

x i . エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の分析法

1 対象物質

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)

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)
	目標検出下限値	目標定量下限値	目標検出下限値	目標検出下限値
EDTA	0.2	0.6	5	10

3 分析法の概要

水質試料は、試料を濃縮乾固し、三フッ化ホウ素メタノール錯体 (BF₃-MeOH)メタノール溶液でメチルエステル誘導体化し、GC/MS-SIM で定量する。なお、本法は海水には適用できない。

底質試料は、超音波で水抽出 (pH 9-12) し、遠心分離後水層を分取、蟻酸で酸性にし、再遠沈後、水質試料と同様に操作する。

生物試料については、ホモジナイザーで水抽出 (pH 9-12) し、遠心分離後水層を分取、蟻酸で酸性にし、底質試料と同様に操作する。

4 試薬、器具及び装置

(1) 試薬

- ・ エチレンジアミン四酢酸・2Na・2H₂O : 市販特級品
- ・ *trans*-1,2-シクロヘキサンジアミン-*N,N,N',N'*-四酢酸 (CYDTA)・H₂O : 市販特級品
- ・ CYDTA 溶液 : CYDTA 一水和物 10 mg を 1M-NaOH 100 mL に溶解して調製する。
- ・ 内標準物質 (フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン-d₁₀) : 市販標準品
- ・ 内標準溶液 : 1.0 µg/mL ジクロロメタン溶液を調製する。
- ・ 三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液 (BF₃ abt. 14% ガスクロマトグラフ用) : 市販品
- ・ 水 : 蒸留水又はミネラルウォーター (注1)
- ・ 緩衝溶液 (pH 7) : 1M-KH₂PO₄ を調製し、10M-NaOH を加えて pH を 7 に調整する。

- ・ジクロロメタン、アセトン：残留農薬試験用
- ・無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用
- ・蟻酸、水酸化ナトリウム：試薬特級

(2) 器具及び装置

- ・超音波洗浄器：底質試料の抽出に用いる。
- ・ホモジナイザー：魚試料の抽出に用いる。
- ・遠心分離器：底質及び魚試料の抽出液の分離に用いる。
- ・ロータリーエバポレーター：試料液の濃縮に用いる（注2）。
- ・ヘアードライヤー：窒素気流による試料の乾固に使用。集中的に加温出来るのでフード付きのものが好ましい。

5 試料の採取・運搬

(1) 水質試料

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（注3）1 Lの共栓付きガラスビンに試料水を採取し、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分析すること。

(2) 底質試料

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るだけ除いたのち、冷凍保存する。

(3) 生物試料

魚試料は、分析部位をホモジナイズした後、冷凍保存する。分析時は自然解凍して用いる。

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

試料 100 mL を 300 mL の丸型フラスコにとり、CYDTA 溶液 50 μ L を添加し (注 4)、ロータリーエバポレーターで 2 mL 程度まで濃縮し (注 5)、10 mL 共栓付き試験管に移しかえ、加熱しながら窒素ガスを吹き付け蒸発乾固する (注 6)。

(イ) 底質試料

試料 10 g を 50 mL 容遠沈管にとり、精製水 30 mL、CYDTA 溶液 50 μ L (注 4)、4M-NaOH を数滴添加し、スパーテルでよくかき混ぜ、超音波抽出を 10 分間行った後、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行う。水層を分取し、4M-蟻酸で pH を 2.5 付近に調整した後 (注 7)、再度遠心分離を行う。水層を分取し、水質試料と同様に処理する。

(ウ) 生物試料

試料 1 g を 200 mL のビーカーにとり、CYDTA 溶液 50 μ L (注 4)、精製水 30 mL 及び 4M-NaOH を数滴加え、ホモジナイザーで抽出する。50 mL 遠沈管に移し替え遠心分離する。水層を分取し (注 8)、4M-蟻酸で pH 2.5 付近に調整した後、底質試料と同様に処理する (注 9)。

(2) 試料液の調製

(ア) 水質試料、底質試料及び生物試料

乾固した試料に $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ 溶液 1 mL を加え、強く栓をしてストッパーで止め (注 10)、80°C で 30 分間誘導体化反応を行う。室温に放冷後、内標準液 0.2 mL 及び緩衝液 (pH 7) 3 mL を加え、50 mL 分液ロートに移した後、ジクロロメタン 3 mL ずつで 2 回抽出する。無水硫酸ナトリウムで脱水し、窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL まで濃縮したものを試料液とする。

(3) 空試験液の調製

(ア) 水質試料、底質試料及び生物試料

試料と同量の精製水を用いて「(1) 前処理」及び「(2) 試料液の調製」の項に従って操作をし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 100 mL、底質試料 10 g 及び生物試料 1 g に各対象物質を検出下限値の 5～10 倍量の水溶液で添加し、充分混合した後、「(1) 前処理」及び「(2) 試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試験液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

EDTA・2Na・2H₂O の 100 µg/mL 水溶液を調製する。

(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×0.32 mm 0.52 µm film thickness)
- ・ 液相：5%フェニルメチルシリコン
- ・ カラム温度：70°C (2分) → 15°C/分 → 300°C (10分)
- ・ 注入口温度：250°C
- ・ 注入法：スプリットレス法 (2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°C

(b) 質量分析部

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

(c) 測定イオン

対象物質、CYDTA 及び内標準物質の測定イオンを表 1 に示す (注 1 1)。

(イ) 検量線

標準液 (10 µg/mL 水溶液) を 0～500 µL の範囲で段階的に採り (注 1 2)、CYDTA 溶液

50 μ L (注4) を加え、加熱しながら窒素ガスをふきつけて蒸発乾固する。以下「試料液の調製」の項に従って操作をして得た試料液を GC/MS に注入し、標準物質と内標準とのピーク面積比から検量線を作成する。

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

	測定イオン	
	定量用	確認用
EDTA	174	289 348
CYDTA	402	
(EDTA-d ₁₂)	360	
フェナンスレン-d ₁₀	188	
フルオランテン-d ₁₀	212	

(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 $\pm 20\%$ 以内の差で合っておれば、物質が存在しているを見なす。

(2) 定量及び計算

得られた対象物質と内標準(注13)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14)。なお、底質の試料量は乾燥試料量とする。

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

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

$$\text{フリー体への換算係数} = \frac{\text{EDTA (292.3)}}{\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O (372.2)}} = 0.785$$

(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「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(注15)。

9 注意事項

本法はサロゲートを使用しないことを前提にして記載した。サロゲート物質の EDTA-d₁₂ が市販されており、使用が可能である。(但し、入手に日数がかかる場合がある。)

サロゲート物質がナトリウム塩の場合は水に溶解するが、遊離体で水に溶解しにくい場合は 1M-NaOH 水溶液で溶解させて調製する。

(注1) 使用する水については本分析法により定量を行い、使用の可否について検討しておくこと。

(注2) ロータリーエバポレーターには必ず逆流止めを付けること。また、前使用者が有機溶媒の濃縮に使用し、溶媒溜に有機溶媒が入っている場合は蒸気圧のため、水の濃縮が困難となる。必ず残っている有機溶媒を除去して使用すること。

(注3) 実験室で使用している洗剤には EDTA が配合されているものが有り、洗浄後は充

分蒸留水で洗浄すること。事前に 0.1 mL の洗剤を乾固し、本法の誘導体化を行い EDTA 添加の有無を確認しておくが良い。

(注 4) サロゲート (EDTA-d₁₂) を使用する場合は添加しなくてよい。またその場合、定量はサロゲートを内標準として行う。サロゲートを使用しない場合は、CYDTA は分析がうまくいっているかの判断に使う。

(注 5) ロータリーエバポレーターの湯浴の温度はコントロールする必要は無い。可能な限り高くして濃縮速度を速めること。但し突沸しない程度の温度にすること。

検体数が多く時間がかかる場合は、試料水を 200 mL 容ビーカーに入れホットプレート上で濃縮してもよい。(ホットプレートの温度にもよるが 2.5 時間程度で濃縮できる。)水が無くなった状態で加熱を続け焦げ付かさないように注意すること。

なお、本法は海水については適用出来ない。塩が大量に析出し分析が困難である。

(注 6) 乾固は充分に行う。水分が残っていると誘導体化反応が完全に進行しない。また窒素の吹き付けを続けても EDTA が揮散する心配は無い。

検体数が多い場合は、濃縮した試料水を 10 mL 容 KD 濃縮管に入れ、130°C 程度にセットされた恒温乾燥器内にセットすれば 3 時間程度で乾固できる。一夜放置して置いても揮散により回収率が低下することは無い。

(注 7) アルカリ性で遠心分離しても水層はわずかに濁っている場合がある。酸性にして再度遠心分離を行うと透明になる。

(注 8) 移し替える時、静かにすること。沈殿物を入れないようにすること。

(注 9) 生物試料の乾固は、ヘアードライヤーで加熱しながら、残さが褐色になるまで完全に行う。この乾固が不十分な場合、誘導体化反応が完全に進行しない。また、ジクロロメタン抽出時に水層と分離しにくい。

(注 10) 圧力がかかるので堅く栓をし、ストッパーで止めておくこと。

(注 11) EDTA の定量にはピーク強度の大きい m/z 174 を使用したが、妨害があれば他の m/z 289 または 348 を使用する。

CYDTA を内標準としての定量もできるが、添加回収実験の結果回収率が 100% を越える結果が得られたのでフルオランテン-d₁₀ を内標準として定量することとした。また、生物試料ではフルオランテン-d₁₀ (m/z 212) に妨害ピークが認めら

れたので、フェナンスレン-d₁₀ (m/z 188) で定量することとした。

(注 1 2) 検量線の濃度範囲は、使用する GC/MS の感度に応じて適宜変更してもよい。

(注 1 3) サロゲートを使用した場合は対象物質とサロゲートのピーク面積比から検量線により定量する。

(注 1 4) EDTA の標準液に EDTA・2Na・2H₂O を使用しているため、遊離体の無水物濃度に換算するため、換算係数を乗じる。

(注 1 5) 本法に於ける底質からの回収率はやや悪く 60%程度であった。サロゲートを使用すれば問題はない。

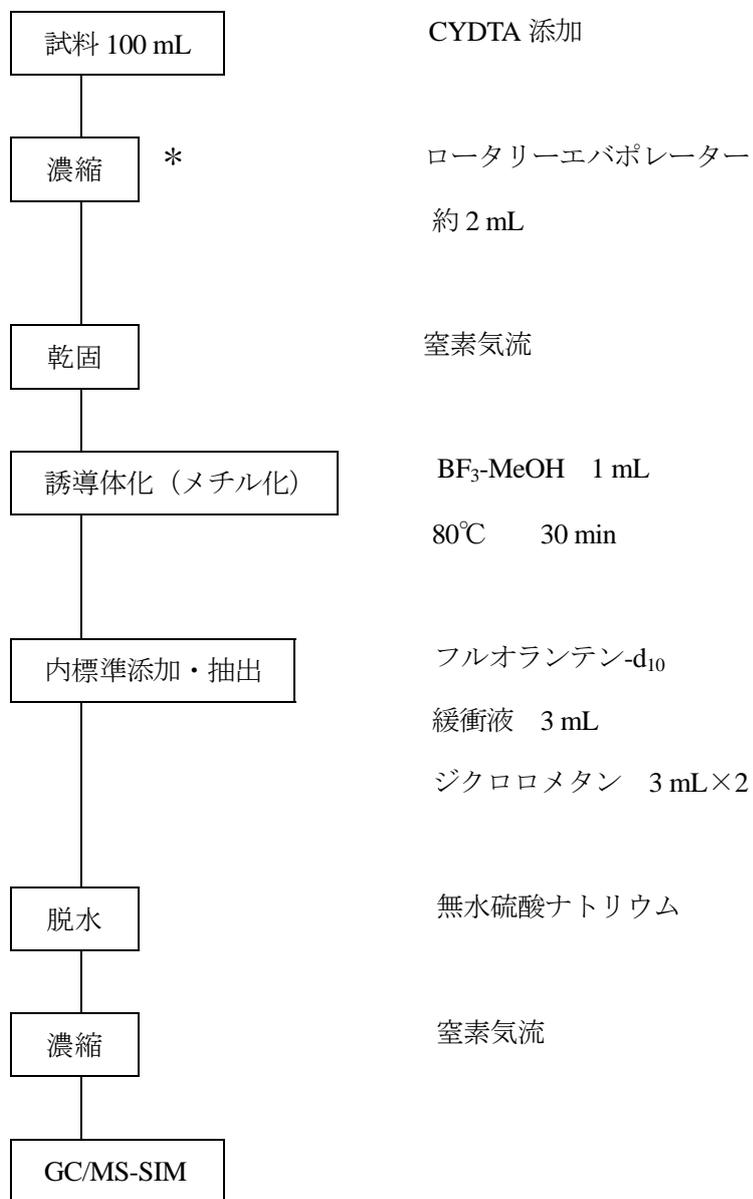
(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして掲げたが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

参考文献

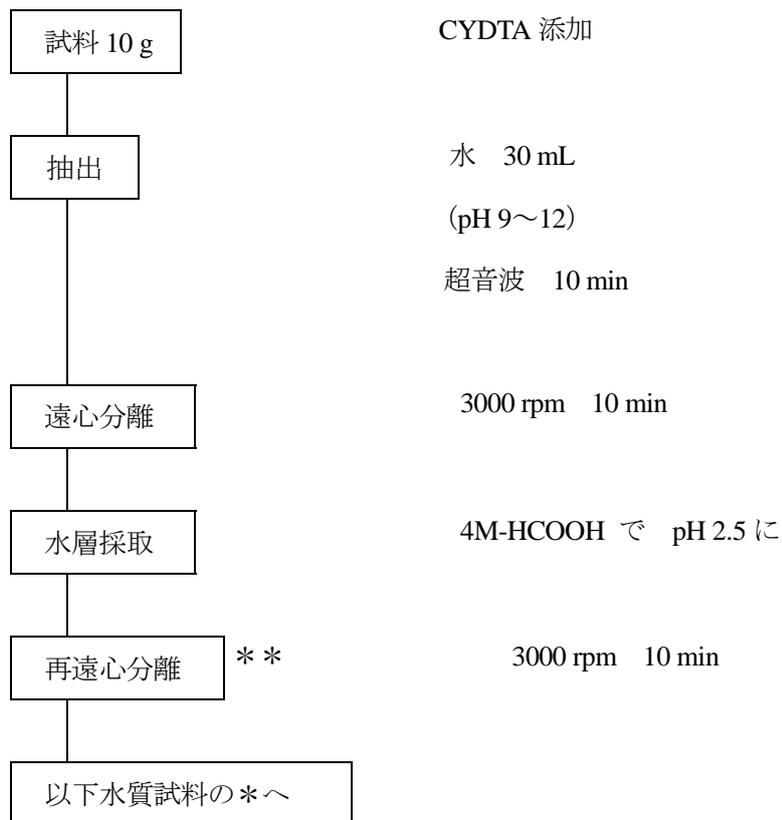
- 1) 環境庁環境保健部保健調査室：「平成 5 年度化学物質分析法開発報告書」、pp88-99 (平成 6 年 6 月)
- 2) Rudlig, L.: *Water Research* , **6**, 871-876 (1972)

分析法フローチャート

水質試料



底質試料



生物試料

