

要調査項目等調査マニュアル  
(水質、底質、水生生物)

平成16年3月

環 境 省

## 要調査項目等調査マニュアルの制定に当たって

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

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

そこで、これら要調査項目について、毒性情報の収集、水環境中の存在状況実態調査を通じて知見の集積を進め、その測定方法等について平成11年12月、平成12年12月、平成14年3月及び平成15年3月に「要調査項目等調査マニュアル(水質、底質、水生生物)」としてとりまとめてきており、今般も、さらに知見の集積や測定方法の検討を進め、本マニュアルにとりまとめた。

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

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

平成16年 3月

環境省環境管理局水環境部企画課

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

## 目 次

・ 調査対象物質一覧表.....	1
・ 分析精度管理 .....	3
・ 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項 .....	21
・ 分析法	
・ ヘキサクロロフェンの分析法 .....	28
・ アシュラム、ベンスリドの分析法 .....	42
・ 2-ブタノン、イソバレルアルデヒドの分析法 .....	54
・ モルホリンの分析法 .....	64
・ パラコート、ジクワットの分析法 .....	74
・ メラミンの分析法 .....	82
・ ジクロロアニリン類、ナフチルアミン類の分析法 .....	90
・ N-フェニルナフチルアミン類の分析法 .....	99
・ フルオレスセント・260、フルオレスセント・351 の分析法 .....	108
・ クロロピクリンの分析法 .....	115
・ ポリ塩化ターフェニル (PCT) の分析法 .....	126
・ 芳香族化合物 (ニトロトルエン類、ピフェニル、ジフェニルメタン、ジベン ジルエーテル、ターフェニル類、ナフタレン、ジメチルナフタレン類、ジイ ソプロピルナフタレン)、多環芳香族炭化水素 (3~4 環) 及びデカヒドロナ フタレン類の分析法 .....	145

## ．調査対象物質一覧表

### 1 調査対象物質及びその分析法

番号	目数	要調査項目	目別番号	要調査項目	物質名	分析法
1. ヘキサクロロフェン						
1	1		239		ヘキサクロロフェン	水質：固相抽出又は溶媒抽出、ジアゾメタンメチル化、GC/MS 底質・生物：溶媒抽出、ジアゾメタンメチル化、GC/MS
2. アシュラム、ベンスリド						
2	2		8		アシュラム	水質：固相抽出又は溶媒抽出、LC/MS 底質・生物：溶媒抽出、LC/MS
3	3		250		ベンスリド（別名SAP）	
3. イソバレラルデヒド、2-ブタノン						
4	4		31		イソバレラルデヒド（別名3-メチルブチルアルデヒド）	水質：PFBOA誘導体化、溶媒抽出、GC/MS 底質・生物：水抽出、PFBOA誘導体化、溶媒抽出、GC/MS
5	5		218		2-ブタノン（別名メチルエチルケトン、MEK）	
4. モルホリン						
6	6		291		モルホリン	水質：ベンゼンスルホニル化、溶媒抽出、GC/MS 底質：加水、蒸留、ベンゼンスルホニル化、溶媒抽出、GC/MS 生物：溶媒抽出、酸性下水抽出、蒸留、ベンゼンスルホニル化、溶媒抽出、GC/MS
5. ジクワット、パラコート						
7	7		105		ジクワット	水質：固相抽出、LC/MS
8	8		197		パラコート	
6. メラミン						
9	9		283		メラミン（別名2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン）	水質：固相抽出、LC/MS 底質：溶媒抽出、固相抽出、LC/MS
7. ジクロロアニリン類、ナフチルアミン類						
10	10		97		2,4-ジクロロアニリン	水質：固相抽出、GC/MS 底質：水蒸気蒸留、固相抽出、GC/MS
11			97		2,5-ジクロロアニリン	
12			97		3,4-ジクロロアニリン	
13	11		184		-ナフチルアミン（別名1-ナフチルアミン）	
14	12		185		-ナフチルアミン（別名2-ナフチルアミン）	
8. N-フェニルナフチルアミン類						
15	13		210		N-フェニル-1-ナフチルアミン	水質：固相抽出、GC/MS 底質：溶媒抽出、GC/MS
16	14		211		N-フェニル-2-ナフチルアミン	
9. フルオレスセント						
17	15		226		フルオレスセント・260	水質：固相抽出、HPLC
18	16		227		フルオレスセント・351	底質：溶媒抽出、HPLC
10. クロロピクリン						
19	17		78		クロロピクリン（別名トリクロロニトロメタン）	水質：ヘッドスプレ-スGC/MS 底質・生物：溶媒抽出、加水、ヘッドスプレ-スGC/MS
11. ポリ塩化ターフェニル						
20	18		259		ポリ塩化ターフェニル	水質：固相抽出、GPC、HR-GC/MS 底質・生物：溶媒抽出、アルカリ分解、GPC、HR-GC/MS

12. ニトロトルエン類、ピフェニル、ジフェニルメタン、ジベンジルエーテル、ターフェニル類、ナフタレン、ジメチルナフタレン類、ジイソプロピルナフタレン、多環芳香属炭化水素類(3~4環)、デカヒドロナフタレン類					
21	19	190	<i>o</i> -ニトロトルエン	水質：連続水蒸気蒸留、GC/MS	
22		190	<i>m</i> -ニトロトルエン		
23		190	<i>p</i> -ニトロトルエン:		
24	20	205	ピフェニル		
25	21	116	ジフェニルメタン		
26	22	124	ジベンジルエーテル		
27	23	139	<i>o</i> -ターフェニル		
28		139	<i>m</i> -ターフェニル		
29		139	<i>p</i> -ターフェニル		
30	24	183	ナフタレン		
31	25	128	1,2-ジメチルナフタレン		
32		128	1,3-ジメチルナフタレン		
33		128	1,4-ジメチルナフタレン		
34		128	1,5-ジメチルナフタレン		
35		128	1,6-ジメチルナフタレン		
36		128	1,7-ジメチルナフタレン		
37		128	1,8-ジメチルナフタレン		
38		128	2,3-ジメチルナフタレン		
39		128	2,6-ジメチルナフタレン		
40		128	2,7-ジメチルナフタレン		
41	26	89	ジイソプロピルナフタレン		
42	27	141	アセナフチレン		
43		141	ジベンゾチオフェン		
44		141	アセナフテン		
45		141	フルオレン		
46	28	148	シス-デカヒドロナフタレン		
47		148	トランス-デカヒドロナフタレン		

## 2 測定可能項目

	分類	番号	水質	底質	水生生物
1	ヘキサクロロフェン	1			
2	アシュラム、ベンスリド	2~3			
3	イソバレラルアルデヒド、2-ブタノン	4~5			
4	モルホリン	6			
5	ジクワット、パラコート	7~8		×	×
6	メラミン	9			×
7	ジクロロアニリン類、ナフチルアミン類	10~14			×
8	<i>N</i> -フェニルナフチルアミン類	15~16			×
9	フルオレスセント	17~18			×
10	クロロピクリン	19			
11	ポリ塩化ターフェニル	20			
12	ニトロトルエン類、ピフェニル、ジフェニルメタン、ジベンジルエーテル、ターフェニル類、ナフタレン、ジメチルナフタレン類、ジイソプロピルナフタレン、多環芳香属炭化水素類(3~4環)、デカヒドロナフタレン類	21~47		×	×

## ．分析精度管理

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

### 1 標準作業手順（SOP）

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

試料採取・運搬用器具等の準備、メンテナンス、保管および取扱い方法

前処理用試薬類の準備、精製、保管および取扱い方法

分析用試薬、標準物質等の準備、標準溶液の調製、保管および取扱い方法

水質、底質および生物試料における前処理操作の手順

分析装置の測定条件の設定、調整、操作手順

分析方法全工程の記録（使用するコンピュータのハードおよびソフトを含む）

### 2 分析方法の妥当性、器具、装置の性能の評価と維持管理

#### （1）試料採取と運搬、保管

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

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

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

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

## （２）分析室内環境と器具・機材、試薬類

### （ア）分析室内環境

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

### （イ）器具・機材類

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

### （ウ）試薬類

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

### (エ) 標準物質（溶液）

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

### (オ) 内標準物質、サロゲート物質

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

## (3) 試料調製と前処理

### (ア) 試料調製

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

### (イ) 前処理操作

抽出、精製、濃縮、誘導体化などの前処理は、操作に知識や熟練を要するため人為的な

誤差の要因となり易い。本調査マニュアル「 . 分析法」章にある個別分析法の操作手順と留意事項を理解し、適切に操作しなければならない。各操作の適否は操作ブランク試験と添加回収率試験で確認する。

#### (4) 分析装置の調整

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

### 3 測定の信頼性の評価

#### (1) 装置の変動

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

#### (2) 検量線(作成と直線性の確認)

検量線は通常5段階以上の濃度の標準溶液を分析し作成する。

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

$$RRF = (C_{is}/C_s) \times (A_s/A_{is})$$

ここで、 $C_{is}$ : 標準溶液中の内標準物質の濃度、 $C_s$ : 標準溶液中の測定対象物質の濃度、 $A_s$ : 標準溶液中の測定対象物質の応答値、 $A_{is}$ : 標準溶液中の内標準物質の応答値である。

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

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

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

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

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

### (3) 操作ブランク試験

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

操作ブランク値が大きいと検出下限・定量下限が高なるばかりでなく、人為的な原因に

よる異常値が出現する可能性が高くなり、分析値の信頼性が低下する。したがって、操作ブランク値は分析値に影響がないよう極力低減を図り、試料濃度への換算値が目標定量下限値以下になるよう管理する。試験頻度は、10 試料ごとに 1 回、または 1 日に 1 回（測定試料が 10 試料以下）が目安である。

#### （４）検出下限値および定量下限値

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

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

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

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

$$IDL = 2 \times s \times t(n-1, 0.05)$$

ここで、IDL は装置検出下限値、 $t(n-1, 0.05)$  は危険率 5%、自由度  $n-1$  の t 値（片側）、s は標準偏差である（次項表参照）。

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

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

装置定量下限値（IQL）は、IDL の算出に用いた標準偏差 s の 10 倍値とする。

$$IQL=10 \times s$$

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

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

$$MDL = 2 \times s \times t(n-1, 0.05)$$

ここで、MDL は分析方法の検出下限値、 $t(n-1, 0.05)$  は次表に示す通り、危険率 5%、自由度  $n-1$  の  $t$  値 (片側)、 $s$  は標準偏差である。

表 Student の  $t$  分布におけるパーセント点 (危険率 5%、片側)

繰り返し回数(n)	自由度(n-1)	$t(0.05, n-1)$ 、片側
7 回	6	1.943
8 回	7	1.895
9 回	8	1.860
10 回	9	1.833

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

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

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

#### MDL 算出用試料の選定

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

## 試料の調製

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

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

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

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

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

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

## 調製試料の分析

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

分析方法の定量下限値（MQL）は MDL の算出に用いた標準偏差  $s$  の 10 倍値とする。

$$MDL=10 \times s$$

この MDL、MQL は、前処理や測定条件によって変動するため、ある一定の周期で確認し、常に MQL が目標定量下限以下であるよう管理しなければならない。また、試料濃縮率を考慮した MDL、MQL は、試料量、前処理操作（濃縮比）により異なるため、試料ごとに算出する必要がある。

分析方法以外の、例えばリスク情報を根拠として目標定量下限が設定されている場合など、目標検出下現値よりもはるかに低いレベルの検出が可能な方法においては、目標定量下限値に関係なく、分析方法がもつ感度性能を最大限発揮して低濃度域まで測定することによって、将来的な濃度変化の解析に役立つ。

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

実試料の分析において、MDL 未満でピークが認識される場合は、そのクロマトグラム上（クロマトグラフィー法以外では、実試料を連続して測定する間のベースラインの変動）の S/N 比から試料測定時の検出下限値（PDL）と定量下限値（PQL）を推定する。PDL は S/N=3 程度のピーク、PQL は S/N=10 程度のピークの面積を概算して、それぞれを濃度の算出式に代入して求める。

ピークが検出されない場合は、ピーク近傍（ピークの半値幅の 10 倍程度の範囲）のベースラインのノイズを計測し、その標準偏差の 2 倍をノイズ幅（N）とする。経験的には、計測範囲のノイズの最大値と最小値の幅は標準偏差の約 5 倍となるので、最大値と最小値の差の 2/5 を N としてもよい。次いで、ノイズの中央値をベースラインとし、N の 3 倍の高さ（S）のピークを想定し、標準液から得られる該当ピークの半値幅をあてて、そのピーク面積を概算し、濃度の算出式に代入して PDL を求める。一方、PQL は S/N=10 のピークを想定して、PDL と同様に求める。

PDL と PQL はそれぞれ MDL、MQL 未満になるよう管理しなければならない。この確保ができない場合は、前処理操作、測定方法等に問題があったか否かを確認し、必要に応じ再分析や再測定を行う。また、MDL の算出に用いた試料の性状、あるいは分析法が対象とする試料の性状が実試料のそれと大きく異なっている可能性もあるので、実試料に近い性

状をもつ試料での MDL の再測定や他の分析法の採用も考慮する。

#### ( 5 ) 添加回収率試験

基本的には、試験液中の濃度が定量下限値の 10 倍程度となるよう測定対象の標準物質及び必要に応じ所定量のサロゲート物質を試料に添加して、分析方法と同じ前処理、試料液の調製、測定の操作を行い、添加量と分析値から回収率を算出する。ここで、操作ブランク値が大きかったり、試料中に対象物質が含まれる場合は、その濃度が回収率の測定に影響しない程度に標準物質の添加量を増やして試験する。回収率の許容範囲の目安は 70 ~ 120% であり、同位体希釈法ではサロゲート物質の回収率は 50 ~ 120% の範囲を目標とする。

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

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

#### ( 6 ) 二重測定

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

#### ( 7 ) トラベルブランク試験

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

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

## 4 データの管理及び評価

### (1) 異常値、欠測値の取扱い

操作ブランク値が大きい、二重測定の結果が大きく異なる、トラベルブランク値が大きいなど、精度管理上の基準を満たさない場合は、測定値の信頼性に問題があると考えられるため、欠測扱いとして再測定を行う。再測定には、多大な労力、時間、コストがかかるだけでなく、試料の採取時期が異なることから解析上の支障も生じ、調査全体の評価に影響することになる。したがって、事前のチェックを十分に行い、異常値や欠測値を出さないように注意する。また、異常値や欠測値が出現した経緯を十分に検討し、記録に残して、以後の再発防止に役立てることが重要である。

### (2) 測定操作の記録

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

#### 試料採取、保管、運搬の方法

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

#### 試料に関する付加情報

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

#### 試料調整の条件と方法

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

#### 試料の前処理法

- ・変更、改良、改善点とその検証結果

- ・ その他特記事項
  - 前処理・分析装置の操作条件と校正記録
- ・ 製造メーカー、製品番号、動作状況など
- ・ 維持管理記録
  - 測定値を得るまでの各種の数値
- ・ 試料供給量、抽出液量、濃縮率など
- ・ 各装置の設定条件など

## 5 精度管理に関する報告

精度管理に関する以下の情報を記録し、データと共に報告する。

試料採取と運搬、保管の履歴

分析操作の記録（前処理・分析に関する記録）

装置の検出下限値および定量下限値

分析方法の検出下限値および定量下限値

試料測定時における検出下限値および定量下限値

操作ブランク試験結果

添加回収試験結果

二重測定結果

トラベルブランク試験結果

SOP に規定されていること

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

## 解説) 検出下限値の算出方法の経緯

要調査項目等調査マニュアルでは、調査データの信頼性を確保する観点から、平成 12 年度版以降検出下限値とその算出方法を示してきた。提示に際しては、検出下限値が調査の目的に適っていること、根拠が明確なこと(科学的に立証が可能なこと)、国内的あるいは国際的な動向に調和していること、調査担当者に過大な負担がかからないことに留意しながら検討会での議論を重ね、結果的に表 1 のように算出方法が変わってきた。そこで、検出下限値への理解の一助として、変更の経緯についてまとめる。

表 1 IDL および MDL の算出式

発行年月	IDL	MDL
2000 (平成 12) 年 12 月	$t(n-1,0.05) \times 2s$	$t(n-1,0.05) \times s$
2002 (平成 14) 年 3 月	$t(n-1,0.05) \times 2s$	$t(n-1,0.05) \times s$
2003 (平成 15) 年 3 月	$t(n-1,0.01) \times s$	$t(n-1,0.01) \times s$
2004 (平成 16) 年 3 月	$t(n-1,0.05) \times 2s$	$t(n-1,0.05) \times 2s$

注) IDL : 装置検出下限値、MDL : 分析方法の検出下限値

s : 繰り返し測定 ( 併行測定 ) で得られた測定値の標準偏差

$t(n-1, \quad )$  : 自由度  $n-1$ 、危険率  $\quad$  に対応する student の  $t$  分布のパーセント点  
(片側確率)

### 1 . 基本方針

本調査マニュアルの検出下限値の算出方法は次の 3 点を基本とする。

- ・ 検出下限値は、公定法等にデフォルト的に用いられている“ 3 ”を受けて、「標準偏差に基づく方法」を採用する。
- ・ 従来の“ 3 ”は、その根拠が必ずしも明確となっていない問題がある。
- ・ この解決も含めて、JIS、日本分析化学会、ISO、IUPAC、EPA 等の考え方を参考に、検出下限値の算出方法を決める。

冒頭にも記したように、併せて次に留意する。

- ・ 検出下限値が調査の目的に適っていること
- ・ 根拠が明確なこと(科学的に立証が可能なこと)
- ・ 国内的あるいは国際的な動向に調和していること
- ・ 調査担当者に過大な負担がかからないこと

## 2. 主な論点と課題

検出下限値を併行測定の結果から推定される母標準偏差に基づいて設定する際に、想定される論点や課題について整理する。

1) “検出できる最小の濃度(量)”と定義される検出限界値に対し、“検出”と“最小”をどのように規定するか？

“検出”の特性(図1)

- ・ 検出下限値に誤差要因を考慮するか否か。Kaiser と Currie のいずれの考え方に。
- ・ Currie は、ブランク試料と低濃度の試料溶液の併行測定値の確率分布はほぼ等しい、すなわち標準偏差は同じと仮定して検出下限値の誤差を見積もること。

“最小”の表現

- ・ “最小”は誤認の危険率で規定することになるが、推奨の1~5%の間でどの値に。

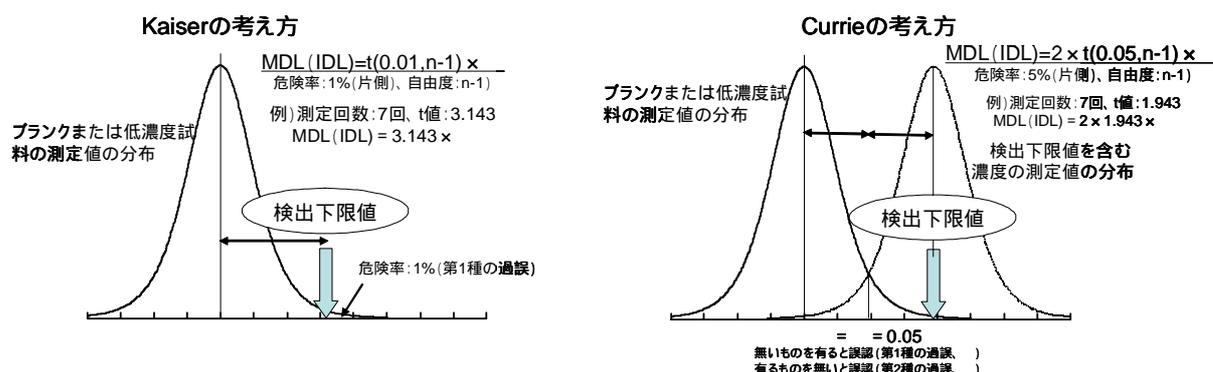


図1 検出下限値の考え方 (Kaiser と Currie)

2) “3”の根拠は何処に？

- ・ 「JISK0124-2002: 高速液体クロマトグラフィー通則」では、検出下限値は、“95%の確率 [誤りの確率 (危険率 5%)] でブランク信号と区別できる信号を与える分析対象成分の濃度(量)”と規定して、20回以上の併行測定で標準偏差を求めて、3.29を乗じた値とし、20回に満たない場合はその自由度と危険度に応じたt分布のパーセント点(片側)を乗じるとしている。基本的には、Currieで危険率を5%としたものであるが、20回の繰り返しは現実的か。
- ・ 他に、根拠を明示した例は少なく、“3”あるいは“3.3”のみを規定。これは、

測定値はランダム誤差のみを含み正規分布すると仮定し、Currie で危険率 5%を根拠とした値とみなせるが、仮定した測定値の正規分布は？

- ・ その一方、Kaiser でも説明でき、危険率 1%の t 分布のパーセント点は自由度 5 ~ 22 の範囲で 3.4 ~ 2.5 の値をとり、丸めると“3”。より現実的な繰り返しで、“3”を導くことが可能。

### 3) 経過と現状

- ・ わが国では、検出下限の定義について、歴史的には Kaiser の意見に近いものから Currie の意見に近いものへ変化
- ・ IUPAC と ISO は、デフォルト値として  $\alpha = 0.05$ 、すなわち Currie で危険率を 5% とすることを勧告しつつ、「特定の分野においては、その分野の状況にあわせて使うことができる」としている
- ・ EPA は検出下限値を Kaiser の定義を採用して危険率 1%で統一するよう提案

## 3. 変更の経緯

本調査マニュアルでは、上記の方針、論点、課題等を踏まえたき台の議論の結果、検出下限値は表 1 の経過をたどってきた。

### 1) 平成 12 年度

$$\text{IDL} = t(n-1, 0.05) \times 2s \quad \text{MDL} = t(n-1, 0.05) \times s$$

本調査マニュアルで検出下限値を検討した初年度あたり、最も認知度が高い Currie で危険率 5%とする案をたたき台として検討が行われた。一つの論点は、一般的な“MDL=3”との整合性である。

上記の案で“3”を導くには 20 回以上の繰り返しが必要で現実性に欠ける。また、測定値の確率分布が Student の t 分布でなく正規分布と仮定するには問題が多い。一方で、数回の繰り返しで t 分布の 95%点をあてると、標準偏差を 4 倍することになり、“3”との乖離が大きくなって、“問題発掘型”という要調査項目の調査目的からも適切でない。

これらを踏まえて、測定値の取得が比較的容易な IDL については、Currie で危険率を 5%、MDL は Kaiser で危険率を 5%、すなわち標準偏差の 2 倍を検出限界値として検出データの確保を優先する方向でまとまった。

## 2) 平成 13 年度

$$\underline{IDL = t(n-1,0.05) \times 2s} \quad \underline{MDL = t(n-1,0.05) \times s}$$

平成 12 年度を踏襲した結果になっているが、低く見積もりすぎている MDL について、次式をたたき台とした議論が継続された。しかし、年次報告書への掲載には至っていない。

.....

$$MDL = [ 2 \times t(0.05, n-1) \times (1+1/n)^{1/2} \times sB ]$$

ここで、MDL は分析方法の検出下限値、 $t(0.05, n-1)$  は表 1 の危険率 5%、自由度  $n-1$  の  $t$  値 (片側) で  $\alpha = 0.05$  とし、 $n$  は試験の繰り返し回数、 $sB$  は測定値の標準偏差である。 $(1+1/n)^{1/2}$  項は、真値と平均値の誤差の上限を考慮したもので、繰り返し回数が多くなるにつれて 1 に近づく。

.....

また、従来の MDL の算出方法で、試料測定時の検出下限値が管理できるか? の懸念も浮上し、抜本的な見直しも必要となった。

## 3) 平成 14 年度

$$\underline{IDL = t(n-1,0.01) \times s} \quad \underline{MDL = t(n-1,0.01) \times s}$$

検出下限値の抜本的見直しに、偶然時を同じくして、EPA は検出下限値の設定方法をレビューして、Kaiser で危険率 1% をあてる方向で検出下限値を統一する提案を行った (2003.3)。併せて、パブリックコメントを収集する告示も行っている。

これを受けて、本調査マニュアルの検出下限値も EPA の提案に整合するよう修正することになり、標準偏差に  $t$  分布の 99% 値を乗じて検出下限値を算出する方法に変更した。

また、EPA のレビューを参考に、MDL の算出を実試料に近づけるために、試料マトリックスに添加して併行測定する方法に変更した。さらに、試料測定時の検出下限値 (PDL) も新たに設定し、PDL はシグナル/ノイズ (S/N) 比から求め、常に PDL が MDL 以下の状態で測定するよう規定した。

## 4) 平成 15 年度

$$\underline{IDL = t(n-1,0.05) \times 2s} \quad \underline{MDL = t(n-1,0.05) \times 2s}$$

EPA はパブリックコメントを受けて、2004 年 10 月に検出下限値・定量下限値設定のガイドラインの修正版を公表し、同年 11 月に Kaiser の危険率 1% で検出下限値を統一する

2003年の提案を取り下げる公示を行った。これにより、Kaiser や Currie などの考え方が共存する従来の状況に戻る結果となった。これを受けて、本調査マニュアルにおいても他の公定法等との整合性をはかるために Currie の考え方に戻し、危険率 5%を定義どおりに適用する方法に変更することになった。

#### 4 . 定量下限値の算出方法

定量下限値に関しては、平成 12 年度以降変更なく検出下限値の 3 倍値で規定してきた。しかし、検出下限値を Currie の危険率 5%に戻し、かつ定義どおりに適用することに変更したのを契機とし、平成 15 年次報告書から“ 定量下限値は標準偏差の 10 倍 ”に変更した。これも他の公定法等と整合性を図るためである。

#### 5 . 主な参考資料

- 1) Currie, L.A.: Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal. Chim. Act.*, **391**, 127-134 (1999)
- 2) 尾関徹: 検出限界と定量限界, *ぶんせき*, **2001.2**, 56-61 (2001)
- 3) 日本規格協会 : 「JIS K0124 高速液体クロマトグラフィー通則」(2002)
- 4) US EPA: Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Procedures for Detection and Quantitation. Federal Register Vol.68, No.48, pp11770-11790, Wed., Mar. 12, 2003 / Proposed Rules (2003)
- 5) US EPA: Technical Support Document for the Assessment of Detection and Quantitation Concepts. Federal Register Vol.68, No.48, pp11791-11793, Wed., Mar. 12, 2003 / Proposed Rules (2003)
- 6) US EPA: Technical Support Document for the Assessment of Detection and Quantitation Approaches. EPA-821-R-03-005, Feb. 2003, Engineering and Analysis Division Office of Science and Technology U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC 20460 (2003)
- 7) US EPA: Revised Assessment of Detection and Quantitation Approaches. <http://yosemite.epa.gov/water/owrccatalog.nsf/0/34a67b4c6ef0197d85256f4200527cbd?OpenDocument>, <http://www.epa.gov/waterscience/methods/det/rad/rad.pdf> (2004)
- 8) US EPA: Federal Register Pollutants analysis test procedures; guidelines--Detection and quantitation approaches assessment; technical support document, 64704-64707,

<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-WATER/2004/November/Day-08/w24824.htm>,

[http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/getdoc.cgi?dbname=2004\\_register&docid=fr08no04-23.pdf](http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/getdoc.cgi?dbname=2004_register&docid=fr08no04-23.pdf) (2004)

- 9) US EPA: Detection and quantitation procedures; withdrawn, 64707-64710,

<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-WATER/2004/November/Day-08/w24823.htm>,

[http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/getdoc.cgi?dbname=2004\\_register&docid=fr08no04-24.pdf](http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/getdoc.cgi?dbname=2004_register&docid=fr08no04-24.pdf) (2004)

## ・試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項

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

### 1 試料採取地点の選定

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

### 2 試料採取

#### (1) 水質

##### (ア) 採水時期

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

##### (イ) 採水部位

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

##### (ウ) 採水器

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

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

なお、試料容器で直接試料水を採ることもできる。

#### (エ) 試料容器

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

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

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

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

#### (オ) 採水操作

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

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

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

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

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

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

## （２）底質

### （ア）採泥時期

水質と底質は同時に採取することを原則とする。

### （イ）採泥場所

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

### （ウ）採泥器

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

### （エ）試料容器

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

下限値が確保できるものを用いる。

#### (オ) 採泥操作

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

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

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

#### (3) 生物

##### (ア) 生物種の選定

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

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

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

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

・海産貝類：ムラサキイガイ、マガキ、アサリ

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

#### （イ）採捕時期

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

#### （ウ）試料容器

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

#### （エ）採捕器具と方法

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

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

### 3 運搬・保存方法

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

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

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

## 4 試料調製

水質試料は、原則として懸濁物質を含む試料を分析する。

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

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

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

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

## 5 野外および試料に関するデータの記録

### (1) 野外データ

次の事項を参考に、試料採取に先立ち様式を決めて、野外データを記録する。

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

### (2) 試料データ

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

データは試料調製に併せて測定、整理し、記録することが望まれる。

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

## 6 参考資料

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

## ．分析法

### ．ヘキサクロロフェンの分析法

#### 1 対象物質

本分析法の対象物質を表 1 に示す。

表 1 対象物質

項目番号	物質名	Cas.No.	水溶解度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Log Pow
239	ヘキサクロロフェン	70-30-4	140	7.54

#### 2 目標検出下限及び定量下限値

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

表 2 目標とする検出下限値

項目番号	物質名	水質 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	底質 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	生物 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
239	ヘキサクロロフェン	0.02	5	10

#### 3 分析法の概要

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

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

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

前処理液は、必要に応じてフロリジルカラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、非孔性グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィーによる精製を

行ったのち、ジアゾメタンによりメチル化を行い、測定用の内標準物質を添加して、GC/MSで同定・定量を行う。

なお、濃度の算出は測定用内標準物質との相対検量線に基づく。

## 4 試薬、器具及び装置

### (1) 試薬

- ・標準物質：純度 97%以上の試薬であって測定の妨害となる成分を含有しないもの、または既知濃度に調製した標準液。純品は個別に必要量を精秤して、アセトンで 1,000 ~ 2,000 µg/mL の標準原液を調製する。
- ・内標準物質：フルオランテン-d<sub>10</sub> または同様の用途に供することができる標準物質。これらは個別に必要量を精秤し、ヘキサンに溶解して 1,000 ~ 2,000 µg/mL の標準原液を調製する。
- ・試薬、溶媒類：無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどの試薬類、ヘキサン、アセトン、ジクロロメタン、メタノールなどの溶媒類は、原則として残留農薬試験用の純度を用い、あらかじめ測定を妨害する成分が無いことを確認する。

### ・ジアゾメタン・アセトン溶液

ジエチルエーテル管( )	ジエチルエーテル	30 mL
ジアゾメタン発生管( )	ジエチレングリコールモノエチルエーテル	10 mL
	10N 水酸化カリウム水溶液	5 mL
反応管( )	アセトン	50 mL

*N*-メチル-*N*-ニトロソ-4-トルエンスルホン酸アミド 3 g をジエチルエーテル 10 mL に溶かし、ジアゾメタン発生管( )に入れ、ジエチルエーテル管( )を通して窒素ガスを 5 分間穏やかに通す。発生したジアゾメタンを反応管( )に通じてアセトンに捕集したものを使用する。

- ・精製水：超高純度水（蒸留水を超純水製造装置で精製したもの）であって、妨害成分を含まないもの。必要に応じて、ジクロロメタンで洗浄して用いる。
- ・窒素ガス：高純度窒素 1 級（純度 99.999%以上）を用い、配管に活性炭や水分吸収剤を装着する。
- ・固相抽出用カートリッジカラム：ODS またはポリスチレン系樹脂などを充填したもの。これらは、使用前に溶出溶媒及び精製水で十分に洗浄する。（注 1）

- ・5%含水シリカゲル：カラムクロマト用シリカゲル（注2）を130 で15時間加熱活性化した後、95 gを300 mLの共栓（透明摺）付き三角フラスコにステンレス製ロートを用いて秤量し、密栓してデシケーター内で室温まで冷却する。シリカゲルを攪拌しながら、5 mLのホールピペットを用いて精製水を滴下して含水させ、密栓して発熱が終了するまで静かに混合する。更に、振とう器で30分間振とうした後、デシケータ（乾燥剤：シリカゲル）中に15時間以上保存したものを使用する。
- ・フロリジル：130 で12時間程度加熱処理する。
- ・グラファイトカーボンカートリッジカラム：容量3 mL程度のカラムに非孔性グラファイトカーボンを0.2~0.3 g充てんしたもの（注3）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、あらかじめ操作条件の検討を要する。

## （2）器具及び装置

- ・ガラス器具：試料瓶、分液ロート、共栓付試験管、クロマトグラフ管、濃縮フラスコ、遠沈管、メスシリンダー、メスフラスコ、ホールピペット、駒込ピペット、パス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。
- ・振とう機。
- ・固相抽出装置：加圧型。流量コントロールの可能なもの（注4）。
- ・濃縮器：ロータリーエバポレーター（恒温槽付き）。窒素吹き付けによる濃縮装置（注5）または同等の性能を有するもの。
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー（注6）、超高速万能ホモジナイザー（注7）、攪拌分散器（注8）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、あらかじめアセトン、ヘキサン等でよく洗浄したもので、容量1 L程度の

共栓またはねじ栓つき褐色硬質ガラス瓶を用い、氷冷して実験室へ持ち帰る。分析操作は可能な限り速やかに行う。やむを得ず保管が必要な場合は、1~2日を限度として冷暗所(4)に置く。

#### (2) 底質試料

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

#### (3) 生物試料

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

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

## 6 試験操作

### (1) 前処理

#### (ア) 水質試料

##### 固相抽出法(注1)

固相抽出カラムは、あらかじめジクロロメタン、メタノール、精製水の各10 mLでコンディショニング(注9)する。試料水500 mLを10~20 mL/minの速度で通水し対象物質を捕集する。通水終了後、固相抽出カラムに高純度窒素を通気して乾燥させる(注10)。ジクロロメタン5 mLで対象物質を溶出させ(注9)、無水硫酸ナトリウムで脱水した後(注11)、窒素気流下で約1 mLまで濃縮して試料前処理液とする(注12)。

##### 溶媒抽出法

試料水1 Lに50 gの塩化ナトリウムと100 mLのジクロロメタンを加えて10分間振とう

する。ジクロロメタン抽出液を分取して、さらに 100 mL のジクロロメタンで振とう抽出を繰り返し、抽出液を併せる。抽出液にヘキサン 100 mL を加えて無水硫酸ナトリウムで脱水する。脱水した抽出液は、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で約 1 mL まで濃縮して試料前処理液とする（注 12）。

#### （イ）底質試料

湿泥 20 g を共栓付遠心沈殿管に採り、アセトン 50 mL を加え密栓して 10 分間振とうする。アセトン抽出液は、遠心分離（3,000 rpm、10 分）して 1 L 容分液ロートに分取する。この分液ロートにはあらかじめ塩化ナトリウム 25 g、精製水 500 mL を入れておく。遠心分離の残渣にはアセトン 50 mL を加えてさらに 10 分間振とうして、遠心分離を行い、アセトン抽出液を先の分液ロートに併せる。アセトン抽出液を入れた分液ロートにジクロロメタン 100 mL を加えて 10 分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を分取、水層にジクロロメタン 100 mL を加えて同様の操作を繰り返し、抽出液を併せる。ジクロロメタン抽出液には、ヘキサン 100 mL を加え、無水硫酸ナトリウムで脱水、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で約 1 mL まで濃縮して試料前処理液とする（注 12）。

#### （ウ）生物試料

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

次いで、メタノール/ヘキサン分配によって抽出液から脂質成分を除く操作を行う。メタノール抽出液を入れた 1 L 容の分液ロートにメタノール飽和ヘキサン 50 mL を加え、5 分間激しく振とうする。静置後、下層のメタノール層は別の 1 L 容分液ロートに移し、ヘキサン層は捨てる。メタノール層は、メタノール飽和ヘキサン 50 mL を加え、5 分間激しく振とうして静置し、下層のメタノール層を先の 1 L 容分液ロートに移す。この分液ロートに精製水 5 mL を加えて、緩やかに攪拌、暫時静置する。メタノール層の上部にヘキサンが分離した後、メタノール層を別の 1 L 容分液ロートに移し、5% 塩化ナトリウム水溶液 500 mL を加えて混合、さらにジクロロメタン 100 mL を加え 10 分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を分取し、水層にジクロロメタン 100 mL を加えて振とう抽出を繰り返

し、ジクロロメタン層を先の抽出液に併せる。ジクロロメタン抽出液には、ヘキサン 100 mL を加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で約 1 mL に濃縮して試料前処理液とする（注 12）。

## （ 2 ） 試料液の調製

### （ア）水質試料

前処理液はジアゾメタンによりメチル化を行った後、測定用内標準溶液（フルオランテン-d<sub>10</sub> を 10 µg/mL の濃度に調製したヘキサン溶液）を 20 µL（固相抽出法の場合は 10 µL）添加し、窒素気流下で 1.0 mL に定容（固相抽出法の場合は 0.5 mL）して GC/MS 測定する。測定を妨害する物質が共存する場合は、前処理液を後述するフロリジルまたはシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、溶出液を下記「（ 3 ）ジアゾメタンによるメチル化」に示す方法によりメチル化した後に、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 13）。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、5% アセトン含有ヘキサン 50 mL、10% アセトン含有ヘキサン 50 mL を順次、1 滴/秒程度の速度で通してカラムを洗浄する。次いで 30% アセトン含有ヘキサン 60 mL を同様の速度で流下させて目的物質を溶出させる。

これらの溶出液において、なお着色が著しく、不揮発性夾雑物が測定の妨害となる恐れがある場合は、非孔性グラファイトカーボンを 0.2 ~ 0.3 g 充てんしたカートリッジカラム（注 3）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% アセトン含有ヘキサン 5 mL で溶出し、この間の溶出液は全量を試験管に受ける。これらの溶出液は合せ、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で 1 mL まで濃縮する。この濃縮液を下記「（ 3 ）ジアゾメタンによるメチル化」に示す方法によりメチル化した後に、測定用内標準溶液（10 µg/mL ヘキサン溶液）を 20 µL 添加し、1.0 mL に定容して GC/MS 測定を行う。

#### (ウ) 生物試料

生物試料の前処理液はカラムクロマトグラフィーによる精製を行う。精製操作は底質と同様であり、溶出液は濃縮して下記「(3) ジアゾメタンによるメチル化」に示す方法によりメチル化した後に、測定用内標準溶液(10 µg/mL ヘキサン溶液)を20 µL 添加後1.0 mL に定容して、GC/MS 測定を行う。

#### (3) ジアゾメタンによるメチル化

1 mL 以下に濃縮した試料液にジアゾメタン・アセトン溶液を黄色が残るまで加え、1時間放置する。窒素気流下で約1 mL まで濃縮して前処理液とする(注12)。

#### (4) 空試験液の調製

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

#### (5) 添加回収試験液の調製

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

#### (6) 標準液の調製

検量線作成用標準液、測定用内標準溶液を調製する。検量線作成用標準液は、その原液をジアゾメタンによりメチル化した後、ヘキサンで希釈して0~1.0 µg/mL の範囲で5段階以上個別に調製する。測定用内標準溶液は、フルオランテン-d<sub>10</sub> をヘキサンで希釈して10 µg/mL の濃度に調製する。

#### (7) 測定

##### (ア) GC/MS 測定条件

GC/MS 測定条件の一例を参考として示す。これを参考にして適宜設定する。

##### (a) ガスクロマトグラフ部

- ・ 試料注入部：スプリットレス、オンカラム、昇温気化方式などの非分割方式のもの。
- ・ キャピラリーカラム：5%フェニルメチルシリコン系、内径 0.2～0.3 mm、長さ 20～30 m、膜厚 0.2～0.3 $\mu$ m。
- ・ キャリヤーガス：純度 99.999% 以上の高純度ヘリウム、流速 1 mL/min、線速度 35 cm/sec。
- ・ カラム恒温槽：50（1 min）（30 /min） 200（10 /min） 300。
- ・ 注入口温度：220。

(b) 質量分析部

イオン化法：電子衝撃イオン化 (EI) 法、イオン化電圧 70 eV

イオン源温度：230

インタフェース温度：250

イオン検出法：選択イオンまたは全イオン検出

(c) 測定イオン

対象物質および内部標準物質の検出に設定する測定イオンを表 3 に示した。

表 3 5%フェニルメチルシリコン系 GC カラムの溶出順位と測定イオン

項目番号	物質名	質量数	モニタ - イオン m/z		
			定量	確認	
IS	フルオランテン-d <sub>10</sub>	212.14	212	-	-
239	ヘキサクロロフェン - メチル	434.9	189	191	223

(イ) 検量線

(a) 標準液の測定

各濃度段階の検量線作成用標準液 (0～1.0  $\mu$ g/mL の範囲で 5 段階以上) の 1.0 mL にそれぞれに測定用内標準溶液 (10  $\mu$ g/mL) を 20  $\mu$ L 添加する。この標準液系列は、標準物質を 0～1.0  $\mu$ g/mL、測定用内標準物質を 0.2  $\mu$ g/mL の濃度で含み、1 濃度段階の 1 または 2  $\mu$ 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

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

#### (ウ) 試料液の測定

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

## 7 同定、定量及び計算

### (1) 同定

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

### (2) 定量

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

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

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

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

- (注1) ジーエルサイエンス社製 RP-1 または同等の性能を持つもの。この他にも充填剤としては C<sub>18</sub> 系、ポリマー系（スチレンジビニルベンゼン共重合体）、形状としてはシリンジ型、ディスク型など多数の固相吸着剤がある。固相吸着法では、コンディショニングの条件、試料の吸着速度、カラムの乾燥条件、溶出溶媒の種類や量などにより回収率が異なることがあるので、これらの諸条件も含めてあらかじめ添加回収テストを行ったのち使用する必要がある（備考1）。
- (注2) 和光純薬社製ワコーゲル C-200 など（備考1）。
- (注3) スペルコ社製 ENVI-Carb（250 mg/6 mL）など（備考1）。
- (注4) ウォーターズ社製セップパックコンセントレーターまたは同等の性能を持つもの（備考1）。
- (注5) Zymark 社製 Turbo Vap 、 Turbo Vap LV など（備考1）。
- (注6) KINEMATICA 社製ポリトロンなど（備考1）。
- (注7) マイクロテック・ニチオン社製ヒスコトロンなど（備考1）。
- (注8) IKA 社製ウルトララックスなど（備考1）。
- (注9) コンディショニング及び対象物質の溶出は 1～2 mL/min（1～2 滴/sec）の流速で行う。
- (注10) 高純度窒素は約 1 L/min の流速で約 20 分間通気した。乾燥が不十分な場合は、カートリッジカラムからジクロロメタンとともに水が溶出し、脱水が必要となる。また、過剰に通気しすぎると吸着していた対象物質が失われる可能性がある。
- (注11) 無水硫酸ナトリウムを充填したカートリッジカラム（Sep-Pak Dry）を吸着カラムに直結して溶出する方法もある。この場合、あらかじめジクロロメタン 5 mL でコンディショニングが必要。吸着カラムの乾燥が十分な場合はこの操作を省略してもよい（備考1）。
- (注12) 乾固しないよう注意する。
- (注13) 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。

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

## 参考文献

- 1) 愛知県環境調査センター：ヘキサクロロフェン、ビスフェノール A，pp195-213，「平成 7 年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部環境安全課（平成 8 年 6 月）
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課：置換ベンゼン類、有機酸エステル類、有機リン酸エステル類及び農薬類の分析法，p81-99，「平成 12 年度要調査項目等調査マニュアル」(平成 12 年 12 月)
- 3) 環境省環境管理局水環境部水環境管理課：農薬類及びニトロベンゼン類の分析法，pp229-242，「平成 13 年度要調査項目等調査マニュアル」(平成 14 年 3 月)

分析法フローチャート

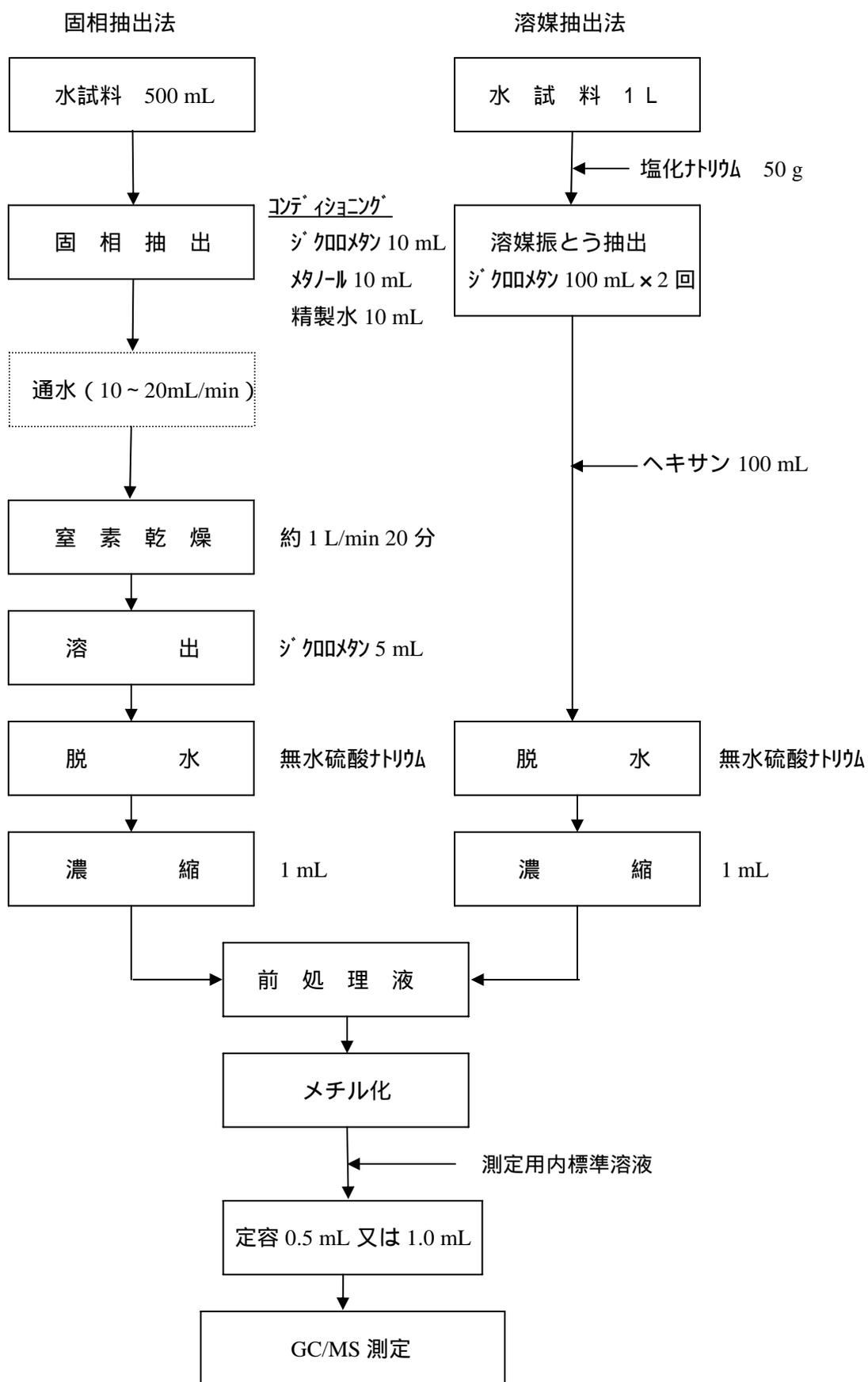


図 1 水試料の分析操作手順

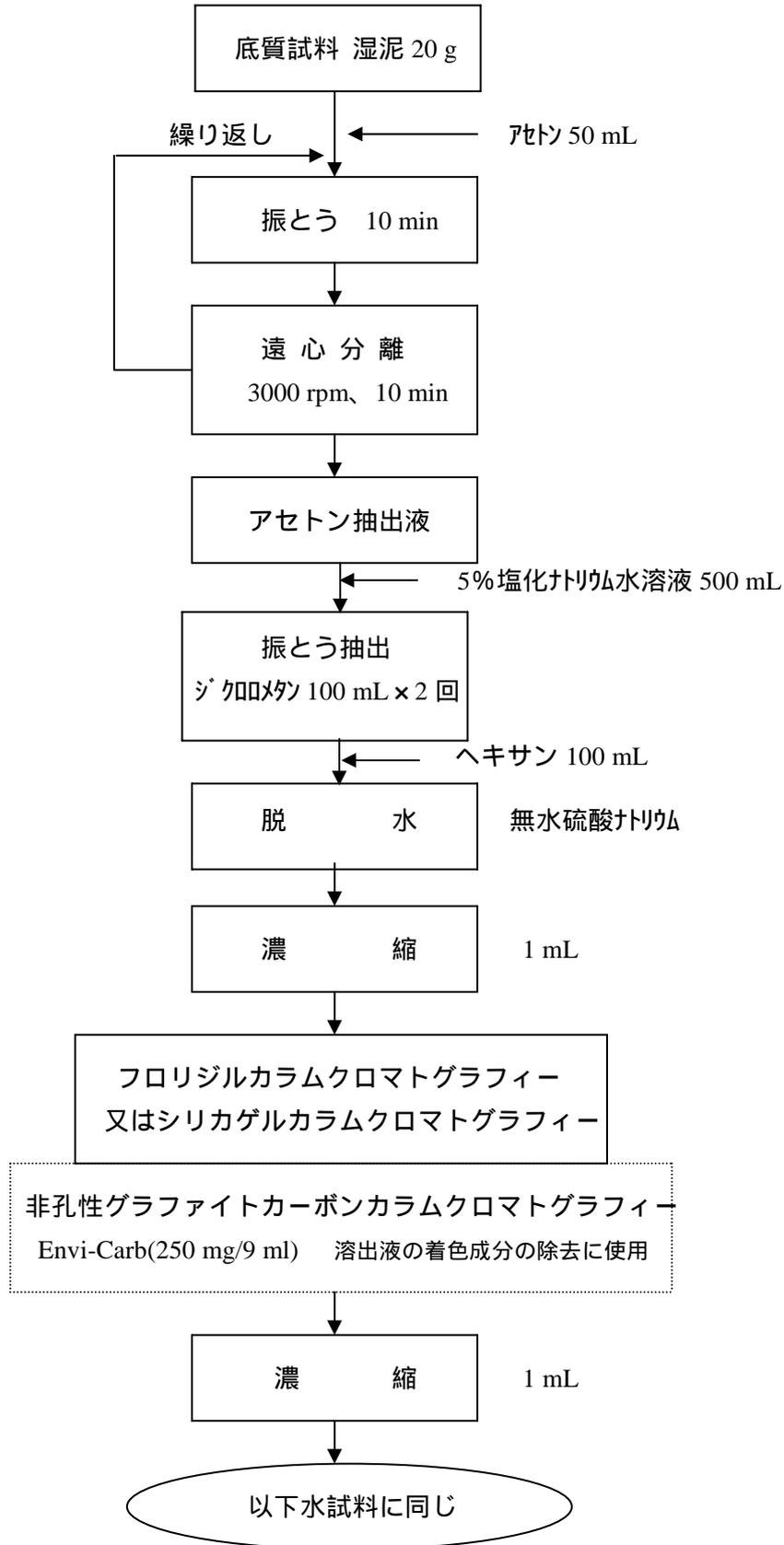


図2 底質試料の分析操作手順

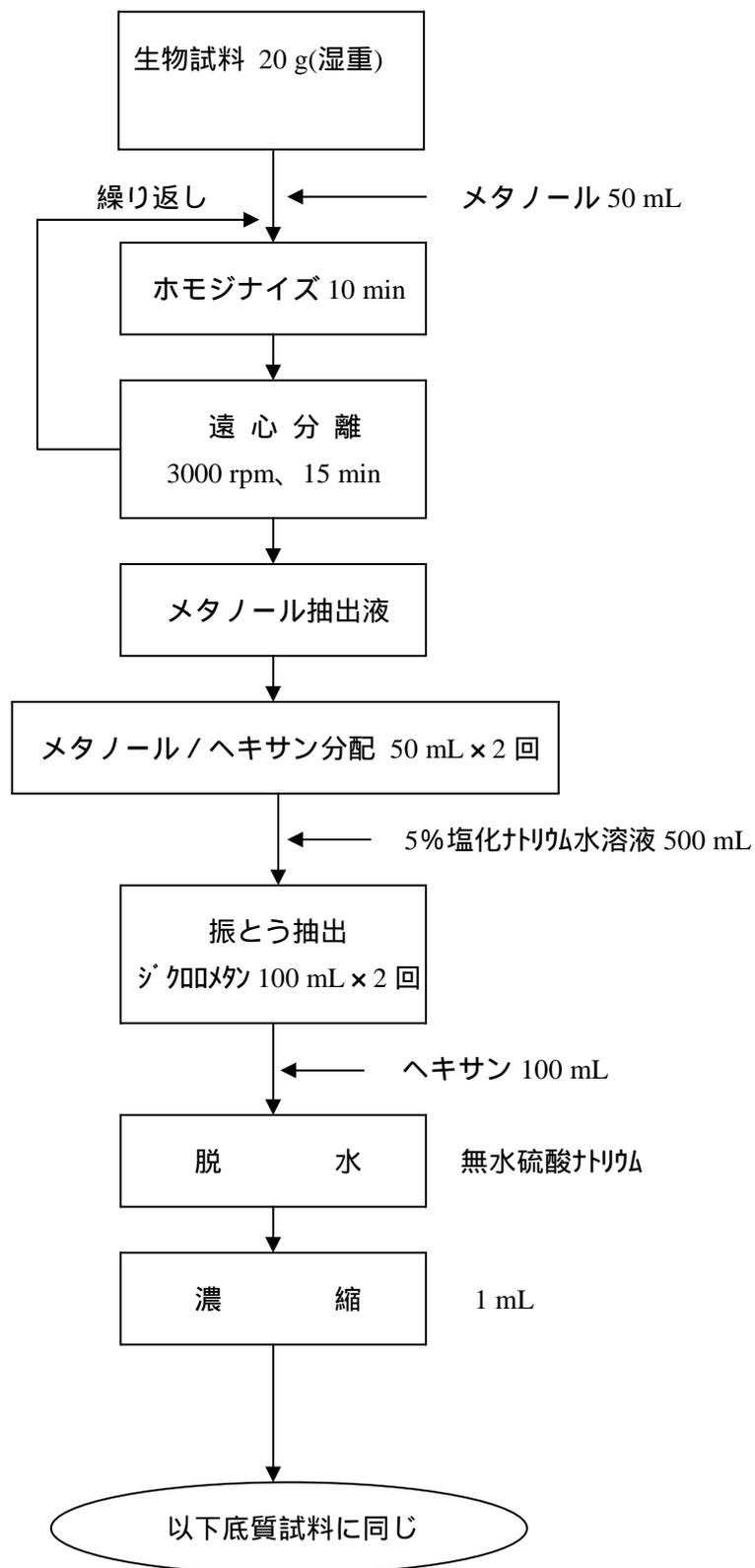


図3 生物試料の分析操作手順

## ．アシュラム及びベンスリドの分析法

### 1 対象物質

本分析法の対象物質を表 1 に示す。

表 1 対象物質

項目番号	物質名	Cas.No.	水溶解度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log Pow
8	アシュラム	3337-71-1	5,000	- 0.27
250	ベンスリド	741-58-2	25	4.20

### 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を表 2 に示す。目標定量下限値はその 3 倍である。

表 2 目標とする検出下限値

項目番号	物質名	水質 ( $\mu\text{g/L}$ )	底質 ( $\mu\text{g/kg}$ )	生物 ( $\mu\text{g/kg}$ )
8	アシュラム	0.01	3	5
250	ベンスリド	0.01	3	5

### 3 分析法の概要

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

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

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

前処理液は、必要に応じてフロリジルカラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムク

ロマトグラフィー、非孔性グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィーによる精製を行い濃縮したのち精製水に溶解し、LC/MS により分析する。

## 4 試薬、器具及び装置

### (1) 試薬

- ・標準物質：純度 97%以上の試薬であって測定の妨害となる成分を含有しないもの、または既知濃度に調製した標準液。純品は個別に必要な量を精秤して、アセトニトリルで 1,000 ~ 2,000 µg/mL の標準原液を調製する。
- ・精製水：超高純度水（蒸留水を超純水製造装置で精製したもの）であって、妨害成分を含まないもの。必要に応じて、ジクロロメタンで洗浄して用いる。
- ・窒素ガス：高純度窒素 1 級（純度 99.999%以上）を用い、配管に活性炭や水分吸収剤を装着する。
- ・固相抽出用カートリッジカラム：N 化合物含有ポリマー系（スチレンジビニルベンゼン共重合体）(注 1)
- ・5%含水シリカゲル：カラムクロマト用シリカゲル(注 2)を 130 で 15 時間加熱活性化した後、95 g を 300 mL の共栓（透明摺）付き三角フラスコにステンレス製ロートを用いて秤量し、密栓して室温まで冷却する。シリカゲルを攪拌しながら、5 mL のホールピペットを用いて精製水を滴下して含水させ、密栓して発熱が終了するまで静かに混合する。更に、振とう器で 30 分間振とうした後、デシケータ（乾燥剤:シリカゲル）中に 15 時間以上保存したものを使用する。
- ・フロリジル：130 で 12 時間程度加熱処理する。
- ・グラファイトカーボンカートリッジカラム：容量 3 mL 程度のカラムに非孔性グラファイトカーボンを 0.2 ~ 0.3 g 充てんしたもの、または同等品（注 3）。使用に先立ち、トルエン、アセトン、ジクロロメタン、ヘキサンによる洗浄が不可欠である。
- ・シリカゲルカートリッジカラム、フロリジルカートリッジカラム：充てんカラムの代替として利用することができるが、あらかじめ操作条件の検討を要する。

### (2) 器具及び装置

- ・ガラス器具：試料瓶、分液ロート、共栓付試験管、クロマトグラフ管、濃縮フラスコ、遠沈管、メスシリンダー、メスフラスコ、ホールピペット、駒込ピペット、パスツ

ルピペットなど。使用に先立ち、精製水や有機溶媒で十分に洗浄する。

- ・振とう機。
- ・固相抽出装置：加圧型。流量コントロールの可能なもの（注4）。
- ・濃縮器：ロータリーエバポレーター（恒温槽付き）。窒素吹き付けによる濃縮装置（注5）または同等の性能を有するもの。
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー（注6）、超高速万能ホモジナイザー（注7）、攪拌分散器（注8）または同等品。
- ・超音波抽出器：超音波洗浄器または同等品。
- ・液体クロマトグラフ/質量分析計（LC/MS）

## 5 試料の採取・運搬

### （1）水質試料

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

### （2）底質試料

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

### （3）生物試料

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

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

## 6 試験操作

### (1) 前処理

#### (ア) 水質試料

##### 固相抽出法(注1)

固相抽出カラムは、あらかじめアセトニトリル、メタノール、精製水の各 10 mL でコンディショニング(注9)する。試料水 500 mL に 1 N 塩酸 1 mL を加えて pH を約 3.5 に調製し、10~20 mL/min の速度で通水して対象物質を捕集する。通水終了後、固相抽出カラムに高純度窒素を通気して乾燥させる(注10)。アセトニトリル 5 mL で対象物質を溶出させ(注9) 窒素気流下で 0.5 mL まで濃縮して前処理液とする(注11)。

##### 溶媒抽出法

試料水 1 L に 50 g の塩化ナトリウムと 100 mL のジクロロメタンを加えて 10 分間振とうする。ジクロロメタン抽出液を分取して、さらに 100 mL のジクロロメタンで振とう抽出を繰り返し、抽出液を併せる。抽出液にヘキサン 100 mL を加えて無水硫酸ナトリウムで脱水する。脱水した抽出液は、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で 1 mL まで濃縮して前処理液とする(注11)。

#### (イ) 底質試料

湿泥 20 g を共栓付遠心沈殿管に採り、アセトン 50 mL を加え密栓して 10 分間振とうする。アセトン抽出液は、遠心分離(3,000 rpm、10 分)して 1 L 容分液ロートに分取する。この分液ロートにはあらかじめ塩化ナトリウム 25 g、精製水 500 mL を入れておく。遠心分離の残渣にはアセトン 50 mL を加えてさらに 10 分間振とうして、遠心分離を行い、アセトン抽出液を先の分液ロートに併せる。アセトン抽出液を入れた分液ロートにジクロロメタン 100 mL を加えて 10 分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を分取、水層にジクロロメタン 100 mL を加えて同様の操作を繰り返し、抽出液を併せる。ジクロロメタン抽出液には、ヘキサン 100 mL を加え、無水硫酸ナトリウムで脱水、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で 1 mL まで濃縮して前処理液とする(注11)。

#### (ウ) 生物試料

細切し均一化した湿組織 20 g にメタノール 50 mL を加え、10 分間ホモジナイザーで攪

拌し対象物質を抽出する。攪拌後、3,000 rpm で 15 分間遠心分離して、メタノール抽出液を 1 L 容分液ロートに分取する。遠心分離の残渣にはメタノール 50 mL を加えて、同様の操作を行い、抽出液を併せる。

次いで、メタノール/ヘキサン分配によって抽出液から脂質成分を除く操作を行う。メタノール抽出液を入れた 1 L 容の分液ロートにメタノール飽和ヘキサン 50 mL を加え、5 分間激しく振とうする。静置後、下層のメタノール層は別の 1 L 容分液ロートに移し、ヘキサン層は捨てる。メタノール層は、メタノール飽和ヘキサン 50 mL を加え、5 分間激しく振とうして静置し、下層のメタノール層を先の 1 L 容分液ロートに移す。この分液ロートに精製水 5 mL を加えて、緩やかに攪拌、暫時静置する。メタノール層の上部にヘキサンが分離した後、メタノール層を別の 1 L 容分液ロートに移し、5%塩化ナトリウム水溶液 500 mL を加えて混合、さらにジクロロメタン 100 mL を加え 10 分間振とうする。静置後、ジクロロメタン層を分取し、水層にジクロロメタン 100 mL を加えて振とう抽出を繰り返し、ジクロロメタン層を先の抽出液に併せる。ジクロロメタン抽出液には、ヘキサン 100 mL を加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターまたは窒素気流下 40 以下で 1 mL に濃縮し、前処理液を得る（注 11）。

## （ 2 ） 試料液の調製

### （ア）水質試料

前処理液は窒素気流下で乾固直前まで濃縮し、精製水（0.1%ギ酸）に溶解して 1.0 mL に定容（固相抽出法の場合は 0.5 mL）し、LC/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、精製水（0.1%ギ酸）に溶解して LC/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 12）。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 及び 5%アセトン含有ヘキサン 50 mL を 1 滴/秒程度の速度で通し、カラムを洗浄する。その後、10%アセトン含有ヘキサン 50 mL を 1 滴/秒程度の速度で通し、アシュラムを溶出させる。次いで 30%アセトン含有ヘキサン

30mLを同様の速度で流下させてベンスリドを溶出させる。

これらの溶出液において、なお着色が著しく、不揮発性夾雑物が測定の妨害となる恐れがある場合は、非孔性グラファイトカーボンを0.2~0.3 g 充てんしたカートリッジカラム（注3）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、窒素気流下40以下で乾固直前まで濃縮し、精製水（0.1%ギ酸）に溶解して1.0 mLに定容し、LC/MS測定する。

#### （ウ）生物試料

生物試料の前処理液はカラムクロマトグラフィーによる精製を行う。精製操作は底質と同様であり、溶出液は窒素気流下40以下で乾固直前まで濃縮し、精製水（0.1%ギ酸）に溶解して1.0 mLに定容し、LC/MS測定する。

#### （3）空試験液の調製

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

#### （4）添加回収試験液の調製

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

#### （5）標準液の調製

検量線作成用混合標準液、測定用内標準混合溶液を調製する。検量線作成用混合標準液は、その原液を精製水（0.1%ギ酸）で希釈して0~1.0 µg/mLの範囲で5段階以上個別に調製する。

#### （6）測定

## (ア) LC/MS 測定条件

LC/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) 高速液体クロマトグラフ部

- ・ カラム：ODS 系、内径 2.1 mm、長さ 150 mm , 5  $\mu$ m
- ・ カラム恒温槽温度：40
- ・ 移動相 A：水 (0.1 % ギ酸)
- ・ 移動相 B：アセトニトリル
- ・ グラジエント：5 %B (0 min) 95 %B (20 min) 95 %B (30 min)
- ・ 注入量：50  $\mu$ L

### (b) 質量分析部

- ・ 検出モード：ESI positive
- ・ 乾燥ガス圧力：0.2 MPa
- ・ ネブライザーガス：1.5 mL/min
- ・ EM：1.7Kv
- ・ 測定質量数：230.9 , 272.1 (アシュラム) , 398.1 , 356.0 (ベンスリド)

## (イ) 検量線

### (a) 標準液の測定

各濃度段階の検量線作成用混合標準液 (0 ~ 1.0  $\mu$ g/mL の範囲で 5 段階以上) の標準液系列を、1 濃度段階の一定量を最低 3 回 LC/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

各標準物質の対応する濃度と強度の関係を XY プロットし、検量線を作成する。この時、各濃度段階における標準物質毎の強度比の変動が 5 % 以内であることを確認する。

## (ウ) 試料液の測定

実試料、空試験あるいは添加回収試験から得られた試料液を 1.0 mL (固相抽出法にあつ

ては 0.1mL) に定容し、LC/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、対象物質のピーク強度の比から、検量線により定量する。

## 7 同定、定量及び計算

### (1) 同定

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

### (2) 定量

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

$$C_t(\mu\text{g}/\text{l}, \mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{RF_t}{V_s(\text{l}, \text{kg})}$$

ここで、 $C_t$  : 対象物質の試料中濃度 ( $\mu\text{g}/\text{L}$  または  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、 $RF_t$  : 濃度、 $V_s$  : 分析への試料採取量 (L または kg)。

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

(注1) ジーエルサイエンス社製 PLS-3 または同等の性能を持つもの。このほかにも N 化合物含有ポリマー系が使用可能である。固相吸着法では、コンディショニングの条件、試料の吸着速度、カラムの乾燥条件、溶出溶媒の種類や量などにより回収率が異なることがあるので、これらの諸条件も含めてあらかじめ添加回収テストを行ったのち使用する必要がある (備考1)。

(注2) 和光純薬社製ワコーゲル C-200 など (備考1)。

(注3) スペルコ社製 ENVI-Carb (250 mg/6 mL) など (備考1)。

(注 4) ウォーターズ社製セップパックコンセントレーターまたは同等の性能を持つもの  
(備考 1)。

(注 5) Zymark 社製 Turbo Vap 、 Turbo Vap LV など (備考 1)。

(注 6) KINEMATICA 社製ポリトロンなど (備考 1)。

(注 7) マイクロテック・ニチオン社製ヒスコトロンなど (備考 1)。

(注 8) IKA 社製ウルトラタラックスなど (備考 1)。

(注 9) コンディショニング及び対象物質の溶出は 1~2 mL/min (1~2 滴/sec) の流速で行う。

(注 10) 高純度窒素は約 1 L/min の流速で約 20 分間通気した。過剰に通気しすぎると吸着していた対象物質が失われる可能性がある。

(注 11) 乾固しないよう注意する。

(注 12) 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。

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

## 参考文献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課：置換ベンゼン類、有機酸エステル類、有機リン酸エステル類及び農薬類の分析法，p81-99，「平成 12 年度要調査項目等調査マニュアル」(平成 12 年 12 月)
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課：農薬類及びニトロベンゼン類の分析法，pp229-242，「平成 13 年度要調査項目等調査マニュアル」(平成 14 年 3 月)

分析法フローチャート

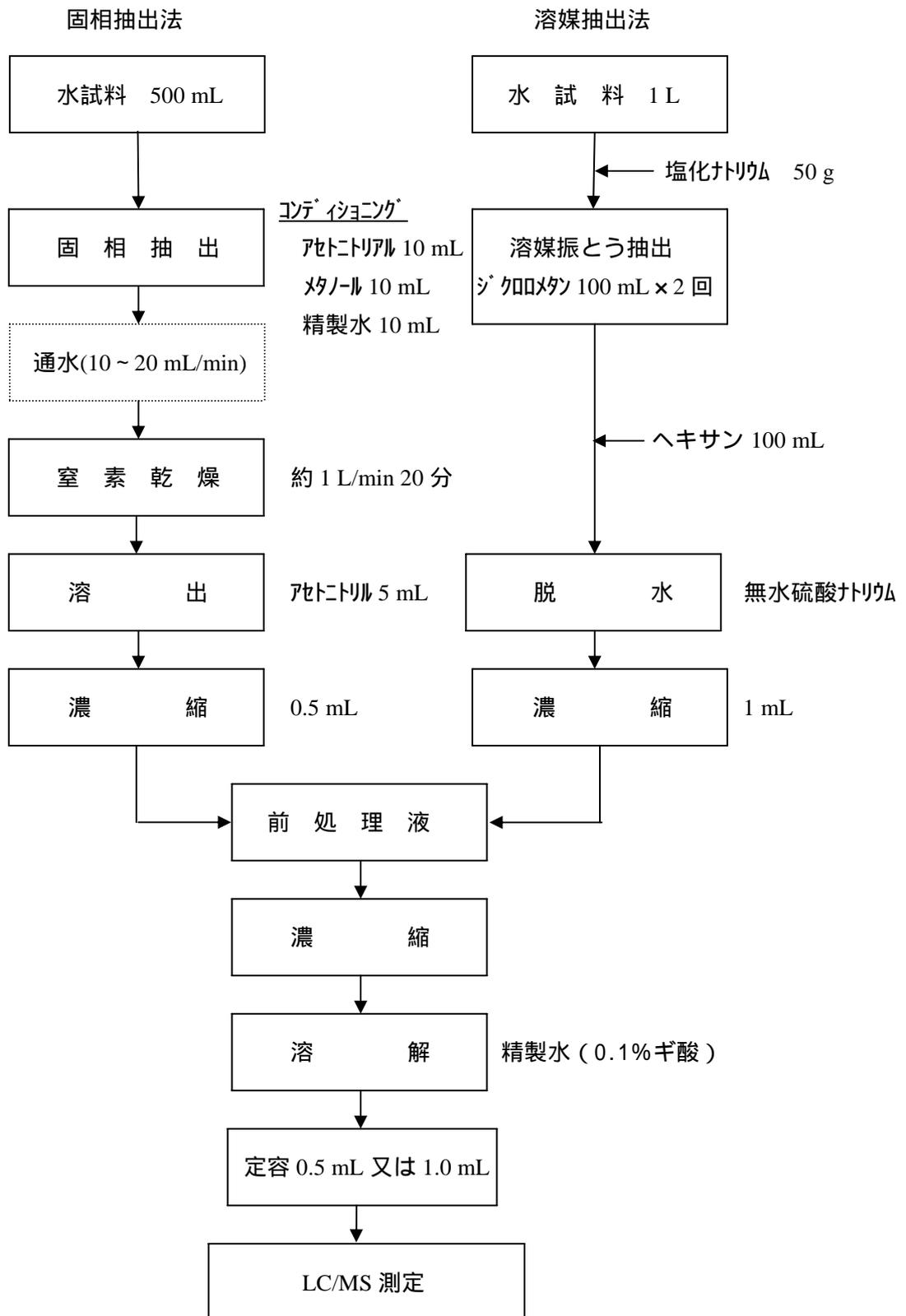


図 1 水試料の分析操作手順

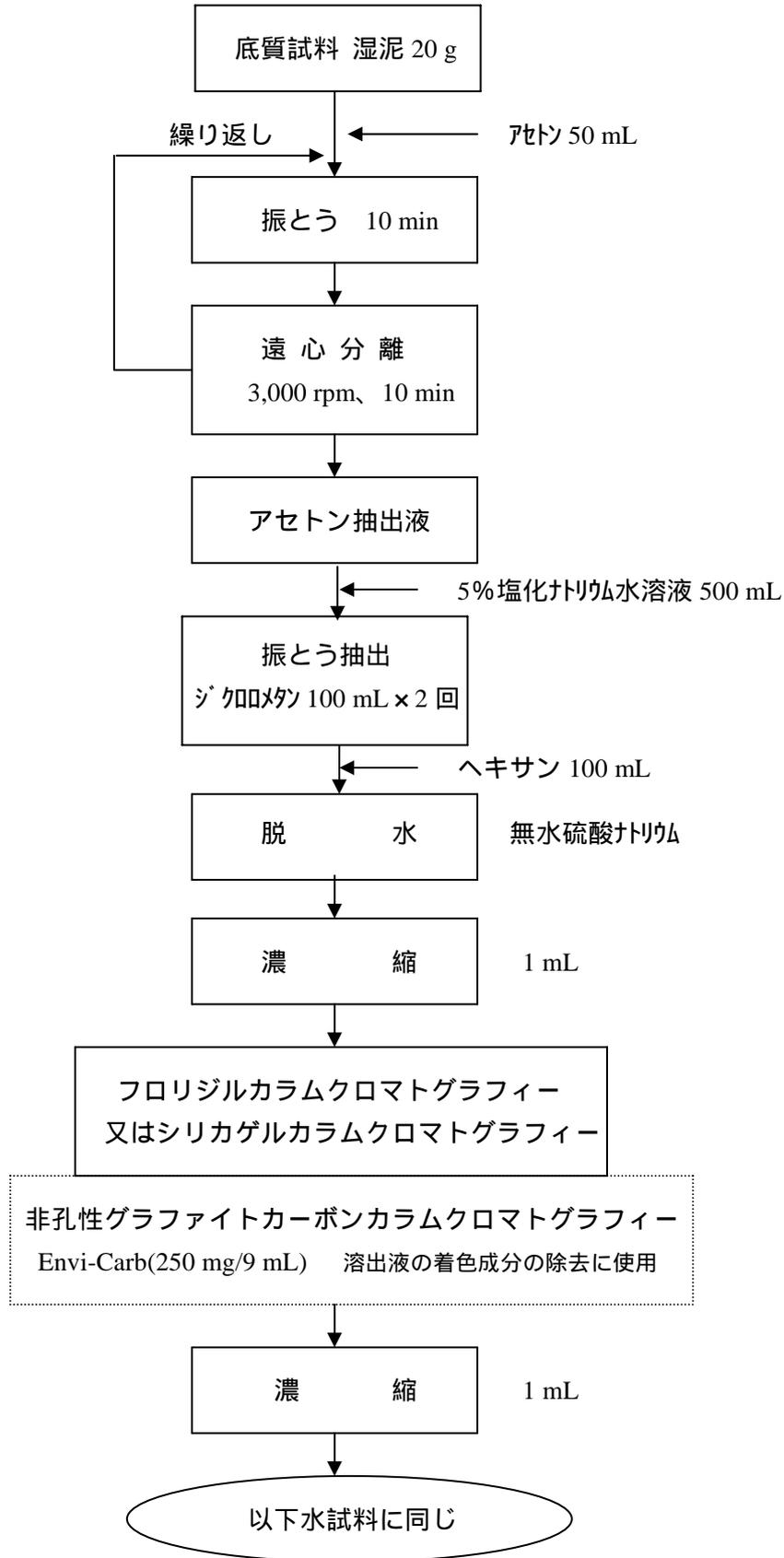


図2 底質試料の分析操作手順

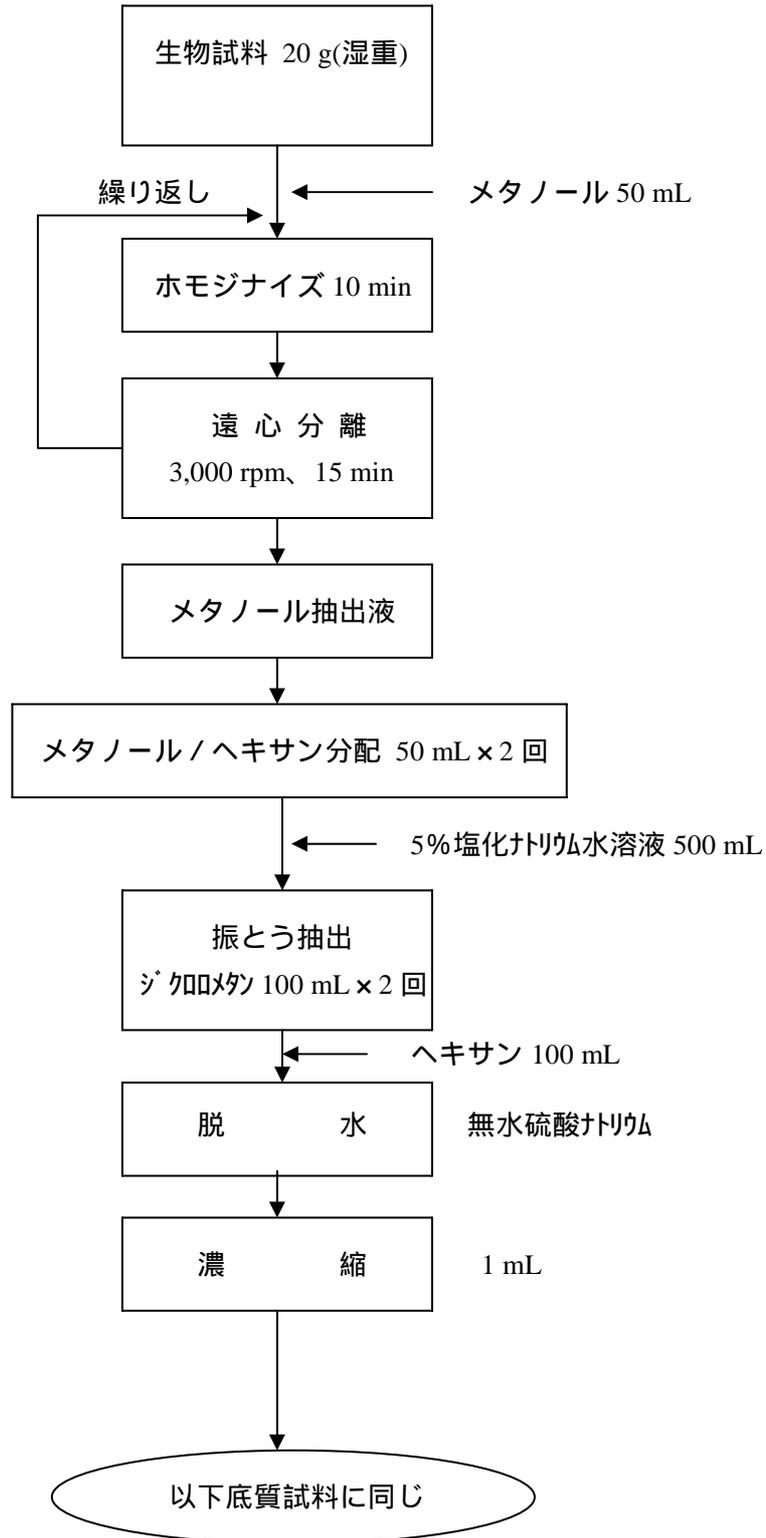


図3 生物試料の分析操作手順

## 2 - ブタノン、イソバレルアルデヒドの分析法

### 1 対象物質

2 - ブタノン、イソバレルアルデヒド

### 2 目標検出下限値及び定量下限値（注1）

	水質（ $\mu\text{g/L}$ ）		底質（ $\mu\text{g/kg}$ ）		生物（ $\mu\text{g/kg}$ ）	
	100 mL		10 g		10g	
目標検出・定量下限値	検出	定量	検出	定量	検出	定量
2 - ブタノン	2.00	4.00	10.00	20.00	10.00	20.00
イソバレルアルデヒド	0.20	0.60	1.00	3.00	1.00	3.00

### 3 分析法の概要

水質試料は *o*-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン塩酸塩（PFBOA）を用いて対応するオキシムに誘導体化した後、ヘキサンで抽出し、この誘導体化生成物を GC/MS-SIM で定量する。

底質試料は精製水で振とう抽出後、遠心分離で得られた上澄液を水質試料と同様に処理する。

生物試料は精製水を用いてホモジナイズ抽出後、遠心分離後で得られた上澄み液を固相抽出にかけて疎水性有機物等を除去した後、ろ液を水質試料と同様に処理する。

### 4 試薬、器具及び装置

#### （1）試薬

- ・対象物質（2 - ブタノン、イソバレルアルデヒド）：市販特級品
- ・サロゲート物質（ブタノン- $d_5$ ）：市販品
- ・内部標準物質（ナフタレン- $d_8$ 、ビフェニル- $d_{10}$ ）：市販標準品
- ・誘導体化試薬 PFBOA：特別規格品または市販特級品（注2）
- ・PFBOA 溶液（1 mg/mL）：PFBOA 100 mg を精製水 100 mL に溶かし、この PFBOA 溶液を更に水質分析用ヘキサン 50 mL で2回洗浄したもの（注3）。

- ・ 固相カートリッジカラム（注4）
- ・ アセトン：残留農薬試験用。
- ・ ヘキサン、メタノール：水質分析用（注3）。
- ・ 無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用。
- ・ 塩化ナトリウム：特級品の塩化ナトリウムを 400 で 6 時間強加熱後、汚染のないところで放冷したもの。
- ・ 硫酸：重金属用
- ・ チオ硫酸ナトリウム：試薬特級品。
- ・ 18N 硫酸：濃硫酸と精製水を 1：1 で混合したもの。
- ・ 精製水（注10）：目的物質の分析に影響のないもの。

## （2）器具及び装置（注5）

- ・ ねじ口瓶：容量 200 mL で、ポリテトラフルオロエチレン張りのねじ口キャップをしたガラス瓶（注5）。
- ・ パスツールピペット：容量 2 mL 強のもの。
- ・ 透明摺り合わせまたは SPC 共栓付分液ロート：容量 200 mL のもの。
- ・ 透明摺り合わせまたは SPC 共栓付遠沈管：容量 200 mL のもの。
- ・ 透明摺り合わせまたは SPC 共栓付試験管：容量 10 mL のもの。
- ・ 乾燥器：ガラス器具等の乾燥に使用する。
- ・ 振とう器：水質試料及び底質試料の抽出に用いる。
- ・ 遠心分離器：抽出液の分離に使用する。
- ・ ホモジナイザー：生物試料の抽出に用いる。
- ・ 固相抽出用器具（カートリッジ、ろ過・濃縮装置、注射器等）
- ・ 電気炉：塩化ナトリウムの焼成に使用する。
- ・ GC/MS：GC はキャピラリーカラム対応のもの。MS は二重収束型もしくは四重極型のもの。

## 5 試料の採取・運搬

### （1）水質試料

水質試料については、洗剤、水、アセトンで洗浄したねじ口瓶を試料水で 2～3 回共洗い

した後、試料水を泡立てないように採水し、満水にして直ちに密栓し、直ちに試験を行う。直ちに試験できないときは、冷暗所(4 )に保存し、速やかに試験する。なお、残留塩素が含まれている場合は、採水時に残留塩素 1 mg に対してチオ硫酸ナトリウムを 0.01 ないし 0.02 g の割合で加える。

## (2) 底質試料

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

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

## 6 試験操作(注7)

### (1) 測定試料液の調製

#### (ア) 水質試料

試料水 100 mL を透明摺り合わせ分液ロート 200 mL に採取し、サロゲート標準液(5~20 µg)(注8)を加え、さらに PFBOA 水溶液 6 mL を加え、緩やかに振った後、2 時間静置する。この溶液に 18N 硫酸 1.6 mL を加えてよくかき混ぜ、5 分間静置する。これにより、過剰の PFBOA を分解し、更に塩化ナトリウム 40 g と内部標準液(50 mg/L) 20 µL を加えた後、ヘキサン 10 mL で 10 分間振とう抽出を行う(注9)。ヘキサン抽出液を透明摺り合わせ試験管 10 mL に移し、無水硫酸ナトリウムで脱水したヘキサンを測定試料液とする。

#### (イ) 底質試料

底質試料 10 g(湿重量)を透明摺り合わせ遠沈管 100 mL に採り、サロゲート標準液(5~20 µg)(注8)を加え、さらに精製水 50 mL を加え 15 分間振とう抽出する。次に 3,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上澄液を透明摺り合わせ分液ロート 200 mL に入れる。残渣に精製水 50 mL を加えて、同様の操作を行い、上澄液を先の分液漏斗ロートに合わせる。以下、水質試料と同様の操作を行い、測定試料液とする。

なお、誘導体化試薬分解後の振とう抽出で、水質試料ではエマルジョンができないが、底質試料ではエマルジョンができる場合がある。エマルジョンができた場合には凍結分離を行い、ヘキサン層と水層を分離する。

#### (ウ) 生物試料

生物試料 10 g を透明摺り合わせ遠沈管 100 mL に採り、サロゲート標準液(5 ~ 20 µg)(注 8)を加え、さらに精製水 50 mL を加え、氷水で冷却しながら 5 分間ホモジナイズ抽出する。次に 3,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上澄液を取り出す。残渣に精製水 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コンディショニング済みの固相カートリッジ(注 4)に通水し、このろ液を透明摺り合わせ分液ポートに入れる。このろ液を水質試料と同様の操作(注 9)を行い、測定試料液とする。

なお、誘導体化試薬分解後の振とう抽出で、生物試料ではエマルジョンができるので、凍結分離を行い、ヘキサン層と水層を分離する。

#### (2) 空試験液の調製

水質試料は 100 mL、底質・生物試料は 10 mL の精製水(注 10)を用いて「(1) 測定試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。

#### (3) 添加回収試験液の調製

水質試料では任意の試料水 100 mL、底質・生物試料では任意の試料 10 g に検出下限の 10 倍量の混合標準液を添加し、充分混合する。60 分以上放置した後、「(1) 測定試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

#### (4) 標準液の調製(注 11)

各標準物質、サロゲート物質(ブタノン-d<sub>5</sub>)、内部標準物質はそれぞれ 50 mg を精秤してメタノールで正確に 50 mL とし、1,000 µg/mL の各標準原液、サロゲート標準原液、内部標準原液を調製する。

混合標準液は各標準原液をメタノールで段階的に希釈し、2.0 ~ 25.0 µg/mL の範囲で 5 点以上調製する。内部標準液(50 µg/mL)はメタノールを用いて、内部標準原液を希釈して調製する。これらの標準原液及び標準液は暗所-20 で保存する。

#### (5) 測定

(ア) GC/MS の測定条件

- ・使用カラム：5%フェニルメチルシリコン（注12）

長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm

- ・カラム槽温度：45（2分）- 5 /分 - 220 - 10 /分 - 290（5分）
- ・注入法：スプリットレス法
- ・注入温度：240
- ・キャリアーガス：ヘリウム(99.999vol%以上)であって、定流量型では1 mL /分、定圧型では線速度が30～60 cm/秒
- ・パージ開始時間：1.0分
- ・イオン化法：EI法（注13）
- ・イオン化電圧：70 eV
- ・モニターイオン（注14）

2-ブタン PFBOA M/Z：181 ,( 250 )

イソバレルアルデヒド PFBOA M/Z：181 ,( 239 )

サロゲート物質

2-ブタン-d<sub>5</sub> PFBOA M/Z：186

内部標準物質

ナフタレン-d<sub>8</sub> M/Z：136

ビフェニル-d<sub>10</sub> M/Z：164

( )：確認イオン

(イ) 検量線の作成

検量線は水質試料では、混合標準液（2.0～25.0 μg/mL、5段階以上）100 μL、更にサロゲート標準液（5～20 μg）（注8）を精製水（注10）100 mL の入った透明摺り合わせ分液ロートに入れ、底質・生物試料でも、混合標準液（2.0～25.0 μg/mL、5段階以上）100 μL、更にサロゲート標準液（5～20 μg）（注8）を精製水（注10）10 mL の入った透明摺り合わせ遠沈管に入れ、「（1）測定試料液の調製」に従って操作を行い、検量線の試料液を調製する。この検量線の試料液1 μL を GC/MS に注入し、2-ブタノンはブタノン PFBOA の示すピーク面積（又は高さ）とブタノン-d<sub>5</sub> PFBOA のピーク面積（又は高さ）の比から、イソバレルアルデヒドはその標準物質 PFBOA の示すピーク面積（又は高さ）と内部標準物

質のピーク面積（又は高さ）の比から検量線を作成する。

#### （ウ）試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収試験液を注入して測定を行う。一定時間毎に検量線用の中間濃度の試料液を注入し、期待値の20%以内の変動であることを確認する。もし、20%を越えていればGC/MSを再調製後、検量線を作成し直して測定を行う。

### 7 同定、定量及び計算

#### （1）同定

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

#### （2）定量及び計算

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

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

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

（ここでの検出量とは試料液中に存在する対象物質の全量である。）

### 8 分析精度管理

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

の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

## 9 注意事項

(注 1) 使用するキャピラリーカラムの種類、膜厚、内径、長さにより、対象物質の検出下限値が異なる。

(注 2) 誘導体化試薬 PFBOA の特別規格品として、和光純薬の特別規格品等がある(備考 1)。

(注 3) 本溶液は使用の都度調製し、冷暗所に保存する。

未処理の PFBOA は水質分析用ヘキサンを使用して処理するが、使用する水質分析用ヘキサンが測定対象物質に汚染されていないことを確認すること。

処理済みの PFBOA が市販されているが、測定対象物質に汚染されていないことを確認すること。

(注 4) 逆相系固相カートリッジカラムとして、ウォーターズ社製のセップパックプラス PS-2、HLB 等がある(備考 1)。

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、精製水 40 mL を順に通してコンディショニングする。

(注 5) ガラス器具類は洗浄し、測定対象物質の汚染のない実験室で加熱乾燥、放冷したもの。

(注 5) 一例として、水質分析用の空き瓶 200 mL を加熱乾燥して使用。

(注 7) 実験室内の空気が測定対象物質等で汚染されている場合には、窓を開け、外気を換気して、定量に影響を与えないことを確認してから分析を行う。

(注 8) 感度は使用する GC/MS、キャピラリーカラム等により、また対象物質により、異なるので、分析者が添加量を決めて一定量を加える。

(注 9) 特に生物試料では、ヘキサン抽出液はエマルジョンになっているので、分液漏斗ごと -20 の冷凍庫に入れ、凍らせる。これを室温解凍後、ヘキサン層を採取する。

(注 10) 目的物質の分析に影響のない市販品のミネラルウォーターも可能である。

(注 11) 2-ブタノン(2-ブタンオン)はサロゲート物質が市販されているのでサロゲート法で行う。サロゲート物質が未市販のイソバレルアルデヒドは内部標準法であるが、市販されたらサロゲート法に切り換えることを推奨する。

(注 12) 一例として、DB-5、または SPB-5 (備考 1)。

高压注入方式 (別名: PTV 方式) の GC/MS の条件の例を示す。

カラム: Ultra 1 25 m × 0.20 mm × 0.33 μm

カラム温度: 40 (2 分) - 9 /分 - 190 (0 分) - 15 /分 - 260 (2.67 分)

カラム圧力: 60 Kpa(0 分) - 280 Kpa/分 - 280 Kpa(1 分) - -280 Kpa/分 - 80 Kpa(0 分)  
- 9 Kpa/分 - 160 Kpa(0 分) - 6 Kpa/分 - 220 Kpa(2.25 分) - 11 Kpa/分 -  
240 Kpa(2.79 分)

MS オンタイム: 9.0 分 MS オフタイム: 15.0 分

注入温度: 250 インターフェイス温度: 270 注入量: 3 μL

(注 13) 十分な感度が得られる場合には SIM 測定の代わりにスキャン測定でもよい。

(注 14) 2 - ブタンの PFBOA 誘導体はシン型とアンチ型の幾何異性体の混合物となるため、それぞれの異性体のピーク面積 (ピーク高さ) の和を使用する。なお、それぞれ異性体の濃度比を求め、数値化法で行うことは更に望ましい。

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

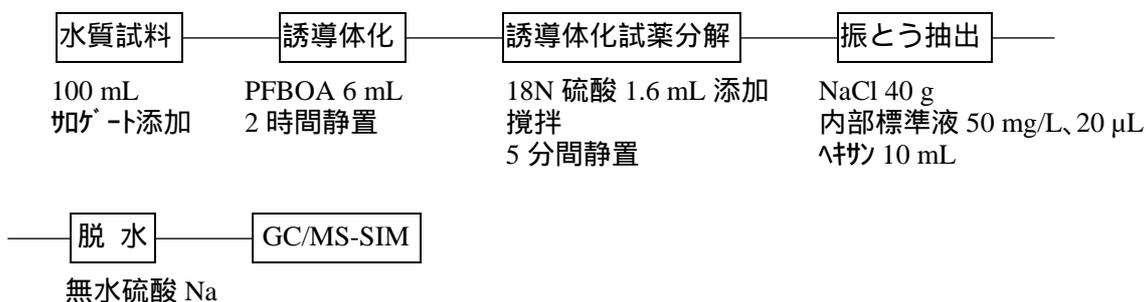
## 参考文献

- 1) 東京都立衛生研究所: 2-ブタノン、4-メチル-2-ペンタノン, pp172-185, 「平成 6 年度化学物質分析法開発調査報告書」, 環境庁環境保健部環境安全課 (平成 7 年 6 月)
- 2) Glaze, W.H., Koga, M. and Cancilla, D.: Ozonation byproducts. 2. Improvement of an aqueous-phase derivatization method for the detection of formaldehyde and other carbonyl compounds formed by the ozonation of drinking water. *Environ.Sci.Technol.*, **23**, 838-847 (1989)
- 3) Bao., M-L., Pantani, F., Griffini, O., Burrini, D., Santianni, D. and Barbieri, K.: Determination of carbonyl compounds in water by derivatization-solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis. *J.Chromatogr. A*, **809**, 75-87 (1998)
- 4) Cancho, B., Ventura, F. and Galceran, T.: Determination of aldehydes in drinking water using pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and solid-phase microextraction.

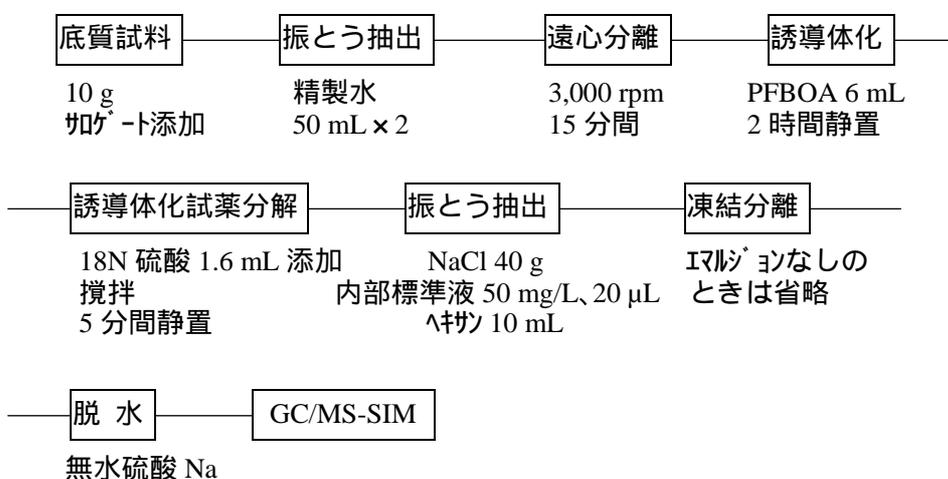
*J.Chromatogr. A*, **943**, 1-13 (2002)

## 分析フローチャート

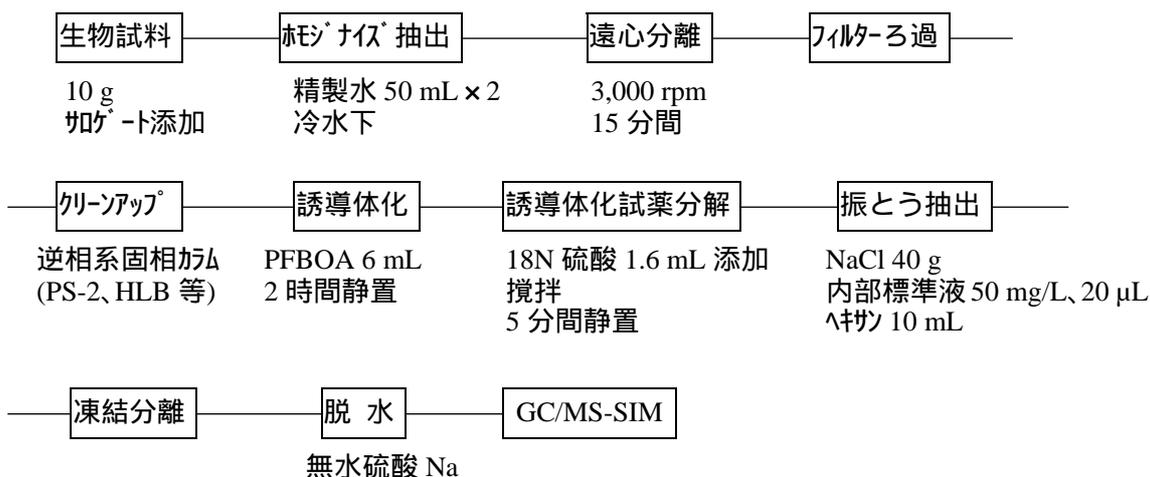
### 水質試料



### 底質試料



### 生物試料



## ・モルホリンの分析法

### 1 対象物質

モルホリン

### 2 目標検出下限値及び定量下限値（注1）

	水質（ $\mu\text{g/L}$ ）		底質（ $\mu\text{g/kg}$ ）		生物（ $\mu\text{g/kg}$ ）	
	500 mL		50 g		10 g	
目標検出・定量下限値	検出	定量	検出	定量	検出	定量
モルホリン	0.02	0.10	0.30	1.0	1.0	3.0

### 3 分析法の概要

水質試料はベンゼンスルホニルクロリドを用いて、ベンゼンスルホニル化し、塩酸で pH 5.5 に調整し、ジクロロメタン抽出する。この抽出液を濃縮した後、更にシリカゲルカラムでクリアップ後、この誘導体化生成物を GC/MS-SIM で定量する。

底質試料は精製水を加えて蒸留後、水質試料と同様な操作を行い定量する。生物試料はアセトニトリルで抽出し、このアセトニトリル抽出液を酸性下の塩化ナトリウム溶液に溶かした後、酢酸エチルで洗浄する。その塩化ナトリウム溶液に精製水を加えて蒸留し、水質試料と同様な操作を行い定量する。

### 4 試薬、器具及び装置

#### （1）試薬

- ・対象物質（モルホリン）：市販特級品
- ・サロゲート物質（*n*-ヘキシルアミン）：市販特級品
- ・内部標準物質（フルオランテン- $\text{d}_{10}$ ）：市販標準品
- ・誘導体化試薬（ベンゼンスルホニルクロリド）：市販特級品
- ・アセトン、ジクロロメタン、メタノール、ヘキサン、アセトニトリル、酢酸エチル：残留農薬試験用。
- ・無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用。

- ・塩化ナトリウム：特級品の塩化ナトリウムを 400 で 9 時間強加熱後、汚染のないところで放冷したもの。
- ・硫酸、塩酸、水酸化ナトリウム：市販特級品
- ・精製水、またはミネラルウォーター：目的物質の分析に影響のないもの。
- ・5%含水シリカゲル：透明摺り合わせ共栓付き三角フラスコにカラムクロマトグラフ用シリカゲルを入れ、130 で 16 時間加熱後、密栓して室温まで放冷する。このシリカゲルを攪拌しながら、シリカゲル 95 g に対して精製水 5 mL を滴下する。密栓し、発熱が終了するまで、静かに混合する。更に振とう器で 30 分振とう後、乾燥剤としてシリカゲルを入れたデシケーター中で 15 時間以上放置する。  
なお、試薬会社から 5%含水フロリジルが市販されている。
- ・5%含水シリカゲルカラム：内径 1 cm のガラスカラムに 5%含水シリカゲル 5 g を、ヘキサンを用いて湿式充填し、この上部に無水硫酸ナトリウムを 2 cm 積層したもの。

## ( 2 ) 器具及び装置

- ・ねじ口瓶：容量 500 ~ 1,000 mL で、ポリテトラフルオロエチレン張りのねじ口キャップをしたガラス瓶（注 2）
- ・パスツールピペット：容量 2 mL 強のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付平底フラスコ：容量 700 mL（特注品）のもの。
- ・透明摺り合わせ蒸留フラスコ及び冷却管一式：容量 1000 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付分液ロート：容量 300 mL、及び 1 L のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付遠沈管：容量 200 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付試験管：容量 10 mL、及び 500 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC ナス型フラスコ：容量 300 mL、及び 100 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付三角フラスコ：容量 300 mL のもの。
- ・透明摺り合わせまたは SPC 共栓付メスフラスコ：容量 100 mL、及び 50 mL のもの。
- ・カラムクロマト管：内径 1 cm、長さ 20 ~ 30 cm のもの。
- ・乾燥器：ガラス器具等の乾燥及びシリカゲルの活性化に使用する。
- ・振とう器：底質試料からの抽出に用いる。
- ・マグネチックスターラー及び磁気攪拌子(テフロン被膜)：ベンゼンスルホン化に使用する。

- ・ポリトロン型ホモジナイザー：生物試料からの抽出に用いる。
- ・遠心分離器：底質及び生物試料の固液分離に使用する。
- ・ロータリーエバポレータ濃縮装置：抽出液の濃縮に用いる。
- ・電気炉：塩化ナトリウムの焼成に使用する。
- ・GC/MS：GC はキャピラリーカラム対応のもの。MS は二重収束型もしくは四重極型のもの。

## 5 試料の採取・運搬

### (1) 水質試料

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

### (2) 底質試料及び生物試料

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

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

## 6 試験操作

### (1) 前処理液の調製

#### (ア) 水質試料

試料水 500 mL を攪拌子の入った透明摺り合わせ平底フラスコ 700 mL に採取し、サロゲート標準液(100 µg/mL) 2 µL を加える。更に 10M 水酸化ナトリウム 20 mL、ベンゼンスルホニルクロリド(BSC) 5 mL を加え(注3) 栓をした後、スターラーで 30 分間攪拌し、BSC 誘導体化物を生成する(注4)。このフラスコに 10M 水酸化ナトリウム 25 mL を加えた後、水浴 80 に入れて、30 分間攪拌し、過剰の BSC を分解する。その後、冷水で冷やした後、冷却しながら 18.5% 塩酸で pH 5.5 に調整する。

この水溶液を透明摺り合わせ分液ロート 1 L に移し、ジクロロメタン 100 mL を加えて約 10 分間振とうした後、十分に静置したジクロロメタン層を透明摺り合わせ分液ロート 300 mL に採取する。水相に再度ジクロロメタン 100 mL を加え同様な振とう抽出を行い、ジクロロメタン層を先の透明摺り合わせ分液ロートに合わせる。この分液ロートに 0.05M 炭酸ナトリウム 40 mL を加え、ジクロロメタン層を洗浄する。このジクロロメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、透明摺り合わせナス型フラスコ 300 mL に移し、ロータリーエバポレータを用いて、水浴を加熱せずに約 10 mL 弱まで減圧濃縮する（注 5）。このジクロロメタン濃縮液を透明摺り合わせ試験管 10 mL に移し、窒素ガスを吹き付けて約 0.5 mL に濃縮する（注 6）。この濃縮液にヘキサン約 10 mL を加え、窒素ガスを吹き付けて約 0.50 mL に濃縮し（注 6）ヘキサンに転溶し、これを前処理液とする。

但し、次の「(2) 測定試料液の調製」を省略する場合、即ちクリンアップ省略の場合、ヘキサン転溶前のジクロロメタン濃縮液約 0.5 mL をさらに 0.25 mL まで濃縮し（注 6）内部標準液（10  $\mu\text{g/mL}$ ）を正確に 2.5  $\mu\text{L}$  加え、測定試料液とする。

#### (イ) 底質試料

試料 50 g を透明摺り合わせ蒸留フラスコ 1 L に採り、サロゲート標準液（100  $\mu\text{g/mL}$ ）2  $\mu\text{L}$  を加え、更に精製水 500 mL、水酸化ナトリウム 3 g 及びシリコンオイルを加えて、6M 硫酸 4 mL を吸収液とし、470 mL 蒸留する（注 7）。この蒸留液を撈拌子の入った透明摺り合わせ平底フラスコ 700 mL に移し、10M 水酸化ナトリウム 20 mL、BSC 5 mL を加え（注 3）栓をした後、スターラーで 30 分間撈拌し、BSC 誘導体化物を生成する（注 4）。以下水質試料の過剰の BSC を分解以後の操作を行い、前処理液とする。

#### (ウ) 生物試料

生物試料は 10 g を透明摺り合わせ遠沈管 200 mL に採取し、サロゲート標準液（100  $\mu\text{g/mL}$ ）2  $\mu\text{L}$  を加え、更にアセトニトリル 50 mL を加え、約 5 分間ポリトンホモジナイザーでホモジナイズする。遠心分離（3,000 rpm、10 分間）により、上澄みのアセトニトリル層を透明摺り合わせ分液ロート 500 mL に入れる。残査に、更にアセトニトリル 50 mL を加え、同様の操作を行い、上澄みのアセトニトリル層を先の分液ロートに合わせる。

このアセトニトリル層の入った分液ロートに 5% 塩化ナトリウム溶液 200 mL を加え、更に 6M 硫酸 0.5 mL を加えて酸性にした後、酢酸エチル 50 mL を加え 10 分間振とうする。

静置後、水層を透明摺り合わせ蒸留フラスコ 1 L に移し、精製水 260 mL、水酸化ナトリウム 3 g を加えて、6M 硫酸 4 mL を吸収液とし、470 mL 蒸留する（注 7）。この蒸留液を攪拌子の入った透明摺り合わせ平底フラスコ 700 mL に移し、10M 水酸化ナトリウム 20 mL、BSC 5 mL を加え(注 3)、栓をした後、スターラーで 30 分間攪拌し、BSC 誘導体化物を生成する（注 4）。以下水質試料の過剰の BSC を分解以後の操作を行い、前処理液とする。

#### （ 2 ）測定試料液の調製（水質試料、底質試料及び生物試料）

前処理液及びその前処理液の入った試験管を洗った少量のヘキサン、このヘキサン液を 5% 含水シリカゲルカラムに負荷し、2% 酢酸エチル含有ヘキサンを毎分 1 mL 強で 50 mL 流し、この 2% 酢酸エチル含有ヘキサン溶出液を捨てる。引き続き、2% 酢酸エチル含有ヘキサンが断続せずに、20% 酢酸エチル含有ヘキサン 50 mL を 1 mL 強/分の速度で流して、モルホリン BSC 誘導体化物を透明摺り合わせ共栓三角フラスコ 200 mL に溶出させる（注 8）。

この溶出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、透明摺り合わせナス型フラスコ 200 mL に移し、ロータリーエバポレータを用いて、水浴を加熱せずに約 10 mL 弱まで減圧濃縮する。このジクロロメタン濃縮液を透明摺り合わせ試験管 10 mL に移し、窒素ガスを吹き付けて 0.25 mL に濃縮する。この濃縮液に内部標準液（10 µg/mL）を正確に 2.5 µL 加え、測定試料液とする。

#### （ 3 ）空試験液の調製

水質は 500 mL、底質は 50 mL、生物は 10 mL の精製水を用いて「（ 1 ）前処理液の調製」及び「（ 2 ）測定試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を空試料液とする。

#### （ 4 ）添加回収試験液の調製

水質試料では任意の試料水 500 mL、底質試料では任意の試料 50 g、生物試料では任意の試料 10 g に検出下限の 10 倍量の標準液を添加し、充分混合する。60 分以上放置した後、「（ 1 ）前処理液の調製」及び「（ 2 ）測定試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

#### （ 5 ）標準液の調製

モルホリン標準物質、フルオランテン-d<sub>10</sub> 内部標準物質、*n*-ヘキシルアミンサロゲート標準物質(注9)はそれぞれ 50 mg を精秤してメタノールで正確に 50 mL とし、1,000 µg/mL の標準原液を調製する。

モルホリン標準液は標準原液をメタノールで段階的に希釈し、0.02 ~ 1.0 µg/mL の範囲で 5 点以上調製する。サロゲート標準液 (100 µg/mL) 及び内部標準液 (10 µg/mL) はメタノールを用いて、それぞれの標準原液を希釈して調製する。これらの標準原液及び標準液は暗所-20 で保存する。

## (6) 測定

### (ア) GC/MS の測定条件

- ・使用カラム：5%フェニルメチルシリコン(注10)

長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 µm

- ・カラム槽温度：45 (2分) - 5 /分 - 220 - 10 /分 - 290 (5分)

- ・注入法：スプリットレス法
- ・注入温度：240
- ・キャリアーガス：ヘリウム (99.999 vol%以上) であって、定流量型では 1 mL / 分、定圧型では線速度が 30 ~ 60 cm/秒
- ・パーズ開始時間：1.0 分
- ・イオン化法：EI 法(注11)
- ・イオン化電圧：70 eV
- ・モニターイオン

モルホリン BSC M/Z : 227 , (184)

#### サロゲート物質

*n*-ヘキシルアミン BSC M/Z : 170 , (241)

#### 内部標準物質

フルオランテン-d<sub>10</sub> M/Z : 212

( ): 確認イオン

### (イ) 検量線の作成

検量線は水質試料では、モルホリン標準液 (0.02 ~ 1.0 µg/mL) 1 mL 及び *n*-ヘキシルアミ

ンサロゲート標準液 (100 µg/mL) 2 µL を精製水 500 mL の入った透明摺り合わせ平底フラスコ 700 mL に入れ、更に 10M 水酸化ナトリウム 20 mL、ベンゼンスルホニルクロリド (BSC) 5 mL を加えた誘導体化以後の操作を行い、検量線の標準液を調製する。

一方、底質試料では、モルホリン標準液 (0.02 ~ 1.0 µg/mL) 1 mL 及び *n*-ヘキシルアミンサロゲート標準液 (100 µg/mL) 2 µL を精製水 50 mL の入った透明摺り合わせ蒸留フラスコに入れ、更に精製水 500 mL、水酸化ナトリウム 3 g 及びシリコンオイルを加えた蒸留以後の操作を行い、検量線の標準液を調製する。

また生物試料では、モルホリン標準液 (0.02 ~ 1.0 µg/mL) 1 mL 及び *n*-ヘキシルアミンサロゲート標準液 (100 µg/mL) 2 µL を精製水 10 mL 入った透明摺り合わせ遠沈管に入れ、更にアセトニトリル 50 mL 加えたホモジナイズ以後の操作を行い、検量線の標準液を調製する。

この検量線の標準液 2 µL を GC/MS に注入し、モルホリン BSC の示すピーク面積 (又は高さ) と *n*-ヘキシルアミン BSC のピーク面積 (又は高さ) の比から検量線を作成する。

#### (ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収試験液を注入して測定を行う。一定時間毎に検量線用の中間濃度の試料液を注入し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし、20% を越えていれば GC/MS を再調製後、検量線を作成し直して測定を行う。

## 7 同定、定量及び計算

### (1) 同定

モルホリン BSC 及び *n*-ヘキシルアミン BSC の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間の ±5 秒以内に出現し、また定量イオンと確認イオンのピーク強度比が予想値の ±20% 以下であれば、対象物質が存在すると見なす。

### (2) 定量及び計算

試料液 2 µL を GC/MS に注入し、モルホリン BSC の示すピーク面積 (又は高さ) と *n*-ヘキシルアミン BSC のピーク面積 (又は高さ) の比から検量線により検出量を求める。次に検出量、分析した試料量等から、次式により試料中の濃度を計算する。なお、底質の試

料量は乾燥試料量とする。

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

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

(ここでの検出量とは試料液中に存在する対象物質の全量である。)

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

(注1) 使用するキャピラリーカラムの種類、膜厚、内径、長さにより、検出下限値が異なる。また試料中の夾雑物及び使用機器により、検出下限値が異なる。

(注2) 一例として、残留農薬分析用の空き瓶 1,000 mL を加熱乾燥して使用。

(注3) 水酸化ナトリウムの添加量が多くなるにつれ、ベンゼンスルホニルクロリド誘導体化の生成率が少しずつ低下する傾向が見られる。

(注4) 攪拌速度により異なるが、反応時間が 30 分以上長くなるにつれ、ベンゼンスルホニルクロリド誘導体化の生成率が多少低下する傾向が見られる。

(注5) 濃縮を 5 mL 以下にすると、損失することがあるので、5 mL 以下にしないこと。

(注6) 窒素ガス吹き付けで濃縮する時、乾固させないこと。乾固すると、水質試料ではキーパー量が少ないので、顕著に損失する。

(注7) モルホリンは留出速度が遅いので、できるだけ多く蒸留する必要があった。今回 470 mL としたが、蒸留量と回収率を確認すること。

(注8) 予め 5% 含水シリカゲルカラムクロマトにおける、モルホリンの溶離パターンを確認すること。

(注9) モルホリンの同位体サロゲート物質が市販されたら、これに換えること。

(注 10) 一例として、DB-17，または HP-50+ (備考 1)。

(注 11) 十分な感度が得られる場合には SIM 測定の代わりにスキャン測定でもよい。

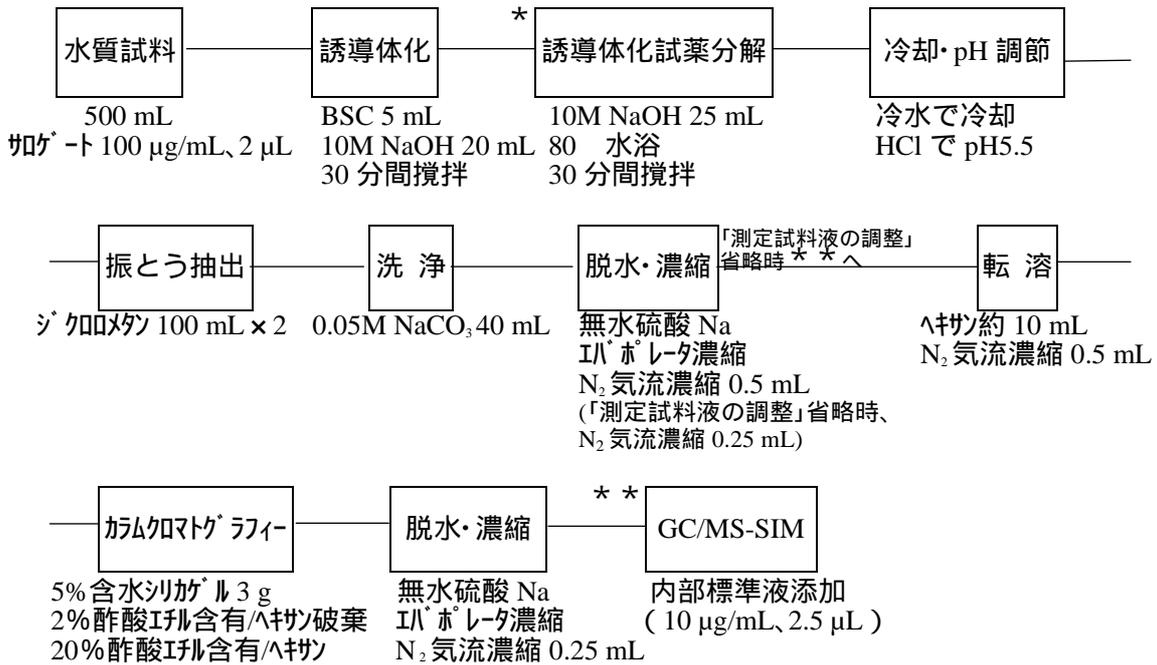
(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

## 参考文献

- 1) 長野県衛生公害研究所：モルホリン，pp22-31, 「平成 5 年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部保健調査室（平成 6 年 6 月）
- 2) Sacher, F., Lenz, S., and Brauch, H-J. : Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl chloride. *J.Chromatogr. A*, **764**, 85-93 (1997)

## 分析フローチャート

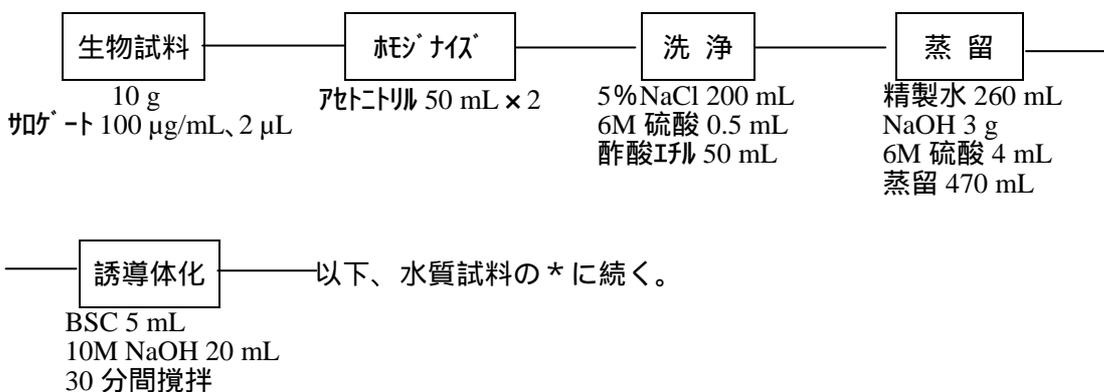
### 水質試料



### 底質試料



### 生物試料



## ．パラコート、ジクワットの分析法

### 1 対象物質

パラコート

ジクワット

表1 対象物質（注1）及びその物理化学的性質

物質名	分子式	分子量	沸点（ ）	水溶解度(mg/L)
パラコート	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> （塩化物）	257.2	175～180で分解	700,000
ジクワット	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> （臭化物）	344.1	-	700,000
物質名	Log Pow	水中での安定性		
パラコート	-4.22（pH7.4）	酸性で安定、塩基性で不安定		
ジクワット	-3.05	酸性で安定、塩基性で不安定		

### 2 目標検出下限値及び定量下限値

本分析法の目標検出下限値及び目標定量下限値を表2に示す。

表2 目標検出下限値及び目標定量下限値

物質名	水質（μg/L）	
	目標検出下限値	目標定量下限値
パラコート	0.04	0.09
ジクワット	0.03	0.07

### 3 分析法の概要

水質試料は、サロゲートとしてパラコート-d<sub>8</sub>及びジクワット-d<sub>4</sub>を添加後、過塩素酸を加え、パラコート及びジクワットをポリマー充填カートリッジに接続した活性炭カートリッジを用いて固相抽出後、活性炭カラムから溶離液で溶出し、加熱濃縮後、LC/MSで定量する。

### 4 試薬、器具及び装置

#### （1）試薬

- ・パラコート及びジクワット標準品：市販標準品
- ・サロゲート物質：パラコート-d<sub>8</sub>及びジクワット-d<sub>4</sub>で市販標準品
- ・メチルアルコール：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・アセトニトリル：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・ベンゼン：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・60%過塩素酸：試薬特級
- ・酢酸アンモニウム：試薬特級
- ・蟻酸：試薬特級
- ・活性炭カートリッジ溶離液：メチルアルコール/アセトニトリル/ベンゼン(10:10:1) 100 mL に過塩素酸 0.1 mL を加えたもの。
- ・過塩素酸含有精製水：精製水 100 mL に過塩素酸 0.1 mL を加えたもの。
- ・LC/MS 移動相：蟻酸で pH3 に調整した 0.2 M 酢酸アンモニウムとアセトニトリルを 1:1 で混合したもの。
- ・精製水：(注2)
- ・ポリマー充填カートリッジ(注3)：使用前に、活性炭カートリッジ溶離液 10 mL、過塩素酸含有精製水 10 mL の順でコンディショニングを行っておく。
- ・活性炭カートリッジ(注4)：使用前に、活性炭カートリッジ溶離液 10 mL、過塩素酸含有精製水 10 mL の順でコンディショニングを行っておく。

## (2) 器具及び装置

- ・加圧型固相抽出用定流量ポンプ：試料水のポリマー充填カートリッジ-活性炭カートリッジへの通水及び活性炭カートリッジからのパラコート及びジクワットの溶出に使用する。
  - ・固相抽出用バキュームマニホールド：抽出後の活性炭カートリッジの洗浄及び脱水に使用する。
  - ・ホットプレート
  - ・テフロン製ビーカー：100 mL
- (これらのテフロン及びガラス器具等は、メチルアルコールで十分洗浄し、乾燥後使用する。)



た混合標準液を加え、十分に混合した後、「(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

#### (5) 標準液の調製 (注 10)

各対象標準物質及び各サロゲート物質の各 100 mg を精秤し、0.1 M 塩酸に溶解させて正確に 100 mL とし、1,000 µg/mL の標準原液とする。各標準原液を混合し、0.1 M 塩酸で希釈して 10 µg/mL の混合標準液を調製する。検量線作成用の標準系列は、混合標準液を LC/MS 移動相 (蟻酸で pH 3 に調整した 0.2 M 酢酸アンモニウム/アセトニトリル) で適宜希釈して 0.002 ~ 0.1 µg/mL の範囲で調製する。

#### (6) 測定

##### (ア) LC/MS 測定条件の例

###### (a) 液体クロマトグラフ部

- ・ LC : (注 11)
- ・ カラム : アミド系カラム ( 2 mm × 250 mm ) (注 12)
- ・ 移動相 : 0.2 M 酢酸アンモニウム/アセトニトリル (1 : 1)
- ・ 流量 : 0.2 mL/ min
- ・ カラム温度 : 40
- ・ 注入量 : 10 µL

###### (b) 質量分析部

- ・ MS : (注 11)
- ・ イオン化法 : ESI/ポジティブ
- ・ モード : SIM
- ・ フラグメンター電圧 : 100 V
- ・ ガス温度 : 320
- ・ 揮発部温度 : 330
- ・ 乾燥ガス流量 : 11.0 L/ min
- ・ ネブライザー圧 : 40 psig
- ・ キャピラリ電圧 ( V Cap ) : 3,500 V

###### (c) 測定イオン

m/z	( 定量用 )	( 確認用 )
パラコート	93	185、186
ジクワット	92	183、184
サロゲート物質		
パラコート-d <sub>8</sub>	97	
ジクワット-d <sub>4</sub>	94	

#### (イ) 検量線

対象物質の混合標準液 ( 0.002 ~ 0.1 µg/mL ) 5 mL に 10 µg/mL サロゲート物質の混合標準液 10 µL を添加した標準液 10 µL を LC/MS に注入し、各対象物質のピーク面積とサロゲート物質のピーク面積の比から検量線を作成する。これを用いて、試料中の各対象物質を定量する。

#### (ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収試験液の各 10 µL を LC/MS に注入して測定を行う。一定時間ごとに、検量線の間濃度の標準液を測定し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし、この範囲を外れた場合は、LC/MS 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

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

### (2) 定量及び計算

各対象物質のピーク面積とサロゲート物質のピーク面積の比から検量線により検出量を求める。次に、検出量と分析試料量から、次式により試料中の濃度を計算する。

$$\text{計算値 ( µg/L )} = \text{検出量 ( µg )} / \text{試料量 ( L )}$$

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

(注 1) これらは、アルキルジピリジリウム塩系除草剤として使用されている。パラコートによる中毒事故が多く致死率が高いことなどから、昭和 61 年 7 月以後、パラコートのみ製の剤の使用並びに販売が中止となり、現在、パラコートとジクワットの混合剤 (パラコート 5%、ジクワット 7% 等) として市販されるようになった。

(注 2) 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。

(注 3) ウォーターズ社製セップパックプラス PS-2 またはこれらと同等以上の性能を有するもの (備考 1)。

(注 4) ウォーターズ社製セップパックプラス AC-2 またはこれらと同等以上の性能を有するもの (備考 1)。

(注 5) パラコート及びジクワットは、ガラス表面に吸着するため、試料水はポリエチレンまたはテフロン製ねじ口瓶に採る。

(注 6) 検出下限値付近では、安定性はあるものの、回収率がいずれも 50% 程度と低いので、サロゲート試薬を添加し補正する。サロゲート混合標準液の添加量は試料中の対象物質濃度、LC/MS の感度等の状況に応じて適宜変更する。なお、サロゲート試薬の回収率も同程度以上を確保する。

(注 7) パラコート及びジクワットは、水溶解度は非常に高いが、底質や浮遊物質等と強力に結合するため、水では脱着しない。

(注 8) パラコート及びジクワットの活性炭カートリッジへの吸着が強いため、溶離液は過塩素酸含有の混合有機溶媒とし、バックフラッシュ法で溶出する。

(注 9) ガラス製では吸着が強いためテフロン製とした。

(注 10) 標準原液及び混合標準液は、ポリエチレンまたはテフロン製容器で、暗所 4 以下で保存し、検量線用標準液は用時調製する。

(注 11) ここでは、アジレント・テクノロジー社製 1100MSD SL を用いた (備考 1)。

(注 12) ここでは、東ソー社製 TSK-GEL Amide-80 を用いた (備考 1)。

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

## 10 参考

### (1) 分析試料の送付方法

#### (ア) 試料の前処理を行わない場合

メチルアルコールで十分洗浄し、乾燥させたポリエチレンまたはテフロン瓶に、ヘッドスペースが残らないように試料を採取し、梱包して送付する。

#### (イ) 試料の前処理を行う場合

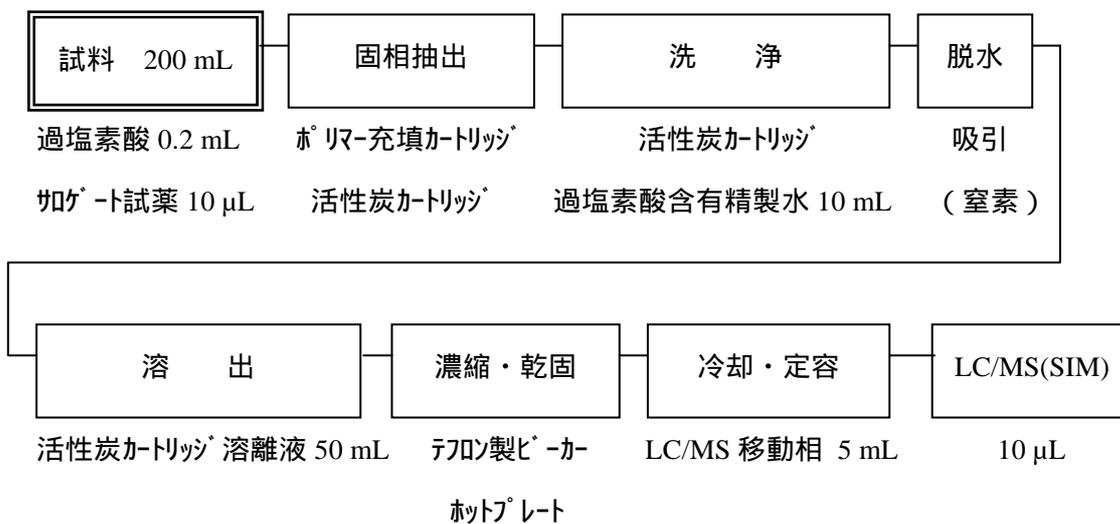
分析法に示した「6(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」の要領に従って得られた約 5 mL 程度の LC/MS 移動相溶液を、ポリエチレンまたはテフロン瓶に密封して送付する。

## 参考文献

- 1) 北九州市環境衛生研究所：パラコート，ジクワット，pp110-122，「平成 2 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 3 年 6 月）
- 2) 土橋均，辰野道昭，大槻一夫：酸化法によるパラコート及びジクワットの高速液体クロマトグラフィー同時分析法，衛生化学，**34**(1)，31-35（1988）
- 3) Hodgeson, J. W., Bashe, W. J., and Eichelberger, J. W.: Determination of diquat and paraquat in drinking water by liquid-solid extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, EPA Method 549.1, Environmental Monitoring System Laboratory, Office of Research and Development, US EPA, Ohio (1992)
- 4) 上路雅子，小林裕子，中村幸二：ジクワット，パラコート，pp183-186，「2002 年版残留農薬分析法」，上路雅子，小林裕子，中村幸二編著，ソフトサイエンス，東京（2001）

# 分析法フローチャート

## 水質試料



## メラミンの分析法

### 1 対象物質

メラミン

表1 対象物質（注1）及びその物理化学的性質

物質名	分子式	分子量	融点( )	沸点( )	水溶解度(mg/L)
メラミン	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N <sub>6</sub>	126.1	354	昇華または分解	3,240 ( 20 )

### 2 目標検出下限値及び定量下限値

本分析法の目標検出下限値及び目標定量下限値を表2に示す。

表2 目標検出下限値及び目標定量下限値

物質名	水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)	
	目標検出下限値	目標定量下限値	目標検出下限値	目標定量下限値
メラミン	0.02	0.05	5.6	14

### 3 分析法の概要

水質試料は、メラミンを ODS 系カートリッジに接続したカーボン系カートリッジを用いて固相抽出後、カーボン系カラムから溶離液で溶出し、加熱濃縮後、LC/MS で定量する。

底質試料は、アンモニア水含有メチルアルコールで超音波抽出後、上澄液を濃縮し、精製水を加えてジクロロメタン及び ODS 系カートリッジで洗浄した後濃縮し、LC/MS で定量する。

### 4 試薬、器具及び装置

#### (1) 試薬

- ・メラミン標準品：市販標準品
- ・クロロホルム：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・メチルアルコール：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。

- ・アセトニトリル：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・ジクロロメタン：残留農薬試験用で被験物質の測定を妨害しないもの。
- ・28%アンモニア水：試薬特級
- ・酢酸アンモニウム：試薬特級
- ・カーボン系カートリッジ溶離液：28%アンモニア水、クロロホルム及びメチルアルコールを1：1：3で混合したもの（注2）。
- ・LC/MS 移動相：50 mM 酢酸アンモニウムとアセトニトリルを1：4で混合したもの。
- ・精製水：（注3）
- ・ODS系カートリッジ（注4）：使用前に、メチルアルコール5 mL、精製水10 mLの順でコンディショニングを行っておく。
- ・カーボン系カートリッジ（注5）：使用前に、メチルアルコール5 mL、精製水10 mLの順でコンディショニングを行っておく。

## （2）器具及び装置

- ・超音波洗浄装置
- ・固相抽出装置
- ・遠心分離機
- ・ロータリーエバポレーター
- ・ターボバップ
- ・遠心分離管：50 mL
- ・分液ロート：200 mL
- ・濃縮管

（これらのガラス器具は、メチルアルコールで十分洗浄し、乾燥後使用する。）

## 5 試料の採取・運搬

### （1）水質試料

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

## ( 2 ) 底質試料

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

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「[4. 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項](#)」に従う。

## 6 試験操作

### ( 1 ) 前処理

#### (ア) 水質試料

試料 250 mL を前段に ODS 系、後段にカーボン系を連結した 2 段の固相カートリッジに通水し、メラミンを吸着濃縮する。カーボン系カートリッジを精製水 10 mL で洗浄後、28% アンモニア水/クロロホルム/メチルアルコール ( 1 : 1 : 3 ) 混合溶液 10 mL を用いてバックフラッシュ法で溶出し、試料前処理液とする。

#### (イ) 底質試料

試料 20 g を 50 mL 遠心分離管に取り、2.8% アンモニア水含有メチルアルコール 20 mL を加え、20 分間超音波抽出する。これを 2,500 rpm で 10 分間遠心分離後上澄液を分取する。この抽出操作をさらに 2 回繰り返し、抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮後、精製水 100 mL を加える。これを 30 mL ずつのジクロロメタンで 2 回洗浄後、ODS 系カートリッジで洗浄したものを試料前処理液とする。

### ( 2 ) 試料液の調製

各試料の前処理液をロータリーエバポレーター及び窒素ガスを吹き付けながら乾固し、冷却後アセトニトリル 1 mL を加えて LC/MS 測定用試料液とする。

### ( 3 ) 空試験液の調製

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

#### ( 4 ) 添加回収試験液の調製

任意の水質試料 250 mL、底質試料 20 g に検出下限値の 5～10 倍になるように精製水で希釈調製した標準液を加え、十分に混合した後、「( 1 ) 試料の前処理」及び「( 2 ) 試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

#### ( 5 ) 標準液の調製

メラミン 100 mg を精秤し、精製水に溶解させて正確に 100 mL とし、1,000 µg/mL の標準原液とする。標準原液を精製水で希釈し 10 µg/mL の標準溶液を調製する。検量線作成用の標準系列は、LC/MS 移動相 ( 50 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル ) で適宜希釈して 0.01～5 µg/mL の範囲で調製する。

#### ( 6 ) 測定

##### (ア) LC/MS 測定条件の例

###### (a) 液体クロマトグラフ部

- ・ LC : ( 注 6 )
- ・ カラム : シクロデキストリン系カラム ( 5 µm × 2 mm × 150 mm ) ( 注 7 )
- ・ 移動相 : 50 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル ( 1 : 4 )
- ・ 流量 : 0.2 mL/ min
- ・ カラム温度 : 40
- ・ 注入量 : 10 µL

###### (b) 質量分析部

- ・ MS : ( 注 6 )
- ・ イオン化法 : APCI/ポジティブ ( 注 8 )
- ・ モード : SIM
- ・ フラグメンター電圧 : 140 V ( 注 9 )
- ・ ガス温度 : 320
- ・ 揮発部温度 : 320
- ・ 乾燥ガス流量 : 8.0 L/ min
- ・ ネブライザー圧 : 40 psig
- ・ キャピラリー電圧 ( V Cap ) : 3,000 V

・コロナ電流（ポジティブ）：6.0 μA

(c) 測定イオン

・ m/z	( 定量用 ) ( 確認用 )
メラミン	127 ( 128 ) ( 注 10 )

(イ) 検量線

標準液 10 μL を LC/MS に注入し、メラミンのピーク面積から検量線を作成する。

(ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試料液及び添加回収試験液の各 10 μL を LC/MS に注入して測定を行う。一定時間ごとに、検量線の間濃度の標準液を測定し、期待値の 20% 以内の変動であることを確認する。もし、この範囲を外れた場合は、LC/MS 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

LC/MS の測定結果から、定量用及び確認用モニターイオンのピークが予想保持時間の ± 5 秒以内に出現し、定量用と確認用モニターイオンのピーク強度比が予想値と ± 50% ( 注 11 ) 以内で一致した場合、物質が存在していると見なす。

(2) 定量及び計算

メラミンのピーク面積を求め、上記の検量線に照らして検出量を求める。次に、検出量と分析試料量から、次式により試料中の濃度を計算する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

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

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

- (注1) メラミン樹脂の原料として使用されている。また、マウスでの経口毒性は、LDL<sub>0</sub> 1,600 mg/kg。
- (注2) カーボン系カートリッジからの溶出は、本溶離液を用いることにより安定した溶出が可能となり、さらに、バックフラッシュ法を用いると溶離液 10 mL で 93% 以上が回収された。
- (注3) 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。
- (注4) ウォーターズ社製セップパックプラス C18 またはこれらと同等以上の性能を有するもの(備考1)。
- (注5) ウォーターズ社製セップパックプラス AC-2 またはこれらと同等以上の性能を有するもの。Carbograph、Carboxen 1000 及び Envi-Carb など(必要に応じ 0.2 μm または 0.45 μm PTFE フィルターをつける)(備考1)。
- (注6) ここでは、アジレント・テクノロジー社製 1100MSD SL を用いた(備考1)。
- (注7) 対象物質の水溶性が非常に高く、ODS 系カラムでは十分な保持が得られなかったため、順相系カラムやイオン交換系カラム、GPC カラム等について検討した結果、シクロデキストリン系カラムを用いた場合に安定した保持が得られた。ここでは、住化分析センター社製 SUMICHRAL OA-7000 を用いた(備考1)。
- (注8) 水/アセトニトリル系移動相において、APCI 及び ESI のポジティブモードで  $m/z$  127  $[M+H]^+$  の擬分子イオンが生成することを確認したが、ネガティブモードでは特徴的なイオンの生成は見られなかった。APCI/ポジティブモードは、ESI/ポジティブモードに比べ、感度は低いが検量線の直線性が良く、繰り返し測定値の変動が小さい。
- (注9) ポジティブモードでフラグメンター電圧を変えて擬分子イオン強度を調べたところ、APCI、ESI 共に 140 V で最高感度となった。
- (注10) LC/MS ではソフトなイオン化のため、メインピーク以外のピークが得にくい。確認イオン ( $m/z$  128) のイオン強度は、定量イオン ( $m/z$  127) の 5%程度であるため、検出下限値付近濃度ではピークが検出されない。
- (注11) メラミンの場合、確認イオンのイオン強度は、定量イオンの 5%程度であるため、相対強度比の許容範囲としては ±50%程度とするのが妥当と考えられる。

(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。

## 10 参考

### (1) 分析試料の送付方法

#### (ア) 試料の前処理を行わない場合

##### (a) 水質試料

メチルアルコールで十分洗浄し、乾燥させたガラス瓶に、ヘッドスペースが残らないように試料を採取し、梱包して送付する。

##### (b) 底質試料

メチルアルコールで十分洗浄し、乾燥させたガラス瓶に試料を入れ、ドライアイスで冷却した状態で、梱包して送付する。

#### (イ) 試料の前処理を行う場合

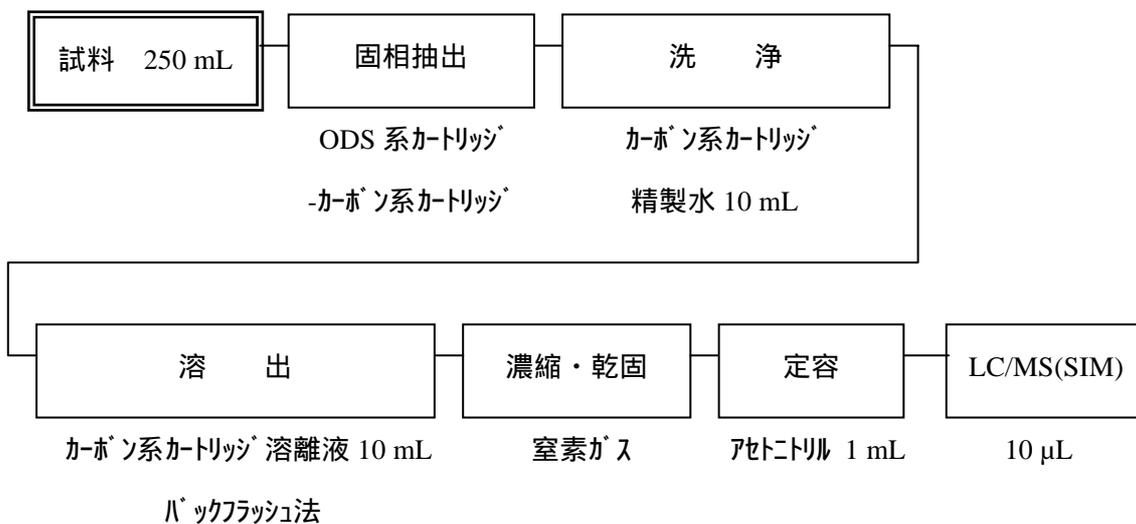
分析法に示した「6(1) 試料の前処理」及び「(2) 試料液の調製」の要領に従って得られた約 5 mL 程度のアセトニトリル溶液を、アンプルまたはバイアル瓶に密封して送付する。

## 参考文献

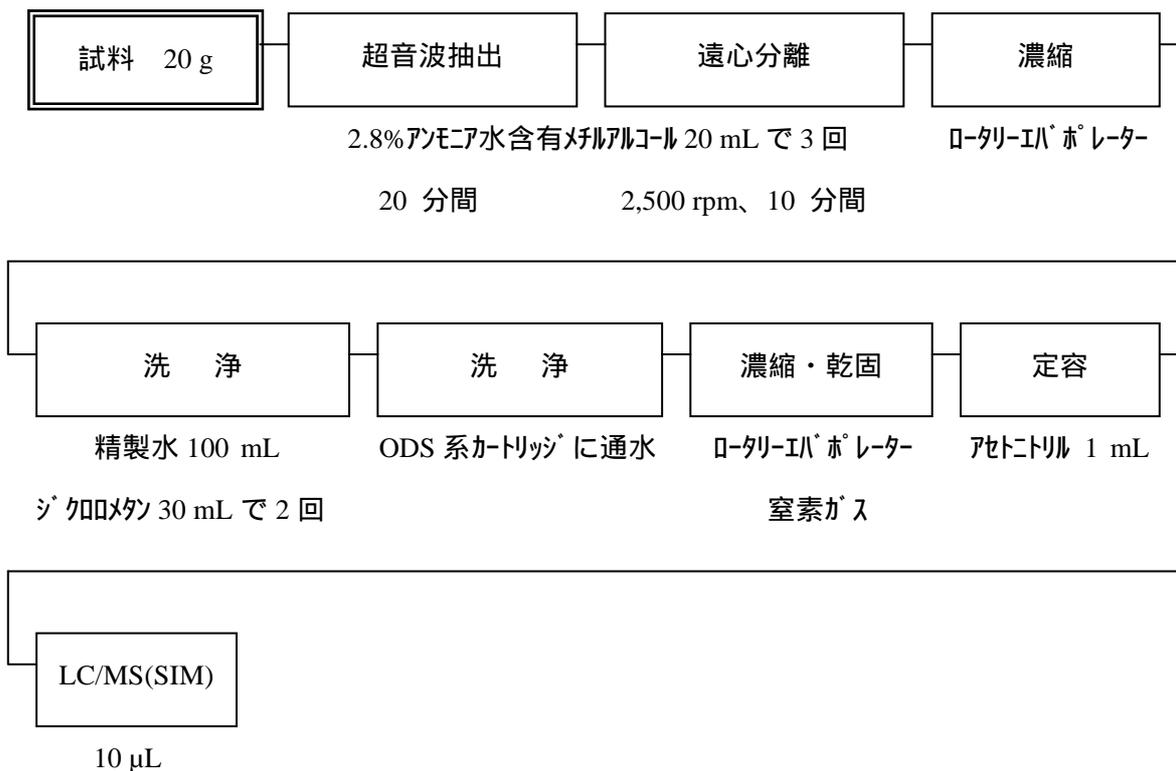
- 1) 長野県衛生公害研究所：メラミン，pp9-21，「平成 5 年度化学物質分析法開発調査報告書」，環境庁環境保健部保健調査室（平成 6 年 6 月）

# 分析法フローチャート

## 水質試料



## 底質試料



## ・ジクロロアニリン類、ナフチルアミン類の分析法

### 1 対象物質

- 2,4-ジクロロアニリン
- 2,5-ジクロロアニリン
- 3,4-ジクロロアニリン
- ナフチルアミン
- ナフチルアミン

### 2 目標検出下限値及び定量下限値

	水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)
	検出下限	定量下限	検出下限
2,4-ジクロロアニリン	0.05	0.15	1.5
2,5-ジクロロアニリン	0.05	0.15	1.5
3,4-ジクロロアニリン	0.1	0.3	3.0
-ナフチルアミン	0.1	0.3	3.0
-ナフチルアミン	0.1	0.3	3.0

### 3 分析法の概要

水質試料については、固相カートリッジに通水捕集後、酢酸メチルで溶出し、ヘキサン及び内標準を添加後、脱水・濃縮し、GC/MS-SIM で定量する。

底質試料については、水酸化ナトリウムを添加して水蒸気蒸留を行い、留出液について水質試料と同様に分析する。

### 4 試薬、器具及び装置

#### (1) 試薬

- ・標準物質 (2,4-ジクロロアニリン、2,5-ジクロロアニリン、3,4-ジクロロアニリン、  
-ナフチルアミン、  
-ナフチルアミン) : 市販特級又は1級試薬
- ・内標準物質 (アセナフテン-d<sub>10</sub>) : 市販標準品
- ・ヘキサン、アセトン : 市販残留農薬試験用

- ・酢酸メチル：市販 1 級試薬
- ・塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム：市販残留農薬試験用
- ・水：イオン交換蒸留水
- ・抽出用固相カートリッジ：市販品（注 1）

## （ 2 ） 器具及び装置

- ・コンセントレーター：水質試料の固相抽出に用いる。
- ・水蒸気蒸留装置：全ガラス製 底質試料の水蒸気蒸留に用いる。
- ・KD 濃縮器：試料液の濃縮に用いる。

## 5 試料の採取・運搬

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

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

## 6 試験操作

### （ 1 ） 前処理

#### （ア）水質試料

試料 500 mL を 20 mL/min の流速で固相カートリッジに通水し目的物質を捕集する。通水終了後、10 mL のシリンジで 2～3 回程度空気を通し間隙水を除去する。次いで酢酸メチル 4 mL で目的物質を 10 mL 容 KD 濃縮管に溶出する（注 2）。ヘアードライヤーで軽く加温しながら窒素気流で 1 mL の標線まで濃縮する（注 3）。

#### （イ）底質試料

試料 20 g を 1 L 容水蒸気蒸留用丸底フラスコに約 50 mL の水を用いてスパークルで良くかき混ぜながら入れ、水酸化ナトリウム 1 g を添加する（注 4）。水蒸気蒸留を行い留出液 500 mL を採取する。以下水質試料と同じ操作を行い試料前処理液を得る（注 5）。

### （ 2 ） 試料液の調整

(ア) 水質試料

試料前処理液にヘキサン 1 mL 及び内標準 (アセナフテン-d<sub>10</sub> 50 µg/mL ヘキサン溶液) 4 µL (注 6) を添加し、栓をして激しく振り混ぜる。あらかじめ、10 mL 容 KD 濃縮管に、綿栓 (注 7) をした小ロートに約 10 g の無水硫酸ナトリウムを入れたものをセットしたものを用意しておく。振り混ぜたものを直ちに無水硫酸ナトリウムにしみ込ませる。KD 濃縮管は少量のヘキサンで洗浄しながら無水硫酸ナトリウムに入れ、溶出液が 5 mL になるまで繰り返す。溶出液を窒素気流で 1 mL まで濃縮し GC/MS-SIM の試料液とする。

(イ) 底質試料

水質試料と同じ。

(3) 空試験液の調製

(ア) 水質試料

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

(イ) 底質試料

水 50 mL を用い水蒸気蒸留を行い、以下試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を空試験液とする。

(4) 添加回収試験液の調製

水質試料 500 mL、底質試料 20 g に各対象物質を検出下限の 5~10 倍量を添加し、充分混合した後、試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を添加回収試験液とする。

(5) 標準液の調製

ジクロロアニリン類の各 100 µg/mL 混合酢酸メチル溶液とナフチルアミン類の各 100 µg/mL 混合酢酸メチル溶液を別々に調製する (注 8)。これを標準原液 (保存溶液) とする。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例

(a)GC

- ・カラム：溶融シリカキャピラリーカラム (25 m×0.2 mm)
- ・液相：ポリエチレングリコール (0.1 μm film thickness) (注9)
- ・カラム温度：60 [1分] - 5 /分 - 230 [10分間保持]
- ・注入口温度：230
- ・インターフェース温度：230
- ・キャリアーガス：He (カラムヘッド圧 13 psi)
- ・注入方法：スプリットレス (パージオン時間 1分間)
- ・注入量：2 μL

(b)MS

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

(c)測定イオン

対象物質及び内標準の測定イオンを表1に示す。

表1 対象物質及び内標準物質の測定イオン

化合物名	測定イオン	
	定量用	確認用
ジクロロアニリン類	161	163
ナフチルアミン類	143	115

(イ) 検量線

数個のバイアル瓶にヘキサンを1 mL ずつ入れ、これに各混合標準原液(100 μg/mL 酢酸メチル溶液)を0~10 μLの間で段階的に入れ、さらに内標準溶液(50 μg/mL ヘキサン溶液)4 μLを入れたものを検量線用標準溶液列とする。これの2 μLをGC/MSに注入し、得られたクロマトグラムピーク面積と内標準のピーク面積比との関係から検量線を作成す

る。

#### (ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試験液及び添加回収試験液を注入して測定を行う。一定時間毎に検量線用の中間濃度の試料液を注入し、期待値の15%以内の変動であることを確認する。もし、15%を超えていればGC/MSを再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

## 7 同定、定量及び計算

### (1) 同定

対象物質の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間と±5秒以内に出現し、確認イオンと定量イオンのピーク強度比が予想値と±20%以内の差で合っていれば、物質が存在しているを見なす。

### (2) 定量及び計算

得られた各対象物質と内標準とのピーク面積比から検量線により検出量を求める。次に検出量、分析した試料量等から、次式により試料中の濃度を計算する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

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

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

(ここでの検出量とは試料液中に存在する対象物質の全量である。)

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

- (注1)例 セツパックプラス PS-2 Part NO. JJAN20131(ウォーターズ社製)(備考1)。  
使用直前にアセトン 10 mL 次いで水 10 mL でコンディショニングをして使用する。
- (注2) 溶出液の底部に水が 0.4 ~ 0.5 mL 程度存在するが差し支えない。
- (注3) 濃縮しすぎないこと。1 mL の標線以上に濃縮すると、ヘキサンを加えて振り混ぜた時有機層に移行しない場合がある。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4) 底質試料の中には pH がやや酸性側になっているものがあり、このような場合には特にナフチルアミン類の留出率が低下するので添加する。また、水酸化ナトリウムを添加すると硫黄が留出してこないで次の固相抽出に好都合である(硫黄が留出すると固相カートリッジへの通水が著しく困難になる)。
- (注5) 留出液の受器には予め水を 50 mL 程度入れ、留出口の先端がこの水の中にあるようにセットし、受器を氷水で冷却しながら捕集すること。また、水蒸気発生用の水は蒸留水を使用すること。水道水は絶対に使用してはならない。残留塩素との接触は著しい回収率の低下の原因になる。使用する器具等すべては、水道水洗浄後は必ず蒸留水で洗浄して使用すること。
- (注6) 添加する内標準の量(濃度)及び検量線用標準液の濃度は使用する GC/MS の感度に応じて適宜変更しても良い。また、内標準溶液については溶媒の種類は問わない。
- (注7) 脱脂綿をアセトンで 2~3 回洗浄し、風乾して用いる。
- (注8) ナフチルアミンの標準液(保存液)はやや不安定で経日的に分解が見られるので、調製後は冷凍庫に保管する。冷凍庫内でも僅かに着色してくるのが観測されるが、僅か程度の着色では濃度の変化は無視できる程度である。分解が無視出来ない程度であれば調製し直す。
- (注9) ジクロロアニリンの異性体は 6 物質存在するが、ここでは要調査項目に指定された 3 物質について記載したが、本法で 6 種の異性体のすべてが定量できる。本カラムでの保持時間は 2,6- < 2,4- < 2,5- < 2,3- < 3,5- < 3,4-ジクロロフェノールの順である。
- (備考1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜上、一般に入手できるもの

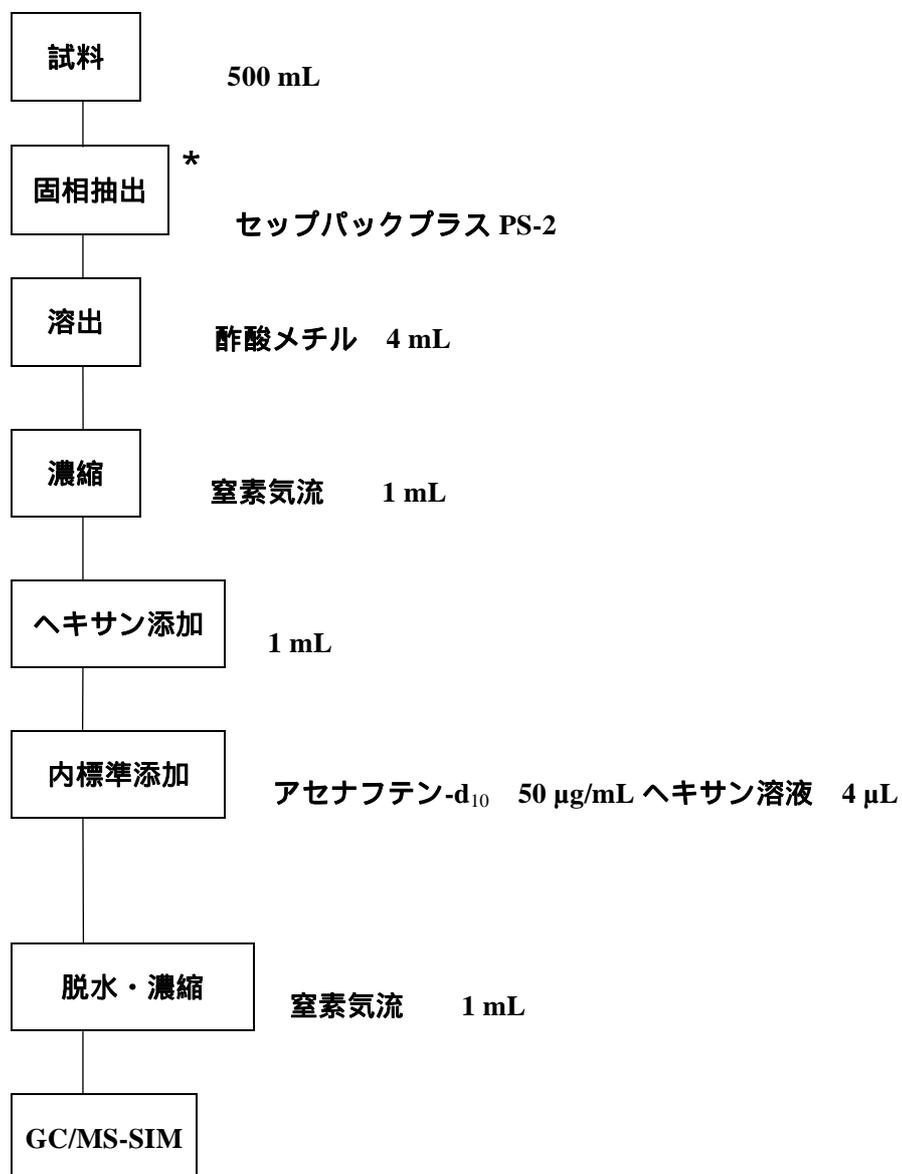
及び本分析法開発に使用したものを例示したが、これを推奨するものではない。これと同等または同等以上の品質・性能のものを用いても良い。

#### 参考文献

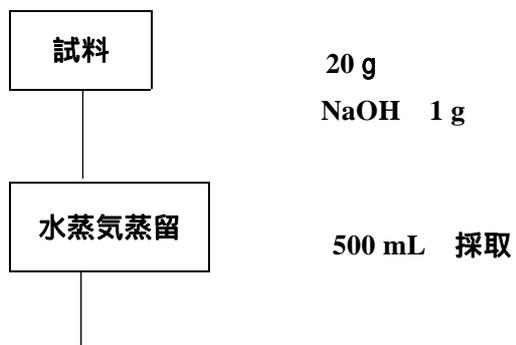
- 1) 愛知県公害調査センター：ジクロロアニリン類，pp101-105，「昭和 58 年度化学物質分析法開発調査報告書」環境庁環境保健部保健調査室（昭和 59 年 5 月）
- 2) 大阪府公害監視センター：，pp34-77，「平成 9 年度化学物質分析法開発調査報告書」環境庁環境保健部環境安全課（平成 10 年 7 月）

## 分析法フローチャート

### 水質試料



## 底質試料



以下水質試料の\*へ

## ・ *N*-フェニルナフチルアミン類の分析法

### 1 対象物質

*N*-フェニル-1-ナフチルアミン

*N*-フェニル-2-ナフチルアミン

### 2 目標検出下限値及び定量下限値

	水質 (µg/L)		底質 (µg/kg)
	検出下限	定量下限	検出下限
<i>N</i> -フェニル-1-ナフチルアミン	0.05	0.15	2.5
<i>N</i> -フェニル-2-ナフチルアミン	0.1	0.3	5.0

### 3 分析法の概要

水質試料については、固相カートリッジに通水捕集後、酢酸メチルで溶出し、ヘキサン及び内標準を添加した後、脱水して GC/MS-SIM で定量する（注 1）。

底質試料については、メタノールで超音波抽出し、ジクロロメタンに転溶後、脱水・濃縮・乾固し、シリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップを行い、内標準を添加して GC/MS-SIM で定量する。

### 4 試薬、器具及び装置

#### (1) 試薬

- ・ 標準物質 (*N*-フェニル-1-ナフチルアミン及び *N*-フェニル-2-ナフチルアミン)：市販特級又は 1 級試薬。
- ・ 内標準物質 (フルオランテン- $d_{10}$ )：市販標準品
- ・ ヘキサン、アセトン、メタノール、ジクロロメタン：市販残留農薬試験用
- ・ 酢酸メチル：市販 1 級試薬
- ・ ポリエチレングリコール 300：市販 1 級試薬
- ・ 塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム：市販残留農薬試験用
- ・ 水：イオン交換蒸留水又は市販ミネラルウォーター
- ・ 抽出用固相カートリッジ：(注 2)

- ・シリカゲルカートリッジカラム：(注3)

## (2) 器具及び装置

- ・コンセントレーター：水質試料（水蒸気蒸留留出液）の固相抽出に用いる。
- ・超音波洗浄器：底質試料の抽出に用いる。
- ・遠心分離器：底質試料抽出液の分離に用いる。
- ・KD濃縮器：試料液の濃縮に用いる。

## 5 試料の採取・運搬

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

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

## 6 試験操作

### (1) 前処理

#### (ア) 水質試料

試料 500 mL を 20 mL/min の流速で固相カートリッジ通水し目的物質を捕集する。通水終了後、10 mL のシリンジで 2~3 回程度空気を通し間隙水を除去する。次いで酢酸メチル 4 mL で目的物質を 10 mL 容 KD 濃縮管に溶出する（注4）。ヘアードライヤーで軽く加温しながら窒素気流で 1 mL の標線まで濃縮する（注5）。

#### (イ) 底質試料

試料 10 g を 50 mL 容遠沈管にとり、メタノール 30 mL を加え、スパーテルで良くかき混ぜた後、10 分間超音波抽出を行う。3,000 rpm で 10 分間遠心分離してアセトン層を採取する。残渣にはさらにアセトン 30 mL を加え、同じ操作を繰り返し、アセトン層を合わせる。アセトン層は、あらかじめ分液ロート（注6）に用意した、水 200 mL（注7）に NaCl 10 g を溶解させた水溶液に入れ、さらにジクロロメタン 50 mL を加え、5 分間振とうし、静置してジクロロメタン層を採取する。水層はさらにジクロロメタン 50 mL で抽出し、ジクロロメタン層を合わせる。ジクロロメタン層は無水硫酸ナトリウムで脱水（注8）した

後、KD濃縮器で5 mL程度に濃縮し、さらに窒素気流で乾固し（注9）、1 mL程度のヘキサンを添加して溶解させる。

## （2）試料液の調整

### （ア）水質試料

試料前処理液にヘキサン 1 mL 及び内標準（フルオランテン-d<sub>10</sub> 50 µg/mL ヘキサン溶液）4 µL（注10）を添加し、栓をして激しく振り混ぜる。あらかじめ、10 mL 容 KD 濃縮管に、綿栓（注11）をした小ロートに約 10 g の無水硫酸ナトリウムを入れたものをセットしたものを用意しておく。振り混ぜたものを直ちに無水硫酸ナトリウムにしみ込ませる。KD 濃縮管は少量のヘキサンで洗浄しながら無水硫酸ナトリウムに入れ、溶出液が 5 mL になるまで繰り返す。溶出液を窒素気流で 1 mL まで濃縮し GC/MS-SIM の試料液とする。

### （イ）底質試料

シリカゲルカートリッジカラムに負荷し、最初にヘキサン：ジクロロメタン = 10 : 1 8 mL で展開し、この部分は捨てる。次いでヘキサン：ジクロロメタン = 1 : 1 5 mL で展開し、この部分を採取する（注12）。窒素気流で 1 mL まで濃縮し、内標準（フルオランテン-d<sub>10</sub> 50 µg/mL ヘキサン溶液）4 µL（注10）を添加し GC/MS-SIM の試料液とする。

## （3）空試験液の調製

### （ア）水質試料

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

### （イ）底質試料

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

## （4）添加回収試験液の調製

水質試料 500 mL、底質試料 10 g に各対象物質を検出下限の 5 ~ 10 倍量を添加し、充分混合した後、試料の前処理及び試料液の調製の項に従って得られた試料液を添加回収試験

液とする。

( 5 ) 標準液の調製

*N*-フェニル-1-ナフチルアミン及び *N*-フェニル-2-ナフチルアミンの 100 µg/mL アセトン混合溶液を調製し、これを標準保存液とする。

( 6 ) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例

(a)GC

- ・ カラム：溶融シリカキャピラリーカラム ( 25 m × 0.32 mm )
- ・ 液層：5% フェニルメチルシリコン ( 0.52 µm film thickness )
- ・ カラム温度：70 [1分] - 15 /分 - 280 [6分間保持]
- ・ 注入口温度：250
- ・ インターフェース温度：250
- ・ キャリヤーガス：He ( カラムヘッド圧 13 psi )
- ・ 注入方法：スプリットレス ( パージオン時間 1 分間 )
- ・ 注入量：2 µL

(b)MS

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

(c)測定イオン

対象物質及び内標準の測定イオンを表 1 に示す。

表 1 対象物質及び内標準物質の測定イオン

化合物名	測定イオン	
	定量用	確認用
N-フェニル-1-ナフチルアミン	219.0	218.0
N-フェニル-2-ナフチルアミン	219.0	218.0
内標 (フルオランテン-d <sub>10</sub> )	212.0	

#### (イ) 検量線

ポリエチレングリコール 300 (PEG300) の 100 µg/mL アセトン溶液を調製し、これを検量線作成用の溶媒とする。

数個のバイアル瓶に PEG300 溶液を 1 mL ずつ採り、これに標準保存液 0 ~ 10 µL の範囲で段階的に入れ、さらに内標準液 4 µL (注 10) を添加したものを検量線作成用の標準液列とする。

これの 2 µL を GC/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積と内標準のピーク面積比との関係から検量線を作成する。

#### (ウ) 試料液の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試験液及び添加回収試験液を注入して測定を行う。一定時間毎に検量線用の中間濃度の試料液を注入し、期待値の 15% 以内の変動であることを確認する。もし、15% を超えていれば GC/MS を再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

## 7 同定、定量及び計算

### (1) 同定

対象物質の定量イオン及び確認イオンのピークが予想保持時間と ±5 秒以内に出現し、確認イオンと定量イオンのピーク強度比が予想値と ±20% 以内の差で合っていれば、物質が存在しているを見なす。

### (2) 定量及び計算

得られた各対象物質と内標準とのピーク面積比から検量線により検出量を求める。次に

検出量、分析した試料量等から、次式により試料中の濃度を計算する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

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

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

(ここでの検出量とは試料液中に存在する対象物質の全量である。)

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

(注 1) 水質試料の本分析操作は、使用内標準とキャピラリーカラム以外、ジクロロアニリン類及びナフチルアミン類と同じである。

(注 2) 例 セツパックプラス PS-2 Part NO. JJAN20131(ウォーターズ社製)(備考 1)  
使用直前にアセトン 10 mL 次いで水 10 mL でコンディショニングをして使用する。

(注 3) 例 セツパック Silica Part NO. WAT051900 (ウォーターズ社製)(備考 1)  
ヘキサン 10 mL で洗浄して使用する。

(注 4) 溶出液の底部に水が 0.4 ~ 0.5 mL 程度存在するが差し支えない。

(注 5) 濃縮しすぎないこと。1 mL の標線以上に濃縮すると、ヘキサンを加えて振り混ぜた時有機層に移行しない場合がある。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 6) 分析に使用する器具に残留塩素が存在しないようにする。特に分液ロートは表面積が大きいので注意をようする。水道水で洗浄した後は蒸留水でよく濯いで使用すること。

(注 7) 些かの残留塩素も存在しないという点から蒸留水よりもミネラルウォーターのほうが良い。

(注 8) ジクロロメタン中にメタノールが存在するので脱水に多少時間を要する。無水硫酸ナトリウムを添加した後、時々振り混ぜながら 30 分程度かけて脱水する。

(注 9) ヘアードライヤーで加温しながら行うが、液が 0.1 mL 程度になったら加温を止め、穏やかに乾固する。

(注 10) 添加する内標準の量(濃度)及び検量線用標準液の濃度は使用する GC/MS の感度に応じて適宜変更しても良い。また、内標準溶液については溶媒の種類は問わない。

(注 11) 脱脂綿をアセトンで 2~3 回洗浄し、風乾して用いる。

(注 12) 使用するカートリッジカラムについては事前に溶出パターンをチェックしておくこと。

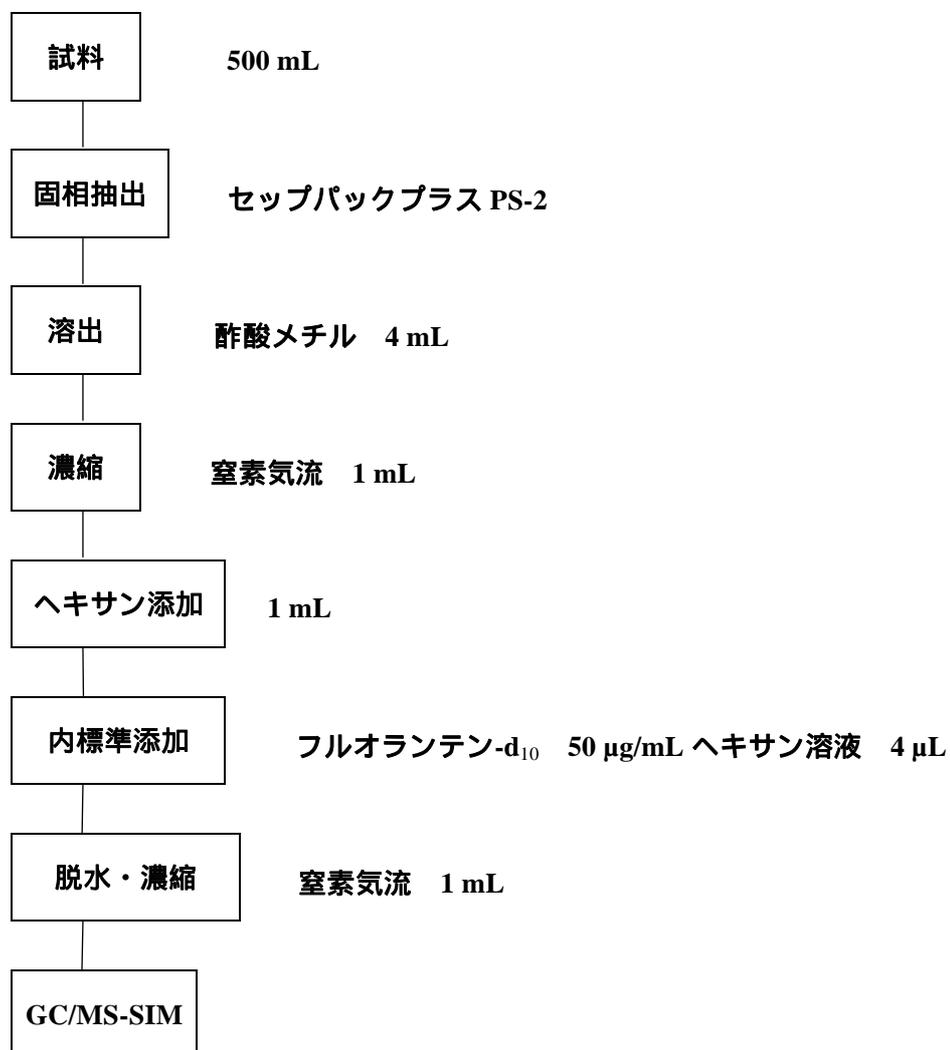
(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜上、一般に入手できるもの及び本分析法開発に使用したものを例示したが、これを推奨するものではない。これと同等または同等以上の品質・性能のものを用いても良い。

## 参考文献

- 1) 大阪市立環境科学研究所：N-フェニル-1-ナフチルアミン( )、N-フェニル-2-ナフチルアミン( )、pp90-94、「昭和 54 年度化学物質分析法開発調査報告書」、環境庁環境保健部保健調査室(昭和 55 年 3 月)

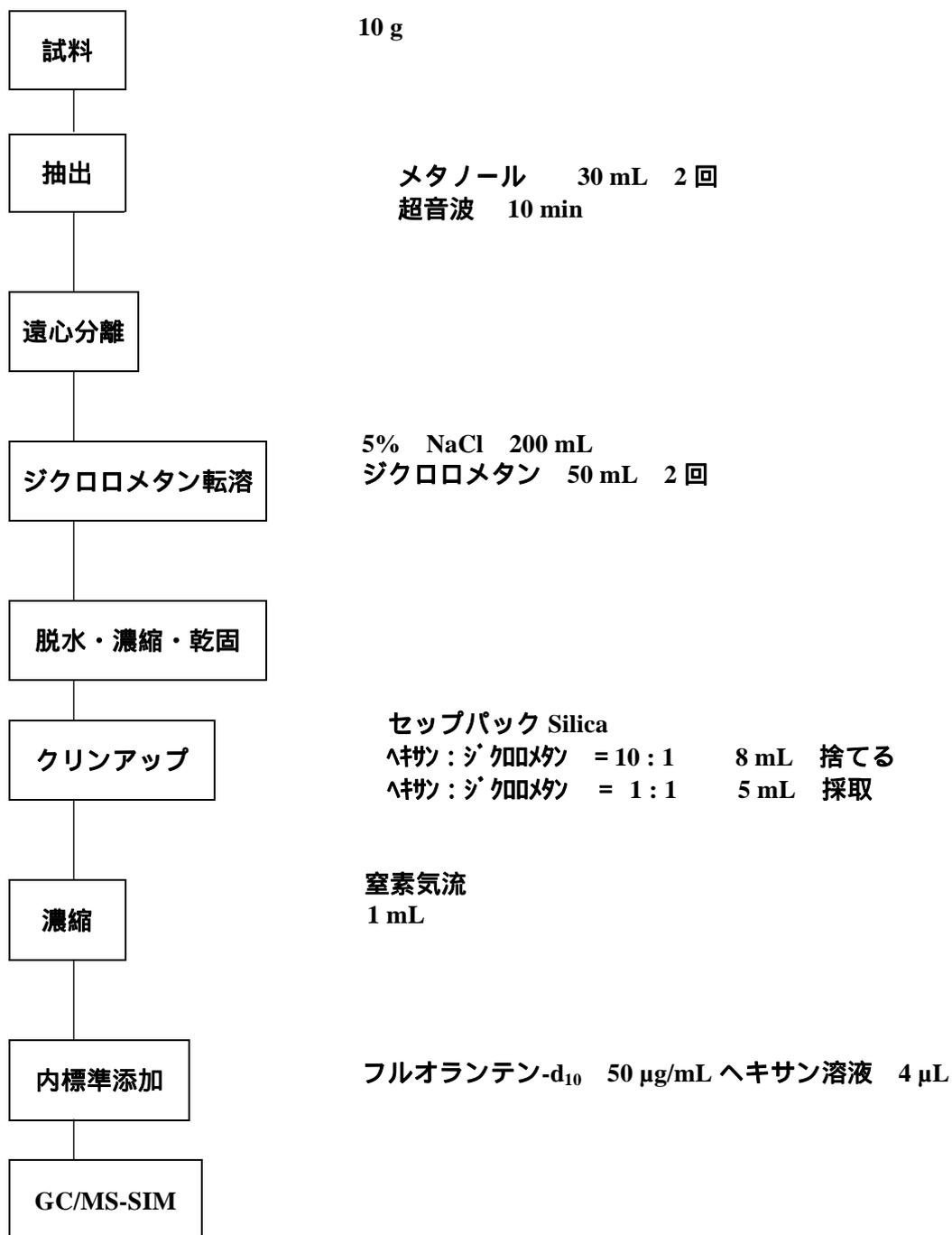
## 分析法フローチャート

### 水質試料



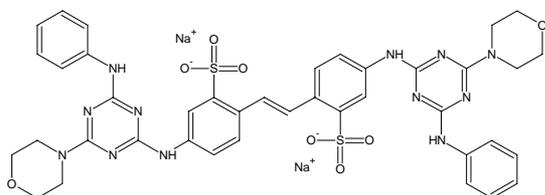
(前処理についてはジクロロアニリン類及びナフチルアミン類の分析法と同じ)

底質試料



## ・フルオレスセント・260、フルオレスセント・351 の分析法

### 1 対象物質

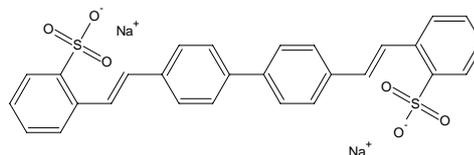


フルオレスセント・260 (Fluorescent-260)  
4,4'-ビス(4-アニリノ-6-モルホリノ-1,3,5-  
トリアジン-2-イル)アミノスチルベン-2,2'-  
ジスルホン酸二ナトリウム

CAS 番号：16090-02-1

分子式：C<sub>40</sub>H<sub>35</sub>N<sub>12</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>

分子量：924



フルオレスセント・351 (Fluorescent-351)  
4,4'-ビス(2-スルフォスチリル)ビフェニル  
二ナトリウム

CAS 番号：27344-41-8

分子式：C<sub>28</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>

分子量：562

### 2 目標検出下限値

本分析法の目標検出下限値は、フルオレスセント・260 が水質試料で 5 µg/L、底質で 0.16 mg/kg (乾泥)、フルオレスセント・351 が水質試料で 0.5 µg/L、底質で 0.016 mg/kg (乾泥) である。

### 3 分析法の概要

水質試料は、ODS 系固相抽出カートリッジカラム (注1) を用いて濃縮し、メタノールで溶離した後、メタノール溶媒を蒸発乾固し、これを一定量の水・アセトニトリル混合溶媒に再溶解し、蛍光光度計検出器付高速液体クロマトグラフ (HPLC) で定量する。

底質試料は、メタノールで抽出し、これをメンブランフィルターを用いてろ過した後、メタノール溶媒を蒸発乾固し、これを一定量の水・アセトニトリル混合溶媒に再溶解し、蛍光光度計検出器付高速液体クロマトグラフ (HPLC) で定量する。

### 4 試薬、器具及び装置

#### (1) 試薬

- ・過塩素酸テトラエチルアンモニウム (TEA<sup>+</sup>)：市販特級試薬 (注2)

- ・メタノール：液体クロマトグラフ用（注3）
- ・アセトニトリル：液体クロマトグラフ用（注3）
- ・フルオレスセント・260：工業品（注4）
- ・フルオレスセント・351：工業品（注5）

## （2）器具及び装置

- ・ ODS 系固相抽出カートリッジカラム：（注1）
- ・ 振とう器
- ・ 遠心分離機
- ・ 高速液体クロマトグラフ

## 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た褐色ねじ口瓶を試料水で2～3回共洗いした後、試料水を泡立てないように採水し、満水にして密栓し、直ちに試験を行う（注6）。直ちに試験できないときは、冷暗所（4）に保存し、速やかに試験を行う。

### （2）底質試料

底質試料は、水質試料と同様の方法で洗浄した摺り合せの褐色広口瓶に入れ密栓する（注6）。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、-20℃以下で凍結保存する。

なお、試料採取、運搬、調整にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「[5. 試料の採取、運搬、調整にかかわる一般事項](#)」に従う。

## 6 試験操作

### （1）前処理法

#### （ア）水質試料

試料水（注6）に0.1%になるように過塩素酸テトラエチルアンモニウム（TEA<sup>+</sup>）を加え溶解させる（注7）。その20 mLを正確に注射筒に取り、注射筒の先端にとりつけた ODS 系固相抽出カートリッジカラム（注1）に試料水を約3～4 mL/分の速度で通過させる。つ

いで、ODS 系固相抽出カートリッジカラム(注1)に0.1%過塩素酸テトラエチルアンモニウム溶液5 mLを通水した後(注8)メタノール3 mLを2回通しフルオレスセント・260、フルオレスセント・351を溶離させる。このメタノール溶液を前処理液とする。

#### (イ) 底質試料

底質(湿泥)5 g(乾泥相当)を100 mLの共栓付遠沈管に取り(注6)、これにメタノール50 mLを加え、振とう機を用いて20分間振とうした後、3,000回転で5分間遠心分離する。上澄液(メタノール層)を200 mLのメスフラスコにデカンテーションして移す。ついで再び遠沈管にメタノール50 mLを加え、同様に操作し、メタノール層を先のメタノール抽出液と合わせる。この操作をもう一度繰り返した後、メタノール抽出液の全量を200 mLとし、その一定量をメンブランフィルターでろ過する。このメタノール溶液を前処理液とする。

#### (2) 試験液の調製

試料の前処理により得られたメタノール溶液(注9)(水質試料の場合は全量の6 mL、底質試料の場合は5 mLを分取)をロータリーエバポレーターを用いて蒸発乾固した後、これらに1 mLの水・アセトニトリル混合溶媒(70:30 v/v)を正確に加え、これをHPLC用試験液とする。

#### (3) 空試験液の調製

試料を用いないで、「(1) 試料の前処理」および「(2) 試験液の調製」と同様に操作して得られた溶液をHPLC用空試験液とする。

#### (4) 添加回収試験液の調製

水質試料20 mL、底質試料10 gに対象物質に各対象物質を検出下限の5~10倍になるように水・アセトニトリル混合溶媒(70:30 v/v)で希釈調整した標準液を添加し、十分に混合した後、「(1) 前処理法」及び「(2) 試験液の調製」に従って操作を行い、得られた試験液を添加回収試験液とする。

#### (5) 標準液の調製

(ア) 標準原液の調整

フルオレスセント・260 の 0.100 g をメスフラスコに取り、これにジメチルスルホキシド ( $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ) 10 mL を加え溶解させた後、水を加えて 100 mL とする。これをフルオレスセント・260 標準原液 (1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とする。

フルオレスセント・351 の 0.100 g をメスフラスコに取り、水を加えて 100 mL とする。これをフルオレスセント・351 標準原液 (1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とする。

(イ) 標準溶液の調整

それぞれの標準原液を水・アセトニトリル混合溶媒 (70 : 30 v/v) で希釈して、フルオレスセント・260 については 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フルオレスセント・351 については 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の標準溶液を調整する。

(6) 測定

(ア) HPLC 測定条件 (注 10)

測定は、HPLC に試験液及び空試験液それぞれ 10  $\mu\text{L}$  を注入する。

- ・検出器：蛍光光度計検出器 (Ex 358 nm、Em 403 nm)
- ・カラム：ODS カラム (注 11) (ステンレス 4 mm × 250 m)
- ・移動相 (注 12) :
  - a) 0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  / アセトニトリル (75 : 25 v/v)
  - b) 0.1%  $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NClO}_4\text{NClO}_4$  - 水 / アセトニトリル (70 : 30 v/v)
- ・流速：1 mL/分

(イ) 検量線

標準溶液から、フルオレスセント・260 については 0.1 ~ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フルオレスセント・351 については 0.01 ~ 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶液を調整し、その 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入して、そのピーク高さにより検量線を作成する。

(ウ) 試料の測定

検量線作成後、空試験液、測定用試験液及び添加回収試験液を注入して測定を行う。一定時間毎に検量線用の中間濃度の試料液を注入し、期待値の 20% 以内の変動であることを

確認する。もし、20%を越えていれば HPLC を再調整後、検量線を作成し直して測定を再開する。

## 7 同定、定量及び計算

### (1) 同定

対象物質のピークが標準物質の保持時間と一致すれば、試料液中に対象物質が存在していると思なす。

### (2) 定量

得られた各対象物質のピーク高さから検量線により検出量を求める。次に検出量、分析した試料量等から、次式により試料中の濃度を計算する。なお、底質の試料量は乾燥重量とする。

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

$$\text{底質試料中濃度 (mg/kg)} = \text{検出量 (mg)} \times \frac{\text{抽出液量 (200 mL)}}{\text{分取液量 (5 mL)}} \times \frac{1}{\text{試料量 (kg)}}$$

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

(注1) ここではウォーターズ社製セップパック C<sub>18</sub> カートリッジカラムを用いた(備考1)。

(注2) ここでは和光純薬工業社製特級試薬を用いた(備考1)。

(注3) ここでは和光純薬工業社製液体クロマトグラフ用溶媒を用いた(備考1)。

(注4) Tinopal AMS-GX。チバ・スペシャルティ・ケミカルズ株式会社より入手(備考1)。

(注5) UVITEX NFW 450%。チバ・スペシャルティ・ケミカルズ株式会社より入手(備考1)。

(注 6) フルオレスセント・260、フルオレスセント・351 は光によって分解されやすいので、試料の採取には褐色の容器を用い、分析操作も遮光して行う。

(注 7) 過塩素酸テトラエチルアンモニウムを加えることにより、試料中に含まれているフルオレスセント・260、フルオレスセント・351 が ODS 系固相抽出カートリッジカラム (注 1) に吸着されやすくなる。

(注 8) 海水のように塩濃度が高い試料は、塩類が保持時間を遅らせる原因となるので、ODS 系固相抽出カートリッジカラム (注 1) に吸着した塩類を追い出すために 0.1% 過塩素酸テトラエチルアンモニウムを通水する。

(注 9) 水質、底質試料中に含有されているフルオレスセント・260、フルオレスセント・351 の量により、メタノール抽出液を適量分取するとよい。

(注 10) HPLC 測定条件は使用する機器によって最適条件が異なるので、適宜調整する。

(注 11) ここでは日本分光工業社製 ODS SS-10-B を用いた (備考 1)。

(注 12) 通常、環境試料から検出されるフルオレスセント・260 とフルオレスセント・351 を分離するには、0.1% (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub>NCIO<sub>4</sub> - 水 / アセトニトリル (70 : 30 v/v) の移動層を用いることが操作上便利である。しかし他のスチルベン系の蛍光増白剤\*には、この条件ではフルオレスセント・351 との分離が難しいものもあるので、定性的確認には 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / アセトニトリル (75 : 25 v/v) の移動相を併用するとよい。

\* : フルオレスセント・134 (4,4'-ビス(4-アニリノ-6-メトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)アミノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸二ナトリウム) など。

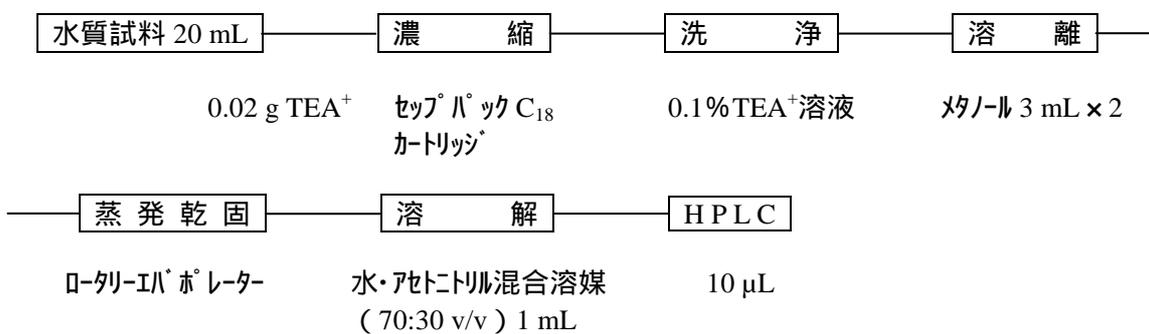
(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜上、一般に入手できるものを例示したが、これを推奨するものではない。これと同等または同等以上の品質・性能のものを用いても良い。

## 参考文献

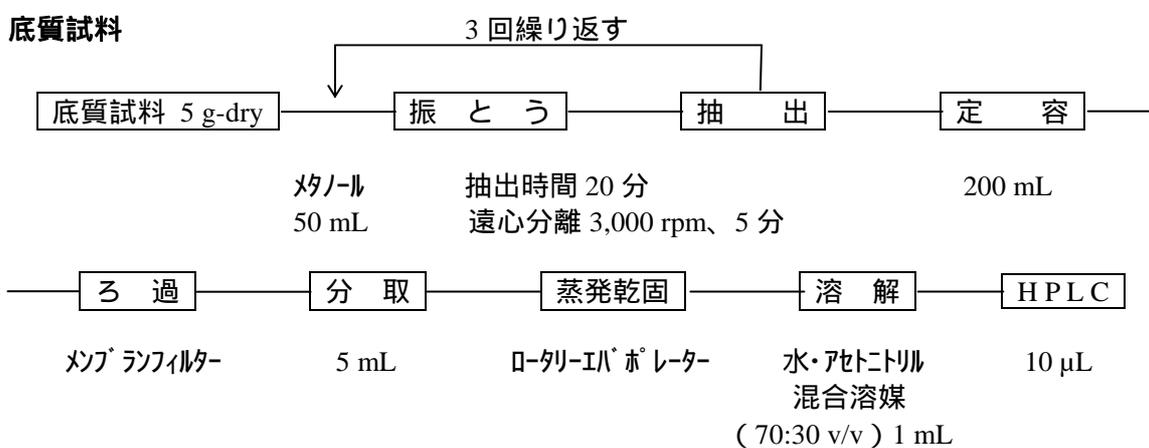
- 1) 神奈川県公害センター : 4,4'-ビス(4-アニリノ-6-ホルキノ-1,3,5-トリアジン-2-イル)アミノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸二ナトリウム、4,4'-ビス(2-スルフォスチリル)ビフェニル二ナトリウム, pp123-132, 「昭和 56 年度化学物質分析法開発調査報告書」, 環境庁環境保健部保健調査室 (昭和 57 年 5 月)

## 分析法フローチャート

### 水質試料



### 底質試料



## x. クロロピクリンの分析法

### 1 対象物質

クロロピクリン（表1）

表1 対象物質、サロゲートと定量イオンの例（注1）

物 質 名	測定イオンの例	サロゲートの例	測定イオンの例
クロロピクリン	117 119 82	フルオロベンゼン- $d_5$	101 82
		クロロベンゼン- $d_5$	82 117

### 2 目標検出下限値及び定量下限値

本分析法の目標検出下限値及び目標定量下限値を表2に示す。

表2 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（ $\mu\text{g/L}$ ）		底質（ $\mu\text{g/kg}$ ）		生物（ $\mu\text{g/kg}$ ）	
	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
クロロピクリン	0.07	0.18	3	8	3	8

### 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、塩化ナトリウムを入れたバイアルに採り内標準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採り、内標準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、注2、注3）。

### 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）。
- ・標準原液：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100 mgを精秤し、メタノールで100 mLとし標準混合原液（1,000 µg/mL）とする（注8）。
- ・サロゲート原液：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10 mgを秤量し、メタノールで100 mLとし、サロゲート原液（100 µg/mL）とする（注9）。
- ・サロゲート溶液：メタノールを50～80 mL程度入れた100 mLメスフラスコに、サロゲート原液10 mLを採り、メタノールで100 mLとしサロゲート溶液（10 µg/mL）とする（注10）。
- ・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（フルオロベンゼン）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を採り、メタノールで100 mLとし内標準溶液（10 µg/mL）とする（注10）。

## （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ー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ー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、キャップを強く締め、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、キャップを強く締め、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、シリコーンゴム栓（注11）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12）。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 13、注 14）
- ・GC/MS：キャピラリーカラムの取付可能な GC 付き四重極型、二重収束型又はこれらと同等以上の性能を有する MS。

## 5 試料の採取・運搬

### （1）水質試料

試料採取容器を採取試料で数回共洗いしてから、試料を泡立たないように静かに採取容器に満たし、マイクロシリンジでサロゲート溶液を添加し（注 15）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 16）。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 16）。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。

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「[5.1 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

塩化ナトリウムをバイアルに入れる(注17)。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(注18)。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 (乾重量として) を遠心管に採り、3,000 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15)、メタノール 10 mL を加え、10 分間超音波抽出を行う。3,000 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19)。3,000 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17)。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20)、内標準溶液を添加する(注18)。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振り混ぜ、測定用試料とする。

#### (ウ) 生物試料

試料 20 g を遠心管に採り、3,000 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15)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)。3,000 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。3,000 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17)。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20)、内標準溶液を添加する(注18)。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ものを空試料とする ( 注 21 )。

## ( 3 ) 添加回収試験用試料の調製

「 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 ( 注 22 ) 添加回収試験用試料とする。

## ( 4 ) 標準液の調製

標準原液をメタノールで希釈し、0.1 ~ 50 µg/mL の標準溶液を調製する。

## ( 5 ) 測定

### ( ア ) ヘッドスペース測定条件の例 ( 注 23 )

- ・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 測定条件の例

#### ( a ) ガスクロマトグラフ部

- ・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 24 )
- ・カラム温度 : 40 ( 1 分 ) 15 / 分 210 ( 8 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) 質量分析部 (注 25)

- ・イオン化法：EI
- ・イオン化エネルギー：70 eV
- ・イオン化電流：300  $\mu$ A
- ・イオン源温度：230

(c) 測定イオン (注 26)

- ・クロロピクリン：117, 119, 82
- ・フルオロベンゼン- $d_5$ ：102, 82
- ・クロロベンゼン- $d_5$ ：82, 117

(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をバイアルに入れ、標準溶液を添加して 0.01 ~ 50  $\mu$ g/L とする (注 20)。これを 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 27)。サロゲート又は内標準と対象物質の面積比を求め、検量線を作成する (注 28)。

(エ) 試料液の測定

「6 試験操作(1)前処理」により得られた測定用試料は、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 27)。サロゲート又は内標準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 (注 28)。

## 7 同定、定量及び計算

(1) 同定

対象物質、サロゲート及び内標準について、定量イオン及び確認イオンが、検量線作成に用いた標準物質などの保持時間の  $\pm 5$  秒以内に出現し (注 29)、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

測定用試料及び空試料について、サロゲート又は内標準と対象物質の面積比から、対象物質の検出量を求める(注30)。次式で試料中の各対象物質濃度を計算する。なお、底質の試料量は乾燥試料量とする。

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

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

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

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

(注1) 分析操作において揮散しやすいことから、安定同位体をサロゲート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として用いてもよい。GC/MS測定においては最適なイオンを選定する。

(注2) あらかじめ使用する機器における諸条件を検討し、表2に示す目標検出下限値及び目標定量下限値まで分析できるよう調整する。GC/MS測定においては、十分な感度が得られればSIM測定の代わりにスキャン測定などでもよい。

(注3) 本分析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romometan(ブrom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、塩化アリル（アリルクロライド）、塩化エチル（クロロエタン）、塩化ビニル、塩化メチル、ジシクロペンタジエン、シクロペンタン、1,1-ジクロロエタン、ジブromoklorometan、臭化メチル、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、1,2,3-トリクロロプロパン、1,3-ブタジエン、ブromoklorometan、ブromojシクロロメタン、1-ブromopropan、2-ブromopropan、*n*-ヘキサン、メチル *t*-ブチルエーテル、クロロベンゼン、アクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ブチル、イソプレン、イソプロピルベンゼン（クメン）、エピクロロヒドリン、塩化ベンジル、1-オクテン、クロロ酢酸エチル、*p*-クロロトルエン、酢酸ビニル、1,2-ジエチルベンゼン、1,3-ジエチルベンゼン、1,4-ジエチルベンゼン、1,2-ジシクロロベンゼン、1,3-ジシクロロベンゼン、1,2,3-トリクロロベンゼン、1,2,4-トリクロロベンゼン、1,3,5-トリクロロベンゼン、二硫化炭素、ヘキサクロロブタジエン、ペンタクロロエタン、 $\alpha$ -メチルスチレン、ニトロベンゼンなどの分析が可能である。

（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 を三角フラスコに採り、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）市販の標準メタノール溶液などを用いても良い。

（注8）標準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カ月は保存できる。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。なお、使用する装置の感度などにあわせて各物質の濃度比を変えても良い。

（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カ月は保存できる。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サロゲート又は内標準として用いてもよい。

(注 10) サロゲート溶液や内標準溶液の濃度は対象物質濃度や試験操作条件などに応じて適切な濃度となるように調製する。

(注 11) 四フッ化エチレン樹脂張りシリコーンゴム栓を用いてもよい。

(注 12) 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 13) 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 14) 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 $\pm 0.5$  に調節可能な恒温水槽を用いる。

(注 15) 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)あたりの内標準の量と同程度を目安とする。

(注 16) 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。可能な限り速やかに測定すること。

(注 17) 塩化ナトリウムは試料量に対し、濃度が 30%程度となるように加える。

(注 18) 内標準やサロゲートの添加量は対象物質濃度や試験操作条件などに応じて適切な量とする。

(注 19) 良好な結果が得られれば超音波抽出に代えて振とう抽出やホモジナイズを、また、ホモジナイズに代えて振とう抽出等を行ってもよい。なお、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 20) 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 を採り、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 21) 空試験値については可能な限り低減化を図る。

(注 22) 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 23) 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 24) 例えば、Aquatic、DB-1、DB-1301、DB-624、DB-WAX、VOCOL など(備考 1)。
- (注 25) GC/MS 装置により、最適な条件を設定する。
- (注 26) 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 27) 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。シリコーンゴム栓を通じて、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 28) 定量に用いる内標準は、原則として対象化合物の保持時間に最も近いものを用いる。
- (注 29) 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 30) 空試料の検出値が空試験に用いた水に由来する場合は、空試料の検出量は差し引かない。
- (備考 1) ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これ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) 日本規格協会：「JIS K 0125 用水・排水中の揮発性有機化合物試験方法」(1996)
- 4) EPA: Method 524.2, US EPA.
- 5) 田辺顕子ほか：環境化学, 7, 69 (1997)
- 6) 環境庁水質保全局水質管理課：1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、スチレン及び n-ブチルベンゼンの分析法, p. -1 「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物)」(平成 10 年 10 月)

## 分析法フローチャート

### 水質試料

水質試料	バイアル	ヘッドスペース GC/MS
サロゲート添加	NaCl、内標準添加	密栓、振り混ぜ、加温

### 底質試料

底質試料	固液抽出	バイアル	ヘッドスペース GC/MS
サロゲート添加	メタノール	NaCl、水、 内標準添加	密栓、振り混ぜ、加温

### 生物試料

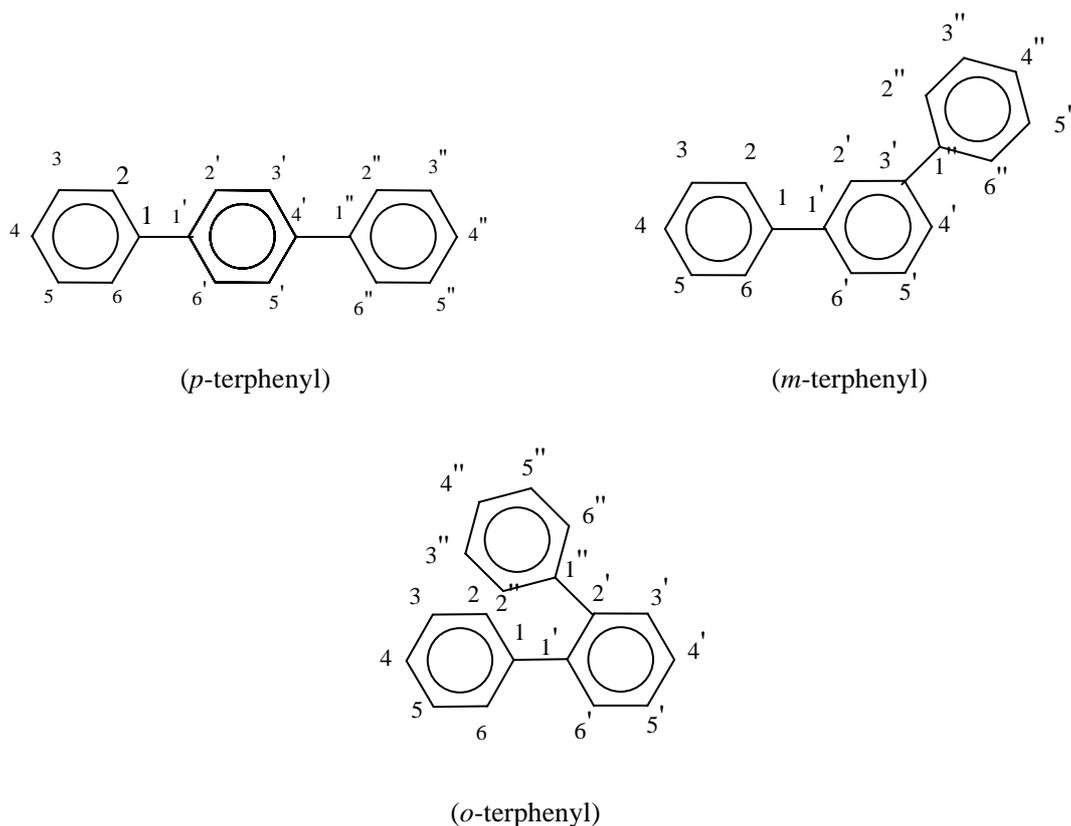
生物試料	固液抽出	バイアル	ヘッドスペース GC/MS
サロゲート添加	メタノール	NaCl、水、 内標準添加	密栓、振り混ぜ、加温

## ．ポリ塩化ターフェニル（PCT）の分析法

### 1 対象物質

#### （1）対象物質及び化学式

ポリ塩化ターフェニル（PCT）



（1～14個 Cl原子：*p*-体 1,951、*m*-体 3,155、*o*-体 3,043、合計 8,149 異性体）

分子量：ターフェニル：230.31、1塩化物：264.75、2塩化物：299.20、3塩化物：333.64、  
4塩化物：368.09、5塩化物：402.53、6塩化物：436.98、7塩化物：471.42、  
8塩化物：505.87、9塩化物：540.31、10塩化物：574.76、11塩化物：609.20、  
12塩化物：643.65、13塩化物：678.09、14塩化物：712.54

### 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および目標定量下限値を以下に示す（表1および2）。

表1 対象物質の目標検出下限値

物質名	水質 (ng/L)	底質 (ng/g-dry)	生物 (ng/g-wet)
1 塩化ターフェニル	0.02	0.03	0.01
2 塩化ターフェニル	0.02	0.03	0.02
3 塩化ターフェニル	0.03	0.02	0.01
4 塩化ターフェニル	0.03	0.03	0.03
5 塩化ターフェニル	0.03	0.03	0.03
6 塩化ターフェニル	0.6	0.05	0.1
7 塩化ターフェニル	0.6	0.05	0.1
8 塩化ターフェニル	0.6	0.05	0.1
9 塩化ターフェニル	0.6	0.05	0.1
10 塩化ターフェニル	0.6	0.05	0.1
11 塩化ターフェニル	0.6	0.05	0.1
12 塩化ターフェニル	0.6	0.05	0.1
13 塩化ターフェニル	0.6	0.05	0.1
14 塩化ターフェニル	0.4	0.04	0.08
4-モノクロロ- <i>o</i> -ターフェニル	0.03	0.04	0.01
4-モノクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.02	0.03	0.04
2,5-ジクロロ- <i>o</i> -ターフェニル	0.03	0.03	0.02
2,5-ジクロロ- <i>m</i> -ターフェニル	0.02	0.03	0.02
2,4-ジクロロ- <i>p</i> -ターフェニル +2,5-ジクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.03	0.03	0.02
2,4,6-トリクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.03	0.02	0.01
2,3,5,6-テトラクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.03	0.03	0.03
2,4,4',6-テトラクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.04	0.03	0.03
2,3,4,5,6-ペンタクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.02	0.03	0.01

表2 対象物質の目標定量下限値

物質名	水質 (ng/L)	底質 (ng/g-dry)	生物 (ng/g-wet)
1 塩化ターフェニル	0.05	0.08	0.03
2 塩化ターフェニル	0.05	0.08	0.05
3 塩化ターフェニル	0.08	0.05	0.03
4 塩化ターフェニル	0.08	0.08	0.08
5 塩化ターフェニル	0.08	0.08	0.08
6 塩化ターフェニル	2	0.1	0.3
7 塩化ターフェニル	2	0.1	0.3
8 塩化ターフェニル	2	0.1	0.3
9 塩化ターフェニル	2	0.1	0.3
10 塩化ターフェニル	2	0.1	0.3

11 塩化ターフェニル	2	0.1	0.3
12 塩化ターフェニル	2	0.1	0.3
13 塩化ターフェニル	2	0.1	0.3
14 塩化ターフェニル	1	0.1	0.2
4-モノクロロ- <i>o</i> -ターフェニル	0.08	0.1	0.03
4-モノクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.05	0.08	0.1
2,5-ジクロロ- <i>o</i> -ターフェニル	0.08	0.08	0.05
2,5-ジクロロ- <i>m</i> -ターフェニル	0.05	0.08	0.05
2,4-ジクロロ- <i>p</i> -ターフェニル +2,5-ジクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.08	0.08	0.05
2,4,6-トリクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.08	0.05	0.03
2,3,5,6-テトラクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.08	0.08	0.08
2,4,4',6-テトラクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.1	0.08	0.08
2,3,4,5,6-ペンタクロロ- <i>p</i> -ターフェニル	0.05	0.08	0.03

### 3 分析法の概要

水質試料は、固相ディスクで抽出後、Gel Permeation Chromatography (GPC) 及びシリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップし、底質・生物試料は、アセトン抽出後、室温アルカリ分解、硫酸洗浄を行った後、GPC 及びシリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップし、高分解能 GC/MS (HR-GC/MS) を用いて定量する。

### 4 試薬、器具及び装置

#### (1) 試薬

- ・1~5 塩化ターフェニル : (4-モノクロロ-*o*-ターフェニル、4-モノクロロ-*p*-ターフェニル、2,5-ジクロロ-*o*-ターフェニル、2,5-ジクロロ-*m*-ターフェニル、2,5-ジクロロ-*p*-ターフェニル、2,4-ジクロロ-*p*-ターフェニル、2,4,6-トリクロロ-*p*-ターフェニル、2,3,5,6-テトラクロロ-*p*-ターフェニル、2,4,4',6-テトラクロロ-*p*-ターフェニル、2,3,4,5,6-ペンタクロロ-*p*-ターフェニル)(注1)
- ・製品 PCT : (注2)
- ・*o*-、*m*-、*p*-ターフェニル : (注3)
- ・*p*-ターフェニル- $d_{14}$  : (注4)
- ・Decachlorobiphenyl- $^{13}C_{10}$  : (注5)
- ・トルエン残留農薬試験用 3000、エタノール残留農薬試験用 3000、ヘキサン残留農薬試

験用 3000、シクロヘキサン残留農薬試験用 3000 : (注 6)

- ・アセトン残留農薬試験用 2000、メタノール残留農薬試験用 2000 : (注 7)
- ・水酸化カリウム特級 : (注 8)
- ・無水硫酸ナトリウム残留農薬試験用 : (注 9)
- ・精製水 : (注 10)

## (2) 器具及び装置

- ・シリカゲルカートリッジカラム : (注 11)
- ・フロリジルカートリッジカラム : (注 12)
- ・シリカゲル (PCB 分析用) : (注 13)
- ・C18FF 固相ディスク (90 mm) : (注 14)
- ・ガラス繊維ろ紙 (90 mm) : (注 15)
- ・ガラス繊維ろ紙 (47 mm) : (注 16)
- ・シリンジフィルター (1  $\mu\text{m}$ ) : (注 17)
- ・ロータリーエバポレータ (恒温槽付き) : 抽出液の濃縮に用いる。
- ・振とう器 : 分液ロートの振とうや底質・生物からの抽出に用いる。
- ・超音波洗浄器 : 底質・生物試料の超音波照射に用いる。
- ・遠心分離機 : 底質・生物試料の抽出液の分離に用いる。
- ・マグネチックスターラー及び磁気攪拌子 (テフロン被覆) : 室温アルカリ分解に用いる。
- ・マイクロシリンジ (10  $\mu\text{L}$ ) : サロゲート化合物及び内標準液の添加に用いる。
- ・注射筒 (5 mL) : 試料のろ過等に用いる。
- ・カラムクロマト管 (10 mm  $\times$  30 cm、G2 ガラスフィルター付き) : アセトンで洗浄し、熱風乾燥後、ヘキサンで洗浄して用いる。
- ・試料採取瓶 (共栓付き全ガラス製) 分液ロート (2 L、250 mL) トールピーカー (200 mL) ナス型フラスコ (200 mL) 共栓付き三角フラスコ (100 mL) スピッツ型共栓付き試験管 (10 mL) KD 濃縮器用受器 (20 mL) パスツールピペット : アセトンで洗浄し、乾燥して用いる。長時間試料液を取り扱うガラス器具は、褐色が望ましい。
- ・ソックスレー抽出器 : 全ガラス製、抽出用には円筒ろ紙サイズ 28 mm 用、洗浄用にはウレタンフォーム抽出用を用いる。
- ・GPC カラム : (注 18)

- ・テフロン製ラインフィルター（オシネ型：（注 19）、プレカラムの前に装着する）
- ・減圧装置及び減圧ろ過装置：固相抽出時の減圧及び底質・生物試料アルカリ分解液のろ過に用いる。
- ・固相抽出装置：C18FF 固相ディスク吸引マニホールド（90 mm 固相ディスク対応）

## 5 試料の採取・運搬

本マニュアルの「[5.1 試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項](#)」に従う。前処理操作は試料採取後、速やかに行う。

## 6 試験操作

### （1）前処理

#### （ア）水質試料

〔水質：固相ディスク法〕

試料水 1 L を 2 L の分液ロートに採取し、サロゲート化合物標準液（0.2 µg/mL）を正確に 5 µL 添加した後、約 10 分間振とうする（注 20）。予めコンディショニングした C18FF 固相ディスク（90 mm、注 14）に試料水を通水（通液速度約 100 mL/min）する（注 21）。更に、試料水 1 L を先の 2 L の分液ロートに採取し、約 10 分間振とうし、固相ディスクに通水する。この通水操作を合計 5 回行う（通液総量 5 L）。

通水終了後、ガラスファンネルと固相ディスクを精製水 20 mL で 2 回洗浄した後、5 秒程度の強い減圧と常圧に戻す操作を数回繰り返して、固相ディスク及びガラスサポートベースに付着した水滴を除去する（注 22）。

固相ディスク及びガラス繊維ろ紙をソックスレー抽出装置に装着し、トルエン約 150 mL を加え、6 時間以上ソックスレー抽出を行う（注 23）。抽出終了後、冷却管部及び抽出部を少量のトルエンで数回洗浄し、洗浄液は抽出液に合わせる。

水分を十分取り除いた試料容器と 2 L の分液ロートとガラスファンネルはトルエンで洗い込み（注 24）、先のソックスレー抽出液と合わせる。

抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、200 mL のナス型フラスコに移して、ロータリーエバポレータを用いた減圧濃縮とヘキサンの添加を繰り返し、溶媒をヘキサンに置換する（注 25）。最終的に約 0.5 mL まで減圧濃縮して、試料抽出液を得る。

## (イ) 底質試料・生物試料

### 〔底質・生物：アセトン抽出法〕

湿泥試料約 20 g (乾泥換算試料量として 10 g 相当、注 26) 又は生物試料 20 g を 100 mL の遠心分離管に採取し、精秤する。底質試料は遠心分離 (3,000 rpm、10 分) した後、遠沈管を転倒させ、間隙水をできるだけ除去する。サロゲート化合物標準液 (0.2 µg/mL) を正確に 5 µL 添加し混合する。アセトン 50 mL を加えた後、密栓して 10 分間振とうした後、10 分間超音波抽出する。遠心分離 (3,000 rpm、10 分) を行い、得られたアセトン抽出液は、ガラス繊維ろ紙 (47 mm、注 16) でろ過し、200 mL のナス型フラスコに移す。残渣にアセトン 50 mL を加え、振とう (注 27)・超音波抽出・遠心分離操作を繰り返し、得られた抽出液はガラス繊維ろ紙 (47 mm、注 16) でろ過し、先の抽出液と合わせる。抽出液にエタノールを 20 mL 加えロータリーエバポレータを用いて約 25 mL まで減圧濃縮 (注 28、注 29) し、試料抽出液を得る。

## (2) 試料液の調製

### (ア) 水質試料

試料抽出液を GPC 処理 (ウ 項参照、注 30) を行った後、シリカゲルカートリッジカラム (ウ 項参照) によるクリーンアップを行い、ロータリーエバポレータを用いて約 0.2 mL まで減圧濃縮し、測定用内標準液 (0.2 µg/mL) を正確に 5 µL 加えた後、窒素ガスを吹き付けて 0.1 mL まで濃縮し、測定用バイアル瓶にパスツールピペットを用いて移す (注 31)。

### (イ) 底質試料・生物試料

試料抽出液を室温アルカリ分解 (ウ 項参照)、硫酸洗浄 (ウ 項参照)、GPC 処理 (ウ 項参照) を行った後、シリカゲルカートリッジカラム (ウ 項参照、注 32) によるクリーンアップを行い、ロータリーエバポレータを用いて約 0.2 mL まで減圧濃縮し、測定用内標準液 (0.2 µg/mL) を正確に 5 µL 加えた後、窒素ガスを吹き付けて 0.1 mL まで濃縮し、測定用バイアル瓶にパスツールピペットを用いて移す (注 31)。

### (ウ) クリーンアップ操作

クリーンアップ操作の詳細を下記に示す。

### 室温アルカリ分解

試料抽出液（エタノール溶液 25 mL）に 1N KOH / エタノール溶液 25 mL を加え、室温で暗所に 1 時間放置する（注 33）。

アルカリ分解液をエタノール 10 mL 及びヘキサン 60 mL で洗い込み、予め精製水 50 mL 加えた 250 mL の分液ロートに移し、分液ロートを 10 分間振とうする。十分静置後、ヘキサン抽出液を予め 5% 塩化ナトリウム溶液 30 mL を加えた 250 mL の分液ロートに移す。アルカリ分解液は、ヘキサン 50 mL を用いて再度振とう抽出し、得られたヘキサン抽出液は、先のヘキサン抽出液と合わせ、穏やかに振とうして洗浄する（注 34）。ヘキサン抽出液は、再度 5% 塩化ナトリウム溶液 20 mL を用いて再度振とう洗浄する。得られたヘキサン抽出液は、200 mL のトールピーカーに移して無水硫酸ナトリウムを用いて脱水する。

### 硫酸洗浄

無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した試料液（ヘキサン溶液、約 100 mL）を少量のヘキサンを用いて乾燥した 250 mL の分液ロートに移し（注 35）、濃硫酸 10 mL を加え、振とうする（注 36）。分液により硫酸層を除去した後、更に濃硫酸 5 mL を加え振とう洗浄する。この操作を硫酸相が着色しなくなるまで繰り返す。洗浄後、ヘキサン試料液は、予め 5% 塩化ナトリウム溶液 30 mL を加えた 250 mL の分液ロートに移し（注 37）、穏やかに振とうして洗浄する（注 38）。ヘキサン試料液は、再度 5% 塩化ナトリウム溶液 20 mL を用いて再度振とう洗浄する。得られたヘキサン試料液は、200 mL のトールピーカーに移して無水硫酸ナトリウムを用いて脱水する。

### GPC 処理

試料抽出液（ヘキサン溶液）を 200 mL のナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレータを用いて約 0.5 mL 以下まで減圧濃縮する（注 39）。濃縮液はシリンジフィルターでろ過し、アセトンで洗い込み、窒素ガスで 2 mL まで濃縮した後（注 40）、GPC 装置（注 41）に注入し、14~18 分の分画を分取する（注 42）。なお、2 mL まで濃縮したときに沈殿物が析出した場合には、遠心分離により沈殿物を GPC にできるだけ注入しないようにする。また、分取開始前及び分取終了の度に、テトラヒドロフラン（THF）/ トルエン（1:1）2 mL を GPC 装置に注入し、GPC カラムを洗浄する。

分取した試料液は、0.5 mL まで減圧濃縮し、ヘキサン 5 mL を添加してロータリーエバポレータを用いて約 0.5 mL まで減圧濃縮する。再度ヘキサン 5 mL を添加して 0.5 mL まで再濃縮し、アセトンを除去する（注 43）。

GPC 装置の操作条件は、下記のとおりである。

カラム：(注 18)

ラインフィルター：テフロン製ラインフィルター (注 19、注 44)

移動相及び流速：シクロヘキサン / アセトン (5:95) 4 mL/min (注 45)

カラム温度：40

注入量：2 mL (サンプルループ容量：2 mL)

サイクルタイム：30 min (洗浄時間を含めると 1 時間)

検出器：紫外吸収検出器 (UV：330 nm) または示差屈折検出器 (IR)

#### シリカゲルカートリッジカラムクロマトグラフィー

予めヘキサン 10 mL で洗浄したシリカゲルカートリッジカラム (注 46) に KD 濃縮器用受器 (20 mL) をセットした後、試料液をカラムに負荷 (注 47) し、液面をカラムベッドまで下げてから、ヘキサンで濃縮容器及びカラム壁面を洗いながら試料をカラムに負荷し、ヘキサン 15 mL で溶出する。

#### フロリジルカートリッジカラムクロマトグラフィー

予めヘキサン 10 mL で洗浄したフロリジルカートリッジカラム (注 46) に KD 濃縮器用受器 (20 mL) をセットした後、試料液をカラムに負荷 (注 47) し、液面をカラムベッドまで下げてから、ヘキサンで濃縮容器及びカラム壁面を洗いながら試料をカラムに負荷し、ヘキサン 15 mL で溶出する。

#### シリカゲルクロマトグラフィー (活性、3 g) (注 48)

シリカゲル (PCB 分析用、注 13) を 130 で一夜活性化後、3 g を内径 10 mm のカラムクロマト管にヘキサンで湿式充填し、ヘキサンで洗浄後、無水硫酸ナトリウムを約 2 cm 積層する。受器に 200 mL のナス型フラスコをセットした後、試料液をカラムに負荷し、液面をカラムベッドまで下げてから、少量のヘキサンで数回濃縮容器及びカラムの壁面を洗いながら試料をカラムに負荷し、1% ジクロロメタン / ヘキサン 150 mL で目的物質を溶出する。

### (3) 空試料液の調製

#### (ア) 水質試料 (注 49)

200 mL の分液ロートに精製水 100 mL を入れ、サロゲート化合物標準液 (0.2 µg/mL) を正確に 5 µL 添加した後約 10 分間振とうし、ディスクに通液する。更に精製水 100 mL を

使用した分液ロートに入れ、約 10 分間振とうし、ディスクに通液する( 通液総量 200 mL )。以下、「( 1 ) 前処理、及び( 2 ) 試料液の調製」の項に従った操作をして得た試料液を空試料液とする。

(イ) 底質試料・生物試料

試料を用いないで、「( 1 ) 前処理、及び( 2 ) 試料液の調製」の項に従った操作をして得た試料液を空試料液とする。

( 4 ) 添加回収試験液の調製 ( 注 50 )

(ア) 水質試料

試料水 1 L を 2 L の分液ロートに採取し、標準溶液 ( 添加総量の 5 分の 1 の量 ) を添加する。さらにサロゲート化合物標準液 ( 0.2 µg/mL ) を正確に 5 µL 添加した後、約 10 分間振とうする ( 注 20 )。予めコンディショニングした C18FF 固相ディスク ( 90 mm、注 14 ) に試料水を通水 ( 通液速度約 100 mL/min ) する ( 注 21 )。更に、試料水 1 L を先の 2 L の分液ロートに採取し、約 10 分間振とうし、固相ディスクに通水する。この通水操作を合計 5 回行う ( 通液総量 5 L )。以下、「( 1 ) 前処理、及び( 2 ) 試料液の調製」の項に従って得られた試料液を添加回収試験液とする。

(イ) 底質試料・生物試料

底質は湿泥 20g を「( 1 ) 前処理」に従い間隙水を除いた試料に、生物は試料 20g に、各々、標準溶液を添加する。以下、「( 1 ) 前処理、及び( 2 ) 試料液の調製」の項に従って得られた試料液を添加回収試験液とする。

( 5 ) 標準液の調製

1 ~ 5 塩化ターフェニルの標準品をそれぞれヘキサンに溶解し、1,000 µg/mL の標準原液を作成する。それぞれの標準原液を段階液にヘキサンで希釈して 0.2 µg/mL の混合標準溶液を作成する。また、製品 PCT ( 注 2 ) はヘキサンで 10 µg/mL 程度の溶液を調整し、PCT の確認用として使用する。

サロゲート物質として使用する Decachlorobiphenyl-<sup>13</sup>C<sub>12</sub> をヘキサンに溶解し、0.2 µg/mL のサロゲート物質標準液を作成する。

内部標準として使用する *p*-ターフェニル- $d_{14}$  をヘキサンに溶解し、0.2  $\mu\text{g/mL}$  の内部標準液を作成する。

(6) 測定

(ア) GC/MS 測定条件の例 (注 51)

(a) ガスクロマトグラフ部

使用カラム : キャピラリーカラム (注 52)

液相 : 5 % Phenyl Methylpolysiloxane

膜厚 : 0.1  $\mu\text{m}$  長さ、内径 : 15 m  $\times$  0.25 mm

カラム昇温条件 : 70 (2分) - 10 /分 - 200 - 5 /分 - 320 (15分)

注入法 : スプリットレス法 注入口温度 : 270 注入量 : 1  $\mu\text{L}$

流速 : 1.2 mL/min (ヘリウム : 定流量) パージ開始時間 : 1.5 分

インタフェース部 : ダイレクトカップリング (300 )

(b) 質量分析部

イオン化条件 : イオン化電圧 : 45 eV (EI) イオン化電流 : 700  $\mu\text{A}$

イオン源温度 : 270

測定条件 : 分解能 : 10,000 加速電圧 : 10 kV

イオンマルチプライヤ電圧 : 1.2 kV

測定法 : SIM 法

(c) 測定イオン

対象物質	m/z	
	定量イオン	確認イオン
ターフェニル	230.1096	231.1129
1 塩化ターフェニル	264.0706	266.0682
2 塩化ターフェニル	298.0316	300.0289
3 塩化ターフェニル	331.9926	333.9899
4 塩化ターフェニル	367.9509	365.9537
5 塩化ターフェニル	401.9119	403.9091
6 塩化ターフェニル	435.8729	437.8700
7 塩化ターフェニル	469.8339	471.8310

8 塩化ターフェニル	505.7920	503.7949
9 塩化ターフェニル	539.7530	537.7559
10 塩化ターフェニル	573.7141	575.7112
11 塩化ターフェニル	607.6751	609.6722
12 塩化ターフェニル	643.6332	641.6361
13 塩化ターフェニル	677.5942	675.5971
14 塩化ターフェニル	711.5552	713.5523
<i>p</i> -ターフェニル-d <sub>14</sub>	244.1974	
Decachlorobiphenyl - <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	509.7229	511.7199

### (イ) 検量線

#### (a) 標準品が入手可能な 1～5 塩化ターフェニルの場合

感度係数法 (RF) により試料を定量する。5 段階以上の標準液 (最小は分析法の検出限界の 3 倍程度) 1 μL を測定し、次式から RF を求める。RF の相対標準偏差が、15% 以下の場合は、平均 RF を用いて試料を定量する。毎測定時の試料測定前に、検量線の間濃度の標準液を測定して感度係数法で定量し、得られた定量値が注入標準液濃度の ± 15 % 以内であるなら、平均 RF をそのまま用いて試料を定量する。± 15% を外れた場合は、全ての標準液を測定し直して新たな平均 RF を求めて試料の定量を行う。

$$RF = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times C_s}$$

ここで、  $A_s$  : 対象物質の測定イオンのピーク面積

$A_{is}$  : サロゲート物質の測定イオンのピーク面積

$C_{is}$  : 検量線標準液中のサロゲート物質質量 (ng)

$C_s$  : 検量線標準液中の対象物質質量 (ng)

#### (b) 標準品が入手不可能な 6～14 塩化ターフェニルの場合

製品 PCT (注 2) を用いて、感度係数法 (RF) により試料を定量する。5 段階以上の標準液 (最小は分析法の検出限界の 3 倍程度) 1 μL を測定し、次式から製品 PCT 中の各異性体 (6～14 塩素) の面積比 ( $S_n$ ) を求める。

$$S_n = \frac{A_n \times C_{is}}{A_{is} \times C_{sT}}$$

ここで、  $A_n$  : 各異性体の測定イオン（塩素数  $n$ ）のピーク面積

$A_{is}$  : サロゲート物質の測定イオンのピーク面積

$C_{is}$  : 検量線標準液中のサロゲート物質質量（ng）

$C_{sT}$  : 検量線標準液中の製品 PCT 質量（ng）

$$CB_n = \frac{S_n}{\sum_{n=6}^{14} S_n}$$

ここで、  $CB_n$  : 各異性体の製品 PCT 中の含有率

$S_n$  : 製品 PCT 中の各異性体（ $n=6 \sim 14$ ）の面積比

$CB_n$  の平均値（ $CB_{nAv}$ ）を求め、次式により、PCT 製品中に含まれる異性体の検量線 RF を求める。RF の相対標準偏差が、15%以下の場合、平均 RF を用いて試料を定量する。毎測定時の試料測定前に、検量線の間濃度の標準液を測定して感度係数法で定量し、得られた定量値が注入標準液濃度の  $\pm 15\%$  以内であるなら、平均 RF をそのまま用いて試料を定量する。 $\pm 15\%$  を外れた場合は、全ての標準液を測定し直して新たな平均 RF を求めて試料の定量を行う。

$$RF = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times C_{sT} \times CB_{nAv}}$$

ここで、  $A_s$  : 対象物質の測定イオンのピーク面積

$A_{is}$  : サロゲート物質の測定イオンのピーク面積

$C_{is}$  : 検量線標準液中のサロゲート物質質量（ng）

$C_{sT}$  : 検量線標準液中の対象物質質量（ng）

### (ウ) 試料液の測定

試料液、空試料液及び添加回収試験液の各 1 μL を GC/MS に注入し、測定を行う。

## 7 同定、定量及び計算

### (1) 同定

対象物質、サロゲート及び内標準について、定量イオン及び確認イオンが、検量線作成に用いた標準物質などの保持時間の ±5 秒以内に出現し、定量イオンと確認イオンの強度比が検量線作成に用いた標準物質などにおける強度比の ±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

#### (ア) 定量

本分析法では、次の方法で塩素数毎の異性体 (1~14CT) 濃度および総 PCT 濃度を求める。定量は、同一塩素数の対象物質の定量イオン (通常分子イオン) のイオン強度に大きな差がないとして、標準液 (又は製品 PCT) に含まれる同一塩素数の全異性体の平均 RF を用いて、その塩素数の対象物質濃度を計算する。

#### (イ) 計算

RF を用いて、次式から検出量 (ng) を求める。

$$\text{検出量}(ng) = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times RF}$$

ここで、  $A_s$  : 対象物質の測定イオンのピーク面積

$A_{is}$  : サロゲート物質の測定イオンのピーク面積

$C_{is}$  : 試料に添加したサロゲート物質質量 (ng)

$$\text{濃度 (pg/L、pg/g - dry、pg/g)} = \frac{\text{検出量 (ng)} \times 1000}{W}$$

ここで、 W：試料採取量（L、g-dry あるいは g）

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

（注1）ここでは ULTRA Scientific 社製を用いた（備考1）。

（注2）ここでは和光純薬工業社製「ポリ塩化テルフェニル」を用いた（備考1）。

（注3）ここでは和光純薬工業社製を用いた（備考1）。

（注4）ここでは CIL 社製を用いた（備考1）。

（注5）ここでは CIL 社製を用いた（備考1）。

（注6）ここでは関東化学社製を用いた（備考1）。

（注7）ここでは和光純薬工業社製を用いた（備考1）。

（注8）ここではナカライテスク社製を用いた（備考1）。

（注9）ここでは関東化学社製を用いた（備考1）。

（注10）ミリポア社製 Mili-Q gradient A10 による精製水と同等以上のもの（備考1）。

（注11）ここではスペルコ社製スペルクリン LC-Si 6 mL Glass Tube, 1g を用いた（備考1）。

（注12）ここではスペルコ社製スペルクリンフロリジル 6 mL Glass Tube, 1g を用いた（備考1）。

（注13）ここでは和光純薬工業社製ワコーゲル S-1 を用いた（備考1）。

（注14）ここでは3M社製エムポアディスク C18FF（90 mm）を用いた（備考1）。

（注15）ここではADVANTEC社製ガラス繊維ろ紙 GB-140（90 mm）を用いた（備考1）。

（注16）ここではワットマン社製ガラス繊維ろ紙 GF/C を用いた（備考1）。

（注17）ここではワットマン社製シリンジフィルター-PURADISK25GD（1 μm, GMF-150）を用いた（備考1）。

（注18）ここでは昭和電工社製 CLNpak PAE-2000 AC（プレカラム：PAE-G AC）を用いた（備考1）。

（注19）ここではジーエルサイエンス社製テフロン製ラインフィルター（オシネ型）を用

いた(備考1)。

- (注20) サロゲート化合物の添加は、試料1L単位で行い、最終的に試料水5Lを固相抽出する。なお、5L以上の試料水を抽出したい場合は、5L毎に固相ディスクとガラス繊維ろ紙を交換する。サロゲート化合物及び測定用内標準の添加量及び試料液の濃縮量は、試料中濃度、GC/MSの感度等の状況に応じて適宜変更して良い。
- (注21) 固相ディスクとガラス繊維ろ紙は、予めアセトンに浸漬して洗浄した後、ソックスレー抽出装置を用いてトルエンで6時間以上洗浄する。洗浄後、アセトンに浸漬してトルエンを除去した後、固相ディスクは風乾により、ガラス繊維ろ紙等は、加熱乾燥によりアセトンを除去する。固相ディスクのコンディショニングは、最初にメタノールを滴下して固相ディスクを膨潤させ、次に固相ディスクの上にガラス繊維ろ紙を重ねてさらにメタノールを滴下し湿潤させる。次に、トルエン10mL×3回、アセトン10mL×3回、メタノール10mL×3回、精製水50mL×3回通水し、活性化する。
- (注22) 通気脱水を行うと、大気からの汚染を受ける可能性があるため、短時間に減圧・常圧操作を繰り返して、ろ過器等に付着した過剰な水分を除去する。
- (注23) ダイオキシン類の分析法では16時間となっている。固相ディスク及びろ紙をソックスレー抽出装置に装着し、抽出部にトルエンを満たした状態で、15時間(例えば夜間)程度放置し、その後、6時間抽出する方法を行うことにより十分な回収率が得られる。トルエンの使用量は使用するソックスレー抽出装置により異なるが、使用量は一定としてブランク値の変動を避ける。抽出時の循環数は、6~10回/時程度を目安とする。
- (注24) PCTは一般に疎水性であり、懸濁物質に吸着して存在する。試料容器内や分液ポート内に残存した懸濁物質から目的物質を溶出する目的で溶媒洗浄操作を行う。トルエンで洗浄する場合は、残存する水分が抽出率を下げる可能性があるため、転倒等により容器内の水分を予め除去しておく。
- (注25) ヘキサンを用いて再濃縮することにより、抽出液中に残存するトルエンを除去する。トルエンが残存すると、GPC及びシリカゲルカラムクロマトグラフィーの分離パターンが変動する場合がある。
- (注26) 予め水分含量を測定しておき、乾泥として10gに相当する量を採取する。
- (注27) 遠沈管中の残渣は、振とう操作、ホモジナイズ操作等のみでは完全に混合しない

- ため、ステンレス製スパーテル等を用いて十分に攪拌、分散させてから抽出する。
- (注 28) エタノールは、アセトンを除去し、濃縮時の突沸を防止する目的で加える。エタノールが約 25 mL 残存する量まで濃縮する。
- (注 29) 25 mL のエタノール溶液とし、後のアルカリ分解操作には 1N KOH / エタノール溶液 25 mL を添加するため、アルカリ分解時の KOH 濃度は 0.5 N となる。
- (注 30) 清浄な試料では省略しても差し支えない。
- (注 31) ノナン溶液ではピーク形状が悪化し、添加回収率が大きく変動したため注入溶媒をヘキサンとした。
- (注 32) フロリジルカートリッジカラムを使用しても良い。夾雑物の多い試料では活性シリカゲルカラム (3 g) を使用する。
- (注 33) 分解中、時々振り混ぜる。
- (注 34) ヘキサン抽出液中に混入した塩基性成分、グリセリド、エタノール等を除去する目的で行う。激しく振とうするとエマルジョンが生成する場合がありますので、手で軽く振とうする。
- (注 35) 硫酸洗浄は危険な操作なので水分の混入による発熱、漏洩等に十分注意する必要がある。脱水時に用いた無水硫酸ナトリウムが混入すると、硫酸洗浄時にエマルジョンを生成しやすくなるので、混入は避ける。
- (注 36) 最初の洗浄時に強く振とうするとエマルジョンが生成して、分液が困難となるため、手で軽く振とうする。エマルジョンの生成が収まった場合は、10 分間の機械振とうを行う。脂肪量の多い生物試料では、5 回程度の洗浄が必要となる。
- (注 37) 濃硫酸が混入すると、次の水洗操作で濃硫酸に含まれる成分がヘキサン層に抽出されてくることや発熱の危険もあるため、ヘキサン抽出液は別の分液ポートに移す。
- (注 38) ヘキサン抽出液中に混入した硫酸、酸性成分等を除去する目的で行う。激しく振とうするとエマルジョンが生成する場合がありますので、手で軽く振とうする。
- (注 39) 移動相 (シクロヘキサン / アセトン (5:95)) と性質の異なる溶媒を注入すると GPC の保持時間が乱れるため、ヘキサンの残存量を 0.5 mL 以下とした。
- (注 40) 固形物は、配管の詰まりを生じるばかりでなく、カラムの劣化の原因となる。底質中の単体硫黄は、抽出液をアセトンに希釈した際に結晶として沈殿する。単体硫黄は、アルカリ分解時に分解され、GPC でも 18 ~ 20 min の分画に溶出するため、

本分析法では妨害とならないが、アルカリ分解を省略した場合には、多量の硫黄結晶が生ずるため、銅チップ処理、ろ過等の操作を行う必要が生じる。

(注 41) 市販の高速液体クロマトグラフ (HPLC) が使用できる。移動相の流速が大きい  
ため、余熱ループを設けて、移動相の温度をカラム温度と同じにするのが望ましい。

オートサンプラーを用いる場合は、全量注入は困難なため、実注入量を測定し、  
補正する。

(注 42) カラムの劣化の程度、装置の仕様により、保持時間は変化するので、予め溶離パ  
ターンをチェックする必要がある。今回の操作条件では、PCT は 14.25 ~ 16.5 min  
に溶出した。同じ条件で PCBs は 14.5 ~ 16.25 min、PCNs は 16 ~ 18 min に溶出す  
ることから、今回の添加回収試験では 14 ~ 18 min を分取することとした。夾雑物  
の多い試料では、それぞれの分画を分取することが望ましい。

(注 43) アセトンが残存するとカラムクロマトの分離が乱れるので、十分に留去する。

(注 44) カラムの劣化、配管の詰まりを防止するため、ラインフィルターをプレカラムの  
前に装着する。

カラムが詰まった場合は、ラインフィルターを交換または逆洗する。

操作中は、ヘッド圧の変動を監視し、ヘッド圧が上昇し、回復しない場合は、ラ  
インフィルターの洗浄・交換を行い、更にプレカラムの交換の可否を判断する。

(注 45) 移動相の溶媒を変更する場合は、移動相流速を 1 mL/min 程度に落としてから行  
う。移動相溶媒を変更するたびにカラムの理論段数が 5% 程度低下するので注意  
が必要である。

(注 46) カラムは、ロットによって溶離パターンが変化する場合があるので、予め、溶離  
パターン、コンタミネーション及び妨害物質の有無等を必ず確認しておくこと。

(注 47) パスツールピペットを用いると良い。

(注 48) 夾雑物の量が多く、カートリッジカラム処理ではクリーンアップが困難な場合に  
使用する。

(注 49) 精製水中にも微量の対象物質が存在する可能性があること、また、固相ディスク  
法では食塩等の添加剤が不要のため、ディスク、溶出溶媒等、室内空気汚染等に  
起因するブランク値のみ評価する目的で、少量の精製水をブランク試料水として  
用いる。

(注 50) 添加する標準溶液は、試料中の対象物質濃度や試験操作条件に応じて適切な量とする。

(注 51) ここでは、日本電子 JMS MS-700D (GC : HP6890) を使用した (備考 1)。

(注 52) ここでは 5 % Phenyl Methylpolysiloxane (J&W 社、DB-5HT) を使用したが、DB-1HT (J&W 社、15 m、0.1  $\mu$ m、0.25 mm)、DB-5MS (J&W 社、20 m、0.18  $\mu$ m、0.18 m)、BPX (SGE 社、15 m、0.25  $\mu$ m、0.2 mm) 等のカラムでも分析可能である (備考 1)。

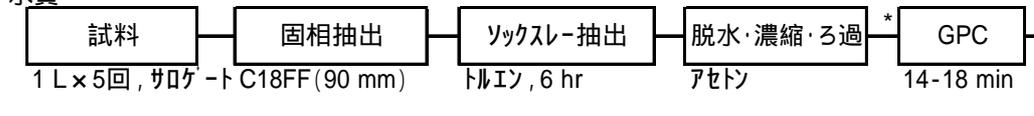
(備考 1) ここに示す商品は、このマニュアルの使用者の便宜上、一般に入手できるもの及び分析法開発に使用したものを例示したが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質・性能のものを用いても良い。

## 参考文献

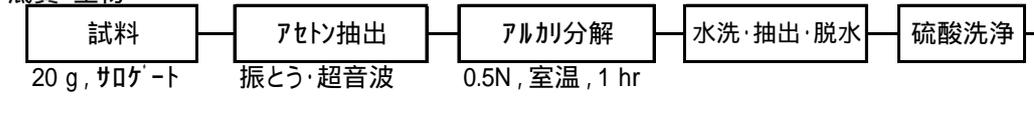
- 1) 岡山県環境保健センター：ポリ塩化ターフェニル (PCT), pp83-112, 「平成 13 年度化学物質分析法開発調査報告書 (その 1)」, 環境省環境保健部環境安全課 (平成 14 年 10 月)

## 分析法フローチャート

### 水質



### 底質・生物



・芳香族化合物（ニトロトルエン類、ビフェニル、ジフェニルメタン、ジベンジルエーテル、ターフェニル類、ナフタレン、ジメチルナフタレン類、ジイソプロピルナフタレン）、多環芳香族炭化水素（3～4環）及びデカヒドロナフタレン類の分析法

## 1 対象物質

表1に示すニトロトルエン類、ビフェニル、ジフェニルメタン、ジベンジルエーテル、ターフェニル類、ナフタレン、ジメチルナフタレン類、ジイソプロピルナフタレン、多環芳香族炭化水素（3～4環）及びデカヒドロナフタレン類。

## 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)	
	検出下限値	定量下限値
<i>o</i> -ニトロトルエン	0.02	0.05
<i>m</i> -ニトロトルエン	0.02	0.05
ビフェニル	0.02	0.05
ジフェニルメタン	0.02	0.05
ジベンジルエーテル	0.02	0.05
<i>o</i> -ターフェニル	0.02	0.05
<i>m</i> -ターフェニル	0.02	0.05
<i>p</i> -ターフェニル	0.02	0.05
ナフタレン	0.02	0.05
ジメチルナフタレン (注 1)	0.02	0.05
ジイソプロピルナフタレン (2,6-)	0.02	0.05
アセナフチレン	0.02	0.05
アセナフテン	0.02	0.05
フルオレン	0.02	0.05
フェナントレン	0.02	0.05
アントラセン	0.02	0.05
フルオランテン	0.02	0.05
ピレン	0.02	0.05
<i>cis</i> -デカヒドロナフタレン	0.02	0.05
<i>trans</i> -デカヒドロナフタレン	0.02	0.05

### 3 分析法の概要

水質試料中の対象物質は、精油定量器を用いて連続水蒸気蒸留し、濃縮後、GC/MS-SIMで定量する（注 2、注 3、注 4）。

### 4 試薬・器具・装置

#### (1) 試薬

- ・*n*-ヘキサン、アセトン：残留農薬分析用またはこれと同等以上のもの（注 5）。
- ・無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留農薬分析用またはこれと同等以上のもの（注 6）。

- ・対象物質：市販品（注 7）。

サロゲート：ニトロベンゼン- $d_5$ 、2-ニトロトルエン- $^{13}C_6$ 、4-ニトロトルエン- $^{13}C_6$ 、ビフェニル- $d_{10}$ 、1,2-ジフェニルエタン- $d_{14}$ 、*p*-ターフェニル- $d_{14}$ 、ナフタレン- $d_8$ 、1,6-ジメチルナフタレン- $d_{12}$ 、1,8-ジメチルナフタレン- $d_{12}$ 、2,6-ジメチルナフタレン- $d_{12}$ 、アセナフチレン- $d_{10}$ 、フルオレン- $d_{10}$ 、フェナントレン- $d_{10}$ 、アントラセン- $d_{10}$ 、フルオランテン- $d_{10}$ 、ピレン- $d_{10}$ （注 8）。

内標準：ヘキサクロロベンゼン- $^{13}C_6$ （注 9）。

- ・標準混合原液：標準物質 100 mg を各々別の 100 mL メスフラスコに精秤し、*n*-ヘキサン又はアセトンを加えて正確に 100 mL とし、これを 1000  $\mu\text{g/mL}$  の標準原液とする。各標準原液 10 mL を 500 mL メスフラスコに正確にとり、*n*-ヘキササンで 500 mL とし、これを標準混合原液とする。標準混合原液は 1 mL 中に各標準物質 20  $\mu\text{g}$  を含む（注 10）。
- ・サロゲート溶液：サロゲート 100 mg を各々別の 100 mL メスフラスコに精秤し、アセトンを加えて正確に 100 mL とし、これを 1000  $\mu\text{g/mL}$  のサロゲート原液とする。各サロゲート原液 10 mL を 500 mL メスフラスコに正確にとり、アセトンで 500 mL とし、これをサロゲート溶液とする。サロゲート溶液は 1 mL 中に各サロゲート 20  $\mu\text{g}$  を含む。
- ・内標準溶液：各内標準 100 mg を各々別の 100 mL メスフラスコに精秤し、アセトンを加えて正確に 100 mL とし、これを 1000  $\mu\text{g/mL}$  の内標準原液とする。各内標準原液 10 mL を 100 mL メスフラスコに正確にとり、アセトンで 100 mL とし、これを内標準溶液とする。内標準溶液は 1 mL 中に各内標準 100  $\mu\text{g}$  を含む。
- ・還元銅：有機元素分析用還元銅またはこれと同等以上のもので 60～80 メッシュ程度のも

の。窒素ガス中で保存し、使用直前に使用する溶媒で洗浄する。

- ・シリカゲルカラム：市販のシリカカートリッジ（注 11）またはコック付きガラス製カラム（内径 1 cm、長さ 30 cm）に、5 % 含水シリカゲル（注 12）5 g を *n*-ヘキサンを用いて湿式充填し、上部に無水硫酸ナトリウムを 2 cm 積層したもの。使用前に、*n*-ヘキサン 10 mL を通して洗浄する。
- ・水：対象対象及びその妨害物質を含まないもの（注 13）。

## （ 2 ） 器具・装置

- ・試料採取容器：水質試料用は、ガラス製共栓付き褐色ガラス瓶（容量 1 L）又は、四フッ化エチレン樹脂張りシリコンゴム栓付きスクリューキャップ用ネジ口褐色ガラス瓶（容量 1 L）又はこれと同等以上のもの。底質試料用はガラス製共栓付き褐色広口ガラス瓶（容量 100 ~ 300 mL）又は、四フッ化エチレン樹脂張りシリコンゴム栓付きスクリューキャップ用ネジ口褐色広口ガラス瓶（容量 100 ~ 300 mL）又はこれと同等以上のもの。洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。アセトン及び *n*-ヘキサンで洗浄し、乾燥する。キャップを強くしめ、汚染のない場所に保管する。
- ・精油定量装置：500 ~ 1000 mL のナスフラスコが接続できるもの。冷却部は蛇管冷却管又はこれと同等以上の性能を有するものを用い、5 以下で冷却できるもの。洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。さらにアセトン及び *n*-ヘキサンで洗浄し、乾燥する。
- ・ガラス器具：洗浄後、水ですすぎ、乾燥する。さらに、アセトン及び *n*-ヘキサンで洗浄し、乾燥する。
- ・マントールヒータ及びスライダック
- ・試験管ミキサー
- ・ホモジナイザー：万能ホモジナイザー、超高速万能ホモジナイザー、攪拌分散器、又は同等品
- ・GC/MS：キャピラリーカラムの取付可能な GC 付き四重極型、二重収束型又はこれらと同等以上の性能を有する MS。

## 5 試料の採取・運搬

試料採取容器を採取試料で数回共洗いしてから、試料を泡立たないように静かに採取容器に満たし、直ちにキャップをする。このとき、瓶内に空気層を残さないよう注意する。

試料は遮光して運搬する。試験操作は試料採取後直ちに行う。

## 6 試験操作

### (1) 前処理

試料水 300 ~ 500 mL を 500 ~ 1000 mL ナスフラスコにとり、サロゲート(注 14)を添加して混合した後、ヘキサン 5 ~ 10mL 及び沸騰石を入れ(注 15) あらかじめ水で満たした精油定量器に接続する(注 16)。精油定量器の蛇管冷却部を 5 以下で冷却しながら、マントルヒーターでヘキサンが流出するまで穏やかに加熱後、さらに 90 分間加熱し連続水蒸気蒸留をする。冷却後、精油定量器内の水を捨て、ヘキサン層を分取し、精油定量装置を少量のヘキサンで洗浄する。洗浄液を分取したヘキサン層に合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後(注 17) 清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1 mL とし、前処理液とする。

### (2) 試料液の調製(注 18)

前処理液をシリカゲルカートリッジに負荷し、ヘキサン 1 mL を流し、溶出液は捨てる。次に、アセトン-ヘキサン(20:80 v/v) 5 mL を流す(注 19)。得られた溶出液に清浄な窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1 mL とし、内標準化合物を 0.2 µg 添加し(注 20) GC/MS 測定用試料とする。

### (3) 空試料液の調製

試料と同量の水を用いて、「試験操作」に従って試料と同様の処理をして得た試料液を空試料液とする(注 21)。

### (4) 添加回収試験液の調製

任意の試料水 300 ~ 500 mL にアセトンで転溶した標準原液を加え(注 22) 十分に混合した後、「(1) 前処理」及び「(2) 試料液の調製」に従って操作を行い、得られた試料液を添加回収試験液とする。

### (5) 標準液の調製

標準混合原液を順次 *n*-ヘキサンで希釈し、0.005 ~ 0.5 µg/mL 程度の濃度の標準溶液を製作する(注 22)。

( 6 ) 測定

( ア ) GC/MS 条件の例 ( 注 23、注 24 )

( a ) GC

- ・ カラム : 5% フェニルメチルシリコン化学結合型 ( 内径 0.2 ~ 0.75 mm、長さ 15 ~ 30 m、膜厚 0.1 ~ 3.0  $\mu\text{m}$  程度 ) カラムまたは同等以上の分離性能をもつもの ( 注 25 )
- ・ カラム温度 : 60 ( 1 分 ) 7.5 / 分 300 ( 7 分 )
- ・ 注入口温度 : 250
- ・ キャリアガス : ヘリウム ( 線速度 40 cm / 秒 )
- ・ 注入法 : スプリットレス ( 1 分後パーズ開始 )

( b ) MS

- ・ イオン化法 : EI
- ・ イオン化エネルギー : 70 eV
- ・ イオン化電流 : 300  $\mu\text{A}$
- ・ イオン源温度 : 250

( c ) 定量イオンの例 ( 注 26、注 27 )

<i>o</i> -ニトロトルエン	137	( 91 )
<i>m</i> -ニトロトルエン	137	( 91 )
<i>p</i> -ニトロトルエン	137	( 91 )
ビフェニル	154	( 153 )
ジフェニルメタン	167	( 168 )
ジベンジルエーテル	92	( 91, 107 )
<i>o</i> -ターフェニル	230	( 229, 215 )
<i>m</i> -ターフェニル	230	( 228 )
<i>p</i> -ターフェニル	230	( 231, 228 )
ナフタレン	128	( 127 )
ジメチルナフタレン	156	( 141 )
ジイソプロピルナフタレン	197	( 212 )
アセナフチレン	152	( 151 )
アセナフテン	153	( 154 )
フルオレン	166	( 165 )
フェナントレン	178	( 177 )
アントラセン	178	( 177 )
フルオランテン	202	( 201 )
ピレン	202	( 201 )
<i>cis</i> -デカヒドロナフタレン	138	( 96 )
<i>trans</i> -デカヒドロナフタレン	138	( 96 )
ニトロベンゼン- $\text{d}_5$	128	

ニトロトルエン- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	143
ビフェニル- d <sub>10</sub>	164
1,2-ジフェニルエタン-d <sub>14</sub>	196
p-ターフェニル-d <sub>14</sub>	244
ナフタレン-d <sub>8</sub>	136
ジメチルナフタレン-d <sub>12</sub>	168
アセナフチレン-d <sub>10</sub>	164
フルオレン-d <sub>10</sub>	176
フェナントレン-d <sub>10</sub>	188
アントラセン-d <sub>10</sub>	188
フルオランテン-d <sub>10</sub>	212
ピレン-d <sub>10</sub>	212
ヘキサクロロベンゼン- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	290

#### (イ) 検量線

各標準液 1 mL に内標準を添加し、その一部を GC/MS に注入する (注 28)。内標準と対象物質の面積比を求め、検量線を作製する (注 29)。

#### (ウ) 試料液の測定

測定用試料液の一部を GC/MS に注入する。内標準と対象物質の各測定イオンの面積を求める。

### 7 同定、定量及び計算

#### (1) 同定

対象物質、サロゲート及び内標準について、定量イオン及び確認イオンが、検量線作成に用いた標準物質などの保持時間の ±5 秒以内に出現し (注 30)、定量イオンと確認イオンの強度比が検量線作成に用いた標準物質などにおける強度比の ±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

測定用試料液及び空試料液について内標準と対象物質の面積比を求め、対象物質の濃度を内標準法で求める。次式で試料中の各対象物質濃度を計算する (注 31)。

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

## 8 分析精度管理

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

## 9 注意事項

- (注 1) ジメチルナフタレンについては、1,2-、1,3-、1,4-、1,5-、1,6-、1,7-、1,8-、2,3-、2,6-、2,7-の異性体がある。
- (注 2) 本法により p-ニトロトルエン (4-ニトロトルエン) の分析が可能である。
- (注 3) 全操作を通じて、良好な回収結果が得られることをあらかじめ確認すること。  
GC/MS 測定において、十分な感度が得られれば SIM 測定の代わりにスキャン測定でもよい。
- (注 4) 対象物質の安定同位体が入手可能であればサロゲートとして用いることが望ましい。対象物質と類似構造をもつ物質の安定同位体など適当な物質をサロゲートとして用いても良い。サロゲートは試験操作において試料に添加する。サロゲートは、原則として全操作を通しての回収率を確認するために用いる。
- (注 5) 使用前に空試験を行い、使用の適否を確認すること。
- (注 6) 妨害が認められる場合は、500～700 で 8 時間程度加熱後、汚染のない場所で冷却して用いる。
- (注 7) 純度を確認してから使用すること。
- (注 8) これらのうち、適当なものを使用する。他に適当な物質があればサロゲートとして用いてよい。
- (注 9) サロゲートとして示した物質のうちの一部を内標準として用いてもよい。他に適当な物質があれば内標準として用いてよい。
- (注 10) 長期の保存はさける。保存した標準原液は、純度を確認してから使用する。
- (注 11) 例えばセップパックプラス Silica など。大容量のもの (例えばメガボンドエリート SI (5 g)、LC-Si (5 g) 等) を用いてもよい (備考 1)。
- (注 12) 5 % 含水シリカゲルは、カラムクロマトグラフ用シリカゲル、例えばワコーゲル C-200 (備考 1) を用いて以下のように作成する：シリカゲルを 130 で 15

時間加熱後、透明すり合わせ共栓付き三角フラスコに入れ、密栓して室温まで冷却する。シリカゲルを攪拌しながら、シリカゲル 95 g に対して水 5 mL を滴下する。密栓し、発熱が終了するまで静かに混合する。さらに、振とう器で 30 分間振とう後、乾燥剤としてシリカゲルを入れたデシケータ中で 15 時間以上放置する。

(注 13) 蒸留水や逆浸透膜により精製した水などを用いる。必要に応じて n-ヘキサンや使用する溶媒などで洗浄する。いずれも使用前に空試験を行い、使用の適否を確認すること。

(注 14) サロゲートの添加量は対象物質濃度や試験操作条件などに応じて適切な量とする。

(注 15) 必要に応じて消泡剤を加えてもよい。

(注 16) 試料量、ヘキサン量及び使用するフラスコ容量などは、使用する精油定量器にあわせて変更して良い。冷却管は冷却効果の高いものを用い、5 以下に冷却する。

(注 17) 必要に応じて、還元銅で硫黄分を除く。

(注 18) 以下のカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ操作を必要としない試料の場合は、得られた溶液に内標準物質を添加し測定用試料液とする。

(注 19) 事前に試料と同様の濃縮液に既知量の標準物質を添加したものをを用いて、対象物質の溶出パターンを確認し、カラムクロマトグラフ操作に必要な n-ヘキサン及びアセトン-n-ヘキサン (20:80 v/v) の量を求めておく。

(注 20) 内標準の添加量は対象物質濃度や試験操作条件などに応じて適切な量とする。

(注 21) 空試験値については可能な限り低減化を図る。

(注 22) 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 23) 共存する他の物質の影響を受けないよう GC 条件を十分検討する。また、試料注入部やカラムなどに対象物質が吸着することがあるので、材質や汚れなどに注意する。

(注 24) GC の注入口セプタムからゴーストが出現することがある。その場合には、セプタムを GC に装着後、270 程度で一夜程度パージしてから使用する。

(注 25) 例えば HP-5 など (備考 1)。

(注 26) ここに示す測定イオン例を参考にして、最適な定量用イオンを選定する。定量用イオンと異なる質量数のイオンを対象物質の確認用イオンとする。

(注 27) 定量に用いる内標準は、原則として対象化合物の保持時間に最も近いものを用いる。

(注 28) GC/MS への注入量は装置に応じて適切な量とする。

(注 29) サロゲートを用いた場合は、内標準のかわりにサロゲートを用いて定量を行い、内標準をサロゲートの回収率の確認に用いてもよい。

(注 30) 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 31) 空試料における検出値が空試験に用いた水に由来する場合は、空試料の検出量は差し引かない。

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

## 参考文献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課：ベンゾ[a]ピレン、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、スチレン 2 量体及び 3 量体の分析法，p.VI-1，「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質、底質、水生生物）」（平成 10 年 10 月）
- 2) 茨木剛，川田邦明，雅楽川憲子，坂井正昭，貴船育英，森田昌敏：精油定量器を用いる水及び底質中の内分泌攪乱作用が疑われる芳香族化合物類の定量，分析化学，**48**，609 (1999)
- 3) Kawata, K., Tanabe, A., Yagoh, H., Ibaraki, T., Yasuhara, A., and Shibamoto, T. : Determination of semivolatile organic compounds in environmental samples by gas chromatography/mass spectrometry after extraction by cyclic steam distillation, *J. AOAC*, **86**, 246 (2003)

## 分析法フローチャート

