

アジピン酸ジ'-2-エチルヘキシルの分析法

1 対象物質

アジピン酸ジ'-2-エチルヘキシル(DEHA)

2 目標検出限界

本分析法の目標検出限界は水質試料では 0.01 μ g/L, 底質試料・生物試料では 10 μ g/kg である。

3 分析法概要

水質試料は塩化ナトリウム等を加えてヘキサンで抽出後, GC/MS-SIM で測定する。

試料水 —— 塩析 —— 振とう抽出 —— 脱水・濃縮 —— 定量

底質試料は振とうと超音波洗浄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 5 % 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, GC/MS-SIM で測定する。(注1)

底質試料 —— アセトニトリル超音波抽出 —— 塩化Na水溶液 —— ヘキサン抽出 —— 脱水濃縮

カラムクロマトグラフィー —— 濃縮脱水 —— 定量

生物試料はホモジナイザーを用いてアセトニトリルで抽出し, アセトニトリル/ヘキサン分配で脂質を除去した後, アセトニトリル層に 5 % 塩化ナトリウム水溶液を加え, 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, GC/MS-SIM で測定する。(注1)

生物試料 —— アセトニトリルホモジナイザ'-抽出 —— アセトニトリル/ヘキサン分配 —— 塩化Na水溶液

ヘキサン抽出 —— 脱水濃縮 —— カラムクロマトグラフィー —— 濃縮脱水 —— 定量

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ので, 分析を行うにあたり, 十分注意すること。(注2)

4 試料の採取及び保存方法

4.1 水質試料

洗剤, 水, アセトン, ヘキサン(注3)の順に洗浄し, 乾燥させた 1L のネジ口ガラスビン(注4)に試料水を泡立てないように静かに採取し, 満水にして密栓をする。試験は試料採取後直ちに行う。直ちに行得ない場合には冷暗所(4)で保存する。

なお, ガラスビンのネジ口はアジピン酸エステル類の汚染のないアルミホイル等の付いた内蓋を使用すること。

4.2 底質試料

水質試料と同様の方法で洗浄したネジ口の広口ガラスビンに入れ密栓し、-10℃以下で保存する。

4.3 底質試料

試料をミキサーで摩砕均一化し、底質試料と同様にして保存する。

5 試薬・器具

5.1 試薬

有機溶媒：PCB 試験用，または残留農薬 1000 倍用(注 5)を使用。

DEHA：市販標準試薬。

サロゲート物質 (DEHA-d₈)：市販標準試薬。

内標準物質 (フルオランテン-d₁₀)：市販標準試薬。

無水硫酸ナトリウム：PCB・フタル酸エステル試験用(注 6)を使用。

塩化ナトリウム：特級試薬を 500 ~ 700℃で 8 時間程度焼成した後，汚染のない場所で放冷して用いる。

精製水：逆浸透さらにミリQ処理した精製水(注 7)をヘキサンで洗浄したもの。(備考 1)

5 %無水硫酸ナトリウム：精製水に 5 % (w/V)となるように無水硫酸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。

5 %塩化ナトリウム：精製水に 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。

含水フロリジル：残留農薬試験用(60/100 メッシュ)フロリジルを 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とり，精製水 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。

その他の試薬：特級試薬。

5.2 器具及び装置

含水フロリジルカラム：長さ 30cm，内径 1cm のガラスカラムに 2g のフロリジルをヘキサンを用いて湿式充填し，この上部に無水硫酸ナトリウムを 1cm 積層したもの。

ロータリーエバポレーター，または K D 濃縮装置：抽出液の濃縮に用いる。

分液漏斗：SPC 摺り合わせ，または透明摺り合わせを使用する。

共栓付試験管，共栓付遠沈管，ナス型フラスコ等のガラス器具：SPC 摺り合わせ，または透明摺り合わせを使用する。

電気炉：塩化ナトリウムの焼成に使用する。

ホモジナイザー：生物質の均一化及び固液抽出に用いる。

超音波照射器 (超音波洗浄器でもよい)

遠心分離器：底質，生物質の固液抽出時の分離抽出に用いる。

振とう器：液々抽出に用いる。

乾燥器：フロリジルの活性化，及びガラス器具等を乾燥させるのに用いる。

ガスクロマトグラフ / 質量分析計 (GC/MS)：GC は，キャピラリーカラム対応のもの。MS は，二重収束型もしくは四重極型のもの。

6 試験操作

6.1 試料の前処理

(1) 水質試料 (注 8)

試料水 1000ml を分液漏斗 2L にとり(注 9), 所定量のサロゲート物質(注 10)及び塩化ナトリウム(注 11)50g を加え溶解した後, ヘキサン 100ml を加え 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, 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 30 以下の湯浴中でロータリーエバポレーター(注 12)を用いて, 約 10ml まで濃縮し, さらに窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml(注 13, 注 14)とし, 前処理液とする.

(2) 底質試料

底質(湿泥)20g を共栓付遠沈管 100ml にとり, 所定量のサロゲート物質(注 10)を添加後, アセトニトリル(注 15)50ml を加えて 5 分間振とうする. さらに, 超音波洗浄器を用いて 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, 予め 5 % 塩化ナトリウム溶液 500ml(注 16)を入れた分液漏斗 1000ml 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無水硫酸ナトリウムで脱水後, 30 以下の湯浴中でロータリーエバポレーターを用いて, 約 10ml まで濃縮し, 更に窒素ガスを穏やかに吹き付けて約 5ml とし, 前処理液とする.

(3) 生物試料

均一化した生物試料 20g を共栓付遠沈管 100ml にとり, 所定量のサロゲート物質(注 10)を添加後, アセトニトリル(注 15)50ml を加えてポリトロン型ホモジナイザーを用いて 2 ~ 5 分間ホモジナイズする. これを 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, 抽出液を合わせる.

このアセトニトリル抽出液にヘキサンを滴下して飽和にする. これにヘキサン 10ml を加えて 5 分間振とうし, アセトニトリルを分取する. 残ったヘキサン層に 5 % 含水アセトニトリル 20ml を加えて逆抽出し, アセトニトリル層と先のアセトニトリル抽出液を合わせる. これを予め 5 % 塩化ナトリウム溶液 500ml(注 16)を入れた 1000ml 分液漏斗に加える. これにヘキサン 100ml 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, ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後, 30 以下の湯浴中でロータリーエバポレーターを用いて, 約 10ml まで濃縮し, 更に窒素ガスを穏やかに吹き付けて約 5ml とし, 前処理液とする.

6.2 測定用試料液の調製

(1) 水質試料

通常, 試料の前処理液を測定用試料液とする. 但し, 排水等の狭雑物が多い試料は底質・生物試料と同様に, 含水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操作を行い, GC/MS 測定用試料液(注 17)とする.

なお, 内標準法で測定する場合には, 測定用試料液に内標準液を所定量添加後, GC/MS

に注入する。

(2) 底質・生物試料

前処理液を含水フロリジルカラム(10 × 300mm のカラムに 5g の含水フロリジルをヘキサンで湿式充填し、この上層に無水硫酸ナトリウムを 1cm の高さに層積して調製)に負荷する。受器を設置し、1ml 強/分の速度で液面をカラムヘッド面まで下げてから、ヘキサン 50ml(注 18)を同速度で流す。このヘキサン溶出液は捨てる。再び、受器を変えてヘキサンが断続しないようにアセトニトリル/ヘキサン(1:100)100ml(注 19)を用いて、1ml 強/分の速度で溶出させる。この溶出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、30 以下の湯浴中でロータリーエバポレーターを用いて、約 10ml 弱まで濃縮し、更に窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml(注 14)にして、GC/MS 測定用試料液(注 17)とする。但し、クリーンアップ不足である場合には、更にシリカゲルカラムクロマトグラフィー(注 20)、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(注 21)を行う。

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

6.3 空試験液の調製

試料を用いずに「試料の前処理」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。

6.4 標準液の調製(注 22)

DEHA 標準品をヘキサンに溶解し 1000mg/L 標準原液を調製する。これを、適宜ヘキサンで希釈混合して所定濃度の混合標準液を 5 段階以上作製する。サロゲート物質(DEHA-d)は DEHA 標準品と同様にヘキサンに溶解し 100mg/L 標準原液を調製し、またこの標準原液をアセトンに溶解して、所定濃度(通常、0.1mg/L)の混合標準液も調製する。内標準物質(フルオランテン-d₁₀)は DEHA 標準品と同様にヘキサンに溶解し 1000mg/L 標準原液を調製し、またこの標準原液をアセトンに溶解して、所定濃度(通常、1 ~ 10mg/L)の混合標準液も調製する。

全ての標準原液及び混合標準液は暗所-5 以下で保存する。

6.5 測定

GC/MS 測定条件(注 23)

GC カラム：溶融シリカキャピラリーカラム (30m × 0.25mm i.d., 0.25 μ m)

液相は、メチルシリコンまたは 5%フェニルメチルシリコン

カラム温度：50 (2分) - 約 10 /分 - 260 (10分)

注入口温度：250

注入法：スプリットレス法 (1分後ページ), 1 μ l 注入

キャリアーガス：He, 平均線速度：40cm / 秒

トランスファーライン温度またはデテクター温度)：270

MS イオン化法：EI

イオン化電圧：70V

イオン源温度：220 ~ 280 （機種により 200 以下でも可能）

検出モード：SIM(注 24)，または同等のもの

対象物質の測定質量数(m/z)：以下の通り 但し，() 内は確認用イオン

DEHA：129(147)

サロゲート物質の測定質量数(m/z)：以下の通り

DEHA-d₈：137

内標準物質の測定質量数(m/z)：以下の通り

フルオランテン-d₁₀：212

6.6 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（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-d₁₀ を加え，その 1 μ l を GC に注入し，DEHA とフルオランテン-d₁₀ とのピーク面積値（高さ）の比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．

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 DEHA-d₈ を加え，以下内標準法と同様に行う．

6.7 定量及び計算(注 25)

絶対検量線法を用いる場合は，測定用試料液 1 μ l を GC に注入し，得られた DEHA のピーク面積値（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，測定用試料液 1 μ l を GC に注入し，得られた DEHA とフルオランテン-d₁₀ 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る．

次に，検出量，GC 注入量，分析した試料量及び濃縮率などから試料中の DEHA 濃度を計算する．

〔計算〕次式で試料中の DEHA 濃度を計算する．

水質，底質及び生物濃度（μ g/ml または μ g/g）= 検出量(ng) × (測定用試料液量(ml)/注入量(μ l)) × (1/試料量(ml または g))

サロゲート物質を用いる場合は，測定用試料液 1 μ l を GC に注入し，得られた DEHA と DEHA-d₈ 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る．これに添加した DEHA-d₈ の重量を乗じて DEHA の重量を求め，これを試料量で除して算出する．なお，サロゲート物質(DEHA-d₈)と内標準物質(フルオランテン-d₁₀)とのピーク面積値（高さ）の比を求め，相対感度係数からサロゲート物質(DEHA-d)の重量を求め，その時の回収率を求める．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．

7 添加回収試験

10 試料毎に 1 回または 1 日に 1 回、試料と同じあるいは類似の試料をもちいて添加回収試験を行い回収率を求める。対象物質のアセトン標準液を検出限界の 10 倍量程度添加して十分に混合後、60 分以上放置してから回収試験を開始する。

8 注意事項

- (1) ポリビニルアルコール系ハードゲルのカラムを用いたゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)によるクリーンアップを検討したが、コーンオイルとアジピンサンジ-2-エチルヘキシルの分離が不十分であったので、今回 GPC を不採用とした。
- (2) DEHA は最近、DEHP の代替品として使用されてきている。その為、実験室内は DEHP と同様に汚染されている可能性があるため、特に注意する必要がある。
- (3) 使用器具があまり汚染されていない場合には、ヘキサン洗浄を省略してもよい。
- (4) 一例として、残留農薬試験用の空瓶を加熱処理して使用。
- (5) 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^o-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。その為、1000 倍残留農薬試験用を使用する。
- (6) 無視できない汚染が認められる場合には、500 ~ 700 で 8 時間程度焼成した後、汚染のない場所で放冷してから用いる。
- (7) 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精製水と見なせる。
- (8) EPA method506 では検出器 PID を、EPA method525.2 では検出器 GC/MS を使用したカートリッジ型固相抽出法、デスク型抽出の試験方法が報告されている。しかし、今回試験方法を併記しなかった。
- (9) 浮遊物が多い試料では、アセトンを 1 ~ 5ml 加えると、DEHA より一層回収される。
- (10) サロゲート法で測定しない場合には省略する。
- (11) PCB・フタル酸エステル試験用の無水硫酸ナトリウムを使用してもよい。
- (12) ロータリーエバポレーター又は K.D.濃縮器で濃縮する場合、測定用試料液中にキーパーが存在すれば、濃縮しすぎ及び乾固してもロスはほとんどない。しかし、河川水等では通常キーパー量が少ないので、濃縮しすぎ及び乾固(即ち 5ml 以下)は絶対に行わないこと。
- (13) 窒素吹き付けで濃縮する時、絶対に乾固させないこと。
- (14) DEHA の感度は良くないので、0.25ml まで濃縮するが多い。
- (15) 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。
- (16) 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、次の濃縮操作でアセトニトリルが残留する。その為、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。
- (17) マススペクトルにより確認する事が望ましい。しかし、マススペクトルの確認がで

きない場合には測定質量数と確認イオンのピーク強度比で確認する。

(18) 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、試料液を還元銅カラムに通して、硫黄を除去する。

(19) 予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。

(20) 測定用試料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の湿式充填し、この上層に無水硫酸ナトリウムを 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、アセトン/ヘキサン(5:95)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、測定用試料液を調製する。

なお、含水シリカゲルは以下のように作成する。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 に対して精製水 5g を滴下する。密栓し、発熱が終了するまで、静かに混合する。更に振とう器で 30 分振とう後、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。

(21) 測定用試料液を活性炭フロリジルカラム(10 × 300mm のカラムに 5g の 5 %活性炭含有フロリジルをヘキサンの湿式充填し、この上層に無水硫酸ナトリウムを 2 cm 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、アセトン/ヘキサン(2:98)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、測定用試料液を調製する。

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、振とう器で 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に保存する。

精製活性炭とはダルコ G 活性炭 100g を 2L の分液ロートにとり、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濾紙で減圧濾過し、少量のアセトンで濾過・洗浄する。130 で乾燥後、乳鉢で粉碎し、更に 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。

(22) DEHA 標準液、DEHA-d₈ 標準液、フルオランテン-d₁₀ 標準液は DEHA 汚染されないように注意する。

(23) セプタムゴーストがあるので、セプタムを GC に装着し、270 にして 1 晩パージしたものを使用する。

生物・底質試料では注入口に油滴等が付着し、ピークの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。

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

(25) 絶対検量線法では定量値のバラッキが大きいので、内標準法またはサロゲート法を推奨する。

(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜上、一般に入手できるも

のとして例示したが，これを推奨するものではない．これと同等または同等以上の品質・性能のものを用いても良い．

参考文献

1. 環境庁環境保健部環境安全課：平成 6 年度 化学物質分析法開発調査報告書
2. 環境庁環境保健部環境安全課：昭和 55 年度 化学物質分析法開発調査報告書
3. 環境庁環境保健部環境安全課：昭和 53 年度 化学物質分析法開発調査報告書
4. EPA:Method 8270B, US EPA
5. EPA:Method 525.2, USEPA
6. EPA:Method 506, USEPA