

vi. 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

1 対象物質

水、底質および生物（原則として淡水・海産魚類、甲殻類、貝類）試料中の置換ベンゼン類、有機酸エステル類、有機リン酸エステル類および農薬類の分析に適用する。具体的な対象物質は表 1 である。なお、本法は広範な中揮発性化学物質の多成分一斉分析への適用も意図している。

表 1 対象物質

項目番号	物質名	略称	CAS No.	水溶解度 (µg/mL)	Log Pow
77.1	<i>o</i> -クロロニトロベンゼン	<i>o</i> -CNBz	88-73-3	441	2.24
77.2	<i>p</i> -クロロニトロベンゼン	<i>p</i> -CNBz	100-00-5	225	2.39
110.2	2,4-ジニトロトルエン	2,4-DNT	121-14-2	270	1.98
110.4	2,6-ジニトロトルエン	2,6-DNT	606-20-2	182	2.10
3.4	アクリル酸 2-エチルヘキシル	EHAc	103-11-7	100	4.09
220.01	フタル酸ジアリル	DAP	131-17-9	182	3.23
220.02	フタル酸ジ- <i>i</i> -ヘプチル <sup>注1)</sup>	DIHP	41451-28-9 (71888-89-6) <sup>注2)</sup>	—	—
220.04	フタル酸ジメチル	DMP	131-11-3	4,000	1.60
220.07	フタル酸ジ- <i>n</i> -オクチル	DNOP	117-84-0	0.02	8.10
220.10	フタル酸ジ- <i>i</i> -ブチル	DIBP	84-69-5	6.2	4.11
220.13	フタル酸ジ- <i>n</i> -ヘプチル	DNHP	3648-21-3	0.002	7.56
299.1	リン酸トリキシレニル <sup>注1)</sup>	TXP	25155-23-1	0.89	5.63
299.2	リン酸トリクレシル <sup>注1)</sup>	TCP	1330-78-5	0.36	5.11
299.3	リン酸トリス ( <i>i</i> -プロピルフェニル) <sup>注1)</sup>	TIPP	26967-76-0	—	—
299.4	リン酸トリス (2-エチルヘキシル)	TEHP	78-42-2	0.6	9.49
299.5	リン酸トリス (2-クロロエチル)	TCEP	115-96-8	7,000	1.44
299.6	リン酸トリフェニル	TPP	115-86-6	1.9	4.59
299.7	リン酸トリブチル	TBP	126-73-8	280	4.00
60	カルボフラン	—	1563-66-2	320	2.32
71	クロルピリホス	—	2921-88-2	1.12	4.96
131	シメトリン	—	1014-70-6	450	2.80
229	プレチラクロール	—	51218-49-6	50	4.08
290	モリネート	—	2212-67-1	970	3.21

注 1) : 複数の異性体の混合物として検出されるが、化学構造は特定されていないものが多い。  
測定対象は原則として DIHP は主要 3 成分 (ピーク)、TCP は 4 成分となる。TXP と TIPP については存在実態に関する知見がまだ十分でない。

注 2) : ( )内の CAS 登録番号は、炭素数 7 の側鎖炭化水素を主成分とする炭素数 6~8 のフタル酸エステルの混合物を特定する。

## 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は表2の通りであり、定量下限値はその3倍値となる。

表2 目標とする検出下限値

項目番号	物質名	水質 ( $\mu\text{g/L}$ )	底質 ( $\mu\text{g/kg}$ )	生物 ( $\mu\text{g/kg}$ )
77.1	<i>o</i> -クロロニトロベンゼン ( <i>o</i> -CNBz)	0.01	1	3
77.2	<i>p</i> -クロロニトロベンゼン ( <i>p</i> -CNBz)	0.01	1	3
110.2	2,4-ジニトロトルエン (2,4-DNT)	0.01	3	5
110.4	2,6-ジニトロトルエン (2,6-DNT)	0.01	3	5
3.4	アクリル酸2-エチルヘキシル (EHAc)	0.01	2	5
220.01	フタル酸ジアリル (DAP)	0.01	2	5
220.02	フタル酸ジ- <i>i</i> -ヘプチル <sup>注)</sup> (DIHP)	0.01	3	5
220.04	フタル酸ジメチル (DMP)	0.01	2	5
220.07	フタル酸ジ- <i>n</i> -オクチル (DNOP)	0.01	5	20
220.10	フタル酸ジ- <i>i</i> -ブチル (DIBP)	0.01	3	10
220.13	フタル酸ジ- <i>n</i> -ヘプチル (DNHP)	0.01	5	20
299.1	リン酸トリキシレニル <sup>注)</sup> (TXP)	0.01	5	15
299.2	リン酸トリクレシル <sup>注)</sup> (TCP)	0.03	8	15
299.3	リン酸トリス ( <i>i</i> -プロピルフェニル) <sup>注)</sup> (TIPP)	0.01	4	15
299.4	リン酸トリス (2-エチルヘキシル) (TEHP)	0.02	4	10
299.5	リン酸トリス (2-クロロエチル) (TCEP)	0.02	7	10
299.6	リン酸トリフェニル (TPP)	0.01	4	10
299.7	リン酸トリブチル (TBP)	0.01	7	10
60	カルボフラン	0.01	5	10
71	クロルピリホス	0.01	3	5
131	シメトリン	0.02	3	5
229	プレチラクロール	0.01	3	5
290	モリネート	0.01	3	5

注) DIHP、TXP、TCP および TIPP については、それぞれ定量用の標準物質としたフタル酸ジ-2-メチルヘキシル(2-DIHP)、リン酸トリス (3,5-ジメチルフェニル) [3,5-TXP]、TCP (複数の異性体の混合物、純度 98%以上)、リン酸トリス (3-イソプロピルフェニル) [3-TIPP] で推定。

## 3 分析法の概要

本法は同位体希釈質量分析を基本とする。安定同位体標識標準物質の混合溶液であるサロゲート標準溶液を各供試試料に添加して 1~2 時間攪拌または振とうして十分に均一混合した後、抽出操作を行う。

対象物質の水試料からの抽出は、固相ディスク法または溶媒振とう法による。固相ディスク法では 50~100 mL/min の速度で通水して対象物質を捕集し、ジクロロメタンとヘキサンの溶離、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2回振とう抽出し、脱水、濃縮して前処理液を得る。

底質試料はアセトンで2回振とう抽出を繰り返し、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2回繰り返し、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行い、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あるいは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、入手可能な安定同位体標識標準物質に限りがあるため、濃度の算出は置換ベンゼン類、有機リン酸エステル類および有機リン酸エステル類についてはサロゲート標準物質との相対検量線、農薬類について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。置換ベンゼン類、有機酸エステル類および有機リン酸エステル類について、現在入手可能な標準物質を表3にまとめた。DIHP、TCP、TIPP および TXP は異性体あるいは同属体の混合物として存在するが、その全ての成分について標準物質を入手することができない。したがって、本法では DIHP はフタル酸ジ-2-メチルヘキシル（フタル酸ジ-2-イソヘプチル）(2-DIHP)、TCP は TCP としての純度が 98%以上の試薬（4種類以上の TCP 異性体を主成分とする）、TIPP はリン酸トリス（3-イソプロピルフェニル）(3-TIPP)、TXP はリン酸トリス（3,5-ジメチルフェニル）(3,5-TXP)を標準物質に代表させる（注1）。純品は個別に必要量を精秤して、少量をアセトンに溶解させた後、ヘキサンで 1,000~2,000 µg/mL の標準原液を調製する。
- ・サロゲート標準物質：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安定同位体標識物。現在入手可能な物質を表3にまとめた。これらは個別に必要量を正確に秤りとり、標準物質と同様に 1,000~2,000 µg/mL の標準原液を調製する。

表3 置換ベンゼン類、有機酸エステル類および有機リン酸エステル類の標準物質

対象物質	標準物質 物質名 [略称] ・ 分子式	サロゲート標準物質 物質名 [略称] ・ 分子式
<i>o</i> -CNBz	<i>o</i> -Chloronitrobenzene C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> Cl	
<i>p</i> -CNBz	<i>p</i> -Chloronitrobenzene C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> Cl	<i>p</i> -Chloronitrobenzene ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) [ <i>p</i> -CNBz- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ] *C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> Cl
2,4-DNT	2,4-Dinitrotoluene CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2,4-Dinitrotoluene (ring-d <sub>3</sub> ) [2,4-DNT-d <sub>3</sub> ] CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> D <sub>3</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
2,6-DNT	2,6-Dinitrotoluene CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2,6-Dinitrotoluene (alkyl-d <sub>3</sub> ) [2,6-DNT-d <sub>3</sub> ] CD <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
EHAc	2-Ethylhexyl acrylate CH <sub>2</sub> CHCO <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	
DAP	Diallyl phthalate C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> =CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Diallyl phthalate (ring-d <sub>4</sub> ) [DAP-d <sub>4</sub> ] C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> =CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
DIHP	Di-2-methylhexyl phthalate [2-DIHP] C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> ) <sub>2</sub>	Di-2-methylhexyl phthalate (ring-d <sub>4</sub> ) [2-DIHP-d <sub>4</sub> ] C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> ) <sub>2</sub>
DMP	Dimethyl phthalate C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Dimethyl phthalate (ring-D <sub>4</sub> ) [DMP-d <sub>4</sub> ] C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
DNOP	Di- <i>n</i> -octyl phthalate C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ) <sub>2</sub>	Di- <i>n</i> -octyl phthalate (ring-d <sub>4</sub> ) [DNOP-d <sub>4</sub> ] C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ) <sub>2</sub>
DIBP	Di- <i>i</i> -butyl phthalate C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>2</sub>	Di- <i>i</i> -butyl phthalate (ring-d <sub>4</sub> ) [DIBP-d <sub>4</sub> ] C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>2</sub>
DNHP	Di- <i>n</i> -heptyl phthalate C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) <sub>2</sub>	Di- <i>n</i> -heptyl phthalate (ring-d <sub>4</sub> ) [DNHP-d <sub>4</sub> ] C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> -1,2-(CO <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) <sub>2</sub>
TXP	Tris (3,5-dimethyl phenyl) phosphate [3,5-TXP] [(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> O] <sub>3</sub> P=O	Tris (3,5-dimethyl phenyl) phosphate (ring-d <sub>9</sub> ) [3,5-TXP-d <sub>9</sub> ] [(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> D <sub>3</sub> O] <sub>3</sub> P=O
TCP	Tri- <i>p</i> -cresyl phosphate (d <sub>21</sub> ) (CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>3</sub> P=O	Tri- <i>p</i> -cresyl phosphate (alkyl-d <sub>9</sub> , ring-d <sub>12</sub> ) [TpCP-d <sub>21</sub> ] (CD <sub>3</sub> C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> O) <sub>3</sub> P=O
TIPP	Tris (3-isopropylphenyl) phosphate [(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O] <sub>3</sub> P=O	Tris (3-isopropylphenyl) phosphate (alkyl-d <sub>21</sub> , ring-d <sub>12</sub> ) [3-TIPP-d <sub>33</sub> ] [(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CD <sub>6</sub> D <sub>4</sub> O] <sub>3</sub> P=O
TEHP	Tris (2-ethylhexyl) phosphate [(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> ] <sub>3</sub> P=O	Tris (2-ethylhexyl) phosphate (alkyl-d <sub>51</sub> ) [TEHP-d <sub>51</sub> ] [(C <sub>2</sub> D <sub>5</sub> )C <sub>6</sub> D <sub>12</sub> ] <sub>3</sub> P=O
TCEP	Tris (2-chloroethyl) phosphate (CClH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> P=O	Tris (2-chloroethyl) phosphate (alkyl-d <sub>12</sub> ) [TCEP-d <sub>12</sub> ] (CClD <sub>2</sub> CD <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> P=O
TPP	Triphenyl phosphate (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O) <sub>3</sub> P=O	Triphenyl phosphate (ring-d <sub>15</sub> ) [TPP-d <sub>15</sub> ] (C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> O) <sub>3</sub> P=O
TBP	Tributyl phosphate [CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O] <sub>3</sub> P=O	Tributyl phosphate (alkyl-d <sub>27</sub> ) [TBP-d <sub>27</sub> ] [CD <sub>3</sub> (CD <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O] <sub>3</sub> P=O

- ・ 内標準物質：ナフタレン-d<sub>8</sub>、アセナフテン-d<sub>10</sub>、フェナンスレン-d<sub>10</sub>、フルオランテン-d<sub>10</sub>、クリセン-d<sub>12</sub>、ベンゾ-[*e*]-ピレン-d<sub>12</sub>の重水素標識標準物質、または同様の用途に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200 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分析用の純度を用い、予め測定を妨害する成分が無いことを確認する（注2）。

- ・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。
- ・固相ディスク：(注3)
- ・5%含水シリカゲル：カラムクロマト用シリカゲル（注4）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、デシゲータ（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5）、または同等品。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、予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、パスツールピペットなど。使用に先立ち、精製水や有機溶媒で十分に洗浄する（注2）。
- ・振とう機。
- ・固相抽出装置：吸引型。吸引マニホールド、ガラス製減圧ろ過装置など。
- ・濃縮器：ロータリーエバポレータ(恒温槽付き)。
- ・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）、攪拌分散器（ウルトラターラックス）または同等品。
- ・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、予めアセトン、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硬質ガラス瓶に満水に入れ、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、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℃ で凍結さす。

### (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「Ⅲ. 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

1 L 容試料瓶中の試水の全量を秤量して分液ロートに移す。試料瓶は内壁を 10 mL 程度のメタノールで 2~3 回洗い、試水に併せる (注 6)。これにサロゲート標準混合溶液 (各物質 0.5 µg/mL の混合アセトン溶液) を 0.5 mL 添加して 1~2 時間振とうし、十分に溶解混合さす。抽出は固相ディスク (注 3) またはジクロロメタンによる振とう法で行う。

#### 《固相ディスク法》

固相ディスクをフィルターホルダーのベースにのせ、少量のメタノールを垂らして、ヘッドを装着する（注7）。固相ディスクは、予めジクロロメタン、メタノール、精製水の各10 mLでコンディショニングして、精製水がなくなる直前に試水の通水を開始する（注8）。通水は50~100 mL/minの速度で行う（注9）。通水終了後、ヘッドと固相ディスクを精製水20 mLで2回洗浄した後、2~3回減圧と常圧に戻す操作を繰り返して、フィルターホルダーと固相ディスクに付着した水滴を除去する。残存する水分は実験用ティッシュペーパーあるいはろ紙等で拭き取った後に、ヘッドの内壁を洗いながらジクロロメタン3 mLを加え弱い減圧により対象物質を溶出させる。さらに、ジクロロメタン3 mL、ヘキサン3 mLを順次加え、自然落下で溶出を続ける。溶出液は、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素気流下で1 mLまで濃縮して前処理液とする（注10）。

#### 《溶媒振とう法》

サロゲート標準混合溶液を溶解混合させた試水に30 gの塩化ナトリウムと150 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す。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を用いて30℃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を共栓付遠心分離管に採り、0.5 µg/mLのサロゲート標準混合溶液0.5 mLを添加、少量（2~3 mL）の精製水を加えてガラス棒でスラリー状になるまで十分に攪拌して、15分超音波振とうする。その後、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予め塩化ナトリウム15 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50 mLを加えて、振とう抽出を繰り返し、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を用いて30℃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 にサロゲート標準物質混合溶液（各 0.5 µg/mL アセトン溶液）0.5 mL を添加して、ワーリングブレンダーまたはポリトロンホモジナイザーで 10 分間程度攪拌する。これにメタノール 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 100 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 1000 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 50 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 50 mL を加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、浴温 30°C 以下でロータリーエバポレータにより 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（ナフタレン-d<sub>8</sub>、フェナンスレン-d<sub>10</sub>、フルオランテン-d<sub>10</sub>、クリセン-d<sub>12</sub> およびベンゾ-[e]-ピレン-d<sub>12</sub> の各標識物質を 20 µg/mL の濃度に調製したヘキサン溶液）を 5 µL 添加し、窒素気流下で 0.5 mL 定容として 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 1 1）。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 50 mL を 1 滴/秒程度の速度で通し、カラム内を洗浄する（注 1 2）。次いで、10%アセトン含有ヘキサン 100 mL を 1 滴/秒程度で流下させる。この画分に、シメトリンと TCEP を除く、全ての成分が含まれる。シメトリンと TCEP は 30%ベンゼン 5%エタノール含有ヘキサン 50 mL で溶出する。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妨害となる恐れがある場合は、非孔性グラフアイトカーボンを 0.2~0.3 g 充てんしたカートリッジカラム（注 5）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を用い 30°C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 20 µg/mL ヘキサン溶液）を 5 µL 添加し、1.0 mL 定容として GC/MS 測定を行う。

#### (ウ) 生物試料

生物試料の前処理液はフロリジル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、測定用内標準混合溶液（各 20 µg/mL ヘキサン溶液）を 5 µL 添加、1.0 mL 定容として、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 に、サロゲート標準物質混合溶液（各 0.5 µg/mL アセトン溶液）0.5 mL を添加し、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 に検出下限値の 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、サロゲート標準物質混合溶液（各 0.5 µg/mL アセトン溶液）0.5 mL を添加して、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。添加した標準物質の試料換算濃度は、TCPを除いて水試料では0.25 µg/L、底質と生物試料では10 µg/kg程度が目安となる。TCPは他の物質の5倍量を添加する。

#### (5) 標準液の調製

検量線作成用混合標準液、サロゲート標準物質混合溶液、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0~2.0 µg/mLの範囲で5段階以上個別に調製する。但し、TCPは0~10 µg/mLの濃度範囲とする。サロゲート標準物質混合溶液は、対象物質の安定同位体標識標準物質を混合したアセトン溶液であり、各物質の濃度が0.5 µg/mLとなるよう調製する。測定用内標準混合溶液は、ナフタレン-d<sub>8</sub>、フェナンスレン-d<sub>10</sub>、フルオランテン-d<sub>10</sub>、クリセン-d<sub>12</sub>およびベンゾ-[e]-ピレン-d<sub>12</sub>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20 µg/mLの濃度に調製する。なお、検量線作成用混合標準液とサロゲート標準物質混合溶液の原液を混合し、アセトンで希釈して各物質の濃度が0.2 µg/mL（但し、TCPは1.0 µg/mL）とした溶液は、回収率測定用の添加用標準液に用いることができる。

#### (6) 測定

##### (ア) GC/MS 測定条件の例

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：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°C(2 min)→(20°C/min)→180°C→(5°C/min)→280°C(10 min)。
- ・ 注入口温度：260°C。

##### (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：250°C。
- ・ インタフェース部：ダイレクトカップリング (250°C)。

- ・イオン検出法：選択イオンまたは全イオン検出。

#### (c)GC/MS の調整

本法が測定対象とする物質は、沸点や蒸気圧、あるいは吸着性などの物理化学的性状が大きく異なり、またカルボフランのように装置内での分解がみられる物質も含まれる。

したがって、一回の測定で対象物質の全てを最適に検出することはかなりの無理があるが、GC の注入口、キャピラリーカラム性能、イオン源等を清浄に保ち、装置が正常に作動している状態で、操作条件の最適化と質量校正を行い、マススペクトルパターンや分解能の確認を行い、感度、応答性、再現性などの基本的なチェックを行う。もし、装置感度が目標とする検出下限値を達成する見込みがないと判断されれば、対象物質（群）毎に測定条件を変えるなどの対処を要する。

#### (d)測定イオン

対象物質および標準物質の検出に設定するモニターイオンの質量を表 4 にまとめた。

### (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（0～2.0  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で 5 段階以上、TCP は 0～10  $\mu\text{g/mL}$ ）の 0.5 mL にサロゲート標準物質混合溶液（0.5  $\mu\text{g/mL}$ ）を 0.5 mL 加え、それぞれに測定用内標準混合溶液（20  $\mu\text{g/mL}$ ）を 5  $\mu\text{L}$  添加する。この標準液系列は、各標準物質を 0～1.0  $\mu\text{g/mL}$ （TCP は 0～5.0  $\mu\text{g/mL}$ ）、サロゲート標準物質をそれぞれ 0.25  $\mu\text{g/mL}$ 、各測定用標準物質を 0.1  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で含み、1 濃度段階の 1 または 2  $\mu\text{L}$  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)検量線の作成と相対感度係数の算出

表 4 の通り、各標準物質と対応するサロゲート標準物質または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。なお、TCP は 4 つのピークに分離するので、個々のピークに対して検量線を作成する。

表4 メチルシリコン系GCカラムの溶出順位とモニターイオン質量

項目 番号	物質名	質量数	モニターイオン m/z			参照 サロ ゲート	参照 内標準
			定量	確認			
IS1	naphthalene-d <sub>8</sub>	136.11	136	—	—	—	—
SR1	<i>p</i> -CNBz- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	163.01	163	—	—	—	IS1
77.2	<i>p</i> -CNBz	156.99	157	111	127	SR1	IS1
77.1	<i>o</i> -CNBz	156.99	157	111	127	SR1	IS1
3.4	EHAc	184.15	112	70	55	SR3	IS1
SR2	2,6-DNT-d <sub>3</sub>	185.04	167	—	—	—	IS2
110.4	2,6-DNT	182.03	165	99	182	SR2	IS2
SR3	DMP-d <sub>4</sub>	198.08	167	—	—	—	IS2
220.04	DMP	194.06	163	194	135	SR3	IS2
IS2	Acenaphthene-d <sub>10</sub>	164.14	164	—	—	—	—
SR4	2,4-DNT-d <sub>3</sub>	185.04	168	—	—	—	IS2
110.2	2,4-DNT	182.03	165	99	182	SR4	IS2
290	Morinate	187.1	126	187	158	—	IS2
SR5	TBP-d <sub>27</sub>	293.33	103	—	—	—	IS3
299.7	TBP	266.16	99	155	211	SR5	IS3
60	Carbofuran	221.11	164	149	221	—	IS3
SR6	TCEP-d <sub>12</sub>	296.03	261	—	—	—	IS3
299.5	TCEP	283.95	249	251	205	SR6	IS3
SR7	DAP-d <sub>4</sub>	250.11	153	—	—	—	IS3
220.01	DAP	246.09	149	189	235	SR7	IS3
IS3	Phenanthrene-d <sub>10</sub>	188.14	188	—	—	—	—
SR8	DIBP-d <sub>4</sub>	282.18	153	—	—	—	IS3
220.1	DIBP	278.15	149	223	205	SR8	IS3
131	Simetryn	213.1	213	170	155	—	IS4
71	Chlorpyrifos	348.93	197	314	349	—	IS4
IS4	Fluoranthene-d <sub>10</sub>	212.14	212	—	—	—	—
229	Pretilachlor	311.17	262	238	176	—	IS4
SR9	TPP-d <sub>15</sub>	341.16	341	—	—	—	IS5
299.6	TPP	326.07	326	326	170	SR9	IS5
IS5	Chrysene-d <sub>12</sub>	240.17	240	—	—	—	—
SR10	2-DIHP-d <sub>4</sub>	366.27	153	—	—	—	IS5
220.1	2-DIHP	362.25	149	265	167	SR10	IS5
SR11	TEHP-d <sub>51</sub>	485.67	103	—	—	—	IS5
299.4	TEHP	434.35	99	113	211	SR11	IS5
SR12	DNHP-d <sub>4</sub>	366.27	153	—	—	—	IS5
220.13	DNHP	362.25	149	265	207	SR12	IS5
299.2	TCP	368.12	368	367	165	SR13	IS6
SR13	TpCP-d <sub>21</sub>	389.25	389	—	—	—	IS6
SR14	3,5-TXP-d <sub>9</sub>	419.22	419	—	—	—	IS6
299.1	3,5-TXP	410.16	410	193	305	SR14	IS6
SR15	3-TIPP-d <sub>33</sub>	485.41	485	—	—	—	IS6
299.3	3-TIPP	452.21	452	437	281	SR15	IS6
SR16	DNOP-d <sub>4</sub>	394.3	153	—	—	—	IS6
220.07	DNOP	390.28	149	279	261	SR16	IS6
IS6	Benzo[ <i>e</i> ]pylene-d <sub>12</sub>	264.17	264	—	—	—	—

サロゲート標準物質と対比する物質については、次式により相対感度係数 (RRF: Relative Response Factor) を求め、定量値の算出にあてる。

$$RRF = \frac{C_{is}}{C_t} \times \frac{A_t}{A_{is}}$$

ここで、 $C_{is}$ : 標準液中のサロゲート標準物質の濃度、 $C_t$ : 標準溶液中の対象物質の濃度、 $A_t$ : 標準溶液中の対象物質のピーク面積（または高さ）、 $A_{is}$ : 標準溶液中のサロゲート標準物質のピーク面積（または高さ）である。

$RRF$  は、強度比の変動係数が 5%以内であれば、濃度段階毎に求め平均した値である。また、検量線から最小二乗法で一次回帰直線を求め、その傾きを  $RRF$  としてもよい。この場合、直線性が十分であるとともに回帰式の切片がほぼ 0 でなければならない。

#### (ウ) 試料液の測定 (注 1 3)

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を 1 mL 定容とし、測定用内標準混合溶液 (20  $\mu\text{g/mL}$ ) を 5  $\mu\text{L}$  添加して、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  $\mu\text{L}$  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、対応するサロゲート標準物質または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、検量線または相対感度係数により定量する。

## 7 同定、定量及び計算

### (1) 同定

測定対象物質、サロゲート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  $\pm 5$  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  $\pm 20\%$  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。

但し、DIHP、TIPP および TXP については複数の異性体を 1 種の異性体で定量するので、検量線に用いた標準物質と測定対象物質の保持時間は異なる (注 1 4)。また、これらの物質は異性体によって MS におけるフラグメントイオンの相対強度も異なることから、保持時間は異なっても定量イオンと確認イオンが検出されれば測定対象物質とみなすことになる。この場合、標準物質とした特定の異性体について予めマススペクトルを確認し、可能な限り多くの確認イオンを設定することによって同定の確度を高める。

## (2) 定量及び計算

サロゲート標準物質または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。

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

ここで、Ct：対象物質の試料中濃度（ $\mu\text{g}/\text{L}$  または  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、RFt：濃度比、Qis：サロゲート標準物質または内標準物質の添加量（ $\mu\text{g}$ ）、分析への試料採取量：Vs（L または kg）。

または、予め求めた対象物質のサロゲート標準物質に対する相対感度係数（RRF）を用いて、次式により試料中の対象物質の濃度を算出する。

$$Ct(\mu\text{g}/\text{l}, \mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{As}{Ais} \times \frac{Qis(\mu\text{g})}{RRF} \times \frac{1}{Vs(\text{l}, \text{kg})}$$

ここで、Ct：試料抽出液全量中の対象物質の量（ $\mu\text{g}/\text{L}$  または  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、As：試料液中の対象物質のピーク強度、Ais：試料液中のサロゲート標準物質のピーク強度、Qis：内標準物質の総添加量（ $\mu\text{g}$ ）、RRF：サロゲート物質に対する対象物質の相対感度係数、分析への試料採取量：Vs（L または kg）。なお、底質の試料採取量は乾燥重量とする。

DIHP、TIPP、TCP および TXP は複数の異性体について定量するが、標準物質は TCP については異性体の混合物を、DIHP、TIPP および TXP は特定の 1 異性体を用いている。したがって、これらの物質（群）の濃度は、TCP は定量した各ピークの濃度の平均、DIHP、TIPP および TXP は総和となることに注意する。

## 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) 対象となる農薬類の標準物質は広く流通している分析用純度の標準品または標準溶液を用いる。また、フタル酸エステル類と有機リン酸エステル類に関して、標

準物質の準備の都合上、DIHPは2-DIHP、TIPPは3-TIPP、TXPは3,5-TXPに代表させ定量することとしている。TIPPは異性体の中でGCの保持時間が中位の3-TIPPを標準としたが、検出状況に合わせて2-TIPPあるいは4-TIPPの異性体を用いることができる。さらに、今後DIHPの3-DIHP、4-DIHP、TXPの2,6-TXPなどの標準物質も準備される予定であり、適宜利用する。

- (注2) 対象物質のなかで、置換ベンゼン類の2,4-DNT、有機酸エステル類のEHAc、DMP、DIBP、DIHP、有機リン酸エステル類のTBP、TCEPはブランクの影響を受け易い。必要に応じて、再蒸留、溶媒洗浄、硫酸洗浄、焼きだし(600°Cで4時間以上加熱)等の除去処理を行う。
- (注3) 3M社製エムポアディスク(SDB-XD, 47 mm)、または同等の性能を持つもの(備考1)。DNHP、DNOP、TXP、TCPなど極めて疎水性が高い物質が対象となっている。これらは、操作過程で器具の壁面に付着し、回収率の低下につながる可能性が高い。そのため、壁面の洗浄処理が最も容易な固相ディスク法の利用を基本とした。この問題が回避できれば、カートリッジやシリンジ型の固相材を利用して差し支えない。
- (注4) 和光純薬社製ワコーゲルC-200(備考1)。
- (注5) ENVI-Carb、250 mg/6 mL、スペルコ社製など(備考1)。
- (注6) 懸濁物質へ吸着したり、容器内壁に付着した疎水性物質を残すことなく分析するよう全量を供試し、さらに容器壁面を洗う。
- (注7) 固相ディスクはメタノールを吸収して膨潤するため、予め膨潤させてヘッドを装着する。
- (注8) ディスク内部に空気が入ると通水が困難となる。
- (注9) 通水は100 mL/min以下で行い、懸濁物質などで通水が困難な試料の場合は、塩酸でpH3程度にすると改善できる。
- (注10) 沸点が低いCNB、DNT、DMP、モリネートなどは濃縮時の揮散損失が著しいことから、絶対に乾固は避ける。
- (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) この溶出液(第1画分)には、直鎖炭化水素、分子状イオウ、PCB等の無極性物質が溶出する。但し、濃縮過程でのヘキサンへの溶媒置換を不十分な場合、対象物質のCNBなどが第1画分に溶出する可能性があり、注意を要す。

(注13) サロゲート物質による補正では問題ないが、有機リン酸エステル類や農薬には同一濃度であっても標準液と試料試験液ではクロマトグラム上のピーク形状や強度が異なることがある。マトリックス効果と呼ばれる現象であって、一般に試料試験液で良好なピーク形状が得られる。この場合には、1%ポリエチレングリコール200と300の1%アセトン溶液を調製し、両者の混合溶液10 $\mu$ Lを検量線作成用標準液と試料試験液に加えて測定する。

(注14) TCPも複数の異性体をもつ混合物であるが、環境中に存在するTCPと定量用標準物質としたTCPのピーク形状はほぼ同じであり、両者の保持時間も一致している。

(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。

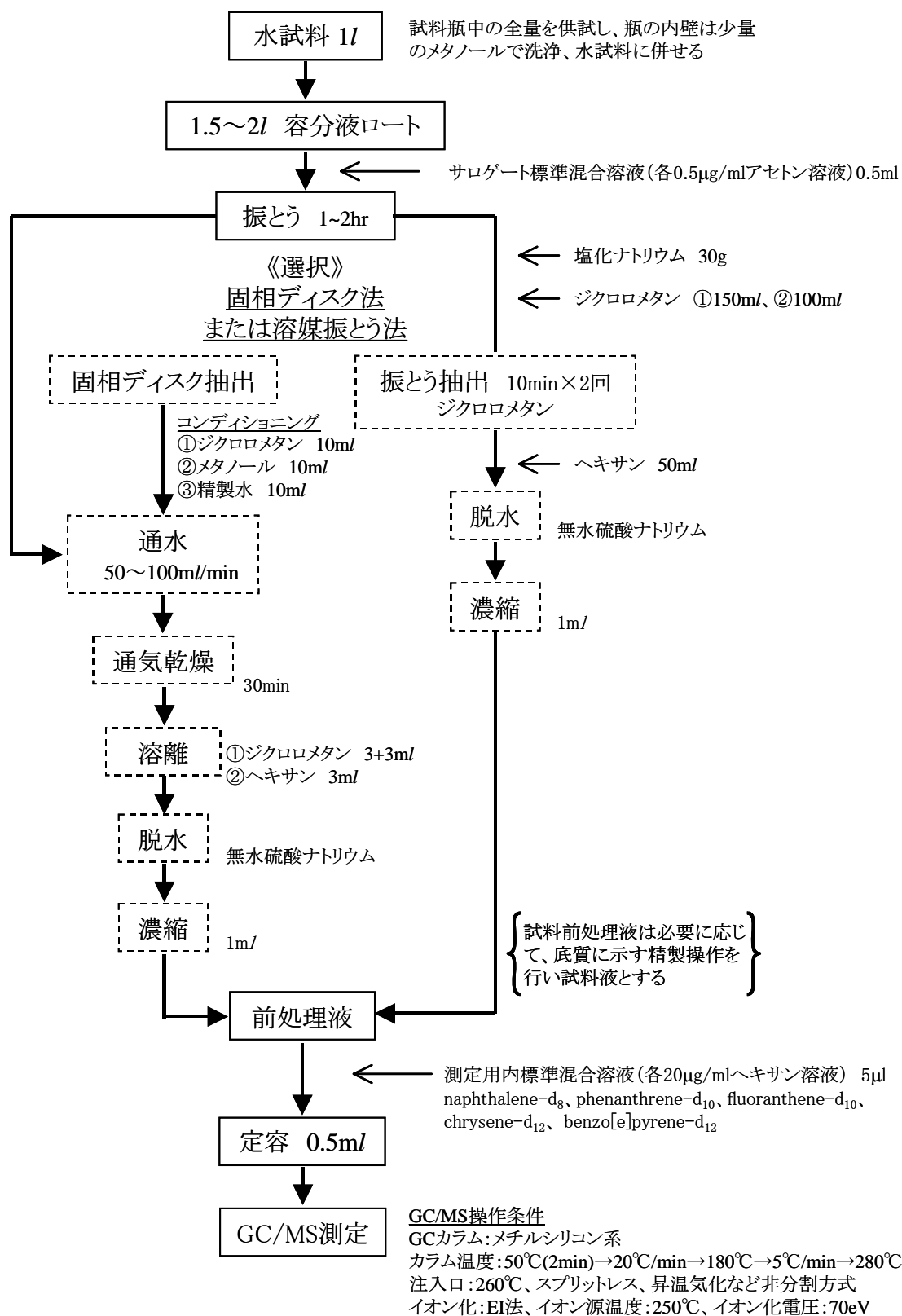
## 参考文献

- 1) 劔持堅志：有機リン酸トリエステル類の(OPEs)の分析法、pp71-114、「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)
- 2) 角脇怜、内藤宏孝：モリネート、pp22-34、「平成4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4年6月)
- 3) 橋本浩一、高橋幸治、西川嘉範、服部幸和：シメトリン、トリシクラゾール、プロベナゾール、イソプロチオラン、ベンチオカーブ、キャプタン、カルボスルファン、ベントゾン、カルボフラン、pp35-54、「平成4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4年6月)

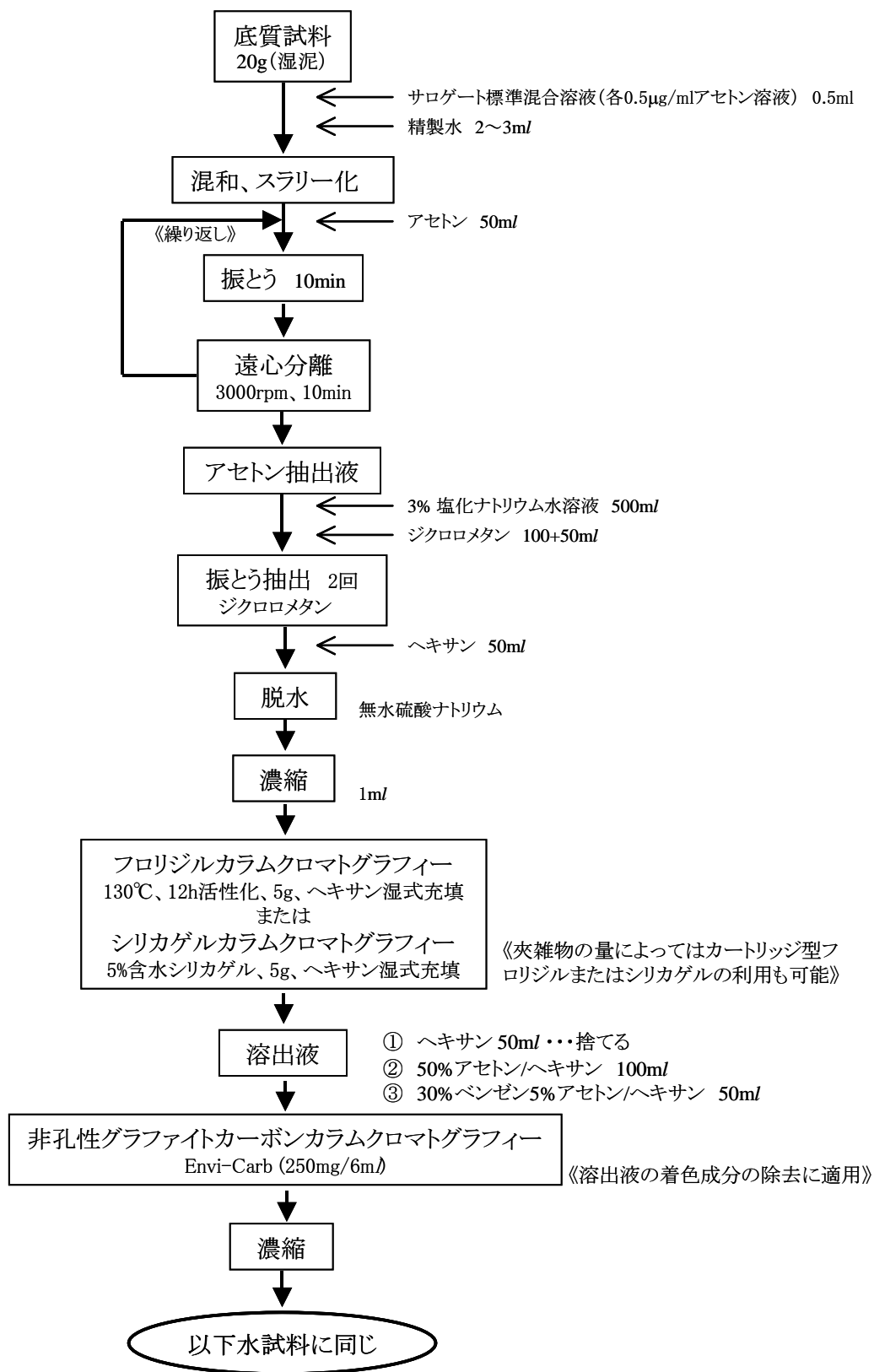


# 分析法フローチャート

## 水質試料



底質試料



# 生物試料

