{検出量 (ng)} / \text{試料量 (l)}$$

注2) サロゲートの添加量はMSの感度により調整しても良い。抱合体分解処理を行わない場合は17-エストラジオール-2,4,16,16-d₄の方が17-エストラジオール-16,16,17-d₃より好ましい（質量数300及び227へは殆ど無視できるほど小さい）。抱合体分解処理を行う場合には、17-エストラジオール-2,4,16,16-d₄は塩酸/メタノールでの加熱によりH-D交換が起こるので使用しない。17-エストラジオール-16,16,17-d₃は塩酸/メタノールで加熱してもH-D交換は起こらない（ただし、質量数227はサロゲートからの寄与が大きく使用出来ない）。

注3) SSの多い水質試料では1000mlの通水が困難な場合があるので事前にグラスファイバーろ紙でろ過しておく。SS分は10mlのアセトンで2回抽出（超音波10分）し、抽出液はろ過水に合わせる。アセトン抽出液はろ過する必要はない。また、使用するグラスファイバーろ紙はアセトンで洗浄して使用する。この洗浄の際、アセトンが白濁する場合はバインダーが入っている可能性があるため、このようなる紙は使用しない。

注4) C18カートリッジカラムは使用直前に、アセトン10ml、次いで水10mlを通液して洗浄とコンディショニングを行う。

注5) アスピレーター吸引による脱水を行ってはいけない。ここでは間隙水を除去するだけでよい。

注6) 底部に0.3ml程度の水層ができるが差し支えない。

注7) 約0.7mlの酢酸メチルが残るようにする。濃縮しすぎるとエストラジオール類が有機溶媒層に移行しないので注意する。濃縮しすぎた場合は1mlの標線まで酢酸メチルを加える。

注8) 乾固する操作ではやりすぎによる揮発ロスに充分注意すること。アルミ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。ヘヤードライヤーの使用の方が好ましい。

注9) この方法では遊離のエストラジオール類のみを対象とし、抱合体分解処理は行わないこととしている。その理由は抱合体分解処理により遊離体の生成率についての情報が充分でないことによる。現在、塩酸/メタノールや酵素による分解が検討されており、その結果を踏まえて今後検討することになる。

注10) 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程度から溶出するので、最初の10ml（負荷分も含めて）を捨てることにした。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11) 先の尖ったスピッツ型のKD濃縮管を用いると次の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12) 共栓付き50mlメスシリンダーに水酸化ナトリウム2.0g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13) 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、ボンベからの窒素には、極めて微量ではあるが、水分が含まれていて十分に乾燥出来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(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、窒素の脱水、恒温槽の温度コントロール及び通気速度に充分配慮し、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-d₁₂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14) 本反応はジメチル硫酸と接触すると瞬時に起こるが、固体の内部にジメチル硫酸がしみ込みにくいので、すりつぶして十分に接触させる。ジメチル硫酸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。

注15) 水を入れてから固形物をスパーテルで少しつついて傷を付けてから栓をして激しく振ると容易に溶解する。

注16) 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17) 微量用KD濃縮管での窒素吹き付けによる10~50 μ lまでの濃縮では最後の方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限界を達成できるようにする。

注18) 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。

注19) GCカラムの条件は、17 β -と17 α -エストラジオール異性体が完全に分離するように設定する。

注20) 検量線用の処理液は、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。したがって、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21) 17 β -エストラジオールの質量数227のピーク面積には、サロゲートからの

寄与があるので使用できない（使用機器及び測定条件により異なるが、本分析条件では質量数303のピーク面積で59%である）。

注22)内標準として使用したクリセン-d₁₂（質量数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、検量線用の液ではクリセン-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。

（2）ペンタフルオロベンジル誘導体化-GC/NCI-MS法

1）試薬

【標準物質】市販標準試薬（17β-エストラジオール、17α-エストラジオール及びエチニルエストラジオール）

【サロゲート物質】17β-エストラジオール-2,4,16,16-d₄

【2-プロパノール】試薬特級

【ヘキサン、アセトン、メタノール、酢酸エチル】残留農薬分析用又はこれと同等以上のもの

【無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム】残留農薬分析用又はこれと同等以上のもの

【水】対象物質を含まないもの

【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)

【フロリジルカートリッジカラム】例えば、ウォータズ社製Sep-Pak Cartridges Florisil（備考1）

【C18カートリッジ】例えば、ウォータズ社製Sep-Pak Plus C18 Cartridges（備考1）

注1)本試薬は毒性が懸念されるため取り扱いに注意する。PFBBは催涙性があるので必ずドラフト内で操作し、使用済み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。

備考1）ここに示す商品は、使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これらを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

2）器具及び装置

【ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）】⁽²⁾負イオン化学イオン化（NCI）法で測定が可能なもの

【パスツールピペット】

【コンセンレーター】固相抽出カラムによる水質試料からの捕集に用いる。

【ロータリーエバポレーター】

注2) 目標定量下限値(0.1ng/l)を達成するには、装置の検出限界を1pg以下とする必要がある。

3) 操作

(ア) 前処理

試料(実施要領5.(1)②により作成した分析用試料)1000mlを正確に計りとり、懸濁物質の多い試料はグラスファイバーろ紙でろ過をする⁽³⁾。サロゲート1ng(0.02µg/mlアセトン溶液50µl)⁽⁴⁾を加え、よく振り混ぜて混合する。これをカートリッジカラム⁽⁵⁾に通水する。水5ml、ヘキサン5mlでカートリッジカラムを洗浄後、メタノール5mlで溶出し、10mlの遠心管に受ける⁽⁶⁾。この溶出液に、窒素を吹き付け乾固する。

(イ) 測定用試料液の調製

乾固した試料にPFBB溶液0.5ml及び炭酸カリウム約3mgを加えた後、密栓をし、80で30分間加熱する。冷却後、水6ml、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採取し⁽⁷⁾、抽出を再度繰り返す。ヘキサン抽出液を少量の無水硫酸ナトリウムをつめたカラムに通して乾燥する。容器とカラムをヘキサン5mlで洗浄し、抽出液と合わせ、窒素を吹き付けて乾固する⁽⁸⁾。これにトリメチルシリルイミダゾール20µlを加え、容器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。反応液にヘキサン1mlを加えよく混合した後、あらかじめ5mlのヘキサンで洗浄したシリカゲルミニカラムに添加する⁽⁹⁾。容器を少量のヘキサンで洗い、再度カラムに添加し、カラムにヘキサンを流し入れ、最初の流出液5mlを捨てる。次いで、ヘキサン/酢酸エチル(9:1)5mlを流し入れ、溶出液を10mlの遠心管にとる。窒素を吹き付け濃縮、乾固し、ヘキサン0.2mlに溶解し試料液とする⁽¹⁰⁾。

(ウ) 空試験液の調製

水1000mlをとり、試料に添加したのと同量のサロゲートを添加した後、「前処理」及び「測定用試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。

(エ) 標準液の調製⁽¹¹⁾

各対象物質の1000µg/mlのアセトン溶液を調製する。各標準液から、一定量を正確に計り取り混合する。各対象物質濃度がそれぞれ1µg/ml(混合標準液A)、0.1µg/ml(混合標準液B)及び0.01µg/ml(混合標準液C)となるようにアセトンで希釈したものを、混合標準液とする。

17 - エストラジオール -2,4,16,16-d₄の1000 µg/mlアセトン溶液を調製する。これを0.1 µg/mlとなるようにアセトンで希釈したものを、サロゲート溶液とする。

(オ) 測定

(ア) GC / MS 測定条件例

(a) GC

- ・ カラム： 溶融シリカキャピラリーカラム (25m × 0.25mm , 膜厚0.25 µm)
- ・ 液相： 5% フェニルメチルシリコン
- ・ カラム温度： 150 (1分) 10 /分 300 (10分)
- ・ 注入口温度： 260
- ・ 注入法： スプリットレス法 (1分後パージ、 2 µl 注入)
- ・ キャリアガス： He カラムヘッド圧 15psi
- ・ インターフェース温度： 260

(b) MS

- ・ イオン化法： NCI (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： メタン又はイソブタン
- ・ イオン源温度： 150 ~ 250
- ・ 検出モード： SIM

(c) 測定イオン

対象物質、サロゲート物質の測定イオンを表 1 に示す⁽¹²⁾。

表 1 対象物質、サロゲート物質の測定イオン

化合物名	測定イオン	
	定量用	確認用
17 - エストラジオール	343	344
17 - エストラジオール	343	344
エチニルエストラジオール	367	368
17 - エストラジオール -d ₄	347	348

(1) 検量線⁽¹³⁾

混合標準液 A、B、C を 10ml の遠心管に、それぞれ 500 µl 計り取る。これらにサロゲート標準液 (0.1 µg/ml アセトン溶液) 500 µl を添加し、窒素を吹き付けて乾固する。以下、「測定用試料液の調製」と同様にペンタフルオロベンジル誘導体化、トリメチルシリル化を行ったのち、シリカゲルカラムにより精製する。ヘキサン / 酢酸エチル (9 : 1) で溶出される画分を、窒素を吹き付けて乾固した後、ヘキサン 2ml で溶解する。標準液中のサロゲート物質の濃度が試料液中に含まれるサロゲート物質の濃度に等しくなるように希釈し、この 2 µl 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。

(ウ) 試料液の測定

検量線を作成後、空試験液及び測定用試料液を注入して測定を行う。一定時間毎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%を超えていればGC/MSを再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

(カ) 同定及び定量

(a) 同定

対象物質の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間と±5秒以内に出現し、確認イオンと定量イオンのピーク強度比が予想値と±20%以内の差で合っていれば、物質が存在していると見なす。

(b) 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る。次に、検出量、分析した試料量等から、次式により試料中の濃度を計算する。

$$\text{試料濃度 (ng/l)} = \text{検出量 (ng)} / \text{試料量 (l)}$$

注3) 懸濁物質の多い試料では事前にグラスファイバーろ紙でろ過しておく。ろ過された懸濁物質は、10mlのメタノール/1mol/l酢酸緩衝液(pH5)9:1で抽出する。抽出液はろ過水に合わせる。抽出液はろ過する必要はない。また、使用するグラスファイバーろ紙はメタノール/1mol/l酢酸緩衝液(pH5)9:1で洗浄して使用する。この洗浄の際、アセトンが白濁する場合はバインダーが入っている可能性があるため、このような紙は使用しない。

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、17β-エストラジオール-16,16,17-d₃を使用する。ろ過しなかった場合は、1mol/l酢酸緩衝液(pH5)1mlも加える。

注5) C18カートリッジカラムは使用直前に、メタノール10ml、次いで水10mlを通して洗浄とコンディショニングを行う。

注6) メタノールに若干水が混入するが、差し支えない。

注7) 出来るだけ水が入らないように採取する。

注8) クラウンエーテルが残る。水が混入するとTMS化できない。

注9) 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。

注10) 装置の感度が十分にある場合は、できるだけ希釈して(1ml程度)測定した方がよい。

注11) 混合標準、サロゲートの濃度は使用するMSの感度に合わせて調製してもよい。

注12) 表1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(17β-エストラジオールと17α-エストラジオリ

ールは質量数253、エチニルエストラジオールは質量数277、サロゲートは質量数257)を選択できる。エストロンを測定する場合には、定量イオンは269、確認イオンは270を使用できる。

注13) 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。したがって、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カ月程度、使用可能である。