

要調査項目等調査マニュアル
(水質、底質、水生生物)

平成11年12月

環境庁水質保全局水質管理課

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からの、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ているところである。

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。

今般、塩化ビニル、メチル t-ブチルエーテル等の揮発性有機物質、ホルムアルデヒド、ジंकピリチオン・銅ピリチオン及びエストラジオール類など要調査項目等についての調査方法を本マニュアルのとおりとりまとめた。

本マニュアルの作成に当たっては、国立環境研究所地域環境研究グループ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いただいたものである。

本マニュアルにより、本マニュアルに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11年12月

環境庁水質保全局水質管理課

総括	森田 昌敏	国立環境研究所地域環境研究グループ統括研究官
	石井 康雄	農業環境技術研究所資材動態部農薬動態科農薬管理研究室長
	奥村 為男	大阪府公害監視センター調査室主任研究員
	門上 希和夫	北九州市環境科学研究所アクア研究センター水質環境係長
	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環境部計測管理研究室長
	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
	安原 昭夫	国立環境研究所地域環境研究グループ有害廃棄物対策研究チーム総合研究官
	福島 実	大阪市立環境科学研究所生活衛生課研究主任

目 次

分析対象物質一覧表	1
. 塩化ビニル, メチル t-ブチルエーテル等の揮発性有機物質の分析法 (ヘッドスペース GC/MS 法)	2
. 塩化ビニル, メチル t-ブチルエーテル等の揮発性有機物質の分析法 (パーティトラップ GC/MS 法)	14
. ホルムアルデヒドの分析法	23
. ジンクピリチオン及び銅ピリチオンの分析法 (試案)	34
. エストラジオール類の分析法 (メチル誘導体化・GC/MS-SIM 法)	47
. エストラジオール類の分析法 (ペンタフルオロベンジル誘導体化・GC/ NCI-MS 法)	63

分析対象物質一覧表

分類	対象物質	分析法
揮発性有機物質	1 エチルベンゼン	ヘッドスペース GC/MS パージトラップ GC/MS
	2 塩化アリル (アリルクロライド)	
	3 塩化エチル (クロロエタン)	
	4 塩化ビニル	
	5 塩化メチル	
	6 シクロペンタン	
	7 1,1-ジクロロエタン	
	8 ジシクロペンタジエン	
	9 ジブromoklorometan	
	10 臭化メチル	
	11 1,1,1,2-テトラクロロエタン	
	12 1,1,2,2-テトラクロロエタン	
	13 1,2,3-トリクロロプロパン	
	14 1,3-ブタジエン	
	15 ブロモクロロメタン	
	16 ブロモジクロロメタン	
	17 1-ブロモプロパン	
	18 2-ブロモプロパン	
	19 <i>n</i> -ヘキサン	
	20 メチル <i>t</i> -ブチルエーテル	
	21 クロロベンゼン	
ホルムアルデヒド	1 ホルムアルデヒド	PFBOA誘導体化 GC/MS
ピリチオン類	1 ジンクピリチオン	LC/MS
	2 カッパーピリチオン	
エストラジオール類	1 17 -エストラジオール	メチル誘導体化 GC/MS-SIM ペンタフル和ベンゾール誘導体化 GC/NCI-MS
	2 17 -エストラジオール	
	3 エチニルエストラジオール	

．塩化ビニル、メチル *t*-ブチルエーテル等の揮発性有機物質の分析法
(ヘッドスペース GC/MS 法)

1 対象物質

表 1 に示す 21 物質。

表 1 対象物質、サロゲート物質と定量イオンの例 (注 1)

物質名	測定イオンの例	サロゲート物質の例	測定イオンの例
エチルベンゼン	91 106	エチルベンゼン-d ₁₀	98 116
塩化アリル (アリルクロライド)	76 41 78 39		
塩化エチル (クロロエタン)	64 66	塩化エチル-d ₅	69 71
塩化ビニル	62 64	塩化ビニル-d ₃	65 67
塩化メチル	50 52	塩化メチル-d ₃	53 55
ジシクロペンタジエン	66 132		
シクロペンタン	70 55 42		
1,1-ジクロロエタン	63 65 98 83	1,1-ジクロロエタン-d ₃	66 68 101 83
ジブromクロロメタン	129 127		
臭化メチル	96 94		
1,1,1,2-テトラクロロエタン	131 133 95		
1,1,2,2-テトラクロロエタン	83 85 166 168	1,1,2,2-テトラクロロエタン-d ₂	84 86 170 168
1,2,3-トリクロロプロパン	110 112 39 77		
1,3-ブタジエン	54 53 39	1,3-ブタジエン-d ₆	58 42 60
ブromクロロメタン	49 128 130		
ブromジクロロメタン	83 85		
1-ブromプロパン	122 43 124 39		
2-ブromプロパン	122 43 124 39	2-ブromプロパン- ¹³ C ₁	123 125
<i>n</i> -ヘキサン	86 57	<i>n</i> -ヘキサン-d ₁₄	66 64 100
メチル <i>t</i> -ブチルエーテル	73 79 57		
クロロベンゼン	112 114	クロロベンゼン-d ₅	82 117 119

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。

3 分析法の概要

水質試料については、サロゲート物質を添加し、塩化ナトリウムを入れたバイアルに採り内標準物質を加えて密栓して混和する。底質及び生物試料については、サロゲート物質を添加し、試料中の対象物質をメタノールで抽出する。抽出液の一部を水及び塩化ナトリウムを入れたバイアルにとり、内標準物質を加えて密栓して混和する。これらのバイアルは一定温度で保持し、対象物質を気液平衡状態とし、気相の一部を GC/MS-SIM で定量する (注 1、2、3)。分析法の概要を図 1 に示す。

表2 対象物質の目標検出下限値及び定量下限値

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
エチルベンゼン	0.03	0.1	2	7	2	7
塩化アリル (アリルクロライド)	0.1	0.3	9	30	9	30
塩化エチル (クロロエタン)	0.2	0.7	10	30	10	30
塩化ビニル	0.2	0.7	3	10	3	10
塩化メチル	0.1	0.3	10	30	10	30
ジシクロペンタジエン	0.01	0.03	1	3	1	3
シクロペンタン	0.1	0.3	3	10	3	10
1,1-ジクロロエタン	0.2	0.7	2	7	2	7
ジブromクロロメタン	0.04	0.1	2	7	2	7
臭化メチル	0.1	0.3	10	30	10	30
1,1,1,2-テトラクロロエタン	0.04	0.1	1	3	1	3
1,1,2,2-テトラクロロエタン	0.1	0.3	4	10	4	10
1,2,3-トリクロロプロパン	0.2	0.7	5	20	5	20
1,3-ブタジエン	0.1	0.3	10	30	10	30
ブromクロロメタン	0.1	0.3	2	7	2	7
ブromジクロロメタン	0.03	0.1	2	7	2	7
1-ブromプロパン	0.1	0.3	2	7	2	7
2-ブromプロパン	0.03	0.1	8	30	8	30
n-ヘキサン	0.1	0.3	3	10	3	10
メチル t-ブチルエーテル	0.1	0.3	3	10	3	10
クロロベンゼン	0.03	0.1	2	7	2	7

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・メタノール：対象物質の分析に影響のないもの（注4）。
- ・塩化ナトリウム：対象物質の分析に影響のないもの（注5）。
- ・水：対象物質の分析に影響のないもの（注6）。
- ・対象物質：試験に支障のない純度のもの（注7）。

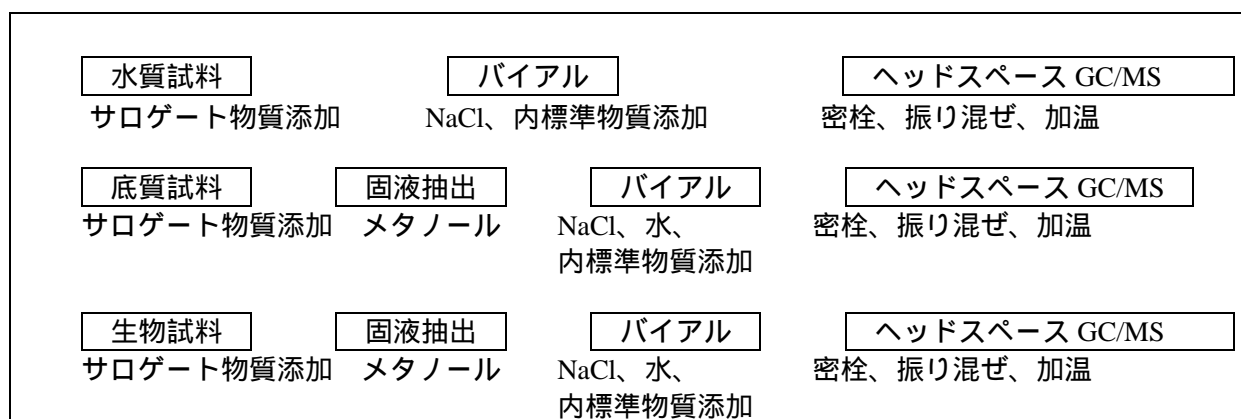


図1 ヘッドスペース GC/MS 法の概要

- ・標準原液：常温でガス状の物質については、65 mL バイアル中にメタノール 50 mL を入れ、四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコーンゴム栓及びアルミシールで栓をし、液体窒素またはメタノール・ドライアイスなどの冷媒を用いて冷却する。10000 µg の標準物質（ガス）を含む体積の標準ガスをガスタイトシリンジに正確にとり、バイアル中のメタノールに溶解し、200 µg/mL の標準混合原液(A)とする。その他の物質はメタノールを 30～50 mL 入れた 100 mL メスフラスコに、対象物質の標準品各 20 mg を精秤し、メタノールで 100 mL とし標準混合原液とする(B)。標準混合原液(A)及び標準混合原液(B)の同体積を混合し、標準原液（100 µg/mL）とする（注 8）。
- ・サロゲート溶液：常温でガス状の物質については、65 mL バイアル中にメタノール 50 mL を入れ、四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコーンゴム栓及びアルミシールで栓をし、液体窒素またはアセトン・ドライアイスなどの冷媒を用いて冷却する。10000 µg の標準物質（ガス）を含む体積の標準ガスをガスタイトシリンジにとり、バイアル中のメタノールに溶解し、200 µg/mL のサロゲート混合原液(A)とする。その他の物質は、メタノールを 50～90 mL 入れた 100 mL メスフラスコに、サロゲート物質各 20 mg を秤量し、メタノールで 100 mL とし、サロゲート混合原液(B)とする（注 9）。メタノールを 50～80 mL 程度入れた 100 mL メスフラスコに、サロゲート混合原液(A)及びサロゲート混合原液(B)各 5 mL をとり、メタノールで 100 mL としサロゲート溶液（10 µg/mL）とする。
- ・内標準原液：メタノールを 50～90 mL 入れた 100 mL メスフラスコに、内標準物質（フルオロベンゼン及び 4-ブロモフルオロベンゼン）各 100 mg を秤量し、メタノールで 100 mL とする（注 9）。
- ・内標準溶液：メタノールを 50～90 mL 程度入れた 100 mL メスフラスコに、内標準原液 1 mL をとり、メタノールで 100 mL とし内標準溶液（10 µg/mL）とする。

（ 2 ） 器具及び装置

- ・試料採取容器：水質試料用は、容量 50～250 mL 程度の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ガラス瓶。底質試料用は、容量 50～250 mL 程度の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広口ネジ口ガラス瓶、またはこれと同等以上の瓶。洗浄後、水ですすぎ、

乾燥する。約 105 の電気乾燥器内で 3 時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。冷却後、キャップを堅くしめ、汚染のない場所に保管する。

- ・遠心管：容量 50 mL の共栓付きガラス製のもの。洗浄し、水ですすぎ、メタノールで洗浄後、乾燥する。約 105 の電気乾燥器内で 3 時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。冷却後、キャップを堅くしめ、汚染のない場所に保管する。
- ・バイアル：試料（10～100 mL）を入れた時に、試料量の 10～30%の空間が残るガラス製容器で、その上部の口に四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコンゴム栓（注 10）、アルミニウムキャップをキャップ締め器で固定し、加温、冷却しても容器の機密性が保たれるもの（注 11）。洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。約 105 の電気乾燥器内で 3 時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。
- ・ヘッドスペースサンプラー（注 12、13）
- ・GC/MS：キャピラリーカラム取付可能な GC 付き四重極型、または二重収束型 MS。

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、マイクロシリンジでサロゲート溶液を添加し（注 14）、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。試料を運搬する場合には、汚染のない運搬用容器を用いて遮光・冷蔵する。前処理操作は試料採取後直ちに行う。直ちに行えない場合には、試料は汚染のない冷暗所（4 以下）で凍結しないように保存する。

（2）底質試料

試料は採泥器で採取後、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に直ちに密栓する。試料を運搬する場合には、汚染のない運搬用容器を用いて遮光・冷蔵する。試験操作は試料採取後直ちに行う。直ちに行えない場合には、試料は汚染のない冷暗所（4 以下）で凍結しないように保存する（注 15）。試料はフルイを通さず、容器内の表層の水を捨て、表層部をかき取った下層とし、固形物を含まないものを試験する。

（3）生物試料

試料を運搬する場合には、汚染のない運搬用容器を用いて遮光・冷蔵する。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（4℃以下）で凍結しないように保存する（注15）。試験操作の直前に、汚染のない冷所で試験する部位を速やかに分け取る。

6 試験操作

（1）前処理

（ア）水質試料

塩化ナトリウムをバイアルに入れる（注16）。試料 10～100 mL の適量を静かに泡立てないようにバイアルにホールピペットで入れ、内標準溶液を添加する。四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコーンゴム栓及びアルミシールで直ちに密栓してふりませ、測定用試料とする。

（イ）底質試料

試料 20 g を遠心管に採り、3000 rpm で 20 分間遠心分離し、上澄みは捨てる。試料にサロゲート溶液を添加し（注14）、メタノール 10 mL を加え、10 分間超音波抽出を行う。3000 rpm で 10 分間遠心分離し、液層を全量フラスコに入れる。残さにメタノール 10 mL を加え、10 分間超音波抽出を行う（注17）。3000 rpm で 10 分間遠心分離し、液層を全量フラスコに加え、定容（25～50 mL）とし、試料液とする。

塩化ナトリウムをバイアルに入れる（注16）。バイアルに、水 9.4 mL に対して試料液 0.6 mL の割合となるように、水 9.4～94 mL 及び試料液 0.6～6 mL を静かに泡立てないように入れ（注18）、内標準溶液を添加する。四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコーンゴム栓及びアルミシールで直ちに密栓してふりませ、測定用試料とする。

（ウ）生物試料

試料 20 g を遠心管に採り、3000 rpm で 20 分間遠心分離し、上澄みは捨てる。試料にサロゲート溶液（注14）を添加し、メタノール 10 mL を加え、3 分間ホモジナイズする（注19）。3000 rpm で 10 分間遠心分離し、液層を全量フラスコに入れる。残さにメタノール 10 mL を加え、10 分間超音波抽出を行う。3000 rpm で 10 分間遠心分離し、液層を全量フラスコに加え、定容（25～50 mL）とし、試料液とする。

塩化ナトリウムをバイアルに入れる（注 16）。バイアルに、水 9.4 mL に対して試料液 0.6 mL の割合となるように、水 9.4 ~ 94 mL 及び試料液 0.6 ~ 6 mL を静かに泡立てないように入れ（注 18）、内標準溶液を添加する。四フッ化エチレン樹脂フィルム、シリコーンゴム栓及びアルミシールで直ちに密栓してふりませ、測定用試料とする。

（ 2 ） 空試料液の調製

水質試料については、試料と同量の水を用いて、また、底質及び生物試料については、試料と同量の水及びメタノールを用いて、「6 試験操作（1）前処理」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。

（ 3 ） 添加回収試験液の調製

「6 試験操作（1）前処理」に従って、水質試料の場合はバイアル中の試料に、また、底質及び生物試料の場合は遠心管に採った試料に、各々、標準溶液を添加して 0.01 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ とする（注 20）。

（ 4 ） 標準溶液の調製

標準原液をメタノールで希釈し、0.1 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製する。

（ 5 ） 測定

（ア）ヘッドスペース条件の例（注 21）

- ・ 注入圧：10 psi
- ・ ループ温度：140
- ・ トランスファーライン温度：150
- ・ ループ充填時間：0.01 分
- ・ ループ平衡時間：0.05 分
- ・ 注入時間：0.1 分

（イ）GC-MS 条件の例

（a）GC（注 22）

- ・ カラム：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 25 ~ 120 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 2 3)

・ カラム温度 : 35 (3 分) 5 /分 90 (0 分) 10 /分 170 (0 分)
5 /分 200 (2 分)

・ 注入口温度 : 200

・ 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)

(b) MS (注 2 4)

・ 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 : 230

(c) 定量イオン及び確認イオン (注 2 5)

・ 塩化ビニル : 62、64

・ メチル *t*-ブチルエーテル : 73、79、57 など (表 1 参照)

・ フルオロベンゼン : 96、70

・ 4-ブロモフルオロベンゼン : 174、176、95

(ウ) 検量線

「6 試験操作 (1) 前処理」に従って、水質試料の場合は試料と同量の水に、また、底質及び生物試料の場合は、試料と同量の水及びメタノールに、標準溶液を添加して 0.01 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ とする (注 2 0)。これをヘッドスペースサンプラーにより 20 ~ 70 の範囲の一定温度で、20 ~ 120 分の範囲で一定時間放置する。ヘッドスペースガスの一定量を採取し、GC/MS に注入して測定する (注 2 6)。サロゲート物質又は内標準物質と対象物質の面積比を求め、検量線を作成する。

(エ) 測定用試料の測定

「6 試験操作 (1) 前処理」により得られた測定用試料は、ヘッドスペースサンプラーにより 20 ~ 70 の範囲の一定温度で、20 ~ 120 分の範囲で一定時間放置する。ヘッドスペースガスの一定量を採取し、GC/MS に注入して測定する (注 2 6)。サロゲート物質又は内標準物質と対象物質の面積比から、試料中の対象物質の検出量を求める。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

対象物質、サロゲート物質及び内標準物質について、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27)、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の強度比の $\pm 20\%$ 以下であれば、対象物質などが存在していると見なす。

(2) 定量及び計算

サロゲート物質又は内標準物質と対象物質の面積比から、試料中の対象物質の検出量を求める。次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

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

底質: 濃度 ($\mu\text{g/kg}$) = 検出量 (ng) \times 試料液量 (mL) / パイアルへの分取量 (mL) / 試料量 (g)

生物: 濃度 ($\mu\text{g/kg}$) = 検出量 (ng) \times 試料液量 (mL) / パイアルへの分取量 (mL) / 試料量 (g)

8 分析精度管理

正確な分析値が得られていることを保証するために以下の作業を行い、その結果を記録・保存する。

(1) 内部精度管理

- ・ 10 検体又は 1 バッチ試験毎に全操作ブランク、二重分析及び添加回収試験(注28)を各 1 検体以上行う。
- ・ 操作ブランクが通常を超えた場合は、原因を究明して対策を講じた後、全ての試料の再試験を行う。
- ・ 二重分析の結果が許容差(注29)を超えた場合は、その試料について再試験を行う。
- ・ サロゲート物質の回収率は、50% ~ 120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。
- ・ 添加回収試験における回収率は、80% ~ 120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。

(2) 標準物質の確認

標準原液の調製時に、異なる供給元の標準物質を用いて使用する標準物質を検定する。

9 注意事項

(注 1) 特に常温でガス状の物質 (塩化エチル、塩化ビニル、塩化メチル、1,3-ブタジエンなど) は分析操作で揮散しやすいことから、安定同位体をサロゲート物質として用いることが望ましい。表 1 に例示した以外に適当な物質があればサロゲート物質として用いてもよい。

(注 2) 十分な感度を得られれば SIM 測定代わりにスキャン測定などでもよい。本法において適当なモニターイオンを用いて GC/MS 測定することにより、1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、スチレン、*n*-ブチルベンゼン、ジクロロメタン、ジブromokロロメタン、テトラクロロメタン、トリクロロメタン (クロロホルム)、トリブromomメタン (ブロモホルム)、1,2-ジクロロエタン、1,1,1-トリクロロエタン、1,1,2-トリクロロエタン、1,1-ジクロロエチレン、*cis*-1,2-ジクロロエチレン、*trans*-1,2-ジクロロエチレン、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、1,2-ジクロロプロパン、1,3-ジクロロ-1-プロペン、1,4-ジクロロベンゼン、キシレン、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼンなどの分析が可能である。

(注 3) 底質試料を直接バイアルにとり、水及び塩化ナトリウムを加えてヘッドスペース GC/MS 法で測定した場合の回収率は、対象物質や底質の性状などにより異なるが、エチルベンゼン、1,1-ジクロロエタン、ジブromokロロメタン、1,1,1,2-テトラクロロエタン、1,1,2,2-テトラクロロエタン、ブromokロロメタン、ブromojクロロメタン、クロロベンゼンでは 90 ~ 100% 程度である。

(注 4) 例えば、水質試験用、トリハロメタン測定用など (備考 1)。使用前に空試験を行い、使用の適否を確認する。

(注 5) 例えば、試薬特級品を約 105 ~ 200 の電気乾燥器内で 3 ~ 6 時間程度放置し、汚染のない場所で冷却したもの。使用前に空試験を行い、使用の適否を確認する。

(注 6) 蒸留水またはイオン交換水 1 ~ 3 L を三角フラスコにとり、これをガスコンロなどで強く加熱して、液量が約 1/3 になるまで煮沸する。直ちに環境からの汚染がない場所に静置して冷却する。蒸留水またはイオン交換水を炭素系吸着剤を充填したカラムで精製したもの、市販の揮発性有機物質試験用の水、市販のミネラルウォーター

ターなどを用いても良い。使用前に空試験を行い、使用の適否を確認する。

(注7) 市販の揮発性有機物質混合メタノール溶液などを用いても良い。

(注8) 標準原液及びサロゲート原液は使用時に調製する。ただし、調製した標準品を直ちに液体窒素で冷却し、液体窒素またはメタノール・ドライアイスなどの冷媒を用いた冷却条件下でアンプルに移し、溶封して冷暗所に保存すれば1~3 か月は保存できる。それ以上の期間を経過したものは純度を確認してから使用する。

(注9) 標準原液と同様にアンプルに封入し、冷暗所に保存すれば1~3 か月は保存できる。それ以上の期間を経過したものは純度を確認してから使用する。例示した以外に適当な物質があれば内標準物質として用いてもよい。

(注10) 四フッ化エチレン樹脂はりシリコンゴム栓を用いてもよい。

(注11) バイアルによっては多少の誤差があるので、使用前に容量を確認し、誤差が大きいバイアルは除いて使用する。

(注12) ヘッドスペースサンプラーの取り扱い説明書などに従って洗浄し、試験操作に支障のある妨害などが無いことを確認する。

(注13) ヘッドスペースサンプラーを用いない場合は、0.02~5 mL 程度の容量を正確に採取できるガスタイトシリンジと20~60 程度の範囲で ± 0.5 に調節可能な恒温水槽を用いる。

(注14) 単位体積(又は重量)あたりのサロゲートの添加量は、試料の前処理において添加する単位体積(又は重量)あたりの内標準物質の量と同程度を目安とする。

(注15) 保存中は試料体積の変動にともない汚染されることがあるので、この場合は、試料採取容器をチャック付きポリエチレン製袋などに入れて密封し、試料採取容器の口を下にした状態で保存する。

(注16) 塩化ナトリウムは試料量に対し、濃度が30%となるように加える。

(注17) 良好な結果がえられれば振とう抽出やホモジナイズしてもよい。塩化ビニルなど常温で気体状の物質は、抽出操作で損失が考えられるので、必要に応じてメタノール・ドライアイスなどの冷媒で冷却しながら抽出する。

(注18) または、あらかじめ、全量フラスコに容量の90%程度の水を入れ、水9.4 mL に対して試料液0.6 mL の割合となるように静かに泡立てないように加え、水で標線までメスアップする。泡立てないように静かに混和後、その10~100 mL をとり、塩化ナトリウムを入れたバイアルに静かに泡立てないように入れる。

GC/MS 測定において、メタノールが影響する場合もあるので注意する。

(注19) 塩化ビニルなど常温で気体状の物質は、抽出操作で損失が考えられるので、メタノール・ドライアイスなどの冷媒で冷却しながら抽出する。

(注20) 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21) ヘッドスペースサンプラーの構造などにより、最適な条件を設定する。

(注22) GC 分離条件によっては、4-ブロモフルオロベンゼンのピークが 1,2,3-トリクロロプロパンのピークと重なることがある。両者はマスペクトル中に m/z 75 のイオンを有するので、4-ブロモフルオロベンゼンを内標準として使用する場合は両者のピークが十分に分離することを確認する。

GC 分離条件によっては、クロロベンゼン- d_5 のピークが 1,1,1,2-テトラクロロエタンのピークと重なることがある。両者はマスペクトル中に m/z 117 及び 119 のイオンを有するので、クロロベンゼン- d_5 のモニターイオンとして m/z 82 を、1,1,1,2-テトラクロロエタンのモニターイオンとして m/z 131 及び 133 を用いる。クロロベンゼン- d_5 及び 1,1,1,2-テトラクロロエタンを m/z 117 及び 119 でモニターする場合は、両者のピークが十分に分離することを確認する。

GC 分離条件によっては、クロロベンゼンのピークが *m*-、*p*-キシレンのピークと重なることがある。これらの物質はマスペクトル中に m/z 77 のイオンを有するので、クロロベンゼンを m/z 112、114 でモニターする。クロロベンゼンを m/z 77 でモニターする場合は、これらの物質のピークが十分に分離することを確認する。

GC 分離条件によっては、エチルベンゼンのピークが *m*-、*p*-キシレンのピークと重なることがある。これらの物質はほとんど同一のマスペクトルを有するので、エチルベンゼンのピークが *m*-、*p*-キシレンのピークと十分に分離することを確認する。

GC 分離条件によっては、シクロペンタン、メチル *t*-ブチルエーテル及びヘキサン- d_{14} のピークが重なることがあるので、表1を参考にして、相互に妨害とならないイオンを選択してモニターする。

(注23) 例えば、VOCOL、Aquatic、DB-624、DB-WAX、DB-1301 など(備考1)。

(注24) GC/MS 装置により、最適な条件を設定する。

(注25) 表1に示す測定イオン例を参考に、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26) ヘッドスペースサンプラーの取り扱い説明書などに従って操作する。ヘッドスペースサンプラーを用いない場合は、一定温度に保った恒温水槽中にバイアルをくびまで入れ、一定時間放置する。シリコンゴム栓を通じて、バイアル瓶の気相の一定量をガスタイトシリンジで採取し、GC/MS に注入する。

(注27) 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28) 添加回収試験は、試料と同じあるいは類似の試料に対象物質のアセトン標準液を検出限界の5~10倍量程度添加して行う。

(注29) 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 環境庁水質保全局水質規制課：環境水質分析マニュアル、環境化学研究会 (1993).
- 2 環境庁水質保全局水質規制課：新しい排水基準とその分析、環境化学研究会 (1994).
- 3 JIS K0125 (1996).
- 4 EPA: Method 524.2, US EPA.
- 5 田辺顕子ほか：環境化学, 7, 69 (1997).
- 6 環境庁環境保健部環境安全課：平成8年度 化学物質分析法開発調査報告書、p.1 (1997).
- 7 環境庁環境保健部環境安全課：平成8年度 化学物質分析法開発調査報告書、p.22 (1997).
- 8 環境庁水質保全局水質管理課："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)"、p.VI-1 (1998).

. 塩化ビニル、メチル *t*-ブチルエーテル等の揮発性有機物質の分析法 (パーティトラップ GC/MS 法)

1 対象物質

表 1 参照。

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)		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
エチルベンゼン	0.01	0.03	1	3	1	3
塩化アリル (アリルクロライド)	0.01	0.03	1	3	1	3
塩化エチル (クロロエタン)	0.01	0.03	1	3	1	3
塩化ビニル	0.01	0.03	1	3	1	3
塩化メチル	0.01	0.03	1	3	1	3
ジシクロペンタジエン	0.01	0.03	1	3	1	3
シクロペンタン	0.01	0.03	1	3	1	3
1,1-ジクロロエタン	0.01	0.03	1	3	1	3
ジブromクロロメタン	0.01	0.03	1	3	1	3
臭化メチル	0.01	0.03	2	7	2	7
1,1,1,2-テトラクロロエタン	0.01	0.03	1	3	1	3
1,1,2,2-テトラクロロエタン	0.01	0.03	1	3	1	3
1,2,3-トリクロロプロパン	0.01	0.03	1	3	1	3
1,3-ブタジエン	0.01	0.03	1	3	1	3
ブromクロロメタン	0.01	0.03	1	3	1	3
ブromジクロロメタン	0.01	0.03	1	3	1	3
1-ブromプロパン	0.01	0.03	1	3	1	3
2-ブromプロパン	0.01	0.03	1	3	1	3
<i>n</i> -ヘキサン	0.01	0.03	1	3	1	3
メチル <i>t</i> -ブチルエーテル	0.01	0.03	1	3	1	3
クロロベンゼン	0.01	0.03	1	3	1	3

3 分析法の概要

水質試料については、サロゲートを添加し、試料液中に不活性ガスを通気して対象物質を気相中に移動させてトラップ管に捕集し、次にトラップ管を加熱し対象物質を脱着して、冷却凝縮装置でクライオフォーカスさせ、GC/MS-SIM に導入して測定する。底質及び生物試料については、サロゲートを添加し、試料中の対象物質をメタノールで抽出後、抽出液の一部に水を加えたものに不活性ガスを通気することにより、水質試料と同様に測定す

る（注 1、2、3）。分析法の概要を図 1 に示す。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・メタノール：ヘッドスペース GC/MS 法参照。
- ・水：ヘッドスペース GC/MS 法参照（注 4）。
- ・対象物質：ヘッドスペース GC/MS 法参照。
- ・標準原液：ヘッドスペース GC/MS 法参照。
- ・サロゲート溶液：ヘッドスペース GC/MS 法参照。
- ・内標準原液：ヘッドスペース GC/MS 法参照。
- ・内標準溶液：メタノールを 50～90 mL 入れた 100 mL メスフラスコに、内標準原液 1 mL をとり、メタノールで 100 mL とし内標準溶液とする。
- ・内標準原液：ヘッドスペース GC/MS 法参照。
- ・内標準溶液：メタノールを 50～90 mL 程度入れた 100 mL メスフラスコに、内標準原液 1 mL をとり、メタノールで 100 mL とし内標準溶液（10 µg/mL）とする。

(2) 器具・装置

- ・パージ容器：試料 5～50 mL のパージが可能なガラス製容器またはそれに試料導入部を有するもので、試験操作中に加温、冷却しても容器の機密性が保たれるもの（注 5）。洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。約 105 °C の電気乾燥器内で 3 時間程度放置し、汚染のない場所で冷却する。

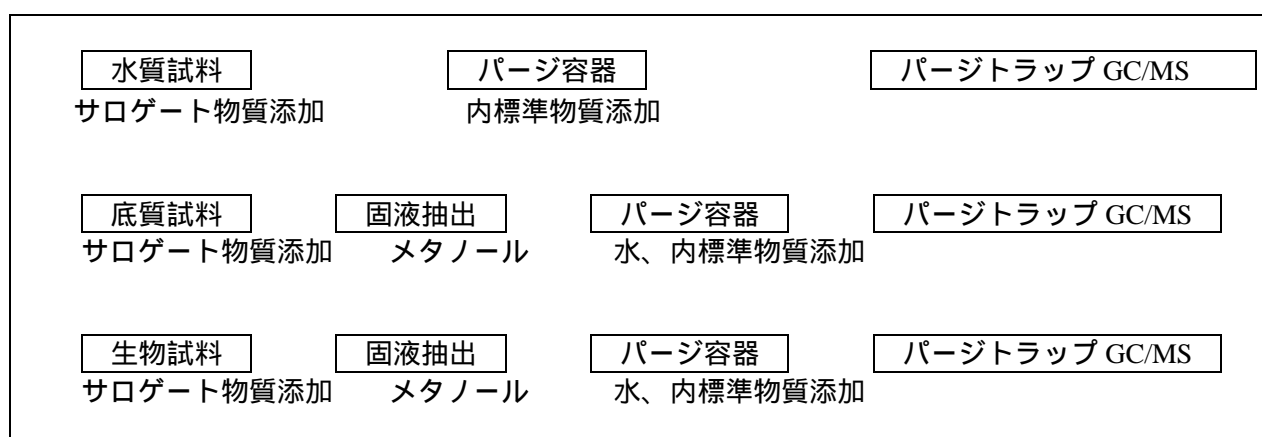


図 1 パージトラップ GC/MS 法の概要

- ・パージトラップ装置（注 6）。
- ・GC/MS：キャピラリーカラム取付可能な GC 付き四重極型、または二重収束型 MS。

5 試料の採取・運搬

（ 1 ）水質試料

ヘッドスペース GC/MS 法参照。

（ 2 ）底質試料

ヘッドスペース GC/MS 法参照。

（ 3 ）生物試料

ヘッドスペース GC/MS 法参照。

6 試験操作

（ 1 ）前処理

（ア）水質試料

試料 5～50 mL の適量を静かに泡立てないようにパージ容器にホールピペットで入れ、内標準溶液を添加し、測定用試料とする（注 7）。

（イ）底質試料

試料液の調製はヘッドスペース GC/MS 法参照。

パージ容器に、水 9.8 mL に対して試料液 0.2 mL の割合となるように、水 4.9～49 mL 及び試料液 0.1～1 mL を静かに泡立てないように入れ（注 8）内標準溶液を添加し、測定用試料とする（注 9）。

（ウ）生物試料

試料液の調製はヘッドスペース GC/MS 法参照。

パージ容器に、水 9.8 mL に対して試料液 0.2 mL の割合となるように、水 4.9～49 mL 及び試料液 0.1～1 mL を静かに泡立てないように入れ（注 8）内標準溶液を添加し、測定用試料とする（注 9）。

(2) 空試料液の調製

水質試料については、試料と同量の水を用いて、また、底質及び生物試料については、試料と同量の水及びメタノールを用いて、「6 試験操作 (1) 前処理」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。

(3) 添加回収試験液の調製

「6 試験操作 (1) 前処理」に従って、水質試料の場合はパージ容器中の試料に、また、底質及び生物試料の場合は遠心管に採った試料に、各々、標準溶液を添加して 0.01 ~ 1 µg/L とする (注 1 0)。

(4) 標準溶液の調製

標準原液をメタノールで希釈し、0.05 ~ 50 µg/mL の標準溶液を調製する。

(5) 測定

(ア) パージトラップ条件の例 (注 1 1、1 2、1 3)

- ・パージ時間：10 分
- ・パージ温度：室温
- ・ドライパージ時間：4 分
- ・トラップ温度：-150
- ・トラップ管加熱時間：2 分
- ・トラップ管加熱温度：220
- ・注入時間：3 分
- ・注入温度：220
- ・トラップ管焼きだし時間：20 分
- ・トラップ管焼きだし温度：260

(イ) GC-MS 条件の例

(a) GC (注 1 4)

- ・カラム：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 25 ~ 120 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 1 5)

・カラム温度：40（5分） 7 /分 230（5分）

・注入口温度：180

・キャリアガス：ヘリウム（線速度 40 cm/秒）

(b) MS（注 1 6）

・イオン化法：EI

・イオン化エネルギー：70 eV

・イオン化電流：300 μ A

・イオン源温度：230

(c) 定量イオン（注 1 7）

・塩化ビニル：62、64

・メチル *t*-ブチルエーテル：73、79、57 など（表 1 参照）

・フルオロベンゼン：96、70

・4-ブロモフルオロベンゼン：174、176、95

(ウ) 検量線

「6 試験操作（1）前処理」に従って、水質試料の場合は試料と同量の水に、また、底質及び生物試料の場合は、試料と同量の水及びメタノールに、標準溶液を添加して 0.01 ~ 1 μ g/L とする（注 1 0）。これをパージトラップ装置のトラップ部に接続する（注 1 8）。パージガスを一定量通気して対象物質を気相中に移動させてトラップ管に捕集し、次にトラップ管を加熱し対象物質を脱着して、冷却凝縮装置でクライオフォーカスさせ、GC/MS に導入して測定する（注 1 1、1 2、1 3）。サロゲート物質又は内標準物質と対象物質の面積比を求め、検量線を作成する。

(エ) 測定用試料の測定

「6 試験操作（1）前処理」により得られた測定用試料をパージトラップ装置のトラップ部に接続する（注 1 8）。パージガスを一定量通気して対象物質を気相中に移動させてトラップ管に捕集し、次にトラップ管を加熱し対象物質を脱着して、冷却凝縮装置でクライオフォーカスさせ、GC/MS に導入して測定する（注 1 1、1 2、1 3）。サロゲート物質又は内標準物質と対象物質の面積比から、試料中の対象物質の検出量を求める。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

対象物質、サロゲート物質及び内標準物質について、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19)、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の強度比の $\pm 20\%$ 以下であれば、対象物質などが存在していると見なす。

(2) 定量及び計算

サロゲート物質又は内標準物質と対象物質の面積比から、試料中の対象物質の検出量を求める。次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。

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

底質: 濃度 ($\mu\text{g/kg}$) = 検出量 (ng) \times 試料液量 (mL) / パージ容器への分取量 (mL) / 試料量 (g)

生物: 濃度 ($\mu\text{g/kg}$) = 検出量 (ng) \times 試料液量 (mL) / パージ容器への分取量 (mL) / 試料量 (g)

8 分析精度管理

ヘッドスペース GC/MS 法参照。

9 注意事項

(注1) 特に常温でガス状の物質(塩化エチル、塩化ビニル、塩化メチル、1,3-ブタジエンなど)は分析操作で揮散しやすいことから、安定同位体をサロゲート物質として用いることが望ましい。表1に例示した以外に適当な物質があればサロゲート物質として用いてもよい。

(注2) クライオフォーカスを行わない場合は、対象物質をトラップ管に捕集後、トラップ管を加熱して、そのまま GC/MS に導入する。

(注3) 十分な感度を得られれば SIM 測定の代わりにスキャン測定などでもよい。本法において適当なモニターイオンを用いて GC/MS 測定することにより、1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、スチレン、*n*-ブチルベンゼン、ジクロロメタン、ジブromoクロロメタン、テトラクロロメタン、トリクロロメタン(クロロホルム)、トリブromoメタン(ブromoホルム)、1,2-ジクロロエタン、1,1,1-トリクロロエタン、1,1,2-

トリクロロエタン、1,1-ジクロロエチレン、*cis*-1,2-ジクロロエチレン、*trans*-1,2-ジクロロエチレン、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、1,2-ジクロロプロパン、1,3-ジクロロ-1-プロペン、1,4-ジクロロベンゼン、キシレン、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼンなどの分析が可能である。

(注4) 市販のミネラルウォーターなどを用いる場合、パージトラップ装置の経路にアルカリ土類金属塩などが析出することがある。

(注5) パージ容器によっては、多少の誤差があるので、使用前に容量を確認し、誤差が大きいものは除いて使用する。

(注6) パージトラップ装置の取り扱い説明書などに従って洗浄し、試験操作に支障のある妨害などが無いことを確認する。

(注7) 装置によっては、試料を泡立たないように静かにバイアルに満たし、内標準溶液を添加後、直ちにキャップをし、測定用試料とする。このとき、バイアル内に空気層を残さないよう注意する。バイアルは、洗浄後、水ですすぎ、乾燥し、使用直前に約 105 ℃ の電気乾燥器内で 3 時間程度放置し、汚染のない場所で冷却して使用する。

(注8) または、あらかじめ、全量フラスコに容量の 90% 程度の水を入れ、水 9.8 mL に対して試料液 0.2 mL の割合となるように静かに泡立たないように加え、水で標線までメスアップする。泡立たないように静かに混和後、その 5~50 mL を採り、パージ容器に静かに泡立たないように入れる。GC/MS 測定において、メタノールが影響する場合もあるので注意する。

(注9) 装置によっては、水 9.8 mL に対して試料液 0.2 mL の割合となるように静かにバイアルに満たし、内標準溶液を添加後、直ちにキャップをし、測定用試料とする。このとき、バイアル内に空気層を残さないよう注意する。

(注10) 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。装置によっては、パージ容器の代わりにバイアル中に作成する。

(注11) パージトラップ装置の取り扱い説明書などに従って操作する。

(注12) クライオフォーカスを行わない場合は、対象物質をトラップ管に捕集後、トラップ管を加熱して、そのまま GC/MS に導入する。

(注13) パージトラップの最適条件は使用する吸着剤の種類、量などによって異なるため、あらかじめ十分な回収結果のえられる条件を求めておく。パージ条件はトラッ

ブ管の破過容量を超えないよう注意する。トラップ管の例として、室温で捕集する場合はポリマー（Tenax TA など）、シリカゲル、及び活性炭を 3 層に充填したものを、-20 程度で捕集する場合はポリマー（Tenax TA）などを用いる（備考 1）。

（注 1 4）GC 分離条件によっては、4-ブロモフルオロベンゼンのピークが 1,2,3-トリクロロプロパンのピークと重なることがある。両者はマススペクトル中に m/z 75 のイオンを有するので、4-ブロモフルオロベンゼンを内標準として使用する場合は両者のピークが十分に分離することを確認する。

GC 分離条件によっては、クロロベンゼン- d_5 のピークが 1,1,1,2-テトラクロロエタンのピークと重なることがある。両者はマススペクトル中に m/z 117 及び 119 のイオンを有するので、クロロベンゼン- d_5 のモニターイオンとして m/z 82 を、1,1,1,2-テトラクロロエタンのモニターイオンとして m/z 131 及び 133 を用いる。クロロベンゼン- d_5 及び 1,1,1,2-テトラクロロエタンを m/z 117 及び 119 でモニターする場合は、両者のピークが十分に分離することを確認する。

GC 分離条件によっては、クロロベンゼンのピークが *m*-、*p*-キシレンのピークと重なることがある。これらの物質はマススペクトル中に m/z 77 のイオンを有するので、クロロベンゼンを m/z 112、114 でモニターする。クロロベンゼンを m/z 77 でモニターする場合は、これらの物質のピークが十分に分離することを確認する。

GC 分離条件によっては、エチルベンゼンのピークが *m*-、*p*-キシレンのピークと重なることがある。これらの物質はほとんど同一のマススペクトルを有するので、エチルベンゼンのピークが *m*-、*p*-キシレンのピークと十分に分離することを確認する。

GC 分離条件によっては、シクロペンタン、メチル *t*-ブチルエーテル及びヘキサン- d_{14} のピークが重なることがあるので、GC/MS 法の表 1 を参考にして、相互に妨害とならないイオンを選択してモニターする。

（注 1 5）例えば、VOCOL、Aquatic、DB-624、DB-WAX、DB-1301 など（備考 1）。

（注 1 6）GC/MS 装置により、最適な条件を設定する。

（注 1 7）ヘッドスペース GC/MS 法の表 1 に示す測定イオン例を参考に、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 1 8）測定用試料をパージ容器の代わりにバイアル中に調製した場合は、バイアルを

パージトラップ装置にセットする。パージトラップ装置の取り扱い説明書などに従って操作し、測定用試料の一部又は全量をパージ容器に移し入れる。

(注19) 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。

(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 環境庁環境保健部保健調査室：昭和61年度 化学物質分析法開発調査報告書 (1987).
- 2 環境庁水質保全局水質規制課：環境水質分析マニュアル、環境化学研究会 (1993).
- 3 環境庁水質保全局水質規制課：新しい排水基準とその分析、環境化学研究会 (1994).
- 4 JIS K0125 (1996).
- 5 EPA: Method 524.2, US EPA.
- 6 EPA: Method 624, US EPA.
- 7 城山二郎、松浦洋文：環境化学, 6, 583 (1996).
- 8 環境庁環境保健部環境安全課：平成8年度 化学物質分析法開発調査報告書、p.22 (1997).
- 9 環境庁水質保全局水質管理課："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)"、p.VI-1 (1998).

・ホルムアルデヒドの分析法

1 対象物質

ホルムアルデヒド

2 目標検出限界値及び定量下限値

本分析法の目標検出限界値は水質が 1 $\mu\text{g/L}$ 、底質及び生物試料が 50 $\mu\text{g/kg}$ であり、定量下限値は水質が 3 $\mu\text{g/L}$ 、底質及び生物試料が 150 $\mu\text{g/kg}$ である（注 1）。

3 分析法概要

水質試料については、試料に直接ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン塩酸塩（PFBOA）を加えて誘導体化し、過剰の PFBOA を硫酸で分解後、ヘキサンで抽出する。底質試料については水で振とう抽出後、遠心分離で得られた上澄み液を水質試料と同様に処理する。生物試料については水を用いてホモジナイズ抽出後、遠心分離で得られた上澄み液を固相抽出にかけて疎水性有機物などを除去した後、ろ液に PFBOA を加えて誘導体化し、過剰の PFBOA を硫酸で分解する。塩析で生じた白色沈殿をろ過し、ろ液と沈殿をそれぞれヘキサンで抽出し、抽出液を脱水後、濃縮しないで GC/MS（注 2）で定量する。

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

4 試薬・器具

（1）試薬

- ・ホルムアルデヒド：市販特級品
- ・内標準物質（ナフタレン- d_8 ）：市販標準品
- ・ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン塩酸塩（PFBOA）：市販標準品
- ・PFBOA ホルムアルドキシム：市販標準品
- ・メチルアルコール、ヘキサン、酢酸エチル：残留農薬試験用試薬
- ・無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用試薬
- ・ヨウ素酸カリウム：容量分析用標準試薬
- ・その他の試薬：特級試薬を用いる

- ・ 蒸留水：市販のもの
- ・ ブランク水：ホルムアルデヒドのブランク値が低い水（注3）
- ・ ヨウ素溶液：ヨウ素約 13 g をビーカーに採り、ヨウ化カリウム 20 g と蒸留水 20 mL を加えて溶かした後、蒸留水を加えて 1 L としたもの。
- ・ 水酸化カリウム溶液（6 w/v%）：水酸化カリウム 6 g を蒸留水 94 mL に溶かしたもの。
- ・ 硫酸（1 + 15）：純硫酸 1 容を蒸留水 15 容に入れて希釈したもの。
- ・ 硫酸（1 + 5）：純硫酸 1 容を蒸留水 5 容に入れて希釈したもの。
- ・ 硫酸（1 + 1）：純硫酸 1 容をブランク水 1 容に入れて希釈したもの。
- ・ でんぷん溶液（1 w/v%）：可溶性でんぷん 1 g を蒸留水 99 mL にとかしたもの。腐敗しやすいために、冷蔵庫内での短期保存しかできない。
- ・ 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液：市販のチオ硫酸ナトリウム五水和物 26 g 及び炭酸ナトリウム 0.2 g を蒸留水に溶かして 1 L とする。2 日間放置した後、使用時に標定して使用すること。

[標定] 容量分析用標準試薬のヨウ素酸カリウムを 130 で約 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷する。その約 0.72 g を 1 mg のけたまで正確に量り採り、少量の蒸留水に溶かしてメスフラスコ(200 mL)に移し入れ、蒸留水を標線まで加える。この 20 mL を共栓付き三角フラスコ (300 mL) に採り、ヨウ化カリウム 2 g 及び硫酸 (1 + 5) 5 mL を加え、直ちに密栓して静かに混ぜ、暗所に約 5 分間放置する。蒸留水約 100 mL を加えた後、遊離したヨウ素をこのチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し、溶液の黄色が薄くなってから指示薬としてでんぷん溶液 (1 w/v%) 1 mL を加え、生じたヨウ素でんぷんの青い色が消えるまで滴定する。別に、蒸留水について同一条件で空試験を行って補正した mL 数から、次式によって 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター (f) を算出する。

$$f = a \times (b/100) \times (20/200) \times [1 / (x \times 0.003567)]$$

ここで、a：ヨウ素酸カリウムの量 (g)

b：ヨウ素酸カリウムの純度 (%)

x：滴定に要した 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液 (補正值、mL)

- ・ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン塩酸塩（PFBOA）溶液：PFBOA 600 mg をメスフラスコ（100 mL）に採り、ブランク水で溶かして全量を 100 mL とする。本溶液は冷暗所に保存する。

（２）器具及び装置

- ・遠心分離機
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー（ポリトロン）、超高速万能ホモジナイザー（ヒスコトロン）、攪拌分散機（ウルトラターラックス）または同等品
- ・振とう機
- ・固相抽出用器具（カートリッジ、ろ過・濃縮装置、注射器など）
- ・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。

5 試料の採取・運搬

水質試料は細口褐色ガラス瓶（内容積は 500～1000 mL 程度。金属キャップ付き）に、試料水で内部を共洗い後、空気が入らないように口一杯に試料水を満たし、冷蔵状態で試験室まで運び、すみやかに分析する。底質試料、生物試料は採取後、褐色広口ガラス瓶に入れ、冷蔵状態で試験室まで運び、冷凍保管し、すみやかに分析する。

水質試料にチオ硫酸ナトリウムなどを添加することは、汚染を持ち込む可能性があるもので、やむを得ない場合を除いて行わない。やむを得ず添加した場合は、試薬によるブランクをチェックすること。

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。

ホルムアルデヒドは空気中の微量常在成分であり、家具類や衣類、プラスチックからも発生することがあるので、試料採取容器の汚染には細心の注意を払う必要がある。ホルマリンを使用している実験室で試料および採取容器を扱うことは避けねばならない。

6 試験操作（注４）

（１）前処理法

（ア）水質試料

水質試料 100 mL を取り出し、必要ならばフィルターでろ過してけん濁物を除き、密栓付き三角フラスコ (100 mL) に入れる。

(イ) 底質試料

底質試料 10 g (湿重量) を 100 mL 共栓付き遠沈管に秤取し、ブランク水 50 mL を加え 20 分間振とう抽出する。次に 2500 rpm で 20 分間遠心分離し、上澄み液を取り出す。残渣にブランク水 50 mL を加えて、同様の操作をし、上澄み液を合わせ、密栓付き三角フラスコ (100 mL) に入れる。

(ウ) 生物試料

生物試料 10 g を 100 mL 共栓付き遠沈管に秤取し、ブランク水 50 mL を加え氷水で冷却しながら 2 分間ホモジナイズ抽出する。次に 2500 rpm で 20 分間遠心分離し、上澄み液を取り出す。残渣にブランク水 50 mL を加えて、同様の操作をし、上澄み液を合わせる。この上澄み液をフィルターでろ過して懸濁物を除去してからスチレンジビニルベンゼン共重合体などの固相カートリッジ (注 5) に通水して、脂肪などの有機物を除去する。ろ液を密栓付き三角フラスコ (100 mL) に入れる。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

前処理法で得られた液に PFBOA 溶液 1 mL を加えて密栓し緩やかに振とうし、2 時間放置する。硫酸 (1 + 1) 1.6 mL を加えてよくかき混ぜ、5 分間おく。次いで塩化ナトリウム 25 g を溶かし、ヘキサン 10 mL で 10 分間抽出する。抽出液に内標準液 1 mL を加えてよく混合し、無水硫酸ナトリウムで脱水したもの (注 6) を試料液とする。

(イ) 底質試料

前処理法で得られた液に PFBOA 溶液 1 mL を加えて密栓し緩やかに振とうし、2 時間放置する。硫酸 (1 + 1) 1.6 mL を加えてよくかき混ぜ、5 分間おく。次いで塩化ナトリウム 25 g を溶かし、ヘキサン 10 mL で 10 分間抽出する。抽出液に内標準液 1 mL を加えてよく混合し、無水硫酸ナトリウムで脱水したもの (注 6) を試料液とする。

(ウ) 生物試料

前処理法で得られた液に PFBOA 溶液 1 mL を加えて密栓し緩やかに振とうし、2 時間放置する。硫酸 (1 + 1) 1.6 mL を加えてよくかき混ぜ、5 分間おく。次いで塩化ナトリウム 25 g を溶かした後、30 分間おく。生成した白色けん濁物をろ別 (注 7) してから、ろ液をヘキサン 30 mL で 10 分間抽出する (注 8)。この抽出液 (必要ならば過してけん濁物を除去する) で、白色けん濁物を十分な量の無水硫酸ナトリウム (注 9) とともに 20 分間氷水中で超音波抽出する。抽出液に内標準液 1 mL を加えてよく混合したもの (注 6) を試料液とする。

(3) 空試験液の調製 (注 1 0)

水質試料の場合は、PFBOA 溶液 1 mL に硫酸 (1 + 1) 1.6 mL を加えてよくかき混ぜ、ブランク水 100 mL を加えて 5 分間おく。次いで塩化ナトリウム 25 g を溶かし、ヘキサン 10 mL で 10 分間抽出する。内標準液 1 mL を添加して、無水硫酸ナトリウムで脱水したものを空試験液とする。

底質・生物試料の場合は、ブランク水 100 mL のみを試料として、「前処理法」ならびに「試料液の調製」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

任意の水質試料 100 mL にホルムアルデヒド 5 μ g、あるいは任意の底質 / 生物試料 10 g にホルムアルデヒド 50 μ g を添加し、十分に混合した後、「前処理法」ならびに「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

- ・ホルムアルデヒド標準原液 (1 mg/mL) : ホルマリン (ホルムアルデヒド濃度 : C %) の 10/C (g) を正確にメスフラスコ (100 mL) に採り、メタノールを加えて全量を 100 mL とする。本溶液は、褐色ガラス瓶に入れて冷凍保存する。ここで、C の値は以下のように標定する。

[標定] 市販ホルマリンの約 1 g をブランク水 5 mL を入れた褐色メスフラスコに採り、ブランク水を加えて 100 mL とする。その 10 mL を共栓付き三角フラスコに採り、これにヨウ素溶液 50 mL 及び水酸化カリウム溶液 (6 w/v %) 20 mL を加え、栓を

して静かに振り混ぜ、15分間常温で静置する。次いで、硫酸(1+15) 15 mLを加え、遊離したヨウ素を0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液を用いて滴定し、液が淡黄色になったら、でんぷん溶液 1 mL を指示薬として加えた後、液の青色が消えるまで更に滴定し、これに要した0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の mL 数(a)を求める。別にブランク水 10 mL についても同様に操作し、これに要した0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の mL 数(b)を求め、次式によりホルマリン中のホルムアルデヒド含量(%)を算定する。

$$C = 1.5013 \times [(b-a)/W] \times f$$

ここで、f : 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター

W : ホルマリンの採取量 (g)

- ・内標準原液：内標準(ナフタレン-d₈)を褐色メスフラスコ(100 mL)に正確に100 mg 採り、ヘキサンの溶かして100 mL とする。
- ・内標準液：内標準原液 1 mL を褐色メスフラスコ(100 mL)に採り、ヘキサンの溶かして100 mL とする。本溶液 1 mL は内標準を0.010 mg 含む。
- ・PFBOAホルムアルドキシム標準原液：PFBOAホルムアルドキシムを正確に10 mg 採り、ヘキサンの溶かして100 mL とする。市販の標準溶液を利用してもよい。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件

- ・カラム：熔融シリカキャピラリーカラム(内径0.2~0.25 mm、長さ30 m程度)
- ・液相：5%フェニルメチルシリコン、膜厚は0.25 μm程度
- ・カラム温度：一例として、60 (2分) 6 /分 150
- ・注入口温度：250
- ・注入法：スプリットレス(1分後パーズ開始)
- ・キャリアガス：ヘリウム(カラム流速は1 mL/分)
- ・MSインターフェース温度：250
- ・イオン化法：EI
- ・イオン化エネルギー：70 eV

- ・イオン源温度：200 位
- ・検出モード：SIM。定量用モニターイオンは m/z 181 (PFBOA ホルムアルドキシム)、 m/z 136 (内標準、ナフタレン- d_6)。確認用モニターイオンは m/z 195 (PFBOA ホルムアルドキシム)。

(イ) 検量線 (注 1 1)

毎測定時に検量線を作成する。検量線用標準液は下記の方法で調製する。PFBOA ホルムアルドキシム標準原液から調製した検量線用標準液に所定量の内標準を加える。検量線用標準液の 1 μ L を GC/MS に注入、対象物質と内標準との含有量比とピーク面積比から検量線を作成し、それを用いて試験液を定量する。検量線の濃度範囲は、検出下限及び定量上限と予想される濃度を含む 5 段階とする。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、測定用試料液、空試験液及び添加回収試験液の各 1 μ L を GC/MS に注入して測定を行う。一定時間ごとに、検量線の間濃度の標準液を測定し、期待値の 15% 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

GC/MS の測定結果から、定量用及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。試験液のピーク面積比を上記の検量線に照らしてホルムアルドキシムの量 (A μ g) を求める。各試料中のホルムアルデヒドの濃度は

$$\text{ホルムアルデヒドの濃度 (}\mu\text{g/L, }\mu\text{g/kg)} = 0.133 \times A \times (1000 / \text{検体量(mL, g)})$$

必要ならば、空試験値を差し引いて補正を行う。

8 . 分析精度管理

正確な分析値が得られていることを保証するために以下の作業を行い、その結果を記録・保存する。

10 検体又は 1 バッチ試験毎に空試験、二重分析及び添加回収試験を各 1 検体以上行う。

- ・空試験値が通常の値を超えた場合は、原因を究明して対策を講じた後、全ての試料の再試験を行う。
- ・二重分析の結果が許容差(注 1 2)を超えた場合は、その試料について再試験を行う。
- ・添加回収試験における回収率は、80% ~ 120% であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。

9 . 注意事項

(注 1) ホルムアルデヒドは空試験において常時検出されるため、7 回の空試験を行い、
平均値 (\bar{x}) と標準偏差 (s) から次式によって検出限界値を求める。

$$\text{検出限界値} = \bar{x} + 1.943s$$

検出限界値の 3 倍を定量下限値とする。

水中におけるホルムアルデヒドの LC 50 値および NOEC 値、LOEC 値は概ね 1 mg/L ~ 100 µg/L 以上であり、今回の定量下限値よりも高濃度である。

(注 2) GC/MS が利用できない時は、妨害物の存在に注意しながら、GC-ECD を利用して分析することも可能である。その際は内標準物質を適切なものに変える必要がある。

(注 3) 100 mL 当たり、PFBOA ホルムアルドキシムとして 1 µg 程度以下のレベルが望ましい。試薬メーカーの純水やミネラルウォーター(備考 1) などから適切なものを選ぶのが便利である。

(注 4) 実験室内の大気中ホルムアルデヒド濃度が高い場合は、窓を開けて外気を通気しながら分析操作する必要がある。

(注 5) 固相カートリッジは使用直前に、酢酸エチル 10 mL、メタノール 20 mL、ブランク水 40 mL を順に通してコンディショニングする。

(注 6) PFBOA ホルムアルドキシムは揮発性が高いために、濃縮操作を行うと散逸の起こる可能性がある。

(注 7) 吸引ろ過を行うと PFBOA ホルムアルドキシムが散逸する可能性があるため、氷水で冷却しながら、自然ろ過をおこなう。ろ紙は定性用標準品をひだ折りにして使用する。

(注 8) 1 分間 190 回程度の緩い振とう抽出を行う。強い振とう抽出を行うとエマルジョンが発生し、ヘキサン層を分取できなくなるので、注意が必要である。

(注9)ろ紙と白色懸濁物をビーカーに入れ、さらさらとした感じが出るまで無水硫酸ナトリウムを加えてよくかき混ぜる。

(注10)水質試料ではPFBOA溶液1 mLから、底質・生物試料では溶出に使用するブランク水100 mLとPFBOA溶液1 mLからブランクが入り込むので、空試験ではこの部分に焦点をあてている。

(注11)上水試験法での検量線作成とは異なっているので注意が必要である。

(注12)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)evianやHIGHLAND SPRINGなどのミネラルウォーターが一般に入手できるブランク水であるが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質のものを用いてよい。

10. 参考

微量のホルムアルデヒドはいたるところに存在しているために、低ブランクの水、試薬を入手することが不可欠である。

検量線を誘導体化されたPFBOAホルムアルドキシムで作成する方法を採用したために、装置的には極めて微量のPFBOAホルムアルドキシムを定量できる。

サロゲート(PFBOAホルムアルドキシム- d_2)を使用すると、GC/MS-SIMのモニターイオン m/z 181での定量を妨害するピークが観察されるために、本分析法ではサロゲートを使用しない。多くの実験から誘導体化率、抽出率ともほぼ定量的である。

誘導体化試薬であるPFBOAは硫酸(1+1)で容易に分解されるため、試料中のホルムアルデヒドを誘導体化した後、残りのPFBOAを硫酸(1+1)で分解することにより、他からのコンタミネーションを完全に無視できることになる。従って試薬類から持ち込まれるホルムアルデヒドのブランクはPFBOA溶液(1 mL)と底質・生物試料の抽出に使用するブランク水(100 mL)だけである。

生物試料では、誘導体化した後、硫酸(1+1)で分解、塩化ナトリウムを溶かすが、この時大量の白色沈殿物が析出してくる。この沈殿物を完全に分別しないと、ヘキサン抽出が成功しない。また、PFBOAホルムアルドキシムは沈殿物と液相の両方に分配しているために、両方からの抽出が必要である。

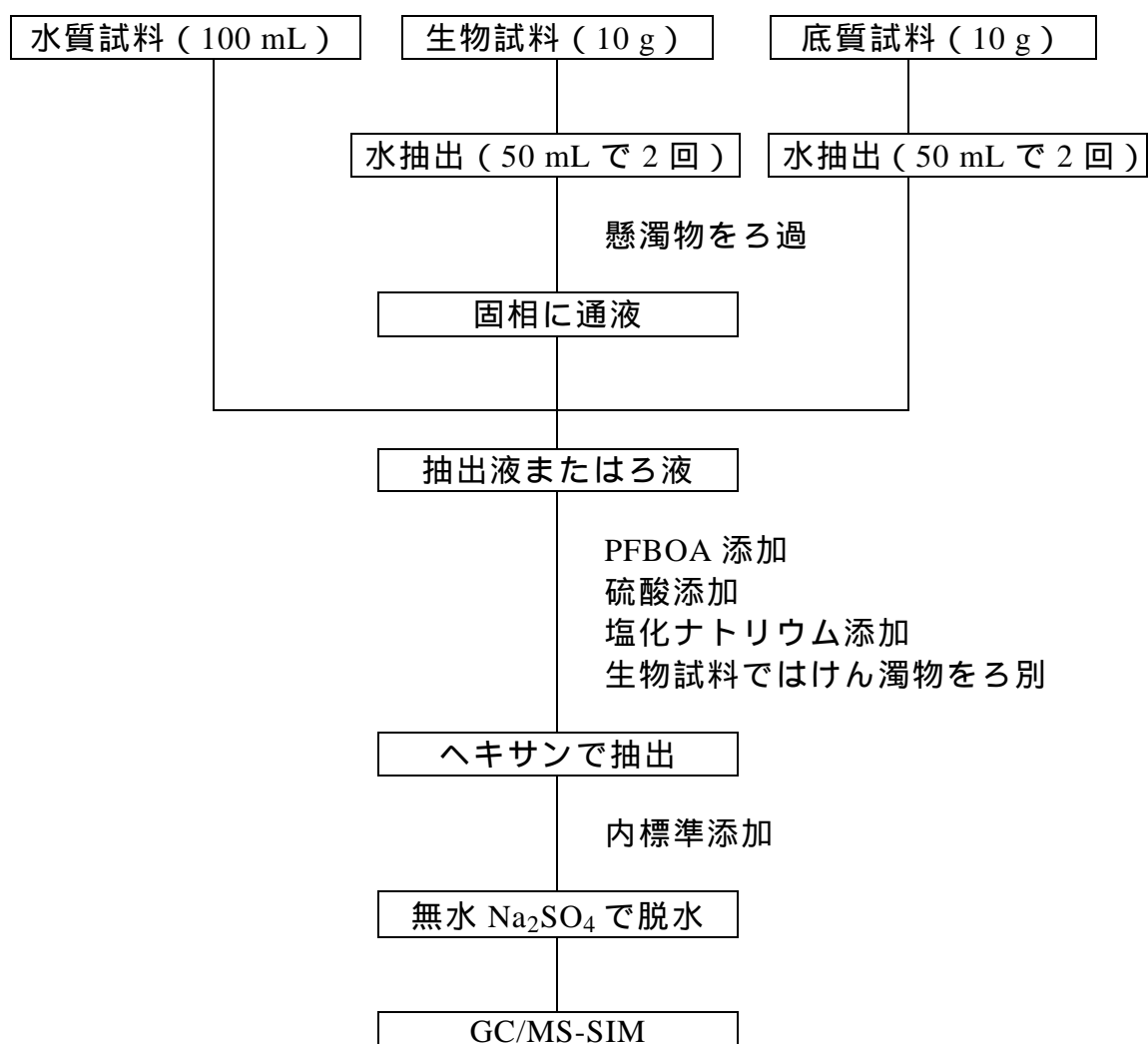
生物試料での添加回収率にはかなりの変動が観察される。生物試料中にフリーのアミノ

基が存在する場合、添加されたホルムアルデヒドの一部がアミノ基と反応してシッフ塩基となることも考えられる。従って、完全な添加回収が実現されない場合もあることを考慮しなければならない。

参考文献

- 1 平成6年度化学物質分析法開発調査報告書、p.1-14(広島県保健環境センター) (1995)
- 2 山本圭吾、梅林清志、松浦洋文、伊藤重美、城山二郎、佐々木美智子；奈良県衛生研究所年報、第29号、148-150 (1995)
- 3 上水試験法
- 4 T. K. Choudhury, T. Kotiaho and R. G. Cooks; Talanta, 39, 1113-1120 (1992)
- 5 馬場謙三、石川精一、花田喜文、内村 豊、末田新太郎、城戸浩三；分析化学、37, 519-523 (1988)
- 6 L. Yang, K. T. Alben, R. Briggs, J. Regan and K. M. Aldous; Proc. AWWA Water Qual. Technol. Conf., No.1995, Pt.2, 1287-1296 (1996)

分析法フローチャート



．ジंकピリチオン及び銅ピリチオンの分析法（試案）（注1）

1 対象物質

本法は水質試料中のジंकピリチオンと銅ピリチオンの含量の分析に適用する。
両者の化学構造、化学名、CAS-No.などの物質情報は以下の通りである。

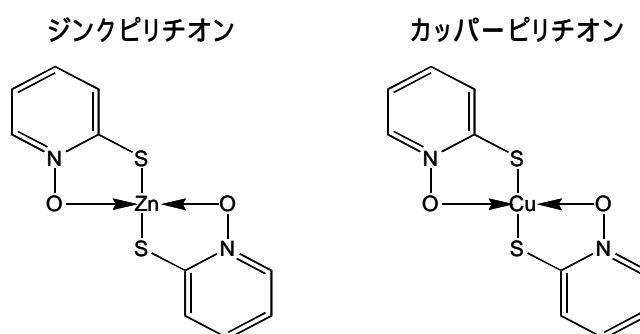


図1 化学構造

<ジंकピリチオン>

化学名：Zinc, bis(2-pyridylthio)-, N,N'-dioxide (CAS No. 13463-41-7, RTECS No. ZH0950000)、
分子式：C₁₀H₈N₂O₂S₂Zn、分子量：317.7078（平均同位体）、315.9319（最多同位体）、別名/
商品名：Bis(1-hydroxy-2(1H)-pyridinethionato)zinc、OM-1563、Omadine Zinc、
2-Pyridinethiol-1-oxide, zinc salt、Pyrithione zinc、Vancide P、Zinc,
bis(1-hydroxy-2(1H)-pyridinethionato)-、Zinc, bis(1-hydroxy-2(1H)-pyridinethionato-O,S)-,
(T-4)-、Zinc, bis(2-pyridylthio)-, 1,1'-dioxide、Zinc omadine、Zincpolyanemine、Zinc PT、Zinc
pyridine-2-thiol-1-oxide、Zinc 2-pyridinethiol-1-oxide、Zinc pyridinethione、Zinc pyrion、Zinc
pyrithione、ZnPT、ZPT、用途：船底塗料、抗ふけ剤、抗菌剤、毒性：生殖毒性

<銅ピリチオン>

化学名：Copper, bis(2-pyridylthio)-, N,N'-dioxide、分子式：C₁₀H₈N₂O₂S₂Cu、分子量：315.8638
（平均同位体）、314.9323（最多同位体）、別名/商品名：Bis(1-hydroxy-2(1H)-pyridinethionato)
Copper、Omadine Copper、2-Pyridinethiol-1-oxide, copper salt、Pyrithione copper、Copper,
bis(1-hydroxy-2(1H)-pyridinethionato)-、Copper, bis(1-hydroxy-2(1H)-pyridinethionato-O,S)-,
(T-4)-、Copper, bis(2-pyridylthio)-, 1,1'-dioxide、Copper omadine、Copper polyanemine、Copper
PT、Copper pyridine-2-thiol-1-oxide、Copper 2-pyridinethiol-1-oxide、Copper pyridinethione、
Copper pyrion、Copper pyrithione、CuPT、水溶解度：0.09μg/mL、オクタノール/水分配係数：
1.4（対数値）、用途：船底塗料

2 目標検出限界及び定量上限値

目標検出限界値は0.02 μg/Lである。また、定量域は0.5 μg/Lを上限とする（注1、2、
参考2）。

3 分析方法の概要

分析方法の概要は図2の通りである。水中のジंकピリチオンと銅ピリチオンはジクロロメタンで振とう抽出し、脱水、ロータリーエボレータで乾固直前まで濃縮した後、アセトニトリル 1 mL を加えて超音波で再溶解したものを試料液とする。この試料液 20 μ L を LC/MS に注入して絶対検量線法で定量する。

ジंकピリチオンは LC カラムを通過する間に銅ピリチオンに変化するので、MS では銅ピリチオンとして検出することになり、両者の含量値を得る。

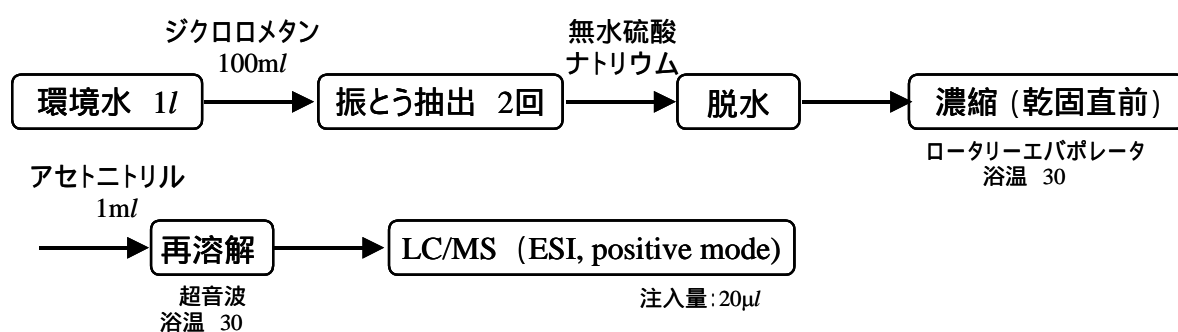


図2 分析方法の概要

4 試薬・器具・装置

(1) 試薬

- ・ジंकピリチオン：純度 97%以上 (Arch Chemicals)。この 10 mg をアセトニトリル 100 mL に溶解し、標準原液を調製する。
- ・銅ピリチオン：純度 97%以上 (Arch Chemicals)。この 10 mg をアセトニトリル 100 mL に溶解し、標準原液を調製する。
- ・有機溶媒類：ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、メタノール(残留農薬分析用)、アセトニトリル、イソプロピルアルコール (HPLC 分析用)
- ・酢酸アンモニウム：試薬特級以上で、測定を妨害する成分を含まないもの。
- ・硝酸 (試薬特級)
- ・無水硫酸ナトリウム：残留農薬分析用
- ・精製水：超純水であって、測定を妨害したり、バックグラウンドレベルを上昇させる成分を含まないもの。

(2) 器具及び装置

- ・ 試薬瓶、分液ロート、共栓付試験管、メスシリンダー、メスフラスコ、オートサンプラーバイアル瓶などガラス器具：良質ガラス製で、可能な限り褐色を用いる(注3)。
- ・ 振とう機
- ・ ロータリーエバポレータ
- ・ 超音波振とう器
- ・ 高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS)：C4 シリカ系充填剤の LC カラムを装着し、電界噴霧-エレクトロスプレーイオン化法 (ESI: Electrospray Ionization) または大気圧化学イオン化法 (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization) の大気圧イオン化法 (API: Atmospheric Pressure Ionization) の機能をもつもの (注4)。

(3) 器具の管理と LC/MS 装置の最適化

ジンクピリチオンの配位子であるピリチオン分子は、分析の濃縮操作や LC/MS 測定時において溶存あるいはガラス器具表面に露出する他の金属原子に容易に結合する。この性質が感度や再現性に決定的に影響するので、注3～4に留意して適切なガラス器具の洗浄と LC カラムのコンディショニングを行わなければならない。

5 試料の採取・運搬

試料水は 1 L 容試料瓶に満水に採り、全量を分析に供する。

水中のジンクピリチオンと銅ピリチオンは直射日光下で速やかに分解する。この傾向はジンクピリチオンが特に顕著で、半減期は 10～30 分である(参考2)。したがって、試料水は褐色の試料瓶に採って、直ちにクーラーボックスに収納し、可能な限り速やかに実験室に持ち帰って抽出に供する。氷冷、遮光状態では比較的安定であるが、試料採取から抽出まで 1～2 日以内に操作しなければならない。

6 試験操作

(1) 前処理と試料液の調製

抽出から LC/MS 測定に至る操作は速やかに、かつ連続的に行い、全ての操作を 1 日以内に完了する。この一連の操作は、直射日光の当たらない場所で行い、ガラス器具は褐色が望ましい。

試料水 1 L を 2 L 容分液ロートに採り、ジクロロメタン 100 mL を加えて、振とう機で 10 分間振とう、ジンクピリチオンを抽出する。静置後、ジクロロメタンを分取する。水層にジクロロメタン 100 mL を加え、同様な抽出操作を繰り返して、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は、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレータで乾固直前まで濃縮する。これにアセトニトリル 1 mL を正確に加え、超音波をあてて再溶解したものを LC/MS に注入する試験液とする。

(2) 空試験液の調製

試料と同量の精製水を用いて、前項の操作を行い水試料の空試料液を調製する。

(3) 添加回収試験液の調製

精製水 1 L にジンクピリチオンと銅ピリチオンをそれぞれ 0.25 μg (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アセトニトリル溶液、0.5 mL) 添加して、十分に混合した後、「前処理と試料液の調製」の操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

(4) 標準液の調製

ジンクピリチオンと銅ピリチオンの 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準原液をアセトニトリルで段階的に希釈し、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の検量線用標準液を作成する。

標準原液は密封褐色試薬瓶に入れ、1 ヶ月を限度として冷暗所に保存する。また、検量線作成用の標準液は使用の都度調製する。

(5) 測定

(ア) LC/MS 測定条件

LC/MS (HP1100 Series LC/MSD) をもとに測定条件の一例を以下に示すが、各装置に応じた最適条件に設定する (注 4、参考 1、4、5)。

<HPLC>

- ・カラム : C4 シリカ系充填剤、Inertsil C4 (4.6×150mm、5 μm 、GL Science)、Develosil TMS-VG-5 (4.6×150mm、5 μm 、Nomura Chemical) など
- ・移動相 : A 液 (2 mM 酢酸アンモニウム水溶液)、B 液 (HPLC 用アセトニトリル)
- ・溶離条件 : 0 ~ 10 分 B 液 (20%) (95%)、10 ~ 15 分 B 液 (95%) (100%)

- ・流速：0.5 mL/分
- ・カラム温度：40°C
- ・注入量：20 μ L

<MS>

- ・マスレンジ (m/z)：100 ~ 400
- ・イオン化法：Electrospray 陽イオン検出モード (ESI-Positive)
- ・フラグメンター電圧：50 V
- ・ネブライザー：N₂ (60 psi)
- ・ドラインガス：N₂ (12 L/分、350°C)
- ・モニターイオン (m/z)：316 (定量用)、318 (確認用)

(イ) 検量線

ジンクピリチオンの検量線作成用標準液 20 μ L を LC/MS に注入し、銅ピリチオンとして検出したピークの強度 (面積または高さ) と濃度から検量線を作成する。同様に、銅ピリチオンについても検量線を作成する。両者の応答が等しいことを確認し、同一の直線回帰が得られる範囲を検量線とする (注 2、参考 2)。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、添加回収試験液、試料試験液の 20 μ L を LC/MS に注入して測定を行う。10 試料に 1 回以上、検量線の中位程度の濃度の標準液を注入して、その感度変動が検量線作成時の 15 % 以内であることを確認する。もし、これを超えていれば原因を取り除き、検量線を作成し直して、試料液の再測定を行う。

7 同定、定量及び計算

標準物質の LC における保持時間が一致し、かつ MS における確認イオンと定量イオンのピーク強度比が理論値の $\pm 20\%$ 以内であれば、試料液中にジンクピリチオンあるいは銅ピリチオンが存在していると見なす。

試料液における銅ピリチオンの定量イオンピークの強度から、検量線により絶対量を求め、次式で定量値を算出する。

$$C(\mu\text{g/L}) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{mL}) \times 1,000 / V_{\text{inj}}(\mu\text{L}) \times V_{\text{spl}}(\text{mL})$$

ここで、C：試料水中のジंकピリチオン及び銅ピリチオン濃度（ $\mu\text{g/L}$ ）

S_{abs} ：検量線から求めた試料液中ジंकピリチオン及び銅ピリチオン量（ng）

V_{conc} ：試料液の最終液量（mL）

V_{inj} ：LC/MS への注入量（ μL ）

V_{spl} ：試料水量（mL）

8 分析精度管理

（1）検出下限値、定量下限値

検量線作成時の最低濃度（定量限界値付近）の標準溶液を LC/MS に注入して測定値を求め、濃度算出式に代入して試料水中の濃度を算出する。5 試料以上を測定して求めた標準偏差（s）から、ジंकピリチオンおよび銅ピリチオンの検出下限値および定量下限値を算出する。但し、操作ブランク値のある場合には、その値を測定し、標準溶液と操作ブランクの測定値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。

$$\text{検出下限値} = 3s \quad (\mu\text{g/L}), \quad \text{定量下限値} = 10s \quad (\mu\text{g/L})$$

（2）二重測定

二重測定は採取後から試料数の 10% 程度の頻度で実施する。定量下限値以上の濃度の測定対象物質に対して、2 つ以上の測定値の差が 30% 以下であることを確認する。差が大きいときには原則として欠測扱いとし、その原因をチェックして再度試料採取する。

9 注意事項

（注 1）本法は水中のジंकピリチオンと銅ピリチオンを“溶媒抽出 LC/MS 検出”によって測定する方法である。しかし、ジंकピリチオンは LC/MS 装置の LC カラム内で銅ピリチオンに変化するので、ジंकピリチオンとして検出することができない。ジंकピリチオンの配位子であるピリチオンが LC カラム（カラム本体、シリカ充填剤、移動相溶媒）に含まれる不純物の銅に結合するためと考えられ

る。現在、一般的に流通している器材ではこの反応を抑制することができない。したがって、ジンクピリチオンは銅ピリチオンとして検出せざるを得ないことから、両者の含量を測定する方法を試案として示した。このようにジンクピリチオンは銅ピリチオンに比べて不安定であり、銅イオンの存在下で銅ピリチオンに変化することから、方法の検討はジンクピリチオンの挙動に焦点をあてている。

(注2) シリカ系の充填剤では、少なくとも 0.5 µg/mL 以下の濃度であればジンクピリチオンと銅ピリチオンは同一と見なせる検量線が得られる。この濃度以上では、ジンクピリチオンの検量線の傾きが、銅ピリチオンに比べて低下する可能性があり、定量上限値を 0.5 µg/L とした(参考2)。

(注3) ガラス器具の洗浄は分析結果の精度に決定的に影響する。これは、ガラス器具の表面に付着したり露出している金属原子、あるいは試料溶液中の溶存金属イオンにジンクピリチオンのピリチオンが配位するためと想定され、このような過程は濃縮操作で起こる。この反応を抑えるために、分析操作に用いる全てのガラス器具から予め金属を除く必要があり、洗浄、乾燥および保管に関する留意点を以下に示す。また、分析環境など全般的な留意点については、ICP-MS 等による重金属類の超微量分析を参考する。

ガラス器具の洗浄と乾燥

全てのガラス器具は、洗剤で洗浄し、十分に水洗した後一昼夜程度以上濃硝酸槽に浸漬して、ガラス表面の金属を溶解さす。使用に際して、水道水で酸を洗い流し、精製水で濯いだ後、アセトンとヘキサンで洗浄して乾燥さす。乾燥は風乾で行い、決してドライヤーや乾燥機は用いない。ドライヤーで乾燥すると、鉄やニッケルがガラス表面に付着し、著しい回収率の低下につながる。また、乾燥機のオープン内は金属粒子の浮遊が顕著であると想定されるので避ける。

風乾時のガラス器具の入れ物はプラスチック製とし、埃の付着を防ぐためにろ紙やガーゼ等で覆いをする。覆いにはアルミホイル等の金属素材は使わない。

ガラス器具の保管

埃等の付着を防ぐために、ガラス器具は風乾後直ちにポリ袋に入れて保管する。しかし、ガラス器具は使用の都度濃硝酸槽から取り出し、水洗、溶媒洗浄、風乾して、分析操作に用いることが望ましい。

ガラス器具の質

ガラス器具表面の露出金属も回収率や精度低下の原因となるので、可能な限り高品質なもので、かつ使用履歴が明確なものを用いる。

- (注4) ガラス器具の取り扱いとともに、LC/MS の測定条件の設定も極めて重要である。ジンクピリチオンと銅ピリチオンのマススペクトルは参考1の通りであるが、10 µg/mL 以上の高濃度は別として、LC 導入ではジンクピリチオンは銅ピリチオンとなって検出される。このメカニズムは明確となっていないが、一般的なカラム本体やフリットの素材であるステンレス、充填剤基材のシリカ、精製水、移動相溶媒にプロトドナーとして添加する酢酸アンモニウム等に含まれる不純物としての銅が移動相中に溶出し、ジンクピリチオンのピリチオン分子が配位するためと考えられる。低濃度域であれば、ジンクピリチオンから銅ピリチオンへの変化は意図的な操作がなくとも定量的に進行する。その一方で、ジンクピリチオンは充填剤の素材や状態によっては、定量域が狭まったり、全く検出できないこともあり、事前の確認と条件の最適化が不可欠である。以下に基本的な留意点をまとめる。

検量線の確認

LC カラムや移動相溶媒によって銅の含有量が異なることが想定されるので、予めジンクピリチオンと銅ピリチオンで検量線を作成し、両者の一致度と定量域を確認する必要がある。分離性能が同等以上であれば、ポリマー系の充填剤も使用できるが、銅の溶出量の低下で定量域が狭まる可能性がある(参考2)。

カラムの洗浄

とくにカラムの接続直後では、鉄ピリチオンやニッケルピリチオンの質量に近接した m/z 308 ~ 313 に強いピークが出現して、銅ピリチオンが全く検出できないことがある。この場合は、期待される銅ピリチオンのマススペクトルが得られるまで、イソプロピルアルコールでカラムを洗浄するか、別のカラムに取替え、マススペクトルを確認する。洗浄は一晩から1日程度を要する(参考1)。

流路の洗浄

銅ピリチオンの擬分子イオンであるプロトンとナトリウム付加ピークの比率が流路の汚れの目安となる。汚れるに従って、ナトリウム付加ピークの強度が増加し、ベースピークとなることがある。この場合も、ナトリウム付加がプロトン付加ピークの 1/5 ~ 1/10 程度の強度になるまで流路をイソプロピルアルコールで洗浄

することが望ましい。さらに汚れが進むと、感度が極端に低下したり、検出できなくなる。この際は、インターフェース部の分解洗浄が必要となる。

イオン検出

LC/MS はインターフェースの構造や制御方式による機種間差が大きい。本法では、ESI の陽イオン検出を一例として示したが、装置によっては APCI の陽イオン検出で最高感度を得られる可能性がある。したがって、測定条件の最適化にあっては選択できる全ての機能について検討する。

10 参考

参考1) マススペクトル

銅ペリチオンの LC/MS (ESI-Positive モード) スペクトルは、プロトン付加の擬分子イオン (m/z 316) とナトリウム付加の擬分子イオン (m/z 338) の同位体クラスターで構成され、プロトン付加がベースピークをなす (図3)。しかし、プロトンとナトリウム付加の擬分子イオンの相対強度は、LC/MS 装置内の流路系に付着するナトリウム量によって変化し、場合によってはナトリウム付加の擬分子イオンがベースピークとなる可能性がある。したがって、事前の LC/MS 操作条件の最適化が不可欠であり、両者の相対強度が 5:1 ~ 10:1 になるよう設定する。

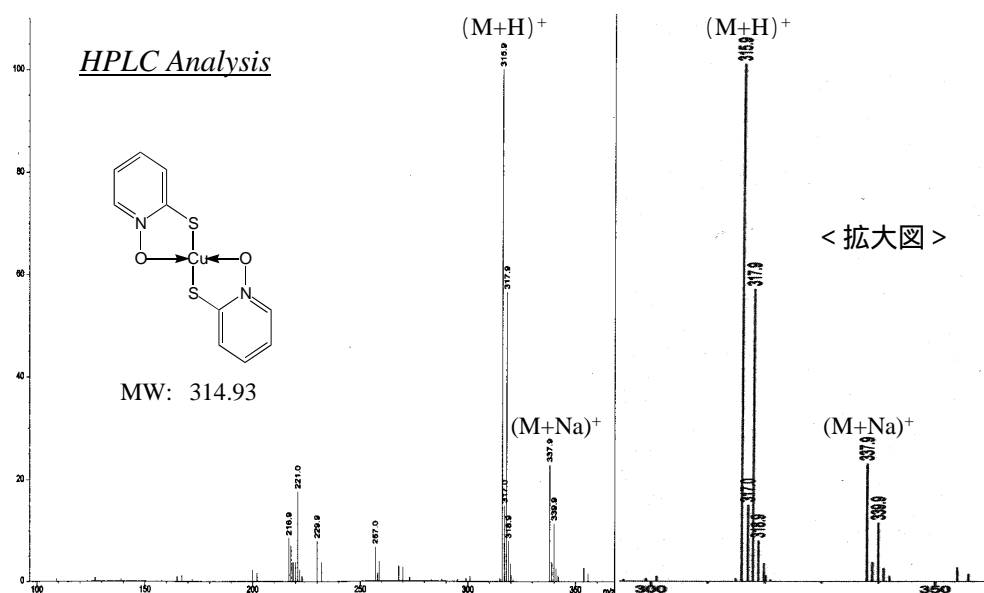


図3 銅ペリチオンの LC/MS スペクトル (ESI-Positive)

図4はジンクピリチオンのマススペクトルであり、フローインジェクション分析(FIA)で得られたものである。銅ピリチオンと同様に、ジンクピリチオンもプロトンとナトリウム付加の擬分子イオンで構成されるスペクトルを描く。しかし、フラグメンテーションは銅ピリチオンに比べてさらに測定条件に左右される。また、ジンクピリチオンの分子内の亜鉛は他の重金属元素と置換し易く、図中にみられる m/z 308 ~ 312 のクラスターイオンは、質量的にはニッケルや鉄ピリチオンに相当する。

ジンクピリチオンの LC 注入において、上記のイオンピークがベースに検出される場合は、銅ピリチオンの感度が極端に低い、全く検出されない状態となるので、LC カラムのイソプロピルアルコールによる洗浄で対処する。

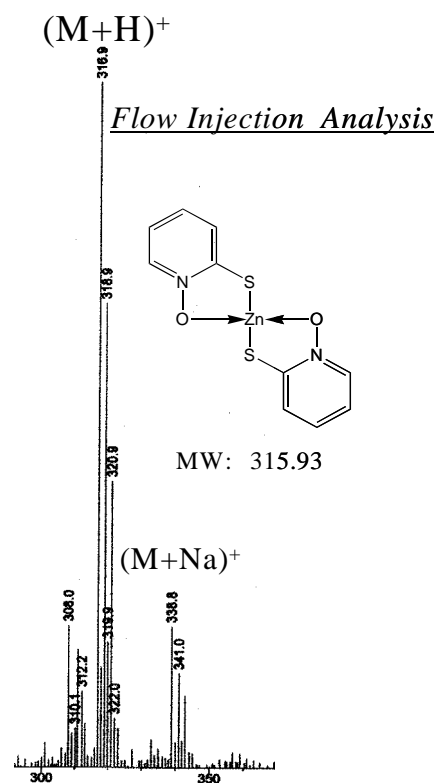


図4 ジンクピリチオンの LC/MS スペクトル(ESI-Positive)

参考2) 検量線の作成

ジンクピリチオンと銅ピリチオンの 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ~ 5 $\mu\text{g/mL}$ アセトニトリル溶液 20 μL を LC/MS に注入して得られた検量線を図5に比較した。左図のように、ジンクピリチオンは銅ピリチオンに比べて明らかに直線領域が狭い。しかし、0 ~ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ の低濃度域においてはほぼ等しい検量線で表現できる(右図)。ジンクピリチオンは、右図が確認できる条件で測定し、定量は直線性が得られる範囲内に限定され、検量線濃度の上限が定量上限値に相当する。

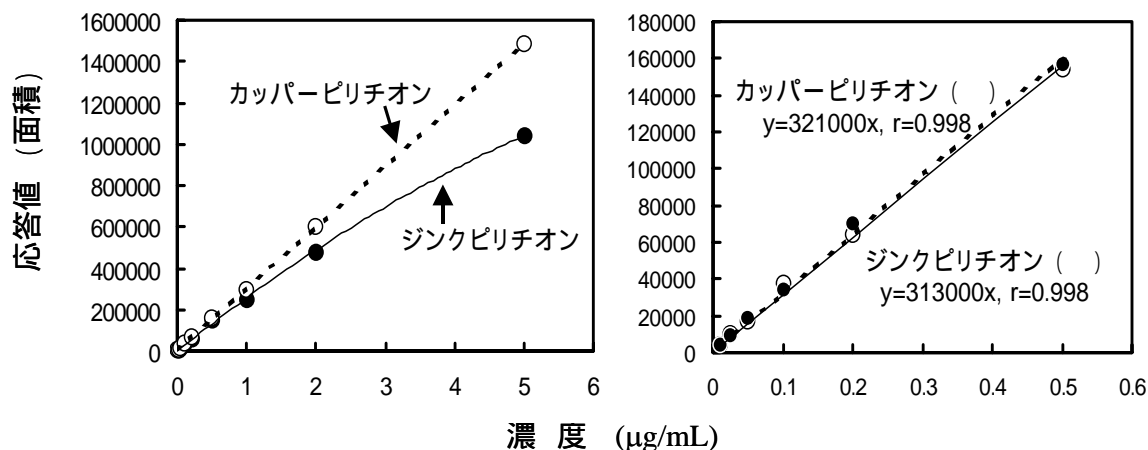


図5 ジンクピリチオンと銅ピリチオンの検量線の比較

参考3) 回収率と定量下限値

1 L の精製水と海水(大阪港表層海水)にジンクピリチオンの 50 µg/L アセトニトリル溶液を 1 mL 添加し混合して、0.05 µg/L の試験溶液を調製した。この試験溶液にジクロロメタンを加え、振とう抽出して、脱水、濃縮の操作を辿り、LC/MS 測定して回収率を求めた。5 回繰り返しの結果が表 1 である。

表 1 回収率試験の結果

繰り返し	濃度	精製水 (%)	海水 (%)
1	0.05µg/L	79	50
2	0.05µg/L	74	83
3	0.05µg/L	74	71
4	0.05µg/L	73	90
5	0.05µg/L	75	70
平均		75	73
標準偏差		3	15

ジンクピリチオンの回収率は、精製水で 73 ~ 79%、海水で 50 ~ 90% の範囲にあり、海水で若干変動が大きかったが、70% 程度の回収率が期待できる。

この結果の標準偏差から、MDL(Method Detection Limit)と PDL(Practice Detection Limit) を求めた。MDL は精製水、PDL は海水の結果をあて、 $MDL (PDL) = BL+k$ から算出した。K 値は、Student の t 分布の危険率 5% における t 値 (片側)、 は測定結果の標準偏差

である。BL はブランク値であるが、この値はゼロであった。結果は次の通りであり、実試料において、0.02 µg/L の検出が可能と判断された。

MDL : 0.005 µg/L、PDL : 0.019 µg/L (危険率 5%)

目標検出下限値 : 0.020 µg/L

参考 4) 実試料における定量妨害成分

大阪港表層海水から保持時間が銅ピリチオンに近接して溶出し、定量の妨げとなる成分の存在が確認された(図 6 上)。この分離に関して、移動相溶媒をグラディエント分析の最初の展開溶媒(20% 2 mM 酢酸アンモニウム + 80% アセトニトリル)を 10 分間保持することで若干の改善がみられた(図 6 下)。

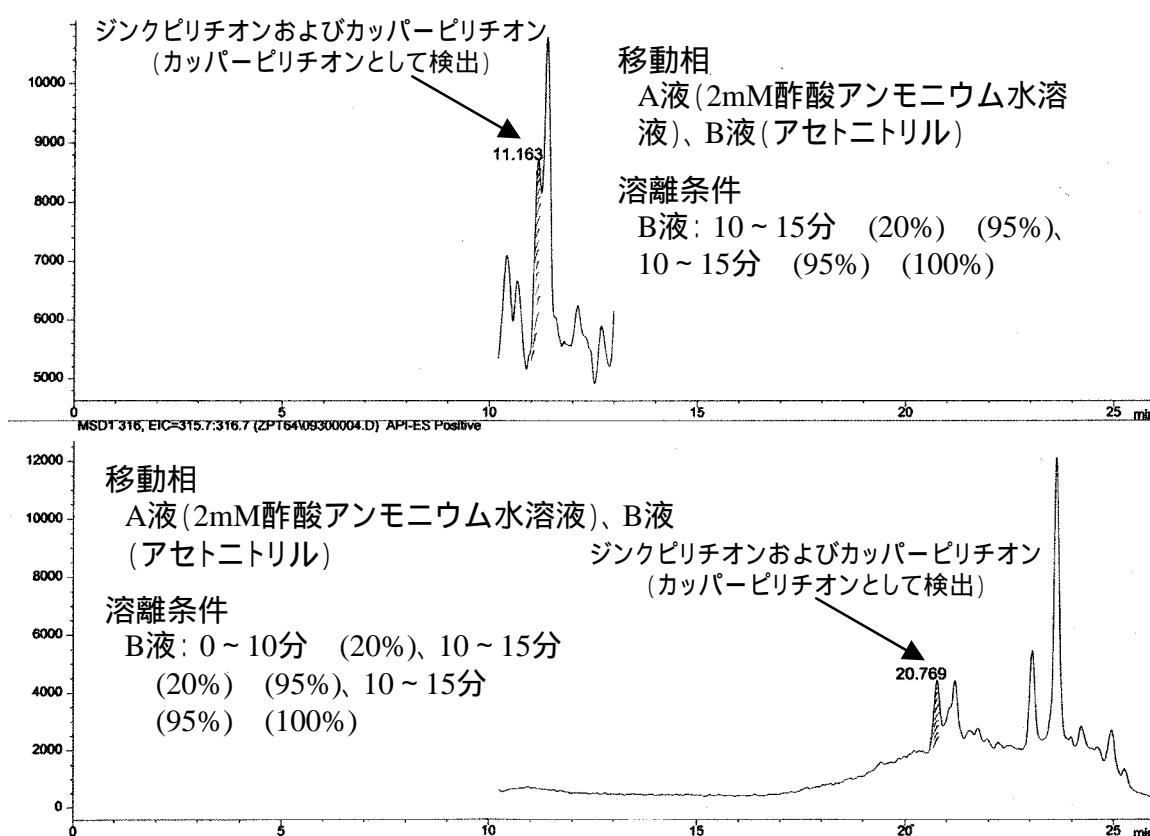


図 6 実試料分析で出現した定量妨害物質の LC における挙動

参考5) HPLC カラムの選択

使用するカラムは ODS や疎水性ポリマー基材の充てん剤など有機物質との相互作用が大きいカラムではピーク形状が不良で、満足な分離が行えない。現状では、C4 カラムを用いるのが適当との結果を得ている。しかし、移動相溶媒をメタノールに変えることで C18 カラムの利用が可能とのアプリケーションがある。

参考6) 光分解性

ジンクピリチオンを 500 µg/L、25 µg/L の濃度に調製した精製水と海水(標準海水、塩分 3.5%) をビーカーに入れ、直射日光をあてて濃度の減衰挙動をみた。結果は図7の通りであり、精製水中のジンクピリチオンの分解速度は海水に比べて若干速く、半減期で 10~20 分、海水では 25~30 分であった。対照の遮光条件では濃度の低下はなかった。

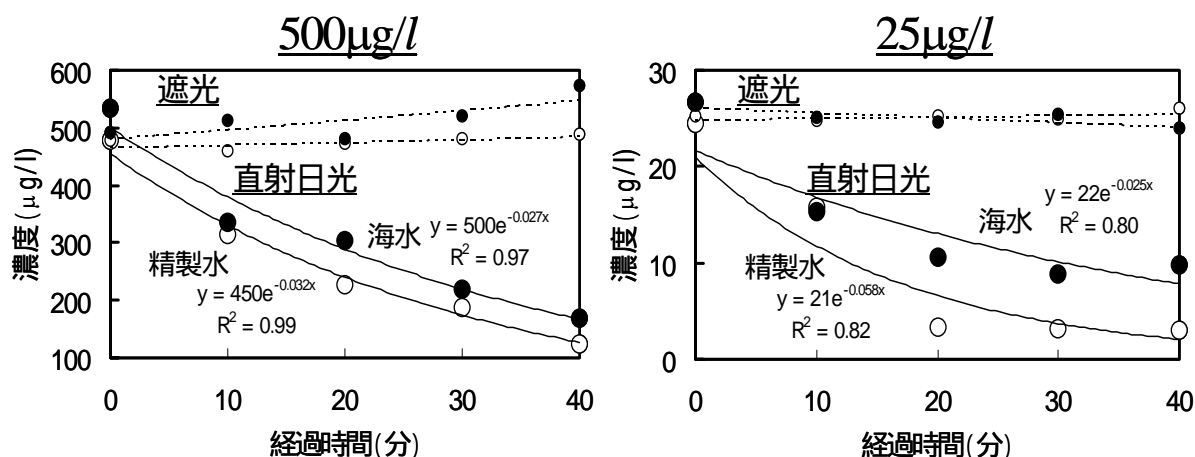


図7 精製水および海水中におけるジンクピリチオンの光分解性

(備考) このマニュアルで示した商品名は、使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして挙げたが、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。

．エストラジオール類の分析法（メチル誘導体化・GC/MS-SIM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、エチニルエストラジオール

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 0.01 μ g/kg である。

（注1）

3 分析法の概要

水質試料は試料水にサロゲート物質、塩酸及びアスコルビン酸を加え、固相カートリッジに通水捕集後、酢酸メチルで溶出し、濃縮後、ヘキサンに転溶する。無水硫酸ナトリウムで脱水し乾固する。ヘキサン：ジクロロメタン（1：1）1 mL で溶解し、無水硫酸ナトリウムで脱水し、フロリジルカートリッジカラムで誘導体化前のクリンアップを行う。目的画分を乾固し、ジメチル硫酸でメチル化を行う。反応終了後、KOH/エタノール溶液及び水を加え、内標準（クリセン-d₁₂）のヘキサン溶液を加え、振とうしてメチル化誘導体をヘキサン層に移行させる。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、濃縮して GC/MS の試料液とする。

底質試料及び生物試料については、サロゲート物質を添加し、メタノールで抽出した後、メタノール/ヘキサン分配を行う。ジクロロメタンに転溶後脱水濃縮・乾固し、ヘキサン：ジクロロメタン（1：1）1 mL で溶解し、無水硫酸ナトリウムで脱水し、フロリジルカートリッジカラムで誘導体化前のクリンアップを行う。溶出液を乾固し、ジメチル誘導体化処理を行う。反応終了後、KOH/エタノール溶液と水を加えて 70℃ で 1 時間アルカリ分解を行う。内標準（クリセン-d₁₂）のヘキサン溶液を加えて振とうし、ヘキサン層をフロリジルカートリッジカラムでクリンアップし、濃縮して GC/MS-SIM で測定する。

今回の調査では遊離のエストラジオールのみを対象とし、抱合体の分解処理は行わないこととする。

ここに提示した GC/MS によるエストラジオール類の分析法は、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」（水質、底質、水生生物）平成 10 年 10 月 環境庁水質保全局水質管理課（以下暫定マニュアル）に提示されている *t*-BDMS 化法とは、誘導体化及び

クリンアップ法に於いて大幅に異なっている。その理由は、暫定マニュアル法によるクリンアップ法は煩雑な操作と高度な熟練が必要であることである。即ち、薄層クロマト(TLC)による掻き取り、液体クロマト(HPLC)による分取及びゲルパーミュエーション(GPC)による方法は多くの分析技術者にとって未経験であり、また設備等の面からも困難な点が多い。

本法は市販のカートリッジカラムのみを使用するという極めて簡単で誰にでも出来る方法である。即ち、エストラジオール類を誘導体化前の強極性状態でクリンアップを行い、さらに誘導体化(ジメチル化)後、無(微)極性状態で再度クリンアップする方法であり、極めて効果的なクリンアップが出来る。また、誘導体化したものは極めて安定で、アルカリ分解が可能であるためクリンアップ効果が飛躍的に向上される方法であり、特に底質や生物試料に効果的である。

4 . 試薬・器具・装置

(1) 試薬

- ・対象物質：市販標準試薬
- ・サロゲート物質：17 β -エストラジオール-16,16,17-d₃
17 β -エストラジオール-2,4,16,16-d₄ 市販標準試薬
- ・内標準物質：クリセン-d₁₂ 市販標準試薬
- ・L-アスコルビン酸：試薬特級
- ・*n*-ヘキサン、ジクロロメタン、アセトン、メタノール、エタノール、エチルエーテル：
残留農薬分析用
- ・酢酸メチル：試薬1級
- ・ジメチル硫酸：試薬1級 (新しく購入したものを使用すること)
- ・無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留農薬分析用
- ・過塩素酸マグネシウム：元素分析用 20~48 mesh
- ・1M-NaOH / メタノール溶液：2 g の水酸化ナトリウムにメタノールを加えて 50 mL とし、時々振り混ぜて溶解させる。(調製時に絶対に水を加えないこと。)吸水しないように密栓して室温で保存する。
- ・1M-KOH / エタノール溶液：56 g の水酸化カリウムに水 50 mL を加え、ホットプレートで加熱して溶解させる。これを熱いうち(冷えると固まるから)に約 950 mL のエ

タノールに加えて調製する。使用後は冷蔵庫内に保管すると長期にわたり安定である。（室温に放置しておくると徐々に黄色化する。）

- ・水：市販ミネラルウォーター
- ・フロリジルカートリッジカラム：ここではウォータズ社製 Sep-Pak® Cartridges Florisil® を用いた。
- ・C18カートリッジ：ここではウォータズ社製 Sep-Pak® Plus C18 Cartridges を用いた。
- ・グラスファイバー濾紙：試料水の濾過に用いる。ここでは東洋濾紙会社製 GS25（47 mm）を用いた。

（2）器具及び装置

- ・パストゥールピペット
- ・コンセンレーター：C18カートリッジ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。
- ・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液固分離に用いる。
- ・KD濃縮器又はロータリーエバポレーター
- ・恒温水槽：試料液の濃縮・乾固及びアルカリ分解に用いる。
- ・脱水管：パストゥールピペットの細くなった部分を切断し、グラスウールを詰め、過塩素酸マグネシウムを充てんし、グラスウールで栓をする。（長さ約10 cm）このものを3本作製し、直列に繋いで使用する。
- ・10 mL容丸底型KD濃縮管
- ・10 mL容微量用KD濃縮管：最終試料液の調製時に用いる。最終試料液量が10～50 µLでマイクロシリンジでサンプリングが可能なもの。先端の内径が2～3 mmと極細のもの。

5．試料の採取・運搬

（1）試料採取方法

（ア）水質

（a）採水時期

採水日前において比較的晴天が続き、水質が安定している日を選ぶ。

(b) 採水部位

原則として、調査地点の流心において表層水(水面下 0~50 cm)を採取するものとする。ただし、表面の浮遊ゴミ、浮遊油類を混入しないよう表層 1~2 cm を避けて採取する。

(イ) 底質

(a) 採取方法・前処理

調査地点において底質の性状を考慮したエクマンバージ型採泥器又はこれに準ずる採泥器によって採取した底質を清浄なバットに移し、小石、貝類、動植物片などの異物を除いた後、ふるい径 1 mm のふるいでふるう。このものを 3000 rpm で 10 分間遠心分離したものを分析に供する。

(ウ) 生物試料

(a) 採取試料

試料は調査地点で再生産されるものを標準とする。

(b) 前処理

分析対象部位をホモジナイズして、清浄な広口ガラス瓶に入れ、冷凍保存する。分析時はこれを自然解凍して使用する。

(2) 試料採取容器の材質・容量等

(ア) 水質

ガラス瓶を使用する。(使用するガラス瓶は洗剤で洗浄し、十分に水道水(湯)ですすぐ。さらに蒸留水で十分にすすぎ、残留塩素が残らないようにする。容量は 1 L (残留農薬試験用溶媒の空き瓶でよい)で、この容器に 1 L の試料水を採取し、アスコルビン酸 1 g を添加し、振り混ぜて溶解させ、氷冷しておく(アスコルビン酸を添加した場合は試料瓶にその由を明示する)。予備を含めて 2~3 本採取する。

(イ) 底質

ガラス製広口瓶に 500 g 程度採取する。ただし、底質の性状により、ふるい処理及び遠

心分離処理をおこなった後、50 g 程度の底質が得られるように配慮する。

(3) 試料採取から分析機関までの運搬方法

氷冷して搬入する。運送業者に依頼する場合はクール宅急便等を使用する。

(4) 試料の保存

搬入された試料は、直ちに分析に供する。(少なくとも抽出操作は直ちに行うこと。) 生物試料は冷凍保存する。(-30 以下)

5 その他

エストラジオール類以外の測定項目については環境庁の指示に従う。その他不明の点があれば、環境庁に連絡する。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

試料水 1 L に、サロゲート 5.0 ng (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アセトン溶液 5 μL) (注 2) 塩酸 1 mL とアスコルビン酸 1 g を加え、振り混ぜて溶解させる (注 3)。これを捕集用カートリッジカラム (注 4) に 20 mL/min の流速で通水する。通水終了後、カートリッジに 10 mL 容シリンジを取り付け、軽く空気を送りカートリッジ内の間隙水を取り除く (注 5)。酢酸メチル 4 mL で溶出し、10 mL 容 KD 濃縮管に受ける (注 6)。チッソガスを吹き付け 1 mL の標線まで濃縮する (注 7)。これにヘキサン 5 mL を入れ、栓をして激しく振り混ぜる。別に 10 mL 容 KD 濃縮管に小口ートをセットし、綿栓をし、この上に無水硫酸ナトリウムを約 7 g を乗せておく。振り混ぜた含水ヘキサン溶液をこの無水硫酸ナトリウムの上に入れ、さらに容器をヘキサン 3 mL で洗浄し、これも無水硫酸ナトリウムの上に入れて合わせる。KD 濃縮管に得られたヘキサン溶液にチッソガスを吹き付けて乾固する (注 8) (注 9)。これにヘキサン : ジクロロメタン (1 : 1) を 1 mL を加えて溶解させる、これを、別に 10 mL 容シリンジをセットした Sep-Pak Florisil カートリッジに負荷する。KD 濃縮管はさらにヘキサン : ジクロロメタン (1 : 1) 1 mL で洗浄しカートリッジに負荷する。ヘキサン : ジクロロメタン (1 : 1) 10 mL で展開し (負荷時の分も含めて) この画分は捨てる (注 10)。

次いで 5%アセトン/ジクロロメタン 6 mL で対象物質を 10 mL 容丸底型 KD 濃縮管(注 1 1) に溶出させ、チッソガスを吹き付けて乾固する。

(イ) 底質試料

湿泥 10 g (注 1 2) を 50 mL 容遠沈管にとり、サロゲートを添加し(注 2)、メタノール 30 mL を加え、スパーテルでかき混ぜてよく混合し、超音波洗浄器を用いて 10 分間抽出を行う。3000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄み液を 100 mL 容分液ロートにとる。残さにはさらにメタノール 30 mL を加え、同じ抽出操作を行い、上澄み液を合わせる。これにメタノール飽和ヘキサン 20 mL を加え、振とう後、静置する。メタノール層(下層)を、5%塩化ナトリウム水溶液 200 mL を入れた 500 mL 容分液ロートに入れ、ジクロロメタン 50 mL を加え、振とう抽出を行い、静置後ジクロロメタン層を 300 mL 容三角フラスコにとる。水層は、さらにジクロロメタン 50 mL で抽出し、抽出液を合わせる。無水硫酸ナトリウムで脱水し、KD 濃縮器で濃縮後、チッソガスを吹き付けて乾固する。以下、誘導体化前のクリンアップからは水質試料の場合と同様にする。

(ウ) 生物試料

試料 10 g を 100 mL 容ビーカーにとり、サロゲートを添加し(注 2)、メタノール 30 mL を加えてホモジナイザーで 10 分間抽出を行う。50 mL 容遠沈管に移し、3000 rpm で 10 分間遠沈を行う。上澄み液を 100 mL 容分液ロートにとり、残さは 100 mL 容ビーカーに移し、メタノール 30 mL を加えて同様に抽出、遠沈を行い、上澄み液を合わせる。以下の操作は、底質試料と同じ。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

乾固した試料に 1M-NaOH/メタノール溶液(注 1 3) 0.5 mL を加え、50 の湯浴にセットし、チッソガスを吹き付けて充分乾固・乾燥する(注 1 4)。これにジメチル硫酸 0.5 mL を加え、析出している固体部分にジメチル硫酸を接触させ、直ちにスパーテルを用いて KD 濃縮管の内面に付着している固形物をすりつぶす。スパーテルを入れたままで約 30 分間室温に放置する(注 1 5)。(栓はしなくて良い) 1M-KOH/エタノール溶液を 5 mL の標線まで、次いで水を 8 mL の標線まで加えてスパーテルで内容物をかき混ぜ、スパー

テルを取り出し、栓をして激しく振り混ぜて内容物を溶解させる(注16)。これに内標準溶液(クリセン-d₁₂ 0.0005 µg/mL ヘキサン溶液 2.0 mL)を加え、激しく振り混ぜて静置する。別に、微量用 KD 濃縮管に小ロートをセットし、綿栓をした上に約 7 g の無水硫酸ナトリウムを乗せておく。パスツールピペットを用いてヘキサン層を採取し(注17)無水硫酸ナトリウムの上の全体に広がるようにしみ込ませる。ヘキサン 5 mL で溶出させ、チッソガスを吹き付けて乾固し、10~50 µL のヘキサンで KD 濃縮管の内面を洗うようにして付着物を底部に溶かし込み試料液とする(注18)。

(イ) 底質及び生物試料

水質試料と同様にメチル誘導体化処理を行い、5 mL の標線まで 1M-KOH / エタノール溶液、次いで 8 mL の標線まで水を加え、栓をして 70 °C の湯浴に 1 時間浸してアルカリ分解を行う(注19)。室温に放冷後、内標準溶液(クリセン-d₁₂ 0.0005 µL/mL ヘキサン溶液 2.0mL)を加え、激しく振り混ぜて静置する。別に、KD 濃縮管に小ロートをセットし、綿栓をした上に約 7 g の無水硫酸ナトリウムを乗せておく。パスツールピペットを用いてヘキサン層を採取し(注17)無水硫酸ナトリウムの上の全体に広がるようにしみ込ませる。ヘキサン 5 mL で溶出させ、チッソガスを吹き付けて乾固する。15%エーテル / ヘキサン 1mL を加え溶解させる。これを 10 mL シリンジをセットしたフロリジルカートリッジ(注20)に負荷し、容器は少量の 15%エーテル / ヘキサンで洗浄し、洗浄液もカートリッジに負荷する。15%エーテル / ヘキサンで展開し、最初から(負荷時の分も含めて)の 8 mL を微量用 KD 濃縮管に採取する。チッソガスを吹き付けて乾固し、10~50 µL のヘキサンで容器内面を洗うようにして底部に溶かし込み(注18) 試料液とする。

(3) 空試験液の調製

水質試料については、ミネラルウォーター 1 L にサロゲート、塩酸 1 mL 及びアスコルビン酸 1 g を添加し、底質及び生物試料についてはメタノール 60 mL にサロゲート及び水 5 mL を添加したものについて、「前処理法」及び「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。

(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限界の 5~10 倍量をアセトン

溶液で添加し、十分に混合した後、「前処理法」及び「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2 1)

各対象物質の 1.0 µL/mL (標準混合液 A) 及び 0.1 µg/mL (標準混合液 B) アセトン溶液を調製する。

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

内標準溶液は、クリセン-d₁₂ 0.005 µg/mL (内標準溶液 A) 及び 0.0005 µg/mL (内標準溶液 B) ヘキサン溶液を調製する。検量線作成時には標準液 A を使用する。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件

(a) GC

- ・カラム：溶融シリカキャピラリーカラム (25m × 0.2mm I.D., df = 0.52 µm)
- ・液相：5% フェニルメチルシリコン
- ・カラム温度：60 (1分) 20 /分 280 (10分) (注2 2)
- ・注入口温度：260
- ・注入法：スプリットレス法 (1.5分後パージ、2 µL 注入)
- ・キャリアガス：He カラムヘッド圧 15 psi
- ・インターフェース温度：260

(b) MS

- ・イオン化法：EI
- ・イオン化電圧：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、サロゲート物質及び内標準物質の測定イオンを表 1 に示す。

表 1 対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の測定イオン

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

*17 -エストラジオールの m/z 300 は、環境試料中に 17 -エストラジオールでないピークが認められるので、 m/z 227 により定量すること。

(イ) 検量線 (注 2 4)

標準混合液 A (各 1.0 $\mu\text{g/mL}$ アセトン溶液) を 0 ~ 50 μL の範囲で段階的に採り、これらにサロゲート標準液 (1.0 $\mu\text{g/mL}$ アセトン溶液) 50 μL を添加し (注 2)、チツソガスを吹き付けて乾固する。以下試料液の調製の項で述べた方法によりジメチル誘導体化処理を行う。得られたヘキサン溶液はチツソガスを吹き付けて 0.1 ~ 0.5 mL まで濃縮する。この 2 μL を GC/MS に注入し、各対象物質 (ジメチル化物) とサロゲート物質とのピーク面積比から検量線を作成する。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、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 15% 以内の変動であることを確認する。もし、15% を越えていれば GC/MS を再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

7. 同定、定量及び計算

(1) 同定

対象物質 (ジメチル化物) の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間と ± 5 秒以内に出現し、確認イオンと定量イオンのピーク強度比が予想値と $\pm 20\%$ 以内の差で合っておれば (注 2 4)、物質が存在していると見なす。

(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（注 2 5）。

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

$$\text{底質及び生物中濃度 (}\mu\text{g/Kg)} = \text{検出量 (ng)} \times \frac{1}{\text{試料量 (g)}} \times \frac{1}{1000}$$

8 . 分析精度管理

正確な分析値が得られていることを保証するために以下の作業を行い、その結果を記録・保存する。

10 検体又はバッチ試験毎に全操作ブランク、二重分析及び添加回収試験（注 2 6）を各一回以上行う。

- ・操作ブランクが通常値を越えた場合は、原因を究明して対策を講じた後、全ての試料の再試験を行う。
- ・二重分析の結果が許容差(注 2 8)を越えた場合は、その試料について再試験を行う。
- ・サロゲート物質の回収率は、50～120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。
- ・添加回収試験における回収率は、80～120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。

9 注意事項

（注 1）魚の雌化現象の原因物質が 17 β -エストラジオールかノニルフェノールかという議論があり、河川水中でノニルフェノールが $\mu\text{g/L}$ で検出されることがあり、17 β -エストラジオールのエストロゲン作用がノニルフェノールの 10⁴倍と言われていること及び ELISA 法における検出限界が 0.1～1.0 ng/L であることから目標検出下限を水質試料で 0.1 ng/L と設定した。この目標検出下限を達成するには、高分解能等の高感度 MS が要求される。

（注 2）サロゲートの添加量は MS の感度により調整しても良い。抱合体分解処理を行わない場合は 17 β -エストラジオール-2,4,16,16-d₄の方が 17 β -エストラジオール-16,16,17-d₃より好ましい（*m/z* 300 及び 227 への殆ど無視できるほど小さい）。抱合

体分解処理を行う場合には、 $17\text{-エストラジオール-2,4,16,16-d}_4$ は塩酸 / メタノールでの加熱により H-D 交換が起こるので使用しない。 $17\text{-エストラジオール-16,16,17-d}_3$ は塩酸 / メタノールで加熱しても H-D 交換は起こらない(但し、 m/z 227 はサロゲートからの寄与が大きく使用出来ない)。

(注3) SS の多い水質試料では 1 L の通水が困難な場合があるので事前にグラスファイバー濾紙で濾過しておく。SS 分は 10 mL のアセトンで 2 回抽出 (超音波 10 分) し抽出液は濾過水に合わせる。アセトン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アセトンで洗浄して使用する。この洗浄の際、アセトンが白濁する場合はバインダーが入っている可能性があるため、このような濾紙は使用しない。

試料採取時にアスコルビン酸が添加してある場合は、分析時に添加しなくてよい。

(注4) C18 カートリッジカラムは使用直前に、アセトン 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。

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

(注6) 底部に 0.3 mL 程度の水層ができるが差し支えない。

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

(注8) 乾固する操作ではやりすぎによる揮発ロスに充分注意すること。アルミブロックによる加熱は内部が見えないので好ましくない。ヘヤードライヤーの使用の方が好ましい。

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

(注10) 対象 3 物質のうちエチニルエストラジオールが最初に 15 mL 程度から溶出しはじめるので、最初の 10 mL (負荷分も含めて) を捨てることにした。この操作を行わないと、底質及び生物試料では誘導体化反応がうまく進行しなかった。また、本操作によりクロマトグラムが著しく改善された。なお、ここで使用するフロリジル

カートリッジは使用前の洗浄はしなくてよい。

(注11) 先の尖ったスピッツ型の KD 濃縮管を用いると次の誘導体化操作のチッソガス吹き付けによる濃縮・乾固時に濃縮液が一ヶ所に集まり均一に乾燥できにくくなり、ジメチル誘導体の生成率のばらつきの原因になる。

(注12) 底質試料は、3000 rpm で 10 分間遠心分離で脱水したものを使用する。

(注13) 共栓付き 50 mL 容メスシリンダーに水酸化ナトリウム 2.0 g を入れ、メタノールで 50 mL とし、栓をして時々振り混ぜて溶解させる。使用時以外は栓をして水分が入らないようにしておく。

(注14) 溶媒のメタノールが揮散して無くなった時点からさらに 15 分間通気して十分に乾燥させる。また、ポンベからのチッソガスには、極めて微量ではあるが、水分が含まれていて十分に乾燥出来ず反応率が低くなることがある。(特に、梅雨期に製造されたものに著しい。)そこでチッソラインの途中に 30 cm 程度の過塩素酸マグネシウム管を接続して完全に脱水することが重要である。さらに、温度コントロールも重要であり 50 ± 2 を保つこと。(温度が高くなるとエチニルエストラジオールのピークが小さくなる。)本分析法の精度は、この乾燥操作が極めて重要な位置を占めているので、チッソガスの脱水、恒温槽の温度コントロール及び通気速度に充分配慮し、分析に使用するチッソ吹き付け装置を用いて、乾燥時間と誘導体生成率の関係を検討し、その装置の乾燥時間を決めること。各ピークが最高値を示し(クリセン-d₁₂とのピーク面積比)、経時的に安定しているところを乾燥時間とする。通気速度は通常溶媒を濃縮する時よりも強くする。

(注15) 本反応はジメチル硫酸と接触すると瞬時に起こるが、固体の内部にジメチル硫酸がしみ込みにくいので、すりつぶして十分に接触させる。ジメチル硫酸は危険であるので絶対に皮膚に付けてはならない。もし、付着した場合は直ちに石鹼で洗うこと。

(注16) 水を入れてから固形物をスパーテルで少しつついて傷を付けてから栓をして激しく振ると容易に溶解する。

(注17) 全量を採取する必要はない。出来るだけ水が入らないように 80~90%採取する。きつく吸い上げると水が入りやすいのでゆっくり吸い上げる、

(注18) 微量用 KD 濃縮管でのチッソ吹き付けによる 10~50 μ L までの濃縮では最後のほうで器壁に付着しやすいので、いったん乾固して、少量のヘキサンで器壁内面に

付着したものを洗い落とすようにする。ヘキサン量は MS の感度に応じて目標検出限界を達成できるようにする。

(注 19) 固形物がある場合は、10 分程して内容物が暖まった状態で振り混ぜれば簡単に溶解する。

(注 20) カートリッジは使用直前に 15% エ - テル / ヘキサン 10 mL で洗浄して使用すること。また、開封後は直ちに乾燥剤の入った清浄なデシケータ内に保管すること。

(注 21) 混合標準、サロゲート及び内標準溶液の濃度は使用する MS の感度に合わせて調製しても良い。

(注 22) GC カラムの条件は、17 - と 17 - エストラゼ異性体が完全に分離するように設定する。

(注 23) 検量線用の処理液は、一度作成すれば多数回使用できるように、10 倍量のレベルで調製することとした。従って最終処理液は 0.1 ~ 0.5 mL となっている。このものは安定であり、冷蔵庫内に保管すれば半永久的に使用可能である。

(注 24) 17 - エストラジオールの m/z 227 のピーク面積には、サロゲートからの寄与があるので全く使用できない。(使用機器及び測定条件により異なるが、本分析条件では m/z 303 のピーク面積で 59%)

(注 25) 内標準として使用したクリセン- d_{12} (m/z 240) との比で定量すると過小に定量されることがある。これは、検量線用試料液ではクリセン- d_{12} のピークにテーリングが見られる(ピーク面積が小さくなっている)が、実試料ではマトリックス効果のためテーリングが解消され(ピーク面積が大きくなる)、一方対象物質及びサロゲートのジメチル誘導体のピークは両者共左右対称のきれいなピークを与えるためである。

(注 26) 添加回収試験は、試料と同じあるいは類似の試料に対象物質のアセトン標準液を検出限界の 5 ~ 10 倍量程度添加して行う。

(注 27) 許容差の求め方は、JIS Z8402、分析・試験の許容差通則、1974 を参照。

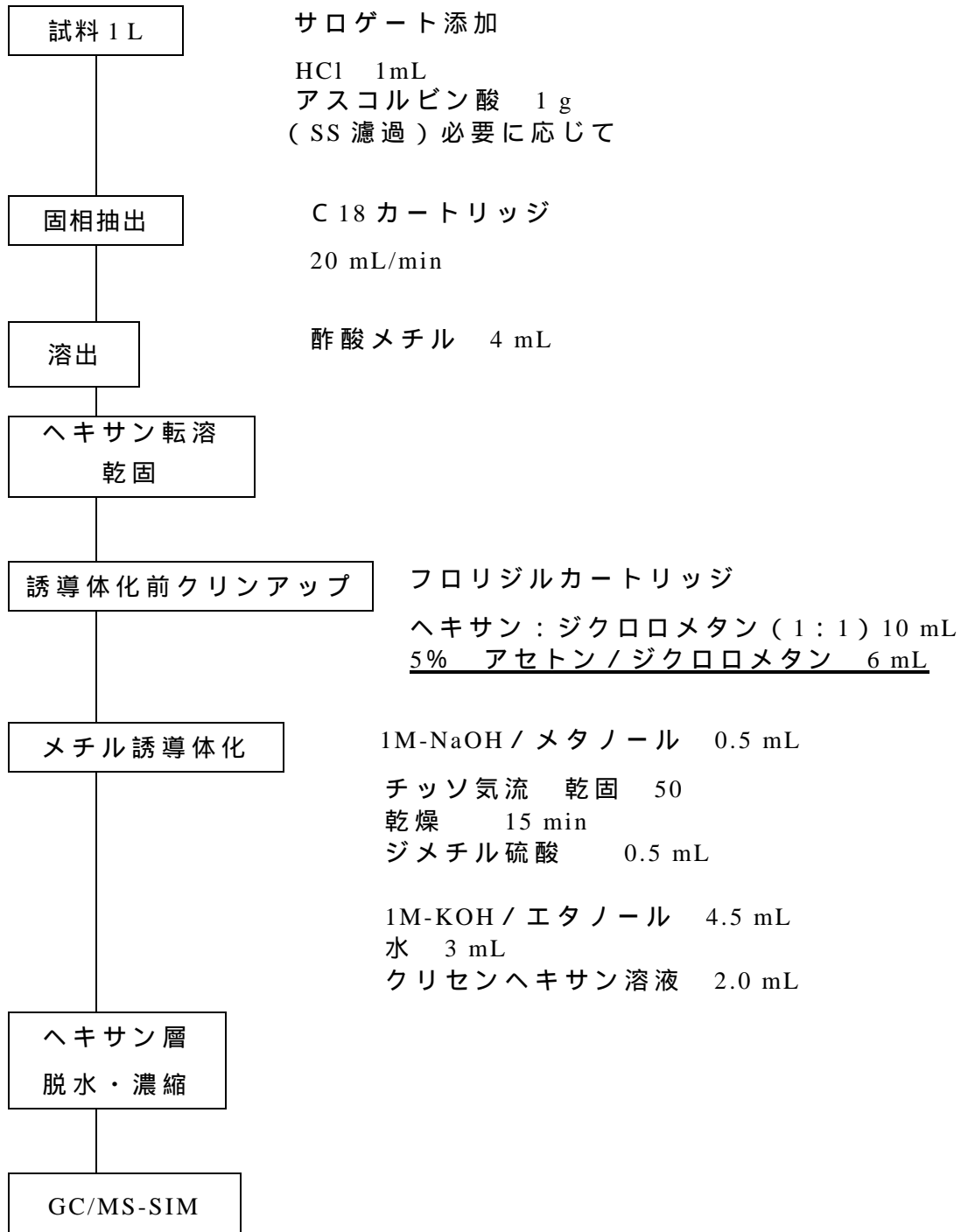
参考文献

- 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) 環境庁水質保全局水質管理課 平成 10 年 10 月

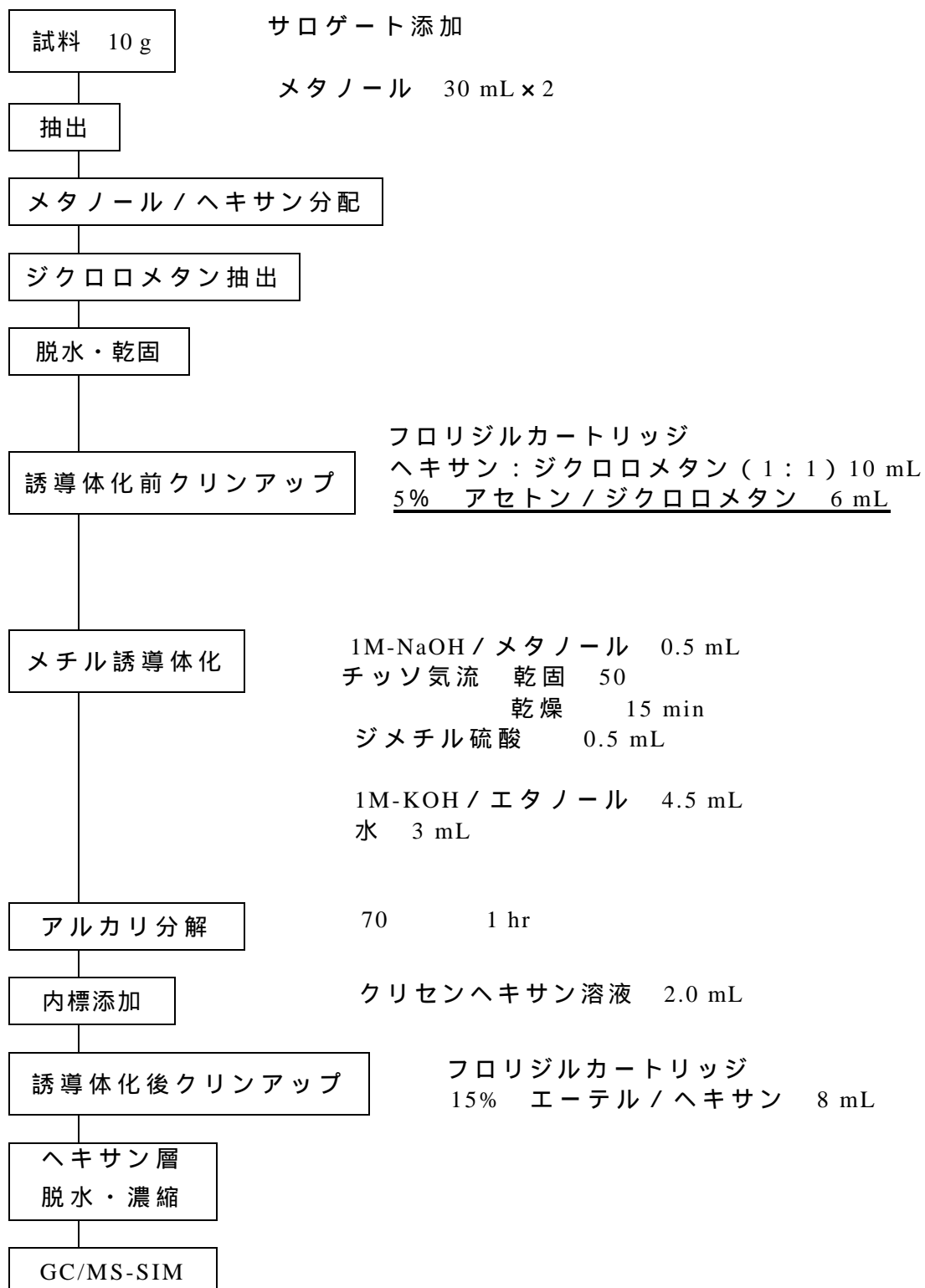
(備考)ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜上、一般に入手できるもの及び本分析法開発に使用したものを例示したが、これを推奨するものではない。これと同等または同等以上の品質・性能のものを用いても良い。

分析法フローチャート

水質試料



底質及び生物試料



. エストラジオール類の分析法
(ペンタフルオロベンジル誘導体化・GC/NCI-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、エチニルエストラジオール

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 0.01 μ g/kg 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 0.03 μ g/kg 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、メタノールで溶出し、濃縮乾固後、フェノール性の水酸基をペンタフルオロベンジル化、次いでアルコール性の水酸基をトリメチルシリル化し、ガスクロマトグラフ-負イオン化学イオン化質量分析法により定量する。

底質試料及び生物試料については、サロゲート物質を添加し、メタノール：pH 5 酢酸緩衝液（9：1、v/v）で抽出した後、メタノール/ヘキサン分配により、脂質を除去した後、精製水に溶解し底質は固相抽出、生物試料はジクロロメタンで抽出した後、濃縮する。カラム等によるクリンアップを行ったのち、ペンタフルオロベンジル化する。生成した誘導体をヘキサンで抽出し、フロリジルカラムで精製後、トリメチルシリル化する。これを、シリカゲルカラムにより精製し、ガスクロマトグラフ-負イオン化学イオン化質量分析法により定量する。

4 試薬・器具

(1) 試薬

- ・ 17 β -エストラジオール、17 α -エストラジオール、エチニルエストラジオール（市販標準試薬）
- ・ 17 β -エストラジオール-2,4,16,16-d₄（市販標準試薬）
- ・ 2-プロパノール（試薬特級）
- ・ ヘキサン、アセトン、メタノール、エタノール、酢酸エチル（残留農薬分析用）

- ・無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム（残留農薬分析用）
- ・精製水：対象物質を含まないもの
- ・1M-酢酸緩衝液
- ・PFBB 溶液：臭化ペンタフルオロベンジル 1 g、18-クラウン 6-エーテル 1 g を 2-プロパノールで溶かし 50 mL としたもの（この溶液は冷暗所保存で 1 週間安定である）
（注 2）
- ・フロリジルミニカラム：ここではウォータズ社製 Sep-Pak Florisil を用いた。（備考 1）
- ・C18 カートリッジカラム：ここではウォータズ社製 Sep-Pak Plus C18 を用いた。
（備考 1）
- ・GPC カラム：ここでは昭和電工社製 PAE-2000 を用いた。（備考 1）
- ・グラスファイバー濾紙：試料水の濾過に用いる。ここでワットマン GF/C（47 mm）を用いた。（備考 1）

（ 2 ） 器具及び装置

- ・ガクソロマトグラフ質量分析計（負イオン化学イオン化法で測定が可能なもの）
- ・高速液体クロマトグラフ：GPC や HPLC による精製に用いる。
- ・パストゥールピペット
- ・コンセンレーター：固相抽出カラムによる水質試料からの捕集に用いる。
- ・超音波洗浄機：底質試料からの抽出に用いる。
- ・ホモゲナイザー：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 1 L 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 50 g の底質を採取し、遠心分離（2,000 g, 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。乾燥試料は、冷暗所（4℃以下）で保存できる。生物試料は、分析対象部位をミンチ状にして、清浄な広口ガラス瓶に入れ、冷凍保存する。分析時はこれを自然解凍して使用する。

6 試験操作

(1) 前処理法

(ア) 水質試料

試料水 1 L 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 3）。サロゲート 1 ng（0.02 µg/mL アセトン溶液 50 µL）（注 4）を加え、よく振り混ぜて混合する。これをカートリッジカラム（注 5）に通水する。精製水 5 mL、ヘキサン 5 mL でカートリッジカラムを洗浄後、メタノール 5 mL で溶出し、10 mL の遠心管に受ける（注 6）。この溶出液に、窒素を吹き付け乾固する。

(イ) 底質試料

底質 10 g（注 7）を 50 mL の遠沈管にとり、サロゲートを添加し（注 4）、メタノール:pH 5 酢酸緩衝液（9:1、v/v）40 mL を加え、30 分間振とう抽出後、2000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄み液をとる。残さにはさらにメタノール 40 mL を加え、5 分間振とう抽出し、吸引ろ過する。遠心管および残渣を 20 mL のメタノールで洗浄し、吸引ろ過する。上澄み液とろ液を合わせ、これにメタノール飽和ヘキサン 20 mL を加え、振とう後、静置する。メタノール層（下層）をロータリーエバポレーターで 40℃で 10 mL 以下まで濃縮する。これに精製水 200 mL を加え超音波など用いて均一に混合したのち、C18 カートリッジカラム（注 5）に通水する。精製水 5 mL、ヘキサン 5 mL でカートリッジカラムを洗浄後、メタノール 5 mL で溶出し、10 mL の遠心管に受ける（注 6）。この溶出液に、窒素を吹き付け乾固する。これを、下記に例示するいずれかの方法またはその組み合わせで精製を行なう（注 8）。

- (i) ヘキサン:ジクロロメタン（1:1）1 mL で溶解し、あらかじめヘキサン 5 mL で洗浄したフロリジルミニカラムに負荷する。遠心管をヘキサン:ジクロロメタン（1:1）1 mL で洗い、洗浄液をフロリジルミニカラムに負荷する。さらにヘキサン:ジクロロメタン（1:1）で展開し、流出液 10 mL を捨てる。次いで 5%アセトン/ジクロロメ

タン 5 mL を流しいれ、溶出液を 10 mL の遠心管にとる。窒素を吹き付けて乾固する。

(注 8 -i)

(ii) 10%メタノール 5 mL に溶解し、C18 カートリッジカラムに通す。50%メタノール水溶液 5 mL で展開し、流出液をすてる。ついでメタノール 6 mL で溶出し、溶出液を 10 mL の遠心管にとる。窒素を吹き付けて乾固する。(注 8 -ii)

(iii) 対象成分が溶出する時間をあらかじめ検定してある GPC カラムに、溶離液に溶解した濃縮物を注入し、対象成分が溶出する部分を分取する。これを濃縮し、濃縮物を 10 mL の遠心管に移しいれ、窒素を吹き付けて乾固する。(注 8 -iii)

(iv) その他の方法 (注 8 -iv)

(ウ) 生物試料

試料 10 g を 100 mL のビーカーにとり、サロゲートを添加し(注 4)、メタノール:pH 5 酢酸緩衝液 (9:1、v/v) 30 mL を加えてホモゲナイザーで 10 分間抽出を行う。50 mL の遠心管に移し、2000 rpm で 10 分間遠心を行う。上澄み液を 100 mL 容分液ロートにとり、残さは 100 mL のビーカーに移し、メタノール 30 mL を加えて同様に抽出、遠心後、上澄み液を合わせる。これにメタノール飽和ヘキサン 20 mL を加え、振とう後、静置する。メタノール層(下層)を、5%塩化ナトリウム水溶液 200 mL を入れた 500 mL の分液ロートに入れ、ジクロロメタン 50 mL を加え、振とうする。静置後ジクロロメタン層を 300 mL の三角フラスコにとる。水層は、さらにジクロロメタン 50 mL で抽出し、抽出液を合わせる。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で濃縮する。濃縮物を 10 mL の遠心管に移しいれ、窒素を吹き付けて乾固する。以下、底質試料と同様の操作を行なう。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料

乾固した試料に PFBB 誘導体化試薬 0.5 mL 及び炭酸カリウム約 3 mg を加えた後、密栓をし、80 °C で 30 分間加熱する。冷却後、精製水 6 mL、ヘキサン 2 mL を加え、激しく振り混ぜて静置する。パスツールピペットを用いてヘキサン層を採取し(注 9)、抽出を再度繰り返す。ヘキサン抽出液を少量の無水硫酸ナトリウムをつめたカラムに通じ乾燥する。容器とカラムをヘキサン 5 mL で洗浄し、抽出液とあわせ、窒素を吹き付け乾固する(注 10)。これにトリメチルシリルイミダゾール 20 µL を加え、容器内面を洗うようにして内

容物と良く混合した後、室温で 30 分間放置する。反応液にヘキサン 1 mL を加え良く混合した後、あらかじめ 5 mL のヘキサンで洗浄したシリカゲルミニカラムに添加する（注 1 1）。容器を少量のヘキサンで洗い、再度カラムに添加し、カラムにヘキサンを流し入れ、最初の流出液 5 mL を捨てる。次いで、ヘキサン：酢酸エチル（9：1）5 mL を流し入れ、溶出液を 10 mL の遠心管にとる。窒素を吹き付け濃縮、乾固し、ヘキサン 0.2 mL に溶解し試験液とする（注 1 2）。

（イ）底質及び生物試料

水質試料と同様にペンタフルオロベンジル化を行う。これにヘキサン 1 mL を加え溶解させ、あらかじめヘキサン 10 mL で洗浄したフロリジルミニカラム(注 1 3)に負荷する。容器は、少量のヘキサンで洗い、洗浄液をカートリッジに負荷する。ヘキサン 5 mL を流し、流出液を棄てる。ついで、ヘキサン：酢酸エチル（1：1）5 mL で展開し、溶出液を 10 mL の遠心管に採取し、窒素を吹き付けて乾固する。これにトリメチルシリルイミダゾール約 20 μ L を加え、遠心管の内面を洗うようにして内容物と良く混合した後、室温で 30 分間放置する。反応液にヘキサン 1 mL を加え良く混合した後、シリカゲルミニカラムに添加する。（注 1 1）。容器を少量のヘキサンで洗い再度カラムに添加する。ヘキサンを流し、最初の流出液 5 mL を捨てる。次いで、ヘキサン：酢酸エチル（9：1）5 mL を流し溶出液を 10 mL の遠心管にとる。窒素を吹き付け乾固した後、ヘキサン 0.2 mL に溶解し試験液とする。（注 1 2）。

（3）空試験液の調製

水質試料については、ブランク水 1000 mL に試験水に添加したのと同量のサロゲート及び酢酸緩衝液を添加し、底質及び生物試料については試料に添加したのと同量のメタノール：pH 5 酢酸緩衝液、サロゲート及び水 5 mL を添加したものについて、「前処理法」及び「試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。

（4）添加回収試験液の調製

水質試料 1000 mL、底質及び生物試料 10 g に対象物質各 1 ng（0.01 μ g/mL アセトン溶液、100 μ L）を添加し、十分に混合した後、「前処理法」及び「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 1 4)

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

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

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件

(a) ガスクロマトグラフ部

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

(b) 質量分析部

- ・イオン化法：NCI (1 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)
- ・反応ガス：メタンまたはイソブタン
- ・イオン源温度：150 ~ 250
- ・検出モード：SIM

(c) 測定イオン

対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の測定イオンを表 1 に示す (注 1 5)。

表 1 対象物質、サロゲート物質及び内標準物質の測定イオン

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

(イ) 検量線 (注 16)

標準混合液 A、B、C、D を 10 mL の遠心管に、それぞれ 500 μ L 計り採る。これらにサロゲート標準液(0.1 μ g/mL アセトン溶液)500 μ L を添加し、窒素を吹き付けて乾固する。以下試料液の調製の項で述べた方法によりペンタフルオロベンジル誘導體化、トリメチルシリル化を行ったのち、シリカゲルカラムにより精製する。ヘキサン：酢酸エチル(9:1)で溶出される画分を、窒素を吹き付けて乾固した後、ヘキサン 2 mL で溶解する。標準液中のサロゲート物質の濃度が試料液中に含まれるサロゲート物質の濃度に等しくなるように希釈し、この 2 μ L を GC/MS に注入し、各対象物質とサロゲート物質とのピーク面積比から検量線を作成する。

(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 15% 以内の変動であることを確認する。もし、15% を越えていれば GC/MS を再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

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 $\pm 20\%$ 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

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

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

$$\text{底質及び生物中濃度 (ng/kg)} = \text{検出量 (ng)} / \text{試料量 (kg)}$$

8 精度管理

正確な分析値が得られていることを保証するために以下の作業を行い、その結果を記録・保存する。

(1) 内部精度管理

- ・10 検体又は1 バッチ試験毎に全操作ブランク、二重分析及び添加回収試験を各1 検体以上行う。
- ・操作ブランクが通常値を超えた場合は、原因を究明して対策を講じた後、全ての試料の再試験を行う。
- ・二重分析の結果が許容差(注17)を超えた場合は、その試料について再試験を行う。
- ・サロゲート物質の回収率は、50%～120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。
- ・添加回収試験における回収率は、80%～120%であることが望ましい。この範囲を大きく逸脱した場合は、原因を究明して全ての試料の再試験を行う。

9 注意事項

(注1) 装置の検出下限が1 pg 以下であること。

(注2) 本試薬は毒性が懸念されるため取り扱いに注意すること。PFBB は催涙性があるので必ずドラフト内で操作をし、使用済みの容器はドラフト内でアルカリ洗浄(KOH・メタノール溶液など)によりPFBBを分解してから水洗すること。

(注3) 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：1M酢酸緩衝液(pH5)9：1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：1M酢酸緩衝液(pH5)9：1で洗浄して使用する。この洗浄の際、アセトンが白濁する場合はバインダーが入っている可能性があるため、このような濾紙は使用しない。

(注4) サロゲートの添加量は試料中濃度に応じて1～5 ngの範囲で添加する。塩酸/メタノールとの加熱によって抱合体を分解する場合には、17 β -エストラジオール-16,16,17-d₃を使用すること。ろ過しなかった場合は1M酢酸緩衝液(pH5)1 mLも加える。

(注5) C18カートリッジカラムは使用直前に、メタノール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。

(注6) メタノールに若干水が混入するが差し支えない。

(注7) 底質試料は、凍結乾燥したものを使用する。

(注8) 必要な場合に行う。十分な回収率が得られることをあらかじめ確認しておくこと。

本方法では、メチル誘導体化のようにアルカリ分解が使用できないためこの段階で十分に精製をしておく必要がある。

- (i) 対象3物質のうちエチニルエストラジオールが最初に 15 mL 程度から溶出しはじめるので、最初の 10 mL (負荷分も含めて) を捨てる。ここで使用するフロリジルカートリッジは使用前の洗浄はしなくてよい。
- (ii) メタノール 0.5 mL に溶解したのち、水 4.5 mL を加えるとよい。カラムはメタノール 6 mL、次いで 10%メタノール水溶液 10 mL であらかじめコンディショニングしておく。
- (iii) GPC カラムには市販品がある。PAE-2000 (Shodex) を用いアセトン (4.0 mL/分) で溶離すると、対象成分は 16~18 分 (16.9 分がピーク) 付近に溶出する。PAE-2000 (Shodex) を用い、シクロヘキサン：酢酸エチル (1:1) (4.0 mL/分) で溶離すると、14~17 分 (15.1~15.9 分がピーク) 付近に溶出する。脂質やイオウが除去できる。(備考1)
- (iv) その他の方法には、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」に示されている TLC や HPLC を用いる方法などがある。

(注9) 出来るだけ水が入らないように採取する。

(注10) クラウンエーテルが残る。水が混入すると TMS 化できない。

(注11) 白色結晶 (イミダゾール) が生じるが分析上の問題とはならない。

(注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) 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14) 検量線用の標準液は、一度作成すれば多数回使用できるように、10 倍量のレベルで調製することとした。従って最終処理液は 2 mL となっている。このものは安定であり、冷蔵庫内に保管すれば 1 ヶ月程度、使用可能である。

(注15) 表1の確認イオンは、脱 TMSO のフラグメントが生成するイオン化条件であれば、それぞれ、定量イオン-90 (17⁻-エストラジオールと 17⁻-エストラジオールは、 m/z 253、エチニルエストラジオールは、 m/z 277、サロゲートは m/z 257) を選択できる。エストロンを測定する場合には、定量イオン 269、確認イオン 270 を使用でき

る。エストリオールでは、定量イオン m/z 431、確認イオン m/z 432 などを使用できる。

(注16) 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17) 許容差の求め方は、JIS Z8402、分析・試験の許容差通則、1974 を参照。

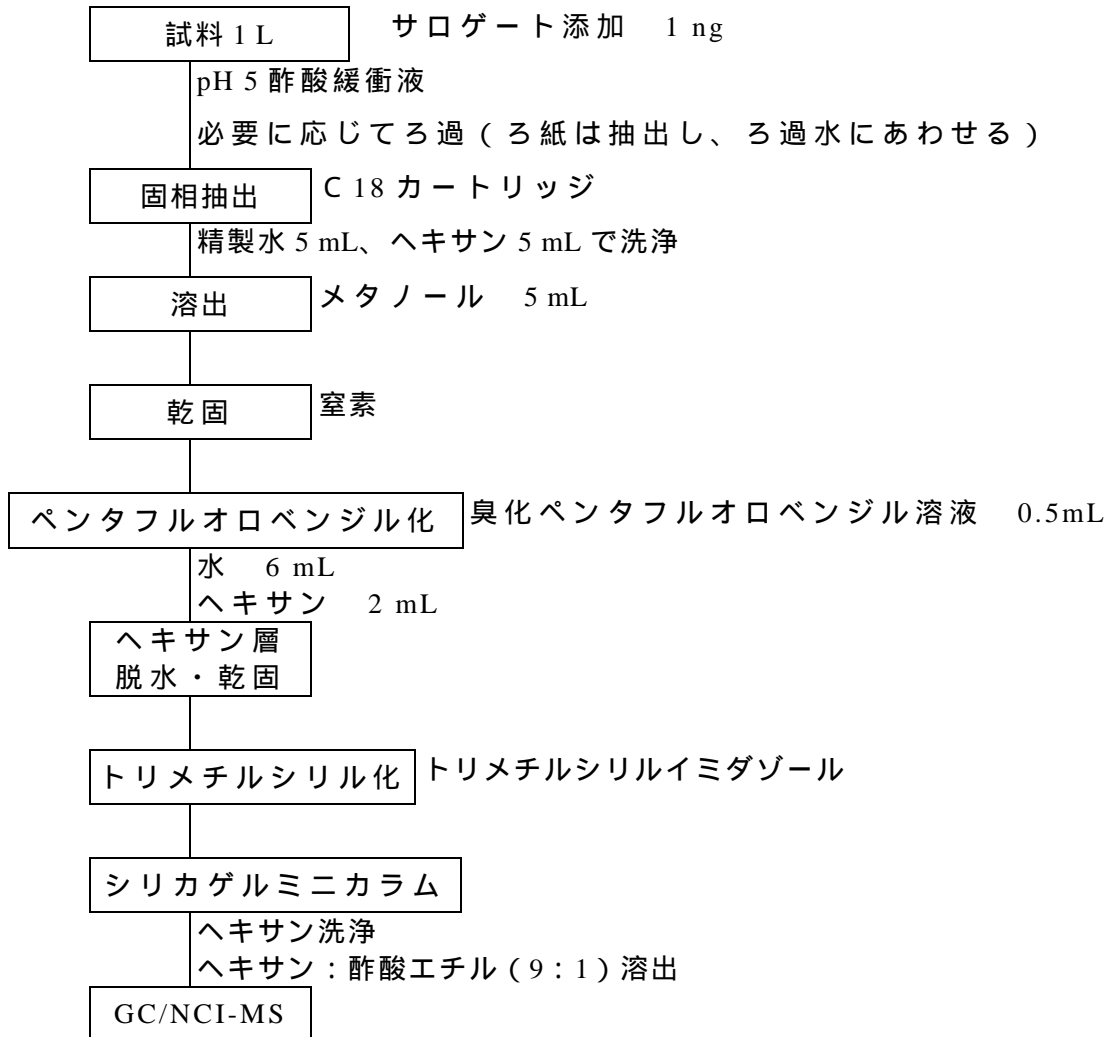
(備考1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜上、一般に入手できるものを例示したが、これを推奨するものではない。これと同等または同等以上の品質・性能のものを用いても良い。

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)、環境庁水質保全局水質管理課(平成10年10月)
- 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(平成8年6月)
- 3 EPA Method 604, US EPA (1984)

分析法フローチャート

水質試料



分析法フローチャート

底質及び生物試料

