

要調査項目等調査マニュアル
(水質、底質、水生生物)

平成15年3月

環境省環境管理局水環境部企画課

要調査項目等調査マニュアルの制定に当たって

水環境を経由した多種多様な化学物質が人の健康や生態系に有害な影響を与えるおそれを低減するため、あらかじめ系統的、効率的に対策を進める必要があるとの認識のもと、調査を進める際に優先的に知見の集積を図るべき物質のリストとして「水環境保全に向けた取り組みのための要調査項目リスト」を平成10年6月に作成した。

これら、選定された要調査項目の調査は、超微量測定を要求され、高度な測定技術等が必要である。しかしながら、測定方法の詳細について標準化されていないため、要調査項目の調査実施に当たっては、測定方法の確立が必要である。

そこで、これら要調査項目について、毒性情報の収集、水環境中の存在状況実態調査を通じて知見の集積を進め、その測定方法等について平成11年12月、平成12年12月及び平成14年3月に「要調査項目等調査マニュアル(水質、底質、水生生物)」としてとりまとめてきており、今般も、さらに知見の集積や測定方法の検討を進め、本マニュアルにとりまとめた。

本マニュアルの作成にあたっては、国立環境研究所森田昌敏統括研究官のご指導のもと、下記の方々にご尽力頂いた。

本マニュアルにより、掲載した要調査項目の分析方法が標準化され、測定値の信頼性向上等に寄与し、環境保全活動の一助となれば幸いである。

平成15年 3月

環境省環境管理局水環境部企画課

総括	森田 昌敏	国立環境研究所統括研究官
	石井 康雄	農業環境技術研究所環境化学分析センター長
	石川 精一	北九州市環境科学研究所保健環境課主査
	岡本 拓	広島県保健環境センター環境技術部主任研究員
	奥村 為男	大阪府環境情報センター環境測定室調査課主任研究員
	彼谷 邦光	国立環境研究所環境研究基盤技術ラボラトリー長
	川田 邦明	新潟県保健環境科学研究所水質科学科専門研究員
	白石 寛明	国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター暴露評価研究室長
	高橋 保雄	東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科主任研究員
	中野 武	兵庫県立健康環境科学研究所安全科学部研究主幹
	福嶋 実	大阪市立環境科学研究所研究副主幹
	藤森 一男	兵庫県立健康環境科学研究所安全科学部主任研究員
	吉永 淳	東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻環境学助教授

目 次

・ 調査対象物質一覧表.....	1
・ 分析精度管理	3
・ 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項	16
・ 分析法	
・ バリウム、テルルの分析法.....	23
・ アニシジン類、キシリジン類、トルイジン類、 <i>N</i> -エチルアニリン、 <i>N,N</i> -ジメチルアニリンの分析法.....	36
・ 4-クロロ-3-メチルフェノール、クロロフェノール類、 <i>p</i> -プロモフェノールの 分析法.....	45
・ トリクロサン及びその塩素置換体の分析法	59
・ 2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル-4-メチルフェノール、2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル-4-エチルフェノール、 2,4,6-トリ- <i>t</i> -ブチルフェノールの分析法	73
・ テトラプロモビスフェノール A の分析法.....	84
・ ビス[ヒドロキシエトキシジプロモフェニル]プロパン (TBA-EO) の分析 法.....	93
・ ベンゾチアゾールの分析法	101
・ 多環芳香族炭化水素 (PAHs) の分析法	108
・ 農薬類の分析法.....	122
・ ポリ塩化ナフタレンの分析法	136
・ ミクロシスチン類の分析法.....	164
・ エストラジオールおよびその代謝産物の分析法 (LC/MS/MS 法)	173

・調査対象物質一覧表

1 調査対象物質及びその分析法

番号	目別番号	要調査項目	物質名	分析法
1. テルル、バリウム				
1	156		テルル及びその化合物（または総テルル）	水素化物発生原子吸光法、 水素化物発生ICP発光法、 ICP発光法、ICP質量分析法
2	199		バリウム及びその化合物（または総バリウム）	ICP発光法、ICP質量分析法
2. アニシジン類、キシリジン類、トリイジン類、 <i>N</i> -エチルアニリン、 <i>N,N</i> -ジメチルアニリン				
3	15		アニシジン類（メトキシアニリン類）	水質：溶媒抽出、GC/MS
4	61		キシリジン類	底質：水蒸気蒸留、溶媒抽出、 GC/MS
5	179		トリイジン類（メチルアニリン）	
6	39		<i>N</i> -エチルアニリン	
7	125		<i>N,N</i> -ジメチルアニリン	
3. 4-クロロ-3-メチルフェノール、クロロフェノール類、 <i>p</i> -プロモフェノール				
8	79		4-クロロ-3-メチルフェノール（4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール）	水質：固相抽出、硫酸ジエチル誘導体化、GC/MS
9	287		モノクロロフェノール類	底質：アルカリ抽出、硫酸ジエチル誘導体化、アルカリ分解、GC/MS
10	236		<i>p</i> -プロモフェノール	生物：抽出(脱脂)、硫酸ジエチル誘導体化、アルカリ分解、GC/MS
4. トリクロサン及び塩素置換体				
11	163		トリクロサン及び塩素置換体	ジアゾメタン誘導体化、GC/MS
5. 2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル-4-メチルフェノール、2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル-4-エチルフェノール、2,4,6-トリ- <i>t</i> -ブチルフェノール				
12	120		2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル-4-メチルフェノール（BHT）	水質：固相抽出、GC/MS
13	118		2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル-4-エチルフェノール	底質：生物：溶媒抽出、GC/MS
14	172		2,4,6-トリ- <i>t</i> -ブチルフェノール	
6. テトラプロモビスフェノールA				
15	154		テトラプロモビスフェノールA	固相抽出、硫酸ジエチル誘導体化、GC/MS
7. ビス[ヒドロキシエトキシ-3,5-ジプロモフェニル]プロパン				
16	203		2,2 - ビス[4 - (2 - ヒドロキシエトキシ) - 3,5 - ジプロモフェニル]プロパン	水質：固相抽出、TMS誘導体化、GC/MS 底質・生物：溶媒抽出、TMS誘導体化、GC/MS
8. ベンゾチアゾール				
17	251		ベンゾチアゾール	水質：固相抽出、GC/MS 底質：水蒸気蒸留、固相抽出、GC/MS
9. 多環芳香族炭化水素				
18	141		多環芳香族炭化水素類	水質：溶媒抽出、GC/MS 底質：抽出、アルカリ分解、GC/MS 生物：アルカリ分解、GC/MS
10. 農薬				
19	32		イソフェンホス	水質：固相抽出または溶媒抽出、GC/MS
20	36		イプロジオン	
21	64		キャプタン	底質・生物：溶媒抽出、GC/MS
22	182		トルクロホスメチル	
23	186		ナプロバミド	
24	215		ブタクロール	
25	228		フルトラニル	
26	233		プロベナゾール	

11. ポリ塩化ナフタレン			
27	260	ポリ塩化ナフタレン	水質：大容量サブトラPUF固相吸着 またはディスク型固相抽出 または溶媒抽出、GC/MS 底質：ソックスレ-抽出または高速溶媒 抽出、GC/MS
12. ミクロシスチン類			
28	269	ミクロシスチン類	固相抽出、酸化分解、GC/MSまたは LC/MS
13. エストラジオール類およびその代謝化合物			
29	-	エストラジオール類およびその代謝化合物	固相抽出、分画、LC/MS/MS

2 測定可能項目

	分類	番号	水質	底質	水生生物
1	テルル、バリウム	1~2			
2	アニシジン類、キシリジン類、トルイジン類、 <i>N</i> -エチルアニリン、 <i>N,N</i> -ジメチルアニリン	3~7			×
3	4-クロロ-3-メチルフェノール、クロロフェノール類、 <i>p</i> -プロモフェノール	8~10			
4	トリクロサン及び塩素置換体	11			
5	2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル-4-メチルフェノール、2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル-4-エチルフェノール、2,4,6-トリ- <i>t</i> -ブチルフェノール	12~14			
6	テトラプロモビスフェノールA	15			
7	ビス[ヒドロキシエトキシ-3,5-ジプロモフェニル]プロパン	16			
8	ベンゾチアゾール	17			×
9	多環芳香族炭化水素	18			
10	農薬	19~26			
11	ポリ塩化ナフタレン	27			×
12	ミクロシスチン類	28			×
13	エストラジオール類	29			×

．分析精度管理

要調査項目等は、化学物質の環境リスク対策を系統的かつ効率的に進めるにあたって、水環境中での検出状況や複合影響等に関する知見を優先的に集積すべき物質（群）として選定されたものである。本調査マニュアルは、これらの物質を対象として既に開発され実績のある測定方法のうち、検証試験等によってその基本的性能が確認できたものを中心に提示している。実際の水質、底質および生物試料への適用に際しては、各試験機関において事前に分析能力の評価を行うとともに、試料採取から前処理、測定、報告に至る過程で適切な精度管理を実施し、測定値の信頼性の確保に努めなければならない。分析精度の管理は、1）標準作業手順（SOP：Standard Operating Procedure）、2）分析方法の妥当性、器具、装置の性能の評価と維持管理および3）測定値の信頼性の評価によって行われ、基本的な留意事項を以下に示す。個々の測定対象物質に応じた具体的な留意事項は各分析方法に従う。

1 標準作業手順（SOP）

試験機関においては以下の項目等について作業手順を設定しておく。この作業手順は具体的で分かり易いこと、および関係者に周知徹底することが重要である。

試料採取・運搬用器具等の準備、メンテナンス、保管および取扱い方法

前処理用試薬類の準備、精製、保管および取扱い方法

分析用試薬、標準物質等の準備、標準溶液の調製、保管および取扱い方法

水質、底質および生物試料における前処理操作の手順

分析装置の測定条件の設定、調整、操作手順

分析方法全工程の記録（使用するコンピュータのハードおよびソフトを含む）

2 分析方法の妥当性、器具、装置の性能の評価と維持管理

（1）試料採取と運搬、保管

具体的には、本調査マニュアルの「 、試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従うが、試料採取に必要な器具類、材料および試薬等については、予め測定対象物質や測定に妨害を及ぼす物質が検出されないことを確認する。これらの物質が検出される場合は、その原因を究明し、各分析方法の目標検出下限値に相当する量を越えないように対処

する。また、常に同一の品質を維持するために、器具類、材料および試薬等の管理方法について規格化しておき、その規格について説明ができるようにしておく。

試料の採取に当たっては、調査の目的に対して適切な精度を保ち、かつ代表性のある試料を採取し、試料間相互の汚染（クロスコンタミネーション）に留意しながら、必要に応じて混合、固定化、異物除去等の処理を行う。

運搬と保管に際しては、外部からの汚染や分解、吸着等に留意し、試料品質の維持に努めなければならない。

（２）分析室内環境と器具・機材、試薬類

（ア）分析室内環境

測定対象物質によっては、野外環境よりも室内の濃度が高い場合があり、測定に重大な影響を及ぼす可能性がある。器具・機材の洗浄、乾燥、保管、試料調製、前処理、計測等を行う室内については、事前に空気中の対象物質濃度を実測することなどによって、室内環境の汚染が試料の測定に支障を及ぼさないことを確認しておく。支障があれば、その原因を追求し、回避する対策をとらなければならない。

（イ）器具・機材類

器具・機材類は、破損しがたいもので、測定を妨害する成分の溶出がなく、揮散、付着・吸着、分解等による損失がない、もしくはそれが洗浄等によって回避できる品質・形状のものを選択する。例えば、容器内壁に付着しやすい物質に対しては、有機溶媒や酸による洗浄で付着の回収が容易にできるよう、凹凸が少なく平滑な面を持つ品質・形状が望ましく、揮発性物質では蓋や接合部の気密性、光分解性物質では遮光性が必要となる。また、洗浄後の保管にあっては、測定対象物質に応じた適切な管理を行う。

（ウ）試薬類

試薬類は、適切な品質・純度をもつものを準備し、後述の操作ブランク試験や添加回収試験を通じて、妨害成分の有無を確認する。共存する不純物、分解物、添加物等が測定を妨害する可能性は高いため、製造ロットや使用履歴を記録しておくとともに、保管中、とりわけ開封後の品質の劣化に注意する必要がある。また、洗浄、蒸留、再結晶化などの精製を行う場合は、精製のたびに、その品質や純度を確認する必要がある。

(エ) 標準物質（溶液）

測定値は標準溶液の濃度に基づいて決定されるので、その信頼性の確保のために、可能な限りトレーサビリティの保証された標準物質、標準溶液を用いることが望ましい。入手できなければ、純度が98%以上の高純度分析用試薬や試薬特級等で代用する。これらの標準物質、標準溶液については、製造メーカー、ロット、供給元、調製方法と日時などの記録を適切に行う。標準溶液を保管する場合は、有効期限を明確にするとともに、使用前に濃度に変化がないことを確認する。

(オ) 内標準物質、サロゲート物質

内標準法に用いる添加用標準物質であり、内標準物質は装置測定直前の試験液に添加して試料注入誤差や分析装置の変動を補正、サロゲート物質は試料採取または前処理段階の試料に添加して添加位置以降から測定に至る分析操作の変動を補正するために利用する。これらの標準物質の選定、添加の位置と量は、個々の分析方法に従うが、選定にあっては測定対象物質と区別できること、試料マトリックス中に存在しないこと、分析操作の過程で安定であり、可能な限り対象物質と似た挙動をとること、検出感度が高いことが条件となる。GC/MS、LC/MSを分析装置とする場合は、 ^2H または ^{13}C をラベルした安定同位体標識物質の利用が多いが、不純物となる非標識体の存在量が問題となり、可能な限り純度の高い標準物質を用い、製造メーカー、ロット、供給元、調製方法と日時などの記録を適切に行い、調製した標準溶液の有効期限を明確にしておく。

(3) 試料調製と前処理

(ア) 試料調製

乾燥、混合、均一化、解剖等の試料調製にあたっては、クロスコンタミネーションに十分に注意するとともに、室内や器材に起因する外部からの汚染にも配慮しなければならない。

(イ) 前処理操作

抽出、精製、濃縮、誘導体化などの前処理は、操作に知識や熟練を要するため人為的な誤差の要因となり易い。本調査マニュアル「[5. 分析法](#)」章にある個別分析法の操作手順

と留意事項を理解し、適切に操作しなければならない。各操作の適否は操作ブランク試験と添加回収率試験で確認する。

(4) 分析装置の調整

使用する分析装置は、SOP に従い、試料の測定が可能になるよう測定条件を設定し、調整する。この際、感度、直線性、安定性等に問題がないことを確認するほか、干渉の有無や大きさ、その補正機能等が正常に機能するかどうかを確認しておく。

3 測定の信頼性の評価

(1) 装置の変動

1日に1回以上、定期的に検量線の間程度濃度の標準溶液を測定して、測定対象物質または内標準物質の感度が検量線作成時に比べ大きく変動していないことを確認する。測定対象物質と内標準物質との強度比である相対感度でみると、検量線作成時に比較して±20%の範囲を超えて変動する場合には、その原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。GCやLCを用いる分析装置において、分離カラムの劣化等によって保持時間が変動する場合には、必要に応じて対応をとればよいが、比較的短い期間の変動（通常、1日に保持時間が±5%以上、内標準物質との保持比が±2%以上）に対しては、その原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。分離カラムの劣化等によって長期にわたり徐々に保持時間が変動する場合には、必要に応じて対応をとればよい。

(2) 検量線（作成と直線性の確認）

検量線は通常5段階以上の濃度の標準溶液を分析し作成する。

内標準法による分析方法の場合、予め使用する分析装置固有の相対感度係数（RRF：Relative Response Factor）を求める。各検量線作成用標準溶液を3回以上繰り返して分析し、対象物質とそれに対応させる内標準物質（またはサロゲート物質）の濃度比と応答比（ピーク面積比など）の関係から、次式によりRRFを算出する。

$$RRF = (C_i / C_s) \times (A_s / A_i)$$

ここで、 C_i ：標準溶液中の内標準物質の濃度、 C_s ：標準溶液中の測定対象物質の濃度、 A_s ：標準溶液中の測定対象物質の応答値、 A_i ：標準溶液中の内標準物質の応答値である。

各検量線作成用標準溶液の分析で得られたRRFの平均値が、実試料分析時の検量線確認

の基準となるが、平均する RRF は相対標準偏差が 5%以内の変動であるよう装置等の設定条件をあらかじめ検討する必要がある。また、検量線データから最小自乗法で一次回帰直線を求め、その傾きを基準の RRF とすることができるが、切片が限りなく 0（ゼロ）に近いことを確認する。なお、維持管理等による分析装置の動作状況の変化、あるいは新たな標準溶液の調製などがあった場合には、同様の標準溶液の繰り返し分析によって基準となる RRF を新たに算出しなければならない。

実試料の分析開始時には、2～3 濃度の検量線作成用標準溶液を分析して RRF を求め、その値が基準の RRF に対して 20%以内の変動であることを確認する。これを超えて変動する場合は、原因を取り除き、再度標準溶液を分析して RRF を確認する。

実試料の分析開始後は、想定される試験溶液中の濃度と同程度の標準溶液を定期的に測定し、RRF が 20%以内の変動であることを確認する。GC/MS や LC/MS の利用にあっては、内標準物質との保持比の変化が $\pm 0.5\%$ 以内であることを確認する。

分析装置の基準となる RRF を算出しない場合は、実試料の分析の都度、併行して 5 段階以上の検量線作成用標準溶液を分析し、濃度比と応答比の関係から検量線を作成しなければならない。この検量線の作成は、一連の分析の開始、中間および終了時に実施することが望ましく、一次回帰直線の傾きの変動が 20%以内であることを確認して、定量に用いる。

内標準物質またはサロゲート物質を用いない分析方法にあっては、実試料の分析の都度、上述と同様に標準溶液の分析を行い、対象物質の濃度と応答値の関係、すなわち絶対検量線法の検量線を作成する。作成頻度は、一連の試料分析に対して 3 回以上が望ましく、一次回帰直線の傾きの変動が 20%以内であることを確認する。

（ 3 ） 操作ブランク試験

操作ブランク試験は空試験ともいい、試験液の調製または分析装置への導入操作等に起因する汚染を確認し、試料の分析に支障がない測定環境に設定し、分析値の信頼性を確保するために行う。試験の手順は各分析法に記載の通りであるが、試料マトリックスのみがない状態で調製した試験液について、測定対象成分が検出されるか否か、検出されればその濃度を、併せて他の妨害成分の有無を十分把握しておき、必要に応じてその値を提示できるようにしておく。

操作ブランク値が大きいと検出下限・定量下限が高くなるばかりでなく、人為的な原因による異常値が出現する可能性が高くなり、分析値の信頼性が低下する。したがって、操

作ブランク値は分析値に影響がないよう極力低減を図り、試料濃度への換算値が目標定量下限値以下になるよう管理する。試験頻度は、10 試料ごとに 1 回、または 1 日に 1 回（測定試料が 10 試料以下）が目安である。

（４）検出下限値および定量下限値

検出下限値および定量下限値は、装置と分析方法については繰り返し分析で得られる測定値の標準偏差に基づき算出し、試料測定時の検出下限値と定量下限値は実測時のシグナル/ノイズ比（S/N 比）から推定する。

（ア）装置の検出下限値（IDL：Instrument Detection Limit）および定量下限値（IQL：Instrument Quantification Limit）

分析に用いる測定装置が、分析方法に記載されている検出下限値や定量下限値を満足するか否かは、装置検出下限値（IDL）を算出することで判断する。

IDL は標準溶液の繰り返しによる分析値のバラツキに基づき算出する。検量線作成用標準溶液の最低濃度（定量下限値付近）、もしくはシグナル/ノイズ（S/N）比が 5～15 程度に相当する標準溶液を通常 7 回、可能であればそれ以上繰り返し測定し、得られた分析値から標準偏差（s）を求め、次式より装置検出下限値を求める。

$$IDL = t(n-1, 0.01) \times s$$

ここで、IDL は装置検出下限値、 $t(n-1, 0.01)$ は危険率 1%、自由度 $n-1$ の t 値（片側）、s は標準偏差である（次項表参照）。

標準溶液の繰り返し分析の値は正規性を示していることが前提となるので、繰り返しの分析値の中にはずれ値など異常値と判定される値が得られた場合は、装置の再調整を行い、再測定しなければならない。

試料採取量、最終試験液量、分析装置への導入量等から、IDL の試料換算濃度を求め、この値が各分析方法の目標検出下限値以下であることを確認する。もし、これを満足しなければ、装置の再調整等などによって原因を解消する。また、装置の感度が改善しない場合は、試料の供試量を増やす、試料濃縮率を高めるなどによって、目標検出下限値の達成が可能か否かを検討する。

装置定量下限値（IQL）は IDL の 3 倍値とする。

$$IQL = 3 \cdot IDL$$

(イ) 分析方法の検出下限値 (MDL : Method Detection Limit) および定量下限値 (MQL : Method Quantification Limit)

定量下限値付近の濃度をもつ試料を用いて、所定の操作により分析し、得られた分析値を試料濃度に換算する。この操作を7回以上繰り返して、その時の標準偏差から次式により分析方法の検出下限値を求める。

$$MDL = t(n-1, 0.01) \times s$$

ここで、MDL は分析方法の検出下限値、 $t(n-1, 0.01)$ は次表に示す通り、危険率1%、自由度 $n-1$ の t 値 (片側)、 s は標準偏差である。

表 Student の t 分布におけるパーセント点 (危険率1%、片側)

繰り返し回数(n)	自由度(n-1)	$t(0.01, n-1)$ 、片側
7回	6	3.143
8回	7	2.998
9回	8	2.896
10回	9	2.821

ここで求めた MDL が各分析方法の目標検出下限値を満足していることを確認する。満足できない場合は、分析装置の再調整を行う。また、試料量を増やしたり、測定用試料液をより濃縮することなどで対応してもよいが、その手順を記録しておく。

MDL は、使用する分析装置やその操作条件により異なるため、これらに変更があった時など必要に応じて、MDL を求め、目標検出下限値を満足していることを確認する。

また、試料中の含有濃度が高すぎたり、低すぎる場合は適切な MDL が算出できないので、試料の選定や試料調製は以下に従う。

MDL 算出用試料の選定

MDL の算出に用いる試料は可能な限り対象物質や妨害物質を含まないものから選定する。含有量が不明の場合は、実試料と同量の試料を供試して、所定の前処理、試験液の調製を行い、実測で確認する。操作ブランク値も含め、含有濃度が目標検出下限値の5倍以内であり、妨害物質も不検出であれば、MDL 算出用の試料とすることができる。

試料の調製

操作ブランク試験および MDL 算出用試料の分析結果に応じ、次のいずれかで試料を調製する。

- ・ 操作ブランク試験および MDL 算出用試料の分析の結果、対象物質が検出されない（目標検出下限値以下）場合

選定した試料に対象物質を目標検出下限値の 5 倍程度の濃度となるよう添加し、必要に応じて所定量のサロゲート物質を添加して、十分に混合し均一化させ、所定の前処理、試験液の調製を行い、分析値を求める。MDL の算出は 7 回以上の繰り返し分析の結果が根拠となるので、調製試料の均一性が重要となり、一連の繰り返し分析に供試できる充分量を、一時期に調製することが望ましい。

- ・ 操作ブランク試験または MDL 算出用試料に対象物質が検出され、その濃度が目標検出下限値の 5 倍を超えない場合

選定した試料に対象物質を添加するが、添加後の分析値が目標検出下限値の 5 倍程度の濃度となるよう添加量を調整する。添加後は上記の通りとする。但し、対象物質の添加により人為的なバイアスが生じる可能性が高いと判断される場合には、対象物質の添加は行わず、選定した試料をそのまま繰り返し分析に供してもよい。

なお、操作ブランク試験などにおいて対象物質が検出され、その濃度が目標検出下限値の 5 倍を超える場合は、MDL の算出は行わず、溶媒、試薬、器具類の見直し等により、その原因を取り除く。

調製試料の分析

調製試料は所定の方法で抽出から前処理、試料液調製、測定に至る全操作を行い、分析値を求める。1 回の分析に供試する調製試料の量は実試料と同じとし、繰り返しは最低 7 回行い、MDL 算出の基礎データとする。

分析方法の定量下限値（MQL）は MDL の 3 倍値をとする。

$$\text{MDL}=3\cdot\text{MQL}$$

検出下限値や定量下限値は使用する測定機器や測定条件により異なるために、機器の分析条件を設定した場合など、必要に応じて1回程以上測定し、定量下限値が目標定量下限値以下であることを確認する。しかし、基準値が高いものでは、目標定量下限値に関係なく、将来の濃度変化をみるためには、定量下限値はできるだけ小さくして低濃度まで測定することが望ましい。また、検出下限値や定量下限値は、試料量、前処理操作（濃縮比）により異なるため、試料ごとに算出する必要がある。

（ウ）試料測定時の検出下限値（PDL：Practice Detection Limit）および定量下限値（PQL：Practice Quantification Limit）

実試料の分析において、MDL未滿と判断されるものについては、そのクロマトグラム上（クロマトグラフィー法以外では、実試料を連続して測定する間のベースラインの変動）のS/N比から試料測定時の検出下限値（PDL）と定量下限値（PQL）を推定する。ピークが検出されない場合は、ピーク近傍（ピークの半値幅の10倍程度の範囲）のベースラインのノイズを計測し、その標準偏差の2倍をノイズ幅（N）とする。経験的には、計測範囲のノイズの最大値と最小値の幅は標準偏差の約5倍となるので、最大値と最小値の差の2/5をノイズ幅としてもよい。次いで、ノイズの中央値をベースラインとし、ノイズ幅の3倍の高さ（S）のピークを想定し、標準液から得られる該当ピークの半値幅をあてて、そのピーク面積を推定する。一方、MDL未滿でピークが認識される場合は同様にピーク面積を求め、このピーク面積を濃度の算出式に代入して試料中の濃度を求め、この値をPDLとする。PQLはPDLの3倍値である。

PDLはMDL未滿と判断される試料ごとに算出する。PDLがMDL以上であれば、前処理操作、測定方法等に問題があったか否かを確認し、必要に応じ再分析や再測定を行う。また、MDLの算出に用いた試料の性状、あるいは分析法が対象とする試料の性状が実試料のそれと大きく異なっている可能性もあるので、実試料に近い性状をもつ試料でのMDLの再測定や他の分析法の採用も考慮する。

（5）添加回収率試験

基本的には、試験液中の濃度が定量下限値の10倍程度となるよう測定対象の標準物質及

び必要に応じ所定量のサロゲート物質を試料に添加して、分析方法と同じ前処理、試料液の調製、測定を行い、添加量と分析値から回収率を算出する。ここで、操作ブランク値が大きかったり、試料中に対象物質が含まれる場合は、その濃度が回収率の測定に影響しない程度に標準物質の添加量を増やして試験する。回収率の許容範囲の目安は 70 ~ 120% であり、同位体希釈法ではサロゲート物質の回収率は 50 ~ 120% の範囲を目標とする。

回収率が許容できる範囲を大きく逸脱する場合は、その原因を究明した後、試料の再採取または粗抽出液から測定をやり直す。

回収率の測定は実試料の測定に先だてて行う。また、用いる器具・試薬類の製造メーカーあるいはロットの変更が回収率に影響する可能性がある時には、添加回収率試験を行い回収率を確認する必要がある。

(6) 二重測定

試料採取、前処理操作および装置分析における総合的な信頼性を確保するために、同一条件で採取した 2 つ以上の試料について同様に分析する。頻度は 10 試料ごとに 1 回が目安であり、定量下限値以上の濃度の被検物質に対して 2 つ以上の測定値の差が平均値に比べて 30% 以下であることを確認する。測定値の差が大きい場合は、その原因を精査して取り除き、再測定する。

(7) トラベルブランク試験

トラベルブランク試験は、試料採取準備時から試料測定時までの汚染の有無を確認するためのものであり、採取操作以外は試料と全く同様に扱い持ち運んだものを測定し、トラベルブランク値とする。移送中に汚染が考えられる場合には、一連の試料採取において試料数の 10% 程度の頻度で、少なくとも 3 試料以上行う。

但し、トラベルブランク値を毎回行わなくてもよいが、試料採取における信頼性を確保するため、前もってトラベルブランク値について十分検討しておき、必要に応じてそのデータが提示できるように管理しておく。

4 データの管理及び評価

(1) 異常値、欠測値の取扱い

操作ブランク値が大きい、二重測定の結果が大きく異なる、トラベルブランク値が大き

いなど、精度管理上の基準を満たさない場合は、測定値の信頼性に問題があると考えられるため、欠測扱いとして再測定を行う。再測定には、多大な労力、時間、コストがかかるだけでなく、試料の採取時期が異なることから解析上の支障も生じ、調査全体の評価に影響することになる。したがって、事前のチェックを十分に行い、異常値や欠測値を出さないように注意する。また、異常値や欠測値が出現した経緯を十分に検討し、記録に残して、以後の再発防止に役立てることが重要である。

(2) 測定操作の記録

試料採取・運搬から試料調製、抽出、測定に至る過程の操作に関し、以下のデータを記録し、整理・保管しておき、報告要請があれば提出できる準備をしておく。

試料採取、保管、運搬の方法

- ・装置や器具の特定、調整および操作の状況
- ・採取対象の条件及び状況（採取方法、採取地点、採取日時など）
- ・気象条件
- ・容器等の取扱い及び保管の状況
- ・運搬の方法

試料に関する付加情報

- ・水質：pH、有機物濃度、懸濁物質質量など
- ・底質：外観、臭気、夾雑物、水分含量、強熱減量など
- ・生物：種、生物計測データ、生育段階、脂質含量など

試料調整の条件と方法

- ・水質：ろ過の有無とその方法など
- ・底質：間隙水除去とその方法、乾燥の有無とその方法など
- ・生物：試料採取部位とその方法など

試料の前処理法

- ・変更、改良、改善点とその検証結果
- ・その他特記事項

前処理・分析装置の操作条件と校正記録

- ・製造メーカー、製品番号、動作状況など
- ・維持管理記録

測定値を得るまでの各種の数値

- ・ 試料供給量、抽出液量、濃縮率など
- ・ 各装置の設定条件など

5 精度管理に関する報告

精度管理に関する以下の情報を記録し、データと共に報告する。

試料採取と運搬、保管の履歴

分析操作の記録（前処理・分析に関する記録）

装置の検出下限値および定量下限値

分析方法の検出下限値および定量下限値

試料測定時における検出下限値および定量下限値

操作ブランク試験結果

添加回収試験結果

二重測定結果

トラベルブランク試験結果

SOP に規定されていること

- ・ 分析装置の種類と測定条件
- ・ 日常的点検、調整（装置の校正等）の記録
- ・ 標準物質・標準溶液等の履歴・調整・保管方法
- ・ 分析装置の感度変動の記録

参考資料

- 1) US EPA (2003) Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Procedures for Detection and Quantitation. *Federal Register* Vol.68, No.48, pp11770-11790, Wed., Mar. 12, 2003 / Proposed Rules.
- 2) US EPA (2003) Technical Support Document for the Assessment of Detection and Quantitation Concepts. *Federal Register* Vol.68, No.48, pp11791-11793, Wed., Mar. 12, 2003 / Proposed Rules.
- 3) US EPA (2003) Technical Support Document for the Assessment of Detection and Quantitation Approaches. EPA-821-R-03-005, Feb. 2003, Engineering and Analysis Division Office of

Science and Technology U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC 20460.

・試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項

ここでは、試料の採取、運搬、調製にかかわる一般的な考え方、手順、方法についてまとめます。本章とともに、各分析法の「試薬、器具及び装置」、「試料の採取・運搬」ならびに「注意事項」に留意して、適切な地点と時期を選定し、代表性のある試料採取を行い、調査媒体と測定対象物質に変質が無いよう運搬、調製することが重要である。

1 試料採取地点の選定

試料採取に当たっては、特定の発生源の影響を受けない一般的な環境を対象として地点を選定すると共に、水質及び底質を同一地点で採取する場合は、泥分率の高い地点を選定する。また、測定結果を評価する上で参考となる水文、気象、土地利用等のデータが利用できる地点を優先する。なお、河川、湖沼および海域で試料を採取する際、特に生物の採取や港湾内の作業では各種規制等に抵触する場合がありますので、事前に関係機関に確認するなどして許可申請等必要な措置を講ずる。

2 試料採取

(1) 水質

(ア) 採水時期

原則として比較的晴天が続き、水質が安定している日を選定する。感潮域や海域にあっては潮汐等も考慮して採水時間を決める。

(イ) 採水部位

表層水の採取を基本とし、河川では原則として流心で採取する。表層は水深の 1/5 程度までの層であり、通常水面下 0～数 10 cm を採取することになる。水深が極浅い地点においては浮泥の混入がないよう注意深く採水する。また、表面に浮遊ゴミや浮遊油脂類等が目視されれば、これらが混入しないよう 0～2 cm 層を避ける。なお、目的によっては深度別に採水する。

(ウ) 採水器

採水器具は、地点の状況に応じ、バケツ、柄付きの採水器（ひしゃく）、ハイロート採水

器、バンドーン採水器等を用いる。材質はガラス製、ステンレス製、合成樹脂製、四フッ化エチレン樹脂フィルムコーティング製などがあるが、測定対象物質や測定を妨害する物質が溶出しない材質、また測定対象物質が内壁に付着し難い材質を選ぶ。基本的には、有機化合物の分析には合成樹脂製、重金属類にはステンレス製の材質は避ける。採水器は予め水洗等による洗浄を行い、装着するロープやワイヤー等も含めて測定対象物質等の汚染や溶出がないことを予め確認しなければならない。

なお、試料容器で直接試料水を採ることもできる。

(エ) 試料容器

試料容器は、運搬・保管時の汚染や損失がないよう、測定対象物質に応じて準備しなければならない。試料容器の品名、品質および形状、ならびにそれらの洗浄方法は各分析法に記載の通りであるが、予め定めた目標検出下限値が確保できるものを使用する。

基本的には、揮発性有機物質の場合は、四フッ化エチレン樹脂でコーティングしたシリコンゴムセプタム等で密封できる無色または褐色のガラス製ネジ口瓶または同等以上の容器を用い、水洗、有機溶媒洗浄したものを使用直前に 105 で 3 時間程度加熱し、デシケータなどに入れて室内空気からの再汚染がないよう配慮して放冷した容器を用いる。

中・難揮発性有機物質には、無色または褐色の硬質ガラス製の共栓付試薬瓶またはネジ口試薬瓶を用いる。これらは使用直前に水洗を行い有機溶媒で洗って乾燥させる。但し、EDTA と界面活性剤の試料容器は、可能な限り洗剤を用いた洗浄は避けるとともに、精製水による十分な濯ぎを行う。

重金属等無機物質用の試料容器は、ポリエチレン、ポリカーボネートなどの合成樹脂製、または硬質ガラス製の容器を用い、予め水洗、硝酸 (1+10) または塩酸 (1+5) による酸洗浄を行い、精製水で濯ぐ。

(オ) 採水操作

採取場所の状況、測定対象物質に適した採水器を用いて表層水を採取する。採水器は表層水で 2~3 回共洗いした後、試料とする表層水を試料容器に移す。

揮発性有機物質の分析に用いる試料は、予め試料容器を共洗いした後に、泡立てないよう静かに容器に流し入れて満水にし、直ちに密栓する。密栓の後、容器中に気泡が無いことを確認する。

中・難揮発性有機物質および重金属等無機性物質についても同様に採取して試料容器に流し入れ満水にして栓をする。但し、試料容器の内壁への付着が想定される疎水性有機物質（水溶解度：1 µg/mL 以下）等が測定対象となる場合は、試料容器の共洗いは行わない。

なお、測定対象物質の安定化のために還元剤や酸の添加、あるいはサロゲート標準物質の添加が必要な場合は、分析法に従って適切に処理する。

採水量と試料数は、分析法と調査項目数によって決まるが、予備保存用あるいは二重測定も考慮しなければならない。

採水にあわせて、水温、外観、色相、臭気、夾雑物、油膜の有無など水質にかかわる基本事項を記録する。

（２）底質

（ア）採泥時期

水質と底質は同時に採取することを原則とする。

（イ）採泥場所

一般に底質の性状は流れの速さで異なる。地点の特性が試料に反映するように配慮しつつ、可能な限り泥分率が高い底質が確保できる場所で採泥を行う。また、河川では中心と両岸の 3 ヶ所、湖沼・海域では 50 m 間隔の 3 ヶ所で採泥し、均質に混合したものを試料としてもよい。

（ウ）採泥器

底質はエクマンバージ型採泥器またはこれに準ずる採泥器、例えば SK 式採泥器、スミスマッキンタイヤー型採泥器など、を用いて採取する。深度別の柱状サンプルが必要な時は柱状試料採泥器を用いる。

（エ）試料容器

揮発性有機化学物質用には水質試料に準じた密封できるガラス製容器を用いる。その他の有機物質および重金属等無機物質については、硬質ガラス製または硬質プラスチック製広口試薬瓶であって、共栓やねじ口栓ができる容器、あるいはポリエチレン製袋や箱を用いる。いずれも、測定対象物質や妨害物質の溶出がない材質を選び、予め定めた目標検出

下限値が確保できるものを用いる。

(オ) 採泥操作

原則として底質表面から 10 cm 程度の表層泥を試料とする。エクマンバージ採泥器等を用いて 1ヶ所から 3 回以上の採泥を行い、表層泥をポリエチレン製(重金属分析用)、ステンレス製(有機物質分析用)または珧瑯引き(重金属及び有機物質分析用)バットに集め、竹べら、竹製ピンセットなどで静かにかき混ぜ、小石、貝殻、動植物片などの明らかな夾雑物を除く。この時、泥温、外観、色相、臭気、夾雑物等について記録する。均質に混合した底質は試料容器に入れる。

なお、揮発性有機物質測定用の試料にあつては、採泥器内で水切りをし、小石、貝類、動植物片などの固形物を含まないように混和し、速やかに試料採取容器に移し入れ、空隙が残らないよう直ちに密栓する。

採泥量と試料数は、分析法と調査項目数によって決まるが、予備保存用あるいは二重測定も考慮しなければならない。

(3) 生物

(ア) 生物種の選定

魚類、甲殻類および貝類の水生生物を調査対象生物とする。生物種は調査目的によって決まるが、要調査項目物質の生物への蓄積の有無を知る観点から、次の条件を満たすことが望まれる。物質を蓄積する性質があり、体内濃度が比較的速やかに平衡に達すること。

年齢と成長の関係および食性に関する知見が得られていること。全生活史にわたる生活領域が明確であり、それが比較的狭いこと。日本各地に広く分布し、採捕が容易なこと。

これらの全てを兼ね備えた生物種の選定は困難な面があるが、比較的適した生物種に次がある。

- ・淡水産魚類：ウグイ、フナ類、コイ、オイカワ、オオクチバス、チチブ
- ・淡水産甲殻類：アメリカザリガニ、スジエビ
- ・淡水産貝類：カワニナ、ヤマトシジミ
- ・海産魚類：スズキ、ボラ、コノシロ、マハゼ、マコガレイ
- ・海産甲殻類：ガザミ、シャコ

・海産貝類：ムラサキイガイ、マガキ、アサリ

なお、地域差に関する知見を得るためには、生物種と成長段階（体長、殻長など）を可能な限り固定することが重要である。

（イ）採捕時期

水質および底質試料と同時期を原則とするが、一般的に水生生物の活動が活発な 4～11 月期が望ましい。

（ウ）試料容器

基本的に底質試料に同じ、測定対象物質や妨害物質の溶出がない清浄な容器であって、予め定めた目標検出下限値が確保できるものを用いる。

（エ）採捕器具と方法

魚類は定置網、投網、刺網など、甲殻類はタモ網やカニ籠などを用いて採捕する。貝類はタモ網等で採捕し、ムラサキイガイやマガキなどの付着性の貝類にあっては金属製ヘラ等を用いて殻が壊れないよう注意しながら剥ぎ取る。各試料は、採捕日、地点および標準和名等を記録し、試料容器に入れて、氷またはドライアイスの入ったクーラーボックスに収容する。

なお、採捕日と水域が特定できれば、漁業者が捕獲した魚介類を購入し、試料とすることが出来る。

3 運搬・保存方法

採取した試料は、汚染のない適切な運搬容器に入れて、遮光・保冷状態で試験施設まで運搬する。

試験施設に到着後、できるだけ速やかに試料の調製を行い、分析に供する。やむを得ず保存が必要な場合は、試料を汚染することのない冷暗所（4℃以下）で保存する。

試料調製と分析が異なる機関で行われる場合は、試料調製を行った後、水質試料は遮光・保冷状態、底質と生物試料は凍結状態で送達する。但し、揮発性有機物質の試料は、試料調製を行わず、試料採取時の状態で、遮光・保冷して送達する。

4 試料調製

水質試料は、原則として懸濁物質を含む試料を分析する。

底質試料は、揮発性物質の試料にあつては、後述の篩別処理は行わず、試料容器内の表層に浮上した間隙水を捨て、さらに表層部をかきとった下層で、固形物を含まない部分を分析に供する。同時に水分含量と強熱減量を測定する試料を採取する。

中・難揮発性有機物質および重金属等無機物質の試料は、孔径 2 mm (8.6 メッシュ) のフルイで篩別し、20 分間の遠心分離 (3,000 rpm) で間隙水を除き、均質に混合したものを分析試料とする。この際、重金属等無機物質の試料調製には、原則として金属製のフルイおよび遠心分離管の使用は避ける。

なお、調製した底質試料について、泥分率 (フルイを通過した試料の重量/フルイにかける前の試料重量%)、水分含量 (105 ~ 110 °C、2 時間程度) および強熱減量 (600 ± 25 °C、2 時間程度) を求める。

生物試料の分析部位は、原則として魚類では筋肉部、甲殻類と貝類は軟体部とする。シジミやアサリなどの底棲貝類は餌とともに底質を取り込むため、これらの生物を分析試料とする場合は、3%程度の食塩水に一晩浸け置き、消化管中の底質を体外に排出させる。単一個体で分析に必要な量を確保できない場合は、複数個体を混合して必要量を確保する。

5 野外および試料に関するデータの記録

(1) 野外データ

次の事項を参考に、試料採取に先立ち様式を決めて、野外データを記録する。

- ・採取日時、採取者名
- ・採取地域の名称、正確な位置(地図)、一般環境状態、周辺施設その他の生活圏の状況、潮汐の状態、気象条件、水深、流速、流量
- ・水温、泥温、透明度、水底の状態、濁度、pH、塩分、溶存酸素、目視観察による色相、臭気、夾雑物
- ・捕獲生物の標準名、体長、体重、個体数、採捕方法
- ・試料の安定化処理、運搬・運搬の条件

(2) 試料データ

測定結果の表示に必要な、あるいは結果の評価に参考となる項目をあげる。これらの試料

データは試料調製に併せて測定、整理し、記録することが望まれる。

- ・水質試料：浮遊物質、有機物量（COD、BOD、TOC など）、塩素イオン（または塩分）など。
- ・底質試料：水分含量、強熱減量、泥分率、粒度組成、有機炭素量、硫化物など。
- ・生物試料：体長（殻高、殻長、殻幅、甲長、甲幅）、体重（重量）、生物種、雌雄、生育段階（年・月・週齢、性成熟・未成熟）、脂質含量、腸管内容物など。

6 参考資料

- 1) 環境庁水質保全局：「水質調査方法」（昭和 46 年 9 月）
- 2) 日本規格協会：「JIS K 0094 工業用水・工場排水の試料採取方法」（1994）
- 3) 環境庁水質保全局：「底質調査方法」（昭和 63 年 9 月）
- 4) 環境庁環境保健部：「生物モニタリング調査マニュアル」（昭和 62 年 5 月）

. 分析法

. バリウム、テルルの分析法

1 対象物質

バリウム、テルル

2 目標検出下限値及び定量下限値

本分析法の目標検出下限値及び目標定量下限値を表 1 に示す。

表 1 目標検出下限値及び目標定量下限値

	水 質 (µg/L)		底 質 (mg/kg)		生 物 (mg/kg)	
	目標検出 下限値	目標定量 下限値	目標検出 下限値	目標定量 下限値	目標検出 下限値	目標定量 下限値
バリウム	1	5	1	5	1	5
テルル	0.2	1	0.05	0.25	0.05	0.25

3 分析法の概要

表 2 のいずれかの方法により単元素測定あるいは多元素同時測定を行う。

表 2 分析法の一覧表

	単元素測定	多元素同時測定
バリウム	ICP 発光法 ICP 質量分析法	
テルル	水素化物発生原子吸光法 水素化物発生 ICP 発光法	ICP 質量分析法

- ・水素化物発生原子吸光法：試料を前処理した後、試料溶液中のテルルを還元剤によって水素化テルルガスに変換、原子化しテルルによる原子吸光を測定して定量する。
- ・水素化物発生 ICP 発光分析法：試料を前処理した後、試料溶液中のテルルを還元剤によって水素化テルルガスに変換して誘導結合プラズマ中に導入し、テルルによる原子発光を測定して定量する。
- ・ICP 発光分析法：試料を前処理した後、試料導入部を通して誘導結合プラズマ中に噴霧し、各元素による発光を測定して定量する。
- ・ICP 質量分析法：試料を前処理した後、内標準物質を加え、試料導入部を通して誘導結合プラズマ中に噴霧し、各元素と内標準物質のそれぞれの質量 / 荷電数におけるイ

オンの電流を測定し、各元素のイオンの電流と内標準物質のイオンの電流との比を求めて定量する。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・テルル：定量分析用標準物質または標準物質標準液
- ・バリウム：定量分析用標準物質または標準物質標準液
- ・水：定量する元素について空試験を行なって使用に支障のないことを確認しておく。
- ・硝酸：有害金属測定用又は同等品
- ・塩酸：有害金属測定用又は同等品
- ・過塩素酸：有害金属測定用又は同等品
- ・硫酸：有害金属測定用又は同等品
- ・テトラヒドロほう酸ナトリウム
- ・水酸化ナトリウム：有害金属測定用又は同等品

(2) 器具及び装置

水素化物発生原子吸光法

- ・水素化物発生原子吸光分析装置：試料溶液と酸・還元剤を反応させ水素化物を発生させる部分はバッチ式あるいはフロー式のもの。原子化部はセラミック・石英等製のセル、原子化方法はフレイム、電気加熱等の方式のもの。
- ・テルル中空陰極ランプ

水素化物発生 ICP 発光分析法

- ・水素化物発生 ICP 発光分析法装置：試料溶液と酸・還元剤を反応させ水素化物を発生させる部分はフロー式のもの。同時多元素分析型 ICP 発光分析装置またはシーケンシャル型 ICP 発光分析装置：バックグラウンド補正が可能なもの。

ICP 発光分析法

- ・同時多元素分析型 ICP 発光分析装置またはシーケンシャル型 ICP 発光分析装置：バックグラウンド補正が可能なもの

ICP 質量分析法

- ・ICP 質量分析計

5 試料の採取・運搬

(1) 水質試料

水質試料は、予め水洗、硝酸(1+10)または塩酸(1+5)による酸洗浄を行い、精製水で濯いだポリエチレン、ポリカーボネートなどの合成樹脂製容器を用い、氷冷・遮光して、実験室へ持ち帰る。分析操作は可能な限り速やかに行い、試料容器中の全量を分析に供試する。やむを得ず保管が必要な場合は、冷暗所(4)に置く。

(2) 底質試料

底質試料は、エクマンバージ型採泥器等によって表層泥(0~10 cm)を採取し、目視できる夾雑物を除いて、硬質プラスチック製広口試薬瓶、ポリエチレン製袋または箱等に入れ、氷冷・遮光状態で実験室へ持ち帰る。この試料は、孔径2 mm目の篩に通した後、20分間の遠心分離(3,000 rpm)で間隙水を除き、均質に混合したものを分析に供する。底質試料の保存は、調製試料を-20 で凍結させる。保存する試料は乾燥試料・風乾試料が望ましい。

(3) 生物試料

採捕した生物試料は、ポリエチレン製袋に入れ、氷またはドライアイスで保冷したクーラーボックスに収納して、実験室に持ち帰る。生物試料の分析部位は、原則として筋肉組織(可食部)である。生物試料の保存は-20 での凍結による。保存試料は凍結乾燥試料が望ましい。

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「 . 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。

6 試験操作及び同定、定量

(1) 前処理

(ア) 水質試料

河川水

共存物質により妨害を除去するための前処理方法として、工場排水試験公定法には、元素定量のための前処理方法が記載されている。これらは共存する無機、有機物質の分解が

目的であり、元素によらずほぼ共通の方法である。検水の性状によって以下(a)～(d)の方法があげられている。なお、溶存状態の成分のみを分析する場合には、採水直後にろ紙（たとえば5種C）メンブランフィルターなどでろ過し、最初の約50 mLを捨て、その後のろ液を試料として分析する。

(a)塩酸または硝酸酸性で煮沸

有機物や懸濁物質がきわめて少ない試料に適用する。

試料100 mLにつき塩酸5 mLまたは硝酸5 mLの割合で加える。

加熱して約10分間沸騰させる。

放冷後、必要に応じて蒸留水で一定量にする。

(b)塩酸または硝酸による分解

有機物が少なく、懸濁物質として水酸化物、酸化物、硫化物、リン酸塩などを含む試料に適用する。

試料をよく振り混ぜた後、直ちに分取し、試料100 mLにつき塩酸5 mLまたは硝酸5 mLの割合で加える。

加熱して液量が約15 mLになるまで濃縮する。

不溶解物が残った場合はろ過し、蒸留水でよく洗浄する。

ろ液と洗液を合せて一定量にする。

(c)硝酸と過塩素酸による分解

酸化されにくい有機物を含む試料に適用する。

試料をよく振り混ぜた後、適量をビーカー等にとり、硝酸5～10 mLを加える。

ホットプレート上で加熱濃縮し、液量が10 mL程度になったら放冷し、硝酸5 mLを加え、過塩素酸（60%）10 mLを少量ずつ加える。

過塩素酸の白煙を生ずるまで加熱を続け、その後時計皿などで覆いをして加熱を続ける。

有機物の分解が完全に終了するまで、を繰り返し行う。

放冷後、蒸留水を加え、不溶解物が残った場合はろ過後よく洗浄し、ろ液と洗液を合せて一定量とする。

(d)硝酸と硫酸による分解

この方法は多種類の試料の前処理として適用できる。

試料をよく振り混ぜた後、適量をビーカー等にとり、硝酸5～10 mLを加える。

ホットプレート上で加熱濃縮し、液量が 10 mL 程度になったら放冷し、硝酸 5 mL と硫酸 (1+1) 10 mL を加える。

硫酸の白煙を生ずるまで加熱を続ける。

有機物の分解が完全に終了するまで、を繰り返し行う。

放冷後、蒸留水を加え、不溶解物が残った場合はろ過後よく洗浄し、ろ液と洗液を合わせて一定量とする。

試料に含まれている有機物及び懸濁物の量、その存在状態及び適用しようとする分析法を考慮して上記(a)~(d)のうち最も適当なものを選択して前処理を行う(注1)。調製した試料をそのまま噴霧する ICP 発光分析法を適用する場合には、特に断らない限り試料は塩酸または硝酸酸性、電気加熱原子吸光法及び ICP 質量分析法を適用する場合には硝酸酸性とし、適当な濃度に調節する。

(イ) 底質試料

乾燥試料約 0.1 g を密閉式のテフロン容器に 1 mg の桁まではかり取る。硝酸 5 mL、塩酸 2 mL を加え、密閉して加熱装置に入れ、加圧分解する(注2)。放冷後、溶液が淡黄色から白色になっていることを確認した後(注3)、100 mL のテフロンビーカーに移し入れる。容器及びふたを少量の水で洗い、硝酸 2 mL を加え加熱溶解後、水 50 mL を加えて静かに加熱した後、不溶解物が沈降するのを待って、ろ紙 5 種 B でろ過し、ろ液を全量フラスコ 100 mL に受ける。ビーカー中の不溶解物を少量の水で洗浄し、洗液を先のろ紙上に移し入れる。この操作を 2~3 回繰り返す。ろ液を受けた全量フラスコ 100 mL に水を標線まで加える。

(ウ) 生物試料

試料約 0.1 g を密閉式のテフロン容器に 1 mg の桁まではかり取る。硝酸 3 mL、純水 3 mL を加え、密閉して加熱装置に入れ、加圧分解する(注2)。分解液を 100 mL のテフロンビーカーに移し入れ、容器及びふたを少量の水で洗い、この洗液もビーカーに入れる。これを蒸発乾固させた後、1%硝酸で定容する。

(2) 水素化物発生原子吸光分析法

(ア) 概要

試料を前処理して、テルルをテルル化水素とし、原子化セル中に導き、テルルによる原子吸光を波長 214.3 nm で測定してテルルを定量する。

定量範囲： 1 ~ 10 µg/L

繰り返し分析精度：変動係数で 2 ~ 10 % (装置、測定条件によって異なる)

(イ) 標準液の調製

テルル標準液 (1 µg Te/mL): テルル標準液 (10 µg Te/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、硝酸 (1+1) 2 mL を加え、水を標線まで加える。

(ウ) 操作

- 1) 前処理法 (1) に従い処理した試料の一定量 (Te として 25 ~ 250 ng を含む) をビーカー 100 mL にとり、硫酸 (1+1) 1 mL および硝酸 2 mL を加える。
- 2) 加熱板上で乾固する直前まで加熱する。
- 3) 放冷した後、6 mol/L 塩酸 17 mL を加えて加熱し、穏やかな沸騰状態を 10 分間維持する。
- 4) 放冷した後、テルル化水素発生装置の反応容器に移し入れ、水を加えて 25 mL とする (注 4)。
- 5) テルル化水素発生装置と原子吸光分析装置を連結し、系内の空気をアルゴンで置換した後、テトラヒドロほう酸ナトリウム溶液 [テトラヒドロほう酸ナトリウム 5 g を水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) 500 mL に溶解したもの] 2 mL を手早く (注 5) 反応容器中に加え、マグネチックスターラーを作動してテルル化水素を発生させる。
- 6) コックを回転して、テルル化水素を原子化セル中に導き、波長 214.3 nm における指示値を読み取る。

(備考 1) JIS K0102 の 61.3 に示す装置の代わりに、同規格 61.4 に一例を示すような連続式の水素化物発生装置を用いて定量してもよい。この場合の操作は次による。

(2)(ウ) 1) ~ 3) の操作を行った試料を冷却した後、全量フラスコ 25 mL に移し入れ、水を標線まで加える。装置にアルゴンを流しながら、この溶液と 4 mol/L 塩酸、テトラヒドロほう酸ナトリウム溶液 (10 g/L) を定量ポンプを用いてそれぞれ 1 ~ 10 mL/min の流量 (装置によって試料溶液、塩酸、テトラヒドロほう酸ナトリウム溶液の流量は異なる)

る)で連続的に装置に導入し、テルル化水素を発生させる。

(エ) 空試験

試料と同量の精製水を用いて、試料と同様に前処理、測定を行い、試料について得られた指示値を補正する。

(オ) 検量線

テルル標準液(1 µg Te/mL) 0.1 ~ 1 mL を全量フラスコ 100 mL に段階的にとり試料と同じ酸の濃度になるように酸を加えた後、水を標線まで加える。この溶液について(ウ)の測定操作を行って標準液について得た指示値を補正し、テルルの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。

(カ) 同定・定量

検量線からテルルの量を求め、試料中のテルルの濃度を算出する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

(3) 水素化物発生 ICP 発光分光分析法

(ア) 概要

試料を前処理して、テルルをテルル化水素とし、試料導入部を通して誘導結合プラズマ中に噴霧し、テルルによる発光を波長 214.281 nm で測定してテルルを定量する。

定量範囲： 1 ~ 100 µg/L

繰り返し分析精度：変動係数で 3 ~ 10 % (装置、測定条件によって異なる)

(イ) 標準液の調製

テルル標準液(1 µg Te/mL): テルル標準液(10 µg Te/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、硝酸(1+1) 2 mL を加え、水を標線まで加える。

(ウ) 操作

- 1) (2)(ウ)1)~3)を行った試料を冷却した後、全量フラスコ 25 mL に移し入れ、水を標線まで加える。

- 2) テルル化水素発生装置と ICP 発光分光分析装置を連結し、アルゴンを流しながら 1)の溶液、テトラヒドロほう酸ナトリウム溶液 (10 g/L) および 4 mol/L 塩酸を定量ポンプで連続的に導入し、テルル化水素を発生させる。
- 3) テルル化水素を試料導入部を通してプラズマに噴霧し、波長 214.281 nm の発光強度を測定する。

(エ) 空試験

試料と同量の精製水を用いて、試料と同様に前処理、測定を行い、試料について得られた指示値を補正する。

(オ) 検量線

テルル標準液 (1 µg Te/mL) 0.1 ~ 1 mL を全量フラスコ 100 mL に段階的にとり試料と同じ酸の濃度になるように酸を加えた後、水を標線まで加える。この溶液について(ウ)の測定操作を行って標準液について得た指示値を補正し、テルルの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。

(カ) 同定・定量

検量線からテルルの量を求め、試料中のテルルの濃度を算出する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

(4) ICP 発光分光分析法を用いた多元素同時分析法

(ア) 概要

試料を前処理した後、試料導入部を通して誘導結合プラズマ中に噴霧し、バリウムによる発光をそれぞれ波長 455.403 nm で測定し、バリウムを定量する。

定量範囲 Ba 0.005 ~ 10 µg/mL

繰り返し分析精度 2 ~ 10% (装置、測定条件によって異なる)

(イ) 標準液の調製

混合標準原液 [(10 µg Ba) /mL] およびこれらと分光干渉をもたない他元素を適当な濃度で含む。

いずれも使用時に調製する。例えば 100 mL の全量フラスコを用いる場合は、予め水約 20 mL と硝酸 1 mL を全量フラスコに入れておき、そこに各標準液を上記の濃度になるように添加し、水を標線まで加える。

(ウ) 操作

試料を前処理法(1)に従い処理し、JIS K 0116 の 7.3 (ICP 発光分析)に従って、プラズマ中に噴霧し(注6)、バリウムの波長(455.403 nm あるいは 493.409 nm)の発光強度を測定する(注7、注8、注9)。

(エ) 空試験

試料と同量の精製水を用いて、試料と同様に前処理、測定を行い、試料について得られた発光強度を補正する。

(オ) 検量線

混合標準液 0.1 ~ 20 mL を全量フラスコ 100 mL に段階的にとる。(4)(ウ)の操作を行った試料と同じ酸の濃度になるように酸を加えた後、水を標線まで加える。この溶液について(4)(ウ)の操作を行う。別に空試験として水について検量線の作成に用いた標準液と同じ条件になるように酸を加えた後、(4)(ウ)の操作を行って、標準液について得た発光強度を補正し、各元素の量と発光強度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。

(カ) 同定・定量

検量線から各元素の量を求め、試料中の各元素の濃度を算出する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

(5) ICP 質量分析法を用いた多元素同時分析法

(ア) 概要

試料を前処理した後、内標準物質を加え、試料導入部を通して誘導結合プラズマ中に噴霧し、元素と内標準物質のそれぞれの質量/荷電数におけるイオンの電流を測定し、元素イオンの電流と内標準物質のイオンの電流との比を求め定量する。

定量範囲 Te 0.0001 ~ 0.5 µg/mL Ba 0.0001 ~ 0.5 µg/mL

繰り返し分析精度 2 ~ 10% (装置、測定条件によって異なる)

(イ) 標準液の調製

混合標準液 [1 µg 各元素 /mL]: テルル、バリウム及び他の測定元素を含む市販混合標準液(注10)から混合標準液を調製する。これらの標準液の適量(0.1 mg/mLの場合は1 mL、10 µg/mLの場合は10 mL)をあらかじめ硝酸(1+1)3 mLを入れた全量フラスコ100 mLにとり、水を標線まで加える。使用時に調製する。

(ウ) 操作

試料を前処理法(1)に従い処理し、試料中の被測定元素の濃度が0.5 µg/mL以下となるように水で希釈する。また試料中のナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどの濃度が高い場合には、試料中の全塩濃度が0.1%以下になるよう純水で希釈した後定量操作を行う。この試料をプラズマトーチ中に噴霧し、各元素の質量数(m/z)(Te: 128、Ba 138)におけるイオンカウント値を測定する(注11、注12、注13)。

(エ) 空試験

試料と同量の精製水を用いて、試料と同様に前処理、測定を行い、試料について得られたイオンカウント値を補正する。

(オ) 検量線

混合標準液 1 µg 各元素 /mL 0.05 ~ 5 mLを別の全量フラスコ100 mLに段階的にとる。

(5)(ウ)の試料と同じ酸の濃度になるように酸を加えた後、水を標線まで加える。この溶液について(5)(ウ)の操作を行う。別に空試験として水について検量線の作成に用いた標準液と同じ酸の濃度になるように酸を加えた後、(5)(ウ)の操作を行って、標準液について得たイオンカウント値を補正し、各元素の量とイオンカウント値との関係線を作成し検量線を作成する。検量線の作成は、試料測定時に行う。

(カ) 同定・定量

検量線から各元素の量を求め、試料中の試料中の各元素の濃度を算出する。なお、底質

の試料量は乾燥重量とする。

7 分析精度管理

本調査マニュアルの「 . 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

8 注意事項

- (注1) ICP 発光分析法、ICP 質量分析法の場合、硫酸酸性では試料導入量が少なく感度が悪くなることもあるため、(d)の適用はやむを得ない場合のみとする。
- (注2) 分解条件は機種や試料の採取量により異なる。
- (注3) 液がまだ茶褐色を呈していたら、再び分解を継続する。
- (注4) 銅、ニッケルなどが共存するとテルルの定量を妨害する。こうした元素がテルルの10倍量以上共存する試料では標準添加法を使用するか、適当な方法により妨害元素からテルルの分離を行う必要がある。
- (注5) テルル化水素はテトラヒドロほう酸ナトリウム溶液添加直後に急激に発生するので、逃さないようにする。
- (注6) 前処理を行った試料のナトリウム、カリウム、カルシウムやマグネシウムなどの濃度の総量が約1 mg/Lを超えることが無い場合は、超音波ネブライザーを使用することができる。(注7)に記載する内標準法を用いることが望ましい。
- (注7) 波長の異なる2本以上のスペクトル線の同時またはシーケンシャル測定が可能な装置では、内標準法によることができる。内標準法を用いるときは、前処理した試料の適量を全量フラスコ100 mLにとり、イットリウム溶液(50 µg Y/mL) [酸化イットリウム()0.318 g をとり高純度試薬硝酸5 mLを加え加熱して溶かし、窒素酸化物を追い出し、冷却後、全量フラスコ250 mLに移し入れ、水を標線まで加える。この溶液10 mLを全量フラスコ200 mLにとり、水を標線まで加える。]10 mLを加え、(4)(ウ)の試料と同じ条件になるように酸を加えた後、水を標線まで加える。この溶液について(4)(ウ)の噴霧操作を行って各元素の波長と同時または逐次に371.029 nm(イットリウム)の発光強度を測定し、各元素とイットリウムの発光強度の比を求める。各元素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各元素の量を求め、試料中の各元素の濃度を算出する。

- (注 8) 塩濃度が高いため、検量線法が適用できない試料の場合には、JIS K 0116 の 5.8.3(2)に規定する標準添加法を用いるとよい。ただし、この場合は試料の種類によらずバックグラウンド補正を行う必要がある。
- (注 9) 高次のスペクトル線が使用可能な装置では、高次のスペクトル線を用いて測定してもよい。また、精度、正確さを確認してあれば、他の波長を用いてもよい。
- (注 10) 米国スペックス社製混合標準用液、関東化学混合標準液 (EM サイエンス社製) などがある (備考 2)。
- (注 11) 内標準法を用いる。前処理した試料の適量を全量フラスコ 100 mL にとり、イットリウム溶液 (5 $\mu\text{g Y/mL}$) [(注 7) のイットリウム溶液 (50 $\mu\text{g Y/mL}$) 100 mL を全量フラスコ 1000 mL にとり硝酸(1+1)を 3 mL を加え水を標線まで加える]あるいはインジウム溶液 (5 $\mu\text{g In/mL}$) [金属インジウム 0.250 g をとり高純度試薬硝酸 10 mL を加え加熱して溶かし、窒素酸化物を追い出し、冷却後、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、水を標線まで加える。この溶液 5 mL を全量フラスコ 1 L にとり、水を標線まで加える。] 1 mL を加え、(5)(ウ)の試料と同じ条件になるように硝酸を加えた後、水を標線まで加える。この溶液について(5)(ウ)の噴霧操作を行って各元素の質量数 (m/z) (Te : 125、128、Ba : 137、138) と同時に 89 (イットリウム) あるいは 115 (インジウム) のイオンカウント値を測定し、各元素とイットリウム、あるいはインジウムのイオンカウント値の比を求め、別に混合標準液混合標準液 [(2 $\mu\text{g Cd}$ 、1 $\mu\text{g Pb}$ 、1 $\mu\text{g Cu}$ 、1 $\mu\text{g Zn}$ 、1 $\mu\text{g Mn}$ 、1 $\mu\text{g Ni}$ 、1 $\mu\text{g Be}$) /mL] 0.05 ~ 5 mL を全量フラスコ 100 mL に段階的にとる。イットリウム溶液 (5 $\mu\text{g Y/mL}$) 1 mL をそれぞれ加えた後、水を標線まで加える。この溶液について(5)(ウ)の噴霧操作を行って各元素の質量数 (m/z) (Cd : 111、114、Pb : 206、207、208、Cu : 63、65、Zn : 64、66、Mn : 55、Ni : 58、60、Be : 9) と同時に 89 (イットリウム) のイオンカウント値を測定し、各元素の濃度に対する各元素とイットリ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各元素の量を求め、試料中の各元素の濃度 (mg/L) を算出する。
- (注 12) 試料中のマトリックスの影響が大きく検量線法が適用できない場合には、JIS K 0133 に規定する標準添加法を用いるとよい。

(注 13) 複数の質量数 (m/z) を用いて測定を行うことにより、その同位体比から分子イオンによる妨害を確認することができる。試料の希釈によっても分子イオンによる影響を無視できない場合には、適当な分離法を用いて妨害となるマトリックスを除去した後、測定を行う必要がある。

(備考 2) ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

9 参考

原子スペクトル分析に関しては、「原子吸光分析通則 (JIS K 0121: 1993)」と「発光分光分析通則 (JIS K 0116: 1995)」が定められている。

また、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP 質量分析法) については、ICP 質量分析法が広く一般に普及するようになってきたことから、1998 年 4 月に改正された「工業用水試験方法 (JIS K 0101: 1998)」、
「工業排水試験法 (JIS K 0102: 1998)」に、銅、亜鉛、鉛、マンガ
ン、クロムの分析法として ICP 質量分析法が新たに採用された。また、今般、2000 年 7 月に「高周波プラズマ質量分析通則 (JIS K 0133: 2000)」が規定された。詳細については、これらの通則を参考にして頂きたい。

． アニシジン類、キシリジン類、トルイジン類、*N*-エチルアニリン、
N,N-ジメチルアニリンの分析法

1 対象物質

アニシジン類： *o*-アニシジン、*m*-アニシジン、*p*-アニシジン

キシリジン類： 2,3-キシリジン、2,4-キシリジン、2,5-キシリジン

2,6-キシリジン、3,4-キシリジン、3,5-キシリジン

トルイジン類： *o*-トルイジン、*m*-トルイジン、*p*-トルイジン

N-エチルアニリン

N,N-ジメチルアニリン

2 目標検出下限値及び定量下限値

化合物名	水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)
	検出下限	定量下限	検出下限
<i>o</i> -アニシジン	0.015	0.049	2.7
<i>m</i> -アニシジン	0.016	0.055	3.0
<i>p</i> -アニシジン	0.031	0.1	3.6
2,3-キシリジン	0.007	0.024	2.4
2,4-キシリジン	0.008	0.026	2.0
2,5-キシリジン	0.004	0.02	1.0
2,6-キシリジン	0.004	0.02	1.0
3,4-キシリジン	0.025	0.083	3.4
3,5-キシリジン	0.007	0.03	2.4
<i>o</i> -トルイジン	0.003	0.01	0.4
<i>m</i> -トルイジン	0.006	0.02	0.8
<i>p</i> -トルイジン	0.004	0.01	1.0
<i>N</i> -エチルアニリン	0.001	0.003	0.1
<i>N,N</i> -ジメチルアニリン	0.003	0.008	0.3

3 分析法の概要

水質試料は、サロゲートとしてアニリン-d₅を添加後、ジクロロメタンで抽出し、塩酸逆抽出によりクリンアップを行う。塩酸抽出液を水酸化ナトリウムでアルカリ性にし、ジクロロメタンで抽出後、脱水・濃縮し、アニリン-d₅を内標準としてGC/MS-SIMで定量する。

底質試料は、サロゲートを添加後、水蒸気蒸留を行い、以下水質試料に準ずる。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・ *o*-アニシジン、*m*-アニシジン、*p*-アニシジン、2,3-キシリジン、2,4-キシリジン、2,5-キシリジン、2,6-キシリジン、3,4-キシリジン、3,5-キシリジン、*o*-トルイジン、*m*-トルイジン、*p*-トルイジン、*N*-エチルアニリン、*N,N*-ジメチルアニリン：市販特級品
- ・ サロゲート（アニリン-d₅）：市販標準品の0.2 µg/mL ジクロロメタン溶液を調製し、サロゲート溶液とする。
- ・ ジクロロメタン：市販残留農薬試験用
- ・ 塩化ナトリウム：市販残留農薬試験用
- ・ 無水硫酸ナトリウム：市販残留農薬試験用
- ・ 水酸化ナトリウム：市販特級品
- ・ 塩酸：精密分析用 20%（6N）
- ・ 水：蒸留水をジクロロメタンで洗浄して使用。
- ・ 標準混合溶液：各 10 µg/mL ジクロロメタン混合溶液を調製する。

(2) 器具及び装置

- ・ 水蒸気蒸留装置：全ガラス製（底質試料の水蒸気蒸留に用いる。）

5 試料の採取・運搬

洗剤、水、アセトンの順で洗浄し、最後は蒸留水で5回程度すすいだ1 Lの共栓付きガラスビン（残留塩素が残らないようにする。）に試料水を採取し、冷暗所（4℃以下）で保存し、氷冷輸送すること。搬入されたサンプルは出来るだけすみやかに抽出すること。（保存の目的で塩酸を絶対に添加してはならない。）

底質は、湿重量約100 gの底質を採取し、夾雑物を除去した後、遠心分離して水分を出

来るだけ除いたのち、冷凍保存する。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

試料 1 L を 2 L 分液ロートにとり(注 1)、塩化ナトリウム 30 g、ジクロロメタン 100 mL、アニリン-d₅ 0.2 µg/mL ジクロロメタン溶液 0.5 mL を加え 5 分間振とう抽出する(注 2)、静置してジクロロメタン層を採取する。再び、水層にジクロロメタン 50 mL を加えて同様な操作を繰り返し、抽出液を合わせる。ジクロロメタン層を 200 mL の分液ロートに移し、6N 塩酸 10 mL を加え、5 分間振とう抽出をする。静置し、塩酸層を採取する。再び、ジクロロメタン層に 6N 塩酸 10 mL を加え同様の操作を繰り返し、塩酸層を合わせる。塩酸層を氷冷しながら 6N 水酸化ナトリウム水溶液 22 mL を加え、これを 100 mL 分液ロートに移す。ジクロロメタン 10 mL を加え、5 分間振とう抽出する。静置後ジクロロメタン層を採取する。再び、水層にジクロロメタン 10 mL を加え同様の操作を繰り返し、ジクロロメタン層を合わせる。

(イ) 底質試料

試料 20 g を精製水 50 mL を用いて水蒸気蒸留用フラスコに入れる(注 3)。アニリン-d₅ 0.2 µg/mL ジクロロメタン溶液 0.5 mL を加え、水蒸気蒸留を行い、留出液 500 mL を採取する(注 4、注 5)。留出液を 1 L 分液ロートに移し、塩化ナトリウム 15 g、ジクロロメタン 100 mL を加え、5 分間振とう抽出する。静置後ジクロロメタン層を採取する。再び、水層にジクロロメタン 50 mL を加え、同様の操作を繰り返し、ジクロロメタン層を合わせる。ジクロロメタン層を 200 mL の分液ロートに移し、6N 塩酸 10 mL を加え、5 分間振とう抽出をする。静置し、塩酸層を採取する。再び、ジクロロメタン層に 6N 塩酸 10 mL を加え同様の操作を繰り返し、塩酸層を合わせる。塩酸層を氷冷しながら 6N 水酸化ナトリウム水溶液 22 mL を加え、これを 100 mL 分液ロートに移す。ジクロロメタン 10 mL を加え、5 分間振とう抽出する。静置後ジクロロメタン層を採取する。再び、水層にジクロロメタン 10 mL を加え同様の操作を繰り返し、ジクロロメタン層を合わせる。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

前処理で得られたジクロロメタン溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、KD 濃縮器で約 5 mL まで濃縮し、さらに窒素ガスを吹き付けて 1 mL まで濃縮したものを測定用試料液とする。

(イ) 底質試料

水質試料に同じ。

(3) 空試験液の調製

(ア) 水質試料

試料と同量の精製水を用い、試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を空試験液とする。

(イ) 底質試料

精製水 50 mL を用い、試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を空試験液とする。

(4) 添加回収試験液の調製

水質試料 1,000 mL (注 6)、底質試料 20 g に各対象物質を検出限界の 5~10 倍量を添加し、充分混合した後、試料の前処理及び試料液の調製に従って操作を行い、得られた試験液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

各対象物質の 10 µg/mL ジクロロメタン混合溶液を調製する。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例

(a) GC

- ・ カラム：溶融シリカキャピラリーカラム (25m × 0.2mm 0.1 µm film thickness)
- ・ 液相：ポリエチレングリコール

- ・ カラム温度：60（1分） 5 /分 240（10分）
- ・ 注入口温度：250
- ・ 注入法：スプリットレス法（1分後パージ、2 μL 注入）
- ・ キャリアーガス：He カラムヘッド圧 7.5 psi
- ・ インターフェース温度：250

(b) MS

- ・ イオン化法：EI
- ・ イオン化エネルギー：70 eV
- ・ イオン源温度：250
- ・ イオン化電流：300 μA
- ・ 検出モード：SIM

(c) 測定イオン

対象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
<i>o</i> -アニシジン	123	108
<i>m</i> -アニシジン	123	94
<i>p</i> -アニシジン	123	108
2,3-キシリジン	121	106
2,4-キシリジン	121	106
2,5-キシリジン	121	106
2,6-キシリジン	121	106
3,4-キシリジン	121	106
3,5-キシリジン	121	106
<i>o</i> -トルイジン	107	106
<i>m</i> -トルイジン	107	106
<i>p</i> -トルイジン	107	106
<i>N</i> -エチルアニリン	106	121
<i>N,N</i> -ジメチルアニリン	120	121

(イ) 検量線

混合標準液を 0～10 μL の範囲で段階的に採り（注 7）、サロゲート溶液 0.5 mL を加え、ジクロロメタンで 1 mL にする。この 2 μL を GC/MS に注入し、対象物質のピーク面積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（注 8）。

（ウ）試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試験液及び添加回収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試料液を注入し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし、20% 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。

7 同定、定量及び計算

（1）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を見なす。

（2）定量及び計算

得られた各対象物質とサロゲート又は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。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$\begin{aligned} \text{水質試料濃度 (}\mu\text{g/L)} &= \text{検出量 (}\mu\text{g)} \times \frac{1}{\text{試料量 (L)}} \\ \text{底質試料濃度 (}\mu\text{g/kg)} &= \text{検出量 (}\mu\text{g)} \times \frac{1}{\text{試料量 (kg)}} \end{aligned}$$

（ここでの検出量とは試料液中に存在する対象物質の全量である。）

8 分析精度管理

本マニュアルの「 . 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性

能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

- (注1) 分析に使用する器具類(特に分液ロート)は水道水で洗浄した際の残留塩素の付着があってはならない。対象物質の分解により著しく回収率が低下する。蒸留水により充分すすいで(5回程度)から使用すること。
- (注2) サロゲートをジクロロメタン溶液で添加するので、分液ロートのすり合わせ部分への浸透による誤差を防ぐため、抽出溶媒のジクロロメタンを先に加えておくこと。
- (注3) 50 mLの水を数回に分けて底質試料に加え、良くかき混ぜてほぐしながら水蒸気蒸留用フラスコにロートを用いて入れること。摺り合わせ部に試料が付着しないようにすること。
- (注4) 水蒸気発生用の水はジクロロメタンで洗浄したものを使用する。
- (注5) 留出してくる対象物質の揮散を防ぐため、受器に50 mL程度の水を入れ、受器を氷冷しながら留出口が水中にあるようにして水蒸気蒸留を行うこと。
- (注6) 水質試料にジクロロメタン混合標準液を添加する場合は、(注2)と同様に行うこと。
- (注7) 混合標準液及びサロゲート溶液の濃度は、GC/MSの感度に応じて適宜変更しても良い。
- (注8) 厳密な意味でアニリン-d₅は対象全物質のサロゲートではないが、ここではサロゲートとして取り扱っている。サロゲート物質が市販されているものがあれば、それを使用するほうが好ましい。

(備考1)

ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜のために、一般に入手できるもの及び本分析法開発に使用したものを例示したが、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。

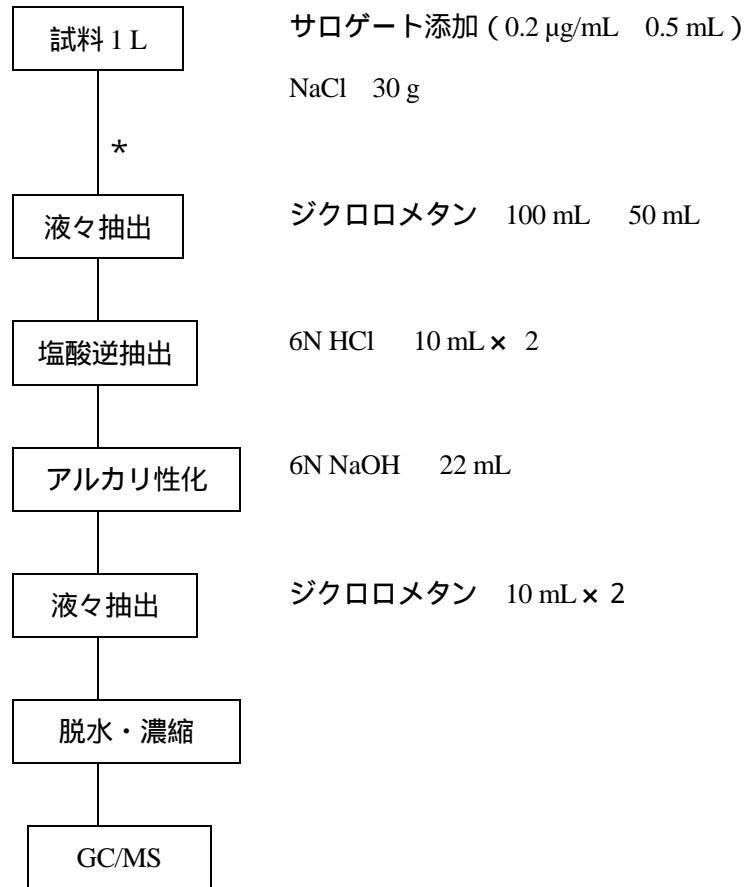
参考文献

- 1) 大阪府公害監視センター：アニリン、2,3-キシリジン、2,4-キシリジン、3,4-キシリジン、

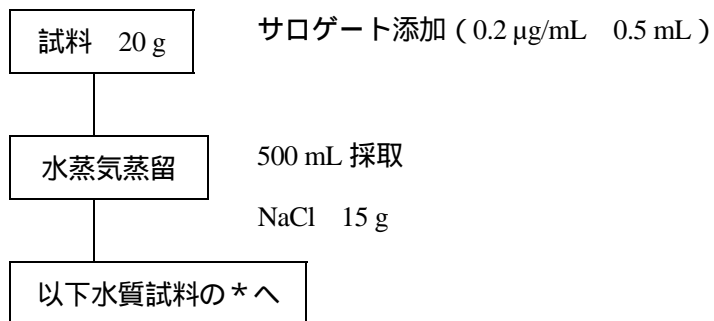
- o*-アニシジン , *m*-アニシジン , *p*-アニシジン , *o*-クロロアニリン , *m*-クロロアニリン ,
p-クロロアニリン , pp1-18 , 「平成元年度化学物質分析法開発調査報告書」, 環境庁環境
保健部保健調査室 , (平成 2 年 6 月)
- 2) 岡山県環境保健センター : *N*-メチルアニリン , *N*-エチルアニリン , *N,N*-ジメチルアニリ
ン , pp19-30 , 「平成元年度化学物質分析法開発調査報告書」, 環境庁環境保健部保健調
査室 , (平成 2 年 6 月)
- 3) 大阪府公害監視センター : アニリン , 4-エトキシアニリン (フェネチジン) , *o*-クロロ
アニリン , *m*-クロロアニリン , *p*-クロロアニリン , 2,4-ジクロロアニリン , 2,5-ジクロ
ロアニリン , 3,4-ジクロロアニリン , *o*-トルイジン , *m*-トルイジン , *p*-トルイジン , pp34-77 ,
「平成 9 年度化学物質分析法開発調査報告書」, 環境庁環境保健部環境安全課 , (平成
10 年 7 月)

分析法フローチャート

水質試料



底質試料



4-クロロ-3-メチルフェノール、クロロフェノール類、
p-プロモフェノールの分析法

1 対象物質

4-クロロ-3-メチルフェノール、o-クロロフェノール、m-クロロフェノール、p-クロロフェノール、p-プロモフェノールとする。

なお、平成13年度要調査項目等調査マニュアル掲載の2,4-ジメチルフェノール、2,5-ジメチルフェノール、2,6-ジメチルフェノール、3,5-ジメチルフェノール、2-メトキシフェノール、3-メトキシフェノール*、4-メトキシフェノール*、2,4,6-トリプロモフェノール、2,4,6-トリクロロフェノールも測定可能である。

2 目標検出下限値及び定量下限値（注1）

目標検出・定量下限値	水質（μg/L） 500mL		底質（μg/L） 20g		生物（μg/L） 10g	
	検出	定量	検出	定量	検出	定量
4-クロロ-3-メチルフェノール	0.002	0.006	0.06	0.20	0.10	0.40
o-クロロフェノール	0.005	0.015	0.15	0.50	0.30	1.00
m-クロロフェノール	0.005	0.015	0.15	0.50	0.30	1.00
p-クロロフェノール	0.005	0.015	0.15	0.50	0.30	1.00
p-プロモフェノール	0.010	0.030	0.30	1.00	0.60	1.50

3 分析法の概要

水質試料はpH 3.0～3.5に調整し、固相抽出する。通水後、脱水しアセトンで溶出させる。このアセトン溶出液を、濃縮後、硫酸ジエチルを用いてエチル化し、この誘導体化生成物をGC/MS-SIMで定量する。

底質試料は0.1N水酸化カリウム/メタノール溶液で振とう抽出を行う。この抽出液をジクロロメタンで洗浄した後、塩酸でpH 3.0～3.5に調整し、ジクロロメタン抽出を行う。このジクロロメタン抽出液をアセトンに転溶・濃縮、更に硫酸ジエチルを用いてエチル化し

* :3-メトキシフェノール、4-メトキシフェノールは要調査項目ではないが、同時測定可能なので参考までに記載した。

た後、アルカリ分解、フロリジルカートリッジカラムでクリーンアップし、この誘導体化生成物を GC/MS-SIM で定量する。

生物試料はメタノールで抽出し、メタノール/ヘキサン分配で脂質を除去後、pH 3.0～3.5 に調整し、ジクロロメタン抽出を行う。以下、底質試料と同様に、このジクロロメタン抽出液をアセトンに転溶・濃縮、更にエチル化、アルカリ分解、フロリジルカートリッジカラムでクリーンアップし、この誘導体化生成物を GC/MS-SIM で定量する。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・対象物質：市販標準品、または市販特級品・一級品
- ・サロゲート物質：市販標準品
- ・内部標準物質：市販標準品
- ・アセトン、ジクロロメタン、エタノール、メタノール、ヘキサン、エーテル：残留農薬試験用。
- ・無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用。
- ・硫酸ジエチル：試薬一級品
- ・塩酸、水酸化カリウム：試薬特級品。
- ・固相カートリッジカラム（注2）
- ・塩化ナトリウム：特級品の塩化ナトリウムを 250 で 9 時間強加熱後、汚染のないところで放冷したもの。
- ・1 N 塩酸：濃塩酸 1 容を精製水 11 容に入れて希釈したもの。
- ・0.1 N 塩酸：濃塩酸 1 容を精製水 110 容に入れて希釈したもの。
- ・0.1 N 水酸化カリウム：水酸化カリウム 1.12 g を精製水に溶かし、精製水で 1 L に定容。
- ・1 N KOH/エタノール：水酸化カリウム 5.6 g を精製水 5 mL でホットプレートまたはドライヤーで熱しながら溶解する。溶解後、直ちにエタノール 95 mL を加えたもの。
- ・0.1 N 水酸化カリウム/メタノール：300 mL のメタノールに水酸化カリウム 2.8 g を入れ、完全に溶解させた後、メタノールで 500 mL に定容する。
- ・精製水、またはミネラルウォーター：目的物質の分析に影響のないもの。
- ・石英ウール：ヘキサンで洗浄したもの。
- ・フロリジルカートリッジカラム（注3）

(2) 器具及び装置

- ・ねじ口瓶：容量 500～1,000 mL で、ポリテトラフルオロエチレン張りのねじ口キャップをしたガラス瓶（注4）。
- ・パストゥールピペット：容量 2 mL 強のもの。
- ・小型ロート：誘導体（エチル）化物を含むヘキサン層の脱水に使用。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付分液漏斗：容量 200 mL、及び 1L、2L のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付遠沈管：容量 200 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付試験管：容量 10 mL、及び 20 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC ナス型フラスコ：容量 300 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付三角フラスコ：容量 300 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付メスフラスコ：容量 50 mL、及び 100 mL のもの。
- ・乾燥器：ガラス器具等の乾燥に使用する。
- ・振とう器：底質試料からの抽出に用いる。
- ・超音波照射器（または超音波洗浄器）：底質及び生物試料からの抽出に用いる。
- ・ポリトロン型ホモジナイザー：生物試料からの抽出に用いる。
- ・遠心分離器：底質及び生物試料の固液分離に使用する。
- ・ロータリーエバポレーター濃縮装置：抽出液の濃縮に用いる。
- ・電気炉：塩化ナトリウムの焼成に使用する。
- ・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。

5 試料の採取・運搬

(1) 水質試料

水質試料については、洗剤、水、アセトンで洗浄したねじ口瓶を試料水で 2～3 回共洗した後、試料水を泡立てないように採水し、満水にして直ちに密栓し、直ちに試験を行う。直ちに試験できないときは、冷暗所（4 ）に保存し、速やかに試験する。なお、残留塩素が含まれている場合は、採水時に残留塩素 1 mg に対してアスコルビン酸ナトリウムを 0.01 ないし 0.02 g の割合で加える。

(2) 底質試料及び生物試料

底質試料及び生物試料については、水質試料と同様の方法で洗浄した摺り合わせの広口ガラスビンに入れ密栓し、-20℃以下で保存する。

なお、水質試料、底質試料及び生物試料の採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「4. 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。

6 試験操作

(1) 前処理液の調製

(ア) 水質試料

試料水 500 mL (注5) を採取し、サロゲート混合標準液 (0.5 µg/mL) 0.5 mL 加え、更に 1 N 塩酸 1 mL 加え、pH 3.0~3.5 (注6) に調整後、固相カートリッジカラム (注7、注8) に通水 (5~10 mL/分) する。精製水約 10 mL を固相カートリッジカラムに通し、更に吸引操作等で固相カートリッジカラム中の水分を除去 (注9) した後、アセトン (注10) 10 mL を 1~2 mL/分の通液速度で目的物質を透明摺り合わせ試験管 10 mL に溶出させる。このアセトン溶出液に、窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL (注11) に濃縮する。この濃縮液を前処理液とする。

[参考：溶媒抽出法]

試料水 1 L を透明摺り合わせ分液漏斗 2 L に採取し、塩化ナトリウム 50 g 及びサロゲート混合標準液 (0.5 µg/mL) 0.5 mL 加え十分混合し、溶解した後、更に 1 N 塩酸 2 mL 加え、pH 3.0~3.5 に調整する。ジクロロメタン 100 mL を加えて約 10 分間振とうした後、十分に静置したジクロロメタン層を透明摺り合わせ三角フラスコ 300 mL に採取する。水相に再度ジクロロメタン 100 mL を加え同様な振とう抽出を行い、ジクロロメタン層を先の透明摺り合わせ三角フラスコに合わせる。

このジクロロメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、透明摺り合わせナス型フラスコ 300 mL に移し、ロータリーエバポレーターを用いて、水浴を加熱せずに約 10 mL 弱 (注12) まで減圧濃縮する。このジクロロメタン濃縮液を透明摺り合わせ試験管 10 mL に移し、窒素ガスを吹き付けて約 1 mL に濃縮した後、アセトン約 8 mL を加え、窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL (注11) に濃縮する。この濃縮液を前処理液とする。

(イ) 底質試料

試料 20 g を透明摺り合わせ遠沈管 200ml に採取し、サロゲート混合標準液 (0.5 µg/mL) 0.5 mL 加え、0.1 N 水酸化カリウム/メタノール溶液 50 mL を加え、10 分間振とうする。更に超音波照射を 10 分間行う。遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) により、上澄みのメタノール層を透明摺り合わせ分液漏斗 1 L に入れる。残渣に、更に 0.1 N 水酸化カリウム/メタノール 50 mL を加え、同様の操作を行い、上澄みのメタノール層を先の分液漏斗に合わせる。

このメタノール層の入った分液漏斗に精製水 500 mL を入れ、ジクロロメタン 100 mL を加え、15 分間振とうし、ジクロロメタン層 (注 13) を捨てる。水相に再度ジクロロメタン 50 mL を加え洗浄し、ジクロロメタン層 (注 13) を捨てる。この洗浄操作を再度繰り返す。この水相に塩化ナトリウム 50 g を加え、更に 1 N と 0.1 N の塩酸で pH 3.0 ~ 3.5 (注 6) に調整した後、ジクロロメタン 100 mL を加えて、10 分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を透明摺り合わせ三角フラスコ 300 mL に採取し、水相に再度ジクロロメタン 100 mL を加えて、同様な操作を行い、ジクロロメタン層を先の透明摺り合わせ三角フラスコに合わせる。

このジクロロメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、透明摺り合わせナス型フラスコ 300 mL に移し、ロータリーエバポレーターを用いて、水浴を加熱せずに約 10 mL 弱 (注 12) まで減圧濃縮する。このジクロロメタン濃縮液を透明摺り合わせ試験管 10 mL に移し、窒素ガスを吹き付けて約 1 mL に濃縮した後、アセトン約 8 mL を加え、窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL (注 11) に濃縮する。この濃縮液を前処理液とする。

(ウ) 生物試料

生物試料は 10 g を透明摺り合わせ遠沈管 200 mL に採取し、サロゲート混合標準液 (0.5 µg/mL) 0.5 mL 加え、メタノール溶液 50 mL を加え、約 10 分間ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズする。遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) により、上澄みのメタノール層を透明摺り合わせ分液漏斗 200 mL に入れる。残渣に、更にメタノール 50 mL を加え、同様の操作を行い、上澄みのメタノール層を先の分液漏斗に合わせる (注 14)。

このメタノール層の入った分液漏斗に精製水約 1 mL (注 15) を加え、更にメタノール飽和ヘキサン 20 mL (注 16) を加えて約 5 分間振とうし、静置する。メタノール層を別の透明摺り合わせ分液漏斗 200 mL に移し、再度ヘキサン 10 mL 加えて洗浄した後、予め 10% 塩化ナトリウム水溶液 500 mL を入れた透明摺り合わせ分液漏斗 1 L に移す。1 N と 0.1 N の塩酸で pH 3.0 ~ 3.5 (注 6) に調整した後、ジクロロメタン 100 mL を加えて、10 分間振

とす。静置後、ジクロロメタン層を透明摺り合わせ三角フラスコ 300 mL に採取し、水相に再度ジクロロメタン 100 mL を加えて、同様な操作を行い、ジクロロメタン層を先の透明摺り合わせ三角フラスコに合わせる。

以下、底質試料と同様に、このジクロロメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて、水浴を加熱せずに約 10 mL 弱（注 12）まで減圧濃縮する。このジクロロメタン濃縮液を窒素ガスを吹き付けて約 1 mL に濃縮した後、アセトン約 8 mL を加え、窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL（注 11）に濃縮する。この濃縮液を前処理液とする。

（2）測定試料液の調製

（ア）水質試料

前処理液に 1 N 水酸化カリウム/エタノール 0.5 mL と硫酸ジエチル 0.5 mL（注 17、注 18）を加え攪拌し、30 分間静置（注 19）する。その後、1 N 水酸化カリウム/エタノール 4 mL と精製水 3 mL を加え、溶解（注 20）する。ヘキサン 1 mL 強を加え振とう（注 21）する。約 10 分間静置後、ヘキサン層をパスツールピペットで石英ウールと無水硫酸ナトリウムを詰めた小型ロートに通し、透明摺り合わせ試験管 10mL に分取する。同様に、ヘキサン 1mL 強の振とう抽出を、更に二回繰り返し、先の透明摺り合わせ試験管 10ml に分取する。このロートを少量のヘキサンで洗い込み、先の透明摺り合わせ試験管 10ml に合わせる。この分取液に窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL（注 11）に濃縮した後、混合内部標準液（10 µg/mL）を正確に 5 µL 加え、測定試料液とする。

（イ）底質及び生物試料

前処理液に 1 N 水酸化カリウム/エタノール 0.5 mL と硫酸ジエチル 0.5 mL（注 17、注 18）を加え攪拌し、30 分間静置（注 19）する。その後、1 N 水酸化カリウム/エタノール 4 mL を加え、70 の温浴に 1 時間放置（注 22）する。その後、精製水 3 mL を加え、混合し放冷し、ヘキサン 1 mL 強を加え振とう（注 21）する。約 10 分間静置後、ヘキサン層をパスツールピペットで石英ウールと無水硫酸ナトリウムを詰めた小型ロートに通し、透明摺り合わせ試験管 10ml に分取する。同様に、ヘキサン 1mL 強の振とう抽出を、更に二回繰り返し、先の透明摺り合わせ試験管 10ml に分取する。このロートを少量のヘキサンで洗い込み、先の透明摺り合わせ試験管 10ml に合わせる。この分取液に窒素ガスを吹き付けて

約 1.0 mL に濃縮する。この濃縮液をフロリジルカートリッジカラム（注 23）に供し、4% エーテル/ヘキサン 20 mL でエチル化したフェノール類を透明摺り合わせ試験管 20 mL に溶出させる。この溶出液に窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL（注 11）に濃縮した後、混合内部標準液（10 µg/mL）を正確に 5 µL 加え、測定試料液とする。

（ 3 ）空試験液の調製

（ア）水質試料

水質は精製水 500 mL（注 24）を用いて「（ 1 ）前処理液の調製」及び「（ 2 ）測定試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試料液とする。

（イ）底質及び生物試料

底質は 20 mL、生物は 10 mL の精製水を用いて「（ 1 ）前処理液の調製」及び「（ 2 ）測定試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試料液とする。

（ 4 ）添加回収試験液の調製

水質試料では任意の試料水 500 mL、底質試料では任意の試料 20 g、生物試料では任意の試料 10 g に検出下限の 10 倍量の混合標準液を添加し、充分混合する。60 分以上放置した後、「（ 1 ）前処理液の調製」及び「（ 2 ）測定試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

（ 5 ）標準液の調製（注 25）

各標準物質、各内部標準物質はそれぞれ 50 mg を精秤してアセトンで正確に 50 mL とし、1,000 µg/mL の標準原液を調製する。各サロゲート標準物質はそれぞれ 5 mg を精秤してアセトンで正確に 50 mL とし、100 µg/mL の標準原液を調製する。

対象物質の混合標準液は各標準原液をアセトンで段階的に希釈し、0.02 ~ 1.0 µg/mL の範囲で 5 点以上調製する。対象物質の混合標準液（50 µg/mL）、サロゲート物質の混合標準液（0.5 µg/mL）及び混合内部標準液（10 µg/mL）はアセトンを用いて、それぞれの標準原液を希釈して調製する。これらの標準原液及び標準液は暗所-20 で保存する。

（ 6 ）測定

(ア) GC/MS の測定条件

- ・使用カラム：50%フェニルメチルポリシロキサン（注26）
長さ 30 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.25 μm
 - ・カラム槽温度：45（2分）- 10 /分 - 200 - 20 /分 - 250（13.5分）
- ・使用カラム：5%フェニルメチルシリコン（注27）
長さ 30 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.50 μm
 - ・カラム槽温度：45（2分）- 4 /分 - 200 - 10 /分 - 270（3.5分）
- ・注入法：スプリットレス法、1μL 注入（注28）
- ・注入温度：240
- ・キャリアーガス：ヘリウム(99.999vol%以上)であって、定流量型では1 mL/分、定圧型では線速度が30～60 cm/秒
- ・パーズ開始時間：1.0分
- ・イオン化法：EI法（注29）
- ・イオン化電圧：70 eV
- ・モニターイオン

測定対象物質

4-クロロ-3-メチルフェノール M/Z：142, 170

* *o*-クロロフェノール M/Z：128, 156

m-クロロフェノール M/Z：128, 156

* *p*-クロロフェノール M/Z：128, 156

* *p*-ブromoフェノール M/Z：172, 200

サロゲート物質

2-クロロフェノール-3,4,5,6-d₄ M/Z：132, 160

4-クロロフェノール-2,3,5,6-d₄ M/Z：132, 160

p-ブromoフェノール-2,3,5,6-d₄ M/Z：176, 204

内部標準物質

ナフタレン - d₈ M/Z：136

ビフェニル - d₁₀ M/Z：164

*：現在、サロゲート物質が市販されている。

(サロゲート物質が市販のフェノール類はサロゲート物質を使用して、サロゲート法で定量する。)

(加ゲート物質が未市販のフェノール類は内部標準物質を使用して、内部標準法で定量する。

なお、市販の 4-クロロ-3-メチルフェノールのサロゲート物質は-d₂ であるので、塩素の同位体比より使用不能である。)

(イ) 検量線の作成

検量線は対象物質の混合標準液 (0.02 ~ 1.0 µg/mL) 0.5 mL 及びサロゲート物質の混合標準液 (0.5 µg/mL) 0.5 mL を透明摺り合わせ試験管 10 mL に採取し、窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL (注 11) に濃縮した後、「(2) 測定試料液の調製」を行って検量線の標準液を作成する。この検量線の標準液 1 µL を GC/MS に注入し、*印のフェノール類はサロゲート法で、各物質の示すピーク面積 (又は高さ) とサロゲート物質のピーク面積 (又は高さ) の比から、印の無いフェノール類は内部標準法で、各物質の示すピーク面積 (又は高さ) と内部標準物質のピーク面積 (又は高さ) の比から検量線を作成する。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収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試料液を注入し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし、20% を越えていれば GC/MS を再調製後、検量線を作成し直して測定を行う。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

対象物質及びサロゲート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の ± 5 秒以内に出現し、また定量イオンと確認イオンのピーク強度比が予想値の ± 20% 以下であれば、対象物質が存在すると見なす。

(2) 定量及び計算

試料液 1 µL を GC/MS に注入し、各物質の示すピーク面積 (又は高さ) とサロゲート物質又は内部標準物質のピーク面積 (又は高さ) の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。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$\text{水質試料濃度} (\mu\text{g/L}) = \text{検出量} (\mu\text{g}) \times \frac{1}{\text{試料量} (\text{L})}$$

$$\text{底質・生物試料濃度} (\mu\text{g/kg}) = \text{検出量} (\mu\text{g}) \times \frac{1}{\text{試料量} (\text{kg})}$$

(ここでの検出量とは試料液中に存在する対象物質の全量である。)

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「 . 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

- (注1) 使用するキャピラリーカラムの種類、膜厚、内径、長さにより、フェノール類の検出下限値が異なる。また試料中の夾雑物及び使用機器により、検出下限値が異なる。
- (注2) 横川アナリティカルシステムズ社製の SPE UNI/154。またはウォーターズ社製の セットアッププラス PS-2 (備考1)。
- (注3) ウォーターズ社製のセットアップフロリジル (備考1)。
- (注4) 一例として、残留農薬分析用の空き瓶 1,000 mL を加熱乾燥して使用。
- (注5) マトリックス等を考慮すると、試料水の量は 500 mL ~ 700 mL 以下である。
- (注6) pH を下げすぎると、回収率が変動する対象物質もあるので、pH 3.0 ~ 3.5 の範囲に調整する。pH の微量調整は 1 N と 0.1 N の塩酸及び 0.1 N の水酸化カリウムで行う。
- (注7) 逆相系固相カートリッジカラムの内、回収率を考慮すると、一例として、横川アナリティカルシステムズ社製の SPE UNI/154 がある (備考1)。
- (注8) 固相カートリッジカラムは使用直前アセトン 10 mL、精製水 10 mL でコンデシヨニングを行う。
- (注9) アスピレーターの引きの強さに関係するが、約 30 分引く。または 3,000 rpm で 10 分間強遠心分離することで脱水する。

- (注 10) 溶出液として、アセトンの代わりにジクロロメタンを用いても良い。
- ジクロロメタンを使用の場合には、固相カートリッジカラムは使用直前にジクロロメタン 10 mL、メタノール 10 mL、精製水 10 mL でコンデショニングを行う。
- (注 11) 窒素ガス吹き付けで濃縮する時、乾固させないこと。乾固すると、水質試料ではキーパー量が少ないので、顕著に損失する。
- (注 12) 濃縮を 5 mL 以下にすると、損失することがあるので、5 mL 以下にしないこと。
- (注 13) 分離しない場合には、冷凍凍結法、又は遠心分離で分離する。
- (注 14) 底質試料と同様に 0.1N 水酸化カリウム/メタノール溶液で抽出を行うと、エマルジョンが多量にでき、遠心分離が行えないことがある。そこで、生物試料はメタノールで抽出し、メタノール/ヘキサン分配で脱脂することにした。
- メタノール/ヘキサン分配操作は回収率に大きく影響するので、十二分に注意すること。最近では脱脂を GPC カラムで行うことが度々ある。
- (注 15) 添加する精製水と試料中の水分合計量が 5 mL を超えると対象物質がヘキサン層に移行する可能性があるので、注意する。
- (注 16) メタノールを飽和させるヘキサン量は 8~15 mL 程度であるので、メタノール飽和ヘキサンを 20 mL 加えた。
- (注 17) 硫酸ジエチルの添加量が 2 mL を超えると、硫酸ジエチル由来の大きなピークが生じる。
- (注 18) 硫酸ジエチルは添加後数十秒で固化するので、すばやく攪拌する。
- (注 19) 生成量は反応時間(静置時間)、10 分から 6 時間はほぼ一定である。
- (注 20) 溶解しにくいのが、振とうを続けると徐々に溶解する。固形物は完全に溶解させる。
- (注 21) 手で 1 分間激しく振とうする。
- (注 22) ジクロロメタンが残留する為、試験管の栓が飛ばないようにクリップ等で止める。
- 固形物は温めながら振とうすることで、完全に溶解させる。
- (注 23) フロリジルカートリッジカラムは使用直前に 4%エーテル/ヘキサン 20 mL で洗浄する。また対象物質の溶出パターンと回収率も確認しておく。
- (注 24) 目的物質の分析に影響のない市販品のミネラルウォーターも使用可である。
- (注 25) 測定物質の d 体または ^{13}C が市販されているフェノール類はサロゲート法、未市販のフェノール類は内部標準法で定量する。但し、未市販のフェノール類でも市販されたら、サロゲート法に切り替えることを推奨する。

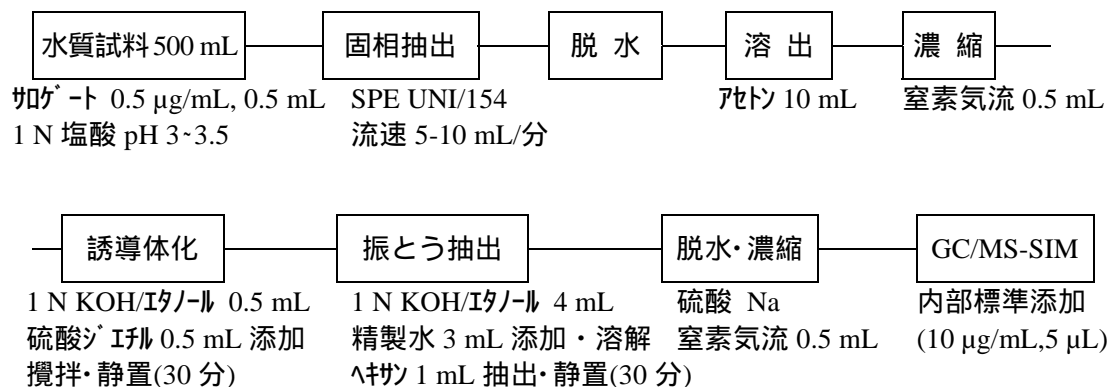
- (注26) 一例として、DB-17，またはHP-50+ (備考1)。
- (注27) 一例として、DB-625。DB-17・HP-50+カラムでは、夾雑物の影響でフェノール類が測定不能である場合、DB-625 を使用する。DB-625 カラムは管理不足及びGCを付け替えるごとに、酸素により著しく劣化するので注意すること(備考1)。
- (注28) 高圧注入方式にすれば、注入量も増やせ、感度も上がる。但し、サロゲート混合標準液、混合内部標準液の添加量を変更する必要がある。
- (注29) 十分な感度が得られる場合にはSIM測定代わりにスキャン測定でもよい。
- (備考1) ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

参考文献

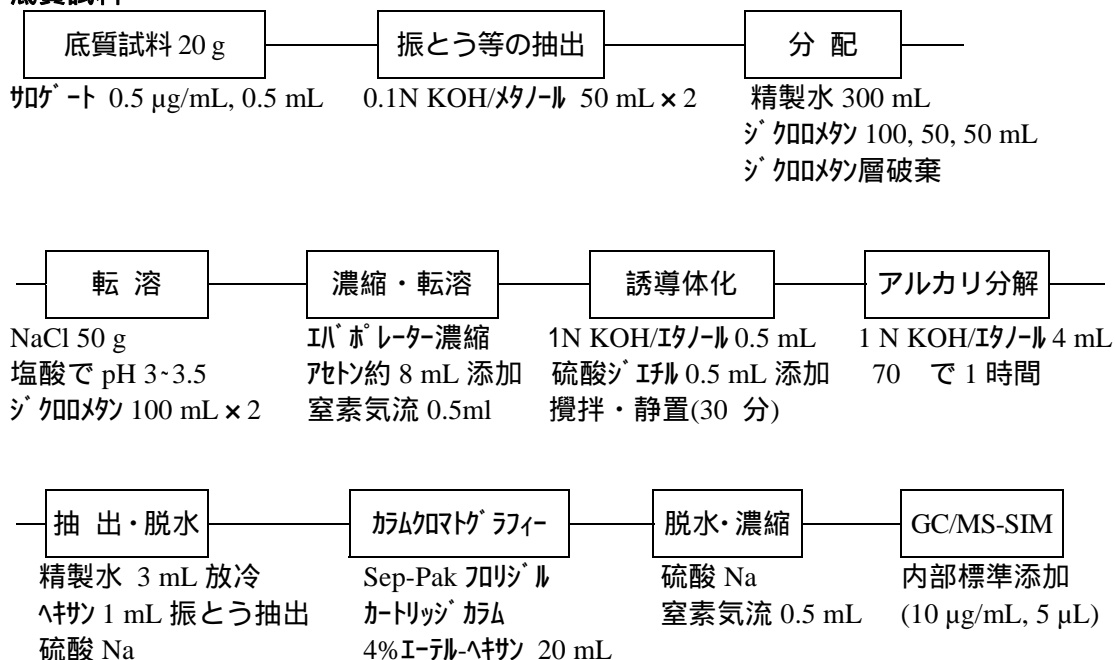
- 1) 岡山県環境保健センター：o-ニトロフェノール，m-ニトロフェノール，p-ニトロフェノール，2,4-ジニトロフェノール，2,6-ジニトロ-p-クレゾール，pp102-143，「平成5年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部保健調査室（平成6年6月）
- 2) 大阪市立環境科学研究所：2,4,5-トリクロロフェノール，2,4,6-トリクロロフェノール，2,4,6-トリプロモフェノール，2,3,4,6-テトラクロロフェノール，ペンタクロロフェノール（ペンクロール），pp48-77，「平成7年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部環境安全課（平成8年6月）
- 3) 大阪市立環境科学研究所：3,5-ジメチルフェノール，2,4-ジメチルフェノール，2,5-ジメチルフェノール，m-tert-ブチルフェノール，o-sec-ブチルフェノール，2-メトキシフェノール，3-メトキシフェノール，4-メトキシフェノール，pp74-93，「平成10年度化学物質分析法開発調査報告書」環境庁環境保健部環境安全課（平成11年6月）
- 4) 高橋保雄，森田昌敏：GC/MSによる水中のフェノール類の分析，環境化学，6，363-373（1996）
- 5) 山口之彦，福島実也：フェノール類の多成分分析法の検討，第10回環境化学討論会要旨集，492-493（2001）

分析フローチャート

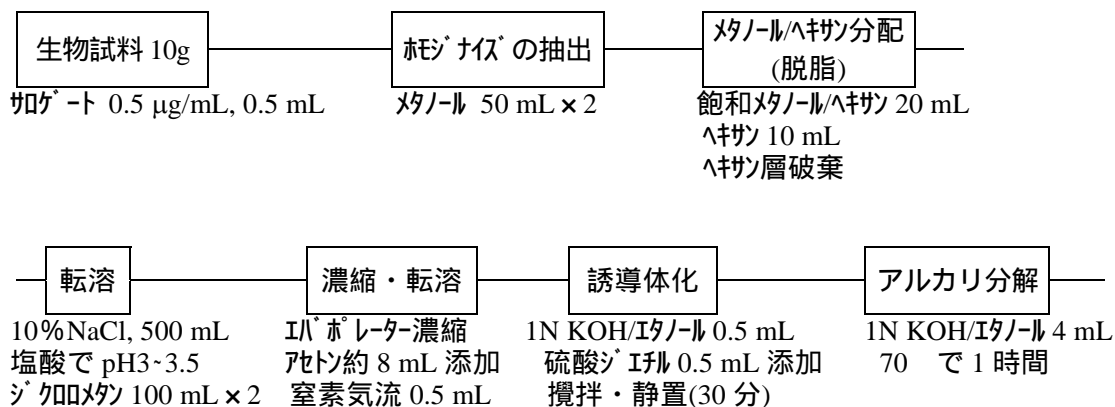
水質試料



底質試料



生物試料





．トリクロサン及びその塩素置換体の分析法

1 対象物質

トリクロサン	2',4,4'-trichloro-2-hydroxydiphenylether
3-クロロトリクロサン	2',3,4,4'-tetrachloro-2-hydroxydiphenylether
5-クロロトリクロサン	2',4,4',5-tetrachloro-2-hydroxydiphenylether
3,5,-ジクロロトリクロサン	2',3,4,4',5-pentachloro-2-hydroxydiphenylether

2 目標検出下限値及び定量下限値

	水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)	生物 (µg/kg)
	検出下限	定量下限	検出下限	検出下限
トリクロサン	0.007	0.02	0.9	0.5
3-クロロトリクロサン	0.006	0.02	0.4	0.4
5-クロロトリクロサン	0.01	0.04	0.4	0.4
3,5-ジクロロトリクロサン	0.009	0.03	0.4	0.2

3 分析法の概要

水質試料については、水酸化ナトリウムでアルカリ性(pH > 13)としヘキサンで洗浄後、塩酸で酸性 (pH: 2~3) としヘキサン抽出した後、脱水・濃縮・乾固し、ジアゾメタンでメチル化を行い、GC/MS-SIM で定量する。但し、海水試料については、アルカリ性下でのヘキサン洗浄は行わない。

底質試料については、アセトン抽出し、アルカリ性下でヘキサン洗浄後、酸性下でヘキサン抽出し、水質試料と同様にメチル化し、フロリジルカートリッジカラムでクリンアップを行い、GC/MS-SIM で定量する。

生物試料については、アセトニトリルで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配により脂質を除去した後、アルカリ性下でヘキサン洗浄した後、塩酸酸性下でヘキサン抽出し、脱水・濃縮・乾固後、ジアゾメタンでメチル化する。このものを、1N KOH/エタノール溶液でアルカリ分解を行い、内標準を添加、塩酸酸性下でヘキサン抽出し、フロリジルカートリッジカラムでクリンアップを行い、GC/MS-SIM で定量する。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・標準物質（トリクロサン、3-クロロトリクロサン、5-クロロトリクロサン及び 3,5-ジクロロトリクロサン）：（注1）
- ・ヘキサン、アセトン、アセトニトリル、エーテル、エタノール：市販残留農薬試験用
- ・塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム：市販残留農薬試験用
- ・水酸化ナトリウム、水酸化カリウム：市販試薬特級
- ・塩酸（35%）：有害金属測定用
- ・水：イオン交換蒸留水又は市販ミネラルウォーター
- ・ジアゾメタン発生試薬（1-メチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジン）：市販試薬（注2）
ジアゾメタン発生法：ジアゾメタン発生器の外管にエーテル 6 mL、内管に発生試薬 500 mg を入れ、セプタムとキャップをし、外管に差し込む。氷水で冷却しながら 20% NaOH 水溶液（2 mL 程度）をセプタム部から注射器で注入滴下する。このとき NaOH 水溶液がエーテル部に入らないようにジアゾメタンの出口の小穴（内管にある）は上部を向くようにしておく。発生器を軽く振り、発生したジアゾメタンとエーテルが良く接触するようにする。NaOH 水溶液の滴下速度は、速すぎると激しい反応による発泡で内管の試薬がエーテル部に入ってしまうことがあり失敗である。あまり遅すぎるとリーク等によるロスのためジアゾメタンの濃度が薄くなってしまう。注射器のシリンドーには発生するジアゾメタンガスによる圧力がかかるのでしっかり抑えておくこと。さらに必ず、この操作は両手にゴム手袋をし、ドラフト内で行うこと。
- ・フロリジルカートリッジカラム：（注3、注4）
- ・内標準（フルオランテン-d₁₀）：1 µL/mL アセトン溶液を調製して内標準溶液とする（注5）。

(2) 器具及び装置

- ・ジアゾメタン発生装置：ミリモル用（注6）
- ・ホモジナイザー：ポリトロン型 生物試料の抽出に用いる。
- ・超音波洗浄器：底質試料の抽出に用いる。
- ・遠心分離器：底質及び生物試料の抽出液の分離に用いる。
- ・KD 濃縮器：試料液の濃縮に用いる。

5 試料の採取・運搬

洗剤、水、アセトンの順で洗浄した共栓付きガラス瓶に試料水を採取し、氷冷して搬入する。搬入後は出来るだけ速やかに分析に供する。

底質試料は、約 100 g を採取し、夾雑物を除去した後、遠心分離して水分を出来るだけ除いた後、冷凍保存する。

生物試料は、分析部位をホモジナイザーで均一化し、冷凍保存する。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

a 湖沼、河川水等塩分の少ない試料の場合

試料 1 L を分液ロートにとり、NaOH 10 g を加えて溶解させる(注 7)。ヘキサン 100 mL を加え、5 分間振とうし、静置する(注 8)。水層をビーカーにとり塩酸(35%)を加え pH を 2~3 に調整する(注 9)。これを分液ロートに移し、ヘキサン 100 mL を加え、5 分間振とうし、静置後ヘキサン層を採取する。水層にはさらにヘキサン 100 mL を加え、振とうし、静置後ヘキサン層を採取し、ヘキサン層を合わせる。無水硫酸ナトリウムで脱水し、KD濃縮器で 3~5 mL 程度まで濃縮し、試料前処理液とする。

b 海水の場合(注 10)

試料 1 L をビーカーにとり、塩酸を加えて pH を 2~3 に調整する。これを分液ロートに移し、ヘキサン 100 mL ずつで 2 回抽出し、a と同様に処理して試料前処理液とする。

(イ) 底質試料

試料 10 g を 50 mL 容遠沈管にとり、アセトン 30 mL を加え、スパーテルで良くかき混ぜた後、10 分間超音波抽出を行う。3,000 rpm で 10 分間遠心分離してアセトン層を採取する。残さにはさらにアセトン 30 mL を加え、同じ操作を繰り返し、アセトン層を合わせる。アセトン層は、あらかじめ分液ロートに用意した、水 500 mL に NaOH 5 g を溶解させた水溶液に入れ、さらにヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とうし、静置する。水層をビーカーにとり、塩酸で pH を 2~3 に調整した後、ヘキサン 50 mL ずつで 2 回抽出し、水質試料と同様にして試料前処理液とする。

(ウ) 生物試料

試料 10 g をとり、アセトニトリル 50 mL を加え、5 分間ホモジナイザーで抽出、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採取する。残さはさらにアセトニトリル 50 mL で抽出し、アセトニトリル層を合わせる。アセトニトリル層を分液ロートに入れ、ヘキサン 20 mL を加え、5 分間振とうし、静置する（注 11）。アセトニトリル層は、あらかじめ分液ロートに用意した水 500 mL に NaOH 6 g と NaCl 25 g を溶解させたものに入れ、ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とうし、静置する。水層はビーカーにとり、底質試料と同様にして試料前処理液を得る。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

a 湖沼及び河川水の場合

試料前処理液を窒素気流で乾固し（注 12）、メタノールを 2~3 滴（注 13）とジアゾメタン/エーテル溶液 1 mL を加え、栓をして室温で 1 時間放置する（注 14）。窒素気流で乾固し、内標準溶液 0.2 mL を加え（注 15）、アセトンで 1 mL にして試料処理液とする。

b 海水の場合

試料前処理液を窒素気流で乾固し、内標準溶液 0.2 mL を加え（注 15）、アセトンで 1 mL とし、GC/MS-SIM 測定を行う（注 16）。SIM 測定後、窒素気流で乾固し、a と同様にメチル化を行い試料処理液を得る（注 17）。

(イ) 底質試料

試料前処理液を窒素気流で乾固し、メタノールを 2~3 滴とジアゾメタン/エーテル溶液 2 mL を加え、栓をして室温で 1 時間放置する（注 18）。内標準溶液 0.2 mL を加え、窒素気流で乾固し、ヘキサン 1 mL で溶解しする。これをフロリジルカートリッジに負荷し、4%エーテル/ヘキサン 7 mL で目的物及び内標準を溶出させ、窒素気流で乾固後、アセトン 1 mL を加えて溶解したものを試料処理液とする（注 19）。

(ウ) 生物試料

試料前処理液を窒素気流で乾固し、メタノールを 2~3 滴とジアゾメタン/エーテル溶液

3 mL を加え、栓をして室温で 1 時間放置する（注 20）。窒素気流で乾固し、1N KOH エタノール溶液 2 mL を加え、きつく栓をし 60～70 の湯浴で 1 時間アルカリ分解を行う（注 21）。放冷後、水 2 mL、内標準溶液 0.2 mL（注 22）、塩酸（35%）4～5 滴（注 23）、ヘキサン 3 mL を加えて栓をし、1 分間激しく振とうし静置する。ヘキサン層を（注 24）、あらかじめ用意した 10 mL 容 KD 濃縮管にセットした小ロート（脱脂綿またはグラスウールで軽く栓をし 2～3 g の無水硫酸ナトリウムを入れておく）に入れる。水層にはヘキサン 3 mL を入れ、同じ操作を繰り返し（塩酸はいれなくてよい）、ヘキサン層を小ロート内の無水硫酸ナトリウム上に入れる。無水硫酸ナトリウム上にさらにヘキサン 1 mL を入れ、溶出させる。このヘキサン溶液を窒素気流で乾固し、ヘキサン 1 mL を加えて溶解させる。以下底質試料と同様にフロリジルカートリッジカラムによるクリンアップを行い、窒素気流で乾固し、アセトン 1 mL で溶解して試料処理液とする。

（3）空試験液の調製

（ア）水質試料

試料と同量の精製水を用い、試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を空試験液とする。

（イ）底質試料

アセトン 60 mL を用い、試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を空試験液とする。

（ウ）生物試料

アセトニトリル 100 mL を用い、試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を空試験液とする。

（4）添加回収試験液の調製

水質試料 1 L、底質及び生物試料 10 g に各対象物質を検出下限の 5～10 倍量を添加し、充分混合した後、試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

トリクロサン類の各 100 µg/mL 混合アセトン溶液を調製し、これを標準原液(保存溶液) とする。これを適宜アセトンで希釈し 1.0 µg/mL (検量線用) 及び 0.1 µg/mL (添加回収実験用) アセトン溶液を調製する。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例

(a) GC

- ・カラム : 溶融シリカキャピラリーカラム (25 m × 0.32 mm, 0.52 µm film thickness)
- ・カラム温度 : 70 [1 分] - 15 /分 - 280 [6 分間保持]
- ・液層 : 5% phenyl methyl silicone
- ・注入口温度 : 250
- ・インターフェース温度 : 250
- ・キャリアーガス : He (カラムヘッド圧 7.5 psi、線速度 61 cm/sec)
- ・注入方法 : スプリットレス (パージオフ時間 1 分間)
- ・注入量 : 2 µL

(b) MS

- ・イオン化法 : EI
- ・イオン化エネルギー : 70 eV
- ・イオン化電流 : 300 µA
- ・イオン源温度 : 250
- ・検出モード : SIM

(c) 測定イオン

対象物質及び内標準の測定イオンを表 1 に示す

表 1 対象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
トリカブツ	302.0	304.0
3-クロトリカブツ	337.9	335.9
5-クロトリカブツ	337.9	335.9
3,5-ジクロトリカブツ	371.9	369.9
内標 (フルオランテン-d ₁₀)	212.0	

(イ) 検量線

混合標準液 (1.0 µg/mL アセトン溶液) を 0~1.0 mL の範囲で段階的にとり、窒素気流で乾固する。メタノール 2~3 滴を加え、さらにジアゾメタン/エーテル溶液 1 mL を加え、栓をし室温で 1 時間放置する。窒素気流で乾固し、内標準溶液 0.2 mL を加え、アセトンで 1 mL にする。これの 2 µL を GC/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積と内標準のピーク面積比との関係から検量線を作成する。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試験液及び添加回収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試料液を注入し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし、20% 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。

7 同定、定量及び計算

(1) 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% 以内の差で合っておれば、物質が存在していると思なす。

(2) 定量及び計算

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。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$\text{水質試料濃度 (}\mu\text{g/L)} = \text{検出量 (}\mu\text{g)} \times \frac{1}{\text{試料量 (L)}}$$

$$\text{底質試料濃度 (}\mu\text{g/kg)} = \text{検出量 (}\mu\text{g)} \times \frac{1}{\text{試料量 (kg)}}$$

(ここでの検出量とは試料液中に存在する対象物質の全量である。)

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「 . 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

- (注1) ここでは、北海道立衛生研究所 兼俊明夫氏より供与されたものを使用した。
- (注2) Aldrich Chem.Co 製など(備考1)。
- (注3) ここでは Waters 製 (QTA Part NO.51960) を使用した(注4)(備考1)。
- (注4) 類似の製品を使用しても良いが、事前に目的物質及び内標準物質の溶出についてチェックすること。
- (注5) ここでは CIL 製を使用した(備考1)。
- (注6) ここでは Wheaton 製 (ミリモル用) を使用した(備考1)。
- (注7) NaOH を溶解させる時、静置した状態ではなかなか溶解しない。振とう機にかけると容易に溶解する。なお、この時溶解熱で発熱するので洗浄溶媒のヘキサンを入れられないこと。
- (注8) 充分静置時間を取り分離を完全に行うこと。エマルション部に被検物質が吸着されるので、エマルション部は水層に入れる。
- (注9) 酸性化 (pH 2~3) に要する塩酸量は 22 mL 前後である。
- (注10) 海水の場合は、NaOH を加えて pH > 13 にすると水酸化物が析出し、ヘキサンと振とうした時分離しないので、アルカリ性下ヘキサン洗浄は行わない。
- (注11) 静置時間を充分にとり可能な限り脂質を除去すること。脂質が残留するとメチル化の時にジアゾメタンを消費するのでメチル化が完全に進行しないことがある。

る。

- (注 12) 乾固する操作はすべて溶媒がわずかに残る程度で行う。やりすぎると揮散ロスが起こるので注意すること。
- (注 13) メタノールはメチル化の速度を速めるために入れる。
- (注 14) 室温に 1 時間放置した時、ジアゾメタンエーテル溶液の黄色が残っていることを確かめること。この時点で無色になっている場合はメチル化が完全に進行していない可能性があるため、再乾固してジアゾメタン溶液を加える。
- (注 15) 添加する内標準の量は、使用する GC/MS の感度や濃縮率に応じて適宜変更しても良い。
- (注 16) フェノール類の自然界におけるメチル化が指摘されているので、アルカリ性下ヘキサン洗浄で除去する。しかし、海水ではこの操作が困難であるため、この段階でトリクロサン類のメチル化体の存在をチェックする。もし、検出された場合は結果を補正する。
- (注 17) ここでは、既に内標準は添加してあるので加えない。
- (注 18) 底質試料では多少黄色に着色している場合が多いので、ジアゾメタンの残留をチェックするのは困難であるため 2 mL 添加する。
- (注 19) フロリジルカートリッジカラムはヘキサン 10 mL を通液洗浄して使用する。
- (注 20) 可能な限り脂質を除去しても、極めてわずかに残った脂質がジアゾメタンを消費する。(ジアゾメタン溶液を入れた時、窒素ガスの発生が肉眼的にも観測される) 従って、ジアゾメタン溶液は 3 mL 使用した。この時も、1 時間後にジアゾメタン溶液の黄色が残っていることを確認すること。
- (注 21) ジアゾメタンでメチル化を行うと残留している生体成分もメチル化され、極性が小さくなりピークがシャープになり著しく GC/MS 分析を妨害する。この状態では目的物とフロリジルにより分離できない。そこでアルカリ分解することにより生体成分のメチル化物(メチルエステルタイプと推定される。)のみをもとの強極性物質に戻す。目的物はエーテルであるためアルカリ分解されない。このようにすれば容易に生体成分を除去できる。この温度は、エタノールの沸点以下であるため、KD濃縮管の栓をややきつくしておくだけで栓が飛ぶようなことはない。
- (注 22) 内標準溶液はこの時点で添加する。フルオランテン-d₁₀ はトリクロサン類のメチル化物とヘキサンによる抽出挙動及びフロリジルカートリッジによる溶出挙動

がほとんど同じであるのでサロゲートの役割をするのでこの時点に入れるのが好都合である。

(注 23) アルカリ性のままヘキサン抽出を行うとなかなか分離しない。酸性にするとすみやかに分離する。

(注 24) この時点では既に内標準を入れてあるので必ずしもヘキサン層の全量をとる必要はない。パスツールピペットのようなもので 9 割程度とればよい。

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

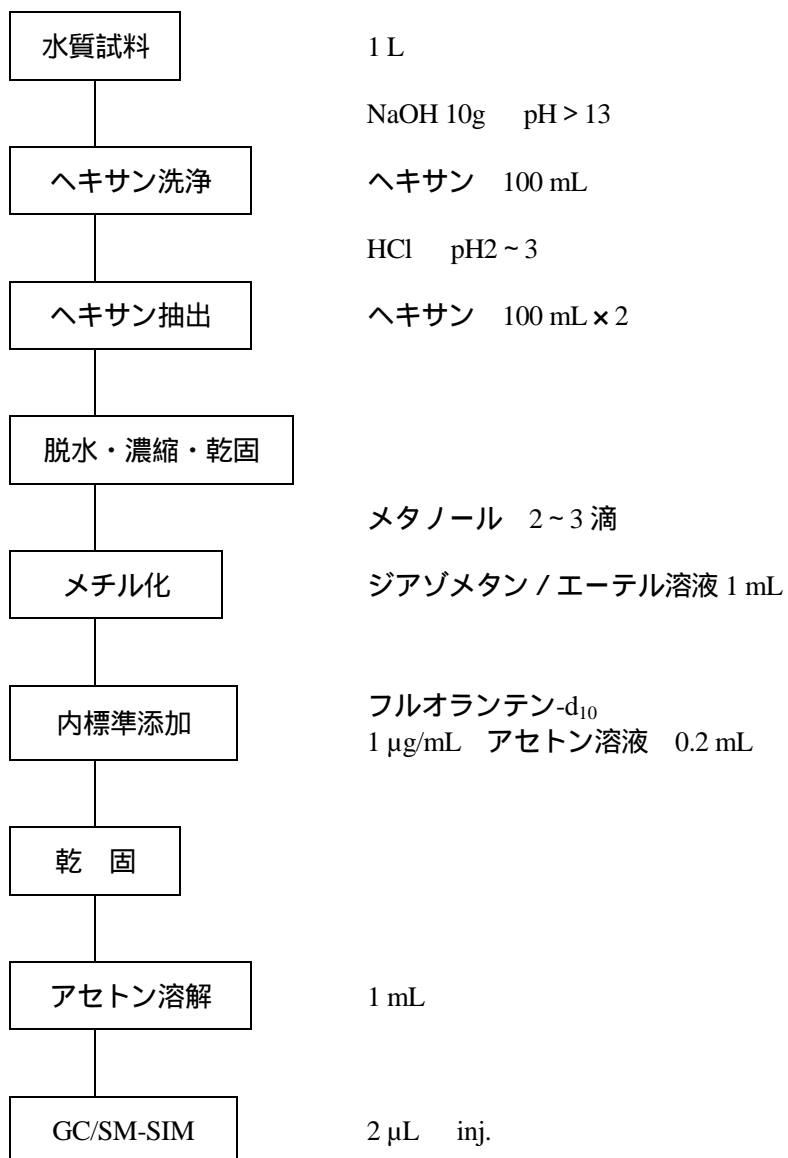
参考文献

- 1) 大阪府公害監視センター：トリクロサン，3-クロロトリクロサン，5-クロロトリクロサン，3,5-ジクロロトリクロサン，pp201-219，「平成 6 年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部環境安全課（平成 7 年 6 月）

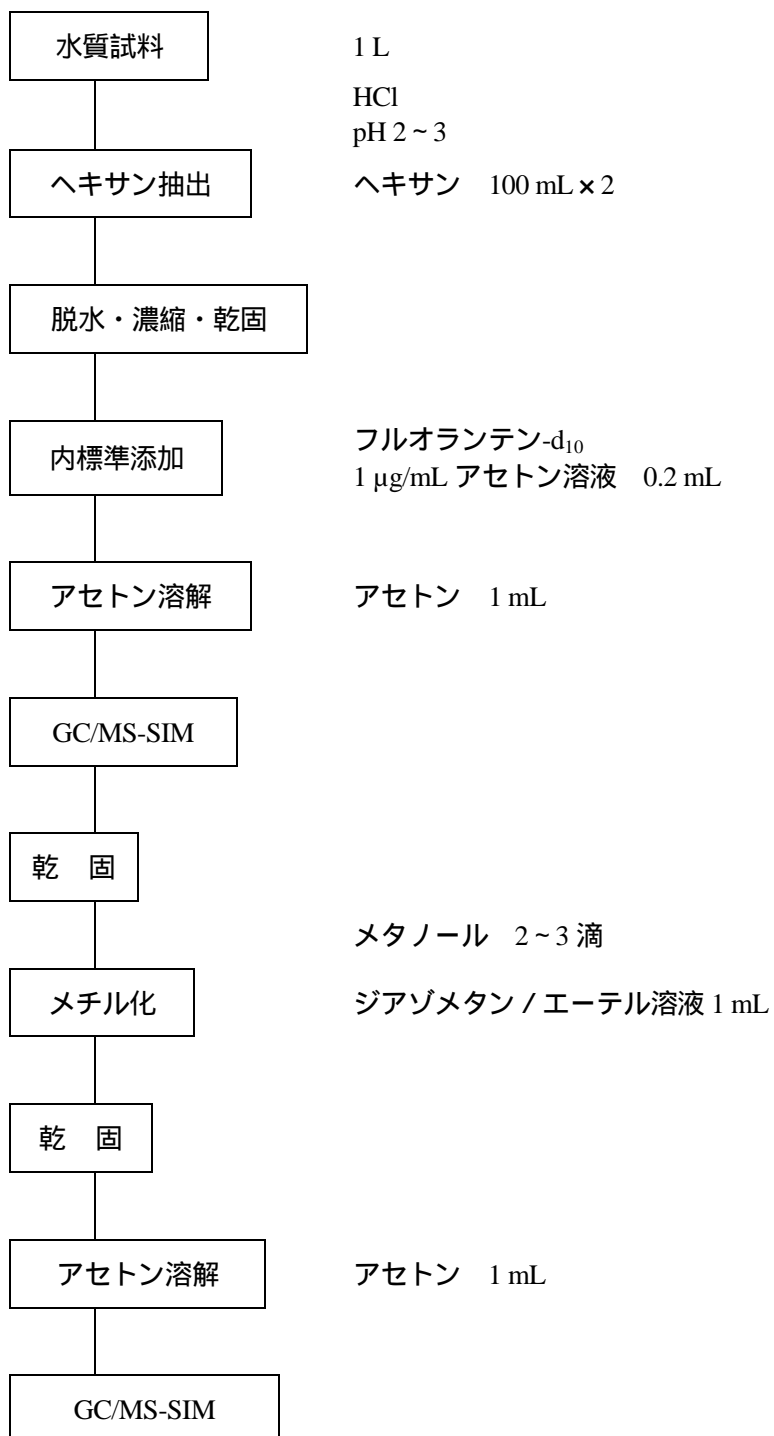
分析法フローチャート

水質試料

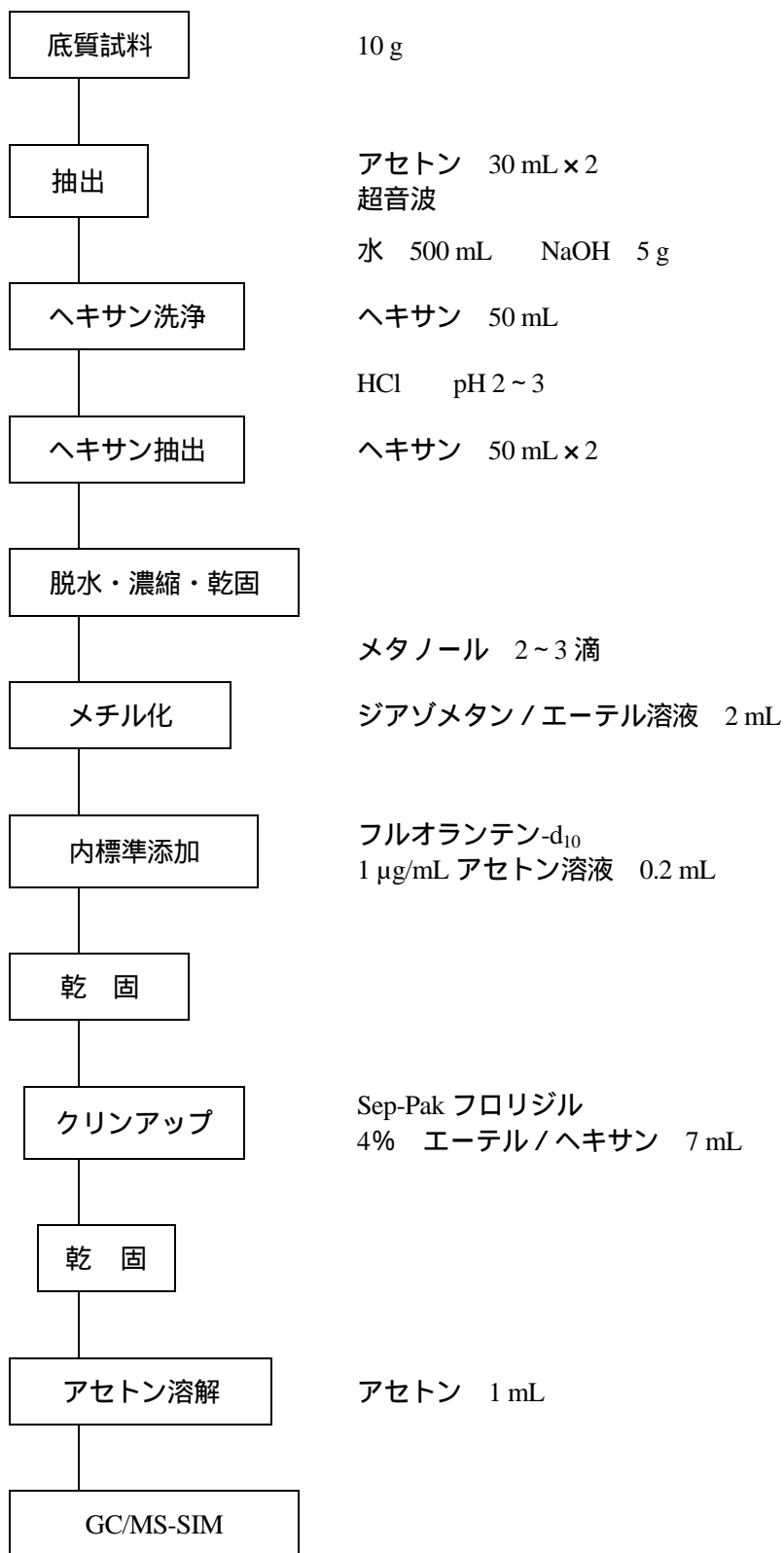
a 河川、湖沼水



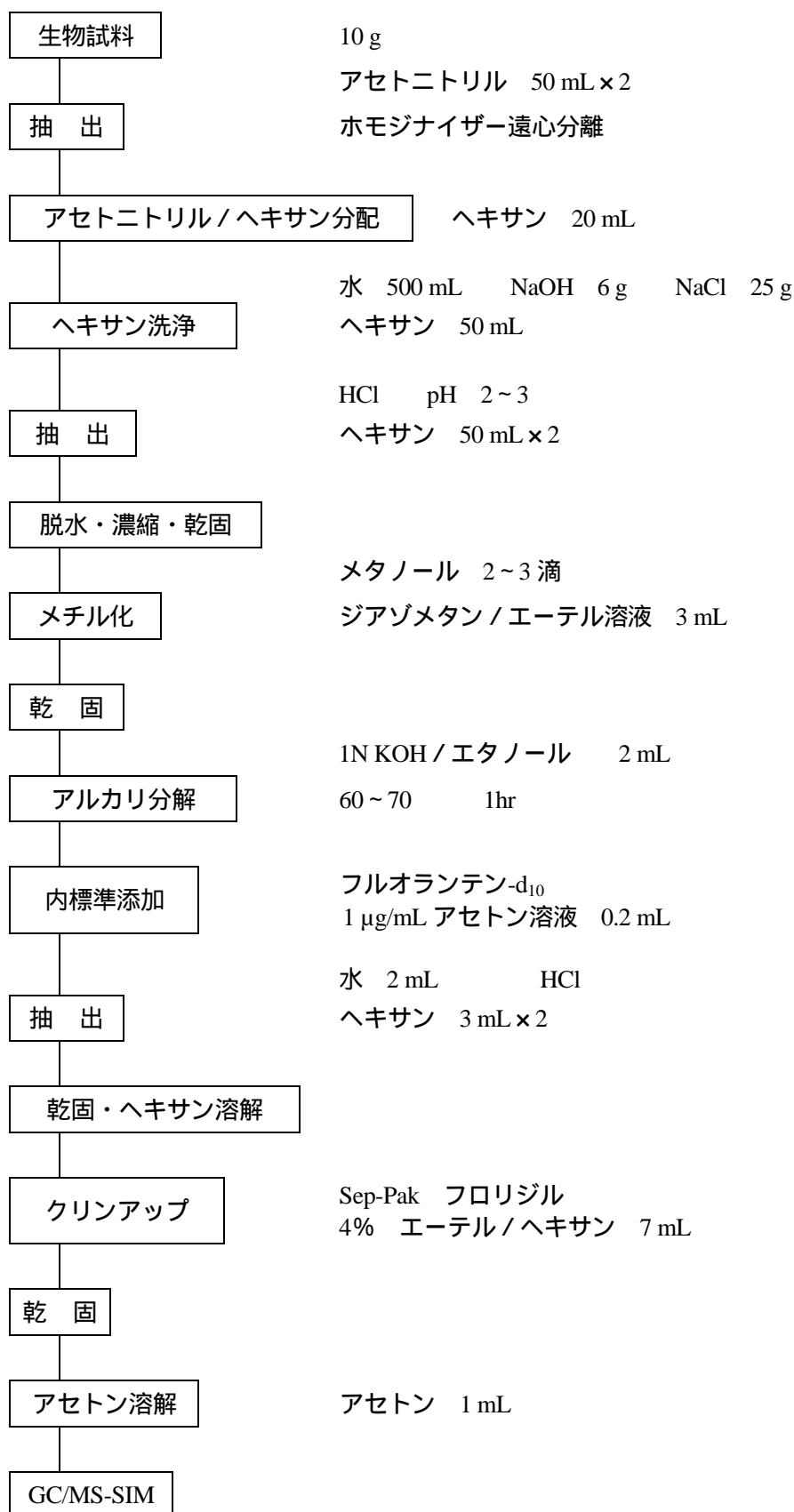
b 海水



底質試料



生物試料



2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール、2,6-ジ-*t*-ブチル-4-エチルフェノール、2,4,6-トリ-*t*-ブチルフェノールの分析法

1 対象物質

2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール (2,6-di-*t*B-4MP)

2,6-ジ-*t*-ブチル-4-エチルフェノール (2,6-di-*t*B-4EP)

2,4,6-トリ-*t*-ブチルフェノール (2,4,6-tri-*t*BP)

表1 対象物質(注1)及びその物理化学的性質

物質名	分子式	分子量	融点()	沸点()	水溶解度(mg/L)	Log Pow
2,6-di- <i>t</i> B-4MP	C ₁₅ H ₂₄ O	220	71	265	0.6	5.10
2,6-di- <i>t</i> B-4EP	C ₁₆ H ₂₆ O	234	45	272	-	5.07
2,4,6-tri- <i>t</i> BP	C ₁₈ H ₃₀ O	262	129 ~ 132	277	35	5.64

2 目標検出下限値及び定量下限値

本分析法の目標検出下限値及び目標定量下限値を表2に示す。

表2 目標検出下限値及び目標定量下限値

物質名	水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)	
	目標検出下限値	目標定量下限値	目標検出下限値	目標定量下限値
2,6-di- <i>t</i> B-4MP	0.050	0.17	6.4	-
2,6-di- <i>t</i> B-4EP	0.055	0.19	2.6	-
2,4,6-tri- <i>t</i> BP	0.020	0.061	6.5	-
物質名	生物 (µg/kg)			
	目標検出下限値	目標定量下限値		
2,6-di- <i>t</i> B-4MP	24	-		
2,6-di- <i>t</i> B-4EP	19	-		
2,4,6-tri- <i>t</i> BP	21	-		

3 分析法の概要

水質試料は、2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール (2,6-di-*t*B-4MP)、2,6-ジ-*t*-ブチル-4-エチルフェノール (2,6-di-*t*B-4EP) 及び 2,4,6-トリ-*t*-ブチルフェノール (2,4,6-tri-*t*BP) をハウジングがガラス製の ODS カートリッジを用いた固相抽出後、ヘキサンで溶出し、脱水、濃

縮後、GC/MS (SIM) で定量する。

底質試料は、アセトンで抽出後、抽出液を水に溶解させてヘキサンで抽出し、脱水、濃縮した後、GC/MS (SIM) で定量する。

生物試料は、アセトニトリルで抽出後、抽出液を水に溶解させてヘキサンで抽出し、脱水、濃縮した後、GC/MS (SIM) で定量する。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・ 2,6-di-*t*B-4MP、2,6-di-*t*B-4EP 及び 2,4,6-tri-*t*BP 標準品：市販標準品
- ・ ヘキサン：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・ アセトン：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・ アセトニトリル：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・ ピロガロール：試薬特級
- ・ 亜硫酸ナトリウム：試薬特級
- ・ 無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用を 500 で 4 時間加熱処理したもの。
- ・ 塩化ナトリウム：残留農薬試験用を 500 で 4 時間加熱処理したもの。
- ・ ヘキサクロロベンゼン-¹³C₆ (HCB-¹³C₆)：市販標準品
- ・ ODS カラム (注 2)：ハウジングがガラス製で、被験物質の測定を妨害しないカートリッジを使用前にヘキサン 5 mL、0.1%ピロガロール含有アセトン溶液 5 mL、0.1%亜硫酸ナトリウム水溶液 5 mL の順でコンディショニングを行っておく。
- ・ フロリジルカラム：ハウジングがガラス製で、被験物質の測定を妨害しないカートリッジ (注 3) を使用前にヘキサンで洗浄しておく。もしくは、フロリジル (注 4) をヘキサンで充填したガラスカラムを使用する。この際、活性化すると吸着が強くなりすぎるためか、溶出率が低下するので、未活性のまま使用の方がよい。
- ・ アミノプロピルカラム：被験物質の測定を妨害しないカートリッジ (注 5) を使用前にヘキサンで洗浄しておく。
- ・ 酸化アルミナカラム：被験物質の測定を妨害しないカートリッジ (注 6) を使用前にヘキサンで洗浄しておく。
- ・ 精製水：(注 7)

(2) 器具及び装置

- ・ 振とう機
- ・ 遠心分離機
- ・ 超音波洗浄器
- ・ ガラス製共栓付遠沈管：50 mL
- ・ 分液ロート：300 mL、1 L
- ・ 共栓付ナス型フラスコ：300 ~ 500 mL
- ・ 濃縮管：200 mL
- ・ ターボバップ
- ・ 高速溶媒抽出装置（ASE：Accelerated Solvent Extractor）：（注 8）
- ・ 抽出用セル：（注 9）
- ・ 抽出液捕集バイアル：（注 10）
- ・ セルロースフィルター：（注 11）
- ・ ハイドロマトリクス：（注 12）

（これらのガラス器具は、アセトンで十分洗浄し、乾燥後使用する。）

5 試料の採取・運搬

(1) 水質試料

洗剤、水、アセトンで洗浄したねじ口瓶を試料水で 2~3 回共洗いした後、試料水を泡立
てないように採水し、満水にして密栓し、直ちに試験を行う。直ちに試験できないときは、
冷暗所（ 4 ）に保存し、速やかに試験を行う。

(2) 底質試料

水質試料と同様の方法で洗浄した摺り合せの広口ガラス瓶に入れ密栓し、-20 以下で保
存する。

(3) 生物試料

水質試料と同様の方法で洗浄した摺り合せの広口ガラス瓶に入れ密栓し、-20 以下で保
存する。

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「 . 試料の

採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

試料 500 mL にピロガロール 0.5 g を添加し混合する（注 13）。ハウジングがガラス製の ODS カートリッジに本試料水を通水し、乾燥後、ヘキサン 5 mL で溶出する。この溶出液に無水硫酸ナトリウムを加え脱水した後、ターボバップを用いて窒素を吹きつけ約 1 mL まで濃縮し、試料前処理液とする。

(イ) 底質試料

試料 20 g を 50 mL ガラス製共栓付遠沈管に取り、アセトン 50 mL を加え、15 分間超音波処理、10 分間振とう抽出した後、2,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い抽出液を分取する。残渣にアセトン 50 mL を加え、再度同様の操作を行い、抽出液を合わせる。精製水 500 mL を入れた 1 L 分液ロートにこの抽出液を合わせ、ヘキサン 100 mL を加え、10 分間振とう後静置し、ヘキサン層を分取する。水層に再度ヘキサン 100 mL を加え、同様の操作を行う。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、以下「(ア) 水質試料」と同様の操作を行い、試料前処理液とする（注 14）。

(ウ) 生物試料

試料 5 g を 50 mL ガラス製共栓付遠沈管に取り、アセトニトリル 50 mL を加え、15 分間超音波処理、ホモジナイズした後、2,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い抽出液を分取する。残渣にアセトニトリル 50 mL を加え、再度同様の操作を行い、抽出液を合わせる（注 15）。2%塩化ナトリウム水溶液 500 mL を入れた 1L 分液ロートにこの抽出液を合わせ、ヘキサン 100 mL を加え、10 分間振とう後静置し、ヘキサン層を分取する。水層に再度ヘキサン 100 mL を加え、同様の操作を行う。ヘキサン層を合わせ、精製水 100 mL で 3 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、以下「(ア) 水質試料」と同様の操作を行い、試料前処理液とする（注 16）。

(2) 試料液の調製

各試料の前処理液に、内標準物質として $1 \mu\text{g/mL}$ HCB- $^{13}\text{C}_6$ 溶液 0.1 mL を添加し、GC/MS (SIM) 測定用試料液とする。

(3) 空試験液の調製

水質、底質及び生物については、試料と同じ量の精製水を用い、「(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」と同様に操作して得られたものを空試験液とする(注 17)。

(4) 添加回収試験液の調製

任意の水質試料 500 mL 、底質試料 20 g 及び生物試料 5 g に検出下限値の $5 \sim 10$ 倍になるようにアセトンで希釈調製した標準液を加え、十分に混合した後、「(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

3 種の対象物質各 100 mg を精秤し、アセトンに溶解させて正確に 100 mL とし、 $1,000 \mu\text{g/mL}$ の標準原液とする。標準原液をヘキサンで希釈し $1 \mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製する。内標準物質の HCB- $^{13}\text{C}_6$ も同様に $1,000 \mu\text{g/mL}$ を調製し、ヘキサンで希釈して $1 \mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製する。検量線作成用の標準系列は、各標準溶液を混合し、ヘキサンで適宜希釈して $0.05 \sim 0.3 \mu\text{g/mL}$ の範囲で調製する。これら標準系列中の HCB- $^{13}\text{C}_6$ 濃度は $0.1 \mu\text{g/mL}$ とする。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例

(a) ガスクロマトグラフ部

- ・ GC : (注 18)
- ・ カラム : 液相 5% フェニルメチルポリシロキサン ($0.2 \text{ mm} \times 25 \text{ m}$ 膜厚 $0.33 \mu\text{m}$)
(注 19)
- ・ カラム温度 : $60 (2 \text{ min}) - 20 /\text{min} - 180 - 3 /\text{min} - 240$
- ・ 注入口温度 : 220
- ・ 注入量 : $2 \mu\text{L}$

・注入方法：スプリットレス（1.5 分間パージオフ）

・キャリアーガス：He 1 mL/ min

(b) 質量分析部

・MS：(注 20)

・イオン化法：EI

・イオン化電流：300 μ A

・インターフェイス温度：250

・イオン源温度：250

(c) 測定イオン

m/z	(定量用)(確認用)	
2,6-di- <i>t</i> B-4MP	205	220
2,6-di- <i>t</i> B-4EP	219	234
2,4,6-tri- <i>t</i> BP	247	262
内標準物質 (HCB- ¹³ C ₆)	290	255

(イ) 検量線

標準液 2 μ L を GC/MS に注入し、対象物質と内標準物質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、空試験液、測定用試料液及び添加回収試験液の各 2 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。もし、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。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

GC/MS の測定結果から、定量用及び確認用モニターイオンのピークが予想保持時間の \pm 5 秒以内に出現し、定量用と確認用モニターイオンのピーク強度比が予想値と \pm 20% 以内で一致した場合、物質が存在していると見なす。

(2) 定量及び計算

各対象物質と内標準物質のピーク面積比を求め、上記の検量線に照らして検出量を求める。次に、検出量と分析試料量から、次式により試料中の濃度を計算する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$\text{計算値}(\mu\text{g/L、}\mu\text{g/kg}) = \text{検出量}(\mu\text{g}) / \text{試料量}(\text{L、kg})$$

8 分析精度管理

本マニュアルの「 . 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

- (注1) これらは、プラスチック及びゴム製品の酸化防止剤や調整添加剤をはじめとして、殺虫剤や医薬品、潤滑剤、ジェット燃料油の劣化防止剤として使用されている。また、2,4,6-tri-*t*BP は、平成 13 年 7 月に第一種特定化学物質に追加指定された。
- (注2) ハウジングの材質がポリプロピレンやポリエチレンフリットを用いたカートリッジは、ブランク値が高くなるので、ガラス製ハウジングやテフロンフリットを用いたカートリッジの使用を推奨する。一般に市販されているスペルコ社製スペルクリン ENVI-18 及び Carboxen 1,000、ウォーターズ社製 PS-2 及びオアシスでの吸着及び溶出は、ブランク値が高いものの可能である。しかし、使用する際には回収率の確認が必要である(備考1)。
- (注3) スペルコ社製スペルクリン LC-Florisil など(備考1)。
- (注4) 和光純薬工業株式会社製フロリジル PR など(備考1)。
- (注5) スペルコ社製スペルクリン LC-NH₂ など(備考1)。
- (注6) スペルコ社製スペルクリン LC-Alumina-A など(備考1)。
- (注7) Milli-Q SP 超純水装置(ミリポア社製)による精製水と同等以上のもの(備考1)。
- (注8) ダイオネクス社製 ASE-200 など(備考1)。
- (注9) ダイオネクス社製 33 mL セルなど(備考1)。
- (注10) ダイオネクス社製 60 mL バイアルなど(備考1)。
- (注11) ダイオネクス社製 GRADE.D28、径 1.98cm など(備考1)。

- (注 12) バリアン社製 CHEM TUBE-HYDROMATRIX など (備考 1)。
- (注 13) ピロガロールを添加することによって、水中に存在する対象物質の測定時における酸化防止を図る。
- (注 14) 底質の濃縮液は着色しているが、分析に支障がなければクリーンアップをしなくてもよい。フロリジルクリーンアップを行っても回収率等の分析結果に差は見られない。
- (注 15) ASE 抽出法を用いる場合、2,6-di-*t*B-4MP 及び 2,6-di-*t*B-4EP については、装置部品のプラスチック材によるブランク値のため、定量に支障をきたす。2,4,6-tri-*t*BP について ASE 抽出法を用いる場合、試料 5g をハイドロマトリクスと混合し、均一になるようよくかき混ぜる。この生物試料混合ハイドロマトリクスをセルローズフィルター及びハイドロマトリクスを入れたセルに詰め、再びハイドロマトリクスで上端を覆い ASE 供試セルとし、溶媒にアセトニトリルを用いた ASE で抽出する。

【ASE 抽出条件】

抽出溶媒：アセトニトリル	フラッシュ容量：60%
オープン温度：150	保持サイクル数：3 回
抽出圧力：2,000 psi	パージ時間：90 秒間
オープン昇温時間：7 分間	溶媒消費量：30 ~ 50 mL
設定温度保持時間：10 分間	合計時間：40 ~ 45 分間

- (注 16) クリーンアップが必要な場合は、フロリジルやアミノプロピル、酸化アルミナカラムを用いたクリーンアップを行う。いずれのカラムを用いてもヘキサン 5 mL でほぼ 100% 溶出するが、ハウジングがプラスチックのものは 2,6-di-*t*B-4MP 及び 2,6-di-*t*B-4EP のブランク値が高くなり、正確な定量が困難である。
- (注 17) 精製水から 2,6-di-*t*B-4MP 及び 2,6-di-*t*B-4EP のブランク値が検出されるので、使用するガラス器具はすべてアセトンで十分洗浄して乾燥後使用し、無水硫酸ナトリウムは加熱処理して使用する。
- (注 18) ヒューレット・パッカード社製 HP-5890 など (備考 1)。
- (注 19) アジレント・テクノロジー社製 Agilent Ultra-2 など (備考 1)。
- (注 20) ヒューレット・パッカード社製 JMS-AM150 など (備考 1)。

(備考1)ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして掲げたが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

10 参考

(1) 分析試料の送付方法

(ア) 試料の前処理を行わない場合

(a) 水質試料

アセトンで十分洗浄し、乾燥させたガラス瓶に、ヘッドスペースが残らないように試料を採取し、梱包して送付する。

(b) 底質試料

アセトンで十分洗浄し、乾燥させたガラス瓶に試料を入れ、ドライアイスで冷却した状態で、梱包して送付する。

(c) 生物試料

アセトンで十分洗浄し、乾燥させたガラス瓶に試料を入れ、ドライアイスで冷却した状態で、梱包して送付する。

(イ) 試料の前処理を行う場合

分析法に示した「6(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」の要領に従って得られた約5 mL程度のヘキサン溶液を、アンプルまたはバイアル瓶に密封して送付する。

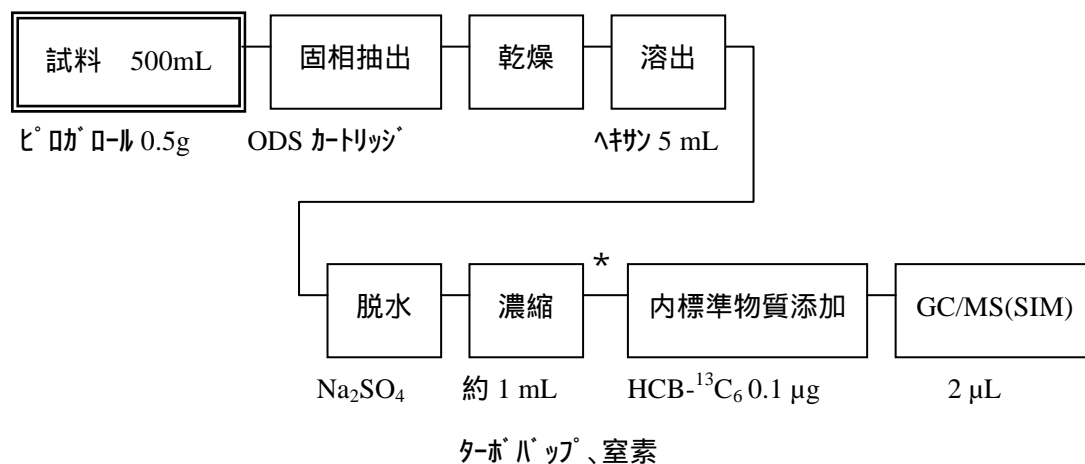
参考文献

- 1) 東京都立衛生研究所：p-クレゾール，p-tert-ブチルフェノール，2,6-ジ-tert-ブチルフェノール，4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール，pp90-108，「平成7年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部環境安全課（平成8年6月）
- 2) 橋本俊次，柴田康行，森田昌敏，田中博之，谷津明彦：イカ肝臓を指標とした海洋におけるダイオキシン類モニタリング（続報），pp242-243，「第8回環境化学討論会講演要旨集」，日本環境化学会，茨城（1999）
- 3) 日本薬学会編：酸化防止剤，pp298-301，「衛生試験法・注解2000」，金原出版，東京（2000）

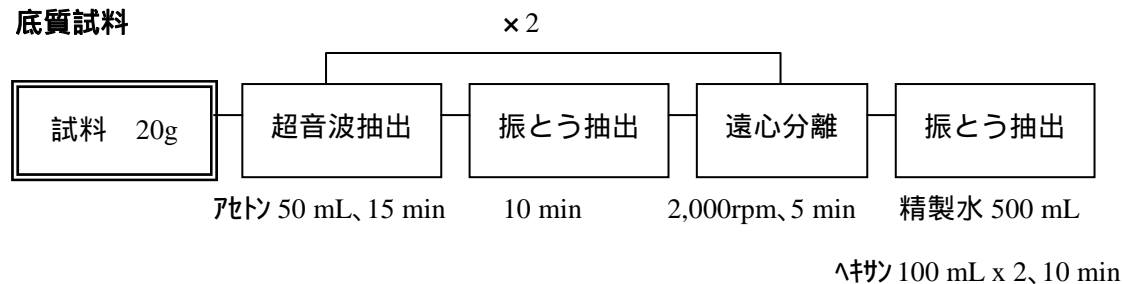
- 4) 兵庫県立公害研究所:2,6-ジ-*t*-ブチルフェノール ,2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール ,
2,4,6-トリ-*t*-ブチルフェノール , 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-エチルフェノール , pp63-75 ,「化学
物質と環境 平成 12 年度化学物質分析法開発調査報告書(その 1)」,環境省環境保健部
環境安全課 (平成 13 年 8 月)
- 5) 兵庫県立公害研究所:2,6-ジ-*t*-ブチルフェノール ,2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール ,
2,4,6-トリ-*t*-ブチルフェノール , 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-エチルフェノール , pp69-82 ,「化学
物質と環境 平成 13 年度化学物質分析法開発調査報告書(その 1)」,環境省環境保健部
環境安全課 (平成 14 年 10 月)

分析法フローチャート

水質試料

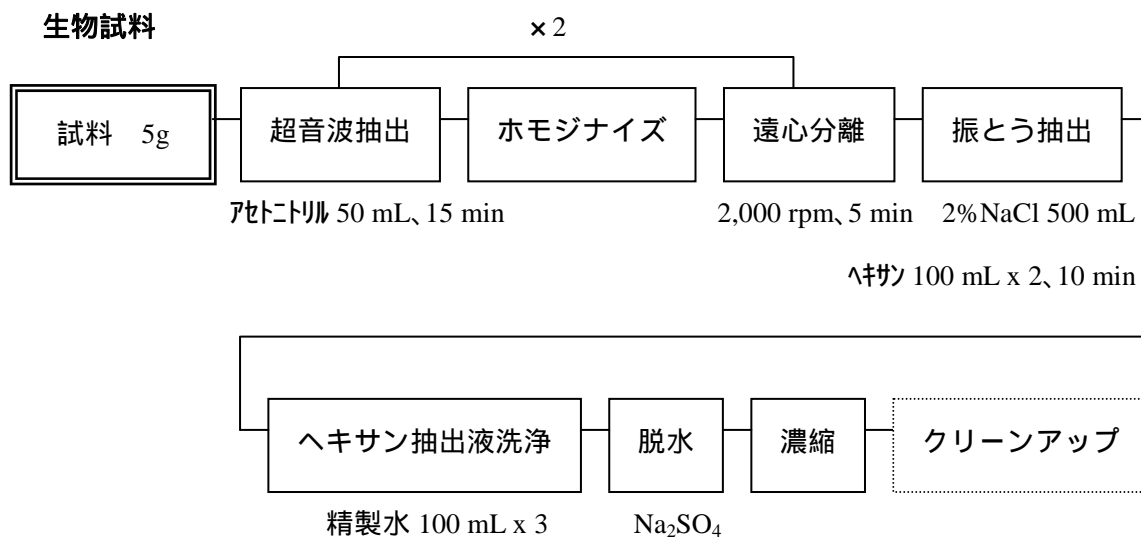


底質試料



以下、脱水、ロータリーエバポレーター濃縮後、水質試料の*に続く。

生物試料



以下、濃縮後、水質試料の*に続く。

．テトラブロモビスフェノールAの分析法

1 対象物質

テトラブロモビスフェノール A

2 目標検出下限値及び定量下限値

本分析法の目標検出下限値及び目標定量下限値を表 1 に示す。

表 1 対象物質の検出下限値

物質名	水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)		生物 (µg/kg)	
	目標検出 下限値	目標定量 下限値	目標検出 下限値	目標定量 下限値	目標検出 下限値	目標定量 下限値
テトラブロモビスフェノール A	0.01	0.03	1	3	1	3

3 分析法の概要

水質試料は pH を 3.5 前後に調整後、固液抽出を、底質及び生物試料は、メタノールで抽出し、メタノール/ヘキサン分配後、固相抽出をし、酢酸エチルで溶出する。脱水後、濃縮乾固したものをジエチル硫酸で誘導体化する。KOH/エタノールでアルカリ分解後、ヘキサンで抽出する。フロリジルカートリッジでクリーンアップを行い、得られた溶液を GC/MS で定量する（注 1、注 2）。

4 試薬・器具及び装置

(1) 試薬

- ・ヘキサン、アセトン、メタノール、ジクロロメタン、ジエチルエーテル：残留農薬分析用またはこれと同等以上のもの（注 3）
- ・無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留農薬分析用またはこれと同等以上のもの（注 4）
- ・標準品：市販品（注 5）
- ・サロゲート：テトラブロモビスフェノール A-¹³C₁₂（注 6）
- ・内標準：クリセン-d₁₂（注 7）
- ・標準原液：標準物質 100 mg を各々別の 100 mL メスフラスコに精秤し、ヘキサン又は

アセトンを加えて正確に 100 mL とし、これを 1,000 µg/mL の標準原液とする。各標準原液 10 mL を 500 mL メスフラスコに正確にとり、ヘキサンで 500 mL とし、これを標準混合原液とする。標準混合原液は 1 mL 中に各標準物質 20 µg を含む（注 8）。

- ・内標準溶液：各内標準 100 mg を各々別の 100 mL メスフラスコに精秤し、アセトンを加えて正確に 100 mL とし、これを 1,000 µg/mL の内標準原液とする。各内標準原液 10 mL を 100 mL メスフラスコに正確にとり、アセトンで 100 mL とし、これを内標準溶液とする。内標準溶液は 1 mL 中に各内標準 100 µg を含む。
- ・還元銅：有機元素分析用還元銅またはこれと同等以上のもので 60～80 メッシュ程度のもので、窒素ガス中で保存し、使用直前に使用する溶媒で洗浄する。
- ・固相カートリッジ：ポリマーゲル、またはこれと同等の性能を有する基材を充填または成型したもの（注 9）、使用前にアセトン及び水各 5 mL でコンディショニングする。
- ・フロリジルカートリッジ：市販のシリカカートリッジ（注 10）、使用前にヘキサン 10 mL 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（注 11）。

（2）器具及び装置

- ・試料採取容器：水質試料用は、ガラス製共栓付き褐色ガラス瓶（容量 1 L）又は、四フッ化エチレン樹脂張りシリコーンゴム栓付きスクリュウキャップ用ネジ口褐色ガラス瓶（容量 1 L）又はこれと同等以上のもの。底質試料用はガラス製共栓付き褐色広口ガラス瓶（容量 100～300 mL）又は、四フッ化エチレン樹脂張りシリコーンゴム栓付きスクリュウキャップ用ネジ口褐色広口ガラス瓶（容量 100～300 mL）又はこれと同等以上のもの。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。キャップを強くしめ、汚染のない場所に保管する。
- ・ガラス器具：洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。さらに、アセトン及びヘキサンで洗浄し、乾燥する。
- ・試験管ミキサー
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー、超高速万能ホモジナイザー、攪拌分散器、又は同等品
- ・GC/MS：キャピラリーカラムの取付可能な GC 付き四重極型、二重収束型又はこれらと同等以上の性能を有する MS。

5 試料の採取・運搬

(1) 水質試料

試料採取容器を採取試料で数回共洗いしてから、試料を泡立たないように静かに採取容器に満たし、直ちにキャップをする。このとき、瓶内に空気層を残さないよう注意する。試料は遮光して運搬する。試験操作は試料採取後直ちに行う。

(2) 底質試料

試料を採取容器に 8 割程度採り、キャップをする。試料は遮光して運搬する。試験操作は試料採取後直ちに行う。直ちに行えない場合は、汚染のない冷暗所で凍結保存する。

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順などの詳細は、本マニュアルの「[試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項](#)」に従う。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

試料 1 L にサロゲート (注 12) を添加して混合し、1 M 塩酸で pH3.5 前後に調整後、固相カートリッジを 2 個連結したものに 10 mL/分で通水する。固相カートリッジを水 10 mL で洗浄し、アスピレーターで吸引後、酢酸エチル 6 mL で溶出する。溶出液に窒素ガスを吹き付け、水層の上にわずかに酢酸エチル層が残る程度まで濃縮する。ヘキサン 5 mL を加え、栓をして振り混ぜる。この溶液及び洗液を、無水硫酸ナトリウム約 7 g を入れたポート (軽く綿栓をしたもの) に移し入れる。得られたる液を前処理液とする (注 13)。

(イ) 底質試料

試料 20 g を 100 mL 遠沈管に入れ、サロゲートを添加後、メタノール 50 mL を加え 10 分間振とう抽出する。3,000 rpm で遠心分離 (10 分間) を行い、メタノール抽出液を分取する。抽出操作は 3 回繰り返して行う。抽出液をあわせ、300 mL 分液ポートに入れ、メタノール飽和ヘキサン 50 mL を加えて振とうする。メタノール層をロータリーエバポレーターを用いて 50 mL まで濃縮し、水 500 mL を加える。1 M 塩酸で pH 3.5 前後に調整後、固相カートリッジを 2 個連結したものに 10 mL/分で通水し、以下水質試料と同じ操作を行う (注

14) なお、無水硫酸ナトリウムで脱水後、必要に応じて還元銅で硫黄分を除く。

(ウ) 生物試料

試料 20 g を 100 mL 遠沈管に入れ、メタノール 50 mL を加えホモジナイザーで抽出する。3,000 rpm で遠心分離 (10 分間) を行い、メタノール抽出液を分取する。抽出操作は 2 回繰り返して行う。以下底質試料と同じ操作を行う。

(2) 測定用試料液の調製

前処理液に窒素を吹き付けて乾固する。乾固した試料に 1M-KOH/エタノール溶液 0.5 mL とジエチル硫酸 0.2 mL を加え、栓をして軽く振り、室温で 30 分間放置する。反応終了後、1M-KOH/エタノール溶液を 5 mL の標線まで加え、栓をして 70 °C の湯浴に入れ 1 時間放置する。水を 8 mL の標線まで加えて栓をして激しく振とうする。これにヘキサンを 1 mL 加え、ヘキサン層に内標準溶液 10 µL を添加した後、栓をして激しく振とうし、静置する。ヘキサン層をパスツールピペットでとり、無水硫酸ナトリウムで脱水する。得られたヘキサン溶液に窒素を吹き付けて乾固し、4% エーテル/ヘキサン 1 mL を加える。この溶液をフロリジルカートリッジに負荷し、4% エーテル/ヘキサン 8 mL で溶出する。溶出液に窒素を吹き付けて 1 mL に濃縮し測定用試料液とする (注 15)。

(3) 空試料液の調製

試料と同量の水を用いて、「試験操作」に従って試料と同様の処理をして得た試料液を空試料液とする (注 16)。

(4) 添加回収試験液の調整

水質試料では任意の試料水 1 L、底質試料及び生物試料では任意の試料 20 g に検出下限の 10 倍量の混合標準液を添加し、充分混合する。60 分以上放置した後、「(1) 前処理液の調製」及び「(2) 測定用試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

標準混合原液を順次ヘキサンの希釈し、0.005 ~ 0.5 µg/mL 程度の濃度の標準溶液を作製

する（注 17）。

（6）測定

（ア）GC/MS 条件の例（注 18、注 19）

（a）GC

- ・ カラム：5%フェニルメチルシリコン化学結合型（内径 0.2～0.75 mm、長さ 15～30 m、膜厚 0.1～3.0 μm 程度）カラムまたは同等以上の分離性能をもつもの（注 20）
- ・ カラム温度：60（1分） 20 /分 220 10 /分 300（6分）
- ・ 注入口温度：250
- ・ キャリアガス：ヘリウム（線速度 40 cm/秒）
- ・ 注入法：スプリットレス（1分後パージ開始）

（b）MS

- ・ イオン化法：EI
- ・ イオン化エネルギー：70 eV
- ・ イオン化電流：300 μA
- ・ イオン源温度：280

（c）定量イオンの例（注 21、注 22）

- ・ テトラプロモビスフェノール A（エチル化体）：529（557）
- ・ テトラプロモビスフェノール A-¹³C₁₂（エチル化体）：541
- ・ クリセン-d₁₂：240

（ ）のイオンは確認用に用いる。

（イ）検量線

各標準液 1 mL に内標準を添加し、その一部を GC/MS に注入する（注 23）。内標準と対象物質の面積比を求め、検量線を作製する（注 24）。

（ウ）試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収用試験液の一部を GC/MS に注入する。内標準と対象物質の各測定イオンの面積を求める。一定時間毎に検量線用の中間濃度の試料液を注入し、期待値の 20%以内の変動であることを確認する。もし 20%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。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

対象物質、サロゲート及び内標準について、定量イオン及び確認イオンが、検量線作成に用いた標準物質などの保持時間の ± 5 秒以内に出現し(注25)、定量イオンと確認イオンの強度比が検量線作成に用いた標準物質などにおける強度比の $\pm 20\%$ 以下であれば、対象物質などが存在しているを見なす。

(2) 定量及び計算

測定用試料液及び空試料液について内標準と対象物質の面積比を求め、対象物質の濃度を内標準法で求める。次式で試料中の各対象物質濃度を計算する(注26)。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$\text{水質：濃度}(\mu\text{g/L}) = (\text{検出量}(\text{ng}) - \text{空試料液の検出量}(\text{ng})) \times \text{測定用試料液量}(\text{mL}) / \text{注入量}(\mu\text{L}) / \text{試料量}(\text{L})$$

$$\text{底質：濃度}(\mu\text{g/kg}) = (\text{検出量}(\text{ng}) - \text{空試料液の検出量}(\text{ng})) \times \text{測定用試料液量}(\text{mL}) / \text{注入量}(\mu\text{L}) / \text{試料量}(\text{g}) \times 1,000$$

$$\text{生物：濃度}(\mu\text{g/kg}) = (\text{検出量}(\text{ng}) - \text{空試料液の検出量}(\text{ng})) \times \text{測定用試料液量}(\text{mL}) / \text{注入量}(\mu\text{L}) / \text{試料量}(\text{g}) \times 1,000$$

8 注意事項

(注1) 全操作を通じて、良好な回収結果が得られることをあらかじめ確認すること。
GC/MS 測定において、十分な感度が得られれば SIM 測定の代わりにスキャン測定でもよい。

(注2) 対象物質の安定同位体が入手可能であればサロゲートとして用いることが望ましい。対象物質と類似構造をもつ物質の安定同位体など適当な物質をサロゲートとして用いても良い。サロゲートは試験操作において試料に添加する。サロゲートは、原則として全操作を通しての回収率を確認するために用いる。

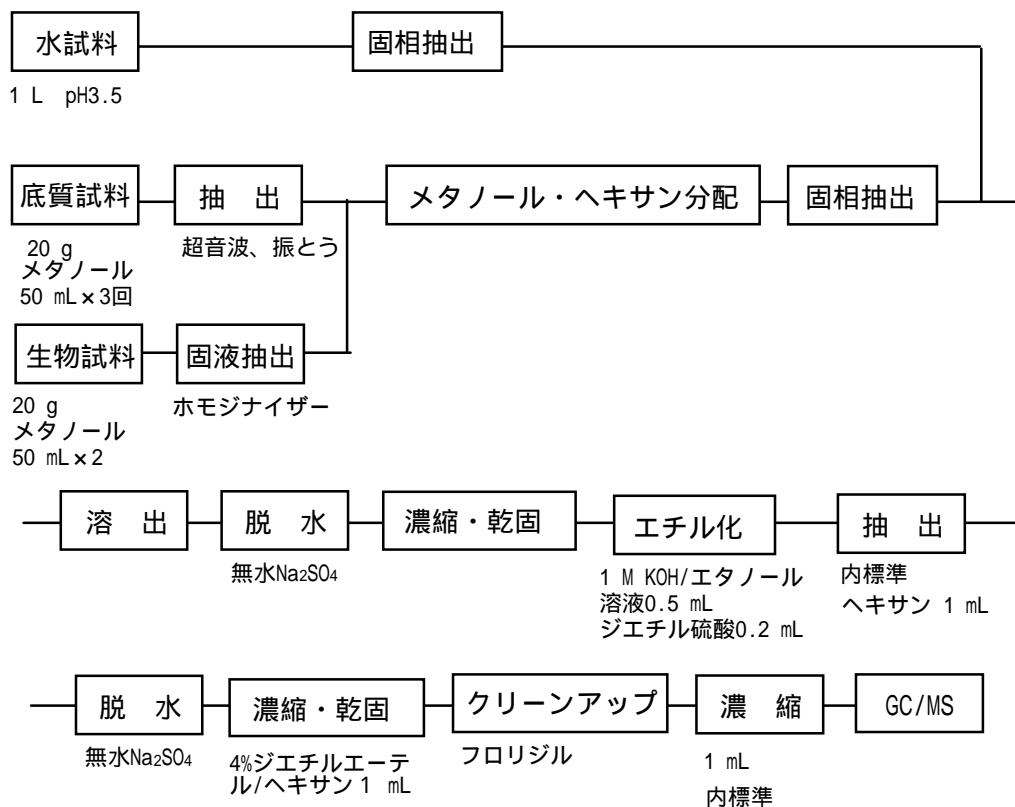
- (注 3) 使用前に空試験を行い、使用の適否を確認すること。
- (注 4) 妨害が認められる場合は、500～700 で 8 時間程度加熱後、汚染のない場所で冷却して用いる。
- (注 5) 純度を確認してから使用すること。
- (注 6) 他に適当な物質があれば内標準として用いてもよい。
- (注 7) 他に適当な物質があれば内標準として用いてもよい。
- (注 8) 長期の保存はさける。保存した標準原液は、純度を確認してから使用する。
- (注 9) 例えば Sep-Pak Plus PS-2 など (備考 1)、ディスク型などを用いてもよい。
- (注 10) 例えば Sep-Pak Plus フロリジルなど。大容量のもの (例えばメガボンドエリート FL 等) を用いてもよい (備考 1)。
- (注 11) 蒸留水や逆浸透膜により精製した水などを用いる。必要に応じてヘキサンや使用する溶媒などで洗浄する。いずれも使用前に空試験を行い、使用の適否を確認すること。
- (注 12) サロゲートの添加量は対象物質濃度や試験操作条件などに応じて適切な量とする。
- (注 13) 固相抽出に代えて液液抽出を用いてもよい。この場合は、水質試料 1 L を 2 L 分液ロートに取り、海水試料以外については塩化ナトリウム 50 g を加えて充分混合し溶解させる。ジクロロメタン 100 mL を加えて 5 分間振とう抽出し、静置してジクロロメタン層を分取する。再び水層にジクロロメタン 50 mL を加えて、同様な抽出操作を繰り返す。ジクロロメタン層を合わせ、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 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 5 mL まで濃縮する。ロータリーエバポレーターを用いて濃縮する場合、湯浴温度は 30 以下とする。
- (注 14) 固相抽出に代えて液液抽出を用いてもよい。この場合は、抽出液を 300 mL 分液ロートに入れ、メタノール飽和ヘキサン 50 mL を加えて振とう後、メタノール層をあらかじめ 5% 塩化ナトリウム水溶液 500 mL を入れた 1 L 分液ロートに入れ、ジクロロメタン 50 mL で 2 回抽出する。ジクロロメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、KD 濃縮装置またはロータリーエバポレーターを用いて濃縮する。

- (注 15) トリメチルシリル化しても良い。この場合は、固相抽出後、溶出液に窒素ガスを吹き付け 1 mL まで濃縮し試料前処理液とする。試料前処理液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、内標準溶液 10 μ L を加える。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、室温で 1 時間放置し誘導体化したものを測定用試料液とする。m/z 673 (定量用)、675 (確認用) 等をモニターイオンとして用いる。
- (注 16) 空試験値については可能な限り低減化を図る。
- (注 17) 試料中の対象物質濃度や試験操作条件に応じて適切な濃度範囲とする。
- (注 18) 共存する他の物質の影響を受けないよう GC 条件を十分検討する。また、試料注入部やカラムなどに対象物質が吸着することがあるので、材質や汚れなどに注意する。
- (注 19) 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 程度で一夜程度ページしてから使用する。
- (注 20) 例えば HP-5 など (備考 1)。
- (注 21) ここに示す測定イオン例を参考にして、最適な定量用イオンを選定する。定量用イオンと異なる質量数のイオンを対象物質の確認用イオンとする。
- (注 22) 定量に用いる内標準は、原則として対象化合物の保持時間に最も近いものを用いる。
- (注 23) GC/MS への注入量は装置に応じて適切な量とする。
- (注 24) サロゲートを用いた場合は、内標準のかわりにサロゲートを用いて定量を行い、内標準をサロゲートの回収率の確認に用いてもよい。
- (注 25) 測定用試料中に夾雑物が多い場合には、保持時間が変わることがあるので注意する。
- (注 26) 空試料における検出値が空試験に用いた水に由来する場合は、空試料の検出量は差し引かない。
- (備考 1) ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、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。

参考文献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課：フェノール類の分析法，p.III-1，「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 10 月）
- 2) 新潟県保健環境化学研究所：テトラプロモビスフェノール A，pp98-109，「平成 11 年度化学物質分析法開発調査報告書（その 1）」，環境庁環境保健部環境安全課（平成 12 年 8 月）
- 3) 茨木 剛，家合浩明，田辺顕子，川田邦明：環境試料中のテトラプロモビスフェノール A の分析，環境化学，12, 585-592（2002）

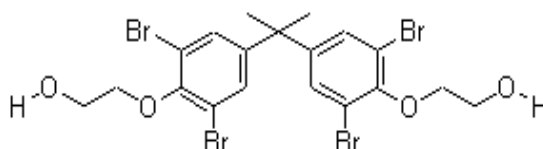
分析法フローチャート



．ビス〔ヒドロキシエトキシジブロモフェニル〕プロパン（TBA-EO） の分析法

1 対象物質

水質、底質、生物試料中の 2,2-ビス〔4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3,5-ジブロモフェニル〕プロパン（TBA-EO）の分析に適用する。本物質の用途は難燃剤であり、別名イソプロピリデンビス〔ジブロモフェニレンオキシ〕ジエタノールあるいはテトラブロモビスフェノール A ビス(2-ヒドロキシエチル)エーテル等と記されることもある。分子量 631.98、構造式は $C_{19}H_{20}O_4Br_4$ 、CAS No.は 4162-45-2 である。



2 目標検出下限値及び定量下限値

本法が目標とする検出下限値および定量下限値は次のとおりである。

	試料量	検出下限	定量下限
水質試料	1 L	0.02 µg/L	0.06 µg/L
底質試料	30 g	2 µg/kg(wet)	6 µg/kg(wet)
生物試料	20 g	6 µg/kg(wet)	20 µg/kg(wet)

3 分析法の概要

水質試料については、カートリッジカラムにより固相吸着後ジクロロメタンで溶出し、フロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ後、トリメチルシリル(TMS)誘導体化し、GC/MS-SIM によって定量する。底質についてはメタノールで抽出した後、ジクロロメタンに転溶し、水質と同様にクリーンアップ、誘導体化後定量する。生物試料はアルカリ分解を行った後、ジクロロメタンで抽出し、水質と同様にクリーンアップ、誘導体化後定量する（注 1、注 2）。

4 試薬、器具及び装置

（1）試薬

- ・標準物質：2,2-ビス [4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3,5-ジブロモフェニル] プロパン (TBA-EO)
- ・内標準物質：ペリレン-d₁₂
- ・ジクロロメタン、メタノール、エタノール、アセトン：残留農薬試験用
- ・ポリエチレングリコール 400：試薬特級、1%アセトン溶液を調製して用いる。
- ・*N,N*-ジメチルホルムアミド：シリル化用 (注 3)
- ・*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)：(注 3)
- ・無水硫酸ナトリウム：PCB フタル酸エステル分析用
- ・塩化ナトリウム：残留農薬分析用
- ・水酸化カリウム：試薬特級
- ・フロリジル：130 で 1 夜 (16 時間) 活性化したものをデシケータ中で 30 分間放冷して用いる。
- ・精製水：イオン交換水を全ガラス製蒸留器で蒸留したもの。
- ・固相吸着カートリッジ：ポリスチレンタイプ (注 4)

(2) 器具及び装置

- ・フロリジルカラム：内径 10 mm × 長さ 30 cm のガラスカラムにフロリジル 3 g をジクロロメタンで湿式充てんしたもの。
- ・ガラス器具：分液ロート、遠心分離管、カラム管、その他のガラス器具は使用前にアセトンで洗浄した後、乾燥して用いる。

5 試料の採取・運搬

試料の採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「[試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項](#)」に従う。前処理操作は試料採取後速やかに行う。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

固相吸着カートリッジ(注 4)をジクロロメタン 10 mL、メタノール 10 mL、精製水 20 mL の順でコンディショニングした後、毎分 20 mL 以下の流速で試料水 1 L を通水する。水を

十分切った後、ジクロロメタン 5 mL で TBA-EO を溶出させ、無水硫酸ナトリウムで脱水、ロータリーエバポレータで濃縮し、試料処理液とする。

(イ) 底質試料

試料 30 g 程度 (湿重量) を 300 mL の栓付ガラス製遠心分離管に正確にはかり取り、メタノール 100 mL を加え密栓して 1 時間振とう抽出する。2,500 rpm で 20 分間遠心分離を行った後、1 L の分液ロートに分取する。この分液ロートにはあらかじめ塩化ナトリウム 25 g、精製水 600 mL を入れておく。遠心分離の残さにはメタノール 50 mL を加えて 20 分間振とうして遠心分離を行い、メタノール抽出液を先の分液ロートに併せる。メタノール抽出液を入れた分液ロートにジクロロメタン 100 mL を加えて 5 分間振とうし、TBA-EO をジクロロメタン層に転溶させる。静置後ジクロロメタン層を分取、水層にジクロロメタン 50 mL を加えて振とうを繰り返し、抽出液を併せる。ジクロロメタン層を脱水し、ロータリーエバポレータで 5 mL 以下まで濃縮を行い、これを試料処理液とする。

(ウ) 生物試料

細切し均一化した湿組織 20 g をナスフラスコにとり、0.5N-水酸化カリウム・エタノール 100 mL を加えて冷却管を付け、組織が分解するまで湯浴で 1、2 時間還流を行う。還流後、50 程度に冷えたら石英ウールでろ過し、残さはエタノールで洗浄する。ろ液をあらかじめ塩化ナトリウム 25 g、精製水 600 mL を入れた 1 L の分液ロートに受け、ジクロロメタン 100 mL を加えて 5 分間振とうし、TBA-EO をジクロロメタン層に転溶させる。静置後ジクロロメタン層を分取、水層にジクロロメタン 50 mL を加えて振とうを繰り返し、抽出液をあわせる。ジクロロメタン層を脱水し、ロータリーエバポレータで 5 mL 以下まで濃縮を行い、これを試料処理液とする。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

濃縮器の試料処理液をあらかじめ用意したフロリジルカラムクロマト管に静かに入れる。試料処理液の入っていた試験管は約 1 mL のジクロロメタンで 2 回洗い、洗液をカラムクロマト管に加える。下方のコックを調節して、液面をカラムベッドまで流下させる。液面が下がった後、カラムのガラス壁をジクロロメタン約 1 mL で洗い、液面をカラムベ

ッドまで下げる。この操作を 2 回繰り返す、最後にカラムの上 3~5 cm の高さにジクロロメタンを加え、カラム管上部に 50 mL のジクロロメタンの入った分液ロートを付し、1 秒 1 滴の流速で展開する。

ジクロロメタンが流出し終わると、続いてアセトン 2% を含有するジクロロメタン 80 mL を分液ロートに加え、1 秒 1 滴の流速で流下させる。この画分中に TBA-EO が流出しているので、ロータリーエバポレータ濃縮フラスコに受け、5 mL 以下まで濃縮する（注 5）。次に濃縮液を試験管に移し、窒素ガスを吹き付けてジクロロメタンを留去した後、*N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）200 μ L を加えて残渣を溶解し、さらに、*N,N*-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 を加えてよく混合し、50 に設定したアルミブロックに入れ、TBA-EO をトリメチルシリルエーテル誘導体（TMS）化する（注 6）。ついで窒素気流により、過剰の BSTFA と DMF を留去し、直ちに内標準であるペリレン- d_{12} 、0.1 μ g/mL ヘキサン溶液 1 mL を加えて TMS 化物を溶解させ、GC/MS-SIM 用試料液とする（注 7）。

（イ）底質試料

水質試料と同様にフロリジルカラムクリーンアップ、TMS 化処理を行い、試料液を得る。

（ウ）生物試料

水質試料と同様にフロリジルカラムクリーンアップ、TMS 化処理を行い、試料液を得る。

（3）空試験液の調製

試料と同じ量の精製水を用いて、前処理、試料液の調製の項と同様の操作を行って得られる液を空試験液とする。

（4）添加回収試験液の調整

任意の水質試料 1L、底質試料 30g 及び生物試料 20g に検出下限値の 5~10 倍になるようにメタノールで希釈調製した標準液を加え、十分に混合した後、前処理、試料液の調製の項と同様の操作を行って得られる液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

TBA-EO の 50 mg を正確にはかり、メタノールを加えて正確に 50 mL とし、標準原液を作成する (1,000 $\mu\text{g/mL}$)。この標準原液をメタノールで順次希釈して段階的に 0.02 ~ 1 $\mu\text{g/mL}$ の溶液を作成する。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例

(a) ガスクロマトグラフ部

- ・ 試料注入法：パルスドスプリットレス注入 (注 8)
- ・ カラム：メチルシリコン (注 9) を固定層液体とするキャピラリカラム、長さ 15 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm (注 10)
- ・ キャリアーガス：ヘリウム、1.2 mL/min
- ・ カラム温度：100 (1分保持) - 20 /min - 240 - 8 /min - 280 (7分保持)
- ・ 注入口温度：300

(b) 質量分析部

- ・ イオン化法：電子衝撃イオン化 (EI) 法、イオン化電圧 70 eV
- ・ イオン化電流：300 μA
- ・ イオン源温度：280

(c) 測定イオン

- ・ TBA-EO の TMS 化物：m/z 117 (親イオンは m/z 776)
- ・ ペリレン- d_{12} : m/z 264

(イ) 検量線

各標準液 1 mL に内標準を添加し、その一部を GC/MS に注入する。内標準と対象物質の面積比を求め、検量線を作成する。

(ウ) 試験液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収用試験液の一部を GC/MS に注入する。内標準と対象物質の各測定イオンの面積比を求める (注 11)。一定時間毎に検量線用の中間濃度の試料液を注入し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし 20%

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。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

TBA-EO の定量イオン m/z 117 のピークが検量線に用いた標準物質の保持時間の ± 10 秒以内に出現していれば TBA-EO が存在している可能性がある。その場合確認のため TMS 化物の親イオン m/z 776 の検出を試みる (注 12)。

(2) 定量及び計算

内標準物質と TBA-EO の面積比から、試料液中の TBA-EO の検出量を求める。次式により各試料中の TBA-EO 濃度を計算する。なお、底質試料については乾燥重量に換算する。

水質： 濃度($\mu\text{g/L}$) = 検出量(ng)/試料量(mL)

底質： 濃度($\mu\text{g/kg}$ 乾重量) = 検出量(ng)/(試料量(g 湿重量) \times (1 - 水分含量(%)/100))

生物： 濃度($\mu\text{g/kg}$ 湿重量) = 検出量(ng)/試料量(g)

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「 . 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具、装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

(注 1) TMS 誘導体化をしないでも GC の条件設定しだいでは検出が可能である。その場合、分離カラムに膜厚が $0.1 \mu\text{m}$ 、長さ 10 m 程度の無極性カラムを用い、測定フラグメントはベースピークの m/z 527、529、531 を用いる。

(注 2) 誘導体化せずに液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) でも定量可能である。この際のイオン化モードは ESI, Positive、酢酸アンモニウム添加、フラグメントは m/z 649.7 ($M+\text{NH}_4$) を用いる。

(注 3) Pierce 社製など (備考 1)。

(注 4) Waters 社製 Sep-Pak PS-2 など (備考 1)。

(注 5) 分画におけるジクロロメタン量はフロジリルのロットによって多少異なるので、あらかじめ溶出試験を行う必要がある。

- (注6) BSTFAによるTMS化は室温で放置するだけでよい。70℃以上に長時間維持すると分解する。BSTFAの留去はカラム及びGC/MS装置の保護のために行うが、50℃のアルミブロック中で窒素ガスを吹き付けることによって行う。実際の手順としては、DMFを加えて試料を溶解した後、BSTFAを加えた後よく混合し、続いてすぐに50℃でBSTFAの留去にうつる。
- (注7) 本物質は低濃度で急にピークの面積値が小さくなり、検量線の直線性が失われる場合がある。この現象に対してはGC注入液にポリエチレングリコール400の1%アセトン溶液を、20 µL程度添加することによって顕著に改善することができる。
- (注8) 通常のスプリットレスよりもパルスドスプリットレス方式の方が検量線の直線性がよい。
- (注9) 例えばSGE BP-1など(備考1)。
- (注10) ガスクロマトグラフィーの分離カラムは、膜厚が比較的薄く、長さも15 m程度の短いものを用いる。質量分析計のイオン源の真空度が十分保てないときは内径0.25 mm程度の固定層液体をコーティングしていないカラム2 mを分離カラムの後にフィッティングコネクタで連結して用いるとよい。
- (注11) 底質の分析において、強い妨害ピークが認められる場合はアルカリ分解を行うとよい。この場合、0.5N KOH-EtOHで60分環留したときの回収率は81%であった。
- (注12) 確認のための適切なフラグメントがないので、強度が2%程度と小さいが親イオンの検出を試みる。
- (備考1) ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして揚げたが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

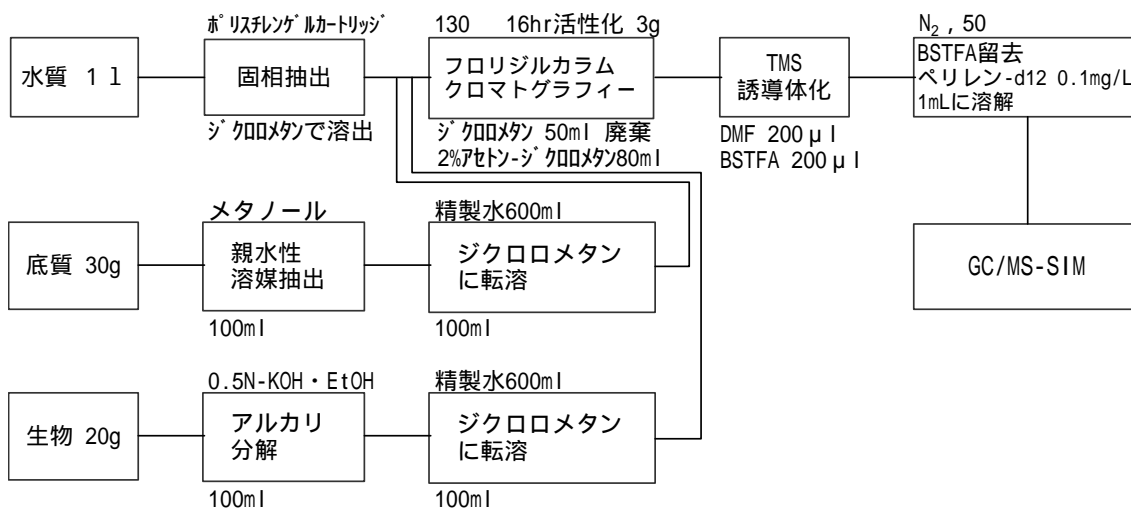
参考文献

- 1) 広島県環境センター：ビス[ヒドロキシエトキシジプロモフェニル]プロパン，pp129-133，「昭和59年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境省環境保健部保健調査室(昭

和 60 年 5 月)

- 2) 岡本拓, 白根義治: 水質及び底質中のビス[ヒドロキシエトキシジプロモフェニル]プロパンの分析法, 広島県環境センター研究報告, 7, 75-80(1985)

分析法フローチャート



．ベンゾチアゾールの分析法

1 対象物質

ベンゾチアゾール

表 1 対象物質（注 1）及びその物理化学的性質

物質名	分子式	分子量	沸点()
ベンゾチアゾール	C ₇ H ₅ NS	135.18	227 ~ 228

2 目標検出下限値及び定量下限値

本分析法の目標検出下限値及び目標定量下限値を表 2 に示す。

表 2 目標検出下限値及び目標定量下限値

物質名	水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)	
	目標検出下限値	目標定量下限値	目標検出下限値	目標定量下限値
ベンゾチアゾール	0.087	0.30	1.8	6.2

3 分析法の概要

水質試料は、ベンゾチアゾールを ODS カートリッジを用いた固相抽出、乾燥後、ジクロロメタンで溶出し、脱水後、GC/MS (SIM) で定量する。

底質試料は、水蒸気蒸留後、留出液について水質試料と同様の操作を行い、GC/MS (SIM) で定量する。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・ベンゾチアゾール標準品：市販標準品
- ・ジクロロメタン：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・メチルアルコール：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・アセトン：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・硫酸銅：試薬特級

- ・無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用を 500 で 4 時間加熱処理したもの。
- ・ナフタレン-d₈：市販標準品
- ・ODS カラム：被験物質の測定を妨害しないカートリッジ（注 2）を使用前にジクロロメタン 5 mL、メチルアルコール 5 mL、精製水 5 mL の順でコンディショニングを行っておく。
- ・精製水：（注 3）

（ 2 ） 器具及び装置

- ・バキュームポンプ
- ・水蒸気蒸留装置
- ・水蒸気蒸留フラスコ：500 mL
- ・ターボバップ
- ・濃縮管

（これらのガラス器具は、アセトンで十分洗浄し、乾燥後使用する。）

5 試料の採取・運搬

（ 1 ） 水質試料

洗剤、水、アセトンで洗浄したねじ口瓶を試料水で 2~3 回共洗いした後、試料水を泡立てないように採水し、満水にして密栓し、直ちに試験を行う。直ちに試験できないときは、冷暗所（ 4 ）に保存し、速やかに試験を行う。

（ 2 ） 底質試料

水質試料と同様の方法で洗浄した摺り合せの広口ガラス瓶に入れ密栓し、-20 以下で保存する。

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「 . 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。

6 試験操作

（ 1 ） 前処理

（ア）水質試料

試料 1 L を ODS カートリッジに 5 mL/min の流速で通水し、真空ポンプを用いて ODS カートリッジを 30 秒間乾燥後、ジクロロメタン 3 mL で溶出する。この溶出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ターボバップを用いて窒素を吹きつけ約 1 mL まで濃縮し(注 4) 試料前処理液とする。

(イ) 底質試料

試料 20 g を 500 mL 水蒸気蒸留フラスコに採取し、精製水約 100 mL 及び 20% 硫酸銅溶液 10 mL を加え、留出液が約 180 mL になるまで水蒸気蒸留を行う。留出液について「(ア) 水質試料」と同様の操作を行い、試料前処理液とする。

(2) 試料液の調製

各試料の前処理液に、内標準物質として 10 µg/mL ナフタレン-d₈ 溶液 5 µL を添加し、GC/MS (SIM) 測定用試料液とする。

(3) 空試験液の調製

水質及び底質については、試料と同じ量の精製水を用い、「(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」と同様に操作して得られたものを空試験液とする。

(4) 添加回収試験液の調製

任意の水質試料 1 L、底質試料 20 g に検出下限値の 5~10 倍になるようにアセトンで希釈調製した標準液を加え、十分に混合した後、「(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

ベンゾチアゾール 100 mg を精秤し、アセトンに溶解させて正確に 100 mL とし、1,000 µg/mL の標準原液とする。標準原液をアセトンで希釈し 1 µg/mL の標準溶液を調製する。内標準物質のナフタレン-d₈ も同様に 1,000 µg/mL を調製し、アセトンで希釈して 10 µg/mL の標準溶液を調製する。検量線作成用の標準系列は、各標準溶液を混合し、ジクロロメタンで適宜希釈して 0.05~0.5 µg/mL の範囲で調製する。これら標準系列中のナフタレン-d₈ 濃度は 0.05 µg/mL とする。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例

(a) ガスクロマトグラフ部

- ・ GC : (注5)
- ・ カラム : 液相 フェニルアリレンポリマー (5% フェニルメチルポリシロキサン相当)
(注6)、 0.25mm × 30m 膜厚 0.25 μm
- ・ カラム温度 : 50 - 10 /min - 280
- ・ 注入口温度 : 250
- ・ 注入量 : 2 μL
- ・ 注入方法 : スプリットレス (1 分間パージオフ)
- ・ キャリアーガス : He 1.2mL/ min

(b) 質量分析部

- ・ MS : (注7)
- ・ イオン化法 : EI
- ・ イオン化電流 : 300 μA
- ・ インターフェイス温度 : 280
- ・ イオン源温度 : 250

(c) 測定イオン

m/z	(定量用)	(確認用)
ベンゾチアゾール	135	108
内標準物質 (ナフタレン-d ₈)	136	

(イ) 検量線

標準液 2 μL を GC/MS に注入し、対象物質と内標準物質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、空試験液、測定用試料液及び添加回収試験液の各 2 μL 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。もし、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。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

GC/MS の測定結果から、定量用及び確認用モニターイオンのピークが予想保持時間の ± 5 秒以内に出現し、定量用と確認用モニターイオンのピーク強度比が予想値と ± 20% 以内で一致した場合、物質が存在しているを見なす。

(2) 定量及び計算

各対象物質と内標準物質のピーク面積比を求め、上記の検量線に照らして検出量を求める。次に、検出量と分析試料量から、次式により試料中の濃度を計算する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$\text{計算値} (\mu\text{g/L}, \mu\text{g/kg}) = \text{検出量} (\mu\text{g}) / \text{試料量} (\text{L}, \text{kg})$$

8 分析精度管理

本マニュアルの「 . 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

(注1) 自動車タイヤなどのゴム製品の加硫促進剤として使用されている。

(注2) ウォーターズ社製オアシス HLB が PS-2 またはこれらと同等以上の性能を有するもの。ウォーターズ社製オアシス HLB、PS-2、C8、C18 及び AC2 で検討したが、オアシス HLB と PS-2 で高い回収率が得られた (備考 1)。

(注3) Milli-Q SP 超純水装置 (ミリポア社製) による精製水と同等以上のもの (備考 1)。

(注4) ベンゾチアゾールは、比較的揮発しやすい物質であるため、濃縮段階での回収率の低下が起こりやすい。そのため、窒素気流を用いて、乾固しないよう穏やかに濃縮する。

(注5) ここでは、ヒューレット・パッカード社製 HP-6890 を用いた (備考 1)。

(注6) アジレント・テクノロジー社製 J&W Scientific DB-5MS など (備考 1)。

(注7) ここでは、ヒューレット・パッカード社製 HP-5973 を用いた(備考1)。

(備考1)ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして掲げたが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

10 参考

(1) 分析試料の送付方法

(ア) 試料の前処理を行わない場合

(a) 水質試料

アセトンで十分洗浄し、乾燥させたガラス瓶に、ヘッドスペースが残らないように試料を採取し、梱包して送付する。

(b) 底質試料

アセトンで十分洗浄し、乾燥させたガラス瓶に試料を入れ、ドライアイスで冷却した状態で、梱包して送付する。

(イ) 試料の前処理を行う場合

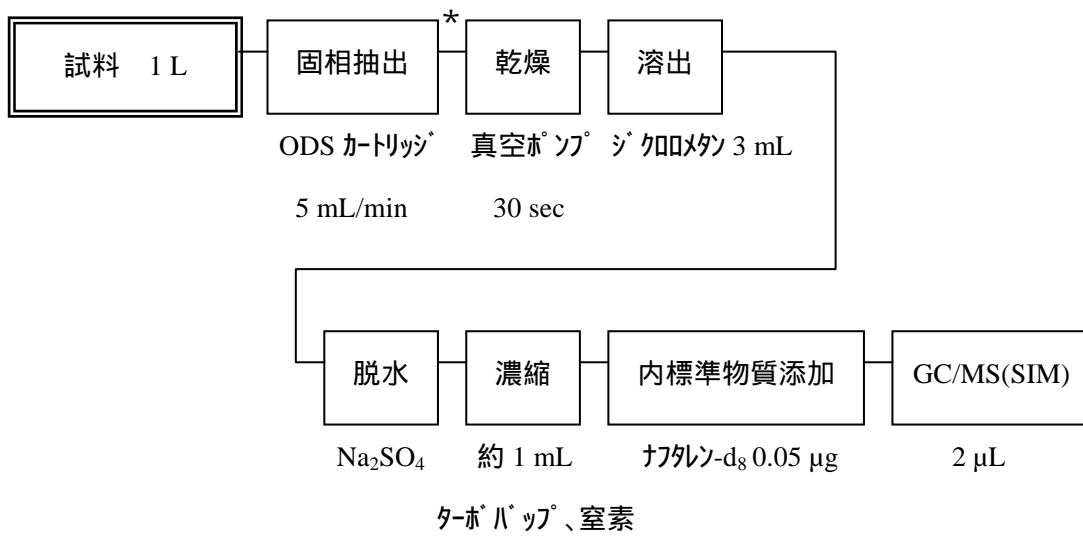
分析法に示した「6(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」の要領に従って得られた約 5 mL 程度のジクロロメタン溶液を、アンプルまたはバイアル瓶に密封して送付する。

参考文献

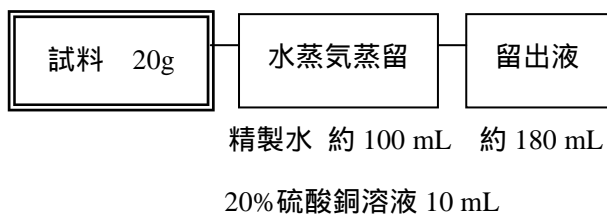
- 1) 北九州市環境衛生研究所：ベンゾチアゾール，pp258-262，「昭和 57 年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部保健調査室（昭和 58 年 5 月）

分析法フローチャート

水質試料



底質試料



以下、水質試料の*に続く。

・多環芳香族炭化水素（PAHs）の分析法

1 対象物質（注1）

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

2 目標検出下限値及び定量下限値（注2）

	水質（ $\mu\text{g/L}$ ）		底質（ $\mu\text{g/kg}$ ）		生物（ $\mu\text{g/kg}$ ）	
	1,000 mL		20 g		20 g	
目標検出・定量下限値	検出	定量	検出	定量	検出	定量
アントラセン	0.013	0.040	1.1	3.5	0.54	2.0
ベンゾ[a]アントラセン	0.023	0.075	5.0	15.0	0.80	2.5
ジベンゾ[a,h]アントラセン	0.023	0.078	1.0	3.0	0.78	2.5
フェナントレン	0.010	0.035	5.0	15.0	0.69	2.5
フルオランテン	0.010	0.035	5.0	15.0	0.50	2.0
ベンゾ[b]フルオランテン	0.018	0.030	4.8	15.0	0.22	0.8
ベンゾ[k]フルオランテン	0.018	0.030	4.8	15.0	0.22	0.8
ベンゾ[j]フルオランテン	0.018	0.030	4.8	15.0	0.22	0.8
ピレン	0.006	0.022	6.2	20.0	0.34	1.0
ベンゾ[a]ピレン	0.015	0.050	4.1	13.0	0.41	1.5
ベンゾ[e]ピレン	0.015	0.050	4.1	13.0	0.41	1.5
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	0.020	0.060	6.0	18.0	0.30	1.0
クリセン	0.020	0.060	6.0	18.0	0.30	1.0
ペリレン	0.020	0.060	6.0	18.0	0.30	1.0
ベンゾ[ghi]ペリレン	0.027	0.070	9.0	30.0	0.20	0.7

3 分析法の概要

水質試料はヘキサンで抽出後、シリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップし、GC/MS-SIM で定量する。底質試料はアセトンで抽出後、濃縮し、1N 水酸化ナトリウム/エタノール溶液で室温アルカリ分解を行った後、生物試料は試料を直接 1N 水酸化ナトリウム/エタノール溶液で室温アルカリ分解を行った後、5% 含水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、GC/MS-SIM で定量する。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・対象物質：市販標準品、または市販特級品・一級品
- ・サロゲート物質：アントラセン-d₁₀、ジベンゾ[*a,h*]アントラセン-d₁₄、フェナントレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀、ベンゾ[*k*]フルオランテン-d₁₂、ピレン-d₁₀、ベンゾ[*e*]ピレン-d₁₂、クリセン-d₁₂、ペリレン-d₁₂、ベンゾ[*ghi*]ペリレン-d₁₂ は市販標準品
- ・内部標準物質：*p*-ターフェニル-d₁₄ は市販標準品
- ・アセトン、ジクロロメタン、エタノール、メタノール、ヘキサン：残留農薬試験用。
- ・無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用。
- ・塩化ナトリウム：特級品の塩化ナトリウムを 300 で 8 時間強加熱（注 3）後、汚染のないところで放冷したもの。なお、試薬会社から残留農薬試験用が市販されている。
- ・水酸化カリウム：試薬特級品。
- ・1N KOH/エタノール：水酸化カリウム 56 g を精製水 50 mL でホットプレートまたはドライヤーで熱しながら溶解する。溶解後、直ちにエタノール 950 mL を加えたもの。冷暗所（4）に保存する。
- ・精製水：精製水をヘキサンで 2 回洗浄して用いる。なお、対象物質の分析に影響のないミネラルウォーターを用いても良い。
- ・石英ウール：ヘキサンで洗浄したもの。
- ・シリカゲルカートリッジカラム：シリカゲルを充填したもの（注 4）。
- ・5% 含水シリカゲル：透明摺り合わせ共栓付き三角フラスコにカラムクロマトグラフ用シリカゲルを入れ、130 で 16 時間加熱後、密栓して室温まで放冷する。このシリカゲルを攪拌しながら、シリカゲル 95 g に対して精製水 5 mL 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。

なお、試薬会社から 5% 含水フロリジルが市販されている。

- ・ 5% 含水シリカゲルカラム：内径 1 cm のガラスカラムに 5 g の 5% シリカゲルをヘキサンをういて湿式充填し、この上部に無水硫酸ナトリウムを 2 cm 積層したもの。

(2) 器具及び装置

- ・ 褐色ねじ口瓶：容量 500 ~ 1,000 mL で、ポリテトラフルオロエチレン張りのねじ口キャップをしたガラス瓶（注 5）。
- ・ マイクロシリンジ：容量 10 μ L、及び 50 μ L のもの。
- ・ パスツールピペット：容量 2 mL 強のもの。
- ・ 褐色透明摺り合わせまたは SPC 共栓付分液漏斗：容量 2 L、及び 300 mL のもの。
- ・ 褐色透明摺り合わせまたは SPC 共栓付遠沈管：容量 200 mL のもの。
- ・ 褐色透明摺り合わせまたは SPC 共栓付試験管：容量 10 mL、及び 20 mL のもの。
- ・ 褐色透明摺り合わせまたは SPC 共栓付ナス型フラスコ：容量 300 mL、及び 200 mL のもの。
- ・ 褐色透明摺り合わせまたは SPC 共栓付三角フラスコ：容量 300 mL、及び 200 mL、100 mL のもの。
- ・ 乾燥器：ガラス器具等の乾燥、及びシリカゲルの活性化に使用する。
- ・ 振とう器：底質試料からの抽出に用いる。
- ・ 超音波照射器（または超音波洗浄器）：底質試料からの抽出に用いる。
- ・ マグネチックスターラー及び磁気攪拌子（テフロン被膜）：室温アルカリ分解に用いる。
- ・ 遠心分離器：底質及び生物試料の固液分離に使用する。
- ・ 注射筒（10 mL）：シリカゲルカートリッジカラムを用いたクリーンアップに用いる。
- ・ 固相抽出装置：シリカゲルカートリッジカラムを用いたクリーンアップに用いる。
- ・ ロータリーエバポレーター濃縮装置：抽出液の濃縮に用いる。
- ・ 電気炉：塩化ナトリウムの焼成に使用する。
- ・ 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。

5 試料の採取・運搬

(1) 水質試料

水質試料については、洗剤、水、アセトンで洗浄したねじ口瓶を試料水で2~3回共洗った後、試料水を泡立てないように採水し、満水にして直ちに密栓し、直ちに試験を行う。直ちに試験できないときは、冷暗所(4)に保存し、速やかに試験する。

なお、残留塩素が含まれている場合は、採水時に残留塩素 1 mg に対してアスコルビン酸ナトリウムを 0.01 ないし 0.02 g の割合で加える。

(2) 底質試料及び生物試料

底質試料及び生物試料については、水質試料と同様の方法で洗浄した摺り合わせの広口ガラスビンに入れ密栓し、-20 以下で保存する。

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「 . 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。

6 試験操作

(1) 前処理液の調製(注2、注5)

(ア) 水質試料

試料水 1 L を褐色透明摺り合わせ分液漏斗 2 L に採取し、サロゲート混合標準液(10 µg/mL)を正確に 10 µL(注6)及び塩化ナトリウム 30 g(注7)を加え十分混合し、溶解する。試料容器をアセトンを用いて数回洗浄(アセトン総容量 50 mL 以下)し、更にヘキサン 100 mL を用いて試料容器を洗浄する(注8)。得られたアセトン及びヘキサンを分液漏斗内の試料水に合わせ、約 15 分間振とう抽出し、十分に静置してヘキサン層を褐色透明摺り合わせ三角フラスコ 300mL に採取する(注9)。水層に再度ヘキサン 100 mL を加え同様な振とう抽出を行い、ヘキサン層を先の褐色三角フラスコに合わせる。

このヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水(注10)した後、褐色透明摺り合わせナス型フラスコ 300 mL に移し、ロータリーエバポレーターを用いて、水浴を加熱せずに約 10 mL 弱まで減圧濃縮する(注11)。このヘキサン濃縮液を褐色透明摺り合わせ試験管 10 mL に移し、窒素ガスを吹き付けて 1 mL 弱(注12)にした濃縮液を前処理液とする。

(イ) 底質試料

試料 20 g を褐色透明摺り合わせ遠沈管 200 mL に採取し、サロゲート混合標準液 (10 µg/mL) を正確に 10 µL (注 13) 加え混合する。アセトン 50 mL を添加後、密栓して 10 分間振とうし (注 14) 更に 10 分間超音波抽出する。遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) を行い、上澄みのアセトン層を褐色透明摺り合わせナス型フラスコ 200 mL に移す。残渣に再度アセトン 50 mL を加え、同様の操作を行い、上澄みのアセトン層を先の褐色ナス型フラスコ 200 mL に合わせる。このアセトン抽出液をロータリーエバポレーターを用いて、水浴を加熱せずに約 20 mL 弱まで減圧濃縮し (注 15) この濃縮液に 1N KOH/エタノール溶液 50 mL を加え、室温で暗所 15 時間放置し、アルカリ分解する (注 16、注 17)。

このアルカリ分解液をエタノール/ヘキサン (1:1) 20 mL 及びヘキサン 50 mL を用いて褐色透明摺り合わせ分液漏斗 300 mL に移し、精製水 50 mL を加えた後、10 分間振とう抽出を行い、十二分に静置する。ヘキサン層を別の褐色透明摺り合わせ分液漏斗 300 mL に移し (注 18) 再度ヘキサン 50 mL 加え 10 分間振とう抽出を行い、得られたヘキサン層を先の別の褐色分液漏斗 300 mL に合わせ、精製水 50 mL を加えて緩やかに振とうして洗浄する (注 19)。ヘキサン層に再度精製水 25 mL を加えて緩やかに振とうして洗浄する (注 19)。

このヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、褐色透明摺り合わせナス型フラスコ 300 mL に移し、ロータリーエバポレーターを用いて、水浴を加熱せずに約 10 mL 弱まで減圧濃縮する (注 11)。このヘキサン濃縮液を褐色透明摺り合わせ試験管 10 mL に移し、窒素ガスを吹き付けて 1 mL 弱 (注 12) にした濃縮液を前処理液とする。

(ウ) 生物試料

試料 20 g を褐色透明摺り合わせ三角フラスコ 100 mL に採取し (注 20) サロゲート混合標準液 (10 µg/mL) を正確に 10 µL (注 13) 加え混合する。1N KOH/エタノール溶液 50 mL を加えた後、磁気攪拌子も入れ、マグネチックスターラーで攪拌しながら、室温で 15 時間アルカリ分解する (注 17、注 21)。その後、磁気攪拌子を取り出し、振とう機で 30 分以上激しく振とうさせる (注 17、注 22)。

このアルカリ分解液をエタノール/ヘキサン (1:1) 20 mL 及びヘキサン 50 mL を用いて褐色透明摺り合わせ分液漏斗 300 mL に移し、底質と同様な方法で抽出・洗浄・濃縮操作を行い前処理液を得る。

(2) 測定試料液の調製

(ア) 水質試料(注 23)

使用直前に 1%アセトン/ヘキサン 10 mL で洗浄したシリカゲルカートリッジカラム(注 24)の下に褐色透明摺り合わせ試験管 10 mL をセットした後、前処理液をカラムに負荷し(注 25)液面をカラムヘッドまで下げてから、ヘキサン 3 mL 用いて前処理液の入っていた試験管と注射筒の壁面を洗いながら、前処理液をカラムに負荷し、このヘキサン溶出液は捨てる。この後、ヘキサンが断続しないように 1%アセトン/ヘキサン 12 mL を用いて溶出させる。この溶出液に窒素ガスを吹き付けて 1 mL(注 12)に濃縮した後、内部標準液(10 µg/mL)を正確に 10 µL(注 6)加え、測定試料液とする(注 26)。

(イ) 底質及び生物試料

5%含水シリカゲルカラム(10×300 mm のカラムに 5 g の含水シリカゲ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 2 cm の高さに積層して調製)の下に受器をセットした後、前処理液をカラムに負荷し、1 mL 強/分の速度で液面をカラムヘッド面まで下げてから、少量のヘキサン約 2 mL を用いて前処理液の入っていた褐色透明摺り合わせ試験管とカラムの壁面を洗いながら、前処理液をカラムに負荷し、更にヘキサン 15 mL を同速度で流す。このヘキサン溶出液は捨てる。

再び、受器を褐色透明摺り合わせ三角フラスコ 200 mL に交換し、ヘキサンが断続しないように 1%アセトン/ヘキサン 100 mL を 1 mL 強/分の速度で対象物質を溶出させる(注 27)。この溶出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、褐色透明摺り合わせナス型フラスコ 300 mL に移し、ロータリーエバポレーターを用いて、水浴を加熱せずに約 10 mL 弱まで減圧濃縮する(注 11)。このヘキサン濃縮液を褐色透明摺り合わせ試験管 10 mL に移し、窒素ガスを吹き付けて 1 mL(注 12)にした後、内部標準液(10 µg/mL)を正確に 10 µL(注 13)加え、測定試料液とする(注 26)。

(3) 空試験液の調製

水質試料では精製水 1 L、底質試料では精製水 10 mL(注 28)、生物試料では精製水 20 mL を用いて、「(1) 前処理液の調製」及び「(2) 測定試料液の調製」の項に従った操作をして得た試料液を空試料液とする。

(4) 添加回収試験液の調製

水質試料では任意の試料水 500 mL、底質・生物試料では任意の試料 20 g に検出下限の 10 倍量の混合標準液を添加し、充分混合する。60 分以上放置した後、前処理の調製及び測定試料液の調製の項に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製 (注2)

各対象標準物質、各サロゲート物質及び内部標準物質(*p*-ターフェニル- d_{14})の各々 20 mg を正確に秤取り、少量のアセトン及びベンゼンに溶解した後、ヘキサンを加えて正確に 100 mL とし、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製する。

対象物質の混合標準液はヘキサンを用いて 0.005 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を 5 段階以上作成する。対象物質の混合標準液、サロゲート物質の混合標準液はアセトンを用いて、内部標準液はヘキサンを用いて、共に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して調製する。これらの標準原液及び標準液は暗所 -20 に保存する。

(6) 測定

(ア) GC/MS の測定条件

- ・カラム：溶融シリカキャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm)
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 (注 29): 50 (2 分) - 20 /分 - 120 - 7 /分 - 310 (10 分)
または 50 (2 分) - 7 /分 - 310 (10 分)
- ・注入口温度：300 (注 30)
- ・注入法：スプリットレス法 (1.5 分後パージ)、1 μL 注入 (注 31)
- ・キャリアーガス：He、平均線速度：40 cm / 秒
- ・インターフェース温度 (またはデテクター温度)：310 (注 32)
- ・イオン化法：EI
- ・イオン化電圧：70 eV
- ・イオン源温度：310 (注 32) (機種により 200 以下でも可能)
- ・検出モード：SIM

・モニターイオン

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

サロゲート物質

A. アントラセン-d ₁₀	M/Z 188
B. ジベンゾ[a,h]アントラセン-d ₁₄	M/Z 292
C. フェナントレン-d ₁₀	M/Z 188
D. フルオランテン-d ₁₀	M/Z 212
E. ベンゾ[k]フルオランテン-d ₁₂	M/Z 264
F. ピレン-d ₁₀	M/Z 212
G. ベンゾ[e]ピレン-d ₁₂	M/Z 264
H. クリセン-d ₁₂	M/Z 240
I. ペリレン-d ₁₂	M/Z 264
J. ベンゾ[ghi]ペリレン-d ₁₂	M/Z 288

内部標準物質

p-ターフェニル-d ₁₄	M/Z 244
--------------------------	---------

(今回、サロゲート物質が未市販でも、代替・類似物質をサロゲート物質として、サロゲート法で定量する。代替・類似物質もサロゲート物質が市販された段階でサロゲート物質に切り替える。)

(今回、内部標準物質は個々の試料のサロゲート物質の回収率を確認するために使用する。)

(イ) 検量線の作成 (注 33)

対象物質の混合標準液 (0.005 ~ 1.0 µg/mL、5 段階以上) 1 mL にサロゲート物質の混合標準液 (10 µg/mL) 10 µL 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。これを用いて、試料中の各対象物質を定量する。

また、ヘキサン 1 mL にサロゲート混合標準液 (10 µg/mL) を 2、4、6、8、10、12 µL を添加し、更に内部標準液 (10 µg/mL) 10 µL 加えた標準液 1 µL を GC/MS に注入し、サロゲート物質のピーク面積 (または高さ) と内部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。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定試料液及び添加回収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試料液を注入し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし、20% を越えていれば GC/MS を再調製後、検量線を作成し直して測定を行う。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

対象物質の定量イオン及び確認イオンのピーク及びサロゲート物質の定量イオンのピークが予想保持時間の ±5 秒以内に出現し、また定量イオンと確認イオンのピーク強度比が予想値の ±20% 以下であれば、対象物質が存在すると見なす。

(2) 定量及び計算

試料液 1 µL を GC/MS に注入し、各対象物質のピーク面積 (又は高さ) とサロゲート物質のピーク面積 (又は高さ) の比から検量線により検出量を求める。次に検出量、分析した試料量から、次式により試料中の濃度を計算する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$\text{水質試料濃度(mg/L)} = \text{検出量(mg)} \times (1 / \text{試料量(L)})$$

$$\text{底質・生物試料濃度(mg/kg)} = \text{検出量(mg)} \times (1 / \text{試料量(kg)})$$

(ここでの検出量とは試料液中に存在する対象物質の全量である。)

なお、サロゲート物質と内部標準物質とのピーク面積値（高さ）の比を求め、サロゲート回収確認用の検量線により、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。

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「 、分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

（注 1）多環芳香族炭化水素類(PAHs)には発癌性を有する化合物が多数存在するので、標準物質、標準液等の取り扱いを十分に注意する。

（注 2）使用するキャピラリーカラムの種類、膜厚、内径、長さにより、PAHs の検出下限値が異なる。また試料中の夾雑物及び使用機器により、検出下限値が異なる。

（注 3）高い温度（400～650 ）で焼成すると、塩化ナトリウム中の不純物から多環芳香族炭化水素類が生成されるので、なるべく低い温度で短時間で焼成することを推奨する。

残留農薬試験用の塩化ナトリウムは溶媒処理を施してあるので、PAHs を殆ど含有していないので、便利である。

（注 4）ウォーターズ社製のセップパックシリカゲル（690 mg）など（備考 1）。

（注 5）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 6）サロゲート混合標準液の添加量、測定試料液の濃縮量及び内部標準液の添加量は試料中の PAHs 濃度、GC/MS の感度等の状況に応じて適宜変更する。

（注 7）海水の場合には塩化ナトリウムを添加しない。空試験液にはヘキサンで洗浄した 3%塩化ナトリウム溶液を、使用する予定の分液ロートで用時作成すると良い。

（注 8）PAHs は一般に疎水性であるので、懸濁物質に吸着しやすい。試料容器等に残存した対象物質を溶出する目的で溶媒洗浄操作を行う。ヘキサンのみの洗浄では予

め容器内の水分を転倒等で除去後、ヘキサンで洗浄する。

- (注 9) 水相を用いた試料容器に移し、ヘキサン抽出液を採取すると便利である。
- (注 10) 無水硫酸ナトリウムを添加後、直ちに攪拌し、無水硫酸ナトリウムの固化を防止する。過剰の無水硫酸ナトリウムは空試験値を増大させるので、できるだけ少量(目安として、約 10 g)で脱水する。
- (注 11) ロータリエバポレータ濃縮の場合には濃縮液量を約 5 mL 以下にすると、キーパーの少ない試料水中の PAHs、特に低分子の PAHs は損失する。
- (注 12) 窒素ガス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試料水中の PAHs は損失する。
- (注 13) 底質及び生物中には高濃度の 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、内部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 14) 遠沈管中の残渣は振とう操作で完全に混合しないので、予めガラス棒等を用いて十分に攪拌し、分散させてから振とうする。
- (注 15) 20 mL 以下まで濃縮すると揮発性の PAHs は損失することがある。泡が立ち始め、不溶性物質が認められたら、概ね濃縮は完了している。
- (注 16) 放置中、時々軽く攪拌してフラスコ側面に付着した試料をアルカリ分解する。
夾雑物の少ない試料は 5 時間程度で分解する。
光分解防止の為に、フラスコをアルミホイル等で覆い遮光する。
- (注 17) 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 KOH/エタノールを付着させない。
- (注 18) 水とヘキサンの界面に不溶性物質が生ずるので、不溶性物質がヘキサン抽出液に混入しないように分液する。
アルカリ分解液が混入すると、次の操作で分解液に含まれる成分がヘキサン相に抽出されてくるので、分液に注意する。
- (注 19) ヘキサン抽出液に抽出された塩基性成分、グリセリド、エタノール等を除去する目的で行う。除去が不十分であると、次のカラムクロマトグラフィー操作の溶離パターンに影響することがある。その為、分液ロートを手で軽く振とうする。
- (注 20) 肉用ミンチ等を用いて細切りにして均質化した試料を用いる。細切化が不十分で

あると、アルカリ分解が不十分になる可能性がある。

(注 21) 1N KOH/エタノール溶液 50 mL 加えた時、試料が完全に浸漬され、容器の壁面に試料が付着しないように採取する。アルカリ分解時には試料が完全に混合するように磁気攪拌子の回転数を調節する。また光分解防止の為に、三角フラスコをアルミホイル等で覆い遮光する。

なお、脂肪量が多い場合には、1N KOH/エタノール溶液の添加量を 100 mL にすると共に、以後の分析操作で使用する抽出溶媒、洗浄用精製水等の使用量を 2 倍にする。

(注 22) 三角フラスコの壁面に付着した試料、沈殿、固着した試料を完全にアルカリ分解する目的で行う。

(注 23) 汚濁の少ない水質試料ではシリカゲルクリーンアップを省略できる。

(注 24) シリカゲルカートリッジカラムはロットにより、コンタミネーションや妨害物質の溶出、対象物質の溶離パターンが変化する場合があるので、予めコンタミネーション、妨害物質の有無、対象物質の溶離パターンを確認すること。

(注 25) パスツールピペットを用いると良い。

(注 26) GC/MS の機種、試料により、溶出液を窒素ガス吹き付けて 0.25mL に濃縮できる場合がある。この場合には、サロゲート混合標準液 2.5 μ L (μ g/mL) にし、内部標準液 2.5 μ L (μ g/mL) にする。これにより、定量下限値を 4 倍下げられる。

(注 27) 予め 5% 含水シリカゲルカラムクロマトにおける、PAHs の溶離パターンを確認すること。

(注 28) PAHs はキーパーがない空試験液では減圧濃縮すると損失する可能性があるため、底質試料の空試験液の調製は分析に使用したアセトン 100 mL を 10 mL まで減圧濃縮した後、精製水 10 mL を添加してアルカリ分解する。

(注 29) 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、URTA 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 で十二分にエージングを行っておく。

(注 30) 保持時間の遅い PAHs を測定しない場合には、即ち GC/MS クロマトグラム上にピークの認められる保持時間の温度近くまで、注入口温度を下げて良い。

(注 31) 高圧注入方式にすれば、注入量も増やせ、感度も上がる。但し、サロゲート混合標準液、内部標準液の添加量を変更する必要がある。

(注 32) PAHs の感度のバラツキを防ぐ為に、昇温条件の最高温度と同一温度、または最高温度に +5 に設定する。

保持時間の長い PAHs を測定しない場合には、インターフェース温度、イオン源温度を下げても良い。

(注 33) ベンゾ[b]フルオランテンとベンゾ[k]フルオランテンはクロマトグラム上で分離できない。またベンゾ[j]フルオランテンも前二物質とも完全に分離しない。通常三物質の面積値の合計を用いて定量する。

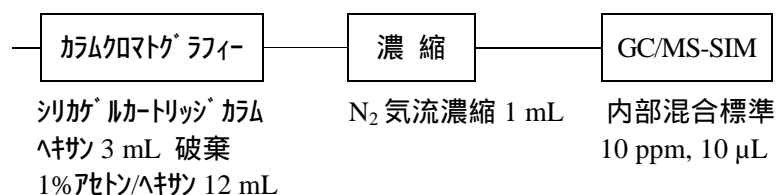
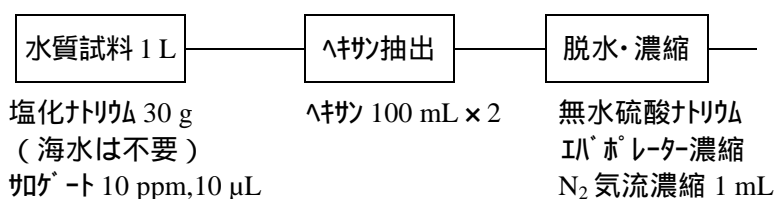
(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして掲げたが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

参考文献

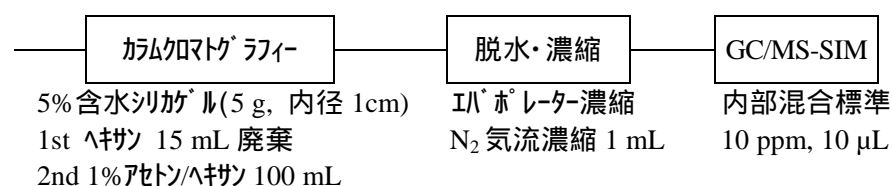
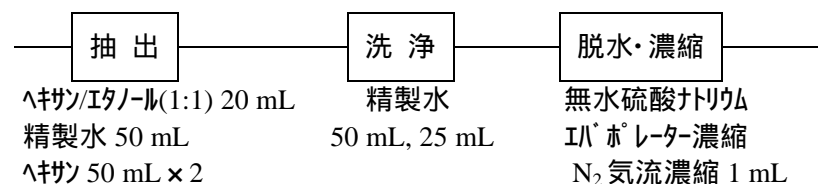
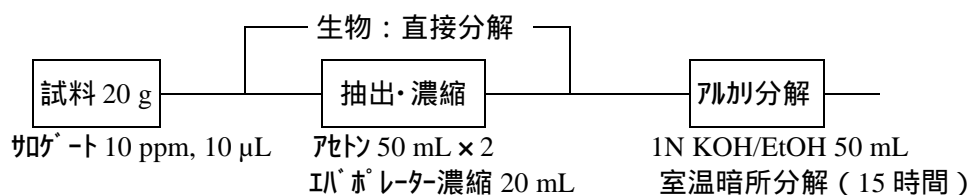
- 1) 岡山県環境保健センター：ベンゾチオフェン、ジベンゾチオフェン（多環芳香族炭化水素類（PAHs）の同時分析法）pp176-227，「平成 9 年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部環境安全課（平成 10 年 7 月）
- 2) 岡山県環境保健センター：多環芳香族炭化水素類（PAHs）の分析法，pp1-70，「平成 10 年度化学物質分析法開発調査報告書（その 2）」環境庁環境保健部環境安全課（平成 12 年 1 月）
- 3) 日本水道協会：多環芳香族炭化水素（PAHs），pp505-511，「上水試験方法」，東京（2001）

分析フローチャート

水質試料



底質及び生物試料



．農薬類の分析法

1 対象物質

本分析法の対象物質を表 1 に示す。

表 1 対象物質

項目番号	物質名	Cas.No.	水溶解度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Log Pow
32	イソフェンホス	25311-71-1	22.1	4.12
36	イプロジオン	36734-19-7	13.9	3.00
64	キャプタン	133-06-2	5.1	2.80
182	トルクロホスメチル	57018-04-9	1.1	4.56
186	ナプロパミド	15299-99-7	73	3.36
215	ブタクロール	23184-66-9	23	4.50
228	フルトラニル	66332-96-5	6.53	3.70
233	プロベナゾール	27605-76-1	150	1.40

2 目標検出下限及び定量下限

本分析法の目標検出下限値を表 2 に示す。目標定量下限値はその 3 倍である。

表 2 目標とする検出下限値

項目番号	物質名	水質 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	底質 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	生物 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
32	イソフェンホス	0.01	3	5
36	イプロジオン	0.05	15	30
64	キャプタン	0.03	10	20
182	トルクロホスメチル	0.01	3	5
186	ナプロパミド	0.02	5	10
215	ブタクロール	0.01	3	5
228	フルトラニル	0.01	3	5
233	プロベナゾール	0.05	15	30

3 分析法の概要

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

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

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

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

なお、濃度の算出は測定用内標準物質との相対検量線に基づく。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・標準物質：純度 97%以上の試薬であって測定の妨害となる成分を含有しないもの、または既知濃度に調製した標準液。純品は個別に必要量を精秤して、アセトンで 1,000 ~ 2,000 µg/mL の標準原液を調製する。
- ・内標準物質：フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀、*p*-ターフェニル-d₁₄ の重水素標識標準物質、または同様の用途に供することができる標準物質。これらは個別に必要量を精秤し、ヘキサンに溶解して 1,000 ~ 2,000 µg/mL の標準原液を調製する。
- ・試薬、溶媒類：無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどの試薬類、ヘキサン、アセトン、ジクロロメタン、メタノールなどの溶媒類は、原則として残留農薬試験用の純度を用い、あらかじめ測定を妨害する成分が無いことを確認する。
- ・精製水：超高純度水（蒸留水を超純水製造装置で精製したもの）であって、妨害成分を含まないもの。必要に応じて、ジクロロメタンで洗浄して用いる。
- ・窒素ガス：高純度窒素 1 級（純度 99.999%以上）を用い、配管に活性炭や水分吸収剤を装着する。
- ・固相抽出用カートリッジカラム：（注 1）
- ・5%含水シリカゲル：カラムクロマト用シリカゲル（注 2）を 130 で 15 時間加熱活性化した後、95 g を 300 mL の共栓（透明摺）付き三角フラスコにステンレス製ロートを用いて秤量し、密栓して室温まで冷却する。シリカゲルを攪拌しながら、5 mL のホールピペットを用いて精製水を滴下して含水させ、密栓して発熱が終了するまで静か

に混合する。更に、振とう器で 30 分間振とうした後、デシケータ（乾燥剤:シリカゲル）中に 15 時間以上保存したものを使用する。

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

（ 2 ）器具及び装置

- ・ガラス器具：試料瓶、分液ロート、共栓付試験管、クロマトグラフ管、濃縮フラスコ、遠沈管、メスシリンダー、メスフラスコ、ホールピペット、駒込ピペット、パストゥールピペットなど。使用に先立ち、精製水や有機溶媒で十分に洗浄する。
- ・振とう機。
- ・固相抽出装置：加圧型（注 4）。
- ・濃縮器：ロータリーエバポレーター（恒温槽付き）、窒素吹き付けによる濃縮装置（注 5）または同等の性能を有するもの。
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー、超高速万能ホモジナイザー、攪拌分散器または同等品（注 6）。
- ・超音波抽出器：超音波洗浄器または同等品。
- ・ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）
- ・マイクロシリンジ：内部標準液の添加あるいは GC/MS の注入に用いる。

5 試料の採取・運搬

（ 1 ）水質試料

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

(2) 底質試料

底質試料は、エクマンバージ型採泥器等によって表層泥(0~10 cm)を採取し、目視で
きる夾雑物を除いて、硬質ガラス瓶、ポリエチレン製袋または箱等に入れ、氷冷・遮光状
態で実験室へ持ち帰る。この試料は、孔径2 mm目の篩に通した後、20分間の遠心分離(3,000
rpm)で間隙水を除き、均質に混合したものを分析に供する。底質試料の保存は、調製試
料を-4℃で凍結させる。

(3) 生物試料

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

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「 。試料の
採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

固相抽出法(注1)

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

溶媒抽出法

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

(イ) 底質試料

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

(ウ) 生物試料

細切し均一化した湿組織 20 g にメタノール 50 mL を加え、10 分間ホモジナイザーで攪拌し対象物質を抽出する。攪拌後、3,000 rpm で 15 分間遠心分離して、メタノール抽出液を 1 L 容分液ロートに分取する。遠心分離の残渣にはメタノール 50 mL を加えて、同様の操作を行い、抽出液を併せる。

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

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

前処理液は測定用内標準混合溶液（フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀、*p*-ターフェニル-d₁₄の各標識物質を 10 µg/mL の濃度に調製したヘキサン溶液）を 20 µL（固相抽出法の場合は 10 µL）を添加し、窒素気流下で 1.0 mL に定容（固相抽出法の場合は 0.5 mL）して GC/MS 測定する。測定を妨害する物質が共存する場合は、前処理液を後述するフロリジルまたはシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、溶出液に測定用内標準溶液を添加して GC/MS 測定する。

(イ) 底質試料

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

(ウ) 生物試料

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

(3) 空試験液の調製

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

(4) 添加回収試験液の調製

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

(5) 標準液の調製

検量線作成用混合標準液、測定用内標準混合溶液を調製する。検量線作成用混合標準液は、その原液をヘキサンで希釈して 0 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で 5 段階以上個別に調製する。測定用内標準混合溶液は、フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀、*p*-ターフェニル-d₁₄ の各重水素標識標準物質を混合し、ヘキサンで希釈してそれぞれ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製する。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件

GC/MS 測定条件の一例を参考として示す。これを参考にして適宜設定する。

(a) ガスクロマトグラフ部

- ・ 試料注入部：スプリットレス、オンカラム、昇温気化方式などの非分割方式のもの。
- ・ キャピラリーカラム：5%フェニルメチルシリコン系、内径 0.2 ~ 0.3 mm、長さ 20 ~ 30 m、膜厚 0.2 ~ 0.3 μm
- ・ キャリヤーガス：純度 99.999% 以上の高純度ヘリウム、流速 1 mL/min、線速度 35 cm/sec。
- ・ カラム恒温槽：50 (1 min) (30 /min) 180 (5 /min) 280
- ・ 注入口温度：220

(b) 質量分析部

イオン化法：電子衝撃イオン化 (EI) 法、イオン化電圧 70 eV

イオン源温度：230

インタフェース温度：250

イオン検出法：選択イオンまたは全イオン検出

(c) 測定イオン

対象物質および内部標準物質の検出に設定する測定イオンを表 3 にまとめた。

表 3 5%フェニルメチルシリコン系 GC カラムの溶出順位と測定イオン

項目番号	物質名	質量数	モニタ - イオン m/z			参照内標準
			定量	確認		
IS-1	フェナンスレン-d ₁₀	188.14	188	-	-	-
182	トルクロホスメチル	301.13	265	267	125	IS-1
233	プロベナゾール	223.25	130	132	159	IS-2
IS-2	フルオランテン-d ₁₀	212.14	212	-	-	-
32	イソフェンホス	345.40	213	185	255	IS-2
64	キャプタン	300.59	79	107	149	IS-2
215	ブタクロール	311.86	176	160	146	IS-2
186	ナプロパミド	271.36	271	128	115	IS-3
228	フルトラニル	323.32	173	281	323	IS-3
IS-3	p-ターフェニル-d ₁₄	244.31	244	-	-	-
36	イプロジオン	330.17	314	187	316	IS-3

(イ) 検量線

(a) 標準液の測定

各濃度段階の検量線作成用混合標準液 (0 ~ 1.0 µg/mL の範囲で 5 段階以上) の 1.0 mL にそれぞれに測定用内標準混合溶液 (10 µg/mL) を 20 µL 添加する。この標準液系列は、各標準物質を 0 ~ 1.0 µg/mL、各測定用内標準物質を 0.2 µg/mL の濃度で含み、1 濃度段階の 1 または 2 µL の一定量を最低 3 回 GC/MS に注入し、全濃度域で計 15 点以上のデータを得る。

(b) ピーク面積 (または高さ) の強度比の確認

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

(c) 検量線の作成

表 3 の通り、各標準物質と対応する測定用内標準物質の濃度比と強度比の関係を XY プロットし、検量線を作成する。この時、各濃度段階における標準物質毎の強度比の変動が 5% 以内であることを確認する。

(ウ) 試料液の測定

実試料、空試験あるいは添加回収試験から得られた試料液に測定用内標準混合溶液(10 µg/mL)を20 µL 添加して1.0 mL に定容し、GC/MS 注入用の試料液とする。注入量は検量線作成用の混合標準液と同量であって1または2 µL である。検出されたクロマトグラム上のピークについて、同定確認の後、対応する測定用内部標準物質のピーク強度(面積または高さ)に対する対象物質のピーク強度の比から、検量線により定量する。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

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

(2) 定量

内標準物質と対象物質のピークの強度比から、検量線から濃度比を求め、次式により試料中の対象物質の濃度を算出する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

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

ここで、Ct：対象物質の試料中濃度(µg/L または µg/kg)、RFt：濃度比、Qis：内標準物質の添加量(µg)、分析への試料採取量：Vs(L または kg)。

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「 . 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

(注1) Waters 社製 Sep-Pak PS-2 または同等の性能を持つもの。ここでは、ポリマー系(スチレンジビニルベンゼン共重合体)である Waters 社製 PS-2 カートリッジカラムを用いたがこの他にも充填剤としては C₁₈系など、形状としてはシリンジ型、

ディスク型など多数の固相吸着剤がある。固相吸着法では、コンディショニングの条件、試料の吸着速度、カラムの乾燥条件、溶出溶媒の種類や量などにより回収率が異なることがあるので、これらの諸条件も含めてあらかじめ添加回収テストを行ったのち使用する必要がある（備考1）。

（注2） 和光純薬社製ワコーゲル C-200 など（備考1）

（注3） Supelco 社製 ENVI-Carb（250 mg/6 mL）または同等品（備考1）

（注4） Waters 社製 Sep-Pak コンセントレーターまたは同等の性能を持つ流量コントロールの可能なもの（備考1）

（注5） Turbo Vap 、 Turbo Vap LV または同等の性能を有するもの（備考1）

（注6） 万能ホモジナイザー（ポリトロンなど）、超高速万能ホモジナイザー（ヒスコトロンなど）、攪拌分散器（ウルトララックスなど）または同等品（備考1）

（注7） コンディショニング及び対象物質の溶出は 1～2 mL/min（1～2 滴/sec）の流速で行う。

（注8） 高純度窒素は約 1 L/min の流速で約 20 分間通気した。乾燥が不十分な場合は、カートリッジカラムからジクロロメタンとともに水が溶出し、脱水が必要となる。また、過剰に通気しすぎると吸着していた対象物質が失われる可能性がある。

（注9） 無水硫酸ナトリウムを充填したカートリッジカラム（Sep-Pak Dry）を吸着カラムに直結して溶出する方法もある。この場合、あらかじめジクロロメタン 5 mL でコンディショニングが必要。吸着カラムの乾燥が十分な場合はこの操作を省略してもよい。（備考1）

（注10） 乾固しないよう注意する。

（注11） ここに示すカラムクロマトグラフィーによる精製条件は一例である。充てん剤の活性度や前処理液の性状等によって溶離パターンが異なるので、必ず事前に分画試験を行い、操作条件を決定する。また、本法では充てんカラムを基本としたが、カートリッジカラムの利用も効果が期待できる。

（注12） ヘキサン量が多い場合、トルクロホスメチルが流出する可能性があるので注意を要する。

（注13） Envi-Carb など（備考1）

(備考 1)ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして掲げたが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

参考文献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課：置換ベンゼン類、有機酸エステル類、有機リン酸エステル類及び農薬類の分析法，pp81-99，「平成 12 年度要調査項目等調査マニュアル」(平成 12 年 12 月)
- 2) 環境省環境管理局水環境部水環境管理課：農薬類及びニトロベンゼン類の分析法，pp229-242，「平成 13 年度要調査項目等調査マニュアル」(平成 14 年 3 月)

分析法フローチャート

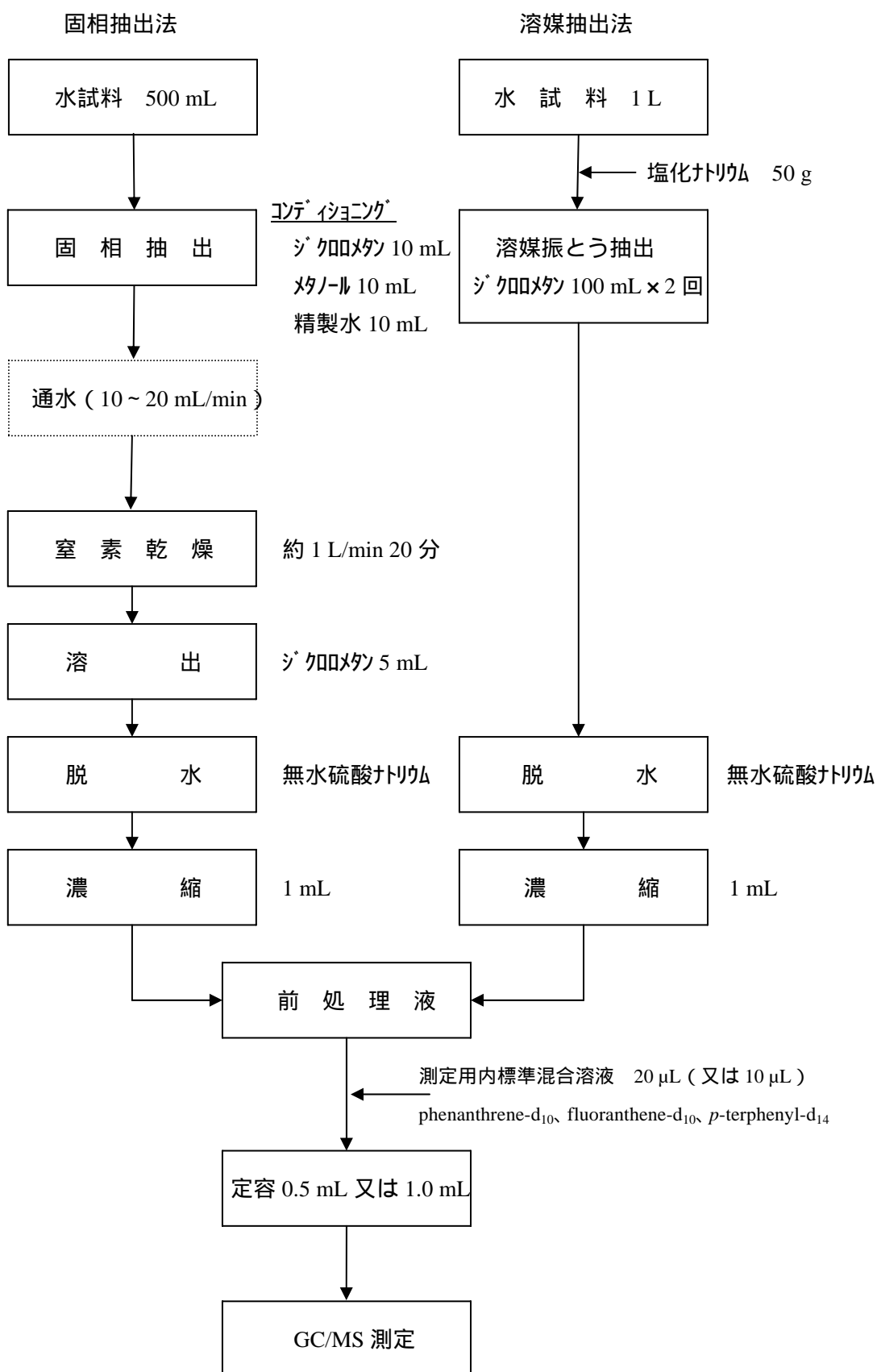


図 1 水試料の分析操作手順

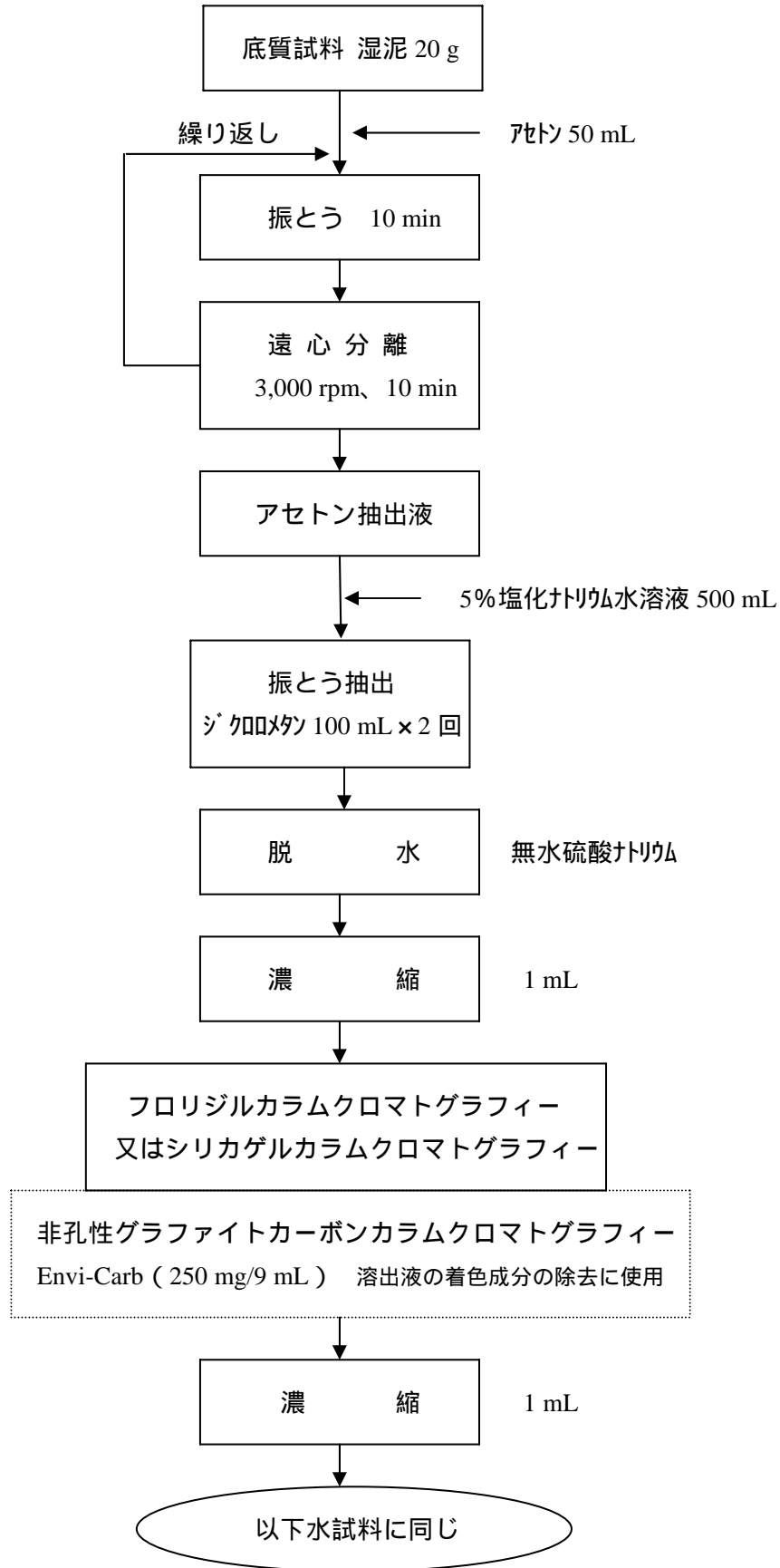


図2 底質試料の分析操作手順

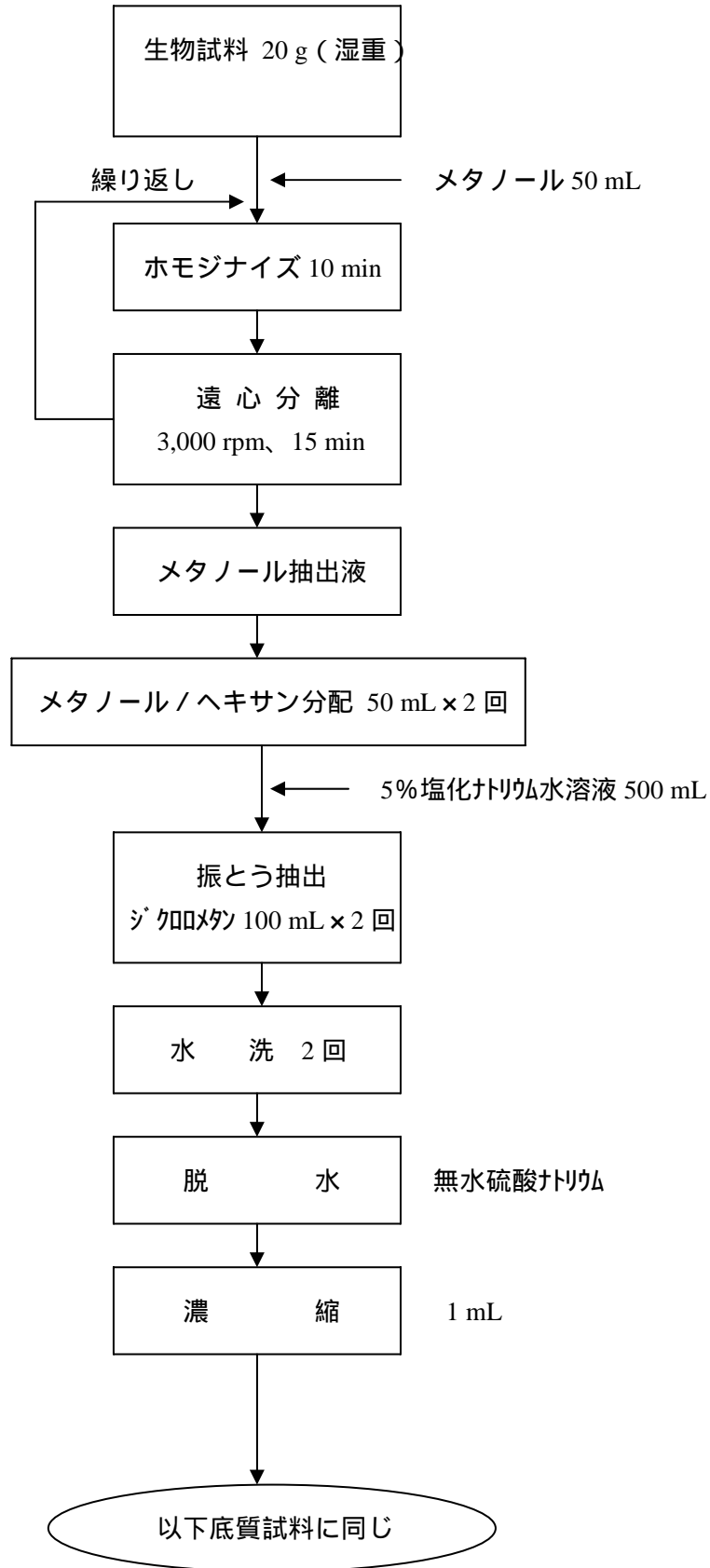


図3 生物試料の分析操作手順

．ポリ塩化ナフタレンの分析法

1 対象物質

ポリ塩化ナフタレン（PCN；1塩化物～8塩化物） 75異性体

物理化学的性状値

分子量：一塩化物 162.6、二塩化物 197.1、三塩化物 231.5、四塩化物 265.9、
五塩化物 300.4、六塩化物 334.8、七塩化物 369.3、八塩化物 403.7

融点（ ）：一塩化物 -2.3～59.5、二塩化物 37～138

沸点（ ）：一塩化物 262.7～266、二塩化物 285～295

2 目標検出下限値および定量下限値

検出下限値および定量下限値を表1に示す（注1）。

表1 水質、底質のポリ塩化ナフタレンの目標検出下限

	水質（pg/L）		底質（pg/g）	
	目標検出下限値	目標定量下限値	目標検出下限値	目標定量下限値
一塩化ナフタレン	1	3	1	3
二塩化ナフタレン	1	3	1	3
三塩化ナフタレン	1	3	1	3
四塩化ナフタレン	1	3	1	3
五塩化ナフタレン	1	3	1	3
六塩化ナフタレン	1	3	1	3
七塩化ナフタレン	1	3	1	3
八塩化ナフタレン	1	3	1	3

3 分析法の概要

（1）水質試料

（ア）大容量サンプラー-PUF固相吸着法（分析フロー 1-1）

水質試料を、大容量サンプラーを用いて、粒子態はガラス繊維ろ紙（保留粒子径 1.0 μm 程度、保留粒子径 0.5 μm 程度（注2））に、溶存態はポリウレタンフォーム（PUF）に吸着捕集する。捕集したろ紙および PUF はアセトンでソックスレー抽出を行い、硫酸で洗浄する。水洗、脱水し窒素ガスを吹き付けて約 1 mL まで濃縮後、活性化銅粉末を添加して硫黄を除去する。カラムクリーンアップを行った後、GC/MS-SIM で同定、定量を行う。

(イ) ディスク型固相抽出法 (分析フロー 1-2)

水質試料中の PCN を抽出後、抽出液をヘキサン転溶、カラムクリーンアップした後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で同定、定量する。

(ウ) 液々抽出法 (分析フロー 1-3)

水質試料中の PCN を液々抽出後、抽出液をヘキサン転溶、カラムクリーンアップした後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で同定、定量する。

(2) 底質試料 (分析フロー 2-1、2-2)

底質試料中の PCN をソックスレー抽出法 (分析フロー2-1) または高速溶媒抽出法 (分析フロー2-1) で抽出し、抽出液をヘキサン転溶、カラムクリーンアップした後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で同定、定量する。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・アセトン：残留農薬試験用 2000
- ・メタノール：残留農薬試験用 2000
- ・トルエン：残留農薬試験用 2000
- ・エタノール：残留農薬試験用
- ・ヘキサン：残留農薬試験用 2000
- ・ジクロロメタン：残留農薬試験用 2000
- ・ノナン：ダイオキシン類分析用
- ・硫酸：精密分析用
- ・塩酸：精密分析用
- ・無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用
- ・水酸化カリウム：試薬特級
- ・多層シリカゲルカラム：(注3)
- ・活性炭シリカゲルカラム：ダイオキシン類分析用 (注4)
- ・クリーンアップスパイク： $^{13}\text{C}_{10}$ -PCN 混合溶液 (Tetra ~ OctaPCN を含む)。含まれる

化合物は、 $^{13}\text{C}_{10-1,2,3,4\text{-TetraCN}}$ 、 $^{13}\text{C}_{10-1,3,5,7\text{-TetraCN}}$ 、 $^{13}\text{C}_{10-1,2,3,5,7\text{-PentaCN}}$ 、 $^{13}\text{C}_{10-1,2,3,5,6,7\text{-HexaCN}}$ 、 $^{13}\text{C}_{10-1,2,3,4,5,6,7\text{-HeptaCN}}$ 、 $^{13}\text{C}_{10-1,2,3,4,5,6,7,8\text{-OctaCN}}$ (注5)。

- ・ シリンジスパイク： $^{13}\text{C}_{10-2,3',4,4',5\text{-Pentachlorobiphenyl}}$
- ・ PCN-MXA、PCN-MXB：PCN 標準混合物(注6)。PCN-MXA は各塩化物毎に1種類ずつ、PCN-MXB はA に対して4塩化物が4種類、5塩化物が3種類、6塩化物が3種類プラスして含まれる。検量線用としてはPCN-MXB を用いる。

PCN-MXA に含まれる PCN 異性体

	IUPAC #
2-Chloronaphthalene	2
1,5-Dichloronaphthalene	6
1,2,3-Trichloronaphthalene	13
1,2,3,5-Tetrachloronaphthalene	28
1,2,3,5,7-Pentachloronaphthalene	52
1,2,3,4,6,7-Hexachloronaphthalene	66
1,2,3,4,5,6,7-Heptachloronaphthalene	73
Octachloronaphthalene	75

PCN-MXB に含まれる PCN 異性体

	IUPAC #
2-Chloronaphthalene	2
1,5-Dichloronaphthalene	6
1,2,3-Trichloronaphthalene	13
1,2,3,4-Tetrachloronaphthalene	27
1,2,3,5-Tetrachloronaphthalene	28
1,2,5,6-Tetrachloronaphthalene	36
1,4,5,8-Tetrachloronaphthalene	46
2,3,6,7-Tetrachloronaphthalene	48
1,2,3,4,5-Pentachloronaphthalene	49
1,2,3,4,6-Pentachloronaphthalene	50
1,2,3,5,7-Pentachloronaphthalene	52
1,2,3,5,8-Pentachloronaphthalene	53
1,2,3,4,5,6-Hexachloronaphthalene	63
1,2,3,4,6,7-Hexachloronaphthalene	66
1,2,3,5,7,8-Hexachloronaphthalene	69
1,2,4,5,7,8-Hexachloronaphthalene	72
1,2,3,4,5,6,7-Heptachloronaphthalene	73
Octachloronaphthalene	75

(2) 器具及び装置

- ・超音波洗浄装置
- ・水中ダイオキシン固相抽出キットファンネルタイプ
- ・ソックスレー抽出器
- ・マントルヒーター
- ・冷却水循環装置
- ・ロータリーエバポレーター
- ・試験管濃縮システム

5 試料の採取・運搬

(1) 水質試料・底質試料

試料容器はガラス製で密栓できるものを用い、使用前にメタノール（またはアセトン）でよく洗浄したものをを用いる。洗浄に用いた溶媒は容器内に残らないようにする。採取後、容器を密栓・遮光して運搬し、冷暗所に保存する。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

(a) 大容量サンプラー-PUF 固相吸着法（分析フロー 1-1）

試料捕集

ろ紙ホルダーにガラス繊維ろ紙（保留粒子径 1.0 μm 程度、保留粒子径 0.5 μm 程度（注 2））を、PUF 装着用ホルダーに PUF（5×8.5cm、2 個）（注 7、注 8）を装着し、水質試料を捕集流量 1～1.5 L/min 程度で約 1 時間（約 100 L）捕集する（注 9）。

溶出

水質を捕集したろ紙および PUF はアセトンを用いてソックスレー抽出を行う。ソックスレー抽出器は（大）（受器容量 500 mL）を用い、受器フラスコに予めヘキサン約 150～200 mL を入れておき、ろ紙および PUF を入れた抽出器にヘキサンを注ぎ入れオーバーフローさせる（注 8）。冷却水が流れていることを確認した後、加熱を開始し約 16～24 時間抽出を行う（注 10）。終了時は、溶媒がオーバーフローする直前で止める（注 10）。

アセトン抽出液を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、ヘキサンに転溶する。ヘキサ

ン溶液を 100 mL または 200 mL 容分液ロートに、20～30 mL の硫酸を注意深く注ぎ入れ(注 11) 約 5 分間振とうする。最低 30 分程度放置した後硫酸層を捨てる。この操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返す。ヘキサン層を、ヘキサンと同量以上の水で 3～5 回洗浄する。洗浄液の pH が中性付近になったら(注 12) ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素ガス気流下またはロータリーエバポレーターで 1 mL まで濃縮し、活性化銅粉末(注 13、注 14) を添加して硫黄を除去する。

(b) ディスク型固相抽出法(分析フロー 1-2)

ろ過

試料 10 L に内標準物質(クリーンアップスパイク)を 2 ng 添加してからガラス繊維ろ紙(保留粒子径 0.5 μm 程度)で吸引ろ過し、ろ過残留物とろ液に分ける。

ディスク型固相の準備

ディスク型固相を、ベース上のサポートスクリーンにセット後、トルエンを浸潤させる。ディスクホルダにディスク型固相をセット後、トルエン約 15 mL を注ぎ、液滴が落ち始めるまでしばらく吸引したのち、1 分程度吸引を緩める。再び吸引しトルエンを除く。アセトン約 15 mL で 2 回洗浄する。メタノール 15 mL でディスク型固相を 1 分程度浸潤し、メタノールがディスク型固相に 1 mm 程度残るまで吸引する。以後、抽出操作終了までディスク型固相を乾かさないうち注意しながら、ヘキサン洗浄水を 50 mL ずつ 2 回通水する。

抽出

で得たる液を で準備した固相抽出装置のファンネルに注ぎ、吸引ろ過を行う。通水速度は、100 mL/mim 程度とする。ファンネル内の試料がなくなる前に、試料容器の器壁を少量の水で洗い、ファンネルに注ぐ。同様に、ファンネルの内壁を少量の水で洗浄する。ファンネル内の水がなくなるまで吸引し、水切りを十分に行なってから、ディスク型固相を取り外す。乾燥させた後、 で得たガラス繊維ろ紙上の残留物と合わせて、トルエン - エタノール(10 : 1 ; v/v) 150 mL を用いて 16 時間以上ソックスレー抽出を行う。なお、試料容器内壁をトルエンまたはジクロロメタンで洗浄した洗浄液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ソックスレー抽出液と合わせる。得られた抽出液を濃縮後、ヘキサンに転溶する。

(c) 液々抽出法(分析フロー 1-3)

試料水 1 L に内標準物質(クリーンアップスパイク)を 0.5 ng 添加し、100 mL のジクロ

ロメタンを加えて約 20 分間振り混ぜて抽出する。さらに 2 回、100 mL のジクロロメタンによる抽出を繰り返し、抽出液を硫酸ナトリウムで脱水する。

ジクロロメタン抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮し、ヘキサン 100 mL に転溶する。ヘキサン溶液を分液ロートに移し、10 mL の硫酸を注意深く注ぎ入れ（注 11）約 5 分間振とうする。最低 30 分程度放置した後硫酸層を捨てる。この操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返す。ヘキサン層を、ヘキサンと同量以上の水で 3~5 回洗浄する。洗浄液の pH が中性付近になったら（注 12）、ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素ガス気流下またはロータリーエバポレーターで 1 mL まで濃縮し、活性化銅粉末（注 13、注 14）を添加して硫黄を除去する。

（イ）底質試料

（a）ソックスレー抽出法（分析フロー 2-1）

試料 10 g を秤りとり、内標準物質（クリーンアップスパイク）を 0.5 ng 添加し、アセトンを用いてソックスレー抽出を行う。ソックスレー抽出器は（大）（受器容量 500 mL）を用い、受器フラスコに予めヘキサン約 150~200 mL を入れておき、ろ紙および PUF を入れた抽出器にヘキサンを注ぎ入れオーバーフローさせる（注 8）。冷却水が流れていることを確認した後、加熱を開始し約 16~24 時間抽出を行う（注 10）。終了時は、溶媒がオーバーフローする直前で止める（注 10）。

アセトン抽出液を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、ヘキサンに転溶する。ヘキサン溶液を 100 mL または 200 mL 容分液ロートに、20~30 mL の硫酸を注意深く注ぎ入れ（注 11）約 5 分間振とうする。最低 30 分程度放置した後硫酸層を捨てる。この操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返す。ヘキサン層を、ヘキサンと同量以上の水で 3~5 回洗浄する。洗浄液の pH が中性付近になったら（注 12）、ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素ガス気流下またはロータリーエバポレーターで 1 mL まで濃縮し、活性化銅粉末（注 13、注 14）を添加して硫黄を除去する。

（b）高速溶媒抽出法（分析フロー 2-2）

試料 25 g を秤りとり、高速溶媒抽出装置（ASE）のセルに試料を入れる。ここに内標準物質（クリーンアップスパイク）を 2 ng 正確に添加する。また、このとき、セルの内部に空隙がないよう、ヒドロマトリックス等を一緒に充填して空隙をなくす。アセトンを抽

出溶媒として試料中の分析目的化合物を抽出する。ASE 抽出条件の例を以下に示す。アセトン抽出液を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、ヘキサンに転溶する。ヘキサン溶液を 100 mL または 200 mL 容分液ロートに、20 ~ 30 mL の硫酸を注意深く注ぎ入れ（注 11）約 5 分間振とうする。最低 30 分程度放置した後硫酸層を捨てる。この操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返す。ヘキサン層を、ヘキサンと同量以上の水で 3 ~ 5 回洗浄する。洗浄液の pH が中性付近になったら（注 12）、ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素ガス気流下またはロータリーエバポレーターで 1 mL まで濃縮し、活性化銅粉末（注 13、注 14）を添加して硫黄を除去する。

抽出条件の一例

- Press : 2,000 psi • Flush : 35%
- Temp : 150 • Purge : 150 sec
- Static : 10min • Cycles : 3 回
- SOL # 1 (アセトン)

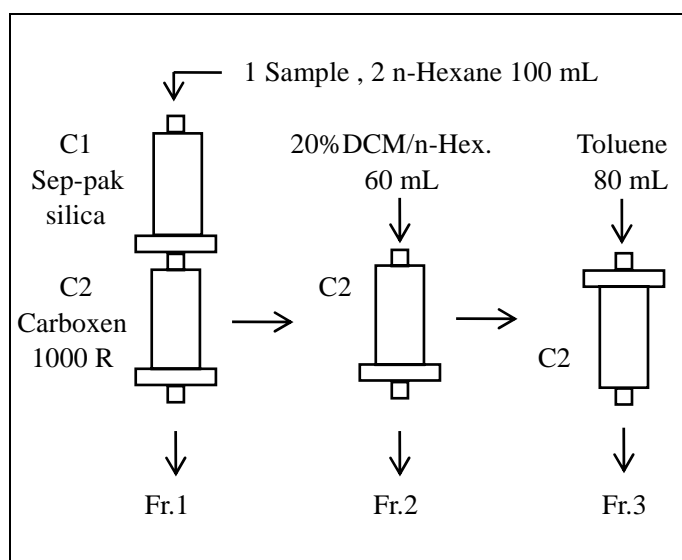
(2) 試料液の調製 (注 15)

多層シリカゲルカラム（注 3）(C1) と活性炭シリカゲルカラム（注 4）(C2) を直列に接続したものの上流側 C1 にガラス注射筒を接続し、約 20 mL のヘキサンでコンディショニングを行う。前処理で得られた濃縮液を C1 側から洗い込み C1 に充填する。少量のヘキサンで注射筒壁面を洗いながら滴下させる。ヘキサン 100 mL で 3 ~ 4 mL/min の流速で溶出後（Fr.1）C1 を取り除き注射筒を C2 に接続し直し 20%ジクロロメタン（DCM）/ヘキサン溶液 60 mL を 3 ~ 4 mL/min の流速で滴下させる（Fr.2）。さらに、予め 50 ~ 60 °C に加熱したトルエン 80 mL で逆方向から 1 ~ 2 mL/min の流速で溶出させる（Fr.3）。PCN は、最後の Fr.3 に含まれる（注 16）。Fr.3 にノナン 300 μ L を添加し、ロータリーエバポレーターあるいは窒素気流下で濃縮してトルエンを除去する。10 ~ 20 mL 容試験管に DCM またはヘキサン 2 ~ 3 mL で 3 回洗い込みながら移し入れ、これにシリンジスパイクとして $^{13}\text{C}_{10}$ -Pentachlorobiphenyl を検量線作成用標準液と同濃度となるように添加して、再度窒素気流下で濃縮することにより 300 μ L ノナン溶液としたものを GC/MS 分析用試料とする。

(3) 空試験液の調製

(ア) 水質試料

サンプリングに使用するものと同じ状態のガラス繊維ろ紙、PUF（あるいはディスク型固相およびガラス繊維フィルター）を、水質試料と同様に抽出・クリーンアップを行い 300 μ L ノナン溶液とする（注 8）。



液々抽出法の場合には、同量の試薬・溶媒を用いて水質試料と同様に抽出・クリーンアップを行い 300 μ L ノナン溶液とする。

(イ) 底質試料

試料を用いずに底質試料と同様に抽出・クリーンアップしたものを底質試料のブランクとする。

(4) 添加回収試験液の調製

PCN 製品（注 17）を混合して PCN 製品混合溶液を調製し、必要に応じて希釈したものを添加回収用試験液とする。

(5) 標準液の調製

・検量線作成用標準溶液

市販の PCN 標準混合物 PCN-MXA、PCN-MXB を 5 段階の濃度に希釈し、ここにクリーンアップスパイクとして $^{13}\text{C}_{10}$ -でラベル化した 4~8 塩素化物、シリンジスパイクとして $^{13}\text{C}_{10}$ -2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl を加え、最終濃度を 0.16~100 ng/mL とする（注 18、注 19）。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例

表 2、表 3 に PCN の GC/MS 測定条件の例を、表 4 にモニタリングイオンの例を示した。

表 2 PCN の GC/MS 測定条件の例 - 1

<u>GC 条件</u>	装置 : (注 20)	
カラム :	5%フェニルポリシルフェニレン - シロキサン (注 21) (0.22mmID, 25m, film thickness 0.25 μ m)	
昇温条件 :	90 (2 min) 5.5 /min 320 (10min)	
注入方法 :	スプリットレス (パージまでの時間 2 分)	
注 入 :	注入量 : 1 μ l	注入口温度 : 280
キャリアガス :	ヘリウム 1.0 L/min	
<u>MS 条件</u>	装置 : (注 22)	測定方法 : SIM 法
測定時の分解能 :	分解能 : 10,000	イオン加速電圧 : 8 kV
イオン化 :	方法 : EI 法	電子加速電圧 : 38 eV
	電 流 : 600 μ A	イオン源温度 : 280

表 3 PCN の GC/MS 測定条件の例 - 2

<u>GC/MS 条件</u>	装置 : (注 23)	
カラム :	5%-ジフェニル 95%-ジメチルシロキサン (注 24) (25m \times 0.20mmID, 0.33 μ m)	
カラム温度 :	70 (2min) - 8 /min - 300 (10min)	
注入方法 :	スプリットレス (パージまでの時間 2 分)	
キャリアガス/流量 :	He / 1.63ml/min	チャンバ ⁺ - 温度 : 250
注入口温度 :	200	イオン化I補 ⁺ - : 70eV
セプタム温度 :	250	注 入 量 : 2 μ L

表4 PCN 測定時のモニタリングイオン

モニタリングイオン (物質名 : m/z)		
ロックマス	: 230.9856 ^{*1} , 318.9792 ^{*2}	
1 塩化ナフレン	: 162.0236, 164.0208	2 塩化ナフレン : 195.9847, 197.9818
3 塩化ナフレン	: 229.9457, 231.9428	4 塩化ナフレン : 263.9067, 265.9038
5 塩化ナフレン	: 299.8648, 301.8619	6 塩化ナフレン : 333.8258, 335.8229
7 塩化ナフレン	: 367.7869, 369.7839	8 塩化ナフレン : 401.7479, 403.7450
*1 : 1 ~ 4 塩化ナフレンの測定用 ; *2 : 5 ~ 8 塩化ナフレンの測定用		
2-Choronaphthalene-d ₇	: 169.0675	171.0647
1,3,5,7- Tetrachoronaphthalene- ¹³ C ₁₀	: 275.9373	273.9402
1,2,3,4- Tetrachoronaphthalene- ¹³ C ₁₀	: 275.9373	273.9402
1,2,3,5,7- Pentachoronaphthalene- ¹³ C ₁₀	: 309.8983	311.8954
1,2,3,5,6,7- Hexachoronaphthalene- ¹³ C ₁₀	: 343.8593	345.8564
1,2,3,4,5,7- Hexachoronaphthalene- ¹³ C ₁₀	: 343.8593	345.8564
1,2,3,4,5,6,7- Heptachoronaphthalene- ¹³ C ₁₀	: 377.8204	379.8174
1,2,3,4,5,6,7,8- Octachoronaphthalene- ¹³ C ₁₀	: 413.7785	411.7764
# 3- ¹³ C ₁₂ -PCB	: 200.0795	202.0766
# 15- ¹³ C ₁₂ -PCB	: 234.0406	236.0376
# 81- ¹³ C ₁₂ -PCB	: 301.9626	303.9597
# 126- ¹³ C ₁₂ -PCB	: 335.9237	337.9207
# 169- ¹³ C ₁₂ -PCB	: 371.8817	373.8788

(イ) 検量線

検量線作成用標準液 2 μL を GC/MS に注入し、注入量とピーク面積から検量線を作成する (注 19、注 25、注 26)。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収試験液を注入して測定を行なう。なお、一定時間毎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。もし、20% を超えていれば、GC/MS を再調整後、検量線を作成し直して

測定を行う。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

PCN 製品混合溶液(注 17)を測定して得られたクロマトグラムと試料を測定して得られたクロマトグラムを比較し、以下の条件を満たすものを PCN のピークとして同定する。

ピークの保持時間が標準物質とほぼ同じであり、対応する内標準物質との相対保持時間が標準物質と一致すること

モニターした 2 つのイオン(定量用と確認用)におけるクロマトグラム上のピーク面積の比が標準物質のものとはほぼ同じであり、塩素原子の同位体存在比から推定される理論同位対比と比較して ±15% 以内で一致すること

(2) 定量及び計算

PCN 濃度は、内標準法により以下の式から算出した。ここで用いた相対応答係数は、PCN 検量線作成用標準溶液を測定することによりあらかじめ作成しておいた検量線から算出したものである。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$C = [(A_s/A_i) \times IS \times RRF] / V$$

ここで、

C: 試料中濃度

A_s: 測定チャンネルにおける PCN のピーク面積

A_i: A_s に対応する内標準のピーク面積

RRF: 相対応答係数

IS: 内標準添加量

V: 分析に供した試料量

8 分析精度管理

試料中の PCN を測定する際には、PCN 製品混合溶液などを用いて PCN の保持時間を確認するとともに、標準溶液を測定し、その定量値が理論値の ±20% 以内にあることを確認する。

9 注意事項

- (注1) PUF の予備洗浄後および抽出操作前に必要以上に大気雰囲気中にさらされた場合、1~4 塩化物（特に 1 塩化物）の検出限界値が高くなることがあるので注意を要する。
- (注2) アドバンテック東洋社製ガラス繊維ろ紙 GA-100、GC-50 または同等以上の性能を有するもの（備考1）。
- (注3) スペルコ社製多層シリカゲルカラム Sep-Pak Plus Silica Cartridge（10%AgNO₃-Silica / 44%H₂SO₄-Silica / LC-SI）または同等以上の性能を有するもの（備考1）。
- (注4) スペルコ社製活性炭シリカゲルカラム Carboxen 1000 Reversing Tube（100 mg）または同等以上の性能を有するもの（備考1）。
- (注5) ここでは CIL 社製のものを用いた（備考1）。
- (注6) ここでは Wellington 社製のものを用いた（備考1）。
- (注7) PUF 2 個を、ソックスレー抽出器(大)(受器容量 500 mL)を用いてアセトン 500 mL で 24 時間予備洗浄を行う。PUF は、30 cm ステンレス製ピンセットで取り扱い、洗浄後すみやかに真空乾燥機等に移し十分に乾燥してから用いる。PUF の乾燥が不十分だと、ハイボリュームエアースンプラーで捕集中に PUF が潰れてしまうことがある。このため、真空乾燥機等で十分に乾燥する必要がある。
- (注8) PUF は、大気雰囲気中に放置すると静的吸着による汚染を受けやすく、1~3 塩化物のブランク値が高くなることがあるのですみやかに処理を行う。
- (注9) PUF は、装着するとき壁面と間隙の無いように装着する。また、ろ紙ホルダーからポンプまでの各接続部は、漏れ等の無いようにしっかりと接続する。
- (注10) ソックスレー抽出を行う場合、溶媒の気散と乾固防止のため冷却水は多めに流すか、または低温循環機を用いる。予め受器フラスコに溶媒を入れておき、試料を入れた抽出器に溶媒を注ぎ入れオーバーフローさせる。この時もやや多めに溶媒を注ぐこと。冷却水が流れていることを確認した後、加熱を開始すること。循環の回数目安は、20 分/回程度である。終了時は、抽出液量が少ない方が、後の操作が簡単であるため溶媒がオーバーフローする直前で止める。
- (注11) 硫酸を添加する時は、抽出液中に含有される水と混合する時激しく発熱するので注意深く注ぎ入れる。振とう後の静置時間は 30 分程度が良いが、より長い方が分離は良く、後の水洗操作も早くなる。

- (注 12) 水層の pH は、pH 試験紙で確認をするとよい。
- (注 13) 銅粉末に塩酸を添加し約 10 分間超音波処理を行い、デカンテーションにより塩酸を除去する。水で 3~5 回同様に操作を行う。以下、アセトン、ヘキサンの順に同様の操作を行いヘキサン懸濁液とし、これを用いる。
- (注 14) 水質中の硫黄化合物は、PCN のクロマト上影響は少ないが、キャピラリーカラム等への影響を考慮して、活性化銅粉末を添加して硫黄を除去する。
- (注 15) Supelco 製 Carboxen 1000 Reversing Tube は 100~500 mg まで 4 種類あるが、いずれの場合も PCN、Co-PCB および PCDD/DF はトルエンフラクション以外では溶出してこないため、100 mg のものを用いる。流量コントロールのために、Supelco 製ディスポーザブルテフロンバルブライナーを溶出側に接続する。また、逆方向から溶出させる時 Supelco 製ヒメールルアーカップラーを用いて注射筒と Carboxen1000R を接続する。トルエンは、予め湯煎器等で 50~60 に加熱して用いるほうが回収率が良い。
- (注 16) Fr.1 および 2 には di~tetra-ortho-PCB が、Fr.3 には PCN の他に non-~di-ortho-PCB、PCDD/DF が含まれる。
- (注 17) ここでは Halowax を用いた (備考 1)。
- (注 18) PCN 標準混合物の一覧を表 1 に示す。Wellington 製 PCN 標準混合物 PCN-MXA は各塩化物毎に 1 種類ずつ、PCN-MXB は A に対して 4 塩化物が 4 種類、5 塩化物が 3 種類、6 塩化物が 3 種類プラスして含まれている。検量線用としては PCN-MXA を、異性体確認用として PCN-MXB を用いるとよい。
- (注 19) 1~4 塩化ナフタレンでは 100 ng/mL では濃度が高すぎるため、濃度を 50 ng/mL とするかあるいは注入量を 1 μ L とする。
- (注 20) ここでは、HP6800 シリーズ (Hewlett Packard) を用いた (備考 1)。
- (注 21) SGE 社製 BPX-5 など (備考 1)。
- (注 22) ここでは、AutoSpec Ultima (micromass) を用いた (備考 1)。
- (注 23) ここでは、JEOL JMS-700 質量分析計を用いた (備考 1)。
- (注 24) HP 製 Ultra 2 など (備考 1)。
- (注 25) 異性体の同定は、図 1 の製品中 (Halowax) と大気試料中の GC/MS-SIM クロマトグラム中に示す異性体(塩素置換位置で示した)に基づいて行う。大気、底質、排ガスなどの異性体パターンを参考に同定が可能である。燃烧起源の試料には、

Halowax に含まれない異性体が検出されるので、Halowax のみでは環境試料の同定は困難である。大気試料と Halowax を同時に分析すると分かりやすい。製品と比較して環境大気試料中では、2-、2,3-、1,8-、1,2,3-等の異性体比率が高く、4 塩化物以上でも 1,2,3,4-/1,2,3,7-、1,2,3,8-のような 1,2,3 置換体を中心とする異性体比率が高かった。これらの特徴を参考にして同定が可能である。

また、クリーンアップを行わない場合は、図 1 のようにクロルデン類のピークが検出される場合があるので同定に注意を要する。

(注 26) $^{13}\text{C}_{10}$ ラベル化異性体が入手可能であるため、内標準物質を用いて定量を行う。

(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして掲げたが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

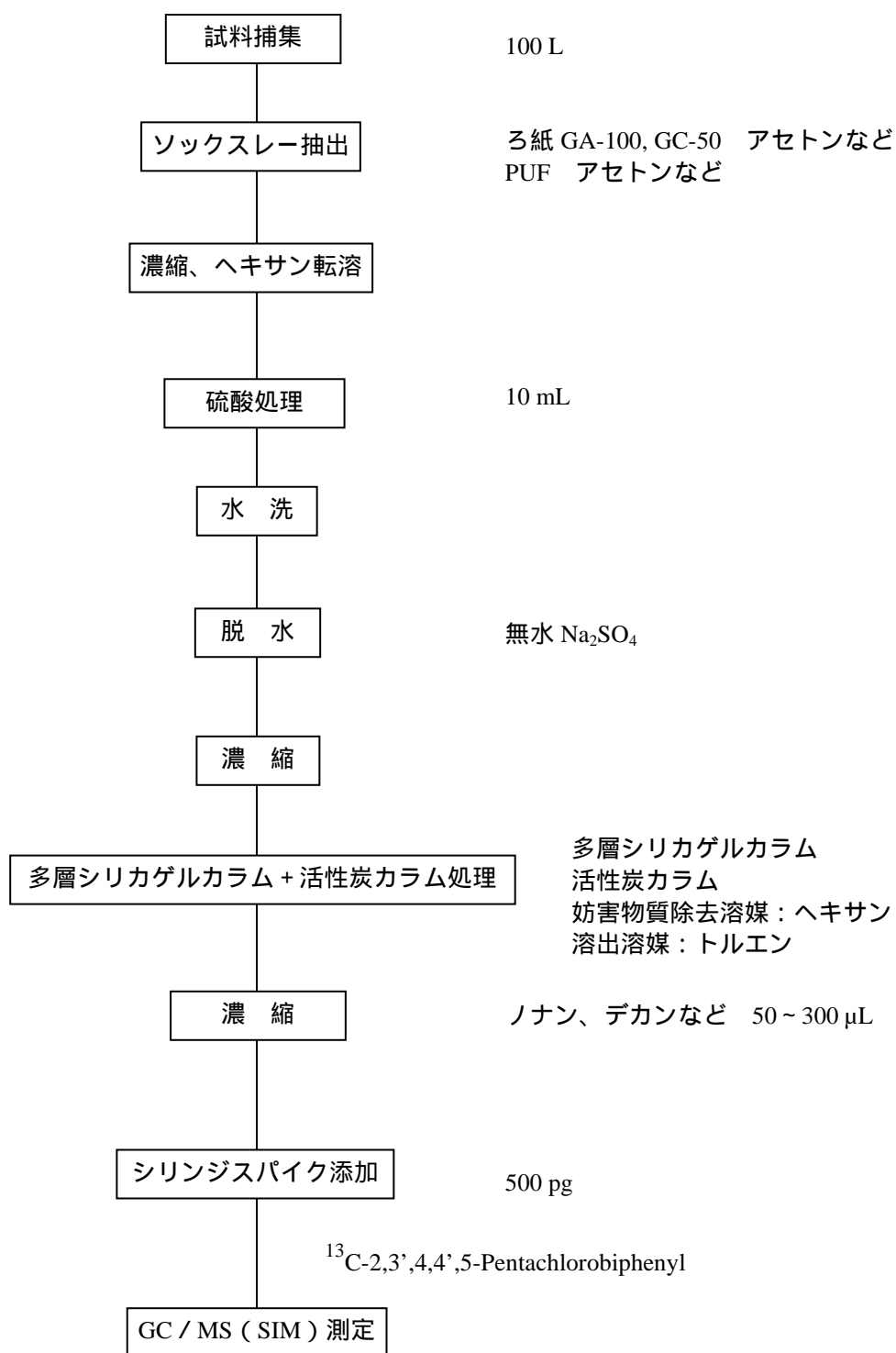
参考文献

- 1) Matsumura, C., Tsurukawa, M., Fujimori, K., Nakano, T.,: Monitoring Method of Mono-to Deca- Chlorinated Biphenyls / Mono-to Octa- Chlorinated Naphthalenes using SPE Cartoridge in Atmosphere. *Organohalogen Compounds*, **50**, 94-98 (2001)
- 2) 劔持堅志 , 吉岡敏行 , 西島倫子 , 難波順子 , 武志保 : GPC (Gel Permiation Chromatography) の微量化学物質 (PCBs、PCNs 等) 分析への応用 , 第 11 回環境化学討論会講演要旨集 , pp164-165 (2002)
- 3) 兵庫県立公害研究所 : ポリ塩化ナフタレン (PCN) , pp280-296 , 「平成 9 年度化学物質分析法開発調査報告書」, 環境庁環境保健部環境安全課 (1998)
- 4) Halsall, C.J., Lee, R.G.M., Coleman, P.J., Burnett, V., Harding-Jones, P., and Jones, K.C.: *Environ. Sci. Technol.*, **29(9)**, 2368-2376 (1995)
- 5) Leathem, S.V., Day, P.J., Dye, E.A., Hofmann, K.A., Lister, A.R., Porter, L.J., Symons, R.K., Van Maanen, T., and Buckland, S.J. : *Organohalogen Compounds*, **31**, 124-129 (1997)
- 6) Jarnberg, U., Asplund, L., De Wlt, C., Grafstrom, A-K., Haglund, P., Jansson, B., Lexen, K., Strandell, M., Olsson, M., and Jonsson, B. : *Environ.Sci.Technol.*, **27(7)**, 1364-1374 (1993)
- 7) Bandh, C., Ishaq, R., Broman, D., Naf, C., Ronquist-Nii, Y., and Zebuhr, Y. : *Environ. Sci. Technol.*, **30(1)**, 214-219 (1996)

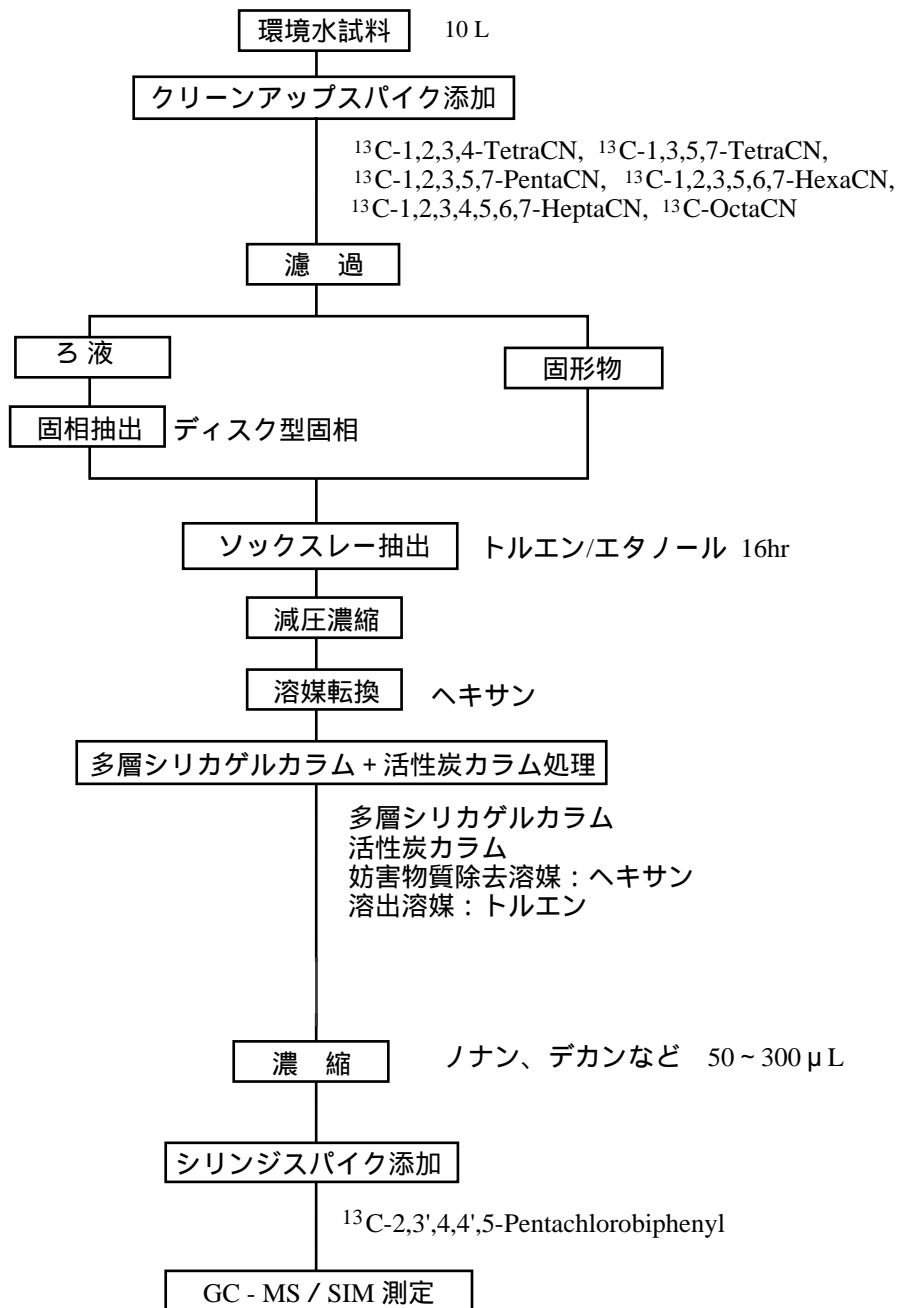
- 8) Krahn, M.M., Ilytalo, G.M., Buzitis, J., Sloan, C.A., Boyd, D.T., Chan, S-L., and Varanasi, U. :
Chemosphere, **29(1)**, 117-139 (1994)
- 9) Nakano, T., Matsumura, C., and Fujimori, K. : Isomer Specific Analysis of Polychlorinated Naphthalenes for Environmental Sample. *Organohalogen Compounds*, **47**, 178-181(2000)

分析法フローチャート

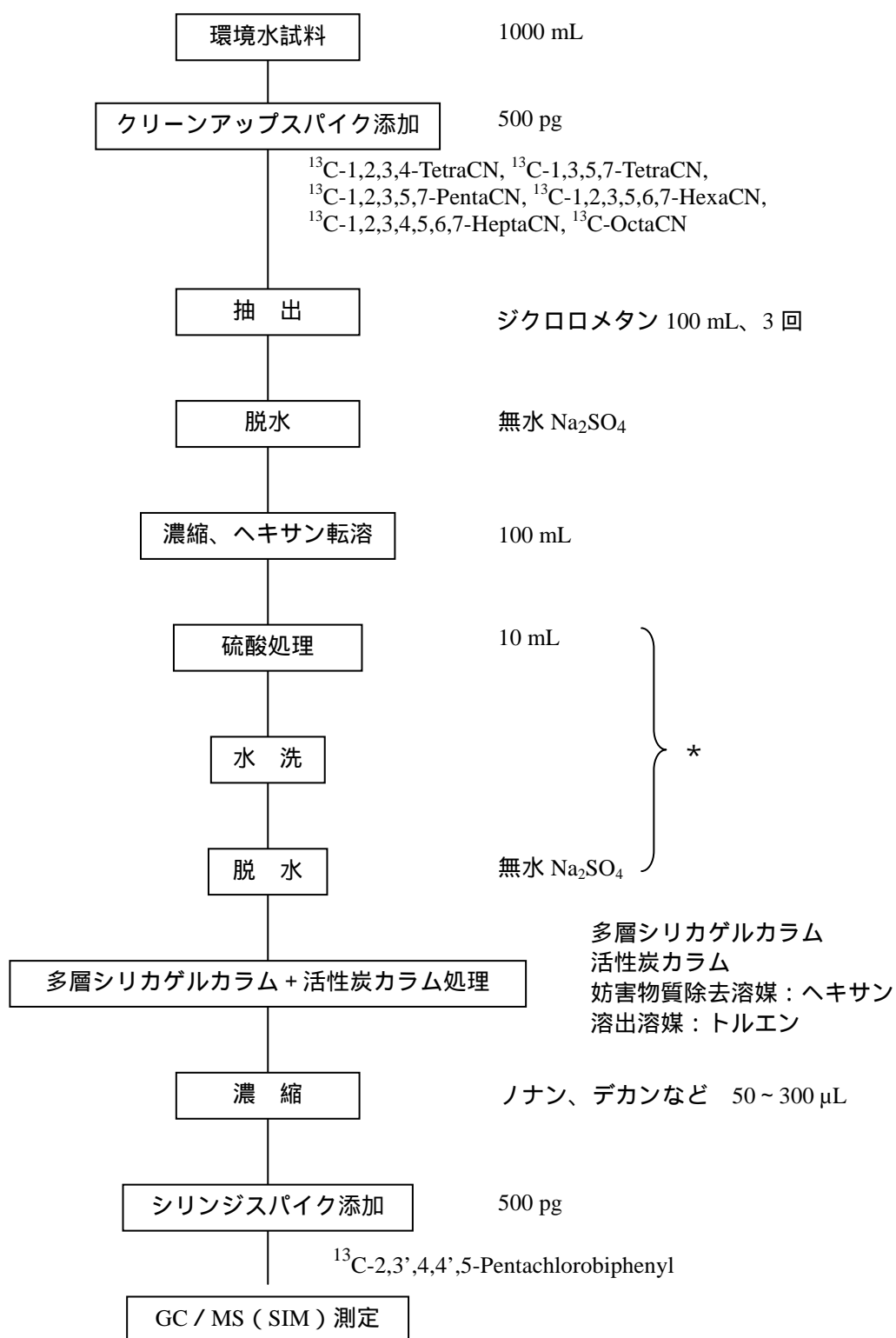
(1-1) 水質-大容量サンプラー-PUF 固相吸着法



(1-2) 水質-ディスク型固相吸着法

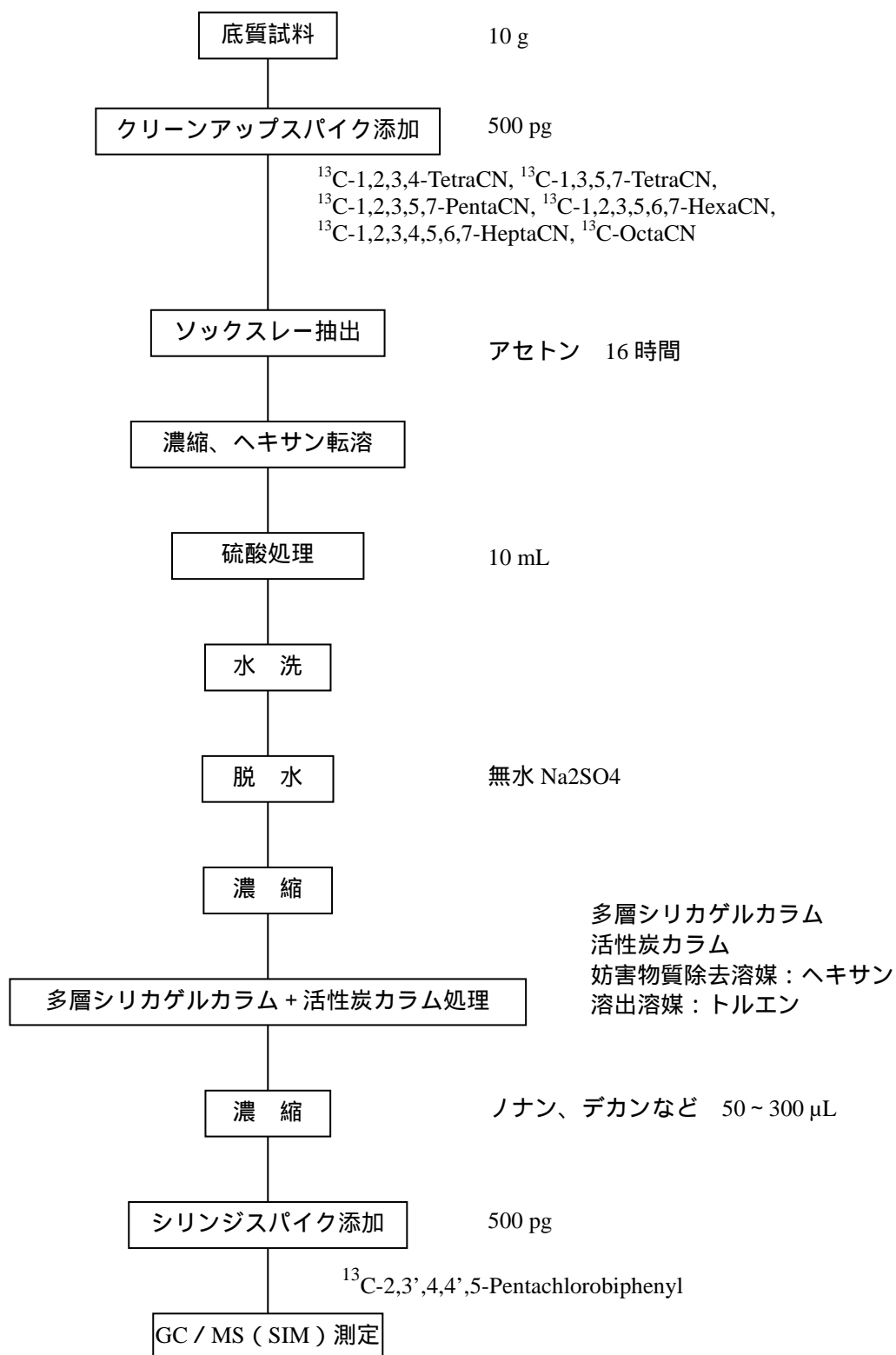


(1-3) 水質-液々抽出法

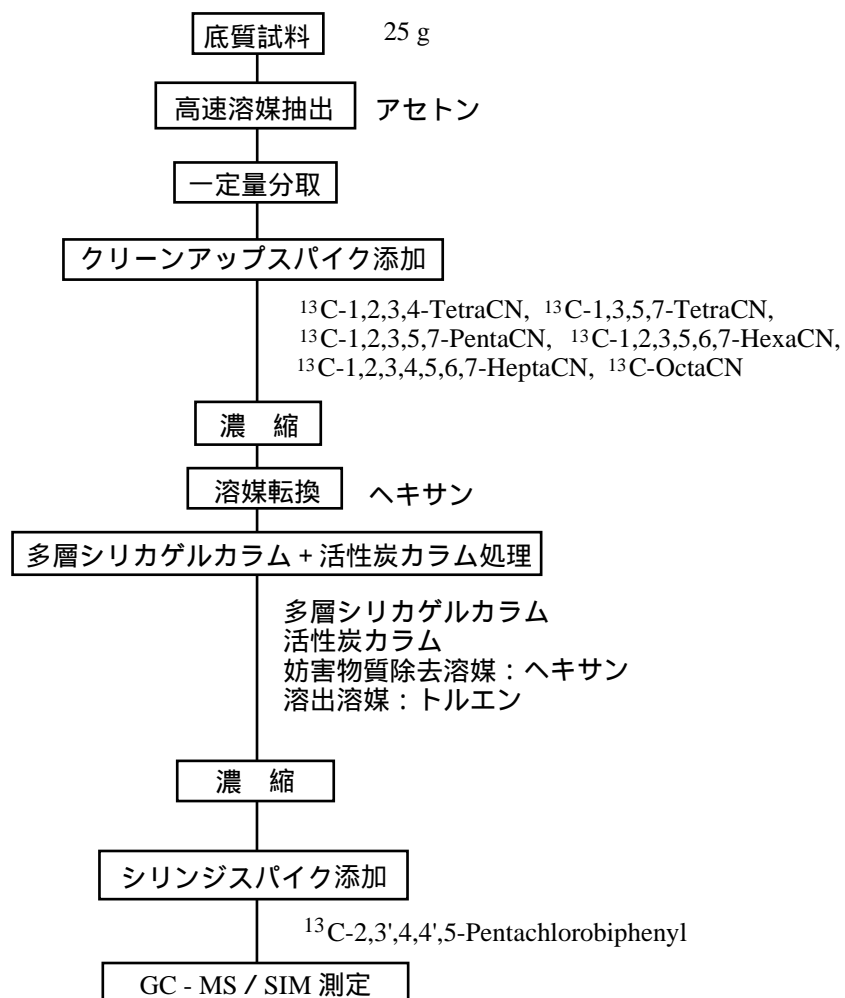


* 妨害が少なければ省略可能

(2-1) 底質-ソックスレー抽出法



(2-2) 底質-高速溶媒抽出法



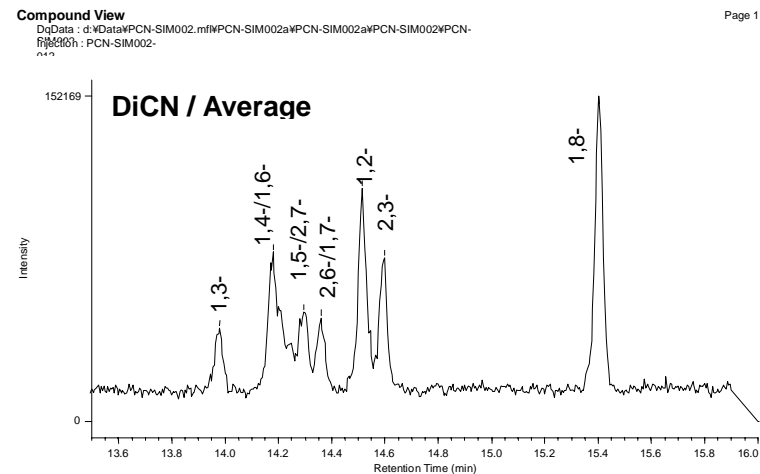
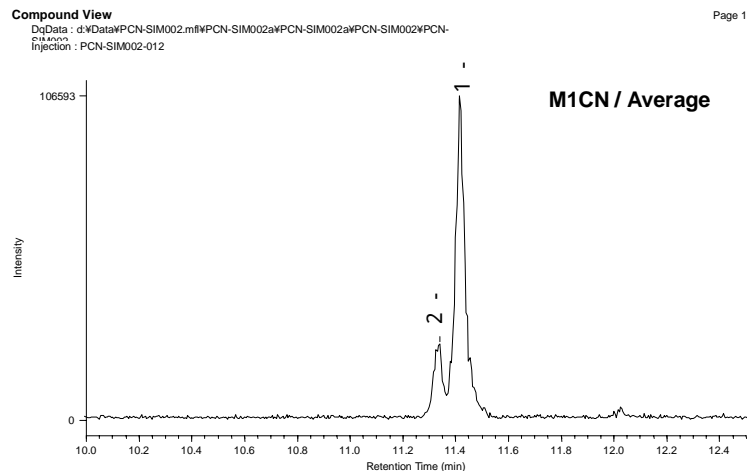
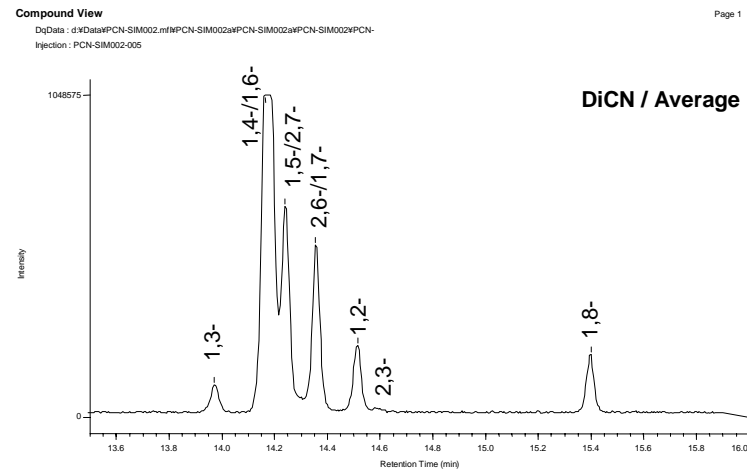
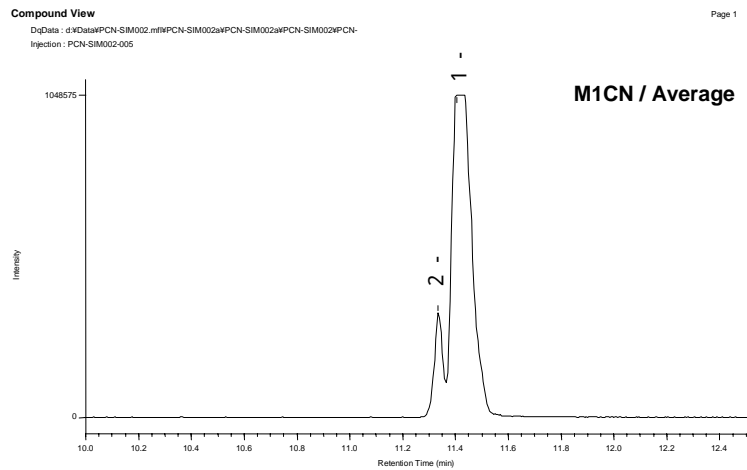


図 1 - 1 PCN(1 塩化物および 2 塩化物)の GC/MS-SIM クロマトグラム (上段 : Halowax 混合物、および下段 : 環境大気試料(PUF))

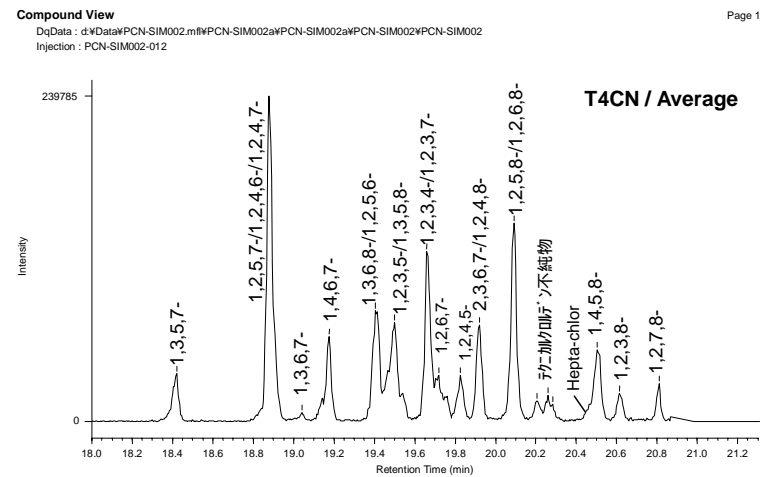
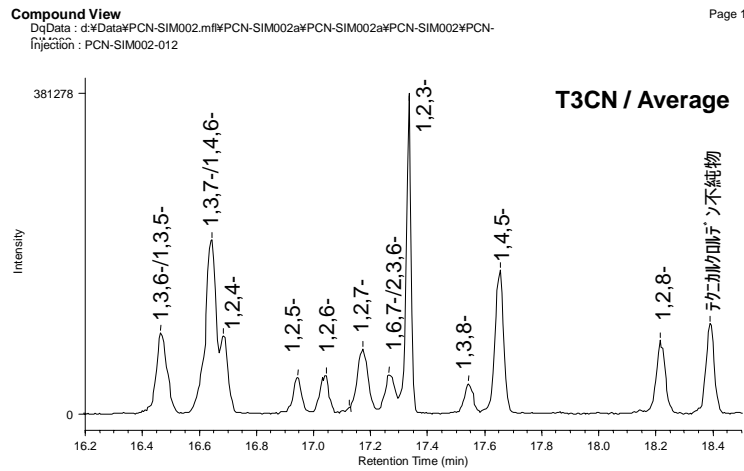
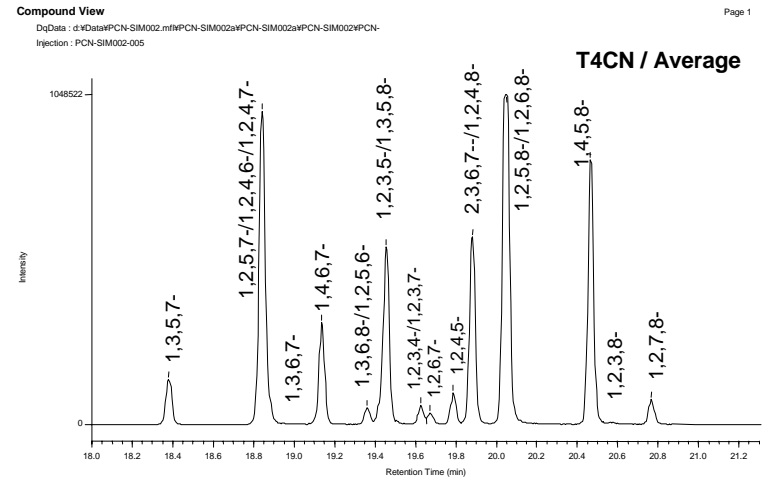
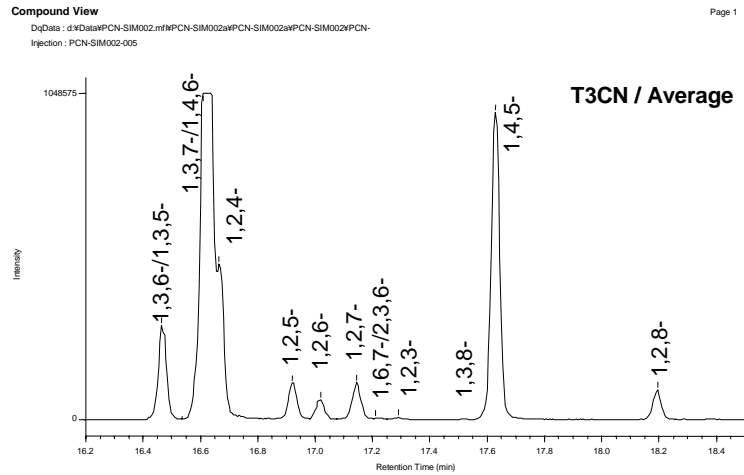


図 1 - 2 PCN(3 塩化物および 4 塩化物)の GC/MS-SIM クロマトグラム (上段 : Halowax 混合物、および下段 : 環境大気試料(PUF))

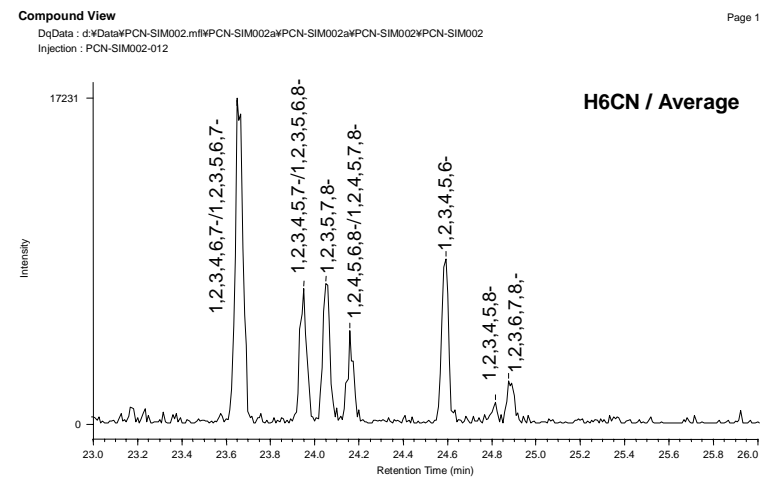
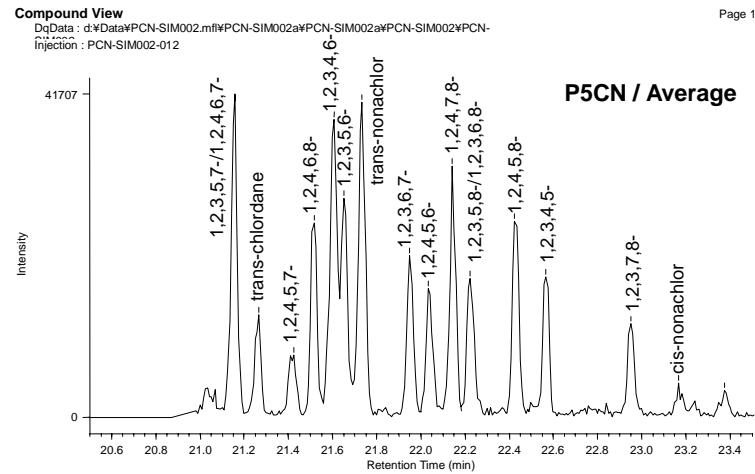
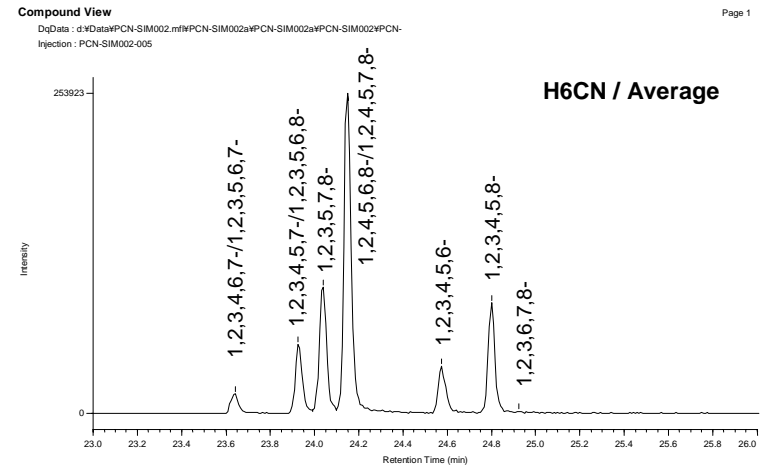
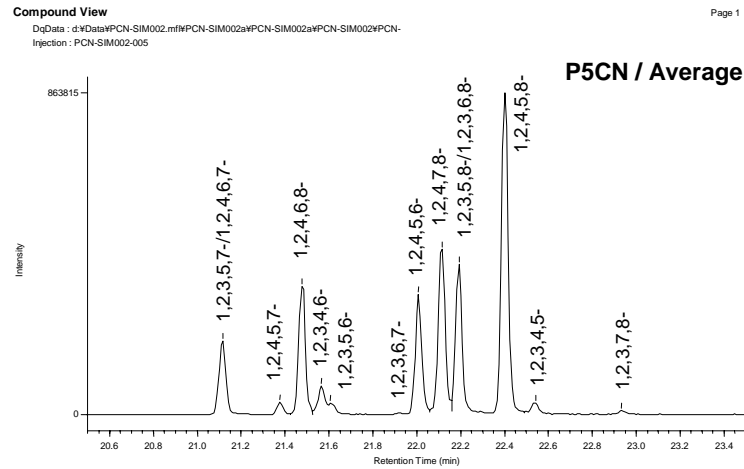


図 1 - 3 PCN(5 塩化物および 6 塩化物)の GC/MS-SIM クロマトグラム (上段 : Halowax 混合物、および下段 : 環境大気試料(PUF))

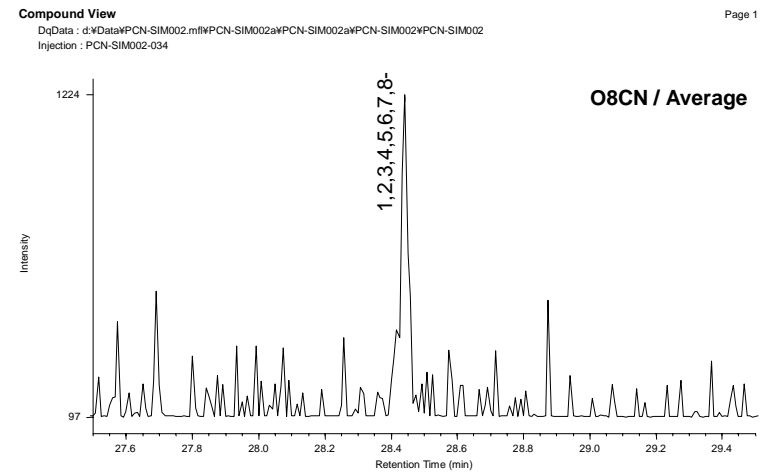
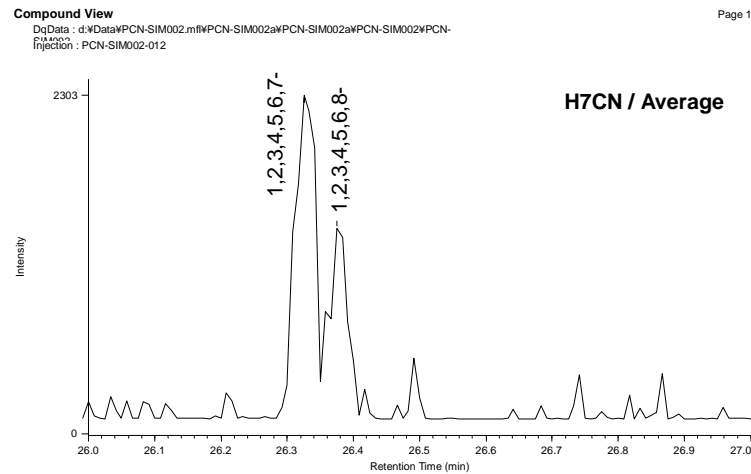
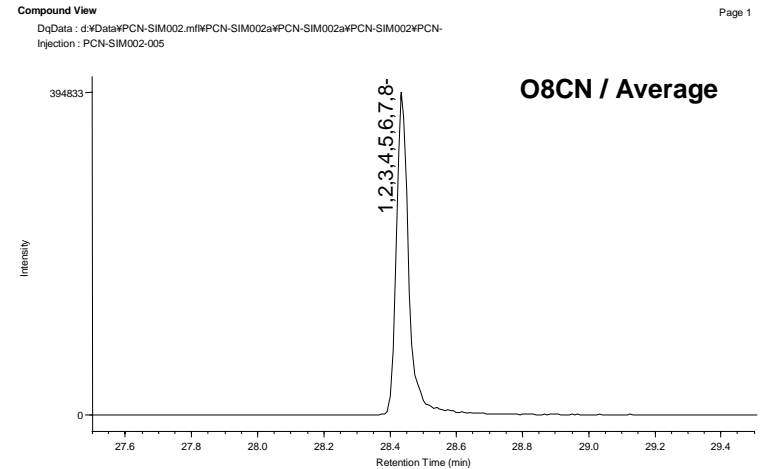
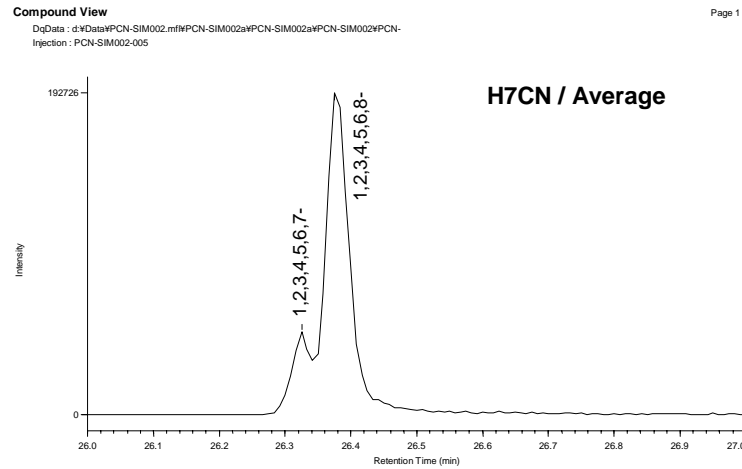
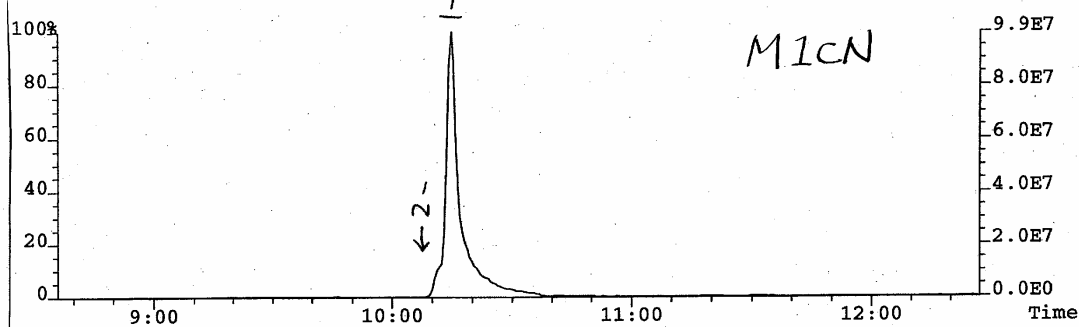


図 1 - 4 PCN(7 塩化物および 8 塩化物)の GC/MS-SIM クロマトグラム (上段 : Halowax 混合物、および下段 : 環境大気試料(PUF))

File:02I30PCN1 #1-1497 Acq: 1-OCT-2002 04:48:08 Start/Stop EI+ Voltage SIR Autospec->
162.0236 S:25 Exp:PCN_1



File:02I30PCN1 #1-1496 Acq: 1-OCT-2002 07:11:01 Start/Stop EI+ Voltage SIR Autospec->
162.0236 S:28 Exp:PCN_1

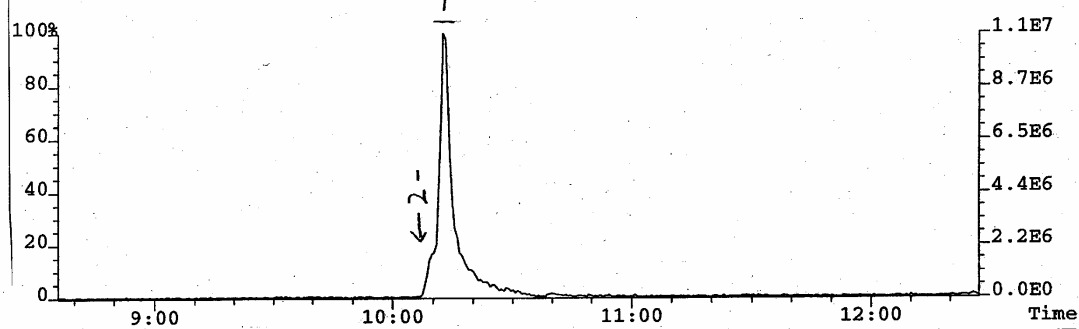
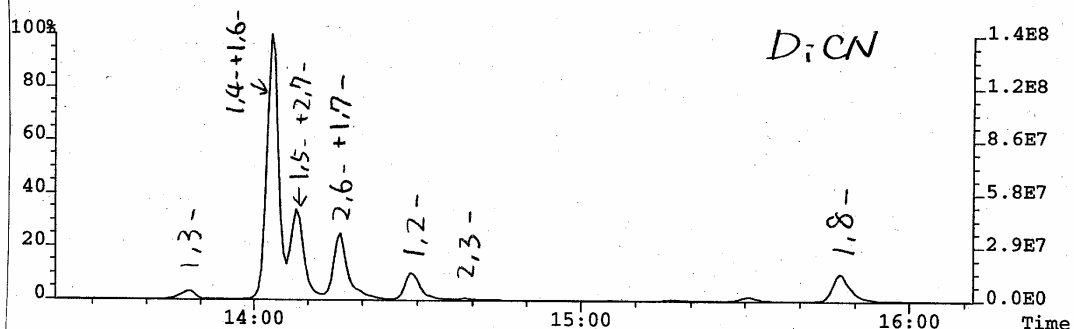


図 2 - 1 PCN (1 塩化物) の GC/MS-SIM クロマトグラム
(上段 : 環境水にハロワックス混合物を添加した試料、下段 : 底質試料)

File:02I30PCN1 #1-1497 Acq: 1-OCT-2002 04:48:08 Start/Stop EI+ Voltage SIR Autospec->
195.9847 S:25 Exp:PCN_1



File:02I30PCN1 #1-1496 Acq: 1-OCT-2002 07:11:01 Start/Stop EI+ Voltage SIR Autospec->
195.9847 S:28 Exp:PCN_1

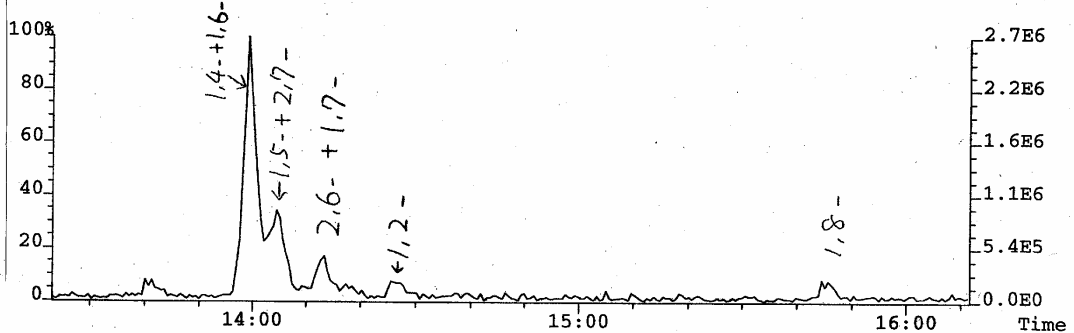


図 2 - 2 PCN (2 塩化物) の GC/MS-SIM クロマトグラム
(上段 : 環境水にハロワックス混合物を添加した試料、下段 : 底質試料)

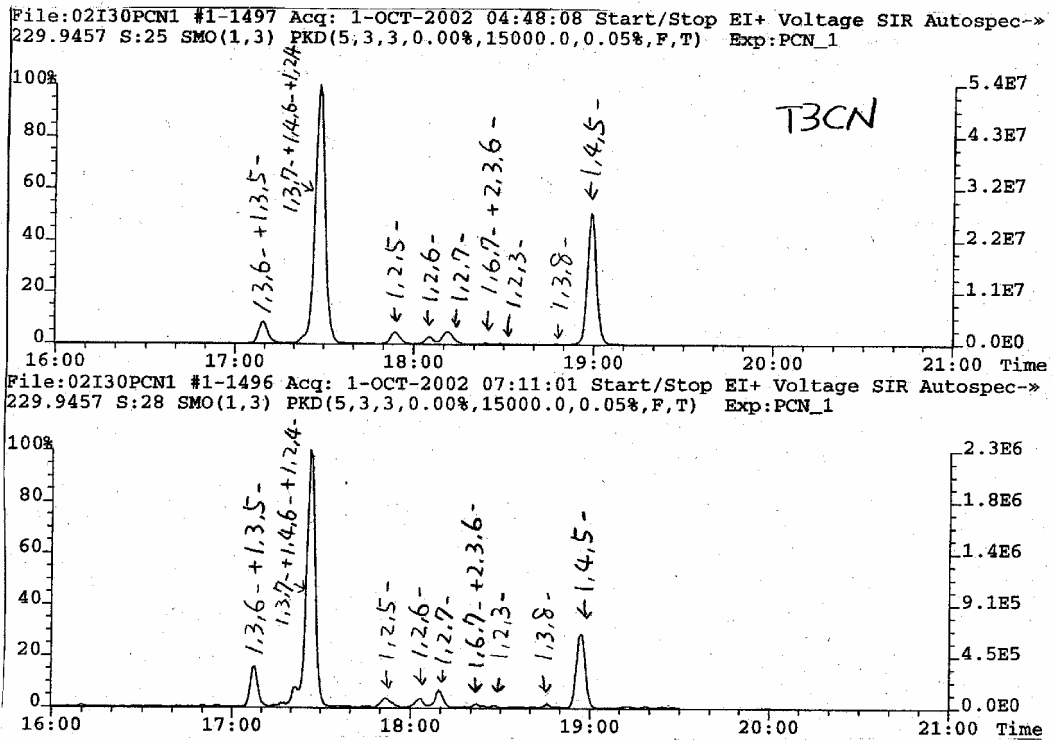


図 2 - 3 PCN (3 塩化物) の GC/MS-SIM クロマトグラム

(上段 : 環境水にハロワックス混合物を添加した試料、 下段 : 底質試料)

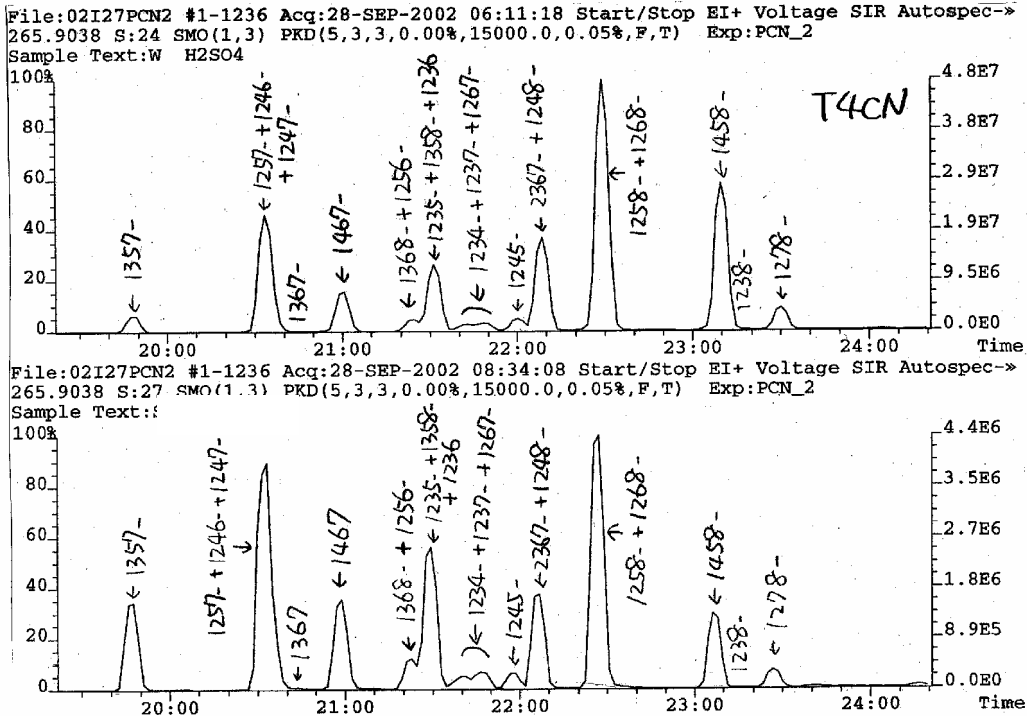


図 2 - 4 PCN (4 塩化物) の GC/MS-SIM クロマトグラム

(上段 : 環境水にハロワックス混合物を添加した試料、 下段 : 底質試料)

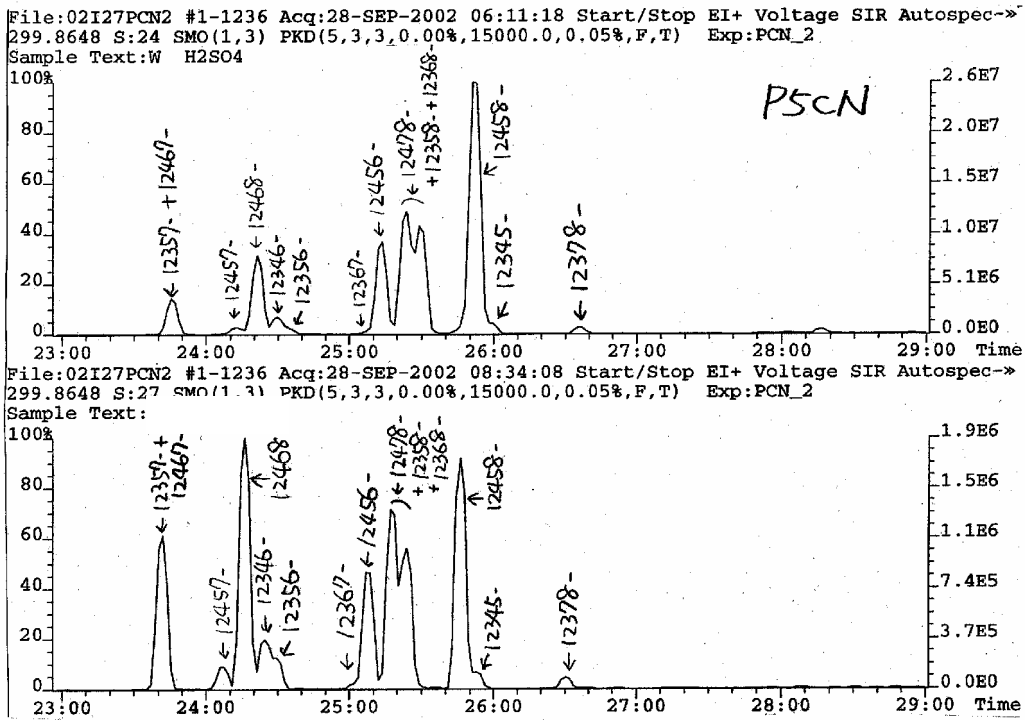


図 2 - 5 PCN (5 塩化物) の GC/MS-SIM クロマトグラム

(上段 : 環境水にハロワックス混合物を添加した試料、下段 : 底質試料)

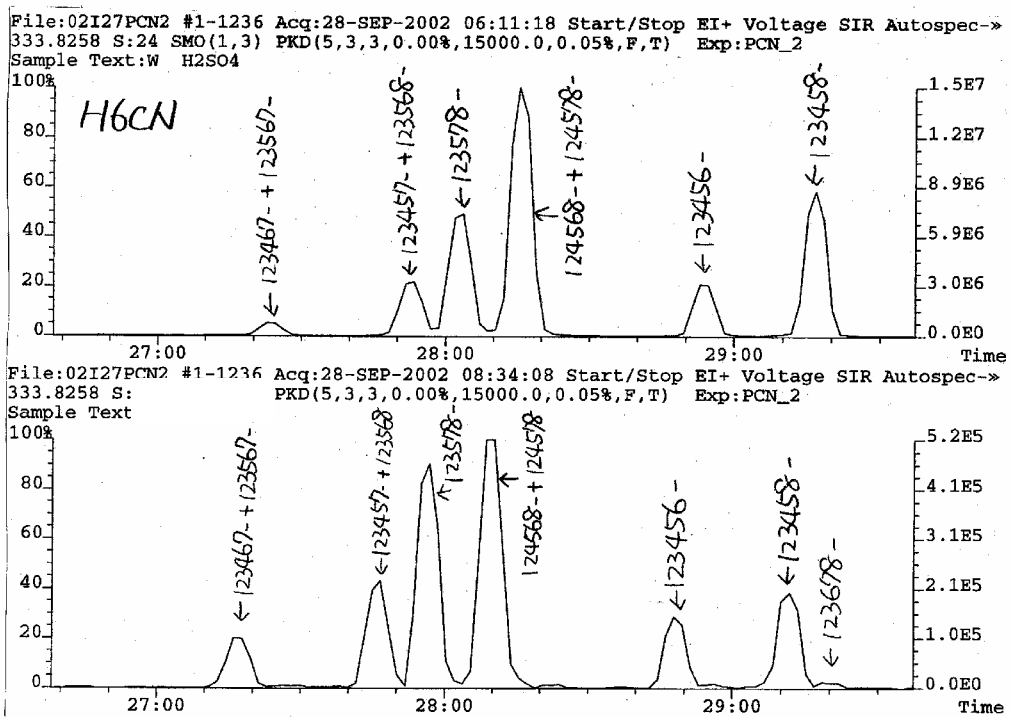


図 2 - 6 PCN (6 塩化物) の GC/MS-SIM クロマトグラム

(上段 : 環境水にハロワックス混合物を添加した試料、下段 : 底質試料)

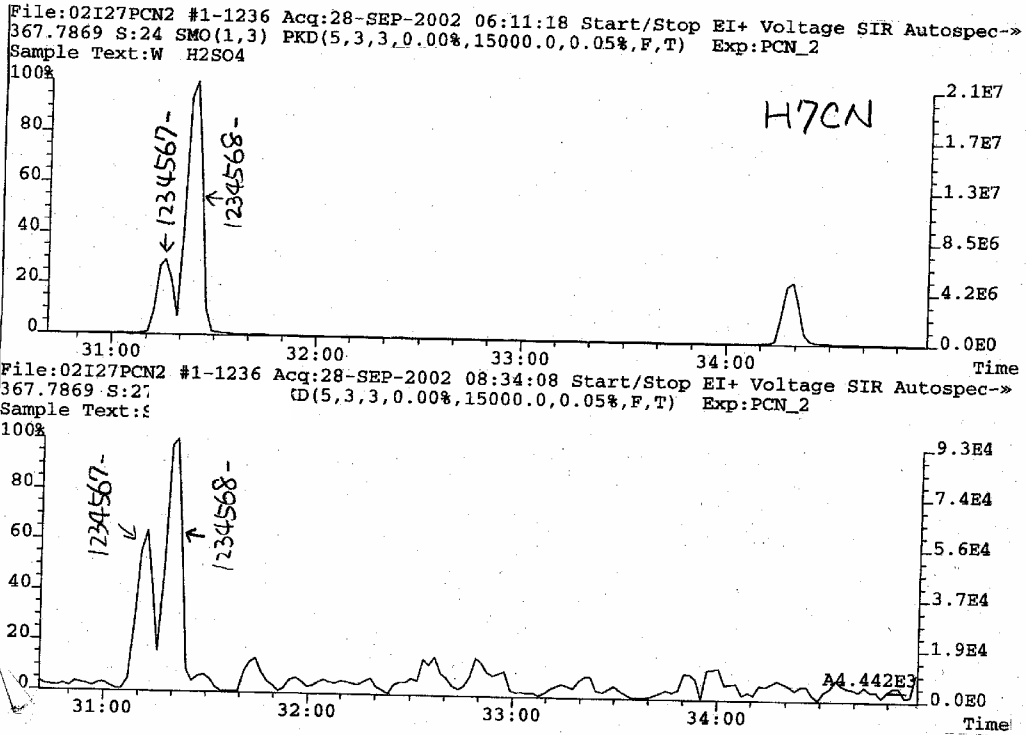


図 2 - 7 PCN (7 塩化物) の GC/MS-SIM クロマトグラム

(上段 : 環境水にハロワックス混合物を添加した試料、下段 : 底質試料)

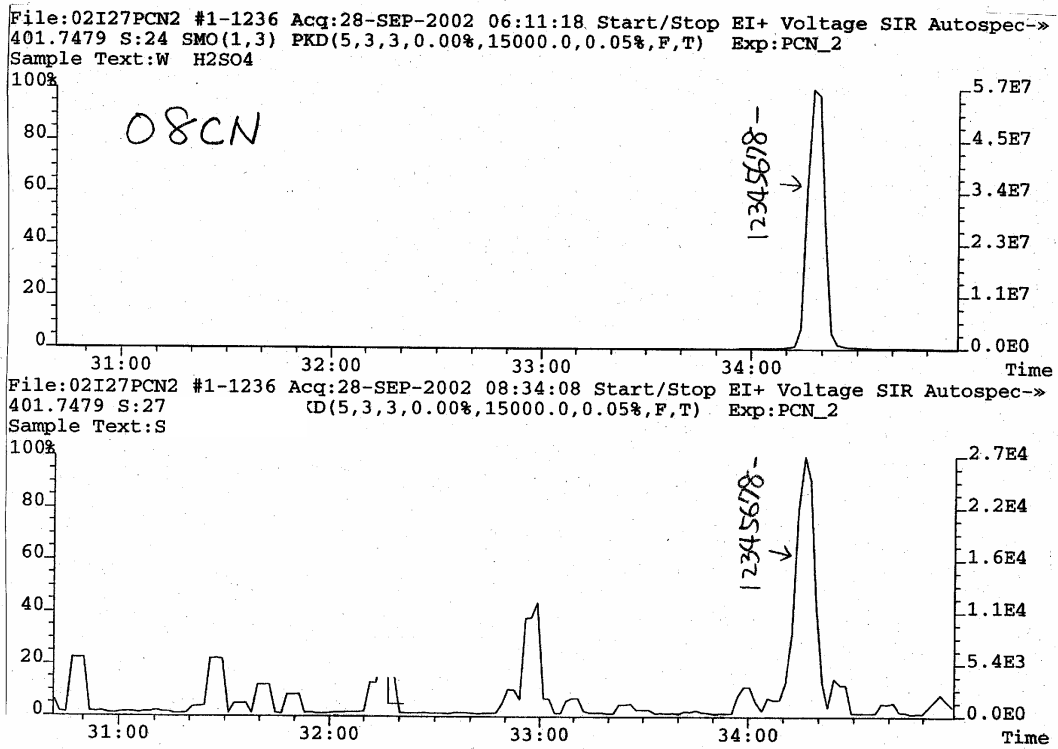


図 2 - 8 PCN (8 塩化物) の GC/MS-SIM クロマトグラム

(上段 : 環境水にハロワックス混合物を添加した試料、下段 : 底質試料)

．マイクロシスチン類の分析法

1 対象物質

マイクロシスチン総量

2 目標検出下限値及び定量下限値

目標検出下限値：MMPB として 0.1 ng (S/N = 5)

マイクロシスチン量として 0.5 ng

定量下限値：MMPB として 0.2 ng (S/N = 10)

マイクロシスチン量として 1.0 ng

3 分析法の概要

水質試料または底質試料からマイクロシスチンを抽出し、過マンガン酸カリウム/過ヨウ素酸ナトリウムで共役ジエンを酸化分解し、生成する 2-methyl-3-methoxy-4-phenyl butyric acid (MMPB)を LC/MS または GC/MS で定量し、マイクロシスチン-LR の量に換算してマイクロシスチン-LR 換算等量を求める。内部標準として、MMPB-d₃ を用いる。

4 試薬、器具および装置

(1) 試薬 (注1)

- ・マイクロシスチン標準溶液：市販標準品
- ・2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB)ナトリウム塩及び内部標準物質 (MMPB-d₃ナトリウム塩)標準品：市販標準品
- ・炭酸カリウム：特級試薬を用いる。
- ・メタノール：試薬特級を用いる。
- ・酢酸：試薬特級を用いる。
- ・抽出用 C18 カートリッジ：市販のものを用いる。
- ・過マンガン酸カリウム：試薬特級を用いる。
- ・過ヨウ素酸ナトリウム：試薬特級を用いる。
- ・亜硫酸水素ナトリウム：試薬特級を用いる。
- ・リン酸：試薬特級を用いる。

- ・ヘキサン：試薬特級を用いる。
- ・メチル化剤（BF₃-14%メタノール）：市販のものを用いる。
- ・塩化ナトリウム：試薬特級を用いる。
- ・蒸留水：市販のもの
- ・0.024 M 過マンガン酸カリウム溶液：過マンガン酸カリウム 38 mg を蒸留水に溶かして 10 mL とする。

（2）器具及び装置

- ・ガラス器具（遠心沈殿管（50 mL）、ピペット、メスシリンダー、テフロンライニングスクリューキャップ付円錐底試験管（10 mL）、酸化反应用テフロンライニングスクリューキャップ付丸底試験管（10 mL）など）
- ・試料採取容器（広口褐色ガラス瓶）
- ・遠心分離機
- ・超音波発生器
- ・ロータリーエバポレーター
- ・アルミブロックヒーター
- ・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。
- ・液体クロマトグラフ/質量分析計（LC/MS）：LC は LC/MS 専用のもの。MS は二重収束型もしくは四重極型のもの。

5 試料の採取・運搬

（1）採水地点

アオコの出現は日照や風に影響される。採水時間が午前 10 時～午後 3 時位までの間は水面に集積し易い。また、風下に吹き寄せられるので、採水にあたっては風向きに注意する。定点と移動点を設定しておく。

（2）水質試料

水質試料の表層水（水面から 30 cm 位まで）をバケツなどで汲み、よく混合する。試料採取容器に 8 割程度まで試料水を満たし、冷蔵状態で試験室まで運び、速やかに分析

する。

(3) 底質試料

底質試料は採取後、試料採取容器に入れ、冷蔵状態で試験室まで運び、冷凍保管し、速やかに分析する。

試料容器は純水で十分洗浄後、200 程度のオープンで6時間ほど加熱し、冷却後密栓して清浄な場所に保管する。

6 試験操作 (注2)

(1) 前処理

(ア) 水質試料

均一に攪拌混合した試料水 200 mL をスクリーキャップ付き遠沈管に移し、10 mL の酢酸を加え、密栓して超音波発生器の水槽に漬けて3分間処理する。処理後、2,500 rpm で20分間遠心分離し、上澄み液を取り出す。残渣にメタノール 30 mL を加えて、同様の操作をし、上澄み液を合わせる。

(イ) 底質試料

底質試料 10 g (湿重量) をスクリーキャップ付き遠沈管 (50 mL) に移し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0) を含む 80%メタノール 20 mL を加え、密栓して超音波発生器の水槽に漬けて3分間処理する。処理後、2,500 rpm で20分間遠心分離し、上澄み液を取り出す。同様の操作をし、上澄み液を合わせ、蒸留水で5倍に希釈する。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

前処理法で得られた液を活性化した C18 カートリッジ (注3) に通し、マイクロシスチンを吸着させる。20 mL の蒸留水及び 20 mL の 20%メタノールでカートリッジを洗浄し、3 mL の 80%メタノールでマイクロシスチンを溶出する。溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、1.0 mL の 20%メタノールに溶解する。この溶液 0.100 mL を丸底試験管に入れ、0.5M 炭酸カリウム水溶液 0.4 mL を加え (注4)、これを氷冷する。これに 1.0 mL の過マン

ガン酸溶液、0.10 mL の飽和過ヨウ素酸ナトリウム溶液（注 5）を加えて氷水中に 1 時間保持する。その後、室温に 3 時間置く（30 分に 1 回程度攪拌する）。酸化後、精製水 4 mL と 20% 亜硫酸水素ナトリウム溶液を無色透明になるまで攪拌しながら加える（0.02 ~ 0.03 mL）。透明になった溶液に、2.0 M リン酸を加えて、pH 3 以下にする（約 1.0 mL）。さらに、サロゲート物質水溶液（MMMPB-d₃ 0.5 µg 相当）を加え均一になるように攪拌する。この溶液を 1 mL のポリスチレンポリマーカートリッジ（注 6）に通し、蒸留水 1 mL でカートリッジを洗浄し、0.2 mL の 90% メタノールで 2 回 MMPB を溶出する。さらに 0.6 mL の精製水でカートリッジを洗う。溶出液と洗浄液を合わせ、一定容量（2.0 mL）にしたものを LC/MS 用の試料液とする。

GC/MS 試料の場合は MMPB 溶出液にトリエチルアミンを一滴加え、N₂ ガス気流下、35 以下で濃縮乾固する。これに 14% 三フッ化ホウ素-MeOH（14% BF₃-MeOH）を 0.2 mL 加えて密栓し、70 °C、20 分加熱する。加熱後、4 mL の飽和食塩水と 2 mL のヘキサンを加えて激しく振とうし、ヘキサン層を分け取る。ヘキサンによる抽出をさらに 2 回行い、分け取ったヘキサン抽出液は氷水中で冷却しながら N₂ 気流下で、0.1 mL 程度まで濃縮し、ヘキサンで一定容量にしたものを GC/MS 用試料液とする。

（イ）底質試料

水質試料と同様にして LC/MS および GC/MS 用の試料液を調製する。

（3）空試験液の調製

水質試料及び底質試料の代わりに蒸留水 200 mL を用いて試料溶液の調製と同様の操作を行って調製したものを空試験溶液とする。

（4）添加回収試験液の調製

水質試料 200 mL にマイクロシスチン-LR の標準溶液（10 mg/mL）を 1 ~ 5 µg/L になるように、あるいは任意の底質試料 10 g にマイクロシスチン標準液を添加し、十分に混合した後、「前処理法」ならびに「試験液の調製」に従って操作を行い、得られた試験液を添加回収試験液とする。

（5）標準液の調製

- ・ ミクロシスチン標準原液 (10 µg/mL) : 市販のミクロシスチン-LR の標準溶液を用いる。
- ・ MMPB 標準原液 (100 µg/mL) : MMPB ナトリウム塩 1 mg を正確にメスフラスコ (10 mL) に採り、50%メタノールを加えて全量を 10 mL とする。本溶液は、密栓できる褐色ガラス試験管に入れて冷蔵庫に保存する。
- ・ 内標準原液 : 内標準 (MMPB-d₃ ナトリウム塩) 1 mg を正確にメスフラスコ (10 mL) に採り、50%メタノールを加えて全量を 10 mL とする。本溶液は、密栓できる褐色ガラス試験管に入れて冷蔵庫に保存する。
- ・ 内標準液 (10 µg/mL) : 内標準原液 1 mL をメスフラスコ (10 mL) に採り、50%メタノールを加えて全量を 10 mL とする。本溶液 1 mL は内標準を 10 µg 含む。

(6) 測定

(ア) LC/MS 測定条件の例

(a) HPLC

- ・ カラム : C18 シリカ系充填剤の LC カラム (注7) (i.d. 2.1 × 150 mm)
- ・ 移動相 : 0.001% 酢酸 : アセトニトリル = 60 : 40
- ・ 流速 : 0.2 mL/min
- ・ カラム温度 : 40
- ・ 注入試料量 : 5 ~ 50 µL

(b) MS

- ・ イオン化法 : ESI
- ・ ポラリティ : ネガティブ
- ・ ネブライザー : N₂
- ・ SIM (m/z) : 207 (MMPB), 210 (内部標準、MMPB-d₃)

保持時間 : 6.0 min (MMPB)

定量下限値 : MMPB = 10 pg (= 48 pg ミクロシスチン)(注8)

(イ) GC/MS の測定条件の例

(a) GC

- ・ カラム : HP-1 キャピラリーカラム (内径 0.25 ~ 0.32 mm, 長さ 25 m 程度)

- ・ カラム温度：一例として、80 (1分) 5 /分 250
- ・ 注入口温度：250
- ・ 注入法：スプリットレス
- ・ キャリアーガス：ヘリウム (カラム流速は 1mL/分)

(b) MS

- ・ イオン化法：CI (反応ガス = イソブタン)
- ・ 検出モード：SIM, モニターイオン 223[(MMPB methyl ester + 1)+], 226 [(内部標準、MMPB-d₃ methyl ester + 1)+]

保持時間：MMPB methyl ester (16.05 分)、MMPB-d₃ methyl ester (16.02 分)

検出下限：MMPB-methyl ester = 100 pg (= 430 pg ミクロシスチン)

(ウ) 検量線

毎測定時に検量線を作成する。検量線標準液は下記の方法で調製する。

- ミクロシスチン-LR 標準溶液をメタノールで希釈して 0.5 µg/mL ~ 5.0 µg/mL を調製し、0.05 µg ~ 1.0 µg を取り分け、窒素ガスで乾燥させる。これを 0.4 mL の 0.5M 炭酸カリウムに溶解し、「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた MMPB 溶液又は MMPB methyl ester 溶液を LC/MS または GC/MS 用の検量線用標準液とする。
- MMPB 標準液を純水で希釈して 0.5 µg/mL ~ 5.0 µg/mL を調製し、0.01 µg ~ 1.0 µg を取り分けたものを LC 用標準液とする。MMPB 標準溶液をメタノールで希釈して 0.5 µg/mL ~ 5.0 µg/mL を調製し、0.01 µg ~ 1.0 µg を取り分け、窒素ガスで乾燥させる。これを「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた MMPB methyl ester 溶液を GC/MS 用の検量線用標準液とする。

検量線はミクロシスチン-LR でも MMPB でもよいが、ミクロシスチンから MMPB の生成率は 68~72% (平均 70.7%) である。

(エ) 試料液の測定

検量線の作成後、測定用試料液、空試験液および添加回収試験液の一定量を LC/MS または 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。もし、この範囲を外れた場合は、LC/MS または GC/MS を再調整後、検量線を作成し直して、測定を再開する。

7 同定、定量および計算

(1) 同定

測定結果から、定量用および確認用モニターイオンが当該保持時間に観察されたものについて、定量と計算を行う。

(2) 定量および計算

試料液のピーク面積比を上記の検量線に照らして MMPB または MMPB methyl ester 量(A mg) を求める。

(ア) 各試料液中の MMPB の量(B)は

$$B = [A/LC \text{ への注入量 (mL)}] \times \text{試料液量 (mL)}$$

B mg は試験水 200 mL 中の量であるから、試験水 1 L 中の MMPB の濃度は $5B \mu\text{g/L}$ である。なお、底質試料については乾燥重量に換算する。

$$\text{マイクロシスチン濃度 (}\mu\text{g/L)} = \frac{5B \mu\text{g} \times 1000 \text{ (マイクロシスチンの平均分子量)}}{208 \text{ (MMPB の分子量)}}$$

(イ) MMPB methyl ester の場合は、

$$B = [A/GC \text{ への注入量 (mL)}] \times \text{試料液量 (mL)}$$

B μg は試験水 200 mL 中の量であるから、試験水 1 L 中の MMPB の濃度は $5B \mu\text{g/L}$ である。なお、底質試料については乾燥重量に換算する。

$$\text{マイクロシスチン濃度 (}\mu\text{g/L)} = \frac{5B \mu\text{g} \times 1000 \text{ (マイクロシスチンの平均分子量)}}{222 \text{ (MMPB methyl ester の分子量)}}$$

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「II. 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

- (注1) 1) 関東化学(株)からマイクロシスチン-LR, -YR, -RRの20%メタノール溶液が市販されている(備考1)。
- 2) MMPB および MMPB-d₃ のナトリウム塩は和光純薬から市販されている(備考1)。
- 3) 包装容器には1 mg と記載してあるが、通常 1.2~2.5 mg 入っているので、正確に計る必要がある。
- 4) MMPB および MMPB-d₃ の分子吸光係数を $\epsilon_{\max}(\text{H}_2\text{O})_{207\text{ nm}}(, 7600)$ として濃度計算する。
- 5) 水溶液中の MMPB は室温や冷蔵庫内でバクテリアやカビで分解する場合があるので、3~4日使用しない場合は凍結保存する。
- 6) C18 カートリッジ: オクタデシルシラン(O DS)のカートリッジ。
- (注2) 処理中の試料の温度を 40 以上に上げない。特に、超音波処理による温度の上昇を抑えるために、氷等で冷やす。
- (注3) カートリッジにメタノール 10 mL および蒸留水 20 mL を通して活性化する。シリカベースの C18 カートリッジはエンドキャッピングがしてないので、塩基性物質(マイクロシスチン RR や WR 等)は吸着し、メタノールで溶出しにくくなる。このような場合は少量の酸を加えたメタノール溶液で溶出する。
- ポリマー系のカートリッジ(例えば、GLサイエンスの InertSep RP-1 等)を用いればこのような吸着はない(備考1)。溶出条件は C18 カートリッジとほぼ同じ。
- (注4) 丸底試験管中で酸化する。溶けにくい場合は超音波で溶かす。機械的に攪拌できるもの(振とう機等)を用いると便利である。
- (注5) 飽和過ヨウ素酸ナトリウム溶液は過ヨウ素酸ナトリウム 1 g に精製水 9 mL を加えて調製する。過ヨウ素酸ナトリウム溶液は分解し易いので、酸化処理の前に調製する。

(注6) 例えば、GLサイエンス製の InertSep RP-1 の 30 mg/mL カートリッジ、メタノール 1 mL、精製水 1 mL で洗浄したもの(備考1)。酸化分解による MMPB の生成率は 69~73%(平均 70.7%)。カートリッジからの MMPB の回収率は 71~74%(平均 73.4%)。

(注7) Zorbax Eclipse XDB C18 など(備考1)。

(注8) LC/MS の感度は装置によって 10~300 倍程度異なる。感度が悪い場合は試料量を増やすか、LC/MS への注入量を増やして対応する。

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

10 参考

(1) 底質試料からのミクロシスチンの抽出は添加回収率が 60~70%程度、底質試料を乾燥させるとほとんど回収できない。

(2) 生物試料については、添加回収率が悪いため記載していない。これはミクロシスチンが生体成分と反応するため。

参考文献

- 1) Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F. and Kaya, K.: *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **49**, 163-170 (1992)
- 2) Kaya, K. and Sano, T.: *Anal. Chim. Acta*, **386**, 107-112 (1999)
- 3) Tsuji, K., Masui, H., Uemura, H., Mori, Y. and Harada, K.: *Toxicol.*, **39**, 687-692 (2001)
- 4) 高木博夫, 白井美幸, 佐野友春, 彼谷邦光: LC/MS を用いた総ミクロシスチンの定量法の開発, 第 12 回環境化学討論会(新潟)要旨集, 562-563 (2003)

．エストラジオールおよびその代謝産物の分析法（LC/MS/MS法）

1 対象物質

17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール、エストロン、エストリオール、エチニルエストラジオール、17 β -エストラジオール-3-硫酸、17 α -エストラジオール-3-グルクロニド、17 β -エストラジオール-17 β -グルクロニド、エストロン-3-硫酸、エストロン-3-グルクロニド、エストリオール-3-硫酸、エストリオール-3-グルクロニド

2 目標検出限界

本分析法の目標検出下限は、水質試料で 0.1 ng/L、底質及び生物質で 0.1 μ g/kg（乾泥）である。目標定量下限は、水質試料で 0.3 ng/L、底質及び生物質で 0.3 μ g/kg（乾泥）である（注1）。

3 分析法の概要

水質試料は、サロゲート物質を加え、固相抽出法により抽出を行なう。捕集された対象物質を、酢酸エチルで抱合体以外を溶出しフリー体画分とし、ついでトリエチルアミンメタノールで溶出し抱合体画分とする。フリー体画分は窒素下で濃縮乾固しフロリジルカラムにより精製後、抱合体画分は窒素下で濃縮後、液体クロマトグラフ-負イオンエレクトロスプレーイオン化質量分析法により定量する。

底質試料は、サロゲート物質を添加し、アセトニトリル水溶液で2回超音波抽出を行なう。ロータリーエバポレーターにより濃縮後、精製水を加えた後、固相抽出する。捕集された対象物質を、酢酸エチルで抱合体以外を溶出しフリー体画分とし、ついでトリエチルアミンメタノールで溶出し抱合体画分とする。フリー体画分は濃縮後、ゲルろ過クロマトグラフおよびフロリジルカラムにより精製後、液体クロマトグラフ-負イオンエレクトロスプレーイオン化質量分析法により定量する。抱合体画分は、濃縮後、精製水に溶解しポリアミドカラムによる精製の後、液体クロマトグラフ-負イオンエレクトロスプレーイオン化質量分析法により定量する。

4 試薬、器具及び装置

（1）試薬

- ・ 17 -エストラジオール（市販標準試薬）
- ・ 17 -エストラジオール（市販標準試薬）
- ・ エストロン（市販標準試薬）
- ・ エストリオール（市販標準試薬）
- ・ エチニルエストラジオール（市販標準試薬）
- ・ 17 -エストラジオール-3-硫酸（市販標準試薬）
- ・ 17 -エストラジオール-3-グルクロニド（市販標準試薬）
- ・ 17 -エストラジオール-17-グルクロニド（市販標準試薬）
- ・ エストロン-3-硫酸（市販標準試薬）
- ・ エストロン-3-グルクロニド（市販標準試薬）
- ・ エストリオール-3-硫酸（市販標準試薬）
- ・ エストリオール-3-グルクロニド（市販標準試薬）
- ・ $^{13}\text{C}_4$ -エストラジオール（市販標準試薬）
- ・ $^{13}\text{C}_4$ -エストロン（市販標準試薬）
- ・ $^{13}\text{C}_4$ -エストリオール（市販標準試薬）
- ・ $^{13}\text{C}_2$ -エチニルエストラジオール - d_2 （市販標準試薬）
- ・ エストロン-3-硫酸- d_4 （市販標準試薬）
- ・ 17 -エストラジオール-硫酸- d_4 （市販標準試薬）
- ・ $^{13}\text{C}_4$ -17 -エストラジオール-3-グルクロニド（市販標準試薬）
- ・ ヘキサン、アセトン、メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ジクロロメタン（残留農薬分析用）
- ・ トリエチルアミン（試薬特級）
- ・ 塩酸（試薬特級）
- ・ 精製水：対象物質を含まないもの
- ・ フロリジルミニカラム：（注2）
- ・ ポリアミドカラム：（注3）
- ・ 固相抽出カラム：（注4）
- ・ GPC カラム：ゲルろ化担体（注5）をガラスカラム（1 cm i.d. × 25 cm）に充填したもの
- ・ グラスファイバー濾紙：試料水の濾過に用いる（注6）。

(2) 器具及び装置

- ・ 負イオンエレクトロスプレーイオン化質量分析計
- ・ 高速液体クロマトグラフ
- ・ パスツールピペット
- ・ コンセントレーター：固相抽出カラムによる水質試料からの捕集に用いる。
- ・ 超音波洗浄機：底質試料からの抽出に用いる。
- ・ 遠心分離器：底質の液固分離に用いる。
- ・ ロータリーエバポレーター
- ・ 窒素吹き付け装置：試料液の濃縮・乾固及びアルカリ分解に用いる。

5 試料の採取・運搬

洗剤、水、1M塩酸-メタノール、水、アセトンの順で洗浄した1Lの共栓付ガラスビンに試料水を採取し、冷暗所(4℃以下)で保存する。エストラジオール類は微生物による分解が速いので、サンプルは冷蔵輸送し、直ちに抽出すること。やむなく保存する場合は凍結保存すること。底質は、湿重量約50gの底質を採取し、遠心分離(2,000g、20分)して水分をできるだけ除いた後、直ちに凍結する。分析時に凍結乾燥し、乾燥試料は均一に混合し分析に供する。

6 試験操作

(1) 前処理法

(ア) 水質試料

試料水1Lを正確に計り取り、懸濁物質の多い試料はグラスファイバー濾紙で濾過をする(注7)。サロゲート1ng(0.01µg/mLアセトニトリル水溶液、100µL)(注8)を加え、よく振り混ぜて混合する。これを固相抽出カラム(注9)に通水する。精製水5mLで固相抽出カラムを洗浄後、酢酸エチル6mLで溶出し、10mLの遠心管に受ける(フリー体画分)。ついで5mMトリエチルアミン/メタノール10mLでE3および抱合体を溶出させる(抱合体画分)。この溶出液に、窒素を吹き付け乾固する。

(イ) 底質試料

凍結乾燥した底質 1 g (注 10) を 50 mL の遠沈管にとり、サロゲート (0.01 µg/mL アセトニトリル水溶液、100 µL) を添加し、アセトニトリル：水 (9：1、v/v) 20 mL を加え、20 分間超音波抽出後、2,000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、上澄み液をとる。残さにはさらにアセトニトリル：水 (9：1、v/v) 20 mL を加え、20 分間超音波抽出後、2,000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、上澄み液をとる。遠心管および残渣をアセトニトリル：水 (9：1、v/v) 20 mL で洗浄し、吸引ろ過する。上澄み液とろ液を合わせ、ロータリーエバポレーターで 40 °C で 10 mL 以下まで濃縮する。これに精製水 50 mL を加え超音波などを用いて均一に混合したのち、固相抽出カラム (注 9) に通水する。精製水 5 mL でカートリッジカラムを洗浄後、酢酸エチル 6 mL で溶出し、10 mL の遠心管に受ける (フリー体画分)。ついで 5 mM トリエチルアミン / メタノール 10 mL で E3 および抱合体を溶出させる (抱合体画分)。この溶出液に、窒素を吹き付け乾固する。

フリー体画分の残留物にジクロロメタン / メタノール (1:1, v/v) 1 mL を加えて溶かし、ゲル濾過カラム (注 5) (1 cm i.d. × 25 cm) に流し入れる。ジクロロメタン / メタノール (1:1, v/v) で展開し、最初の 20 mL を捨て、次の溶出液 10 mL をとり、窒素を吹き付け乾固する。残留物にヘキサン / ジクロロメタン (3:1, v/v) 1 mL を加えて溶かし、あらかじめヘキサン 5 mL で洗浄したフロリジルカラム (注 2) (500 mg) に流し入れ、ヘキサン / ジクロロメタン (3:1, v/v) 5 mL で洗浄、アセトン / ジクロロメタン (5:95, v/v) 5 mL で溶出させ、試験管にとる (注 11)。

抱合体画分の残留物に、蒸留水 10 mL と 4 M 塩酸 50 µL を加えて溶かし、予めメタノール、蒸留水各 5 mL で洗浄したポリアミドカラム (Supelco Discovery DPA-6S, 500 mg) に流し入れる。蒸留水、25% メタノール水溶液 5 mL で洗浄後、しばらく吸引乾燥した後、5 mM トリエチルアミン / メタノール 5 mL で溶出させ、試験管にとる。

(2) 試験液の調製

それぞれの画分は窒素ガスにより濃縮した後、5% アセトニトリル水溶液 100 µL で再溶解し、試験液とする (注 12)。

(3) 空試験液の調製

水質試料については、ブランク水 1,000 mL に試験水に添加したのと同量のサロゲートを添加し、底質については試料に添加したのと同量のアセトニトリル水溶液とサロゲートを

添加したものについて、「前処理法」及び「試験液の調製」に従って操作を行い、得られた試験液を空試験液とする。

(4) 添加回収試験液の調製

水質試料 1,000 mL、底質試料 1 g に対象物質各 1 ng(0.01 µg/mL アセトニトリル水溶液、100 µL) を添加し、十分に混合した後、「前処理法」及び「試験液の調製」に従って操作を行い、得られた試験液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製 (注 13)

17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール、エストロン、エストリオール、エチニルエストラジオールの 1,000 µg/mL のアセトン溶液を調製する。17 β -エストラジオール-3-硫酸、17 β -エストラジオール-3-グルクロニド、17 α -エストラジオール-17-グルクロニド、エストロン-3-硫酸、エストロン-3-グルクロニド、エストリオール-3-硫酸、エストリオール-3-グルクロニド 1,000 µg/mL の水溶液を調製する。各標準液から、一定量を正確に計り取り、各対象物質濃度がそれぞれ 0.1 µg/mL (標準混合液 A) 0.01 µg/mL (標準混合液 B) 及び 0.001 µg/mL (標準混合液 C) となるように 5% アセトニトリル水溶液で正確に希釈したものを、混合標準溶液とする。

¹³C₄-エストラジオール、¹³C₄-エストロン、¹³C₄-エストリオール、¹³C₂-エチニルエストラジオール-d₂、エストロン-3-硫酸-d₄、17 β -エストラジオール-硫酸-d₄、¹³C₄-17 β -エストラジオール-3-グルクロニドの 100 µg/mL メタノール標準液を調製する。各標準液から、一定量を正確に計り取り、各対象物質濃度がそれぞれ 0.1 µg/mL (サロゲート混合液 A) 0.01 µg/mL (サロゲート混合液 B) となるように 5% アセトニトリル水溶液で希釈したものを、混合サロゲート溶液とする。

(6) 測定

(ア) LC/MS/MS 測定条件 (注 13)

(a) 高速液体クロマト部

・ カラム : ODS カラム (注 14) (2mm i.d. × 150mm, 3.5µm, Agilent)

・ カラム温度 : 35

条件 1 (備考)

溶離液 A : アセトニトリル

溶離液 B : 蒸留水

溶離液 C : 100mM トリエチルアミン :

A:B:C= 0:80:20 (0min) – 40:40:20 (12min) – 80:0:20 (15min)で直線グラジエント、その後 2 分間保持する。

条件 2 (備考)

溶離液 A : アセトニトリル

溶離液 B : 蒸留水

A:B= 20:80 (0min) –100:0 (15min)で直線グラジエント、その後 2 分間保持する。

条件 3 (備考)

溶離液 A : アセトニトリル

溶離液 B : 蒸留水

溶離液 C : 100 mM 蟻酸

A:B:C= 0:80:20 (0min) – 40:40:20 (12min) – 80:0:20 (15min)で直線グラジエント、その後 2 分間保持する。

(b) 質量分析部

- ・ イオン化法 : ESI (10 pg 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)
- ・ キャピラリー電圧 2,500 ~ 3,500V
- ・ イオン源温度 : 150 ~ 250
- ・ 検出モード : MRM

(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

対象物質	MRM Ion	Cone (V)	Collision (V)
Estrone	269>145	70	40
17 α -Estradiol	271>145	70	40
17 β -Estradiol	271>145	70	40
Estriol	287>171	70	35
Estrone-Glucuronide	445>269	40	40
Estrone-Sulfate	349>269	70	40
Estradiol-3-Glucuronide	447>271	40	35
Estradiol-17-Glucuronide	447>271	40	35
Estradiol-3-Sulfate	351>271	70	35
Estriol-3-Glucuronide	463>287	40	40
Estriol-3-Sulfate	367>287	35	30
17 α -Ethyanyl Estradiol	295>145	70	40
Estrone- ¹³ C ₄	273>149	70	40
17 β -Estradiol- ¹³ C ₄	275>149	70	40
Estriol- ¹³ C ₄	291>175	70	35
Estrone-Sulfate- <i>d</i> ₄	353>273	70	40
Estradiol-17-Glucuronide- ¹³ C ₄	451>275	40	35
17 β -Estradiol-3-Sulfate- <i>d</i> ₄	355>275	70	35
17 α -Ethyanyl Estradiol- ¹³ C ₂ <i>d</i> ₂	299>145	70	40

(イ) 検量線 (注 15)

標準混合液 A、B、C、D を 10 mL の遠心管に、それぞれ正確に 1 mL 量り採る。これらにサロゲート標準液 (0.1 μ g/mL アセトン溶液) 100 μ L を添加し、この 5 μ L を LC/MS/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) 試料の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試験液及び添加回収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試料液を注入し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし、20% を越えていれば LC/MS/MS を再調整後、検量線を作成し直して測定

を再開する。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

対象物質のピークが予想保持時間と±0.2分以内に出現し、サロゲートピークとの相対保持時間が±1%以内の差で合っていれば、物質が存在しているを見なす。

(2) 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。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

$$\text{水質試料中濃度 (ng/L)} = \text{検出量 (ng)} / \text{試料量 (L)}$$

$$\text{底質試料中濃度 (ng/kg)} = \text{検出量 (ng)} / \text{試料量 (kg)}$$

8 分析精度管理

本調査マニュアルの「II. 分析精度管理」に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

(注1) 装置の検出下限が10 pg以下であること。

(注2) ここではバリアン社製 Bond Elute FL を用いた(備考1)。

(注3) ここではスペルコ社製 Discovery DPA-6S を用いた(備考1)。

(注4) ここでは昭和電工社製 EDS-1 を用いた(備考1)。

(注5) アマシャム社製 Sephadex LH-20 または同等以上のもの(備考1)。

(注6) ここではワットマン GF/C (47 mm) を用いた(備考1)。

(注7) 懸濁物質の多い水質試料では事前にグラスファイバー濾紙で濾過しておく。濾過された懸濁物質は、10 mL のメタノールで抽出する。抽出液は濾過水に合わせる。抽出液は濾過する必要はない。また、使用するグラスファイバー濾紙はメタノー

ル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ので、このような濾紙は使用しない。

- (注 8) サロゲートの添加量は試料中濃度に応じて 1~5 ng の範囲で添加する。
- (注 9) 固相抽出カラム(昭和電工社製 EDS-1)は使用直前に、メタノール 10 mL、次いで水 10 mL を通液して洗浄とコンディショニングを行う(備考 1)。
- (注 10) 底質試料は、凍結乾燥したものを使用する。
- (注 11) カートリッジは使用直前にヘキサン 10 mL で洗浄して使用すること。
- (注 12) 装置の感度が十分にある場合は、できるだけ希釈して(1 mL 程度)測定したほうがよい。
- (注 13) LC/MS/MS 測定条件は使用する機器によって最適条件が異なるので、適宜調整する。条件 1 でフリー体画分および抱合体画分を同一条件で分析できるが、トリエチルアミンを使用することにより、カラム、ポンプ、イオン源などの劣化を起こすおそれのある機器では、条件 2 および条件 3 を用い、それぞれフリー体画分および抱合体画分の分析を行う。条件 3 に用いる C 液は、酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウムなど機器の性能に応じて最適条件を検討すること。
- (注 14) Zorbax Extend-C18 など。
- (注 15) 混合標準、サロゲート及び内標準溶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。
- (注 16) 許容差の求め方は、JIS Z8402、分析・試験の許容差通則、1974 を参照。
- (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を例示したが、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) 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), pp.XI-1-XI-10, 環境庁水質保全局水質管理課(1998)
- 2) 平成 7 年度化学物質分析法開発調査報告書, 環境庁環境保健部環境安全課(1996)
- 3) Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H and Morita, M.: Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid

chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **984**, 195-202
(2003)

分析法フローチャート

